



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109153708 A

(43)申请公布日 2019.01.04

(21)申请号 201780025363.2

(74)专利代理机构 北京商专永信知识产权代理
事务所(普通合伙) 11400

(22)申请日 2017.03.03

代理人 郭玥 方挺

(30)优先权数据

62/303,954 2016.03.04 US

(51)Int.Cl.

G07K 14/47(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

A61P 21/00(2006.01)

2018.10.23

A61K 38/17(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

A61K 38/22(2006.01)

PCT/US2017/020723 2017.03.03

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/152090 EN 2017.09.08

(71)申请人 夏尔人类遗传性治疗公司

地址 美国马萨诸塞州

(72)发明人 A·伊斯肯德瑞安 A·W·诺顿

C·沈 C·潘

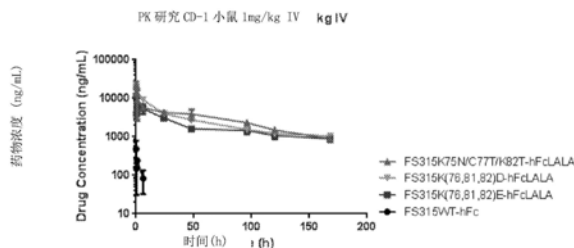
权利要求书4页 说明书63页 附图2页

(54)发明名称

重组卵泡抑素-FC融合蛋白及其在治疗杜氏肌营养不良症中的应用

(57)摘要

本发明尤其提供了用于治疗肌营养不良症特别是杜氏肌营养不良症(DMD)的方法和组合。在一些实施方案中,根据本发明的方法包括向患有或易患DMD的个体施用有效量的重组卵泡抑素融合蛋白,使得DMD的至少一种症状或特征在强度、严重性或频率上减少或具有延迟的发作。



1. 一种重组卵泡抑素多肽,其包含与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5至少80%相同的氨基酸序列,其中重组卵泡抑素蛋白具有肝素结合序列(HBS),并且其中HBS内的一个或多个氨基酸被与被取代的氨基酸相比具有较少正电荷的氨基酸取代。

2. 根据权利要求1的重组卵泡抑素多肽,其中HBS内的一个或多个氨基酸被具有中性电荷的氨基酸取代。

3. 根据权利要求1的重组卵泡抑素多肽,其中HBS内的一个或多个氨基酸被具有负电荷的氨基酸取代。

4. 根据权利要求1-3中任一项的重组卵泡抑素多肽,其中所述一个或多个氨基酸包括至少1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸。

5. 根据权利要求4的重组卵泡抑素多肽,其中所述一个或多个氨基酸包括3个氨基酸。

6. 根据权利要求1-5中任一项的重组卵泡抑素多肽,其中与天然存在的卵泡抑素相比,所述重组多肽具有降低的肝素结合亲和力。

7. 根据权利要求1-6中任一项的重组卵泡抑素多肽,其中所述重组卵泡抑素蛋白不结合BMP-9或BMP-10。

8. 根据权利要求1的重组卵泡抑素多肽,其中所述重组卵泡抑素蛋白具有与SEQ ID NO:12-40或SEQ ID NO:101-106中的任一个至少80%相同的序列。

9. 根据权利要求1-8中任一项的重组卵泡抑素多肽,其包含与SEQ ID NO:2、SEQ NO:4或SEQ ID NO:5至少80%相同的氨基酸序列和

其中对应于SEQ ID NO:2、SEQ NO:4或SEQ ID NO:5的第66至88位的氨基酸与SEQ ID NO:42-67或SEQ ID NO:111-116中的任一个相同。

10. 根据权利要求9的重组卵泡抑素多肽,其中对应于SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5的第66至88位的氨基酸序列与SEQ ID NO:58-67或SEQ ID NO:111-113中的任一个相同。

11. 根据权利要求10的重组卵泡抑素多肽,其中所述重组卵泡抑素多肽是高糖基化突变体。

12. 一种重组卵泡抑素多肽,其包含与SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5至少80%相同的氨基酸序列和

包含选自C66S、C66A、G74N、K75E、K75N、K76A、K76D、K76S、K76E、C77S、C77T、R78E、R78N、N80T、K81A、K81D、K82A、K82D、K81E、K82T、K82E、K84E、P85T、R86N、V88E和V88T的任何一种氨基酸变异或其组合。

13. 根据权利要求9或12的重组卵泡抑素多肽,其中所述氨基酸序列与SEQ ID NO:2、SEQ NO:4或SEQ ID NO:5至少90%相同。

14. 根据权利要求9或12的重组卵泡抑素多肽,其中所述氨基酸序列与SEQ ID NO:2、SEQ NO:4或SEQ ID NO:5至少95%相同。

15. 根据权利要求9或12的重组卵泡抑素多肽,其中所述氨基酸序列与SEQ ID NO:2、SEQ NO:4或SEQ ID NO:5至少98%相同。

16. 根据权利要求9或12的重组卵泡抑素多肽,其中所述氨基酸序列与SEQ ID NO:2、SEQ NO:4或SEQ ID NO:5 100%相同。

17. 一种重组卵泡抑素多肽,其包含选自SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:17-30和SEQ ID NO:32-40的氨基酸序列。

18. 一种重组卵泡抑素融合蛋白,其包含权利要求1-17中任一项的卵泡抑素多肽和IgG Fc结构域。

19. 一种重组卵泡抑素融合蛋白,其包含卵泡抑素多肽和人IgG Fc结构域,

其中重组卵泡抑素多肽包含与SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5至少80%相同的氨基酸序列和

其中对应于SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5的第66-88位的氨基酸与SEQ ID NO:41、42、43或58相同。

20. 根据权利要求19的重组卵泡抑素融合蛋白,其中重组卵泡抑素多肽包含与SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5至少90%相同的氨基酸序列。

21. 根据权利要求19的重组卵泡抑素融合蛋白,其中重组卵泡抑素多肽包含与SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5至少95%相同的氨基酸序列。

22. 根据权利要求19的重组卵泡抑素融合蛋白,其中重组卵泡抑素多肽包含与SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5至少98%相同的氨基酸序列。

23. 根据权利要求19的重组卵泡抑素融合蛋白,其中重组卵泡抑素多肽包含与SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5 100%相同的氨基酸序列。

24. 一种重组卵泡抑素融合蛋白,其包含卵泡抑素多肽和IgG Fc结构域,

其中所述卵泡抑素多肽包含选自SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:15至SEQ ID NO:40中的任一个的氨基酸序列。

25. 根据权利要求18-24中任一项的重组卵泡抑素融合蛋白,其中所述IgG Fc结构域包含氨基酸取代;和

其中根据EU编号,所述氨基酸取代选自L234A、L235A、H433K、N434F及其组合。

26. 根据权利要求18-24中任一项的重组卵泡抑素融合蛋白,其中所述IgG Fc结构域包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列和

其中根据EU编号,所述氨基酸序列包含选自L234A、L235A、H433K、N434F及其组合的氨基酸取代。

27. 根据权利要求18-24中任一项的重组卵泡抑素融合蛋白,其中所述IgG Fc结构域包含选自SEQ ID NO:7至SEQ ID NO:11的氨基酸序列。

28. 根据权利要求18-25中任一项的重组卵泡抑素融合蛋白,其中所述IgG Fc结构域是人IgG Fc结构域。

29. 根据权利要求18-25中任一项的重组卵泡抑素融合蛋白,其中所述IgG Fc结构域是IgG1、IgG2、IgG3或IgG4Fc结构域。

30. 一种重组卵泡抑素融合蛋白,其包含SEQ ID NO:73至SEQ ID NO:100、SEQ ID NO:117或SEQ ID NO:118中任一个的氨基酸序列。

31. 根据权利要求18-30中任一项的重组卵泡抑素融合蛋白,其中所述蛋白与肌生长抑制素结合,亲和解离常数(K_D)为1-100pM。

32. 根据权利要求18-30中任一项的重组卵泡抑素融合蛋白,其中所述蛋白与激活素A结合,亲和解离常数(K_D)为1-100pM。

33. 根据权利要求18-30中任一项的重组卵泡抑素融合蛋白,其中所述蛋白在0.2nM至25nM的范围内不结合骨形态发生蛋白-9 (BMP-9) 和/或骨形态发生蛋白-10 (BMP-10)。

34. 根据权利要求18-30中任一项的重组卵泡抑素融合蛋白,其中所述蛋白与肝素结合,亲和解离常数(K_D)为0.1至 >25 nM。

35. 根据权利要求18-30中任一项的重组卵泡抑素融合蛋白,其中所述蛋白与FcRn受体结合,亲和解离常数(K_D)为25-400nM。

36. 根据权利要求18-30中任一项的重组卵泡抑素融合蛋白,其中所述蛋白抑制肌生长抑制素, IC_{50} 为0.1至10nM。

37. 根据权利要求18-30中任一项的重组卵泡抑素融合蛋白,其中所述蛋白抑制活化素A, IC_{50} 为0.1至10nM。

38. 一种药物组合物,其包含权利要求18-37中任一项的重组卵泡抑素融合蛋白和药学上可接受的载体。

39. 一种多核苷酸,其包含编码权利要求1-17中任一项的重组卵泡抑素多肽的核苷酸序列。

40. 一种多核苷酸,其包含编码权利要求18-30中任一项的重组卵泡抑素融合蛋白的核苷酸序列。

41. 一种表达载体,其包含权利要求39或40的多核苷酸。

42. 一种宿主细胞,其包含权利要求39或40的多核苷酸或权利要求30的表达载体。

43. 一种制备特异性结合肌生长抑制素的重组卵泡抑素融合蛋白的方法,其包括培养权利要求42的宿主细胞。

44. 一种杂交瘤细胞,其产生权利要求1-17中任一项的重组卵泡抑素多肽或权利要求18-30中任一项的重组卵泡抑素融合蛋白。

45. 一种治疗杜氏肌营养不良症 (DMD) 的方法,所述方法包括:

向患有或易患DMD的受试者施用有效量的权利要求18-37中任一项的重组卵泡抑素融合蛋白或权利要求38的药物组合物,使得DMD的至少一种症状或特征在强度、严重程度或频率上减少或具有延迟的发作。

46. 根据权利要求45的方法,其中所述方法还包括向所述受试者施用一种或多种另外的治疗剂。

47. 根据权利要求46的方法,其中所述一种或多种另外的治疗剂选自抗Flt-1抗体或其片段、edasalonexent、pamrevlumab、泼尼松、地夫可特、RNA调节治疗剂、外显子跳跃治疗剂和基因疗法。

48. 根据权利要求45-47中任一项的方法,其中肠胃外施用有效量的重组卵泡抑素融合蛋白。

49. 根据权利要求48的方法,其中肠胃外施用选自静脉内、皮内、鞘内、吸入、透皮(局部)、眼内、肌肉内、皮下、跨粘膜施用或其组合。

50. 根据权利要求49的方法,其中肠胃外施用是静脉内施用。

51. 根据权利要求49的方法,其中肠胃外施用是皮下施用。

52. 根据权利要求45-51中任一项的方法,其中每天、每周两次、每周、每月或每两月施用重组卵泡抑素融合蛋白。

53. 根据权利要求52的方法,其中每周两次施用重组卵泡抑素融合蛋白。

54. 根据权利要求45-53中任一项的方法,其中将重组卵泡抑素融合蛋白递送至选自表1的一种或多种骨骼肌。

55. 根据权利要求45-54中任一项的方法,其中所述重组卵泡抑素融合蛋白的施用导致肌肉的质量相对于对照增加。

56. 根据权利要求55的方法,其中所述肌肉是选自表1的一种或多种骨骼肌。

57. 根据权利要求56的方法,其中所述肌肉选自膈肌、肱三头肌、比目鱼肌、胫骨前肌、腓肠肌、趾长伸肌、腹直肌、股四头肌及其组合。

58. 根据权利要求57的方法,其中所述肌肉是腓肠肌。

59. 根据权利要求55-58中任一项的方法,其中所述肌肉质量的增加是相对于对照的至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、150%、200%或500%的增加。

60. 根据权利要求45-59中任一项的方法,其中所述重组卵泡抑素融合蛋白的施用导致肌肉再生、增加的肌肉强度、增加的柔韧性、增加的运动范围、增加的耐力、减少的易疲劳性、增加的血流量、改善的认知、改善的肺功能、炎症抑制、减少的肌纤维化和/或减少的肌肉坏死。

61. 根据权利要求45-59中任一项的方法,其中DMD的至少一种症状或特征选自肌肉萎缩、肌无力、肌肉脆弱、肌肉坏死、肌纤维化、关节挛缩、骨骼变形、心肌病、吞咽受损、肠和膀胱功能受损、肌肉缺血、认知障碍、行为功能障碍、社交障碍、脊柱侧凸和呼吸功能受损。

62. 一种抑制受试者中的肌生长抑制素的方法,所述方法包括:

向受试者的肌肉施用包含有效量的权利要求18-30中任一项的重组卵泡抑素融合蛋白的组合物。

重组卵泡抑素-Fc融合蛋白及其在治疗杜氏肌营养不良症中的应用

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求2016年3月4日提交的临时申请U.S.S.N.62/303,954的权益,其全部内容通过引用并入本文。

背景技术

[0003] 杜氏肌营养不良症(DMD)是一种X连锁隐性遗传疾病,影响估计1:3600名男性出生,并且估计全世界有50,000名受影响的个体。这种疾病的特征是肌肉逐渐消瘦,并且受影响的儿童在达到13岁时要靠轮椅生活。受影响的个体通常在3岁时出现症状,这些个体的中位生存期在25至30岁之间。由于膈肌无力和心肌病引起的呼吸衰竭是常见的死亡原因。

[0004] DMD是由肌营养不良蛋白基因突变引起的。肌营养不良蛋白基因位于X染色体上并编码肌营养不良蛋白。肌营养不良蛋白负责通过肌营养不良蛋白聚糖复合物将肌纤维的收缩机制(肌动蛋白-肌球蛋白复合物)与周围的细胞外基质连接。肌营养不良蛋白基因的突变导致肌营养不良蛋白的改变或缺失以及异常的肌纤维膜功能。虽然雄性和雌性都可以携带肌营养不良蛋白基因的突变,但雌性很少受到DMD的影响。

[0005] DMD的一个特征是受影响组织的缺血。缺血是对组织或器官的血液供应的受限或减少,这导致缺乏细胞代谢所需的氧气和营养物质。局部缺血通常由血管收缩或阻塞引起,导致组织或器官的损伤或功能障碍。缺血的治疗旨在增加到到达受影响的组织或器官的血流量。

[0006] 目前,没有治愈DMD的方法。已经研究了几种治疗途径,包括基因治疗和皮质类固醇给药,但DMD患者仍然存在对替代品的需求。

发明内容

[0007] 本发明尤其提供了基于施用重组卵泡抑素-Fc融合蛋白治疗DMD的改进方法和组合物。本发明尤其包括以下出人意料的观察结果:卵泡抑素多肽中的某些氨基酸修饰导致改善的卵泡抑素蛋白,其以高亲和力特异性靶向肌生长抑制素和活化素A,并且不以有意义的亲和力结合非靶BMP或肝素。预期肌生长抑制素和活化素A对Smad2/3途径的激活导致肌原蛋白表达的抑制,和从而导致成肌细胞不分化成肌肉。因此,肌生长抑制素和活化素是用于刺激肌肉再生的可行靶标。然而,由于某些结构相似性,肌生长抑制素和活化素拮抗剂包括卵泡抑素可以结合骨形态发生蛋白(BMP)。BMP,特别是BMP-9和BMP-10,是关键形态发生信号,其协调整个身体内的组织结构。抑制这种BMP可能导致不希望的病理状况。卵泡抑素还通过三个FS结构域中的第一个中的碱性肝素结合序列(HBS)与细胞表面硫酸乙酰肝素蛋白多糖结合。预期肝素结合的失活、减少或调节可增加卵泡抑素的体内暴露和/或半衰期。因此,本发明提供了改进的卵泡抑素,其具有更长的半衰期并且更有效用于DMD的有效治疗。

[0008] 在一个方面,本发明提供了重组卵泡抑素多肽,其包含与SEQ ID NO:1、SEQ ID

NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5至少80%相同的氨基酸序列,其中重组卵泡抑素蛋白具有肝素结合结构域(HBS),并且其中HBS内的一个或多个氨基酸被与取代的氨基酸相比具有较少正电荷的氨基酸取代。在一个实施方案中,HBS内的一个或多个氨基酸被具有中性电荷的氨基酸取代。在一个实施方案中,HBS内的一个或多个氨基酸被具有负电荷的氨基酸取代。在一个实施方案中,所述一个或多个氨基酸包括至少1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸。在一个实施方案中,所述一个或多个氨基酸包括3个氨基酸。在一个实施方案中,与天然存在的卵泡抑素相比,重组多肽具有降低的肝素结合亲和力。在一个实施方案中,重组卵泡抑素蛋白不与BMP-9或BMP-10结合。在一个实施方案中,重组卵泡抑素蛋白具有与SEQ ID NO:12-40或SEQ ID NO:101-106中的任一个至少80%相同的序列。

[0009] 在一个方面,本发明提供了重组卵泡抑素多肽,其包含与SEQ ID NO:2、SEQ NO:4或SEQ ID NO:5至少80%相同的氨基酸序列,并且其中对应于SEQ ID NO:2、SEQ NO:4或SEQ ID NO:5的第66至88位的氨基酸与SEQ ID NO:42-67或SEQ ID NO:111-116中的任一个相同。在一些实施方案中,对应于SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5的第66至88位的氨基酸序列与SEQ ID NO:58-67或SEQ ID NO:111-113中的任一个相同。在一些实施方案中,重组卵泡抑素多肽是高糖基化突变体。在一些实施方案中,重组卵泡抑素多肽的氨基酸序列与SEQ ID NO:2、SEQ NO:4或SEQ ID NO:5至少90%相同。在一些实施方案中,重组卵泡抑素多肽的氨基酸序列与SEQ ID NO:2、SEQ NO:4或SEQ ID NO:5至少95%相同。在一些实施方案中,重组卵泡抑素多肽的氨基酸序列与SEQ ID NO:2、SEQ NO:4或SEQ ID NO:5至少98%相同。在一些实施方案中,重组卵泡抑素多肽的氨基酸序列与SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5 100%相同。

[0010] 在一个方面,本发明提供了重组卵泡抑素多肽,其包含与SEQ ID NO:2、SEQ NO:4或SEQ ID NO:5至少80%相同的氨基酸序列,并且包含选自C66S、C66A、G74N、K75E、K75N、K76A、K76D、K76S、K76E、C77S、C77T、R78E、R78N、N80T、K81A、K81D、K82A、K82D、K81E、K82T、K82E、K84E、P85T、R86N、V88E和V88T的任何一种氨基酸变异或其组合。在一些实施方案中,重组卵泡抑素多肽的氨基酸序列与SEQ ID NO:2、SEQ NO:4或SEQ ID NO:5至少90%相同。在一些实施方案中,重组卵泡抑素多肽的氨基酸序列与SEQ ID NO:2、SEQ NO:4或SEQ ID NO:5至少95%相同。在一些实施方案中,重组卵泡抑素多肽的氨基酸序列与SEQ ID NO:2、SEQ NO:4或SEQ ID NO:5至少98%相同。在一些实施方案中,重组卵泡抑素多肽的氨基酸序列与SEQ ID NO:2、SEQ NO:4或SEQ ID NO:5 100%相同。

[0011] 在一个方面,本发明提供了重组卵泡抑素多肽,其包含选自SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:17-30和SEQ ID NO:32-40的氨基酸序列。

[0012] 在一个方面,本发明提供了重组卵泡抑素融合蛋白,其包含重组卵泡抑素多肽和IgG Fc结构域。

[0013] 在一个方面,本发明提供了包含卵泡抑素多肽和人IgG Fc结构域的重组卵泡抑素融合蛋白,其中重组卵泡抑素多肽包含与SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5至少80%相同的氨基酸序列,并且其中对应于SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5的第66至88位的氨基酸与SEQ ID NO:41、42、43或58相同。在一些实施方案中,重组卵泡抑素多肽包含与SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5至少90%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,重组卵泡抑素多肽包含与SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5至少95%相同

的氨基酸序列。在一些实施方案中,重组卵泡抑素多肽包含与SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5至少98%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,重组卵泡抑素多肽包含与SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5 100%相同的氨基酸序列。

[0014] 在一个方面,本发明提供了包含卵泡抑素多肽和IgG Fc结构域的重组卵泡抑素融合蛋白,其中所述卵泡抑素多肽包含选自SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:15至SEQ ID NO:40中的任一个的氨基酸序列。

[0015] 在一些实施方案中,IgG Fc结构域包含氨基酸取代,其中根据EU编号,氨基酸取代选自L234A、L235A、H433K、N434F及其组合。

[0016] 在一些实施方案中,IgG Fc结构域包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列,并且其中根据EU编号,所述氨基酸序列包含选自L234A、L235A、H433K、N434F及其组合的氨基酸取代。

[0017] 在一些实施方案中,IgG Fc结构域包含选自SEQ ID NO:7至SEQ ID NO:11的氨基酸序列。在一些实施方案中,IgG Fc结构域是人IgG Fc结构域。在一些实施方案中,IgG Fc结构域是IgG1、IgG2、IgG3或IgG4Fc结构域。

[0018] 在一个方面,本发明提供了重组卵泡抑素融合蛋白,其包含SEQ ID NO:73至SEQ ID NO:100中任一个的氨基酸序列。

[0019] 在一些实施方案中,重组卵泡抑素融合蛋白与肌生长抑制素结合,亲和解离常数(K_D)为1至100pM。在一些实施方案中,重组卵泡抑素融合蛋白结合激活素A,亲和解离常数(K_D)为1至100pM。在一些实施方案中,重组卵泡抑素融合蛋白在0.2nM至25nM的范围内不结合骨形态发生蛋白-9(BMP-9)和/或骨形态发生蛋白-10(BMP-10)。在一些实施方案中,重组卵泡抑素融合蛋白与肝素结合,亲和解离常数(K_D)为0.1至200nM。在一些实施方案中,重组卵泡抑素融合蛋白与Fc受体结合,亲和解离常数(K_D)为25至400nM。

[0020] 在一些实施方案中,重组卵泡抑素融合蛋白抑制肌生长抑制素, IC_{50} 为0.1至10nM。在一些实施方案中,重组卵泡抑素融合蛋白抑制活化素, IC_{50} 为0.1至10nM。

[0021] 在一个方面,本发明提供了包含重组卵泡抑素融合蛋白和药学上可接受的载体的药物组合物。

[0022] 在一个方面,本发明提供了包含编码重组卵泡抑素多肽的核苷酸序列的多核苷酸。

[0023] 在一个方面,本发明提供了包含编码重组卵泡抑素融合蛋白的核苷酸序列的多核苷酸。在一些实施方案中,表达载体包含所述多核苷酸。在一些实施方案中,宿主细胞包含多核苷酸或表达载体。

[0024] 在一个方面,本发明提供了通过培养所述宿主细胞制备特异性结合肌生长抑制素和激活素A的重组卵泡抑素融合蛋白的方法。

[0025] 在一个方面,本发明提供了产生重组卵泡抑素多肽或重组卵泡抑素融合蛋白的杂交瘤细胞。

[0026] 在一个方面,本发明提供了治疗杜氏肌营养不良症(DMD)的方法,该方法包括向患有或易患DMD的受试者施用有效量的重组卵泡抑素融合蛋白或包含重组卵泡抑素融合蛋白的药物组合物,使得DMD的至少一种症状或特征在强度、严重程度或频率上减少或具有延迟的发作。

[0027] 在一些实施方案中,该方法还包括向受试者施用一种或多种另外的治疗剂。在一

些实施方案中,所述一种或多种另外的治疗剂选自抗Flt-1抗体或其片段、edasalonexent、pamrevlumab、泼尼松、地夫可特、RNA调节治疗剂、外显子跳跃治疗剂和基因疗法。

[0028] 在一些实施方案中,肠胃外施用有效量的重组卵泡抑素融合蛋白。在一些实施方案中,肠胃外施用选自静脉内、皮内、鞘内、吸入、透皮(局部)、眼内、肌肉内、皮下、跨粘膜施用或其组合。在一些实施方案中,肠胃外施用是静脉内施用。在一些实施方案中,肠胃外施用是皮下施用。在一些实施方案中,每天、每周两次、每周、每月或每两月施用重组卵泡抑素融合蛋白。在一些实施方案中,每周两次施用重组卵泡抑素融合蛋白。

[0029] 在一些实施方案中,将重组卵泡抑素融合蛋白递送至选自表1的一种或多种骨骼肌。在一些实施方案中,重组卵泡抑素融合蛋白的施用导致肌肉的质量相对于对照增加。在一些实施方案中,肌肉是选自表1的一种或多种骨骼肌。在一些实施方案中,肌肉选自膈肌、肱三头肌、比目鱼肌、胫骨前肌、腓肠肌、趾长伸肌、腹直肌、股四头肌,及其组合。在一些实施方案中,肌肉是腓肠肌。在一些实施方案中,肌肉质量的增加是相对于对照的至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、150%、200%或500%的增加。

[0030] 在一些实施方案中,重组卵泡抑素融合蛋白的施用导致肌肉再生、增加的肌肉强度、增加的柔韧性、增加的运动范围、增加的耐力、减少的易疲劳性、增加的血流量、改善的认知、改善的肺功能、炎症抑制、减少的肌纤维化和/或减少的肌肉坏死。

[0031] 在一些实施方案中,DMD的至少一种症状或特征选自肌肉萎缩、肌无力、肌肉脆弱、肌肉坏死、肌纤维化、关节挛缩、骨骼变形、心肌病、吞咽受损、肠和膀胱功能受损、肌肉缺血、认知障碍、行为功能障碍、社交障碍、脊柱侧凸和呼吸功能受损。

[0032] 在一个方面,本发明提供了抑制受试者中的肌生长抑制素的方法,该方法包括向受试者的肌肉施用包含有效量的重组卵泡抑素融合蛋白的组合物。

附图说明

[0033] 附图仅用于说明性目的,而不是限制。

[0034] 图1A和1B显示了示例性结果,其显示了施用示例性重组卵泡抑素-Fc融合蛋白或FS315WT-hFc(一种比较蛋白)的CD-1小鼠中的血清PK曲线。

[0035] 图2是显示与野生型小鼠的握力相比,用PBS媒介物、10mg/kg的FS315K(76,81,82)E-mFc或3mg/kg的ActRIIB-mFc处理的mdx小鼠中的前肢握力的图。在施用11周后测量前肢握力。数据显示,与单独用媒介物处理的动物的握力相比,用FS315K(76,81,82)E-mFc处理的mdx小鼠的前肢握力显著增加。

[0036] 定义

[0037] 为了使本发明更容易理解,首先在下文定义了某些术语。下述术语和其它术语的另外定义在说明书各处阐述。

[0038] 亲和力:如本领域所知,“亲和力”是特定配体与其配偶体结合的紧密度的量度。在一些实施方案中,配体或配偶体是重组卵泡抑素多肽。在一些实施方案中,配体或配偶体是重组卵泡抑素-Fc融合蛋白。亲和力可以以不同方式测量。在一些实施方案中,通过定量测定法测量亲和力。在一些这样的实施方案中,可以将结合配偶体浓度固定为超过配体浓度,以模拟生理条件。或者或另外地,在一些实施方案中,可改变结合配偶体浓度和/或配体浓度。在一些这样的实施方案中,可以在可比较的条件(例如浓度)下将亲和力与参照进行比

较。

[0039] 改善(amelioration):如本文所用,术语“改善”是指预防、减轻或缓解状态,或改善受试者的状态。改善包括但不需要完全恢复或完全预防疾病。

[0040] 动物:如本文使用的,术语“动物”指动物界的任何成员。在一些实施例中,“动物”指处于任何发育阶段的人。在一些实施例中,“动物”指处于任何发育阶段的非人动物。在某些实施例中,非人动物是哺乳动物(例如啮齿类动物、小鼠、大鼠、兔、猴、犬、猫、绵羊、牛、灵长类动物和/或猪)。在一些实施例中,动物包括但不限于哺乳动物、鸟类、爬行动物、两栖动物、鱼类、昆虫和/或蠕虫。在一些实施例中,动物可以为转基因动物、基因改造的动物和/或克隆。

[0041] 大约或约:如本文使用的,当应用于一个或多个目的值时,术语“大约”或“约”指与所述参考值相似的值。在某些实施例中,术语“大约”或“约”指落入所述值任一方向(大于或小于)中的25%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%或更少的一系列值,除非另有说明或从上下文中另外显而易见的(除非该数字超过可能值的100%)。

[0042] 与...相关:如本文所使用的,如果两个事件或实体中的一个的存在、水平和/或形式与另一个的存在、水平和/或形式相关,则这两个事件或实体彼此“相关”。例如,如果特定实体(例如,多肽)的存在、水平和/或形式与疾病、病症或病况的发病率和/或易感性相关(例如,在相关人群中),则认为其与特定疾病、病症或病况相关。在一些实施方案中,如果两个或更多个实体直接或间接地相互作用,以使得它们彼此物理接近并保持彼此物理接近,则它们彼此在物理上“相关”。在一些实施方案中,彼此物理相关的两个或更多个实体彼此共价连接;在一些实施方案中,彼此物理相关的两个或更多个实体彼此不共价连接但是非共价缔合的,例如通过氢键、范德华相互作用、疏水相互作用、磁力及其组合。

[0043] 生物利用度:如本文使用的,术语“生物利用度”一般指达到受试者血流的施用剂量的百分比。

[0044] 生物活性的:如本文使用的,短语“生物活性的”指在生物系统中,且特别是在生物体中具有活性的任何试剂的特征。例如,当施用于生物时,对该生物体具有生物效应的试剂视为生物活性的。在特定实施例中,当肽是生物活性的情况下,共享肽的至少一种生物活性的该肽的一部分通常被称为“生物活性”部分。

[0045] 心肌:如本文所用,术语“心肌”是指在心脏壁特别是心肌中发现的一种非随意横纹肌。

[0046] 载体或稀释剂:如本文使用的,术语“载体”和“稀释剂”指可用于制备药物制剂的药学可接受的(例如,对于施用于人安全和无毒的)载体或稀释物质。示例性稀释剂包括无菌水、注射用抑菌水(BWFI)、pH缓冲溶液(例如磷酸缓冲盐溶液)、无菌盐水溶液、林格溶液或右旋糖溶液。

[0047] 剂型:如本文所用,术语“剂型”和“单位剂型”是指用于待治疗的患者的治疗性蛋白(例如,重组卵泡抑素多肽或重组卵泡抑素-Fc融合蛋白)的物理上离散的单位。每个单位含有经计算可产生所需的治疗效果的预定量的活性物质。然而,应该理解,组合物的总剂量将由主治医师在合理的医学判断范围内决定。

[0048] 卵泡抑素或重组卵泡抑素:如本文所用,术语“卵泡抑素(FS)”或“重组卵泡抑素”

是指任何野生型或经修饰的卵泡抑素蛋白或多肽(例如,具有氨基酸突变、缺失、插入的卵泡抑素蛋白和/或融合蛋白),除非另有说明,否则其保留基本的卵泡抑素生物活性。

[0049] Fc区:如本文所用,术语“Fc区”是指两个“Fc多肽”的二聚体,每个“Fc多肽”包含除第一恒定区免疫球蛋白结构域之外的抗体的恒定区。在一些实施方案中,“Fc区”包括通过一个或多个二硫键、化学接头或肽接头连接的两个Fc多肽。“Fc多肽”是指IgA、IgD和IgG的最后两个恒定区免疫球蛋白结构域,以及IgE和IgM的最后三个恒定区免疫球蛋白结构域,并且还可以包括这些结构域的N端的部分或全部柔性铰链。对于IgG,“Fc多肽”包含免疫球蛋白结构域C γ 2(C γ 2)和C γ 3(C γ 3)以及C γ 1(C γ 1)和C γ 2之间的铰链的下部。虽然Fc多肽的边界可以变化,但是人IgG重链Fc多肽通常被定义为包含从T223或C226或P230开始到其羧基末端的残基,其中编号是根据如Kabat等人(1991,NIH Publication91-3242,National Technical Information Services,Springfield,VA)的EU索引。对于IgA,Fc多肽包含免疫球蛋白结构域C α 2(C α 2)和C α 3(C α 3)以及C α 1(C α 1)和C α 2之间的铰链的下部。Fc区可以是合成的、重组的或由天然来源如IVIG产生。

[0050] 功能等价物或衍生物:如本文使用的,在氨基酸序列的功能性衍生物的上下文中,术语“功能等价物”或“功能衍生物”指示保留与原始序列基本上相似的生物活性(功能或结构)的分子。功能性衍生物或等价物可以为天然衍生物或合成制备的。示例性的功能性衍生物包括具有一个或多个氨基酸的取代、缺失或添加的氨基酸序列,条件是蛋白质的生物活性是保守的。取代氨基酸期望地具有与被取代氨基酸相似的化学-物理性质。期望的相似的化学-物理性质包括电荷、膨松性、疏水性、亲水性等等中的相似性。

[0051] 融合蛋白:如本文使用的,术语“融合蛋白”或“嵌合蛋白”指通过连接两种或更多种最初分离的蛋白质或其一部分而产生的蛋白质。在一些实施例中,每种蛋白质之间将存在接头或间隔物。融合蛋白的非限制性实例是Fc融合蛋白。融合蛋白的非限制性实例是卵泡抑素-Fc融合蛋白。

[0052] 半衰期:如本文使用的,术语“半衰期”是数量例如蛋白质浓度或活性降至如在时间段开始时测量时其值的一半所需的时间。

[0053] 肥大:如本文所用,术语“肥大”是指由于其组分细胞的增大导致的器官或组织的体积增加。

[0054] 改善、增加或减少:如本文使用的,术语“改善”、“增加”或“减少”或语法等价物指示相对于基线测量的值,所述基线测量例如在本文所述的治疗开始之前相同个体中的测量,或在不存在本文所述的治疗的情况下在对照受试者(或多个对照受试者)中的测量。“对照受试者”是患有与正在接受治疗的受试者相同形式的疾病的受试者,其与正在接受治疗的受试者大约相同的年龄。

[0055] 抑制:如本文所用,术语“抑制”(“inhibition”、“inhibit”和“inhibiting”)是指降低或减少感兴趣的蛋白或基因的活性和/或表达的过程或方法。通常,抑制蛋白或基因是指将蛋白或基因的表达或相关活性降低至少10%或更多,例如,20%、30%、40%或50%、60%、70%、80%、90%或更多,或表达或相关活性的大于1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、50倍、100倍或更多的降低,如通过本文描述的或本领域公知的一种或多种方法测量的。

[0056] 体外:如本文使用的,术语“体外”指在人造环境中,例如在试管或反应容器中,在细胞培养等中,而不是在多细胞生物体内发生的事件。

[0057] 体内:如本文使用的,术语“体内”指在多细胞生物内,例如人和非人动物内发生的事件。在基于细胞的系统的背景下,该术语可用于指在活细胞内(与例如体外系统相反)发生的事件。

[0058] K_D :如本文所用,术语“ K_D ”旨在表示解离常数,其从 K_d 与 K_a 的比(即 K_d/K_a)获得并表示为摩尔浓度(M)。配体的 K_D 值可使用本领域熟知的方法测定。测定配体 K_D 的优选方法是使用表面等离子体共振,优选使用生物传感器系统如BIAcore系统。

[0059] 接头:如本文使用的,术语“接头”指在融合蛋白中,除在天然蛋白中的特定位置处出现的那种外的氨基酸序列,并且一般设计为柔性的或在两个蛋白质部分之间插入结构,例如 α -螺旋。接头也被称为间隔物。接头或间隔物通常本身不具有生物学功能。

[0060] 药学上可接受的:如本文所用,术语“药学上可接受的”是指在合理的医学判断范围内适用于与人类和动物的组织接触而没有过度毒性、刺激性、过敏反应或其他问题或并发症(与合理的利益/风险比相当)的物质。

[0061] 多肽:如本文使用的,术语“多肽”指经由肽键连接在一起的氨基酸的连续链。该术语用于指任何长度的氨基酸链,但本领域普通技术人员将理解,该术语并不限于长链,并且可以指包含经由肽键连接在一起的两个氨基酸的最小链。如本领域技术人员已知的,多肽可进行加工和/或修饰。如本文使用的,术语“多肽”和“肽”可互换使用。

[0062] 预防:如本文使用的,当与疾病、病症和/或状况的发生结合使用时,术语“预防(prevent)”或“预防(prevention)”指降低疾病、病症和/或状况发展的风险。参见“风险”的定义。

[0063] 蛋白质:如本文使用的,术语“蛋白质”指充当离散单位的一种或多种多肽。如果单个多肽是离散功能单元,并且不需要与其它多肽永久或暂时物理结合以便形成离散功能单元,则术语“多肽”和“蛋白质”可互换使用。如果离散功能单元由超过一种彼此物理结合的多肽组成,则术语“蛋白质”指离散单元物理偶联和共同起作用的多种多肽。

[0064] 风险:如从上下文应理解的,疾病、病症和/或状况的“风险”包括特定个体将发展成疾病、病症和/或状况(例如肌营养不良)的可能性。在一些实施例中,风险表示为百分比。在一些实施例中,风险为0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90直至100%。在一些实施例中,风险表示为相对于与参考样品或参考样品组相关的风险的风险。在一些实施例中,参考样品或参考样品组具有疾病、病症、病况和/或事件(例如肌营养不良)的已知风险。在一些实施例中,参考样品或参考样品组来自与特定个体相当的个体。在一些实施例中,相对风险是0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多。

[0065] 横纹肌:如本文所用,术语“横纹肌”是指多核肌肉组织,其具有细胞内可收缩单元(肌节)的规则排列,从而导致在使用显微镜和在自主控制下出现条纹。通常,横纹肌可以是心肌,骨骼肌和鳃节肌。

[0066] 平滑肌:如本文所用,术语“平滑肌”是指非随意控制的非横纹肌,包括单一性和多元肌。

[0067] 受试者:如本文使用的,术语“受试者”指人或任何非人动物(例如小鼠、大鼠、兔、犬、猫、牛、猪、绵羊、马或灵长类动物)。人包括出生前和出生后形式。在许多实施例中,受试者是人类。受试者可以为患者,其指提供给医疗提供者用于疾病的诊断或治疗的人。术语“受试者”在本文中可与“个体”或“患者”互换使用。受试者可患有或易患疾病或病症,但可

表现出或可不表现出疾病或病症的症状。

[0068] 基本上:如本文使用的,术语“基本上”指显示出目的特征或性质的总体或接近总体程度或范围的定性条件。生物领域的普通技术人员应理解,生物学现象和化学现象很少(如果有的话)完成和/或进行至完成或达到或避免绝对结果。术语“基本上”因此在本文中用于捕获许多生物学现象和化学现象固有的潜在缺乏的完整性。

[0069] 基本同源性:短语“基本同源性”在本文中用于指氨基酸或核酸序列之间的比较。如本领域普通技术人员应了解的,如果两个序列在相应位置含有同源残基,则它们一般视为“基本同源的”。同源残基可以为相同的残基。可替代地,同源残基可以为具有适当相似的结构和/或功能特征的不相同的残基。例如,如本领域普通技术人员众所周知的,某些氨基酸通常被分类为“疏水”或“亲水”氨基酸,和/或具有“极性”或“非极性”侧链。一种氨基酸取代相同类型的另一种氨基酸可经常被视为“同源”取代。

[0070] 如本领域众所周知的,可使用各种算法中的任一种比较氨基酸或核酸序列,所述算法包括可在商业计算机程序中获得的那些算法,例如用于核苷酸序列和BLASTP的BLASTN、缺口BLAST和用于氨基酸序列的PSI-BLAST。示例性的这种程序在以下中描述:Altschul等人,Basic local alignment search tool,J.Mol.Biol.,215(3):403-410,1990;Altschul等人,Methods in Enzymology;Altschul等人,“Gapped BLAST and PSI-BLAST:a new generation of protein database search programs”,Nucleic Acids Res.25:3389-3402,1997;Baxevanis等人,Bioinformatics:A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins,Wiley,1998;和Misener等人,(编辑),Bioinformatics Methods and Protocols(Methods in Molecular Biology,第132卷),Humana Press,1999。除鉴定同源序列之外,上述程序通常提供同源性程度的指示。在一些实施例中,如果其相应残基的至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多在相关残基段上是同源的,则两个序列表示为基本同源。在一些实施例中,相关段是全序列。在一些实施例中,相关段是至少10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、125、150、175、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、500个或更多个残基。

[0071] 基本同一性:短语“基本同一性”在本文中用于指氨基酸或核酸序列之间的比较。如本领域普通技术人员应了解的,如果两个序列在相应位置含有相同残基,则它们一般视为“基本相同的”。如本领域众所周知的,可使用各种算法中的任一种比较氨基酸或核酸序列,所述算法包括可在商业计算机程序中获得的那些算法,例如用于核苷酸序列和BLASTP的BLASTN、缺口BLAST和用于氨基酸序列的PSI-BLAST。示例性的这种程序在以下中描述:Altschul等人,Basic local alignment search tool,J.Mol.Biol.,215(3):403-410,1990;Altschul等人,Methods in Enzymology;Altschul等人,Nucleic Acids Res.25:3389-3402,1997;Baxevanis等人,Bioinformatics:A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins,Wiley,1998;和Misener等人,(编辑),Bioinformatics Methods and Protocols(Methods in Molecular Biology,第132卷),Humana Press,1999。除鉴定相同序列之外,上述程序通常提供同一性程度的指示。在一些实施例中,如果其相应残基的至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多在相关残基段上是相同的,则两个序列表示为基本相同。在一

些实施例中,相关段是全序列。在一些实施例中,相关段是至少10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、125、150、175、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、500个或更多个残基。

[0072] 表面等离子体共振:如本文所用,是指允许实时分析特异性结合相互作用的光学现象,例如通过检测生物传感器基质内蛋白浓度的变化,例如通过使用BIAcore®系统(Pharmacia Biosensor AB,Uppsala,Sweden和Piscataway,NJ)。有关进一步说明,参见Jonsson,U.等人(1993)Ann.Biol.Clin.51:19-26;Jonsson,U.等人(1991)Biotechniques 11:620-627;Johnsson,B.等人(1995)J.Mol.Recognit.8:125-131;和Johnson,B.等人(1991)Anal.Biochem.198:268-277。

[0073] 患有:患有“疾病、病症和/或状况”的个体已被诊断有或表现出疾病、病症和/或状况的一种或多种症状。

[0074] 易患:“易患”疾病、病症和/或状况的个体仍未被诊断患有疾病、病症和/或状况。在一些实施例中,易患疾病、病症和/或状况的个体可不表现出疾病、病症和/或状况的症状。在一些实施例中,易患疾病、病症、状况或事件(例如DMD)的个体可通过下述中的一种或多种来表征:(1)与疾病、病症和/或状况的发展有关的基因突变;(2)与疾病、病症和/或状况的发展有关的遗传多态性;(3)与疾病、病症和/或状况相关的蛋白质的表达和/或活性增加和/或降低;(4)与疾病、病症、状况和/或事件的发展相关的习惯和/或生活方式,(5)已经历移植,计划经历移植或需要移植。在一些实施例中,易患疾病、病症和/或状况的个体将发展疾病、病症和/或状况。在一些实施例中,易患疾病、病症和/或状况的个体将不发展疾病、病症和/或状况。

[0075] 靶组织:如本文所用,术语“靶组织”是指受待治疗的疾病如杜氏肌营养不良症(DMD)影响的任何组织。在一些实施方案中,靶组织包括显示疾病相关病理学、症状或特征(包括但不限于肌肉萎缩、骨骼变形、心肌病和呼吸功能受损)的那些组织。

[0076] 治疗有效量:如本文使用的,术语治疗剂的“治疗有效量”意指当施用于患有或易患疾病、病症和/或状况的受试者时,足以治疗、诊断、预防和/或延迟疾病、病症和/或状况的症状发作的量。本领域普通技术人员应了解,治疗有效量通常经由包含至少一个单位剂量的给药方案施用。

[0077] 治疗:如本文使用的,术语“治疗(treat)”、“治疗(treatment)”或“治疗(treating)”指用于部分或完全缓解、改善、减轻、抑制、预防、延迟以下的发作、减少以下的严重性和/或减少以下的发生率:特定疾病、病症和/或状况的一种或多种症状或特征。治疗可施用于未表现出疾病征兆和/或仅表现出疾病早期征兆的受试者,用于降低与疾病相关病理发展的风险。

具体实施方式

[0078] 本发明尤其提供了基于卵泡抑素作为蛋白治疗剂治疗肌营养不良症(包括杜氏肌营养不良症(DMD)和/或贝克尔肌营养不良症)的方法和组合物。在一些实施方案中,本发明提供治疗DMD的方法,包括向患有或易患DMD的个体施用有效量的重组卵泡抑素蛋白或重组卵泡抑素-Fc融合蛋白,使得DMD的至少一种症状或特征的强度、严重程度或频率降低或者具有延迟的发作。

[0079] 下述节段详细描述了本发明的各个方面。节段的使用并不意味着限制本发明。每个节段可适用于本发明的任何方面。在本专利申请中，除非另有说明，否则使用“或”意指“和/或”。

[0080] 杜氏肌营养不良症 (DMD)

[0081] DMD是特征在于全身的肌肉进行性退化和肌肉相关功能的丧失的疾病。预期本发明提供用于再生肌肉和治疗纤维化、炎症和与DMD相关的其他症状或特征以及各种肌肉组织中的其他肌营养不良的方法和组合物。在一些实施方案中，在受试者中使用提供的方法和组合物导致该受试者的纤维化和/或坏死减少。

[0082] 肌肉组织

[0083] 动物有两种主要类型的肌肉组织-横纹肌和平滑肌。如本文所用，术语“横纹肌”是指含有重复肌节的肌肉组织。横纹肌往往受到自主控制并附着在骨骼上，尽管有一些例外，例如心肌，它具有横纹肌的几种特性，但不受自主控制。通常，横纹肌允许身体的自主运动并且包括主要肌肉群，包括股四头肌，腓肠肌，肱二头肌，肱三头肌，斜方肌，三角肌等等。横纹肌往往很长，并且许多横纹肌能够独立发挥功能。然而，一些横纹肌不附着于骨骼，包括口腔、肛门、心脏和食道上部的那些。

[0084] 另一方面，平滑肌具有非常不同的结构。平滑肌不是一系列具有单独骨骼附着的长肌，而是倾向于组织成连续的片，其中在平滑肌细胞之间具有机械连接。平滑肌通常位于中空器官的壁中，通常不受自主控制。衬在特定器官上的平滑肌必须同时承受相同的负荷和收缩。平滑肌至少部分地起到处理由于运动和/或姿势或压力的变化引起的中空器官负荷变化的作用。这种双重作用意味着平滑肌不仅必须像横纹肌一样收缩，而且还必须能够强直收缩以保持器官尺寸以抵抗持续负荷。平滑肌的实例是衬在血管、膀胱、胃肠道如直肠的那些。

[0085] 肌肉的强度取决于肌细胞的数量和大小以及它们的解剖学排列。通过增加现有肌原纤维的大小(肥大)和/或形成更多肌细胞(增生)来增加肌纤维的直径将增加肌肉的力产生能力。

[0086] 肌肉也可以按位置或功能分组。在一些实施方案中，重组卵泡抑素蛋白靶向一种或多种面部肌肉，一种或多种用于咀嚼的肌肉，一种或多种舌和颈部肌肉，一种或多种胸部肌肉，一种或多种胸带和手臂肌肉，一种或多种手臂和肩膀肌肉，一种或多种腹侧和背侧前臂肌肉，一种或多种手部肌肉，一种或多种竖脊肌肌肉，一种或多种骨盆带和腿肌肉和/或一种或多种前腿和脚肌肉。

[0087] 在一些实施方案中，面部肌肉包括但不限于眼内肌，例如睫状肌，虹膜扩张器，虹膜括约肌；耳朵的肌肉，如耳肌，颞顶肌，镫骨肌，鼓膜张肌；鼻肌肉，如降眉间肌，鼻肌，鼻翼肌，降鼻中隔肌，提上唇鼻翼肌；口腔肌肉，如提口角肌，降口角肌，口轮匝肌，颊肌，颧大肌和颧小肌，颈阔肌，提上唇肌，提下唇肌，笑肌，颞肌和/或皱眉肌。

[0088] 在一些实施方案中，咀嚼肌包括但不限于咬肌，颞肌，翼内肌，翼外肌。在一些实施方案中，舌和颈的肌肉包括但不限于颞舌肌，茎突舌肌，腭舌肌，舌骨舌肌，二腹肌，茎突舌骨肌，下颌舌骨肌，颌舌骨肌，肩胛舌骨肌，胸骨舌骨肌，胸骨甲状肌，甲状舌骨肌，胸锁乳突肌，前斜角肌，中斜角肌，和/或后斜角肌。

[0089] 在一些实施方案中，胸部、胸带和手臂的肌肉包括但不限于锁骨下肌，胸大肌，小

胸小肌,腹直肌,腹外斜肌,腹内斜肌,腹横肌,膈肌,外肋间肌,内肋间肌,前锯肌,斜方肌,肩胛提肌,大菱形肌,小菱形肌,背阔肌,三角肌,肩胛下肌,冈上肌,冈下肌,大圆肌,小圆肌和/或喙肱肌。

[0090] 在一些实施方案中,手臂和肩部的肌肉包括但不限于肱二头肌长头,肱二头肌短头,肱三头肌长头,肱三头肌外侧头,肱三头肌内侧头,肘肌,旋前圆肌,旋后肌和/或肱肌。

[0091] 在一些实施方案中,腹侧和背侧前臂的肌肉包括但不限于肱桡肌,桡侧腕屈肌,尺侧腕屈肌,掌长肌,尺侧腕伸肌,桡侧腕长伸肌,桡侧腕短伸肌,指伸肌,小指伸肌。

[0092] 在一些实施方案中,手部的肌肉包括但不限于手的内在肌,例如鱼际,拇短展肌,拇短屈肌,拇对掌肌,小鱼际,小指展肌,小指短屈肌,小指对掌肌,骨间掌侧肌,骨间背侧肌和/或蚯蚓状肌。

[0093] 在一些实施方案中,竖脊肌的肌肉包括但不限于颈、脊柱、最长肌和/或髂骨肌。

[0094] 在一些实施方案中,骨盆带和腿部的肌肉包括但不限于腰大肌,髂肌,股方肌,长收肌,短收肌,大收肌,股薄肌,缝匠肌,股四头肌,如股直肌,股外侧肌,股内侧肌,股中间肌,腓肠肌,腓骨(腓)长肌,比目鱼肌,臀大肌,臀中肌,臀小肌,腘绳肌:股二头肌:长头,腘绳肌:股二头肌:短头,腘绳肌:半腱肌,腘绳肌:半膜肌,阔筋膜张肌,耻骨肌和/或胫骨前肌。

[0095] 在一些实施方案中,前腿和足部的肌肉包括但不限于趾长伸肌,拇长伸肌,腓骨短肌,跖肌,胫骨后肌,拇长屈肌,趾短伸肌,拇短伸肌,拇展肌,拇短屈肌,小指展肌,小指屈肌,小指对掌肌,趾短伸肌,脚的蚯蚓状肌,足底方肌或副屈肌,趾短屈肌,背侧骨间肌和/或足底骨间肌。

[0096] 示例性肌肉靶标总结于表1中。

[0097] 表1:肌肉靶标

[0098] **眼轮匝肌**

| | | | |
|---------------------------------|---------|---------|----------|
| 眼内: 睫状肌, 虹膜扩张肌, 虹膜括约肌 | | | |
| 耳朵: 耳肌, 颞顶肌, 镫骨肌, 鼓膜张肌 | | | |
| 鼻: 降眉间肌, 鼻肌, 鼻翼肌, 降鼻中隔肌, 提上唇鼻翼肌 | | | |
| 口腔: 提口角肌, 降口角肌, 口轮匝肌 | | | |
| 颊肌 | 颧大肌和颧小肌 | 颈阔肌 | 提上唇肌 |
| 提下唇肌 | 笑肌 | 颞肌 | 皱眉肌 |
| 肘肌 | 旋前圆肌 | 旋后肌 | 肱肌 |
| 咀嚼肌 | | | |
| 咬肌 | 颞肌 | 翼内肌 | 翼外肌 |
| 舌和颈的肌肉 | | | |
| 颞舌肌 | 茎突舌肌 | 腭舌肌 | 舌骨舌肌 |
| 二腹肌 | 茎突舌骨肌 | 下颌舌骨肌 | 颌舌骨肌 |
| 肩胛舌骨肌 | 胸骨舌骨肌 | 胸骨甲状肌 | 甲状舌骨肌 |
| 胸锁乳突肌 | 前斜角肌 | 中斜角肌 | 后斜角肌 |
| 胸部、胸带和手臂的肌肉 | | | |
| 锁骨下肌 | 胸大肌 | 胸小肌 | 腹直肌 |
| 腹外斜肌 | 腹内斜肌 | 腹横肌 | 膈 |
| 外肋间肌 | 内肋间肌 | 前锯肌 | 斜方肌 |
| 肩胛提肌 | 大菱形肌 | 小菱形肌 | 背阔肌 |
| 三角肌 | 肩胛下肌 | 冈上肌 | 冈下肌 |
| 大圆肌 | 小圆肌 | 喙肱肌 | |
| 手臂和肩部 | | | |
| 肱二头肌长头 | 肱二头肌短头 | 肱三头肌长头 | 肱三头肌外侧头 |
| 肱三头肌内侧头 | 肘肌 | 旋前圆肌 | 旋后肌 |
| 肱肌 | | | |
| 前臂肌肉: 腹侧和背侧 | | | |
| 肱桡肌 | 桡侧腕屈肌 | 尺侧腕屈肌 | 掌长肌 |
| 尺侧腕伸肌 | 桡侧腕长伸肌 | 桡侧腕短伸肌 | 指伸肌 |
| 小指伸肌 | 竖脊肌: 颈 | 竖脊肌: 脊柱 | 竖脊肌: 最长肌 |
| 竖脊肌: 髂骨肌 | | | |
| 手的内在肌: 鱼际, 拇短展肌, 拇短屈肌和拇对掌肌 | | | |
| 手的内在肌: 小鱼际, 小指展肌, 小指短屈肌和小指对掌肌 | | | |

[0099]

| | | | |
|--------------------------|------------|---------------|---------------|
| 手的内在肌: 骨间掌侧肌, 骨间背侧肌和蚯蚓状肌 | | | |
| 骨盆带和腿部的肌肉 | | | |
| 髂腰肌: 腰大肌 | 髂腰肌: 髂肌 | 股方肌 | 长收肌 |
| 短收肌 | 大收肌 | 股薄肌 | 缝匠肌 |
| 股四头肌: 股直肌 | 股四头肌: 股外侧肌 | 股四头肌: 股内侧肌 | 股四头肌: 股中间肌 |
| 腓肠肌 | 腓骨(腓)长肌 | 比目鱼肌 | 臀大肌 |
| 臀中肌 | 臀小肌 | 腘绳肌: 股二头肌: 长头 | 腘绳肌: 股二头肌: 短头 |
| 腘绳肌: 半腱肌 | 腘绳肌: 半膜肌 | 阔筋膜张肌 | 耻骨肌 |
| 胫骨前肌 | | | |
| 前腿和足部的肌肉 | | | |
| 趾长伸肌 | 拇长伸肌 | 腓骨短肌 | 跖肌 |
| 胫骨后肌 | 拇长屈肌 | 趾短伸肌 | 拇短伸肌 |
| 拇展肌 | 拇短屈肌 | 小指展肌 | 小指屈肌 |
| 小指对掌肌 | 趾短伸肌 | 脚的蚯蚓状肌 | 足底方肌或副屈肌 |
| 趾短屈肌 | 背侧骨间肌 | 足底骨间肌 | |

[0101] 肌营养不良症

[0102] 肌营养不良症是一组遗传性疾病,其导致肌肉退化,从而引起运动虚弱和受损。所有肌营养不良症的一个主要特征是它们本质上是进行性的。肌营养不良症包括但不限于:杜氏肌营养不良症(DMD),Becker肌营养不良症,Emery-Dreifuss肌营养不良症,面肩肱型肌营养不良症,肢带肌营养不良症和1型和2型肌强直性营养不良,包括先天性形式肌强直性营养不良类型1。症状可能因肌肉萎缩症的类型而有所不同(部分或全部肌肉受到影响)。肌营养不良症的示例性症状包括肌肉运动技能的延迟发展,使用一个或多个肌肉群的困难,吞咽、说话或进食困难,流口水,眼睑下垂,频繁跌倒,成人肌肉或肌肉群体的力量丧失,肌肉尺寸丢失,由于身体虚弱或身体生物力学改变而导致的行走问题,肌肉肥大,肌肉假性肥大,肌肉脂肪浸润,非收缩组织肌肉替代(如肌纤维化),肌肉坏死和/或认知或行为障碍/精神发育迟滞。

[0103] 虽然没有已知的治疗肌营养不良症的方法,但使用了几种支持性治疗方法,包括对症治疗和疾病改善治疗。用于ADL和肺功能的皮质类固醇、物理疗法、矫形装置、轮椅或其他辅助医疗装置通常用于肌营养不良症。心脏起搏器用于预防强直性肌营养不良中心律失常的猝死。改善肌强直症症状(无法放松)的抗肌强直药包括mexilitine,在某些情况下包括苯妥英、普鲁卡因酰胺和奎宁。

[0104] 杜氏肌营养不良症

[0105] 杜氏肌营养不良症 (DMD) 是肌营养不良症的隐性X连锁形式,其导致肌肉退化和最终死亡。DMD的特征在于近端肌无力、步态异常、腓肠肌(小腿)肌肉中的假性肥大和肌酸激酶(CK)升高。许多DMD患者在5岁左右被诊断出来,此时症状/体征通常变得更加明显。由于心肺功能障碍,受影响的个体通常在10-13岁左右停止行走并在20岁中期至晚期死亡或在这之前死亡。

[0106] DMD疾病是由位于人类X染色体上的肌营养不良蛋白基因突变引起的,该基因编码肌营养不良蛋白,其是肌肉组织中为细胞膜的肌营养不良蛋白复合物(DGC)提供结构稳定性的重要结构组分。肌营养不良蛋白连接内部细胞质肌动蛋白丝网和细胞外基质,为肌纤维提供物理强度。因此,肌营养不良蛋白的改变或缺失导致肌纤维膜异常撕裂和肌纤维坏死。虽然雄性和雌性都可以携带突变,但雌性很少表现出严重的疾病迹象。

[0107] DMD的主要症状是与肌肉萎缩相关的肌无力,通常首先影响随意肌,特别是影响臀部、骨盆区域、大腿、肩部和小腿肌肉的肌肉。肌无力也发生在手臂、颈部和其他部位。腓经常被扩大。症状和体征通常出现在6岁之前,并且可能出现在婴儿期。其他身体症状包括但不限于独立行走的延迟能力,步行、踏步或跑步的前进困难,以及最终丧失行走能力(通常在15岁时);经常跌倒;疲劳;运动技能(跑步,单脚跳,跳跃)的困难;增加的腰椎前凸,导致髋屈肌缩短;损害功能的跟腱和腿筋挛缩,因为肌纤维缩短和纤维化发生在结缔组织;肌纤维畸形;由脂肪和结缔组织替代肌肉组织引起的舌和小腿肌肉的假性肥大(肿大);神经行为障碍(例如ADHD)、学习障碍(阅读障碍)和特定认知技能(特别是短期言语记忆)的非进行性削弱的风险升高;骨骼畸形(在某些情况下包括脊柱侧凸)。

[0108] 重组卵泡抑素蛋白

[0109] 如本文所用,适用于本发明的重组卵泡抑素蛋白包括任何野生型和经修饰的卵泡抑素蛋白(例如,具有氨基酸突变、缺失、插入的卵泡抑素蛋白和/或融合蛋白),其保留基本的卵泡抑素生物活性。通常,使用重组技术产生重组卵泡抑素蛋白。然而,根据本发明,可以使用从天然资源纯化或化学合成的卵泡抑素蛋白(野生型或经修饰的)。通常,合适的重组卵泡抑素蛋白具有的体内半衰期为或大于约12小时、18小时、24小时、36小时、2天、2.5天、3天、3.5天、4天、4.5天、5天、5.5天、6天、6.5天、7天、7.5天、8天、8.5天、9天、9.5天或10天。在一些实施例中,重组卵泡抑素蛋白具有以下范围内的体内半衰期:0.5至10天、1天至10天、1天至9天、1天至8天、1天至7天、1天至6天、1天至5天、1天至4天、1天至3天、2天至10天、2天至9天、2天至8天、2天至7天、2天至6天、2天至5天、2天至4天、2天至3天、2.5天至10天、2.5天至9天、2.5天至8天、2.5天至7天、2.5天至6天、2.5天至5天、2.5天至4天、3天至10天、3天至9天、3天至8天、3天至7天、3天至6天、3天至5天、3天至4天、3.5天至10天、3.5天至9天、3.5天至8天、3.5天至7天、3.5天至6天、3.5天至5天、3.5天至4天、4天至10天、4天至9天、4天至8天、4天至7天、4天至6天、4天至5天、4.5天至10天、4.5天至9天、4.5天至8天、4.5天至7天、4.5天至6天、4.5天至5天、5天至10天、5天至9天、5天至8天、5天至7天、5天至6天、5.5天至10天、5.5天至9天、5.5天至8天、5.5天至7天、5.5天至6天、6天至10天、7天至10天、8天至10天、9天至10天。

[0110] 卵泡抑素(FS)首先从卵泡液中分离出来,作为能够抑制垂体细胞卵泡刺激素(FSH)分泌的蛋白因子。FS至少部分地通过激活素的结合和中和发挥其对FSH的影响。

[0111] 至少有三种FS同种型:FS288,FS303和FS315(表3)。全长FS315蛋白包含由外显子6

编码的酸性26-残基C-末端尾部 (SEQ ID NO:2, C-末端尾部是单下划线的)。在一些情况下, FS315同种型可包含信号序列 (SEQ ID NO:1, 信号序列以粗体和斜体表示)。FS288同种型通过C末端的可变剪接产生, 因此以外显子5结束 (SEQ ID NO:5)。卵泡抑素蛋白具有独特的结构, 其由包含对激活素结合重要的疏水残基的63个氨基酸的N-末端区域组成, 其中蛋白的主要部分 (残基64-288, 例如如SEQ ID NO:2所示) 包含三个10-半胱氨酸FS结构域, 每个约73-75个氨基酸。这些10-半胱氨酸结构域 (从N-末端到C-末端) 分别称为结构域1、结构域2和结构域3 (即FSD1, FSD2和FSD3)。由于存在肝素结合结构域, FS288倾向于组织结合, 而FS315倾向于是循环形式, 可能是因为肝素结合结构域被延伸的C-末端掩盖。认为FS303 (SEQ ID NO:4) 是通过从FS315蛋白水解切割C末端结构域而产生的。在一些情况下, FS303同种型可包含信号序列 (SEQ ID NO:3, 信号序列以粗体和斜体表示)。FS303具有在FS288和FS315之间中等水平的细胞表面结合。

[0112] 肝素结合结构域或序列 (例如, HBS) 包含对应于FS315的残基75-86的氨基酸, 并且在FSD1内, 如例如SEQ ID NO:2中所示。HBS由双下划线指定。FS303和FS288蛋白还包含相应氨基酸的HBS (也用双下划线表示)。该区域内氨基酸的突变、缺失或取代可以减少或消除肝素结合, 从而减少清除并改善治疗性卵泡抑素-Fc融合蛋白的半衰期。

[0113] 在一些实施方案中, 用具有较少正电荷的氨基酸取代HBS内的至少一个或多个氨基酸导致重组卵泡抑素蛋白具有降低的肝素结合亲和力。在一些实施方案中, 用具有更中性或阴性电荷的氨基酸取代HBS内的至少一个或多个氨基酸导致重组卵泡抑素蛋白具有降低的肝素结合亲和力。在一些实施方案中, 与原始氨基酸相比, 具有降低电荷的氨基酸取代导致重组卵泡抑素蛋白具有降低的肝素结合亲和力。在一些实施方案中, 用具有较少正电荷、中性电荷、较多负电荷或减少的电荷的氨基酸对HBS中存在的氨基酸的1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个取代导致重组卵泡抑素蛋白具有降低的肝素结合亲和力。在一些实施方案中, 用具有较少正电荷、中性电荷、较多负电荷或减少的电荷的氨基酸对HBS中存在的氨基酸的1、2或3个取代导致重组卵泡抑素蛋白具有降低的肝素结合亲和力。在一些实施方案中, 用较少正电荷的氨基酸、中性氨基酸、带负电荷的氨基酸或减少电荷的氨基酸取代HBS中的多于一个氨基酸导致对应于氨基酸取代量的逐渐降低的肝素结合。例如, 与用具有较少的正电荷、中性电荷、较多负电荷或减少电荷的氨基酸仅取代HBS中的2个氨基酸相比, 用具有较少正电荷、中性电荷、较多负电荷或减少电荷的氨基酸取代HBS中的3个氨基酸导致重组卵泡抑素蛋白的较少的肝素结合。作为另一个例子, 与用具有较少的正电荷、中性电荷、较多负电荷或减少电荷的氨基酸仅取代HBS中的1个氨基酸相比, 用具有较少正电荷、中性电荷、较多负电荷或减少电荷的氨基酸取代HBS中的2个氨基酸导致重组卵泡抑素蛋白的较少的肝素结合。

[0114] 本领域技术人员将认识到, 与其他氨基酸相比, 某些氨基酸带较少的正电荷、是中性的、带负电荷或具有降低的电荷。可以基于净电荷分离氨基酸, 如通过氨基酸的等电点所示的。等电点是氨基酸分子的平均净电荷为零时的pH。当 $pH > pI$ 时, 氨基酸具有净负电荷, 而当 $pH < pI$ 时, 氨基酸具有净正电荷。在一些实施方案中, 重组卵泡抑素蛋白的测量的pI值为约3至9 (例如3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5和9) 以及它们之间的任何值。在一些实施方案中, 重组卵泡抑素蛋白的测量的pI值为约4至7 (例如4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0) 以及它们之间的任何值。氨基酸的示例性等电点显

示在下表2中。通常,具有带正电荷侧链的氨基酸包括例如精氨酸(R),组氨酸(H)和赖氨酸(K)。具有带负电侧链的氨基酸包括例如天冬氨酸(D)和谷氨酸(E)。具有极性的氨基酸包括,例如,丝氨酸(S),苏氨酸(T),天冬酰胺(N),谷氨酰胺(Q)和半胱氨酸(C),酪氨酸(Y)和色氨酸(W)。非极性氨基酸包括,例如,丙氨酸(A),缬氨酸(V),异亮氨酸(I),亮氨酸(L),甲硫氨酸(M),苯丙氨酸(F),甘氨酸(G)和脯氨酸(P)。

[0115] 在一些实施方案中,HBS中的点突变包括HBS中一个或多个赖氨酸(K)残基的一个或多个取代。例如,一个或多个(例如1、2、3、4、5)赖氨酸残基取代卵泡抑素多肽的HBS中的另一个氨基酸。HBS包含对应于FS315的残基75-86的氨基酸,即残基KKCRMNKKNKPR。在一些实施方案中,用赖氨酸(K)氨基酸取代一个或多个带负电荷的氨基酸(例如谷氨酸(E)和/或天冬氨酸(D))导致重组卵泡抑素多肽的总电荷改变,称为pI转变。在一些实施方案中,卵泡抑素分子的总电荷的变化改善了体内清除率和半衰期。在一个实施方案中,重组卵泡抑素多肽的总电荷的变化减慢了体内清除。在一些实施方案中,用一个或多个赖氨酸(K)氨基酸取代一个或多个带负电荷的氨基酸(例如谷氨酸(E)和/或天冬氨酸(D))导致重组卵泡抑素分子的总电荷改变。在一些实施方案中,用一个或多个赖氨酸(K)氨基酸取代一个或多个带负电荷的氨基酸(例如谷氨酸(E)和/或天冬氨酸(D))导致在重组卵泡抑素多肽的表达过程中的高分子量物质的量减少。在一些实施方案中,用一个或多个赖氨酸(K)氨基酸取代一个或多个带负电荷的氨基酸(例如谷氨酸(E)和/或天冬氨酸(D))导致重组卵泡抑素多肽的表达增加

[0116] 表2,氨基酸等电点

[0117]

| 氨基酸 | 单字母缩写 | pI (等电点) |
|------|-------|----------|
| 丙氨酸 | A | 6.0 |
| 精氨酸 | R | 10.76 |
| 天冬酰胺 | N | 5.41 |
| 天冬氨酸 | D | 2.77 |
| 半胱氨酸 | C | 5.07 |
| 谷氨酸 | E | 3.22 |
| 谷氨酰胺 | Q | 5.65 |
| 甘氨酸 | G | 5.97 |
| 组氨酸 | H | 7.59 |

| | | | |
|--------|------|---|------|
| [0118] | 异亮氨酸 | I | 6.02 |
| | 亮氨酸 | L | 5.98 |
| | 赖氨酸 | K | 9.74 |
| | 甲硫氨酸 | M | 5.74 |
| | 苯丙氨酸 | F | 5.48 |
| | 脯氨酸 | P | 6.30 |
| | 丝氨酸 | S | 5.58 |
| | 苏氨酸 | T | 5.60 |
| | 色氨酸 | W | 5.89 |
| | 酪氨酸 | Y | 5.66 |
| | 缬氨酸 | V | 5.96 |

[0119] 已经显示FS在体外抑制肌生长抑制素和活化素,并且这种抑制可以导致小鼠体内肌肉肥大(Lee等人,Regulation of Muscle Mass by Follistatin and Activins,(2010),Mol.Endocrinol.,24(10):1998-2008;Gilson等人,Follistatin Induces Muscle Hypertrophy Through Satellite Cell Proliferation and Inhibition of Both Myostatin and Activin,(2009),J.Physiol.Endocrinol.,297(1):E157-E164)。不希望受特定理论束缚,这种观察到的效果可能至少部分是由于FS阻止肌生长抑制素和激活素激活Smad2/3途径。已显示Smad2/3途径的激活导致肌肉生长的负调节(Zhu等人,Follistatin Improves Skeletal Muscle Healing After Injury and Disease Through an Interaction with Muscle Regeneration,Angiogenesis,and Fibrosis,(2011),Musculoskeletal Pathology,179(2):915-930)。

[0120] 表3中显示了典型的野生型或天然存在的人FS315、FS303和FS288蛋白的氨基酸序列。

[0121] 表3. 示例性人卵泡抑素同种型

[0122]

| 同种型 | 卵泡抑素同种型序列 |
|--------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 具有信号序列的FS315 | <i>MVRARHQPGGLLLLLLLCQFMEDRSAQAGNCWLRQ AKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDN TLFKWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKKCRMNK KNKPRCVCAPDCSNITWKGPVCGLDGKTYRNECALL KARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQ TNNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLR KATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWD FKVGRGRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECA MKEAACSSGVLLLEVKHSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDY</i> |

[0123]

| | |
|----------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| | SFPISSILEW (SEQ ID NO:1) |
| FS315 | GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWT EEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPG <u>KKCRMNKKNKPRCVCAPDCSNITWKGPVCGLDGKTY</u> RNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGS STCVVDQTNNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVT YSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCT GGKKCLWDFKVGRGRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDN ATYASECAMKEAACSSGVLLEVKHSGSCNSISEDTEEE <u>EEDEDQDYSFPISSILEW (SEQ ID NO:2)</u> |
| 具有信号序列的 FS303 | <i>MVRARHQPGGLLLLLLLCQFMEDRSAQ</i> AGNCWLRQ AKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDN TLFKWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPG <u>KKCRMNK</u> <u>KNKPRCVCAPDCSNITWKGPVCGLDGKTYRNECALL</u> KARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQ TNNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLR KATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWD FKVGRGRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECA MKEAACSSGVLLEVKHSGSCNSISEDTEEEEEDEDQ (SEQ ID NO:3) |
| FS303 | GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWT EEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPG <u>KKCRMNKKNKPRCVCAPDCSNITWKGPVCGLDGKTY</u> RNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGS STCVVDQTNNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVT YSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCT GGKKCLWDFKVGRGRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDN ATYASECAMKEAACSSGVLLEVKHSGSCNSISEDTEEE EEDEDQ (SEQ ID NO:4) |
| 具有信号序列的 FS288 | <i>MVRARHQPGGLLLLLLLCQFMEDRSAQ</i> AGNCWLRQ AKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDN TLFKWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPG <u>KKCRMNK</u> <u>KNKPRCVCAPDCSNITWKGPVCGLDGKTYRNECALL</u> KARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQ TNNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLR |

[0124]

| | |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| | KATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWD FKVGRGRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECA MKEAACSSGVLLLEVKHSGSCN (SEQ ID NO: 119) |
| FS288 | GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWT EEDVNDNTLTKWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPG <u>KKCRMNKKNKPRCVCAPDCSNITWKGPVCGLDGKTY</u> RNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGS STCVVDQTNNAVCVTCNRICPEPASSEQYLGCNDGVT YSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCT GGKKCLWDFKVGRGRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDN ATYASECAMKEAACSSGVLLLEVKHSGSCN (SEQ ID NO:5) |

[0125] 因此,在一些实施方案中,适用于本发明的重组卵泡抑素蛋白是人FS315 (SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2)。如本文公开的,SEQ ID NO:2代表人卵泡抑素蛋白的经典氨基酸序列。在一些实施方案中,卵泡抑素蛋白可以是剪接同种型或蛋白水解变体,例如FS303 (SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:4)。在一些实施方案中,卵泡抑素蛋白可以是剪接同种型,例如FS288 (SEQ ID NO:5)。在一些实施例中,合适的重组卵泡抑素蛋白可以为野生型或天然存在的蛋白质的同源物或相似物。例如,与野生型或天然存在的卵泡抑素蛋白相比,人野生型或天然存在的卵泡抑素蛋白的同源物或类似物可含有一个或多个氨基酸或结构域取代、缺失和/或插入(例如,SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5),同时保留基本的卵泡抑素蛋白活性(例如肌生长抑制素或激活素抑制)。因此,在一些实施方案中,适用于本发明的重组卵泡抑素蛋白与人FS315卵泡抑素蛋白 (SEQ ID NO:1) 基本同源。在一些实施例中,适合于本发明的重组卵泡抑素蛋白具有与SEQ ID NO:1至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更同源的氨基酸序列。在一些实施方案中,适用于本发明的重组卵泡抑素蛋白与人FS315卵泡抑素蛋白 (SEQ ID NO:1) 基本相同。在一些实施例中,适合于本发明的重组卵泡抑素蛋白具有与SEQ ID NO:1至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更相同的氨基酸序列。

[0126] 在一些实施方案中,适用于本发明的重组卵泡抑素蛋白与人FS315卵泡抑素蛋白 (SEQ ID NO:2) 基本同源。在一些实施例中,适合于本发明的重组卵泡抑素蛋白具有与SEQ ID NO:2至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更同源的氨基酸序列。在一些实施方案中,适用于本发明的重组卵泡抑素蛋白与人FS315卵泡抑素蛋白 (SEQ ID NO:2) 基本相同。在一些实施例中,适合于本发明的重组卵泡抑素蛋白具有与SEQ ID NO:2至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更相同的氨基酸序列。

[0127] 在一些实施方案中,适用于本发明的重组卵泡抑素蛋白与人FS303卵泡抑素蛋白(SEQ ID NO:3)基本同源。在一些实施例中,适合于本发明的重组卵泡抑素蛋白具有与SEQ ID NO:3至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更同源的氨基酸序列。在一些实施方案中,适用于本发明的重组卵泡抑素蛋白与人FS303卵泡抑素蛋白(SEQ ID NO:3)基本相同。在一些实施例中,适合于本发明的重组卵泡抑素蛋白具有与SEQ ID NO:3至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更相同的氨基酸序列。

[0128] 在一些实施方案中,适用于本发明的重组卵泡抑素蛋白与人FS303卵泡抑素蛋白(SEQ ID NO:4)基本同源。在一些实施例中,适合于本发明的重组卵泡抑素蛋白具有与SEQ ID NO:4至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更同源的氨基酸序列。在一些实施方案中,适用于本发明的重组卵泡抑素蛋白与人FS303卵泡抑素蛋白(SEQ ID NO:4)基本相同。在一些实施例中,适合于本发明的重组卵泡抑素蛋白具有与SEQ ID NO:4至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更相同的氨基酸序列。

[0129] 因此,在一些实施方案中,适用于本发明的重组卵泡抑素蛋白与人FS288卵泡抑素蛋白(SEQ ID NO:5)基本同源。在一些实施例中,适合于本发明的重组卵泡抑素蛋白具有与SEQ ID NO:5至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更同源的氨基酸序列。在一些实施方案中,适用于本发明的重组卵泡抑素蛋白与人FS288卵泡抑素蛋白(SEQ ID NO:5)基本相同。在一些实施例中,适合于本发明的重组卵泡抑素蛋白具有与SEQ ID NO:5至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更相同的氨基酸序列。

[0130] 人卵泡抑素蛋白的同源物或相似物可根据本领域普通技术人员已知的用于改变多肽序列的方法来制备,所述方法例如在编译此类方法的参考文献中发现的。如本领域普通技术人员应了解的,如果两个序列在相应位置含有同源残基,则它们一般视为“基本同源的”。同源残基可以为相同的残基。可替代地,同源残基可以为具有适当相似的结构和/或功能特征的不相同的残基。例如,如本领域普通技术人员众所周知的,某些氨基酸通常被分类为“疏水”或“亲水”氨基酸,和/或具有“极性”或“非极性”侧链。一种氨基酸取代相同类型的另一种氨基酸可经常被视为“同源”取代。在一些实施例中,氨基酸的保守取代包括在下述组内的氨基酸中进行的取代:(a)M、I、L、V;(b)F、Y、W;(c)K、R、H;(d)A、G;(e)S、T;(f)Q、N;以及(g)E、D。在一些实施例中,“保守氨基酸取代”指不改变其中进行氨基酸取代的蛋白质的相对电荷或尺寸特征的氨基酸取代。

[0131] 如本领域众所周知的,可使用各种算法中的任一种比较氨基酸或核酸序列,所述算法包括可在商业计算机程序中获得的那些算法,例如用于核苷酸序列和BLASTP的BLASTN、缺口BLAST和用于氨基酸序列的PSI-BLAST。示例性的这种程序在以下中描述:Altschul等人,Basic local alignment search tool,J.Mol.Biol.,215(3):403-410,1990;Altschul等人,Methods in Enzymology;Altschul等人,“Gapped BLAST and PSI-

BLAST:a new generation of protein database search programs”,Nucleic Acids Res.25:3389-3402,1997;Baxevanis等人,Bioinformatics:A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins,Wiley,1998;和Misener等人,(编辑),Bioinformatics Methods and Protocols(Methods in Molecular Biology,第132卷),Humana Press,1999.除鉴定同源序列之外,上述程序通常提供同源性程度的指示。

[0132] 在一些实施方案中,与野生型人卵泡抑素蛋白相比,适用于本发明的重组卵泡抑素蛋白含有一个或多个氨基酸缺失、插入或取代。例如,合适的重组卵泡抑素蛋白可以含有表4中提供的氨基酸缺失、插入和/或取代。示例性氨基酸缺失、插入和/或取代在对应于SEQ ID NO:2的FS315中举例说明。在一些实施方案中,在包含信号序列的FS315(例如,SEQ ID NO:1)、FS303(例如,SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:4)或FS288(例如,SEQ ID NO:5)中在相应位置可以存在相同的缺失、插入或取代。

[0133] 表4. 示例性重组卵泡抑素蛋白

[0134]

| 序列 ID No. (突变的描述*) | 示例性重组卵泡抑素蛋白 |
|-----------------------|-------------|
|-----------------------|-------------|

[0135]

| | |
|-------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>SEQ ID NO: 12 (氨基酸 75 至 86 的缺失; 断点由^^表示)</p> | <p>GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEE DVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIP CKETCENVDCGPGCVCAPDCSNITWKGPVCGLDGKTYRN ^^ ECALLKARCKEQPELEVQYQGR CKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTNNAYCVTCNRICPEPASSE QYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAK SCEDIQCTGGKKCLWDFKVGRGRCSLCDELCPDSKSDEP VCASDNATYASECAMKEAACSSGVLLEVKHSGSCNSISED TEEEEEDEDQDYSFPISSILEW</p> |
| <p>SEQ ID NO:13 (氨基酸 75 至 84 的缺失和 QSCVVDQTS 的插入(SEQ ID NO:14)**</p> | <p>GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEE DVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGQSCV VDQTGSPRCVCAPDCSNITWKGPVCGLDGKTYRNECALL KARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTN NAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKATC LLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGRG RCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSG VLEVKHSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISSILEW</p> |
| <p>SEQ ID NO:15 (K(81,82)A)</p> | <p>GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEE DVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKKCR MNAANKPRCVCAPDCSNITWKGPVCGLDGKTYRNECAL LKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTN NAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKAT CLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGR GRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSS GVLEVKHSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISSILEW</p> |
| <p>SEQ ID NO:16 (K(76,81,82)A)</p> | <p>GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEE DVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKACR MNAANKPRCVCAPDCSNITWKGPVCGLDGKTYRNECAL LKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTN NAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKAT CLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGR GRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSS GVLEVKHSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISSILEW</p> |

[0136]

| | |
|--------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| SEQ ID NO:17 (K82E) | GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEE DVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGK K CR MNKENKPRVCAPDCSNITWKGPVCGLDGKTYRNECAL LKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQT NNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKAT CLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGR GRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSS GVLLEVKHSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISILEW |
| SEQ ID NO:18 (K(75,76)E) | GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEE DVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPG E ECR MNKKNKPRVCAPDCSNITWKGPVCGLDGKTYRNECAL LKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQT NNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKAT CLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGR GRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSS GVLLEVKHSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISILEW |
| SEQ ID NO:19 (K(76,82)E) | GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEE DVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGK E CR MNKENKPRVCAPDCSNITWKGPVCGLDGKTYRNECAL LKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQT NNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKAT CLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGR GRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSS GVLLEVKHSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISILEW |
| SEQ ID NO:20 (K(81,82)E) | GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEE DVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGK K CR MNEENKPRVCAPDCSNITWKGPVCGLDGKTYRNECALL KARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTN NAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKATC LLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGRG RCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSG VLLEVKHSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISILEW |
| SEQ ID NO:21 (K(76,81,82)E) | GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEE DVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGK E CR MNEENKPRVCAPDCSNITWKGPVCGLDGKTYRNECALL |

[0137]

| | |
|-----------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| | KARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTN NAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVITYSSACHLRKATC LLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGRG RCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSG VLLEVKHSGSCNSISEDTEEEEEDEDEDQDYSFPISILEW |
| SEQ ID NO:22 (K(76,81,82)E/ V88E) | GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEE DVNDNTLFLKWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKECR MNEENKPRCECAPDCSNITWKGPVCGLDGKTYRNECALL KARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTN NAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVITYSSACHLRKATC LLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGRG RCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSG VLLEVKHSGSCNSISEDTEEEEEDEDEDQDYSFPISILEW |
| SEQ ID NO:23 (K84E) | GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEE DVNDNTLFLKWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKCCR MNKKNPRCVCAPDCSNITWKGPVCGLDGKTYRNECAL LKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQT NNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVITYSSACHLRKAT CLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGR GRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSS GVLLEVKHSGSCNSISEDTEEEEEDEDEDQDYSFPISILEW |
| SEQ ID NO:24 (K(76,84)E) | GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEE DVNDNTLFLKWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKECR MNKKNPRCVCAPDCSNITWKGPVCGLDGKTYRNECAL LKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQT NNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVITYSSACHLRKAT CLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGR GRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSS GVLLEVKHSGSCNSISEDTEEEEEDEDEDQDYSFPISILEW |
| SEQ ID NO:25 (K(82,84)E) | GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEE DVNDNTLFLKWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKCCR MNKENPRCVCAPDCSNITWKGPVCGLDGKTYRNECALL KARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTN NAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVITYSSACHLRKATC LLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGRG |

[0138]

| | |
|---------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| | RCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSG VLLEVKHSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISILEW |
| SEQ ID NO:26 (R78E/K84E) | GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEE DVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKKCE MNKKN <u>E</u> PRCVCAPDCSNITWKGPVCGLDGKTYRNECAL LKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQT NNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVITYSSACHLRKAT CLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGR GRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSS GVLLEVKHSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISILEW |
| SEQ ID NO:27 (K(76,82,84)E) | GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEE DVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKECR MNK <u>E</u> PRCVCAPDCSNITWKGPVCGLDGKTYRNECALL KARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTN NAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVITYSSACHLRKATC LLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGRG RCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSG VLLEVKHSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISILEW |
| SEQ ID NO:28 (R78E/K82E) | GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEE DVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKKCE MNK <u>E</u> NKPRCVCAPDCSNITWKGPVCGLDGKTYRNECAL LKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQT NNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVITYSSACHLRKAT CLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGR GRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSS GVLLEVKHSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISILEW |
| SEQ ID NO:29 (R78E/K(82,84))E) | GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEE DVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKKCE MNK <u>E</u> PRCVCAPDCSNITWKGPVCGLDGKTYRNECALL KARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTN NAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVITYSSACHLRKATC LLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGRG RCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSG VLLEVKHSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISILEW |
| SEQ ID NO:30 | GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEE |

[0139]

| | |
|------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| K(76,81)E) | DVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKE <u>C</u> R MNE <u>K</u> NKPRVCAPDCSNITWKGPVCGLDGKTYRNECAL LKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQT NNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKAT CLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGR GRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSS GVLLEVKHSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISILEW |
| SEQ ID NO:31 (K82T)# | GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEE DVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKKCR MNK <u>T</u> NKPRVCAPDCSNITWKGPVCGLDGKTYRNECAL LKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQT NNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKAT CLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGR GRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSS GVLLEVKHSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISILEW |
| SEQ ID NO:32 (P85T)# | GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEE DVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKKCR MNKKNK <u>T</u> RCVAPDCSNITWKGPVCGLDGKTYRNECAL LKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQT NNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKAT CLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGR GRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSS GVLLEVKHSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISILEW |
| SEQ ID NO:33 (R78N/N80T)# | GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEE DVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKK <u>C</u> N M <u>T</u> KKNKPRVCAPDCSNITWKGPVCGLDGKTYRNECAL LKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQT NNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKAT CLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGR GRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSS GVLLEVKHSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISILEW |
| SEQ ID NO:34 (R86N/V88T)# | GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEE DVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKKCR MNKKNK <u>P</u> <u>N</u> <u>C</u> <u>T</u> CAPDCSNITWKGPVCGLDGKTYRNECAL LKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQT |

[0140]

| | |
|------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| | <p>NNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVITYSSACHLRKAT CLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGR GRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSS GVLLEVKHSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISILEW</p> |
| <p>SEQ ID NO:35 (K75N/C77T/K 82T)#</p> | <p>GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEE DVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPN<u>K</u><u>T</u><u>R</u> MNK<u>T</u><u>N</u>KPRCVCAPDCSNITWKGPVCGLDGKTYRNECAL LKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQT NNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVITYSSACHLRKAT CLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGR GRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSS GVLLEVKHSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISILEW</p> |
| <p>SEQ ID NO:36 (G74N/K76S)#</p> | <p>GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEE DVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPN<u>K</u><u>S</u><u>C</u><u>R</u> MNKKNKPRCVCAPDCSNITWKGPVCGLDGKTYRNECAL LKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQT NNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVITYSSACHLRKAT CLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGR GRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSS GVLLEVKHSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISILEW</p> |
| <p>SEQ ID NO:37 (G74N/K76T)#</p> | <p>GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEE DVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPN<u>K</u><u>T</u><u>C</u><u>R</u> MNKKNKPRCVCAPDCSNITWKGPVCGLDGKTYRNECAL LKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQT NNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVITYSSACHLRKAT CLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGR GRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSS GVLLEVKHSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISILEW</p> |
| <p>SEQ ID NO:38 (G74N/K76T/P 85T)#</p> | <p>GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEE DVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPN<u>K</u><u>T</u><u>C</u><u>R</u> MNKKNK<u>T</u><u>R</u>CVCAPDCSNITWKGPVCGLDGKTYRNECAL LKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQT NNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVITYSSACHLRKAT CLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGR GRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSS</p> |

[0141]

| | |
|----------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| | GVLLEVKHS G SCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFP I SSILEW |
| SEQ ID NO:39 (C66S/K75N/C77T)# | GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEE DVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPCKETS E ENVDCGPGN K TR MNKKNKPRCVCAPDCSNITWKGPVCGLDGKTYRNECAL LKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQT NNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKAT CLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGR GRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSS GVLLEVKHS G SCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFP I SSILEW |
| SEQ ID NO:40 (C66A/K75N/C77T)# | GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEE DVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPCKETA E ENVDCGPGN K TR MNKKNKPRCVCAPDCSNITWKGPVCGLDGKTYRNECAL LKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQT NNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKAT CLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGR GRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSS GVLLEVKHS G SCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFP I SSILEW |
| SEQ ID NO: 101 (K75N/C77S/K82T)# | GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEE DVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPCKETC E ENVDCGPGN K SR MNK T NKPRCVCAPDCSNITWKGPVCGLDGKTYRNECAL LKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQT NNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKAT CLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGR GRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSS GVLLEVKHS G SCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFP I SSILEW |
| SEQ ID NO: 102 (C66S/K75N/C77S)# | GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEE DVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPCKETS E ENVDCGPGN K SR MNKKNKPRCVCAPDCSNITWKGPVCGLDGKTYRNECAL LKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQT NNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKAT CLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGR GRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSS GVLLEVKHS G SCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFP I SSILEW |
| SEQ ID NO: 103 | GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEE DVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPCKETA E ENVDCGPGN K SR |

[0142]

| | |
|-----------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| (C66A/K75N/C77S)# | MNKKNKPRVCAPDCSNITWKGPVCGLDGKTYRNECAL LKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQT NNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVITYSSACHLRKAT CLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGR GRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSS GVLLEVKHSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISILEW |
| SEQ ID NO: 104 K(81,82)D | GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEE DVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKKCR <u>MNDD</u> NKPRVCAPDCSNITWKGPVCGLDGKTYRNECAL LKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQT NNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVITYSSACHLRKAT CLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGR GRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSS GVLLEVKHSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISILEW |
| SEQ ID NO: 105 K(76,81,82)D | GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEE DVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGK <u>DCR</u> <u>MNDD</u> NKPRVCAPDCSNITWKGPVCGLDGKTYRNECAL LKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQT NNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVITYSSACHLRKAT CLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGR GRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSS GVLLEVKHSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISILEW |
| SEQ ID NO: 106 K(76,82)D | GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEE DVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGK <u>DCR</u> <u>MNKD</u> NKPRVCAPDCSNITWKGPVCGLDGKTYRNECAL LKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQT NNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVITYSSACHLRKAT CLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGR GRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSS GVLLEVKHSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISILEW |

[0143] *氨基酸的编号对应于FS315序列(例如,SEQ ID NO:2);与野生型FS315序列相比的氨基酸变化标有下划线。

[0144] **QSCVVDQTGS的替换发表在J Pharmacol Exp Ther (2015) 354 (2) :238中。将其用作实验对照。

[0145] #高糖基化变体

[0146] 在一些实施方案中,适用于本发明的重组卵泡抑素蛋白包括具有N-X-T/S共有序

列的HBS区的高糖基化突变体。N-X-T/S共有序列是糖基化共有序列基序,其中X可以是除Asn (N) 和Thr (T) 或Asn (N) 和Ser (S) 之外的任何氨基酸。在一些实施方案中,糖基化共有序列的添加掩蔽、削弱或阻止肝素结合。在一些实施方案中,适用于本发明的重组卵泡抑素蛋白包含表5中提供的氨基酸序列,其对应于野生型人卵泡抑素蛋白FS315、FS303和FS288(例如,SEQ ID NO:2,SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5)的位置66至88。在一些实施方案中,高糖基化变体具有改善的PK参数。在一些实施方案中,如pI(等电点)所示,高糖基化变体不具有电荷的净变化。

[0147] 在一些实施方案中,卵泡抑素多肽内氨基酸的缺失、插入或取代在HBS内。在一些实施方案中,氨基酸的缺失、插入或取代在HBS附近或邻近,例如在HBS的N-末端或C-末端氨基酸的20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个氨基酸内。不希望受理论束缚,预期HBS内、附近或邻近的变化会降低肝素结合。预期降低的肝素结合可改善重组蛋白的药代动力学参数,例如体内血清半衰期。不希望受理论束缚,还预期HBS内、附近或邻近的变化可降低免疫原性和/或增加重组蛋白的表达。在一些实施方案中,重组卵泡抑素的表达增加与K75D、K75E、K76D、K76E、K81D、K81E、K81D或K82E HBS突变中的一种或多种一起存在。在一些实施方案中,重组卵泡抑素的表达增加与K82E HBS突变一起存在。在一些实施方案中,用至少一个具有较少正电荷的氨基酸残基取代HBS内的至少一个氨基酸残基(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个)可以降低通过重组卵泡抑素蛋白的肝素结合。

[0148] 在一些实施方案中,卵泡抑素多肽内的氨基酸取代在肝素结合区内引入共有糖基化位点(例如,K82T,P85T,R78N/N80T,R86N/V88T,K75N/C77T/K82T,G74N/K76S,G74N/K76T,G74N/K76T/P85T,C66S/K75N/C77T,C66A/K75N/C77T K75N/C77S/K82T,C66S/K75N/C77S,C66A/K75N/C77S)。预期氨基酸的后续糖基化掩盖肝素结合结构域,从而降低重组蛋白与肝素的结合。预期聚糖的存在也会掩盖取代的氨基酸,从而调节重组蛋白赋予的免疫原性的任何潜在增加。还预期高糖基化可改善重组蛋白的溶解度和/或半衰期。如表4、5和9中所示,显示了示例性的高糖基化变体。

[0149] 表5. 示例性FS序列

[0150]

| Sequence ID No. (突变的描述*) | 对应于野生型卵泡抑素的氨基酸 66 至 88 的 FS 序列* |
|-----------------------------|------------------------------------|
|-----------------------------|------------------------------------|

[0151]

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| FS-WT 氨基酸 66 至 88 SEQ ID NO: 107 | CENVDCGPGKKCRMNKKNKPRCV |
| FSdelHBS (FSD2) (FS315; FS303; FS288) SEQ ID NO: 108 | CENVDCGPGSTCVVDQTNNAYCV |
| FS315HBS (del75-86) SEQ ID NO: 109 | <u>CENVDCGPG</u> -----CV |
| SEQ ID NO:41 FS315delHBS/FSTL-D2 (氨基酸 75 至 84 的缺失和 QSCVVDQTGS 的插入(SEQ ID NO:14))** | CENVDCGPGQSCVVDQTGSPRCV |
| SEQ ID NO:42 (K(81,82)A) | CENVDCGPGKKCRMNA <u>ANK</u> PRCV |
| SEQ ID NO:43 (K(76,81,82)A) | CENVDCGPGK <u>AC</u> RMNA <u>ANK</u> PRCV |
| SEQ ID NO:44 (K82E) | CENVDCGPGKKCRMN <u>KEN</u> KPRCV |
| SEQ ID NO:45 (K(75,76)E) | CENVDCGPG <u>EE</u> CRMNKKNKPRCV |
| SEQ ID NO:46 (K(76,82)E) | CENVDCGPGK <u>E</u> CRMN <u>KEN</u> KPRCV |
| SEQ ID NO:47 (K(81,82)E) | CENVDCGPGKKCRMN <u>EE</u> NKPRCV |
| SEQ ID NO:48 (K(76,81,82)E) | CENVDCGPGK <u>E</u> CRMN <u>EE</u> NKPRCV |
| SEQ ID NO:49 (K(76,81,82)E/V88E) | CENVDCGPGK <u>E</u> CRMN <u>EE</u> NKPR <u>CE</u> |
| SEQ ID NO:50 (K84E) | CENVDCGPGKKCRMNKK <u>NE</u> PRCV |
| SEQ ID NO:51 (K(76,84)E) | CENVDCGPGK <u>E</u> CRMNKK <u>NE</u> PRCV |
| SEQ ID NO:52 (K(82,84)E) | CENVDCGPGKKCRMN <u>KEN</u> <u>NE</u> PRCV |
| SEQ ID NO:53 | CENVDCGPGKK <u>CE</u> MNKK <u>NE</u> PRCV |

[0152]

| | |
|-------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|
| (R78E/K84E) | |
| SEQ ID NO:54 (K(76,82,84)E) | CENVDCGPGK <u>E</u> CRM <u>N</u> K <u>E</u> NE <u>P</u> RCV |
| SEQ ID NO:55 (R78E/K82E) | CENVDCGPGK <u>K</u> CE <u>M</u> N <u>K</u> EN <u>K</u> PRCV |
| SEQ ID NO:56 (R78E/K(82,84)E) | CENVDCGPGK <u>K</u> CE <u>M</u> N <u>K</u> EN <u>E</u> PRCV |
| SEQ ID NO:57 (K(76,81)E) | CENVDCGPGK <u>E</u> CRM <u>N</u> E <u>K</u> KN <u>K</u> PRCV |
| SEQ ID NO:58 (K82T)# | CENVDCGPGK <u>K</u> CRM <u>N</u> K <u>T</u> KN <u>K</u> PRCV |
| SEQ ID NO:59 (P85T)# | CENVDCGPGK <u>K</u> CRM <u>N</u> K <u>K</u> KN <u>T</u> RCV |
| SEQ ID NO:60 (R78N/N80T)# | CENVDCGPGK <u>K</u> C <u>N</u> M <u>T</u> K <u>K</u> KN <u>K</u> PRCV |
| SEQ ID NO:61 (R86N/V88T)# | CENVDCGPGK <u>K</u> CRM <u>N</u> K <u>K</u> KN <u>P</u> <u>N</u> <u>C</u> <u>T</u> |
| SEQ ID NO:62 (K75N/C77T/K82T)# | CENVDCGPG <u>N</u> <u>K</u> <u>T</u> RM <u>N</u> K <u>T</u> KN <u>K</u> PRCV |
| SEQ ID NO:63 (G74N/K76S)# | CENVDCG <u>P</u> <u>N</u> <u>K</u> <u>S</u> CRM <u>N</u> K <u>K</u> KN <u>K</u> PRCV |
| SEQ ID NO:64 (G74N/K76T)# | CENVDCG <u>P</u> <u>N</u> <u>K</u> <u>T</u> CRM <u>N</u> K <u>K</u> KN <u>K</u> PRCV |
| SEQ ID NO:65 (G74N/K76T/P85T)# | CENVDCG <u>P</u> <u>N</u> <u>K</u> <u>T</u> CRM <u>N</u> K <u>K</u> KN <u>T</u> RCV |
| SEQ ID NO:66 (C66S/K75N/C77T)# | <u>S</u> ENVDCG <u>P</u> <u>N</u> <u>K</u> <u>T</u> RM <u>N</u> K <u>K</u> KN <u>K</u> PRCV |
| SEQ ID NO:67 (C66A/K75N/C77T)# | <u>A</u> ENVDCG <u>P</u> <u>N</u> <u>K</u> <u>T</u> RM <u>N</u> K <u>K</u> KN <u>K</u> PRCV |
| SEQ ID NO: 111 (K75N/C77S/K82T)# | CENVDCG <u>P</u> <u>N</u> <u>K</u> <u>S</u> RM <u>N</u> K <u>T</u> KN <u>K</u> PRCV |
| SEQ ID NO: 112 (C66S/K75N/C77S)# | <u>S</u> ENVDCG <u>P</u> <u>N</u> <u>K</u> <u>S</u> RM <u>N</u> K <u>K</u> KN <u>K</u> PRCV |
| SEQ ID NO: 113 (C66A/K75N/C77S)# | <u>A</u> ENVDCG <u>P</u> <u>N</u> <u>K</u> <u>S</u> RM <u>N</u> K <u>K</u> KN <u>K</u> PRCV |

[0153]

| | |
|--------------------------------|-------------------------|
| SEQ ID NO: 114 K(81,82)D | CENVDCGPGKKCRMNDDNKPRCV |
| SEQ ID NO: 115 K(76,81,82)D | CENVDCGPGKDCRMNDDNKPRCV |
| SEQ ID NO: 116 K(76,82)D | CENVDCGPGKDCRMNKDNKPRCV |

[0154] *氨基酸的编号对应于FS315序列(例如,SEQ ID NO:2);氨基酸改变是下划线的。

[0155] **QSCVVDQTGS的替换发表在J Pharmacol Exp Ther (2015) 354 (2) :238中。将其用作实验对照。

[0156] #高糖基化变体。

[0157] 卵泡抑素融合蛋白

[0158] 预期合适的重组卵泡抑素蛋白可以是融合蛋白构型。例如,适用于本发明的重组卵泡抑素蛋白可以是卵泡抑素结构域与另一个结构域或部分(其通常可以通过例如增强或增加卵泡抑素蛋白的稳定性、效力和/或递送或减少或消除免疫原性或清除来促进卵泡抑素的治疗效果)之间的融合蛋白。用于卵泡抑素融合蛋白的此类合适的结构域或部分包括但不限于Fc结构域、XTEN结构域或人白蛋白融合蛋白。

[0159] Fc结构域

[0160] 在一些实施方案中,合适的重组卵泡抑素蛋白含有结合FcRn受体的Fc结构域或其部分。作为非限制性实例,合适的Fc结构域可以衍生自免疫球蛋白亚类,例如IgG。在一些实施方案中,合适的Fc结构域衍生自IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。在一些实施方案中,合适的Fc结构域衍生自IgM、IgA、IgD或IgE。特别合适的Fc结构域包括衍生自人或人源化抗体的Fc结构域。在一些实施方案中,合适的Fc结构域是修饰的Fc部分,例如修饰的人Fc部分。

[0161] 在一些实施方案中,合适的Fc结构域包含表6中提供的氨基酸序列。

[0162] 表6. 示例性Fc结构域

[0163]

| 序列 ID No. (描述) | Fc 结构域* |
|---------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| SEQ ID NO:6 野生型人 IgG1 Fc) | DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |

[0164]

| | |
|---------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| SEQ ID NO:7 (人 IgG1 Fc-LALA) | DKTHTCPPCPAPEA <u>AG</u> GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| SEQ ID NO:8 (人 IgG1 Fc-NHance) | DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEAL <u>K</u> FHYTQKSLSLSPGK |
| SEQ ID NO:9 (人 IgG1 Fc-LALA + NHance) | DKTHTCPPCPAPEA <u>AG</u> GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEAL <u>K</u> FHYTQKSLSLSPGK |
| SEQ ID NO:10 | EPKSCDKTHTCPPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| SEQ ID NO:11 | KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |

[0165] *基于EU编号的氨基酸编号。LALA和NHance突变是下划线的。

[0166] 在一些实施例中,合适的Fc结构域具有与SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:11至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更同源或相同的氨基酸序列。

[0167] 预期Fc结构域和FcRn受体之间的改善的结合导致重组蛋白的血清半衰期延长。因此,在一些实施方案中,合适的Fc结构域包含一个或多个氨基酸突变,其导致与FcRn的结合的改善。Fc结构域内影响与FcRn的改善的结合的各种突变是本领域已知的,并且可以适用于实施本发明。在一些实施方案中,合适的Fc结构域在对应于人IgG1的Thr 250、Met 252、

Ser254、Thr 256、Thr 307、Glu 380、Met 428、His 433和/或Asn 434(根据EU编号)的一个或多个位置处包含一个或多个突变。

[0168] 在一些实施方案中,合适的Fc结构域在对应于人IgG1的L234、L235、H433和N434(根据EU编号)的一个或多个位置处包含一个或多个突变。

[0169] 重组融合蛋白的Fc部分可导致靶向表达Fc受体的细胞,从而导致促炎作用。Fc结构域中的一些突变降低了重组蛋白与Fc γ 受体的结合,从而抑制了效应子功能。在一个实施方案中,效应子功能是抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)。例如,合适的Fc结构域可含有L234A(Leu234Ala)和/或L235A(Leu235Ala)(EU编号)的突变。在一些实施方案中,L234A和L235A突变也称为LALA突变。作为非限制性实例,合适的Fc结构域可含有突变L234A和L235A(EU编号)。包含L234A和L235A突变的示例性Fc结构域序列在表6中显示为SEQ ID NO:7。

[0170] 在一些实施方案中,合适的Fc结构域可含有H433K(His433Lys)和/或N434F(Asn434Phe)(EU编号)的突变。作为非限制性实例,合适的Fc结构域可含有突变H433K和N434F(EU编号)。在一些实施方案中,H433K和N434F突变也称为NHance突变。掺入突变H433K和N434F的示例性Fc结构域序列在表6中显示为SEQ ID NO:8。

[0171] 在一些实施方案中,合适的Fc结构域可含有L234A(Leu234Ala)、L235A(Leu235Ala)、H433K(His433Lys)和/或N434F(Asn434Phe)(EU编号)的突变。作为非限制性实例,合适的Fc结构域可含有突变L234A、L235A、H433K和N434F(EU编号)。掺入突变L234A、L235A、H433K和N434F的示例性Fc结构域序列在表6中显示为SEQ ID NO:9。

[0172] 可包括在Fc结构域中的另外的氨基酸取代包括描述于例如美国专利号6,277,375、8,012,476和8,163,881中的那些,其在此通过引入并入本文。

[0173] 接头或间隔物

[0174] 卵泡抑素结构域可以直接或间接地与Fc结构域连接。在一些实施方案中,合适的重组卵泡抑素蛋白含有连接卵泡抑素结构域和Fc结构域的接头或间隔物。氨基酸接头或间隔物通常设计为柔性的或插入两个蛋白部分之间的结构,例如 α -螺旋。接头或间隔物可以相对较短或者可以更长。通常,接头或间隔物的长度为例如3-100(例如,5-100、10-100、20-100、30-100、40-100、50-100、60-100、70-100、80-100、90-100、5-55、10-50、10-45、10-40、10-35、10-30、10-25、10-20)个氨基酸。在一些实施方案中,接头或间隔物的长度等于或长于2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95或100个氨基酸。通常,较长的接头可降低空间位阻。在一些实施方案中,接头将包含甘氨酸和丝氨酸残基的混合物。在一些实施方案中,接头可另外包含苏氨酸、脯氨酸和/或丙氨酸残基。因此,在一些实施方案中,接头包含10-100、10-90、10-80、10-70、10-60、10-50、10-40、10-30、10-20、10-15个氨基酸。在一些实施方案中,接头包含至少10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90或95个氨基酸。在一些实施方案中,接头不是由ALEVLFQGP(SEQ ID NO:68)组成的接头。

[0175] 作为非限制性实例,适用于本发明的接头或间隔物包括但不限于:

[0176] GGG(SEQ ID NO:69);

[0177] GAPGGGGGAAAAAGGGGGGAP(GAG linker,SEQ ID NO:70);

[0178] GAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPGGGGGAAAAAGGGGGGAP(GAG2 linker,SEQ ID NO:71);和

[0179] GAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPGGGGGAAAAAGGGGGGAP (GAG3linker, SEQ ID NO:72)。

[0180] 合适的接头或间隔物还包括具有与上述示例性接头例如GAG接头 (SEQ ID NO:70)、GAG2接头 (SEQ ID NO:71) 或GAG3接头 (SEQ ID NO:72) 至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多同源或相同的氨基酸序列的那些。适合与一些实施方案一起使用的另外的接头可以在2012年3月2日提交的US20120232021中找到,其公开内容通过引用整体并入本文。

[0181] 在一些实施方案中,提供了接头,其将卵泡抑素多肽与Fc结构域相缔合,而基本上不影响卵泡抑素多肽与其任何同源配体(例如,活化素A,肌生长抑制素,肝素等)结合的能力。在一些实施方案中,提供接头使得与单独的卵泡抑素多肽相比,卵泡抑素肽与肝素的结合不会改变。

[0182] 示例性的卵泡抑素融合蛋白

[0183] 在特定实施方案中,合适的重组卵泡抑素融合蛋白包含卵泡抑素多肽和Fc结构域,其中卵泡抑素多肽包含与野生型人FS315蛋白 (SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2)、FS303蛋白 (SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:4) 或FS288 (SEQ ID NO:5) 至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。在具体的实施方案中,合适的重组卵泡抑素融合蛋白包含卵泡抑素多肽、Fc结构域和将卵泡抑素多肽与Fc结构域相缔合的接头,其中卵泡抑素多肽包含与野生型人FS315蛋白 (SEQ ID NO:1) 或FS315蛋白 (SEQ ID NO:2) 至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。通常,合适的重组卵泡抑素融合蛋白能够结合激活素A和肌生长抑制素。在一些实施例中,合适的重组卵泡抑素蛋白具有范围为约0.5-6天(例如约0.5-5.5天、约0.5-5天、约1-5天、约1.5-5天、约1.5-4.5天、约1.5-4.0天、约1.5-3.5天、约1.5-3天、约1.5-2.5天、约2-6天、约2-5.5天、约2-5天、约2-4.5天、约2-4天、约2-3.5天、约2-3天)的体内半衰期。在一些实施例中,合适的重组卵泡抑素蛋白具有范围为约2-10天(例如,范围为约2.5-10天、约3-10天、约3.5-10天、约4-10天、约4.5-10天、约5-10天、约3-8天、约3.5-8天、约4-8天、约4.5-8天、约5-8天、约3-6天、约3.5-6天、约4-6天、约4.5-6天、约5-6天)的体内半衰期。

[0184] 作为非限制性实例,合适的卵泡抑素Fc融合蛋白可具有表7中所示的氨基酸序列。

[0185] 表7: 示例性卵泡抑素Fc融合蛋白

[0186]

| 序列 ID No. (突变的描述*) | 示例性重组卵泡抑素-Fc 融合蛋白# |
|-----------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| SEQ ID NO: 73 (氨基酸 75 至 86 的缺失; 断点由^^表示) | GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFKWMIF NGGAPNCIPCKETCENVDCGPGVCAPDCSNITWKG PVC ^^ GLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGR CKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTNNAVCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSS ACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGGRGRCSL CDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLLEVKHSGSCNSISED EEEEEDEDQDYSFPISILEW DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQOGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| SEQ ID NO:74 (氨基酸 75 至 84 的缺失 和 QSCVVDQTGS 的插入(SEQ ID NO:14)**) | GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFKWMIF NGGAPNCIPCKETCENVDCGPG QSCVVDQTGS PRCVCAPDCSNITWKG PVCGL DGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTNNAVCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCI KAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGGRGRCSL CDELCPDSKSDEPVCASDNATYAS ECAMKEAACSSGVLLEVKHSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISILEW DKT HTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN |

[0187]

| | |
|--------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| | <p><i>WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNH YTQKSLSLSPGK</i></p> |
| SEQ ID NO:75 (K(81,82)A) | <p>GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFKWMIF NGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKKCRMNA<u>AA</u>NKPRVCAPDCSNITWKG P VCG LDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTN NAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKC IKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFK VGRGRCSL CDELCPDSKSDEPVCASDNATYA SECAMKEAACSSGVLLLEVKHSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPIS SILEW <i>DKT</i> <i>HTCPPCAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVTCVVVDVSHEDPEVKFN</i> <i>WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL</i> <i>PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES</i> <i>NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNH</i> <i>YTQKSLSLSPGK</i></p> |
| SEQ ID NO:76 (K(76,81,82)A) | <p>GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFKWMIF NGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKA<u>AC</u>CRMNA<u>AA</u>NKPRVCAPDCSNITWKG P VCG LDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTN NAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKC IKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFK VGRGRCSL CDELCPDSKSDEPVCASDNATYA SECAMKEAACSSGVLLLEVKHSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPIS SILEW <i>DKT</i> <i>HTCPPCAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVTCVVVDVSHEDPEVKFN</i> <i>WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL</i> <i>PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES</i> <i>NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNH</i> <i>YTQKSLSLSPGK</i></p> |
| SEQ ID NO:77 (K82E) | <p>GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFKWMIF NGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKKCRMN<u>KN</u>ENKPRVCAPDCSNITWKG P VCG LDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTN NAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKC IKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFK VGRGRCSL CDELCPDSKSDEPVCASDNATYA SECAMKEAACSSGVLLLEVKHSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPIS SILEW <i>DKT</i> <i>HTCPPCAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVTCVVVDVSHEDPEVKFN</i> <i>WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL</i> <i>PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES</i></p> |

[0188]

| | |
|-----------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| | <i>NGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK</i> |
| SEQ ID NO:78 (K(75,76)E) | GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFKWMIF NGGAPNCIPCKETCENVDCGPGG <u>EE</u> CRMNKKNKPRVCAPDCSNITWKGVPVCG LDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTN NAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKC IKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGRGRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYA SECAMKEAACSSGVLLEVKHSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISILEW DKT HTCPPCAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES <i>NGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK</i> |
| SEQ ID NO:79 (K(76,82)E) | GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFKWMIF NGGAPNCIPCKETCENVDCGPGG <u>KE</u> CRMNK <u>EN</u> KPRVCAPDCSNITWKGVPVCG LDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTN NAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKC IKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGRGRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYA SECAMKEAACSSGVLLEVKHSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISILEW DKT HTCPPCAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES <i>NGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK</i> |
| SEQ ID NO:80 (K(81,82)E) | GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFKWMIF NGGAPNCIPCKETCENVDCGPGG <u>KK</u> CRMN <u>EE</u> NKPRVCAPDCSNITWKGVPVCG LDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTN NAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKC IKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGRGRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYA SECAMKEAACSSGVLLEVKHSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISILEW DKT HTCPPCAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES <i>NGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK</i> |

[0189]

| | |
|--------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>SEQ ID NO:81 (K(76,81,82)E)</p> | <p>GNCWLRQA^KNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFKWMIF NGGAPNCIPCKETCENVDCGPGK<u>E</u>CRMNE<u>E</u>ENKPRCVCAPDCSNITWKG^PVCG LDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTN NAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKC IKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGRGRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYA SECAMKEAACSSGVLLLEVKHSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISILEW<i>DKT</i> <i>HTCPPCAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN</i> <i>WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL</i> <i>PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES</i> <i>NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH</i> <i>YTQKSLSLSPGK</i></p> |
| <p>SEQ ID NO:82 (K(76,81,82)E/V88 E)</p> | <p>GNCWLRQA^KNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFKWMIF NGGAPNCIPCKETCENVDCGPGK<u>E</u>CRMNE<u>E</u>ENKPRCVCAPDCSNITWKG^PVCG LDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTN NAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKC IKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGRGRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYA SECAMKEAACSSGVLLLEVKHSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISILEW<i>DKT</i> <i>HTCPPCAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN</i> <i>WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL</i> <i>PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES</i> <i>NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH</i> <i>YTQKSLSLSPGK</i></p> |
| <p>SEQ ID NO:83 (K84E)</p> | <p>GNCWLRQA^KNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFKWMIF NGGAPNCIPCKETCENVDCGPGK<u>K</u>CRMN<u>K</u>NEPRCVCAPDCSNITWKG^PVCG LDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTN NAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKC IKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGRGRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYA SECAMKEAACSSGVLLLEVKHSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISILEW<i>DKT</i> <i>HTCPPCAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN</i> <i>WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL</i> <i>PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES</i> <i>NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH</i> <i>YTQKSLSLSPGK</i></p> |
| <p>SEQ ID NO:84 (K(76,84)E)</p> | <p>GNCWLRQA^KNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFKWMIF NGGAPNCIPCKETCENVDCGPGK<u>E</u>CRMN<u>K</u>NEPRCVCAPDCSNITWKG^PVCG</p> |

[0190]

| | |
|----------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| | <p>LDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTN NAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKC IKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGRGRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYA SECAMKEAACSSGVLEVKHSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISILEWDKT HTCPPCAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK</p> |
| <p>SEQ ID NO:85 (K(82,84)E)</p> | <p>GNCWLRQAANGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFKWMIF NGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKKCRMNKENEPRCVCAPDCSNITWKGVPVCG LDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTN NAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKC IKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGRGRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYA SECAMKEAACSSGVLEVKHSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISILEWDKT HTCPPCAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK</p> |
| <p>SEQ ID NO:86 (R78E/K84E)</p> | <p>GNCWLRQAANGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFKWMIF NGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKKCEMKNKNEPRCVCAPDCSNITWKGVPVCG LDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTN NAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKC IKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGRGRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYA SECAMKEAACSSGVLEVKHSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISILEWDKT HTCPPCAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK</p> |
| <p>SEQ ID NO:87 (K(76,82,84)E)</p> | <p>GNCWLRQAANGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFKWMIF NGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKCECRMNKENEPRCVCAPDCSNITWKGVPVCG LDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTN NAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKC</p> |

[0191]

| | |
|------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| | <p>IKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGRGRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYA SECAMKEAACSSGVLLEVKHSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSPISSILEW DKT HTCPPCAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK</p> |
| <p>SEQ ID NO:88 (R78E/K82E)</p> | <p>GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFKWMIF NGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKKCEMKNKENKPRVCAPDCSNITWKGPVCG LDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPSSTCVVDQTN NAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKC IKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGRGRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYA SECAMKEAACSSGVLLEVKHSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSPISSILEW DKT HTCPPCAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK</p> |
| <p>SEQ ID NO:89 (R78E/K(82,84)E)</p> | <p>GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFKWMIF NGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKKCEMKNKENPRVCAPDCSNITWKGPVCG LDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPSSTCVVDQTN NAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKC IKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGRGRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYA SECAMKEAACSSGVLLEVKHSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSPISSILEW DKT HTCPPCAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK</p> |
| <p>SEQ ID NO:90 K(76,81)E)</p> | <p>GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFKWMIF NGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKECRMNEKNKPRVCAPDCSNITWKGPVCG LDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPSSTCVVDQTN NAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKC IKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGRGRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYA SECAMKEAACSSGVLLEVKHSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSPISSILEW DKT</p> |

[0192]

| | |
|-------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| | <p><i>HTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVT CVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQOQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK</i></p> |
| <p>SEQ ID NO:91 (K82T)</p> | <p>GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFKWMIF NGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKKCRMNK_TNKPRVCAPDCSNITWKG P VCG LDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTN NAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKC IKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGRGRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYA SECAMKEAACSSGVLEVKHSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISILEW DKT <i>HTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVT CVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQOQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK</i></p> |
| <p>SEQ ID NO:92 (P85T)</p> | <p>GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFKWMIF NGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKKCRMNK_KNKTRVCAPDCSNITWKG P VCG LDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTN NAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKC IKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGRGRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYA SECAMKEAACSSGVLEVKHSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISILEW DKT <i>HTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVT CVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQOQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK</i></p> |
| <p>SEQ ID NO:93 (R78N/N80T)</p> | <p>GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFKWMIF NGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKKCN_MTKKNKPRVCAPDCSNITWKG P VCG LDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTN NAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKC IKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGRGRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYA SECAMKEAACSSGVLEVKHSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISILEW DKT <i>HTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVT CVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL</i></p> |

[0193]

| | |
|-------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| | <p><i>PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFNCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK</i></p> |
| <p>SEQ ID NO:94 (R86N/V88T)</p> | <p>GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFKWMIF NGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKKCRMNKKNKPNCTCAPDCSNITWKGVPVCG LDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTN NAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKC IKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGGRGRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYA SECAMKEAACSSGVLLEVKHSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISILEW DKT HTCPPCAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFNCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK</p> |
| <p>SEQ ID NO:95 (K75N/C77T/K82T)</p> | <p>GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFKWMIF NGGAPNCIPCKETCENVDCGPGNKTRMNKTNKPRVCAPDCSNITWKGVPVCG LDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTN NAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKC IKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGGRGRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYA SECAMKEAACSSGVLLEVKHSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISILEW DKT HTCPPCAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFNCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK</p> |
| <p>SEQ ID NO:96 (G74N/K76S)</p> | <p>GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFKWMIF NGGAPNCIPCKETCENVDCGPNKSCRMNKKNKPRVCAPDCSNITWKGVPVCG LDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTN NAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKC IKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGGRGRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYA SECAMKEAACSSGVLLEVKHSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISILEW DKT HTCPPCAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFNCSVMHEALHNH</p> |

[0194]

| | |
|--------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| | <i>YTQKSLSLSPGK</i> |
| SEQ ID NO:97 (G74N/K76T) | GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFKWMIF NGGAPNCIPCKETCENVDCGPN <u>K</u> TCRMNKKNKPRCVCAPDCSNITWKGPVCG LDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTN NAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKC IKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGRGRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYA SECAMKEAACSSGVLLEVKHSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISILEW DKT HTCPPCAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH <i>YTQKSLSLSPGK</i> |
| SEQ ID NO:98 (G74N/K76T/P85T) | GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFKWMIF NGGAPNCIPCKETCENVDCGPN <u>K</u> TCRMNKKNKTRCVCAPDCSNITWKGPVCG LDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTN NAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKC IKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGRGRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYA SECAMKEAACSSGVLLEVKHSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISILEW DKT HTCPPCAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH <i>YTQKSLSLSPGK</i> |
| SEQ ID NO:99 (C66S/K75N/C77T) | GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFKWMIF NGGAPNCIPCKETSENVDCGPGN <u>K</u> TRMKNKKNKPRCVCAPDCSNITWKGPVCG LDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTN NAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKC IKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGRGRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYA SECAMKEAACSSGVLLEVKHSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISILEW DKT HTCPPCAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH <i>YTQKSLSLSPGK</i> |
| SEQ ID NO:100 | GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFKWMIF |

[0195]

| | |
|------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>(C66A/K75N/C77T)</p> | <p>NGGAPNCIPCKETAENVDCGPGNKTRMKNKKNKPRCVCAPDCSNITWKGPVCG LDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTN NAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKC IKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGRGRCSLCDELCPDSKSEDEPVCASDNATYA SECAMKEAACSSGVLLEVKHSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSPISSILEWDKT HTCPPCAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK</p> |
| <p>SEQ ID NO: 117 (K(76,82)D)</p> | <p>GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFKWMIF NGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKDCRMNKDNKPRCVCAPDCSNITWKGPVCG LDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTN NAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKC IKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGRGRCSLCDELCPDSKSEDEPVCASDNATYA SECAMKEAACSSGVLLEVKHSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSPISSILEWDKT HTCPPCAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK</p> |
| <p>SEQ ID NO: 120 (K(81,82)D)</p> | <p>GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFKWMIF NGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKCRMNDNKNKPRCVCAPDCSNITWKGPVCG LDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTN NAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKC IKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGRGRCSLCDELCPDSKSEDEPVCASDNATYA SECAMKEAACSSGVLLEVKHSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSPISSILEWDKT HTCPPCAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK</p> |
| <p>SEQ ID NO: 118 (K(76,81,82)D)</p> | <p>GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWTEEDVNDNTLFKWMIF NGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKDCRMNDNKNKPRCVCAPDCSNITWKGPVCG LDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTN</p> |

[0196]

| | |
|--|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| | <p>NAYCVTCNTRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKC IKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGRGRCSLDELCPDSKSDPVCASDNATYA SECAMKEAACSSGVLLLEVKHSGSCNSISEDTEEEEEDEDQDYSFPISILEWDKT HTCPPCAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK</p> |
|--|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

[0197] FS氨基酸的编号对应于FS315序列(例如,SEQ ID NO:2)。

[0198] **QSCVVDQTGS的替换发表在J Pharmacol Exp Ther (2015) 354 (2) :238中。将其用作实验对照。

[0199] #粗体和斜体的序列对应于包含位置234和235处(下划线并且根据EU编号)的LALA突变的人IgG1Fc (SEQ ID NO:7)。

[0200] 在一些实施方案中,重组卵泡抑素-Fc融合蛋白可命名为FS315K (81,82) A-hFcLALA、FS315K (81,82) A-GGG-hFcLALA、FS315K (76,81,82) A-hFcLALA、FS303K (76,81,82) A-hFcLALA、FS315K (76,81,82) A-GGG-hFcLALA、FS303K (76,81,82) A-GGG-hFcLALA、FS315K82T-hFcLALA、FS303K82T-hFcLALA、FS315K82T-GGG-hFcLALA、FS303K82T-GGG-hFcLALA、FS315K (76,81) E-hFcLALA、FS315K (76,81,82) E/V88E-hFcLALA、FS315WT-hFcLALA、FS315K (75,76) E-hFcLALA、FS315K (76,82) E-hFcLALA、FS315K (76,82) D-hFcLALA、FS315R86N/V88T-hFcLALA、FS315K75N/C77T/K82T-hFcLALA、FS315K75N/C77S/K82T-hFcLALA、FS315del175-86-hFcLALA、FS315K (81,82) E-hFcLALA、FS315K (81,82) D-hFcLALA、FS315K82E-hFcLALA、FS315K (76,81,82) E-hFcLALA、FS315K (76,81,82) D-hFcLALA、FS315R78N/N80T-hFcLALA、FS315P85T-hFcLALA、FS315K (76,81) E-hFcLALA或FS315K75N/C77N/K82T-hFcLALA。

[0201] 预期卵泡抑素-Fc融合蛋白可以以各种构型提供,包括同二聚体或单体构型。例如,可以设计合适的同二聚体构型以使融合配偶体(例如,卵泡抑素多肽加上接头)的C末端与两条Fc多肽链的N-末端连接。可以设计合适的单体构型以使融合配偶体(例如,卵泡抑素多肽加上接头)的C-末端与一个Fc二聚体或一个Fc单体融合。单体构型可降低空间位阻。

[0202] 如本文使用的,关于本文鉴定的参考蛋白质序列(例如,参考卵泡抑素蛋白序列)的“百分比(%)氨基酸序列同一性”定义为在比对序列和需要时引入缺口以实现最大百分比序列同一性之后,并且不考虑任何保守取代作为序列同一性的部分,候选序列中的氨基酸残基与参考序列中的氨基酸残基相同的百分比。用于确定百分比氨基酸序列同一性目的的比对可以在本领域技术范围内的各种方式实现,例如使用公众可用的计算机软件,例如BLAST、ALIGN或Megalign (DNASTAR) 软件。本领域技术人员可确定用于测量比对的适当参数,包括在待比较的序列的全长上实现最大比对所需的任何算法。优选地,使用WU-BLAST-2软件来确定氨基酸序列同一性(Altschul等人, *Methods in Enzymology* 266,460-480 (1996); <http://blast.wustl.edu/blast/README.html>)。WU-BLAST-2使用几个搜索参数,

其中大部分设定为默认值。可调参数设为下述值：重叠跨度=1，重叠分数=0.125，世界阈值(T)=11。HSP评分(S)和HSP S2参数是动态值，并且由程序本身确定，取决于特定序列的组成，然而，最小值可被调整并且如上所述设定。

[0203] 在一些实施方案中，重组卵泡抑素-Fc融合蛋白抑制肌生长抑制素的结合和/或活性。在一些实施方案中，当结合肌生长抑制素时，重组卵泡抑素-Fc融合蛋白的 K_D 大于约0.1pM，大于约0.5pM，大于约1pM，大于约5pM，大于约10pM，大于约50pM，大于约100pM，大于约500pM或大于约1000pM。重组卵泡抑素-Fc融合蛋白的亲合力可以例如在表面等离子体共振测定例如BIAcore测定中测量。

[0204] 在一些实施方案中，重组卵泡抑素-Fc融合蛋白抑制激活素A的结合和/或活性。在一些实施方案中，当结合活化素A时，重组卵泡抑素-Fc融合蛋白的 K_D 大于约0.1pM，大于约0.5pM，大于约1pM，大于约5pM，大于约10pM，大于约50pM，大于约100pM，大于约500pM或大于约1000pM。例如，可以在表面等离子体共振测定例如BIAcore测定中测量重组卵泡抑素-Fc融合蛋白的重组。

[0205] 在一些实施方案中，与野生型卵泡抑素-Fc蛋白对肝素的结合亲和力相比，重组卵泡抑素-Fc融合蛋白对肝素的结合亲和力降低。在一些实施方案中，当结合肝素时，重组卵泡抑素-Fc融合蛋白的 K_D 大于约0.01nM，大于约0.05nM，大于约0.1nM，大于约0.5nM，大于约1nM，大于约5nM，大于约10nM，大于约50nM，大于约100nM，大于约150nM，大于约200nM，大于约250nM或大于约500nM。

[0206] 在一些实施方案中，当结合Fc受体时，重组卵泡抑素-Fc融合蛋白的 K_D 大于约1nM，大于约5nM，大于约10nM，大于约50nM，大于约100nM，大于约500nM，或大于约1000nM。在一些实施方案中，Fc受体是Fc γ 受体。在一些实施方案中，Fc γ 受体是Fc γ RI，Fc γ RIIA，Fc γ RIIB，Fc γ RIIIA或Fc γ RIIIB。

[0207] 在一些实施方案中，重组卵泡抑素-Fc融合蛋白与BMP-9具有最小的结合或没有可见的结合。在一些实施方案中，重组卵泡抑素-Fc融合蛋白与BMP-10具有最小的结合或没有可见的结合。在一些实施方案中，最小的结合或没有可见的结合在190pM至25000pM的范围内确定。

[0208] 在一些实施方案中，重组卵泡抑素-Fc融合蛋白的特征在于在肌生长抑制素刺激测定中的 IC_{50} 低于约20nM，低于约15nM，低于约10nM，低于约5nM，低于约4nM，低于约3nM，低于约2nM，低于约1nM，低于约0.5nM，低于约0.25nM，低于约0.1nM，低于约0.05nM或低于约0.01nM。

[0209] 在一些实施方案中，重组卵泡抑素-Fc融合蛋白的特征在于在激活素A刺激测定中的 IC_{50} 低于约20nM，低于约15nM，低于约10nM，低于约5nM，低于约4nM，低于约3nM，低于约2nM，低于约1nM，低于约0.5nM，低于约0.25nM，低于约0.1nM，低于约0.05nM或低于约0.01nM。

[0210] 在一些实施方案中，重组卵泡抑素-Fc融合蛋白的体内施用导致肌肉的质量相对于对照增加。在一些实施方案中，肌肉的质量例如是肌肉的重量。在一些实施方案中，肌肉是一种或多种骨骼肌，例如，表1中所示的那些。在一些实施方案中，肌肉选自膈肌、肱三头肌、比目鱼肌、胫骨前肌、腓肠肌，趾长伸肌，腹直肌，股四头肌及其组合。

[0211] 重组卵泡抑素或重组卵泡抑素-Fc融合蛋白的产生

[0212] 适用于本发明的重组卵泡抑素蛋白或重组卵泡抑素-Fc融合蛋白可通过任何可用的方法产生。例如,重组卵泡抑素蛋白或重组卵泡抑素-Fc融合蛋白可以通过利用经工程改造以表达编码重组卵泡抑素蛋白或重组卵泡抑素-Fc融合蛋白的核酸的宿主细胞系统重组产生。或者或另外地,可通过激活内源基因产生重组卵泡抑素蛋白或重组卵泡抑素-Fc融合蛋白。或者或另外地,可通过化学合成部分或完全制备重组卵泡抑素蛋白或重组卵泡抑素-Fc融合蛋白。

[0213] 在蛋白质重组产生的情况下,可使用任何表达系统。仅举几个例子,已知的表达系统包括例如大肠杆菌(E.coli)、鸡蛋、杆状病毒、植物、酵母或哺乳动物细胞(例如CHO细胞)。

[0214] 在一些实施方案中,在哺乳动物细胞中产生适用于本发明的重组卵泡抑素蛋白或重组卵泡抑素-Fc融合蛋白。根据本发明可使用的哺乳动物细胞的非限制性例子包括BALB/c小鼠骨髓瘤细胞系(NS0/1,ECACC编号:85110503);人成视网膜细胞(PER.C6,CruCell,Leiden,荷兰);由SV40转化的猴肾CV1系(COS-7,ATCC CRL 1651);人胚肾系(亚克隆而用于在悬浮培养中生长的HEK293或293细胞,Graham等人,J.GenVirol.,36:59,1977);人纤维肉瘤细胞系(例如HT1080);幼仓鼠肾细胞(BHK21,ATCC CCL 10);中国仓鼠卵巢细胞+/-DHFR(CHO,Urlaub和Chasin,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,77:4216,1980);小鼠塞尔托利细胞(TM4,Mather,Biol.Reprod.,23:243-251,1980);猴肾细胞(CV1ATCC CCL70);非洲绿猴肾细胞(VERO-76,ATCC CRL-1 587);人宫颈癌细胞(HeLa,ATCC CCL 2);犬肾细胞(MDCK,ATCC CCL 34);水牛鼠肝细胞(BRL 3A,ATCC CRL 1442);人肺细胞(W138,ATCC CCL 75);人肝细胞(Hep G2,HB 8065);小鼠乳房肿瘤(MMT 060562,ATCC CCL51);TRI细胞(Mather等人,Annals N.Y.Acad.Sci.,383:44-68,1982);MRC 5细胞;FS4细胞;和人肝癌细胞系(Hep G2)。

[0215] 在一些实施方案中,本发明提供了由非人细胞或人细胞产生的重组卵泡抑素蛋白或重组卵泡抑素-Fc融合蛋白。在一些实施方案中,本发明提供了由CHO细胞或HT1080细胞产生的重组卵泡抑素蛋白或重组卵泡抑素-Fc融合蛋白。

[0216] 通常,经工程改造以表达重组卵泡抑素蛋白或重组卵泡抑素-Fc融合蛋白的细胞可包含编码本文所述的重组卵泡抑素蛋白或重组卵泡抑素-Fc融合蛋白的转基因。应该了解,编码重组卵泡抑素蛋白的核酸可含有用于表达重组卵泡抑素蛋白的调节序列、基因控制序列、启动子、非编码序列和/或其它合适序列。通常,编码区与这些核酸组分中的一种或多种可操作地连接。

[0217] 转基因的编码区可包括一个或多个沉默突变,以优化特定细胞类型的密码子使用。例如,卵泡抑素转基因的密码子可被优化用于在脊椎动物细胞中表达。在一些实施例中,卵泡抑素转基因的密码子可被优化用于在哺乳动物细胞(例如CHO细胞)中表达。在一些实施例中,卵泡抑素转基因的密码子可被优化用于在人细胞中表达。

[0218] 药物组合物和施用

[0219] 本发明进一步提供药物组合物,其包含根据本发明的治疗活性成分(例如,重组卵泡抑素蛋白,或重组卵泡抑素-Fc融合蛋白),以及一种或多种药学上可接受的载体或赋形剂。此类药物组合物可任选地包含一种或多种另外的治疗活性物质。

[0220] 尽管本文提供的药物组合物的描述主要涉及适合于对人类进行伦理施用的药物

组合物,但本领域技术人员将理解,此类组合物通常适合施用于各种动物。为了使组合物适于施用于各种动物而对适于施用于人的药物组合物进行的修饰是很好理解的,并且普通技术的兽医药理学家可以仅通过普通的(如果有的话)实验来设计和/或进行这种修饰。

[0221] 本文所述的药物组合物的制剂可以通过药理学领域中已知的或以后开发的任何方法制备。通常,这种制备方法包括将活性成分与稀释剂或另一种赋形剂或载体和/或一种或多种其它辅助成分结合的步骤,然后,如果需要和/或需要,将其成形和/或包装。将产品转化为所需的单剂量或多剂量单位。

[0222] 根据本发明的药物组合物可以作为单一单位剂量和/或作为多个单一单位剂量大量制备、包装和/或销售。如本文所用,“单位剂量”是离散量的包含预定量活性成分的药物组合物。活性成分的量通常等于会施用至受试者的活性成分的剂量和/或这种剂量的方便部分,例如,这种剂量的一半或三分之一。

[0223] 根据本发明的药物组合物中的活性成分、药学上可接受的赋形剂或载体和/或任何其他成分的相对量将根据所治疗的受试者的身份、尺寸和/或状况以及组合物的施用途径而变化。举例来说,组合物可包含0.1%至100% (w/w)的活性成分。

[0224] 药物制剂可另外包含药学上可接受的赋形剂或载体,如本文所用,其包括适合于所需的特定剂型的任何和所有溶剂、分散介质、稀释剂或其他液体媒介物、分散或悬浮助剂、表面活性剂、等渗剂、增稠剂或乳化剂、防腐剂、固体粘合剂、润滑剂等。Remington's The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition, A.R. Gennaro (Lippincott, Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2006; 通过引用并入本文) 公开了用于配制药剂组合物的各种赋形剂和用于其制备的已知技术。除非任何常规赋形剂介质或载体与物质或其衍生物不相容,例如通过产生任何不希望的生物效应或以其他方式以有害方式与药物组合物的任何其他组分相互作用,否则其使用预期在本发明的范围内。

[0225] 在一些实施方案中,药学上可接受的赋形剂或载体为至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%纯的。在一些实施方案中,赋形剂或载体被批准用于人类和兽医用途。在一些实施方案中,赋形剂或载体由美国食品和药物管理局批准。在一些实施方案中,赋形剂或载体是药物级的。在一些实施方案中,赋形剂或载体符合美国药典(USP)、欧洲药典(EP)、英国药典和/或国际药典的标准。

[0226] 用于制备药物组合物的药学上可接受的赋形剂或载体包括但不限于惰性稀释剂,分散剂和/或造粒剂,表面活性剂和/或乳化剂,崩解剂,粘合剂,防腐剂,缓冲剂,润滑剂和/或油。此类赋形剂或载体可任选地包含在药物制剂中。根据配方设计师的判断,组合物中可存在赋形剂或载体如可可脂和栓剂蜡、着色剂、包衣剂、甜味剂、调味剂和/或芳香剂。

[0227] 合适的药学可接受的载体包括但不限于水、盐溶液(例如NaCl)、盐水、缓冲盐水、醇、甘油、乙醇、阿拉伯树胶、植物油、苯甲醇、聚乙二醇、明胶、碳水化合物例如乳糖、直链淀粉或淀粉、糖例如甘露醇、蔗糖或其它、右旋糖、硬脂酸镁、滑石、硅酸、粘性石蜡、芳香油、脂肪酸酯、羟甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮等、以及其组合。需要时,药物制剂可与辅助试剂(例如润滑剂、防腐剂、稳定剂、润湿剂、乳化剂、影响渗透压的盐、缓冲剂、着色剂、调味剂和/或芳香物质等等)混合,所述辅助试剂不会有害地与活性化合物反应或干扰其活性。在一个优选实施例中,使用适合于静脉内施用的水溶性载体。

[0228] 需要时,合适的药物组合物或药剂还可含有少量润湿剂或乳化剂或pH缓冲剂。组

合物可以为液体溶液、悬浮液、乳液、片剂、丸剂、胶囊、缓释制剂或粉末。组合物也可用传统的粘合剂和载体如甘油三酯配制成栓剂。经口制剂可包括标准载体例如药物级的甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、聚乙烯吡咯烷酮、糖精钠、纤维素、碳酸镁等。

[0229] 药物组合物或药剂可根据常规程序配制为适合施用于人类的药物组合物。例如，在一些实施例中，用于静脉内施用的组合物通常是无菌等渗水性缓冲液中的溶液。必要时，组合物还可包括增溶剂和局部麻醉剂，以缓解在注射部位处的疼痛。一般地，成分分开供应或以单位剂型混合在一起供应，例如作为在指示活性剂数量的气密封容器例如安瓿或小药囊中的干燥冻干粉末或无水浓缩物。当组合物通过输注施用，它可以用含有无菌药物级水、盐水或右旋糖/水的输液瓶来分配。当组合物通过注射施用，可提供用于注射的无菌水或盐水的安瓿，以便可在施用之前混合成分。

[0230] 本文所述的重组卵泡抑素蛋白或重组卵泡抑素-Fc融合蛋白可以配制成中性或盐形式。药学可接受的盐包括与游离氨基形成的那些，如源自盐酸、磷酸、乙酸、草酸、酒石酸等的那些，以及与游离羧基形成的那些，例如源自钠、钾、铵、钙、氢氧化铁、异丙胺、三乙胺、2-乙氨基乙醇、组氨酸、普鲁卡因等的那些。

[0231] 配制和/或制备药剂中的一般考虑因素可以在例如Remington: The Science and Practice of Pharmacy 21st ed., Lippincott Williams&Wilkins, 2005 (通过引用并入本文)中找到。

[0232] 施用途径

[0233] 通过任何合适的途径施用本文所述的重组卵泡抑素蛋白或重组卵泡抑素-Fc融合蛋白(或含有本文所述的重组卵泡抑素蛋白的组合物或药物)。在一些实施例中，全身施用重组卵泡抑素蛋白、重组卵泡抑素-Fc融合蛋白或含有其的药物组合物。全身施用可以为静脉内、皮内、颅内、鞘内、吸入、透皮(局部)、眼内、肌内、皮下、肌内、经口和/或透粘膜施用。在一些实施例中，皮下施用重组卵泡抑素蛋白或含有其的药物组合物。如本文使用的，术语“皮下组织”被定义为紧接在皮肤之下的松散的不规则的结缔组织层。例如，皮下施用可通过将组合物注射到区域包括但不限于大腿部、腹部、臀部或肩胛部的区域内来执行。在一些实施例中，静脉内施用重组卵泡抑素蛋白、重组卵泡抑素蛋白-Fc融合蛋白或含有其的药物组合物。在一些实施方案中，口服施用重组卵泡抑素蛋白、重组卵泡抑素-Fc融合蛋白或含有其的药物组合物。在一些实施方案中，肌肉内施用重组卵泡抑素蛋白、重组卵泡抑素-Fc融合蛋白或含有其的药物组合物。例如，皮下施用可通过将组合物注射到区域包括但不限于大腿部、腹部、臀部、肩胛部或表1中记载的任何肌肉内来执行。需要时，可同时使用多于一个途径。

[0234] 在一些实施例中，施用仅在个体中产生局部效应，而在其它实施例中，施用在该个体的多个部分各处产生效应，例如全身效应。通常，施用导致重组卵泡抑素蛋白或重组卵泡抑素-Fc融合蛋白递送至一种或多种靶组织。在一些实施例中，重组卵泡抑素蛋白被递送至一种或多种靶组织，包括但不限于心脏、脑、皮肤、血液、脊髓、横纹肌(例如骨骼肌)、平滑肌、肾、肝、肺和/或脾。在一些实施方案中，将重组卵泡抑素蛋白或重组卵泡抑素-Fc融合蛋白递送至心脏。在一些实施方案中，将重组卵泡抑素蛋白或重组卵泡抑素-Fc融合蛋白递送至横纹肌，特别是骨骼肌。在一些实施例中，重组卵泡抑素蛋白或重组卵泡抑素蛋白-Fc融合蛋白被递送至三头肌、胫骨前肌、比目鱼肌、腓肠肌、二头肌、斜方肌、三角肌、四头肌和/或

膈肌。

[0235] 剂型和给药方案

[0236] 在一些实施方案中,组合物以治疗有效量和/或根据与特定期望结果(例如,治疗或降低肌营养不良例如杜氏肌营养不良症的风险)相关的给药方案施用。

[0237] 根据本发明的待施用的特定剂量或量可例如取决于所需结果的性质和/或程度、施用途径和/或施用时机的细节、和/或一个或多个特征(例如,体重、年龄、个人历史、遗传特征、生活方式参数、心脏缺陷的严重性和/或心脏缺陷的风险水平等、或其组合)。这些剂量或量可由普通技术人员确定。在一些实施例中,根据标准临床技术确定适当的剂量或量。可替代地或另外地,在一些实施例中,通过使用一种或多种体外或体内测定来确定适当的剂量或量,以帮助鉴定待施用的期望或最佳的剂量范围或量。

[0238] 在各种实施例中,重组卵泡抑素蛋白以治疗有效量施用。一般地,治疗有效量足以对受试者实现有意义的益处(例如,预防、治疗、调节、治愈、防止和/或改善潜在的疾病或状况)。在一些特定实施例中,可从源自体外或动物模型测试系统的剂量-响应曲线推断待施用的适当剂量或量。

[0239] 在一些实施例中,组合物作为药物制剂提供。在一些实施例中,药物制剂是或包含单位剂量,用于根据与实现HAE发作的减少发生率或风险相关的施用方案施用。

[0240] 在一些实施方案中,包含本文所述的重组卵泡抑素蛋白或重组卵泡抑素-Fc融合蛋白的制剂作为单个剂量施用。在一些实施方案中,以规则的间隔施用包含本文所述的重组卵泡抑素蛋白或重组卵泡抑素-Fc融合蛋白的制剂。如本文使用的,以“间隔”施用指示治疗有效量是周期性地(与一次性剂量不同)施用。间隔可通过标准的临床技术来确定。在一些实施例中,包含本文所述的重组卵泡抑素蛋白的制剂双月一次、每月一次、每月两次、三周一次、双周一次、每周一次、每周两次、每周三次、每天一次、每天两次或每六小时一次施用。单一个体的施用间隔不需要是固定的间隔,而是可随着时间过去变化,这取决于个体的需要。

[0241] 如本文使用的,术语“双月一次”意指施用一次/两个月(即每两个月一次);术语“每月一次”意指施用一次/月;术语“三周一次”意指施用一次/三周(即每三周一次);术语“双周一次”意指施用一次/两周(即每两周一次);术语“每周一次”意指施用一次/周;而“每天一次”意指施用一次/天。

[0242] 在一些实施例中,包含本文所述的重组卵泡抑素蛋白或重组卵泡抑素蛋白-Fc融合蛋白的制剂无限期地以规律间隔施用。在一些实施例中,包含本文所述的重组卵泡抑素蛋白或重组卵泡抑素蛋白-Fc融合蛋白的制剂以规律间隔施用限定时期。

[0243] 如本文所述,术语“治疗有效量”主要基于本发明药物组合物中包含的治疗剂的总量来确定。治疗有效量通常以可包含多个单位剂量的给药方案施用。对于任何特定的治疗性蛋白质,治疗有效量(和/或有效给药方案内的适当单位剂量)可例如根据施用途径、与其它药物试剂的组合而变。

[0244] 在一些实施方案中,施用重组卵泡抑素蛋白或重组卵泡抑素-Fc融合蛋白降低至少一种DMD征兆或症状的强度、严重性或频率或延迟至少一种DMD征兆或症状的发作。在一些实施方案中,施用重组卵泡抑素蛋白或重组卵泡抑素-Fc融合蛋白降低至少一种选自肌肉萎缩、骨骼变形、心肌病、肌肉缺血、认知障碍和呼吸功能受损的DMD征兆或症状的强度、

严重性或频率,或延迟至少一种选自肌肉萎缩、骨骼变形、心肌病、肌肉缺血、认知障碍和呼吸功能受损的DMD征兆或症状的发作。

[0245] 在一些实施方案中,重组卵泡抑素蛋白或重组卵泡抑素-Fc融合蛋白的施用改善临床结果,如通过6分钟步行测试、定量肌肉力量测试、定时运动性能测试、Brooke和Vignos肢体功能量表、肺功能测试(用力肺活量,1秒用力呼气量、呼气峰值流量、最大吸气和呼气压力)、与健康相关的生活质量、膝关节和肘屈肌、肘伸肌、肩外展、握力、仰卧位起身时间、North Start动态评估、计时10米步行/跑步、Egen-Klassifikation量表、Gowers评分、Hammersmith运动能力、手持肌力测量、运动范围、测角术、高碳酸血症、婴儿和幼儿发育的Nayley量表和/或照顾者负担量表测量的。

[0246] 组合疗法

[0247] 在一些实施例中,重组卵泡抑素蛋白与目前用于治疗补体介导的疾病的一种或多种已知治疗剂(例如皮质类固醇)组合施用。在一些实施例中,已知的治疗剂根据其标准或批准的给药方案和/或时间表施用。在一些实施例中,已知的治疗剂根据与其标准或批准的给药方案和/或时间表相比改变的方案施用。在一些实施例中,这种改变的方案与标准或批准的给药方案的不同之处在于一个或多个单位剂量的量被改变(例如减少或增加),和/或给药在频率中改变(例如,单位剂量之间的一个或多个间隔扩大,导致更低的频率,或间隔减少,导致更高的频率)。

[0248] 在一些实施方案中,重组卵泡抑素蛋白或重组卵泡抑素-Fc融合蛋白与一种或多种另外的治疗剂组合施用。在一个实施方案中,另外的治疗剂是皮质类固醇,例如泼尼松。在另一个实施方案中,另外的治疗剂是糖皮质激素,例如地夫可特。在另一个实施方案中,另外的治疗剂是抗F1t-1抗体或其抗原结合片段。在另一个实施方案中,另外的治疗剂是RNA调节治疗剂。RNA调节治疗剂可以是外显子跳跃治疗剂或基因治疗剂。RNA调节治疗剂可以是,例如,Drispersen,CAT-1004,FG3019,PRO044,PRO045,Eteplirsen(AVI-4658),SRP-4053,SRP-4045,SRP-4050,SRP-4044,SRP-4052,SRP-4055或SRP-4008。在一些实施方案中,另外的治疗剂目前用于治疗肌营养不良症。在其他实施方案中,另外的治疗剂也可用于治疗其他疾病或病症。在一些实施例中,已知的治疗剂根据其标准或批准的给药方案和/或时间表施用。在一些实施例中,已知的治疗剂根据与其标准或批准的给药方案和/或时间表相比改变的方案施用。在一些实施例中,这种改变的方案与标准或批准的给药方案的不同之处在于一个或多个单位剂量的量被改变(例如减少或增加),和/或给药在频率中改变(例如,单位剂量之间的一个或多个间隔扩大,导致更低的频率,或间隔减少,导致更高的频率)。

[0249] 实施例

[0250] 实施例1. 卵泡抑素-Fc融合蛋白靶向肌生长抑制素

[0251] 本实施例举例说明了卵泡抑素-Fc融合蛋白与靶和非靶配体的结合。不希望受理论束缚,预期肌生长抑制素和激活素A对Smad2/3途径的激活导致肌原蛋白表达的抑制,从而成肌细胞不分化成肌肉。因此,肌生长抑制素和激活素A被认为是刺激肌肉再生的可行靶标。然而,由于某些结构相似性,许多肌生长抑制素和活化素A拮抗剂如可溶性激活素受体IIB型(sActRIIB)也结合骨形态发生蛋白(BMP)。BMPs,特别是BMP-9和BMP-10,被认为是关键的形态发生信号,其协调整个身体内的组织结构。抑制这种BMP可能导致不希望的病理状

况。卵泡抑素还通过三个FS结构域中的第一个中的碱性肝素结合序列(HBS)与细胞表面硫酸乙酰肝素蛋白多糖结合。不希望受理论束缚,通过例如HBS的突变或缺失对肝素结合的失活、减少或调节可以增加卵泡抑素和/或卵泡抑素融合蛋白的体内暴露和/或半衰期。如下文详细描述,本实施例中描述的实验数据证实卵泡抑素-Fc融合蛋白以高亲和力特异性靶向肌生长抑制素,并且不以有意义的亲和力结合非靶BMP或肝素。

[0252] 具体地,使用如下所述的BIAcore®测定和标准方法评估卵泡抑素-Fc融合蛋白对肌生长抑制素、激活素A、肝素、BMP-9和BMP-10的结合亲和力(K_D)和动力学。

[0253] 为了确定肌生长抑制素的结合亲和力和动力学,将抗人Fc(GE目录号BR-1008-39)以10 μ l/min的流速固定在两个流动池CM5芯片上420秒。运行缓冲区是HBS-EP+。使用运行缓冲液将所有样品和对照稀释至10 μ g/mL。基于25kDa的分子量,将肌生长抑制素(0.1mg/mL,在4mM HCl中)(R&D Systems,目录号788-G8-010/CF)稀释至0.3125、0.625、1.25、2.5和5nM。以50 μ L/min的流速以8秒的捕获设置进行测定,以50 μ L/min的流速结合300秒并以50 μ L/min的流速解离1200秒,随后通过使用3M MgCl₂以60 μ L/min的流速再生30秒。

[0254] 为了确定激活素A的结合亲和力和动力学,将抗人Fc(GE目录号BR-1008-39)以10 μ l/min的流速固定在两个流动池CM5芯片上420秒。运行缓冲区是HBS-EP+。使用运行缓冲液将所有样品和对照稀释至10 μ g/mL。使用26kDa的分子量将激活素A(0.1mg/mL,在4mM HCl中)(R&D Systems,目录号338-AC-050CF)稀释至0.156、0.3125、0.625、1.25和2.5nM。

[0255] 为了测定肝素的结合亲和力和动力学,在测定当天以1mg/mL制备生物素化的肝素,然后在HBS+N中稀释至100 μ g/mL。通过使用HBS+N缓冲液以100 μ g/mL以5 μ l/min固定5分钟来制备链霉抗生物素蛋白芯片流动池。将样品在HBS+EP中稀释至0.31nM至25nM的浓度。使用以30 μ L/min的流速的300秒的结合时间和300秒的解离时间进行测定,然后用4M NaCl再生30秒,接着用4M NaCl第二次再生30秒。

[0256] 为了测定BMP-9和/或BMP-10的结合亲和力和动力学,在CM5芯片上将抗人Fc与约6000至9000RU的FC3和FC4偶联。ActRIIB-Fc蛋白用作用于结合BMP-9和BMP-10的阳性对照(R&D Systems,目录号339-RBB-100)。为了分析BMP-9结合,将所有样品稀释至2.5 μ g/mL并且运行缓冲液为HBS+EP。为了分析BMP-10结合,将所有样品稀释至5 μ g/mL,并且运行缓冲液为HBS+EP+0.5mg/mL BSA。分析条件包括180秒的接触时间,300秒的解离时间和30 μ L/分钟的流速。将BMP-9(R&D Systems,目录号3209-BP-010CF)和BMP-10(R&D Systems,目录号2926-BP-025CF)稀释至25nM至0.19nM的三倍系列稀释液。示例性结果显示在表8中。

[0257] 表8. 示例性结合亲和力和动力学数据

[0258]

| 卵泡抑素-Fc 融合蛋白 | 肌生长抑制素结合 K_D (pM) 测试范围 5-0.31 nM | 激活素 A 结合 K_D (pM) 测试范围 2.5-0.15 nM | 肝素结合 K_D (nM) 测试范围 25-0.31 nM | BMP-9 测试范围 25-0.190 nM | BMP-10 测试范围 25-0.190 nM |
|------------------------------------|---------------------------------------------|-----------------------------------------------|------------------------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| FS315WT-hFc | 6-10 | 1-2 | 0.3 | 在测试范围中 无结合 | 在测试范围中无 结合 |
| FS315WT-hFcLALA | 20.2 | 未测试 | 0.16 | 未测试 | 未测试 |
| ActRIIB-Fc | 未测试 | 未测试 | 未测试 | 0.44 | 0.9 |
| FS315K(81,82)A- hFcLALA | 11.9 | 未测试 | 1.50 | 在测试范围中 无结合 | 在测试范围中无 结合 |
| FS315K(81,82)A- GGG- hFcLALA | 10.7 | 未测试 | 1.30 | 未测试 | 未测试 |
| FS315K(76,81,82)A- hFcLALA | 11.3 | 未测试 | 9.40 | 在测试范围中 无结合 | 在测试范围中无 结合 |
| FS303K(76,81,82)A- hFcLALA | 12.7 | 未测试 | 0.57 | 在测试范围中 无结合 | 在测试范围中无 结合 |
| FS315K(76,81,82)A- GGG- hFcLALA | 10.9 | 未测试 | 3.70 | 未测试 | 未测试 |
| FS303K(76,81,82)A- GGG- hFcLALA | 11.6 | 未测试 | 0.51 | 未测试 | 未测试 |

[0259]

| | | | | | |
|--------------------------------|-------|------|---------------------|-----------|-----------|
| FS315K82T-hFcLALA | 15.0 | 未测试 | 1.40 | 在测试范围中无结合 | 在测试范围中无结合 |
| FS303K82T-hFcLALA | 9.7 | 未测试 | 0.33 | 在测试范围中无结合 | 在测试范围中无结合 |
| FS315K82T-GGG-hFcLALA | 13.0 | 未测试 | 1.30 | 未测试 | 未测试 |
| FS303K82T-GGG-hFcLALA | 9.6 | 未测试 | 0.18 | 未测试 | 未测试 |
| FS315K82E-hFcLALA | 11.90 | 未测试 | 1.50 | 未测试 | 未测试 |
| FS315K(75,76)E-hFcLALA | 11.70 | 未测试 | 1.10 | 未测试 | 未测试 |
| FS315K(76,81)E-hFcLALA | 11 | 未测试 | 4 | 未测试 | 未测试 |
| FS315K(76,82)E-hFcLALA | 10.50 | 未测试 | 4 | 未测试 | 在测试范围中无结合 |
| FS315K(81,82)E-hFcLALA | 9.87 | 未测试 | 11 | 未测试 | 在测试范围中无结合 |
| FS315K(81,82)D-hFcLALA | 7.09 | 0.47 | 20.6 | 在测试范围中无结合 | 在测试范围中无结合 |
| FS315K(76,81,82)E-hFcLALA | 2-6 | 1-2 | >25 | 在测试范围中无结合 | 在测试范围中无结合 |
| FS315K(76,81,82)D-hFcLALA | 5.92 | 0.76 | >25 | 在测试范围中无结合 | 在测试范围中无结合 |
| FS315K(76,81,82)E/V88E-hFcLALA | 4.5 | 未测试 | >25 | 未测试 | 未测试 |
| FS315(del75-86)-hFcLALA | 57.10 | 未测试 | >25 | 未测试 | 在测试范围中无结合 |
| FS315R86N/V88T-hFcLALA | 12.70 | 未测试 | 1.30-1.7 | 未测试 | 在测试范围中无结合 |
| FS315K75N/C77T/K82T-hFcLALA | 40.30 | 未测试 | 1.4 | 未测试 | 在测试范围中无结合 |
| FS315R78N/N80T-hFcLALA | 13.00 | 未测试 | 0.85 | 未测试 | 未测试 |
| FS315P85T-hFcLALA | 12.40 | 未测试 | 0.37 | 未测试 | 未测试 |
| FS315C66A/K75N/C77T-hFcLALA | 24.4 | 未测试 | 比 FS315wt-hFc 低 3 倍 | 在测试范围中无结合 | 在测试范围中无结合 |

[0260]

| | | | | | |
|-------------------------------|------|-----|---------------------|-----------|-----------|
| FS315C66S/K75N/C77T-hFcLALA | 6.4 | 未测试 | 比 FS315wt-hFc 低 3 倍 | 在测试范围中无结合 | 在测试范围中无结合 |
| FS315K(76,81,82)E-mFc | 14.8 | 未测试 | >25 | 未测试 | 未测试 |
| MONOVALENT MOLECULES: | | | | | |
| monoFS315wt-hFcLALA | 2.89 | 未测试 | 29.2 | 未测试 | 未测试 |
| monoFS315ΔHBS-hFcLALA | 3.3 | 未测试 | >25 | 未测试 | 未测试 |
| monoFS315K(76,81,82)E-hFcLALA | <4 | 未测试 | >25 | 在测试范围中无结合 | 在测试范围中无结合 |

[0261] 如表8中所示, 卵泡抑素融合蛋白以高亲和力结合肌生长抑制素但不结合BMP-9和/或BMP-10。在测试卵泡抑素-Fc融合蛋白与BMP-10结合的研究中, 在测试范围(25000至190pM)内未测定动力学常数。这表示结合亲和力比最弱的肌生长抑制素结合 K_D 高约430倍。在测试卵泡抑素-Fc融合蛋白与BMP-9结合的研究中, 在测试范围(25000至190pM)内未测定动力学常数。这表示结合亲和力比最弱的肌生长抑制素结合 K_D 高约1400倍。

[0262] 实施例2. 卵泡抑素-Fc融合蛋白与FcRn受体的结合

[0263] Fc结构域中的一些突变导致与FcRn受体的结合降低, 从而降低了体内血清半衰期。使用标准方法评估卵泡抑素-Fc融合蛋白与FcRn受体的结合亲和力。示例性结果显示在表9中。

[0264] 表9. 示例性FcRn结合数据

| 卵泡抑素-Fc 融合蛋白 | K_D (nM) |
|---------------------------|------------|
| FS315WT-hFc | 114.0 |
| FS315K(81,82)A-hFcLALA | 107.0 |
| FS315K(76,81,82)A-hFcLALA | 86.5 |
| FS315K(76,82)E-hFcLALA | 125.0 |
| FS315K(81,82)E-hFcLALA | 178.0 |
| FS315K(81,82)D-hFcLALA | 24.7 |
| FS315K(76,81,82)E-hFcLALA | 96-131 |
| FS315K(76,81,82)D-hFcLALA | 59.9 |
| FS315ΔHBS-hFcLALA | 372.0 |
| FS315(del75-86)-hFcLALA | 126.0 |

[0265]

| | | |
|--------|--------------------------------|-------|
| | FS315K82T--hFcLALA | 44.8 |
| | FS303K82T-hFcLALA | 27.6 |
| | FS315R86N/V88T-hFcLALA | 69.5 |
| | FS315K75N/C77T/K82T-hFcLALA | 126.0 |
| [0266] | FS315C66A/K75N/C77T-hFcLALA | 28.0 |
| | FS315C66S/K75N/C77T-hFcLALA | 83.0 |
| | monoFS315K(76,81,82)E-hFcLALA | 40.6 |
| | monoFS315-hFcLALA | 12.8 |
| | monoFS315 Δ HBS-hFcLALA | 36.7 |

[0267] Fc结构域中的一些突变导致与Fc γ IR受体的结合降低,从而具有降低的效应子功能。使用标准方法评估卵泡抑素-Fc融合蛋白与Fc γ IA受体的结合亲和力。使用标准方法评估卵泡抑素-Fc融合蛋白与Fc γ IA受体的结合亲和力。

[0268] 为了确定Fc γ 受体IA的结合亲和力,将卵泡抑素-Fc蛋白在pH5.0至2.5 μ g/mL的乙酸钠中稀释,并以约150RU固定在CM5芯片上。Fc γ 受体RIA作为R&D Systems,目录号1257-FC-050的冻干原料购买。对于Fc γ 受体IA的分析,运行缓冲液是HBS-P+。分析条件包括180秒的接触时间,600秒的解离时间和30 μ L/分钟的流速。再生条件为30 μ L/min的pH 2.5的10mM磷酸钠、500mM NaCl,持续10秒,以及30秒稳定期。Fc γ 受体IA稀释至62.5nM-0.49nM。示例性结果显示在表10中。

[0269] 表10. 示例性Fc γ IA结合数据

[0270]

| 卵泡抑素-Fc融合蛋白 | Fc γ IA K_D (nM) |
|------------------------|---------------------------|
| FS315wt-hFc (比较蛋白) | 0.14 |
| FS315K (76, 81, 82) E- | 81.9 |
| FS315K (76, 81, 82) D- | 58.8 |

[0271] 实施例3. 卵泡抑素-Fc融合蛋白具有延长的血清半衰期

[0272] 据报道,卵泡抑素具有短的血清半衰期。例如,典型的商业FS315蛋白具有约1小时的血清半衰期。在本实施例中,确定包含如图1A、图1B和表11中所示的各种突变的卵泡抑素-Fc融合蛋白的体内半衰期与对照蛋白相比具有显著延长的血清半衰期。

[0273] 具体地,CD-1小鼠以表11中所示的剂量静脉内施用单独的卵泡抑素-Fc融合蛋白。施用后,在不同时间点收集卵泡抑素-Fc融合蛋白的血清水平(图1A和图1B)。重组卵泡抑素-Fc融合蛋白的血清半衰期为45.7-194小时。

[0274] 表11. 示例性卵泡抑素-Fc融合蛋白体内PK数据

[0275]

| 融合蛋白 | 剂量 (mg/kg) | $T_{1/2}$ (hr) | AUC_{INF} (hr*ng/ml) | %AUC 外推 (%) | Cl (mL/hr/kg) | V_{ss} (mL/kg) |
|-------------------|---------------|-------------------|---------------------------|-------------|---------------|------------------|
| WT (比较) | 1.0 | 3.77 | 1550 | 29.3 | 322 | 1490 |
| K82E | 1.0 | 93.5 | 67700 | 14.1 | 11.8 | 807 |
| K(76,82)E | 1.0 | 95.4 | 262000 | 17.4 | 2.67 | 222 |
| K(82,84)E | 1.0 | 64.2 | 336000 | 9.97 | 2.98 | 167 |
| K(81,82)E | 1.0 | 104 | 236500 | 17.6 | 4.20 | 418 |
| K(81,82)D | 1.0 | 194 | 529000 | 37.7 | 1.89 | 371 |
| R78E/K82E | 1.0 | 94.5 | 760000 | 25.0 | 1.32 | 151 |
| K(76,81,82)A | 1.0 | 60.4 | 179000 | 5.95 | 4.46 | 205 |
| K(76,81,82)E | 1.0 | 116 | 646000 | 28.8 | 1.86 | 253 |
| K(76,81,82)D | 1.0 | 85.4 | 598000 | 21.7 | 1.67 | 168 |
| K(76,82,84)E | 1.0 | 74.7 | 638000 | 17.3 | 1.57 | 136 |
| K(76,81,82)E/V88E | 1.0 | 87.9 | 993000 | 26.1 | 1.01 | 122 |
| R78E/K(82,84)E | 1.0 | 71.5 | 453000 | 18.0 | 2.21 | 202 |
| K75N/C77T/K82T | 1.0 | 55.6 | 566000 | 12.7 | 0.886 | 71.0 |
| G74N/K76T/P85T | 1.0 | 45.7 | 92100 | 5.54 | 10.9 | 509 |
| C66A/K75N/C77T | 1.0 | 51.6 | 331000 | 9.37 | 3.02 | 194 |

[0276] 实施例4. 卵泡抑素-Fc融合蛋白抑制肌生长抑制素和激活素A

[0277] 使用荧光素酶基因报道分子测定法测试卵泡抑素-Fc融合蛋白抑制肌生长抑制素和活化素A活性的能力。用pGL3 (CAGA) 12-Luc质粒稳定转染横纹肌肉瘤A204细胞,该质粒含有在萤火虫荧光素酶基因前的Smad3选择性应答元件。1.2nM肌生长抑制素或激活素A用于刺激Smad3信号传导。将融合蛋白与肌生长抑制素或激活素A在室温下孵育30分钟,然后加入细胞中,然后在37°C孵育24小时后,测量荧光素酶活性。用于信号传导测定的肌生长抑制素或激活素A的浓度为1.2nM。如表14所示,卵泡抑素-Fc融合蛋白在刺激测定中抑制肌生长抑制素,IC₅₀为小于0.5nM至超过1.5nM。如表12中所示,卵泡抑素-Fc融合蛋白在刺激测定中抑制活化素A,IC₅₀为小于0.5nM至超过1.5nM。

[0278] 表12来自SMAD途径的基于细胞的测定的肌生长抑制素和活化素A的IC₅₀

| 样品名称 | 肌生长抑制素 IC50 (nM) | 激活素 A IC50 (nM) |
|--------------------------------|------------------|-----------------|
| FS315wt-hFc (比较蛋白) | 0.4 | 0.7 |
| ActRIIB-Fc | 0.5 | 0.5 |
| FS315 Δ HBS-hFcLALA | 0.4 | 未测试 |
| FS315K(76,81,82)A-hFcLALA | 0.3 | 0.7 |
| FS315K82E--hFcLALA | 0.4 | 0.6 |
| FS315K(81,82)E-hFcLALA | 0.6 | 1.0 |
| FS315K(82,84)E-hFcLALA | 0.7 | 1.1 |
| FS315K(76,81,82)E-hFcLALA | 0.5 | 0.7 |
| FS315K(81,82,84)E-hFcLALA | 0.4 | 1.0 |
| FS315K(76,81,82)E/V88E-hFcLALA | 0.6 | 0.6 |
| FS315R78E/K82E-hFcLALA | 0.5 | 1.0 |
| FS315R78E/K(82,84)E-hFcLALA | 0.5 | 0.6 |
| FS315K75N/C77T/K82T-hFcLALA | 0.7 | 1.1 |
| FS315G74N/K76T/P85T-hFcLALA | 1.0 | 1.3 |
| FS315C66S/K75N/C77T-hFcLALA | 1.5 | 2.1 |
| FS315K(76,81,82)E-mFc | 0.7 | 0.8 |

[0279] 实施例5. 卵泡抑素-Fc融合蛋白的体内功效-全身施用

[0280] 本实施例证明了对野生型小鼠和杜氏肌营养不良症的mdx小鼠模型以10mg/kg的剂量静脉内或皮下全身施用卵泡抑素-Fc融合蛋白(例如,FS315K(76,81,82)E-hFcLALA,FS315K(76,81,82)E-mFc)导致体内肌肉量增加的趋势。

[0281] 具体地,在一项研究中,对雄性C57BL/6(野生型小鼠)通过以10mg/kg的剂量静脉注射或以20mg/kg的剂量皮下注射施用媒介物(即PBS)或FS315K(76,81,82)E-hFcLALA,每周两次,持续4周。在第二项研究中,对雄性mdx小鼠通过以10mg/kg的剂量皮下注射施用媒介物(即PBS)或FS315K(76,81,82)E-mFc或以3mg/kg的剂量皮下注射施用小鼠可溶性激活素受体IIB型嵌合Fc融合蛋白(ActRIIB-mFc),每周两次,持续12周。最后一次处理后24小时,处死小鼠并收集腓肠肌和股四头肌并称重。表13中的示例性数据显示,与仅用媒介物处理的腓肠肌或股四头肌相比,来自mdx和C57BL/6小鼠的腓肠肌和股四头肌的重量显著增加。因此,有明确的迹象表明,当在野生型小鼠和DMD的动物模型中全身施用重组卵泡抑素-Fc融合蛋白增加肌肉量。在mdx s研究中,在给药11周后测量前肢握力。图2中的示例性

数据显示,与仅用媒介物处理的动物的握力相比,用FS315K (76,81,82) E-mFc处理的mdx小鼠的前肢握力显著增加。FS315K (76,81,82) E-mFc处理动物的握力量值大于用ActRIIB-mFc阳性对照处理的动物,并且也大于野生型C57BL/10ScSnJ动物。

[0283]

| 表 13 来自 C57BL/6 和 mdx 小鼠的肌肉质量数据 (相对于媒介物的变化%) | | | | |
|-----------------------------------------------|-------------|-------|----------|-------|
| | 相对于介质的百分率变化 | | | |
| | C57BL/6 | | mdx | |
| | Gastroc. | Quad. | Gastroc. | Quad. |
| FS315K(76,81,82)E-hFcLALA 10 mg/kg (IV 2x 每周) | +28% | +33% | | |
| FS315K(76,81,82)E-hFcLALA 20 mg/kg (SC 2x 每周) | +32% | +39% | | |
| FS315K(76,81,82)E-mFc 10 mg/kg (SC 2x 每周) | | | 31% | 36% |
| ActRIIB-mFc 3 mg/kg (SC 2x 每周) | | | 24% | 28% |

[0284] 实施例6: 卵泡抑素构建体的表征

[0285] 本实施例证明了对野生型小鼠和杜氏肌营养不良症的mdx小鼠模型以10mg/kg的剂量静脉内或皮下全身施用卵泡抑素-Fc融合蛋白(例如,FS315K (76,81,82) E-hFcLALA, FS315K (76,81,82) E-mFc) 导致体内肌肉量增加的趋势。

[0286] 还评估了卵泡抑素-Fc融合蛋白的pI变化。下表14显示了HBS中的E和D突变以及高糖基化变体的向更酸性pI的变化。pI的变化与肝素结合减少和体内暴露增加相关。

[0287] 使用NanoPro仪器(ProteinSimple)测定cIEF谱(pI范围)。测试的最终蛋白浓度为0.0025mg/ml,在孔中加载12 μ L。使用的稀释缓冲液是DPBS和尿素/Chaps (10M/0.6%)。使用的其他试剂包括G2预混物:4-9(ProteinSimple 040-969),pI标准梯1(ProteinSimple 040-644),一抗:以1:100稀释的兔抗FS pAB(Abcam#ab47941),二抗:以1:100稀释的兔抗IgG HRP缀合物(Promega#4011),以及底物:鲁米诺/过氧化物XDR。

[0288] 表14. 卵泡抑素-Fc融合蛋白中的等电点(pI)范围

[0289]

| 卵泡抑素-Fc 融合蛋白 | pI 范围 |
|-------------------------------|---------------|
| FS315WT-hFc | 5.51-6.17 |
| FS Δ HBS-hFcLALA | 4.82-5.72 |
| FS Δ HBS-GGG-hFcLALA | 4.82-5.72 |
| FS315del75-86-hFcLALA | 4.83— 5.26 |
| FS315K(81,82)A-hFcLALA | 5.31-5.96 |
| FS315K(81,82)A-GGG-hFcLALA | 5.23-5.93 |
| FS315K(76,81,82)A-hFcLALA | 5.24-5.93 |
| FS303K(76,81,82)A-hFcLALA | 5.28-5.93 |
| FS315K(76,81,82)A-GGG-hFcLALA | 5.23-5.87 |
| FS303K(76,81,82)A-GGG-hFcLALA | 5.23-5.93 |
| FS315K82T-hFcLALA | 5.29-5.93 |
| FS303K82T-hFcLALA | 5.27-6.14 |
| FS315K82T-GGG-hFcLALA | 5.48-5.95 |
| FS303K82T-GGG-hFcLALA | 5.23-6.15 |
| FS315K82E-hFcLALA | 5.48— 6.09 |
| FS315K(75,76)E-hFcLALA | 5.05— 5.26 |
| FS315K(76,82)E-hFcLALA | 4.89— 5.26 |

| | | |
|--------|--------------------------------|-----------------|
| [0290] | FS315K(81,82)E-hFcLALA | 4.83— 5.25 |
| | FS315K(81,82)D-hFcLALA | 4.88— 5.59 |
| | FS315K(76,81,82)E-hFcLALA | 4.87--- 5.80 |
| | FS315K(76,81,82)D-hFcLALA | 4.82— 5.67 |
| | FS315P85T-hFcLALA | 5.51— 6.09 |
| | FS315R86N/V88T-hFcLALA | 5.49— 6.08 |
| | FS315K75N/C77T/K82T-hFcLALA | 4.89— 5.26 |
| | FS315R78N/N80T-hFcLALA | 5.47— 6.09 |
| | FS315C66A/K75N/C77T-hFcLALA | 4.81-6.47 |
| | FS315C66S/K75N/C77T-hFcLALA | 4.82-6.59 |
| | FS315K(76,81,82)E-mFc | 4.7-5.3 |
| | MonoFS315K(76,81,82)E-hFcLALA | 4.7-5.3 |
| | MonoFS315WT-hFcLALA | 4.7-5.67 |
| | MonoFS315 Δ HBS-hFcLALA | 4.83-5.9 |

[0291] 总之,上述实施例证明重组卵泡抑素-Fc融合蛋白在DMD疾病模型中通过例如全身施用非常有效地诱导肌肉肥大。mdx小鼠模型中的肌肉肥大转化为前肢握力的功能改善。因此,重组卵泡抑素-Fc融合蛋白可以是用于治疗DMD的有效蛋白治疗剂。

[0292] 等价方案和范围

[0293] 本领域技术人员将认识到,或使用不超过常规实验能够确定本文所述的本发明的具体实施例的许多等价方案。本发明的范围并不预期限于上文说明书,而是如在下述权利要求中阐述的。

PK 研究 CD-1 小鼠 1mg/kg IV kg IV

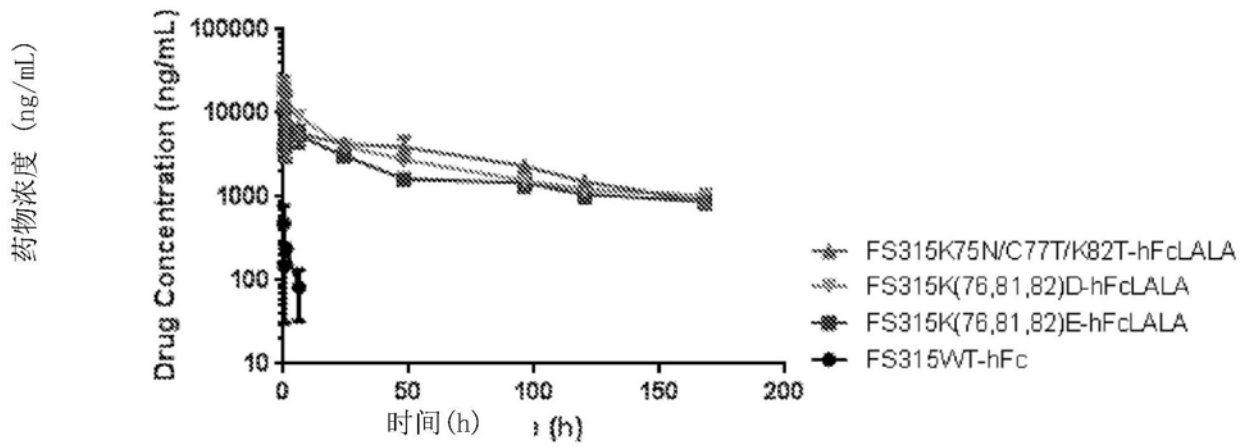


图1A

PK 研究 CD-1 小鼠 1mg/kg IV

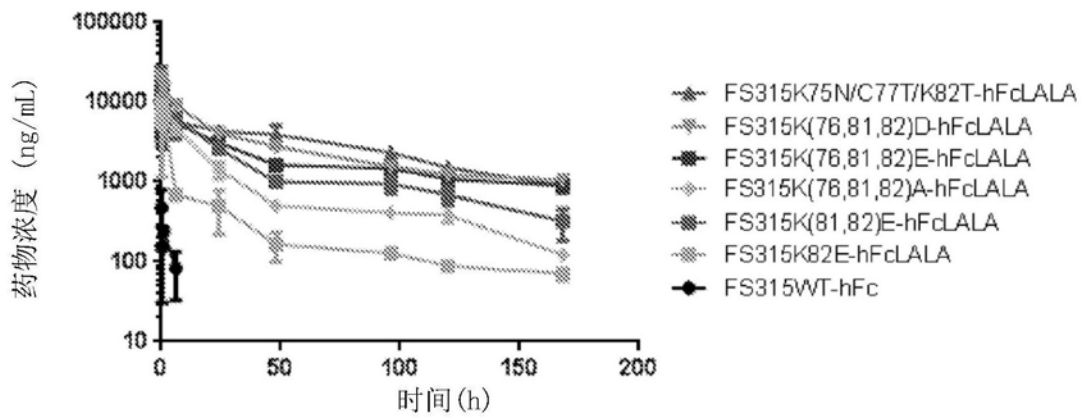


图1B

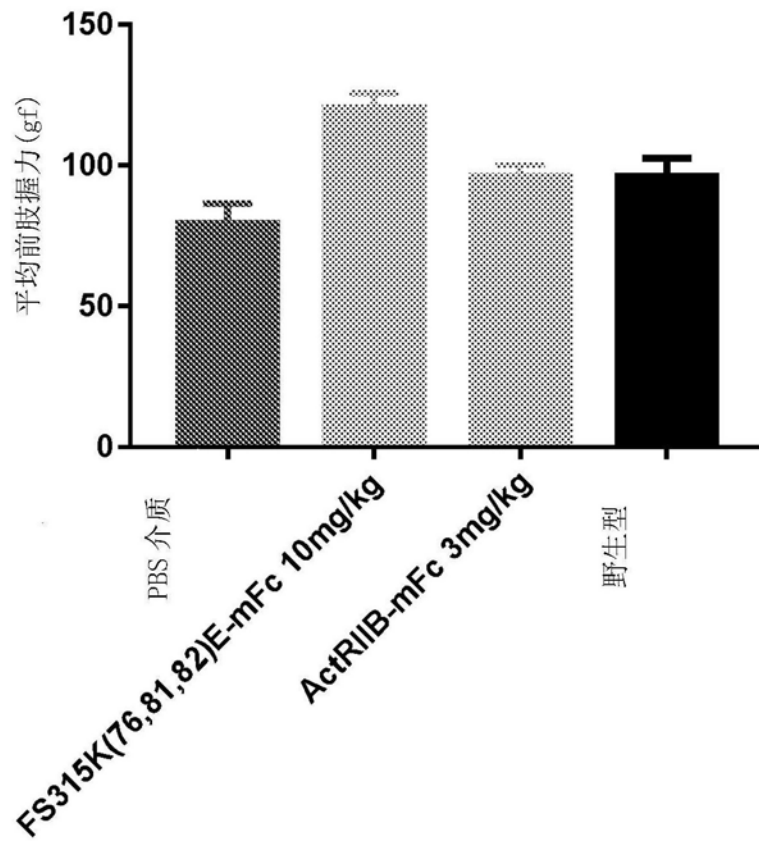


图2