



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110914294 A

(43)申请公布日 2020.03.24

(21)申请号 201880045571.3

(74)专利代理机构 北京市君合律师事务所

(22)申请日 2018.05.11

11517

(30)优先权数据

62/505,642 2017.05.12 US

(51)Int.Cl.

62/618,376 2018.01.17 US

C07K 14/47(2006.01)

A61K 38/17(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2020.01.07

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2018/032332 2018.05.11

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/209242 EN 2018.11.15

(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 戎皓菁 A·伊斯肯德瑞安

A·W·诺顿 C·沈 C·潘

权利要求书6页 说明书76页 附图28页

(54)发明名称

重组卵泡抑素-FC融合蛋白及其在治疗杜氏
肌营养不良中的用途

(57)摘要

本发明尤其提供了用于治疗肌营养不良，特
别是杜氏肌营养不良(DMD)的方法和组合物。在
一些实施方案中，根据本发明的方法包括向患有
DMD或对DMD敏感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、严重性或频率方面降低，或延迟发作。

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,其中所述重组卵泡抑素蛋白具有肝素结合序列(HBS),并且其中所述HBS内的一个或多个氨基酸被与经取代的氨基酸相比具有较少正电荷的氨基酸取代。
2. 如权利要求1所述的重组卵泡抑素多肽,其中所述HBS内的所述一个或多个氨基酸被具有中性电荷的氨基酸取代。
3. 如权利要求1所述的重组卵泡抑素多肽,其中所述HBS内的所述一个或多个氨基酸被具有负电荷的氨基酸取代。
4. 如权利要求1-3中任一项所述的重组卵泡抑素多肽,其中所述一个或多个包含至少1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸。
5. 如权利要求4所述的重组卵泡抑素多肽,其中所述一个或多个包含3个氨基酸。
6. 如权利要求1-5中任一项所述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. 如权利要求6所述的重组卵泡抑素多肽,其中增加所述HBS内的氨基酸取代的数量使肝素结合亲和力逐渐降低。
8. 如权利要求7所述的重组卵泡抑素多肽,其中所述HBS内的氨基酸取代的数量为2个氨基酸。
9. 如权利要求8所述的重组卵泡抑素多肽,其中所述HBS内的氨基酸取代的数量为3个氨基酸。
10. 如前述权利要求中任一项所述的重组卵泡抑素多肽,其中在由所述HBS结构域的氨基酸残基81-84标识的BBXB基序中进行所述氨基酸取代。
11. 如前述权利要求中任一项所述的重组卵泡抑素多肽,其中在由所述HBS结构域的氨基酸残基75-78标识的BBXB基序中进行所述氨基酸取代。
12. 如权利要求10或11所述的重组卵泡抑素多肽,其中前两个碱性氨基酸残基被带负电荷或中性的氨基酸残基取代。
13. 如权利要求12所述的重组卵泡抑素多肽,其中所述前两个碱性氨基酸残基被带负电荷的氨基酸残基取代。
14. 如权利要求1-13中任一项所述的重组卵泡抑素多肽,其中所述重组卵泡抑素蛋白不与BMP-9或BMP-10结合。
15. 如权利要求1所述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。
16. 如权利要求1-15中任一项所述的重组卵泡抑素多肽,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,并且
其中对应于SEQ ID NO:2、SEQ NO:4或SEQ ID NO:5的位置66至88的氨基酸与SEQ ID NO:42-67或SEQ ID NO:111-116中的任一个相同。
17. 如权利要求16所述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的位置66至88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。
18. 如权利要求17所述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。

19. 一种重组卵泡抑素多肽, 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

包含选自以下的氨基酸变异中的任一个: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或其组合。

20. 如权利要求16或19所述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。

21. 如权利要求16或19所述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。

22. 如权利要求16或19所述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。

23. 如权利要求16或19所述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。

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

25. 一种重组卵泡抑素融合蛋白, 其包含如权利要求1-24中任一项所述的卵泡抑素多肽和IgG Fc结构域。

26. 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,

其中所述重组卵泡抑素多肽包含与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的位置66至88的氨基酸与SEQ ID NO:41、42、43或58相同。

27. 如权利要求26所述的重组卵泡抑素融合蛋白, 其中所述重组卵泡抑素多肽包含与SEQ ID NO:2、SEQ NO:4或SEQ ID NO:5至少90%相同的氨基酸序列。

28. 如权利要求26所述的重组卵泡抑素融合蛋白, 其中所述重组卵泡抑素多肽包含与SEQ ID NO:2、SEQ NO:4或SEQ ID NO:5至少95%相同的氨基酸序列。

29. 如权利要求26所述的重组卵泡抑素融合蛋白, 其中所述重组卵泡抑素多肽包含与SEQ ID NO:2、SEQ NO:4或SEQ ID NO:5至少98%相同的氨基酸序列。

30. 如权利要求26所述的重组卵泡抑素融合蛋白, 其中所述重组卵泡抑素多肽包含与SEQ ID NO:2、SEQ NO:4或SEQ ID NO:5 100%相同的氨基酸序列。

31. 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。

32. 如权利要求25-31中任一项所述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; 并且

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

33. 如权利要求25-31中任一项所述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。

34. 如权利要求25-31中任一项所述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。

35. 如权利要求25-31中任一项所述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。

36. 如权利要求25-31中任一项所述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IgG4 Fc结构域。

37. 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。

38. 如权利要求25-37中任一项所述的重组卵泡抑素融合蛋白,其中所述蛋白以1至100pM的亲和解离常数(K_D)与肌生长抑制素结合。

39. 如权利要求25-37中任一项所述的重组卵泡抑素融合蛋白,其中所述蛋白以1至100pM的亲和解离常数(K_D)与激活素A结合。

40. 如权利要求25-37中任一项所述的重组卵泡抑素融合蛋白,其中所述蛋白在0.2nM至25nM的范围内不与骨形态发生蛋白-9(BMP-9)和/或骨形态发生蛋白-10(BMP-10)结合。

41. 如权利要求25-37中任一项所述的重组卵泡抑素融合蛋白,其中所述蛋白以0.1至>25nM的亲和解离常数(K_D)与肝素结合。

42. 如权利要求25-37中任一项所述的重组卵泡抑素融合蛋白,其中所述蛋白以25至400nM的亲和解离常数(K_D)与FcRn受体结合。

43. 如权利要求25-37中任一项所述的重组卵泡抑素融合蛋白,其中所述蛋白以0.1至10nM的IC₅₀抑制肌生长抑制素。

44. 如权利要求25-37中任一项所述的重组卵泡抑素融合蛋白,其中所述蛋白以0.1至10nM的IC₅₀抑制激活素A。

45. 如权利要求25-37中任一项所述的重组卵泡抑素蛋白融合蛋白,其中所述重组卵泡抑素蛋白融合蛋白与野生型卵泡抑素相比具有延长的半衰期。

46. 一种药物组合物,其包含如权利要求25-45中任一项所述的重组卵泡抑素融合蛋白和药学上可接受的载体。

47. 一种多核苷酸,其包含编码如权利要求1-24中任一项所述的重组卵泡抑素多肽的核苷酸序列。

48. 一种多核苷酸,其包含编码如权利要求25-37中任一项所述的重组卵泡抑素融合蛋白的核苷酸序列。

49. 一种表达载体,其包含如权利要求47或48所述的多核苷酸。

50. 一种宿主细胞,其包含如权利要求47或48所述的多核苷酸或如权利要求30所述的表达载体。

51. 一种制备与肌生长抑制素特异性结合的重组卵泡抑素融合蛋白的方法,其包括培养如权利要求50所述的宿主细胞。

52. 一种杂交瘤细胞,其产生如权利要求1-17中任一项所述的重组卵泡抑素多肽或如权利要求25-37中任一项所述的重组卵泡抑素融合蛋白。

53.一种治疗杜氏肌营养不良(DMD)的方法,所述方法包括:

向患有DMD或对DMD敏感的受试者施用有效量的如权利要求25-37中任一项所述的重组卵泡抑素融合蛋白或如权利要求38所述的药物组合物,使得DMD的至少一种症状或特征在强度、严重性或频率方面降低,或延迟发作。

54.如权利要求53所述的方法,其中所述方法还包括向所述受试者施用一种或多种附加治疗剂。

55.如权利要求54所述的方法,其中所述一种或多种附加治疗剂选自抗F1t-1抗体或其片段、依达沙龙、帕姆雷单抗、泼尼松、地夫可特、RNA调节治疗剂、外显子跳跃治疗剂和基因治疗剂。

56.如权利要求53-55中任一项所述的方法,其中肠胃外施用有效量的所述重组卵泡抑素融合蛋白。

57.如权利要求56所述的方法,其中所述肠胃外施用选自静脉内、皮内、鞘内、吸入、经皮(局部)、眼内、肌内、皮下、经粘膜施用或其组合。

58.如权利要求57所述的方法,其中所述肠胃外施用是静脉内施用。

59.如权利要求53-58中任一项所述的方法,其中所述重组卵泡抑素融合蛋白的有效量是静脉内施用约1mg/kg至50mg/kg。

60.如权利要求59所述的方法,其中所述重组卵泡抑素融合蛋白的有效量是静脉内施用约8mg/kg至15mg/kg。

61.如权利要求60所述的方法,其中所述重组卵泡抑素融合蛋白的有效量为至少约8mg/kg。

62.如权利要求61所述的方法,其中所述重组卵泡抑素融合蛋白的有效量为至少约10mg/kg。

63.如权利要求59所述的方法,其中所述重组卵泡抑素融合蛋白的有效量为至少约50mg/kg。

64.如权利要求58-63中任一项所述的方法,其中所述静脉内施用每月进行一次。

65.如权利要求57所述的方法,其中所述肠胃外施用是皮下施用。

66.如权利要求53-58或65中任一项所述的方法,其中所述重组卵泡抑素融合蛋白的有效量是皮下施用约2mg/kg至100mg/kg。

67.如权利要求66所述的方法,其中所述重组卵泡抑素融合蛋白的有效量是皮下施用约3mg/kg至30mg/kg。

68.如权利要求67所述的方法,其中所述重组卵泡抑素融合蛋白的有效量是皮下施用约2mg/kg至5mg/kg。

69.如权利要求68所述的方法,其中所述重组卵泡抑素融合蛋白的有效量为至少约2mg/kg。

70.如权利要求69所述的方法,其中所述重组卵泡抑素融合蛋白的有效量为至少约3mg/kg。

71.如权利要求70所述的方法,其中所述重组卵泡抑素融合蛋白的有效量为至少约30mg/kg。

72.如权利要求66-71中任一项所述的方法,其中所述皮下施用每周进行一次。

73. 如权利要求57-72中任一项所述的方法,其中所述重组卵泡抑素融合蛋白的施用与剂量成比例关系。

74. 如权利要求57-72中任一项所述的方法,其中所述重组卵泡抑素融合蛋白的施用与剂量成线性关系。

75. 如权利要求53-74中任一项所述的方法,其中将所述重组卵泡抑素融合蛋白递送至选自表1的一块或多块骨骼肌。

76. 如权利要求53-75中任一项所述的方法,其中所述重组卵泡抑素融合蛋白的施用引起肌肉质量相对于对照增加。

77. 如权利要求76所述的方法,其中所述肌肉是选自表1的一块或多块骨骼肌。

78. 如权利要求77所述的方法,其中所述肌肉选自膈肌、三头肌、比目鱼肌、胫骨前肌、腓肠肌、趾长伸肌、腹直肌、四头肌及其组合。

79. 如权利要求78所述的方法,其中所述肌肉是腓肠肌。

80. 如权利要求76-79中任一项所述的方法,其中所述肌肉质量的增加是相对于对照增加至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、150%、200%或500%。

81. 如权利要求53-80中任一项所述的方法,其中所述重组卵泡抑素融合蛋白的施用引起肌肉再生、肌肉力量增加、柔韧性增加、运动范围增大、耐力增加、易疲劳性降低、血流量增加、认知改善、肺功能改善、炎症抑制、肌纤维化减少、肌肉坏死减少和/或体重增加。

82. 如权利要求53-80中任一项所述的方法,其中DMD的所述至少一种症状或特征选自肌肉消瘦、肌无力、肌肉脆性、肌肉坏死、肌纤维化、关节挛缩、骨骼变形、心肌病、吞咽障碍、肠和膀胱功能受损、肌肉缺血、认知障碍、行为功能异常、社会化障碍、脊柱侧凸和呼吸功能受损。

83. 一种用于抑制受试者的肌生长抑制素和/或激活素的方法,所述方法包括

向受试者施用包含有效量的如权利要求25-37中任一项所述的重组卵泡抑素融合蛋白的组合物。

84. 如权利要求83所述的方法,其中所述重组卵泡抑素融合蛋白的有效量是静脉内施用约1mg/kg至50mg/kg。

85. 如权利要求84所述的方法,其中所述重组卵泡抑素融合蛋白的有效量是静脉内施用约8mg/kg至15mg/kg。

86. 如权利要求85所述的方法,其中所述重组卵泡抑素融合蛋白的有效量为至少约8mg/kg。

87. 如权利要求86所述的方法,其中所述重组卵泡抑素融合蛋白的有效量为至少约10mg/kg。

88. 如权利要求87所述的方法,其中所述重组卵泡抑素融合蛋白的有效量为至少约50mg/kg。

89. 如权利要求84-88中任一项所述的方法,其中所述静脉内施用每月进行一次。

90. 如权利要求83所述的方法,其中所述重组卵泡抑素融合蛋白的有效量是皮下施用约2mg/kg至100mg/kg。

91. 如权利要求90所述的方法,其中所述重组卵泡抑素融合蛋白的有效量是皮下施用约3mg/kg至30mg/kg。

92. 如权利要求90所述的方法,其中所述重组卵泡抑素融合蛋白的有效量是皮下施用约2mg/kg至5mg/kg。

93. 如权利要求92所述的方法,其中所述重组卵泡抑素融合蛋白的有效量为至少约2mg/kg。

94. 如权利要求93所述的方法,其中所述重组卵泡抑素融合蛋白的有效量为至少约3mg/kg。

95. 如权利要求91所述的方法,其中所述重组卵泡抑素融合蛋白的有效量为皮下施用至少约30mg/kg。

96. 如权利要求90-95中任一项所述的方法,其中所述皮下施用每周进行一次。

重组卵泡抑素-FC融合蛋白及其在治疗杜氏肌营养不良中的用途

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求保护2018年1月17日提交的美国临时申请号62/618,376和2017年5月12日提交的美国临时申请号62/505,642的优先权和权益,每个所述临时申请的内容通过引用整体并入本文。

背景技术

[0003] 杜氏肌营养不良 (DMD) 是一种X连锁的隐性病症,估计影响了1:3600的男性出生人数,全世界估计有50,000人受到影响。这种病症的特征是肌肉逐渐消瘦,受影响的儿童到他们13岁时就开始依赖轮椅。受影响的个体通常在3岁时呈现症状,此类个体的中位存活期介于25至30岁之间。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 (dystrophin) 基因的突变引起的。肌营养不良蛋白基因位于X染色体上,编码蛋白质肌营养不良蛋白。肌营养不良蛋白负责通过肌营养不良蛋白聚糖 (dystroglycan) 复合物将肌纤维的收缩机构 (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改变或不存在以及肌纤维膜功能异常。虽然男性和女性均可在肌营养不良蛋白基因中携带突变,但女性很少受到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给的限制或减少,导致细胞代谢所需的氧气和营养物质短缺。缺血通常是由血管收缩或阻塞引起的,导致组织或器官的损伤或功能障碍。缺血的治疗旨在增加流向受影响组织或器官的血流量。

[0006] 目前,尚无DMD的治愈方法。已经研究了几种治疗途径,包括基因疗法和皮质类固醇施用,但是对于DMD患者而言仍然需要替代方案。

发明内容

[0007] 除其他事项外,本发明提供了基于施用重组卵泡抑素-Fc融合蛋白的用于治疗DMD的改良方法和组合物。本发明尤其涵盖这样的意外观测结果,即卵泡抑素多肽中的某些氨基酸修饰产生改良的卵泡抑素蛋白,这种改良的卵泡抑素蛋白以高亲和力特异性靶向肌生长抑制素和激活素A,而不会以有意义的亲和力与非靶BMP或肝素结合。可以预期的是,肌生长抑制素和激活素A对Smad2/3途径的激活导致肌源性蛋白表达的抑制,因而成肌细胞不会分化成肌肉。因此,肌生长抑制素和激活素是刺激肌肉再生的可行靶标。然而,由于某些结构相似性,包括卵泡抑素 (“FS”) 在内的肌生长抑制素和激活素拮抗剂可以结合骨形态发生蛋白 (BMP)。BMP,特别是BMP-9和BMP-10,是关键的形态发生信号,可协调整个身体的组织结构。抑制此类BMP可能会导致不良的病理状况。卵泡抑素还通过三个FS结构域中的第一个中的基本肝素结合序列 (HBS) 与细胞表面硫酸乙酰肝素蛋白聚糖结合。可以预期的是,对肝素结合的灭活、减少或调节可增加卵泡抑素的体内暴露和/或半衰期。因此,本发明提供了改良的卵泡抑素,其具有更长的半衰期并且对于有效治疗DMD更有效。

[0008] 一方面,本发明提供了重组卵泡抑素多肽,其包含与SEQ ID N0:1、SEQ ID N0:2、SEQ ID N0:3、SEQ ID N0:4或SEQ ID N0:5至少80%相同的氨基酸序列,其中所述重组卵泡抑素蛋白具有肝素结合结构域(HBS),并且其中所述HBS内的一个或多个氨基酸被与经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,所述HBS内的所述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,所述HBS内的所述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,所述一个或多个包含至少1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸。在一个实施方案中,所述一个或多个包含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,增加所述HBS内的氨基酸取代的数量使肝素结合亲和力逐渐降低。在一个实施方案中,所述HBS内的氨基酸取代的数量为2个氨基酸。在一个实施方案中,所述HBS内的氨基酸取代的数量为3个氨基酸。在一个实施方案中,在由所述HBS结构域的氨基酸残基81-84标识的BBXB基序中进行所述氨基酸取代。在一个实施方案中,在由所述HBS结构域的氨基酸残基75-78标识的BBXB基序中进行所述氨基酸取代。在一个实施方案中,前两个碱性氨基酸残基被带负电荷或中性的氨基酸残基取代。在一个实施方案中,前两个碱性氨基酸残基被带负电荷的氨基酸残基取代。

[0009] 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,所述重组卵泡抑素蛋白具有与SEQ ID N0:12-40或SEQ ID N0:101-106中的任一个至少80%相同的序列。

[0010] 一方面,本发明提供了重组卵泡抑素多肽,其包含与SEQ ID N0:2、SEQ N0:4或SEQ ID N0:5至少80%相同的氨基酸序列,并且其中对应于SEQ ID N0:2、SEQ N0:4或SEQ ID N0:5的位置66至88的氨基酸与SEQ ID N0:42-67或SEQ ID N0:111-116中的任一个相同。在一些实施方案中,对应于SEQ ID N0:2、SEQ ID N0:4或SEQ ID N0:5的位置66至88的氨基酸序列与SEQ ID N0:58-67或SEQ ID N0:111-113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 N0:2、SEQ N0:4或SEQ ID N0:5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 N0:2、SEQ N0:4或SEQ ID N0:5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 N0:2、SEQ N0:4或SEQ ID N0:5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 N0:2、SEQ N0:4或SEQ ID N0:5 100%相同。

[0011] 一方面,本发明提供了重组卵泡抑素多肽,其包含与SEQ ID N0:2、SEQ N0:4或SEQ ID N0:5至少80%相同的氨基酸序列,并且包含选自以下的氨基酸变异中的任一个: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 N0:2、SEQ N0:4或SEQ ID N0:5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 N0:2、SEQ N0:4或SEQ ID N0:5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 N0:2、SEQ N0:4或SEQ ID N0:5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 N0:2、SEQ N0:4或SEQ ID N0:5 100%相同。

[0012] 一方面,本发明提供了重组卵泡抑素多肽,其包含选自SEQ N0:12、SEQ ID N0:17-

30和SEQ ID NO:32-40的氨基酸序列。

[0013] 一方面,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。

[0014] 一方面,本发明提供了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,其中所述重组卵泡抑素多肽包含与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的位置66至88的氨基酸与SEQ ID NO:41、42、43或58相同。在一些实施方案中,所述重组卵泡抑素多肽包含与SEQ ID NO:2、SEQ 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,所述重组卵泡抑素多肽包含与SEQ ID NO:2、SEQ 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,所述重组卵泡抑素多肽包含与SEQ ID NO:2、SEQ 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,所述重组卵泡抑素多肽包含与SEQ ID NO:2、SEQ NO:4或SEQ ID NO:5100%相同的氨基酸序列。

[0015] 一方面,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。

[0016] 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,所述氨基酸取代选自由L234A、L235A、H433K、N434F及其组合。

[0017] 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。

[0018] 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IgG4 Fc结构域。

[0019] 一方面,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。

[0020] 在一些实施方案中,重组卵泡抑素融合蛋白以1至100pM的亲和解离常数(K_D)与肌生长抑制素结合。在一些实施方案中,重组卵泡抑素融合蛋白以1至100pM的亲和解离常数(K_D)结合激活素A。在一些实施方案中,重组卵泡抑素融合蛋白在0.2nM至25nM的范围内不与骨形态发生蛋白-9(BMP-9)和/或骨形态发生蛋白-10(BMP-10)结合。在一些实施方案中,重组卵泡抑素融合蛋白以0.1至200nM的亲和解离常数(K_D)与肝素结合。在一些实施方案中,重组卵泡抑素融合蛋白以25至400nM的亲和解离常数(K_D)与Fc受体结合。

[0021] 在一些实施方案中,重组卵泡抑素融合蛋白以0.1至10nM的IC₅₀抑制肌生长抑制素。在一些实施方案中,重组卵泡抑素融合蛋白以0.1至10nM的IC₅₀抑制激活素。在一些实施方案中,与野生型卵泡抑素相比,重组卵泡抑素蛋白融合蛋白具有延长的半衰期。

[0022] 一方面,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。

[0023] 一方面,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。

[0024] 一方面,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。

[0025] 一方面,本发明提供了一种通过培养宿主细胞来制备与肌生长抑制素和激活素A特异性结合的重组卵泡抑素融合蛋白的方法。

[0026] 一方面,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。

[0027] 一方面,本发明提供了一种治疗杜氏肌营养不良(DMD)的方法,该方法包括向患有DMD或对DMD敏感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、严重性或频率方面降低,或延迟发作。

[0028] 在一些实施方案中,该方法还包括向所述受试者施用一种或多种附加治疗剂。在一些实施方案中,所述一种或多种附加治疗剂选自抗Flt-1抗体或其片段、依达沙龙(edasalonexent)、帕姆雷单抗(pamrevlumab)、泼尼松(prednisone)、地夫可特(deflazacort)、RNA调节治疗剂、外显子跳跃治疗剂和基因治疗剂。

[0029] 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、经皮(局部)、眼内、肌内、皮下、经粘膜施用或其组合。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,重组卵泡抑素融合蛋白的有效量是静脉内施用约1mg/kg至50mg/kg。在一些实施方案中,重组卵泡抑素融合蛋白的有效量是静脉内施用约8mg/kg至15mg/kg。在一些实施方案中,重组卵泡抑素融合蛋白的有效量为至少约8mg/kg。在一些实施方案中,重组卵泡抑素融合蛋白的有效量为至少约10mg/kg。在一些实施方案中,重组卵泡抑素融合蛋白的有效量为至少约50mg/kg。在一些实施方案中,静脉内施用每月进行一次。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,其中重组卵泡抑素融合蛋白的有效量是皮下施用约2mg/kg至100mg/kg。在一些实施方案中,重组卵泡抑素融合蛋白的有效量是皮下施用约3mg/kg至30mg/kg。在一些实施方案中,重组卵泡抑素融合蛋白的有效量是皮下施用约2mg/kg至5mg/kg。在一些实施方案中,重组卵泡抑素融合蛋白的有效量为至少约2mg/kg。在一些实施方案中,重组卵泡抑素融合蛋白的有效量为至少约3mg/kg。在一些实施方案中,重组卵泡抑素融合蛋白的有效量为至少约30mg/kg。在一些实施方案中,皮下施用每周进行一次,每周进行两次,或每周进行三次。在一些实施方案中,皮下施用每周进行一次。在一些实施方案中,重组卵泡抑素融合蛋白的施用与剂量成比例关系。在一些实施方案中,重组卵泡抑素融合蛋白的施用与剂量成线性关系。

[0030] 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的一块或多块骨骼肌。在一些实施方案中,重组卵泡抑素融合蛋白的施用引起肌肉质量相对于对照增加。在一些实施方案中,肌肉是选自表1的一块或多块骨骼肌。在一些实施方案中,肌肉选自膈肌、三头肌、比目鱼肌、胫骨前肌、腓肠肌、趾长伸肌、腹直肌、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增加至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、150%、200%或500%。

[0031] 在一些实施方案中,重组卵泡抑素融合蛋白的施用引起肌肉再生、肌肉力量增加、柔韧性增加、运动范围增大、耐力增加、易疲劳性降低、血流量增加、认知改善、肺功能改善、炎症抑制、肌纤维化减少、肌肉坏死减少和/或体重增加。

[0032] 在一些实施方案中,DMD的所述至少一种症状或特征选自肌肉消瘦、肌无力、肌肉

脆性、肌肉坏死、肌纤维化、关节挛缩、骨骼变形、心肌病、吞咽障碍、肠和膀胱功能受损、肌肉缺血、认知障碍、行为功能异常、社会化障碍、脊柱侧凸和呼吸功能受损。

[0033] 一方面,本发明提供了用于抑制受试者的肌生长抑制素和/或激活素的方法,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。在一些实施方案中,重组卵泡抑素融合蛋白的有效量是静脉内施用约1mg/kg至50mg/kg。在一些实施方案中,重组卵泡抑素融合蛋白的有效量是静脉内施用约8mg/kg至15mg/kg。在一些实施方案中,重组卵泡抑素融合蛋白的有效量为至少约8mg/kg。在一些实施方案中,重组卵泡抑素融合蛋白的有效量为至少约10mg/kg。在一些实施方案中,重组卵泡抑素融合蛋白的有效量为至少约50mg/kg。在一些实施方案中,静脉内施用每月进行一次。在一些实施方案中,重组卵泡抑素融合蛋白的有效量是皮下施用约2mg/kg至100mg/kg。在一些实施方案中,重组卵泡抑素融合蛋白的有效量是皮下施用约3mg/kg至30mg/kg。在一些实施方案中,重组卵泡抑素融合蛋白的有效量是皮下施用约2mg/kg至5mg/kg。在一些实施方案中,重组卵泡抑素融合蛋白的有效量为至少约2mg/kg。在一些实施方案中,重组卵泡抑素融合蛋白的有效量为至少约3mg/kg。在一些实施方案中,重组卵泡抑素融合蛋白的有效量是皮下施用至少约30mg/kg。在一些实施方案中,皮下施用每周进行一次,每周进行两次,或每周进行三次。在一些实施方案中,皮下施用每周进行一次。

附图说明

[0034] 这些附图仅用于说明的目的,而非限制。

[0035] 图1是显示FS315的蛋白质结构域结构的示意图。FS315由一个N端结构域(ND),三个具有高度同源性的连续FS结构域(FSD1、FSD2和FSD3)和一个强酸性的C端尾(AD)组成。肝素结合位点(HBS)位于FSD1中,两个保守的基本肝素结合核心基序以粗体显示。三个内源性N连接的糖基化位点的位置用实心三角形表示。

[0036] 图2描绘了一系列图表,这些图表显示了重组卵泡抑素构建体基于体外细胞的功能测定结果。在A204横纹肌肉瘤细胞中使用SMAD2/3荧光素酶报告基因测定法研究了对肌生长抑制素和激活素A的抑制作用。图2的图A显示了代表性FS315-hFc变体的肌生长抑制素和激活素A的IC₅₀曲线。单突变、双突变和三突变对功能活性没有影响,但是HBS de175-86变体的效力大大降低;图2的图B显示了代表性FS315-hFc高糖基化变体的肌生成抑制素和激活素A的IC₅₀曲线。三种高糖基化变体K75N/C77T/K82T、C66A/K75N/C77T和C66S/K75N/C77T的效力有适度降低。

[0037] 图3A和图3B显示了示例性结果,其举例说明了在施用示例性重组卵泡抑素-Fc融合蛋白或比较蛋白FS315WT-hFc的CD-1小鼠中的血清PK特性。

[0038] 图4A和图4B是证明重组卵泡抑素构建体的肝素结合亲和力与PK特相关的图表。图4A和图4B中的数据描绘是通过向小鼠(n=3)单次静脉内施用1mg/kg的每种肝素结合变体而获得的。图4A描绘了单次静脉内施用1mg/kg的FS315-Fc变体之后血浆浓度与时间的关系。PK特性显示,降低的肝素结合亲和力与逐步改善的PK行为相关。图4B显示了FS315-hFc变体的肝素结合亲和力,以及与它们的血清清除率的相关性。肝素结合亲和力降低导致体内清除率降低。

[0039] 图5A和图5B分别描绘了与高糖基化FS变体以及所引起的分子量和PI的转变有关

的凝胶和图表。图5A描绘了对还原的FS315-hFc高糖基化变体进行考马斯亮蓝(Coomassie blue)染色的凝胶,通过聚丙烯酰胺凝胶电泳分离这些还原的FS315-hFc高糖基化变体。箭头指示由于高糖基化而显示出分子量明显转变的变体。图5B描绘了显示两种代表性变体的cIEF特性的图表。高糖基化变体K75N/C77T/K82T与非高糖基化变体K82T相比,显示出明显的酸性转变。

[0040] 图6是显示FS315-hFc高糖基化变体的特性的图表。通过静脉内施用给予小鼠单剂量1mg/kg蛋白(每组n=3)。高糖基化变体K75N/C77T/K82T和C66A/K75N/C77T较非高糖基化变体K82T以及野生型具有显著改善的PK特性。

[0041] 图7是显示与野生型小鼠的抓力相比,用PBS媒介物、10mg/kg的FS315K(76,81,82)E-mFc或3mg/kg的ActRIIB-mFc处理的mdx小鼠的前肢抓力的图表。给药11周后测量前肢抓力。数据显示,与单独用媒介物处理的动物的抓力相比,用FS315K(76,81,82)E-mFc处理的mdx小鼠的前肢抓力显著增加。

[0042] 图8A描绘了FS315-hFc肝素结合变体在肝素结合区内的序列。表中列出了野生型、核心HBS置换变体 Δ HBS、核心HBS缺失变体de175-86以及在两个基本BBXB基序中具有点突变的一系列变体在肝素结合区内的残基73-88的序列。

[0043] 图8B描绘了FS315-hFc高糖基化变体在肝素结合区内的序列。表中列出了高糖基化变体中产生一个或两个共有N-糖基化位点(NXT/S)的残基66-88的序列。核心肝素结合序列显示为斜体。突变的残基显示为粗体,产生的新的N-糖基化位点显示为带下划线。

[0044] 图9的图A-G是一系列图表和显微照片,描绘了来自为期4周的C57BL/6小鼠研究的体重、肌重、血清药物浓度和形态测量分析。图9的图A是描绘从FS-EEE-mFc给药开始的体重的图表。图9的图B是描绘从FS-EEE-mFc给药开始的肌重的图表。图9的图C是描绘来自于在即将给药之前获取的血清样品的FS-EEE-mFc浓度的图表。图9的图D是描绘从FS-EEE-hFc给药开始第28天的体重变化的图表。图9的图E是描绘从FS-EEE-hFc给药开始的肌重的图表。图9的图F是一系列显微照片,显示了通过Oregon **Gree**[®]488WGA染色四头肌进行的四头肌形态测量分析。图9的图G是描绘肌纤维直径的直方图的图表。与媒介物给药组相比,*p<0.05。

[0045] 图10的图A-G是一系列图表和显微图,描绘了mdx四头肌的免疫组织化学染色和qPCR分析。图10的图A描绘了小鼠IgG阳性染色的代表性图像,其描绘了来自媒介物对照的异质坏死区域,并且图10的图B是显示所有剂量组的整个载玻片图像分析的图表。图10的图C描绘了对于来自媒介物对照的巨噬细胞浸润的CD68阳性染色的代表性图像,并且图10的图D是显示全载玻片图像分析的图表。图10的图E是一系列显微照片,描绘了对于纤维化的胶原蛋白I阳性染色:(左)媒介物对照和(右)30mg/kg FS-EEE-mFc。图10的图F是显示胶原蛋白I的全图像分析的图表。图10的图G是显示纤维化和炎症标志物的qPCR的图表。

[0046] 图11的图A-G是一系列图表和显微照片,描绘了来自为期12周的未运动的mdx研究的体重、肌重、肌纤维大小、抓力和血清生物标志物。图11的图A是描绘体重的图表。图11的图B是描绘肌重的图表。图11的图C是描绘四头肌股直肌面积的图表。图11的图D是描绘例如来自媒介物组的四头肌的Oregon **Green**[®]488WGA染色的显微照片。图11的图E是描绘肌纤维直径大小分布的四头肌形态测量分析直方图的图表。图11的图F是描绘前肢抓力的图表:(左)绝对值,(右)按体重归一化的值。图11的图(G)是描绘血清生物标志物(左)肌酸激酶、

(中)骨骼肌肌钙蛋白1、(右)心肌肌钙蛋白1的图表。与mdx媒介物给药组相比,*=p<0.05。

[0047] 图12的图A-D是一系列图表和显微图,描绘了mdx膈肌的免疫组织化学染色和qPCR分析。图12的图A是描绘CD68阳性染色的图像分析的图表。图12的图B是描绘胶原蛋白I阳性染色的图像分析的图表。图12的图C是显微照片,描绘了胶原蛋白I染色的膈肌的代表性放大图像:(左)媒介物对照和(右)30mg/kg FS-EEE-mFc。图12的图D是描绘qPCR炎症和纤维化标志物的图表。与mdx媒介物给药组相比,*=p<0.05。

[0048] 图13的图A-H是一系列图表,描绘了来自为期12周的运动mdx研究的体重、组织重量、功能测量、行为测量和血清分析。图13的图(A)描绘了体重,图(B)描绘了肌重,并且图(C)描绘了器官重量。图13的图D描绘了前肢抓力(上)以及按体重归一化的抓力(下)。图13的图E描绘了EDL肌肉的离体作用力(上)以及按横截面积归一化的作用力(下)。图13的图F描绘了强制踏车距离(上),并按体重归一化的强制踏车距离(下)。图13的图(G)描绘了血清肌酸激酶的测量值并且图(H)描绘了在第56天取样的血清药物浓度。与所述的mdx媒介物给药组相比,*=p<0.05。

[0049] 图14的图A-D是一系列图表和显微照片,描绘了来自为期12周的运动mdx研究的四头肌组织分析。图14的图A-C是来自(上)媒介物对照和(中)30mg/kg FS-EEE-mFc以及(下)全载玻片图像分析的代表性图像,图(A)针对坏死的小鼠IgG阳性染色,图(B)针对巨噬细胞浸润的CD68阳性染色,图(C)针对纤维化的胶原蛋白I阳性染色。图14的图D描绘了纤维化和炎症标志物的qPCR。与mdx媒介物给药组相比,*=p<0.05。

[0050] 图15的图A-D是一系列图表和显微照片,描绘了来自为期12周的运动mdx研究的膈组织分析。图(A-C)是来自(上)媒介物对照和(中)30mg/kg FS-EEE-mFc以及(下)全载玻片图像分析的代表性图像,图(A)针对坏死的小鼠IgG阳性染色,图(B)针对巨噬细胞浸润的CD68阳性染色,图(C)针对纤维化的胶原蛋白I阳性染色。图(D)描绘了纤维化和炎症标志物的qPCR。与mdx媒介物给药组相比,*=p<0.05。

[0051] 定义

[0052] 为了使本发明更容易理解,下面首先对某些术语进行了定义。在整个说明书中阐述了以下术语和其他术语的其他定义。

[0053] 亲和力:如本领域中已知的那样,“亲和力”是对特定配体与其伴侣结合的紧密度的量度。在一些实施方案中,配体或伴侣是重组卵泡抑素多肽。在一些实施方案中,配体或伴侣是重组卵泡抑素-Fc融合蛋白。可以通过不同的方式测量亲和力。在一些实施方案中,通过定量测定法测量亲和力。在一些此类实施方案中,结合伴侣浓度可以固定为超过配体浓度,以便模拟生理条件。可替代地或另外,在一些实施方案中,结合伴侣浓度和/或配体浓度可以变化。在一些此类实施方案中,可以在同等条件(例如浓度)下将亲和力与参考进行比较。

[0054] 转佳:如本文所用,术语“转佳”意指受试者状态的预防、减轻或缓和,或状态的改善。转佳包括但不要求疾病病状的完全恢复或完全预防。

[0055] 动物:如本文所用,术语“动物”是指动物界的任何成员。在一些实施方案中,“动物”是指处于任何发育阶段的人。在一些实施方案中,“动物”是指处于任何发育阶段的非人动物。在某些实施方案中,非人动物是哺乳动物(例如,啮齿动物、小鼠、大鼠、兔、猴子、狗、猫、绵羊、牛、灵长类和/或猪)。在一些实施方案中,动物包括但不限于哺乳动物、鸟类、爬行

动物、两栖动物、鱼、昆虫和/或蠕虫。在一些实施方案中,动物可以是转基因动物、基因工程动物和/或克隆物。

[0056] 大约或约:如本文所用,术语“大约”或“约”,正如适用于一个或多个目标值那样,是指与规定参考值相似的值。在某些实施方案中,除非另有规定或另外从上下文中显而易见(除非在此类数字超过可能值的100%的情况下),术语“大约”或“约”是指落入规定参考值任一方向(大于或小于)的25%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%或更小的范围内的一系列值。

[0057] 关联:正如该术语在本文中使用一样,如果一个事件或实体的存在、水平和/或形式与另一事件或实体相关,则两个事件或实体彼此“关联”。例如,如果特定实体(例如多肽)的存在、水平和/或形式与特定疾病、病症或病状的发病率和/或易感性相关(例如,在相关群体中),则认为该特定实体(例如多肽)与该疾病、病症或病状关联。在一些实施方案中,如果两个或更多个实体直接或间接相互作用,使得它们彼此物理接近并且保持彼此物理接近,则它们彼此物理“关联”。在一些实施方案中,彼此物理关联的两个或更多个实体彼此共价连接;在一些实施方案中,彼此物理关联的两个或更多个实体彼此不共价连接,而是例如通过氢键、范德华相互作用、疏水相互作用、磁力及其组合非共价关联。

[0058] 生物利用度:如本文所用,术语“生物利用度”通常是指到达受试者血流的施用剂量的百分比。

[0059] 生物活性:如本文所用,短语“生物活性”是指任何药剂在生物系统中,特别是在生物体中具有活性的特征。例如,将施用于生物体时,对该生物体具有生物学作用的药剂视为具有生物活性。在特定实施方案中,在肽具有生物活性的情况下,该肽中具有该肽的至少一种生物活性的部分通常称为“生物活性”部分。

[0060] 心肌:如本文所用,术语“心肌”是指在心脏壁,尤其是在心肌中发现的一种不随意横纹肌。

[0061] 载体或稀释剂:如本文所用,术语“载体”和“稀释剂”是指可用于制备药物制剂的药学上可接受的(例如,对人施用安全且无毒的)载体或稀释物质。示例性的稀释剂包括无菌水、抑菌性注射用水(BWFI)、pH缓冲溶液(例如,磷酸盐缓冲盐水)、无菌盐水溶液、林格氏溶液(Ringer's solution)或右旋糖溶液。

[0062] 剂型:如本文所用,术语“剂型”和“单位剂型”是指用于待治疗患者的治疗性蛋白(例如,重组卵泡抑素多肽或重组卵泡抑素-Fc融合蛋白)的物理离散单元。每个单元含有预定量的活性物质,经计算该预定量可产生所需疗效。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。

[0063] 卵泡抑素或重组卵泡抑素:如本文所用,除非另有说明,否则术语“卵泡抑素(FS)”或“重组卵泡抑素”是指保持大量卵泡抑素生物活性的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)。

[0064] 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N端的部分或整个柔性铰链。对于IgG而言,“Fc多肽”包含免疫球

蛋白结构域Cgamma2 (C γ 2) 和Cgamma3 (C γ 3) 以及Cgamma1 (C γ 1) 和C γ 2之间的铰链下部。尽管Fc多肽的边界可以变化,但是通常将人IgG重链Fc多肽定义为包含从T223或C226或P230开始到其羧基末端的残基,其中编号是根据Kabat等人的EU索引(1991, NIH Publication 91-3242, National Technical Information Services, Springfield, VA)。对于IgA而言,Fc多肽包含免疫球蛋白结构域Calpha2 (Ca2) 和Calpha3 (Ca3) 以及Calpha1 (C α 1) 和Ca2之间的铰链下部。Fc区可以是合成的、重组的或由天然来源诸如IVIG产生。

[0065] 功能等效物或衍生物:如本文所用,术语“功能等效物”或“功能衍生物”在氨基酸序列的功能衍生物的上下文中,表示保持与原始序列基本上相似的生物活性(功能或结构)的分子。功能衍生物或等效物可以是天然衍生物或合成制备的。示例性的功能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。期望取代氨基酸具有与被取代的氨基酸相似的化学-物理性质。期望的相似化学-物理性质包括电荷、蓬松性、疏水性、亲水性等的相似性。

[0066] 融合蛋白:如本文所用,术语“融合蛋白”或“嵌合蛋白”是指通过将两个或更多个最初分离的蛋白或其部分连接而产生的蛋白。在一些实施方案中,每种蛋白之间将会存在接头或间隔区。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。

[0067] 半衰期:如本文所用,术语“半衰期”是诸如蛋白质浓度或活性的量下降到在一个时间段开始时测量的其值的一半所需的时间。

[0068] 肥大:如本文所用,术语“肥大”是指器官或组织的体积由于其组成细胞的膨大而增加。

[0069] 改善、增加或减少:如本文所用,术语“改善”、“增加”或“减少”或语法等同项表示相对于基线测量值,诸如在本文所述治疗开始之前同一个体的测量值,或在没有本文所述治疗的情况下对照受试者(或多个对照受试者)的测量值的值。“对照受试者”是患有与所治受试者相同形式的疾病,其年龄与所治受试者大约相同的受试者。

[0070] 抑制:如本文所用,术语“抑制”是指降低或减少目标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,正如通过本文所述或本领域公认的一种或多种方法所测量的,使蛋白或基因的表达或有关活性降低至少10%或更多,例如20%、30%、40%或50%,60%、70%、80%、90%或更多,或使表达或有关活性降低超过1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、50倍、100倍或更多倍。

[0071] 体外:如本文所用,术语“体外”是指在人工环境中,例如在试管或反应容器中,在细胞培养物中等,而不是在多细胞生物体内发生的事件。

[0072] 体内:如本文所用,术语“体内”是指在多细胞生物体诸如人和非人动物内发生的事件。在基于细胞的系统的上下文中,该术语可用于指在活细胞内发生的事件(与例如体外系统相反)。

[0073] K_D:如本文所用,术语“K_D”,如本文所用,是指解离常数,该解离常数是由K_d与K_a之比(即K_d/K_a)获得的并且表示为摩尔浓度(M)。配体的K_D值可以使用本领域得到确认的方法来测定。测定配体的K_D的优选方法通过使用表面等离子体共振,优选使用生物传感器系统,诸如BIAcore[®]系统来进行。

[0074] 接头:如本文所用,术语“接头”是指融合蛋白中与天然蛋白中的特定位置出现的

氨基酸序列不同的氨基酸序列，并且通常设计为具有柔性或插入介于两个蛋白质部分之间的结构诸如 α -螺旋中。接头也称为间隔区。接头或间隔区通常自身不具有生物学功能。

[0075] 药学上可接受的：如本文所用，短语“药学上可接受的”是指在合理的医学判断范围内，适合接触人类和动物的组织使用而无过度毒性、刺激、过敏反应或其他问题或并发症，与合理的效益/风险比相称的物质。

[0076] 多肽：如本文所用，术语“多肽”是指经由肽键连接在一起的氨基酸的顺序链。该术语用于指任何长度的氨基酸链，但是本领域的普通技术人员将理解，该术语不限于长链，可以指包含两个经由肽连接在一起的氨基酸的最小链。如本领域技术人员已知的那样，可以加工和/或修饰多肽。如本文所用，术语“多肽”和“肽”可互换使用。

[0077] 预防：如本文所用，术语“预防”当连同疾病、病症和/或病状的发生使用时，是指降低发展该疾病、病症和/或病状的风险。参见“风险”的定义。

[0078] 蛋白：如本文所用，术语“蛋白”是指一种或多种起离散单元的作用的多肽。如果单个多肽是离散功能单元并且不需要与其他多肽永久或暂时性物理关联以形成离散功能单元，则术语“多肽”和“蛋白”可以互换使用。如果离散功能单元由多于一个彼此物理关联的多肽组成，则术语“蛋白”是指物理偶联并一起起到离散单元作用的多个多肽。

[0079] 风险：正如从上下文中将理解的，疾病、病症和/或病状的“风险”包括特定个体将会发展疾病、病症和/或病状（例如，肌营养不良）的可能性。在一些实施方案中，浆风险表示为百分比。在一些实施方案中，风险从0%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%直至100%。在一些实施方案中，将风险表示为相对于与一个参考样品或一组参考样品关联的风险的风险。在一些实施方案中，一个参考样品或一组参考样品具有已知的疾病、病症、病状和/或事件（例如，肌营养不良）风险。在一些实施方案中，一个参考样品或一组参考样品来自与特定个体相当的个体。在一些实施方案中，相对风险为0.1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更高。

[0080] 横纹肌：如本文所用，术语“横纹肌”是指其细胞内收缩单元即肌节规则排列，导致使用显微镜术在随意控制下出现条纹的多核肌肉组织。通常，横纹肌可以是心肌、骨骼肌和鳃节肌(Branchiomeric muscle)。

[0081] 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，包括单一和多单位平滑肌。

[0082] 受试者：如本文所用，术语“受试者”是指人或任何非人动物（例如，小鼠、大鼠、兔、狗、猫、牛、猪、绵羊、马或灵长类动物）。人包括产前和产后形式。在许多实施方案中，受试者是人。受试者可以是患者，该患者是指向医疗提供者提出进行疾病诊断或治疗的人。术语“受试者”在本文中可与“个体”或“患者”互换使用。受试者可以患有疾病或病症或对疾病或病症敏感，但是可以或不可以显示出该疾病或病症的症状。

[0083] 基本上：如本文所用，术语“基本上”是指表现出全部或接近全部范围或程度的目标特征或性质的定性条件。生物学领域的普通技术人员将理解，生物学和化学现象很少（如果曾经有）完成和/或继续完成或达到或避免绝对结果。因此，在本文中使用术语“基本上”来捕获许多生物学和化学现象中固有的潜在完整性缺失。

[0084] 基本同源性：本文中使用短语“基本同源性”指氨基酸或核酸序列之间的比较。如本领域普通技术人员将理解的，如果两个序列在相应位置含有同源残基，则通常认为它们

是“基本上同源”。同源残基可以是相同的残基。可替代地，同源残基可以是将具有适当相似的结构和/或功能特征的不同残基。例如，如本领域普通技术人员众所周知的，通常将某些氨基酸分类为“疏水性”或“亲水性”氨基酸，和/或具有“极性”或“非极性”侧链。一个氨基酸取代相同类型的另一个氨基酸通常被认为是“同源”取代。

[0085] 如本领域中众所周知的，可以使用多种算法中的任何一种来比较氨基酸或核酸序列，这些算法包括商业计算机程序中可用的那些算法，诸如用于核苷酸序列的BLASTN和用于氨基酸序列的BLASTP、空位BLAST和PSI-BLAST。此类示例性程序在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; 以及Misener等人(编辑), Bioinformatics Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology, 第132卷), Humana Press, 1999中进行了描述。除了鉴定同源序列外，以上提到的程序通常还提供对同源性程度的指示。在一些实施方案中，如果在有关残基段上两个序列至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多的相应残基同源，则认为这两个序列基本上同源。在一些实施方案中，有关段是完整序列。在一些实施方案中，有关段是至少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。

[0086] 基本同一性:本文中使用短语“基本同一性”指氨基酸或核酸序列之间的比较。如本领域普通技术人员将理解的，如果两个序列在相应位置含有相同残基，则通常认为它们是“基本上相同的”。如本领域中众所周知的，可以使用多种算法中的任何一种来比较氨基酸或核酸序列，这些算法包括商业计算机程序中可用的那些算法，诸如用于核苷酸序列的BLASTN和用于氨基酸序列的BLASTP、空位BLAST和PSI-BLAST。此类示例性程序在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; 以及Misener等人(编辑), Bioinformatics Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology, 第132卷), Humana Press, 1999中进行了描述。除了鉴定相同序列外，以上提到的程序通常还提供对同一性程度的指示。在一些实施方案中，如果在有关残基段上两个序列至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多的相应残基相同，则认为这两个序列基本上相同。在一些实施方案中，有关段是完整序列。在一些实施方案中，有关段是至少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。

[0087] 表面等离振子共振:如本文所用，是指一种光学现象，其允许例如通过检测生物传感器基质中蛋白浓度的改变，例如通过使用BIAcore®系统 (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden and Piscataway, N.J.) 来检测，实时分析特异性结合相互作用。有关更多说明，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; 以及 Johnnson, B. 等人 (1991) Anal. Biochem. 198:268-277。

[0088] 患有：“患有”疾病、病症和/或病状的个体已被诊断出具有或展示出该疾病、病症和/或病状的一种或多种症状。

[0089] 对.....敏感：对疾病、病症和/或病状“敏感”的个体尚未被诊断出具有该疾病、病症和/或病状。在一些实施方案中，对疾病、病症和/或病状敏感的个体可能不表现出该疾病、病症和/或病状的症状。在一些实施方案中，对疾病、病症、病状或事件（例如DMD）敏感的个体可以通过以下一项或多项来表征：(1)与疾病、病症和/或病状的发展关联的遗传突变；(2)与疾病、病症和/或病状的发展关联的遗传多态性；(3)与疾病、病症和/或病状关联的蛋白质的表达和/或活性增加和/或减少；(4)与疾病、病症、病状和/或事件的发展关联的习惯和/或生活方式；(5)已经进行、计划进行或需要移植。在一些实施方案中，对疾病、病症和/或病状敏感的个体将会发展该疾病、病症和/或病状。在一些实施方案中，对疾病、病症和/或病状敏感的个体不会发展该疾病、病症和/或病状。

[0090] 靶组织：如本文所用，术语“靶组织”是指受待治疾病诸如杜氏肌营养不良 (DMD) 影响的任何组织。在一些实施方案中，靶组织包括显示出疾病关联的病理、症状或特征，包括但不限于肌肉消瘦、骨骼变形、心肌病和呼吸功能受损的那些组织。

[0091] 治疗有效量：如本文所用，术语治疗剂的“治疗有效量”是指当施用于患有疾病、病症和/或病状或对疾病、病症和/或病状敏感的受试者时，足以治疗、诊断、预防和/或延迟该疾病、病症和/或病状的症状发作的量。本领域的普通技术人员将认识到，通常通过包含至少一个单位剂量的给药方案来施用治疗有效量。

[0092] 治疗：如本文所用，术语“治疗”是指用于使特定疾病、病症和/或病状的一种或多种症状或特征部分或完全缓解、转佳、减轻，抑制、预防、延迟其发作，降低其严重性和/或降低其发病率的任何方法。为了降低发展与疾病关联的病理的风险，可以向未表现出疾病体征和/或仅表现出疾病早期体征的受试者施用治疗。

具体实施方式

[0093] 除其他事项外，本发明提供了基于作为蛋白治疗剂的卵泡抑素，用于治疗肌营养不良，包括杜氏肌营养不良 (DMD) 和/或贝克肌营养不良的方法和组合物。在一些实施方案中，本发明提供了治疗DMD的方法，所述方法包括向患有DMD或对DMD敏感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在强度、严重性或频率方面降低，或延迟发作。

[0094] 在以下部分中详细描述了本发明的各个方面。部分的使用并不意在限制本发明。每个部分可以适用于本发明的任何方面。在本申请中，除非另有说明，否则“或”的使用意指“和/或”。

[0095] 杜氏肌营养不良 (DMD)

[0096] DMD是一种以全身肌肉进行性退化和肌肉有关功能丧失为特征的疾病。预期本发明提供了用于在各种肌肉组织中再生肌肉并治疗与DMD和其他肌营养不良关联的纤维化、炎症和其他症状或特征的方法和组合物。在一些实施方案中，在受试者中使用所提供的方法和组合物引起该受试者的纤维化和/或坏死减少。

[0097] 肌肉组织

[0098] 动物中主要存在两种类型的肌肉组织：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。横纹肌往往受随意控制并附着于骨骼上，但是有一些例外，诸如心肌，它具有横纹肌的几种特性，但不受随意控制。通常，横纹肌允许身体随意运动并且包括主要肌群，包括四头肌、腓肠肌、二头肌、三头肌、斜方肌、三角肌等。横纹肌往往很长，许多横纹肌都能够独立起作用。然而，某些横纹肌未附着于骨骼上，包括口腔、肛门、心脏和食道上部的那些。

[0099] 另一方面，平滑肌具有截然不同的结构。平滑肌往往组织成连续的薄片，在平滑肌细胞之间具有机械连接，而不是一系列具有独立骨骼附着的长肌。平滑肌常常位于中空器官的壁中，通常不受随意控制。衬于特定器官的平滑肌必须承受相同的负荷并同时收缩。平滑肌至少部分起到处理中空器官的负荷变化的作用，这些变化是由运动和/或姿势或压力变化引起的。这种双重作用意味着，平滑肌不仅必须能够像横纹肌一样收缩，而且还必须能够强直性收缩以抵抗长期负荷保持器官尺寸。平滑肌的实例是那些衬于血管、膀胱、胃肠道（诸如直肠）的平滑肌。

[0100] 肌肉的力量取决于肌肉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/或形成更多的肌细胞（增生）来增加肌纤维的直径，将会增加肌肉产生力的能力。

[0101] 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面部的一块或多块肌肉，用于咀嚼的一块或多块肌肉，舌头和颈部的一块或多块肌肉，胸廓的一块或多块肌肉，肩胛带和手臂的一块或多块肌肉，手臂和肩部的一块或多块肌肉，一块或多块前臂腹侧和背侧肌肉，手的一块或多块肌肉，竖脊肌的一块或多块肌肉，骨盆带和腿部的一块或多块肌肉，和/或前腿和足部的一块或多块肌肉。

[0102] 在一些实施方案中，面部的肌肉包括但不限于眼内肌肉，诸如睫状肌、虹膜扩张肌、虹膜括约肌；或耳部肌肉，诸如耳廓肌、颞顶肌、镫骨肌、鼓膜张肌；鼻部肌肉，诸如降眉间肌、鼻肌、鼻孔开大肌、降鼻中隔肌、提上唇鼻翼肌等；口腔肌肉，诸如提口角肌、降口角肌、口轮匝肌、颊肌、大颤肌和小颤肌、颈阔肌、提上唇肌、降下唇肌、笑肌、颏肌和/或皱眉肌。

[0103] 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，舌头和颈部的肌肉包括但不限于颏舌肌、茎突舌肌、舌腭肌、舌骨舌肌、二腹肌、茎突舌骨肌、下颌舌骨肌、颏舌骨肌、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。

[0104] 在一些实施方案中，胸廓、肩胛带和手臂的肌肉包括但不限于锁骨下肌胸大肌、胸小肌、腹直肌、腹外斜肌、腹内斜肌、腹横肌、膈肌、肋间外肌、肋间内肌、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。

[0105] 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。

[0106] 在一些实施方案中，前臂腹侧和背侧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。

[0107] 在一些实施方案中,手的肌肉包括但不限于手的内在肌,诸如鱼际、外展拇指短肌、拇指短屈肌、拇指对掌肌、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/或蚓状肌。

[0108] 在一些实施方案中,竖脊肌的肌肉包括但不限于颈部肌、棘肌、最长肌和/或髂肋肌。

[0109] 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(诸如股直肌、股外侧肌、股内侧肌、股中间肌)、腓肠肌、腓侧(腓骨)长肌、比目鱼肌、臀大肌、臀中肌、臀小肌、肌腱:肱二头肌:长头,肌腱:肱二头肌:短头,肌腱:半腱肌,肌腱:半膜肌、阔筋膜张肌、耻骨肌和/或胫骨前肌。

[0110] 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、伸拇长肌、腓骨短肌、跖肌、胫骨后肌、屈姆长肌、趾短伸肌、伸足母短肌、拇指外展肌、屈姆短肌、小趾展肌、屈小指短肌、小趾对跖肌、趾短伸肌、足部蚓状肌、跖方肌或副屈肌、趾短屈肌、背侧骨间肌和/或骨间足底肌。

[0111] 在表1中汇总了示例性的肌肉靶标。

[0112] 表1:肌肉靶标

[0113] **眼轮匝肌**

| | | | |
|-------------------------------|---------|---------|----------|
| 眼内：睫状肌、虹膜扩张肌、虹膜括约肌 | | | |
| 耳部：耳廓肌、颞顶肌、镫骨肌、鼓膜张肌 | | | |
| 鼻部：降眉间肌、鼻肌、鼻孔开大肌、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 | 大颤肌和小颤肌 | 颈阔肌 | 提上唇肌 |
| 降下唇肌 | 笑肌 | 颤肌 | 皱眉肌 |
| 肘肌 | 旋前圆肌 | 旋后肌 | 肱肌 |
| 咀嚼肌 | | | |
| 咬肌 | 颤肌 | 翼内肌 | 翼外肌 |
| 舌头和颈部的肌肉 | | | |
| 颏舌肌 | 茎突舌肌 | 舌腭肌 | 舌骨舌肌 |
| 二腹肌 | 茎突舌骨肌 | 下颌舌骨肌 | 颏舌骨肌 |
| 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 |
| 胸廓、肩胛带和手臂的肌肉 | | | |
| 锁骨下肌 | 胸大肌 | 胸小肌 | 腹直肌 |
| 腹外斜肌 | 腹内斜肌 | 腹横肌 | 膈肌 |
| 肋间外肌 | 肋间内肌 | 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：颈部肌 | 竖脊肌：棘肌 | 竖脊肌：最长肌 |
| 竖脊肌：髂肋肌 | | | |
| 手的内在肌：鱼际、外展拇指肌、拇指屈肌和拇指对掌肌 | | | |
| 手的内在肌：小鱼际、小指展肌、小指短屈肌和小指对掌肌 | | | |
| 手的内在肌：骨间掌侧肌、骨间背侧肌和蚓状肌 | | | |
| 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 | 股四头肌：股外 | 股四头肌：股内 | 股四头肌：中间 |

[0114]

| 肌 | 侧肌 | 侧肌 | 股肌 |
|-----------------|----------|---------------|---------------|
| 腓肠肌 | 腓侧(腓骨)长肌 | 比目鱼肌 | 臀大肌 |
| 臀中肌 | 臀小肌 | 肌腱肱二头肌: 长头 | 肌腱肱二头肌: 短头 |
| 肌腱半腱肌 | 肌腱半膜肌 | 阔筋膜张肌 | 耻骨肌 |
| 胫骨前肌 | | | |
| 前腿和足部的肌肉 | | | |
| 趾长伸肌 | 伸姆长肌 | 腓骨短肌 | 跖肌 |
| 胫骨后肌 | 屈姆长肌 | 趾短伸肌 | 伸足母短肌 |
| 拇外展肌 | 屈姆短肌 | 小趾展肌 | 屈小指短肌 |
| 小趾对跖肌 | 趾短伸肌 | 足部蚓状肌 | 跖方肌或副屈肌 |
| 趾短屈肌 | 背侧骨间肌 | 骨间足底肌 | |

[0115] [0116] 肌营养不良

[0117] 肌营养不良是一类会引起肌肉退化,从而导致运动减弱和受损的遗传性病症。所有肌营养不良的主要特征是它们本质上是进行性的。肌营养不良包括但不限于:杜氏肌营养不良(DMD)、贝克肌营养不良、Emery-Dreifuss肌营养不良、面肩肱型肌营养不良、肢带型肌营养不良及1型和2型强直性肌营养不良,包括先天性形式的1型强直性肌营养不良。症状可因肌营养不良类型而异,某些或所有肌肉受到影响。肌营养不良的示例性症状包括肌肉运动技能发展迟缓,使用一个或多个肌群困难,吞咽、说话或进食困难,流口水,眼睑下垂,频繁跌倒,成年时肌肉或肌群力量丧失,肌肉大小减少,因身体无力或生物力学改变而导致行走问题,肌肉肥大,肌肉假性肥大,肌肉脂肪浸润,非收缩性组织替代肌肉(例如,肌纤维化),肌肉坏死,和/或认知或行为障碍/智力低下。

[0118] 虽然对于肌营养不良尚无已知的治愈方法,但仍使用了几种支持性治疗,包括对症疗法和疾病缓解疗法。在肌营养不良中常用皮质类固醇、物理疗法、矫形设备、轮椅或其他用于ADL和肺功能的辅助医疗设备。使用心脏起搏器预防强直性肌营养不良中因心律不齐而突然死亡。改善肌强直症状(无法放松)的抗肌强直剂包括慢心律(mexilitine),在某些情况下包括苯妥英(phenytoin)、普鲁卡因胺(procainamide)和奎宁(quinine)。

[0119] 杜氏肌营养不良

[0120] 杜氏肌营养不良(DMD)是一种隐性X连锁形式的肌营养不良,可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(小腿)肌的假性肥大和肌酸激酶(CK)升高。许多DMD患者在5岁左右,当症状/体征通常变得更加明显时被诊出。受影响的个体通常在10-13岁左右停止行走,并且在20岁中期至后期或之前由于心肺功能障碍而死亡。

[0121] DMD病症是由位于人X染色体上的肌营养不良蛋白基因的突变引起的,该基因编码蛋白质肌营养不良蛋白,肌营养不良蛋白是肌肉组织内为细胞膜的肌营养不良蛋白聚糖复合物(DGC)提供结构稳定性的重要结构组分。肌营养不良蛋白将内部细胞质肌动蛋白丝网络和细胞外基质连接起来,为肌纤维提供物理强度。因此,肌营养不良蛋白的改变或不存在导致异常的肌纤维膜撕裂和肌纤维坏死。虽然男性和女性都可携带该突变,但女性很少表现出该疾病的严重体征。

[0122] DMD的主要症状是与肌肉消瘦关联的肌无力,通常随意肌首先受到影响,尤其影响臀部、骨盆区、大腿、肩部的肌肉和小腿肌肉。肌无力也发生在手臂、颈部和其他区域。小腿常常增大。体征和症状通常在6岁之前出现,可能早在婴儿期出现。其他体症包括但不限于:独立行走的能力延迟,进行性行走、踩踏或跑步困难以及最终丧失行走能力(通常到15岁);经常跌倒;疲劳;运动技能(跑步、跳跃、跳动)困难;腰椎前凸增加,导致髋屈肌缩短;跟腱和肌腱挛缩削弱功能(因为肌纤维缩短并且在结缔组织中发生纤维化);肌纤维畸形;由脂肪和结缔组织替代肌肉组织引起的舌头和小腿肌肉假性肥大(增大);神经行为障碍(例如ADHD)、学习障碍(诵读困难)和特定认知技能的非进行性削弱(特别是短期非文字性记忆)的风险较高;骨骼畸形(在某些情况下包括脊柱侧凸)。

[0123] 重组卵泡抑素蛋白

[0124] 卵泡抑素(FS),一种单体糖蛋白,最初是从猪卵巢卵泡液中鉴定出来的,并且根据其特异性抑制垂体促卵泡激素(FSH)分泌的功能进行命名。随后,通过它结合和抑制TGF- β 的某些成员,主要是激活素和肌生长抑制素,进一步了解了人卵泡抑素的生理功能。激活素在多种生物学过程中起着重要作用,包括胚胎发育与生长、繁殖、能量代谢、骨稳态、炎症和纤维化。肌生长抑制素,也称为生长和分化因子8(GDF-8),是众所周知的肌生成和骨骼肌质量的重要负调控因子。肌生长抑制素的抑制通过肥大引起骨骼肌质量的显著增加。已经指出卵泡抑素,作为激活素和肌生长抑制素的天然拮抗剂,是治疗与炎症、纤维化和肌肉病症关联的人类疾病的有前景的治疗靶标,所述肌肉病症诸如杜氏肌营养不良(DMD)、贝克肌营养不良(BMD)和包涵体肌炎(IBM)。

[0125] 卵泡抑素基因位于染色体5q11.2上。RNA加工中的另一剪接事件产生两种编码的卵泡抑素前体,即344个氨基酸的前体蛋白和羧基端截短27个氨基酸的317个氨基酸的前体。前体的前29个氨基酸残基对应于推定的信号序列,从而产生两个N端相同的核心成熟FS同种型,FS315和FS288。据报道,FS的另一种变体FS303是由FS315的蛋白水解裂解产生的。这三种同种型基于对配体结合和定位的不同亲和力而发挥不同的生物学作用。有人认为FS315是人血清中的主要循环同种型,而FS303是卵巢卵泡液中的主要循环同种型。FS的结构域结构是一种源自外显子改组的典型镶嵌蛋白,在FS315和FS303同种型中由63个残基的N端结构域(ND),后面是三个连续的FS结构域(FSD1、FSD2和FSD3)和强酸性C端尾(AD)组成(图1)。具有大约50%一级序列同源性的三个FS结构域通过其十个半胱氨酸残基的比对而明确联系起来。FSD1的晶体结构表明,FS结构域可分为两个不同的亚结构域:N端EGF样模块和C端Kazal蛋白酶抑制剂结构域,并且预计每个FS结构域会通过由10个保守性半胱氨酸形成的域内二硫键形成自主折叠单元。

[0126] 在最初的分离和表征研究中描述了FS与肝素-琼脂糖亲和柱和细胞表面上蛋白聚糖的硫酸乙酰肝素链的结合。后来的研究确定了FS中的核心肝素结合序列(HBS),该序列是位于FSD1结构域中的强碱性的12残基区段(残基75-86)。HBS区域包含两个共有肝素结合基序BBXB,其中B是赖氨酸(K)或精氨酸(R),并且HBS区域起到肝素结合的重要决定因素的作用。HBS的置换或BBXB基序中的点突变可以减少或消除与肝素的结合。在最近的动物研究中,去除了HBS的与鼠Ig1 Fc结构域融合的经工程改造的FS315(FS315 Δ HBS-Fc)显著改善小鼠的暴露和半衰期,并且在小鼠肌肉萎缩模型中也显示出剂量依赖性药理作用,这突出了操纵肝素结合亲和力以开发治疗相关的重组FS变体的重要性。

[0127] 用于治疗应用的重组FS的系统蛋白质工程在很大程度上尚未开发。在一些实施方案中,本文提出了经工程改造的重组FS变体。在一些实施方案中,经工程改造的重组FS变体与IgG Fc融合。在一些实施方案中,经工程改造的重组FS变体与人IgG1 Fc融合。

[0128] 在一些实施方案中,FS HBS内基本BBXB基序中的某些残基的电荷影响肝素结合亲和力。FS315由一个N端结构域(ND)、三个FS结构域(FSD1、FSD2和FSD3)和一个强酸性C端尾(AD)组成(图1)。富含碱性残基的两个核心肝素结合基序KKCR和KKNK位于FSD1中,使得FSD1与FSD2(pI 6.7)和FSD3(pI 4.8)相比,成为最基本的结构域(pI 8.9)。与肝素复合的20种非冗余三维蛋白质结构的结构分析表明,在肝素中静电和氢键相互作用在阳离子残基(K或R)与阴离子基团之间的结合中贡献最大。与肝素类似物复合的FS FSD1结构域的晶体结构还表明,肝素类似物通过其带负电荷的硫酸基团,通过静电相互作用与强碱性的HBS结合。在一些实施方案中,在HBS区域的BBXB基序中用阴离子残基取代阳离子残基将会破坏静电相互作用并消除肝素结合。在一些实施方案中,在SPR结合测定中,经负性残基取代的变体K(76,81,82)E和K(76,81,82)D的肝素结合亲和力不可检测,而经中性残基取代的变体K(76,81,82)A具有9.4nM的结合 K_D ,从而证实了使用负电荷取代对消除肝素结合的作用更大。负电荷取代对肝素结合亲和力有重大影响,仅引入几个点突变即可实现与HBS置换变体 Δ HBS和HBS缺失变体de175-86所见相同的结合变化。在我们手中,利用最小限度的取代可以提高CHO中FS变体的表达水平,并减少蛋白A洗脱液中的蛋白质聚集,以及保留与野生型相似的激活素A和肌生长抑制素结合亲和力。

[0129] 在一些实施方案中,增加重组卵泡抑素变体中谷氨酸取代的程度会逐渐降低肝素结合。在一些实施方案中,第二BBXB基序KKNK(81-84)相比于第一BBXB基序KKCR(75-78)在肝素结合中起主导作用。在一些实施方案中,每个FS BBXB基序中的第三碱性残基对肝素结合的影响较弱。在一些实施方案中,与FS BBXB基序中的第三碱性残基相比,FS BBXB基序中的前两个碱性残基对肝素结合和/或清除率的影响更大。

[0130] 通过使用带负电荷的谷氨酸E对BBXB基序中的关键残基产生一系列1、2或3个氨基酸取代,可以鉴定肝素结合的关键位置和组合。对两个BBXB基序中六个碱性残基的筛选表明,第二BBXB基序中的K81和K82对静电相互作用起主导作用,因为我们观察到双联体变体K(81,82)E与其他六种双联体变体(包括K(75,76)E、K(76,82)E、K(76,84)E、R78E/K82E、R78E/K84E和K(82,84)E)相比,对肝素结合的影响最大(表8b)。在一些实施方案中,具有K82E突变的变体始终显示蛋白质表达水平增加~2倍,这暗示K82E对蛋白质折叠的积极影响。在一些实施方案中,产生了具有不同肝素结合程度的变体,与野生型相比在我们的测试范围内具有4~100倍范围的降低或更大程度的降低。已经显示FS与细胞表面硫酸乙酰肝素蛋白聚糖之间的结合引起快速的细胞摄取和清除。选择具有不同肝素结合亲和力的多种变体,并将这些变体作为单次静脉剂量(1mg/kg)施用于雌性CD1小鼠。与野生型相比,所有变体均显示出改善的PK特性,并且肝素结合减少明显与AUC增加和清除率降低相关(表11)。实施例中呈现的数据表明,与细胞表面硫酸乙酰肝素蛋白聚糖的结合是卵泡抑素蛋白体内药代动力学特性的决定性过程之一。对于治疗性应用,可以通过操纵肝素结合来调节卵泡抑素蛋白的暴露和药代动力学特性。

[0131] 与肝素结合和AUC或清除率之间的关系不同,尽管许多变体与野生型相比具有延长的半衰期,但在终末半衰期上没有直接关系。由于药物的半衰期取决于清除率和分布体

积,因此可能由蛋白质电荷和结构所产生的分布体积(表11),可能是导致终末半衰期与肝素结合之间非直接关系的因素。

[0132] 已使用不同的FS同种型/变体和不同的测定系统研究了HBS区域内的突变对配体结合的影响,从而得出了不同的数据集。对于de175-86变体,肌生长抑制素抑制作用降低大约~20倍且激活素A抑制作用降低~5倍,可能是由于分子构象的变化引起的。在一些实施方案中,与野生型卵泡抑素相比,重组卵泡抑素变体使肌生长抑制素抑制作用降低约50、45、40、35、30、25、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2.5、2、1.5或1倍。在一些实施方案中,与野生型卵泡抑素相比,重组卵泡抑素使激活素A抑制作用降低约30、25、20、15、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1倍。

[0133] 糖工程(Glyco-engineering)技术正成为一种有吸引力的用于改善治疗剂的药物性质的策略。有许多方法用于通过表达或破坏相关酶类来对宿主生物合成途径进行糖工程遗传修饰;2)通过使用可溶性酶抑制剂对宿主生物合成途径进行代谢干扰;3)对纯化蛋白进行翻译后酶促修饰或化学酶促修饰;和4)引入新的糖基化位点以增加碳水化合物含量或阻断特异性结合。

[0134] 在一些实施方案中,在卵泡抑素的N75上发现高糖基化位点。FSD1的晶体结构表明残基64-74形成环,其后是 β 1链(75-79)和 β 2链(85-89)。残基75位于连接环和 β 1链的II型 β -转角(72-75)中,这与糖基化常常发生在暴露的具有一定柔性的环区的发现一致。

[0135] 在小鼠研究中,与野生型相比,两种高糖基化变体K75N/C77N/K82T和C66A/K75N/C77T显著改善了体内暴露。在N75上添加聚糖后,C66A/K75N/C77T的体外肝素结合没有降低。

[0136] 在一些实施方案中,第一BBXB基序(残基75-78)对肝素结合的影响小于第二BBXB基序(残基81-84)。不希望受理论约束,C66A/K75N/C77T的体内暴露提高~10倍可能是由于聚糖占用率增加所致,聚糖占用率增加降低了重组FS315-Fc分子在体内的糖依赖性清除率,并且还可能通过增加体内大体积的聚糖而在一定程度上阻断某些肝素结合。与C66A/K75N/C77T相比,变体K75N/C77N/K82T具有更高的聚糖占用率和更弱的体外肝素结合亲和力,这有助于体内暴露的更大改善。

[0137] 如本文所用,适于本发明的重组卵泡抑素蛋白包括保持大量卵泡抑素生物活性的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、插入和/或融合蛋白的卵泡抑素蛋白)。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,可以使用从自然资源纯化的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或重组卵泡抑素融合蛋白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。在一些实施方案中,重组卵泡抑素蛋白的体内半衰期为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。

[0138] 首先从卵泡液中分离出卵泡抑素(FS),它是一种能够抑制垂体细胞促卵泡激素(FSH)分泌的蛋白因子。FS至少部分通过激活素的结合和中和对FSH发挥作用。

[0139] 存在至少三种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端尾(SEQ ID NO:2,C-端尾加单下划线)。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同种型是通过在C端进行选择性剪接产生的,因此以外显子5(SEQ ID NO:5)结尾。卵泡抑素蛋白具有独特的结构,该结构由63个氨基酸的N端区域组成,该区域含有对激活素结合很重要的疏水性残基,该蛋白的主要部分(残基64-288,例如SEQ ID NO:2所示)包含三个各约73-75个氨基酸的10个半胱氨酸的FS结构域。从N端到C端的这些10个半胱氨酸的结构域分别称为结构域1、结构域2和结构域3(即,FSD1、FSD2和FSD3)。FS288由于存在肝素结合结构域而倾向于与组织结合,而FS315倾向于为循环形式,这可能是因为肝素结合结构域被延伸的C端所掩盖。认为FS303(SEQ ID NO:4)是因C端结构域从FS315上蛋白水解裂解而产生的。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具有介于FS288和FS315之间的中间细胞表面结合水平。

[0140] 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用双下划线表示。FS303和FS288蛋白也在相应的氨基酸处包含HBS(也用双下划线表示)。该区域内氨基酸的突变、缺失或取代可减少或消除肝素结合,从而降低清除率并提高治疗性卵泡抑素-Fc融合蛋白的半衰期。

[0141] 在一些实施方案中,用具有较少正电荷的氨基酸取代HBS中的至少一个或多个氨基酸,产生肝素结合亲和力降低的重组卵泡抑素蛋白。在一些实施方案中,用具有较多中性或负电荷的氨基酸取代HBS中的至少一个或多个氨基酸,产生肝素结合亲和力降低的重组卵泡抑素蛋白。在一些实施方案中,用与原始氨基酸相比电荷减少的氨基酸取代,产生肝素结合亲和力降低的重组卵泡抑素蛋白。在一些实施方案中,用具有较少正电荷,中性电荷,较多负电荷或电荷减少的氨基酸对HBS中存在的氨基酸进行1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个取代,产生肝素结合亲和力降低的重组卵泡抑素蛋白。在一些实施方案中,用具有较少正电荷、中性电荷、较多负电荷或电荷减少的氨基酸对HBS中存在的氨基酸进行1、2或3个取代,产生肝素结合亲和力降低的重组卵泡抑素蛋白。在一些实施方案中,用带较少正电荷的氨基酸,中性氨基酸,带负电荷的氨基酸或电荷减少的氨基酸取代HBS中的一个以上氨基酸导致肝素结合对应于所产生的氨基酸取代的量逐渐降低。例如,用具有较少正电荷、中性电荷、较多负电荷的氨基酸,或电荷减少的氨基酸取代HBS中的3个氨基酸,与用具有较少正电荷、中性电荷、较多负电荷的氨基酸,或电荷减少的氨基酸取代HBS中的仅2个氨基酸相比,导致重组卵泡抑素蛋白进行的肝素结合更少。再如,用具有较少正电荷、中性电荷、较多负电荷的氨基酸,或电荷减少的氨基酸取代HBS中的2个氨基酸,与用具有较少正电荷、中性电荷、较多负电荷的氨基酸,或电荷减少的氨基酸取代HBS中的仅1个氨基酸相比,导致重组卵泡抑素蛋白进行的肝素结合更少。

[0142] 本领域技术人员将认识到,与其他氨基酸相比,某些氨基酸的正电荷更少,为中

性,带负电荷或具有的电荷减少。可以根据如氨基酸的等电点所示的净电荷来区分氨基酸。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pI测量值为约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)以及介于两者之间的任何值。在一些实施方案中,重组卵泡抑素蛋白的pI测量值为约4至7(例如4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0)以及介于两者之间的任何值。氨基酸的示例性等电点示于下表2中。通常,具有带正电荷的侧链的氨基酸包括例如精氨酸(R)、组氨酸(H)和赖氨酸(K)。具有带负电荷的侧链的氨基酸包括例如天冬氨酸(D)和谷氨酸(E)。具有极性性质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)。

[0143] 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个)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,即残基KKCRMNKKNKPR的氨基酸。在一些实施方案中,用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)取代赖氨酸(K)氨基酸导致重组卵泡抑素多肽的总电荷变化,称为pI转变。在一些实施方案中,卵泡抑素分子的总电荷变化改善了体内清除和半衰期。在一个实施方案中,重组卵泡抑素多肽的总电荷变化减缓了体内清除。在一些实施方案中,用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)取代一个或多个赖氨酸(K)氨基酸导致重组卵泡抑素分子的总电荷变化。在一些实施方案中,用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),取代一个或多个赖氨酸(K)氨基酸,导致在重组卵泡抑素多肽表达期间高分子量物质的量减少。在一些实施方案中,用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)取代一个或多个赖氨酸(K)氨基酸导致重组卵泡抑素多肽的表达增加。

[0144] 表2:氨基酸等电点

[0145]

| <u>氨基酸</u> | <u>单字母缩写</u> | <u>pI(等电点)</u> |
|------------|--------------|----------------|
| 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 |
| 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 |

[0146] 已经证实,FS在体外同时抑制肌生长抑制素和激活素,并且这种抑制作用可在小鼠体内导致肌肉肥大(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,观察到的这种效应可能至少部分是由于FS阻止了肌生长抑制素和激活素激活Smad2/3途径。已经证实Smad2/3途径的激活会对肌肉生长产生负调控(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)。

[0147] 表3中示出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。

[0148] 表3.示例性的人卵泡抑素同种型

| 同种型 | 卵泡抑素同种型序列 |
|--------------------------|--|
| 带有信号序列的 FS315 | MVRARHQPGGLCLLLLLCQFMEDRSAQAGNCWL RQAKNGRCQVLYKTELSKEECSTGRLSTSWTEED VNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGK <u>KCRMNKKNNKPRCVCAPDCSNITWKGPCVGLDGKT</u> YRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVF CPGSSTCVVDQTNNAYCVCNRICPEPASSEQYLCG NDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKS CEDIQCTGGKKCLWDFKVGRGRCSLCDELCPDSKS DEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLLLEVKHSG SCNSISEDTEEEEDEDQDYSFPISSILEW (SEQ ID NO:1) |
| FS315 [0149] | GNCWLQRQAKNGRCQVLYKTELSKEECSTGRLSTSWTEEDVND NTLFKWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGK <u>KCRMNKKNNKPRCVCAPDCSNITWKGPCVGLDGKT</u> YRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVF CPGSSTCVVDQTNNAYCVCNRICPEPASSEQYLCG NDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKS DIQCTGGKKCLWDFKVGRGRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNA TYASECAMKEAACSSGVLLLEVKHSGSCNSISEDTEEEEDEDQD YSFPISSILEW (SEQ ID NO:2) |
| 带有信号序列的 FS303 | MVRARHQPGGLCLLLLLCQFMEDRSAQAGNCWL RQAKNGRCQVLYKTELSKEECSTGRLSTSWTEED VNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGK <u>KCRMNKKNNKPRCVCAPDCSNITWKGPCVGLDGKT</u> YRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVF CPGSSTCVVDQTNNAYCVCNRICPEPASSEQYLCG NDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKS CEDIQCTGGKKCLWDFKVGRGRCSLCDELCPDSKS |

| | |
|------------------------------------|--|
| | DEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLEVKHSG SCNSISEDTEEEEDEDQ (SEQ ID NO:3) |
| FS303 | GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSEECCSTGRLSTS WTEEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPCKETCENV <u>CGPGKKCRMNKKNKPRCVCAPDCSNITWKGPVCG</u> LDGKYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKT CRDVFCPGSSTCVVDQTNNAYCVCNRICPEPASSE QYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGK CIAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGRGRCSLCDEL CPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLL EVKHSGSCNSISEDTEEEEDEDQ (SEQ ID NO:4) |
| 带有信号序列的 FS288 [0150] | MVRARHQPGGLCLLLLLCQFMEDRSAQAGNCWL RQAKNGRCQVLYKTELSEECCSTGRLSTS VNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGK <u>KCRMNKKNKPRCVCAPDCSNITWKGPVCGLDGKT</u> YRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKT CPGSSTCVVDQTNNAYCVCNRICPEPASSE QYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGK CIAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGRGRCSLCDEL CPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLL SCN (SEQ ID NO: 119) |
| FS288 | GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSEECCSTGRLSTS WTEEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPCKETCENV <u>CGPGKKCRMNKKNKPRCVCAPDCSNITWKGPVCG</u> LDGKYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKT CRDVFCPGSSTCVVDQTNNAYCVCNRICPEPASSE QYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLGRSIGLAYEGK CIAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGRGRCSLCDEL CPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVLL EVKHSGSCN (SEQ ID NO:5) |

[0151] 因此,在一些实施方案中,适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)。如本文所公开,SEQ ID NO:2表示人卵泡抑素蛋白的规范氨基酸序列。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,诸如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,诸如FS288 (SEQ ID NO:5)。在一些实施方案中,合适的重组卵泡抑素蛋白可以是野生型或天然存在的蛋白的同源物或类似物。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

保持大量的卵泡抑素蛋白活性(例如,肌生长抑制素或激活素抑制作用)。因此,在一些实施方案中,适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)基本上同源。在一些实施方案中,适于本发明的重组卵泡抑素蛋白的氨基酸序列与SEQ ID NO:1至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多同源。在一些实施方案中,适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)基本上相同。在一些实施方案中,适于本发明的重组卵泡抑素蛋白的氨基酸序列与SEQ ID NO:1至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多相同。

[0152] 在一些实施方案中,适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)基本上同源。在一些实施方案中,适于本发明的重组卵泡抑素蛋白的氨基酸序列与SEQ ID NO:2至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多同源。在一些实施方案中,适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)基本上相同。在一些实施方案中,适于本发明的重组卵泡抑素蛋白的氨基酸序列与SEQ ID NO:2至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多相同。

[0153] 在一些实施方案中,适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)基本上同源。在一些实施方案中,适于本发明的重组卵泡抑素蛋白的氨基酸序列与SEQ ID NO:3至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多同源。在一些实施方案中,适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)基本上相同。在一些实施方案中,适于本发明的重组卵泡抑素蛋白的氨基酸序列与SEQ ID NO:3至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多相同。

[0154] 在一些实施方案中,适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)基本上同源。在一些实施方案中,适于本发明的重组卵泡抑素蛋白的氨基酸序列与SEQ ID NO:4至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多同源。在一些实施方案中,适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)基本上相同。在一些实施方案中,适于本发明的重组卵泡抑素蛋白的氨基酸序列与SEQ ID NO:4至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多相同。

[0155] 因此,在一些实施方案中,适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)基本上同源。在一些实施方案中,适于本发明的重组卵泡抑素蛋白的氨基酸序列与SEQ ID NO:5至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多同源。在一些实施方案中,适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)基本上相同。在一些实施方案中,适于本发明的重组卵泡抑素蛋白的氨基酸序列与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

更多相同。

[0156] 人卵泡抑素蛋白的同源物或类似物可以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制备,所述方法例如在汇编此类方法的参考文献中可以找到。如本领域普通技术人员将理解的,如果两个序列在相应位置含有同源残基,则通常认为它们是“基本上同源”。同源残基可以是相同的残基。可替代地,同源残基可以是将具有适当相似的结构和/或功能特征的不同残基。例如,如本领域普通技术人员众所周知的,通常将某些氨基酸分类为“疏水性”或“亲水性”氨基酸,和/或分类为具有“极性”或“非极性”侧链。一个氨基酸取代同一类型的另一个氨基酸通常可以视为“同源”取代。在一些实施方案中,氨基酸的保守性取代包括在以下组内的氨基酸之间进行的取代:(a) M、I、L、V; (b) F、Y、W; (c) K、R、H; (d) A、G; (e) S、T; (f) Q、N; 和 (g) E、D。在一些实施方案中,“保守性氨基酸取代”是指不改变在其中进行氨基酸取代的蛋白质的相对电荷或大小特征的氨基酸取代。

[0157] 如本领域中众所周知的,可以使用多种算法中的任何一种来比较氨基酸或核酸序列,这些算法包括商业计算机程序中可用的那些算法,诸如用于核苷酸序列的BLASTN和用于氨基酸序列的BLASTP、空位BLAST和PSI-BLAST。此类示例性程序在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; 以及Misener等人(编辑), *Bioinformatics Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology)*, 第132卷, Humana Press, 1999中进行了描述。除了鉴定同源序列外,以上提到的程序通常还提供对同源性程度的指示。

[0158] 在一些实施方案中,与野生型人卵泡抑素蛋白相比,适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如表4中所提供的氨基酸缺失、插入和/或取代。在对应于SEQ ID NO:2的FS315中举例说明了示例性的氨基酸缺失、插入和/或取代。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)中相应的位置处,可以存在相同的缺失、插入或取代。

[0159] 表4.示例性重组卵泡抑素蛋白

[0160]

| 序列 ID 号 (突变的描述*) | 示例性重组卵泡抑素蛋白 |
|---|--|
| SEQ ID NO: 12 (氨基酸 75 至 86 缺失; 断点用^^表示) | GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECSTGRLSTSWEEDVNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCPGVCAPDCSNITWKGPVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGR ^^ CKKTCRDVFCPGSSTCVVDQTNNAYCTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKATCLLG RSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGRGRCSLCDLCPDSKSDEPVCASDNATYAS ECAMKEAACSSGVILLEVKHSGSCNSISEDTEEEEDEDQDYSFPISSILEW |
| SEQ ID NO:13 (氨基酸 75 至 84 缺失并 且 插 入 QSCVVDQGTGS (SEQ ID NO:14) ** | GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECSTGRLSTSWEEDVNDNTLF KWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCPG <u>QSCVVDQTGS</u> PRVCAPD CSNITWKGPVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTC RDVFCPGSSTCVVDQTNNAYCTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSS AChLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGRG RCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVILLEVKHS GSCNSISEDTEEEEDEDQDYSFPISSILEW |
| SEQ ID NO:15 (K (81,82) A) | GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECSTGRLSTSWEEDVNDNTLF KWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCPG <u>KCRMNA</u> AANKPRCVCAPD CSNITWKGPVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTC RDVFCPGSSTCVVDQTNNAYCTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSS AChLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGRG RCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVILLEVKHS GSCNSISEDTEEEEDEDQDYSFPISSILEW |
| SEQ ID NO:16 (K (76,81,82) A) | GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECSTGRLSTSWEEDVNDNTLF KWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCPG <u>KCRMNA</u> AANKPRCVCAPD CSNITWKGPVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTC RDVFCPGSSTCVVDQTNNAYCTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSS AChLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGRG RCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVILLEVKHS GSCNSISEDTEEEEDEDQDYSFPISSILEW |
| SEQ ID NO:17 (K82E) | GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECSTGRLSTSWEEDVNDNTLF KWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCPG <u>KKCRMN</u> <u>KEN</u> KPRCVCAPD |

| | | |
|----------------------------------|--|--|
| | CSNITWKGPGVCGLDGKTYRNECALLKARCKEPELEVQYQGRCKKTC RDVFCPGSSTCVVDQTNAYCVCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSS AHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVRG RCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVILLEVKHS GSCNSISEDTEEEEDEDQDYSFPISSILEW | |
| SEQ ID NO:18 (K (75,76) E) | GNCWLQRQAKNGRCQVLYKTELSEECCSTGRLSTSWEEDVNDNTLF KWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGEECRMNNKKPRVCAPD CSNITWKGPGVCGLDGKTYRNECALLKARCKEPELEVQYQGRCKKTC RDVFCPGSSTCVVDQTNAYCVCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSS AHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVRG RCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVILLEVKHS GSCNSISEDTEEEEDEDQDYSFPISSILEW | |
| SEQ ID NO:19 (K (76,82) E) | GNCWLQRQAKNGRCQVLYKTELSEECCSTGRLSTSWEEDVNDNTLF KWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGK E CRMNK E NKPRVCAPD CSNITWKGPGVCGLDGKTYRNECALLKARCKEPELEVQYQGRCKKTC RDVFCPGSSTCVVDQTNAYCVCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSS AHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVRG RCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVILLEVKHS GSCNSISEDTEEEEDEDQDYSFPISSILEW | |
| [0161] | SEQ ID NO:20 (K (81,82) E) | GNCWLQRQAKNGRCQVLYKTELSEECCSTGRLSTSWEEDVNDNTLF KWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKKCRMNE E NKPRVCAPD CSNITWKGPGVCGLDGKTYRNECALLKARCKEPELEVQYQGRCKKTC RDVFCPGSSTCVVDQTNAYCVCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSS AHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVRG RCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVILLEVKHS GSCNSISEDTEEEEDEDQDYSFPISSILEW |
| | SEQ ID NO:21 (K (76,81,82) E) | GNCWLQRQAKNGRCQVLYKTELSEECCSTGRLSTSWEEDVNDNTLF KWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGK E CRMNE E NKPRVCAPD CSNITWKGPGVCGLDGKTYRNECALLKARCKEPELEVQYQGRCKKTC RDVFCPGSSTCVVDQTNAYCVCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSS AHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVRG RCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVILLEVKHS GSCNSISEDTEEEEDEDQDYSFPISSILEW |
| | SEQ ID NO:22 (K (76,81,82) E/V88E) | GNCWLQRQAKNGRCQVLYKTELSEECCSTGRLSTSWEEDVNDNTLF KWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGK E CRMNE E NKPRCE C APD CSNITWKGPGVCGLDGKTYRNECALLKARCKEPELEVQYQGRCKKTC RDVFCPGSSTCVVDQTNAYCVCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSS AHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVRG RCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVILLEVKHS GSCNSISEDTEEEEDEDQDYSFPISSILEW |
| | SEQ ID NO:23 (K84E) | GNCWLQRQAKNGRCQVLYKTELSEECCSTGRLSTSWEEDVNDNTLF KWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKKCRMNNKK E PRVCAPD |

| | | |
|--|---|---|
| | CSNITWKGPGVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTC RDVFCPGSSTCVVDQTNAYCVCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSS ACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGRC RCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVILLEVKHS GSCNSISEDTEEEEDEDQDYSFPISSILEW | |
| SEQ ID NO:24 (K (76,84) E) | GNCWLQRQAKNGRCQVLYKTELSEECCSTGRLSTSWEEDVNDNTLF KWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGK <u>E</u> CRMNK <u>N</u> <u>E</u> PRCVCAPD CSNITWKGPGVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTC RDVFCPGSSTCVVDQTNAYCVCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSS ACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGRC RCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVILLEVKHS GSCNSISEDTEEEEDEDQDYSFPISSILEW | |
| SEQ ID NO:25 (K (82,84) E) | GNCWLQRQAKNGRCQVLYKTELSEECCSTGRLSTSWEEDVNDNTLF KWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKKCRMNK <u>E</u> <u>N</u> <u>E</u> PRCVCAPD CSNITWKGPGVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTC RDVFCPGSSTCVVDQTNAYCVCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSS ACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGRC RCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVILLEVKHS GSCNSISEDTEEEEDEDQDYSFPISSILEW | |
| [0162] | SEQ ID NO:26 (R78E/K84E)) | GNCWLQRQAKNGRCQVLYKTELSEECCSTGRLSTSWEEDVNDNTLF KWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKK <u>C</u> <u>M</u> <u>N</u> <u>K</u> <u>N</u> <u>E</u> PRCVCAPD CSNITWKGPGVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTC RDVFCPGSSTCVVDQTNAYCVCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSS ACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGRC RCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVILLEVKHS GSCNSISEDTEEEEDEDQDYSFPISSILEW |
| SEQ ID NO:27 (K (76,82,84) E) | GNCWLQRQAKNGRCQVLYKTELSEECCSTGRLSTSWEEDVNDNTLF KWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGK <u>E</u> CRMNK <u>E</u> <u>N</u> <u>E</u> PRCVCAPD CSNITWKGPGVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTC RDVFCPGSSTCVVDQTNAYCVCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSS ACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGRC RCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVILLEVKHS GSCNSISEDTEEEEDEDQDYSFPISSILEW | |
| SEQ ID NO:28 (R78E/K82E)) | GNCWLQRQAKNGRCQVLYKTELSEECCSTGRLSTSWEEDVNDNTLF KWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKK <u>C</u> <u>M</u> <u>N</u> <u>K</u> <u>E</u> <u>N</u> <u>P</u> RCVCAPD CSNITWKGPGVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTC RDVFCPGSSTCVVDQTNAYCVCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSS ACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGRC RCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVILLEVKHS GSCNSISEDTEEEEDEDQDYSFPISSILEW | |
| SEQ ID NO:29 (R78E/K) | GNCWLQRQAKNGRCQVLYKTELSEECCSTGRLSTSWEEDVNDNTLF KWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKK <u>C</u> <u>M</u> <u>N</u> <u>K</u> <u>E</u> <u>N</u> <u>E</u> PRCVCAPD | |

| | | |
|--------|----------------------------------|---|
| | (82,84) E) | CSNITWKGPGVCGLDGKTYRNECALLKARCKEPELEVQYQGRCKKTC RDVFCPGSSTCVVDQTNAYCVCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSS AChLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGRC RCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVILLEVKHS GSCNSISEDTEEEEDEDQDYSFPISSILEW |
| [0163] | SEQ ID NO:30 K (76,81) E) | GNCWLQRQAKNGRCQVLYKTELSEECCSTGRLSTSWEEDVNDNTLF KWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKECRMNEKNKPRCVCAPD CSNITWKGPGVCGLDGKTYRNECALLKARCKEPELEVQYQGRCKKTC RDVFCPGSSTCVVDQTNAYCVCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSS AChLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGRC RCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVILLEVKHS GSCNSISEDTEEEEDEDQDYSFPISSILEW |
| | SEQ ID NO:31 (K82T) # | GNCWLQRQAKNGRCQVLYKTELSEECCSTGRLSTSWEEDVNDNTLF KWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKKCRMNKTKPRCVCAPD CSNITWKGPGVCGLDGKTYRNECALLKARCKEPELEVQYQGRCKKTC RDVFCPGSSTCVVDQTNAYCVCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSS AChLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGRC RCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVILLEVKHS GSCNSISEDTEEEEDEDQDYSFPISSILEW |
| | SEQ ID NO:32 (P85T) # | GNCWLQRQAKNGRCQVLYKTELSEECCSTGRLSTSWEEDVNDNTLF KWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKKCRMNNKTRCVCAPD CSNITWKGPGVCGLDGKTYRNECALLKARCKEPELEVQYQGRCKKTC RDVFCPGSSTCVVDQTNAYCVCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSS AChLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGRC RCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVILLEVKHS GSCNSISEDTEEEEDEDQDYSFPISSILEW |
| | SEQ ID NO:33 (R78N/N80T) # | GNCWLQRQAKNGRCQVLYKTELSEECCSTGRLSTSWEEDVNDNTLF KWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKKCNMTKKNKPRCVCAPD CSNITWKGPGVCGLDGKTYRNECALLKARCKEPELEVQYQGRCKKTC RDVFCPGSSTCVVDQTNAYCVCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSS AChLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGRC RCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVILLEVKHS GSCNSISEDTEEEEDEDQDYSFPISSILEW |
| | SEQ ID NO:34 (R86N/V88T) # | GNCWLQRQAKNGRCQVLYKTELSEECCSTGRLSTSWEEDVNDNTLF KWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKKCRMNNKPNCTCAPD CSNITWKGPGVCGLDGKTYRNECALLKARCKEPELEVQYQGRCKKTC RDVFCPGSSTCVVDQTNAYCVCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSS AChLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGRC RCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVILLEVKHS GSCNSISEDTEEEEDEDQDYSFPISSILEW |
| | SEQ ID NO:35 (K75N/C77T) | GNCWLQRQAKNGRCQVLYKTELSEECCSTGRLSTSWEEDVNDNTLF KWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGNKTRMNKTNKPRCVCAPD |

| | | |
|--------|--|--|
| [0164] | /K82T) # | CSNITWKGPGVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTC RDVFCPGSSTCVVDQTNAYCVCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSS ACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGRC RCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVILLEVKHS GSCNSISEDTEEEEDEDQDYSFPISSILEW |
| | SEQ ID NO:36 (G74N/K76S) # | GNCWLQRQAKNGRCQVLYKTELSEECCSTGRLSTSWEEDVNDNTLF KWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGP <u>NK</u> CRMNNKKPRCVCAPD CSNITWKGPGVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTC RDVFCPGSSTCVVDQTNAYCVCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSS ACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGRC RCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVILLEVKHS GSCNSISEDTEEEEDEDQDYSFPISSILEW |
| | SEQ ID NO:37 (G74N/K76T) # | GNCWLQRQAKNGRCQVLYKTELSEECCSTGRLSTSWEEDVNDNTLF KWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGP <u>NK</u> CRMNNKKPRCVCAPD CSNITWKGPGVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTC RDVFCPGSSTCVVDQTNAYCVCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSS ACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGRC RCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVILLEVKHS GSCNSISEDTEEEEDEDQDYSFPISSILEW |
| | SEQ ID NO:38 (G74N/K76T/ P85T) # | GNCWLQRQAKNGRCQVLYKTELSEECCSTGRLSTSWEEDVNDNTLF KWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGP <u>NK</u> CRMNNKKPRCVCAPD CSNITWKGPGVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTC RDVFCPGSSTCVVDQTNAYCVCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSS ACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGRC RCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVILLEVKHS GSCNSISEDTEEEEDEDQDYSFPISSILEW |
| | SEQ ID NO:39 (C66S/K75N/ C77T) # | GNCWLQRQAKNGRCQVLYKTELSEECCSTGRLSTSWEEDVNDNTLF KWMIFNGGAPNCIPCKET <u>S</u> ENVDCGP <u>NK</u> CRMNNKKPRCVCAPD CSNITWKGPGVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTC RDVFCPGSSTCVVDQTNAYCVCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSS ACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGRC RCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVILLEVKHS GSCNSISEDTEEEEDEDQDYSFPISSILEW |
| | SEQ ID NO:40 (C66A/K75N/ C77T) # | GNCWLQRQAKNGRCQVLYKTELSEECCSTGRLSTSWEEDVNDNTLF KWMIFNGGAPNCIPCKET <u>A</u> ENVDCGP <u>NK</u> CRMNNKKPRCVCAPD CSNITWKGPGVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTC RDVFCPGSSTCVVDQTNAYCVCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSS ACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGRC RCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVILLEVKHS GSCNSISEDTEEEEDEDQDYSFPISSILEW |
| | SEQ ID NO: 101 | GNCWLQRQAKNGRCQVLYKTELSEECCSTGRLSTSWEEDVNDNTLF KWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGP <u>NK</u> SRMNN <u>K</u> PRCVCAPD |

| | |
|--|---|
| (K75N/C77S /K82T) # | CSNITWKGPGVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTC RDVFCPGSSTCVVDQTNNAYCVCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSS ACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVRG RCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVILLEVKHS GSCNSISEDTEEEEDEDQDYSFPISSILEW |
| SEQ ID NO: 102 (C66S/K75N /C77S) # | GNCWLQRQAKNGRCQVLYKTELSEECCSTGRLSTSWEEDVNDNTLF KWMIFNGGAPNCIPCKET <u>SEN</u> VDCGPGN <u>K</u> SRMNKKNKPRCVCAPD CSNITWKGPGVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTC RDVFCPGSSTCVVDQTNNAYCVCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSS ACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVRG RCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVILLEVKHS GSCNSISEDTEEEEDEDQDYSFPISSILEW |
| SEQ ID NO: 103 (C66A/K75N /C77S) # | GNCWLQRQAKNGRCQVLYKTELSEECCSTGRLSTSWEEDVNDNTLF KWMIFNGGAPNCIPCKET <u>A</u> ENVDCGPGN <u>K</u> SRMNKKNKPRCVCAPD CSNITWKGPGVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTC RDVFCPGSSTCVVDQTNNAYCVCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSS ACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVRG RCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVILLEVKHS GSCNSISEDTEEEEDEDQDYSFPISSILEW |
| [0165] SEQ ID NO: 104 K (81,82) D | GNCWLQRQAKNGRCQVLYKTELSEECCSTGRLSTSWEEDVNDNTLF KWMIFNGGAPNCIPCKET <u>C</u> ENVDCGPGKKCRMN <u>DD</u> NKPRCVCAPD CSNITWKGPGVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTC RDVFCPGSSTCVVDQTNNAYCVCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSS ACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVRG RCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVILLEVKHS GSCNSISEDTEEEEDEDQDYSFPISSILEW |
| SEQ ID NO: 105 K (76,81,82) D | GNCWLQRQAKNGRCQVLYKTELSEECCSTGRLSTSWEEDVNDNTLF KWMIFNGGAPNCIPCKET <u>C</u> ENVDCGPGK <u>D</u> CRMN <u>DD</u> NKPRCVCAP DCSNITWKGPGVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKT CRDVFCPGSSTCVVDQTNNAYCVCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYS SACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVR GRCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVILLEVKH SGSCNSISEDTEEEEDEDQDYSFPISSILEW |
| SEQ ID NO: 106 K (76,82) D | GNCWLQRQAKNGRCQVLYKTELSEECCSTGRLSTSWEEDVNDNTLF KWMIFNGGAPNCIPCKET <u>C</u> ENVDCGPGK <u>D</u> CRMN <u>K</u> <u>D</u> NKPRCVCAPD CSNITWKGPGVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTC RDVFCPGSSTCVVDQTNNAYCVCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSS ACHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVRG RCSLCDELCPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVILLEVKHS GSCNSISEDTEEEEDEDQDYSFPISSILEW |

[0166] *氨基酸编号对应于FS315序列(例如,SEQ ID NO:2);与野生型FS315序列相比的氨基酸变化加下划线。

[0167] **QSCVVDQTGS的置换公开于J Pharmacol Exp Ther (2015) 354 (2) :238中。将这用作实验对照。

[0168] #高糖基化变体

[0169] 糖基化是针对糖蛋白的复杂翻译后修饰，并且影响蛋白的溶解性、折叠、稳定性、细胞转运、免疫原性、生物活性和分布。目前，临床研究中正在评估15种以上经糖工程改造的抗体。天然FS同种型在天冬酰胺N95、N112和N259处具有三个N糖基化位点(图1)。将新型糖基化位点引入FS肝素结合环以潜在地调节碳水化合物含量，阻断肝素结合并降低免疫原性风险尚未探索。

[0170] 在一些实施方案中，适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区域的高糖基化突变体。N-X-T/S共有序列是糖基化共有序列基序，其中X可以是介于Asn (N) 和Thr (T) 或Asn (N) 和Ser (S) 之间的除脯氨酸以外的任何氨基酸。在一些实施方案中，糖基化共有序列的添加掩盖、削弱或防止肝素结合。在一些实施方案中，适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，所述氨基酸序列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，高糖基化变体不具有如pI(等电点)所示的净电荷变化。

[0171] 在一些实施方案中，卵泡抑素多肽内氨基酸的缺失、插入或取代是在HBS内。在一些实施方案中，氨基酸的缺失、插入或取代靠近或邻近HBS，例如在HBS的N端或C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个氨基酸范围内。不希望受理论约束，可以预期的是，在HBS内，靠近或邻近HBS的变化减少了肝素结合。预期肝素结合减少会改善重组蛋白的药代动力学参数，例如，体内血清半衰期。不希望受理论约束，还可以预期的是，在HBS内，靠近或邻近HBS的变化可降低重组蛋白的免疫原性和/或增加重组蛋白的表达。在一些实施方案中，随K75D、K75E、K76D、K76E、K81D、K81E、K81D或K82E HBS突变中的一个或多个存在重组卵泡抑素表达增加。在一些实施方案中，随K82E HBS突变存在重组卵泡抑素表达增加。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)可以减少重组卵泡抑素蛋白的肝素结合。

[0172] 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会掩盖肝素结合结构域，从而减少重组蛋白与肝素的结合。还预计聚糖的存在会掩盖经取代的氨基酸，从而调节重组蛋白所赋予的免疫原性的任何潜在增加。预期高糖基化也会改善重组蛋白的溶解性和/或半衰期。如表4、表5和表9所示，示出了示例性的高糖基化变体。

[0173] 表5.示例性FS序列

| 序列 ID 号 (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* |
|---|--|
| FS-WT 氨基酸 66 至 88 SEQ ID NO: 107 | CENVDCPGKKCRMNKKNKPRCV |
| FSdelHBS (FSD2) (FS315; FS303; FS288) SEQ ID NO: 108 | CENVDCPGSTCVVDQTNNAYCV |
| FS315HBS (del75-86) SEQ ID NO: 109 | <u>CENVDCGPG</u> -----CV |
| SEQ ID NO:41 FS315delHBS/FSTL-D2 (氨基酸 75 至 84 缺失并且插 入 QSCVVDQTGS (SEQ ID NO:14)) ** | CENVDCGPG <u>QSCVVDQTGSPRCV</u> |
| SEQ ID NO:42 (K (81,82) A) | CENVDCPGKKCRMNA <u>A</u> NKPRCV |
| SEQ ID NO:43 (K (76,81,82) A) | CENVDCGPG <u>K</u> CRMNA <u>A</u> NKPRCV |
| SEQ ID NO:44 (K82E) | CENVDCGPGKKCRMNK <u>E</u> NKPRCV |
| SEQ ID NO:45 (K (75,76) E) | CENVDCGPG <u>E</u> CRMNKKNKPRCV |
| SEQ ID NO:46 (K (76,82) E) | CENVDCGPG <u>K</u> CRMNK <u>E</u> NKPRCV |
| SEQ ID NO:47 (K (81,82) E) | CENVDCGPGKKCRMN <u>E</u> NKPRCV |
| SEQ ID NO:48 (K (76,81,82) E) | CENVDCGPG <u>K</u> CRMN <u>E</u> NKPRCV |
| SEQ ID NO:49 (K (76,81,82) E/V88E) | CENVDCGPG <u>K</u> CRMN <u>E</u> ENKPRC <u>E</u> |
| SEQ ID NO:50 (K84E) | CENVDCGPGKKCRMNKK <u>N</u> EPRCV |
| SEQ ID NO:51 | CENVDCGPG <u>K</u> CRMNKK <u>N</u> EPRCV |

[0174]

| | | |
|--------|--------------------------------------|---|
| | (K (76,84) E) | |
| | SEQ ID NO:52 (K (82,84) E) | CENVDCGPGKKCRMNK <u>E</u> N <u>E</u> PRCV |
| | SEQ ID NO:53 (R78E/K84E) | CENVDCGPGKK <u>C</u> MNKK <u>N</u> <u>E</u> PRCV |
| | SEQ ID NO:54 (K (76,82,84) E) | CENVDCGPGK <u>E</u> CRMNK <u>E</u> N <u>E</u> PRCV |
| | SEQ ID NO:55 (R78E/K82E) | CENVDCGPGKK <u>C</u> MN <u>K</u> <u>E</u> NKPRCV |
| | SEQ ID NO:56 (R78E/K (82,84) E) | CENVDCGPGKK <u>C</u> MN <u>K</u> <u>E</u> N <u>E</u> PRCV |
| | SEQ ID NO:57 (K (76,81) E) | CENVDCGPGK <u>E</u> CRMN <u>E</u> KNKPRCV |
| | SEQ ID NO:58 (K82T) # | CENVDCGPGKKCRMNK <u>T</u> NKPRCV |
| [0175] | SEQ ID NO:59 (P85T) # | CENVDCGPGKKCRMNKK <u>N</u> <u>K</u> <u>T</u> RCV |
| | SEQ ID NO:60 (R78N/N80T) # | CENVDCGPGKK <u>C</u> N <u>M</u> <u>T</u> KKNKPRCV |
| | SEQ ID NO:61 (R86N/V88T) # | CENVDCGPGKKCRMNK <u>N</u> <u>K</u> <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> RMN <u>K</u> <u>T</u> NKPRCV |
| | SEQ ID NO:63 (G74N/K76S) # | CENVDCGPN <u>K</u> <u>S</u> CRMNKK <u>N</u> <u>K</u> <u>P</u> RCV |
| | SEQ ID NO:64 (G74N/K76T) # | CENVDCGPN <u>K</u> <u>T</u> CRMNKK <u>N</u> <u>K</u> <u>P</u> RCV |
| | SEQ ID NO:65 (G74N/K76T/P85T) # | CENVDCGPN <u>K</u> <u>T</u> CRMNKK <u>N</u> <u>K</u> <u>T</u> RCV |
| | SEQ ID NO:66 (C66S/K75N/C77T) # | <u>S</u> ENVDCGPG <u>N</u> <u>K</u> <u>T</u> RMNKK <u>N</u> <u>K</u> <u>P</u> RCV |
| | SEQ ID NO:67 (C66A/K75N/C77T) # | <u>A</u> ENVDCGPG <u>N</u> <u>K</u> <u>T</u> RMNKK <u>N</u> <u>K</u> <u>P</u> RCV |
| | SEQ ID NO: 111 (K75N/C77S/K82T) # | CENVDCGPG <u>N</u> <u>K</u> <u>S</u> RMN <u>K</u> <u>T</u> NKPRCV |
| | SEQ ID NO: 112 (C66S/K75N/C77S) # | <u>S</u> ENVDCGPG <u>N</u> <u>K</u> <u>S</u> RMNKK <u>N</u> <u>K</u> <u>P</u> RCV |
| | SEQ ID NO: 113 (C66A/K75N/C77S) # | <u>A</u> ENVDCGPG <u>N</u> <u>K</u> <u>S</u> RMNKK <u>N</u> <u>K</u> <u>P</u> RCV |
| | SEQ ID NO: 114 | CENVDCGPGKKCRMND <u>D</u> NKPRCV |

| | | |
|--------|----------------|---|
| [0176] | K (81,82) D | |
| | SEQ ID NO: 115 | CENVDCGPGK <u>D</u> CRMN <u>D</u> NKPRCV |
| | K (76,81,82) D | |
| | SEQ ID NO: 116 | CENVDCGPGK <u>D</u> CRMN <u>K</u> DNKPRCV |
| | K (76,82) D | |

[0177] *氨基酸编号对应于FS315序列(例如,SEQ ID NO:2);氨基酸变化加下划线。

[0178] **QSCVVDQTGS的置换公开于J Pharmacol Exp Ther (2015) 354 (2) :238中。将这用作实验对照。

[0179] #高糖基化变体。

[0180] 卵泡抑素融合蛋白

[0181] 预期合适的重组卵泡抑素蛋白可以呈融合蛋白构型。例如,适于本发明的重组卵泡抑素蛋白可以是卵泡抑素结构域和另一结构域或部分之间的融合蛋白,所述另一结构域或部分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,或降低或消除免疫原性或清除来促进卵泡抑素的疗效。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体。

[0182] Fc结构域

[0183] 在一些实施方案中,合适的重组卵泡抑素蛋白含有与FcRn受体结合的Fc结构域或其一部分。作为非限制性实例,合适的Fc结构域可源自免疫球蛋白亚类,诸如IgG。在一些实施方案中,合适的Fc结构域源自IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。在一些实施方案中,合适的Fc结构域源自IgM、IgA、IgD或IgE。特别合适的Fc结构域包括源自人或人源化抗体的那些。在一些实施方案中,合适的Fc结构域是经修饰的Fc部分,诸如经修饰的人Fc部分。

[0184] 在一些实施方案中,合适的Fc结构域包含如表6中提供的氨基酸序列。

[0185] 表6.示例性Fc结构域

| 序列 ID 号 (描 述) | Fc 结构域* |
|------------------|--|
| [0186] | SEQ ID NO:6 (野生型人 IgG1 Fc) DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| | SEQ ID NO:7 (人 IgG1 Fc- LALA) DKTHTCPPCPAPE <u>A</u> AGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |

| | |
|--|---|
| SEQ ID NO:8 (人 IgG1 Fc-NHance) | DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALK <u>FHYTQKSLSLSPGK</u> |
| SEQ ID NO:9 (人 IgG1 Fc-LALA + NHance) | DKTHTCPPCPAPE <u>AAGG</u> PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALK <u>FHYTQKSLSLSPGK</u> |
| [0187] SEQ ID NO:10 | EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDEVKFNWYVDGVEVHNNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSRDELTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| SEQ ID NO:11 | KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DEVKFNWYVDGVEVHNNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSL C LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |

[0188] *氨基酸编号基于EU编号。LALA和NHance突变带下划线。

[0189] 在一些实施方案中,合适的Fc结构域包含与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%或更多同源或相同的氨基酸序列。

[0190] 预期Fc结构域与FcRn受体之间的结合改善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导致与FcRn的结合改善的氨基酸突变。Fc结构域内实现与FcRn的结合改善的各种突变是本领域已知的,并且可以适于实践本发明。在一些实施方案中,根据EU编号,合适的Fc结构域在与人IgG1的Thr 250、Met 252、Ser 254、Thr 256、Thr 307、Glu 380、Met 428、His 433和/或Asn 434相对应的一个或多个位置包含一个或多个突变。

[0191] 在一些实施方案中,根据EU编号,合适的Fc结构域在与人IgG1的L234、L235、H433和N434相对应的一个或多个位置包含一个或多个突变。

[0192] 重组融合蛋白的Fc部分可导致对表达Fc受体的细胞的靶向,从而导致促炎作用。Fc结构域中的一些突变减少重组蛋白与Fc γ 受体的结合,从而抑制效应子功能。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结构域序列如表6中的SEQ ID NO:7所示。

[0193] 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。并入突变H433K和N434F的示例性Fc结构域序列如表6中的SEQ ID NO:8所示。

[0194] 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)。并入突变L234A、L235A、H433K和N434F的示例性Fc结构域序列如表6中的SEQ ID NO:9所示。

[0195] Fc结构域中可以包括的其他氨基酸取代包括, 例如, 美国专利号6,277,375、8,012,476和8,163,881中描述的那些氨基酸取代, 这些美国专利通过引用并入本文。

[0196] 接头或间隔区

[0197] 卵泡抑素结构域可以与Fc结构域直接或间接连接。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区。通常将氨基酸接头或间隔区设计为具有柔性或在两个蛋白质部分之间插入诸如 α -螺旋的结构。接头或间隔区可以相对较短, 或者可以较长。通常, 接头或间隔区在长度上含例如3-100个(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, 接头或间隔区的长度等于或长于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, 较长的接头可以减小位阻。在一些实施方案中, 接头将会包含甘氨酸和丝氨酸残基的混合物。在一些实施方案中, 接头可以另外包含苏氨酸、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。

[0198] 作为非限制性实例, 适于本发明的接头或间隔区包括但不限于:

[0199] GGG (SEQ ID NO:69) ;

[0200] GAPGGGGAAAAAGGGGGGAP (GAG接头, SEQ ID NO:70) ; GAPGGGGAAAAAGGGGGGAPGGG GGAAAAAGGGGGGAP (GAG2接头, SEQ ID NO:71) ; 和GAPGGGGAAAAAGGGGGGAPGGGGAAAAAGGGG GGAPGGGGAAAAAGGGGGGAP (GAG3接头, SEQ ID NO:72) 。

[0201] 合适的接头或间隔区还包括具有与以上示例性接头例如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接头或间隔区。适合与一些实施方案一起使用的其他接头可以在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。

[0202] 在一些实施方案中, 提供了将卵泡抑素多肽与Fc结构域缔合而基本上不会影响卵泡抑素多肽与任何其同源配体(例如, 激活素A、肌生长抑制素, 肝素等)结合的能力的接头。在一些实施方案中, 提供了一种接头, 使得卵泡抑素肽与肝素的结合与单独的卵泡抑素多肽相比没有改变。

[0203] 示例性卵泡抑素融合蛋白

[0204] 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、Fc结构域和结合卵泡抑素多肽与Fc结构域的接头,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与激活素A和肌生长抑制素结合。在一些实施方案中,合适的重组卵泡抑素融合蛋白的体内半衰期范围为约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)。在一些实施方案中,合适的重组卵泡抑素融合蛋白的体内半衰期范围为约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)。

[0205] 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所示的氨基酸序列。

[0206] 表7:示例性卵泡抑素Fc融合蛋白

| 序列 ID 号 (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 缺 失 ; 断 点 用 ^ 表 示) | GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKECCSTGRLSTSWEEDVNNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCPGVCAPDCSNITWKGPVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGR CKKTCRDVF CPGSSTCVVDQTNNAYCVCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSAHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVRGRCSLCDELCPDSKSDEPVCA SDNATYASECAMKEAACSSGVILLEVKHSGSCNSISEDTEEEEDEDQDYSFPISSILEW DKTHCPCPAPEAAGGPSVFLFPPPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| SEQ ID NO:74 (氨 基 酸 75 至 84 缺失并 且 插 入 QSCVVDQ T GS (SEQ ID NO:14) ** [0207] | GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKECCSTGRLSTSWEEDVNNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCPGQSCVVDQTGSPRCVCAPDCSNITWKGPVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVF C GSSTCVVDQTNNAYCVCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSAHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVRGRCSLCDELCP DSKSDEPVCA SDNATYASECAMKEAACSSGVILLEVKHSGSCNSISEDTEEEEDEDQDYSFPISSILEW DKTHCPCPAPEAAGGPSVFLFPPPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| SEQ ID NO:75 (K (81,82) A) | GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKECCSTGRLSTSWEEDVNNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCPGKKCRMNAANKPRCVCAPDCSNITWKGPVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVF CPGSSTCVVDQTNNAYCVCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSAHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVRGRCSLCDELCP DSKSDEPVCA SDNATYASECAMKEAACSSGVILLEVKHSGSCNSISEDTEEEEDEDQDYSFPISSILEW DKTHCPCPAPEAAGGPSVFLFPPPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| SEQ ID NO:76 (K (76,81,82) A) | GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKECCSTGRLSTSWEEDVNNDNTLFKWMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCPGKACRMNAANKPRCVCAPDCSNITWKGPVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVF CPGSSTCVVDQTNNAYCVCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSAHLRKATCLLGRSIGLAYEGKCIKAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVRGRCSLCDEL |

| | | |
|--------|-------------------------------------|---|
| | | CPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVILLEVKHSGSCNSISEDT EEEEDEDQDYSFPISSILEW <u>DKTHTCP</u> <u>CP</u> <u>CAPEAAGGPSVFLFP</u> <u>PK</u> <u>KD</u> TLMISRTPEVTCVVVDVS <u>HEDPEV</u> <u>KFNWY</u> <u>VDGVEVHN</u> <u>AKT</u> <u>KP</u> <u>REEQ</u> Y NSTYRVSVLTVLHQDWLN <u>GKEY</u> <u>KCKVSNKALP</u> <u>APIEKT</u> <u>ISKAKGQ</u> <u>P</u> RE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLCLVKG <u>FYPSDI</u> <u>AVEWE</u> <u>NGQP</u> <u>ENNY</u> KTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVD <u>KSRWQQGNVF</u> <u>CSVMHEALHN</u> <u>HYTQ</u> <u>KSL</u> S LSPGK |
| | SEQ ID NO:77 (K82E) | GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECSTGRLSTSWEEDVNDNTLFK WMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKKCRMNK <u>E</u> NKPRCVCAPDCSN ITWKGPCG LDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFC PGSSTCVVDQTNNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKA TCLLGRSIGLAYEGKCIAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGRGRCSLCDEL PDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVILLEVKHSGSCNSISEDE EEEEDEDQDYSFPISSILEW <u>DKTHTCP</u> <u>CP</u> <u>CAPEAAGGPSVFLFP</u> <u>PK</u> <u>KD</u> TLMISRTPEVTCVVVDVS <u>HEDPEV</u> <u>KFNWY</u> <u>VDGVEVHN</u> <u>AKT</u> <u>KP</u> <u>REEQ</u> Y STYRVSVLTVLHQDWLN <u>GKEY</u> <u>KCKVSNKALP</u> <u>APIEKT</u> <u>ISKAKGQ</u> <u>P</u> RE QVYTLPPSRDELTKNQVSLCLVKG <u>FYPSDI</u> <u>AVEWE</u> <u>NGQP</u> <u>ENNY</u> KTT PVLDSDGSFFLYSKLTVD <u>KSRWQQGNVF</u> <u>CSVMHEALHN</u> <u>HYTQ</u> <u>KSL</u> S SPGK |
| [0208] | SEQ ID NO:78 (K (75,76) E) | GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECSTGRLSTSWEEDVNDNTLFK WMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPG <u>E</u> CRMNNKKPRCVCAPDCSN ITWKGPCG LDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFC PGSSTCVVDQTNNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKA TCLLGRSIGLAYEGKCIAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGRGRCSLCDEL PDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVILLEVKHSGSCNSISEDE EEEEDEDQDYSFPISSILEW <u>DKTHTCP</u> <u>CP</u> <u>CAPEAAGGPSVFLFP</u> <u>PK</u> <u>KD</u> TLMISRTPEVTCVVVDVS <u>HEDPEV</u> <u>KFNWY</u> <u>VDGVEVHN</u> <u>AKT</u> <u>KP</u> <u>REEQ</u> Y STYRVSVLTVLHQDWLN <u>GKEY</u> <u>KCKVSNKALP</u> <u>APIEKT</u> <u>ISKAKGQ</u> <u>P</u> RE QVYTLPPSRDELTKNQVSLCLVKG <u>FYPSDI</u> <u>AVEWE</u> <u>NGQP</u> <u>ENNY</u> KTT PVLDSDGSFFLYSKLTVD <u>KSRWQQGNVF</u> <u>CSVMHEALHN</u> <u>HYTQ</u> <u>KSL</u> S SPGK |
| | SEQ ID NO:79 (K (76,82) E) | GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECSTGRLSTSWEEDVNDNTLFK WMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPG <u>E</u> CRMNK <u>E</u> NKPRCVCAPDCSN ITWKGPCG LDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFC PGSSTCVVDQTNNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKA TCLLGRSIGLAYEGKCIAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGRGRCSLCDEL PDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVILLEVKHSGSCNSISEDE EEEEDEDQDYSFPISSILEW <u>DKTHTCP</u> <u>CP</u> <u>CAPEAAGGPSVFLFP</u> <u>PK</u> <u>KD</u> TLMISRTPEVTCVVVDVS <u>HEDPEV</u> <u>KFNWY</u> <u>VDGVEVHN</u> <u>AKT</u> <u>KP</u> <u>REEQ</u> Y STYRVSVLTVLHQDWLN <u>GKEY</u> <u>KCKVSNKALP</u> <u>APIEKT</u> <u>ISKAKGQ</u> <u>P</u> RE QVYTLPPSRDELTKNQVSLCLVKG <u>FYPSDI</u> <u>AVEWE</u> <u>NGQP</u> <u>ENNY</u> KTT PVLDSDGSFFLYSKLTVD <u>KSRWQQGNVF</u> <u>CSVMHEALHN</u> <u>HYTQ</u> <u>KSL</u> S SPGK |

[0209]

| | | SPGK |
|--|----|---|
| SEQ NO:80 (K (81,82) E) | ID | GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECSTGRLSTSWEEDVNDNTLFK WMIFNGGAPNCIPCKETCENDCGPGKKCRMNE <u>E</u> NKPRCVCAPDCSNI TWKGPVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCDVFCP GSSTCVVDQTNNAYCVCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKAT CLLGRSIGLAYEGKCIAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVRGRCSLCDELCP DSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVILLEVKHSGSCNSISEDTEE EEEDEDQDYSFPISSILEW D KTHTC P PCPAPE <u>A</u> AGGPSVFLFPKPKDTL M ISRTPEVTCVVVDVSHEDEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI S AKGQP <small>R</small> EPPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP VLDSDGSSFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSVVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| SEQ NO:81 (K (76,81,82)) E) | ID | GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECSTGRLSTSWEEDVNDNTLFK WMIFNGGAPNCIPCKETCENDCGPGK <u>E</u> CRMNE <u>E</u> NKPRCVCAPDCSNI TWKGPVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCDVFCP GSSTCVVDQTNNAYCVCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKAT CLLGRSIGLAYEGKCIAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVRGRCSLCDELCP DSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVILLEVKHSGSCNSISEDTEE EEEDEDQDYSFPISSILEW D KTHTC P PCPAPE <u>A</u> AGGPSVFLFPKPKDTL M ISRTPEVTCVVVDVSHEDEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI S AKGQP <small>R</small> EPPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP VLDSDGSSFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSVVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| SEQ NO:82 (K (76,81,82)) E/V88E) | ID | GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECSTGRLSTSWEEDVNDNTLFK WMIFNGGAPNCIPCKETCENDCGPGK <u>E</u> CRMNE <u>E</u> NKPR <u>C</u> E <u>E</u> APDCSNI TWKGPVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCDVFCP GSSTCVVDQTNNAYCVCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKAT CLLGRSIGLAYEGKCIAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVRGRCSLCDELCP DSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVILLEVKHSGSCNSISEDTEE EEEDEDQDYSFPISSILEW D KTHTC P PCPAPE <u>A</u> AGGPSVFLFPKPKDTL M ISRTPEVTCVVVDVSHEDEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI S AKGQP <small>R</small> EPPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP VLDSDGSSFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSVVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| SEQ NO:83 (K84E) | ID | GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECSTGRLSTSWEEDVNDNTLFK WMIFNGGAPNCIPCKETCENDCGPGKKCRMNN <u>E</u> PRCVCAPDCSNI ITWKGPVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCDVFC PGSSTCVVDQTNNAYCVCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKA TCLLGRSIGLAYEGKCIAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVRGRCSLCDELCP |

| | | |
|--------|----------------------------------|--|
| | | PDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVILLEVKHSGSCNSISEDTE EEEEEDEDQDYSFPISSILEWDKTHTCPPCPAPE <u>AAGGPSVFLFPKPKD</u> LMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYN STYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTP PVLSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSV MHEALHNHYTQKSLSL SPGK |
| [0210] | SEQ NO:84 (K (76,84) E) | GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECSTGRLSTSWEEDVNDNTLFK WMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGK <u>E</u> CRMNKKNEPRCVCAPDCSN ITWKGPVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFC PGSSTCVVDQTNNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSAHLRKA TCLLGRSIGLAYEGKCIAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGRGRCSLCDEL PDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVILLEVKHSGSCNSISEDTE EEEEEDEDQDYSFPISSILEWDKTHTCPPCPAPE <u>AAGGPSVFLFPKPKD</u> LMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYN STYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTP PVLSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSV MHEALHNHYTQKSLSL SPGK |
| | SEQ NO:85 (K (82,84) E) | GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECSTGRLSTSWEEDVNDNTLFK WMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKKCRMNK <u>E</u> NEPRCVCAPDCSNI TWKGPGVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFC GSSTCVVDQTNNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSAHLRAT CLLGRSIGLAYEGKCIAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGRGRCSLCDELCP DSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVILLEVKHSGSCNSISEDTE EEEEEDEDQDYSFPISSILEWDKTHTCPPCPAPE <u>AAGGPSVFLFPKPKD</u> MISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYN STYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSV MHEALHNHYTQKSLSL PGK |
| | SEQ NO:86 (R78E/K8 4E) | GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECSTGRLSTSWEEDVNDNTLFK WMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKK <u>C</u> EMNKKNEPRCVCAPDCSNI TWKGPGVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFC GSSTCVVDQTNNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSAHLRAT CLLGRSIGLAYEGKCIAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGRGRCSLCDELCP DSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVILLEVKHSGSCNSISEDTE EEEEEDEDQDYSFPISSILEWDKTHTCPPCPAPE <u>AAGGPSVFLFPKPKD</u> MISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYN STYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSV MHEALHNHYTQKSLSL PGK |

[0211]

| | | PGK |
|--|----|--|
| SEQ NO:87 (K (76,82,84) E) | ID | GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECSTGRLSTSWEEDVNDNTLFK WMIFNGGAPNCIPCKETCENDCGPGK <u>E</u> CRMN <u>K</u> <u>E</u> PRCVAPDCSNI TWKGPVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCDVFCP GSSTCVVDQTNNAYCVCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKAT CLLGRSIGLAYEGKCIAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVRGRCSLCDELCP DSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVILLEVKHSGSCNSISEDTEE EEEDEDQDYSFPISSILEW <u>D</u> <u>K</u> <u>T</u> <u>H</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>P</u> <u>C</u> <u>P</u> <u>A</u> <u>P</u> <u>E</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>P</u> <u>S</u> <u>V</u> <u>F</u> <u>L</u> <u>F</u> <u>P</u> <u>P</u> <u>K</u> <u>P</u> <u>K</u> <u>D</u> <u>T</u> <u>L</u> MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNS TYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSVVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| SEQ NO:88 (R78E/K8 2E) | ID | GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECSTGRLSTSWEEDVNDNTLFK WMIFNGGAPNCIPCKETCENDCGPGKK <u>C</u> <u>E</u> MN <u>K</u> <u>E</u> N <u>K</u> PRCVAPDCSNI TWKGPVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCDVFCP GSSTCVVDQTNNAYCVCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKAT CLLGRSIGLAYEGKCIAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVRGRCSLCDELCP DSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVILLEVKHSGSCNSISEDTEE EEEDEDQDYSFPISSILEW <u>D</u> <u>K</u> <u>T</u> <u>H</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>P</u> <u>C</u> <u>P</u> <u>A</u> <u>P</u> <u>E</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>P</u> <u>S</u> <u>V</u> <u>F</u> <u>L</u> <u>F</u> <u>P</u> <u>P</u> <u>K</u> <u>P</u> <u>K</u> <u>D</u> <u>T</u> <u>L</u> MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNS TYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSVVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| SEQ NO:89 (R78E/K (82,84) E) | ID | GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECSTGRLSTSWEEDVNDNTLFK WMIFNGGAPNCIPCKETCENDCGPGKK <u>C</u> <u>E</u> MN <u>K</u> <u>E</u> N <u>K</u> PRCVAPDCSNI TWKGPVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCDVFCP GSSTCVVDQTNNAYCVCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKAT CLLGRSIGLAYEGKCIAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVRGRCSLCDELCP DSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVILLEVKHSGSCNSISEDTEE EEEDEDQDYSFPISSILEW <u>D</u> <u>K</u> <u>T</u> <u>H</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>P</u> <u>C</u> <u>P</u> <u>A</u> <u>P</u> <u>E</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>P</u> <u>S</u> <u>V</u> <u>F</u> <u>L</u> <u>F</u> <u>P</u> <u>P</u> <u>K</u> <u>P</u> <u>K</u> <u>D</u> <u>T</u> <u>L</u> MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNS TYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSVVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| SEQ NO:90 (76,81) E) | ID | GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECSTGRLSTSWEEDVNDNTLFK WMIFNGGAPNCIPCKETCENDCGPGK <u>E</u> CRMN <u>E</u> KN <u>K</u> PRCVAPDCSNI ITWKGPVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCDVFC PGSSTCVVDQTNNAYCVCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKA TCLLGRSIGLAYEGKCIAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVRGRCSLCDELCP |

| | | |
|--------|---|---|
| | PDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVILLEVKHSGSCNSISEDTE EEEEDEDQDYSFPISSILEWDKTHTCPPCPAPE <u>AAGGPSVLFPPPKPKDT</u> LMISRTPEVTCVVVDVSHEDEXKFNWYVDGVEVHNAAKTKPREEQYN STYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP PVLSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK | |
| [0212] | SEQ ID NO:91 (K82T) | GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECSTGRLSTSWEEDVNDNTLFK WMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCPGKKCRMNK <u>T</u> NKPRCVCAPDCSN ITWKGPCGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFC PGSSTCVVDQTNNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKA TCLLGRSIGLAYEGKCIAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGRGRCSLCDEL PDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVILLEVKHSGSCNSISEDTE EEEEDEDQDYSFPISSILEWDKTHTCPPCPAPE <u>AAGGPSVLFPPPKPKDT</u> LMISRTPEVTCVVVDVSHEDEXKFNWYVDGVEVHNAAKTKPREEQYN STYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP PVLSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK |
| | SEQ ID NO:92 (P85T) | GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECSTGRLSTSWEEDVNDNTLFK WMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCPGKKCRMNNK <u>T</u> RCVCAPDCSN ITWKGPCGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFC PGSSTCVVDQTNNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKA TCLLGRSIGLAYEGKCIAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGRGRCSLCDEL PDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVILLEVKHSGSCNSISEDTE EEEEDEDQDYSFPISSILEWDKTHTCPPCPAPE <u>AAGGPSVLFPPPKPKDT</u> LMISRTPEVTCVVVDVSHEDEXKFNWYVDGVEVHNAAKTKPREEQYN STYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP PVLSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK |
| | SEQ ID NO:93 (R78N/N80T) | GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECSTGRLSTSWEEDVNDNTLFK WMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCPGKKC <u>NM</u> <u>T</u> KKNKPRCVCAPDCSN ITWKGPCGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFC PGSSTCVVDQTNNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKA TCLLGRSIGLAYEGKCIAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGRGRCSLCDEL PDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVILLEVKHSGSCNSISEDTE EEEEDEDQDYSFPISSILEWDKTHTCPPCPAPE <u>AAGGPSVLFPPPKPKDT</u> LMISRTPEVTCVVVDVSHEDEXKFNWYVDGVEVHNAAKTKPREEQYN STYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP PVLSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK |

[0213]

| | | SPGK |
|--------------------------------------|----|--|
| SEQ NO:94 (R86N/V8 8T) | ID | GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECSTGRLSTSWEEDVNDNTLFK WMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPKCRMNNKPN <u>C</u> APDCSN ITWKGPVCGLDGKTYRNECALLKARCKEPELEVQYQGRCKKTCRDVFC PGSSTCVVDQTNNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKA TCLLGRSIGLAYEGKCIAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVRGRCSLCDEL PDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVILLEVKHSGSCNSISEDTE EEEDEDQDYSPPISSILEW <u>D</u> <u>K</u> <u>T</u> <u>H</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>P</u> <u>P</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>P</u> <u>E</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>P</u> <u>S</u> <u>V</u> <u>F</u> <u>L</u> <u>F</u> <u>P</u> <u>P</u> <u>K</u> <u>P</u> <u>K</u> <u>D</u> LMISRTPEVTCVVVDVSHEDEVKFNWYVDGVEVHNNAKTKPREEQYN STYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIASKAKGQPREP QVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSVVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK |
| SEQ NO:95 (K75N/C7 7T/K82T) | ID | GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECSTGRLSTSWEEDVNDNTLFK WMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPN <u>K</u> TRMN <u>K</u> PRCVCAPDCSN ITWKGPVCGLDGKTYRNECALLKARCKEPELEVQYQGRCKKTCRDVFC PGSSTCVVDQTNNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKA TCLLGRSIGLAYEGKCIAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVRGRCSLCDEL PDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVILLEVKHSGSCNSISEDTE EEEDEDQDYSPPISSILEW <u>D</u> <u>K</u> <u>T</u> <u>H</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>P</u> <u>P</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>P</u> <u>E</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>P</u> <u>S</u> <u>V</u> <u>F</u> <u>L</u> <u>F</u> <u>P</u> <u>P</u> <u>K</u> <u>P</u> <u>K</u> <u>D</u> LMISRTPEVTCVVVDVSHEDEVKFNWYVDGVEVHNNAKTKPREEQYN STYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIASKAKGQPREP QVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSVVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK |
| SEQ NO:96 (G74N/K7 6S) | ID | GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECSTGRLSTSWEEDVNDNTLFK WMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGP <u>N</u> <u>K</u> CRMNNKPRCVCAPDCSN ITWKGPVCGLDGKTYRNECALLKARCKEPELEVQYQGRCKKTCRDVFC PGSSTCVVDQTNNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKA TCLLGRSIGLAYEGKCIAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVRGRCSLCDEL PDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVILLEVKHSGSCNSISEDTE EEEDEDQDYSPPISSILEW <u>D</u> <u>K</u> <u>T</u> <u>H</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>P</u> <u>P</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>P</u> <u>E</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>P</u> <u>S</u> <u>V</u> <u>F</u> <u>L</u> <u>F</u> <u>P</u> <u>P</u> <u>K</u> <u>P</u> <u>K</u> <u>D</u> LMISRTPEVTCVVVDVSHEDEVKFNWYVDGVEVHNNAKTKPREEQYN STYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIASKAKGQPREP QVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSVVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK |
| SEQ NO:97 (G74N/K7 6T) | ID | GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECSTGRLSTSWEEDVNDNTLFK WMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGP <u>N</u> <u>K</u> CRMNNKPRCVCAPDCSN ITWKGPVCGLDGKTYRNECALLKARCKEPELEVQYQGRCKKTCRDVFC PGSSTCVVDQTNNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKA TCLLGRSIGLAYEGKCIAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVRGRCSLCDEL |

| | | |
|--------|--|---|
| | PDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVILLEVKHSGSCNSISEDTE EEEEDEDQDYSFPISSILEWDKTHTCPPCPAPE <u>AAGGPSVLFPPPKPKDT</u> LMISRTPEVTCVVVDVSHEDEXKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP PVLSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK | |
| [0214] | SEQ ID NO:98 (G74N/K76T/P85T) | GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECSTGRLSTSWEEDVNDNTLFK WMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGP <u>NK</u> CRMNNKKNTRCVCAPDCSN ITWKGPCVGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFC PGSSTCVVDQTNNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKA TCLLGRSIGLAYEGKCIAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGRGRCSLCDEL PDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVILLEVKHSGSCNSISEDTE EEEEDEDQDYSFPISSILEWDKTHTCPPCPAPE <u>AAGGPSVLFPPPKPKDT</u> LMISRTPEVTCVVVDVSHEDEXKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP PVLSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK |
| | SEQ ID NO:99 (C66S/K75N/C77T) | GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECSTGRLSTSWEEDVNDNTLFK WMIFNGGAPNCIPCKET <u>SEN</u> VDGP <u>GNK</u> TRMNKKNPRCVCAPDCSN ITWKGPCVGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFC PGSSTCVVDQTNNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKA TCLLGRSIGLAYEGKCIAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGRGRCSLCDEL PDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVILLEVKHSGSCNSISEDTE EEEEDEDQDYSFPISSILEWDKTHTCPPCPAPE <u>AAGGPSVLFPPPKPKDT</u> LMISRTPEVTCVVVDVSHEDEXKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP PVLSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK |
| | SEQ ID NO:100 (C66A/K75N/C77T) | GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECSTGRLSTSWEEDVNDNTLFK WMIFNGGAPNCIPCKET <u>AE</u> NDGP <u>GNK</u> TRMNKKNPRCVCAPDCSN ITWKGPCVGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFC PGSSTCVVDQTNNAYCVTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKA TCLLGRSIGLAYEGKCIAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGRGRCSLCDEL PDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVILLEVKHSGSCNSISEDTE EEEEDEDQDYSFPISSILEWDKTHTCPPCPAPE <u>AAGGPSVLFPPPKPKDT</u> LMISRTPEVTCVVVDVSHEDEXKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP PVLSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK |

| | SPGK |
|---|--|
| SEQ ID NO: 117 (K (76,82) D) | GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWEEDVNDNTLFK WMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKDCRMNKDNKPRCVCAPDCS NITWKGPVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVF CPGSSTCVVDQTNNAYCTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRK ATCLLGRSIGLAGEGKCIAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGRGRCSLCDEL CPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVILLEVKHSGSCNSISEDT EEEEEEDEDQDYSFPISSILEWDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSCHEDPEVKFNWYVDGVEVHNNAKTKPREEQY NSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREG PQVTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| SEQ ID NO: 120 (K (81,82) D) | GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWEEDVNDNTLFK WMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKKCRMNDDNKPRCVCAPDCSN ITWKGPVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVFC PGSSTCVVDQTNNAYCTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRKA TCLLGRSIGLAGEGKCIAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGRGRCSLCDEL PDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVILLEVKHSGSCNSISEDTE EEEEEEDEDQDYSFPISSILEWDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSCHEDPEVKFNWYVDGVEVHNNAKTKPREEQYN STYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREG QVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| SEQ ID NO: 118 (K (76,81,82) D) | GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGRLSTSWEEDVNDNTLFK WMIFNGGAPNCIPCKETCENVDCGPGKDCRMNDDNKPRCVCAPDCS NITWKGPVCGLDGKTYRNECALLKARCKEQPELEVQYQGRCKKTCRDVF CPGSSTCVVDQTNNAYCTCNRICPEPASSEQYLCGNDGVTYSSACHLRK ATCLLGRSIGLAGEGKCIAKSCEDIQCTGGKKCLWDFKVGRGRCSLCDEL CPDSKSDEPVCASDNATYASECAMKEAACSSGVILLEVKHSGSCNSISEDT EEEEEEDEDQDYSFPISSILEWDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSCHEDPEVKFNWYVDGVEVHNNAKTKPREEQY NSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREG PQVTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |

[0216] *FS氨基酸编号对应于FS315序列(例如,SEQ ID NO:2)。

[0217] **QSCVVDQTGS的置换公开于J Pharmacol Exp Ther (2015) 354 (2) :238中。将这用作实验对照。

[0218] #粗体和斜体序列对应于在位置234和235(带下划线并且根据EU编号)包含LALA突变的人IgG1Fc (SEQ_ID NO:7)。

[0219] 在一些实施方案中，重组卵泡抑素-Fc融合蛋白可以命名为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、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、FS315 de175-86-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。

[0220] 预期可以以各种构型提供卵泡抑素-Fc融合蛋白,包括同型二聚体或单体构型。例如,可以将合适的同型二聚体构型设计成使融合伴侣(例如,卵泡抑素多肽加接头)的C端附接至两条Fc多肽链的N端。可以将合适的单体构型设计成使融合伴侣(例如,卵泡抑素多肽加接头)的C端与一个Fc二聚体或与一个Fc单体融合。单体构型可以减小位阻。

[0221] 如本文所用,相对于本文鉴定的参考蛋白序列(例如,参考卵泡抑素蛋白序列)的“氨基酸序列百分比(%)同一性”定义为在比对序列并且在必要时,引入空位以实现最大百分比序列同一性之后,并且不考虑任何保守性取代作为序列同一性的一部分,候选序列中与参考序列中的氨基酸残基相同的氨基酸残基的百分比。为了测定氨基酸序列百分比同一性的比对可以按本领域技术范围内的各种方式实现,例如,使用公开可用的计算机软件诸如BLAST、ALIGN或Megalign(DNASTAR)软件。本领域技术人员可以确定用于测量比对的适当参数,包括在所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,其中大多数参数设置为默认值。可调参数设置为以下值:重叠跨度=1,重叠分数=0.125,世界阈值(T)=11。HSP分数(S)和HSP S2参数是动态值,由程序本身根据特定序列的组成确定,但是,可以调整最小值并按上述指示进行设置。

[0222] 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,重组卵泡抑素-Fc融合蛋白在结合肌生长抑制素时的 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。可以例如在表面等离子体共振测定法,诸如BIAcore测定法中测量重组卵泡抑素-Fc融合蛋白的亲和力。

[0223] 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,重组卵泡抑素-Fc融合蛋白在结合激活素A时的 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。可以例如在表面等离子体共振测定法,诸如BIAcore测定法中测量重组卵泡抑素-Fc融合蛋白的亲和力。

[0224] 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,重组卵泡抑素-Fc融合蛋白在结合肝素时的 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。

[0225] 在一些实施方案中, 重组卵泡抑素-Fc融合蛋白在结合Fc受体时的 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。

[0226] 在一些实施方案中, 重组卵泡抑素-Fc融合蛋白与BMP-9具有最小程度的结合或无明显的结合。在一些实施方案中, 重组卵泡抑素-Fc融合蛋白与BMP-10具有最小程度的结合或无明显的结合。在一些实施方案中, 在190pM至25000pM的范围内确定最小程度的结合或无明显的结合。

[0227] 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 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。

[0228] 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 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。

[0229] 在一些实施方案中, 体内施用重组卵泡抑素-Fc融合蛋白导致肌肉质量相对于对照增加。在一些实施方案中, 肌肉质量是例如肌肉的重量。在一些实施方案中, 所述肌肉是一种或多种骨骼肌, 例如表1中呈现的那些。在一些实施方案中, 肌肉选自膈肌、三头肌、比目鱼肌、胫骨前肌、腓肠肌、趾长伸肌、腹直肌、四头肌及其组合。

[0230] 在一些实施方案中, 卵泡抑素-Fc施用导致肌肉肥大。在一些实施方案中, 卵泡抑素-Fc施用导致肌肉功能的改善。

[0231] 重组卵泡抑素或重组卵泡抑素-Fc融合蛋白的产生

[0232] 适于本发明的重组卵泡抑素蛋白或重组卵泡抑素-Fc融合蛋白可以通过任何可用的方式产生。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。可替代地或另外, 可以通过激活内源基因来产生重组卵泡抑素蛋白或重组卵泡抑素-Fc融合蛋白。可替代地或另外, 可以部分或完全通过化学合成来制备重组卵泡抑素蛋白或重组卵泡抑素-Fc融合蛋白。

[0233] 当重组产生蛋白质时, 可以使用任何表达系统。仅举几个例子, 已知的表达系统包括例如大肠杆菌 (E.coli)、卵、杆状病毒、植物、酵母或哺乳动物细胞, 例如下文所述的CHO细胞和/或其他哺乳动物细胞。

[0234] 在一些实施方案中, 在哺乳动物细胞中产生适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。可以根据本发明使用的哺乳动物细胞的非限制性实例包括BALB/c小鼠骨髓瘤细胞系 (NS0/1, ECACC No:85110503); 人成视网膜细胞 (PER.C6, CruCell, Leiden, The Netherlands); 经SV40转化的猴肾CV1系 (COS-7, ATCC CRL 1651); 人胚肾细胞系 (经亚克隆以在悬浮培养中生长的HEK293或293细胞, Graham等人, J.Gen Virol., 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); 小鼠塞尔托利氏细胞 (sertoli cell) (TM4, Mather, Biol. Reprod., 23:243-251, 1980); 猴肾细胞 (CV1 ATCC CCL 70); 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); 布法罗大鼠肝细胞 (BRL 3A, ATCC CRL 1442); 人肺细胞 (W138, ATCC CCL 75); 人肝细胞 (Hep G2, HB 8065); 小鼠乳腺肿瘤 (MMT 060562, ATCC CCL51); TRI细胞 (Mather等人, Annals N.Y. Acad. Sci., 383:44-68, 1982); MRC 5个细胞; FS4细胞; 和人肝癌细胞系 (Hep G2)。

[0235] 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。

[0236] 通常,经工程改造成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。应当认识到,编码重组卵泡抑素蛋白或重组卵泡抑素-Fc融合蛋白的核酸可以含有用于表达重组卵泡抑素蛋白或重组卵泡抑素-Fc融合蛋白的调控序列、基因控制序列、启动子、非编码序列和/或其他适当的序列。通常,编码区与这些核酸组件中的一种或多种可操作地连接。

[0237] 转基因的编码区可包括一个或多个沉默突变,以针对特定细胞类型优化密码子使用。例如,可以优化卵泡抑素转基因的密码子以在脊椎动物细胞中表达。在一些实施方案中,可以优化卵泡抑素转基因的密码子以在哺乳动物细胞例如CHO细胞中表达。在一些实施方案中,可以优化卵泡抑素转基因的密码子以在人细胞中表达。

[0238] 药物组合物和施用

[0239] 本发明还提供了药物组合物,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。此类药物组合物可以任选地包含一种或多种附加治疗活性物质。

[0240] 尽管本文提供的药物组合物的描述主要针对适于对人类进行伦理性施用的药物组合物,但是本领域技术人员应理解,此类组合物通常适于向各种动物施用。为了使组合物适于向各种动物施用,对适于向人施用的药物组合物的修饰得到很好的理解,并且普通技术的兽医药理师可以仅通过普通的实验(如果有)来设计和/或进行此类修饰。

[0241] 本文描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来制备。一般而言,此类制备方法包括以下步骤:使活性成分与稀释剂或另一种赋形剂或载体和/或一种或多种其他辅助成分缔合,然后,如果必要和/或期望的话,将产物成型和/或包装为所需的单剂量或多剂量单位。

[0242] 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散装制备、包装和/或销售。如本文所用,“单位剂量”是包含预定量的活性成分的药物组合物的离散量。活性成分的量通常等于将施用给受试者的活性成分的剂量和/或此类剂量的适宜分数,例如此类剂量的一半或三分之一。

[0243] 根据本发明的药物组合物中活性成分、药学上可接受的赋形剂或载体和/或任何附加成分的相对量将根据所治受试者的特性、大小和/或状况,并进一步根据施用组合物的途径而变化。举例来说,组合物可包含0.1%至100% (w/w) 的活性成分。

[0244] 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,所述赋形剂或

载体包括适于预期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的The Science and Practice of Pharmacy,第21版,A.R.Gennaro(Lippincott,Williams&Wilkins,Baltimore,MD,2006;其通过引用并入本文)公开了用于配制药物组合物的各种赋形剂和用于制备药物组合物的已知技术。除非任何常规的赋形剂介质或载体与物质或其衍生物不相容,诸如产生任何不良的生物学作用或另外以有害方式与药物组合物的任何其他组分相互作用,否则考虑其用途在本发明的范围内。

[0245] 在一些实施方案中,药学上可接受的赋形剂或载体的纯度为至少95%,至少96%,至少97%,至少98%,至少99%或100%。在一些实施方案中,赋形剂或载体经批准用于人类和兽医用途。在一些实施方案中,赋形剂或载体得到美国食品和药物管理局批准。在一些实施方案中,赋形剂或载体是药用级的。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。

[0246] 用于生产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/或制粒剂、表面活性剂和/或乳化剂、崩解剂、粘合剂、防腐剂、缓冲剂、润滑剂剂和/或油。此类赋形剂或载体可以任选地包含在药物制剂中。根据配方设计师的判断,组合物中可以存在赋形剂或载体,诸如可可脂和栓剂蜡、着色剂、包衣剂、甜味剂、调味剂和/或芳香剂。

[0247] 合适的药学上可接受的赋形剂或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、苄醇、聚乙二醇、明胶、碳水化合物(诸如乳糖、直链淀粉或淀粉)、糖(诸如甘露糖醇、蔗糖等)、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、聚乙烯吡咯烷酮等及其组合。如果需要,药物制剂可以混有不与活性化合物发生有害反应或干扰其活性的助剂(例如,润滑剂、防腐剂、稳定剂、润湿剂、乳化剂、用于影响渗透压的盐、缓冲剂、着色剂、调味剂和/或芳香族物质等)。在一个优选的实施方案中,使用适于静脉内施用的水溶性载体。

[0248] 如果需要,合适的药物组合物或药物还可以含有少量的湿润剂或乳化剂或pH缓冲剂。组合物可以是液体溶液、悬浮液、乳剂、片剂、丸剂、胶囊剂、缓释制剂或粉剂。还可将组合物与传统粘合剂和载体诸如甘油三酯一起配制成栓剂。口服制剂可包括标准载体,诸如药用级的甘露糖醇、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。

[0249] 可以根据常规程序将药物组合物或药物配制成适于向人类施用的药物组合物。例如,在一些实施方案中,用于静脉内施用的组合物通常是无菌等渗水性缓冲液的溶液。必要时,该组合物还可包含增溶剂和局部麻醉剂以减轻注射部位的疼痛。通常,将成分分开提供或以单位剂型混合在一起,例如在密闭容器,诸如指示活性剂的量的安瓿或小药囊中作为干燥冻干粉或无水浓缩物的形式。当要通过输注施用组合物的情况下,可以用装有药用级的无菌水、盐水或右旋糖/水的输液瓶分配组合物。当要通过注射施用组合物的情况下,可以提供一安瓿的注射用无菌水或盐水,以便可以在施用之前将成分混合。

[0250] 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。药学上可接受的盐包括与游离氨基形成的盐,诸如源自盐酸、磷酸、乙酸、草酸、酒石酸等的盐,以及与游离羧基形成的盐,诸如源自钠、钾、铵、钙、氢氧化铁、异丙胺、三乙胺、2-乙基氨基乙醇、组氨酸、普鲁卡因等的盐。

[0251] 配制和/或生产药剂中的一般考虑因素可以例如在Remington: The Science and Practice of Pharmacy第21版,Lippincott Williams&Wilkins,2005(通过引用并入本文)中找到。

[0252] 施用途径

[0253] 通过任何适当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(或包含本文所述的重组卵泡抑素蛋白的组合物或药物)。在一些实施方案中,全身性施用重组卵泡抑素蛋白、重组卵泡抑素-Fc融合蛋白或含重组卵泡抑素蛋白、重组卵泡抑素-Fc融合蛋白的药物组合物。全身施用可以是静脉内、皮内、吸入、透皮(局部)、眼内、肌内、皮下、肌内、口服和/或透粘膜施用。在一些实施方案中,皮下施用重组卵泡抑素蛋白、重组卵泡抑素-Fc融合蛋白或含重组卵泡抑素蛋白、重组卵泡抑素-Fc融合蛋白的药物组合物。如本文所用,术语“皮下组织”定义为紧接皮肤下方的一层松散、不规则的结缔组织。例如,可以通过将组合物注射到下述区域,包括但不限于大腿区域、腹部区域、臀部区域或肩胛区域中来进行皮下施用。在一些实施方案中,静脉内施用重组卵泡抑素蛋白、重组卵泡抑素-Fc融合蛋白或含重组卵泡抑素蛋白、重组卵泡抑素-Fc融合蛋白的药物组合物。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融合蛋白或含重组卵泡抑素蛋白、重组卵泡抑素-Fc融合蛋白的药物组合物。在一些实施方案中,肌内施用重组卵泡抑素蛋白、重组卵泡抑素-Fc融合蛋白或含重组卵泡抑素蛋白、重组卵泡抑素-Fc融合蛋白的药物组合物。例如,可以通过将组合物注射到下述区域,包括但不限于大腿区域、腹部区域、臀部区域、肩胛区域的肌肉,或注射到表1中公开的任何肌肉中来进行肌内施用。如果需要,可以同时使用多于一种途径。

[0254] 在一些实施方案中,施用仅在个体中产生局部作用,而在其他实施方案中,施用在个体的多个部分中产生作用,例如全身作用。通常,施用引起重组卵泡抑素蛋白或重组卵泡抑素-Fc融合蛋白递送至一个或多个靶组织。在一些实施方案中,重组卵泡抑素蛋白或重组卵泡抑素-Fc融合蛋白递送至一个或多个靶组织,包括但不限于心脏、脑部、脊髓、横纹肌(例如,骨骼肌)、平滑肌、肾、肝、肺和/或脾脏。在一些实施方案中,重组卵泡抑素蛋白或重组卵泡抑素-Fc融合蛋白递送至心脏。在一些实施方案中,重组卵泡抑素蛋白或重组卵泡抑素-Fc融合蛋白递送至横纹肌,尤其是骨骼肌。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。

[0255] 剂型和给药方案

[0256] 在一些实施方案中,以治疗有效量和/或根据与特定期望结果(例如,与治疗肌营养不良诸如杜氏肌营养不良或降低肌营养不良诸如杜氏肌营养不良的风险)相关的给药方案施用组合物。

[0257] 要根据本发明施用的特定剂量或量可以例如根据期望结果的性质和/或程度,施用途径和/或施用时间的细节,和/或一种或多种特征(例如,体重、年龄、个人史、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)而变化。此类剂量或量可以由普通技术人员确定。在一些实施方案中,根据标准临床技术确定适当的剂量或量。可替代地或另外,在一些实施方案中,通过使用一种或多种体外或体内测定法来确定适当的剂量或量,以帮助鉴定要施用的期望或最佳剂量范围或量。

[0258] 在各个实施方案中,以治疗有效量施用重组卵泡抑素蛋白。通常,治疗有效量足以对受试者实现有意义的益处(例如,治疗、调节、治愈、预防潜在的疾病或病状和/或使其转佳)。在一些特定实施方案中,可以从源自体外或动物模型试验系统的剂量反应曲线推断要施用的适当剂量或量。

[0259] 在一些实施方案中,静脉内施用用于治疗肌营养不良的治疗有效量的卵泡抑素-Fc。在一些实施方案中,静脉内施用的治疗有效量介于约0.5mg/kg至约75mg/kg动物或人体体重之间;然而,高于或低于该示例性范围的剂量在本公开的范围内。在一些实施方案中,治疗有效剂量介于约0.5mg/kg至75mg/kg动物或人体体重之间(即,治疗剂量为约0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、60、65、70或约75mg/kg)。在一些实施方案中,静脉内施用的治疗有效剂量为约5mg/kg、10mg/kg、15mg/kg、20mg/kg和25mg/kg。

[0260] 在一些实施方案中,静脉内施用介于约5.0至18.0mg/kg之间的治疗有效量(即5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5、10.0、10.5、11.0、11.5、12.0、12.5、13.0、13.5、14.0、14.5、15.0、15.5、16.0、16.5、17.0、17.5至18.0mg/kg,及介于之间的任何值)。在一些实施方案中,有效量为至少约8mg/kg。在一些实施方案中,有效量为至少约10mg/kg。在一些实施方案中,静脉内施用每月进行一次。在一些实施方案中,静脉内施用每月进行两次。

[0261] 在一些实施方案中,皮下施用用于治疗肌营养不良的治疗有效量的卵泡抑素-Fc。在一些实施方案中,皮下施用的治疗有效量介于约20mg/kg至110mg/kg动物或人体体重之间(即,治疗有效剂量为约20、25、30、35、40、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105或约110mg/kg)。在一些实施方案中,皮下施用的治疗有效量介于约1.0mg/kg至50mg/kg动物或人体体重之间(即治疗有效剂量为约1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5、10.0、11.0、12.0、13.0、14.0、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49和约50mg/kg)。在一些实施方案中,皮下施用的治疗有效量为约3mg/kg、5mg/kg、10mg/kg、15mg/kg、20mg/kg、25mg/kg和30mg/kg)。

[0262] 在一些实施方案中,皮下施用用于治疗肌营养不良的治疗有效量的卵泡抑素-Fc。在一些实施方案中,皮下施用约1.5至7.0mg/kg的治疗有效量(即1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5至7.0mg/kg,及介于之间的任何值)。在一些实施方案中,治疗有效量为至少约2.0mg/kg。在一些实施方案中,治疗有效量为至少约3.0mg/kg。在一些实施方案中,皮下施用每周进行一次。在一些实施方案中,皮下施用每周进行两次。在一些实施方案中,皮下施用每两周进行一次。

[0263] 在一些实施方案中,卵泡抑素-Fc蛋白具有剂量比例性。在一些实施方案中,卵泡抑素-Fc蛋白具有剂量线性。在一些实施方案中,当施用剂量的增加伴随暴露和结果成比例增加时,出现剂量比例性和/或剂量线性。在一些实施方案中,施用剂量越高,对有益结果的影响越大。在一些实施方案中,所治受试者的体重以剂量依赖性方式增加。

[0264] 在一些实施方案中,卵泡抑素-Fc施用导致肌肉肥大。在一些实施方案中,卵泡抑素-Fc施用导致肌肉功能的改善。在一些实施方案中,经工程改造的卵泡抑素治疗后,四头肌和膈肌病理改善。在一些实施方案中,与用肌生长抑制素拮抗剂治疗相比,卵泡抑素-Fc

治疗患有肌营养不良的受试者引起肌肉功能的更大改善。在一些实施方案中,与用肌生长抑制素拮抗剂治疗相比,卵泡抑素-Fc治疗患有肌营养不良的受试者引起肌肉病理的更大改善。

[0265] 在一些实施方案中,提供的组合物是作为药物制剂提供的。在一些实施方案中,药物制剂是或包含单位剂量的量,用于根据与实现肌营养不良(诸如杜氏肌营养不良)的发病率或风险降低相关的给药方案来施用。

[0266] 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剂量施用。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融合蛋白的制剂以有规律的间隔施用。如本文所用,以一定“间隔”施用表示定期施用治疗有效量(与一次性剂量不同)。该间隔可以通过标准临床技术确定。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融合蛋白的制剂每两月、每月施用一次,每月施用两次,每三周、每两周、每周施用一次,每周施用两次,每周施用三次,每天施用一次,每天施用两次,或每六小时施用一次。单个个体的施用间隔不必是固定的间隔,而是可以根据个体的需要随时间变化的。

[0267] 如本文所用,术语“每两月”意指每两个月施用一次(即,每两个月一次);术语“每月”意指每个月施用一次;术语“每三周”意指每三周施用一次(即,每三周一次);术语“每两周”意指每两周施用一次(即,每两周一次);术语“每周”意指每周施用一次;并且术语“每天”意指每天施用一次。

[0268] 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融合蛋白的制剂以有规律的间隔无限期地施用。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融合蛋白的制剂以有规律的间隔施用限定时期。

[0269] 如本文所述,术语“治疗有效量”主要基于本发明的药物组合物中所含的治疗剂的总量来确定。通常以可包含多个单位剂量的给药方案来施用治疗有效量。对于任何特定的组合物,治疗有效量(和/或有效给药方案内的适当单位剂量)可以例如根据施用途径或与其他药剂的组合而变化。

[0270] 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融合蛋白降低了至少一种DMD体征或症状的强度、严重性或频率,或延迟其发作。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融合蛋白降低了选自下组的至少一种DMD体征或症状的强度、严重性或频率,或延迟其发作:肌肉消瘦、骨骼变形、心肌病、肌肉缺血、认知障碍和呼吸功能受损。

[0271] 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融合蛋白改善了通过6分钟步行测试、定量肌肉力量测试、定时运动性能测试所测量的临床结果。Brooke和Vignos肢体功能量表、肺功能测试(用力肺活量、1秒钟用力呼气量、呼气峰值流速、最大吸气和呼气压力)、健康相关的生活质量、膝和肘屈肌、肘伸肌、肩外展、抓力、仰卧起立时间、北极星移动评估(North Start Ambulatory Assessment)、计时10米步行/跑步、Egen-Klassification量表、Gowers评分,Hammersmith运动能力、手持式肌力测定法(hand held myometry)、运动范围、测角法、高碳酸血症、奈利婴幼儿发育量表(Nayley Scales of Infant and Toddler Development)和/或照顾者负担量表。

[0272] 组合疗法

[0273] 在一些实施方案中，重组卵泡抑素蛋白与目前用于治疗肌营养不良的一种或多种已知治疗剂(例如，皮质类固醇)组合施用。在一些实施方案中，已知治疗剂根据其标准或批准的给药方案和/或时间表来施用。在一些实施方案中，已知的治疗剂根据与其标准或批准的给药方案和/或时间表相比有所改变的方案来施用。在一些实施方案中，此类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改变(例如，减少或增加)，和/或给药的频率改变(例如，单位剂量之间的一个或多个间隔扩大，从而导致频率更低，或间隔减少，从而导致频率更高)。

[0274] 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附加治疗剂组合施用。在一个实施方案中，附加治疗剂是皮质类固醇，例如泼尼松。在另一个实施方案中，附加治疗剂是糖皮质激素，例如地夫可特(deflazacort)。在另一个实施方案中，附加治疗剂是抗Flt-1抗体或其抗原结合片段。在另一个实施方案中，附加治疗剂是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、PR0044、PR0045、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，附加治疗剂当前用于治疗肌营养不良。在其他实施方案中，附加治疗剂也可以用于治疗其他疾病或病症。在一些实施方案中，已知治疗剂根据其标准或批准的给药方案和/或时间表来施用。在一些实施方案中，已知的治疗剂根据与其标准或批准的给药方案和/或时间表相比有所改变的方案来施用。在一些实施方案中，此类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改变(例如，减少或增加)，和/或给药的频率改变(例如，单位剂量之间的一个或多个间隔扩大，从而导致频率更低，或间隔减少，从而导致频率更高)。

[0275] 实施例

[0276] 实施例1. 卵泡抑素-Fc融合蛋白靶向肌生成抑制素

[0277] 该实施例说明了卵泡抑素-Fc融合蛋白与靶标和非靶标配体的结合。不希望受理论约束，可以预期的是，肌生长抑制素和激活素A对Smad2/3途径的激活导致肌源性蛋白表达的抑制，因而成肌细胞不会分化成肌肉。因此，将肌生长抑制素和激活素A视为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激活素A拮抗剂诸如可溶性激活素受体IIB型(sActRIIB)也结合骨形态发生蛋白(BMP)。BMP，特别是BMP-9和BMP-10，被视为关键的形态发生信号，可协调整个身体的组织结构。抑制此类BMP可能会导致不良的病理状况。卵泡抑素还通过三个FS结构域中的第一个中的基本肝素结合序列(HBS)与细胞表面硫酸乙酰肝素蛋白聚糖结合。不希望受理论约束，通过例如HBS的突变或缺失来灭活、减少或调节肝素结合，可增加卵泡抑素和/或卵泡抑素融合蛋白的体内暴露和/或半衰期。如下面详细描述的那样，该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，不会以有意义的亲和力与非靶标BMP或肝素结合。

[0278] 具体地，使用BIAcore[®]测定法和如下所述的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)和动力学性质。

[0279] 为了测定肌生长抑制素的结合亲和力和动力学性质，将抗人Fc(GE目录号#BR-1008-39)以10μl/分钟的流速固定到两个流通池CM5芯片上420秒。运行缓冲液为HBS-EP+。使用运行缓冲液将所有样品和对照稀释至10μg/mL。基于25kDa的分子量，将肌生长抑制素

(0.1mg/mL在4mM HC1中) (R&D Systems, 目录号788-G8-010/CF) 稀释至0.3125、0.625、1.25、2.5和5nM。以下述设置进行测定,以50μL/分钟的流速进行捕获8秒,以50μL/分钟的流速进行缔合300秒并且以50μL/分钟的流速进行解离1200秒,然后使用3M MgCl₂以60μL/分钟的流速再生30秒。

[0280] 为了测定激活素A的结合亲和力和动力学性质,将抗人Fc (GE目录号#BR-1008-39) 以10μl/分钟的流速固定到两个流通池CM5芯片上420秒。运行缓冲液为HBS-EP+。使用运行缓冲液将所有样品和对照稀释至10μg/mL。使用26kDa的分子量,将激活素A (0.1mg/mL在4mM HC1中) (R&D Systems, 目录号338-AC-050CF) 稀释至0.156、0.3125、0.625、1.25和2.5nM。

[0281] 为了测定对肝素的结合亲和力和动力学性质,在测定当天制备1mg/mL的生物素化肝素,然后在HBS+N中稀释为100μg/mL。通过在100μg/mL下使用HBS+N缓冲液以5μl/分钟固定5分钟来制备链霉亲和素芯片流通池。将样品在HBS+EP中稀释为0.31nM至25nM的浓度。以30μL/分钟的流速使用300秒的缔合时间,和300秒的解离时间进行测定,随后用4M NaCl再生30秒,然后立即用4M NaCl进行二次再生30秒。

[0282] 为了测定对BMP-9和/或BMP-10的结合亲和力和动力学性质,在CM5芯片上以约6000至9000RU将抗人Fc偶联至FC3和FC4。ActRIIB-Fc蛋白用作与BMP-9和BMP-10结合的阳性对照 (R&D Systems, 目录号339-RBB-100)。为了分析BMP-9的结合,将所有样品稀释至2.5 μg/mL,运行缓冲液为HBS+EP。为了分析BMP-10的结合,将所有样品稀释至5μg/mL,运行缓冲液为HBS+EP+0.5mg/mL BSA。分析条件包括:接触时间180秒,解离时间300秒,流速30μL/分钟。将BMP-9 (R&D Systems, 目录号3209-BP-010CF) 和BMP-10 (R&D Systems, 目录号2926-BP-025CF) 从25nM三倍连续稀释至0.19nM。表8A和表8B中示出了示例性结果。

[0283] 表8A.选定的卵泡抑素-Fc融合蛋白的示例性结合亲和力和动力学性质数据

| | 卵泡抑素-Fc 融合蛋白 肌生长抑制素结合 KD (pM) 测试范围 5- 0.31 nM | 激活素A 结合 KD (pM) 测试范围 2.5- 0.15 nM | 肝素结合 KD (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 |
|--------|---|--|--|-------------------------------|--------------------------------|
| [0284] | FS315WT-hFc | 6-10 | 1-2 | 0.3 在测试范围内 无结合 | 在测试范围内 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 在测试范围内 无结合 | 在测试范围内 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 在测试范围内 无结合 | 在测试范围内 无结合 |
| | FS303K (76,81,82) A- hFcLALA | 12.7 | 未测试 | 0.57 在测试范围内 无结合 | 在测试范围内 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 |
| | FS315K82T-hFcLALA | 15.0 | 未测试 | 1.40 在测试范围内 无结合 | 在测试范围内 无结合 |
| | FS303K82T-hFcLALA | 9.7 | 未测试 | 0.33 在测试范围内 无结合 | 在测试范围内 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 |

[0285]

| | | | | | |
|----------------------------------|-------|------|---------------------|-----------|-----------|
| FS315K (76,82) E-hFcLALA | 10.50 | 未测试 | 4 | 未测试 | 在测试范围内无结合 |
| FS315K (81,82) E-hFcLALA | 9.87 | 未测试 | 11 | 未测试 | 在测试范围内无结合 |
| FS315K (81,82) D-hFcLALA | 7.09 | 0.47 | 20.6 | 在测试范围内无结合 | 在测试范围内无结合 |
| FS315K (76,81,82) E-hFcLALA | 2-6 | 1-2 | >25 | 在测试范围内无结合 | 在测试范围内无结合 |
| FS315K (76,81,82) D-hFcLALA | 5.92 | 0.76 | >25 | 在测试范围内无结合 | 在测试范围内无结合 |
| 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 | 在测试范围内无结合 |
| FS315R86N/V88T-hFcLALA | 12.70 | 未测试 | 1.30-1.7 | 未测试 | 在测试范围内无结合 |
| FS315K75N/C77T/K82T-hFcLALA | 40.30 | 未测试 | 1.4 | 未测试 | 在测试范围内无结合 |
| 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 | 在测试范围内无结合 | 在测试范围内无结合 |
| FS315C66S/K75N/C77T-hFcLALA | 6.4 | 未测试 | 比 FS315wt-hFc 低 3 倍 | 在测试范围内无结合 | 在测试范围内无结合 |
| FS315K (76,81,82) E-mFc | 14.8 | 未测试 | >25 | 未测试 | 未测试 |
| 单价分子： | | | | | |
| 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 | 在测试范围内无结合 | 在测试范围内无结合 |

[0286] 表8B. 选定的卵泡抑素-Fc融合蛋白的示例性结合亲和力和动力学性质数据

| FS315-hFc 变体 | 肝素结合 K_D (nM) | 肌生长抑制素 结合 K_D (pM) | FcRN 结合 K_D (nM) | cIEF (pI) |
|----------------|--------------------|----------------------------|-----------------------|--------------|
| 野生型 | 0.2 | 20.2 | 31.4 | 5.07 - 5.89 |
| Δ HBS | ND* | 17.4 | 48 | 4.82 - 5.72 |
| del75-86 | ND* | 57.1 | 38.8 | 4.83 - 5.26 |
| K84E | 0.9 | 9.9 | 34.9 | 5.07 - 6.01 |
| K82E | 1.5 | 11.9 | 10.5 | 5.48 - 6.09 |
| K (76,84) E | 0.8 | 9 | 33 | 4.87 - 5.95 |
| R78E/K84E | 0.8 | 7.2 | 45.5 | 5.06 - 5.96 |
| K (75,76) E | 1.1 | 11.7 | 34.2 | 5.05 - 5.26 |
| K (82,84) E | 1.1 | 9 | 45.1 | 4.86 - 5.95 |
| R78E/K82E | 1.3 | 3.9 | 53.3 | 4.96 - 5.96 |
| K (81,82) A | 1.5 | 11.9 | 38.5 | 5.31 - 5.96 |
| K (76,82) E | 3.9 | 10.5 | 38.2 | 4.89 - 5.26 |
| K (81,82) E | 10.7 | 9.9 | 40.8 | 4.83 - 5.25 |
| K (81,82) D | 20.6 | 7.1 | 24.7 | 4.88 - 5.59 |
| K (76,81,82) A | 9.4 | 11.3 | 41.6 | 5.24 - 5.93 |
| K (76,82,84) E | 13.8 | 4.7 | 50.8 | 4.85 - 5.80 |
| K (76,81,82) E | ND* | 4.2 | 44 | 4.87 - 5.80 |
| K (76,81,82) D | ND* | 5.9 | 59.9 | 4.82 - 5.67 |

[0288] ND*:在测试的FS浓度范围0.019~25nM内未检测到肝素结合

[0289] 如表8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)中未测定出动力学常数。这表示结合亲和力是最弱的肌生长抑制素结合 K_D 的大约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)中未测定出动力学常数。这表示结合亲和力是最弱的肌生长抑制素结合 K_D 的大约1400倍。

[0290] 实施例2.FS HBS内基本基序(BBXB)的电荷会影响肝素结合亲和力

[0291] 即使与抗体Fc片段融合,肝素介导的天然FS的快速肝脏清除也会限制其治疗潜力。为了克服这一限制,靶向FS的肝素结合环通过定点诱变来调节肝素结合活性。FS288同种型肝素结合基序((K (75,76) A,K (81,82) A和K (76,81,82) A))内赖氨酸残基的突变导致在竞争性测定中肝素结合减少。假设用具有负电荷的氨基酸取代两个BBXB基序内带正电荷的残基会引起比用丙氨酸取代所见更多的肝素结合减少。为了检验这一假设,我们生成了K (81,82) E、K (81,82) D、K (76,81,82) E和K (76,81,82) D变体,以与K (81,81) A和K (76,81,82) A进行比较。在一些实施方案中,本文提出的变体和野生型是直接与人IgG1 Fc部分融合的FS315同种型的重组蛋白。使用表面等离子体共振(SPR)方法测量FS变体和肝素之间的结合相互作用。通过平衡解离常数(K_D)来测量和报告结合亲和力(表8A和8B)。取代为更多负性残基后,与K (81,82) A相比,K (81,82) E和K (81,82) D的肝素结合减少7~13倍,表明肝素结合活性进一步受损。一致地,与K (76,81,82) A相比,三联体变体K (76,81,82) E和K (76,81,82) D的亲和力也大大降低。含E和D三联体变体的分子在我们的测试范围内均未检测到肝素结合。然而,对于具有与双联体K (81,82) E和K (81,82) D变体同等或更强亲和力的K (76,81,82) A而言,肝素SPR结合 K_D 为9.4nM。这些数据表明,用较少带负电荷的氨基酸取代可以减少肝

素结合,与用中性氨基酸取代的多个位点类似。总的来说,这些数据显示,改变FS HBS内基本BBXB基序的电荷会显著影响与肝素的结合亲和力。

[0292] 数据还证明,改变了两个BBXB基序的三联体K(76,81,82)E和K(76,81,82)D变体与仅改变了两个BBXB基序之一的双联体K(81,82)E和K(81,82)D变体相比,显示出更大的亲和力减小,表明两个基序促成了肝素结合(表8B)。为了进一步了解两个BBXB基序内关键碱性残基对肝素结合亲和力的作用,生成了一系列变体,其中将一个、两个或三个碱性残基用带负电荷的谷氨酸E置换。还生成了两个具有较大变化的HBS变体:1) HBS置换变体 Δ HBS,其中HBS(残基75-86)被来自FSD2的相应区段(残基148-159)置换,该变体缺乏肝素结合能力,和2) HBS缺失变体de175-86,其中缺失核心12aa HBS(序列在图8A和8B中列出)。在基于细胞的测定中,与hFc融合的重组野生型FS315同种型对肌生长抑制素和激活素具有与天然FS315(R&D,目录号#4889-FN/CF)相似的功效。将这种等效物称为“野生类型”,并始终用作对照。SPR结合数据显示,与野生型相比,具有一、二或三个谷氨酸取代的所有变体的亲和力均有不同程度的降低(在我们的测试范围内降低4~100倍或无法检测到结合)(表8B)。数据显示,增加谷氨酸取代的程度逐渐降低了肝素结合。例如,对于K82E、K(81,82)E和K(76,81,82)E而言,肝素结合 K_D 值分别为1.5nM、10.7nM和无法检测到结合。K(76,81,82)E、 Δ HBS和de175-86变体全部显示出相似的消除的肝素结合(表8B),表明三个带负电荷的点突变有效地消除了FS肝素结合亲和力。

[0293] 通过评价不同的变体,关于两个FS BBXB基序中碱性残基的作用,得出以下结论。首先,第二BBXB基序KKNK(81-84)相比于第一个BBXB基序KKCR(75-78)在肝素结合中起主导作用,正如K(81,82)E(K_D 10.7nM)与K(75,76)E(K_D 1.1nM)相比具有弱~10倍的结合力所表明的那样(表8B)。其次,每个FS BBXB基序中的第三碱性残基对肝素结合的影响弱得多。数据(表8B)显示:1)在两个基序中均具有第二碱性残基突变的双联体变体K(76,82)E的结合比在两个基序中均具有第三碱性残基突变的双联体变体R78/K84弱5倍;2)向K82E变体添加来自每个基序的第三碱性残基的突变(R78E和K84E)不会影响结合亲和力,因为K82E、K78E/82E和K(82,84)E的KD分别为1.5nM、1.3nM和1.1nM;以及3)K(81,82)E变体与肝素的结合比K(82,84)E变体弱~10倍(10.7nM和1.1nM);并且K(76,81,82)E的结合亲和力也比K(76,82,84)E弱得多,表明K84的作用较小。在一些实施方案中,数据证明在FS BBXB基序中前两个碱性残基对于肝素结合而言比第三碱性残基更重要。总的来说,这些数据证明,氨基酸取代的量、位置以及残基的电荷都会影响肝素结合亲和力。

[0294] 实施例2.卵泡抑素-Fc融合蛋白与FcRn受体的结合

[0295] Fc结构域中的一些突变导致与FcRn受体的结合减少,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融合蛋白对FcRn受体的结合亲和力。表9中示出了示例性结果。

[0296] 表9.示例性FcRn结合数据

| [0297] | 卵泡抑素-Fc融合蛋白 | KD (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 |
| FS315 Δ HBS-hFcLALA | 372.0 |
| FS315 (de175–86) –hFcLALA | 126.0 |
| FS315K82T--hFcLALA | 44.8 |
| FS303K82T-hFcLALA | 27.6 |
| FS315R86N/V88T-hFcLALA | 69.5 |
| FS315K75N/C77T/K82T-hFcLALA | 126.0 |
| 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 |

[0298] Fc结构域中的一些突变导致与Fc γ IA受体的结合减少,从而降低了效应子功能。使用标准方法评估卵泡抑素-Fc融合蛋白对Fc γ IA受体的结合亲和力。使用标准方法评估卵泡抑素-Fc融合蛋白对Fc γ IA受体的结合亲和力。

[0299] 为了测定对Fc γ 受体IA的结合亲和力,将卵泡抑素-Fc蛋白在pH 5.0的乙酸钠中稀释成2.5μg/mL,并以~150RU固定在CM5芯片上。Fc γ 受体RIA作为冻干原料购自R&D Systems,目录号为#1257-FC-050。为了分析Fc γ 受体IA,运行缓冲液是HBS-P+。分析条件包括:接触时间180秒,解离时间600秒,流速30μL/分钟。再生条件为10mM磷酸钠pH 2.5、500mM NaCl以30μL/分钟保持10秒,并稳定30秒。将Fc γ 受体IA稀释为62.5nM–0.49nM。

[0300] 表10中示出了示例性结果。

[0301] 表10.示例性Fc γ IA结合数据

| [0302] | 卵泡抑素-Fc融合蛋白 | Fc γ IA KD (nM) |
|--------|-----------------------------|-----------------|
| | FS315wt-hFc (对比蛋白) | 0.14 |
| | FS315K (76,81,82) E-hFcLALA | 81.9 |
| | FS315K (76,81,82) D-hFcLALA | 58.8 |

[0303] 实施例3.卵泡抑素-Fc融合蛋白具有延长的血清半衰期

[0304] 在一些实施方案中,对肝素的结合亲和力会影响体内PK特性。据报道,卵泡抑素的血清半衰期短。例如,典型的商用FS315蛋白的血清半衰期约为一小时。在该实施例中,确定包含图3A、图3B和表11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比蛋白相比,血清半衰期显著延长。

[0305] 表11.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3A和图3B)。重组卵泡抑素-Fc融合蛋白的血清半衰期范围为45.7至194小时。

[0306] 通过诱变基本BBXB基序,生成了一系列具有不同体外肝素结合亲和力的变体。肝素结合是与细胞表面硫酸乙酰肝素蛋白聚糖缔合的替代手段,缔合是体内许多蛋白质内化和清除的关键过程。研究了小鼠体内在药代动力学方面调节的肝素结合。将选定的具有不

同肝素结合亲和力的HBS变体作为单次静脉剂量(1mg/kg)施用于雌性CD1小鼠。监测这些分子的血清暴露,直到给药后168小时。在单次1.0mg/kg静脉剂量后,野生型的清除率和半衰期分别为30ml/小时/kg和68小时,而 Δ HBS变体具有低得多的清除率和更长的半衰期,分别为1.3ml/小时/kg和92小时(表12),与FS315-mFc和FS315 HBS-mFc的报告值一致。与野生型相比,所有新设计的肝素结合变体均显示出改善的PK特性(图3A、表11)。与野生型相比,体外肝素结合亲和力降低与以曲线下面积(AUC)测量的暴露增加和清除降低(范围为2~25倍)相关(图3A和3B;图4A和4B)。大多数经工程改造的变体还显示出延长的半衰期(表11)。数据清楚地证明了肝素结合对体内PK特性关键影响。

[0307] 先前的报道显示,在小鼠中与重组野生型相比,重组FS315 Δ HBS蛋白的AUC和半衰期提高了~8倍和~3倍。与野生型相比,未显示出可测量的肝素结合的K(76,81,82)E变体的AUC提高~25倍且半衰期提高~2倍(表11)。另外,在我们的研究中,与 Δ HBS变体相比K(76,81,82)E也显示出更好的开发性,包括蛋白质表达增加和聚集减少(表11)。基于此处描述的改善的PK特性和开发性特征,将与人Fc或鼠Fc融合的K(76,81,82)E变体用于药效学研究,并且以剂量依赖性方式产生显著增加的肌肉质量和功能改善。

[0308] 表11.示例性卵泡抑素-Fc融合蛋白体内PK数据

| 融合蛋白 | 剂量 (mg/kg) | T _{1/2} (小时) | AUC _{INF} (小时 *ng/ml) | %AUC # (%) | Cl (mL/小时/kg) | V _{ss} (mL/kg) |
|--------------------|---------------|--------------------------|--------------------------------------|---------------|------------------|----------------------------|
| WT(对比融合蛋白) | 1.0 | 3.77 | 1550 | 29.3 | 322 | 1490 |
| K82E | 1.0 | 93.5 | 67700 | 14.1 | 11.8 | 807 |
| K82T | 1.0 | 58.9 | 63.3 | | 16 | 424 |
| K(81,82) A | 1.0 | 80.1 | 126 | | 8.0 | 385 |
| K(76,81,82) E | 1.0 | 154 | 851 | | 1.2 | 227 |
| 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 |

[0310] 实施例4.卵泡抑素-Fc融合蛋白抑制肌生成抑制素和激活素A

[0311] 使用荧光素酶基因报告测定法测试卵泡抑素-Fc融合蛋白抑制肌生成抑制素和激活素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面的Smad3选择性反应元件。使用1.2nM肌生长抑制素或激活素A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,之后添加到细胞中,然后在37℃下孵育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,在刺激测定中卵泡抑素-Fc融合蛋白抑制肌生长抑制素,其IC₅₀范围从小于0.5nM到大于1.5nM。如表12所示,在刺激测定中卵泡抑素-Fc融合蛋白抑制激活素A,其IC₅₀范围从小于0.5nM到大于1.5nM。

[0312] 与对于带负电荷的氨基酸取代的FS315-hFc变体中的肝素结合亲和力所观测到的巨大差异(与野生型相比,降低了4~>100倍)相反,所述变体表现出对肌生长抑制素的结合亲和力几乎没有变化。表8A和8B中汇总了通过SPR方法测定的K_D值。通过SPR测定,几种肝素结合变体具有适度改善的肌生长抑制素结合亲和力(与野生型相比诱导1.5~5倍)。与野生型相比,HBS缺失变体de175-86显示出肌生长抑制素结合亲和力降低3倍。为了确定所述变体是否改变了FS生物学功能,选择变体的子集,并且在A204横纹肌肉瘤细胞中使用SMAD2/3荧光素酶报告基因测定法评估对肌生长抑制素和激活素A诱导的Smad2/3信号的抑制作用。对于具有一个、两个或三个点突变的所有肝素结合变体而言,抑制肌生长抑制素和激活素信号传导的效力相似,并且与野生型相当(表12和图2A)。在基于细胞的测定中,与野生型相比,HBS缺失(de175-86)变体的肌生长抑制素抑制作用降低~20倍,激活素抑制作用降低~5倍(表12和图2A)。然而,HBS置换变体Δ HBS的功能没有降低(表12),表明氨基酸75-86的缺失可以改变分子的构象。

[0313] 通过SPR测试BBXB基序中的突变,以评估这些突变是否影响重组变体的Fc部分与FcRn之间的相互作用。数据表明与野生型相比,对于我们的肝素结合变体而言对FcRn的亲和力没有明显变化(表8A和8B),因为突变位于FSD1的HBS区域中,远离C端融合的Fc区域。大多数经带负电荷的氨基酸取代的变体,以及Δ HBS和de175-86变体的等电点(pI)转变至酸性范围(表8B)。

[0314] 表12来自基于细胞的SMAD途径测定的肌生成抑制素和激活素A的IC₅₀

| 样品名称 | 肌生长抑制素 IC ₅₀ (nM) | 激活素 A IC ₅₀ (nM) |
|-----------------------------|---------------------------------|--------------------------------|
| FS315wt-hFc (对比蛋白) | 0.4 | 0.7 |
| ActRIIB-Fc | 0.5 | 0.5 |
| FS315ΔHBS-hFcLALA | 0.4 | 1.4 |
| 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 |
| K (76,82,84) E | 0.4 | 1.0 |

[0315]

[0316]

| | | |
|----------------------------------|-----|-----|
| K (76,81,82) A | 0.8 | 1.1 |
| K (76,81,82) D | 0.7 | 1.1 |
| 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 |
| 高糖基化变体 | | |
| K75N/C77T/K82T | 1.8 | 3.4 |
| C66A/K75N/C77T | 1.5 | 2.1 |
| C66S/K75N/C77T | 1.9 | 4.2 |
| K82T | 0.9 | 1.2 |
| G74N/K76S | 0.9 | 1.3 |

[0317] 实施例5. 卵泡抑素-Fc融合蛋白全身施用的体内功效

[0318] 该实施例证明以静脉或皮下施用10mg/kg的剂量,向野生型小鼠和杜氏肌营养不良mdx小鼠模型全身施用卵泡抑素-Fc融合蛋白(例如,FS315K (76,81,82) E-hFcLALA、FS315K (76,81,82) E-mFc)引起体内肌肉质量增加的趋势。

[0319] 具体地,在一项研究中,通过以10mg/kg的剂量静脉注射或以20mg/kg的剂量皮下注射,为雄性C57BL/6(野生型小鼠)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,通过以10mg/kg的剂量皮下注射为雄性mdx小鼠施用媒介物(即,PBS)或FS315K (76,81,82) E-mFc或通过以3mg/kg的剂量皮下注射为小鼠施用可溶性激活素受体IIB型,每周两次,持续12周。最后一次处理后二十四小时,处死小鼠,收集腓肠肌和四头肌并称重。表13中的示例性数据显示,与单独用赋形剂处理的腓肠肌或四头肌相比,来自mdx和C57BL/6小鼠的腓肠肌和四头肌的重量显著增加。因此,有明确的迹象表明,在野生型小鼠和DMD动物模型中全身施用时,重组卵泡抑素-Fc融合蛋白会增加肌肉质量。在mdx研究中,给药11周后测量前肢抓力。图7中的示例性数据显示,与单独用媒介物处理的动物的抓力相比,用FS315K (76,81,82) E-mFc处理的mdx小鼠的前肢抓力显著增加。经FS315K (76,81,82) E-mFc处理的动物的抓力大小大于经ActRIIB-mFc阳性对照处理的动物,也大于野生型C57BL/10ScSnJ动物。

| 表 13 来自 C57BL/6 和 <i>mdx</i> 小鼠的肌肉质量数据 (相对于媒介物的变化%) | | | | | |
|---|---|------------|------|------------|---------|
| | | 相对于媒介物的变化% | | | |
| | | C57BL/6 | | <i>mdx</i> | |
| | | 腓肠肌 | 四头肌 | 腓肠肌 | 四头肌 |
| [0320] | FS315K (76,81,82) E-hFcLALA mg/kg (每周静脉注射 2 次) | 10 | +28% | +33% | |
| | FS315K (76,81,82) E-hFcLALA mg/kg (每周皮下注射 2 次) | 20 | +32% | +39% | |
| | FS315K (76,81,82) E-mFc (每周皮下注射 2 次) | 10 mg/kg | | | 31% 36% |
| | ActRIIB-mFc (每周皮下注射 2 次) | 3 mg/kg | | | 24% 28% |

[0321] 实施例6:卵泡抑素构建体的表征

[0322] 该实施例证明以静脉或皮下施用10mg/kg的剂量,向野生型小鼠和杜氏肌营养不良*mdx*小鼠模型全身施用卵泡抑素-Fc融合蛋白(例如,FS315K (76,81,82) E-hFcLALA、FS315K (76,81,82) E-mFc)引起体内肌肉质量增加的趋势。

[0323] 还评估了卵泡抑素-Fc融合蛋白的pI变化。下面表14示出了在HBS中具有E和D突变以及高糖基化变体向更强酸性pI的转变。pI的转变与肝素结合减少和体内暴露增加相关。

[0324] 使用NanoPro仪器(ProteinSimple)测定cIEF特性(pI范围)。测试的最终蛋白质浓度为0.0025mg/ml,孔中上样12μL。所用稀释缓冲液为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梯度标准品1 (ProteinSimple 040-644)、1:100稀释度的一抗:兔抗FS pAB (Abcam#ab47941)、1:100稀释度的二抗:兔抗IgG HRP缀合物 (Promega#4011),和底物:鲁米诺(Luminol)/过氧化物XDR。

[0325] 表14. 卵泡抑素-Fc融合蛋白的等电点(pI) 范围

| 卵泡抑素-Fc 融合蛋白 | pI 范围 |
|------------------------------|-----------|
| FS315WT-hFc | 5.51-6.17 |
| FSΔHBS-hFcLALA | 4.82-5.72 |
| FSΔHBS-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 |

| | | |
|--------|---------------------------------|-------------|
| [0327] | 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 |
| | 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 |
| | MonoFS315ΔHBS-hFcLALA | 4.83-5.9 |

[0328] 实施例7:重组卵泡抑素-Fc对去卵巢雌性Sprague Dawley大鼠的促卵泡激素(FSH)和肌生长抑制素水平的影响

[0329] 这项研究的目的是评价向雌性去卵巢Sprague Dawley大鼠单次静脉注射(推注)FS315K (76,81,82) E-hFcLALA、ACE-031或FS315WT-hFc对促卵泡激素(FSH)和肌生长抑制素水平的影响。

[0330] 对于这些研究,通过静脉(IV)注射(推注)为雌性去卵巢大鼠施用单剂量的媒介物1(PBS)、媒介物2(10mM柠檬酸盐、8%蔗糖、0.02% Tween®80, pH 6.5)、媒介物3(20mM组氨酸、50mM精氨酸、6%蔗糖、0.005%聚山梨醇酯20, pH6.8)、在媒介物2中的FS315K (76,81,82) E-hFcLALA或想媒介物3中的FS315WT-hFc。下面的表15是研究设计的概要。

[0331] 表15:单次静脉注射(推注)后对去卵巢雌性Sprague Dawley大鼠的促卵泡素(FSH)和肌生长抑制素水平的处理效果的研究设计

| 组号 | 试验品 ^a | 剂量水平 (mg/kg) | 剂量浓度 (mg/mL) | 剂量体积 (mL/kg) | 雌性数 量 |
|----|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|----------|
| 1 | 媒介物 1 | 0 | 0 | 5 | 12 |
| 2 | 媒介物 2 | 0 | 0 | 5 | 12 |
| 3 | 媒介物 3 | 0 | 0 | 5 | 12 |
| 4 | EEE-FS-hFc* | 1 | 0.2 | 5 | 12 |
| 5 | | 3 | 0.6 | 5 | 12 |
| 6 | | 10 | 2 | 5 | 12 |
| 7 | | 30 | 6 | 5 | 12 |
| 8 | ACE-031 | 10 | 2 | 5 | 12 |
| 9 | FS315WT-hFc | 10 | 2 | 5 | 12 |

[0333] ^a根据体重计算的剂量。

[0334] *EEE-FS-hFc是FS315K(76,81,82)E-hFcLALA

[0335] 在研究第-2天、第-1天，在给药前，在给药后5分钟，以及在给药后1、2、6、10、16、24、48、72、168、240和336小时从6个雌性/组/个时间点将血样收集到含抗凝剂的管中。下面表16中示出了这些研究的FSH浓度数据。

[0336] 表16:给药后的平均FSH浓度

| 时 间 点 | 平均 FSH 浓度 (ng/mL) | | | | | | | | | |
|-------------------|-------------------|----------|----------|--------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|----------------------------|--------------------------------|--|
| | 媒介物 1 | 媒介物 2 | 媒介物 3 | 1 mg/kg EEE-FS- hFc * | 3 mg/kg EEE-FS- hFc * | 10 mg/kg EEE-FS- hFc * | 30 mg/kg EEE-FS- hFc * | 10 mg/kg ACE- 031 | 10 mg/kg FS315WT- hFc | |
| 给 药 前 | 21.9 | 20.3 | 24.5 | 29.8 | 23.6 | 20.9 | 25.2 | 24.3 | 23.9 | |
| 给 药 后 5 分钟 | 25.7 | 23.9 | 24.7 | 23.6 | 27.1 | 29.1 | 23.8 | 22.3 | 26.3 | |
| 给 药 后 1 小时 | 30.0 | 27.9 | 30.2 | 28.1 | 25.6 | 20.8 | 26.1 | 26.0 | 26.9 | |
| 给 药 后 2 小时 | 24.9 | 26.5 | 26.0 | 24.4 | 24.9 | 26.3 | 22.2 | 22.0 | 30.4 | |
| 给 药 后 6 小时 | 27.6 | 24.0 | 24.5 | 21.9 | 18.4 | 16.2 | 18.7 | 24.5 | 21.7 | |
| 给 药 后 10 小时 | 30.4 | 31.2 | 30.6 | 17.0 | 16.1 | 15.8 | 9.5 | 12.2 | 13.5 | |
| 给 药 后 16 小时 | 30.9 | 27.9 | 28.9 | 22.4 | 12.8 | 8.8 | 10.1 | 19.4 | 22.7 | |

| | | | | | | | | | | |
|--------|------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| [0338] | 给药后 24 小时 | 29.7 | 27.4 | 28.4 | 17.9 | 13.6 | 4.6 | 2.9 | 14.7 | 29.2 |
| | 给药后 48 小时 | 27.9 | 26.4 | 29.0 | 26.0 | 15.4 | 8.9 | 7.0 | 16.1 | 30.2 |
| | 给药后 72 小时 | 32.0 | 28.1 | 27.4 | 23.5 | 20.0 | 11.2 | 2.8 | 14.8 | 29.5 |
| | 给药后 168 小时 | 28.0 | 25.6 | 28.4 | 26.9 | 26.8 | 17.6 | 13.8 | 17.1 | 30.1 |
| | 给药后 240 小时 | 31.3 | 26.8 | 32.6 | 25.6 | 31.9 | 25.1 | 19.6 | 16.3 | 28.6 |
| | 给药后 336 小时 | 30.1 | 27.7 | 30.0 | 30.7 | 31.0 | 29.9 | 29.3 | 24.8 | 39.9 |

[0339] PD=给药后;hr=小时;min=分钟

[0340] *EEE-FS-hFc是FS315K (76,81,82) E-hFcLALA

[0341] 表17中汇总了显示平均试验品(TA)浓度(即,媒介物1、媒介物2、媒介物3、FS315K (76,81,82) E-hFcLALA、ACE-031或FS315WT-hFc)的生物分析数据,表下面是PK(药物暴露)。

[0342] 表17:给药后的生物分析数据

| 时间点 | 平均 TA 浓度 (ng/mL) (SD) | | | | | | | | |
|-----------|-----------------------|-----------|-----------|----------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|--------------------|----------------------|
| | 媒介物 1 | 媒介物 2 | 媒介物 3 | 1 mg/kg EEE-FS-hFc * | 3 mg/kg EEE-FS-hFc * | 10 mg/kg EEE-FS-hFc * | 30 mg/kg EEE-FS-hFc * | 10 mg/kg ACE-031 | 10 mg/kg FS315WT-hFc |
| 给药前 | 0.0 (0.0) | 0.0 (0.0) | 0.0 (0.0) | 0.0 (0.0) | 0.0 (0.0) | 0.0 (0.0) | 0.0 (0.0) | 0.0 (0.0) | 0.0 (0.0) |
| 给药后 5 分钟 | 0.0 (0.0) | 0.0 (0.0) | 0.0 (0.0) | 17500.0 (2354.0) | 66000.0 (8863.8) | 217000.0 (25183.8) | 774000.0 (90650.3) | 225000.0 (37052.5) | 36800.0 (9190.2) |
| 给药后 1 小时 | 0.0 (0.0) | 0.0 (0.0) | 0.0 (0.0) | 10200.0 (7308.1) | 32900.0 (16645.4) | 78500.0 (53774.0) | 160000.0 (210793.0) | 57600.0 (71006.1) | 3920.0 (2022.1) |
| 给药后 2 小时 | 0.0 (0.0) | 0.0 (0.0) | 0.0 (0.0) | 12900.0 (958.6) | 35800.0 (7922.5) | 123000.0 (47016.5) | 401000.0 (97890.2) | 164000.0 (20719.7) | 1570.0 (371.0) |
| 给药后 6 小时 | 0.0 (0.0) | 0.0 (0.0) | 0.0 (0.0) | 7230.0 (3304.1) | 24900.0 (8544.6) | 63000.0 (30004.0) | 161000.0 (88094.8) | 73700.0 (49048.4) | 620.0 (347.1) |
| 给药后 10 小时 | 0.0 (0.0) | 0.0 (0.0) | 0.0 (0.0) | 7720.0 (590.4) | 22800.0 (4591.9) | 73200.0 (13229.1) | 238000.0 (53610.7) | 151000.0 (21990.9) | 263.0 (94.8) |
| 给药 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 5060.0 | 17200.0 | 43300.0 | 134000.0 | 85000.0 | 458.0 |

| | | | | | | | | | | |
|--------|----------------------|--------------|--------------|--------------|-------------------|---------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|------------------|
| | 后 16 小时 | (0.0) | (0.0) | (0.0) | (1024.4) | (5205.6) | (11025.3) | (30675.8) | (38208.8) | (597.6) |
| [0344] | 给药 后 24 小时 | 0.0 (0.0) | 0.0 (0.0) | 0.0 (0.0) | 6080.0 (182.7) | 14900.0 (1793.0) | 44800.0 (9838.3) | 1270000 (21903.3) | 102000.0 (10660.1) | 101.0 (73.2) |
| | 给药 后 48 小时 | 0.0 (0.0) | 0.0 (0.0) | 0.0 (0.0) | 2590.0 (390.2) | 8330.0 (1776.9) | 14100.0 (3557.2) | 65500.0 (5433.0) | 78800.0 (14341.1) | 301.0 (444.4) |
| | 给药 后 72 小时 | 0.0 (0.0) | 0.0 (0.0) | 0.0 (0.0) | 1770.0 (324.3) | 6360.0 (1205.9) | 25400.0 (10170.1) | 68700.0 (6478.3) | 71300.0 (10509.1) | 54.5 (54.2) |
| | 给药 后 168 小时 | 0.0 (0.0) | 0.0 (0.0) | 0.0 (0.0) | 1010.0 (265.3) | 2730.0 (814.3) | 7360.0 (1592.5) | 17900.0 (2463.4) | 43600.0 (19076.9) | 96.7 (154.1) |
| | 给药 后 240 小时 | 0.0 (0.0) | 0.0 (0.0) | 0.0 (0.0) | 740.0 (157.9) | 1610.0 (185.5) | 3930.0 (1314.7) | 10500.0 (1462.4) | 31700.0 (7431.8) | 6.2 (15.1) |
| | 给药 后 336 小时 | 0.0 (0.0) | 0.0 (0.0) | 0.0 (0.0) | 450.0 (83.5) | 939.0 (243.4) | 3530.0 (1143.5) | 6200.0 (1679.6) | 17300.0 (13034.0) | 24.7 (51.0) |

[0345] PD=给药后;hr=小时;min=分钟

[0346] *EEE-FS-hFc是FS315K (76,81,82) E-hFcLALA

[0347] 药代动力学分析

[0348] 分别以所有剂量水平单次静脉推注FS315K (76,81,82) E-hFcLALA、ACE-031或FS315WT-hFc后,所有雌性大鼠暴露于FS315K (76,81,82) E-hFcLALA、ACE-031或FS315WT-hFc。总体而言,当比较1至30mg/kg的剂量范围时,就AUClast和Cmax而言,FS315K (76,81,82) E-hFcLALA的暴露以一般剂量比例方式增加。在所有剂量水平下,FS315K (76,81,82) E-hFcLALA的C1值均较低,范围为0.0246至0.0318mL/分钟/kg。在所有剂量水平下,FS315K (76,81,82) E-hFcLALA的Vss值的范围为0.177至0.212L/kg,表明与大鼠的总血容量(0.054L/kg)相比向组织的中等分布。在所有剂量水平下,FS315K (76,81,82) E-hFcLALA的T1/2值范围为74.8至135小时。ACE-031的C1和Vss分别为0.00812mL/分钟/kg和0.0891L/kg。与大鼠的总血容量相比,C1值较低,向组织的分布(Vss)小。这些值导致ACE-031的T1/2为134小时。SHP619的C1和Vss分别为2.82mL/分钟/kg和10.1L/kg(均为近似值)。与大鼠的总血容量相比,C1值较低,向组织的分布(Vss)高。这些值导致FS315WT-hFc的T1/2为60.8小时(近似值)。

[0349] 实施例8:卵泡抑素-Fc融合蛋白的剂量预测

[0350] 基于以上实施例中呈现的数据,建立一种机理PK/PD模型,以预测用于治疗肌营养不良的重组卵泡抑素Fc融合蛋白(FS-Fc)在人体内的有效剂量。以下分析了机理PK/PD模型的构建。首先,分析了有关肌生长抑制素/激活素信号传导途径的相关文献,以鉴定可用于PK/PD模型参数化、校准和验证的数据。其次,开发肌生长抑制素/激活素A结合的机理模型,以及相关疗法对PD终点(包括肌肉质量增加和FSH调节)的影响。使用来自文献中报道的工具分子和肌生长抑制素抗体的临床前和临床暴露、生物标志物和功效数据验证该模型。参见Jacobsen L等人,PPMD Connect Conference,2016年6月26-29日,其内容通过引用整体

并入本文。最后,使用机理PK/PD模型来模拟各种PD终点的剂量反应关系,PD终点包括受体占用率(R0)、肌肉质量增加和作用时间。

[0351] 构建的机理PK/PD模型包括三个区室,即血浆、垂体和肌肉。设计该模型以描述FS-Fc的生物学过程及其与肌生长抑制素和激活素A的相互作用。使用PBPK方法估计FS-Fc从血清到肌肉和垂体的生物分布。PBPK方法在Shah和Betts AM., *J Pharmacokinet Pharmacodyn* (2012) 39:67–86中有描述,其内容通过引用整体并入本文。此外,在去卵巢大鼠中使用FSH调节来验证体内激活素A抑制作用。结果表明,在肌肉内通过肌肉生长抑素和激活素A的结合引起的ActRIIB R0与肌肉质量增加有关。使用BMS-986089治疗肌营养不良的临床数据(参见Jacobsen L等人,*PPMD Connect Conference*,2016年6月26–29日)用于确定人体内肌肉质量增加的ActIIB R0阈值。

[0352] 应用结合了针对肌肉内肌生长抑制素和激活素A抑制作用的ActRIIB R0的机理PK/PD模型,预测FS-Fc在每周一次皮下施用约3mg/kg的剂量下会显著增加健康的人类志愿者的肌肉体积。该模型还预测,FS-FC在每月一次静脉施用约10mg/kg的剂量下会显著增加健康的人类志愿者的肌肉体积。

[0353] 总的来说,以上实施例证明重组卵泡抑素-Fc融合蛋白通过例如全身施用在DMD疾病模型中诱导肌肉肥大非常有效。mdx小鼠模型中的肌肉肥大转化为前肢抓力的功能性改善。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。

[0354] 实施例9.为进行高糖基化而引入的新型N-连接的糖基化共有序列(NXT/S)

[0355] 该实施例显示了通过将新的N-连接的糖基化共有序列引入肝素结合环中来生成高糖基化重组FS315-hFc变体。产生高糖基化突变体的基本原理包括降低免疫原性风险,调节碳水化合物含量以降低清除率,以及通过添加带负电荷的大体积聚糖结构来阻断肝素结合。设计了10个新的变体,它们代表6个共有的N-连接的糖基化位点NXT/S,其中X可以是HBS区域内位置74、75、78、80、83和86上除脯氨酸以外的任何氨基酸。通过SDS-PAGE上的分子量(MW)转变,观察到最初检测到的其他碳水化合物部分的并入(图5A)。与野生型和其他变体相比,变体K75N/C77T/K82T显示出向更高MW的明显转变,表明并入了聚糖。另外两种变体(C66A/K75N/C77T和C66S/K75N/C77T)显示出不太明显的向较高MW的转变(图5A)。所有这三种变体均具有共同的突变位点K75N/C77T。cIEF数据显示,与K82T变体相比,K75N/C77T/K82T变体具有明显的pI酸性转变(图5B),这表明带负电荷的聚糖部分可能占用K75N位点,导致MW和pI转变。为了进一步确认所有引入的N-连接的糖基化位点上的聚糖占用状态,进行了基于LC/MS的表征。LC/MS数据证实,在肝素结合环中研究的六个位点中,通过在位置75引入糖基化共位点生成高糖基化FS(表18)。含有相同K75N/C77T突变的三种变体K75N/C77T/K82T、C66A/K75N/C77T和C66S/K75N/C77T具有可变的聚糖占用率(69.7%、39.6%和21.5%),在N75上具有相似的唾液酸摩尔/摩尔寡糖比率(1.99、1.88和1.96)(表18)。对于三种高糖基化变体而言,聚丙烯酰胺电泳凝胶上的迁移率转变程度与N75上的聚糖占用程度相符(图5A和表18)。野生型、△HBS变体和设计的所有10种聚糖变体在天然FS聚糖位点N112和N259上具有相似的聚糖占用率和唾液酸含量,但在N95上具有变化很大的占用率(表18)。

[0356] 表18:内源性和高糖基化的N-连接的糖基化位点的表征。示出了百分比聚糖占用率和唾液酸含量。

| FS315-hFc 变体 | 高糖基化位点 | | N95 | | N112 | | N259 | |
|--------------|----------------|------|--------------------|--------------|--------------------|-------------------|--------------------|-------|
| | 位置 | 占用率 | 唾液酸含量 ^a | 占用率 | 唾液酸含量 ^a | 占用率 | 唾液酸含量 ^a | 占用率 |
| [0357] | 野生型 | | | 14.7% | 2.27 | 13.6% | 0.93 | 96.0% |
| | ΔHBS | | | 22.72% | 1.83 | 20.2% | 1.68 | 98.8% |
| | K82T | N80 | n.d. | n.d. | 49.7% | 1.69 | 16.2% | 0.84 |
| | P85T | N83 | n.d. | n.d. | 9.3% | 2.40 | 18.6% | 1.14 |
| | R78N/N80T | N78 | n.d. | n.d. | 31.3% | 2.37 | 17.7% | 1.02 |
| | R86N/V88T | N86 | ^b | ^b | 21.0% ^b | 1.05 ^b | 15.1% | 1.02 |
| | G74N/K76T/P85T | N74: | n.d. | n.d. | 15.0% | 2.21 | 23.1% | 1.29 |
| | | N83: | n.d. | n.d. | | | | |
| | K75N/C77T/K82T | N75 | 69.7% | 1.96 | 47.9% | 2.34 | 16.9% | 1.52 |
| | | N80 | n.d. | n.d. | | | | |
| | C66A/K75N/C77T | N75 | 39.6% | 1.88 | 32.8% | 2.27 | 17.8% | 1.44 |
| | C66S/K75N/C77T | N75 | 21.5% | 1.96 | 32.9% | 2.36 | 19.7% | 1.44 |
| | | | | | | | | 95.1% |
| | | | | | | | | 1.29 |

[0358] ^a唾液酸mol/mol寡糖

[0359] ^b结果无法区分是N86还是N95处的糖基化

[0360] 实施例10:高糖基化变体的体外结合特征和体内药代动力学性质

[0361] 在HBS区域内设计新的高糖基化位点的基本原理是试图通过引入带负电荷的大体积聚糖结构来阻断肝素结合。对于三种在N75上有聚糖占用的高糖基化变体,仅用变体K75N/C77T/K82T观察到体外肝素结合亲和力降低(与野生型相比降低~15倍),该变体在N75上具有最高的聚糖占用率并且在第二BBXB基序中具有K82T突变(表19),表明N75上的碳水化合物对肝素结合活性的影响可能是中等的。如通过SPR测量的那样,与野生型相比,三种高糖基化变体显示出肌生长抑制素结合的轻度或中度减少(表19)。在基于A204细胞的报告基因测定中,与野生型和其他非高糖基化变体相比,三种高糖基化变体的肌生长抑制素抑制作用降低2~3倍,激活素A抑制作用降低2~4倍(表19和图2的图B),表明其他碳水化合物对效力的轻微抑制。表19示出了具有新设计的用于进行N-糖基化的一个或两个共有序列(Asn-X-Thr/Ser)的重组FS315-hFc变体。通过表面等离子体共振(SPR)测定变体与肝素、肌生长抑制素或FcRn的结合。通过平衡解离常数(K_D)来测量和报告结合亲和力。通过毛细管等电聚焦(cIEF)测定变体的电荷异质性,并显示为等电点(pI)的范围。

[0362] 表19.FS-315高糖基化变体的体外分析数据。

| FS315-hFc 变体 | 肝素结合 K_D (nM) | 肌生长抑制素结合 K_D (pM) | FcRn 结合 K_D (nM) | cIEF (pI) |
|--------------|--------------------|------------------------|-----------------------|--------------|
| 野生型 | 0.2 | 20.2 | 28.3 | 5.07 - 5.89 |
| K82T | 1.4 | 15.0 | 13.8 | 5.29 - 5.93 |
| P85T | 0.4 | 12.4 | 20.1 | 5.51 - 6.09 |
| [0363] | R78N/N80T | 0.9 | 13.0 | 5.47 - 6.09 |
| | R86N/V88T | 1.5 | 12.7 | 5.49 - 6.08 |
| | G74N/K76S | 0.3 | 11.6 | 5.06 - 5.88 |
| | G74N/K76T | 0.5 | 11.1 | 5.06 - 5.99 |
| | G74N/K76T/P85T | 0.3 | 11.6 | 4.86 - 5.87 |
| | K75N/C77T/K82T | 3.5 | 40.3 | 4.72 - 5.88 |
| | C66A/K75N/C77T | 0.3 | 27.5 | 4.81 - 6.47 |
| | C66S/K75N/C77T | 0.4 | 82.8 | 4.86 - 6.47 |

[0364] 为了测定高糖基化对药代动力学特性的影响,我们使用野生型、 Δ HBS、非高糖基化变体K82T及两种高糖基化变体K75N/C77T/K82T和C66A/K75N/C77T进行了小鼠PK研究。与野生型相比,非高糖基化变体K82T的PK特征略有改善;然而,与野生型相比,两种高糖基化变体的PK特性显著改善(图6和表11)。与野生型相比,变体C66A/K75N/C77T显示出高~10倍的暴露量,而变体K75N/C77T/K82T显示出高~17倍的暴露量,与 Δ HBS变体相似(表11)。与C66A/K75N/C77T相比,K75N/C77T/K82T变体具有更高的聚糖含量和更低的体外肝素结合,这表明调节肝素结合活性和糖基化含量可能是设计所需FS治疗分子的一种有吸引力的方法。

[0365] 实施例11:FS-EEE-mFc给药引起体重以剂量依赖性方式增加

[0366] 经工程改造的卵泡抑素和全身递送在野生型小鼠中引起肌肉肥大

[0367] 在野生型C57BL/6小鼠的研究中,在4周的给药期限内采用了两种经工程改造的卵泡抑素分子。在一项研究中,静脉给药1至50mg/kg的FS-EEE-mFc(K76、K81、K82取代为谷氨酸)。在FS-EEE-mFc给药后,体重以剂量依赖性方式增加(图9,图A),这与骨骼肌质量的增加有关(图9,图B)。使用电化学发光免疫测定法测量FS-EEE-mFc的血清浓度,并且如图9的图C所示,FS-EEE-mFc的低谷水平与剂量成比例,为1mg/kg至50mg/kg。在皮下和静脉内施用之后对FS-EEE-hFc分子进行评价。静脉给药10mg/kg或皮下给药20mg/kg的FS-EEE-hFc对体重产生相似的影响,增加20%,个体肌肉质量增加范围为28%至44%。静脉给药50mg/kg或皮下给药100mg/kg的FS-EEE-hFc对体重产生相似的影响,增加26%,个体肌肉质量增加范围为46%至69%(图9的图D和图9的图E)。将心脏重量按胫骨长度归一化,并且在较高的FS-EEE-hFc剂量下看到心脏/胫骨比率增加。检查四头肌组织样品与媒介物处理的形态差异。使用免疫荧光显微镜术,在FS-EEE-hFc给药后观察到与媒介物给药动物相比,肌纤维大小更大(图9的图F)。在两种剂量水平下,对于FS-EEE-hFc而言,与媒介物相比,平均肌纤维直径增加(图9的图G)。

[0368] 在mdx小鼠中,卵泡抑素处理引起肌肉肥大和肌肉功能的改善

[0369] 为了评价对营养不良病理的影响,通过免疫组织化学全载玻片分析法来分析四头

肌和膈组织的组织坏死、炎症和纤维化标志物。作为坏死的标志物,开发了一种利用坏死区IgG积聚来检测内源性小鼠IgG与抗小鼠IgG的IHC方法,IgG与富含组氨酸的糖蛋白(HGP)结合形成促进坏死细胞清除的HGP-IgG复合物。在mdx肌肉中,正如通过总IgG检测评估的那样,小鼠IgG IHC准确标记坏死细胞,但在组织切片(图10A)和整个动物(图10B)中坏死面积是可变的。为了最好地解释可变性,分析了整个载玻片图像以进行定量,并且每组的群组动物数量都很高($n=15$)。在四头肌的全载玻片分析中,在10和30mg/kg的FS-EEE-mFc剂量下,而不是在3mg/kg的ActRIIB-mFc剂量下,实现坏死组织面积的统计学显著减少。与对坏死区域的发现相似,CD68(一种促炎性M1型巨噬细胞的标志物)染色也显示出斑块状阳性染色区域(图10C)。由于可检测到的巨噬细胞浸润总体水平较低,当对整个载玻片图像进行CD68阳性区域定量时,药物治疗效果未达到显著性(图10D)。胶原蛋白I检测能够在媒介物对照中鉴定出4%的阳性染色区域,在10mg/kg和30mg/kg的FS-EEE-mFc和3mg/kg的ActRIIB中阳性染色区域均显著减少(图10E和10F)。mdx四头肌中FS-EEE-mFc处理的总体模式与现存、中心核、再生肌纤维的肥大相符。再生细胞的扩增引起变性减少,并且具有更少的受损、坏死组织会驱动细胞外基质中的胶原蛋白沉积,FS-EEE-mFc减少了纤维化。

[0370] 为了评价对营养不良性肌肉的影响,通过皮下施用将卵泡抑素FS-EEE-mFc分子给药至3周龄的mdx小鼠,持续12周。选择FS-EEE-mFc的三个剂量,范围为3至30mg/kg,并与以3mg/kg给药的重组激活素IIB受体(ActRIIB-mFc)的Fc融合物进行比较。小鼠不进行定期运动,并在研究的第10周评估其前肢抓力。如图11A所示,对于各剂量的FS-EEE-mFc而言体重均增加,范围为9%至25%,相比而言ActRIIB-mFc为14%。肢体骨骼肌的增加范围从12%至27%(3mg/kg FS-EEE-mFc),到46%至59%(30mg/kg FS-EEE-mFc)(图11B)。心脏和膈肌的重量增加小于肢体肌肉,与PBS媒介物处理无显著差异。从四头肌中,对股直肌的面积进行定量,并且对于所有药物处理组观察到显著增加(图11C)。另外,对肌纤维大小进行定量并且在FS-EEE-mFc处理后与媒介物对照相比,平均肌纤维直径增加了(图11D和图11E)。

[0371] 所有剂量的FS-EEE-mFc均使绝对前肢抓力恢复到高于C57BL/10野生型小鼠的水平,在10mg/kg FS-EEE-mFc下作用最大(图11F)。当按体重归一化时,3mg/kg和10mg/kg的FS-EEE-mFc均使抓力提高到比mdx媒介物对照更高而与野生型水平相似的水平。测量了对肌肉损伤循环标志物的影响。血清肌酸激酶活性高度可变,与媒介物处理相比,最高剂量的FSEEE-mFc引起最大的降低(图11G)。在最高的FS-EEE-mFc剂量下,骨骼肌肌钙蛋白I水平降低,但心脏肌钙蛋白I水平保持不变,这与肢体肌肉相比心脏观察到更大的肥大一致。

[0372] 为了证实组织病理学结果,从四头肌组织匀浆中测量了纤维化的基因标志物。如图10G所见,所有三种剂量的FS-EEE-mFc均降低了与胶原蛋白col1A1、lox、cthrc1和acta2的沉积和交联有关的基因的表达。对于编码骨桥蛋白的CD68或spp1而言转录物水平并未降低,骨桥蛋白是营养不良性肌肉中高度表达的细胞外蛋白,与mdx模型中的纤维化发展和DMD疾病严重性具有遗传连锁。在mRNA分析中,ActRIIB-mFc组未显示出降低,而在一些情况下,增加了纤维化和炎症的基因标志物水平。

[0373] 在膈组织中,CD68阳性巨噬细胞浸润的基线水平高于四头肌,并且在10mg/kg和30mg/kg的FS-EEE-mFc以及3mg/kg的ActRIIB-mFc下观察到降低(图12A和图12C)。胶原蛋白I免疫组织化学分析揭示,与四头肌相比,膈肌的纤维化水平更高,对于媒介物对照而言在两种肌肉中分别为12%与4%(图12B和图10F)。与四头肌不同,经药物处理后膈肌中的胶原

蛋白I含量没有显著改变。涉及纤维化和炎症的基因的定量RT-PCR显示在10和30mg/kg的FS-EEE-mFc剂量下RNA表达降低(图12D)。与四头肌相似,ActRIIB-mFc组的纤维化标志物的基因转录反应增加。

[0374] 实施例12:卵泡抑素处理mdx小鼠比用肌生长抑制素拮抗剂处理引起的肌肉功能和病理学改善更大

[0375] 为了比较经工程改造的卵泡抑素与对肌生长抑制素拮抗作用有特异性的药剂的作用,制备了一种设计成与肌生长抑制素特异性结合的单克隆抗体。使用表面等离子体共振方法,比较所得的含有小鼠IgG Fc的抗体与FS-EEE-mFc结合配体肌生长抑制素和激活素A的能力。FS-EEE-mFc和抗MST抗体都紧密地结合肌生长抑制素,KD值分别为7.5和15pM,而对于激活素A,FS-EEE-mFc显示出6.1pM的KD,而抗MST抗体未显示出可检测的结合。

[0376] 接下来,比较两种分子对小鼠营养不良性肌肉的影响。在这项研究中,通过皮下施用对5周龄并接受定期运动方案的mdx小鼠给药,持续12周。每个分子选择两种剂量,3和30mg/kg,然而基于抗体更长的预测半衰期,将FS-EEE-mFc的给药频率设置为每周两次,相比而言抗肌生长抑制素抗体为每周一次。

[0377] 在两种药剂的两种剂量下均观察到体重和肌肉质量增加(图13A和图13B)。与30mg/kg的抗MST抗体相比,在30mg/kg的FS-EEE-mFc剂量下,体重和肌肉质量增加的幅度更大。与30mg/kg相比,在3mg/kg的剂量下,体重和肌肉质量的增加大大降低了,两种药剂的作用幅度相当。绝对的和按体重归一化的心脏、肝脏和脾脏重量均未改变,除了脾脏重量随着抗MST抗体剂量的增加而增加以外(图13C)。

[0378] 根据mdx研究的建议,在动物对仪器适应之后记录功能和行为测量值。在前肢抓力方面,两种药剂的两种剂量均引起高于媒介物处理的增加(图13D)。30mg/kg剂量的FS-EEE-mFc比30mg/kg的抗MST抗体产生更大的增加。按体重归一化后,抓力增加与媒介物处理没有区别。在研究结束时测量EDL肌肉的独立强直力量(图13E)。两种药剂仅30mg/kg的剂量引起强直力增加,并且FS-EEE-mFc的增加大于抗MST抗体的增加。当将其按EDL横截面积归一化时,比力与mdx媒介物给药组没有区别。检查了强制踏车现象并且对于30mg/kg的FS-EEE-mFc组以及两种剂量的抗MST抗体而言,观察到跑动距离均减小(图13F)。当按体重归一化时,这些与媒介物相比的减小得以维持。

[0379] 血清CK分析显示了各组内的高水平变异性,高水平变异性避免了各组之间显著性差异的出现(图13G)。在研究第8周期间,还分析了血清中的药物浓度。如图13H中所见,两种药剂的剂量比例明显,其中30mg/kg的剂量导致浓度为3mg/kg剂量的大约10倍。即使给药频率较低,抗MST抗体的浓度也是FS-EEE-mFc的约4倍。将血清浓度与肥大作用进行比较,在3mg/kg剂量下,比抗MST抗体低4倍的FS-EEE-mFc的血清浓度产生了相似的肌肉质量效应。在30mg/kg剂量下,这种趋势更为明显,其中与抗MST抗体相比,尽管循环中的FS-EEE-mFc药物少4倍,但是对于FS-EEE-mFc观察到肌肉质量更大、前肢抓力和EDL强直力增加。

[0380] 通过免疫组织化学和qPCR分析四头肌和膈组织的营养不良病理变化。与未运动的研究相比,在运动研究中,在媒介物对照组中观察到相似的四头肌和膈肌损伤本底水平。鉴于有报道证明在运动与未运动的mdx中,肢体肌肉坏死和膈肌纤维化恶化,这令人惊讶。对于我们研究的一种可能解释可能是动物起始年龄的差异(未运动的动物为3周龄,运动的动物为5周龄)。

[0381] 如图14A-C所示,与四头肌的媒介物处理相比,两种药剂的3mg/kg剂量均引起肌肉坏死和纤维化的少量减少。在30mg/kg下,与抗MST抗体的少量减少相比,对于FS-EEE-mFc观察到坏死和纤维化的大量减少。CD68阳性巨噬细胞染色不能将处理组与媒介物对照区分开,这可能受到该标志物基线染色水平低的限制。对侧四头肌肌肉的纤维化和炎症标志物的mRNA分析如图14D所示。在这里,对于任何药剂或剂量均未观察到转录物水平降低,实际上,对于低剂量抗MST抗体(c011A1、cthrc1、CD68)和高剂量FSEEE-mFc(CD68)而言,几种标志物显示出水平略有增加。对于纤维化基因标志物,对胶原蛋白IHC和c011A1基因表达之间差异的一种可能解释是动物的年龄。在mdx中,肢体肌肉严重肌坏死的时期始于3周龄左右,到第8周时恢复到活动性受损程度较低的状态。研究终止时,动物>4月龄,这个年龄超出活动性肢体肌肉变性的窗口,将会产生驱动结缔组织沉积所必需的促炎性、促纤维化信号传导。因此,FS-EEE-mFc的抗纤维化作用在蛋白质水平上表现出来,因为在研究早期阶段最活跃的纤维化基因途径在研究终止时处于静止状态。

[0382] 与四头肌相比,在膈肌中,通过IHC观察到更高的总体基线组织损伤水平(图15A-C,另请参见图15D)。两种剂量的抗MST抗体均显示对CD68或胶原蛋白I染色无影响。对于FS-EEE-mFc,在30mg/kg下观察到CD68巨噬细胞浸润的定性减少,但是胶原蛋白I染色未见显著变化。mRNA分析揭示,与媒介物处理相比,对于30mg/kg剂量的FS-EEE-mFc而言几种炎症和纤维化标志物的转录水平更低。对于骨桥蛋白的spp1而言,观察到最大程度的减少。已显示降低骨桥蛋白水平会减少促炎性巨噬细胞群,有利于促再生性巨噬细胞。与这种模式一致,连同spp1一起,CD68的mRNA在30mg/kg的FS-EEE-mFc剂量下也减少。

[0383] 等同形式和范围

[0384] 本领域的技术人员将认识到,或仅仅使用常规实验就能够确定本文描述的本发明的具体实施方案的许多等同形式。本发明的范围并非旨在限于以上描述,而是如以下权利要求书中所述。

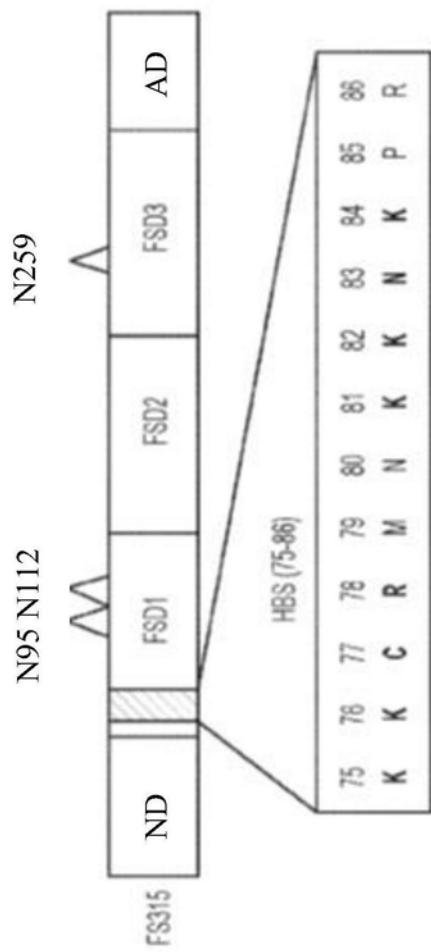


图1

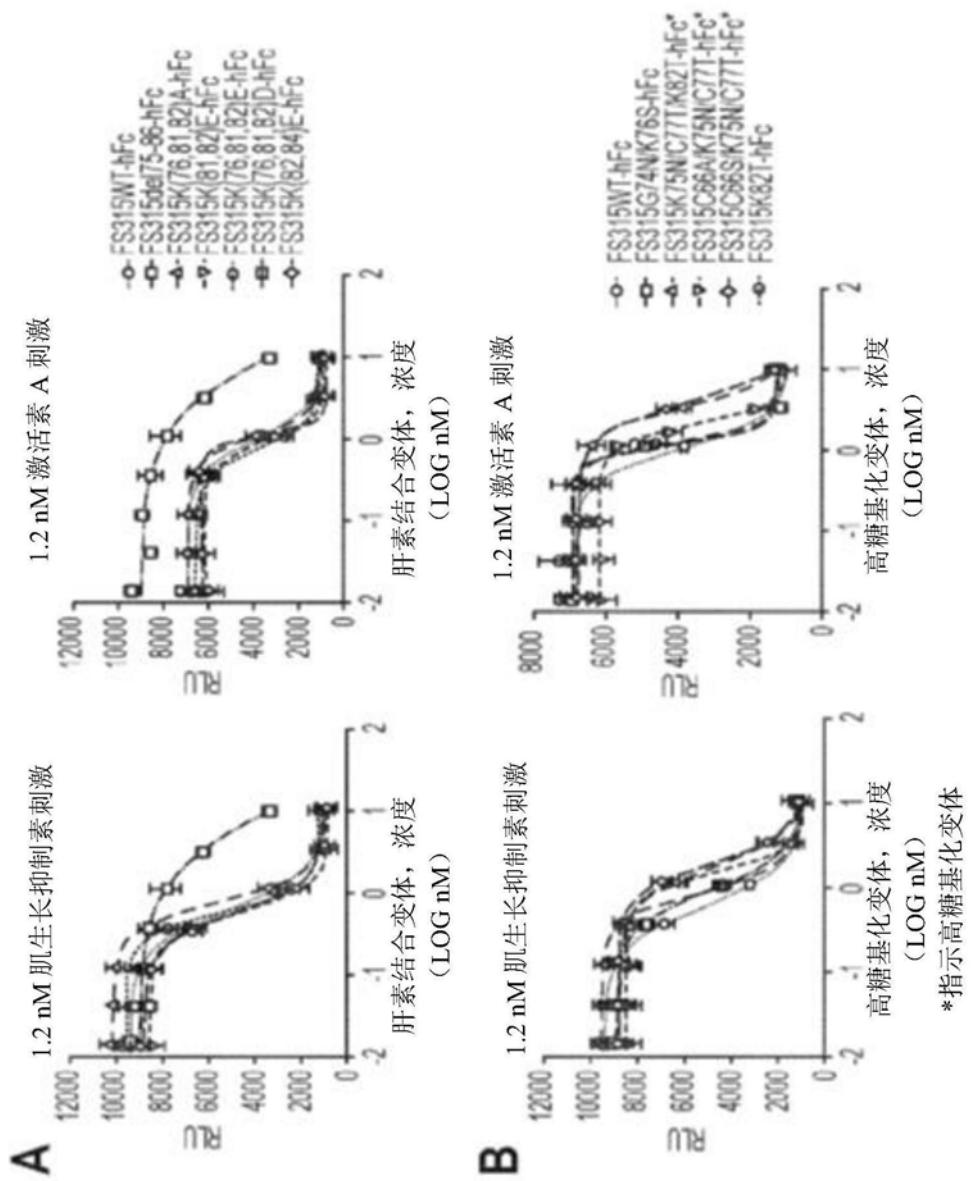


图2

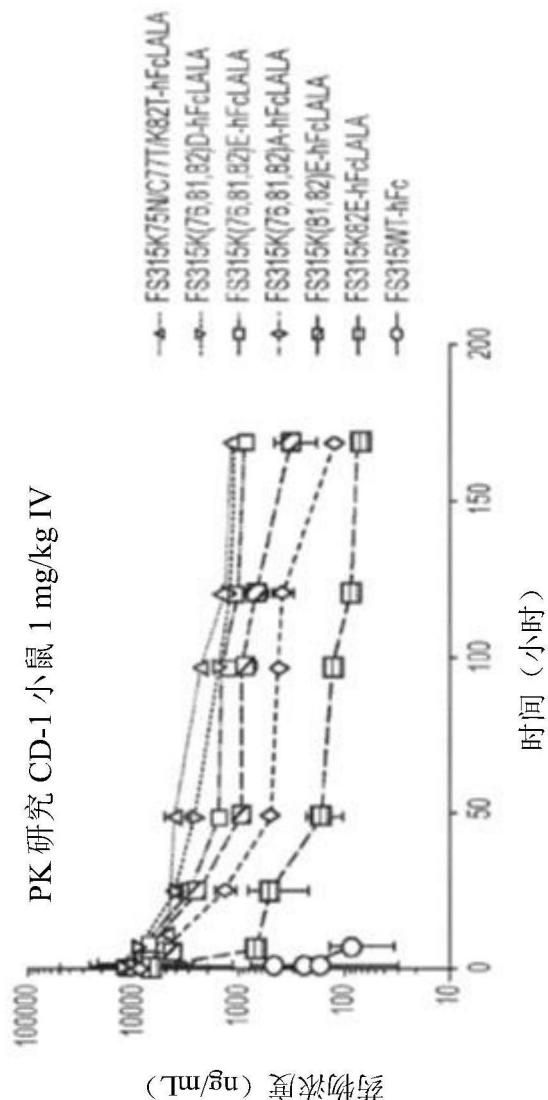


图3A

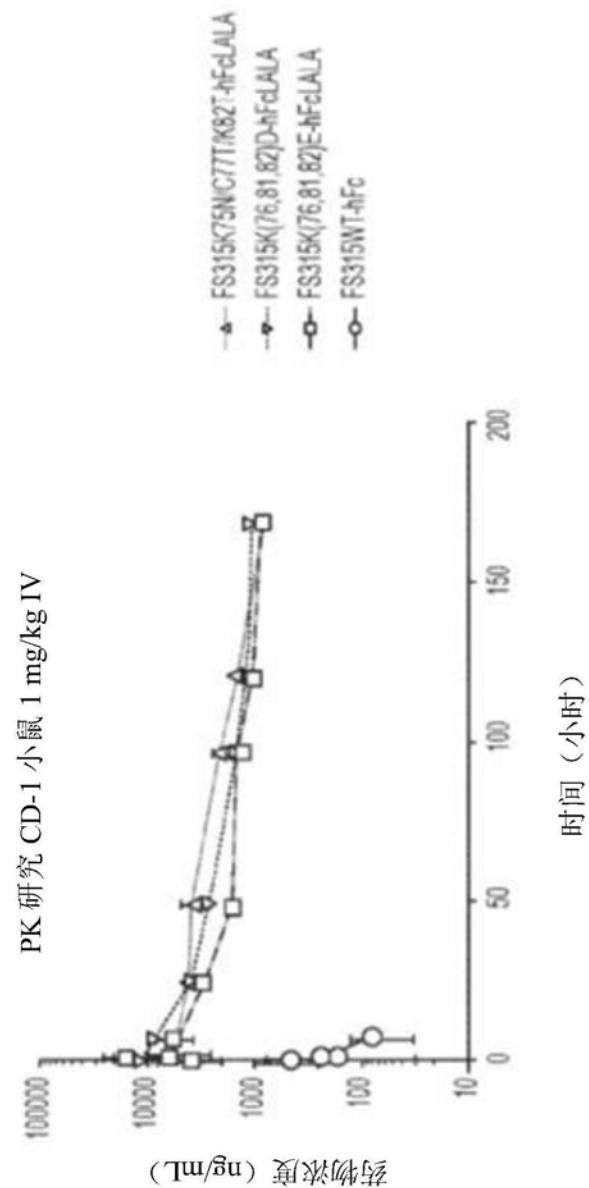


图3B

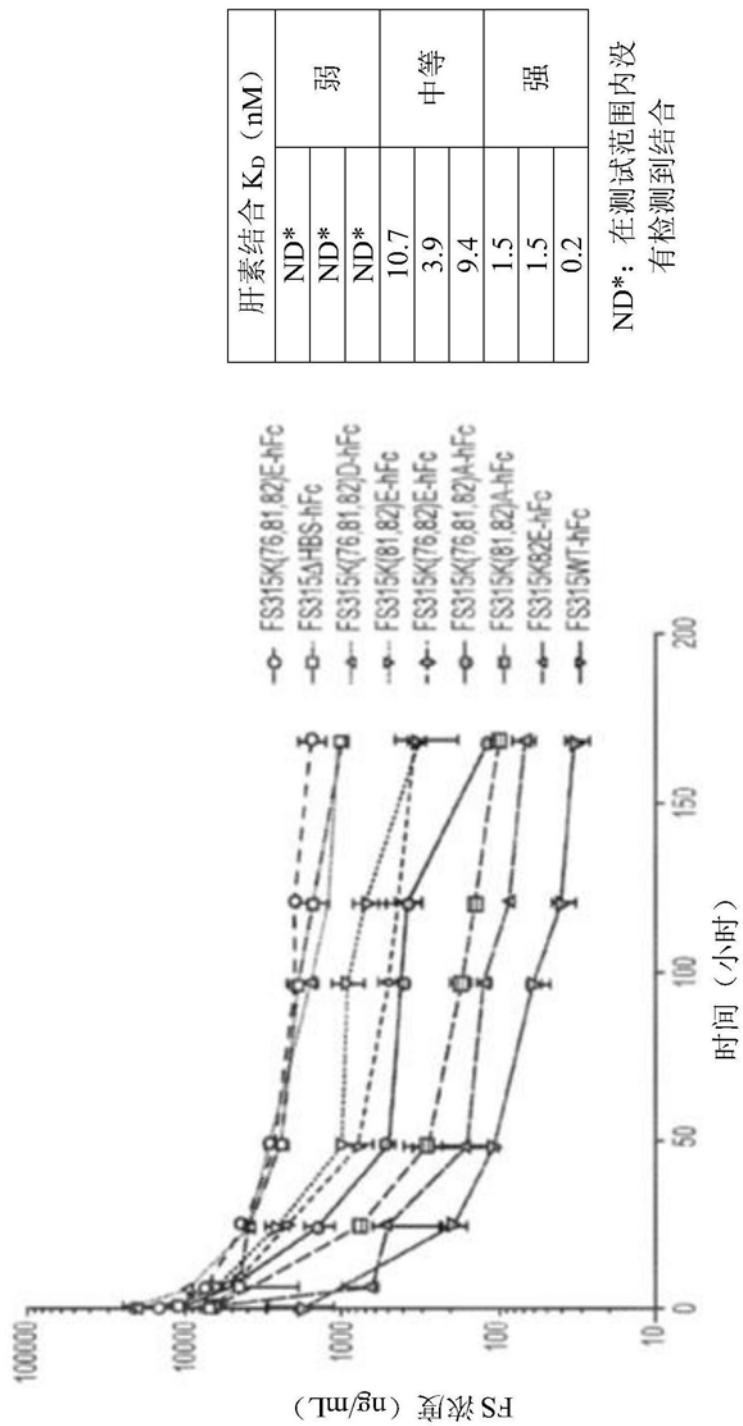


图4A

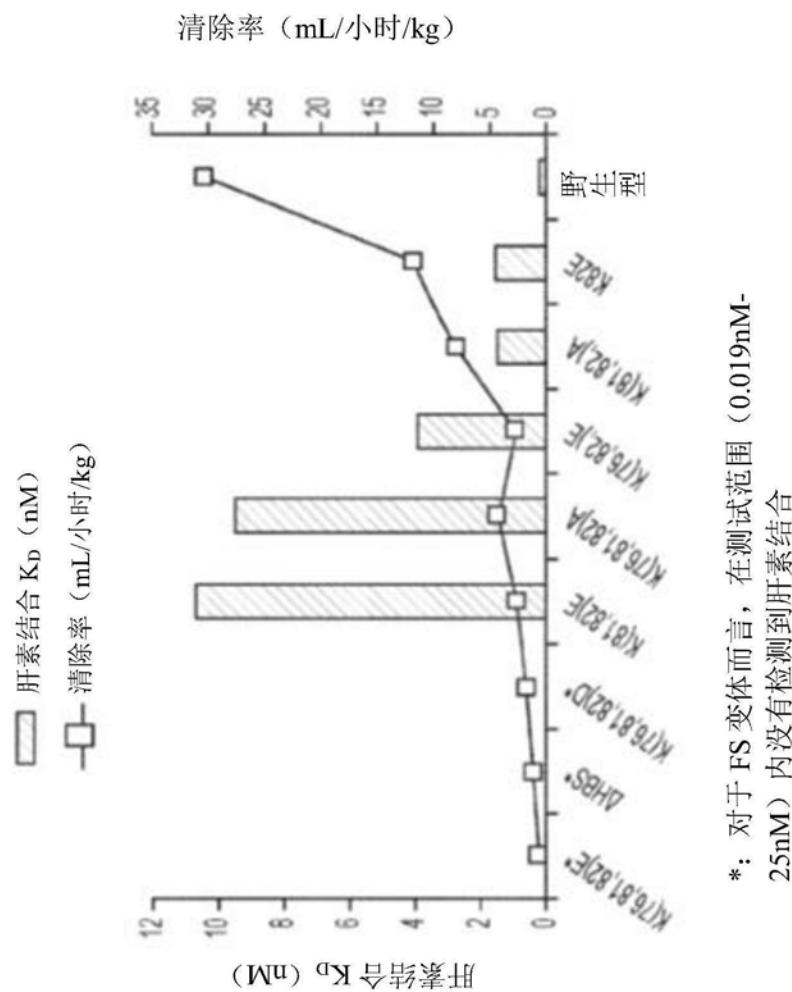


图4B

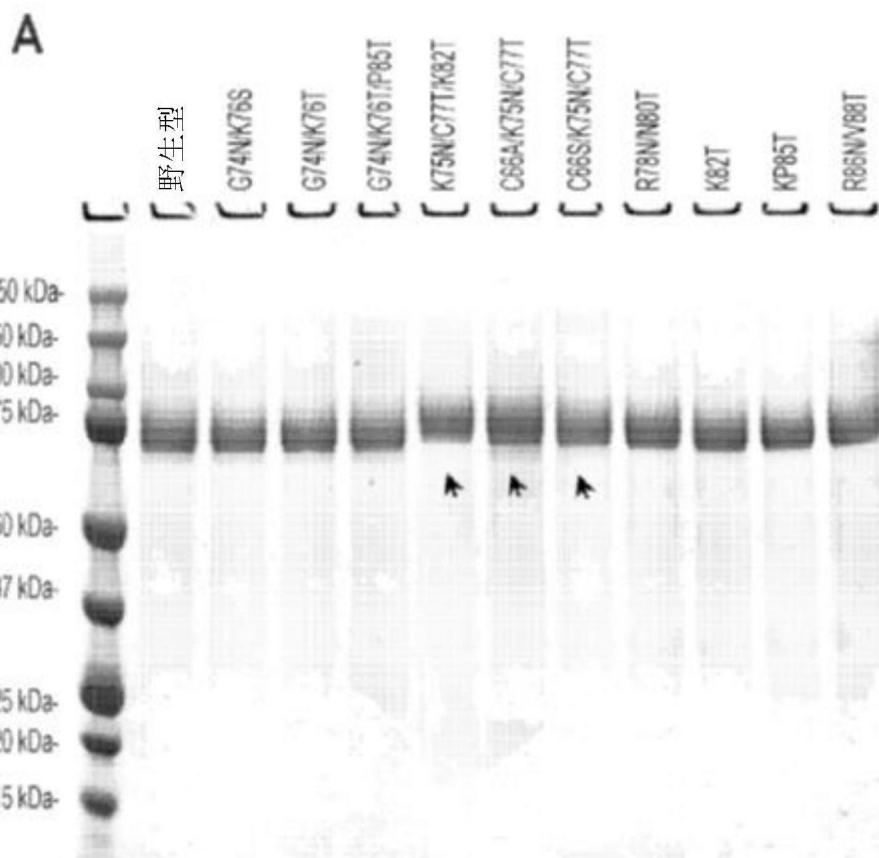


图5A

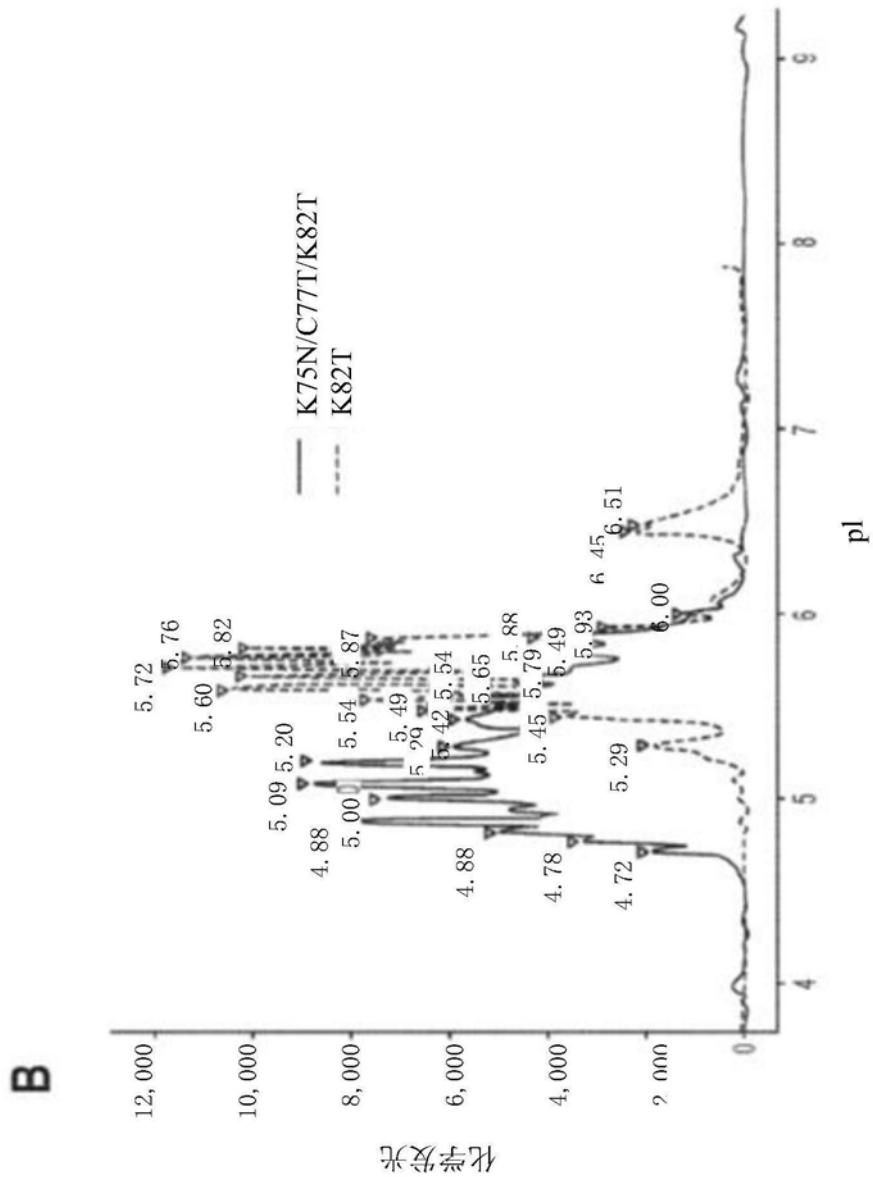


图5B

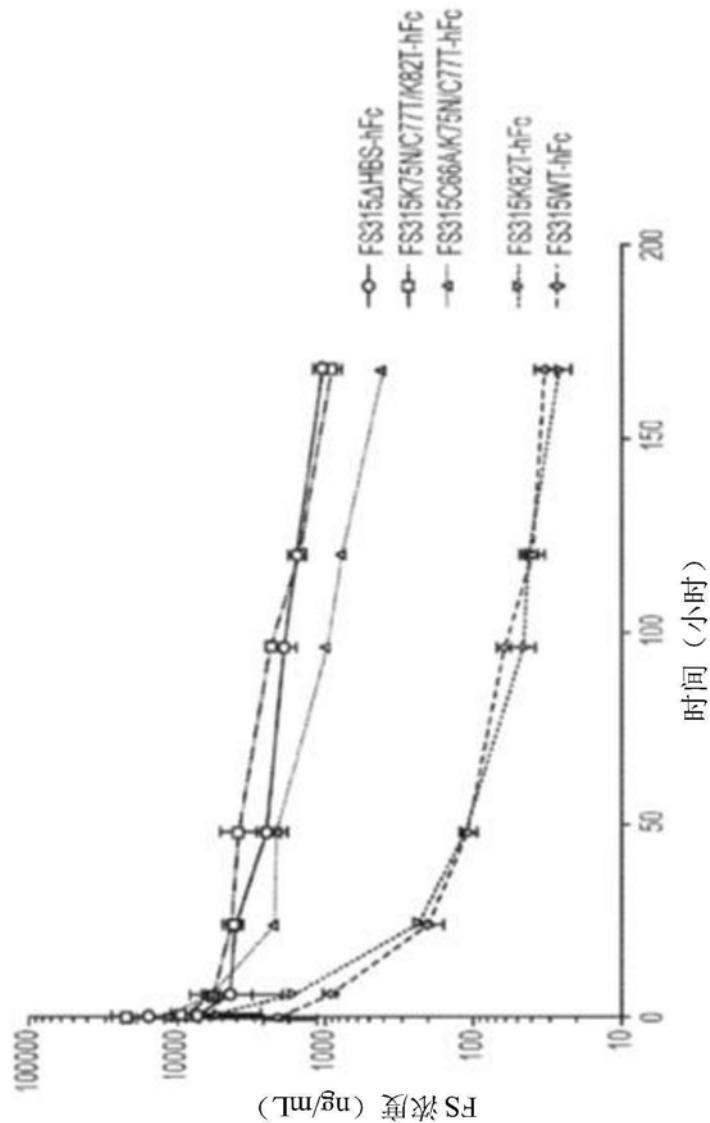


图6

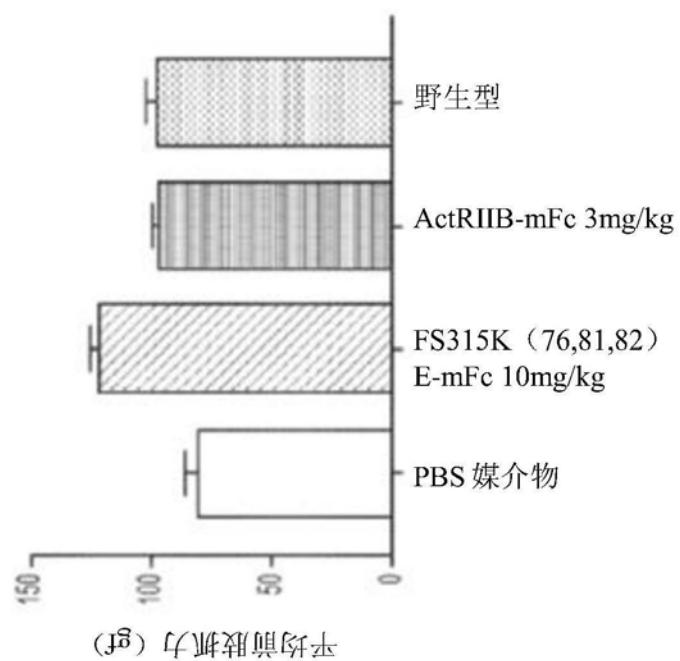


图7

图8A

*: 用于高糖基化的天冬酰胺残基

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| FS315-HFC 变体 | 66 | 67 | 68 | 69 | 70 | 71 | 72 | 73 | 74 | 75 | 76 | 77 | 78 | 79 | 80 | 81 | 82 | 83 | 84 | 85 | 86 | 87 | 88 |
| 野生型 | C | E | N | V | D | C | G | P | G | K | K | C | R | M | N | K | K | N | K | P | R | C | V |
| K62T | C | E | N | V | D | C | G | P | G | K | K | C | R | M | N | K | I | N | K | P | R | C | V |
| P65T | C | E | N | V | D | C | G | P | G | K | K | C | R | M | N | K | I | N | K | P | R | C | V |
| R78NNN80T | C | E | N | V | D | C | G | P | G | K | K | C | R | M | N | K | I | N | K | P | R | C | V |
| R86NNN88T | C | E | N | V | D | C | G | P | G | K | K | C | R | M | N | K | I | N | K | P | R | C | V |
| G74NK76S | C | E | N | V | D | C | G | P | G | N | K | S | C | R | M | N | K | N | K | P | R | C | V |
| G74NK76T | C | E | N | V | D | C | G | P | G | N | K | T | C | R | M | N | K | N | K | P | R | C | V |
| G74NK76TP85T | C | E | N | V | D | C | G | P | G | N | K | T | I | C | R | M | N | K | I | N | K | R | C |
| K75NC77TK82T | C | E | N | V | D | C | G | P | G | N | K | I | R | M | N | K | I | N | K | P | R | C | V |
| C66AK75NC77T | A | E | N | V | D | C | G | P | G | N | K | I | R | M | N | K | I | N | K | P | R | C | V |
| C66SK75NC77T | S | E | N | V | D | C | G | P | G | N | K | I | R | M | N | K | I | N | K | P | R | C | V |

图8B

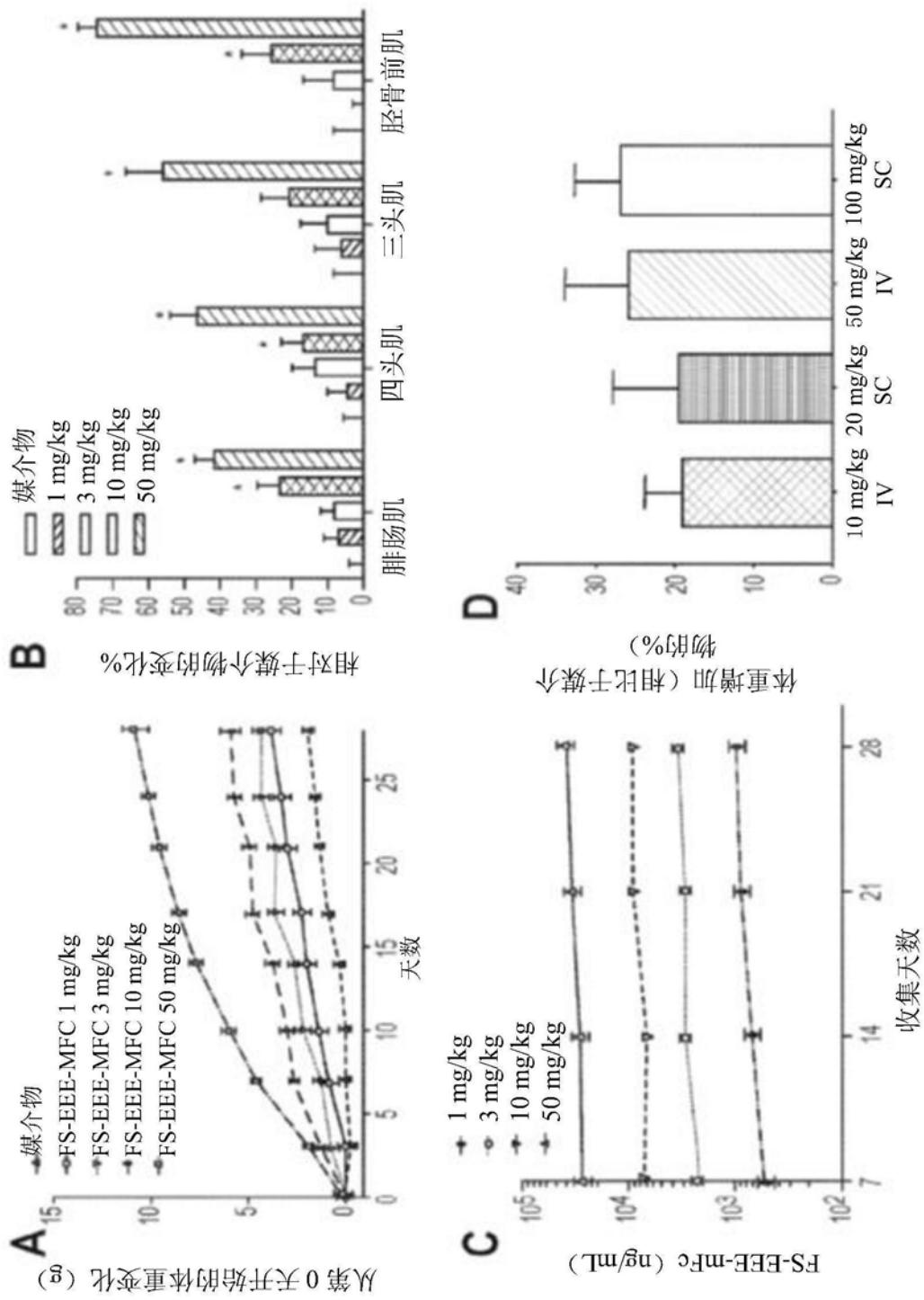


图9

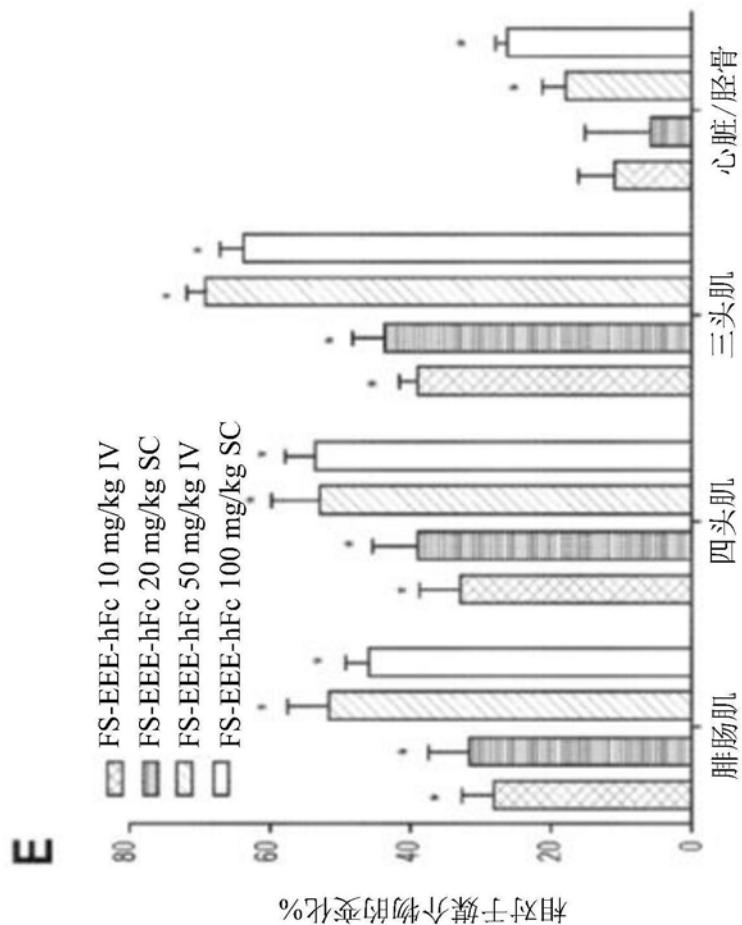
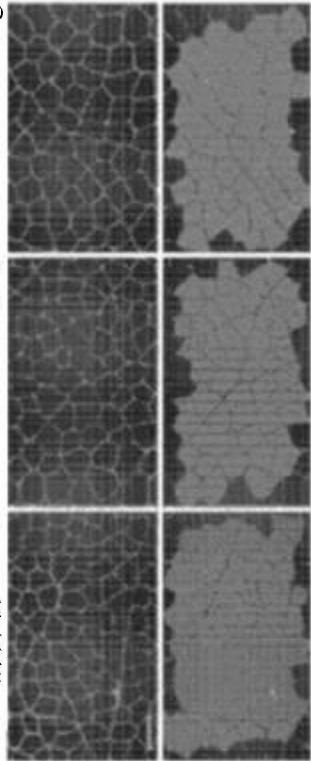


图9(续)

媒介物 FS-EEE-hFc 10 mg/kg FS-EEE-hFc 50 mg/kg



F

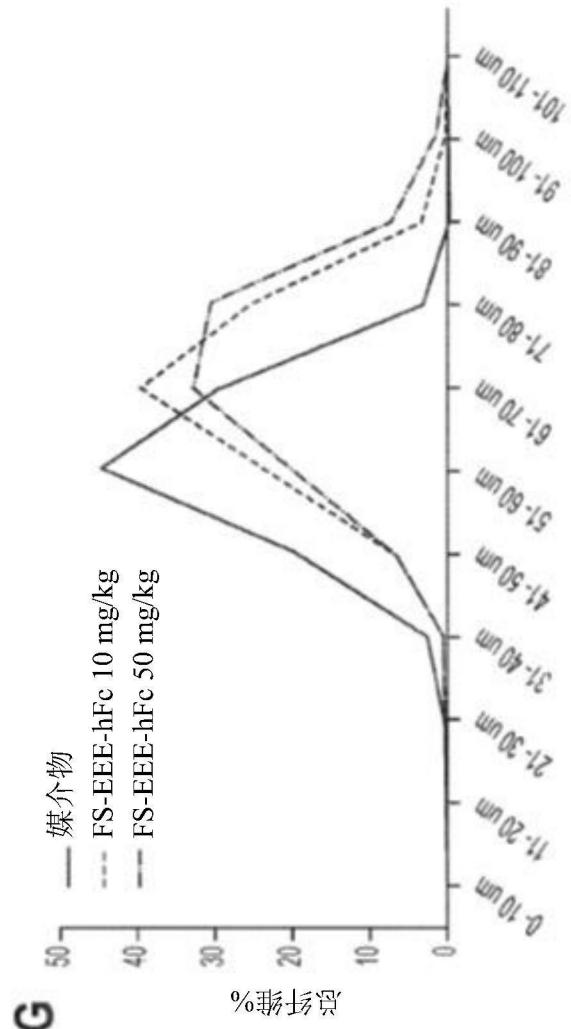


图9 (续)

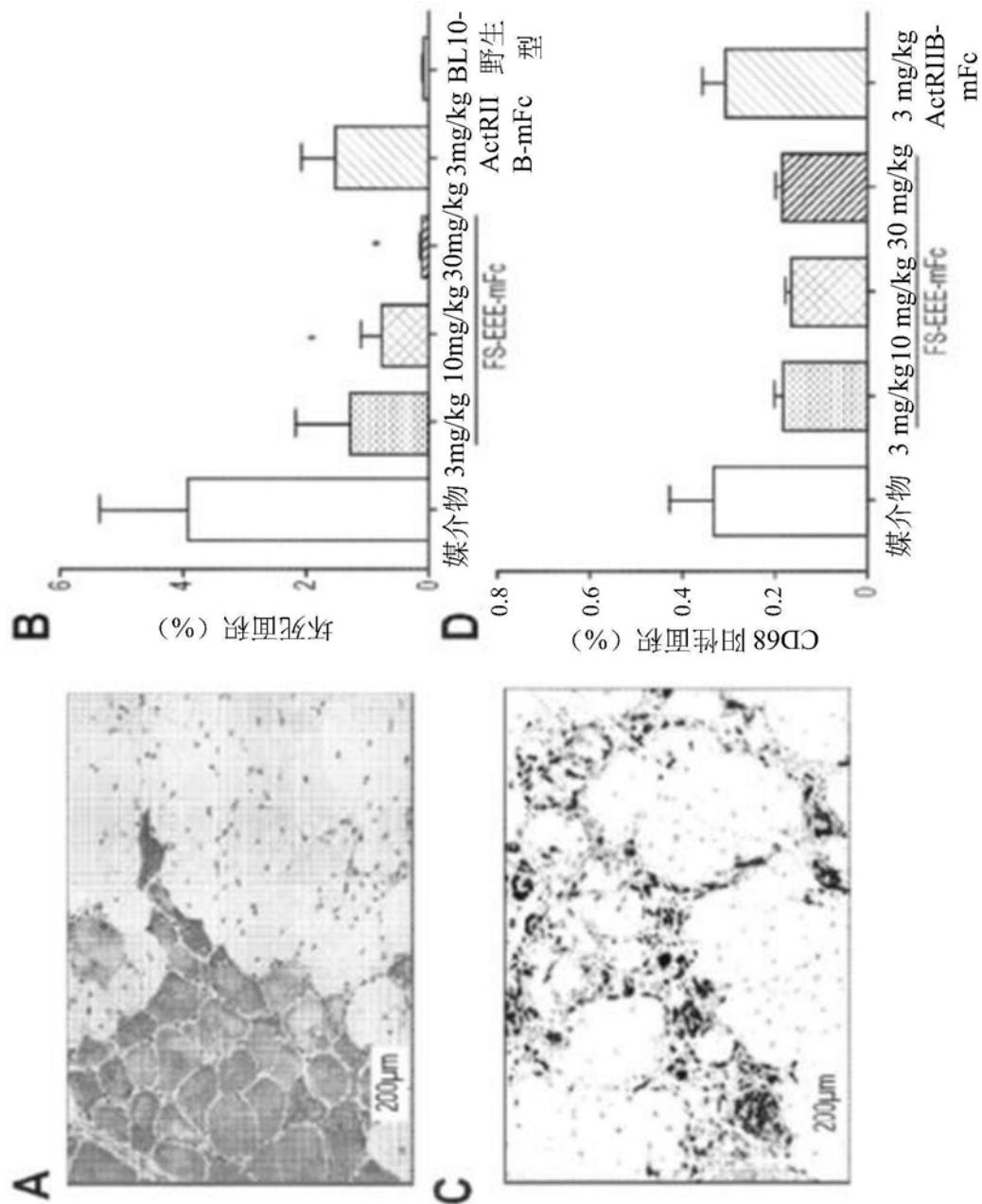


图10

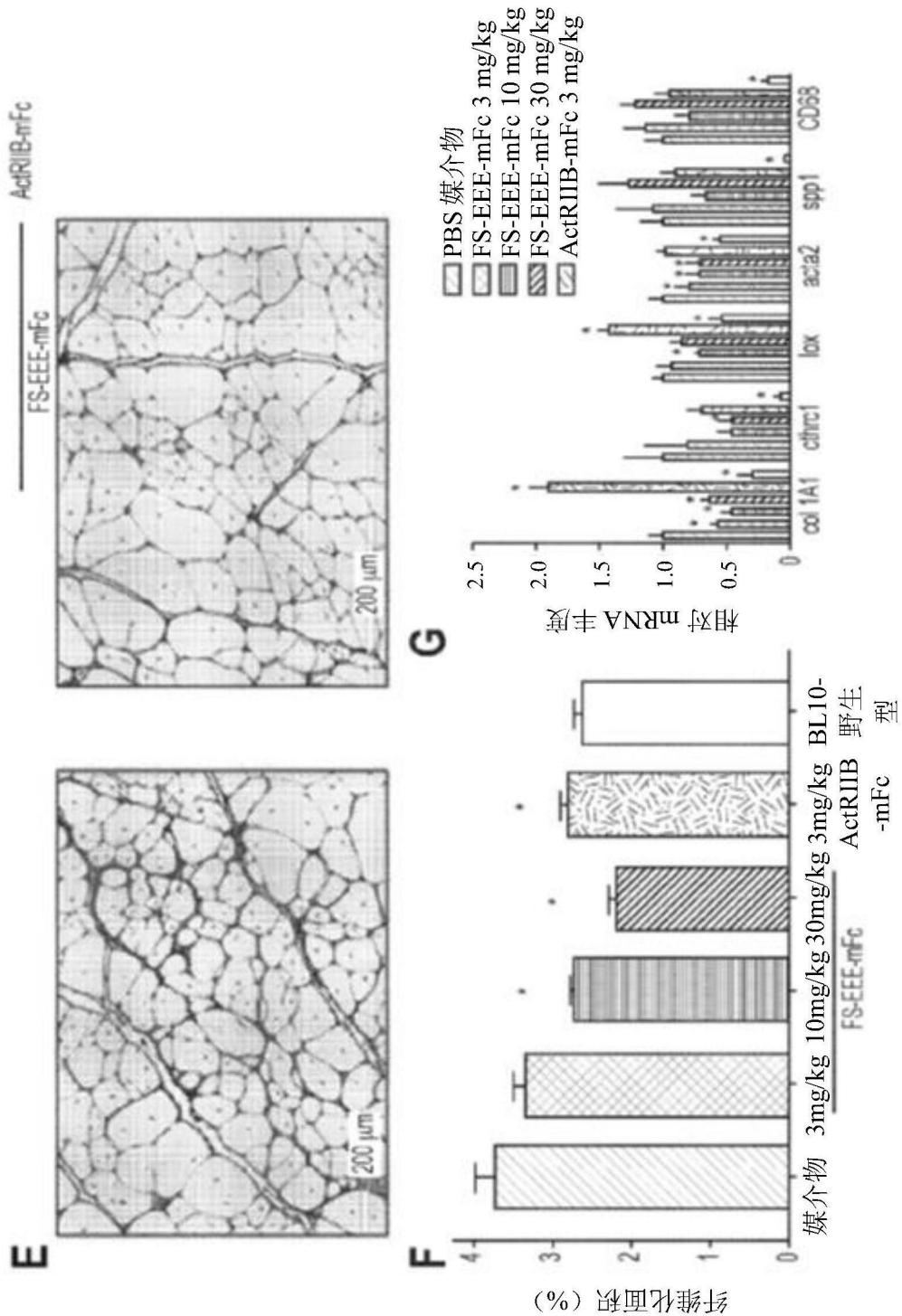


图10(续)

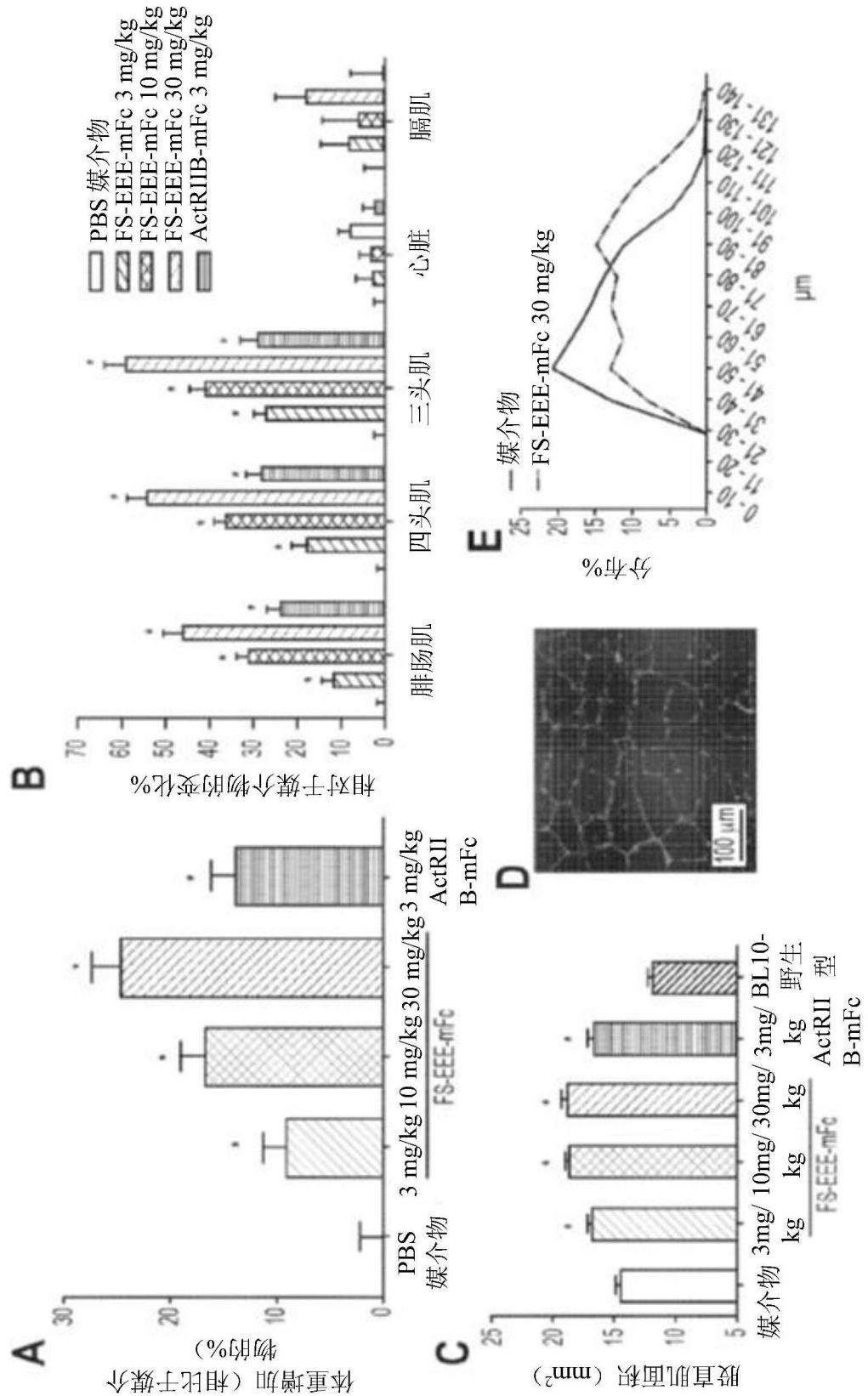


图11

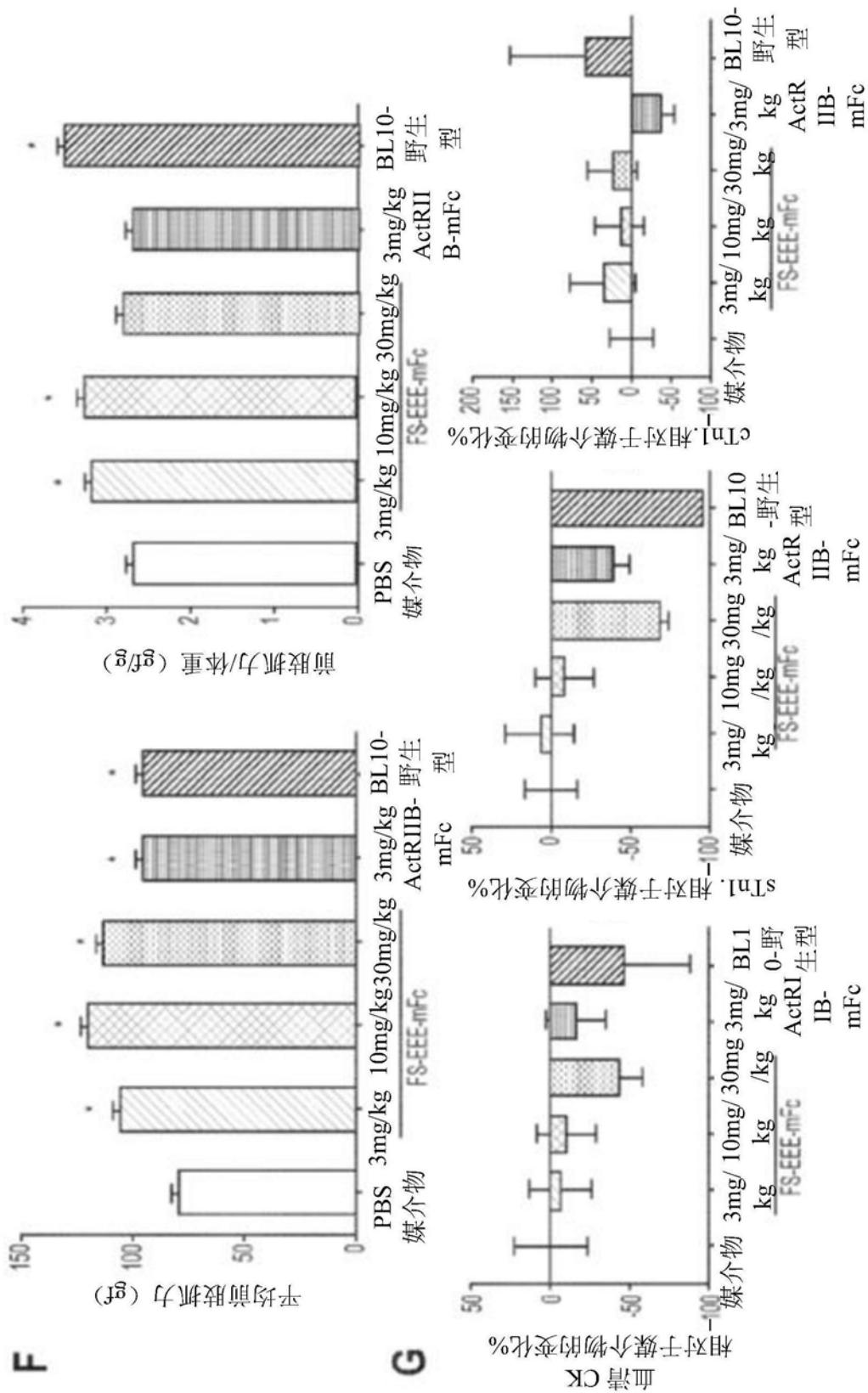


图11(续)

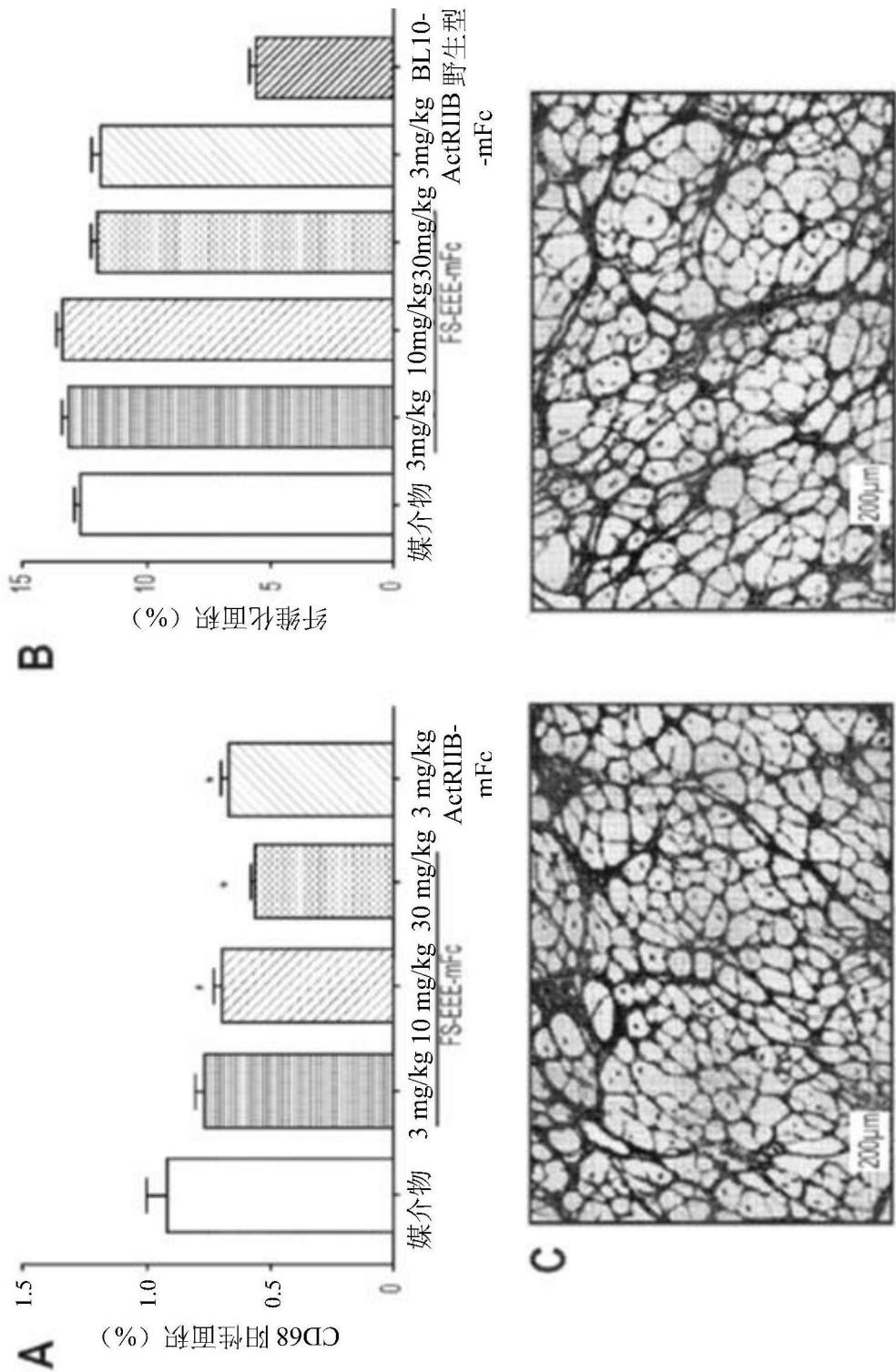


图12

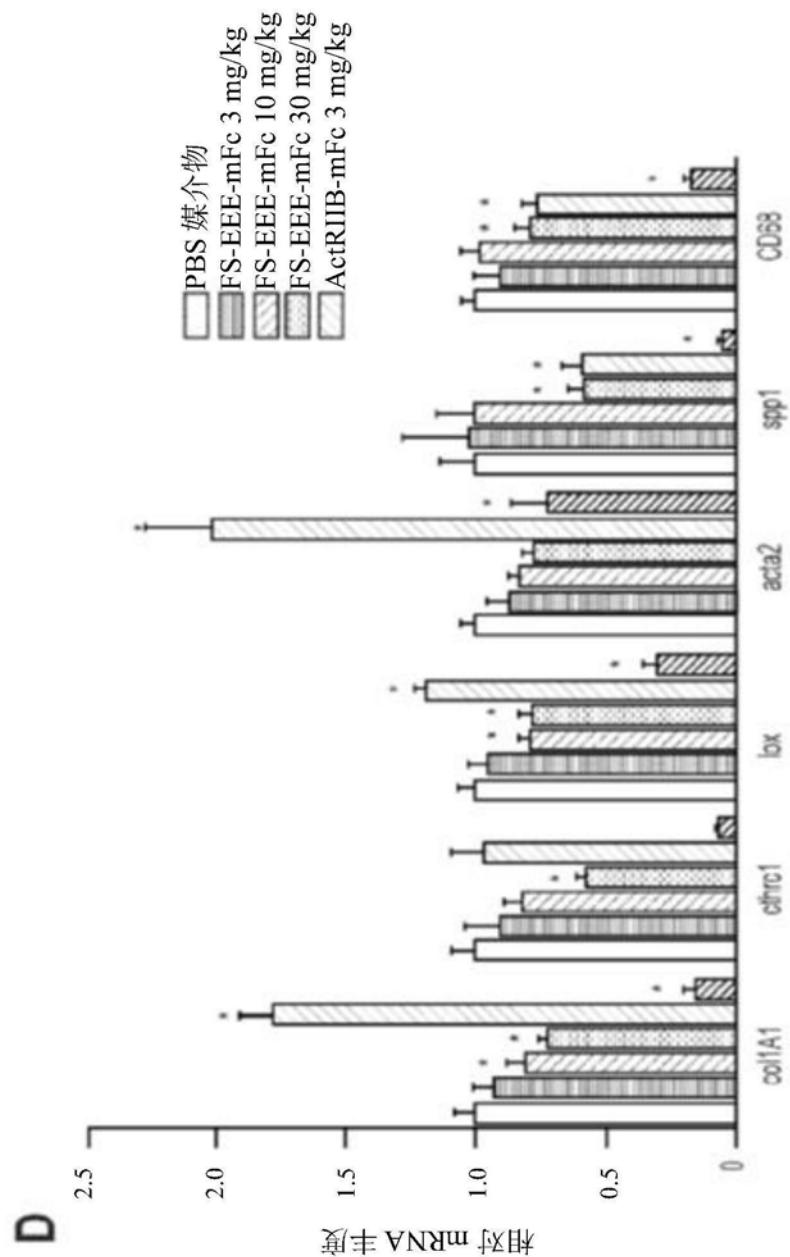


图12(续)

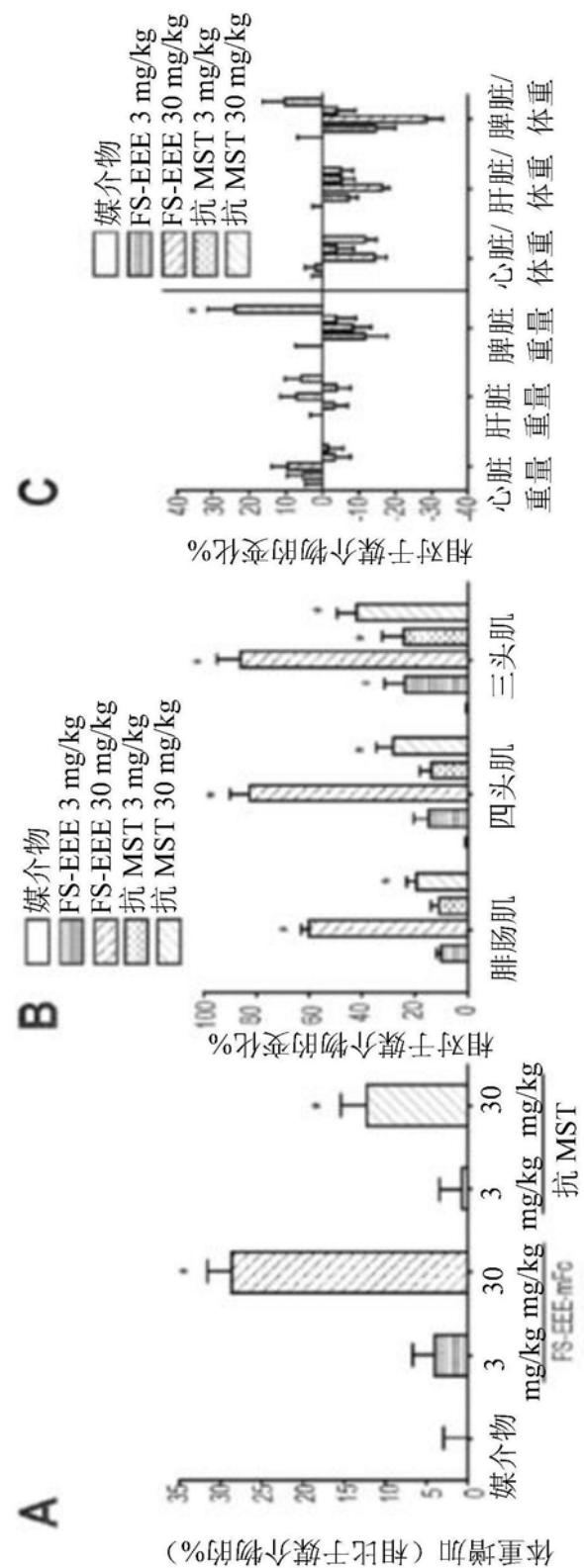


图13

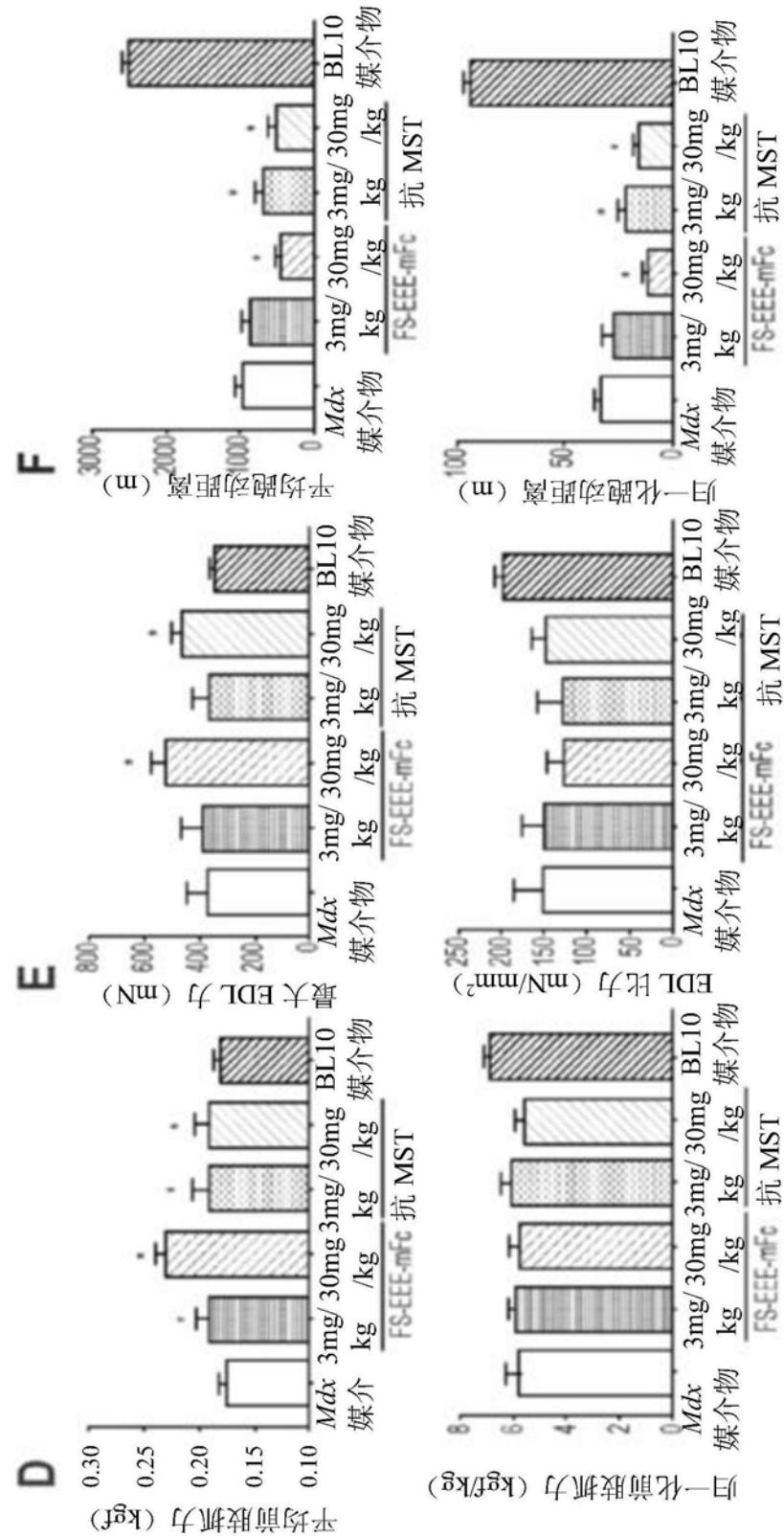


图13 (续)

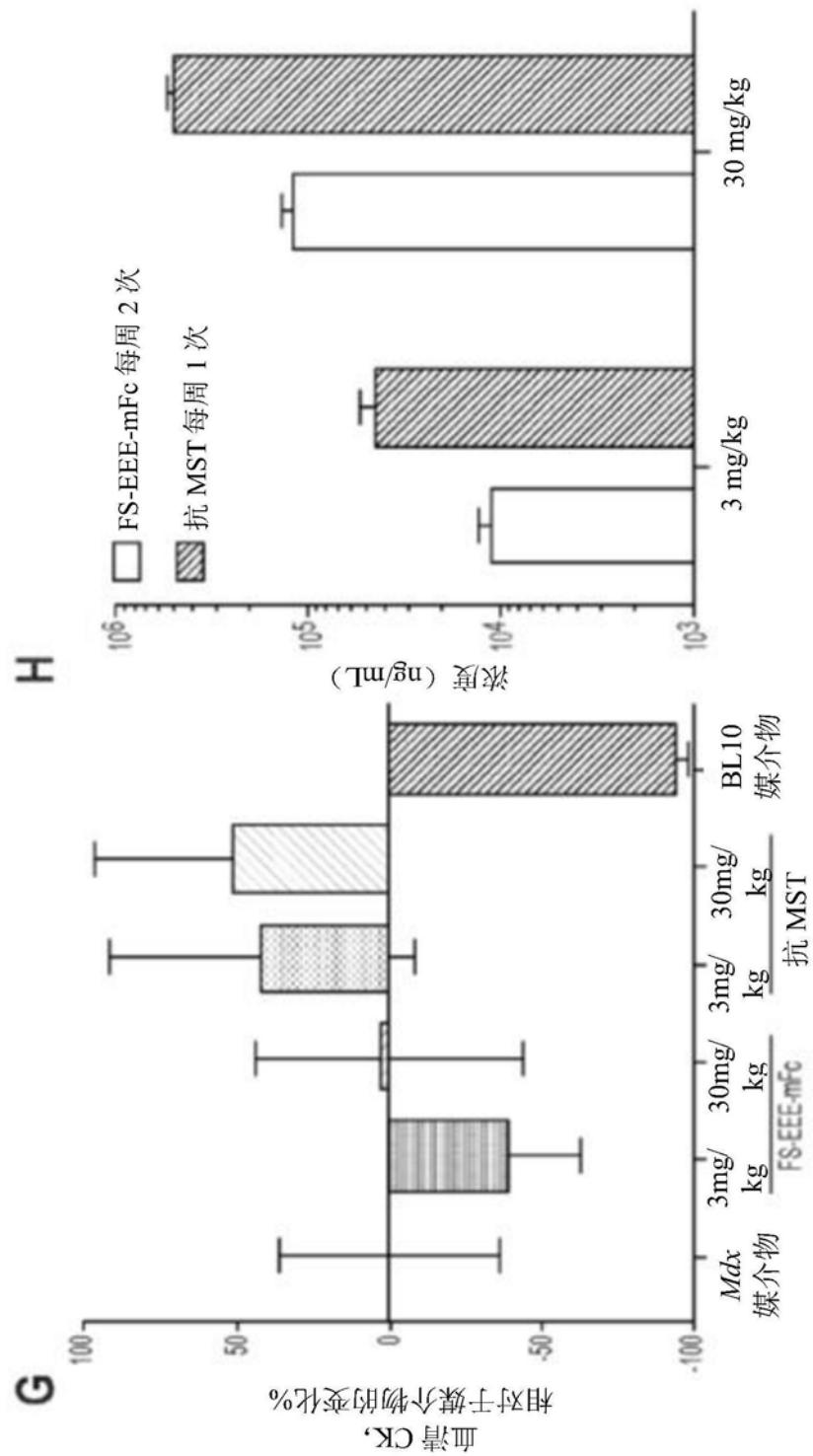


图13(续)

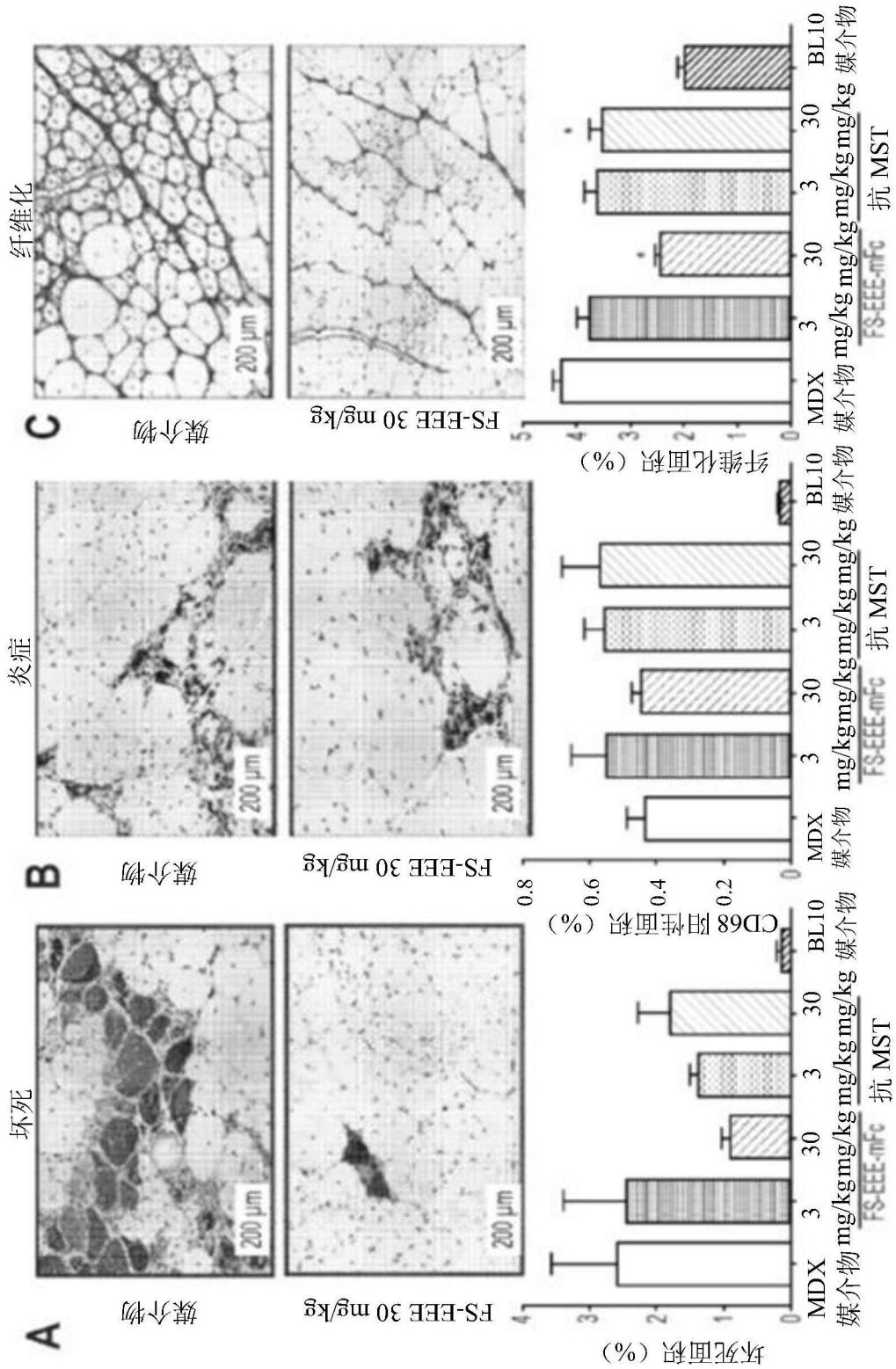


图14

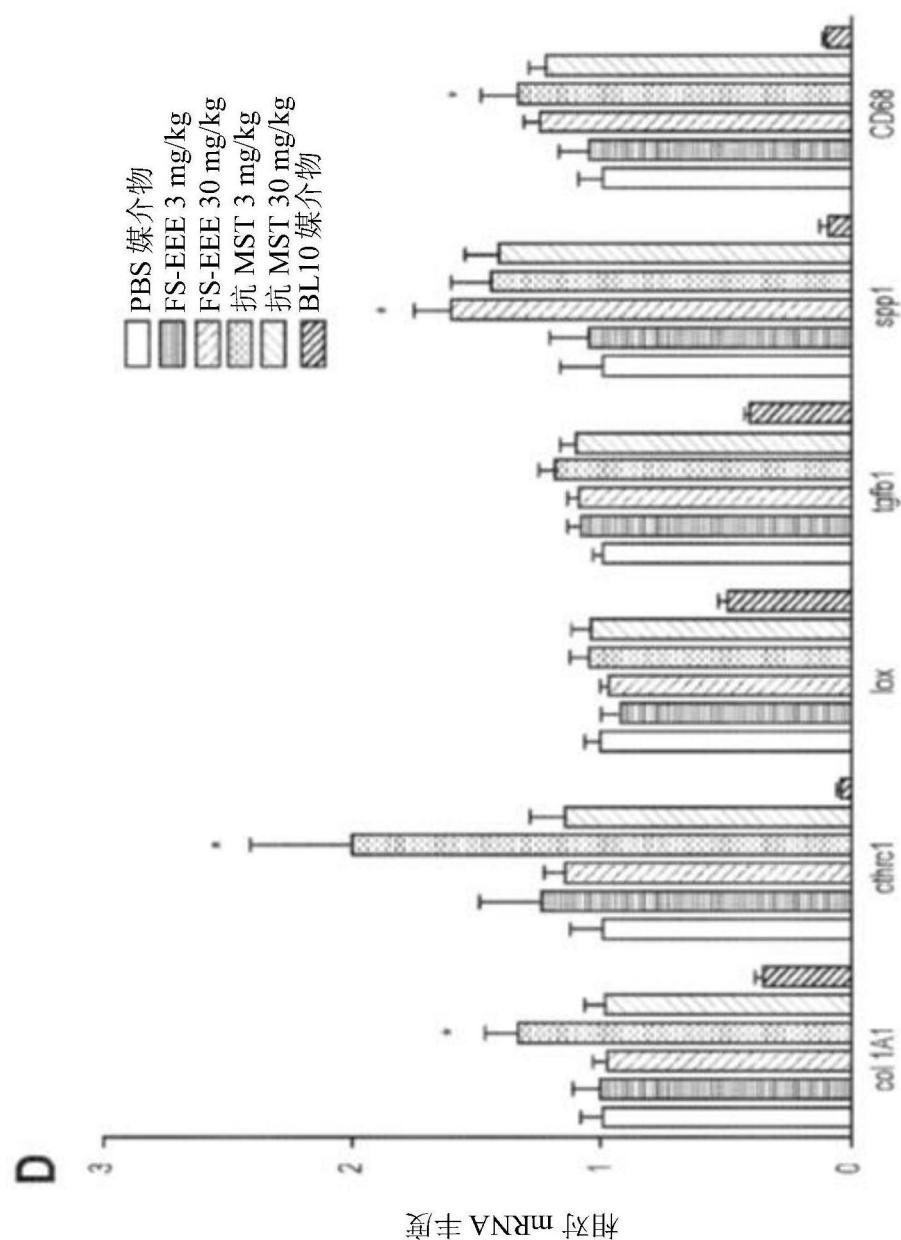


图14(续)

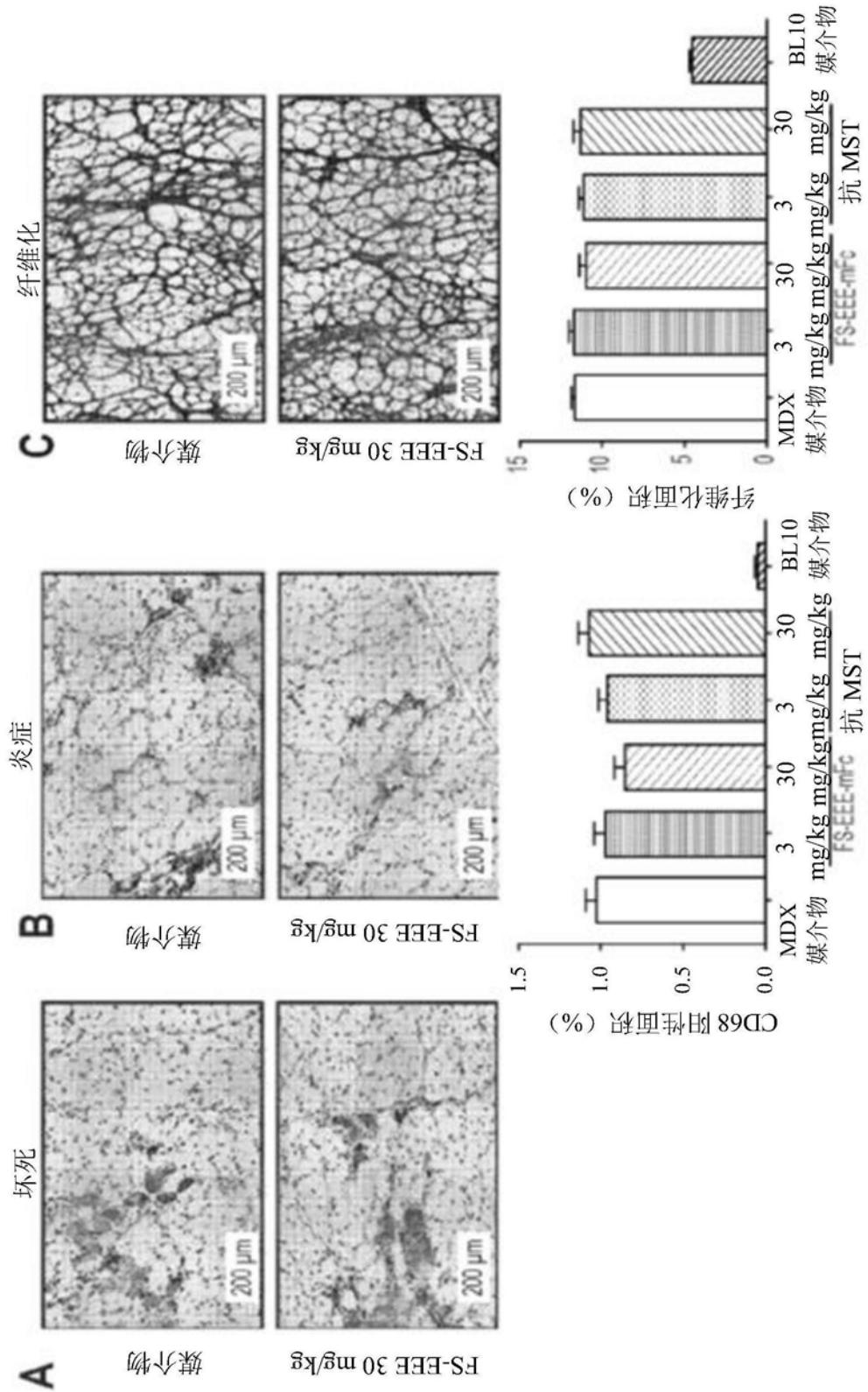


图15

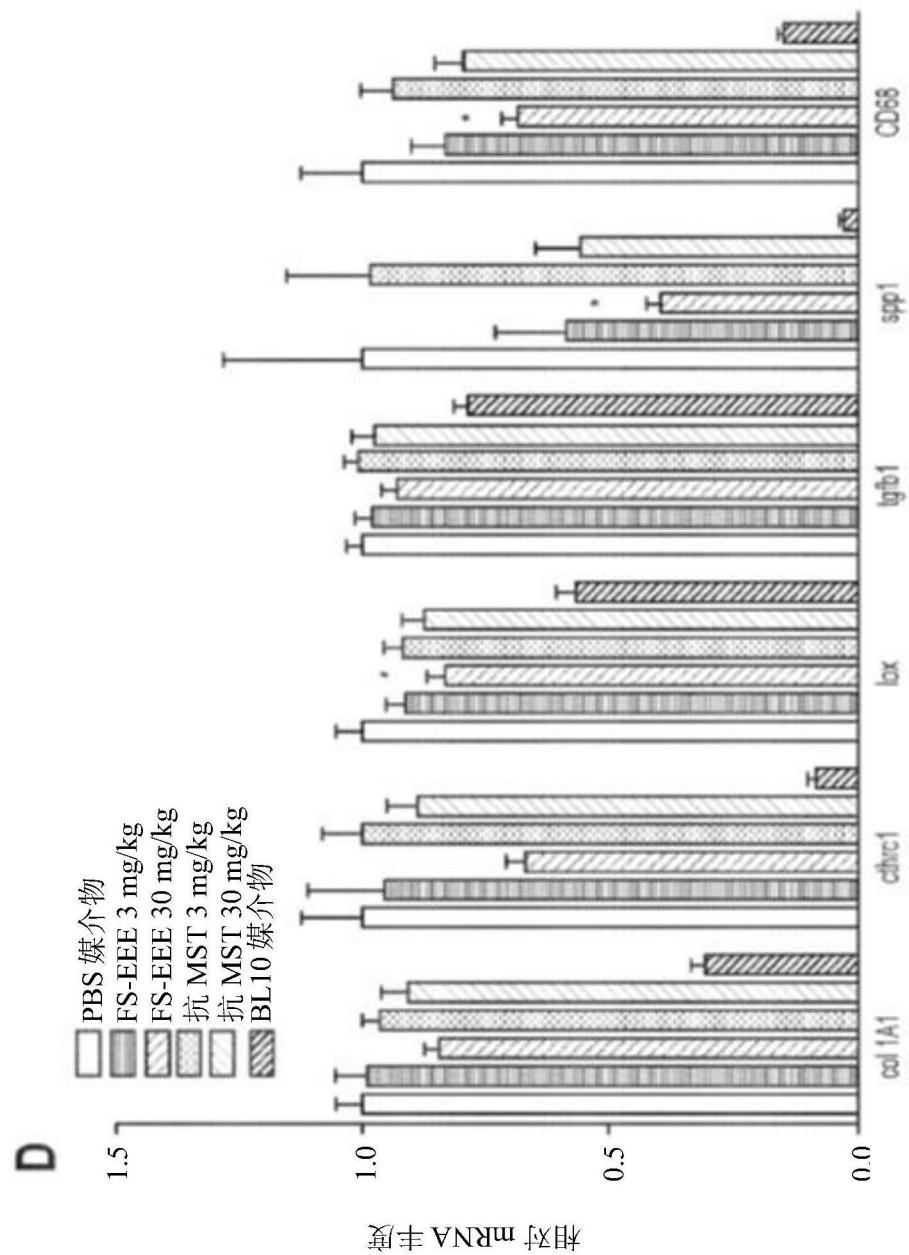


图15(续)