



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104955843 B

(45)授权公告日 2019.08.13

(21)申请号 201480003714.6

(22)申请日 2014.01.28

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 104955843 A

(43)申请公布日 2015.09.30

(30)优先权数据  
61/757,571 2013.01.28 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日  
2015.06.26

(86)PCT国际申请的申请数据  
PCT/US2014/013402 2014.01.28

(87)PCT国际申请的公布数据  
W02014/117160 EN 2014.07.31

(73)专利权人 夏尔人类遗传性治疗公司  
地址 美国马萨诸塞州  
专利权人 明尼苏达大学董事会

(72)发明人 S·约西亚 T·M·卢比 A·朝仓  
D·基夫 L·查纳斯 M·维马

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

(51)Int.Cl.

C07K 16/28(2006.01) (续)

(56)对比文件

WO 2006055809 A2,2006.05.26,  
Verma M. 等.《Flt-1 haploinsufficiency  
ameliorates muscular dystrophy phenotype  
by developmentally increased vasculature  
in mdx mice》.《Human Molecular Genetics》  
.2010,第19卷(第21期),

Yan Wu 等.《Anti-Vascular Endothelial  
Growth Factor Receptor-1Antagonist》.  
《Clinical Cancer Research》.2006,第12卷(第  
21期),

Verma M. 等.《Flt-1 haploinsufficiency  
ameliorates muscular dystrophy phenotype  
by developmentally increased vasculature  
in mdx mice》.《Human Molecular Genetics》  
.2010,第19卷(第21期), (续)

审查员 黄炎

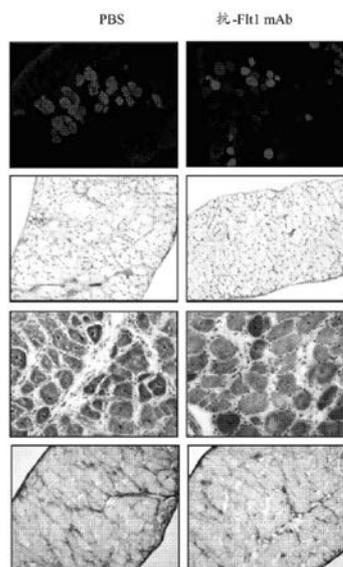
权利要求书2页 说明书19页  
序列表2页 附图10页

(54)发明名称

治疗杜兴氏肌营养不良的抗FLT-1抗体

(57)摘要

本发明尤其提供用于治疗肌营养不良、特别是杜兴氏肌营养不良(DMD)的方法和组合物。在一些实施方案中,根据本发明的方法包括向罹患或易患DMD的个体施用有效量的抗Flt-1抗体或其抗原结合片段以使DMD的至少一种症状或特征在强度、严重性或频率方面得以降低,或延迟发作。



CN 104955843 B

[接上页]

(51) Int.Cl.

A61K 39/395(2006.01)

Growth Factor Receptor-1Antagonist》.

《Clinical Cancer Research》.2006,第12卷(第12期),

(56)对比文件

Yan Wu等.《Anti-Vascular Endothelial

1. 一种抗F1t-1单克隆抗体在制备治疗杜兴氏肌营养不良 (DMD) 的药物中的应用, 其中将所述药物向罹患或易患DMD的个体施用以提供有效量的所述抗F1t-1单克隆抗体, 以使DMD的至少一种症状或特征在强度、严重性或频率方面得以降低, 或延迟发作, 且其中所述抗F1t-1单克隆抗体抑制VEGF结合F1t-1受体。

2. 如权利要求1所述的应用, 其中所述抗F1t-1单克隆抗体选自由IgG、F(ab')<sub>2</sub>、F(ab)<sub>2</sub>、Fab'、Fab、ScFv、双链抗体、三链抗体和四链抗体组成的组。

3. 如权利要求2所述的应用, 其中所述抗F1t-1单克隆抗体是IgG。

4. 如权利要求3所述的应用, 其中所述抗F1t-1单克隆抗体是IgG1。

5. 如前述权利要求中任一项所述的应用, 其中所述抗F1t-1单克隆抗体是人源化单克隆抗体。

6. 如权利要求5所述的应用, 其中所述人源化单克隆抗体含有人Fc区。

7. 如权利要求6所述的应用, 其中所述Fc区含有一个或多个增强所述Fc区与FcRn受体之间的结合亲和力以使所述抗体的体内半衰期得以延长的突变。

8. 如权利要求7所述的应用, 其中所述Fc区在一个或多个对应于人IgG1的Thr 250、Met 252、Ser 254、Thr 256、Thr 307、Glu 380、Met 428、His 433和/或Asn 434的位置处含有一个或多个突变。

9. 如权利要求1-4和6-8所述的应用, 其中所述抗F1t-1单克隆抗体经胃肠外施用。

10. 如权利要求9所述的应用, 其中所述胃肠外施用选自静脉内、皮内、鞘内、吸入、经皮、眼内、肌肉内、皮下和/或经粘膜施用。

11. 如权利要求10所述的应用, 其中所述胃肠外施用是静脉内施用。

12. 如权利要求10所述的应用, 其中所述胃肠外施用是皮下施用。

13. 如权利要求1-4、6-8和10-12中任一项所述的应用, 其中所述抗F1t-1单克隆抗体经口服施用。

14. 如权利要求1-4、6-8和10-12中任一项所述的应用, 其中所述抗F1t-1单克隆抗体每两月、每月、每三周、每两周、每周、每日或以可变间隔施用。

15. 如权利要求1-4、6-8和10-12中任一项所述的应用, 其中所述抗F1t-1单克隆抗体被递送至一种或多种的骨骼肌。

16. 如权利要求1-4、6-8和10-12中任一项所述的应用, 其中所述抗F1t-1单克隆抗体被递送至一种或多种选自膈肌、三头肌、比目鱼肌、胫骨前肌、腓肠肌、趾长伸肌、腹直肌和/或四头肌的靶标组织。

17. 如权利要求1-4、6-8和10-12中任一项所述的应用, 其中所述抗F1t-1单克隆抗体被递送至膈肌。

18. 如权利要求1-4、6-8和10-12中任一项所述的应用, 其中所述抗F1t-1单克隆抗体被递送至心脏。

19. 如权利要求1-4、6-8和10-12中任一项所述的应用, 其中所述抗F1t-1单克隆抗体的施用导致肌肉再生、纤维化减少、稳定性增加、肌肉强度增加、灵活性增加、活动范围增加、耐力增加、易疲劳性降低、血流增加、认知改进、肺功能改进和/或炎症抑制。

20. 如权利要求1-4、6-8和10-12中任一项所述的应用, 其中所述DMD的至少一种症状或特征选自以下组成的组: 肌肉萎缩、肌肉无力、肌肉脆弱、肌肉肥大、肌肉假性肥大、关节

挛缩、骨骼变形、心肌病、吞咽受损、肠和膀胱功能受损、肌肉缺血、认知损害、行为功能障碍、社交损害、脊柱侧凸和呼吸功能受损。

## 治疗杜兴氏肌营养不良的抗FLT-1抗体

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2013年1月28日提交的美国临时申请序列号61/757,571的权益,所述美国临时申请的公开内容以引用的方式整体并入本文。

[0003] 背景

[0004] 杜兴氏肌营养不良 (Duchenne muscular dystrophy, DMD) 是一种影响约3,600分之1的男孩的隐性X染色体关联形式的肌营养不良,其导致肌肉退化以及最终死亡。所述病症是由位于人X染色体上的肌营养不良蛋白 (dystrophin) 基因的突变引起,所述基因编码蛋白质肌营养不良蛋白,所述肌营养不良蛋白是肌肉组织内的一种对细胞膜的肌营养不良蛋白聚糖复合物 (DGC) 提供结构稳定性的重要结构组分。肌营养不良蛋白连接内部细胞质肌动蛋白微丝网状结构和细胞外基质,从而对肌肉纤维提供物理强度。因此,改变肌营养不良蛋白或不存在肌营养不良蛋白会导致肌纤维膜功能异常。尽管两性均可携带突变,但女性很少展现所述疾病的见于男孩中的典型临床特征。

[0005] 目前,不存在用于DMD的已知治愈方法。已探究若干治疗途径,包括基因疗法和施用皮质类固醇。尽管这些治疗中的一些可延迟某些症状,但目前不存在用于DMD患者的满意治疗选项。

[0006] 发明概述

[0007] 本发明尤其提供用于基于抗F1t-1抗体疗法来治疗肌营养不良、特别是杜兴氏肌营养不良 (DMD) 和/或贝克尔肌营养不良 (Becker Muscular Dystrophy) 的改进方法和组合物。如以下实施例中所述,本发明是部分地基于发现抗F1t-1抗体或其抗原结合片段可抑制VEGF和其它配体结合F1t-1受体,由此增加可用于结合VEGF受体的VEGF和/或其它配体的量。DMD症状的结构性和功能性改进得以增进。实际上,如实施例中所示,本发明者已证明施用抗F1t-1抗体会改进DMD的动物模型中肌肉病变以及肌肉功能的量度。因此,本发明提供用于治疗DMD的安全且有效的基于抗体的治疗剂。

[0008] 在一些实施方案中,本发明提供治疗杜兴氏肌营养不良 (DMD) 的方法,其包括向罹患或易患DMD的个体施用有效量的抗F1t-1抗体或其抗原结合片段以使DMD的至少一种症状或特征在强度、严重性或频率方面得以降低,或延迟发作。

[0009] 在一些实施方案中,抗F1t-1抗体或其抗原结合片段经胃肠外施用。在一些实施方案中,胃肠外施用选自静脉内、皮内、鞘内、吸入、经皮(局部)、眼内、肌肉内、皮下和/或经粘膜施用。

[0010] 在一些实施方案中,抗F1t-1抗体或其抗原结合片段经口服施用。

[0011] 在一些实施方案中,抗F1t-1抗体或其抗原结合片段被递送至一种或多种选自横纹肌(例如骨骼肌、心肌)的靶标组织。在一些实施方案中,抗F1t-1抗体或其抗原结合片段被递送至心脏。在一些实施方案中,抗F1t-1抗体或其抗原结合片段被递送至骨骼肌。在一些实施方案中,抗F1t-1抗体或其抗原结合片段被递送至一种或多种选自表1的骨骼肌。在一些实施方案中,横纹肌(例如骨骼肌)选自由三头肌、胫骨前肌、比目鱼肌、腓肠肌、二头肌、斜方肌、三角肌、四头肌和膈肌组成的组。

[0012] 在一些实施方案中,横纹肌选自由三头肌、胫骨前肌、比目鱼肌、腓肠肌、二头肌、斜方肌、三角肌、四头肌和膈肌组成的组。

[0013] 在一些实施方案中,抗F1t-1抗体或其抗原结合片段每两月、每月、每三周、每两周、每周、每日或以可变间隔施用。

[0014] 在一些实施方案中,施用抗F1t-1抗体或其抗原结合片段会导致肌肉再生、纤维化减少、肌肉强度增加、稳定性增加、灵活性增加、活动范围增加、耐力增加、易疲劳性降低、血流增加、认知改进、肺功能改进和/或炎症抑制。

[0015] 在一些实施方案中,施用抗F1t-1抗体或其抗原结合片段会降低至少一种DMD症状的强度、严重性或频率或延迟其发作。在一些实施方案中,施用抗F1t-1抗体或其抗原结合片段会降低至少一种DMD症状的强度、严重性或频率或延迟其发作,所述症状选自由以下组成的组:肌肉萎缩、肌肉无力、肌肉脆弱、肌肉肥大、肌肉假性肥大、关节挛缩、骨骼变形、心肌病、吞咽受损、肠和膀胱功能受损、肌肉缺血、认知损害、行为功能障碍、社交损害、脊柱侧凸和呼吸功能受损。

[0016] 在一些实施方案中,本发明提供特征在于能够抑制VEGF结合F1t-1受体的抗体或其抗原结合片段。

[0017] 在一些实施方案中,抗F1t-1抗体或其抗原结合片段的特征在于在表面等离子体共振(例如BIACORE)结合测定中,能够以大于 $10^{-9}$ M、大于 $10^{-10}$ M、大于 $0.5 \times 10^{-10}$ M、大于 $10^{-11}$ M、大于 $0.5 \times 10^{-11}$ M、大于 $10^{-12}$ M、或大于 $0.5 \times 10^{-12}$ M的亲和力结合人F1t-1。

[0018] 在一些实施方案中,抗F1t-1抗体或其抗原结合片段的特征在于在用人F1t-1进行的竞争测定中的 $IC_{50}$ 低于100pM、低于10pM、或低于1pM。在一些实施方案中,抗F1t-1抗体或其抗原结合片段的特征在于在竞争测定中,抑制VEGF结合人F1t-1的 $IC_{50}$ 低于100pM、低于10pM、或低于1pM。在一些实施方案中,抗F1t-1抗体或其抗原结合片段的特征在于在竞争测定中,抑制PLGF结合人F1t-1的 $IC_{50}$ 低于100pM、低于10pM、或低于1pM。

[0019] 在一些实施方案中,抗F1t-1抗体或其抗原结合片段不结合VEGFR2 (F1k-1) 和/或VEGFR3 (F1t-4)。

[0020] 在一些实施方案中,抗F1t-1抗体或其抗原结合片段结合小鼠或猴F1t-1。在一些实施方案中,抗F1t-1抗体或其抗原结合片段不结合小鼠或猴F1t-1。

[0021] 在一些实施方案中,抗F1t-1抗体或其抗原结合片段选自由IgG、F(ab')<sub>2</sub>、F(ab)<sub>2</sub>、Fab'、Fab、ScFv、双链抗体、三链抗体和四链抗体组成的组。

[0022] 在一些实施方案中,抗F1t-1抗体或其抗原结合片段是IgG。在一些实施方案中,抗F1t-1抗体或其抗原结合片段是IgG1。

[0023] 在一些实施方案中,抗F1t-1抗体或其抗原结合片段是单克隆抗体,并且在某些实施方案中,是人源化单克隆抗体。在一些实施方案中,人源化单克隆抗体含有人Fc区。在一些实施方案中,Fc区含有一个或多个增强Fc区与FcRn受体之间的结合亲和力以使抗体的体内半衰期得以延长的突变。在一些实施方案中,Fc区在一个或多个对应于人IgG1的Thr 250、Met 252、Ser 254、Thr 256、Thr 307、Glu 380、Met 428、His 433和/或Asn 434的位置处含有一个或多个突变。

[0024] 在一些实施方案中,本发明提供一种包含抗F1t-1抗体或其抗原结合片段以及药学上可接受的载体的药物组合物。

[0025] 如本申请中所用,术语“约”和“近似”用作等效语。与或不与约/近似一起用于本申请中的任何数字都意图涵盖由相关领域普通技术人员所了解的任何正常波动。

[0026] 本发明的其它特征、目标和优势在以下详细描述中显而易见。然而,应了解尽管指示本发明的实施方案,但详细描述是通过仅仅说明而非限制的方式给出。在本发明的范围内的各种变化和修改将根据详细描述而变得为本领域技术人员显而易见。

[0027] 附图简述

[0028] 图1显示说明用可溶性人F1t-1抗原免疫的小鼠的抗可溶性人F1t-1抗血清滴度的示例性结果。描绘在施用之后20天,5只单独Balb/c小鼠的抗sF1t-1血清滴度。

[0029] 图2显示说明在ELISA中单克隆抗体与人可溶性F1t-1的竞争性结合的示例性结果。描绘杂交瘤上清液关于VEGF在人F1t-1上结合的竞争ELISA。阴性对照(纯化多克隆小鼠IgG)不显示关于人F1t-1的任何竞争,而融合产物01A04和阳性对照商业抗体Abcam56300是竞争性结合剂。

[0030] 图3显示与可溶性人F1t-1的示例性单克隆抗体结合。描绘来自杂交瘤克隆01A04-02B10亚克隆的纯化IgG相对于人sF1t-1抗原的直接结合ELISA。基于吸光度读数和显微形态,选择亚克隆01A04-02B10-02G07用于进一步按比例放大和表征。

[0031] 图4显示说明通过表面等离子体共振(BIACORE)测定获得的单克隆抗体与可溶性人F1t-1结合的示例性结果。描绘杂交瘤克隆01A04(亚克隆02B10-02G07) IgG结合固定的人sF1t-1抗原的表面等离子体共振传感图。

[0032] 图5显示说明单克隆抗体与食蟹猕猴(猴)F1t-1结合的交叉反应性的示例性结果。描绘来自杂交瘤克隆01A04(亚克隆02B10-02G07)的纯化IgG与过度表达人F1t-1和食蟹猕猴F1t-1的细胞系的结合。深色直方图代表同种型对照抗体。浅色直方图代表单克隆抗体01A04-02B10-02G7。

[0033] 图6显示说明在ELISA中单克隆抗体与人可溶性F1t-1的竞争性结合的示例性结果。描绘单克隆抗体01A04(亚克隆02B10-02G07)相对于商业基准的VEGF:sF1t-1IC<sub>50</sub>测定结果。值是通过进行相应IgG关于VEGF在人F1t-1上结合的竞争ELISA来获得。阴性对照(纯化多克隆小鼠IgG)不显示关于人F1t-1的任何竞争,而单克隆抗体01A04和来自Abeam的商业抗sF1t-1抗体(目录号56300)竞争VEGF结合位点。单克隆抗体01A04是比商业基准更强大的拮抗剂。01A04的IC<sub>50</sub>是2.3pM。Abcam 56300的IC<sub>50</sub>是65pM。

[0034] 图7显示说明在基于细胞的测定中抗F1t-1单克隆抗体抑制VEGF结合sF1t-1的示例性结果。在存在或不存在重组人可溶性F1t-1(15X摩尔当量,36nM)和单克隆抗体01A04(亚克隆02B10-02G07)下用重组人VEGF(100ng/mL,2.4nM)处理初级HUVEC。添加01A04会拯救VEGF诱导的HUVEC活化,如通过VEGF R2的细胞质尾部的磷酸化所测量。单独单克隆抗体01A04对受体磷酸化无影响,而在VEGF和可溶性F1t-1存在下,对照IgG不能拯救信号传导。

[0035] 图8显示说明通过施用抗F1t-1抗体达成的肌肉组织病理学改进的示例性显微照片。描绘在用抗sF1t-1单克隆抗体治疗之后,mdx肌肉病变的改进。用针对sF1t-1的商业单克隆抗体(Angio Proteomie,克隆AP-MAB0702)或作为对照的PBS治疗动物。顶行显示对膈肌的伊文思蓝染料染色。第二行显示用以定量血管的对膈肌的CD31染色。第三行显示对膈肌的H+E染色。底行显示用以定量纤维化的对膈肌的范杰森染色(van Giesson staining)。

[0036] 图9显示说明对组织病理学标记的定量的示例性结果,所述结果指示通过向小鼠

施用抗F1t-1抗体,肌肉组织学得以改进。描绘对图8中呈现的组织病理学数据的定量。在4x和10x放大倍数下对伊文思蓝阳性纤维(顶部图)、CD31+血管(第二图);和中心定位核(第三图)的数目进行手动计数。使用图像分析软件对总纤维化面积定量(底部图)。\*= $p < 0.05$ ,根据学生不成对t检验。

[0037] 图10显示说明对组织病理学标记的定量的示例性结果,所述结果指示通过向小鼠施用抗F1t-1抗体,肌肉组织学得以改进。描绘对图8中呈现的组织病理学数据的定量。顶部:在用抗F1t1单克隆抗体治疗之后,膈肌中具有中心定位核(CLN)的纤维降低。在4x和10x放大倍数下对具有CLN的纤维进行手动计数。底部:在用抗F1t1单克隆抗体治疗之后,膈肌中略微变换至较大纤维尺寸。在4x和10x放大倍数下对纤维直径进行手动计数。\*= $p < 0.05$ ,根据学生不成对t检验。

[0038] 图11显示说明F1t-1抗体对肌肉功能的体内功效的示例性结果。相较于施用PBS的对照mdx小鼠,向mdx小鼠施用F1t-1抗体使关于抓握测试(上部图)和跑台测试(下部图)的表现改进。对每个动物独立测量3次动物抓握强度,其中各试验相隔30分钟。对每个动物测量3次总跑台距离。

[0039] 图12显示说明血清中的游离可溶性F1t1的体内降低的示例性结果。相较于同种型对照抗体,向mdx小鼠施用F1t-1抗体导致血液中的可溶性F1t1的水平高度显著降低。在4周龄开始,每周两次持续四周在20mg/kg下对动物给药。在尸检时,收集血液供生物标记分析。\*\*\* $p < 0.001$ ,相对于同种型。

[0040] 图13显示说明血清VEGF浓度的体内增加的示例性结果。相较于同种型对照抗体,向mdx小鼠施用F1t-1抗体导致血液中的游离VEGF的水平高度显著增加。在4周龄开始,每周两次持续四周在20mg/kg下对动物给药。在尸检时,收集血液供生物标记分析。\*\*\* $p = 0.0063$ ,相对于同种型。

[0041] 图14显示说明膈肌中的血管生成的体内增加的示例性结果。相较于同种型对照抗体,向mdx小鼠施用F1t-1抗体导致膈肌中的内皮细胞增殖显著增加,如通过CD31染色所例示。在4周龄开始,每周两次持续四周在20mg/kg下对动物给药。在尸检时,保存组织供组织病理学分析。描绘对内皮细胞标记CD31的染色。在用抗F1t-1单克隆抗体治疗之后,内皮细胞数目存在统计显著增加( $p < 0.05$ )。使用自动定量成像软件分析数据。研究者对样本不知情。

[0042] 定义

[0043] 为使本发明更易于理解,以下首先定义某些术语。以下术语和其它术语的其它定义在整篇说明书中加以阐述。

[0044] 动物:如本文所用,术语“动物”是指动物界的任何成员。在一些实施方案中,“动物”是指处于任何发育阶段的人。在一些实施方案中,“动物”是指处于任何发育阶段的非人动物。在某些实施方案中,非人动物是哺乳动物(例如啮齿动物、小鼠、大鼠、兔、猴、狗、猫、绵羊、牛、灵长类动物和/或猪)。在一些实施方案中,动物包括但不限于哺乳动物、鸟、爬行动物、两栖动物、鱼、昆虫和/或蠕虫。在一些实施方案中,动物可为转基因动物、遗传工程化动物和/或克隆。

[0045] 抗体:如本文所用,术语“抗体”是指任何免疫球蛋白,无论是天然的或完全或部分合成产生。其维持特定结合能力的所有衍生物也都包括在所述术语中。所述术语也涵盖具

有与免疫球蛋白结合结构域同源或大部分同源的结合结构域的任何蛋白质。所述蛋白质可源于天然来源,或部分或完全合成产生。抗体可为单克隆的或多克隆的。抗体可为任何免疫球蛋白类别的成员,所述类别包括人类别:IgG、IgM、IgA、IgD和IgE中的任一个。在某些实施方案中,抗体可为IgG免疫球蛋白类别的成员。如本文所用,术语“抗体片段”或“抗体的特征部分”可互换使用,并且是指抗体的小于全长的任何衍生物。一般来说,抗体片段保留全长抗体的至少一大部分的特定结合能力。抗体片段的实例包括但不限于Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、scFv、Fv、dsFv双链抗体和Fd片段。抗体片段可通过任何手段产生。举例来说,抗体片段可通过使完整抗体断裂来酶促产生或化学产生,和/或它可由编码部分抗体序列的基因重组产生。或者或另外,抗体片段可完全或部分合成产生。抗体片段可任选包括单链抗体片段。或者或另外,抗体片段可包含例如通过二硫键连接在一起的多个链。抗体片段可任选包括多分子复合物。功能性抗体片段通常包含至少约50个氨基酸,并且更通常包含至少约200个氨基酸。在一些实施方案中,抗体可为人抗体。在一些实施方案中,抗体可为人源化抗体。

[0046] 抗原结合片段:如本文所用,术语“抗原结合片段”是指免疫球蛋白分子的接触并结合抗原(即F1t-1)的部分。

[0047] 近似或约:如本文所用,如应用于一个或多个目标值的术语“近似”或“约”是指值类似于所述参照值。在某些实施方案中,除非另外陈述或另外根据上下文是明显的,否则术语“近似”或“约”是指一定范围的值落在所述参照值在任一方向(大于或小于)上的25%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%或小于1%内(例外之处是当所述数值将超过可能值的100%时)。

[0048] 生物活性:如本文所用,短语“生物活性”是指在生物系统中,并且特别是在生物体中具有活性的任何药剂的特征。举例来说,当向生物体施用,对那个生物体具有生物作用的药剂被视为具有生物活性。在特定实施方案中,当肽具有生物活性时,那个肽的共有所述肽的至少一种生物活性的部分通常称为“生物活性”部分。在某些实施方案中,不具有内在生物活性但抑制一种或多种VEGF配体的结合的肽被视为具有生物活性。

[0049] 载体或稀释剂:如本文所用,术语“载体”和“稀释剂”是指适用于制备药物制剂的药学上可接受的(例如安全和无毒用于向人施用)载体或稀释物质。示例性稀释剂包括无菌水、抑菌注射用水(BWFI)、pH缓冲溶液(例如磷酸盐缓冲盐水)、无菌盐水溶液、林格氏溶液(Ringer's solution)或右旋糖溶液。

[0050] 剂型:如本文所用,术语“剂型”和“单位剂型”是指用于待治疗的患者的治疗性蛋白质(例如抗体)的物理个别单元。各单元含有被计算来产生所需治疗作用的预定量的活性物质。然而,应了解组合物的总剂量将由主治医师在合理医学判断的范围内决定。

[0051] 功能性等效物或衍生物:如本文所用,在氨基酸序列的功能性衍生物的情形下,术语“功能性等效物”或“功能性衍生物”表示保留大致上类似于原始序列的生物活性的生物活性(功能或结构)的分子。功能性衍生物或等效物可为天然衍生物,或是合成制备。示例性功能衍生物包括具有一个或多个氨基酸的取代、缺失或添加的氨基酸序列,前提是蛋白质的生物活性得以保全。取代性氨基酸合乎需要地具有与被取代的氨基酸的化学物理性质类似的化学物理性质。合乎需要的类似化学物理性质包括电荷、体积大小、疏水性、亲水性等方面的类似性。

[0052] 融合蛋白:如本文所用,术语“融合蛋白”或“嵌合蛋白”是指通过接合两个或更多

个最初分开的蛋白质或其部分产生的蛋白质。在一些实施方案中,接头或间隔子将存在于各蛋白质之间。

[0053] 半衰期:如本文所用,术语“半衰期”是为如蛋白质浓度或活性的数量降至它的如在某一时期开始时测量的值的一半所需的时间。

[0054] 肥大:如本文所用,术语“肥大”是指器官或组织的体积由于它的组成细胞的增大而增加。

[0055] 改进、增加或降低:如本文所用,术语“改进”、“增加”或“降低”或语法等效形式指示相对于基线测量结果的值,所述基线测量结果如同一个体中在启始本文所述的治疗之前的测量结果,或对照受试者(或多个对照受试者)中不存在本文所述的治疗下的测量结果。“对照受试者”是与所治疗的受试者受相同形式的疾病折磨,与所治疗的受试者具有大约相同的年龄的受试者。

[0056] 体外:如本文所用,术语“体外”是指事件发生在人工环境中,例如试管或反应容器中,细胞培养物中等,而非在多细胞生物体内。

[0057] 体内:如本文所用,术语“体内”是指事件发生在多细胞生物体,如人和非人动物内。在基于细胞的系统的情形下,所述术语可用于指代事件发生在活细胞内(与例如体外系统相反)。

[0058] 接头:如本文所用,术语“接头”是指在融合蛋白中,除出现在天然蛋白质中的特定位置处的氨基酸序列以外的氨基酸序列,并且通常被设计来具有可挠性或插入两个蛋白质部分之间的结构,如 $\alpha$ -螺旋。接头也称为间隔子。接头或间隔子通常自身不具有生物功能。

[0059] 药学上可接受:如本文所用的术语“药学上可接受”是指在合理医学判断的范围内适于与人类和动物的组织接触使用而无过度毒性、刺激、过敏反应或其它问题或并发症,与合理益处/风险比相称的物质。

[0060] 多肽:如本文所用的术语“多肽”是指通过肽键连接在一起的氨基酸的连续链。所述术语用于指代具有任何长度的氨基酸链,但本领域普通技术人员应了解,所述术语不限于长链,并且可指包含两个通过肽键连接在一起的氨基酸的最小链。如为本领域技术人员所知,多肽可被加工和/或修饰。

[0061] 预防:如本文所用,术语“预防(prevent/prevention)”在与疾病、病症和/或病状的发生关联使用时是指降低发展所述疾病、病症和/或病状的风险。参见对“风险”的定义。

[0062] 蛋白质:如本文所用的术语“蛋白质”是指一个或多个充当个别单元的多肽。如果单一多肽是个别功能性单元,并且不需要与其它多肽永久或暂时物理缔合以形成个别功能性单元,那么术语“多肽”和“蛋白质”可互换使用。如果个别功能性单元包含一个以上彼此物理缔合的多肽,那么术语“蛋白质”是指物理偶联并且一起充当个别单元的多个多肽。

[0063] 风险:如将根据上下文所了解,疾病、病症和/或病状的“风险”包括特定个体将发展疾病、病症和/或病状(例如DMD)的可能性。在一些实施方案中,将风险表示为百分比。在一些实施方案中,风险是0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90直至100%。在一些实施方案中,将风险表示为相对于与某一参照样本或一组参照样本相关的风险的风险。在一些实施方案中,某一参照样本或一组参照样本具有疾病、病症、病状和/或事件(例如DMD)的已知风险。在一些实施方案中,某一参照样本或一组参照样本来自与特定个体相当的个体。在一些实施方案中,相对风险是0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更大。

[0064] 横纹肌:如本文所用,术语“横纹肌”是指多核肌肉组织,其中它们的细胞内收缩性单位(即肌节)规则排列,从而导致在使用显微术下出现条纹并处于随意控制下。通常,横纹肌可为心肌、骨骼肌和鳃节肌。

[0065] 平滑肌:如本文所用,术语“平滑肌”是指不随意控制的非横纹肌,包括单一肌肉和多单位肌肉。

[0066] 受试者:如本文所用,术语“受试者”是指人或任何非人动物(例如小鼠、大鼠、兔、狗、猫、牛、猪、绵羊、马或灵长类动物)。人包括出生前和出生后形式。在许多实施方案中,受试者是人类。受试者可为患者,其是指向医疗提供者递呈以诊断或治疗疾病的人。术语“受试者”在本文中可与“个体”或“患者”互换使用。受试者可受疾病或病症折磨或易患疾病或病症,但可或可不显示所述疾病或病症的症状。

[0067] 大致上:如本文所用,术语“大致上”是指展现总体或接近总体范围或程度的目标特征或性质的定性情况。生物领域普通技术人员将了解如果发生,那么生物和化学现象很少达到完全和/或进行至完全或达成或避免绝对结果。因此,术语“大致上”在本文中用于获取许多生物和化学现象中固有的潜在完全性缺乏。

[0068] 大致同源性:短语“大致同源性”在本文中用于指代氨基酸或核酸序列之间的比较。如将由本领域普通技术人员所了解,如果两个序列在相应位置中含有同源残基,那么它们通常被视为“大致上同源”。同源残基可为相同残基。或者,同源残基可为将具有适当类似结构和/或功能特征的非相同残基。举例来说,如本领域普通技术人员所熟知,某些氨基酸通常被分类为“疏水性”或“亲水性”氨基酸,和/或具有“极性”或“非极性”侧链。将一个氨基酸取代成另一相同类型可常被视为“同源”取代。

[0069] 如本领域中所熟知,可使用多种算法中的任一个比较氨基酸或核酸序列,所述算法包括如针对核苷酸序列的BLASTN以及针对氨基酸序列的BLASTP、空位BLAST和PSI-BLAST的商业计算机程序中可用的那些。示例性所述程序描述于Altschul等,basic local alignment search tool,J.Mol.Biol.,215(3):403-410,1990;Altschul等,Methods in Enzymology;Altschul等,“Gapped BLAST and PSI-BLAST:a new generation of protein database search programs”,Nucleic Acids Res.25:3389-3402,1997;Baxevanis等,Bioinformatics:A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins,Wiley,1998;以及Misener等(编),Bioinformatics Methods and Protocols(Methods in Molecular Biology,第132卷),Humana Press,1999中。除鉴定同源序列之外,以上提及的程序也通常提供同源性程度的指示。在一些实施方案中,如果两个序列的相应残基中的至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多在残基的相关链段上是同源的,那么它们被视为大致上同源。在一些实施方案中,相关链段是完整序列。在一些实施方案中,相关链段是至少10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、125、150、175、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、500个或更多个残基。

[0070] 大致同一性:短语“大致同一性”在本文中用于指代氨基酸或核酸序列之间的比较。如将由本领域普通技术人员所了解,如果两个序列在相应位置中含有相同残基,那么它们通常被视为“大致上相同”。如本领域中所熟知,可使用多种算法中的任一个比较氨基酸或核酸序列,所述算法包括如针对核苷酸序列的BLASTN以及针对氨基酸序列的BLASTP、空

位BLAST和PSI-BLAST的商业计算机程序中可用的那些。示例性所述程序描述于Altschul等, Basic local alignment search tool, *J. Mol. Biol.*, 215(3):403-410, 1990; Altschul等, *Methods in Enzymology*; Altschul等, *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402, 1997; Baxevanis等, *Bioinformatics: A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins*, Wiley, 1998; 以及Misener等(编), *Bioinformatics Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology, 第132卷)*, Humana Press, 1999中。除鉴定相同序列之外, 以上提及的程序也通常提供同一性程度的指示。在一些实施方案中, 如果两个序列的相应残基中的至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多在残基的相关链段上是相同的, 那么它们被视为大致上相同。在一些实施方案中, 相关链段是完整序列。在一些实施方案中, 相关链段是至少10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、125、150、175、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、500个或更多个残基。

[0071] 罹患: 正“罹患”疾病、病症和/或病状的个体已被诊断有或显示所述疾病、病症和/或病状的一种或多种症状。

[0072] 易患: “易患”疾病、病症和/或病状的个体尚未被诊断有所述疾病、病症和/或病状。在一些实施方案中, 易患疾病、病症和/或病状的个体可不展现所述疾病、病症和/或病状的症状。在一些实施方案中, 易患疾病、病症、病状或事件(例如DMD)的个体可具有一个或多个以下特征: (1) 与发展所述疾病、病症和/或病状相关的遗传突变; (2) 与发展所述疾病、病症和/或病状相关的遗传多态性; (3) 与所述疾病、病症和/或病状相关的蛋白质的表达和/或活性增加和/或降低; (4) 与所述疾病、病症、病状的发展和/或事件相关的习惯和/或生活方式; (5) 已经受、计划经受或需要移植。在一些实施方案中, 易患疾病、病症和/或病状的个体将发展所述疾病、病症和/或病状。在一些实施方案中, 易患疾病、病症和/或病状的个体将不发展所述疾病、病症和/或病状。

[0073] 靶标组织: 如本文所用, 术语“靶标组织”是指受待治疗的疾病, 如DMD影响的任何组织。在一些实施方案中, 靶标组织包括显示疾病相关的病变、症状或特征, 包括但不限于肌肉萎缩、骨骼变形、心肌病、肌肉缺血、认知损害和呼吸功能受损的那些组织。

[0074] 治疗有效量: 如本文所用, 术语治疗剂的“治疗有效量”是指当向罹患或易患疾病、病症和/或病状的受试者施用, 足以治疗、诊断、预防所述疾病、病症和/或病状的症状和/或延迟其发作的量。本领域普通技术人员应了解, 治疗有效量通常是通过包含至少一个单位剂量的给药方案施用。

[0075] 治疗: 如本文所用, 术语“治疗(treat/treatment/treating)”是指用于部分或完全减轻、改善、缓和、抑制、预防特定疾病、病症和/或病状的一种或多种症状或特征、延迟其发作、减轻其严重性、和/或降低其发生率的任何方法。治疗可向不展现疾病的征象和/或仅展现所述疾病的早期征象的受试者施用, 以达成降低发展与所述疾病相关的病变的风险的目的。

[0076] 某些实施方案的详述

[0077] 本发明尤其提供用于基于作为治疗剂的抗Flt-1抗体或其抗原结合片段来治疗肌营养不良, 包括杜兴氏肌营养不良(DMD)和/或贝克尔肌营养不良的方法和组合物。在一些实施方案中, 本发明提供治疗DMD的方法, 其包括向罹患或易患DMD的个体施用有效量的

F1t-1抗体或其抗原结合片段以使DMD的至少一种症状或特征在强度、严重性或频率方面得以降低,或延迟发作。

[0078] 本发明的各个方面详述于以下章节中。使用所述章节不意图限制本发明。各章节可适用于本发明的任何方面。在本申请中,除非另外陈述,否则使用“或”是指“和/或”。

[0079] 杜兴氏肌营养不良 (DMD)

[0080] DMD是一种特征在于全身肌肉进行性退化以及肌肉相关功能丧失的疾病。预期本发明提供用于减缓、延迟或预防肌肉退化,再生肌肉以及使各种肌肉组织中与DMD和其它肌营养不良相关的纤维化、炎症和其它症状或特征逆转、消除、延迟、预防或减至最小限度的方法和组合物。

[0081] 肌肉组织

[0082] 在动物中存在两种主要类型的肌肉组织-横纹肌和平滑肌。如本文所用,术语“横纹肌”是指含有重复肌节的肌肉组织。横纹肌倾向于处于随意控制下,并且连接于骨骼。横纹肌允许身体随意运动,并且包括主要肌肉群,包括四头肌、腓肠肌、二头肌、三头肌、斜方肌、三角肌和许多其它肌肉群。横纹肌倾向于是极长的,并且许多横纹肌能够独立地起作用。然而,一些横纹肌不连接于骨骼,包括口腔、肛门、心脏和食道上部中的那些。

[0083] 另一方面,平滑肌具有极其不同的结构。并非是具有单独骨骼连接的一系列长肌,平滑肌倾向于组织成连续薄片,其中在平滑肌细胞之间具有机械连接。平滑肌常位于中空器官的壁中,并且通常不处于随意控制下。衬于特定器官的平滑肌必须承担相同负荷并同时收缩。平滑肌至少部分地起处理中空器官上由运动和/或姿势或压力变化引起的负荷变化的作用。这个双重作用意味着平滑肌必须不仅能够像横纹肌一样收缩,而且它必须能够紧张性收缩以针对持续负荷维持器官尺寸。平滑肌的实例是衬于血管、细支气管、膀胱和胃肠道(如直肠)的那些。

[0084] 肌肉的强度取决于肌肉细胞的数目和尺寸以及它们的解剖排列。通过合成新肌原纤维(肥大)和/或形成更多肌肉细胞(增生)来增加肌肉纤维的直径将使肌肉的力量产生能力增加。

[0085] 肌肉也可根据位置或功能来分组。在一些实施方案中,使F1t-1抗体或其抗原结合片段靶向面部的一种或多种肌肉、一种或多种用于咀嚼的肌肉、舌部和颈部的一种或多种肌肉、胸部的一种或多种肌肉、胸带和手臂的一种或多种肌肉、手臂和肩部的一种或多种肌肉、一种或多种腹侧和背侧前臂肌肉、手部的一种或多种肌肉、竖脊肌的一种或多种肌肉、骨盆带和腿部的一种或多种肌肉、和/或前腿和足部的一种或多种肌肉。

[0086] 在一些实施方案中,面部的肌肉包括但不限于眼内肌肉,如睫状肌、虹膜开大肌、虹膜括约肌;耳部的肌肉,如耳廓肌、颞顶肌、镫骨肌、鼓膜张肌;鼻部的肌肉,如降眉间肌、鼻肌、鼻孔开大肌、降鼻中隔肌、提上唇鼻翼肌;口腔的肌肉,如提口角肌、降口角肌、口轮匝肌、颊肌、颧大肌和颧小肌、颈阔肌、提上唇肌、降下唇肌、笑肌、颞肌和/或皱眉肌。

[0087] 在一些实施方案中,咀嚼肌包括但不限于咬肌、颞肌、翼内肌、翼外肌。在一些实施方案中,舌部和颈部的肌肉包括但不限于颞舌肌、茎突舌肌、舌腭肌、舌骨舌肌、二腹肌、茎突舌骨肌、下颌舌骨肌、颞舌骨肌、肩胛舌骨肌、胸骨舌骨肌、胸骨甲状肌、甲状舌骨肌、胸锁乳突肌、前斜角肌、中斜角肌和/或后斜角肌。

[0088] 在一些实施方案中,胸部、胸带和手臂的肌肉包括但不限于锁骨下胸大肌、胸小

肌、腹直肌、外腹斜肌、内腹斜肌、腹横肌、膈肌、肋间外肌、肋间内肌、前锯肌、斜方肌、肩胛提肌、大菱形肌、小菱形肌、背阔肌、三角肌、肩胛下肌、冈上肌、冈下肌、大圆肌、小圆肌和/或喙肱肌。

[0089] 在一些实施方案中,手臂和肩部的肌肉包括但不限于肱二头肌-长头、肱二头肌-短头、肱三头肌-长头、肱三头肌外侧头、肱三头肌-内侧头、肘肌、旋前圆肌、旋后肌和/或肱肌。

[0090] 在一些实施方案中,腹侧和背侧前臂的肌肉包括但不限于肱桡肌、桡侧腕屈肌、尺侧腕屈肌、掌长肌、尺侧腕伸肌、桡侧腕长伸肌、桡侧腕短伸肌、指伸肌、小指伸肌。

[0091] 在一些实施方案中,手部的肌肉包括但不限于手部的内附肌,如鱼际、拇短展肌、拇短屈肌、拇指对掌肌、小鱼际、小指展肌、小指短屈肌、小指对掌肌、骨间掌侧肌、骨间背侧肌和/或蚓状肌。

[0092] 在一些实施方案中,竖脊肌的肌肉包括但不限于颈肌、棘肌、最长肌和/或髂肋肌。

[0093] 在一些实施方案中,骨盆带和腿部的肌肉包括但不限于腰大肌、髂肌、股方肌、长收肌、短收肌、大收肌、股薄肌、缝匠肌、股四头肌(如股直肌、股外侧肌、股内侧肌、股中间肌)、腓肠肌、腓骨长肌(腓长肌)、比目鱼肌、臀大肌、臀中肌、臀小肌、腿筋:股二头肌:长头、腿筋:股二头肌:短头、腿筋:半腱肌、腿筋:半膜肌、阔筋膜张肌、耻骨肌和/或胫骨前肌。

[0094] 在一些实施方案中,前腿和足部的肌肉包括但不限于趾长伸肌、拇长伸肌、腓骨短肌、跖肌、胫骨后肌、拇长屈肌、趾短伸肌、拇短伸肌、展肌、拇短屈肌、小指展肌、小指屈肌、小指对掌肌、趾短伸肌、足部的蚓状肌、足底方肌或副屈肌、趾短屈肌、骨间背侧肌和/或骨间足底肌。

[0095] 示例性肌肉靶标概述于表1中。

[0096] 表1

[0097]	<b>眼轮匝肌</b>			
	眼内: 睫状肌、虹膜开大肌、虹膜括约肌			
	耳部: 耳廓肌、颞顶肌、镫骨肌、鼓膜张肌			
	鼻部: 降眉间肌、鼻肌、鼻孔开大肌、降鼻中隔肌、提上唇鼻翼肌			
	口腔: 提口角肌、降口角肌、口轮匝肌			
	颊肌	颧大肌和颧小肌	颈阔肌	提上唇肌

[0098]

降下唇肌	笑肌	颞肌	皱眉肌
肘肌	旋前圆肌	旋后肌	肱肌
<b>咀嚼肌</b>			
咬肌	颞肌	翼内肌	翼外肌
<b>舌部和颈部的肌肉</b>			
颞舌肌	茎突舌肌	舌腭肌	舌骨舌肌
二腹肌	茎突舌骨肌	下颌舌骨肌	颞舌骨肌
肩胛舌骨肌	胸骨舌骨肌	胸骨甲状肌	甲状舌骨肌
胸锁乳突肌	前斜角肌	中斜角肌	后斜角肌
<b>胸部、胸带和手臂的肌肉</b>			
锁骨下肌	胸大肌	胸小肌	腹直肌
外腹斜肌	内腹斜肌	腹横肌	膈肌
肋间外肌	肋间内肌	前锯肌	斜方肌
肩胛提肌	大菱形肌	小菱形肌	背阔肌
三角肌	肩胛下肌	冈上肌	冈下肌
大圆肌	小圆肌	喙肱肌	
<b>手臂和肩部</b>			
肱二头肌-长头	肱二头肌-短头	肱三头肌-长头	肱三头肌-外侧头
肱三头肌-内侧头	肘肌	旋前圆肌	旋后肌
肱肌			
<b>前臂肌肉：腹侧和背侧</b>			
肱桡肌	桡侧腕屈肌	尺侧腕屈肌	掌长肌
尺侧腕伸肌	桡侧腕长伸肌	桡侧腕短伸肌	指伸肌
小指伸肌	竖脊肌：颈肌	竖脊肌：棘肌	竖脊肌：最长肌
竖脊肌：髂肋肌			
手部的内附肌：鱼际、拇短展肌、拇短屈肌和拇指对掌肌			
手部的内附肌：小鱼际、小指展肌、小指短屈肌和小指对掌肌			
手部的内附肌：骨间掌侧肌、骨间背侧肌和蚓状肌			
<b>骨盆带和腿部的肌肉</b>			
髂腰肌：腰大肌	髂腰肌：髂肌	股方肌	长收肌
短收肌	大收肌	股薄肌	缝匠肌
股四头肌：	股四头肌：股外	股四头肌：股内	股四头肌：股中

	股直肌	侧肌	侧肌	间肌
	腓肠肌	腓骨长肌 (腓长肌)	比目鱼肌	臀大肌
	臀中肌	臀小肌	腿筋: 股二头肌: 长头	腿筋: 股二头肌: 短头
	腿筋: 半腱肌	腿筋: 半膜肌	阔筋膜张肌	耻骨肌
[0099]	胫骨前肌			
	<b>前腿和足部的肌肉</b>			
	趾长伸肌	拇长伸肌	腓骨短肌	跖肌
	胫骨后肌	拇长屈肌	趾短伸肌	拇短伸肌
	展肌	拇短屈肌	小指展肌	小指屈肌
	小指对掌肌	趾短伸肌	足部的蚓状肌	足底方肌或副屈肌
	趾短屈肌	骨间背侧肌	骨间足底肌	

#### [0100] 肌营养不良

[0101] 肌营养不良是一组导致肌肉退化,从而导致运动无力和受损的遗传病症。所有肌营养不良的主要特征都在于它们在性质上是进行性的。肌营养不良包括但不限于:杜兴氏肌营养不良 (DMD)、贝克尔肌营养不良、艾梅-德莱富斯 (Emery-Dreifuss) 肌营养不良、面肩胛臂性肌营养不良、肢带肌营养不良、以及1型和2型肌强直性营养不良,包括先天性形式的1型肌强直性营养不良。症状可随肌营养不良的类型而变化,其中一些或所有肌肉受影响。肌营养不良的示例性症状包括肌肉运动技能的发展延迟、使用一个或多个肌肉群有困难、吞咽、说话或进食有困难、垂涎、眼睑下垂、频繁跌倒、就成人而言某一肌肉或一组肌肉的强度损失、肌肉尺寸损失、由于身体无力或生物力学改变所致的行走问题和/或认知或行为损害/精神迟缓。

[0102] 尽管不存在用于肌营养不良的已知治愈方法,但在使用包括对症性疗法与疾病改进性疗法两者的若干支持性治疗。皮质类固醇、ACE抑制剂、血管紧张素受体阻断剂、物理疗法、矫正装置、轮椅或针对ADL和肺功能的其它辅助性医学装置通常用于肌营养不良中。心脏起搏器用于在肌强直性营养不良中预防猝死于心律不整。改进肌强直(不能松弛)的症状的抗肌强直剂包括美西律 (mexilitine),并且在一些情况下,包括苯妥英、普鲁卡因胺 (procainamide) 和奎宁 (quinine)。

#### [0103] 杜兴氏肌营养不良

[0104] 杜兴氏肌营养不良 (DMD) 是隐性X染色体关联形式的肌营养不良,其导致肌肉退化以及最终死亡。DMD的特征在于近端肌肉无力、步态异常、腓肠(小腿)肌肥大和肌酸激酶升高。许多DMD患者在年龄约5岁时被确诊,此时症状/征象通常变得更明显。受影响的个体通常在年龄约10-13岁时停止行走,并且由于心肺功能障碍而在他们的20多岁的中期至后期时或之前死亡。

[0105] 病症DMD是由位于人X染色体上的肌营养不良蛋白基因的突变引起,所述基因编码蛋白质肌营养不良蛋白,所述肌营养不良蛋白是肌肉组织内的一种对细胞膜的肌营养不良蛋白聚糖复合物 (DGC) 提供结构稳定性的重要结构组分。肌营养不良蛋白连接内部细胞质

肌动蛋白微丝网状结构和细胞外基质,从而对肌肉纤维提供物理强度。因此,改变肌营养不良蛋白或不存在肌营养不良蛋白会导致肌肉纤维的异常肌纤维膜撕裂和坏死。尽管两性均可携带突变,但女性很少展现重度疾病征象。

[0106] DMD的主要症状是与肌肉萎缩相关的肌肉无力,其中随意肌通常首先受影响,尤其影响臀部、骨盆区域、大腿、肩部的肌肉以及小腿肌肉。肌肉无力也发生在手臂、颈部和其它区域中。小腿常增大。征象和症状通常出现在6岁年龄之前,并且可早在婴儿期出现。其它身体症状包括但不限于独立行走的能力延迟、进行性行走、步进或奔跑困难、以及最终丧失行走能力(通常截至12岁年龄);频繁跌倒;疲劳;运动技能(奔跑、弹跳、跳跃)有困难;腰椎脊柱前凸增加,从而导致臀部屈肌缩短;跟腱和腿筋的功能性受损、结缔组织中的纤维化;肌肉纤维变形;由肌肉组织被脂肪和结缔组织替换引起的舌部和小腿肌肉的假性肥大(增大);神经行为病症(例如ADHD)的风险较高、学习障碍(阅读困难)、以及特定认知技能(具体来说短期言语性记忆)的非进行性薄弱;骨骼变形(在一些情况下包括脊柱侧凸)。

[0107] Flt-1受体

[0108] Flt-1受体,也称为血管内皮生长因子受体1,是一种由FLT1基因编码的受体。信号糖蛋白的血管内皮生长因子(VEGF)家族在胚胎发生和出生后生长期间充当血管生成的强力促进剂。具体来说,已显示VEGF-A配体与VEGF受体结合会促进血管渗透性,并且也会触发内皮细胞迁移、增殖和存活,并且新形成的内皮细胞提供新血管结构的基本结构。用于血管生成的主要VEGF信号分子VEGF-A通过VEGF受体-1(VEGFR-1,也称为Flt-1)和VEGF受体-2(VEGFR-2,也称为Flk-1)介导它的信号。也存在可溶形式的Flt-1(sFlt-1),但其缺乏细胞内信号传导结构域,因此据信仅通过隔离VEGF-A或与它结合的其它配体来发挥调控能力。sFlt-1和与细胞内信号转导路径关联的含有Flt-1结合位点的其它分子称为“诱饵受体”。Flt-1和Flk-1受体含有细胞外VEGF-A结合结构域和细胞内酪氨酸激酶结构域,并且两者均显示在成血管细胞和内皮细胞谱系的发育阶段和组织再生期间表达。相较于Flk-1,Flt-1对VEGF-A的结合亲和力大近似10倍( $K_d \sim 2-10 \text{pM}$ ),但较微弱酪氨酸激酶结构域指示在VEGF-A结合Flt-1之后的血管生成信号转导相比较来说弱于Flk-1信号。因此,纯合Flt-1基因敲除小鼠在胚胎期死于内皮细胞过度产生和血管组织破坏(disorganization)。相反,纯合Flk-1基因敲除小鼠死于组织化(organized)血管的归因于在胚胎发生期间缺乏卵黄囊血岛形成的发育缺陷。Flt-1受体与Flk-1受体两者均为正常发育所需,但选择性增大VEGF-A浓度可允许与Flk-1受体更大结合,并且诱导促血管生成作用,所述作用使毛细血管密度增加,并且促进肌肉再生、纤维化和炎症减轻、以及减轻各种肌肉组织中与DMD和其它肌营养不良相关的症状和特征。

[0109] 如本文所用,术语“Flt-1受体”是指可溶性Flt-1受体与膜缔合Flt-1受体两者或其功能性片段。

[0110] 抗Flt-1抗体

[0111] 如本文所用,术语“抗Flt-1抗体”是指结合Flt-1受体(例如可溶性或膜缔合Flt-1受体)的任何抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,产生以高亲和力结合Flt-1受体的抗Flt-1抗体。在不希望受理论束缚下,据信结合Flt-1受体的抗Flt-1抗体会抑制一种或多种内源性配体结合Flt-1,并且由此允许更大量的配体可用于与其它VEGF受体,如Flk-1受体缔合。在一些实施方案中,结合Flt-1受体的抗体使可用于结合其它VEGF受体的VEGF的

量增加。在一些实施方案中,结合Flt-1受体的抗体使可用于结合其它VEGF受体的胎盘生长因子(PLGF)的量增加。

[0112] 在一些实施方案中,抗Flt-1抗体或其抗原结合片段结合人Flt-1的亲合力大于约 $10^{-9}$ M、大于约 $10^{-10}$ M、大于约 $0.5 \times 10^{-10}$ M、大于约 $10^{-11}$ M、大于约 $0.5 \times 10^{-11}$ M、大于约 $10^{-12}$ M、或大于约 $0.5 \times 10^{-12}$ M。可例如在表面等离子体共振测定,如BIAcore测定中测量Flt-1抗体的亲合力。

[0113] 在一些实施方案中,抗Flt-1抗体或其抗原结合片段的特征在于在用人Flt-1进行的竞争测定中的 $IC_{50}$ 低于100pM、低于10pM、或低于1pM。

[0114] 在一些实施方案中,抗Flt-1抗体或其抗原结合片段抑制VEGF对Flt-1受体的结合和/或活性。在一些实施方案中,抗Flt-1抗体或其抗原结合片段的特征在于在竞争测定中,抑制VEGF结合人Flt-1的 $IC_{50}$ 低于100pM、低于10pM、或低于1pM。

[0115] 在一些实施方案中,抗Flt-1抗体或其抗原结合片段抑制PLGF对Flt-1受体的结合和/或活性。在一些实施方案中,抗Flt-1抗体或其抗原结合片段的特征在于在竞争测定中,抑制PLGF结合人Flt-1的 $IC_{50}$ 低于100pM、低于10pM、或低于1pM。

[0116] 在一些实施方案中,抗Flt-1抗体或其抗原结合片段选择性结合Flt-1,并且对其它VEGF受体具有最小限度结合或不具有可观结合。在一些实施方案中,抗Flt-1抗体或其抗原结合片段选择性结合Flt-1,并且对VEGFR2 (Flk-1) 和/或VEGFR3 (Flt-4) 具有最小限度结合或不具有可观结合。

[0117] 在一些实施方案中,抗Flt-1抗体或其抗原结合片段选择性结合人Flt-1,并且对其它哺乳动物Flt-1受体具有最小限度结合或不具有可观结合(例如结合亲合力小于 $10^{-7}$ M或 $10^{-6}$ M)。在一些实施方案中,抗Flt-1抗体或其抗原结合片段选择性结合人Flt-1,并且不结合猴Flt-1。在一些实施方案中,抗Flt-1抗体或其抗原结合片段选择性结合人Flt-1,并且不结合小鼠Flt-1。

[0118] 在一些实施方案中,抗Flt-1抗体或其抗原结合片段结合人Flt-1以及猴Flt-1。在一些实施方案中,抗Flt-1抗体或其抗原结合片段结合人Flt-1以及小鼠Flt-1。

[0119] 在一些实施方案中,抗Flt-1抗体或其抗原结合片段选自自由IgG、F(ab')<sub>2</sub>、F(ab)<sub>2</sub>、Fab'、Fab、ScFv、双链抗体、三链抗体和四链抗体组成的组。

[0120] 在一些实施方案中,抗Flt-1抗体或其抗原结合片段是IgG。在一些实施方案中,抗Flt-1抗体或其抗原结合片段是IgG1。

[0121] 在一些实施方案中,适合的抗Flt-1抗体含有Fc结构域或其结合FcRn受体的部分。作为非限制性实例,适合的Fc结构域可源于免疫球蛋白子类,如IgG。在一些实施方案中,适合的Fc结构域源于IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。特别适合的Fc结构域包括源于人抗体或人源化抗体的那些。

[0122] 预期Fc结构域与FcRn受体之间的结合改进会导致血清半衰期延长。因此,在一些实施方案中,适合的Fc结构域包含一个或多个导致与FcRn的结合改进的氨基酸突变。Fc结构域内实现与FcRn的结合改进的各种突变在本领域中是已知的,并且可适合于实施本发明。在一些实施方案中,适合的Fc结构域在一个或多个对应于人IgG1的Thr 250、Met 252、Ser 254、Thr 256、Thr 307、Glu 380、Met 428、His 433和/或Asn 434的位置处包含一个或多个突变。

[0123] 在一些实施方案中,抗FLT-1抗体或抗原结合片段含有间隔子和/或连接于另一实体。在一些实施方案中,接头或间隔子包含与GAPGGGGGAAAAAGGGGGGAP (SEQ ID NO:1) (GAG接头) 至少50% (例如至少55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 相同的序列。在一些实施方案中,接头或间隔子包含与GAPGGGGGAAAAAGGGGGGAP (SEQ ID NO:2) (GAG2接头) 至少50% (例如至少55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 相同的序列。在一些实施方案中,接头或间隔子包含与GAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPGGGGGAAAAAGGGGGGAPGGGGGAAAAAGGGGGGAP (SEQ ID NO:3) (GAG3接头) 至少50% (例如至少55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 相同的序列。

[0124] 产生抗F1t-1抗体和抗原结合片段

[0125] 适于本发明的重组抗F1t-1抗体或抗原结合片段可通过任何可用手段来产生。举例来说,可通过利用被工程化来表达重组抗F1t-1抗体或抗原结合片段编码核酸的宿主细胞系统来重组产生重组抗F1t-1抗体或抗原结合片段。

[0126] 当重组产生抗体时,可使用任何表达系统。仅举几例来说,已知表达系统包括例如卵、杆状病毒、植物、酵母或哺乳动物细胞。

[0127] 在一些实施方案中,适于本发明的重组抗F1t-1抗体或抗原结合片段是在哺乳动物细胞中产生。可根据本发明使用的哺乳动物细胞的非限制性实例包括但不限于BALB/c小鼠骨髓瘤株系(NS0/1, ECACC编号:85110503);人成视网膜细胞(PER.C6, CruCell, Leiden, The Netherlands);由SV40转化的猴肾CV1株系(COS-7, ATCC CRL1651)。

[0128] 在一些实施方案中,本发明提供由人细胞产生的重组抗F1t-1抗体或抗原结合片段。在一些实施方案中,本发明提供由CHO细胞产生的抗F1t-1抗体或抗原结合片段。

[0129] 药物组合物和施用

[0130] 本发明进一步提供一种药物组合物,其含有本文所述的抗F1t-1抗体或抗原结合片段以及生理可接受的载体或赋形剂。

[0131] 适合药学上可接受的载体包括但不限于水、盐溶液(例如NaCl)、盐水、缓冲盐水、醇、甘油、乙醇、阿拉伯胶(gum arabic)、植物油、苯甲醇、聚乙二醇、明胶、碳水化合物(如乳糖、直链淀粉或淀粉、糖(如甘露糖醇、蔗糖或其它糖、右旋糖))、硬脂酸镁、滑石、硅酸、粘稠石蜡、芳香油、脂肪酸酯、羟甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮等以及其组合。必要时,药物制剂可与不有害地与活性化合物反应或干扰它们的活性的助剂(例如润滑剂、防腐剂、稳定剂、湿润剂、乳化剂、用于影响渗透压的盐、缓冲剂、着色剂、调味剂和/或芳族物质等)混合。在优选实施方案中,使用适于静脉内施用的水溶性载体。

[0132] 必要时,适合的药物组合物或药剂也可含有少量湿润剂或乳化剂或pH缓冲剂。组合物可为液体溶液、混悬液、乳液、片剂、丸剂、胶囊、持续释放制剂或粉末。组合物也可用传统粘合剂和载体(如甘油三酯)配制成栓剂。口服制剂可包括标准载体,如医药级甘露糖醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、聚乙烯吡咯烷酮、糖精钠、纤维素、碳酸镁等。

[0133] 可根据常规程序将药物组合物或药剂配制成适合于向人类施用的药物组合物。举例来说,在一些实施方案中,用于静脉内施用的组合物通常是于无菌等张水性缓冲液中的溶液。必要时,组合物也可包括增溶剂和局部麻醉剂以减轻注射部位处的疼痛。通常,分开或以单位剂型混合在一起来将成分供应于如安瓿或药囊的指示活性剂的量的气密容器中,

所述单位剂型例如呈干燥冻干粉末或无水浓缩物形式。当组合物待通过输注施用，它可用含有无菌医药级水、盐水或右旋糖/水的输注瓶分配。当组合物是通过注射施用，可提供含无菌注射用水或盐水的安瓿以使成分可在施用之前加以混合。

[0134] 施用途径

[0135] 本文所述的抗Flt-1抗体或抗原结合片段(或含有本文所述的抗Flt-1抗体或抗原结合片段的组合物或药剂)是通过任何适当途径施用。在一些实施方案中，抗Flt-1抗体或抗原结合片段蛋白质或含有其的药物组合物经胃肠外施用。胃肠外施用可为静脉内、皮内、鞘内、吸入、经皮(局部)、眼内、肌肉内、皮下、肌肉内和/或经粘膜施用。在一些实施方案中，抗Flt-1抗体或抗原结合片段或含有其的药物组合物是皮下施用。如本文所用，术语“皮下组织”定义为紧靠在皮肤下的一层松散、不规则结缔组织。举例来说，皮下施用可通过向包括但不限于大腿区域、腹部区域、臀区域或肩胛区域的区域中注射组合物来进行。在一些实施方案中，抗Flt-1抗体或其抗原结合片段或含有其的药物组合物是静脉内施用。在一些实施方案中，抗Flt-1抗体或抗原结合片段或含有其的药物组合物经口服施用。必要时，可同时使用一种以上途径。

[0136] 在一些实施方案中，施用仅在个体中产生局部作用，而在其它实施方案中，施用遍及个体的多个部分产生作用，例如全身性作用。通常，施用导致向一种或多种靶标组织递送抗Flt-1抗体或抗原结合片段，所述组织包括但不限于肾、肝、脑、脊髓、肠道、眼、肺、脾、心脏、横纹肌和平滑肌。

[0137] 在一些实施方案中，横纹肌选自自由三头肌、胫骨前肌、比目鱼肌、腓肠肌、四头肌和膈肌组成的组。

[0138] 在一些实施方案中，平滑肌选自自由组成的组。

[0139] 剂型和给药方案

[0140] 在一些实施方案中，组合物是以治疗有效量和/或根据与特定所需结果相关(例如与治疗或降低如杜兴氏肌营养不良的肌营养不良的风险相关)的给药方案施用。

[0141] 待根据本发明施用的特定剂量或量可例如随以下而变化：所需结果的性质和/或程度、施用途径和/或时序的细节、和/或一种或多种特征(例如重量、年龄、个人史、遗传特征、生活方式参数、心脏缺陷的严重性和/或心脏缺陷的风险水平等或其组合)。所述剂量或量可由普通技术人员确定。在一些实施方案中，适当剂量或量是根据标准临床技术确定。或者或另外，在一些实施方案中，适当剂量或量是通过使用一种或多种体外或体内测定以帮助鉴定待施用的合乎需要或最优剂量范围或量来确定。

[0142] 在各种实施方案中，抗Flt-1抗体或其抗原结合片段是在治疗有效量下施用。通常，治疗有效量足以达成对受试者有意义的益处(例如治疗、调节、治愈、预防和/或改善潜伏疾病或病状)。在一些特定实施方案中，待施用的适当剂量或量可根据由体外或动物模型测试系统获得的剂量-反应曲线外推。

[0143] 在一些实施方案中，提供的组合物是以药物制剂形式提供。在一些实施方案中，药物制剂是或包含单位给药量以根据与达成如杜兴氏肌营养不良的肌营养不良的发生率或风险降低相关的给药方案来施用。

[0144] 在一些实施方案中，包含本文所述的抗Flt-1抗体或抗原结合片段的制剂是以单次剂量形式施用。在一些实施方案中，包含本文所述的抗Flt-1抗体或抗原结合片段的制剂

是在定期间隔下施用。如本文所用,在某一“间隔”下施用指示治疗有效量是定期施用(不同于一次性给药)。可通过标准临床技术确定间隔。在一些实施方案中,包含本文所述的抗F1t-1抗体或抗原结合片段的制剂每两月、每月、每月两次、每三周、每两周、每周、每周两次、每周三次、每日、每日两次或每6小时加以施用。视个体的需要而定,用于单一个体的施用间隔无需是固定间隔,而是可随时间变化。

[0145] 如本文所用,术语“每两月”是指每两个月施用一次(即每两个月一次);术语“每月”是指每个月施用一次;术语“每三周”是指每三周施用一次(即每三周一次);术语“每两周”是指每两周施用一次(即每两周一次);术语“每周”是指每周施用一次;并且术语“每日”是指每天施用一次。

[0146] 在一些实施方案中,包含本文所述的抗F1t-1抗体或抗原结合片段的制剂是在定期间隔下无限期施用。在一些实施方案中,包含本文所述的抗F1t-1抗体或抗原结合片段的制剂是在定期间隔下施用确定时期。

[0147] 在一些实施方案中,施用抗F1t-1抗体或其抗原结合片段会降低至少一种DMD征象或症状的强度、严重性或频率或延迟其发作。在一些实施方案中,施用抗F1t-1抗体或其抗原结合片段会降低至少一种DMD征象或症状的强度、严重性或频率或延迟其发作,所述征象或症状选自自由肌肉萎缩、骨骼变形、心肌病、肌肉缺血、认知损害和呼吸功能受损组成的组。

[0148] 在一些实施方案中,施用抗F1t-1抗体或其抗原结合片段会改进临床结果,如通过6分钟行走测试、定量肌肉强度测试、定时运动表现测试、Brooke和Vignos肢体功能量表、肺功能测试(用力肺活量、1秒内的用力呼气量、峰值呼气流速、最大吸气和呼气压压力)、健康相关的生活质量、膝和肘屈肌、肘伸肌、肩部外展、抓握强度、自仰卧位到起身的时间、North Start动态评估、定时10米行走/奔跑、Egen分类量表、Gowers计分、Hammersmith运动能力、手持式肌力量度器、活动范围、测角术、高碳酸血、婴儿和学步儿发育的Nayley量表和/或照顾者负担量表所测量。

[0149] 组合疗法

[0150] 在一些实施方案中,抗F1t-1抗体或抗原结合片段是与一种或多种当前用于治疗肌营养不良的已知治疗剂(例如皮质类固醇)组合施用。在一些实施方案中,已知治疗剂是根据它的标准或核准给药方案和/或时程施用。在一些实施方案中,已知治疗剂是根据相较于它的标准或核准给药方案和/或时程被改变的方案施用。在一些实施方案中,所述改变的方案在以下方面不同于标准或核准给药方案:一个或多个单位剂量的量被改变(例如降低或增加),和/或给药的频率被改变(例如单位剂量之间的一个或多个间隔被扩大,从而导致频率较低,或所述间隔被降低,从而导致频率较高)。

## 实施例

[0151] 实施例1.产生和表征高亲和力抗F1t-1抗体

[0152] 抗体01A04

[0153] 使用传统小鼠单克隆抗体方法针对可溶性F1t-1产生抗体。简要来说,用重组人可溶性F1t-1(购自ABCAM)免疫Balb/c小鼠。在免疫后第20天,通过ELISA来滴定动物的抗sF1t-1产量(图1)。发现一只小鼠是高滴度反应者;随后用抗原使这个动物加强免疫,并且在5天后处死。使来自这个动物的脾和淋巴结细胞融合于小鼠骨髓瘤伴侣以产生杂交瘤。相

对于sFlt-1抗原筛选杂交瘤上清液,并且按比例扩大阳性反应者并再测定其与人sFlt-1与小鼠sFlt-1两者的结合,以及与sFlt-1竞争结合VEGF的能力。不存在可结合人sFlt-1与小鼠sFlt-1两者的交叉反应性杂交瘤。然而,在人sFlt-1反应性杂交瘤之中,通过竞争ELISA鉴定出若干sFlt-1:VEGF拮抗剂(对于代表性实验,参见图2)。使这些拮抗剂中的最有力拮抗剂融合伴侣01A04经受三轮单细胞克隆以获得单克隆抗体01A04。进一步表征这个抗体对sFlt-1抗原的结合亲和力(ELISA、BIACORE和FACS);在sFlt-1:VEGF竞争ELISA中的IC<sub>50</sub>;以及在基于细胞的测定中的性能。

[0154] 抗体01A04表征-结合

[0155] 在克隆和亚克隆融合伴侣亲本之后,01A04亲本的多个亚克隆显示与固定的可溶性Flt-1结合(图3)。选择这些亚克隆中的一个(即单克隆01A04-02B10-02G07)用于按比例放大以及基于抗原结合、克隆形态和活力进行细胞存库。通过表面等离子体共振方法(BIACORE,参见图4)测定01A04-02B10-02G07对sFlt-1抗原的结合常数。单克隆抗体01A04-02B10-02G07是对人sFlt-1的亚纳摩尔浓度结合剂。

[0156] 抗体01A04表征-交叉反应性

[0157] 用FACS测试单克隆抗体01A04与在细胞上表达的Flt-1受体的结合。测试表达人Flt-1、小鼠Flt-1或食蟹猕猴Flt-1的三种转染细胞系。通过使细胞与抗体一起孵育1小时来测试与所有三种细胞系的结合。接着用抗小鼠IgG PE抗体揭示抗体与细胞的结合。结果显示于图5中。与ELISA和BIACORE数据一致,单克隆抗体01A04不结合小鼠Flt-1。然而,抗体不结合在细胞上表达的人Flt-1和食蟹猕猴Flt-1。

[0158] 抗体01A04表征-竞争

[0159] 为估计抗体的效能,使用被设置来筛选美洲驼Fab和IgG的竞争ELISA(使用人sFlt-1和VEGF)。测试10至0.01 $\mu$ g/ml的浓度范围的IgG。相对于阴性对照(纯化的多克隆小鼠IgG)与阳性对照(商业抗sFlt-1单克隆抗体Abcam56300)分子两者测定单克隆抗体01A04。计算半数最大抑制(IC<sub>50</sub>)值。结果呈现于图6中。

[0160] 抗体01A04表征-基于细胞的测定

[0161] 在存在或不存在可溶性Flt-1和单克隆抗体01A04下,用VEGF刺激人初级脐静脉内皮细胞(HUVEC)。通过测定VEGF R2受体的磷酸化状态来测定VEGF诱导的细胞活化。在可溶性Flt-1存在下,VEGF诱导的HUVEC活化被减弱。添加单克隆抗体01A04会通过拮抗可溶性Flt-1来拯救细胞活化(图7)。

[0162] 实施例2.抗Flt-1抗体的体内功效

[0163] 向mdx小鼠中施用抗Flt-1抗体

[0164] 在出生后第21天开始,用抗Flt-1抗体(0(PBS)、0.1mg或0.5mg,静脉内)注射小鼠(n=8)。抗Flt-1抗体源自商业供应商(Angio Proteomie,目录号AP-MAB0702)。这个抗体是一种已知Flt-1:VEGF拮抗剂。小鼠每3天接受注射直至第48天。在第53天,评估体内作用。在第二组实验中,相对于不结合Flt1的同种型匹配对照抗体测试抗体性能。自第28天直至第56天,小鼠每周两次在20mg/kg的固定剂量下接受注射。在第57天,评估体内作用。

[0165] 组织病理学

[0166] 相较于媒介物对照,用抗Flt-1抗体在0.5mg的剂量(静脉内)下治疗显著改进mdx小鼠的肌肉病变(图8、9和10)。具体来说,肌肉纤维完整性得以改进,如通过依文氏蓝染料

在膈肌中累积所确定(图8,上部图);纤维化得以减轻,如通过对膈肌的范杰森染色所确定(图8,下部图);并且肌肉坏死得以减轻,如通过对膈肌的苏木精和曙红(H+E)染色所确定(图8,自顶部开始的第三图)。肌肉纤维中的中心定位核(CLN)是一种与DMD相关的典型表型。抗体治疗组中的CLN较低指示纤维转换降低以及肌肉纤维稳定性增加(图10)。假设由于肌肉灌注增加而发生肌肉健康状况增加,因为抗体治疗的动物显示膈肌和胫骨前肌中的CD31+血管数目增加(图8,第二图;图14)。结果定量于图9、10和14中。进一步假设CD31+血管细胞的增殖由中和内源性VEGF拮抗剂可溶性F1t1(图12),从而导致治疗的小鼠的血流中的游离VEGF增加(图13)所致。

[0167] 肌肉功能

[0168] 用抗F1t-1抗体在0.5mg的剂量(静脉内)下治疗显著改进抓握测试中小鼠的肌肉功能(图1,上部图),并且在跑台测试中显示明确改进趋势(图11,下部图)。

[0169] 等效物和范围

[0170] 本领域技术人员将认识到或者仅使用常规实验能够确定本文所述的本发明的具体实施方案的许多等效物。本发明的范围不意图限于以上说明书,而是如以下权利要求中所阐述。

## 序列表

- <110> 夏尔人类遗传性治疗公司  
明尼苏达大学董事会
- <120> 治疗杜兴氏肌营养不良的抗FLT-1抗体
- <130> 2006685-0438
- <140> PCT/US2014/013402
- <141> 2014-01-28
- <150> US 61/757, 571
- <151> 2013-01-28
- <160> 3
- <170> PatentIn 3.5版
- <210> 1
- <211> 21
- <212> PRT
- <213> 人工序列
- <220>
- <223> 化学合成的肽

[0001]

&lt;400&gt; 1

Gly Ala Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gly Gly  
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ala Pro  
20

- <210> 2
- <211> 39
- <212> PRT
- <213> 人工序列

<220>

<223> 化学合成的肽

&lt;400&gt; 2

Gly Ala Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gly Gly  
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ala Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ala Ala Ala Ala Ala Gly  
20 25 30

Gly Gly Gly Gly Gly Ala Pro

35

<210> 3  
 <211> 57  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 化学合成的肽

<400> 3

[0002] Gly Ala Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gly Gly  
 1 5 10 15

Gly Gly Gly Ala Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ala Ala Ala Ala Ala Gly  
 20 25 30

Gly Gly Gly Gly Gly Ala Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ala Ala Ala Ala  
 35 40 45

Ala Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ala Pro  
 50 55

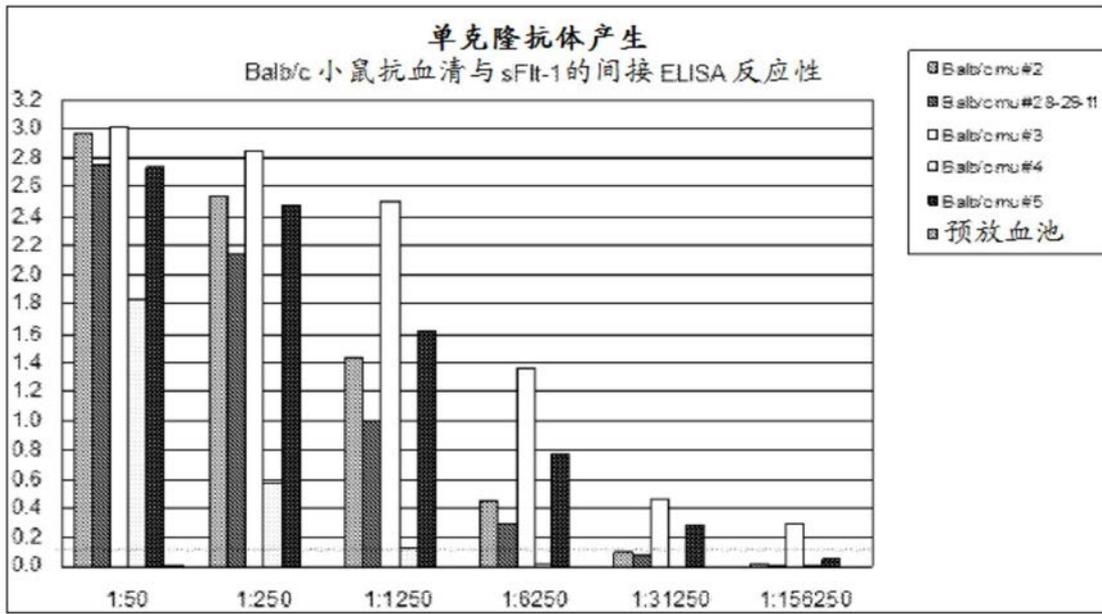


图1

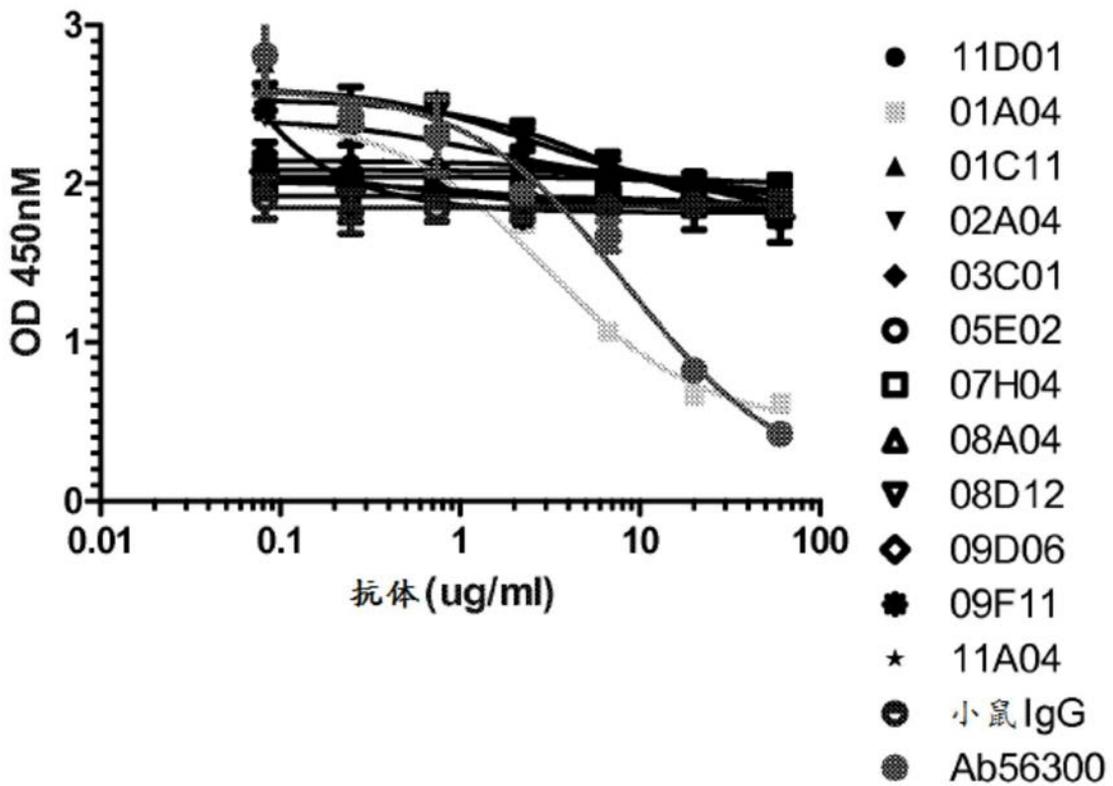


图2

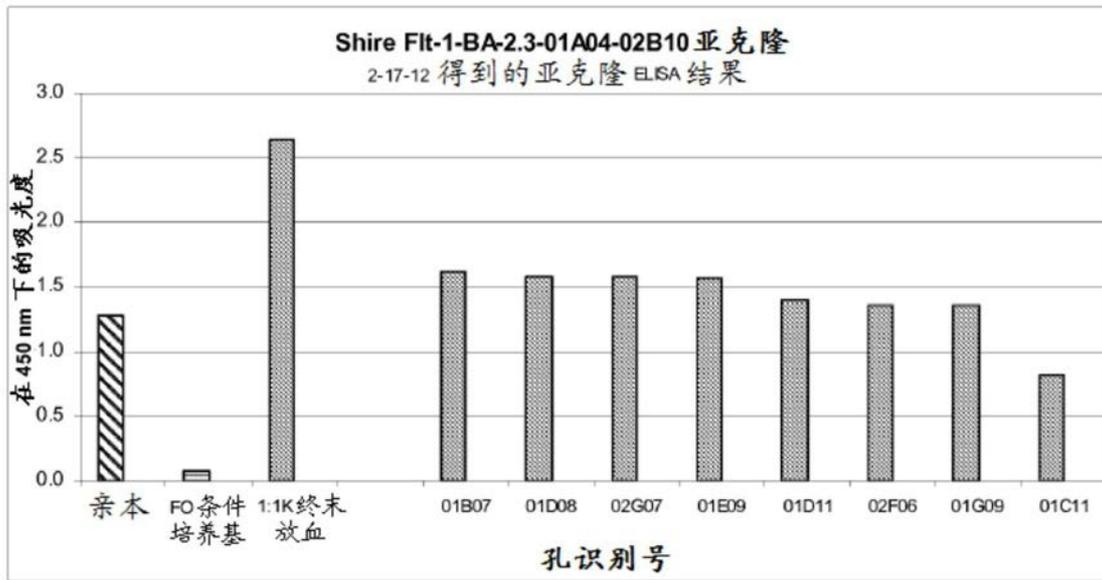
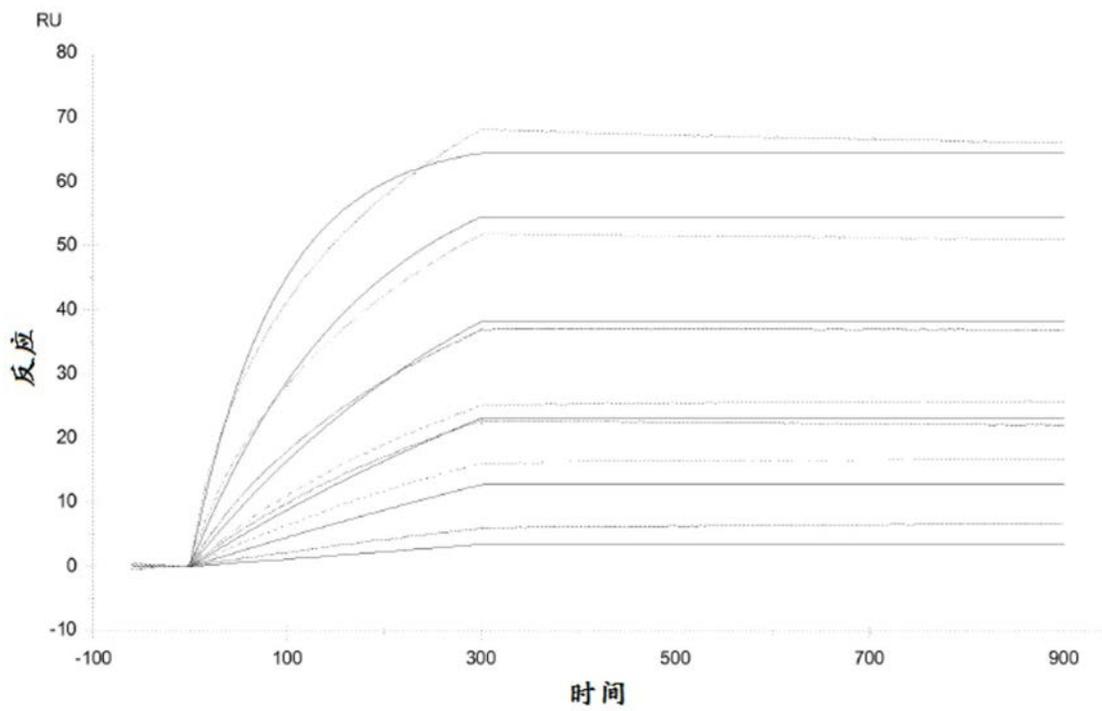


图3



ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	Rmax (RU)	tc	Chi² (RU²)
3.785E+5	6.516E-7	1.722E-12	66.70	1.307E+10	5.44

图4

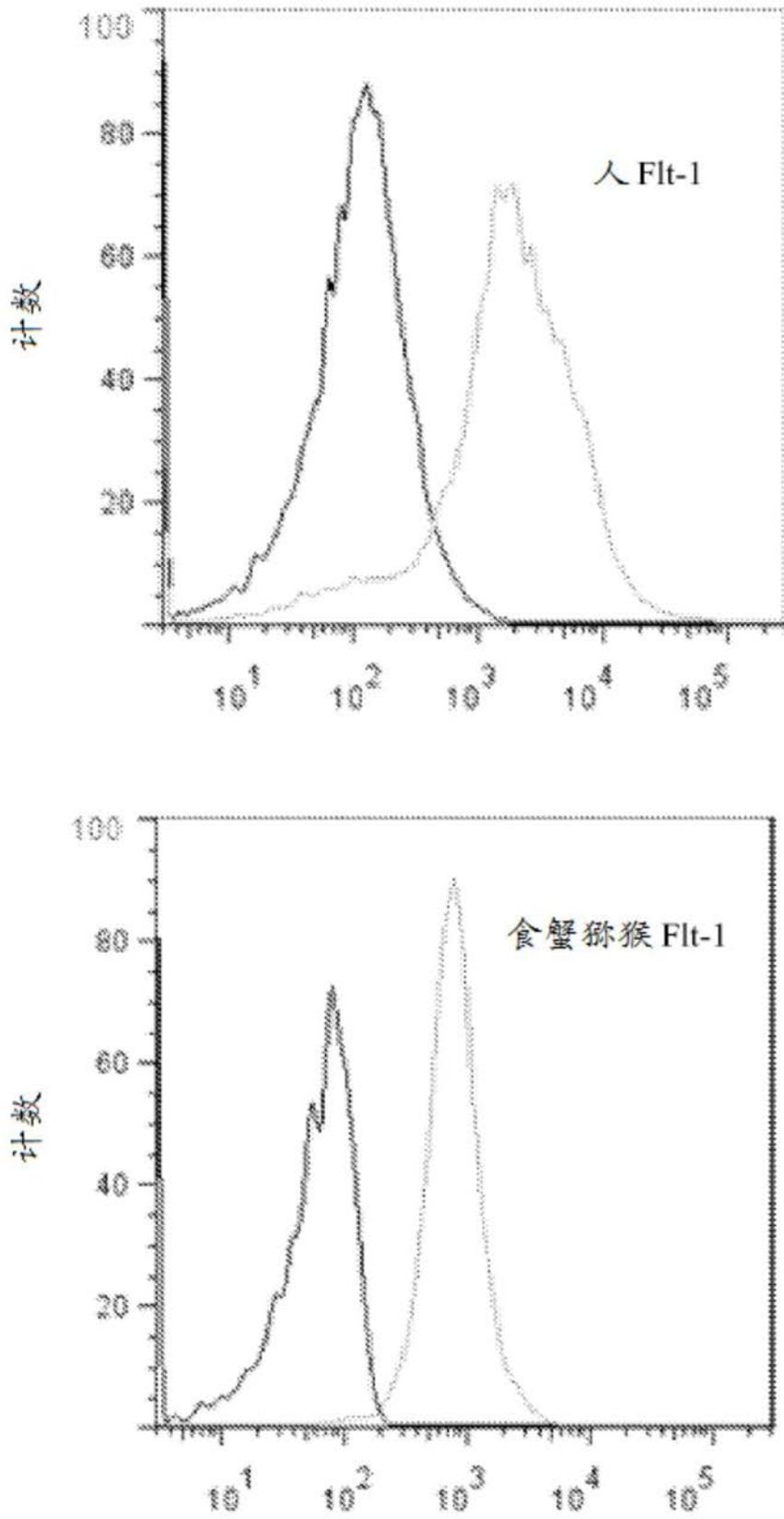


图5

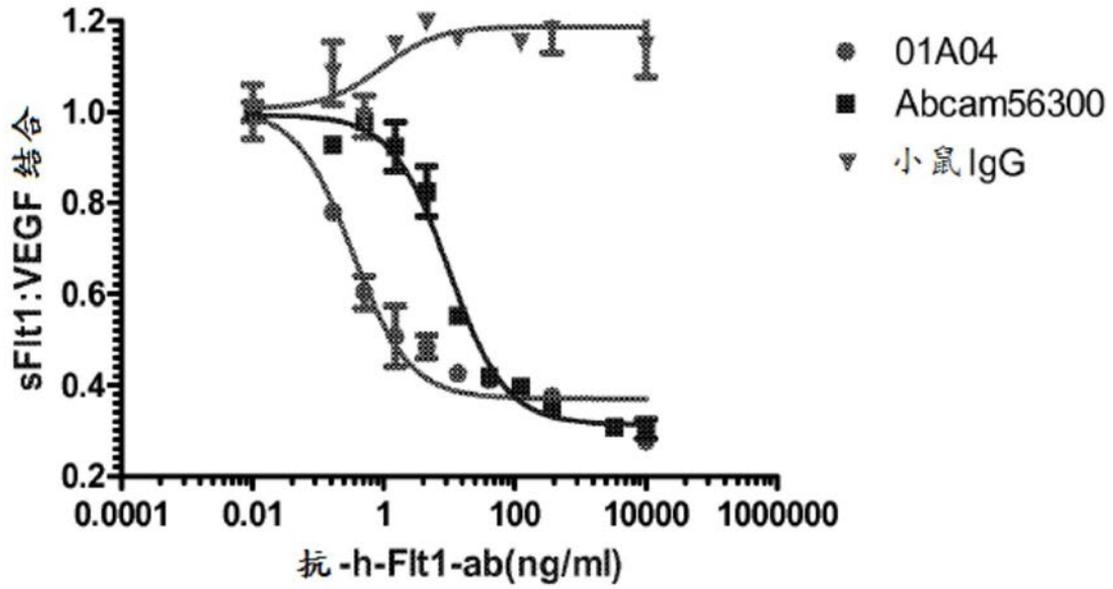


图6

基于 HUVEC VEGF 细胞的测定

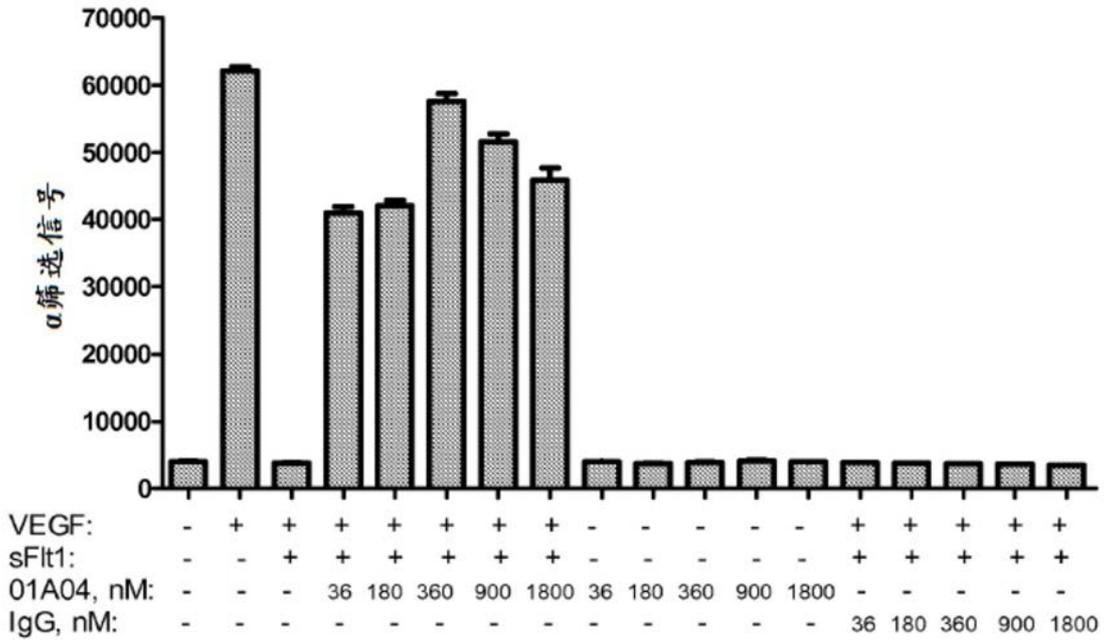


图7

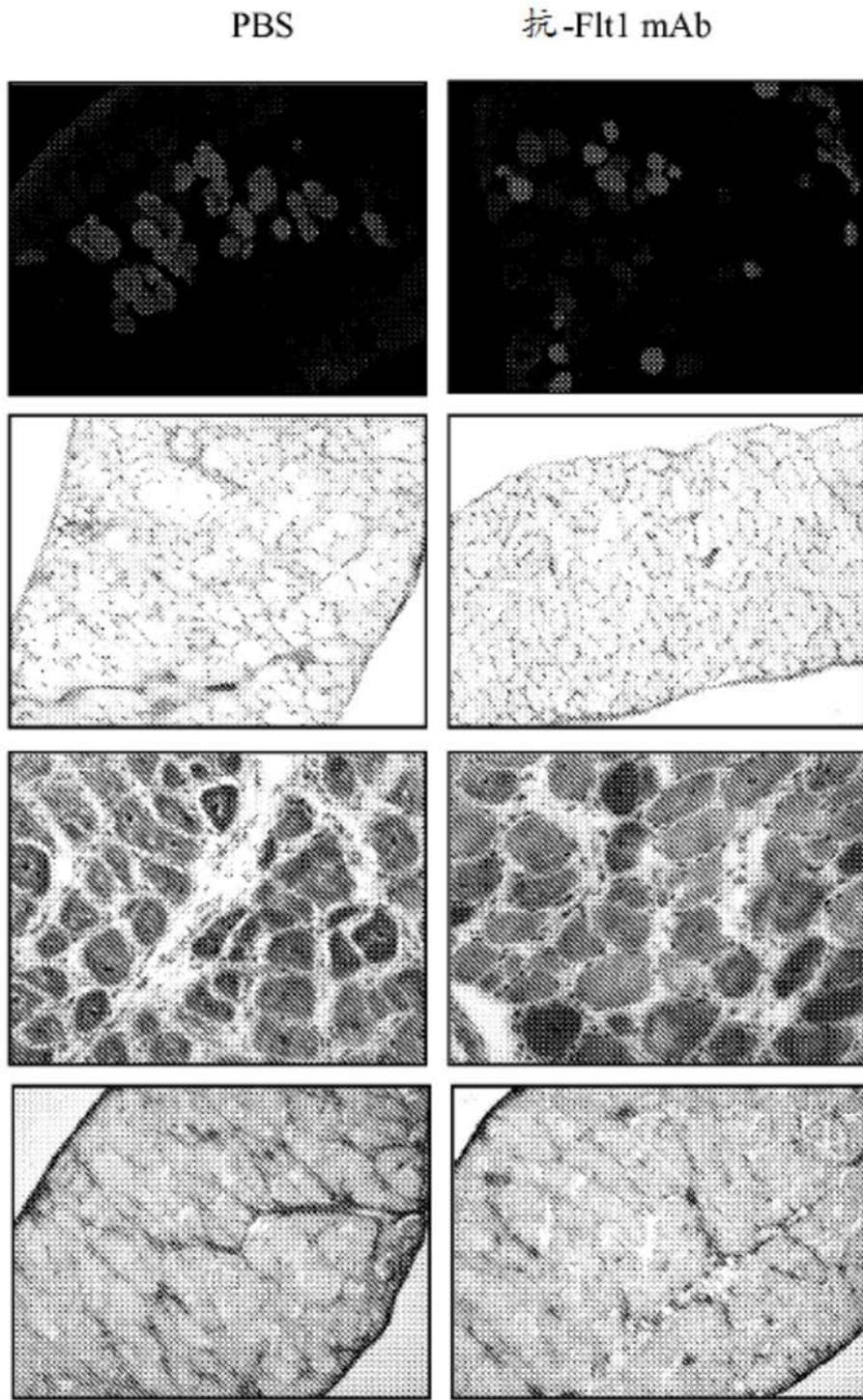


图8

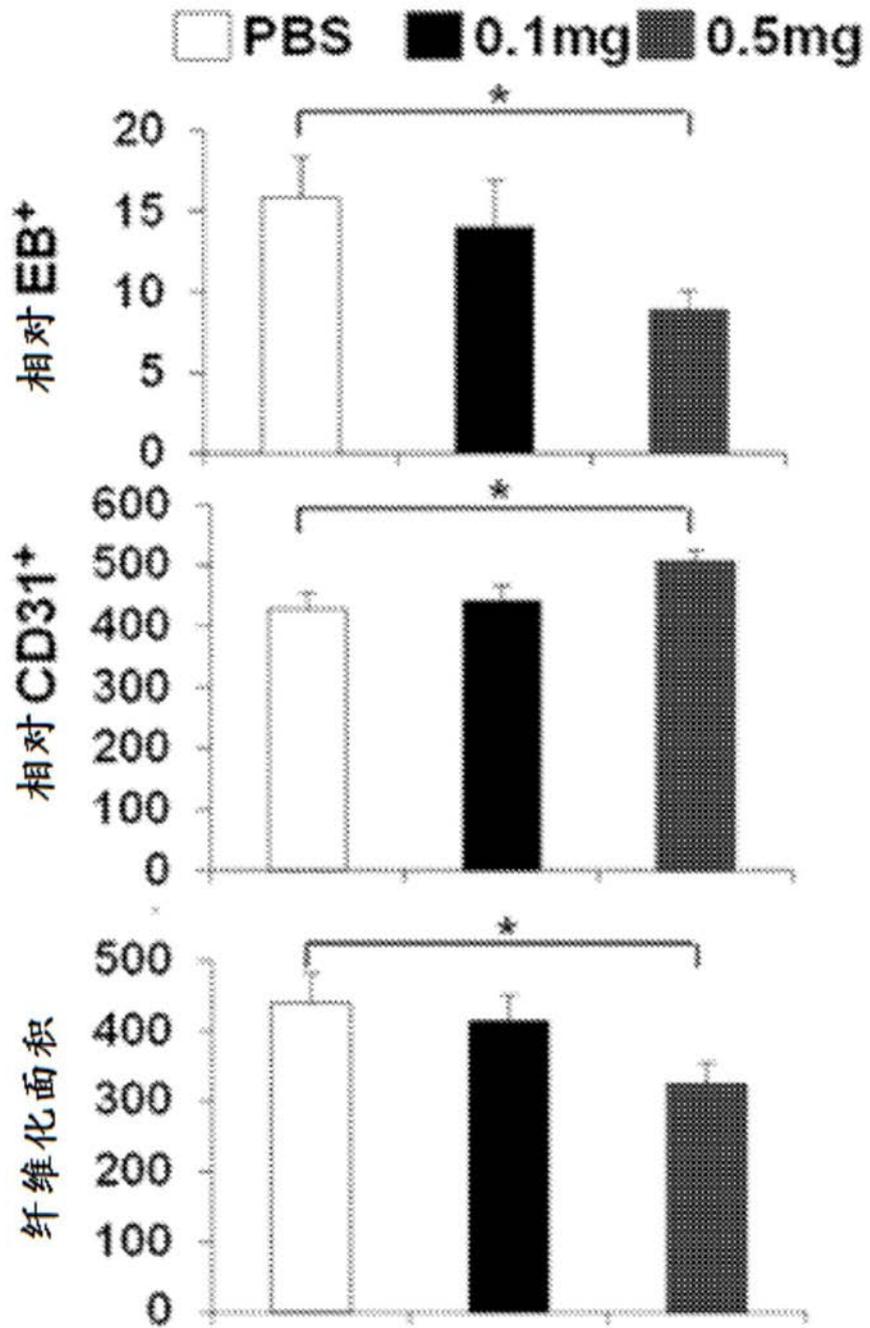


图9

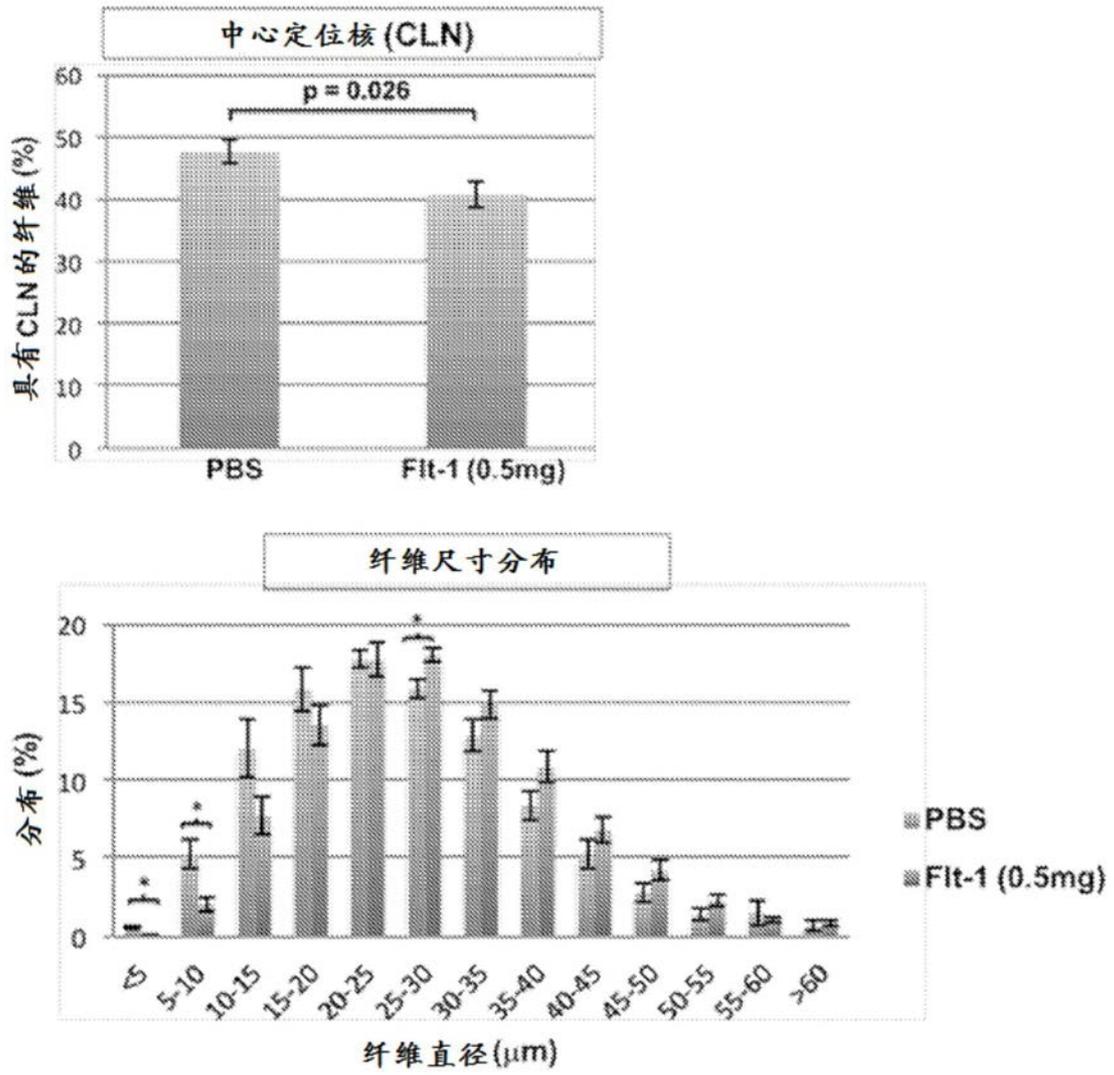


图10

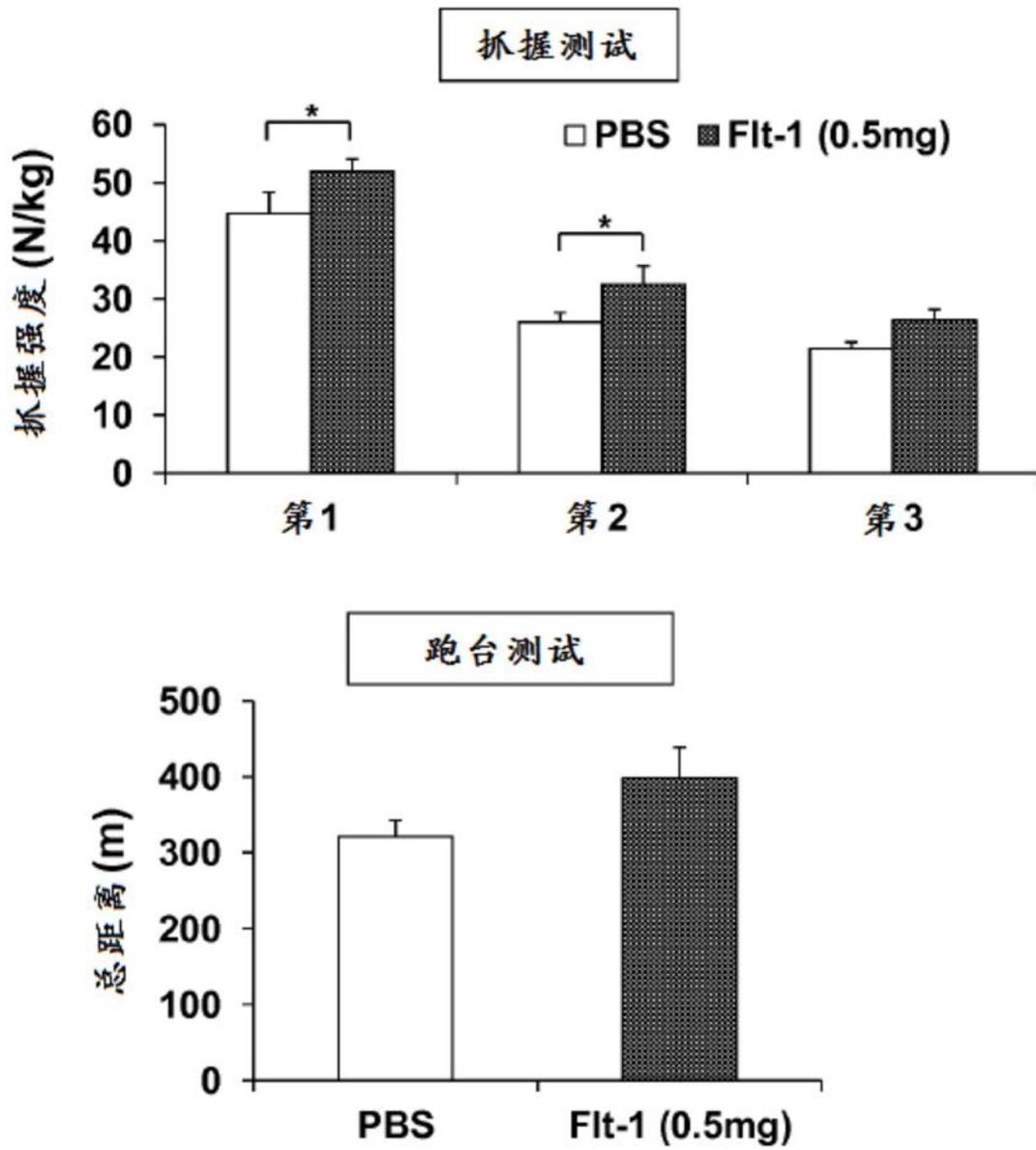


图11

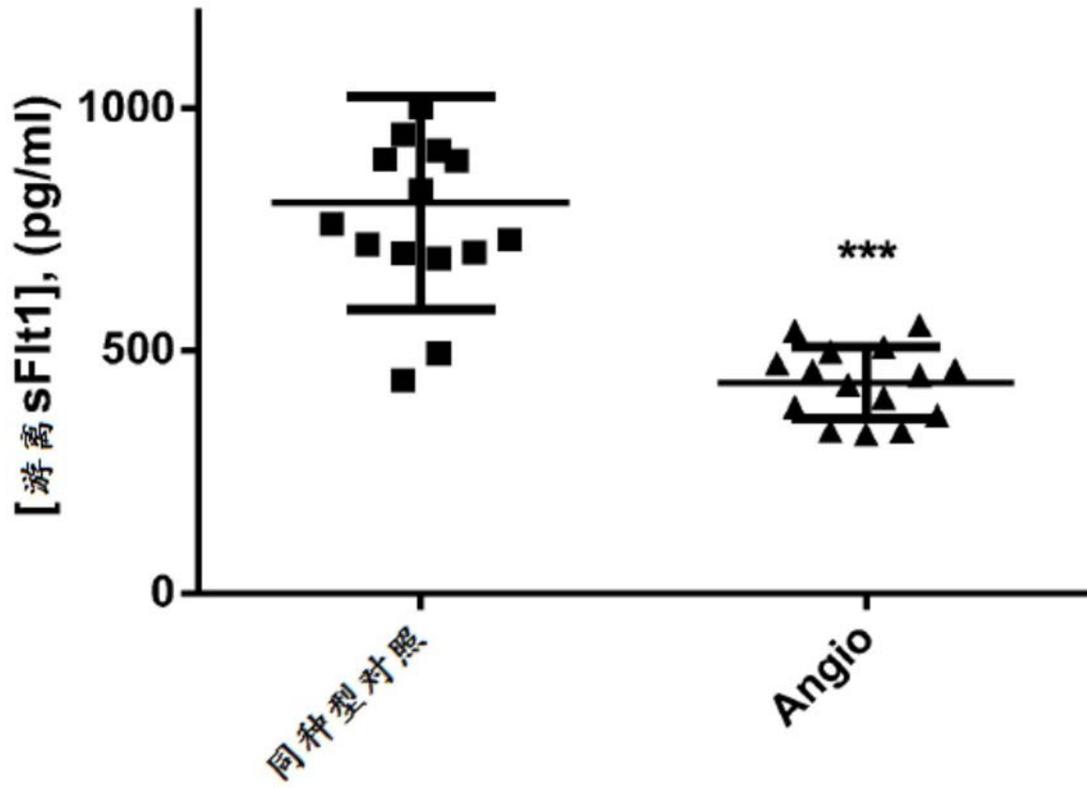


图12

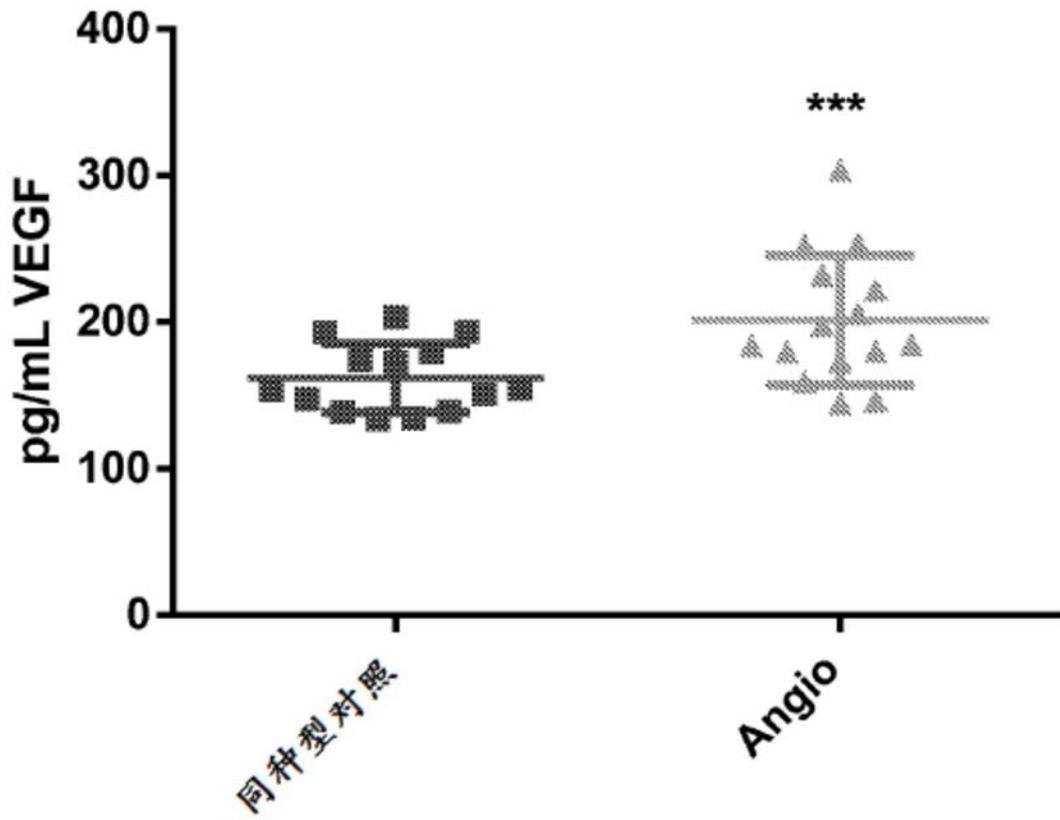


图13

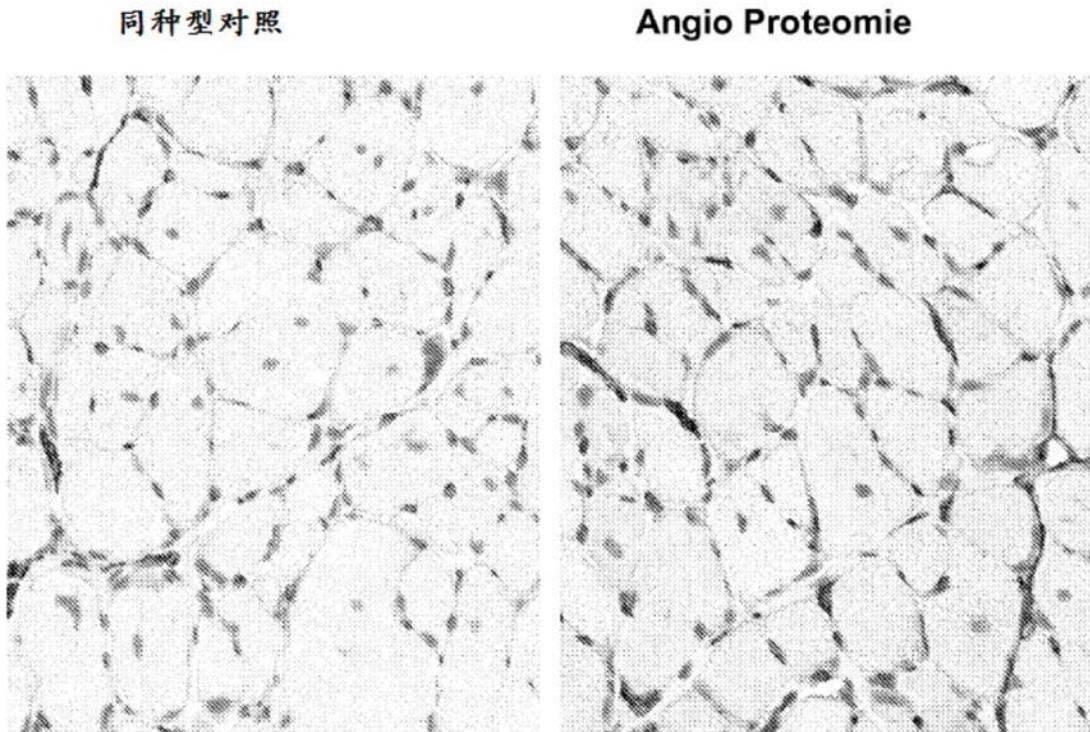


图14