



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101679504 B

(45) 授权公告日 2013.06.19

(21) 申请号 200880021473.2

CN 1604965 A, 2005.04.06, 全文.

(22) 申请日 2008.07.16

WO 2006010891 A2, 2006.02.02, 图9和图10.

(30) 优先权数据

60/951,122 2007.07.20 US

0717985.6 2007.09.14 GB

Mode agneta et al. The human growth hormone(hGH) antagonist G120RhGH dose not antagonize GH in the rat, but has paradoxical agonist activity probably via the prolactin receptor.

(85) PCT申请进入国家阶段日

2009.12.22

《Endocrinology》.1996, 第137卷(第2期), 第447-454页.

(86) PCT申请的申请数据

PCT/GB2008/002406 2008.07.16

Pradhananga S L et al. Tandem fusions of growth hormone and its G120R mutated antagonist retain biological activity and demonstrate prolonged plasma half-life.

(87) PCT申请的公布数据

W02009/013461 EN 2009.01.29

《Growth hormone and IGf research》.2004, 第14卷(第2期), 全文.

(73) 专利权人 埃斯特瑞恩有限公司

地址 英国谢菲尔德

审查员 黎舒婷

(72) 发明人 理查德·罗斯 彼得·阿蒂米克

乔恩·塞耶斯

(74) 专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理

有限责任公司 11204

代理人 王达佐 洪欣

(51) Int. Cl.

C07K 14/61 (2006.01)

C07K 14/71 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

(56) 对比文件

WO 2004090135 A2, 2004.10.21, 全文.

权利要求书1页 说明书13页

序列表19页 附图10页

(54) 发明名称

生长激素融合蛋白

(57) 摘要

本申请公开了体内稳定性和活性增加的生长激素融合蛋白、编码所述蛋白的核酸分子以及使用所述蛋白治疗生长激素缺乏症的方法。

1. 核酸分子,其由 SEQ ID NO :4 所示的核酸序列组成,其中所述核酸序列编码具有生长激素受体激动剂活性的多肽。
2. 多肽,其由 SEQ ID NO :11 所示的氨基酸序列或者 SEQ ID NO :12 所示的氨基酸序列组成,其中所述多肽具有生长激素受体激动剂活性。
3. 如权利要求 2 所述的多肽,其中所述多肽由 SEQ ID NO :11 所示的氨基酸序列组成。
4. 如权利要求 2 所述的多肽,其中所述多肽由 SEQ ID NO :12 所示的氨基酸序列组成。
5. 由两个多肽组成的同型二聚体,所述多肽由 SEQ ID NO :11 组成。
6. 由两个多肽组成的同型二聚体,所述多肽由 SEQ ID NO :12 组成。
7. 载体,其包含权利要求 1 所述的核酸分子。
8. 如权利要求 7 所述的载体,其中所述载体是表达载体。
9. 用权利要求 8 所述的载体转染或转化的细胞。
10. 如权利要求 9 所述的细胞,其中所述细胞是真核细胞。
11. 如权利要求 9 所述的细胞,其中所述细胞是原核细胞。
12. 包含权利要求 2 所述的多肽的药物组合物,其含有赋形剂或载体。
13. 权利要求 2 至 4 中的任一项所述的多肽或权利要求 5 或 6 所述的同型二聚体在制备治疗患有生长激素缺乏症的人个体的药物组合物中的用途。
14. 如权利要求 13 所述的用途,其中所述药物组合物包含有效量的如权利要求 2 至 4 的任一项所述的多肽或如权利要求 5 或 6 所述的同型二聚体。
15. 如权利要求 13 或 14 所述的用途,其中所述药物组合物用于静脉内给药。
16. 如权利要求 13 或 14 所述的用途,其中所述药物组合物用于皮下给药。
17. 如权利要求 13 或 14 所述的用途,其中所述药物组合物用于以 2 天为间隔的给药。
18. 如权利要求 13 或 14 所述的用途,其中所述药物组合物用于以每周为间隔的给药。
19. 如权利要求 13 或 14 所述的用途,其中所述药物组合物用于以 2 周为间隔的给药。
20. 如权利要求 13 或 14 所述的用途,其中所述药物组合物用于以每月为间隔的给药。
21. 如权利要求 13 或 14 所述的用途,其中所述生长激素缺乏症是儿童期生长激素缺乏症。
22. 如权利要求 13 或 14 所述的用途,其中所述生长激素缺乏症是成人生长激素缺乏症。

## 生长激素融合蛋白

[0001] 本发明涉及生长激素融合蛋白、编码所述蛋白的核酸分子以及使用所述蛋白的治疗方法。

[0002] 与受体相互作用产生生化应答 (biochemical response) 的配体被称为激动剂, 并且那些防止或阻碍生化应答的配体被称为拮抗剂。例如, 细胞特异性生长因子是充当激动剂并结合位于细胞表面的受体的配体。由配体特异性结合而导致的受体激活, 通过激活细胞内信号级联促进细胞增殖, 其中, 该信号级联导致细胞周期特异性基因的表达以及激活静态细胞从而增殖。

[0003] 被称为细胞因子的一组生长因子涉及许多不同的细胞功能。其包括调节免疫系统、调控能量代谢以及控制生长和发育。细胞因子通过表达于靶细胞的细胞表面的受体介导其功能。细胞因子受体分成三种不同的亚类。1 型 (生长激素家族) 受体的特征为位于其细胞内区域的氨基末端部分的 4 个保守半胱氨酸残基和存在于 C- 末端部分的 Trp-Ser-Xaa-Trp-Ser 基序。重复的 Cys 基序也存在于 2 型 (干扰素家族) 和 III 型 (中瘤坏死因子家族) 中。

[0004] 生长激素 (GH) 是对儿童期的线性生长和成人的正常身体组成重要的合成代谢细胞因子激素<sup>1</sup>。目前的 GH 替代治疗方案要求每天一次的皮下注射, 这是不方便并且昂贵的。已经采取许多方法制备长效制剂, 其包括聚乙二醇化<sup>2</sup>和缓释制剂<sup>3-5</sup>。聚乙二醇化的缺点在于其降低激素对受体的亲和力<sup>2</sup>, 并且用后续纯化进行化学修饰是昂贵的。缓释制剂已经证明是有效的<sup>4-7</sup>, 但是这些 GH 制剂的特征为突出的早期释放 (early-release) 谱, 这导致超生理 (supraphysiological) GH 水平<sup>3</sup>, 制备是昂贵的并且注射可能是痛苦的<sup>4</sup>。亟需将制造成本降至最低程度、具有好的药物动力学谱、容易给药并且对患者是可以接受的细胞因子制剂。

[0005] GH 通过细胞表面 1 型细胞因子受体 (GHR) 起作用。与其它细胞因子受体一样, GHR 的胞外区域被蛋白酶剪切并且作为结合蛋白 (GHBP) 循环<sup>8</sup>。在生理条件下, GH 以 1 : 1 的摩尔比被 GHBP 在循环中部分地结合并且该复合物是无生物活性的, 从而避免清除和降解<sup>9, 10</sup>。GH 与 GHBP 的交联复合物延迟了清除但是没有生物活性<sup>11</sup>。以 1 : 1 的比率同时给予分别纯化的 GHBP 和 GH 能增强 GH 的合成代谢作用<sup>12</sup>。因此, 与许多激素系统一样, 循环中的结合提供了与活性的游离激素处于平衡的无活性激素循环储存<sup>13</sup>。

[0006] 如生长激素的细胞因子激素的血浆半衰期不长并要求经常给药。例如, 生长激素 (GH) 替代疗法包括每天注射。与其它细胞因子一样, 胞外区域 GH 受体作为结合蛋白循环并且自然地延长了 GH 的生物半衰期。

[0007] 本公开涉及 GH 与其胞外区域受体的配体 - 受体融合物 (LR- 融合物) 生物作用。从哺乳动物细胞培养物纯化这种遗传工程处理的 LR- 融合蛋白。在大鼠中, LR- 融合物的清除率比天然 GH 的清除率降低了 300 倍, 并且一次给药促进生长达 10 天, 这远高于用天然 GH 所观察到的效果。降低的清除率在灵长动物模型中可以重现。LR- 融合物形成相互头尾结合的二聚体, 其提供如 GH 与其结合蛋白天然发生的无活性激素的储存。

[0008] 根据本发明的一方面, 提供了包含核酸序列的核酸分子, 该核酸序列选自:

- [0009] i) SEQ ID NO:1 所示的核酸序列；  
[0010] ii) SEQ ID NO:2 所示的核酸序列；  
[0011] iii) SEQ ID NO:3 所示的核酸序列；  
[0012] iv) SEQ ID NO:4 所示的核酸序列；或  
[0013] v) 核酸分子，其包含在严紧杂交条件下与 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3 或 SEQ ID NO:4 杂交的核酸序列，并且该核酸序列编码具有生长激素受体激动剂活性的多肽。

[0014] 当两个互补核酸分子相互间产生许多氢键时，发生核酸分子的杂交。杂交的严紧性能根据核酸所处的环境条件、杂交方法的特点及所用的核酸分子的成分和长度而变化。Sambrook 等人，Molecular Cloning: A Laboratory Manual (分子克隆：试验手册) (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001) 和 Tijssen, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes Part I, Chapter 2 (生物化学和分子生物学试验技术 - 核酸探针杂交，第一部分，第二章) (Elsevier, New York, 1993) 讨论了为达到特定程度的严紧性，所要求的杂交条件的计算。 $T_m$  是核酸分子的一条链的 50% 与其互补链杂交的温度。下文是一组示例性但非限制性的杂交条件：

[0015] 极高严紧性（允许至少 90% 相同的序列杂交）

[0016] 杂交：5×SSC 于 65℃ 达 16 小时

[0017] 洗涤两次：2×SSC 每次在室温 (RT) 达 15 分钟

[0018] 洗涤两次：0.5×SSC 每次于 65℃ 达 20 分钟

[0019] 高严紧性（允许至少 80% 相同的序列杂交）

[0020] 杂交：5×-6×SSC 于 65℃ -70℃ 达 16-20 小时

[0021] 洗涤两次：2×SSC 每次在室温 (RT) 达 5-20 分钟

[0022] 洗涤两次：1×SSC 每次于 55℃ -70℃ 达 30 分钟

[0023] 低严紧性（允许至少 50% 相同的序列杂交）

[0024] 杂交：6×SSC 在 RT 至 55℃ 达 16-20 小时

[0025] 至少洗涤两次：2×-3×SSC 每次在 RT 至 55℃ 达 20-30 分钟。

[0026] 在本发明的优选实施方案中，所述核酸分子包含或由 SEQ ID NO:1 所示的核酸序列组成。

[0027] 在本发明的优选实施方案中，所述核酸分子包含 SEQ ID NO:2 所示的核酸序列或由其组成。

[0028] 在本发明的优选实施方案中，所述核酸分子包含 SEQ ID NO:3 所示的核酸序列或由其组成。

[0029] 在本发明的优选实施方案中，所述核酸分子包含 SEQ ID NO:4 所示的核酸序列或由其组成。

[0030] 根据本发明的一方面，提供了由本发明的核酸编码的多肽。

[0031] 根据本发明的另一方面，提供了包含氨基酸序列的多肽，该氨基酸序列选自：

[0032] i) SEQ ID NO:5 所示的氨基酸序列；

[0033] ii) SEQ ID NO:6 所示的氨基酸序列；

- [0034] iii)SEQ ID NO:7 所示的氨基酸序列；
- [0035] iv)SEQ ID NO:8 所示的氨基酸序列；
- [0036] v)SEQ ID NO:9 所示的氨基酸序列；
- [0037] vi)SEQ ID NO:10 所示的氨基酸序列；
- [0038] vii)SEQ ID NO:11 所示的氨基酸序列；
- [0039] viii)SEQ ID NO:12 所示的氨基酸序列；其中所述多肽具有生长激素受体激动剂活性。
- [0040] 在本发明的优选实施方案中，所述多肽包含 SEQ ID NO:5 所示的氨基酸序列或由其组成。
- [0041] 在本发明的优选实施方案中，所述多肽包含 SEQ ID NO:6 所示的氨基酸序列或由其组成。
- [0042] 在本发明的优选实施方案中，所述多肽包含 SEQ ID NO:7 所示的氨基酸序列或由其组成。
- [0043] 在本发明的优选实施方案中，所述多肽包含 SEQ ID NO:8 所示的氨基酸序列或由其组成。
- [0044] 在本发明的优选实施方案中，所述多肽包含 SEQ ID NO:9 所示的氨基酸序列或由其组成。
- [0045] 在本发明的优选实施方案中，所述多肽包含 SEQ ID NO:10 所示的氨基酸序列或由其组成。
- [0046] 在本发明的优选实施方案中，所述多肽包含 SEQ ID NO:11 所示的氨基酸序列或由其组成。
- [0047] 在本发明的优选实施方案中，所述多肽包含 SEQ ID NO:12 所示的氨基酸序列或由其组成。
- [0048] 根据本发明的另一方面，提供了包含两个多肽的同型二聚体，该多肽包含 SEQ ID NO:5 或由其组成。
- [0049] 根据本发明的另一方面，提供了包含两个多肽的同型二聚体，该多肽包含 SEQ ID NO:6 或由其组成。
- [0050] 根据本发明的另一方面，提供了包含两个多肽的同型二聚体，该多肽包含 SEQ ID NO:7 或由其组成。
- [0051] 根据本发明的另一方面，提供了包含两个多肽的同型二聚体，该多肽包含 SEQ ID NO:8 或由其组成。
- [0052] 根据本发明的另一方面，提供了包含两个多肽的同型二聚体，该多肽包含 SEQ ID NO:9 或由其组成。
- [0053] 根据本发明的另一方面，提供了包含两个多肽的同型二聚体，该多肽包含 SEQ ID NO:10 或由其组成。
- [0054] 根据本发明的另一方面，提供了包含两个多肽的同型二聚体，该多肽包含 SEQ ID NO:11 或由其组成。
- [0055] 根据本发明的另一方面，提供了包含两个多肽的同型二聚体，该多肽包含 SEQ ID NO:12 或由其组成。

[0056] 根据本发明的另一方面,提供了包含本发明的核酸分子的载体。

[0057] 在本发明的优选实施方案中,所述载体是适于表达本发明的核酸分子的表达载体。

[0058] 本发明的包含核酸的载体不需要包含启动子或其它调节序列,具体地,如果该载体被用于将核酸导入细胞以重组入基因组而实现稳定的转染。优选地,所述载体中的核酸可操作地连接至在宿主细胞中转录的合适启动子或其它调节元件。所述载体可以是在多种宿主中起作用的双功能表达载体。“启动子”是转录起始位点上游的核苷酸序列,其含有转录要求的所有调节区。合适的启动子包括组成的、组织特异性的、诱导的、发育的或其它它在真核或原核细胞中表达的启动子。“可操作地连接”表示连接成为相同核酸分子的部分,合适地放置和定向以起始从启动子的转录。DNA 可操作地连接至启动子即是在启动子的“转录起始调节之下”。

[0059] 在优选的实施方案中,启动子是组成的、诱导的或可调节的启动子。

[0060] 根据本发明的另一方面,提供了用本发明的核酸分子或载体转染或转化的细胞。

[0061] 优选地,所述细胞是真核细胞。或者,所述细胞是原核细胞。

[0062] 在本发明的优选实施方案中,所述细胞选自真菌细胞(例如, *Pichiaspp*、*Saccharomyces spp*、*Neurospora spp*)、昆虫细胞(例如, *Spodopteraspp*)、哺乳动物细胞(例如, COS 细胞、CHO 细胞)、植物细胞。

[0063] 根据本发明的另一方面,提供了包含本发明的多肽的药物组合物,其含有赋形剂或载体。

[0064] 在本发明的优选实施方案中,所述药物组合物与另外的治疗剂组合。

[0065] 给药时,以药物可接受的制剂给予本发明的药物组合物。这些制剂通常含有药物可接受浓度的盐、缓冲剂、防腐剂、相容的载体以及任选的其它治疗剂。

[0066] 能以包括注射在内的常规途径进行本发明的药物组合物的给药。给药和施用可以是,例如,口服、静脉内、腹膜内、肌肉内、腔内、关节内、皮下、局部(眼)、真皮(例如,插入皮肤或粘膜的脂溶性乳膏)、透皮或鼻内。

[0067] 以有效量给予本发明的药物组合物。“有效量”是单独或与其它剂量或协同药物一起,产生期望的应答的药物/组合物的量。这可以仅包括暂时延缓疾病的进展,尽管更优选地,其包括永久地停止疾病的进展。这能通过常规方法进行监测或根据诊断方法进行监测。

[0068] 能根据不同的参数选择给予个体的药物组合物的剂量,特别是,根据所用的给药方式和个体的情况(即年龄、性别)。给药时,以药物可接受的量和药物可接受的组成应用本发明的药物组合物。使用时,药物盐应当是药物可接受的,但是可以方便地使用非药物可接受的盐制备其药物可接受的盐,非药物可接受的盐并不被排除在本发明的范围之外。这些药物学和药物可接受的盐包括但不限于从下述酸制备的盐:盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、磷酸、马来酸、乙酸、水杨酸、柠檬酸、甲酸、丙二酸、琥珀酸等。而且,药物可接受的盐能制备成碱金属或碱土金属盐,例如,钠、钾或钙盐。

[0069] 如需要,可以将药物组合物与药物可接受的载体组合。本文所用的术语“药物可接受的载体”表示适合向人给药的一种或多种相容的固体或液体填充物、稀释剂或封装物质。术语“载体”表示天然或合成的有机或无机成分,活性成分与其组合以促进应用。所述药物

组合物的组分还能以没有基本上削弱期望的药物疗效的相互作用的方式,与本发明的分子以及互相共混合。

[0070] 药物组合物可以含有合适的缓冲剂,其包括乙酸盐、柠檬酸盐、硼酸盐以及磷酸盐。

[0071] 任选地,药物组合物还可以含有合适的防腐剂,例如苯扎氯胺、氯丁醇、对羟基基本甲酸酯和乙基汞硫代水杨酸钠。

[0072] 药物组合物可以方便地表现为单位剂量形式并且可以通过制药领域中熟知的方法的任何一种进行制备。所有的方法包括使活性成分与构成一种或多种附属成分的载体相结合的步骤。通常,通过均匀并充分地使活性化合物与液体载体、细碎固体载体或这两者相结合,然后,若需要,成形产物,制备组合物。

[0073] 适合口服给药的组合物可以为分离的单位,例如,每一个含有预定量活性化合物的胶囊剂、片剂、锭剂。其它组合物包括水性液体或诸如糖浆、酏剂或乳剂的非水性液体形式的悬浮液。

[0074] 适合胃肠外给药的组合物通常地包括无菌水性或非水性制剂,其优选地与受者的血液等渗。可以利用合适的分散剂或润湿剂和悬浮剂,根据已知的方法制备这种制剂。无菌注射制剂还可以是无菌注射溶液或无毒的胃肠外可接受的稀释剂或溶剂的悬浮液,例如,1,3-丁二醇的溶液。可以使用的可接受溶剂中有水、林格氏溶液(Ringer's solution)和等渗氯化钠溶液。另外,常规地使用无菌的不挥发性油作为溶剂或悬浮介质。为了该目的,可以使用包括合成单-或二-甘油酯在内的任何温和的不挥发性油。另外,诸如油酸的脂肪酸可用于制备注射剂。能在Remington's Pharmaceutical Sciences(雷明登氏制药科学),MackPublishing Co., Easton, PA 中找到适合口服、皮下、静脉内、肌肉内给药的载体配方。

[0075] 根据本发明的另一方面,提供了治疗患有生长激素缺乏症的人个体的方法,其包括给予有效量的至少一种本发明的多肽。

[0076] 在本发明的优选方法中,所述多肽被静脉内给药。

[0077] 在本发明的可选的优选方法中,所述多肽被皮下给药。

[0078] 在本发明的另一优选方法中,所述多肽以2天的间隔给药,优选地,以每周、每两周或每月的间隔进行所述多肽的给药。

[0079] 在本发明的优选方法中,所述生长激素缺乏症是儿童期生长激素缺乏症。

[0080] 在本发明的优选方法中,所述生长激素缺乏症是成人生长激素缺乏症。

[0081] 所述生长激素缺乏症的治疗包括,例如,特纳氏综合征(Turners Syndrome)、普拉德-威利综合征(Prader Willi Syndrome)、子宫内生长迟缓、特发性身材矮小、肾衰竭、例如化疗治疗和AIDS治疗期间的异化状态的治疗。

[0082] 在全部的描述和本说明书的权利要求书中,词语“包含(comprise)”和“包含(contain)”及其诸如“包含(comprising)”和“包含(comprise)”的变化形式表示“包括但不限于”并且不意图(并且不)排除其它部分、添加物、组分、整体或步骤。

[0083] 在本说明书的全部的描述和权利要求书中,除非上下文要求,单数形式包括复数形式。具体地,当使用不定冠词时,除非上下文要求,说明书被理解为考虑复数形式以及单数形式。

[0084] 在本发明具体的方面、实施方案或实施例中描述的特性、整体、特征、化合物、化学部分或基团应理解为应用于本文所述的任何其它方面、实施方案或实施例，除非与其不相容。

[0085] 现在将仅通过实施例并参考下文的附图来描述本发明的实施方案：

[0086] 图 1 显示了 GH、GH 结合蛋白 (GHBP)、LR- 融合物以及基于公开结构的 GHR<sup>27</sup> (pdb3HHR) 的关系示意图：(a) 1 : 1 的复合物中 GH 结合 GHBP 的天然构型。(b) GH，其从 GHBP 复合物释放，结合至细胞表面 GH 受体。(c) GH 连接至胞外 GHR (exGHR) 的单体形式的 LR- 融合物分子。(d) LR- 融合物形成相互头-尾结合的二聚体的模型，其中一个分子中的 GH 结合另一分子中的 exGHR。最后，(e) 单体形式 LR- 融合物能结合并激活 GH 受体。

[0087] 图 2 显示了 LR- 融合物的特征和生物活性：(a) 显示了通过 SDS-PAGE，然后用考马斯亮蓝染色 (coomassie staining) (CS) 和利用 GH 特异性抗体的蛋白质印迹法 (western blotting) (WB) 分离的 LR- 融合物。LR- 融合物约为 75kDa 并且分离成相差约 5kDa 的两条条带。(b) 显示了非变性 PAGE 分离的 LR- 融合物，其显示有快 (F) 和慢 (S) 的两种蛋白形式。(c) 切除来自非变性 PAGE 的各条带 (F 和 S) 并通过还原条件 SDS-PAGE 进一步分离，然后进行使用 GH 特异性抗体的蛋白质印迹法。两条条带 (F 和 S) 都跑 (run) 在约 75kDa 处并分离成前面证明的双峰。这表明通过非变性 PAGE 观察到的两条不同的条带都由 75kDa 的 LR- 融合物组成并且可以以单体和二聚体的平衡存在于天然条件下。(d) 显示了凝胶过滤后的 LR- 融合物的洗脱谱。2 个不同峰的分离再次表明了溶液中以单体和二聚体存在的 LR- 融合物。(e) GH 和 LR- 融合物的基于细胞的 GHR 信号生物检测。Y 轴表示从 Stat 5 荧光素酶报道检测的修正的荧光素酶倍数诱导 (fold induction)。GH 的标准曲线的范围为 0nM、0.25nM、0.5nM、1.0nM、2.0nM 和 5nM；LR- 融合物的标准曲线的范围为 0nM、1nM、2nM、5nM、10nM、25nM、50nM、100nM 和 250nM。以 5nM 实现了 GH 的最大应答，而与 LR- 融合物的最大应答要求 50nM 至 250nM；

[0088] 图 3 显示了皮下 (sc) 和静脉内 (iv) 给药后测量的 GH 和 LR- 融合物的谱：(a) 显示 sc 给药后的早期 (5 小时)；(b) 显示 iv 后的晚期 (8 天)；以及 (c) sc 给药后的晚期；

[0089] 图 4 显示用 GH 和 LR- 融合物皮下处理后的体重变化：(a) 与安慰剂 (只有媒介物) 相比，每天用 GH 处理后的体重；(b) 隔天注射；(c) 第 1 天和第 5 天注射两次；(d) 第一天注射一次；以及 (e) 不同处理方案后体重变化的概要。\*\*\* = GH 与 LR- 融合物比较， $p < 0.0001$ ；

[0090] 图 5 示出 1B7v0、1B7v1、1B7v2 和 1B7v3 的体内活性；

[0091] 图 6 示出显示给予 1B7v0、1B7v1、1B7v2 和 1B7v3 的大鼠体重增加的时间进程；

[0092] 图 7 示出皮下给药后 1B7v0、1B7v1、1B7v2 和 1B7v3 的药物动力学；

[0093] 图 8 示出静脉内给药后 1B7v0、1B7v1、1B7v2 和 1B7v3 的药物动力学；

[0094] 图 9 示出以 1mg/kg 顺序 s/c 剂量给予恒河猴后，1B7v2 和 1B7v3 的药物动力学谱。红色虚线表示人生长激素的最小有效浓度。

[0095] 表 1 显示用 GH 或 LR- 融合物处理切除垂体的大鼠 10 天后的结果 (平均值  $\pm$  平均标准误差)。

[0096] 材料与方法

[0097] 动物和人样品的使用。本地伦理学委员会 (local ethics committee) 批准使用

人的样品并且患者提供了知情许可。依照涉及保护用于试验或其它科学目的动物的法国法律 (French law) 进行所有的试验。

[0098] 材料。除非另外指出,所有的材料购自 Sigma(Poole, UK)。重组 GH 购自 Pfizer, DSL(DSL Research Reagents, Oxfordshire, UK) 赠送了结合检测中使用的重组 E. coli 衍生人 GH 结合蛋白,并且 NovoNordisk(NovoNordisk Park, Denmark) 赠送了碘化 GH。除了 mAb B07b 和 B24a,以及 mAb 263(AbD Serotec, Kidlington, Oxford, UK),是 Dr. Skriver(NovoNordisk Park,Denmark) 赠送的礼物,用于纯化和表征的 GH 和 GHR mAb 是自有 (in-house) 材料。

[0099] GH-exGHR LR- 融合物的纯化。通过 RT-PCR 分别从人脑垂体和肝扩增人 GH 和 GH 受体,并将其克隆至载体 pSecTag-V5/FRT/Hist-TOPO(Invitrogen, Paisley, UK) 中,并位于人 GH 分泌信号序列后。使用 4 个重复的 Gly<sub>4</sub>Ser 接头连接人 GH 的天然 C- 末端至人 GHR 的天然 N- 末端。在 CHO Flp-In 细胞 (Invitrogen, Paisley, UK) 中制备稳定的克隆,该细胞适合无蛋白质的培养基并生长于悬浮培养中。用自有 ELISA 证实 LR- 融合物的表达。利用 GH mAb 柱进行亲和纯化。

[0100] 转录生物检测。如以前的稳定地表达人 GHR 的人 293 细胞所述进行转录生物检测<sup>16</sup>。

[0101] ELISA。基于夹心 ELISA 方法建立自有 GH 和 LR- 融合物 ELISA。在检测中,在预包被了人 GH 抗体的小鼠抗体 (mAb 10A7) 的孔中,用生物素标记的抗人 GH 的小鼠抗体 (mAb 7F8) 孵育标准品 (GH 或 LR- 融合物)、对照和未知物。检测的检测极限是 2.5pg 并且检测内和检测间 CV 小于 10%。IGF-I ELISA 购自 DSL(DSL-10-2900ACTIVEmouse/rat IGF-I kit; DSL Research Reagents, Oxfordshire, UK)。

[0102] 药物动力学试验。使用来自 Janvier(Le Genest Saint Isle, France) 的 7 周大的正常 Sprague Dawley 大鼠进行药物动力学试验。在异氟烷麻醉下,进行 Sc 或 iv 给药 (阴茎静脉) 和采血 (眼窝窦)。给大鼠 (n = 4-6/ 组) iv 或 sc 注射 0.1mg/kg 的 rhGH 或 LR- 融合物。从眼球后血管丛收集血液样品。收获血清并保存于 -70℃ 直至检测。利用非线性最小二乘回归分析,将随时间变化的激素浓度与房室模型拟合,来估算药物动力学参数。根据动物重量标准化清除率值。利用从 iv 推注模型拟合获得的系数和指数计算按动物重量的清除率和终末半衰期 ( $t_{1/2}$ )。

[0103] 灵长动物药物动力学试验

[0104] 将试验物质 IB7v2 和 IB7v3 配制在含有 11.9mM 磷酸钠钾、137mM 氯化钠、2.7mM 氯化钾、0.01% 聚山梨酸酯 80 的溶液中,调整该溶液的 pH 为 7.4。

[0105] 试验设计

[0106] 将动物分成 4 个处理组 (1 个媒介物组、1 个 IB7v2 测试组、1 个 IB7v3 测试组),其中媒介物组含有 3 个雄性动物,2 个处理组每组含有 4 个雄性动物。下文的表中列出了剂量水平和给药体积:

[0107]

| 组 | 处理       | # 猴 (雄性) | 剂量 (mg/kg/ 剂量) | 剂量体积                   |
|---|----------|----------|----------------|------------------------|
| 1 | 媒介物 (对照) | 3        | 0              | 0.2mL/kg, 在第 1 和第 15 天 |

|   |       |   |   |                        |
|---|-------|---|---|------------------------|
| 2 | IB7v2 | 4 | 1 | 0.2mL/kg, 在第 1 和第 15 天 |
| 3 | IB7v3 | 4 | 1 | 0.2mL/kg, 在第 1 和第 15 天 |

[0108] 从全部试验的所有动物获得血液样品以测定血清中合适试验材料的浓度。在全部试验的许多时间点采取这些样品。

[0109] 临床终点和测量

[0110] 利用确认的 ELISA 方法测定 IB7v2 和 IB7v3 的血清浓度。利用 WinNonlin Pro (v4.0.1) 软件, 将血清中每种蛋白质的浓度对时间作图, 从而测定每种蛋白质的药物动力学谱。

[0111] 生长试验。生长试验使用切除垂体的大鼠并在来自 Charles River 实验室 (Larbresle, France) 的 Sprague Dawley 大鼠上进行该试验。在 4 周大时, 由饲养员在异氟烷麻醉下切除大鼠的垂体, 并且该大鼠在根据成功手术的体重标准进行选择一周后被送达。将动物单独关在笼中, 并让其在进入试验期前再休息一周。赋形剂、rhGH 和 LR- 融合物的注射溶液不超过 2ml/kg。每天称重大鼠并根据给药方案, 使其接受 10 天的试验物质注射。

[0112] LR- 融合物的表征。利用一组 16 个构象敏感的 hGH 受体 mAb 检查 LR- 融合物的构象。使用变性、非变性胶和蛋白质印迹法分析 LR- 融合物, 并且以对 GH 非构象敏感进行蛋白质印迹法。利用 SuperoseG200 分析柱和分析超速离心, 通过凝胶过滤确定溶液中形成的 LR- 融合蛋白的形式。通过沉积速度进行分析超速离心 (AUC) (分析服务, Dr Andy Barry, Astbury, Leeds University, Leeds, UK)。

[0113] 统计学。如果两组的差异是正态分布的, 使用 Student 检验比较两组, 或者, 如果两组的差异不是正态分布的, 使用 Student-Satterthwaite 检验进行比较。用 F 检验检验分布。使用单因素 ANOVA 比较 3 组或更多组的平均值, 并且, 如果显著水平为  $p < 0.05$ , 使用 Dunnett 检验进行个体比较。在 5% 的显著水平上, 所有的统计学检验都是双侧的 (two-sided) 并且没有估算缺失值。

[0114] 实施例

[0115] LR- 融合物的设计和表征

[0116] 生成重组基因 (图 1c), 该重组基因编码通过柔性  $(\text{Gly}_4\text{Ser})_4$  接头连接至 GHR 胞外区域 (exGHR1-238) 的 A&B 区域的人 GH。在 CHO 细胞中表达该 LR- 融合物, 并利用 GH 的 mAb 抗体的亲和介质纯化该 LR- 融合物至纯度大于 95% (图 2a)。利用 16 个构象敏感的 mAb, 通过 ELISA 筛查 LR- 融合物。所有这些 mAb 以与来自人血清的 GHBP 相当的亲和力结合所述 LR- 融合物。考马斯亮蓝染色和 SDS-PAGE 胶的蛋白印迹法显示该 LR- 融合蛋白分离成约 75kDa 的双峰, 并且两条条带之间的差别约为 5kDa。非变性 PAGE 胶分析 (图 2b) 没有显示凝集的证据。该 LR- 融合物表现出两种不同的形式。从非变性 PAGE 胶切下这些不同的蛋白形式, 快 (F) 和慢 (S), 然后用还原条件 SDS-PAGE 再进行分析。来自非变性 PAGE 的 F&S 形式都包含 75kDa 的双峰 (图 2c)。分析凝胶过滤证实了溶液存在两种形式 LR- 融合物的证据 (图 2d)。这些结果与 LR- 融合物以二聚体存在于溶液中的情况是一致的。分析超速离心证实了这种情况, 其中单体大小被证实为 75kDa。

[0117] 体外生物检测和药物动力学

[0118] 利用 GH 特异性荧光素酶报道检测测试了 LR- 融合物的体外生物活性<sup>16</sup>。LR- 融合物的生物活性约为本静态检测系统中的 GH 的 10%，尽管该 LR- 融合物即使在高于 GH 的浓度下，也能刺激最大的应答（图 2e）。单次皮下（sc）或静脉内（iv）注射后，在正常大鼠中检查了 LR- 融合物药物动力学谱（图 3）。LR- 融合物证明了不分给药途径的延迟清除和 sc 给药后的延迟吸收。iv 推注后，LR- 融合物的终末半衰期为  $21 \pm 2\text{h}$ ，并且清除率为  $3.3 \pm 0.9\text{ml} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。LR- 融合物的清除比 GH 慢 300 倍<sup>2,12</sup>。单次 sc 给药后，LR- 融合物具有与 GH 相比延迟的峰（30 小时比 1 小时）。8 天后仍然能检测到 LR- 融合物而 6 小时后就无法检测到 GH。我们检查了 LR- 融合物的异常药物动力学是否与大小有关。测试了具有相同接头的两种不同 LR- 融合物分子：一种是与只有 B 区域 exGHR 连接的 GH 的 LR- 融合物（55kDa），另一种是与 exGHR 连接的串联（GH 连接 GH）（100kDa）。55kDa 和 100kDa 的蛋白都在生物检测中表现出与原始 75kDa LR- 融合物相比增加的激动剂活性，但是这两者 iv 给药后的循环半衰期都小于 4 小时（精确的半衰期是不可能的，因为所用的取样方案预期较长的半衰期）。结果证实原始 75kDa LR- 融合物的异常药物动力学并不是只与分子量有关。

[0119] 在 t=0 和 t=336 小时（14 天）的两次以 1mg/kg 顺序 s/c 剂量给药后，灵长类试验中的 IB7v2 和 IB7v3 的药物动力学谱示于图 9 中。能注意到，该水平迅速达到最大并随与半衰期小于 1 小时的天然人生长激素相比下降时间段明显延长。如随顺序剂量给药的持续时间的虚线所明确的，该水平很好地保持在最小有效浓度之上。

[0120] LR- 融合物对 GH 的生长促进优势

[0121] 给予切除垂体（缺乏 GH）的大鼠 LR- 融合物和 GH 以测试生物活性。每天给予 GH 在 10 天中诱导连续生长。然后通过隔日 sc 注射或 10 天中两次注射或一次注射将 LR- 融合物与 GH 进行比较。对于所有试验，使用了等摩尔剂量的 GH 和 LR- 融合物并且在 10 天中提供了相同的总剂量：220  $\mu\text{g/kg/天}$ ，10 天中约 10nmol，其类似于以前获得最大生长应答所使用的剂量<sup>12</sup>。LR- 融合物促进增重的升高，这大于相同注射方案下的 GH 并类似于每天 GH 注射所观察到的情况（图 4 和表）。GH 仅在注射后 24 小时内表现出促进增重。相比之下，甚至在以一次注射提供时，LR- 融合物在十天中产生持续的增重。在股骨、胫骨、胸腺、肝和肾中观察到类似的生长方式（表）。分析了所有动物的 10 天末端血液中的 GH 依赖的生物标记物、胰岛素样生长因子 -I（IGF-I）和 GH 以及 LR- 融合物水平（表）。给予 LR- 融合物后，甚至一次注射后，IGF-I 水平明显升高，并且明显高于每天注射 GH 后所观察到的 IGF-I 水平。所有的注射方案后，在末端血液中不能检测到 GH 的水平，而一次注射 10 天后可以检测到 LR- 融合物的水平。

[0122] 我们证明，GH 的 LR- 融合物产生有效的激动剂。我们认为分子形成头尾相互结合的二聚体（图 1d）的能力是其增强的体内生物活性的原因。

[0123] LR- 融合物的设计基于 GHR 已知的晶体结构<sup>17</sup>。我们使用了 4 次重复的柔性 Gly<sub>4</sub>Ser 接头（预计长度为 80 Å）。选择这种长接头作为 GH 和 GHR 之间相对柔性的系绳（tether），从而 GH 部分仍然能与细胞表面 GHR 相互作用（图 1e）。由于稳定性和没有免疫原性，在重组单链 Fv 抗体制备中使用了类似的 Gly<sub>4</sub>Ser 接头<sup>18</sup>。

[0124] LR- 融合物合适地折叠，从而在非变性 PAGE 胶和凝胶过滤中表现为两种不同的类型，即潜在的单体和二聚体。用分析超速离心证实了存在的二聚体。我们认为，LR- 融合物通过每个 LR- 融合物分子中的 GH 部分与另一 LR- 融合物分子中的受体部分的分子间结合

形成相互头尾结合的二聚体（图 1d）。可能由于糖基化，LR- 融合物在 SDS-PAGE 中表现为两条条带，并且分子量差别为 5kDa<sup>19,20</sup>。

[0125] 与 GH 相比，LR- 融合物在体内更有效，但是在体外其生物活性却低 10 倍。这种差别能归因于 LR- 融合物的二聚作用。在静态体外生物检测中，如用天然 GH/GHBP 复合物所观察到的，二聚体没有生物活性。然而，在体内，二聚体提供了与生物活性单体处于平衡的无活性激素的储存。

[0126] 向大鼠 iv 给药后，本发明的 LR- 融合物的清除率比 GH 降低 300 倍，并且比之前报道的 GH/GHBP 复合物或铎合物的清除率降低 10 至 30 倍<sup>21,22</sup>。我们测试了两种其它 LR- 融合物变体，一个为 55kDa，另一个为 100kDa。两种蛋白质都不显示出相同的延迟清除。因此，我们认为，单独的单体不会导致 LR 融合物的延迟清除。肾对 GH 清除率在人中估计为 25-53%<sup>23</sup>，在大鼠中估计为 67%<sup>24</sup>。因此，仅降低肾清除率预计只能大约减半 GH 清除<sup>2</sup>。由于 GH 清除与 GH 受体机制相对独立<sup>25</sup>，据推测蛋白质水解是主要的促成因素。我们认为，本发明的 LR- 融合物清除率的明显降低不但归因于降低的肾清除率，还归因于防止蛋白水解的构象。

[0127] 在切除垂体的大鼠中，仅在 10 天期间提供一次的本发明的 LR- 融合物产生了类似于每天注射 GH 所观察到的增重。上文已经显示，与 GH 以 1：1 摩尔比的复合物共给药的 GHBP 促进了生长<sup>12</sup>。使用相同的方案，本发明的 LR- 融合蛋白在一次注射后的 10 天内促进了生长，而 GH/GHBP 复合物要求每天注射并且本发明的 LR- 融合物产生比 GH/GHBP 共给药后所观察到的 IGF-I 水平更高的 IGF-I 水平。与 GHBP 铎合时，GH 没有生物活性，并且非共价连接的复合物缺乏 LR- 融合物的稳定性<sup>11,12</sup>。LR- 融合物的更强的生物作用可能与其增强的稳定性及其激活单体形式 GHR 的能力有关。

[0128] 在人中，IGF-I 水品通常是 GH 活性的良好的生物标记物。然而，在切除垂体的大鼠中，IGF-I 水平并不总是反映对 GH 的生长应答<sup>2,12</sup>。给予 LR- 融合物导致与 GH 注射相比明显升高的 IGF-I 水平。我们认为对 GH 的生长和 IGF-I 的剂量应答在切除垂体的大鼠中是不同的。因此，本发明的试验中所用的 LR- 融合物的剂量超出促进最大生长应答所要求的剂量，但仍然能刺激产生 IGF-I。大鼠表现出比人更快的肾清除，这使得难以预测人所要求的剂量给药方案。可以预计，能以比 GH 更低的剂量和低得多的频率使用 LR- 融合物。

[0129] 细胞因子激素与血清白蛋白的融合物和聚乙二醇化已经用于延长循环半衰期<sup>2</sup><sup>26</sup>。本发明的 LR- 融合物分子比这两种方法有较大的优势。聚乙二醇化高效地延迟蛋白质的清除，但其要求化学修饰并降低了配体对其受体的亲和力<sup>2</sup>。因此，对于聚乙二醇化，要求更大的剂量，而对于本发明的 LR- 融合物，类似的剂量有比天然 GH 更大的效果。对于 GH 与白蛋白的融合物，白蛋白融合生长激素（Albutropin），因为可以理解地是，其已经从临床试验中撤除了，所以了解得很少。在一个 PK 试验中<sup>26</sup>，当以 s. c. 提供时，白蛋白融合生长激素的终末半衰期比 GH 的终末半衰期长 6 倍，而以 i. v. 提供时，本发明的 LR- 融合蛋白的终末半衰期比 GH 公开的终末半衰期长 100 倍<sup>12</sup>（对于天然人 GH：清除值为 18.6ml/min. kg = 1116ml/hr. kg 并且 Vd = 336ml/kg，因此  $T_{1/2} = 0.693 \times 336 / 1116 = 0.21\text{hrs}$ ）。GH 天然地结合循环外 GHR，因此本发明的 LR- 融合物与其它蛋白质的融合物相比不大可能是免疫原性的，并且大规模硅片 T 细胞表位筛选表明在 LR- 融合物分子上没有位点（数据未显示）。

[0130] 参考文献：

[0131] 1. Woodhouse, L.J., Mukherjee, A., Shalet, S.M. & Ezzat, S. The influence of growth hormone status on physical impairments, functional limitations, and health-related quality of life in adults (生长激素状态对成人身体损伤、功能限制以及健康相关的生活质量的影响). *Endocr Rev.* 27, 287-317 (2006).

[0132] 2. Clark, R. et al. Long-acting growth hormones produced by conjugation with polyethylene glycol (用与聚乙二醇共轭制备的长效生长激素). *Journal of Biological Chemistry.* 271, 21969-21977 (1996).

[0133] 3. Cook, D.M. et al. The pharmacokinetic and pharmacodynamic characteristics of a long-acting growth hormone (GH) preparation (nutropin depot) in GH-deficient adults (缺乏 GH 的成人中长效生长激素 (GH) 制剂 (重组生长激素缓释剂) 的药物动力学和药效学特征). *J Clin Endocrinol Metab.* 87, 4508-4514 (2002).

[0134] 4. Reiter, E.O. et al. A multicenter study of the efficacy and safety of sustained release GH in the treatment of naive pediatric patients with GH deficiency (缓释 GH 治疗患有 GH 缺乏症的无经历 (naive) 儿科患者的疗效和安全性多中心研究). *J Clin Endocrinol Metab.* 86, 470-466 (2001).

[0135] 5. Jostel, A., Mukherjee, A., Alenfall, J., Smethurst, L. & Shalet, S.M. A new sustained-release preparation of human growth hormone and its pharmacokinetic, pharmacodynamic and safety profile (人生长激素新缓释制剂及其药物动力学、药效学 and 安全性谱). *Clin Endocrinol (OxT).* 62, 623-7 (2005).

[0136] 6. Laursen, T. et al. Long-term effects of continuous subcutaneous infusion versus daily subcutaneous injections of growth hormone (GH) on the insulin-like growth factor system, insulin sensitivity, body composition, and bone and lipoprotein metabolism in GH-deficient adults (生长激素 (GH) 的持续皮下输注与每天皮下注射相比对缺乏 GH 的成人的类胰岛素生长因子系统、胰岛素敏感性、身体成分及骨和脂蛋白代谢的长期影响). *J Clin Endocrinol Metab.* 86, 1222-1228 (2001).

[0137] 7. Laursen, T., Jorgensen, J.O., Jakobsen, G., Hansen, B.L. & Christiansen, J.S. Continuous infusion versus daily injections of growth hormone (GH) for 4 weeks in GH-deficient patients (缺乏 GH 的患者中的与每天注射相比的 4 周生长激素 (GH) 连续输注). *J Clin Endocrinol Metab.* 80, 2410-8 (1995).

[0138] 8. Muller-Newen, G., Kohne, C. & Heinrich, P.C. Soluble receptors for cytokines and growth factors (细胞因子和生长因子的可溶性受体). [Review] [58 refs]. *International Archives of Allergy & Immunology.* 111, 99-106 (1996).

[0139] 9. Baumann, G., Amburn, K.D. & Buchanan, T.A. The effect of circulating growth hormone-binding protein on metabolic clearance, distribution, and degradation of human growth hormone (循环生长激素结合蛋白对人生长激素的代谢清除、分布和降解的影响). *J Clin Endocrinol Metab.* 64, 657-660 (1987).

[0140] 10. Baumann, G. Growth hormone heterogeneity: genes, isoforms, variants, and binding proteins (生长激素的异质性: 基因、同工激素、变体和结合蛋白). *Endocrine*

Reviews 12,424449(1991).

[0141] 11. Baumann, G., Shaw, M. A. & Buchanan, T. A. In vivo kinetics of a covalent growth hormone-binding protein complex(共价生长激素结合蛋白复合物的体内动力学). Metabolism. 38,3303(1989).

[0142] 12. Clark, R. G. et al. Recombinant human growth hormone(GH)-binding protein enhances the growth-promoting activity of human GH in the rat(重组人生长激素(GH)结合蛋白在大鼠中增强人GH的生长促进活性). Endocrinology. 137, 43084315(1996).

[0143] 13. Baumann, G. Growth hormone binding protein-errant receptor or active player(生长激素结合蛋白-错误的受体还是主动的参与者)? [editorial]. Endocrinology. 136,377378(1995).

[0144] 14. Ayling, R. M. et al. A dominant-negative mutation of the growth hormone receptor causes familial short stature(生长激素受体的显性失活突变导致家族性矮小症). Nature Genetics. 16,1314(1997).

[0145] 15. Ross, R. J. et al. A short isoform of the human growth hormone receptor functions as a dominant negative inhibitor of the full-length receptor and generates large amounts of binding protein(人生长激素受体的短同工型作为全长受体的显性失活抑制剂并产生大量结合蛋白). Molecular Endocrinology. 11, 265273(1997).

[0146] 16. Ross, R. J. M. et al. Binding and functional studies with the growth hormone receptor antagonist, B2036-PEG(pegvisomant), reveal effects of pegylation and evidence that it binds to a receptor dimer(生长激素受体拮抗剂B2036-PEG(培维索孟(pegvisomant))的结合与功能研究揭示了聚乙二醇化的影响以及其结合受体二聚体的证据). Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 86,17161723(2001).

[0147] 17. Cunningham, B. C. et al. Dimerization of the extracellular domain of the human growth hormone receptor by a single hormone molecule(人生长激素受体的胞外区域与单个激素分子的二聚作用). Science. 254,821825(1991).

[0148] 18. Huston, J. S., Tai, M. S., McCartney, J., Keck, P. & Oppermann, H. Antigen recognition and targeted delivery by the single-chain Fv(单链Fv的抗原识别和靶向递送). Cell Biophys. 22,189-224(1993).

[0149] 19. Herington, A. C., Smith, A. I., Wallace, C. & Stevenson, J. L. Partial purification from human serum of a specific binding protein for human growth hormone(人生长激素特异性结合蛋白从人血清中的部分纯化). Mol Cell Endocrinol. 53, 2039(1987).

[0150] 20. Frick, G. P., Tai, L. R., Baumbach, W. R. & Goodman, H. M. Tissue distribution, turnover, and glycosylation of the long and short growth hormone receptor isoforms in rat tissues(大鼠组织中的长和短生长激素受体同工型的组织分布、代谢和糖基化). Endocrinology. 139,282430(1998).

[0151] 21. Mannor, D. A., Winer, L. M., Shaw, M. A. & Baumann, G. Plasma growth

hormone (GH)-binding proteins :effect on GH binding to receptors and GH action (血浆生长激素 (GH) 结合蛋白 :对 GH 结合受体和 GH 作用的影响 ). J Clin Endocrinol Metab. 73, 304 (1991).

[0152] 22. Lim, L. , Spencer, S. A. , McKay, P. & Waters, M. J. Regulation of growth hormone (GH) bioactivity by a recombinant human GH-binding protein (重组人 GH 结合蛋白对生长激素 (GH) 的生物活性的调节 ). Endocrinology. 127, 1287-91 (1990).

[0153] 23. Haffner, D. , Schaefer, F. , Gifard, J. , Ritz, E. & Mehls, O. Metabolic clearance of recombinant human growth hormone in health and chronic renal failure (重组人生长激素在健康和慢性肾衰竭中的代谢清除 ). J Clin Invest. 93, 1163-71 (1994).

[0154] 24. Johnson, V. & Maack, T. Renal extraction, filtration, absorption, and catabolism of growth hormone (生长激素的肾清除 (extraction)、过滤、吸收和分解代谢 ). American Journal of Physiology 233, F185-F196 (1977).

[0155] 25. Veldhuis, J. D. et al. Impact of experimental blockade of peripheral growth hormone (GH) receptors on the kinetics of endogenous and exogenous GH removal in healthy women and men (试验阻断外周生长激素 (GH) 受体对健康女性和男性的内源和外源 GH 消除动力学的影响 ). Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 87, 5737-5745 (2002).

[0156] 26. Osborn, B. L. et al. Albutropin : a growth hormone-albumin fusion with improved pharmacokinetics and pharmacodynamics in rats and monkeys (白蛋白融合生长激素 : 在大鼠和猴中具有改善的药物动力学和药效学的生长激素白蛋白融合物 ). Eur J Pharmacol 456, 149-58 (2002).

[0157] 27. de Vos, A. M. , Ultsch, M. & Kossiakoff, A. A. Human growth hormone and extracellular domain of its receptor : crystal structure of the complex (人生长激素及其受体的胞外区域 : 复合物的晶体结构 ). Science 255, 3063-12 (1992)

## 序列表

&lt;110&gt; 埃斯特瑞恩有限公司

&lt;120&gt; 生长激素融合蛋白

&lt;130&gt;0746P/W0

&lt;140&gt; 欲指定

&lt;141&gt; 欲指定

&lt;160&gt;12

&lt;170&gt;PatentIn version 3.3

&lt;210&gt;1

&lt;211&gt;1455

&lt;212&gt;DNA

&lt;213&gt; 人工的

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 生长激素 / 受体融合蛋白

&lt;400&gt;1

|                                                                    |      |
|--------------------------------------------------------------------|------|
| atggctacag gctceeggac gtccctgctc ctggcttttg gcctgctctg cctgccctgg  | 60   |
| cttcaagagg gcagtgcctt cccaaccatt cccttatcca ggctttttga caacgctatg  | 120  |
| ctccgcgccc atcgtctgca ccagctggcc tttagacacct accaggagtt tgaagaagcc | 180  |
| tatatcccaa aggaacagaa gtattcattc ctgcagaacc cccagacctc cctctgtttc  | 240  |
| tcagagtcta ttccgacacc ctccaacagg gaggaacac aacagaaatc caacctagag   | 300  |
| ctgctccgca tctccctgct gctcatccag tctgtggctgg agcccgtgca gttcctcagg | 360  |
| agtgtcttcg ccaacagcct ggtgtacggc gcctctgaca gcaacgtcta tgacctccta  | 420  |
| aaggacctag aggaaggcat ccaaacgctg atggggaggc tggaagatgg cagcccccg   | 480  |
| actgggcaga tcttcaagca gacctacagc aagttcgaca caaactcaca caacgatgac  | 540  |
| gcactactca agaactacgg gctgctctac tgcttcagga aggacatgga caaggtcgag  | 600  |
| acattcctgc gcatcgtgca gtgccgtctt gtggagggca gctgtggctt cggcggccgc  | 660  |
| ggtggcggag gtagtggtgg cggaggtagc ggtggcggag gttctggtgg cggaggttcc  | 720  |
| gaattctttt ctggaagtga ggccacagca gctatcctta gcagagcacc ctggagtctg  | 780  |
| caaagtgtta atccaggcct aaagacaaat tcttctaagg agcctaaatt caccaagtgc  | 840  |
| cgttcacctg agcgagagac tttttcatgc cactggacag atgaggttca tcatggtaca  | 900  |
| aagaacctag gaccataca gctgttctat accagaagga aactcaaga atggactcaa    | 960  |
| gaatggaaag aatgccctga ttatgtttct gctggggaaa acagctgtta ctttaattca  | 1020 |
| tcttttacct ccatctggat accttattgt atcaagctaa ctagcaatgg tggtagctg   | 1080 |

|                                                                     |      |
|---------------------------------------------------------------------|------|
| gatgaaaagt gtttctctgt tgatgaaata gtgcaaccag atccacccat tgccctcaac   | 1140 |
| tggaactttac tgaacgtcag ttttaactggg attcatgcag atatccaagt gagatgggaa | 1200 |
| gcaccacgca atgcagatat tcagaaagga tggatgggtc tggagtatga acttcaatac   | 1260 |
| aaagaagtaa atgaaactaa atggaaaatg atggacccta tattgacaac atcagttcca   | 1320 |
| gtgtactcat tgaagtgga taaggaatat gaagtacgcg tgagatccaa acaacgaaac    | 1380 |
| tctggaaatt atggcgagtt cagtgaggtg ctctatgtaa cacttcctca gatgagccaa   | 1440 |
| aagcttttcg aataa                                                    | 1455 |

&lt;210&gt;2

&lt;211&gt;1443

&lt;212&gt;DNA

&lt;213&gt; 人工的

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 生长激素 / 受体融合物

&lt;400&gt;2

|                                                                     |      |
|---------------------------------------------------------------------|------|
| atggctacag gctcccggac gtccctgctc ctggcttttg gcctgctctg cctgccctgg   | 60   |
| cttcaagagg gcagtgcctt cccaaccatt cccttatcca ggcttttttga caacgctatg  | 120  |
| ctccgcgccc atcgtctgca ccagctggcc tttagacacct accaggagtt tgaagaagcc  | 180  |
| tatatcccaa aggaacagaa gtattcattc ctgcagaacc ccagacctc cctctgtttc    | 240  |
| tcagagtcta ttcgcacacc ctccaacagg gaggaacac aacagaaatc caacctagag    | 300  |
| ctgctccgca tctccctgct gctcatccag tcgtggctgg agcccgtgca gttcctcagg   | 360  |
| agtgtcttcg ccaacagcct ggtgtacggc gcctctgaca gcaacgtcta tgacctccta   | 420  |
| aaggacctag aggaaggcat ccaaacgctg atggggaggc tggaagatgg cagcccccg    | 480  |
| actgggcaga tcttcaagca gacctacagc aagttcgaca caaactcaca caacgatgac   | 540  |
| gcactactca agaactacgg gctgctctac tgcttcagga aggacatgga caaggctcag   | 600  |
| acattcctgc gcatcgtgca gtgccgctct gtggagggca gctgtggctt cggcggccgc   | 660  |
| ggtggcggag gtagtggtgg cggaggtagc ggtggcggag gttctgggtg cggaggttcc   | 720  |
| gaattctttt ctggaagtga ggccacagca gctatcctta gcagagcacc ctggagtctg   | 780  |
| caaagtgtta atccaggcct aaagacaaat tcttctaagg agcctaaatt caccaagtgc   | 840  |
| cgttcacctg agcgagagac tttttcatgc cactggacag atgaggttca tcatggtaca   | 900  |
| aagaacctag gaccataca gctgttctat accagaagga acactcaaga atggactcaa    | 960  |
| gaatggaaag aatgccctga ttatgtttct gctggggaaa acagctgtta ctttaattca   | 1020 |
| tcgtttacct ccatctggat accttattgt atcaagctaa ctagcaatgg tggtagagt    | 1080 |
| gatgaaaagt gtttctctgt tgatgaaata gtgcaaccag atccacccat tgccctcaac   | 1140 |
| tggaactttac tgaacgtcag ttttaactggg attcatgcag atatccaagt gagatgggaa | 1200 |
| gcaccacgca atgcagatat tcagaaagga tggatgggtc tggagtatga acttcaatac   | 1260 |
| aaagaagtaa atgaaactaa atggaaaatg atggacccta tattgacaac atcagttcca   | 1320 |

|            |            |             |            |            |            |      |
|------------|------------|-------------|------------|------------|------------|------|
| gtgtactcat | tgaaagtgga | taaggaatat  | gaagtgcgtg | tgagatccaa | acaacgaaac | 1380 |
| tctggaaatt | atggcgagtt | cagtgagggtg | ctctatgtaa | cacttcctca | gatgagccaa | 1440 |
| taa        |            |             |            |            |            | 1443 |

&lt;210&gt;3

&lt;211&gt;1443

&lt;212&gt;DNA

&lt;213&gt; 人工的

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 生长激素 / 受体融合物

&lt;400&gt;3

|             |            |             |             |             |             |      |
|-------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------|
| atggctacag  | gctcccggac | gtccctgctc  | ctggcttttg  | gcctgctctg  | cctgccctgg  | 60   |
| cttcaagagg  | gcagtgcctt | cccaaccatt  | cccttatcca  | ggctttttga  | caacgctatg  | 120  |
| ctccgcgccc  | atcgtctgca | ccagctggcc  | tttgacacct  | accaggagtt  | tgaagaagcc  | 180  |
| tatatcccaa  | aggaacagaa | gtattcattc  | ctgcagaacc  | cccagacctc  | cctctgtttc  | 240  |
| tcagagtcta  | tccgcacacc | ctccaacagg  | gaggaaacac  | aacagaaatc  | caacctagag  | 300  |
| ctgctccgca  | tctccctgct | gtcatccag   | tcgtggctgg  | agcccgtgca  | gttcctcagg  | 360  |
| agtgtcttcg  | ccaacagcct | ggtgtacggc  | gcctctgaca  | gcaacgtcta  | tgacctccta  | 420  |
| aaggacctag  | aggaaggcat | ccaacgctg   | atggggaggc  | tggaagatgg  | cagcccccg   | 480  |
| actgggcaga  | tcttcaagca | gacctacagc  | aagttcgaca  | caaactcaca  | caacgatgac  | 540  |
| gcactactca  | agaactacgg | gctgctctac  | tgcttcagga  | aggacatgga  | caaggctcag  | 600  |
| acattcctgc  | gcatcgtgca | gtgccgctct  | gtggagggca  | gctgtggctt  | cgggtggcgga | 660  |
| ggtagtgggtg | gcggaggtag | cgggtggcgga | ggttctgggtg | gcggagggttc | cgggtggcgga | 720  |
| ggtagttttt  | ctggaagtga | ggccacagca  | gctatcctta  | gcagagcacc  | ctggagtctg  | 780  |
| caaagtgtta  | atccaggcct | aaagacaaat  | tcttctaagg  | agcctaaatt  | caccaagtgc  | 840  |
| cgttcacctg  | agcgagagac | tttttcatgc  | cactggacag  | atgaggttca  | tcatggtaca  | 900  |
| aagaacctag  | gaccataca  | gctgttctat  | accagaagga  | acactcaaga  | atggactcaa  | 960  |
| gaatggaaag  | aatgccctga | ttatgtttct  | gctggggaaa  | acagctgtta  | ctttaattca  | 1020 |
| tcgtttacct  | ccatctggat | accttattgt  | atcaagctaa  | ctagcaatgg  | tggtacagtg  | 1080 |
| gatgaaaagt  | gtttctctgt | tgatgaaata  | gtgcaaccag  | atccacccat  | tgccctcaac  | 1140 |
| tggaactttac | tgaacgtcag | tttaactggg  | attcatgcag  | atatccaagt  | gagatgggaa  | 1200 |
| gcaccacgca  | atgcagatat | tcagaaagga  | tggtatgggtc | tggaagtatga | acttcaatac  | 1260 |
| aaagaagtaa  | atgaaactaa | atggaaaatg  | atggacccta  | tattgacaac  | atcagttcca  | 1320 |
| gtgtactcat  | tgaaagtgga | taaggaatat  | gaagtgcgtg  | tgagatccaa  | acaacgaaac  | 1380 |
| tctggaaatt  | atggcgagtt | cagtgagggtg | ctctatgtaa  | cacttcctca  | gatgagccaa  | 1440 |
| taa         |            |             |             |             |             | 1443 |

&lt;210&gt;4

&lt;211&gt;1368

&lt;212&gt;DNA

&lt;213&gt; 人工的

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 生长激素 / 受体融合物

&lt;400&gt;4

|                                                                    |      |
|--------------------------------------------------------------------|------|
| atggctacag gctcccgac gtcctgctc ctggcttttg gcctgctctg cctgccctgg    | 60   |
| cttcaagagg gcagtgcctt cccaaccatt cccttatcca ggctttttga caacgctatg  | 120  |
| ctccgcgccc atcgtctgca ccagctggcc ttgacacct accaggagtt tgaagaagcc   | 180  |
| tatatcccaa aggaacagaa gtattcattc ctgcagaacc ccagacctc cctctgtttc   | 240  |
| tcagagtcta ttccgacacc ctccaacagg gaggaacac aacagaaatc caacctagag   | 300  |
| ctgctccgca tctccctgct gctcatccag tcgtggctgg agcccgtgca gttcctcagg  | 360  |
| agtgtcttcg ccaacagcct ggtgtacggc gcctctgaca gcaacgtcta tgacctccta  | 420  |
| aaggacctag aggaaggcat ccaacgctg atggggaggc tggaagatgg cagcccccg    | 480  |
| actgggcaga tcttcaagca gacctacagc aagttcgaca caaactcaca caacgatgac  | 540  |
| gcactactca agaactacgg gctgctctac tgcttcagga aggacatgga caaggctcag  | 600  |
| acattcctgc gcatcgtgca gtgccgctct gtggagggca gctgtggctt cttttctgga  | 660  |
| agtgaggcca cagcagctat ccttagcaga gcacctgga gtctgcaaag tgtaaatcca   | 720  |
| ggcctaaaga caaattcttc taaggagcct aaattcacca agtgccgttc acctgagcga  | 780  |
| gagacttttt catgccactg gacagatgag gttcatcatg gtacaaagaa cctaggaccc  | 840  |
| atacagctgt tctataccag aaggaacact caagaatgga ctcaagaatg gaaagaatgc  | 900  |
| cctgattatg tttctgctgg ggaaaacagc tgttacttta attcatcggt tacctccatc  | 960  |
| tggatacctt attgtatcaa gctaactagc aatggtggta cagtggatga aaagtgtttc  | 1020 |
| tctgttgatg aaatagtgca accagatcca ccattgccc tcaactggac ttactgaac    | 1080 |
| gtcagtttaa ctgggattca tgcagatata caagtgagat gggaagcacc acgcaatgca  | 1140 |
| gatattcaga aaggatggat ggttctggag tatgaacttc aatacaaaga agtaaatgaa  | 1200 |
| actaaatgga aaatgatgga ccctatatattg acaacatcag ttccagtgtg ctcatgaaa | 1260 |
| gtggataagg aatatgaagt gcgtgtgaga tccaacaac gaaactctgg aaattatggc   | 1320 |
| gagttcagtg aggtgctcta tgtaacactt cctcagatga gcccaataa              | 1368 |

&lt;210&gt;5

&lt;211&gt;484

&lt;212&gt;PRT

&lt;213&gt; 人工的

&lt;220&gt;

## &lt;223&gt; 生长激素 / 受体融合物

&lt;400&gt;5

```

Met Ala Thr Gly Ser Arg Thr Ser Leu Leu Leu Ala Phe Gly Leu Leu
1           5           10           15
Cys Leu Pro Trp Leu Gln Glu Gly Ser Ala Phe Pro Thr Ile Pro Leu
          20           25           30
Ser Arg Leu Phe Asp Asn Ala Met Leu Arg Ala His Arg Leu His Gln
          35           40           45
Leu Ala Phe Asp Thr Tyr Gln Glu Phe Glu Glu Ala Tyr Ile Pro Lys
          50           55           60
Glu Gln Lys Tyr Ser Phe Leu Gln Asn Pro Gln Thr Ser Leu Cys Phe
65           70           75           80
Ser Glu Ser Ile Pro Thr Pro Ser Asn Arg Glu Glu Thr Gln Gln Lys
          85           90           95
Ser Asn Leu Glu Leu Leu Arg Ile Ser Leu Leu Leu Ile Gln Ser Trp
          100          105          110
Leu Glu Pro Val Gln Phe Leu Arg Ser Val Phe Ala Asn Ser Leu Val
          115          120          125
Tyr Gly Ala Ser Asp Ser Asn Val Tyr Asp Leu Leu Lys Asp Leu Glu
          130          135          140
Glu Gly Ile Gln Thr Leu Met Gly Arg Leu Glu Asp Gly Ser Pro Arg
145          150          155          160
Thr Gly Gln Ile Phe Lys Gln Thr Tyr Ser Lys Phe Asp Thr Asn Ser
          165          170          175
His Asn Asp Asp Ala Leu Leu Lys Asn Tyr Gly Leu Leu Tyr Cys Phe
          180          185          190
Arg Lys Asp Met Asp Lys Val Glu Thr Phe Leu Arg Ile Val Gln Cys
          195          200          205
Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe Gly Gly Arg Gly Gly Gly Gly
          210          215          220
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
225          230          235          240
Glu Phe Phe Ser Gly Ser Glu Ala Thr Ala Ala Ile Leu Ser Arg Ala
          245          250          255
Pro Trp Ser Leu Gln Ser Val Asn Pro Gly Leu Lys Thr Asn Ser Ser
          260          265          270
Lys Glu Pro Lys Phe Thr Lys Cys Arg Ser Pro Glu Arg Glu Thr Phe

```



|                                                                 |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| Ala His Arg Leu His Gln Leu Ala Phe Asp Thr Tyr Gln Glu Phe Glu |     |     |
| 20                                                              | 25  | 30  |
| Glu Ala Tyr Ile Pro Lys Glu Gln Lys Tyr Ser Phe Leu Gln Asn Pro |     |     |
| 35                                                              | 40  | 45  |
| Gln Thr Ser Leu Cys Phe Ser Glu Ser Ile Pro Thr Pro Ser Asn Arg |     |     |
| 50                                                              | 55  | 60  |
| Glu Glu Thr Gln Gln Lys Ser Asn Leu Glu Leu Leu Arg Ile Ser Leu |     |     |
| 65                                                              | 70  | 75  |
| Leu Leu Ile Gln Ser Trp Leu Glu Pro Val Gln Phe Leu Arg Ser Val |     |     |
| 85                                                              | 90  | 95  |
| Phe Ala Asn Ser Leu Val Tyr Gly Ala Ser Asp Ser Asn Val Tyr Asp |     |     |
| 100                                                             | 105 | 110 |
| Leu Leu Lys Asp Leu Glu Glu Gly Ile Gln Thr Leu Met Gly Arg Leu |     |     |
| 115                                                             | 120 | 125 |
| Glu Asp Gly Ser Pro Arg Thr Gly Gln Ile Phe Lys Gln Thr Tyr Ser |     |     |
| 130                                                             | 135 | 140 |
| Lys Phe Asp Thr Asn Ser His Asn Asp Asp Ala Leu Leu Lys Asn Tyr |     |     |
| 145                                                             | 150 | 155 |
| Gly Leu Leu Tyr Cys Phe Arg Lys Asp Met Asp Lys Val Glu Thr Phe |     |     |
| 165                                                             | 170 | 175 |
| Leu Arg Ile Val Gln Cys Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe Gly |     |     |
| 180                                                             | 185 | 190 |
| Gly Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly |     |     |
| 195                                                             | 200 | 205 |
| Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Phe Phe Ser Gly Ser Glu Ala Thr Ala |     |     |
| 210                                                             | 215 | 220 |
| Ala Ile Leu Ser Arg Ala Pro Trp Ser Leu Gln Ser Val Asn Pro Gly |     |     |
| 225                                                             | 230 | 235 |
| Leu Lys Thr Asn Ser Ser Lys Glu Pro Lys Phe Thr Lys Cys Arg Ser |     |     |
| 245                                                             | 250 | 255 |
| Pro Glu Arg Glu Thr Phe Ser Cys His Trp Thr Asp Glu Val His His |     |     |
| 260                                                             | 265 | 270 |
| Gly Thr Lys Asn Leu Gly Pro Ile Gln Leu Phe Tyr Thr Arg Arg Asn |     |     |
| 275                                                             | 280 | 285 |
| Thr Gln Glu Trp Thr Gln Glu Trp Lys Glu Cys Pro Asp Tyr Val Ser |     |     |
| 290                                                             | 295 | 300 |
| Ala Gly Glu Asn Ser Cys Tyr Phe Asn Ser Ser Phe Thr Ser Ile Trp |     |     |
| 305                                                             | 310 | 315 |
| Ile Pro Tyr Cys Ile Lys Leu Thr Ser Asn Gly Gly Thr Val Asp Glu |     |     |

|                                                                 |     |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
|                                                                 | 325 | 330 | 335 |
| Lys Cys Phe Ser Val Asp Glu Ile Val Gln Pro Asp Pro Pro Ile Ala |     |     |     |
|                                                                 | 340 | 345 | 350 |
| Leu Asn Trp Thr Leu Leu Asn Val Ser Leu Thr Gly Ile His Ala Asp |     |     |     |
|                                                                 | 355 | 360 | 365 |
| Ile Gln Val Arg Trp Glu Ala Pro Arg Asn Ala Asp Ile Gln Lys Gly |     |     |     |
|                                                                 | 370 | 375 | 380 |
| Trp Met Val Leu Glu Tyr Glu Leu Gln Tyr Lys Glu Val Asn Glu Thr |     |     |     |
| 385                                                             | 390 | 395 | 400 |
| Lys Trp Lys Met Met Asp Pro Ile Leu Thr Thr Ser Val Pro Val Tyr |     |     |     |
|                                                                 | 405 | 410 | 415 |
| Ser Leu Lys Val Asp Lys Glu Tyr Glu Val Arg Val Arg Ser Lys Gln |     |     |     |
|                                                                 | 420 | 425 | 430 |
| Arg Asn Ser Gly Asn Tyr Gly Glu Phe Ser Glu Val Leu Tyr Val Thr |     |     |     |
|                                                                 | 435 | 440 | 445 |
| Leu Pro Gln Met Ser Gln Lys Leu Phe Glu                         |     |     |     |
|                                                                 | 450 | 455 |     |

&lt;210&gt;7

&lt;211&gt;480

&lt;212&gt;PRT

&lt;213&gt; 人工的

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 生长激素 / 受体融合物

&lt;400&gt;7

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

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 85  |     |     |     |     |     |     |     | 90  |     |     |     | 95  |     |     |     |
| Ser | Asn | Leu | Glu | Leu | Leu | Arg | Ile | Ser | Leu | Leu | Leu | Ile | Gln | Ser | Trp |
| 100 |     |     |     |     |     |     |     | 105 |     |     |     | 110 |     |     |     |
| Leu | Glu | Pro | Val | Gln | Phe | Leu | Arg | Ser | Val | Phe | Ala | Asn | Ser | Leu | Val |
| 115 |     |     |     |     |     |     |     | 120 |     |     |     | 125 |     |     |     |
| Tyr | Gly | Ala | Ser | Asp | Ser | Asn | Val | Tyr | Asp | Leu | Leu | Lys | Asp | Leu | Glu |
| 130 |     |     |     |     |     |     |     | 135 |     |     |     | 140 |     |     |     |
| Glu | Gly | Ile | Gln | Thr | Leu | Met | Gly | Arg | Leu | Glu | Asp | Gly | Ser | Pro | Arg |
| 145 |     |     |     |     |     |     |     | 150 |     |     |     | 155 |     |     |     |
| Thr | Gly | Gln | Ile | Phe | Lys | Gln | Thr | Tyr | Ser | Lys | Phe | Asp | Thr | Asn | Ser |
| 165 |     |     |     |     |     |     |     | 170 |     |     |     | 175 |     |     |     |
| His | Asn | Asp | Asp | Ala | Leu | Leu | Lys | Asn | Tyr | Gly | Leu | Leu | Tyr | Cys | Phe |
| 180 |     |     |     |     |     |     |     | 185 |     |     |     | 190 |     |     |     |
| Arg | Lys | Asp | Met | Asp | Lys | Val | Glu | Thr | Phe | Leu | Arg | Ile | Val | Gln | Cys |
| 195 |     |     |     |     |     |     |     | 200 |     |     |     | 205 |     |     |     |
| Arg | Ser | Val | Glu | Gly | Ser | Cys | Gly | Phe | Gly | Gly | Arg | Gly | Gly | Gly | Gly |
| 210 |     |     |     |     |     |     |     | 215 |     |     |     | 220 |     |     |     |
| Ser | Gly | Gly | Gly | Gly | Ser | Gly | Gly | Gly | Gly | Ser | Gly | Gly | Gly | Gly | Ser |
| 225 |     |     |     |     |     |     |     | 230 |     |     |     | 235 |     |     |     |
| Glu | Phe | Phe | Ser | Gly | Ser | Glu | Ala | Thr | Ala | Ala | Ile | Leu | Ser | Arg | Ala |
| 245 |     |     |     |     |     |     |     | 250 |     |     |     | 255 |     |     |     |
| Pro | Trp | Ser | Leu | Gln | Ser | Val | Asn | Pro | Gly | Leu | Lys | Thr | Asn | Ser | Ser |
| 260 |     |     |     |     |     |     |     | 265 |     |     |     | 270 |     |     |     |
| Lys | Glu | Pro | Lys | Phe | Thr | Lys | Cys | Arg | Ser | Pro | Glu | Arg | Glu | Thr | Phe |
| 275 |     |     |     |     |     |     |     | 280 |     |     |     | 285 |     |     |     |
| Ser | Cys | His | Trp | Thr | Asp | Glu | Val | His | His | Gly | Thr | Lys | Asn | Leu | Gly |
| 290 |     |     |     |     |     |     |     | 295 |     |     |     | 300 |     |     |     |
| Pro | Ile | Gln | Leu | Phe | Tyr | Thr | Arg | Arg | Asn | Thr | Gln | Glu | Trp | Thr | Gln |
| 305 |     |     |     |     |     |     |     | 310 |     |     |     | 315 |     |     |     |
| Glu | Trp | Lys | Glu | Cys | Pro | Asp | Tyr | Val | Ser | Ala | Gly | Glu | Asn | Ser | Cys |
| 325 |     |     |     |     |     |     |     | 330 |     |     |     | 335 |     |     |     |
| Tyr | Phe | Asn | Ser | Ser | Phe | Thr | Ser | Ile | Trp | Ile | Pro | Tyr | Cys | Ile | Lys |
| 340 |     |     |     |     |     |     |     | 345 |     |     |     | 350 |     |     |     |
| Leu | Thr | Ser | Asn | Gly | Gly | Thr | Val | Asp | Glu | Lys | Cys | Phe | Ser | Val | Asp |
| 355 |     |     |     |     |     |     |     | 360 |     |     |     | 365 |     |     |     |
| Glu | Ile | Val | Gln | Pro | Asp | Pro | Pro | Ile | Ala | Leu | Asn | Trp | Thr | Leu | Leu |
| 370 |     |     |     |     |     |     |     | 375 |     |     |     | 380 |     |     |     |
| Asn | Val | Ser | Leu | Thr | Gly | Ile | His | Ala | Asp | Ile | Gln | Val | Arg | Trp | Glu |
| 385 |     |     |     |     |     |     |     | 390 |     |     |     | 395 |     |     |     |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 400 |     |     |     |

|                                                                 |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| Ala Pro Arg Asn Ala Asp Ile Gln Lys Gly Trp Met Val Leu Glu Tyr |     |     |
| 405                                                             | 410 | 415 |
| Glu Leu Gln Tyr Lys Glu Val Asn Glu Thr Lys Trp Lys Met Met Asp |     |     |
| 420                                                             | 425 | 430 |
| Pro Ile Leu Thr Thr Ser Val Pro Val Tyr Ser Leu Lys Val Asp Lys |     |     |
| 435                                                             | 440 | 445 |
| Glu Tyr Glu Val Arg Val Arg Ser Lys Gln Arg Asn Ser Gly Asn Tyr |     |     |
| 450                                                             | 455 | 460 |
| Gly Glu Phe Ser Glu Val Leu Tyr Val Thr Leu Pro Gln Met Ser Gln |     |     |
| 465                                                             | 470 | 475 |
|                                                                 |     | 480 |

&lt;210&gt;8

&lt;211&gt;454

&lt;212&gt;PRT

&lt;213&gt; 人工的

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 生长激素 / 受体融合物

&lt;400&gt;8

|                                                                 |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| Phe Pro Thr Ile Pro Leu Ser Arg Leu Phe Asp Asn Ala Met Leu Arg |     |     |
| 1                                                               | 5   | 10  |
| Ala His Arg Leu His Gln Leu Ala Phe Asp Thr Tyr Gln Glu Phe Glu |     |     |
| 20                                                              | 25  | 30  |
| Glu Ala Tyr Ile Pro Lys Glu Gln Lys Tyr Ser Phe Leu Gln Asn Pro |     |     |
| 35                                                              | 40  | 45  |
| Gln Thr Ser Leu Cys Phe Ser Glu Ser Ile Pro Thr Pro Ser Asn Arg |     |     |
| 50                                                              | 55  | 60  |
| Glu Glu Thr Gln Gln Lys Ser Asn Leu Glu Leu Leu Arg Ile Ser Leu |     |     |
| 65                                                              | 70  | 75  |
| Leu Leu Ile Gln Ser Trp Leu Glu Pro Val Gln Phe Leu Arg Ser Val |     |     |
| 85                                                              | 90  | 95  |
| Phe Ala Asn Ser Leu Val Tyr Gly Ala Ser Asp Ser Asn Val Tyr Asp |     |     |
| 100                                                             | 105 | 110 |
| Leu Leu Lys Asp Leu Glu Glu Gly Ile Gln Thr Leu Met Gly Arg Leu |     |     |
| 115                                                             | 120 | 125 |
| Glu Asp Gly Ser Pro Arg Thr Gly Gln Ile Phe Lys Gln Thr Tyr Ser |     |     |
| 130                                                             | 135 | 140 |

|                                                                 |     |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
| Lys Phe Asp Thr Asn Ser His Asn Asp Asp Ala Leu Leu Lys Asn Tyr |     |     |     |
| 145                                                             | 150 | 155 | 160 |
| Gly Leu Leu Tyr Cys Phe Arg Lys Asp Met Asp Lys Val Glu Thr Phe |     |     |     |
|                                                                 | 165 | 170 | 175 |
| Leu Arg Ile Val Gln Cys Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe Gly |     |     |     |
|                                                                 | 180 | 185 | 190 |
| Gly Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly |     |     |     |
|                                                                 | 195 | 200 | 205 |
| Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Phe Phe Ser Gly Ser Glu Ala Thr Ala |     |     |     |
|                                                                 | 210 | 215 | 220 |
| Ala Ile Leu Ser Arg Ala Pro Trp Ser Leu Gln Ser Val Asn Pro Gly |     |     |     |
| 225                                                             | 230 | 235 | 240 |
| Leu Lys Thr Asn Ser Ser Lys Glu Pro Lys Phe Thr Lys Cys Arg Ser |     |     |     |
|                                                                 | 245 | 250 | 255 |
| Pro Glu Arg Glu Thr Phe Ser Cys His Trp Thr Asp Glu Val His His |     |     |     |
|                                                                 | 260 | 265 | 270 |
| Gly Thr Lys Asn Leu Gly Pro Ile Gln Leu Phe Tyr Thr Arg Arg Asn |     |     |     |
|                                                                 | 275 | 280 | 285 |
| Thr Gln Glu Trp Thr Gln Glu Trp Lys Glu Cys Pro Asp Tyr Val Ser |     |     |     |
|                                                                 | 290 | 295 | 300 |
| Ala Gly Glu Asn Ser Cys Tyr Phe Asn Ser Ser Phe Thr Ser Ile Trp |     |     |     |
| 305                                                             | 310 | 315 | 320 |
| Ile Pro Tyr Cys Ile Lys Leu Thr Ser Asn Gly Gly Thr Val Asp Glu |     |     |     |
|                                                                 | 325 | 330 | 335 |
| Lys Cys Phe Ser Val Asp Glu Ile Val Gln Pro Asp Pro Pro Ile Ala |     |     |     |
|                                                                 | 340 | 345 | 350 |
| Leu Asn Trp Thr Leu Leu Asn Val Ser Leu Thr Gly Ile His Ala Asp |     |     |     |
|                                                                 | 355 | 360 | 365 |
| Ile Gln Val Arg Trp Glu Ala Pro Arg Asn Ala Asp Ile Gln Lys Gly |     |     |     |
|                                                                 | 370 | 375 | 380 |
| Trp Met Val Leu Glu Tyr Glu Leu Gln Tyr Lys Glu Val Asn Glu Thr |     |     |     |
| 385                                                             | 390 | 395 | 400 |
| Lys Trp Lys Met Met Asp Pro Ile Leu Thr Thr Ser Val Pro Val Tyr |     |     |     |
|                                                                 | 405 | 410 | 415 |
| Ser Leu Lys Val Asp Lys Glu Tyr Glu Val Arg Val Arg Ser Lys Gln |     |     |     |
|                                                                 | 420 | 425 | 430 |
| Arg Asn Ser Gly Asn Tyr Gly Glu Phe Ser Glu Val Leu Tyr Val Thr |     |     |     |
|                                                                 | 435 | 440 | 445 |
| Leu Pro Gln Met Ser Gln                                         |     |     |     |

450

&lt;210&gt;9

&lt;211&gt;480

&lt;212&gt;PRT

&lt;213&gt; 人工的

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 生长激素 / 受体融合物

&lt;400&gt;9

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Ala | Thr | Gly | Ser | Arg | Thr | Ser | Leu | Leu | Leu | Ala | Phe | Gly | Leu | Leu |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     | 10  |     |     |     |     |     | 15  |     |
| Cys | Leu | Pro | Trp | Leu | Gln | Glu | Gly | Ser | Ala | Phe | Pro | Thr | Ile | Pro | Leu |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |
| Ser | Arg | Leu | Phe | Asp | Asn | Ala | Met | Leu | Arg | Ala | His | Arg | Leu | His | Gln |
|     |     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |
| Leu | Ala | Phe | Asp | Thr | Tyr | Gln | Glu | Phe | Glu | Glu | Ala | Tyr | Ile | Pro | Lys |
|     |     |     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |
| Glu | Gln | Lys | Tyr | Ser | Phe | Leu | Gln | Asn | Pro | Gln | Thr | Ser | Leu | Cys | Phe |
| 65  |     |     |     |     |     | 70  |     |     |     | 75  |     |     |     | 80  |     |
| Ser | Glu | Ser | Ile | Pro | Thr | Pro | Ser | Asn | Arg | Glu | Glu | Thr | Gln | Gln | Lys |
|     |     |     |     | 85  |     |     |     |     |     | 90  |     |     |     | 95  |     |
| Ser | Asn | Leu | Glu | Leu | Leu | Arg | Ile | Ser | Leu | Leu | Leu | Ile | Gln | Ser | Trp |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     |     |     | 105 |     |     |     | 110 |     |
| Leu | Glu | Pro | Val | Gln | Phe | Leu | Arg | Ser | Val | Phe | Ala | Asn | Ser | Leu | Val |
|     |     |     | 115 |     |     |     |     |     |     | 120 |     |     |     | 125 |     |
| Tyr | Gly | Ala | Ser | Asp | Ser | Asn | Val | Tyr | Asp | Leu | Leu | Lys | Asp | Leu | Glu |
|     |     |     | 130 |     |     |     |     |     |     | 135 |     |     |     | 140 |     |
| Glu | Gly | Ile | Gln | Thr | Leu | Met | Gly | Arg | Leu | Glu | Asp | Gly | Ser | Pro | Arg |
| 145 |     |     |     |     |     | 150 |     |     |     | 155 |     |     |     | 160 |     |
| Thr | Gly | Gln | Ile | Phe | Lys | Gln | Thr | Tyr | Ser | Lys | Phe | Asp | Thr | Asn | Ser |
|     |     |     |     | 165 |     |     |     |     |     | 170 |     |     |     | 175 |     |
| His | Asn | Asp | Asp | Ala | Leu | Leu | Lys | Asn | Tyr | Gly | Leu | Leu | Tyr | Cys | Phe |
|     |     |     |     | 180 |     |     |     |     |     | 185 |     |     |     | 190 |     |
| Arg | Lys | Asp | Met | Asp | Lys | Val | Glu | Thr | Phe | Leu | Arg | Ile | Val | Gln | Cys |
|     |     |     | 195 |     |     |     |     |     |     | 200 |     |     |     | 205 |     |
| Arg | Ser | Val | Glu | Gly | Ser | Cys | Gly | Phe | Gly | Gly | Gly | Gly | Ser | Gly | Gly |

|                                                                 |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 210                                                             | 215 | 220 |
| Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly |     |     |
| 225                                                             | 230 | 235 |
| Gly Ser Phe Ser Gly Ser Glu Ala Thr Ala Ala Ile Leu Ser Arg Ala |     | 240 |
|                                                                 | 245 | 250 |
| Pro Trp Ser Leu Gln Ser Val Asn Pro Gly Leu Lys Thr Asn Ser Ser |     | 255 |
|                                                                 | 260 | 265 |
| Lys Glu Pro Lys Phe Thr Lys Cys Arg Ser Pro Glu Arg Glu Thr Phe |     | 270 |
|                                                                 | 275 | 280 |
| Ser Cys His Trp Thr Asp Glu Val His His Gly Thr Lys Asn Leu Gly |     | 285 |
|                                                                 | 290 | 295 |
| Pro Ile Gln Leu Phe Tyr Thr Arg Arg Asn Thr Gln Glu Trp Thr Gln |     | 300 |
| 305                                                             | 310 | 315 |
| Glu Trp Lys Glu Cys Pro Asp Tyr Val Ser Ala Gly Glu Asn Ser Cys |     | 320 |
|                                                                 | 325 | 330 |
| Tyr Phe Asn Ser Ser Phe Thr Ser Ile Trp Ile Pro Tyr Cys Ile Lys |     | 335 |
|                                                                 | 340 | 345 |
| Leu Thr Ser Asn Gly Gly Thr Val Asp Glu Lys Cys Phe Ser Val Asp |     | 350 |
|                                                                 | 355 | 360 |
| Glu Ile Val Gln Pro Asp Pro Pro Ile Ala Leu Asn Trp Thr Leu Leu |     | 365 |
|                                                                 | 370 | 375 |
| Asn Val Ser Leu Thr Gly Ile His Ala Asp Ile Gln Val Arg Trp Glu |     | 380 |
| 385                                                             | 390 | 395 |
| Ala Pro Arg Asn Ala Asp Ile Gln Lys Gly Trp Met Val Leu Glu Tyr |     | 400 |
|                                                                 | 405 | 410 |
| Glu Leu Gln Tyr Lys Glu Val Asn Glu Thr Lys Trp Lys Met Met Asp |     | 415 |
|                                                                 | 420 | 425 |
| Pro Ile Leu Thr Thr Ser Val Pro Val Tyr Ser Leu Lys Val Asp Lys |     | 430 |
|                                                                 | 435 | 440 |
| Glu Tyr Glu Val Arg Val Arg Ser Lys Gln Arg Asn Ser Gly Asn Tyr |     | 445 |
|                                                                 | 450 | 455 |
| Gly Glu Phe Ser Glu Val Leu Tyr Val Thr Leu Pro Gln Met Ser Gln |     | 460 |
| 465                                                             | 470 | 475 |
|                                                                 |     | 480 |

&lt;210&gt;10

&lt;211&gt;454

&lt;212&gt;PRT

&lt;213&gt; 人工的

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 生长激素 / 受体融合物

&lt;400&gt;10

Phe Pro Thr Ile Pro Leu Ser Arg Leu Phe Asp Asn Ala Met Leu Arg  
 1                      5                      10                      15  
 Ala His Arg Leu His Gln Leu Ala Phe Asp Thr Tyr Gln Glu Phe Glu  
                     20                      25                      30  
 Glu Ala Tyr Ile Pro Lys Glu Gln Lys Tyr Ser Phe Leu Gln Asn Pro  
                     35                      40                      45  
 Gln Thr Ser Leu Cys Phe Ser Glu Ser Ile Pro Thr Pro Ser Asn Arg  
                     50                      55                      60  
 Glu Glu Thr Gln Gln Lys Ser Asn Leu Glu Leu Leu Arg Ile Ser Leu  
 65                      70                      75                      80  
 Leu Leu Ile Gln Ser Trp Leu Glu Pro Val Gln Phe Leu Arg Ser Val  
                     85                      90                      95  
 Phe Ala Asn Ser Leu Val Tyr Gly Ala Ser Asp Ser Asn Val Tyr Asp  
                     100                      105                      110  
 Leu Leu Lys Asp Leu Glu Glu Gly Ile Gln Thr Leu Met Gly Arg Leu  
                     115                      120                      125  
 Glu Asp Gly Ser Pro Arg Thr Gly Gln Ile Phe Lys Gln Thr Tyr Ser  
                     130                      135                      140  
 Lys Phe Asp Thr Asn Ser His Asn Asp Asp Ala Leu Leu Lys Asn Tyr  
 145                      150                      155                      160  
 Gly Leu Leu Tyr Cys Phe Arg Lys Asp Met Asp Lys Val Glu Thr Phe  
                     165                      170                      175  
 Leu Arg Ile Val Gln Cys Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe Gly  
                     180                      185                      190  
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly  
                     195                      200                      205  
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Phe Ser Gly Ser Glu Ala Thr Ala  
                     210                      215                      220  
 Ala Ile Leu Ser Arg Ala Pro Trp Ser Leu Gln Ser Val Asn Pro Gly  
 225                      230                      235                      240  
 Leu Lys Thr Asn Ser Ser Lys Glu Pro Lys Phe Thr Lys Cys Arg Ser  
                     245                      250                      255  
 Pro Glu Arg Glu Thr Phe Ser Cys His Trp Thr Asp Glu Val His His  
                     260                      265                      270

|                                                                 |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| Gly Thr Lys Asn Leu Gly Pro Ile Gln Leu Phe Tyr Thr Arg Arg Asn |     |     |
| 275                                                             | 280 | 285 |
| Thr Gln Glu Trp Thr Gln Glu Trp Lys Glu Cys Pro Asp Tyr Val Ser |     |     |
| 290                                                             | 295 | 300 |
| Ala Gly Glu Asn Ser Cys Tyr Phe Asn Ser Ser Phe Thr Ser Ile Trp |     |     |
| 305                                                             | 310 | 315 |
| Ile Pro Tyr Cys Ile Lys Leu Thr Ser Asn Gly Gly Thr Val Asp Glu |     |     |
|                                                                 | 325 | 330 |
| Lys Cys Phe Ser Val Asp Glu Ile Val Gln Pro Asp Pro Pro Ile Ala |     |     |
|                                                                 | 340 | 345 |
| Leu Asn Trp Thr Leu Leu Asn Val Ser Leu Thr Gly Ile His Ala Asp |     |     |
|                                                                 | 355 | 360 |
| Ile Gln Val Arg Trp Glu Ala Pro Arg Asn Ala Asp Ile Gln Lys Gly |     |     |
|                                                                 | 370 | 375 |
| Trp Met Val Leu Glu Tyr Glu Leu Gln Tyr Lys Glu Val Asn Glu Thr |     |     |
| 385                                                             | 390 | 395 |
| Lys Trp Lys Met Met Asp Pro Ile Leu Thr Thr Ser Val Pro Val Tyr |     |     |
|                                                                 | 405 | 410 |
| Ser Leu Lys Val Asp Lys Glu Tyr Glu Val Arg Val Arg Ser Lys Gln |     |     |
|                                                                 | 420 | 425 |
| Arg Asn Ser Gly Asn Tyr Gly Glu Phe Ser Glu Val Leu Tyr Val Thr |     |     |
|                                                                 | 435 | 440 |
| Leu Pro Gln Met Ser Gln                                         |     | 445 |
| 450                                                             |     |     |

&lt;210&gt;11

&lt;211&gt;455

&lt;212&gt;PRT

&lt;213&gt; 人工的

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 生长激素 / 受体融合物

&lt;400&gt;11

|                                                                 |    |    |
|-----------------------------------------------------------------|----|----|
| Met Ala Thr Gly Ser Arg Thr Ser Leu Leu Leu Ala Phe Gly Leu Leu |    |    |
| 1                                                               | 5  | 10 |
| Cys Leu Pro Trp Leu Gln Glu Gly Ser Ala Phe Pro Thr Ile Pro Leu |    |    |
|                                                                 | 20 | 30 |

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

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

|                                                                 |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 100                                                             | 105 | 110 |
| Leu Leu Lys Asp Leu Glu Glu Gly Ile Gln Thr Leu Met Gly Arg Leu |     |     |
| 115                                                             | 120 | 125 |
| Glu Asp Gly Ser Pro Arg Thr Gly Gln Ile Phe Lys Gln Thr Tyr Ser |     |     |
| 130                                                             | 135 | 140 |
| Lys Phe Asp Thr Asn Ser His Asn Asp Asp Ala Leu Leu Lys Asn Tyr |     |     |
| 145                                                             | 150 | 155 |
| Gly Leu Leu Tyr Cys Phe Arg Lys Asp Met Asp Lys Val Glu Thr Phe |     |     |
| 165                                                             | 170 | 175 |
| Leu Arg Ile Val Gln Cys Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe Phe |     |     |
| 180                                                             | 185 | 190 |
| Ser Gly Ser Glu Ala Thr Ala Ala Ile Leu Ser Arg Ala Pro Trp Ser |     |     |
| 195                                                             | 200 | 205 |
| Leu Gln Ser Val Asn Pro Gly Leu Lys Thr Asn Ser Ser Lys Glu Pro |     |     |
| 210                                                             | 215 | 220 |
| Lys Phe Thr Lys Cys Arg Ser Pro Glu Arg Glu Thr Phe Ser Cys His |     |     |
| 225                                                             | 230 | 235 |
| Trp Thr Asp Glu Val His His Gly Thr Lys Asn Leu Gly Pro Ile Gln |     |     |
| 245                                                             | 250 | 255 |
| Leu Phe Tyr Thr Arg Arg Asn Thr Gln Glu Trp Thr Gln Glu Trp Lys |     |     |
| 260                                                             | 265 | 270 |
| Glu Cys Pro Asp Tyr Val Ser Ala Gly Glu Asn Ser Cys Tyr Phe Asn |     |     |
| 275                                                             | 280 | 285 |
| Ser Ser Phe Thr Ser Ile Trp Ile Pro Tyr Cys Ile Lys Leu Thr Ser |     |     |
| 290                                                             | 295 | 300 |
| Asn Gly Gly Thr Val Asp Glu Lys Cys Phe Ser Val Asp Glu Ile Val |     |     |
| 305                                                             | 310 | 315 |
| Gln Pro Asp Pro Pro Ile Ala Leu Asn Trp Thr Leu Leu Asn Val Ser |     |     |
| 325                                                             | 330 | 335 |
| Leu Thr Gly Ile His Ala Asp Ile Gln Val Arg Trp Glu Ala Pro Arg |     |     |
| 340                                                             | 345 | 350 |
| Asn Ala Asp Ile Gln Lys Gly Trp Met Val Leu Glu Tyr Glu Leu Gln |     |     |
| 355                                                             | 360 | 365 |
| Tyr Lys Glu Val Asn Glu Thr Lys Trp Lys Met Met Asp Pro Ile Leu |     |     |
| 370                                                             | 375 | 380 |
| Thr Thr Ser Val Pro Val Tyr Ser Leu Lys Val Asp Lys Glu Tyr Glu |     |     |
| 385                                                             | 390 | 395 |
| Val Arg Val Arg Ser Lys Gln Arg Asn Ser Gly Asn Tyr Gly Glu Phe |     |     |
| 405                                                             | 410 | 415 |

---

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ser | Glu | Val | Leu | Tyr | Val | Thr | Leu | Pro | Gln | Met | Ser | Gln |
| 420 |     |     |     |     |     |     | 425 |     |     |     |     |     |

表 1

| 10 天的变化                         | 安慰剂       | 处理      | GH        | LR-融合物    | t-检验 p<br>GH 比 LR |
|---------------------------------|-----------|---------|-----------|-----------|-------------------|
| 重量<br>(g)                       | 86.3±1.6  | 每天注射    | 103.3±1.4 | na        | na                |
|                                 |           | 每 2 天注射 | 95.9±0.8  | 102.2±1.6 | <0.001            |
|                                 |           | 每 5 天注射 | 88.4±2.1  | 101.1±0.7 | <0.001            |
|                                 |           | 一次注射    | 93.2±2.9  | 108.3±1.5 | <0.001            |
| 从基线的重量变化<br>(g)                 | 1.43±0.96 | 每天注射    | 16.4±0.8  | na        | na                |
|                                 |           | 每 2 天注射 | 9.9±0.5   | 17±1.5    | 0.003             |
|                                 |           | 每 5 天注射 | 4.5±1.3   | 14.8±0.9  | <0.001            |
|                                 |           | 一次注射    | 5.0±0.1   | 17.2±1.1  | <0.001            |
| 股骨长度变化<br>(mM)                  | 0.00±0.25 | 每天注射    | 0.83±0.26 | na        | na                |
|                                 |           | 每 2 天注射 | 0.99±0.18 | 1.08±0.07 | 0.667             |
|                                 |           | 每 5 天注射 | 0.44±0.21 | 1.29±0.22 | 0.0194            |
|                                 |           | 一次注射    | na        | na        | na                |
| 胫骨重量变化<br>(g)                   | 0.00±0.02 | 每天注射    | 0.03±0.01 | na        | na                |
|                                 |           | 每 2 天注射 | 0.06±0.02 | 0.05±0.01 | 0.52              |
|                                 |           | 每 5 天注射 | 0.01±0.01 | 0.07±0.02 | 0.027             |
|                                 |           | 一次注射    | na        | na        | na                |
| 胸腺重量变化<br>(mg)                  | 0.00±21   | 每天注射    | 79±20     | na        | na                |
|                                 |           | 每 2 天注射 | 43±6      | 142±22    | 0.0054            |
|                                 |           | 每 5 天注射 | 35±12     | 120±15    | 0.0132            |
|                                 |           | 一次注射    | -13±22    | 117±21    | 0.0017            |
| 肝重量变化<br>(mg)                   | 0±167     | 每天注射    | 123±170   | na        | na                |
|                                 |           | 每 2 天注射 | 362±74    | 587±206   | 0.056             |
|                                 |           | 每 5 天注射 | 402±236   | 407±116   | 0.073             |
|                                 |           | 一次注射    | na        | na        | na                |
| 肾重量变化<br>(mg)                   | 0±11      | 每天注射    | 51±22     | na        | na                |
|                                 |           | 每 2 天注射 | 45±26     | 75±21     | 0.0053            |
|                                 |           | 每 5 天注射 | 5±26      | 67±12     | 0.0273            |
|                                 |           | 一次注射    | 7±22      | 78±15     | 0.0062            |
| IGF-I<br>(ng.ml <sup>-1</sup> ) | 51±12     | 每天注射    | 92±30     | na        | na                |
|                                 |           | 每 2 天注射 | 92±30     | 329±35    | 0.0005            |
|                                 |           | 每 5 天注射 | 55±15     | 205±5     | <0.001            |
|                                 |           | 一次注射    | 18±2.5    | 198±66    | 0.0146            |
| 通过 ELISA 分析的<br>GH 或嵌合体<br>(nM) | nd        | 每天注射    | nd        | na        | na                |
|                                 |           | 每 2 天注射 | nd        | 44±15     | 0.015             |
|                                 |           | 每 5 天注射 | nd        | 23±5      | 0.0015            |
|                                 |           | 一次注射    | nd        | 3.2±1.2   | 0.0193            |

nd=未检测到

na=未分析

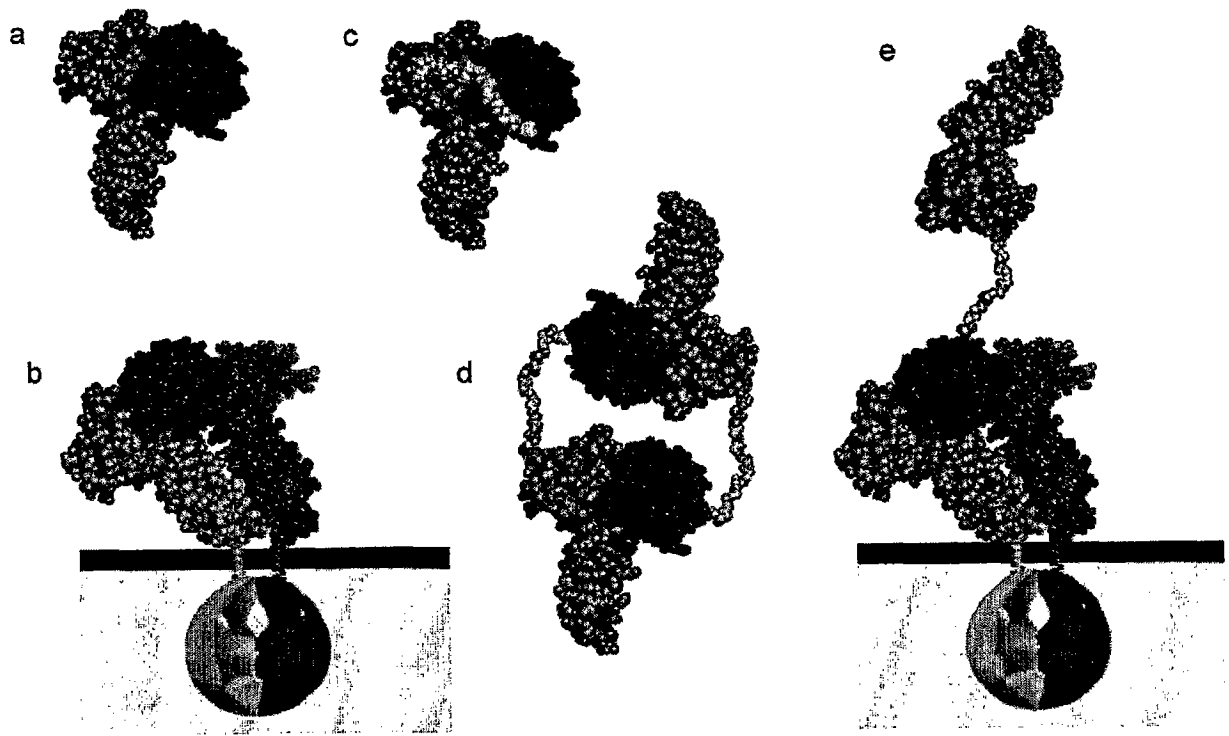


图 1

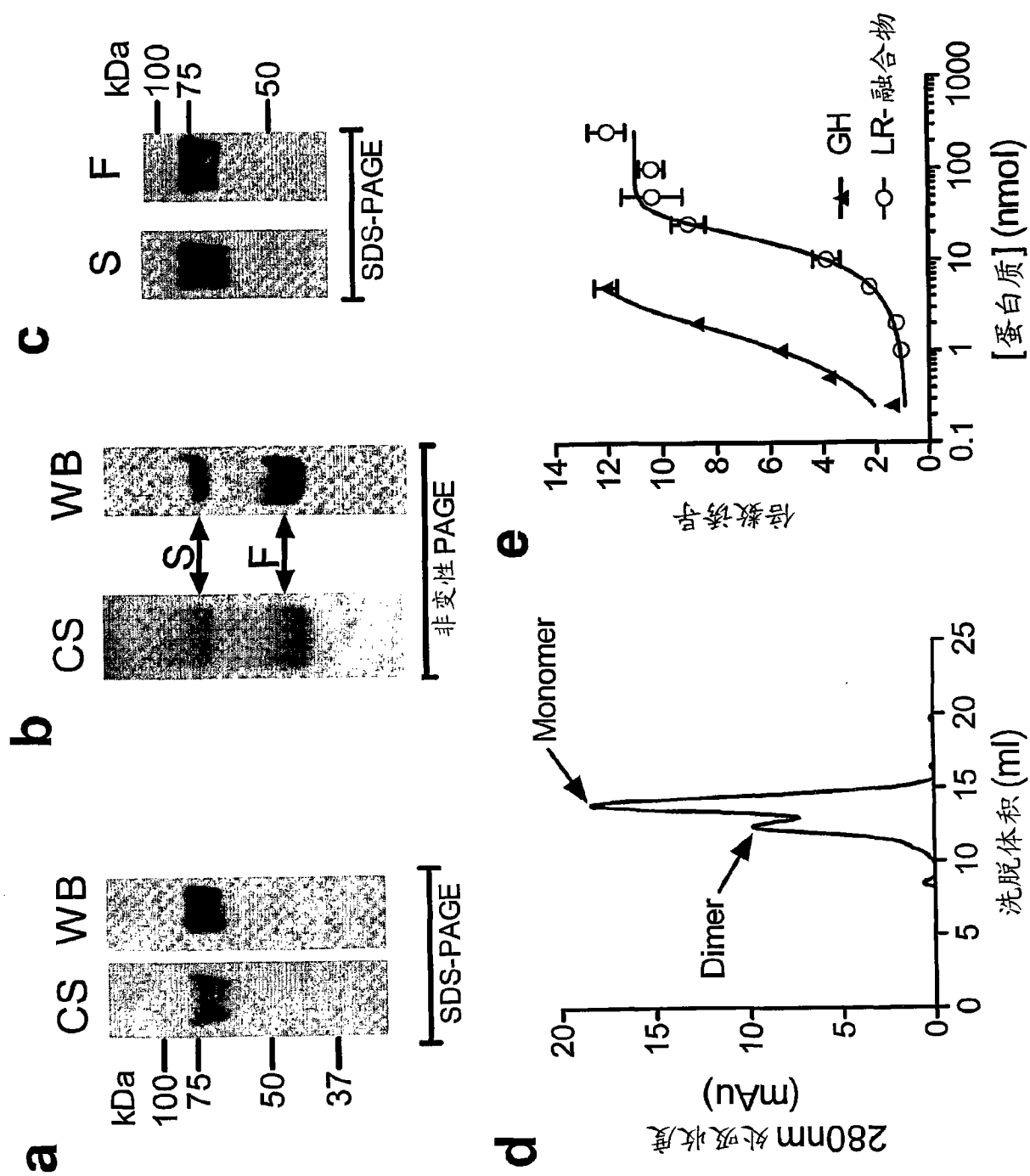


图 2

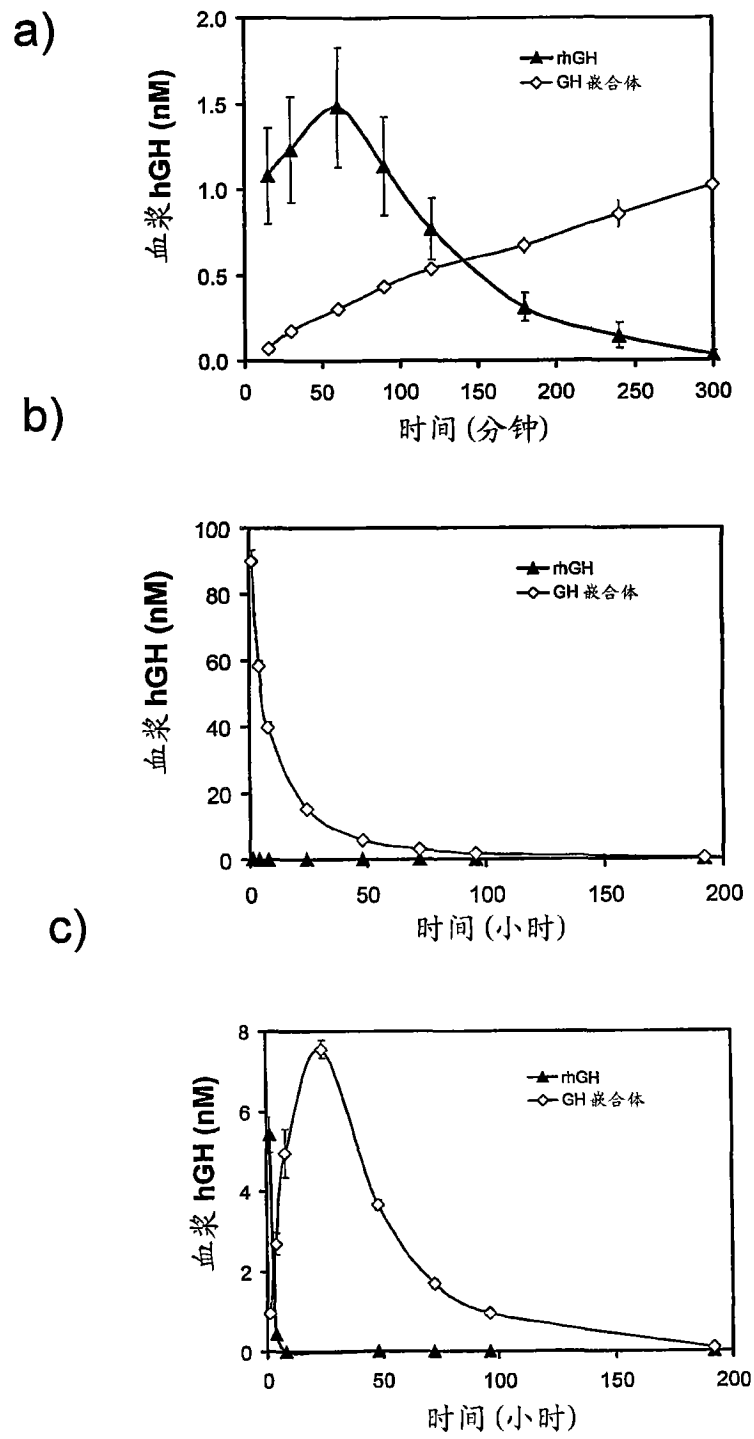


图 3

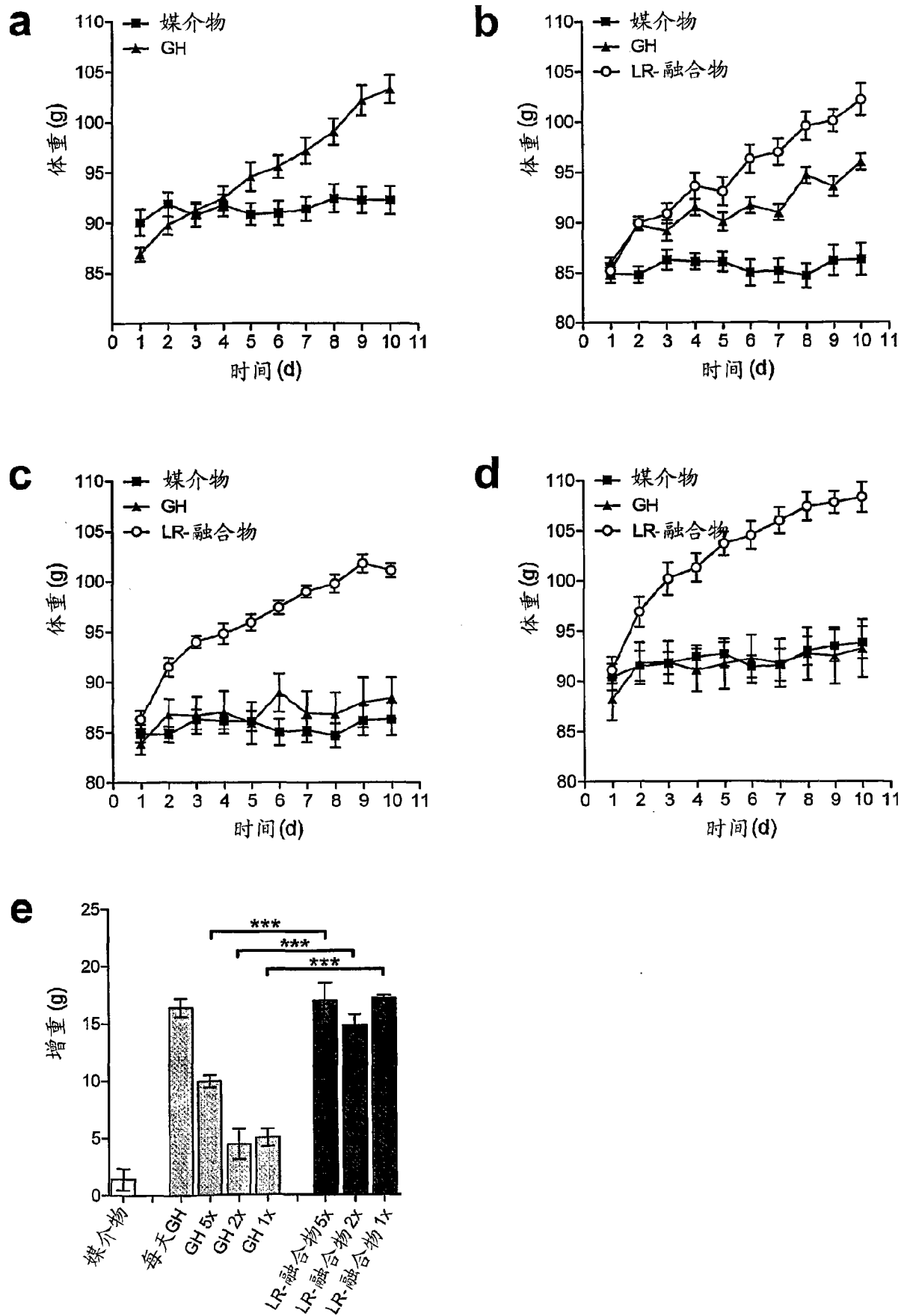


图 4

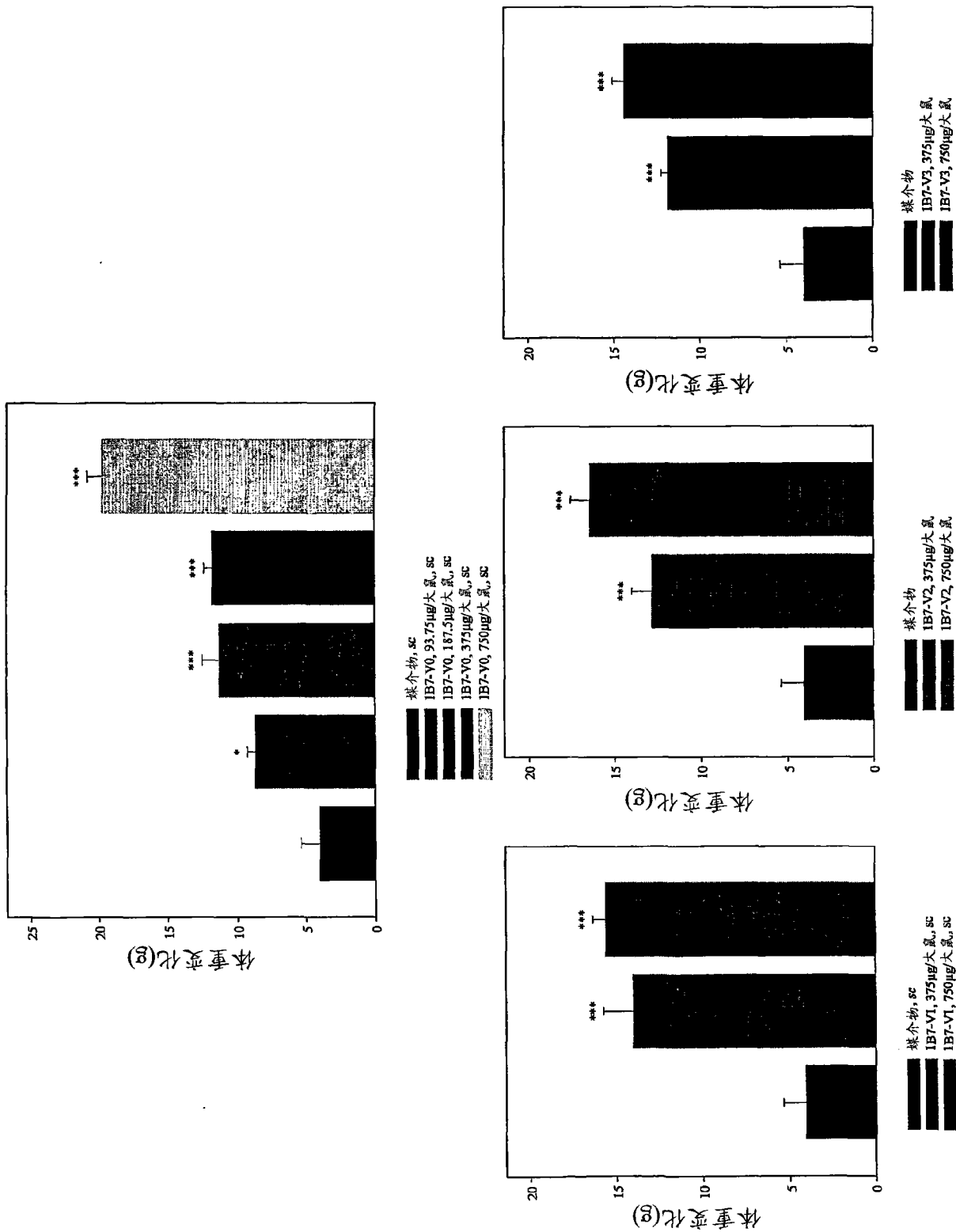


图 5

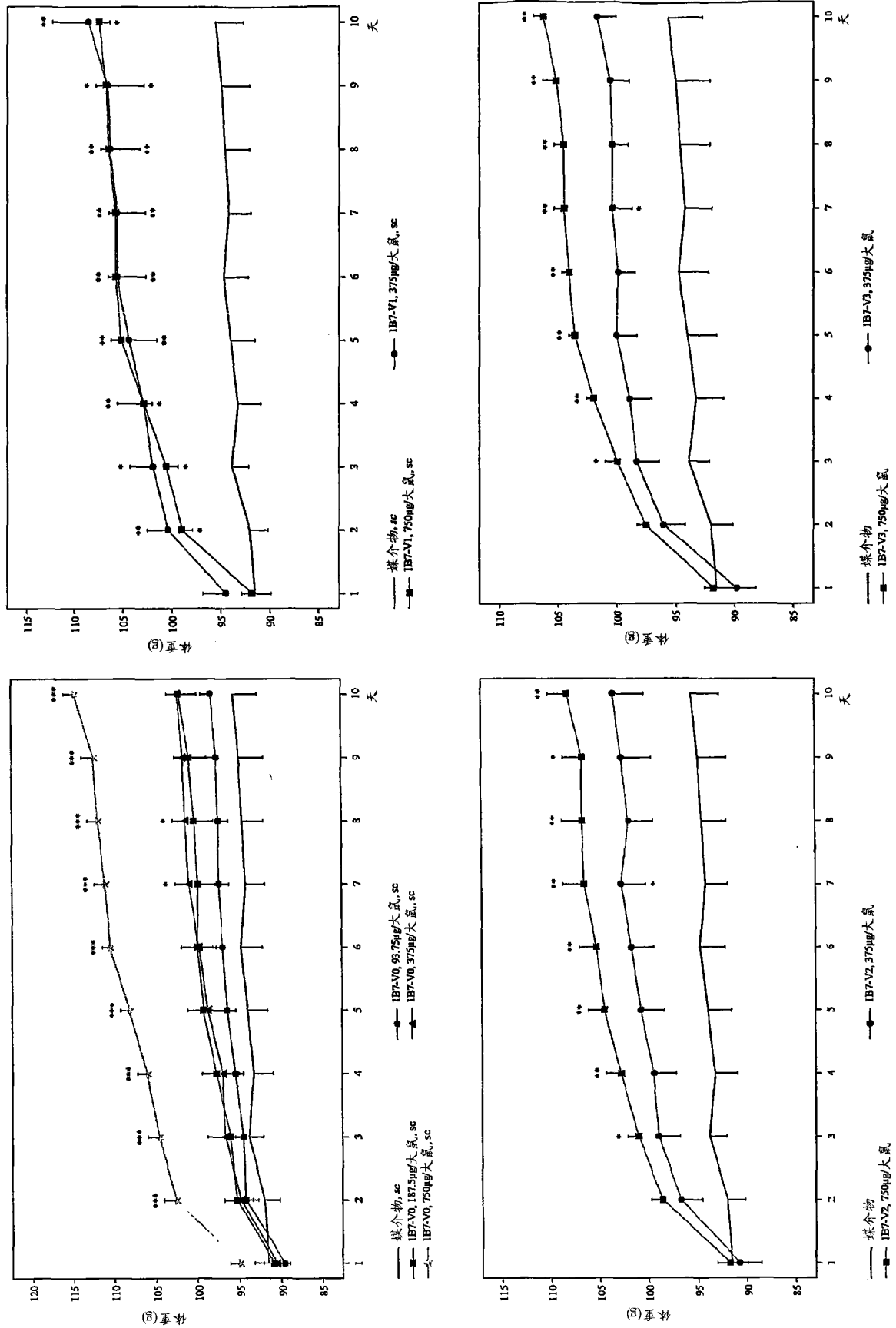


图 6

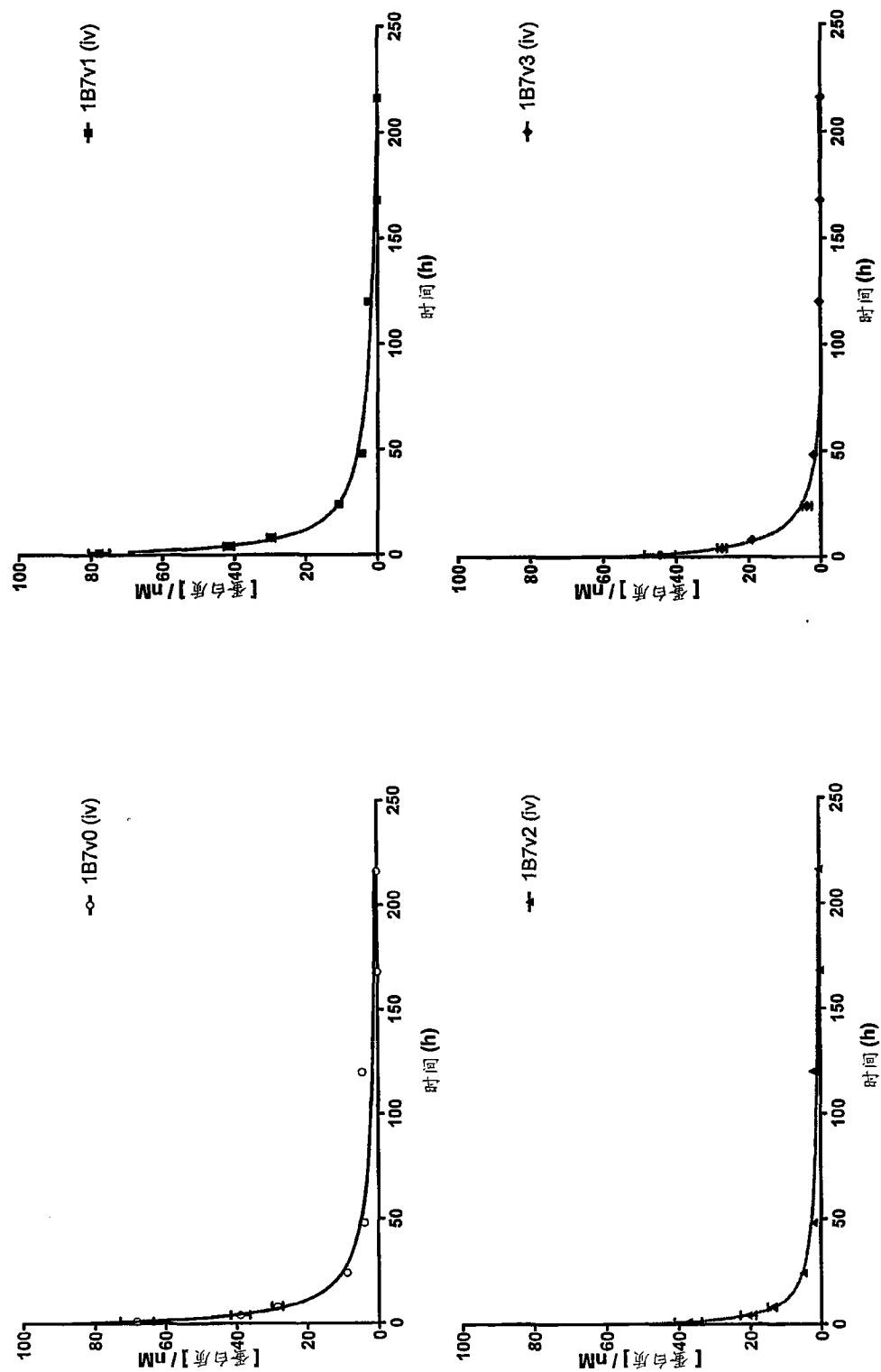


图 7

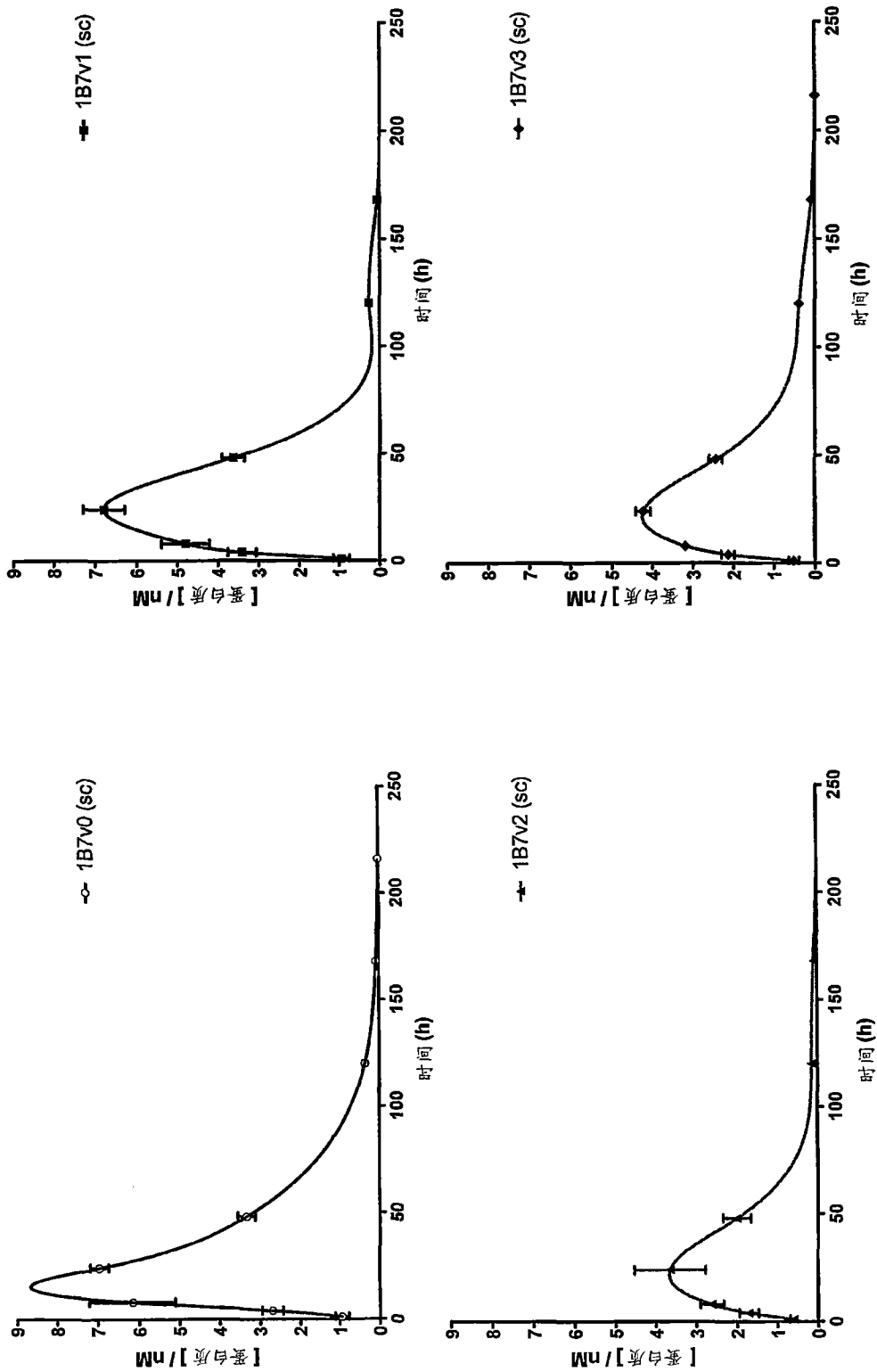


图 8

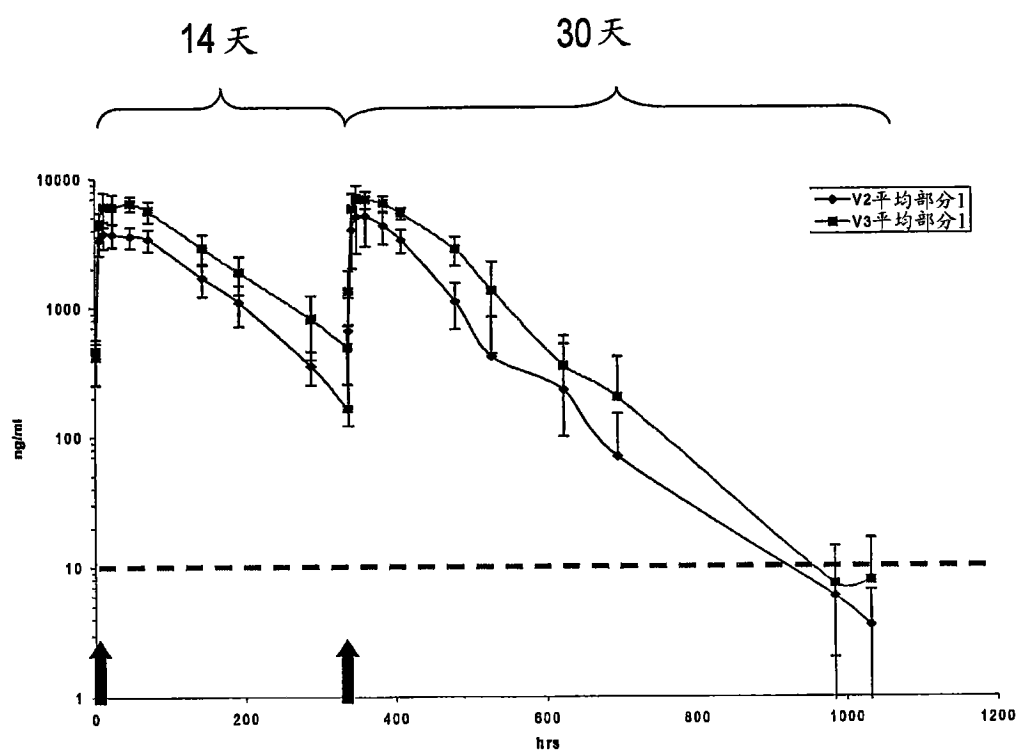


图 9