



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102099374 B

(45) 授权公告日 2016.06.08

(21) 申请号 200980125712.3

代理人 顾晋伟 田旻

(22) 申请日 2009.05.01

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

61/050,168 2008.05.02 US

61/144,131 2009.01.12 US

C07K 16/18(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

A61P 37/00(2006.01)

C07K 14/71(2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2010.12.31

(56) 对比文件

WO 2008057461 A2, 2008.05.15,

WO 2005113590 A2, 2005.12.01,

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2009/002699 2009.05.01

David Laurent 等. Identification of BMP9

(87) PCT国际申请的公布数据

W02009/134428 EN 2009.11.05

and BMP10 as functional activators of the orphan activin receptor-like kinase 1

(73) 专利权人 阿塞勒隆制药公司

地址 美国马萨诸塞州

专利权人 路德维格癌症研究有限公司

(ALK1) in endothelial cells. 《Blood》. 2007,

第 109 卷 (第 5 期), 1953-1961.

审查员 潘天耀

(72) 发明人 阿斯亚·格林贝格 约翰·克诺夫

拉温德拉·库马尔

罗伯特·斯科特·皮尔索尔

亚斯比尔·西拉

克里斯蒂安·彼得拉斯

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司

公司 11227

权利要求书3页 说明书32页

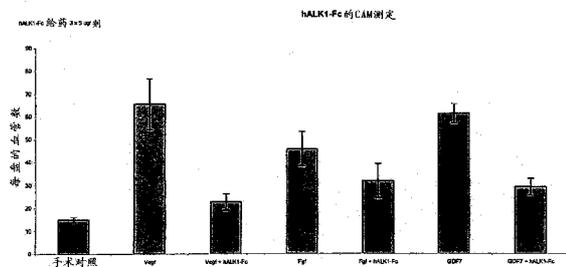
序列表12页 附图16页

(54) 发明名称

用于调节血管发生和周细胞包裹的基于 ALK1 拮抗剂的方法和组合物

(57) 摘要

在一些方面,本公开内容涉及以下见解,即包含激活蛋白样激酶 I(ALK1) 多肽细胞外区域之配体结合部分的多肽可用于抑制体内(特别是在患有血管发生相关疾病的哺乳动物中)血管发生。此外,本公开内容证实 ALK1 的抑制剂可用于提高血管化组织(包括肿瘤和视网膜)的周细胞包裹。本公开内容还鉴定了 ALK1 的配体,并证实这些配体具有促血管发生活性,同时描述了抑制受体-配体相互作用的抗体。



1. 一种包含ALK1-ECD多肽的药物制剂,其中所述多肽:
  - (a)起始于SEQ ID NO:1的第22位氨基酸,
  - (b)结束于SEQ ID NO:1的第113-123位之任一氨基酸,使用或不使用间插接头将该多肽与免疫球蛋白的Fc部分融合从而形成ALK1-Fc融合蛋白,并且  
其中所述ALK1-Fc融合蛋白的至少90%以二聚体形式存在。
2. 权利要求1的药物制剂,其中所述ALK1-Fc融合蛋白的Fc部分是人IgG1的Fc部分。
3. 权利要求1的药物制剂,其中所述ALK1-Fc融合蛋白的氨基酸序列为SEQ ID NO:3。
4. 权利要求1的药物制剂,其中所述ALK1-Fc融合蛋白通过在哺乳动物细胞系中表达SEQ ID NO:4的核酸来产生。
5. 权利要求4的药物制剂,其中所述ALK1-Fc融合蛋白通过在中国仓鼠卵巢(CHO)细胞系中表达SEQ ID NO:4的核酸来产生。
6. 权利要求1的药物制剂,其中所述药物制剂为适于施用于眼部的药物制剂。
7. 权利要求1-6中任一项的药物制剂,其中所述ALK1-Fc融合蛋白的至少95%以二聚体形式存在。
8. 权利要求1-6中任一项的药物制剂,其中所述ALK1-Fc融合蛋白的至少99%以二聚体形式存在。
9. 权利要求1的药物制剂在制备用于在有此需要的哺乳动物中抑制血管发生之药物中的用途。
10. 权利要求1的药物制剂在制备用于在有此需要的哺乳动物中治疗血管发生依赖性癌症之药物中的用途。
11. 权利要求1的药物制剂在制备用于在有此需要的哺乳动物的眼中抑制血管发生之药物中的用途。
12. 权利要求1的药物制剂在制备用于在有此需要的哺乳动物中治疗类风湿性关节炎之药物中的用途。
13. 权利要求9-12中任一项的用途,其中权利要求1的药物制剂与抑制血管发生的另一种药剂联用。
14. ALK1-ECD多肽在制备用于在有此需要的哺乳动物中抑制血管发生之药物中的用途,其中所述ALK1-ECD多肽:
  - (a)起始于SEQ ID NO:1的第22位氨基酸,
  - (b)结束于SEQ ID NO:1的第113-123位之任一氨基酸,使用或不使用间插接头将该多肽与免疫球蛋白的Fc部分融合从而形成ALK1-Fc融合蛋白,并且  
其中所述ALK1-Fc融合蛋白的至少90%以二聚体形式存在。
15. 权利要求14的用途,其中所述ALK1-Fc融合蛋白结合选自BMP9和BMP10的一种或多种ALK1配体。
16. 权利要求14的用途,其中所述ALK1-Fc融合蛋白具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列。
17. 权利要求14的用途,其中所述ALK1-Fc融合蛋白的至少95%为二聚体形式。
18. 权利要求14的用途,其中所述ALK1-Fc融合蛋白被配制用于经静脉内递送或局部

递送至眼。

19. 权利要求14的用途,其中所述ALK1-Fc融合蛋白与抑制血管发生的另一种药剂联用。

20. 权利要求14的用途,其中所述血管发生是在血管化组织中,所述血管化组织选自肿瘤、骨、关节和哺乳动物的眼。

21. 权利要求14的用途,其中所述哺乳动物患有糖尿病性视网膜病或者特征在于视网膜血管中周细胞包裹缺失的其它视网膜疾病。

22. 权利要求14的用途,其中所述哺乳动物患有选自黑素瘤、肺肿瘤、多发性骨髓瘤和乳腺癌的肿瘤。

23. 权利要求14的用途,其中所述哺乳动物患有胰腺肿瘤。

24. 权利要求23的用途,其中所述哺乳动物患有胰腺内分泌组织肿瘤。

25. ALK1-ECD多肽在制备用于治疗哺乳动物中肿瘤之药物中的用途,

其中所述肿瘤选自:黑素瘤、多发性骨髓瘤、骨相关肿瘤、已转移至骨的肿瘤、肺肿瘤、胰腺肿瘤和乳腺癌,其中所述ALK1-ECD多肽:

(a)起始于SEQ ID NO:1的第22位氨基酸,

(b)结束于SEQ ID NO:1的第113-123位之任一氨基酸,

使用或不使用间插接头将该多肽与免疫球蛋白的Fc部分融合从而形成ALK1-Fc融合蛋白,并且

其中所述ALK1-Fc融合蛋白的至少90%以二聚体形式存在。

26. 权利要求25的用途,其中所述ALK1-Fc融合蛋白以大于 $1 \times 10^{-6}$ 的KD结合TGF $\beta$ -1。

27. 权利要求25的用途,其中所述ALK1-Fc融合蛋白结合选自BMP9和BMP10的一种或多种ALK1配体。

28. 权利要求25的用途,其中所述ALK1-Fc融合蛋白具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列。

29. 权利要求25的用途,其中所述ALK1-Fc融合蛋白被配制用于经静脉内递送。

30. 权利要求25的用途,其中所述ALK1-Fc融合蛋白与抑制血管发生的另一种药剂联用。

31. 权利要求10的用途,其中所述癌症选自:黑素瘤、肺肿瘤、多发性骨髓瘤、胰腺肿瘤和乳腺癌。

32. 权利要求1的药物制剂,其中所述ALK1-Fc融合蛋白结合选自BMP9和BMP10的一种或多种ALK1配体。

33. 权利要求1的药物制剂,其中所述ALK1-ECD多肽:

(a)起始于SEQ ID NO:1的第22位氨基酸,并且

(b)结束于SEQ ID NO:1的第120位氨基酸。

34. 权利要求14的用途,其中所述ALK1-ECD多肽:

(a)起始于SEQ ID NO:1的第22位氨基酸,并且

(b)结束于SEQ ID NO:1的第120位氨基酸。

35. 权利要求14的用途,其中所述ALK1-Fc融合蛋白的至少95%以二聚体形式存在。

36. 权利要求14的用途,其中所述ALK1-Fc融合蛋白的至少99%以二聚体形式存在。

37. 权利要求25的用途,其中所述ALK1-ECD多肽:

(a)起始于SEQ ID NO:1的第22位氨基酸,并且

(b)结束于SEQ ID NO:1的第120位氨基酸。

38. 权利要求25的用途,其中所述ALK1-Fc融合蛋白的至少95%以二聚体形式存在。

39. 权利要求25的用途,其中所述ALK1-Fc融合蛋白的至少99%以二聚体形式存在。

## 用于调节血管发生和周细胞包裹的基于ALK1拮抗剂的方法和组合物

[0001] 相关申请

[0002] 根据美国35 USC§119法案,本申请要求2008年5月2日提交的美国临时申请61/050,168以及2009年1月12日提交的临时申请61/144,131之申请日的权益,两者内容均通过引用并入本文中。

### 背景技术

[0003] 血管发生是形成新血管的过程,其对于许多正常和异常的生理状态来说是很关键的。在正常的生理状况下,人和动物在特定的和局限的情况下经历血管发生。例如,通常在创伤愈合、胚胎发育以及黄体、子宫内膜和胎盘的形中观察到血管发生。

[0004] 许多疾病中存在不期望的或调节不当的血管发生,其中异常的内皮生长可导致或参与病理过程。例如,血管发生参与许多肿瘤的生长。失调的血管发生涉及到病理过程中,例如类风湿性关节炎、视网膜病、血管瘤和银屑病。已将存在失控之血管发生的各种病理疾病状态归类为血管发生相关疾病。

[0005] 认为受控和失控的血管发生均以类似方式的进行。毛细血管主要由内皮细胞和周细胞(pericyte)组成,其周围是基膜(basement membrane)。血管发生开始于由内皮细胞和白细胞释放的酶对基膜的侵蚀。随后,沿血管腔排列的内皮细胞从基膜穿出。血管发生因子诱导内皮细胞穿过被侵蚀的基膜迁移。迁移细胞形成从母血管伸出的“芽”,内皮细胞在此处进行有丝分裂和增殖。内皮细胞芽彼此融合从而形成毛细血管祥,产生新血管。

[0006] 已证实抑制血管发生的物质可有效治疗多种疾病。阿瓦斯丁(Avastin)<sup>TM</sup>(贝伐单抗(bevacizumab))——一种结合血管内皮生长因子(VEGF)的单克隆抗体——已被证实有效治疗多种癌症。麦可净(Macugen)<sup>TM</sup>——一种结合VEGF的适配体(aptamer)——已被证实有效治疗新生血管性(湿性)年龄相关黄斑变性。SDF/CXCR4信号传导途径的拮抗剂抑制肿瘤新血管生成,并有效抗御小鼠模型中的癌症(Guleng等,Cancer Res.2005年7月1日;65(13):5864-71)。异香豆素2-(8-羟基-6-甲氧基-1-氧代-1H-2-苯并吡喃-3-基)丙酸(NM-3)作为口服生物可利用的血管发生抑制剂已完成I期临床评估。NM-3在体外直接杀伤内皮细胞和肿瘤细胞,并有效治疗小鼠中的多种人类肿瘤异种移植物(Agata等,Cancer Chemother Pharmacol.2005年12月;56(6):610-4)。沙利度胺(thalidomide)和相关化合物已显示出治疗癌症的有益作用,并且尽管其分子作用机制尚不清楚,但是对血管发生的抑制似乎是抗肿瘤作用的重要组成部分(参见例如Dredge等,Microvasc Res.2005年1月;69(1-2):56-63)。TNF- $\alpha$ 拮抗剂在治疗类风湿性关节炎上的成功部分是因为对炎症关节组织的抗血管发生作用(Feldmann等,Annu Rev Immunol.2001;19:163-96)。普遍预期抗血管发生疗法对其它炎症性疾病(特别是银屑病)具有有益疗效。尽管许多抗血管发生剂对血管发生具有作用(不论受影响组织为何),然而另一些血管发生剂可能倾向于具有组织特异性作用。

[0007] 周细胞是组成血管的细胞类型之一,与其一起组成血管的还有内皮细胞和平滑肌

细胞。中枢神经系统中周细胞与内皮细胞的比值最高,并且认为周细胞在血脑屏障中起重要作用。糖尿病性视网膜病以视网膜微血管的周细胞缺失为标志,而且认为这种周细胞缺失对疾病进展起重要的病理生理作用。

[0008] 期望拥有用于抑制血管发生和用于提高血管化组织中周细胞包裹的另一些组合物和方法。这些包括可普遍地或者在某些组织中和/或疾病状态下抑制血管不利生长的方法和组合物。

[0009] 发明概述

[0010] 一方面,本公开内容提供对激活蛋白样激酶I(activin-like kinase I, ALK1)介导之调节系统的表征,以及该系统在体内血管化组织的血管发生和调节周细胞包裹中的作用。在某些方面,本公开内容提供了ALK-1配体的拮抗剂以及这些拮抗剂作为抗血管发生剂或者提高周细胞包裹的用途。另外,本公开内容提供了ALK-1自身的拮抗剂,以及这样的拮抗剂作为抗血管发生剂的用途。如本文所述,ALK1是GDF5配体群(包括GDF6和GDF7)的受体,也是BMP9配体群(包括BMP10)的受体。本公开内容证实了由ALK1和上述配体介导的信号传导参与体内血管发生,以及抑制该调节系统具有强效的抗血管发生作用。此外,本公开内容证实了抑制ALK1调节系统导致血管化组织中提高的周细胞包裹。因此,在某些方面,本公开内容提供了用于抑制血管发生的ALK1调节系统的拮抗剂,包括所述受体或者一种或多种配体的拮抗剂。在某些方面,本公开内容提供了ALK1配体的拮抗剂,其用于治疗癌症(特别是多发性骨髓瘤、黑素瘤、肺癌、胰腺癌(特别是胰腺内分泌组织肿瘤)、乳腺癌(例如,原发性乳腺癌或转移性乳腺癌;雌激素受体阳性(ER+)或雌激素受体阴性(ER-))、类风湿性关节炎、眼部病理性血管发生相关疾病以及与血管化组织中周细胞缺失相关的疾病(如糖尿病性视网膜病)。

[0011] 在某些方面,本公开内容提供了用于抑制血管发生的包含ALK1细胞外结构域之配体结合部分的多肽(“ALK1 ECD多肽”)。不希望受任何特定作用机制的约束,预期这样的多肽通过结合ALK1配体并抑制这些配体与ALK1以及其它受体相互作用的能力而起作用。在一些实施方案中,ALK1 ECD多肽包含与人ALK1序列(SEQ ID NO:1)之22-118位氨基酸所示序列的同源性至少为70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的氨基酸序列。ALK1 ECD多肽可作为小的单体蛋白或以二聚化形式(例如,表达为融合蛋白)来使用,特别是用于局部施用到组织(例如眼)中。还可将ALK1 ECD与另一多肽部分融合以提供改进的性质(例如提高的半衰期或者更易于生产或纯化)。与免疫球蛋白的Fc部分融合或者与聚氧乙烯部分(例如,聚乙二醇)连接可对全身施用(静脉内、动脉内和腹膜内施用)时提高ALK1 ECD多肽的血清半衰期特别有用。如本文所证明地,全身性施用ALK1-Fc多肽在眼中具有强效的抗血管发生作用,还在类风湿性关节炎和多种肿瘤的小鼠模型中提供了积极作用。在一些实施方案中,ALK1-Fc融合蛋白包含具有与SEQ ID NO:1之22-118位氨基酸所示序列的同源性至少为70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的氨基酸序列的多肽,其中使用或不使用间隔接头将所述多肽与免疫球蛋白的Fc部分融合,其中所述ALK1-Fc融合蛋白以小于 $1 \times 10^{-7}$ M的 $K_D$ 结合GDF5、GDF7和BMP9,并且以大于 $1 \times 10^{-6}$ 的 $K_D$ 结合TGF $\beta$ -1。可以选择适于生物体的Fc部分。任选地,Fc部分是人IgG1的Fc部分。在一个优选的实施方案中,所述ALK1-Fc融合蛋白包含SEQ ID NO:1的22-118位氨基酸。任选地,所述ALK1-Fc融合蛋白包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列。任选地,所述ALK1-Fc融合蛋白是在哺乳动物细胞系

(特别是中国仓鼠卵巢(CHO)细胞系)中由SEQ ID NO:4之核酸的表达所产生的蛋白质。ALK1-ECD多肽可配制为基本上不含热原的药物制备物。该药物制备物可制备用于全身递送(例如,静脉内、动脉内或皮下递送)或局部递送(例如,递送至眼)。

[0012] 在一些方面,本公开内容确认了开发治疗用的相对均一的ALK1-Fc融合蛋白制剂的困难。如本文所述,ALK1-Fc融合蛋白倾向于聚集成更高级的多聚体。本公开内容提供了这些困难的解决方法,并因此提供了包含ALK1-Fc融合蛋白的药物制剂,其中该制剂中至少85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%由二聚体ALK1-Fc融合蛋白组成。因此,在一些方面中,本公开内容提供了包含如下ALK1-Fc融合蛋白的药物制剂,所述ALK1-Fc融合蛋白包含氨基酸序列与SEQ ID NO:1的22-118位氨基酸序列具有至少97%同一性的多肽,该多肽与免疫球蛋白的Fc部分融合,且其中所述ALK1-Fc融合蛋白以小于 $1 \times 10^{-7}$ M的 $K_D$ 与GDF5、GDF7和BMP9结合,以大于 $1 \times 10^{-6}$ 的 $K_D$ 与TGF $\beta$ -1结合,而且其中至少85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的ALK1-Fc融合蛋白以二聚体形式存在。所述ALK1-Fc融合蛋白的Fc部分可以为IgG1的Fc部分。所述ALK1-Fc融合蛋白可包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列。所述ALK1-Fc融合蛋白可通过在哺乳动物细胞系(特别是中国仓鼠卵巢(CHO)细胞系)中表达SEQ ID NO:4之核酸而产生。这种药物制剂可配制成适于向眼部施用(特别是通过注射来实现)。所公开的药物制剂可用于本文表述的多种治疗目的,包括抑制血管发生、治疗肿瘤、治疗类风湿性关节炎、治疗与血管发生相关的眼部疾病以及治疗与血管化组织中周细胞包裹缺失相关的疾病(例如糖尿病性视网膜病)。所述ALK1-Fc药物制剂可与抑制血管发生的另一药剂(例如VEGF拮抗剂(如阿瓦斯丁、索拉非尼(sorafenib)和VEGF受体诱捕剂))联用。

[0013] 本公开内容证实ALK1信号传导途径的拮抗剂提高血管化组织中的周细胞包裹。因此,本公开内容提供了促进哺乳动物血管化组织中周细胞包裹提高的方法。这样的拮抗剂可为本文所述的任何拮抗剂(包括ALK1 ECD蛋白(例如,ALK1-Fc)、DAN蛋白)和靶向ALK1及其任何配体(包括BMP9、BMP10、GDF5、GDF6和GDF7)的抗体。在一些方面中,本公开内容提供了在有必要需要的哺乳动物中促进血管化组织中周细胞包裹提高的方法,该方法包括向哺乳动物施用有效量的ALK1 ECD蛋白。所述ALK1 ECD蛋白可以是ALK1-Fc融合蛋白,并且所述ALK1-Fc融合蛋白可包含氨基酸序列与SEQ ID NO:1的22-118位氨基酸序列具有至少90%同一性的多肽,该多肽与免疫球蛋白的Fc部分融合,并且其中ALK1-Fc融合蛋白以大于 $1 \times 10^{-6}$ 的 $K_D$ 与TGF $\beta$ -1结合。所述ALK1 ECD蛋白可与选自GDF5、GDF6、GDF7、BMP9和BMP10的一种或多种ALK1配体结合。所述ALK1 ECD多肽可包含与SEQ ID NO:1的34-95位氨基酸对应的氨基酸序列具有至少85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。所述ALK1 ECD可包含由如下核酸编码的氨基酸序列,所述核酸在严格的杂交条件下与SEQ ID NO:2之100-285位核苷酸杂交或者与编码相同氨基酸序列的SEQ ID NO:2之100-285位核苷酸的变体杂交。所述ALK1-Fc融合蛋白可具有SEQ ID NO:3的序列。所述ALK1 ECD融合蛋白可通过静脉内递送或局部递送至眼部。在一些方面中,本公开内容提供了在有必要需要的哺乳动物中促进血管化组织中周细胞包裹提高的方法,该方法包括向哺乳动物施用有效量的如下抗体,所述抗体与由SEQ ID NO:1之22-118位氨基酸组成的ALK1多肽结合并抑制选自GDF5、GDF6、GDF7、BMP9和BMP10的至少一种ALK1配体的结合。所述抗体可以以小于 $5 \times 10^{-8}$ M、小于 $1 \times 10^{-9}$ M或小于 $1 \times 10^{-10}$ M的 $K_D$ 与ALK1多肽结合。所述抗体可抑制ALK1与ALK1配体的结合,其中所述ALK1配体选自BMP9和BMP10。所述抗体可通过静脉内或眼内递送。WO 2007/

040912中所述的抗体可用于此方法中。所述ALK1信号传导拮抗剂可与另一抑制血管发生的药剂(如VEGF拮抗剂)一起施用。待治疗的哺乳动物可患有糖尿病性视网膜病或以视网膜血管中周细胞包裹缺失为特征的其它视网膜疾病或选自以下的肿瘤:黑素瘤、肺肿瘤、多发性骨髓瘤、胰腺肿瘤(如胰腺内分泌组织肿瘤)和乳腺癌(例如,原发性乳腺癌或转移性乳腺癌;雌激素受体阳性(ER+)或雌激素受体阴性(ER-))。

[0014] 在一些方面中,本公开内容提供了用于抑制哺乳动物中血管发生的方法,其通过施用本文一般性或具体描述的任何ALK1 ECD多肽来实现。在一个实施方案中,方法包括向哺乳动物施用有效量的ALK1-Fc融合蛋白,其中所述ALK1 Fc融合蛋白包含具有与SEQ ID NO:1之22-118位氨基酸所示序列的同一性至少为90%的氨基酸序列的多肽,该多肽与免疫球蛋白的Fc部分融合,其中所述ALK1-Fc融合蛋白以大于 $1 \times 10^{-6}$ 的 $K_D$ 结合TGF $\beta$ -1。任选地,所述ALK1-Fc融合蛋白结合选自GDF5、GDF6、GDF7、BMP9和BMP10的一种或多种ALK1配体。任选地,所述ALK1-Fc融合蛋白具有SEQ ID NO:3的序列。所述ALK1 ECD多肽可以局部递送(例如,递送至眼)或全身递送(例如,静脉内、动脉内或皮下)。在一个具体实施方案中,本公开内容提供了用于抑制哺乳动物眼中血管发生的方法,其通过在远离眼的位置向哺乳动物施用ALK1-Fc蛋白来实现,例如通过全身施用。

[0015] 在一些方面中,本公开内容提供了与ALK1(特别是位于细胞外结构域(SEQ ID NO:1的22-118位氨基酸)中的表位)结合并抑制ALK1与选自GDF5、GDF6、GDF7、BMP9和BMP10的至少一种ALK1配体结合的抗体。基于这些配体对ALK1的亲合力,抗体可以以小于 $5 \times 10^{-8}$ M(任选地 $5 \times 10^{-8} \sim 1 \times 10^{-10}$ )的 $K_D$ 结合。预期亲合力在该范围内的抗体抑制GDF5、6和7中一种或多种的信号传导,而对BMP9和10的信号传导具有较小影响。这样的抗体优选地抑制由选自GDF5、GDF6和GDF7的至少一种ALK1配体所刺激的血管发生。不希望受特定机制的约束,预期这样的抗体会通过直接抑制ALK1活性来起作用,这应当与ALK1-Fc融合蛋白的活性相对,后者预期抑制ALK1配体的活性。预期抗ALK1抗体不干扰GDF5、GDF6、GDF7、BMP9或BMP10经由替代性受体系统(例如BMPRIa、BMPRIb和BMRII复合物)进行信号传导的能力。然而,预期抗ALK1抗体会干扰ALK1的低亲合力配体(例如TGF- $\beta$ ,一般认为,尽管结合相当弱但其仍经由ALK-1诱发重要的信号传导事件)经由ALK1进行信号传导的能力,尽管ALK1 ECD可能不结合或抑制这样的低亲合力配体。抗体可以以小于 $1 \times 10^{-10}$ M的 $K_D$ 结合ALK1多肽。预期亲合力在该范围内的抗体抑制BMP9或10的信号传导。这样的抗体优选地抑制BMP9和BMP10与ALK1的结合。值得注意地,基于本文公开的数据,与ALK1结合相对较弱的抗体可抑制TGF $\beta$ 结合ALK1,而不能抑制更紧密的结合配体例如GDF5或BMP9。本文所述的抗体优选为重组抗体,意为从利用分子生物学技术构建的核酸表达而来的抗体,例如人源化抗体或者从单链抗体开发而来的完全人抗体。Fv、Fab和单链抗体也包括在术语“重组抗体”的范畴内。抗体也可以是多克隆抗体或非重组型单克隆抗体(包括人或小鼠的形式,以及从转基因小鼠获得的人抗体)。抗体和ALK1-ECD多肽可配制为基本上不含热原的药物制备物。所述药物制备物可制备用于全身递送(例如,静脉内、动脉内或皮下递送)或局部递送(例如,递送至眼)。WO 2007/040912中所述的抗体可用于本文所述的各方法中。

[0016] 在一些方面中,本公开内容提供了用于抑制哺乳动物中血管发生的方法,其通过向哺乳动物施用本文一般性或具体描述的与ALK1多肽结合的有效量抗体来实现。可用于该目的的抗体可结合ALK1的细胞外结构域(例如,结合由SEQ ID NO:1的22-118位氨基酸组

成的多肽)或ALK1的另一部分。所述抗体可结合由SEQ ID NO:1的22-118位氨基酸组成的多肽并抑制选自GDF5、GDF6、GDF7、BMP9和BMP10中至少一种ALK1配体的结合。所述抗体可以以小于 $5 \times 10^{-8} \text{M}$ (任选地 $5 \times 10^{-8} \sim 1 \times 10^{-10}$ )的 $K_D$ 结合ALK1多肽。所述抗体可抑制由选自GDF5、GDF6和GDF7中至少一种ALK1配体所刺激的血管发生。相对于BMP9或10的信号传导而言选择性抑制GDF5、GDF6或GDF7所介导之信号传导的抗体可用作GDF5、6或7所定位的组织(主要是骨或关节)中所发生的血管发生的选择性抑制剂。所述抗体可以以小于 $1 \times 10^{-10} \text{M}$ 的 $K_D$ 结合ALK1多肽。所述抗体可抑制ALK1与ALK1配体的结合,其中所述ALK1配体选自BMP9和BMP10。所述抗ALK1抗体可局部递送(例如,递送至眼)或全身递送(例如,静脉内、动脉内或皮下)。在一个具体的实施方案中,本公开内容提供了通过施用抗ALK1抗体来抑制哺乳动物眼中血管发生的方法。在另一具体实施方案中,本公开内容提供了用于治疗患多发性骨髓瘤的患者的方法。在一个具体实施方案中,本公开内容提供了用于抑制如下疾病中血管发生的方法,所述疾病与多种促血管发生因子(例如,VEGF、PDGF和/或FGF)导致的病理性血管发生有关。

[0017] 在一些方面中,本公开内容提供了与本文公开之ALK1配体结合并抑制所述ALK1配体与ALK1结合的抗体。不希望受任何特定机制的约束,预期与ALK1配体结合的抗体具有实际上类似于ALK1 ECD多肽的作用,因为这两类物质都结合所述配体,而非结合所述受体本身。在一些实施方案中,所述抗体结合选自GDF5、GDF6和GDF7的配体。所述抗体可以以小于 $5 \times 10^{-8} \text{M}$ 的 $K_D$ 结合ALK1配体。可选择所述抗体用于抑制由ALK1配体刺激的血管发生。CAM测定是适于选择期望抗体的测定系统。这样的抗体优选为重组抗体,并可配制为基本不含热原的药物制备物。所述药物制备物可制备用于全身递送(例如,静脉内、动脉内或皮下递送)或局部递送(例如,递送至眼)。

[0018] 在一些方面,本公开内容提供了结合ALK1配体并抑制ALK1配体与ALK1结合的抗体,其中所述ALK1配体选自BMP9和BMP10。所述抗体可以以小于 $1 \times 10^{-10} \text{M}$ 的 $K_D$ 结合ALK1配体。这样的抗体优选为重组抗体,并可配制为基本不含热原的药物制备物。所述药物制备物可制备用于全身递送(例如,静脉内、动脉内或皮下递送)或局部递送(例如,递送至眼)。

[0019] 在一些方面中,本公开内容提供了抑制哺乳动物中血管发生的方法,该方法包括向哺乳动物施用与ALK1配体结合并抑制所述ALK1配体结合ALK1的有效量的抗体,其中所述ALK1配体选自GDF5、GDF6、GDF7、BMP9和BMP10。所述抗体可抑制由选自GDF5、GDF6和GDF7的至少一种ALK1配体所刺激的血管发生。

[0020] BMP/GDF家族的成员(包括BMP9、BMP10、GDF5、GDF6和GDF7)与I型和II型受体结合从而形成有功能的信号传导复合物。这些受体的结合位点是不一样的。因此,在一些实施方案中,与ALK1配体结合并抑制所述配体与ALK1结合的抗体是在该配体的I型受体结合位点处或其附近结合的抗体。

[0021] 在一些方面中,本公开内容提供了用于抑制哺乳动物中血管发生的方法,其通过施用本文公开的ALK1信号传导系统的其它抑制剂来实现。这样的抑制剂可包括降低ALK1、GDF5、GDF6、GDF7、BMP9或BMP10产生的核酸(例如,反义或RNAi构建体)。也可使用各种亲和性结合试剂,例如可通过修饰而结合所选靶标的适配体、随机肽、蛋白支架(所述支架的实例包括anticalin和FNIII结构域);在每种情形中,选择能够破坏本文公开之ALK1调节系统的亲和性结合试剂,其或者通过破坏ALK1-配体相互作用或者通过抑制结合后所发生的信

号传导来实现。

[0022] 在另一实施方案中,本公开内容描述了DAN作为ALK1调节系统之调节剂的作用。如本文所示,DAN结合GDF5配体群,但不结合BMP9配体群。因此,预计DAN抑制由GDF5、GDF6或GDF7介导的血管发生,但不抑制由BMP9或BMP10介导的血管发生。因此,DAN可用作在主要表达GDF5蛋白质群的骨或关节中抑制血管发生的选择性试剂。因此,在一些实施方案中,本公开内容提供了DAN蛋白用作在骨或关节血管发生背景下的抗血管发生剂,包括类风湿性关节炎和涉及骨或关节的癌症(例如多发性骨髓瘤和骨转移)。DAN蛋白通常结合选自GDF5、GDF6和GDF7的一种或多种ALK1配体,而与BMP9或BMP10的结合相对较弱。DAN蛋白可包含与对应于SEQ ID NO:10之17-180位氨基酸(成熟的人DAN)或SEQ ID NO:10之21-125位氨基酸(DAN的保守性半胱氨酸结(cysteine knot)结构域)的氨基酸序列具有至少70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的氨基酸序列。DAN蛋白还可由核酸编码,所述核酸包含其互补物在严格杂交条件下与下列序列杂交的序列:SEQ ID NO:11的153-467位核苷酸、或具有相同编码序列的SEQ ID NO:11之153-467位核苷酸的变体(“沉默”变体,例如在三联体密码的摆动位置(wobble position)包含一个或多个改变的变体),或者SEQ ID NO:11的93-635位核苷酸或其沉默变体。在一些方面中,所述DAN蛋白是融合蛋白,例如Fc融合蛋白。尽管预期DAN特别有用于抑制骨和关节中的血管发生(包括位于骨或关节中的肿瘤,例如多发性骨髓瘤和骨转移),但是它也可用于其它方面,例如位于其它部位的肿瘤,或眼中的肿瘤。

[0023] 在一些方面中,本公开内容提供了用于治疗哺乳动物中类风湿性关节炎的方法,该方法包括向患类风湿性关节炎的哺乳动物施用有效量的选自下列的试剂:ALK1 ECD蛋白;结合ALK1配体并抑制ALK1配体与ALK1结合的抗体,其中所述ALK1配体选自GDF5、GDF6、GDF7、BMP9和BMP10;结合ALK1多肽并抑制与选自GDF5、GDF6、GDF7、BMP9和BMP10的至少一种ALK1配体结合的抗体,所述ALK1多肽由SEQ ID NO:1的22-118位氨基酸组成;DAN多肽。

[0024] 在一些方面中,本公开内容提供了用于治疗哺乳动物中肿瘤的方法。这样的方法可包括向患肿瘤的哺乳动物施用有效量的选自以下的试剂:ALK1 ECD蛋白(例如,ALK1-Fc);结合ALK1配体并抑制ALK1配体与ALK1结合的抗体,其中所述ALK1配体选自GDF5、GDF6、GDF7、BMP9和BMP10;结合ALK1多肽并抑制与选自GDF5、GDF6、GDF7、BMP9和BMP10的至少一种ALK1配体结合的抗体,所述ALK1多肽由SEQ ID NO:1的22-118位氨基酸组成;DAN多肽。该方法还可包括施用抑制血管发生的另一试剂。所述肿瘤可以是与骨有关的肿瘤,例如白血病、骨髓肿瘤、多发性骨髓瘤或骨转移,例如常常与乳腺癌或前列腺癌有关的那些。肿瘤可以是黑素瘤、肺癌肿瘤、胰腺肿瘤(如胰腺内分泌组织肿瘤)或乳腺癌(如原发性乳腺癌或转移性乳腺癌)。乳腺癌可以是雌激素受体阳性(ER+)或雌激素受体阴性(ER-)。肿瘤还可以是利用多种促血管发生因子的肿瘤,例如对于抗VEGF疗法具有抗性的肿瘤。

[0025] 在一些方面中,本公开内容提供了眼药制剂。这样的制剂可包含选自以下的试剂:ALK1 ECD蛋白;结合ALK1配体并抑制ALK1配体与ALK1结合的抗体,其中所述ALK1配体选自GDF5、GDF6、GDF7、BMP9和BMP10;结合ALK1多肽并抑制与选自GDF5、GDF6、GDF7、BMP9和BMP10的至少一种ALK1配体结合的抗体,所述ALK1多肽由SEQ ID NO:1的22-118位氨基酸组成;DAN多肽。

[0026] 在一些方面中,本公开内容提供了用于治疗血管发生相关的眼病的方法。这样的

方法可包括全身施用或者向所述眼睛施用包含有效量的选自下列之试剂的药物制剂:ALK1 ECD蛋白;结合ALK1配体并抑制ALK1配体与ALK1结合的抗体,其中所述ALK1配体选自GDF5、GDF6、GDF7、BMP9和BMP10;结合ALK1多肽并抑制与选自GDF5、GDF6、GDF7、BMP9和BMP10的至少一种ALK1配体结合的抗体,所述ALK1多肽由SEQ ID NO:1的22-118位氨基酸组成;DAN多肽。

[0027] 在每种情形中,可将本文所述的试剂与抑制血管发生的另一试剂联用。在期望抑制肿瘤的血管发生时,可将所述试剂与具有抗癌作用的另一试剂联用,所述另一试剂例如化疗试剂或生物抗癌剂。

[0028] 本公开内容还提供了包含ALK1-Fc融合蛋白的眼科药物制剂,所述融合蛋白具有与SEQ ID NO:1的22-118位氨基酸所示序列同一性至少为97%、98%或99%的氨基酸序列,该多肽与免疫球蛋白的Fc部分融合,其中所述ALK1-Fc融合蛋白与GDF5、GDF7和BMP9以小于 $1 \times 10^{-7}$ M的 $K_D$ 结合,与TGF $\beta$ -1以大于 $1 \times 10^{-6}$ 的 $K_D$ 结合。在一个实施方案中,所述融合蛋白具有SEQ ID NO:3的序列。在一个实施方案中,所述Fc部分来自人IgG1。在一个实施方案中,所述融合蛋白通过在哺乳动物细胞系中表达SEQ ID NO:4的核酸而得到。在一个实施方案中,所述细胞系是中国仓鼠卵巢细胞系。所述制剂还可包含一种或多种以下药物:倍加他尼(pegaptanib)、雷珠单抗(ranibizumab)或糖皮质激素。在一个实施方案中,所述制剂基本不含热原。

[0029] 本申请还提供了包含如下抗体的眼科药物制剂,所述抗体结合由SEQ ID NO:1的22-118位氨基酸组成的ALK1多肽并抑制与选自GDF5、GDF6、GDF7、BMP9和BMP10的至少一种ALK1配体的结合。在一个实施方案中,所述抗体抑制由选自GDF5、GDF6和GDF7的至少一种ALK1配体所刺激的血管发生。在一个实施方案中,所述抗体以小于 $5 \times 10^{-8}$ M的 $K_D$ 结合ALK1多肽。在另一实施方案中,所述抗体以小于 $1 \times 10^{-10}$ M的 $K_D$ 结合ALK1多肽。在一个实施方案中,所述抗体抑制由GDF5、GDF6、GDF7、BMP9或BMP10刺激的血管发生。所述制剂还可包含一种或多种以下药物:倍加他尼、雷珠单抗或糖皮质激素。在一个实施方案中,所述制剂基本不含热原。

[0030] 在一些方面中,本公开内容提供了包含如下抗体的眼科药物制剂,所述抗体结合本文公开的ALK1配体并抑制所述ALK1配体与ALK1的结合。在一些实施方案中,所述抗体结合选自GDF5、GDF6和GDF7的配体。所述抗体可以以小于 $5 \times 10^{-8}$ M的 $K_D$ 结合ALK1配体。可选择所述抗体用于抑制由ALK1配体所刺激的血管发生。CAM测定是适于选择理想抗体的测定系统。这样的抗体优选为重组抗体。所述制剂还可包含一种或多种以下药物:倍加他尼、雷珠单抗或糖皮质激素。在一个实施方案中,所述制剂基本不含热原。

[0031] 本申请还提供了治疗血管发生相关眼病的方法,该方法包括向所述眼睛施用包含ALK1-Fc融合蛋白的眼科药物制剂,所述融合蛋白包含具有与SEQ ID NO:1的22-118位氨基酸所示序列同一性至少为97%、98%或99%的氨基酸序列的多肽,该多肽与免疫球蛋白的Fc部分融合,其中所述ALK1-Fc融合蛋白以小于 $1 \times 10^{-7}$ M的 $K_D$ 与GDF5、GDF7和BMP9结合,以大于 $1 \times 10^{-6}$ 的 $K_D$ 与TGF $\beta$ -1结合。在一个实施方案中,所述融合蛋白具有SEQ ID NO:3的序列。在一个实施方案中,所述Fc部分来自人IgG1。在一个实施方案中,所述融合蛋白通过在哺乳动物细胞系中表达SEQ ID NO:4的核酸而得到。在一个实施方案中,所述细胞系是中国仓鼠卵巢细胞系。所述制剂还可包含一种或多种以下药物:倍加他尼、雷珠单抗或糖皮质激素。

在一个实施方案中,所述制剂基本不含热原。

[0032] 本申请还提供了治疗血管发生相关眼病的方法,该方法包括向所述眼睛施用包含如下抗体的眼药制剂,所述抗体结合由SEQ ID NO:1的22-118位氨基酸组成的ALK1多肽并抑制与选自GDF5、GDF6、GDF7、BMP9和BMP10的至少一种ALK1配体的结合。在一个实施方案中,所述抗体抑制由选自GDF5、GDF6和GDF7的至少一种ALK1配体所刺激的血管发生。在一个实施方案中,所述抗体以小于 $5 \times 10^{-8}$ M的 $K_D$ 结合ALK1多肽。在另一实施方案中,所述抗体以小于 $1 \times 10^{-10}$ M的 $K_D$ 结合ALK1多肽。在一个实施方案中,所述抗体抑制由GDF5、GDF6、GDF7、BMP9或BMP10所刺激的血管发生。所述制剂还可包含一种或多种以下药物:倍加他尼、雷珠单抗或糖皮质激素。在一个实施方案中,所述制剂基本不含热原。

[0033] 在所公开方法的一个实施方案中,所述血管发生相关疾病选自肿瘤、对于抗VEGF疗法具有抗性的肿瘤、多发性骨髓瘤、已转移至骨的肿瘤、关节或骨的炎症、类风湿性关节炎、糖尿病性视网膜病、早产儿视网膜病、黄斑变性、角膜移植排斥、新生血管性青光眼和晶状体后纤维增生症。

#### 附图说明

[0034] 图1显示人激活蛋白样激酶1——ALK1的氨基酸序列(SEQ ID NO:1)。单下划线表示预测的细胞外结构域。双下划线表示细胞内结构域。信号肽和跨膜结构域未用下划线示出。

[0035] 图2显示人ALK1cDNA的核酸序列(SEQ ID NO:2)。编码序列用下划线表示。编码细胞外结构域的部分用双下划线表示。

[0036] 图3显示人ALK1的细胞外结构域与Fc结构域融合的实例(SEQ ID NO:3)。hALK1-Fc蛋白包含C端与接头(下划线表示)和IgG1 Fc区域融合的人ALK1蛋白22-120位氨基酸。

[0037] 图4显示表达SEQ ID NO:3的hALK1-Fc多肽的核酸序列。还显示了所编码的氨基酸序列。由于前导序列被切割,因此Asp 22是所分泌蛋白的N端氨基酸。

[0038] 图5显示鼠ALK1-Fc(“RAP”)和人ALK1-Fc(“ACE”)在内皮细胞管形成测定中的抗血管发生作用。与阳性对照(内皮抑素)相比,在响应于内皮细胞生长添加剂(Endothelial Cell Growth Supplement, ECGF)时所有浓度的RAP和ACE使管形成水平降低得更多。

[0039] 图6显示GDF7在鸡绒毛尿囊膜(chick chorioallantoic membrane, CAM)测定中的血管发生作用。GDF7的作用与VEGF的作用相当。

[0040] 图7显示人ALK1-Fc融合蛋白在CAM测定中的抗血管发生作用。hALK1-Fc抑制由VEGF、FGF和GDF7刺激的血管发生。

[0041] 图8显示鼠ALK1-Fc(mALK1-Fc)、hALK1-Fc、市售的抗ALK1单克隆抗体(Anti-ALK1 mAb)和市售的中和性抗VEGF单克隆抗体相比较的抗血管发生作用。ALK1-Fc构建体的抗血管发生作用与抗VEGF抗体的作用相当。

[0042] 图9显示hALK1-Fc和抗VEGF抗体在体内的抗血管发生作用。利用小鼠角膜微囊袋测定(mouse corneal micropocket assay)测量,hALK1-Fc和抗VEGF抗体对眼中血管发生具有相当的作用。

[0043] 图10显示mALK1-Fc在鼠胶原诱导关节炎(collagen-induced arthritis, CIA)的类风湿性关节炎模型中的作用。该图显示在胶原诱导的雄性DBA/1关节炎小鼠的42天观察

期中测定的平均群体关节炎评分。RAP-041是mALK1-Fc。阿瓦斯丁™是抗VEGF抗体贝伐单抗。

[0044] 图11显示hALK1-Fc(SEQ ID NO:3)和来自R&D Systems(Minneapolis,MN)的hALK1-Fc融合蛋白在Superose 12 10/300GL大小排阻柱(Amersham Biosciences,Piscataway,NJ)上的分离度。R&D Systems的材料含有约13%的聚集蛋白(如图左侧的峰所显示)以及一些低分子量物质。所述SEQ ID NO:3的材料中超过99%由合适分子大小的二聚体组成。

[0045] 图12显示在用PBS(圆圈)和mALK1-Fc(三角形)处理的小鼠中的表达萤光素酶之Lewis肺癌(LL/2-luc)细胞的荧光信号。将肿瘤细胞注射入尾静脉,并在施用细胞的当天开始处理(PBS或10mg/kg mALK1-Fc,腹腔内,每周两次)。在第22天处死濒死的经PBS处理的小鼠。处理组和对照组各由7只动物组成(n=7)。

[0046] 图13显示在胰腺内分泌肿瘤RIP1-Tag2小鼠模型中ALK1和BMP9在不同肿瘤发展阶段的表达水平。ALK1表达在血管发生活性最高的阶段达到峰值,而BMP9表达在整个肿瘤发展过程中升高。

[0047] 图14显示在RIP1-Tag2小鼠中mALK1-Fc处理对肿瘤生长的作用。从10周龄或12周龄开始,用mALK1-Fc或对照Fc(在每种情况下均为每只小鼠300微克,每周两次)处理小鼠两周。mALK1-Fc处理完全阻滞肿瘤生长。

[0048] 图15显示经mALK1-Fc或对照Fc处理的RIP1-Tag2小鼠中肿瘤的血管密度(CD31<sup>+</sup>细胞)。mALK1-Fc处理将肿瘤的血管密度降低约50%。

[0049] 图16显示经mALK1-Fc或对照Fc处理的RIP1-Tag2小鼠肿瘤血管中的周细胞包裹(NG2<sup>+</sup>细胞与CD31<sup>+</sup>细胞的比值)。mALK1-Fc处理将周细胞包裹升高约100%。

[0050] 图17显示,采用MDA-MB-231细胞系(一种源自ER-乳腺癌细胞的细胞系),mALK1-Fc对同位异种移植模型的作用。在30mg/kg的剂量下,mALK1-Fc对异种移植肿瘤有显著的生长延迟作用。

[0051] 图18显示,采用MCF7细胞系(一种源自ER+乳腺癌细胞的细胞系),hALK1-Fc对同位异种移植模型的作用。在10或30mg/kg的剂量下,hALK1-Fc对异种移植肿瘤有显著的生长延迟作用。

[0052] 发明详述

[0053] 1. 综述

[0054] ALK1是针对TGF- $\beta$ 超家族配体的I型细胞表面受体,也被称为ACVRL1和ACVRLK1。已提示ALK1可作为TGF- $\beta$ 1、TGF- $\beta$ 3和BMP-9的受体(Marchuk等,Hum Mol Genet.2003;Brown等,J Biol Chem.2005年7月1日;280(26):25111-8)。

[0055] 在小鼠中,ALK1的功能丧失突变导致发育中血管系统的多种异常(Oh等,Proc.Natl Acad.Sci.USA 2000,97,2626-2631;Urness等,Nat.Genet.2000,26,328-331)。

[0056] 在人中,ALK1的功能丧失突变与遗传性出血性毛细血管扩张(hereditary hemorrhagic telangiectasia,HHT或Osler-Rendu-Weber综合征)有关,其中患者发生动静脉畸形,其导致从动脉直接流向(连通)静脉(动静脉短路(arteriovenous shunt)),而不经过中间的毛细血管网(capillary bed)。患HHT患者的典型症状包括复发性鼻出血、胃肠道出血、皮肤和皮肤粘膜毛细血管扩张以及肺、脑或肝血管系统的动静脉畸形(arteriovenous malformation,AVM)。

[0057] 最近来自David等(Blood.2007年3月1日;109(5):1953-61)和Scharpfenecker等(J Cell Sci.2007年3月15日;120(Pt 6):964-72)的出版物得出结论,BMP9和BMP10激活内皮细胞中的ALK1,并且该激活导致内皮细胞增殖和迁移的抑制。这些作用与促血管发生因子(例如VEGF)的作用刚好相反。因此这些出版物得出,BMP9和BMP10自身是抗血管发生因子,并且ALK1活化具有抗血管发生作用。相反地,本公开内容表明BMP9和BMP10的拮抗剂(而非激动剂)具有抗血管发生作用。

[0058] 本公开内容涉及发现包含ALK1细胞外结构域之一部分的多肽(“ALK1 ECD多肽”)可用于抑制体内血管发生,包括非VEGF依赖性的血管发生以及由多种血管发生因子(包括VEGF、FGF和PDGF)介导的血管发生。在一些方面中,本公开内容鉴定了ALK1的生理性高亲和力配体,并表明ALK1 ECD多肽抑制血管发生。该数据表明,ALK1 ECD多肽可发挥抗血管发生作用,即使ALK1 ECD多肽与TGF- $\beta$ 1未表现出明显结合。而且,ALK1 ECD多肽抑制由许多不同促血管发生因子(包括VEGF、FGF和GDF7)刺激的血管发生。因此,本公开内容描述了ALK1调节系统,其中ALK1是GDF5配体群(包括GDF6和GDF7)的受体,也是BMP9配体群(包括BMP10)的受体,其与这两组配体的亲和力不同。此外,本公开内容表明由ALK1和上述配体介导的信号传导在体内是促血管发生的,在体内抑制该调节系统具有强效的抗血管发生作用。因此,在一些方面中,本公开内容提供了用以抑制血管发生(包括VEGF依赖型血管发生和非VEGF依赖型血管发生)的ALK1调节系统的拮抗剂,包括所述受体或者一种或多种所述配体的拮抗剂。然而,应注意的是,预期针对ALK1自身的抗体具有与ALK1 ECD多肽不同的作用。预期针对ALK1的泛中和性抗体(pan-neutralizing antibody)(抑制所有强配体和弱配体结合的抗体)抑制这些配体经由ALK1的信号传导,但预期不会抑制这些配体经由其它受体(例如,在GDF5-7和BMP9-10情形中的BMPRIa、BMPRIb、BMPRII,以及TGF $\beta$ 情形中的TBRI和TBRII)的信号传导能力。另一方面,预期ALK1 ECD多肽抑制所有与其紧密结合的配体(对于例如实施例中显示的构建体,包括GDF5-7和BMP9-10),但不影响与其弱结合的配体(例如TGF- $\beta$ )。所以,尽管针对ALK1的泛中和性抗体会阻断BMP9和TGF- $\beta$ 经由ALK1的信号传导,但其不会阻断BMP9和TGF- $\beta$ 经由另一受体的信号传导;尽管ALK1 ECD多肽可抑制BMP9经由所有受体的信号传导(即使受体不是ALK1),但预期其不抑制TGF- $\beta$ 经由任何受体(即使是ALK1)的信号传导。

[0059] 除非另有指明,本文所述蛋白质是人蛋白质。所述蛋白质的Genbank序列号如下:人GDF5,CAA56874;人GDF6,AAH43222;人GDF7,NP\_878248;人BMP9,Q9UK05;人BMP10,095393;人DAN,BAA92265。ALK1序列列于图1-5中。

[0060] 人DAN氨基酸序列(SEQ ID NO:10)(Genbank BAA92265):

[0061] MLRVLVGAVL PAMLLAAPP INKLALFPDK SAWCEAKNIT QIVGHSGCRA KSIQNRACLG  
QCFSYSVPNT FPQSTESLVH CDSCMPAQSM WEIVTLECPG HEEVPRVDKL VEKILHCSCQACGKEPSHEG  
LSVYVQGEDG PGSQPGTHPH PHPHPHPGGQ TPEPEDPPGA PHTEEEGAED

[0062] 成熟的DAN蛋白预期对应于17-180位氨基酸。DAN的保守性半胱氨酸结构域对应于21-125位氨基酸(下划线表示)。

[0063] 人DAN cDNA序列(SEQ ID NO:11)(Genbank BC012037):

[0064]

```

gccgagcctc ctggggcgcc cgggcccgcg acccccgcac ccagctccgc aggaccggcg
ggcgcgcgcg ggctctggag gccacgggca tgatgcttcg ggtcctggtg ggggetgtcc
tccttgccat gctactggct gcccaccac ccatacaaa gctggcactg tcccagata
agagtgcctg gtgcgaagcc aagaacatca ccagatcgt gggccacagc ggctgtgagg

```

[0065]

```

ccaagtccat ccagaacagg gcgtgcctag gacagtgett cagctacagc gtcccccaaca
ccttcccaca gtccacagag tccttggttc actgtgactc ctgcatgcc a gcccagtcca
tgtgggagat tgtgacgctg gactgcccgg gccacgagga ggtgccagg gtggacaage
tgggtggagaa gatcctgcac tgtagctgcc aggcctgcgg caaggagcct agtcacgagg
ggctgagcgt ctatgtgcag ggcgaggacg ggccgggatc ccagcccggc acccaccctc
acccccatcc ccaccccat cctggcgggc agaccctga gcccaggac cccctgggg
ccccccacac agaggaagag ggggctgagg actgaggccc ccccaactct tcctcccctc
tcatccccct gtggaatgtt gggctcact ctctggggaa gtcaggggag aagctgaagc
ccccctttgg cactggatgg acttggcttc agactcggac ttgaatgctg cccggttgcc
atggagatct gaagggcgcg ggttagagcc aagctgcaca atttaataata ttcaagagtg
gggggaggaa gcagaggtct tcagggtctt ttttttgggg ggggggtgggt ctcttctgt
ctggcttcta gagatgtgcc tgtgggaggg ggaggaagt ggctgagcca ttgagtgtg
ggggaggcca tccaagatgg catgaatcgg gctaaggctc ctgggggtgc agatggact
gctgaggtcc cgggcttagt gtgagcatct tgccagcctc aggcctgagg gagggtggg
ctagaaagac cactggcaga aacaggaggc tccggcccca caggtttccc caaggcctct
caccaccactt cccatctcca gggaaagcgc gcccagtg cactgaagtg gcctccctc
agcggaggggg tttgggagtc aggcctgggc aggaccctgc tgactcgtgg cgcgggagct
gggagccagg ctctccgggc cttctctgg cttccttggc ttgctggtg ggggaaaggg
aggaggggaa gaaggaaagg gaagagtctt ccaaggccag aaggaggggg acaaccccc
aagaccatcc ctgaagacga gcatccccct cctctccctg ttagaaatgt tagtgccccg
cactgtgccc caagttctag gccccccaga aagctgtcag agccggcgc cttctcccct
ctcccaggga tgctctttgt aaatatcgga tgggtgtggg agtgaggggt tacctccctc
gccccaaagg tccagaggcc ctaggcggga tgggtctcgt gaacctcgag gaactccagg
acgaggagga catgggactt gcgtggacag tcagggttca ctgggctct ctctagctcc
ccaattctgc ctgcctcctc cctcccagct gcactttaac cctagaagggt ggggacctgg
ggggagggac agggcaggcg ggcccatgaa gaaagccct cgttgcccag cactgtctgc
gtctgctctt ctgtgccag ggtggctgcc agcccactgc ctctgcctg ggggtggctg
gccctctgg ctgttgccag gcgggcttct ggagcttgtc accattggac agtctccctg
atggaccctc agtcttctca tgaataaatt ccttcaacgc caaaaaaaaa aaaaaaaaa
aaaaaaaaaa aaaaaaaaa aaa

```

[0066] DAN前体的编码序列对应于93-635位核酸。成熟DAN蛋白的编码序列对应于141-632位核酸。DAN的保守性半胱氨酸结部分的编码序列对应于153-467位核酸。

[0067] 本说明书中使用的术语在本公开内容的上下文中以及在每个术语使用的特定上下文中一般具有本领域的普通含义。某些术语在说明书中进行了论述，从而向实施者提供有关描述本文公开的组合物和方法以及如何制备和使用它们的额外指导。从术语使用的特定上下文，该术语之任何用途的范围或含义将是显而易见的。

## [0068] 2. 可溶性ALK1多肽

[0069] 天然ALK1蛋白是跨膜蛋白质，该蛋白的一部分位于细胞外(细胞外部分)，一部分位于细胞内(细胞内部分)。本公开内容的多个方面包括含有ALK1细胞外结构域之一部分的多肽。

[0070] 在一些实施方案中，本公开内容提供了“ALK1 ECD多肽”。术语“ALK1 ECD多肽”意指由天然ALK1多肽细胞外结构域的氨基酸序列组成或者包含其的多肽(其包括或不包括任何信号序列和信号序列N端的序列)，或者意指与天然ALK1多肽细胞外结构域具有至少33%同一性的氨基酸序列，任选地与天然ALK1多肽细胞外结构域具有至少60%、至少70%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99或100%同一

性,例如SEQ ID NO:1的34-95位氨基酸的半胱氨酸结区域或者半胱氨酸结加细胞外结构域之N-端和C-端的额外氨基酸(例如SEQ ID NO:1的22-118位氨基酸)。同样,ALK1 ECD多肽可包含由SEQ ID NO:2的100-285位核苷酸或其沉默变体或者在严格杂交条件(一般地,这样的条件是本领域已知的,例如可包括于65°C在50%(体积/体积)甲酰胺、5×SSC、2%(重量/体积)封闭剂、0.1%N-十二烷基肌氨酸、0.3%SDS中过夜杂交,并例如于约65°C在5×SSC中清洗)下与其互补物杂交的核酸所编码的多肽。此外,ALK1 ECD多肽可包含由SEQ ID NO:2的64-384位核苷酸或其沉默变体或者在严格杂交条件(一般地,这样的条件是本领域已知的,例如可包括于65°C在50%(体积/体积)甲酰胺、5×SSC、2%(重量/体积)封闭剂、0.1%N-十二烷基肌氨酸、0.3%SDS中过夜杂交,并例如于65°C在5×SSC中清洗)下与其互补物杂交的核酸所编码的多肽。因此,术语“ALK1 ECD多肽”包含ALK1多肽的分离的细胞外部分、其变体(包括含有在对应于SEQ ID NO:1的22-118位氨基酸所示序列中例如不超过2、3、4、5或10个氨基酸替换、添加或缺失的变体,以及包括含有在对应于SEQ ID NO:1的34-95位氨基酸所示序列中不超过2、3、4、5或10个氨基酸替换、添加或缺失的变体)、其片段和包含任何上述序列的融合蛋白;然而,在每种情形中,任何前述的ALK1 ECD多肽优选将保持与GDF5、GDF6、GDF7、BMP9和BMP10中一种或多种的高亲和力。术语“ALK1 ECD多肽”显然旨在排除任何全长的天然ALK1多肽。一般地,ALK1 ECD多肽被设计为在生物学相关的温度、pH水平和渗透压下可溶于水性溶液。

[0071] 如上所述,本公开内容提供了与天然ALK1多肽共有特定程度的序列同一性或相似性的ALK1 ECD多肽。为了确定这两种氨基酸序列的同一性百分比,对所述序列进行以最优比较为目的的比对(例如,为了最优比对可以在第一和第二氨基酸(或核酸)序列中一个或二者中引入空位,为比较目的可以忽略非同源序列)。然后比较对应氨基酸位置处的氨基酸残基。当第一序列中的位置与第二序列中的对应位置均为同样氨基酸残基时,则所述分子在该位置是一致的(如本文所使用的“同一性”,其等同于氨基酸“同源性”)。所述两个序列之间的同一性百分比是这两个序列共有的相同残基之数目的函数,其中考虑到了空位数和每个空位的长度,所述空位是为了这两个序列最优比对的需要而引入。

[0072] 序列比较以及确定两个序列之间同一性和相似性的百分比可使用数学算法来实现(Computational Molecular Biology,Lesk,A.M.编著,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,第一部分,Griffin,A.M.和Griffin,H.G.编著,Humana Press,New Jersey,1994;Sequence Analysis in Molecular Biology,von Heinje,G.,Academic Press,1987以及Sequence Analysis Primer,Gribskov,M.和Devereux,J.,eds.,M Stockton Press,New York,1991)。

[0073] 在一个实施方案中,使用Needleman和Wunsch算法(J Mol.Biol.(48):444-453(1970))来确定两个氨基酸序列之间的同一性百分比,该算法已并入GCG软件包(可从<http://www.gcg.com>获得)的GAP程序中。在一个具体实施方案中,在GAP程序中使用以下参数:Blosum 62矩阵或PAM250矩阵,空位权重为16、14、12、10、8、6或4,长度权重为1、2、3、4、5或6。在另一实施方案中,使用GCG软件包(Devereux,J.等,Nucleic Acids Res.12(1):387(1984))(可从<http://www.gcg.com>获得)中的GAP程序来确定两个核苷酸序列之间的同一性百分比。示例性参数包括使用NWSgapdna.CMP矩阵,空位权重为40、50、60、70或80,长度权

重为1、2、3、4、5或6。除非另有指明,使用采用Blosum 62矩阵、空位权重为10以及长度权重为3的GAP程序来确定两个氨基酸序列之间的同一性百分比;如果这样的算法不能计算期望的同一性百分比,则应选择本文公开的合适的其它算法。

[0074] 在另一实施方案中,使用E.Myers和W.Miller的算法(CABIOS,4:11-17(1989))来确定两个氨基酸序列之间的同一性百分比,该算法已并入采用PAM120权重残基表(weight residue table)、空位长度罚分为12以及空位罚分为4的ALIGN程序(2.0版)中。

[0075] 在另一实施方案中,可使用基于Brutlag等的算法(Comp.App.Biosci.,6:237-245(1990))的FASTDB计算机程序来确定两个氨基酸序列之间的最佳整体比对。在序列比对中,查询序列和目的序列均为氨基酸序列。所述全面序列比对的结果表示为同一性百分比。在一个实施方案中,使用基于Brutlag等的算法(Comp.App.Biosci.,6:237-245(1990))的FASTDB计算机程序来确定氨基酸序列同一性。在一个具体的实施方案中,所使用的计算氨基酸比对的同一性和相似性百分比的参数包括:矩阵=PAM 150,k-tuple=2,错配罚分=1,连接罚分(joining penalty)=20,随机化群组长度=0,截断值=1,空位罚分=5,空位大小罚分=0.05。

[0076] 在一些实施方案中,ALK1 ECD多肽包含天然ALK1蛋白(例如SEQ ID NO:1的序列)的细胞外部分,优选是ALK1细胞外结构域的配体结合部分。在一些实施方案中,可溶性ALK1多肽包含与SEQ ID NO:1的22-118位氨基酸所示序列具有至少60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,截短的细胞外ALK1多肽包含SEQ ID NO:1细胞外部分氨基酸序列的至少30、40或50个连续氨基酸。

[0077] 在一些优选的实施方案中,ALK1 ECD多肽结合GDF5、GDF6、GDF7、BMP9和BMP10中的一种或多种。任选地,所述ALK1多肽基本上不显示与TGF- $\beta$ 1或TGF- $\beta$ 3的结合。可使用纯化蛋白质在溶液中或在表面等离子体共振系统(例如Biacore™系统)中对结合进行评估。优选的可溶性ALK1多肽将显示抗血管发生活性。血管发生抑制活性的生物测定包括鸡绒毛尿囊膜(CAM)测定、小鼠角膜微囊袋测定、测量施用分离的或合成的蛋白质对植入肿瘤之作用的测定。CAM测定由O'Reilly等描述于“Angiogenic Regulation of Metastatic Growth”Cell,79(2)卷,1994年10月1日,315-328页。简言之,将具有完整卵黄的3日龄鸡胚从卵中分离并置于petri培养皿中。孵育3天后,将含有待测试蛋白质的甲基纤维素盘(methylcellulose disc)施加至每个胚胎的CAM。孵育48小时后,观察胚胎和CAM以确定内皮生长是否已被抑制。小鼠角膜微囊袋测定包括将含有生长因子的粒状物(pellet)连同含有疑似内皮生长抑制剂的另一粒状物植入小鼠的角膜中,观察角膜中形成的毛细血管模式。其它测定描述于实施例中。

[0078] ALK1 ECD多肽可通过去除ALK1多肽的细胞质尾部和跨膜区域而得到。或者,可通过缺失或通过用亲水性氨基酸残基替换构成跨膜结构域的正常疏水氨基酸残基来使跨膜结构域失活。在上述任一情形中,形成了基本上亲水的亲水性模式,其降低亲脂性并增进水溶性。跨膜结构域的缺失优选依靠用亲水氨基酸残基进行替换,因为这样避免引入可能具有免疫原性的表位。

[0079] ALK1 ECD多肽还可在N端包含任意的各种前导序列。在真核系统中这样的序列会使所述肽表达以及靶向到分泌途径。参见,例如Ernst等,美国专利No.5,082,783(1992)。或者,可以使用本源的ALK1信号序列来实现从细胞泌出。可能的前导序列包括本源的、tPa和

蜜蜂蜂毒素(mellitin)前导序列(分别为SEQ ID NO 7-9)。对信号肽的加工可依所选前导序列、所使用细胞类型和培养条件等参数而变化,因此成熟ALK1 ECD多肽(包括SEQ ID NO: 5)的实际N端起始位点可在N端或C端方向上移动1-5个氨基酸。

[0080] 在一些实施方案中,本公开内容涵盖了ALK1多肽的特定突变从而改变该肽的糖基化。可选择这样的突变以引入或消除一个或多个糖基化位点,例如O-连接或N-连接的糖基化位点。天冬酰胺连接的糖基化识别位点通常包含三肽序列——天冬酰胺-X-苏氨酸(或天冬酰胺-X-丝氨酸)(其中“X”是任意氨基酸),其被合适的细胞糖基化酶特异性识别。还可以通过将一个或多个丝氨酸或苏氨酸残基添加、替换至野生型ALK1多肽序列(针对O-连接的糖基化位点)来进行改变。在糖基化识别位点的第一个或第三个氨基酸位置的一处或两处进行多种氨基酸替换或缺失(和/或在第二个位置进行氨基酸缺失)导致经修饰三肽序列的非糖基化。在ALK1多肽上增加碳水化合物部分数目的另一方法是将糖苷通过化学方法或酶促法偶联至ALK1多肽来实现。取决于所使用的偶联模式,可以使糖连接至(a)精氨酸和组氨酸;(b)游离的羧基;(c)游离的巯基(例如半胱氨酸的巯基);(d)游离的羟基(例如丝氨酸、苏氨酸或羟脯氨酸的羟基);(e)芳族残基(例如苯丙氨酸、酪氨酸或色氨酸的芳族残基);或(f)谷氨酰胺的酰胺基团。这些方法描述于1987年9月11日公布的WO 87/05330以及Aplin和Wriston(1981)CRC Crit.Rev.Biochem.,259-306页中,其通过引用并入本文。可通过化学方法和/或酶促方法将ALK1多肽上存在的一个或多个碳水化合物去除。化学方法去糖基化可包括例如使ALK1多肽暴露于化合物三氟甲磺酸或等同化合物。该处理导致除连接糖(N-乙酰葡萄糖胺或N-乙酰半乳糖胺)以外的大多数或所有糖被切割,而氨基酸序列则保持完好。化学方法去糖基化还描述于Hakimuddin等(1987)Arch.Biochem.Biophys.259:52以及Edge等(1981)Anal.Biochem.118:131。酶促法切割ALK1多肽上的碳水化合物部分可通过使用多种内切和外切糖苷酶来实现,如Thotakura等(1987)Meth.Enzymol.138:350所描述。需要时,可根据所用表达系统的类型来调整ALK1多肽的序列,这是因为哺乳动物、酵母、昆虫和植物细胞均可引入不同的糖基化模式,这些糖基化模式可受到所述肽的氨基酸序列的影响。一般地,用于人中的ALK1蛋白将表达在提供适当糖基化的哺乳动物细胞系中,例如HEK293或CHO细胞系,然而预计另一些哺乳动物表达细胞系、昆虫细胞以及含有经改造之糖基化酶的酵母细胞系也可使用。

[0081] 本公开内容还涵盖了获得突变体的方法,特别是ALK1多肽的组合突变体集合以及截短突变体;组合突变体库尤其可用于鉴定功能性变体序列。筛选这些组合文库的目的可以是获得例如可用作激动剂或拮抗剂的ALK1多肽变体或者具有新活性的ALK1多肽变体。以下提供了多种筛选测定,这样的测定可用于评价变体。例如,可根据结合ALK1配体之能力、阻止ALK1配体与ALK1多肽结合或者干扰ALK1配体引起之信号传导的能力来筛选ALK1多肽变体。ALK1多肽或其变体的活性还可以在基于细胞的或者体内测定中进行测试,尤其是实施例中公开的任何测定。

[0082] 可获得源于组合的变体,其具有相对于ALK1 ECD多肽(其包含天然ALK1多肽的细胞外结构域)来说选择性的或普遍提高的效力。同样,可通过诱变来获得血清半衰期显著不同于对应野生型ALK1 ECD多肽的变体。例如,可使经改变的蛋白质对蛋白水解降解或者导致天然ALK1 ECD多肽破坏、清除或失活的其它过程更稳定或更不稳定。可利用这样的变体和编码其的基因通过调节ALK1多肽的半衰期来改变ALK1 ECD多肽水平。例如,短半衰期可

带来更短暂的生物学效应,并可更严格地控制患者体内的重组ALK1 ECD多肽水平。在Fc融合蛋白中,可在接头(如果存在的话)和/或Fc部分形成突变以改变该蛋白质的半衰期。

[0083] 可通过编码多肽文库之基因的简并文库来得到组合文库,所述多肽均包含潜在ALK1多肽序列的至少一部分。例如,可将合成寡核苷酸混合物酶促连接进基因序列,从而潜在ALK1多肽核苷酸序列的简并集合可表达为单独的肽,或者表达为一组较大的融合蛋白(例如,用于噬菌体展示)。

[0084] 可通过许多方法从简并寡核苷酸序列得到潜在ALK1 ECD变体的文库。可以在自动DNA合成仪中化学合成简并基因序列,然后将合成基因连接进合适的表达载体。简并寡核苷酸的合成在本领域是公知的(参见,例如Narang,SA(1983)*Tetrahedron* 39:3;Itakura等,(1981)*Recombinant DNA,Proc.*第3版Cleveland Sympos.Macromolecules,ed.AG Walton,Amsterdam:Elsevier 273-289页;Itakura等,(1984)*Annu.Rev.Biochem.*53:323;Itakura等,(1984)*Science* 198:1056;Ike等,(1983)*Nucleic Acid Res.*11:477)。这样的技术已用于其它蛋白质的定向演化中(参见,例如Scott等,(1990)*Science* 249:386-390;Roberts等,(1992)*PNAS USA* 89:2429-2433;Devlin等,(1990)*Science* 249:404-406;Cwirla等,(1990)*PNAS USA* 87:6378-6382;以及美国专利No:5,223,409、5,198,346和5,096,815)。

[0085] 或者,可利用其它形式的诱变来得到组合文库。例如,可通过使用例如丙氨酸扫描诱变及类似方法(Ruf等,(1994)*Biochemistry* 33:1565-1572;Wang等,(1994)*J.Biol.Chem.*269:3095-3099;Balint等,(1993)*Gene* 137:109-118;Grodberg等,(1993)*Eur.J.Biochem.*218:597-601;Nagashima等,(1993)*J.Biol.Chem.*268:2888-2892;Lowman等,(1991)*Biochemistry* 30:10832-10838;和Cunningham等,(1989)*Science* 244:1081-1085)、接头扫描诱变(linker scanning mutagenesis)(Gustin等,(1993)*Virology* 193:653-660;Brown等,(1992)*Mol.Cell Biol.*12:2644-2652;McKnight等,(1982)*Science* 232:316)、饱和诱变(saturation mutagenesis)(Meyers等,(1986)*Science* 232:613)、PCR诱变(Leung等,(1989)*Method Cell Mol Biol* 1:11-19)或随机诱变包括化学诱变等(Miller等,(1992)*A Short Course in Bacterial Genetics*,CSHL Press,Cold Spring Harbor,NY;和Greener等,(1994)*Strategies in Mol Biol* 7:32-34)来筛选而从文库产生并分离出ALK1多肽变体。接头扫描诱变(特别是在组合的背景下进行的)是鉴定ALK1多肽截短(生物活性)形式的诱人方法。

[0086] 本领域已知多种用于筛选由点突变和截短形成的组合文库之基因产物的技术,以及就此而言已知多种用于针对具有特定性质之基因产物筛选cDNA文库的技术。这样的技术一般适用于快速筛选由组合诱变ALK1多肽获得的基因文库。筛选大基因文库的最广泛使用的技术通常包括:将基因文库克隆进可复制的表达载体中;用得到的文库载体转化合适的细胞;以及在下述条件下表达组合基因,所述条件即在此条件下对期望活性的检测使得分离编码其产物被检测之基因的载体相对容易。优选的测定包括ALK1配体结合测定和配体介导的细胞信号传导测定。

[0087] 在一些实施方案中,本公开内容的ALK1 ECD多肽还可包含除了ALK1多肽中天然存在的之外的翻译后修饰。这样的修饰包括但不限于乙酰化、羧基化、糖基化、磷酸化、脂化和酰基化。结果,经修饰的ALK1 ECD多肽可包含非氨基酸组分,例如聚乙二醇、脂质、多糖或单糖以及磷酸。这样的非氨基酸组分对ALK1 ECD多肽功能的作用可如本文针对其它ALK1 ECD

多肽变体所述的那样进行测试。当ALK1 ECD多肽通过对ALK1多肽初始形式进行切割在细胞中产生时,翻译后加工对于正确折叠和/或蛋白质功能可能也是重要的。不同的细胞(例如CHO、HeLa、MDCK、293、WI38、NIH-3T3或HEK293)拥有针对这些翻译后活性的特定细胞机器和特有机制,并且可以选择不同的细胞以确保ALK1多肽的正确修饰和加工。

[0088] 在一些方面,ALK1 ECD多肽的功能性变体或经修饰形式包括含有ALK1 ECD多肽至少一部分以及一个或多个融合结构域的融合蛋白。这些融合结构域的公知实例包括但不限于多组氨酸、Glu-Glu、谷胱甘肽S转移酶(GST)、硫氧还蛋白、蛋白A、蛋白G、免疫球蛋白重链恒定区(Fc)、麦芽糖结合蛋白(MBP)或人血清白蛋白。可选择融合结构域使其具备所需特质。例如,某些融合结构域尤其可用于通过亲和层析来分离融合蛋白。为了亲和纯化的目的,针对亲和层析使用了相关基质,例如谷胱甘肽、淀粉酶以及缀合有镍或钴的树脂。许多这样的基质可以“试剂盒”形式得到,例如可用于HIS<sub>6</sub>融合伴侣的Pharmacia GST纯化系统和QIAexpress<sup>TM</sup>系统(Qiagen)。另一个实例是,可选择融合结构域从而有利于ALK1 ECD多肽的检测。这些检测结构域的实例包括多种荧光蛋白(例如GFP)以及通常是短肽序列的“表位标签”,针对其的特异性抗体是可用的。特异性单克隆抗体可用的公知表位标签包括FLAG、流感病毒血细胞凝集素(HA)和c-myc标签。在一些情况下,融合结构域包含蛋白酶切割位点,例如针对Factor Xa或凝血酶(Thrombin)的切割位点,这使得相关蛋白酶部分地消化该融合蛋白并因而从中释放重组蛋白。然后,所释放的蛋白通过随后的层析分离得以与融合结构域分离。在一些优选的实施方案中,ALK1 ECD多肽与在体内稳定ALK1多肽的结构域(“稳定”结构域)融合。“稳定”是指增加血清半衰期,不论是由于减少破坏、减少通过肾的清除还是其它药代动力学效应引起。已知与免疫球蛋白的Fc部分融合会赋予多数蛋白质以理想的药代动力学性质。同样,与人血清白蛋白融合可赋予理想的性质。可选择的其它类型融合结构域包括多聚化(例如,二聚化、四聚化)结构域和功能性结构域。

[0089] 作为一个具体实例,本公开内容提供了包含与Fc结构域融合之ALK1可溶性细胞外结构域的融合蛋白(例如,SEQ ID NO:6)。

[0090] THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD(A)  
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK(A)  
VSNKALPVIIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD  
SDGPFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHN(A)HYTQKSLSLSPGK\*

[0091] 任选地,Fc结构域在例如Asp-265、赖氨酸322和Asn-434残基处具有一个或多个突变。在一些情况下,包含一个或多个所述突变(例如Asp-265突变)的突变Fc结构域与野生型Fc结构域相比具有降低的结合Fc $\gamma$ 受体的能力。在另一些情况下,包含一个或多个所述突变(例如Asn-434突变)的突变Fc结构域与野生型Fc结构域相比具有提高的结合I类MHC相关Fc受体(FcRN)的能力。

[0092] 应理解,融合蛋白的不同组分可以按照符合所需功能的任何方式排列。例如,ALK1 ECD多肽可置于外源结构域的C端,或者外源结构域可置于ALK1 ECD多肽的C端。ALK1 ECD多肽结构域和外源结构域不需要在融合蛋白中邻接,另外的结构域或氨基酸序列可包含在各结构域的C端或N端或者所述结构域之间。

[0093] 本文使用的术语“免疫球蛋白Fc区域”或简称“Fc”应理解为是指免疫球蛋白链恒定区(优选免疫球蛋白重链恒定区)的羧基端部分或其一部分。例如,免疫球蛋白Fc区可包

含:1)CH1结构域、CH2结构域和CH3结构域;2)CH1结构域和CH2结构域;3)CH1结构域和CH3结构域;4)CH2结构域和CH3结构域;或5)两个或更多个结构域和免疫球蛋白铰链区的组合。在一个优选的实施方案中,所述免疫球蛋白Fc区域包含至少免疫球蛋白铰链区、CH2结构域和CH3结构域,优选缺少CH1结构域。

[0094] 在一个实施方案中,所述重链恒定区源自的免疫球蛋白类型是IgG(Ig $\gamma$ )( $\gamma$ 亚型1、2、3或4)。可使用免疫球蛋白的其它类型:IgA(Ig $\alpha$ )、IgD(Ig $\delta$ )、IgE(Ig $\epsilon$ )和IgM(Ig $\mu$ )。有关选择合适的免疫球蛋白重链恒定区的论述详见美国专利No.5,541,087和5,726,044。认为从某些免疫球蛋白类型和亚型选择特定免疫球蛋白重链恒定区序列以实现特定的结果是在本领域技术水平之内的。编码免疫球蛋白Fc区之DNA构建体的一部分优选包含铰链结构域的至少一部分以及优选地Fc $\gamma$ 的CH<sub>3</sub>或者IgA、IgD、IgE或IgM任一中同源结构域的至少一部分。

[0095] 此外,还考虑到,在本文公开的方法和组合物的实施中,替换或缺失免疫球蛋白重链恒定区的氨基酸可能是有用的。一个实例是在上游的CH<sub>2</sub>区域中引入氨基酸替换以构建与Fc受体亲和力降低的Fc变体(Cole等(1997)J. Immunol. 159:3613)。

[0096] 在一些实施方案中,本公开使得分离和/或纯化形式的ALK1 ECD多肽可用,其从其它蛋白质和/或其它ALK1 ECD多肽种类中分离出来或者基本不含(例如,至少80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%地不含)其它蛋白质和/或其它ALK1 ECD多肽种类。

[0097] 在一些实施方案中,本公开内容包括编码可溶性ALK1多肽的核酸,所述核酸包含ALK1蛋白细胞外部分的编码序列。在另一些实施方案中,本公开内容还涉及包含这些核酸的宿主细胞。所述宿主细胞可以是任意原核和真核细胞。例如,本公开内容的多肽可以表达在细菌细胞(例如大肠杆菌)、昆虫细胞(例如,使用杆状病毒表达载体)、酵母或哺乳动物细胞中。其它合适的宿主细胞是本领域技术人员已知的。因此,本公开内容的一些实施方案还涉及生产ALK1 ECD多肽的方法。已证实,SEQ ID NO:3所示的在CHO细胞中表达的ALK1-Fc融合蛋白具有强的抗血管发生活性。

[0098] 可如ALK1 ECD蛋白有关描述得到和表征DAN多肽(包括野生型DAN的变体)和包含DAN蛋白的融合蛋白。

### [0099] 3. 编码ALK1多肽的核酸

[0100] 在一些方面中,本公开内容提供了编码包括本文公开的片段、功能性变体和融合蛋白在内的任何ALK1多肽(例如,ALK1 ECD多肽)的分离的和/或重组的核酸。例如,SEQ ID NO:2编码天然的人ALK1前体多肽,而SEQ ID NO:4编码与IgG1 Fc结构域融合的ALK1细胞外结构域的前体。所述目标核酸可以是单链的或双链的。这样的核酸可以是DNA或RNA分子。这些核酸可用于例如制备ALK1多肽的方法中或用作直接的治疗剂(例如,在反义、RNAi或基因治疗策略中)。

[0101] 在一些方面中,所述编码ALK1多肽的目标核酸还应理解为包括SEQ ID NO:2或4之变体的核酸。变体核苷酸序列包括由于一个或多个核苷酸替换、添加或缺失而不同的序列,例如等位基因变体。

[0102] 在一些实施方案中,本公开内容提供了分离的或重组的核酸序列,其与SEQ ID NO:2或4具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的同一性。本领域普通技术人员会理解,与SEQ ID NO:2或4互补以及与SEQ ID NO:2或4的变体互补的核酸序

列也在本公开的范围。在另一些实施方案中,本公开内容的核酸序列可被分离、重组和/或与外源核苷酸序列融合,或者在DNA文库中。

[0103] 在另一些实施方案中,本公开内容的核酸还包括在高度严格条件下与SEQ ID NO:2或4所示核苷酸序列杂交的核苷酸序列、SEQ ID NO:2或4的互补序列或者其片段。如上所述,本领域普通技术人员会容易地理解,促进DNA杂交的合适的严格条件可有不同。例如,可以于约45°C在6.0×氯化钠/柠檬酸钠(SSC)中进行杂交,然后于50°C用2.0×SSC清洗。例如,所述清洗步骤中的盐浓度可以从低严格的50°C、约2.0×SSC到高严格的50°C、约0.2×SSC之中选择。另外,所述清洗步骤中的温度可从低严格条件的室温(约22°C)提高到高严格条件的约65°C。温度和盐均可变化,或者温度或盐浓度可保持恒定而其它变量发生改变。在一个实施方案中,本公开内容提供了在室温6×SSC的低严格条件下杂交并随后在室温用2×SSC清洗的核酸。

[0104] 本公开内容的范围还包括由于遗传密码简并性而导致不同于SEQ ID NO:2或4所示核酸的核酸。例如,许多氨基酸对应于超过一种的三联体。对应于同一氨基酸的密码子,或称“同义密码子”(例如,CAU和CAC是组氨酸的同义密码子),可导致不影响该蛋白之氨基酸序列的“沉默”突变。然而,导致目的蛋白质之氨基酸序列改变的DNA序列多态性预期会存在于哺乳动物细胞中。本领域技术人员会理解,在编码特定蛋白质之核酸的一个或多个核苷酸(多达核苷酸的约3-5%)中的这些变化可能由于天然等位基因变化而存在于给定物种的个体中。任何以及全部这样的核苷酸改变和得到的氨基酸多态性均在本公开内容的范围内。

[0105] 在一些实施方案中,本公开内容的重组核酸可有效连接至表达构建体的一个或多个调控核苷酸序列。调控核苷酸序列一般会适合于用于表达的宿主细胞。本领域已知针对多种宿主细胞的众多类型的合适表达载体和适当调控序列。通常,所述一种或多种调控核苷酸序列可包括但不限于:启动子序列、前导或信号序列、核糖体结合位点、转录起始和终止序列、翻译起始和终止序列以及增强子或激活子(activator)序列。本公开内容涵盖了本领域已知的组成型或诱导型启动子。所述启动子可以是天然启动子或者组合了多于一种启动子之元件的杂合启动子。表达构建体可以以附加体(例如质粒)的形式存在于细胞中,或者表达构建体可插入染色体中。在一个优选的实施方案中,表达载体包含选择标记基因以允许选择经转化的宿主细胞。选择标记基因是本领域周知的,并且随所使用宿主细胞而不同。

[0106] 在本文公开的一些方面中,目标核酸在包含编码ALK1多肽并与至少一种调控序列有效连接的核苷酸序列的表达载体中提供。调控序列是本领域公知的,并被选择用于指导ALK1多肽的表达。因此,术语“调控序列”包括启动子、增强子和其它表达调控元件。示例性的调控序列描述于Goeddel;Gene Expression Technology:Methods in Enzymology, Academic Press, San Diego, CA(1990)。例如,在与之有效连接时调控DNA序列表达的许多种表达调控序列中任意一种均可用于这些载体中以表达编码ALK1多肽的DNA序列。这样可用的表达调控序列包括例如SV40的早期和晚期启动子、tet启动子、腺病毒或巨细胞病毒立即早期启动子、RSV启动子、lac系统、trp系统、TAC或TRC系统、表达由T7 RNA聚合酶指导的T7启动子、 $\lambda$ 噬菌体的主要操纵子和启动子区域、fd外被蛋白的调控区、3-磷酸甘油酸激酶或其它糖酵解酶的启动子、酸性磷酸酶的启动子(例如Pho5)、酵母 $\alpha$ -接合因子的启动子、杆

状病毒系统的多面体启动子以及其它已知调控原核或真核细胞或其病毒之基因表达的序列,及其多种组合。应理解,设计表达载体可取决于如下因素:待转化之宿主细胞的选择和/或所需表达之蛋白的类型。并且,还应考虑载体的拷贝数、调控该拷贝数的能力以及该载体编码之任何其它蛋白(例如抗生素标记)的表达。

[0107] 本公开内容中涉及的重组核酸可通过将所克隆基因或其一部分连接进适于在原核细胞、真核细胞(酵母、鸟类、昆虫或哺乳动物)或两者中表达的载体中而产生。用于产生重组ALK1多肽的表达载体包括质粒和其它载体。例如,合适的载体包括用于在原核细胞(例如大肠杆菌)中表达的如下类型的质粒:pBR322来源的质粒、pEMBL来源的质粒、pEX来源的质粒、pBTac来源的质粒和pUC来源的质粒。

[0108] 一些哺乳动物表达载体既包含利于在细菌中扩增载体的原核序列,也包含在真核细胞中表达的一种或多种真核转录单元。适于转染真核细胞的哺乳动物表达载体的实例有:pcDNA1/amp、pcDNA1/neo、pRc/CMV、pSV2gpt、pSV2neo、pSV2-dhfr、pTk2、pRSVneo、pMSG、pSVT7、pko-neo和pHyg来源的载体。这些载体中的一些用来自细菌质粒(例如pBR322)的序列进行修饰,以利于在原核和真核细胞中进行复制和药物抗性筛选。或者,病毒例如牛乳头瘤病毒(BPV-1)或EB病毒的衍生物(pHEBo、pREP来源的以及p205)可用于在真核细胞中瞬时表达蛋白。其它病毒(包括逆转录病毒)表达系统的实例可见于以下对基因治疗递送系统的描述。用于制备质粒和转化宿主生物的各种方法是本领域周知的。对于其它针对原核和真核细胞的合适表达系统以及通用重组方法,参见Sambrook,Fritsch和Maniatis编著的Molecular Cloning A Laboratory Manual,第3版(Cold Spring Harbor Laboratory Press,2001)。在一些情况下,通过使用杆状病毒表达系统来表达重组多肽可能是理想的。这样的杆状病毒表达系统的实例包括pVL来源的载体(例如pVL1392、pVL1393和pVL941)、pAcUW来源的载体(例如pAcUW1)和pBlueBac来源的载体(例如含 $\beta$ -gal的pBlueBac III)。

[0109] 在一个优选的实施方案中,载体被设计成用于在CHO细胞中产生目的ALK1多肽,例如Pcmv-Script载体(Stratagene,La Jolla,Calif.)、pcDNA4载体(Invitrogen,Carlsbad,Calif.)和pCI-neo载体(Promega,Madison,Wisc.)。很明显,可使用目的基因构建体使目的ALK1多肽在培养扩增的细胞中表达,从而例如产生用于纯化的蛋白质,包括融合蛋白或变体蛋白。

[0110] 本公开内容还涉及转染有包含编码序列(例如,SEQ ID NO:2或4)之重组基因的宿主细胞,所述编码序列针对一种或多种目的ALK1多肽。所述宿主细胞可以是任何原核或真核细胞。例如,本文公开的ALK1多肽可表达于细菌细胞(例如大肠杆菌)、昆虫细胞(例如,使用杆状病毒表达系统)、酵母或哺乳动物细胞中。其它合适的宿主细胞是本领域技术人员已知的。

[0111] 因此,本公开内容还涉及产生目的ALK1多肽(包括ALK1 ECD多肽)的方法。例如,可以在合适的条件下培养转染有编码ALK1多肽之表达载体的宿主细胞以表达ALK1多肽。所述ALK1多肽可从含有ALK1多肽的细胞和培养混合物中泌出并分离。或者,ALK1多肽可保留在细胞质中或膜级分中,收集、裂解细胞并分离蛋白质。细胞培养物包括宿主细胞、培养基和其它副产物。用于细胞培养的合适培养基是本领域公知的。可使用本领域已知的用于纯化蛋白质的技术来从细胞培养基、宿主细胞或两者中分离出目的ALK1多肽,所述技术包括离子交换层析、凝胶过滤层析、超滤、电泳、使用特异性针对ALK1多肽之特定表位的抗体的

免疫亲和纯化以及使用与融合到ALK1多肽之结构域结合的试剂的亲和纯化(例如,可使用蛋白A柱来纯化ALK1-Fc融合蛋白)。在一个优选的实施方案中,所述ALK1多肽是含有利于其纯化之结构域的融合蛋白。在一个优选的实施方案中,通过一系列柱层析步骤来实现纯化,包括例如下述的三种或更多种:蛋白A层析、Q sepharose层析、phenylsepharose层析、大小排阻层析和阳离子交换层析。可以通过病毒过滤(viral filtration)和缓冲液交换(buffer exchange)来完成纯化。

[0112] 在另一实施方案中,编码纯化用前导序列(例如在重组ALK1多肽所需部分之N端的多-(His)/肠激酶切割位点序列)的融合基因可允许使用Ni<sup>2+</sup>金属树脂的亲和层析来纯化所表达的融合蛋白。然后,可通过用肠激酶处理来除去所述纯化用前导序列,以提供经纯化的ALK1多肽(例如,参见Hochuli等,(1987)J.Chromatography 411:177以及Janknecht等,PNAS USA 88:8972)。

[0113] 用于制备融合基因的技术是周知的。实质上,按照常规技术对编码不同多肽序列的多种DNA片段进行连接,其使用平末端或交错末端(stagger-end)进行连接,使用限制酶消化以提供合适的末端,需要时填补粘性末端,用碱性磷酸酶处理以避免不期望的连接,以及酶促连接。在另一实施方案中,可通过常规技术(包括自动DNA合成仪)来合成融合基因。或者,可使用锚定引物对基因片段进行PCR扩增,所述锚定引物产生了两个连续基因片段之间的互补突出端,所述突出端可随后退火以得到嵌合基因序列(参见,例如Current Protocols in Molecular Biology,Ausubel等编著,John Wiley&Sons:1992)。

[0114] ALK1、BMP9、BMP10、GDF5、GDF6或GDF7之拮抗剂的各类核酸化合物的实例包括反义核酸、RNAi构建体和催化性核酸构建体。核酸化合物可以是单链或双链的。双链化合物还可包括突出端或非互补的区域,在此处一条链或另一条链是单链的。单链化合物可包括自身互补的区域,即该化合物的双螺旋结构区域形成所谓“发夹”或“茎环”结构。核酸化合物可包含与由全长ALK1核酸序列或配体核酸序列之至多1000、至多500、至多250、至多100或至多50、35、30、25、22、20或18个核苷酸组成的区域互补的核苷酸序列。互补区域优选为至少8个核苷酸,任选地至少10个或至少15个核苷酸,任选地在15到25个核苷酸之间。互补区域可落入靶转录物的内含子、编码序列或非编码序列内,例如编码序列部分。一般地,核酸化合物的长度为约8至约500个核苷酸或碱基对,任选地其长度为约14至约50个核苷酸。核酸可以是DNA(特别是用作反义核酸时)、RNA或RNA:DNA混合物。任何一条链可包含DNA和RNA混合物,以及不能简单归类为DNA或RNA的经修饰形式。同样,双链化合物可以是DNA:DNA、DNA:RNA或RNA:RNA,任何一条链也可包含DNA和RNA混合物以及不能简单归类为DNA或RNA的经修饰形式。核酸化合物可包含多种修饰中的任意种,包括对骨架(天然核酸的糖-磷酸部分,包括核苷酸间连接)或碱基部分(天然核酸的嘌呤或嘧啶部分)的一种或多种修饰。反义核酸化合物优选具有约15至约30个核苷酸的长度,并常包含一种或多种修饰以改善性质,例如在血清中、在细胞中或者在该化合物可能被递送至的位置(例如,在经口递送化合物情形中的胃部,对吸入型化合物来说的肺部)的稳定性。在RNAi构建体的情形中,与靶转录物互补的链一般是RNA或其修饰物。另一条链可以是RNA、DNA或任何其它变化形式。双链或单链“发夹”RNAi构建体的双链体部分优选具有18~40个核苷酸的长度,任选地约21~23个核苷酸长度,只要其可作为Dicer的底物即可。催化性或酶促性核酸可以是核酶或DNA酶,还可包括经修饰的形式。当在生理条件下以及在无义或有义对照很少或没有作用的浓度下与细胞接

触时,核酸化合物可抑制靶标表达约50%、75%、90%或更多。测试核酸化合物效应的优选浓度为1、5和10微摩尔/升。还可测试核酸化合物例如针对血管发生的作用。

[0115] 编码DAN多肽(包括野生型DAN之变体)的核酸以及编码含有DAN蛋白之融合蛋白的核酸可如上有关编码ALK1 ECD蛋白之核酸所述产生以及表征。

#### [0116] 4. 抗体

[0117] 本公开内容的另一方面涉及与ALK1多肽细胞外部分反应的抗体,优选特异性与ALK1多肽反应的抗体。在一个优选的实施方案中,这样的抗体可干扰ALK1与配体(例如GDF5、GDF6、GDF7、BMP-9或BMP-10)的结合。应理解,针对ALK1配体的抗体应结合成熟的、经加工形式的相应蛋白质。本公开内容还提供了与GDF5、GDF6、GDF7、BMP-9和/或BMP-10结合并抑制ALK1与这些配体结合的抗体。优选的抗体会在生物测定(例如CAM测定或角膜微囊袋测定,参见上文)中表现出抗血管发生活性。

[0118] 本文使用的术语“抗体”意在包括全部抗体,例如任何同种型(IgG、IgA、IgM、IgE等),并包括与所选抗原反应的免疫球蛋白之片段或结构域。可使用常规技术将抗体片段化,并筛选可用的和/或与目标特定表位相互作用的片段。因此,该术语包括抗体分子的经蛋白水解切割或重组制备部分的片段,并且该片段能够选择性地与某些蛋白质反应。这些蛋白水解和/或重组的片段之非限制性实例包括Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fab'、Fv以及含有由肽接头连接之V[L]和/或V[H]结构域的单链抗体(scFv)。所述scFv可共价或非共价连接以形成具有两个或多个结合位点的抗体。术语“抗体”还包括多克隆、单克隆或者抗体和重组抗体的其它纯化制备物。术语“重组抗体”是指从使用分子生物学技术构建的核酸表达的抗体或免疫球蛋白之抗原结合结构域,例如从单链抗体开发而来的人源化抗体或完全人抗体。单结构域和单链抗体也涵盖在术语“重组抗体”的范围内。

[0119] 抗体可通过本领域已知的多种方法中任一种来产生,包括向动物施用抗原,向携带了人免疫球蛋白基因的动物施用抗原,或者用抗原针对抗体(常常为单链抗体或抗体结构域)文库进行筛选。一经检测到抗原结合活性,则可将蛋白质的相应部分移植进其它抗体框架中,包括全长IgG框架。例如,通过使用源自ALK1多肽或ALK1配体的免疫原,可利用标准方案(参见,例如Harlow和Lane编著的Antibodies: A Laboratory Manual(Cold Spring Harbor Press:1988))来制备抗蛋白/抗肽的抗血清或单克隆抗体。可使用免疫原形式的肽(例如,ALK1多肽,或能够引发抗体应答的抗原片段,或融合蛋白)来免疫哺乳动物,例如小鼠、仓鼠或兔。对蛋白质或肽赋予免疫原性的技术包括与载体缀合或其它本领域公知的技术。可在佐剂存在时施用ALK1多肽的免疫原性部分(优选细胞外部分)。可通过检测血浆或血清中的抗体效价来监测免疫过程。可利用免疫原作为抗原使用标准ELISA或其它免疫测定来评价抗体水平。

[0120] 在用ALK1多肽的抗原制备物免疫动物后,可获得抗ALK1抗血清,如果需要的话,可从该血清中分离出抗ALK1抗体。为了产生单克隆抗体,可从经免疫动物收集产抗体细胞(淋巴细胞),通过标准体细胞融合步骤与永生化细胞(例如骨髓瘤细胞)融合以得到杂交瘤细胞。这样的技术是本领域公知的,包括例如杂交瘤技术(最初由Kohler和Milstein,(1975) Nature, 256:495-497开发)、人B细胞杂交瘤技术(Kozbar等,(1983) Immunology Today, 4:72)以及产生人单克隆抗体的EBV-杂交瘤技术(Cole等,(1985) Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc. 77-96页)。可通过免疫化学方法来筛选杂交瘤,以

产生与本公开内容之哺乳动物ALK1多肽特异性反应的抗体以及从包含所述杂交瘤细胞之培养物分离出的单克隆抗体。

[0121] 本文使用的术语“抗体”意在包括同样与目标ALK1多肽之一特异性反应的其片段。可使用常规技术将抗体片段化,用来以与上述针对完整抗体同样的方式筛选可用的片段。例如,可通过用胃蛋白酶处理得到F(ab)<sub>2</sub>片段。可处理所得的F(ab)<sub>2</sub>片段以还原二硫桥,从而得到Fab片段。本公开内容的抗体还意在包括对ALK1多肽具有亲和力(其由抗体的至少一个CDR区域所赋予)的双特异性、单链、嵌合以及人源化的分子。在一些优选的实施方案中,所述抗体还包含与其连接并能够被检出的标签(例如,所述标签可以是放射性同位素、荧光化合物、酶或酶辅因子)。

[0122] 在一些优选的实施方案中,本公开内容的抗体是重组抗体,特别是人源化单克隆抗体或完全人重组抗体。

[0123] 如本领域一般所理解地,涉及抗体时使用的“与.....特异性反应”意在指抗体在目标抗原(例如,ALK1多肽或ALK1配体)与其它非目标抗原之间具有足够的选择性,因此该抗体至少可用于检测特定类型生物样品中目标抗原的存在。在一些使用抗体的方法中,较高程度的结合特异性可能是理想的。例如,如果抗体在目标抗原和其它交叉反应物之间具有较高程度的选择性,则其在一种或多种非常高丰度的非目标蛋白存在下检测低丰度目标蛋白时可表现得更好。单克隆抗体一般可更好地(与多克隆抗体相比)有效区分期望抗原和交叉反应性多肽。另外,有效用于在一类生物样品(例如,粪便样品)中选择性鉴定目标抗原的抗体可能在选择性鉴定另一类生物样品(例如,血液样品)中的相同抗原时无法同样有效。同样,有效用于鉴定纯化蛋白制备物(其不含其它生物杂质)中目标抗原的抗体可能在鉴定粗制生物样品中的目标抗原时无法同样有效。因此,在一些优选的实施方案中,本申请提供了已证实其对抗体使用时可能选择之样品类型中的目标抗原具有特异性的抗体。

[0124] 影响抗体-抗原相互作用特异性的一个特征是抗体对抗原的亲和力。尽管实现所需特异性要在一定的亲和力范围内,但是优选抗体一般具有(解离常数)约为 $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$ 、 $10^{-8}$ 、 $10^{-9}$ 或更低数值的亲和力。鉴于TGFβ对ALK1的明显低的结合亲和力,预期许多抗ALK1抗体会抑制TGFβ结合。然而,GDF5、6、7的配体群以约 $5 \times 10^{-8}$ M的K<sub>d</sub>结合,BMP9、10配体以约 $1 \times 10^{-10}$ M的K<sub>d</sub>结合。因此,可选择具有适当亲和力的抗体来干扰这些配体的信号传导活性。

[0125] 此外,用于筛选抗体以鉴别所需抗体的技术可影响所获得抗体的性质。例如,用于某些治疗目的的抗体优选地能够靶向特定细胞类型。因此,为了获得这类抗体,可能需要筛选与表达目标抗原之细胞结合的抗体(例如,通过荧光激活细胞分选来实现)。同样,如果抗体是用于结合溶液中的抗原,可能需要测试溶液结合。多种不同的测试抗体-抗原相互作用以鉴别特别理想之抗体的技术是可用的。这样的技术包括ELISA、表面等离子体共振结合测定(例如,Biacore结合测定,Bia-core AB,Uppsala,Sweden)、夹心法测定(例如,IGEN International,Inc.,Gaithersburg,Maryland的顺磁珠系统)、western印迹、免疫沉淀测定和免疫组化。

[0126] 5. 抗体和Fc融合蛋白中的改变

[0127] 本申请还提供了具有经改造或改变之Fc区域的抗体、ALK1-Fc融合蛋白和DAN-Fc融合蛋白。这样的抗体和Fc融合蛋白可用于例如调节效应子功能,例如抗原依赖性细胞毒性(ADCC)和补体依赖性细胞毒性(CDC)。此外,所述修饰可改善抗体和Fc融合蛋白的稳定

性。通过将合适的核苷酸改变引入DNA或通过肽合成来制备所述抗体和Fc融合蛋白的氨基酸序列变体。这样的变体包括例如在本文公开的抗体和Fc融合蛋白的氨基酸序列中缺失和/或插入和/或替换残基。可进行缺失、插入和替换的任意组合以形成最终构建体,条件是最终构建体具有所需的特征。氨基酸变化还可改变抗体和Fc融合蛋白的翻译后加工,例如改变糖基化位点的数目或位置。

[0128] 效应子功能降低的抗体和Fc融合蛋白可通过在氨基酸序列中引入改变来产生,所述改变包括但不限于Bluestone等所述的Ala-Ala突变(参见WO 94/28027和WO 98/47531;还参见Xu等2000Cell Immunol 200;16-26)。因此,在一些实施方案中,在恒定区内具有突变(包括Ala-Ala突变)的本公开内容之抗体和Fc融合蛋白可用于降低或消除效应子功能。根据这些实施方案,抗体和Fc融合蛋白可包含234位的丙氨酸突变或235位的丙氨酸突变,或者其组合。在一个实施方案中,所述抗体或Fc融合蛋白包含IgG4框架,其中Ala-Ala突变为在234位从苯丙氨酸突变为丙氨酸和/或235位从亮氨酸突变为丙氨酸。在另一实施方案中,所述抗体或Fc融合蛋白包含IgG1框架,其中Ala-Ala突变表示在234位从亮氨酸突变为丙氨酸和/或235位从亮氨酸突变为丙氨酸。所述抗体或Fc融合蛋白可作为替代地或另外地携带其它突变,包括CH2结构域中的点突变K322A(Hezareh等2001 J Virol.75:12161-8)。

[0129] 在一些具体实施方案中,可对所述抗体或Fc融合蛋白进行修饰使其增强或抑制补体依赖性细胞毒性(CDC)。可通过在Fc区域中引入一个或多个氨基酸替换、插入或缺失来实现CDC活性的调节(参见,例如美国专利No.6,194,551)。作为替代地或另外地,可在Fc区域中引入半胱氨酸残基,从而允许在该区域中形成链间二硫键。因此,所得到的同源二聚体抗体可具有提高的或降低的内化能力和/或增强的或减弱的补体介导之细胞杀伤。参见,Caron等,J.Exp Med.176:1191-1195(1992)和Shopes,B.J.Immunol.148:2918-2922(1992),W099/51642,Duncan&Winter Nature 322:738-40(1988);美国专利No.5,648,260;美国专利No.5,624,821以及W094/29351。

#### [0130] 6. 调节血管发生、周细胞包裹和某些疾病的方法和组合物

[0131] 本公开内容提供了抑制哺乳动物中血管发生和/或提高周细胞包裹的方法,其通过向对象施用有效量的此后统称为“治疗剂”的ALK1 ECD多肽(例如ALK1-Fc融合蛋白)、DAN蛋白(例如DAN-Fc融合蛋白)、本文公开的抗体(例如针对GDF5、GDF6、GDF7、BMP9、BMP10或ALK1 ECD的抗体)或任何前述核酸拮抗物(例如,反义核酸或siRNA)来实现。所展示数据具体表明,本文公开的抗血管发生治疗剂可用于抑制哺乳动物眼中的血管发生。预期这些治疗剂还可用于抑制骨和关节以及肿瘤中的血管发生,尤其是与骨和关节有关的肿瘤。

[0132] 血管发生相关疾病包括但不限于血管发生依赖性癌症,其包括例如实体瘤、血源性肿瘤(例如白血病)和肿瘤转移;良性肿瘤,例如血管瘤、听神经瘤(acoustic neuroma)、神经纤维瘤(neurofibroma)、沙眼(trachoma)和化脓性肉芽肿(pyogenic granuloma);类风湿性关节炎;银屑病;红变(rubeosis);奥斯勒-韦伯综合征(Osier-Webber Syndrome);心肌血管发生(myocardial angiogenesis);动脉粥样斑块新血管形成(plaque neovascularization);毛细血管扩张(telangiectasia);血友病性关节(hemophilic joint)和血管纤维瘤(angiofibroma)。

[0133] 特别地,本公开内容的多肽治疗剂可用于治疗或预防癌症(肿瘤),特别是已知依赖于血管发生过程来支持生长的那些癌症。与大多数抗血管发生剂不同的是,ALK1 ECD多

肽影响由多种因素引起的血管发生。这与癌症中的情况非常吻合,在癌症中常需要多种因素来支持肿瘤血管发生。因此,本文公开的治疗剂特别有效地用于治疗对于靶向单一血管发生因素之药物(例如,靶向VEGF的贝伐单抗)治疗具有抗性的肿瘤。如本文证明地,ALK1-Fc融合蛋白有效用于减轻黑素瘤、肺癌、胰腺癌(如,胰腺内分泌组织肿瘤)、多发性骨髓瘤和乳腺癌(例如,原发性乳腺癌或转移性乳腺癌;雌激素受体阳性(ER+)或雌激素受体阴性(ER-))的病理作用。

[0134] 多发性骨髓瘤被普遍认为是包括显著的血管发生要素的癌症。因此,预期ALK1-Fc融合蛋白和本文公开的其它治疗剂可用于治疗多发性骨髓瘤和与骨相关的其它肿瘤。如本文所证明地,本文公开的治疗剂可用于改善与多发性骨髓瘤相关的骨损伤,并且因此可用于减轻与其它肿瘤(例如乳腺癌或前列腺癌)之骨转移有关的骨损伤。如本文指出地,GDF5-7配体在骨中高度表达,不希望受任何具体机制的约束,干扰这些配体可破坏骨中肿瘤发展所需的过程。

[0135] 在所述方法的一些实施方案中,可一起(同时)或在不同时间(依次地)施用一种或多种多肽治疗剂。另外,多肽治疗剂可与另一类治疗癌症或抑制血管发生的化合物一起施用。

[0136] 在一些实施方案中,本公开内容的主题方法可单独使用。或者,可将所述主题方法与其它用于治疗或预防增殖性疾病(例如肿瘤)的常规抗癌治疗法组合使用。例如,这些方法可用于预防癌症、预防癌症复发和手术后转移,以及作为其它癌症治疗的辅助手段。本公开内容表明,可通过使用目标多肽治疗剂来增强常规癌症治疗(例如,化疗、放疗、光疗、免疫疗法和手术)的有效性。

[0137] 众多的常规化合物已显示出具有抗肿瘤活性。这些化合物已用作化疗中的药剂来缩小实体瘤、预防转移及进一步生长或者降低白血病或骨髓恶性肿瘤中恶性细胞的数目。尽管化疗已有效用于治疗多种类型的恶性肿瘤,但是许多抗肿瘤化合物会诱导有害副作用。已显示,当联合应用两种或更多种不同的治疗时,这些治疗可协同作用并使每种治疗的剂量降低,从而降低了每种化合物在较高剂量下的有害副作用。在另一些情况下,对某种治疗具有“难治性”的恶性肿瘤可对包括两种或多种不同治疗的组合治疗产生反应。

[0138] 当将本文公开的多肽治疗剂与另一常规抗肿瘤药剂(同时或依次)联合施用时,这些治疗剂可提高该抗肿瘤药剂的治疗效果或者克服对该抗肿瘤药剂的细胞抗性。这允许减少抗肿瘤药剂的剂量,从而降低有害副作用,或者恢复抗肿瘤药剂在抗性细胞中的有效性。

[0139] 根据本公开内容,本文所述的抗血管发生药剂可与其它治疗疾病的组合物和方法联合使用。例如,可使用与ALK1或ALK1配体拮抗剂相联合的手术、放疗或化疗来常规地治疗肿瘤,随后向患者施用该拮抗剂以延长微转移(micrometastasis)的休眠以及稳定任何残余的原发肿瘤。

[0140] 还可以将血管发生抑制剂预防性地给予已知具有发生新发癌症或复发癌症高风险的个体。因此,本公开内容的一个方面包括在对象中预防癌症发生的方法,所述方法包括向该对象施用有效量的ALK1或ALK1配体拮抗剂和/或其衍生物或者本公开内容的另一种血管发生抑制剂。

[0141] 如本文所证明地,ALK1-Fc有效用于减轻类风湿性关节炎小鼠模型的表型。因此,本文公开的治疗剂可用于治疗类风湿性关节炎和其它类型的骨或关节炎。

[0142] 某些正常的生理过程也与血管发生有关,例如排卵、月经和胎盘形成。本公开内容的血管发生抑制蛋白可用于治疗过度或异常刺激内皮细胞的疾病。这些疾病包括但不限于肠粘连、动脉粥样硬化、硬皮病和肥厚性瘢痕(即瘢痕疙瘩)。它们还可用于治疗以血管发生为病理性后果的疾病,例如猫抓病(cat scratch disease)(*Rochele minalia quintosa*)和溃疡(幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*))。

[0143] 一般的血管发生抑制蛋白可用作生育控制剂,其通过降低或阻止胚胎着床所需的子宫血管发生来实现。因此当将足以阻止胚胎着床之量的所述抑制蛋白施用于雌性个体时,本公开内容提供了有效的生育控制方法。在所述生育控制方法的一个方面,在性交和受精发生前或发生后施用足以阻止胚胎着床之量的所述抑制蛋白,从而提供了生育控制的有效方法,有可能为“房事后施用(morning after)”的方法。不希望受本说明书的约束,认为抑制子宫内膜的血管生成会干扰胚泡的着床。类似的对输卵管粘膜血管生成的抑制会干扰胚泡的着床,防止输卵管妊娠的发生。施用方法可包括但不限于药片、注射(静脉内、皮下、肌内)、栓剂、阴道海绵(vaginal sponge)、阴道棉条(vaginal tampon)和子宫内装置。还认为,施用本公开内容的血管发生抑制剂会干扰胎盘的正常血管生成增加,还会干扰成功着床的胚泡以及发育中胚胎和胎儿内的血管发育。

[0144] 在眼中,血管发生与例如糖尿病性视网膜病、早产儿视网膜病(retinopathy of prematurity)、黄斑变性、角膜移植排斥、新生血管性青光眼和晶状体后纤维增生症(retrolental fibroplasia)相关。本文公开的治疗剂可在眼内施用或通过其它施用至眼的局部施用来实现。另外,如实施例中所示,ALK1-Fc可全身施用,仍可对眼部血管发生具有期望效果。

[0145] 与眼中血管发生有关的其它疾病包括但不限于流行性角膜结膜炎(epidemic keratoconjunctivitis)、维生素A缺乏症(Vitamin A deficiency)、隐形眼镜过戴(contact lens overwear)、特应性角膜炎(atopic keratitis)、上边缘角膜炎(superior limbic keratitis)、干燥性翼状胬肉角膜炎(ptyerygium keratitis sicca)、舍格伦病(sjogren)、玫瑰痤疮(acne rosacea)、小水疱病、梅毒(syphilis)、分支杆菌感染(Mycobacteria infection)、脂质变性(lipid degeneration)、化学烧伤、细菌性溃疡(bacterial ulcer)、真菌性溃疡(fungal ulcer)、单纯疱疹感染(Herpes simplex infection)、带状疱疹感染(Herpes zoster infection)、原生动物感染(protozoan infection)、卡波西肉瘤(Kaposi sarcoma)、莫伦溃疡(Mooren ulcer)、Terrie角膜边缘性变性(Terrien's marginal degeneration)、边缘性角质分离(marginal keratolysis)、类风湿性关节炎、系统性狼疮(systemic lupus)、多动脉炎(polyarteritis)、创伤(trauma)、韦格纳结节病(Wegeners sarcoidosis)、巩膜炎(Scleritis)、史-约病(Steven's Johnson disease)、类天疱疮放射状角膜切开术(periphigoid radial keratotomy)和角膜移植排斥(corneal graft rejection)、镰状细胞贫血(sickle cell anemia)、结节病(sarcoid)、弹性假黄瘤(pseudoxanthoma elasticum)、佩吉特病(Pagets disease)、静脉阻塞(vein occlusion)、动脉阻塞(artery occlusion)、颈动脉阻塞性疾病(carotid obstructive disease)、慢性葡萄膜炎/玻璃体炎(chronic uveitis/vitritis)、分支杆菌感染(mycobacterial infections)、莱姆病(Lyme's disease)、系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus)、早产儿视网膜病(retinopathy of prematurity)、伊尔斯病(Eales

disease)、白塞病(Bechets disease)、导致视网膜炎(retinitis)或脉络膜炎(choroiditis)的感染、假定的眼组织胞浆菌病(presumed ocular histoplasmosis)、贝斯特病(Bests disease)、近视(myopia)、视凹(optic pit)、斯达加特病(Stargarts disease)、睫状体平坦部炎(pars planitis)、慢性视网膜脱落(chronic retinal detachment)、高粘滞综合征(hyperviscosity syndromes)、弓形体病(toxoplasmosis)、创伤(trauma)和激光手术后并发症(post-laser complication)。其它疾病包括但不限于与红变(角新生血管(neovasculariation of the angle))有关的疾病以及由纤维血管(fibrovascular)或纤维组织(fibrous tissue)异常增生引起的疾病,包括所有形式的增生性玻璃体视网膜病(vitreoretinopathy)。

[0146] 可通过以下方式来治疗或预防眼部病症,例如通过治疗剂的全身、局部、眼内注射或通过植入释放治疗剂的持续释放装置来实现。可利用可药用眼科装置来递送治疗剂,从而使该化合物与眼表面维持接触足够的时间以使该化合物穿透眼的角膜和内部区域(例如前房(anterior chamber)、后房(posterior chamber)、玻璃体(vitreous body)、房水(aqueous humor)、玻璃体液(vitreous humor)、角膜(cornea)、虹膜/睫状体(iris/ciliary)、晶状体、脉络膜/视网膜(choroid/retina)和巩膜(sclera)。所述可药用的眼科载体可以是例如软膏、植物油或包裹材料。或者,本公开内容的治疗剂可直接注射进玻璃体液或房水中。在另一替代性方案中,可全身施用所述化合物进行眼部治疗,例如通过静脉内输注或注射来实现。

[0147] 可施用一种或多种治疗剂。本公开内容的方法还包括与用于治疗眼部病症的其它药物共施用。当施用多于一种药剂或者药剂和药物组合时,可同时施用或依时间前后施用。可通过不同施用途径或通过同样的施用途径来施用所述治疗剂和/或药物。在一个实施方案中,治疗剂和药物以眼科药物制剂的形式一起施用。

[0148] 在一个实施方案中,使用治疗剂来治疗与眼中血管发生有关的疾病,其通过与利用药物机制阻断血管发生的其它药物同时施用来实现。可与本公开内容的治疗剂同时施用的药物包括但不限于:倍加他尼(Macugen<sup>TM</sup>)、雷珠单抗(Lucentis<sup>TM</sup>)、乳酸角鲨胺(squalamine lactate)(Evizon<sup>TM</sup>)、肝素酶(heparinase)和糖皮质激素(例如曲安西龙(Triamcinolone))。在一个实施方案中,提供了治疗血管发生相关疾病的方法,其通过施用含有至少一种本文公开之治疗剂和至少一种以下药物的眼科药物制剂来治疗:倍加他尼(Macugen<sup>TM</sup>)、雷珠单抗(Lucentis<sup>TM</sup>)、乳酸角鲨胺(Evizon<sup>TM</sup>)、肝素酶和糖皮质激素(例如曲安西龙)。

#### [0149] 7. 制剂和有效剂量

[0150] 可将本文所述的治疗剂配制成药物组合物。按照本公开内容使用的药物组合物可使用一种或多种生理可接受的载体或赋形剂以常规方式进行配制。这样的制剂通常基本不含热原,以符合大多数法规要求。

[0151] 在一些实施方案中,本公开内容的治疗方法包括全身性或者作为植入物或装置局部地施用所述组合物。当施用时,本公开内容中使用的治疗组合物是无热原、生理可接受的形式。组合物中除ALK1信号传导拮抗剂以外的可任选含有的上述治疗用药剂可与本文公开之方法中的目的化合物(例如,本文公开的ALK1 ECD多肽或任何抗体)同时施用或依次施用。

[0152] 通常,本文公开的蛋白质治疗剂经胃肠外施用,特别是静脉内或皮下施用。适于胃肠外施用的药物组合物可包含一种或多种ALK1 ECD多肽或其它抗体并联合一种或多种药物可接受的无菌等渗水溶液或非水溶液、分散体系、混悬液或乳剂、或可在使用前被重构成无菌注射用溶液或分散体系的无菌粉末,其可包含抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂、使制剂与目标接受者之血液等渗的溶质或者助悬剂或增稠剂。本公开内容的药物组合物中可用的合适的水性载体和非水性载体的实例包括水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇、聚乙二醇等)及其适当的混合物、植物油(例如橄榄油)以及可注射有机酯(例如油酸乙酯)。可保持适当的流动性,例如通过使用涂层物质(例如卵磷脂)、(在胶体溶液的情形中)通过保持所需颗粒大小以及通过使用表面活性剂来实现。

[0153] 在一个实施方案中,本文公开的抗体和ALK1 ECD蛋白采用眼科药物制剂的形式来施用。在一些实施方案中,所述眼科药物制剂是无菌水溶液(优选合适的注射用浓度)或者油膏(salve)或软膏(ointment)。这样的油膏或软膏通常包含溶于或悬于无菌可药用油膏或软膏基质(例如矿物油-白凡士林基质)中的一种或多种本文公开的抗体或ALK1 ECD蛋白。在油膏或软膏组合物中,所述制剂中还可包含无水羊毛脂。硫柳汞或氯代丁醇也优选作为抗微生物剂被添加至所述软膏组合物中。在一个实施方案中,所述无菌水溶液描述于美国专利No.6,071,958中。

[0154] 本公开内容提供了包含酸和碱以调节pH的可变化的制剂;将pH保持在一窄范围内的缓冲剂。可将另外的药物添加至所述制剂中。这些药物包括但不限于倍加他尼、肝素酶、雷珠单抗或糖皮质激素。通过无菌操作来制备本公开内容的眼科药物制剂,或者在制备的适当阶段进行灭菌处理。

[0155] 如果需要,所述组合物和制剂可采用包(盒、袋)或分配装置的形式提供,其可包含含有活性成分的一个或多个单位剂型。所述包(盒、袋)可例如包含金属箔或塑料箔,例如吸塑包装(blister pack)。所述包(盒、袋)或分配装置可带有施用说明。

## 实施例

[0156] 实施例1:ALK1-Fc融合蛋白的表达

[0157] 申请人构建了包含融合有人Fc的人ALK1细胞外结构域或融合有小鼠Fc结构域的小鼠ALK1的可溶性ALK1融合蛋白,其中所述ALK1和Fc结构域之间具有最小接头。所述构建体分别表示为hALK1-Fc和mALK1-Fc。

[0158] 图3显示从CHO细胞系纯化的hALK1-Fc(SEQ ID NO:3)。值得注意的是,尽管惯常的人ALK1蛋白细胞外结构域C端是SEQ ID NO:1的118位氨基酸,但我们已证实避免以谷氨酰胺残基结尾的结构域是理想的。因此,源自人ALK1的SEQ ID NO:3的部分在Q118之C端并入两个残基——亮氨酸和丙氨酸。因此,本公开内容提供了ALK1 ECD多肽(包含Fc融合蛋白),其ALK1来源序列的C端包含Q118上游(SEQ ID NO:1的113-117位)或下游(119-123位)的1~5个氨基酸。

[0159] 所述hALK1-Fc和mALK1-Fc蛋白表达在CHO细胞系中。考虑三种不同的前导序列::

[0160] (i)蜜蜂蜂毒素(HBML):MKFLVNVALVFMVVYISYIYA(SEQ ID NO:7);

[0161] (ii)组织型纤维蛋白溶酶原激活蛋白(tissue plasminogen activator,TPA):MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSP(SEQ ID NO:8);

[0162] (iii)天然的:MTLGSPRKGLLMLLMALVTQG(SEQ ID NO:9)。

[0163] 所选形式使用了TPA前导序列并具有图4中所示的未加工氨基酸序列(SEQ ID NO:5)。

[0164] 该多肽由图4中所示核酸序列(SEQ ID NO:4)编码。

[0165] 可通过一系列柱层析步骤实现纯化,包括例如采用任何顺序的以下中三种或更多种:蛋白A层析、Q sepharose层析、phenylsepharose层析、大小排阻层析和阳离子交换层析。可使用病毒过滤和缓冲剂交换来完成纯化。将hALK1-Fc蛋白纯化至纯度>98%(通过大小排阻层析来确定)以及>95%(通过SDS PAGE来确定)。

[0166] 在蛋白质产生和纯化过程中,我们观察到,尽管在变性、还原性条件下(例如,还原性SDS-PAGE)hALK1-Fc显示为纯的,但其倾向于以二聚体与更高级聚集体的混合物表达,这会对向患者施用带来问题。所述聚集体可以是免疫原性的或生物利用度低的,并且由于其不均一性,这些聚集体难以赋予药物制剂以药物开发期望水平的特征。因此,已测试多种方法来降低最终制剂中聚集体的量。

[0167] 在一个方法中,测试了多种不同的细胞培养基。IS CHO-CD(货号91119,Irvine Scientific,Santa Ana,CA)显示显著降低了聚集体产物的产生,同时保持了hALK1-Fc的高水平产生。此外,在pH 8.0将材料从疏水相互作用柱(如苯基琼脂糖)进行洗脱使得聚集体进一步分离。所得的材料包含超过99%的二聚体。与R&D Systems(货号370-AL,Minneapolis,MN)所售ALK1-Fc融合蛋白的比较显示,在NSO细胞中产生的该蛋白质的84%为二聚体,其余的蛋白质经大小排阻层析显示为高分子量种类。图11显示制剂的大小排阻柱谱图的比较。由于已确定聚集体的形成是ALK1-Fc生产的重要问题,预期可以开发出其它方法,包括涉及额外纯化步骤的方法(尽管此种步骤可导致纯化蛋白的低产量)。

[0168] 实施例2:ALK1-Fc配体的鉴定

[0169] ALK1是TGF $\beta$ 家族成员的I型受体。使用Biacore™系统测试了TGF $\beta$ 家族多种成员与人ALK1-Fc融合蛋白的结合。TGF $\beta$ 本身、GDF8、GDF11、BMP2和BMP4均不显示与hALK1-Fc蛋白的显著结合。BMP2和BMP4显示有限的结合。GDF5、GDF7和BMP9分别显示K<sub>d</sub>值约为 $5 \times 10^{-8}$ M、 $5 \times 10^{-8}$ M和 $1 \times 10^{-10}$ M的结合。基于GDF5和GDF7与GDF6的相似性,预计GDF6会以类似的亲和力结合。BMP10与BMP9密切相关,因此也预期BMP10以类似的亲和力结合。

[0170] 实施例3:表征ALK1-Fc和抗ALK1抗体对内皮细胞的作用

[0171] 使用受四个连续的相同SBE位点调控的萤光素酶报告基因构建体(SBE4-1uc),其响应于Smad1/5/8介导的信号传导,我们在HMVEC细胞中测量了在hALK1-Fc药物或中和性ALK1特异性单克隆抗体存在和不存在时BMP-9介导的活性。HMVEC细胞被诱导Smad1/5/8介导之转录活化的rhBMP-9(50ng/ml)所刺激,在这里由SBE4-1uc调节之转录上调的增加显示。当添加后,hALK1-Fc化合物(10 $\mu$ g/ml)或抗体(10 $\mu$ g/ml)降低了该转录应答,每种均降低了几近60%,这表明ALK1-Fc的存在显著降低了BMP9信号传导,并且BMP9信号传导与ALK1活性有关。

[0172] 常使用SMAD磷酸化的活化来测定上游激活蛋白受体的活化。已知ALK1在被其配体活化后调节SMAD蛋白1、5和8的磷酸化。在这里,我们添加rhBMP-9(50ng/ml),在30分钟时程期间起始HUVEC细胞中的SMAD磷酸化,所述HUVEC细胞是固有表达ALK1受体的人内皮细胞系。在用所述配体处理细胞5分钟后观察到SMAD1/5/8的磷酸化,并且在整个30分钟期间保

持磷酸化。在相对低浓度的hALK1-Fc(250ng/ml)存在时,SMAD1/5/8磷酸化减少,证明该药剂抑制内皮细胞中的Smad1/5/8活化。

[0173] 为了评价ALK1-Fc在体外系统中对血管发生的作用,我们测定了该化合物对减少Matrigel基底上内皮细胞管形成的有效性。该技术常用于评估新血管生成,其可得到快速且高重复性的结果。使用内皮细胞生长添加剂(ECGS)来诱导从Matrigel上由内皮细胞形成微血管,然后在18小时时程期间,在所述药物和ECGS存在下,测量抗血管发生化合物减少管形成的效果。正如预期的一样,与阴性对照(未施加处理)相比,添加ECGS(200ng/ml)诱导显著的管形成,这表明在Matrigel基底上产生了基础水平的内皮细胞管形成(图5)。添加了hALK1-Fc(100ng/ml)或mALK1-Fc(100ng/ml)之后,可观察到管形成的减少。最后对所有样品中的管长度定量测定表明,各种浓度的hALK1-Fc或mALK1-Fc均将新生血管发生减少至基础水平。另外,在强的促血管发生因子ECGS存在时,hALK1-Fc和mALK1-Fc对新血管生成保持强的抑制,这表明其比阴性对照内皮抑素(100ng/ml)具有更强的抗血管发生活性。

[0174] 实施例4:CAM检测

[0175] VEGF和FGF刺激血管发生是众所周知的。使用CAM(鸡绒毛尿囊膜)测定系统来评估GDF7的血管发生作用。如图6所示,GDF7刺激血管发生的效力与VEGF类似。使用GDF5和GDF6也观察到类似的结果。

[0176] 在CAM测定中测试ALK1-Fc融合蛋白的抗血管发生活性。这些融合蛋白对由VEGF、FGF和GDF7刺激的血管发生显示出强的抗血管发生作用。参见图7。在该测定中,BMP9和PDGF显示出相对较弱的血管发生诱导能力,尽管如此,这些因子的血管发生作用仍被ALK1抑制。

[0177] 在CAM测定中将ALK1-Fc蛋白与市售抗血管发生的抗VEGF单克隆抗体进行比较。与抗VEGF相比,ALK1-Fc蛋白具有相似的效力。抗VEGF抗体贝伐单抗目前用于在人中治疗癌症和黄斑变性。参见图8。

[0178] 令人感兴趣的是,在该测定系统中抗ALK1抗体(R&D Systems)不能显著抑制血管发生。我们预计这可能反映出不同物种中ALK1序列的差异。

[0179] 实施例5:小鼠角膜微囊袋测定

[0180] 小鼠角膜微囊袋测定用于评估ALK1-Fc对小鼠眼中血管发生的作用。经腹膜内施用的hALK1-Fc显著抑制眼部血管发生。如图9所示,hALK1-Fc与抗VEGF抑制眼部血管发生的程度相同。hALK1-Fc和抗VEGF以同样的重量/重量剂量使用。当将灌满VEGF的Matrigel栓植入非眼部位置时,得到了类似的数据。

[0181] 这些数据表明ALK1的高亲和力配体促进血管发生,ALK1-Fc融合蛋白具有强的抗血管发生活性。ALK1的配体归为两类,其中GDF5、6、7组具有针对ALK1的中等亲和力,BMP9、10组具有针对ALK1的高亲和力。

[0182] GDF5、6和7主要定位于骨和关节,而BMP9在血液中循环。因此,似乎存在骨和关节的促血管发生系统(其包含ALK1、GDF5、6和7)以及全身的血管发生系统(其包含ALK1和BMP9,以及可能的BMP10)。

[0183] 实施例6:小鼠类风湿性关节炎模型

[0184] 胶原诱导的关节炎小鼠模型是广泛接受的类风湿性关节炎模型。在该研究中,用载体、抗VEGF(贝伐单抗——作为阴性对照,因为贝伐单抗不抑制小鼠VEGF)或1mg/kg、10mg/kg或25mg/kg剂量的mALK1-Fc(“RAP-041”)处理每组10只的小鼠组。在第21天用胶原

加强后,所有组中的关节炎评分(参见图10)和爪肿胀均持续提高,在约第38天时到达峰值。用mALK1-Fc(“RAP-041”)处理的小鼠显示出上述两项特征评分的降低,尤其是在最高剂量(25mg/kg)时,尽管该降低不具有统计学显著性。但是,剂量相关性趋势是明显的。

[0185] 通过研究第42天结束时的情形,关节炎的发生已达到:在用载体对照处理的小鼠中为10/10,在用贝伐单抗处理的小鼠中为9/10,在1mg/kg mALK1-Fc处理组中为8/10,在10mg/kg mALK1-Fc处理组中为9/10。在25mg/kg mALK1-Fc处理组中疾病发生降低至6/10。

[0186] 实施例7:DAN的配体结合特性

[0187] DAN是分泌型胱氨酸结蛋白家族的成员,其抑制BMP活性。已知DAN结合并拮抗GDF5。我们已测定DAN还紧密结合GDF7,但不结合BMP9。因此,我们得出结论:DAN抑制定位于骨和关节的ALK1配体组,并预计DAN是骨和关节相关血管发生的强拮抗剂。因此,DAN可用于治疗骨癌,例如多发性骨髓瘤和骨转移,以及类风湿性关节炎和骨关节炎。

[0188] 综上,这些实施例公开的发现提供了本文所述的多种试剂用于体内抑制血管发生,特别是眼部血管发生。这些发现还表明,靶向GDF5、6和7的药剂可用于选择性地抑制骨和关节血管发生。这些发现还表明这些药剂可用于治疗癌症和类风湿性关节炎。

[0189] 实施例8:ALK1-Fc在CAM测定中减少肿瘤血管发生

[0190] 任何组织的肿瘤都有基本的营养和氧气需求。尽管小肿瘤可从邻近血管的扩散中获得足够的量,但随着肿瘤大小的增加,其必须通过募集和维系已存在的毛细血管来确保营养供应。为了测试ALK1-Fc蛋白通过抑制血管而限制肿瘤生长的能力,我们在黑素瘤外植体CAM测定中测试了不同浓度的mALK1-Fc。与上述CAM测定一样,在每个蛋表面开小孔,并通过该小孔植入 $5 \times 10^5$ 个B16黑素瘤细胞。然后,每天用0.02mg/ml mALK1-Fc、0.2mg/ml mALK1-Fc处理蛋,持续一周,或者不进行处理。在实验结束时,小心取出肿瘤,称重并获取数码图像。与未处理的CAM肿瘤相比,源自用mALK1-Fc处理的CAM肿瘤的大小显示显著的体积减小。对肿瘤重量定量表明,与未处理的CAM相比,每天用0.02mg/ml或0.2mg/ml mALK1-Fc处理的肿瘤的重量分别有65%和85%的降低。结论是,加入ALK1-Fc使新血管发生和肿瘤生长以剂量响应的方式被显著抑制,这表明ALK1-Fc是强的抗血管发生药剂。

[0191] 实施例9:肺癌实验模型

[0192] 为了进一步证实ALK1-Fc对肿瘤进展的作用,测试了小鼠肺癌模型。将荧光标记的鼠Lewis肺癌细胞(LL/2-luc)经由尾静脉施加到白化Black6小鼠中。在同一天,开始用经腹膜内施加的PBS对照(n=7)或10mg/kg mALK1-Fc(n=7)处理小鼠。活体荧光成像显示了对照小鼠中肺部肿瘤的显著进展,以致于在植入后22天小鼠已濒临死亡,并只能进行处死。与之相反,经ALK1-Fc处理的小鼠显示了显著的肺肿瘤生长延迟,在第22天时仍具有100%的存活率。见图12。

[0193] 这些数据表明,ALK1-Fc对肺癌小鼠模型中的肿瘤生长有明显的作用,并有益于存活。

[0194] 实施例10:ALK1-Fc蛋白对胰腺肿瘤模型的作用

[0195] SV40大T抗原是癌基因,其可在小鼠的多种不同组织中表达从而刺激小鼠中自发、同位肿瘤的形成。与常用的异种移植模型相比,这些肿瘤可具有与天然肿瘤更大的相似性。在RIP1-Tag2小鼠中,对小鼠进行遗传改造从而在胰岛素启动子的控制下表达T抗原,这样小鼠会特异性地在胰腺内分泌组织中生成肿瘤。我们测试了ALK1-Fc对RIP1-Tag2肿瘤的作

用。

[0196] 我们观察到RIP1-Tag2小鼠的胰腺组织经历一系列阶段,开始为正常组织,然后表现出增生,经历血管发生形成显著的新血管系统,并最终产生成形的肿瘤。在这些不同阶段监测了组织中ALK1和BMP9的表达。结果显示在图13中。在肿瘤生成的血管发生阶段ALK1的表达到达峰值,而BMP9的表达则在肿瘤生成的整个过程中升高。

[0197] 从10周龄(肿瘤生成早期)或12周龄(肿瘤生成成熟期)开始,用mALK1-Fc或对照Fc(每只小鼠300微克,或约12mg/kg,一周两次,持续2周)处理RIP1-Tag2小鼠。在每种情形中,mALK1-Fc的处理都基本停止了肿瘤的生长。见图14。值得注意的是,在10周龄进行处理的小鼠的肿瘤体积在10周到12周期间未增加,而用对照Fc蛋白处理的小鼠在相同的期间内肿瘤体积增加为3倍。类似地,在12周龄进行处理的小鼠的肿瘤体积在12周到14周期间未增加,但对对照组则显示肿瘤体积又增加了30%。

[0198] 如对CD31(内皮细胞标志物)进行染色所测量地,对经处理和对照肿瘤的荧光染色显示mALK1-Fc处理导致血管化降低。图15。明显地,如通过NG2阳性细胞(周细胞)与CD31阳性细胞的比值而测量地,mALK1-Fc处理使得肿瘤血管的周细胞包裹升高。见图16。周细胞是形成血管之一部分并在调节血管稳定性和渗透性中起作用的细胞。在用CaLu6非小细胞肺癌细胞系的异种移植肿瘤模型中,观察到周细胞包裹响应于ALK1-Fc处理的类似升高。

[0199] 总之,这些数据显示ALK1-Fc是RIP1-Tag2小鼠中形成的自发、同位胰腺肿瘤中肿瘤生长的强效抑制剂,且肿瘤抑制与肿瘤血管化的显著降低和肿瘤血管周细胞包裹的显著升高相关。后者对肿瘤生物学的意义仍待确定。然而,应注意,糖尿病性视网膜病的病理很大程度上归因于周细胞的缺失以及从糖尿病性视网膜血管的流体泄漏。因此,这些数据表明ALK1-Fc可用作抗肿瘤/抗血管发生药剂,进一步地,该药剂可用于促进血管化组织中周细胞的形成。

[0200] 实施例11:ALK1-Fc融合蛋白对乳腺癌肿瘤模型的作用

[0201] mALK1-Fc有效地延迟了源自雌激素受体阳性(ER+)和雌激素受体阴性(ER-)两种肿瘤细胞的乳腺癌肿瘤细胞系的生长。

[0202] 用萤光素酶基因稳定转染MDA-MB-231乳腺癌细胞系(源自ER-细胞)以允许体内检测肿瘤生长和潜在转移。在本研究中,将 $1 \times 10^6$ 个MDA-MB-231-Luc细胞同位植入无胸腺裸鼠(Harlan)的乳房脂肪垫中。用IVIS光谱成像系统(Caliper Life Sciences)通过生物发光检测来跟踪肿瘤进展。发光(所检测的光子数)的提高对应于肿瘤负荷的增加。

[0203] 将 $1 \times 10^6$ 个肿瘤细胞注射入30只雌性裸鼠的乳房脂肪垫中。肿瘤植入3天后通过皮下(SC)注射用对照载体或mALK1-Fc(30mg/kg)每周2次处理小鼠。继续进行处理,并利用生物发光成像监测肿瘤进展,持续10周。利用生物发光检测,与载体处理的对照相比,用30mg/kg mALK1-Fc进行处理减缓了肿瘤进展(图17)。在该模型中,用mALK1-Fc处理延迟了肿瘤生长,但并没有逆转肿瘤生长。这是抗血管发生化合物的可预期作用,即肿瘤可以在需要新血管形成以支持其继续生长之前存活至一定体积。在一个类似的实验中,在低至3mg/kg的剂量水平下,hALK1-Fc产生了类似(稍小)的作用。

[0204] 还在同位植入模型中测试了雌激素受体阳性(ER+)的表达萤光素酶的细胞系MCF-7。在该模型中,在雌性裸鼠皮下植入 $17\beta$ -雌二醇的60天缓释颗粒。在植入颗粒两天后,将 $5 \times 10^6$ 个MCF-7肿瘤细胞植入乳房脂肪垫中。经腹膜内途径用载体对照或3、10和30mg/kg的

hALK1-Fc处理小鼠,一周2次。用IVIS光谱成像仪(Caliper Life Sciences)通过生物发光成像每周跟踪肿瘤进展。在载体处理的小鼠中,肿瘤快速进展直至研究第26天(图18)。26天后肿瘤发光有起伏,一直持续到第60天本研究终止时(当雌二醇颗粒耗尽时)。这些起伏是该模型的常见特点,即肿瘤快速生长可超过宿主动物的血管发生应答,导致肿瘤坏死并伴随着发光信号的下降。存留的细胞继续生长并导致信号增强。与载体处理的对照相比,用10或30mg/kg hALK1-Fc处理的小鼠可在本研究期间使肿瘤大小维持在恒定的水平,这表明该分子对肿瘤生长的强效作用。

[0205] 通过引用并入

[0206] 本文提及的所有出版物和专利均通过引用整体并入本文,如同指明每篇出版物或专利具体地以及单独地通过引用并入本文一样。在存在矛盾时,以本申请(包括本文中的任意定义)为准。

[0207] 等同方案

[0208] 尽管本发明的具体实施方式在本文中明确地公开,以上说明书是示例性的而非限制性的。通过阅读本说明书和权利要求书,本发明的许多变化形式对本领域技术人员来说是显而易见的。本发明的完整范围应参考权利要求书及其等同方案的完整范围以及说明书连同所述变化形式来确定。

序 列 表

<110> 阿塞勒隆制药公司  
 路德维格癌症研究有限公司  
 阿斯亚·格林贝格  
 约翰·克诺夫  
 拉温德拉·库马尔  
 罗伯特·斯科特·皮尔索尔  
 亚斯比尔·西拉  
 克里斯蒂安·彼得拉斯

<120> 调节血管发生和周细胞组成的方法和组合物

<130> A0904.70003US01

<140> not yet assigned

<141> 2009-05-01

<150> US 61/050,168

<151> 2008-05-02

<150> US 61/144,131

<151> 2009-01-12

<160> 11

<170> PatentIn version 3.5

[0001]

<210> 1  
 <211> 503  
 <212> PRT  
 <213> 人

<400> 1

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

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

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

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

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

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

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

Pro Gly Thr Asp Gly Gln Leu Ala Leu Ile Leu Gly Pro Val Leu Ala  
 115 120 125  
 Leu Leu Ala Leu Val Ala Leu Gly Val Leu Gly Leu Trp His Val Arg  
 130 135 140  
 Arg Arg Gln Glu Lys Gln Arg Gly Leu His Ser Glu Leu Gly Glu Ser  
 145 150 155 160  
 Ser Leu Ile Leu Lys Ala Ser Glu Gln Gly Asp Ser Met Leu Gly Asp  
 165 170 175  
 Leu Leu Asp Ser Asp Cys Thr Thr Gly Ser Gly Ser Gly Leu Pro Phe  
 180 185 190  
 Leu Val Gln Arg Thr Val Ala Arg Gln Val Ala Leu Val Glu Cys Val  
 195 200 205  
 Gly Lys Gly Arg Tyr Gly Glu Val Trp Arg Gly Leu Trp His Gly Glu  
 210 215 220  
 Ser Val Ala Val Lys Ile Phe Ser Ser Arg Asp Glu Gln Ser Trp Phe  
 225 230 235 240  
 [0002] Arg Glu Thr Glu Ile Tyr Asn Thr Val Leu Leu Arg His Asp Asn Ile  
 245 250 255  
 Leu Gly Phe Ile Ala Ser Asp Met Thr Ser Arg Asn Ser Ser Thr Gln  
 260 265 270  
 Leu Trp Leu Ile Thr His Tyr His Glu His Gly Ser Leu Tyr Asp Phe  
 275 280 285  
 Leu Gln Arg Gln Thr Leu Glu Pro His Leu Ala Leu Arg Leu Ala Val  
 290 295 300  
 Ser Ala Ala Cys Gly Leu Ala His Leu His Val Glu Ile Phe Gly Thr  
 305 310 315 320  
 Gln Gly Lys Pro Ala Ile Ala His Arg Asp Phe Lys Ser Arg Asn Val  
 325 330 335  
 Leu Val Lys Ser Asn Leu Gln Cys Cys Ile Ala Asp Leu Gly Leu Ala  
 340 345 350  
 Val Met His Ser Gln Gly Ser Asp Tyr Leu Asp Ile Gly Asn Asn Pro  
 355 360 365

[0003]

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

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

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

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

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

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

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

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

Glu Lys Pro Lys Val Ile Gln  
 500

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

<400> 2  
 atgaccttgg gctccccag gaaaggcctt ctgatgctgc tgatggcctt ggtgaccag 60  
 ggagaccctg tgaagccgtc tcggggcccg ctggtgacct gcacgtgtga gagccacat 120  
 tgcaaggggc ctacctgccg gggggcctgg tgcacagtag tgctggtgcg ggaggagggg 180  
 aggaccccc aggaacatcg gggctgcggg aacttgcaaca gggagctctg cagggggcgc 240  
 cccaccgagt tcgtcaacca ctactgctgc gacagccacc tctgcaacca caactgtcc 300  
 ctggtgctgg aggccacca acctcctcg gacagcccg gaacagatgg ccagctggcc 360  
 ctgatcctgg gccccgtgct ggccttgctg gccctgggtg ccctgggtgt cctgggcctg 420  
 tggcatgtcc gacggaggca ggagaagcag cgtggcctgc acagcgagct gggagagtcc 480  
 agtctcatcc tgaagcatc tgagcagggc gacagcatgt tgggggacct cctggacagt 540  
 gactgcacca cagggagtgg ctcagggctc cccttcctgg tgcagaggac agtggcacgg 600  
 caggttgctt tggtggagtg tgtgggaaaa ggccgctatg gcgaagtgtg gcggggcctg 660

[0004]

tggcacggtg agagtgtggc cgtcaagatc ttctcctcga gggatgaaca gtcctggttc 720  
 cgggagactg agatctataa cacagtgttg ctcagacacg acaacatcct aggcttcac 780  
 gcctcagaca tgacctcccg caactcgagc acgcagctgt ggctcatcac gcaactaccac 840  
 gagcacggct cctctacga ctttctgcag agacagacgc tggagcccca tctggctctg 900  
 aggctagctg tgtcccgggc atgctggcctg gcgcacctgc acgtggagat cttcggtaca 960  
 cagggcaaac cagccattgc ccaccgagc ttcaagagcc gcaatgtgct ggtcaagagc 1020  
 aacctgcagt gttgcatcgc cgacctgggc ctggctgtga tgcactcaca gggcagcgat 1080  
 tacctggaca tcggcaacaa cccgagagtg ggcaccaagc ggtacatggc acccgaggtg 1140  
 ctggacgagc agatccgcac ggactgctt gagtcctaca agtggactga catctgggcc 1200  
 tttggcctgg tgctgtggga gattgcccgc cggaccatcg tgaatggcat cgtggaggac 1260  
 tatagaccac ctttctatga tgtggtgccc aatgacccca gctttgagga catgaagaag 1320  
 gtggtgtgtg tggatcagca gacccccacc atccctaacc ggctggctgc agacccggtc 1380  
 ctctcaggcc tagctcagat gatgcgggag tgctggtacc caaacccctc tgcccgactc 1440  
 accgcgctgc ggatcaagaa gacactacaa aaaattagca acagtccaga gaagcctaaa 1500  
 gtgattcaat ag 1512

<210> 3  
 <211> 328  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 重组蛋白

<400> 3

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

Gln Leu Ala Thr Gly Gly Gly Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala  
 100 105 110  
 Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro  
 115 120 125  
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val  
 130 135 140  
 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val  
 145 150 155  
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln  
 165 170 175  
 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln  
 180 185 190  
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala  
 195 200 205  
 Leu Pro Val Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro  
 210 215 220  
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr  
 225 230 235 240  
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser  
 245 250 255  
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr  
 260 265 270  
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr  
 275 280 285  
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe  
 290 295 300  
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys  
 305 310 315 320  
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 325

<210> 4  
 <211> 1075  
 <212> DNA

[0006]

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组DNA

<400> 4

```

gctagcacca tggatgcaat gaagagaggg ctctgctgtg tgctgctgct gtgtggagca      60
gtcttcgttt cgcccggcgc cgaccctgtg aagccgtctc ggggcccgct ggtgacctgc      120
acgtgtgaga gcccacattg caaggggcct acctgccggg gggcctggtg cacagtagtg      180
ctggtgcggg aggaggggag gcacccccag gaacatcggg gctgcgggaa cttgcacagg      240
gagctctgca ggggccgccc caccgagttc gtcaaccact actgctgcga cagccacctc      300
tgcaaccaca acgtgtccct ggtgctggag gccacccaac ctcttcgga gcagccggga      360
acagatggcc agctggccac cggtggtgga actcacacat gcccaccgtg cccagcacct      420
gaagccctgg gggcaccgtc agtcttcctc ttcccccaa aaccaagga caccctcatg      480
atctcccgga cccctgaggt cacatgcgtg gtggtggagc tgagccacga agaccctgag      540
gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg      600
gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac      660
tggctgaatg gcaaggagta caagtgaag gtctccaaca aagccctccc agtccccatc      720
gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc      780
ccatcccggg aggagatgac caagaaccag gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc      840
tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag agcaatgggc agccggagaa caactacaag      900
accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc cccttcttcc tctacagcaa gctcaccgtg      960
gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg     1020
cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc ctgtctccgg gtaaataagg aattc         1075
    
```

<210> 5

<211> 352

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组蛋白

<400> 5

```

Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly
1          5          10          15
Ala Val Phe Val Ser Pro Gly Ala Asp Pro Val Lys Pro Ser Arg Gly
20          25          30
Pro Leu Val Thr Cys Thr Cys Glu Ser Pro His Cys Lys Gly Pro Thr
35          40          45
    
```

Cys Arg Gly Ala Trp Cys Thr Val Val Leu Val Arg Glu Glu Gly Arg  
 50 55 60  
 His Pro Gln Glu His Arg Gly Cys Gly Asn Leu His Arg Glu Leu Cys  
 65 70 75 80  
 Arg Gly Arg Pro Thr Glu Phe Val Asn His Tyr Cys Cys Asp Ser His  
 85 90 95  
 Leu Cys Asn His Asn Val Ser Leu Val Leu Glu Ala Thr Gln Pro Pro  
 100 105 110  
 Ser Glu Gln Pro Gly Thr Asp Gly Gln Leu Ala Thr Gly Gly Gly Thr  
 115 120 125  
 His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Leu Gly Ala Pro Ser  
 130 135 140  
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg  
 145 150 155 160  
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro  
 165 170 175  
 [0007]  
 Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala  
 180 185 190  
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val  
 195 200 205  
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr  
 210 215 220  
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Val Pro Ile Glu Lys Thr  
 225 230 235 240  
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu  
 245 250 255  
 Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys  
 260 265 270  
 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser  
 275 280 285  
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp  
 290 295 300

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

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

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

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

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (43)..(43)  
<223> 残基可任选地突变为丙氨酸

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (100)..(100)  
<223> 残基可任选地突变为丙氨酸

[0008] <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (212)..(212)  
<223> 残基可任选地突变为丙氨酸

<400> 6

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys  
 225

[0009]

- <210> 7
- <211> 21
- <212> PRT
- <213> 人工序列

- <220>
- <223> 重组前导肽

<400> 7

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

Ser Tyr Ile Tyr Ala  
 20

- <210> 8
- <211> 22
- <212> PRT
- <213> 人工序列

- <220>
- <223> 重组前导肽

<400> 8

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

Ala Val Phe Val Ser Pro  
20

<210> 9  
<211> 21  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 重组前导肽

<400> 9

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

Leu Val Thr Gln Gly  
20

<210> 10  
<211> 180  
<212> PRT  
<213> 人

<400> 10

[0010]

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

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

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

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

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

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

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

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

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

[0011]

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

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

Gly Ala Glu Asp  
 180

<210> 11  
 <211> 2003  
 <212> DNA  
 <213> 人

<400> 11  
 gccgagcctc ctggggcgcc cgggcccgcg acccccgcac ccagctccgc aggaccggcg 60  
 ggcgcgcgcg ggctctggag gccacgggca tgatgcttcg ggtcctgggtg ggggctgtcc 120  
 tccctgccat gctactggct gccccaccac ccatcaacaa gctggcactg ttcccagata 180  
 agagtgcctg gtgcgaagcc aagaacatca cccagatcgt gggccacagc ggctgtgagg 240  
 ccaagtccat ccagaacagg gcgtgcctag gacagtgtt cagctacagc gtcccaaca 300  
 ctttcccaca gtccacagag tccctggttc actgtgactc ctgcatgcca gccagtcca 360  
 tgtgggagat tgtgacgctg gaggccccgg gccacgagga ggtgccagg gtggacaagc 420  
 tggtgagaaa gatcctgcac ttagctgcc aggcctgcgg caaggagcct agtcacgagg 480  
 ggctgagcgt ctatgtgcag ggcgaggac ggcgggatc ccagcccggc acccaccctc 540  
 acccccatcc ccaccccat cctggcgggc agaccctga gcccgaggac ccccctgggg 600  
 cccccacac agaggaagag ggggctgagg actgaggccc cccaactct tcctcccctc 660  
 tcatccccct gtggaatggt gggctcact ctctggggaa gtcaggggag aagctgaagc 720  
 ccccctttgg cactggatgg acttgcttc agactcggac ttgaatgctg cccggttgc 780  
 atggagatct gaaggggagg ggttagagcc aagctgcaca attaatata ttcaagagt 840  
 gggggaggaa gcagaggtct tcagggtct tttttgggg ggggggtgt ctcttcctgt 900  
 ctggcttcta gagatgtgcc tgtgggagg gagggaagt ggctgagcca ttgagtgtg 960  
 ggggaggcca tccaagatgg catgaatcgg gctaaggctc ctgggggtgc agatggtact 1020  
 gctgaggtcc cgggcttagt gtgagcatct tgccagctc aggcttgagg gagggctgg 1080  
 ctagaaagac cactggcaga aacaggaggc tccggcccc caggtttccc caaggcctct 1140  
 caccactt cccatctcca ggaagcgtc gcccagtg cactgaagt gccctccctc 1200  
 agcggagggg tttgggagtc aggcctgggc agaccctgc tgactcgtg gcgaggagct 1260  
 gggagccagg ctctccggc ctttctctgg ctctctggc ttgcctggtg ggggaaggg 1320  
 aggaggggaa gaaggaaagg gaagagtct ccaaggccag aaggagggg acaaccccc 1380

[0012]

---

aagaccatcc ctgaagacga gcatccccct cctctccctg ttagaaatgt tagtgccccg	1440
caactgtgcc caagttctag gccccccaga aagctgtcag agccggccgc cttctccccct	1500
ctcccagggg tgctctttgt aaatatcgga tgggtgtggg agtgaggggt tacctccctc	1560
gccccaaagg tccagaggcc ctaggcggga tgggctcgct gaacctcgag gaactccagg	1620
acgaggagga catgggactt gcgtggacag tcagggttca cttgggctct ctctagctcc	1680
ccaattctgc ctgcctcctc cctcccagct gcactttaac cctagaagggt ggggacctgg	1740
ggggagggac agggcaggcg ggcccatgaa gaaagcccct cgttgcccag cactgtctgc	1800
gtctgtcttt ctgtgcccag ggtggctgcc agcccactgc ctctgcctg ggggtggcctg	1860
gccctcctgg ctggtgacgac gcgggcttct ggagcttgtc accattggac agtctccctg	1920
atggaccctc agtctttctca tgaataaatt ccttcaacgc caaaaaaaaa aaaaaaaaaa	1980
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaa	2003

图1: 人激活蛋白受体样激酶1(ALK-1)的氨基酸序列

(gi:3915750; SEQ ID NO:1)

1 MTLGSPRKGL LMLLMALVTQ GDPVKPSRGP LVTCTCESPH CKGPTCRGAW CTVVLVREEG  
61 RHPOEHRGCG NLHRELCRGR PTEFVNHYCC DSHLCNHNVS LVLEATOPPS EOPGTDGOLA  
121 LILOPVLALL ALVALGVLGL WHVRRROEKO RGLHSELGES SLILKASEOG DSMLOGDLLDS  
181 DCTTQSGSGL PELVORTVAR OVALVECVGK GRYGEVWRGL WHGESVAVKLFSSRDEOSWF  
241 RETEINYNTVL LRHDNILGFL ASDMTRSNS TOLWLITHYH EHGSLYDFLO ROTLEPHLAL  
301 RLAVSAACGL AHLHVEIEGT OGGKPAIAHRD FKSRNVLVKS NLOCCIALDLGLAYMHSOGSD  
361 YLDIGNNPRV GTKRYMAPEV LDEQIRTDCE ESYKWTDIWA FGLVLWEIAR RTIVNGIVED  
421 YRPPFYDVVP NDRPFEDMKK VVCVDOOTPT IPNRLAADPV LSGLAOMMRE CWYPNPSARL  
481 TALRIKKTLO KISNSPEKPK VIQ

图1

图2: 人激活蛋白受体样激酶1(ALK-1)的核酸序列

(SEQ ID NO:2)

1 atgaccttgg gctccccag gaaaggcett ctgatgctgc tgatggcett ggtgaccag  
61 ggagaccctg tgaagccctc tcggggcccg ctggtgacct gcacgtgtga gaqccacat  
121 tgaaggggc ctacctgccc gggggcctgg tgcacagtga tctggtgca gaaaggggg  
181 aggcaccccc aggaacatcg gggctgcccg aacttgaca gggagctctg caagggggcg  
241 cccaccgagt tcgtcaacca ctactgctgc gacagccacc tctgcaacca caactgtctc  
301 ctggtgctgg aggcaccca acctccttcg gacagcccgg gaacagatgg ccagctggcc  
361 ctgatectgg gcccctgct ggcttctctg ccctgggtgg cctgggctg cctgggctg  
421 tggcatgtcc gacggaggca ggagaagcag cgtggcctgc acagcgagct gggagagtc  
481 agtctcatcc tgaagcatc tgagcagggc gacagcatgt tgggggacct cctggacagt  
541 gactgcacca cagggagtgg ctacgggctc ccttctctgg tgcagaggac agtggcacgg  
601 caggttgect tgggtggagt tgtgggaaa ggcgctatg gcgaagtgtg ggggggcttg  
661 tggcacggtg agagtgtggc cgtcaagatc ttctctctga gggatgaaca gtctgggtc  
721 cgggagactg agatctataa cacagtgtg ctgagacag acaacatctt aggtctcatc  
781 gcctcagaca tgacctccg caactcgagc acgagctgt ggctcatcac gactaccac  
841 gagcacggct cctctacga cttctgagc agacagagc tggagccca tctggctctg  
901 aggtagctg tgtccgggc atgcccctg gcgacctgc acgtggagat cttcggta  
961 cagggcaaac cagccattgc ccaccggac tcaagagcc gcaatgtgt ggtcaagagc  
1021 aacctgcagt gttgcatgc cgacctggc ctggctgtga tgcactcaca gggcagcgat  
1081 tacctggaca tcggcaaca cccgagagt ggcaccaagc ggtacatggc acccgaggtg  
1141 ctggacgagc agatccgac ggactgctt gactctaca agtggactga catctggg  
1201 tttggcctgg tctgtggga gattgcccg cggaccatcg tgaatggcat cgtggaggac  
1261 tatagaccac cttctatga tgtggtgccc aatgaccca gctttgagga catgaagaag  
1321 gtggtgtgtg tggatcagca gaccccacc atccctaacc ggctggctgc agaccggctc  
1381 ctctcagggc tagctcagat gatcgggag tctggttacc caaacctc tgcccgctc  
1441 accgctgctg ggatcaagaa gacactaca aaaattagca acagtccaga gaagcctaaa  
1501 gtgattcaat ag

图2

图3: ALK1-Fc 融合蛋白 (SEQ ID NO:3).

DPVKPSRGPLVTCTCESPHCKGPTCRGAWCTVVLVREEGRHPQEHRGCGNLH  
RELCRGRPTEFVNHYCCDShLCNHVSLVLEATQPPSEQPGTDGQLATGGGT  
HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN  
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK  
ALPVPPIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE  
WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSHEA  
LHNHYTQKSLSLSPGK

图3



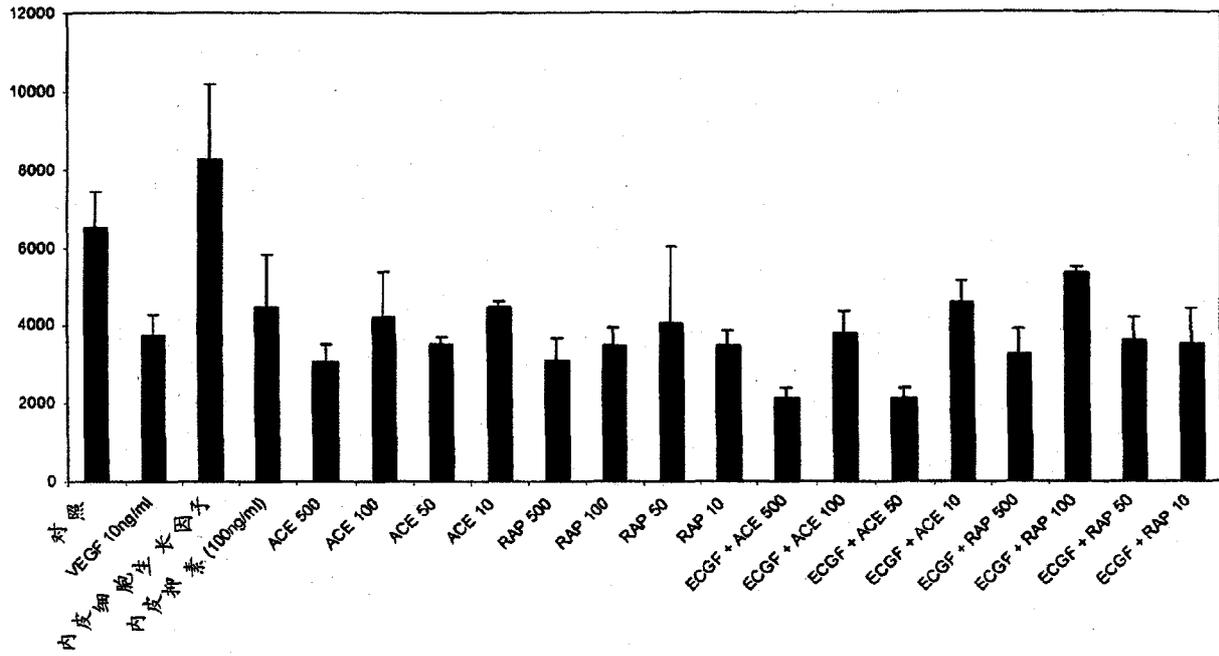


图5

CAM 1C 促血管发生

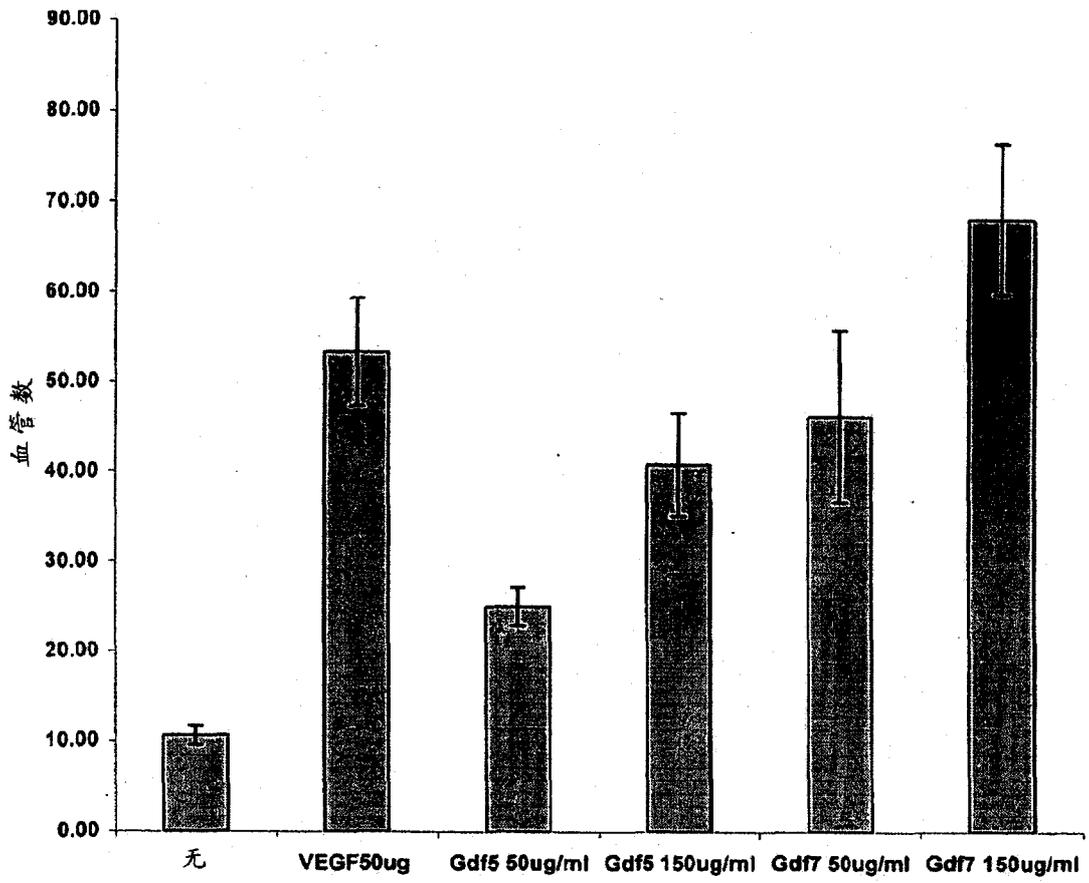


图6

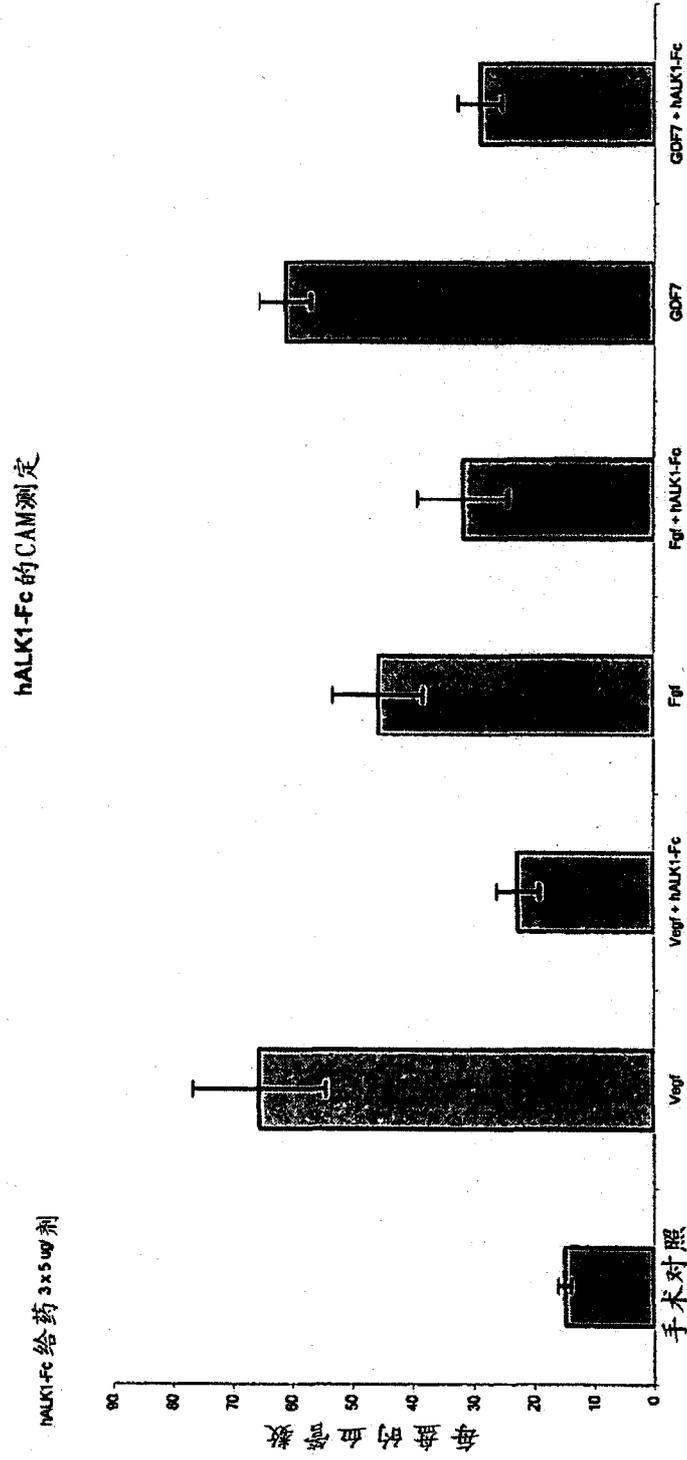


图7

CAM 血管发生测定

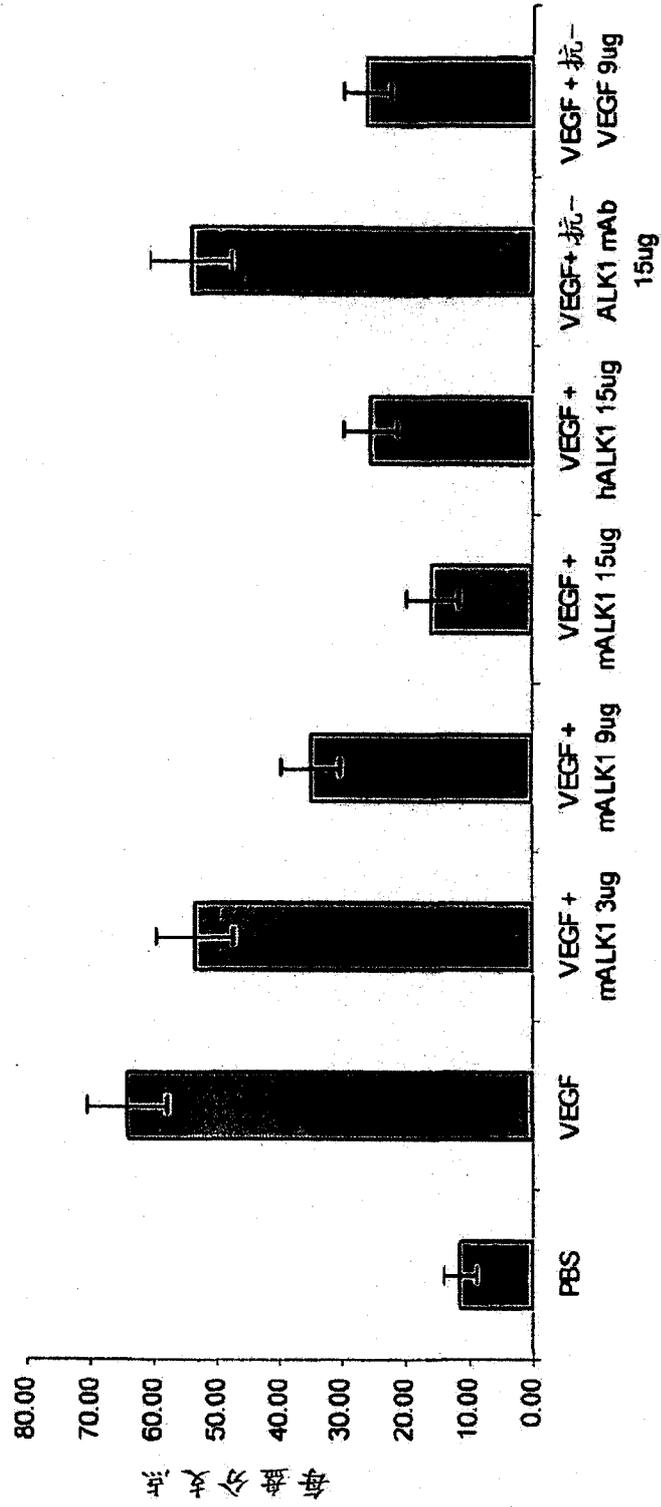


图8

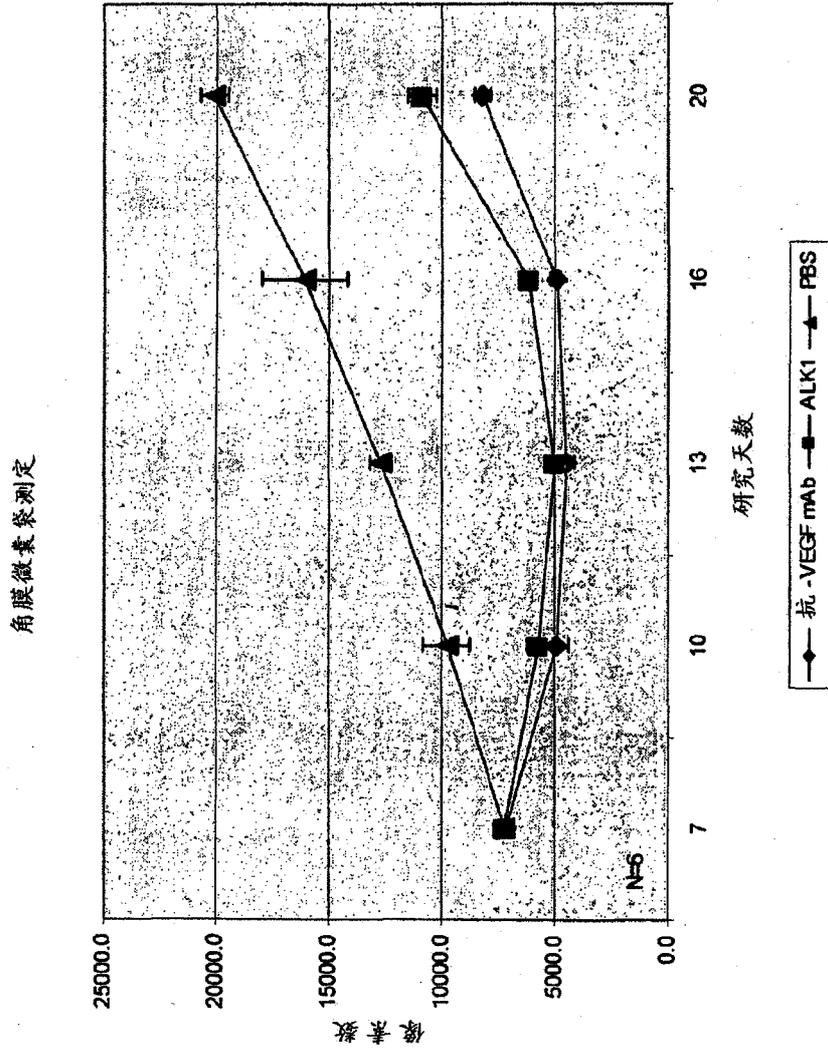


图9

MDAC-1 - 平均关节临床分数

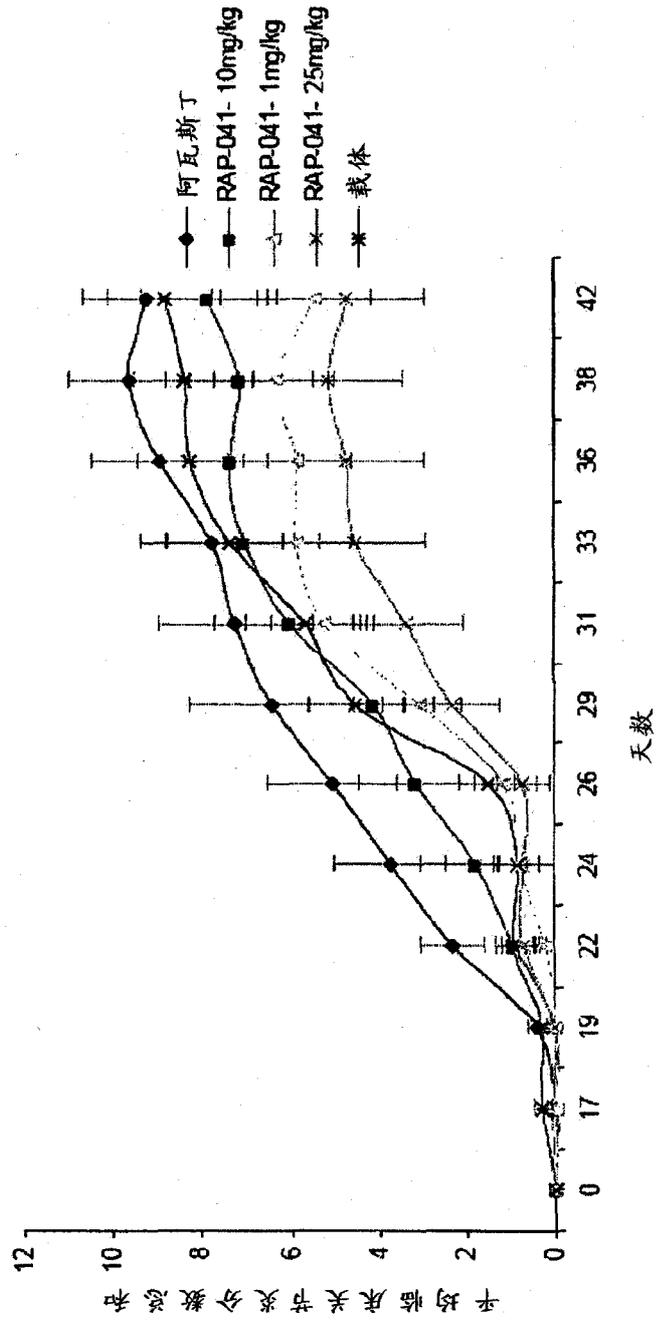


图10

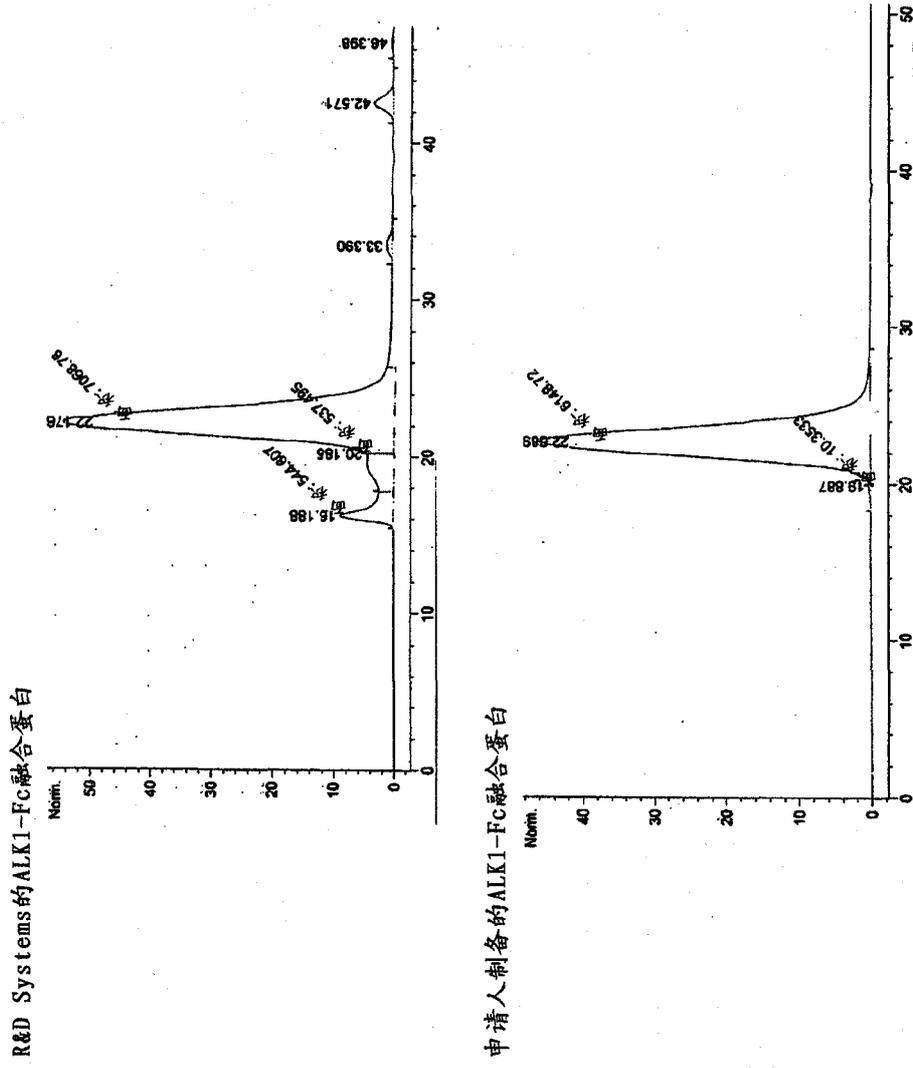


图11

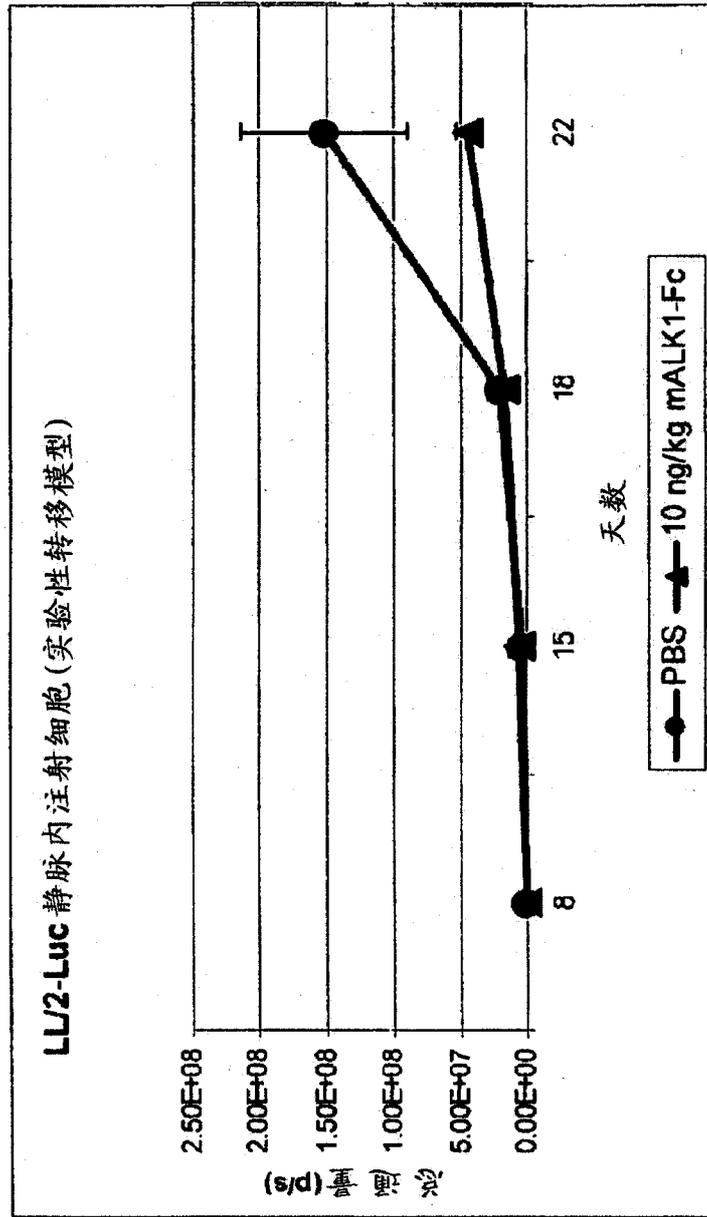


图12

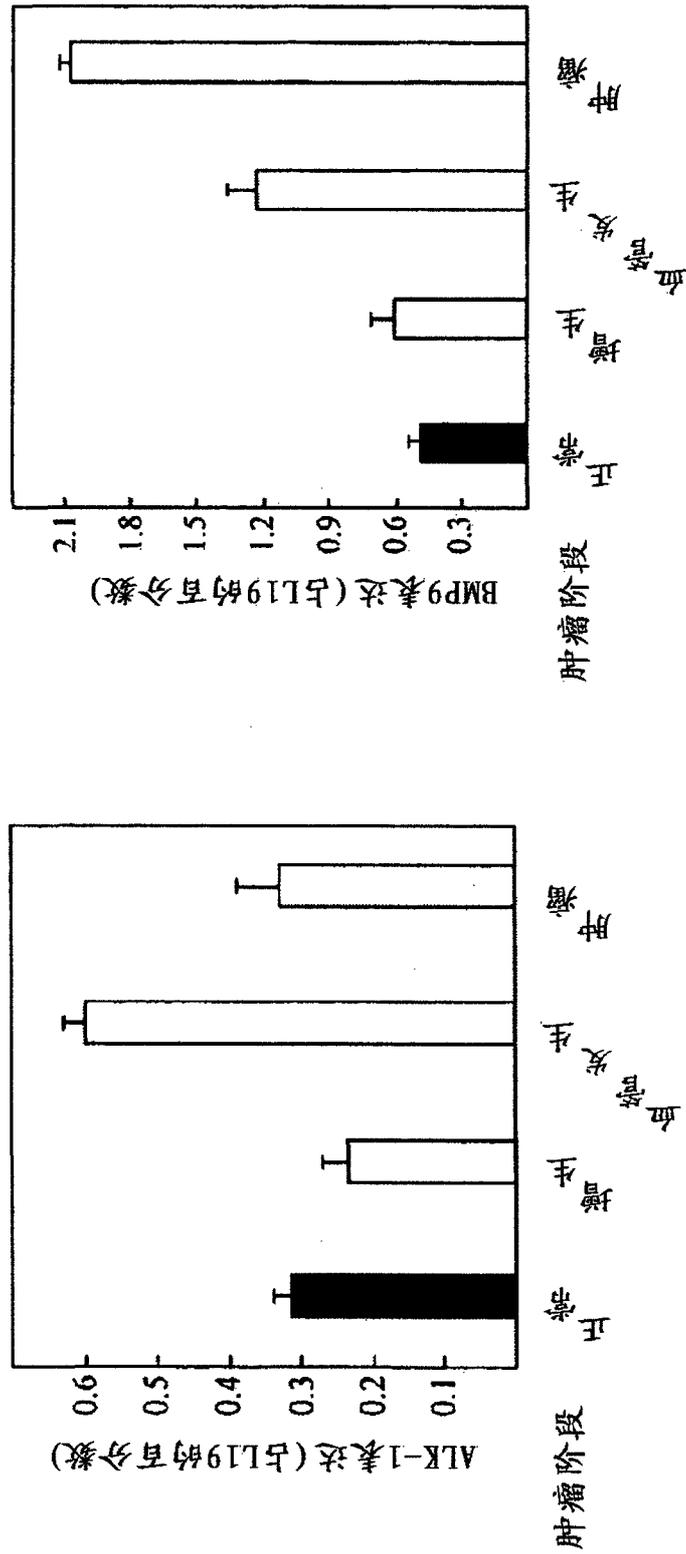


图13

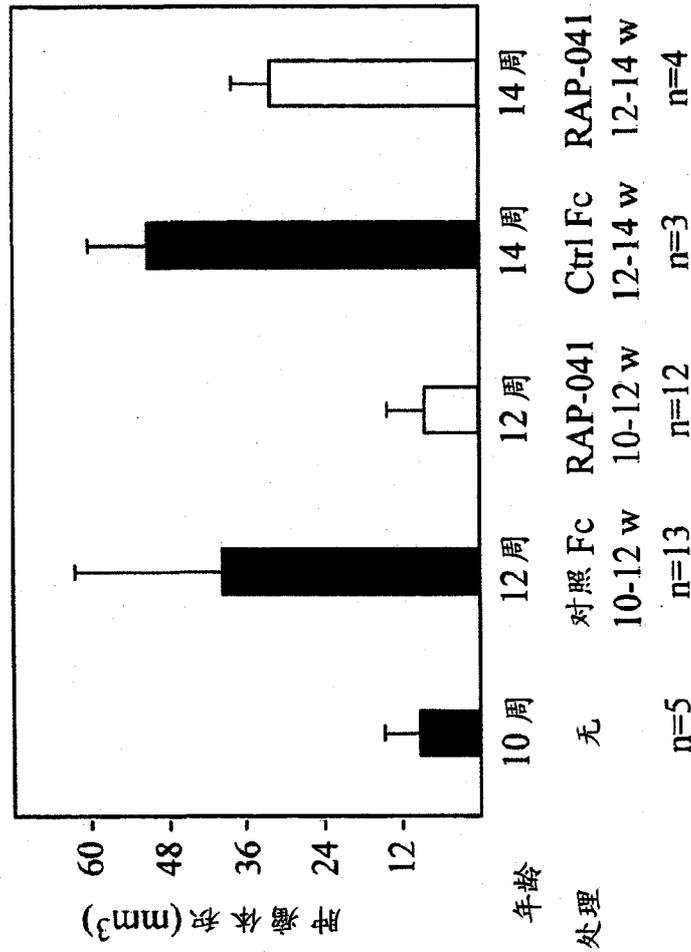


图14

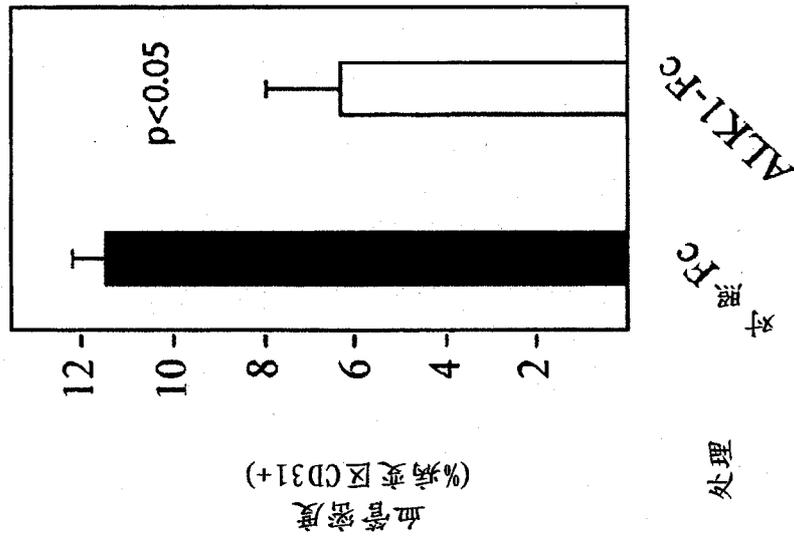


图15

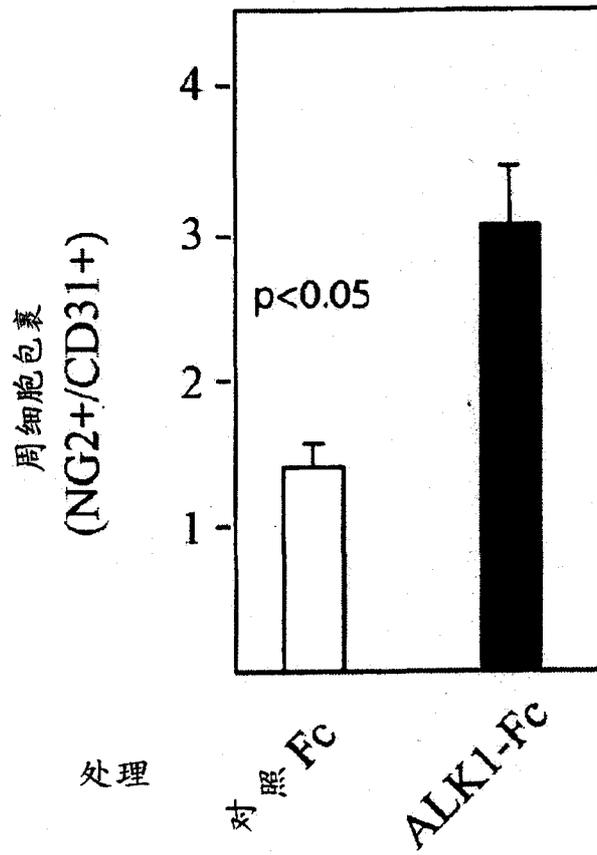


图16

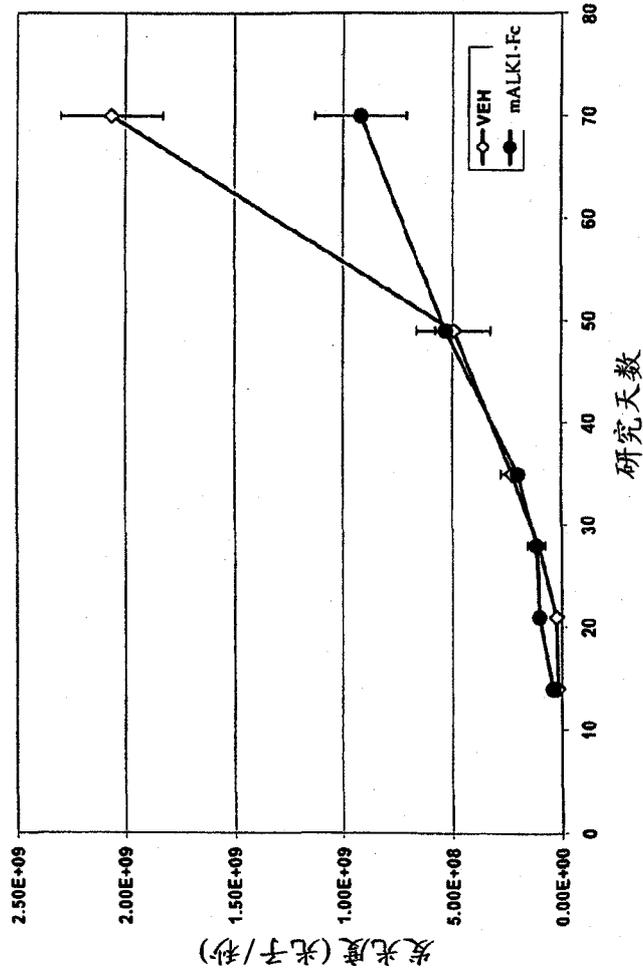


图17

MCF-7-Luc: ACE-041 剂量应答

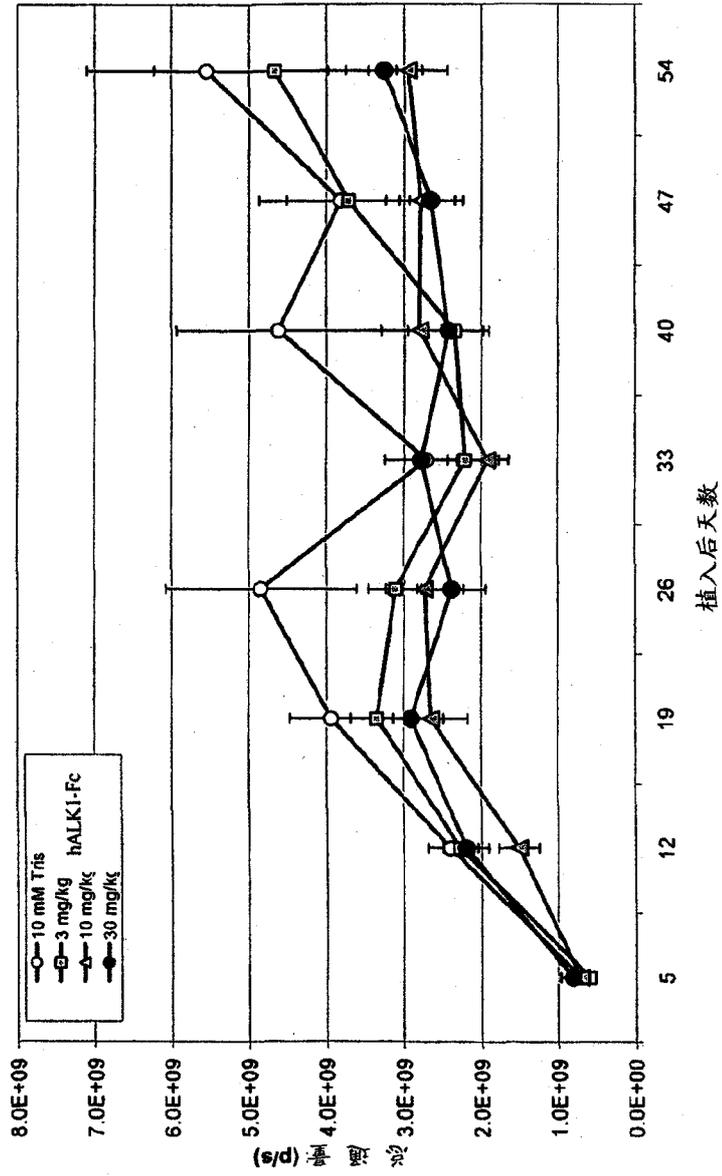


图18