(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 114599385 A
(43)申请公布日 2022.06.07

(21)申请号 202080054569.X
(22)申请日 2020.06.08
(30)优先权数据
62/858,479 2019.06.07 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2022.01.27
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2020/036662 2020.06.08
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2020/247936 EN 2020.12.10
(71)申请人 总医院公司
地址 美国马萨诸塞州
申请人 儿童医学中心公司
(72)发明人 斯蒂芬妮·贝丝·塞米纳拉
陈怡明
玛格丽特·弗林·利平科特
(74)专利代理机构 北京林达刘知识产权代理事务所(普通合伙) 11277
专利代理师 刘新宇 李茂家
(51)Int.Cl.
A61K 38/17(2006.01)
A61K 38/08(2019.01)
A61K 45/06(2006.01)
A61P 5/24(2006.01)
A61P 5/22(2006.01)
A61P 5/00(2006.01)
A61K 31/485(2006.01)

权利要求书2页 说明书33页 附图20页

(54)发明名称

预测和治疗青春期延迟的亲吻肽

(57)摘要

使用亲吻肽和亲吻肽类似物的诊断和治疗病理性低促性腺激素性性腺功能减退症和生殖内分泌功能障碍的方法。

CN 114599385 A

1.一种治疗患有生殖内分泌功能障碍、任选地病理性低促性腺激素性低性腺促素症的受试者的方法，所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的(i)多剂量的亲吻肽或亲吻肽类似物，和/或(ii)阿片类拮抗剂或混合的激动剂-拮抗剂。

2.根据权利要求1所述的方法，其中所述多剂量在至少2-3天和优选地在至少1-12个月，以1-6小时间隔、优选地以2小时间隔施用。

3.根据权利要求1所述的方法，其中所述多剂量的每一剂量包括相当于0.08-2.4nmol/kg亲吻肽-10的剂量，通过静脉团注(IVB)施用。

4.根据权利要求3所述的方法，其中所述多剂量的每一剂量包括相当于0.2-0.3nmol/kg亲吻肽-10、优选地0.24nmol/kg亲吻肽-10的剂量。

5.根据权利要求1所述的方法，其中所述多剂量包括相当于2.4-24nmol/kg亲吻肽-10的至少一个超生理剂量。

6.根据权利要求5所述的方法，其中所述至少一个超生理剂量作为所述多剂量中的第一剂量、或前两个或更多个剂量、任选地所有剂量施用。

7.根据权利要求1所述的方法，其还包括向所述受试者施用治疗有效量的阿片类拮抗剂或混合的激动剂-拮抗剂。

8.根据权利要求7所述的方法，其中所述阿片类拮抗剂为纳洛酮或纳曲酮或所述混合的激动剂-拮抗剂为叔丁啡。

9.一种鉴定患有病理性低促性腺激素性低性腺促素症、处于病理性低促性腺激素性性腺功能减退症的风险、或患有弱化形式的病理性低促性腺激素性性腺功能减退症的受试者的方法，所述方法包括：

测定所述受试者中的LH基线水平；

向所述受试者施用刺激剂量的亲吻肽或亲吻肽类似物，所述刺激剂量例如包括0.08-15nmol/kg亲吻肽-10的剂量，通过静脉团注(IVB)施用，或包括0.8-500nmol/kg亲吻肽-10的剂量，通过皮下(SC)注射施用；

测定施用所述刺激剂量后的至少一个LH水平，例如在施用所述刺激剂量后约10、15、20、30、45、或60分钟内；

将所述受试者中的LH基线水平与施用所述刺激剂量后的LH水平相比较，和

将施用所述刺激剂量后的LH水平与LH基线水平没有显著差异的青春期延迟的受试者鉴定为患有病理性低促性腺激素性低性腺促素症。

10.根据权利要求9所述的方法，其还包括向所鉴定出的受试者施用用于病理性低促性腺激素性低性腺促素症的治疗。

11.根据权利要求10所述的方法，其中所述治疗包括施用多剂量的亲吻肽或亲吻肽类似物。

12.根据权利要求11所述的方法，其中所述多剂量在至少2-3天和优选地在至少1-12个月，以1-6小时间隔、优选地以2小时间隔施用。

13.根据权利要求11所述的方法，其中所述多剂量的每一剂量包括相当于0.08-2.4nmol/kg亲吻肽-10的剂量，通过静脉团注(IVB)施用。

14.根据权利要求13所述的方法，其中所述多剂量的每一剂量包括相当于0.2-0.3nmol/kg亲吻肽-10、优选地0.24nmol/kg亲吻肽-10的剂量。

15.根据权利要求11所述的方法，其中所述多剂量包括相当于2.4-24nmol/kg亲吻肽-10的至少一个超生理剂量。

16.根据权利要求15所述的方法，其中所述至少一个超生理剂量作为所述多剂量中的第一剂量、或前两个或更多个剂量、任选地所有剂量施用。

17.根据权利要求10所述的方法，其还包括向所述受试者施用治疗有效量的阿片类拮抗剂或混合的激动剂-拮抗剂。

18.根据权利要求17所述的方法，其中所述阿片类拮抗剂为纳洛酮或纳曲酮或所述混合的激动剂-拮抗剂为叔丁啡。

19.根据权利要求1或10所述的方法，其中所述治疗还包括施用性腺类固醇替代疗法。

20.根据权利要求19所述的方法，其中所述性腺类固醇替代疗法包括在男性中施用睾酮和在女性中施用雌激素和/或孕酮/黄体酮。

21.根据权利要求1或10所述的方法，其还包括施用一种或多种促性腺激素。

22.一种组合物，其包含(i)亲吻肽或亲吻肽类似物和/或(ii)阿片类拮抗剂或混合的激动剂-拮抗剂，用于治疗患有病理性低促性腺激素性低性腺促素症的受试者的方法中的用途，所述方法包括施用多剂量的亲吻肽或亲吻肽类似物。

23.根据权利要求22所述的组合物，其中所述多剂量在至少2-3天和优选地在至少1-12个月，以1-6小时间隔、优选地以2小时间隔施用。

24.根据权利要求22所述的组合物，其中所述多剂量的每一剂量包括相当于0.08-2.4nmol/kg亲吻肽-10的剂量，通过静脉团注(IVB)施用。

25.根据权利要求24所述的组合物，其中所述多剂量的每一剂量包括相当于0.2-0.3nmol/kg亲吻肽-10、优选地0.24nmol/kg亲吻肽-10的剂量。

26.根据权利要求22所述的组合物，其中所述多剂量包括相当于2.4-24nmol/kg亲吻肽-10的至少一个超生理剂量。

27.根据权利要求26所述的组合物，其中所述至少一个超生理剂量作为所述多剂量中的第一剂量、或前两个或更多个剂量、任选地所有剂量施用。

28.根据权利要求22所述的组合物，其还包括向所述受试者施用治疗有效量的阿片类拮抗剂或混合的激动剂-拮抗剂。

29.根据权利要求22所述的组合物，其中所述阿片类拮抗剂为纳洛酮或纳曲酮或所述混合的激动剂-拮抗剂为叔丁啡。

30.根据权利要求22所述的组合物，其中所述治疗还包括施用性腺类固醇替代疗法。

31.根据权利要求30所述的组合物，其中所述性腺类固醇替代疗法包括在男性中施用睾酮和在女性中施用雌激素和/或孕酮/黄体酮。

32.根据权利要求22所述的组合物，其中所述方法还包括施用一种或多种促性腺激素。

预测和治疗青春期延迟的亲吻肽

[0001] 优先权声明

[0002] 本申请要求2019年6月7日提交的美国临时申请系列号62/858,479的权益。前述文献的完整内容通过引用结合在此。

[0003] 联邦资助的研究或开发

[0004] 本发明借助美国政府支持、在美国国立卫生研究院(National Institutes of Health)授予的授权号HD043341和美国食品和药物管理局(Food and Drug Administration)授予的FD005712下做出。美国政府享有本发明的一定的权利。

技术领域

[0005] 本文描述了使用亲吻肽诊断和治疗青春期延迟的方法。

背景技术

[0006] 特发性低促性腺激素性性腺功能减退症(Idiopathic hypogonadotropic hypogonadism,IHH)是一种起因于下丘脑中缺少GnRH神经元或它们的调节神经回路的罕见病症。它导致黄体生成素(LH)和促卵泡激素(FSH)的缺陷分泌并且到18岁也无法实现正常的生殖功能。当伴随有嗅觉丧失时,IHH称为卡尔曼综合征(Kallmann Syndrome,KS)。未经治疗,患者保持性幼稚(sexually infantile)。

[0007] 表现青春期延迟的儿童给临床医生来带棘手的挑战,这是因为难以预测哪些儿童最终会青春期进展(progress through puberty)而哪些儿童不会(1,2)。可容易地识别青春期延迟的一些原因,例如原发性性腺功能不全(primary gonadal insufficiency)、下丘脑/垂体区的解剖学损伤、和功能性低促性腺激素性性腺功能减退症(functional hypogonadotropic hypogonadism)(即,由慢性疾病、压力、或能量负平衡导致的生殖内分泌轴(reproductive endocrine axis)的生理学抑制)。然而,这些病况仅导致就诊于儿科内分泌护理的女孩的36-47%和男孩的11-29%的青春期延迟(3-5)。对于青春期延迟的大部分女孩和男孩,留给医师两种具有显著不同的结果的可能的诊断:体质性延迟(constitutional delay)和IHH(1)。体质性延迟是其中青春期开始的晚(或开始然后暂时停滞)但最终开始并发展以达到完全的成年生殖内分泌功能的自限性病况(6)。相反地,IHH是需要治疗的病理学病症(7)。目前,没有可将体质性延迟与IHH区分开的可靠的方法。

发明内容

[0008] 本文提供治疗患有生殖内分泌功能障碍、任选地病理性低促性腺激素性低性腺促素症(pathologic hypogonadotropic hypogonadotropism)的受试者的方法。所述方法包括向受试者施用治疗有效量的(i)多剂量(例如,至少2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多,例如2、3、4、5、或6/天)的亲吻肽或亲吻肽类似物和/或(ii)阿片类拮抗剂(opioid antagonist)或混合的激动剂-拮抗剂。本文还提供包含(i)亲吻肽或亲吻肽类似物和/或(ii)阿片类拮抗剂或混合的激动剂-拮抗剂的组合物,其用于治疗患有病理性低促性腺激素性低性腺促素

症的受试者的方法中的用途，所述方法包括施用多剂量的亲吻肽或亲吻肽类似物和/或(ii)阿片类拮抗剂或混合的激动剂-拮抗剂。

[0009] 在一些实施方案中，所述多剂量在至少2-3天和优选地在至少1、2、3、4、6、或12个月，以1-6小时间隔、优选地以2-3小时间隔施用。

[0010] 在一些实施方案中，多剂量的每一剂量包括相当于0.08-2.4nmol/kg亲吻肽-10的剂量，通过静脉团注(IVB)、皮下注射(SC)、或通过泵施用。

[0011] 在一些实施方案中，多剂量的每一剂量包括相当于0.2-0.3nmol/kg亲吻肽-10、优选地0.24nmol/kg亲吻肽-10的剂量。

[0012] 在一些实施方案中，多剂量包括相当于2.4-24nmol/kg亲吻肽-10的至少一个超生理剂量(supraphysiologic dose)。在一些实施方案中，所述至少一个超生理剂量作为多剂量中的第一剂量、或前两个或更多个剂量、任选地全部剂量施用。

[0013] 在一些实施方案中，所述方法包括向受试者施用治疗有效量的阿片类拮抗剂或混合的激动剂-拮抗剂。在一些实施方案中，阿片类拮抗剂为纳洛酮(naloxone)或纳曲酮(naltrexone)，或混合的激动剂-拮抗剂为叔丁啡(buprenorphine)。

[0014] 在一些实施方案中，所述方法还包括施用一种或多种促性腺激素(例如，黄体生成素(LH)和/或促卵泡激素(FSH))。

[0015] 本文还提供一种鉴定患有生殖内分泌功能障碍(RED)如病理性低促性腺激素性低性腺促素症、处于其风险、或患有其的弱化形式(attenuated form)的受试者的方法。所述方法包括测定受试者中的LH基线水平；向受试者施用刺激剂量的亲吻肽或亲吻肽类似物，例如包括0.08-15nmol/kg亲吻肽-10的剂量，通过静脉团注(IVB)施用，或包括0.8-500nmol/kg亲吻肽-10的剂量，通过皮下(SC)注射施用；测定施用刺激剂量后的至少一个LH水平，例如在施用刺激剂量后约10、15、20、30、45、或60分钟内；将受试者中的LH基线水平与施用刺激剂量后的LH水平相比较，和将施用刺激剂量后的LH水平与LH基线水平类似(例如，小于基线水平的3.5、3、2.5、或2倍)的青春期延迟的受试者鉴定为患有RED、例如病理性低促性腺激素性低性腺促素症。

[0016] 可选地，所述方法可包括向受试者施用刺激剂量的亲吻肽或亲吻肽类似物，例如包括0.08-15nmol/kg亲吻肽-10的剂量，通过静脉团注(IVB)施用，或包括0.8-500nmol/kg亲吻肽-10的剂量，通过皮下(SC)注射施用；测定施用刺激剂量后的至少一个LH水平，例如在施用刺激剂量后约10、15、20、30、45、或60分钟内；将施用刺激剂量后的LH水平与参照水平相比较，和将施用刺激剂量后的LH水平低于LH参照水平(或无显著差异)的青春期延迟的受试者鉴定为患有RED、例如病理性低促性腺激素性低性腺促素症。

[0017] 在一些实施方案中，所述方法包括向所鉴定的受试者施用用于生殖内分泌功能障碍、例如病理性低促性腺激素性低性腺促素症的治疗。

[0018] 在一些实施方案中，所述治疗包括施用多剂量的亲吻肽或亲吻肽类似物。在一些实施方案中，所述多剂量在至少2-3天和优选地在至少1-12个月，以1-6小时间隔、优选地以2-3小时间隔施用。在一些实施方案中，多剂量的每一剂量包括相当于0.08-2.4nmol/kg亲吻肽-10的剂量，通过静脉团注(IVB)、皮下注射(SC)、或通过泵施用。在一些实施方案中，所述多剂量的每一剂量包括相当于0.2-0.3nmol/kg亲吻肽-10、优选地0.24nmol/kg亲吻肽-10的剂量。在一些实施方案中，多剂量包括相当于2.4-24nmol/kg亲吻肽-10的至少一个超

生理剂量。在一些实施方案中，所述至少一个超生理剂量作为多剂量中的第一剂量、或前两个或更多个剂量、任选地全部剂量施用。

[0019] 在一些实施方案中，所述方法包括向受试者施用治疗有效量的阿片类拮抗剂或混合的激动剂-拮抗剂。在一些实施方案中，阿片类拮抗剂为纳洛酮或纳曲酮，或混合的激动剂-拮抗剂为叔丁啡。

[0020] 在一些实施方案中，所述治疗还包括施用性腺类固醇替代疗法，例如在男性中施用睾酮和在女性中施用雌激素和/或孕酮/黄体酮。

[0021] 在一些实施方案中，所述方法还包括施用一种或多种促性腺激素(例如，黄体生成素(LH)和/或促卵泡激素(FSH))。

[0022] 在一些实施方案中，所述多剂量在至少2-3天和优选地在至少1-12个月，以1-6小时间隔、优选地以2小时间隔施用。

[0023] 除非另外说明，否则本文所用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常所理解的相同含义。本文描述了用于本发明的方法和材料；也可使用本领域已知的其它合适的方法和材料。材料、方法、和实施例仅为说明性的而不旨在进行限制。本文提及的所有出版物、专利申请、专利、序列、数据库条目、和其它参考文献均通过引用将其全部内容结合在此。在冲突的情况下，本说明书包括定义将占主导。

[0024] 本发明的其它特征和优点将从以下详细描述和附图、以及从权利要求中显而易见。

附图说明

[0025] 图1.招募和参与的概述。

[0026] 图2A-C.表现延迟的或停滞的青春期的儿童的神经内分泌特征。子图(panel)A中示出方案的示意图。方案的细节提供于参考文献(20)。第一次访问时，测定参与者的血清LH以评价自发脉动性(spontaneous pulsatility)过夜并对于对亲吻肽和GnRH的应答作图。然后，参与者接受外源脉动性GnRH以增强对GnRH的垂体应答性。然后，他们返回进行第二次访问以测定在该垂体“激发(priming)”后应答于亲吻肽和GnRH的LH分泌。显示参与者A“亲吻肽无应答者”(B)和参与者B“亲吻肽应答者”(C)的结果。

[0027] 图3.在青春期进展的儿童和不进展的那些儿童中，对亲吻肽的不同应答。对表现延迟的或停滞的青春期的女孩(空心圆)和男孩(实心圆)进行亲吻肽-刺激试验以评价应答于外源亲吻肽的黄体生成素的变化($\Delta LH_{亲吻肽}$)。然后，随访参与者直至18岁以确定他们是否自发青春期进展。

[0028] 图4A-D.青春期进展或不进展的儿童的附加的激素评价。在就诊时对表现延迟的和停滞的青春期的女孩(空心圆)和男孩(实心圆)评价血清黄体生成素(LH)和促卵泡激素(FSH)(分别为A和B)、和应答于外源促性腺激素释放激素的LH变化(GnRH，子图C)。对男孩附加地评价血清抑制素B(D)。

[0029] 图5A-D:LH对亲吻肽的应答。点线(dotted line)表示施用的时间点。(▼)＝由修订的Santen&Bardin标准来确定的LH脉冲。A:健康男性。未评价遗传学。在6小时时进行亲吻肽0.313ug/kg IVB。(+)应答。B:KS男性。PROKR2c.518T>G p.L173R het;DMXL2 c.4016T>G p.V1339G het。在6小时时进行亲吻肽0.313ug/kg IVB。(-)应答。C.KS女性。未评价遗传学。

对应于亲吻肽剂量作图LH应答。在剂量范围内(+)LH应答。D.KS男性。CHD7 c.2417T>C p.M806T het;PROKR2 c.254G>Ap.R85H het。与子图C中相同的给药。(+)LH应答。在同一Y轴上作图所有数据。

[0030] 图6.对来自图5C的数据再作图,显示KS女性以2小时频率对不同剂量下的亲吻肽的应答。

[0031] 图7A-C:基线神经内分泌分析。A.研究概要;B.研究患有IHH的受试者,所述受试者在2010-2011之间经历8小时采样;C.处于早期卵泡期(EFP)的健康姐妹。E2=雌二醇(estradiol),P=孕酮,LH=黄体生成素。

[0032] 图8A-B.对亲吻肽和GnRH的应答的基线研究。A.研究概要;B.研究受试者。箭头表示通过算法检测的黄体生成素脉冲。K=由静脉团注的亲吻肽-10,并且下标表示剂量1=0.24nmol/kg、2=0.72nmol/kg、3=2.4nmol/kg。G=GnRH IVB 75ng/kg。E2=雌二醇,FSH=促卵泡激素,LH=黄体生成素。

[0033] 图9A-B:对亲吻肽输注和GnRH的应答。A.研究概要;B.研究受试者。箭头表示通过算法检测的黄体生成素脉冲。G=GnRH IVB 75ng/kg。E2=雌二醇,FSH=促卵泡激素,LH=黄体生成素。

[0034] 图10A-B:对亲吻肽和GnRH应答的神经肽施用。A.研究概要;B.研究受试者。箭头表示通过算法检测的黄体生成素脉冲。K=由静脉团注的亲吻肽-10,并且下标表示剂量1=0.24nmol/kg、2=0.72nmol/kg、3=2.4nmol/kg。G=GnRH IVB 75ng/kg。E2=雌二醇,FSH=促卵泡激素,LH=黄体生成素。

[0035] 图11:Tac2敲除小鼠的亲吻肽施用和性发育中的同窝仔鼠对照(littermate control)。短划线(Dashed line)=亲吻肽施用。对于各时间点,黄体生成素值为平均值±SEM。

[0036] 图12A-F.成年OVX WT和Tac2敲除小鼠中的LH脉冲谱(A和D)和纳洛酮(NLX)的作用(B、C、E、和F)。A和D:NLX注射前120分钟的LH脉冲,和NLX注射后180分钟的LH脉冲;由长箭头(arrow)表示NLX注射。箭头表示LH脉冲。B和E:分别为WT和OVX Tac2KO小鼠中NLX之前60分钟和之后120分钟的LH分泌的变化(平均值±SEM)。C和F:来自NLX注射之前20分钟(NLX前)和之后20分钟(NLX后)的、NLX处理对LH释放的影响还表示为平均值±SEM。*P<0.05,学生t检验。

具体实施方式

[0037] 尽管自发现GnRH以来已将近50年(31),但理解驱动性成熟的起始和其后维持生殖功能的因素仍是挑战,这使诊断和治疗变得复杂。患有特发性低促性腺激素性性腺功能减退症(IHH)的患者是揭露这些信号的关键群体,因为他们具有异常的GnRH分泌/作用(32,33)。大部分的IHH患者表现为具有延迟的青春期发育的青少年并在未经治疗的情况下遭受终身的性幼稚和不孕不育(infertility)(32,33)。

[0038] 本文描述了使用亲吻肽诊断和治疗青春期延迟的方法。

[0039] 诊断病理性低促性腺激素性低性腺促素症

[0040] 几十年来,临床医师和研究员试图开发预测青春期延迟的儿童是否最终会青春期进展的试验(8)。这些试验包括测定基线(非刺激的)血清促性腺激素(黄体生成素LH,和促

卵泡激素FSH)、用GnRH或GnRH类似物刺激后的促性腺激素、和基线处的抑制素B。遗憾地，所有这些试验在灵敏度、特异性、或二者方面显著不足(8)。例如，研究已表明在患有体质性延迟的男孩和患有IHH的男孩之间的血清抑制素B浓度存在显著重叠，10-29％的患有体质性延迟的男孩和22-45％的患有IHH的男孩具有落在重叠范围内的抑制素B(9-11)。尽管对IHH和体质性延迟的遗传学的理解不断增加，目前基因检测不足以预测青春期结果。目前，少于一半的IHH患者具有IHH基因中可识别的突变(7)。此外，即使发现突变，预测能力受到可变的外显率(penetrance)和表现度(expressivity)的限制；在同一家族中，IHH基因突变的一些携带者可能患有IHH，而其他携带者可能患有体质性延迟(24)。

[0041] 通常在第一次就诊时难以将后来青春期进展的青春期延迟的儿童与患有持久低性腺促素症的那些儿童区分开，并且在知道指定儿童的结果前可能需要等待几年。因此，患者、家族、和医师在用于青春期延迟的两种常见管理方法之间做决定时可能会面临难题：用性类固醇治疗还是等待观察而不干预。

[0042] 亲吻肽是在下丘脑中分泌的神经肽，可有效刺激迄今为止研究的所有哺乳动物物种(包括人)中的GnRH分泌(12)。在我们组和其他人的研究中，生殖完整的成人应答于单一团注的亲吻肽，LH显著增加，然而患有IHH的成人很大程度上无应答(13-19)。因此，使用亲吻肽的前瞻性研究可用于评价个体的GnRH分泌能力。

[0043] 具有延迟的或停滞的青春期的儿童具有对亲吻肽的从无应答至强力应答的一系列应答(20)。本文描述了激发研究的结果，显示儿童应答于亲吻肽的能力可预测儿童随后是否会青春期进展。

[0044] 本文描述的亲吻肽刺激试验克服了在对于青春期延迟的儿童中预测青春期结果的两个基础挑战。第一个挑战是尚无将正常青春期前儿童(prepubertal child)的生理性低促性腺激素性性腺功能减退症与患有IHH的儿童的病理性低促性腺激素性低性腺促素症区分开的方法。作为前瞻性试验，亲吻肽刺激试验提供测定儿童对GnRH分泌的未来潜力的首个方法。实际上，我们发现，亲吻肽可在体格检查和日间实验室评价中表现为青春期前而最终青春期进展的儿童中引发LH应答。

[0045] 第二个挑战是将青春期发育暂时暂停的儿童与患有IHH和部分青春期发育永久停滞的儿童区分开。我们先前显示患有IHH和部分生殖内分泌活性的成人不应答于亲吻肽(19)。类似地，在当前研究中，表现部分生殖内分泌活性的一位参与者(参与者8)具有减弱的对亲吻肽的应答，正确地预测他到18岁时缺少青春期发育，然而抑制素B和GnRH诱导的LH表明他在以后将青春期进展。

[0046] 如实施例1中所描述的，在两位参与者(参与者B和11)中，过夜测定中LH脉冲的缺少无法正确地预测参与者的最终青春期进展，然而亲吻肽刺激试验准确地预测参与者的结果。这些参与者在他们的研究访问时一直在接受性-类固醇治疗，这可能抑制了内源LH分泌。相反地，他们对亲吻肽的应答为强力的，因此亲吻肽刺激试验可靠地预测他们最终的青春期进展，即使在外源性-类固醇(例如，男性中睾酮和女性中雌激素和/或孕酮/黄体酮)治疗的情况中进行。

[0047] 患有IHH的一些患者可具有对亲吻肽的完整的应答(例如，具有TAC3和TACR3突变的患者，TAC3和TACR3是似乎在亲吻肽的上游起作用的神经激肽B及其受体的基因，或具有KISS1突变的患者，KISS1编码亲吻肽其自身)(25,26)。然而，这可能仅是小部分的IHH患者，

因为TACR3突变仅存在于约5％的患有嗅觉正常的IHH的患者中，TAC3和KISS1突变是IHH的罕见原因(27-30)。

[0048] 因此，本方法可用于在受试者例如哺乳动物如人受试者中诊断病理性低促性腺激素性低性腺促素症例如IHH。在一些实施方案中，受试者为至少10、11、12、13、14、或15岁，和/或18、19、或20岁以下，例如为10-20岁、10-19、10-18、11-18、11-19、11-20、12-18、12-19、或12-20岁。所述方法还可用于例如在任何年龄的受试者中检测生殖内分泌功能中的功能障碍或者部分或晚发形式的病理性低促性腺激素性性腺功能减退症。在一些实施方案中，所述方法用于例如在任何年龄的儿童包括新生儿中诊断先天形式的病理性低促性腺激素性性腺功能减退症。

[0049] 在一些实施方案中，尽管目前IHH的正式临床定义需要患者为18岁以上，在小于18岁的受试者中，本方法确定他们患有IHH，允许该诊断比传统年龄截止早几年做出。在一些实施方案中，本方法确定他们处于发展IHH的风险或具有发展IHH的高可能性。

[0050] 所述方法依赖于检测应答于施用至少一种刺激剂量的亲吻肽或亲吻肽类似物的LH水平，所述刺激剂量例如，相当于至少0.08、0.1、0.12、0.14、0.16、0.18、0.20、0.22、或0.24nmol/kg亲吻肽-10的剂量，多至约8、10、12、14、或15nmol/kg亲吻肽-10，例如0.08-15nmol/kg亲吻肽-10，例如0.1-12nmol/kg亲吻肽-10，例如0.2-10.11nmol/kg亲吻肽-10，例如0.2-0.5nmol/kg亲吻肽-10，例如0.22-0.25nmol/kg亲吻肽-10，例如0.24nmol/kg亲吻肽-10，优选地作为静脉团注(IVB)施用。剂量还可例如作为皮下(SC)或鼻内团注来施用。当SC施用时，剂量高于IV剂量范围，例如为上述剂量范围的10、20或约30倍以上，例如，至少0.8nmol/kg上至约500、600、或750nmol/kg。鼻内剂量通常为～10x皮下剂量，因此为24至5000、6000、或7500nmol/kg。

[0051] 所述方法可包括从受试者获得至少一种、例如一种或多种样品，评价样品中的LH水平，并将所述水平与一种或多种参照相比较，所述参照例如表现正常LH水平的对照参照，例如不患有病理性低促性腺激素性低性腺促素症的受试者中的水平，和/或表现患有病理性低促性腺激素性低性腺促素症的受试者中的LH水平的疾病参照。合适的参照值可包括下文中实施例中所示的那些。在优选实施方案中，所述方法包括从受试者获得多种样品，例如在施用刺激剂量之前、期间、和之后，确定样品中的LH水平，并将施用刺激剂量前的样品中的LH水平(例如，基线水平)与施用刺激剂量后的水平相比较。因此，所述方法可包括将亲吻肽施用后的绝对LH水平与参照(例如，代表一组受试者的参照、或受试者中的基线水平)相比较；和/或确定从基线至刺激后的LH水平的变化，作为a)单位增加量(差异)，或b)相对变化(比)。在一些实施方案中，将具有3.5、4、4.5以上、例如4.85以上的LH比的受试者鉴定为患有体质性延迟，而将具有低于3.5、例如低于3、例如2.33以下的LH比的那些鉴定为患有病理性HH。

[0052] 如本文所用的术语“样品”，当涉及使用本文所描述的方法对其测试LH的存在的材料时尤其包括全血、血浆、血清、或尿。

[0053] 本领域公知从样品定量LH的各种方法。所述方法可包括在定量前从样品分离和/或纯化LH。“分离的”或“纯化的”生物标志物是实质上无来自生物标志物所源自的细胞或组织来源的细胞材料或其它污染物，即通过人干预从天然状态部分地或完全地改变或去除。例如，根据标准方法首先分离样品中所包含的核酸，例如使用分解酶、化学溶液、或根据制

造商的说明通过核酸结合树脂来分离。

[0054] 可使用本领域已知的方法来评价LH的存在和/或水平，例如使用对于蛋白质的标准电泳和定量免疫检验方法，包括但不限于，蛋白免疫印迹法、酶联免疫吸附测定(ELISA)；生物素/亲和素型检验；蛋白质阵列检测；反射免疫测定；免疫组织化学(IHC)；免疫沉淀检验；FACS(荧光激活的细胞分选)；质谱法(Kim(2010)Am J Clin Pathol 134:157-162；Yasun(2012)Anal Chem84(14):6008-6015；Brody(2010)Expert Rev Mol Diagn 10(8):1013-1022；Philips(2014)PLOS One 9(3):e90226；Pfaffe(2011)Clin Chem 57(5):675-687)。所述方法通常包括揭露标签(revealing label)，例如直接或间接提供信号的荧光的、化学发光的、放射性的、和酶的或染料分子。如本文所用，术语“标签”是指例如放射性试剂或荧光团(例如，藻红蛋白(PE)或吲哚菁绿(Cy5))等可检测物质至抗体或探针的偶联(即，物理连接)，以及通过与可检测物质的反应性的探针或抗体的间接标记(例如，辣根过氧化物酶，HRP)。

[0055] 在一些实施方案中，可使用ELISA法，其中用针对要试验的蛋白质的抗体涂布微量滴定板的孔。然后将含有或疑似含有生物标志物的样品施加至孔。在足量的形成抗体-抗原复合物的时间后，洗涤板以去除任何未结合的部分，并添加可检测的标记的分子。再次，在足够的培养时间后，洗涤板以去除任何过量的、未结合的分子，使用本领域已知的方法确定标记的分子的存在。还可使用ELISA法的变体，例如竞争性ELISA或竞争检验、和夹心ELISA，这些是本领域技术人员已知的。可使用免疫测定法(Immunometric assay)。

[0056] 质谱法、和特别地基质辅助激光解吸/电离质谱法(MALDI-MS)和表面增强激光解吸/电离质谱法(SELDI-MS)可用于检测LH。(参见，美国专利号5,118,937；5,045,694；5,719,060；6,225,047)。

[0057] 用于LH的具体检验描述于Wheeler,Methods Mol Biol.2006;324:109-24；Beastall等,Ann Clin Biochem.1987May;24(Pt 3):246-62；Pappa等,Theriogenology.1999Apr 1;51(5):911-26。

[0058] 在一些实施方案中，亲吻肽刺激后的LH水平与疾病参照中的蛋白质(一种或多种)的存在和/或水平为可比的，并且受试者具有一种或多种与病理性低促性腺激素性低性腺促素症相关的症状，则受试者患有病理性低促性腺激素性低性腺促素症。在一些实施方案中，受试者不具有明显的病理性低促性腺激素性低性腺促素症的征象(sign)或症状，但评价的一种或多种蛋白质的存在和/或水平与疾病参照中的蛋白质(一种或多种)的存在和/或水平为可比的，则受试者具有弱化形式的病理性低促性腺激素性性腺功能减退症和/或具有增加的发展病理性低促性腺激素性性腺功能减退症的风险。在一些实施方案中，受试者具有病理性低促性腺激素性低性腺促素症的征象或症状，但具有正常的LH应答，则对受试者进行附加的测试。在一些实施方案中，一旦确定某人患有病理性低促性腺激素性低性腺促素症或具有增加的发展病理性低促性腺激素性低性腺促素症的风险，则可施用例如本领域已知的或如本文所描述的治疗。

[0059] 可使用本领域已知的方法来确定合适的参照值，例如使用临床试验方法和统计学分析。参照值可具有任何相关形式。在一些情况中，参照包括对于有意义的LH水平的预定值，例如代表LH的正常水平的对照参照水平，例如未受影响的受试者或不处于发展本文所描述的疾病的风险的受试者中的水平，和/或表示与病理性低促性腺激素性低性腺促素症

相关的LH水平的疾病参照，例如患有IHH或KS的受试者中的水平。

[0060] 预定水平可为单截断(阈值)值，例如中位数或平均值，或限定确定与其它部分为统计学上不同的、临床试验群体的上或下四分位数、三分位数、或其他部分的界限的水平。其可为截断(或阈值)值的范围，例如，置信区间。其可基于比较组来确立，例如与一个限定组中发展疾病的风险或疾病的存在的相关性(association)与另一限定组中的疾病风险或存在相比为倍数更高、或更低(例如，约2倍、4倍、8倍、16倍以上)。其可为范围，例如将受试者(例如，对照受试者)的群体均等地(或不均等地)分为几组，例如，低风险组、中风险组和高风险组；或分为四分位数，最小四分位数为具有最低风险的受试者和最大四分位数为具有最高风险的受试者；或分为n分位数(即，n个规律间隔)，最小n分位数为具有最低风险的受试者和最大n分位数为具有最高风险的受试者。

[0061] 在一些实施方案中，预定水平是在同一受试者中例如在不同时间点如早期时间点(例如，在用亲吻肽或亲吻肽类似物刺激前)的水平或发生率。因此，在一些实施方案中，所述方法可包括计算水平的比或水平中的差异，并检测由亲吻肽或亲吻肽类似物刺激后的LH水平的变化的存在。

[0062] 与预定值相关的受试者通常称为参照受试者。例如，在一些实施方案中，对照参照受试者不患有本文所描述的疾病(例如，病理性低促性腺激素性低性腺促素症)。在一些情况中，可期望对照受试者为男性，并且在其它情况中，可期望对照受试者为女性，并且确立的参照水平用于相同性别的受试者。在一些情况中，可期望对照受试者患有病理性低促性腺激素性低性腺促素症，并且在其他情况中，可期望对照受试者不患有病理性低促性腺激素性低性腺促素症(例如，是患有体质性青春期延迟但最终将在无干预的情况下自行经历青春期的受试者)。

[0063] 疾病参照受试者是患有病理性低促性腺激素性低性腺促素症的受试者。

[0064] 因此，在一些情况中，受试者中的LH水平小于或等于LH参照水平(或刺激后的LH的变化)是临床状态的指示(例如，病理性低促性腺激素性低性腺促素症的指示)。在其它情况中，受试者中的LH水平大于或等于LH的参照水平是不存在疾病或疾病的正常风险的指示。在一些实施方案中，受试者中的水平小于参照水平的量足以将该受试者与对照受试者区分，并且任选地统计学上显著小于对照受试者中的水平。在受试者中的LH水平等于LH参照水平的情况中，“等于”是指近似等于(例如，没有统计学上差异)。

[0065] 在具有性腺功能不全(gonadal insufficiency)(与脑或垂体腺的水平下的功能不全、即低促性腺激素性性腺功能减退症相反)的青春期前儿童中，对亲吻肽的应答可大于普通群体中的。他们仍具有病理性低促性腺激素性性腺功能减退症的“正常风险”。

[0066] 预定值可取决于所选受试者(例如，人受试者)的特定群体。例如，表面健康群体与患有、可能患有、或处于更大风险患有病理性低促性腺激素性低性腺促素症的受试者群体相比将具有不同的‘正常’范围的LH水平。因此，所选的预定值可考虑受试者(例如，人受试者)所落入的类别(例如，性别，年龄，其它疾病的存在)。本领域普通技术人员可在不多于常规实验的情况下选择合适的范围和类别。

[0067] 在表征可能性或风险时，可确立许多预定值。

[0068] 治疗方法

[0069] 本方法可包括用于病理性低促性腺激素性低性腺促素症的治疗。在一些实施方案

中,向通过本文所描述的方法鉴定的受试者施用所述治疗。

[0070] 本文所描述的方法包括用于治疗与病理性低促性腺激素性低性腺促素症相关的病症的方法。在一些实施方案中,病症为IHH或KS(例如,如果受试者具有嗅觉丧失)。通常,所述方法包括向需要或确定需要此类治疗的受试者施用治疗有效量的如本文所描述的亲吻肽或亲吻肽类似物。所述方法可用于治疗患有下丘脑性闭经的受试者,例如,由于能量负平衡(例如,营养不良、厌食、或运动员(athlete))的状态、高泌乳素血症、成年型低促性腺激素性性腺功能减退症、药物作用(例如,来自糖皮质激素、阿片类)或弱化形式的病理性低促性腺激素性性腺功能减退症和/或处于发展病理性HH的风险,例如,患有特发性不孕不育、不规律月经周期、或异常精液分析的受试者。

[0071] 如在本文中所用,"治疗"是指减轻与病理性低促性腺激素性低性腺促素症相关的病症的至少一种症状。通常,病理性低促性腺激素性低性腺促素症导致例如到18岁时不存在青春期;发育不良或未发育的第二性征、或不孕不育;因此,治疗可导致青春期的起始、第二性征的发育和/或恢复生育力。施用治疗有效量的本文所描述的化合物用于治疗病理性低促性腺激素性低性腺促素症将导致增加的LH水平、增加的性类固醇水平(例如,男性中睾酮和女性中雌激素和/或孕酮/黄体酮)、和配子发生(gametogenesis)中的一者或多者,例如在一些情况中,应答于施用刺激剂量的亲吻肽或亲吻肽类似物的增加的LH水平。

[0072] 因此,在一些情况中,本文提供了用于治疗病理性低促性腺激素性低性腺促素症如IHH或KS的方法。所述方法可包括施用一个或多个剂量,例如超生理和/或生理或近生理剂量的亲吻肽或亲吻肽类似物。在一些实施方案中,剂量可例如定期地施用,例如在几天、几周、几个月、或几年的时间,例如达2-4天如达48小时,每1-6、1-4、2-6、或2-4小时施用,任选地每月一次、每隔一个月一次、每三个月一次、每四个月一次、每6个月一次、每8个月一次、每10个月一次、或每年一次重复,任选地长期施用,例如每天施用达几天、几周、几个月、或几年的时间。可持续治疗直至实现如生育力、或第二性征的发育等期望的结果时、和当实现如生育力、或第二性征的发育等期望的结果时任选地停止或降低。在一些实施方案中,至少一些的剂量为生理或近生理水平,例如0.08-2.4、例如0.1-5、0.2-0.4、例如0.24nmol/kg IVB。在一些实施方案中,所述方法包括以超生理的至少一剂量施用,例如相当于2-25、例如2.4-24nmol/kg亲吻肽-10,例如至少2、2.4、2.5、2.6、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、或20nmol/kg亲吻肽-10,多至10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、或25nmol/kg亲吻肽-10。在一些实施方案中,SC施用剂量,生理剂量为0.8至60nmol/kg的、和超生理剂量为60至1200nmol/kg。

[0073] 在一些实施方案中,所述施用为例如静脉内、皮下、或鼻内。在一些实施方案中,所述方法包括使用泵来施用剂量。因此,施用可借助于输液泵来进行,例如,以由受试者或患者携带并包括含有包含活性剂的液体组合物的储药器(reservoir)、和用于将组合物递送/施用至受试者或患者的输液泵的设备或系统的形式,或以可递送活性剂的周期性团注的、适用于植入受试者或患者的体内的相应的小型化设备的形式,例如类似于胰岛素泵的设备。

[0074] 在一些实施方案中,所述方法包括重复如上所述的亲吻肽刺激试验,例如在2-3天后。在一些实施方案中,治疗持续几个月和几年直至所有期望的效果。例如,对于女性中的排卵诱导,疗程(course)可为从1个月至6个月的任何时间。对于男性中的精子发生

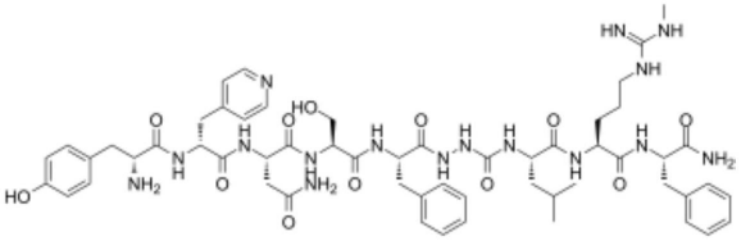
(spermatogenesis)诱导,疗程可为从3个月至24个月的任何时间。对于青春期诱导和/或维持生殖内分泌功能,治疗可为几年。

[0075] 所述方法还可包括或可选地包括施用阿片类拮抗剂,和/或用于病理性低促性腺激素性低性腺促素症的常规治疗。

[0076] 亲吻肽抗性可发生于嗅觉正常和嗅觉缺失形式的低性腺促素症,如图5C&D为在患有KS的患者中的。患者的基因印记(genetic signature)无法预测他/她应答于亲吻肽的能力。这由实施例3(参见图5)支持,其显示在两个基因中携带变体的患者仍应答。尽管有各种潜在的基因诊断,但目前的数据支持亲吻肽抗性作为先天性低性腺促素症的首要病理机制的作用,其可延伸至包括下丘脑性闭经等生殖内分泌功能障碍的其它原因,例如,由于能量负平衡的状态(例如,营养不良、厌食、或运动员)、高泌乳素血症、成年型低促性腺激素性性腺功能减退症,药物作用(例如,来自糖皮质激素、阿片类)或弱化形式的病理性低促性腺激素性性腺功能减退症和/或处于发展病理性HH的风险,例如患有特发性不孕不育、不规律月经周期、或异常精液分析的受试者。随着重复暴露,对亲吻肽的灵敏度增加;因此,在一些实施方案中,本方法可包括重复施用亲吻肽以提高灵敏度至内源亲吻肽分泌产生有意义的应答的点,以诱导亲吻肽抗性的逆转。

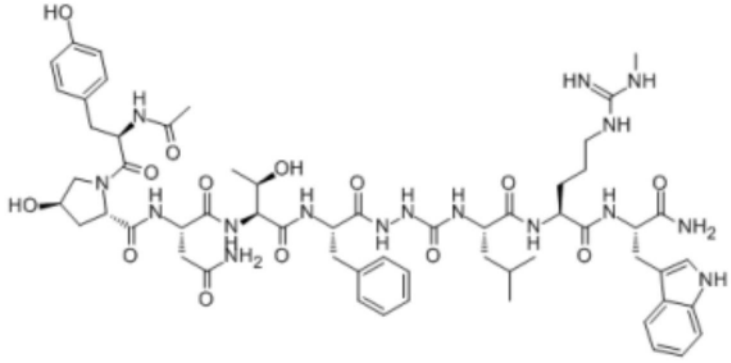
[0077] 亲吻肽和亲吻肽类似物

[0078] 如本文所用,亲吻肽是指由KISS1基因编码的145-氨基酸前体肽的裂解所产生的神经肽的家族(Lee等1996,Ohtaki等2001)。在人中,亲吻肽的活性形式被认为是54-氨基酸肽(Ohtaki等2001,Terao等2004)。本方法可包括施用全长亲吻肽(NP_002247.3)、54-氨基酸肽(亲吻肽-54(KP54))、或亲吻肽-10(一种包含序列YNWNSFGLRF(SEQ ID NO:1)的10-氨基酸肽)。本领域已知Kiss-10的类似物并且包括在以下中描述的那些:Curtis等,Am J Physiol Endocrinol Metab.2010Feb;298(2):E296-E303;Gutiérrez-Pascual等,Mol Pharmacol.2009Jul;76(1):58-67;Niida等,Bioorg Med Chem Lett.2006Jan 1;16(1):134-7;Orsini等,J Med Chem.2007Feb 8;50(3):462-71;Roseweir等,J Neurosci.2009Mar 25;29(12):3920-9。在一些实施方案中,类似物为[dY]^{1}KP-10。类似物可包括其中对本文所公开的序列进行保守置换的那些,例如1、2、或3种氨基酸置换,其中所述类似物保留对KISS1R的激动活性。在一些实施方案中,所述类似物是肽化合物,其中,尤其,位于靠近化合物的C末端的区域的甘氨酸残基和相邻残基之间的肽键,由双取代的1,2,3-三唑环替换,例如,如描述于WO2014118318A1;肽化合物如描述于US20200172575;化合物1,描述于US 20200046797美国专利号7,960,348和8,404,643;C6,描述于Parker等,Theriogenology.2019May;130:111-119;KISS1-305;TAK-448(Ac-D-Tyr-D-Trp-Asn-Thr-Phe-azaGly-Leu-Arg(Me)-Trp-NH2(SEQ ID NO:2);参见Decourt等,Sci Rep.2016;6:26908;MacLean等,J Clin Endocrinol Metab.2014Aug;99(8):E1445-53;Skorupskaite等,Hum Reprod Update.2014Jul;20(4):485-500)(例如,TAK-448乙酸酯);或TAK-683(N-乙酰基-YWNTFGL{Met-R}W-NH2(SEQ ID NO:3);参见Kanai等,J Reprod Dev.2017Jun;63(3):305-310);和描述于以下的化合物:US 20160074320;WO200285399;WO2004060264;WO2004101747;WO2004063221;EP1604682;WO2005117939;和EP1464652。还参见Matsui和Asami,Neuroendocrinology 2014;99:49-60。其药学上可接受的盐、含有亲吻肽或亲吻肽类似物的药物组合物可用于本文的方法。



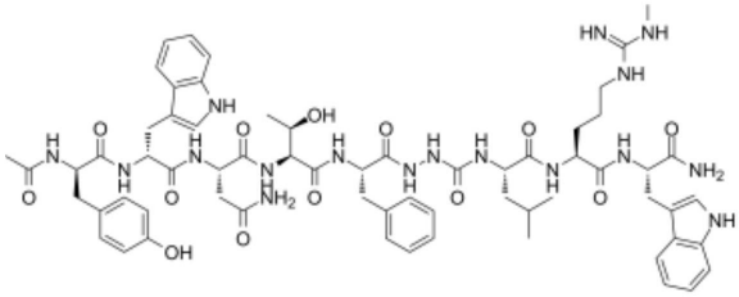
KISS1-305

[0079]



TAK-448

[0080]



TAK-683

[0081] 在一些实施方案中,当使用肽激动剂时,肽为修饰的。

[0082] 还可使用包括逆向序列如FRLGFSNWNY(SEQ ID NO:4)的肽类似物。

[0083] 本文所公开的肽类似物可包括根据生产肽模拟物(peptidomimetic)的领域中已知的方法来修饰的那些。参见,例如,Qvit等,Drug Discov Today.2017Feb;22(2):454-462;Farhadi和Hashemian,Drug Des Devel Ther.2018;12:1239-1254;Avan等,Chem.Soc.Rev.,2014,43,3575-3594;Pathak,等,Indo American Journal of Pharmaceutical Research,2015.8;Kazmierski,W.M.,ed.,Peptidomimetics Protocols,Human Press(Totowa NJ 1998);Goodman等,eds.,Houben-Weyl Methods of Organic Chemistry:Synthesis of Peptides and Peptidomimetics,Thiele Verlag(New York 2003);和Mayo等,J.Biol.Chem.,278:45746(2003)。在一些情况中,相对于非肽模拟肽(non-peptidomimetic peptide),本文所公开的肽和片段的修饰的肽模拟物形式表现增强的体内稳定性。

[0084] 用于产生肽模拟物的方法包括由D氨基酸对映体置换肽序列中的氨基酸的一个或更多个、例如全部。这样的序列在本文中称为“反向(retro)”序列。在另一方法中,氨基酸残基的N末端至C末端顺序被逆转,使得从原始肽的N末端至C末端的氨基酸残基的顺序变为修饰的肽模拟物中C末端至N末端的氨基酸残基的顺序。这样的序列可被称为“翻转(inverso)”序列。

[0085] 肽模拟物可为反向和翻转形式二者,即本文所公开的肽的“反向-翻转”形式。新的肽模拟物可由配置使得肽模拟物中从N末端至C末端的氨基酸残基的顺序对应于原始肽中从C末端至N末端的氨基酸残基的顺序的D氨基酸构成。

[0086] 用于制造肽模拟物的其它方法包括用化学上不同但公认的氨基酸的功能类似物、即人工氨基酸类似物替换肽中一个或多个氨基酸残基。人工氨基酸类似物包括β-氨基酸、β-置换的β氨基酸(“β^3-氨基酸”)、氨基酸的磷类似物如α-氨基膦酸(α-amino phosphonic acid)和α-氨基次膦酸(α-amino phosphinic acid)、和具有非-肽键的氨基酸。人工氨基酸可用于产生肽模拟物,例如类肽低聚物(例如,类肽酰胺或酯类似物)、β-肽、环状肽、寡脲(oligourea)或寡氨基甲酸酯(oligocarbamate)肽;或杂环分子。示例性反向-翻转肽模拟物包括FRLGFSNWNY,其中序列包括所有D氨基酸。

[0087] 序列还可为修饰的,例如通过氨基末端的生物素化或聚乙二醇化和/或羧基末端的酰胺化。

[0088] 阿片类拮抗剂

[0089] 在一些实施方案中,本文所描述的方法包括施用有效量的阿片类拮抗剂如纳洛酮或纳曲酮、或混合的激动剂-拮抗剂如叔丁啡。还可使用其它的,例如纳美芬。阿片类拮抗剂可作为如本文所描述的亲吻肽或亲吻肽类似物或其它处理的替代物施用、或在其之前、之后、或同时地施用。因此,本文提供了组合物,其包含(i)亲吻肽或亲吻肽类似物和(ii)阿片类拮抗剂如纳洛酮或纳曲酮、或混合的激动剂-拮抗剂如叔丁啡。

[0090] 病理性低促性腺激素性低性腺促素症的常规治疗

[0091] 在一些实施方案中,所述方法包括施用性腺类固醇替代疗法,包括男性中施用睾酮(例如,睾酮酯(例如,庚酸酯、环戊丙酸酯、十一烷酸酯)和女性中施用雌激素和/或黄体酮(例如,结合型雌激素(普力马林(Premarin))、炔雌醇、或雌二醇;和/或甲羟孕酮、微粒化孕酮);和/或激素类避孕药(例如炔雌醇/炔诺酮)。所述方法还可包括施用促性腺激素,例如促卵泡激素(FSH)或人绒毛膜促性腺激素(hCG)。任选地,氯米芬和/或来曲唑可用于刺激一部分患者排卵。

[0092] 实施例

[0093] 在以下实施例中进一步描述本发明,但这些实施例不限制权利要求中所描述的本发明的范围。

[0094] 实施例1.使用亲吻肽预测青春期延迟的青少年的青春期结果

[0095] 材料和方法

[0096] 以下材料和方法用于本实施例。

[0097] 研究许可

[0098] 对亲吻肽刺激试验的生理学研究由麻省总医院(Massachusetts General Hospital)(MGH)/Partners IRB批准并注册于ClinicalTrials.gov(NCT01438034)。根据IND 113,591使用亲吻肽,并根据IND 93,353使用GnRH。对青春期延迟和IHH的遗传学的研究分别由波士顿儿童医院(Boston Children's Hospital)和MGH批准。所有参与者给出书面知情许可书(assent),并且至少一名父母给出书面知情同意书(consent)。对于经历重复试验的两名参与者,由Partners IRB批准重复试验,并且参与者和他们的家长给出关于重复试验的书面知情许可书和知情同意书。

[0099] 研究方案

[0100] 先前已描述研究方案的细节(20)。简言之,入选标准为女孩年龄12岁以上和男孩年龄13.5岁以上,具有基于女孩的乳房发育和男孩的睾丸体积定义的延迟的或停滞的青春期。排除具有可识别起因的青春期延迟的儿童。参与者两次入院MGH转化和临床研究中心(Translational and Clinical Research Center,TCRC),每10分钟进行血液采样以测定基线LH分泌过夜、应答于亲吻肽-10 0.313mcg/kg的LH分泌($\Delta LH_{亲吻肽}$)、和应答于GnRH 75ng/kg的LH分泌(ΔLH_{GnRH})。在由垂体"激发"之前和之后均评价$\Delta LH_{亲吻肽}$和ΔLH_{GnRH},所述垂体"激发"用脉冲皮下GnRH 75ng/kg每2小时持续6天以确保对GnRH的强力垂体应答性(8)。

[0101] 参与者随后每6个月返回进行复查访问以经历体格检查和测定FSH、LH、和雌二醇或睾酮以评价生殖内分泌活性。在达到18岁时,参与者进行对生殖内分泌活性的身体和实验室征象的最终评价。对于接受性-类固醇治疗的参与者,在实验室研究之前进行治疗以确保性-类固醇测定反应了内源生产而不是外源施用(对于雌二醇为4周,对于注射的睾酮为6周,对于经皮睾酮为2周)。

[0102] 实验室检验

[0103] 对于TCRC访问,如先前所述(20)由MGH临床实验室研究中心(Clinical Laboratory Research Core)、布里格姆妇女医院研究检验&分析中心(Brigham and Women's Hospital Research Assay&Analysis Core)、和Labcorp测定LH、FSH、睾酮(T)和雌二醇,例如,使用利用对于血清LH和FSH的自动Abbott AxSYM系统(Abbott Laboratories,Chicago,IL)、对于血清T浓度的DPC Coat-A-Count RIA试剂盒(Diagnostics Products Corporation,Los Angeles,CA)的微粒酶免疫测定法(60)。LH检验的精确度为4.3-6.4%。由弗吉尼亚大学配体检验中心(University of Virginia Ligand Assay Core)、通过免疫测定法在单批次中测定抑制素B,试验内变异系数为2.5%。对于复查访问,由Labcorp和Quest Diagnostics进行实验室研究。对于波士顿区域以外的参与者,通过来自他们当地的内分泌学家和临床实验室的他们的常规临床护理来获得复查数据。

[0104] 基因检测

[0105] 在博德研究所(Broad Institute)(Cambridge,MA)进行全外显子组测序。对外显子组测序数据筛选与IHH/KS、青春期延迟、或二者相关的30种基因(表1中列出(21))内的变体。根据美国医学遗传学和基因组学学会(American College of Medical Genetics and Genomics)的标准(22)对变体进行分类。

[0106] 统计学

[0107] Fisher精确检验用于评价亲吻肽刺激试验的结果和青春期结果之间的关系。p-值<0.05认为是显著的。Jeffreys区间用于计算灵敏度和特异性的置信区间。

[0108] 表1.在经历全外显子组测序的参与者中分析与特发性低促性腺激素性性腺功能减退症、Kallmann综合征、和体质性延迟相关的基因

[0109]

基因	基因座
ANOS1(KAL1)	Xp22.32
AXL	19q13.2
CHD7	8q12.2

DMXL2	15q21.2
DUSP6	12q21.33
FEZF1	7q31.32
FGF17	8p21.3
FGF8	10q24.32
FGFR1	8p12
FLRT3	20p11
GNRH1	8p21.2
GNRHR	4q21.2
HS6ST1	2q21
IGSF10	3q25.1
IL17RD	3p21.1
KISS1	1q32
KISS1R	19p13.3
NSMF(NELF)	9q34.3
PNPLA6	19p13.2
POLR3A	10q22.3
POLR3B	12q24
PROK2	3p21.1
PROKR2	20p12.3
RNF216	7p22.1
SEMA3A	7q12.1
SEMA3E	7q21.11
SOX10	22q13.1
SPRY4	5q31.3
TAC3	12q13.3
TACR3	4q25
WDR11	10q26

[0110] 表2.筛选时的参与者特征

[0111]

ID	性别	年龄(岁)	身高(cm)	体重(kg)	BMI (kg/m^2)	谭纳乳房分期	右/左睾丸体积(mL)	嗅觉*
1	M	17.0	163.8	66.7	24.9		1/1	自我报告的嗅觉丧失
2	M	15.7	171.0	79.8	27.4		3/3	嗅觉丧失
3	F	16.7	167.6	98.4	35.0	I		嗅觉丧失
4	M	15.6	171.0	79.8	27.4		2/1	嗅觉丧失
A	M	16.4	164.1	55.0	20.4		2/不可触知	嗅觉丧失
5	F	15.2	153.7	43.4	18.4	I		严重嗅觉减退
6	F	16.5	165.4	55.4	20.3	I		正常嗅觉
7	M	14.9	165.1	52.9	19.4		1-2/1-2	中度嗅觉减退
8	M	14.6	165.7	67.7	24.7		2/2	嗅觉丧失
9	M	16.0	164.9	51.5	18.9		6/6†	中度嗅觉减退
10	M	14.9	149.9	49.5	22.1		3/3	正常嗅觉
B	F	15.0	154.5	64.7	27.1	II†		ND
11	M	15.1	167.0	53.2	19.1		4/4†	中度嗅觉减退
12	M	14.8	152.4	43.5	18.7		1/1	中度嗅觉减退
13	F	13.9	146.1	39.9	18.8	I		正常嗅觉
14	M	17.5	175.4	101.6	33.0		8/8†	严重嗅觉减退
15	M	14.2	153.0	38.9	16.6		1/1	正常嗅觉

[0112]

ID	骨龄(评价时的实际年龄，岁)	其它特征
1	14 (16.5)	
2	14 (15.6)	
3	ND	
4	14 (15.6)	联带运动，单侧肾不发育
A	14 (16.4)	隐睾症
5	13 (15.0)	
6	13 (16.6)	
7	13 (14.9)	小阴茎
8	13 (14.4)	小阴茎，双侧隐睾症
9	13.5 (15.3)	双侧腹股沟疝
10	13 (13.8)	
B	11 (13.8)	
11	12.5 (14.5)	
12	13 (14.7)	创伤性分娩(traumatic birth)、脑室扩大(ventriculomegaly)、癫痫、双侧隐睾症史；单侧肾囊

[0113]

		肿；下肢不等长
13	11 (13.0)	
14	14 (14.7)	
15	11 (13.5)	

[0114] 表3.复查结果

[0115]

ID	性别	注意到自发青春期进展的年龄(岁)	性-类固醇治疗的年龄(岁)	最后一次复查的年龄(岁)	谭纳乳房分期	睾丸体积(右/左, mL)
1	M	-	17.0-	18.0		2/不可触知
2	M	-	15.3-	18.6		ND
3	F	-	16.9-	18.0	IV	
4	M	-	14.7-	18.1		3/1
A	M	-	16.9-	17.8		3/不可触知
5	F	失访				
6	F	-	16.7-	18.4	II	
7	M	-	15.9-	18.3		1/1
8	M	-	14.9-	18.0		3/3
9	M	16.6	15.9-16.3	18.9		15/15
10	M	15.8	无	17.2		8/8*
B	F	16.3	15.4-15.7	16.3	IV	
11	M	16.0	14.5-15.4	18.0		12/15
12	M	16.6	15.7-16.0	18.1		12/12
13	F	14.6	无	18.1	V	
14	M	18.2	15.4-15.9, 17.0-18.0	18.2		12/12
15	M	17.5	14.4-17.0	18.0		12-15/12

[0116]

ID	FSH (mIU/mL)	LH (mIU/mL)	雌二醇 (pg/mL)	睾酮 (ng/mL)
1	<0.2	0.1		49
2	<0.2	0.2		9
3	0.2	<0.2	<5	
4	0.4	0.2		22
A	0.2	0		40
5				
6	0.3	0.1	<10	
7	0.8	0.4		10
8	1.0	2.1		50
9	2.5	2.9		297
10	0.6	1.5		186
B	2.9	1.3	<20	
11	5.5	4.1		422

[0117]

12	14.4	5.7		686
13	17.4	31.5	201	
14	4.0	2.9		363
15	11.1	2.9		398

[0118] 结果

[0119] 对亲吻肽的应答

[0120] 患有延迟的或停滞的青春期的17名参与者参与本研究(4名女孩和13名男孩,图1)。先前已在参考文献(20)中报道了15名这些参与者(参与者1-15)的亲吻肽-和GnRH-刺激试验的结果。参与者A,本研究的新成员,表现“亲吻肽无应答者”模式,然而参与者B,也是本研究的新成员,表现“亲吻肽应答者”模式(图2)。参与者的特征和他们的神经内分泌表型提供于表4和表2(21)。

[0121] 长期复查

[0122] 在本初始神经内分泌表征后,参与者每6个月返回进行复查访问。8名参与者(2名女孩和6名男孩)在复查期间青春期进展(表4,表3(21))。在无外源治疗的情况下,男孩表现逐渐增加的睾丸体积,女孩表现进展性乳房发育。所有这些参与者为“亲吻肽应答者”,其应答于外源亲吻肽,LH增加0.8mIU/mL或以上(图3,表4)。

[0123] 相反地,8名参与者(1名女孩和7名男孩)到18岁未进入青春期(表4,表3(21))。这些参与者在体格检查中表现持续性性不成熟;男孩具有<4mL的睾丸体积,女孩不具有乳房发育直至她开始外源雌二醇的治疗。对于停止性-类固醇治疗后的内源生殖内分泌活性的评价,所有这些参与者具有低于成人参照范围的性类固醇(女孩为雌二醇,男孩为睾酮)的血清浓度,并且在低性类固醇的情况中,血清促性腺激素浓度低或不当正常(inappropriately normal)。未进入青春期的这些个体是“亲吻肽无应答者”(1名女孩和6名男孩),其显示对亲吻肽几乎没有应答(第8名“无应答者”失访),和1名男性“中度应答者(intermediate responder)”,其显示0.4mIU/mL的对亲吻肽的LH应答(图3,表4)。

[0124] 因此,参与者对亲吻肽的应答清楚地将后来青春期进展的那些与不进展的那些区分开(p=0.0002)。亲吻肽刺激试验的灵敏度和特异性二者均为100%(95%CI 74-100%)。

[0125] 三种条件下的LH测定:日间、过夜、和GnRH刺激后

[0126] 研究了未刺激的LH浓度(在日间或过夜期间测定)和在用外源GnRH刺激后测定的LH作为预测儿童是否将最终进入青春期的方法(8)。在本研究中,2名男孩在登记时具有青春期范围内的未刺激的血清LH浓度,并且1名后来发现青春期进展。在登记时具有青春期前范围内的LH的剩余14名参与者中,7名后来青春期进展而7名不进展(图4,表4)。因此,未刺激的LH无法准确预测青春期结果。

[0127] 在青春期早期,日间促性腺激素测定无法准确反映生殖内分泌腺轴的活性,因为GnRH和LH分泌的脉冲仅在深度睡眠阶段中的夜间发生(23)。因此,我们进行过夜血液采样以检测睡眠相关的LH分泌。后来发现具有至少一个LH分泌脉冲过夜的所有6名儿童青春期进展(表4)。相反地,对于不具有LH脉冲过夜的10名儿童观察到可变的结果。8名未能青春期进展,2名表现青春期进展:在神经内分泌评价时用外源性类固醇治疗的1名女孩和1名男孩(参与者B和11)可具有抑制的内源LH分泌。

[0128] 还研究了GnRH刺激的LH分泌作为预测青春期结果的试验(8)。在我们的群组

(cohort)中,对GnRH的LH应答重叠,后来青春期进展的那些人中的范围为1.2至15.4mIU/mL和不进展的那些人中的范围为0.2至7.5mIU/mL(图4,表4)。

[0129] 因此,这些试验-未刺激的LH,无论在日间或在夜间测定的,或GnRH刺激的LH-都不如在本研究群组中预测青春期结果的亲吻肽刺激试验准确。

[0130] 抑制素B

[0131] 已提议测定血清抑制素B作为预测青春期延迟的儿童的青春期结果的方法(8-11)。血清抑制素B在后来青春期进展的男孩中的范围为39至209pg/mL,在不进展的男孩中的范围为<17pg/mL至48pg/mL(图4,表4)。因此,抑制素B不能准确地将后来青春期进展的那些与不进展的那些区分开。

[0132] 基因检测

[0133] 一部分参与者同意进行外显子组测序。在后来青春期进展的5名参与者的2名中和在不进入青春期的6名参与者的2名中识别到30种IHH基因中的致病性和可能致病性变体(表1;(21))(表5)。在IGSF10(一种与体质性延迟潜在相关的基因)中未识别到致病性或可能致病性变体。因此,基因检测不能预测青春期延迟的儿童的青春期结果。

[0134] 表4.参与者特征和生殖内分泌评价

[0135]

ID*	性别	参加时				垂体激发前			垂体激发后	复查
		年龄(y)	青春期发育	LH(mIU/mL)	FSH(mIU/mL)	过夜LH脉冲	抑制素B(pg/mL)	ΔLH_{GnRH}(mIU/mL)	$\Delta LH_{亲吻肽}$(mIU/mL)	青春期进展?
1	M	17.0	缺失	0.1	0.2	缺失	<17	0.2	0	N
2	M	15.7	缺失	0.2	0.2	缺失	<17	0.2	0	N
3	F	16.7	缺失	<0.2	0.2	缺失	ND	0.5	0	N
4	M	15.6	缺失	0.1	0.7	缺失	<17	0.6	0	N
A	M	16.4	缺失	<0.1	0.3	缺失	23	0.7	0	N
5	F	15.2	缺失	0.1	0.5	缺失	ND	0.8	0	失访
6	F	16.5	缺失	<0.2	0.6	缺失	ND	1.3	0	N
7	M	14.9	缺失	0.1	0.3	缺失	<17	1.6	0.1	N
8	M	14.6	缺失	0.8	1.4	缺失	47	7.5	0.4	N
9	M	16.0	停滞	0.1	0.5	存在	209	3.7	0.8	Y
10	M	14.9	缺失	<0.3	1.1	存在	96	3.0	0.8	Y
B	F	15.0	缺失	0.1	0.2	缺失†	ND	1.2	0.9	Y
11	M	15.1	停滞	0.1	0.3	缺失†	156	6.3	1.0	Y
12	M	14.8	缺失	0.1	1.7	存在	44	3.1	1.4	Y
13	F	13.9	缺失	0.1	1.0	存在	ND	1.7	1.4	Y
14	M	17.5	停滞	0.2	0.7	存在	66	15.4	1.5	Y
15	M	14.2	缺失	0.6	3.4	存在	39	2.0	1.7	Y

[0136] *如参考文献(20)中编号具有数字ID的参与者;具有字母ID的参与者在该报道后参与研究。†参与者B和11在他们的预激发访问时接受外源性类固醇。$\Delta LH_{亲吻肽}$,亲吻肽后的黄体生成素(LH)的增加;ΔLH_{GnRH},促性腺激素释放激素(GnRH)后的LH的增加。ND,未确定的。本表中的一些数据已先前报道于参考文献(20)。

[0137] 表5.与特发性低促性腺激素性性腺功能减退症相关的基因中的致病性和可能致病性变体。

[0138]

ID	性别	青春期进展?	识别的变体
1	M	N	ND
2	M	N	未发现符合条件的变体
3	F	N	*FGFR1* p.R609X
4	M	N	*ANOS1** p.T193Kfs*24
A	M	N	未发现符合条件的变体
6	F	N	未发现符合条件的变体
7	M	N	ND
8	M	N	未发现符合条件的变体
9	M	Y	ND
10	M	Y	未发现符合条件的变体
B	F	Y	ND
11	M	Y	未发现符合条件的变体
12	M	Y	*FGFR1* p.I676Dfs*7
13	F	Y	未发现符合条件的变体
14	M	Y	ND
15	M	Y	*TACR3* p.W208X

[0139] *原名KAL1。ND,未进行。

[0140] 实施例2.超生理亲吻肽以改善青春期延迟的青少年的青春期结果

[0141] 实施例1中所描述的研究中的一名青春期延迟的受试者在15.3岁时接受亲吻肽-10 0.313μg/kg IVB(生理剂量)并且未能进行LH应答。在其后不久单独入院期间,他接受超生理剂量的亲吻肽(18μg/kg)并令人惊讶地确实应答。受试者的最终诊断为IHH,如由未能到18岁时显示青春期的体征所证明的。这表明1)GnRH缺乏可归因于亲吻肽抗性和2)该抗性可由高剂量的亲吻肽来克服。

[0142] 基于该观察结果,假设高剂量和/或重复施用亲吻肽可刺激患有IHH/KS的患者中的GnRH诱导的LH分泌。为了解决该假设,进行以下方案:1)q10分钟血液采样x 6小时,2)亲吻肽施用q2小时x 40小时(5组,4剂量,各自为:0.313、0.939、3.13、和13.19μg/kg)。为了比较,图5A显示健康男性。他具有正常LH脉冲并且生理剂量的亲吻肽清楚地导致GnRH诱导的LH脉冲。图5B显示KS男性,他不具有内源LH脉冲并且对亲吻肽无LH应答(即,亲吻肽抗性)。他携带在编码前动力蛋白受体的基因PROKR2、和DMXL2中的罕见变体。图5C显示KS女性,她不应答于生理剂量的亲吻肽,但确实应答于超生理剂量且并伴有清晰的亲吻肽诱导的GnRH诱导的LH脉冲。此外,脉冲幅度随时间而增加,暗示了重复暴露的"激发"效果。尚未知晓她的基因印记。图5D显示也具有遗传变体的KS男性,他也应答于超生理亲吻肽,尽管他的应答没有那么明显。图6显示来自图5C的数据,重新作图以清晰地显示随时间变化的、对各剂量的应答。因此,尽管在单一IV团注剂量下、患有持久性低性腺促素症的患者被认为是亲吻肽抗性的,当重复施用亲吻肽、特别地以较高剂量重复施用亲吻肽时,这些患者表现非常不同的应答。他们的数据表明,通过重复亲吻肽刺激可将患有IHH/KS的患者中的GnRH神经元从其静止状态中唤醒。此外,该重复亲吻肽刺激导致GnRH诱导的LH脉冲。

[0143] 实施例3.下丘脑生殖内分泌脉冲发生器活性不依赖于神经激肽B和强啡肽信号传

导

[0144] 目前内源因子(例如,性腺类固醇、应激激素、和营养信号)和外部原因(例如,社会原因和白昼长)调节GnRH释放的传入通路(afferent pathway)的识别已集中于亲吻肽/神经激肽B/强啡肽系统(34)。亲吻肽、神经激肽B(NKB)、和它们各自的受体中的失活突变在人和小鼠中导致IHH,表明这些神经肽参与GnRH脉冲的产生(35-42)。强啡肽被认为通过在月经周期的黄体期期间应答于孕酮而提供GnRH脉冲发生器活性的邻接减慢来对抗这种刺激活性(43-45)。这三种神经肽在弓状核中的神经元群KNDy(亲吻肽(Kisspeptin)-神经激肽(Neurokinin)B-强啡肽(Dynorphin))神经元中合并(coalesce),并且假定以协同方式起作用以同步GnRH神经元的分泌活性,从而产生驱动生殖内分泌功能所需的GnRH分泌的脉冲(46-48)。

[0145] 由于双等位基因功能丧失型突变破坏基因的两拷贝,携带这样的突变的患者(即,“人敲除”)提供基因破坏或丧失的表型结果的新见解。在本研究中,携带在编码NKB(KNDy神经元中的关键神经肽之一)的基因中的双等位基因的、完全功能丧失型突变的四名姐妹经受基因型驱动的表型分型(phenotyping)。尽管初始诊断为IHH,但几名姐妹在成年生活中自发恢复生殖内分泌功能。在正常和神经激肽B缺陷家族成员以及正常和神经激肽B缺陷小鼠二者中进行研究以调查NKB在GnRH脉冲产生中的作用并详细分析NKB、亲吻肽、和强啡肽之间的相互作用。使用特定神经内分泌探针的组合揭露了下丘脑能够产生GnRH诱导的LH脉冲,而无论三种KNDy组分中的两种即NKB和强啡肽的遗传和药理学拮抗作用。

[0146] 结果显示在患有IHH的受试者中,NLX输注期间LH水平增加。迄今为止,不存在刺激模拟患有IHH的患者中正常生理机能的内源GnRH诱导的LH脉冲的能力。

[0147] 关于LH脉冲的考虑包括受试者4看起来具有比受试者5更明显的对NLX的应答的观察结果。受试者4经历用外源GnRH的垂体激发而受试者5不,这可能放大了受试者4中NLX对LH应答的任何作用。受试者4还接受间歇性激素替代疗法,这可具有增强的对GnRH释放的内源亲吻肽作用。

[0148] 在先前的研究中,在健康男性和黄体期女性中引起强力GnRH诱导的LH应答的相同剂量的kp-10不能在一系列的基因型中的IHH患者中引起任何效果,表明GnRH神经元网络的功能能力在患有IHH的患者中严重受损(58)。与具有TAC3或TACR3以外的基因型的IHH患者中的这些先前的观察结果相反,受试者3、4、和5应答于kp-10IVB(58)。这里,低频率脉冲和应答于外源kp-10施用的能力表明脉冲发生所需的GnRH神经元电路在缺乏NKB的患者中保持完整。然而,以LH脉冲应答于kp-10的能力仅在IVB施用、而不是连续输注的情况中观察到,如由其他人所报道的(59)。不同剂量的kp-10、LH检验和LH脉冲算法可能是该不一致的原因。

[0149] 方法

[0150] 以下材料和方法用于实施例3。

[0151] 受试者和合格标准

[0152] 基于他们的基因型,招募来自单一血亲家族的五名女性(表6)。受试者为生殖正常(受试者1;基因型TAC3 c.61_61delG p.A21LfsX44杂合子)或具有低促性腺激素性性腺功能减退症的诊断(受试者2-5;基因型TAC3 c.61_61delG p.A21LfsX44纯合子)。兄弟和父母不可用于研究参与。IHH定义为在≥18岁的年龄下的低或正常促性腺激素水平并缺乏任何

可导致低促性腺激素性性腺功能减退症的可识别的医疗状况的情况中的、性腺机能减退的(hypogonadal)性类固醇水平(女性中雌二醇<20pg/mL)。如在我们先前的报告中(19),女性中的IHH的逆转定义为:1)在不使用外源GnRH或促性腺激素治疗的情况下的生育力;2)在无治疗的情况中的至少3个月的自发的月经周期;和/或3)在女性的正常范围内的LH脉冲频率和幅度。逆转后的复发定义为再次具有性腺机能减退的性-类固醇水平(女性中血清雌二醇<20pg/mL)和/或闭经。

[0153] 受试者还参与遗传学研究。对父母的DNA筛选罕见序列变体(RSV),定义为在如先前所描述的(20,21)已知导致IHH的基因中在The Genome Aggregation Database(gnomAD)中具有小于1%的次等位基因频率。通过外显子的PCR扩增、接着Sanger测序来筛选的基因为CHD7(MIM 608892)、FGF8(MIM 600483)、FGFR1(MIM 136350)、GNRH1(MIM 152760)、GNRHR(MIM 138850)、HS6ST1(MIM 604846)、ANOS1(先前称为KAL1、MIM 300836)、KISS1(MIM 603286)、KISS1R(MIM 604161)、NSMF(先前称为NELF、MIM 60813)、PROK2(MIM 607002)、PROKR2(MIM 607123)、TAC3(MIM 162330)、和TACR3(MIM 162332)。如果RSV由四种计算机预测程序:PolyPhen-2(22)、SIFT(23)、Mutation Taster(24)、或Panther(25)中的至少两种预测为有破坏性的,则报告RSV。来自12项气味测试的宾夕法尼亚大学气味识别测试(The University of Pennsylvania Smell Identification Test)(UPSIT)评分用于分类嗅觉能力(26,27)。

[0154] 表6.研究受试者特征

[0155]

ID	表现	初始治疗和后续疗程
TAC3 c.61_61delG p.A21LfsX44 杂合子		
1	12.6 岁，初潮	12.6 岁 – 35 岁，正常每月月经 35 岁，妊娠
TAC3 c.61_61delG p.A21LfsX44 纯合子		
2	15 岁，1°闭经，最小乳房初长(thelarche)	15-20 岁，HRT 和乳房发育，生长突增 20 岁，MPA X 10 天 + 缩退性出血(withdrawal bleed) 20 多岁，HRT x 6 个月 20 多岁，草药(herbal medication) 31 岁 – 至今，闭经
3	14 岁，1°闭经，无乳房初长	16 岁 8 个月，FSH 2.1IU/L (0.6-11)，LH 1.1IU/L (1-11)，E_2 <40pmol/L 16-20 岁，HRT 和乳房发育，生长突增 HRT 22 岁，FSH 7.7IU/L (0.6-11)，LH 11.9IU/L (1-11) 22 岁，MPA x1 + 缩退性出血 22 岁，自然受孕健康儿子，1 最多 MPA 24 岁，超数排卵(superovulation)x2 (MPA 接着 CC)，无妊娠 24- 37 岁，~q3 个月 MPA, + 间歇性缩退性出血 37-40 岁，闭经 40 岁 – 至今，重新进行~q3 个月 MPA
4	14 岁，1°闭经，无乳房初长	16 岁 4 个月，FSH 2.4IU/L (0.6-11)，LH <0.5IU/L (1-11)，E_2 49pmol/L 16-22 岁，HRT 和乳房发育 22-24 岁，闭经 24 岁，+家庭妊娠试验接着 SAB 24 岁，FSH 5.5IU/L (0.6-11)，LH 5.4IU/L (1-11) 25-27 岁，HRT 28 岁 5 个月，草药，2 个自然周期相隔 6 个月 28 岁，FSH，LH “正常范围”，E_2 “低”为 52pmol/L 29 -30 岁，HRT 30-31 岁，闭经 31- 至今，间歇性 HRT 使用
5	13 岁，1°闭经，无乳房初长	17-18 岁，HRT 21 岁，OCP 进行 6 个月 25 岁，草药 + 缩退性出血，重复但无效果 26-28 岁，闭经 28-29 岁，正常每月循环(1.3 年) 29-31 岁，q2.5 个月循环(2.5 年) 31 岁 – 至今，每年自发滴血(spotting)

[0156]

ID	表现	研究性学习 2016				
		方案	FSH (IU/L)	LH (IU/L)	E_2 (pg/mL)	成像
TAC3 c.61_61delG p.A21LfsX44 杂合子						
1	12.6 岁，初潮	1)基线 2) IVB Kiss，GnRH	4.23	2.18	20.4	US：子宫内膜 6mm，多个小卵泡
TAC3 c.61_61delG p.A21LfsX44 纯合子						
2	15 岁，1°闭经，最小乳房初长	不适用				
3	14 岁，1°闭经，无乳房初长	1)基线& IVB Kiss，GnRH 2) 亲吻肽输注& IVB GnRH	2.12	0.49	20.3	正常 MRI US – 子宫内膜 4mm，所有的卵泡<2 mm，子宫小成人尺寸
4	14 岁，1°闭经，无乳房初长	1)基线& IVB Kiss，GnRH 2)纳洛酮输注& IVB Kiss，GnRH	3.97	0.94	11.2	US – 子宫内膜 5mm，一个卵泡 10mm，子宫小成人尺寸
5	13 岁，1°闭经，无乳房初长	1)基线& IVB Kiss，GnRH 2)纳洛酮输注& IVB Kiss，GnRH	3.42	0.86	34	正常 MRI US – 子宫内膜 9mm，囊肿 3cm

[0157] FSH＝促卵泡激素,LH＝黄体生成素,E2＝雌二醇,IVB＝静脉团注,kiss＝亲吻肽,GnRH＝促性腺激素刺激激素,US＝经阴道超声,HRT＝激素替代疗法,MPA＝醋酸甲羟孕酮,CC＝枸橼酸氯米芬,SAB＝自然流产,OCPs＝口服避孕药

[0158] 研究设计

[0159] 在2010年,在I.Sadaf Farooqi教授的指导下、在英国剑桥的惠康信托基金会临床研究机构(Wellcome Trust Clinical Research Facility,Cambridge,UK)中,患有低促性腺激素性性腺功能减退症的受试者(受试者2、3、4、5)接受了详细的神经内分泌表型分型,其中每10分钟进行血液采样(q10分钟)6-8小时,以作图内源LH脉冲(图7A)。

[0160] 在2016年,邀请受试者1、3、4和5参与在麻省总医院(MGH)临床研究中心(CRC)(Massachusetts General Hospital(MGH)Clinical Research Center(CRC))的第二系列的日间研究以确定他们的内源LH脉冲模式是否可通过施用GnRH、亲吻肽112-121(kp-10)和阻断强啡肽的非特异性阿片类拮抗剂纳洛酮(NLX)来改变(图8A,图9A,图10A)。为了确保垂体促性腺激素细胞(gonadotrope)处于准备状态(state of readiness),在入院MGH CRC前,受试者3和4通过Crono F便携式输液泵(CanèS.p.A,Turin,Italy)每2小时(q2小时)接受外源脉动性GnRH 25ng/kg3天(28)。最近证明受试者5有一些神经内分泌活性(每年自发出血),因此她不由脉冲GnRH激发(表6)。

[0161] 基线研究:所有受试者在他们访问MGH CRC的数天中的一天中,接受q10分钟血液采样至少6小时,以评价内源GnRH诱导的LH分泌(图7A,图8A)。

[0162] 亲吻肽团注:在评价内源GnRH诱导的LH分泌后,受试者3、4、和5接受施用kp-10

0.24nmol/kg静脉团注(IVB)，如我们组先前的工作所表明的，该剂量在健康男性和健康黄体期女性中始终激发生理幅度的GnRH诱导的LH脉冲(29,30)(图8A)。其后，受试者4、5接受0.72和2.4nmol/kg的kp-10IVB。然后，受试者3、4、和5在这些研究结束时接受75ng/kg IVB的GnRH，如我们组先前所示，该剂量在具有完整促性腺激素细胞功能的个体中导致强力的GnRH诱导的LH应答(31)。

[0163] 亲吻肽输注：与IVB研究相反，受试者3返回CRC以参与第二次入院，其中kp-10作为连续输注(9.5nmol/kg/小时)施用12小时以确定其对内源GnRH诱导的LH脉冲的作用。类似于IVB研究，q10分钟抽取血液样品并在研究结束时施用GnRH 75ng/kg IVB(图9A)。

[0164] 纳洛酮输注，阻断强啡肽：受试者4和5返回CRC并接受NLX输注(NLX 10mg IVB，接着以0.8mg/小时输注)13小时以确定在无NKB信号传导的情况中、用阿片类拮抗作用来阻断强啡肽信号传导对内源LH脉冲的作用。在输注中途，施用kp-10和GnRH团注(kp-10剂量范围：0.24至2.4nmol/kg，GnRH：75ng/kg)以确定NLX施用是否可增强对这些肽的应答(图10A)。再次，q10分钟抽取血液样品用于激素测定。由于护理失误，受试者5在9小时时提早结束NLX输注。

[0165] 肽的来源

[0166] 通过NeoMPS(PolyPeptide Laboratories,San Diego,CA)、使用良好的生产规范合成亲吻肽112-121，即亲吻肽的10-氨基酸异形体(isoform)(对应于前激素原(pre-prohormone)的氨基酸112-121)，和GnRH。NeoMPS根据合同向尤妮斯·肯尼迪·施莱佛国家儿童健康与人类发育研究所(Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development)提供亲吻肽112-121。纳洛酮订购自Hospira(Lake Forest,IL)。

[0167] 人实验室检验

[0168] 如先前所描述的(28)，使用自动化Abbott ARCHITECT系统(Abbott Laboratories,Inc.,Abbott Park,IL)、通过直接免疫测定法测定2小时池上的各样品的LH和雌二醇。对于2010-2011年的研究，通过起源于基于质谱法的测定的第二代免疫测定法测定雌二醇，对于2016年的研究，通过Elecsys(Roche Diagnostics,Indianapolis,IN)测定雌二醇(32,33)。

[0169] 环青春期(peripubertal)和成年Tac2敲除小鼠中脉冲LH释放的评价

[0170] 由德克萨斯A&M基因组医学研究所(Texas A&M Institute for Genomic Medicine)(College Station,TX)产生$Tac2^{+/-}$繁殖对并基因分型(34)。所有的小鼠产生并维持在Sv129/C57BL/6混合背景中，并且在布里格姆妇女医院、在0600-1800h开灯和任意提供食物和水的温度-和光-受控环境中成组居住(3至4只每笼)。在实验前每天处理小鼠2至6周以使其适应采样条件。

[0171] 在性成熟(6周龄)和成年(16周龄)完整和卵巢切除的(OVX)Tac2敲除(KO)雌性小鼠和对照(野生型；WT)同窝仔鼠(n＝4-5只每组)中评价LH分泌的变化。由于小鼠中的Tac2编码人中的NKB，这些小鼠缺少NKB。通过尾部的尖端处的单一切口重复血液收集来评价LH分泌的脉冲测定。用盐水清洗尾部，然后用移液器在各时间点从切开的尾部取得4ul血液。立即将全血在116ul的0.05％PBST中稀释、涡旋并在干冰上冷冻。将样品保存在-80℃下用于后续的LH ELISA。对于kp-10施用研究，在6小时采样周期中收集36份连续血液样品。在采

样的170分钟(或对环青春期Tac2敲除小鼠的采样的180分钟),用小鼠kp-10腹腔内注射小鼠(7.5nmol/100ul盐水;Phoenix Pharmaceuticals)。对于NLX施用研究,在5小时采样周期中从WT和Tac2 KO小鼠收集30份连续血液样品。对WT和Tac2 KO小鼠进行OVX以增加LH脉冲的频率和幅度以更好地确定强啡肽去除在LH脉冲的产生中的作用。在取样的120分钟,用NLX腹腔内注射小鼠(5mg/kg/100ul盐水;Sigma Aldrich)。

[0172] 数据分析

[0173] 人脉冲分析:使用由反卷积算法(29)增强的Santen和Bardin法(35,36)的验证修改(validated modification)来识别LH脉冲。kp-10诱导的或GnRH诱导的LH脉冲的脉冲幅度计算为kp-10或GnRH施用的时间0与脉冲的峰之差。

[0174] 小鼠脉冲分析:使用读取由LH夹心ELISA收集的LH脉冲数据的定制的MATLAB代码来识别LH脉冲。该代码包括基于以下来确定脉冲的循环(loop):如果:a)LH值的高度比前两个值任一者的高度大20%或更高以及比后一个值的高度大10%或更高;b)第二时间间隔(i=2)处的峰比在其之前被视为脉冲的单一值大>20%或更高。

[0175] 统计:成对双向t检验用于评价与对神经肽干涉的应答相比较,如上述方法中所定义的平均值LH、LH幅度(LH脉冲的最低点至峰)和基线处FSH的变化。除非另外指出,所有值报告为平均值±标准偏差。

[0176] 研究许可

[0177] 所有人体研究由MGH/合作医疗的机构审查委员会(Institutional Review Board of MGH/Partners Healthcare)批准、或由英国剑桥的当地伦理委员会(Local Regional Ethics Committee of Cambridge,United Kingdom)批准。所有受试者在参与研究前提供书面知情同意书。对于小鼠研究,布里格姆妇女医院实验动物管理与使用委员会(Brigham and Women's Hospital Institutional Animal Care and Use Committee)批准所有程序。

[0178] 结果

[0179] 研究受试者初始临床表现和其后的进程

[0180] 受试者1具有正常初潮时间、正常月经周期、和自然妊娠(表6)。她的姐妹,受试者2、3、4、和5,在13-15岁表现首次闭经并接受雌激素治疗以诱导第二性征。由于到18岁缺少自然性成熟、正常MRI、和低促性腺激素,受试者2、3、4、和5全部接受IHH的诊断(表6)。姐妹们均不为嗅觉丧失。四名IHH姐妹中的三名在22-28岁之间表现她们的低性腺促素症的逆转,由在无生育药物的情况下的妊娠(受试者3和4)和正常自然月经周期(受试者5)所证明的。然而,逆转不是永久性的并且在生理学研究时,受试者3、4、和5回复至低促性腺激素性性腺功能减退症的状态(表6)。

[0181] 遗传学

[0182] 候选基因的测序揭露了,受试者1(正常青春期时间和正常月经周期)对于编码NKB的基因(TAC3)中的单核苷酸的删除为杂合的(c.61_61delG p.A21LfsX44)。该碱基对删除导致在NKB序列前的前激素原中的移码突变和早熟终止密码子,这将预测为导致无义介导的降解。即使转录本逃脱无义介导的降解,移码突变会破坏前激素原中被加工以产生称为NKB的十肽的部分。受试者2、3、4、和5,全部患有低促性腺激素性性腺功能减退症,对于该移码突变为纯合的。该突变为新型的并且未发现于gnomAD(含有123,136个外显子组和15,496

个基因组的规范数据库)(21)。应注意,gnomAD中没有对TAC3中的任何蛋白质截断突变为纯合的个体。该家族在已知导致IHH的基因中不具有其它突变。

[0183] 基线研究:慢LH脉冲频率表征无神经激肽B的IHH个体

[0184] 在这些基线研究时,IHH姐妹(受试者2、3、4、和5)在脱离激素药物的情况中闭经、具有低但可检测的血清雌二醇水平和低孕酮水平(表6,图7B)。所有患有IHH的受试者具有衰弱的但公认的GnRH脉冲发生器的证据,如由低频率LH分泌活动所证明的(用于比较表征为低雌二醇、低黄体酮的生理性早期卵泡期:LH频率,7.0±1.8脉冲/12小时;LH幅度,2.3±1.0IU/L[平均值±2SD])(37,38)。受试者2、4、和5中,在采样间隔中观察到一个脉冲(7-8小时;平均LH幅度1.5±0.8mIU/mL)(图7B)。在受试者3中,在研究期间未观察到脉冲。此外,受试者3、4、和5的LH水平表明采样间隔开始时的慢降解,表明LH分泌活动在研究开始前发生。因此,所有的受试者表现不正常的低频率的LH分泌活动。在2016年中的重复试验中,研究受试者(受试者3、4、5)在脱离激素药物的情况中再次闭经、具有低但可检测的雌二醇水平。所有研究概述了在2010年观察到的同一内源LH模型,具有低频率的LH分泌活动和1.3±1.1mIU/mL的平均LH幅度(图8B)。

[0185] 相反地,受试者1,具有TAC3中杂合蛋白截断变体的健康姐妹,在月经周期的第4天(早期卵泡期;EEP)接受血液采样。她在12小时中表现11个LH脉冲,具有0.46±0.25mIU/mL的平均LH脉冲幅度(图7C)(健康早期卵泡期女性:频率,7.0±1.8脉冲/12小时;幅度,2.3±1.0IU/L[平均值±2SD])(19,20)。

[0186] 亲吻肽团注:无NKB的IHH个体应答于亲吻肽

[0187] 所有受试者以LH脉冲应答于亲吻肽(图8B)。两名研究受试者接受三种亲吻肽团注并在6次团注的5次中表现亲吻肽后的LH脉冲。当在内源LH峰后立即施用亲吻肽时发生一个例外,导致延长的单峰(图8B,受试者5)。与该应答性相符的,所有受试者表现充足的垂体激发,表明没有可损害亲吻肽应答性的垂体缺陷(GnRH施用后的LH脉冲幅度:受试者3:1.6mIU/mL,受试者4:5.1:mIU/mL,受试者5:3.0mIU/mL)。

[0188] 亲吻肽输注:无脉冲LH分泌

[0189] 受试者3接受kp-10输注(9.5nmol/kg/小时)12小时并且未检测到LH脉冲。输注期间,平均LH略微增加(基线:0.46±0.24mIU/mL;kp-10输注:0.63±0.08mIU/mL;$p<0.0001$)(图8B&9B)。与基线相比,平均FSH水平也增加(基线:1.9±0.2mIU/mL;kp-10输注:2.4±0.1mIU/mL;$p<0.001$)。kp-10输注后,受试者3接受GnRH的IVB,导致与前日中的基线研究中所观察到的可比幅度的LH脉冲(基线,1.6mIU/mL;kp-10输注后,2.5mIU/mL)。

[0190] 纳洛酮输注:用纳洛酮阻断强啡肽增加了LH&FSH分泌和LH脉冲频率,但不放大亲吻肽诱导的LH脉冲

[0191] 受试者4和5接受非选择性阿片类拮抗剂NLX、以及逐步增加的亲吻肽的团注(0.24、0.72、2.4nmol/kg)以确定阻断强啡肽信号传导对内源和亲吻肽刺激的LH分泌模式的作用。两种研究均表明与基线相比,NLX输注期间的增加的平均LH水平(受试者4-基线:1.44±0.76mIU/mL,NLX:2.82±0.54mIU/mL,$p<0.00001$;受试者5-基线:0.6±0.25mIU/mL,NLX:1.1±0.37mIU/mL,$p<0.00001$,在匹配的时间点中)(图8B、10B)。对于其中在NLX输注和脱离NLX输注时进行完整LH采样以允许比较的研究受试者,受试者4,LH脉冲频率从6小时中1个脉冲(图8B)增加至6小时中4个脉冲(图10B)。与基线相比,平均FSH水平也增加(受试者

4-基线:3.7±0.3mIU/mL,NLX:5.0±0.9mIU/mL;p<0.01;受试者5-基线:3.3±0.3mIU/mL,NLX:5.1±0.1mIU/mL;p<0.0001)。LH脉冲幅度中没有一致的变化(受试者4-基线:2.59mIU/,NLX:0.45±0.29mIU/mL;受试者5-基线:0.82mIU/mL,NLX:1.22和1.39mIU/mL)。通过抑制阿片类药物紧张度(opioid tone)来阻断强啡肽的NLX输注在患有IHH的个体中由于丧失NKB信号传导而增加促性腺激素分泌和改善LH脉冲频率。

[0192] 受试者4和5还接受逐步增加的kp-10的团注(0.24、0.72、2.4nmol/kg),接着为LH脉冲,概括了在脱离NLX的情况中看到的结果(图8B、10B)。有或脱离NLX的情况中的亲吻肽诱导的LH应答中的变化中无显著差异,并且无清晰的剂量-应答关系;尽管各剂量下的少量团注限制了评价这样的关系的能力。

[0193] 亲吻肽团注在环青春期和成年WT和NKB缺陷(Tac2 KO)小鼠中刺激LH释放

[0194] 为了证实在IHH患者中的发现,我们在Tac2 KO和WT对照雌性小鼠中进行实验。kp-10的外周施用在所有动物组中激发强力的LH增加,无论年龄和基因型。有趣地,缺乏NKB的环青春期Tac2 KO雌性小鼠表现高于对照雌性小鼠(2.67±0.48ng/ml,n=5;p<0.01)的LH释放量(5.29±0.43ng/ml,n=5)(图11)。然而,与WT对照(68±3.72分钟,n=5;p<0.01)中相比,LH在Tac2 KO小鼠中较快返回至基线(注射后52±3.72分钟,n=5)。成年WT小鼠表现应答于kp-10的预期的LH脉冲,而应答于kp-10的Tac2 KO小鼠显示双相应答(bi-phasic response),表现LH的两个重叠的峰(图10)。在两个成年组中,LH释放的诱导似乎比环青春期小鼠中的更持久(注射后,环青春期WT:68±3.742分钟,n=5vs成年WT142.5±4.78分钟,n=4,p<0.0001;环青春期Tac2 KO:52±3.742,n=5vs成年Tac2 KO 156.7±3.33分钟,n=3,p=0.07)。

[0195] 纳洛酮在成年OVX WT和Tac2 KO小鼠中增加脉冲LH释放

[0196] 为了确定无NKB的情况中的阿片类(强啡肽)影响对亲吻肽信号传导的作用,我们检验了阻断强啡肽的NLX对LH分泌的作用。NLX 5mg/kg的外周施用在施用的20分钟内、在WT(图12A-C)和Tac2 KO雌性小鼠(图12D-E)二者中均诱导LH的增加(WT:NLX前20分钟,2.37±0.59,n=4vs NLX后20分钟,4.31±0.32,n=4;p<0.05。Tac2 KO:NLX前20分钟,0.31±0.06,n=4vs NLX后20分钟,1.22±0.29,n=4,p<0.05)。

[0197] 在NLX施用后,WT小鼠应答,且NLX施用后的下一个LH脉冲的持续时间增加(NLX前:WT 25±2.67分钟,n=3;Tac2 KO 23.33±2.10分钟,n=3,p=0.13;NLX后:WT:83.33±12.02分钟,n=3;Tac2 KO:30±5.77分钟,n=3;p<0.01)(图12A)。此外,在WT小鼠中,NLX后LH脉冲的持续时间的增加伴随有明显的且较长的脉冲间间隔(WT脉冲间间隔NLX前25.38±1.83分钟;WT脉冲间间隔NLX后46.67±3.33分钟,p<0.0002)。

[0198] Tac2 KO动物表现与OVX对照中相比为显著降低的LH基线和脉冲数(NLX前120分钟中0-1LH脉冲)。NLX的施用诱导强力LH脉冲,所述强力LH脉冲在所有情况中在处理后20分钟发生,具有达到与基线相比为两倍增加的峰(NLX前:0.31±0.06mIU/mL;NLX后:1.2±0.28mIU/mL,p<0.02)。然而有限的LH脉冲数排除了脉冲间间隔的分析;数据表明NLX不增加LH脉冲的持续时间(NLX前Tac2 KO 23.33±2.10分钟,n=3,NLX后:Tac2 KO:30±5.77分钟,n=3,p>0.05)(图12D-E)。

[0199] 参考文献

[0200] 1.Palmert MR,Dunkel L.Clinical practice.Delayed puberty.N Engl J

Med.2012;366(5):443-453.

[0201] 2.Wei C,Crowne EC.Recent advances in the understanding and management of delayed puberty.Arch Dis Child.2015.

[0202] 3.Sedlmeyer IL,Palmert MR.Delayed puberty:analysis of a large case series from an academic center.J Clin Endocrinol Metab.2002;87(4):1613-1620.

[0203] 4.Lawaetz JG,Hagen CP,Mieritz MG,Blomberg Jensen M,Petersen JH,Juul A.Evaluation of 451 Danish boys with delayed puberty:diagnostic use of a new puberty nomogram and effects of oral testosterone therapy.J Clin Endocrinol Metab.2015;100(4):1376-1385.

[0204] 5.Varimo T,Miettinen PJ,Kansakoski J,Raivio T,Hero M.Congenital hypogonadotropic hypogonadism,functional hypogonadotropism or constitutional delay of growth and puberty?An analysis of a large patient series from a single tertiary center.Hum Reprod.2017;32(1):147-153.

[0205] 6.Zhu J,Chan YM.Adult Consequences of Self-Limited Delayed Puberty.Pediatrics.2017;139(6).

[0206] 7.Balasubramanian R,Crowley WF,Jr.Isolated Gonadotropin-Releasing Hormone(GnRH)Deficiency.In:Adam MP,Ardinger HH,Pagon RA,Wallace SE,Bean LJH,Stephens K,Amemiya A,eds.GeneReviews((R)).Seattle(WA)1993.

[0207] 8.Harrington J,Palmert MR.Clinical review:Distinguishing constitutional delay of growth and puberty from isolated hypogonadotropic hypogonadism:critical appraisal of available diagnostic tests.J Clin Endocrinol Metab.2012;97(9):3056-3067.

[0208] 9.Adan L,Lechevalier P,Couto-Silva AC,Boissan M,Trivin C,Brailly-Tabard S,Brauner R.Plasma inhibin B and antimullerian hormone concentrations in boys:discriminating between congenital hypogonadotropic hypogonadism and constitutional pubertal delay.Med Sci Monit.2010;16(11):CR511-517.

[0209] 10.Binder G,Schweizer R,Blumenstock G,Braun R.Inhibin B plus LH vs GnRH agonist test for distinguishing constitutional delay of growth and puberty from isolated hypogonadotropic hypogonadism in boys.Clin Endocrinol (Oxf).2015;82(1):100-105.

[0210] 11.Rohayem J,Nieschlag E,Kliesch S,Zitzmann M.Inhibin B,AMH,but not INSL3,IGF1 or DHEAS support differentiation between constitutional delay of growth and puberty and hypogonadotropic hypogonadism.Andrology.2015;3(5):882-887.

[0211] 12.Harter CJL,Kavanagh GS,Smith JT.The role of kisspeptin neurons in reproduction and metabolism.J Endocrinol.2018;238(3):R173-R183.

[0212] 13.Dhillo WS,Chaudhri OB,Patterson M,Thompson EL,Murphy KG,Badman MK,McGowan BM,Amber V,Patel S,Ghatei MA,Bloom SR.Kisspeptin-54 stimulates the hypothalamic-pituitary gonadal axis in human males.J Clin Endocrinol

Metab.2005;90(12):6609-6615.

[0213] 14.Dhillo WS,Chaudhri OB,Thompson EL,Murphy KG,Patterson M,Ramachandran R,Nijher GK,Amber V,Kokkinos A,Donaldson M,Ghatei MA,Bloom SR.Kisspeptin-54 stimulates gonadotropin release most potently during the preovulatory phase of the menstrual cycle in women.J Clin Endocrinol Metab.2007;92(10):3958-3966.

[0214] 15.Chan YM,Butler JP,Pinnell NE,Pralong FP,Crowley WF,Jr.,Ren C,Chan KK,Seminara SB.Kisspeptin resets the hypothalamic GnRH clock in men.J Clin Endocrinol Metab.2011;96(6):E908-915.

[0215] 16.George JT,Veldhuis JD,Roseweir AK,Newton CL,Faccenda E,Millar RP,Anderson RA.Kisspeptin-10 is a potent stimulator of LH and increases pulse frequency in men.J Clin Endocrinol Metab.2011;96(8):E1228-1236.

[0216] 17.Jayasena CN,Nijher GM,Comninos AN,Abbara A,Januszewki A,Vaal ML,Sriskandarajah L,Murphy KG,Farzad Z,Ghatei MA,Bloom SR,Dhillo WS.The effects of kisspeptin-10on reproductive hormone release show sexual dimorphism in humans.J Clin Endocrinol Metab.2011;96(12):E1963-1972.

[0217] 18.Chan YM,Butler JP,Sidhoum VF,Pinnell NE,Seminara SB.Kisspeptin administration to women:a window into endogenous kisspeptin secretion and GnRH responsiveness across the menstrual cycle.J Clin Endocrinol Metab.2012.

[0218] 19.Chan YM,Lippincott MF,Butler JP,Sidhoum VF,Li CX,Plummer L,Seminara SB.Exogenous kisspeptin administration as a probe of GnRH neuronal function in patients with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism.J Clin Endocrinol Metab.2014;99(12):E2762-2771.

[0219] 20.Chan YM,Lippincott MF,Kusa TO,Seminara SB.Divergent responses to kisspeptin in children with delayed puberty.JCI Insight.2018;3(8).

[0220] 21.-空白-

[0221] 22.Richards S,Aziz N,Bale S,Bick D,Das S,Gastier-Foster J,Grody WW,Hegde M,Lyon E,Spector E,Voelkerding K,Rehm HL,Committee ALQA.Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants:a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology.Genet Med.2015;17(5):405-424.

[0222] 23.Boyar R,Finkelstein J,Roffwarg H,Kapen S,Weitzman E,Hellman L.Synchronization of augmented luteinizing hormone secretion with sleep during puberty.N Engl J Med.1972;287(12):582-586.

[0223] 24.Zhu J,Choa RE,Guo MH,Plummer L,Buck C,Palmert MR,Hirschhorn JN,Seminara SB,Chan YM.A shared genetic basis for self-limited delayed puberty and idiopathic hypogonadotropic hypogonadism.J Clin Endocrinol Metab.2015;100(4):E646-654.

[0224] 25.Young J,George JT,Tello JA,Francou B,Bouligand J,Guiochon-Mantel

A,Brailly-Tabard S,Anderson RA,Millar RP.Kisspeptin restores pulsatile LH secretion in patients with neurokinin B signaling deficiencies:physiological, pathophysiological and therapeutic implications.Neuroendocrinology.2013;97 (2):193-202.

[0225] 26.Lippincott MF,Leon S,Chan YM,Fergani C,Talbi R,Farooqi IS,Jones CM,Arlt W,Stewart SE,Cole TR,Terasawa E,Hall JE,Shaw ND,Navarro VM,Seminara SB.Hypothalamic Reproductive Endocrine Pulse Generator Activity Independent of Neurokinin B and Dynorphin Signaling.J Clin Endocrinol Metab.2019.

[0226] 27.Topaloglu AK,Reimann F,Guclu M,Yalin AS,Kotan LD,Porter KM,Serin A,Mungan NO,Cook JR,Ozbek MN,Imamoglu S,Akalin NS,Yuksel B,O'Rahilly S,Semple RK.TAC3 and TACR3 mutations in familial hypogonadotropic hypogonadism reveal a key role for Neurokinin B in the central control of reproduction.Nat Genet.2009;41(3):354-358.

[0227] 28.Gianetti E,Tusset C,Noel SD,Au MG,Dwyer AA,Hughes VA,Abreu AP, Carroll J,Trarbach E,Silveira LF,Costa EM,de Mendonca BB,de Castro M,Lofrano A,Hall JE,Bolu E,Ozata M,Quinton R,Amory JK,Stewart SE,Arlt W,Cole TR,Crowley WF,Kaiser UB,Latronico AC,Seminara SB.TAC3/TACR3mutations reveal preferential activation of gonadotropin-releasing hormone release by neurokinin B in neonatal life followed by reversal in adulthood.J Clin Endocrinol Metab.2010; 95(6):2857-2867.

[0228] 29.Tusset C,Noel SD,Trarbach EB,Silveira LF,Jorge AA,Brito VN,Cukier P,Seminara SB,Mendonca BB,Kaiser UB,Latronico AC.Mutational analysis of TAC3 and TACR3 genes in patients with idiopathic central pubertal disorders.Arq Bras Endocrinol Metabol.2012;56(9):646-652.

[0229] 30.Topaloglu AK,Tello JA,Kotan LD,Ozbek MN,Yilmaz MB,Erdogan S,Gurbuz F,Temiz F,Millar RP,Yuksel B.Inactivating KISS1 mutation and hypogonadotropic hypogonadism.N Engl J Med.2012;366(7):629-635.

[0230] 31.Schally AV,Arimura A,Kastin AJ,Matsuo H,Baba Y,Redding TW,Nair RM, Debeljuk L,White WF 1971 Gonadotropin-releasing hormone:one polypeptide regulates secretion of luteinizing and follicle-stimulating hormones.Science 173:1036-1038

[0231] 32.Spratt DI,Carr DB,Merriam GR,Scully RE,Rao PN,Crowley WF,Jr.1987 The spectrum of abnormal patterns of gonadotropin-releasing hormone secretion in men with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism:clinical and laboratory correlations.J Clin Endocrinol Metab 64:283-291

[0232] 33.Shaw ND,Seminara SB,Welt CK,Au MG,Plummer L,Hughes VA,Dwyer AA, Martin KA,Quinton R,Mericq V,Merino PM,Gusella JF,Crowley WF,Jr.,Pitteloud N, Hall JE 2011 Expanding the phenotype and genotype of female GnRH deficiency.J Clin Endocrinol Metab 96:E566-576

[0233] 34.Moore AM,Coolen LM,Porter DT,Goodman RL,Lehman MN 2018KNDy Cells Revisited.Endocrinology 159:3219-3234

[0234] 35.Chan YM,Broder-Fingert S,Paraschos S,Lapatto R,Au M,Hughes V,Bianco SD,Min L,Plummer L,Cerrato F,De Guillebon A,Wu IH,Wahab F,Dwyer A,Kirsch S,Quinton R,Cheetham T,Ozata M,Ten S,Chanoine JP,Pitteloud N,Martin KA,Schiffmann R,Van der Kamp HJ,Nader S,Hall JE,Kaiser UB,Seminara SB 2011 GnRH-deficient phenotypes in humans and mice with heterozygous variants in KISS1/Kiss1.J Clin Endocrinol Metab 96:E1771-1781

[0235] 36.Lapatto R,Pallais JC,Zhang D,Chan YM,Mahan A,Cerrato F,Le WW,Hoffman GE,Seminara SB 2007 Kiss1-/-mice exhibit more variable hypogonadism than Gpr54-/-mice.Endocrinology 148:4927-4936

[0236] 37.Seminara SB,Messager S,Chatzidaki EE,Thresher RR,Acierno JS,Jr.,Shagoury JK,Bo-Abbas Y,Kuohung W,Schwinof KM,Hendrick AG,Zahn D,Dixon J,Kaiser UB,Slaugenhaupt SA,Gusella JF,O'Rahilly S,Carlton MB,Crowley WF,Jr.,Aparicio SA,Colledge WH 2003 The GPR54 gene as a regulator of puberty.N Engl J Med 349:1614-1627

[0237] 38.de Roux N,Genin E,Carel JC,Matsuda F,Chaussain JL,Milgrom E 2003 Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54.Proc Natl Acad Sci U S A 100:10972-10976

[0238] 39.Funes S,Hedrick JA,Vassileva G,Markowitz L,Abbondanzo S,Golovko A,Yang S,Monsma FJ,Gustafson EL 2003 The KiSS-1 receptor GPR54 is essential for the development of the murine reproductive system.Biochem Biophys Res Commun 312:1357-1363、

[0239] 40.Topaloglu AK,Reimann F,Guclu M,Yalin AS,Kotan LD,Porter KM,Serin A,Mungan NO,Cook JR,Ozbek MN,Imamoglu S,Akalin NS,Yuksel B,O'Rahilly S,Semple RK 2009 TAC3 and TACR3 mutations in familial hypogonadotropic hypogonadism reveal a key role for Neurokinin B in the central control of reproduction.Nature genetics 41:354-358

[0240] 41.Topaloglu AK,Tello JA,Kotan LD,Ozbek MN,Yilmaz MB,Erdogan S,Gurbuz F,Temiz F,Millar RP,Yuksel B 2012 Inactivating KISS1 mutation and hypogonadotropic hypogonadism.N Engl J Med 366:629-635

[0241] 42.d'Anglemont de Tassigny X,Fagg LA,Dixon JP,Day K,Leitch HG,Hendrick AG,Zahn D,Franceschini I,Caraty A,Carlton MB,Aparicio SA,Colledge WH 2007 Hypogonadotropic hypogonadism in mice lacking a functional Kiss1 gene.Proc Natl Acad Sci U S A 104:10714-10719

[0242] 43.Goodman RL,Coolen LM,Anderson GM,Hardy SL,Valent M,Connors JM,Fitzgerald ME,Lehman MN 2004 Evidence that dynorphin plays a major role in mediating progesterone negative feedback on gonadotropin-releasing hormone neurons in sheep.Endocrinology 145:2959-2967

[0243] 44.Foradori CD,Goodman RL,Adams VL,Valent M,Lehman MN 2005 Progesterone increases dynorphin a concentrations in cerebrospinal fluid and preprodynorphin messenger ribonucleic Acid levels in a subset of dynorphin neurons in the sheep.Endocrinology 146:1835-1842

[0244] 45.Shoupe D,Mishell DR,Jr.,Fossum G,Bopp BL,Spitz IM,Lobo RA 1990 Antiprogestin treatment decreases midluteal luteinizing hormone pulse amplitude and primarily exerts a pituitary inhibition.American journal of obstetrics and gynecology 163:1982-1985

[0245] 46.Goodman RL,Lehman MN,Smith JT,Coolen LM,de Oliveira CV,Jafarzadehshirazi MR,Pereira A,Iqbal J,Caraty A,Ciofi P,Clarke IJ 2007 Kisspeptin neurons in the arcuate nucleus of the ewe express both dynorphin A and neurokinin B.Endocrinology 148:5752-5760

[0246] 47.Han SY,McLennan T,Czieselsky K,Herbison AE 2015 Selective optogenetic activation of arcuate kisspeptin neurons generates pulsatile luteinizing hormone secretion.Proc Natl Acad Sci U S A 112:13109-13114

[0247] 48.Clarkson J,Han SY,Piet R,McLennan T,Kane GM,Ng J,Porteous RW,Kim JS,Colledge WH,Iremonger KJ,Herbison AE 2017 Definition of the hypothalamic GnRH pulse generator in mice.Proc Natl Acad Sci U S A 114:E10216-E10223

[0248] 49.Sidhoum VF,Chan YM,Lippincott MF,Balasubramanian R,Quinton R,Plummer L,Dwyer A,Pitteloud N,Hayes FJ,Hall JE,Martin KA,Boepple PA,Seminara SB 2014 Reversal and relapse of hypogonadotropic hypogonadism:resilience and fragility of the reproductive neuroendocrine system.J Clin Endocrinol Metab 99:861-870

[0249] 50.Sykiotis GP,Plummer L,Hughes VA,Au M,Durrani S,Nayak-Young S,Dwyer AA,Quinton R,Hall JE,Gusella JF,Seminara SB,Crowley WF,Jr.,Pitteloud N 2010 Oligogenic basis of isolated gonadotropin-releasing hormone deficiency.Proc Natl Acad Sci U S A 107:15140-15144

[0250] 51.Lek M,Karczewski K,Minikel E,Samocha K,Banks E,Fennell T,O'Donnell-Luria A,Ware J,Hill A,Cummings B,Tukiainen T,Birnbaum D,Kosmicki J,Duncan L,Estrada K,Zhao F,Zou J,Pierce-Hoffman E,Cooper D,DePristo M,Do R,Flannick J,Fromer M,Gauthier L,Goldstein J,Gupta N,Howrigan D,Kiezun A,Kurki M,Levy Moonshine A,Natarajan P,Orozco L,Peloso G,Poplin R,Rivas M,Ruano-Rubio V,Ruderfer D,Shakir K,Stenson P,Stevens C,Thomas B,Tiao G,Tusie-Luna M,Weisburd B,Won H-H,Yu D,Altshuler D,Ardissino D,Boehnke M,Danesh J,Roberto E,Florez J,Gabriel S,Getz G,Hultman C,Kathiresan S,Laakso M,McCarroll S,McCarthy M,McGovern D,McPherson R,Neale B,Palotie A,Purcell S,Saleheen D,Scharf J,Sklar P,Patrick S,Tuomilehto J,Watkins H,Wilson J,Daly M,MacArthur D 2015 Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans.bioRxiv

[0251] 52.Adzhubei IA,Schmidt S,Peshkin L,Ramensky VE,Gerasimova A,Bork P,

Kondrashov AS,Sunyaev SR 2010 A method and server for predicting damaging missense mutations.Nature methods 7:248-249

[0252] 53.Ng PC,Henikoff S 2003 SIFT:Predicting amino acid changes that affect protein function.Nucleic acids research 31:3812-3814

[0253] 54.Schwarz JM,Rodelsperger C,Schuelke M,Seelow D 2010 MutationTaster evaluates disease-causing potential of sequence alterations.Nature methods 7:575-576

[0254] 55.Thomas PD,Kejariwal A,Guo N,Mi H,Campbell MJ,Muruganujan A,Lazareva-Ulitsky B 2006 Applications for protein sequence-function evolution data:mRNA/protein expression analysis and coding SNP scoring tools.Nucleic acids research 34:W645-650

[0255] 56.Doty RL,Marcus A,Lee WW 1996 Development of the 12-item Cross-Cultural Smell Identification Test(CC-SIT).The Laryngoscope 106:353-356

[0256] 57.Doty RL,Shaman P,Dann M 1984 Development of the University of Pennsylvania Smell Identification Test:a standardized microencapsulated test of olfactory function.Physiology&behavior 32:489-502

[0257] 58.Chan YM,Lippincott MF,Butler JP,Sidhoum VF,Li CX,Plummer L,Seminara SB 2014 Exogenous kisspeptin administration as a probe of GnRH neuronal function in patients with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism.J Clin Endocrinol Metab 99:E2762-2771

[0258] 59.Young J,George JT,Tello JA,Francou B,Bouligand J,Guiochon-Mantel A,Brailly-Tabard S,Anderson RA,Millar RP 2012 Kisspeptin Restores Pulsatile LH Secretion in Patients with Neurokinin B Signaling Deficiencies:Physiological,Pathophysiological and Therapeutic Implications.Neuroendocrinology

[0259] 60.Dwyer AA,Hayes FJ,Plummer L,Pitteloud N,and Crowley WF,Jr.The Long-Term Clinical Follow-Up and Natural History of Men with Adult-Onset Idiopathic Hypogonadotropic Hypogonadism.J Clin Endocrinol Metab.2010 Sep;95(9):4235-4243.

[0260] 61.Lee JH,Miele ME,Hicks DJ,Phillips KK,Trent JM,Weissman BE&Welch DR 1996 KiSS-1,a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene.Journal of the National Cancer Institute 88 1731-1737.

[0261] 62.Ohtaki T,Shintani Y,Honda S,Matsumoto H,Hori A,Kanehashi K,Terao Y,Kumano S,Takatsu Y,Masuda Y,et al.2001 Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor.Nature 411 613-617.

[0262] 其它实施方案

[0263] 应理解,即使已结合本发明的详细说明来描述本发明,前述说明旨在为示例性的且不旨在限制本发明的范围,本发明的范围由所附权利要求的范围来限定。其它方面、优点、和修改在所附权利要求的范围内。

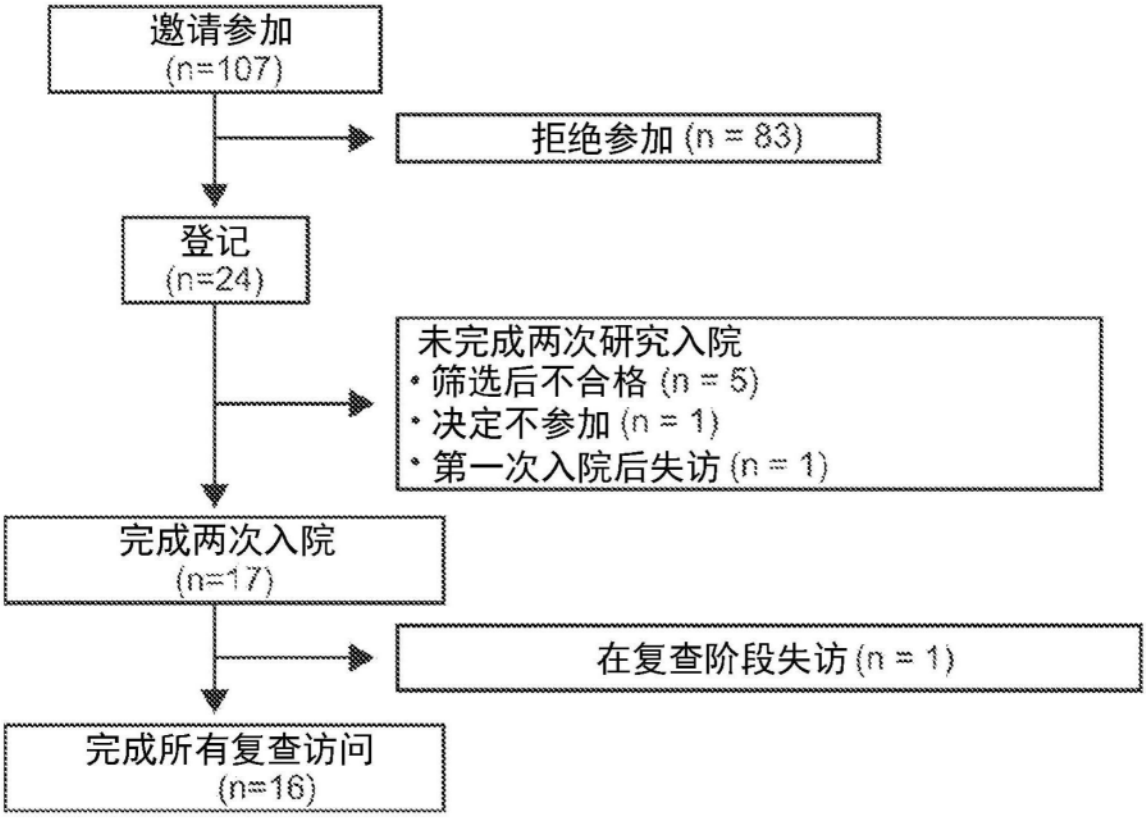

邀请参加
(n=107)
拒绝参加 (n = 83)
登记
(n=24)
未完成两次研究入院
• 筛选后不合格 (n = 5)
• 决定不参加 (n = 1)
• 第一次入院后失访 (n = 1)
完成两次入院
(n=17)
在复查阶段失访 (n = 1)
完成所有复查访问
(n=16)

图1

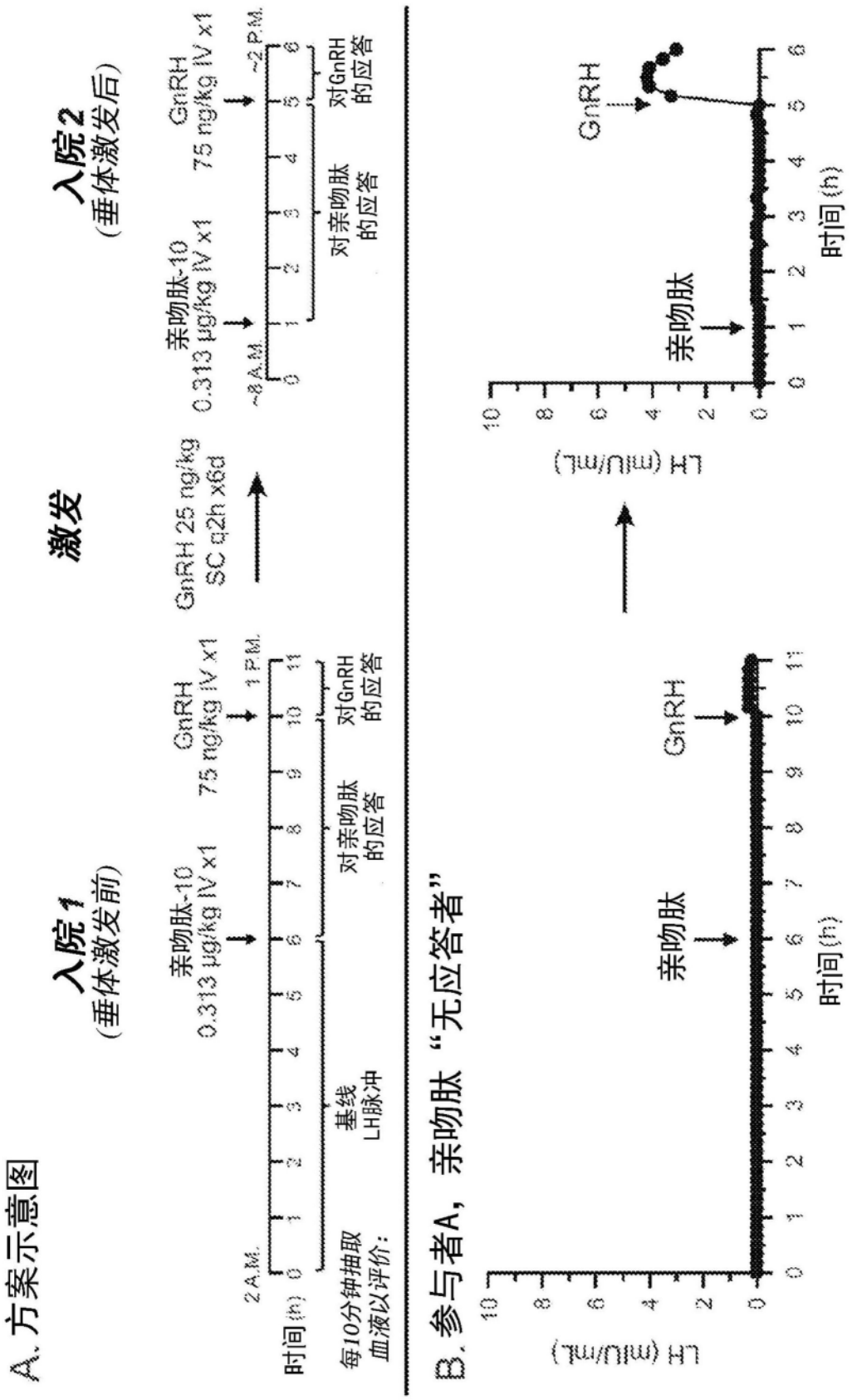
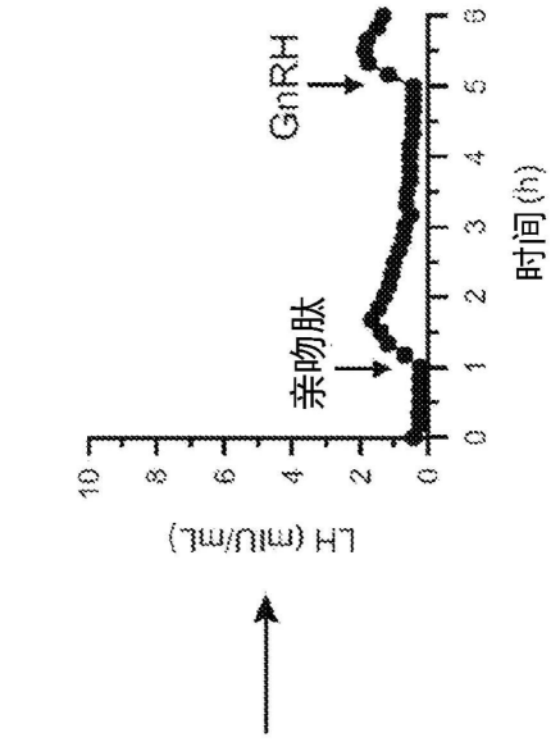

A. 方案示意图
入院1
(垂体激发前)
激发
入院2
(垂体激发后)
亲吻肽-10
0.313 μg/kg IV x1
GnRH
75 ng/kg IV x1
GnRH 25 ng/kg
SC q2h x6d
2 A.M.
1 P.M.
~8 A.M.
~2 P.M.
时间(h)
每10分钟抽取
血液以评价:
基线
LH脉冲
对亲吻肽
的应答
对GnRH
的应答
B. 参与者A，亲吻肽“无应答者”
LH (mIU/mL)
亲吻肽
GnRH
时间(h)

图2A-B


LH (mIU/mL)
10
8
6
4
2
0
0 1 2 3 4 5 6
时间(h)
亲吻肽
GnRH

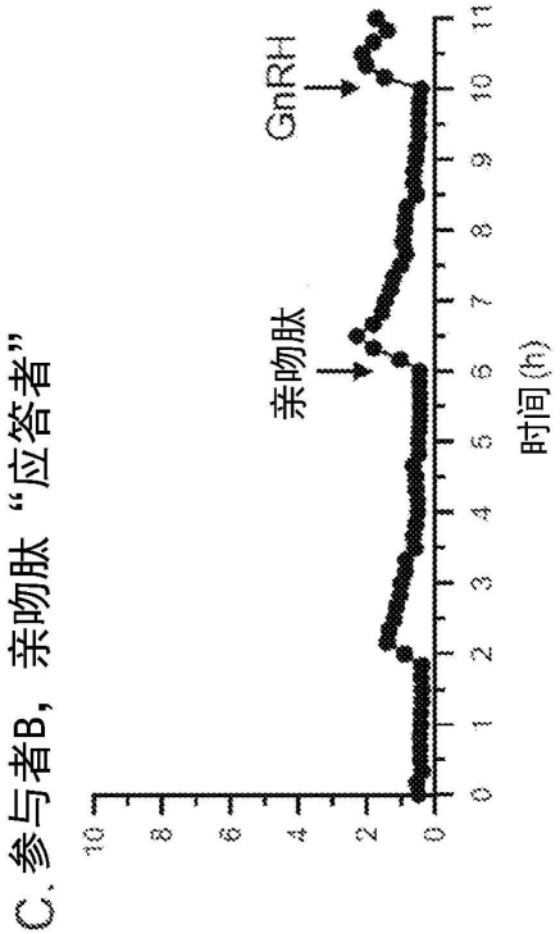

C. 参与者B，亲吻肽“应答者”
10
8
6
4
2
0
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11
时间(h)
亲吻肽
GnRH

图2C

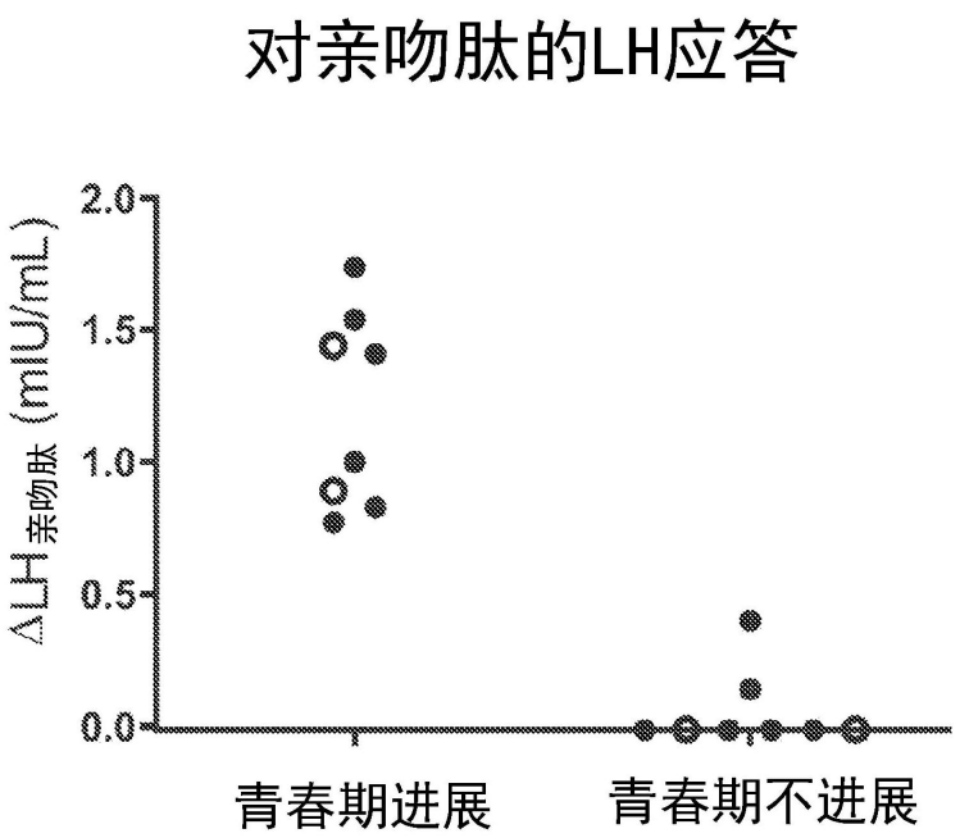

对亲吻肽的LH应答
ΔLH亲吻肽 (mIU/mL)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
青春期进展
青春期不进展

图3

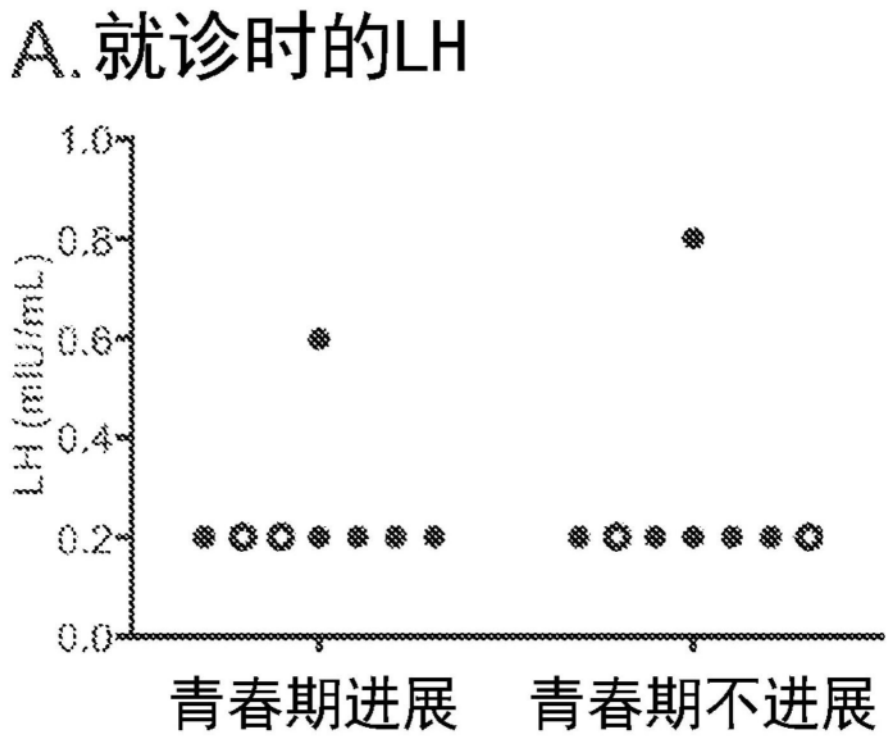

A.就诊时的LH
LH (mIU/mL)
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
青春期进展
青春期不进展

图4A

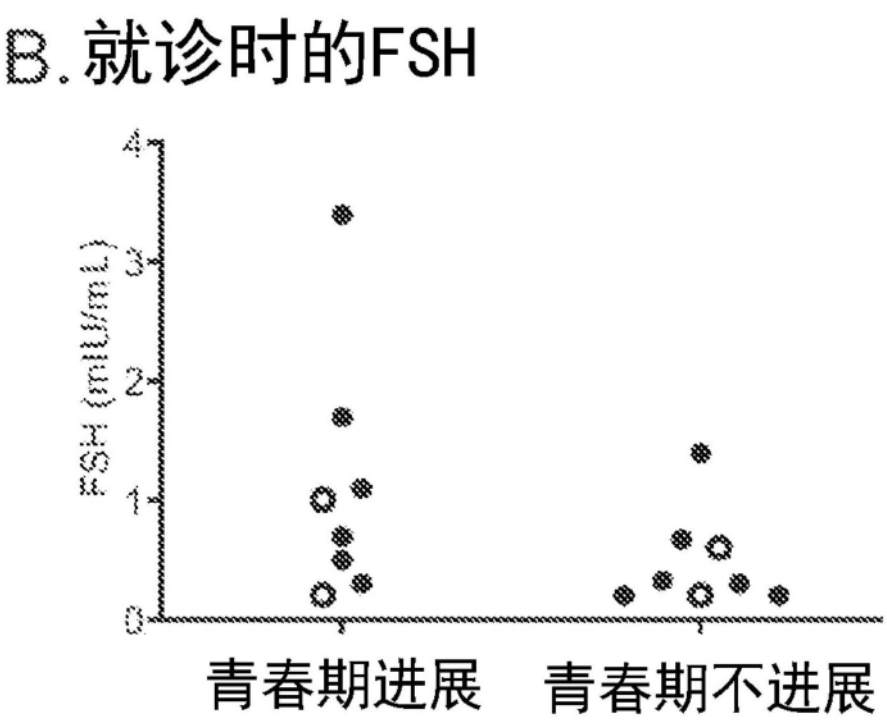

B. 就诊时的FSH
FSH (mIU/ml)
0
1
2
3
4
青春期进展
青春期不进展

图4B

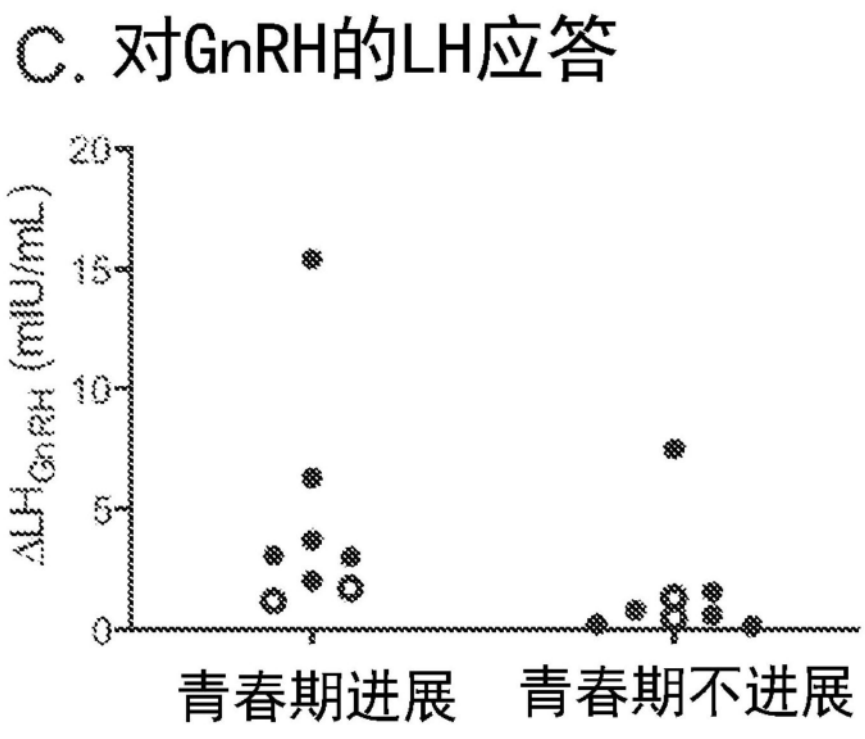

C. 对GnRH的LH应答
ΔLHGnRH (mIU/ml)
0
5
10
15
20
青春期进展
青春期不进展

图4C

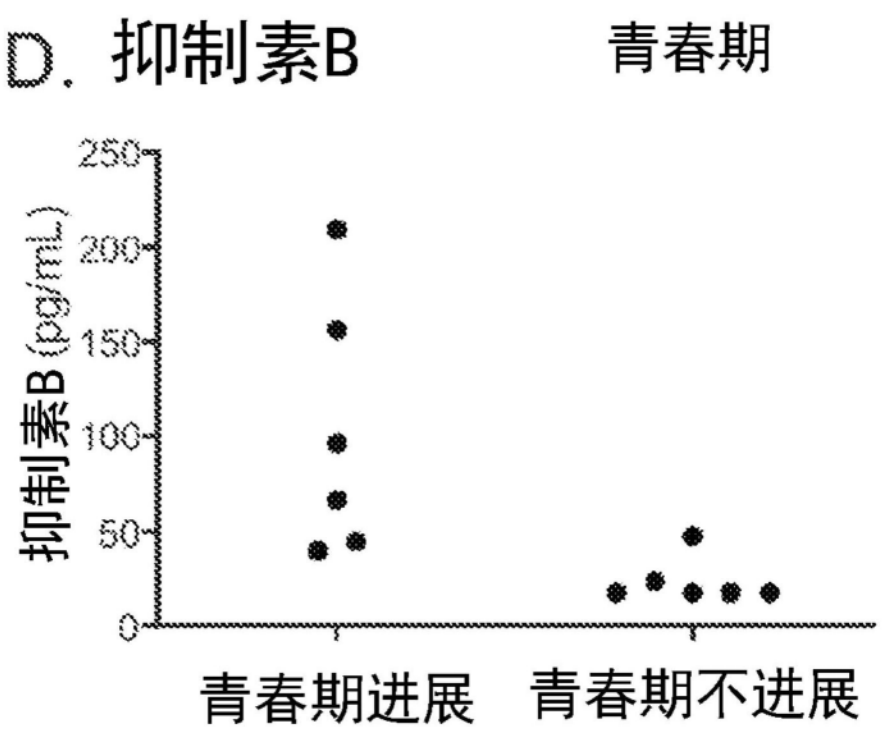

D. 抑制素B
青春期
抑制素B (pg/mL)
250
200
150
100
50
0
青春期进展
青春期不进展

图4D

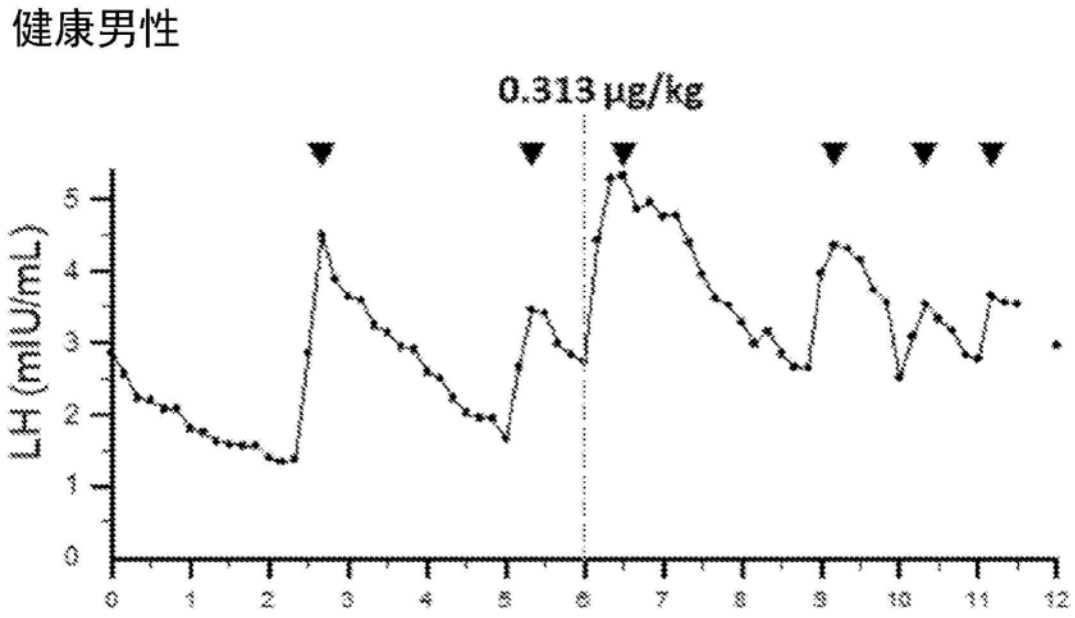

健康男性
0.313 μg/kg
LH (mIU/mL)
0
1
2
3
4
5
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12

图5A

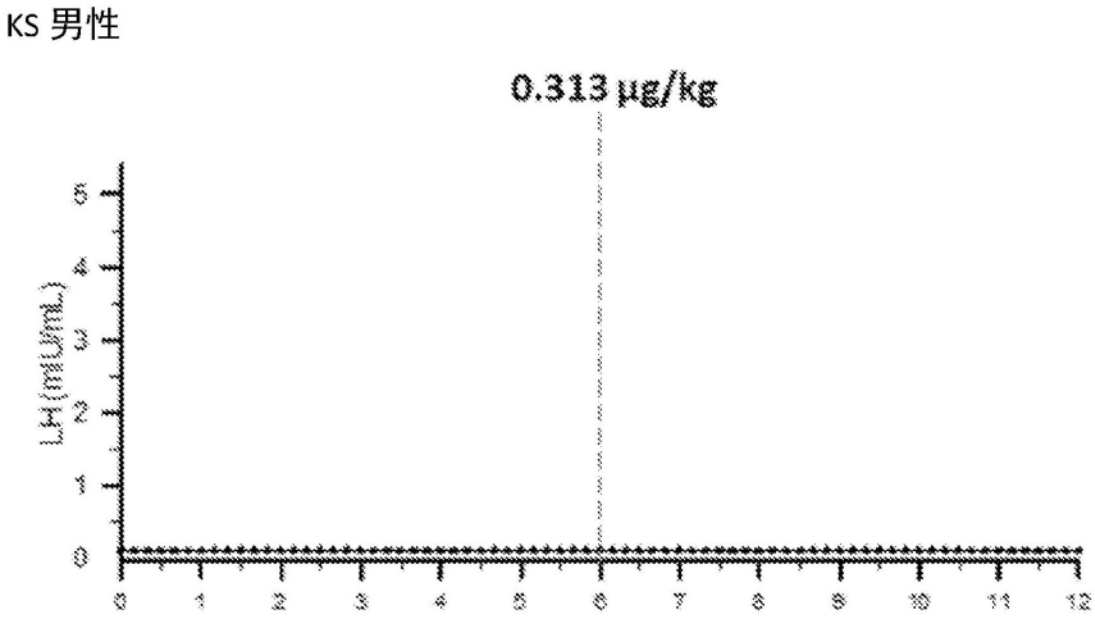


图5B

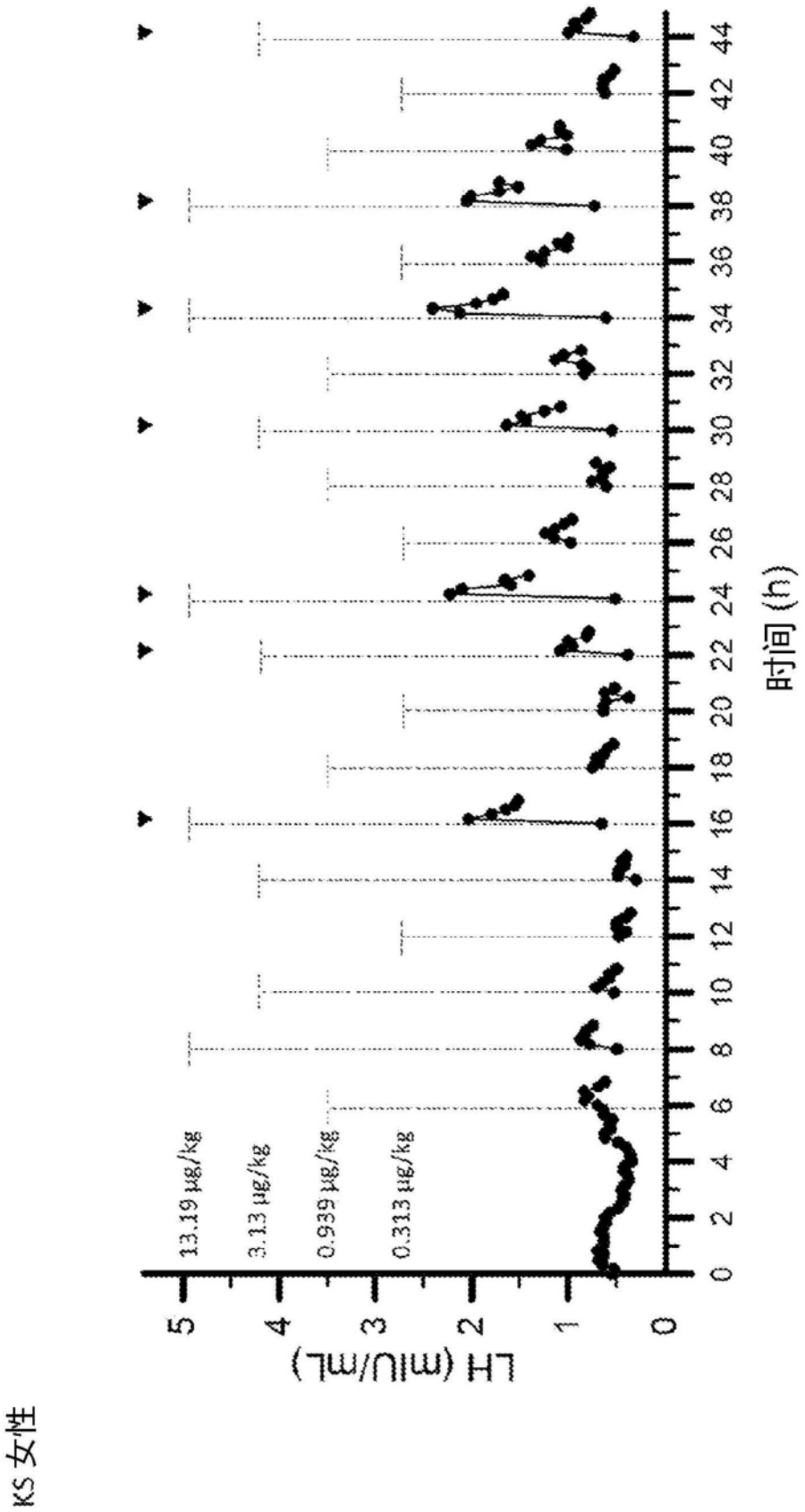

KS 女性
LH (mIU/mL)
0
1
2
3
4
5
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24 26 28 30 32 34 36 38 40 42 44
时间 (h)
13.19 μg/kg
3.13 μg/kg
0.939 μg/kg
0.313 μg/kg

图5C

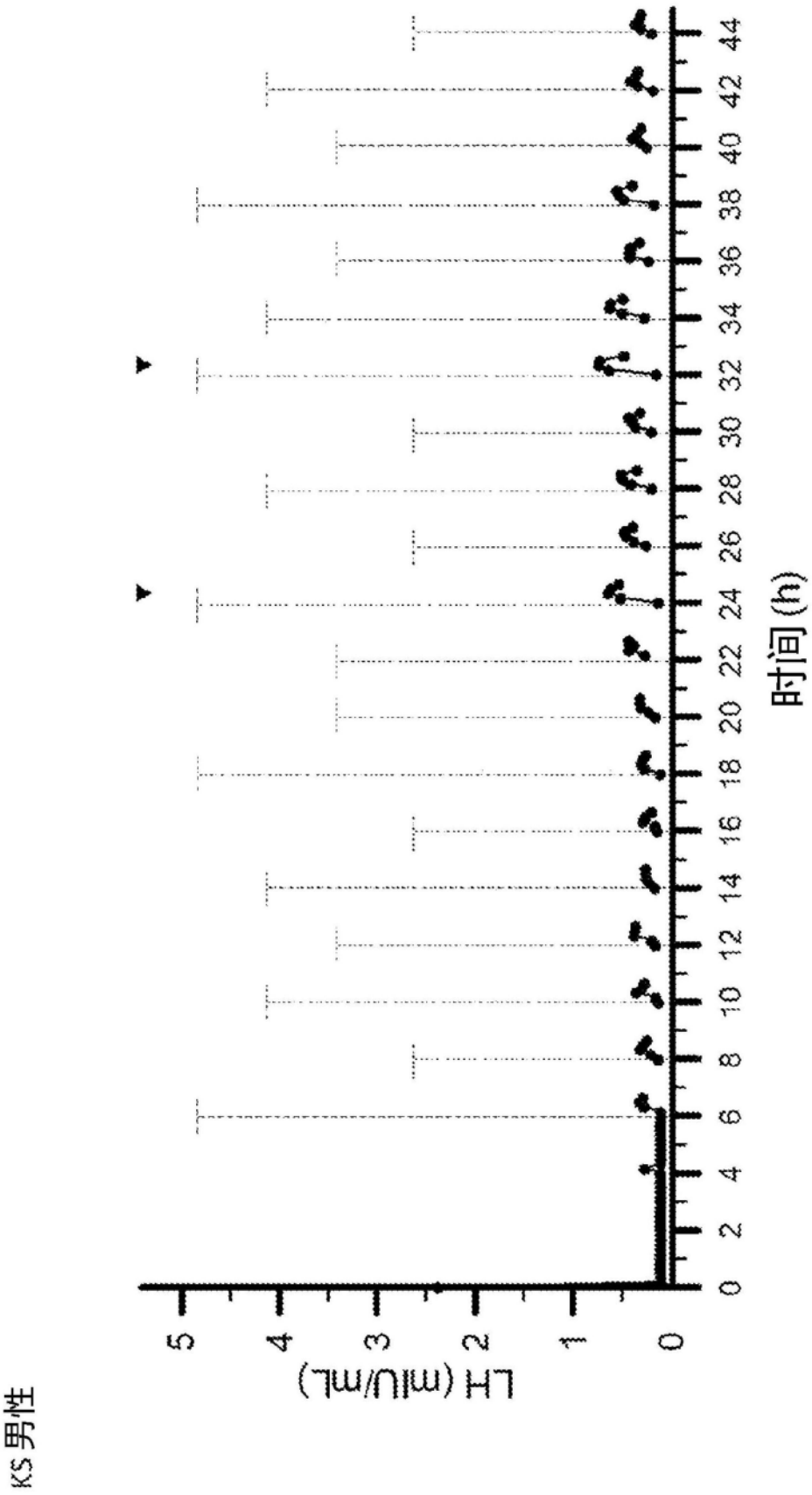

KS 男性
LH (mIU/mL)
0
1
2
3
4
5
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24 26 28 30 32 34 36 38 40 42 44
时间 (h)

图5D

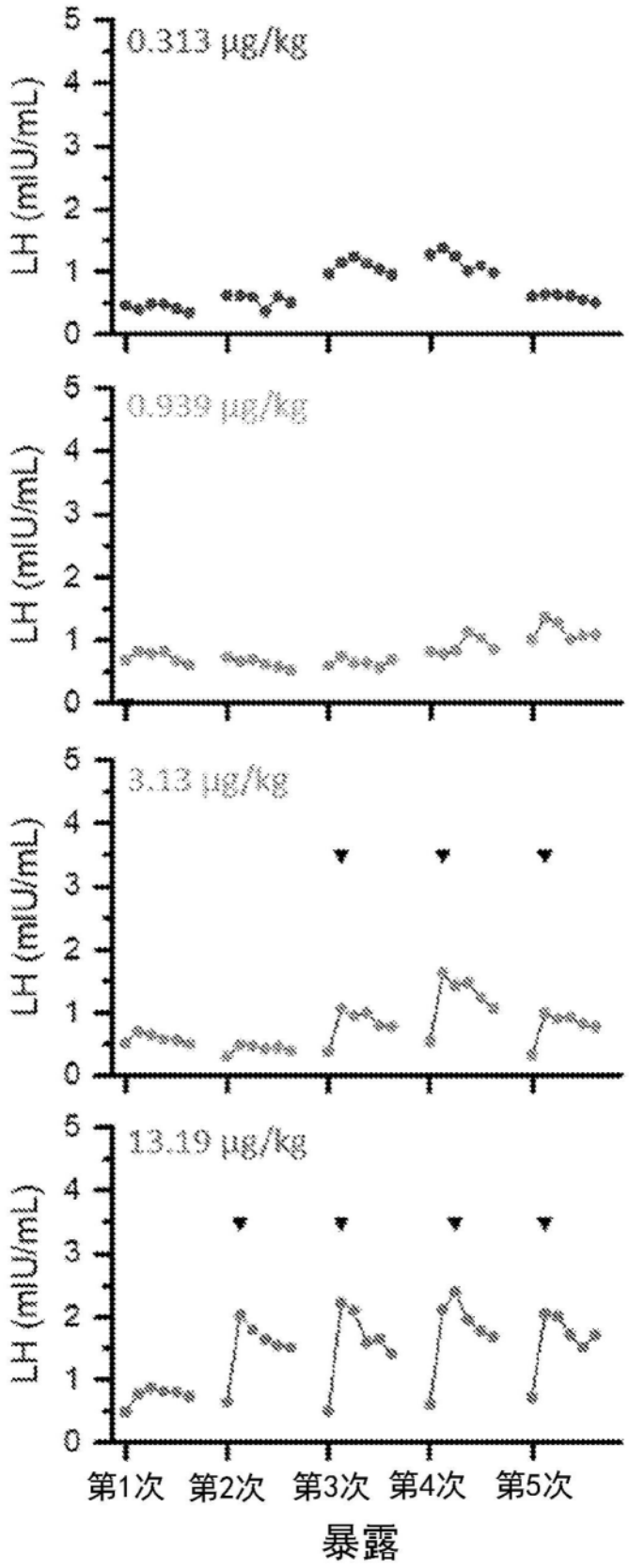

0.313 μg/kg
0.939 μg/kg
3.13 μg/kg
13.19 μg/kg
LH (mIU/mL)
0
1
2
3
4
5
第1次
第2次
第3次
第4次
第5次
暴露

图6

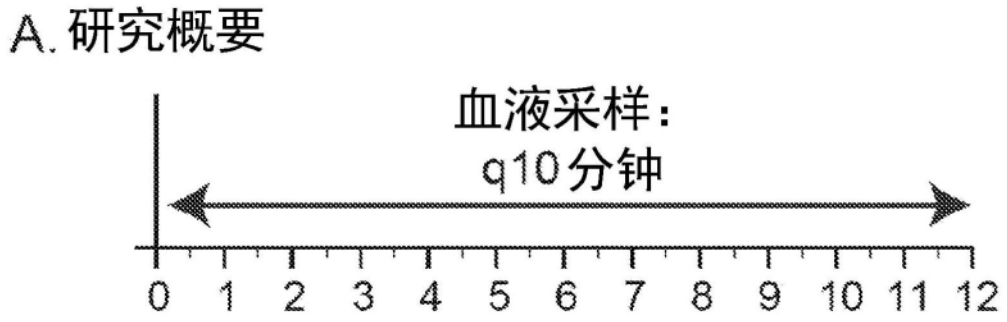

A. 研究概要
血液采样：
q10分钟
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

图7A

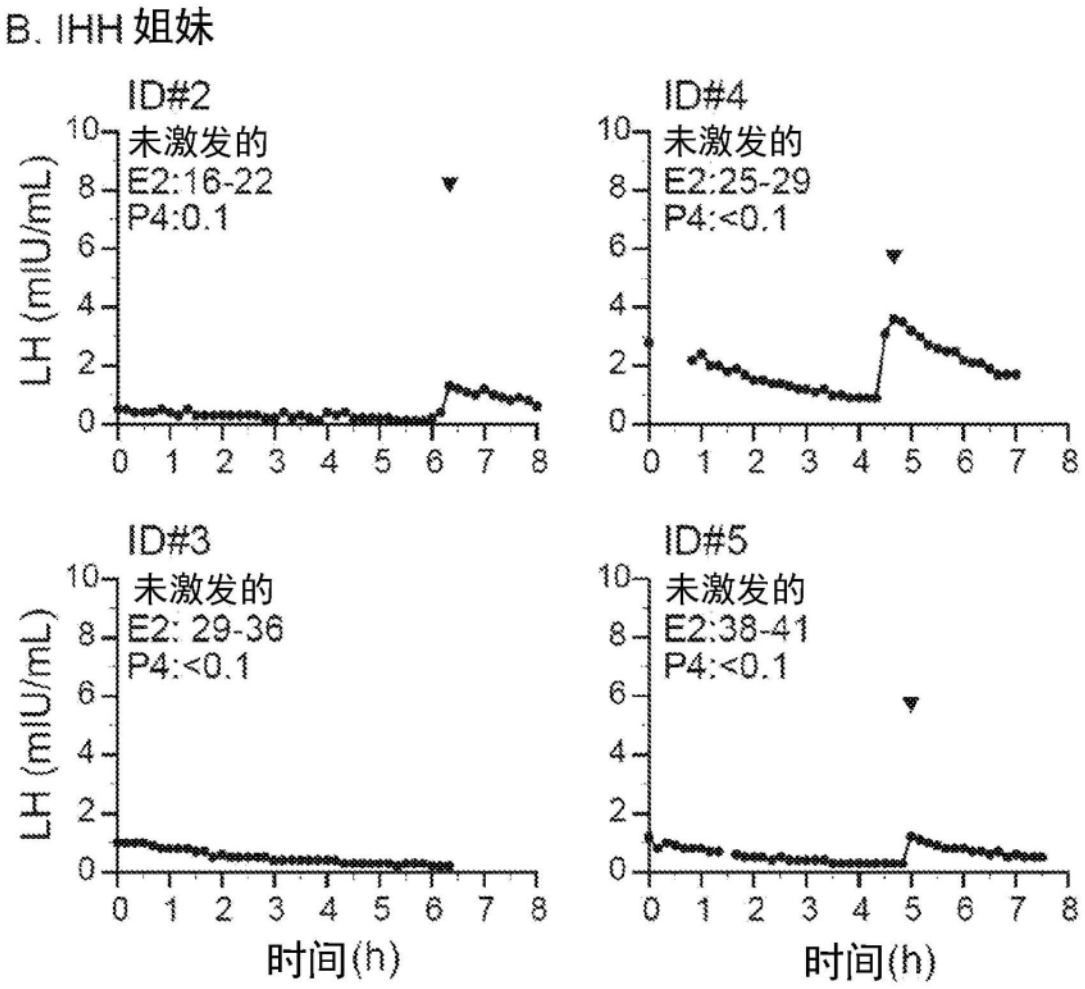

B. IHH 姐妹
ID#2
未激发的
E2:16-22
P4:0.1
ID#4
未激发的
E2:25-29
P4:<0.1
ID#3
未激发的
E2: 29-36
P4:<0.1
ID#5
未激发的
E2:38-41
P4:<0.1
LH (mIU/mL)
时间(h)

图7B

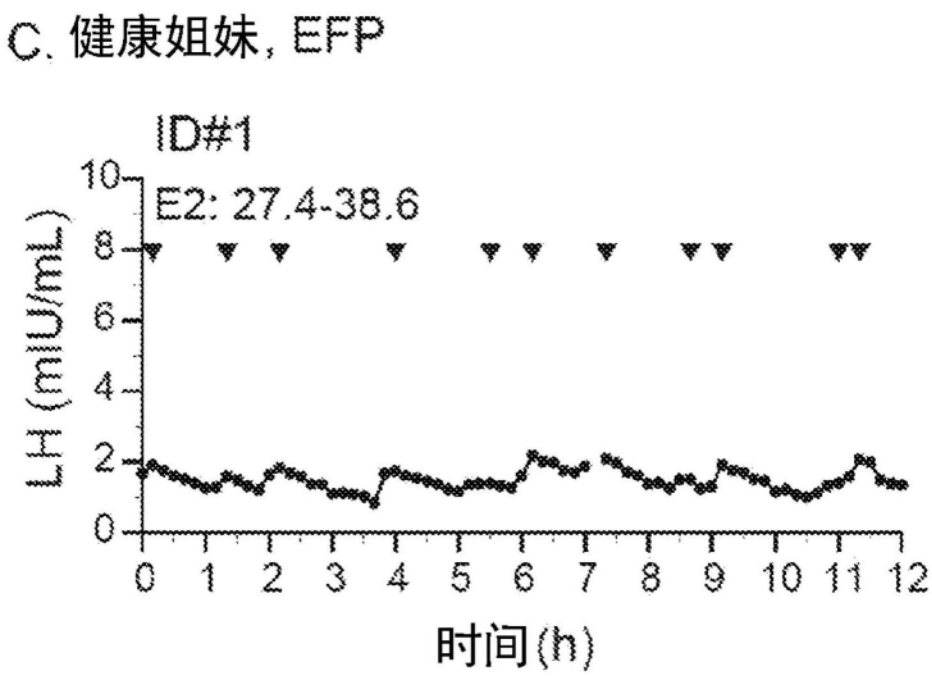

C. 健康姐妹, EFP
ID#1
E2: 27.4-38.6
LH (mIU/mL)
10
8
6
4
2
0
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
时间(h)

图7C

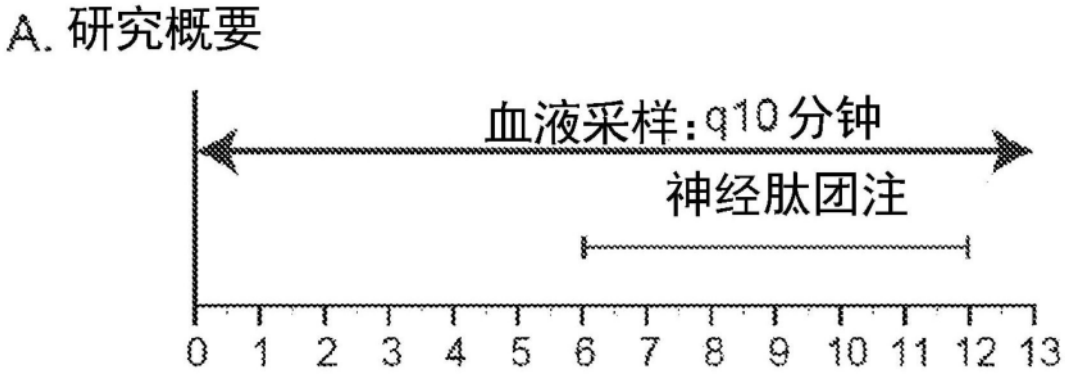

A. 研究概要
血液采样:q10分钟
神经肽团注
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

图8A

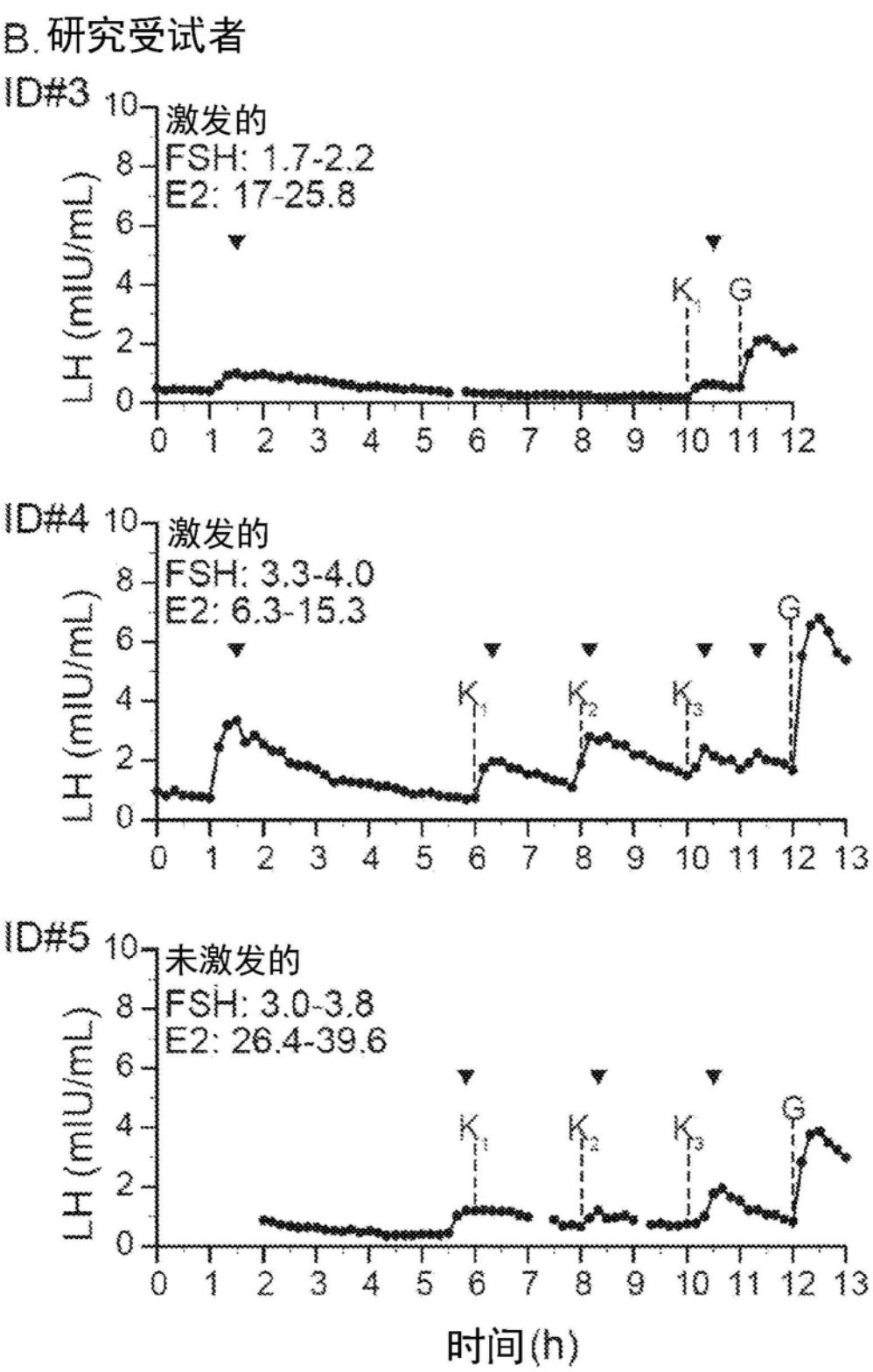

B.研究受试者
ID#3
激发的
FSH: 1.7-2.2
E2: 17-25.8
LH (mIU/mL)
K1
G
ID#4
激发的
FSH: 3.3-4.0
E2: 6.3-15.3
LH (mIU/mL)
K1
K2
K3
G
ID#5
未激发的
FSH: 3.0-3.8
E2: 26.4-39.6
LH (mIU/mL)
K1
K2
K3
G
时间(h)

图8B

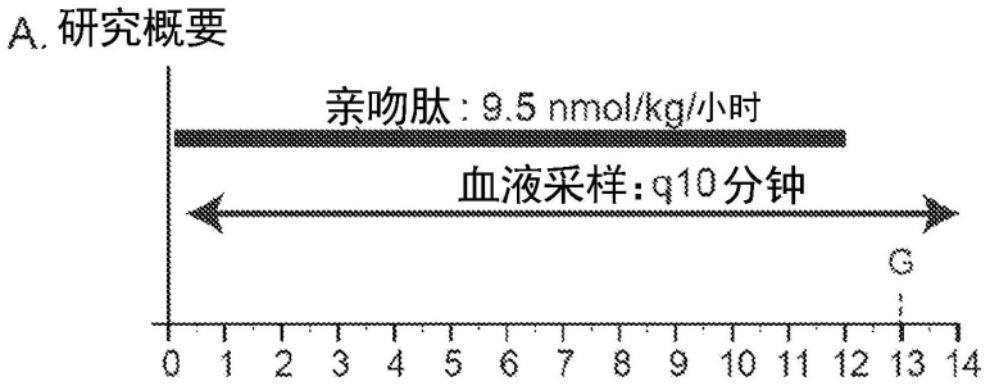

A. 研究概要
亲吻肽 : 9.5 nmol/kg/小时
血液采样：q10分钟
G
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

图9A

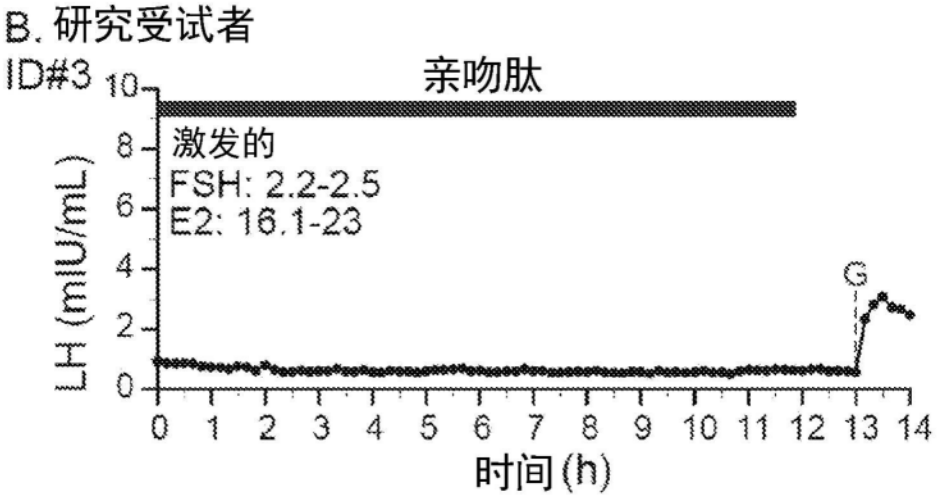

B. 研究受试者
ID#3
亲吻肽
激发的
FSH: 2.2-2.5
E2: 16.1-23
LH (mIU/mL)
0 2 4 6 8 10
G
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14
时间 (h)

图9B

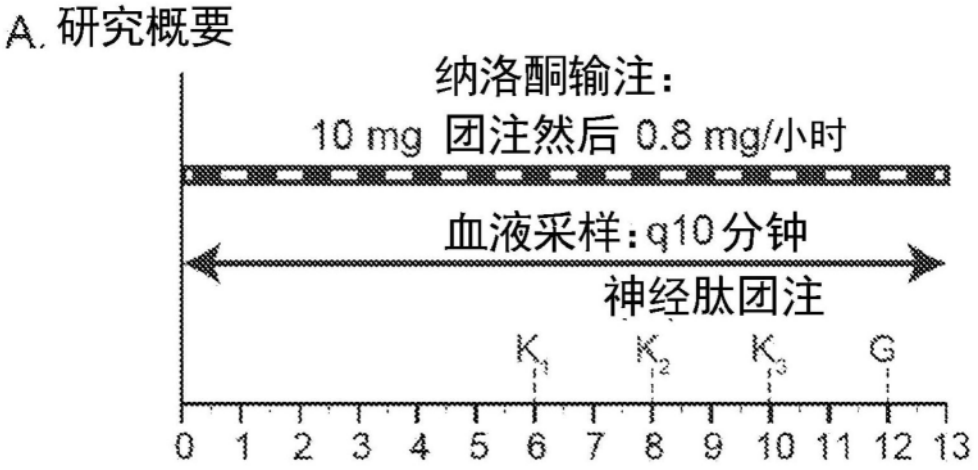

A. 研究概要
纳洛酮输注：
10 mg 团注然后 0.8 mg/小时
血液采样：q10分钟
神经肽团注
K1 K2 K3 G
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

图10A

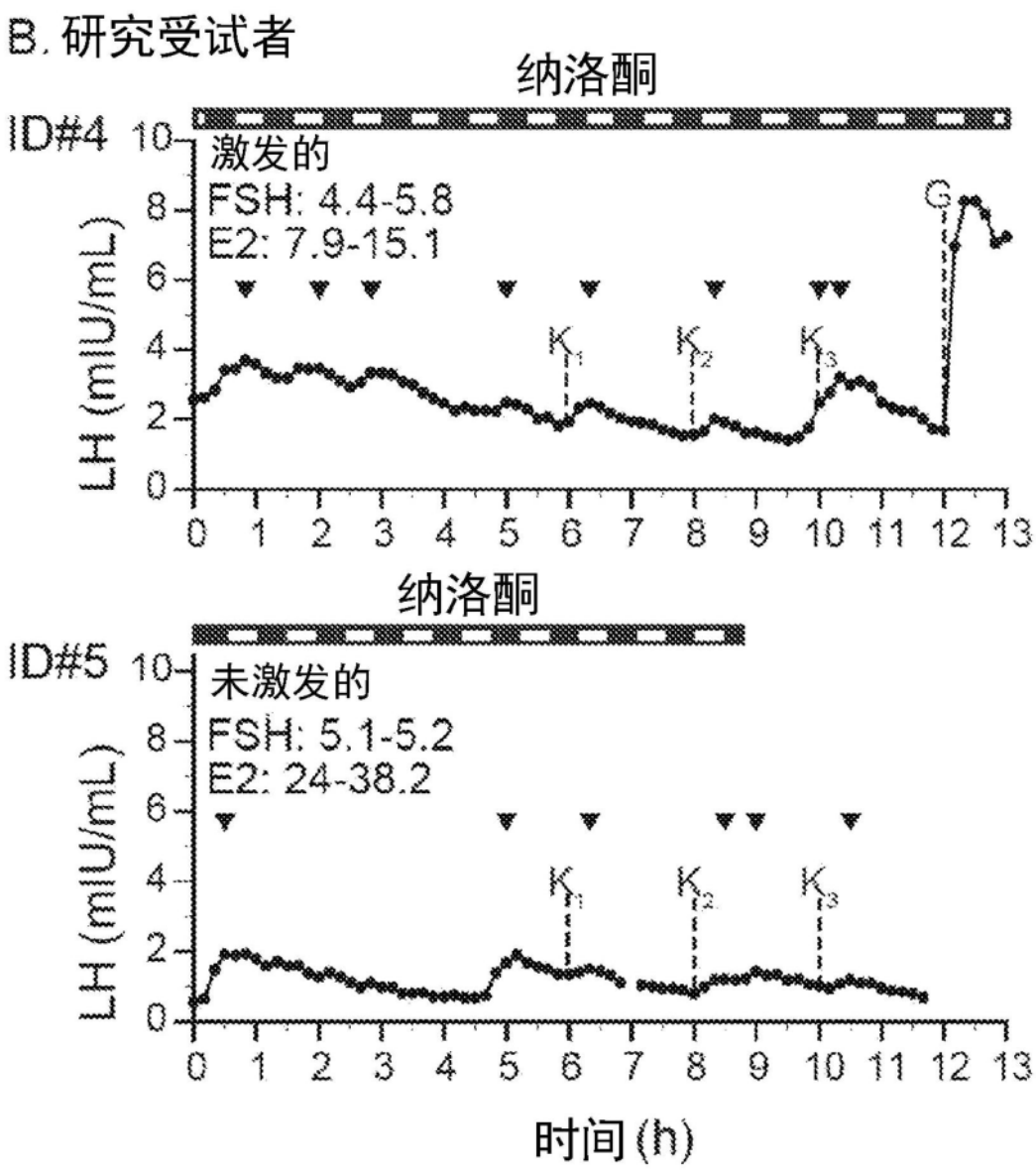

B. 研究受试者
纳洛酮
ID#4
激发的
FSH: 4.4-5.8
E2: 7.9-15.1
LH (mIU/mL)
G
K1
K2
K3
纳洛酮
ID#5
未激发的
FSH: 5.1-5.2
E2: 24-38.2
时间 (h)

图10B

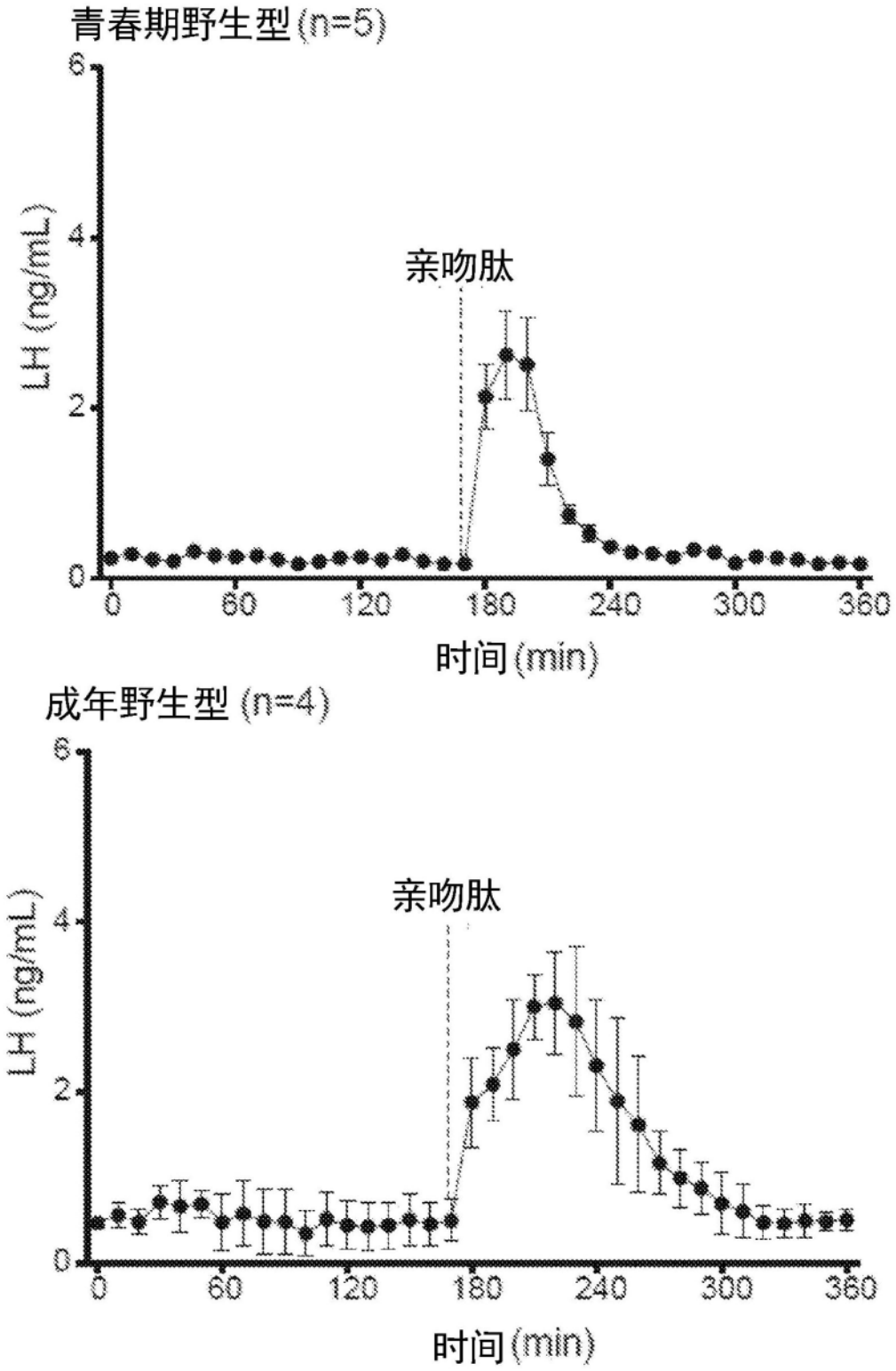

青春期野生型(n=5)
LH (ng/mL)
6
4
2
0
亲吻肽
0
60
120
180
240
300
360
时间(min)
成年野生型(n=4)
LH (ng/mL)
6
4
2
0
亲吻肽
0
60
120
180
240
300
360
时间(min)

图11

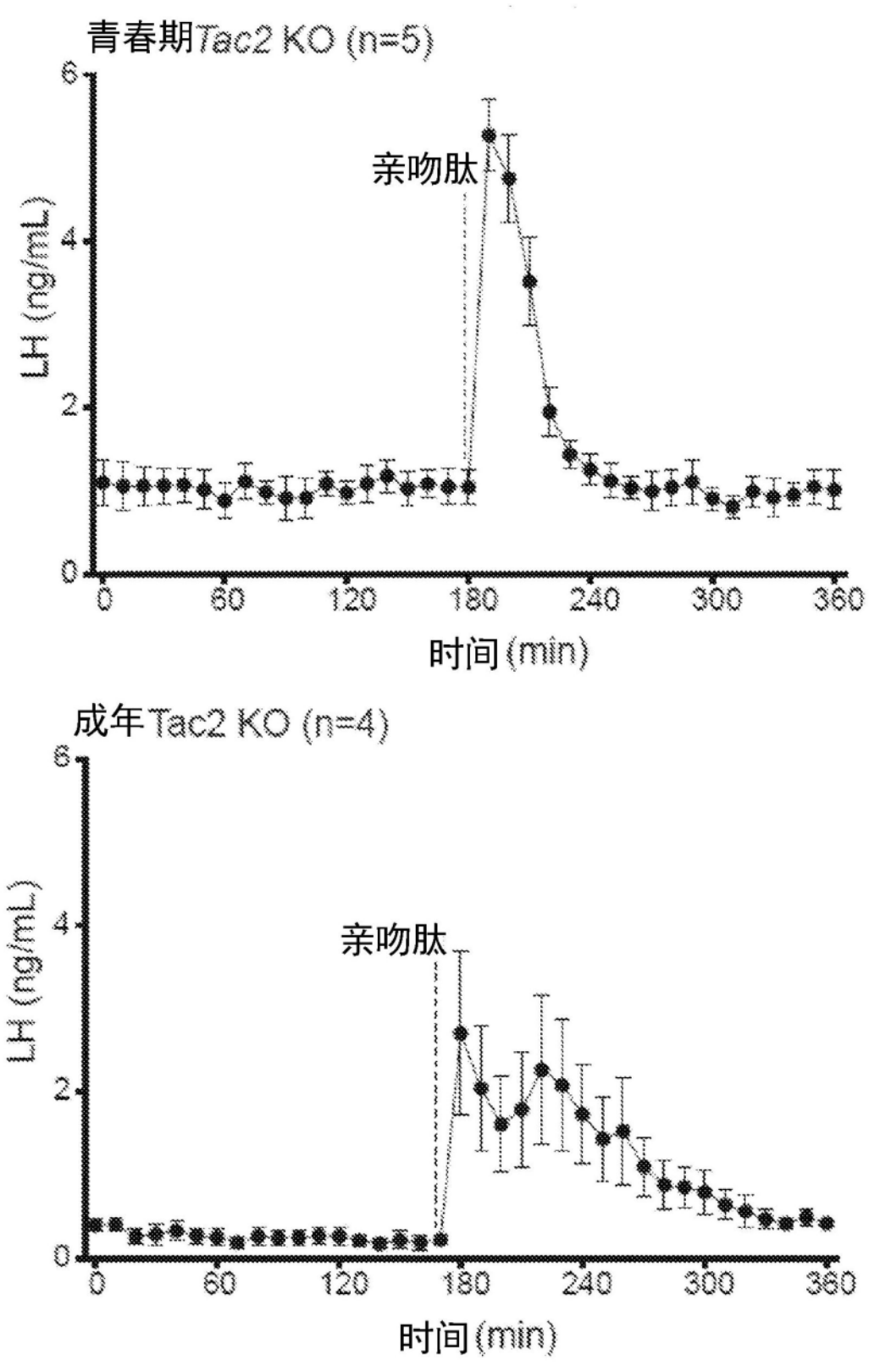


图11,续

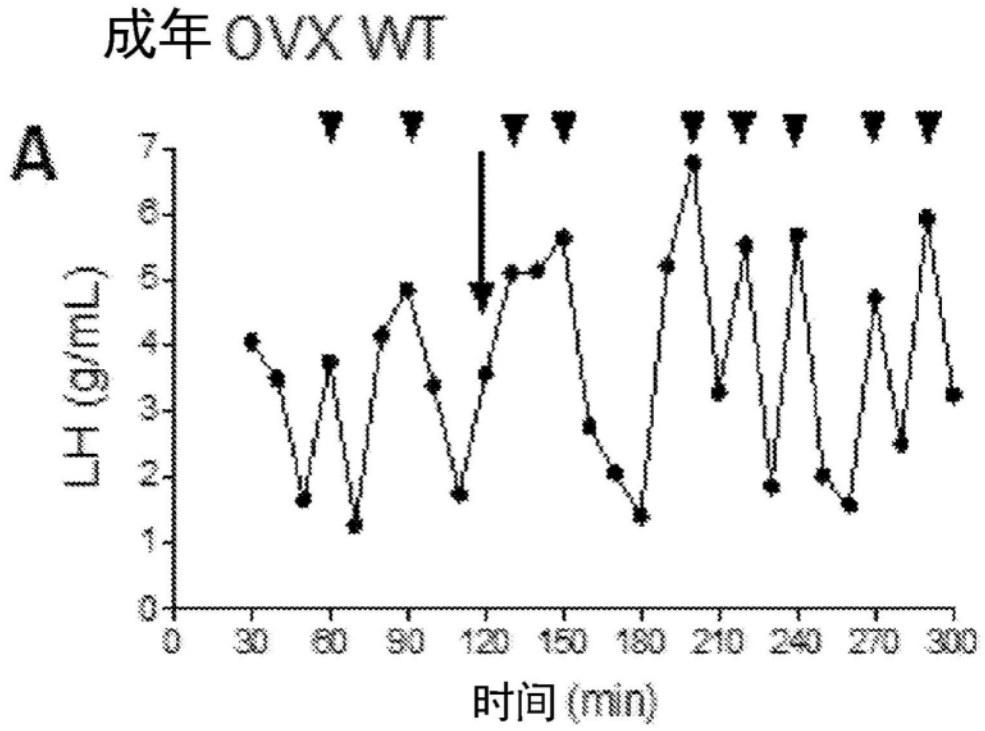

成年 OVX WT
A
LH (g/mL)
0
1
2
3
4
5
6
7
0
30
60
90
120
150
180
210
240
270
300
时间 (min)

图12A

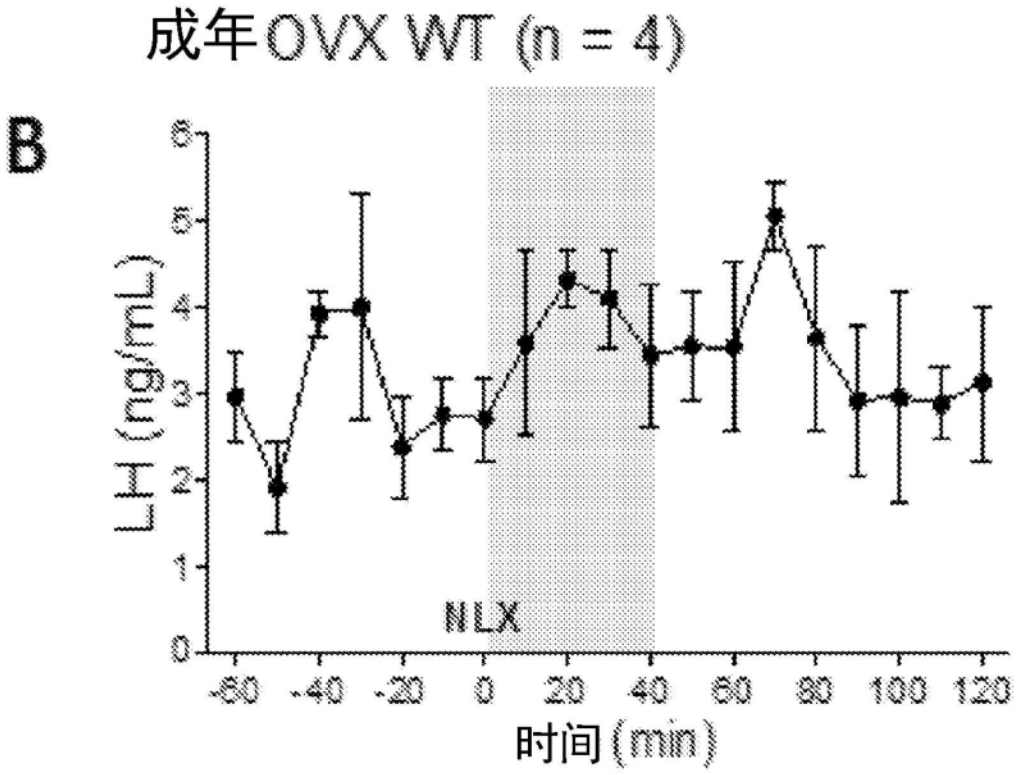

成年 OVX WT (n = 4)
B
LH (ng/mL)
0
1
2
3
4
5
6
NLX
-60
-40
-20
0
20
40
60
80
100
120
时间 (min)

图12B

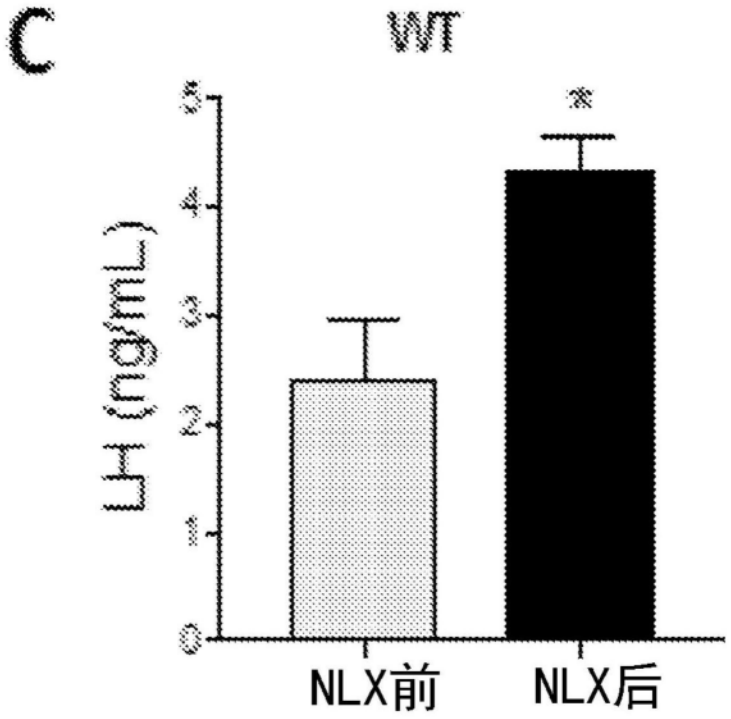

C
WT
*
LH (ng/mL)
0
1
2
3
4
5
NLX前
NLX后

图12C

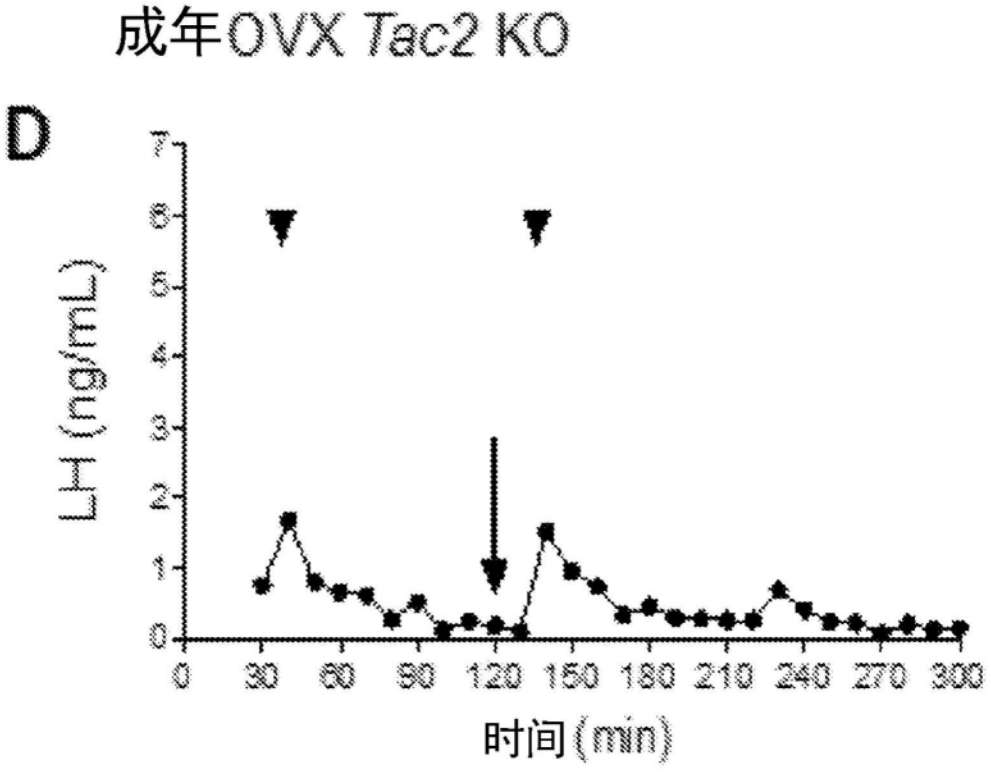

成年OVX Tac2 KO
D
LH (ng/mL)
0
1
2
3
4
5
6
7
0
30
60
90
120
150
180
210
240
270
300
时间 (min)

图12D

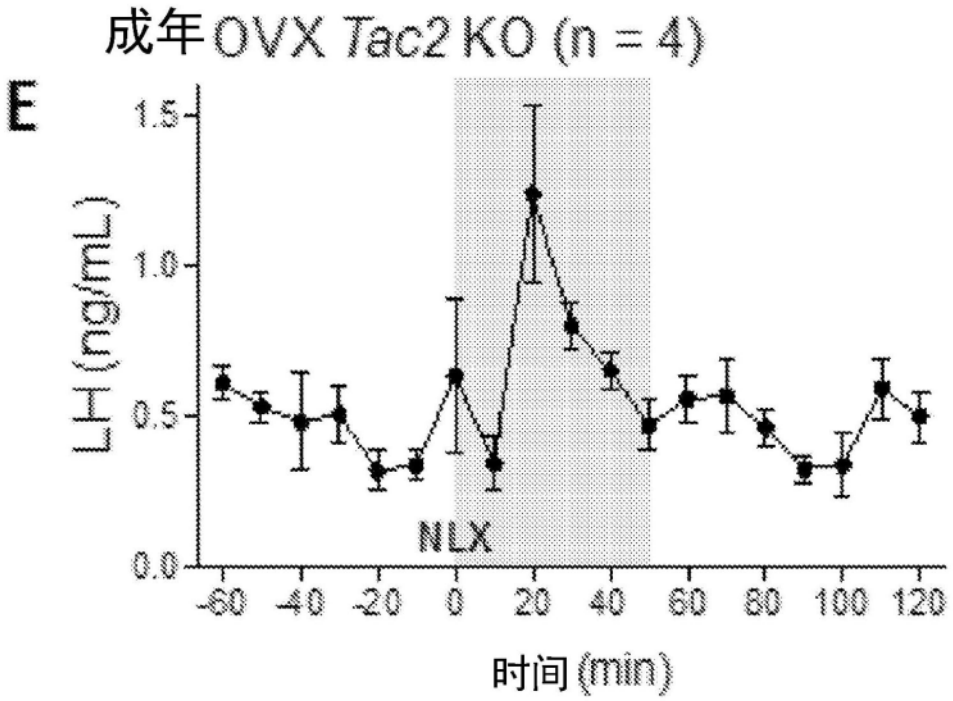

成年OVX Tac2 KO (n = 4)
E
LH (ng/mL)
1.5
1.0
0.5
0.0
NLX
-60 -40 -20 0 20 40 60 80 100 120
时间 (min)

图12E

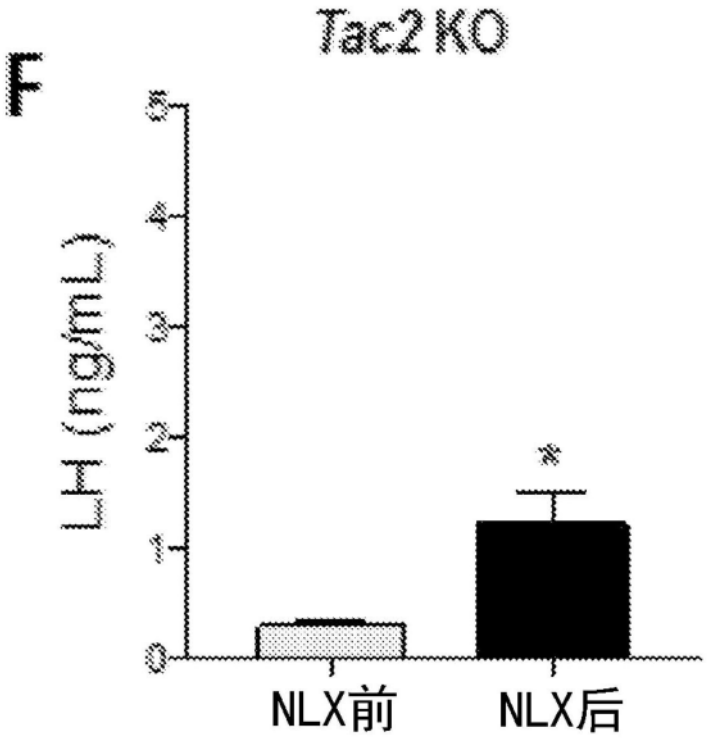

Tac2 KO
F
LH (ng/mL)
5
4
3
2
1
0
*
NLX前
NLX后

图12F