

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 035481

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента

2020.06.23

(51) Int. Cl. A61K 38/17 (2006.01)

(21) Номер заявки

201690855

(22) Дата подачи заявки

2014.10.24

(54) ЭНДОГЛИНОВЫЕ ПЕПТИДЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ФИБРОЗНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

(31) 61/896,002

(56) WO-A1-2012145539

(32) 2013.10.25

WO-A1-2013019805

(33) US

"563 Increased intrahepatic and circulating levels of endoglin, a TGF- β 1 co-receptor, in chronic hepatitis C patients: Relationship with histological and serum markers of hepatic fibrosis", JOURNAL OF HEPATOLOGY, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 42, 1 April 2005 (2005-04-01), page 205, XP027781027, ISSN: 0168-8278 [retrieved on 2005-04-01] abstract

(43) 2016.10.31

(86) PCT/US2014/062147

(87) WO 2015/061666 2015.04.30

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
АКСЕЛЕРОН ФАРМА, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:

Гринберг Ася, Кастонгэй Роузлин,
Вернер Эрик, Кумар Равиндра (US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) В определенных аспектах настояще изобретение относится к неожиданному открытию того, что для лечения фиброзного нарушения можно применять полипептид, содержащий укороченную лигандсвязывающую часть внеклеточного домена эндоглинового (ENG) полипептида.

035481
B1

B1
—

035481
—

По настоящей заявке испрашивается приоритет по дате подачи согласно 35 U.S.C. §119 по предварительной патентной заявке США № 61/896002, поданной 25 октября 2013 года и названной Endoglin Peptides To Treat Fibrotic Diseases, полное содержание которой включено в настоящее описание посредством ссылки.

Уровень техники

Фиброз представляет собой образование избытка волокнистой соединительной ткани в органе или ткани. Фиброз может возникать в ответ на физическое или химическое повреждение как часть репараторного или реактивного процесса, также обозначаемого как рубцевание. Фиброз также может возникать в результате патологических аномалий в клетке или ткани без внешнего повреждения. Фиброз приводит к депонированию соединительной ткани, которая может поддерживать гомеостаз ткани и заживление после травмы. Однако избыточный фиброз может приводить к облитерации структуры и затруднять функционирование соответствующего органа или ткани, приводя к фиброзным нарушениям, таким как, например, фиброз печени, легочный фиброз и кистозный фиброз. Как правило, фиброзная ткань не может осуществлять специализированные функции соответствующего органа и не может репарироваться. Таким образом, варианты лечения фиброзных нарушений ограничены подходами замены ткани, такими как трансплантация органа, и паллиативное лечение.

Желательна разработка эффективных композиций и способов ингибиования и лечения фиброза. Они включают способы и композиции, которые могут ингибировать и/или реверсировать избыточный фиброз, ассоциированный с фиброзными нарушениями.

Сущность изобретения

Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к эндоглиновым (ENG) полипептидам и применению таких эндоглиновых полипептидов для лечения или профилактики фиброзных нарушений. Некоторые варианты осуществления настоящего изобретения относятся к способам лечения или профилактики фиброзного нарушения у нуждающегося в этом пациента. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение пациенту эффективного количества эндоглинового полипептида, представленного в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления используемый эндоглиновый полипептид содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную аминокислотам 42-333 SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления фиброзное нарушение является фиброзом печени, сосудистым фиброзом, легочным фиброзом, фиброзом поджелудочной железы, фиброзом почек, скелетно-мышечным фиброзом, фиброзом сердца, фиброзом кожи, фиброзом глаза, диффузной склеродермии (PSS), хронической реакцией "трансплантат против хозяина", болезнью Пейрони, постцистокопическим стенозом уретры, ретроперитонеальным фиброзом, медиастинальным фиброзом, прогрессирующим массивным фиброзом, пролиферативным фиброзом, нефрогенным системным фиброзом, опухолевым фиброзом, болезнью Дюпюитрена, стриктурами, фиброзом, индуцируемым радиацией, кистозным фиброзом, плевральным фиброзом, саркоидозом, склеродермии, повреждением/фиброзом спинного мозга, миелофиброзом, рестенозом сосудов, атеросклерозом, инъекционным фиброзом (который может возникать как осложнение внутримышечных инъекций, особенно у детей) или осложнениями пневмокониоза у работников угольной промышленности. В некоторых вариантах осуществления фиброзное нарушение не является миелофиброзом. В некоторых вариантах осуществления фиброз печени является циррозом печени, алкогольным фиброзом печени, повреждением желчных протоков, первичным биллиарным циррозом, инфекционным фиброзом печени, врожденным фиброзом печени или аутоиммунным гепатитом. В некоторых вариантах осуществления инфекционный фиброз печени является бактериально-индуцированным или вирусно-индуцированным. В некоторых вариантах осуществления легочный фиброз является идиопатическим, фармакологически-индуцированным, индуцированным радиацией, хронической обструктивной болезнью легких (COPD) или хронической астмой. В некоторых вариантах осуществления фиброз сердца является эндомиокардиальным фиброзом или идиопатической кардиомиопатией. В некоторых вариантах осуществления фиброз кожи является склеродермии, посттравматическим, оперативным рубцеванием кожи, келоидами или образованием кожных келоидов. В некоторых вариантах осуществления фиброз глаза является глаукомой, склерозом глаз, рубцеванием конъюнктивы, рубцеванием роговицы или птеригиумом. В некоторых вариантах осуществления ретроперитонеальный фиброз является идиопатическим, фармакологически-индуцированным или индуцированным радиацией. В некоторых вариантах осуществления кистозный фиброз является кистозным фиброзом поджелудочной железы или кистозным фиброзом легких. В некоторых вариантах осуществления инъекционный фиброз возникает как осложнение внутримышечной инъекции.

В некоторых вариантах осуществления эндоглиновый полипептид, применяемый для лечения фиброзного нарушения по настоящему изобретению, не включает последовательность, состоящую из аминокислот 379-430 SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления эндоглиновый полипептид содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную последовательности, начинающейся с аминокислоты, соответствующей любому из положений 26-42 SEQ ID NO: 1 и заканчивающейся аминокислотой, соответствующей любому из положений 333-378 SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления эндоглиновый полипептид содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную аминокислотам 26-346 SEQ ID NO: 1, аминокислотам 26-359 SEQ ID

NO: 1 или аминокислотам 26-378 SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления эндоглиновый полипептид состоит из первой части, состоящей из аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 95% идентичной аминокислотам 26-346 SEQ ID NO: 1, аминокислотам 26-359 SEQ ID NO: 1 или аминокислотам 26-378 SEQ ID NO: 1, и второй части, гетерологичной по отношению к SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления вторая часть эндоглинового полипептида содержит Fc-часть IgG. В некоторых вариантах осуществления эндоглиновый полипептид не включает более 50 последовательных аминокислот из последовательности, состоящей из аминокислот 379-586 SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления эндоглиновый полипептид является димером или мультимером более высокого порядка, содержащим два или более эндоглиновых полипептида, и, необязательно, может являться гомодимером, гетеродимером, гомомультимером или гетеромультимером.

В некоторых вариантах осуществления эндоглиновый полипептид, применяемый для лечения фиброзного нарушения по настоящему изобретению, связывается с BMP-9 человека с равновесной константой диссоциации (KD) менее 1×10^{-9} М или константой скорости диссоциации (kd) менее 1×10^{-3} с⁻¹. В некоторых вариантах осуществления эндоглиновый полипептид связывается с BMP-9 человека с равновесной константой диссоциации (KD) менее 1×10^{-9} М или константой скорости диссоциации (kd) менее 5×10^{-4} с⁻¹. В некоторых вариантах осуществления эндоглиновый полипептид связывается с BMP-10 человека с равновесной константой диссоциации (KD) менее 1×10^{-9} М или константой скорости диссоциации (kd) менее 5×10^{-3} с⁻¹. В некоторых вариантах осуществления эндоглиновый полипептид связывается с BMP-10 человека с равновесной константой диссоциации (KD) менее 1×10^{-9} М или константой скорости диссоциации (kd) менее $2,5 \times 10^{-3}$ с⁻¹. Необязательно эндоглиновый полипептид, отличающийся любым из указанных выше свойств связывания BMP-9 или BMP-10, является димером или мультимером более высокого порядка. В некоторых вариантах осуществления эндоглиновый полипептид не связывается с TGF- β 1 человека, TGF- β 3 человека, VEGF человека или основным фактором роста фибробластов человека (FGF-2). В некоторых вариантах осуществления эндоглиновый полипептид является слитым белком, включающим, помимо части, содержащей аминокислотную последовательность эндоглина, одну или несколько полипептидных частей, повышающих оно или несколько из: стабильности *in vivo*, времени полужизни *in vivo*, захвата/введения, локализации или распределения в тканях, образования белковых комплексов, таких как димеры или мультимеры, и/или очистки. В некоторых вариантах осуществления эндоглиновый полипептид включает часть константного домена иммуноглобулина и/или часть сывороточного альбумина. В некоторых вариантах осуществления эндоглиновый полипептид содержит домен Fc иммуноглобулина. В некоторых вариантах осуществления домен Fc иммуноглобулина соединяют с полипептидной частью ENG с помощью линкера. В некоторых вариантах осуществления линкер состоит из аминокислотной последовательности, состоящей из SEQ ID NO: 31 (TGGG) или GGG. В некоторых вариантах осуществления домены Fc образуют димер. В некоторых вариантах осуществления эндоглиновый полипептид включает один или несколько модифицированных аминокислотных остатка, выбранных из: гликозилированной аминокислоты, пегилированной аминокислоты, фарнезилированной аминокислоты, ацетилированной аминокислоты, биотинилированной аминокислоты, аминокислоты, конъюгированной с остатком липида, и аминокислоты, конъюгированной с органическим дериватизирующим средством.

В некоторых вариантах осуществления эндоглиновый полипептид вводят внутривенно, внутримышечно, внутриартериально, подкожно или перорально.

Настоящее изобретение частично относится к эндоглиновым полипептидам и применению таких эндоглиновых полипептидов в качестве селективных антагонистов BMP9 и/или BMP10. Как представлено в настоящем описании, полипептиды, содержащие часть или весь внеклеточный домен эндоглина (ECD), связываются с BMP9 и BMP10, не демонстрируя существенного связывания с другими членами суперсемейства TGF-бета. В настоящем описании показано, что полипептиды, содержащие часть или весь ECD эндоглина, являются эффективными антагонистами передачи сигнала BMP9 и BMP10 и действуют, ингибируя ангиогенез и рост опухоли *in vivo*. Таким образом, в определенных аспектах настояще изобретение относится к эндоглиновым полипептидам как антагонистам BMP9 и/или BMP10 для применения в ингибировании ангиогенеза, а также других нарушений, ассоциированных с BMP9 или BMP10, представленных в настоящем описании.

В определенных аспектах настояще изобретение относится к полипептидам, содержащим укороченный внеклеточный домен эндоглина, для применения в ингибировании ангиогенеза и лечении других BMP9-или BMP10-ассоциированных нарушений. Не будучи связанными каким-либо конкретным механизмом действия, ожидают, что такие полипептиды будут действовать, связывая BMP9 и/или BMP10 и ингибируя способность этих лигандов образовывать сигнальные комплексы с такими рецепторами, как ALK1, ALK2, ActRIIA, ActRIIB и BMPRII. В определенных вариантах осуществления эндоглиновый полипептид содержит, состоит или, по существу, состоит из аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 70, 80, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичной последовательности аминокислот 42-333, 26-346, 26-359 или 26-378 последовательности эндоглина человека SEQ ID NO: 1. Эндоглиновый полипептид может содержать, состоять или, по существу, состоять из аминокислотной последовательно-

сти, по меньшей мере на 70, 80, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичной последовательности аминокислот, начинающейся с любого из положений 26-42 SEQ ID NO: 1 и заканчивающейся любым из положений 333-378 последовательности эндоглина человека SEQ ID NO: 1. Эндоглиновый полипептид может содержать, состоять или, по существу, состоять из полипептида, кодируемого нуклеиновой кислотой, гибридизующейся в менее строгих, строгих или очень строгих условиях с последовательностью, комплементарной нуклеотидной последовательности, выбранной из группы, состоящей из: нуклеотидов 537-1412 SEQ ID NO: 2, нуклеотидов 121-1035 SEQ ID NO: 30, нуклеотидов 121-1074 SEQ ID NO: 26, нуклеотидов 121-1131 SEQ ID NO: 24, нуклеотидов 73-1035 SEQ ID NO: 30, нуклеотидов 73-1074 SEQ ID NO: 26 и нуклеотидов 73-1131 SEQ ID NO: 24. В каждом из перечисленных выше случаев эндоглиновый полипептид можно выбирать так, чтобы он не включал полноразмерный ECD эндоглина (например, эндоглиновый полипептид можно выбирать так, чтобы он не включал последовательность аминокислот 379-430 SEQ ID NO: 1, или их часть, или любую дополнительную часть уникальной последовательности SEQ ID NO: 1). Эндоглиновый полипептид можно использовать в качестве мономерного белка или в димеризованной форме. Эндоглиновый полипептид также можно подвергать слиянию со второй полипептидной частью для получения улучшенных свойств, таких как повышенное время полужизни или более высокая легкость получения или очистки. Слияние может являться прямым, или между эндоглиновым полипептидом и любой другой частью можно встраивать линкер. Линкер может являться структурированным или неструктурным и может состоять из 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 30, 50 или более аминокислот, необязательно, с относительно свободной вторичной структурой. Линкер может быть богат остатками глицина и пролина и, например, может содержать последовательность из треонина/серина и глицинов (например, TGGG (SEQ ID NO: 31)) или просто один или несколько остатков глицина (например, GGG (SEQ ID NO: 32)). Для повышения времени полужизни эндоглинового полипептида в сыворотке при системном введении (например, внутривенном, интраартериальном и интраперитонеальном введении) особенно пригодным могут являться слияния с Fc-частью иммуноглобулина или соединение с остатком полиоксиэтилена (например, полиэтиленгликоля). В определенных вариантах осуществления слитый белок эндоглин-Fc содержит полипептид, содержащий, состоящий или, по существу, состоящий из аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 70, 80, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичной последовательности аминокислот, начинающейся с любого из положений 26-42 SEQ ID NO: 1 и заканчивающейся любым из положений 333-378 последовательности эндоглина человека SEQ ID NO: 1, и, необязательно, может не включать полноразмерный ECD эндоглина (например, эндоглиновый полипептид можно выбирать так, чтобы он не включал последовательность аминокислот 379-430 SEQ ID NO: 1 или ее часть, или так, чтобы он не включал какие-либо 5, 10, 20, 30, 40, 50, 52, 60, 70, 100, 150 или 200 или более других аминокислот из любой части эндоглина или любой части аминокислот 379-581 SEQ ID NO: 1), где полипептид является слитым с Fc-частью иммуноглобулина с промежуточным линкером или без него. Эндоглиновый полипептид, включающий слитый белок эндоглин-Fc, может связываться с BMP9 и/или BMP10 с K_D менее 10^{-8} М, 10^{-9} М, 10^{-10} М, 10^{-11} М или менее или константой диссоциации (k_d) менее 10^{-3} с⁻¹, 3×10^{-3} с⁻¹, 5×10^{-3} с⁻¹ или 1×10^{-4} с⁻¹. Можно выбирать эндоглиновый полипептид, имеющий K_D к BMP9 меньше K_D к BMP10, необязательно, меньше в 5, 10, 20, 30, 40 раз или более. Эндоглиновый полипептид может иметь небольшую аффинность или не иметь значительной аффинности к любому или всем из TGF- β 1, - β 2 или - β 3 и может иметь K_D к любому или всем из TGF- β 1, - β 2 или - β 3 более 10^{-9} М, 10^{-8} М, 10^{-7} М или 10^{-6} М. Эндоглиновый полипептид может являться димером или мультимером более высокого порядка.

Fc-часть можно выбирать таким образом, чтобы она соответствовала организму. Необязательно, Fc-часть является Fc-частью IgG1 человека. Необязательно, слитый белок эндоглин-Fc содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 33, 34, 35 или 36. Необязательно, слитый белок эндоглин-Fc является белком, получаемым посредством экспрессии нуклеиновой кислоты любой из SEQ ID NO: 17, 20, 22, 24, 26, 28 или 30 в линии клеток млекопитающего, в частности, линии клеток китайского хомяка (CHO). Эндоглиновый полипептид можно составлять в виде фармацевтического препарата, по существу, апирогенного. Можно получать фармацевтический препарат для системной доставки (например, внутривенной, внутримышечной, интраартериальной или подкожной доставки) или местной доставки (например, в глаз).

Эндоглиновые полипептиды, представленные в настоящем описании, можно использовать совместно или последовательно с одним или несколькими дополнительными терапевтическими средствами, включая, например, антиангиогенные средства, антагонисты VEGF, антитела против VEGF, противоопухолевые композиции, цитотоксические средства, химиотерапевтические средства, противогормональные средства и ингибирующие рост средства. Дополнительные примеры каждой из указанных выше категорий молекул представлены в настоящем описании.

В определенных аспектах настоящее изобретение относится к способам ингибиования ангиогенеза у млекопитающего посредством введения какого-либо из эндоглиновых полипептидов, представленных в настоящем описании в целом или конкретно. Эндоглиновый полипептид можно доставлять местно (например, в глаз) или системно (например, внутривенно, внутримышечно, внутриартериально или подкож-

но). В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу ингибиования ангиогенеза в глазу млекопитающего посредством введения эндоглинового полипептида млекопитающему в место, дистальное относительно глаза, например, посредством системного введения.

В определенных аспектах настоящее изобретение относится к способам лечения опухоли у млекопитающего. Такой способ может включать введение млекопитающему, имеющему опухоль, эффективного количества эндоглинового полипептида. Способ дополнительно может включать введение одного или нескольких дополнительных средств, включая, например, антиангиогенные средства, антагонисты VEGF, антитела против VEGF, противоопухолевые композиции, цитотоксические средства, химиотерапевтические средства, противогормональные средства и ингибирующие рост средства. Опухоль также может являться опухолью, использующей множество проангиогенных факторов, такой как опухоль, резистентная к терапии против VEGF.

В определенных аспектах настоящее изобретение относится к способам лечения пациентов, имеющих нарушение, связанное с BMP9 или BMP10. Примеры таких нарушений представлены в настоящем описании, и, как правило, они могут включать нарушения сосудистого русла, гипертензию и фиброзные нарушения.

В определенных аспектах настоящее изобретение относится к офтальмологическим составам. Такие составы могут содержать эндоглиновый полипептид, представленный в настоящем описании. В определенных аспектах настоящее изобретение относится к способам лечения фиброзного заболевания глаза или заболевания глаза, связанного с ангиогенезом. Такие способы могут включать системное введение или введение в указанный глаз фармацевтического состава, содержащего эффективное количество эндоглинового полипептида, представленного в настоящем описании.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 показана нативная аминокислотная последовательность ENG человека, изоформа 1 (L-ENG). Подчеркнуты лидерная последовательность (остатки 1-25) и предсказанный трансмембранный домен (остатки 587-611).

На фиг. 2 показана нативная нуклеотидная последовательность, кодирующая ENG человека, изоформу 1 (L-ENG).

Подчеркнуты последовательности, кодирующие лидерную последовательность (нуклеотиды 414-488) и предсказанный трансмембранный домен (нуклеотиды 2172-2246).

На фиг. 3 показана нативная аминокислотная последовательность ENG человека, изоформа 2 (S-ENG). Подчеркнуты лидерная последовательность (остатки 1-25) и предсказанный трансмембранный домен (остатки 587-611). По сравнению с изоформой 1, изоформа 2 имеет более короткий и отличающийся С-конец, но последовательность внеклеточного домена (см. фиг. 9) является идентичной.

На фиг. 4 показана нативная нуклеотидная последовательность, кодирующая ENG человека, изоформу 2 (S-ENG). Подчеркнуты последовательности, кодирующие лидерную последовательность (нуклеотиды 414-488) и предсказанный трансмембранный домен (нуклеотиды 2172-2246).

На фиг. 5 показана нативная аминокислотная последовательность ENG мыши, изоформа 1 (L-ENG). Подчеркнуты лидерная последовательность (остатки 1-26) и предсказанный трансмембранный домен (остатки 582-606), а внеклеточный домен зрелого пептида выделен квадратными скобками (см. фиг. 10). Изоформа 3 ENG мыши (инвентарный номер GenBank NM_001146348) отличается от представленной последовательности только лидерной последовательностью, в которой треонин в положении 23 (выделен) подвергнут делеции и есть замена глицина серином в положении 24 (также выделена).

На фиг. 6 показана нативная нуклеотидная последовательность, кодирующая ENG мыши, изоформу 1 (L-ENG). Подчеркнуты последовательности, кодирующие лидерную последовательность (нуклеотиды 364-441) и предсказанный трансмембранный домен (нуклеотиды 2107-2181). Нуклеотидная последовательность, кодирующая изоформу 3 ENG мыши (инвентарный номер GenBank NM_001146348), отличается от представленной последовательности только лидерной последовательностью, особенно в положениях 430-433 (выделены).

На фиг. 7 показана нативная аминокислотная последовательность ENG мыши, изоформа 2 (S-ENG). Подчеркнуты лидерная последовательность (остатки 1-26) и предсказанный трансмембранный домен (остатки 582-606). По сравнению с изоформой 1, изоформа 2 имеет более короткий и отличающийся С-конец, но последовательность внеклеточного домена (см. фиг. 10) является идентичной.

На фиг. 8 показана нативная нуклеотидная последовательность, кодирующая ENG мыши, изоформу 2 (S-ENG). Подчеркнуты последовательности, кодирующие лидерную последовательность (нуклеотиды 364-441) и предсказанный трансмембранный домен (нуклеотиды 2107-2181).

На фиг. 9 показана аминокислотная последовательность внеклеточного домена ENG человека. Внеклеточные домены двух изоформ человека идентичны по аминокислотной и нуклеотидной последовательности.

На фиг. 10 показана аминокислотная последовательность внеклеточного домена ENG мыши, на 69% идентичного его аналогу у человека. Внеклеточные домены двух изоформ мыши идентичны по аминокислотной и нуклеотидной последовательности.

На фиг. 11 показана аминокислотная последовательность домена Fc IgG1 человека. Подчеркнутые

остатки являются необязательными участками мутаций, как описано в тексте.

На фиг. 12 показана укороченная с N-конца аминокислотная последовательность домена Fc IgGl человека. Подчеркнутые остатки являются необязательными участками мутаций, как описано в тексте.

На фиг. 13 показана аминокислотная последовательность hENG(26-586)-hFc. Подчеркнут домен ENG, лидерная последовательность TPA подчеркнута двойной линией, и последовательности линкера приведены жирным шрифтом и выделены.

На фиг. 14 показана нуклеотидная последовательность, кодирующая hENG(26-586)-hFc. Подчеркнуты нуклеотиды, кодирующие домен ENG, нуклеотиды, кодирующие лидерную последовательность TPA, подчеркнуты двойной линией, и нуклеотиды, кодирующие последовательности линкера, приведены жирным шрифтом и выделены.

На фиг. 15 показана аминокислотная последовательность hENG(26-586)-hFc с укороченным с N-конца доменом Fc. Подчеркнут домен ENG, лидерная последовательность TPA подчеркнута двойной линией, и последовательности линкера приведены жирным шрифтом и выделены.

На фиг. 16 показана аминокислотная последовательность mENG(27-581)-mFc. Подчеркнут домен ENG, лидерная последовательность TPA подчеркнута двойной линией, и последовательности линкера приведены жирным шрифтом и выделены.

На фиг. 17 показана нуклеотидная последовательность, кодирующая mENG(27-581)-mFc. Подчеркнуты нуклеотиды, кодирующие домен ENG, нуклеотиды, кодирующие лидерную последовательность TPA, подчеркнуты двойной линией, и нуклеотиды, кодирующие последовательности линкера, приведены жирным шрифтом и выделены.

На фиг. 18 показано определение характеристик связывания BMP-9 с hENG(26-586)-hFc, как определяли с помощью анализа на основе поверхностного плазмонного резонанса (SPR). Связывание BMP-9 с иммобилизованным hENG(26-586)-hFc оценивали при концентрациях лиганда 0 и 0,01-0,625 нМ (с двукратными повышениями, за исключением 0,3125 нМ) и использовали нелинейную регрессию для определения K_D как 29 пМ.

На фиг. 19 показано определение характеристик связывание BMP-10 с hENG(26-586)-hFc, как определяли с помощью анализа на основе SPR. Связывание BMP-10 с иммобилизованным hENG(26-586)-hFc оценивали при концентрациях лиганда 0 и 0,01-1,25 нМ (с двукратными повышениями) и использовали нелинейную регрессию для определения K_D как 400 пМ.

На фиг. 20 показан эффект растворимого внеклеточного домена ENG человека, hENG(26-586), в отношении связывания BMP-9 с ALK1. Концентрации hENG(26-586) 0-50 нМ предварительно смешивали с фиксированной концентрацией BMP-9 (10 нМ) и определяли связывание BMP-9 с иммобилизованным ALK1 с помощью анализа на основе SPR. Преобладающий след соответствует отсутствию hENG(26-586), в то время как наименьший след соответствует соотношению ENG: BMP-9 5:1. Связывание BMP-9 с ALK1 ингибиравалось растворимым hENG(26-586) в зависимости от концентрации с IC_{50} 9,7 нМ.

На фиг. 21 показан эффект растворимого внеклеточного домена ENG человека, hENG(26-586), в отношении связывания BMP-10 с ALK1. Концентрации hENG(26-586) 0-50 нМ предварительно смешивали с фиксированной концентрацией BMP-10 (10 нМ) и измеряли связывание BMP-10 с иммобилизованным ALK1 с помощью анализа на основе SPR. Преобладающий след соответствует отсутствию hENG(26-586), и наименьший след соответствует соотношению ENG: BMP-10 5:1. Связывание BMP-10 с ALK1 ингибиравалось растворимым hENG(26-586) в зависимости от концентрации с IC_{50} 6,3 нМ.

На фиг. 22 показан эффект mENG(27-581)-hFc в отношении образования тяжа эндотелиальными клетками пупочной вены человека (HUEVC) в культуре. Данные представляют собой средние значения для двух параллельных культур $\pm SD$. Индуктор, стимулятор роста эндотелиальных клеток (ECGS), удваивал среднюю длину тяжа по сравнению с отсутствием обработки, и mENG(27-581)-hFc сокращает это повышение на приблизительно 60%. В отсутствие стимуляции (без обработки) mENG(27-581)-hFc имеет низкий эффект.

На фиг. 23 показан эффект mENG(27-581)-hFc в отношении ангиогенеза, стимулируемого VEGF, в анализе хориоаллантиновой мембранны куриного яйца (CAM). Данные представляют собой средние значения $\pm SEM$; * $p<0,05$. Количество дополнительных кровеносных сосудов, индуцируемых обработкой VEGF, снижалось на 65% при конкурентной обработке mENG(27-581)-hFc.

На фиг. 24 показан эффект обработки mENG(27-581)-mFc в течение 11 дней в отношении ангиогенеза, стимулируемого комбинацией факторов роста (GF) фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) и основного фактора роста фибробластов (FGF-2) в анализе антиреактора мыши. Ангиогенез в единицах относительной флуоресценции $\pm SEM$; * $p<0,05$. mENG(27-581)-mFc полностью блокировал ангиогенез, стимулируемый GF, в этом анализе *in vivo*.

На фиг. 25 показана доменная структура слитых конструкций hENG-Fc. Полноразмерный внеклеточный домен ENG(остатки 26-586 в верхней структуре) состоит из орфанного домена и N-концевых и C-концевых доменов zona pellucida (ZP). Под ней представлена структура выбранных укороченных вариантов и то, проявляют ли они высокоаффинное связывание (+/-) с BMP-9 и BMP-10 в анализе на основе SPR.

На фиг. 26 показана аминокислотная последовательность hENG(26-437)-hFc. Подчеркнут домен ENG, лидерная последовательность ТРА подчеркнута двойной линией, и последовательности линкера приведены жирным шрифтом и выделены.

На фиг. 27 показана нуклеотидная последовательность, кодирующая hENG(26-437)-hFc. Подчеркнуты нуклеотиды, кодирующие домен ENG, нуклеотиды, кодирующие лидерную последовательность ТРА, подчеркнуты двойной линией, и нуклеотиды, кодирующие последовательности линкера, приведены жирным шрифтом и выделены.

На фиг. 28 показана аминокислотная последовательность hENG(26-378)-hFc с укороченным с N-конца доменом Fc. Подчеркнут домен ENG, лидерная последовательность ТРА подчеркнута двойной линией, и последовательности линкера приведены жирным шрифтом и выделены.

На фиг. 29 показана нуклеотидная последовательность, кодирующая hENG(26-378)-hFc с укороченным с N-конца доменом Fc. Подчеркнуты нуклеотиды, кодирующие домен ENG, и нуклеотиды, кодирующие последовательности линкера, приведены жирным шрифтом и выделены.

На фиг. 30 показана аминокислотная последовательность hENG(26-359)-hFc. Подчеркнут домен ENG, лидерная последовательность ТРА подчеркнута двойной линией, и последовательности линкера приведены жирным шрифтом и выделены.

На фиг. 31 показана нуклеотидная последовательность, кодирующая hENG(26-359)-hFc. Подчеркнуты нуклеотиды, кодирующие домен ENG, нуклеотиды, кодирующие лидерную последовательность ТРА, подчеркнуты двойной линией, и нуклеотиды, кодирующие последовательности линкера, приведены жирным шрифтом и выделены.

На фиг. 32 показана аминокислотная последовательность hENG(26-359)-hFc с укороченным с N-конца доменом Fc. Подчеркнут домен ENG, лидерная последовательность ТРА подчеркнута двойной линией, и последовательности линкера приведены жирным шрифтом и выделены.

На фиг. 33 показана нуклеотидная последовательность, кодирующая hENG(26-359)-hFc с укороченным с N-конца доменом Fc. Подчеркнуты нуклеотиды, кодирующие домен ENG, нуклеотиды, кодирующие лидерную последовательность ТРА, подчеркнуты двойной линией, и нуклеотиды, кодирующие последовательности линкера, приведены жирным шрифтом и выделены.

На фиг. 34 показана аминокислотная последовательность hENG(26-346)-hFc с укороченным с N-конца доменом Fc. Подчеркнут домен ENG, лидерная последовательность ТРА подчеркнута двойной линией, и последовательности линкера приведены жирным шрифтом и выделены.

На фиг. 35 показана нуклеотидная последовательность, кодирующая hENG(26-346)-hFc с укороченным с N-конца доменом Fc. Подчеркнуты нуклеотиды, кодирующие домен ENG, и нуклеотиды, кодирующие последовательности линкера, приведены жирным шрифтом и выделены.

На фиг. 36 показаны эксклюзивные хроматограммы hENG(26-586)-hFc (A), hENG(26-359)-hFc (B) и hENG(26-346)-hFc (C) после очистки соответствующих белков, полученных из клеток СНО, с помощью аффинной хроматографии с протеином A. Процент выделения мономерного hENG(26-346)-hFc равен таковому в случае hENG(26-586)-hFc. Напротив, выделение мономерного hENG(26-359)-hFc снижалось в присутствие дополнительных высокомолекулярных агрегатов, таким образом, требуя дополнительных способов для достижения чистоты, эквивалентной чистоте для других конструкций.

На фиг. 37 показано определение кинетических характеристик связывания BMP-9 с hENG(26-586)-hFc (A), hENG(26-359)-hFc (B) и hENG(26-346)-hFc (C), как определяли в анализе на основе SPR. Связывание BMP-9 с иммобилизованными белками, полученными из клеток СНО, оценивали при концентрациях лиганда 0,0195-0,625 нМ с двукратными повышениями RU, единицы ответа. Необходимо отметить более низкие скорости обратной реакции для укороченных вариантов по сравнению с hENG(26-586)-hFc.

На фиг. 38 показан эффект hENG(26-359)-hFc в отношении ангиогенеза, стимулируемого VEGF, в анализе САМ. Данные представляют собой средние значения \pm SEM; * p <0,05. Количество дополнительных кровеносных сосудов, индуцируемых обработкой VEGF, снижалось на 75% при конкурентной обработке hENG(26-359)-hFc, хотя hENG(26-359)-hFc не связывается с VEGF.

На фиг. 39 показан эффект обработки hENG(26-346)-hFc в течение 11 дней в отношении ангиогенеза, стимулируемого комбинацией факторов роста (GF) VEGF и FGF-2 в анализе ангиореактора мыши. А. Ангиогенез в единицах относительной флуоресценции \pm SEM; * p <0,05. В. Фотографии отдельных ангиореакторов (четыре на мышь), распределенных по исследуемым группам, с образованием кровеносного сосуда, видимым в виде затененных включений. Хотя сам по себе он неспособен связываться с VEGF или FGF-2, в этом анализе *in vivo* hENG(26-346)-hFc полностью блокировал ангиогенез, стимулируемый GF.

На фиг. 40 показан эффект mENG(27-581)-mFc в отношении роста ксенотрансплантатов опухоли молочной железы 4T1 у мышей. Данные представляют собой средние значения \pm SEM. Ко дню 24 после имплантации объем опухоли составлял на 45% меньше (p <0,05) у мышей, которым вводили mENG(27-581)-mFc, по сравнению с наполнителем.

На фиг. 41 показан эффект mENG(27-581)-mFc в отношении роста ксенотрансплантатов опухоли Colon-26 у мышей. Обработка mENG(27-581)-mFc ингибировала рост опухоли дозозависимым образом,

при этом объем опухоли в группе высокой дозы составлял на приблизительно 70% меньше, чем в случае наполнителя, ко дню 58 после имплантации.

На фиг. 42 показана печень как % массы тела в модели фиброза печени мыши CC14 с введением эндоглина (mENG(27-581)-mFc) или без него.

На фиг. 43 показано окрашивание ткани печени гематоксилин-эозином у ложно-инъецированных мышей (PBS).

На фиг. 44 показано окрашивание ткани печени гематоксилин-эозином у мышей, которым инъецировали mENG(27-581)-mFc.

На фиг. 45 показано окрашивание ткани печени трихромом по Массону у мышей с индуцированной CC14.

На фиг. 46 показано окрашивание ткани печени масляным красным О у CC14-индуцированных мышей, которым инъецировали PBS или mENG(27-581)-mFc. Животные, которым вводили mENG(27-581)-mFc, имели наименьшую процентную долю печени с обширным положительным окрашиванием масляным красным О.

На фиг. 47 показаны уровни щелочной фосфатазы в сыворотке у CC14-индуцированных и ложно-индуцированных (оливковым маслом) мышей, которым вводили mENG(27-581)-mFc или PBS. АР в сыворотке была более низкой в когортах, которым вводили эндоглин.

На фиг. 48 показан эффект введения ENG-Fc в отношении печеночного депонирования липидов у мышей MCDD, модели фиброза печени, вызываемого пищевой недостаточностью метионина и холина. По сравнению с наполнителем (A, C), введение mENG(27-581)-mFc в течение 3 недель значительно снижало печеночное депонирование липидов (B, D) у мышей MCDD. Отложения липидов идентифицировали по интенсивному окрашиванию масляным красным О, растворимым в липидах диазокрасителем. Увеличение в 100 раз (A, B) и 200 раз (C, D).

Подробное описание изобретения

1. Обзор.

В определенных аспектах настоящее изобретение относится к полипептидам ENG. ENG(также известный как CD105) обозначают как корецептор лигандов суперсемейства трансформирующего фактора роста-β (TGF-β), и он участвует в нормальном и патологическом фиброзе и ангиогенезе. Экспрессия ENG является низкой в покоящемся сосудистом эндотелии, но повышающее регулируется в эндотелиальных клетках заживающих ран, развивающихся эмбрионов, воспаленных тканях и солидных опухолях (Dallas et al., 2008, Clin Cancer Res 14:1931-1937). Мыши, гомозиготные по нулевым аллелям ENG, умирают рано в период беременности по причине дефектного развития сосудов (Li et al., 1999, Science 284:1534-1537), в то время как мыши, гетерозиготные по нулевому аллелю ENG, демонстрируют аномалии ангиогенеза во взрослом возрасте (Jerkic et al., 2006, Cardiovasc Res 69:845-854). У людей идентифицированы мутации гена ENG, являющиеся причиной наследственной геморрагической телеангиэкзазии (болезни Рандю-Бебера-Ослера) типа-1 (ННТ-1), аутосомно-домinantной формы сосудистой дисплазии, отличающейся артериовенозными мальформациями, приводящими к прямому току (соединению) артерий с веной (артериовенозному шунту) без участия капиллярного русла (McAllister et al., 1994, Nat Genet 8:345-351; Fernandez-L et al., 2006, Clin Med Res 4:66-78). Типичные симптомы у пациентов с ННТ включают рецидивирующий повторяющийся время от времени эпистаксис, желудочно-кишечное кровотечение, кожные и кожно-слизистые телеангиэкзазы и артериовенозные мальформации в легочном, мозговом или печеночном сосудистом русле.

Хотя конкретную роль ENG в фиброзе и ангиогенезе еще предстоит определить, вероятно, она связана со значительной ролью системы передачи сигнала TGF-β в этом процессе (Cheifetz et al., 1992, J Biol Chem 267:19027-19030; Pardali et al., 2010, Trends Cell Biol 20:556-567). Примечательно, что экспрессия ENG повышающее регулируется в пролиферирующих клетках эндотелия сосудов в опухолевых тканях (Burrows et al., 1995, Clin Cancer Res 1:1623-1634; Miller et al., 1999, Int J Cancer 81:568-572), и количество экспрессирующих ENG кровеносных сосудов в опухоли отрицательно коррелирует с выживаемостью для широкого диапазона опухолей человека (Fonsatti et al., 2010, Cardiovasc Res 86:12-19). Таким образом, ENG является многообещающей мишенью для антиангиогенной терапии в целом и для злокачественных новообразований в частности (Dallas et al., 2008, Clin Cancer Res 14:1931-1937; Bernabeu et al., 2009, Biochim Biophys Acta 1792:954-973).

Структурно ENG является гомодимерным гликопротеином поверхности клетки. Он принадлежит к семейству белков zona pellucida (ZP) и состоит из короткого С-концевого цитоплазматического домена, одного гидрофобного трансмембранных домена и длинного внеклеточного домена (ECD) (Gougos et al., 1990, J Biol Chem 265:8361-8364). Как определяли с помощью электронной микроскопии, мономерный ECD ENG состоит из двух областей ZP и орфанного домена, локализованного на N-конце (Llorca et al., 2007, J Mol Biol 365:694-705). У людей альтернативный сплайсинг первичного транскрипта приводит к образованию двух изоформ ENG, одна из которых состоит из 658 остатков (длинная, L, SEQ ID NO: 1), и другая - из 625 остатков (короткая, S, SEQ ID NO: 3), отличающихся только их цитоплазматическим доменом (Bellon et al., 1993, 23:2340-2345; ten Dijke et al., 2008, Angiogenesis 11:79-89). ENG мыши суще-

ствует в виде трех изоформ: L-ENG (SEQ ID NO: 5), S-ENG (SEQ ID NO: 7) и третьего варианта (изоформы 3) с неизвестным функциональным значением, идентичной L-ENG, за исключением изменений в двух положениях в лидерной последовательности (Perez-Gomez et al., 2005, Oncogene 24:4450-4461). ECD ENG мыши демонстрирует идентичность аминокислот 69% по отношению к таковому в ENG человека, и в нем отсутствует интегриновый мотив взаимодействия Arg-Gly-Asp (RGD), обнаруживаемый в белке человека. Недавно полученные данные позволяют предполагать, что изоформы L-ENG и S-ENG могут играть разные функциональные роли *in vivo* (Blanco et al., 2008, Circ Res 103:1383-1392; ten Dijke et al., 2008, Angiogenesis 11:79-89).

Считают, что в качестве корецептора ENG модулирует ответы других рецепторов на лиганды семейства TGF- β без прямого опосредования передачи сигнала самого лиганда. Лиганды семейства TGF- β , как правило, передают сигнал посредством связывания с гомодимерным рецептором типа II, запускающим рекрутирование и трансфосфорилирование гомодимерного рецептора типа I, таким образом, приводя к фосфорилированию белков Smad, отвечающих за активацию транскрипции конкретных генов (Massagué, 2000, Nat Rev Mol Cell Biol 1:169-178). С учетом анализа эктопической клеточной экспрессии, сообщалось, что ENG не может связываться с лигандами самостоятельно, и что для его связывания с TGF- β 1, TGF- β 3, активином A, морфогенетическим белком кости-2 (BMP-2) и BMP-7 необходимо наличие соответствующего рецептора типа I и/или типа II (Barbara et al., 1999, J Biol Chem 274:584-594). Как бы то ни было, есть доказательство того, что ENG, экспрессируемый клеточной линией фибробластов, может связываться с TGF- β 1 (St.-Jacques et al., 1994, Endocrinology 134:2645-2657), и результаты, полученные недавно с помощью клеток COS, свидетельствуют о том, что трансфицированный полноразмерный ENG может связываться с BMP-9 в отсутствие трансфицированных рецепторов типа I или типа II (Scharpfenecker et al., 2007, J Cell Sci 120:964-972).

В дополнение к изложенному выше, ENG может находиться в растворимой форме *in vivo* в конкретных условиях после протеолитического расщепления полноразмерного мембраносвязанного белка (Hawinkels et al., 2010, Cancer Res 70:4141-4150). Наблюдали повышенные уровни растворимого ENG в кровотоке пациентов со злокачественными новообразованиями и преэкламсией (Li et al., 2000, Int J Cancer 89:122-126; Calabro et al., 2003, J Cell Physiol 194:171-175; Venkatesha et al., 2006, Nat Med 12:642-649; Levine et al., 2006, N Engl J Med 355:992-1005). Хотя роль эндогенного растворимого ENG плохо понятна, предполагают, что белок, соответствующий остаткам 26-437 предшественника ENG (аминокислотам 26-437 SEQ ID NO: 1), действует как скавенджер или ловушка для лигандов семейства TGF- β (Venkatesha et al., 2006, Nat Med 12:642-649; WO-2007/143023), из которых лишь TGF- β 1 и TGF- β 3 специфически вовлечены в этот процесс.

Настоящее изобретение относится к полипептидам, содержащим укороченную часть внеклеточного домена ENG, селективно связывающимся с BMP9 и/или BMP10 и которые могут действовать как антагонисты BMP9 и/или BMP10, имеющим полезные свойства относительно полноразмерного внеклеточного домена и которые можно использовать для ингибирования фиброза. Настоящее изобретение частично относится к особенностям физиологических, высокоаффинных лигандов для растворимых полипептидов ENG. Неожиданно, в настоящем описании показано, что растворимые полипептиды ENG обладают высокоспецифичным, высокоаффинным связыванием с BMP-9 и BMP-10, в то же время не проявляя какого-либо значимого связывания с TGF- β 1, TGF- β 2 или TGF- β 3, и, кроме того, в настоящем описании показано, что растворимые полипептиды ENG ингибируют взаимодействие BMP9 и BMP10 с рецепторами типа II, таким образом, ингибируя передачу клеточного сигнала. В описании также показано, что полипептиды ENG ингибируют фиброз. Кроме того, данные свидетельствуют о том, что полипептид ENG может иметь антиангиогенный эффект несмотря на обнаружение того, что полипептид ENG не проявляет значимое связывание с TGF- β 1, TGF- β 3, VEGF или FGF-2.

Таким образом, в определенных аспектах настоящее изобретение относится к эндоглиновым полипептидам как антагонистам BMP-9 или BMP-10 для применения в ингибировании какого-либо нарушения, связанного с BMP-9 или BMP-10, в целом и в ингибировании фиброза и/или ангиогенеза в частности, включая VEGF-зависимый ангиогенез и VEGF-независимый ангиогенез. Однако, следует отметить, что ожидают, что антитела против самого ENG будут иметь другие эффекты полипептида ENG. Ожидают, что пан-нейтрализующее антитело против ENG (ингибирующее связывание всех сильных и слабых лигандов) будет ингибировать передачу сигнала таких лигандов через ENG, но не будет ингибировать способность таких лигандов передавать сигнал через другие рецепторы (например, ALK-1, ALK-2, BMPRII, ActRIIA или ActRIIB в случае BMP-9 или BMP-10). Также следует отметить, что, учитывая существование циркулирующих нативных растворимых полипептидов ENG, которые, учитывая представленные в настоящем описании данные, предположительно, действуют как природные антагонисты BMP-9/10, не ясно, будет ли нейтрализующее антитело против ENG, главным образом, ингибировать мембраносвязанную форму ENG(таким образом, действуя как антагонист ENG/BMP-9/10) или растворимую форму ENG(таким образом, действуя как агонист ENG/BMP-9/10). С другой стороны, с учетом настоящего описания, ожидают, что полипептид ENG будет ингибировать все лиганды, с которыми он сильно связывается (включая BMP-9 или BMP-10 в случае конструкций, таких как описанные в примерах), но не

будет влиять на лиганда, с которыми он слабо связывается. Таким образом, хотя пан-нейтрализующее антитело против ENG будет блокировать передачу сигнала BMP-9 и BMP-10 через ENG, оно не будет блокировать передачу сигнала BMP-9 или BMP-10 через другой рецептор. Кроме того, хотя полипептид ENG может ингибировать передачу сигнала BMP-9 через все рецепторы (включая рецепторы помимо ENG), ожидают, что он будет ингибировать передачу сигнала слабо связывающегося лиганда через любой рецептор, даже ENG.

Если не указано иначе, белки, представленные в настоящем описании, являются человеческими формами. Ссылки Genbank для белков являются следующими: изоформа 1 ENG человека (L-ENG), NM_001114753; изоформа 2 ENG человека (S-ENG), NM_000118; изоформа 1 ENG мыши (L-ENG), NM_007932; изоформа 2 ENG мыши (S-ENG), NM_001146350; изоформа 3 ENG мыши, NM_001146348.

Последовательности нативных белков ENG человека и мыши приведены на фиг. 1-8.

Термины, используемые в настоящем описании, как правило, имеют значения, общепринятые в этой области, в контексте настоящего описания и в конкретном контексте, в котором используют каждый термин. Конкретные термины представлены в описании для обеспечения дополнительного руководства для практикующего специалиста в описании композиций и способов, представленных в настоящем описании, и их получении и применении. Объем или значение любого использования термина будут очевидны из конкретного контекста, в котором используют термин.

2. Терапевтические способы и применение полипептидов ENG.

Фиброз и фиброзные нарушения.

Некоторые аспекты настоящего изобретения основаны на неожиданном наблюдении того, что полипептиды ENG можно применять для ингибирования и/или лечения фиброзных нарушений. Настоящее изобретение относится к способам ингибирования фиброза у млекопитающего посредством введения эффективного количества полипептида ENG, например, полипептида ENG, содержащего аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную аминокислотам 42-333 SEQ ID NO: 1, включая слитый белок ENG-Fc или антагонисты нуклеиновой кислоты (например, антисмысловую или миРНК) указанного выше. Эти полипептиды ENG, слитые белки ENG-Fc и антагонисты нуклеиновой кислоты в настоящем описании в совокупности обозначают как "терапевтические средства".

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к полипептидам ENG и способам применения таких полипептидов, применимых в лечении, ингибировании или профилактике фиброза. Как применяют в настоящем описании, термин "фиброз" относится к аномальному образованию или развитию избыточной волокнистой соединительной ткани клетками в органе или ткани. Хотя процессы, относящиеся к фиброзу, могут возникать как часть образования нормальной ткани или заживления, дисрегуляция этих процессов может приводить к изменению клеточного состава и избыточному депонированию соединительной ткани, постепенно нарушающему функционирование ткани или органа. Образование волокнистой ткани может являться результатом репаративного или реактивного процесса.

Фиброзные нарушения или состояния, которые можно лечить полипептидами ENG и терапевтическими способами с применением таких полипептидов по настоящему изобретению, включают, в качестве неограничивающих примеров, фибрознапролиферативные нарушения, связанные с сердечно-сосудистыми заболеваниями, такими как заболевание сердца, заболевание мозга и заболевание периферических сосудов, а также систем тканей и органов, включая сердце, кожу, почки, легкие, брюшную полость, кишечник и печень (как описано, например, в Wynn, 2004, Nat Rev 4:583-594, включенном в настоящее описание посредством ссылки). Примеры нарушений, которые можно лечить, включают, в качестве неограничивающих примеров, фиброз почек, включая нефропатии, ассоциированные с травмой/фиброзом, например, хронические нефропатии, ассоциированные с диабетом (например, диабетическую нефропатию), волчанку, склеродермию, гломерулонефрит, фокально-сегментарный гломерулосклероз и IgA-нефропатию; легочный фиброз, например, идиопатический легочный фиброз, фиброз, индуцируемый радиацией, хроническую обструктивную болезнь легких (COPD), склеродермию и хроническую астму; фиброз кишечника, например, склеродермию и фиброз кишечника, индуцированный радиацией; фиброз печени, например, цирроз, алкогольный фиброз печени, повреждение желчных протоков, первичный биллиарный цирроз, фиброз печени, индуцируемый инфекцией или вирусом, врожденный фиброз печени и аутоиммунный гепатит; и другие фиброзные состояния, такие как кистозный фиброз, эндомиокардиальный фиброз, медиастинальный фиброз, плевральный фиброз, саркоидоз, склеродермия, повреждение/фиброз спинного мозга, миелофиброз, рестеноз сосудов, атеросклероз, кистозный фиброз поджелудочной железы и легких, инъекционный фиброз (который может возникать как осложнение внутримышечных инъекций, особенно у детей), эндомиокардиальный фиброз, идиопатический легочный фиброз, медиастинальный фиброз, миелофиброз, ретроперитонеальный фиброз, прогрессирующий массивный фиброз, осложнение пневмокониоза у работников угольной промышленности и нефрогенный системный фиброз.

Как применяют в настоящем описании, термины "фиброзное нарушение", "фиброзное состояние" и "фиброзное заболевание" взаимозаменяют и используют в отношении нарушения, состояния или заболевания, отличающегося фиброзом. Примеры фиброзных нарушений включают, в качестве неограничивающих примеров, сосудистый фиброз, легочный фиброз (например, идиопатический легочный фиброз),

фиброз поджелудочной железы, фиброз печени (например, цирроз), фиброз почек, скелетно-мышечный фиброз, фиброз сердца (например, эндомиокардиальный фиброз, идиопатическую кардиомиопатию), фиброз кожи (например, склеродермию, посттравматическое, оперативное рубцевание кожи, келоиды и образование келоидов кожи), фиброз глаза (например, глаукому, склероз глаз, рубцевание конъюнктивы и роговицы и птеригиум), диффузную склеродермию (PSS), хроническую реакцию "трансплантат против хозяина", болезнь Пейрони, постцистокопический стеноз уретры, идиопатический и фармакологически-индуцированный ретроперитонеальный фиброз, медиастинальный фиброз, прогрессирующий массивный фиброз, пролиферативный фиброз и опухолевый фиброз.

Как применяют в настоящем описании, термин "клетка" относится к любой клетке, подверженной фиброзному ответу, включая, в качестве неограничивающих примеров, отдельные клетки, ткани и клетки в тканях и органах. Как применяют в настоящем описании, термин "клетка" включает саму клетку, а также внеклеточный матрикс (ECM), окружающий клетку. Например, ингибиование фиброзного ответа клетки включает, в качестве неограничивающих примеров ингибиование фиброзного ответа одной или нескольких клеток в легком (или ткани легкого); одной или нескольких клеток в печени (или ткани печени); одной или нескольких клеток в почке (или ткани почки); одной или нескольких клеток в мышечной ткани; одной или нескольких клеток в сердце (или ткани сердца); одной или нескольких клеток в поджелудочной железе; одной или нескольких клеток в коже; одной или нескольких клеток в кости, одной или нескольких клеток в сосудистом русле, одной или нескольких стволовых клеток или одной или нескольких клеток в глазу.

Способы и композиции по настоящему изобретению можно применять для лечения и/или профилактики фиброзных нарушений. Примеры типов фиброзных нарушений включают, в качестве неограничивающих примеров, сосудистый фиброз, легочный фиброз (например, идиопатический легочный фиброз), фиброз поджелудочной железы, фиброз печени (например, цирроз), фиброз почек, скелетно-мышечный фиброз, фиброз сердца (например, эндомиокардиальный фиброз, идиопатическую кардиомиопатию), фиброз кожи (например, склеродермию, посттравматическое, оперативное рубцевание кожи, келоиды и образование келоидов кожи), фиброз глаза (например, глаукому, склероз глаз, рубцевание конъюнктивы и роговицы и птеригиум), диффузную склеродермию (PSS), хроническую реакцию "трансплантат-против-хозяина", болезнь Пейрони, постцистокопический стеноз уретры, идиопатический и фармакологически-индуцированный ретроперитонеальный фиброз, медиастинальный фиброз, прогрессирующий массивный фиброз, пролиферативный фиброз, опухолевый фиброз, болезнь Дюпюитрена, стриктуры и фиброз, индуцируемый радиацией. В конкретном варианте осуществления фиброзное нарушение не является миелофиброзом.

Способы и композиции по настоящему изобретению можно применять для лечения и/или профилактики нарушения печени, проявляющихся фиброзом печени или приводящих к нему, включая неалкогольную жировую болезнь печени (NAFLD), неалкогольный стеатогепатит (NASH) и острые фиброзные нарушения, которые могут являться результатом длительного избыточного потребления алкоголя, холестаза, аутоиммунные болезни печени, избыток железа или меди и хронический вирусный гепатит. NAFLD является результатом метаболических состояний ожирения и диабета типа 2. Пациенты с NAFLD могут проявлять диапазон гистопатологических признаков, включая от отдельного стеатоза (жировой инфильтрации печени) до некровоспаления, часто обозначаемого как NASH. NAFLD и NASH у пациентов могут прогрессировать до состояний фиброза на более поздней стадии, включая фиброз на поздней стадии и цирроз. У пациентов с NASH развивается прогрессирующий фиброз в 25-50% в течение периода от 4 до 6 лет, и NASH у 15-25% индивидуумов может прогрессировать до цирроза. Цирроз при NASH является основной причиной трансплантации печени в США и связан с повышенным риском печеночноклеточной карциномы и смертностью среди пациентов, ожидающих трансплантацию печени. Алкоголизм и вирусная инфекция также могут вызывать повреждение печени, прогрессирующее до фиброза печени и цирроза. Можно использовать множество инструментов для оценки состояния печени и прогрессирования фиброзного заболевания. Биопсия печени позволяет оценивать гистологические свойства ткани печени, включая окрашивание на коллаген и количественный анализ уровней коллагена в ткани, а также уровней липидов в случае стеатоза. Шкала активности NAFLD (NAS) представляет собой балльную оценку и является суммой отдельных баллов для стеатоза (0-3), баллонной дистрофии гепатоцитов (0-2) и лобулярного воспаления (0-3), при этом большинство пациентов с NASH имеют баллы $NAS \geq 5$. См. Kleiner et al., Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. Hepatology 41(6), 1313-1321 (2005). Сывороточные маркеры включают маркеры функции печени, АЛТ и АСТ, и маркеры образования внеклеточного матрикса, маркеры фибролитического процесса, маркеры деградации внеклеточного матрикса и конкретные цитокины.

Настоящее изобретение относится к применению полипептидов ENG в комбинации с одними или несколькими другими способами лечения. Таким образом, в дополнение к применению полипептидов ENG, по отношению к индивидууму также можно использовать один или несколько "стандартных" способов терапии для лечения фиброзных нарушений. Например, полипептиды ENG можно вводить в комбинации с (т.е. совместно с) цитотоксинами, иммуносупрессорными средствами, радиотоксичными средствами и/или терапевтическими антителами. Конкретные кетерапевтические средства, предусматрива-

мые в настоящем изобретении, включают, в качестве неограничивающих примеров, стероиды (например, кортикостероиды, такие как преднизон), иммуносупрессорные и/или противовоспалительные средства (например, гамма-интерферон, циклофосфамид, азатиоприн, метотрексат, пеницилламин, циклоспорин, колхицины, антитимоцитарный глобулин, миофенолат мофетил и гидроксихлорохин), цитотоксические лекарственные средства, блокаторы кальциевых каналов (например, нифедипин), ингибиторы ангиотензин-превращающего фермента (АСЕ), парааминобензойную кислоту (РАВА), диметилсульфоксид, ингибиторы трансформирующего фактора роста-бета (TGF- β), ингибиторы интерлейкина-5 (ИЛ-5) и пан-ингибиторы каспаз.

Дополнительные противофиброзные средства, которые можно использовать в комбинации с полипептидами ENG, включают, в качестве неограничивающих примеров, лектины (как описано, например, в патенте США №: 7026283, содержание которого включено в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме), а также противофиброзные средства, описываемые Wynn et al. (2007, *J Clin Invest* 117:524-529, содержание которого включено в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме). Например, дополнительные противофиброзные средства и способы терапии включают, в качестве неограничивающих примеров, различные противовоспалительные/иммуносупрессорные/цитотоксические лекарственные средства (включая колхицин, азатиоприн, циклофосфамид, преднизон, талидомид, пентоксифиллин и теофиллин), модификаторы передачи сигнала TGF- β (включая релаксин, SMAD7, HGF, и BMP7, а также ингибиторы TGF- β 1, TGF β RI, TGF β RII, EGR-I и CTGF), цитокин и антагонисты рецепторов цитокинов (ингибиторы ИЛ-1 β , ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-13, ИЛ-21, ИЛ-4R, ИЛ-13R α 1, ГМ-КСФ, ФНО, онкостатина M, WISP-I и PDGF), цитокины и хемокины (ИФН γ , ИФН α/β , ИЛ-12, ИЛ-10, HGF, CXCL10 и CXCL11), антагонисты хемокинов (ингибиторы CXCL1, CXCL2, CXCL12, CCL2, CCL3, CCL6, CCL17 и CCL18), антагонисты рецепторов хемокинов (ингибиторы CCR2, CCR3, CCR5, CCR7, CXCR2 и CXCR4), антагонисты TLR (ингибиторы TLR3, TLR4 и TLR9), антагонисты ангиогенеза (VEGF-специфические антитела и заместительная терапия аденоzindezaminазой), гипотензивные лекарственные средства (бета-блокаторы и ингибиторы ANG 11, ACE и альдостерона), вазоактивные вещества (антагонисты рецептора ET-1 и бозентан), ингибиторы ферментов, синтезирующих и процессирующих коллаген (ингибиторы пролилгидроксилазы), антагонисты В-клеток (ритуксимаб), антагонисты интегринов/молекул адгезии (молекулы, блокирующие интегрины α 1 β 1 и α v β 6, а также ингибиторы интегрин-зависимых киназ и антитела против ICAM-1 и VCAM-1), проапоптотические лекарственные средства, направленные против миофибробластов, ингибиторы MMP (ингибиторы MMP2, MMP9 и MMP12), и ингибиторы TIMP (антитела против TIMP-1).

Полипептид ENG и котерапевтическое средство или котерапию можно использовать в одном составе или раздельно. В случае раздельного введения полипептид ENG можно вводить до, после или одновременно с котерапевтическим средством или котерапией. Одно средство может предшествовать или следовать после введения другого средства через интервалы в диапазоне от минут до недель. В вариантах, осуществления в которых индивидууму раздельно вводят два или более различных типа терапевтических средств, как правило, будут обеспечивать, чтобы между временем каждой доставки не прошел значительный период времени, таким образом, чтобы эти разные типы средств все равно были способны иметь преимущественно комбинированный эффект в отношении тканей или клеток-мишеней.

Ангиогенез.

Ангиогенез, процесс образования новых кровеносных сосудов, критичен при многих нормальных и аномальных физиологических состояниях. В нормальных физиологических условиях у людей и животных ангиогенез происходит в конкретных и ограниченных ситуациях. Например, в норме ангиогенез наблюдают при заживлении ран, эмбриональном развитии и образовании corpus luteum, эндометрия и плаценты.

Нежелательный или неправильно регулируемый ангиогенез возникает при многих нарушениях, при которых аномальный рост эндотелия может вызывать патологический процесс или участвовать в нем. Например, ангиогенез участвует в росте многих опухолей. Нерегулируемый ангиогенез вовлечен в такие патологические процессы, как ревматоидный артрит, ретинопатия, гемангиомы и псориаз. Различные патологические состояния, при которых имеет место нерегулируемый ангиогенез, классифицируют как заболевания, ассоциированные с ангиогенезом.

Считают, что контролируемый и неконтролируемый ангиогенез происходит схожим образом. Капилляры, главным образом, состоят из эндотелиальных клеток и перицитов, окруженных базальной мембраной. Ангиогенез начинается с эрозии базальной мембранны ферментами, высвобождаемыми эндотелиальными клетками и лейкоцитами. Затем эндотелиальные клетки, выстилающие просвет кровеносных сосудов, выступают через базальную мембрану. Ангиогенные факторы заставляют эндотелиальные клетки мигрировать через эродированную базальную мембрану. Мигрирующие клетки образуют "отросток", выступающий из родительского кровеносного сосуда, где эндотелиальные клетки подвергаются митозу и пролиферируют. Эндотелиальные отростки соединяются друг с другом с образованием капиллярных петель, создавая новый кровеносный сосуд.

Доказано, что средства, ингибирующие ангиогенез, являются эффективными в лечении множества

нарушений. Avastin (бевацизумаб), моноклональное антитело, связывающееся с фактором роста эндотелия сосудов (VEGF), используют в лечении множества злокачественных новообразований. Доказано, что Macugen™, апгамер, связывающийся с VEGF, является эффективным в лечении неоваскулярной (влажной) возрастной дегенерации желтого пятна. Антагонисты пути передачи сигнала SDF/CXCR4 ингибируют неоваскуляризацию опухоли и эффективны против злокачественного новообразования в моделях на мышах (Guleng et al. Cancer Res. 2005 Jul 1; 65 (13) : 5864-71). В лечении различных типов опухолей в качестве антиангиогенных средств используют множество, так называемых, многоцелевых ингибиторов тирозинкиназ, включая вандетаниб, сунитиниб, акситиниб, сорафениб, ваталаниб и пазопаниб. Талидомид и родственные соединения (включая помалидомид и леналидомид) демонстрируют благоприятные эффекты в лечении злокачественных новообразований, и хотя молекулярный механизм действия неясен, ингибирование ангиогенеза, по-видимому, является важным компонентом противоопухолевого эффекта (см., например, Dredge et al., Microvasc Res. 2005 Jan;69(1-2):56-63). Хотя многие антиангиогенные средства обладают эффектом в отношении ангиогенеза независимо от затронутой ткани, другие ангиогенные средства, как правило, могут иметь ткане-специфичный эффект.

Настоящее изобретение относится к способам и композициям для лечения или профилактики состояний нерегулируемого ангиогенеза, включая неопластические и ненеопластические нарушения. Кроме того, изобретение относится к способам и композициям для лечения или профилактики конкретных сердечно-сосудистых нарушений. Кроме того, настоящее изобретение относится к способам лечения нарушений, ассоциированных с активностью BMP9 и/или BMP10.

Настоящее изобретение относится к способам ингибирования ангиогенеза у млекопитающего посредством введения индивидууму эффективного количества полипептида ENG, включая слитый белок ENG-Fc или антагонисты нуклеиновых кислот (например, антисмысловой или миРНК) указанного выше, в совокупности обозначаемых в настоящем описании как "терапевтические средства". Представленные данные конкретно указывают на то, что антиангиогенные терапевтические средства, представленные в настоящем описании, можно применять для ингибирования ангиогенеза, ассоциированного с опухолями. Ожидают, что эти терапевтические средства также будут применимы в ингибировании ангиогенеза в глазу.

Заболевания, ассоциированные с ангиогенезом, включают, в качестве неограничивающих примеров, ангиогенез-зависимое злокачественное новообразование, включая, например, солидные опухоли, гемобластозы, такие как лейкозы, и опухолевые метастазы; доброкачественные опухоли, например гемангиомы, невриномы слухового нерва, нейрофибромы, трахомы и пиогенные гранулемы; ревматоидный артрит; псориаз; рубеоз; болезнь Рандю-Вебера-Ослера; ангиогенез миокарда; неоваскуляризацию бляшек; телеангиэктазию; гемофильский артрит и ангиофиброму.

В частности, полипептидные терапевтические средства по настоящему изобретению применимы для лечения или профилактики злокачественного новообразования (опухоли) и, в частности, таких злокачественных новообразований, о которых известно, что они основаны на ангиогенных процессах для поддержания роста. В отличие от большинства антиангиогенных средств, полипептиды ENG влияют на ангиогенез, индуцируемый множеством факторов. Это весьма актуально в случае злокачественных новообразований, где злокачественное новообразование часто имеет множество факторов, поддерживающих ангиогенез в опухоли. Таким образом, терапевтические средства, представленные в настоящем описании, будут особенно эффективными в лечении опухолей, резистентных к лечению лекарственным средством, направленным против отдельного ангиогенного фактора (например, бевацизумабом, направленным против VEGF), а также могут являться особенно эффективными в комбинации с другими антиангиогенными соединениями, действующим за счет другого механизма.

Дисрегуляция ангиогенеза может приводить ко многим нарушениям, которые можно лечить композициями и способами по изобретению. Эти нарушения включают неопластические и ненеопластические состояния. Термины "злокачественное новообразование" и "злокачественный" относятся к физиологическому состоянию у млекопитающих, как правило, отличающемуся повышающее регулируемым ростом/пролиферацией клеток. Примеры злокачественного новообразования или неопластических нарушений включают, в качестве неограничивающих примеров, карциному, лимфому, бластому, саркому и лейкоз. Более конкретные примеры таких злокачественных новообразований включают плоскоклеточный рак, мелкоклеточный рак легких, немелкоклеточный рак легких, adenокарциному легкого, плоскоклеточную карциному легкого, рак брюшины, печеночно-клеточный рак, злокачественные новообразования желудочно-кишечного тракта, рак поджелудочной железы, глиобластому, рак шейки матки, рак яичников, рак печени, рак мочевого пузыря, гепатому, рак молочной железы, рак толстого кишечника, колоректальный рак, карциному эндометрия или тела матки, карциному слюнной железы, рак почки, рак предстательной железы, рак женских наружных половых органов, рак щитовидной железы, печеночную карциному, рак желудка, меланому и различные типы рака головы и шеи, включая плоскоклеточный рак головы и шеи. Другие примеры неопластических нарушений и родственных состояний включают карциномы пищевода, текомы, арренобластомы, гиперплазию эндометрия, эндометриоз, фиброзаркомы, хориокарциному, назофарингеальную карциному, ларингеальные карциномы, гепатобластому, саркому Капоши, карциномы кожи, гемангиому, кавернозную гемангиому, гемангиобластому, ретинобластому,

астроцитому, глиобластому, шванному, олигодендроглиому, медуллобластому, нейробластому, рабдомиосаркому, остеогенную саркому, лейомиосаркомы, карциномы мочевыводящих путей, опухоль Вильмса, почечноклеточную карциному, карциному предстательной железы, аномальную пролиферацию сосудов, ассоциированную с факоматозом, и синдром Мейгса. Злокачественное новообразование, в частности, поддающееся лечению терапевтическими средствами, представленными в настоящем описании, может отличаться одним или несколькими из следующего: злокачественное новообразование имеет ангиогенную активность, повышенные уровни ENG, определяемые в опухоли или сыворотке, повышенные уровни экспрессии или биологической активности BMP-9 или BMP-10, метастазирует или имеет риск метастазирования, или любую их комбинацию.

Ненеопластические нарушения с нерегулируемым ангиогенезом, поддающиеся лечению полипептидами ENG, применимыми в изобретении, включают, в качестве неограничивающих примеров, нежелательную или аномальную гипертрофию, артрит, ревматоидный артрит, псориаз, псориатические бляшки, саркоидоз, атеросклероз, атеросклеротические бляшки, диабетические и другие пролиферативные ретинопатии, включая синдром Терри, ретролентальную фиброплазию, неоваскулярную глаукому, возрастную дегенерацию желтого пятна, диабетический отек желтого пятна, неоваскуляризацию роговицы, неоваскуляризацию трансплантата роговицы, отторжение трансплантата роговицы, неоваскуляризацию сетчатки/сосудистой оболочки, неоваскуляризацию радужки (рубеоз), болезнь неоваскуляризации глаза, рестеноз сосудов, артериовенозные мальформации (AVM), менингиому, гемангиому, ангиофиброму, гиперплазию щитовидной железы (включая болезнь Грейвса), трансплантацию роговицы и другой ткани, хроническое воспаление, воспаление легких, острое повреждение легких/ARDS, сепсис, первичную легочную гипертензию, злокачественные легочные выпоты, отек мозга (например, ассоциированный с острым инсультом/закрытой черепно-мозговой травмой/травмой), синовиальное воспаление, образование паннуса при RA, оссифицирующий миозит, гипертрофический остеогенез, остеоартрит, рефрактерный асцит, поликистоз яичников, эндометриоз, заболевания с образованием полостей, заполненных жидкостью (панкреатит, компартмент-синдром, ожоги, заболевание кишечника), фиброз матки, преждевременные роды, хроническое воспаление, такое как IBD (болезнь Крона и язвенный колит), отторжение аллотрансплантата почки, воспалительное заболевание кишечника, нефротический синдром, нежелательное или аномальное разрастание тканевых масс (не злокачественных), гемофилический артрит, гипертрофические рубцы, ингибирование роста волос, болезнь Рандю-Бебера-Ослера, пиогенную гранулему, ретролентальную фиброплазию, склеродермию, трахому, сращения сосудов, синовит, дерматит, преэкламсию, асциты, перикардиальный выпот (такой как ассоциированный с перикардитом) и плевральный выпот.

Дополнительные примеры таких нарушений включают эпителиальные или сердечные нарушения.

В определенных вариантах осуществления таких способов одно или несколько полипептидных терапевтических средств можно вводить совместно (одновременно) или в разные моменты времени (последовательно). Кроме того, полипептидные терапевтические средства можно вводить с другим типом соединений для лечения злокачественного новообразования или для ингибирования ангиогенеза.

В определенных вариантах осуществления рассматриваемые способы по настоящему изобретению можно применять в отдельности. Альтернативно, рассматриваемые способы можно применять в комбинации с другими общепринятыми подходами противоопухолевой терапии, направленными на лечение или профилактику пролиферативных нарушений (например, опухоли). Например, такие способы можно применять в профилактике злокачественного новообразования, профилактике рецидива злокачественного новообразования и метастазирования после хирургического вмешательства, и в качестве адьюванта в другой общепринятой терапии злокачественного новообразования. В настоящем описании признают, что можно повышать эффективность общепринятых способов терапии злокачественных новообразований (например, химиотерапии, лучевой терапии, фототерапии, иммунотерапии и хирургии), применяя рассматриваемое полипептидное терапевтическое средство.

Показано, что широкий спектр общепринятых соединений имеет противоопухолевую активность. Эти соединения используют в качестве фармацевтических средств в химиотерапии для уменьшения размеров солидных опухолей, профилактике метастазирования и дальнейшего роста или снижения количества злокачественных клеток при лейкозах или злокачественных новообразованиях костного мозга. Хотя химиотерапия эффективна в лечении различных типов злокачественных новообразований, многие противоопухолевые соединения индуцируют нежелательные побочные эффекты. Показано, что при комбинировании двух или более разных способов лечения, они могут действовать синергично и делать возможным снижение дозы каждого из лекарственных средств, таким образом, снижая вредные побочные эффекты, вызываемые каждым соединением при более высоких дозах. В других случаях, злокачественные новообразования, рефрактерные к лечению, могут отвечать на комбинированное лечение двумя или более разными способами лечения.

При одновременном или последовательном введении терапевтического средства, представленного в настоящем описании, в комбинации с другим общепринятым противоопухолевым средством, такое терапевтическое средство может повышать терапевтический эффект противоопухолевого средства или преодолевать резистентность клеток к такому противоопухолевому средству. Это делает возможным сниже-

ние дозы противоопухолевого средства, таким образом, снижая нежелательные побочные эффекты, или восстанавливает эффективность противоопухолевого средства в резистентных клетках.

По настоящему изобретению антиангиогенные средства, представленные в настоящем описании, можно применять в комбинации с другими композициями и способами лечения заболеваний. Например, опухоль можно общепринято лечить посредством хирургического вмешательства, лучевой или химиотерапии в комбинации с полипептидом ENG, а затем можно вводить полипептид ENG пациенту для увеличения периода покоя микрометастазов и для стабилизации любой остаточной первичной опухоли.

В этой области идентифицированы и известны многие антиангиогенные средства, включая приведенные в настоящем описании и, например, в Carmeliet and Jain, *Nature* 407:249-257 (2000); Ferrara et al., *Nature Reviews:Drug Discovery*, 3:391-400 (2004) и Sato Int. J. Clin. Oncol, 8:200-206 (2003). Также см. патентную заявку США № US20030055006. В одном из вариантов осуществления полипептид ENG применяют в комбинации с нейтрализующим антителом против VEGF (или фрагментом), и/или другим антагонистом VEGF, или антагонистом рецептора VEGF, включая, в качестве неограничивающих примеров, например, растворимый рецептор VEGF (например, VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, фрагменты нейропилинов (например, NRP1, NRP2)), аптамеры, способные блокировать VEGF или VEGFR, нейтрализующие антитела против VEGFR, низкомолекулярные ингибиторы тирозинкиназ VEGFR (RTK), антисмысловые стратегии для VEGF, рибозимы против VEGF или рецепторов VEGF, варианты антагонистов VEGF и любые их комбинации. Альтернативно или дополнительно, в дополнение к антагонисту VEGF и другому средству пациенту можно совместно вводить, необязательно, два или более ингибиторов ангиогенеза. В определенном варианте осуществления в комбинации с полипептидом ENG, антагонистом VEGF и антиангиогенным средством можно вводить одно или несколько дополнительных терапевтических средств, например, противоопухолевых средств.

Термины "VEGF" и "VEGF-A" взаимозаменяют в отношении фактора роста эндотелия сосудов из 165 аминокислот и родственных факторов роста эндотелия сосудов из 121, 145, 183, 189 и 206 аминокислот, как описано в Leung et al., *Science*, 246:1306 (1989), Houck et al., *Mol Endocrinol*, 5:1806 (1991) и Robinson & Stringer, *J Cell Sci*, 144 (5):853-865 (2001), вместе с его природными аллельными и процессированными формами.

Термин "антагонист VEGF" относится к молекуле, способной нейтрализовать, блокировать, ингибировать, отменять, снижать или противодействовать активностям VEGF, включая его связывание с одним или несколькими рецепторами VEGF. Антагонисты VEGF включают антитела против VEGF и их антигенсвязывающие фрагменты, молекулы рецепторов и производные, специфически связывающиеся с VEGF, таким образом, блокируя его связывание с одним или несколькими рецепторами, антителами против рецепторов VEGF и антагонистами рецепторов VEGF, такими как низкомолекулярные ингибиторы тирозинкиназ VEGFR, и слитые белки, например, VEGF-Trap (Regeneron), VEGF121-гелонин (Peregrine). Антагонисты VEGF также включают варианты антагонистов VEGF, антисмысловые молекулы против VEGF, аптамеры РНК и рибозимы против VEGF или рецепторов VEGF.

"Антитело против VEGF" является антителом, связывающимся с VEGF с достаточной аффинностью и специфичностью. Антитело против VEGF можно использовать в качестве терапевтического средства для таргетной терапии и противодействия заболеваниям или состояниям, в которые вовлечена активность VEGF. См., например, патенты США №№ 6582959 6703020; WO98/45332; WO96/30046; WO94/10202, WO2005/044853; EP 0666868B1; патентные заявки США №№ 20030206899, 20030190317, 20030203409, 20050112126, 20050186208 и 20050112126; Popkov et al., *Journal of Immunological Methods* 288:149-164 (2004); и WO2005012359. Антитело против VEGF, как правило, не будет связываться ни с другими гомологами VEGF, такими как VEGF-B или VEGF-C, ни с другими факторами роста, такими как P1GF, PDGF или bFGF. Антитело против VEGF "бевацизумаб (BV)", также известное как "rhuMAb VEGF" или "Avastin®", является рекомбинантным гуманизированным моноклональным антителом против VEGF, полученным согласно Presta et al., *Cancer Res.* 57:4593-4599 (1997). Оно содержит мутантные каркасные области IgG1 человека и антигенсвязывающие определяющие комплементарность области из моноклонального антитела мыши против hVEGF A4.6.1, блокирующего связывание VEGF человека с его рецепторами. Приблизительно 93% аминокислотной последовательности бевацизумаба, включая большую часть каркасных областей, получают из IgG1 человека, и приблизительно 7% последовательности получают из антитела мыши A4.6.1. Бевацизумаб имеет молекулярную массу приблизительно 149000 Да и является гликозилированным. Бевацизумаб и другие гуманизированные антитела против VEGF, включая фрагмент антитела против VEGF "ранибизумаб", также известный как "Lucentis®", дополнительно описываются в патенте США № 6884879, выданном 26 февраля 2005 года.

Термин " противоопухолевая композиция" относится к композиции, применимой в лечении злокачественного новообразования, содержащей по меньшей мере одно активное терапевтическое средство, например, " противоопухолевое средство". Примеры терапевтических средств (противоопухолевых средств, также обозначаемых в настоящем описании как " противоопухолевое средство") включают, в качестве неограничивающих примеров, например, химиотерапевтические средства, ингибирующие рост средства, цитотоксические средства, средства, используемые в лучевой терапии, антиангиогенные средства, апоп-

тотические средства, антитубулиновые средства, токсины, и другие средства для лечения злокачественных новообразований, например, нейтрализующее антитело против VEGF, антагонист VEGF, средства против HER-2, против CD20, антагонист рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) (например, ингибитор тирозинкиназ), ингибитор HER1/EGFR, эрлотиниб, ингибитор COX-2 (например, целеоксиг), интерфероны, цитокины, антагонисты (например, нейтрализующие антитела), связывающиеся с одним или несколькими из ErbB2, ErbB3, ErbB4 или рецепторов VEGF, ингибиторы тирозинкиназ рецепторов тромбоцитарного фактора роста (PDGF) и/или фактора стволовых клеток (SCF) (например, иматиниба мезилат (Gleevec® Novartis)), TRAIL/Apo2L и другие биоактивные и органические химические средства, и т.д.

"Ангиогенный фактор или средство" является фактором роста, стимулирующим развитие кровеносных сосудов, например, стимулирующим ангиогенез, рост эндотелиальных клеток, стабильность кровеносных сосудов и/или васкулогенез и т.д. Например, ангиогенные факторы включают, в качестве неограничивающих примеров, VEGF и членов семейства VEGF, P1GF, семейство PDGF, семейство фактора роста фибробластов (FGF), лиганда TIE (ангиопоэтины), эфрины, ANGPTL3, ALK-1, и т.д. Они также будут включать факторы, усиливающие заживление ран, такие как гормон роста, инсулиноподобный фактор роста-I (IGF-I), VIGF, эпидермальный фактор роста (EGF), CTF и членов его семейства и TGF- α и TGF- β . См., например, Klagsbrun and D'Amore, Annu. Rev. Physiol., 53:217-39 (1991); Streit and Detmar, Oncogene, 22:3172-3179 (2003); Ferrara & Alitalo, Nature Medicine 5(12):1359-1364 (1999); Tonini et al., Oncogene, 22:6549-6556 (2003) (например, табл. 1, в которой приведены ангиогенные факторы); и Sato Int. J. Clin. Oncol., 8:200-206 (2003).

Термин "антиангиогенное средство" или "ингибитор ангиогенеза" относится к низкомолекулярному веществу, полинуклеотиду (включая, например, ингибиторную РНК (РНКи или миРНК)), полипептид, выделенный белок, рекомбинантный белок, антитело или его конъюгаты или слитые белки, прямо или косвенно ингибирующие ангиогенез, васкулогенез или нежелательную проницаемость сосудов. Например, антиангиогенное средство является антителом или другим антагонистом ангиогенного средства, как определено выше, например, антителами против VEGF, антителами против рецепторов VEGF, низкомолекулярными соединениями, блокирующим передачу сигнала рецепторами VEGF (например, РТК787/ZK2284, SU6668, SUTENT®/SU 11248 (сунитиниб малат), AMG706 или описываемые, например, в международной патентной заявке № WO2004/113304). Антиангиогенные средства также включают нативные ингибиторы ангиогенеза, например, ангиостатин, эндостатин и т.д. См., например, Klagsbrun and D'Amore, Annu. Rev. Physiol., 53:217-39 (1991); Streit and Detmar, Oncogene, 22:3172-3179 (2003) (например, табл. 3, в которой представлена антиангиогенная терапия при злокачественной меланоме); Ferrara & Alitalo, Nat Med 5(12): 1359-1364 (1999); Tonini et al., Oncogene, 22:6549-6556 (2003) (например, табл. 2, в которой приведены ангиогенные факторы); и Sato Int. J. Clin. Oncol., 8:200-206 (2003) (например, в табл. 1 приведены антиангиогенные средства, используемые в клинических испытаниях).

В определенных аспектах изобретения другие терапевтические средства, применимые для комбинированной противоопухолевой терапии с помощью полипептида ENG, включают другие способы терапии злокачественных новообразований: например, хирургическое вмешательство, цитотоксические средства, способы лучевой терапии, включающие облучение или введение радиоактивных веществ, химиотерапевтические средства, противогормональные средства, ингибирующие рост средства, противоопухолевые композиции и лечение противоопухолевыми средствами, приведенными в настоящем описании и известными в этой области, или их комбинации.

Как применяют в настоящем описании, термин "цитотоксическое средство" относится к веществу, ингибирующему или предотвращающему функционирование клеток и/или вызывающему деструкцию клеток. Термин предназначен для включения радиоактивных изотопов (например, At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} и радиоактивных изотопов Lu), химиотерапевтических средств, например, метотрексата, адриамицина, алкалоидов барвинка (винクリстина, винбластина, этопозида), доксорубицина, мелфалана, митомицина С, хлорамбуцила, даунорубицина или других интеркаляторов, ферментов и их фрагментов, таких как нуклеолитические ферменты, антибиотики и токсины, такие как низкомолекулярные токсины или ферментативно-активные токсины бактериального, грибкового, растительного или животного происхождения, включая их фрагменты и/или варианты, и различные противоопухолевые или противораковые средства, описываемые ниже. Другие цитотоксические средства описаны ниже. Туморицидное средство вызывает деструкцию опухолевых клеток.

"Химиотерапевтическое средство" является химическим соединением, применимым в лечении злокачественного новообразования. Примеры химиотерапевтических средств включают алкилирующие средства, такие как тиотепа и CYTOXAN® циклофосфамид; алкилсульфонаты, такие как бусульфан, импрусульфан и пипосульфан; азиридины, такие как бензодопа, карбоквон, метуредопа и уредопа; этиленимины и метиламеламины, включая алтretамин, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамид, триэтилентиофосфаорамид и триметилоломеламин; ацетогенины (особенно буллатацин и буллатацинон); дельта-9-тетрагидроканнабиол (дронабинол, MARINOL®); бета-лапахон; лапахол; колхицины; бетулиновую кислоту; камптотецин (включая синтетический аналог топотекан (HYCAMTIN®), CPT-11 (иринотекан,

CAMPTOSAR®), ацетилкамптотецин, скополетин и 9-аминокамптотецин); бриостатин; каллистатин; СС-1065 (включая его синтетические аналоги адозелезин, карзелезин и бизелезин); подофилютоксин; подофилиновую кислоту; тенипозид; криптофицины (в частности, криптофицин 1 и криптофицин 8); доластатин; дуокармицин (включая синтетические аналоги, KW-2189 и СВ1-TM1); элеутеробин; панкрактистатин; саркодиктин; спонгистатин; азотистые иприты, такие как хлорамбуцил, хлорнафазин, хлорфосфамид, эстрамустин, ифосфамид, мехлоретамин, гидрохлорид оксида мехлоретамина, мелфалан, новэмбихин, фенестерин, преднимустин, трофосфамид, урацилипрат; нитрозомочевины, такие как кармустин, хлорзотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин и ранимустин; антибиотики, такие как ендиноевые антибиотики (например, калихемицин, в частности, калихемицин гамма II и калихемицин омега II (см., например, Agnew, Chem Int'l. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994)); динемицин, включая динемицин А; эсперамицин; а также неокарциностатин хромофор и родственные хромопротеиновые хромофоры ендиноевых антибиотиков), аклациномизины, актиномицин, антрамицин, азасерин, блеомицины, кактиномицин, карабицин, карминомицин, карцинофилин, хромомицины, дактиномицин, даунорубицин, деторубицин, 6-диазо-5-оксо-1-норлейцин, доксорубицин ADRIAMYCIN® (включая морфолино-доксорубицин, цианоморфолино-доксорубицин, 2-пирролино-доксорубицин и дезоксидоксорубицин), эпирубицин, эзорубицин, идарубицин, марселломицин, митомицины, такие как митомицин С, микофеноловая кислота, ногаламицины, оливомицины, пепломицин, порфиромицин, пуромицин, квеламицин, родорубицин, стрептонигрин, стрептозоцин, туберцидин, убенимекс, зиностатин, зорубицин; антиметаболиты, такие как метотрексат и 5-фторурацил (5-FU); аналоги фолиевой кислоты, такие как деноптерин, метотрексат, птероптерин, триметрексат; аналоги пурина, такие как флударабин, 6-меркаптопурин, тиамиприн, тиогуанин; аналоги пиримидина, такие как анцитабин, азаситидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин, дидезоксиуридин, доксифлуридин, эноцитабин, флоксуридин; андрогены, такие как калустерон, пропионат дромостанолона, эпitiостанол, мепитиостан, тестолактон; антиадреналовые средства, такие как аминогlutетимид, митотан, трилостан; производное фолиевой кислоты, такое как фолиновая кислота; ацеглатон; альдофосфамид гликозид; аминолевулиновая кислота; энилурацил; амсакрин; бестрабуцил; бисантрен; эдатраксат; дефофамин; демеколцин; диазиквон; элфорнитин; ацетат эллиптиния; эпотион; этоглусид; нитрат галлия; гидроксимочевина; лентинан; лонидамин; майтансиниды, такие как майтансин и ансамитоцины; митогузон; митоксанtron; мопиданмол; нитраерин; пентостатин; фенамет; пиарубицин; лозоксанtron; 2-этилгидразид; прокарбазин; полисахаридный комплекс PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); разоксан; ризоксин; сизофирин; спирогерманий; тенуазоновую кислоту; триазиквон; 2,2'-трихлортриэтиламин; трихотецины (в частности, токсин Т-2, верракурин А, роридин А и ангидин); уретан; виндезин (ELDISINE®, FILDESIN®); дакарбазин; маниномустин; митобронитол; митолактол; пипоброман; дацитозин; арабинозид ("Ara-C"); тиотепа; таксоиды, например, TAXOL® паклитаксел (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), ABRAXANE™ без кремофора, состав сконструированных альбуминовых наночастиц паклитаксела (American Pharmaceutical Partners, Schaumberg, Illinois), и TAXOTERE® доксетаксел (Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France); хлорамбуцил; гемцитабин (GEMZAR®); 6-тиогуанин; меркаптопурин; метотрексат; аналоги платины, такие как цисплатин и карбоплатин; винбластин (VELBAN®); платину; этопозид (VP-16); ифосфамид; митоксанtron; винкристин (ONCOVIN®); оксалиплатин; лейковорин; винорелбин (NAVELBINE®); новантрон; эдатраксат; дауномицин; аминоптерин; ибандронат; ингибитор топоизомераз RFS 2000; дифторметилорнитин (DMFO); ретиноиды, такие как ретиноевая кислота; капецитабин (XELODA®); фармацевтически приемлем соли, кислоты или производные любого из указанных выше; а также комбинации двух или более из указанных выше, такие как CHOP, an аббревиатура для комбинированной терапии циклофосфамидом, доксорубицином, винкристином и преднизолоном, и FOLFOX, аббревиатура для схемы лечения оксалиплатином (ELOXATIN™) в комбинации с 5-FU и лейковорином.

В определение также включены противогормональные средства, регулирующие, снижающие, блокирующие или ингибирующие эффекты гормонов, которые могут стимулировать рост злокачественного новообразования, и зачастую находятся в форме системного или общего лечения. Они могут сами являться гормонами. Примеры включают антиэстрогены и селективные модуляторы рецепторов эстрогена (SERM), включая, например, тамоксифен (включая NOLVADEX® тамоксифен), EVISTA® ралоксифен, дролоксифен, 4-гидрокситамоксифен, триоксифен, кеоксифен, LY117018, онапристон и FARESTON® торемифен; антипрогестероны; ингибиторы рецепторов эстрогена (ERD); средства, супрессирующие или прекращающие работу яичников, например, агонисты гонадолибера (LHRH), такие как LUPRON® и ELIGARD® лейпролида ацетат, гозерелина ацетат, бусерелина ацетат и трилорелин; другие антиандrogenы, такие как флутамид, нилутамид, бикалутамид; и ингибиторы ароматазы, ингибирующие фермент ароматазу, регулирующую продукцию эстрогена в надпочечниках, такие как, например, 4(5)-имидазолы, аминоглютетимид, MEGASE® мегестрола ацетат, AROMASIN® экземестан, форместанин, фадрозол, RIVISOR® ворозол, FEMARA® летрозол, и ARIMIDEX® анастрозол. Кроме того, такое определение химиотерапевтических средств включает бисфосфонаты, такие как клодронат (например, BONEFOS® или OSTAC®), DIDROCAL® этидронат, NE-58095, ZOMETA® золедроновую кислоту/золедронат,

FOSAMAX® аледронат, AREDIA® памидронат, SKELID® тилудронат, или ACTONEL® ризедронат; а также троксасцитабин (аналог нуклеозида цитозина 1,3-диоксолан); антисмыловые олигонуклеотиды, в частности, ингибирующие экспрессию генов пути передачи сигнала, участвующего в аномальной клеточной пролиферации, такие как, например, РКС-альфа, Raf, H-Ras и receptor эпидермального фактора роста (EGF-R); вакцины, такие как вакцина THERATOPE®, и генотерапевтические вакцины, например, вакцина ALLOVECTIN®, вакцина LEUVECTIN® и вакцина VAXID®; ингибитор топоизомеразы 1 LURTOTECAN®; ABARELIX® rmRH; лапатиниб дитозилат (двойной низкомолекулярный ингибитор тирозинкиназ ErbB-2 и EGFR, также известный как GW572016); и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из указанных выше.

Как применяют в настоящем описании, термин "ингибирующее рост средство" относится к соединению или композиции, ингибирующей рост клетки *in vitro* или *in vivo*. Таким образом, ингибирующее рост средство может являться средством, значительно снижающим процентную долю клеток в S-фазе. Примеры ингибирующих рост средств включают средства, блокирующие прохождение клеточного цикла (в ином месте, чем S-фаза), такие как средства индуцирующие арест клеточного цикла в G1-фазе и в M-фазе. Классические блокаторы M-фазы включают алкалоиды барвинка (винкристин и винбластин), таксаны и ингибиторы топоизомеразы II, такие как доксорубицин, эпирубицин, даунорубицин, этопозид и блеомицин. Средства, вызывающие арест клеточного цикла в G1-фазе также приводят к аресту клеточно-го цикла в S-фазе, например, ДНК-алкилирующие средства, такие как тамоксифен, преднизон, дакарбазин, мехлоретамин, цисплатин, метотрексат, 5-фторурацил и ага-С. Дополнительную информацию можно найти в The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn and Israel, eds., Chapter 1, названной "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" Murakami et al. (WB Saunders: Philadelphia, 1995), в частности р. 13. Таксаны (паклитаксел и доцетаксел) являются противоопухолевыми лекарственными средствами, получаемыми из тисового дерева. Доцетаксел (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer), получаемый из тиса европейского, является полусинтетическим аналогом паклитаксела (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb). Паклитаксел и доцетаксел стимулируют сборку микротрубочек из димеров тубулина и стабилизируют микротрубочки, предотвращая деполимеризацию, что приводит к ингибиованию митоза в клетках.

Кроме того, индивидуумам, о которых известно, что они имеют высокий риск развития новых и рецидивирующих злокачественных новообразований, профилактически можно вводить средства, ингиби-рующие ангиогенез. Таким образом, аспект настоящего изобретения включает способы профилактики злокачественного новообразования у индивидуума, включающие введение индивидууму эффективного количества полипептида ENG и/или его производного или другого средства по настоящему изобретению, ингибирующего ангиогенез.

Конкретные нормальные физиологические процессы также ассоциированы с ангиогенезом, напри-мер, овуляция, менструация и плацентация. Белки по настоящему изобретению, ингибирующие ангиогенез, применимы в лечении заболевания с избыточной или аномальной стимуляцией эндотелиальных кле-ток. Эти заболевания включают, в качестве неограничивающих примеров, спайки в желудочно-кишечном тракте, атеросклероз, склеродермию и гипертрофические рубцы, т.е. келоиды. Они также применимы в лечении заболеваний, включающих ангиогенез как патологическое следствие, таких как болезнь кошачьих царапин (Rochele minalia quintosa) и язвы (*Helicobacter pylori*).

Общие белки, ингибирующие ангиогенез, можно использовать в качестве противозачаточных средств, снижая или предотвращая васкуляризацию матки, необходимую для имплантации эмбриона. Таким образом, настоящее изобретение относится к эффективному способу контроля рождаемости, когда женщины вводят количество ингибиторного белка, достаточное для предотвращения имплантации эм-бриона. В одном из аспектов способа контроля рождаемости количество ингибирующего белка, доста-точное для блокирования имплантации эмбриона, вводят до или после полового акта и оплодотворения, таким образом, предоставляемый эффективный способ контроля рождаемости, возможно способ, "исполь-зуемый на следующее утро". Хотя и не желая быть связанными этим утверждением, полагают, что инги-биование васкуляризации эндометрия матки препятствует имплантации бластоцисты. Аналогично ин-гибиование васкуляризации слизистой оболочки маточной трубы препятствует имплантации бластоци-сты, предотвращая возникновение внематочной беременности. Способы введения могут включать, в ка-честве неограничивающих примеров, пилюли, инъекции (внутривенные, подкожные, внутримышечные), суппозитории, вагинальные губки, вагинальные тампоны и внутриматочные контрацептивы. Также счи-тают, что введение средств по настоящему изобретению, ингибирующих ангиогенез, будет препятство-вать нормальной повышенной васкуляризации плаценты, а также развитию сосудов в успешно имплан-тировавшейся бластоцисте и развитию эмбриона и плода.

В глазу ангиогенез ассоциирован, например, с диабетической ретинопатией, синдромом Терри, дегенерацией желтого пятна, отторжением трансплантата роговицы, неоваскулярной глаукомой и ретро-лентальной фиброплазией. Терапевтические средства, представленные в настоящем описании, можно вводить интраокулярно или посредством другого местного введения в глаз. Другие заболевания, ассо-цированные с ангиогенезом в глазу, включают в качестве неограничивающих примеров, эпидемический кератоконъюнктивит, дефицит витамина А, излишнее ношение контактных линз, атопический кератит,

верхний лимбальный кератит, птеригиум, сухой кератоконъюнктивит, синдром Шегрена, розацеа, фликтенулез, сифилис, микобактериальную инфекцию, липидную дегенерацию, химические ожоги, бактериальные язвы, грибковые язвы, инфекции, вызванные вирусом простого герпеса, опоясывающий лишай, инфекции, вызванные простейшими, саркому Капоши, язву Мурена, краевую дегенерацию роговицы Терьена, краевой кератолиз, ревматоидный артрит, системную красную волчанку, полиартрит, травму, гранулематоз Вегенера, склерит, синдром Стивенса-Джонсона, пемфигоид, радиальную кератотомию, отторжение трансплантата роговицы, серповидноклеточную анемию, саркоид, эластическую псевдоксантому, болезнь Педжета, окклюзию вен, окклюзию артерий, обструктивное заболевание сонных артерий (carotid obstructive disease), хроническийuveititis/витреит, микобактериальные инфекции, болезнь Лайма, системную красную волчанку, синдром Терри, болезнь Илза, болезнь Бехчета, инфекции, вызывающие ретинит или хориоидит, предполагаемый глазной гистоплазмоз, болезнь Беста, миопию, ямки диска зрительного нерва, болезнь Штаргардта, промежуточныйuveititis, хроническое отслоение сетчатки, синдром повышенной вязкости крови, токсоплазмоз, осложнения после травмы и лазерной обработки. Другие заболевания включают, в качестве неограничивающих примеров, заболевания, ассоциированные с рубеозом (неоваскуляризацией угла передней камеры), и заболевания, вызываемые аномальной пролиферацией сосудисто-волокнистой или волокнистой ткани, включая все формы пролиферативной витреоретинопатии.

Состояния глаза можно подвергать лечению или профилактике, например, посредством системной, местной, внутриглазной инъекции терапевтического средства или посредством введения устройства с замедленным высвобождением, высвобождающего терапевтическое средство. Терапевтическое средство можно доставлять в фармацевтически приемлемом офтальмологическом наполнителе, таким образом, что соединение поддерживает в контакте с поверхностью глаза в течение достаточного периода времени, чтобы позволять соединению проникать через роговицу и внутренние области глаза, например, переднюю камеру, заднюю камеру, стекловидное тело, водянистую влагу, жидкую часть стекловидного тела, роговицу, радужку/ресничное тело, хрусталик, сосудистую оболочку глаза/сетчатку и склеру. Фармацевтически приемлемый офтальмологический наполнитель, например, может являться мазью, растительным маслом или инкапсулирующим материалом. Альтернативно, терапевтические средства по настоящему изобретению можно инъектировать напрямую в стекловидное тело и водянистую влагу. Кроме того, альтернативно, соединения можно вводить системно, например, посредством внутривенной инфузии или инъекции, для лечения глаза.

Можно вводить одно или несколько терапевтических средств. Способы по настоящему изобретению также включают совместное введение с другими лекарственными средствами, используемыми для лечения состояний глаза. При введении нескольких средств или комбинации средств и лекарственных средств, введение можно осуществлять одновременно или последовательно. Терапевтические средства и/или лекарственные средства можно вводить различными путями введения или одним и тем же путем введения. В одном из вариантов осуществления терапевтическое средство и лекарственное средство вводят вместе с офтальмологическим фармацевтическим составом.

В одном из вариантов осуществления терапевтическое средство применяют для лечения заболевания, ассоциированного с ангиогенезом в глазу, посредством конкурентного введения с другими лекарственными средствами, блокирующими ангиогенез с помощью фармакологических механизмов. Лекарственные средства, которые можно вводить одновременно с терапевтическим средством по настоящему изобретению, включают, в качестве неограничивающих примеров, пегаптаниб (Macugen™), ранибизумаб (Lucentis™), скваламина лактат (Evizor™), гепараназу и глюкокортикоиды (например, триамцинолон). Один из вариантов осуществления относится к способу лечения заболевания, ассоциированного с ангиогенезом, посредством введения офтальмологического фармацевтического состава, содержащего по меньшей мере одно терапевтическое средство, представленное в настоящем описании, и по меньшей мере одно из следующих лекарственных средств: пагаптаниб (Macugen™), ранибизумаб (Lucentis™), скваламина лактат (Evizor™), гепараназу и глюкокортикоиды (например, триацинолон).

Другие заболевания или нарушения.

В некоторых вариантах осуществления полипептиды ENG можно применять для лечения пациента, страдающего сердечно-сосудистым нарушением или состоянием, ассоциированным с BMP-9 или BMP-10, но не обязательно с сопутствующим ангиогенезом. Неограничивающие примеры нарушений этого типа включают заболевание сердца (включая заболевание миокарда, инфаркт миокарда, стенокардию и заболевание клапанов сердца); заболевание почек (включая хроническое воспаление клубочков, диабетическую почечную недостаточность и ассоциированное с волчанкой воспаление почек); нарушения кровяного давления (включая системный и легочный типы); нарушения, ассоциированные с атеросклерозом или другими типами артериосклероза (включая инсульт, геморрагический инсульт, субарахноидальное кровотечение, стенокардию и почечный артериосклероз); тромботические нарушения (включая тромбоз сосудов головного мозга, легочный тромбоз, тромботический некроз кишечника); осложнения диабета (включая диабетическую ретинопатию, диабетическую нефропатию, диабетическую полинейропатию, диабетическую гангрену и связанные с диабетом хронические инфекции); воспалительные нару-

шения сосудов (системную красную волчанку, ревматизм суставов, воспаление артерий суставов, крупноклеточное воспаление артерий, болезнь Кавасаки, болезнь Такаясу, синдром Чарга-Страсса и болезнь Шенлейн-Геноха); и нарушения сердца, такие как врожденное заболевание сердца, кардиомиопатия (например, дилатационная, гипертрофическая, рестриктивная кардиомиопатия) и застойная сердечная недостаточность. Полипептид ENG можно вводить индивидууму в отдельности или в комбинации с одним или несколькими средствами или способами терапии, например, терапевтическими средствами, применимыми для лечения BMP-9/10-ассоциированных сердечно-сосудистых нарушений и/или состояний. В одном из вариантов осуществления второе средство или способ терапии выбран из одного или нескольких из: ангиопластики, бета-блокаторов, гипотензивных средств, кардиотонических средств, антитромботических средств, вазодилататоров, антагонистов гормонов, антагонистов эндотелина, блокаторов кальциевых каналов, ингибиторов фосфодиэстеразы, антагонистов ангиотензина типа 2 и/или блокаторов/ингибиторов цитокинов.

В других вариантах осуществления полипептиды ENG могут быть применимы в лечении воспалительных нарушений или состояний, вероятно, связанных с BMP9, но еще не указанных выше. Примеры нарушений включают заболевание печени (включая острый гепатит, хронический гепатит и цирроз); торакальный или абдоминальный отек; хроническое заболевание поджелудочной железы; аллергии (включая аллергический ринит, астму, бронхит и атопический дерматит); болезнь Альцгеймера; синдром Рейно и диффузный склероз.

3. Составы и эффективные дозы.

Терапевтические средства, представленные в настоящем описании, можно составлять в фармацевтических композициях. Фармацевтические композиции для применения по настоящему изобретению можно составлять общепринятым образом с использованием одного или нескольких физиологически приемлемых носителей или эксципиентов. Такие составы, как правило, будут, по существу, апирогенными, в соответствии с большинством нормативных требований.

В определенных вариантах осуществления терапевтический способ по настоящему изобретению включает системное или местное введение композиции в виде имплантата или устройства. При введении терапевтическая композиция для применения по настоящему изобретению находится в апирогенной, физиологически приемлемой форме. Терапевтически применимые средства, иные, чем антагонисты передачи сигнала ENG, которые, необязательно, также можно включать в композицию, как описано выше, можно вводить одновременно или последовательно с рассматриваемыми соединениями (например, полипептидами ENG) в способах, представленных в настоящем описании.

Как правило, белковые терапевтические средства, представленные в настоящем описании, будут вводить парентерально и, в частности, внутривенно или подкожно. Фармацевтические композиции, подходящие для парентерального введения, могут содержать один или несколько полипептидов ENG в комбинации с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми стерильными изотоническими водными или неводными растворами, дисперсиями, супензиями или эмульсиями или стерильными порошками, которые можно восстанавливать в стерильные инъецируемые растворы или растворы непосредственно перед использованием, которые могут содержать антиоксиданты, буферы, бактериостатические средства, растворы, делающие состав изотоническим по отношению к крови предполагаемого реципиента, или супендирующие средства или загустители. Примеры подходящих водных и неводных носителей, которые можно использовать в фармацевтических композициях по настоящему изобретению, включают воду, этанол, полиолы (такие как глицерин, пропиленгликоль, полизиленгликоль и т.п.) и их подходящие смеси, растительные масла, такие как оливковое масло, и инъецируемые органические сложные эфиры, такие как этилолеат. Можно поддерживать подходящую текучесть, например, используя материалы для покрытия, такие как лецитин, поддерживая необходимый размер частиц в случае дисперсий и используя поверхностно-активные вещества.

В одном из вариантов осуществления полипептиды ENG, представленные в настоящем описании, вводят в офтальмологическом фармацевтическом составе. В некоторых вариантах осуществления офтальмологический фармацевтический состав является стерильным водным раствором, предпочтительно, с подходящей концентрацией для инъекции, или мазью. Такие мази, как правило, содержат один или несколько полипептидов ENG, представленных в настоящем описании, растворенных или супендируемых в стерильной фармацевтически приемлемой мазевой основе, такой как основа минеральное масло-белый вазелин. В композициях мазей в состав также можно включать безводный ланолин. В такие композиции мазей также предпочтительно добавляют тиомерсал или хлорбутанол в качестве противомикробных средств. В одном из вариантов осуществления стерильный водный раствор является таким, как описано в патенте США № 6071958.

Настоящее изобретение относится к составам, которые можно варыровать по включению кислот и оснований для корректировки pH и буферных средств для поддержания pH в узком диапазоне. В состав можно добавлять дополнительные лекарственные средства. Они включают, в качестве неограничивающих примеров, пагаптаниб, гепараназу, ранибизумаб или глюкокортикоиды. Офтальмологический фармацевтический состав по настоящему изобретению получают посредством асептических манипуляций, или осуществляют стерилизацию на подходящей стадии получения.

Композиции и составы, при желании, могут находиться в упаковке или дозирующем устройстве, которое может содержать одну или несколько стандартных лекарственных форм, содержащих активный ингредиент. Например, упаковка может содержать металлическую фольгу или полимерную пленку, такая как блистерная упаковка. Упаковку или дозирующее устройство можно дополнять инструкциями по введению.

4. Растворимые полипептиды ENG.

За исключением конкретных условий, природные белки ENG являются трансмембранными белками, при этом часть белка расположена вне клетки (внеклеточная часть), и часть белка расположена внутри клетки (внутриклеточная часть). Аспекты настоящего изобретения включают полипептиды, содержащие часть внеклеточного домена (ECD) ENG.

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретение относится к полипептидам ENG. Полипептиды ENG могут включать полипептид, состоящий из или содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную и, необязательно, по меньшей мере на 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичную укороченному домену ECD природного полипептида ENG, С-конец которого приходится на любую из аминокислот 333-378 SEQ ID NO: 1, и где полипептид не включает последовательность, состоящую из аминокислот 379-430 SEQ ID NO: 1. Необязательно, полипептид ENG не включает более 5 последовательных аминокислот или более 10, 20, 30, 40, 50, 52, 60, 70, 80, 90, 100, 150 или 200 или более последовательных аминокислот из последовательности, состоящей из аминокислот 379-586 SEQ ID NO: 1, или последовательности, состоящей из аминокислот 379-581 SEQ ID NO: 1. Не-процессированный полипептид ENG может включать или исключать любую сигнальную последовательность, а также любую последовательность, N-концевую по отношению к сигнальной последовательности. Как подробно представлено в настоящем описании, N-конец зрелого (процессированного) полипептида ENG может приходиться на любую из аминокислот 26-42 SEQ ID NO: 1. Примеры зрелых полипептидов ENG включают аминокислоты 25-377 SEQ ID NO: 23, аминокислоты 25-358 SEQ ID NO: 25 и аминокислоты 25-345 SEQ ID NO: 29. Аналогично, полипептид ENG может содержать полипептид, кодируемый нуклеотидами 73-1131 SEQ ID NO: 24, нуклеотидами 73-1074 SEQ ID NO: 26 или нуклеотидами 73-1035 SEQ ID NO: 30, или их молчащими вариантами или нуклеиновыми кислотами, гибридизующимися с последовательностью, комплементарной им, в строгих условиях гибридизации (как правило, такие условия известны в этой области, но могут включать, например, гибридизацию в 50% об./об. формамиде, 5-кратном SSC, 2% мас./об. блокирующем средстве, 0,1% N-лаурилсарказине и 0,3% SDS при 65°C в течение ночи и промывку, например, 5-кратным SSC при приблизительно 65°C). Таким образом, термин "полипептид ENG" включает выделенные внеклеточные части полипептидов ENG, их варианты (включая варианты, содержащие, например, не более 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30 или 35 замен аминокислот в последовательности, соответствующей аминокислотам 26-378 SEQ ID NO: 1), их фрагменты и слияные белки, содержащие что-либо из указанного выше, но в каждом случае, предпочтительно, любой из указанных выше полипептидов ENG будет сохранять значительную аффинность к BMP-9 и/или BMP-10. Как правило, полипептид ENG будут конструировать растворимыми в водных растворах при биологически значимых температурах, уровнях pH и осмолярности.

Данные, представленные в настоящем описании, свидетельствуют о том, что Fc-слияные белки, содержащие более короткие, укороченные с С-конца варианты полипептидов ENG, не проявляют значительного связывания с TGF- β 1 и TGF- β 3, но, вместо этого, проявляют более высокоаффинное связывание с BMP-9, со значимо меньшей скоростью диссоциации по сравнению с ENG(26-437)-Fc или Fc-слитым белком, содержащим полноразмерный ENG ECD. Конкретно, обнаруживали, что все укороченные с С-конца варианты, заканчивающиеся аминокислотами 378, 359 и 346 SEQ ID NO: 1, связываются с BMP-9 со значимо более высокой аффинностью (и связываются с BMP-10 с не меньшей аффинностью) по сравнению с ENG(26-437) или ENG(26-586). Однако, связывание с BMP-9 и BMP-10 полностью нарушалось более обширными укорочениями С-конца до аминокислот 332, 329 или 257. Таким образом, ожидают, что все полипептиды ENG, заканчивающиеся между аминокислотой 333 и аминокислотой 378, будут активными, но конструкции, заканчивающиеся аминокислотами 346 и 359 или между ними, могут являться наиболее активными. Предсказывали, что формы, заканчивающиеся аминокислотами 360 и 378 или между ними, имеют тенденцию к промежуточной аффинности связывания лиганда, показанной ENG(26-378). Ожидают улучшений в других ключевых параметрах в случае конкретных конструкций, заканчивающихся аминокислотами 333 и 378 или между ними, с учетом улучшений экспрессии белка и времени полуыведения, наблюдавшихся в случае ENG(26-346)-Fc по сравнению со слизыми белками, содержащими полноразмерный ECD ENG (см. примеры). Желательным может являться использование любого из этих укороченных вариантов в зависимости от клинических или экспериментальных условий.

Ожидают, что на N-конце полипептид ENG, начинающийся с аминокислоты 26 (начального глутамата) SEQ ID NO: 1 или перед ней, будет сохранять активность связывания лиганда. Как представлено в настоящем описании, N-концевое укорочение до аминокислоты 61 SEQ ID NO: 1 устраняет связывание лиганда, как и более обширные укорочения N-конца. Однако, как дополнительно представлено в настоящем описании, консенсусное моделирование первичных последовательностей ENG свидетельствует о том, что упорядоченная вторичная структура в области, определяемой аминокислотами 26-60 SEQ ID

NO: 1, ограничена бета-тяжем из четырех остатков, с высокой достоверностью предсказанным в положениях 42-45 SEQ ID NO: 1, и бета-тяжем из двух остатков, с очень низкой достоверностью предсказанным в положениях 28-29 SEQ ID NO: 1. Таким образом, активный полипептид ENG, предпочтительно, будет начинаться с (или до) аминокислоты 26 или с любой из аминокислот 27-42 SEQ ID NO: 1.

В совокупности, активная часть полипептида ENG может содержать аминокислотные последовательности 26-333, 26-334, 26-335, 26-336, 26-337, 26-338, 26-339, 26-340, 26-341, 26-342, 26-343, 26-344, 26-345 или 26-346 SEQ ID NO: 1, а также варианты этих последовательностей, начинающиеся с любой из аминокислот 27-42 SEQ ID NO: 1. Примеры полипептидов ENG содержат аминокислотные последовательности 26-346, 26-359 и 26-378 SEQ ID NO: 1. Также включены варианты в этих диапазонах, в частности, варианты, имеющие по меньшей мере 80, 85, 90, 95 или 99% идентичности по отношению к соответствующей части SEQ ID NO: 1. Полипептид ENG может не включать последовательность, состоящую из аминокислот 379-430 SEQ ID NO: 1.

Как описано выше, настоящее изобретение относится к полипептидам ENG, имеющим конкретную степень идентичности или схожести последовательности по отношению к природному полипептиду ENG. Для определения процента идентичности двух аминокислотных последовательностей, их выравнивают в целях оптимального сравнения (например, можно включать пропуски в одной или обеих первой и второй аминокислотной последовательности или последовательности нуклеиновой кислоты для оптимального выравнивания, и в целях сравнения можно не принимать во внимание негомологичные последовательности). Затем сравнивают аминокислотные остатки в соответствующих положениях аминокислот. Если положение в первой последовательности занято тем же аминокислотным остатком, что и соответствующее положение во второй последовательности, то молекулы являются идентичными в этом положении (как применяют в настоящем описании, "идентичность" аминокислоты эквивалентна "гомологии" аминокислоты). Процент идентичности между двумя последовательностями является функцией количества идентичных положений, общих для последовательностей, принимая во внимание количество пропусков и длину каждого пропуска, который необходимо включать для оптимального выравнивания двух последовательностей.

Сравнение последовательностей и определение процента идентичности и схожести двух последовательностей можно осуществлять с использованием математического алгоритма. (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., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heijne, G., Academic Press, 1987; и Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991).

В одном из вариантов осуществления процента идентичности двух аминокислотных последовательностей определяют с использованием алгоритма Needleman и Wunsch (J Mol. Biol. (48):444-453 (1970)), включенного в программу GAP в пакете программ GCG (доступном на <http://www.gcg.com>). В конкретном варианте осуществления в программе GAP используют следующие параметры: матрицу Blosum 62 или матрицу PAM250, штраф за открытие пропуска 16, 14, 12, 10, 8, 6 или 4 и штраф за удлинение пропуска 1, 2, 3, 4, 5 или 6. В еще одном варианте осуществления процента идентичности двух нуклеотидных последовательностей определяют с использованием программы GAP в пакете программ GCG (Devereux, J., et al., Nucleic Acids Res. 12(1):387 (1984)) (доступном на <http://www.gcg.com>). Примеры параметров включают использование матрицы NWGapDNA.CMP, штрафа за открытие пропуска 40, 50, 60, 70 или 80 и штрафа за удлинение пропуска 1, 2, 3, 4, 5 или 6. Если не указано иначе, процент идентичности двух аминокислотных последовательностей следует определять с помощью программы GAP с использованием матрицы Blosum 62, штрафа за открытие пропуска 10 и штрафа за удлинение пропуска 3, и если с помощью такого алгоритма нельзя вычислить желаемый процент идентичности, необходимо выбирать подходящую альтернативу, представленную в настоящем описании.

В другом варианте осуществления процента идентичности двух аминокислотных последовательностей определяют с использованием алгоритма E. Myers и W. Miller (CABIOS, 4:11-17 (1989)), включенного в программу ALIGN (версии 2.0), с использованием таблицы веса остатков PAM120, штрафа за удлинение пропуска 12 и штрафа за открытие пропуска 4.

Другой вариант осуществления для определения лучшего общего выравнивания между двумя аминокислотными последовательностями можно определять с использованием компьютерной программы FASTDB на основе алгоритма Brutlag et al. (Cotrop. App. Biosci., 6:237-245 (1990)). При выравнивании последовательностей запрашиваемая и рассматриваемая последовательности являются аминокислотными последовательностями. Результат указанного глобального выравнивания последовательностей представлен в терминах процента идентичности. В одном из вариантов осуществления идентичность аминокислотных последовательностей определяют с использованием компьютерной программы FASTDB на основе алгоритма Brutlag et al. (Cotrop. App. Biosci., 6:237-245 (1990)). В конкретном варианте осуществления параметры, используемые для вычисления процента идентичности и схожести выравниваемых аминокислот, включают: матрица=PAM 150, размер участка максимального совпадения=2, штраф за несовпадение=1, штраф за соединение=20, длина группы randomизации=0, граничный балл=1, штраф за откры-

тие пропуска=5 и штраф за удлинение пропуска=0,05.

В определенных вариантах осуществления полипептид ENG связывается с BMP-9 и BMP-10, и полипептид ENG не демонстрирует значительного связывания с TGF- β 1 или TGF- β 3. Связывание можно оценивать с использованием очищенных белков в растворе или в системе поверхностного плазмонного резонанса, такой как система BiacoreTM. Можно выбирать полипептиды ENG, проявляющие антиангиогенную активность. Биологические анализы на активность ингибиования ангиогенеза включают анализ хориоаллантоиновой мембранны куриного яйца (CAM), анализ ангиореактора мыши и анализы для измерения эффекта введения выделенных или синтезированных белков в отношении имплантированных опухолей. Анализ CAM, анализ ангиореактора мыши и другие анализы описаны в примерах.

Полипептиды ENG дополнительно могут включать какую-либо из различных лидерных последовательностей на N-конце. Такая последовательность будет позволять пептидам экспрессироваться и воздействовать на путь секреции в эукариотической системе. См., например, Ernst et al., патент США № 5082783 (1992). Альтернативно, нативную сигнальную последовательность ENG можно использовать для воздействия на экструзию из клетки. Возможные лидерные последовательности включают меллитин пчелы медоносной, TPA и нативные лидерные последовательности (SEQ ID NO: 13-15, соответственно). Примеры слитых белков ENG-Fc, включающих лидерную последовательность TPA, включают SEQ ID NO: 23, 25, 27 и 29. Процессинг сигнальных пептидов может варьироваться, помимо других переменных факторов, в зависимости от выбранной лидерной последовательности, используемого типа клеток и условий культивирования, и, таким образом, конкретные N-концевые участки инициации транскрипции в случае зрелых полипептидов ENG могут сдвигаться на 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот в направлении N-конца или C-конца. Примеры зрелых слитых белков ENG-Fc включают SEQ ID NO: 33-36, как представлено ниже с подчеркнутой частью полипептида ENG.

ENG(26-378)-hFc человека (укороченный Fc)

```

ETVHCD LQPVGPERDE VTYTTSQVSK GCVAQAPNAI LEVHVLFLEF PTGPSQLELT
LQASKQNGTW PREVLLVLSV NSSVFLHLQA LGIPLHLAYN SSLVTFQEPP GVNTTELPNF
PKTQILEWAA ERGPITSAAE LNDPQSILLR LGQAQGSLSF CMLEASQDMG RTLEWRPRTP
ALVRGCHLEG VAGHKEAHIL RVLPGHSAGP RTVTVKVELS CAPGDLDAVL ILQGPPYVSW
LIDANHNMQI WTTGEYSFKI FPEKNIRGFK LPDTPQGLLG EARMLNASIV ASFVELPLAS
IVSLHASSCG GRLQTSPAPI QTTPPKDTCS PELLMSLIQT KCADDAMTLV LKKELVATGG
GTHTCPPCPA PELLGGPSVF LFPFPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG
VEVHNAKTKP REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVSNKALPAP IEKTISKAKG
QPREPQVYTL PPSREEMTKN QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNQOPENNY KTPPPVLDSD
GSFFFLYSKLT VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSPGK (SEQ ID NO: 33)

```

ENG(26-359)-hFc человека

```

ETVHCD LQPVGPERDE VTYTTSQVSK GCVAQAPNAI LEVHVLFLEF PTGPSQLELT
LQASKQNGTW PREVLLVLSV NSSVFLHLQA LGIPLHLAYN SSLVTFQEPP GVNTTELPNF
PKTQILEWAA ERGPITSAAE LNDPQSILLR LGQAQGSLSF CMLEASQDMG RTLEWRPRTP
ALVRGCHLEG VAGHKEAHIL RVLPGHSAGP RTVTVKVELS CAPGDLDAVL ILQGPPYVSW
LIDANHNMQI WTTGEYSFKI FPEKNIRGFK LPDTPQGLLG EARMLNASIV ASFVELPLAS
IVSLHASSCG GRLQTSPAPI QTTPPKDTCS PELLMSLITG GGPKSCDKTH TCPCCPAPEL
LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE
QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPS
REEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN QOPENNYKTT PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK
SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PGK (SEQ ID NO: 34)

```

ENG(26-359)-hFc человека (укороченный Fc)

```

ETVHCD LQPVGPERDE VTYTTSQVSK GCVAQAPNAI LEVHVLFLEF PTGPSQLELT
LQASKQNGTW PREVLLVLSV NSSVFLHLQA LGIPLHLAYN SSLVTFQEPP GVNTTELPNF
PKTQILEWAA ERGPITSAAE LNDPQSILLR LGQAQGSLSF CMLEASQDMG RTLEWRPRTP
ALVRGCHLEG VAGHKEAHIL RVLPGHSAGP RTVTVKVELS CAPGDLDAVL ILQGPPYVSW

```

LIDANHNMQI WTTGEYSFKI FPEKNIRGFK LPDTPQGLLG EARMLNASIV ASFVELPLAS
 IVSLHASSCG GRLQTSPAPI QTPPKDTCS PELLMSLITG GGTHTCPPCP APPELLGGPSV
 FLFPPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY
 RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK
 NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTPPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG
 NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGK (SEQ ID NO: 35)
 ENG(26-346)-hFc человека (укороченный Fc)
 ETVHCD LQPVGPERDE VTYTTSQVSK GCVAQAPNAI LEVHVLFLEF PTGPSQLELT
 LQASKQNGTW PREVLLVLSV NSSVFLHLQA LGIPLHLAYN SSLVTFQEPP GVNTTELPSE
 PKTQILEWAA ERGPITSAAE LNDPQSILLR LGQAQGSLSF CMLEASQDMG RTLEWRPRTE
 ALVRGCHLEG VAGHKEAHIL RVLPGHSAGP RTVTVKVELS CAPGDLDAVL ILQGPPYVSW
 LIDANHNMQI WTTGEYSFKI FPEKNIRGFK LPDTPQGLLG EARMLNASIV ASFVELPLAS
 IVSLHASSCG GRLQTSPAPI QTPPKDTCS PELLMSLITG GGTHTCPPCP APPELLGGPSV
 SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW
 LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP SREEMTKNQV SLTCLVKGFY
 PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSDGS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH
 NHYTQKSLSL SPGK (SEQ ID NO: 36)

В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрены конкретные мутации полипептидной ENG таким образом, что изменяют гликозилирование полипептида. Можно выбирать такие мутации таким образом, чтобы встраивать или удалять один или несколько участков гликозилирования, таких как O-связанные или N-связанные участки гликозилирования. Как правило, аспарагин-связанные участки распознавания гликозилирования содержат трипептидную последовательность, аспарагин-X-треонин (или аспарагин-X-серин) (где "X" является любой аминокислотой), специфически распознаваемую соответствующими клеточными ферментами гликозилирования. Изменение также можно осуществлять посредством добавления или замены одного или нескольких остатков серина или треонина в последовательность полипептида ENG дикого типа (в случае O-связанных участков гликозилирования). Множество замен или делеций аминокислот в одном или обоих первом или третьем положениях аминокислот участка распознавания гликозилирования (и/или делеция аминокислоты во втором положении) приводит к отсутствию гликозилирования в модифицированной трипептидной последовательности. Другими способами повышения количества молекул углеводов на полипептиде ENG является химическое или ферментативное присоединение гликозидов к полипептиду ENG. В зависимости от используемого способа присоединения, сахара можно присоединять к (a) аргинину и гистидину; (b) свободным карбоксильным группам; (c) свободным сульфидрильным группам, таким как группы цистеина; (d) свободным гидроксильным группам, таким как группы серина, треонина или гидроксипролина; (e) ароматическим остаткам, таким как фенилаланин, тирозин или триптофан; или (f) амидной группе глутамина. Эти способы описаны в WO 87/05330, опубликованном 11 сентября 1987 года, и Aplin and Wriston (1981) CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306, включенных в настоящее описание посредством ссылок. Удаление одной или нескольких молекул углеводов, присутствующих на полипептиде ENG, можно осуществлять химически и/или ферментативно. Химическое дегликозилирование может включать, например, подвергание полипептида ENG воздействию соединения трифторметансульфоновой кислоты или эквивалентного соединения. Эта обработка приводит к расщеплению большинства или всех Сахаров, за исключением соединяющего сахара (N-ацетилглюкозамина или N-ацетилгалактозамина), одновременно оставляя аминокислотную последовательность интактной. Химическое дегликозилирование дополнительно описано Hakimuddin et al. (1987) Arch. Biochem. Biophys. 259:52 и Edge et al. (1981) Anal. Biochem. 118:131. Ферментативное расщепление молекул углеводов на полипептидах ENG можно осуществлять с использованием различных эндо- и экзо-гликозидаз, как описано Thotakura et al. (1987) Meth. Enzymol. 138:350. Последовательность полипептида ENG при необходимости можно корректировать в зависимости от типа используемой системы экспрессии, т.к. все из клеток млекопитающих, дрожжей, насекомых и растений могут встраивать различные профили гликозилирования, на которые может влиять аминокислотная последовательность пептида. В основном, полипептиды ENG для применения у людей будут экспрессироваться в линии клеток млекопитающих, обеспечивающей правильное гликозилирование, такой как линии клеток HEK293 или CHO, хотя ожидают, что другие экспрессирующие линии клеток млекопитающих, линии дрожжевых клеток со сконструированными ферментами гликозилирования и клетки насекомых также будут применимыми.

В настоящем изобретении дополнительно предусмотрен способ получения мутантов, в частности, наборов комбинаторных мутантов полипептида ENG, а также укороченные мутанты; совокупности комбинаторных мутантов особенно применимы для идентификации функционального варианта последовательности. Целью скрининга таких комбинаторных библиотек может являться получение, например, вариантов полипептида ENG, которые могут действовать как агонисты или антагонисты, или альтернативно, которые вместе обладают новыми активностями. Ниже представлены различные анализы для скрининга, и такие анализы можно использовать для оценки вариантов. Например, вариант полипептида ENG можно подвергать скринингу на способность связываться с лигандом ENG для предотвращения связывания лиганда ENG с полипептидом ENG или для противодействия передачи сигнала, вызываемой лигандом ENG. Активность полипептида ENG или его вариантов также можно тестировать в клеточном анализе или анализе *in vivo*, в частности, любом из анализов, описываемых в примерах.

Можно получать варианты, полученные комбинаторно, имеющие селективную или, как правило, повышенную активность относительно полипептида ENG, содержащего внеклеточный домен природного полипептида ENG. Аналогично, с помощью мутагенеза можно получать варианты, имеющие времена полужизни в сыворотке, значительно отличающиеся от соответствующего полипептида ENG дикого типа. Например, измененный белок можно делать более стабильным или менее стабильным к протеолитической деградации или другим процессам, приводящим к деструкции или иной элиминации или инактивации нативного полипептида ENG. Такие варианты и кодирующие их гены можно использовать для изменения уровней полипептидов ENG посредством модуляции времени полужизни полипептидов ENG. Например, короткое время полужизни может приводить к более временными биологическим эффектам и делать возможным более жесткий контроль уровней рекомбинантного полипептида ENG у пациента. В слитый белок Fc можно встраивать мутации в линкере (при его наличии) и/или Fc-части для изменения времени полужизни белка.

Можно получать комбинаторную библиотеку с помощью вырожденной библиотеки генов, кодирующих библиотеку полипептидов, каждый из которых включает, по меньшей мере, часть потенциальных последовательностей полипептида ENG. Например, смесь синтетических олигонуклеотидов можно ферментативно лигировать в последовательности генов таким образом, что вырожденный набор потенциальных нуклеотидных последовательностей полипептида ENG экспрессируется в виде отдельных полипептидов, или альтернативно, в виде набора более крупных слитых белков (например, в случае фагового дисплея).

Существует множество способов, с помощью которых можно получать библиотеку потенциальных вариантов полипептидов ENG из вырожденной олигонуклеотидной последовательности. Химический синтез вырожденной последовательности гена можно осуществлять с помощью автоматизированного ДНК-синтезатора, а затем синтетические гены можно лигировать в подходящий вектор для экспрессии. Синтез вырожденных олигонуклеотидов хорошо известен в этой области (см. например, Narang, SA (1983) *Tetrahedron* 39:3; Itakura et al., (1981) *Recombinant DNA, Proc. 3rd Cleveland Sympos. Macromolecules*, ed. AG Walton, Amsterdam: Elsevier pp273-289; Itakura et al. (1984) *Annu. Rev. Biochem.* 53:323; Itakura et al. (1984) *Science* 198:1056; Ike et al. (1983) *Nucleic Acid Res.* 11:477). Такие способы используют для прямой оценки других белков (см., например, Scott et al. (1990) *Science* 249:386-390; Roberts et al. (1992) *PNAS USA* 89:2429-2433; Devlin et al. (1990) *Science* 249: 404-406; Cwirla et al. (1990) *PNAS USA* 87: 6378-6382; а также патенты США №№: 5223409, 5198346 и 5096815).

Альтернативно, можно использовать другие формы мутагенеза для получения комбинаторной библиотеки. Например, варианты полипептида ENG можно получать и выделять из библиотеки посредством скрининга с использованием, например, аланин-сканирующего мутагенеза и т.п. (Ruf et al. (1994) *Biochemistry* 33:1565-1572; Wang et al. (1994) *J. Biol. Chem.* 269:3095-3099; Balint et al. (1993) *Gene* 137:109-118; Grodberg et al. (1993) *Eur. J. Biochem.* 218:597-601; Nagashima et al. (1993) *J. Biol. Chem.* 268:2888-2892; Lowman et al. (1991) *Biochemistry* 30:10832-10838; и Cunningham et al. (1989) *Science* 244:1081-1085), линкер-сканирующего мутагенеза (Gustin et al. (1993) *Virology* 193:653-660; Brown et al. (1992) *Mol. Cell Biol.* 12:2644-2652; McKnight et al. (1982) *Science* 232:316); насыщающего мутагенеза (Meyers et al. (1986) *Science* 232:613); ПЦР-мутагенеза (Leung et al. (1989) *Method Cell Mol Biol* 1:11-19) или случайного мутагенеза, включая химический мутагенез, и т.д. (Miller et al. (1992) *A Short Course in Bacterial Genetics*, CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY; и Greener et al. (1994) *Strategies in Mol Biol* 7:32-34). Линкер-сканирующий мутагенез, в частности, в комбинаторных условиях, является привлекательным способом идентификации укороченных (бионактивных) форм полипептидов ENG.

В этой области известен широкий диапазон способов скрининга продуктов генов комбинаторных библиотек, полученных с помощью точечных мутаций и укорочений, и, в связи с этим, скрининга библиотек кДНК на продукты генов, имеющие конкретное свойство. Такие способы, как правило, можно будет адаптировать для быстрого скрининга библиотек генов, полученных посредством комбинаторного мутагенеза полипептидов ENG. Наиболее широко используемые способы скрининга больших библиотек генов, как правило, включают клонирование библиотеки генов в реплицируемые экспрессирующие векторы, трансформации соответствующих клеток с получением библиотеки векторов и экспрессию комбинаторных генов в условиях, в которых определение желаемой активности способствует относительно

легкому выделению вектора, кодирующего ген, продукт которого определяли. Предпочтительные анализы включают анализы связывания лиганда ENG и анализы лиганд-опосредованной передачи сигнала в клетке.

В определенных вариантах осуществления полипептиды ENG по настоящему изобретению дополнительно могут содержать посттрансляционные модификации в дополнение к любым, от природы присущим в полипептидах ENG. Такие модификации включают, в качестве неограничивающих примеров, ацетилирование, карбоксилирование, гликозилирование, фосфорилирование, липидизацию, пегилирование (полиэтиленгликолем) и ацилирование. В результате модифицированные полипептиды ENG могут содержать неаминокислотные элементы, такие как полиэтиленгликоли, липиды, поли- или моносахарид и фосфаты. Эффекты таких неаминокислотных элементов в отношении функциональности полипептида ENG можно тестировать, как представлено в настоящем описании, для других вариантов полипептида ENG. Когда полипептид ENG продуцируется в клетках посредством расщепления образующейся формы полипептида ENG, посттрансляционный процессинг также может быть важен для правильного фолдинга и/или функционирования белка. Различные клетки (такие как CHO, HeLa, MDCK, 293, WI38, NIH-3T3 или HEK293) имеют конкретный клеточный аппарат и характерные механизмы для таких посттрансляционных активностей, и их можно выбирать для обеспечения правильной модификации и процессинга полипептидов ENG.

В определенных аспектах функциональные варианты или модифицированные формы полипептидов ENG включают слитые белки, имеющие, по меньшей мере, часть полипептидов ENG и один или несколько слитых доменов. Хорошо известные примеры таких слитых доменов включают, в качестве неограничивающих примеров, полигистидин, Glu-Glu, глутатион-S-трансферазу (GST), тиоредоксин, протеин A, протеин G, константную область тяжелой цепи иммуноглобулина (Fc), мальтозо-связывающий белок (MBP) или сывороточный альбумин человека. Слитый домен можно выбирать таким образом, чтобы он придавал желательную активность. Например, некоторые слитые домены особенно пригодны для выделения слитых белков посредством аффинной хроматографии. В целях аффинной очистки используют соответствующие матрицы для аффинной хроматографии, такие как глутатион-, амилаза- и никель- или кобальт-конъюгированные смолы. Многие из таких матриц доступны в форме "набора", такие как система очистки Pharmacia GST и система QIAexpress (Qiagen), применимые с партнерами по слиянию с (HIS₆). В качестве другого примера, слитый домен можно выбирать таким образом, чтобы он облегчал определение полипептидов ENG.

Примеры таких доменов для определения включают различные флуоресцентные белки (например, GFP), а также "эпитопные метки", как правило, являющиеся короткими пептидными последовательностями, для которых доступно специфическое антитело. Хорошо известные эпитопные метки, для которых легкодоступны специфические моноклональные антитела, включают метки FLAG, гемагглютинина вируса гриппа (HA) и с-мус. В некоторых случаях слитые домены имеют участок расщепления протеазой, такой как в случае фактора Xa или тромбина, позволяющей соответствующей протеазе частично расщеплять слитые белки и, таким образом, высвобождать из них рекомбинантные белки. Затем высвобожденные белки можно отделять от слитого домена с помощью последующего хроматографического расщепления. В конкретных предпочтительных вариантах осуществления полипептид ENG подвергают слиянию с доменом, стабилизирующим полипептид ENG *in vivo* (домен-“стабилизатор”). Термин “стабилизирующий” означает что-либо, повышающее время полужизни в сыворотке, независимо от того, является ли это результатом снижения деструкции, снижения выведения почками или другого фармакокинетического эффекта. Известно, что слияние с Fc-частью иммуноглобулина придает желаемые фармакокинетические свойства широкому диапазону белков.

Аналогично, слияние с сывороточным альбумином человека может придавать желаемые свойства. Другие типы слитых доменов, которые можно выбирать, включают домены мультимеризации (например, димеризации, тетramerизации) и функциональные домены.

В качестве конкретных примеров, настоящее изобретение относится к слитым белкам, содержащим варианты полипептидов ENG, слитые с одной из двух последовательностей домена Fc (например, SEQ ID NO: 11, 12). Необязательно, домен Fc имеет одну или несколько мутаций в таких остатках, как Asp-265, Lys-322 и Asn-434 (пронумерованных согласно соответствующему полноразмерному IgG). В конкретных случаях мутантный домен Fc, имеющий одну или несколько из этих мутаций (например, мутацию Asp-265), имеет сниженную способность к связыванию с рецептором Fe γ относительно домена Fc дикого типа. В других случаях мутантный домен Fc, имеющий одну или несколько из этих мутаций (например, мутацию Asn-434), имеет повышенную способность к связыванию с Fc-рецептором, связанным с МНС класса I, (FcRN) относительно домена Fc дикого типа.

Следует понимать, что различные элементы слитых белков можно располагать любым образом, соответствующим желаемой функциональности. Например, полипептид ENG можно помещать на C-конец гетерологичного домена, или, альтернативно, гетерологичный домен можно помещать на C-конец полипептида ENG. Домен полипептида ENG и гетерологичный домен могут не являться смежными в слитом белке, и на C- или N-конец домена или между доменами можно включать дополнительные домены или аминокислотные последовательности.

Как применяют в настоящем описании, термин "домен Fc иммуноглобулина" или просто "Fc" следует понимать как означающий карбокси-концевую часть константной области цепи иммуноглобулина, предпочтительно - константной области тяжелой цепи иммуноглобулина или ее части. Например, Fc-область иммуноглобулина может содержать 1) домен CH1, домен CH2 и домен CH3, 2) домен CH1 и домен CH2, 3) домен CH1 и домен CH3, 4) домен CH2 и домен CH3 или 5) комбинацию двух или более доменов и шарнирной области иммуноглобулина. В предпочтительном варианте осуществления Fc-область иммуноглобулина содержит, по меньшей мере, шарнирную область иммуноглобулина, домен CH2 и домен CH3, и, предпочтительно, в ней отсутствует домен CH1.

В одном из вариантов осуществления классом иммуноглобулина, из которого получают константную область тяжелой цепи, является IgG (Ig γ) (подклассы γ 1, 2, 3 или 4). Можно использовать другие классы иммуноглобулина, IgA (Ig α), IgD (Ig δ), IgE (Ig ϵ) и IgM (Ig μ). Выбор подходящей константной области тяжелой цепи иммуноглобулина подробно описан в патентах США №№ 5541087 и 5726044. Считают, что выбор конкретных последовательностей константной области тяжелой цепи иммуноглобулина из конкретных классов и подклассов иммуноглобулинов для достижения конкретного результата находится в пределах знаний в этой области. Часть конструкции ДНК, кодирующей область Fc иммуноглобулина, предпочтительно, содержит, по меньшей мере, часть шарнирного домена, и предпочтительно - по меньшей мере, часть домена CH₃ Fc гамма или гомологичных доменов в любом из IgA, IgD, IgE или IgM.

Кроме того, предполагают, что замена или делеция аминокислот в константных областях тяжелой цепи иммуноглобулина может быть применима в практическом осуществлении способов и композиций, представленных в настоящем описании. Одним из примеров будет встраивание замен аминокислот в верхнюю область CH2 для получения варианта Fc со сниженной аффинностью к Fc-рецепторам (Cole et al. (1997) J. Immunol. 159:3613).

В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к выделенным и/или очищенным формам полипептидов ENG, выделенным или иным образом, по существу, не содержащим (например, по меньшей мере на 80, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% не содержащим) другие белки и/или другие виды полипептидов ENG. Как правило, полипептиды ENG будут получать посредством экспрессии из рекомбинантных нуклеиновых кислот.

В определенных вариантах осуществления изобретение включает нуклеиновые кислоты, кодирующие растворимые полипептиды ENG, содержащие кодирующую последовательность для внеклеточной части белка ENG. В дополнительных вариантах осуществления настоящее изобретение также относится к клетке-хозяину, содержащей такие нуклеиновые кислоты. Клетка-хозяин может являться любой прокариотической или эукариотической клеткой. Например, полипептид по настоящему изобретению можно экспрессировать в бактериальных клетках, таких как *E. coli*, клетках насекомых (например, с использованием бакуловирусной системы экспрессии), дрожжах или клетках млекопитающих. Другие подходящие клетки-хозяева известны специалистам в этой области. Таким образом, некоторые варианты осуществления настоящего изобретения дополнительно относятся к способам получения полипептидов ENG. Установлено, что слитые белки ENG-Fc, приведенные в SEQ ID NO: 25 и 29 и экспрессируемые в клетках CHO, имеют мощную антиангиогенную активность.

5. Нуклеиновые кислоты, кодирующие полипептиды ENG.

В определенных аспектах настоящее изобретение относится к выделенным и/или рекомбинантным нуклеиновым кислотам, кодирующими любые из полипептидов ENG, включая фрагменты, функциональные варианты и слитые белки, представленные в настоящем описании. Например, SEQ ID NO: 2 и 4 кодируют длинную и короткую изоформы, соответственно, нативного полипептида-предшественника ENG человека, в то время как SEQ ID NO: 30 кодирует один вариант внеклеточного домена ENG, слитого с доменом Fc IgG1. Рассматриваемые нуклеиновые кислоты могут являться одноцепочечными или двухцепочечными. Такие нуклеиновые кислоты могут являться молекулами ДНК или РНК. Эти нуклеиновые кислоты можно использовать, например, в способах получения полипептидов ENG или непосредственно в качестве терапевтических средств (например, в подходах антисмысловой, РНК- или генотерапии).

Следует понимать, что в определенных аспектах рассматриваемые нуклеиновые кислоты, кодирующие полипептиды ENG, дополнительно включают нуклеиновые кислоты, являющиеся вариантами SEQ ID NO: 24, 26, 28 или 30. Варианты нуклеотидных последовательностей включают последовательности, отличающиеся одной или несколькими заменами, вставками или делециями нуклеотидов, такие как аллельные варианты.

В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к выделенным или рекомбинантным последовательностям нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичным SEQ ID NO: 24, 26, 28 или 30. Специалисту в этой области будет понятно, что последовательности нуклеиновой кислоты, комплементарные SEQ ID NO: 24, 26, 28 или 30, и варианты SEQ ID NO: 24, 26, 28 или 30 также входят в объем настоящего изобретения. В дополнительных вариантах осуществления последовательности нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению могут являться выделенными, рекомбинантными и/или слитыми с гетерологичной нуклеотидной последователь-

ностью или находиться в библиотеке ДНК.

В других вариантах осуществления нуклеиновые кислоты по настоящему изобретению также включают нуклеотидные последовательности, в очень строгих условиях гибридизующиеся с нуклеотидными последовательностями, приведенными в SEQ ID NO: 24, 26, 28 или 30, последовательностями, комплементарными SEQ ID NO: 24, 26, 28 или 30, или их фрагментами. Как указано выше, специалисту в этой области будет понятно, что можно варыировать соответствующую строгость условий, способствующих гибридизации ДНК. Например, можно осуществлять гибридизацию в 6,0-кратном хлориде натрия/цитрате натрия (SSC) при приблизительно 45°C с последующей промывкой 2,0-кратным SSC при 50°C. Например, концентрацию соли на этапе промывки можно выбирать из условий от низкой строгости при приблизительно 2,0-кратном SSC при 50°C до высокой строгости при приблизительно 0,2-кратном SSC при 50°C. Кроме того, температуру на этапе промывки можно повышать с условий с низкой строгостью при комнатной температуре приблизительно 22°C до условий с высокой строгостью при приблизительно 65°C. Можно варыировать температуру и концентрацию соли или можно поддерживать постоянную температуру или концентрацию соли, одновременно меняя другую переменную. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения относится к нуклеиновым кислотам, гибридизующимся в условиях с низкой строгостью при 6-кратном SSC при комнатной температуре с последующей промывкой в 2-кратном SSC при комнатной температуре.

Выделенные нуклеиновые кислоты, отличающиеся от нуклеиновых кислот, приведенных SEQ ID NO: 24, 26, 28 или 30, по причине вырожденности генетического кода, также входят в объем настоящего изобретения. Например, ряд аминокислот обозначен несколькими триплетами. Кодоны, обозначающие одну и ту же аминокислоту, или синонимичные кодоны (например, CAU и CAC являются синонимичными кодонами для гистидина) могут приводить к "молчащим" мутациям, не влияющим на аминокислотную последовательность белка. Однако, ожидают, что в клетках млекопитающих будут существовать полиморфизмы последовательности ДНК, приводящие к изменениям в аминокислотных последовательностях рассматриваемых белков.

Специалисту в этой области будет понятно, что эти изменения одного или нескольких нуклеотидов (до приблизительно 3-5% нуклеотидов) нуклеиновых кислот, кодирующих конкретный белок, могут существовать у индивидуумов указанных видов как результат природных аллельных вариантов. Любое и все такие изменения нуклеотидов и образующиеся полиморфизмы аминокислот входят в объем настоящего изобретения.

В определенных вариантах осуществления рекомбинантные нуклеиновые кислоты по настоящему изобретению могут быть функционально связаны с одной или несколькими регуляторными нуклеотидными последовательностями в экспрессирующую конструкцию. Регуляторные нуклеотидные последовательности, как правило, будут соответствовать клетке-хозяину, используемой для экспрессии. В этой области известно множество типов соответствующих экспрессирующих векторов и подходящих регуляторных последовательностей для различных клеток-хозяев. Как правило, указанные одна или несколько регуляторных нуклеотидных последовательностей могут включать, в качестве неограничивающих примеров, промоторные последовательности, лидерные или сигнальные последовательности, участки связывания рибосомы, последовательности инициации и терминации транскрипции, последовательности инициации и терминации трансляции и последовательности энхансеров или активаторов. Конститутивные или индуцибельные промоторы, известные в этой области, включены в настоящее изобретение. Промоторы могут являться природными промоторами или гибридными промоторами, в которых комбинируют элементы нескольких промоторов. Экспрессирующая конструкция может присутствовать в клетке на эписоме, такая как плазмида, или экспрессирующую конструкцию можно встраивать в хромосому. В предпочтительном варианте осуществления экспрессирующий вектор содержит ген селективного маркера, делающий возможной селекцию трансформированных клеток-хозяев. Гены селективных маркеров хорошо известны в этой области и будут варыироваться в зависимости от используемой клетки-хозяина.

В определенных аспектах настоящего изобретения рассматриваемую нуклеиновую кислоту предстаивают в экспрессирующем векторе, содержащем нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид ENG, и функционально связанную по меньшей мере с одной регуляторной последовательностью. Регуляторные последовательности известны в этой области, и их выбирают для воздействия на экспрессию полипептида ENG. Таким образом, термин "регуляторная последовательность" включает промоторы, энхансеры и другие элементы контроля экспрессии. Примеры регуляторных последовательностей описаны в Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology, Academic Press, San Diego, CA (1990). Например, в этих векторах для экспрессии последовательностей ДНК, кодирующих полипептид ENG, можно использовать любую из широкого спектра последовательностей контроля экспрессии, контролирующих экспрессию последовательности ДНК при функциональной связи с ней. Такие применимые последовательности контроля экспрессии, включают, например, ранние и поздние промоторы SV40, промотор tet, предранний промотор аденоовириуса или цитомегаловириуса, промоторы RSV, систему lac, систему trp, систему TAC или TRC, промотор T7, экспрессия которого регулируется РНК-полимеразой T7, основные области оператора и промотора фага лямбда, контрольные области белка оболочки fd, промотор 3-фосфоглицераткиназы или других гликолитических ферментов, промоторы кислой

фосфатазы, например, *Pho5*, промоторы факторов α -скрещивания дрожжей, полигедроновый промотор бакуловирусной системы и другие последовательности, о которых известно, что они контролируют экспрессию генов прокариотических или эукариотических клеток или их вирусов, и различные их комбинации. Следует понимать, что дизайн экспрессирующего вектора может зависеть от таких факторов как выбор клетки-хозяина, подлежащей трансформации, и/или типа белка, экспрессия которого является желательной. Кроме того, также необходимо принимать во внимание копийность вектора, способность контролировать эту копийность и экспрессию любого другого белка, кодируемого вектором.

Рекомбинантную нуклеиновую кислоту, включенную в настоящее изобретение, можно получать посредством лигирования клонированного гена или его части, в вектор, подходящий для экспрессии в прокариотических клетках, эукариотических клетках (дрожжей, птиц, насекомых или млекопитающих) или и тех, и других. Средства экспрессии для получения рекомбинантного полипептида ENG включают плазмиды и другие векторы. Например, подходящие векторы включают плазмиды следующих типов: плазмиды, полученные из pBR322, плазмиды, полученные из pEMBL, плазмиды, полученные из pEX, плазмиды, полученные из pBTac, и плазмиды, полученные из pUC, для экспрессии в прокариотических клетках, таких как *E. coli*.

Некоторые векторы для экспрессии в клетках млекопитающих содержат прокариотические последовательности для облегчения размножения вектора в бактериях и одну или несколько эукариотических единиц транскрипции, экспрессирующихся в эукариотических клетках. Векторы, полученные из pcDNA1/amp, pcDNA1/neo, pRc/CMV, pSV2 gpt, pSV2neo, pSV2-dhfr, pTk2, pRSVneo, nMSG, pSVT7, pko-neo и pHug, являются примерами векторов для экспрессии в клетках млекопитающих, подходящих для трансфекции эукариотических клеток. Некоторые из этих векторов модифицируют с использованием последовательностей из бактериальных плазмид, таких как pBR322, для облегчения репликации и селекции по резистентности к лекарственному средству в прокариотических и эукариотических клетках. Альтернативно, для транзиторной экспрессии белков в эукариотических клетках можно использовать производные вирусов, таких как вирус папилломы крупного рогатого скота (BPV-1) или вирус Эпштейна-Барр (pHEBo, производное pREP и p205). Примеры других вирусных (включая ретровирусных) систем экспрессии можно найти ниже в описании систем доставки для генотерапии. В этой области хорошо известны различные способы, используемые в получении плазмид и трансформации организмов-хозяев. Другие подходящие системы экспрессии для прокариотических и эукариотических клеток, а также общие рекомбинантные способы см. в Molecular Cloning A Laboratory Manual, 3rd Ed., ed. by Sambrook, Fritsch and Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001). В некоторых случаях, желательной может являться экспрессия рекомбинантных полипептидов с использованием бакуловирусной системы экспрессии. Примеры таких бакуловирусных систем экспрессии включают векторы, полученные из pVL (такие как pVL1392, pVL1393 и pVL941), векторы, полученные из pAcUW (такие как pAcUW1), и векторы, полученные из pBlueBac (такие как β -gal-содержащие pBlueBac III).

В предпочтительном варианте осуществления для получения рассматриваемых полипептидов ENG в клетках СНО будут конструировать вектор, такой как вектор Pcmv-Script (Stratagene, La Jolla, Calif.), векторы pcDNA4 (Invitrogen, Carlsbad, Calif.) и векторы pCI-neo (Promega, Madison, Wise.). Как будет очевидно, рассматриваемые генные конструкции можно использовать, чтобы вызывать экспрессию рассматриваемых полипептидов ENG в клетках, выращиваемых в культуре, например, для получения белков, включающих слитые белки или варианты белков, для очистки.

Настоящее изобретение также относится к клетке-хозяину, трансфицированной с использованием рекомбинантного гена, включающего кодирующую последовательность (например, SEQ ID NO: 24, 26, 28 или 30) для одного или нескольких рассматриваемых полипептидов ENG. Клетка-хозяин может являться любой прокариотической или эукариотической клеткой. Например, полипептид ENG, представленный в настоящем описании, можно экспрессировать в бактериальных клетках, таких как *E. coli*, клетках насекомых (например, с использованием бакуловирусной системы экспрессии), дрожжах или клетках млекопитающих. Специалистам в этой области известны другие подходящие клетки-хозяева.

Таким образом, настоящее изобретение дополнительно относится к способам получения рассматриваемых полипептидов ENG. Например, клетку-хозяина, трансфицированную с использованием экспрессирующего вектора, кодирующего полипептид ENG, можно культивировать в подходящих условиях, чтобы сделать возможной экспрессию полипептида ENG. Полипептид ENG может секретироваться, и его можно выделять из смеси клеток и среды, содержащей полипептид ENG. Альтернативно, полипептид ENG может оставаться в цитоплазме или мембранный фракции, и клетки собирают, лизируют и выделяют белок. Культура клеток включает клетки-хозяева, среды и другие побочные продукты. Подходящие среды для культивирования клеток хорошо известны в этой области. Рассматриваемые полипептиды ENG можно выделять из среды для культивирования клеток, клеток-хозяев или и того, и другого известными в этой области способами очистки белков, включая ионообменную хроматографию, эксклюзионную хроматографию, ультрафильтрацию, электрофорез, иммуноаффинную очистку с использованием антител, специфичных для конкретных эпигенетических полипептидов ENG, и аффинную очистку с использованием средства, связывающегося с доменом, слитым с полипептидом ENG (например, для очистки сли-

того белка ENG-Fc можно использовать колонку с протеином A). В предпочтительном варианте осуществления полипептид ENG является слитым белком, содержащим домен, облегчающий его очистку. Например, очистку можно осуществлять посредством серии этапов хроматографии на колонках, включая, например, три или более из следующего, в любом порядке: хроматографию с протеином A, хроматографию с Q-сепарозой, хроматографию с фенилсепарозой, эксклюзивную хроматографию и катионообменную хроматографию. Очистку можно завершать вирусной фильтрацией и заменой буфера.

В другом варианте осуществления слитый ген, кодирующий лидерную последовательность для очистки, такую как поли-(His)/ последовательность участка расщепления энтерокиназой на N-конце желаемой части рекомбинантного полипептида ENG, может делать возможной очистку экспрессируемого слитого белка посредством аффинной хроматографии с использованием Ni^{2+} -смолы. Затем лидерную последовательность для очистки можно удалять посредством обработки энтерокиназой для получения очищенного полипептида ENG(например, см. Hochuli et al. (1987) *J. Chromatography* 411:177; и Janknecht et al., *PNAS USA* 88:8972).

Способы получения слитых генов хорошо известны. По существу, соединение различных фрагментов ДНК, кодирующих различные последовательности полипептида, осуществляют общепринятыми способами с использованием тупых концов или ступенчатых разрывов для лигирования, расщепления рестрикционными ферментами для получения соответствующих концов, заполнения липких концов при необходимости, обработки щелочной фосфатазой во избежание нежелательного соединения и ферментативного лигирования. В другом варианте осуществления слитый ген можно синтезировать общепринятыми способами, включая использование автоматизированных ДНК-синтезаторов. Альтернативно, можно осуществлять ПЦР-амплификацию фрагментов гена с использованием якорных праймеров, при этом между двумя последовательными фрагментами генов образуются комплементарные липкие концы, которые затем можно отжигать для получения последовательности химерного гена (см., например, Current Protocols in Molecular biology, eds. Ausubel et al., John Wiley & Sons: 1992).

Примеры категорий соединений нуклеиновых кислот, являющихся антагонистами ENG, BMP-9 или BMP-10, включают антисмыловые нуклеиновые кислоты, конструкции РНКи и каталитические конструкции нуклеиновых кислот. Соединение нуклеиновой кислоты может являться одно- или двухцепочечным. Двухцепочечное соединение также может включать области липких концов или некомплементарности, где одна или другая цепь является одноцепочечной. Одноцепочечное соединение может включать области самокомплементарности, что означает, что соединение образует, так называемую, "шпильку" или структуру "стебель-петля", с областью с двухцепочечной структурой. Соединение нуклеиновой кислоты может содержать нуклеотидную последовательность, комплементарную области, состоящей из не более 1000, не более 500, не более 250, не более 100 или не более 50, 35, 30, 25, 22, 20 или 18 нуклеотидов полноразмерной последовательности нуклеиновой кислоты ENG или последовательность нуклеиновой кислоты лиганда. Предпочтительно, область комплементарности будет составлять по меньшей мере 8 нуклеотидов, и необязательно, по меньшей мере 10 или по меньшей мере, 15 нуклеотидов, и необязательно от 15 до 25 нуклеотидов. Область комплементарности может находиться на инtron, кодирующую последовательность или некодирующую последовательность целевого транскрипта, такого как часть кодирующей последовательности. Как правило, соединение нуклеиновой кислоты будет иметь длину от приблизительно 8 до приблизительно 500 нуклеотидов или пар оснований в длину, и, необязательно, длина будет составлять от приблизительно 14 до приблизительно 50 нуклеотидов. Нуклеиновая кислота может являться ДНК (в частности для применения в качестве антисмыловой), РНК или гибридом РНК:ДНК. Любая цепь может включать смесь ДНК и РНК, а также модифицированные формы, которые нелегко классифицировать как ДНК или РНК. Аналогично, двухцепочечное соединение может являться ДНК:ДНК, ДНК:РНК или РНК:РНК, и любая цепь также может включать смесь ДНК и РНК, а также модифицированные формы, которые нелегко классифицировать как ДНК или РНК. Соединение нуклеиновой кислоты может включать любую из множества модификаций, включая одну или несколько модификаций остова (сахар-фосфатной части природной нуклеиновой кислоты, включающей межнуклеотидные связи) или части оснований (пуриновой или пиримидиновой части природной нуклеиновой кислоты). Соединение антисмыловой нуклеиновой кислоты, предпочтительно, будет иметь длину от приблизительно 15 до приблизительно 30 нуклеотидов и, зачастую, будет содержать одну или несколько модификаций для улучшения характеристик, таких как стабильность в сыворотке, в клетке или в месте, в которое соединение, вероятно, будут доставлять, таком как желудок в случае перорально доставляемых соединений и легкое для ингаляционных соединений. В случае конструкции РНКи, цепь, комплементарная целевому транскрипту, как правило, будет являться РНК или ее модификацией. Другая цепь может являться РНК, ДНК или любым другим вариантом. Дуплексная часть двухцепочечной или одноцепочечной "шпильки" конструкции РНКи, предпочтительно, будет иметь длину от 18 до 40 нуклеотидов и, необязательно, от приблизительно 21 до 23 нуклеотидов, при условии, что она служит субстратом для Dicer. Каталитические или ферментативные нуклеиновые кислоты могут являться рибозимами или ДНК-ферментами, а также могут содержать модифицированные формы. Соединения нуклеиновых кислот могут ингибировать экспрессию мишени приблизительно на 50, 75, 90 или более при контакте с клетками в физиологических условиях и в концентрации, когда нонсенс- или смысловой контроль имеет небольшой

эффект или не имеет эффекта. Предпочтительными концентрациями для тестирования эффекта соединений нуклеиновых кислот являются 1, 5 и 10 микромоль. Соединения нуклеиновых кислот также можно тестировать на эффекты, например, в отношении ангиогенеза.

6. Изменения Fc-слитых белков.

Изобретение дополнительно относится к слитым белкам ENG-Fc со сконструированными Fc-областями или вариантами Fc-областей. Такие антитела и Fc-слитые белки могут быть применимы, например, в модуляции эффекторных функций, таких как антиген-зависимая цитотоксичность (ADCC) и комплементзависимая цитотоксичность (CDC). Кроме того, модификации могут улучшать стабильность антител и сливных белков Fc. Варианты аминокислотной последовательности антител и сливных белков Fc получают посредством включения соответствующих изменений нуклеотидов в ДНК или посредством пептидного синтеза. Такие варианты включают, например, делеции, и/или инсерции, и/или замены остатков в аминокислотных последовательностях антител и Fc-слитых белков, представленных в настоящем описании. Любую комбинацию делеций, инсерций и замены осуществляют на конечной конструкции, при условии, что конечная конструкция обладает желаемыми характеристиками. Изменения аминокислот также могут изменять посттрансляционный процессинг антител и Fc-слитых белков, такие как изменения количества или положения участков гликозилирования.

Можно получать антитела и Fc-слитые белки со сниженной эффекторной функцией, включая изменения в аминокислотную последовательность, включая, в качестве неограничивающих примеров, мутацию Ala-Ala, описываемую Bluestone et al. (см. WO 94/28027 и WO 98/47531; также см. Xu et al., 2000 Cell Immunol 200; 16-26). Таким образом, в определенных вариантах осуществления для снижения или устранения эффекторной функции можно использовать антитела и Fc-слитые белки по настоящему изобретению с мутациями в константной области, включая мутацию Ala-Ala. По этим вариантам осуществления антитела и Fc-слитые белки могут содержать мутацию в аланин в положении 234, или мутацию в аланин в положении 235, или их комбинацию. В одном из вариантов осуществления антитела или Fc-слитый белок содержит каркас IgG4, где мутация Ala-Ala будет означать мутации из фенилаланина в аланин в положении 234 и/или мутацию из лейцина в аланин в положении 235. В другом варианте осуществления антитела или Fc-слитый белок содержит каркас IgG1, где мутация Ala-Ala будет означать мутации из лейцина в аланин в положении 234 и/или мутацию из лейцина в аланин в положении 235. Антитело или Fc-слитый белок альтернативно или дополнительно могут нести другие мутации, включая точечную мутацию K322A в домене CH2 (Hezareh et al., 2001 J Virol. 75: 12161-8).

В конкретных вариантах осуществления антитела или Fc-слитый белок можно модифицировать для повышения или ингибирования обусловленной комплементом цитотоксичности (CDC). Модулированной активности CDC можно достигать посредством включения одной или нескольких замен, инсерций или делеций аминокислот в Fc-область (см., например, патент США № 6194551). Альтернативно или дополнительно, в Fc-область можно встраивать остатки цистеина, таким образом, делая возможным образование межцепочечной дисульфидной связи в этой области. Полученное таким образом гомодимерное антитело может иметь улучшенную или сниженную способность к интернализации и/или повышенное или сниженное обусловленное комплементом уничтожение клеток. См. Caron et al., J. Exp Med. 176:1191-1195 (1992) и Shope, B. J. Immunol. 148:2918-2922 (1992), WO 99/51642, Duncan & Winter Nature 322: 738-40 (1988); патент США № 5648260; патент США № 5624821 и WO 94/29351.

Примеры

В целом, описанное изобретение будет более понятным со ссылкой на следующие примеры, включенные исключительно в целях иллюстрации конкретных вариантов осуществления и вариантов осуществления настоящего изобретения и не предназначенные для ограничения изобретения.

Пример 1. Экспрессия сливного белка, содержащего полноразмерный внеклеточный домен ENG человека.

Авторы настоящего изобретения сконструировали растворимый сливный белок эндоглина (ENG) (hENG(26-586)-hFc), в котором полноразмерный внеклеточный домен (ECD) ENG человека (фиг. 9, SEQ ID NO: 9) присоединяли к домену Fc IgG1 человека (фиг. 11, SEQ ID NO: 11) с минимальным линкером между этими доменами. hENG(26-586)-hFc экспрессировали посредством транзиторной трансфекции в клетках HEK293. В кратком изложении, клетки HEK293 подготавливали в спиннере емкостью 500-мл при 6×10^5 клеток/мл в средах Freestyle (Invitrogen) объемом 250 мл и выращивали в течение ночи. На следующий день эти клетки обрабатывали комплексом ДНК:PEI (1:1) при 0,5 мкг/мл конечной концентрации ДНК. Через 4 ч добавляли 250 мл среды и выращивали клетки в течение 7 дней. Кондиционированные среды собирали посредством центрифугирования клеток и концентрировали. Для экспрессии в клетках СНО конструкции полипептида ENG трансфицировали в линию клеток СНО DUKX B11. Клоны подвергали селекции метотрексатом (MTX), как правило, при начальной концентрации 5 нМ или 10 нМ, и, необязательно, с последующей амплификацией в 50 нМ MTX для повышения экспрессии. Высокоэкспрессирующийся клон можно идентифицировать посредством клонирования способом разведений и адаптировать для выращивания в бессывороточной супензии для получения кондиционированных сред для очистки. Необязательно, в вектор можно включать универсальный хроматинраскрывающий элемент (UCOE) для облегчения экспрессии. См., например, Cytotechnology. 2002 Jan;38(1-3):43-6.

Можно использовать три разные лидерные последовательности:

- (i) Меллитина пчелы медоносной (HBML): MKFLVNVALVFMVYYISYIYA (SEQ ID NO: 13),
- (ii) Тканевого активатора плазминогена (TPA): MDAMKRGCCVLLCGAVFVSP (SEQ ID NO: 14),
- (iii) Нативного ENG человека: MDRGTLPLAVALLASCSLSPTSLA (SEQ ID NO: 15).

В выбранной форме hENG(26-586)-hFc используют лидерную последовательность TPA, она имеет непроцессированную аминокислотную последовательность, представленную на фиг. 13 (SEQ ID NO: 16), и кодируется нуклеотидной последовательностью, представленной на фиг. 14 (SEQ ID NO: 17). Авторы настоящего изобретения также предусмотрели альтернативную последовательность hENG(26-586)-hFc с лидерной последовательностью TPA (фиг. 15, SEQ ID NO: 18), содержащей укороченный с N-конца домен hFc (фиг. 12, SEQ ID NO: 12), присоединенный к hENG(26-586) через линкер TGGG. Очистку осуществляли различными способами, включая, например, фильтрацию кондиционированных сред с последующей хроматографией с протеином A, элюированием с глициновым буфером с низким pH (3,0), нейтрализацией образца и диализом против PBS. Чистоту образцов оценивали посредством аналитической эксклюзационной хроматографии, электрофореза в ПААГ в присутствие SDS, окрашивания серебром и вестерн-блоттинга. С помощью анализа зрелого белка подтверждали ожидаемую N-концевую последовательность.

Пример 2. Экспрессия слитого белка, содержащего полноразмерный внеклеточный домен ENG мыши.

Авторы настоящего изобретения конструировали растворимый слитый белок ENG мыши (mENG(27-581)-mFc), в котором полноразмерный внеклеточный домен ENG мыши (фиг. 10, SEQ ID NO: 10) подвергали слиянию с доменом Fc IgG_{2a} мыши с минимальными линкерами между эти доменами. mENG(27-581)-mFc экспрессировали посредством транзиторной трансфекции в клетки HEK 293.

В выбранной форме mENG(27-581)-mFc использовали лидерную последовательность TPA, она имеет непроцессированную аминокислотную последовательность, представленную на фиг. 16 (SEQ ID NO: 19) и кодируется нуклеотидной последовательностью, представленной на фиг. 17 (SEQ ID NO: 20). Очистку осуществляли посредством фильтрации кондиционированных сред из трансфицированных клеток HEK293 с последующей хроматографией с протеином A. Чистоту образцов оценивали посредством аналитической эксклюзационной хроматографии, электрофореза в ПААГ в присутствие SDS, окрашивания серебром и анализа вестерн-блоттинга.

Пример 3. Селективное связывание BMP-9/BMP-10 с белками, содержащими полноразмерный внеклеточный домен ENG.

Считают, что рассматриваемый в качестве корецептора ENG функционирует, облегчая связывание TGF- β 1 и -3 с мультибелковыми комплексами рецепторов типа I и типа II. Для исследования возможности прямого связывания лиганда выделенным ENG авторы настоящего изобретения использовали методологию поверхностного плазмонного резонанса (SPR) (инструмент BiacoreTM) для скрининга на связывание иммобилизованных белков, содержащих полноразмерный внеклеточный домен ENG, с различными растворимыми лигандами семейства TGF- β человека.

Лиганд	Связывание конструкции		
	hENG (26-586) -hFc*	hENG (26-586) **	mENG (27-581) -hFc***
hBMP-2	-	-	-
hBMP-2/7	-	-	-
hBMP-7	-	-	-
hBMP-9	++++	++++	++++
hBMP-10	++++	++++	++++
hTGF- β 1	-	-	-
hTGF- β 2	-	-	-
hTGF- β 3	-	-	-
hАктивин A	-	-	-

*[hBMP-9], [hBMP-10]=2,5 нМ; все другие лиганды тестировали при 100 нМ,

**[hBMP-9], [hBMP-10]=2,5 нМ; все другие лиганды тестировали при 25 нМ,

***[hBMP-9], [hBMP-10]=0,5 нМ; [hTGF- β 1], [hTGF- β 2], [hTGF- β 3]=10 нМ;

все другие лиганды тестировали при 25 нМ.

Как показано в этой таблице, аффинность связывания с hENG(26-586)-hFc являлась высокой (+++), $K_D < 1$ нМ) для hBMP-9 и hBMP-10, как оценивали при низких концентрациях лиганда. Даже при концентрации в 40 раз выше связывание TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, активина A, BMP-2 и BMP-7 с hENG(26-

586)-hFc являлось неопределенным (-). В случае этой последней группы лигандов примечательно отсутствие прямого связывания с выделенным слитым белком ENG, т.к. показано, что мультибелковые комплексы рецепторов типа I и типа II лучше связываются с большинством из них в присутствие ENG, чем в его отсутствие. Как дополнительно показано в таблице выше, аналогичные результаты получали при скрининге лигандов на их способность связываться с иммобилизованным hENG(26-586) (R&D Systems, кат. №1097-EN), вариантом человека без домена Fc, или их способность связываться с иммобилизованным mENG(27-581)-hFc (R&D Systems, кат. №1320-EN), состоящим из внеклеточного домена ENG мыши (остатки 27-581), присоединенного к домену Fc IgG₁ человека через последовательность линкера из шести остатков (IEGRMD). Определение характеристик с помощью SPR (фиг. 18, 19) показало, что иммобилизованный hENG(26-586)-hFc связывается с растворимым BMP-9 с K_D 29 пМ, а растворимый BMP-10 - с K_D 400 пМ. Таким образом, селективное высокоаффинное связывание с BMP-9 и BMP-10 является ранее неизвестным свойством внеклеточного домена ENG, являющимся общим для различных видов.

Пример 4. Растворимый внеклеточный домен hENG ингибитирует связывание BMP-9/BMP-10 с ALK1 и другими родственными рецепторами.

BMP-9 и BMP-10 являются высокоаффинными лигандами для рецептора ALK1 типа I (киназы, подобной рецептору активина 1). Для определения эффекта растворимого hENG(26-586) (R&D Systems, кат. №1097-EN) в отношении связывания BMP-9 и BMP-10 с ALK1 использовали анализ на основе SPR. ALK1-hFc иммобилизовали, а затем подвергали воздействию растворов, содержащих растворимый hENG(26-586), предварительно смешанный с BMP-9 в различных соотношениях. Как показано на фиг. 20, растворимый hENG(26-586) ингибирал связывание BMP-9 с ALK1-Fc в зависимости от концентрации с IC₅₀ менее 10 нМ. Аналогичные результаты получали с использованием BMP-10 (фиг. 21). Различные эксперименты показали, что растворимый hENG(26-586) не связывает ALK1 и, таким образом, не ингибитирует связывание лиганда с ALK1 с помощью этого механизма. Фактически, дополнительные эксперименты на основе SPR показали, что растворимый hENG(26-586) не связывается ни с рецепторами ALK2-ALK7 типа I, ни с рецепторами типа II, такими как рецептор активина II A, рецептор активина II B, рецептор морфогенетического белка кости II и рецептор TGF-β II. Эти результаты представляют собой дополнительное доказательство того, что ENG ингибитирует связывание BMP-9 и BMP-10 с ALK1, главным образом, посредством прямого взаимодействия с этими лигандами.

В совокупности, эти данные свидетельствуют о том, что растворимые химерные белки ENG-Fc, а также нехимерный растворимый ENG можно использовать в качестве антагонистов передачи сигнала BMP-9 и BMP-10 через множество путей передачи сигнала, включая ALK1.

Пример 5. Эффект mENG(27-581)-hFc в отношении эндотелиальных клеток пупочной вены человека (HUVEC) в культуре.

Авторы настоящего изобретения исследовали ангиогенный эффект mENG(27-581)-hFc в системе культивирования на основе HUVEC. HUVEC культивировали на полимеризованном субстрате Matrigel, и эффект тестируемых образцов в отношении образования трубок из эндотелиальных клеток (тяжей) оценивали посредством фазово-контрастной микроскопии через 12 ч воздействия. Тяжи, имеющие ширину в одну клетку и по меньшей мере три ветви, идентифицировали визуально и использовали компьютеризированный анализ изображений для определения общей длины таких тяжей. Средние значения основаны на двух параллельных лунках планшета для культивирования на условие эксперимента, при этом каждую лунку охарактеризовывали как среднее для трех полей наблюдения. По сравнению с базовыми условиями (без обработки) сильный индуктор, стимулятор роста эндотелиальных клеток (ECGS, 0,2 мкг/мл), приводил к удвоению средней длины тяжа (фиг. 22). mENG(27-581)-hFc (R&D Systems, кат. №1320-EN; 10 мкг/мл) снижал это повышение приблизительно на 60%, эффект, специфичный для условий стимуляции, т.к. одна и та же концентрация mENG(27-581)-hFc имела небольшой эффект в отсутствие ECGS (фиг. 22). Эти результаты свидетельствуют о том, что слитый белок ENG-Fc может ингибирать агрегацию эндотелиальных клеток в условиях иной стимуляции в модели ангиогенеза в культуре клеток.

Пример 6. ENG-Fc ингибитирует индуцируемый VEGF ангиогенез в анализе хориоаллантоиновой мембранны куриного яйца (САМ).

Систему анализа хориоаллантоиновой мембранны куриного яйца (САМ) использовали для исследования эффектов слитого белка ENG-Fc в отношении ангиогенеза. В кратком изложении, оплодотворенные эмбрионы курицы возрастом девять дней держали в инкубаторе для яиц при контролируемой температуре (37°C) и влажности (60%). Скорлупу яйца размягчали спиртом, делали небольшое отверстие для создания "пузыря" между мембраной скорлупы и САМ и удаляли для создания окна, располагающегося над видимыми кровеносными сосудами.

Небольшие фильтровальные диски обрабатывали VEGF (50 нг ежедневно) в присутствие или отсутствие белка mENG(27-581)-hFc (R&D Systems, кат. №1320-EN; 14 мкг ежедневно), растворенного в буфере (pH 7,4) содержащем 0,01 М HEPES, 0,5 М NaCl, 3 мМ ЭДТА, 0,005% об./об. поверхности-активного вещества P20 и 0,5 мг/мл бычьего сывороточного альбумина. Затем фильтровальные диски, содержащие тестируемый образец, вставляли в отверстие и соединяли с САМ. Яйца (n=8 на группу) обрабатывали свежим тестируемым образцом ежедневно в течение трех дней и на четвертый день визуально определяли количество кровеносных сосудов, связанных с фильтровальным диском, с использованием

ем лампы для яиц.

Как и ожидали, обработка VEGF в анализе САМ значительно повышала количество кровеносных сосудов по сравнению с наполнителем. Количество дополнительных кровеносных сосудов, индуцируемых с помощью обработки VEGF, снижалось на 65% при конкурентной обработке mENG(27-581)-hFc (фиг. 23). Исследования с использованием SPR показали, что VEGF не связывается с mENG(27-581)-mFc, и, таким образом, эффекты mENG(27-581)-hFc в отношении ангиогенеза в настоящем эксперименте с САМ не являлись результатом прямого взаимодействия между сливным белком и VEGF. Изложенные выше результаты свидетельствуют о том, что ENG-Fc может значительно ингибировать хорошо известный ангиогенный эффект VEGF в модели *in vivo* без контакта с самим VEGF.

Пример 7. Эффект mENG(27-581)-mFc в отношении ангиогенеза в анализе ангиореактора мыши.

Эффекты сливного белка ENG-Fc в отношении ангиогенеза дополнительно исследовали в анализе ангиореактора мыши, также известного как прямой анализ ангиогенеза *in vivo* (DIVAA™; Guedez et al., 2003, Am J Pathol 162:1431-1439), который осуществляли по инструкциям производителя (Trevigen®). В кратком изложении, полые цилиндры, полученные из силикона, подходящего для имплантации, и закрытые с одного конца, наполняли 20 мкл экстракта базальной мембранны (BME), предварительного смешанного с комбинацией основного фактора роста фибробластов (FGF-2, 1,8 г) и VEGF (600 нг) или без нее. После желирования BME ангиореакторы подкожно имплантировали бестимусным мышам (четыре на мышь). Мышам ежедневно вводили mENG(27-581)-mFc (10 мг/кг, s.c.) или наполнитель (Tris-забуференный физиологический раствор) в течение 11 дней, после чего мышам инъецировали декстран, меченный флуоресцеинизотиоцианатом (FITC), (20 мг/кг, i.v.) и умерщвляли их через 20 мин. Удаляли ангиореакторы и количественно анализировали количество FITC-декстриана, содержащегося в каждом из них, с помощью флуоресцентного спектрофотометра для чтения планшетов (Infinite® M200, Tecan) при возбуждении 485 нм/эмиссии 520 нм в качестве индекса образования кровеносных сосудов. Как показано на фиг. 24, добавление FGF-2 и VEGF к BME приводило к значительному повышению васкуляризации в ангиореакторах по завершении исследования, в то время как конкурентное введение mENG(27-581)-mFc полностью предотвращало это повышение. Эти результаты, полученные в системе млекопитающего, дополняют результаты, полученные с использованием описываемого выше анализа САМ, и демонстрируют антиангиогенную активность сливных белков ENG-Fc, включающих полноразмерный внеклеточный домен ENG, *in vivo*.

Пример 8. Экспрессия вариантов с укороченным внеклеточным доменом hENG.

Авторы настоящего изобретения получали растворимые сливные белки ENG, в которых укороченные варианты ECD ENG человека подвергали слиянию с доменом Fc IgG1 человека с минимальным линкером. Эти варианты приведены ниже, и структуры выбранных вариантов схематически представлены на фиг. 25.

	Конструкция человека	Транзиторная экспрессия	Очищенный	Стабильная Экспрессия (клетки СНО)
Полноразмерный	hENG(26-586)-hFc	HEK 293	Да	Да
Карбокси-концевые укорочения	hENG(26-581)-hFc	HEK 293	Да	Нет
	hENG(26-437)-hFc	HEK 293	Да	Нет
	hENG(26-378)-hFc	HEK 293	Да	Нет
	hENG(26-359)-hFc	HEK 293	Да	Да
	hENG(26-346)-hFc	HEK 293	Да	Да
	hENG(26-332)-hFc	HEK 293	Да	Нет
	hENG(26-329)-hFc	HEK 293	Да	Нет
	hENG(26-257)-hFc	HEK 293	Да	Нет
Амино-концевые укорочения	hENG(360-586)-hFc	HEK 293	Да	Нет
	hENG(438-586)-hFc	HEK 293	Да	Нет
	hENG(458-586)-hFc	COS	Нет	Нет
Двойные укорочения	hENG(61-346)-hFc	HEK 293	Да	Нет
	hENG(129-346)-hFc	HEK 293	Да	Нет
	hENG(133-346)-hFc	HEK 293	Да	Нет
	hENG(166-346)-hFc	HEK 293	Да	Нет
	hENG(258-346)-hFc	HEK 293	Да	Нет
	hENG(360-581)-hFc	HEK 293	Да	Нет
	hENG(360-457)-hFc	COS	Нет	Нет
	hENG(360-437)-hFc	COS	Нет	Нет
	hENG(458-581)-hFc	COS	Нет	Нет

Эти варианты экспрессировали посредством транзиторной трансфекции в клетках HEK293 или клетках COS, как указано.

В выбранной форме hENG(26-437)-hFc использовали лидерную последовательность TPA, она имеет непроцессированную аминокислотную последовательность, представленную на фиг. 26 (SEQ ID NO: 21), и кодируется нуклеотидной последовательностью, представленной на фиг. 27 (SEQ ID NO: 22). В выбранной форме hENG(26-378)-hFc также использовали лидерную последовательность TPA, она имеет непроцессированную аминокислотную последовательность, представленную на фиг. 28 (SEQ ID NO: 23), кодируется нуклеотидной последовательностью, представленной на фиг. 29 (SEQ ID NO: 24). В выбранной форме hENG(26-359)-hFc также использовали лидерную последовательность TPA, она имеет непроцессированную аминокислотную последовательность, представленную на фиг. 30 (SEQ ID NO: 25), кодируется нуклеотидной последовательностью, представленной на фиг. 31 (SEQ ID NO: 26). Авторы настоящего изобретения также предусмотрели альтернативную последовательность hENG(26-359)-hFc с лидерной последовательностью TPA (фиг. 32, SEQ ID NO: 27), содержащую укороченный с N-конца домен hFc (фиг. 12, SEQ ID NO: 12), присоединенный к hENG(26-359) с помощью линкера TGGG. Нуклеотидная последовательность, кодирующая этот альтернативный белок hENG(26-359)-hFc, представлена на фиг. 33 (SEQ ID NO: 28). В выбранной форме hENG(26-346)-hFc использовали лидерную последовательность TPA, она имеет непроцессированную аминокислотную последовательность, представленную на фиг. 34 (SEQ ID NO: 29) содержащую укороченный с N-конца домен hFc, кодируется нуклеотидной последовательностью, представленной на фиг. 35 (SEQ ID NO: 30).

Выбранные варианты hENG-hFc, каждый с укороченным с N-конца доменом Fc (SEQ ID NO: 12), стабильно экспрессировали в клетках CHO (описанными выше способами) и очищали от кондидонированных сред посредством фильтрации и хроматографии с протеином A. С помощью анализа зрелого белка, экспрессируемого в клетках CHO, подтверждали ожидаемую N-концевую последовательность hENG(26-359)-hFc и hENG(26-346)-hFc. Учитывая выход белка (некорректированный по различиям в теоретической молекулярной массе), hENG(26-346)-hFc (90 мг/л) превосходил hENG(26-359)-hFc (9 мг/л) и полноразмерный hENG(26-586)-hFc (31 мг/л). Как показано на фиг. 36, при анализе этих очищенных образцов посредством эксклюзационной хроматографии определяли качество белка hENG(26-346)-hFc (на 96% мономерного) как превосходящее качество белка hENG(26-359)-hFc (на 84% мономерного) и эквивалентное качеству белка hENG(26-586)-hFc (на 96% мономерного). Таким образом, в случае более высоких уровней высокомолекулярных агрегатов необходимо использование дополнительных этапов очистки для hENG(26-359)-hFc по сравнению с hENG(26-346)-hFc.

Пример 9. Высокоаффинное связывание BMP-9/BMP-10 с укороченными вариантами hENG-hFc.

Авторы настоящего изобретения использовали способ SPR для скрининга следующих вариантов белка hENG-hFc на высокоаффинное связывание с BMP-9 и BMP-10 человека. В этих экспериментах, иммобилизованные белки hENG-hFc подвергали воздействию растворимого BMP-9 или BMP-10 по 100 нМ каждого.

	Конструкция человека	Связывание с hBMP-9 и hBMP-10
Полноразмерный	hENG (26-586) -hFc	++++
Карбокси-концевые укорочения	hENG (26-581) -hFc	++++
	hENG (26-437) -hFc	++++
	hENG (26-378) -hFc	++++
	hENG (26-359) -hFc	++++
	hENG (26-346) -hFc	++++
	hENG (26-332) -hFc	-
	hENG (26-329) -hFc	-
	hENG (26-257) -hFc	-
Амино-концевые укорочения	hENG (360-586) -hFc	-
	hENG (438-586) -hFc	-
	hENG (458-586) -hFc	-

Двойные укорочения	hENG (61-346)-hFc	-
	hENG (129-346)-hFc	-
	hENG (133-346)-hFc	-
	hENG (166-346)-hFc	-
	hENG (258-346)-hFc	-
	hENG (360-581)-hFc	-
	hENG (360-457)-hFc	-
	hENG (360-437)-hFc	-
	hENG (458-581)-hFc	-

++++KD<1 нМ,

- связывание неопределено.

Как указано выше в таблице, высокоаффинное связывание с BMP-9 и BMP-10 наблюдали только для полноразмерной конструкции и для таких укороченных с С-конца вариантов, как hENG(26-346)-hFc. Высокоаффинное связывание с BMP-9 и BMP-10 было утрачено для всех протестированных N-концевых укорочений более чем на 61 аминокислот.

Панель лигандов подвергали скринингу на потенциальное связывание с укороченными с С-конца вариантами hENG(26-346)-hFc, hENG(26-359)-hFc и hENG(26-437)-hFc. Высокоаффинное связывание этих трех белков являлось селективным для BMP-9 и BMP-10. Ни hENG(26-346)-hFc, ни hENG(26-359)-hFc, ни hENG(26-437)-hFc не проявляли детектируемое связывание с BMP-2, BMP-7, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3 или активином А даже при высоких концентрациях лиганда.

Лиганд	Связывание конструкции		
	hENG (26-346) - hFc*	hENG (26-359) - hFc**	hENG (26-437) - hFc**
hBMP-2	-	-	-
hBMP-2/7	-	-	-
hBMP-7	-	-	-
hBMP-9	++++	++++	++++
hBMP-10	++++	++++	++++
hTGF- β 1	-	-	-
hTGF- β 2	-	-	-
hTGF- β 3	-	-	-
hАктивин А	-	-	-

*[hBMP-9], [hBMP-10]=5 нМ; [hTGF- β 3]=50 нМ; все другие лиганды тестировали при 100 нМ,**[hBMP-9], [hBMP-10]=5 нМ; [hTGF- β 3]=50 нМ; все другие лиганды тестировали при 100 нМ,

++++ KD<1 нМ,

- связывание неопределено.

Авторы настоящего изобретения использовали способ SPR для сравнения кинетики связывания BMP-9 с пятью конструкциями: hENG(26-586)-hFc, hENG(26-437)-hFc, hENG(26-378)-hFc, hENG(26-359)-hFc и hENG(26-346)-hFc. На фиг. 37 показаны кривые связывания для нескольких конструкций, и в таблице ниже приведены вычисленные значения равновесной константы диссоциации и констант скорости диссоциации (k_d). Аффинность BMP-9 человека к hENG(26-359)-hFc или hENG(26-346)-hFc (с K_D в нижнем пикомолярном диапазоне) была на порядок выше, чем в случае полноразмерной конструкции. Для ловушек лигандов, таких как ENG-Fc, крайне желательно проявлять относительно низкую скорость диссоциации лиганда, поэтому десятикратное улучшение (снижение) скорости диссоциации BMP-9 в случае hENG(26-346)-hFc по сравнению с полноразмерной конструкцией является особенно примечательным.

Лиганд	Конструкция	K_D ($\times 10^{-12}$ М)	k_d ($\times 10^{-4}$ с $^{-1}$)
hBMP-9	hENG(26-586)-hFc*	33	25
	hENG(26-437)-hFc**	19	14
	hENG(26-378)-hFc**	6,7	3,4
	hENG(26-359)-hFc*	4,2	3,5
	hENG(26-346)-hFc*	4,3	2,4

*белок, полученный из клеток CHO, **белок, полученный из клеток HEK293.

Как показано ниже, каждый из укороченных вариантов также связывался с BMP-10 с более высокой аффинностью и с лучшей кинетикой по сравнению с полноразмерной конструкцией. Тем не менее, укороченные варианты отличались по их степени предпочтительности для BMP-9 по сравнению с BMP-10 (с учетом соотношения K_D), при этом hENG(26-346)-hFc демонстрировал наибольший дифференциал, а hENG(26-437)-hFc - наименьший. Это различие в степени предпочтительности лиганда среди укороченных вариантов потенциально может отражаться в значимых различиях их активности *in vivo*.

Лиганд	Конструкция	K_D ($\times 10^{-12}$ М)	k_d ($\times 10^{-4}$ с $^{-1}$)
hBMP-10	hENG(26-586)-hFc*	490	110
	hENG(26-437)-hFc**	130	28
	hENG(26-378)-hFc**	95	19
	hENG(26-359)-hFc*	86	23
	hENG(26-346)-hFc*	140	28

*белок, полученный из клеток CHO,

**белок, полученный из клеток HEK293.

Представленные выше результаты свидетельствуют о том, что слитые белки, содержащие конкретные укороченные с C-конца варианты ECD hENG, демонстрируют высокоаффинное связывание с BMP-9 и BMP-10, но не с различными другими лигандами семейства TGF- β , включая TGF- β 1 и TGF- β 3. В частности, укороченные варианты hENG(26-359)-hFc, hENG(26-346)-hFc и hENG(26-378)-hFc демонстрируют более высокую аффинность связывания при равновесии и улучшенные кинетические свойства в случае BMP-9 по сравнению с полноразмерной конструкцией hENG(26-586)-hFc и укороченным вариантом hENG(26-437)-hFc.

Пример 10. Прогнозирование вторичной структуры N-концевой области ENG.

Как описано выше, обнаруживали, что N-концевые укорочения, такие короткие, как 36 аминокислоты (hENG(61-346)-hFc), устраняют связывание лиганда с полипептидами ENG. Для прогнозирования эффекта даже более коротких N-концевых укорочений в отношении связывания лиганда вторичную структуру орфанного домена эндоглина человека предсказывали путем вычислений с использованием модифицированного Psipred версии 3 (Jones, 1999, J Mol Biol 292:195-202). Анализ показал, что упорядоченная вторичная структура в области полипептида ENG, определяемая аминокислотами 26-60 SEQ ID NO: 1, ограничена бета-тяжем из четырех остатков, предсказанным с высокой достоверностью в положениях 42-45 SEQ ID NO: 1, и бета-тяжем из двух остатков, предсказанным с очень низкой достоверностью в положениях 28-29 SEQ ID NO: 1. Таким образом, варианты полипептида ENG, начинающиеся с аминокислот 27 или 28 и, необязательно, начинающиеся с любой из аминокислот 29-42 SEQ ID NO: 1, вероятно, сохраняют важные элементы и связывание лиганда. Пример 11: Активность вариантов ENG-Fc в клеточном анализе Для определения активности, с которой слитые белки hENG-hFc ингибируют передачу сигнала BMP-9 и BMP-10, использовали анализ репортерного гена в клетках A204. Этот анализ основан на линии клеток рабдомиосаркомы человека, трансфицированных с использованием pGL3 BRE-люцифераза-репортерной плазиды (Korchynskyi et al., 2002, J Biol Chem 277: 4883-4891), а также репортерной плазиды Renilla (pRLCMV-люцифераза) для контроля эффективности трансфекции. В BMP-чувствительных генах (содержащих промотор Id1) присутствуют мотивы BRE, поэтому этот вектор общеупотреблен в случае факторов передачи сигнала через Smad1 и/или Smad5. В отсутствие слитых белков ENG-Fc BMP-9 и BMP-10 дозозависимым образом стимулируют передачу сигнала в клетках A204.

В первый день анализа клетки A204 (инвентарный номер ATCC®: HTB-82™; депонент: DJ Giard) распределяли в 48-луночные планшеты при 10^5 клеток на лунку. На следующий день раствор, содержащий 12 мкг pGL3 BRE-люциферазы, 0,1 мкг pRLCMV-люциферазы, 30 мкЛ Fugene 6 (Roche Diagnostics) и 970 мкЛ OptiMEM (Invitrogen), преинкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре перед добавлением к 24 мл буфера для анализа (среды МакКоя, дополненной 0,1% BSA). Эту смесь наносили на высеванные клетки (500 мкЛ/лунку) для инкубации в течение ночи при 37°C. На третий день удаляли среду и заменяли ее тестируемыми веществами (250 мкЛ/лунку), разведенными в буфере для анализа. После инкубации в течение ночи при 37°C клетки промывали, лизировали пассивным буфером для лизи-

са (Promega E1941) и замораживали при -70°C. Перед анализом планшеты нагревали до комнатной температуры с осторожным встряхиванием. Лизаты клеток переносили в двух параллелях на планшет для считывания хемилюминесценции (96-луночный) и анализировали в люминометре с реагентами из системы Dual-Luciferase Reporter Assay system (Promega E1980) для определения нормированной активности люциферазы.

Результаты свидетельствуют о том, что белки hENG-hFc являются мощными ингибиторами клеточной передачи сигнала, опосредуемой BMP-9 и BMP-10. Как показано в таблице ниже, полноразмерная конструкция hENG(26-586)-hFc ингибирует передачу сигнала BMP-9 и BMP-10 со значениями IC₅₀ в субнаномолярном и нижнем наномолярном диапазонах, соответственно. Кроме того, укороченные варианты hENG(26-359)-hFc и hENG(26-346)-hFc являлись более мощными, чем hENG(26-586)-hFc.

Конструкция	IC ₅₀ (нМ)	
	hBMP-9	hBMP-10
hENG (26-586) -hFc	0,26	7,9
hENG (26-359) -hFc	0,16	3,5
hENG (26-346) -hFc	0,19	4,6

Пример 12. Укороченный вариант hENG(26-359)-hFc ингибирует индуцируемый VEGF ангиогенез в анализе CAM.

Авторы настоящего изобретения исследовали эффекты укороченного варианта hENG(26-359)-hFc в отношении ангиогенеза в той же системе анализа CAM, которая описана в примере 6, в которой VEGF используют для индукции ангиогенеза. Количество дополнительных кровеносных сосудов, индуцируемых обработкой VEGF (50 нг ежедневно), снижали на 75% посредством конкурентной обработки hENG(26-359)-hFc (SEQ ID NO: 25; 20 мкг ежедневно) (фиг. 38). С помощью исследований на основе SPR подтверждали, что VEGF не связывается с hENG(26-359)-hFc, и, таким образом, эффекты этого варианта в отношении ангиогенеза в настоящем эксперименте CAM не являлись результатом прямого взаимодействия между слитым белком и VEGF. Необходимо отметить, что в случае hENG(26-359) -hFc доза 10 мкг соответствует дозе 14 мкг, используемой в случае более длинных конструкций ENG-Fc, тестируемых в примере 6, с учетом теоретической молекулярной массы каждой конструкции. Таким образом, укороченный вариант hENG(26-359)-hFc демонстрировал эквивалентную, если не более высокую, эффективность ингибирования индуцируемого VEGF ангиогенеза по сравнению с конструкциями ENG с полноразмерным ECD (фиг. 23) в той же системе анализа.

Пример 13. Укороченный вариант hENG(26-346)-hFc ингибирует ангиогенез в анализе ангиореактора мыши.

Укороченный вариант hENG(26-346)-hFc тестировали в том же анализе ангиореактора мыши, который описан в примере 7. Ангиореакторы подкожно имплантировали бестимусным мышам (четыре на мышь) и мышам ежедневно вводили hENG(26-346)-hFc (10 мг/кг, с.с.) или наполнитель (Tris-забуференный физиологический раствор) в течение 11 дней, после чего мышам инъектировали декстран, меченный флуоресцинозотиоцианатом (FITC), (20 мг/кг, i.v.) и умерщвляли их через 20 мин. Затем измеряли количество FITC-декстрана, содержащегося в каждом ангиореакторе, в качестве индекса образования кровеносных сосудов. Как показано на фиг. 39, добавление факторов роста (GF) FGF-2 и VEGF в ангиореакторы приводило к значительному повышению васкуляризации, в то время как конкурентное введение hENG(26-346)-hFc полностью предотвращало это повышение. В исследованиях на основе SPR подтверждали, что hENG(26-346)-hFc не связывается ни с FGF-2, ни с VEGF, таким образом, исключая возможность того, что эффекты hENG(26-346)-hFc в отношении индуцируемого ангиогенеза в настоящем эксперименте являлись результатом прямого взаимодействия между слитым белком и FGF-2 или VEGF. Эти результаты, полученные с помощью системы анализа млекопитающего, дополняют результаты, полученные для укороченного варианта hENG(26-359)-hFc в анализе CAM (пример 12). В совокупности, они демонстрируют антиангиогенную активность слитых белков ENG-Fc, включающих предпочтительные укорочения внеклеточного домена ENG, *in vivo*.

Пример 14. Большее время полужизни укороченного варианта hENG(26-346)-hFc *in vivo*.

Авторы настоящего изобретения осуществляли модифицированное исследование фармакокинетики для определения общего времени полувыведения hENG(26-346)-hFc и сравнивали его с таковым для полноразмерного белка mENG(27-581)-mFc. Белок hENG(26-346)-hFc флуоресцентно метили красителем Alexa Fluor® 750 с использованием набора для быстрого мечения антитела SAVI™ (визуализации небольших животных *in vivo*) по инструкциям производителя (Invitrogen™). Меченный белок отделяли от свободной метки посредством эксклюзационной хроматографии. Бестимусным мышам (n=3, 17-20 г) инъектировали меченный hENG(26-346)-hFc (2 мг/кг, с.с.) и осуществляли визуализацию всего тела посредством системы визуализации IVIS (Xenogen®/Caliper Life Sciences) для определения уровня слитого белка через 2, 4, 6, 8, 24, 32, 48 и 72 ч после инъекции. Среднее время полувыведения hENG(26-346)-hFc со-

ставляло 26,5 ч, что составляет на 20% больше, чем время полужизни mENG(27-581)-mFc 22 ч, определенное в аналогичном исследовании.

Пример 15. Эффект белков ENG-Fc в отношении роста опухоли в моделях ксенотрансплантата мыши.

Белки ENG-Fc тестировали на двух разных моделях ксенотрансплантатов мыши для определения того, могут ли эти белки ингибировать рост опухоли. В первом эксперименте бестимусным мышам в возрасте 6 недель подкожно инъецировали 10^6 клеток карциномы молочной железы 4T1 (инвентарный номер ATCC®: CRL-2539™; депонент: BA Pulaski). Мышам (n=10 на группу) ежедневно вводили (s.c.) дозу mENG(27-581)-mFc (10 мг/кг) или наполнителя (Tris-забуференного физиологического раствора). Опухоли измеряли вручную с помощью штангенциркуля с цифровой индикацией и вычисляли объем опухоли по формуле: объем=0,5(длина)×(ширина²). Как показано на фиг. 40, введение mENG(27-581)-mFc снижало объем опухоли на 45% по сравнению с наполнителем ко дню 24 после имплантации.

Слитые белки ENG-Fc также тестировали на модели ксенотрансплантата карциномы Colon-26. Мышам BALB/c в возрасте 7 недель подкожно инъецировали $1,5 \times 10^6$ клеток карциномы Colon-26 (инвентарный номер ATCC®: CRL-2638™; депонент: N Restifo). Мышам (n=10 на группу) ежедневно вводили (s.c.) дозу mENG(27-581)-mFc (1, 10 или 30 мг/кг) или наполнителя (Tris-забуференного физиологического раствора). Объем опухоли определяли, как описано выше. Как показано на фиг. 41, введение mENG(27-581)-mFc вызывало дозозависимое снижение объема опухоли со снижениями на 55% и приблизительно 70% по сравнению с наполнителем в дозах 10 мг/кг и 30 мг/кг, соответственно, ко дню 58 после имплантации. Таким образом, mENG(27-581)-mFc значительно замедлял рост двух разных типов опухолей в моделях ксенотрансплантатов мыши, что соответствует указанной выше антиангиогенной активности слитых белков, включающих полноразмерный внеклеточный домен ENG мыши (примеры 5-7). В предварительном эксперименте укороченный вариант hENG(26-346) также замедлял рост опухоли по сравнению с наполнителем в модели ксенотрансплантата Colon-26, что соответствует антиангиогенной активности этого варианта в анализе аngиореактора мыши (пример 13).

В совокупности, указанные выше результаты свидетельствуют о том, что слитые белки, содержащие полноразмерный ECD ENG, и их конкретные укороченные варианты демонстрируют высокоаффинное связывание с BMP-9 и BMP-10, но не с множеством других лигандов семейства TGF β , включая TGF β -1 и TGF β -3. Эти полипептиды ENG могут ингибировать ангиогенез и рост опухоли в модельных системах и, таким образом, иметь потенциал для лечения пациентов с нежелательным ангиогенезом, включая пациентов со злокачественными новообразованиями. По сравнению с конструкциями, содержащими полноразмерный ECD ENG, укороченные полипептиды ENG hENG(26-346)-hFc и/или hENG(26-359)-hFc демонстрировали более высокую активность и улучшенные свойства в отношении нескольких других ключевых параметров (см. общую таблицу ниже).

Параметр		Полипептид ECD в слитом белке (полученный из клеток СНО)		
		Полноразмерный ECD – 26-586 человека или 27-581 мыши	26-359 человека	26-346 человека
Экспрессия	Количество	31 мг/л	9 мг/л	90 мг/л
	Качество	на 96% мономерный	на 84% мономерный	на 96% мономерный
Аффинность связывания (K _d)	BMP-9	33 пМ	4,2 пМ	4,3 пМ
	BMP-10	490 пМ	86 пМ	140 пМ
Скорость диссоциации (k _d)	BMP-9	25×10^{-4} с ⁻¹	$3,5 \times 10^{-4}$ с ⁻¹	$2,4 \times 10^{-4}$ с ⁻¹
	BMP-10	110×10^{-4} с ⁻¹	23×10^{-4} с ⁻¹	28×10^{-4} с ⁻¹
Активность (IC ₅₀ в клеточном анализе)	BMP-9	0,26 нМ	0,16 нМ	0,19 нМ
	BMP-10	7,9 нМ	3,5 нМ	4,6 нМ
Время полувыведения		22 часа	---	26,5 часа
Антиангиогенная активность	HUVEC	Да	---	---
	CAM	ингибирование 65%	ингибирование 75%	---
	Аngиореактор	ингибирование 100%	---	ингибирование 100%
Противоопухолевая активность	Опухоль 4T1	Да	---	---
	Опухоль Colon-26	Да дозозависимая	---	Да

--- не исследовали.

Вариант hENG(26-346)-hFc, в частности, обладал лучшей комбинацией свойств с более высокой активностью, более высокой аффинностью связывания, более медленной скоростью диссоциации, большим временем полувыведения и лучшей продукцией белка, чем конструкции с ECD полноразмерным ENG. В качестве ловушек для лигандов, укороченные полипептиды ENG, предпочтительно, должны проявлять низкую скорость диссоциации лиганда, т.к. крайне желательным является десятикратное сни-

жение скорости диссоциации BMP-9 в случае hENG(26-346)-hFc по сравнению с полноразмерной конструкцией. Вариант hENG(26-378)-hFc демонстрировал свойства связывания BMP-9 (аффинность и скорость диссоциации) в промежутке между hENG(26-346)-hFc и hENG(26-359)-hFc, с одной стороны, и hENG(26-437)-hFc, с другой стороны, при этом hENG(26-378) больше похож на более короткие конструкции.

Пример 16. Лечение с использованием белков ENG-Fc в модели фиброза печени мыши.

Эффективность белков ENG-Fc в лечении фиброза оценивали в модели фиброза печени мыши, вызванного CCL4 (тетрахлоридом углерода). В этом исследовании использовали пятьдесят мышей. Самцов и самок мышей A/J возрастом приблизительно 14 недель на начало эксперимента (день 0) подвергали акклиматизации в лаборатории в течение по меньшей мере 48 ч. Животных проверяли ежедневно в течение эксперимента и умерщвляли при наблюдении любых признаков заболеваемости, летальности и токсичности тестируемого образца.

Животным вводили дозу 1 мл/кг 50% CCL4 в оливковом масле через желудочный зонд дважды в неделю для индукции фиброза печени. Животным вводили дозы mENG(27-581)-mFc в течение 13 недель, как описано в таблице ниже.

Группа	N	Фиброз печени	Лечение	Доза	Частота	Введение
1	20	CCL4+Оливковое масло	PBS	Равный объем	В.И.В.	И.Р.
2	20	CCL4+Оливковое масло	мю-эндоглин	10 мг/кг	Т.И.В.	И.Р.
3	5	Оливковое масло	PBS	Равный объем	В.И.В.	И.Р.
4	5	Оливковое масло	мю-эндоглин	10 мг/кг	Т.И.В.	И.Р.

Животных анализировали на предмет изменений массы тела (BW), массы печени, внешнего вида печени и гистологию. В день 0, день 28, день 56 и день 90 животных подвергали ЯМР-сканированию. Животных умерщвляли в день 45 или 90 с использованием CO₂. Для анализа сыворотки животных не кормили за 12 ч до умерщвления и забора сыворотки. Цельную кровь собирали для анализа функции печени, и печень каждого животного собирали и взвешивали. Половину печени помещали в картридж с 10% формалином и быстро замораживали долю печени в жидком азоте.

Лечение mENG(27-581)-mFc не влияло на массу печени (измеряемую как процентную долю массы тела) в течение 13 недель (фиг. 42). Через 13-недельный период введения животных умерщвляли и срезы печени окрашивали гематоксилином-эозином и трихромом по Массону (фиг. 43-45). Подвергнутые лечению животные демонстрировали значительно меньший фиброз относительно неподвергнутых лечению животных (фиг. 45). Кроме того, при окрашивании масляным красным О выявляли, что лечение mENG(27-581)-mFc приводило к снижению накопления жировых отложений в ткани печени, что, зачастую, является предшественником повреждения печени и фиброзного депонирования (фиг. 46). Кроме того, по-видимому, лечение mENG(27-581)-mFc снижало баллонную дегенерацию гепатоцитов, ассоциированную с апоптозом и наблюдавшуюся в связи с воспалением печени. Уровни щелочной фосфатазы в сыворотке были меньше в когортах, подвергнутых лечению эндоглином, по сравнению с неподвергнутыми лечению (фиг. 47). В совокупности, эти данные свидетельствуют о том, что лечение mENG(27-581)-mFc может снижать повреждение печени в этой модели фиброза печени мыши, и, таким образом, по-видимому, белки ENG-Fc применимы в лечении фиброзных нарушений печени, включая цирроз и возможные печеночноклеточные карциномы.

Пример 17. Эффект белка ENG-Fc в пищевой модели фиброза печени мыши.

Эффективность белков ENG-Fc также оценивали на модели неалкогольного стеатогепатита (NASH) мыши, вызываемого метионином и пищевой недостаточностью холина (MCDD). Мышей C57BL/6 дикого типа держали на стандартной диете или диете, включающей большое количество сахара (40%) и жира (10%), но с недостатком метионина и холина, важных для β-окисления в печени и продукции липопротеина очень низкой плотности (Takahashi et al., 2012, World J Gastroenterol 18:2300-2308). В результате мыши с MCDD демонстрировали жировые отложения, считающиеся предшественниками повреждения печени и фиброзного депонирования (Corbin et al., 2012, Curr Opin Gastroenterol 28:159-165). В возрасте 12 недель мышей сажали на соответствующие диеты и начинали интраперитонеальное введение mENG(27-581)-mFc (10 мг/кг) или наполнителя (n=10 на группу) дважды в неделю в течение 3 недель. По завершении введения доз мышей умерщвляли и срезы печени окрашивали масляным красным О, растворимым в липидах диазокрасителем, для оценки степени депонирования липидов.

Как и ожидали, у мышей, которых кормили стандартным кормом, наблюдали лишь небольшие липидные отложения в ткани печени (данные не представлены), в то время как мыши с MCDD демонстри-

ровали множество больших липидных отложений, в совокупности занимающих значительную часть общей площади ткани (фиг. 48А, С). У мышей с MCDD лечение mENG(27-581)-mFc значительно снижало липидные отложения в печени по сравнению с наполнителем (фиг. 48). Хотя эндогенный TGF β в значительной степени участвует в прогрессировании заболевания печени (Dooley et al., 2012, Cell Tissue Res 347:245-256), Fc-слитый белок, содержащий рецептор TGF β типа II и связывающийся с TGF β с высокой аффинностью, имеет небольшой эффект в отношении накопления липидных отложений в печени (даные не представлены). Как описано в примере 3, mENG(27-581)-mFc и другие белки ENG-Fc не связываются ни с TGF β 1, TGF β 2, ни с TGF β 3, поэтому биологическая активность mENG(27-581)-mFc у мышей с MCDD не является результатом ингибирования передачи сигнала этими лигандами. В совокупности, эти результаты свидетельствуют о том, что mENG(27-581)-mFc может значительно снижать депонирование липидов в модели на мышах, в которой недостаточность питательных веществ, в конечном итоге, приводит к фиброзу и неалкогольному стеатогепатозу, таким образом, представляя дополнительное доказательство того, что белки ENG-Fc, по-видимому, применимы в лечении фиброза печени.

Включение посредством ссылки.

Все публикации и патенты, упомянутые в настоящем описании, таким образом, включены посредством ссылки в полном объеме, как если бы каждая отдельная публикация или патент были конкретно и отдельно указаны как включенные посредством ссылок. В случае конфликта, настоящая заявка, включая любые определения в настоящем описании, будет обладать приоритетом.

Эквиваленты.

Хотя конкретные варианты осуществления настоящего изобретения подробно представлены в настоящем описании, изложенное выше описание является иллюстративным, а не ограничивающим. Многие варианты изобретения будут очевидны специалистам в этой области при рассмотрении настоящего описания и представленной ниже формулы изобретения. Полный объем изобретения необходимо определять со ссылкой на формулу изобретения вместе с полным объемом эквивалентов и описание вместе с такими вариантами.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения или профилактики неалкогольного стеатогепатита (NASH), неалкогольной жировой болезни печени (NAFLD) или бактериально-индуцированного или вирусно-индуцированного фиброза печени у нуждающегося в этом пациента, включающий введение пациенту эффективного количества эндоглинового полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную аминокислотам 42-333 SEQ ID NO: 1.

2. Способ по п.1, где эндоглиновый полипептид не включает последовательность, состоящую из аминокислот 379-430 SEQ ID NO: 1.

3. Способ по п.1 или 2, где эндоглиновый полипептид содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную последовательности, начинающейся с аминокислоты, соответствующей любому из положений 26-42 SEQ ID NO: 1, и заканчивающейся аминокислотой, соответствующей любому из положений 333-378 SEQ ID NO: 1.

4. Способ по любому из пп.1-3, где эндоглиновый полипептид содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную последовательности, выбранной из группы, состоящей из:

- а) аминокислот 26-34 6 SEQ ID NO: 1,
- б) аминокислот 26-359 SEQ ID NO: 1 и
- с) аминокислот 26-378 SEQ ID NO: 1.

5. Способ по любому из пп.1-4, где эндоглиновый полипептид состоит из первой части, состоящей из аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 95% идентичной последовательности, выбранной из группы, состоящей из:

- а) аминокислот 26-34 6 SEQ ID NO: 1,
- б) аминокислот 26-359 SEQ ID NO: 1 и
- с) аминокислот 26-378 SEQ ID NO: 1

и второй части, являющейся гетерологичной SEQ ID NO: 1.

6. Способ по п.5, где вторая часть эндоглинового полипептида содержит Fc-часть IgG.

7. Способ по любому из пп.1-6, где эндоглиновый полипептид является димером.

8. Способ по любому из пп.1-7, где эндоглиновый полипептид является гомодимером.

9. Способ по любому из пп.1-8, где эндоглиновый полипептид не включает более 50 последовательных аминокислот из последовательности, состоящей из аминокислот 379-586 SEQ ID NO: 1.

10. Способ по любому из пп.1-9, где эндоглиновый полипептид связывается с BMP-9 человека с равновесной константой диссоциации (KD) менее 1×10^{-9} М или константой скорости диссоциации (k_d) менее 1×10^{-3} с⁻¹.

11. Способ по любому из пп.1-10, где эндоглиновый полипептид связывается с BMP-9 человека с равновесной константой диссоциации (KD) менее 1×10^{-9} М или константой скорости диссоциации (k_d)

менее 5×10^{-4} с⁻¹.

12. Способ по любому из пп.1-11, где эндоглиновый полипептид связывается с BMP-10 человека с равновесной константой диссоциации (K_D) менее 1×10^{-9} М или константой скорости диссоциации (k_d) менее 5×10^{-3} с⁻¹.

13. Способ по любому из пп.1-12, где эндоглиновый полипептид связывается с BMP-10 человека с равновесной константой диссоциации (K_D) менее 1×10^{-9} М или константой скорости диссоциации (k_d) менее $2,5 \times 10^{-3}$ с⁻¹.

14. Способ по любому из пп.1-13, где эндоглиновый полипептид не связывается с TGF- β 1 человека, TGF- β 3 человека, VEGF человека или основным фактором роста фибробластов человека (FGF-2).

15. Способ по любому из пп.1-14, где эндоглиновый полипептид является слитым белком, включающим, помимо части, содержащей аминокислотную последовательность эндоглина, одну или несколько полипептидных частей, повышающих одно или несколько: стабильность *in vivo*, время полужизни *in vivo*, захват/введение, локализацию или распределение в тканях, образование белковых комплексов и/или очистку.

16. Способ по любому из пп.1-15, где эндоглиновый полипептид включает часть, выбранную из группы, состоящей из константного домена иммуноглобулина и сывороточного альбумина.

17. Способ по любому из пп.1-16, где эндоглиновый полипептид содержит домен Fc иммуноглобулина.

18. Способ по п.17, где домен Fc иммуноглобулина соединяют с частью полипептида ENG посредством линкера.

19. Способ по п.18, где линкер состоит из аминокислотной последовательности, состоящей из SEQ ID NO: 31 (TGGG) или GGG.

20. Способ по любому из пп.1-19, где эндоглиновый полипептид включает один или несколько модифицированных аминокислотных остатков, выбранных из гликозилированной аминокислоты, пегилированной аминокислоты, фарнезилированной аминокислоты, ацетилированной аминокислоты, биотинилированной аминокислоты, аминокислоты, конъюгированной с остатком липида, и аминокислоты, конъюгированной с органическим дериватизирующим средством.

21. Способ по любому из пп.1-20, где эндоглиновый полипептид вводят внутривенно, внутримышечно, внутриартериально, подкожно или перорально.

Аминокислотная последовательность ENG человека, изоформа 1 (L-ENG)

(GenBank NM_001114753)

```

1 MDRGTLPLAV ALLLASCSLS PTSLAETVHC DLQPVGPERG EVTYTTSQVS KGCVAQAPNA
61 ILEVHVLFLE FPTGPSQEL ELQASKQNGT WPREVLLVLS VNSSVFLHLQ ALGIPLHLAY
121 NSSLVTFQEP PGVNTTELPs FPKTQILEWA AERCPITSAA ELNDPQSILL RLGQAQGSLS
181 FCMLEASQDM GRTLEWRPRT PALVRGCHE GVAGHKEAH1 LRVLPGHSAG PRTVTVKVEL
241 SCAPGDLDAV LILQGPPYVS WLIDANHNMQ IWTTEGEYSFK IFPEKNIRGF KLPDTPQGLL
301 GEARMLNASI VASFVELFLA SIVSLHASSC GGRLQTSPAP IQTTPPKDTC SPELLMSLIQ
361 TKCADDAMTL VLKKELVAHL KCTITGLTFW DPSCEAEDRG DKFVLRSAWS SCGMQVSASM
421 ISNEAVVN1L SSSSPQRKKV HCLNMDLSF QLGLYSPHF LQASNTIEPG QQSFVQVRVS
481 PSVSEFLLQL DSCHLDLGPE GGTVELIQR AAKGNCVSLL SPSPEGDPRF SFLLHFYTVP
541 IPKTGTLsCT VALRPKTGSQ DQEVRHRTVFM RLNIISPDLs GCTSKGLVLP AVLGITFGAF
601 LIGALLTAAL WYIYSHTRSP SKREPVVAVA APASSESSST NHSIGSTQST PCSTSSMA

```

(SEQ ID NO: 1)

Фиг. 1

Нуклеотидная последовательность, кодирующая ENG человека, изоформу 1 (L-ENG)
(GenBank NM_001114753)

361 CCTGCCACTG GACACAGGAT AAGGCCAGC GCACAGGCC CCACGTGGAC ACCATGGACC
 421 GCGGCACGCT CCCTCTGGCT GTGCCCCCTGC TGCTGGCCAG CTGCAGCCTC AGCCCCACAA
 481 GCTTGAGA AACAGTCAT TGTGACCTTC AGCCTGGGG CCCCGAGAGG GCGGAGGTGA
 541 CATATACAC TAGCCAGGTC TCGAAGGGCT GCGTGGCTCA GGCCCCAAT GCCATCCTTG
 601 AAGTCCATGT CCTCTTCCTG GAGTCCCAA CGGGCCGTC ACAGCTGGAG CTGACTCTCC
 661 AGGCATCCAA GCAAAATGGC ACCTGGCCCC GAGAGGTGCT TCTGGTCCTC AGTGTAAACA
 721 GCAGTGTCTT CCTGCATCTC CAGGCCCTGG GAATCCACT GCACTGGCC TACAATTCCA
 781 GCCTGGTCAC CTTCCAAGAG CCCCCGGGG TCAACACCA AGAGCTGCCA TCCCTCCCCA
 841 AGACCCAGAT CCTTGAGTGC GCAAGCTGAGA GGGGCCCCAT CACCTCTGCT GCTGAGCTGA
 901 ATGACCCCCA GAGCATCTC CTCCGACTGG GCCAAGCCA GGGGTCACTG TCCCTCTGCA
 961 TGCTGGAAGC CAGCCAGGAC ATGGGCCGA CGCTCGAGTC GGGGCCGCGT ACTCCAGCCT
 1021 TGGTCCGGGG CTGCCACTTG GAAGGCGTGG CGGGCCCAA GGAGGCCAC ATCCCTGAGGG
 1081 TCCCTGGGG CCACTCGCC GGGCCCCGGA CGGTGACGGT GAAGGTGGAA CTGAGCTGCC
 1141 CACCCGGGA TCTCGATGCC CTCCATCTC TGCAGGGCTC CCCCTACCTG TCCCTGCC
 1201 TCGACGCCAA CCACAAACATC CAGATCTGGA CCACTGGAGA ATACTCCCTC AAGATCTTTC
 1261 CAGAGAAAAA CATTCTGGC TTCAAGCTCC CAGACACACC TCAAGGCCTC CTGGGGGAGG
 1321 CCCGGATGCT CAATGCCAGC ATTGTGGCAT CCTCTGTGGA GCTACCGCTG GCCAGCATTG
 1381 TCTCACTTCA TGCCCTCCAGC TCGGGTGTGTA GGCTGCAGAC CTCACCCGCA CGGATCCAGA
 1441 CCACTCCCTC CAAGGACACT TGTAGCCCG AGCTGCTCAT GTCCCTGATC CAGACAAAGT
 1501 GTGCCGCGA CGCCATGACC CTGGTACTAA AGAAAGAGCT TGTGCGCAT TTGAAGTGCA
 1561 CCATCACGGG CCTGACCTTC TGGGACCCCA GCTGTGAGGC AGAGGACAGG GGTGACAAGT
 1621 TTGTCTTGCG CACTGCTTAC TCCAGCTGTG GCATGCGAGT GTCAGGAAGT ATGATCAGCA
 1681 ATGAGGGCGT GGTCAATATC CTGTCGAGCT CATCACCACA CGGGAAAAAG GTCCACTGCC
 1741 TCAACATGGA CAGCCTCTCT TTCCAGCTGG GCCTCTACCT CAGCCCCACAC TTCCCTCCAGG
 1801 CCTCCAAACAC CATCGAGGCC GGGCAGCAGA GCTTTGTGCA GGTCAAGATG TCCCCATCCG
 1861 TCTCCGAGTT CCTGCTTCCAG TTAGACAGCT GCCACCTGGA CTTGGGGCCT GAGGGAGGCA
 1921 CCCGGAACT CATCCAGGGC CGGGCGGCCA AGGGCAACTG TGTGACCTG CTGCCCCAA
 1981 GGGGGAGGG TGACCCCCGC TTCAAGCTCC TCCCTCCACTT CTACACAGTA CCCATACCCA
 2041 AAACCGGCAC CCTCAGCTGC ACCGTAGCCC TGGGTCCCAA GACCGGGCTC AAAGACCAAGG
 2101 AAGTCCATAG GACTGCTTTC ATGCGCTGTA ACATCATCAG CCCTGACCTG TCTGGTTGCA
 2161 CAAGCAAGG CCTCGTCTG CCCGCCGTG TGGGCATCAC CTTGGTGCC TTCCCTCATCG
 2221 GGGCCCTGCT CACTGCTGCA CTCTGGTACA TCTACTCGCA CACCGCTGCC CCCAGCAAGC
 2281 GGGAGCCCCGTT GGTGGCGGTG GCTGCCCGG CCTCTCGGA GAGCAGCAGC ACCAACCCACA
 2341 GCATGGGGAG CACCCAGAGC ACCCCCTGCT CCACCAAGCAG CATGGCATAG

(SEQ ID NO: 2)

Фиг. 2

Аминокислотная последовательность ENG человека, изоформа 2 (S-ENG)
(GenBank NM_0001118)

1 MDRGTLPLAV ALLIASCSLS PTSIAETVHC DLQPVGPERG EVTYTTSQVS KGCVAQAPNA
 61 ILEVHVIFLE FPTGPSQLEL TLQASKQNGT WPREVLLVLS VNSSVFLHLO ALGIPLHLAY
 121 NSSLVTQFQEP PGVNNTTEPLS FPKTQILEWA AERGPITSAA ELNDPQSILL RLGQRAQGSLS
 181 FCMLEASQDM GRTLEWRPRT PALVRGCHLE GVAGHKAEAH1 LRVLPGHSAG PRTVTVKVEL
 241 SCAPGDLDAV LILQGPPVVS WLIDANHNMQ IWTTGEYSFK IFPEKNIRGF KLPDTPQQLL
 301 GEARMLNASI VASFVVELFLA SIVSLHASSC GGRLQTPAP IQTTPPKDTC SPELLMSLIQ
 361 TKCADDAMTL VLKKELVAHL KCTITGLTFW DPSCEAEDRG DKFVLRSSAYS SCGMQVSASM
 421 ISNEAVVNIL SSSSPQRKKV HCLNMDSLSF QLGLYLSPHF LQASNTIEPG QQSFFVQVRVS
 481 PSVSEFLLQL DSCHLDLGP EGGTVELIQGR AAKGNCVSSL SPSPEGDPRF SFLLHFYTVF
 541 IPKTGTLSC VALRPKTGSQ DQEVRHRTVFM RLNIISPDL S GCTSKGLVLP AVLGITFGAF
 601 LIGALLTAAL WYIYSHTREY PRPPQ

(SEQ ID NO: 3)

Фиг. 3

Нуклеотидная последовательность, кодирующая ENG человека, изоформу 2 (S-ENG)
(GenBank NM_000118)

361 CCGGCCACTG GACACAGGAT AAGGCCAGC GCACAGGCC CCACGTGGAC AGCATGGACC
 421 GCGGCACGCT CCCTCTGGCT GTGCCCCGCAG CTGGCAGCCTC AGCCCCACAA
 481 GTCCTTGAGA AACAGTCAT TGTGACCTTC AGCCTGTGG CCCCGAGAGG GCGCAGGTGA
 541 CATATACCAAC TAGCCAGGTC TCGAAGGGCT GCGTGGCTCA GGCCCCCAAT GCCATCCTG
 601 AAGTCCATGT CCTCTCTCTG GAGTCCCAA CGGGCCCGT ACAGCTGGAG CTCACTCTCC
 661 AGGCATCCAA GCAAAATGGC ACCTGGCCCC GAGAGGTGCT TCTGGTCTC AGTGTAAACA
 721 GCAGTGTCTT CCTGCATCTC CAGGCCCTGG GAATCCACT GCACCTGGCC TACAATTCCA
 781 GCCTGGTAC CTTCCAAGAG CCCCCGGGG TCAACACCCAG AGAGCTGCCA TCCCTCCCCA
 841 AGACCCAGAT CCTTGACTGG GCAGCTGAGA GGGGCCCCAT CACCTCTGCT GCTGACACTGA
 901 ATGACCCCCA GAGCATCTC CTCCGACTGG GCGAAGGCCA GGGGTCACTG TCCCTCTGCA
 961 TGCTGGAAGC CAGCCAGGAC ATGGGCCGA CGCTCGAGTG GCGGCCCCGT ACTCCAGCCT
 1021 TGGTCCGGGG CTGCCACTTG GAAGGCGTGG CGGCCACAA GGAGGCGCAC ATCCTGAGGG
 1081 TCCCTGGGGG CCACTCGGCC GGGCCCGGA CGGTGACGGT GAAGGTGGAA CTGAGCTGCC
 1141 CACCCCGGGG TCTCGATGCC GTCCATCTC TGCGACGGTC CCCCTACCGT TCCCTGGCTCA
 1201 TCGACGCCAA CCACAAACATG CAGATCTGGA CCACTGGAGA ATACTCTTC AAGATCTTC
 1261 CAGAGAAAAA CATTCTGGC TTCAAGCTCC CAGACACACC TCAAGGCCCTC CTGGGGGAGG
 1321 CCCGGATGCT CAATGCCAGC ATTGTGGCAT CCTCTGTGG GCTACCGCTG GCCAGCATTG
 1381 TCTCACTTCA TCCCTCCAGC TGCGGTGCTA GGCTGAGAC CTCACCCGCA CCGATCCAGA
 1441 CCACTCCCTCC CAAAGGACACT TGTAGCCCGG AGCTGCTCATC GTCCTTGATC CAGACAAAGT
 1501 GTGCCCAACGA CGCCATGACC CTGGTACTAA AGAAAGAGT TGTGCGCAT TTCAAGTGC
 1561 CCATCACGGG CCTGACCTTC TGGGACCCCA CCTGTGAGGC AGAGGACAGG GTGACAAAGT
 1621 TTGTCTTGGC CAGTGCTTAC TCCAGCTGTG CCATGCAAGT GTCAGCAAGT ATGATCAGCA
 1681 ATGAGGCGGT GCTCAATATC CTGTCGAGCT CATCACCACA GCGGAAAAG GTGCACTGCC
 1741 TCAACATGGA CAGCCTCTCT TTCCAGCTGG GCCTCTACCT CAGCCCACAC TTCCCTCCAGG
 1801 CCTCCAAACAC CATCGACCGG GGGCAGCAGA CCTTTGTGCA GTGCAAGACTG TCCCCATCCG
 1861 TCTCCGAGTT CCTGCTCCAG TTAGACAGCT GCCACCTGGA CTTGGGGCCTG GAGGGAGGCA
 1921 CCGTGGAACT CATCCAGGGC CGGGCGGCCA AGGGCAACTG TGTGACCCCTG CTGCCCCAA
 1981 GCCCCGAGGG TGACCCCGC TTCAGCTTCC TCCCTCACTT CTACACAGTA CCCATACCCA
 2041 AAACCGGCAC CCTCAGTGC ACGGTAGCC TCGCTCCAA GACCGGGTCT CAAGACCCAGG
 2101 AACTCCATAG GACTGTCTTC ATGCGCTTCA ACATCATCAG CCTGACACTG TCTGGTTGCA
 2161 CAAGCAAAAGG CCTCGTCTG CCCGCCGTGC TGGGCATCAC CTTTGGTGCC TTCCCTCATCG
 2221 GGGCCCTGCT CACTGCTGCA CCTCTGGTACA TCTACTCCCA CACGGCTGAG TACCCCAGGC
 2281 CCCCACAGTG A
 (SEQ ID NO: 4)

Фиг. 4

Аминокислотная последовательность ENG мыши, изоформа 1 (L-ENG)
(GenBank NM_007932)

1 MDRGVLPLPI TLLFVIYSFV PTEGLAERVG CDLQPVDPTR GEVTFTTSQV SEGVVAQAA
 61 AVREVHVLFL DFPGMLSHLE LTLQASKQNG TETQEVFLVL VSNKNVFVKF QAPEIPLHLA
 121 YDSSLVIFQG QPRVNITVLP SLTSRKQILD WAATKGAITS IAALDDPQSI VLQLGQDPKA
 181 PFLCLPEAKK DMGATLEWQP RAQTPVQSCR LEGVSGHKEA YILRILPGSE AGPRTVTVM
 241 ELSCTSGDAI LILHGPPYVS WFIDINHSMQ ILTTGEYSVK IFPGSKVKGV ELPDTPQQLI
 301 AEARKLNASI VT\$FVELPLV SNVSLRASSC GGVFQTTPAP VVTTPPKDTC SPVLLMSLIQ
 361 PKCGNQVMTL ALNKKHVQTL QCTITGLTFW DSSCQAEDT DHVLVSSAYS SCGMKVTAHV
 421 VSNEVIISFP SGSPPLRKKV QCIDMDSLSF QLGLYLSPHF LQASNTIELG QQAFVQVSVS
 481 PLTSEVTVQL DSCHLDLCP EDMVELIQSR TAKGSCVTLL SPSPECDPRF SFLLRVYMVP
 541 TPTAGTLSCN LALRPSTLSQ EVYKTVSMRL NIVSPDLSGK GLVLPSVLGI TPGAFLIGAL
 601 LPAALWYIYS HTRGPKREP VVAVAAPASS ESSSTNHSIG STQSTPCSTS SMA
 (SEQ ID NO: 5)

Фиг. 5

**Нуклеотидная последовательность, кодирующая ENG мыши, изоформу 1 (L-ENG)
(GenBank NM_007932)**

361 AGCATGGACC CTGGCGTGCT CCCTCTGCC ATTACCTGC TGTTTGTCA CTATAGCTT
 421 GTACCCACAA CAGGTCGCG AGAAAGAGTC GGCTGTGATC TACAGCCTGT GGACCCACA
 481 AGGGGTGAGG TGACGTTAC CACCAAGCCAG CTCTCCGAGG CCTGTGTAGC TCAGGCTGCC
 541 AATGCTGTGC CTGAAGTCCA CGTTCTCTTC CTGGATTTTC CGGAAATGCT GTCACATCTG
 601 CAGCTGACTC TTCAAGGCATC CAAGAAAT CGCACGGAGA CCCACGGAGT GTTCTGCTC
 661 CTCGTTCCA ACAAAATCTT CTTCCTGAAG TTCCAGGCC CGGAATCCC ATTGCACTTG
 721 GCCTACGACT CCAGCCTGGT CATCTTCCAA GGACAGCCAA GAGTCACAT CACAGTGCTA
 781 CCATCCCTTA CCTCCAGGAA ACAGATCCTC GACTGGCG AGCCACATCACC CGCCATCACC
 841 TCGATAGCAG CACTGGATGA CCCCCAAAGC ATCGTCCTCC AGTTGGGCC AGACCCAAAG
 901 GCACCATCT TGTGCTTGCG AGAAGCTCAC AAGGACATGG GCGCCACACT TGAATGGCAA
 961 CCACGAGGCC AGACCCAGT CCAAAGCTGT CGCTTGGAG GTGTCTCTGG CCACAAGGAG
 1021 GCCTACATCC TGAGGATCTT GCCAGGTTCT GAGGCCGGCC CCCGGACGGT GACCGTAATG
 1081 ATGGAACTGA GTTGACATC TGAGGCC ATTCTCATCC TGATGGTCC TCCATATGTC
 1141 TCCTGGTCA TCGACATCAA CCACAGCATG CAGATCTGA CCACAGGTGA ATACTCCCTC
 1201 AAGATCTTC CAGGAAGCAA CGTCAAAGGC GTGGAGCTCC CAGACACACC CCAAGGCCTG
 1261 ATAGCGAGG CCCGCAAGCT CAATGCCAGC ATTGTCACCT CCTTTGTAGA GCTCCCTCTG
 1321 GTCAGCAATG TCTCCCTGAG GGCCTCCAGC TGCGTGGTG TGTTCCAGAC CACCCCTGCA
 1381 CCCGTTCTGA CCACACCTCC CAAGGACACA TGCAAGCCCG TGCTACTCAT GTCCCTGATC
 1441 CAGCCAAAGT GTGCCAATCA GTGCACTACT CTGGCACTCA ATAAAAAAACA CGTGCAGACT
 1501 CTCCAGTCCA CCATCACAGG CCTGACTTTC TGAGGCCA GCTGCCAGGC TGAAGACACT
 1561 GACGACCATC TTGTCTGAG TAGGCCCTAC TCCAGCTGC GCATGAAAGT GACAGCCCAT
 1621 GTGGTCAGCA ATGAGGTGAT CATCAGTTTC CGCTCAGGCT CACCACCACT TCGGAAAAG
 1681 GTACAGTGCA TCGACATGGA CAGCCTCTCC TTCCAGCTGG CCCTCTACCT CAGCCCGCAC
 1741 TTCCTCCAGG CATCCAAACAC CATCGAACTA GGCCAGCAGG CCTTCGTACA GGTGAGCGTG
 1801 TCTCCATTGA CCTCTGAGGT CACACTCCAG CTAGATACTG GCCATCTGGA CTTGGGGCCC
 1861 GAAGGGGACA TGGTGGAACT CATCCAGAGC CGAACAGCCA AGGGCAGCTG TGTGACCTTG
 1921 CTGTCTCCAA GCCCCTGAAGG TGACCCACGC TTCAAGCTTC TCCCTCCGGGT CTACATGGT
 1981 CCCACACCCA CGCGTGGCAC CCTCAGTTCC AACTTAGCTC TGCGCCCTAG CACCTTGCC
 2041 CAGGAAGCTT ACAAGACAGT CTCCATGCC CTGAACATGG TCAGCCCTGA CCTGCTCTGG
 2101 AAAGGCCTTG CCTCTGCCCTC TGTAAGGGT ATCACCTTGT GTGCCTCTCT GATTGGGGCC
 2161 CTGCTCACAG CTGCACTCTG ATACATCTAT TCTCACACAC GTGGCCCCAG CAAGCGGGAG
 2221 CCCGTGGTGG CAGTGGCTGC CCCGGCCTCC TCTGAGAGCA GCAGTACCAA CCACAGCATC
 2281 GGGAGCACCC AGAGCACCCCC CTGCTCCACC AGCAGCATGG CGTAG

(SEQ ID NO: 6)

Фиг. 6

**Аминокислотная последовательность ENG мыши, изоформа 2 (S-ENG)
(GenBank NM_001146350)**

1 MDRGVLPLPI TLLFVIYSV PTTGLAERVG CDLQPVDPTR GEVTFTTSQV SEGCVAQAAN
 61 AVREHVHLFL DFPGMLSHLE LTLQASKQNG TETQEVFLVL VSNKNVFVKF QAPEIPLHLA
 121 YDSSLVIFQG QPRVNITVLP SLTSRKQILD WAATKGAITS IAALDDPQSI VLQLGQDPKA
 181 PFLCLPEAKH DMGATLWQP RAQTPVQSCR LEGVSGHKEA YILRILPGSE AGPRTVTVM
 241 ELSCTSGDAI LILHGPPYVS WFIDINHSMQ ILTTGEYSVK IFPGSKVKGV ELPDTPQGLI
 301 AEARKLNASI VTSFVELPLV SNVSLRASSC GGVFQTTPAP VVTPPKDTC SPVLLMSLIQ
 361 PKCGNQVMTL ALNKKHVQTL QCTITGLTFW DSSCQAEDT DHVLVLSAYS SCGMKVTAHV
 421 VSNEVIISFP SGSPPLRKKV QCIDMDSLSF QLGLYLSPHF LQASNTIELG QQAFVQVSVS
 481 PLTSEVTVQL DSCHLDLGPE GDMVELIQSR TAKGSCVTLL SPSPEGDPRF SFLLRVYMVP
 541 TPTAGTLCN LALRPSTLSQ EVYKTVSMRL NIVSPDLSK GLVLPSVLGI TFGAFLIGAL
 601 LTAALWYIYS HTREYPKPPP HSHSKRSGPV HTTPGHTQWS L

(SEQ ID NO: 7)

Фиг. 7

**Нуклеотидная последовательность, кодирующая ENG мыши, изоформу 2 (S-ENG)
(GenBank NM_001146350)**

361 AGCATGGACC GTGGCGTGTGCT CCCTCTGCC ATTACCTGC TGTTTGTAT CTATAGCTTT
 421 GTACCCACAA CAGGTCTCGC AGAAAGAGTC GGCTGTGATC TACAGCCTGT GGACCCACAA
 481 AGGGGTGAGG TGACGTTAC CACCAGGAG GCTCTCCGAGG GCTCTGTAGC TCAGGCTGCC
 541 AATGCTGTGC GTGAAGTCCA CGTTCTTTC CTGGATTTTC CGGAATGCT GTCACATCTG
 601 GAGCTGACTC TTCAGGCATC CAAGCAAAAT GGCACGGAGA CCCAGGAGGT GTTCTGGTC
 661 CTCGTTCCA ACAAAAATGT CTTCTGCAAG TTCCAGGCC CGGAATCCC ATTCCACTTG
 721 GCCTACGACT CCAGCCTGGT CATCTTCAA CGACACCAA GAGTCAACAT CACAGTGTCA
 781 CCATCCCTTA CCTCCAGGAA ACAGATCCTC GACTGGCAG CCACCAAGGG CGCCATCACC
 841 TCGATAGCAG CACTGGATGA CCCCAAAGC ATCGTCTCC AGTTGGGCCA AGACCCAAAG
 901 GCACCAATTCT TGTGCTTGCC AGAAGCTCAC AAGGACATGG GCGCCACACT TGAATGGCAA
 961 CCACGAGCCC AGACCCCAAGT CCAAAGCTGT CGCTTGGAAAG GTGTGCTCTGG CCACAAGGAG
 1021 GCCTACATCC TGAGGATCTT GCCAGGTTCT GAGGCCGGGC CCCGGACGGT GACCGTAATG
 1081 ATGGAACTGA GTTCCACATC TGGGACGCC ATTCTCATCC TGCATGGTCC TCCATATGTC
 1141 TCCCTGGTCA TCGACATCAA CCACAGCATG CAGATCTTGA CCACAGGTGA ATACTCCGTC
 1201 AAAGATCTTC CAGGAAGCAA GGTCAAAGGC GTGGAGCTCC CAGACACACC CCAAGGCCTG
 1261 ATAGGGGAGG CCCGCAAGCT CAATGCCAGC ATTGTACCT CCTTTGTAGA GCTCCCTCTG
 1321 GTCAGCAATG TCTCCCTGAG GGCCTCCAGC TGCCTGGGTG TGTTCCAGAC CACCCCTGCA
 1381 CCCGTTGTGA CCACACCTCC CAAGGACACA TGCAGGCCCG TGCTACTCAT GTCCCTGATC
 1441 CAGGCAAAGT GTGCAATCA GGTCAACTC CTGGCACTCA ATAAAAAAACA CGTGCAGACT
 1501 CTCCAGTGCA CCATCACAGG CCTGACTTTC TGGGACTCCA GCTGCCAGGC TGAAGACACT
 1561 GACGACCACATC TTGTCCTGAG TAGCGCCTAC TCCAGCTGCG GCATGAAAGT GACAGCCCAT
 1621 GTGGTCAAGCA ATGAGGTGAT CATCAGTTTC CCGTCAGGCT CACCAACACT TCGGAAAAG
 1681 GTACAGTGCA TCGACATGCA CAGCCTCTCC TTCCAGCTGG GCCTCTACCT CAGCCCGCAC
 1741 TTCCCTCCAGG CATCCAACAC CATCGAACTA GGCCACCGAG CCTCTGTACA GGTGAGCGTG
 1801 TCTCATTGCA CCTCTGAGGT CACAGTCCAG CTAGATAGCT GCCATCTGGA CTTGGGGCCC
 1861 GAAGGGGACA TGGTGGAACT CATCCAGAGC CGAACAGCCA AGGGCAGCTG TGTGACCTTG
 1921 CTGTCTCCAA GCCCTGAAG TGACCCACGC TTCAGCTTCC TCCCTGGGT CTACATGGTG
 1981 CCCACACCCA CCGCTGGCAC CCTCAGTTGC AACTTAGCTC TGCGCCCTAG CACCTTGTCC
 2041 CAGGAAGTCT ACAAGACAGT CTCCATGCCG CTGAACATCG TCAGCCCTGA CCTGTCTGGT
 2101 AAAGGCCTG TCTCTGCCCTC TCTACTGGGT ATCACCTTG CTGCCCTCCT GATTGGGGCC
 2161 CTGCTCACAG CTGCACTCTG GTACATCTAT TCTCACACAC GTGAGTATCC CAAGCCTCCA
 2221 CCCCCATTCCCC ACAGCAAGCG CTCAGGCCCG GTCCACACCA CCCCCGGGCA CACCCAGTGG
 2281 AGCCCTCTGA

(SEQ ID NO: 8)

Фиг. 8

Аминокислотная последовательность внеклеточного домена ENG человека

ETVHC DLQPVGPERG EVTYTTSQVS KGCVAQAPNA
 ILEVHVLFLE FFTGPSQLEL TLQASKQNGT WPREVLLVLS VNSSVFLHLQ ALGIPLHLAY
 NSSLVTFQEP PGVNTTELPS FPKTQILEWA AERGPITSAA ELNDPQSILL RLGQAQGSLS
 FCMLEASQDM GRTLEWRPRT PALVRGCHLE GVAGHKEAHI LRVLPCHSAG PRTVTVKVEL
 SCAPGDLDLAV LILQGPPYVS WLIDANHNMQ IWTTGEYSFK IFPEKNIRGF KLPDTPQGLL
 GEARMLNASI VASFVELPLA SIVSLHASSC GGRLQTSPAP IQTTPPKDTG SPELLMSLIQ
 TKCADDAMTL VLKKELV AHL KCTITGLTFW DPSCEAEDRG DKFVLRSAYS SCGMQVSASM
 ISNEAVVNIL SSSSPQRKKV HCLNMDSLSF QLGLYLSPHF LQASNTIEPG QQSFWQVRVS
 PSVSEFLLQL DSCHLIDLGE GGTVELIQGR AAKGNCSVSL SPSPEGDPRF SFLLHFYTVP
 IPKTGTLSC VALRPKTGSQ DQEVTHTVFM RLNIISPDLG GCTSKG (SEQ ID NO: 9)

Фиг. 9

Аминокислотная последовательность внеклеточного домена ENG мыши

ERVG CDLQPVDPTR GEVTFTTSQV SEGCCVAQAAN
 AVREHVHLFL DPPGMLSHLE LTLQASKQNG TETREVFLVL VSNKNVPVKF QAPEIPLHLA
 YDSSLVIFQG QPRVNITVLP SLTSRKQILD WAATKGAITS IAALDDPQSI VLQLGQDPKA
 PFLCLPEANK DMGATLEWQP RAQTPVQSCR LEGVSGHKEA YILRILPGSE AGPRTVTVM
 ELSCTSGDAI LILHGPPYVS WFIDINHSMQ ILTTGEYSVK IFPGSKVKGV ELPDTPQGLI
 AEARKLNASI VTSFVELPLV SNVSLRASSC CGVPQTTPAP VVTPPKDTC SPVLLMSLIQ
 PKCGNQVMTL ALNKKHVQLT QCTITGLTFW DSSCQAEDTD DHVLVSSAYS SCGMKVTAHV
 VSNEVIISFP SGSPPLRKV QCIDMDSLSPH LQASNTIELG QQAFVQVSVS
 PLTSEVTVQL DSCHLDLGPE GDMVELIQSR TAKGSCVTL SPSPEGDPRF SFLLRVYMP
 TPTAGTLSCN LALRPSTLSQ EVYKTVSMRL NVVSPDLSGK G (SEQ ID NO: 10)

Фиг. 10

Аминокислотная последовательность домена Fc IgG1 человека

1 GGPKSCDKTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK
 61 FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK
 121 TISKAKGQPR EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYF SDIAVEWESN QOPENNYKPT
 181 PPVLDSDGF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSL S PKG
 (SEQ ID NO: 11)

Фиг. 11

**Аминокислотная последовательность домена Fc IgG1 человека,
укороченного с N-конца**

1 THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPPKDTL ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE VKFNWYVDGV
 61 EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK VSNKALPAPI EKTISKAKGQ
 121 PREPQVYTLPS PSREEMTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TPPVLDSDG
 181 SFFFLYSKLT DKSRWQQGNV FSCSVMHEAL HNHYTQKSL S LSPGK
 (SEQ ID NO: 12)

Фиг. 12

Аминокислотная последовательность hENG(26-586)-hFc

1 MDAMKRGGLCC VLLLCGAVFV SPGAETYVCD LOPYGPERDE VTYTTSQVSK
 51 GCVAQAPNAI LEVHVLFLF PTGPSOLELT LOASKQNGTW PREVLLVLSV
 101 NSSVFLHLQA LGIPLHLAYN SSLVTFQEPP GVNTTELPsf PKTQILEWAA
 151 ERGPITSAAE IMDPQSIILR LGQAGGSISPF CMLEASQDMG RTLEWRRTP
 201 ALVRGCHLEG VRAGHKEAHIL RVLPGHSAGP RTVTVKVELS CAPGDLDAVL
 251 ILOQPPYVSW LIDANHNMQI WTTGBYSFKI FPEKNIRGFK LPDTPQGLLG
 301 EARMILNASIV ASFVELPLAS IVSLHASSCG GRLOTPSPAPI QTTPPKDTC
 351 PELLMSLIQ KCADDAMTLV LKKEVLAHLK CTITGLTFWD PSCEAEDRGD
 401 KFVLR SAYSS CGM0V5ASMI SNEAVVNILS SSSPQRKKVH CLNMDSLSFQ
 451 LGLYLSPHF L QASNTIEPCQ QSFVQVRVSP SVSEFLQLD SCHLDLGP
 501 GTVELIQGRA AKGNCSVLLS PSPEGDPRFS FLLHFYTVPI PKTGTLSCTV
 551 ALRPKTGSQD QEVHRTVFM R LNIISPDLSG CTSKGTGGP KSCDKTHTCP
 601 PCPAPELLGG PSVFLFPPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW
 651 YVDGVEVHN A KTKPREEQYN STYRVVSLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA
 701 LPAPIEKTIS KAKGQPREFQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI
 751 AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV
 801 MHEALHNHYT QKSLSLSPGK
 (SEQ ID NO: 16)

Фиг. 13

Нуклеотидная последовательность, кодирующая hENG(26-586)-hFc

1 ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT STGCTGCTGC TGTGTGGAGC
AGTCTTCGTT TCGCCCGGCC CCGAAACAGT CCATTGTGAC CTTCAGCCTG
 101 TGGGCCCCGA GAGGGACGAG GTGACATATA CCACTAGCCA GGTCTCGAAG
GGCTGCGTGG CTCAGGCCCG CAATGCCATC CTTGAAGTCC ATGTCTCTT
 201 CCTGGAGTTG CCAACGGGCC CGTCACAGCT GGAGCTGACT CTCCAGGCAT
CCAAGCAAA TGGCACCTGG CCCCGAGAGG TGCTTCTGGT CCTCAGTGT
 301 301 AACAGCAGTG TCTTCCCTGCA TCTCCAGGCC CTGGGAATCC CACTGCAC
GGCCTACAAT TCCAGCCTGG TCACCTTCCA AGAGCCCCG GGGGTCAACA
 401 401 CCACAGAGCT GCCATCCTTC CCCAAGACCC AGATCCTTGA GTGGGCAGCT
GAGAGGGGCC CCATCACCTC TGCTGCTGAG CTGAATGACC CCCAGAGCAT
 501 501 CCTCCTCCGA CTGGGCAAG CCCAGGGTC ACTGTCCTTC TGCAATGCTGG
AAGCCAGGCC GGACATGGC CGCACGCTCG AGTGGCAGGC GCGTACTCCA
 601 601 GCCTTGGTCC GGGGCTGCCA CTTGGAAAGGC CTGGCCGGCC ACAAGGAGGC
GCACATCCTG AGGGTCTGC CGGGCCACTC GGCGGGGCC CGGACGGTGA
 701 701 CGGTGAAGGT GGAACTGAGC TGCGCACCCG GGGATCTCGA TGCCGTCTC
ATCTCTGCAGG CTCCCCCTA CGTGTCTGG CTCATCGACG CCAACCACAA
 801 801 CATGCAGATC TGGACCACTG GAGAATACTC CTTCAAGATC TTTCCAGAGA
AAAACATTG TGGCTTCAGA CTCCCAGACA CACCTCAAGG CCTCCTGGGG
 901 901 GAGGCCCGGA TGCTCAATGC CAGCATTGTG GCATCCTTCG TGGAGCTACC
GCTGGCCAGC ATTGTCTCAC TTCATGCCTC CAGCTGCGGT GGTAGGCTGC
 1001 1001 AGACCTCACCG CGCACCGATC CAGACCACTC CTCCAAGGA CACTTGTAGC
CGGGAGCTGC TCATGTCCTT GATCCAGACA AAGTGTGCCG ACGACGCCAT
 1101 1101 GACCCCTGGTA CTAAAGAAAG AGCTTGTGC GCATTTGAAG TGCAACCATCA
CGGGCCTGAC CTTCTGGAC CCCAGCTGTG AGGCAGAGGA CAGGGGTGAC
 1201 1201 AAGTTTGTCT TGCAGCTGC TTACTCCAGC TGTGGCATGC AGGTGTAGC
AAAGTATGATC AGCAATGAGG CGGTGGTCAA TATCTGTGAG AGTCATCAC
 1301 1301 CACAGCGGAA AAAGGTGAC TGCCTCAACA TGGACAGCCT CTCTTCCAG
CTGGGCCTCT ACCTCAGCCC ACACCTCCTC CAGGCTCCA ACACCATCGA
 1401 1401 GCGGGGGCAG CAGAGCTTG TGCAGGTAG AGTGTCCCCA TCCGCTCCG
AGTTCCCTGCT CCAGTTAGAC AGCTGCCACC TGGACTTGGG GCCTGAGGGA
 1501 1501 GGCACCGTGG AACTCATCCA GGGCCGGGG CCGAACGGCA ACTGTGTGAG
CCTGCTGTCC CCAAGCCCCG AGGGTGAACCC CGCGCTTCAGC TTCCCTCTCC
 1601 1601 ACTTCTACAC AGTACCCATA CCCAAACCG GCACCCCTCAG CTGCACGGTA
CCCCTGCGTC CCAAGACCCG GTCTCAAGAC CAGGAAGTCC ATAGGACTGT
 1701 1701 CTTCATGCGC TTGAACATCA TCAGCCCTGA CCTGTCTGGT TGCAACAGCA
AAGGCACCCGG TGGTGGACCC AAATCTGTG ACAAAACTCA CACATGCCCA
 1801 1801 CCGTGCCAG CACCTGAACCT CCTGGGGGCA CGGTCACTCT TCCCTTCTCC
CCCAAAACCC AAGGACACCC TCATGATCTC CCGGACCCCT GAGGTACAT
 1901 1901 GCGTGGTGGT GGACGTGAGC CACGAAGACCTTGAGGTCAA GTTCAACTGG
TACGTGGACG CGTGTGGAGGT GCATAATGCC AAGACAAAGC CGGGGGAGGA
 2001 2001 GCAGTACAAC AGCACGTACC GTGTGGTCAG CGTCCTCACC GTCTGCACC
AGGACTGGCT GAATGGCAAG GAGTACAAGT GCAAGGTCTC CAACAAAGCC
 2101 2101 CTCCCAAGCCC CCATCGAGAA AACCATCTCC AAAGCCAAG GGCAGCCCCG
AGAACACACAG GTCTACACCC TGCCCCATC CGGGAGGAG ATGACCAAGA
 2201 2201 ACCAGGTCACTGCCTGC CTGGTCAAAG GCTTCTATCC CAGCGACATC
GGCGTGGAGT GGGAGAGCAA TGGGCAGCCG GAGAACAAC ACAAGACCAAC
 2301 2301 GCCTCCCTGTC CTGGCACTCCG ACGGCTCCCTT CTTCTCTAT AGCAAGCTCA
CCCGTGGACAA GAGCAGGTGG CAGCAGGGGA ACGTCTTCTC ATGCTCCGTG
 2401 2401 ATGCATGAGG CTCTGCACAA CCACTACACG CAGAAGAGCC TCTCCCTGTC
CCCGGGTAAA TGA

(SEQ ID NO: 17)

Фиг. 14

**Аминокислотная последовательность hENG(26-586)-hFc с укороченным
с N-конца доменом Fc**

```

1  MDAMKRLGCC VLLLCGAVFV SPGAETVHCD LOPVGPERDE VTYTTSQVSK
51  GCVAQAPNAI LEVHVLFLF PTGFSOLELT LQASKQNGTW PREVLLVLSV
101 NSSVFIHLQA LGIPLHLAYN SSLVTFQEPF GVNTTEPLSF PKTQILEWAA
151 ERGPITSAAE LNDPQSIILR LGQAOQSLSF CMLEASQDMG RTELWRPRTP
201 ALVRGCHLEG VAGHKAEAHIL RVLPGHSAGP RTVTVKVELS CAPGDLDAVL
251 ILQGPPYVSW LIDANHNMOI WTTGEYSFKI FPEKNIRGFK LPDTPQGLLG
301 EARMLNASIV ASFVELPLAS IVSLHASSCG GRLQTSPAPI QTTPPKDTCS
351 PELLMSLIQT KCADDAMTLV LKKELVAHLK CTITGLTFWD PSCEAEDRGD
401 KFVLRSAYSS CGMQLSASMI SNEAVVNILS SSSPQRKKVH CLNMDSLSFQ
451 LGLYLSPHFL QASNTIEPGQ QSFVQVRVSP SVSEFLLQLD SCHLDLGPEG
501 GTVELIQLGRA AKGNCVSSLPS PSPEGDPRFS FLLHFYTVPI PKTGTLSCTV
551 ALRPKTGSOD QEVHRTVFMR LNTISPDLSG CTSKGGGGT HTCPPCPAPE
601 LLGGPSVFLF PPKPKDTLMN SRTPEVTCCV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE
651 VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCRV SNKALPAPIE
701 KTISKAKGQP REPOVYTLPP SREEMTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES
751 NGQPENNYKT TPPVLDSDGS FFLYSKLTVD KSRWQOQGNVF SCSVMHEALH
801 NHYTQKSLSL SPGK
(SEQ ID NO: 18)

```

Фиг. 15

Аминокислотная последовательность mENG(27-581)-mFc

```

1  MDAMKRLGCC VLLLCGAVFV SPGGERVCCD LOPVDPTRGE VTFTTSQVSE
51  GCVAQAAANAV REVHVLFLDF PGMLSHLELT LQASKQNGTE TQEVLFLVLS
101 NKNVFVKFOA PEIPLHLAYD SSLVIFQGQP RVNITVLPPL TSRKQILDWA
151 ATKGAITSIA ALDDPQSIVL OLGQDPKAPP LCLPEAHKDM GATLWQOPRA
201 QTPVQSCRLE GVSGHKEAVI LRILPGSEAG PRTVTVMML SCTSGDAILI
251 LHGPPYVSWF IDINHSMQIL TTGEYSVKIF PGSKVKGVEL PDTPOGLIAE
301 ARKLNASIVT SFVELPLVSN VSLRASSCGG VFQTPAPVV TPPKDTCSPE
351 VLLMSLIQPK CGNQVMTLAL NKKHVQTLQC TITGLTFWDS SCQAEDTDDH
401 LVLSSAYSSC GMKVTAHVVS NEVIISFPSC SPPLRKKVQC IDMDSLSFQI
451 GLYLSPHFLQ ASNTIELGQQ AFVQVSVSPL TSEVTVQOLDS CHLDLGPEGD
501 MVELIQSRTA KGSCVTLLSP SPEDPREFSF LLRVYMVPTP TAGTILSCNLA
551 LRPSTLISOEV YKTVSMRLNI VSPDLSGKGT GGCEPRVPIT QNPPCPLKEC
601 PPCAAPDLLG GPSVFIFPPK IKDVLMISSL PMVTCVVVDV SEDDPDVQIS
651 WFVNNNEVHT AQTQTHREDY NSTLRVVSAL PIQHQDWMSG KEFKCKVNNR
701 ALPSPIEKTI SKPRGPVRAP QVYVLPPPAE EMTKKEFSLT CMITGFLPAA
751 IAVDWTSNGR TEQNYKNTAT VLDSDGSYFM YSKLRVQKST WERGSLFACS
801 VVHEGLHNEL TTKTISRSLG K
(SEQ ID NO: 19)

```

Фиг. 16

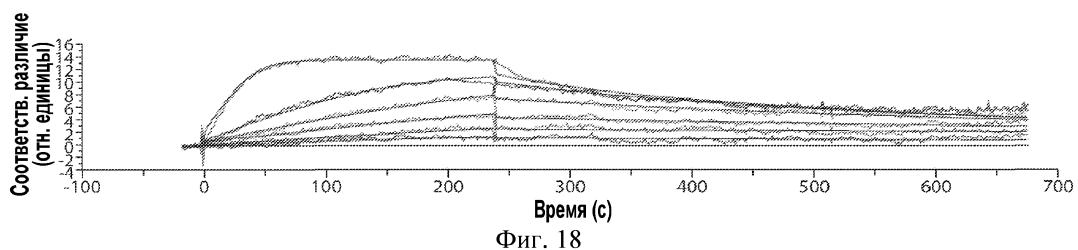
Нуклеотидная последовательность, кодирующая mENG(27-581)-mFc

1 ATGGATGCAA TGAAGAGAGG CCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC
 AGTCTTCGTT TCCCCCGGCG GGGAAAGAGT CGGCTGTGAT CTACAGCCTG
 101 TGGACCCAC AAGGGGTGAG GTGACGTTA CCACCAAGCC AAGTCTCCGAG
 GGCTGTGAG CTCAGGCTGC CAATGCTGTC CGTGAAGTCC ACGTTCTCTT
 201 CCTGGATTTT CCCGGAAATGC TGTACATCT GGAGCTGACT CTTCAGGCAT
 CCAAGCAAA TGGCACGGAG ACCCAGGAGG TGTTCTGGT CCTCGTTCG
 301 AACAAAAATG TCTTCGTGAA GTTCCAGGCC CGGGAAATCC CATTGCACTT
 GGCCTACGAC TCCAGCCTGG TCATCTTCCA AGGACAGCC AAGTCAACA
 401 TCACAGTGCT ACCATCCCTT ACCTCCAGGA AACAGATCCT CGACTGGGCA
 GCCACCAAGG GCGCCATCAC CTCGATAGCA GCACTGGATG ACCCCAAAG
 501 CATCGTCTC CAGTTGGGCC AAGACCCAAA GGCACCATTC TTGTGCTTGC
 CAGAAGCTCA CAAGGACATG GGCAGCACAC TTGAATGGCA ACCACGAGCC
 601 CAGACCCAG TCCAAAGCTG TCGCTTGAA GGTGTGTCTG GCCACAAGGA
 GGCCTACATC CTGAGGATCC TGCCAGGTTG TGAGGCCGGG CCCCCGACGG
 701 TGACCGTAAT GATGGAACATG AGTTGCACAT CTGGGGACGC CATTCTCATC
 CTGCATGGTC CTCCATATGT CTCCCTGGTC ATCGACATCA ACCACAGCAT
 801 GCAGATCTTG ACCACAGGTG AATACTCCGT CAAGATCTT CCAGGAAGCA
 AGGTCAAAGG CGTGGAGCTC CCAGACACAC CCCAAGGCCT GATAGCGGAG
 901 GCCCCGAAGC TCAATGCCAG CATTGTCACC TCCCTTGTAG AGCTCCCTCT
 GGTCAACAT GTCTCCCTGA GGGCCTCCAG CTGCGGTGGT GTGTTCCAGA
 1001 CCACCCCTGC ACCCGTTGTG ACCACACCTC CCAAGGACAC ATGCAGCCCC
 GTGCTACTCA TGTCCCTGAT CCAGCCAAAG TGTGGCAATC AGGTCAATGAC
 1101 TCTGGACTC AATAAAAAAC ACGTGCAGAC TCTCCAGTGC ACCATCACAG
 GCCTGACTT CTGGGACTCC AGCTGCCAG CTGAAGACAC TGACGACCAT
 1201 CTTGTCCTGA GTAGCGCTA CTCCAGCTGC GGCAAGAAAG TGACAGCCA
 TGTGGTCAGC AATGAGGTGA TCATCAGTT CCCGTCAGGC TCACCACAC
 1301 TTCGGAAAAA GGTACAGTGC ATCGACATGG ACAGCCTCTC CTTCCAGCTG
 GGCCTCTACC TCAGCCCGCA CTTCCTCCAG GCATCCAACA CCATCGAACT
 1401 AGGCCAGCAG GCCTCGTAC AGGTGAGCGT GTCTCCATTG ACCTCTGAGG
 TCACAGTCCA GCTAGATAGC TCCCACATCTGG ACTTGGGCC CGAAGGGGAC
 1501 ATGGTGGAAC TCATCCAGAG CCCAACAGCC AAGGGCAGCT GTGTGACCTT
 GCTGTCCTCA AGCCCTGAAG GTGACCCACG CTTCAGCTTC CTCCCTCCGG
 1601 TCTACATGGT GCCCACACCC ACCGCTGGCA CCCTCACTTG CAACTTAGCT
 CTGCGCCCTA GCACCTTGTC CCAGGAAGTC TACAAGACAG TCTCCATGCG
 1701 CCTGAACATC GTCAAGCCCTG ACCTGTCTGG TAAAGGCACC CGTGGGGGTG
 AGCCCAGAGT GCCCATAACA CAGAACCCCT GTCCCTCCACT CAAAGAGTGT
 1801 CCCCCCATGCG CAGCTCCAGA CCTCTTGGGT GGACCATCCG TCTTCATCTT
 CCCTCCAAG ATCAAGGATG TACTCATGAT CTCCCTGAGC CCCATGGTCA
 1901 CATGTGTGGT GGTGGATGTG AGCGAGGATG ACCCAGACGT CCAGATCAGC
 TGGTTGTGA ACAACGTGGA AGTACACACA GCTCAGACAC AAACCCATAG
 2001 AGAGGATTAC AACAGTACTC TCCGGGTGGT CAGTGCCTC CCCATCCAGC
 ACCAGGACTG GATGAGTGGC AAGGAGTTCA AATGCAAGGT CAACAAAGA
 2101 GCCCCCTCCAT CCCCCCATCGA GAAAACCACAT TCAAAACCCCA GAGGGCCAGT
 AACAGCTCCA CAGGTATATG TCTTGCCTCC ACCAGCAGAA GAGATGACTA
 2201 AGAAAAGATTC CAGCTTGACCC TGCATGATCA CAGGCTTCTT ACCTGCCAA
 ATTGCTGTGG ACTGGACCAAG CAATGGCGT ACAGAGCAA ACTACAAGAA
 2301 CACCGCAACA GTCCCTGGACT CTGATGGTTC TTACTTCATG TACAGCAAGC
 TCAGAGTACA AAAGACCACT TGGGAAAGAG GAAGTCTTTT CGCCTGCTCA
 2401 GTGGTCCACG AGGGTCTGCA CAATCACCTT ACGACTAAGA CCATCTCCCG
 GTCTCTGGGT AAATGA

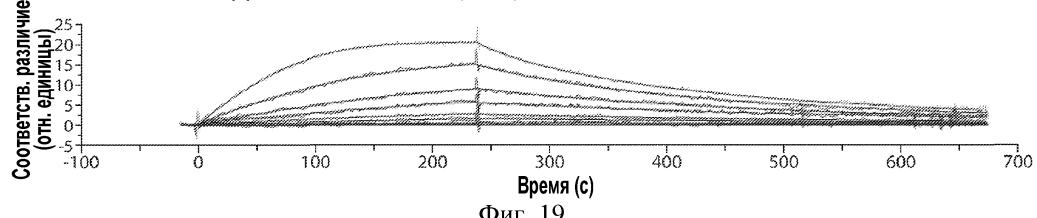
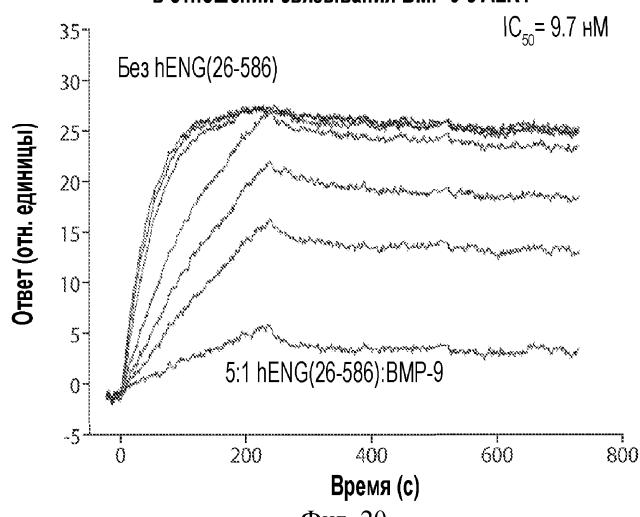
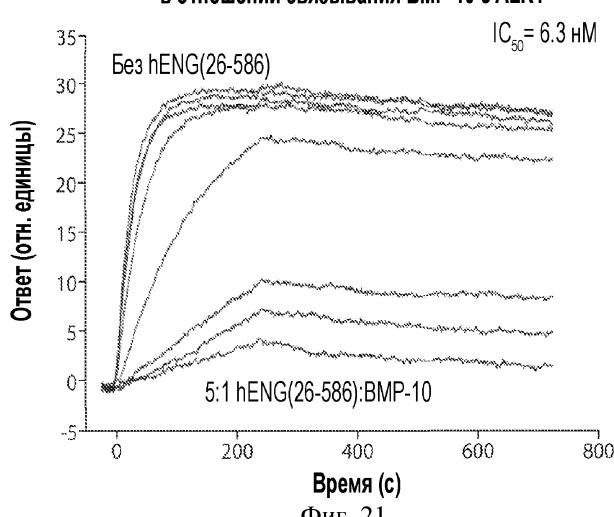
(SEQ ID NO: 20)

Фиг. 17

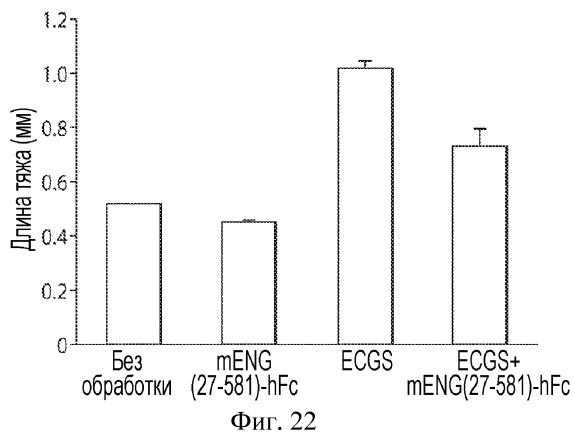
Высокоаффинное связывание hENG(26-586)-hFc с BMP-9



Высокоаффинное связывание hENG(26-586)-hFc с BMP-10

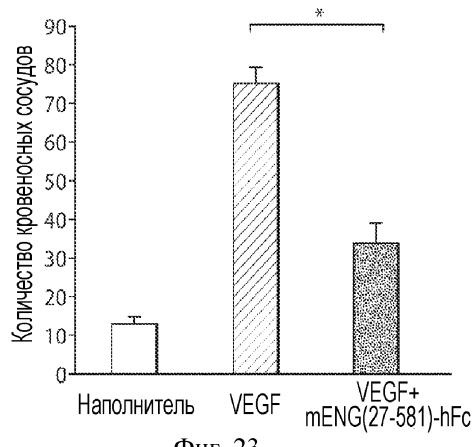
Эффект растворимого внеклеточного домена ENG человека, hENG(26-586),
в отношении связывания BMP-9 с ALK1Эффект растворимого внеклеточного домена ENG человека, hENG(26-586),
в отношении связывания BMP-10 с ALK1

Эффект mENG(27-581)-hFc в отношении образования тяжа эндотелиальными клетками пупочной вены человека (HUVEC) в культуре



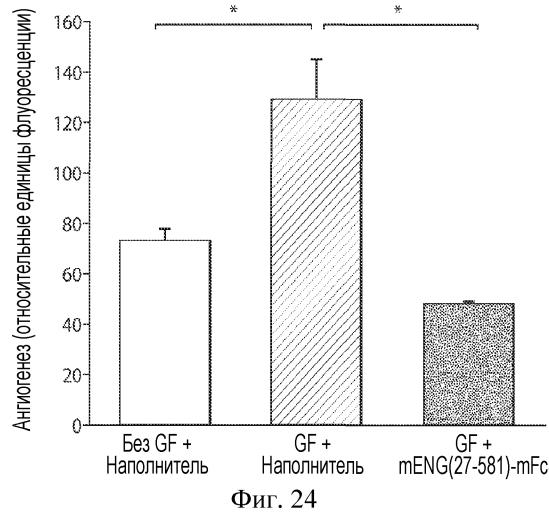
Фиг. 22

mENG(27-581)-hFc ингибирует ангиогенеза, стимулируемого VEGF, в анализе CAM



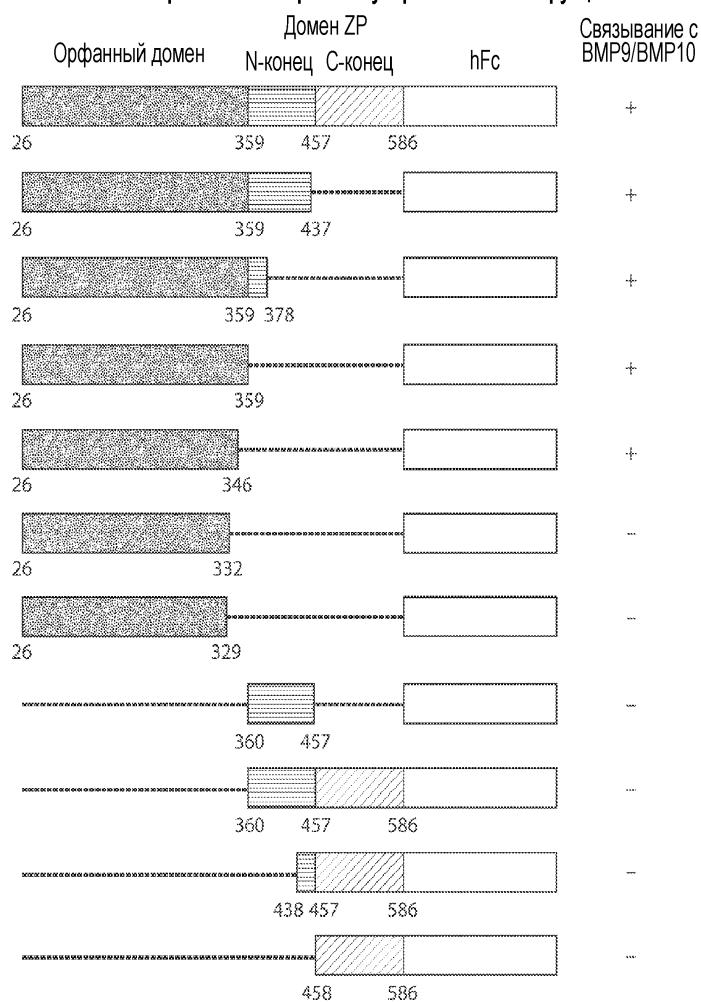
Фиг. 23

Эффект mENG(27-581)-hFc в отношении ангиогенеза, стимулируемого факторами роста, в анализе ангиореактора мыши



Фиг. 24

Схематическое сравнение выбранных укороченных конструкций hENG



Фиг. 25

Аминокислотная последовательность hENG(26-437)-hFc

```

1 MDAMKRLGCC VLLLCAVVFV SPGAETVHCD LQPGPERDE VTYTTSQVSK
51 GCVAQAPNAI LEVHVLLFLEPPGPSOLELT LOASKQNGTW PREVLLVLSV
101 NSSVFHLQA LGIPLHLAYN SSLVTFQEPP GVNTTELPSF PKTQILEWAA
151 ERGPITSAAE LNDPQSILLR LGQAQGSLSF CMLEASQDMG RTLEWRPRTPE
201 ALVRGCLEG VAGRKEAHIL RVLPGHSAGP RTVTVKVELS CAPGDLDAVL
251 ILQGPPVSW LIDANHNMQI WTTGEYSFKI FPEKNIRGFK LPDTPQGLLG
301 EARMLNASIV ASFVELPLAS IVSLHASSCG GRLOTSPAPI QTTPPKDTCS
351 PELLMSLIQT KCADDAMTLV LKKELVAHLK CTITGLTFWD PSCEAEDRRGD
401 KFVLRSAYS CGMQVSSASMI SNEAVVNILS SSSPORTTGG PKSCDKTHTC
451 PPCPAELLG GPSVFLFPPK PKDTILMISRT PETCVVVDV SHEDPEVVKFN
501 WYVDGVEVHN AKTKPREEQY NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK
551 ALPAPIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSRE EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD
601 IAVEWESNGQ PENNYKTTPP VLDSDGSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS
651 VMHEALHNNY TQKSLSLSPG K
(SEQ ID NO: 21)

```

Фиг. 26

Нуклеотидная последовательность, кодирующая hENG(26-437)-hFc

1 ATGGATGCAA TGAAGAGAGG CCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC
 AGTCTTCGTT TCGCCCGGGCG CGGAAACAGT CCATTGTGAC CTTCAGCCTG
 101 TGGGCCCCGA GAGGGACGAG CTGACATATA CCACTAGCCA GGTCTCGAAG
 GGCTGCGTGG CTCAGGCCCG CAATGCCATC CTTGAAGTCC ATGTCCTCTT
 201 CCTGGAGTTTC CCAACGGGCC CGTCACAGCT GGAGCTGACT CTCCAGGCAT
 CCAAGCAAAA TGGCACCTGG CCCCGAGAGG TGCTTCTGTT CCTCAGTGT
 301 AACAGCAGTG TCTTCCTGCA TCTCCAGGCC CTGGGAATCC CACTGCACTT
 GGCCCTACAAT TCCAGCCTGG TCACCTTCCA AGAGCCCCCG GGGGTCAACA
 401 CCACAGAGCT GCCATCCTTC CCCAAGACCC AGATCCTTGA GTGGCAGCT
 GAGAGGGGCC CCATCACCTC TGCTGCTGAG CTGAATGACC CCCAGAGCAT
 501 CCTCCTCCGA CTGGGCCAAG CCCAGGGTC ACTGTCCCTTC TGCATGCTGG
 AAGCCAGCCA GGACATGGGC CGCACGCTCG AGTGGCGGCC GCCTACTCCA
 601 GCCTTGGTCC GGGGCTGCCA CTTGGAAAGC GTGGCCGGCC ACAAGGAGGC
 GCACATCCTG AGGGTCCCTGC CGGGCCACTC GGCCGGGCC CGGACGGTGA
 701 CGGTGAAGGT GGAACTGAGC TGCCCACCCG GGGATCTCGA TGCCGTCTC
 ATCCTGCAGG GTCCCCCTTA CGTGTCTGG CTCATCGACG CCAACCACAA
 801 CATGCAGATC TGGACCACTG GAGAATACTC CTTCAAGATC TTTCCAGAGA
 AAAACATTG TGGCTTCAAG CTCCCAGACA CACCTCAAGG CCTCCTGGGG
 901 GAGGCCCGGA TGCTCAATGC CAGCATTGTG GCATCCTTCG TGGAGCTACC
 GCTGGCCAGC ATTGTCTCAC TTCATGCCTC CAGCTGCGGT GGTAGGCTGC
 1001 AGACCTCACC CGCACCGATC CAGACCACTC CTCCCAAGGA CACTTGTAGC
 CCGGAGCTGC TCATGTCTT GATCCAGACA AACTGTGCCG ACCACGCCAT
 1101 GACCCTGGTA CTAAAGAAAAG AGCTTGTG GCATTTGAAG TGCACCATCA
 CGGGCCTGAC CTTCTGGGAC CCCAGCTGTG AGGCAGAGGA CAGGGGTGAC
 1201 AAGTTGTCT TCGCAGTGC TTACTCCAGC TGTGGCATGC AGGTGTCAAGC
 AAGTATGATC AGCAATGAGG CGGTGGTCAA TATCCTGTG AGCTCATCAC
 1301 CACAGCGCAC CGGIGGTGGA CCCAAATCTT GTGACAAAAC TCACACATGC
 CCACCGTGCC CAGCACCTGA ACTCCTGGGG GGACCGTCAAG TCTTCCCTCTT
 1401 CCCCCCAAAA CCCAAGGACA CCCTCATGAT CTCCCGGACC CCTGAGGTCA
 CATGCGTGGT GGTGGACGTG AGCCACGAAG ACCCTGAGGT CAAGTTCAAC
 1501 TGGTACGTGG ACGGCGTGGG GGTGCATAAT GCCAAGACAA AGCCCGGGGA
 GGAGCACTAC AACAGCACGT ACCGTGTGGT CAGCGTCCCTC ACCGTCCCTGC
 1601 ACCAGGACTG GCTGAATGGC AAGGAGTACA AGTGCAGGT CTCCAACAAA
 GCCCTCCCAG CCCCCATCGA GAAAACCATC TCCAAAGCCA AAGGGCAGCC
 1701 CCGAGAACCA CAGGTGTACA CCCTCCCCC ATCCCCGGAG GAGATGACCA
 AGAACCAAGGT CAGCCTGACC TGCCTGGTCA AAGGCTTCTA TCCCAGGCAC
 1801 ATCGCCGTGG AGTGGGAGAG CAATGGGCAG CCGGAGAACAA ACTACAAGAC
 CACGGCTCCC GTGCTGGACT CCGACGGCTC CTTCTTCCCTC TATAGCAAGC
 1901 TCACCGTGGG CAAGAGCAGG TGGCAGCAGG GGAACGTOTT CTCATGCTCC
 GTGATGCATG AGGCTCTGCA CAACCACTAC ACGCAGAAGA GCCTCTCCCT
 2001 GTCCCCGGGT AAATGA

(SEQ ID NO: 22)

Фиг. 27

Аминокислотная последовательность hENG(26-378)-hFc

1 MDAMKRLGCC VLLLCGAVFV SP**G**AETVHCD LQPVGPERDE VTYTTSQVSK
 51 GCVAQAPNAI LEVHVLFLEF PTG**P**SOLELT LOASKQNGTW PREVLLVLSV
 101 NSSVFLHQA LGIPLHLAYN SSLVTFQEPP GVNNTTELPSF PKTQILEWAA
 151 ERGPITSAAE LNDPQSILLR LGQAQGSLSF CMLEASQDMG RTLEWRPRTP
 201 ALVRGCHLEG VAGRKEARIL RVLPGHSAGP RTVTVKVELS CAPGDLDAVL
 251 ILQGPPYVSW LIDANHNMOI WTTGEYSFKI FPEKNIRGFK LPDTPQGLLG
 301 EARMLNASIV ASFVELPLAS IVSLHASSCG GRLQTPSPAPI QTTPPKDTCS
 351 PELLMSLIOT KCADDAMTLV LKKEVLATGG GTHTCPPCPA PELLGGPSVF
 401 LFPPPKKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG VEVHNNAKTP
 451 REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVSNKALPAP IEKTISKAKG
 501 QPREPQVYTL PPSREEMTKN QVSLTCLVKG FYPSPDIAVEW ESNQOPENNY
 551 KTTPPVLDSD GSFFFLYSKLT VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL
 601 SLSPGK

(SEQ ID NO: 23)

Фиг. 28

Нуклеотидная последовательность, кодирующая hENG(26-378)-hFc

1 ATGGATGCAA TCAAGAGAGG GCTCTGCTGT CTGCTCTGC TGTGTGGAGC AGTCTTCGTT
 61 TCGCCGGCG CGAAACAGT CCATTGAGC CTTCAGCCTG TGGGCCCGA GAGGGACGAG
 121 GTGACATATA CCACTAGCCA GGTCTCGAAG GGCTGCGTGG CTCAGGCCCC CAATGCCATC
 181 CTTGAAGTCC ATGTCCTCTT CCTGGAGTTC CCAACGGGCC CGTCACAGCT GGAGCTGACT
 241 CTCCAGGCAT CCAAGCAAAA TGGCACCTGG CCCCCAGAGG TGCTCTGGT CCTCACTGTA
 301 AACAGCAGTG TCTTCCTGCA TCTCCAGGCC CTGGGAATCC CACTGCACCTT GGCTCTACAAT
 361 TCCAGCCTGG TCACCTTCCA AGAGCCCCCG GGGCTCAACA CCACAGAGCT GCCATCCTTC
 421 CCAAGACCC AGATCCTTGA GTGGGAGCT GAGAGGGCC CCATCACCTC TGCTGCTGAG
 481 CTGAATGACC CCCAGAGCAT CCTCCTCCGA CTGGGCAAG CCCAGGGGTC ACTGTCTTC
 541 TGCATGCTGG AAGCCAGCCA GGACATGGGC CGCACGGCTCG AGTGGCGGCC GCGTACTCCA
 601 GCCTTGGTCC GGGGCTGCCA CCTGGAAGGC GTGGCCGGCC ACAAGGAGGC GCACATCCTG
 661 AGGGTCCCTGC CGGGCCACTC GGCGGGGCC CGGACGGTGA CGGTGAAGGT GGAACGTGAGC
 721 TCCGGCACCCG GGGATCTCGA TCCCGTCCTC ATCCCTCAGG CTCCCCCTA CGTGTCTGG
 781 CTCATCGACG CCAACCACAA CATGCAGATC TGGACCACTG GAGAATACTC CTTCAAGATC
 841 TTTCCAGAGA AAAACATTAG TGGCTTCAAG CTCCCAGACA CACCTCAAGG CCTCCTGGGG
 901 GAGGCCCGGA TGCTCAATGC CAGCATTGTG GCATCCCTCG TGGAGCTACC GCTGGCCAGC
 961 ATTGTCTCAC TTCATGCCTC CAGCTGCCGT GGTAGGCTGC AGACCTCACC CGCACCGATC
 1021 CAGACCACTC CTCCCAAGGA CACTTGTAGC CGGGAGCTGC TCATGTCTTT GATCCAGACA
 1081 AAGTGTGCCG ACGACCCAT GACCCCTGCTA CTAAAGAAAG AGCTTGTGCA GACCGGTGGT
 1141 GCAACTCACA CATGCCCACT GTGCCAGCA CCTGAACCTCC TGGGGGGACC GTCACTCTTC
 1201 CTCTTCCCCC CAAAACCCAA GGACACCCCTC ATGATCTCC GGACCCCTGA GGTCACTGC
 1261 GTGGTGGTGG ACCTGAGCCA CGAAGACCT GAGGTCAGT TCAACTGGTA CGTGGACGGC
 1321 GTGGAGGTGC ATAATGCCAA GACAAAGCCG CGGGAGGAGC AGTACAACAG CACGTACCGT
 1381 GTGGTCACCG TCCCTCACCG CCTGCACCAAG GACTGGCTGA ATGGCAAGGA GTACAAGTGC
 1441 AAGGTCTCCA ACAAAAGCCCT CCCAGCCCCC ATCGAGAAAA CCATCTCAA AGCCAAAGGG
 1501 CAGCCCCGAG AACCACAGGT GTACACCCCTG CCCCCATCCC GGGAGGAGAT GACCAAGAAC
 1561 CAGGTCAAGCC TGACCTGCC GGTCAAAGGC TTCTATCCA GCGACATCGC CGTGGAGTGG
 1621 GAGACCAATG GGCAGCCGGA GAACAACATAC AAGACCACGC CTCCCGTGC GGACTCCGAC
 1681 GGCTCCTCTC TCCCTCATAG CAAGCTCACG GTGGACAAAGA GCAGGTGGCA GCAGGGAAC
 1741 GTCTTCTCAT GCTCCGTGAT CCATGAGGCT CTGCACAAACC ACTACACGCA GAAGACCTC
 1801 TCCCTGTCCC CGGGTAAATG A

(SEQ ID NO: 24)

Фиг. 29

Аминокислотная последовательность hENG(26-359)-hFc

1 MDAMKRLCC VLLLGAVFV SPGAETVHCD LOPVGPERDE VTYTTSQVSK
 51 GCVAQAPNAI LEVHVLFLEF PTGPMOLELT LOASKONCTW PREVLLVLSV
 101 NSSSVFLHLQA LGIPLHLAYN SSLVTFQEPP GVNTTELPSPF PKTQILEWAA
 151 ERGPITSAAE LNDPQSLR LQQAQGSLSF CMLEASQDMG RTLEWRPRTP
 201 ALVRGCHLEG VAGHKEAHIL RVLPGHSAGP RTVTVKVELS CAPGDLDAVL
 251 IHQGPPYVSW LIDANHNMQI WTTGEYSFKI FPEKNIRGFK LPDTQQLLG
 301 EARMILNASIV ASFVELPLAS IVSLHASSCG GRLQTSPAPI QTPPKDTCS
 351 PELLMSLITG GGPKSCDKTH TCPPCPAPEL LGGPSVPLFP PKPKDTLMIS
 401 RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS
 451 VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPS
 501 REEMTKNOVS LTCLVKGFYF SDIAVEWESN QOPENNYKTT PPVLDSDGSF
 551 FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVNHEALRN HYTQKSLSLS PGK

(SEQ ID NO: 25)

Фиг. 30

Нуклеотидная последовательность, кодирующая hENG(26-359)-hFc

1 ATGGATGCAA TGAAGACAGG GCTCTGCTGT CTGCTGCTGC TGTGTGGAGC
AGTCTTCGTT TCGCCCGGGCG CCGAAACAGT CCATTGTGAC CTTCAGCCTG
 101 TGGGCCCCGA GAGGGACGAG GTGACATATA CCACTAGCCA GGTCTCGAAG
GGCTGCGTGG CTCAGGCCCC CAATGCCATC CTTGAAGTCC ATGTCTCTT
 201 CCTGGAGTTCC CCAACGGGCC CGTCACAGCT GGAGCTGACT CTCCAGGCAT
CCAAGGAAAA TGGCACCTGG CCCCGAGAGG TCTTCTGTT CTCAGTGTAA
 301 AACAGCAGTG TCTTCCTGCA TCTCCAGGCC CTGGGAATCC CACTGCACCT
GGCCCTACAAT TCCAGCCTGG TCACCTTCCA AGAGCCCCCG GGGGTCACA
 401 CCACAGAGCT CCCATCCTTC CCCAAGACCC AGATCCTTGA GTGGGCAGCT
GAGAGGGGCC CCATCACCTC TGTCGCTGAG CTGAATGACC CCCAGAGCAT
 501 CCTCCCTCGA CTGGCCAAG CCCAGGGTC ACTGTCTTC TGCATGCTGG
AAGCCAGCCA GGACATGGGC CGCACGCTCG AGTGGGGGCC GCGTACTCCA
 601 GCCTTGGTCC GGGGCTGCC CTGGAAAGGC GTGGCCGGCC ACAAGGAGGC
GCACATCCTG AGGGTCTGC CGGCCACTC GGCGGGGCC CGGACGGTGA
 701 CGGTGAAGGT GGAAGTGAGC TGCCGACCCCG GGGATCTCGA TGCCGTCCTC
ATCCTGCAAG GTCCCCCTA CGTGTCTGG CTCATCGAGC CCAACCACAA
 801 CATGCAGATC TGGACCACTG GAGAACTTC CTTCAGATC TTTCCAGAGA
AAAACATTG TGGCTTCAG CTCCTCAGACA CACCTCAAGG CCTCCTGGGG
 901 GAGGCCCGGA TGCTCAATGC CAGCATTGTG GCATCCTTCG TGGAGCTACC
GCTGGCCAGC ATTGTCAC TTCACTGCC CAGCTGCGGT GGTAGGCTGC
 1001 AGACACTCACC CGCACCGATC CAGACCACTC CTCCCAAGGA CACTTGTACC
CCGGAGCTGC TCATGTCTT GATACCCGT GGTGGACCCA AATTTGTGA
 1101 CAAAACTCAC ACATGCCAC CGTGCCTCAGC ACCTGAACTC CTGGGGGGAC
CGTCAGTCTT CCTCTTCCCC CCAAAACCCA AGGACACCCCT CATGATCTCC
 1201 CGGACCCCTG AGGTACATC CGTGGTGGTG GACGTGAGCC ACGAAGACCC
TGAGGTCAAG TTCAACTGGT ACCTGGACGG CGTGGAGGTG CATAATGCCA
 1301 AGACAAAGCC CGGGCAGGAG CACTACAACA CCACGTACCG TGTGGTCACC
GTCCCTCACCG TCCCTCACCA GGACTGGTG AATGGCAAGG AGTACAAGTG
 1401 CAAGGGCTCC AACAAAGCCC TCCCAGCCCC CATCGAGAAA ACCATCTCCA
AAGCRAAGG GCAGCCCCGA GAACCAACAGG TGTACACCCCT GCCCCCATCC
 1501 CGGGAGGAGA TGACCAAGAA CCAGGTCAAC CTGACCTGCC TGGTCAAAGG
CTTCATCTCC AGCGACATCG CCTGGACTG GGAGAGCAAT GGGCAGCCGG
 1601 AGAACAACTA CAAGACCAAG CCTCCCCGTGC TGGACTCCGA CGGTCCCTC
TTCCCTCTATA GCAAGCTCAC CGTGGACAAG ACCAGGTGGC AGCAGGGGAA
 1701 CGTCCTCTCA TGCTCCGTGA TGCACTGAGGC TCTGCACAAAC CACTACACCC
AGAAGAGCCT CTCCCTGTCC CGGGGTAAAT GA

(SEQ ID NO: 26)

Фиг. 31

**Аминокислотная последовательность hENG(26-359)-hFc
с укороченным с N-конца доменом Fc**

```

1 MDAMKRLGCC VLLLCAVVFV SPGAAETVHCD LQPVGPERDE VTYTTSQVSK
51 GCVAQAPNAI LEVHVLFLEF PTGPSOLELT LQASKQNGTW PREVLLVLSY
101 NSSVFLHLQA LGIPLHLAYN SSLVTFQEPPE GVNTTELPSP PKTQILEWAA
151 ERGPITSAAE LNDPQSTILLR LGQAOQGSLSF CMLEASQDMG RTLEWRPRTP
201 ALVRGCHLEG VAGHKEAHIL RVLPGHSAGP RTVTVKVELS CAPGDLDAVL
251 ILOQPPYVSW LIDANHNMQI WTTGEYSFKI FPEKNIRGFK LPDTPQGLLG
301 EARMLNASIV ASTVELPLAS IVSLHASSCG GRLQTSAPPI QTTPPKDTCS
351 PELLMSLITG GGTHTCPPCP APELLGGPSV FLFPPPKPKDT LMISRTPEVT
401 CVVVDVSHED PEVKPNWYVD GVEVHNNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH
451 QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK
501 NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTPPVLDs DGSFFLYSKL
551 TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGK

(SEQ ID NO: 27)

```

Фиг. 32

**Нуклеотидная последовательность, кодирующая hENG(26-359)-hFc с
укороченным с N-конца доменом Fc**

```

1 ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC
AGTCTTCGTT TCGCCCGGCG CCCAAACAGT CCATTTGTGAC CTCAGGCCG
101 TGGGCCCGA GAGGGACGAG GTGACATATA CCACTAGCCA GGTCTCGAAG
GGCTGCGTGG CTCAGCCCC CAATGCCATC CTTGAAGTCC ATGCTCTCTT
201 CCTGGAGTTC CCAACGGGCC CGTCACAGCT GGAGCTGACT CTCCAGGCAT
CCAAGCAAAA TGCCACCTGG CCCCGAGAGG TGCTTCTGGT CCTCAGTGTA
301 AACAGCAGTG TCTTCCTGCA TCTCCAGGCC CTGGGAATCC CACTGGACTT
GGCCTACAAT TCCAGCCTGG TCACCTTCCA AGAGCCCCCG GGGGTCAACA
401 CCACAGAGT GCCATCTTC CCCAAGACCC AGATCTTGA GTGGGGAGCT
GAGAGGGGCC CCATCACCTC TGCTGCTGAG CTCAATGACC CCCAGGACAT
501 CCTCCTCCGA CTGGGCAAG CCCACGGGTC ACTGTCCTTC TGCATGCTGG
AAGCAGCCA GGACATGGC CGCACCGCTCG AGTGGCGGCC GCCTACTCCA
601 GCCTTGGTCC GGGGCTGCCA CTTGGAAGGC GTGGCCGGCC ACAAGGAGGC
GCACATCTG AGGGTCTTGC CGGGCCACTC GGCGGGGCC CGGACGGTGA
701 CGGTGAAGGT GGAACTGAGC TGCGCACCCG GGGATCTCGA TGCGTCTTC
ATCCTGCAAG GTCCCCCTTA CGTGTCTGG CTCATCGACG CCAACCACAA
801 CATGCAGATC TGGACCACTG GAGAATAACTC CTTCAAGATC TTTCCAGAGA
AAAACATTG TGGCTCAAG CTCCAGACA CACCTCAAGG CCTCCTGGGG
901 GAGGCCCGA TGCTCAATGC CAGCATTGTC GCATCCTTCG TGGAGCTACC
GCTGGCCAGC ATTGTCTCAC TTCATGCCCTC CAGCTGCCGT GTIAGGCTGC
1001 AGACCTCACC CGCACCGATC CAGACCACTC CTCCCAAGGA CACTTGTAGC
CCGGAGCTG TCATGTCCTT GATGACCGGT GGTGGAACTC ACACATGCC
1101 ACCGTGCCCA GCACCTGAAC TCCTGGGGGG ACCGTCAGTC TTCCCTCTCC
CCCCAAACC CAAGGACACC CTCATGATCT CCCGGACCCC TGAGGTCACA
1201 TGCCTGGTGG TGGACGTGAG CCACGAAGAC CCTGAGGTCA ASTTCAACTG
GTACGTGGAC CGCGTGGAGG TGCATAATGC CAAGACAAAG CGCGGGGAGG
1301 AGCAGTACAA CACGACCGTAC CGTGTGGTCA GCCTCCTCAC CGTCCTGCAC
CAGGACTGGC TGAATGGCAA GGAGTACAAG TGCAAGGTCT CCAACAAAGC
1401 CCTCCCAGCC CCCATCGAGA AAACCATCTC CAAAGCCAAA GGGCAGCCCC
GAGAACACA GGTGTACACC CTGCCCCCAT CCCGGGAGGA GATGACCAAG
1501 AACCCAGTCA GCCTGACCTG CCTGCTCAA GGCTCTATC CCAGCGACAT
CGCCGTGGAG TGGGAGAGCA ATGGGCAGCC GGAGAACAAAC TACAAGACCA
1601 CGCCTCCCGT GCTGGACTCC GACGGCTCCT TCTTCCTCTA TAGCAAGCTC
ACCCGTGACA AGAGCAGGTG CGAGCAGGGG AACCTCTCT CATGCTCCGT
1701 GATGCATGAG GCTCTGCACA ACCACTACAC GCAGAAGAGC CTCTCCCTGT
CCCCGGGTAA ATGA

(SEQ ID NO: 28)

```

Фиг. 33

Аминокислотная последовательность hENG(26-346)-hFc с укороченным с N-конца доменом Fc

```

1 MDAMKRLGCC VLLLCGAVFV SFGAETVHCD LQPVGPERDE VTYTTSQVSK
51 GCVAQAPNAI LEVHVLFLF PTGPSOLELT LOASKQNGTW PREVLLVLGV
101 NSSVFLHLQA LGIPLHLAYN SSLVTFOEPP GVNTTELPNF PKTQILLEWAA
151 ERGPITSAAE LNDPQSLLR LCQAOQGSLSF CMLEASQDMG RTLEWRPRTP
201 ALVRCGCHLEG VAGHKEAHIL RVLPGHSGAP RTVTVKVELS CAPGDLDAVL
251 ILQGPPYVSW LIDANHNMOI WTTGEYSFKI FPEKNIRGFK LPDTPQGLLG
301 EARMLNASIV ASFVELPLAS IVSLHASSCG GRLQTSPAPI QTTPPTGGGT
351 HTCPPCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDLMF SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV
401 KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV
451 SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP SREEMTKNQV SLTCLVKGFY
501 PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSDGS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF
551 SCSVMHEALH NYHTQKSLSL SPGK

```

(SEQ ID NO: 29)

Фиг. 34

Нуклеотидная последовательность, кодирующая hENG(26-346)-hFc с укороченным с N-конца доменом Fc

```

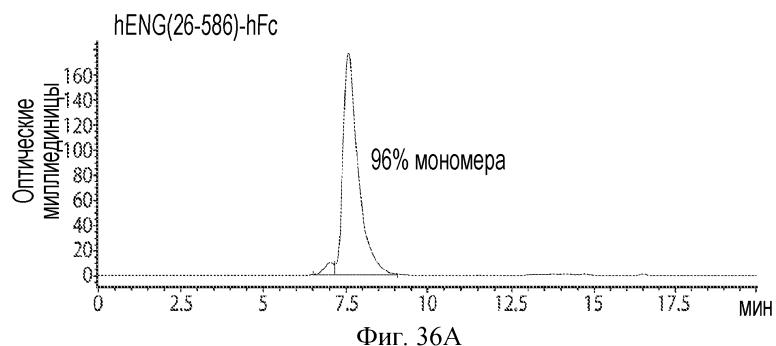
1 ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC AGTCTTCGTT
61 TCGCCCGGGGG CGGAAACAGT CCATTGTGAC CTTCAGCCTG TGGGGCCCGA GAGGGACGAG
121 GTGACATATA CCACTAGCCA GGTCTCGAAG GGCTGCGTGG CTCAGGCCCG CAATGCCATC
181 CTTGAAGTCC ATGTCCTCTT CCTGGAGTTC CCAACGGGCC CGTCACAGCT GGAGCTGACT
241 CTCCAGGCAT CCAAGCAAAA TGGCACCTGG CCCCAGAGG TGCTTCTGGT CCTCAGTGTAA
301 AACAGCACTG TCTTCCTGCA TCTCCAGGCC CTGGGAATCC CACTGCACTT GGCTCTACAAT
361 TCCAGCCTGG TCACCTTCCA AGAGCCCCG GGGGTCAACA CCACAGAGCT GGCATCCTTC
421 CCCAAGACCC AGATCCTTGA GTGGGCAGCT GAGAGGGGCC CCATCACCTC TGCTGCTGAG
481 CTGAATGACC CCCAGAGCAT CCTCCCTCCGA CTGGGCCAAG CCCAGGGCTC ACTGTCCTTC
541 TGCATGCTGG AAGCCAGCCA GGACATGGGC CGCACGCTCG AGTGGGGGCC GCGTACTCCA
601 GCCTTGGTCC GGGCTGCCA CTTGCAAGGC GTGGCCGGCC ACAAGCAGGC GCACATCCTG
661 AGGGTCTGCG CGGGCCACTC GGCGGGGCC CGGACGGTGA CGGTGAAGGT GGAACTGAGC
721 TGCCGACCCCG GGGATCTCCA TGCGCTCTC ATCTGCAAGG GTCCCCCTA CGTGTCTGG
781 CTCATCGAGC CCAACCACAA CATGCAGATC TGGACCACTG GAGAATACTC CTTCAAGATC
841 TTTCCAGAGA AAAACATTG TGGCTTCAAG CTCCAGACA CACCTCAAGG CCTCCTGGGG
901 GAGGCCCGGA TGCTCAATGC CAGCATGTG GCATCCTTC TGAGCTACC GCTGGCCAGC
961 ATGTCTCAC TTCACTGCCCTC CAGCTGCCGT GGTAGGCTGC AGACCTCACC CGCACCGATC
1021 CAGACCACTC CTCACCCACCGG TGGTGGAACT CACACATGCC CACCGTGGCC AGCACCTGAA
1081 CTCCTGGGG CACCGTCAGT CTTCTCTTC CCCCCAAAAC CCAAGGACAC CCTCATGATC
1141 TCCCGGACCC CTGAGGTAC ATGCGTGGTG GTGGACGTGA GCCACCAAGA CCCTGAGGTC
1201 AAGTTCAACT GGTACGTGGA CGGGCTGGAG GTGCATAATG CCAAGACAAA GCCGGGGAG
1261 GACCACTACA ACAGCACGTA CGGTCTGGTC AGCGTCCCTCA CCGTCCTGCA CCAGGACTGG
1321 CTGAATGGCA AGGAGTACAA GTGCAAGGTC TCCAACAAAG CCCTCCCAGC CCCCATCGAG
1381 AAAACCATCT CCAAAGCCAA AGGGCAGGCC CGAGAACACAG AGGTGTACAC CCTGCCCCCA
1441 TCCCGGGAGG AGATGACCAA GAACCAGGTC AGCCTGACCT GCCTGGTCAA AGGCTTCTAT
1501 CCCAGCGACA TCGCCGTGGA GTGGGAGAGC AATGGGCAGC CGGAGAACAA CTACAAGACC
1561 ACACCTCCCG TGCTGGACTC CGACGGCTCC TTCTCTCT ATAGCAAGCT CACCGTGGAC
1621 AAGAGCAGGT GGCAGCAGGG GAACGCTCTC TCATGCTCCG TGATGCATGA GGCTCTGCAC
1681 AACCACTACA CGCAGAAGAG CCTCTCCCTG TCCCCGGTA AATGA

```

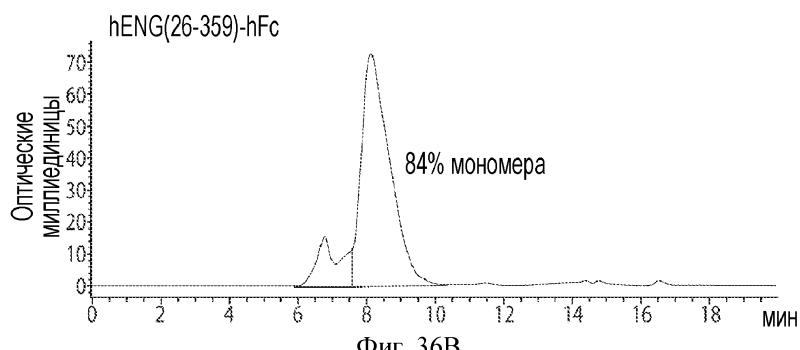
(SEQ ID NO: 30)

Фиг. 35

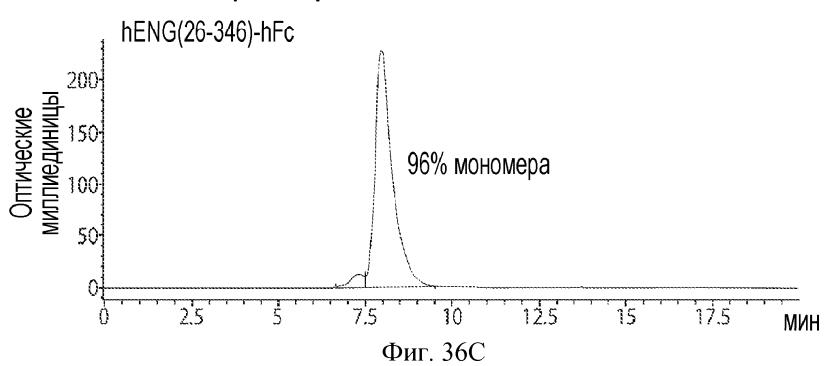
Эксклюзионная хроматограмма белков hENG-hFc после начальной очистки



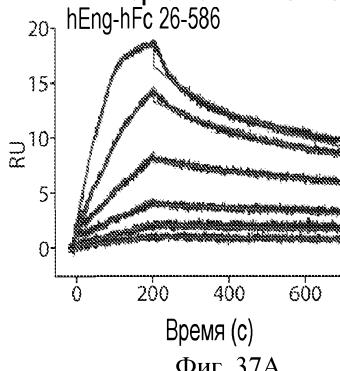
Эксклюзионная хроматограмма белков hENG-hFc после начальной очистки



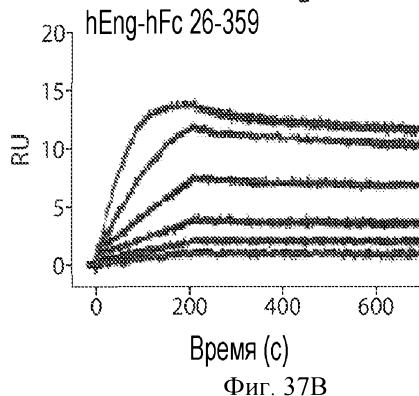
Эксклюзионная хроматограмма белков hENG-hFc после начальной очистки



Определение характеристик высокоаффинного связывания BMP-9 с вариантами hENG-hFc

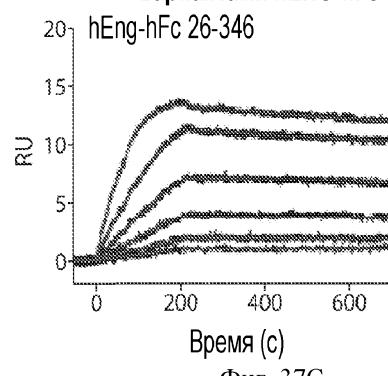


Определение характеристик высокоаффинного связывания BMP-9 с вариантами hENG-hFc



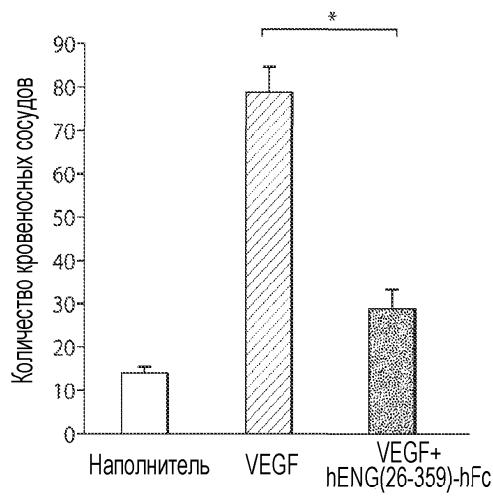
Фиг. 37В

Определение характеристик высокоаффинного связывания BMP-9 с вариантами hENG-hFc



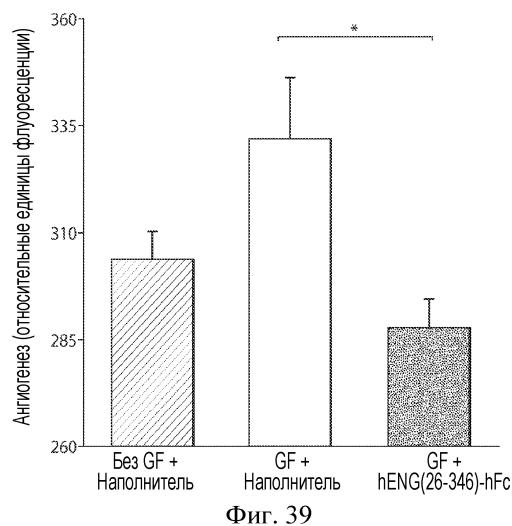
Фиг. 37С

hENG(26-359)-hFc ингибирует ангиогенез, стимулируемого VEGF, в анализе CAM



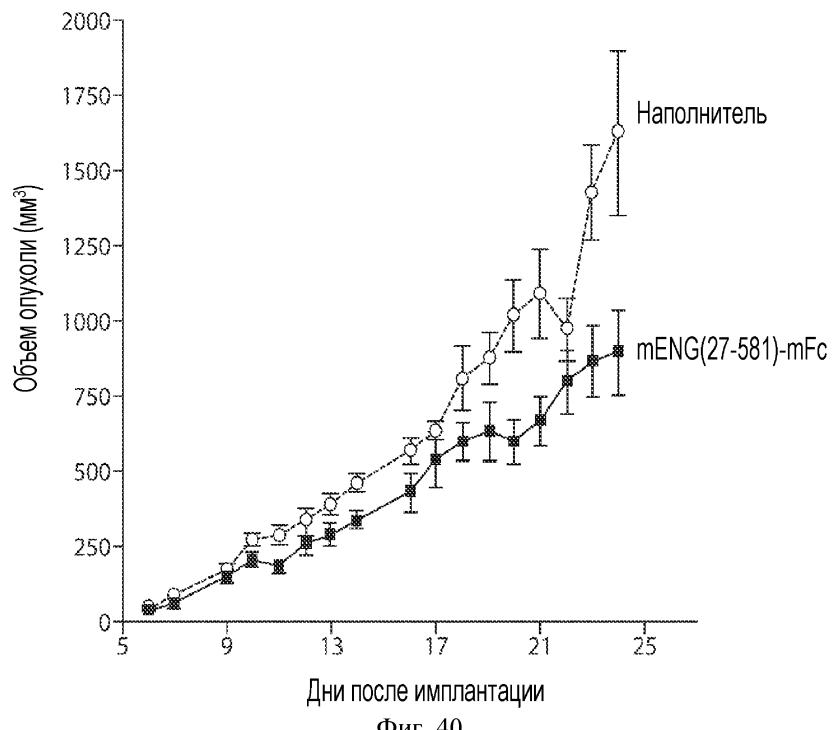
Фиг. 38

Эффект hENG(26-346)-hFc в отношении ангиогенеза, стимулируемого факторами роста, в анализе аngиореактора мыши



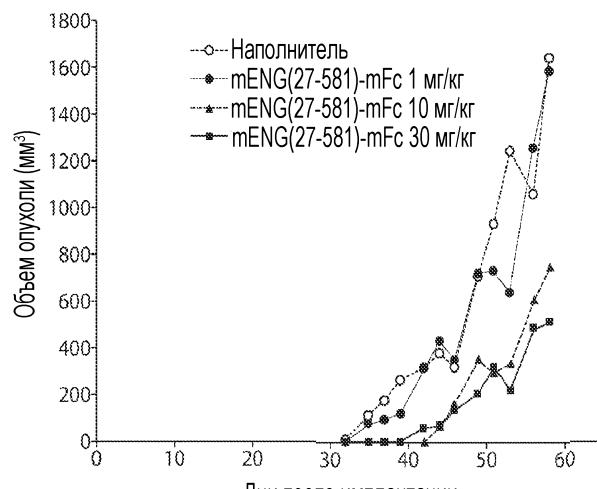
Фиг. 39

Эффект mENG(27-581)-mFc в отношении роста опухолей молочной железы 4T1 у мышей



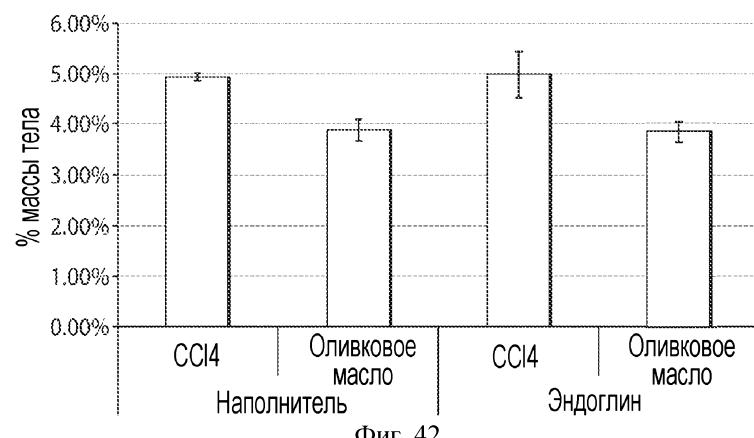
Фиг. 40

Эффект mENG(27-581)-mFc в отношении роста опухолей Colon-26 у мышей

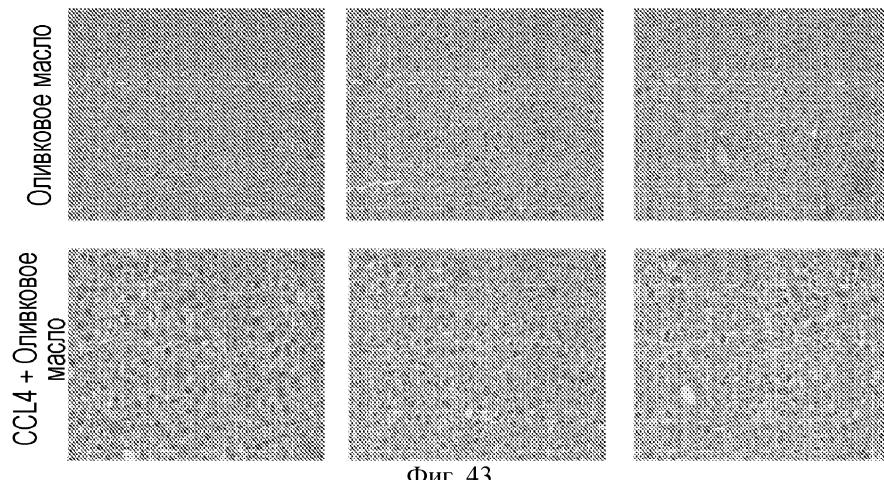


Фиг. 41

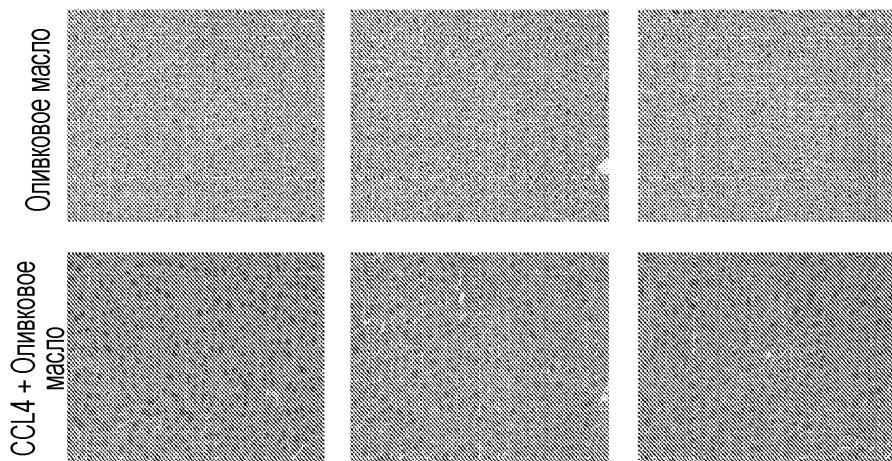
Печень как % массы тела



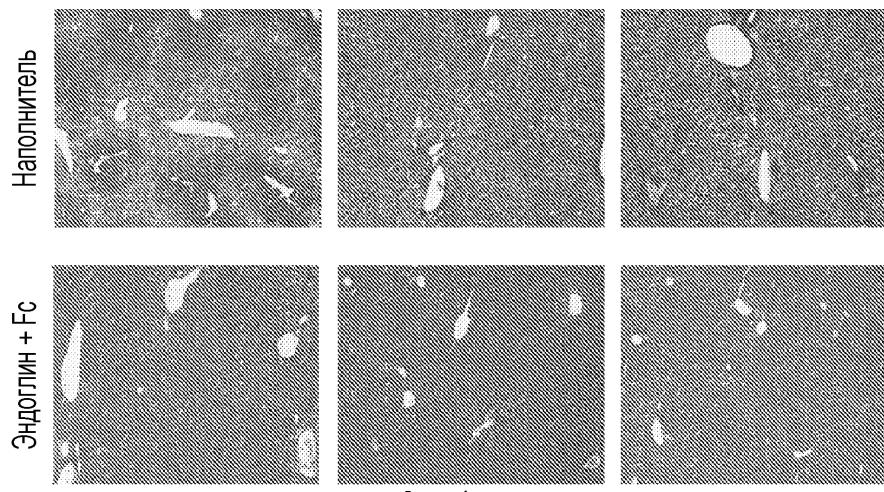
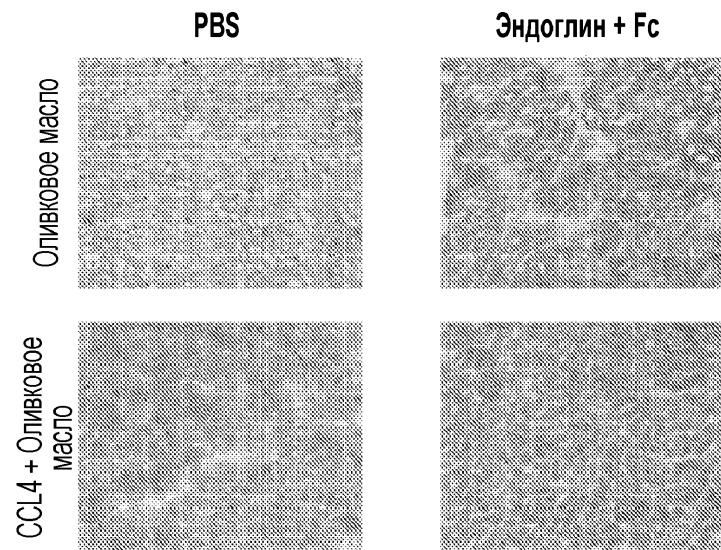
Фиг. 42



Фиг. 43



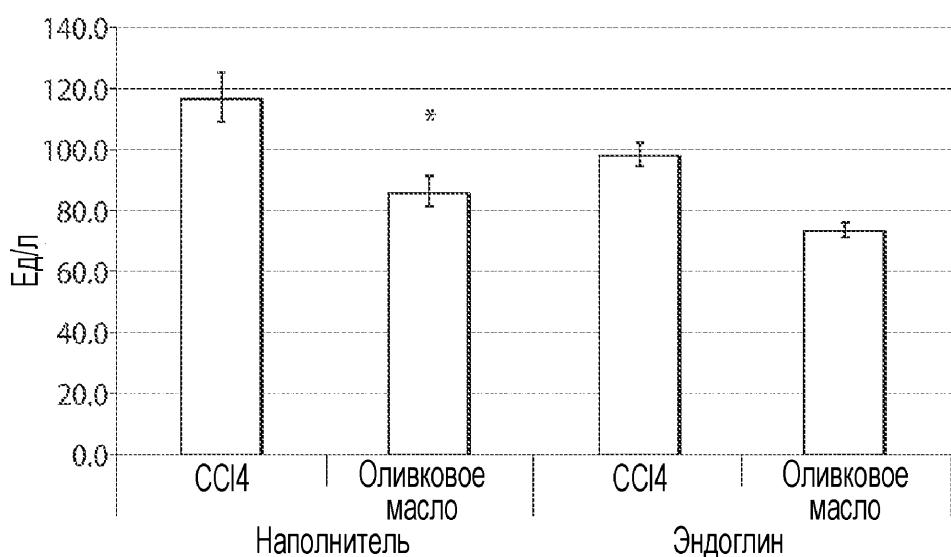
Фиг. 44

Фиг. 4
5

Животные, которым вводили эндоглибин-Fc, имели наименьшую процентную долю печени с обширным положительным окрашиванием масляным красным О

Фиг. 46

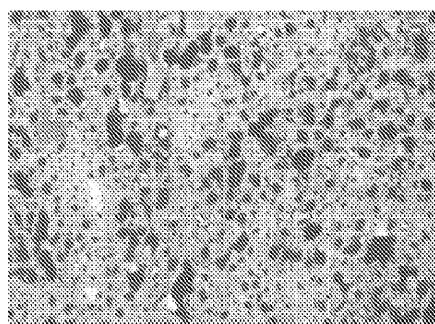
Уровни щелочной фосфатазы



* $p<0,05$ по сравнению с наполнителем+CCl4

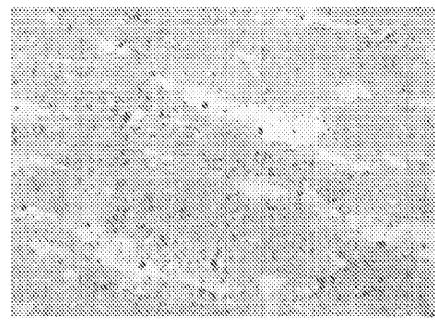
Фиг. 47

Наполнитель



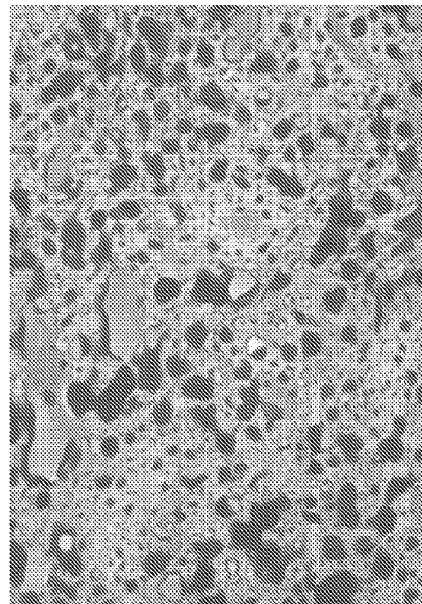
Фиг. 48А

ENG-Fc



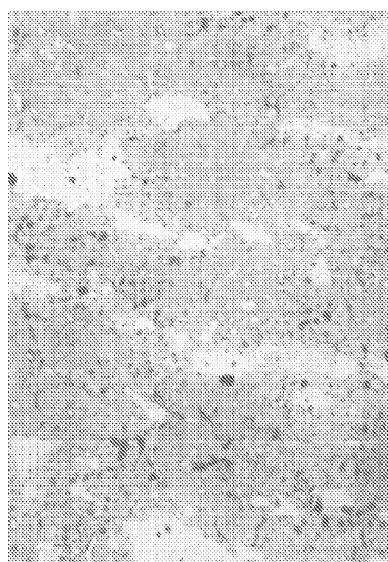
Фиг. 48В

Наполнитель



Фиг. 48С

ENG-Fc



Фиг. 48D



Евразийская патентная организация, ЕАПО
Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2