



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115960249 A

(43) 申请公布日 2023.04.14

(21) 申请号 202210868944.5

(51) Int.CI.

(22) 申请日 2016.09.30

C07K 19/00 (2006.01)

(30) 优先权数据

C12N 15/62 (2006.01)

62/236,169 2015.10.02 US

A61K 38/16 (2006.01)

62/237,889 2015.10.06 US

A61K 38/30 (2006.01)

62/322,910 2016.04.15 US

A61K 38/38 (2006.01)

(62) 分案原申请数据

A61K 38/17 (2006.01)

201680070850.6 2016.09.30

A61P 9/00 (2006.01)

(71) 申请人 银溪制药股份有限公司

A61P 13/12 (2006.01)

地址 美国加利福尼亚州

A61P 19/08 (2006.01)

(72) 发明人 L·D·J·安提珀夫 S·艾西吉

A61P 19/04 (2006.01)

K·M·库臣贝克 B·L·米勒德

A61P 19/02 (2006.01)

M·D·昂桑姆 A·D·尼克森

A61P 17/00 (2006.01)

T·R·斯托 Y·张

A61P 1/16 (2006.01)

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公

A61P 1/18 (2006.01)

司 31100

A61P 7/00 (2006.01)

专利代理人 陶家蓉 陈扬扬

A61P 11/00 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

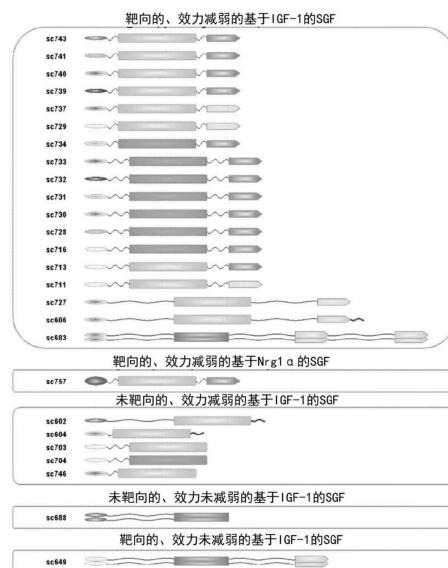
权利要求书2页 说明书62页
序列表（电子公布） 附图15页

(54) 发明名称

用于组织修复的双特异性治疗性蛋白质

(57) 摘要

提供了具有治疗应用的双特异性融合蛋白，以及包括这种融合蛋白的药物组合物，以及使用这种融合蛋白修复或使受损或病变组织再生的方法。



1. 一种双特异性蛋白质,其包括:

a) 靶向结构域,其对与组织细胞外表面相关联的靶分子具有结合特异性,其中靶向结构域包含人膜联蛋白A5的变体,所述变体包含一个或多个突变,所述突变由对应于C316的位点和可任选的对应于R63、K70、K101、E138、D139、N160的一个或多个位点及其组合的取代组成;以及

b) 激活剂结构域,其对与组织细胞表面相关联的受体具有结合特异性,其中所述激活剂结构域具有人胰岛素样生长因子-1 (IGF-1) 变体,所述变体具有N-末端13个残基的延伸和对应于E3位置的取代,所述人IGF-1变体可任选地在一个或多个位置具有突变,所述突变对应于在R37位置的缺失,在对应于K68、S69和A70位置的氨基酸缺失,在对应于Y24、Y31、Y60的一个或多个位置的取代,及其组合,其中N-末端13个残基的延伸由氨基酸序列 MFPAMPLSSLFVN组成,和其中IGF-1的变体相对于所述野生型IGF-1降低IGF-1受体的激活,

其中,据受体或下游效应物分子的磷酸化作用测定,相较于不包含所述靶分子的细胞,所述双特异性蛋白质对包含所述靶分子的细胞展现出至少强两倍的IGF-1受体激活。

2. 如权利要求1所述的双特异性蛋白质,其中,所述双特异性融合蛋白促进组织再生、细胞存活、细胞分化,抑制凋亡,诱导细胞增殖,促进细胞生长,促进干细胞运动性,促进干细胞分化,预防细胞损伤,和/或促进血管新生。

3. 如权利要求1或权利要求2所述的双特异性蛋白质,其中,所述组织是心脏组织,肾组织,骨,软骨,关节,皮肤,肝组织,胰腺组织,血细胞,肺组织,脑组织和神经组织。

4. 如先前任一权利要求所述的双特异性蛋白质,其中所述双特异性蛋白质在受损组织中所具有的半最大有效浓度 ($EC_{50}^{\text{受损}}$) 比在其健康组织 ($EC_{50}^{\text{健康}}$) 中的低。

5. 如先前任一权利要求所述的双特异性蛋白质,其中,所述双特异性蛋白质还包括肽接头,其中所述肽接头可任选地是半衰期调节剂,其中所述半衰期调节剂是人血清白蛋白、Fc片段或其变体。

6. 如权利要求5所述的双特异性蛋白质,其中所述半衰期调节剂与野生型人血清白蛋白具有至少80%的相同性。

7. 如权利要求5所述的双特异性蛋白质,其中,所述半衰期调节剂是人血清白蛋白或其变体,可任选地具有SEQ ID NO:54-56或124中任一项所示的氨基酸序列。

8. 如权利要求5-7任一所述的双特异性蛋白质,其中所述双特异性蛋白质包括人膜联蛋白A5非内化变体的氨基酸序列,并且其中,相较于包括野生型人膜联蛋白A5氨基酸序列的双特异性蛋白质,所述双特异性蛋白质具有延长的半衰期。

9. 如先前任一权利要求所述的双特异性蛋白质,其中所述双特异性蛋白质包含具有SEQ ID NO:4所示氨基酸序列的靶向结构域。

10. 如先前任一权利要求所述的双特异性蛋白质,其中所述双特异性蛋白质包含具有SEQ ID NO:122所示氨基酸序列的靶向结构域。

11. 如先前任一权利要求所述的双特异性蛋白质,其中所述双特异性蛋白质包含具有SEQ ID NO:15-20任一所示氨基酸序列的激活剂结构域。

12. 一种双特异性蛋白质,其包含SEQ ID NO:74、75、77、79、80-86任一所示的氨基酸序列。

13. 一种药物组合物,其包括根据权利要求1-12任一所述的双特异性蛋白质和生理学

上可接受的运载体。

14. 一种药物组合物,用于治疗对象以促进组织再生或存活,所述药物组合物包含治疗有效量的权利要求1-12所述的双特异性抗体。

15. 编码权利要求1-12任一所述的双特异性蛋白质的核酸。

16. 一种双特异性蛋白质,包含:(a) 靶向结构域,所述靶向结构域具有对与组织细胞外表面相关联的靶分子的结合特异性;和

(b) 工程改造的激活剂结构域,其具有对与组织细胞表面相关联的受体的结合特异性,其中所述工程改造的激活剂结构域具有野生型激活剂结构域氨基酸序列经修饰的氨基酸序列,其中所述工程改造的激活剂结构域相对于所述野生型激活剂结构域降低所述受体的激活,其中所述工程改造的激活剂结构域具有NRG变体;

其中,据受体或下游效应物分子的磷酸化作用测定,相较于不包含所述靶分子的细胞,所述双特异性蛋白质对包含所述靶分子的细胞展现出至少强两倍的受体激活。

17. 如权利要求16所述的双特异性蛋白质,其中所述蛋白质包含SEQ ID NO:110。

18. 如权利要求16所述的双特异性蛋白质,其中,双特异性蛋白质还包含肽接头。

19. 如权利要求18所述的双特异性蛋白质,其中肽接头选自人血清白蛋白、Fc、scFc、白蛋白结合结构域、PAS化、人 α -甲胎蛋白、其片段及其变体。

20. 如权利要求19所述的双特异性蛋白质,其中所述肽包含与SEQ ID NO:53-56、124、137-138任一所示的氨基酸序列具有至少85%相同性的氨基酸序列。

21. 一种双特异性蛋白质,包含:

(a) 靶向结构域,所述靶向结构域具有对与组织细胞外表面相关联的靶分子的结合特异性,其中所述靶向结构域选自膜联蛋白、突触结合蛋白、T细胞免疫球蛋白粘蛋白1和4(TIM蛋白质)和抗-磷脂酰丝氨酸抗体,其片段或其抗体;和

(b) 工程改造的激活剂结构域,其具有对与组织细胞表面相关联的受体的结合特异性,其中所述工程改造的激活剂结构域具有野生型激活剂结构域氨基酸序列经修饰的氨基酸序列,其中所述工程改造的激活剂结构域相对于所述野生型激活剂结构域降低所述受体的激活;

其中,据受体或下游效应物分子的磷酸化作用测定,相较于不包含所述靶分子的细胞,所述双特异性蛋白质对包含所述靶分子的细胞展现出至少强两倍的受体激活。

22. 如权利要求20所述的双特异性蛋白质,其中所述靶向结构域包含与SEQ ID NO:1-4、115、128-136任一所示的氨基酸序列具有至少85%相同性的氨基酸序列。

23. 如权利要求20所述的双特异性抗体,其中双特异性蛋白质包含SEQ ID NO:67、70、73-86、108、110、116或118。

24. 如权利要求20所述的双特异性抗体,其中激活剂结构域包含IGF-1、NRG或其变体。

25. 一种用于治疗个体以促进组织再生或组织存活的药物组合物,所述药物组合物包含治疗有效量的权利要求16-24任一所述的双特异性蛋白质。

26. 编码权利要求16-24任一所述的双特异性蛋白质的核酸。

用于组织修复的双特异性治疗性蛋白质

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2015年10月2日提交的美国临时专利申请系列号62/236,169、2015年10月6日提交的美国临时专利申请系列号62/237,889和2016年4月15日提交的美国临时专利申请系列号62/322,910的优先权和权益，上述各申请通过引用全文纳入本文。

[0003] 关于联邦资助研究的声明

[0004] 本发明是在政府支持下由美国国立卫生研究院 (NIH) SBIR 项目授予的 1R43HL124678-01A1 合同号资助完成。政府对本发明拥有一定的权利。

[0005] 关于序列表

[0006] 本说明书包括所附序列表，其包括创建于2016年9月30日、名为"132463-010304/PCT_ST25.txt"、大小为413,847字节的文件，其内容通过引用全文纳入本文。

技术领域

[0007] 本发明通常涉及具有治疗应用的蛋白质，并且更具体地，涉及双特异性蛋白质，包括这样蛋白质的药物组合物，以及使用这样的蛋白质来修复受损组织的方法。

背景技术

[0008] 组织再生是一种以恢复病变或受损组织生物功能为目标的多学科交叉的科学。组织再生解决诸如心肌梗塞等严重的临床问题。心肌梗塞，通常称之为心脏病发作，其在冠状动脉梗阻切断供给到心脏部分的血液时发生。由于心脏无法充分激活内源性再生程序和自我修复，氧气的缺少导致不可逆的组织损伤(细胞组织坏死或细胞凋亡)。这样的组织损伤是导致充血性心力衰竭的主要原因，而充血性心力衰竭是这样一种病症，其中心脏不再能够有效地泵送血液并且可能导致急性肾脏损伤。在美国，每年有超过百万次心脏病发作，并且将近500万人患有充血性心力衰竭。

[0009] 尚不存在用于使受损心脏组织再生的有效治疗。当前，用于充血性心力衰竭的治疗着眼于预防心律失常、动脉硬化的进展以及复发性心肌梗塞，但是并未解决潜在的组织损伤。超过半数诊断患有充血性心力衰竭的患者在确诊的5年内死亡。

[0010] 因此，本领域需要用于修复或再生受损组织的方法，以及用于改善诸如干细胞的细胞的靶向以促进组织修复的方法。本发明致力于满足这些需求，并提供其它相关的优点。

发明内容

[0011] 本发明提供了双特异性治疗性蛋白质、编码双特异性融合蛋白的核酸分子、以及这样的治疗方法，所述方法使用这样的双特异性治疗性蛋白质以促进组织存活、和/或受损组织的再生。

[0012] 在一些实施方式中，双特异性融合蛋白促进组织再生、细胞存活、细胞分化，抑制凋亡，诱导细胞增殖，促进细胞生长，促进干细胞运动性，促进干细胞分化，预防细胞损伤，和/或促进血管新生。在一些实施方式中，组织可以是心脏组织，肾组织，骨，软骨，关节，皮

肤,肝组织,胰腺组织,血细胞,肺组织,脑组织和神经组织。

[0013] 在其他方面中,本发明提供了药物组合物,其包括与双特异性蛋白质组合的生理上可接受的运载体。

[0014] 同样在其它方面中,提供了用于治疗患者的病理组织损伤的方法,其包括向患有病理组织损伤的患者给予药物组合物,并因此减弱患者的病理组织损伤。

[0015] 在某些方面,本发明提供了双特异性蛋白质,其包括(1)靶向结构域,其具有对与组织细胞外表面相关联的靶分子的结合特异性,以及(2)工程改造的激活剂(activator)结构域,其具有对与组织细胞表面相关联的受体的结合特异性,其中,工程改造的激活剂结构域具有野生型激活剂结构域氨基酸序列经修饰的氨基酸序列,其中,工程改造的激活剂结构域相对于野生型激活剂结构域降低受体的活性。在一些实施方式中,激活剂结构域经修饰以使受体的活性相对于野生型激活剂结构域降低至少3.5倍。在一些方面中,据受体或下游效应物分子的磷酸化作用测定,相较于不包含靶分子的细胞,当激活剂结构域与双特异性蛋白质中的靶向结构域相关联之时,其对包含靶分子的细胞展现出至少强两倍的受体激活。在一些实施方式中,据AKT的磷酸化作用测定,相较于不包含靶分子的细胞,双特异性蛋白质对包含靶分子的细胞展现出至少强两倍的受体激活。

[0016] 在一些实施方式中,工程改造的激活剂结构域中野生型氨基酸序列经修饰包括位于N-和/或C-末端的附加氨基酸序列、缺失、取代、添加、或其组合。在一些实施方式中,工程改造的激活剂结构域包括融合非免疫原性蛋白的野生型激活剂结构域。在一些实施方式中,工程改造的激活剂结构域包括融合非免疫原性蛋白的野生型激活剂结构域氨基酸序列经修饰的氨基酸序列。

[0017] 在一些实施方式中,双特异性蛋白质还包括半衰期调节剂,其中半衰期调节剂增强双特异性蛋白质的半衰期。半衰期调节剂可以包括人血清白蛋白序列、Fc、scFc、白蛋白结合结构域、PAS化、人 α -甲胎蛋白、或其变体。

[0018] 在一些实施方式中,工程改造的激活剂结构域对生长因子受体具有结合亲和力。

[0019] 在一些实施方式中,激活剂结构域和靶向结构域是重组融合的。然而在其它一些实施方式中,激活剂结构域和靶向结构域是化学偶联或连接的。

[0020] 在一些实施方式中,工程改造的激活剂结构域包括生长因子。在一些实施方式中,生长因子是IGF-1、NRG、或其变体。

[0021] 在一些实施方式中,靶向结构域包括膜联蛋白A5或其变体。在一些实施方式中,膜联蛋白A5包括SEQ ID NO:1-4或122中任一项所示的氨基酸序列。

[0022] 在一些实施方式中,工程改造的激活剂结构域包括IGF-1(LR3-Y31A)。在一些实施方式中,工程改造的激活剂结构域包括SEQ ID NO:18、19、23、24、28、29或120中任一项所示的氨基酸序列。

[0023] 在一些实施方式中,半衰期调节剂是人血清白蛋白或其变体。在一些实施方式中,人血清白蛋白包括SEQ ID NO:54-56或124中任一项所示的氨基酸序列。

[0024] 在一些实施方式中,半衰期调节剂包括Fc或其变体。在一些实施方式中,Fc包括SEQ ID NO:53中任一所示的氨基酸序列。

[0025] 在一些实施方式中,双特异性蛋白质还包括将工程改造的激活剂结构域与半衰期调节剂连接的连接物(connector),以及将半衰期调节剂与靶向结构域连接的连接物。在一

些实施方式中，连接物包括SEQ ID NO:60-62或126-127中任一项所示的氨基酸序列。

[0026] 在一些实施方式中，工程改造的激活剂结构域可以经由肽键连接靶向结构域的氨基末端。在一些实施方式中，工程改造的激活剂结构域可以经由肽键连接靶向结构域的羧基末端。

[0027] 在一些方面中，双特异性蛋白质包括：(1) 激活剂结构域，该激活剂结构域包括生长因子，(2) 靶向结构域，该靶向结构域包括结合位于受损细胞外表面的磷脂酰丝氨酸的多肽，以及这样的双特异性蛋白质，其在受损细胞中具有的半最大有效浓度($EC50_{\text{受损}}$)比其在健康细胞($EC50_{\text{健康}}$)中的低。在一些实施方式中，受损细胞可以是正在进行细胞凋亡或坏死的细胞。在一些实施方式中，生长因子是修饰的IGF-1蛋白(在本文中也被称为IGF-1的变体)。在一些实施方式中，双特异性蛋白质包括这样的IGF-1变体，其具有至少10:1的 $EC50_{\text{健康}}/EC50_{\text{受损}}$ 比。

[0028] 在一些实施方式中，激活剂结构域包括IGF-1的变体。在一些实施方式中，靶向结构域包括人膜联蛋白A5或其变体。在一些实施方式中，激活剂结构域包括IGF-1的变体，而靶向结构域包括人膜联蛋白A5或其变体。

[0029] 在一些方面，双特异性蛋白质包括(1) 激活剂结构域，该激活剂结构域包括IGF-1的变体，(2) 靶向结构域，该靶向结构域包括膜联蛋白A5或其变体，其中，膜联蛋白A5或其变体结合位于受损组织内细胞外表面的磷脂酰丝氨酸，其中，双特异性蛋白质在受损组织中具有的半最大有效浓度($EC50_{\text{受损}}$)比在其健康组织($EC50_{\text{健康}}$)中的低。在一些实施方式中，IGF-1变体诱导AKT的磷酸化作用。在一些实施方式中，双特异性蛋白质包括这样的IGF-1变体，其具有至少10:1的 $EC50_{\text{健康}}/EC50_{\text{受损}}$ 比。

[0030] 在一些实施方式中，受损组织是局部缺血组织。在一些实施方式中，靶向的细胞是细胞凋亡或坏死细胞。

[0031] 在一些实施方式中，受损组织是由糖尿病所引起的糖尿病组织损伤。在一些实施方式中，受损组织是由糖尿病肾病所引起的糖尿病组织损伤。在一些实施方式中，受损组织引起足细胞相关的紊乱。在一些实施方式中，靶向结构域能够结合足细胞蛋白，如肝素(nephrin) (NPHS1)、平足蛋白(podoplanin) (PDPN)、足细胞标记蛋白(PODXL)、营养不良蛋白聚糖(DAG1)、GLEPP1 (PTPRO)、NEPH1 (KIRREL)、FAT非典型钙粘蛋白1(FAT1)、半胱氨酸富集跨膜BMP调控子1(CRIM1)、整联蛋白 α -8/ β 1 (ITGA8)。在一些实施方式中，IGF-1变体具有SEQ ID NO:10-30或120中任一项所示的氨基酸序列。在一些实施方式中，IGF-1变体在结合IGF-1受体后诱导生存信号转导。

[0032] 在一些实施方式中，靶向结构域包括能够结合磷脂酰丝氨酸的分子。在一些实施方式中，靶向结构域包括膜联蛋白A5。在一些实施方式中，膜联蛋白A5具有SEQ ID NO:1-4或122中任一项所示的氨基酸序列。

[0033] 在一些实施方式中，靶向结构域包括能够结合足细胞蛋白，如肝素(nephrin) (NPHS1)、平足蛋白(podoplanin) (PDPN)、足细胞标记蛋白(PODXL)、营养不良蛋白聚糖(DAG1)、GLEPP1 (PTPRO)、NEPH1 (KIRREL)、FAT非典型钙粘蛋白1(FAT1)、半胱氨酸富集跨膜BMP调控子1(CRIM1)、整联蛋白 α -8/ β 1 (ITGA8)的分子。在一些实施方式中，靶向结构域包括能够结合足细胞蛋白，如肝素(nephrin) (NPHS1)、平足蛋白(podoplanin) (PDPN)、足细胞标记蛋白(PODXL)、营养不良蛋白聚糖(DAG1)、GLEPP1 (PTPRO)、NEPH1 (KIRREL)、FAT非典型钙

粘蛋白1(FAT1)、半胱氨酸富集跨膜BMP调控子1(CRIM1)、整联蛋白 α -8/ β 1(ITGA8)的抗体。

[0034] 在一些实施方式中,激活剂结构域和靶向结构域通过肽键共价连接以形成单个多肽。

[0035] 在一些实施方式中,IGF-1变体和膜联蛋白A5或其变体通过肽键共价连接以形成单个多肽。在一些实施方式中,IGF-1的变体和膜联蛋白A5或其变体通过肽键共价连接肽接头以形成单个多肽。

[0036] 在一些实施方式中,双特异性蛋白质还包括肽接头。在一些实施方式中,肽接头是半衰期调节剂。在一些实施方式中,半衰期调节剂是人血清白蛋白或其变体。在一些实施方式中,半衰期调节剂是Fc片段或其变体。在一些实施方式中,人血清白蛋白或其变体具有SEQ ID NO:54-56或124中任一项所示的氨基酸序列。在一些实施方式中,Fc片段具有SEQ ID NO:53所示的氨基酸序列。

[0037] 在一些实施方式中,激活剂结构域连接肽接头的氨基末端,而靶向结构域连接肽接头的羧基末端。在一些实施方式中,激活剂结构域连接肽接头的羧基末端,而其靶向结构域连接肽接头的氨基末端。在一些实施方式中,双特异性蛋白质还包括位于激活剂结构域和肽接头之间的肽连接物,以及位于靶向结构域和肽接头之间的肽连接物。

[0038] 在一些实施方式中,IGF-1变体连接肽接头的氨基末端,而膜联蛋白A5或其变体连接肽接头的羧基末端。在一些实施方式中,IGF-1变体连接肽接头的羧基末端,而膜联蛋白A5或其变体连接肽接头的氨基末端。

[0039] 在一些实施方式中,双特异性蛋白质还包括位于IGF-1变体和肽接头之间的肽连接物,以及位于膜联蛋白A5或其变体和肽接头之间的肽连接物。

[0040] 在一些实施方式中,肽连接物具有SEQ ID NO:60-62或126-127中任一项所示的氨基酸序列。

[0041] 在本发明的一些方面中,工程改造的蛋白质具有SEQ ID NO:84中所列的氨基酸序列。在本发明的一些方面中,核酸具有SEQ ID NO:102中所列的序列。

[0042] 在本发明的一些方面中,工程改造的蛋白质具有SEQ ID NO:118中所列氨基酸序列。在本发明的一些方面中,核酸具有SEQ ID NO:119中所列的序列。

[0043] 本发明的方面涉及双特异性蛋白质,其包括:(1) IGF-1变体,其包括SEQ ID NO:18、19、23、24、28、29或120中任一项所示的氨基酸序列,以及(2) 膜联蛋白A5或其变体,其包括SEQ ID NO:1-4或122中任选一项所示的氨基酸序列。

[0044] 在一些实施方式中,双特异性蛋白质包括这样的人血清白蛋白或其变体,其包括SEQ ID NO:54-56或124中任一项所示的氨基酸序列。在一些实施方式中,人血清白蛋白或其变体连接膜联蛋白A5或其变体的C-末端,以及IGF-1变体的N-末端。

[0045] 在一些实施方式中,双特异性蛋白质还包括将人血清白蛋白或其变体的N-末端连接到膜联蛋白或其变体的C-末端的连接物肽,以及将人血清白蛋白或其变体的C-末端连接到IGF-1变体的N-末端的肽。在一些实施方式中,连接物肽包括SEQ ID NO:60-62或126-127中任一项所示的氨基酸序列。

[0046] 在一些实施方式中,双特异性蛋白质还包括前导多肽(leader polypeptide)。

[0047] 在一些实施方式中,双特异性蛋白质还包括多肽亲和力标签。在一些实施方式中,亲和力标签位于融合蛋白的氨基末端,位于融合蛋白的羧基末端,或位于融合蛋白的中间。

在一些实施方式中，双特异性蛋白质包含包括组氨酸的多肽。

[0048] 在一些实施方式中，双特异性蛋白质包括人膜联蛋白A5非内化变体的氨基酸序列，并且相较于包括野生型人膜联蛋白A5氨基酸序列的双特异性蛋白质，该双特异性蛋白质具有延长的半衰期。例如，该双特异性蛋白质包括SEQ ID NO:4中所示的氨基酸序列。

[0049] 本发明的方面涉及双特异性蛋白质，其包括SEQ ID NO:67、70、73-86、108、110、116或118中任一项所示的氨基酸序列。

[0050] 本文所提供的双特异性蛋白质并不限于两种结合特异性。在某些实施方式中，除了靶向结构域，双特异性蛋白质包括两个或多个激活剂结构域，其经由肽键直接或间接地连接。在某些实施方式中，除了激活剂结构域，双特异性蛋白质包括两个或多个靶向构域，其经由肽键直接或间接地连接。

[0051] 本发明的方面涉及在对象中促进组织再生或存活的方法，该方法包括向有需要的患者中给予治疗有效量的双特异性蛋白质，由此靶向结构域特异地结合与受损组织的受损细胞相关联的靶分子，由此使双特异性蛋白质靶向受损组织，并且由此在激活剂结构域暴露于生长因子受体后，激活剂特异地激活生长因子受体，从而促进受损组织的再生或存活。

[0052] 本法的某些方面涉及治疗有需要的患者的方法，该方法包括提供双特异性蛋白质，并且给予患者治疗有效量的双特异性蛋白质，其中该双特异性蛋白质结合组织细胞质膜外部小叶的磷脂酰丝氨酸，以及组织细胞表面的IGF-1生长因子受体。在一些实施方式中，双特异性蛋白质结合与相同组织细胞的表面相关联的分子。在其它一些实施方式中，双特异性蛋白质结合与不同组织细胞的表面相关联的分子。

[0053] 本发明的方面涉及在对象中促进组织再生或存活的方法，该方法包括(a)提供这样的双特异性蛋白质，其具有靶向结构域和工程改造的激活剂结构域，所述靶向结构域具有对与组织的第一细胞外表面相关联的靶分子的结合特异性，所述工程改造的激活剂结构域具有对与组织的第二细胞表面相关联的受体的结合特异性，其中工程改造的激活剂结构域具有野生型激活剂结构域氨基酸序列经修饰的氨基酸序列，其中工程改造的激活剂结构域相对于野生型激活剂结构降低受体的活性；以及(b)向有需要的患者给予治疗有效量的双特异性蛋白质，以此靶向结构域使双特异性融合蛋白靶向组织的第一细胞，并且以此在激活剂结构域暴露于第二细胞表面的生长因子受体后，使激活剂结构域特异地激活生长因子受体，从而促进组织再生，其中，据受体或下游效应物分子的磷酸化作用测定，相较于不包含靶细胞的细胞，双特异性蛋白质对包含靶分子的细胞展现出至少强两倍的受体激活。在一些实施方式中，第一细胞是凋亡或坏死细胞。

[0054] 本发明的方面涉及在对象中促进组织再生或存活的方法，该方法包括(a)提供这样的双特异性蛋白质，其具有(1)激活剂结构域，其中该激活剂结构域包括IGF-1的变体，以及(2)靶向结构域，其中该靶向结构域包括膜联蛋白A5或其变体；以及(b)向有需要的患者给予治疗有效量的双特异性蛋白质，以此膜联蛋白A5或其变体使双特异性融合蛋白靶向组织的第一细胞，其中该细胞在质膜外部小叶表达磷脂酰丝氨酸，并以此在IGF-1变体暴露于位于第二细胞表面的IGF-1受体后，使IGF-1变体特异地激活IGF-1受体，从而促进组织再生。

[0055] 在一些实施方式中，靶向的细胞和激活的细胞是相同的。在其它一些实施方式中，

靶向的细胞和激活的细胞是不同的。在一些实施方式中，靶向的细胞是受损细胞，而激活的细胞是活细胞。在一些实施方式中，靶向的细胞是受损细胞，并且激活的细胞是受损细胞。

[0056] 在某些实施方式中，病理组织损伤是与心肌梗塞相关联的心脏组织损伤。在其它实施方式中，病理组织损伤是与肾组织损伤。在其它实施方式中，病理组织损伤是在骨，软骨，关节，皮肤，肝组织，胰腺组织，血细胞，肺组织或神经组织中。在某些实施方式中，这样的方法还包括向患者给予干细胞。

[0057] 本文还提供了核酸分子，其编码本文所述双特异性融合蛋白。在某些实施方式中，核酸分子是DNA，并且该DNA还包括转录和翻译调节序列，其可操作地连接双特异性融合蛋白编码序列，从而使得编码序列的转录和翻译在至少一种真核细胞类型中发生。

[0058] 参考下文详细描述，本发明的这些和其它方面将是容易理解的。

[0059] 序列表描述

[0060] SEQ ID NO:1是人膜联蛋白A5 (AnxV) 的氨基酸序列。

[0061] SEQ ID NO:2是具有C316S取代的人膜联蛋白A5 (AnxV-C316S) 的氨基酸序列。

[0062] SEQ ID NO:3是具有C316S和包括C-末端六聚组氨酸的肽的人膜联蛋白A5 (AnxV-C316S-6His) 的氨基酸序列。

[0063] SEQ ID NO:4是的人膜联蛋白A5非内在化变体 (ni-AnxV) 的氨基酸序列。

[0064] SEQ ID NO:5是编码膜联蛋白A5 (AnxV) 的核酸序列。

[0065] SEQ ID NO:6是编码AnxV C316S的核酸序列。

[0066] SEQ ID NO:7是编码AnxV C316S-6His的核酸序列。

[0067] SEQ ID NO:8是编码ni-AnxV的核酸序列。

[0068] SEQ ID NO:9是野生型人IGF-1(成熟型)的氨基酸序列。

[0069] SEQ ID NO:10是人IGF-1变体 (IGF-1Des 1-3) 的氨基酸序列。

[0070] SEQ ID NO:11是人IGF-1变体 (IGF-1LONG) 的氨基酸序列。

[0071] SEQ ID NO:12是人IGF-1变体 (IGF-1E3R) 的氨基酸序列。

[0072] SEQ ID NO:13是人IGF-1变体 (IGF1 R37X) 的氨基酸序列。

[0073] SEQ ID NO:14是具有残基68-70缺失的人IGF-1变体 (IGF1 3X) 的氨基酸序列。

[0074] SEQ ID NO:15是人IGF-1变体 (IGF-1LR3) 的氨基酸序列。

[0075] SEQ ID NO:16是包括R37X_3X的人IGF-1 (LR3) 变体的氨基酸序列。

[0076] SEQ ID NO:17是包括Y24L的人IGF-1 (LR3) 变体的氨基酸序列。

[0077] SEQ ID NO:18是包括Y24L_Y31A的人IGF-1 (LR3) 变体的氨基酸序列。

[0078] SEQ ID NO:19是包括Y31A的人IGF-1 (LR3) 变体的氨基酸序列。

[0079] SEQ ID NO:20是包括Y60L的人IGF-1 (LR3) 变体的氨基酸序列。

[0080] SEQ ID NO:21是包括R37X_3X的人IGF-1变体的氨基酸序列。

[0081] SEQ ID NO:22是包括Y24L的野生型人IGF-1变体的氨基酸序列。

[0082] SEQ ID NO:23是包括Y24L_Y31A的野生型人IGF-1变体的氨基酸序列。

[0083] SEQ ID NO:24是包括Y31A的野生型人IGF-1变体的氨基酸序列。

[0084] SEQ ID NO:25是包括Y60L的野生型人IGF-1变体的氨基酸序列。

[0085] SEQ ID NO:26是包括R37X_3X的人IGF-1 (Des1-3) 变体的氨基酸序列。

[0086] SEQ ID NO:27是包括Y24L的人IGF-1 (Des1-3) 变体的氨基酸序列。

- [0087] SEQ ID NO:28是包括Y24L_Y31A的人IGF-1(Des1-3)变体的氨基酸序列。
- [0088] SEQ ID NO:29是包括Y31A的人IGF-1(Des1-3)变体的氨基酸序列。
- [0089] SEQ ID NO:30是包括Y60L的人IGF-1(Des1-3)变体的氨基酸序列。
- [0090] SEQ ID NO:31是编码IGF-1的核酸序列。
- [0091] SEQ ID NO:32是编码IGF-1(Des1-3)的核酸序列。
- [0092] SEQ ID NO:33是人IGF1 LONG的核酸序列。
- [0093] SEQ ID NO:34是人IGF1 E3R的核酸序列。
- [0094] SEQ ID NO:35是人IGF1 R37X的核酸序列。
- [0095] SEQ ID NO:36是人IGF1 3X(缺失残基68-70)的核酸序列。
- [0096] SEQ ID NO:37是编码IGF-1(LR3)的核酸序列。
- [0097] SEQ ID NO:38是编码包括R37X_3X的IGF-1(LR3)变体的核酸序列。
- [0098] SEQ ID NO:39是编码包括Y24L的IGF-1(LR3)变体的核酸序列。
- [0099] SEQ ID NO:40是编码包括Y24L、Y31A的IGF-1(LR3)变体的核酸序列。
- [0100] SEQ ID NO:41是编码包括Y31A的IGF-1(LR3)变体的核酸序列。
- [0101] SEQ ID NO:42是编码包括Y60L的IGF-1(LR3)变体的核酸序列。
- [0102] SEQ ID NO:43是编码包括R37X_3X的IGF-1变体的核酸序列。
- [0103] SEQ ID NO:44是编码包括Y24L的IGF-1变体的核酸序列。
- [0104] SEQ ID NO:45是编码包括Y24L和Y31A的IGF-1变体的核酸序列。
- [0105] SEQ ID NO:46是编码包括Y31A的IGF-1变体的核酸序列。
- [0106] SEQ ID NO:47是编码IGF-1变体Y60L的核酸序列。
- [0107] SEQ ID NO:48是编码IGF-1(Des1-3)变体R37X_3X的核酸序列。
- [0108] SEQ ID NO:49是编码IGF-1(Des1-3)变体Y24L的核酸序列。
- [0109] SEQ ID NO:50是编码IGF-1(Des1-3)变体Y24L、Y31A的核酸序列。
- [0110] SEQ ID NO:51是编码IGF-1(Des1-3)变体Y31A的核酸序列。SEQ ID NO:52是编码IGF-1(Des1-3)变体Y60L的核酸序列。SEQ ID NO:53是Fc肽的氨基酸序列。
- [0111] SEQ ID NO:54是人血清白蛋白(HSA)的氨基酸序列。
- [0112] SEQ ID NO:55是人血清白蛋白变体mHSA的氨基酸序列。SEQ ID NO:56是人血清白蛋白变体mHSA7的氨基酸序列。SEQ ID NO:57是编码人血清白蛋白HSA的核酸序列。SEQ ID NO:58是编码人血清白蛋白变体mHSA的核酸序列。SEQ ID NO:59是编码人血清白蛋白变体mHSA7的核酸序列。SEQ ID NO:60是接头1k7的氨基酸序列。
- [0113] SEQ ID NO:61是接头1k15的氨基酸序列。
- [0114] SEQ ID NO:62是接头1k40的氨基酸序列。
- [0115] SEQ ID NO:63是编码接头1k7的核酸序列。
- [0116] SEQ ID NO:64是编码接头1k15的核酸序列。
- [0117] SEQ ID NO:65是编码接头1k40的核酸序列。
- [0118] SEQ ID NO:66是SGF 602的氨基酸序列。
- [0119] SEQ ID NO:67是SGF 683的氨基酸序列。
- [0120] SEQ ID NO:68是SGF 703的氨基酸序列。
- [0121] SEQ ID NO:69是SGF 604的氨基酸序列。

- [0122] SEQ ID NO:70是SGF 606的氨基酸序列。
- [0123] SEQ ID NO:71是SGF 649的氨基酸序列。
- [0124] SEQ ID NO:72是SGF688的氨基酸序列。
- [0125] SEQ ID NO:73是SGF 711的氨基酸序列。
- [0126] SEQ ID NO:74是SGF 713的氨基酸序列。
- [0127] SEQ ID NO:75是SGF 716的氨基酸序列。
- [0128] SEQ ID NO:76是SGF 727的氨基酸序列。
- [0129] SEQ ID NO:77是SGF 728的氨基酸序列。
- [0130] SEQ ID NO:78是SGF 729的氨基酸序列。
- [0131] SEQ ID NO:79是SGF 730的氨基酸序列。
- [0132] SEQ ID NO:80是SGF 731的氨基酸序列。
- [0133] SEQ ID NO:81是SGF 732的氨基酸序列。
- [0134] SEQ ID NO:82是SGF 733的氨基酸序列。
- [0135] SEQ ID NO:83是SGF 739的氨基酸序列。
- [0136] SEQ ID NO:84是SGF 740的氨基酸序列。
- [0137] SEQ ID NO:85是SGF 741的氨基酸序列。
- [0138] SEQ ID NO:86是SGF 743的氨基酸序列。
- [0139] SEQ ID NO:87是编码SGF 604的核酸序列。
- [0140] SEQ ID NO:88是编码SGF 606的核酸序列。
- [0141] SEQ ID NO:89是编码SGF 649的核酸序列。
- [0142] SEQ ID NO:90是编码SGF 688的核酸序列。
- [0143] SEQ ID NO:91是编码SGF 711的核酸序列。
- [0144] SEQ ID NO:92是编码SGF 713的核酸序列。
- [0145] SEQ ID NO:93是编码SGF 716的核酸序列。
- [0146] SEQ ID NO:94是编码SGF 727的核酸序列。
- [0147] SEQ ID NO:95是编码SGF 728的核酸序列。
- [0148] SEQ ID NO:96是编码SGF 729的核酸序列。
- [0149] SEQ ID NO:97是编码SGF 730的核酸序列。
- [0150] SEQ ID NO:98是编码SGF 731的核酸序列。
- [0151] SEQ ID NO:99是编码SGF 732的核酸序列。
- [0152] SEQ ID NO:100是编码SGF 733的核酸序列。
- [0153] SEQ ID NO:101是编码SGF 739的核酸序列。
- [0154] SEQ ID NO:102是编码SGF 740的核酸序列。
- [0155] SEQ ID NO:103是编码SGF 741的核酸序列。
- [0156] SEQ ID NO:104是编码SGF 743的核酸序列。
- [0157] SEQ ID NO:105是编码前导序列的氨基酸序列。
- [0158] SEQ ID NO:106是编码前导序列的核酸序列。
- [0159] SEQ ID NO:107是SGF 704的氨基酸序列。
- [0160] SEQ ID NO:108是SGF 734的氨基酸序列。

- [0161] SEQ ID NO:109是SGF 746的氨基酸序列。
- [0162] SEQ ID NO:110是SGF 757的氨基酸序列。
- [0163] SEQ ID NO:111是编码SGF 704的核酸序列。
- [0164] SEQ ID NO:112是编码SGF 734的核酸序列。
- [0165] SEQ ID NO:113是编码SGF 746的核酸序列。
- [0166] SEQ ID NO:114是编码SGF 757的核酸序列。
- [0167] SEQ ID NO:115是编码Fc的核酸序列。
- [0168] SEQ ID NO:116是SGF 737的氨基酸序列。
- [0169] SEQ ID NO:117是SGF 737的核酸序列。
- [0170] SEQ ID NO:118是SGF-776的氨基酸序列。
- [0171] SEQ ID NO:119是SGF-776的核酸序列。
- [0172] SEQ ID NO:120是包括E3R和Y31A取代的野生型人IGF-1变体的变体的氨基酸序列。
- [0173] SEQ ID NO:121是包括E3R和Y31A取代的野生型人IGF-1变体的变体的核酸序列。
- [0174] SEQ ID NO:122是野生型人膜联蛋白5变体的氨基酸序列,所述野生型人膜联蛋白5变体包括野生型膜联蛋白5的2-320氨基酸以及R63A、K70A、K101A、E138A、D139G、N160A和C316A取代。
- [0175] SEQ ID NO:123是编码人膜联蛋白5变体的核酸序列,所述人膜联蛋白5变体包括野生型膜联蛋白5的2-320氨基酸以及R63A、K70A、K101A、E138A、D139G、N160A和C316A取代。
- [0176] SEQ ID NO:124是变体人血清白蛋白的氨基酸序列,所述变体人血清白蛋白包括野生型人血清白蛋白的26-609氨基酸以及C58S和N527Q取代。
- [0177] SEQ ID NO:125是编码变体人血清白蛋白的核酸序列,所述变体人血清白蛋白包括野生型人血清白蛋白的26-609氨基酸以及C58S和N527Q取代。
- [0178] SEQ ID NO:126是接头1k7的氨基酸序列。
- [0179] SEQ ID NO:127是接头脂肪族1k7的氨基酸序列。
- [0180] SEQ ID NO:128是抗-磷脂酰丝氨酸scFv PS4A7的氨基酸序列。
- [0181] SEQ ID NO:129是抗-DNA scFv SI-1的氨基酸序列。
- [0182] SEQ ID NO:130是抗-DNA scFv SI-22的氨基酸序列。
- [0183] SEQ ID NO:131是B7 scFv抗-肌球蛋白scFv抗体的氨基酸序列。
- [0184] SEQ ID NO:132是FD2抗-肌球蛋白scFv抗体的氨基酸序列。
- [0185] SEQ ID NO:133是MCA1抗-肌球蛋白scFv抗体的氨基酸序列。
- [0186] SEQ ID NO:134是MCA11抗-肌球蛋白scFv抗体的氨基酸序列。
- [0187] SEQ ID NO:135是S3F51抗-肌球蛋白scFv抗体的氨基酸序列。
- [0188] SEQ ID NO:136是抗-DNA scFv抗体的氨基酸序列。
- [0189] SEQ ID NO:137是基序PAS化的氨基酸序列。
- [0190] SEQ ID NO:138是白蛋白结合结构域人抗体(aldudAB)的氨基酸序列。
- [0191] 附图简要说明
- [0192] 图1A和图1B是根据一些实施方式的代表性的治疗性双特异性蛋白质(本文也称之为精明生长因子(Smart Growth Factor)或SGF)和未靶向的对照蛋白的原理图。图1A和图

1B是根据一些实施方式的下述代表性物质的原理图,所述物质是(1)靶向的、效力减弱的基于IGF-1的蛋白质,(2)靶向的、效力减弱的基于Nrg1 α 的蛋白质,(3)未靶向的、效力减弱的基于IGF-1的蛋白质,(4)未靶向的、效力未减弱的基于IGF-1的蛋白质,(5)靶向的、效力未降低的基于IGF-1的蛋白质,(6)信号转导臂(signaling arm),(7)靶向臂(targeting arm),(8)半衰期调节剂,以及(9)接头。

[0193] 图2A和2B是根据一些实施方式的表格,其中列出治疗性双特异性蛋白质以及相较于野生型生长因子(wt GF)其在健康细胞中的效力和效力减弱倍数。图2A和2B显示了根据本发明实施方式经工程改造的生长因子,相较于野生型生长因子,其具有减弱的效力(即,增加的pAKT EC50)。EC50被定义为实现半最大pAKT信号转导水平所需要的浓度。iPSC衍生的心肌细胞(CDI)用(S)GF刺激10分钟,并且通过ELISA测量pAKT水平。图2A和2B显示了相较于wt GF,通过氨基酸的添加、缺失或突变或通过融合其它蛋白质结构域工程改造GF引起效力的减弱。

[0194] 图3A是这样一组图表,其描述了根据一些实施方式,在健康和受损心肌细胞中使用不同的治疗性双特异性蛋白质和未靶向的对照蛋白的pAKT(蛋白激酶B)剂量反应。候选精明生长因子(SGF)的效力在多能干细胞衍生的心肌细胞(细胞动力学国际公司(cellular Dynamics International))中测量,并且通过磷酸化Akt的累积来定量信号转导。为了评估精明生长因子的靶向,在健康和受损心肌细胞中收集剂量反应曲线(受损=用12.5ug/mL多柔比星孵育24小时以诱导细胞凋亡)。随后将剂量反应曲线拟合至3参数EC50活化模型,并且在健康(圆形,蓝色)和受损(方块,红色)情况之间比较计算的EC50。在这些标准化的图中,示出了最佳拟合线并且以实心的圆形和方块描述了各数据点。

[0195] 图3B是这样的图表,其描述了根据一些实施方式,相较于未靶向的对照蛋白,针对不同的治疗性双特异性蛋白质,通过EC50健康/EC50受损在对数级别上计算的效力移位(Potency Shift)。拟合EC50值表示健康(填充的圆形)和受损(用12.5ug/mL多柔比星孵育24小时以诱导细胞凋亡)情况。误差线表示对于参数的95%置信区间。由健康和受损剂量效应曲线之间拟合EC50值的比获取针对各工程改造的蛋白质计算的效力移位(EC50健康/EC50受损)。标注效力移位,并以受损情况信号转导中增长倍数表示。图3B显示,未靶向的、效力未减弱的分子(例如,688)和未靶向的、效力减弱的分子(例如,704、602、703)无明显的效力移位。此外,靶向的、效力未减弱的分子(例如,649)同样无明显效力移位。只有靶向的、效力减弱的分子(例如,606、683、711、713、716、727、728、729、730、731、732、733、739、740、741、743、757)具有明显的(>4-倍)效力移位。

[0196] 图3C是这样的图表,其描述了在健康和受损心肌细胞中使用治疗性双特异性蛋白质776(sc776)和相应的未靶向的对照蛋白777(sc777)的pAKT(蛋白激酶B)剂量反应。如图3A,候选精明生长因子的效力以不同浓度(nM)在多能干细胞衍生的心肌细胞中测量,并且通过磷酸化Akt的累积来定量信号转导(Y轴)。将健康和受损情况中的剂量反应曲线拟合至三参数EC50活化模型。分别针对健康(蓝色,填充的圆形)和受损(红色,填充的方块)情况描述对于sc776的信号转导。分别针对健康(紫色,填充的三角形)和受损(绿色,填充的倒三角形)情况描述对于sc777的信号转导应答。

[0197] 图4是这样的图表,其描述了在人心肌细胞中使用治疗性双特异性蛋白质SGF 740减弱通过缺氧诱导的胱天蛋白酶活性。图4显示,根据本发明实施方式的靶向的、工程改造

的生长因子以剂量依赖性方式减弱人心肌细胞中的细胞凋亡。细胞凋亡通过将细胞在1%氧气进行48小时培养诱导。治疗性双特异性蛋白质740在缺氧阶段的起始添加。胱天蛋白酶3/7活性使用caspaseGlo(普洛麦格公司(Promega))测量。融合蛋白740在人心肌细胞中显著地($p \leq 0.01$)减弱通过缺氧诱导的半胱天冬酶活性。

[0198] 图5是这样的图表,其描述了使用治疗性双特异性蛋白质SGF 727、740、734以及未靶向的对照(746)在人肾近球小管上皮细胞中降低缺氧诱导的细胞死亡。图5显示,根据本发明实施方式的靶向的工程改造生长因子在人肾近球小管上皮细胞中降低缺氧诱导的细胞死亡,而未靶向的对照不显示效果。细胞死亡通过流式细胞术针对碘化丙啶阳性染色的细胞百分比进行测量。将细胞血清饥饿5小时,然后在将其置于厌氧袋之前用治疗性双特异性蛋白质SGF 727、740、734或未靶向的对照(746)预处理18小时(具有指示剂BD 260683的GasPak EZ厌氧袋系统)。常氧对照以相同的方式处理,除了不将该对照置于厌氧袋中。将所有结果标准化至常氧对照。结果为2-3次独立实验的平均。通过单尾ANOVA测试确定显著性, $\alpha=0.05$ 。

[0199] 图6是这样的表格,其描述了不同的治疗性双特异性蛋白质在静脉注射给药后的半衰期和衰减率。使用单室模型计算不同的治疗性双特异性蛋白质和wt IGF-1在小鼠中的半衰期。SGF 727具有IGF1(LR-3-R37X-3X)_1k40_mHSA_1k40_AnxV结构,而分子739-743具有IGF1*(LR3)_1k7_mHSA_1k7_AnxV(ni)基础结构,其中*表示IGF1的效力减弱缺失或突变。SGF757具有Nrg1a_1k7_mHSA_1k7_AnxV(ni)结构。图6显示,根据一些实施方式的靶向的工程改造生长因子(SGF)具有比野生型生长因子(wt IGF1)更长的半衰期。

[0200] 图7A和7B是一组这样的图表,其描述了静脉注射给药后不同的治疗性双特异性蛋白质对血糖水平的影响。图7显示,根据一些实施方式的靶向的工程改造生长因子(SGF)具有减弱的脱靶作用。相较于未靶向的、高效力的IGF1融合蛋白,Anx靶向的、效力减弱的IGF1融合蛋白显著地降低低血糖。

[0201] 图7A是这样的图表,其描述了不同治疗性双特异性蛋白质给药后小鼠中血糖的时程。数据以mg/dL血糖水平示出。SGF 727-743是靶向的、效力减弱的基于IGF1的融合蛋白,而688是未靶向的高效力的IGF1融合蛋白。将重组HAS作为阴性对照,且将IGF-1(LR3变体)作为阳性对照给予小鼠。

[0202] 图7B是这样的图表,其描述了SGF效力(定义为实现半最大pAKT水平所需的浓度,即,治疗性双特异性蛋白质的pAKT EC50)与3小时血糖曲线下面积(AUC)之间的关系。图7B证明了,较大的效力减弱(即,增加的pAKT EC50)导致增强的3小时血糖AUC(即,较少的血糖降低)。

[0203] 图8是描述受损(梗塞)与健康(远端)大鼠心脏区域中相对pAKT水平的图表。使用大鼠局部缺血/再灌注模型,通过在大鼠中连接左前降支冠状动脉(LAD),以生成局部缺血损伤。局部缺血1小时且再灌注2小时后,切除心脏,并通过解剖学指标将其显微分隔成远端(健康)和梗塞(受损)区域。生成各区域的组织匀浆,并使用完全AKT/pAKT夹心ELISA分析磷酸-AKT。此时,IGF-1并不导致pAKT在远端或梗塞组织中增强,而未靶向的、高效力的IGF1融合蛋白(688)在远端和梗塞组织中增强pAKT。靶向的、效力减弱的IGF1融合蛋白606,相较于远端组织,选择性地增强梗塞组织中的pAKT($p < 0.05$)。图8显示,靶向的工程改造生长因子(SGF)在受损组织中体内激活促存活信号转导。靶向的、效力减弱的IGF1融合蛋白606,相较

于远端(健康)组织,在梗塞组织体内显著地激活更多pAKT信号转导。并未在wt IGF1或未靶向的、高效力融合蛋白(688)中观察到选择性的信号转导。

[0204] 图9A、9B和9C显示了根据一些实施方式的靶向的工程改造生长因子是体内有效的,并且在急性心肌梗塞的大鼠局部缺血/再灌注模型中减小梗塞大小。在大鼠急性心肌梗塞后,靶向的、效力减弱的IGF1融合蛋白(SGF 606)显著地降低梗塞/风险区域(AAR)。用SGF606观察到比wt IGF1显著更强的梗塞/AAR降低。

[0205] 图9A描述了大鼠急性心肌梗塞(AMI)模型的概况。大鼠AMI模型的概况。将左前降支冠状动脉(LAD)在连接点系上1小时,然后松开并在72小时的恢复阶段进行再灌注。经由侧尾静脉在再灌注的时间静脉注射载剂、IGF1或SGF 606。72小时后,再次连接LAD,并且对心脏进行梗塞大小的组织学评估。

[0206] 图9B是这样的图表,其描述了使用图9A中所示模型,局部缺血后处于风险的左心室的面积百分比(风险区域(AAR)/LV%)。如通过风险区域(AAR)相对于左心室(LV)区域类似的大小所指示的,任意各组之间手术过程产生的损伤大小并不存在显著地差异。

[0207] 图9C是这样的图表,其描述了AMI损伤且用载剂、wtIGF1、或靶向的治疗性双特异性蛋白质(SGF 606)治疗的大鼠中梗塞/风险区域百分比。相较于载剂对照,72小时时靶向的、效力减弱的SGF 606在减小梗塞大小中非常显著地有效($p<0.001$)。相对于载剂,IGF1也能够显著地减小梗塞大小($p<0.05$);然而,相较于IGF1,用SGF 606的治疗产生更大的梗塞减少($p<0.05$)。

[0208] 图10是按照一些实施方式靶向的工程改造生长因子的原理图。

[0209] 发明详述

[0210] 应当理解本文所使用的术语仅为了描述本发明特定的实施方式而不是限制。

[0211] 除非另有限定,在此使用的所有技术和科学术语均与本发明所述领域的技术人员的通常理解一致。

[0212] 此外,本文之前和之后引用的所有出版物、专利和专利申请通过引用全文纳入本文。

[0213] 在本说明书和权利要求书中所用的单数形式“一个”,“一种”和“该”、“所述”包括复数指示物,除非上下文中有明确的另外说明。

[0214] 本文所用术语“肽”、“多肽”和“蛋白质”可互换使用以表示通过酰胺键(本文也称之为肽键)共价连接的至少两个氨基酸的序列聚合物。

[0215] 本文所用术语“双特异性”指融合蛋白与两个不同配体相互作用的能力。在一些实施方式中,双特异性蛋白质与靶分子针对靶向结构域相互作用,并与受体针对激活剂结构域相互作用。

[0216] 本文所用术语“靶分子”指与组织(例如,“处于风险的”、病变的或受损的组织)相关联的任何分子。“靶细胞”意指双特异性蛋白质或其靶向结构域可以特异性结合的细胞。

[0217] “结合”或“特异性结合”在本文可以互换使用,并且表示对特定分子(例如,对靶分子(例如,展现出对靶分子显著亲和力的靶向结构域,或对与细胞表面相关联的分子(如生长因子受体)展现出显著亲和力的激活剂结构域)或包含该分子的细胞或组织展现出显著的亲和力的蛋白质(或其靶向多肽结构域或其激活剂结构域),并且据说当蛋白质(或其靶向多肽结构域或其激活剂结构域)对特定分子具有显著亲和力时发生,并且具有选择性,并

不展现与其它分子显著的交叉反应性。

[0218] 本文所用术语“重组”表示区别于自然界中通常存在的遗传实体。当适用于多核苷酸或基因时,其表示该多核苷酸是这样多种组合的产物,所述多种组合是克隆、限制性酶切和/或连接步骤,以及导致区别于自然界中存在的多核苷酸的构建体产生的其他方法。

[0219] 术语“可操作地连接”指将核酸序列置于与另一核酸序列的功能性关系中。当将核酸置于与另一核酸序列的功能性关系中时,其是“可操作地连接”。

[0220] 本文所用术语“载体”旨在指代能够运输所连接的另一核酸的核酸分子。载体的一种类型是“质粒”,其指的是环状双链DNA环,其中可以连接额外DNA区段。载体的另一种类型是病毒载体(例如,复制缺陷型逆转录病毒、腺病毒和腺相关病毒),其中可以将额外的DNA区段连接到病毒基因组中,从而可操作地连接这样的启动子(例如,病毒启动子),所述启动子将驱动由该DNA区段编码的蛋白质的表达。某些载体能够在其转导的宿主细胞中自主复制(例如,具有细菌复制起点和细菌载体和附加体哺乳动物载体)。可在导入宿主细胞后将其他载体(例如,非附加体哺乳动物载体)整合到宿主细胞的基因组中,从而与宿主基因组一起复制。此外,某些载体能够引导与其操作性连接的基因的表达。这样的载体在本文中称为“表达载体”。

[0221] 本文所用术语“宿主细胞”旨在指已经在其中导入表达载体的细胞,该细胞能够复制,并且优选表达由该载体编码的蛋白质。应理解,所述术语不仅指具体对象细胞,还指所述细胞的后代。由于在连续传代过程中可能因突变或环境影响而发生某些改变,这类后代事实上可能不与亲代细胞相同,但仍落入本文所用术语“宿主细胞”的范围内。

[0222] 本领域所知的“相同性”是通过比较序列确定的两个或多个多肽或蛋白质序列之间的关系。本领域中,“相同性”也指通过此类序列字串之间的匹配确定的多肽或蛋白质之间序列相关的程度。“相同性”可通过本领域已知的任何合适的生物信息学方法容易地计算。

[0223] 术语“亲本多肽”指野生型多肽,并且该野生型多肽的氨基酸序列或核苷酸序列是公众可及的蛋白质数据的一部分(例如,EMBL核苷酸序列数据库、NCBI Entrez、ExPasy、蛋白质数据库等)。

[0224] 术语“突变的多肽”或“多肽变体”指这样一种形式的多肽,其中,其氨基酸序列不同于其相应的野生型(亲本)形式、自然存在的形式或任何其它亲本形式的氨基酸序列。突变的多肽可以包含导致突变多肽的一个或多个突变,例如,取代、插入、缺失、添加等。

[0225] 术语“对应亲本多肽”用于描述本发明的多肽,其中,该多肽的氨基酸序列与相应的亲本多肽的氨基酸序列仅存在至少一个氨基酸变异的区别。通常,变体多肽和亲本多肽的氨基酸序列展现出高百分比的相同性。在一示例中“对应亲本多肽”表示变体多肽的氨基酸序列与亲本多肽的氨基酸序列具有至少50%的相同性,至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、至少约95%、至少约98%的相同性,或至少约99%的相同性。在另一示例中,编码变体多肽的核酸序列与编码亲本多肽的核酸序列具有至少约50%的相同性,至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、至少约95%、至少约98%的相同性,或至少约99%的相同性。

[0226] 本文所用术语“基本相同性”或“基本相似性”当指核酸或其片段时,表示在将适当的核苷酸插入或缺失与另一核酸(或其互补链)进行最佳比对时,在该序列的至少约95%-

99%中有核苷酸序列相同性。

[0227] 本文所用术语“同源的”，当其涉及肽时，指两个肽之间的氨基酸序列相似性。当在两个肽中的氨基酸位置被相同的氨基酸占据时，它们在该位置是同源的。如本文所用，本文所用“基本同源的”表示序列与参照肽是至少50%相同的，并且优选是至少75%和更优选是95%同源的，并且该序列保留与其同源的序列所有或大部分活性。

[0228] 本文所用术语“受损细胞”或“受损组织”表示并且包括生物细胞或组织，例如但不限于，由创伤或化学侵蚀所损害或损伤的心血管细胞或组织，局部缺血组织，或由各种导致组织正常血液流动中断的手段所损害的梗塞组织或细胞。

[0229] 本文所用术语“治疗有效量”表示这样的双特异性蛋白质的量，其将引起研究人员、兽医、医生或其它临床工作人员所寻求的组织、系统、动物或人的生物学或医学反应。

[0230] 本文所用术语“药学上可接受的”表示必须与制剂中的其它成分相容的运载体、稀释剂或者赋形剂，且对接受者没有毒害作用。

[0231] 本发明的方面涉及用于修复或使受损或病变组织或细胞再生的双特异性治疗性蛋白质、药物组合物和方法。在一些实施方式中，双特异性治疗性蛋白质可以正向调节靶向的细胞或靶向的组织的存活。具体而言，双特异性治疗性蛋白质可以促进存活信号转导。

[0232] 在一些实施方式中，本发明的药物组合物可以还包括一种或多种其它生物活性试剂或组分，以协助受损组织或细胞的治疗和/或促进组织再生过程。

[0233] 本发明的方面还包括编码治疗性双特异性蛋白质和其变体的多核苷酸，其可以处于RNA的形式或处于DNA的形式，其中DNA包括cDNA和合成DNA。DNA可以是双链或单链的。由于遗传密码冗余或简并的结果，编码本发明变体的编码序列可以不同。

[0234] 本发明的方面涉及包括两个结合结构域的双特异性治疗性蛋白质，各自对不同的靶分子或“配体”具有特异性。在一些实施方式中，双特异性蛋白质包括靶向结构域或靶向部分，以及激活剂结构域或治疗性部分。本文所用术语“靶向部分”、“靶向结构域”或“靶向多肽”可以互换使用，并且指使双特异性治疗选择性地定位在身体的特定组织或区域中的分子。该定位可以通过特异性识别分子决定簇、靶向结构域的分子大小、离子相互作用、疏水性相互作用等介导。如本文所用，本文所用术语“治疗性部分”、“激活剂结构域”、“激活剂多肽”和“信号转导臂”可以互换使用，并且指这样的任何试剂，其可以用于治疗，并且是非毒性的，不具有细胞毒性作用或不是不利于细胞的，包括但不限于生长因子。

[0235] 本文所用“双特异性蛋白质”指能够特异性结合两个或多个不同特异性分子的蛋白质。在一些实施方式中，双特异性蛋白质包括具有对第一特异性靶分子结合特异性的靶向结构域以及对第二靶分子具有结合特异性的激活剂结构域。在一些实施方式中，激活剂结构域具有对受体的结合特异性。在一些实施方式中，激活剂结构域对调节/促进组织再生的受体具有结合特异性。在一些实施方式中，靶向结构域用于使双特异性蛋白质靶向细胞或组织，而激活剂结构域用于激活细胞，因此促进靶向的组织再生。

[0236] 在一些方面中，双特异性治疗性蛋白质是嵌合蛋白，其具有连接激活剂多肽的靶向多肽。在一些方面中，双特异性治疗性蛋白质是嵌合蛋白，其具有连接生长因子变体的靶向多肽。

[0237] 靶向结构域通常用于使双特异性蛋白质靶向选择的细胞，也称之为“靶细胞”。靶向结构域与其靶分子的结合并不在靶细胞中诱导显著的生物作用。激活剂结构域结合细胞

上的第二靶分子或配体。激活剂结构域与其配体的结合旨在调节特定的生物作用,例如,以增强生物活性。在一些实施方式中,激活剂结构域与其配体的结合旨在正向调节靶向的细胞或组织的存活。具体而言,双特异性蛋白质的激活剂结构域可以促进存活信号转导。

[0238] 在一些实施方式中,靶向结构域和激活剂结构域与多聚体蛋白质的不同亚基相关联。在一些实施方式中,激活剂结构域与靶向结构域交联。在一些实施方式中,激活剂结构域直接或间接融合靶向结构域。

[0239] 特别需要指出的是,激活剂结构域中一个氨基酸残基的取代可以影响整个双特异性蛋白质的特性,并且该整体作用可能对双特异性蛋白质的药理学效力及靶向特异性有益(或有害)。

[0240] 在本发明的方法和组合物的一些方面中,双特异性治疗性蛋白质具有这样经工程改造的激活剂结构域,其相较于野生型激活剂结构域具有减弱的效力。已经观察到,激活剂结构域减弱的效力可以增强双特异性治疗性蛋白质的选择性,这导致包含靶细胞的细胞或组织的优选激活(参见,图3A、图3B和图3C)。在一些实施方式中,激活剂结构域是治疗剂。在一些实施方式中,激活剂结构域是生长因子变体。观察到相对于野生型激活剂结构域效力的减弱可以归因于在较大多结构域融合蛋白的情况下激活结构的位阻现象以及扩散率的下降。在一些实施方式中,激活剂结构域是IGF-1变体。在一些实施方式中,激活剂结构域是NRG变体。

[0241] 在本发明的方法和组合物的一些方面中,双特异性治疗性蛋白质具有这样的激活剂结构域,其融合半衰期调节结构域以及靶向结构域,因此激活剂结构域相较于野生型激活剂结构域具有减弱的激活效力。已经观察到,激活剂结构域与半衰期调节和靶向结构域的融合减弱激活剂结构域的效力,因此增强双特异性治疗性蛋白质的选择性,这导致包含靶分子的细胞或组织的优选激活。观察到相对于野生型激活剂结构域效力的减弱可以归因于在较大多结构域融合蛋白的情况下激活结构的位阻现象以及扩散率的下降。在一些实施方式中,激活剂结构域是治疗剂。在一些实施方式中,激活剂结构域是生长因子变体。在一些实施方式中,激活剂结构域是IGF-1变体。在一些实施方式中,激活剂结构域是NRG变体。

[0242] 本发明的一些实施方式提供了工程改造的蛋白质,其具有靶向结构域、激活剂结构域、以及任选的肽接头或半衰期调节剂。在各种实施方式中,本发明提供了具有与本文所定义的亲本多肽序列的部分相同水平的变体,例如,人胰岛素生长因子1(IGF-1)、膜联蛋白A5(AnxA5或AnxV)、人血清白蛋白(HSA)。在各种实施方式中,变体具有与本文所定义的亲本多肽或亲本多肽序列的部分至少约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列相同性,例如,IGF-1、膜联蛋白A5、人血清白蛋白。

[0243] 在本发明的方法和组合物的一些方面中,双特异性蛋白质的激活剂结构域(即,生长因子)经工程改造以在其融合靶向结构域之时给予双特异性融合蛋白这样的半最大有效浓度(EC50),其在受损细胞或组织中的EC50比其在健康细胞或组织中的低。在一些实施方式中,双特异性蛋白质的激活剂结构域(即,生长因子)经工程改造以在其融合靶向结构域之时给予双特异性融合蛋白这样的EC50,其在受损细胞或组织中的EC50比其在健康细胞或组织中的低至少一个数量级。

[0244] 在本发明的方法和组合物的一些方面中,可以选择双特异性蛋白质的靶向结构

域,以使其对其配体的结合亲和力比激活结构域对其配体所具有的亲和力高至少一个数量级。例如,靶向结构域对其配体的亲和力是激活结构域对其配体的亲和力至少10倍或更大。在一些实施方式中,靶向结构域对其配体的亲和力是激活结构域对其配体的亲和力的至少15倍高或至少20倍或更高,25倍或更高。在一些实施方式中,靶向结构域对其配体的亲和力是激活结构域对其配体的亲和力至少30、40、50、或甚至100倍或更高。

[0245] 激活剂结构域的不同效力和/或靶向结构域和激活剂结合结构域之间不同的结合亲和力提供了对于现有双特异性蛋白质令人意外且之前未认识到的优势。具体而言,发现了,双特异性蛋白质激活剂结构域的一个或多个残基的改变(添加、缺失、取代)可以导致对于靶细胞较高的特异性,以及激活剂结构域对于非靶细胞减弱的效力。不受受制于理论,假设由于其较低的EC50(即,高效力),生长因子无法被有效的靶向。根据本发明的方面,可以制造具有显著减弱效力(即,增强的EC50)的生长因子的变体。当这些生长因子变体与高亲和力靶向臂融合时,其可以导致包含靶分子的细胞或组织上的生长因子受体选择性激活,并且基本上不激活不包含靶分子的细胞或组织。

[0246] 在本发明的一些方面中,靶向结构域和激活剂结构域是直接连接的。在本发明的一些方面中,靶向结构域和激活剂结构域是间接连接的。在本发明的一些方面中,靶向结构域和激活剂结构域是共价连接的。同样,在本发明的一些方面中,靶向结构域和激活剂结构域是非共价关联的。

[0247] 激活剂部分和靶向部分之间的连接,激活剂部分和半衰期调节剂(或肽接头)之间的连接,以及靶向部分和半衰期调节剂(或肽接头)之间的连接可以是共价连接或非共价连接。连接可以是通过衍生与肽相关的组分并且在肽之间形成肽连接而形成的肽键。连接可以是非共价的连接,如生物素/亲和素或生物素/链酶亲和素连接或特异性抗原/抗体或半抗原/抗体连接。

[0248] 在一些实施方式中,双特异性蛋白质包括(1)靶向结构域,其具有对与组织损伤细胞相关联的分子的结合特异性,其中所述分子在活细胞的细胞内并且暴露于受损细胞的细胞外空间;和(2)激活剂结构域,其具有对组织内细胞的生长因子受体的结合特异性,其中在激活剂结构域暴露于生长因子受体后,激活剂结构域结合生长因子受体,从而促进组织的再生或存活。在一些实施方式中,激活结构域是这样的生长因子,其经工程改造以在其融合靶向结构域之时给予双特异性融合蛋白这样的半最大有效浓度(EC50),其在受损细胞或组织中的EC50比其在健康细胞或组织中的低。在一些实施方式中,激活结构域是这样的生长因子,其经工程改造以在其融合靶向结构域之时给予双特异性融合蛋白这样的EC50,其在受损细胞或组织中的EC50比其在健康细胞或组织中的低至少一个数量级。

[0249] 在一些实施方式中,双特异性融合蛋白质包括(1)靶向结构域,其具有对与组织损伤细胞相关联的分子的结合特异性,其中所述分子在活细胞的细胞内并且暴露于受损细胞的细胞外空间;(2)激活剂结构域,其具有对与组织内细胞表面相关联的分子的结合特异性,其中在激活剂结构域暴露于与膜相关联的分子后,激活剂结构域结合与膜相关联的分子,从而调整组织的再生;和(3)肽接头。在一些实施方式中,激活剂结构域是这样的生长因子,其经工程改造以给予双特异性融合蛋白这样的半最大有效浓度(EC50),其在受损细胞或组织中的EC50比其在健康细胞或组织中的低。在一些实施方式中,激活结构域是这样的生长因子,其经工程改造以在其融合靶向结构域之时给予双特异性融合蛋白这样的EC50,

其在受损细胞或组织中的EC50比其在健康细胞或组织中的低至少一个数量级。在一些实施方式中，接头是非免疫原性肽。在一些实施方式中，肽接头是半衰期调节剂，其能够调整(例如，增加)双特异性蛋白质的半衰期。

[0250] 在一些实施方式中，双特异性蛋白质包括：(1)靶向多肽结构域，其结合与局部缺血相关联的分子；和(2)生长因子多肽，其经工程改造以给予双特异性融合蛋白这样的半最大有效浓度(EC50)，其在局部缺血细胞或组织中的EC50比其在健康细胞或组织中的低，同时具有对位于组织内细胞表面的受体具有亲和力，从而促进组织的再生或存活。

[0251] 在一些实施方式中，双特异性蛋白质包括：(1)靶向多肽结构域，其结合与局部缺血相关联的分子；和(2)生长因子多肽，其经工程改造以给予双特异性融合蛋白这样的半最大有效浓度(EC50)，其在局部缺血细胞或组织中的EC50比其在健康细胞组织中的低，同时具有对组织中细胞表面的受体具有亲和力，从而促进组织的再生或存活。

[0252] 在一些实施方式中，双特异性蛋白质包括(1)至少一个靶向结合域，其具有对与组织相关联的至少一个靶分子的结合特异性；(2)至少一个激活剂结构域，其具有对与组织中细胞表面相关联的至少一个分子的结合特异性，其中在结合结构域暴露于分子后，结合结构域结合分子，从而促进组织的再生或存活；和(3)任选的肽接头。在一些实施方式中，融合蛋白包括两个或多个靶向结构域，各靶向结构域具有对与组织相关联的靶分子的结合亲和力。各靶向结构域可以具有相同的结合亲和力(例如，对相同靶分子的结合亲和力)或者不同的结合亲和力(例如，对不同靶分子的结合亲和力)。各靶向结构域可以具有相同的结合亲和力或不同的结合亲和力。在一些实施方式中，蛋白质包括两个或多个激活剂结构域。各激活剂结构域可以具有相同的结合亲和力(例如，对细胞上相同受体的结合亲和力)或者不同的结合亲和力(例如，对细胞上不同受体的结合亲和力)。各激活剂结构域可以具有相同的结合亲和力或不同的结合亲和力。在一些实施方式中，接头是肽。在一些实施方式中，接头是非免疫原性肽。在一些实施方式中，接头是半衰期调节剂，其中该半衰期调节剂调节双特异性蛋白质的半衰期。

[0253] 在某些实施方式中，双特异性蛋白质还包括半衰期调节剂(HLM)。在一些实施方式中，半衰期调节剂是多肽。半衰期调节剂可以有N-末端和C-末端两个末端，并且在一个末端经由肽键连接靶向多肽结构域，而在另一个末端经由肽键连接激活剂结构域。在其他实施方式中，半衰期调节剂在一个末端(N-末端或C-末端)连接激活剂结构域或连接靶向结构域。因此，半衰期调节剂可以位于双特异性蛋白质的N-末端或C-末端。半衰期调节剂可以经由肽键连接靶向结构域或激活剂结构域。

[0254] 本领域技术人员将会意识到，这样的双特异性蛋白质可以应用于组织再生。在一些实施方式中，组织或器官损伤后，或在可能使组织细胞受损的事件后，双特异性融合蛋白质可以用于病变细胞。在一些实施方式中，双特异性融合蛋白可以激活表达一种或多种生长因子受体的细胞。在其它实施方式中，双特异性融合蛋白可用于例如招募这样的细胞，所述细胞在例如损伤或在可能使组织细胞受损或使其变得功能紊乱的事件后，向组织表达一种或多种生长因子受体。

[0255] 在一些方面，这样双特异性蛋白质的给予可以用于促进受损组织或器官的修复、存活或再生。在一些实施方式中，本文所公开的双特异性蛋白质可用于调整组织存活。例如，双特异性蛋白质可以增强或维持细胞或组织的活力。在一些实施方式中，双特异性融合

蛋白可以激活促存活或细胞存活途径。在一些实施方式中，双特异性蛋白质可以减少细胞凋亡或减少细胞死亡。

[0256] 在一些实施方式中，双特异性蛋白质可以具有(1)靶向结构域，其中该靶向结构域结合靶分子，因此使双特异性融合蛋白靶向组织的第一细胞，和(2)激活剂结构域，其具有对生长因子受体的结合特异性。激活剂结构域暴露于生长因子受体后，激活剂结构域可以激活第二细胞的受体，从而促进细胞招募、细胞凋亡的抑制、细胞增殖的诱导、促存活途径的激活、再生、和/或组织的存活。本领域技术人员将会意识到，双特异性融合蛋白可以结合第一细胞群，并且作用于相同的细胞群(例如，以自分泌方式)或不同的细胞群(例如，以傍分泌方式)。在一些实施方式中，靶向结构域特异性地结合与受损的第一细胞群相关联的靶分子，而激活剂结构域特异性地结合活细胞第二细胞群的受体。在一些实施方式中，靶向结构域特异性地结合与受损的细胞群相关联的靶分子，而激活剂结构域特异性地结合相同细胞群的受体。在一些实施方式中，靶向结构域特异性地结合位于第一细胞群表面的组织特异性靶分子，而激活剂结构域对第二细胞群特异性地作用。在一些实施方式中，靶向结构域特异性地结合位于细胞群表面的组织特异性靶分子，而激活剂结构域对相同细胞群特异性地作用。第一细胞可以是活细胞，或者是“处于风险的”细胞。本文所用“处于风险的”细胞指这样的活细胞，所述活细胞尚未经历细胞凋亡并且没有受损，但是处于受损的风险。

[0257] 在一些实施方式中，双特异性蛋白质具有两个不同的结合结构域(如靶向结构域和激活剂结构域)，两者结合组织或器官中不同细胞上的不同的分子。然而在一些实施方式中，双特异性蛋白质具有两个不同的结合结构域，两者结合组织内相同靶细胞上的不同的分子，对靶向结构域进行选择以特异性地结合靶细胞和这样的激活剂结构域，所述激活剂结构域经选择以结合位于细胞表面的受体(例如，生长因子)，从而促进组织再生、细胞招募、细胞凋亡的抑制、细胞增殖的诱导、促存活途径的激活、再生、和/或组织的存活。

[0258] 靶分子

[0259] 在一些方面中，靶分子暴露于或在靶细胞外部富集。在一些实施方式中，靶分子与受损细胞相关联，靶分子在活细胞或未受损细胞的细胞内，并且暴露于受损细胞内的细胞外空间。这样的分子包括，例如，暴露在经历坏死(如DNA)或细胞凋亡(例如，磷脂酰丝氨酸)、肌球蛋白(包括其组织类型特异性亚型)或ICAM-1、或P-选择素的细胞中的分子。同样在其它实施方式，靶分子是这样的分子，相较于在健康或功能性细胞或组织中检测到的水平，其存在于或富集在病变或功能失调的细胞或组织的表面。在一些实施方式中，靶细胞不是肿瘤或癌性细胞。

[0260] 细胞以包括脂质双分子层的质膜(或细胞膜)为边界。可以认为细胞膜具有面向胞液的表面(胞质侧或细胞的内部)以及面向细胞外部或胞外空间的表面。阴离子磷脂从质膜内部到外部小叶的跨双层运动发生在细胞凋亡期间。阴离子磷脂结合蛋白，如膜联蛋白A5、突触结合蛋白I或乳凝集素可以用于检测细胞膜外部小叶上磷脂酰丝氨酸的存在。磷脂酰丝氨酸是一种磷脂，其通常限于活细胞或未受损细胞中膜的胞质侧，并且其在受损细胞或细胞凋亡中暴露于细胞外表面或的细胞外空间。

[0261] 在一些实施方式中，靶分子是“与局部缺血相关联的分子”。“与局部缺血相关联的分子”是在局部缺血(其导致缺氧)或缺氧后经检测处于显著较高水平(例如，至少高1.5、至少高2倍、至少高3倍、至少高4倍、至少高5倍)的任何分子。局部缺血发生在没有足够的血流

来提供足够的氧气作用时,这导致组织缺氧(氧气降低)或缺氧症(不存在氧气)这一最严重的缺氧形式,并且最终导致组织坏死和细胞凋亡。可以使用任何合适的结合试验来鉴定与局部缺血相关联的分子,包括本文所提供的那些。检测到分子的水平增加可能是由于上调或降低的转换的结果,或者可能是由于增强的可及性(例如,造成细胞损伤)或增强的细胞外暴露(例如,从质膜内部到外部小叶的跨双层运动)。在某些实施方式中,在局部缺血后组织的细胞中检测到比并未经历局部缺血事件的相同组织细胞中显著高水平的与局部缺血相关联的分子(例如,至少高1.5、至少高2倍、至少高3倍、至少高4倍、至少高5倍)。在另外的实施方式中,与局部缺血相关联的分子与细胞损伤相关联(即,在受损细胞中检测到该分子的水平显著高于在相同类型的未损伤细胞所检测的)。在局部缺血事件后,某些与局部缺血相关联的分子富集(例如,至少高1.5、至少高2倍、至少高3倍、至少高4倍、至少高5倍)在心脏中(或在用于模拟心脏局部缺血的模型系统中)。在一些实施方式中,在局部缺血事件后,与局部缺血相关联的分子约1.5倍富集、约2倍富集、约3倍富集、约4倍富集、约5倍富集在心脏中(或在用于模拟心脏局部缺血的模型系统中)。在一些实施方式中,在局部缺血事件后,与局部缺血相关联的分子从约1.5倍至约5倍或更多倍富集在心脏中(或在用于模拟心脏局部缺血的模型系统中)。在一些实施方式中,在局部缺血事件后,与局部缺血相关联的分子从约1.5倍至约2倍、约2倍至约2.5倍、约2.5倍至约3倍、约3倍至约3.5倍、约3.5倍至约4倍、约4倍至约4.5倍、约4.5倍至约5倍、或更多倍富集在心脏中(或在用于模拟心脏局部缺血的模型系统中)。在一些实施方式中,这样的分子包括暴露在经历坏死(例如但不限于,DNA)或细胞凋亡(例如,但不限于磷脂酰丝氨酸)的肌细胞或其它心肌细胞的分子。在一些实施方式中,这样的分子包括富集在疤痕心脏组织中的分子,如胶原(胶原I,III),肌球蛋白(包括其细胞类型特异性亚型),或其它富集在局部缺血后心脏内的细胞外基质蛋白。体内局部缺血再灌注或体外模拟局部缺血再灌注之后,或暴露于诸如缺氧、ATP下降、活性氧(ROS)或一氧化氮合成酶(NOS)产生增加、或体外培养细胞血清饥饿等条件之后,可以基于富集鉴定这样的分子。

[0262] 在一些实施方式中,靶分子是与足细胞相关联的分子。在一些实施方式中,靶细胞是下述一种:肝素(nephrin)(NPHS1)、平足蛋白(podoplanin)(PDPN)、足细胞标记蛋白(PODXL)、营养不良蛋白聚糖(DAG1)、GLEPP1(PTPRO)、NEPH1(KIRREL)、FAT非典型钙粘蛋白1(FAT1)、半胱氨酸富集跨膜BMP调控子1(CRIM1)、整联蛋白 α -8/ β 1(ITGA8)。

[0263] 激活剂结构域

[0264] 激活剂结构域可以是可检测地调整细胞网络活性或从一个位置向另一个位置招募细胞的任何多肽。在一些实施方式中,激活结构域能够通过结合细胞表面受体激活信号转导途径。在一些实施方式中,某些激活剂结构域是生长因子多肽,或受体的任何激活剂。应当理解的是,这样的调整可能是细胞网络活性的增强,例如,诱导细胞增殖、诱导细胞生长、促进细胞存活和/或抑制细胞凋亡。在一些实施方式中,激活剂结构域可以招募其它因子或细胞(例如,干细胞)。

[0265] 用于特定应用的激活剂结构域可以根据所需治疗结果选择。例如,为了增强存活和/或出于干细胞分化(再生的)目的,可以使用包括IGF、HGF、G-CSF、GLP-1、PDGF、SDF1、TB4或NRG1(或其部分或衍生物)的激活剂结构域。为了增强细胞分化(再生的)目的,可以使用包括IGF、FGF2、G-CSF、GH、HGF、PDGF、TB4或NRG1(或其部分或衍生物)的激活剂结构域。通常

可以使用包括基本上保持结合关联受体能力的FGF2、G-CSF、GH、HGF、SGF1、TB4、VEGFA或其部分或衍生物的激活剂结构域来增强血管生成。

[0266] 在一些实施方式中,激活剂结构域包括相对于野生型蛋白质,在氨基酸序列、蛋白质三维结构和/或蛋白质活性中的改变。应当理解的是,为了创造具有所需治疗效果的双特异性蛋白质,激活剂结构域中合适修饰的选择可以取决于多种因素。

[0267] 在一些实施方式中,激活剂结构域是这样的生长因子,其具有涉及野生型生长因子(例如,IGF-1)的氨基酸序列修饰以降低其对其天然受体(例如,IGF-1受体)的结合,以降低其对结合蛋白(例如,IGF结合蛋白)的结合,和/或降低其对其天然受体(例如,IGF-1受体)的活化。在一些实施方式中,激活剂结构域是具有这样的氨基酸序列修饰的生长因子,所述氨基酸序列修饰降低(例如,降低约1-5%、5-10%、10%-20%、约20%-40%、约50%、约40%-60%、约60%-80%、约80%-90%、90-95%)其与其天然受体(例如,IGF-1受体)的结合。

[0268] 生长因子多肽可检测地调节生长因子受体的活化。在一些实施方式中,双特异性蛋白质的激活剂结构域是生长因子、其变体或衍生物,其保持了至少约0.01%的野生型生物活性。在一些实施方式中,双特异性蛋白质的激活剂结构域是生长因子、其变体或衍生物,其保持了至少约0.1%、至少约1%、至少约10%的野生型生物活性。在一些实施方式中,双特异性蛋白质的激活剂结构域是生长因子、其变体或衍生物,其保持了至少约0.01%至约0.1%之间的野生型生物活性。在一些实施方式中,双特异性蛋白质的激活剂结构域是生长因子、其变体或衍生物,其保持了至少约0.01%至约1%之间的野生型生物活性。在一些实施方式中,双特异性蛋白质的激活剂结构域是生长因子、其变体或衍生物,其保持了至少约0.01%至约10%之间的野生型生物活性。在一些实施方式中,双特异性蛋白质的激活剂结构域是生长因子、其变体或衍生物,其保持了至少约0.1%至约1%之间的野生型生物活性。在一些实施方式中,双特异性蛋白质的激活剂结构域是生长因子、其变体或衍生物,其保持了至少约0.1%至约10%之间的野生型生物活性。在一些实施方式中,双特异性蛋白质的激活剂结构域是生长因子、其变体或衍生物,其保持了至少约0.01%至约10%之间的野生型生物活性。在一些实施方式中,通过测量合适细胞中相应生长因子受体的活化可以确定生物活性。在一些实施方式中,例如,通过测量受体激酶的磷酸化作用或下游效应物蛋白,诸如但不限于AKT、S6、ERK、JNK、mTOR等,可以评估活化。

[0269] 胰岛素样生长因子(IGF)及其衍生物

[0270] 胰岛素样生长因子(IGF)组成了具有胰岛素样和生长刺激特性的蛋白质家族。IGF人IGF1是70个氨基酸基本肽,其具有分别示于SEQ ID NO:9和31的蛋白质和DNA序列。IGF-1和IGF-1受体对于诸如细胞增殖和存活等细胞过程十分重要。IGF-1或其变体与IGF-1受体的结合刺激激酶活性,引起多种底物的磷酸化作用,因此启动信号转导级联。IGF-1通过AKT途径的激活来刺激细胞增殖和存活。IGF-1与IGF-1受体结合后,酪氨酸激酶使位于IRS-1和Shc两种主要底物上的酪氨酸残基磷酸化,其后续通过Ras/Raf和PI 3-激酶/AKT途径传递信号。

[0271] IGF-1(和IGF-2)与IGF-1受体的相互作用通过IGF结合蛋白(IGFBP)调节。所有6个IGFBP(特别是IGFBP5)都显示出抑制IGF作用,但是在一些情况中,已经观察到刺激效应。在该循环中至少99%的IGF通常结合IGFBP。

[0272] 根据一些实施方式,双特异性蛋白质可以保持通过IGF-1受体传递信号的能力。通过评估下游细胞内靶标(例如,AKT(丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶B))是否响应双特异性蛋白质与细胞表面受体的结合进行磷酸化,可以确认该信号转导能力。

[0273] 在一些实施方式中,激活剂结构域(本文也称之为信号转导臂)是人IGF-1或人IGF-1的衍生物。在一些实施方式中,激活剂结构域具有SEQ ID N0:9-30或120中任一项所列的氨基酸序列。

[0274] 在一些实施方式中,激活剂结构域是IGF-1的变体,通过测定响应IGF-1的变体与IGF-1受体的结合的受体磷酸化作用或下游信号转导蛋白质磷酸化作用,其能够维持对于IGF-1受体的选择性。

[0275] 在一些实施方式中,激活剂结构域是IGF-1的变体,其经修饰以相对于野生型IGF-1减弱对于IGF-1结合蛋白质(IGFBP)的结合,同时保持其激活AKT途径的能力。在一些实施方式中,如pAKT EC50所评估,IGF-1变体可以对于非靶细胞减弱的效力激活IGF-1受体。EC50定义为实现pAKT信号转导的半最大水平所需的浓度。

[0276] 在一些实施方式中,激活剂结构域是人IGF-1的衍生物,并且经工程改造以降低存在于血清或其它体液中的激活剂结构域与IGF结合蛋白的结合。

[0277] 在一些实施方式中,激活剂结构域是人IGF-1的衍生物,并且包括N-末端13个残基的延伸(也称为IGF-1LONG,SEQ ID N0:11)、E3R突变(SEQ ID N0:12)或其组合(LONG E3R,也称为LR3,SEQ ID N0:15)。在一些实施方式中,IGF-1变体包括E3R取代、N-末端13个残基的延伸、氨基酸1-3((Des1-3),SEQ ID N0:10)的缺失或其组合,以减弱存在于血清或其它体液中的激活剂结构域与IGF结合蛋白的结合。

[0278] 在一些实施方式中,激活剂结构域是人IGF-1的衍生物,其包括一种或多种下述修饰:N-末端13个残基的延伸(称为IGF-1LONG,SEQ ID N0:11)、氨基酸1-3的缺失(Des-1-3,SEQ ID N0:10)、在多肽的3位用Arg替换Glu的取代(E3R,SEQ ID N0:12)、在37位无精氨酸(R37X,SEQ ID N0:13)、氨基酸68-70的缺失(3X,SEQ ID N0:14)、或N-末端13个残基的延伸和在野生型多肽的3位用Arg替换Glu的取代(LR3,SEQ ID N0:15)。

[0279] 在一些实施方式中,IGF-1或IGF-1变体可以包括位于一个或多个酪氨酸残基的取代。例如,IGF-1或IGF-1变体(例如,LR3、Des 1-3)可以包括一个或多个下述取代,Y24L(SEQ ID N0:17、22和27)、Y31A(SEQ ID N0:19、24和29)和Y60L(SEQ ID N0:20、25和30)。例如,IGF-1变体可以包括Y24L取代和Y31A取代(SEQ ID N0:18、23和28)。在一些实施方式中,一个或多个酪氨酸残基(Y24、Y31、Y60或其组合)可以被取代为短脂肪族氨基酸。在一些实施方式中,一个或多个酪氨酸残基(Y24、Y31、Y60或其组合)可以被取代为极性氨基酸。在一些实施方式中,一个或多个酪氨酸残基(Y24、Y31、Y60或其组合)可以被取代为亮氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、丝氨酸、苏氨酸或任何其它氨基酸。

[0280] 在一些实施方式中,激活剂结构域是人IGF-1的衍生物,其包括一种或多种下述修饰:N-末端13个残基的延伸(IGF-1LONG)、氨基酸1-3的缺失(Des-1-3)、在多肽的3位用Arg替换Glu的取代(E3R)、在37位无精氨酸(R37X)、氨基酸68-70的缺失(3X)、N-末端13个残基的延伸和在野生型多肽的3位用Arg替换Glu的取代(LR3)、一个或多个酪氨酸残基(Y24、Y31、Y60或其组合)的取代(例如,Y24L、Y31A、Y60L取代或其组合)。

[0281] 在一些实施方式中,激活剂结构域是人IGF-1的衍生物,其包括位于位置3和31的

取代。例如,激活剂结构域可以是人IGF-1的衍生物,其包括E3R和Y31A取代。在一些实施方式中,激活剂结构域具有SEQ ID NO:120的氨基酸序列。在一些实施方式中,激活剂结构域通过具有SEQ ID NO:121的核酸序列编码。

[0282] 在一些实施方式中,激活剂结构域是人IGF-1的衍生物,其包括位于残基24-37中的一个或多个的突变(例如,取代、缺失)。

[0283] 在一些实施方式中,通过使存在于IGF-1变体的一个或多个糖基化位点糖基化,可以修饰IGF-1变体。

[0284] 人们认为,包含IGF-1LONG、IGF-1LONG E3R(被称之为IGF-1(LR3))或IGF1 Des1-3的双特异性蛋白质相对于野生型IGF-1具有对IGF结合蛋白减弱的亲和力。在一些实施方式中,本文所述双特异性蛋白质的IGF-1变体可以激活信号转导途径,同时具有相对于野生型IGF-1,与IGF-1结合蛋白显著降低的相互作用。

[0285] 在一些实施方式中,包含本文所述IGF-1变体的双特异性蛋白质对非靶细胞所具有的效力小于野生型IGF-1对非靶细胞所具有的效力。

[0286] 本文在SEQ ID NO:9-30和120中提供了结合生长因子受体的某些激活剂结构域。

[0287] 可以包括其它肽序列修饰,如本文所公开序列的氨基酸序列的变异、缺失、取代或衍生化,只要该序列具有与未修饰的肽基本上相同的活性或功能。应注意,修饰的肽将保持与未修饰的肽相关联的活性或功能,修饰的肽通常将具有与未修饰的序列的氨基酸序列“基本同源的”氨基酸序列。

[0288] 在一些实施方式中,IGF-1变体可以具有这样的氨基酸序列,其具有与SEQ ID NO:9-30和120中提供的氨基酸序列至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%相同性或至少约99%相同性。在一些实施方式中,IGF-1变体可以具有这样的氨基酸序列,其具有与SEQ ID NO:9-30和120中提供的氨基酸序列从约85%至约90%、从约90%至约95%、从约95%至约98%、从约98%至约99%的相同性。在一些实施方式中,IGF-1变体可以包括SEQ ID NO:9-30和120中任一项氨基酸的10、20、30、40、50、60或更多个连续的氨基酸。在一些实施方式中,IGF-1变体可以具有SEQ ID NO:15-20中任一项所列的氨基酸序列。在一些实施方式中,IGF-1变体可以具有SEQ ID NO:10、或26-30中任一项所列的氨基酸序列。在一些实施方式中,IGF-1变体可以具有SEQ ID NO:11-14、或21-25和120中任一项所列的氨基酸序列。

[0289] 在一些实施方式中,双特异性蛋白质包括具有生长因子变体的激活剂结构域,该生长因子变体经选择以给予双特异性蛋白质这样的EC50,其在受损组织中的EC50比其在健康组织中的低至少一个数量级。例如,双特异性蛋白质结构域包括生长因子变体,并且在受损组织中具有的EC50比在健康组织中的EC50低至少10倍、至少低15倍、至少低20倍、至少低25倍、至少低30倍、至少低35倍、至少低40倍、至少低45倍、至少低50倍、至少低55倍、至少低60倍、至少低65倍、至少低70倍、至少低75倍、至少低80倍、至少低85倍、至少低90倍、至少低95倍、至少低100倍、至少低110倍。

[0290] 在一些实施方式中,包含IGF-1变体的双特异性蛋白质在受损组织中具有比其在健康组织中低的半最大有效浓度(EC50)。在一些实施方式中,包含IGF-1变体的双特异性蛋白质在受损组织中具有的EC50比在其健康组织中的低至少10倍、至少低15倍、至少低20倍、至少低25倍、至少低30倍、至少低35倍、至少低40倍、至少低45倍、至少低50倍、至少低55倍、

至少低60倍、至少低65倍、至少低70倍、至少低75倍、至少低80倍、至少低85倍、至少低90倍、至少低95倍、至少低100倍、至少低110倍。

[0291] 双特异性融合蛋白对受体结合的结合亲和力和动力学结合和解离速率可以使用标准技术测量，并且可以与其它阴性对照分子（具有不相关对照激活剂结构域的融合蛋白，缺少激活剂结构域的融合蛋白）和阳性对照分子（重组的野生型受体配体，如生长因子）比较。也可以将双特异性融合蛋白的平衡和动力学结合参数与针对未融合的野生型配体测量的相同参数进行比较，以确定配体对其他分子的融合是否影响配体与其相应受体的正常结合。这样的信息可以用于确定双特异性融合蛋白的有效剂量。

[0292] 双特异性融合蛋白以比阴性对照观察到的亲和力显著更高的亲和力（例如，至少100倍）结合固定的生长因子。双特异性融合蛋白以比阴性对照观察到的亲和力显著更高的亲和力（例如，至少100倍）但是比阳性对照观察到的亲和力更低的亲和力（例如，至少5倍）结合固定的生长因子。

[0293] 此外，结合固定的受体可以使用过量的可溶性多肽、可溶性受体、或结合多肽或受体并阻断其相互作用的抗体进行竞争。在一些实施方式中，双特异性融合蛋白以天然配体结合其受体亲和力1000倍以内的亲和力结合生长因子受体。

[0294] 天然生长因子可以用作激活剂结构域。然而，已经观察到，可以使用具有这样生长因子的双特异性融合蛋白，所述生长因子具有改变的序列，其被设计成降低效力但是保持激活关联生长因子受体的能力。在一些实施方式中，双特异性融合蛋白具有修饰的IGF-1信号转导臂，其具有被设计成减弱与IGF-1结合蛋白和/或IGF-1受体结合或相互作用的改变的序列。令人惊奇的是，具有这样修饰的生长因子的双特异性蛋白质已经显示具有对于受损组织靶标更高的特异性。

[0295] 双特异性融合蛋白（以及其激活剂结构域）还具有介导关联受体激活的能力。例如，这样的活性可以评估细胞模型。对于局部缺血，可以使用局部缺血再灌注的细胞模型，其使用诸如新生大鼠心肌细胞（NRVM）的培养的心肌细胞或诱导的多能干细胞衍生的心肌细胞或细胞系。可以通过代谢抑制剂（脱氧葡萄糖和连二亚硫酸盐）和代谢物（高钾、乳酸、低pH）或通过在厌氧室或缺氧袋中缺氧启动模拟的局部缺血（SI）。可以通过在氧饱和缓冲液中在悬浮刺激再灌注。已经研究了局部缺血体外成体心肌细胞颗粒模型，其在不存在任何外源代谢抑制剂或代谢物的情况下提供局部缺血的两个主要部分——缺氧和代谢物累积。下述表1显示了用于证明双特异性融合蛋白预防心肌细胞损伤，促进心脏干细胞生长、运动性或分化，和/或促进受损组织修复能力的代表性方法。

[0296] 表1：活性评估方法

方面	试验	参考文献
激活剂结构域的定位和保留动力学	<ul style="list-style-type: none"> 通过 ELISA 检测细胞裂解物中的激活剂结构域 通过免疫荧光法检测细胞中的激活剂结构域（流式细胞术或显微镜镜检） 	Davis, <i>Proc Natl Acad Sci USA</i> 103(21):8155-60 (2006) Urbanek, <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> 102 (24): 8692–97 (2005)
通过激活剂结构域的信号转导	<ul style="list-style-type: none"> 通过流式细胞术、免疫荧光法、ELISA、磷酸标签或 Western 检测细胞中的磷酸-akt 或磷酸-ERK 	Davis, <i>Proc Natl Acad Sci USA</i> 103(21):8155-60 (2006) Urbanek, <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> 102 (24): 8692–97 (2005)
[0297]	<ul style="list-style-type: none"> 通过免疫荧光法或流式细胞术检测膜联蛋白 V 结合 胱天蛋白酶活性的检测 TUNEL 试验 (TUNEL 阳性细胞减少的数量) DNA 梯度 细胞活力 暴露于 H₂O₂ 或缺氧或化学侵蚀后心肌细胞活力的增强 棒状细胞数量 基因表达的 qPCR 评估 	
保护细胞免于坏死	减少的通过 H&E 染色坏死区域	
疤痕形成的减少	<p>梗塞区域中成纤维细胞数量的减少 胶原沉积减少 与疤痕形成相关联的其它基质蛋白的减少</p>	
SCS 迁移到梗塞区域	c-kit+、sca-1+、MDR1+细胞数量以及进行小肌细胞转换的数量的时间依赖性增加	Urbanek, <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> 102 (24): 8692–97 (2005)

[0298]	肌细胞力学和细胞融合	肌细胞尺寸分布频率 峰值缩短 缩短和再延长的速率 细胞融合的评估 (X 染色体的数量)	Urbanek, <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> 102 (24): 8692–97 (2005)
	心脏功能评估	比较 MI 处理的动物与 MI 未处理的动物 <ul style="list-style-type: none"> • LVEDP • LVDP • +dp/dT • LV 重量 • 隔室体积 • 舒张压壁应力 • 存活 	Urbanek, <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> 102 (24): 8692–97 (2005)
	心肌再生	再生心肌的构成 处理动物与未处理动物梗塞区域内 BrdU+ 细胞的评估 处理动物与未处理动物梗塞区域中的肌球蛋白+细胞	Urbanek, <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> 102 (24): 8692–97 (2005)
	心脏结构	梗塞尺寸 纤维化 心肌细胞肥大	Urbanek, <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> 102 (24): 8692–97 (2005)

[0299] 在一些情况下,可能需要同时评估激活剂结构域和靶向多肽的活性。出于该目的,可以方便的使用ELISA。

[0300] 靶向多肽的底物(例如,膜联蛋白A5)可以被吸收至ELISA板,然后用适当含有BSA的缓冲液阻断。然后可以添加双特异性融合蛋白,其后添加针对激活剂结构域的重组底物(例如,如果激活剂是生长因子,那么底物是重组关联受体或受体片段(胞外域))。可以荧光标记该底物用于检测,或者可以使用对这样的受体区域标记的抗体检测该底物,其并不显著影响配体结合。

[0301] 工程改造的双特异性融合蛋白的体内活性通常通过检测分子中通过双特异性融合蛋白的激活剂结构域进行调节的信号转导变化进行评估。这可以包括通过对处理的组织的流式细胞术、免疫荧光法、ELISA、磷酸标签或Western分析检测的细胞表面受体磷酸化状态或诸如磷酸-AKT或磷酸-ERK的下游介导物中的变化。其它功能性评估包括:通过染色和形态学鉴定测试活细胞数量,通过膜联蛋白A5结合(经由免疫荧光法)或流式细胞术的细胞凋亡水平,胱天蛋白酶活性检测,TUNEL-试验(TUNEL阳性细胞减少的数量)或DNA梯度。在一些实施方式中,如果双特异性融合蛋白在试验中检测到的受调节分子的水平、功能性活性或磷酸化作用中诱导显著的(例如,至少20%)变化,那么该双特异性融合蛋白在体内作用。

[0302] 患者受损组织的修复可以使用任何临床相关标准评估。例如,通过细胞数量的定量,如肌细胞、成纤维细胞或疤痕量的数量,或以针对心脏功能输出和结构方面的功能性试验,包括LVEDP、LVDP、+dp/dT、LV重量、隔室体积和舒张压壁应力,可以测量梗塞组织的修复。这些评估所用的方法都是已知道,并且在文献中详述。总而言之,如果双特异性融合蛋白在任何这样的临床评估中导致显著的(例如,至少10%)变化,可以说该双特异性融合蛋白

白修复受损组织。

[0303] 靶向结构域

[0304] 在本发明的一些方面中，靶向结构域对与组织相关联的靶分子具有特异性（例如，与局部缺血相关联的分子）。在本发明的一些方面中，双特异性蛋白质的靶向结构域使双特异性蛋白质靶向非癌性或非肿瘤细胞或组织。在一些实施方式中，靶向结构域对与足细胞相关联的分子具有特异性。

[0305] 靶向结构域可以是提供该功能的任何多肽序列。在一些实施方式中，靶向结构域与靶分子的结合不具有或者不调整生物活性。本文所用“生物活性”指通过将分子暴露于蛋白质结构域进行的确定的、已知的活性。

[0306] 在一些实施方式中，靶向结构域是对靶分子、其片段或其变体有结合亲和力的非抗体多肽、其片段或其变体。在一些实施方式中，靶向结构域是具有这样肽序列的非抗体多肽，所述肽序列具有对靶分子、其片段或其变体的结合亲和力。

[0307] 同样在其它实施方式中，靶向多肽结构域包括一个或多个抗体可变区。本领域技术人员将会意识到，考虑能够直接或间接结合靶分子的任何靶向结构域。

[0308] 膜联蛋白A5和其变体

[0309] 在一些方面中，靶向结构域是膜联蛋白。术语“膜联蛋白”指能够结合磷脂，特别是磷脂酰丝氨酸(PS)的任何蛋白质，以及膜联蛋白家族的成员。在一些实施方式中，膜联蛋白是膜联蛋白A5，但是其它膜联蛋白同样可以用于产生和使用本发明的膜联蛋白变体。在一些实施方式中，靶向结构域是人膜联蛋白A5(AnxV, SEQ ID NO:1)、其功能性片段、或其变体。膜联蛋白A5的变体在至少一个位置具有至少一个这样的氨基酸，该氨基酸不存在于亲本膜联蛋白A5多肽(野生型, SEQ ID NO:1)中。在一些实施方式中，靶向结构域是膜联蛋白A5(SEQ ID NO:2-4,122)的变体。相应的膜联蛋白变体包括一个或多个氨基酸取代、缺失或添加，其中，氨基酸取代、缺失或添加基本上不影响双特异性蛋白质的膜联蛋白A5变体结合至少一个磷脂(如PS)的能力。在一些实施方式中，膜联蛋白A5变体可以具有这样的氨基酸序列，其具有与SEQ ID NO:1-4,122中提供的氨基酸序列至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%相同性或至少约99%相同性。在一些实施方式中，膜联蛋白A5变体可以包括SEQ ID NO:1-4,122中任一种氨基酸的50、110、200、300或更多个连续的氨基酸。在一些实施方式中，修饰膜联蛋白A5以降低膜联蛋白A5的内化，同时维持磷脂酰丝氨酸结合亲和力。在一些实施方式中，膜联蛋白变体可以结合至少一种磷脂，特别是磷脂酰丝氨酸(PS)，并且不内化到细胞中或以比野生型膜联蛋白慢的速率内化。

[0310] 在一些实施方式中，可以改变膜联蛋白A5的一个或多个残基以修饰结合，从而实现对靶细胞更有利的结合速率，或对靶细胞更有利的解离速率。根据本发明的一些膜联蛋白变体具有氨基酸序列SEQ ID NO:1，其经修饰以抑制向细胞的内化。在一些实施方式中，靶向结构域是膜联蛋白A5非内化的变体，(也称为ni-膜联蛋白A5或ni-AnxV, SEQ ID NO:4)。在一些实施方式中，膜联蛋白A5非内化的突变体可以具有这样的氨基酸序列，其具有与SEQ ID NO:4中提供的氨基酸序列至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%相同性或至少约99%相同性。在一些实施方式中，膜联蛋白A5非内化的突变体具有这样的氨基酸序列，其具有与SEQ ID NO:4中提供的氨基酸序列从约85%至约90%、从约90%至约95%、从约95%至约98%、从约98%至约99%的相同性。在一些实施方式中，膜联蛋白A5变

体可以包括SEQ ID NO:4中任一种氨基酸的50、110、200、300或更多个连续的氨基酸。

[0311] 设想了基本上不导致内化的膜联蛋白A5的各种变异。应当理解的是，膜联蛋白A5非内化的变体可以赋予双特异性蛋白质相较于包含野生型A5的双特异性蛋白质延长的半衰期。

[0312] 在一些实施方式中，可以使用基本上不导致内化的膜联蛋白A5的变体来延长膜联蛋白变体或与膜联蛋白变体相关联的蛋白质的半衰期。在一些实施方式中，相较于野生型膜联蛋白A5或包含野生型膜联蛋白A5的融合蛋白，基本上不导致内化的膜联蛋白A5的变体或包含基本上不导致内化的膜联蛋白A5的变体的融合蛋白可以具有1.1至1.2、1.1至1.3、1.1至1.4、1.1至1.5、1.1至1.6、1.1至1.7、1.1至1.8、1.1至1.9、1.1至2或更长的半衰期。例如，与包含wt膜联蛋白A5的双特异性融合蛋白(SGF 737)的变体相比，包含ni-膜联蛋白A5的该双特异性融合蛋白(SGF 740, SEQ ID NO:84)的半衰期延长增加了约1.15倍。此外，基本上不导致内化的膜联蛋白A5的变体应当能被用于延长其它包含膜联蛋白A5的蛋白质或融合分子的半衰期，如在成像研究或预靶向研究中使用的那些。

[0313] 本文所用术语“非内化的”和“基本上无内化”指大量本发明的双特异性蛋白质缺少内化。例如，短语“基本上无内化”将被理解为少于50%的本发明的双特异性蛋白质将会被该双特异性分子结合的细胞内化，或少于25%的本发明的双特异性蛋白质将会被该双特异性分子结合的细胞内化，或少于10%的本发明的双特异性蛋白质将会被该双特异性分子结合的细胞内化，或少于5%的本发明的双特异性蛋白质将会被该双特异性分子结合的细胞内化，或少于3%的本发明的双特异性蛋白质将会被该双特异性分子结合的细胞内化，或少于1%的本发明的双特异性蛋白质将会被该双特异性分子结合的细胞内化。

[0314] 本文所用术语“对应”通常用于指定氨基酸残基在多肽(例如，膜联蛋白A5)中的位置/相同性。本领域技术人员将理解，出于简化的目的，本文利用了标准编号系统(根据野生型膜联蛋白A5)，所以例如“对应”位于316位置残基的氨基酸实际上不需要在特定氨基酸链中的第316个氨基酸，而是与存在于例如N-末端蛋氨酸翻译后移除之前的膜联蛋白A5中316位置的残基相对应；本领域技术人员将容易地意识到如何鉴定相应的氨基酸。具体而言，应注意，野生型膜联蛋白A5的氨基酸序列(SEQ ID NO:1)并不以蛋氨酸开始，因为蛋氨酸在加工过程中被切割。

[0315] 在一些实施方式中，膜联蛋白A5经修饰以将在315位置(对应C316)的半胱氨酸取代为丝氨酸或丙氨酸以降低二聚体形成。在一些实施方式中，具有将在315位置的半胱氨酸取代成丝氨酸的膜联蛋白A5变体具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列。在一些实施方式中，膜联蛋白A5变体具有这样的取代，其将在315位置的半胱氨酸取代成丙氨酸。在一些实施方式中，膜联蛋白A5非内化的突变体可以具有这样的氨基酸序列，其具有与经修饰以在315位置(对应C316)用丝氨酸或丙氨酸取代半胱氨酸的膜联蛋白A5至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%相同性或至少约99%相同性。

[0316] 在一些实施方式中，可以使用这样的膜联蛋白A5的变体，其中D143被取代成N，和/或用A取代E227(参见Mira, 1997; Kenis, 2004; Kenis 2010和Ungethum, 2010)。例如，可以修饰具有在315位置的半胱氨酸取代的膜联蛋白A5变体，以具有位于D143和/或E227的取代。

[0317] 在一些实施方式中，对膜联蛋白A5或膜联蛋白A5变体(例如，在C316、D143和/或E227具有取代)进行修饰以包括一个或多个下述取代：R62A, K69A, K100A, E137A, D138G、

N159A、L313E(对应R63A、K70A、K101A、E138A、D139G、N160A、L314E)。例如,具有SEQ ID NO:1的膜联蛋白A5可以经修饰以具有C315A或C315S取代(相对于野生型膜联蛋白A5对应C316A或C316S)以及下述取代中的一个或多个:R62A、K69A、K100A、E137A、D138G、N159A、L313E(相对于野生型A5对应R63A、K70A、K101A、E138A、D139G、N160A、L314E)。

[0318] 在一些实施方式中,对膜联蛋白A5(SEQ ID NO:1)或膜联蛋白A5变体(例如,在C316、D143和/或E227具有取代)进行修饰以包括一个或多个下述取代:R62A、K69A、K100A、E137A、D138G、N159A、D143N、E227A、C315S或C315A(相对于野生型膜联蛋白A5对应R63A、K70A、K101A、E138A、D139G、D144N、N160A、E228A、C316S或C316A)。

[0319] 在一些实施方式中,靶向结构域是膜联蛋白A5,其经工程改造,相对于野生型膜联蛋白A5,具有R63A、K70A、K101A、E138A、D139G、N160A和C316A或C316S取代。例如,靶向结构域可以具有SEQ ID NO:122的氨基酸序列。

[0320] 在一些实施方式中,膜联蛋白A5变体包括在不同区内的一个或多个、两个、或两个或多个取代,因此进一步减弱膜联蛋白在细胞中的内化。例如,膜联蛋白A5变体可以包括R62A和K69A、R62A和K100A、R62A和E137A、R62A和D138G、R62A和N159A、R62A和K69A和K100A、R62A和K69A和E137A等等。

[0321] 相应的膜联蛋白变体还包括一个或多个氨基酸取代、缺失或添加,其中,氨基酸取代、缺失或添加基本上不影响双特异性蛋白质的膜联蛋白A5结合至少一种磷脂(如PS)的能力。

[0322] 其它非抗体靶向结构域

[0323] 在一些实施方式中,靶向结构域是突触结合蛋白I、其片段或其变体。突触结合蛋白I(Syt I)已经显示出以Ca⁺⁺-依赖性方式以约5至40nM的结合亲和力结合磷脂酰丝氨酸。在一些实施方式中,突触结合蛋白(例如,C2B)的两个C2结构域中的一个可以用作靶向结构域。在一些实施方式中,靶向结构域是Ca⁺⁺-依赖性膜靶向蛋白的C2结构域,其参与信号转导或膜运输(例如,蛋白激酶C、血液凝固因子V和VIII)。在一些实施方式中,靶向结构域具有SEQ ID.N0:114中所列序列,如美国专利申请号13/068,808中所提供,其全部内容通过引用纳入本文。乳凝集素,也称为乳脂球状EGF 8,其是由巨噬细胞分泌的45kDa的磷脂酰丝氨酸结合糖蛋白。乳凝集素在氨基末端包含EGF样结构域,以及位于羧基末端的两个C-结构域。因此,在一些实施方式中,靶向结构域包括乳凝集素的C-结构域、或其片段或其变体。在一些实施方式中,可以改变C2结构域的一个或多个残基以修饰结合,从而实现对靶细胞更有利的结合速率,或实现对靶细胞更有利的解离速率。在一些实施方式中,靶向结构域具有SEQ ID.N0:115或116中所列序列,如美国专利申请号13/068,808中所提供,其全部内容通过引用纳入本文。在一些实施方式中,靶向多肽结构域包括T细胞免疫球蛋白粘蛋白1和4(TIM蛋白)。在其他实施方式中,靶向多肽结构域包括能够通过血浆2-糖蛋白1间接结合磷脂酰丝氨酸的3G4抗体或抗体结构域。同样在其它实施方式中,靶向多肽结构域包括能够结合磷脂酰丝氨酸的抗-磷脂酰丝氨酸抗体(例如,PS4A7,SEQ ID NO:128)或抗体结构域,如美国专利申请号13/068,808中所提供,其全部内容通过引用纳入本文。

[0324] 在一些实施方式中,靶向多肽结构域包括结合靶分子的多肽。这样代表性的多肽包括或具有如本文SEQ ID NO:1-4和122提供的序列。代表性的多肽包括或具有这样的氨基酸序列,其与如SEQ ID NO:1-4和122提供的序列具有至少85%、至少约90%、至少约95%、

至少约98%相同性或至少约99%相同性。这样代表性的核酸序列包括或具有如本文SEQ ID N0:5-8和123提供的序列。代表性的多肽核酸序列可以包括或具有这样的核酸序列，其与如SEQ ID N0:5-8和123提供的序列具有至少85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%相同性或至少约99%相同性。

[0325] 天然多肽可以用作靶向结构域。然而，很显然，也可以使用这样天然序列以及具有改变序列的多肽的部分，这提供了这样的多肽保持如下文详述的以适当的结合亲和力(K_d)结合靶分子的能力。

[0326] 抗体靶向结构域：

[0327] 本文所用术语“抗体”是由基本上由免疫球蛋白基因编码的一种或多种多肽组成的蛋白质。一种典型的抗体是四聚体，其由两个相同的多肽链对组成，各对有一条“轻链”(约25kD)和一条“重链”(约50-70kD)。“VL”和“VH”分别指这些轻链和重链。“抗体可变区”是抗体可变链(VL或VH)的N-末端区域，其包括主要负责抗原识别的氨基酸残基。本领域技术人员能够容易地鉴定抗体可变区，并且确定赋予抗原识别所需的最小大小。通常，抗体可变区包括至少70个氨基酸残基，并且更为常见的是至少100个氨基酸残基。包括抗体可变区的多肽可以(但不是必需)还包括其它轻链序列和/或重链序列，并且可以(但不是必需)还包括非抗体衍生的序列。显然，抗体可变区的序列可以是天然产生的，或者可以是使用标准技术修饰的，前体是保留功能(抗原识别)。包括抗体可变区的某些多肽是单链抗体(以单个多肽链存在的抗体)，更优选地是这样的单链Fv抗体(scFv)，其中可变重链区和可变轻链区连接在一起(直接或通过肽接头)以形成连续多肽。scFv抗体可以是化学合成的，或者可以表达自包括 V_{H^-} 和 V_{L^-} 编码序列的核酸，所述 V_{H^-} 和 V_{L^-} 编码序列是直接连接的或通过肽编码接头连接。

[0328] 这样的单链抗体也旨在被“抗体”这一术语所涵盖。

[0329] 双抗体也包括在术语“抗体”内。双抗体是二价的、双特异性抗体，其中VH和VL结构域表达于单个多肽链，但是使用非常短的接头以允许位于相同链上的两个结构域之间配对，从而促进结构域与另一链的互补结构域配对，并且创造两个抗原结合位点。双抗体可以是化学合成的，或者可以表达自包括 V_{H^-} 和 V_{L^-} 编码序列的核酸，所述 V_{H^-} 和 V_{L^-} 编码序列通过肽编码接头连接。

[0330] “Fab区域”/“Fab结构域”/“Fab片段”包含限定抗体可以结合的特异性靶标的可变区。可由完整抗体使用本领域已知方法生产Fab片段，如通过使用酶的蛋白质水解切割，或可以通过使用标准重组DNA和蛋白质表达技术重组产生。

[0331] 术语“抗原”涵盖结合片段的示例，因此其包括但不限于：(i) Fab片段，由VL、VH、CL和CH1结构域组成的单价片段；(ii) F(ab)2和F(ab')2片段，包括在铰链区由二硫桥连接的两个Fab片段的二价片段；(iv) scFV片段，其由抗体单臂VL和VH结构域组成；(v) dAb片段，其由VH结构域组成；和(vi) 分离的互补决定区(CDR)。这样的抗体可由完整抗体使用本领域已知方法生产，或可以通过使用标准重组DNA和蛋白质表达技术重组产生。

[0332] 在一些实施方式中，结合磷脂酰丝氨酸的诸如嵌合抗体巴维昔单抗(Bavituximab)的抗-磷脂酰丝氨酸抗体可以用作靶向结构域。

[0333] 在一些实施方式中，结合足细胞相关蛋白的抗体可以用作靶向结构域。例如，可使用能够结合肝素(nephrin)(NPHS1)、平足蛋白(podoplanin)(PDPN)、足细胞标记蛋白

(PODXL)、营养不良蛋白聚糖 (DAG1)、GLEPP1 (PTPRO)、NEPH1 (KIRREL)、FAT非典型钙粘蛋白1 (FAT1)、半胱氨酸富集跨膜BMP调控子1 (CRIM1)、整联蛋白 α -8/ β 1 (ITGA8) 的抗体。

[0334] 肝素是一种细胞表面信号转导受体,其调节足细胞功能。其是肾脏肾小球滤过屏障中重要的足细胞分子。肝素是Ig样跨膜蛋白。其是足细胞裂孔隔膜的主要成分,并且对于维持正常的肾小球通透性十分重要。

[0335] 平足蛋白是血管小球足细胞膜粘蛋白。平足蛋白在维持足细胞足过程 (foot processes) 的独特形状和肾小球通透性中起作用。在大鼠中,43-kD整合膜蛋白平足蛋白位于足细胞的表面,并且转录地下调嘌呤霉素肾病。

[0336] 嘌呤霉素是表达在足细胞顶端膜的主要唾液酸糖蛋白。其涉及粘附和细胞形态学和癌症进展的调节。其起着抗-粘附分子的作用,其可以通过电荷排除在足细胞中维持邻近足过程之间开放的过滤途径。将其用作促粘附分子,从而增强细胞对固定的配体的粘附,以整合素依赖性方式增加迁移和细胞与细胞接触的比例。该蛋白质包括形成顶端肌动蛋白依赖性微绒毛。其参与端前质膜亚结构域的形成,以在肾管腺增生 (renal tubulogenesis) 期间建立初始商品极化和顶端腔形成。其在癌症发展和侵袭性中通过诱导细胞经由与其肌动蛋白结合蛋白EZR的相互作用的迁移和侵略中起作用。其影响EZR依赖性信号转导事件,进而导致癌症细胞中MAPK和PI3K活性的增强。

[0337] 在肾脏中,营养不良蛋白聚糖 (DG) 显示出覆盖足细胞的基底外侧和顶端膜。 α -DG 被重度糖基化,这对其在肾小球基底膜中结合层粘连蛋白和集聚蛋白十分重要。 α -DG 在大鼠中覆盖整个足细胞膜,并且表达在足细胞的基底外侧和顶端膜。这一定位表明, α -DG 分别在通过其与肾小球基底膜的结合维持足细胞独特结构以及在维持滤过裂孔完整性中起着双重作用。营养不良蛋白聚糖广泛地存在于足细胞的整个细胞表面。

[0338] GLEPP1 (PTPRO) 是这样的足蛋白受体膜蛋白酪氨酸磷酸酶,其位于内脏小球上皮细胞和足过程的顶端细胞膜,并且已经被用作急性足细胞损伤的标志物。

[0339] NEPH1 (KIRREL) 是 Ig超家族的足细胞膜蛋白。这些蛋白的胞质结构域与膜蛋白的C末端相互作用。其在肾脏足细胞,参与保证尺寸和电荷选择性超滤的细胞中表达。

[0340] FAT非典型钙粘蛋白1 (FAT1) 是细胞极化的主要蛋白质,其引导细胞迁移并调整细胞与细胞间接触,并且表达于高度极化的足细胞细胞型。

[0341] 半胱氨酸丁苯跨膜调节剂1 (CRIM1) 在肾小球中的具有组织富集表达,并且被认为在通过与转化生长因子 β 家族成员,如骨形成蛋白的相互作用的组织发育中其作用。

[0342] 通过调整叶间细胞进入上皮结构的招募,整合素 α -8/ β 1 (ITGA8) 在肾脏和其它可能的器官的发生中起作用。其在包括TNC、FN1、SPP1 TGFB1、TGFB3和VTN的大量配体中识别序列R-G-D。NPNT可能是其在肾脏发生中的功能性配体。已经显示,响应诸如糖尿病性肾病等的肾损伤,ITGA8在肾小球中累积。

[0343] 靶向结构域的结合

[0344] 优选的大量结合包括以 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} 、 10^{-10} 、 10^{-11} 、 10^{-12} M或更好的解离常数 (K_d) 的结合。例如,抗体-抗原相互作用的 K_d 指示,50%的抗体和抗原分子在热力学平衡下结合在一起的情况下抗体的浓度(以摩尔浓度表示)。因此,处于适当的固定抗原浓度,50%较高(即,较强)亲和力抗体将会以比较低亲和力抗体实现相同百分比结合所需抗体浓度更低的抗体浓度结合抗原分子。 K_d 还是动力学结合和解离速率 (k_{on} 和 k_{off}) 的比例,即, $K_d = k_{off}/k_{on}$

k_{on} 。因此,较低的 K_d 值指示较高的(较强的)亲和力。如本文所用,“更好的”亲和力是较强的亲和力,并且通过比其比较物更小数值的解离常数进行辨别,当 $10^{-10}M$ 的 K_d 是较低数值时,其表示比 $10^{-9}M$ 的 K_d 更好的亲和力。通常优选比 $10^{-7}M$ 更好的亲和力(即,具有更小的 K_d 值,并因此更强),更加优选地选择比 $10^{-8}M$ 更好的亲和力。也考虑了本文所列这些值的中间值,并且优选的结合亲和力可以是解离常数范围的指示,例如,本文所公开的针对抗体的优选结合亲和力由这样范围的 K_d 值表示,所述 K_d 值范围从 10^{-6} 至 $10^{-12}M$ (即,微摩尔至皮摩尔),优选 10^{-7} 至 $10^{-12}M$,更优选 10^{-8} 至 $10^{-12}M$ 或更大。“不显示显著交叉反应性”的抗体是不会明显结合至脱靶抗原的抗体。例如,在一个实施方式中,特异性或选择性地结合心肌肌球蛋白的抗体将会显示出对心肌肌球蛋白至少两个、并且优选三个、或四个或更多个数量级更好的结合亲和力(即,结合显示出低两个、三个、或四个或更多个数量级的 K_d 值),相比对于除了心肌肌球蛋白的肌球蛋白或对于非肌球蛋白或肽。结合亲和力和选择性可以使用本领域认可的用于确定这些特性的方法确定,例如,包括使用卡查德(Scatchard)分析和/或竞争性(竞争)结合试验。

[0345] 可以使用本领域熟知的各种技术中的任何技术评估结合,并且确定 K_d 值。例如,对与局部缺血相关联的DNA分子的结合通常是通过用靶DNA片段包覆适当的固体支持物(例如,珠、ELISA平板或BIACORE芯片)来评估。对于结合任何DNA序列的靶向多肽结构域,10个碱基对或更大的碱基对的DNA片段(单链或双链)固定在固体基材上。对于结合特异性序列或DNA复合物(例如,DNA-组蛋白复合物)的靶向多肽结构域,适当的对应靶标是固定的。在添加与局部缺血相关的分子之前,用BSA、乳液或其它适当的阻断剂阻断针对蛋白质的非特异性结合位点。未包覆的孔或用非靶分子包覆的孔用作特异性对照。用靶标包覆的基材或对照基材孵育浓度渐增的双特异性蛋白质(或靶向多肽结构域)。不结合靶标的融合蛋白或结构域也作为特异性对照进行测试。然后使用对应使用的固体支持物和结合技术的标准方案,通过测量相比对照结合靶标的双特异性融合蛋白(或靶向多肽结构)的量随着渐增剂量的变化,对靶标特异性、剂量依赖性结合的双特异性融合蛋白(或靶向多肽结构域)进行评估。这样代表性的方案包括述于Wassaf等,Anal.Biochem.351 (2) :241-53 (2006);Epub 2006年2月10日(BIACORE);以及Murray和Brown,J.Immunol.Methods.127 (1) :25-8 (1990)(ELISA)中的那些方案。此外,还可以进行这样的研究来监测结合和特异性,所述研究改变了固定的靶分子的量,或者包括渐增水平的可溶性靶分子作为竞争物。

[0346] 针对结合靶分子的结合亲和力和动力学结合和解离速率使用标准技术测量,并且与其它阴性对照分子(例如,具有不相关靶向多肽的融合蛋白或缺少靶向多肽的融合蛋白或具有非结合白多肽的融合蛋白)和阳性对照分子(例如,靶向靶分子的亲本抗体,或已知结合靶分子的其它抗体或抗体片段)比较。例如,非结合的靶向多肽可以是非结合的膜联蛋白A5变体、非结合的突触结合蛋白变体或非结合的scFv。

[0347] 在某些实施方式中,使用生物传感器(例如,表面等离子体共振(例如,BIAcore)或共振镜分析(IAsys))确定 K_d 。这样的测定可如Hefta等.,使用生物传感器测量亲和力(Measuring Affinity Using Biosensors),记载于《抗体工程:实用方法("Antibody Engineering:A Practical Approach")》McCafferty等编著,第99-116页(牛津大学出版社,1996),以及其中所引用的参考文献所述进行。简言之,使用已经与局部缺血细胞偶联的传感器芯片确定动力学结合和解离速率(k_{on} 和 k_{off})。为了评估结合(k_{on}),不同浓度的双特

异性蛋白质(或靶向多肽结构域)的溶液流过芯片,同时使用质量敏感检测对结合进行检测。使用BIAcore系统(新泽西州皮斯卡特维的GE医疗保健公司(GE Healthcare), k_{on} 是dR/dt比对R图像的斜率,其中R是观察到的信号。结合后,通过将缓冲液溶液通过芯片,观察到解离,并且以类似的方式确定 k_{off} 。使用下式计算 K_d :

$$[0348] \quad K_d = k_{off}/k_{on}$$

[0349] 在本发明的上下文中,如果双特异性融合蛋白以小于 $10^{-6}M$ 的 K_d ,优选小于 $10^{-7}M$ 、 $10^{-8}M$ 、 $10^{-9}M$ 或 $10^{-10}M$ 的 K_d 结合,那么其结合靶分子。此外,双特异性融合蛋白与靶分子在该试验中的结合显著高于(例如,至少2倍、10倍或100倍高)双特异性融合蛋白与阴性对照的结合。优选地,结合固定的靶标还可以使用过量的可溶性靶标竞争。

[0350] 如上所指出,某些靶分子对受损细胞具有特异性(或在其中富集)。代表性的靶分子包括但不限于磷脂酰丝氨酸、DNA、肌球蛋白、心肌肌球蛋白、c-Met(HGF受体)、磷脂酰丝氨酸、P-选择素和ICAM-1。使用暴露于诱导坏死或细胞凋亡的条件的培养细胞在体外方便地证实与受损细胞的结合。例如,坏死可以在培养的心肌细胞中通过模拟的局部缺血/再灌注诱导,并且使用LDH释放试验,或台盼蓝试验,然后减去经历细胞凋亡的细胞数量进行监测,基本如Shan等,Am.J.Physiol.Cell.Physiol.294:833-841(2008)中所述。如下文更具体的描述,该试验对总死亡细胞以及总死亡细胞与由于坏死所致的凋亡细胞数量之间的差异进行定量。诱导细胞凋亡的条件包括暴露于 H_2O_2 或缺氧,并且细胞凋亡可以使用本领域已知的各种技术中的任意技术进行监测,例如,膜联蛋白A5结合,通过由细胞凋亡激活的已知胱天蛋白酶切割靶向肽序列,或DNA梯度(通过TUNEL试验测量,基本上如Kuramochi,J.Biol.Chem.279(49):51141-47(2004)中所述)。对经历坏死或细胞凋亡的细胞的结合可以通过向细胞凋亡或坏死诱导后的细胞添加荧光素标记的双特异性融合蛋白(或靶向多肽结构域)或适当的对照蛋白进行评价。在蛋白质与细胞孵育持续几分钟到一天范围的时间后,洗涤细胞,然后使用免疫荧光法、流式细胞术或相似的技术测量细胞结合的荧光。或者,可以使用其它检测结合的双特异性融合蛋白(或靶向多肽结构域)的方法,包括放射性标记,或使用与双特异性融合蛋白(或靶向多肽结构域)或结合融合蛋白(或靶向多肽结构域)的抗体偶联的酶,这是ELISA方案中的常见操作。当与并未受到损伤的细胞(例如,并未经历细胞凋亡或坏死的细胞)比较时,如果在局部缺血后(例如,经历坏死或细胞凋亡的细胞)检测到对细胞显著较高(例如,2倍高)的结合,那么双特异性融合蛋白(或靶向多肽结构域)结合靶细胞。

[0351] 体内靶向可以这样证明,例如,通过在动物模型中诱导局部缺血,并且比较局部缺血之前和之后靶组织中给予的双特异性融合蛋白(或靶向多肽结构域)的水平。对受损细胞的体内靶向可以这样证明,通过在动物模型中诱导组织损伤,给予双特异性融合蛋白(或靶向多肽结构域),并在受损和未受损细胞中比较双特异性融合蛋白(或靶向多肽结构域)的水平。在一实施方式中,双特异性融合蛋白被设计成靶向在局部缺血再灌注损伤后受损的组织区域。在这样的情况下,体内靶向的证明可以通过诱导组织损伤实现,优选通过导致局部缺血然后重建血液供给的方法。许多方法能够对不同组织做到这一点。例如,可用简单的止血带瞬时阻断流至小鼠下肢的血液。或者,可以对进入肾脏的动脉使用临时的夹子。如在小鼠、大鼠、狗或猪中所证明的,经由临时阻断冠状动脉,可以在心脏中诱导局部缺血再灌注损伤。用于在动物模型中诱导组织损伤的代表性方法总结在下述表2中。

[0352] 表2:用于诱导局部缺血-再灌注损伤的代表性方法

器官或组织	用于诱导损伤的方法	参考文献
心脏	小鼠: 夹紧左前降支动脉 (LAD) 上至 30 分钟然后再灌注 大鼠: 冠状动脉连接	Dumont 等, <i>Circulation</i> 102(13):1564-8 (2000) Davis, <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> 23:103(21):8155-60 (2006)
肾脏	小鼠: 用儿科缝合夹紧肾动脉 1-6 小时	Chen 等, <i>FASEB J.</i> 4(12): 3033-39 (1990)
肝脏	狗: 用血管夹交叉夹紧肝梗和肝动脉 (靠近腹腔动脉) 猪: 具体见参考文献	Miranda 等, <i>Braz. J. Med. Biol. Res.</i> 40(6):857-65 (2007) Kobayashi 等, <i>World J. Gastroenterol.</i> 13(25):3487-92 (2007)
后肢		Zbinden 等, <i>Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.</i> 292: H1891-H1897 (2007)

[0354] 用于局部缺血-再灌注损伤的动物模型在下述参考文献中进一步描述:

[0355] Greenberg等,Chapter 7. 局部缺血血管再生和局部缺血-再灌注损伤的小鼠模型 (Mouse models of ischemic angiogenesis and ischemia-reperfusion injury). *Methods Enzymol.* 444:159-74 (2008) ;

[0356] Chimenti等,心肌梗塞:动物模型 (Myocardial infarction:animal models) .*Methods Mol. Med.* 98:217-26 (2004) ;

[0357] Black SC,心肌局部缺血和再灌注损伤的体内模型:针对药物发现的应用及评价 (In vivo models of myocardial ischemia and reperfusion injury:application to drug discovery and evaluation). *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 43 (2) :153-67 (2000)。

[0358] 通过比较如Chen等,FASEB J. 4 (12) :3033-39 (1990) 中所示夹紧的肾脏和未夹紧的肾脏中或如Zbinden等,Am.J.Physiol.Heart Circ.Physiol.292:H1891-H1897 (2007) 中所示处理的和未处理的前肢中双特异性融合蛋白 (或靶向多肽结构域) 沉淀,使用放射性标记的双特异性融合蛋白 (或靶向多肽结构域),可以建立靶向的特异性。或者,可以使用ELISA在均质化的组织中检测双特异性融合蛋白 (或靶向多肽结构域),或者可以使用被适合成像的金属 (例如,Tc99,Y或Gd) 标记的双特异性融合蛋白 (或靶向多肽结构域) 对双特异性融合蛋白 (或靶向多肽结构域) 进行实时成像。心脏受损区域的特定沉淀可以如Dumont等,Circulation 102 (13) :1564-8 (2000) 中所述进行测量。用于证明蛋白质对受损组织靶向的方法在下述表3中示出。

[0359] 表3:对受损组织靶向的证明

靶向的受损器官或组织	用于证明靶向的递送的方法	参考文献
[0360]	心脏 人：Tc99 标记膜联蛋白 A5，然后在人中成像，在患有心肌梗塞的患者中使用 SPECT，然后经由血管形成术或血栓溶解进行再灌注	Hofstra 等， <i>The Lancet</i> 356 (9225): 209-12 (2000)
	心脏 小鼠：以组织学上检测的心肌中的分布，荧光标记局部缺血-再灌注的小鼠模型中膜联蛋白 A5	Dumont 等， <i>Circulation</i> 102(13): 1564-8 (2000)
	心脏 人：Tc99 标记膜联蛋白 A55，然后在人中成像，在经受脏移植排斥反应的患者中使用 SPECT	Hofstra 等， <i>The Lancet</i> 356 (9225): 209-12 (2000)
	心脏 小鼠：使用共聚焦显微镜，小鼠组织中荧光标记的生长因子的成像	Urbanek, <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> 102 (24):8692-97 (2005)
	使用对 DNA 放射性标记的抗体靶向的受损肾脏 夹紧的和未夹紧的肾脏的放射图 显微射线自动图像，以显示肾脏中特定细胞结构的位置 使用针对 DNA 的 I131-标记的抗体（相对于标记的对照）的整个小鼠的成像 I125-标记的抗体的生物分布，以显示在非靶组织中的沉淀	Chen 等, <i>FASEB J.</i> 4(12):3033-9 (1990)

[0361] 如上所示，某些靶向多肽结构域包括结合靶分子（例如，DNA、肌球蛋白、心肌肌球蛋白、c-Met、P-选择素、ICAM-1、磷脂酰丝氨酸）的抗体。在一些实施方式中，靶向结构域是抗-肌球蛋白抗体（例如，针对人心肌肌球蛋白的R11D-10，针对心肌肌球蛋白重链的2G4-sD7，针对心肌肌球蛋白重链的1B2和5C2，针对心肌肌球蛋白的2F4，针对肌球蛋白的单克隆抗体，B7抗体，B7scFv，或本领域已知的其它抗体）。在一些实施方式中，某些靶向多肽结构域包括结合靶分子的 scFv。例如，靶向结构域可以是抗-DNA S1-1scFv或抗-DNA SI-22scFv。代表性的这种抗体和scFv抗体包括或具有如SEQ ID NO:128-136中提供的序列。在一些实施方式中，代表性的这种抗体和scFv包括或具有如美国专利申请号13/068,808中SEQ ID.N0:220-224中提供的序列，其全部内容通过引用纳入本文。

[0362] 显然，功能相关的抗体也可以，或者任选地可以被用作靶向多肽结构域。抗体与靶抗原主要通过氨基酸残基相互作用，该氨基酸残基位于六个重链和轻链互补决定区 (CDR) 中。为此，CDR内的氨基酸序列与单个抗体之间的差异比CDR外的序列更大。因为CDR序列负责大部分抗体-抗原相互作用，通过将来自一个抗体的CDR序列与来自不同抗体的框架序列组合，有可能生成这样修饰的抗体，其模拟原始抗体特性。这样的框架序列可以获自包括种系抗体基因序列的公共DNA数据库。

[0363] 因此，本文提供的靶向结构域序列的一个或多个CDR可以用于创造这样的功能相关的抗体，其保持原始靶向多肽结构域的结合特征。重链和轻链可变框架区域可以衍生自相同或不同的抗体序列。使用与诸如Vbase和IMGT的数据库中的已知序列比对，可以容易的鉴定CDR区域。

[0364] 本领域熟知的是，抗体重链和轻链CDR3结构域在抗体对于抗原的结合特异性/亲

和力中起到非常重要的作用。因此,在某些实施方式中,生成包括本文所述特定抗体重链和/或轻链CDR3的抗体。抗体还包括本文所公开的抗体的重链和/或轻链CDR1和/或CDR2。

[0365] 上述工程改造的抗体的CDR 1、2、和/或3区域可以包括本文所公开精确的氨基酸序列。然而,本领域普通技术人员将意识到,来自精确CDR序列的一些偏差也是可能的,特别是针对CDR1和CDR2序列,它们可以比CDR3序列容许更多的偏差,并且不改变表位特异性(例如,这样的偏差是保守氨基酸取代)。因此,在另一实施方式中,工程改造的抗体可由一个或多个CDR1和CDR2组成,其与本文所指抗体相应的CDR具有例如80%、90%、95%、98%、99%或99.5%的相同性。

[0366] 在另一实施方式中,可以改变CDR的一个或多个残基以修饰结合,从而实现更有利的结合速率,或更有利的解离速率。使用该策略,可以实现具有超高结合亲和力(例如,K_d=10⁻¹⁰或更少)的抗体。本领域熟知的亲和力成熟技术可以用于改变CDR区域,然后针对结合中所需改变对所得结合分子进行筛选。因此,由于改变了CDR,可以对结合亲和力以及免疫原性中的改变进行监测和评分,这样实现了针对最佳组合结合和低免疫原性进行优化的抗体。

[0367] 还可以在抗体重链和/或轻链可变区的一个或多个框架或连接区域(即,非CDR残基)中进行修饰,只要在这些修饰后抗原结合亲和力没有大幅度降低。

[0368] 肽接头和半衰期调节剂

[0369] 本领域技术人员将会意识到,用于治疗性应用的双特异性蛋白质由于其相对低的分子量可能并不展现出最佳的血清半衰期。在一些治疗性应用中,可能因此需要调整双特异性蛋白质的半衰期。在一些实施方式中,为了实现双特异性蛋白质对病变受损器官或器官受损区域的累积,双特异性蛋白质偶联,可操作地来连接或融合肽接头。在一些实施方式中,为了实现双特异性蛋白质对病变受损器官或器官受损区域的累积,双特异性蛋白质偶联,可操作地连接或融合半衰期调节剂。优选地,肽接头或半衰期调节剂在人体内是无免疫原性的。

[0370] 在一些实施方式中,半衰期调节剂可以增加融合蛋白的体内半衰期。例如,包括半衰期调节剂的双特异性蛋白质的半衰期是约1小时、2小时、3小时、4小时、5小时、6小时或更长。在一些实施方式中,包括半衰期调节剂的双特异性蛋白质的半衰期是约24小时,或更长。在一些实施方式中,包括半衰期调节剂的双特异性蛋白质的半衰期是约一周,或更长。

[0371] 靶向多肽结构域和激活剂结构域可以经肽键直接连接。在一些实施方式中,其可以经由半衰期调节剂连接。在优选实施方式中,半衰期调节剂是多肽。因此,半衰期调节剂可以具有两个末端,即N-末端和C-末端。在一些实施方式中,半衰期调节剂在一个末端经由肽键连接靶向多肽结构域,而在另一个末端经由肽键连接激活剂结构域。在某些实施方式中,接头在N-末端连接靶向多肽结构域的C-末端,而在C-末端连接激活剂结构域的N-末端。在某些实施方式中,接头在C-末端连接靶向多肽结构域,而在N-末端连接激活剂结构域。同样,在其他实施方式中,半衰期调节剂在双特异性蛋白质的一个末端连接。例如,在一些实施方式中,半衰期调节剂在C-末端连接激活剂结构域的N-末端。在其他实施方式中,半衰期调节剂在靶向结构域的C-末端连接。在其它实施方式中,半衰期调节剂可以在N-末端连接激活剂结构域的C-末端。同样在其它实施方式中,半衰期调节剂可以在N-末端连接靶向结构域的C-末端。

[0372] 在一些实施方式中，半衰期调节剂被设计成驱动这样大小的双特异性融合蛋白，其超过约70kDa或与最小肾清除率相等的半径。在一些实施方式中，半衰期调节剂被设计成延长双特异性融合蛋白的半衰期，其通过FcRn受体介导的循环或通过结合至诸如人血清白蛋白(HSA)的血清组分。

[0373] 在一些实施方式中，肽接头或半衰期调节剂在人体内是无免疫原性的。半衰期调节剂可以是这样的人血清蛋白或其衍生物，其在由至少100个连续氨基酸组成的区域上保持至少50%的序列相同性。在将多核苷酸或多肽序列与参照序列比较的上下文中，本文所用“序列相同性”表示当对多核苷酸或多肽序列进行最佳比对之时，多核苷酸或多肽序列是相同的，或者在参照序列中的相应位置上具有指定百分比的核苷酸或残基是相同的。

[0374] 在一些实施方式中，通过使存在于半衰期调节剂的一个或多个糖基化位点糖基化，可以修饰半衰期调节剂。例如，可以添加或移除下述氨基酸以改变半衰期调节剂的糖基化：天冬酰胺、丝氨酸、苏氨酸。在一些实施方式中，双特异性蛋白质中半衰期调节剂的糖基化可以调整双特异性蛋白质的半衰期。在一些实施方式中，半衰期调节剂序列经修饰以减少糖基化。这样的修饰包括由Gln (Q) 或Ala (A) 对Asn (N) 取代，和/或由Ala (A) 对Ser (S) 或Thr (T) 取代。

[0375] 人血清白蛋白(HSA, SEQ ID NO:54)具有天然长的血清半衰期，这部分是由于其对于FcRN的结合和循环。HAS是血液中最丰富的蛋白质，并且已经在人体内证明了安全性。

[0376] 在一些实施方式中，半衰期调节剂是HSA变体。在一些实施方式中，半衰期调节剂包括至少100个连续氨基酸，其与野生型人血清白蛋白氨基酸序列具有至少70%、80%、85%、90%或95%的相同性。在一些实施方式中，半衰期调节剂包括至少200个连续氨基酸，其与野生型人血清白蛋白氨基酸序列具有至少70%、80%、85%、90%或95%的相同性。在一些实施方式中，半衰期调节剂包括至少300个连续氨基酸，其与野生型人血清白蛋白氨基酸序列具有至少70%、80%、85%、90%或95%的相同性。在一些实施方式中，半衰期调节剂包括至少400个连续氨基酸，其与野生型人血清白蛋白氨基酸序列具有至少70%、80%、85%、90%或95%的相同性。在一些实施方式中，半衰期调节剂包括至少500个连续氨基酸，其与野生型人血清白蛋白氨基酸序列具有至少70%、80%、85%、90%或95%的相同性。

[0377] 在一些实施方式中，半衰期调节剂包括人血清白蛋白序列或其变体。在一些实施方式中，人血清白蛋白序列在HAS的C-末端可具有3aa、4aa、5aa、6aa或更多的缺失。

[0378] 在一些实施方式中，HAS变体可以具有下述取代中的一种或多种：

[0379] 半胱氨酸C58可以用例如丝氨酸(C58S)取代，

[0380] 赖氨酸K420可以被例如谷氨酸(K420E)取代，

[0381] 天冬酰胺N527可以被例如谷氨酰胺(N527Q)取代，

[0382] 谷氨酸E505可以用例如甘氨酸G(E505G)取代，

[0383] 缬氨酸V547可以用例如丙氨酸(V547A)取代，

[0384] 谷氨酰胺N527可用例如天冬酰胺(N527Q)取代。

[0385] 在一些实施方式中，HAS变体可以具有氨基酸26-609，并且具有下述取代中的一种或多种：

[0386] 半胱氨酸C58可以用例如丝氨酸(C58S)取代，

[0387] 赖氨酸K420可以被例如谷氨酸(K420E)取代，

- [0388] 天冬酰胺N527可以被例如谷氨酰胺(N527Q)取代，
- [0389] 谷氨酸E505可以用例如甘氨酸G(E505G)取代，
- [0390] 缬氨酸V547可以用例如丙氨酸(V547A)取代，
- [0391] 天冬酰胺N503和/或N527可以用例如谷氨酰胺(N503Q和/或N527Q)取代。
- [0392] 在一些实施方式中, HAS变体(本文称之为mHSA)具有下述取代:C34S,N503Q (SEQ ID NO:55)。在一些实施方式中, HAS变体(本文称之为mHSA7)具有下述取代:C34S、N503Q、E505G和V547A (SEQ ID NO:56)。在一些实施方式中, HAS变体具有氨基酸26-609以及下述取代:C58S和N527Q (SEQ ID NO:124)。
- [0393] 在一些实施方式中, 通过N503Q取代和/或N527Q, 可以移除位于HAS位置503和/或527的天冬酰胺, 其可能是脱去酰胺基并且可以降低半衰期。在一些实施方式中, HAS的半胱氨酸C34可以被丝氨酸或丙氨酸(S或A)取代, 以移除游离的半胱氨酸并且使其它二硫键形成最小化。在一些实施方式中, 半衰期调节剂是经修饰的HAS结构域III (mHSA_dIII) 的修饰型, 所述经修饰的HAS具有N503取代以及额外的末端甘氨酸。这样的修饰型保持结合FcRn的HAS特性, 并且升高了血清半衰期。
- [0394] 在一些实施方式中, 半衰期调节剂包括至少100个保守氨基酸, 其与人Fc氨基酸序列(美国专利申请号13/068,808中提供的SEQ ID NO:21, 其全部内容通过引用纳入本文)具有至少70%、80%、85%、90%或95%的相同性。在一些实施方式中, 半衰期调节剂包括至少100个连续氨基酸, 其与野生型人Fc氨基酸序列具有至少约70%、约75%、约80%、约85%或约90%的相同性。抗体的Fc结构域具有结合FcRn的天然能力, 这导致延长的半衰期。在一些实施方式中, 抗体的Fc结构域经工程改造以不结合Fc(γ)R。在一示例性的实施方式中, Fc结构域经工程改造以用Q取代N297 (N297Q变体)。在一些实施方式中, 半衰期调节剂是Fc的单体变体形式, 名为scFc。例如, 天然二聚化以形成Fc的IgG重链的子集是铰链-CH₂-CH₃。在一些实施方式中, Fc结构域经工程改造以通过连接铰链-CH₂-CH₃与诸如GGGGSGGGSGGGSGGGGS的柔性接头来形成单链, 从而创造铰链-CH₂-CH₃-接头-铰链-CH₂-CH₃链。在一示例性实施方式中, 单链Fc (scFc) 经工程改造以用Q取代N297并用S取代C220 (N297Q, C220S)。
- [0395] 在一些实施方式中, 蛋白质可以包括免疫球蛋白分子(例如, IgG)的Fc区域作为半衰期调节剂。使用这样的框架产生组成型二聚化蛋白质。编码Fc融合蛋白的核酸的初级翻译产物是这样的单个分子, 其包括连接衍生自例如人IgG1的Fc单链的信号转导和/或靶向臂。翻译后, 但是在分泌之前, 该融合分子经由Fc区域中的3个半胱氨酸残基二聚化以形成二聚化融合蛋白。在一些实施方式中, Fc融合蛋白可以是同源二聚体, 其具有两个信号臂、两个靶向臂或两个信号转导臂和两个靶向臂(参见, 图1A)。
- [0396] 在一些实施方式中, 半衰期调节剂包括至少100个连续氨基酸, 其与野生型人 α -胎蛋白(AFP)氨基酸序列具有至少70%、80%、85%、90%或95%的相同性。在一些实施方式中, 半衰期调节剂包括至少100个连续氨基酸, 其与野生型人 α -胎蛋白(AFP)氨基酸序列具有约70%、75%、80%、85%、90%或95%的相同性。在一些实施方式中, 通过N251Q取代来移除AFP的N-连接的糖基化位点。
- [0397] 在一些实施方式中, 半衰期调节剂包括至少100个连续氨基酸, 其与野生型维他命D-结合蛋白(VDBP)氨基酸序列具有至少70%、80%、85%、90%或95%的相同性。在一些实

施方式中,半衰期调节剂包括至少100个连续氨基酸,其与野生型维他命D-结合蛋白(VDBP)氨基酸序列具有约70%、75%、80%、85%、90%或95%的相同性。在一些实施方式中,通过N288Q或N288T取代来移除VDBP的N-连接的糖基化位点。

[0398] 在一些实施方式中,半衰期调节剂包括至少100个连续氨基酸,其与野生型人转甲状腺素蛋白(TTR)氨基酸序列具有至少70%、80%、85%、90%或95%的相同性。在一些实施方式中,半衰期调节剂包括至少100个连续氨基酸,其与野生型人转甲状腺素蛋白(TTR)氨基酸序列具有约70%、75%、80%、85%、90%或95%的相同性。在一些实施方式中,转甲状腺蛋白经修饰以移除N118 N-糖基化位点。在一些实施方式中,半衰期调节剂是TTR的但单体形式。

[0399] 在一些实施方式中,半衰期调节剂包括至少100个连续氨基酸,其与PAS化氨基酸序列具有至少70%、80%、85%、90%或95%的相同性。PAS化是模拟PEG化的脯氨酸富集的、丙氨酸富集的和/或丝氨酸富集的序列(参见WO/2008/155134)。在一些实施方式中,半衰期调节剂包括至少100个连续氨基酸,其与PAS化氨基酸序列具有约70%、75%、80%、85%、90%或95%的相同性。PAS化是模拟PEG化的脯氨酸富集的、丙氨酸富集的和/或丝氨酸富集的序列(参见WO/2008/155134)。脯氨酸、丙氨酸和/或丝氨酸的多肽延伸形成具有大流体动力学半径的半结构化的三位结构域,因此降低融合蛋白的清除。在一些实施方式中,PAS化氨基酸序列是约200、300、400、500或600个氨基酸长。例如,PAS化是氨基酸序列ASPAAPAPASPAAPAPSAPA(SEQ ID NO:137)的20次重复。

[0400] 在一些实施方式中,半衰期调节剂包括一个或多个聚乙二醇(PEG)链与融合蛋白的连接,其通过连接至N-和/或C-末端和/或连接至氨基酸侧链(例如,与半胱氨酸的PEG-马来酰亚胺连接)的化学连接。PEG链形成具有大流体动力学半径的半结构化的三位结构域,因此降低融合蛋白的清除。

[0401] 在一些实施方式中,半衰期调节剂包括至少100个连续氨基酸,其与白蛋白-结合结构域人抗体(albulAb)氨基酸序列(SEQ ID NO:138)具有至少70%、80%、85%、90%或95%的相同性。在一些实施方式中,半衰期调节剂包括至少100个连续氨基酸,其与白蛋白-结合结构域人抗体(albulAb)氨基酸序列具有约70%、75%、80%、85%、90%或95%的相同性。通过非共价地结合血清白蛋白,白蛋白-结合结构域抗体可以增加融合蛋白半衰期(参见WO2008/096158)。在一些实施方式中,白蛋白-结合结构域人抗体经工程改造以移除C-末端精氨酸,以移除Lys-Arg Kex2蛋白酶位点。

[0402] 代表性的这样的半衰期调节剂包括在SEQ ID NO:57-59中所列的任一项。

[0403] 在一些实施方式中,半衰期调节剂可以经修饰以将半胱氨酸残基取代成丝氨酸或丙氨酸残基,从而降低形成二硫键的能力。

[0404] 在一些实施方式中,相较于不具有半衰期调节剂的融合蛋白,半衰期调节剂为双特异性蛋白质提供了延长的半衰期。可以使用在生理条件下确定稳定性的试验评价半衰期调节剂的作用。例如,可以将双特异性融合蛋白以37°C在血清(例如,人血清)中孵育120小时,在孵育开始时以及其后每24小时移走样品。然后进行如上所述的结合试验以监测各时间点上功能性双特异性融合蛋白的水平。然后将该水平与没有用半衰期调节剂(或使用不同半衰期调节剂构)构建的双特异性融合蛋白的水平进行比较以提供血清稳定性比较。

[0405] 任选的元件

[0406] 半衰期调节剂可以被单独纳入或偶联至双特异性融合蛋白,或使用短(例如,2-40、2-50、2-100个氨基酸残基)连接物肽。在一些实施方式中,连接物多肽存在于位于一端或两端的半衰期调节剂的N-末端、C-末端或N-末端和C-末端两者。合适用于接头N-末端的短连接物多肽包括,例如,二肽,如-Gly-Ser- (GS)、-Gly-Ala- (GA) 和-Ala-Ser- (AS)。合适用于接头C-末端的短连接物多肽包括,例如,二肽,如-Leu-Gln- (LQ) 和-Thr-Gly- (TG)。在一些实施方式中,连接物长度超过2个氨基酸。例如,连接物长度是5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个氨基酸或更长。在一些实施方式中,连接物的氨基酸长度是20个或超过30个或更长,40或更长,50或更长,60或更长,70或更长,80或更长,90或更长,100或更长。优选地,这样的连接物是柔性的(例如,甘氨酸富集的)或结构的(例如, α 螺旋富集的)。在一些实施方式中,连接物接头具有SEQ ID NO:60-62中所列的序列。在一些实施方式中,连接物接头具有SEQ ID NO:60-62中所列的序列,其中用谷氨酸取代丝氨酸。例如,接头可以具有SEQ ID NO:126中所列的序列。在一些实施方式中,连接物接头具有美国专利申请号13/068,808中所提供的SEQ ID NO:28-30中所列序列,其全部内容通过引用纳入本文。这样的短连接物多肽以及SEQ ID NO:28-30中所列连接物(如果存在)可以位于半衰期调节剂的一个或两个末端。

[0407] 在一些实施方式中,连接物多肽可以是脂肪质接头,即,具有诸如丙氨酸、亮氨酸、缬氨酸、异亮氨酸、脯氨酸或甘氨酸的脂肪族的接头。例如,连接物可以具有如下序列AAALAAA (SEQ ID NO:127)。

[0408] 在一些实施方式中,连接物基于诸如转甲状腺素蛋白的人蛋白质。

[0409] 人们将会理解的是,除了本文上述这些以外的元件可以任选地被包括在本文所提供的双特异性融合蛋白中。这样的元件可以出于各种原因存在,例如,以促进双特异性融合蛋白的表达、制备或纯化,或以进行靶向功能。

[0410] 在一些实施方式中,双特异性融合蛋白具有在表达期间可以被切割的N-末端分泌信号。例如,可以存在N-末端前导多肽。在一些实施方式中,N-末端前导多肽具有SEQ ID NO:105中所列的序列。

[0411] 双特异性融合蛋白还可以,或者任选地,包括多组氨酸(例如,六聚组氨酸)标签以促进纯化。这样的标签包括至少六个组氨酸连续氨基酸残基,并且可以位于C-或N-末端。在某些实施方式中,六聚组氨酸标签包括在双特异性蛋白质的C-末端。其它氨基酸残基可以存在于多组氨酸与双特异性蛋白质残留物(remainder)的连接。

[0412] 代表性双特异性蛋白质

[0413] 根据本发明的一些方面,双特异性蛋白质具有N-末端激活剂(本文也称之为信号转导臂)、C-末端靶向臂和中心肽接头或半衰期调节剂。同样在本发明的一些方面中,双特异性蛋白质具有N-末端激活剂(本文也称之为信号转导臂)和C-末端靶向臂。同样在本发明的一些方面中,双特异性蛋白质具有C-末端激活剂(本文也称之为信号转导臂)和N-末端靶向臂。同样在本发明的一些方面中,双特异性蛋白质具有C-末端激活剂(本文也称之为信号转导臂)、N-末端靶向臂和中心肽接头或半衰期调节剂。

[0414] 在本发明的一些方面中,双特异性蛋白质可以还具有这样的接头或连接物,其将靶向臂与半衰期调节剂和/激活剂结构域与半衰期调节剂连接。

[0415] 代表性的双特异性融合蛋白包括(由N-末端到C-末端):

- [0416] a) 任选的前导多肽；
 [0417] b) 靶向多肽结构域(例如,包括或具有SEQ ID NO:1-4和122中所列序列)；
 [0418] c) 任选的连接物肽(例如,包括或具有SEQ ID NO:60-62、126-127中所列序列)；
 [0419] d) 肽接头或半衰期调节剂(例如,包括或具有SEQ ID NO:54-56和124中所列序列)；
 [0420] e) 任选的连接物肽(例如,包括或具有SEQ ID NO:60-62、126-127中所列序列)；
 [0421] f) 激活剂结构域(例如,包括或具有SEQ ID NO:10-30和120中所列序列)；以及
 [0422] g) 任选的多组氨酸肽。
- [0423] 代表性的双特异性融合蛋白包括(由N-末端到C-末端)：
 [0424] a) 任选的前导多肽；
 [0425] b) 激活剂结构域(例如,包括或具有SEQ ID NO:10-30和120中所列序列)；
 [0426] c) 任选的连接物肽(例如,包括或具有SEQ ID NO:60-62、126-127中所列序列)；
 [0427] d) 肽接头或半衰期调节剂(例如,包括或具有SEQ ID NO:54-56或124中所列序列)；
 [0428] e) 任选的连接物肽(例如,包括或具有SEQ ID NO:60-62、126-127中所列序列)；
 [0429] f) 靶向多肽结构域(例如,包括或具有SEQ ID NO:1-4和124中所列序列)；以及
 [0430] g) 任选的多组氨酸肽。

[0431] 代表性的双特异性蛋白质包括但不限于，

[0432] 靶向的、效力减弱的、基于IGF1的SGF：

[0433]	606	IGF1 (LR3-R37x-3x) _1k40_mHSA_1k40_AnxVC316S_1k8_His6
	683	IGF1 (LR3-R37x-3x) _1k40_Fc_1k40_AnxVmS_1k40_AnxVC316S
	711	IGF1 (LR3) _1k15_mHSA_1k15_AnxV
	713	IGF1 (LR3) _1k15_mHSA_1k15_AnxV (ni)
	716	IGF1 (LR3) _1k15_mHSA7_1k15_AnxV (ni)
	727	IGF1 (LR3-R37x-3x) _1k40_mHSA_1k40_AnxV
	728	IGF1 (LR3_Y60L) _1k15_mHSA7_1k15_AnxV (ni)
	729	IGF1 (LR3) _1k7_mHSA_1k7_AnxV
	730	IGF1 (LR3-R37x-3x) _1k15_mHSA7_1k15_AnxV (ni)
	731	IGF1 (LR3-Y24L/Y31A) _1k15_mHSA7_1k15_AnxV (ni)
	732	IGF1 (LR3-Y24L) _1k15_mHSA7_1k15_AnxV (ni)
	733	IGF1 (LR3-Y31A) _1k15_mHSA7_1k15_AnxV (ni)
	734	IGF1 (LR3-Y24L/Y31A) _1k7_mHSA7_1k7_AnxV (ni)
	737	IGF1 (LR3-Y31A) _1k7_mHSA_1k7_AnxV
	739	IGF1 (LR3-Y24L) _1k7_mHSA_1k7_AnxV (ni)
	740	IGF1 (LR3-Y31A) _1k7_mHSA_1k7_AnxV (ni)
	741	IGF1 (LR3-Y60L) _1k7_mHSA_1k7_AnxV (ni)
	743	IGF1 (LR3-R37X-3X) _1k7_mHSA_1k7_AnxV (ni)
	776	IGF-1 (E3R-Y31A) -1k7-HSA (C58S/N527Q) -1k7-AnxV (ni)

[0434] 靶向的、效力减弱的、基于Nrg1a的SGF：

[0435]	757	Nrg1a_1k7_mHSA_1k7_AnxV(ni)
--------	-----	-----------------------------

[0436] 代表性的对照包括但不限于：

[0437] 未靶向的、效力减弱的、基于IGF1的SGF:

[0438]	602	IGF1(LR3-R37x)_1k40_mHSA_1k8_His6
	604	IGF1(LR3-R37x-3x)_1k2_mHSA_1k8_His6
	703	IGF1(LR3)_1k15_mHSA

[0439]	704	IGF1(LR3)_1k15_mHSA7
	746	IGF1(LR3-Y31A)_1k7_mHSA

[0440] 未靶向的、效力未减弱的、基于IGF1的SGF:

[0441]	688	IGF1 (LR3-R37x-3x) _1k40_Fc
--------	-----	-----------------------------

[0442] 靶向的、效力未减弱的、基于IGF1的SGF:

[0443]	649	IGF1 (LR3) _1k40_Fc_1k40_AnxVC316S
--------	-----	------------------------------------

[0444] 代表性的双特异性蛋白质包括但不限于，蛋白质SGF 606 (SEQ ID NO:70)、SGF 683 (SEQ ID NO:67)、SGF 711 (SEQ ID NO:73)、SGF 713 (SEQ ID NO:74)、SGF 716 (SEQ ID NO:75)、SGF 727 (SEQ ID NO:76)、SGF 728 (SEQ ID NO:77)、SGF 729 (SEQ ID NO:78)、SGF 730 (SEQ ID NO:79)、SGF 731 (SEQ ID NO:80)、SGF 732 (SEQ ID NO:81)、SGF 733 (SEQ ID NO:82)、SGF 739 (SEQ ID NO:83)、SGF 740 (SEQ ID NO:84)、SGF 741 (SEQ ID NO:85)、SGF 743 (SEQ ID NO:86)、SGF 734 (SEQ ID NO:108)、SGF 737 (SEQ ID NO:116)、SGF 757 (SEQ ID NO:110)、SGF 776 (SEQ ID NO:118)。代表性的双特异性蛋白质包括但不限于图1A-1B和图10中所阐述的蛋白质SGF。

[0445] 在一些实施方式中，双特异性蛋白质是工程改造的蛋白质，其由C-末端至N-末端包括具有SEQ ID NO:120的激活剂结构域，具有SEQ ID NO:60-62、126-127的连接物，具有SEQ ID NO:124的接头，具有SEQ ID NO:60-62、126-127的连接物，以及具有SEQ ID NO:122的靶向结构域。在一些实施方式中，双特异性蛋白质是IGF1 (E3R/Y31A) _1k7_HSA26-609 (C58S/N527Q) _1k7_AnxV 2-320 (R63A/K70A/K101A/E138A/D139G/N160A/C316A)。在一些实施方式中，双特异性蛋白质具有SEQ ID NO:118。

[0446] 代表性的双特异性融合蛋白具有SEQ ID NO:67、70、73-86、108、110、或116中所列氨基酸序列。在一些实施方式中，蛋白质不具有靶向臂，并且作为阴性对照。在一些实施方式中，未靶向的对照蛋白质包括但不限于，如图1A-1B所阐述的蛋白质SGF 604 (SEQ ID NO:69)、SGF 688 (SEQ ID NO:72)、SGF 703 (SEQ ID NO:68)、SGF 704 (SEQ ID NO:107)、SGF 602 (SEQ ID NO:66)、SGF 746 (SEQ ID NO:109)，或可以使用不具有靶向臂的代表性双特异性蛋白质SGF 606、SGF 711、SGF 713、SGF 727、SGF 728、SGF 729、SGF 730、SGF 731、SGF 732、SGF 733、SGF 734、SGF 737、SGF 739、SGF 740、SGF 741、SGF 743、SGF 649。在一些实施方式中，不具有靶向臂的蛋白质可以用作阴性对照，例如在效力移位试验中。在一些实施方式中，蛋白质可以包括IgG的Fc区作为半衰期调节剂。使用这样的框架产生组成型二聚化蛋白质。

[0447] 双特异性蛋白质的制备

[0448] 本发明的工程改造的蛋白质可通过本领域已知的传统技术合成，例如，通过诸如固相肽合成的化学合成。这样的方法为本领域技术人员已知。通常，这些方法采用本领域熟知的固体或溶液相合成方法。具体地，方法包括连续添加一个或多个氨基酸，或适当地保护氨基酸至生长的肽链。通常，第一氨基酸的氨基或羧基基团被合适的保护基团所保护。然后在适合形成酰胺键的条件下，通过在具有适当保护的互补(氨基或羧基)基团的序列中添加下一个氨基酸，受保护的或衍生的氨基酸可以连接至惰性固体支持物或用于溶液中。然后将保护基团从该新添加的氨基酸残基去除，并且添加下一个氨基酸(适当保护的)，如此以往。在所有需要的氨基酸都已经连接到适当序列之后，依次或同时去除任何剩余的保护基团和任何固体支持物，以获得最终的多肽。藉由简单修饰该通用过程，有可能一次添加超过一个氨基酸以使链生长，例如，通过将受保护的三肽与适当保护的二肽偶联(在不外消旋手性中心的条件下)以在去保护后形成五肽。

[0449] 可以使用标准技术合成双特异性蛋白质，包括液相和固相肽合成和重组DNA技术。对于固相合成，序列的C-末端氨基酸连接不可溶性支持物，并且残留的氨基酸被添加到序列中。对于长度大于约50个氨基酸的多肽，可能以此方式合成较短的区域，然后经浓缩以形成更长的多肽。通过羧基末端(例如，通过使用偶联剂N,N'-二环己基碳二亚胺)的活化形成肽键的方法为本领域所熟知。在本发明的一些方面中，多肽可以通过重组DNA技术藉由合成编码所需多肽的DNA产生。一旦所需多肽的编码序列已经合成或者分离，可以将其克隆到任何适合表达的载体中。许多克隆载体是本领域技术人员已知的，并且适当克隆载体的选择是选择的问题。该基因可以置于启动子、核糖体结合位点(用于细菌表达)和任选的操作基因(本文统称为“控制”元件)的控制下，使得编码所需多肽的DNA序列在由含有该表达构建体的载体转化的宿主细胞中被转录为RNA。编码序列可以包含或可以不包含信号肽或前导序列。可以向这样的编码序列添加异源性前导序列，所述编码序列引起由宿主生物体表达的多肽分泌。可能也需要其它调节序列，其允许相对宿主细胞生长调节蛋白质序列的表达。这样的调节序列为本领域技术人员所知，并且示例包括响应化学或物理刺激物(包括调节化合物的存在)引起基因表达开启或关闭的那些。其它类型的调节元件也可能存在于载体中，例如，增强子序列。

[0450] 在插入诸如上述克隆载体的载体之前，可将控制序列和其他调节序列与编码序列连接。或者，可以直接将编码序列克隆到这样的表达载体中，其已经包含对照序列和适当的限制位点。

[0451] 本发明还包括编码上述蛋白质和蛋白质变体的多核苷酸，其可以处于RNA的形式或处于DNA的形式，其中DNA包括cDNA和合成DNA。DNA可以是双链或单链的。由于遗传密码冗余或简并的结果，编码本发明变体的编码序列可以不同。

[0452] 对于重组DNA技术，化学制备编码双特异性融合蛋白的DNA，或通过分离且将编码融合蛋白各部分的DNA连接来制备。用于编码双特异性融合蛋白各区段的DNA可以分离自己知或从头合成的基因。用于直接化学合成DNA的方法为本领域所熟知，并且这样的合成方法使用自动的合成仪常规地进行。化学合成产生单链的多核苷酸，通过与互补序列杂交或使用DNA聚合酶，将其转化成双链DNA。尽管DNA的化学合成通常限于比双特异性融合蛋白短的序列，但是显然，完整的双特异性融合蛋白可以通过在框架中连接较短序列获得。或者，通

过克隆制备编码双特异性融合的DNA序列。克隆技术为本领域所熟知，并且例如，在诸如Sambrook等，《分子克隆：实验室手册（Molecular Cloning:A Laboratory Manual）》（第3版），冷泉港实验室出版社（Cold Spring Harbor Laboratory Press）（2001）的标准参考文献中详细描述。DNA的部分可以在框架中连接在一起以生成完整长度的编码序列。

[0453] 一旦获得编码双特异性融合蛋白的DNA，可以将该DNA克隆至载体，用于在原核或真核宿主细胞中表达。用于将DNA纳入这样的载体的技术是本领域普通技术人员熟知的。在这样的表达载体中，编码双特异性融合蛋白的DNA可操作地连接表达所需的核苷酸序列（例如，合适的启动子，以及如果需要，终止信号）。启动子是引导邻近连接的编码序列转录的核苷酸序列（通常位于编码序列的5'）。终止信号可以是终止密码子，以结束翻译和/或转录终止信号。其它调节元件（例如，增强子元件）也可以存在于表达载体中。这样的载体优选是质粒或病毒载体。优选地，表达载体还包括可选择的标志物，其对选择产生抗性。这允许细胞将载体稳定地整合到其染色体内，并且生长以形成灶点，然后可将其在细胞系中克隆和扩增。本领域已知各种可选择的标志物，包括，例如，对氨苄西林、甲氨蝶呤、霉酚酸、氨基糖苷G-418、潮霉素和嘌呤霉素提供耐性的基因。本领域普通技术人员均已知能够用于蛋白质表达的许多表达系统，包括大肠杆菌、其它细菌宿主、酵母、以及各种高等真核生物细胞，诸如COS、CHO、HEK293、HeLa和骨髓瘤细胞系。

[0454] 使用标准方法用包括编码双特异性融合蛋白的DNA转化或转染宿主细胞。宿主细胞中的表达导致DNA被转录成相应的mRNA，然后翻译mRNA以生成双特异性融合蛋白。

[0455] 一旦表达，可以根据标准方法对双特异性融合蛋白进行纯化，包括例如硫酸铵沉淀或亲和柱层析法。优选至少约90-95%均一性的基本纯化的组合物，并且用于药物用途的最优先98-99%或更高的均一性。一旦根据需要部分纯化或均匀纯化，如果要在治疗上使用，多肽应该基本上不含内毒素。

[0456] 药物组合物

[0457] 本发明还提供了这样一种药物组合物，其包括至少一种本文所述双特异性融合蛋白，以及至少一种生理上可接受的运载体。为了预防组织损伤或修复或使受损组织再生，这样的组合物可以用于治疗患有组织损伤或处于组织损伤风险中的患者。这样的患者包括，例如，患有心肌缺血梗塞、肾脏受损、和/或局部缺血中风的患者。如果需要，其它活性成分也可以包括在药物组合物中，如促进受损组织修复的干细胞或其它试剂。

[0458] “患者”是哺乳动物，优选人类。术语“治疗”（或“处理”或“疗法”）表示延缓、降低或逆转病症、紊乱、症状或疾病的进展或严重程度。

[0459] 术语“治疗有效量”指本发明的双特异性蛋白质这样的量或剂量，将其以单个或多个剂量给予患者后提供所需的治疗。

[0460] 本文所用术语“药学上可接受”表示被联邦或州政府管理机构批准，或美国药典或其它公认药典所列用于动物应用，更具体用于人。术语“运载体”表示与双特异性融合蛋白一起给予的稀释剂、佐剂、赋形剂或载体。生理学可接受的运载体可以是无菌液体，如水和油，包括来自石油、动物、植物或合成来源的油（例如，花生油、大豆油、矿物油或芝麻油）。静脉内给予该药物组合物时，水是优选的运载体。盐水溶液和右旋糖水溶液和甘油溶液也可用作液体运载体，特别适用于注射液。合适的药物赋形剂包括，例如，淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽、大米、面粉、白垩（chalk）、硅胶、硬脂酸钠、单硬脂酸甘油酯、滑石粉、氯化

钠、脱脂奶粉、甘油、丙烯、二醇、水、乙醇。如果需要，组合物也可含有少量润湿剂或乳化剂或pH缓冲剂。

[0461] 药物组合物可针对任何适当的给药方式配置，包括例如，肠胃外、鼻内、局部、经口，或定位给予，例如通过透皮方式，用于预防性和/或治疗性治疗。这些组合物可以采取适合给药模式的各种已知形式中任何一种，如溶液剂、悬浮液、乳剂、片剂、丸剂、胶囊剂、粉剂、气雾剂和缓释制剂。组合物可与传统结合剂和运载体(如甘油三酯)配制为栓剂。口服制剂可含有标准运载体，如药物级的甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、纤维素、碳酸镁等。合适的药物给予模式以及运载体的示例描述于“《雷明登：药物科学与实践(Remington: The Science and Practice of Pharmacy)》，A.R.Gennaro编，Lippincott Williams and Wilkins宾夕法尼亚州费城(21版，2005)。

[0462] 通常，本文提供的药物组合物以肠道外给药(例如，通过静脉内、肌肉内或皮下注射)，或通过口服摄取或局部施用。

[0463] 本文所用术语“给药/给予”被定义为将组合物实际物理导入或赋予(酌情)宿主对象。根据本发明考虑将组合物导入对象的任何和所有方法；该方法并不依赖于任何特定的导入方法，并且也不如此理解。导入的方法为本领域技术人员所熟知，并且优选地，皮下或瘤内给予该组合物。本领域技术人员将会意识到，尽管超过一种途径可以用于给药，但是特定的途径比其另一途径可以提供更及时并且更有效的反应。局部或全身递送可以通过这样的给药或通过胃肠道导入实现，所述给药包括施用或灌注到体腔，吸入或吹入气雾剂，所述胃肠道导入包括肌肉内、静脉内、门内(intraportal)、肝内、腹膜、皮下或皮内给药。

[0464] 对于肠道外给药，双特异性融合蛋白可以悬浮或溶解在运载体内。通常优选无菌水性运载体，如水、缓冲的水、生理盐水或磷酸盐缓冲的生理盐水。此外，无菌非挥发油可以作为溶剂或悬浮介质。出于此种目的，可采用任何温和固定油，包括合成的甘油单酯或甘油二酯。此外，诸如油酸的脂肪酸可用于制备可注射组合物。还可以包括药学上可接受的辅助物质以接近生理条件，如pH调节和缓冲剂、张力调节剂、分散剂、悬浮剂、润湿剂、去污剂、防腐剂、局部麻醉和缓冲剂。

[0465] 在一些实施方式中，配置用于静脉内给予患者(例如，人)的药物组合物。静脉内给予的组合物通常是溶于无菌等渗水性缓冲液的溶液。如果需要，组合物也可含有增溶剂和局部麻醉剂(如利多卡因)来减轻注射部位的疼痛。通常，各成分单独提供或混合在一起以单位剂型的形式提供，例如作为标明活性物质含量的封闭的(例如，密封的)容器(如安瓿或药囊)中的冻干粉末或无水浓缩物。通过输液给予该组合物时，可用含有无菌药物级水或盐水的输液瓶分配该组合物。通过注射给予该组合物时，可提供一安瓿的无菌注射用水或盐水，以便在给药前与药物成分混合。

[0466] 旨在用于口服施用的组合物可以例如片剂、含片、锭剂、水性或油性悬浮液、可分散的粉末或颗粒剂、乳剂、硬胶囊或软胶囊剂、或糖浆剂或酏剂存在。这样的组合物还可以包括一种或多种成分，如甜味剂、调味剂、着色剂或防腐剂。片剂含有活性成分和生理上可接受赋形剂的混合物，所述生理上可接受的无毒赋形剂适合用于制备片剂。这样的赋形剂包括，例如，惰性稀释剂、造粒剂和崩解剂、结合剂和润滑剂。口服使用的制剂也可制备成硬明胶胶囊，其中活性成分与惰性固体稀释剂混合，或制备成软明胶胶囊，其中活性成分与水或油性介质混合。水性悬浮液包括与适用于制造水性悬浮液的一种或多种赋形剂混合的活

性物质。这样的赋形剂包括悬浮剂和分散剂或润湿剂。适用于通过加水制备水性悬浮液的可分散粉末和颗粒提供活性成分，其与分散剂或湿润剂、悬浮剂和一种或多种防腐剂混合。

[0467] 通过将活性成分悬浮于植物油(例如，花生油、橄榄油、芝麻油或椰子油)或诸如液体石蜡的矿物油中可以制备油性悬浮液。药物组合物也可以是水包油乳剂的形式。油相可以是植物油或矿物油或它们的混合。适合的乳化剂包括，例如，自然产生的树胶、自然产生的磷脂和酐。

[0468] 药物组合物可通过常规灭菌技术灭菌，或可经无菌过滤。无菌水性溶液可经包装用于原样(as is)使用，或经冻干，冻干的制剂在给予之前与无菌水性运载体合并。水性药物组合物的pH通常将在3和11之间，更优选是5和9或6和8之间，且最优选是7和8之间，如7至7.5。

[0469] 本文所提供的双特异性融合蛋白通常以这样的浓度存在于药物组合物，以此将单个剂量给予患者将递送治疗有效量。治疗有效量是导致明显患者受益的量，如受损组织可检测的修复或再生或组织受损症状的减轻。治疗有效量可以是足以在表3中所阐释的一个或多个动物模型中实现可检测的组织修复或再生的量的近似值。尽管如此，显而易见的是多种因素将会影响治疗有效量，包括使用的双特异性融合蛋白的活性；患者的年龄，体重，健康状况，性别和饮食；给药的时间和途径；排泄率；任何同时的治疗，如药物组合；以及正在进行治疗的患者中组织损伤的类型和严重性。最佳剂量可以使用常规测试建立，并且这样的方法为本领域所熟知。剂量通常从约0.5mg至约400mg双特异性融合蛋白/剂量(例如，0.5mg、1mg、2mg、5mg、10mg、50mg、100mg、200mg、300mg或400mg/剂量)。通常，优选提供这样剂量水平的组合物，所述剂量水平的范围是每天每千克体重约0.1mg至约100mg的剂量。在某些实施方式中，剂量单位形式包含约10mg至约100mg之间的双特异性融合蛋白。

[0470] 可以包装药物组合物，用于治疗或预防组织损伤(例如，用于治疗心肌梗塞或肾脏损伤)。包装的药物制备物包括这样的容器，其中装有治疗有效量的至少一种本文所述药物组合物以及指明包含的组合物将被用于在患者中治疗组织损伤(如，心肌梗塞或肾脏损伤)的说明书(例如，标签)。可以将药物组合物包装成多个单一剂量单位，其各自包含固定量的处于封闭包装的双特异性融合蛋白。或者，容器可能装有多个剂量的药物组合物。

[0471] 也同样包括包含本文所述一种或多种双特异性蛋白质的试剂盒以及使用该试剂治疗组织损伤的说明书。

[0472] 治疗方法

[0473] 可以将药物组合物给予患者(优选哺乳动物，如牛、猪、马、鸡、猫、狗，或更优选的人)以在患者中治疗病理组织损伤。在本发明的上下文中，术语“治疗”包括预防性和治疗性给药。在预防性应用中，为了预防、延迟或降低组织损伤的严重性，将本文所述药物组合物给予疑似或还处于产生病理组织损伤风险中的患者。在治疗性应用中，治疗的进行是为了降低病理组织损伤的严重性或在损伤后再生组织。在一些实施方式中，药物组合物可以与其它治疗性组合物联合给予。

[0474] 代表性的病理组织损伤包括心脏组织损伤(例如，与心肌梗塞相关联的损伤)，肾脏组织损伤和局部中风后的组织损伤(例如，大脑局部缺血，也称为脑缺血，重症肢体局部缺血或其它局部缺血)。在一些实施方式中，药物组合物可以用于保护组织免受损伤和/或在组织或器官受损后再生组织和/或血液供给。

[0475] 在因急性心肌梗塞(AMI)入院的患者中,约20%的患者产生急性肾脏损伤(AKI),与不利的长期结果有关,包括永久性肾脏损伤和晚期肾病。在一些实施方式中,药物组合物可以用于预防或保护组织免受损伤和/或在急性心肌梗塞(AMI)带来的肾脏损伤或组织损伤后再生组织和/或血液供给。

[0476] 在一些实施方式中,可以给予药物组合物以预防、延迟、降低或治疗自身免疫疾病,例如,全身性红斑狼疮(SLE),也称狼疮。SLE是一种自身免疫疾病,其中许多组织或系统受到攻击并且发炎,例如,关节、皮肤、肝脏、肾脏、血细胞、心脏、肺、神经系统、血管。免疫系统针对自身产生抗体,特别是针对核蛋白和DNA。在一些实施方式中,可以将药物组合物给予有需要的对象中以保护组织免受损伤并在损伤后再生组织。在一些实施方式中,药物组合物可以与现有的免疫抑制或其它治疗联合给予。

[0477] 在一些实施方式中,可以将药物组合物给予有需要的对象中以预防、延迟、降低或治疗I型糖尿病。在I型糖尿病中,身体的自身免疫系统破坏胰腺中产生胰岛素的β细胞。在一些实施方式中,可以将药物组合物给予有需要的对象中以再生β细胞。在一些实施方式中,药物组合物可以与本领域已知的I型糖尿病治疗联合给予。

[0478] 在一些实施方式中,可以将药物组合物给予有需要的对象中以预防、延迟、降低或治疗糖尿病肾病或足细胞相关紊乱。糖尿病肾病(也称为Kimmelstiel-Wilson综合征,或结节性糖尿病性肾小球硬化症或毛细血管内肾小球性肾炎)是糖尿病的三大主要并发症之一,并且一直是血液透析开始的主要原因,并且是西方世界中慢性肾衰竭和晚期肾病最常见的原因。足细胞相关疾病或紊乱可以是由于足细胞损伤(由于机械应激、局部缺血、氧气供应缺乏、有毒物质、内分泌紊乱、感染、造影剂、机械创伤、细胞毒性剂、药物、炎症、辐射、感染、免疫系统功能障碍、遗传疾病、器官衰竭、器官移植或尿路疾病)。在一些实施方式中,可以将药物组合物给予有需要的对象中以治疗糖尿病肾病或或足细胞相关紊乱。在一些实施方式中,药物组合物可以与本领域已知的糖尿病肾病治疗联合给予。

[0479] 在一些实施方式中,可以将药物组合物给予有需要的对象中以预防、延迟、降低或治疗组织或器官退化。例如,药物组合物可用于治疗脑、脊髓或神经变性,如阿尔茨海默病、帕金森病、多发性硬化症或肌萎缩性侧索硬化症(ALS),也称为卢伽雷氏病。在一些实施方式中,药物组合物可以与本领域现有的治疗联合给予。

[0480] 在一些实施方式中,可以将药物组合物给予有需要的对象中以预防、延迟、降低或治疗骨骼和/或软骨相关疾病。在一些实施方式中,药物组合物可以用于再生骨骼和/或软骨组织。药物组合物可以与本领域现有的治疗联合给予。

[0481] 可以使用各种已知递送系统中的任一种来给予双特异性融合蛋白,包括例如在包封在脂质体、微粒、微胶囊中,能够表达双特异性融合蛋白的重组细胞,受体介导,或逆转录病毒或其他核酸载体。可通过任何便捷途径,例如输注或推注,通过上皮或粘膜皮肤衬里(如口腔粘膜、直肠和肠粘膜等)吸收给予双特异性融合蛋白,并可与其它生物活性剂一起给药。给药可以是全身给药或局部给药。此外,可能需要将双特异性融合蛋白通过任何合适的途径导入中枢神经系统,包括心室内和鞘内注射;心室内注射可由心室内导管促进,其例如与储器(如奥马耶储器)相连。也可采用经肺给药,例如利用吸入器或喷雾器,以及用雾化剂配制药物。

[0482] 在一些实施方式中,可能需要将本发明的双特异性融合蛋白局部给予需要治疗的

区域；例如，这可通过以下方式来实现：手术期间的局部输注、局部施涂（例如，手术后与伤口敷料联用），通过注射，通过导管的方式，通过栓剂的方式，通过植入物的方式，所述植入物是多孔性、非多孔性或明胶状材料，包括膜，如唾液酸膜（sialastic membrane），或者纤维。在另一实施方式中，可以使用诸如脂质体的囊泡递送双特异性融合蛋白。同样在另一实施方式中，在控释系统中递送双特异性融合蛋白；例如，可以将这样的控释系统防止在或靠近治疗目标（例如，经历或处于组织损伤风险的身体器官）。这样递送系统的应用为本领域普通技术人员熟知。

[0483] 在一些实施方式中，由于本文提供的双特异性融合蛋白招募干细胞至受损组织的能力，其能够有效治疗至少部分病理组织损伤。在某些情况中，患者中可能残留足够的干细胞（例如，残留的心脏干细胞）。然而，在某些实施方式中，其可能受益于共给予干细胞（例如，骨髓衍生的自体同源干细胞）。可以在双特异性融合蛋白之前或之后给予这样的干细胞，或者可以同时给予（在相同的药物组合物中或在分开的组合物中）。

[0484] 在一些实施方式中，本文提供的双特异性蛋白质有效增强组织存活。在一些实施方式中，可以给予双特异性治疗性蛋白质，并且靶向特定组织或器官（例如，心脏）。然后，经由靶向结构域和与组织相关的靶细胞的结合，双特异性蛋白质可以在特定组织或器官（例如，相对于其它器官的心脏）中累积。一旦结合靶分子，双特异性融合蛋白可以从靶分子脱离，离开并且与靶分子，组织的不同细胞的生长因子受体以旁分泌样的方式再结合（例如，受损细胞或“处于风险的”细胞）。

[0485] 如上所述，优选剂量取决于本领域已知的特定因素，但是通常在约0.5mg至约400mg双特异性融合蛋白/剂量（例如，10mg、50mg、100mg、200mg、300mg或400mg/剂量）的范围。可以将双特异性融合蛋白的剂量（如上所述的药物组合物内）每小时、每天、每周、每月或每年1次或多次（例如，每小时、每天、每周、每月或每年2、4、5、6、7、8、9、10、11或12次）治疗性地给予患者。更普遍地，每天或每周给予包含范围在约0.1mg至约100mg每千克体重的双特异性融合蛋白的单一剂量。

[0486] 在其他实施方式中，可以将下述剂量的包含双特异性融合蛋白的药物组合物给予患者，所述剂量的范围从约0.1mg每周至约2500mg每周、约0.1mg每周至约10mg每周、约1mg每周至约100mg每周、约10mg每周至约500mg每周、约100mg每周至约2500mg每周、约10mg每周至约100mg每周或约100mg每周至约1000mg每周。或者，可以下述剂量将包括双特异性融合蛋白的药物组合物给药，所述剂量范围从每隔一天约0.1mg至每隔一天约500mg、每隔一天约1mg至每隔一天约75mg、每隔一天约10mg至每隔一天约50mg、或每隔一天约20mg至每隔一天约40mg。包括双特异性融合蛋白的药物组合物还可以下述剂量给药，所述剂量范围从每周三次约0.1mg至每周三次约100mg、每周三次约1mg至每周三次约75mg、每周三次约10mg至每周三次约50mg、或每周三次约20mg至每周三次约40mg。

[0487] 在一些实施方式中，将包括双特异性融合蛋白的药物组合物连续给予哺乳动物（例如，人）1、2、3或4小时；一天1、2、3或4次；每隔一天或每隔三天、四天、五天或六天；一周1、2、3、4、5、6、7、8、9或10次；每双周；每月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或30次；每两月；每六个月1、2、3、4、5、6、7、8、9或10次；每年1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20次；或每两年。应当理解的是，包括双特异性融合蛋白的药物组合物在治疗方案期间可以（但是不是必需）不

同的频率给予。

[0488] 联合治疗

[0489] 在一些实施方式中,本发明的蛋白质可与一种或多种其它化合物或治疗剂联合给予。例如,本发明的一种或多种蛋白质可与一种或多种治疗化合物联合共同给予。组合治疗可以包括同时或交替给药。

[0490] 通过说明的方式,而非限制性方式提供以下实施例。除非另有指明,否则所有试剂和溶剂是标准商业级的,并无需进一步纯化即可使用。使用常规修饰,下述实施例中提供的方法可能因本领域普通技术人员而不同以制造和使用本发明范围内的其它双特异性融合蛋白和药物组合物。

[0491] 本发明的一些方面涉及双特异性蛋白质,其包括(a)靶向结构域,其具有对与组织细胞外表面相关联的靶分子的结合特异性,以及(b)工程改造的激活剂结构域,其具有对与组织细胞表面相关联的受体的结合特异性,其中,工程改造的激活剂结构域具有野生型激活剂结构域氨基酸序列经修饰的氨基酸序列,其中,工程改造的激活剂结构域使受体的活性相对野生型激活剂结构域降低,并且其中,据受体或下游效应物分子的磷酸化作用测定,相较于不包含靶分子的细胞,双特异性蛋白质对包含靶分子的细胞展现出至少两倍强的受体激活。

[0492] 在一些实施方式中,工程改造的激活剂结构域包括野生型氨基酸序列,其经修饰以包括位于N-和/或C-末端的附加氨基酸序列、缺失、取代、添加、或其组合。工程改造的激活剂结构域可以包括融合非免疫原性蛋白的野生型激活剂结构域。工程改造的激活剂结构域可以包括融合非免疫原性蛋白的野生型激活剂结构域氨基酸序列经修饰的氨基酸序列。

[0493] 在一些实施方式中,工程改造的激活剂结构域使受体的活性相对于野生型激活剂结构域降低至少3.5倍。在一些实施方式中,据AKT的磷酸化作用测定,相较于不包含靶分子的细胞,双特异性蛋白质对包含靶分子的细胞展现出至少强两倍的受体激活。

[0494] 在一些实施方式中,双特异性蛋白质还可以包括半衰期调节剂,其中半衰期调节剂增加双特异性蛋白质的半衰期。在一些实施方式中,半衰期调节剂包括人血清白蛋白序列、Fc、scFc、白蛋白结合结构域、PAS化、人 α -甲胎蛋白、或其变体

[0495] 在一些实施方式中,工程改造的激活剂结构域对生长因子受体具有结合亲和力。在一些实施方式中,工程改造的激活剂结构域和靶向结构域是重组融合的。在一些实施方式中,工程改造的激活剂结构域和靶向结构域是化学偶联的。

[0496] 在一些实施方式中,双特异性融合蛋白促进组织再生、细胞存活、细胞分化,抑制凋亡,诱导细胞增殖,促进细胞生长,促进干细胞运动性,促进干细胞分化,预防细胞损伤,和/或促进血管新生。在一些实施方式中,组织是心脏组织,肾组织,骨,软骨,关节,皮肤,肝组织,胰腺组织,血细胞,肺组织,脑组织和神经组织。

[0497] 在一些实施方式中,工程改造的激活剂结构域包括生长因子。在一些实施方式中,生长因子包括IGF-1、NRG、或其变体。在一些实施方式中,靶向结构域包括膜联蛋白A5或其变体。在一些实施方式中,膜联蛋白A5包含SEQ ID NO:1-4或122中任一项所列的氨基酸序列。在一些实施方式中,工程改造的激活剂结构域包括IGF-1(LR3-Y31A)。在一些实施方式中,工程改造的激活剂结构域包括SEQ ID NO:18、19、23、24、28、29或120中任一项所示的氨基酸序列。

[0498] 在一些实施方式中，半衰期调节剂是人血清白蛋白或其变体。在一些实施方式中，人血清白蛋白包括SEQ ID NO:54-56或124中任一项所示的氨基酸序列。在一些实施方式中，半衰期调节剂包括Fc或其变体。在一些实施方式中，Fc或其变体包括SEQ ID NO:53中所示氨基酸序列。

[0499] 在一些实施方式中，双特异性蛋白质还包括将工程改造的激活剂结构域与半衰期调节剂连接的连接物，以及将半衰期调节剂与靶向结构域连接的连接物。在一些实施方式中，接头包括SEQ ID NO:60-62或126-127中任一项所示的氨基酸序列。

[0500] 在一些实施方式中，工程改造的激活剂结构域经由肽键连接靶向结构域的氨基末端，或者激活剂结构域经由肽键连接靶向结构域的羧基末端。

[0501] 在一些实施方式中，靶向结构域具有对磷脂酰丝氨酸的结合特异性。在一些实施方式中，靶向结构域具有对与足蛋白相关联分子的结合特异性。

[0502] 本发明的方面涉及双特异性蛋白质，其包括：(1) 激活剂结构域，该激活剂结构域包括生长因子，(2) 靶向结构域，该靶向结构域包括在受损细胞外表面结合磷脂酰丝氨酸的多肽，其中双特异性蛋白质在受损细胞中具有的半最大有效浓度($EC50_{\text{受损}}$)比其在健康细胞($EC50_{\text{健康}}$)中的低。在一些实施方式中，受损细胞是正在进行细胞凋亡或坏死的细胞。在一些实施方式中，激活剂结构域包括IGF-1的变体。在一些实施方式中，靶向结构域包括人膜联蛋白A5或其变体。在一些实施方式中，激活剂结构域包括IGF-1的变体，而靶向结构域包括人膜联蛋白A5或其变体。在一些实施方式中，IGF-1变体具有至少10:1的 $EC50_{\text{健康}}/EC50_{\text{受损}}$ 比。在一些实施方式中，IGF-1变体在结合IGF-1受体后诱导生存信号转导。在一些实施方式中，IGF-1变体诱导AKT的磷酸化作用。在一些实施方式中，膜联蛋白A5具有SEQ ID NO:1-4或122中任一项所示的氨基酸序列。在一些实施方式中，IGF-1变体和膜联蛋白A5或其变体通过肽键共价连接以形成单个多肽。在一些实施方式中，IGF-1的变体和膜联蛋白A5或其变体通过肽键共价连接肽接头以形成单个多肽。在一些实施方式中，IGF-1变体连接肽接头的氨基末端，而膜联蛋白A5或其变体连接肽接头的羧基末端。在一些实施方式中，IGF-1变体连接肽接头的羧基末端，而膜联蛋白A5或其变体连接肽接头的氨基末端。在一些实施方式中，双特异性蛋白质还包括位于IGF-1变体和肽接头之间的肽连接物，以及位于膜联蛋白A5或其变体和肽接头之间的肽连接物。

[0503] 本发明的方面涉及双特异性蛋白质，其包括(1) 激活剂结构域，其中，激活剂结构域包括IGF-1的变体；以及(2) 靶向结构域，其中，靶向结构域包括膜联蛋白A5或其变体，其中，膜联蛋白A5或其变体结合位于受损组织内细胞外表面的磷脂酰丝氨酸，其中，双特异性蛋白质在受损组织中所具有的半最大有效浓度($EC50_{\text{受损}}$)比在其健康组织($EC50_{\text{健康}}$)中的低。在一些实施方式中，受损组织是局部缺血组织。在一些实施方式中，IGF-1变体具有至少10:1的 $EC50_{\text{健康}}/EC50_{\text{受损}}$ 比。在一些实施方式中，IGF-1变体具有SEQ ID NO:10-30或120中任一项所示的氨基酸序列。在一些实施方式中，IGF-1变体在结合IGF-1受体后诱导生存信号转导。在一些实施方式中，IGF-1变体诱导AKT的磷酸化作用。在一些实施方式中，膜联蛋白A5具有SEQ ID NO:1-4或122中任一项所示的氨基酸序列。在一些实施方式中，IGF-1变体和膜联蛋白A5或其变体通过肽键共价连接以形成单个多肽。在一些实施方式中，IGF-1的变体和膜联蛋白A5或其变体通过肽键共价连接肽接头以形成单个多肽。在一些实施方式中，IGF-1变体连接肽接头的氨基末端，而膜联蛋白A5或其变体连接肽接头的羧基末端。在一些实施方式中，

中,IGF-1变体连接肽接头的羧基末端,而膜联蛋白A5或其变体连接肽接头的氨基末端。在一些实施方式中,双特异性蛋白质还包括位于IGF-1变体和肽接头之间的肽连接物,以及位于膜联蛋白A5或其变体和肽接头之间的肽连接物。

[0504] 在一些实施方式中,双特异性蛋白质还包括肽接头。在一些实施方式中,肽接头是半衰期调节剂。在一些实施方式中,半衰期调节剂是人血清白蛋白或其变体。在一些实施方式中,半衰期调节剂是Fc片段或其变体。

[0505] 在一些实施方式中,人血清白蛋白或其变体具有SEQ ID NO:54-56或124中任一项所示的氨基酸序列。在一些实施方式中,Fc片段具有SEQ ID NO:53所示的氨基酸序列。在一些实施方式中,肽连接物具有SEQ ID NO:60-62或126-127中任一项所示的氨基酸序列。

[0506] 本发明的方面涉及双特异性蛋白质,其包括:(1) IGF-1变体,其包括SEQ ID NO:18、19、23、24、28、29或120中任一项所示氨基酸序列,以及(2) 膜联蛋白A5或其变体,其包括SEQ ID NO:1-4或122中任选一项所示氨基酸序列。在一些实施方式中,双特异性蛋白质还包括这样的人血清白蛋白或其变体,其包括SEQ ID NO:54-56或124中任一项所示的氨基酸序列。在一些实施方式中,人血清白蛋白或其变体连接膜联蛋白A5或其变体的C-末端,以及IGF-1变体的N-末端。在一些实施方式中,双特异性蛋白质还包括将人血清白蛋白或其变体的N-末端连接到膜联蛋白A5或其变体的C-末端的肽连接物,以及将人血清白蛋白或其变体的C-末端连接到IGF-1变体的N-末端的肽连接物。在一些实施方式中,肽连接物包括SEQ ID NO:60-62或126-127中任一项所示的氨基酸序列。

[0507] 本发明的方面涉及包括本文所述双特异性蛋白质的药物组合物。

[0508] 本发明的方面涉及编码本文所述双特异性蛋白质的分离重组核酸序列。

[0509] 本发明的方面涉及具有SEQ ID NO:84的工程改造的蛋白质。本发明的方面涉及具有SEQ ID NO:102的分离重组核酸。本发明的方面涉及包括具有SEQ ID NO:84的双特异性融合蛋白的药物组合物。

[0510] 本发明的方面涉及具有SEQ ID NO:118的工程改造的蛋白质。本发明的方面涉及具有SEQ ID NO:119的分离重组核酸。本发明的方面涉及包括具有SEQ ID NO:118的双特异性融合蛋白的药物组合物。

[0511] 本发明的方面涉及一种在对象中促进组织再生或存活的方法,该方法包括:(a) 提供具有本文所述靶向结构域的双特异性蛋白质;和(b) 在有需要的患者中给予治疗有效量的双特异性蛋白质,以此靶向结构域使双特异性融合蛋白靶向组织细胞,并且以此在激活剂结构域暴露于细胞表面的生长因子受体后,使激活剂结构域特异性地激活生长因子受体,以促进组织再生。

[0512] 本发明的方面涉及一种在对象中促进组织再生或存活的方法,该方法包括:(a) 提供具有本文所述靶向结构域的双特异性蛋白质;和(b) 在有需要的患者中给予治疗有效量的双特异性蛋白质,以此靶向结构域使双特异性融合蛋白靶向组织的第一细胞,并且以此在激活剂结构域暴露于第二细胞表面的生长因子受体后,使激活剂结构域特异性地激活生长因子受体,以促进组织再生。

[0513] 在一些实施方式中,靶向结构域和激活剂结构域结合与组织的相同细胞表面相关联的分子。在一些实施方式中,靶向结构域和激活剂结构域结合与组织的不同细胞表面相关联的分子。在一些实施方式中,组织是心脏组织,肾组织,骨,软骨,关节,皮肤,肝组织,胰

腺组织,血细胞,肺组织,脑组织或神经组织。

[0514] 本发明的方面涉及一种在对象中促进组织再生或存活的方法,该方法包括: (a) 提供具有本文所述靶向结构域的双特异性蛋白质;并且 (b) 在有需要的患者中给予治疗有效量的双特异性蛋白质,以此膜联蛋白A5或其变体使双特异性融合蛋白靶向组织细胞,其中,细胞在质膜外部小叶表达磷脂酰丝氨酸,并且以此在IGF-1变体暴露于细胞表面的IGF-1受体后,IGF-1变体特异性地激活IGF-1受体,以促进组织再生。

[0515] 本发明的方面涉及在对象中促进组织再生或存活的方法,该方法包括 (a) 提供具有本文所述靶向结构域的双特异性蛋白质;并且 (b) 在有需要的患者中给予治疗有效量的双特异性蛋白质,以此膜联蛋白A5或其变体使双特异性融合蛋白靶向组织的第一细胞,其中,细胞在质膜外部小叶表达磷脂酰丝氨酸,并且以此在IGF-1变体暴露于第二细胞表面的IGF-1受体后,IGF-1变体特异性地激活IGF-1受体,以促进组织再生。

[0516] 在一些实施方式中,膜联蛋白A5或其变体以及IGF-1变体结合与细胞的相同组织表面相关联的不同分子。在一些实施方式中,膜联蛋白A5或其变体以及IGF-1变体结合与组织的不同细胞表面相关联的不同分子。

[0517] 本发明的方面涉及一种在对象中促进组织再生或存活的方法,该方法包括: (a) 提供具有本文所述靶向结构域的双特异性蛋白质,并且 (b) 给予有需要的患者治疗有效量的双特异性蛋白质,其中,双特异性蛋白质结合组织细胞质膜外部小叶的磷脂酰丝氨酸,以及组织细胞表面的IGF-1生长因子受体。

[0518] 本发明的方面涉及一种在对象中促进组织再生或存活的方法,该方法包括: (a) 提供具有本文所述靶向结构域的双特异性蛋白质;并且 (b) 给予有需要的患者治疗有效量的双特异性蛋白质,其中,双特异性蛋白质结合组织的第一细胞质膜外部小叶的磷脂酰丝氨酸,以及组织的第二细胞表面的IGF-1生长因子受体。

[0519] 在一些实施方式中,双特异性蛋白质结合与相同组织细胞的表面相关联的分子。在其它一些实施方式中,双特异性蛋白质结合与不同组织细胞的表面相关联的分子。

[0520] 在一些实施方式中,双特异性蛋白质包括人膜联蛋白A5非内化变体的氨基酸序列,并且其中,相较于包括野生型人膜联蛋白A5氨基酸序列的双特异性蛋白质,该双特异性蛋白质具有延长的半衰期。

[0521] 在一些实施方式中,双特异性蛋白质包括具有SEQ ID NO:4中所示的氨基酸序列的靶向结构域。

[0522] 在一些实施方式中,双特异性蛋白质其包括SEQ ID NO:67、70、73-86、108、110、116或118中任一项所示的氨基酸序列。

实施例

[0523] 下述实施例不应理解为对本公开范围所构成的限定。

[0524] 实施例1. 双特异性融合蛋白可以经工程改造以具有对健康细胞减弱的效力。

[0525] 为了能够靶向/针对受损细胞的选择性,IGF1经工程改造以对健康细胞具有相对于wt IGF-1降低的效力(图2A-2B)。效力被定义为实现pAKT信号转导的半最大水平所需的浓度(pAKT EC50)。在一些实施方式中,使用IGF-1(LR3)变体工程改造IGF1工程改造的变体,所述IGF-1(LR3)变体包含13个氨基酸的N-末端延伸以及在针对位置3谷氨酸的精氨酸

取代。添加用精氨酸取代谷氨酸是为了防止包括IGF-1变体的融合蛋白与IGF结合蛋白(IGFBP)的结合，并且并不显著影响效力(参见，图2A-2B, wt IGF1的EC50是 1.22 ± 0.74 ，相比IGF-1(LR3)的EC50是 0.73 ± 0.35)。

[0526] 6倍或更多的效力减弱是如此实现的：

[0527] 1. 取代氨基酸。在一些实施方式中，酪氨酸残基可以被取代。在一些实施方式中，氨基酸24和/或31可以被取代(例如，包含Y31A取代的SGF740和733，包含Y24L取代的SGF 739 (SEQ ID NO:83) 和732 (SEQ ID NO:81)，包含Y60L取代的SGF 728 (SEQ ID NO:77) 和741 (SEQ ID NO:85)，或包含Y24L和Y31A取代的SGF 731)。

[0528] 2. 删除氨基酸。在一些实施方式中，可以删除对应于蛋白质水解作用位点的氨基酸序列(例如，KR、RR)或K和/或R残基。在一些实施方式中，可以删除C-末端氨基酸，如K68、S69、A70。在一些实施方式中，可以删除氨基酸R37。在一些实施方式中，可以删除C-末端氨基酸，如K68、S69、A70，以及氨基酸R37(例如，包含残基R37缺失的SGF 602，以及包含残基R37缺失和3个C-末端IGF-1残基(K68, S69, A70)缺失的SGF 683、727、606、743和730)。在一些实施方式中，可以删除位于C-末端的多达3个、多达4个、多达5个、多达6个、多达7个、多达8个、多达9个、多达10个氨基酸。

[0529] 3. 将肽(本文也称之为连接物)添加(或融合)到融合蛋白的蛋白质结构域(例如，经由7个或15个氨基酸接头使IGF-1(LR3)融合人血清白蛋白(mHSA)变体的SGF 703、711、713、729、716、704)。在一些实施方式中，接头可以是2个氨基酸长、3个氨基酸长、4个氨基酸长、5个氨基酸长、6个氨基酸长、7个氨基酸长、8个氨基酸长、9个氨基酸长、10个氨基酸长。在一些实施方式中，接头可以是至少2个氨基酸长、至少5个氨基酸长、至少10个氨基酸长、至少15个氨基酸长、至少20个氨基酸长、至少25个氨基酸长、至少30个氨基酸长、至少35个氨基酸长、至少40个氨基酸长。

[0530] 在多能干细胞衍生的心肌细胞(来自细胞动态国际公司(CDI)的iPSC-衍生的心肌细胞)中测量双特异性蛋白质，并且通过磷酸化的AKT(pAKT)的累积对信号转导进行测量。

[0531] 在第0天，根据标准方案将心肌细胞解冻，并且以 1.5×10^4 细胞/孔接种到铺板培养基中(Plating Media)(CDI目录号CMM-100-110-005)。

[0532] 在第2天，上下抽吸培养基若干次以移出死亡细胞，并且用 $100 \mu\text{L}$ /孔预热维持培养基(CDI目录号CMM-100-120-001)替换。每隔一天更换维持培养基。

[0533] 在第14天，制备低血清培养基(无葡萄糖DMEM(英杰公司(Invitrogen)11966-025)、 1mM 丙酮酸钠、 10mM 半乳糖、 0.5% 血清(CDI提供)、 0.7mM CaCl₂)。吸取维持培养基，并且用 $100 \mu\text{L}$ /孔低血清培养基替换。

[0534] 第15天，制备裂解溶液[完整M-PER裂解缓冲液:M-PER裂解缓冲液(皮尔斯公司(Pierce)/赛默飞世尔公司(ThermoScientific)目录号78501)+ 150mM NaCl+蛋白酶(罗氏公司(Roche)完整型)和磷酸酶抑制性(罗氏公司PhosSTOP)]，并且在含 0.7mM CaCl₂的低血清培养基中制备双特异性蛋白质。制备不同的系列稀释物(1:7稀释物)。通过将 $25 \mu\text{L}$ /孔稀释的双特异性蛋白质添加到现存的 $100 \mu\text{L}$ 的各孔中，然后轻拍平板10秒钟以混合，用双特异性蛋白质的稀释溶液刺激细胞。细胞在 37°C 孵育10分钟。通过将培养基从各孔中移除来停止刺激。使用 $200 \mu\text{L}$ /孔冷PBS洗涤细胞，并且倒置轻拍平板以去除多余的PBS。细胞在 $25 \mu\text{L}$ /孔完全M-PER裂解缓冲液中裂解。用箔片封板条密封平板，然后在定轨摇床上 4°C 放置30

分钟。然后将平板储存在-80°C直到用于ELISA。

[0535] 对于pAkt ELISA, 在第0天, 用抗-Akt捕获抗体(克隆SKB1, 密理博(Millipore) 05-591)包覆384-孔的白色平板(LIA高结合, 莱娜第一生化公司(Greiner Bio-One), 781074)。抗-Akt捕获Ab在PBS中1:250稀释, 添加20μL/孔, 并且在室温过夜密封平板。

[0536] 在第1天, 在4°C解冻细胞裂解样品。使用平板洗涤机以80μL/孔0.05%吐温20/PBS洗涤3次ELISA平板, 并且用50μL/孔2%BSA/PBS在室温封闭ELISA平板1小时。在96孔板(无结合表面板, 康宁公司(Corning) 3641)中的MPER缓冲液中制备重组人活性Akt标准曲线。过1:200稀释(9系列1:2稀释)制备rh活性Akt1/PKB α (密理博公司14-276)储液的最高浓度(9165ng/ml)。阻断后, 用80μL/孔0.05%吐温20/PBS洗涤ELISA平板3次。将20μL/孔样品和标准品添加到ELISA平板, 并在室温下孵育2小时。用80μL/孔0.05%吐温20/PBS洗涤ELISA平板3次。添加20μL/孔的检测抗体(在2%BSA/0.1%吐温20/PBS中1:1000稀释的CST 4060), 并在室温孵育1.5小时。用80μL/孔0.05%吐温20/PBS洗涤ELISA平板3次。添加20μL/孔的二抗(抗兔IgG HRP, 在2%BSA/0.1%吐温20/PBS中1:1000稀释的CST 7074), 并在摇床上室温孵育30分钟(避光)。用80μL/孔0.05%吐温20/PBS洗涤ELISA平板3次。20μL/孔SuperSignal ELISA Pico化学发光底物(皮尔斯公司/赛默飞世尔公司)与增强剂以等份混合, 并且添加过氧化氢底物, 然后将平板摇晃1分钟, 并且读取发光。

[0537] 剂量反应曲线拟合至3参数EC50活化模型, 并且在wt IGF-1和双特异性蛋白质(SGF 649、711、683、713、729、716、727、606、743、730、740、733、739、732、728、741、731、757)以及未靶向的对照蛋白质(688、703、704、602, 图2A-2B)之间比较计算的EC50。由融合蛋白和wt IGF-1剂量效应曲线之间拟合EC50值的比($EC50_{\text{融合}}/EC50_{\text{wt IGF1}}$)获取针对各融合蛋白计算的效力减弱。

[0538] 实施例2: 靶向的、效力减弱的双特异性融合蛋白相较于不具有靶分子的细胞在包含靶分子的细胞中选择性地发出信号(即, 展现效力移位)。

[0539] 在健康(其不在细胞表面显示PS)与受损(其在细胞表面显示PS)多能干细胞衍生的心肌细胞(细胞动态国际公司)中测量磷脂酰丝氨酸(PS)靶向的、效力减弱的双特异性蛋白质在包含靶分子PS的细胞上选择性发送信号的能力, 并且通过磷酸化的AKT的累积对信号转导进行定量(图3A、3B和3C)。

[0540] 磷脂酰丝氨酸(PS)-靶向的、效力减弱的双特异性蛋白质(相较于wt IGF-1具有6倍或更大的效力减弱, (例如, SGF 743、741、740、739、733、732、731、730、729、728、727、716、713、711、606, 分别为SEQ ID NO:86、85、84、83、82、81、80、79、78、77、76、75、74、73和70)针对未靶向的效力减弱的融合蛋白(相较于wt IGF-1具有6倍或更大的效力减弱, 例如, 704、602、703, 分别为SEQ ID NO:107、66和68)、未靶向的效力未减弱的融合蛋白(相较于wt IGF-1具有2倍或更少的减弱, 例如SGF 688, SEQ ID NO:72)、以及相较于wt IGF-1具有2倍或更少的减弱的靶向的效力未减弱的(例如, SGF 649, SEQ ID NO:71)进行比较。参见, 例如, 针对蛋白质鉴定的图1B, 以及针对图表显示效力减弱相对于wt IGF-1的图2A-2B。

[0541] 在第0天, 根据标准方案将心肌细胞解冻, 并且以1.5e4细胞/孔接种到接种介质(CDI目录号CMM-100-110-005)。

[0542] 在第2天, 上下抽吸培养基若干次以移出死亡细胞, 并且用100μL/孔预热维持培养基(CDI目录号CMM-100-120-001)替换。每隔一天更换维持培养基。

[0543] 在第14天,制备低血清培养基(无葡萄糖DMEM(英杰公司(Invitrogen)11966-025)、1mM丙酮酸钠、10mM半乳糖、0.5%血清(CDI提供)、0.7mM CaCl₂)。用12.5μg/ml多柔比星制备低血清培养基。对于受损的/处理的细胞,吸取维持培养基,并且用100μL/孔低血清培养基+12.5μg/ml多柔比星替换。对于受损的/处理的细胞,吸取维持培养基,并且用100μL/孔低血清培养基替换。

[0544] 第15天,制备裂解溶液[完整M-PER裂解缓冲液:M-PER裂解缓冲液(皮尔斯公司(Pierce)/赛默飞世尔公司(ThermoScientific)目录号78501)+150mM NaCl+蛋白酶(罗氏公司完整型)和磷酸酶抑制性(罗氏公司PhosSTOP)]],并且在含0.7mM CaCl₂的低血清培养基中制备双特异性蛋白质。制备不同的系列稀释物(1:7稀释物)。用双特异性蛋白质的稀释溶液刺激细胞,其通过将25μL/孔稀释的双特异性蛋白质添加到现存的100μL的各孔中,然后拍打平板10秒钟以混合。细胞在37°C孵育10分钟。通过将培养基从各孔中移除来停止刺激。使用200μL/孔冷PBS洗涤细胞,并且倒置轻拍平板以去除多余的PBS。细胞在25μL/孔完全M-PER裂解缓冲液中裂解。用箔片封板条密封平板,然后在定轨摇床上4°C放置30分钟。然后将平板储存在-80°C直到用于ELISA。

[0545] 对于pAKT ELISA,在第0天,用抗-Akt捕获抗体(克隆SKB1,密理博(Millipore)05-591)包覆384-孔的白色平板(LIA高结合,莱娜第一生化公司(Greiner Bio-One),781074)。抗-Akt捕获Ab在PBS中1:250稀释,添加20μL/孔,并且在室温过夜密封平板。

[0546] 在第1天,在4°C解冻细胞裂解样品。使用平板洗涤机以80μL/孔0.05%吐温20/PBS洗涤3次ELISA平板,并且用50μL/孔2%BSA/PBS在室温封闭ELISA平板1小时。在96孔板(无结合表面板,康宁公司3641)中的MPER缓冲液中制备重组人活性Akt标准曲线。过1:200稀释(9系列1:2稀释)制备rh活性Akt1/PKBα(密理博公司14-276)储液的最高浓度(9165ng/ml)。阻断后,用80μL/孔0.05%吐温20/PBS洗涤ELISA平板3次。将20μL/孔样品和标准品添加到ELISA平板,并在室温下孵育2小时。用80μL/孔0.05%吐温20/PBS洗涤ELISA平板3次。添加20μL/孔的检测抗体(在2%BSA/0.1%Tween20/PBS中1:1000稀释的CST 4060),并在室温孵育1.5小时。用80μL/孔0.05%吐温20/PBS洗涤ELISA平板3次。添加20μL/孔的二抗(抗兔IgG HRP,在2%BSA/0.1%吐温20/PBS中1:1000稀释的CST 7074),并在摇床上室温孵育30分钟(避光)。用80μL/孔0.05%吐温20/PBS洗涤ELISA平板3次。20μL/孔SuperSignal ELISA Pico化学发光底物(皮尔斯公司/赛默飞世尔公司)与增强剂以等份混合,并且添加过氧化氢底物,然后将平板摇晃1分钟,并且读取发光。

[0547] 在健康的和受损的心肌细胞中比较剂量反应曲线(图3A)。随后将剂量反应曲线拟合至三参数EC50活化模型,并且在健康(圆形,蓝色)和受损(方块,红色)心肌细胞之间比较计算的EC50。

[0548] 图3B显示了针对21个双特异性蛋白质在对数标度上的效力移位。拟合的EC50值表示健康(实心圆圈)和受损(实心三角形)心肌细胞。误差线表示对于参数的95%置信区间。由健康和受损剂量效应曲线之间拟合EC50值的比(EC50健康/EC50受损)获取针对各双特异性蛋白质计算的效力移位。标注效力移位,并以受损情况信号转导中增长倍数表示。

[0549] 图3C是这样的图表(以基于10log的nM浓度为函数的信号转导),其描述了在健康和受损心肌细胞中使用治疗性双特异性蛋白质776(sc776)和相应的未靶向的对照蛋白777(sc777)的pAKT(蛋白激酶B)剂量反应。

[0550] 如图3A,精明生长因子sc776以及未靶向的对照sc777)的效力在多能干细胞衍生的心肌细胞中测量,并且通过磷酸化Akt的累积来定量信号转导。将健康和受损情况中的剂量反应曲线拟合至三参数EC50活化模型。分别针对健康(蓝色,填充的圆形)和受损(红色,填充的方块)情况描述对于sc776的信号转导。分别针对健康(紫色,填充的三角形)和受损(绿色,填充的倒三角形)情况描述对于sc777的信号转导应答。sc776的组合物是IGF1(E3R/Y31A)_1k7_HSA(C58S/N527Q)_1k7_AnxV(R63A/K70A/K101A/E138A/D139G/N160A/C316A)。未靶向的对照sc777由IGF1(E3R/Y31A)_1k7_HSA(C58S/N527Q)组成。如图3B,由健康和受损剂量效应曲线之间拟合EC50值的比(EC50健康/EC50受损)获取针对受损情况中信号转导的特异性。未靶向的、效力减弱的分子sc777不显示效力移位,然而靶向的、效力减弱的分子sc776具有57倍的效力移位。

[0551] 这些数据显示,通过添加基于AnxV的靶向臂,PS-靶向的、效力减弱的(相较于wt IGF-1,≥6倍的效力减弱)IGF-1的变体(例如,SGF 743、741、740、739、733、732、731、730、729、728、727、716、713、711、606、776)在受损心肌细胞中相比健康心肌细胞中显示出优选的(10倍-92倍的增强)信号转导。同样,通过添加基于AnxV的靶向臂,PS-靶向的、效力减弱的(相较于wt Nrg1a,约4倍效力减弱)Nrg1a的变体(SGF 757)在受损心肌细胞中相比健康心肌细胞中显示出优选的(5倍增强)信号转导。缺少靶向臂的对照融合蛋白(例如,SGF 704、602、688、703)在受损心肌细胞中相较于健康心肌细胞中显示出微不足道的(≤2倍)优选信号转导,这证明了PS-选择性靶向臂在受损细胞中引起选择性信号转导中的重要性。此外,靶向的、效力未减弱的双特异性蛋白质(相较于wt IGF-1,<2倍的效力减弱)SGF 649在受损心肌细胞中相较于健康心肌细胞也显示出微不足道的(<2倍)优选信号转导,这证明了效力减弱在受损细胞中引起选择性信号转导中的重要性。

[0552] 实施例3:体外使用双特异性蛋白质减少人心肌细胞中缺氧诱导的细胞凋亡

[0553] 图4显示了在体外人心肌细胞缺氧诱导细胞凋亡试验中使用融合蛋白SGF740的细胞凋亡的减少。

[0554] 体外使用这样的双特异性蛋白质SGF 740(SEQ ID NO:84)以评估其效力,所述SGF 740从N-末端至C-末端包括:IGF-1的变体(LR3,Y31A)、7个氨基酸的接头1k7、HAS的变体(mHSA:C58S,K420E和N527Q)、7个氨基酸的接头1k7、以及膜联蛋白A5非内化的变体(ni-AnxV:R63A,K40A,K101A,E138A,D139G,N160A)。细胞凋亡通过将细胞在1%氧气进行48小时培养诱导。融合蛋白740在缺氧阶段的起始添加。测量胱天蛋白酶活性。胱天蛋白酶是天冬氨酸盐特异性、半胱氨酸蛋白酶家族,其作为细胞凋亡的主要介导物。细胞凋亡胱天蛋白酶在受到外在或内在死亡信号后被激活。

[0555] 在第0天,根据标准方案将iCell心肌细胞(细胞动态国际公司(CDI)人诱导的多能干(iPS)细胞诱导的心肌细胞,目录号CMC-100-010-001)解冻。用0.1%明胶在37℃包覆96孔板1小时。将细胞以1.5e4细胞/孔铺板,并在37℃/7%CO₂培养箱中培养。

[0556] 在第2天,上下抽吸培养基5次,并且用100μL/孔预热维持培养基替换。此时,将细胞移至37℃/5%CO₂培养箱。在次转变之后,后续所有实验中将细胞置于37℃/5%CO₂。

[0557] 在第4天,用新鲜维持培养基替换培养基。

[0558] 在第7天,新鲜制备缺氧试验培养基(HAM,无葡萄糖、无谷氨酰胺、无酚红(生命科技公司(Life Technologies),A14430-01)的DMEM+2mM L-肉碱,5mM牛磺酸,5mM肌酸,1X非

必须氨基酸(生命科技公司,11140-50),10mM HEPES,1mM丙酮酸钠,1X GlutaMax(生命科技公司,35050-061),2.75mM D-(+)葡萄糖,1X亚油酸-油酸-白蛋白(西格玛公司(Sigma) L9655)。用80μL HAM洗涤细胞两次以替换维持培养基。然后向板的孔添加100μL HAM,并将板置于37°C/5%CO2培养箱中2天。

[0559] 在第8天,用100μL新鲜HAM替换培养基。

[0560] 在第9天,37°C/5%CO2培养箱中的缺氧腔被设置成1%O2。用新鲜HAM(90uL)替换培养基。在HAM中制备10X浓度的SGF(双特异性蛋白质SGF 740)储液(在添加到细胞前无菌过滤)。向孔添加10□L SGF或HAM。将缺氧平板置于37°C/5%CO2培养箱中1%O2的缺氧腔48小时。将常氧板置于37°C/5%CO2培养箱(与大气中的氧气平衡)中48小时。

[0561] 在第11天,使用测量胱天蛋白酶-3/7活性的胱天蛋白酶GL0 3/7(CaspaseGL0 3/7)试验(普罗麦格公司)分析样品。该实验在针对胱天蛋白酶-3/7活性、荧光素酶活性和细胞裂解优化的试剂中使用高亮度冷光(proluminescent)胱天蛋白酶-3/7DEVD-氨基荧光素底物以及热稳定的荧光素酶。试剂的添加导致细胞裂解,然后是底物的胱天蛋白酶切割。这释放出游离的氨基荧光素,其被荧光素酶消化,生成与胱天蛋白酶-3/7活性成比例的发光信号。

[0562] 图4显示了对照样品[无缺氧(即,常氧)]以及这样的缺氧样品中的胱天蛋白酶活性,所述缺氧样品用不同浓度的双特异性蛋白质SGF 740处理:330nM双特异性蛋白质SGF 740、50nM双特异性蛋白质SGF 740、7.8nM双特异性蛋白质SGF 740、1.2nM双特异性蛋白质SGF 740、以及0.18nM双特异性蛋白质SGF 740。图4显示了双特异性融合蛋白SGF 740在体外人心肌细胞中显著地($p \leq 0.01$)减弱通过缺氧诱导的半胱天冬酶活性和细胞凋亡。

[0563] 这些结果显示,双特异性蛋白质SGF 740在人心肌细胞中以剂量依赖性的方式显著地($p < 0.01$)减弱缺氧诱导的细胞凋亡。在一些浓度的双特异性蛋白质SGF 740下,缺氧诱导的细胞凋亡被减弱到常氧(即,不缺氧)水平。该结果表明,SGF在人心肌细胞中有效治疗缺氧诱导的细胞凋亡。

[0564] 实施例4:使用双特异性蛋白质体外减少肾近球小管上皮细胞中缺氧诱导的细胞死亡

[0565] 使用双特异性蛋白质SGF 740、727和734以评估其相较于非靶向的对照SGF746(SEQ ID NO:109)在缺氧诱导的细胞死亡试验的效率(图5)。双特异性蛋白质SGF 740(SEQ ID NO:84)从N-末端至C-末端包括:IGF-1的变体(LR3,Y31A)、7个氨基酸的接头1k7、HAS的变体(mHSA:C58S、K420E和N527Q)、7个氨基酸的接头1k7、以及膜联蛋白A5非内化的变体(ni-AnxV:R63A、K40A、K101A、E138A、D139G、N160A)。双特异性蛋白质SGF 727(SEQ ID NO:76)从N-末端至C-末端包括:IGF-1的变体(LR3-R37X-3X)、40个氨基酸的接头1k40、人血清白蛋白变体mHAS半衰期调节剂、40个氨基酸的接头1k40、以及膜联蛋白A5。双特异性蛋白质SGF 734(SEQ ID NO:108)从N-末端至C-末端包括:IGF-1的变体(LR3,Y24L/Y31A)、7个氨基酸的接头1k7、HAS的变体(mHSA:C58S、K420E和N527Q、E505G、V547A)、7个氨基酸的接头1k7、以及膜联蛋白A5非内化的变体(ni-AnxV:R63A、K40A、K101A、E138A、D139G、N160A)。未靶向的对照SGF 746从N-末端至C-末端包括:IGF-1的变体(LR3,Y31A)、7个氨基酸的接头1k7、以及HAS的变体(mHSA:C58S、K420E和N527Q)。

[0566] 在第0天,将人肾近球小管上皮细胞(ATCC,PCS-400-010)以10,000细胞/孔接种到

完全培养基(肾上皮细胞基础培养基,肾上皮细胞细胞生长试剂盒,10单位/mL盘尼西林,10 μ g/mL链霉素,10 μ g/mL庆大霉素,0.25 μ g/mL两性霉素B,ATCC)中的96孔板。无菌水添加至孔边缘。

[0567] 在第2天,用PBS洗涤孔,然后将培养基换成低血清培养基(肾上皮细胞基础培养基,0.5%FBS,5 μ g/ml转铁蛋白,2.4mM L-谷氨酰胺,1%盘尼西林/链霉素(10单位/mL盘尼西林+10 μ g/mL链霉素)),100 μ L/孔。5小时后,用不同浓度(5nM、50nM、500nM,或2.5nM、25nM、250nM)的双特异性蛋白质SGF 740、727、734或未靶向的对照蛋白质SGF 746在包含2.5mM CaCl₂的培养基(或低血清作为对照)中处理细胞。将25 μ L的5X浓度样品添加,并且在37°C/5%CO₂培养箱中孵育1小时。

[0568] 用SGF预处理1小时后,将细胞放入厌氧袋(具有指示物BD 260683的GasPak EZ厌氧袋系统)以诱导缺氧并且将其置于37°C/5%CO₂培养箱,或放置在常氧(即,与大气中的氧气平衡)条件下的37°C/5%CO₂培养箱(作为对照)。孵育细胞18小时。

[0569] 在第3天,收集细胞,用于流式细胞术。吸取培养基和漂浮细胞,并且转移至V底平板。用20 μ L/孔的PBS洗涤细胞。针对原代细胞(ATCC PCS-999-003)添加30 μ L/孔的胰蛋白酶/EDTA。将该平板放回37°C培养箱,静置10分钟。

[0570] 通过轻拍平板移出细胞。添加30 μ L/孔胰蛋白酶中和溶液以收集细胞,并且将细胞转移到V底平板。以700g对平板进行5分钟4°C离心。移除上清液,并且将细胞在100 μ L/孔中重悬。用PBS+0.02%EDTA(0.5mM EDTA)洗涤细胞以移出任何结合的双特异性蛋白质。制备AnxV-FITC染色溶液(具有碘化丙啶(PI));0.3 μ g/mL AnxV-FITC(来自230 μ g/mL储液766.6X稀释液)+1 μ g/mL PI(来自1mg/mL储液的1000X稀释液)。以700g对平板进行5分钟4°C离心。移除上清液,并且将细胞在50 μ L/孔AnxV-FITC染色溶液中重悬。板在室温下孵育15分钟。向细胞中添加200 μ L/孔的AnxV结合缓冲液。细胞死亡使用流式细胞术由碘化丙啶阳性细胞百分比进行测量。

[0571] 图5显示了双特异性蛋白质SGF 740、727和734在人肾近球小管上皮细胞中显著地降低通过缺氧诱导的细胞死亡。未靶向的对照蛋白质746并不降低细胞死亡。这些数据表示,靶向的双特异性SGF有效治疗人肾近球小管上皮细胞中缺氧诱导的细胞死亡,然而未靶向的蛋白质无效。

[0572] 实施例5:比较静脉注射给药后的双特异性蛋白质半衰期

[0573] 小鼠中双特异性蛋白质的半衰期在单隔室模型(single-compartment model)中计算(图6)。SGF 727具有结构IGF-1(LR3-R37X-3X)-1k40-mHSA-1k40-AnxV(SEQ ID NO:76),双特异性蛋白质739-743具有IGF-1*(LR3)-1k7-mHSA-1k7-AnxV(ni)的基础结果,其中*表示IGF-1效力减弱的缺失或突变。双特异性蛋白质757具有结构Nrg1a_1k7_mHSA_1k7_ni-AnxV(SEQ ID NO:110)。

[0574] 步骤:

[0575] 称重C57BL/6J小鼠(8-12周龄)并在热灯下温热5-10分钟以允许侧尾静脉的血管舒张。将动物置于限制器内,用酒精棉片清理动物的尾部,并且然后经由尾血管注射100 μ l以40nmol/ml在PBS+0.1%MSA中配置的SGF。在给药1、3、6、9、12、26.5、28、31.5、33.5、35.75和51小时后切开侧尾静脉,将少量(5-10 μ L)血液收集到血清收集管中。对于各后续收集,移开在尾部形成的瘤然后收集血液。收集后允许血液凝结10分钟,然后以10,000xg进行10-15

分钟的4°C离心。

[0576] 对血液样品中SGF浓度的分析使用设计成捕获并且检测HAS的ELISA进行。用在达氏PBS (Dulbecco's PBS) 中1:50稀释的20μL/孔交联-吸附的抗-HAS抗体 (Bethyl Labs, A80-229A) 在4°C过夜包覆试验平板 (384孔LIA高结合, 莱娜第一生化公司, REF 781074)。次日, 用PBS-T (PBS, 0.05% 吐温20) 洗涤3次孔。然后用80μL/孔无蛋白质封闭缓冲液(皮尔斯公司, 37572) 在室温 (RT) 封闭平板1-2小时, 同时准备针对各SGF和血清样品 (在PBS中稀释25x、100x、400x、1600x、6400x) 的标准曲线。使用平板洗涤机用PBS-T (PBS, 0.05% 吐温20) 洗涤孔3次, 将20u1各种样品或标志物添加到合适的平板孔, 并且用白氧化铝密封物 (AluminaSeal) 密封平板, 并且以RT在摇床上孵育2小时。用PBS-T (PBS, 0.05% 吐温20) 洗涤平板3次, 然后添加在PBS-T中1:25 000稀释的40μL/孔交联-吸附的山羊抗-HSA-HRP检测抗体 (Bethyl labs, A80-229P)。平板在RT下孵育30分钟, 位于摇床平台, 避光, 然后使用平板洗涤机用PBS-T (PBS, 0.05% 吐温20) 洗涤3次。用赛默飞公司的超级信号ELISA Pico (Super Signal ELISA Pico) 化学发光底物产物号37069 (20u1/we11) 检测结合的抗体。然后在Tecan Infinite 200Pro上测试平板发光。

[0577] 使用针对Simbiology MATLAB软件平台 (马萨诸塞州纳蒂克的Mathworks有限公司) 的定制脚本, 标准一分室或二分室PK模型与小鼠中实验室药物-血清衰变数据进行校准。校准使用内建的具有指数误差函数(exp)的非线性拟合的算法(nlinfit)进行。

[0578] 结果:

[0579] 图6列出针对wt IGF-1, wt Nrg以及SGF 727、739、740、741、743和757计算的半衰期和衰变率。该值在MATLAB中使用如上所述一分室模型确定。基于IGF-1的SGF的半衰期相较于wt IGF-1增长了8.45至24.6倍。此外, SGF相较于wt IGF-1具有降低2.1至5.66倍的衰变率。

[0580] 实施例6: 基于IGF-1的双特异性蛋白质对小鼠血糖水平的影响

[0581] IGF-1的临床应用受限于低血糖症的风险, 因此, 重要的是了解这些半衰期延长的SGF对血糖水平的影响。根据一些实施方式, 双特异性蛋白质重要的益处是, 由于存在用于有效靶向的效力降低的IGF-1信号转导臂, 这些分子具有对于低血糖症更安全的潜力。

[0582] 使用这样的双特异性蛋白质评估当其以160nmol/kg剂量使用时其对小鼠血糖水平的作用, 所述双特异性蛋白质包含由胰岛素样生长因子-1 (IGF-1)、半衰期调节臂 (HLM) 和膜联蛋白A5 (AnxV) 靶向臂 (TA) 组成的信号转导臂, 所述膜联蛋白A5 (AnxV) 靶向臂 (TA) 被设计成结合暴露于凋亡细胞表面的磷脂酰丝氨酸 (PS)。

[0583] 步骤:

[0584] 尾静脉注射和葡萄糖监测

[0585] 使用24和27g之间的C57BL6/J1小鼠 (n=2/剂量)。在它们抵达后3-5天允许在使用前适应动物饲养设施。动物可以随意进食和饮水, 因为这些高剂量有可能导致危险的低血糖症。

[0586] 在实验当天, 在PBS中制备用0.1% 小鼠血清白蛋白 (MSA) 作为运载剂蛋白的蛋白质量。全部注入体积为100μl。

[0587] 在注射前用热灯温暖动物5-10分钟以使得血管舒张并且使尾静脉更加容易鉴定。

[0588] 将动物保护在适当的限制器中, 用无菌酒精擦拭垫清洁尾部, 然后将剂量注射到

侧尾静脉。

[0589] 对于第一收集物,用乙醇擦拭垫对尾部和刀片进行消毒。将少量的血液(2-3 μ L)施用于葡萄糖测试条(雅培公司(Abbott),AlphaTrak2葡萄糖测试器,狗类设置)。

[0590] 对于各后续收集,移开在尾部形成的痴然后收集血液,并且重复葡萄糖测量。

[0591] 结果:

[0592] 图7a显示了在靶向的效力减弱的双特异性蛋白质(SGF 727 (SEQ ID NO:76)、739 (SEQ ID NO:83)、740 (SEQ ID NO:84)、741 (SEQ ID NO:85) 和743 (SEQ ID NO:86))给药后小鼠中以葡萄糖的血液浓度mg/dL显示的血糖水平的时程。用重组人血清白蛋白IGF1 (LR3 变体),或无效力减弱的、非靶向的、半衰期延长的生长因子(蛋白质688: IGF1 (LR3-R37X-3X)-Fc)作为对照向小鼠给药。这些数据显示,靶向的效力减弱的双特异性蛋白质(SGF 727、739、740、741和743)大幅度改善了其对于低血糖症的安全性能力,相较于未靶向的、效力未减弱的、半衰期延长的生长因子(蛋白质688)和IGF1 (LR3)。接受效力减弱的双特异性分子的动物并不经历低血糖症(以<70mg/dL定义),然而给予IGF1 (LR3)或效力未减弱的、半衰期延长的生长因子688并且处于该给药水平的动物的确经历了低血糖症。应当指出的是,因为IGF1 (LR3)极短的(约0.2小时)半衰期,通过IGF1 (LR3)给予所导致的血糖下降相比SGF 688更多的是瞬时性的。图7B显示了SGF效力(定义为实现半最大pAKT水平所需的浓度,即, pAKT EC50)与3小时血糖曲线下面积(AUC)之间的关系。该图证明了,较大的效力减弱(即,增加的pAKT EC50)导致增强的3小时血糖AUC(即,较少的血糖降低)。

[0593] 响应通过基于IGF-1的SGF诱导的低血糖症的患者常常是高度异质的,并且这些数据表明,特别是对于需要慢性治疗的适应症,高剂量的wt IGF1或未靶向的、效力未减弱的、半衰期延长的GF两者都可能引起严重的安全性风险。这些结果强调了对靶标分子生成的效力进行考虑的重要性。根据一些实施方式,这样靶向的分子更有可能具有比天然或简单延长半衰期的GF更需要的安全性能力,所述靶向的分子具有对非靶分子减弱的效力且对包含感兴趣的靶分子的细胞增强的效力。

[0594] 实施例7:健康和局部缺血大鼠组织中分析双特异性蛋白质信号转导水平

[0595] 为了分析本文所述双特异性蛋白质如何在局部缺血受损后的心脏中发送信号,急性心肌梗塞(AMI)大鼠局部缺血/再灌注(I/R)模型中健康和受损组织中的信号转答(AKT的磷酸化作用)使用这样四种测试化合物进行评估:1) 载剂(PBS+0.1% 小鼠血清白蛋白)、2) wt IGF1 (RnD系统)、3) 未靶向的、效力未减弱的对照蛋白(688, IGF1 (LR3-R37x-3x)_1k40_Fc, SEQ ID NO:72)、以及4) 靶向的、效力减弱的双特异性蛋白质(SGF 606, GF1 (LR3-R37x-3x)_1k40_mHSA_1k40_AnxVC316S_1k8_His6, SEQ ID NO:70),参见图8。

[0596] 测试化合物以16nmol/kg经由静脉内给药在再灌注的时间给药,并且在再灌注后2小时收集用于分析的组织。基于本文所述双特异性蛋白质在健康小鼠心脏中6小时内的药效学选择时间和剂量。根据这些数据,可以推断的是,该剂量和时间点将允许以有利的药效信号在受损心脏中鉴定双特异性蛋白质

[0597] 步骤:

[0598] 组织收获

[0599] 对大鼠这样的I/R手术,1小时局部缺血,然后再灌注并且立即静脉内(尾静脉)注射载剂、IGF-1或SGF。再灌注2小时后,用异氟烷麻醉动物,并在组织收获期间通过鼻锥保持

深度麻醉。打开胸腔,用解剖剪刀夹住右心房,并用15-20ml 0.9%NaCl通过左心室的顶尖(apex)灌注动物以清除循环系统和充分灌注的血液组织。取出心脏,并且用剃刀或切片刀将心脏组织横切成4个部分:顶尖、中部、顶部和基部。中部部分有少量右心室,主要由左心室组成,并且包含最大量的梗塞,这通常由其苍白而轻微可见。从包含梗塞和边界区(梗塞部分)的区域中小心地切下健康组织(远端部分),并将每片组织放置在标记为远端和梗塞的单独管中。

[0600] 均化组织

[0601] 将以约2:1比例 μ L缓冲液:mg组织(例如,对于300mg组织,使用600 μ L缓冲液)的RIPA缓冲液+蛋白酶(罗氏完整型)以及磷酸酶抑制剂(罗氏PhosSTOP)添加到包含心脏组织样品的管中。将组织用显微手术剪切碎以促进珠均化。将1.6mm不锈钢珠以1:1组织重量:珠重量添加。将样品以设定的4分钟8个的速度上样到Bullet Blender,然后放回冰中1分钟。样品以最大速度离心1分钟,然后以14,000rpm进行15分钟的4°C离心。移除1 μ L的上清夜,然后与59或119 μ L的PBS组合以进行BCA试验。蛋白质浓度通过BCA测量两次。

[0602] PD试验(pAKT ELISA)

[0603] 方案:

[0604] 第1天,用在PBS中以1:250稀释的20 μ L/孔的抗-Akt捕获抗体(克隆SKB1,密理博)包覆384孔白色平板(LIA高结合(莱娜第一生化公司,REF781074))。

[0605] 第2天,在冰上解冻组织。用80 μ L/孔0.05%PBS-T洗涤3次ELISA平板。用50 μ L/孔2%BSA/PBS在室温封闭ELISA平板1小时。在96孔板(无结合表面(NBS)康宁平板)PBS中的14.44%RIPA制备重组人活性Akt标准曲线。将rh活性Akt1/PKB α (密理博)稀释200倍至9165ng/mL。封闭后,使用平板洗涤机以PBS-1洗涤3次ELISA平板。从制备型平板添加20 μ L/孔样品或标准品,并在室温下孵育2小时。制备抗-磷酸Akt监测抗体:非生物素化的兔抗-AKT mAb,对组织裂解物的细胞信号转导在2%BSA/0.1%吐温20/PBS中1:1000稀释。用80 μ L/孔0.05%吐温20/PBS洗涤ELISA平板3次。添加20 μ L/孔稀释的抗-磷酸Akt检测Ab,并且将平板在室温下孵育2小时。第二检测抗体:抗-兔-IgG-HRP Ab(CST 7074),在2%BSA/0.1%吐温20/PBS中1:1000稀释。用80 μ L/孔0.05%吐温20/PBS洗涤ELISA平板3次。添加20 μ L/孔稀释的第二检测试剂,并且在室温下振荡孵育30分钟。用80 μ L/孔0.05%吐温20/PBS洗涤ELISA平板3次。用20 μ l/孔超级信号ELISA Pico化学发光底物(赛默飞公司)进行检测。振荡平板1分钟,并在酶标仪上读取发光。

[0606] 结果

[0607] 数据示于图8。在所有的情况下,对照载剂给药的动物作为用于比较各试验之间的基线。对于所有示出的数据,将来自SGF给药的动物远端或梗塞心脏组织的均浆中的pAKT水平分别标准化至载剂给药的(PBS-MSA)远端或梗塞组织均浆。这样,对于各SGF的数据以相对于对各组织区域载剂给药的动物的pAKT水平的“倍数增加”显示。

[0608] 对于各试验,通过将远端和梗塞的组织当作配对的样品,分析数据以比较相同动物内远端组织或梗塞组织中的相对pAKT水平。进行双向ANOVA,然后进行Sidak多重比较检验。

[0609] 数据显示,给药后2小时,来自wt IGF-1给药动物的组织中的pAKT水平并不显著地升高超过载剂给药动物的远端或梗塞组织,这表明wt IGF-1不可能在给药后2小时维持升

高的pAKT水平。相较于载剂，在给药后2小时，半衰期延长的、未靶向的、效力减弱的SGF (688, SEQ ID NO:72) 在远端和梗塞组织中增强pAKT水平，这表明未靶向的、半衰期延长的GF可以至少在给药后至少2小时无选择性地升高pAKT水平(即，在远端和梗塞组织两者中)。相反，给药后2小时，靶向的、效力减弱的SGF (606) 仅在梗塞组织中引起选择性pAKT升高；SGF 606在相同时间点在远端组织中引起不显著的pAKT升高(相对于载剂)。因为在梗塞区域具有比远端区域明显更多表达磷脂酰胺丝氨酸的凋亡细胞，这些数据表明，靶向的、效力减弱的SGF在包含靶标(例如，梗塞组织)中选择性地发送信号，并且更重要的是，其在不包含靶标(例如，远端组织)中不发送信号。这些结果显示，对于受损心肌细胞的体外选择性转变成受损心脏组织中的体内选择性。(参见图3，其显示SGF 606对凋亡细胞相比未凋亡细胞具有22倍增强的选择性，并且，相较于图8中的数据，其显示相同的分子(SGF 606)在梗塞心脏组织中选择性地发送信号)。

[0610] 实施例8：效力减弱的、靶向的基于HAS的SGF 606在大鼠局部缺血/再灌注模型中的功效

[0611] 为了分析本文所述双特异性蛋白质如何预防局部缺血受损后的组织损伤，急性心肌梗塞(AMI)大鼠局部缺血/再灌注(I/R)模型中梗塞/风险区域(AAR)使用这样三种测试化合物进行评估：1) 载剂(PBS+0.1%小鼠血清白蛋白)、2) wt IGF1(RnD系统)、3) 靶向的、效力减弱的SGF (606, GF1(LR3-R37x-3x)_1k40_mHSA_1k40_AnxVC316S_1k8_His6, SEQ ID NO: 70)，参见图9A-C。

[0612] 该研究涉及示于图9A。72小时再灌注后，处死动物并且收获组织用于作为主要终点的梗塞/风险区域(AAR)分析。

[0613] 步骤：

[0614] 手术

[0615] 急性心肌梗塞(AMI)在大鼠中通过如下的局部缺血/再灌注(I/R)手术方案将左冠状动脉暂时连接来诱导：安排雄性CD IGS(200-300g)大鼠在研究前至少72小时抵达以适应环境。在各手术过程之前高压蒸汽处理所有手术仪器。仪器尖端通过浸入酒精中清洁，用酒精纱布垫擦净并置于每只动物之间的玻璃珠消毒器中。用氯胺酮/赛拉嗪(分别为80-100mg/kg和5-10mg/kg)混合物对动物进行麻醉，并且在目视引导下用导管插管，并且置于机械呼吸机(70-85BPM，呼吸容量=10ml/kg)。将动物置于水循环加热垫上右侧卧位以在手术期间维持体温。间电极置于动物的四肢以监测与局部缺血相关联的ECG改变。皮下给予叔丁啡(0.1mg/kg)。提供了用生理盐水(5ml SC)的标准液体替代疗法。

[0616] 将手术部位剃光，并用酒精和聚维酮碘清洁。一旦确认了合适的麻醉手术平面，在动物左侧第4至第5肋间隙将皮肤切开。将其下的肌肉直接解剖以显示肋间肌肉。沿着切开位置皮下给予布比卡因(0.25%，0.2ml)。然后，小心地安放肋骨撑开器以看到心脏。打开心包腔，轻轻收回左心耳，并且将缝合线(丝线或聚丙烯线，尺寸6-0或7-0)置于左冠状动脉(LCA)周围，大约距其原始位置1mm。将缝合线在一片无菌聚乙烯管上连接，并且维持60分钟。通过漂白ECG波形上心肌和局部缺血改变(即，ST段抬高(ST elevation))来证实适当的闭塞。如果注意到心室纤维性颤动，轻轻按摩心脏以使其恢复到正常节奏。局部缺血阶段后，移除管子，并且将缝合线松开逸云潇再灌注。之后立即温热尾部，并且经由通过侧尾静脉的单个静脉内注射给予这样的测试物(载剂、对照或SGF)，它们悬浮在包含作为运载体蛋

白质的0.1%血清白蛋白的200 μ L PBS总体积中。胸壁接近4-0聚乙丙交酯(vicryl)缝合线(一层穿过胸壁和肌肉)。用伤口夹或合适的皮肤缝合线封闭皮肤上头,注意使死腔最小化。一旦麻醉剂开始消失,当动物开始苏醒时,将其呼吸机中取出。然后将它们转移到温暖的恢复单元,直到它们展现出正常的行走行为以及探究行为。在手术后到手术后5天以补充软食物给予叔丁啡(0.1-0.2mg/动物),若需要可继续。可以向恢复单元提供补充性的氧气。然后将动物置于干净笼中,并且回到动物房。允许动物自由进食和饮水,直到其被处死。

[0617] 组织收获

[0618] 在组织收获的时候,用5%异氟烷深度麻醉动物,并且打开胸腔。用10-20ml盐水灌注动物,并且将1-2ml的2%伊文思蓝注射到左心室。然后用纱布使心脏干燥,并且在-80°C短暂冷冻5分钟。然后使用大鼠心脏切片机将心脏横向切割成约2mm的切片。然后将这些切片在1%TTC中以37°C孵育15-20分钟,并且用数码相机对两侧进行拍照用于图像分析。

[0619] 图像分析

[0620] 使用计算机辅助的图像分析对图像进行分析。

[0621] 结果:

[0622] 使用具有在Prism中进行的徒吉(Tukey)多重比较检验的单向ANOVA对结果进行分析。如通过风险区域(AAR)相对于左心室(LV)区域类似的大小所指示的,任意各组之间手术过程产生的损伤大小并不存在显著地差异。图9B和图9C显示,如所预期,IGF-1和SGF 606两者相较于载剂对照给药的动物能够显著降低梗塞大小。该结果说明,SGF 606比wt IGF1导致更显著的梗塞/AAR降低,这表明靶向的、效力减弱的SGF(例如,SGF 606)比wt IGF1在降低梗塞大小上更有效。

[0623] 应理解,本文所述的实施例和实施方式仅用于说明目的,并且据此作出的各种修饰或改变将包括在本申请的主旨和权益以及所附权利要求书的范围内。本文引用的所有出版物、专利和专利申请通过引用全文纳入本文以用于所有目的。

[0624] 通过引用纳入

[0625] 本文提到的所有发表物、专利和序列数据库条目在此通过引用全文纳入,就好像各个单独发表物或专利特定和单独地表明通过引用纳入。

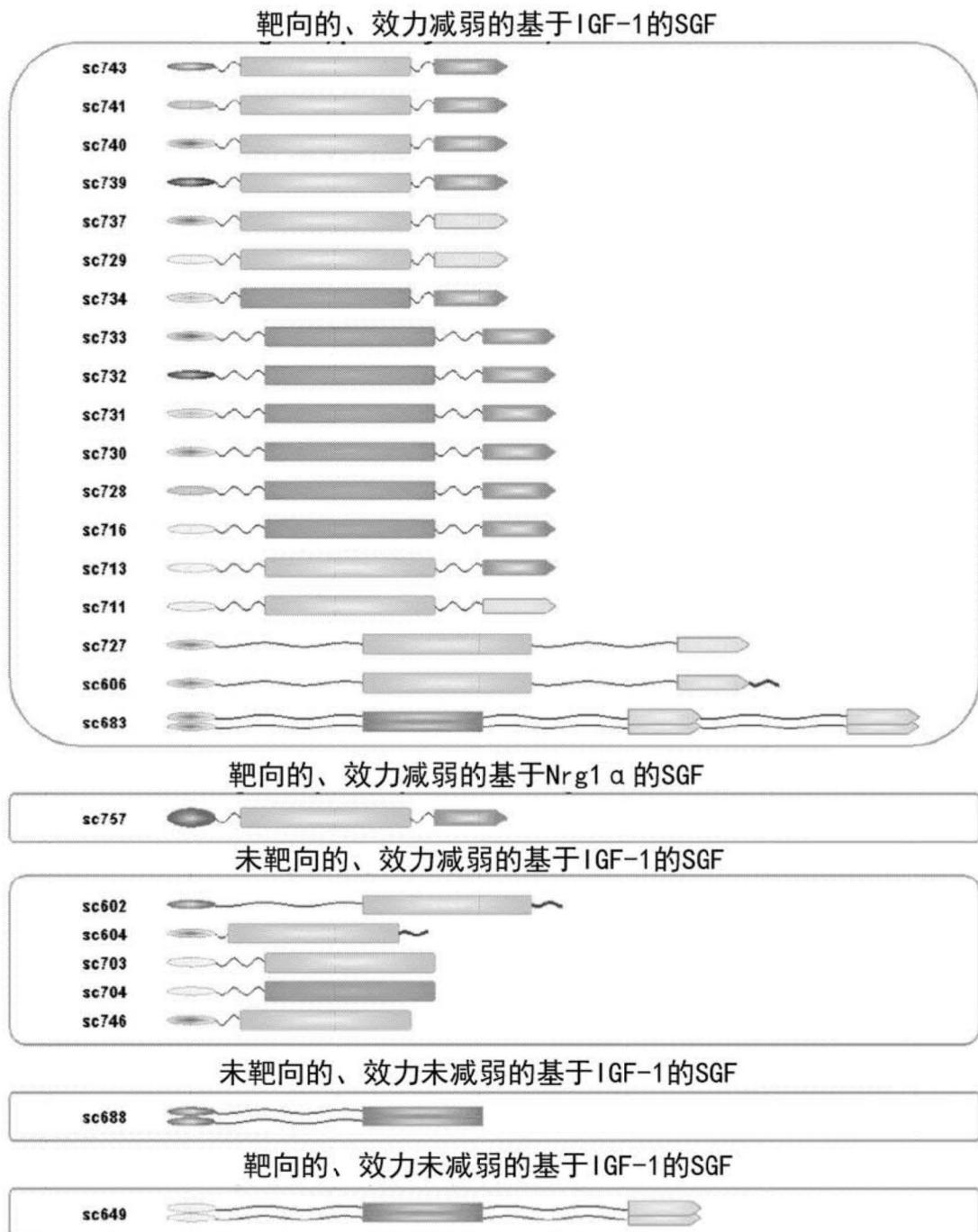


图1A

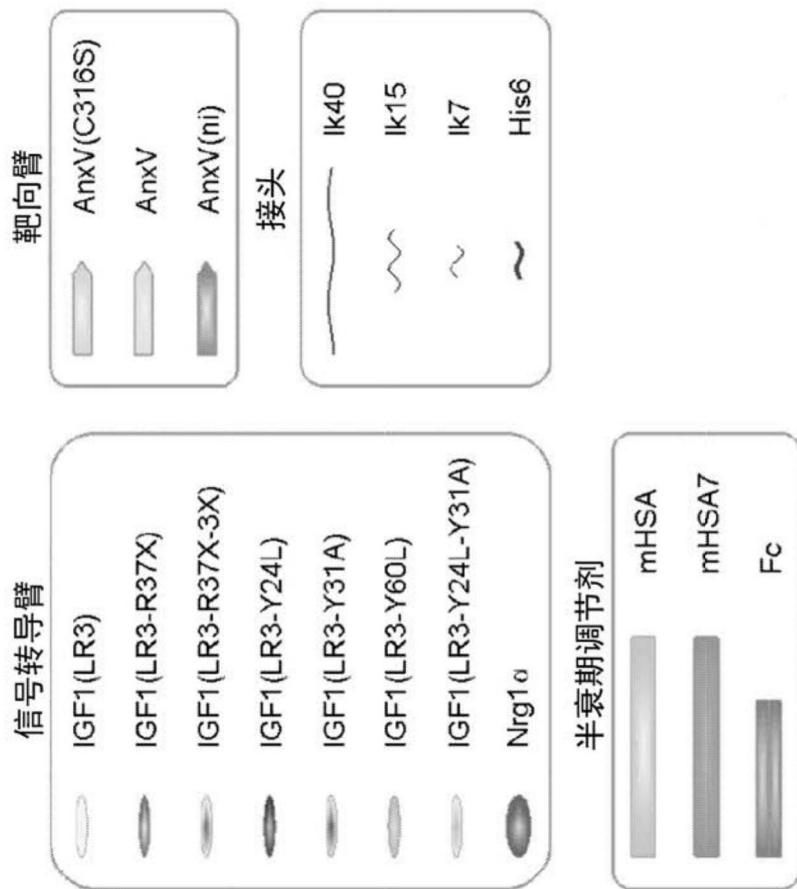


图1A续

靶向的、效力减弱的基于 IGF-1 的 SGF	
606	IGF1(LR3-R37x-3x)_lk40_mHSA_lk40_AnxVC316S_lk8_His6
683	IGF1(LR3-R37x-3x)_lk40_Fc_lk40_Anx/mS_lk40_AnxVC316S
711	IGF1(LR3)_lk15_mHSA_lk15_AnxV
713	IGF1(LR3)_lk15_mHSA_lk15_AnxV/(n)
716	IGF1(LR3)_lk15_mHSA7_lk15_AnxV/(n)
727	IGF1(LR3-R37x-3x)_lk40_mHSA_lk40_AnxV
728	IGF1(LR3_Y60L)_lk15_mHSA7_lk15_AnxV/(n)
729	IGF1(LR3)_lk7_mHSA_lk7_AnxV
730	IGF1(LR3-R37x-3x)_lk15_mHSA7_lk15_AnxV/(n)
731	IGF1(LR3-Y24L/Y31A)_lk15_mHSA7_lk15_AnxV/(n)
732	IGF1(LR3-Y24L)_lk15_mHSA7_lk15_AnxV/(n)
733	IGF1(LR3-Y31A)_lk15_mHSA7_lk15_AnxV/(n)
734	IGF1(LR3-Y24L/Y31A)_lk7_mHSA7_lk7_AnxV/(n)
737	IGF1(LR3-Y31A)_lk7_mHSA_lk7_AnxV
739	IGF1(LR3-Y24L)_lk7_mHSA_lk7_AnxV/(n)
740	IGF1(LR3-Y31A)_lk7_mHSA_lk7_AnxV/(n)
741	IGF1(LR3-Y60L)_lk7_mHSA_lk7_AnxV/(n)
743	IGF1(LR3-R37x-3x)_lk7_mHSA_lk7_AnxV/(n)
757	Nrg1a_lk7_mHSA_lk7_AnxV/(n)
对照：	
未靶向的、效力减弱的基于 Nrg1 α 的 SGF	
602	IGF1(LR3-R37x)_lk40_mHSA_lk8_His6
604	IGF1(LR3-R37x-3x)_lk2_mHSA_lk8_His6
703	IGF1(LR3)_lk15_mHSA
704	IGF1(LR3)_lk15_mHSA7
746	IGF1(LR3-Y31A)_lk7_mHSA
未靶向的、效力未减弱的基于 IGF-1 的 SGF	
688	IGF1(LR3-R37x-3x)_lk40_Fc
649	IGF1(LR3)_lk40_Fc_lk40_AnxVC316S

SGF	名称	EC_{50} (nM)	相较于WT GF 效力减弱的倍数
n/a	wt IGF1	1.22 ± 0.74	1 ± 0.86
n/a	IGF1(LR3)	0.73 ± 0.35	0.6 ± 0.46
649	IGF1(LR3)_ k40_Fc_ k40_Anx\VC316S	2.31 ± 0.13	1.89 ± 1.15
688	IGF1(LR3-R37x-3x)_ k40_Fc (未靶向的对照)	2.91 ± 0.67	2.39 ± 1.55
703	IGF1(LR3)_ k15_mHSA (未靶向的对照)	7.46	6.11
711	IGF1(LR3)_ k15_mHSA_ k15_Anx\	8.52 ± 3.16	6.98 ± 4.97
683	IGF1(LR3-R37x-3x)_ k40_Fc_ k40_Anx\VmS_ k40_Anx\VC316S	8.6 ± 1.81	7.05 ± 4.53
713	IGF1(LR3)_ k15_mHSA_ k15_Anx\V(ni)	8.87	7.27
729	IGF1(LR3)_ k7_mHSA_ k7_Anx\	9.25 ± 0.38	7.58 ± 4.61
716	IGF1(LR3)_ k15_mHSA7_ k15_Anx\V(ni)	11.84 ± 3.71	9.7 ± 6.63
704	IGF1(LR3)_ k15_mHSA7 (未靶向的对照)	12.52 ± 4.33	10.26 ± 7.17
727	IGF1(LR3-R37x-3x)_ k40_mHSA_ k40_Anx\	22.04 ± 5.74	18.07 ± 11.93
602	IGF1(LR3-R37x)_ k40_mHSA_ k8_His6 (未靶向的对照)	35.35 ± 10.46	28.98 ± 19.56
606	IGF1(LR3-R37x-3x)_ k40_mHSA_ k40_Anx\VC316S_ k8_His6	35.52 ± 19.03	29.11 ± 23.56

图2A

SGF	名称	EC ₅₀ (nM)	相较于WT GF 效力减弱的倍数
743	IGF1(LR3-R37X-3X)_Ik7_mHSA_Ik7_AnxV(ni)	44.2 ± 21.6	36.23 ± 28.22
730	IGF1(LR3-R37x-3x)_Ik15_mHSA7_Ik15_AnxV(ni)	48.49 ± 1.46	39.75 ± 24.14
740	IGF1(LR3-Y31A)_Ik7_mHSA_Ik7_AnxV(ni)	65.98 ± 9.65	54.08 ± 33.74
733	IGF1(LR3-Y31A)_Ik15_mHSA7_Ik15_AnxV(ni)	191.73 ± 135.59	157.16 ± 146.42
739	IGF1(LR3-Y24L)_Ik7_mHSA_Ik7_AnxV(ni)	213.15 ± 0.64	174.71 ± 105.97
732	IGF1(LR3-Y24L)_Ik15_mHSA7_Ik15_AnxV(ni)	231.5 ± 179.32	189.75 ± 186.69
728	IGF1(LR3_Y60L)_Ik15_mHSA7_Ik15_AnxV(ni)	645.6 ± 329.65	529.18 ± 419.57
741	IGF1(LR3-Y60L)_Ik7_mHSA_Ik7_AnxV(ni)	915	750
731	IGF1(LR3-Y24L/Y31A)_Ik15_mHSA7_Ik15_AnxV(ni)	2041 ± 793.37	1672.95 ± 1205.24
n/a	wt Nrg1a	19.28	1
757	Nrg1a_Ik7_mHSA_Ik7_AnxV(ni)	76.53 ± 40.55	3.97

图2B

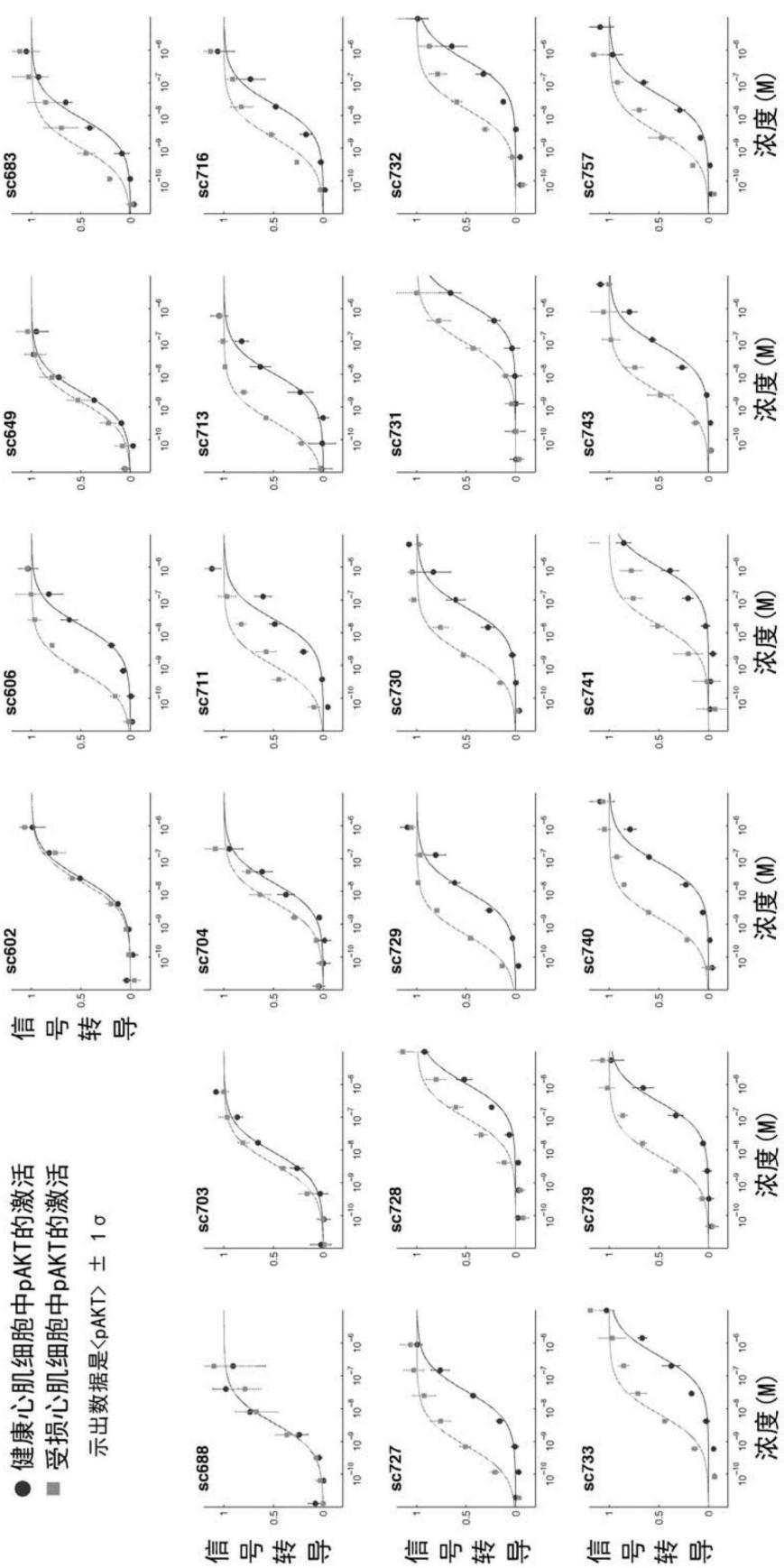


图3A

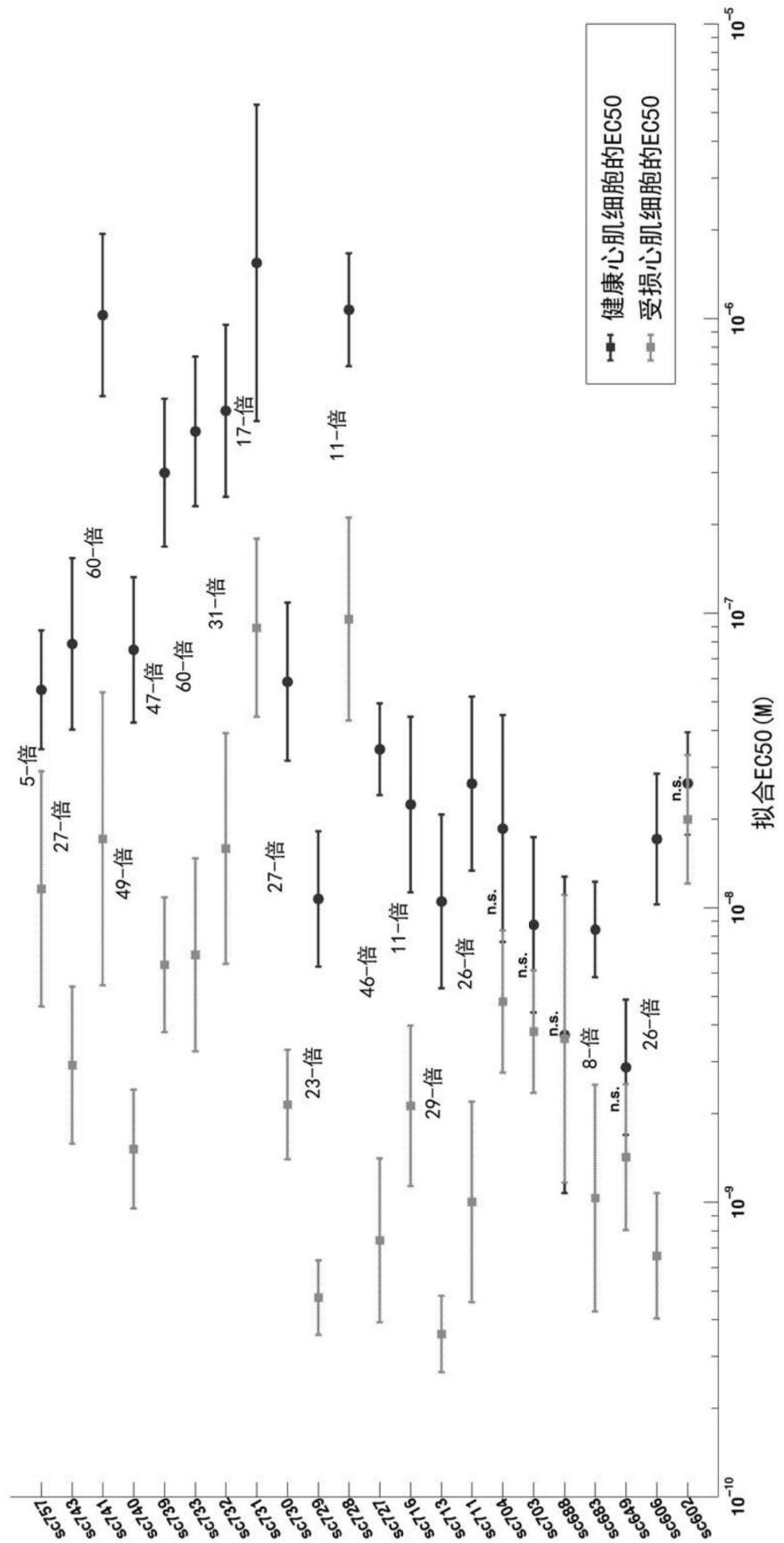


图3B

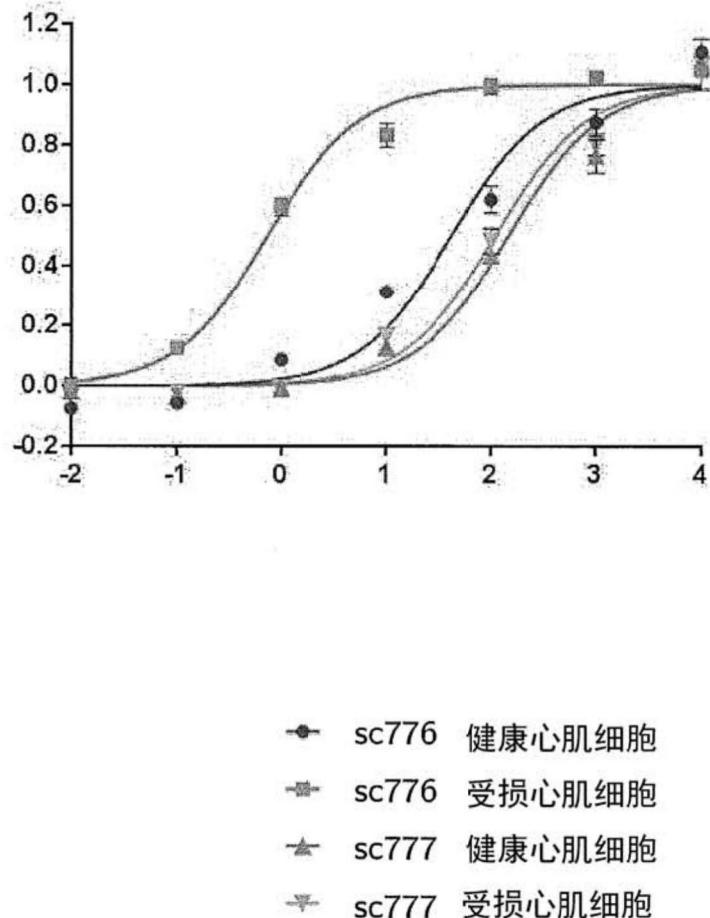


图3C

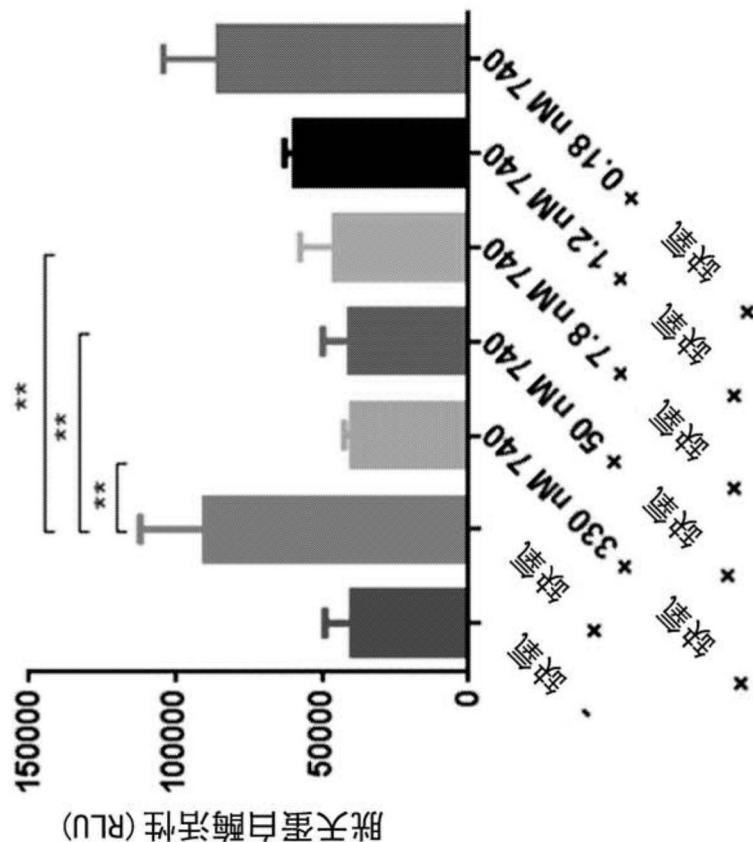


图4

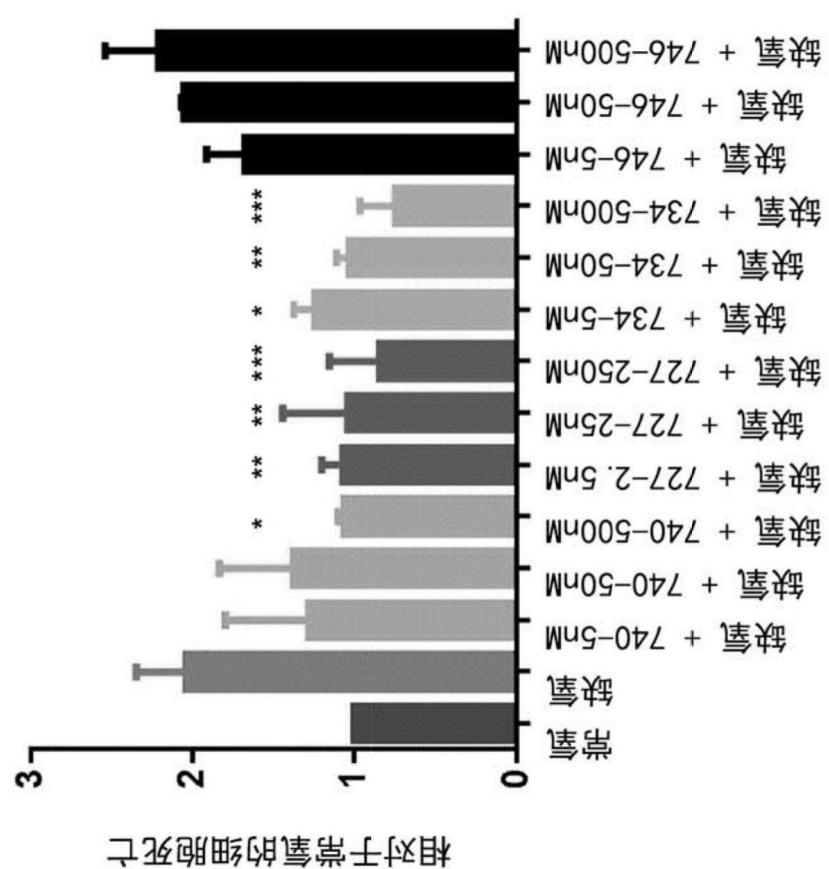


图5

SGF	剂量	半衰期 (小时)	衰减率 (1/小时)
wt IGF1	3.2nmol/kg	0.213	0.7970
727	16nmol/kg	1.8184	0.3806
739	16nmol/kg	3.2491	0.213
740	16nmol/kg	3.6705	0.1885
741	16nmol/kg	5.235	0.1322
743	16nmol/kg	3.6827	0.1879
757	16nmol/kg	4.919	0.1407

图6

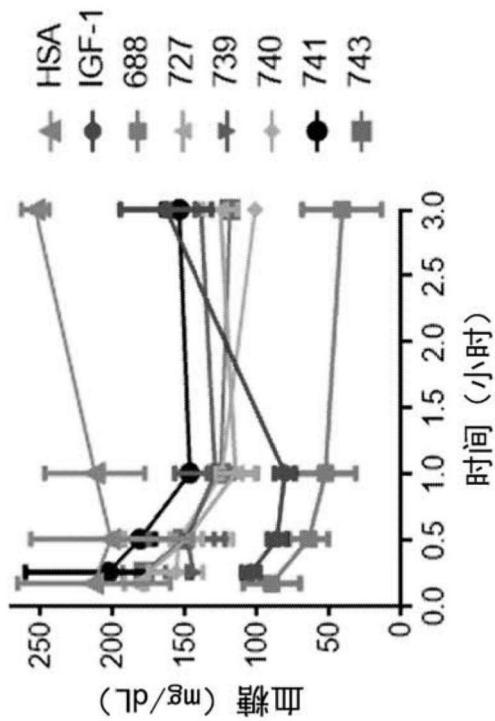


图7A

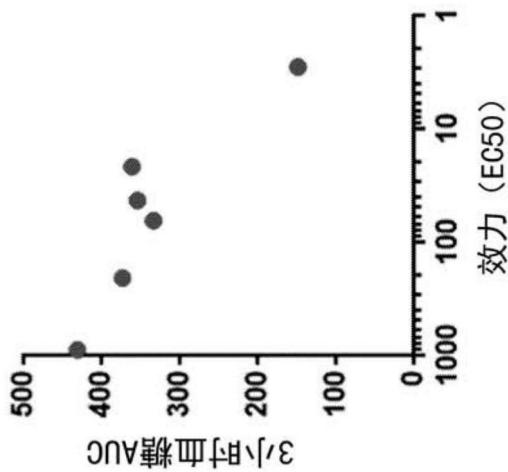


图7B

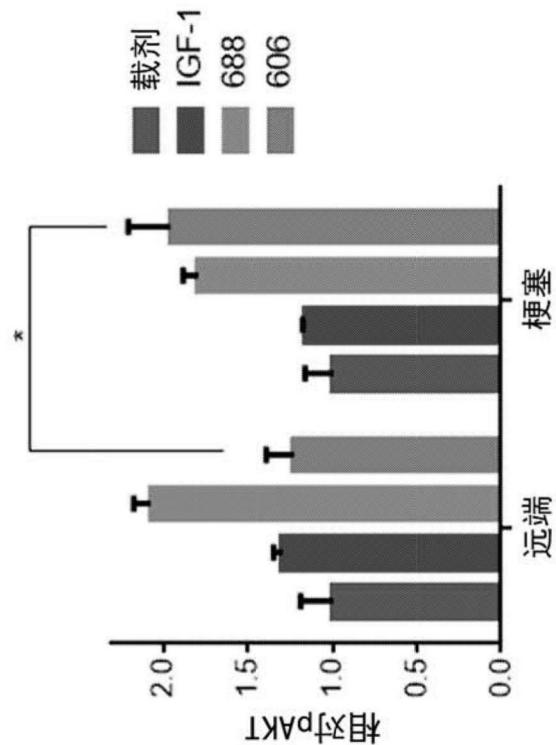


图8

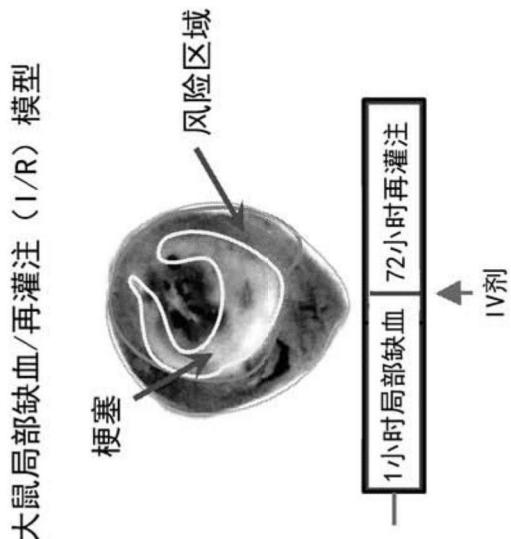


图9A

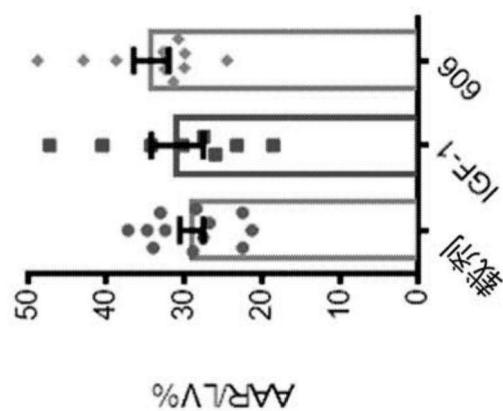


图9B

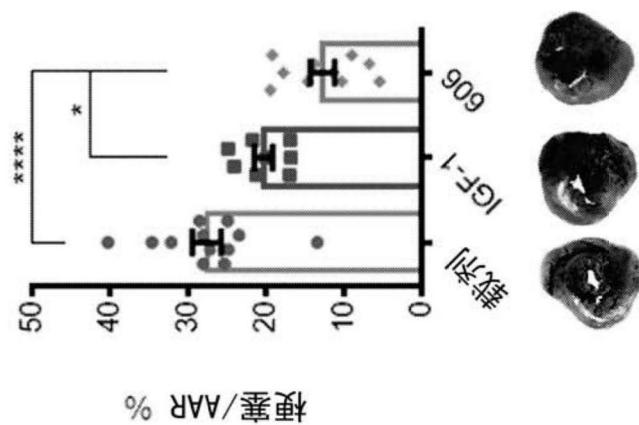


图9C

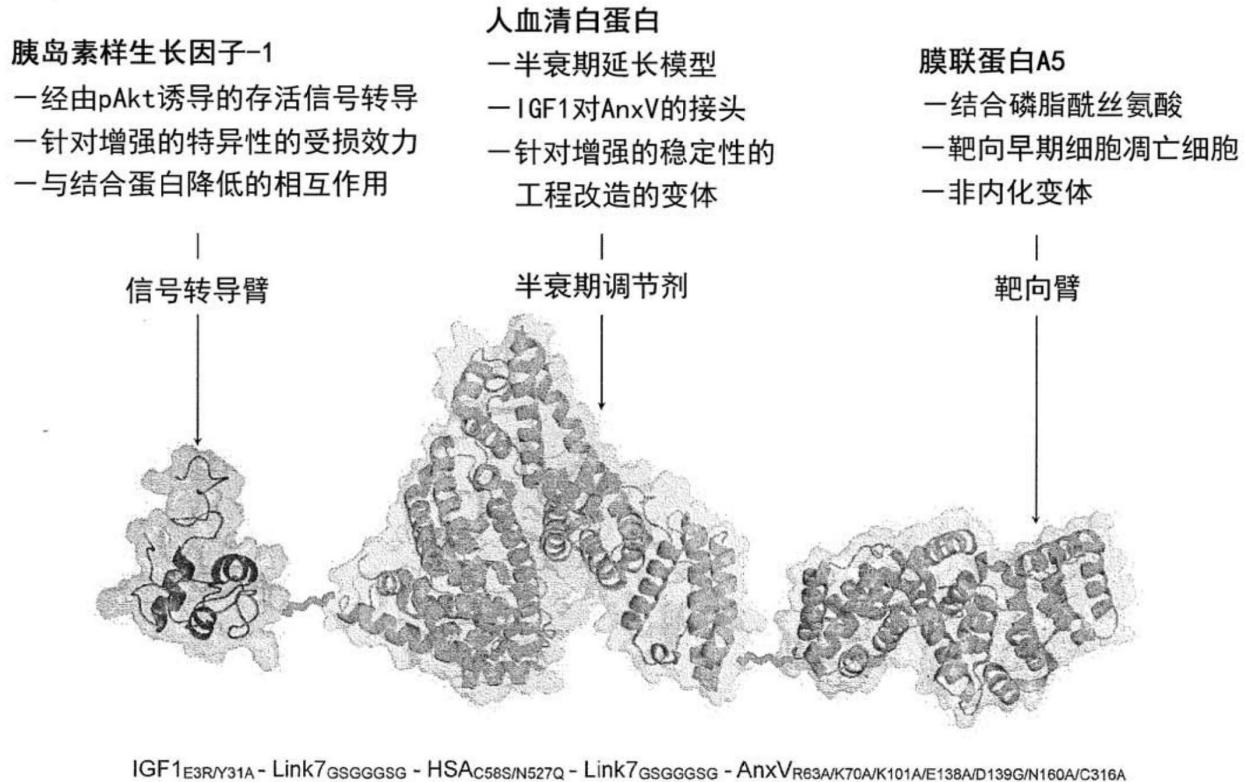


图10