(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105899225 A
(43)申请公布日 2016.08.24

(21)申请号 201480070781.X
(22)申请日 2014.10.24
(30)优先权数据
61/896,002 2013.10.25 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2016.06.23
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2014/062147 2014.10.24
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2015/061666 EN 2015.04.30
(71)申请人 阿塞勒隆制药公司
地址 美国马萨诸塞州
(72)发明人 阿斯亚·格林贝格
罗斯莱因·卡斯顿盖
埃里克·维尔纳
拉温德拉·库马尔
(74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227
代理人 彭鲲鹏 郑斌
(51)Int.Cl.
A61K 38/17(2006.01)

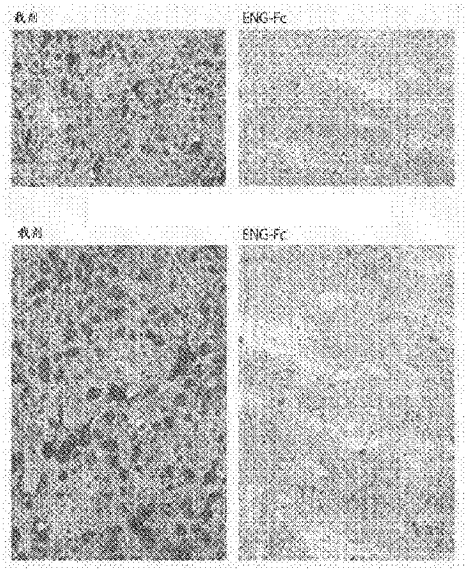
权利要求书2页 说明书47页 附图42页

(54)发明名称

用于治疗纤维化疾病的内皮联蛋白肽

(57)摘要

在某些方面，本公开内容涉及以下见解：包含内皮联蛋白(ENG)多肽胞外域的截短的、配体结合部分的多肽可用于治疗纤维化疾病。



CN 105899225 A

1.在有此需要的患者中治疗或预防纤维化疾病的方法，所述方法包括向所述患者施用有效量的内皮联蛋白多肽，所述内皮联蛋白多肽包含与SEQ ID NO:1的第42-333位氨基酸具有至少95%同一性的氨基酸序列。

2.权利要求1所述的方法，其中所述纤维化疾病是肝纤维化。

3.权利要求2所述的方法，其中所述肝纤维化是肝硬化、酒精诱导的肝纤维化、胆管损伤、原发性胆汁性肝硬化、感染诱导的肝纤维化、先天性肝纤维化或自身免疫性肝炎。

4.权利要求4所述的方法，其中所述感染诱导的肝纤维化是细菌诱导的或病毒诱导的。

5.权利要求1至4中任一项所述的方法，其中所述内皮联蛋白多肽不包含由SEQ ID NO:1的第379-430位氨基酸组成的序列。

6.权利要求1至5中任一项所述的方法，其中所述内皮联蛋白多肽包含与以对应于SEQ ID NO:1第26-42位中任一位置的氨基酸开始并且以对应于SEQ ID NO:1第333-378位中任一位置的氨基酸结束的序列具有至少95%同一性的氨基酸序列。

7.权利要求1至6中任一项所述的方法，其中所述内皮联蛋白多肽包含与选自以下的序列具有至少95%同一性的氨基酸序列：

a.SEQ ID NO:1的第26-346位氨基酸，

b.SEQ ID NO:1的第26-359位氨基酸，和

c.SEQ ID NO:1的第26-378位氨基酸。

8.权利要求1至7中任一项所述的方法，其中所述内皮联蛋白多肽由第一部分和第二部分组成，所述第一部分由与选自以下的序列具有至少95%同一性的氨基酸序列组成：

a.SEQ ID NO:1的第26-346位氨基酸，

b.SEQ ID NO:1的第26-359位氨基酸，和

c.SEQ ID NO:1的第26-378位氨基酸，

并且所述第二部分与SEQ ID NO:1异源。

9.权利要求8所述的方法，其中所述内皮联蛋白多肽的所述第二部分包含IgG的Fc部分。

10.权利要求1至9中任一项所述的方法，其中所述内皮联蛋白多肽是二聚体。

11.权利要求1至10中任一项所述的方法，其中所述内皮联蛋白多肽是同二聚体。

12.权利要求1至11中任一项所述的方法，其中所述内皮联蛋白多肽不包含来自于由SEQ ID NO:1第379-586位氨基酸组成的序列的超过50个连续氨基酸。

13.权利要求1至12中任一项所述的方法，其中所述内皮联蛋白多肽以小于1×10^{-9}M的平衡解离常数(KD)或小于$1\times10^{-3}s^{-1}$的解离速率常数(kd)结合人BMP-9。

14.权利要求1至13中任一项所述的方法，其中所述内皮联蛋白多肽以小于1×10^{-9}M的平衡解离常数(KD)或小于$5\times10^{-4}s^{-1}$的解离速率常数(kd)结合人BMP-9。

15.权利要求1至14中任一项所述的方法，其中所述内皮联蛋白多肽以小于1×10^{-9}M的平衡解离常数(KD)或小于$5\times10^{-3}s^{-1}$的解离速率常数(kd)结合人BMP-10。

16.权利要求1至15中任一项所述的方法，其中所述内皮联蛋白多肽以小于1×10^{-9}M的平衡解离常数(KD)或小于$2.5\times10^{-3}s^{-1}$的解离速率常数(kd)结合人BMP-10。

17.权利要求1至16中任一项所述的方法，其中所述内皮联蛋白多肽不结合人TGF-β1、人TGF-β3、人VEGF或人碱性成纤维细胞生长因子(FGF-2)。

18.权利要求1至17中任一项所述的方法，其中所述内皮联蛋白多肽是融合蛋白，除了含有内皮联蛋白氨基酸序列的部分以外，所述融合蛋白还包含增强以下一项或更多项的一个或更多个多肽部分：体内稳定性、体内半衰期、摄取/施用、组织定位或分布、蛋白质复合体的形成、和/或纯化。

19.权利要求1至18中任一项所述的方法，其中所述内皮联蛋白多肽包含选自以下的部分：免疫球蛋白的恒定结构域和血清白蛋白。

20.权利要求1至19中任一项所述的方法，其中所述内皮联蛋白多肽包含免疫球蛋白Fc结构域。

21.权利要求20所述的方法，其中所述免疫球蛋白Fc结构域通过接头与所述ENG多肽部分相连接。

22.权利要求21所述的方法，其中所述接头由氨基酸序列组成，所述氨基酸序列由SEQ ID NO:31(TGGG)或GGG组成。

23.权利要求1至22中任一项所述的方法，其中所述内皮联蛋白多肽包含选自以下的一个或更多个经修饰氨基酸残基：糖基化氨基酸、PEG化氨基酸、法尼基化氨基酸、乙酰化氨基酸、生物素化氨基酸、与脂质部分缀合的氨基酸、以及与有机衍生化剂缀合的氨基酸。

24.权利要求1至23中任一项所述的方法，其中所述内皮联蛋白多肽静脉内、肌内、动脉内、皮下或经口施用。

用于治疗纤维化疾病的内皮联蛋白肽

[0001] 相关申请

[0002] 本申请根据35U.S.C.§119要求2013年10月25日提交的序列号为61/896,002,标题为“Endoglin Peptides To Treat Fibrotic Diseases”的美国临时申请的申请日权益,其整个内容通过引用并入本文。

背景技术

[0003] 纤维化是器官或组织中形成过量纤维结缔组织。纤维化可以响应于物理或化学损伤作为修复过程或反应过程(也称为结疤)的一部分发生。纤维化也可以由不具有外部损伤的细胞或组织中的病理性失常引起。纤维化导致结缔组织沉积,其可以支持组织稳态和创伤后愈合。但是,过量纤维化可破坏基本器官或组织的结构并且妨碍其功能,导致纤维化疾病(fibrotic disorder),例如,肝纤维化、肺纤维化和囊性纤维化。纤维化组织通常不能进行各自器官的特定功能,并且不能被修复。因此,用于纤维化疾病的治疗选择局限于组织替换方法,例如器官移植和姑息治疗。

[0004] 期望的是开发用于抑制和治疗纤维化的有效组合物和方法。这些包括可抑制和/或逆转与纤维化疾病相关的过量纤维化的方法和组合物。

[0005] 发明概述

[0006] 本公开内容的一些方面提供了内皮联蛋白(endoglin,ENG)多肽以及这些内皮联蛋白多肽用于治疗或预防纤维化疾病的用途。本公开内容的一些实施方案提供了在有此需要的对象中治疗或预防纤维化疾病的方法。在一些实施方案中,所述方法包括向患者施用有效量的本文中提供的内皮联蛋白多肽。在一些实施方案中,所使用的内皮联蛋白多肽包含与SEQ ID NO:1的第42-333位氨基酸具有至少95%同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述纤维化疾病是肝纤维化、血管纤维化、肺纤维化、胰纤维化、肾纤维化、肌肉骨骼纤维化、心脏纤维化、皮肤纤维化、眼纤维化、进行性系统性硬化(progressive systemic sclerosis,PSS)、慢性移植物抗宿主病、佩罗尼病(Peyronie′s disease)、膀胱镜检后的尿道狭窄、腹膜后纤维化、纵膈纤维化、进行性大块纤维化(progressive massive fibrosis)、增生性纤维化、肾源性系统性纤维化、肿瘤纤维化、掌腱膜挛缩症(Dupuytren's disease)、狭窄、辐射诱导的纤维化、囊性纤维化、胸膜纤维化、结节病、硬皮病、脊髓损伤/纤维化、骨髓纤维化、血管再狭窄、动脉粥样硬化、注射纤维化(其可以作为肌内注射的并发症发生,尤其是在儿童中),或者煤矿工人尘肺病的并发症。在一些实施方案中,纤维化疾病不是骨髓纤维化。在一些实施方案中,肝纤维化是肝硬化、酒精诱导的肝纤维化、胆管损伤、原发性胆汁性肝硬化、感染诱导的肝纤维化、先天性肝纤维化或自身免疫性肝炎。在一些实施方案中,感染诱导的肝纤维化是细菌诱导的或病毒诱导的。在一些实施方案中,肺纤维化是特发性的、药理学诱导的、辐射诱导的、慢性阻塞性肺病(chronic obstructive pulmonary disease,COPD)或慢性哮喘。在一些实施方案中,心脏纤维化是心内膜心肌纤维化或特发性心肌病。在一些实施方案中,皮肤纤维化是硬皮病,创伤后、手术性皮肤疤痕形成,疤痕疙瘩或皮肤疤痕疙瘩形成。在一些实施方案中,眼纤维化是青光眼、眼的硬化、结膜

疤痕形成、角膜疤痕形成或翼状胬肉。在一些实施方案中，腹膜后纤维化是特发性的、药理学诱导的或辐射诱导的。在一些实施方案中，囊性纤维化是胰的囊性纤维化或肺的囊性纤维化。在一些实施方案中，注射纤维化作为肌内注射的并发症发生。

[0007] 在一些实施方案中，本文中提供的用于治疗纤维化疾病的内皮联蛋白多肽不包含由SEQ ID NO:1的第379-430位氨基酸组成的序列。在一些实施方案中，内皮联蛋白多肽包含与以对应于SEQ ID NO:1第26-42位中任一位置的氨基酸开始并且以对应于SEQ ID NO:1第333-378位中任一位置的氨基酸结束的序列具有至少95％同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中，内皮联蛋白多肽包含与SEQ ID NO:1的第26-346位氨基酸、SEQ ID NO:1的第26-359位氨基酸或SEQ ID NO:1的第26-378位氨基酸具有至少95％同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中，内皮联蛋白多肽由第一部分和第二部分组成，所述第一部分由与SEQ ID NO:1的第26-346位氨基酸、SEQ ID NO:1的第26-359位氨基酸或SEQ ID NO:1的第26-378位氨基酸具有至少95％同一性的氨基酸序列组成，所述第二部分与SEQ ID NO:1异源。在一些实施方案中，内皮联蛋白多肽的第二部分包含IgG的Fc部分。在一些实施方案中，内皮联蛋白多肽不包含来自于由SEQ ID NO:1第379-586位氨基酸组成的序列的超过50个连续氨基酸。在一些实施方案中，内皮联蛋白多肽是包含两个或更多个内皮联蛋白多肽的二聚体或更高级多聚体，并且可以任选地为同二聚体、异二聚体、同多聚体或异多聚体。

[0008] 在一些实施方案中，本文中提供的用于治疗纤维化疾病的内皮联蛋白多肽以小于1×10^{-9}M的平衡解离常数(equilibrium dissociation constant,KD)或小于$1\times10^{-3}s^{-1}$的解离速率常数(dissociation rate constant,kd)结合人BMP-9。在一些实施方案中，内皮联蛋白多肽以小于1×10^{-9}M的平衡解离常数(KD)或小于$5\times10^{-4}s^{-1}$的解离速率常数(kd)结合人BMP-9。在一些实施方案中，内皮联蛋白多肽以小于1×10^{-9}M的平衡解离常数(KD)或小于$5\times10^{-3}s^{-1}$的解离速率常数(kd)结合人BMP-10。在一些实施方案中，内皮联蛋白多肽以小于1×10^{-9}M的平衡解离常数(KD)或小于$2.5\times10^{-3}s^{-1}$的解离速率常数(kd)结合人BMP-10。任选地，以任意上述BMP-9或BMP-10结合性质为特征的内皮联蛋白多肽是二聚体或更高级多聚体。在一些实施方案中，内皮联蛋白多肽不结合人TGF-β1、人TGF-β3、人VEGF或人碱性成纤维细胞生长因子(FGF-2)。在一些实施方案中，内皮联蛋白多肽是融合蛋白，除了含有内皮联蛋白氨基酸序列的部分外，所述融合蛋白还包含增强以下一项或更多项的一个或更多个多肽部分：体内稳定性、体内半衰期、摄取/施用、组织定位或分布、蛋白质复合体(例如二聚体或多聚体)的形成、和/或纯化。在一些实施方案中，内皮联蛋白多肽包含免疫球蛋白恒定结构域的一部分和/或血清白蛋白的一部分。在一些实施方案中，内皮联蛋白多肽包含免疫球蛋白Fc结构域。在一些实施方案中，免疫球蛋白Fc结构域通过接头与ENG多肽部分连接。在一些实施方案中，接头由氨基酸序列组成，所述氨基酸序列由SEQ ID NO:31(TGGG)或GGG组成。在一些实施方案中，Fc结构域形成二聚体。在一些实施方案中，内皮联蛋白多肽包含选自以下的一个或更多个经修饰氨基酸残基：糖基化氨基酸、PEG化氨基酸、法尼基化氨基酸、乙酰化氨基酸、生物素化氨基酸、与脂质部分缀合的氨基酸、与有机衍生化剂(organic derivatizing agent)缀合的氨基酸。

[0009] 在一些实施方案中，内皮联蛋白多肽静脉内、肌内、动脉内、皮下或经口施用。

[0010] 部分地，本公开内容提供了内皮联蛋白多肽以及这样的内皮联蛋白多肽作为BMP9和/或BMP10的选择性拮抗剂的用途。如本文中所述的，包含内皮联蛋白胞外域

(extracellular domain,ECD)的一部分或全部的多肽结合BMP9和BMP10,但是对TGF-β超家族的其他成员不表现出显著结合。本公开内容证明,包含内皮联蛋白ECD的一部分或全部的多肽是BMP9和BMP10信号传导的有效拮抗剂,并且用于抑制体内血管发生和肿瘤生长。因此,在某些方面,本公开内容提供了作为BMP9和/或BMP10的拮抗剂的内皮联蛋白多肽,其用于抑制血管发生以及与本文中所述BMP9或BMP10相关的其他疾病。

[0011] 在某些方面,本公开内容提供了包含截短的内皮联蛋白胞外域的多肽,其用于抑制血管发生以及治疗其他BMP9或BMP10相关的疾病。尽管不希望受到任何特定作用机制的限制,预期这样的多肽通过与BMP9和/或BMP10结合并且抑制这些配体与受体(例如ALK1、ALK2、ActRIIA、ActRIIB和BMPRII)形成信号传导复合物的能力来发挥作用。在某些实施方案中,内皮联蛋白多肽包含、由或基本上由以下氨基酸序列组成:所述氨基酸序列与SEQ ID NO:1的人内皮联蛋白序列的第42-333、26-346、26-359或26-378位氨基酸的序列具有至少70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性。内皮联蛋白多肽可以包含、由或基本上由以下氨基酸序列组成:所述氨基酸序列与以SEQ ID NO:1的第26-42位中任一位置开始并且以SEQ ID NO:1的人内皮联蛋白序列的第333-378位中任一位置结束的氨基酸序列具有至少70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性。内皮联蛋白多肽可以包含、由或基本上由这样的多肽组成,所述多肽由在较不严格、严格或高度严格的条件下与选自以下的核苷酸序列的互补序列(complement)杂交的核酸所编码:SEQ ID NO:2的第537-1412位核苷酸、SEQ ID NO:30的第121-1035位核苷酸、SEQ ID NO:26的第121-1074位核苷酸、SEQ ID NO:24的第121-1131位核苷酸、SEQ ID NO:30的第73-1035位核苷酸、SEQ ID NO:26的第73-1074位核苷酸以及SEQ ID NO:24的第73-1131位核苷酸。在上述每一个方面,可以选择内皮联蛋白多肽以使得其不包含全长内皮联蛋白ECD(例如,可以选择内皮联蛋白多肽以使得不包含SEQ ID NO:1的第379-430位氨基酸的序列,或者其一部分,或者SEQ ID NO:1的独特序列的任何额外部分)。内皮联蛋白多肽可作为单体蛋白质或以二聚化形式使用。内皮联蛋白多肽也可以与第二多肽部分融合以提供改善的特性,例如提高的半衰期或更易于生产或纯化。融合可以是直接的或者可以在内皮联蛋白多肽和任何其他部分之间插入接头。接头可以是结构化的或非结构化的并且可以由1、2、3、4、5、10、15、20、30、50或更多个氨基酸组成,任选地相对不具有二级结构。接头可以富含甘氨酸残基和脯氨酸残基,并且可以例如包含苏氨酸/丝氨酸和甘氨酸的序列(例如,TGGG(SEQ ID NO:31)),或者简单地一个或更多个甘氨酸残基(例如,GGG(SEQ ID NO:32))。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)连接可特别地用于提高全身性施用(例如,静脉内、动脉内和腹膜内施用)的内皮联蛋白多肽的血清半衰期。在某些实施方案中,内皮联蛋白-Fc融合蛋白包含这样的多肽,所述多肽包含、由或基本上由以下氨基酸序列组成:所述氨基酸序列与以SEQ ID NO:1的第26-42位中任一位置开始并且以SEQ ID NO:1的人内皮联蛋白序列的第333-378位中任一位置结束的氨基酸序列具有至少70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性,并且任选地可以不包含全长内皮联蛋白ECD(例如,可以选择内皮联蛋白多肽以使得不包含SEQ ID NO:1的第379-430位氨基酸的序列或者其一部分,或者使得不包含内皮联蛋白的任何部分或者SEQ ID NO:1的第379至581位氨基酸的任何部分的任意5、10、20、30、40、50、52、60、70、100、150或200或更多个其他氨基酸),所述多肽在具有或不具有间插接头(intervening linker)的情况下与免疫球蛋白

的Fc部分融合。内皮联蛋白多肽(包括内皮联蛋白-Fc融合蛋白)可以以小于10^{-8}M、10^{-9}M、10^{-10}M、10^{-11}M或更小的K_D,或者小于$10^{-3}s^{-1}$、$3x10^{-3}s^{-1}$、$5x10^{-3}s^{-1}$或$1x10^{-4}s^{-1}$的解离常数(k_d)与BMP9和/或BMP10结合。可以选择内皮联蛋白多肽以使对于BMP9的K_D小于对于BMP10的K_D,任选地小5倍、10倍、20倍、30倍、40倍或更多。内皮联蛋白多肽可以对TGF-β1、TGF-β2或TGF-β3中任一种或全部具有很小或不具有显著亲和力,并且可以对TGF-β1、TGF-β2或TGF-β3中的任一种或全部具有大于10^{-9}M、10^{-8}M、10^{-7}M或10^{-6}M的K_D。内皮联蛋白多肽可以是二聚体或者更高级别多聚体。

[0012] 可以选择Fc部分以使得适合于生物体。任选地,Fc部分是人IgG1的Fc部分。任选地,内皮联蛋白-Fc融合蛋白包含SEQ ID NO:33、34、35或36中任一个的氨基酸序列。任选地,内皮联蛋白-Fc融合蛋白是通过在哺乳动物细胞系中(特别是在中国仓鼠卵巢(CHO)细胞系中)由SEQ ID No:17、20、22、24、26、28或30中任一个的核酸表达产生的。内皮联蛋白多肽可以配制成基本上不含热原的药物制剂。药物制剂可以制备成用于全身性递送(例如,静脉内、肌内、动脉内或皮下递送)或者局部递送(例如,向眼部)。

[0013] 本文中公开的内皮联蛋白多肽可与一种或更多种额外的治疗剂联合使用或先后使用,所述额外的治疗剂包括例如抗血管发生剂、VEGF拮抗剂、抗VEGF抗体、抗肿瘤组合物、细胞毒剂、化学治疗剂、抗激素剂和生长抑制剂。本文中提供了每一种前述分子类别的其他实例。

[0014] 在某些方面,本公开内容提供了用于通过施用本文中一般描述或特别描述的任意内皮联蛋白多肽来在哺乳动物中抑制血管发生的方法。内皮联蛋白多肽可以局部递送(例如,向眼部)或者全身性递送(例如,静脉内、肌内、动脉内或皮下)。在某些实施方案中,本公开内容提供了用于通过在眼部远侧的位置向哺乳动物施用内皮联蛋白多肽(例如通过全身性施用)来在哺乳动物眼中抑制血管发生的方法。

[0015] 在某些方面,本公开内容提供了用于在哺乳动物中治疗肿瘤的方法。这样的方法可以包括向具有肿瘤的哺乳动物施用有效量的内皮联蛋白多肽。方法还可以包括施用一种或更多种另外的药剂,包括例如抗血管发生剂、VEGF拮抗剂、抗VEGF抗体、抗肿瘤组合物、细胞毒剂、化学治疗剂、抗激素剂和生长抑制剂。肿瘤也可以是利用多种促血管发生因子的肿瘤,例如耐受抗VEGF治疗的肿瘤。

[0016] 在某些方面,本公开内容提供了用于治疗患有BMP9或BMP10相关疾病的患者的方法。本文中提供了这样疾病的实例,一般可以包括血管系统疾病、高血压和纤维化疾病。

[0017] 在某些方面,本公开内容提供了眼用制剂。这样的制剂可包含本文中公开的内皮联蛋白多肽。在某些方面,本公开内容提供了用于治疗眼部的纤维化疾病或眼部的血管发生相关疾病的方法。这样的方法可包括全身性施用或向所述眼部施用包含有效量的本文中公开的内皮联蛋白多肽的药物制剂。

[0018] 附图简述

[0019] 图1示出了人ENG同种型1(L-ENG)的天然氨基酸序列。前导序列(第1-25位残基)和预测的跨膜结构域(第587-611位残基)各自具有下划线。

[0020] 图2示出了编码人ENG同种型1(L-ENG)的天然核苷酸序列。编码前导序列的序列(第414-488位核苷酸)和编码预测的跨膜结构域的序列(第2172-2246位核苷酸)各自具有下划线。

[0021] 图3示出了人ENG同种型2(S-ENG)的天然氨基酸序列。前导序列(第1-25位残基)和预测的跨膜结构域(第587-611位残基)各自具有下划线。与同种型1相比,同种型2具有更短并且不同的C末端,但是胞外域序列(参见图9)相同。

[0022] 图4示出了编码人ENG同种型2(S-ENG)的天然核苷酸序列。编码前导序列的序列(第414-488位核苷酸)和编码预测的跨膜结构域的序列(第2172-2246位核苷酸)各自具有下划线。

[0023] 图5示出了鼠ENG同种型1(L-ENG)的天然氨基酸序列。前导序列(第1-26位残基)和预测的跨膜结构域(第582-606位残基)具有下划线,并且用括号括出了成熟多肽的胞外域(参见图10)。鼠ENG的同种型3(GenBank登录号NM_001146348)与所描述序列的差别仅在前导序列,其中第23位的苏氨酸(突出显示)缺失,并且在位置24具有甘氨酸至丝氨酸的替换(也突出显示)。

[0024] 图6示出了编码鼠ENG同种型1(L-ENG)的天然核苷酸序列。编码前导序列的序列(第364-441位核苷酸)和编码预测的跨膜结构域的序列(第2107-2181位核苷酸)各自具有下划线。编码鼠ENG同种型3的核苷酸序列(GenBank登录号NM_001146348)与所描述序列的差别仅在前导序列,特别是在第430-433位(突出显示)。

[0025] 图7示出了鼠ENG同种型2(S-ENG)的天然氨基酸序列。前导序列(第1-26位残基)和预测的跨膜结构域(第582-606位残基)具有下划线。与同种型1相比,同种型2具有更短并且不同的C末端,但是胞外域序列(参见图10)相同。

[0026] 图8示出了编码鼠ENG同种型2(S-ENG)的天然核苷酸序列。编码前导序列的序列(第364-441位核苷酸)和编码预测的跨膜结构域的序列(第2107-2181位核苷酸)各自具有下划线。

[0027] 图9示出了人ENG的胞外域的氨基酸序列。两种人同种型的胞外域的氨基酸序列和核苷酸序列二者均相同。

[0028] 图10示出了鼠ENG的胞外域的氨基酸序列,其与其人对应物具有69%同一性。两种鼠同种型的的胞外域的氨基酸序列和核苷酸序列二者均相同。

[0029] 图11示出了人IgG1 Fc结构域的氨基酸序列。具有下划线的残基是正文中讨论的任选突变位点。

[0030] 图12示出了人IgG1 Fc结构域的N末端截短的氨基酸序列。具有下划线的残基是正文中讨论的任选突变位点。

[0031] 图13示出了hENG(26-586)-hFc的氨基酸序列。ENG结构域具有下划线,TPA前导序列具有双下划线,并且接头序列为黑体并且突出显示。

[0032] 图14示出了编码hENG(26-586)-hFc的核苷酸序列。编码ENG结构域的核苷酸具有下划线,编码TPA前导序列的核苷酸具有双下划线,并且编码接头序列的核苷酸为黑体并且突出显示。

[0033] 图15示出了具有N末端截短的Fc结构域的hENG(26-586)-hFc的氨基酸序列。ENG结构域具有下划线,TPA前导序列具有双下划线,并且接头序列为黑体并且突出显示。

[0034] 图16示出了mENG(27-581)-mFc的氨基酸序列。ENG结构域具有下划线,TPA前导序列具有双下划线,并且接头序列为黑体并且突出显示。

[0035] 图17示出了编码mENG(27-581)-mFc的核苷酸序列。编码ENG结构域的核苷酸序列

具有下划线，编码TPA前导序列的核苷酸序列具有双下划线，并且编码接头序列的核苷酸序列为黑体并且突出显示。

[0036] 图18示出了通过基于表面等离子体共振(surface plasmon resonance，SPR)的测定确定的BMP-9与hENG(26-586)-hFc结合的表征。在0和0.01-0.625nM(双倍增量，排除0.3125nM)的配体浓度下评估与捕获的hENG(26-586)-hFc结合的BMP-9，并且使用非线性回归确定K_D为29pM。

[0037] 图19示出了通过基于SPR的测定确定的BMP-10与hENG(26-586)-hFc结合的表征。在0和0.01-1.25nM(双倍增量)的配体浓度下评估与捕获的hENG(26-586)-hFc结合的BMP-10，并且使用非线性回归确定K_D为400pM。

[0038] 图20示出了可溶性人ENG胞外域hENG(26-586)对于BMP-9与ALK1之结合的影响。将0-50nM浓度的hENG(26-586)与固定浓度的BMP-9(10nM)预混合，并且通过基于SPR的测定确定与捕获的ALK1结合的BMP-9。最上面的迹线对应于无hENG(26-586)，而最下面的迹线对应于5:1的ENG:BMP-9比例。BMP-9与ALK1的结合被可溶性hENG(26-586)以浓度依赖性方式抑制，并且IC_{50}为9.7nM。

[0039] 图21示出了可溶性人ENG胞外域hENG(26-586)对于BMP-10与ALK1之结合的影响。将0-50nM浓度的hENG(26-586)与固定浓度的BMP-10(10nM)预混合，并且通过基于SPR的测定测量与捕获的ALK1结合的BMP-10。最上面的迹线对应于无hENG(26-586)，而最下面的迹线对应于5:1的ENG:BMP-10比例。BMP-10与ALK1的结合被可溶性hENG(26-586)以浓度依赖性方式抑制，并且IC_{50}为6.3nM。

[0040] 图22示出了mENG(27-581)-hFC对培养物中的人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell，HUVEC)的索(cord)形成的影响。数据为一式二份培养物的平均值±SD。与不处理相比，诱导物内皮细胞生长物质(endothelial cell growth substance，ECGS)使平均索长翻倍，而mENG(27-581)-hFc使这种增长削减近60％。在不存在刺激(不处理)的情况下，mENG(27-581)-hFc几乎没有影响。

[0041] 图23示出了mENG(27-581)-hFc在鸡绒毛尿囊膜(chick chorioallantoic membrane，CAM)测定中对VEGF刺激的血管发生的影响。数据为平均值±SEM；*，$p<0.05$。同时的mENG(27-581)-hFc处理使VEGF处理诱导的额外血管数目降低65％。

[0042] 图24示出了在小鼠血管反应器(angioreactor)测定中mENG(27-581)-mFc处理11天对生长因子(growth factor，GF)血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor，VEGF)和碱性成纤维细胞生长因子(FGF-2)的组合刺激的血管发生的影响。血管发生的单位为相对荧光±SEM；*，$p<0.05$。在该体内测定中，mENG(27-581)-mFc完全阻断GF刺激的血管发生。

[0043] 图25示出了hENG-Fc融合构建体的结构域结构。全长ENG胞外域(上部结构中第26-586位残基)由孤儿结构域(orphan domain)以及N末端和C末端透明带(zona pellucida，ZP)结构域组成。其下面示出了所选择截短变体的结构，以及其在基于SPR的测定中是否表现出与BMP-9和BMP-10的高亲和力结合(+/-)。

[0044] 图26示出了hENG(26-437)-hFc的氨基酸序列。ENG结构域具有下划线，TPA前导序列具有双下滑线，并且接头序列为黑体并且突出显示。

[0045] 图27示出了编码hENG(26-437)-hFc的核苷酸序列。编码ENG结构域的核苷酸具有

下划线，编码TPA前导序列的核苷酸序列具有双下划线，并且编码接头序列的核苷酸为黑体并且突出显示。

[0046] 图28示出了具有N末端截短的Fc结构域的hENG(26-378)-hFc的氨基酸序列。ENG结构域具有下划线，TPA前导序列具有双下滑线，并且接头序列为黑体并且突出显示。

[0047] 图29示出了编码具有N末端截短的Fc结构域的hENG(26-378)-hFc的核苷酸序列。编码ENG结构域的核苷酸具有下划线并且编码接头序列的核苷酸为黑体并且突出显示。

[0048] 图30示出了hENG(26-359)-hFc的氨基酸序列。ENG结构域具有下划线，TPA前导序列具有双下滑线，并且接头序列为黑体并且突出显示。

[0049] 图31示出了编码hENG(26-359)-hFc的核苷酸序列。编码ENG结构域的核苷酸具有下划线，编码TPA前导序列的核苷酸序列具有双下划线，并且编码接头序列的核苷酸为黑体并且突出显示。

[0050] 图32示出了具有N末端截短的Fc结构域的hENG(26-359)-hFc的氨基酸序列。ENG结构域具有下划线，TPA前导序列具有双下滑线，并且接头序列为黑体并且突出显示。

[0051] 图33示出了编码具有N末端截短的Fc结构域的hENG(26-359)-hFc的核苷酸序列。编码ENG结构域的核苷酸具有下划线，编码TPA前导序列的核苷酸具有双下划线，并且编码接头序列的核苷酸为黑体并且突出显示。

[0052] 图34示出了具有N末端截短的Fc结构域的hENG(26-346)-hFc的氨基酸序列。ENG结构域具有下划线，TPA前导序列具有双下滑线，并且接头序列为黑体并且突出显示。

[0053] 图35示出了编码具有N末端截短的Fc结构域的hENG(26-346)-hFc的核苷酸序列。编码ENG结构域的核苷酸具有下划线，并且编码接头序列的核苷酸为黑体并且突出显示。

[0054] 图36示出了hENG(26-586)-hFc(A)、hENG(26-359)-hFc(B)和hENG(26-346)-hFc(C)的尺寸排阻色谱，其在来自各CHO细胞的蛋白质通过蛋白A亲和色谱纯化后进行。单体hENG(26-346)-hFc的百分比回收率与hENG(26-586)-hFc的相等。相比之下，单体hENG(26-359)-hFc的回收率通过额外高分子量聚集体的存在而降低，因此需要额外操作以获得等同于其他构建体的纯度。

[0055] 图37示出了在基于SPR的测定中确定的与hENG(26-586)-hFc(A)、hENG(26-359)-hFc(B)和hENG(26-346)-hFc(C)结合的BMP-9的动力学表征。在二倍增量的0.0195-0.625nM配体浓度下评估与捕获的来自CHO细胞的蛋白质结合的BMP-9。RU，响应单位(response unit)。注意到与hENG(26-586)-hFc相比截短变体具有更慢的解离速率(off-rate)。

[0056] 图38示出了在CAM测定中hENG(26-359)-hFc对VEGF刺激的血管发生的影响。数据为平均值±SEM；*，$p<0.05$。尽管hENG(26-359)-hFc不结合VEGF，但是同时的hENG(26-359)-hFc处理使VEGF处理诱导的额外血管数目降低75％。

[0057] 图39示出了在小鼠血管反应器测定中hENG(26-346)-hFc处理11天对生长因子(GF)VEGF和FGF-2的组合刺激的血管发生的影响。A.血管发生的单位为相对荧光±SEM。*，$p<0.05$。B.按处理组排列的个体血管反应器的照片(每只小鼠4张)，血管形成作为深色内容可见。尽管其本身不能与VEGF或FGF-2结合，在该体内测定中，hENG(26-346)-hFc完全阻断GF刺激的血管发生。

[0058] 图40示出了mENG(27-581)-mFc对小鼠中4T1乳房肿瘤异种移植物的生长的影响。数据为平均值±SEM。至植入后24天，与载剂相比，用mENG(27-581)-mFc处理的小鼠中的肿

瘤体积小45%(p<0.05)。

[0059] 图41示出了mENG(27-581)-mFc对小鼠中Colon-26肿瘤异种移植物的影响。mENG(27-581)-mFc处理以剂量依赖方式抑制肿瘤生长,至植入后58天,高剂量组中的肿瘤体积与载剂相比小近70%。

[0060] 图42示出了具有或不具有内皮联蛋白(mENG(27-581)-mFc)处理的肝纤维化小鼠CCl4模型中肝占体重的%。

[0061] 图43示出了模拟注射(PBS)的小鼠中肝组织的H&E染色。

[0062] 图44示出了mENG(27-581)-mFc注射的小鼠中肝组织的H&E染色。

[0063] 图45示出了CCl4诱导的小鼠中肝组织的Masson三色染色。

[0064] 图46示出了以PBS注射或mENG(27-581)-mFc注射的CCl4诱导的小鼠中肝组织的油红O染色。mENG(27-581)-mFc处理的动物具有最低肝百分比和广泛的阳性油红O染色。

[0065] 图47示出了mENG(27-581)-mFc处理或PBS处理的CCl4诱导的或模拟诱导的(橄榄油)小鼠中血清碱性磷酸盐的水平。内皮联蛋白处理的组中血清AP更低。

[0066] 图48示出了在甲硫氨酸和胆碱饮食缺陷引起的肝纤维化模型MCDD小鼠中ENG-Fc处理对肝脂质沉积的影响。与载剂(A,C)相比,mENG(27-581)-mFc处理3周显著降低了MCDD小鼠中的肝脂质沉积(B,D)。脂质沉积通过脂溶性重氮染料油红O强烈染色来鉴定。放大率,100×(A,B)和200×(C,D)。

[0067] 发明详述

[0068] 1.概述

[0069] 在某些方面,本发明涉及ENG多肽。ENG(也称为CD105)是指转化生长因子β(TGF-β)超家族配体的共同受体,并且与正常和病理性纤维化和血管发生相关。ENG表达在静止血管内皮中较低,但是在正愈合的伤口、发育中的胚胎、炎性组织和实体瘤的内皮细胞中上调(Dallas等,2008,Clin Cancer Res 14:1931-1937)。由于血管发育缺陷,无效ENG等位基因的纯合子小鼠在妊娠早期死亡(Li等,1999,Science 284:1534-1537),而无效ENG杂合子小鼠成年后表现出血管发生异常(Jerkic等,2006,Cardiovasc Res 69:845-854)。在人中,已经鉴定ENG基因突变是遗传性出血性毛细血管扩张(奥斯勒-朗迪-韦伯综合征(Osler-Rendu-Weber syndrome))1型(HHT-1)的原因,这是以动静脉畸形为特征的常染色体显性形式的血管发育不良,导致从动脉直接流进(连通)静脉(动静脉短路)而不经过介于中间的毛细血管床(McAllister等,1994,Nat Genet 8:345-351;Fernandez-L等,2006,Clin Med Res 4:66-78)。患有HHT的患者的典型症状包括复发性鼻衄、胃肠出血、皮肤和黏膜皮肤毛细血管扩张,以及肺、大脑或肝血管中的动静脉畸形。

[0070] 尽管ENG在纤维化和血管发生中的具体作用依然有待确定,但是其可能与TGF-β信号传导系统在这个过程中的突出作用相关(Cheifetz等,1992,J Biol Chem 267:19027-19030;Pardali等,2010,Trends Cell Biol 20:556-567)。显著地,ENG的表达在肿瘤组织中的增生性血管内皮细胞中上调(Burrows等,1995,Clin Cancer Res 1:1623-1634;Miller等,1999,Int J Cancer 81:568-572),并且肿瘤中表达ENG的血管的数目与很多种人肿瘤的存活率负相关(Fonsatti等,2010,Cardiovasc Res 86:12-19)。因此,ENG是一般的抗血管发生治疗,并且特别是癌症的有希望的靶标(Dallas等,2008,Clin Cancer Res 14:1931-1937;Bernabeu等,2009,Biochim Biophys Acta 1792:954-973)。

[0071] 在结构上,ENG是同二聚体细胞表面糖蛋白。其属于透明带(ZP)家族的蛋白质,并且由短的C末端胞质域、单个疏水性跨膜结构域和长的胞外域(ECD)组成(Gougos等,1990,J Biol Chem 265:8361-8364)。如通过电子显微术确定的,单体ENG ECD由两个ZP区和位于N末端的孤儿结构域组成(Llorca等,2007,J Mol Biol 365:694-705)。在人中,初级转录物的选择性剪接得到两种ENG同种型,一种由658个残基(长,L,SEQ ID NO:1)组成,另一种由625个残基(短,S,SEQ ID NO:3)组成,它们的差异仅在于其胞质域(Bellon等,1993,23:2340-2345;ten Dijke等,2008,Angiogenesis 11:79-89)。鼠ENG存在三种同种型:L-ENG(SEQ ID NO:5)、S-ENG(SEQ ID NO:7)以及与L-ENG相同只是在前导序列中的两个位置具有变化的未知功能意义的第三种变体(同种型3)(Perez-Gomez等,2005,Oncogene 24:4450-4461)。鼠ENG的ECD与人ENG具有69%的氨基酸同一性,并且缺少见于人蛋白质中的Arg-Gly-Asp(RGD)整合素相互作用基序。最近的证据表明,L-ENG和S-ENG同种型可在体内具有不同的功能作用(Blanco等,2008,Circ Res 103:1383-1392;ten Dijke等,2008,Angiogenesis 11:79-89)。

[0072] 作为共同受体,ENG被认为调节其他受体对TGF-β家族配体的响应,但是其本身不直接介导配体信号传导。TGF-β家族的配体通常与同二聚体II型受体结合来进行信号传导,所述受体触发同二聚体I型受体的募集和转磷酸化,从而导致负责特定基因的转录激活的Smad蛋白的磷酸化(Massague,2000,Nat Rev Mol Cell Biol 1:169-178)。基于异位细胞表达分析,已经报道ENG本身不能结合配体,并且其与TGF-β1、TGF-β3、激活素A、骨形态发生蛋白-2(bone morphogenetic protein-2,BMP-2)和BMP-7的结合需要合适的I型和/或II型受体的存在(Barbara等,1999,J Biol Chem 274:584-594)。然而,有证据表明成纤维细胞系表达的ENG可结合TGF-β1(St.-Jacques等,1994,Endocrinology 134:2645-2657),并且最近在COS细胞中的结果表明,转染的全长ENG可以在不存在经转染的I型或II型受体的情况下结合BMP-9(Scharpfenecker等,2007,J Cell Sci 120:964-972)。

[0073] 除了前述内容外,在某些情况下,在全长膜结合蛋白的蛋白水解切割后ENG可以以可溶形式存在于体内(Hawinkels等,2010,Cancer Res 70:4141-4150)。已经在患有癌症和先兆子痫的患者的循环中观察到了升高的可溶性ENG水平(Li等,2000,Int J Cancer 89:122-126;Calabro等,2003,J Cell Physiol 194:171-175;Venkatesha等,2006,Nat Med 12:642-649;Levine等,2006,N Engl J Med 355:992-1005)。尽管对于内源可溶性ENG的作用知之甚少,但是已经提出对应于ENG前体第26-437位残基(SEQ ID NO:1的第26-437位氨基酸)的蛋白质充当TGF-β家族配体的清道夫(scavenger)或陷阱(trap)(Venkatesha等,2006,Nat Med 12:642-649;WO-2007/143023),其中仅具体地涉及TGF-β1和TGF-β3。

[0074] 本公开内容提供了包含与BMP9和/或BMP10选择性结合的ENG的胞外域的截短部分的多肽,并且可充当BMP9和/或BMP10拮抗剂,提供了相对于全长胞外域有利的特性,并且可用于抑制纤维化。部分地,本公开内容提供了用于可溶性ENG多肽的生理性高亲和配体的鉴定。出人意料地,本文中示出可溶性ENG多肽对BMP-9和BMP-10具有高特异性、高亲和力,而对于TGF-β1、TGF-β2或TGF-β3不表现出任何有意义的结合,另外,本文中示出可溶性ENG多肽抑制BMP-9和BMP-10与II型受体的相互作用,从而抑制细胞信号转导。本公开内容还证明,ENG多肽抑制纤维化。数据还证明,ENG多肽可以发挥抗血管发生效果,尽管发现ENG多肽不表现出与TGF-β1、TGF-β3、VEGF或FGF-2的有意义结合。

[0075] 因此，在某些方面，本公开内容提供了作为BMP-9或BMP-10拮抗剂的内皮联蛋白多肽，其一般地用于抑制任何BMP-9或BMP-10疾病，并且特别地用于抑制纤维化和/或血管发生，包括VEGF依赖性血管发生和VEGF非依赖性血管发生。但是，应注意的是，预期针对ENG本身的抗体与ENG多肽具有不同效果。预期针对ENG的泛中和抗体(pan-neutralizing antibody)(抑制所有强和弱配体的结合的抗体)将抑制这样的配体通过ENG的信号传导，但是预期不抑制这样的配体通过其他受体的信号传导的能力(例如，在BMP-9或BMP-10的情况下的ALK-1、ALK-2、BMPRII、ActRIIA或ActRIIB)。还应注意，考虑到天然的循环可溶性ENG多肽(基于本文中提供的数据，推测其充当天然BMP-9/10拮抗剂)的存在，不清楚中和抗ENG抗体会主要抑制膜结合形式的ENG(因此充当ENG/BMP-9/10拮抗剂)还是可溶性形式的ENG(因此，充当ENG/BMP-9/10激动剂)。另一方面，基于本公开内容，预期ENG多肽抑制与其紧密结合的所有配体(对于构建体如实施例中示出的那些，包括BMP-9或BMP-10)，但是不影响与其弱结合的配体。因此，尽管ENG的泛中和抗体将阻断通过ENG的BMP-9和BMP-10信号传导，其不阻断通过其他受体的BMP-9或BMP-10信号传导。另外，尽管ENG多肽可以抑制通过所有受体(包括ENG以外的受体)的BMP-9信号传导，预期其不抑制通过任何受体(甚至ENG)的弱结合配体的信号传导。

[0076] 本文中所述的蛋白质是人形式的，除非另外说明。蛋白质的Genbank参考如下：人ENG同种型1(L-ENG)，NM_001114753；人ENG同种型2(S-ENG)，NM_000118；鼠ENG同种型1(L-ENG)，NM_007932；鼠ENG同种型2(S-ENG)，NM_001146350；鼠ENG同种型3，NM_001146348。图1至8中给出了人和小鼠的天然ENG蛋白的序列。

[0077] 本说明书中使用的术语一般具有其在本领域中，在本公开内容上下文中和使用每个术语的特定环境下的通常含义。在本文中公开的组合物和方法以及如何制备和使用它们的描述中，本说明书中讨论了某些术语以为从业者提供额外的指导。使用的任何术语的范围或含义将通过使用术语的特定上下文变得明显。

[0078] 2.ENG多肽的治疗方法和用途

[0079] 纤维化和纤维化疾病

[0080] 本公开内容的一些方面基于以下出人意料的发现：ENG多肽可用于抑制和/或治疗纤维化疾病。本公开内容提供了在哺乳动物中抑制纤维化的方法，其通过如下实现：施用有效量的ENG多肽，例如包含与SEQ ID NO:1的第42-333位氨基酸具有至少95％同一性的氨基酸序列的ENG多肽，包括ENG-Fc融合蛋白或前述物质的核酸拮抗剂(例如，反义或SiRNA)。这些ENG多肽、ENG-Fc融合蛋白和核酸拮抗剂在下文中统称为“治疗剂”。

[0081] 在一些实施方案中，本公开内容提供了ENG多肽以及使用这样的多肽的方法，所述多肽可用于治疗、抑制或预防纤维化。本文中使用的术语“纤维化”是指器官或组织中通过细胞的过量纤维结缔组织的异常形成或发展。尽管与纤维化相关的过程可以作为正常组织形成或修复的一部分，但是这些过程的调节异常可以导致改变的细胞组成和过量的结缔组织沉积，其进行性地损害组织或器官功能。纤维组织的形成可以由修复或反应过程引起。

[0082] 可以用本文中提供的ENG多肽以及使用这样的多肽的治疗方法治疗的纤维化疾病或病症，其包括但不限于：与血管疾病(例如心脏病、脑病和周围血管疾病)以及组织和器官系统(包括心脏、皮肤、肾、肺、腹膜、肠和肝)相关的纤维增生性疾病(如例如Wynn，2004，Nat Rev 4:583-594中公开的，其通过引用并入本文)。可以治疗的示例性疾病包括但不限于肾

纤维化，包括与损伤/纤维化相关的肾病，例如与糖尿病相关的慢性肾病(例如，糖尿病肾病)、狼疮、硬皮病、肾小球肾炎、局灶性节段性肾小球硬化和IgA肾病；肺或肺纤维化，例如特发性肺纤维化、辐射诱导的纤维化、慢性阻塞性肺病(COPD)、硬皮病和慢性哮喘；肠纤维化，例如，硬皮病和辐射诱导的肠纤维化；肝纤维化，例如肝硬化、酒精诱导的肝纤维化，胆管损伤，原发性胆汁性肝硬化、感染或病毒诱导的肝纤维化、先天性肝纤维化和自身免疫性肝炎；以及其他纤维化病症，例如囊性纤维化、心内膜心肌纤维化、纵膈纤维化、胸膜纤维化、结节病、硬皮病、脊髓损伤/纤维化、骨髓纤维化、血管再狭窄、动脉粥样硬化、胰和肺的囊性纤维化、注射纤维化(其可以作为肌内注射的并发症发生，尤其是在儿童中)，心内膜心肌纤维化、肺部的特发性肺纤维化、纵膈纤维化、骨髓纤维化、腹膜后纤维化、进行性大块纤维化、煤矿工人尘肺病的并发症和肾源性全身纤维化。

[0083] 本文使用的术语“纤维化障碍”、“纤维化病症”和“纤维化疾病”可互换使用，是指以纤维化为特征的障碍、病症或疾病。纤维化疾病的实例包括但不限于血管纤维化、肺纤维化(例如，特发性肺纤维化)、胰纤维化、肝纤维化(例如，肝硬化)、肾纤维化、肌肉骨骼纤维化、心脏纤维化(例如，心内膜心肌纤维化、特发性心肌病)、皮肤纤维化(例如，硬皮病，创伤后、手术性皮肤疤痕形成，疤痕疙瘩和皮肤疤痕疙瘩形成)、眼纤维化(例如，青光眼、眼的硬化、结膜和角膜疤痕形成以及翼状胬肉)、进行性系统硬化(PSS)、慢性移植物抗宿主病、佩罗尼病、膀胱镜检后的尿道狭窄、特发性和药理学诱导的腹膜后纤维化、纵膈纤维化、进行性大块纤维化、增生性纤维化和肿瘤纤维化。

[0084] 本文使用的术语“细胞”是指易于经历纤维变性应答的任何细胞，包括但不限于个别细胞、组织以及组织和器官内的细胞。本文中使用的术语细胞包括细胞本身以及围绕细胞的细胞外基质(extracellular matrix,ECM)。例如，细胞纤维化应答的抑制包括但不限于抑制以下细胞的纤维化应答：肺(或肺组织)内的一种或更多种细胞、肝(或肝组织)内的一种或更多种细胞、肾(或肾组织)内的一种或更多种细胞、肌肉组织内的一种或更多种细胞、心脏(或心脏组织)内的一种或更多种细胞、胰内的一种或更多种细胞、皮肤内的一种或更多种细胞、骨内的一种或更多种细胞、血管内的一种或更多种细胞、一种或更多种干细胞或者眼内的一种或更多种细胞。

[0085] 本发明的方法和组合物可用于治疗和/或预防纤维化疾病。示例性纤维化疾病类型包括但不限于血管纤维化、肺纤维化(例如，特发性肺纤维化)、胰纤维化、肝纤维化(例如，肝硬化)、肾纤维化、肌肉骨骼纤维化、心脏纤维化(例如，心内膜心肌纤维化、特发性心肌病)、皮肤纤维化(例如，硬皮病，创伤后、手术性皮肤疤痕形成，疤痕疙瘩和皮肤疤痕疙瘩形成)、眼纤维化(例如，青光眼、眼的硬化、结膜和角膜疤痕形成以及翼状胬肉)、进行性系统硬化(PSS)、慢性移植物抗宿主病、佩罗尼病、膀胱镜检后的尿道狭窄、特发性和药理学诱导的腹膜后纤维化、纵膈纤维化、进行性大块纤维化、增生性纤维化、肿瘤纤维化、掌腱膜挛缩症、狭窄和辐射诱导的纤维化。在一个特别实施方案中，纤维化疾病不是骨髓纤维化。

[0086] 本发明方法和组合物可用于治疗和/或预防表现为或导致肝纤维化的肝病，包括非酒精性脂肪肝(non-alcoholic fatty liver disease,NAFLD)、非酒精性脂肪性肝炎(nonalcoholic steatohepatitis,NASH)和可能由长期过量酒精消耗、胆汁阻塞、自身免疫性肝病、铁或铜超载以及慢性病毒性肝炎引起的获得性纤维化疾病。NAFLD由肥胖和2型糖尿病的代谢病症引起。患有NAFLD的患者可表现出多种组织病理学发现，包括单纯脂肪变性

(脂肪肝)到坏死性炎症,其通常称为NASH。NAFLD和NASH患者可发展成更晚期的纤维化状态,包括晚期纤维化和肝硬化。患有NASH的患者有25%-50%经过4至6年的时期发展成进行性纤维化,15%至25%的患有NASH的个体可发展为肝硬化。在美国,NASH肝硬化是肝移植的一个重要原因,并且其与等待肝移植的患者中升高的肝细胞癌风险和死亡率相关。酗酒和病毒感染也可造成肝损伤,其发展成肝纤维化和肝硬化。多种工具可用于评估肝健康和纤维化疾病的发展。肝活检允许评估肝组织的组织学特征,包括组织染色和组织的胶原蛋白的量化,以及在脂肪肝疾病的情况下的脂质水平。NAFLD活性评分(NAFLD Activity Score,NAS)提供了数值评分,并且是脂肪变性(0-3)、肝细胞气球样变(hepatocellular ballooning)(0-2)和小叶炎症(0-3)各自分数的总和,大部分患有NASH的患者具有≥5的NAS评分。参见Kleiner等Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease.Hepatology 41(6),1313-1321(2005)。血清标志物包括肝功能标志物,ALT和AST,以及细胞外基质形成标志物、纤维分解过程标志物、细胞外基质降解标志物以及某些细胞因子。

[0087] 本发明考虑与一种或更多种其他治疗部分组合使用ENG多肽。因此,除了使用ENG多肽外,还可以向对象施用一种或更多种用于治疗纤维化疾病的"标准"治疗。例如,可以与细胞毒素、免疫抑制剂、放射毒性剂和/或治疗性抗体组合(即,一起)施用ENG多肽。本发明考虑的特定共治疗剂包括但不限于:类固醇(例如,皮质类固醇,如泼尼松)、免疫抑制剂和/或抗炎剂(例如,γ-干扰素、环磷酰胺、硫唑嘌呤、氨甲蝶呤、青霉胺、环孢素、秋水仙碱、抗胸腺细胞球蛋白、麦考酚酸酯和羟氯喹)、细胞毒药、钙通道阻滞剂(例如,硝苯地平)、血管紧张素转换酶抑制剂(angiotensin converting enzyme,ACE)抑制剂、对氨基苯甲酸(para-aminobenzoic acid,PABA)、二甲基亚砜、转化生长因子-β(TGF-β)抑制剂、白介素-5(IL-5)抑制剂和泛胱天蛋白酶抑制剂(pan caspase inhibitor)。

[0088] 可用于与ENG多肽组合的另外的抗纤维化剂包括但不限于凝集素(如在例如美国专利No.:7,026,283中描述的,其整个内容通过引用并入本文)以及Wynn等(2007,J Clin Invest 117:524-529,其整个内容通过引用并入本文)中描述的抗纤维化剂。例如,另外的抗纤维化剂和治疗包括但不限于多种抗炎/免疫抑制/细胞毒性药物(包括秋水仙碱、硫唑嘌呤、环磷酰胺、泼尼松、沙利度胺、己酮可可碱和茶碱)、TGF-β信号传导调节剂(包括松弛素、SMAD7、HGF和BMP7,以及TGF-β1、TGFβRI、TGFβRII、EGR-I和CTGF抑制剂)、细胞因子和细胞因子受体拮抗剂(IL-1β、IL-5、IL-6、IL-13、IL-21、IL-4R、IL-13Rα1、GM-CSF、TNF-α、抑癌蛋白M、W1SP-I和PDGF的抑制剂)、细胞因子和趋化因子(IFN-y、IFN-α/β、IL-12、IL-10、HGF、CXCL10和CXCL11)、趋化因子拮抗剂(CXCL1、CXCL2、CXCL12、CCL2、CCL3、CCL6、CCL17和CCL18的抑制剂)、趋化因子受体拮抗剂(CCR2、CCR3、CCR5、CCR7、CXCR2和CXCR4的抑制剂)、TLR拮抗剂(TLR3、TLR4和TLR9的抑制剂)、血管发生拮抗剂(VEGF特异性抗体和腺苷脱氨酶替代治疗)、抗高血压药(ANG 11的β阻滞剂和抑制剂、ACE和醛固酮)、血管活性物质(ET-1受体拮抗剂和波生坦(bosetan))、合成和加工胶原蛋白的酶的抑制剂(脯氨酰羟化酶的抑制剂)、B细胞拮抗剂(利妥昔单抗)、整合素/黏附分子拮抗剂(阻滞α1β1和αvβ6整合素的分子,和整合素连接激酶的抑制剂、以及ICAM-I和VCAM-I的特异性抗体)、靶向肌成纤维细胞的促凋亡药、MMP抑制剂(MMP2、MMP9和MMP12的抑制剂)以及TIMP抑制剂(对TIMP-1特异性的抗体)。

[0089] ENG多肽和共治疗剂或共治疗可以在相同制剂中施用或者分开施用。在分开施用

的情况下,ENG多肽可以在共治疗剂或共治疗之前、之后或与其同时施用。一种药剂可以在另一种药剂施用之前或之后间隔数分钟至数周。在其中两种或更多种不同治疗剂分开向对象施用的一些实施方案中,一般将确保每次递送的时间之间的有意义的时期没有流逝,以使得这些不同种类的药剂依然对靶组织或细胞发挥有利的组合效果。

[0090] 血管发生

[0091] 血管发生是形成新血管的过程,在许多正常和异常生理状态中至关重要。在正常生理状况下,人和动物在特定和限制的情况下经历血管发生。例如,在伤口愈合、胎儿和胚胎发育以及黄体、子宫内膜和胎盘的形成中,通常观察到血管发生。

[0092] 不期望的或不适当调节的血管发生发生在许多疾病中,其中异常内皮生长可能造成或参与病理过程。例如,血管发生参与许多肿瘤的生长。失调的血管发生参与病理过程,例如类风湿性关节炎、视网膜病、血管瘤和银屑病。其中存在不受调节的血管发生的多种病理学疾病状态已被归类为血管发生相关疾病。

[0093] 受控的和不受控的血管发生二者被认为以类似方式发展。毛细血管主要由被基底膜包围的内皮细胞和周细胞构成。血管发生以内皮细胞和白细胞释放的酶侵蚀基底膜开始。然后内皮细胞(其内衬于血管腔)穿过基底膜突出。血管发生因子诱导内皮细胞通过被侵蚀的基底膜迁移。迁移的细胞形成从母体血管突出的"芽",其中内皮细胞发生有丝分裂和增殖。内皮细胞芽彼此融合以形成毛细血管袢,产生新血管。

[0094] 已经证明抑制血管发生的药剂在治疗多种疾病中有效。Avastin™(贝伐珠单抗)是与血管内皮生长因子(VEGF)结合的单克隆抗体,被用于治疗多种癌症。已经证明与VEGF结合的适配体Macugen™在治疗新生血管性(湿)年龄相关黄斑变性中有效。SDF/CXCR4信号传导途径的拮抗剂抑制肿瘤新血管形成并且在对抗小鼠模型的癌症中有效(Guleng等Cancer Res.2005Jul 1;65(13):5864-71)。多种所谓的多靶向酪氨酸激酶抑制剂(包括凡德他尼(vandetanib)、舒尼替尼(sunitinib)、阿西替尼(axitinib)、索拉菲尼(sorafenib)、瓦他拉尼(vatalanib)和帕唑帕尼(pazopanib))在多种肿瘤类型的治疗中被用作抗血管发生剂。沙利度胺和相关化合物(包括泊马度胺(pomalidomide)和来那度胺(lenalidomide))已经在癌症治疗中表现出益处,并且尽管作用的分子机制不清楚,但是血管发生的抑制似乎是抗肿瘤效果的重要方面(参见,例如,Dredge等.Microvasc Res.2005Jan;69(1-2):56-63)。尽管许多抗血管发生剂对血管发生具有效果而不论受影响的组织,但是另一些血管发生剂可倾向于具有组织选择性效果。

[0095] 本公开内容提供了用于治疗或预防异常调节的血管发生病症(包括肿瘤和非肿瘤疾病二者)的方法和组合物。还提供了用于治疗或预防某些心血管疾病的方法和组合物。此外,本公开内容提供了用于治疗BMP9和/或BMP10活性相关疾病的方法。

[0096] 本公开内容提供了通过向对象施用有效量的ENG多肽,包括前述的ENG-Fc融合蛋白或核酸拮抗剂(例如,反义或siRNA)(在下文中统称为"治疗剂")来在哺乳动物中抑制血管发生的方法。展示的数据特别表明,本文中公开的抗血管发生治疗剂可用于抑制肿瘤相关的血管发生。预期这些治疗剂也可用于抑制眼中的血管发生。

[0097] 血管发生相关疾病包括但不限于血管依赖性癌症,包括例如实体瘤、血源性肿瘤(如白血病)和肿瘤转移;良性肿瘤,例如血管瘤、听神经瘤、纤维神经瘤、沙眼和化脓性肉芽肿;类风湿性关节炎;银屑病;虹膜红变(rubeosis);奥斯勒-韦伯综合征(Osler-Webber

Syndrome)；心肌血管发生；斑块新血管形成；毛细血管扩张；血友病关节(hemophiliac joint)；和血管纤维瘤。

[0098] 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)，并且特别是已知依赖于血管发生过程来支持生长的癌症。不同于大部分抗血管发生剂，ENG多肽影响多种因子诱导的血管发生。这在癌症中是高度相关的，其中癌症将频繁获取支持肿瘤血管发生的多种因子。因此，本文中公开的治疗剂在治疗抵抗靶向单一血管发生因子的药物(例如，贝伐珠单抗，其靶向VEGF)治疗的肿瘤中特别有效，并且在与通过不同机制作用的其他抗血管发生化合物组合时也特别有效。

[0099] 血管发生的异常调节可能导致许多可以用本发明的组合物和方法治疗的疾病。这些疾病包括肿瘤性和非肿瘤病症。术语“癌症”和“癌性”是指或描述哺乳动物中通常以不受调节的细胞生长/增殖为特征的生理学状况。癌症或肿瘤疾病的实例包括但不限于：癌、淋巴瘤、母细胞瘤、肉瘤和白血病。这样的癌症的更具体地实例包括鳞状细胞癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺腺癌、肺鳞状细胞癌、腹膜癌、肝细胞癌、胃肠癌、胰腺癌、成胶质细胞瘤、宫颈癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、肝细胞肿瘤、乳腺癌、结肠癌、结肠直肠癌、子宫内膜癌或子宫癌、唾液腺癌、肾癌、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、肝癌、胃癌、黑素瘤和多种类型的头颈癌，包括鳞状细胞头颈癌。肿瘤疾病和相关病症的其他实例包括食管癌、泡膜细胞瘤(thecomas)、男性细胞癌瘤(arrhenoblastoma)、子宫内膜增生、子宫内膜异位、纤维肉瘤、绒毛膜癌、鼻咽癌、喉癌、肝母细胞瘤、卡波西肉瘤(Kaposi‘s sarcoma)、皮肤癌、血管瘤、海绵状血管瘤、成血管细胞瘤、视网膜母细胞瘤、星形细胞瘤、胶质母细胞瘤、施万细胞瘤(Schwannoma)、少突神经胶质瘤、成神经管细胞瘤、成神经细胞瘤、横纹肌肉瘤、骨肉瘤、平滑肌肉瘤、尿道癌、肾母细胞瘤(Wilm,s tumor)、肾细胞癌、前列腺癌、斑痣性错构瘤病相关的异常血管增生以及梅格斯综合征(Meigs‘syndrome)。特别可用本文中所述治疗剂治疗的癌症可以由以下一种或更多种表征：所述癌症具有血管发生活性，可在肿瘤或血清中检出的提高的ENG水平，提高的BMP-9或BMP-10表达水平或生物活性，是转移性的或具有变成转移性的风险，或者其任意组合。

[0100] 能够用可用于本发明的ENG多肽治疗的具有异常调节的血管发生的非肿瘤疾病包括但不限于：不期望的或异常的肥大、关节炎、类风湿性关节炎、银屑病、银屑病斑块、结节病、动脉粥样硬化、动脉粥样硬化斑块、糖尿病和其他增生性视网膜病(包括早产儿的视网膜病)、晶状体后纤维增生、新生血管性青光眼、年龄相关性黄斑变性、糖尿病性黄斑水肿、角膜新血管形成、角膜移植新血管形成、角膜移植排斥、视黄醛/脉络膜新血管形成、角新血管形成(虹膜红变)、眼睛新血管病、血管再狭窄、动静脉畸形(arteriovenous malformation,AVM)、脑膜瘤、血管瘤、血管纤维瘤、甲状腺增生(包括格雷夫斯病(Grave′s disease))、角膜和其他组织移植、慢性炎症、肺炎症、急性肺损伤/ARDS、脓毒症、原发性肺动脉高血压、恶性肺渗出(malignant pulmonary effusion)、脑水肿(例如，与急性卒中/封闭性头部损伤/创伤相关)、滑液炎症、RA中的血管翳形成、骨化性肌炎、肥厚性骨形成、骨关节炎、难治性腹水、多囊性卵巢病、子宫内膜易位、流体第三间隙病(3rd spacing of fluid diseases)(胰腺炎、腔室综合征、烧伤、肠病)、子宫纤维瘤、早产、慢性炎症(例如IBD(克罗恩病(Crohn′s disease)和溃疡性结肠炎))、肾同种异体移植排斥、炎性肠病、肾病综合征、不期望的或异常的组织块生长(非癌症)、血友病关节、增生性疤痕、毛发生长抑制、奥斯勒-

韦伯综合征、化脓性肉芽肿、晶状体后纤维增生、硬皮病、沙眼、血管黏连、滑膜炎、皮炎、先兆子痫、腹水、心包积液(例如与心包炎相关的那些)和胸腔积液。这样的疾病的其他实例包括上皮或心脏疾病。

[0101] 在此类方法的某些实施方案中,可以一起(同时)或在不同时间(先后)施用一种或更多种多肽治疗剂。另外,多肽治疗剂可以与用于治疗癌症或用于抑制血管发生的其他类型的化合物一起施用。

[0102] 在某些实施方案中,本公开内容的本发明方法可以单独使用。或者,本发明方法可以与旨在治疗或预防增生性疾病(例如,肿瘤)的其他常规抗癌治疗方法组合使用。例如,这样的方法可用于预防性癌症预防、在手术后预防癌症复发和转移以及作为其他常规癌症治疗的辅助。本公开内容承认,可以通过使用本发明多肽治疗剂增强常规癌症治疗(例如,化学治疗、放射治疗、光治疗、免疫治疗和手术)的效力。

[0103] 已经发现很多种常规化合物具有抗肿瘤活性。这些化合物已用作化学治疗中的治疗剂以使实体瘤收缩,预防转移和进一步生长,或者降低白血病或骨髓恶性肿瘤中恶性细胞的数目。尽管化学治疗在治疗多种恶性肿瘤中有效,但是许多抗肿瘤化合物诱导不期望的副作用。已经示出当两种或更多种不同治疗组合时,治疗可能协同作用并且使得能够降低每一种治疗的剂量,从而降低每种化合物在较高剂量时所表现的不利副作用。在另一些情况下,对于治疗来说难治性的恶性肿瘤可能响应于两种或更多种不同治疗的联合治疗。

[0104] 当本文中公开的治疗剂与其他常规抗肿瘤剂组合(同时或先后)施用时,这样的治疗剂可增强抗肿瘤剂的治疗效果或者克服对这样的抗肿瘤剂的细胞抗性。这允许降低抗肿瘤剂的剂量,从而降低不期望的副作用,或者恢复抗肿瘤剂在抗性细胞中的效力。

[0105] 根据本公开内容,本文中所述的抗血管发生剂可与其他用于治疗疾病的组合物和方法组合使用。例如,可以常规地利用与ENG多肽组合的手术、放射治疗或化学治疗治疗肿瘤,随后可以向患者施用ENG多肽以延长微转移的休眠并且稳定任何残余的原发性肿瘤。

[0106] 许多抗血管发生剂已被鉴定并且是本领域中已知的,包括本文中列出的那些,例如Carmeliet和Jain,Nature 407:249-257(2000);Ferrara等.,Nature Reviews:Drug Discovery,3:391-400(2004);和Sato Int.J.Clin.Oncol,8:200-206(2003)中列出的那些。还参见美国专利申请US20030055006。在一个实施方案中,ENG多肽与以下组合使用:抗VEGF中和抗体(或片段)和/或其他VEGF拮抗剂或VEGF受体拮抗剂,包括但不限于例如可溶性VEGF受体(例如,VEGFR-I、VEGFR-2、VEGFR-3、神经毡蛋白(neuropillin)(例如,NRP1、NRP2))片段、能够阻断VEGF或VEGFR的适配体、中和抗VEGFR抗体、VEGFR酪氨酸激酶(RTK)的低分子量抑制剂、用于VEGF的反义策略、针对VEGF或VEGF受体的核酶、vEGF的拮抗剂变体;及其任意组合。作为替代或补充,除了VEGF拮抗剂和其他药剂外,可任选地向患者共施用两种或更多种血管发生抑制剂。在某一实施方案中,一种或更多种另外的治疗剂(例如抗癌剂)可以与ENG多肽、VEGF拮抗剂和抗血管发生剂组合施用。

[0107] 术语“VEGF”和“VEGF-A”可互换使用,是指165个氨基酸的血管内皮细胞生长因子,以及相关的121、145、183、189和206个氨基酸的血管内皮细胞生长因子,如Leung等Science,246:1306(1989),Houck等.Mol Endocrinol,5:1806(1991),和Robinson&Stringer,J Cell Sci,144(5):853-865(2001)中描述的那些,以及其天然存在的等位基因和加工形式。

[0108] “VEGF拮抗剂”是指能够中和、阻滞、抑制、消除、降低或干扰VEGF的活性(包括其与一种或更多种VEGF受体的结合)的分子。VEGF拮抗剂包括抗VEGF抗体及其抗原结合片段,与VEGF特异性结合的受体分子和衍生物,其与VEGF特异性结合从而隔绝VEGF与一种或更多种受体、抗VEGF受体抗体和VEGF受体拮抗剂结合,例如VEGFR酪氨酸激酶的小分子抑制剂,以及融合蛋白,例如VEGF-Trap(Regeneron)、VEGF121-多花白树毒蛋白(VEGF121-gelonin)(Peregrine)。VEGF拮抗剂还包括VEGF的拮抗剂变体、针对VEGF的反义分子、RNA适配体以及针对VEGF或VEGF受体的核酶。

[0109] “抗VEGF抗体”是以充分的亲和力和特异性与VEGF结合的抗体。抗VEGF抗体可用作靶向和干扰其中涉及VEGF活性的疾病或病症的治疗剂。参见,例如,美国专利6,582,959、6,703,020;WO98/45332;WO 96/30046;WO94/10202、WO2005/044853;EP 0666868B1;美国专利申请20030206899、20030190317、20030203409、20050112126、20050186208和20050112126;Popkov等,Journal of Immunological Methods 288:149-164(2004);以及WO2005012359。抗VEGF抗体通常不与其他VEGF同系物如VEGF-B或VEGF-C结合,也不与其他生长因子如PlGF、PDGF或bFGF结合。抗vEGF抗体“贝伐珠单抗(Bv)”也称为“rhuMAb VEGF”或**“Avastin®”**,是根据Presta等Cancer Res.57:4593-4599(1997)产生的重组人源化抗VEGF单克隆抗体。其包含突变的人IgG1框架区和阻断人VEGF与其受体结合的来自鼠抗hVEGF单克隆抗体A.4.6.1的抗原结合互补决定区。贝伐珠单抗的氨基酸序列的约93%(包括大部分框架区)来自于人IgG1,所述序列的约7%来自于鼠抗体A4.6.1。贝伐珠单抗的分子质量为约149,000道尔顿,并且是糖基化的。贝伐珠单抗和其他人源化抗VEGF抗体(包括抗VEGF抗体片段“兰尼单抗”(也称为**"Lucentis®"**))进一步描述于2005年2月26日提交的美国专利No.6,884,879中。

[0110] 术语“抗肿瘤组合物”是指可用于治疗癌症的组合物,其包含至少一种活性治疗剂,例如“抗癌剂”。治疗剂(“抗癌剂”,在本文中也称为“抗肿瘤剂”)的实例包括但不限于例如化学治疗剂、生长抑制剂、细胞毒剂、用于放射治疗的药剂、抗血管发生剂、凋亡剂、抗微管蛋白剂、毒素以及其他治疗癌症的药剂,例如抗VEGF中和抗体,VEGF拮抗剂、抗HER-2、抗CD20、表皮生长因子受体(EGFR)拮抗剂(例如,酪氨酸激酶抑制剂)、HER1/EGFR抑制剂、埃罗替尼、COX-2抑制剂(例如,塞来昔布)、干扰素、细胞因子,与ErbB2、ErbB3、ErbB4或VEGF受体中的一种或更多种结合的拮抗剂(例如,中和抗体),血小板源性生长因子(PDGF)和/或干细胞因子(SCF)的受体酪氨酸激酶抑制剂(例如,甲磺酸伊马替尼(**Gleevec** ®Novartis))、TRAIL/Apo2L以及其他生物活性和有机化学试剂等。

[0111] “血管发生因子或血管发生剂”是刺激血管发育(例如促进血管发生、内皮细胞生长、使血管稳定和/或血管发生等)的生长因子。例如,血管发生因子包括但不限于例如VEGF以及VEGF家族的成员、PIGF、PDGF家族、成纤维细胞生长因子家族(FGF)、TIE配体(血管生成素)、肝配蛋白(ephrin)、ANGPTL3、ALK-1等。还包括加速伤口愈合的因子,例如生长激素、胰岛素样生长因子-I(IGF-I)、VIGF、表皮生长因子(EGF)、CTGF以及其家族的成员,以及TGF-α和TGF-β。参见例如Klagsbrun和D′Amore,Annu.Rev.Physiol,53:217-39(1991);Streit和Detmar,Oncogene,22:3172-3179(2003);Ferrara&Alitalo,Nature Medicine 5(12):1359-1364(1999);Tonini等,Oncogene,22:6549-6556(2003)(例如,表1所列血管发生因子);以及Sato Int.J.Clin.Oncol.,8:200-206(2003)。

[0112] “抗血管发生剂”或“血管发生抑制剂”是指直接或间接地抑制血管发生、血管生成或不期望的血管渗透性的小分量子物质、多核苷酸(包括例如抑制性RNA(RNAi或siRNA))、多肽、分离的蛋白质、重组蛋白质、抗体或者其缀合物或融合蛋白。例如,抗血管发生剂是上文中定义的血管发生剂的抗体或其他拮抗剂,例如VEGF的抗体、VEGF受体的抗体、阻断VEGF受体信号传导的小分子(例如,PTK787/ZK2284、SU6668、SUTENT®/SU11248(苹果酸舒尼替尼)、AMG706或者例如国际专利申请WO 2004/113304中描述的那些)。抗血管发生剂还包括天然血管发生抑制剂,例如血管稳定因子、内皮抑素等。参见,例如,Klagsbrun和D′Amore,Annu.Rev.Physiol,53:217-39(1991);Streit和Detmar,Oncogene,22:3172-3179(2003)(例如表3所列的在恶性黑色素瘤中的抗血管发生治疗);Ferrara&Alitalo,Nat Med 5(12):1359-1364(1999);Tonini等,Oncogene,22:6549-6556(2003)(例如表2所列的血管发生因子);以及Sato Int.J.Clin.Oncol,8:200-206(2003)(例如,参见表1所述列用于临床试验的抗血管发生剂)。

[0113] 在本发明的某些方面,可用于与ENG多肽的组合肿瘤治疗的其他治疗剂包括其他癌症治疗,例如外科手术、细胞毒剂、涉及辐射或施用放射性物质的放射治疗、化学治疗剂、抗激素剂、生长抑制剂、抗肿瘤组合物、以及利用本文中所列和本领域中已知的抗癌剂的治疗,或其组合。

[0114] 本文中使用的术语“细胞毒剂”是指抑制或阻止细胞的功能和/或引起细胞破坏的物质。该术语旨在包括放射性同位素(例如,At^{211}、I^{131}、I^{125}、Y^{90}、Re^{186}、Re^{188}、Sm^{153}、Bi^{212}、P^{32}以及Lu的放射性同位素)、化学治疗剂,例如甲氨蝶呤、多柔比星、长春碱类(长春新碱、长春碱、依托泊苷)、多柔比星、美法仑、丝裂霉素C、苯丁酸氮芥、道诺霉素或其他嵌入剂、酶及其片段(例如溶核酶(nucleolytic enzyme))、抗生素和毒素,例如小分子毒素或者细菌、真菌、植物或动物来源的酶促活性毒素(包括其片段和/或变体),以及下文中公开的多种抗肿瘤或抗癌剂。下文中描述了另一些细胞毒剂。杀肿瘤剂造成肿瘤细胞的破坏。

[0115] “化学治疗剂”是可用于癌症治疗的化合物。化学治疗剂的实例包括烷化剂,例如塞替派和CYTOXAN®环磷酰胺;烷基磺酸酯类,例如白消安、英丙舒凡(improsulfan)和哌泊舒凡(piposulfan);氮丙啶类,例如苯佐替哌(benzodopa)、卡波醌、美妥替哌(meturedopa)和乌瑞替哌(uredopa);乙撑亚胺类和甲蜜胺类(methylamelamine),包括六甲蜜胺、三亚乙基蜜胺、三亚乙基磷酰胺、三亚乙基硫代磷酰胺和三羟甲蜜胺(trimethylolomelamine);多聚乙酰类(尤其是布拉他辛(bullatacin)和布拉他辛酮(bullatacinone));δ-9-四氢大麻酚(屈大麻酚、MARINOL®);β-拉帕醌;拉帕醇;秋水仙碱;桦木酸;喜树碱(包括合成类似物拓扑替康(HYCAMTIN®))、CPT-11(伊立替康,CAMPTOSAR®)、乙酰基喜树碱、东莨菪素(scopolectin)和9-氨基喜树碱;苔藓虫素(bryostatin);callystatin;CC-1065(包括其阿多来新、卡折来新和比折来新合成类似物);足叶草毒素;足叶草酸;替尼泊苷;隐藻素(cryptophycin)(特别是隐藻素1和隐藻素8);尾海兔素(dolastatin);duocarmycin(包括合成类似物、KW-2189和CBI-TMI);艾榴素(eleutherobin);水鬼蕉碱(pancratistatin);asarcodictyin;海绵素(spongistatin);氮芥,例如苯丁酸氮芥、萘氮芥、氯磷酰胺(cholophosphamide)、雌莫司汀、异环磷酰氨、双氯乙基甲胺、盐酸氧化双氯乙基甲胺、美法仑、新氮芥(novembichin)、苯芥胆甾醇(phenesterine)、泼尼莫司汀、曲洛磷胺、尿嘧啶氮芥;亚硝基脲类,例如卡莫司汀、氯脲霉

素、佛莫司汀(fotemustine)、洛莫司汀、尼莫司汀和雷莫司汀;抗生素,例如烯二炔类抗生素(例如,卡奇霉素,尤其是卡奇霉素γII和卡奇霉素ωII)(参见,例如Agnew,Chem Intl.Ed.Engl.,33:183-186(1994));达内霉素,包括达内霉素A;埃斯波霉素(esperamicin);以及新制癌菌素发色团和相关色蛋白烯二炔类抗生素发色团)、阿拉克霉素、放线菌素、authramycin、重氮丝氨酸、博来霉素、放线菌素C、carabicin、洋红霉素、嗜癌素、chromomycini、更生霉素、道诺霉素、地托比星、6-重氮-5-氧代-L-正亮氨酸、**ADRIAMYCIN®**多柔比星(包括吗啉代-多柔比星、氰基吗啉代-多柔比星、2-吡咯啉并-多柔比星和脱氧多柔比星)、表柔比星、依索比星、伊达比星、麻西罗霉素、丝裂霉素(例如丝裂霉素C)、霉酚酸、诺加霉素、橄榄霉素、培洛霉素、potffromycin、嘌呤霉素、quelamycin、罗多比星、链黑霉素、链脲菌素、杀结核菌素、乌苯美司、净司他丁、佐柔比星;抗代谢物类,例如氨甲嘌呤和5-氟尿嘧啶(5-FU);叶酸类似物,例如二甲叶酸、氨甲嘌呤、蝶并蝶呤(pteropterin)、三甲曲沙;嘌呤类似物,例如氟达拉滨、6-巯基嘌呤、硫咪嘌呤、硫鸟嘌呤;嘧啶类似物,例如安西他滨、阿扎胞苷、6-氮杂尿苷、卡莫氟、阿糖胞苷、双脱氧尿苷、脱氧氟脲苷、依诺他宾、氟脲苷;雄激素类,例如卡普睾酮、屈他雄酮丙酸酯、环硫雄醇、美雄烷、睾内酯;抗肾上腺剂(anti-adrenal),例如氨鲁米特、米托坦、曲洛司坦;叶酸补充液,例如亚叶酸;醋葡醛内酯;醋磷酰胺糖苷;氨基酮戊酸;eniluracil;安丫啶;百垂布昔(bestrabucil);比生群;依达曲沙(edatraxate);defofamine;秋水仙胺;地吖醌;elfornithine;伊利醋胺;埃博霉素;依托格鲁;硝酸镓;羟基脲;香菇多糖;氯尼达明;美登素类化合物,例如美登素和安丝菌素;米托胍腙;米托蒽醌;莫哌达醇;nitraerine;喷司他丁;苯来美特;吡柔比星;洛索蒽醌;2-乙基酰肼;丙卡巴肼;**PSK®**多糖复合物(JHS天然产品,Eugene,OR);雷佐生;利索新(rhizoxin);sizofiran;spirogermanium;细交链孢菌酮酸(tenuazonic acid);三亚胺醌;2,2′,2″-三氯三乙胺;单端孢菌毒素(trichothecene)(尤其是T-2毒素、verracurin A、胞杆菌素A和蛇形菌素);urethan;vindesine(**ELDISINE®、FILDESIN®**);达卡巴嗪;甘露莫司汀;二溴甘露醇;二溴卫矛醇;哌酰溴烷;gacytosine;阿拉伯糖苷(“Ara-C”);噻替派;紫杉烷类,例如**TAXOL®**紫杉醇(Bristol-Myers Squibb Oncology,Princeton,N.J.)、ABRAXANE™紫杉醇的不含氢化蓖麻油的白蛋白工程化纳米颗粒制剂(American Pharmaceutical Partners,Schaumberg,Illinois)和**TAXOTERE®**多西他赛(Rhóne-Poulenc Rorer,Antony,France);苯丁酸氮芥;吉西他滨(**GEMZAR®**);6-硫鸟嘌呤;巯基嘌呤;氨甲蝶岭;铂类似物,例如顺铂和卡铂;长春碱(**VELBAN®**);铂类;依托泊苷(VP-16);异环磷酰胺;米托蒽醌;长春新碱(**ONCOVIN®**);奥沙利铂;亚叶酸钙(leucovovin);长春瑞滨(**NAVELBINE®**);米托蒽醌;依达曲沙;道诺霉素;氨基蝶呤;伊班膦盐酸;拓朴异构酶抑制剂RFS 2000;二氟甲基鸟氨酸(DMFO);类维生素A,例如视黄酸;卡培他滨(**XELODA®**);前述任意物质的可药用盐、酸或衍生物,以及前述两种或更多种的组合,例如CHOP,环磷酰胺、多柔比星、长春新碱和泼尼松龙的联合治疗的缩写,以及FOLFOX,利用与5-FU和亚叶酸钙(leucovovin)组合的奥沙利铂(ELOXATIN™)的治疗方案的缩写。

[0116] 该定义还包括抗激素剂,其用于调节、降低、阻断或抑制可促进癌症生长的激素的

作用，并且通常为系统性或全身性治疗的形式。其可以是激素本身。实例包括抗雌激素和选择性雌激素受体调节剂(selective estrogen receptor modulator，SERM)，包括例如他莫昔芬(包括NOLVADEX®他莫昔芬)、EVISTA®雷洛昔芬、屈洛昔芬、4-羟基他莫昔芬、曲沃昔芬、keoxifene、LYI 17018、奥那司酮和FARESTON®托瑞米芬；抗黄体酮；雌激素受体下调剂(estrogen receptor down-regulator，ERD)；功能为抑制或停止卵巢的药剂，例如黄体化激素释放激素(leutinizing hormone-releasing hormone，LHRH)激动剂，例如LUPRON®和ELIGARD®醋酸亮丙瑞林、醋酸戈舍瑞林、醋酸布舍瑞林和曲普瑞林(tripterelin)；其他抗雄性激素例如氟他胺、尼鲁米特和比卡鲁胺；以及抑制调节肾上腺中的雌激素产生的芳香化酶的芳香化酶抑制剂，例如4(5)-咪唑、氨鲁米特、MEGASE®醋酸甲地孕酮、AROMASIN®依西美坦、福美司坦、法倔唑、RIVISOR®伏氯唑、FEMARA®来曲唑和ARIMIDEX®阿那曲唑。此外，化学治疗剂这种定义包括二磷酸盐，例如氯膦酸(例如，BONEFOS®或OSTAC®)、DIDROC AL®依替膦酸盐、NE-58095、ZOMET A®唑来膦酸/唑来膦酸盐、FOSAMAX®阿仑膦酸盐、AREDIA®帕米磷酸盐、SKELID®替鲁磷酸盐、或ACTONEL®利塞磷酸盐；以及曲沙他滨(1，3-二氧戊环核苷胞嘧啶类似物)；反义寡核苷酸，特别是抑制参与在异常细胞增殖的信号传导通路中的基因表达的那些，例如PKC-α、Raf、H-Ras和表皮生长因子受体(EGF-R)；疫苗，例如THERATOPE®疫苗和基因治疗疫苗，例如ALLOVECTIN®疫苗、LEUVECTIN®疫苗和VAXID®疫苗；LURTOTECAN®拓朴异构酶1抑制剂；ABARELIX®rmRH；二甲苯磺酸拉帕替尼(ErbB-2和EGFR双重酪氨酸激酶小分子抑制剂，也称为GW572016)；以及前述任意物质的可药用盐、酸或衍生物。

[0117] “生长抑制剂”在本文中使用时是指抑制体外或体内细胞生长的化合物或组合物。因此，生长抑制剂可以是显著降低细胞S期百分比的药剂。生长抑制剂的实例包括(在S期以外的地方)阻滞细胞周期进展的药剂，例如诱导G1阻滞和M期阻滞的药剂。经典M期阻滞剂包括长春花碱类(长春新碱和长春碱)、紫杉烷类和拓朴异构酶II抑制剂，例如多柔比星、表柔比星、道诺霉素、依托泊苷和博来霉素。阻滞G1的那些还导致S期阻滞，例如DNA烷化剂，如他莫昔芬、泼尼松、达卡巴嗪、氮芥、顺铂、氨甲蝶岭、5-氟尿嘧啶和ara-C。其他信息可以在以下找到：The Molecular Basis of Cancer，Mendelsohn and Israel，eds.，Chapter 1，标题为"Cell cycle regulation，oncogenes，and antineoplastic drugs"by Murakami等.(WB Saunders:Philadelphia，1995)，尤其是第13页。紫杉烷类(紫杉醇和多西他赛)均是来自于紫杉(yew tree)的抗癌药。多西他赛(TAXOTERE®，Rhone-Poulenc Rorer)来自于欧洲紫杉，是紫杉醇(TAXOL®，Bristol-Myers Squibb)的半合成类似物。紫杉醇和多西他赛有利于由微管蛋白二聚体组装微管并且通过阻止解聚使微管稳定，其导致细胞有丝分裂的抑制。

[0118] 血管发生抑制剂也可以预防性地给予已知具有出现新的或复发癌症的高风险的个体。因此，本公开内容的一个方面包括用于预防性预防对象中癌症的方法，包括向对象施用有效量的ENG多肽和/或其衍生物，或者本公开内容的其他血管发生抑制剂。

[0119] 某些正常生理过程也涉及血管发生，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量或异常内皮细胞刺激的疾病。这些疾病包括但不限于肠黏连、动脉粥样硬化、硬皮病和增生性疤痕(即，疤痕疙瘩)。其还可用于治疗具有血管发生作为病理性结果的疾病，猫抓病(Rochele minalia quintosa)和溃疡(幽门螺杆菌(Helicobacter pylori))。

[0120] 一般的血管发生抑制蛋白可通过降低或阻止胚胎着床所需的子宫血管化作为避孕药。因此，当向女性施用足以抑制胚胎着床的量的抑制蛋白时，本公开内容提供了有效的避孕方法。在避孕方法的一个方面，在性交和受精发生之前或之后施用足以阻止胚胎着床的量的抑制蛋白，从而提供有效的避孕方法，可能作为“翌晨(morning after)”方法。尽管不希望受到本声明的约束，但是认为子宫内膜血管化的抑制干扰胚泡着床。输卵管黏膜的类似血管化抑制干扰胚泡着床，阻止输卵管妊娠的发生。施用方法可包括但不限于丸粒、注射(静脉内、皮下、肌内)、栓剂、阴道海绵、阴道塞和宫内节育器(intrauterine device)。还认为本公开内容的血管发生抑制剂的施用将干扰胎盘的正常的增强血管化，以及干扰成功着床的胚泡和发育的胚胎和胎儿的血管发育。

[0121] 在眼睛中，血管发生与例如糖尿病性视网膜病、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组织增生相关。本文中公开的治疗剂可以在眼内施用或者通过其他局部施用向眼睛施用。与眼睛中的血管发生相关的其他疾病包括但不限于流行性角膜结膜炎、维生素A缺乏、隐形眼镜(contact lens)过度磨损、异位角膜炎、上缘角膜炎、翼状胬肉、干燥性角膜炎、舍格伦病(sjogrens)、玫瑰痤疮、phylectenulosis、梅毒、分枝杆菌感染、脂质变性(lipid degeneration)、化学烧伤、细菌性溃疡、真菌性溃疡、单纯性疱疹感染、带状疱疹感染、原生动物感染、卡波西肉瘤、蚕食性角膜溃疡(Mooren ulcer)、Terrien边缘变性、边缘角质层分离、类风湿性关节炎、系统性狼疮、多动脉炎、创伤、韦格纳结节病(Wegeners sarcoidosis)、巩膜炎、史-约病(Steven′s Johnson disease)、放射状角膜切开术、角膜移植排斥、镰状细胞贫血、肉状瘤、弹性假黄瘤、佩吉特病(Pagets disease)、静脉闭塞、动脉闭塞、颈动脉阻塞性疾病、慢性葡萄膜炎/玻璃体炎、分枝杆菌感染、莱姆病(Lyme disease)、系统性红斑狼疮、早产儿视网膜病、视网膜静脉周围炎(Eales disease)、贝赛特症(Bechets disease)、造成视网膜炎或脉络膜炎的感染、推测的眼睛组织浆菌病、卵黄状黄斑变性(Bests disease)、近视、眼睛凹点(optic pits)、眼底黄色斑点症(Stargarts disease)、睫状体扁平部炎(pars planitis)、慢性视网膜脱落、高黏滞综合征、弓形虫病、创伤和激光后并发症。其他疾病包括但不限于与虹膜发红(角新血管形成)相关的疾病以及由维管组织或纤维组织的异常增殖造成的疾病，包括所有形式的增殖性玻璃体视网膜病。

[0122] 眼部病症可以通过例如全身、局部、眼内注射治疗剂，或通过插入释放治疗剂的持续释放装置来治疗或预防。治疗剂可以在可药用眼用载剂中递送，以使得化合物保持与眼表面接触足够的时间段，使得化合物能够渗透眼的角膜和内部区域，如前房、后房、玻璃体、水状液、玻璃体液、角膜、虹膜/睫状体、晶状体、脉络膜/视网膜和巩膜。可药用眼用载剂可以是例如软膏、植物油或封装材料。或者，本公开内容的治疗剂可以直接注射到玻璃体和房水中。又或者，对于眼睛的治疗，化合物可以全身性施用，例如通过静脉内输注或注射施用。

[0123] 可以施用一种或更多种治疗剂。本公开内容的方法还包括与用于治疗眼部病症的

其他药物共施用。当施用超过一种药剂或者药剂和药物的组合时，施用在时间上可以是同时进行或者先后进行。治疗剂和/或药物可以通过不同的施用途径或者通过相同的施用途径施用。在一个实施方案中，治疗剂和药物在一个眼用药物制剂中一起施用。

[0124] 在一个实施方案中，治疗剂用于通过与用于借助药理学机制阻断血管发生的其他药物同时施用来治疗与眼中的血管发生相关的疾病。可以与本公开内容的治疗剂同时施用的药物包括但不限于：哌加他尼(pegaptanib)(Macugen™)、兰尼单抗(Lucentis™)、乳酸角鲨胺(Evizon™)、肝素酶和糖皮质激素(例如，曲安西龙)。在一个实施方案中，提供了通过施用包含至少一种本文中公开的治疗剂和至少一种以下药物的眼用药物制剂治疗与血管发生相关的疾病的方法：哌加他尼(Macugen™)、兰尼单抗(Lucentis™)、乳酸角鲨胺(Evizon™)、肝素酶和糖皮质激素(例如，曲安西龙)。

[0125] 其他疾病或障碍

[0126] 在一些实施方案中，ENG多肽可用于治疗患有心血管疾病或病症的患者，所述心血管疾病或病症与BMP-9或BMP-10相关，但是未必伴随血管发生。这种示例性的疾病包括但不限于心脏病(包括心肌病、心肌梗死、心绞痛和心脏瓣膜病)；肾病(包括慢性肾小球炎症、糖尿病性肾衰竭和狼疮相关的肾炎症)；血压障碍(包括全身性类型和肺部类型)；与动脉粥样硬化或其他类型的动脉硬化相关的疾病(包括卒中、脑出血、蛛网膜下腔出血、心绞痛和肾动脉硬化)；血栓性疾病(包括脑血栓、肺血栓、血栓性肠坏死)；糖尿病并发症(包括糖尿病相关的视网膜病、白内障、糖尿病相关的肾病、糖尿病相关的神经病、糖尿病相关的坏疽和糖尿病相关的慢性感染)；血管炎性疾病(系统性红斑狼疮、关节风湿、关节动脉炎症、大细胞动脉炎症、川崎病(Kawasaki disease)、大动脉炎(Takayasu arteritis)、变应性肉芽肿性综合征(Churg-Strauss syndrome)和过敏性紫癜(Henoch-Schoenlein pupura))；以及心脏病，例如先天性心脏病、心肌病(例如，扩张性心肌病、肥厚性心肌病、限制性心肌病)和充血性心力衰竭。ENG多肽可以向患者单独施用，或者与可用于治疗BMP-9/10相关心血管病和/或病症的一种或更多种药剂或治疗形式(例如，治疗剂)组合施用。在一个实施方案中，第二药剂或治疗形式选自以下的一种或更多种：血管成形术、β阻滞剂、抗高血压剂、强心剂、抗血栓形成剂、血管扩张药、激素拮抗剂、内皮素拮抗剂、钙通道阻滞剂、磷酸二酯酶抑制剂、2型血管紧张素拮抗剂和/或细胞因子阻滞剂/抑制剂。

[0127] 在另一些实施方案中，ENG多肽可用于治疗炎性疾病或病症，所述炎性疾病或病症可能与BMP9相关，但是之前未注意。示例性疾病包括肝病(包括急性肝炎、慢性肝炎和肝硬化)；胸部或腹部水肿；慢性胰疾病；变态反应(包括鼻变态反应、哮喘、支气管炎和异位性皮肤炎)；阿尔茨海默病(Alzheimer's disease)；雷诺综合征(Raynaud's syndrome)和弥散性硬化。

[0128] 3.制剂和有效剂量

[0129] 本文中所述治疗剂可以配制成药物组合物。根据本公开内容使用的药物组合物可以以常规方式使用一种或更多种生理上可接受的载体或赋形剂配制。这样的制剂通常是基本上无热原的，符合大部分管理机构的要求。

[0130] 在某些实施方案中，本公开内容的治疗方法包括全身性施用或局部作为植入物或装置施用所述组合物。当施用时，用于本公开内容的治疗性组合物是无热原的生理上可接受的形式。还可任选地包含在上述组合物中的ENG信号传导拮抗剂以外的治疗上可用的药

剂可以与本文中公开方法中的本发明化合物(例如,ENG多肽)同时施用或先后施用。

[0131] 通常来说,本文中公开的蛋白质治疗剂将胃肠外施用,特别是静脉内或皮下施用。适合用于胃肠外施用的药物组合物可包含与以下组合的一种或更多种ENG多肽:一种或更多种可药用的无菌等张水性或非水性溶液、分散体、悬液或乳液,或者无菌粉末,所述无菌粉末可以在临时用前重构成无菌可注射溶液或分散体,其可以包含抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂、赋予制剂与预期接受者血液等张的溶质或者助悬剂或增稠剂。可用于本公开内容的药物组合物的合适的水性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)及其合适的混合物,植物油(例如橄榄油)和可注射有机酯(例如油酸乙酯)。可以例如通过使用包衣材料如卵磷脂,通过在分散体的情况下保持所需的颗粒大小,以及通过使用表面活性剂来保持合适的流动性。

[0132] 在一个实施方案中,本文中公开的ENG多肽以眼用药物制剂施用。在一些实施方案中,眼用药物制剂是无菌水溶液(优选用于注射的合适的浓度),或者油膏(salve)或软膏。这样的油膏或软膏通常包含溶解或悬浮在无菌可药用油膏或软膏基质(例如矿物油-白凡士林基质)中的一种或更多种本公开内容的ENG多肽。在油膏或软膏组合物中,无水羊毛脂也可以包含在制剂中。硫柳汞或氯丁醇也优选添加到这样的软膏组合物中作为抗菌剂。在一个实施方案中,无菌水溶液如美国专利No.6,071,958中所描述。

[0133] 本公开内容提供了制剂,所述制剂可以改变以包含酸和碱来调节pH;以及包含缓冲剂以使pH保持在窄范围内。可以向制剂中添加额外的药物。这些包括但不限于:哌加他尼、肝素酶、兰尼单抗或糖皮质激素。根据本公开内容的眼用药物制剂通过无菌操作制备,或者在适当的制备阶段进行灭菌。

[0134] 如果需要,组合物和制剂可以存在于包装或分配器装置中,所述包装或分配器装置可包含含有活性成分的一个或更多个单位剂型。包装可以例如包含金属或塑料薄膜,例如泡罩包装。包装或分配器装置可以附带有用于施用的说明。

[0135] 4.可溶性ENG多肽

[0136] 除了在特定条件下以外,天然存在的ENG蛋白是跨膜蛋白,蛋白质的一部分定位在细胞外(细胞外部分),蛋白质的一部分定位在细胞内(细胞内部分)。本公开内容的一些方面包括包含ENG的胞外域(ECD)部分的多肽。

[0137] 在某些实施方案中,本公开内容提供了ENG多肽。ENG多肽可以包括由以下氨基酸序列组成或包含以下氨基酸序列的多肽,所述氨基酸序列与天然存在的ENG多肽的截短的ECD结构域具有至少90%同一性,并且任选地至少95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性,其C末端出现在SEQ ID NO:1的第333-378位氨基酸中的任一处,并且所述多肽不包含由SEQ ID NO:1的第379-430位氨基酸组成的序列。任选地,ENG多肽不包含由SEQ ID NO:1的第379-586位氨基酸组成的序列或者由SEQ ID NO:1的第379-581位氨基酸组成的序列的大于5个连续氨基酸,或者大于10、20、30、40、50、52、60、70、80、90、100、150或200或更多个连续氨基酸。未加工的ENG多肽可以包含或不包含任何信号序列,以及信号序列的任何N末端序列。如本文中详述的,成熟(经加工)ENG多肽的N末端可以出现在SEQ ID NO:1的第26-42位氨基酸中的任意处。成熟ENG多肽的实例包含SEQ ID NO:23的第25-377位氨基酸、SEQ ID NO:25的第25-358位氨基酸,以及SEQ ID NO:29的第25-345位氨基酸。同样地,ENG多肽可以包含由以下核苷酸编码的多肽:SEQ ID NO:24的第73-1131位核苷酸、SEQ ID NO:26的第

73-1074位核苷酸或者SEQ ID NO:30的第73-1035位核苷酸，或者其沉默变体，或者在严格杂交条件(通常来说，这样的条件是本领域中已知的，但是可例如涉及在65℃下在50％v/v甲酰胺、5×SSC、2％w/v阻滞剂、0.1％N-月桂酰基酰胺和0.3％SDS中杂交过夜，并且例如约65℃下在5×SSC中洗涤)下与其互补序列杂交的核酸。因此，术语“ENG多肽”包括ENG多肽的分离的细胞外部分，其变体(包括在对应于SEQ ID NO:1第26-378位氨基酸的序列中包含例如不大于2、3、4、5、10、15、20、25、30或35个氨基酸替换的变体)、其片段以及包含前述任一种的融合蛋白，但是在每一种情况下，优选地任何前述ENG多肽将保持对于BMP-9和/或BMP-10的充分亲和力。通常来说，ENG多肽设计为在生理相关的温度、pH水平和渗量下在水溶液中可溶。

[0138] 在此给出的数据表明，与ENG(26-437)-Fc或者包含全长ENG ECD的Fc融合蛋白相比，包含ENG多肽的较短的C末端截短变体的Fc融合蛋白不表现出可评估的与TGF-β1和TGF-β3的结合，但是表现出更高的对于BMP-9的结合亲和力和显著更慢的解离速率。特别地，与ENG(26-437)或ENG(26-586)相比，在SEQ ID NO:1的第378、359和346位氨基酸结束时的C末端截短的变体均被发现以显著更高的亲和力与BMP-9结合(并且以未减小的亲和力与BMP-10结合)。但是，在第332、329或257位氨基酸的更广泛的C末端截短完全破坏了与BMP-9和BMP-10的结合。因此，预期在第333位氨基酸至第378位氨基酸之间终止的ENG多肽均具有活性，但是在第346和359位氨基酸处或者它们之间终止的构建体可以是活性最高的。预期在第360和378位氨基酸处或者它们之间终止的形式倾向于ENG(26-378)示出的中等的配体结合亲和力。基于与包含全长ENG ECD的融合蛋白相比在ENG(26-346)-Fc中观察到的蛋白质表达和清除半衰期的改善，预期在第333和378位氨基酸处或它们之间终止的某些构建体的其他关键参数的改善(参见实施例)。根据临床或实验环境，这些截短的变体形式中的任意一种均可以期望地使用。

[0139] 在N末端，预期在SEQ ID NO:1的第26位氨基酸(初始谷氨酸)或之前开始的ENG多肽将保持配体结合活性。如本文中公开的，SEQ ID NO:1的N末端截短到第61位氨基酸消除了配体结合，如更广泛的N末端截短一样。但是，同样如本文中所公开的，ENG一级序列的共有序列模型表明，由SEQ ID NO:1的第26-60位氨基酸限定的区域内的有序二级结构限于在SEQ ID NO:1的第42-45位具有高置信度的四残基β链以及在SEQ ID NO:1的位置28-29具有非常低置信度的二残基β链。因此，活性ENG多肽将优选地在SEQ ID NO:1的第26位氨基酸处(或之前)开始，或者在第27-42位氨基酸的任一处开始。

[0140] 总之，ENG多肽的活性部分可以包含SEQ ID NO:1的第26-333、26-334、26-335、26-336、26-337、26-338、26-339、26-340、26-341、26-342、26-343、26-344、26-345、或26-346位氨基酸序列，以及在SEQ ID NO:1的第27-42位氨基酸的任一处开始的这些序列的变体。示例性ENG多肽包含SEQ ID NO:1的第26-346、26-359和26-378位氨基酸序列。也考虑了这些范围内的变体，特别是与SEQ ID NO:1的相应部分具有至少80％、85％、90％、95％或99％同一性的那些。ENG多肽可不包含由SEQ ID NO:1的第379-430位氨基酸组成的序列。

[0141] 如上文定义的，本公开内容提供了与天然存在的ENG多肽具有特定序列同一性或相似性程度的ENG多肽。为了确定两个氨基酸序列之间的百分比同一性，将序列用于最佳比较目的的比对(例如，可以在第一和第二氨基酸序列中的一个或两个或核酸序列中引入缺口用于最佳比对，为了比较目的可以忽略非同源序列)。然后比较相应氨基酸位置的氨基酸

残基。当第一序列中某位置被与第二序列中相应位置相同的氨基酸残基占据时，分子在该位置是相同的(本文中使用的氨基酸“同一性”等于氨基酸“同源性”)。两个序列之间的百分比同一性是序列共有相同位置的数量的函数，并且考虑为了最佳比对两个序列而引入的缺口的数目和每个缺口的长度。

[0142] 序列的比较以及两个序列之间百分比同一性和相似性的确定可以使用数学算法实现(Computational Molecular Biology,Lesk,A.M.编辑,Oxford University Press,New York,1988;Biocomputing:Informatics and Genome Projects,Smith,D.W.编辑,Academic Press,New York,1993;Computer Analysis of Sequence Data,Part 1,Griffin,A.M.,and Griffin,H.G.编辑,Humana Press,New Jersey,1994;Sequence Analysis in Molecular Biology,von Heinje,G.,Academic Press,1987;以及Sequence Analysis Primer,Gribskov,M.and Devereux,J.编辑,M Stockton Press,New York,1991)。

[0143] 在一个实施方案中，使用Needleman和Wunsch(J Mol.Biol.(48):444-453(1970))算法确定两个氨基酸序列之间的百分比同一性，所述算法已经被引入到了GCG软件包中的GAP程序(可在http://www.gcg.com获得)中。在一个特定实施方案中，在GAP程序中使用以下参数:Blosum 62矩阵或PAM250矩阵，缺口权重为16、14、12、10、8、6或4，长度权重为1、2、3、4、5或6。在另一个实施方案中，使用GCG软件包中的GAP程序(Devereux,J.,等,Nucleic Acids Res.12(1):387(1984))(可在http://www.gcg.com获得)确定两个核苷酸序列之间的百分比同一性。示例性参数包括使用NWSgapdna.CMP矩阵，缺口权重为40、50、60、70或80，缺口权重为1、2、3、4、5或6。除非另有限定，使用GAP程序确定两个氨基酸序列之间的百分比同一性，其使用Blosum 62矩阵，缺口权重为10，长度权重为3，如果这样的算法不能计算出期望的百分比同一性，可以选择本文中公开的合适的替代选择。

[0144] 在另一个实施方案中，使用引入到了ALIGN程序(2.0版)中的E.Myers和W.Miller算法(CABIOS,4:11-17(1989))确定两个氨基酸序列之间的百分比同一性，使用PAM120权重残基表，缺口长度罚分为12，缺口罚分为4。

[0145] 用于确定两个氨基酸序列之间的最佳整体比对的另一个实施方案可以使用FASTDB计算机程序基于Brutlag等(Comp.App.Biosci.,6:237-245(1990))的算法确定。在序列比对中，查询序列和被比较序列均为氨基酸序列。所述全局序列对比的结果以百分比同一性表示。在一个实施方案中，使用FASTDB计算机程序基于Brutlag等(Comp.App.Biosci.,6:237-245(1990))的算法确定氨基酸序列同一性。在一个特定实施方案中，用于计算氨基酸比对的百分比同一性和相似性的参数包括:矩阵＝PAM 150,k-元组(k-tuple)＝2,错配罚分＝1,连接罚分＝20,随机组长＝0,截断值评分＝1,缺口罚分＝5且缺口大小罚分＝0.05。

[0146] 在某些实施方案中，ENG多肽与BMP-9和BMP-10结合，并且所述ENG多肽不对TGF-β1或TGF-β3表现出显著结合。可以使用纯化蛋白在溶液或表面等离子体共振系统(例如Biacore™系统)中评估结合。可以选择ENG多肽以表现出抗血管发生活性。用于血管发生抑制活性的生物测定包括鸡绒毛尿囊膜(CAM)测定、小鼠血管反应器测定和用于测量施用分离的或合成的蛋白质对植入的肿瘤的影响的测定。CAM测定、小鼠血管反应器测定和其他测定在实施例中描述。

[0147] ENG多肽还可以在N末端包含多种前导序列的任一种。这样的序列将允许肽在真核系统中表达并且靶向至分泌途径。参见，例如Ernst等，美国专利No.5,082,783(1992)。或者，天然ENG信号序列可用于引起从细胞中排出。可能的前导序列包括蜜蜂蜂毒肽、TPA和天然前导序列(分别为SEQ ID NO.13-15)。包含TPA前导序列的ENG-Fc融合蛋白的实例包括SEQ ID NO:23、25、27和29。信号肽的加工可以根据所选择的前导序列、所使用的细胞类型和培养条件等变量变化，因此，成熟ENG多肽的实际N末端起始位点可以向N末端方向或C末端方向移动1、2、3、4或5个氨基酸。成熟ENG-Fc融合蛋白的实例包括SEQ ID NO:33-36，如以下示出的，其中ENG多肽部分具有下划线。

[0148] 人ENG(26-378)-hFc(截短的Fc)

[0149]
ETVHCD LQPVGPERDE VTYTTSQVSK GCVAQAPNAI LEVHVLFLEF
PTGPSQLELT LQASKQNGTW PREVLLVLSV NSSVFLHLQA LGIPLHLAYN
SSLVTFQEPP GVNTTELPSF PKTQILEWAA ERGPITSAAE LNDPQSILLR
LGQAQGSLSF CMLEASQDMG RTLEWRPRTP ALVRGCHLEG VAGHKEAHIL
RVLPGHSAGP RTVTVKVELS CAPGDLDAVL ILQGPPYVSW LIDANHNMQI
WTTGEYSFKI FPEKNIRGFK LPDTPQGLLG EARMLNASIV ASFVELPLAS
IVSLHASSCG GRLQTSPAPI QTTPPKDTCS PELLMSLIQT KCADDAMTLV
LKKELVATGG GTHTCPPCPA PELLGGPSVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTC
VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ
DWLNGKEYKC KVSNKALPAP IEKTISKAKG QPREPQVYTL PPSREEMTKN
QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNGQPENNY KTTPPVLDSD GSFFLYSKLT
VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSPGK (SEQ ID NO: 33)

[0150] 人ENG(26-359)-hFc

[0151]
ETVHCD LQPVGPERDE VTYTTSQVSK GCVAQAPNAI LEVHVLFLEF
PTGPSQLELT LQASKQNGTW PREVLLVLSV NSSVFLHLQA LGIPLHLAYN
SSLVTFQEPP GVNTTELPSF PKTQILEWAA ERGPITSAAE LNDPQSILLR
LGQAQGSLSF CMLEASQDMG RTLEWRPRTP ALVRGCHLEG VAGHKEAHIL
RVLPGHSAGP RTVTVKVELS CAPGDLDAVL ILQGPPYVSW LIDANHNMQI
WTTGEYSFKI FPEKNIRGFK LPDTPQGLLG EARMLNASIV ASFVELPLAS
IVSLHASSCG GRLQTSPAPI QTTPPKDTCS PELLMSLITG GGPKSCDKTH
TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK

FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS
NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP
SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS
CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PGK (SEQ ID NO: 34)

[0152] 人ENG(26-359)-hFc(截短的Fc)

[0153] ETVHCD LQPVGPERDE VTYTTSQVSK GCVAQAPNAI LEVHVLFLEF PTGPSQLELT LQASKQNGTW PREVLLVLSV NSSVFLHLQA LGIPLHLAYN SSLVTFQEPP GVNTTELPSF PKTQILEWAA ERGPITSAAE LNDPQSILLR LGQAQGSLSF CMLEASQDMG RTLEWRPRTP ALVRGCHLEG VAGHKEAHIL RVLPGHSAGP RTVTVKVELS CAPGDLDAVL ILQGPPYVSW LIDANHNMQI WTTGEYSFKI FPEKNIRGFK LPDTPQGLLG EARMLNASIV ASFVELPLAS IVSLHASSCG GRLQTSPAPI QTTPPKDTCS PELLMSLITG GGTHTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGK (SEQ ID NO: 35)

[0154] 人ENG(26-346)-hFc(截短的Fc)

[0155] ETVHCD LQPVGPERDE VTYTTSQVSK GCVAQAPNAI LEVHVLFLEF PTGPSQLELT LQASKQNGTW PREVLLVLSV NSSVFLHLQA LGIPLHLAYN SSLVTFQEPP GVNTTELPSF PKTQILEWAA ERGPITSAAE LNDPQSILLR LGQAQGSLSF CMLEASQDMG RTLEWRPRTP ALVRGCHLEG VAGHKEAHIL RVLPGHSAGP RTVTVKVELS CAPGDLDAVL ILQGPPYVSW LIDANHNMQI WTTGEYSFKI FPEKNIRGFK LPDTPQGLLG EARMLNASIV ASFVELPLAS IVSLHASSCG GRLQTSPAPI QTTPPTGGGT HTCPPCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP SREEMTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSDGS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGK (SEQ ID NO: 36)

[0156] 在某些实施方案中，本公开内容考虑了ENG多肽的特定突变，以改变多肽的糖基化。可以选择这样的突变以引入或消除一个或更多个糖基化位点，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氨酸-X-苏氨酸(或天冬氨酸-X-丝氨酸)(其中“X”是任意氨基酸)，其通常被合适的细胞糖基化酶识别。改变还可以通过在野生型ENG多肽序列中添加或替换一个或更多个丝氨酸或苏氨酸残基来进行(对于O连接的糖基化位点)。糖基化识别位点的第一或第三个氨基酸位置中的一处或两处的多种氨基酸替换或缺失(和/或第二位的氨基酸缺失)导致经修饰三肽序列中的非糖基化。另一种提高ENG多肽上的碳水化合物部分之数目的方法是通过糖苷与ENG多肽的化学或酶促偶联。根据所使用的偶联模式，可以将糖连接至：(a)精氨酸和组氨酸；(b)游离羧基；(c)游离巯基，例如半胱氨酸的那些；(d)游离羟基，例如丝氨酸、苏氨酸或羟脯氨酸的那些；(e)芳香族残基，例如苯丙氨酸、酪氨酸或色氨酸的那些；或者(f)谷氨酰胺的酰胺基团。这些方法描

述在1987年9月11日公开的WO 87/05330以及Aplin和Wriston(1981)CRC Crit.Rev.Biochem.,第259-306页中,其通过引用并入本文。除去ENG多肽上存在的一个或更多个碳水化合物部分可以化学地和/或酶促地实现。化学去糖基化可以包括例如,将ENG多肽暴露于化合物三氟甲磺酸或等同的化合物。这种处理导致除了连接糖(N-乙酰葡糖胺或N-乙酰半乳糖胺)之外的大部分或全部糖的切割,而留下完整的氨基酸序列。化学去糖基化进一步描述在Hakimuddin等(1987)Arch.Biochem.Biophys.259:52以及Edge等(1981)Anal.Biochem.118:131中。ENG多肽上碳水化合物部分的酶促切割可以通过使用多种内切和外切糖苷酶实现,如Thotakura等(1987)Meth.Enzymol.138:350中描述的。适当时可以根据所使用的表达系统的类型调节ENG多肽的序列,因为哺乳动物、酵母、昆虫和植物细胞均可能引入不同的糖基化模式,其可受肽的氨基酸序列影响。通常来说,用于人的ENG多肽将在提供合适的糖基化的哺乳动物细胞系(例如HEK293或CHO细胞系)中表达,尽管预期也可用其他哺乳动物表达细胞系、具有工程化糖基化酶的酵母细胞系和昆虫细胞系。

[0157] 本公开内容还考虑了产生突变体,特别是ENG多肽的组合突变体的组,以及截短的突变体的方法;组合突变体库特别可用于鉴定功能性变体序列。筛选这样的组合分库的目的可以是产生例如可以作为激动剂或拮抗剂的,或者同时具有新的活性的END多肽变体。以下提供了多种筛选测定,这样的测定可用于评估变体。例如,可以筛选ENG多肽变体与ENG配体结合的能力,阻止ENG配体与ENG多肽的结合能力或者干扰ENG配体引起的信号传导的能力。还在基于细胞的测定或体内测定中,特别是在实施例中公开的任何测定中测试了ENG多肽或其变体的活性。

[0158] 可以产生组合得到的变体,其具有选择性,或者相对于包含天然存在的ENG多肽的胞外域的ENG多肽的通常提高的效力。同样地,诱变可以得到与相应野生型ENG多肽相比血清半衰期明显不同的变体。例如,改变的蛋白质可以赋予相对于蛋白水解降解或导致天然ENG多肽的破坏或以其他方式的消除或失活的其他处理的更高稳定性或更低稳定性。这样的变体以及编码它们的基因可用于通过调节ENG多肽的半衰期来改变ENG多肽的水平。例如,短半衰期可以导致更短暂的生物学效果,并且可以允许更严格控制患者中的重组ENG多肽水平。在Fc融合蛋白中,可以在接头(如果有的话)和/或Fc部分中进行突变,以改变蛋白质的半衰期。

[0159] 可以通过编码多肽文库的基因的简并文库产生组合文库,所述多肽文库各自包含潜在的ENG多肽序列的至少一部分。例如,可以将合成寡核苷酸的混合物酶促连接到基因序列,以使得潜在的ENG多肽核苷酸序列的简并组可作为单独多肽表达,或者作为较大融合蛋白的组表达(例如,用于噬菌体展示)。

[0160] 可以利用多种方法从简并寡核苷酸文库产生潜在的ENG多肽变体文库。可以在自动DNA合成仪中进行简并基因序列的化学合成,然后将合成的基因连接到合适的载体中用于表达。简并寡核苷酸的合成是本领域中公知的(参见例如,Narang,SA(1983)Tetrahedron 39:3;Itakura等.,(1981)Recombinant DNA,Proc.3rd Cleveland Sympos.Macromolecules,ed.AG Walton,Amsterdam:Elsevier pp273-289;Itakura等.,(1984)Annu.Rev.Biochem.53:323;Itakura等.,(1984)Science 198:1056;Ike等.,(1983)Nucleic Acid Res.11:477)。这样的技术已经用于其他蛋白质的定向进化(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U.S.专利No:5,223,409,5,198,346和5,096,815)。

[0161] 或者,可以利用其他形式的诱变产生组合文库。例如,可以通过使用例如以下手段的筛选从文库产生和分离END多肽变体:丙氨酸扫描诱变等(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;and Cunningham等.,(1989)Science 244:1081-1085),接头扫描诱变(Gustin等.,(1993)Virology 193:653-660;Brown等.,(1992)Mol.Cell Biol.12:2644-2652;McKnight等.,(1982)Science 232:316);通过饱和诱变(Meyers等.,(1986)Science 232:613);通过PCR诱变(Leung等.,(1989)Method Cell Mol Biol 1:11-19);或者通过随机诱变,包括化学诱变等(Miller等.,(1992)A Short Course in Bacterial Genetics,CSHL Press,Cold Spring Harbor;NY;以及Greener等,(1994)Strategies in Mol Biol 7:32-34)。接头扫描诱变,特别是在组合背景下,是用于鉴定截短(生物活性)形式的ENG多肽的有吸引力的方法。

[0162] 多种用于筛选组合文库的基因产物的技术是本领域中已知的,所述组合文库由点突变和截短构成,并且就这一点而言,所述技术为用于筛选某些性质的基因产物的cDNA文库。这样的技术通常适于迅速筛选通过ENG多肽的组合诱变产生的基因文库。用于筛选大基因文库的最常用技术通常包括将基因文库克隆到可复制的表达载体中,用所得载体文库转化合适的细胞,并且在一定条件下表达组合基因,在所述条件下,期望活性的检测有助于相对容易地分离编码所检测产物的基因的载体。优选的测定包括ENG配体结合测定和配体介导的细胞信号传导测定。

[0163] 在某些实施方案中,除了ENG多肽中天然存在的任何修饰以外,本公开内容的ENG多肽还可以包含翻译后修饰。这样的修饰包括但不限于:乙酰化、羧化、糖基化、磷酸化、酯化、PEG化(聚乙二醇化)和酰化。因此,经修饰的ENG多肽可以包含非氨基酸成分,例如聚乙二醇、脂质、多糖或单糖以及磷酸。可以如本文中对于其他ENG多肽变体的描述来测试这样的非氨基酸成分对ENG多肽功能的影响。当通过切割初生形式的ENG多肽在细胞中产生ENG多肽时,翻译后加工也可能对于蛋白质的正确折叠和/或功能很重要。不同细胞(例如,CHO、HeLa、MDCK、293、WI38、NIH-3T3或HEK293)具有特定的细胞机器,并且可以选择用于这样的翻译后活性的典型机制以确保ENG多肽的正确修饰和加工。

[0164] 在某些方面,ENG多肽的功能性变体或修饰形式包括具有ENG多肽的至少一部分和一个或更多个融合结构域的融合蛋白。这样的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、蛋白质A、蛋白质G、免疫球蛋白重链恒定区(Fc)、麦芽糖结合蛋白(MBP)或人血清白蛋白。可以选择融合结构域以赋予期望的性质。例如,一些融合结构域对于通过亲和色谱分离融合蛋白非常有用。对于亲和纯化的目的,使用用于亲和色谱相关基质,例如谷胱甘肽、淀粉酶和镍或钴缀合的树脂。许多这样的基质可以以“试剂盒”形式获得,例如Pharmacia GST纯化系统和QIAexpress™系统(Qiagen)可与(HIS_6)融合伴侣使用。又例如,可以选择融合结构域以有利于ENG多肽的检测。这样的检测结构域的实例包括多种荧光蛋白(例如,GFP)和“表位标记”,所述“表位标记”通常为短肽序

列，并且其特异性抗体可以获得。特异性单克隆抗体可以容易地获得的公知表位标记包括FLAG、流感病毒血凝素(HA)和c-myc标记。在一些情况下，融合结构域具有蛋白酶切割位点，例如因子Xa或凝血酶的切割位点，其允许相关蛋白酶部分消化融合蛋白从而从中释放重组蛋白。然后可以通过随后的色谱分离使释放的蛋白质与融合结构域分离。在某些优选实施方案中，ENG多肽与使ENG多肽在体内稳定的结构域("稳定剂"结构域)融合。"稳定"意指提高血清半衰期的任何事情，而不论这是由于破坏的降低、肾清除的降低还是其他药代动力学作用。已知与免疫球蛋白的Fc部分融合赋予多种蛋白质期望的药代动力学特性。同样地，与人血清白蛋白融合可以赋予期望的特性。其他可以选择的融合结构域类型包括多聚化(例如，二聚化、四聚化)结构域和功能结构域。

[0165] 作为一些具体的实例，本公开内容提供了包含与一个或两个Fc结构域序列(例如，SEQ ID NO:11,12)融合的ENG多肽变体的融合蛋白。任选地，Fc结构域在残基如Asp-265、Lys-322和Asn-434(根据相应全长IgG编号)处具有一个或更多个突变。在某些情况下，相对于野生型Fc结构域，具有一个或更多个这些突变(例如，Asp-265突变)的突变Fc结构域具有降低的与Fcγ受体结合的能力。在另一些情况下，相对于野生型Fc结构域，具有一个或更多个这些突变(例如，Asn-434突变)的突变Fc结构域具有提高的与MHC I类型相关Fc受体(FcRN)结合的能力。

[0166] 理解的是，融合蛋白的不同元件可以以与期望功能一致的任意方式排列。例如，ENG多肽可以位于异源结构域的C末端，或者，异源结构域可以位于ENG多肽的C末端。ENG多肽结构域与异源结构域未必在融合蛋白中相邻，另外的结构域或氨基酸序列可以包含在这两个结构域中的任一个的C末端或N末端或者在这些结构域之间。

[0167] 本文使用的术语"免疫球蛋白Fc结构域"或简单的"Fc"应理解为意指免疫球蛋白链恒定区、优选免疫球蛋白重链恒定区或者其一部分的羧基端部分。例如，免疫球蛋白Fc区可以包含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，或者5)两个或更多个结构域和免疫球蛋白铰链区的组合。在一个优选实施方案中，免疫球蛋白Fc区包含至少免疫球蛋白铰链区CH2结构域和CH3结构域，优选地缺少CH1结构域。

[0168] 在一个实施方案中，得到重链恒定区的免疫球蛋白的类型为IgG(Igγ)(γ亚类1、2、3或4)。可以使用其他免疫球蛋白类型IgA(Igα)、IgD(Igδ)、IgE(Igε)和IgM(Igμ)。合适的免疫球蛋白重链恒定区的选择在美国专利No.5,541,087和5,726,044中详细讨论。从某些免疫球蛋白类型和亚类中选择特定免疫球蛋白重链恒定区序列被认为在本领域技术人员的水平内。DNA构建体的编码免疫球蛋白Fc区的部分优选地包含任意IgA、IgD、IgE或IgM中的铰链结构域的至少一部分，优选地Fcγ的CH_3结构域或同源结构域的至少一部分。

[0169] 另外，预期免疫球蛋白重链恒定区中氨基酸的替换或缺失可用于本文中所公开的方法和组合物的实践。一个实例可以是在上面的CH2区引入氨基酸替换以产生对Fc受体具有降低的亲和力的Fc变体(Cole等(1997)J.Immunol.159:3613)。

[0170] 在某些实施方案中，本公开内容提供了分离和/或纯化形式的ENG多肽，其分离自，或者以其方式基本上不合(例如，至少80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%不舍)其他蛋白质和/或其他ENG多肽物质。通常将通过重组核酸的表达产生ENG多肽。

[0171] 在某些实施方案中，本公开内容包括编码可溶性ENG多肽的核酸，其包含ENG蛋白

的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样的核酸的宿主细胞。宿主细胞可以是任何原核或真核细胞。例如，本公开内容的多肽可以在细菌细胞(例如大肠杆菌(E.coli))、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表达。其他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产生ENG多肽的方法。已经确定SEQ ID NO:25和29中给出并且在CHO细胞中表达的ENG-Fc融合蛋白具有潜在的抗血管发生活性。5.编码ENG多肽的核酸

[0172] 在某些方面，本公开内容提供了本文中公开的编码任意ENG多肽(包括片段、功能性变体和融合蛋白)的分离的和/或重组核酸。例如，SEQ ID NO:2和4分别编码天然人ENG前体多肽的长同种型和短同种型，而SEQ ID NO:30编码与IgG1 Fc结构域融合的ENG胞外域的一种变体。本发明的核酸可以是单链或双链。这样的核酸可以是DNA或RNA分子。这些核酸可用于例如制备ENG多肽的方法或直接作为治疗剂(例如，在反义、RNAi或基因治疗方法中)。

[0173] 在某些方面，本发明编码ENG多肽的核酸进一步理解为包括为SEQ ID NO:24、26、28或30的变体的核酸。变体核苷酸序列包括因一个或更多个核苷酸替换、添加或缺失而具有差异的序列，例如等位基因变体。

[0174] 在某些实施方案中，本公开内容提供了分离的或重组的核酸序列，其与SEQ ID NO:24、26、28或30具有至少80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％、99％或100％同一性。本领域普通技术人员将理解，与SEQ ID NO:24、26、28或30互补的核酸序列以及SEQ ID NO:24、26、28或30的变体也在本公开内容的范围内。在另一些实施方案中，本公开内容的核酸序列可以是分离的、重组的和/或与异源核苷酸序列融合，或者在DNA文库中。

[0175] 在另一些实施方案中，本公开内容的核酸还可以包含在高度严格的条件下与以下杂交的核苷酸序列：指定为SEQ ID NO:24、26、28或30的核苷酸序列，SEQ ID NO:24、26、28或30的互补序列，或者其片段。如上文讨论的，本领域普通技术人员将容易理解，有利于DNA杂交的合适的严格条件可以变化。例如，可以在约45℃下于6.0×氯化钠/柠檬酸钠(SSC)中进行杂交，然后在50℃下用2.0×SSC洗涤。例如，洗涤步骤的盐浓度可以选择为50℃下的2.0×SSC的低严格度至50℃下的0.2×SSC的高严格度。另外，洗涤步骤的温度可以从室温(约22℃)的低严格条件升高到约65℃的高严格条件。温度和盐二者可以一起变化，或者温度或盐浓度可以保持恒定，而另一个变量变化。在一个实施方案中，本公开内容提供了在室温下在6×SSC的低严格条件下杂交，然后在室温下在2×SSC下洗涤的核酸。

[0176] 由于遗传密码子的简并性而不同于SEQ ID NO:24、26、28或30中给出的核酸的分离的核酸也在本公开内容的范围内。例如，多种氨基酸由超过一种三联体确定。指定相同氨基酸的密码子或同义密码子(例如，CAU和CAC是组氨酸的同义密码子)可以导致不影响蛋白质的氨基酸序列的“沉默”突变。但是，预期哺乳动物细胞中将存在导致本发明蛋白质的氨基酸序列变化的DNA序列多态性。本领域技术人员将理解，由于天然等位基因变异，给定物种的个体之间可能在编码特定蛋白质的核酸的一个或更多个核苷酸(多至约3-5％的核苷酸)中存在这些变化。任意和所有这些核苷酸变化以及所得氨基酸多态性也在本公开内容的范围内。

[0177] 在某些实施方案中，本公开内容的重组核酸在表达构建体中可以与一种或更多种调节核苷酸序列可操作地连接。调节核苷酸序列通常适合于用于表达的宿主细胞。对于多种宿主细胞，多种类型的合适的表达载体和合适的调节序列是本领域中已知的。通常来说，

所述一种或更多种调节核苷酸序列可以包括但不限于启动子序列、前导序列或信号序列、核糖体结合位点、转录起始和终止序列、翻译起始和终止序列、以及增强子或活化子序列。本公开内容考虑了本领域中已知的组成型启动子或诱导型启动子。启动子可以是天然存在的启动子，或者组合了超过一种启动子元件的杂合启动子。表达构建体可以存在于细胞中的附加体如质粒上，或者所述表达构建体可以插入在染色体中。在一个优选实施方案中，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中公知的，并且将随所使用宿主细胞而变化。

[0178] 在本公开内容的某些方面，本发明核酸在表达载体中提供，所述表达载体包含与至少一个调节序列可操作地连接的编码ENG多肽的核苷酸序列。调节序列是本领域中认识的并且对其进行选择以直接表达ENG多肽。因此，术语调节序列包括启动子、增强子和其他表达控制元件。示例性调节序列描述在Goeddel;Gene Expression Technology:Methods in Enzymology,Academic Press,San Diego,CA(1990)中。例如，多种在与DNA序列可操作地连接时控制DNA序列的表达的表达控制序列中的任一种均可用于这些载体以表达编码ENG多肽的DNA序列。这样的可用的表达控制序列包括例如SV40的早期启动子和晚期启动子、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、由T7RNA聚合酶指导其表达的T7启动子、λ噬菌体的主要操纵子和启动子区、fd外壳蛋白的控制区、3-磷酸甘油酸激酶或其他糖酵解酶的启动子、酸性磷酸酶(例如,Pho5)的启动子、酵母α-交配因子的启动子、杆状病毒系统的多面体启动子以及已知控制原核细胞或真核细胞或其病毒的基因的表达的其他序列，及其多种组合。应理解的是，表达载体的设计可以取决于例如这样的因素:所选择的待转化宿主细胞和/或期望表达的蛋白质的类型。此外，还应该考虑载体的拷贝数、控制拷贝数的能力以及由载体编码的任何其他蛋白质(如抗生素标记)的表达。

[0179] 包含在本公开内容中的重组核酸可以通过将克隆基因或其一部分连接到适合在原核细胞、真核细胞(酵母、鸟类、昆虫或哺乳动物)或者这二者中表达的载体中。用于产生重组ENG多肽的表达载体包括质粒和其他载体。例如，对于在原核细胞如大肠杆菌中表达，合适的载体包括以下类型的质粒:来自于pBR322的质粒、来自于pEMBL的质粒、来自于pEX的质粒、来自于pBTac的质粒和来自于pUC的质粒。

[0180] 一些哺乳动物表达载体包含有助于载体在细菌中增殖的原核序列以及在真核细胞中表达的一个或更多个真核转录单元。来自于pcDNAI/amp、pcDNAI/neo、pRc/CMV、pSV2gpt、pSV2neo、pSV2-dhfr、pTk2、pRSVneo、pMSG、pSVT7、pko-neo和pHyg的载体是适合于转染真核细胞的哺乳动物表达载体的实例。用来自细菌质粒(例如,pBR322)的序列对这些载体中一些进行修饰以有助于在原核和真核细胞二者中复制和抗药性选择,pBR322。或者，病毒(例如,牛乳头瘤病毒(BPV-1))或EB病毒(Epstein-Barr virus)(来自于pHEBo、pREP的和p205)的衍生物可用于蛋白质在真核细胞中的瞬时表达。其他病毒(包括逆转录病毒)表达系统的实例可以在以下基因治疗递送系统的描述中找到。多种用于制备质粒和转化宿主生物的方法是本领域中公知的。对于原核细胞和真核细胞二者的其他合适的表达系统以及一般重组程序，参见Molecular Cloning A Laboratory Manual,第三版,Sambrook编辑,Fritsch and Maniatis(Cold Spring Harbor Laboratory Press,2001)。在一些情况下，可能希望通过使用杆状病毒表达系统来表达重组多肽。这样的杆状病毒表达系统的实例包

括来自于pVL的载体(例如,pVL1392、pVL1393和pVL941)、来自于pAcUW的载体(例如,pAcUW1)以及来自于pBlueBac的载体(例如,包含pBlueBac III的β-gal)。

[0181] 在一个优选实施方案中,载体将被设计成用于在CHO细胞中产生本发明ENG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.)。将明显地是,本发明基因构建体可用于使本发明ENG多肽在培养物中繁殖的细胞中表达,例如以产生用于纯化的蛋白质,包括融合蛋白或变体蛋白。

[0182] 本公开内容还涉及用重组基因转染的宿主细胞,所述重组基因包含一种或更多种本发明ENG多肽的编码序列(例如,SEQ ID NO:24、26、28或30)。宿主细胞可以是任何原核细胞或真核细胞。例如,本文中公开的ENG多肽可以在细菌细胞(例如大肠杆菌)、昆虫细胞(例如,使用杆状病毒表达系统)、酵母或哺乳动物细胞中表达。其他合适的宿主细胞是本领域技术人员已知的。

[0183] 因此,本公开内容还涉及产生本发明ENG多肽的方法。例如,可以在合适的条件下培养用编码ENG多肽的表达载体转染的宿主细胞,以使得ENG多肽的表达发生。ENG多肽可以从包含ENG多肽的细胞和培养基的混合物中分泌和分离。或者,ENG多肽可以保留在细胞质中或膜级分中,并且收获和裂解细胞并且分离蛋白质。细胞培养物包含宿主细胞、培养基和其他副产物。用于细胞培养的合适的培养基是本领域中公知的。可以使用本领域中已知的用于纯化蛋白质的技术从细胞培养基、宿主细胞或其二者中分离本发明ENG多肽,包括离子交换色谱、凝胶过滤色谱、超滤、电泳、利用ENG多肽特定表位的特异性抗体的免疫亲和纯化,以及利用与ENG多肽融合的结构域结合的试剂的亲和纯化(例如,蛋白质A柱可用于纯化ENG-Fc融合蛋白)。在一个优选实施方案中,ENG多肽是包含有助于其纯化的结构域的融合蛋白。例如,可以通过一系列柱色谱步骤实现纯化,包括例如任意顺序的以下三种或更多种:蛋白质A色谱、Q琼脂糖色谱、苯基琼脂糖色谱、尺寸排阻色谱和阳离子交换色谱。纯化可以用病毒过滤和缓冲液交换来完成。

[0184] 在另一个实施方案中,重组ENG多肽的期望部分的N末端的编码纯化前导序列如聚(His)/肠激酶切割位点序列的融合基因可以允许使用Ni^{2+}金属树脂通过亲和色谱纯化表达的融合蛋白。随后可以通过用肠激酶的处理移除纯化前导序列以提供纯化的ENG多肽(参见例如Hochuli等.,(1987)J.Chromatography 411:177,以及Janknecht等.,PNAS USA 88:8972)。

[0185] 制备融合基因的技术是公知的。基本上,根据常规技术进行不同多肽序列的多种DNA片段的连接,使用钝末端或交错末端用于连接,限制酶消化提供合适的末端,根据情况用黏性末端填补,碱性磷酸酶处理以避免不期望的连接,以及酶促连接。在另一个实施方案中,可以通过常规技术(包括自动化DNA合成仪)合成融合基因。或者,可使用锚定引物进行基因片段的PCR扩增,得到两个连续基因片段之间互补的突出端,其随后可以退火以产生嵌合基因序列(参见,例如,Current Protocols in Molecular Biology,Ausubel等编辑,John Wiley&Sons:1992)。

[0186] 为ENG、BMP-9或BMP-10的拮抗剂的核酸化合物类型的实例包括反义核酸、RNAi构建体和催化核酸构建体。核酸化合物可以是单链或双链。双链化合物还可以包含突出端或非互补的区域,其中一个或另一个链是单链。单链化合物可以包含自互补区域,意味着化合

物形成具有双螺旋结构区域的所谓的“发夹”或“颈环”结构。核酸化合物可以包含与由全长ENG核酸序列或配体核酸序列的不超过1000、不超过500、不超过250、不超过100或者不超过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。互补区域优选地为至少8个核苷酸，任选地至少10或至少15个核苷酸，任选地15至25个核苷酸。互补区域可以落在靶转录物的内含子、编码序列或者非编码序列中，例如编码序列部分中。通常来说，核酸化合物的长度为约8至约500个核苷酸或碱基对，任选地长度为约14至约50个核苷酸。核酸可以是DNA(特别用作反义)、RNA或RNA:DNA杂合体。任意一个链可以包含DNA和RNA的混合物，以及不能容易地归类为DNA或RNA的经修饰形式。同样地，双链化合物可以是DNA:DNA、DNA:RNA或RNA:RNA，并且任意一条链也可以包含DNA和RNA的混合物，以及不能容易地归类为DNA或RNA的经修饰形式。核酸化合物可以包含多种修饰中的任一种，包括骨架(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)的一种或更多种修饰。反义核酸化合物的长度优选地为约15至约30个核苷酸，并且将通常包含一个或更多个修饰以改善特性如在血清、细胞或者化合物可能被递送的地方(例如在经口递送化合物的情况下的胃以及吸入化合物的肺)的稳定性。在RNAi构建体的情况下，与靶转录物互补的链通常为RNA或其修饰。另一条链可以是RNA、DNA或任何其他变化。双链或单链“发夹”RNAi构建体的双链部分的长度优选地为18至40个核苷酸，任选地长度为约21至23个核苷酸，只要其充当Dicer底物即可。催化性或酶核酸可以是核酶或者DNA酶，并且可以还包含经修饰形式。当在生理条件下和无义(nonsense)或有义控制具有很小或没有效果的浓度下与细胞接触时，核酸化合物可以将靶标的表达抑制约50％、75％、90％或更多。测试核酸化合物的效果的优选浓度为1、5和10微摩尔/升(micromolar)。也可以测试核酸化合物对例如血管发生的影响。

[0187] 6.融合蛋白的变化

[0188] 本申请还提供了具有工程化或变体Fc区的ENG-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)。另外，修饰可以提高抗体和Fc融合蛋白的稳定性。通过向DNA中引入合适的核苷酸变化或者通过肽合成来制备抗体和Fc融合蛋白的氨基酸序列变体。这样的变体包括例如本文中公开的抗体和Fc融合蛋白的氨基酸序列内残基的缺失和/或插入和/或替换。进行缺失、插入和替换的任意组合以得到最终构建体，只要最终构建体具有期望特性即可。氨基酸变化还可以改变抗体和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。

[0189] 可以通过向氨基酸序列中引入变化来产生具有降低的效应子功能的抗体和Fc融合蛋白，所述变化包括但不限于Bluestone等描述的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，在某些实施方案中，在恒定区中具有突变(包括Ala-Ala突变)的本公开内容抗体和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融合蛋白可以包含第234位处丙氨酸的突变或者第235位处丙氨酸的突变或者其组合。在一个实施方案中，抗体或Fc融合蛋白包含IgG4框架，其中Ala-Ala突变描述第234位处苯丙氨酸到丙氨酸的突变和/或第235位处亮氨酸到丙氨酸的突变。在另一个实施方案中，抗体或Fc融合蛋白包含IgG1框架，其中Ala-Ala突变描述第234位处亮氨酸到丙氨酸的突变和/或第235位处亮氨酸到丙氨酸的突变。抗体或Fc融合蛋白可以作为替代或补充地具有其他突变，包括CH2结构域中的点突变K322A(Hezareh等

.2001J Virol.75:12161-8)。

[0190] 在一些特定实施方案中,可以修饰抗体或Fc融合蛋白以增强或抑制补体依赖性细胞毒性(CDC)。可以通过在Fc区中引入一个或更多个氨基酸替换、插入或缺失来获得经调节的CDC活性(参见,例如美国专利No.6,194,551)。作为替代或补充,可以向Fc区中引入半胱氨酸残基,以便允许在该区中形成链间二硫键。因此产生的同二聚体抗体可能具有提高的或降低的内化能力和/或提高的或降低的补体介导的细胞杀伤。参见Caron等,J.Exp Med.176:1191-1195(1992)和Shopes,B.J.Immunol.148:2918-2922(1992),WO99/51642,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WO94/29351。

实施例

[0191] 现在将对本发明进行一般性描述,通过参考以下实施例,本发明将更容易理解,引入所述实施例仅为了举例说明本发明的某些实施方案,而不是旨在限制本发明。

[0192] 实施例1:包含人ENG的全长胞外域的融合蛋白的表达

[0193] 申请人构建了可溶性内皮联蛋白(ENG)融合蛋白(hENG(26-586)-hFc),其中人ENG的全长胞外域(ECD)(图9,SEQ ID NO:9)与人IgG_1 Fc结构域(图11,SEQ ID NO:11)连接,在这些结构域之间具有最小接头。通过HEK 293细胞中的瞬时转染表达hENG(26-586)-hFc。简单地说,将HEK 293细胞以6×10^5个细胞/ml装在500ml旋转器(spinner)中的250ml体积的Freestyle培养基(Invitrogen)中并且培养过夜。次日,用0.5ug/ml最终DNA浓度的DNA:PEI(1:1)复合物处理这些细胞。4小时后,添加250ml培养基并且使细胞培养7天。通过细胞的旋转沉淀收获条件培养基(conditioned media)并且浓缩。为了在CHO细胞中表达,将ENG多肽构建体转染到CHO DUKX B11细胞系中。在最初浓度通常为5nM或10nM的甲氨蝶呤(MTX)中选择克隆,任选地接着在50nM MTX中扩增以提高表达。然后可通过稀释克隆来鉴定高表达克隆,并且调节为无血清悬浮培养以产生用于纯化的条件培养基。任选地,载体中可以包含遍在染色质开放元件(ubiquitous chromatin opening element,UCOE)以有助于表达。参见例如Cytotechnology.2002Jan;38(1-3):43-6。

[0194] 可以使用三种不同的前导序列:

[0195] (i)蜜蜂蜂毒肽(honey bee mellitin,HBML):MKFLVNVALVFMVVYISYIYA(SEQ ID NO:13)

[0196] (ii)组织纤溶酶原激活物(TPA):MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSP(SEQ ID NO:14)

[0197] (iii)天然人ENG:MDRGTLPLAVALLLASCSLSPTSLA(SEQ ID NO:15)

[0198] 所选择的hENG(26-586)-hFc形式使用TPA前导序列,具有图13中所示的未加工的氨基酸序列(SEQ ID NO:16),并且由图14中所示的核苷酸序列(SEQ ID NO:17)编码。申请人还考虑具有TPA前导序列(图15,SEQ ID NO:18)的替选hENG(26-586)-hFc序列,其包含通过TGGG接头与hENG(26-586)连接的N末端截短的hFc结构域(图12,SEQ ID NO:12)。使用多种技术实现纯化,包括例如条件培养基的过滤,接着是蛋白质A色谱,低pH(3.0)甘氨酸缓冲液的洗脱,样品中和,以及用PBS透析。通过分析型尺寸排阻色谱、SDS-PAGE、银染色和Western印迹评价样品的纯度。成熟蛋白质的分析证实了预期的N末端序列。

[0199] 实施例2:包含鼠ENG全长胞外域的融合蛋白的表达

[0200] 申请人构建了可溶性鼠ENG融合蛋白(mENG(27-581)-mFc),其中鼠ENG的全长胞外域(ECD)(图10,SEQ ID NO:10)与鼠IgG_{2a} Fc结构域融合,在这些结构域之间具有最小接头。通过HEK 293细胞中的瞬时转染表达mENG(27-581)-mFc。

[0201] 所选择的mENG(27-581)-mFc形式使用TPA前导序列,具有图16中所示的未加工的氨基酸序列(SEQ ID NO:19),并且由图17中所示的核苷酸序列(SEQ ID NO:20)编码。通过从经转染的HEK 293细胞中过滤条件培养基,接着蛋白质A色谱来实现纯化。通过分析型尺寸排阻色谱、SDS-PAGE、银染色和Western印迹分析评价样品的纯度。

[0202] 实施例3:BMP-9/BMP-10与包含全长ENG胞外域的蛋白质的选择性结合

[0203] 考虑到共同受体,广泛认为ENG通过促进TGF-β1和TGF-β3与I型和II型受体的多蛋白复合物结合来发挥作用。为了研究分离的ENG与配体直接结合的可能性,申请人使用表面等离子体共振(surface plasmon resonance,SPR)方法(Biacore™仪器)来筛选包含ENG的全长胞外域的捕获蛋白与多种可溶性人TGF-β家族配体的结合。

[0204]

配体	构建体结合		
	hENG(26-586)-hFc*	hENG(26-586)**	mENG(27-581)-hFc***
hBMP-2	–	–	–
hBMP-2/7	–	–	–
hBMP-7	–	–	–
hBMP-9	++++	++++	++++
hBMP-10	++++	++++	++++
hTGF-β1	–	–	–
hTGF-β2	–	–	–
hTGF-β3	–	–	–
hActivinA	–	–	–

[0205]

[0206] *[hBMP-9],[hBMP-10]=2.5nM;测试的所有其他配体为100nM

[0207] **[hBMP-9],[hBMP-10]=2.5nM;测试的所有其他配体为25nM

[0208] ***[hBMP-9],[hBMP-10]=0.5nM;[hTGF-β1],[hTGF-β2],[hTGF-β3]=10nM;测试的所有其他配体为25nM

[0209] 如本表中所示,如在低配体浓度下评估的,hBMP-9和hBMP-10与hENG(26-586)-hFc为高结合亲和力(++++,K_D<1nM)。即使在40倍高的浓度下,TGF-β1、TGF-β2、TGF-β3、活化素A、BMP-2和BMP-7与hENG(26-586)-hFc的结合依旧检测不到(-)。对于后一组配体,缺少与分离的ENG融合蛋白的直接结合是值得注意的,因为已经发现与不存在ENG相比,在ENG的存在下I型和II型受体的多蛋白复合物与它们中的大部分更好地结合。上表还表明,当筛选配体结合固定的hENG(26-586)(R&D Systems,目录号#1097-EN)(不具有Fc结构域的人变体)的能力,或者其结合捕获的mENG(27-581)-hFc(R&D Systems,目录号#1320-EN)(由通过六残基接头序列(IEGRMD)与人IgG_1的Fc结构域的鼠ENG的胞外域(第27-581位残基)组成)的能力时,得到了类似的结果。SPR表征(图18、19)确认,捕获的hENG(26-586)-hFc以29pM的K_D结合可溶性BMP-9,以400pM的K_D结合可溶性BMP-10。因此,与BMP-9和BMP-10的选择性高亲和

力结合是ENG胞外域的先前未认识到的性质，其在物种间普遍适用。

[0210] 实施例4：hENG的可溶性胞外域抑制BMP-9/BMP-10与ALK1以及其他同源受体的结合

[0211] BMP-9和BMP-10是I型受体ALK1(活化素受体样激酶1)的高亲和力配体。已经使用基于SPR的测定来确定可溶性hENG(26-586)(R&D Systems，目录号#1097-EN)对BMP-9和BMP-10与ALK1的结合的影响。捕获ALK1-hFc然后暴露于包含与BMP-9以多种比例预混合的可溶性hENG(26-586)的溶液。如图20中所示，可溶性hENG(26-586)以浓度依赖性方式抑制BMP-9与ALK1-Fc的结合，其IC_{50}小于10nM。利用BMP-10得到了类似的结果(图21)。独立的实验已证明，可溶性hENG(26-586)不结合ALK1，因此不是通过这种机制抑制与ALK1的配体结合。事实上，另外的基于SPR的实验表明，可溶性hENG(26-586)不结合I型受体ALK2-ALK7或II型受体如活化素受体IIA、活化素受体IIB、骨形态发生蛋白受体II和TGF-β受体II。这些结果进一步证明，ENG主要通过与这些配体直接相互作用抑制BMP-9和BMP-10与ALK1的结合。

[0212] 总之，这些数据证明，可溶性ENG-Fc嵌合蛋白以及非嵌合的可溶性ENG可用作通过多重信号传导通路(包括ALK1)的BMP-9和BMP-10信号传导的拮抗剂。

[0213] 实施例5：mENG(27-581)-hFc对培养物中的人脐静脉内皮细胞(HUVEC)的影响

[0214] 申请人在基于HUVEC的培养系统中研究了mENG(27-581)-hFc的血管发生效应。将HUVEC培养在聚合的基质胶(Matrigel)基底上，并且在12小时暴露后通过相差显微术评估受试物对内皮细胞管(索(cord))形成的影响。从视觉上鉴定具有单细胞宽度和至少三个分支的索，并且使用计算机辅助图像分析来确定这样的索的总长度。平均值为基于每种实验条件下一式二份的培养物孔，每个孔的特征为三个观察视野的平均。与基础条件(不处理)相比，强诱导剂内皮细胞生长物质(ECGS，0.2μg/ml)使平均索长翻倍(图22)。mENG(27-581)-hFc(R&D Systems，目录号#1320-EN；10μg/ml)使这种增长削减了近60％，影响是刺激条件特异性的，因为在不存在ECGS的条件下相同浓度的mENG(27-581)-hFc几乎没有作用。这些结果证明，在血管发生的细胞培养模型中，ENG-Fc融合蛋白可以在否则将刺激的条件下抑制内皮细胞聚集。

[0215] 实施例6：ENG-Fc在鸡绒毛尿囊膜(CAM)测定中抑制VEGF诱导的血管发生

[0216] 使用鸡绒毛尿囊膜(CAM)测定系统研究ENG-Fc融合蛋白对血管发生的影响。简单地说，将9天大的受精鸡胚保持在受控的温度(37℃)和湿度(60％)下的卵孵育器中。用醇使卵壳软化，刺上细孔以在壳膜和CAM之间产生“气泡(blister)”，并且移除以产生覆盖突出的血管的窗口。在溶解在包含0.01M HEPES、0.5M NaCl、3mM EDTA、0.005％v/v表面活性剂P20和0.5mg/ml牛血清白蛋白的缓冲液(pH 7.4)中的mENG(27-581)-hFc蛋白(R&D Systems，目录号#1320-EN；14μg每天)的存在或不存在下，用VEGF(50ng每天)处理小滤盘。然后将包含受试物的滤盘通过开口插入并且放置在CAM对面。将卵(n＝8个/组)每天用新鲜受试物处理，持续3天，并且在第四天在卵灯(egg lamp)的辅助下通过目视检查确定与滤盘结合的血管数目。

[0217] 如预期的，在CAM测定系统中，与载剂相比VEGF处理显著提高了血管数目。同时的mENG(27-581)-hFc处理使VEGF处理诱导的额外血管数目降低了65％(图23)。基于SPR的研究表明，VEGF不结合mENG(27-581)-mFc，因此在本CAM实验中mENG(27-581)-hFc对于血管发

生的影响不是由于融合蛋白与VEGF之间的直接相互作用。前述结果表明，ENG-Fc可以显著抑制体内模型中良好建立的VEGF的血管发生效应，而其本身不与VEGF接触。

[0218] 实施例7：在小鼠血管反应器测定中mENG(27-581)-mFc对血管发生的影响

[0219] 进一步在小鼠血管反应器测定中研究了ENG-Fc融合蛋白对血管发生的影响，所述测定也称为定向体内血管发生测定(DIVAA™;Guedez等，2003，Am J Pathol 162:1431-1439)，其根据制造商(Trevigen®)的说明书进行。简单地说，向用植入级硅胶制备并且在一端封闭的中空圆柱中装入预混合有或没有碱性成纤维细胞生长因子(FGF-2，1.8g)和VEGF(600ng)之组合的20μl基底膜提取物(basement membrane extract，BME)。在BME形成凝胶后，将血管反应器皮下植入到无胸腺裸小鼠中(每只小鼠4个)。每天用mENG(27-581)-mFc(10mg/kg，s.c.)或载剂(Tris缓冲盐水)处理小鼠，持续11天，此时向小鼠注射异硫氰酸荧光素(FITC)标记的右旋糖酐(20mg/kg，i.v.)并且在20分钟后使小鼠安乐死。取出血管反应器，在485nm激发/520nm发射下用荧光板阅读器(Infinite®M200，Tecan)量化每个中包含的FITC-右旋糖酐的量，作为血管形成的指标。如图24所示，向BME中添加FGF-2和VEGF导致在研究结束时血管反应器中的血管形成显著提高，而同时施用mENG(27-581)-mFc完全阻止了这种提高。在哺乳动物系统中获得的这些结果补充了上述利用CAM测定获得的那些，证明并入全长ENG胞外域的ENG-Fc融合蛋白的体内抗血管发生活性。

[0220] 实施例8：具有截短的hENG胞外域的变体的表达

[0221] 申请人产生的其中截短的人ENG ECD变体利用最小接头与人IgG1Fc结构域融合的可溶性ENG融合蛋白。这些变体列举如下，并且在图25中示意性示出了所选择变体的结构。

[0222]

	人构建体	瞬时表达	纯化	稳定表达(CHO细胞)
全长	hENG(26-586)-hFc	HEK 293	是	是
羧基端	hENG(26-581)-hFc	HEK 293	是	否

	截短	hENG(26-437)-hFc	HEK 293	是	否
		hENG(26-378)-hFc	HEK 293	是	否
		hENG(26-359)-hFc	HEK 293	是	是
		hENG(26-346)-hFc	HEK 293	是	是
		hENG(26-332)-hFc	HEK 293	是	否
		hENG(26-329)-hFc	HEK 293	是	否
		hENG(26-257)-hFc	HEK 293	是	否
	氨基端	hENG(360-586)-hFc	HEK 293	是	否
	截短	hENG(438-586)-hFc	HEK 293	是	否
[0223]		hENG(458-586)-hFc	COS	否	否
	双截短	hENG(61-346)-hFc	HEK 293	是	否
		hENG(129-346)-hFc	HEK 293	是	否
		hENG(133-346)-hFc	HEK 293	是	否
		hENG(166-346)-hFc	HEK 293	是	否
		hENG(258-346)-hFc	HEK 293	是	否
		hENG(360-581)-hFc	HEK 293	是	否
		hENG(360-457)-hFc	COS	否	否
		hENG(360-437)-hFc	COS	否	否
		hENG(458-581)-hFc	COS	否	否

[0224] 如所示的,这些变体通过在HEK 293细胞或COS细胞中通过瞬时转染表达。

[0225] 所选择的hENG(26-437)-hFc形式使用TPA前导序列,具有图26中所示的未加工的氨基酸序列(SEQ ID NO:21),并且由图27中所示的核苷酸序列(SEQ ID NO:22)编码。所选择的hENG(26-378)-hFc形式也使用TPA前导序列,具有图28中所示的未加工的氨基酸序列(SEQ ID NO:23),并且由图29中所示的核苷酸序列(SEQ ID NO:24)编码。所选择的hENG(26-359)-hFc形式也使用TPA前导序列,具有图30中所示的未加工的氨基酸序列(SEQ ID NO:25),并且由图31中所示的核苷酸序列(SEQ ID NO:26)编码。申请人还考虑具有TPA前导序列(图32,SEQ ID NO:27)的替选hENG(26-359)-hFc序列,其包含通过TGGG接头与hENG(26-359)连接的N末端截短的hFc结构域(图12,SEQ ID NO:12)。编码这种替选的hENG(26-359)-hFc蛋白的核苷酸序列示出在图33(SEQ ID NO:28)中。所选择的hENG(26-346)-hFc形式使用TPA前导序列,具有图34中所示的包含N末端截短的hFc结构域的未加工的氨基酸序列(SEQ ID NO:29),并且由图35中所示的核苷酸序列(SEQ ID NO:30)编码。

[0226] 将所选择的各自具有N末端截短的Fc结构域(SEQ ID NO:12)的hENG-hFc变体在CHO细胞中稳定表达(使用上述方法)并且通过过滤和蛋白质A色谱从条件培养基中纯化。CHO细胞中表达的成熟蛋白质的分析确认了hENG(26-359)-hFc和hENG(26-346)-hFc的N末端序列如所预期。在蛋白质产率(理论分子量中的差异未校正)的基础上,hENG(26-346)-hFc(90mg/升)优于hENG(26-359)-hFc(9mg/升)和全长hENG(26-586)-hFc(31mg/升)二者。如图36所示,通过尺寸排阻色谱分析这些纯化样品表明,hENG(26-346)-hFc蛋白的质量(96%单体)优于hENG(26-359)-hFc蛋白的质量(84%单体),并且等于hENG(26-586)-hFc蛋白的质量(96%单体)。因此,与hENG(26-346)-hFc相比,hENG(26-359)-hFc的更高水平的高分子量聚集体需要使用额外的纯化步骤。

[0227] 实施例9:BMP-9/BMP-10与截短的hENG-hFc变体的高亲和力结合

[0228] 申请人使用SPR方法筛选以下hENG-hFc蛋白变体对于人BMP-9和BMP-10的高亲和力结合。在这些实验中,使捕获的hENG-hFc蛋白暴露于各自为100nM的可溶性BMP-9或BMP-10。

[0229]

	人构建体	与 hBMP-9 和 hBMP-10 的结合
全长	hENG(26-586)-hFc	++++
羧基端截短	hENG(26-581)-hFc	++++
	hENG(26-437)-hFc	++++
	hENG(26-378)-hFc	++++
	hENG(26-359)-hFc	++++
	hENG(26-346)-hFc	++++

		hENG(26-332)-hFc	–
		hENG(26-329)-hFc	–
		hENG(26-257)-hFc	–
	氨基酸截短	**hENG(360-586)-hFc**	–
		hENG(438-586)-hFc	–
		hENG(458-586)-hFc	–
	双截短	**hENG(61-346)-hFc**	–
[0230]		**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	–

[0231] ++++KD＜1nM

[0232] -检测不到结合

[0233] 如上表所示的，仅在全长构建体和如hENG(26-346)-hFc一样短的C末端截短变体中观察到了与BMP-9和BMP-10的高亲和力结合。测试的所有大于61个氨基酸的N末端截短失去了与BMP-9和BMP-10的高亲和力结合。

[0234] 从配体组中筛选与C末端截短的变体hENG(26-346)-hFc、hENG(26-359)-hFc和hENG(26-437)-hFc的潜在结合。对于BMP-9和BMP-10，这三种蛋白质的高亲和力结合是选择性的。不论是hENG(26-346)-hFc、hENG(26-359)-hFc还是hENG(26-437)-hFc，均未表现出与BMP-2、BMP-7、TGF-β1、TGF-β2、TGF-β3或活化素A的可检出的结合，即使在高配体浓度下也是如此。

	配体	**构建体结合**		
[0235]		**hENG(26-346)-hFc***	**hENG(26-359)-hFc****	**hENG(26-437)-hFc****
	hBMP-2	–	–	–

[0236]

hBMP-2/7	–	–	–
hBMP-7	–	–	–
hBMP-9	++++	++++	++++
hBMP-10	++++	++++	++++
hTGF-β1	–	–	–
hTGF-β2	–	–	–
hTGF-β3	–	–	–
hActivinA	–	–	–

[0237] *[hBMP-9],[hBMP-10]＝5nM;[hTGF-β3]＝50nM;所有其他受试配体为100nM

[0238] **[hBMP-9],[hBMP-10]＝5nM;[hTGF-β3]＝50nM;所有其他受试配体为100nM

[0239] ++++KD＜1nM

[0240] -检测不到结合

[0241] 申请人使用SPR方法比较BMP-9与五种构建体结合的动力学:hENG(26-586)-hFc、hENG(26-437)-hFc、hENG(26-378)-hFc、hENG(26-359)-hFc和hENG(26-346)-hFc。图37示出了多种构建体的结合曲线,下表列出了平衡解离常数和解离速率常数(k_d)的计算值。人BMP-9对于hENG(26-359)-hFc或hENG(26-346)-hFc的亲和力(K_D在低的皮摩尔范围)比全长构建体强近一个数量级。非常理想的是配体陷阱如ENG-Fc表现出相对慢的配体解离速率,因此与全长构建体相比hENG(26-346)-hFc与BMP-9的解离速率改善(降低)十倍是特别值得注意的。

[0242]

配体	构建体	K_D($\times10^{-12}$ M)	k_d($\times10^{-4}$ s^{-1})
hBMP-9	hENG(26-586)-hFc *	33	25
	hENG(26-437)-hFc **	19	14
	hENG(26-378)-hFc **	6.7	3.4
	hENG(26-359)-hFc *	4.2	3.5
	hENG(26-346)-hFc *	4.3	2.4

[0243] *来自于CHO细胞的蛋白质

[0244] **来自于HEK293细胞的蛋白质

[0245] 如下文所示,与全长构建体相比,每一种截短的变体还以更高亲和力和更好的动力学与BMP-10结合。尽管如此,相对于BMP-10,截短变体对BMP-9的偏好度(基于K_D比值)不同,hENG(26-346)-hFc表现出最大的差异,hENG(26-437)-hFC表现出最小差异。截短变体之间配体偏好度的差异可能潜在地转化成其体内活性的有意义的差异。

配体	构建体	K_D ($\times10^{-12}$ M)	k_d ($\times10^{-4}$ s^{-1})
hBMP-10	hENG(26-586)-hFc *	490	110
	hENG(26-437)-hFc **	130	28
	hENG(26-378)-hFc **	95	19
	hENG(26-359)-hFc *	86	23
	hENG(26-346)-hFc *	140	28

[0246]

[0247] *来自于CHO细胞的蛋白质

[0248] **来自于HEK293细胞的蛋白质

[0249] 前述结果表明，包含hENG ECD的某些C末端截短变体的融合蛋白对于BMP-9和BMP-10表现出高亲和力的结合，但是不与各种其他TGF-β家族配体(包括TGF-β1和TGF-β3)结合。特别地，与全长构建体hENG(26-586)-hFc和截短变体hENG(26-437)-hFc二者相比，截短变体hENG(26-359)-hFc、hENG(26-346)-hFc和hENG(26-378)-hFc在平衡和改善的动力学特性下对于BMP-9表现出更高的结合亲和力。

[0250] 实施例10:ENG N末端区域的二级结构的预测

[0251] 如上文讨论的，发现短至36个氨基酸的N末端截短(hENG(61-346)-hFc)消除了配体与ENG多肽的结合。为了预测甚至更短的N末端截短对于配体结合的影响，利用改进的Psipred版本3(Jones,1999,J Mol Biol 292:195-202)通过计算机预测人内皮联蛋白孤儿结构域的二级结构。分析表明，ENG多肽区域内由SEQ ID NO:1的第26-60位氨基酸限定的有序二级结构限于在SEQ ID NO:1的第42-45位预测具有高置信度的四残基β链以及在SEQ ID NO:1的第28-29位预测具有非常低置信度的二残基β链。因此，以SEQ ID NO:1的第27或28位氨基酸开始的ENG多肽变体，任选地以SEQ ID NO:1的第29-42位氨基酸中任一个开始的那些可能保持重要的结构元件和配体结合。

[0252] 实施例11:ENG-Fc变体在基于细胞的测定中的效力

[0253] 使用A204细胞中的报道基因测定确定hENG-hFc融合蛋白抑制通过BMP-9和BMP-10的信号传导的效力。该测定基于用pGL3BRE荧光素酶报道质粒(Korchynskyi等，2002,J Biol Chem 277:4883-4891)以及Renilla报道质粒(pRLCMV荧光素酶)转染人横纹肌肉瘤细胞系以控制转染效率。BRE基序存在于BMP应答基因(包含Id1启动子)中，因此这种载体一般用于通过Smad1和/或Smad5的信号传导因子。在不存在ENG-Fc融合蛋白的情况下，BMP-9和BMP-10以剂量依赖性方式刺激A204细胞中的信号传导。

[0254] 在测定的第一天，使A204细胞(ATCC®编号:HTB-82™;保藏人:DJ Giard)以10^5个细胞/孔分布在48孔板中。第二天，将包含12μg pGL3 BRE荧光素酶、0.1μg pRLCMV荧光素酶、30μl Fugene 6(Roche Diagnostics)和970μl OptiMEM(Invitrogen)的溶液在室温下预孵育30分钟，之后加入到24ml测定缓冲液(补充有0.1％BSA的McCoy培养基)中。将这种混合物应用到平板接种的细胞(500μl/孔)中用于在37℃下孵育过夜。第三天，除去培养基并且替换成在测定缓冲液中稀释的受试物质(250μl/孔)。在37℃孵育过夜后，润洗细胞并且

用被动裂解缓冲液(Promega E1941)裂解并且冷冻在-70℃下。测定之前,通过轻轻摇动使板升温到室温。将细胞裂解物一式两份地转移到化学发光板(96孔)中并且在来自双荧光素酶报告测定系统(Promega E1980)的具有试剂的分光计中进行分析以确定归一化荧光素酶活性。

[0255] 结果表明,hENG-hFc蛋白是BMP-9和BMP-10介导的细胞信号传导的强效抑制剂。如下表所示,全长构建体hENG(26-586)-hFc抑制通过BMP-9和BMP-10的信号传导,IC_{50}值分别在亚纳摩尔和低纳摩尔的范围。另外,截短变体hENG(26-359)-hFc和hENG(26-346)-hFc二者比hENG(26-586)-hFc更强效。

[0256]

构建体	IC_{50} (nM)	
	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

[0257] 实施例12:截短变体hENG(26-359)-hFc在CAM测定中抑制VEGF可诱导的血管发生

[0258] 申请人在与实施例6中所述相同的CAM测定系统中研究了截短变体hENG(26-359)-hFc对血管发生的影响,其中使用VEGF诱导血管发生。同时的hENG(26-359)-hFc(SEQ ID NO:25;20μg每天)使VEGF处理诱导的额外血管数目降低75%(图38)。基于SPR的研究证实VEGF不结合hENG(26-359)-hFc,因此在本CAM实验中这种变体对于血管发生的影响不是由于融合蛋白与VEGF之间的直接相互作用。应注意的是,基于每种构建体的理论分子量,对于hENG(26-359)-hFc,10μg的剂量相当于实施例6中测试的更长的ENG-Fc构建体使用的14μg的剂量。因此,在抑制VEGF可诱导的血管发生中,与在相同测定系统中具有全长ECD的ENG构建体相比,截短变体hENG(26-359)-hFc表现出相等同(如果不大于的话)的效力(图23)。

[0259] 实施例13:截短变体hENG(26-346)-hFc在小鼠血管反应器测定中抑制血管发生

[0260] 在与实施例7中描述相同的小鼠血管反应器中测试截短变体hENG(26-346)-hFc。将血管反应器皮下植入到无胸腺裸小鼠中(每只小鼠4个),每天用hENG(26-346)-hFc(10mg/kg,s.c.)或载剂(Tris缓冲盐水)处理小鼠,持续11天,此时向小鼠注射异硫氰酸荧光素(FITC)标记的右旋糖酐(20mg/kg,i.v.)并且在20分钟后使小鼠安乐死。然后测量每个血管反应器中包含的FITC右旋糖酐的量,作为血管形成的指示。如图39所示,向血管反应器中添加生长因子(GF)FGF-2和VEGF导致血管形成显著提高,而同时施用hENG(26-346)-hFc完全阻止了这种提高。基于SPR的研究证实hENG(26-346)-hFc不结合FGF-2或VEGF,因此排除了本实验中hENG(26-346)-hFc对可诱导的血管发生的影响是由于融合蛋白与FGF-2或VEGF之间的直接相互作用的可能性。在哺乳动物测定系统中获得的该结果补充了在CAM测定中利用截短变体hENG(26-359)-hFc获得的那些(实施例12)。总之,其证明了引入优选的截短的ENG胞外域的ENG-Fc融合蛋白的体内抗血管发生活性。

[0261] 实施例14:截短变体hENG(26-346)-hFc更长的体内半衰期

[0262] 申请人进行了改进的药代动力学研究以确定hENG(26-346)-hFc的全身消除半衰期,并且将其与全长蛋白质mENG(27-581)-mFc的相比较。使用SAIVI™(小动物体内成像)

Rapid Antibody Labeling试剂盒根据制造商(Invitrogen™)的说明书来用Alexa Fluor® 750染料对hENG(26-346)-hFc蛋白进行荧光标记。通过尺寸排阻色谱使标记的蛋白质与游离标记物分开。向无胸腺裸小鼠(n=3,17-20g)注射经标记的hENG(26-346)-hFc(2mg/kg,s.c.),并且利用IVIS成像系统(Xenogen®/Caliper Life Sciences)进行全身成像,以确定注射后2、4、6、8、24、32、48和72小时的融合蛋白水平。hENG(26-346)-hFc的平均清除半衰期为26.5小时,其比在类似研究中测定的mENG(27-581)-mFc的22小时半衰期长20%。

[0263] 实施例15:ENG-Fc蛋白对小鼠异种移植模型中肿瘤生长的影响

[0264] 在两个不同的小鼠异种移植模型中测试ENG-Fc蛋白以确定这些蛋白质是否可以抑制肿瘤生长。在第一个实验中,向6周龄的无胸腺裸小鼠皮下注射10^6个4T1乳房癌细胞(ATCC®编号:CRL-2539™;保藏人:BA Pulaski)。小鼠(n=10/组)用mENG(27-581)-mFc(10mg/kg)或载剂(Tris缓冲盐水)每日给药(s.c.)。利用数显卡尺手动测量肿瘤,并且根据公式体积=0.5(长度)(宽度^2)计算肿瘤体积。如图40中所示,至植入后24天,与载剂相比,mENG(27-581)-mFc处理使肿瘤体积降低45%。

[0265] 还在Colon-26癌异种移植模型中测试ENG-Fc融合蛋白。向7周龄的BALB/c小鼠皮下注射1.5×10^6个Colon-26癌细胞(ATCC®编号:CRL-2638™;保藏人:N Restifo)。小鼠(n=10/组)用mENG(27-581)-mFc(1、10或30mg/kg)或载剂(Tris缓冲盐水)每日给药(s.c.)。如上所述确定肿瘤体积。如图41中所示,mENG(27-581)-mFc处理以剂量依赖性方式降低了肿瘤体积,至植入后58天,与载剂相比,10mg/kg和30mg/kg剂量分别使肿瘤体积降低了55%和近70%。因此,mENG(27-581)-mFc显著减慢了在小鼠异种移植模型中的两种不同类型肿瘤的生长,符合之前的引入全长鼠ENG胞外域的融合蛋白的抗血管发生活性(实施例5-7)。在初步实验中,与载剂相比,截短变体hENG(26-346)也减慢了Colon-26异种移植模型中的肿瘤生长,符合这种变体在小鼠血管反应器测定中的抗血管发生活性(实施例13)。

[0266] 总之,前述结果证明,包含全长ENG ECD及其某些截短变体的融合蛋白表现出与BMP-9和BMP-10高亲和力的结合,但是不与多种其他TGFβ家族配体(包括TGFβ-1和TGFβ-3)结合。这些ENG多肽可以在模型系统中抑制血管发生和肿瘤生长,因此具有治疗患有不需要的血管发生的患者(包括患有癌症的那些)的潜力。与包含全长ENG ECD的构建体相比,截短的ENG多肽hENG(26-346)-hFc和/或hENG(26-359)-hFc表现出更高的效力和对多种其他关键参数的改善的性能(参见如下总结表)。

[0267]

参数		融合蛋白中的ECD多肽(来自于CHO细胞)		
		全长ECD-人26-586或鼠27-581	人26-359	人26-346
表达	数量	31 mg/L	9 mg/L	90 mg/L
	质量	96%单体	84%单体	96%单体
结合亲和力(K_D)	BMP-9	33 pM	4.2 pM	4.3 pM
	BMP-10	490 pM	86 pM	140 pM
解离速率(k_d)	BMP-9	25×10^{-4} s^{-1}	3.5×10^{-4} s^{-1}	2.4×10^{-4} s^{-1}
	BMP-10	110×10^{-4} s^{-1}	23×10^{-4} s^{-1}	28×10^{-4} s^{-1}
效力(基于细胞的IC_{50})	BMP-9	0.26 nM	0.16 nM	0.19 nM
	BMP-10	7.9 nM	3.5 nM	4.6 nM
清除半衰期		22 h	---	26.5 h
抗血管发生活性	HUVEC	是	---	---
	CAM	65%抑制	75%抑制	---
	血管反应器	100%抑制	---	100%抑制
抗肿瘤活性	4T1肿瘤	是	---	---
	Colon-26肿瘤	是	---	是
		剂量依赖性		

[0268] ---未研究

[0269] 与全长ENG ECD构建体相比，变体hENG(26-346)-hFc特别地具有优秀特性的组合，更高效力、更强结合亲和力、更慢解离速率、更长消除半衰期和更好的蛋白质产量。作为配体陷阱，截短的ENG多肽应优选地表现出慢的配体解离速率，因此与全长构建体相比，hENG(26-346)-hFc与BMP-9解离速率10倍的降低是非常期望的。变体hENG(26-378)-hFc表现出一方面介于hENG(26-346)-hFc与hENG(26-359)-hFc之间，另一方面与hENG(26-437)-hFc之间的BMP-9结合特性(亲和力和解离速率)，hENG(26-378)更接近组装较短构建体。

[0270] 实施例16：利用ENG-Fc蛋白治疗小鼠肝纤维化模型

[0271] 在肝纤维化的小鼠CCL4(四氯化碳)模型中评估ENG-Fc蛋白在治疗纤维化中的效

力。本研究中使用50只小鼠。在实验开始时(第0天)使约14周龄的雄性和雌性A/J小鼠适应实验室至少48小时。在实验期间每日监测动物,并且如果观察到任何发病、死亡和受试物毒性的迹象,则处死。

[0272] 动物通过经口强饲每周两次以1ml/kg的剂量接受橄榄油中的50%CCl4以诱导肝纤维化。如下表中所示给予动物mENG(27-581)-mFc 13周。

[0273]

组	N	肝纤维化	处理	剂量	频率	施用
1	20	CCl4+橄榄油	PBS	等体积	B.I.W.	I.P.
2	20	CCl4+橄榄油	mu-内皮联蛋白	10 mg/kg	T.I.W.	I.P.
3	5	橄榄油	PBS	等体积	B.I.W.	I.P.
4	5	橄榄油	mu-内皮联蛋白	10 mg/kg	T.I.W.	I.P.

[0274] 分析动物体重(BW)、肝重量、肝性能和组织学的变化。在第0天、第28天、第56天和第90天,对动物进行NMR扫描。在第45天或第90天使用CO_2使动物安乐死。对于血清分析,在处死前,使动物禁食12小时,并进行血清取样。收集全血用于肝功能分析,收集每个动物的肝并且称重。将肝的一半在10%福尔马林中放在盒中,并且将一叶肝在液氮中快速冷冻。

[0275] 经过13周的时间,mENG(27-581)-mFc的处理不影响肝重量(以体重的百分比测量)(图42)。在13周的给药期后,处死动物并且用H&E和Masson三色染色对肝切片进行染色(图43-45)。相对于未处理的动物,处理的动物表现出显著降低的纤维化(图45)。另外,油红O染色表明,mENG(27-581)-mFc处理导致肝组织中的脂肪沉积的积累降低,脂肪沉积通常是肝损伤和纤维化沉积的前体(图46)。另外,mENG(27-581)-mFc处理表现为降低肝细胞的气球样变性(ballooning degeneration),气球样变性与细胞凋亡相关并且发现与肝中的炎症相关。与未处理动物相比,经内皮联蛋白处理的组中的血清碱性磷酸酶水平更低(图47)。总之,这些数据表明mENG(27-581)-mFc处理可以降低这种小鼠肝纤维化模型中的肝损伤,因此ENG-Fc蛋白可能可用于治疗肝的纤维化疾病(包括肝硬化和最终的肝细胞癌)。

[0276] 实施例17:ENG-Fc蛋白在肝纤维化的小鼠饮食模型中的作用

[0277] 还在甲硫氨酸和胆碱饮食缺陷(methionine and choline dietary deficiency,MCDD)引起非酒精性脂肪肝炎(nonalcoholic steatohepatitis,NASH)的小鼠模型中评估了ENG-Fc蛋白的效力。向野生型C57BL/6小鼠喂养标准饲料饮食(standard chow diet)或者包含高蔗糖(40%)和脂肪(10%)但是缺少甲硫氨酸和胆碱的饮食,甲硫氨酸和胆碱是用于肝β-氧化和产生极低密度脂蛋白所必需的(Takahashi等,2012,World J Gastroenterol 18:2300-2308)。结果,MCDD小鼠表现出脂肪沉积,这被认为是肝损伤和纤维化沉积的前体(Corbin等,2012,Curr Opin Gastroenterol 28:159-165)。在12周龄,使小鼠处于各自的饮食下并且开始用mENG(27-581)-mFc(10mg/kg)或载剂(n=10/组)每周两次进行腹膜内处理,持续3周。在给药结束时,处死小鼠并且用脂溶性重氮染料油红O对肝切片进行染色,以评估脂肪沉积的程度。

[0278] 如所预期的,用啮齿动物饲料饮食喂养的小鼠在肝组织中仅有很少的脂肪沉积

(数据未示出),而MCDD小鼠表现出许多大的脂肪沉积物,其总体占总组织面积的相当大的比例(图48A、48C)。在MCDD小鼠中,与载剂相比,mENG(27-581)-mFc处理显著降低了肝脂质沉积(图48)。尽管内源TGFβ与肝疾病的进展强烈相关(Dooley等,2012,Cell Tissue Res 347:245-256),包含TGFβ受体II型并且以高亲和力结合TGFβ的Fc融合蛋白对肝脂质沉积物的积累几乎没有影响(数据未示出)。如实施例3中公开的,mENG(27-581)-mFc和其他ENG-Fc蛋白不与TGFβ1、TGFβ2或TGFβ3结合,因此mENG(27-581)-mFc在MCDD小鼠中的生物活性不是由于抑制了通过这些配体的信号传导。总之,这些结果表明,mENG(27-581)-mFc可以显著降低饮食缺陷最终导致的纤维化和非酒精性脂肪性肝炎的小鼠模型中的脂质沉积,因此提供了ENG-Fc蛋白可能可用于治疗肝纤维化的另外的证据。

[0279] 通过引用并入

[0280] 本文中提到的所有出版物和专利通过引用整体并入本文,如同每个单独的出版物或专利均被具体且独立地指出通过引用并入。在矛盾的情况下,以本申请(包括本文中的任何定义)为准。

[0281] 等同方案

[0282] 尽管本文明确公开了本发明的一些具体实施方案,但是以上说明书应解释为说明性的而不是限制性的。在阅读本说明书和所附权利要求书之后,本发明的许多变化对于本领域技术人员将是明显的。本发明的完整范围应通过参考权利要求书连同其等同方案的完整范围以及说明书连同这些变化来确定。

人ENG同种型1（L-ENG）的氨基酸序列

(GenBank NM_001114753)

```
  1 MDRGTLPLAV ALLLASCSLS PTSLAETVHC DLQPVGPERG EVTYTTSQVS KGCVAQAPNA
 61 ILEVHVLFLE FPTGPSQLEL TLQASKQNGT WPREVLLVLS VNSSVFLHLQ ALGIPLHLAY
121 NSSLVTFQEP PGVNTTELPS FPKTQILEWA AERGPITSAA ELNDPQSILL RLGQAQGSLS
181 FCMLEASQDM GRTLEWRPRT PALVRGCHLE GVAGHKEAHI LRVLPGHSAG PRTVTVKVEL
241 SCAPGDLDAV LILQGPPYVS WLIDANHNMQ IWTTGEYSFK IFPEKNIRGF KLPDTPQGLL
301 GEARMLNASI VASFVELPLA SIVSLHASSC GGRLQTSPAP IQTTPPKDTC SPELLMSLIQ
361 TKCADDAMTL VLKKELVAHL KCTITGLTFW DPSCRAEDRG DKPVLRSAYS SCGMQVSASM
421 ISNEAVVNIL SSSSPQRKKV HCLNMDSLSF QLGLYLSPHF LQASNTIEPG QQSFVQVRVS
481 PSVSEFLLQL DSCHLDLGPE GGTVELIQGR AAKGNCVSLL SPSPEGDPRF SFLLHFYTVP
541 IPKTGTLSCT VALRPKTGSQ DQEVHRTVFM RLNIISPDLS GCTSKGLVLP AVLGITFGAF
601 LIGALLTAAL WYIYSHTRSP SKREPVVAVA APASSESSST NHSIGSTQST PCSTSSMA
```

(SEQ ID NO: 1)

图1

编码人ENG同种型1（L-ENG）的核苷酸序列
(GenBank NM_001114753)

```
 361 CCTGCCACTG GACACAGGAT AAGGCCCAGC GCACAGGCCC CCACGTGGAC AGCATGGACC
 421 GCGGCACGCT CCCTCTGGCT GTTGCCCTGC TGCTGGCCAG CTGCAGCCTC AGCCCCACAA
 481 GTCTTGCAGA AACAGTCCAT TGTGACCTTC AGCCTGTGGG CCCCGAGAGG GGCGAGGTGA
 541 CATATACCAC TAGCCAGGTC TCGAAGGGCT GCGTGGCTCA GGCCCCCAAT GCCATCCTTG
 601 AAGTCCATGT CCTCTTCCTG GAGTTCCCAA CGGGCCCGTC ACAGCTGGAG CTGACTCTCC
 661 AGGCATCCAA GCAAAATGGC ACCTGGCCCC GAGAGGTGCT TCTGGTCCTC AGTGTAAACA
 721 GCAGTGTCTT CCTGCATCTC CAGGCCCTGG GAATCCCACT GCACTTGGCC TACAATTCCA
 781 GCCTGGTCAC CTTCCAAGAG CCCCCGGGGG TCAACACCAC AGAGCTGCCA TCCTTCCCCA
 841 AGACCCAGAT CCTTGAGTGG GCAGCTGAGA GGGGCCCCAT CACCTCTGCT GCTCAGCTGA
 901 ATGACCCCCA GAGCATCCTC CTCCGACTGG GCCAAGCCCA GGGGTCACTG TCCTTCTGCA
 961 TGCTGGAAGC CAGCCAGGAC ATGGGCCGCA CGCTCGAGTG GCGGCCGCGT ACTCCAGCCT
1021 TGGTCCGGGG CTGCCACTTG GAAGGCGTGG CCGGCCACAA GGAGGCGCAC ATCCTGAGGG
1081 TCCTGCCGGG CCACTCGGCC GGGCCCCGGA CGGTGACGGT GAAGGTGGAA CTGAGCTGCG
1141 CACCCGGGGA TCTCGATGCC GTCCTCATCC TGCAGGGTCC CCCCTACGTG TCCTGGCTCA
1201 TCGACGCCAA CCACAACATG CAGATCTGGA CCACTGGAGA ATACTCCTTC AAGATCTTTC
1261 CAGAGAAAAA CATTCGTGGC TTCAAGCTCC CAGACACACC TCAAGGCCTC CTGGGGGAGG
1321 CCCGGATGCT CAATGCCAGC ATTGTGGCAT CCTTCGTGGA GCTACCGCTG GCCAGCATTG
1381 TCTCACTTCA TGCCTCCAGC TGCGGTGGTA GGCTGCAGAC CTCACCCGCA CCGATCCAGA
1441 CCACTCCTCC CAAGGACACT TGTAGCCCGG AGCTGCTCAT GTCCTTGATC CAGACAAAGT
1501 GTGCCGACGA CGCCATGACC CTGGTACTAA AGAAAGAGCT TGTTGCGCAT TTGAAGTGCA
1561 CCATCACGGG CCTGACCTTC TGGGACCCCA GCTGTGAGGC AGAGGACAGG GGTGACAAGT
1621 TTGTCTTGCG CAGTGCTTAC TCCAGCTGTG GCATGCAGGT GTCAGCAAGT ATGATCAGCA
1681 ATGAGCGCGT GGTCAATATC CTGTCGAGCT CATCACCACA GCGGAAAAAG GTGCACTGCC
1741 TCAACATGGA CAGCCTCTCT TTCCAGCTGG GCCTCTACCT CAGCCCACAC TTCCTCCAGG
1801 CCTCCAACAC CATCGAGCCG GGGCAGCAGA GCTTTGTGCA GGTCAGAGTG TCCCCATCCG
1861 TCTCCGAGTT CCTGCTCCAG TTAGACAGCT GCCACCTGGA CTTGGGGCCT GAGGGAGGCA
1921 CCGTGGAACT CATCCAGGGC CGGGCGGCCA AGGGCAACTG TGTGAGCCTG CTGTCCCCAA
1981 GCCCCGAGGG TGACCCGCGC TTCAGCTTCC TCCTCCACTT CTACACAGTA CCCATACCCA
2041 AAACCGGCAC CCTCAGCTGC ACGGTAGCCC TGCGTCCCAA GACCGGGTCT CAAGACCAGG
2101 AAGTCCATAG GACTGTCTTC ATGCGCTTGA ACATCATCAG CCCTGACCTG TCTGGTTGCA
2161 CAAGCAAAGG CCTCGTCCTG CCCGCCGTGC TGGGCATCAC CTTTGGTGCC TTCCTCATCG
2221 GGGCCCTGCT CACTGCTGCA CTCTGGTACA TCTACTCGCA CACGCGTTCC CCCAGCAAGC
2281 GGGAGCCCGT GGTGGCGGTG GCTGCCCCGG CCTCCTCGGA GAGCAGCAGC ACCAACCACA
2341 GCATCGGGAG CACCCAGAGC ACCCCCTGCT CCACCAGCAG CATGGCATAG
```

(SEQ ID NO: 2)

图2

人ENG同种型2（S-ENG）的氨基酸序列

(GenBank NM_000118)

```
  1 MDRGTLPLAV ALLLASCSLS PTSLAETVHC DLQPVGPERG EVTYTTSQVS KGCVAQAPNA
 61 ILEVHVLFLE FPTGPSQLEL TLQASKQNGT WPREVLLVLS VNSSVFLHLQ ALGIPLHLAY
121 NSSLVTFQEP PGVNTTELPS FPKTQILEWA AERGPITSAA ELNDPQSILL RLGQAQGSLS
181 FCMLEASQDM GRTLEWRPRT PALVRGCHLE GVAGHKEAHI LRVLPGHSAG PRTVTVKVEL
241 SCAPGDLDAV LILQGPPYVS WLIDANHNMQ IWTTGEYSFK IFPERNIRGF KLPDTPQGLL
301 GEARMLNASI VASFVELPLA SIVSLHASSC GGRLQTSPAP IQTTPPKDTC SPELLMSLIQ
361 TKCADDAMTL VLKKELVAHL KCTITGLTFW DPSCEAEDRG DKFVLRSAYS SCGMQVSASM
421 ISNEAVVNIL SSSSPQRKKV HCLNMDSLSF QLGLYLSPHF LQASNTIEPG QQSFVQVRVS
481 PSVSEFLLQL DSCHLDLGPE GGTVELIQGR AAKGNCVSLL SPSPEGDPRF SFLLHFYTVP
541 IPKTGTLSCT VALRPKTGSQ DQEVHRTVFM RLNIISPDLS GCTSKGLVLP AVLGITFGAF
601 LIGALLTAAL WYIYSHTREY PRPPQ
    (SEQ ID NO: 3)
```

图3

编码人ENG同种型2（S-ENG）的核苷酸序列

(GenBank NM_000118)

```
 361 CCTGCCACTG GACACAGGAT AAGGCCCAGC GCACAGGCCC CCACGTGGAC AGCATGGACC
 421 GCGGCACGCT CCCTCTGGCT GTTGCCCTGC TGCTGGCCAG CTGCAGCCTC AGCCCCACAA
 481 GTCTTGCAGA AACAGTCCAT TGTGACCTTC AGCCTGTGGG CCCCGAGAGG GGCGAGGTGA
 541 CATATACCAC TAGCCAGGTC TCGAAGGGCT GCGTGGCTCA GGCCCCCAAT GCCATCCTTG
 601 AAGTCCATGT CCTCTTCCTG GAGTTCCCAA CGGGCCCGTC ACAGCTGGAG CTGACTCTCC
 661 AGGCATCCAA GCAAAATGGC ACCTGGCCCC GAGAGGTGCT TCTGGTCCTC AGTGTAAACA
 721 GCAGTGTCTT CCTGCATCTC CAGGCCCTGG GAATCCCACT GCACTTGGCC TACAATTCCA
 781 GCCTGGTCAC CTTCCAAGAG CCCCCGGGGG TCAACACCAC AGAGCTGCCA TCCTTCCCCA
 841 AGACCCAGAT CCTTGAGTGG GCAGCTGAGA GGGGCCCCAT CACCTCTGCT GCTGAGCTGA
 901 ATGACCCCCA GAGCATCCTC CTCCGACTGG GCCAAGCCCA GGGGTCACTG TCCTTCTGCA
 961 TGCTGGAAGC CAGCCAGGAC ATGGGCCGCA CGCTCGAGTG GCGGCCGCGT ACTCCAGCCT
1021 TGGTCCGGGG CTGCCACTTG GAAGGCGTGG CCGGCCACAA GGAGGCGCAC ATCCTGAGGG
1081 TCCTGCCGGG CCACTCGGCC GGGCCCCGCA CGGTGACGGT GAAGGTGGAA CTGAGCTGCG
1141 CACCCGGGGA TCTCGATGCC GTCCTCATCC TGCAGGGTCG CCCCTACGTG TCCTGGCTCA
1201 TCGACGCCAA CCACAACATG CAGATCTGGA CCACTGGAGA ATACTCCTTC AAGATCTTTC
1261 CAGAGAAAAA CATTCGTGGC TTCAAGCTCC CAGACACACC TCAAGGCCTC CTGGGGGAGG
1321 CCCGGATGCT CAATGCCAGC ATTGTGGCAT CCTTCGTGGA GCTACCGCTG GCCAGCATTG
1381 TCTCACTTCA TGCCTCCAGC TGCGGTGGTA GGCTGCAGAC CTCACCCGCA CCGATCCAGA
1441 CCACTCCTCC CAAGGACACT TGTAGCCCGG AGCTGCTCAT GTCCTTGATC CAGACAAAGT
1501 GTGCCGACGA CGCCATGACC CTGGTACTAA AGAAAGAGCT TGTTGCGCAT TTGAAGTGCA
1561 CCATCACGGG CCTGACCTTC TGGGACCCCA GCTGTGAGGC AGAGGACAGG GGTGACAAGT
1621 TTGTCTTGCG CAGTGCTTAC TCCAGCTGTG GCATGCAGCT GTCAGCAAGT ATGATCAGCA
1681 ATGAGGCCGT GGTCAATATC CTGTCGAGCT CATCACCACA GCGGAAAAAG GTGCACTGCC
1741 TCAACATGGA CAGCCTCTCT TTCCAGCTGG GCCTCTACCT CAGCCCACAC TTCCTCCAGG
1801 CCTCCAACAC CATCGAGCCG GGGCAGCAGA GCTTTGTGCA GGTCAGAGTG TCCCCATCCG
1861 TCTCCGAGTT CCTGCTCCAG TTAGACAGCT GCCACCTGGA CTTGGGGCCT GAGGGAGGCA
1921 CCGTGGAACT CATCCAGGGC CGGGCGGCCA AGGGCAACTG TGTGAGCCTG CTGTCCCCAA
1981 GCCCCGAGGG TGACCCGCGC TTCAGCTTCC TCCTCCACTT CTACACAGTA CCCATACCCA
2041 AAACCGGCAC CCTCAGCTGC ACGGTAGCCC TGCGTCCCAA GACCGGGTCT CAAGACCAGG
2101 AAGTCCATAG GACTGTCTTC ATGCGCTTGA ACATCATCAG CCCTGACCTG TCTGGTTGCA
2161 CAAGCAAAGG CCTCGTCCTG CCCGCCGTGC TGGGCATCAC CTTTGGTGCC TTCCTCATCG
2221 GGGCCCTGCT CACTGCTGCA CTCTGGTACA TCTACTCGCA CACGCGTGAG TACCCCAGGC
2281 CCCCACAGTG A
```

(SEQ ID NO: 4)

图4

鼠ENG同种型1（L-ENG）的氨基酸序列

(GenBank NM_007932)

```
  1 MDRGVLPLPI TLLFVIYSFV PTTGLAERVG CDLQPVDPTR GEVTFTTSQV SEGCVAQAAN
 61 AVREVHVLFL DFPGMLSHLE LTLQASKQNG TETQEVFLVL VSNKNVFVKF QAPEIPLHLA
121 YDSSLVIFQG QPRVNITVLP SLTSRKQILD WAATKGAITS IAALDDPQSI VLQLGQDPKA
181 PFLCLPEAHK DMGATLEWQP RAQTPVQSCR LEGVSGHKEA YILRILPGSE AGPRTVTVNM
241 ELSCTSGDAI LILHGPPYVS WFIDINHSMQ ILTTGEYSVK IFPGSKVKGV ELPDTPQGLI
301 AEARKLNASI VTSFVELFLV SNVSLRASSC GGVFQTTPAP VVTTPPKDTC SPVLLMSLIQ
361 PKCGNQVMTL ALNKKHVQTL QCTITGLTFW DSSCQAEDTD DHLVLSSAYS SCGMKVTAHV
421 VSNEVIISFP SGSPPLRKKV QCIDMDSLSF QLGLYLSPHF LQASNTIELG QQAPVQVSVS
481 PLTSEVTVQL DSCHLDLGPE GDMVELIQSR TAKGSCVTLL SPSPEGDPRF SFLLRVYMVP
541 TPTAGTLSCN LALRPSTLSQ EVYKTVSMRL NIVSPDLSGK GLVLPSVLGI TFGAFLIGAL
601 LTAALWYIYS HTRGPSKREP VVAVAAPASS ESSSTNHSIG STQSTPCSTS SMA
```

(SEQ ID NO: 5)

图5

编码鼠ENG同种型1（L-ENG）的核苷酸序列

(GenBank NM_007932)

```
 361 AGCATGGACC GTGGCGTGCT CCCTCTGCCC ATTACCCTGC TGTTTGTCAT CTATAGCTTT
 421 GTACCCACAA CAGGTCTCGC AGAAAGAGTC GGCTGTGATC TACAGCCTGT GGACCCCACA
 481 AGGGGTGAGG TGACGTTTAC CACCAGCCAG GTCTCCGAGG GCTGTGTAGC TCAGGCTGCC
 541 AATGCTGTGC GTGAAGTCCA CGTTCTCTTC CTGGATTTTC CCGGAATGCT GTCACATCTG
 601 GAGCTGACTC TTCAGGCATC CAAGCAAAAT GGCACGGAGA CCCAGGAGGT GTTCCTGGTC
 661 CTCGTTTCGA ACAAAAATGT CTTCGTGAAG TTCCAGGCCC CGGAAATCCC ATTGCACTTG
 721 GCCTACGACT CCAGCCTGGT CATCTTCCAA GGACAGCCAA GAGTCAACAT CACAGTGCTA
 781 CCATCCCTTA CCTCCAGGAA ACAGATCCTC GACTGGGCAG CCACCAAGGG CGCCATCACC
 841 TCGATAGCAG CACTGCATGA CCCCCAAAGC ATCGTCCTCC AGTTGGGCCA AGACCCAAAG
 901 GCACCATTCT TGTGCTTGCC AGAAGCTCAC AAGGACATGG GCGCCACACT TGAATGGCAA
 961 CCACGAGCCC AGACCCCAGT CCAAAGCTGT CGCTTGGAAG GTGTGTCTGG CCACAAGGAG
1021 GCCTACATCC TGAGGATCCT GCCAGGTTCT GAGGCCTGGC CCCGCACGGT GACCGTAATG
1081 ATGGAACTGA GTTGCACATC TGGGGACGCC ATTCTCATCC TGCATGGTCC TCCATATGTC
1141 TCCTGGTTCA TCGACATCAA CCACAGCATG CAGATCTTGA CCACAGGTGA ATACTCCGTC
1201 AAGATCTTTC CAGGAAGCAA GGTCAAAGGC GTGGAGCTCC CAGACACACC CCAAGGCCTG
1261 ATAGCGGAGG CCCGCAAGCT CAATGCCAGC ATTGTCACCT CCTTTGTAGA GCTCCCTCTG
1321 GTCAGCAATG TCTCCCTGAG GGCCTCCAGC TGCGGTGGTG TGTTCCAGAC CACCCCTGCA
1381 CCCGTTGTGA CCACACCTCC CAAGGACACA TGCAGCCCCG TGCTACTCAT GTCCCTGATC
1441 CAGCCAAAGT GTGGCAATCA GGTCATGACT CTGGCACTCA ATAAAAAACA CGTGCAGACT
1501 CTCCAGTGCA CCATCACAGG CCTGACTTTC TGGGACTCCA GCTGCCAGGC TGAAGACACT
1561 GACGACCATC TTGTCCTGAG TAGCGCCTAC TCCAGCTGCG GCATGAAAGT GACAGCCCAT
1621 GTGGTCAGCA ATGAGGTGAT CATCAGTTTC CCGTCAGGCT CACCACCACT TCGGAAAAAG
1681 GTACAGTGCA TCGACATGGA CAGCCTCTCC TTCCAGCTGG GCCTCTACCT CAGCCCGCAC
1741 TTCCTCCAGG CATCCAACAC CATCGAACTA GGCCAGCAGG CCTTCGTACA GGTGAGCGTG
1801 TCTCCATTGA CCTCTGAGGT CACAGTCCAG CTAGATAGCT GCCATCTGGA CTTGGGGCCC
1861 GAAGGGGACA TGGTGGAACT CATCCAGAGC CGAACAGCCA AGGGCAGCTG TGTGACCTTG
1921 CTGTCTCCAA GCCCTGAAGG TGACCCACGC TTCAGCTTCC TCCTCCGGGT CTACATGGTG
1981 CCCACACCCA CCGCTGGCAC CCTCAGTTGC AACTTAGCTC TGCGCCCTAG CACCTTGTCC
2041 CAGGAAGTCT ACAAGACAGT CTCCATGCGC CTGAACATCG TCAGCCCTGA CCTGTCTGGT
2101 AAAGGCCTTG TCCTGCCCTC TGTACTGGGT ATCACCTTTG GTGCCTTCCT GATTGGGGCC
2161 CTGCTCACAG CTGCACTCTG GTACATCTAT TCTCACACAC GTGGCCCCAG CAAGCGGGAG
2221 CCCGTGGTGG CAGTGGCTGC CCCGGCCTCC TCTGAGAGCA GCAGTACCAA CCACAGCATC
2281 GGGAGCACCC AGAGCACCCC CTGCTCCACC AGCAGCATGG CGTAG
```

(SEQ ID NO: 6)

图6


鼠ENG同种型2（S-ENG）的氨基酸序列
(GenBank NM_001146350)
1 MDRGVLPLPI TLLFVIYSFV PTTGLAERVG CDLQPVDPTR GEVTFTTSQV SEGCVAQAAN
61 AVREVEVLFL DFPGMLSHLE LTLQASKQNG TETQEVFLVL VSNKNVFVKF QAPEIPLHLA
121 YDSSLVIFQG QPRVNITVLP SLTSRKQILD WAATKGAITS IAALDDPQSI VLQLGQDPKA
181 PFLCLPEAEK DMGATLEWQP RAQTPVQSCR LEGVSGHKEA YILRILPGSE AGPRTVTVMM
241 ELSCTSGDAI LILHGPPYVS WFIDINESMQ ILTTGEYSVK IFPGSKVKGV ELPDTPQGLI
301 AEARKLNASI VTSFVELPLV SNVSLEASSC GGVFQTTPAP VVTTPPEDTC SPVLLMSLIQ
361 PKCGNQVMTL ALNKKEVQTL QCTITGLTFW DSSCQAEDTD DHLVLSSAYS SCGMKVTAHV
421 VSNEVIISFP SGSFPLEKKV QCIDMDSLSF QLGLYLSPHF LQASNTIELG QQAFVQVSVS
481 FLTSEVTVQL DSCHLDLGPE GDMVELIQSR TAKGSCVTLL SPSPEGDPRF SFLLEVYMVP
541 TPTAGTLSCN LALRPSTLSQ EVYKTVSMRL NIVSPDLSGK GLVLPSVLGI TFGAFLIGAL
601 LTAALWYIYS HTREYPKPPP RSHSKRSGPV HTTPGHTQWS L
(SEQ ID NO: 7)

图7

编码鼠ENG同种型2（S-ENG）的核苷酸序列
(GenBank NM_001146350)

```
 361 AGCATGGACC GTGGCGTGCT CCCTCTGCCC ATTACCCTGC TGTTTGTCAT CTATAGCTTT
 421 GTACCCACAA CAGGTCTCGC AGAAAGAGTC GGCTGTGATC TACAGCCTGT GGACCCCACA
 481 AGGGGTGAGG TGACGTTTAC CACCAGCCAG GTCTCCGAGG GCTGTGTAGC TCAGGCTGCC
 541 AATGCTGTGC GTGAAGTCCA CGTTCTCTTC CTGGATTTTC CCGGAATGCT GTCACATCTG
 601 GAGCTGACTC TTCAGGCATC CAAGCAAAAT GGCACGGAGA CCCAGGAGGT GTTCCTGGTC
 661 CTCGTTTCGA ACAAAAATGT CTTCGTGAAG TTCCAGGCCC CGGAAATCCC ATTGCACTTG
 721 GCCTACGACT CCAGCCTGGT CATCTTCCAA GGACAGCCAA GAGTCAACAT CACAGTGCTA
 781 CCATCCCTTA CCTCCAGGAA ACAGATCCTC GACTGGGCAG CCACCAAGGG CGCCATCACC
 841 TCGATAGCAG CACTGGATGA CCCCCAAAGC ATCGTCCTCC AGTTGGGCCA AGACCCAAAG
 901 GCACCATTCT TGTGCTTGCC AGAAGCTCAC AAGGACATGG GCGCCACACT TGAATGGCAA
 961 CCACGAGCCC AGACCCCAGT CCAAAGCTGT CGCTTGGAAG GTGTGTCTGG CCACAAGGAG
1021 GCCTACATCC TGAGGATCCT GCCAGGTTCT GAGGCCGGGC CCCGGACGGT GACCGTAATG
1081 ATGGAACTGA GTTGCACATC TGGGGACGCC ATTCTCATCC TGCATGGTCC TCCATATGTC
1141 TCCTGGTTCA TCGACATCAA CCACAGCATG CAGATCTTGA CCACAGGTGA ATACTCCGTC
1201 AAGATCTTTC CAGGAAGCAA GGTCAAAGGC GTGGAGCTCC CAGACACACC CCAAGGCCTG
1261 ATAGCGGAGG CCCGCAAGCT CAATGCCAGC ATTGTCACCT CCTTTGTAGA GCTCCCTCTG
1321 GTCAGCAATG TCTCCCTGAG GGCCTCCAGC TGCGGTGGTG TGTTCCAGAC CACCCCTGCA
1381 CCCGTTGTGA CCACACCTCC CAAGGACACA TGCAGCCCCG TGCTACTCAT GTCCCTGATC
1441 CAGCCAAAGT GTGGCAATCA GGTCATGACT CTGGCACTCA ATAAAAAACA CGTGCAGACT
1501 CTCCAGTGCA CCATCACAGG CCTGACTTTC TGGGACTCCA GCTGCCAGGC TGAAGACACT
1561 GACGACCATC TTGTCCTGAG TAGCGCCTAC TCCAGCTGCG GCATGAAAGT GACAGCCCAT
1621 GTGGTCAGCA ATGAGGTGAT CATCAGTTTC CCGTCAGGCT CACCACCACT TCGGAAAAAG
1681 GTACAGTGCA TCGACATGGA CAGCCTCTCC TTCCAGCTGG GCCTCTACCT CAGCCCGCAC
1741 TTCCTCCAGG CATCCAACAC CATCGAACTA GGCCAGCAGG CCTTCGTACA GGTGAGCGTG
1801 TCTCCATTGA CCTCTGAGGT CACAGTCCAG CTAGATAGCT GCCATCTGGA CTTGGGGCCC
1861 GAAGGGGACA TGGTGGAACT CATCCAGAGC CGAACAGCCA AGGGCAGCTG TGTGACCTTG
1921 CTGTCTCCAA GCCCTGAAGG TGACCCACGC TTCAGCTTCC TCCTCCGGGT CTACATGGTG
1981 CCCACACCCA CCGCTGGCAC CCTCAGTTGC AACTTAGCTC TGCGCCCTAG CACCTTGTCC
2041 CAGGAAGTCT ACAAGACAGT CTCCATGCGC CTGAACATCG TCAGCCCTGA CCTGTCTGGT
2101 AAAGGCCTTG TCCTGCCCTC TGTACTGGGT ATCACCTTTG GTGCCTTCCT GATTGGGGCC
2161 CTGCTCACAG CTGCACTCTG GTACATCTAT TCTCACACAC GTGAGTATCC CAAGCCTCCA
2221 CCCCATTCCC ACAGCAAGCG CTCAGGGCCC GTCCACACCA CCCCGGGGCA CACCCAGTGG
2281 AGCCTCTGA
```

(SEQ ID NO: 8)

图8

人ENG胞外域的氨基酸序列

ETVEC DLQPVGPERG EVTYTTSQVS KGCVAQAPNA
ILEVHVLFLE FPTGPSQLEL TLQASKQNGT WPREVLLVLS VNSSVFLHLQ ALGIPLHLAY
NSSLVTFQEP PGVNTTELPS FPKTQILEWA AERGPITSAA ELNDPQSILL RLGQAQGSLS
FCMLEASQDM GRTLEWRPRT PALVRGCHLE GVAGHKEAHI LRVLPGHSAG PRTVTVKVEL
SCAPGDLDAV LILQGPPYVS WLIDANHNMQ IWTTGEYSFK IFPEKNIRGF KLPDTPQGLL
GEARMLNASI VASFVELPLA SIVSLHASSC GGRLQTSPAP IQTTPPKDTC SPELLMSLIQ
TKCADDAMTL VLKKELVAHL KCTITGLTFW DPSCEAEDRG DKFVLRSAYS SCGMQVSASM
ISNEAVVNIL SSSSPQRKKV HCLNMDSLSF QLGLYLSPHF LQASNTIEPG QQSFVQVRVS
PSVSEFLLQL DSCHLDLGPE GGTVELIQGR AAKGNCVSLL SPSPEGDPRF SPLLHFYTVP
IPKTGTLSCT VALRPKTGSQ DQEVHRTVFM RLNIISPDLS GCTSRG (SEQ ID NO: 9)

图9

鼠ENG胞外域的氨基酸序列

ERVG CDLQPVDPTR GEVTFTTSQV SEGCVAQAAN
AVREVHVLFL DFPGMLSHLE LTLQASKQNG TETREVFLVL VSNKNVFVKF QAPEIFLHLA
YDSSLVIFQG QPRVNITVLP SLTSRKQILD WAATKGAITS IAALDDPQSI VLQLGQDPKA
PFLCLPEAHK DNGATLEWQP RAQTPVQSCR LEGVSGHKEA YILRILPGSE AGPRTVTVNM
ELSCTSGDAI LILHGPPYVS WFIDINHSMQ ILTTGEYSVK IFPGSKVKGV ELPDTPQGLI
AEARKLNASI VTSFVELPLV SNVSLRASSC GGVFQTTPAP VVTTPPKDTC SPVLLMSLIQ
PKCGNQVMTL ALNKKHVQTL QCTITGLTFW DSSCQAEDTD DHLVLSSAYS SCGMKVTAHV
VSNEVIISFP SGSPPLRKKV QCIDMDSLSF QLGLYLSPHF LQASNTIELG QQAFVQVSVS
PLTSEVTVQL DSCHLDLGPE GDMVELIQSR TAKGSCVTLL SPSPEGDPRF SFLLRVYMVP
TPTAGTLSCN LALRPSTLSQ EVYKTVSMRL NVVSPDLSGK G (SEQ ID NO: 10)

图10

人IgG1 Fc结构域的氨基酸序列

1 GGPXSCDXTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP PKPXDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK

61 FNWYVDGVEV HNAXTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYXCXVS NKALPAPIEK

121 TISXAKGQPR EPQVYTLPPS REEMTXNQVS LTCLVXGFYP SDIAVEWESN GQPENNYXTT

181 PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PGK

(SEQ ID NO: 11)

图11

N末端截短的人IgG1 Fc结构域的氨基酸序列

1 THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE VKFNWYVDGV

61 EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK VSNKALPAPI EKTISKAKGQ

121 PREPQVYTLP PSREEMTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG

181 SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV FSCSVMHEAL HNHYTQKSLS LSPGK

(SEQ ID NO: 12)

图12

hENG(26-586)-hFc的氨基酸序列

```
  1 MDAMKRGLCC VLLLCGAVFV SPGAETVHCD LQPVGPERDE VTYTTSQVSK
 51 GCVAQAPNAI LEVHVLFLEF PTGPSQLELT LQASKQNGTW PREVLLVLSV
101 NSSVFLHLQA LGIPLHLAYN SSLVTFQEPP GVNTTELPSF PKTQILEWAA
151 ERGPITSAAE LNDPQSILLR LGQAQGSLSF CMLEASQDMG RTLEWRPRTP
201 ALVRGCHLEG VAGHKEAHIL RVLPGHSAGP RTVTVKVELS CAPGDLDAVL
251 ILQGPPYVSW LIDANHNMQI WTTGEYSFKI FPEKNIRGFK LPDTPQGLLG
301 EARMLNASIV ASFVELPLAS IVSLHASSCG GRLQTSPAPI QTTPPKDTCS
351 PELLMSLIQT KCADDAMTLV LKKELVAHLK CTITGLTFWD PSCEAEDRGD
401 KFVLRSAYSS CGMQVSASMI SNEAVVNILS SSSPQRKKVH CLNMDSLSFQ
451 LGLYLSPHFL QASNTIEPGQ QSFVQVRVSP SVSEFLLQLD SCHLDLGPEG
501 GTVELIQGRA AKGNCVSLLS PSPEGDPRFS FLLHFYTVPI PKTGTLSCTV
551 ALRPKTGSQD QEVHRTVFMR LNIISPDLSG CTSKGTGGGP KSCDKTHTCP
601 PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW
651 YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA
701 LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI
751 AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV
801 MHEALHNHYT QKSLSLSPGK
```

(SEQ ID NO: 16)

图13

编码hBNG(26-586)-hFc的核苷酸序列

```
   1 ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC
     AGTCTTCGTT TCGCCCGGCG CCGAAACAGT CCATTGTGAC CTTCAGCCTG
 101 TGGGCCCCGA GAGGGACGAG GTGACATATA CCACTAGCCA GGTCTCGAAG
     GGCTGCGTGG CTCAGGCCCC CAATGCCATC CTTGAAGTCC ATGTCCTCTT
 201 CCTGGAGTTC CCAACGGGCC CGTCACAGCT GGAGCTGACT CTCCAGGCAT
     CCAAGCAAAA TGGCACCTGG CCCCGAGAGG TGCTTCTGGT CCTCAGTGTA
 301 AACAGCAGTG TCTTCCTGCA TCTCCAGGCC CTGGGAATCC CACTGCACTT
     GGCCTACAAT TCCAGCCTGG TCACCTTCCA AGAGCCCCCG GGGGTCAACA
 401 CCACAGAGCT GCCATCCTTC CCCAAGACCC AGATCCTTGA GTGGGCAGCT
     GAGAGGGGCC CCATCACCTC TGCTGCTGAG CTGAATGACC CCCAGAGCAT
 501 CCTCCTCCGA CTGGGCCAAG CCCAGGGGTC ACTGTCCTTC TGCATGCTGG
     AAGCCAGCCA GGACATGGGC CGCACGCTCG AGTGGCGGCC GCGTACTCCA
 601 GCCTTGGTCC GGGGCTGCCA CTTGGAAGGC GTGGCCGGCC ACAAGGAGGC
     GCACATCCTG AGGGTCCTGC CGGGCCACTC GGCCGGGCCC CGGACGGTGA
 701 CGGTGAAGGT GGAACTGAGC TGCGCACCCG GGGATCTCGA TGCCGTCCTC
     ATCCTGCAGG GTCCCCCCTA CGTGTCCTGG CTCATCGACG CCAACCACAA
 801 CATGCAGATC TGGACCACTG GAGAATACTC CTTCAAGATC TTTCCAGAGA
     AAAACATTCG TGGCTTCAAG CTCCCAGACA CACCTCAAGG CCTCCTGGGG
 901 GAGGCCCGGA TGCTCAATGC CAGCATTGTG GCATCCTTCG TGGAGCTACC
     GCTGGCCAGC ATTGTCTCAC TTCATGCCTC CAGCTGCGGT GGTAGGCTGC
1001 AGACCTCACC CGCACCGATC CAGACCACTC CTCCCAAGGA CACTTGTAGC
     CCGGAGCTGC TCATGTCCTT GATCCAGACA AAGTGTGCCG ACGACGCCAT
1101 GACCCTGGTA CTAAAGAAAG AGCTTGTTGC GCATTTGAAG TGCACCATCA
     CGGGCCTGAC CTTCTGGGAC CCCAGCTGTG AGGCAGAGGA CAGGGGTGAC
1201 AAGTTTGTCT TGCGCAGTGC TTACTCCAGC TGTGGCATGC AGGTGTCAGC
     AAGTATGATC AGCAATGAGG CGGTGGTCAA TATCCTGTCG AGCTCATCAC
1301 CACAGCGGAA AAAGGTGCAC TGCCTCAACA TGGACAGCCT CTCTTTCCAG
     CTGGGCCTCT ACCTCAGCCC ACACTTCCTC CAGGCCTCCA ACACCATCGA
1401 GCCGGGGCAG CAGAGCTTTG TGCAGGTCAG AGTGTCCCCA TCCGTCTCCG
     AGTTCCTGCT CCAGTTAGAC AGCTGCCACC TGGACTTGGG GCCTGAGGGA
1501 GGCACCGTGG AACTCATCCA GGGCCGGGCG GCCAAGGGCA ACTGTGTGAG
     CCTGCTGTCC CCAAGCCCCG AGGGTGACCC GCGCTTCAGC TTCCTCCTCC
1601 ACTTCTACAC AGTACCCATA CCCAAAACCG GCACCCTCAG CTGCACGGTA
     GCCCTGCGTC CCAAGACCGG GTCTCAAGAC CAGGAAGTCC ATAGGACTGT
1701 CTTCATGCGC TTGAACATCA TCAGCCCTGA CCTGTCTGGT TGCACAAGCA
     AAGGCACCGG TGGTGGACCC AAATCTTGTG ACAAAACTCA CACATGCCCA
1801 CCGTGCCCAG CACCTGAACT CCTGGGGGGA CCGTCAGTCT TCCTCTTCCC
     CCCAAAACCC AAGGACACCC TCATGATCTC CCGGACCCCT GAGGTCACAT
```

图14

```
1901 GCGTGGTCGT GGACGTGAGC CACGAAGACC CTGAGGTCAA GTTCAACTGG
     TACGTGGACG GCGTGGAGGT GCATAATGCC AAGACAAAGC CGCGGGAGGA
2001 GCAGTACAAC AGCACGTACC GTGTGGTCAG CGTCCTCACC GTCCTGCACC
     AGGACTGGCT GAATGGCAAG GAGTACAAGT GCAAGGTCTC CAACAAAGCC
2101 CTCCCAGCCC CCATCGAGAA AACCATCTCC AAAGCCAAAG GGCAGCCCCG
     AGAACCACAG GTGTACACCC TGCCCCCATC CCGGGAGGAG ATGACCAAGA
2201 ACCAGGTCAG CCTGACCTGC CTGGTCAAAG GCTTCTATCC CAGCGACATC
     GCCGTGGAGT GGGAGAGCAA TGGGCAGCCG GAGAACAACT ACAAGACCAC
2301 GCCTCCCGTG CTGGACTCCG ACGGCTCCTT CTTCCTCTAT AGCAAGCTCA
     CCGTGGACAA GAGCAGGTGG CAGCAGGGGA ACGTCTTCTC ATGCTCCGTG
2401 ATGCATGAGG CTCTGCACAA CCACTACACG CAGAAGAGCC TCTCCCTGTC
     CCCGGGTAAA TGA
     (SEQ ID NO: 17)
```

图14(续)

具有N末端截短的Fc结构域的hENG(26-586)-hFc的氨基酸序列

```
  1 MDAMKRGLCC VLLLCGAVFV SPGAETVHCD LQPVGPERDE VTYTTSQVSK
 51 GCVAQAPNAI LEVHVLFLEF PTGPSQLELT LQASKQNGTW PREVLLVLSV
101 NSSVFLHLQA LGIPLHLAYN SSLVTFQEPP GVNTTELPSF PKTQILEWAA
151 ERGPITSAAE LNDPQSILLR LGQAQGSLSF CMLEASQDMG RTLEWRPRTP
201 ALVRGCHLEG VAGHKEAHIL RVLPGHSAGP RTVTVKVELS CAPGDLDAVL
251 ILQGPPYVSW LIDANHNMQI WTTGEYSFKI FPEKNIRGFK LPDTPQGLLG
301 EARMLNASIV ASFVELPLAS IVSLHASSCG GRLQTSPAPI QTTPPKDTCS
351 PLLLMSLIQT KCADDAMTLV LKKELVARLK CTITGLTFWD PSCEAEDRGD
401 KFVLRSAYSS CGNQVSASMI SNEAVVNILS SSSPQRKKVH CLNMDSLSFQ
451 LGLYLSPHFL QASNTIEPGQ QSFVQVRVSP SVSEFLLQLD SCHLDLGPEG
501 GTVELIQGRA AKGNCVSLLS PSPEGDPRFS FLLHFYTVPI PKTGTLSCTV
551 ALRPKTGSQD QEVHRTVFMR LNIISPDLSG CTSKGGGGT HTCPPCPAPE
601 LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE
651 VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE
701 KTISKAKGQP REPQVYTLPP SREEMTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES
751 NGQPENNYKT TPPVLDSDGS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH
801 NHYTQKSLSL SPGK
(SEQ ID NO: 18)
```

图15

mENG(27-581)-mFc的氨基酸序列

```
  1 MDAMKRGLCC VLLLCGAVFV SPGGERVGCD LQPVDPTRGE VTFTTSQVSE
 51 GCVAQAANAV REVHVLFLDF PGMLSHLELT LQASKQNGTE TQEVFLVLVS
101 NKNVFVKFQA PEIPLHLAYD SSLVIFQGQP RVNITVLPSL TSRKQILDWA
151 ATKGAITSIA ALDDPQSIVL QLGQDPKAFF LCLPEAHKDM GATLEWQPRA
201 QTPVQSCRLE GVSGHKEAYI LRILPGSEAG PRTVTVMMEL SCTSGDAILI
251 LHGPPYVSWF IDINHSMQIL TTGEYSVKIF PGSKVKGVEL PDTPQGLIAE
301 ARKLNASIVT SFVELPLVSN VSLRASSCGG VFQTTPAPVV TTPPKDTCSP
351 VLLMSLIQPK CGNQVMTLAL NKKHVQTLQC TITGLTFWDS SCQAEDTDDH
401 LVLSSAYSSC GMKVTAHVVS NEVIISFPSG SPPLRKKVQC IDMDSLSFQL
451 GLYLSPHFLQ ASNTIELGQQ AFVQVSVSPL TSEVTVQLDS CHLDLGPEGD
501 MVELIQSRTA KGSCVTLLSP SPEGDPRFSF LLRVYMVPTP TAGTLSCNLA
551 LRPSTLSQEV YKTVSMRLNI VSPDLSGKGT GGGEPRVPIT QNPCPPLKEC
601 PPCAAPDLLG GPSVFIFPPK IKDVLMISLS PMVTCVVVDV SEDDPDVQIS
651 WFVNNVEVHT AQTQTHREDY NSTLRVVSAL PIQHQDWMSG KEFKCKVNNR
701 ALPSPIEKTI SKPRGPVRAP QVYVLPPPAE EMTKKEFSLT CMITGFLPAE
751 IAVDWTSNGR TEQNYKNTAT VLDSDGSYFM YSKLRVQKST WERGSLFACS
801 VVHEGLHNHL TTKTISRSLG K
```

(SEQ ID NO: 19)

图16

编码mENG(27-581)-mFc的核苷酸序列

```
   1 ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC
     AGTCTTCGTT TCGCCCGGCG GCGAAAGAGT CGGCTGTGAT CTACAGCCTG
 101 TGGACCCCAC AAGGGGTGAG GTGACGTTTA CCACCAGCCA GGTCTCCGAG
     GGCTGTGTAG CTCAGGCTGC CAATGCTGTG CGTGAAGTCC ACGTTCTCTT
 201 CCTGGATTTT CCCGGAATGC TGTCACATCT GGAGCTGACT CTTCAGGCAT
     CCAAGCAAAA TGGCACGGAG ACCCAGGAGG TGTTCCTGGT CCTCGTTTCG
 301 AACAAAAATG TCTTCGTGAA GTTCCAGGCC CCGGAAATCC CATTGCACTT
     GGCCTACGAC TCCAGCCTGG TCATCTTCCA AGGACAGCCA AGAGTCAACA
 401 TCACAGTGCT ACCATCCCTT ACCTCCAGGA AACAGATCCT CGACTGGGCA
     GCCACCAAGG GCGCCATCAC CTCGATAGCA GCACTGGATG ACCCCCAAAG
 501 CATCGTCCTC CAGTTGGGCC AAGACCCAAA GGCACCATTC TTGTGCTTGC
     CAGAAGCTCA CAAGGACATG GGCGCCACAC TTGAATGGCA ACCACGAGCC
 601 CAGACCCCAG TCCAAAGCTG TCGCTTGGAA GGTGTGTCTG GCCACAAGGA
     GGCCTACATC CTGAGGATCC TGCCAGGTTC TGAGGCCGGG CCCCGGACGG
 701 TGACCGTAAT GATGGAACTG AGTTGCACAT CTGGGGACGC CATTCTCATC
     CTGCATGGTC CTCCATATGT CTCCTGGTTC ATCGACATCA ACCACAGCAT
 801 GCAGATCTTG ACCACAGGTG AATACTCCGT CAAGATCTTT CCAGGAAGCA
     AGGTCAAAGG CGTGGAGCTC CCAGACACAC CCCAAGGCCT GATAGCGGAG
 901 GCCCGCAAGC TCAATGCCAG CATTGTCACC TCCTTTGTAG AGCTCCCTCT
     GGTCAGCAAT GTCTCCCTGA GGGCCTCCAG CTGCGGTGGT GTGTTCCAGA
1001 CCACCCCTGC ACCCGTTGTG ACCACACCTC CCAAGGACAC ATGCAGCCCC
     GTGCTACTCA TGTCCCTGAT CCAGCCAAAG TGTGGCAATC AGGTCATGAC
1101 TCTGGCACTC AATAAAAAAC ACGTGCAGAC TCTCCAGTGC ACCATCACAG
     GCCTGACTTT CTGGGACTCC AGCTGCCAGG CTGAAGACAC TGACGACCAT
1201 CTTGTCCTGA GTAGCGCCTA CTCCAGCTGC GGCATGAAAG TGACAGCCCA
     TGTGGTCAGC AATGAGGTGA TCATCAGTTT CCCGTCAGGC TCACCACCAC
1301 TTCGGAAAAA GGTACAGTGC ATCGACATGG ACAGCCTCTC CTTCCAGCTG
     GGCCTCTACC TCAGCCCGCA CTTCCTCCAG GCATCCAACA CCATCGAACT
1401 AGGCCAGCAG GCCTTCGTAC AGGTGAGCGT GTCTCCATTG ACCTCTGAGG
     TCACAGTCCA GCTAGATAGC TGCCATCTGG ACTTGGGGCC CGAAGGGGAC
1501 ATGGTGGAAC TCATCCAGAG CCGAACAGCC AAGGGCAGCT GTGTGACCTT
     GCTGTCTCCA AGCCCTGAAG GTGACCCACG CTTCAGCTTC CTCCTCCGGG
1601 TCTACATGGT GCCCACACCC ACCGCTGGCA CCCTCAGTTG CAACTTAGCT
     CTGCGCCCTA GCACCTTGTC CCAGGAAGTC TACAAGACAG TCTCCATGCG
1701 CCTGAACATC GTCAGCCCTG ACCTGTCTGG TAAAGGCACC GGTGGGGGTG
     AGCCCAGAGT GCCCATAACA CAGAACCCCT GTCCTCCACT CAAAGAGTGT
1801 CCCCCATGCG CAGCTCCAGA CCTCTTGGGT GGACCATCCG TCTTCATCTT
     CCCTCCAAAG ATCAAGGATG TACTCATGAT CTCCCTGAGC CCCATGGTCA
```

图17

```
1901 CATGTGTGGT GGTGGATGTG AGCGAGGATG ACCCAGACGT CCAGATCAGC
     TGGTTTGTGA ACAACGTGGA AGTACACACA GCTCAGACAC AAACCCATAG
2001 AGAGGATTAC AACAGTACTC TCCGGGTGGT CAGTGCCCTC CCCATCCAGC
     ACCAGGACTG GATGAGTGGC AAGGAGTTCA AATGCAAGGT CAACAACAGA
2101 GCCCTCCCAT CCCCCATCGA GAAAACCATC TCAAAACCCA GAGGGCCAGT
     AAGAGCTCCA CAGGTATATG TCTTGCCTCC ACCAGCAGAA GAGATGACTA
2201 AGAAAGAGTT CAGTCTGACC TGCATGATCA CAGGCTTCTT ACCTGCCGAA
     ATTGCTGTGG ACTGGACCAG CAATGGGCGT ACAGAGCAAA ACTACAAGAA
2301 CACCGCAACA GTCCTGGACT CTGATGGTTC TTACTTCATG TACAGCAAGC
     TCAGAGTACA AAAGAGCACT TGGGAAAGAG GAAGTCTTTT CGCCTGCTCA
2401 GTGGTCCACG AGGGTCTGCA CAATCACCTT ACGACTAAGA CCATCTCCCG
     GTCTCTGGGT AAATGA
     (SEQ ID NO: 20)
```

图17(续)

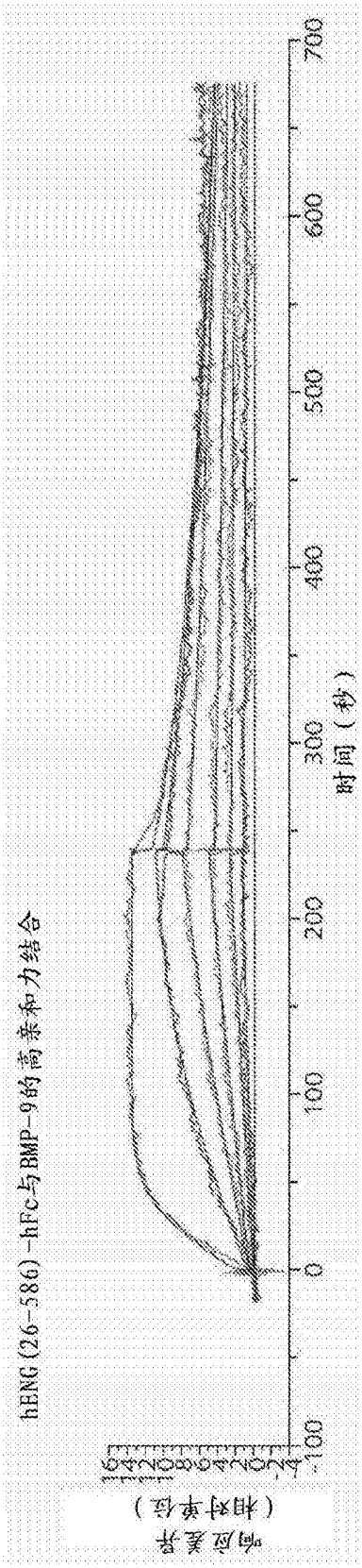

hENG(26-586)-hFc与BMP-9的高亲和力结合
响应差异
（相对单位）
时间（秒）
-100
0
100
200
300
400
500
600
700

图18

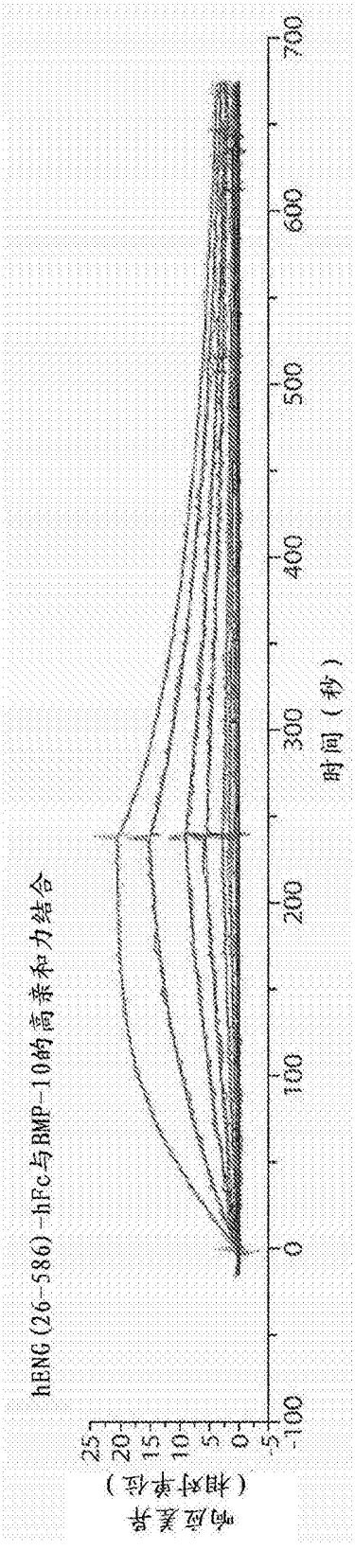

hENG(26-586)-hFc与BMP-10的高亲和力结合
响应差异
（相对单位）
时间（秒）
-100
0
100
200
300
400
500
600
700

图19

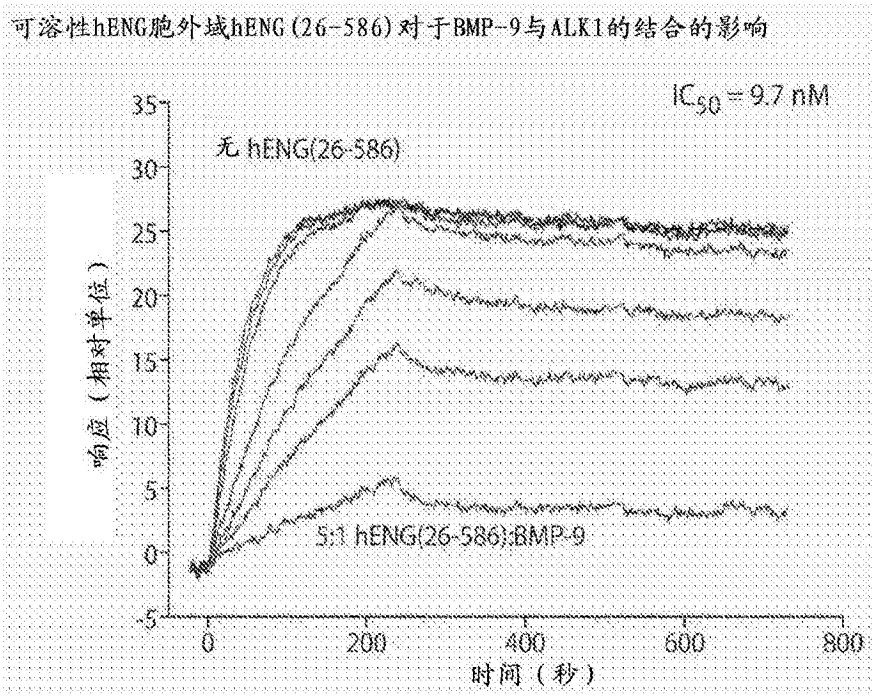

可溶性hENG胞外域hENG(26-586)对于BMP-9与ALK1的结合的影响
IC_{50} = 9.7 nM
无 hENG(26-586)
5:1 hENG(26-586):BMP-9
响应（相对单位）
时间（秒）
35
30
25
20
15
10
5
0
-5
0
200
400
600
800

图20

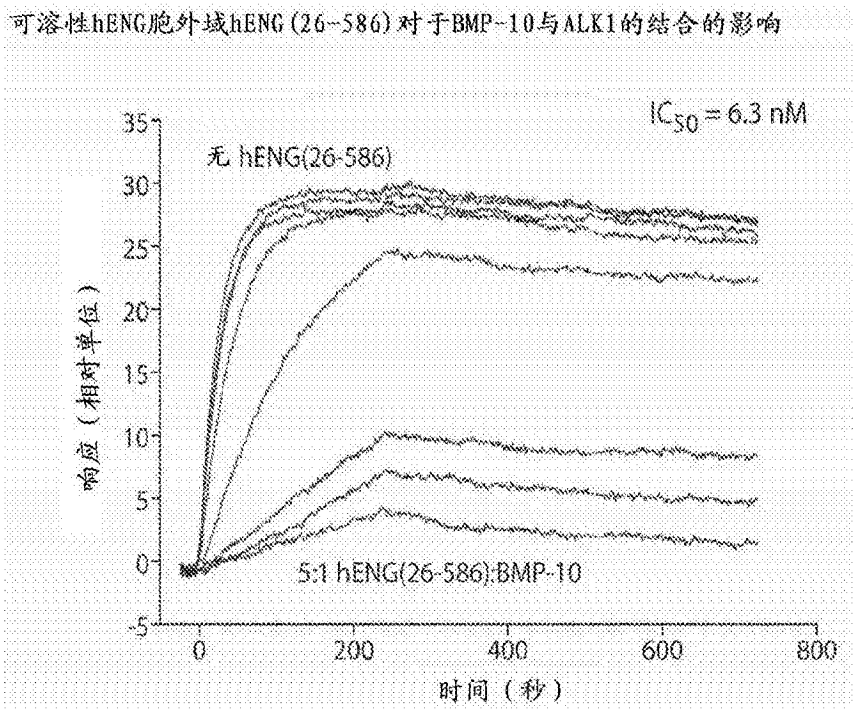

可溶性hENG胞外域hENG(26-586)对于BMP-10与ALK1的结合的影响
IC_{50} = 6.3 nM
无 hENG(26-586)
5:1 hENG(26-586):BMP-10
响应（相对单位）
时间（秒）
35
30
25
20
15
10
5
0
-5
0
200
400
600
800

图21

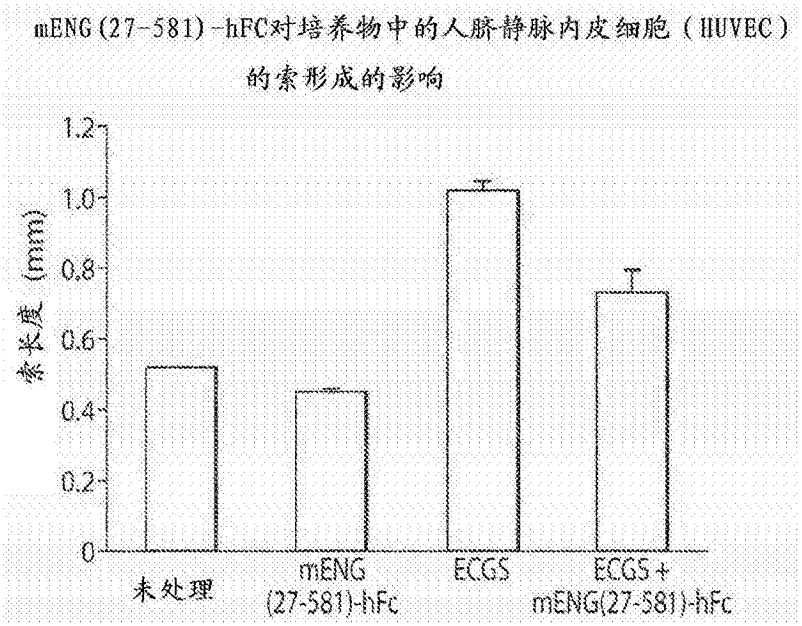

mENG(27-581)-hFC对培养物中的人脐静脉内皮细胞（HUVEC）的索形成的影响
索长度 (mm)
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0
未处理
mENG (27-581)-hFc
ECGS
ECGS + mENG(27-581)-hFc

图22

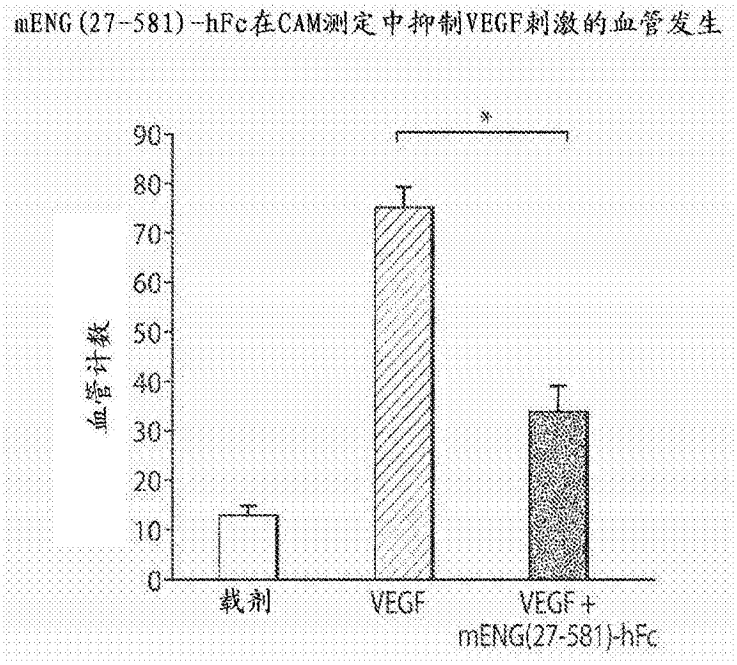

mENG(27-581)-hFc在CAM测定中抑制VEGF刺激的血管发生
血管计数
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
*
载剂
VEGF
VEGF + mENG(27-581)-hFc

图23

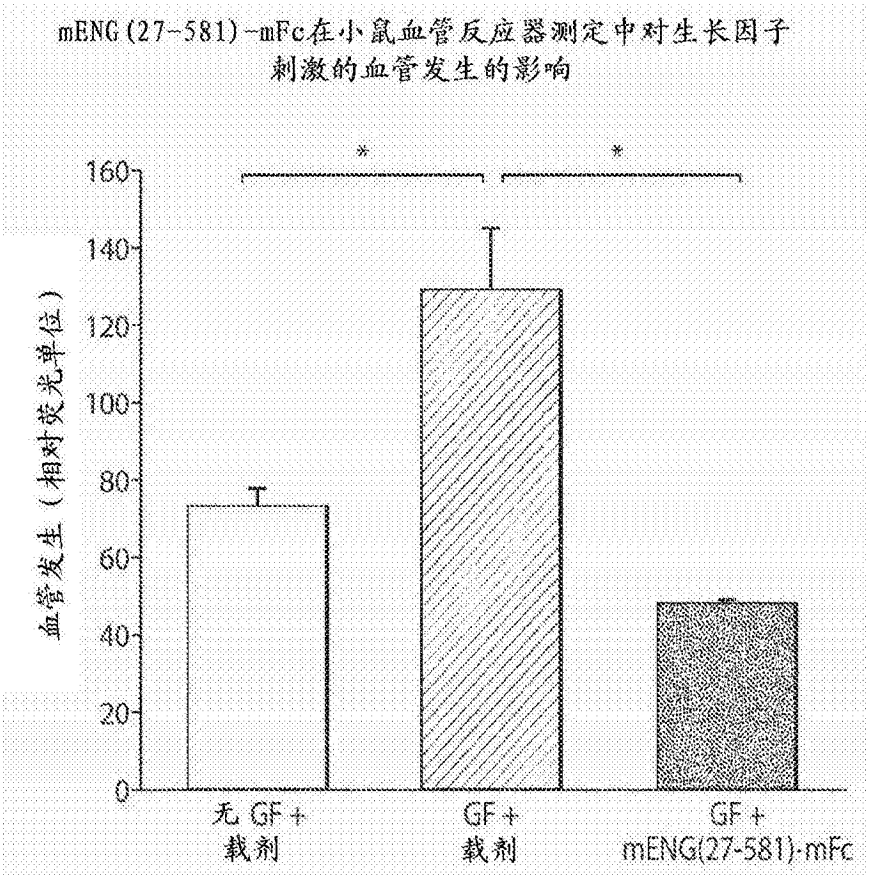

mENG(27-581)-mFc在小鼠血管反应器测定中对生长因子刺激的血管发生的影响
血管发生（相对荧光单位）
160
140
120
100
80
60
40
20
0
*
*
无GF+载剂
GF+载剂
GF+mENG(27-581)-mFc

图24

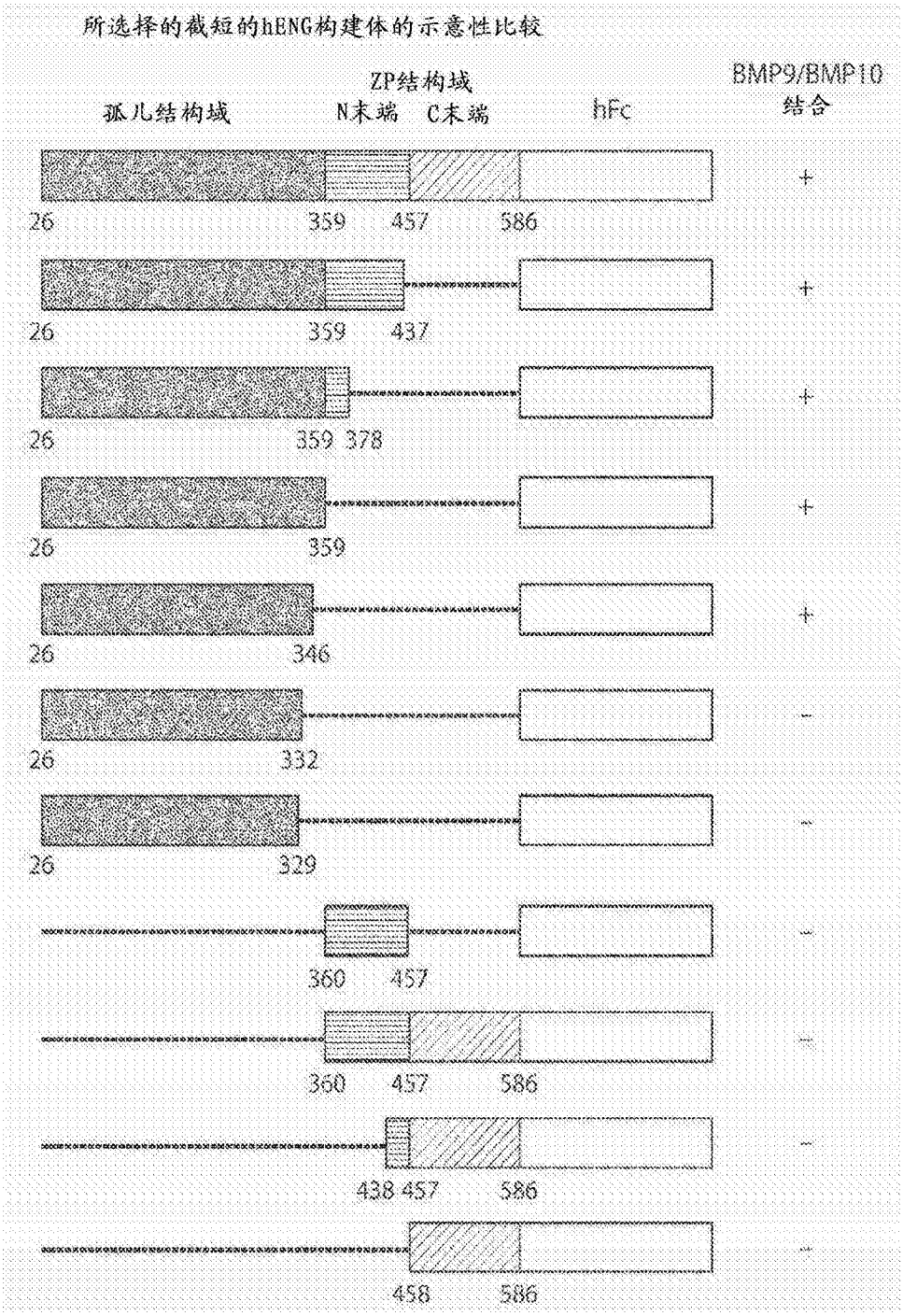

所选择的截短的hENG构建体的示意性比较
孤儿结构域
ZP结构域
N末端
C末端
hFc
BMP9/BMP10
结合
26
359
457
586
+
26
359
437
+
26
359
378
+
26
359
+
26
346
+
26
332
-
26
329
-
360
457
-
360
457
586
-
438
457
586
-
458
586
-

图25

hENG(26-437)-hFc的氨基酸序列

```
  1 MDAMKRGLCC VLLLCGAVFV SPGAETVHCD LQPVGPERDE VTYTTSQVSK
 51 GCVAQAPNAI LEVHVLFLEF PTGPSQLELT LQASKQNGTW PREVLLVLSV
101 NSSVFLHLQA LGIPLHLAYN SSLVTFQEPP GVNTTELPSF PKTQILEWAA
151 ERGPITSAAE LNDPQSILLR LGQAQGSLSF CMLEASQDMG RTLEWRPRTP
201 ALVRGCHLEG VAGHKEAHIL RVLPGHSAGP RTVTVKVELS CAPGDLDAVL
251 ILQGPPYVSW LIDANHNMQI WTTGEYSFKI FPEKNIRGFK LPDTPQGLLG
301 EARMLNASIV ASFVELPLAS IVSLHASSCG GRLQTSPAPI QTTPPKDTCS
351 PELLMSLIQT KCADDAMTLV LKKELVAHLK CTITGLTFWD PSCEAEDRGD
401 KFVLRSAYSS CGMQVSASMI SNEAVVNILS SSSPQRTGGG PKSCDKTHTC
451 PPCPAPELLG GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN
501 WYVDGVEVHN AKTKPREEQY NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK
551 ALPAPIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSRE EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD
601 IAVEWESNGQ PENNYKTTPP VLDSDGSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS
651 VMHEALHNHY TQKSLSLSPG K
(SEQ ID NO: 21)
```

图26

编码hENG(26-437)-hFc的核苷酸序列

```
   1 ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC
     AGTCTTCGTT TCGCCCGGCG CCGAAACAGT CCATTGTGAC CTTCAGCCTG
 101 TGGGCCCCGA GAGGGACGAG GTGACATATA CCACTAGCCA GGTCTCGAAG
     GGCTGCGTGG CTCAGGCCCC CAATGCCATC CTTGAAGTCC ATGTCCTCTT
 201 CCTGGAGTTC CCAACGGGCC CGTCACAGCT GGAGCTGACT CTCCAGGCAT
     CCAAGCAAAA TGGCACCTGG CCCCGAGAGG TGCTTCTGGT CCTCAGTGTA
 301 AACAGCAGTG TCTTCCTGCA TCTCCAGGCC CTGGGAATCC CACTGCACTT
     GGCCTACAAT TCCAGCCTGG TCACCTTCCA AGAGCCCCCG GGGGTCAACA
 401 CCACAGAGCT GCCATCCTTC CCCAAGACCC AGATCCTTGA GTGGGCAGCT
     GAGAGGGGCC CCATCACCTC TGCTGCTGAG CTGAATGACC CCCAGAGCAT
 501 CCTCCTCCGA CTGGGCCAAG CCCAGGGGTC ACTGTCCTTC TGCATGCTGG
     AAGCCAGCCA GGACATGGGC CGCACGCTCG AGTGGCGGCC GCGTACTCCA
 601 GCCTTGGTCC GGGGCTGCCA CTTGGAAGGC GTGGCCGGCC ACAAGGAGGC
     GCACATCCTG AGGGTCCTGC CGGCCACTC GGCCGGGCCC CGGACGGTGA
 701 CGGTGAAGGT GGAACTGAGC TGCGCCACCCG GGGATCTCGA TGCCGTCCTC
     ATCCTGCAGG GTCCCCCCTA CGTGTCCTGG CTCATCGACG CCAACCACAA
 801 CATGCAGATC TGGACCACTG GAGAATACTC CTTCAAGATC TTTCCAGAGA
     AAAACATTCG TGGCTTCAAG CTCCCAGACA CACCTCAAGG CCTCCTGGGG
 901 GAGGCCCGGA TGCTCAATGC CAGCATTGTG GCATCCTTCG TGGAGCTACC
     GCTGGCCAGC ATTGTCTCAC TTCATGCCTC CAGCTGCGGT GGTAGGCTGC
1001 AGACCTCACC CGCACCGATC CAGACCACTC CTCCCAAGGA CACTTGTAGC
     CCGGAGCTGC TCATGTCCTT GATCCAGACA AAGTGTCCCG ACGACGCCAT
1101 GACCCTGGTA CTAAAGAAAG AGCTTGTTGC GCATTTGAAG TGCACCATCA
     CGGGCCTGAC CTTCTGGGAC CCCAGCTGTG AGGCAGAGGA CAGGGGTGAC
1201 AAGTTTGTCT TGCGCAGTGC TTACTCCAGC TGTGGCATGC AGGTGTCAGC
     AAGTATGATC AGCAATGAGG CGGTGGTCAA TATCCTGTCG AGCTCATCAC
1301 CACAGCGGAC CGGTGGTGGA CCCAAATCTT GTGACAAAAC TCACACATGC
     CCACCGTGCC CAGCACCTGA ACTCCTGGGG GGACCGTCAG TCTTCCTCTT
1401 CCCCCCAAAA CCCAAGGACA CCCTCATGAT CTCCCGGACC CCTGAGGTCA
     CATGCGTGGT GGTGGACGTG AGCCACGAAG ACCCTGAGGT CAAGTTCAAC
1501 TGGTACGTGG ACGGCGTGGA GGTGCATAAT GCCAAGACAA AGCCGCGGGA
     GGAGCAGTAC AACAGCACGT ACCGTGTGGT CAGCGTCCTC ACCGTCCTGC
1601 ACCAGGACTG GCTGAATGGC AAGGAGTACA AGTGCAAGGT CTCCAACAAA
     GCCCTCCCAG CCCCCATCGA GAAAACCATC TCCAAAGCCA AAGGGCAGCC
1701 CCGAGAACCA CAGGTGTACA CCCTGCCCCC ATCCCGGGAG GAGATGACCA
     AGAACCAGGT CAGCCTGACC TGCCTGGTCA AAGGCTTCTA TCCCAGCGAC
1801 ATCGCCGTGG AGTGGGAGAG CAATGGGCAG CCGGAGAACA ACTACAAGAC
     CACGCCTCCC GTGCTGGACT CCGACGGCTC CTTCTTCCTC TATAGCAAGC
1901 TCACCGTGGA CAAGAGCAGG TGGCAGCAGG GGAACGTCTT CTCATGCTCC
     GTGATGCATG AGGCTCTGCA CAACCACTAC ACGCAGAAGA GCCTCTCCCT
2001 GTCCCCGGGT AAATGA
     (SEQ ID NO: 22)
```

图27

hENG(26-378)-hFc的氨基酸序列

```
  1 MDAMKRGLCC VLLLCGAVFV SPGAETVHCD LQPVGPERDE VTYTTSQVSK
 51 GCVAQAPNAI LEVHVLFLEF PTGPSQLELT LQASKQNGTW PREVLLVLSV
101 NSSVFLHLQA LGIPLHLAYN SSLVTFQEPP GVNTTELPSF PKTQILEWAA
151 ERGPITSAAE LNDPQSILLR LGQAQGSLSF CMLEASQDMG RTLEWRPRTP
201 ALVRGCHLEG VAGHKEAHIL RVLPGHSAGP RTVTVKVELS CAPGDLDAVL
251 ILQGPPYVSW LIDANHNMQI WTTGEYSFKI FPEKNIRGFK LPDTPQGLLG
301 EARMLNASIV ASFVELPLAS IVSLHASSCG GRLQTSPAPI QTTPPKDTCS
351 PELLMSLIQT KCADDAMTLV LKKELVATGG GTHTCPPCPA PELLGGPSVF
401 LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG VEVHNAKTKP
451 REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVSNKALPAP IEKTISKAKG
501 QPREPQVYTL PPSREEMTKN QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNGQPENNY
551 KTTPPVLDSD GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL
601 SLSPGK
```

(SEQ ID NO: 23)

图28

编码hENG(26-378)-hFc的核苷酸序列

```
   1 ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC AGTCTTCGTT
  61 TCGCCCGGCG CCGAAACAGT CCATTGTGAC CTTCAGCCTG TGGGCCCCGA GAGGGACGAG
 121 GTGACATATA CCACTAGCCA GGTCTCGAAG GGCTGCGTGG CTCAGGCCCC CAATGCCATC
 181 CTTGAAGTCC ATGTCCTCTT CCTGGAGTTC CCAACGGGCC CGTCACAGCT GGAGCTGACT
 241 CTCCAGGCAT CCAAGCAAAA TGGCACCTGG CCCCGAGAGG TGCTTCTGGT CCTCAGTGTA
 301 AACAGCAGTG TCTTCCTGCA TCTCCAGGCC CTGGGAATCC CACTGCACTT GGCCTACAAT
 361 TCCAGCCTGG TCACCTTCCA AGAGCCCCCG GGGGTCAACA CCACAGAGCT GCCATCCTTC
 421 CCCAAGACCC AGATCCTTGA GTGGCCAGCT GAGAGGGGCC CCATCACCTC TGCTGCTGAG
 481 CTGAATGACC CCCAGAGCAT CCTCCTCCGA CTGGGCCAAG CCCAGGGGTC ACTGTCCTTC
 541 TGCATGCTGG AAGCCAGCCA GGACATGGGC CGCACGCTCG AGTGGCGGCC GCGTACTCCA
 601 GCCTTGGTCC GCGGCTGCCA CTTGGAAGGC GTGGCCGGCC ACAAGGAGGC GCACATCCTG
 661 AGGGTCCTGC CGGGCCACTC GGCCGGGCCC CGGACGGTGA CGGTGAAGGT GGAACTGAGC
 721 TGCGCACCCG GGGATCTCGA TGCCGTCCTC ATCCTGCAGG GTCCCCCCTA CGTGTCCTGG
 781 CTCATCGACG CCAACCACAA CATGCAGATC TGGACCACTG GAGAATACTC CTTCAAGATC
 841 TTTCCAGAGA AAAACATTCG TGGCTTCAAG CTCCCAGACA CACCTCAAGG CCTCCTGGGG
 901 GAGGCCCGGA TGCTCAATGC CAGCATTGTG GCATCCTTCG TGGAGCTACC GCTGGCCAGC
 961 ATTGTCTCAC TTCATGCCTC CAGCTGCGGT GGTAGGCTGC AGACCTCACC CGCACCGATC
1021 CAGACCACTC CTCCCAAGGA CACTTGTAGC CCGGAGCTGC TCATGTCCTT GATCCAGACA
1081 AAGTGTGCCG ACGACGCCAT GACCCTGGTA CTAAAGAAAG AGCTTGTTGC GACCGGTGGT
1141 GGAACTCACA CATGCCCACC GTGCCCAGCA CCTGAACTCC TGGGGGGACC GTCAGTCTTC
1201 CTCTTCCCCC CAAAACCCAA GGACACCCTC ATGATCTCCC GGACCCCTGA GGTCACATGC
1261 GTGGTGGTGG ACGTGAGCCA CGAAGACCCT GAGGTCAAGT TCAACTGGTA CGTGGACGGC
1321 GTGGAGGTGC ATAATGCCAA GACAAAGCCG CGGGAGGAGC AGTACAACAG CACGTACCGT
1381 GTGGTCAGCG TCCTCACCGT CCTGCACCAG GACTGGCTGA ATGGCAAGGA GTACAAGTGC
1441 AAGGTCTCCA ACAAAGCCCT CCCAGCCCCC ATCGAGAAAA CCATCTCCAA AGCCAAAGGG
1501 CAGCCCCGAG AACCACAGGT GTACACCCTG CCCCCATCCC GGGAGGAGAT GACCAAGAAC
1561 CAGGTCAGCC TGACCTGCCT GGTCAAAGGC TTCTATCCCA GCGACATCGC CGTGGAGTGG
1621 GAGAGCAATG GGCAGCCGGA GAACAACTAC AAGACCACGC CTCCCGTGCT GGACTCCGAC
1681 GGCTCCTTCT TCCTCTATAG CAAGCTCACC GTGGACAAGA GCAGGTGGCA GCAGGGGAAC
1741 GTCTTCTCAT GCTCCGTGAT GCATGAGGCT CTGCACAACC ACTACACGCA GAAGAGCCTC
1801 TCCCTGTCCC CGGGTAAATG A
```

(SEQ ID NO: 24)

图29

hENG(26-359)-hFc的氨基酸序列

```
  1 MDAMKRGLCC VLLLCGAVFV SPGAETVHCD LQPVGPERDE VTYTTSQVSK
 51 GCVAQAPNAI LEVRVLPLEF PTGPSQLELT LQASKQNGTW PREVLLVLSV
101 NSSVFLHLQA LGIPLHLAYN SSLVTFQEPP GVNTTELPSF PKTQILEWAA
151 ERGPITSAAE LNDPQSILLR LGQAQGSLSF CMLEASQDMG RTLEWRPRTP
201 ALVRGCHLEG VAGHKEAHIL RVLPGHSAGP RTVTVKVELS CAPGDLDAVL
251 ILQGPPYVSW LIDANHNMQI WTTGEYSFKI FPEKNIRGFK LPDTPQGLLG
301 EARMLNASIV ASFVELPLAS IVSLHASSCG GRLQTSPAPI QTTPPKDICS
351 PELLMSLITG GGPKSCDKTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS
401 RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS
451 VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPS
501 REEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSDGSF
551 FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PGK
```

(SEQ ID NO: 25)

图30

编码hBNG(26-359)-hFc的核苷酸序列

```
   1 ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC
     AGTCTTCGTT TCGCCGGCG CCGAAACAGT CCATTGTGAC CTTCAGCCTG
 101 TGGGCCCCGA GAGGGACGAG GTGACATATA CCACTAGCCA GGTCTCGAAG
     GGCTGCGTGG CTCAGGCCCC CAATGCCATC CTTGAAGTCC ATGTCCTCTT
 201 CCTGGAGTTC CCAACGGGCC CGTCACAGCT GGAGCTGACT CTCCAGGCAT
     CCAAGCAAAA TGGCACCTGG CCCCGAGAGG TGCTTCTGGT CCTCAGTGTA
 301 AACAGCAGTG TCTTCCTGCA TCTCCAGGCC CTGGGAATCC CACTGCACTT
     GGCCTACAAT TCCAGCCTGG TCACCTTCCA AGAGCCCCCG GGGGTCAACA
 401 CCACAGAGCT GCCATCCTTC CCCAAGACCC AGATCCTTGA GTGGGCAGCT
     GAGAGGGGCC CCATCACCTC TGCTGCTGAG CTGAATGACC CCCAGAGCAT
 501 CCTCCTCCGA CTGGGCCAAG CCCAGGGGTC ACTGTCCTTC TGCATGCTGG
     AAGCCAGCCA GGACATGGGC CGCACGCTCG AGTGGCGGCC GCGTACTCCA
 601 GCCTTGGTCC GGGGCTGCCA CTTGGAAGGC GTGGCCGGCC ACAAGGAGGC
     GCACATCCTG AGGGTCCTGC CGGGCCACTC GGCCGGGCCC CGGACGGTGA
 701 CGGTGAAGGT GGAACTGAGC TGCGCACCCG GGGATCTCGA TGCCGTCCTC
     ATCCTGCAGG GTCCCCCCTA CGTGTCCTGG CTCATCGACG CCAACCACAA
 801 CATGCAGATC TGGACCACTG GAGAATACTC CTTCAAGATC TTTCCAGAGA
     AAAACATTCG TGGCTTCAAG CTCCCAGACA CACCTCAAGG CCTCCTGGGG
 901 GAGGCCCGGA TGCTCAATGC CAGCATTGTG GCATCCTTCG TGGAGCTACC
     GCTGGCCAGC ATTGTCTCAC TTCATGCCTC CAGCTGCGGT GGTAGGCTGC
1001 AGACCTCACC CGCACCGATC CAGACCACTC CTCCCAAGGA CACTTGTAGC
     CCGGAGCTGC TCATGTCCTT GATCACCGGT GGTGGACCCA AATCTTGTGA
1101 CAAAACTCAC ACATGCCCAC CGTGCCCAGC ACCTGAACTC CTGGGGGGAC
     CGTCAGTCTT CCTCTTCCCC CCAAAACCCA AGGACACCCT CATGATCTCC
1201 CGGACCCCTG AGGTCACATG CGTGGTGGTG GACGTGAGCC ACGAAGACCC
     TGAGGTCAAG TTCAACTGGT ACGTGGACGG CGTGGAGGTG CATAATGCCA
1301 AGACAAAGCC GCGGGAGGAG CAGTACAACA GCACGTACCG TGTGGTCAGC
     GTCCTCACCG TCCTGCACCA GGACTGGCTG AATGGCAAGG AGTACAAGTG
1401 CAAGGTCTCC AACAAAGCCC TCCCAGCCCC CATCGAGAAA ACCATCTCCA
     AAGCCAAAGG GCAGCCCCGA GAACCACAGG TGTACACCCT GCCCCCATCC
1501 CGGGAGGAGA TGACCAAGAA CCAGGTCAGC CTGACCTGCC TGGTCAAAGG
     CTTCTATCCC AGCGACATCG CCGTGGAGTG GGAGAGCAAT GGGCAGCCGG
1601 AGAACAACTA CAAGACCACG CCTCCCGTGC TGGACTCCGA CGGCTCCTTC
     TTCCTCTATA GCAAGCTCAC CGTGGACAAG AGCAGGTGGC AGCAGGGGAA
1701 CGTCTTCTCA TGCTCCGTGA TGCATGAGGC TCTGCACAAC CACTACACGC
     AGAAGAGCCT CTCCCTGTCC CCGGGTAAAT GA
```

(SEQ ID NO: 26)

图31

具有N末端截短的Fc结构域的hENG(26-359)-hFc的氨基酸序列

```
  1 MDAMKRGLCC VLLLCGAVFV SPGAETVHCD LQPVGPERDE VTYTTSQVSK
 51 GCVAQAPNAI LEVHVLFLEF PTGPSQLELT LQASKQNGTW PREVLLVLSV
101 NSSVFLHLQA LGIPLHLAYN SSLVTFQEPP GVNTTELPSF PKTQILEWAA
151 ERGPITSAAE LNDPQSILLR LGQAQGSLSF CMLEASQDMG RTLEWRPRTP
201 ALVRGCHLEG VAGHKEAHIL RVLPGHSAGP RTVTVKVELS CAPGDLDAVL
251 ILQGPPYVSW LIDANHNMQI WTTGEYSFKI FPEKNIRGFK LPDTPQGLLG
301 EARMLNASIV ASFVELPLAS IVSLHASSCG GRLQTSPAPI QTTPPKDTCS
351 PELLMSLITG GQTHTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT
401 CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH
451 QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK
501 NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSKL
551 TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGK
    (SEQ ID NO: 27)
```

图32

编码具有N末端截短的Fc结构域的hENG(26-359)-hFc的核苷酸序列

```
   1 ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC
     AGTCTTCGTT TCGCCCGGCG CCGAAACAGT CCATTGTGAC CTTCAGCCTG
 101 TGGGCCCCGA GAGGGACGAG GTGACATATA CCACTAGCCA GGTCTCGAAG
     GGCTGCGTGG CTCAGGCCCC CAATGCCATC CTTGAAGTCC ATGTCCTCTT
 201 CCTGGAGTTC CCAACGGGCC CGTCACAGCT GGAGCTGACT CTCCAGGCAT
     CCAAGCAAAA TGGCACCTGG CCCCGAGAGG TGCTTCTGGT CCTCAGTGTA
 301 AACAGCAGTG TCTTCCTGCA TCTCCAGGCC CTGGGAATCC CACTGCACTT
     GGCCTACAAT TCCAGCCTGG TCACCTTCCA AGAGCCCCCG GGGGTCAACA
 401 CCACAGAGCT GCCATCCTTC CCCAAGACCC AGATCCTTGA GTGGGCAGCT
     GAGAGGGGCC CCATCACCTC TGCTGCTGAG CTGAATGACC CCCAGAGCAT
 501 CCTCCTCCGA CTGGGCCAAG CCCAGGGGTC ACTGTCCTTC TGCATGCTGG
     AAGCCAGCCA GGACATGGGC CGCACGCTCG AGTGGCGGCC GCGTACTCCA
 601 GCCTTGGTCC GGGGCTGCCA CTTGGAAGGC GTGGCCGGCC ACAAGGAGGC
     GCACATCCTG AGGGTCCTGC CGGGCCACTC GGCCGGGCCC CGGACGGTGA
 701 CGGTGAAGGT GGAACTGAGC TGCGCACCCG GGGATCTCGA TGCCGTCCTC
     ATCCTGCAGG GTCCCCCCTA CGTGTCCTGG CTCATCGACG CCAACCACAA
 801 CATGCAGATC TGGACCACTG GAGAATACTC CTTCAAGATC TTTCCAGAGA
     AAAACATTCG TGGCTTCAAG CTCCCAGACA CACCTCAAGG CCTCCTGGGG
 901 GAGGCCCCGA TGCTCAATGC CAGCATTGTG GCATCCTTCG TGGAGCTACC
     GCTGGCCAGC ATTGTCTCAC TTCATGCCTC CAGCTGCGGT GGTAGGCTGC
1001 AGACCTCACC CGCACCGATC CAGACCACTC CTCCCAAGGA CACTTGTAGC
     CCGGAGCTGC TCATGTCCTT GATCACCGGT GGTGGAACTC ACACATGCCC
1101 ACCGTGCCCA GCACCTGAAC TCCTGGGGGG ACCGTCAGTC TTCCTCTTCC
     CCCCAAAACC CAAGGACACC CTCATGATCT CCCGGACCCC TGAGGTCACA
1201 TGCGTGGTGG TGGACGTGAG CCACGAAGAC CCTGAGGTCA AGTTCAACTG
     GTACGTGGAC GGCGTGGAGG TGCATAATGC CAAGACAAAG CCGCGGGAGG
1301 AGCAGTACAA CAGCACGTAC CGTGTGGTCA GCGTCCTCAC CGTCCTGCAC
     CAGGACTGGC TGAATGGCAA GCAGTACAAG TGCAAGGTCT CCAACAAAGC
1401 CCTCCCAGCC CCCATCGAGA AAACCATCTC CAAAGCCAAA GGGCAGCCCC
     GAGAACCACA GGTGTACACC CTGCCCCCAT CCCGGGAGGA GATGACCAAG
1501 AACCAGGTCA GCCTGACCTG CCTGGTCAAA GGCTTCTATC CCAGCGACAT
     CGCCGTGGAG TGGGAGAGCA ATGGGCAGCC GGAGAACAAC TACAAGACCA
1601 CGCCTCCCGT GCTGGACTCC GACGGCTCCT TCTTCCTCTA TAGCAAGCTC
     ACCGTGGACA AGAGCAGGTG GCAGCAGGGG AACGTCTTCT CATGCTCCGT
1701 GATGCATGAG GCTCTGCACA ACCACTACAC GCAGAAGAGC CTCTCCCTGT
     CCCCGGGTAA ATGA
```

(SEQ ID NO: 28)

图33

具有N末端截短的hFc结构域的hENG(26-346)-hFc的氨基酸序列

1 MDAMKRGLCC VLLLCGAVFV SPGAETVHCD LQPVGPERDE VTVTTSQVSK
51 GCVAQAPNAI LEVHVLFLEF PTGPSQLELT LQASKQNGTW PREVLLVLSV
101 NSSVFLHLQA LGIPLHLAYN SSLVTFQEPP GVNTTELPSF PKTQILEWAA
151 ERGPITSAAE LNDPQSILLR LGQAQGSLSF CMLEASQDMG RTLEWRPRTP
201 ALVRGCHLEG VAGHKEAHIL RVLPGHSAGP RTVTVKVELS CAPGDLDAVL
251 ILQGPPYVSW LIDANHNMQI WTTGEYSFKI FPEKNIRGFK LPDTPQGLLG
301 EARMLNASIV ASFVELPLAS IVSLHASSCG GRLQTSPAPI QTTPPTGGGT
351 HTCPPCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV
401 KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV
451 SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP SREEMTKNQV SLTCLVKGFY
501 PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSDGS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF
551 SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGK
(SEQ ID NO: 29)

图34

编码具有N末端截短的hFc结构域的hENG(26-346)-hFc的核苷酸序列

```
   1 ATGGATGCAA TGAAGAGAGG GCTCTGCTGT GTGCTGCTGC TGTGTGGAGC AGTCTTCGTT
  61 TCGCCCGGCG CCGAAACACT CCATTGTGAC CTTCAGCCTG TGGGCCCCGA GAGGGACGAG
 121 GTGACATATA CCACTAGCCA GGTCTCGAAG GGCTGCGTGG CTCAGGCCCC CAATGCCATC
 181 CTTGAAGTCC ATGTCCTCTT CCTGGAGTTC CCAACGGGCC CGTCACAGCT GGAGCTGACT
 241 CTCCAGGCAT CCAAGCAAAA TGGCACCTGG CCCCGAGAGG TGCTTCTGGT CCTCAGTGTA
 301 AACAGCAGTG TCTTCCTGCA TCTCCAGGCC CTGGGAATCC CACTGCACTT GGCCTACAAT
 361 TCCAGCCTGG TCACCTTCCA AGAGCCCCCG GGGGTCAACA CCACAGAGCT GCCATCCTTC
 421 CCCAAGACCC AGATCCTTGA GTGGGCAGCT GAGAGGGGCC CCATCACCTC TGCTGCTGAG
 481 CTGAATGACC CCCAGAGCAT CCTCCTCCGA CTGGGCCAAG CCCAGGGGTC ACTGTCCTTC
 541 TGCATGCTGG AAGCCAGCCA GGACATGGGC CGCACGCTCG AGTGGCGGCC GCGTACTCCA
 601 GCCTTGGTCC GGGGCTGCCA CTTGGAAGGC GTGGCCGGCC ACAAGGAGGC GCACATCCTG
 661 AGGGTCCTGC CGGGCCACTC GGCCGGGCCC CGGACGGTGA CGGTGAAGGT GGAACTGAGC
 721 TGCGCACCCG GGGATCTCGA TGCCGTCCTC ATCCTGCAGG GTCCCCCCTA CGTGTCCTGG
 781 CTCATCGACG CCAACCACAA CATGCAGATC TGGACCACTG GAGAATACTC CTTCAAGATC
 841 TTTCCAGAGA AAAACATTCG TGGCTTCAAG CTCCCAGACA CACCTCAAGG CCTCCTGGGG
 901 GAGGCCCGGA TGCTCAATGC CAGCATTGTG GCATCCTTCG TGGAGCTACC GCTGGCCAGC
 961 ATTGTCTCAC TTCATGCCTC CAGCTGCGGT GGTAGGCTGC AGACCTCACC CGCACCGATC
1021 CAGACCACTC CTCCCACCGG TGGTGGAACT CACACATGCC CACCGTGCCC AGCACCTGAA
1081 CTCCTGGGGG GACCGTCAGT CTTCCTCTTC CCCCCAAAAC CCAAGGACAC CCTCATGATC
1141 TCCCGGACCC CTGAGGTCAC ATGCGTGGTG GTGGACGTGA GCCACGAAGA CCCTGAGGTC
1201 AAGTTCAACT GGTACGTGGA CGGCGTGGAG GTGCATAATG CCAAGACAAA GCCGCGGGAG
1261 GAGCAGTACA ACAGCACGTA CCGTGTGGTC AGCGTCCTCA CCGTCCTGCA CCAGGACTGG
1321 CTGAATGGCA AGGAGTACAA GTGCAAGGTC TCCAACAAAG CCCTCCCAGC CCCCATCGAG
1381 AAAACCATCT CCAAAGCCAA AGGGCAGCCC CGAGAACCAC AGGTGTACAC CCTGCCCCCA
1441 TCCCGGGAGG AGATGACCAA GAACCAGGTC AGCCTGACCT GCCTGGTCAA AGGCTTCTAT
1501 CCCAGCGACA TCGCCGTGGA GTGGGAGAGC AATGGGCAGC CGGAGAACAA CTACAAGACC
1561 ACGCCTCCCG TGCTGGACTC CGACGGCTCC TTCTTCCTCT ATAGCAAGCT CACCGTGGAC
1621 AAGAGCAGGT GGCAGCAGGG GAACGTCTTC TCATGCTCCG TGATGCATGA GGCTCTGCAC
1681 AACCACTACA CGCAGAAGAG CCTCTCCCTG TCCCCGGGTA AATGA
```

(SEQ ID NO: 30)

图35

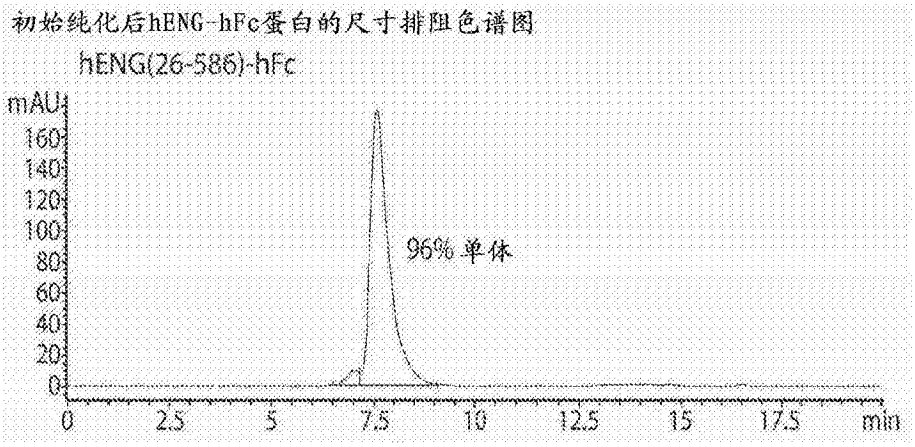


图36A

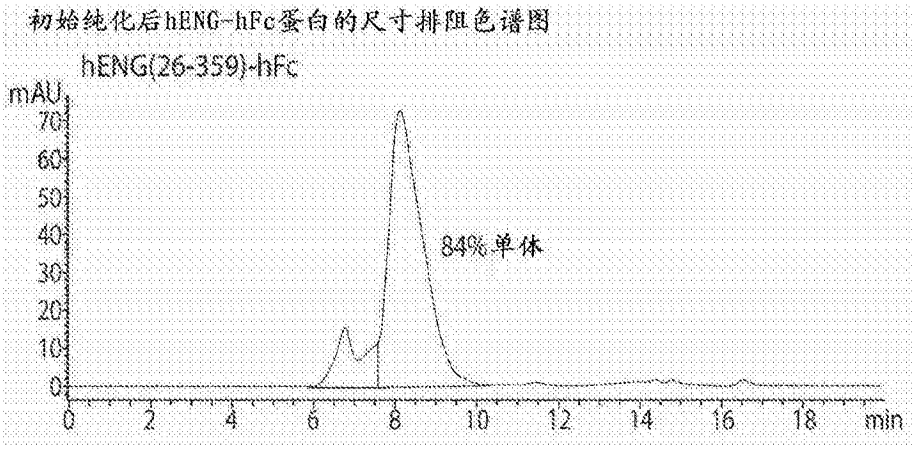


图36B

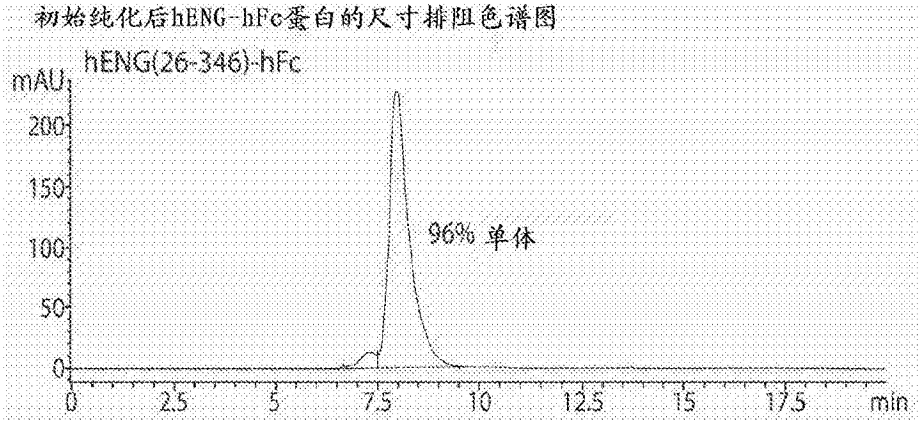


图36C

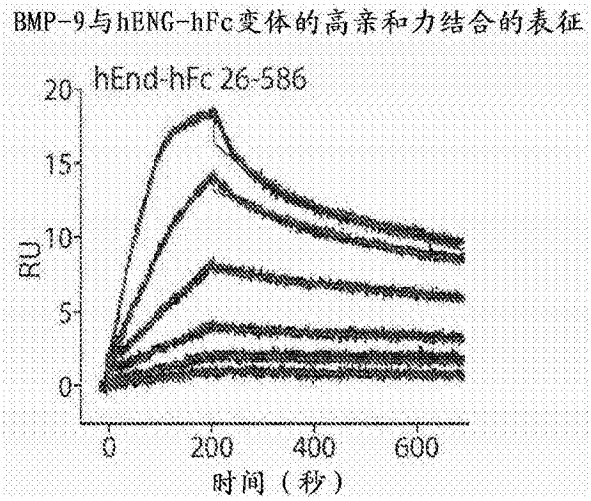


图37A

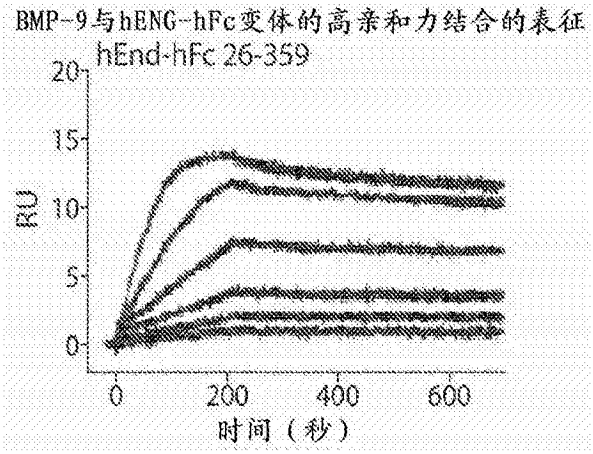


图37B

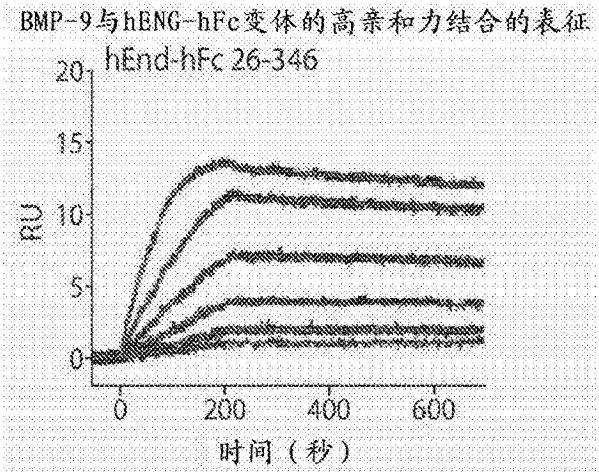


图37C

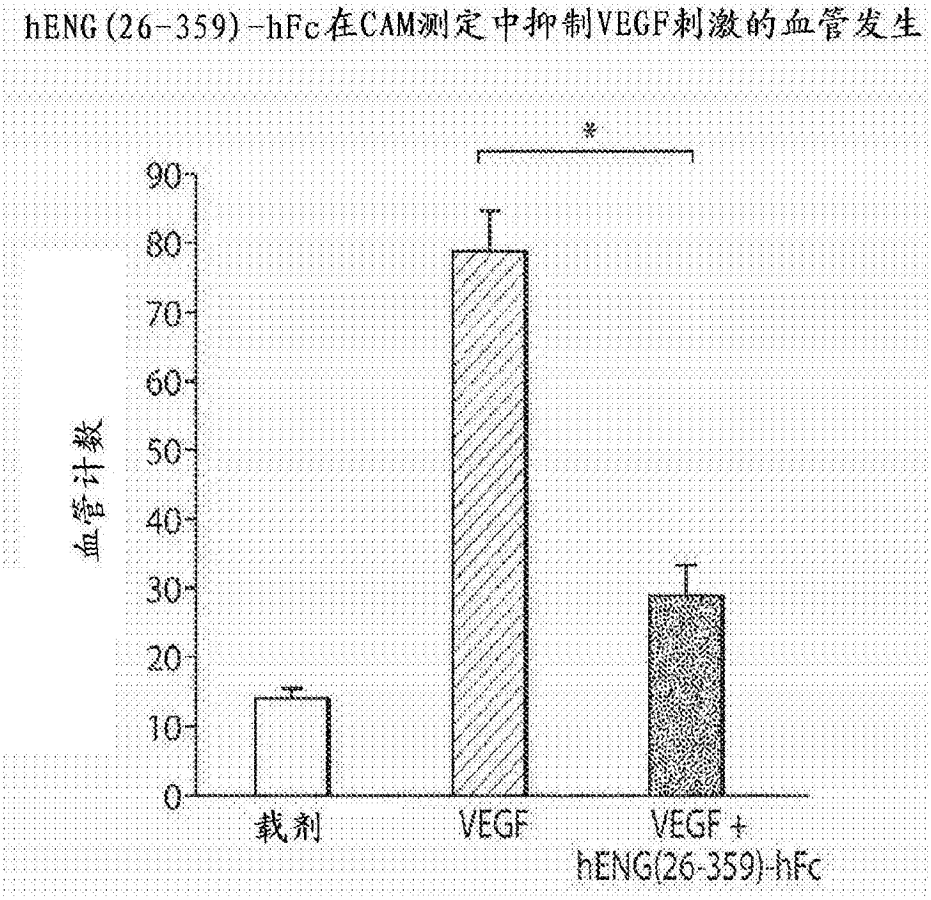

hENG(26-359)-hFc在CAM测定中抑制VEGF刺激的血管发生
*
血管计数
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
载剂
VEGF
VEGF +
hENG(26-359)-hFc

图38

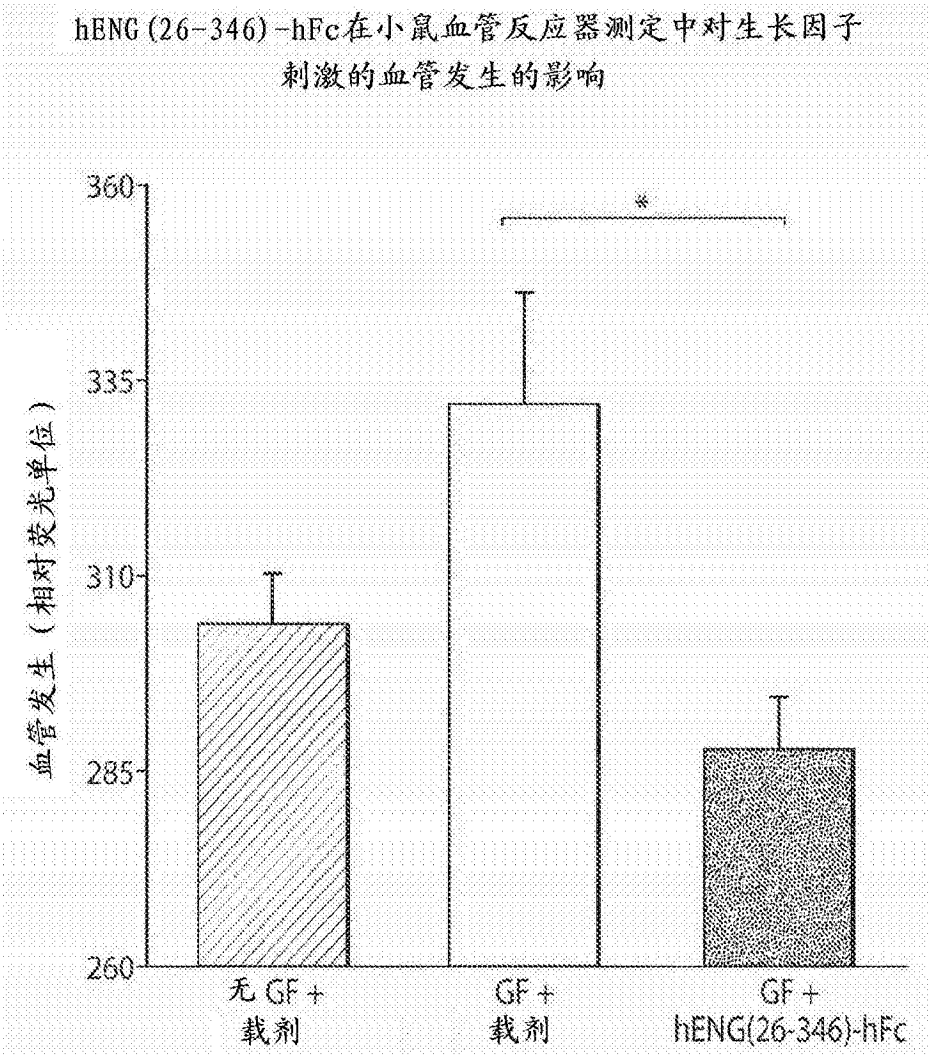

hENG(26-346)-hFc在小鼠血管反应器测定中对生长因子刺激的血管发生的影响
血管发生（相对荧光单位）
360
335
310
285
260
※
无GF+载剂
GF+载剂
GF+hENG(26-346)-hFc

图39

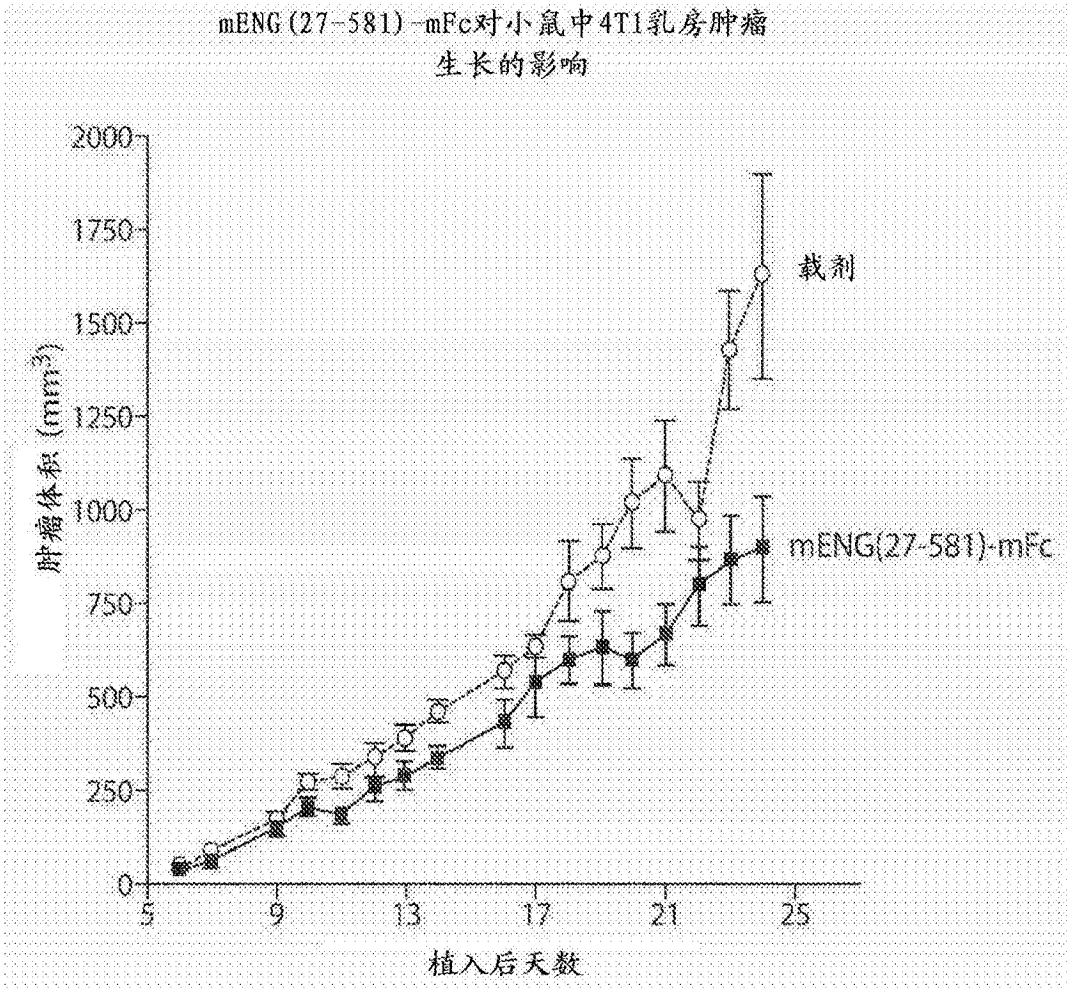

mENG(27-581)-mFc对小鼠中4T1乳房肿瘤
生长的影响
肿瘤体积 (mm3)
2000
1750
1500
1250
1000
750
500
250
0
5
9
13
17
21
25
植入后天数
载剂
mENG(27-581)-mFc

图40

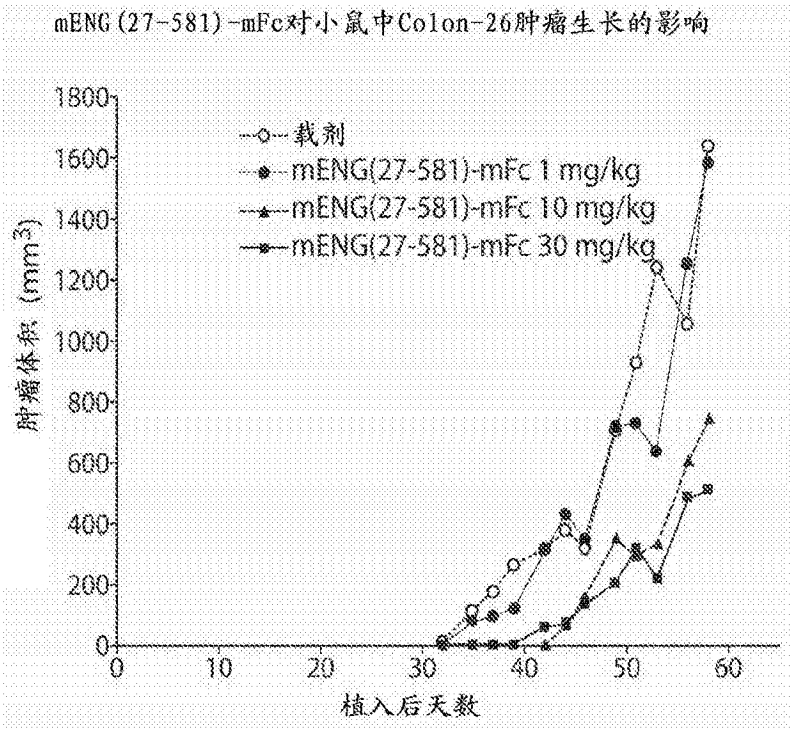

mENG(27-581)-mFc对小鼠中Colon-26肿瘤生长的影响
载剂
mENG(27-581)-mFc 1 mg/kg
mENG(27-581)-mFc 10 mg/kg
mENG(27-581)-mFc 30 mg/kg
肿瘤体积 (mm3)
植入后天数
0
200
400
600
800
1000
1200
1400
1600
1800
0
10
20
30
40
50
60

图41

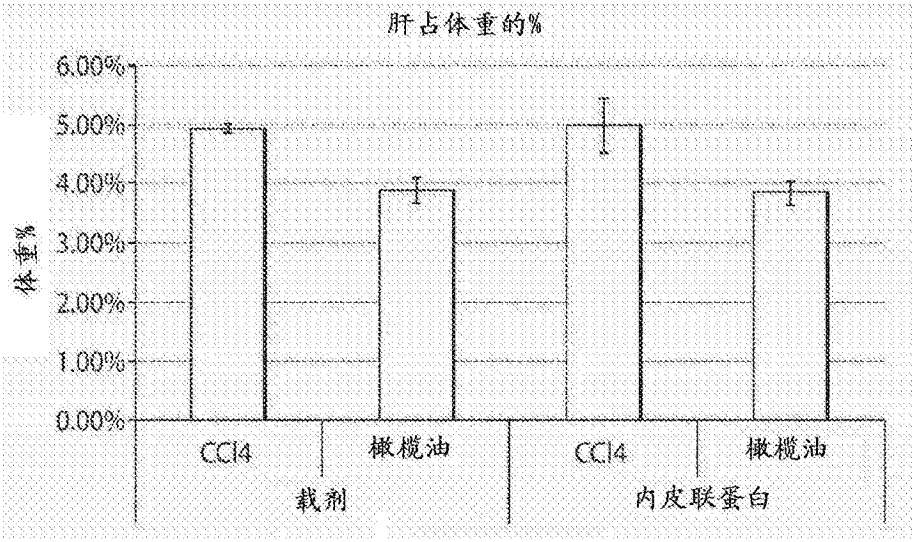

肝占体重的%
体重%
6.00%
5.00%
4.00%
3.00%
2.00%
1.00%
0.00%
CCl4
橄榄油
CCl4
橄榄油
载剂
内皮联蛋白

图42

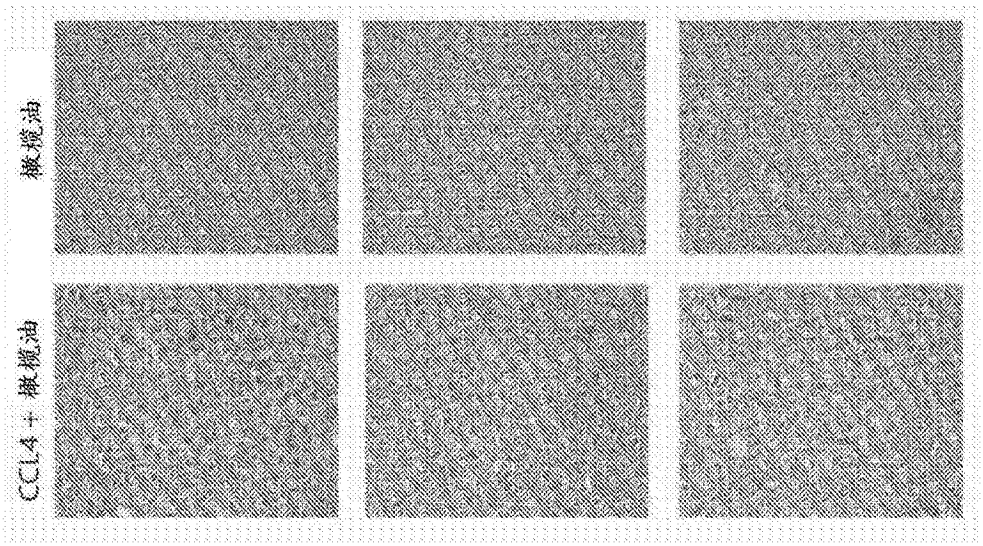


图43

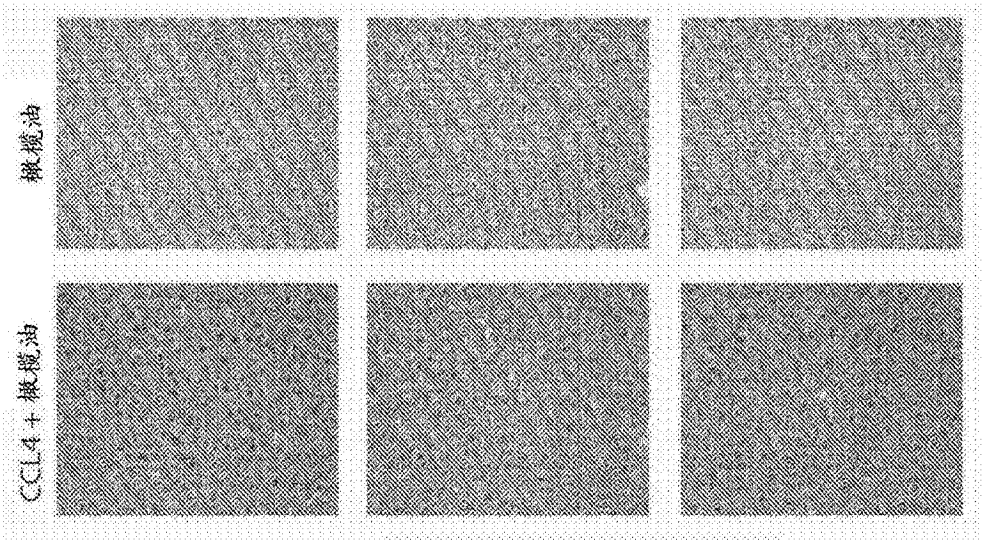


图44

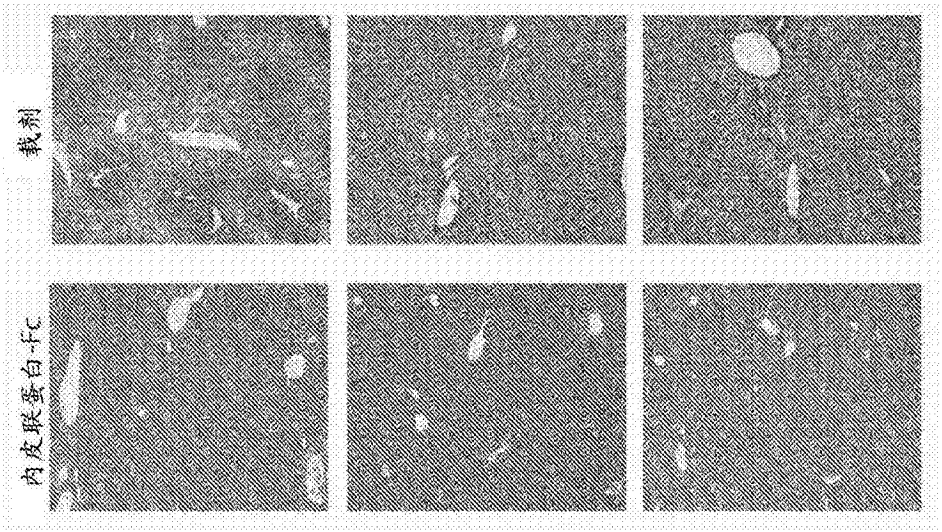

载剂
内皮联蛋白-Fc

图45

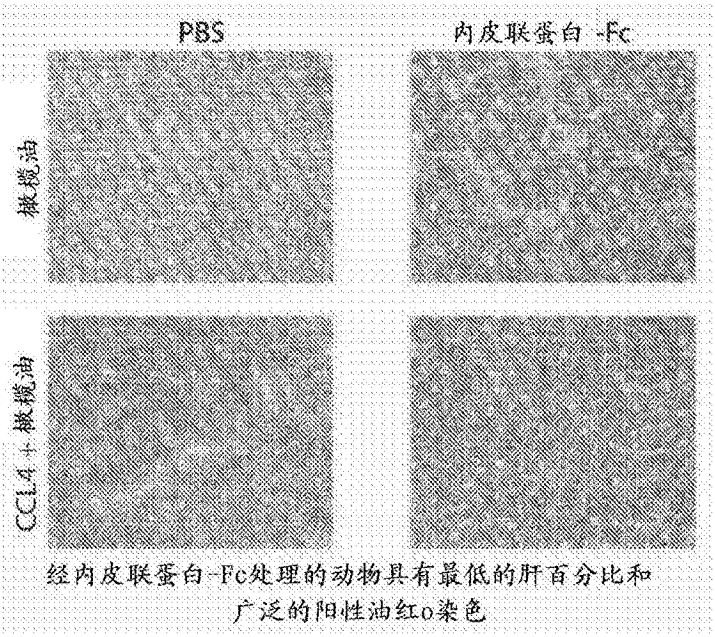

PBS
内皮联蛋白 -Fc
橄榄油
CCL4 + 橄榄油
经内皮联蛋白-Fc处理的动物具有最低的肝百分比和
广泛的阳性油红o染色

图46

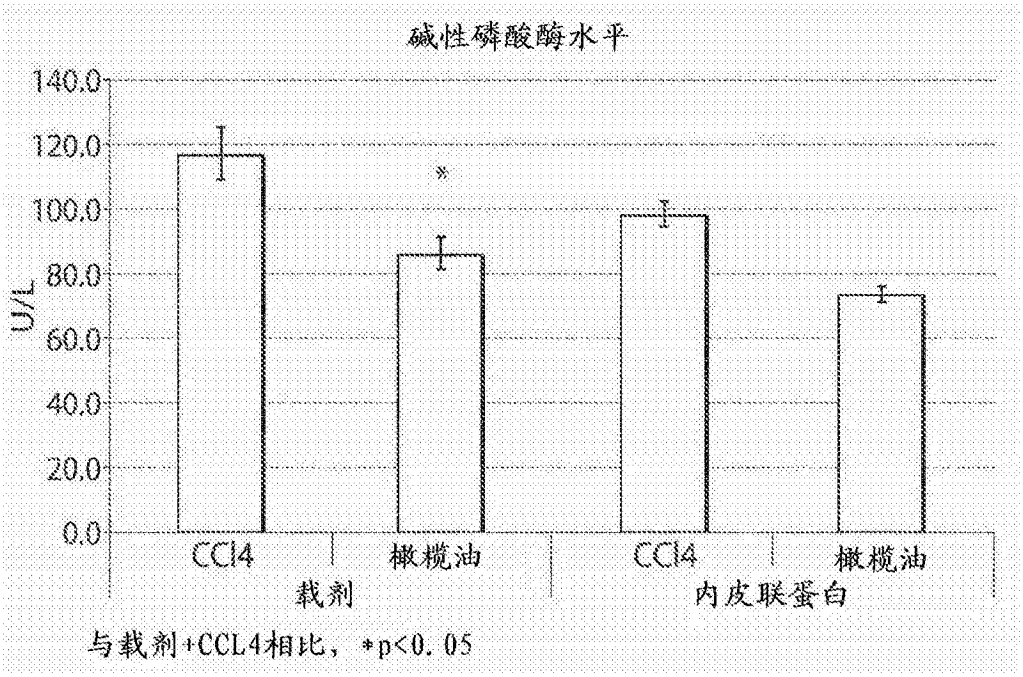


图47

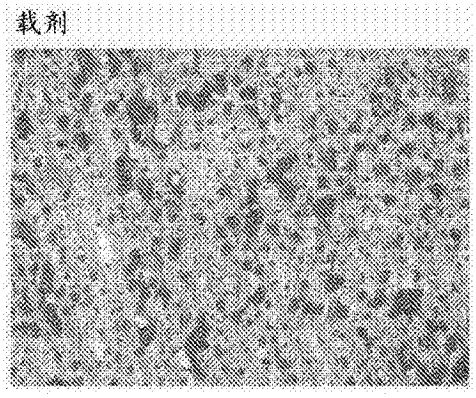


图48A

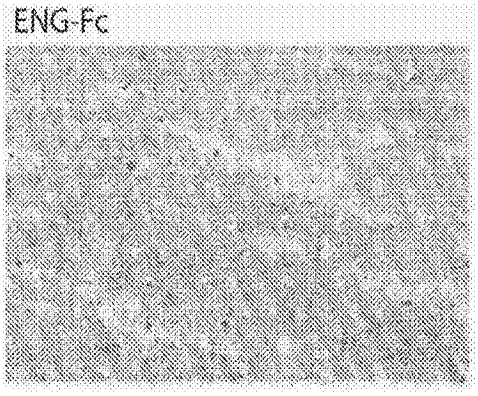


图48B

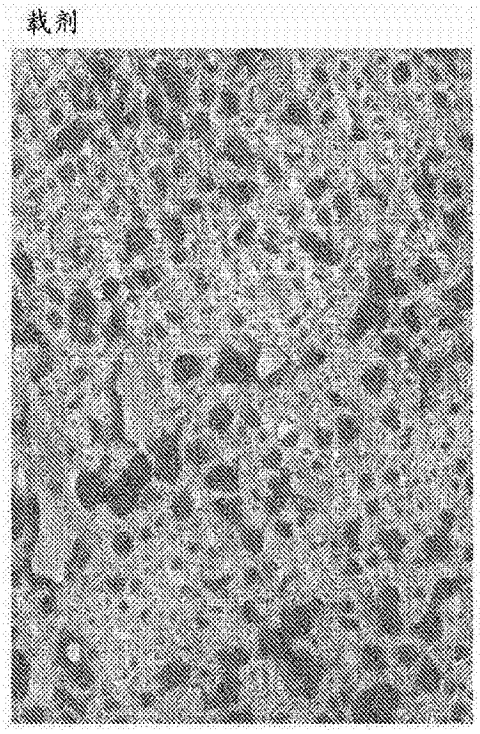


图48C

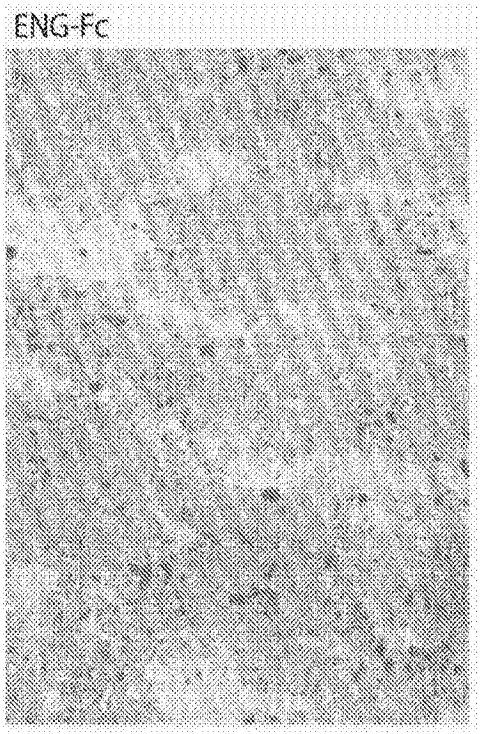


图48D