



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101522707 B

(45) 授权公告日 2013.08.28

(21) 申请号 200780036622.8

A61K 38/18(2006.01)

(22) 申请日 2007.08.02

A61P 19/10(2006.01)

(30) 优先权数据

C07K 19/00(2006.01)

60/835,525 2006.08.03 US

A61P 3/04(2006.01)

A61P 21/06(2006.01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

C12N 15/12(2006.01)

2009.03.31

(86) PCT申请的申请数据

(56) 对比文件

WO 98/33887 A1, 1998.08.06, 全文.

PCT/NZ2007/000203 2007.08.02

WO 01/53350 A1, 2001.07.26, 权利要求

(87) PCT申请的公布数据

7-28, 说明书第3页第3段、第12页倒数第2段-第13页倒数第2段.

W02008/016314 EN 2008.02.07

Xiaolei Zhu 等. Dominant negative myostatin produces hypertrophy without hyperplasia in muscle. 《FEBS Letters》. 2000, 71-75.

(73) 专利权人 莫约斯汀医疗有限公司

地址 澳大利亚维多利亚

Man-Shiow Jiang 等. Characterization and identification of the inhibitory domain of GDF-8 propeptide. 《Biochemical and Biophysical Research Communications》. 2004, 第315卷 252-531.

(72) 发明人 拉维·坎巴德 姆里杜拉·沙玛

莫妮卡·S·S·德穆拉

卡罗尔·J·贝里

维多利亚·赛里特

罗伯特·S·鲍尔

吉纳·D·尼古拉斯

克雷格·D·麦克法莱恩

顾志良. 肌肉生长抑制素基因及其功能.

《常熟理工学院学报》. 2005, 第19卷(第4期), 66-71.

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 沈志红

审查员 马振莲

(51) Int. Cl.

C07K 14/475(2006.01)

A61P 3/10(2006.01)

C07K 14/435(2006.01)

权利要求书2页 说明书34页

序列表7页 附图17页

(54) 发明名称

肌肉生长抑制素拮抗剂

(57) 摘要

一种分离的具有肌肉生长抑制素拮抗剂活性的重组多肽,其包含C端截短的成熟肌肉生长抑制素肽,其中所述C端截短位于氨基酸281和329或者位于氨基酸281和329之间;或所述重组多肽的片段、变体或衍生物。

1. 一种分离的具有肌肉生长抑制素拮抗剂活性的重组多肽,其由 C 端截短的成熟肌肉生长抑制素肽组成,其选自下组的 C 端截短的成熟肌肉生长抑制素多肽,其中所述 C 端截短位于氨基酸位置 320, 310, 或 300(分别是 SEQ ID NO:4-6)。

2. 一种分离的多核苷酸,其由编码权利要求 1 的多肽的核苷酸序列或其互补序列组成。

3. 权利要求 1 的分离的重组多肽,其中的氨基酸在经过修饰后生成具有选择性改变的结合特性或具有改良的生物学分布或体内半衰期或保存期的肌肉生长抑制素拮抗剂,其中经过修饰的氨基酸残基选自下组:糖基化的氨基酸、PEG 化的氨基酸、法尼基化的氨基酸、乙酰化的氨基酸、生物素化的氨基酸、偶联有脂质模块的氨基酸、D- 氨基酸或偶联有有机衍生剂的氨基酸。

4. 一种融合蛋白,其包含一种或多种权利要求 1 的重组多肽以及一种或多种增强一种或多种选自下组的功能的别的多肽:纯化、蛋白质复合物的形成、组织定位或分布、摄取/施用、体内稳定性和/或体内半衰期。

5. 如权利要求 4 所述的融合蛋白,其中所述一种或多种别的多肽包含免疫球蛋白 Fc 结构域。

6. 如权利要求 5 所述的融合蛋白,其中所述一种或多种别的多肽包含 IgG1Fc 片段。

7. 如权利要求 4 所述的融合蛋白,其中所述一种或多种别的多肽包含选自下组的纯化亚序列:表位标签、FLAG 标签、多组氨酸序列、或 GST 融合物。

8. 如权利要求 7 所述的融合蛋白,其包含权利要求 1 的重组多肽、多组氨酸序列和标签序列。

9. 如权利要求 8 所述的融合蛋白,其中所述多组氨酸序列位于重组多肽的 N 端且所述标签序列位于 C 端。

10. 如权利要求 9 所述的融合蛋白,其中所述多组氨酸序列由 SEQ ID NO:13 组成。

11. 如权利要求 9 所述的融合蛋白,其中所述 C 端标签序列由 SEQ ID NO:14 组成。

12. 一种药物组合物,其包含至少一种权利要求 1 的分离的多肽以及药学可接受载体。

13. 一种药物组合物,其包含至少一种权利要求 4 的融合蛋白。

14. 如权利要求 12 或 13 所述的药物组合物,其中所述分离的多肽或融合蛋白偶联有第二药理学活性化合物以增强对靶细胞或组织的治疗效果,且其中所述药物组合物配制成供分开地、相继地或同时地施用所述分离的多肽或融合蛋白和所述第二化合物用。

15. 至少一种权利要求 1 的多肽在制造用于在有需要的动物中调节肌肉生长、促进脂肪形成性分化和/或促进骨生长或矿化的药物中的用途。

16. 至少一种权利要求 5 或 6 的融合蛋白在制造用于在有需要的动物中调节肌肉生长、促进脂肪形成性分化和/或促进骨生长或矿化的药物中的用途。

17. 至少一种权利要求 1 的多肽在制造用于预防、治疗或降低肌肉生长抑制素相关病理学状况的严重性的药物中的用途,所述肌肉生长抑制素相关病理学状况的特征至少部分在于有需要的患者中肌肉或脂肪组织的异常量、发育或代谢活性。

18. 至少一种权利要求 4 的融合蛋白在制造用于预防、治疗或降低肌肉生长抑制素相关病理学状况的严重性的药物中的用途,所述肌肉生长抑制素相关病理学状况的特征至少部分在于有需要的患者中肌肉或脂肪组织的异常量、发育或代谢活性。

19. 如权利要求所述的 17 或 18 的用途, 其中所述病理学状况选自下组: 与肌肉肥大有关的病症; 与炎症性疾病、肌肉营养不良、运动神经元疾病、神经肌肉接头疾病、外周神经疾病、内分泌异常所致疾病代谢综合征、HIV、癌症、老年骨骼肌减少症、恶病质和其它消耗性疾患有关的肌肉萎缩和肌肉消耗; 心力衰竭; 骨质疏松; 肾衰竭或肾病; 肝衰竭或肝病; 食欲缺乏; 肥胖症; 糖尿病; 和伤口愈合。

20. 至少一种权利要求 1 的多肽在制造用于预防、治疗或改善疾患的药物中的用途, 其中所述疾患是会部分受益于增加的卫星细胞活化、成肌细胞增殖、巨噬细胞和成肌细胞迁移和 / 或减少的纤维化的疾患, 其中所述方法包括给有需要的患者施用有效量的至少一种权利要求 1 的多肽。

21. 至少一种权利要求 4 的融合蛋白在制造用于预防、治疗或改善疾患的药物中的用途, 其中所述疾患是会部分受益于增加的卫星细胞活化、成肌细胞增殖、巨噬细胞和成肌细胞迁移和 / 或减少的纤维化的疾患, 其中所述方法包括给有需要的患者施用有效量的至少一种权利要求 1 的多肽。

22. 如权利要求 20 或 21 所述的用途, 其中所述疾患选自下组: 创伤所致肌肉损伤; 药剂、放射疗法、地塞米松施用所致肌肉损伤; 长时间卧床休息所致肌肉消耗; 伤口愈合; 与肌肉肥大有关的病症; 与炎症性疾病、肌肉营养不良、运动神经元疾病、神经肌肉接头疾病、外周神经疾病、内分泌异常所致疾病、代谢综合征、HIV、癌症、老年骨骼肌减少症、恶病质和其它消耗性疾患有关的肌肉萎缩和肌肉损伤; 心力衰竭; 骨质疏松; 肾衰竭或肾病; 肝衰竭或肝病; 食欲缺乏; 肥胖症和糖尿病。

23. 如权利要求 22 所述的用途, 其中所述药剂包括化疗剂。

24. 如权利要求 22 所述的用途, 其中所述长时间卧床休息是手术后所要求的长时间卧床休息。

25. 一种生产权利要求 1 的分离的重组多肽的方法, 所述方法包括以下步骤:

a. PCR 扩增 DNA, 所述 DNA 编码在位置 320, 310, 或 300 处截短的成熟的肌肉生长抑制素肽;

b. 在具有 C 端和 N 端标签序列的合适载体中克隆所述 DNA;

c. 将所述载体转移入合适的宿主;

d. 表达所述肽并利用所述标签序列纯化;

e. 任选地去除所述这两种标签序列或其中之一。

26. 如权利要求 25 所述的方法, 其中所述 N 端标签通过限制酶消化来去除。

27. 如权利要求所述 25 或 26 的方法, 其中所述 C 端标签序列通过限制酶消化来去除。

28. 一种分离的重组多肽, 其通过权利要求 25-27 任一项的方法来生产。

肌肉生长抑制素拮抗剂

发明领域

[0001] 本发明涉及新颖的具有肌肉生长抑制素 (myostatin) 拮抗剂活性的蛋白质。本发明进一步涉及所述新颖的蛋白质在肌肉生长抑制素相关病症治疗中的用途。

[0002] 发明背景

[0003] 肌肉生长抑制素 (或称作 GDF-8) 是肌肉生长的负调节物, 而且在结构上与转化生长因子 β (TGF- β) 超家族有关 (McPherron 等 1997a)。更具体的说, 肌肉生长抑制素是发育过程中和成年期中骨骼肌的有力负调节物。肌肉生长抑制素还见于从鱼类到哺乳类的广泛物种范围, 而且肌肉生长抑制素蛋白在物种间是高度保守的且同源的 (McPherron 和 Lee, 1997a)。肌肉生长抑制素通过与细胞表面受体 IIB 型激活素的相互作用来发挥其生物学效应 (Lee 等, 2001)。还知道肌肉生长抑制素经由目前尚未完全了解的机制来调节其自身表达 (Spiller 等, 2002, Rebbapragada 等, 2003)。

[0004] 已经证明了肌肉生长抑制素在不诱导凋亡或刺激肌肉蛋白质分解 (breakdown) 的情况下抑制成肌细胞增殖和分化 (Thomas 等, 2000 ; Langley 等, 2002 ; Rios 等, 2001 ; Taylor 等, 2001)。敲除了肌肉生长抑制素的小鼠在它们整个身体上具有大大增加的肌肉量。无肌肉生长抑制素小鼠具有比正常小鼠多大约 30% 的体重, 而且展现出肌肉纤维增生和肥大所致的 2-3 倍增量的个体肌肉重量。已经鉴定了肌肉生长抑制素中的天然突变负责“双重肌肉”表型, 诸如比利时蓝 (Belgian Blue) 和皮埃蒙特 (Piedmontese) 牛品种 (McPherron 等, 1997b ; Kambadur 等, 1997 ; Grobet 等, 1997)。已经在具有缺陷型肌肉生长抑制素基因的人中观察到了类似的表型 (Schuelke 等, 2004)。由于不能区别出生前效应与幼年期和成年期肌肉生长抑制素缺乏相关效应, 经由无肌肉生长抑制素动物研究得出的对肌肉生长抑制素在各种生物学过程中的作用的解读已经被搞混乱了。

[0005] 然而, 已经将肌肉生长抑制素与许多肌肉消耗或肌肉萎缩相关病症联系起来, 诸如在患有 HIV、癌症、长时间卧床休息、肌肉营养不良或年龄相关的老年骨骼肌减少症的个体中所看到的 (Gonzalez-Cadavid 等, 1998 ; Langley 等, 2004 ; Zachwieja 等, 1999 ; Bogdanovich 等, 2002 ; W02006/083183)。证明了体内施用肌肉生长抑制素诱发恶病质, 即一种严重形式的与癌症和败血症有关的肌肉消耗 (Zimmers 等, 2002), 其也可由于长时间的卧床休息而发生。此外, 已经在糖皮质激素诱导的肌肉萎缩中观察到肌肉生长抑制素的上调 (Ma 等, 2003)。已经在其它状况中显示了肌肉生长抑制素表达的变化, 例如心脏损伤后心肌细胞中的上调和肌肉再生中的下调 (Sharma 等, 1999)。

[0006] 还已经将肌肉生长抑制素与许多其它生物学过程联系起来。例如, 敲除型转基因小鼠具有改变的骨皮质结构, 指示在骨发生中的作用 (Hamrick 2003)。此外, 已经显示了肌肉生长抑制素牵涉调节葡萄糖和脂肪代谢, 如此它可能牵涉 II 型糖尿病和肥胖症 (McPherron 和 Lee, 2002)。还已经显示了肌肉生长抑制素牵涉伤口愈合过程中的炎症应答 (W02006/083182)。

[0007] 肌肉生长抑制素在肌肉生长和分化的调节及许多疾病和病症的病理学中所发挥的关键作用已经引起了对肌肉生长抑制素拮抗剂的搜索。虽然已经开发了许多肌肉生长抑

制素拮抗剂,诸如抗肌肉生长抑制素抗体 (US6096506 和 US 6468535);截短的 IIB 型激活素受体、肌肉生长抑制素前域 (pro-domain) 和卵泡抑素 (WO 02/085306);过表达肌肉生长抑制素的细胞释放到培养液中的肌肉生长抑制素抑制剂 (WO 00/43781);肌肉生长抑制素的显性失活 (dominant negatives) (WO 01/53350);及小肽,包括 WMCPP 结构域,其结合并抑制肌肉生长抑制素 (US 2004/0181033);当前没有临床使用的肌肉生长抑制素拮抗剂。如此,仍然需要开发更有力的肌肉生长抑制素拮抗剂,供用作治疗剂。

[0008] 因而,本发明的一个目的是提供用于治疗肌肉生长抑制素相关病症的具有肌肉生长抑制素拮抗剂活性的蛋白质,和 / 或给公众提供一个有用的选项。

[0009] 发明概述

[0010] 本发明致力于新颖的、重组生产的具有肌肉生长抑制素拮抗剂活性的肽。

[0011] 一方面,本发明提供了一种具有肌肉生长抑制素拮抗剂活性的分离的重组多肽,其包含 C 端截短的成熟肌肉生长抑制素肽,其中所述 C 端截短位于氨基酸 281 和 329 或者位于氨基酸 281 和 329 之间;或所述分离的重组多肽的片段、变体或衍生物。

[0012] 所述分离的重组多肽可以选自下组: C 端截短的成熟肌肉生长抑制素肽,其中所述 C 端截短位于氨基酸位置 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328 或 329; 或所述分离的重组多肽的片段、变体或衍生物。

[0013] 优选地,本发明的分离的重组多肽选自下组: C 端截短的成熟肌肉生长抑制素多肽,其中所述 C 端截短位于氨基酸位置 329, 320, 310, 300, 295, 289, 284, 282 或 281 (SEQ ID NO :3-11); 或所述分离的重组多肽的片段、变体或衍生物; 或与所述分离的重组多肽具有实质性序列同源性的多肽。

[0014] 更优选地,本发明的分离的重组多肽选自下组: C 端截短的成熟肌肉生长抑制素多肽,其中所述 C 端截短位于氨基酸位置 320, 310 或 300 (SEQ ID NO :4-6); 或所述分离的重组多肽的片段、变体或衍生物; 或与所述分离的重组多肽具有实质性序列同源性的多肽。

[0015] 本发明还提供了一种分离的多核苷酸,其包含编码本发明多肽的核苷酸序列或其互补序列。

[0016] 本发明多肽和多核苷酸序列的变体可以作为生成肌肉生长抑制素拮抗剂的一种方式,所述肌肉生长抑制素拮抗剂具有选择性改变的结合特性或具有改良的生物学分布或体内半衰期或保存期。

[0017] 优选地,本发明的肌肉生长抑制素拮抗剂多肽是融合蛋白的一部分,所述融合蛋白在所述拮抗剂之外包含一种或多种增强选自下组的一种或多种功能的多肽: 纯化、蛋白质复合物的形成、组织定位或分布、摄取 / 施用、体内稳定性和 / 或体内半衰期。例如,所述融合蛋白可包含: 免疫球蛋白 Fc 结构域诸如 IgG1 Fc 片段。所述融合蛋白可以包含纯化亚序列,诸如表位标签、FLAG 标签、多组氨酸序列、或 GST 融合物。优选地,所述标签序列包含 SEQID NO :13 和 14。

[0018] 本发明的肌肉生长抑制素拮抗剂多肽可以包含一个或多个经过修饰的氨基酸残基,诸如糖基化的氨基酸、PEG 化的氨基酸、法尼基化的氨基酸、乙酰化的氨基酸、生物素化的氨基酸、偶联有脂质模块的氨基酸、D- 氨基酸或偶联有有机衍生剂的氨基酸。

[0019] 本发明还提供了药物组合物,其包含至少一种本发明的分离的多肽以及药学可接受载体。

[0020] 本发明还提供了在动物中调节肌肉生长、促进脂肪形成性分化和 / 或促进骨生长或矿化的方法,其包括给所述动物施用有效量的至少一种本发明多肽。优选地,所述方法可用于在绵羊、牛、鹿、家禽、火鸡、猪、马、小鼠、大鼠、猫、犬或人中生成增加的肌肉量、减少的脂肪沉积和 / 或改良的骨生长。

[0021] 所述动物可以具有正常的或异常的肌肉生长抑制素水平。在具有正常肌肉生长抑制素水平的动物中,使用本发明拮抗剂的治疗会导致增加的肌肉量。在具有正常肌肉量的动物中,此类治疗会导致肌肉量的增加,而且可能在肉品生产工业中特别有用。在具有肌肉损伤或创伤所致减少的肌肉量、卧床休息所致消耗等的动物中,使用本发明拮抗剂的治疗会使肌肉量恢复至正常。在具有异常肌肉生长抑制素水平的动物中,肌肉量总是会减少,而使用本发明拮抗剂的治疗会使肌肉量恢复回到正常水平。

[0022] 本发明还提供了预防、治疗或降低肌肉生长抑制素相关病理学状况的严重性的方法,所述肌肉生长抑制素相关病理学状况的特征至少部分在于患者中肌肉或脂肪组织的异常量、发育或代谢活性,其中所述方法包括给有需要的患者施用有效量的至少一种本发明多肽。

[0023] 所述病理学状况可以包括与肌肉肥大有关系的病症;与炎性肌病、肌肉营养不良、运动神经元疾病、神经肌肉接头疾病、外周神经疾病、内分泌异常所致肌病、代谢综合征、HIV、癌症、老年骨骼肌减少症、恶病质、不活动或长时间卧床休息和其它消耗性疾患有关的肌肉萎缩和肌肉消耗;心力衰竭(或心肌衰竭);骨质疏松(症);肾衰竭或肾病;肝衰竭或肝病;食欲缺乏;肥胖症;糖尿病;和伤口愈合。

[0024] 又或者,本发明的多肽可以通过在治疗上文所述疾病或治疗适应症的努力中投递第二化合物来联合另一药学活性化合物以增强对靶细胞或组织的治疗效果。在这些组合中,本发明的肌肉生长抑制素拮抗剂可以独立地和相继地施用或共施用。

[0025] 本发明还提供了调节动物的肌肉生长的方法,其包括给所述动物施用有效量的至少一种本发明多肽。优选地,所述方法可以用于在绵羊、牛、鹿、家禽、火鸡、猪、马、小鼠、大鼠、猫、犬或人中生成增加的肌肉量。

[0026] 附图简述

[0027] 参照以下附图来进一步描述本发明,其中:

[0028] 图 1 显示了肌肉生长抑制素拮抗剂 300,310 和 320 (1 和 5 μ g/ml) 对 C2C12 成肌细胞增殖的效应。所述成肌细胞培养 48 和 / 或 72 小时;

[0029] 图 2 显示了肌肉生长抑制素对 C2C12 成肌细胞增殖的抑制效应及在三个浓度 (1, 5 和 10 μ g/ml) 使用肌肉生长抑制素拮抗剂 300,310 和 320 导致的恢复;

[0030] 图 3 显示了来自年幼的 (1 月龄) 野生型小鼠的分离的纤维上 PCNA 阳性核的数目。分离的纤维无拮抗剂 (对照) 或有 5 μ g 肌肉生长抑制素拮抗剂 300 时温育 24 或 48 小时;

[0031] 图 4 显示了来自年幼的 (1 月龄) 野生型小鼠的卫星细胞活化数据。分离的纤维在无拮抗剂 (对照) 或有 5 μ g 肌肉生长抑制素拮抗剂 300 时温育 24 或 48 小时。经由 ICC 通过 PCNA 标记检测活化的卫星细胞。对每 100 个肌核 (myonuclei) 中的 PCNA 阳性核计数,并将原始数据换算成相对于对照标准化的百分比增量。* $p = < 0.05$;

[0032] 图 5 显示了来自年老的 (2 岁龄) 野生型小鼠的卫星细胞活化数据。分离的纤维在无拮抗剂 (对照) 或有 $5 \mu\text{g}$ 肌肉生长抑制素拮抗剂 300,310 或 320 时温育 24 或 48 小时。经由 ICC 通过 PCNA 标记检测活化的卫星细胞。对每 100 个肌核中的 PCNA 阳性核计数, 并将原始数据换算成相对于对照标准化的百分比增量。 $*p = < 0.05$;

[0033] 图 6 显示了肌肉生长抑制素对来自年老的 (2 岁龄) 小鼠的原代成肌细胞的化学抑制效应及使用肌肉生长抑制素拮抗剂 300,310 或 320 导致的恢复;

[0034] 图 7 显示了肌肉生长抑制素对来自年幼的 (1 月龄) 小鼠的原代成肌细胞的化学抑制效应及使用肌肉生长抑制素拮抗剂 300 和 310 导致的恢复;

[0035] 图 8 显示了来自每周三次、共六周接受盐水 (对照) 或肌肉生长抑制素拮抗剂 300 ($6 \mu\text{g/g}$ 体重) 的小鼠的卫星细胞活化数据;

[0036] 图 9 显示了自每周三次、共六周接受盐水 (对照) 或肌肉生长抑制素拮抗剂 300 ($6 \mu\text{g/g}$ 体重) 的小鼠衍生的成肌细胞的迁移能力;

[0037] 图 10 显示了来自每周三次、共六周接受盐水 (对照) 或肌肉生长抑制素拮抗剂 300 ($6 \mu\text{g/g}$ 体重) 的小鼠的骨髓衍生巨噬细胞的迁移能力;

[0038] 图 11 显示了每周三次、共六周接受盐水 (对照) 或肌肉生长抑制素拮抗剂 300 ($6 \mu\text{g/g}$ 体重) 的小鼠中握力的平均百分比变化;

[0039] 图 12 显示了图 11 的对照和所治疗小鼠在第 0 天和第 42 天的平均握力;

[0040] 图 13 显示了肌肉生长抑制素拮抗剂 300,310 和 320 ($1, 5$ 和 $10 \mu\text{g/ml}$) 对人成肌细胞增殖的效应。成肌细胞培养 144 小时;

[0041] 图 14 显示了肌肉生长抑制素拮抗剂 300,310 和 320 ($1, 5$ 和 $10 \mu\text{g/ml}$) 对免疫成肌细胞增殖的效应。成肌细胞培养 48 小时;

[0042] 图 15 显示了在肌肉营养不良小鼠中在肌肉生长抑制素拮抗剂 300 治疗后 MyoD 和 Pax7 在股二头肌、胫骨前肌和腓肠肌中的上调;

[0043] 图 16 显示了在肌肉营养不良小鼠中 300 对肌肉生长抑制素的拮抗作用增强肌肉再生和降低坏死;

[0044] 图 17 显示了在肌肉营养不良小鼠中 300 对肌肉生长抑制素的拮抗作用降低肌酸激酶活性;

[0045] 图 18 显示了在肌肉营养不良小鼠中 300 对肌肉生长抑制素的拮抗作用提高握力;

[0046] 图 19 显示了在野生型小鼠中长期施用 300 后的握力增加;

[0047] 图 20 显示了在皮肤活检后在用肌肉生长抑制素拮抗剂 300 处理时小鼠中增加的伤口愈合;

[0048] 图 21 显示了在皮肤烧伤后在有和无 300 处理时小鼠中受伤区域上的胶原沉积;

[0049] 图 22 显示了在肌肉烧伤后在用 300 处理时与盐水相比生肌标志物数目 (中央形成的核 (CFN) 的总数) 的增加;

[0050] 图 23 显示了在肌肉烧伤后在用 300 处理时与盐水相比生肌标志物数目 (具有中央形成的核 (CFN) 的纤维的数目) 的增加;

[0051] 图 24 显示了 300 对肌肉生长抑制素的拮抗作用挽救肌肉生长抑制素抑制后的 p-FoxO1 表达;

[0052] 图 25 显示了在地塞米松治疗或地塞米松联合 300 治疗后的 22 天里的平均 % 体重变化；

[0053] 图 26 显示了地塞米松治疗或地塞米松联合 300 治疗后的平均腹膜后脂肪垫重量；

[0054] 图 27 显示了地塞米松治疗或地塞米松联合 300 治疗后的平均 MyoD 表达；

[0055] 图 28 显示了地塞米松治疗或地塞米松联合 300 治疗后的平均 Pax7 表达；

[0056] 图 29 显示了在作为阳性对照的 300 (10 μ g/ml) 之外, 模拟物 280 和 329 在三个浓度 (1, 5 和 10 μ g/ml) 在 48 和 72 小时后的成肌细胞增殖测定法结果；

[0057] 图 30A (对照) 和 B (300 处理的) 显示了烧伤后 21 天肌肉的 van Gieson 染色, 其中箭头指示肌肉上的胶原沉积, 即肌肉上纤维变性组织的形成。与 300 拮抗剂处理的肌肉相比, 盐水处理的肌肉 (对照) 显示了更高的胶原沉积量。图 30C 和 D 显示了肌肉的 H&E 染色。盐水处理的肌肉 (C) 显示了坏死的、正在变性的纤维。300 拮抗剂处理的肌肉 (D) 显示了更暗的染色纤维, 许多具有中央形成的核, 其指示新生的和再生的纤维；

[0058] 图 31 显示了肌肉生长抑制素序列在物种间的高序列同源性。

[0059] 例示定义

[0060] 除非另有定义, 本文中所使用的所有技术和科学术语与本发明所属领域的普通技术人员的共同理解具有相同的含义。虽然与本文所述的方法和组合物相似或等同的任何方法和组合物都可用于实施或检验本发明, 但是本文中描述了优选的方法和组合物。为了本发明, 下文定义了下列术语：

[0061] “肥大”在用于说明书和权利要求书全文时意思是细胞大小的任何增加。

[0062] “增生”在用于说明书和权利要求书全文时意思是细胞数目的任何增加。

[0063] “肌肉萎缩”在用于说明书和权利要求书全文时意思是任何源自缺乏使用的肌肉组织消耗或损失。

[0064] “老年骨骼肌减少症”在用于说明书和权利要求书全文时意思是老龄所致肌肉的量和性能的下降, 以及老年骨骼肌减少症相关的或其它年龄相关的肌肉病症, 其特征不在于肌肉萎缩和卫星细胞变成活化状态的能力的降低。

[0065] 肌肉生长抑制素的“抑制剂”或“拮抗剂”在用于说明书和权利要求书全文时意思是起完全地或部分地降低肌肉生长抑制素活性作用的任何化合物。

[0066] “肌肉生长”理解为意思是肌肉细胞的分裂和 / 或分化, 包括任何前体细胞、此类细胞彼此的和 / 或与现有肌肉纤维的融合物的分裂和 / 或分化, 还包括肌纤维中导致更高蛋白质含量和更大肌肉纤维体积 (肌肉纤维肥大) 的增加的蛋白质合成。

[0067] 术语“多核苷酸”理解为意思是脱氧核糖核酸或核糖核酸的聚合物, 包括单链和双链两种聚合物, 包括 DNA、RNA、cDNA、基因组 DNA、重组 DNA、自天然或人工核苷或核苷酸制备的核酸分子、和所有其它已知形式的多核苷酸。多核苷酸可以自天然存在来源分离, 使用重组或分子生物学技术生成, 或者合成地生成。多核苷酸可以包括全基因或其任何部分, 而且不必包括可读框。所有依照本发明的多核苷酸的用途包括任何和所有可读框。可读框可以使用本领域已知技术来建立。这些技术包括分析多核苷酸序列以鉴定已知的起始和终止密码子。本领域知道许多可实施此功能的计算机软件程序。

[0068] “蛋白质”、“肽”或“多肽”理解为意思是经肽键共价相连接天然存在的和 / 或人

工的氨基酸的聚合物。多肽包括已经自天然存在来源分离的,或者使用重组技术生成的多肽。应当领会,包括前导序列 (leader) 或原序列 (pro-sequence) 的多肽,或者经历翻译后修饰的多肽意图落在多肽的定义内。此术语不包括合成地生成的多肽,因为合成的多肽可能有问题。具体地,合成制备的多肽可能没有正确折叠,因而可能不具有与天然存在的或重组生成的多肽有关的生物学活性。

[0069] 术语“片段或变体”理解为意思是已经通过一个或多个核苷酸或者一个或多个氨基酸的替代、插入或删除而进行了修饰、但具有与未修饰的序列或部分序列基本上相同的活性或功能的任何多核苷酸或多肽序列或部分序列。

[0070] 优选地,变体包含保守替代。“保守替代”指其中一种氨基酸替代另一种具有相似特性的氨基酸,使得肽化学领域技术人员会预期所述多肽的二级结构和亲水性质不会显著变化的替代。氨基酸替代一般可以在残基的极性、电荷、溶解性、疏水性、亲水性和 / 或两亲性性质方面的相似性基础上进行。例如,带负电荷的氨基酸包括天冬氨酸和谷氨酸;带正电荷的氨基酸包括赖氨酸和精氨酸;而具有相似亲水性值的具有不带电荷的极性头基团的氨基酸包括亮氨酸、异亮氨酸和缬氨酸;甘氨酸和丙氨酸;天冬酰胺和谷氨酰胺;及丝氨酸、苏氨酸、苯丙氨酸和色氨酸。可代表保守变化的其它氨基酸组包括 (1) ala, pro, gly, glu, asp, gln, asn, ser, thr; (2) cys, ser, tyr, thr; (3) val, ile, leu, met, ala, phe; (4) lys, arg, his; 和 (5) phe, tyr, trp, his。

[0071] 氨基酸可以根据其侧链基团的性质来分类。具有非极性烃基侧链基团的氨基酸包括甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸。丝氨酸和苏氨酸在其侧链上具有羟基,而且因为羟基是极性的且能够形成氢键,所以这些氨基酸是亲水性的。硫基团可见于甲硫氨酸和半胱氨酸。羧基基团是天冬氨酸和谷氨酸侧链的一部分,因为羧基基团的酸性,所以这两种氨基酸不仅是极性的,而且可以在溶液中变成带负电荷的。谷氨酰胺和天冬酰胺与谷氨酸和天冬氨酸相似,只是侧链包含酰胺基团。赖氨酸、精氨酸和组氨酸在其侧链上具有一个或多个氨基,其可以接受质子,因此这些氨基酸像碱一样起作用。芳族基团可见于苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的侧链上。酪氨酸因为其羟基所以是极性的,但是色氨酸和苯丙氨酸是非极性的。并且 / 或者,变体包含非保守变化。

[0072] 依照本发明的多肽变体可以具有至少一处替代、添加、插入或删除,而且可以依照本领域已知的诱变方法来制备。此类修饰对编码本发明多肽变体或衍生物的多核苷酸序列进行并使用标准诱变技术(诸如寡核苷酸指导的位点特异诱变)来引入。可以通过合成包含突变序列的寡核苷酸而在特定基因座处引入诱变,所述突变序列的侧翼为限制性位点,从而能够连接至天然序列的片段。连接后,所得重构建的序列编码具有期望氨基酸插入、替代或删除的类似物。寡核苷酸指导的位点特异诱变规程也可以用于提供改变的编码多核苷酸,其中预定的密码子可以通过本领域众所周知的替代、删除或插入而改变。

[0073] 或者,多种计算方法可用于生成本发明的变体肌肉生长抑制素拮抗剂蛋白质,包括基于序列的方法和基于结构的方法,诸如蛋白质设计自动化(PDA),如 US 6403312 所述。

[0074] 还应当领会,可以获得非常精确地预测肽序列三维结构的软件(Bradely, 2005)。因此,本领域技术人员有可能使用此类软件来预测肽序列的变异对肽结构的影响,及因此对肽活性的任何可能影响。此类变异也在本发明的范围内。

[0075] 本发明的“衍生物”多肽意思是氨基酸序列已经以一些方式进行改变以生成稳定

性得到大大增加的多肽。例如,氨基酸可以用不同手性的同一氨基酸替换,或者可以在多肽中插入或替代非天然存在氨基酸。或者,多肽可以在化学上修饰以改善药动学,诸如通过与聚合物(诸如聚乙二醇)交联(US4640835)。此类衍生物可以具有增加的体内血清半衰期、生物利用度、解离速率和其它使之在配制药物组合物中非常有用的特性。

[0076] 本发明的多肽或其片段、变体或衍生物具有拮抗肌肉生长抑制素活性的生物学功能。为了确定本发明的多肽或其片段、变体或衍生物是否能够拮抗肌肉生长抑制素活性,可以通过在存在或缺乏(对照)本发明候选多肽时培养成肌细胞来测试此类活性。生成肌肉生长抑制素并因此限制其自身增殖速率的成肌细胞相对于不接受候选多肽的对照成肌细胞的生长增加,表明该肽具有肌肉生长抑制素拮抗剂活性。合适的细胞系可以是鼠 C₂C₁₂ 成肌细胞(ATCCNO :CRL-1772),然而,应当领会,可以使用任何合适的成肌细胞细胞系,诸如原代绵羊、牛、猪或人的成肌细胞。

[0077] 术语“分离的”在用于本文时指将分子,诸如多肽或编码多核苷酸,与其天然来源、环境或背景分开(例如将蛋白质从其完整细胞来源分开),而术语“纯化的”在用于本文时意思是本发明的蛋白质或多肽或其编码多核苷酸基本上没有结合其它多核苷酸、蛋白质或多肽,例如作为重组宿主细胞培养物的纯化产物或作为来自非重组来源的纯化产物。因此,“分离的”多肽指与其原始环境分开的多肽。优选地,此类多肽是至少约 70%,75%,80%,85%或 90%纯的,至少约 95%纯的,或至少约 99%纯的,例如,在这样的纯度指制备物中所存在的可检测肌肉生长抑制素拮抗剂多肽或其编码多核苷酸相对于其它可检测多核苷酸和/或多肽的百分比时。术语“基本上纯化的”或“基本上分离的”在用于本文时意思是含有诸如肌肉生长抑制素拮抗剂多肽或其编码多核苷酸的分子的混合物,其基本上没有结合其它多核苷酸、蛋白质或多肽,但存在可使用常规方法诸如通过使用特异性抗体或配体的亲和测序除去的已知蛋白质,且该基本上纯化的或基本上分离的肌肉生长抑制素拮抗剂多肽或编码多核苷酸保留其如本文所描述的生化特征或保留其至少一种可检测的功能性生物学活性。

[0078] “基因表达”理解为意思是起始转录,DNA 的一段转录成 mRNA,和 mRNA 翻译成多肽。“基因表达的调控物”定义为任何能够以统计学显著的方式引起基因表达的升高或降低且可以作用于基因表达途径中任何点的化合物。

[0079] 术语“包含”在用于本说明书和权利要求书时意思是“至少部分由... 组成”,也就是说,在解释包括该术语的独立权利要求时,各权利要求中以该术语为前言的特征都需要存在但还可以存在其它特征。

[0080] 术语“基本上对应于”、“基本上同源”、或“实质性的同一性”在用于本文时表示核酸或氨基酸序列的一项特征,其中所选择的核酸或氨基酸序列与所选择的参照核酸或氨基酸序列相比具有至少约 70 或约 75 百分比序列同一性。更典型地,所选择的序列和参照序列会具有至少约 76,77,78,79,80,81,82,83,84 或甚至 85 百分比序列同一性,且更优选地,至少约 86,87,88,89,90,91,92,93,94 或 95 百分比序列同一性。仍更优选地,高度同源的序列常常在所选择的序列和与之比较的参照序列之间共享大于至少约 96,97,98 或 99 百分比序列同一性。序列同一性百分比可以在待比较的序列全长上计算,或者可以通过排除总共少于所选择的参照序列约 25 百分比左右的小删除或添加来计算。参照序列可以是更大序列的子集,诸如基因或侧翼序列的一部分或染色体的重复部分。然而,就两条或更多核苷

酸序列的序列同源性而言,参照序列会典型地包含至少约 18-25 个核苷酸,更典型地至少约 26-35 个核苷酸,和甚至更典型地至少约 40,50,60,70,80,90 或甚至 100 个左右核苷酸。期望地,在期望高度同源的片段时,两条序列之间的百分比同一性程度会是至少约 80%,优选地至少约 85%,且更优选地约 90%或 95%或更高,其易于通过一种或多种本领域技术人员众所周知的序列比较算法来测定,诸如例如由 Pearson 和 Lipman(1988) 记载的 FASTA 程序分析。

[0081] 在用于本文时,“%同一性”指在比对两条或更多肽并使用带缺口 BLAST 算法(例如 Altschul 等,Nucleic Acids Res. 25 :3389(1997)) 分析其序列时,序列中位于对应氨基酸残基位置的同样氨基酸的百分比,其中带缺口 BLAST 算法依照(美国)国家卫生研究所(National Institutes of Health)/NCBI 数据库(Bethesda,MD;参见因特网:>www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST/nph-newblast) 提供的默认加权对序列缺口和序列错配加权。

[0082] 术语“基本上互补的”在用于限定氨基酸或核酸序列时意思是特定的受试序列(例如寡核苷酸序列)与所选择的序列的整个或部分基本上互补,因而会特异性结合编码所选择的序列的 mRNA 的一部分。因此,典型地,序列会与 mRNA “靶”序列高度互补,且在序列的整个互补部分上会具有不超过约 1,2,3,4,5,6,7,8,9 或 10 个碱基的错配。在许多情况中,可能期望序列完全匹配,即与寡核苷酸特异性结合的序列完全互补,因此在互补区段上具有零错配。因此,高度互补的序列典型地会相当特异性地结合 mRNA 的靶序列区,因此在降低和/或甚至抑制靶 mRNA 序列翻译成多肽产物方面会是高度有效的。

[0083] 基本上互补的寡核苷酸序列会是与寡核苷酸特异性结合的相应 mRNA 靶序列大于约 80 百分比互补(或“%完全匹配”),且更优选地会是与寡核苷酸特异性结合的相应 mRNA 靶序列大于约 85 百分比互补。在某些情况中,如上文所述,会期望具有甚至更加基本上互补的寡核苷酸序列以用于实施本发明,而且在此类情况中,寡核苷酸序列会是与寡核苷酸特异性结合的相应 mRNA 靶序列大于约 90 百分比互补,而且在某些实施方案中可以是与寡核苷酸特异性结合的相应 mRNA 靶序列大于约 95 百分比互补,且甚至上至包括与所设计的寡核苷酸特异性结合的靶 mRNA 的整个或部分 96%,97%,98%,99%,和甚至 100%完全匹配互补。

[0084] 任何所公开的序列的百分比相似性或百分比互补可以例如通过使用 6.0 版 GAP 计算机程序比较序列信息来测定,6.0 版 GAP 计算机程序可以从威斯康星大学遗传性计算机小组(University of Wisconsin Genetics Computer Group,UWGCG) 获得。GAP 程序利用 Needleman 和 Wunsch(1970) 的算法。简言之,GAP 程序将相似性定义为相似的所比对的符号(即核苷酸或氨基酸)的数目除以两条序列中较短者中符号的总数。优选的 GAP 程序默认参数包括:(1) 用于核苷酸的一元计算矩阵(其包含给同一性的值 1 和给非同一性的 0)和 Gribskov 和 Burgess(1986) 的加权计算矩阵,(2) 给每个缺口的罚分 3.0 和给每个缺口中每个符号的额外 0.10 罚分;和(3) 末端缺口没有罚分。

[0085] 发明详述

[0086] 本发明致力于新颖的拥有肌肉生长抑制素拮抗剂活性的蛋白质,以用于肌肉生长抑制素相关病症的治疗。

[0087] 具体地,本发明致力于新颖的肌肉生长抑制素显性失活,其包含在 SEQID NO :2 的

氨基酸位置 281-329 或在 SEQ ID NO :2 的氨基酸位置 281-329 之间具有 C 端截短的成熟肌肉生长抑制素重组肽,或其片段、变体或衍生物。

[0088] 肌肉生长抑制素蛋白质首先翻译成 375 个氨基酸的前体分子,其具有 N 端的分泌信号序列、弗林内切蛋白酶的蛋白分解加工信号 (RSRR)、和 C 端区中的 9 个保守半胱氨酸残基 (以便于形成“半胱氨酸结”结构)。肌肉生长抑制素通过弗林内切蛋白酶在 Arg266 处切割释放 N 端或“潜伏相关肽”(LAP) 和成熟的 C 端结构域 (其二聚化而形成有活性的肌肉生长抑制素分子) 而活化。加工后,在无活性的复合物中,LAP 肽的同二聚体保持非共价结合成熟肌肉生长抑制素的同二聚体 (Lee 等,2001)。已知其它蛋白质,例如卵泡抑素、titin 帽、GDFP1、卵泡抑素相关基因和 hSGT 也结合并调节潜伏性肌肉生长抑制素复合物的分泌和活化 (Lee 和 McPherron,2001 ;Nicolas 等,2002 ;Hill 等,2002 ;Hill 等,2003 ;Wang 等,2003)。人肌肉生长抑制素前体蛋白质分子的氨基酸序列显示于 SEQ ID NO :2。编码肌肉生长抑制素前体蛋白质的相应核苷酸序列显示于 SEQ ID NO :1。

[0089] 已知包含在氨基酸位置 330 或 350C 端截短的成熟肌肉生长抑制素肽的先前肌肉生长抑制素拮抗剂 (WO 2001/53350)。这些拮抗剂在某个位置处截短,使得关键半胱氨酸得以保留,从而有可能在确定其三维结构及与其它分子的相关相互作用中发挥重要作用。预计这些关键半胱氨酸残基的丢失会对其发挥功能的能力产生不利影响。例如,牛肌肉生长抑制素基因中的 C313Y 替代引起功能丧失,导致皮埃蒙特表型 (Berry 等,2002)。

[0090] 出人意料地,已经首次显示了在接近或排除半胱氨酸残基的位置处 C 端截短的成熟肌肉生长抑制素肽是有生物学活性的。这些新颖的肽具有肌肉生长抑制素拮抗剂活性且在肌肉生长抑制素相关病症的治疗中 useful。已经确定 (其关键性地去除了肌肉生长抑制素肽中除了一个半胱氨酸之外所有半胱氨酸) 是没有生物学活性的。发明人首次显示了 C 端截短的成熟肌肉生长抑制素肽为了保留生物学活性需要至少两个半胱氨酸模块。不受理论束缚,认为只有一个半胱氨酸模块的肽不会能够形成生物学活性所需要的恰当三维结构。认为本发明的重组生成的 C 端截短的肌肉生长抑制素分子折叠成许多不同的有活性的和无活性的构象形式。不知道有生物学活性的准确构象形式。发明人制备合成型式的本发明重组肽的尝试只生成了无活性的形式 (结果未显示)。认为,对于生物学活性而言,重组生成的肽是必需的。

[0091] 如此,本发明提供了分离的具有肌肉生长抑制素拮抗剂活性的重组多肽,其包含 C 端截短的成熟肌肉生长抑制素肽,其中所述 C 端截短位于 SEQ ID NO :2 的氨基酸 281 和 329 或者位于 SEQ ID NO :2 的氨基酸 281 和 329 之间 ;或所述重组多肽的片段、变体或衍生物。

[0092] 本发明的分离的重组多肽可以选自下组 :C 端截短的成熟肌肉生长抑制素肽,其中所述 C 端截短位于 SEQ ID NO :2 的氨基酸位置 281,282,283,284,285,286,287,288,289,290,291,292,293,294,295,296,297,298,299,300,301,302,303,304,305,306,307,308,309,310,311,312,313,314,315,316,317,318,319,320,321,322,323,324,325,326,327,328 或 329,或所述成熟肌肉生长抑制素肽的片段、变体或衍生物。

[0093] 优选地,本发明的分离的重组多肽选自下组 :C 端截短的成熟肌肉生长抑制素多肽,其中所述 C 端截短位于氨基酸位置 329,320,310,300,295,289,284,282 或 281 (SEQ ID NO :3-11) ;或所述重组多肽的片段、变体或衍生物 ;或与所述重组多肽具有实质性序列同源性的多肽。

[0094] 更优选地,本发明的分离的重组多肽选自下组:C端截短的成熟肌肉生长抑制素多肽,其中C端截短位于氨基酸位置320,310或300(SEQ ID NO:4,5或6)。

[0095] 本发明的多肽可以是以任何方式改变的,以生成具有改良的药动学的变体或衍生物,如熟练工作人员会领会的。例如,可以添加改变极性和/或形成氢键能力和会改变多肽溶解性的官能基。类似地,官能基可以通过改变血清半衰期(Werle等,2006)或通过控制多肽自微团在靶位点处释放来改变稳定性。进一步地,官能基可以改变生物相容性,例如通过最小化多肽对患者的副作用。添加能够结合靶细胞或组织或便于转运入靶细胞的官能基会增强多肽的投递和靶向。还应当理解,肽可以自N端截短以改善药动学。

[0096] 偶联至本发明多肽的官能基可以是结合特定生物学物质或位点的生物学靶向分子。生物学物质或位点是投递和结合它的靶向分子的预定靶,使得化合物投递至感兴趣的组织或细胞。

[0097] 配体可以通过选择性结合或具有对另一物质的特异性亲和力而发挥生物学靶向分子的功能。配体受到特异性结合体或结合配偶、或受体的识别和结合。适于靶向的配体的例子是抗原、半抗原、生物素、生物素衍生物、凝集素、半乳糖胺和岩藻糖基胺模块、受体、底物、辅酶和辅因子等。其它能发挥配体的功能而用于投递和靶向的物质是某些类固醇、前列腺素、碳水化合物、脂质、某些蛋白质或蛋白质片段(即激素、毒素)、和合成的或天然的具有细胞亲和力的多肽。配体还包括各种通过重组DNA、遗传和分子工程生成的、具有对配体的选择性亲和力的物质。

[0098] 另一类靶向分子是抗体,该术语在本文中用于包括所有类型的抗体,单克隆抗体、嵌合抗体、Fab片段、其片段和衍生物。其它靶向分子包括酶(尤其是细胞表面的酶,诸如神经氨酸酶)、血浆蛋白质、亲合素、链霉亲合素、抑素(chalones)、cavitands、甲状腺球蛋白、内因子(intrinsic factor)、球蛋白、螯合剂、表面活性剂、有机金属物质、葡萄球菌蛋白A、蛋白G、细胞色素、凝集素、某些树脂、和有机聚合物。靶向分子可以包括肽,包括蛋白质、蛋白质片段或多肽,其可以合成地或通过本领域已知的重组技术生成。肽的例子包括膜转运蛋白,其能促进化合物转移至靶细胞内部或核易位(参见W001/15511)。

[0099] 对本发明多肽的其它修饰包括偶联生物学相容聚合物,诸如聚乙二醇(PEG)和相关聚合物衍生物。已经记载了药物-PEG偶联物改善偶联物水解分解前的循环时间(延长血清半衰期),随后释放所结合的分子,如此提高药物功效。例如,US 6214966记载了使用PEG和相关聚合物衍生物来偶联药物诸如蛋白质、酶和小分子,以改善药物的溶解性和促进受控释放。或者,EP1082105(WO 99/59548)记载了使用生物可降解聚酯聚合物作为药物投递系统来促进所偶联的药物的受控释放。

[0100] 本发明的新颖的多肽也可以以形成嵌合分子的方式来修饰,其中所述嵌合分子包含相融合的新颖的多肽与另一种异源多肽或氨基酸序列。在一个实施方案中,这样的嵌合分子包含本发明多肽与标签多肽的融合物,其中所述标签多肽提供抗标签抗体选择性结合的表位。表位标签一般位于新颖的多肽的氨基或羧基末端。还有,表位标签的提供使得待标签的多肽能够容易地纯化,其通过使用抗标签抗体或结合表位标签的另一类亲和基质的亲和纯化来进行。在另一个实施方案中,嵌合分子可以包含本发明的新颖的多肽与免疫球蛋白或免疫球蛋白特定区的融合物。对于二价形式的嵌合分子,这样的融合物可以是与IgG分子Fc区的融合物。

[0101] 本领域众所周知多种标签多肽及其相应抗体。例子包括多组氨酸 (poly-his) 或多-组氨酸-甘氨酸 (poly-his-gly) 标签;流感 HA 标签多肽及其抗体 12CA5 (Field 等, 1988);c-myc 标签及其 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 和 9E10 抗体 (Evan 等, 1985);及单纯疱疹病毒糖蛋白 D(gD) 标签及其抗体 (Paborsky 等, 1990)。其它标签多肽包括 Flag 肽 (Hopp 等, 1988);KT3 表位肽 (Martin 等, 1992);微管蛋白表位肽 (Skinner 等, 1991);和 T7 基因 10 蛋白肽标签 (Lutz-Freyermuth 等, 1990)。

[0102] 又例如,本发明的多肽可以偶联另一种药理学活性化合物以增强对靶细胞或组织的治疗效果,其通过一起投递具有相似肌肉生长抑制素拮抗剂效应或不同活性的第二化合物来实现。例如,US 6,051,576 记载了通过经不稳定连接偶联两种或更多药剂使用共药物 (co-drug) 配制剂来改善药理学活性化合物的药理学和药理学特性。例如,第二肌肉生长抑制素拮抗剂可以选自任何一种或多种已知的肌肉生长抑制素抑制剂。例如,US 6096506 和 US 6468535 披露了抗肌肉生长抑制素抗体。US 6369201 和 WO 01/05820 教导了能够引发免疫应答和阻断肌肉生长抑制素活性的肌肉生长抑制素肽免疫原、肌肉生长抑制素多聚体和肌肉生长抑制素免疫偶联物。肌肉生长抑制素的蛋白质抑制剂披露于 WO 02/085306, 其包括截短的 II 型激活素受体、肌肉生长抑制素前域、和卵泡抑素。衍生自肌肉生长抑制素肽的其它肌肉生长抑制素抑制剂是已知的,包括例如自过表达肌肉生长抑制素的细胞释放放入培养液的肌肉生长抑制素抑制剂 (WO 00/43781);肌肉生长抑制素的显性失活 (WO 01/53350), 其包括皮埃蒙特等位基因 (在位置 313 处的半胱氨酸被酪氨酸替换) 和在氨基酸位置 330-375 或在氨基酸位置 330-375 之间具有 C 端截短的成熟肌肉生长抑制素肽。US2004/0181033 也教导了包含氨基酸序列 WMCPP 且能够结合和抑制肌肉生长抑制素的小肽。

[0103] 与本发明的肌肉生长抑制素拮抗剂多肽具有不同活性的第二药理学活性化合物可以与本发明的多肽联合用于治疗肌肉生长抑制素相关病症。例如,多肽可以与多肽生长因子、NSAID 或 COX-2 抑制剂、 α 和 β 阻断剂、ACE 抑制剂、二膦酸盐、雌激素受体调控剂、抗高血压药、谷氨酸 (glutamate) 拮抗剂、胰岛素、抗生素、蛋白激酶 C 抑制剂或各种非处方药 (over the countersubstances) 联合施用,正如技术人员会领会的。

[0104] 用以改善稳定性和半衰期的其它修饰包括鉴定本发明的多肽内易感的氨基酸蛋白酶切割位点,并用备选氨基酸替换此类氨基酸以防止多肽在血浆中、在体内的蛋白酶降解。本领域技术人员会领会,可以添加哪些类型的官能基用以在给患者施用多肽后实现期望的结果,由此改善整体治疗指数。

[0105] 本发明进一步致力于本发明多肽的具有肌肉生长抑制素模拟物活性的类似物、衍生物和变体。

[0106] 本发明肽的类似物、衍生物或变体可以包括序列修饰或非序列修饰。非序列修饰可以包括乙酰化、甲基化、磷酸甲基化、羧化或糖基化,如上文所述。

[0107] 本发明中例示的具体的重组生成的 C 端截短的多肽关于它们在 SEQ IDNO :2 之肌肉生长抑制素 C 端部分的位置来显示。

[0108] 优选的类似物包括其序列与本发明的序列因一处或多处不影响肽的生物学活性的保守氨基酸替代、删除或插入而不同的肽。保守替代典型地包括用一种氨基酸替代具有相似特征的其它氨基酸,例如下列组内的替代:缬氨酸,甘氨酸;甘氨酸,丙氨酸;缬氨酸,

异亮氨酸,亮氨酸;天冬氨酸,谷氨酸;天冬酰胺,谷氨酰胺;丝氨酸,苏氨酸;赖氨酸,精氨酸;和苯丙氨酸,酪氨酸。保守替代的例子可以取自下文表 1。

[0109] 表 1

[0110] 保守氨基酸替换

[0111]

氨基酸	代码	用下列中任一替换
丙氨酸	A	D-Ala, Gly, beta-Ala, L-Cys, D-Cys
精氨酸	R	D-Arg, Lys, D-Lys, 高 -Arg, D- 高 -Arg, Met, Ile, D-Met, D-Ile, Orn, D-Orn
天冬酰胺	N	D-Asn, Asp, D-Asp, Glu, D-Glu, Gln, D-Gln
天冬氨酸	D	D-Asp, D-Asn, Asn, Glu, D-Glu, Gln, D-Gln
半胱氨酸	C	D-Cys, S-Me-Cys, Met, D-Met, Thr, D-Thr
谷氨酰胺	Q	D-Gln, Asn, D-Asn, Glu, D-Glu, Asp, D-Asp
谷氨酸	E	D-Glu, D-Asp, Asp, Asn, D-Asn, Gln, D-Gln
甘氨酸	G	Ala, D-Ala, Pro, D-Pro, β -Ala Acp
组氨酸	H	Asp, D-Asp, Lys, D-Lys, Tyr
异亮氨酸	I	D-Ile, Val, D-Val, Leu, D-Leu, Met, D-Met
亮氨酸	L	D-Leu, Val, D-Val, Leu, D-Leu, Met, D-Met
赖氨酸	K	D-Lys, Arg, D-Arg, 高 -Arg, D- 高 -Arg, Met, D-Met, Ile, D-Ile, Orn, D-Orn
甲硫氨酸	M	D-Met, S-Me-Cys, Ile, D-Ile, Leu, D-Leu, Val, D-Val
苯丙氨酸	F	D-Phe, Tyr, D-Thr, L-Dopa, His, D-His, Trp, D-Trp, 反式 -3,4, 或 5- 苯脯氨酸, 顺式 -3,4, 或 5- 苯脯氨酸
脯氨酸	P	D-Pro, L-I- 噻唑烷 -4- 羧酸, D- 或 L-1- 噻唑烷 -4- 羧酸
丝氨酸	S	D-Ser, Thr, D-Thr, allo-Thr, Met, D-Met, Met (0), D-Met (0), L-Cys, D-Cys
苏氨酸	T	D-Thr, Ser, D-Ser, allo-Thr, Met, D-Met, Met (0), D-Met (0), Val, D-Val

酪氨酸	Y	D-Tyr, Phe, D-Phe, L-Dopa, His, D-His
缬氨酸	V	D-Val, Leu, D-Leu, Ile, D-Ile, Met, D-Met

[0112] 其它类似物包括具有影响肽稳定性的修饰的肽。此类类似物可以在肽序列中包含例如一种或多种非肽键（其替换肽键）。还包括包含不同于天然存在 L-氨基酸的残基的类似物，所述残基例如 D-氨基酸或非天然存在合成氨基酸，例如 β 或 γ 氨基酸和环状类似物。

[0113] 本发明进一步涵盖本发明多肽的 N 端截短。此类变体会包含本发明多肽的 C 端截短，其中自 N 末端依次地切除氨基酸，且由此此类 N 端截短的肽保留肌肉生长抑制素拮抗剂活性。

[0114] 本发明还涵盖编码本发明新颖的多肽的核酸序列。

[0115] 最近的研究表明肌肉生长抑制素是细胞周期行进的有力调节物，而且部分通过调节肌发生 (myogenesis) 的增殖和分化这两个步骤来发挥功能 (Langley 等, 2002; Thomas 等, 2000)。数项研究已经证明了肌肉生长抑制素不仅在胚胎肌发生中，而且在出生后肌肉生长中的作用。Wehling 等 (Wehling 等, 2000) 和 Carlson 等 (Carlson 等, 1999) 的研究指出小鼠中后肢悬挂所致萎缩相关肌肉损失与 M. plantaris 中增加的肌肉生长抑制素水平有关。增加的肌肉生长抑制素水平也与在 HIV 患者中看到的严重肌肉消耗有关 (Gonzalez-Cadavid 等, 1998)。关于肌肉废用期间观察到的肌肉生长抑制素水平升高的一种解释是肌肉生长抑制素可能发挥卫星细胞活化抑制剂的功能。这确实得到了最近研究的支持，其显示了肌肉生长抑制素的缺乏导致体内活化的卫星细胞的集合增加和卫星细胞自我更新增强 (McCroskery 等, 2003)。肌肉生长抑制素抑制剂还已经显示了增加卫星细胞的活化，以及增加肌肉再生过程中 (W02006/083182) 和伤口愈合中 (W02006/083183) 巨噬细胞和成肌细胞的迁移。

[0116] 适于测定本发明多肽的肌肉生长抑制素拮抗剂活性的方法可以基于多种已知方法之任一，包括已知的体内动物模型或体外模型。例如，可以首先使用体外单纤维卫星细胞活化测定法、成肌细胞增殖测定法、生物测定法 (W0 2003/00120) 或成肌细胞和 / 或巨噬细胞迁移测定法来测试本发明的潜在肌肉生长抑制素拮抗剂，如下文所述。然后可以对能够在体内增加卫星细胞活化、成肌细胞增殖和 / 或成肌细胞或巨噬细胞迁移的本发明肌肉生长抑制素拮抗剂多肽测试它们在动物体内模型中治疗肌肉生长抑制素相关病症的能力。此类模型包括老年骨骼肌减少症的老年小鼠模型 (Kirk, 2000)；肌肉营养不良的小鼠模型 (Mdx) (Tanabe 等, 1986)；糖尿病的小鼠模型 (Like 等, 1976)；肥胖症的小鼠模型 (Giridharan 等, 1998)；肌肉损伤的虎蛇毒蛋白 (notexin) 模型 (Kirk, 2000)；表层或深层皮肤伤口的模型 (Gillitze 等, 2001)；烧伤的模型 (Yang 等, 2005)；给小鼠注射地塞米松以诱导肌肉消耗的小鼠恶病质模型 (Ma 等, 2003) 或给小鼠注射结肠腺癌 (C26) 细胞或 Lewis 肺癌瘤 (LLC) 细胞以诱导与癌症有关的肌肉消耗的小鼠癌症模型。

[0117] 本发明的分离的多肽优选地以 $1 \mu\text{M}$ 或更少的 Kd，和更优选地以 100nM, 10nM 或甚至 1nM 或更少的 Kd 结合其靶物。

[0118] 本发明还致力于药物组合物，其包含至少一种本发明新颖的具有肌肉生长抑制素

拮抗剂活性的多肽以及药学或生理学可接受的载体。

[0119] 本发明的多肽或其盐可以包括药学可接受载体或稀释剂中,理想地是以给患者有效投递治疗有效量且在所治疗的患者中不引起严重毒性效应的量。组合中活性多肽的浓度取决于多肽的吸收、分布、失活、和排泄速率,以及本领域技术人员知道的其它因素。应当注意,剂量值还会随着待减轻的疾患的严重性而变化。还应当理解,对于任何特定受试者,应当根据个体的需要和施用组合物或监督组合物施用的人的专业判断随时调整具体的剂量方案。上文所述技术和方案的例子可见于 Remington's Pharmaceutical Sciences,第 16 版,Oslo, A. (编),1980。

[0120] 用于胃肠外、(真)皮内、皮下、皮下、或表面应用的溶液或悬浮液可以包括以下成分:无菌稀释剂,诸如注射用水、盐水溶液、不挥发油、聚乙二醇、甘油、聚丙二醇或其它合成溶剂;抗菌剂,诸如苯甲醇或对羟基苯甲酸甲酯;抗氧化剂,诸如抗坏血酸或亚硫酸氢钠;螯合剂,诸如乙二胺四乙酸;缓冲剂,诸如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐;和用于调节张力(toxicity)的药剂,诸如氯化钠或右旋糖。

[0121] 用于胃肠外应用,诸如静脉内、皮下、或肌肉内注射的合适的药学可接受载体包括无菌水、生理盐水、抑菌盐水(含 0.9mg/ml 苯甲醇的盐水)和磷酸盐缓冲盐水。如果静脉内施用,那么优选的载体是生理盐水或磷酸盐缓冲盐水。

[0122] 用于制备经皮(transdermal)配制剂(包括表面配制剂或经皮投递装置,诸如贴剂)的方法是本领域技术人员已知的。例如参见 Brown L. 和 Langer R., Transdermal Delivery of Drugs(1988), Annual Review of Medicine, 39:221-229。

[0123] 本发明的多肽可以与会保护多肽免于自体内快速消除的载体一起制备,诸如通过受控释放配制剂,包括埋植剂微囊投递系统。可以使用生物可降解的、生物相容的聚合物,诸如乙烯-乙酸乙烯、聚酸酐、聚乙醇酸、胶原、聚正酯、和聚乳酸。

[0124] 脂质体悬浮液也是本发明多肽的合适载体。可以通过关于掺入脂质体包膜中的已知方法将多肽与脂质偶联,或者可以将化合物封装到脂质体中。脂质体可以依照本领域技术人员已知的方法来制备,诸如 U. S. 4, 522, 811 所记载的。例如,脂质体配制剂可以如下制备,即在有机溶剂中溶解适宜的脂质(诸如硬脂酰磷脂酰基乙醇胺、硬脂酰磷脂酰基胆碱、花生酰(arachadoyl)磷脂酰基胆碱、和胆固醇),然后蒸发,在容器的表面上留下干燥的脂质的薄膜。然后将本发明活性多肽或其单磷酸酯和/或三磷酸酯衍生物的水溶液导入容器中。然后手工地使容器打旋以释放(free)脂质聚集体,从而形成脂质体悬浮液。

[0125] 对于鼻或肺施用,活性成分会是适于吸入的细粉或溶液或悬浮液的形式。或者,活性成分可以是适于直接应用于鼻粘膜的形式,诸如软膏剂或乳膏、鼻喷雾剂、鼻滴剂或气雾剂。

[0126] 口服组合物可以包含惰性稀释剂或可食用载体。它们可以封装在明胶胶囊中或压制成片剂。为了口服治疗(剂)施用目的,可以与赋形剂一起掺入活性化合物,而且以片剂、锭剂(troche)、或胶囊的形式使用。药学相容的粘合剂和/或佐药材料可以作为组合物的一部分包括在内。用于封装(诸如在硬明胶包衣中)组合物供口服施用的方法是本领域众所周知的(Baker, Richard, Controlled Release of Biological Active Agents, John Wiley and Sons, 1986)。用于克服各种屏障(包括粘液-层屏障、酶屏障、和膜屏障)的技术是本领域众所周知的(Bernkop-Schnurch 等, 2001)。

[0127] 片剂、丸剂、胶囊剂、锭剂等等可以含有任何以下成分或相似性质的化合物：粘合剂，诸如微晶纤维素、西黄蓍胶或明胶；赋形剂，诸如淀粉或乳糖；崩解剂，诸如褐藻酸、或玉米淀粉；润滑剂，诸如硬脂酸镁；助流剂，诸如胶态二氧化硅；甜味剂，诸如蔗糖或糖精；或增香剂，诸如薄荷、水杨酸甲酯、或橙味剂。若剂量单位形式是胶囊剂，则它可以在上述类型的材料之外含有液态载体，诸如脂肪油。另外，剂量单位形式可以含有改良剂量单位的物理形式的各种其它材料，例如糖、紫胶或其它肠内吸收剂的涂层。或者，本发明的多肽可以作为酞剂、悬浮液、糖浆剂、糯米纸囊剂 (wafer)、咀嚼胶等等的成分来施用。糖浆剂可以在活性化合物之外含有蔗糖（作为甜味剂）和某些防腐剂、染料和着色剂和香料。

[0128] 本发明致力于治疗哺乳动物中肌肉生长抑制素相关病理学疾患的方法，其中所述方法一般至少包括给有需要的哺乳动物施用有效量的至少一种具有肌肉生长抑制素拮抗剂活性的本发明多肽，施用的时间足以预防、治疗或改善所述肌肉生长抑制素相关病理学疾患的症状。在优选的实施方案中，所述哺乳动物是患有、怀疑患有、或已经诊断为患有一种或多种肌肉生长抑制素相关病理学疾患的人。

[0129] 所述病理学状况的特征至少部分在于哺乳动物中肌肉或脂肪组织的异常量、发育或代谢活性，而且可以包括与肌肉肥大有关的病症；与炎性肌病、肌肉营养不良、运动神经元疾病、神经肌肉接头疾病、外周神经疾病、内分泌异常所致肌病、代谢综合征、HIV、癌症、老年骨骼肌减少症、恶病质和其它消耗性疾患有关的肌肉萎缩和肌肉消耗；心力衰竭（或心肌衰竭）；骨质疏松（症）；肾衰竭或肾病；肝衰竭或肝病；食欲缺乏；肥胖症；糖尿病；和伤口愈合。

[0130] 可以治疗的炎性肌病包括：皮肌炎 (Dermatomyositis, PM/DM)、包涵体肌炎 (Inclusion Body Myositis, IBM) 和多肌炎 (Polymyositis, PM/DM)。

[0131] 可以治疗的肌肉营养不良包括：Becker 肌肉营养不良 (Becker Muscular Dystrophy, BMD)、先天性肌肉营养不良 (Congenital Muscular Dystrophy, CMD)、远端肌肉营养不良 (Distal Muscular Dystrophy, DD)、Duchenne 肌肉营养不良 (Duchenne Muscular Dystrophy, DMD)、Emery-Dreifuss 肌肉营养不良 (Emery-Dreifuss Muscular Dystrophy, EDMD)、肢带肌肉面肩胛臂肌肉营养不良 (Limb-Girdle Muscular Facioscapulohumeral Muscular Dystrophy, FSH 或 FSHD)、营养不良 (Dystrophy, LGMD)、肌强直性营养不良 (Myotonic Dystrophy, MMD) 和眼咽肌肉营养不良 (Oculopharyngeal Muscular Dystrophy, OPMD)。

[0132] 可以治疗的运动神经元疾病包括：成人脊髓性肌萎缩 (Adult Spinal Muscular Atrophy, SMA)、肌萎缩性侧索硬化 (Amyotrophic Lateral Sclerosis, ALS)、婴儿期进行性脊髓性肌萎缩 (Infantile Progressive Spinal Muscular Atrophy, SMA, SMA1 或 WH)、过渡型 (Intermediate) 脊髓性肌萎缩 (Intermediate Spinal Muscular Atrophy, SMA 或 SMA2)、青少年脊髓性肌萎缩 (Juvenile Spinal Muscular Atrophy, SMA, SMA3 或 KW) 和脊柱延髓肌萎缩 (Spinal Bulbar Muscular Atrophy, SBMA)。

[0133] 可以治疗的神经肌肉接头疾病包括：先天性肌无力综合症 (Congenital Myasthenic Syndrome, CMS)、Lambert-Eaton 综合征 (Lambert-Eaton Syndrome, LES) 和重症肌无力 (Myasthenia Gravis, MG)。

[0134] 可以治疗的外周神经疾病包括：Charcot-Marie-Tooth 病 (Charcot-Marie-Tooth

Disease, CMT)、Dejerine-Sottas 病 (Dejerine-Sottas Disease, DS) 和 Friedreich 氏共济失调 (Friedreich's Ataxia, FA)。

[0135] 可以治疗的内分泌异常所致肌病包括:甲状腺功能亢进性肌病 (Hyperthyroid Myopathy, HYPTM) 和甲状腺功能减退性肌病 (Hypothyroid Myopathy, HYPOTM)。

[0136] 可以治疗的其它肌病包括:中央核疾病 (Central Core Disease, CCD)、先天性肌强直 (Myotonia Congenita, MC)、纤维状肌病 (Nemaline Myopathy, NM)、肌管性肌病 (Myotubular Myopathy, MTM 或 MM)、先天性 (副) 肌强直 (Paramyotonia Congenita, PC) 和周期性麻痹 (Periodic Paralysis, PP)。

[0137] 可以治疗的肌肉代谢疾病包括:酸性麦芽糖酶缺乏症 (Acid Maltase Deficiency, AMD)、肉 [毒] 碱缺乏症 (Carnitine Deficiency, CD)、肉毒碱棕榈酰基转移酶缺乏症 (Carnitine Palmityl Transferase Deficiency, CPT)、脱支酶缺乏症 (Debrancher Enzyme Deficiency, DBD)、糖尿病、乳酸脱氢酶缺乏症 (Lactate Dehydrogenase Deficiency, LDHA)、肌腺苷酸脱氨酶缺乏症 (Myoadenylate Deaminase Deficiency, MAD)、线粒体性肌病 (Mitochondrial Myopathy, MITO)、肥胖症、磷酸化酶缺乏 (Phosphorylase Deficiency, MPD 或 PYGM)、磷酸果糖激酶缺乏 (Phosphofructokinase Deficiency, PFKM)、磷酸甘油酸激酶缺乏症 (Phosphoglycerate Kinase Deficiency, PGK) 和磷酸甘油酸变位酶缺乏症 (Phosphoglycerate Mutase Deficiency, PGAM 或 PGAMM)。

[0138] 本发明的多肽还可用于治疗或预防充血性心力衰竭;用于降低与衰老有关的虚弱;用于提高骨密度 (诸如用于治疗骨质疏松 (症)) 或加速骨折修复;用于治疗生长迟缓、用于治疗生理学身材矮小症、用于削弱蛋白质代谢应答,诸如在大手术后;用于降低慢性病所致蛋白质损失;用于加速伤口愈合;用于加速烧伤患者或经历了大手术的患者的恢复;用于维持皮肤厚度;用于维持代谢稳态、用于治疗肾衰竭 / 肾病和肝衰竭 / 肝病;用于治疗生长激素缺乏的成年人和用于预防糖皮质激素的分解代谢副作用;及用于治疗许多神经系统疾病疾患,包括 CNS 损伤 / 疾病 (诸如脊髓损伤和中风) 和 PNS 损伤 / 疾病。

[0139] 这些病症可以通过给有需要的受试者施用治疗量的一种或多种肌肉生长抑制素拮抗剂来治疗。

[0140] 在另一个实施方案中,本发明涵盖一种或多种肌肉生长因子的用途,其可以与本发明的药物组合物共施用,以给予治疗方案以累加或协同效应。此类生长因子可以选自下组: HGF、FGF、IGF、MGF、生长激素等。此类生长因子与包含至少一种具有肌肉生长抑制素拮抗剂活性的本发明多肽的药物组合物分开地、相继地或同时地施用。

[0141] 在另一个实施方案中,本发明涵盖与待使用的本发明肌肉生长抑制素拮抗剂多肽具有不同活性的第二药理学活性化合物与本发明的多肽联合来治疗肌肉生长抑制素相关病症的用途。例如,可以联合选自下组的活性化合物来施用多肽:多肽生长激素 (如下文所述)、NSAID 或 COX-2 抑制剂、 α 和 β 阻断剂、ACE 抑制剂、二膦酸盐、雌激素受体调控剂、抗高血压药、谷氨酸 (glutamate) 拮抗剂、胰岛素、抗生素、蛋白激酶 C 抑制剂或各种非处方药 (over the counter substances), 正如技术人员会领会的。此类活性化合物可以与至少一种具有肌肉生长抑制素拮抗剂活性的本发明多肽分开地、相继地或同时地施用。

[0142] 本发明还致力于一种或多种肌肉生长抑制素抑制剂在制造用于治疗有需要的患者中肌肉生长抑制素相关病理学疾患的药物中的用途。所述一种或多种肌肉生长抑制素拮

抗剂可以选自上文所述肌肉生长抑制素拮抗剂的组。

[0143] 药物可以配制成供局部或系统施用。例如,药物可以配制成供直接注射入肌肉用,或者可以配制成供口服施用以系统投递至肌肉来治疗肌肉消耗疾患用。药物可以配制成供表面施用、供治疗伤口愈合用,而且可以配制成供口服施用来治疗肥胖症和糖尿病用。

[0144] 药物可以进一步包含一种或多种别的肌肉生长促进化合物来给予肌肉消耗的治疗以累加或协同效应或者来增加肌肉量。药物可以配制成供分开地、相继地或同时地施用一种或多种肌肉生长抑制素拮抗剂及一种或多种肌肉生长促进化合物。

[0145] 不受理论束缚,认为具有肌肉生长抑制素拮抗剂活性的本发明新颖的多肽在经由三种机制部分预防或治疗肌肉生长抑制素相关病症方面是有效的。第一,通过诱导卫星细胞活化、增殖和分化。卫星细胞是肌肉干细胞,因而牵涉肌肉组织再生。第二,通过增强成肌细胞增殖和迁移至再生位点,而第三,通过增强巨噬细胞募集。已知巨噬细胞发挥吸引成肌细胞,从而增加肌发生的作用。对巨噬细胞募集的效应先前已经用其它肌肉生长抑制素拮抗剂观察到,其导致改良的伤口愈合(WO2006/083182)。如此,本发明在改善伤口愈合方面应当也是有效的。

[0146] 我们首次显示了新颖的包含C端截短的成熟肌肉生长抑制素肽(其中所述C端截短在氨基酸329之前)的肌肉生长抑制素抑制剂在治疗肌肉生长抑制素相关病症中是有用的。在年龄相关的老年骨骼肌减少症模型中,本发明的肌肉生长抑制素拮抗剂不仅在改善肌肉量和力量方面,而且在减少老年骨骼肌减少症相关脂肪沉积方面是有效的。考虑到这些肽中的C端截短接近半胱氨酸或使半胱氨酸被排除,导致三维结构的破坏(三维结构被认为是对生物学活性而言必需的一项特征)(Jeanplong等,2001),因而这些结果是出人意料的。

[0147] 本发明也可以广泛地说成单独地或笼统地存在于本申请说明书中提到或指明的各部分、各元素和各特征,及任何两种或更多所述各部分、各元素或各特征的任何或所有组合,而且,若本文中所提到的具体完整物在本发明所涉及的领域具有已知的等同物,则认为此类已知的等同物被收入本文就像单独列举一样。

[0148] 实施例

[0149] 本文包括以下实施例是为了证明本发明的优选实施方案。本领域技术人员应当领会,下文实施例中所公开的技术代表了本发明人发现能在实施本发明的过程中很好地加以运用的技术,因而可以认为是构成该实施的优选模式。然而,本领域技术人员在本公开的启发下应当领会,可以对所公开的具体实施方案进行许多变化,仍获得类似或相似的结果,而不偏离本发明的精神和范围。

[0150] 实施例1:肌肉生长抑制素拮抗剂提高体外成肌细胞增殖

[0151] 方法

[0152] 肌肉生长抑制素拮抗剂的表达和纯化

[0153] 将与牛肌肉生长抑制素序列的氨基酸267-329;267-320;267-310;267-300;和267-280(下文分别称作肌肉生长抑制素拮抗剂329,320,310,300,和280)对应的cDNA分别PCR扩增,并使用BamHI位点克隆入pET16-B载体。肌肉生长抑制素拮抗剂329,320,310,300,和280的表达和纯化依照制造商(Qiagen)的方案在天然条件下进行,产生了具有N端标签(M G H H H H H H H H H S S G H I E G R H M L E D P)和C端标签(E D P A A

N K A R K E A E L A A T A E Q) 的肽。

[0154] 成肌细胞测定法

[0155] 在 Dulbecco 氏改良 Eagle 氏培养基中依照标准技术培养牛 C2C12 成肌细胞 (Thomas 等, 2000)。在未包被的 96 孔微量滴定板中实施成肌细胞增殖测定法。以 1000 个细胞 / 孔接种 C2C12 培养物。16 小时附着期后, 添加含重组野生型肌肉生长抑制素或不同肌肉生长抑制素拮抗剂的测试培养基, 并将细胞再温育 48 或 72 小时的一段时间。对于竞争测定法, 在添加到培养基中之前, 用不同浓度的肌肉生长抑制素拮抗剂竞争野生型肌肉生长抑制素。温育期后, 使用亚甲蓝光度终点测定法如先前所述评估增殖 (Thomas 等, 2000)。

[0156] 依照标准技术在含 20% FBS, 10% 马血清和 0.5% 鸡胚提取物的 Dulbecco 氏改良 Eagle 氏培养基中培养人骨骼肌成肌细胞 (Cambrex, USA) 或原代绵羊成肌细胞。在未包被的 96 孔微量滴定板中实施成肌细胞增殖测定法。以 2000 个细胞 / 孔接种细胞培养物。24 小时附着期后, 添加补充有 5% FCS、含作为对照的缓冲液或 1, 5 和 10 μ g/ml 不同肌肉生长抑制素拮抗剂 (300, 310 或 320) 的测试培养基, 并将细胞再温育 144 小时 (对于人细胞) 或 48 小时 (对于绵羊细胞) 的一段时间。温育期后, 使用亚甲蓝光度终点测定法如先前所述评估增殖 (Thomas 等, 2000)。

[0157] 结果

[0158] 结果显示了与对照相比, 在以 1 μ g/ml 或 5 μ g/ml 存在 48 或 72 小时时, 肌肉生长抑制素拮抗剂 300, 310, 320 和 329 显著增强成肌细胞的增殖能力 (图 1 和图 29)。在 48 小时时间点观察到最高的成肌细胞增殖速率, 对于 300, 310 和 320 拮抗剂中的每一种浓度是 5 μ g/ml 而 329 是 10 μ g/ml。肌肉生长抑制素拮抗剂 280 不显示高于对照的活性。这有可能是由于该肽只包含 1 个半胱氨酸残基。

[0159] 将重组肌肉生长抑制素以 2.25 μ g/ml 添加至对照培养基, 导致 48 小时后对成肌细胞增殖的 25% 抑制。此数值在 72 小时后降至约 10% (图 2)。在以三种不同浓度 (1, 5 和 10 μ g/ml) 添加肌肉生长抑制素拮抗剂 300, 310 和 320 后, 肌肉生长抑制素对成肌细胞的增殖抑制效应被挽救至与阳性对照中所观察到的相似的水平。这证明了肌肉生长抑制素拮抗剂诸如 300, 310 和 320 能通过增强成肌细胞增殖而有效加速肌肉再生 (图 2)。

[0160] 为了确定肌肉生长抑制素拮抗剂是否在不同物种中有效, 我们实施了人和绵羊成肌细胞增殖测定法。在以三种不同浓度 (1, 5 或 10 μ g/ml, 经 48 或 144 小时) 添加肌肉生长抑制素拮抗剂 300, 310 和 320 后, 人和绵羊成肌细胞的增殖能力与对照相比显著增强 (图 13 和图 14)。

[0161] 这些结果指出施用肌肉生长抑制素拮抗剂会对患有肌肉相关病症或任何其它病症 (在这些病症中成肌细胞增殖速率增加是有益的) 的患者产生有益效果, 诸如在肌肉消耗病症的治疗或受伤肌肉组织的再生中。

[0162] 实施例 2: 肌肉生长抑制素调节卫星细胞活化

[0163] 方法

[0164] 单肌纤维分离和培养

[0165] 如先前所述分离单纤维 (Rosenblatt 等, 1995)。简言之, 通过 CO₂ 气体接着颈脱位将 1 和 24 月龄野生型小鼠安乐死。剥离胫骨前肌 (TA), 并在含 0.2% (w/v) 1A 型胶原酶 (> 260 CDU/mg, Sigma) 的 Dulbecco 氏改良 Eagle 氏培养基 (DMEM) (Invitrogen) 中于 37°C

消化 60 分钟。将肌肉转移至 DMEM+10% 马血清 (HS)+0.5% 鸡胚提取物 (CEE) 中,并通过温和研磨将纤维分开。将分离的纤维转移至包被有 10% Matrigel (Becton Dickinson) 的 4 孔腔式载玻片 (Becton Dickinson),并在于 37℃ 在 5% CO₂ 中培养长达 72 小时后用 100% 冰冷的甲醇固定 10 分钟。

[0166] 增殖细胞核抗原 (Proliferating Cell Nuclear Antigen, PCNA) 在活跃地经历细胞周期的细胞中表达,但在休眠细胞中不表达。附着至肌肉纤维的卫星细胞中大百分比的是休眠的,因而不表达 PCNA。然而,在活化后,卫星细胞被活化来表达 PCNA 和通过补充肌肉纤维而再生肌肉。如此,PCNA 是活化的卫星细胞的标志物的非常可靠的抗原。为了测定肌肉生长抑制素拮抗剂对卫星细胞活化的效应,来自年幼的 (1 个月) 或年老的 (24 个月) 野生型小鼠的胫骨前肌肌肉的单肌肉纤维在存在 5 μg/ml 肌肉生长抑制素拮抗剂 320,310 或 300 时在培养基中培养 24,48 和 72 小时,并用甲醇固定和在 PBS 中清洗。将固定后的纤维在含 0.5% TritonX-100 的 PBS 中透化 10 分钟,在含 10% 正常山羊血清和 0.35% 角叉菜胶 λ 的 PBS 中于室温封闭 30 分钟,然后与在封闭液 (blocker) 中 1 : 100 稀释的抗 PCNA 抗体一起温育过夜。使用山羊抗小鼠 -alexa fluor 546 检测一抗,并用 DAPI 对纤维复染。在显微镜下对 PCNA 阳性的活化的卫星细胞计数,并表述成总肌核的百分比。

[0167] 为了测试短期肌肉生长抑制素拮抗剂处理对卫星细胞活化的效应,自每个处理组 (如下文实施例 4 所述) 的小鼠分离单纤维,并如上文所述培养。如所述的使用抗 PCNA 抗体检查卫星细胞活化。

[0168] 结果

[0169] 肌肉生长抑制素拮抗剂能活化卫星细胞

[0170] 在将来自年幼的 (1 月龄) 野生型小鼠的单肌肉纤维与肌肉生长抑制素拮抗剂 300 一起温育后,观察到活化的卫星细胞数目的显著增加 (图 3)。在将活化的细胞数目换算成百分比增加,针对对照标准化后,观察到相似的结果 (图 4)。使用肌肉生长抑制素拮抗剂 300,310 和 320 对来自年老的 (2 岁龄) 小鼠的单肌肉纤维重复此实验。对于所测试的所有肌肉生长抑制素拮抗剂,观察到活化的卫星细胞百分比的显著增加。用拮抗剂 300 处理 48 小时后看到最大的增加 (图 5)。这些结果证实了肌肉生长抑制素拮抗剂 300,310 和 320 是年幼的和年老的野生型肌肉中卫星细胞的有力激活物,并指出施用肌肉生长抑制素拮抗剂能预期治疗或预防与卫星细胞活化降低有关的病症诸如老年骨骼肌减少症 (sarcopenia) 的发作。此外,可以预期,在活化的卫星细胞的比例已经降低的情况下,肌肉生长抑制素拮抗剂可用于降低此类疾患的严重性。此数据还显示了这些拮抗剂有效使肌肉纤维中卫星细胞活化增加超过卫星细胞活化正常水平。因此,肌肉生长抑制素拮抗剂可用作医学处理所致创伤之前或预期导致减少的肌肉力量的疾患诸如强迫性不活动 (enforced inactivity) 或其它疾患的发作之前的处理。

[0171] 实施例 3 :肌肉生长抑制素拮抗剂增加巨噬细胞和成肌细胞的炎症应答和趋化性

[0172] 方法

[0173] 趋化性测定法

[0174] 依照已发表的方案 (Allen 等,1997 ;Partridge,1997),培养来自年幼的 (4-6 周龄) 或年老的 (24 月龄) 小鼠的后肢肌肉的原代成肌细胞。简言之,将肌肉切碎,并在 0.2% 胶原酶 1A 型中消化 90 分钟。通过未包被的板上预铺板 3 小时来使培养物富集成肌细胞。

在 10% Matrigel 包被的板上在补充有 20% 胎牛血清 (FCS), 10% HS 和 1% CEE 的生长培养基 (GM) 中在 37°C / 5% CO₂ 维持成肌细胞培养物。通过培养 48 小时后的 MyoD 表达的流式细胞术分析来评估培养物纯度。使用胰蛋白酶收获细胞, 以 10⁶ 个细胞 / 200 μl 的浓度悬浮, 并在 5ml 70% 乙醇中于 -20°C 固定过夜。于室温实施染色 30 分钟, 其中使用家兔多克隆抗 MyoD, 1 : 200 (Santa Cruz), 接着是 Alexa fluor 488 抗家兔偶联物, 1 : 500 (Molecular Probes)。一式两份实施分析, 其中使用 10⁴ 个在每次测定法中收集的细胞事件。通过前向的 (forward) 和侧向的 (side) 散射序型 (scatter profiles) 进行门控 (gating) 来排除碎片。通过 FACSscan (Becton Dickinson) 分析细胞。通过腹腔灌洗技术分离巨噬细胞, 和 / 或其衍生自骨髓。依照已发表的方案 (Colditz 和 Movat, 1984) 制备酵母聚糖活化的小鼠血清 (ZAMS)。

[0175] 对于成肌细胞的趋化性测定法, 如下对来自 2 岁小鼠的成肌细胞实施第一测定法。含 2% 马血清 (HS), 5% 鸡胚提取物 (CEE) 加透析缓冲液的 DMEM 用作阳性对照。将重组肌肉生长抑制素 (2.5 μg/ml 肌肉生长抑制素) 和肌肉生长抑制素拮抗剂 300, 310 和 320 (5 倍肌肉生长抑制素浓度, 即 12.5 μg/ml) 添加至阳性对照培养基。纯粹的 DMEM 用作阴性对照。在 24 孔板上, 给底部的孔注入测试或对照培养基。给顶部的孔添加 75 × 10³ 个细胞, 该顶部的孔中装有用 1% Matrigel 包被的聚对苯二甲酸乙二醇酯 (PET) 0.8 μm 膜。将板于 37°C, 5% CO₂ 温育 7 小时。将膜的上表面用预湿的药签清洗以除去未迁移的细胞。然后将膜固定, 在 Gill 氏苏木精中染色, 并在载玻片上湿法安装。对每张膜的 4 个代表性视野的迁移细胞计数并将平均数绘图。结果显示于图 6 (来自年老的小鼠的成肌细胞迁移) 和图 7 (来自年幼的小鼠的成肌细胞迁移)。

[0176] 在第二成肌细胞迁移测定法中, 自盐水处理的 (对照) 和肌肉生长抑制素拮抗剂 300 处理的小鼠 (如下文实施例 4 所述) 的后肢分离原代成肌细胞。使用三种化学引诱物培养基: 含 2% 马血清 (HS) 和 5% 鸡胚提取物 (CEE) 的 DMEM (最佳的化学引诱物); 只含 5% CEE 的 DMEM 或只含 2% HS 的 DMEM (都是亚最佳的化学引诱物)。纯粹的 DMEM 用作阴性对照。在 24 孔板上, 给底部的孔注入测试或对照培养基。给顶部的孔添加 75 × 10³ 个细胞。将板于 37°C, 5% CO₂ 温育 7 小时。将膜的上表面用预湿的药签清洗以除去未迁移的细胞。然后将膜固定, 在 Gill 氏苏木精中染色, 并在载玻片上湿法安装。对每张膜的 4 个代表性视野的迁移细胞计数并将平均数绘图。结果显示于图 9。

[0177] 对于巨噬细胞的趋化性分析, 自盐水处理的 (对照) 和肌肉生长抑制素拮抗剂 300 处理的小鼠 (如下文实施例 4 所述) 分离骨髓, 并以 5 × 10⁶ 个细胞 / 板在 DMEM 10% FBS 加 10% L929 条件化培养基 (含 CSF-1) 中涂布 5 天以诱导巨噬细胞分化。然后收获巨噬细胞并用于测定法。使用三种浓度的含酵母聚糖活化的小鼠血清 (ZAMS) 的 DMEM, 33% (最佳的化学引诱物浓度), 22% 和 11% (亚最佳的化学引诱物浓度)。纯粹的 DMEM 用作阴性对照。在 24 孔板上, 给底部的孔注入测试或对照培养基。给装有聚对苯二甲酸乙二醇酯 (PET) 0.8 μm 膜的顶部的孔添加 75 × 10³ 个细胞。将板于 37°C, 5% CO₂ 温育 7 小时。将膜的上表面用预湿的药签清洗以除去未迁移的细胞。然后将膜固定, 在 Gill 氏苏木精中染色, 并在载玻片上湿法安装。对每张膜的 4 个代表性视野的迁移细胞计数并将平均数绘图。

[0178] 结果

[0179] 在将自年老的 (2 岁龄) 小鼠分离的原代成肌细胞与对照 (CEE) 培养基中的

2.5 μ g/ml 重组肌肉生长抑制素一起温育后,看到了迁移的成肌细胞数目显著减少了大约 78%。在以 5 μ g/ml 添加肌肉生长抑制素拮抗剂 300,310 和 320 时,肌肉生长抑制素对成肌细胞迁移的化学抑制效应被挽救至与在对照中所观察到的相似的水平(图 6)。使用来自年幼的(1 月龄)小鼠的成肌细胞重复此实验。再次地,添加肌肉生长抑制素拮抗剂 300 和 310 至含肌肉生长抑制素的培养基,将肌肉生长抑制素细胞的迁移挽救至对照水平(图 7)。这些结果证明了肌肉生长抑制素拮抗剂诸如 300,310 和 320 能通过增强成肌细胞迁移而有效加速肌肉再生。如上所示,肌肉生长抑制素对成肌细胞增长至受伤区域具有负效应。由于已知成肌细胞受到趋化因子的影响来指导它们的移动(Bischoff,1994;Jones,2000),使用三种化学引诱物调查了体内施用肌肉生长抑制素拮抗剂 300 对卫星细胞衍生的成肌细胞迁移能力的效应。与自盐水处理的对照小鼠分离的巨噬细胞相比,自用肌肉生长抑制素拮抗剂 300 处理的小鼠分离的成肌细胞在每种化学引诱物培养基中具有显著增加的迁移速率(图 9)。

[0180] 还知道肌肉生长抑制素对炎症应答有效应,具体地,肌肉生长抑制素干扰在肌肉再生过程中巨噬细胞迁移至损伤部位。为了评估肌肉生长抑制素拮抗剂 300 体内处理是否影响巨噬细胞的迁移,对自用盐水(对照)或拮抗剂 300 处理共六周的小鼠分离的巨噬细胞实施了体外迁移测定法。结果显示了与自盐水处理的对照分离的巨噬细胞相比,拮抗剂 300 体内处理在三种不同浓度的化学引诱物培养基 ZAMS(11%,22%或 33%)中显著增加巨噬细胞的迁移能力(图 10)。

[0181] 体内施用肌肉生长抑制素拮抗剂 300 增强成肌细胞和巨噬细胞二者的迁移速率的能力指出施用肌肉生长抑制素拮抗剂可用作患有如下疾患的患者中的有效治疗,在所述疾患中抑制肌肉生长抑制素活性在临床上会是有益的,包括肌肉消耗疾患(muscle wasting conditions)和炎性肌病(inflammatory myopathies),并且施用肌肉生长抑制素拮抗剂对于伤口愈合和增强的巨噬细胞和成肌细胞迁移可带来好处的任何其它病理学是有用的。

[0182] 实施例 4:使用肌肉生长抑制素模拟物 300 的体内试验

[0183] 方法

[0184] 实施了动物试验来评估肌肉生长抑制素拮抗剂 300 在改善肌肉功能方面的效果。将 16 月龄小鼠分成两组,每组 10 只。对照组接受盐水皮下(SC)注射,其它组皮下接受 6 μ g/g 体重的肌肉生长抑制素拮抗剂 300,每周三次、共六周。通过测量小鼠在试验结束时的握力来评估老年骨骼肌减少症肌肉的功能改善。握力以牛顿测量。

[0185] 结果

[0186] 结果指出,虽然对照小鼠的握力有降低(损失~5%),但是用拮抗剂 300 治疗 6 周的年老的小鼠的握力有高度显著的增加(图 11)。相同的数据表述成两个组在试验开始和结束时的握力(图 12),而且进行相同的观察,其中用肌肉生长抑制素拮抗剂 300 治疗的小鼠的握力有显著增加。这部分是由于在卫星细胞活化中观察到的增加和在治疗期结束时自这些小鼠分离的细胞和纤维中观察到的巨噬细胞和成肌细胞迁移(图 9 和 10)。

[0187] 记录到了另一项重要的观察结果。在 16 个月时,年老的野生型小鼠显示出体脂肪的显著积累。在两个处理组中,所有小鼠都观察到具有与盐水处理的对照相比体脂肪的明显减少。这是非常值得注意的。如此看来,延长的肌肉生长抑制素拮抗剂处理似乎具有与

对照小鼠相比减少的皮下脂肪的量,包括用 300 处理的小鼠中的腹股沟脂肪垫(结果未显示)。

[0188] 先前已经显示了在胚胎阶段删除肌肉生长抑制素影响出生后脂肪积累。然而,这里出人意料的结果是对小鼠进行的 6 周处理减少脂肪组织量。这可能是由于肌肉生长抑制素拮抗剂或是动员了脂肪组织中储存的甘油三酯,从而干扰脂肪酸生物合成,或是其它机制。无论如何,此实验清楚地例示了通过肌肉生长抑制素拮抗剂来控制脂肪组织大小,而不是在胚胎阶段就完全消除肌肉生长抑制素(肌肉生长抑制素缺失小鼠)所致的瘦体量。

[0189] 如此看来,肌肉生长抑制素拮抗剂不仅在治疗或预防由老年骨骼肌减少症诱发的肌肉量和力量降低中是有用的,而且在降低也与老龄有关的增加的脂肪沉积中也是有用的。另外,本发明的肌肉生长抑制素拮抗剂可用于在肥胖症、食欲缺乏和糖尿病的临床疾患中控制/减少脂肪组织量。

[0190] 实施例 5:肌肉营养不良(Mdx)体内试验

[0191] 方法:

[0192] 实施了体内试验,其中给 4 周龄肌肉营养不良小鼠每周 3 次注射 300 (6 μ g/g) 或盐水(每种处理 10 只小鼠)达 4 周。定期记录体重,并收集血液用于肌酸激酶活性以评估肌肉损伤程度。实施抓握测试作为力量测量。处理 4 周后,挑选小鼠并收集个体后肢肌肉用于蛋白质表达分析 Pax7 & MyoD(卫星细胞活化/肌发生),和组织学。

[0193] 自三种后肢肌肉,即股二头肌、胫骨前肌和腓肠肌提取蛋白质。将 15 μ g 蛋白质在 4-12% SDS PAGE 上分开,转移至硝酸纤维素膜,并用 Pax7 和 MyoD 免疫探查。

[0194] 自每个腓肠肌的中间区(midbelly region)切下 10 微米横切片。将肌肉切片用苏木精和曙红(H&E)染色以显现和测量坏死和再生面积。使用 Olympus BX50 显微镜(Olympus, Tokyo, Japan)、SPOT-RT 4.01 照相机和软件(Diagnostic Instruments, Sterling Heights, MI)分析这些面积。使用 Image-Pro Plus(Media Cybernetics, Silver Spring, MD)测量面积。

[0195] 通过尾部采血来收集血液入 75mm 肝素化微量血细胞比容管。将管在微量血细胞比容离心机(Adams)中离心 5 分钟,然后取出血浆。将血浆再次以 2500xg 离心 5 分钟,然后保存于 -80°C 直至分析。在血液收集 2 小时内将血浆与红血球分开以最小化溶血。在血浆收集 6 周内使用 CK N-乙酰基-L-半胱氨酸肌酸激酶试剂盒(Beckman Coulter)测定肌酸激酶活性。在试验开始、中点和结束时使用握力装置(MK-380S, Muromachi ;Tokyo, Japan)评估肌肉力量。以牛顿记录小鼠在被通过尾部向后扯时发挥出来的最大力。计算每只小鼠的三次抓握测试的平均值并确定每组 10 只小鼠的平均最大力。

[0196] 结果

[0197] MyoD 和 Pax7 应答 300 处理而上调。

[0198] Pax7 和 MyoD 都已经被确立为肌发生的有力标志物。Pax7 水平指示卫星细胞集合的程度以及卫星细胞自我更新的程度,而 MyoD 表达指示肌肉内发生的肌发生水平。为了调查肌肉营养不良小鼠肌肉中的 Pax7 和 MyoD 蛋白质水平,实施了 Western 印迹分析。

[0199] 如图 15 所示,Pax7 和 MyoD 都有实质性上调。Pax7 在休眠的和增殖的卫星细胞中都表达。Pax7 上调指示增加的卫星细胞活化、更高的卫星细胞数和增加的卫星细胞自我更新。MyoD 是一种重要的生肌基因且其上调指示经 p21 和成肌蛋白(myogenin)上调的肌发

生的增加。Pax7 和 MyoD 二者的上调表明 300 有效拮抗肌肉生长抑制素,因为完全确立了肌肉生长抑制素缺失导致增加的卫星细胞活化和自我更新及肌发生。

[0200] 在 300 处理的肌肉中观察到减少的坏死和增加的再生。

[0201] 再生和坏死面积的百分比面积显示于图 16。此结果与如下假设一致,即肌肉生长抑制素拮抗剂通过活化卫星细胞由此增加新肌肉纤维形成和降低坏死组织水平(正如血液中增强的 MyoD 和 Pax7 表达和减少的 CK 值也指示的)来增加肌肉再生和修复(图 17)。

[0202] 用肌肉生长抑制素 300 处理的小鼠中肌酸激酶活性减少。

[0203] 肌酸激酶(CK)是常常作为主要标志物用于监测肌肉营养不良小鼠(Bogdanovich 等,2005)和人中肌肉损伤程度的一种细胞内酶。试验开始到结束,肌酸激酶活性的变化显示于图 17。由于再生肌肉细胞对受伤的或坏死的状态的比例变化,用 300 处理的小鼠中肌酸激酶活性的较大降低表明这些动物中较少的肌肉损伤。这验证了显示用 300 处理的小鼠中坏死面积较少的组织学数据。

[0204] 用 300 拮抗肌肉生长抑制素增加握力。

[0205] 计算每只小鼠的三次抓握测试的平均值且每组 10 只小鼠的平均最大力显示于图 18。300 处理 4 周后握力的显著增加指示用 300 处理的小鼠中的功能改善。我们将这主要归功于肌肉营养不良小鼠肌肉病理学的改善,这是通过增加的再生效应来实现的,即经由拮抗肌肉生长抑制素,导致肌肉功能的部分恢复。这些发现表明肌肉生长抑制素拮抗剂在肌肉营养不良小鼠中的有益效应有可能是由于肌肉损伤的有效治疗,从而能够将肌肉营养不良中的握力挽救回到野生型(Amthor 等,2007)。

[0206] 实施例 6:体内皮肤活检试验

[0207] 方法

[0208] 将约 10 月龄的 C56b1/6 小鼠麻醉,将颈部背侧皮肤刮毛,并用 4mm 活检打孔器在皮肤上做两处伤口。在损伤后第 1,3,5 和 7 天给小鼠皮下注射盐水或 6 μ g/g 体重肌肉生长抑制素拮抗剂 300。让小鼠愈合 5,7,14,21 和 28 天,之后挑选小鼠并加工皮肤用于组织学。

[0209] 为了组织学,将皮肤样品在 10%福尔马林中固定,在石蜡中包埋和安装,并用 Masson 氏三色染料染色。对处理后每天的切片分析受伤区域大小并将数值绘图。

[0210] 结果

[0211] 为了评估拮抗肌肉生长抑制素对皮肤中伤口愈合的影响,我们在小鼠中实施了皮肤活检研究。用 300 处理的动物一致地显示了与盐水对照相比较小的受伤区域,特别是在稍晚的时间点,如图 20 所示,指示 300 拮抗剂处理能积极地影响活检创伤后小鼠中皮肤愈合速率。此结果显示了拮抗肌肉生长抑制素能在非肌肉组织诸如皮肤中赋予提高的愈合速率,并指出肌肉生长抑制素拮抗剂的用途在改善创伤、烧伤、手术切口和其它皮肤外伤所致损伤后的皮肤愈合中有应用。

[0212] 实施例 7:体内皮肤烧伤试验

[0213] 方法

[0214] 将约 12 月龄的 C56b1/6 小鼠麻醉,将颈部背侧皮肤刮毛,并将红热的金属棒(1.5mm 宽,7mm 长)应用于小鼠暴露的皮肤达 5 秒钟。在损伤后第 1,3,5,7 和 10 天给小鼠皮下注射盐水或 6 μ g/g 体重肌肉生长抑制素拮抗剂 300。让小鼠愈合 5,7,14,21,28,35 和

46 天,之后挑选小鼠并将皮肤在液氮中冷冻用于羟脯氨酸分析。

[0215] 结果

[0216] 在皮肤烧伤损伤后,实施了羟脯氨酸测定法以测定受伤区域上胶原沉积物的量。羟脯氨酸存在于胶原中,并给予它稳定的螺旋构象。因此,测量给定组织中存在的羟脯氨酸的量能测定组织中存在的胶原的量。用 300 处理的组显示出与对照组相比向着更低水平受伤区域胶原的趋势,如图 21 所示,表明肌肉生长抑制素拮抗剂非肌肉组织的治疗中是有用的,所述非肌肉组织的治疗的期望结果是伤口愈合后纤维化减少。

[0217] 实施例 8:体内肌肉烧伤试验

[0218] 方法

[0219] 将约 12 月龄的 C56b1/6 小鼠麻醉,并将红热的金属棒(1.5mm 宽,7mm 长)应用于胫骨前肌肌肉达 5 秒钟。在损伤后第 1,3,5,7 和 10 天给小鼠皮下注射盐水或 6 μ g/g 体重肌肉生长抑制素拮抗剂 300。让小鼠愈合 5,7,14,21,28,35 和 46 天,之后挑选小鼠并加工肌肉用于组织学。

[0220] 在 OCT 中覆盖组织学肌肉样品并在在液氮中冷却的异戊烷中冷冻。在低温恒温器中以 10 μ m 厚度切出切片并用 H&E 和 Van Gieson 染色。每天分析不同处理后再生标志物诸如中央形成的核(CFN)的总数和具有 CNF 的纤维的数目并将数值绘图。

[0221] 结果

[0222] 成熟骨骼肌纤维具有位于纤维外周的核。然而,在骨骼肌再生过程中,成肌细胞迁移至损伤部分并与原有的纤维融合或者彼此(to each)融合以形成初生肌纤维。在此过程中,这些细胞的核位于纤维的中央。因此,我们使用中央形成的核(CFN)的数目和具有 CNF 的纤维的数目作为肌肉再生的标志物。肌肉中存在的损伤在试验的第一个时间点太普遍了,因而对处理组或对照组都没有检测到阳性再生标志物(图 22 和图 23)。然而,到第 21 天,处理组的 CFN 数目显著高于对照组的,指示被处理的动物肌肉再生增加。此差异维持到损伤后的第 46 天。有趣地,自第 28 天起,处理组和对照组之间损伤肌肉面积百分比没有差异(数据未显示)。这指出 300 处理组中再生的增加(如 CNF 数目增加所显示的)导致烧伤后肌肉再生的改善。此外,在视觉上(visually),在处理组中自第 21 天起能看到处理组和对照组之间肌肉纤维完整性的差异。还有, van Gieson 染色揭示了损伤后第 21 天对照组中与处理组相比更高度度的纤维化(图 30),意味着损伤面积较早的重塑,及因此较早的生肌前体流入,导致自第 28 天起看到的处理组和对照组之间增加的 CFN。减少的纤维化本身也归因于受伤组织的修复过程中发生的肌肉生长抑制素拮抗剂对纤维化程度的影响。

[0223] 实施例 9:体外癌症恶病质试验

[0224] 方法

[0225] 将 C2C12 细胞在分化培养基(DMEM+2% HS)中分化 72 小时。此分化期后,再用重组肌肉生长抑制素(6 μ g/mL)或者用肌肉生长抑制素和 300 重组蛋白质(30,60,90 或 120 μ g/mL)的组合测试肌管 24 小时,以确定 300 是否能在体外挽救肌肉生长抑制素介导的肌肉消耗。分析肌肉生长抑制素介导的恶病质中至关重要的中间体信号传导分子的基因表达变化。因此,自细胞分离蛋白质并实施 Western 印迹分析来测量 p-FoxO1 的蛋白质表达水平,我们已经显示了 p-FoxO1 是肌肉生长抑制素介导的恶病质中至关重要的信号传导中间体(McFarlane 等 2006)。

[0226] 结果

[0227] p-FoxO1 是肌肉生长抑制素介导的恶病质中至关重要的中间体信号传导分子。在实验中,将 p-FoxO1 表达水平相对于 FoxO1 的总水平标准化。如图 24 所示,用 6 μ g/mL 重组肌肉生长抑制素蛋白质进行的处理导致 24 小时处理后 p-FoxO1 表达下调。此结果与我们先前发表的数据一致,该数据描述了肌肉生长抑制素介导的恶病质后面的机制 (McFarlane 等, 2006)。用 90 μ g/mL 300 得到了 p-FoxO1 表达的最大挽救 (图 24)。这显示了应用肌肉生长抑制素拮抗剂 300 能降低对一部分恶病质性消耗性疾患至关重要的 FoxO1 信号的量级。

[0228] 实施例 10 :体内癌症恶病质试验

[0229] 方法

[0230] 设计了一项慢性恶病质研究,其中给 4 周龄 C57B 小鼠注射 1mg/kg 体重浓度的糖皮质激素药物地塞米松。设计了三个处理组:5 只小鼠每天接受盐水注射,5 只小鼠每天接受地塞米松注射,而 5 只小鼠每天接受地塞米松加 6 μ g/g 体重浓度的 300 拮抗剂注射。每天记录小鼠的体重并密切监测恶病质的征候。记录食物和水消耗以确保体重损失不是由于食欲丧失或口渴。评估体重、脂肪垫重量、及 MyoD 和 Pax7 表达。

[0231] 结果

[0232] 体重

[0233] 每天注射地塞米松导致与注射盐水的对照相比平均体重的降低 (图 25)。地塞米松和拮抗剂 300 的共处理导致与对照相比较小的平均体重损失 (图 25),指示拮抗剂能阻止小鼠中恶病质相关肌肉损失及因而体重损失。这也指示肌肉生长抑制素拮抗剂诸如 300 的用途在降低对人类患者使用地塞米松的消极效应中有应用。

[0234] 脂肪垫重量

[0235] 患有 Cushing 氏综合征 (糖皮质激素过生成) 的患者的临床特征之一是增加的脂肪沉积,因此在试验完成后分析脂肪垫重量。

[0236] 地塞米松处理导致与盐水处理小鼠相比腹膜后 (左, 62.9%; 右, 60.4%) 脂肪垫重量的增加,在左和右腹膜后和腹股沟脂肪垫中都观察到统计学显著的增加 ($p < 0.05$) (图 26)。300 处理后也观察到腹膜后 (左, 23.3%; 右, 39.2%) 和腹股沟 (左, 33.2%; 右, 39%) 脂肪垫重量的增加,只是程度比仅用地塞米松处理后观察到的低。因此,用 300 进行的处理在一部分上挽救了地塞米松介导的脂肪垫重量增加,指示我们的拮抗剂不仅在治疗恶病质中是有用,而且还可用于降低脂肪沉积会是有利的情况,诸如在肥胖症的治疗中。

[0237] MyoD 和 Pax7 表达

[0238] 自来自所有小鼠的右腓肠肌肌肉分离蛋白质并对 MyoD 和 Pax7 实施 Western 印迹。地塞米松处理后 MyoD ($p < 0.05$) (图 27) 和 Pax7 ($p < 0.05$) (图 28) 表达有显著下调。另外,我们观察到用地塞米松和肌肉生长抑制素拮抗剂 300 处理的小鼠中 MyoD ($p < 0.05$) 和 Pax7 ($p < 0.01$) 都有显著上调 (挽救)。因此,用 300 拮抗剂进行的处理似乎在地塞米松诱导的恶病质过程中调节 MyoD 和 Pax7 表达。公认 MyoD 和 Pax7 的上调是肌肉再生的标志物。

[0239] 在年幼的野生型和肌肉生长抑制素缺失小鼠的肌肉再生过程中,已经显示了 MyoD 在肌肉生长抑制素缺失肌肉中与野生型肌肉相比更早且以更高水平表达 (McCroskery,

2005)。由于 MyoD 表达可作为标志物用于肌肉再生过程中迁移成肌细胞的极早期检测 (Grounds, 1992), 将 MyoD 的这种早期表达解读为生肌细胞朝向损伤部分迁移 (McCroskery, 2005)。

[0240] 由于 Pax7 是卫星细胞自我更新的标志物 (Oustanina, 2004 ;Zammit, 2004), 较高水平的 Pax7 表明 300 增强此自我更新过程。这与较早的一项发现一致, 该发现表明肌肉生长抑制素抑制卫星细胞自我更新 (McCroskery, 2005)。

[0241] 综上所述, 源自施用 300 的较高的 Pax7 和 MyoD 水平支持如下观察结果, 即 300 处理在这种肌肉消耗的模型中提升肌肉再生, 这是通过提高活化的卫星细胞的水平及后续肌发生和卫星细胞自我更新的水平来实现的。

[0242] 实施例 11 : 体内老年骨骼肌减少症试验

[0243] 方法

[0244] 10 个月的一段时期每两周或每月给野生型小鼠 (32 只小鼠, 大约 4-5 月龄) 皮下注射 300 (6 μ g/g 体重) 或盐水。在试验结束时使用握力装置 (MK-380S, Muromachi ;Tokyo, Japan) 评估肌肉力量。以牛顿记录小鼠在被通过尾部向后扯时发挥出来的最大力。计算每只小鼠的三次抓握测试的平均值并确定每个组的平均最大力。

[0245] 结果

[0246] 使用握力作为肌肉功能的指标 (Wagner 等 2002)。实施 10 个月动物试验来评估肌肉生长抑制素拮抗剂在小鼠中在年幼至年老的行进过程中在改善肌肉功能方面的效果。如图 19 所示, 在试验结束时每月用 300 处理的小鼠相对于盐水对照的握力的显著增加指示用 300 处理的小鼠中的功能改善 (**p < 0.01)。我们已经显示了每月 (图 19) 以及每两周 (数据未显示) 拮抗剂应用这两种应用方案在增加肌肉功能方面是同等有效的, 所述增加肌肉功能最有可能是由于增加的卫星细胞活化及随后肌发生。

[0247] 在使用拮抗剂来增加年老的小鼠中的肌肉力量的有益效应之外, 注意到在此试验过程中, 在年幼的小鼠 (4-5 月龄) 中, 处理一个月后的初始应答显示出肌肉力量的显著增加。这显示了拮抗剂在增加具有正常水平卫星细胞活化和其它肌肉功能决定因素的肌肉的肌肉功能方面是有效的。结果指示在医学处理所致创伤之前或在预计会导致肌肉力量减少的疾患诸如强迫性不活动 (enforced inactivity) 或其它疾患发作之前用肌肉生长抑制素拮抗剂进行处理。

[0248] 讨论

[0249] 肌肉生长抑制素是肌肉生长的负调节物, 因为缺乏肌肉生长抑制素导致肌肉生长, 而高水平的肌肉生长抑制素诱导肌肉消耗。有记录表明肌肉生长抑制素部分通过控制成肌细胞的增殖速率来发挥其生物学功能 (Thomas 等, 2000)。肌肉生长抑制素似乎是细胞周期行进的有力调节物, 而且已经显示了增加的肌肉生长抑制素水平阻断成肌细胞进入 S 期, 由此抑制成肌细胞增殖 (Thomas 等, 2000)。已经显示了肌肉生长抑制素结合激活素 IIB 型受体并经 Smad2/3 途径发信号。已经显示了 TGF β 成员 (包括肌肉生长抑制素) 包含对于决定三维结构至关重要且对于受体结合必需的保守半胱氨酸残基 (Lee 和 McPherron, 2001)。

[0250] 抑制肌肉生长抑制素活性自身可以表现为多种方式, 诸如体重增加 (McPherron 等, 1997)、肥大和增生所致肌肉量增强 (McPherron, . 1997 和 Zhu 等, 2000)、体脂肪含量

降低 (McPherron 等 2002)、肌肉力量增加 (W02006/083183) 和骨质量 (quality) 增加 (Hamrick, 等 2002)。

[0251] 在此研究中,对数种重组分子测试了它们拮抗肌肉生长抑制素功能的能力。如果想让拮抗剂具有功能,预期保守的半胱氨酸残基在决定蛋白质的三维结构、从而赋予生物学活性方面是至关重要的。考虑到氨基酸位置 300,310,320 和 329 处的 C 端截短都导致必需半胱氨酸残基的缺失,导致三维结构的破坏,300,310,320 和 329 在体外和在体内都能够有效中和肌肉生长抑制素活性是非常出人意料的。如此,这些结果是前所未有的,而且出人意料地指示这些拮抗剂不仅是新颖的化合物,而且它们的精确三维蛋白质结构和它们的作用机制是不可预测的。由于在第 281,282,283,284,285,286,287,288,289,290,291,292,293,294,295,296,297,298,299,300,301,302,303,304,305,306,307,308,309,310,311,312,313,314,315,316,317,318,319,320,321,322,323,324,325,326,327,328 或 329 位 C 端截短的肽都包含足够数目的半胱氨酸来赋予如上文实施例所证明的活性,预期所有这些肽会是有功能的。这些半胱氨酸残基在赋予功能中的作用得到了以下观察结果的支持:多删除一个半胱氨酸残基且因此只包含一个半胱氨酸残基的 280 似乎是没有活性的(实施例 1)。

[0252] 这些结果清楚地显示了新颖的肌肉生长抑制素拮抗剂尽管缺失关键的半胱氨酸残基及相关预测结构构象,仍能够拮抗肌肉生长抑制素。本文所述体内和体外试验已经显示了此效应以在如下疾患中提供好处:其中效应或病理学是由于经由增加的肌肉生长抑制素水平的信号传导的疾患,包括多种与增加的肌肉生长抑制素水平有关的消耗性疾患和创伤,如下文所述,其中拮抗肌肉生长抑制素的能力有可能直接赋予有益结果;和其中拮抗肌肉生长抑制素的能力导致生理学过程诸如成肌细胞增殖、卫星细胞活化和自我更新、成肌细胞和巨噬细胞迁移及其它增强,且其中增强这些效应赋予肌肉生长抑制素水平没有增加到超过健康组织中所存在的组织以好处的疾患。

[0253] 本发明在许多疾病和病症的治疗或预防中是有用的,所述疾病和病症的特征至少部分在于哺乳动物中肌肉或脂肪组织的异常量、发育或代谢活性,而且可以包括与肌肉肥大有关的病症;与炎性肌病、肌肉营养不良、运动神经元疾病、神经肌肉接头疾病、外周神经疾病、内分泌异常所致肌病、代谢综合征、HIV、癌症、老年骨骼肌减少症、恶病质和其它消耗性疾患有关的肌肉萎缩和肌肉消耗;心力衰竭(或心肌衰竭);骨质疏松(症);肾衰竭或肾病;肝衰竭或肝病;食欲缺乏;肥胖症;糖尿病;和伤口愈合。例如,已经显示了可以在小鼠中通过系统施用肌肉生长抑制素来诱导恶病质(Zimmers 等,2002)。已经显示了肌肉生长抑制素水平在具有烧伤损伤的动物中(Charles H.Lang, Christine Silvis, Gerald Nystrom 和 Robert A.Frost Regulation of myostatin by glucocorticoids after thermal injury, FASEB 151807-1809 2001)和在 HIV 患者中(Gonzalez-Cadavid 等,1998)升高,而且发现血浆肌肉生长抑制素免疫反应性蛋白质在长时间卧床休息后增加(Zachwieja 等 1999)。我们已经证明了施用肌肉生长抑制素拮抗剂导致挽救肌肉生长抑制素介导的恶病质信号传导分子(实施例 9)和在恶病质小鼠模型中减轻体重损失和增强肌肉再生(实施例 10)。如此指示我们的拮抗剂对于治疗患有源自烧伤损伤、长时间卧床休息、HIV 或癌症的恶病质的个体是有用的。

[0254] 诸如其中增加的肌肉生长抑制素水平被认为是诱导有害效应的关键信号的这些

的疾患的治疗显然会得到使用拮抗剂诸如本文所述拮抗肌肉生长抑制素信号的能力的帮助。应当理解,有许多病理学疾患,其中肌肉生长抑制素在信号传导和诱导病理学中的作用存在但尚未发现。

[0255] 已经显示了本发明肌肉生长抑制素拮抗剂的使用赋予数种疾患以好处,在所述疾患中不清楚是否存在增加的肌肉生长抑制素水平或者它们负责肌肉或其它组织功能的下降。清楚的是抑制肌肉生长抑制素能在野生型成肌细胞(实施例1)、年幼的野生型卫星细胞(实施例2)和年幼的5月龄小鼠(实施例11)中增加成肌细胞增殖方面赋予好处,其中没有异常肌肉生长抑制素水平的迹象。还提供了数据来显示本发明肌肉生长抑制素拮抗剂在两种有害疾患,即老年骨骼肌减少症和肌肉营养不良中的好处,其中有益效应有可能主要是由于增强的成肌细胞增殖、卫星细胞活化和自我更新、成肌细胞和巨噬细胞的迁移的普遍效应,这些是直接由于本发明拮抗剂的效应所致。

[0256] 老年骨骼肌减少症或年龄相关恶病质的特征在于肌肉再生水平不足和肌肉力量降低,这些是由于卫星细胞活性和肌发生降低所致(Conboy等,2005;Bockhold等,1998)。

[0257] 已经证明了使用本发明的拮抗剂,通过两种主要机制来增加肌肉再生,即通过增加成肌细胞增殖(实施例1)和通过增加卫星细胞活化(实施例2)。肌肉再生的增加与肌肉力量的增加有关,如使用短期(实施例4)和长期(实施例11)施用本发明拮抗剂所示。本文所示结果还提供了本发明的拮抗剂可用于在许多疾患中改善肌肉量和力量的证据,诸如肌肉营养不良(实施例5);肌肉损伤(实施例8);老年骨骼肌减少症(实施例11);和癌症恶病质(实施例9和14)。

[0258] 由于其它疾患的作用机制相似,预测拮抗剂在治疗患有源自烧伤损伤、长时间卧床休息、HIV或癌症和老年骨骼肌减少症的恶病质的个体中会是有用的。进一步地,在年幼的野生型肌肉中增加卫星细胞活化和肌肉力量(实施例2和11)也指示拮抗剂对于治疗手术前患者以预防手术后强迫性卧床休息所致肌肉损伤会是有用的。

[0259] 在营养不良性疾患中,存在肌肉变性和后续再生的反复循环所致持续的卫星细胞活化。这些结果证明了本发明的拮抗剂能够在肌肉营养不良小鼠模型中增加肌肉再生、卫星细胞活化和肌肉力量(实施例5)。因为这种小鼠模型是人营养不良的标准模型,预测本发明的肌肉生长抑制素拮抗剂能够成功治疗患有营养不良的个体。

[0260] 上文两个例子显示了拮抗剂对年幼的和年老的小鼠的握力(实施例4)和在肌肉营养不良小鼠中减轻症状(实施例5)中的治疗效应,其中有益效应是由于我们的拮抗剂在降低肌肉生长抑制素水平至低于正常野生型中的效应所引起的增强的成肌细胞增殖、卫星细胞活化和自我更新、成肌细胞和巨噬细胞的迁移所致。在这些例子之外,预期使用本发明肌肉生长抑制素拮抗剂的治疗会在任何医学疾患的治疗中赋予有益效应,其中肌肉功能会通过增强的成肌细胞增殖、卫星细胞活化和自我更新、成肌细胞和巨噬细胞的迁移的效应得到改善。此类疾患包括手术后的肌肉损失、生长迟缓、生理学身材矮小症、慢性病所致肌肉损失、加速烧伤患者的恢复或其中改善肌肉功能会是有益的其它病症。

[0261] 骨骼肌对胰岛素刺激的葡萄糖摄取的抗性是II型糖尿病的最早已知表现(Corregan等1991)。已经显示了缺乏肌肉生长抑制素部分削弱两种小鼠模型(即刺豚鼠致死黄色(agouti lethal yellow)(Yen等1994)和肥胖)的肥胖和糖尿病表型。另外,已经显示了将肌肉生长抑制素突变引入刺豚鼠致死黄色小鼠抑制脂肪积累达5倍(McPherron

等,2002)。这与本发明显示本发明拮抗剂能够降低脂肪沉积的结果(实施例 4 和 11)一起指示患有糖尿病、肥胖症、和高血糖疾患的效应的个体能够用治疗有效剂量的一种或多种本发明肌肉生长抑制素拮抗剂来成功治疗。

[0262] 本发明的结果还显示了本发明肌肉生长抑制素拮抗剂在伤口愈合中是有用的。每个伤口经历三个不同的伤口愈合阶段。第一,用于脱离恶化的组织和用于清洁伤口的炎症阶段;第二,用于肉芽组织发育的增殖阶段;和第三,用于成熟(maturation)和瘢痕形成的分化或再生阶段(Sedlarik 1994)。炎症阶段的特征在于炎症细胞诸如巨噬细胞浸润至损伤部位。本发明结果证明了使用本发明拮抗剂提高巨噬细胞的迁移能力(实施例 3)。这与皮肤中减少的伤口大小(实施例 6)、皮肤中减少的胶原沉积(实施例 7)和如增加的生肌标志物所指示的增加的肌肉再生(实施例 8)一起表明本发明拮抗剂在伤口愈合的治疗中会是有用的。结果显示了在各种组织的伤口中预期有有益效应,其中增加的巨噬细胞和成肌细胞迁移、加速的肌肉组织再生和减少的纤维化是有用的结果。

[0263] 还预期本发明肌肉生长抑制素拮抗剂在损伤心肌的治疗中会是有用的。心肌梗死后,肌肉生长抑制素水平在心肌细胞中上调(Sharma 等,1999),指示抑制肌肉生长抑制素可改善梗死后心脏肌肉的恢复。

[0264] 另外,肌肉生长抑制素缺失小鼠具有增加的骨矿物质含量和密度以及增加的肌肉量(Hamrick 等,2002)。因此预期降低肌肉生长抑制素水平会改善骨力量和降低骨质疏松(症)和其它变性骨疾病。

[0265] 横纹肌肉瘤(RMS),儿童最常见的实体瘤之一,表达高水平的肌肉生长抑制素。已经证明了抑制肌肉生长抑制素容许 RMS 前行进入生肌终末分化(Ricaud 等,2003),因此我们的拮抗剂对于癌症治疗会是有用的。

[0266] 如上文所讨论的,预期本发明的拮抗剂对于人类治疗会是有用的。考虑到肌肉生长抑制素序列在物种间是高度同源的,事实上人和牛序列是同样的(图 31),而且已经证明了我们的拮抗剂在体外增加绵羊、鼠和人细胞的增殖,因此本发明拮抗剂对于治疗其它物种也是有用的。本发明的结果还清楚地证明了本发明的肌肉生长抑制素拮抗剂能增加成肌细胞增殖(实施例 1)。

[0267] 参考文献

[0268] 以下参考文献,就它们提供对本文所列做出补充的例示性的、规程上的或其它详情而言,通过提及将其明确收入本文。本说明书全文中提到的专利说明书也通过提及将其明确收入本文。

[0269] Allen, RE, Temm-Grove, CJ, Sheehan, SM, and Rice, G. (1997). Skeletal muscle satellite cell cultures. *Methods Cel Biol* 52,155-76.

[0270] Bernkop-Schnurch A and Walker G(2001)Multifunctional matrices for oral peptide delivery. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 18(5):459-501

[0271] Berry C, Thomas M, Langley B, Sharma, M and Kambadur R(2000). Single cysteine to tyrosine transition inactivates the growth inhibitory function in Piedmontese myostatin. *Am J Physiol Cel Physiol* 283, C135-C141.

[0272] Bischoff, R. (1994). *Myology*, vol. 1 (eds AG. Engel and C. Franzini-Armstrong), pp. 97-118 :McGraw-Hill Professional

- [0273] Bockhold, K. J., Rosenblatt, J. D. and Partridge, T. A. (1998). Aging normal and dystrophic mouse muscle: analysis of myogenicity in cultures of living single fibers. *Muscle Nerve* 21, 173-83
- [0274] Bogdanovich S, Krag TO, Barton ER, Morris LD, Whittemore LA, Ahima RS, Khurana TS. (2002) Functional improvement of dystrophic muscle by myostatin blockade. *Nature* 420:418-21
- [0275] Bradley, P., Misura, K. M. S. and Baker, D. (2005) Toward High-Resolution de Novo Structure Prediction for Small Proteins. *Science* 309, 1868-1871
- [0276] Carlson, C.J., Booth, F.W. and Gordon, S.E. (1999). Skeletal muscle myostatin mRNA expression is fibre-type specific and increases during hind-limb unloading. *Am J Physiol* 277, R601-6
- [0277] Colditz, I.G. and Movat HZ (1984). Kinetics of neutrophil accumulation in acute inflammatory lesions induced by chemotaxis and chemotaxisogens. *J Immunol* 133, 2167-73.
- [0278] Conboy, I. M., Conboy, M. J., Wagers, A. J., Girma, E. R., Weissman, I. L. and Rando, T. A. (2005). Rejuvenation of aged progenitor cells by exposure to a young systemic environment. *Nature* 433, 760-4;
- [0279] Corrigan AZ, Bilezikjian LM, Carroll RS, Bald LN, Schmelzer CH, Fendly BM, Mason AJ, Chin WW, Schwall RH, and Vale W (1991) Evidence for an autocrine role of activin B within rat anterior pituitary cultures. *Endocrin* 128:1682-1684
- [0280] Evan GI, Lewis GK, Ramsey G and Bishop JM (1985). Isolation of monoclonal antibodies specific for human c-myc proto-oncogene product. *Mol Cell Biol* 5, 3610-16.
- [0281] Field J, Nikawa D, Broek B, MacDonald B, Rodgers L, Wilson IA, Lerner RA and Wigler M (1988). Purification of a RAS-responsive adenylyl cyclase complex from *Saccharomyces cerevisiae* by use of an epitope addition method. *Mol Cell Biol* 8, 2159-65.
- [0282] Giridharan NV (1998). Animal models of obesity and their usefulness in molecular approach to obesity. *Indian J Med Res* 108, 225-42.
- [0283] Gonzalez-Cadavid NF, Taylor WE, Yarasheski K, Sinha-Hikim I, Ma K, Ezzat S, Shen R, Lalani R, Asa S, Mamita M, Nair G, Arver S, Bhasin S. (1998) Organization of the human myostatin gene and expression in healthy men and HIV-infected men with muscle wasting. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:14938-43.
- [0284] Gribskov, M., and Burgess, R. R.. (1986). Sigma factors from *E. coli*, *B. subtilis*, phage SP01, and phage T4 are homologous proteins. " , *Nucleic Acids Research* 14, 6745-6763.
- [0285] Grobet L, Martin LJ, Poncelet D, et al. (1997) A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscling phenotype in cattle. *Nat Genet* 17:71-74.

- [0286] Hamrick MW, McPherron AC, Lovejoy CO. (2002) Bone mineral content and density in the humerus of adult myostatin-deficient mice. *Calcif Tissue Int* 71(1):63-8.
- [0287] Hamrick MW (2003) Increased bone mineral density in the femora of GDF8 knockout mice. *Anat Rec* 272A(1):388-91.
- [0288] Hill JJ, Davies MV, Pearson AA, et al. (2002) The myostatin propeptide and the follistatin-related gene are inhibitory binding proteins of myostatin in normal serum. *J Biol Chem* 277:40735-40741.
- [0289] Hill JJ, Qiu Y, Hewick RM. (2003) Regulation of myostatin in vivo by growth and differentiation factor-associated serum protein-1: a novel protein with protease inhibitor and follistatin domains. *Mol Endocrinol* 17:1144-1154.
- [0290] Hopp, P., Prickett, KS, Price, VL, Libby, RT, Ceretti, DP, March, CJ, Urdal, DL. and Conlon, P. J. 1988. A short polypeptide marker sequence useful for recombinant protein identification and purification. *Bio/Technology* 8:1204-1210.
- [0291] Jeanplong F, Sharma M, Somers WG, Bass JJ and Kambadur R (2001) Genomic organization and neonatal expression of the bovine myostatin gene. *Mol Cell Biochem* 220:31-37.
- [0292] Jones, GE. (2000). Cellular signaling in macrophage migration and chemotaxis. *J Leukoc Biol* 68,593-602.
- [0293] Kambadur R., Sharma M., Smith T. and Bass J. J. (1997) Mutations in myostatin (GDF-8) in double muscled Belgian Blue and Piedmontese Cattle. *Genome Res* 7:910-916.
- [0294] Kirk S, Oldham J, Kambadur R, Sharma M, Dobbie P, and Bass J. (2000). myostatin regulation during skeletal muscle regeneration. *J Cell Physiol* 184(3), 356-63.
- [0295] Langley B, Thomas M, McFarlane C, Gilmour S, Sharma M, Kambadur R. (2004) Myostatin inhibits rhabdomyosarcoma cell proliferation through an Rb-independent pathway. *Oncogene* 23:524-34.
- [0296] Lee SJ, McPherron AC. (2001) Regulation of myostatin activity and muscle growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:9306-9311.
- [0297] Like AA, Rossini AA (1976). Streptozotocin-induced pancreatic insulinitis: new model of diabetes mellitus. *Science* 193,415-7.
- [0298] Lutz-Freyermuth C, Query CC and Keene JD (1990). Quantitative Determination that One of Two Potential RNA-Binding Domains of the A Protein Component of the U1 Small Nuclear Ribonucleoprotein Complex Binds with High Affinity to Stem-Loop II of U1 RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 87,6393-97.
- [0299] Ma K, Mallidis C, Bhasin S, Mahabadi V, Artaza J, Gonzalez-Cadavid N, Arias J, Salehian B. (2003) Glucocorticoid-induced skeletal muscle atrophy is associated

with upregulation of myostatin gene expression. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285 :E363-E371.

[0300] Martin GA, Yatani R, Clark R, Conroy L, Polakis P, Brown AM and McCormick F (1992). GAP domains responsible for ras p21-dependent inhibition of muscarinic atrial K⁺ channel currents. *Science* 255, 192-4.

[0301] McCroskery S, Thomas M, Maxwell L, Sharma M, and Kambadur R. (2003). Myostatin negatively regulates satellite cell activation and self-renewal. *J Cell Biol* 162.

[0302] McPherron AC, Lawler AM, Lee SJ. (1997a) Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- β superfamily member. *Nature* 387 :83-90.

[0303] McPherron AC, Lee SJ. (1997b) Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 94 :12457-12461.

[0304] McPherron AC, Lee SJ (2002) Suppression of body fat accumulation in myostatin-deficient mice. *J Clin Invest* 109 :595-601.

[0305] Needleman SB and Wunsch CD (1970). A General method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. *J Mol Biol* 48(3), 443-53.

[0306] Nicholas G, Thomas M, Langley B, et al. (2002) Titin-cap associates with, and regulates secretion of, myostatin. *J Cell Physiol* 193 :120-131.

[0307] Paborsky LR, Fendly BM, Fisher KL, Lawn RM, Marks BJ, McCray G, Tate, KM, Vehar GA and Gorman CM (1990). Mammalian cell transient expression of tissue factor for the production of antigen. *Protein Engineering* 3(6), 547-53.

[0308] Partridge TA. (1997). Tissue culture of skeletal muscle. *Methods Mol Biol* 75, 131-44.

[0309] Pearson WR and Lipman DJ (1988). Improved tools for biological sequence comparison. *Proc Natl Acad Sci USA* 85(8), 2444-8.

[0310] Rebbapragada A, Benchabane H, Wrana JL, Celeste AJ, Attisano L. (2003) myostatin signals through a transforming growth factor β -like signaling pathway to block adipogenesis. *Mol Cell Biol* 23 :7230-42.

[0311] Ricaud S, Vernus B, Duclos M, Bernardi H, Ritvos O, Carnac G, Bonnieu A. (2003) Inhibition of autocrine secretion of myostatin enhances terminal differentiation in human rhabdomyosarcoma cells. *Oncogene*. 22(51) : 8221-32

[0312] Rios R, Carneiro I, Arce VM, Devesa J. (2001) Myostatin regulates cell survival during C2C12 myogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 280 :561-566.

[0313] Rosenblatt, J. D. , Lunt, A. I. , Parry, D. J. and Partridge, T. A. (1995). Culturing satellite cells from living single muscle fiber explants. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 31, 773-9.

[0314] Sharma M, Kambadur R, Matthews KG, Somers WG, Devlin GP, Conaglen JV,

Fowke PJ, Bass JJ. (1999) Myostatin, a transforming growth factor- β superfamily member, is expressed in heart muscle and is upregulated in cardiomyocytes after infarct. *J Cell Physiol* 180 :1-9.

[0315] Schuelke M, Wagner KR, Stolz LE, Hubner C, Riebel T, Komen W, Braun T, Tobin JF, Lee SJ. (2004) Myostatin mutation associated with gross muscle hypertrophy in a child.

[0316] *N Engl J Med.* 350(26) :2682-8.

[0317] Sedlarik K. M ; The Process of Wound Healing. Wung Forum. Published on-line : hartmann_online, 1994

[0318] Skinner RH, Bradley S, Brown AL, Johnson NJ, Rhodes, S Stammers DK, and Lowe PN (1991) Use of the Glu-Glu-Phe C-terminal epitope for rapid purification of the catalytic domain of normal and mutant ras GTPase-activating proteins. *J. Biol. Chem.* 266 :14163-14166

[0319] Spiller MP, Kambadur R, Jeanplong F, Thomas M, Martyn JK, Bass JJ, Sharma M. (2002) The myostatin gene is a downstream target gene of basic helix-loop-helix transcription factor MyoD. *Mol Cell Biol* 22 :7066-82.

[0320] Tanabe Y, Esaki K, Nomura T (1986). Skeletal muscle pathology in X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) mouse. *Acta Neuropathol (Berl)* 69(1-2), 91-5.

[0321] Taylor WE, Bashin S, Artaza J, et al. (2001) Myostatin inhibits cell proliferation and protein synthesis in C2C12 muscle cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280 :E221-E228.

[0322] Thomas M, Langley B, Berry C, et al. (2000) Myostatin, a negative regulator of muscle growth, functions by inhibiting myoblast proliferation. *J Biol Chem* 275 :40235-40243.

[0323] Wang H, Zhang Q, Zhu D. (2003) hSGT interacts with the N-terminal region of myostatin. *Biochem Biophys Res Commun* 311 :877-883.

[0324] Wehling M, Cai B, and Tidball JG (2000). Modulation of myostatin expression during modified muscle use. *FASEB J* 14, 103-10.

[0325] Werle M. and Bernkop-Schnurch A. (2006) Strategies to improve plasma half life of peptide and protein drugs. *Amino Acids* 30 :351-367.

[0326] Yang L, Scott PG, Dodd C, Medina A, Jiao H, Shankowsky HA, Ghahry A and Tredget EE. (2005). Identification of fibrocytes in postburn hypertrophic scar. *Wound Repair and Regeneration* 13(4), 398-404.

[0327] Yen TT, Gill AM, Frigeri LG, Barsh GS and Wolff GL (1994) Obesity, diabetes, and neoplasia in yellow *Avy*^{-/-} mice : ectopic expression of the agouti gene, *FASEB J.* 8 :479-488.

[0328] Zachwieja JJ, Smith SR, Sinha-Hikim I, Gonzalez-Cadavid N, Bhasin S (1999) Plasma myostatin-immunoreactive protein is increased after prolonged bed rest

with low-dose T3 administration. J Gravit Physiol 6:11-5.

[0329] Zhu X, Hadhazy M, Wehling M, Tidbal JG1, McNally EM, (2000) Dominant negative myostatin produces hypertrophy without hyperplasia in muscle. FEBS Letters 474(1):71-75

[0330] Zimmers TA, Davies MV, Koniaris LG, Haynes P, Esquela AF, Tomkinson KN, McPherron AC, Wolfman NM, Lee SJ. (2002) Induction of cachexia in mice by systemically administered myostatin. Science 296:1486-s8.

[0331] 工业应用

[0332] 本发明提供了新颖的具有肌肉生长抑制素拮抗剂活性的蛋白质,其在肌肉生长抑制素相关病症的治疗中是有用的。此类病症的特征至少部分在于哺乳动物中肌肉或脂肪组织的异常量、发育或代谢活性,而且可以包括与肌肉肥大有关的病症;与炎性肌病、肌肉营养不良、运动神经元疾病、神经肌肉接头疾病、外周神经疾病、内分泌异常所致肌病、代谢综合征、HIV、癌症、老年骨骼肌减少症、恶病质和其它消耗性疾患有关的肌肉萎缩和肌肉消耗;心力衰竭(或心肌衰竭);骨质疏松(症);肾衰竭或肾病;肝衰竭或肝病;食欲缺乏;肥胖症;糖尿病;和伤口愈合。

序列表

<110> 奥里科有限公司 (Orico Ltd)

<120> 肌肉生长抑制素拮抗剂

<130>567032 CJE

<160>14

<170>PatentIn version 3.3

<210>1

<211>2823

<212>DNA

<213> 人类 (Homo sapiens)

<400>1

agattcactg gtgtggcaag ttgtctctca gactgtacat gcattaaaaat tttgcttggc	60
attactcaaa agcaaaagaa aagtaaaagg aagaacaag aacaagaaaa aagattatat	120
tgatttttaa atcatgcaaa aactgcaact ctgtgtttat atttacctgt ttatgctgat	180
tgttgctggg ccagtggatc taaatgagaa cagtgcagaa aaagaaaatg tggaaaaaga	240
ggggctgtgt aatgcatgta ctggagaca aaacactaaa tcttcaagaa tagaagccat	300
taagatacaa atcctcagta aacttcgtct ggaaacagct cctaacaatca gcaaagatgt	360
tataagacaa cttttacceca aagtcctcc actccgggaa ctgattgatc agtatgatgt	420
ccagagggat gacagcagcg atggctcttt ggaagatgac gattatcacg ctacaacgga	480
aacaatcatt accatgccta cagagtctga ttttctaata caagtggatg gaaaacccaa	540
atgttgcttc tttaaattta gctctaaaat acaatacaat aaagtagtaa aggcccaact	600
atggatatat ttgagaccgg tcgagactcc tacaacagtg tttgtgcaaa tcctgagact	660
catcaaacct atgaaagacg gtacaaggta tactggaatc cgatctctga aacttgacat	720
gaaccagggc actgggtatit ggcagagcat tgatgtgaag acagtgttgc aaaattggct	780
caaacaacct gaatccaact taggcattga aataaaagct ttagatgaga atggatcatga	840
tcttgctgta accttcccag gaccaggaga agatgggctg aatccgtttt tagagggtcaa	900
ggtaacagac acaccaaaaa gatccagaag ggattttggg cttgactgtg atgagcactc	960
aacagaatca cgatgctgtc gttacctctt aactgtggat tttgaagctt ttggatggga	1020
ttggattatc gctcctaaaa gatataaggc caattactgc tctggagagt gtgaatttgt	1080
atttttacaa aatatcctc atactcatct ggtacaccaa gcaaacccea gaggttcage	1140
aggcccttgc tgtactccca caaagatgtc tccaattaat atgctatatt ttaatggcaa	1200
agaacaaata atatatggga aaattccage gatggtagta gaccgctgtg ggtgctcatg	1260

```

agatttatat taagcgttca taacttccta aaacatggaa ggttttcccc tcaacaattt 1320
tgaagctgtg aaattaagta ccacaggcta taggcctaga gtatgctaca gtcacttaag 1380
cataagctac agtatgtaaa ctaaaagggg gaatatatgc aatggttggc atttaaccat 1440
ccaacaaat catacaagaa agttttatga tttccagagt ttttgagcta gaaggagatc 1500
aaattacatt tatgttccta tatattacaa catcggcgag gaaatgaaag cgattctcct 1560
tgagttctga tgaattaaag gagtatgctt taaagtctat ttctttaaag ttttgtttaa 1620
tatttacaga aaaatccaca tacagtattg gtaaaatgca ggattgttat ataccatcat 1680
tcgaatcatc cttaaacact tgaatttata ttgtatggta gtatacttgg taagataaaa 1740
ttccacaaaa atagggatgg tgcagcatat gcaatttcca ttcctattat aattgacaca 1800
gtacattaac aatccatgcc aacggtgcta atacgatagg ctgaatgtct gaggctacca 1860
ggtttatcac ataaaaaaca ttcagtaaaa tagtaagttt ctcttttctt caggggcatt 1920
ttcctacacc tccaaatgag gaatggattt tctttaatgt aagaagaatc atttttctag 1980
aggttggctt tcaattctgt agcatacttg gagaaactgc attatcttaa aaggcagtca 2040
aatggtgttt gtttttatca aaatgtcaaa ataacatact tggagaagta tgtaattttg 2100
tctttggaaa attacaacac tgcctttgca acactgcagt ttttatggta aaataataga 2160
aatgatcgac tctatcaata ttgtataaaa agactgaaac aatgcattta tataatatgt 2220
atacaatatt gttttgtaaa taagtgtctc cttttttatt tactttggta tatttttaca 2280
ctaaggacat ttcaaattaa gtactaaggc acaaagacat gtcatgcatc acagaaaagc 2340
aactacttat atttcagagc aaattagcag attaaatagt ggtcttaaaa ctccatatgt 2400
taatgattag atggttatat tacaatcatt ttatatTTTT ttacatgatt aacattcact 2460
tatggattca tgatggctgt ataaagtga tttgaaattt caatggttta ctgtcattgt 2520
gtttaaatct caacgttcca ttattttaat acttgcaaaa acattactaa gtataccaaa 2580
ataattgact ctattatctg aaatgaagaa taaactgatg ctatctcaac aataactgtt 2640
acttttattt tataatttga taatgaatat atttctgcat ttatttactt ctgttttgta 2700
aattgggatt ttgttaatca aatttattgt actatgacta aatgaaatta tttcttacat 2760
ctaatttgta gaaacagtat aagttatatt aaagtgtttt cacatttttt tgaaagacaa 2820
aaa 2823

```

<210>2

<211>375

<212>PRT

<213> 人类 (Homo sapiens)

<400>2

Met Gln Lys Leu Gln Leu Cys Val Tyr Ile Tyr Leu Phe Met Leu Ile

1 5 10 15

Val Ala Gly Pro Val Asp Leu Asn Glu Asn Ser Glu Gln Lys Glu Asn

20 25 30

Val	Glu	Lys	Glu	Gly	Leu	Cys	Asn	Ala	Cys	Thr	Trp	Arg	Gln	Asn	Thr
35				40				45							
Lys	Ser	Ser	Arg	Ile	Glu	Ala	Ile	Lys	Ile	Gln	Ile	Leu	Ser	Lys	Leu
50				55				60							
Arg	Leu	Glu	Thr	Ala	Pro	Asn	Ile	Ser	Lys	Asp	Val	Ile	Arg	Gln	Leu
65				70				75				80			
Leu	Pro	Lys	Ala	Pro	Pro	Leu	Arg	Glu	Leu	Ile	Asp	Gln	Tyr	Asp	Val
				85				90				95			
Gln	Arg	Asp	Asp	Ser	Ser	Asp	Gly	Ser	Leu	Glu	Asp	Asp	Asp	Tyr	His
100				105				110							
Ala	Thr	Thr	Glu	Thr	Ile	Ile	Thr	Met	Pro	Thr	Glu	Ser	Asp	Phe	Leu
115				120				125							
Met	Gln	Val	Asp	Gly	Lys	Pro	Lys	Cys	Cys	Phe	Phe	Lys	Phe	Ser	Ser
130				135				140							
Lys	Ile	Gln	Tyr	Asn	Lys	Val	Val	Lys	Ala	Gln	Leu	Trp	Ile	Tyr	Leu
145				150				155				160			
Arg	Pro	Val	Glu	Thr	Pro	Thr	Thr	Val	Phe	Val	Gln	Ile	Leu	Arg	Leu
				165				170				175			
Ile	Lys	Pro	Met	Lys	Asp	Gly	Thr	Arg	Tyr	Thr	Gly	Ile	Arg	Ser	Leu
180				185				190							
Lys	Leu	Asp	Met	Asn	Pro	Gly	Thr	Gly	Ile	Trp	Gln	Ser	Ile	Asp	Val
195				200				205							
Lys	Thr	Val	Leu	Gln	Asn	Trp	Leu	Lys	Gln	Pro	Glu	Ser	Asn	Leu	Gly
210				215				220							
Ile	Glu	Ile	Lys	Ala	Leu	Asp	Glu	Asn	Gly	His	Asp	Leu	Ala	Val	Thr
225				230				235				240			
Phe	Pro	Gly	Pro	Gly	Glu	Asp	Gly	Leu	Asn	Pro	Phe	Leu	Glu	Val	Lys
				245				250				255			
Val	Thr	Asp	Thr	Pro	Lys	Arg	Ser	Arg	Arg	Asp	Phe	Gly	Leu	Asp	Cys
260				265				270							
Asp	Glu	His	Ser	Thr	Glu	Ser	Arg	Cys	Cys	Arg	Tyr	Pro	Leu	Thr	Val
275				280				285							
Asp	Phe	Glu	Ala	Phe	Gly	Trp	Asp	Trp	Ile	Ile	Ala	Pro	Lys	Arg	Tyr
290				295				300							
Lys	Ala	Asn	Tyr	Cys	Ser	Gly	Glu	Cys	Glu	Phe	Val	Phe	Leu	Gln	Lys
305				310				315				320			
Tyr	Pro	His	Thr	His	Leu	Val	His	Gln	Ala	Asn	Pro	Arg	Gly	Ser	Ala
				325				330				335			
Gly	Pro	Cys	Cys	Thr	Pro	Thr	Lys	Met	Ser	Pro	Ile	Asn	Met	Leu	Tyr

340	345	350
Phe Asn Gly Lys Glu Gln Ile Ile Tyr Gly Lys Ile Pro Ala Met Val		
355	360	365
Val Asp Arg Cys Gly Cys Ser		
370	375	

<210>3

<211>63

<212>PRT

<213> 人类 (Homo sapiens)

<400>3

Asp Phe Gly Leu Asp Cys Asp Glu His Ser Thr Glu Ser Arg Cys Cys		
1	5	10
Arg Tyr Pro Leu Thr Val Asp Phe Glu Ala Phe Gly Trp Asp Trp Ile		
	20	25
Ile Ala Pro Lys Arg Tyr Lys Ala Asn Tyr Cys Ser Gly Glu Cys Glu		
	35	40
Phe Val Phe Leu Gln Lys Tyr Pro His Thr His Leu Val His Gln		
50	55	60

<210>4

<211>54

<212>PRT

<213> 人类 (Homo sapiens)

<400>4

Asp Phe Gly Leu Asp Cys Asp Glu His Ser Thr Glu Ser Arg Cys Cys		
1	5	10
Arg Tyr Pro Leu Thr Val Asp Phe Glu Ala Phe Gly Trp Asp Trp Ile		
	20	25
Ile Ala Pro Lys Arg Tyr Lys Ala Asn Tyr Cys Ser Gly Glu Cys Glu		
	35	40
Phe Val Phe Leu Gln Lys		
50		

<210>5

<211>44

<212>PRT

<213> 人类 (Homo sapiens)

<400>5

Asp	Phe	Gly	Leu	Asp	Cys	Asp	Glu	His	Ser	Thr	Glu	Ser	Arg	Cys	Cys
1				5					10					15	
Arg	Tyr	Pro	Leu	Thr	Val	Asp	Phe	Glu	Ala	Phe	Gly	Trp	Asp	Trp	Ile
			20					25					30		
Ile	Ala	Pro	Lys	Arg	Tyr	Lys	Ala	Asn	Tyr	Cys	Ser				
			35					40							

<210>6

<211>34

<212>PRT

<213> 人类 (Homo sapiens)

<400>6

Asp	Phe	Gly	Leu	Asp	Cys	Asp	Glu	His	Ser	Thr	Glu	Ser	Arg	Cys	Cys
1				5					10					15	
Arg	Tyr	Pro	Leu	Thr	Val	Asp	Phe	Glu	Ala	Phe	Gly	Trp	Asp	Trp	Ile
			20					25					30		
Ile	Ala														

<210>7

<211>28

<212>PRT

<213> 人类 (Homo sapiens)

<400>7

Phe	Gly	Leu	Asp	Cys	Asp	Glu	His	Ser	Thr	Glu	Ser	Arg	Cys	Cys	Arg
1				5					10					15	
Tyr	Pro	Leu	Thr	Val	Asp	Phe	Glu	Ala	Phe	Gly	Trp				
			20					25							

<210>8

<211>23

<212>PRT

<213> 人类 (Homo sapiens)

<400>8

Asp Phe Gly Leu Asp Cys Asp Glu His Ser Thr Glu Ser Arg Cys Cys
1 5 10 15
Arg Tyr Pro Leu Thr Val Asp
 20

<210>9

<211>18

<212>PRT

<213> 人类 (Homo sapiens)

<400>9

Asp Phe Gly Leu Asp Cys Asp Glu His Ser Thr Glu Ser Arg Cys Cys
1 5 10 15
Arg Tyr

<210>10

<211>16

<212>PRT

<213> 人类 (Homo sapiens)

<400>10

Asp Phe Gly Leu Asp Cys Asp Glu His Ser Thr Glu Ser Arg Cys Cys
1 5 10 15

<210>11

<211>15

<212>PRT

<213> 人类 (Homo sapiens)

<400>11

Asp Phe Gly Leu Asp Cys Asp Glu His Ser Thr Glu Ser Arg Cys
1 5 10 15

<210>12

<211>14

<212>PRT

<213> 人类 (Homo sapiens)

<400>12

Asp Phe Gly Leu Asp Cys Asp Glu His Ser Thr Glu Ser Arg

1 5 10

<210>13

<211>26

<212>PRT

<213> 合成的

<400>13

Met Gly His His His His His His His His His Ser Ser Gly His

1 5 10 15

Ile Glu Gly Arg His Met Leu Glu Asp Pro

20 25

<210>14

<211>21

<212>PRT

<213> 大肠杆菌 (E coli)pET16-B 载体

<400>14

Glu Asp Pro Ala Ala Asn Lys Ala Arg Lys Glu Ala Glu Leu Ala Ala

1 5 10 15

Ala Thr Ala Glu Gln

20

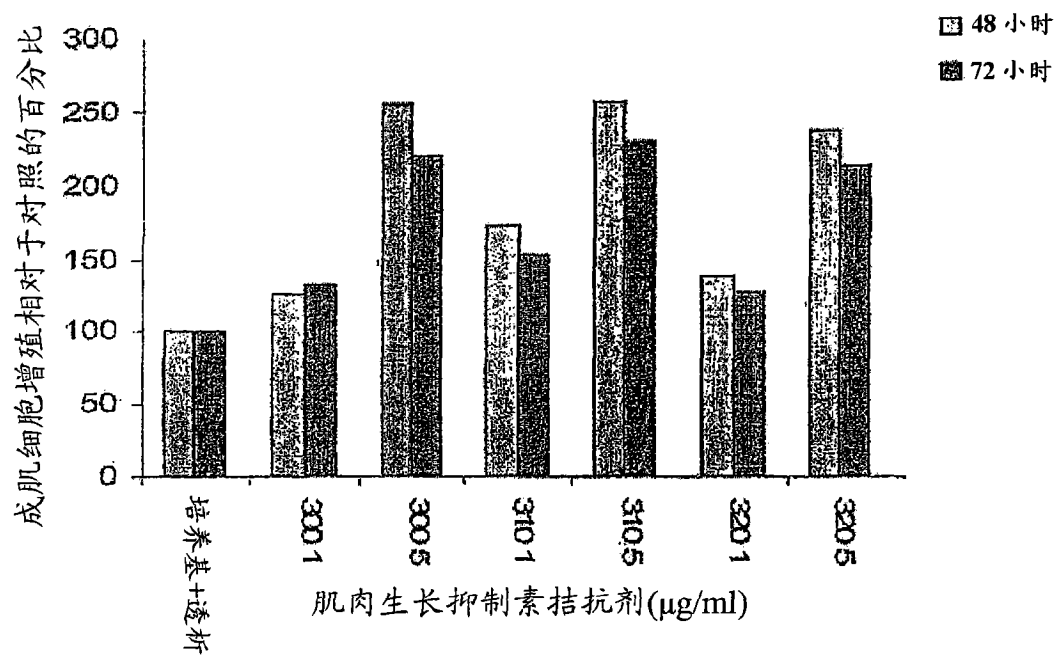


图 1

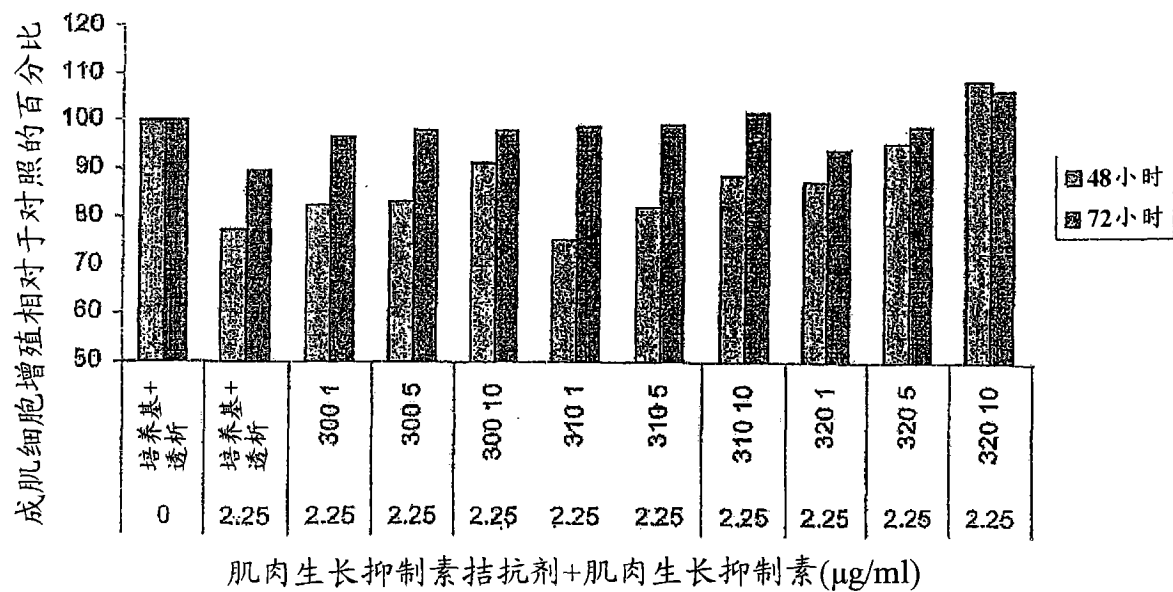


图 2

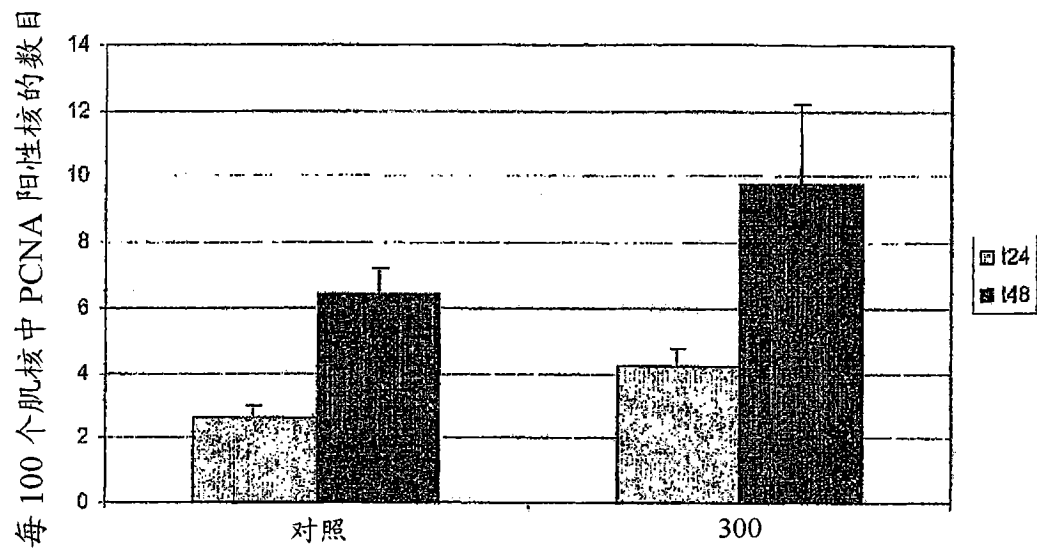


图 3

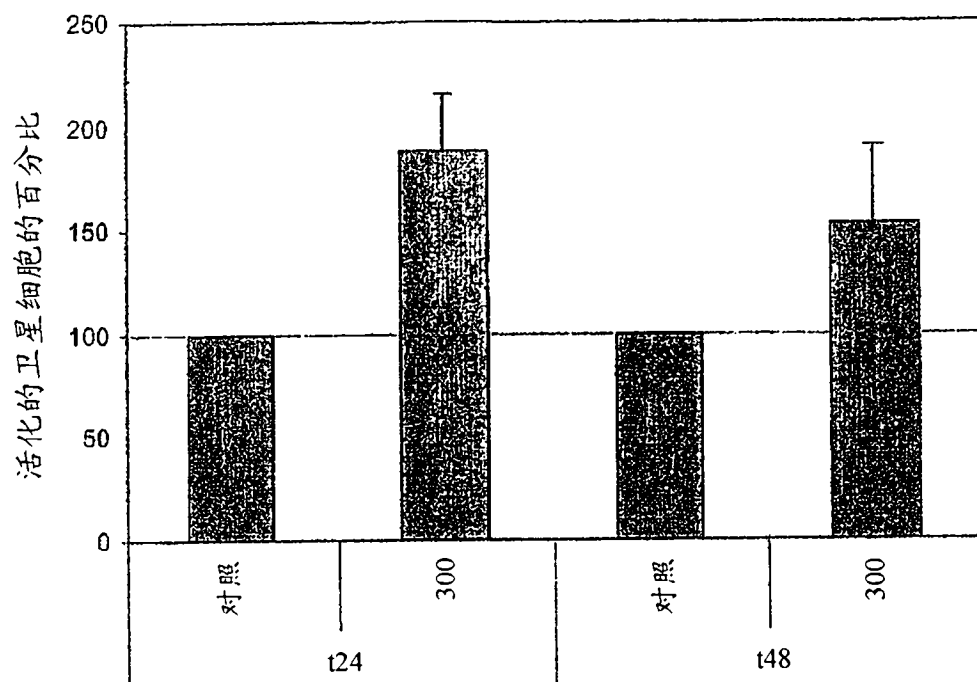


图 4

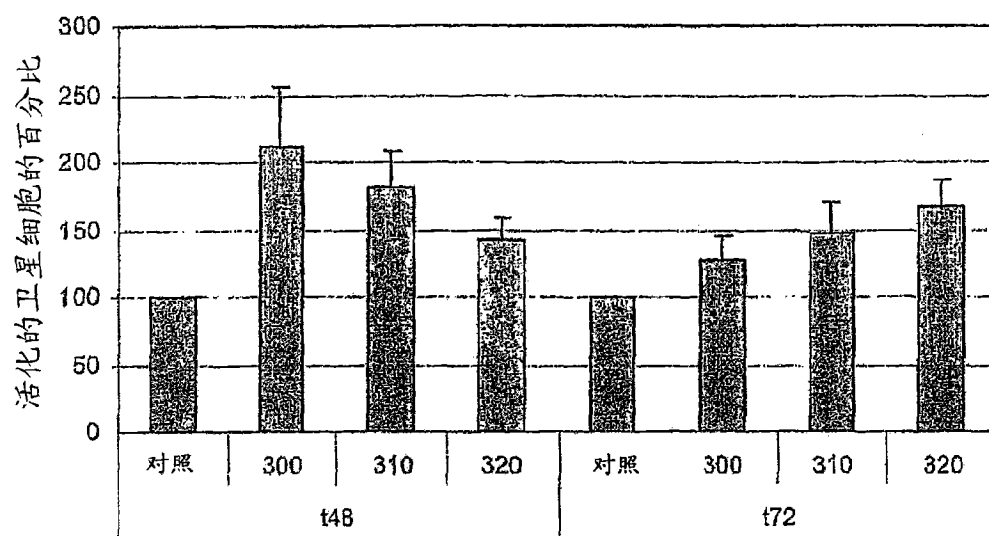


图 5

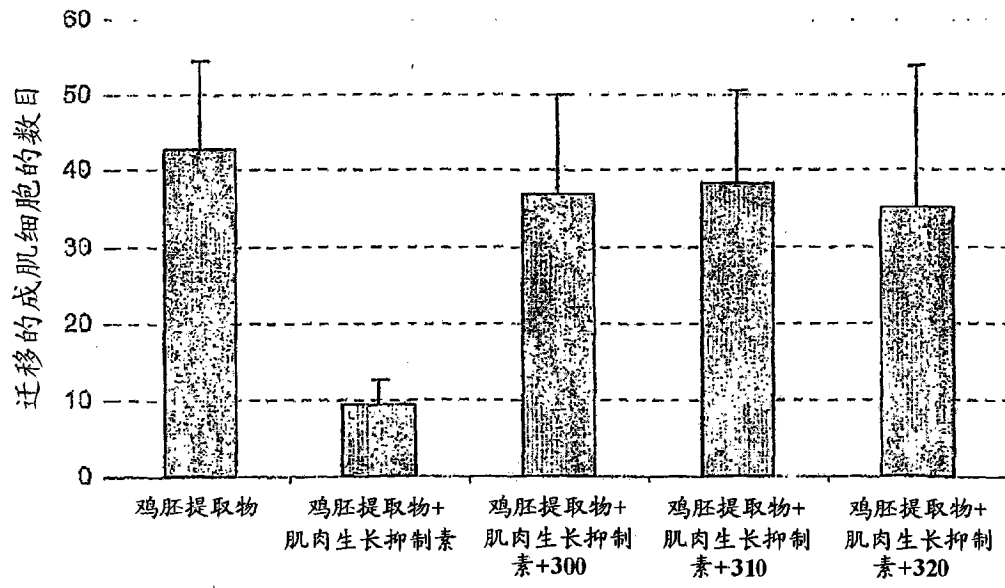


图 6

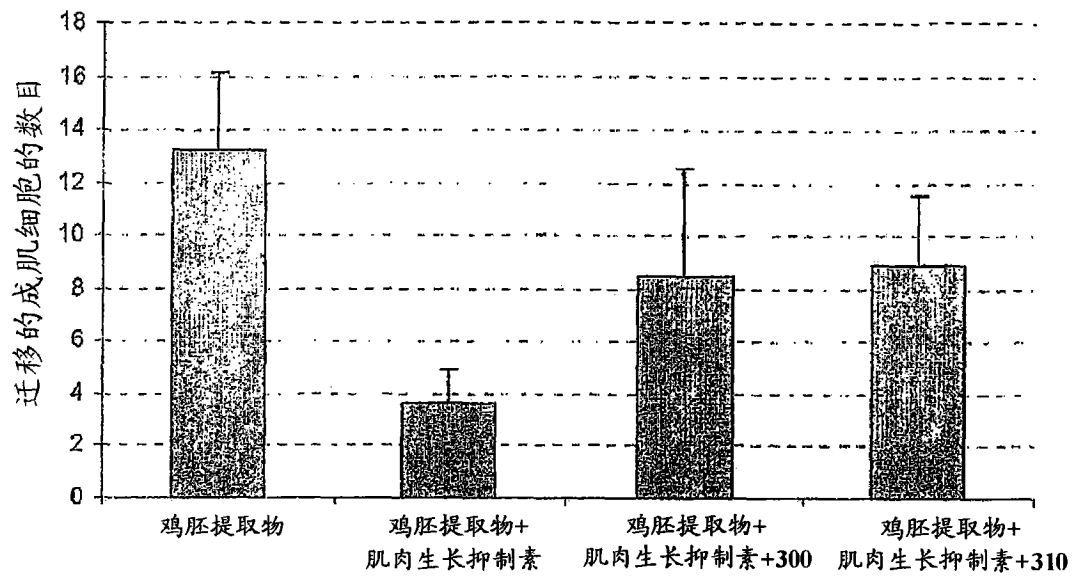


图 7

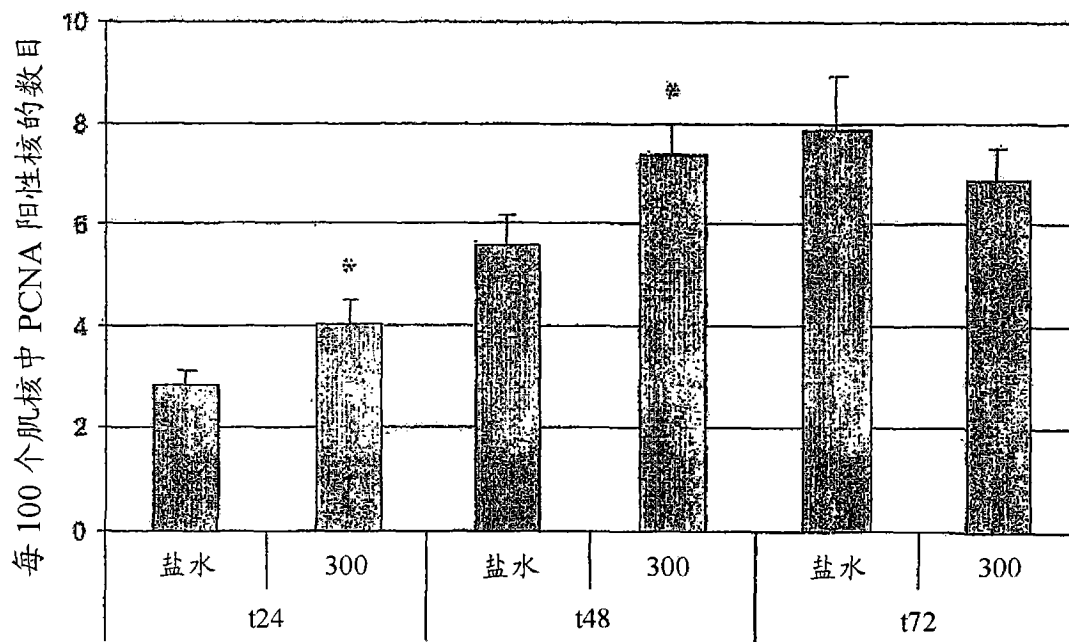


图 8

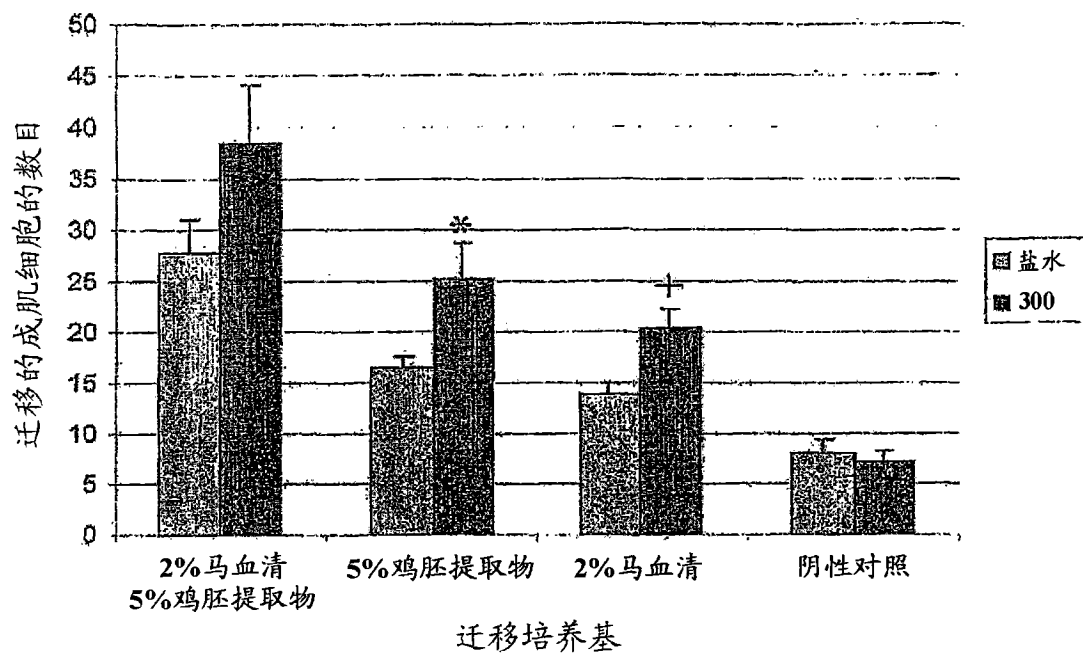


图 9

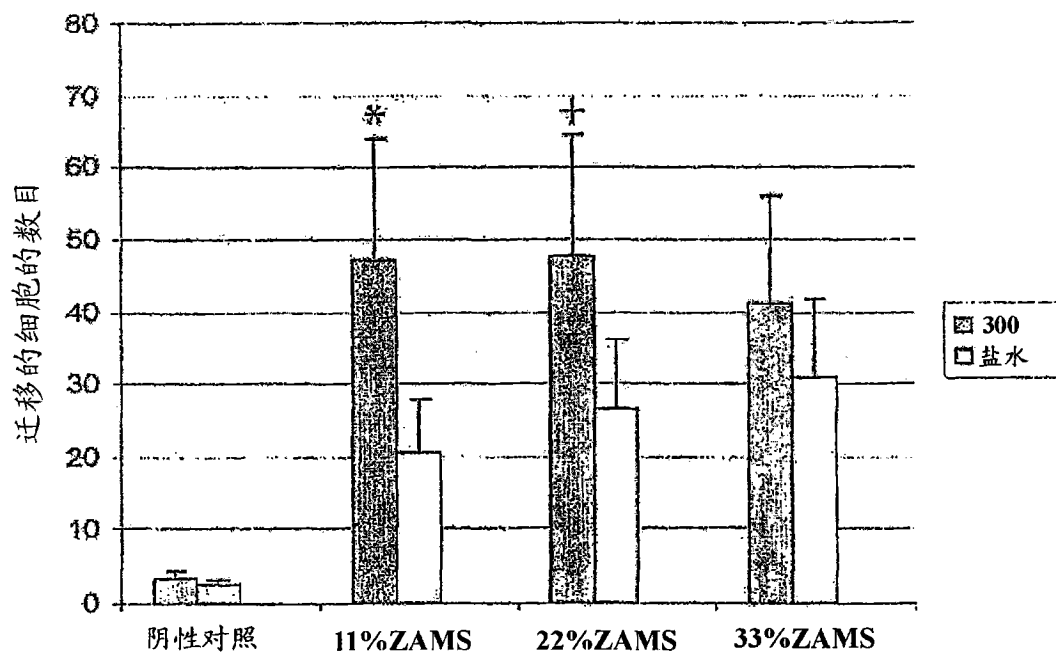


图 10

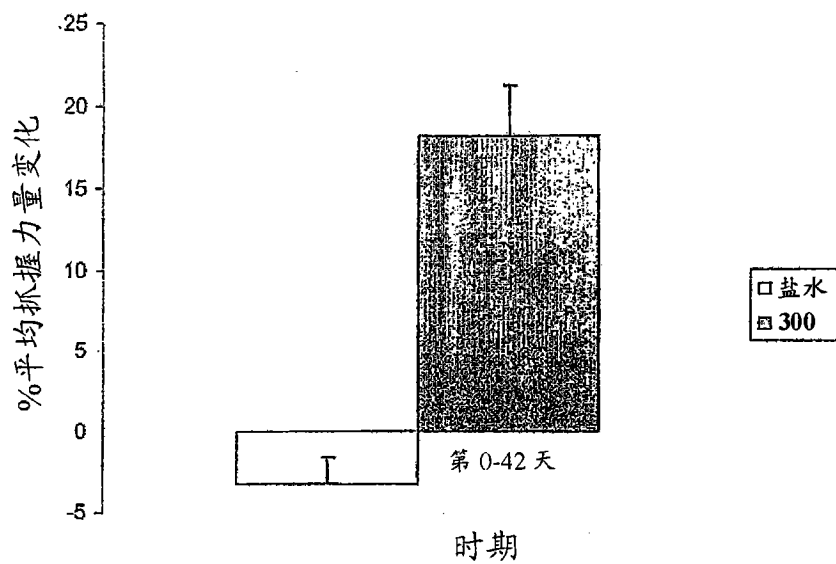


图 11

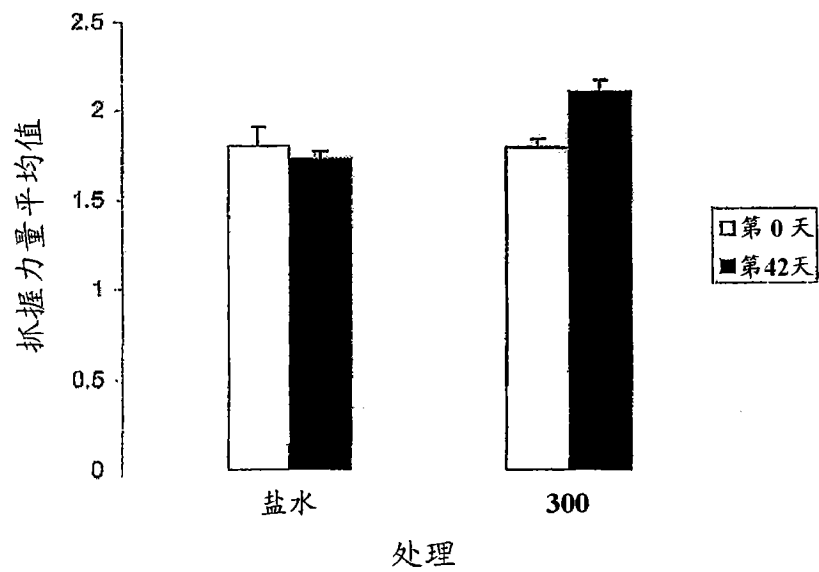


图 12

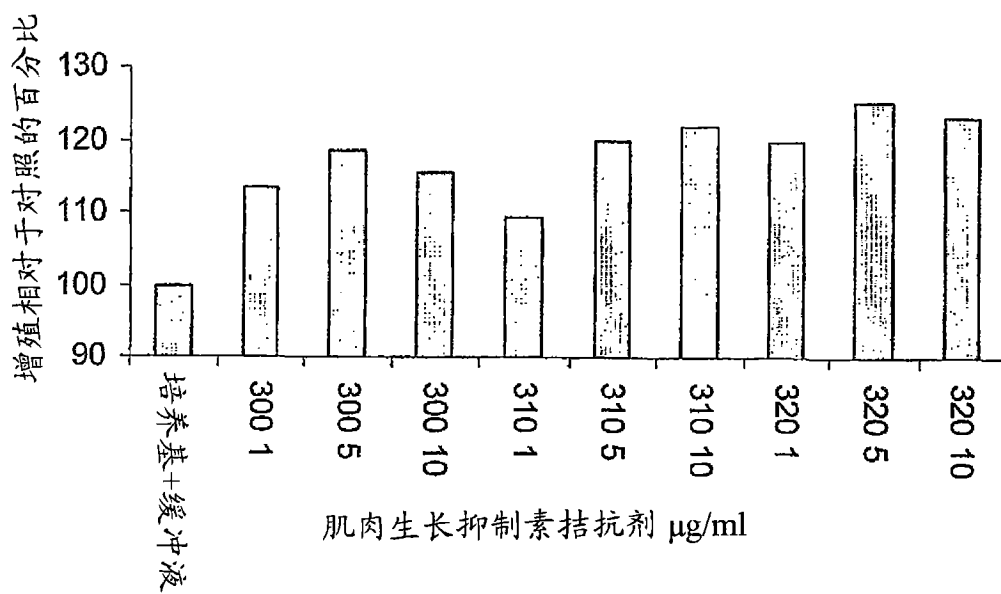


图 13

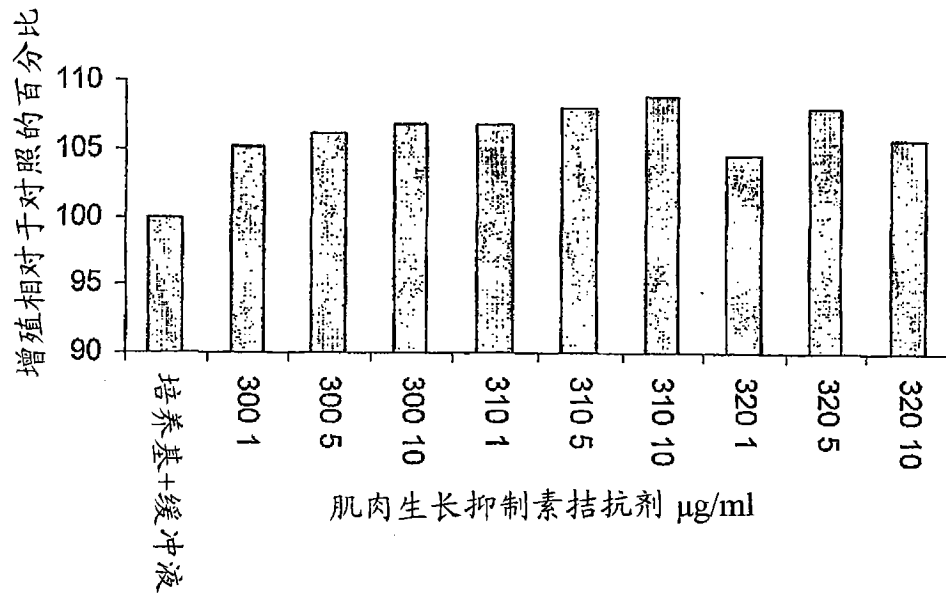


图 14

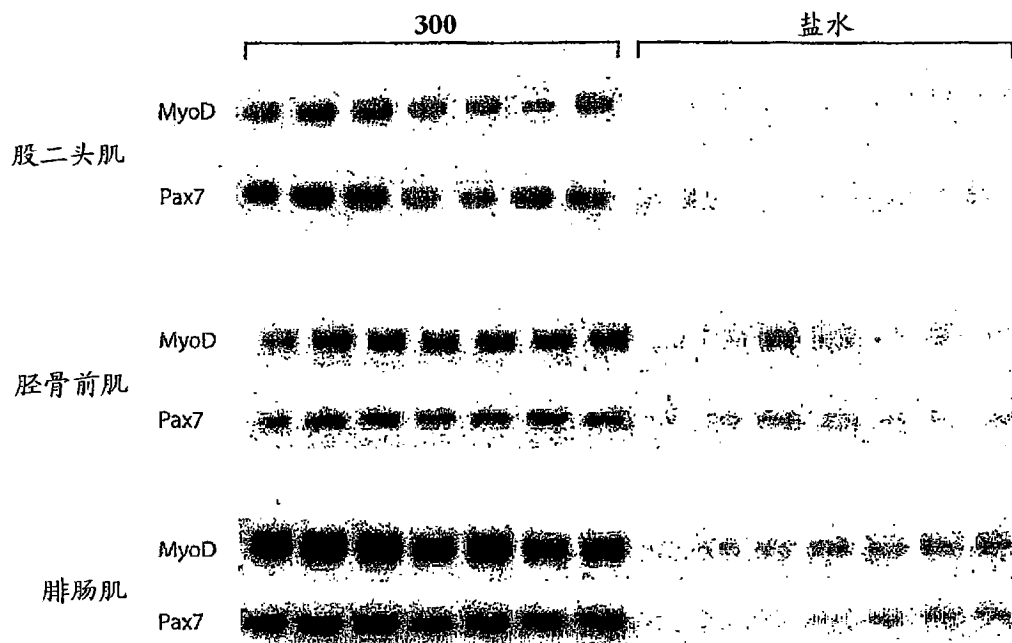


图 15

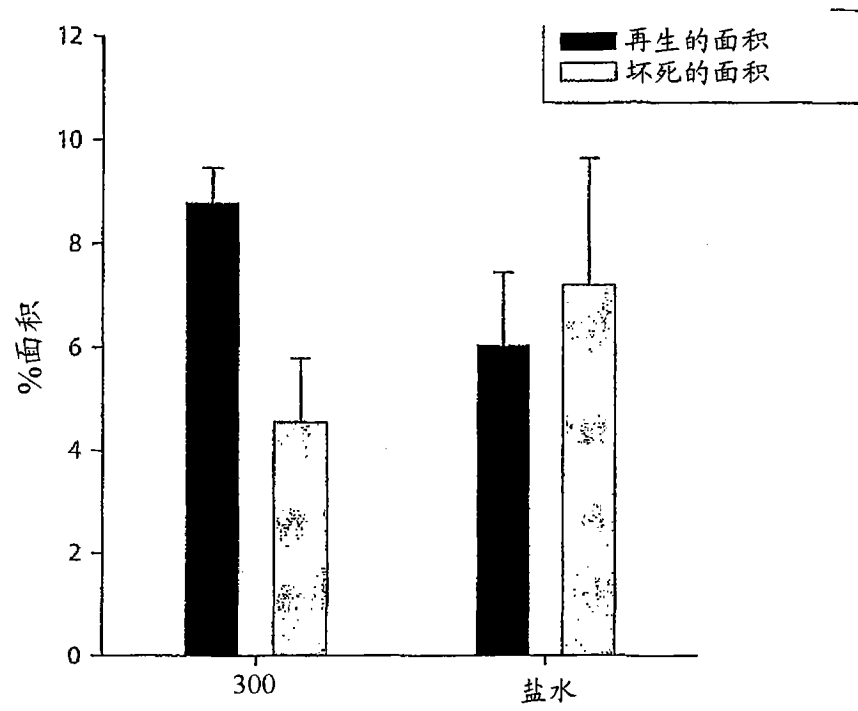


图 16

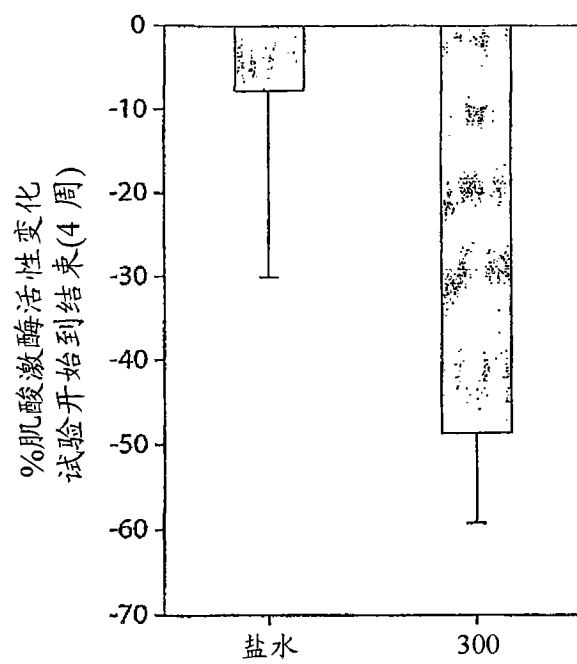


图 17

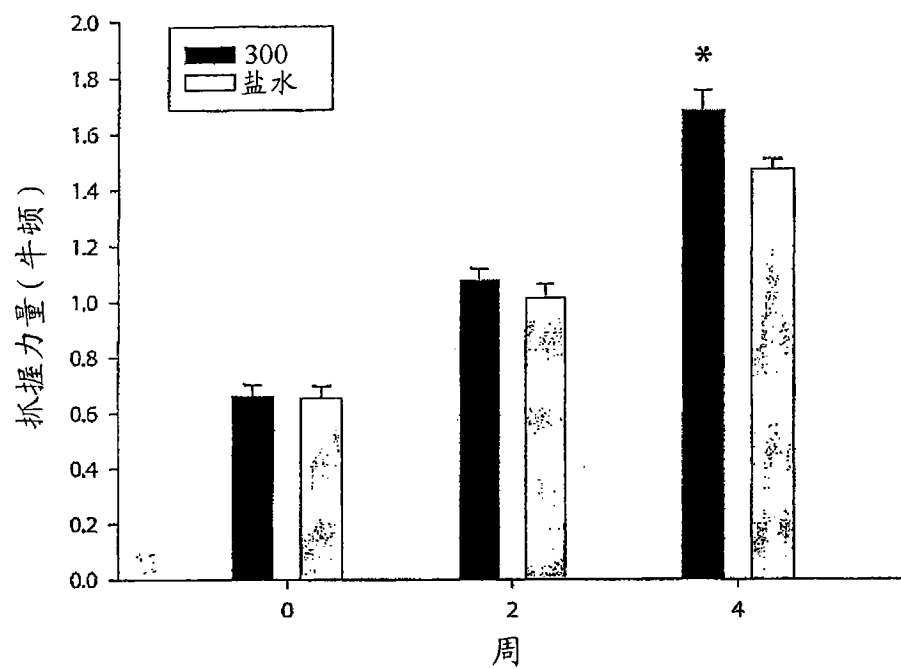


图 18

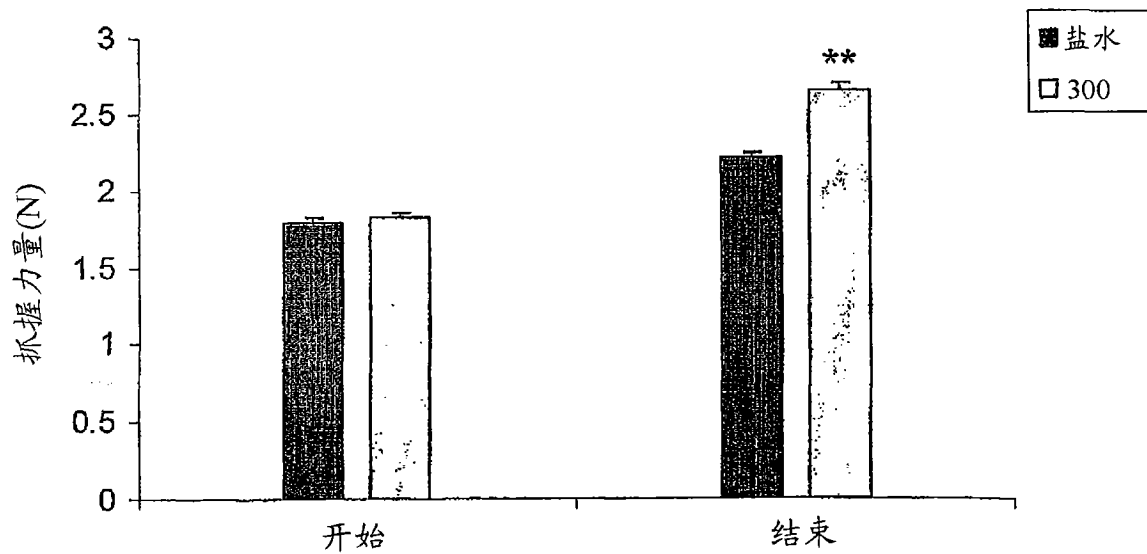


图 19

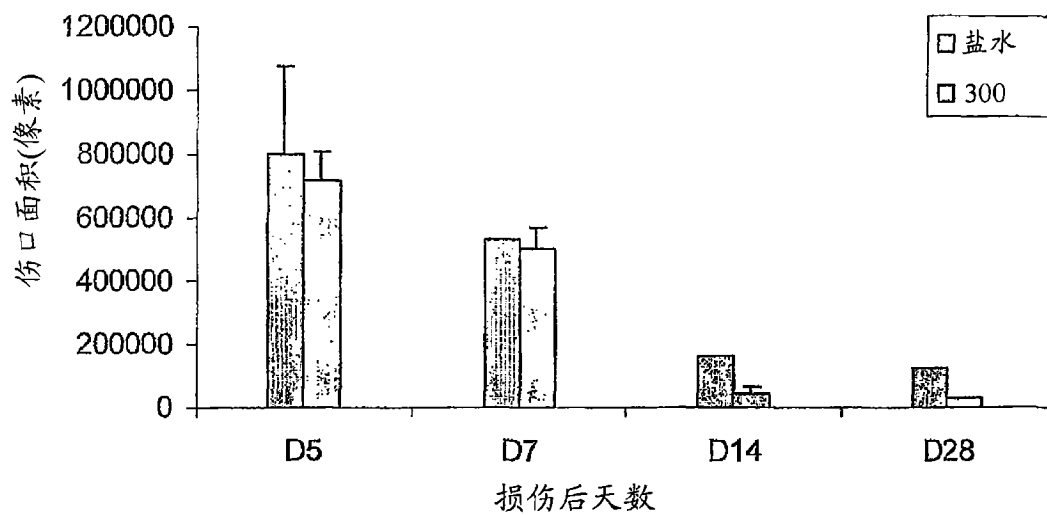


图 20

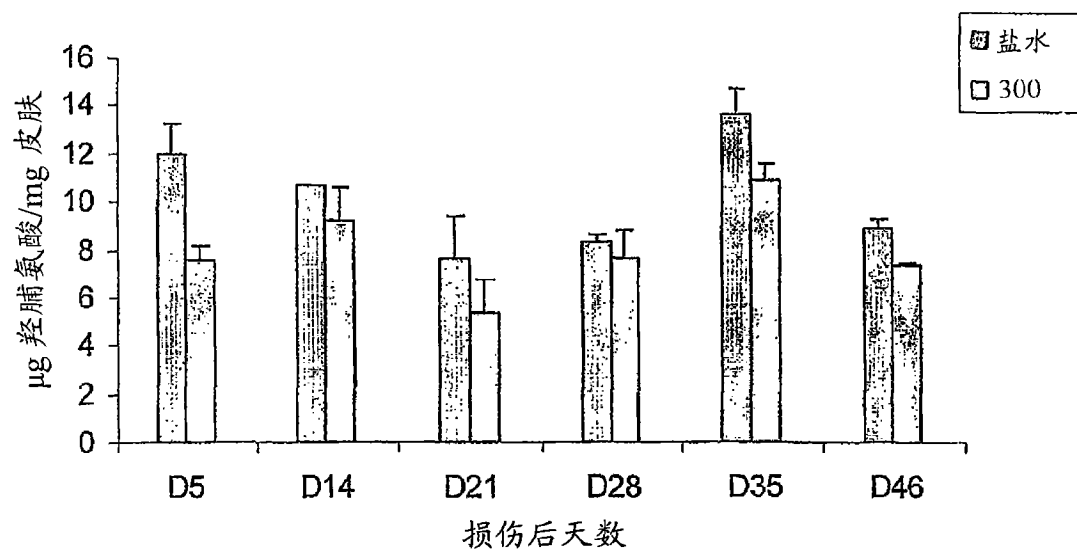


图 21

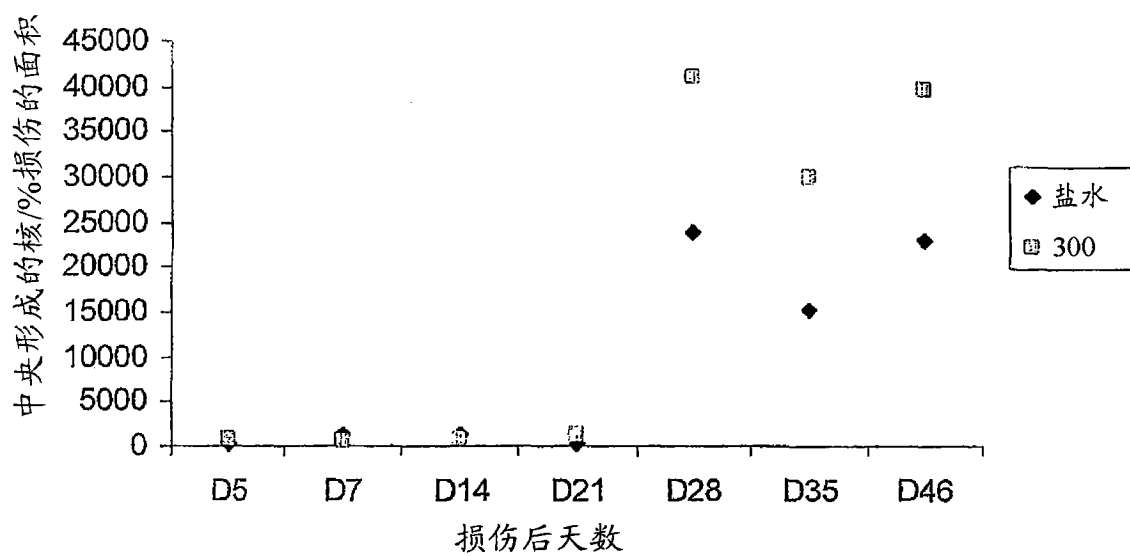


图 22

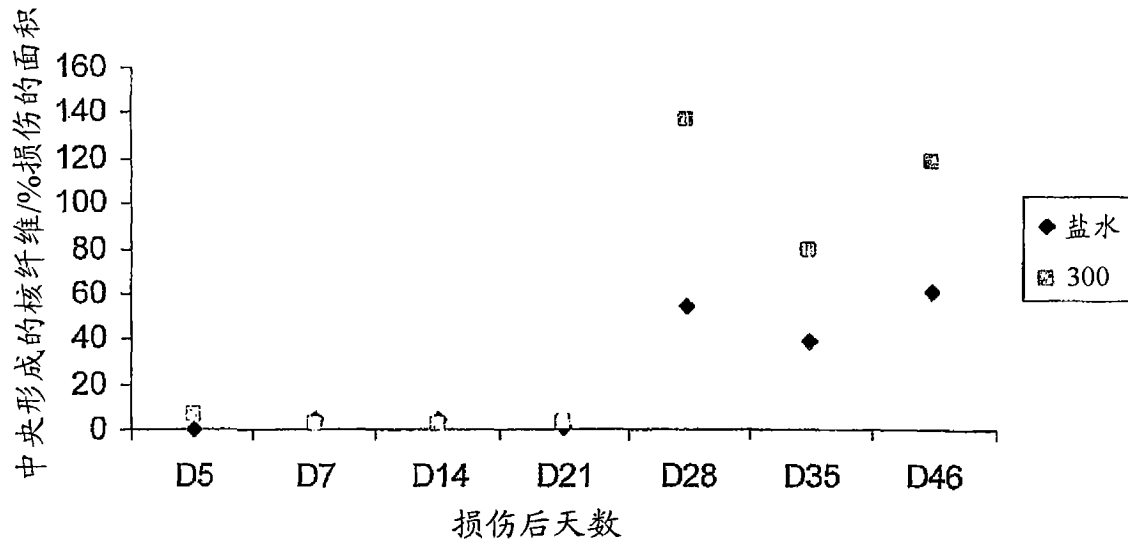


图 23

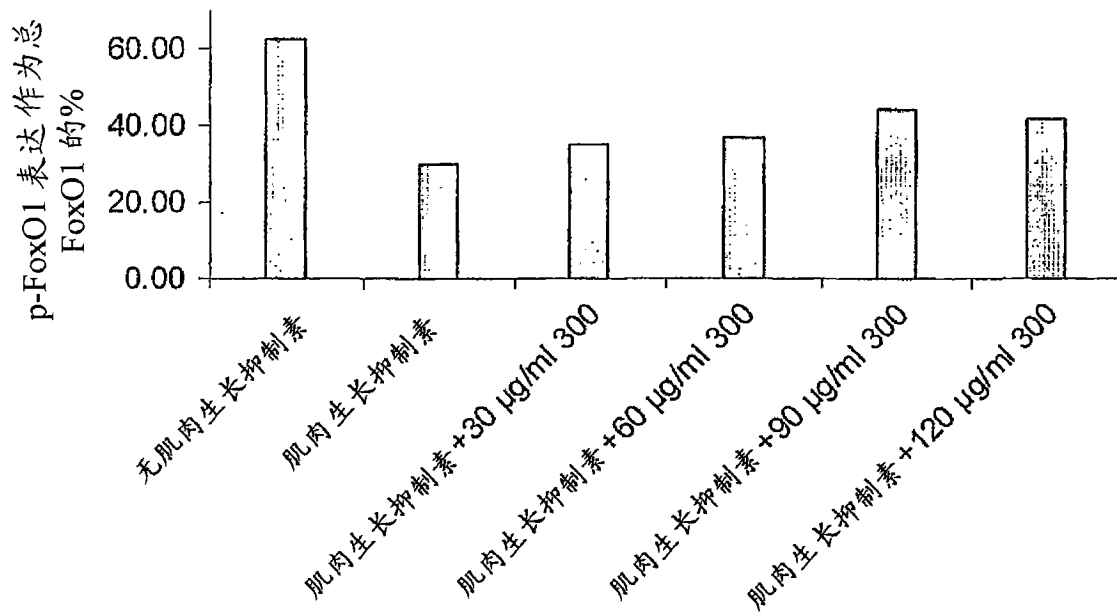


图 24

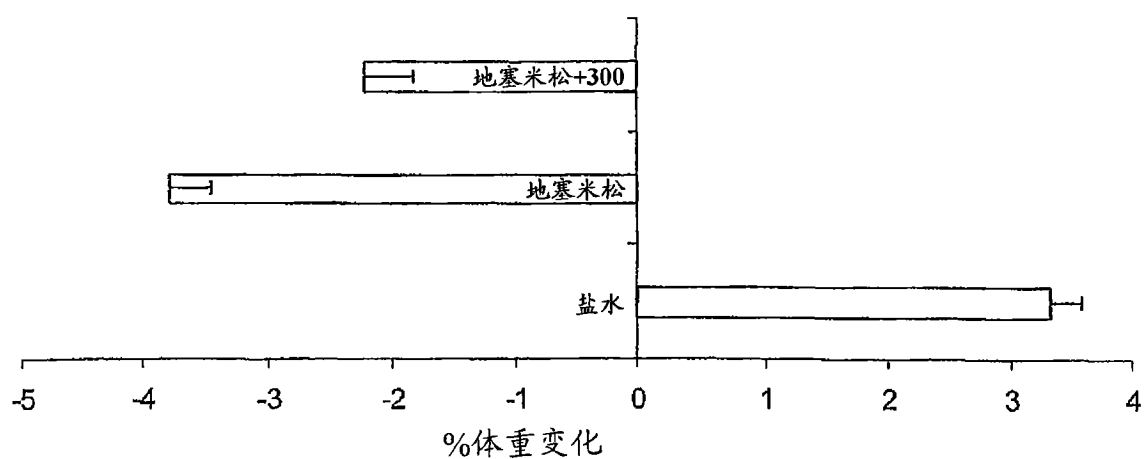


图 25

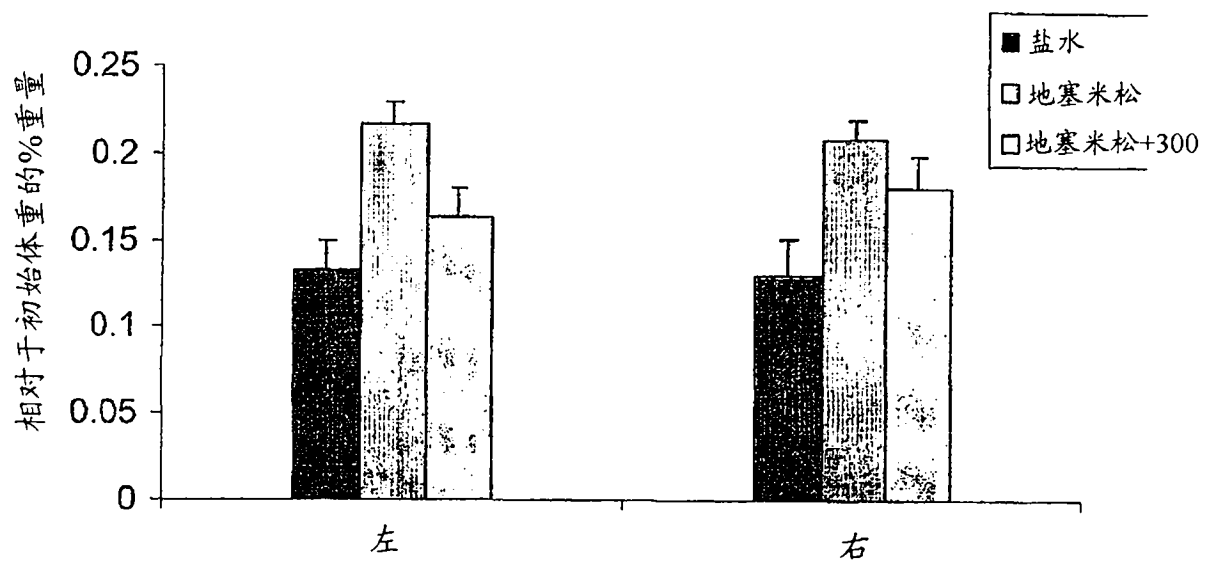


图 26

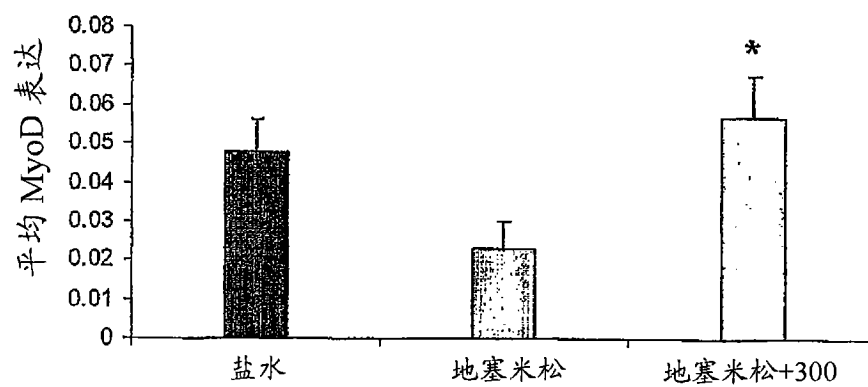


图 27

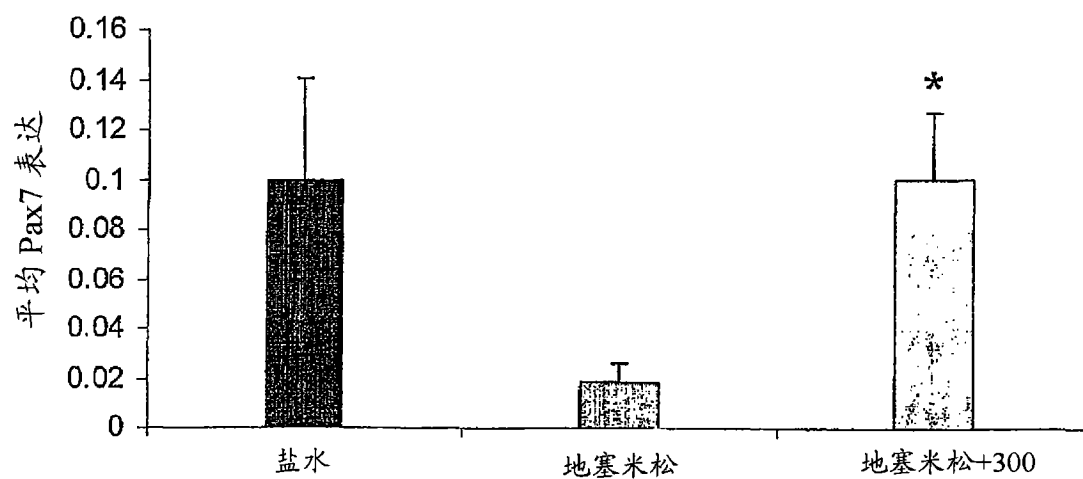


图 28

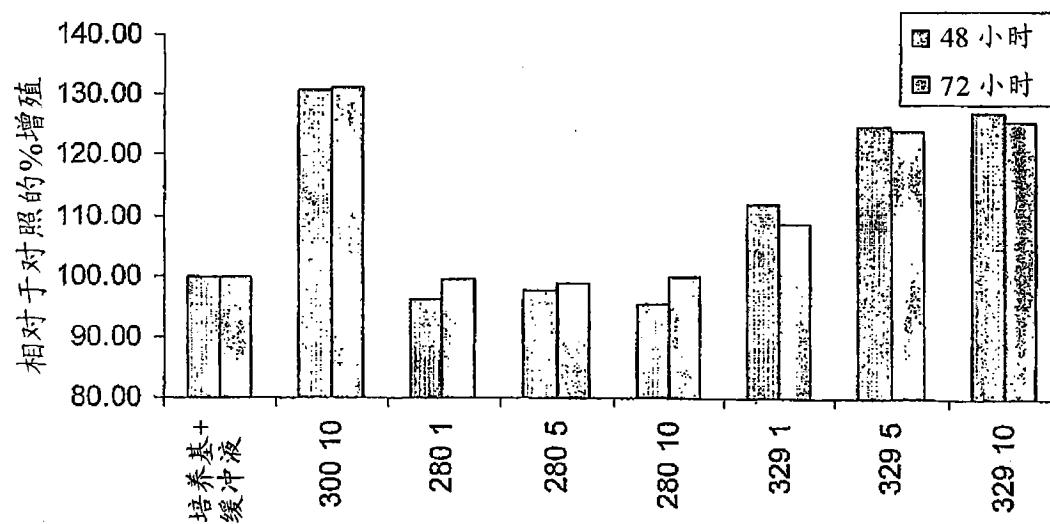


图 29

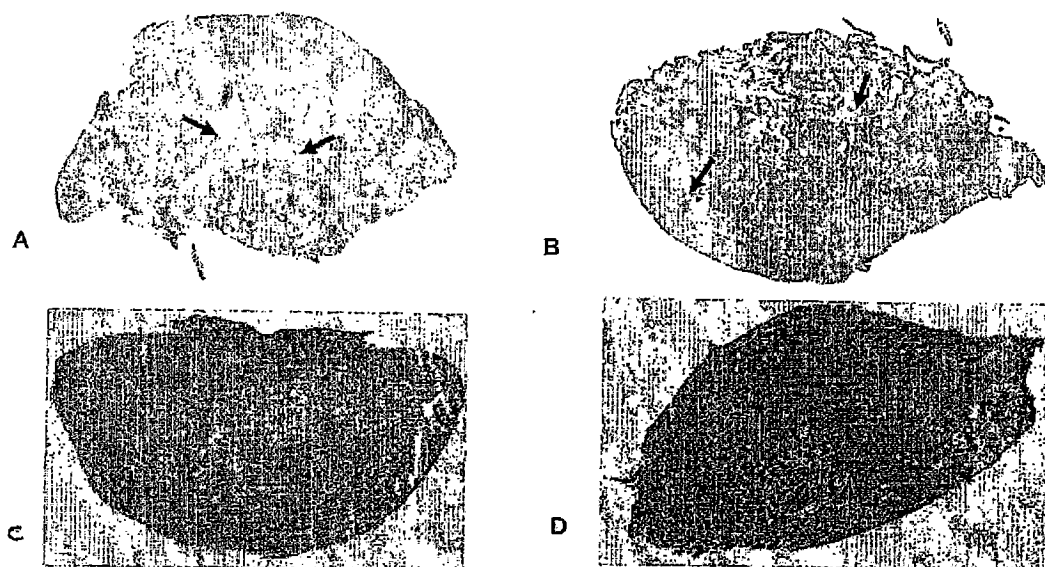


图 30

小鼠肌肉生长抑制素
人肌肉生长抑制素
鸡肌肉生长抑制素
犬肌肉生长抑制素
大鼠肌肉生长抑制素
牛肌肉生长抑制素
绵羊肌肉生长抑制素

```

[
aa268 DFGIDCDDEHSTESRCCRYPLTVDFEAFGNDWIIAPKRYKANYCSGECEFFVFLQKYPHT
aa267 DFGIDCDDEHSTESRCCRYPLTVDFEAFGNDWIIAPKRYKANYCSGECEFFVFLQKYPHT
aa267 DFGIDCDDEHSTESRCCRYPLTVDFEAFGNDWIIAPKRYKANYCSGECEFFVFLQKYPHT
aa267 DFGIDCDDEHSTESRCCRYPLTVDFEAFGNDWIIAPKRYKANYCSGECEFFVFLQKYPHT
aa268 DFGIDCDDEHSTESRCCRYPLTVDFEAFGNDWIIAPKRYKANYCSGECEFFVFLQKYPHT
aa267 DFGIDCDDEHSTESRCCRYPLTVDFEAFGNDWIIAPKRYKANYCSGECEFFVFLQKYPHT
aa267 DFGIDCDDEHSTESRCCRYPLTVDFEAFGNDWIIAPKRYKANYCSGECEFFVFLQKYPHT

```

小鼠肌肉生长抑制素
人肌肉生长抑制素
鸡肌肉生长抑制素
犬肌肉生长抑制素
大鼠肌肉生长抑制素
牛肌肉生长抑制素
绵羊肌肉生长抑制素

```

[
VHOANPRGSAGPCCCTPTKMSPINMLYFNKGKQIITYGKIIPAMVVDRCCCS aa376
VHOANPRGSAGPCCCTPTKMSPINMLYFNKGKQIITYGKIIPAMVVDRCCCS aa375
VHOANPRGSAGPCCCTPTKMSPINMLYFNKGKQIITYGKIIPAMVVDRCCCS aa375
VHOANPRGSAGPCCCTPTKMSPINMLYFNKGKQIITYGKIIPAMVVDRCCCS aa375
VHOANPRGSAGPCCCTPTKMSPINMLYFNKGKQIITYGKIIPAMVVDRCCCS aa376
VHOANPRGSAGPCCCTPTKMSPINMLYFNKGKQIITYGKIIPAMVVDRCCCS aa375
VHOANPRGSAGPCCCTPTKMSPINMLYFNKGKQIITYGKIIPAMVVDRCCCS aa375

```

保藏号:

小鼠	NP_034964
人	NP_005250
鸡	NP_001001461
犬	NP_001002959
大鼠	NP_062024
牛	NP_001001525
绵羊	O18830

图 31