



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115776909 A

(43) 申请公布日 2023.03.10

(21) 申请号 202180048456.3

(22) 申请日 2021.07.15

(30) 优先权数据

63/053,455 2020.07.17 US

63/128,708 2020.12.21 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.01.06

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2021/041755 2021.07.15

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/015935 EN 2022.01.20

(71) 申请人 美国杰龙生物医药公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 A·卡普尔 P·墨菲

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

专利代理人 岑晓东

(51) Int.Cl.

A61P 35/00 (2006.01)

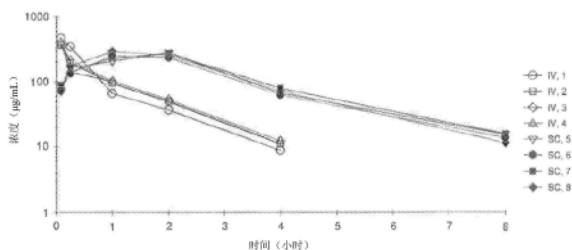
权利要求书9页 说明书69页 附图2页

(54) 发明名称

皮下端粒酶抑制剂组合物及其使用方法

(57) 摘要

本公开的方面包含配制成用于皮下施用的端粒酶抑制剂组合物。根据某些实施例的组合物包含透明质酸酶和端粒酶抑制剂,所述端粒酶抑制剂具有寡核苷酸和与寡核苷酸的5'端和/或3'端连接的脂质部分。还描述了用于皮下施用端粒酶抑制剂组合物,如在肿瘤的治疗中。还提供了具有或不具有皮下注射器的试剂盒。



1. 一种配制成用于皮下施用的组合物,所述组合物包括:
端粒酶抑制剂,其包括寡核苷酸和连接到所述寡核苷酸的5'端和/或3'端的脂质部分;
和
透明质酸酶。
2. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述透明质酸酶是重组人透明质酸酶。
3. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述组合物包括PH20透明质酸酶的变体或片段。
4. 根据权利要求3所述的组合物,其中PH20的所述变体或片段的N末端氨基酸残基或C末端氨基酸残基中的一个或多个被缺失。
5. 根据权利要求4所述的组合物,其中切割被定位在N末端处选自由M1至P42组成的组的氨基酸残基之前,使得在N末端处的一个或多个残基被缺失。
6. 根据权利要求5所述的组合物,其中所述切割被定位在N末端处的氨基酸残基L36、N37、F38、R39、A40、P41或P42之前,使得在N末端处的一个或多个残基被缺失。
7. 根据权利要求6所述的组合物,其中所述切割被定位在C末端处选自由V455至L509组成的组的氨基酸残基之后,使得在C末端处的一个或多个氨基酸残基被缺失。
8. 根据权利要求7所述的组合物,其中所述切割被定位在C末端处选自由V455、C458、D461、C464、I465、D466、A467、F468、K470、P471、P472、M473、E474、T475、E476、E477、P478、Q479、I480、F481、Y482、N483、A484、P486、T488或S490的氨基酸残基之后,使得在C末端处的一个或多个氨基酸残基被缺失。
9. 根据权利要求4至8中任一项所述的组合物,其中PH20的所述变体或片段包括选自如SEQ ID NO:1的氨基酸残基36-482、36-477、366-478、36-479、36-480、36-481和36-483列出的组的多肽。
10. 根据权利要求4至9中任一项所述的组合物,其中所述N末端包括具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列MATGSRTSLLLAFGLLCLPWLQEGSA的人生长激素衍生的信号肽,具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列MKWVTFISLLFLFSSAYS的人血清白蛋白衍生的信号肽,或具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列MAAHLLPICALFLTLLDMAQG的人Hya11衍生的信号肽。
11. 根据权利要求2所述的组合物,其中所述透明质酸酶是rHuPH20。
12. 根据权利要求4至10中任一项所述的组合物,其中PH20的所述变体或片段是与如SEQ ID NO:1所列出的氨基酸序列或SEQ ID NO:1的氨基酸残基36-482、36-477、366-478、36-479、36-480、36-481和36-483具有至少90%序列同一性的肽。
13. 根据权利要求4至10中任一项所述的组合物,其中PH20的所述变体或片段是与如SEQ ID NO:1所列出的氨基酸的序列或SEQ ID NO:1的氨基酸残基36-482、36-477、366-478、36-479、36-480、36-481和36-483具有至少95%序列同一性的肽。
14. 根据权利要求1至13中任一项所述的组合物,其中所述透明质酸酶以100U至50,000U的量存在于所述组合物中。
15. 根据权利要求1至14中任一项所述的组合物,其中所述组合物进一步包括一种或多种药学上可接受的赋形剂。
16. 根据权利要求1至15中任一项所述的组合物,其中所述组合物进一步包括一种或多种糖。
17. 根据权利要求16所述的组合物,其中所述一种或多种糖以10mM至500mM的量存在于

所述组合物中。

18. 根据权利要求1至17中任一项所述的组合物,其中所述组合物进一步包括一种或多种氨基酸。

19. 根据权利要求18所述的组合物,其中所述氨基酸选自甲硫氨酸和组氨酸。

20. 根据权利要求18至19中任一项所述的组合物,其中所述一种或多种氨基酸以1mM至100mM的量存在于所述组合物中。

21. 根据权利要求1至20中任一项所述的组合物,其中所述组合物进一步包括缓冲液。

22. 根据权利要求21所述的组合物,其中所述缓冲液以足以将所述组合物维持在3.0至9.0的pH的量存在于所述组合物中。

23. 根据权利要求21至22中任一项所述的组合物,其中所述缓冲液以1至100mM的量存在于所述组合物中。

24. 根据权利要求1至23中任一项所述的组合物,其中所述端粒酶抑制剂的寡核苷酸包括至少一个N3'→P5'硫代磷酸酯核苷间键。

25. 根据权利要求1至24中任一项所述的组合物,其中所述端粒酶抑制剂的所述脂质部分经由接头与所述寡核苷酸的5'端和/或3'端连接。

26. 根据权利要求25所述的组合物,其中所述接头是甘油或氨基甘油接头。

27. 根据权利要求1至26中任一项所述的组合物,其中所述端粒酶抑制剂的所述脂质部分是棕榈酰(C16)部分。

28. 根据权利要求1至27中任一项所述的组合物,其中所述端粒酶抑制剂是伊美司他或其药学上可接受的盐。

29. 根据权利要求28所述的组合物,其中所述端粒酶抑制剂是伊美司他钠。

30. 根据权利要求1至29中任一项所述的组合物,其中所述端粒酶抑制剂以以下剂量存在于所述组合物中

(i) 约2.0mg/kg至20.0mg/kg;

(ii) 约3mg/kg至约15mg/kg;

(iii) 约9mg/kg至约11mg/kg;或者

(iv) 约11mg/kg至约14mg/kg。

31. 根据权利要求1至29中任一项所述的组合物,其中所述端粒酶抑制剂以以下剂量存在于所述组合物中

(i) 约200mg至3000mg;

(ii) 约750mg至约2500mg;

(iii) 约1000mg至约2000mg;或者

(iv) 约500mg至约2000mg。

32. 根据权利要求1至31所述的组合物,其中所述组合物是冻干的。

33. 一种治疗患有肿瘤的受试者的方法,所述方法包括向所述受试者皮下施用组合物,所述组合物包括:

端粒酶抑制剂,其包括寡核苷酸和连接到所述寡核苷酸的5'端和/或3'端的脂质部分;
和

透明质酸酶。

34. 根据权利要求33所述的方法,其中所述肿瘤是选自骨髓纤维化(MF)、骨髓增生异常综合征(MDS)、原发性血小板增多症(ET)、真性红细胞增多症(PV)、慢性髓性白血病(CML)、慢性嗜中性粒细胞白血病、慢性嗜酸性粒细胞白血病和急性髓性白血病(AML)的血液肿瘤。

35. 根据权利要求33至34中任一项所述的方法,其进一步包括将受试者诊断为患有血液肿瘤。

36. 根据权利要求33至35中任一项所述的方法,其中所述组合物每7天一次皮下施用于所述受试者。

37. 根据权利要求33至35中任一项所述的方法,其中所述组合物每21天一次皮下施用于所述受试者。

38. 根据权利要求33至35中任一项所述的方法,其中所述组合物每28天一次皮下施用于所述受试者。

39. 根据权利要求33至38中任一项所述的方法,其中所述方法重复1次或多次。

40. 根据权利要求33至39中任一项所述的方法,其中所述端粒酶抑制剂以以下剂量施用于所述受试者

- (i) 约2.0mg/kg至20.0mg/kg;
- (ii) 约3mg/kg至约15mg/kg;
- (iii) 约9mg/kg至约11mg/kg;或者
- (iv) 约11mg/kg至约14mg/kg。

41. 根据权利要求33至39中任一项所述的方法,其中所述端粒酶抑制剂以以下剂量1施用于所述受试者

- (i) 约200mg至3000mg;
- (ii) 约750mg至约2500mg;
- (iii) 约1000mg至约2000mg;或者
- (iv) 约500mg至约2000mg。

42. 根据权利要求38至41中任一项所述的方法,其中所述透明质酸酶是重组人透明质酸酶。

43. 根据权利要求38至41中任一项所述的方法,其中所述组合物包括PH20透明质酸酶的变体或片段。

44. 根据权利要求43所述的方法,其中PH20的所述变体或片段的N末端氨基酸残基或C末端氨基酸残基中的一个或多个被缺失。

45. 根据权利要求44所述的方法,其中切割被定位在N末端处选自由M1至P42组成的组的氨基酸残基之前,使得在所述N末端处的一个或多个残基被缺失。

46. 根据权利要求45所述的方法,其中所述切割被定位在所述N末端处的氨基酸残基L36、N37、F38、R39、A40、P41或P42之前,使得在所述N末端处的一个或多个残基被缺失。

47. 根据权利要求44所述的方法,其中所述切割被定位在所述C末端处选自由V455至L509组成的组的氨基酸残基之后,使得在所述C末端处的一个或多个氨基酸残基被缺失。

48. 根据权利要求47所述的方法,其中所述切割被定位在所述C末端处选自由V455、C458、D461、C464、I465、D466、A467、F468、K470、P471、P472、M473、E474、T475、E476、E477、P478、Q479、I480、F481、Y482、N483、A484、P486、T488或S490的氨基酸残基之后,使得在所述C末端

处的一个或多个氨基酸残基被缺失。

49. 根据权利要求43至48中任一项所述的方法,其中PH20的所述变体或片段包括选自作为SEQ ID NO:1的氨基酸残基36-482、36-477、366-478、36-479、36-480、36-481和36-483所列出的组的多肽。

50. 根据权利要求43至49中任一项所述的方法,其中所述N末端包括具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列MATGSRTSLLLAFGLLCLPWLQEGSA的人生长激素衍生的信号肽,具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列MKWVTFISLLFLFSSAYS的人血清白蛋白衍生的信号肽,或具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列MAAHLLPICALFLTLLDMAQG的人Hyal1衍生的信号肽。

51. 根据权利要求42所述的方法,其中所述透明质酸酶是rHuPH20。

52. 根据权利要求43至50中任一项所述的方法,其中PH20的所述变体或片段是与如SEQ ID NO:1所列出的氨基酸的序列或SEQ ID NO:1的氨基酸残基36-482、36-477、366-478、36-479、36-480、36-481和36-483具有至少90%序列同一性的肽。

53. 根据权利要求43至50中任一项所述的方法,其中PH20的所述变体或片段是与如SEQ ID NO:1所列出的氨基酸序列或SEQ ID NO:1的氨基酸残基36-482、36-477、366-478、36-479、36-480、36-481和36-483具有至少95%序列同一性的肽。

54. 根据权利要求33至53中任一项所述的方法,其中所述透明质酸酶以100U至50,000U的量存在于所述组合物中。

55. 根据权利要求33至53中任一项所述的方法,其中所述组合物进一步包括一种或多种药学上可接受的赋形剂。

56. 根据权利要求33至54中任一项所述的方法,其中所述组合物进一步包括一种或多种糖。

57. 根据权利要求56所述的方法,其中所述一种或多种糖以10mM至500mM的量存在于所述组合物中。

58. 根据权利要求33至57中任一项的方法,其中所述组合物进一步包括一种或多种氨基酸。

59. 根据权利要求58所述的方法,其中所述氨基酸选自甲硫氨酸和组氨酸。

60. 根据权利要求57至58中任一项所述的方法,其中所述一种或多种氨基酸以1mM至100mM的量存在于所述组合物中。

61. 根据权利要求33至60中任一项所述的方法,其中所述组合物进一步包括缓冲液。

62. 根据权利要求61所述的方法,其中所述缓冲液以足以将所述组合物维持在3.0至9.0的pH的量存在于所述组合物中。

63. 根据权利要求61至62中任一项所述的方法,其中所述缓冲液以1至100mM的量存在于所述组合物中。

64. 根据权利要求33至63中任一项所述的方法,其中所述端粒酶抑制剂的所述寡核苷酸包括至少一个N3'→P5'硫代磷酸酯核苷间键。

65. 根据权利要求33至64中任一项所述的方法,其中所述端粒酶抑制剂的所述脂质部分经由接头连接到所述寡核苷酸的5'端和/或3'端。

66. 根据权利要求65所述的方法,其中所述接头是甘油或氨基甘油接头。

67. 根据权利要求33至66中任一项所述的方法,其中所述端粒酶抑制剂的所述脂质部

分是棕榈酰 (C16) 部分。

68. 根据权利要求33至67中任一项所述的方法,其中所述端粒酶抑制剂是伊美司他或其药学上可接受的盐。

69. 根据权利要求68所述的方法,其中所述端粒酶抑制剂是伊美司他钠。

70. 一种单位剂型,其包括透明质酸酶和端粒酶抑制剂,所述端粒酶抑制剂包括寡核苷酸和与所述寡核苷酸的5'端和/或3'端连接的脂质部分。

71. 根据权利要求70所述的单位剂型,其中所述透明质酸酶是重组人透明质酸酶。

72. 根据权利要求70所述的单位剂型,其中所述组合物包括PH20透明质酸酶的变体或片段。

73. 根据权利要求70至72中任一项所述的单位剂型,其中PH20的所述变体或片段的N末端氨基酸残基或C末端氨基酸残基中的一个或多个被缺失。

74. 根据权利要求73所述的单位剂型,其中切割被定位在所述N末端处选自由M1至P42组成的组的氨基酸残基之前,使得在所述N末端处的一个或多个残基被缺失。

75. 根据权利要求74所述的单位剂型,其中所述切割被定位在所述N末端处的氨基酸残基L36、N37、F38、R39、A40、P41或P42之前,使得在所述N末端处的一个或多个残基被缺失。

76. 根据权利要求75所述的单位剂型,其中所述切割被定位在所述C末端处选自由V455至L509组成的组的氨基酸残基之后,使得在所述C末端处的一个或多个氨基酸残基被缺失。

77. 根据权利要求76所述的单位剂型,其中所述切割被定位在所述C末端处选自V455、C458、D461、C464、I465、D466、A467、F468、K470、P471、P472、M473、E474、T475、E476、E477、P478、Q479、I480、F481、Y482、N483、A484、P486、T488或S490的氨基酸残基之后,使得在所述C末端处的一个或多个氨基酸残基被缺失。

78. 根据权利要求72至77中任一项所述的单位剂型,其中PH20的所述变体或片段包括选自作为SEQ ID NO:1的氨基酸残基36-482、36-477、366-478、36-479、36-480、36-481和36-483列出的组的多肽。

79. 根据权利要求70至78中任一项所述的单位剂型,其中所述N-末端包括具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列MATGSRTSLLLAFGLLCLPWLQEGSA的人生长激素衍生的信号肽,具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列MKWVTFISLLFLFSSAYS的人血清白蛋白衍生的信号肽,或具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列MAAHLPLICALFLTLLDMAQG的人Hyal1衍生的信号肽。

80. 根据权利要求70所述的单位剂型,其中所述透明质酸酶是rHuPH20。

81. 根据权利要求72至79中任一项所述的单位剂型,其中PH20的所述变体或片段是与如SEQ ID NO:1所列出的氨基酸的序列或SEQ ID NO:1的氨基酸残基36-482、36-477、366-478、36-479、36-480、36-481和36-483具有至少90%序列同一性的肽。

82. 根据权利要求72至79中任一项所述的单位剂型,其中PH20的所述变体或片段是与如SEQ ID NO:1列出的氨基酸序列或SEQ ID NO:1的氨基酸残基36-482、36-477、366-478、36-479、36-480、36-481和36-483具有至少95%序列同一性的肽。

83. 根据权利要求70至82中任一项所述的单位剂型,其中所述透明质酸酶以100U至50,000U的量存在于所述组合物中。

84. 根据权利要求70至83中任一权利要求所述的单位剂型,其中所述组合物进一步包括一种或多种药学上可接受的赋形剂。

85. 根据权利要求84所述的单位剂型,其中所述组合物进一步包括一种或多种糖。
86. 根据权利要求85所述的单位剂型,其中所述一种或多种糖以10mM至500mM的量存在于所述组合物中。
87. 根据权利要求84至86中任一项所述的单位剂型,其中所述组合物进一步包括一种或多种氨基酸。
88. 根据权利要求87所述的单位剂型,其中所述氨基酸选自甲硫氨酸和组氨酸。
89. 根据权利要求87至88中任一项所述的c单位剂型,其中所述一种或多种氨基酸以1mM至100mM的量存在于所述组合物中。
90. 根据权利要求84至89中任一项所述的单位剂型,其中所述组合物进一步包括缓冲液。
91. 根据权利要求90所述的单位剂型,其中所述缓冲液以足以将所述组合物维持在3.0至9.0的pH的量存在于所述组合物中。
92. 根据权利要求90至91中任一项所述的单位剂型,其中所述缓冲液以1至100mM的量存在于所述组合物中。
93. 根据权利要求70至92中任一项所述的单位剂型,其中所述端粒酶抑制剂的寡核苷酸包括至少一个N3'→P5'硫代磷酸酯核苷间键。
94. 根据权利要求70至93中任一项的单位剂型,其中所述端粒酶抑制剂的所述脂质部分经由接头与所述寡核苷酸的5'端和/或3'端连接。
95. 根据权利要求94所述的单位剂型,其中所述接头是甘油或氨基甘油接头。
96. 根据权利要求70至95中任一项所述的单位剂型,其中所述端粒酶抑制剂的所述脂质部分是棕榈酰(C16)部分。
97. 根据权利要求70至96中任一项所述的单位剂型,其中,所述端粒酶抑制剂为伊美司他或其药学上可接受的盐。
98. 根据权利要求97所述的单位剂型,其中所述端粒酶抑制剂是伊美司他钠。
99. 根据权利要求70至98中任一项所述的单位剂型,其中所述端粒酶抑制剂以以下剂量存在于所述组合物中
- (i) 约2.0mg/kg至20.0mg/kg;
 - (ii) 约3mg/kg至约15mg/kg;
 - (iii) 约9mg/kg至约11mg/kg;或者
 - (iv) 约11mg/kg至约14mg/kg。
100. 根据权利要求70至98中任一项的单位剂型,其中所述端粒酶抑制剂以约以下的剂量存在于所述组合物中
- (i) 约200mg至3000mg;
 - (ii) 约750mg至约2500mg;
 - (iii) 约1000mg至约2000mg;或者
 - (iv) 约500mg至约2000mg。
101. 根据权利要求70至100所述的单位剂型,其中所述组合物为液体。
102. 一种试剂盒,其包括:
包括透明质酸酶的组合物,和

包括端粒酶抑制剂的组合物,所述端粒酶抑制剂包括寡核苷酸和与所述寡核苷酸的5'端和/或3'端连接的脂质部分。

103. 根据权利要求102所述的试剂盒,其进一步包括注射器。

104. 根据权利要求102至103所述的试剂盒,其中所述包括端粒酶抑制剂的组合物是冻干的。

105. 根据权利要求102至104所述的试剂盒,其中所述试剂盒进一步包括用于产生重构的液体组合物的缓冲液。

106. 根据权利要求102至105中任一项所述的试剂盒,其中所述皮下注射器包括针头和注射器。

107. 根据权利要求102至105中任一项所述的试剂盒,其中所述皮下注射器是被配置为皮下递送预定量的所述组合物的团注注射器。

108. 根据权利要求102至107中任一项所述的试剂盒,其中所述透明质酸酶是重组人透明质酸酶。

109. 根据权利要求102至108中任一项所述的试剂盒,其中所述组合物包括PH20透明质酸酶的变体或片段。

110. 根据权利要求109所述的试剂盒,其中PH20的所述变体或片段的N末端氨基酸残基或C末端氨基酸残基中的一个或多个被缺失。

111. 根据权利要求110所述的试剂盒,其中切割被定位在所述N末端处选自由M1至P42组成的组的氨基酸残基之前,使得在所述N末端处的一个或多个残基被缺失。

112. 根据权利要求111所述的试剂盒,其中所述切割被定位在所述N末端处的氨基酸残基L36、N37、F38、R39、A40、P41或P42之前,使得在所述N末端处的一个或多个残基被缺失。

113. 根据权利要求110所述的试剂盒,其中所述切割被定位在所述C末端处选自由V455至L509组成的组的氨基酸残基之后,使得在所述C末端处的一个或多个氨基酸残基被缺失。

114. 根据权利要求113所述的试剂盒,其中所述切割被定位在所述C末端处选自V455、C458、D461、C464、I465、D466、A467、F468、K470、P471、P472、M473、E474、T475、E476、E477、P478、Q479、I480、F481、Y482、N483、A484、P486、T488或S490的氨基酸残基之后,使得在所述C末端处的一个或多个氨基酸残基被缺失。

115. 根据权利要求108所述的试剂盒,其中所述透明质酸酶是rHuPH20。

116. 根据权利要求108至115中任一项所述的试剂盒,其中所述N末端包括具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列MATGSRTSLLLAFGLLCLPWLQEGSA的人生长激素衍生的信号肽,具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列MKWVTFISLLFLFSSAYS的人血清白蛋白衍生的信号肽,或具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列MAAHLPLICALFLTLLDMAQG的人Hya11衍生的信号肽。

117. 根据权利要求108至114中任一项所述的试剂盒,其中PH20的所述变体或片段是与如SEQ ID NO:1所列出的氨基酸序列或SEQ ID NO:1的氨基酸残基36-482、36-477、366-478、36-479、36-480、36-481和36-483具有至少90%序列同一性的肽。

118. 根据权利要求108至114中任一项所述的试剂盒,其中PH20的所述变体或片段是与如SEQ ID NO:1所列出的氨基酸序列或SEQ ID NO:1的氨基酸残基36-482、36-477、366-478、36-479、36-480、36-481和36-483具有至少95%序列同一性的肽。

119. 根据权利要求102至118中任一项所述的试剂盒,其中所述透明质酸酶以100U至

50,000U的量存在于所述组合物中。

120. 根据权利要求102至119中任一项所述的试剂盒,其中所述组合物进一步包括一种或多种药学上可接受的赋形剂。

121. 根据权利要求102至120中任一项所述的试剂盒,其中所述组合物进一步包括一种或多种糖。

122. 根据权利要求121所述的试剂盒,其中所述一种或多种糖以10mM至500mM的量存在于所述组合物中。

123. 根据权利要求102至122中任一项所述的试剂盒,其中所述组合物进一步包括一种或多种氨基酸。

124. 根据权利要求123所述的试剂盒,其中所述组合物包括选自甲硫氨酸或组氨酸的氨基酸。

125. 根据权利要求123至124中任一项所述的试剂盒,其中所述一种或多种氨基酸以1mM至100mM的量存在于所述组合物中。

126. 根据权利要求102至125中任一项所述的试剂盒,其中所述组合物进一步包括缓冲液。

127. 根据权利要求126所述的试剂盒,其中所述缓冲液以足以将所述组合物维持在3.0至9.0的pH的量存在于所述组合物中。

128. 根据权利要求126至127中任一项所述的试剂盒,其中所述缓冲液以1至100mM的量存在于所述组合物中。

129. 根据权利要求102至128中任一项所述的试剂盒,其中所述端粒酶抑制剂的寡核苷酸包括至少一个N3'→P5'硫代磷酸酯核昔间键。

130. 根据权利要求102至129中任一项所述的试剂盒,其中所述端粒酶抑制剂的所述脂质部分经由接头连接至所述寡核苷酸的5'端和/或3'端。

131. 根据权利要求130所述的试剂盒,其中所述接头是甘油或氨基甘油接头。

132. 根据权利要求102至131中任一项所述的试剂盒,其中所述端粒酶抑制剂的所述脂质部分是棕榈酰(C16)部分。

133. 根据权利要求102至132中任一项所述的试剂盒,其中所述端粒酶抑制剂为伊美司他或其药学上可接受的盐。

134. 根据权利要求133所述的试剂盒,其中所述端粒酶抑制剂是伊美司他钠。

135. 根据权利要求102至134中任一项所述的试剂盒,其中所述端粒酶抑制剂以以下剂量存在于所述组合物中

(i) 约2.0mg/kg至20.0mg/kg;

(ii) 约3mg/kg至约15mg/kg;

(iii) 约9mg/kg至约11mg/kg;或者

(iv) 约11mg/kg至约14mg/kg。

136. 根据权利要求102至134中任一项所述的试剂盒,其中所述端粒酶抑制剂以以下剂量存在于所述组合物中

(i) 约200mg至3000mg;

(ii) 约750mg至约2500mg;

- (iii) 约1000mg至约2000mg;或者
- (iv) 约500mg至约2000mg。

皮下端粒酶抑制剂组合物及其使用方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2020年7月17日提交的美国临时申请第63/053,455号和2020年12月21日提交的美国临时申请第63/128,708号的权益,其通过引用以其整体并入本文。

[0003] 简介

[0004] 血液恶性肿瘤是始于造血组织细胞(如骨髓)或免疫系统细胞的癌症的形式。血液癌症的实例为急性和慢性白血病、淋巴瘤、多发性骨髓瘤和骨髓增生异常综合征。

[0005] 骨髓增生性肿瘤(MPN)指当身体产生太多的白细胞或红细胞或血小板时发生的一组血液病症。这种骨髓中的血细胞的过度产生可能产生血液量的问题,并且导致各种症状。MPN可能是由骨髓中的骨髓群系的前体引起的。MPN的特征在于无发育异常的骨髓增生、骨髓细胞过多以及易患血栓形成、出血和骨髓纤维化。存在各种类型的慢性骨髓增生性病症。在MPN疾病谱中包含原发性血小板增多症(ET)、真性红细胞增多症(PV)、慢性髓性白血病(CML)、骨髓纤维化(MF)、慢性嗜中性粒细胞白血病、慢性嗜酸性粒细胞白血病和急性髓性白血病(AML)。骨髓增生异常综合征(MDS)是一组包含血液和骨髓癌症的症状。骨髓增生异常综合征(MDS)包含疾病,如难治性贫血、具有过度母细胞的难治性贫血、具有多谱系发育异常的难治性血细胞减少症、具有单谱系发育异常的难治性血细胞减少症和慢性骨髓单核细胞白血病(CMML)。

[0006] 伊美司他(imetelstat)或伊美司他钠是以高度亲和力与端粒酶RNA组分的模板区结合的端粒酶抑制剂。研究表明,伊美司他或伊美司他钠抑制端粒酶活性并有效对抗多种不同癌细胞系和人肿瘤中的细胞增生,如在美国专利第7,494,982中所述。伊美司他或伊美司他钠已经用于患有血液系统恶性肿瘤(包含骨髓增生异常综合征和骨髓增生性肿瘤以及实体肿瘤)的患者的临床试验中。一项针对患有较低风险骨髓增生异常综合征的患者的临床试验显示,静脉施用的伊美司他或伊美司他钠能够在某些患者中实现持久的输血独立性。此外,一项针对患有骨髓纤维化的患者的临床试验显示,静脉施用的伊美司他或伊美司他钠能够实现总体存活率和骨髓纤维化的改善,这与恶性克隆的突变负担和细胞遗传学异常的减少相关。

[0007] 对于皮下施用,施用大体积的端粒酶抑制剂的液体组合物以便实现有效剂量。术语“皮下”是指皮肤的皮下层,如皮下组织层。皮下间质基质由糖胺聚糖(glycosaminoglycan)的粘弹性凝胶中的纤维状蛋白质组成。皮下组织中的糖胺聚糖包含glycoHyaluronan(HA),一种非硫酸化的重复线性二糖。将大量液体递送到皮下组织中可能会受到限制和/或疼痛。透明质酸酶(例如,可溶性透明质酸酶糖蛋白)促进皮下组织的细胞外空间中透明质酸的快速解聚,并降低间质的粘度,增加水力传导率,并允许将更大体积的液体施用到皮下组织中。

发明内容

[0008] 本公开的方面包含配制成用于皮下施用的端粒酶抑制剂组合物。根据某些实施例的组合物包含透明质酸酶和端粒酶抑制剂,所述端粒酶抑制剂具有寡核苷酸和与寡核苷酸

的5'端和/或3'端连接的脂质部分。描述了用于皮下施用端粒酶抑制剂组合物以用于治疗癌症和缓解与癌症相关联的症状的方法。还描述了在血液恶性肿瘤的治疗中皮下施用所述端粒酶抑制剂组合物的方法。还描述了在骨髓增生异常综合征(MDS)的治疗中皮下施用端粒酶抑制剂组合物的方法,所述骨髓增生异常综合征(MDS)包含疾病,如难治性贫血、具有过度母细胞的难治性贫血、具有多谱系发育异常的难治性血细胞减少症、具有单谱系发育异常的难治性血细胞减少症和慢性骨髓单核细胞白血病(CMML)。还描述了在骨髓增生性肿瘤,如原发性血小板增多症(ET)、真性红细胞增多症(PV)、慢性髓性白血病(CML)、骨髓纤维化(MF)、慢性嗜中性粒细胞白血病、慢性嗜酸性粒细胞白血病和急性髓性白血病(AML)的治疗中皮下施用端粒酶抑制剂组合物的方法。还描述了在淋巴瘤的治疗中皮下施用端粒酶抑制剂组合物的方法。还描述了在实体肿瘤的治疗中皮下施用端粒酶抑制剂组合物的方法。描述了包括透明质酸酶和端粒酶抑制剂的液体或冻干的单位剂型。还提供了具有端粒酶抑制剂和透明质酸酶的组合的试剂盒。还提供了具有端粒酶抑制剂和透明质酸酶的组合以及皮下注射器的试剂盒。

[0009] 在一些实施例中,透明质酸酶是重组人透明质酸酶。在某些实施例中,透明质酸酶是rHuPH20。在一些实施例中,端粒酶抑制剂皮下组合物包含一种或多种可溶性透明质酸酶糖蛋白。在实施例中,透明质酸酶以100U至50,000U的量存在于组合物中。在一些情况下,透明质酸酶以100U/mL至50,000U/mL的量存在于组合物中。在一些情况下,透明质酸酶以100U/mL至2,000U/mL的量存在于组合物中。在一些实施例中,透明质酸酶(例如,可溶性透明质酸酶糖蛋白)以促进皮下施用主题端粒酶抑制剂组合物的量存在。在一些情况下,透明质酸酶以促进皮下组织的细胞外间隙中透明质酸的快速解聚的量存在,从而降低间质的粘度,增加水力传导率,并允许将更大体积的端粒酶抑制剂组合物施用到皮下组织中。

[0010] 在一些实施例中,透明质酸酶是重组人透明质酸酶的变体。在某些实施例中,透明质酸酶是对野生型PH20的氨基酸序列具有一个或多个氨基酸残基添加、缺失或取代的透明质酸酶PH20的变体,如对成熟野生型PH20的氨基酸序列具有一个或多个氨基酸残基添加、缺失或取代的透明质酸酶PH20的变体。在某些实施例中,透明质酸酶是野生型透明质酸酶PH20的片段。在某些实施例中,透明质酸酶是野生型透明质酸酶PH20的片段,其对野生型透明质酸酶PH20的氨基酸序列具有一个或多个氨基酸残基添加、缺失或取代。

[0011] 主题组合物可以包含一种或多种药学上可接受的赋形剂。在一些实施例中,组合物包含一种或多种糖。在一些情况下,糖包含一种或多种单糖。单糖可以以1mM至1000mM,如10mM至500mM的量存在于组合物中。在一些情况下,糖包含一种或多种多糖。在一些情况下,多糖包含蔗糖。在其他情况下,多糖包含海藻糖。多糖可以以1mM至1000mM,如10mM至500mM的量存在于组合物中。在某些情况下,多糖以100mM至300mM的量存在于组合物中。

[0012] 在一些实施例中,组合物包含一种或多种氨基酸。在某些实施例中,组合物包含一定量的甲硫氨酸。在其他实施例中,组合物包含一定量的组氨酸。在这些实施例中,氨基酸可以以1mM至200mM,如1mM至100mM的量存在于组合物中。在某些实施例中,氨基酸以1mM至50mM的量存在于组合物中。

[0013] 组合物还可以包含一种或多种缓冲液。在一些情况下,缓冲液以使组合物保持在预定的pH的量存在于组合物中。例如,一种或多种缓冲液可以存在于组合物中,以将组合物保持在3.0至9.0的pH,如5.5至7.5的pH。在一些实施例中,缓冲液以1mM至250mM,如1mM至

100mM并且包含1mM至50mM的量存在于组合物中。在某些情况下,缓冲液是组氨酸缓冲液。在某些情况下,所述组合物包括甲硫氨酸和聚山梨醇酯80或聚山梨醇酯20。

[0014] 在本文的实施例中的任何一个中,端粒酶抑制剂包括寡核苷酸。在一些实施例中,寡核苷酸与端粒酶的RNA组分互补。在一些实施例中,寡核苷酸的长度为10-20个碱基对。在一些实施例中,寡核苷酸包括序列TAGGGTTAGACAA。在本文任何实施例的一些实施例中,寡核苷酸包括至少一个N3'→P5'硫代磷酸酯核苷间键。在本文任何实施例的一些实施例中,寡核苷酸包括所有N3'→P5'硫代磷酸酯核苷间键。根据某些实施例的端粒酶抑制剂是一种寡核苷酸,其包含与寡核苷酸的5'端和/或3'端连接的脂质部分。在一些实施例中,端粒酶抑制剂的脂质部分经由接头连与寡核苷酸的5'端和/或3'端连接。在某些情况下,接头是甘油或氨基甘油接头。在某些情况中,端粒酶抑制剂的脂质部分是棕榈酰(C16)部分。在一些实施例中,主题组合物包含伊美司他或其药学上可接受的盐。在某些实施例中,组合物包含伊美司他钠。

[0015] 在一些实施例中,皮下组合物中端粒酶抑制剂的量为约0.5至约5mg、约5至约10mg、约10至约15mg、约15至约20mg、约20至约25mg、约20至约50mg、约25至约50mg、约50至约75mg、约50至约100mg、约75至约100mg、约100至约125mg、约125至约150mg、约150至约175mg、约175至约200mg、约200至约225mg、约225至约250mg、约250至约300mg、约300至约350mg、约350至约400mg、约400至约450mg、约450至约500mg、约500mg至约600mg、约600mg至约700mg、约700mg至约800mg、约800mg至约900mg、约900mg至约1000mg、约1100mg至约1200mg、约1200mg至约1300mg、约1300mg至约1400mg、约1400mg至约1500mg、约1500mg至约1600mg、约1600mg至约1700mg、约1700mg至约1800mg、约1800mg至约1900mg、约1900mg至约2000mg、约2000mg至约2100mg、约2100mg至约2200mg、约2200mg至约2300mg、约2300mg至约2400mg、约2400mg至约2500mg。

[0016] 在一些实施例中,端粒酶抑制剂的量为单位剂型,所述单位剂型具有在约5mg至约1000mg,5mg至约500mg,如约30mg至约300mg或约50mg至约200mg的范围内的量。在一些实施例中,端粒酶抑制剂的量在单位剂型中,所述单位剂型具有在约500mg至约3000mg、750mg至约2500mg,如约1000mg至约2000mg或约50mg至约200mg的范围内的量。单位剂型可以是液体或冻干的。

[0017] 在一些实施例中,组合物中端粒酶抑制剂的浓度是稀释的(约0.1mg/ml)或浓缩的(约300mg/ml),包含例如以下中的任一个:约0.1至约300mg/ml、约0.1至约200mg/ml、约0.1至约180mg/ml、约0.1至约160mg/ml、约0.1至约140mg/ml、约0.1至约120mg/ml、约0.1至约100mg/ml、约0.1至约80mg/ml、约0.1至约60mg/ml、约0.1至约40mg/ml、约0.1至约20mg/ml、约0.1至约10mg/ml、约2至约40mg/ml、约4至约35mg/ml、约6至约30mg/ml、约8至约25mg/ml、约10至约20mg/ml、约12至约15mg/ml,或以下中的任一个:约0.1mg/ml、0.2mg/ml、0.3mg/ml、0.4mg/ml、0.5mg/ml、0.6mg/ml、0.7mg/ml、0.8mg/ml、0.9mg/ml、1mg/ml、1.1mg/ml、1.2mg/ml、1.3mg/ml、1.4mg/ml、1.5mg/ml、1.6mg/ml、1.7mg/ml、1.8mg/ml、1.9mg/ml、2mg/ml、2.1mg/ml、2.2mg/ml、2.3mg/ml、2.4mg/ml或2.5mg/ml。在一些实施例中,端粒酶抑制剂的浓度为至少约以下中的任一个:0.1mg/ml、0.2mg/ml、0.3mg/ml、0.4mg/ml、0.5mg/ml、1.3mg/ml、1.5mg/ml、2mg/ml、3mg/ml、4mg/ml、5mg/ml、6mg/ml、7mg/ml、8mg/ml、9mg/ml、10mg/ml、11mg/ml、12mg/ml、13mg/ml、14mg/ml、15mg/ml、16mg/ml、17mg/ml、18mg/ml、19mg/ml

m1、20mg/ml、21mg/ml、22mg/ml、23mg/ml、24mg/ml、25mg/ml、26mg/ml、27mg/ml、28mg/ml、29mg/ml、30mg/ml、31mg/ml、32mg/ml、33mg/ml、33.3mg/ml、34mg/ml、35mg/ml、36mg/ml、37mg/ml、38mg/ml、39mg/ml、40mg/ml、50mg/ml、60mg/ml、70mg/ml、80mg/ml、90mg/ml、100mg/ml、110mg/ml、120mg/ml、130mg/ml、140mg/ml、150mg/ml、160mg/ml、170mg/ml、180mg/ml、190mg/ml、200mg/ml、210mg/ml、220mg/ml、230mg/ml、240mg/ml、250mg/ml、260mg/ml、270mg/ml、280mg/ml、290mg/ml或300mg/ml。在某些实施例中，组合物被配制成包含端粒酶抑制剂，如伊美司他或伊美司他钠，剂量为约2.0mg/kg至约20.0mg/kg、约3.0mg/kg至约15.0mg/kg，如约4.0mg/kg至约10mg/kg、约7.5mg/kg至9.4mg/kg、约9mg/kg至约11mg/kg以及约11mg/kg至约14mg/kg。在某些实施例中，组合物被配制成包含端粒酶抑制剂，如伊美司他或伊美司他钠，剂量为4.0mg/kg、4.1mg/kg、4.2mg/kg、4.3mg/kg、4.4mg/kg、4.5mg/kg、4.6mg/kg、4.7mg/kg、4.8mg/kg、4.9mg/kg、5.0mg/kg、5.1mg/kg、5.2mg/kg、5.3mg/kg、5.4mg/kg、5.5mg/kg、5.6mg/kg、5.7mg/kg、5.8mg/kg、5.9mg/kg、6.0mg/kg、6.1mg/kg、6.2mg/kg、6.3mg/kg、6.4mg/kg、6.5mg/kg、6.6mg/kg、6.7mg/kg、6.8mg/kg、6.9mg/kg、7.0mg/kg、7.1mg/kg、7.2mg/kg、7.3mg/kg、7.4mg/kg、7.5mg/kg、7.6mg/kg、7.7mg/kg、7.8mg/kg、7.9mg/kg、8.0mg/kg、8.1mg/kg、8.2mg/kg、8.3mg/kg、8.4mg/kg、8.5mg/kg、8.6mg/kg、8.7mg/kg、8.8mg/kg、8.9mg/kg、9.0mg/kg、9.1mg/kg、9.2mg/kg、9.3mg/kg、9.4mg/kg、9.5mg/kg、9.6mg/kg、9.7mg/kg、9.8mg/kg、9.9mg/kg、10.0mg/kg、10.5mg/kg、11.0mg/kg、11.5mg/kg、12.0mg/kg、12.5mg/kg、13.0mg/kg、13.5mg/kg、14.0mg/kg、14.5mg/kg、15.0mg/kg、15.5mg/kg、16.0mg/kg、16.5mg/kg、17.0mg/kg、17.0mg/kg、17.5mg/kg、18.0mg/kg、18.5mg/kg、19.0mg/kg、19.5mg/kg或20.0mg/kg。

[0018] 本公开的方面还包含用于向受试者皮下施用端粒酶抑制剂组合物的方法。在实施根据某些实施例的方法时，向受试者皮下施用具有端粒酶抑制剂和透明质酸酶的组合物。在一些实施例中，组合物通过皮下注射被施用于受试者。在其他实施例中，组合物可以从植入的装置(如皮下植入的导管)被施用于受试者。在某些实施例中，使用皮下团注射器将端粒酶抑制剂组合物施用于受试者，所述皮下团注射器被配置以将预定量的组合物皮下递送至受试者。在某些实施例中，端粒酶抑制剂和透明质酸酶同时施用。例如，端粒酶抑制剂和透明质酸酶可以在施用前混合在一起。在一些情况下，端粒酶抑制剂和透明质酸酶依次施用。例如，可以在端粒酶抑制剂之前施用透明质酸酶。在一些情况下，首先施用透明质酸酶，然后施用端粒酶抑制剂。例如，可以施用透明质酸酶，然后立即施用端粒酶抑制剂。

[0019] 在某些实施例中，本主题的方法包含治疗肿瘤。在一些实施例中，肿瘤可以是实体肿瘤癌症。根据本公开的实施例的用于治疗癌症的实例可以包含但不限于，例如肾上腺皮质癌、肛门癌、阑尾癌、星形细胞瘤、非典型畸胎样/横纹肌样瘤、基底细胞癌、胆管癌(肝外)、膀胱癌、骨癌(例如，尤文肉瘤、骨肉瘤和恶性纤维组织细胞瘤等)、脑干神经胶质瘤、脑肿瘤(例如，星形细胞瘤、中枢神经系统胚胎肿瘤、中枢神经系统生殖细胞肿瘤、颅咽管瘤、室管膜瘤等)、乳腺癌(例如，女性乳腺癌、男性乳腺癌、儿童乳腺癌等)、支气管肿瘤、类癌瘤(例如，儿童、胃肠道等)、未知原发癌、心脏(心脏)肿瘤、宫颈癌、结肠癌、结肠直肠癌、颅咽管瘤、导管(例如，胆管、肝外等)、导管原位癌(DCIS)、胚胎肿瘤、子宫内膜癌、室管膜瘤、食道癌、嗅神经母细胞瘤、尤因肉瘤、颅外生殖细胞瘤、性腺外生殖细胞瘤、肝外胆管癌、眼癌(例如，眼内黑色素瘤、视网膜母细胞瘤等)、骨的纤维组织细胞瘤(例如，恶性、骨肉瘤等)、

胆囊癌、胃(胃)癌、胃肠道类癌、胃肠道间质瘤(GIST)、生殖细胞瘤(例如,颅外、性腺外、卵巢、睾丸等)、妊娠滋养细胞疾病、神经胶质瘤、毛细胞白血病、头颈癌、心脏癌、肝细胞(肝)癌、组织细胞增生症(例如,朗格汉斯细胞)等)、下咽癌、眼内黑色素瘤、胰岛细胞瘤(例如,胰腺神经内分泌肿瘤等)、肾癌(例如,肾细胞瘤、肾母细胞瘤、儿童肾肿瘤等)、朗格汉斯细胞组织细胞增生症、喉癌、唇和口腔癌、肝癌(原发性)、小叶原位癌(LCIS)、肺癌(例如非小细胞、小细胞等)、骨的恶性纤维组织细胞瘤和骨肉瘤、黑色素瘤、梅克尔细胞癌、间皮瘤、具有隐匿原发性的转移性鳞状颈部癌、口腔癌、多发性内分泌瘤综合征、鼻腔和副鼻窦癌、鼻咽癌、成神经细胞瘤、非小细胞肺癌、口腔癌(Oral Cancer)、口腔癌(Oral Cavity Cancer)(例如唇癌等)、口咽癌、骨肉瘤和骨的恶性纤维组织细胞瘤、卵巢癌(例如,上皮、生殖细胞肿瘤、低恶性潜能肿瘤等)、胰腺癌、胰腺神经内分泌肿瘤(胰岛细胞瘤)、乳头状瘤病、副神经节瘤、副鼻窦和鼻腔癌、甲状旁腺癌、阴茎癌、咽癌、嗜铬细胞瘤、垂体瘤、胸膜肺母细胞瘤、前列腺癌、直肠癌、肾细胞(肾)癌、肾盂和输尿管、移行细胞癌、视网膜母细胞瘤、横纹肌肉瘤、唾液腺癌、塞泽里综合征(Sézary Syndrome)、皮肤癌(例如,儿童、黑色素瘤、梅克尔细胞癌、非黑色素瘤等)、小细胞肺癌、小肠癌、软组织肉瘤、鳞状细胞癌、鳞状颈癌(例如,具有隐匿性原发、转移性等)、胃(胃)癌、睾丸癌、咽喉癌、胸腺瘤和胸腺癌、甲状腺癌、肾盂和输尿管的移行细胞癌、输尿管和肾盂癌、尿道癌、子宫癌(例如,子宫内膜癌等)、子宫肉瘤、阴道癌、外阴癌、Waldenström巨球蛋白血症、肾母细胞瘤等。在某些实施例中,方法包含如在美国专利第7,494,982号中所述治疗患有肿瘤的受试者。

[0020] 在一些实施例中,肿瘤可以是血液肿瘤。在某些实施例中,本主题的方法包含治疗患有骨髓增生性肿瘤的受试者。在一些情况中,所述骨髓增生性肿瘤是骨髓纤维化(MF),如原发性骨髓纤维化,或在先前ET或PV(ETMF后或PVMF后)之后的骨髓纤维化。在其它实施例中,所述骨髓增生性肿瘤包含原发性血小板增多症(ET)、真性红细胞增多症(PV)、慢性骨髓性白血病(CML)、慢性嗜中性粒细胞白血病、慢性嗜酸性粒细胞白血病和急性髓性白血病(AML)。在其他情况下,血液肿瘤是骨髓增生异常综合征(MDS)。在仍其它实施例中,血液肿瘤是具有分离的非de1(5q)的骨髓增生异常综合征(MDS)。骨髓增生异常综合征(MDS)包含疾病,如难治性贫血、具有过度母细胞的难治性贫血、具有多谱系发育异常的难治性血细胞减少症、具有单谱系发育异常的难治性血细胞减少症和慢性骨髓单核细胞白血病(CMML)。根据某些实施例的方法还包含将受试者诊断为患有骨髓增生性肿瘤。在一个实例中,方法包含将受试者诊断为患有骨髓纤维化(MF),如原发性骨髓纤维化。在一些实施例中,受试者先前尚未施用端粒酶抑制剂(例如,未用端粒酶抑制剂治疗过)。在一些实施例中,受试者是对促红细胞生成素刺激剂(ESA)复发或难治的具有较低风险输血依赖性MDS的受试者。在一些实施例中,受试者未接受用低甲基化药剂(HMA)的预先治疗。在一些实施例中,受试者未接受用来那度胺的预先治疗。在一些实施例中,受试者是非de1(5q)的受试者。在一些实施例中,受试者是对Janus激酶(JAK)抑制剂复发或难治的受试者。在一些实施例中,所述方法包含治疗患有骨髓增生性肿瘤的受试者,如美国专利第9,375,485号和国际专利公开号WO 2019/023667和WO 2020/028261中所述,它们的公开通过引用并入本文。

[0021] 在某些实施例中,本主题的方法包含治疗患有淋巴肿瘤的受试者。在一些实施例中,淋巴肿瘤(例如淋巴瘤)是B细胞肿瘤。在一些实施例中,淋巴肿瘤(例如淋巴瘤)是T细胞和/或推定的NK细胞肿瘤。

[0022] 在某些实施例中,向受试者皮下施用端粒酶抑制剂和透明质酸酶。端粒酶抑制剂组合物和透明质酸酶可以每天一次或多次皮下施用于受试者,如每天两次或更多次,如每天三次或更多次,如每天四次或更多次,并且包含每天五次或更多次。在一些实施例中,将组合物皮下施用于给受试者持续1天或更长时间、2天或更长时间、3天或更长时间、4天或更长时间、5天或更长时间、6天或更长时间、7天或更长时间,如10天或更长时间,如14天或更长时间,如21天或更长时间。可以在端粒酶抑制剂组合物和透明质酸酶的施用周期中给药。在一些实施例中,周期是每天一次。在一些实施例中,周期是每隔一天一次(即,每2天一次)。在一些实施例中,周期是每3天一次。在一些实施例中,周期是每4天一次。在一些实施例中,周期是每5天一次。在一些实施例中,周期是每6天一次。在一些实施例中,周期是每7天一次。在一些实施例中,周期为每14天一次,在一些情况下,周期为每21天一次,在其他情况下,周期为每28天或更多天一次。端粒酶抑制剂组合物的施用周期可以重复1、2、3、4、5、6、7、8或多于8个给药周期,总时间段为6个月或1年或2年或3年或4年或5年或6年或7年或8年或9年或10年或更长。例如,可以进行施用周期,随后在1天或更长时间内不施用组合物,然后进行随后的施用周期。施用周期之间的时间可以是1天或更多天、2天或更多天、3天或更多天、4天或更多天、5天或更多天、6天或更多天、7天或更多天、10天或更多天、14天或更多天、21天或更多天或28天或更多天。

[0023] 不希望受理论的束缚,本发明提供了包括端粒酶抑制剂和透明质酸酶的组合物、单位剂型和试剂盒,端粒酶抑制剂和透明质酸酶两者如本文所定义,具有相容性和稳定性,用于通过皮下施用治疗患有肿瘤的受试者的方法中。本发明还提供了此类配制成用于皮下施用的组合物,其中所述组合物对于所治疗的受试者是安全的和可耐受的,并且当与透明质酸酶共同配制时,能够实现端粒酶抑制剂的有效药代动力学概况。本发明进一步提供用于皮下施用的含有足够剂量的端粒酶抑制剂的具有适当液体体积的剂型。

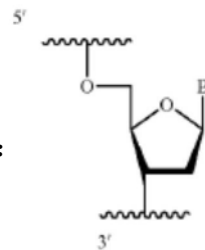
附图说明

[0024] 图1描绘了根据某些实施例的在大鼠中皮下注射和静脉内递送之后的伊美司他钠的血浆浓度时间概况。

[0025] 图2描绘了根据某些实施例的各种样品配方的端粒酶活性抑制(%)相对于处理浓度(μM)。

[0026] 精选的定义

[0027] 术语“核苷”是指具有以下一般结构的部分:



其中B表示核碱基,

并且2'碳可以如下所述被取代。当并入到低聚物或聚合物中时,3'碳进一步与氧或氮原子连接。核苷可以包含2'-脱氧和2'-羟基(即,脱氧核糖和核糖)形式及其类似物。在某些实例中,5'-NH基团可以取代5'-氧。关于核苷的“类似物”包含具有经修饰的核碱基部分(参见以下“核碱基”的定义)和/或经修饰的糖部分,如2'-氟糖以及其它类似物的合成核苷。此类类

似物通常被设计成影响结合性质,例如稳定性、特异性等。术语核苷包含天然核苷,包含2'-脱氧和2'-羟基形式,例如,如在Komberg和Baker,《DNA复制(DNA Replication)》,第2版(弗里曼,旧金山(Freeman, San Francisco), 1992)中描述的,和类似物。关于核苷的“类似物”包含具有经修饰的核碱基部分(参见下文“核碱基”的定义)和/或经修饰的糖部分的合成核苷,例如,通常由Scheit,《核苷酸类似物(Nucleotide Analogs)》(约翰威立公司(John Wiley), 纽约(New York), 1980)描述的。此类类似物包含被设计成增强结合性质,例如稳定性、特异性等的合成核苷,如由Uhlmann和Peyman,《化学评论(Chemical reviews)》, 90: 543-584, 1990所公开的)。含有此类核苷并且通常含有合成的抗核酸酶的核苷间键的寡核苷酸本身可以被称为“类似物”。

[0028] “多核苷酸”或“寡核苷酸”是指具有介于约2到约200个连续亚基之间的核糖和/或脱氧核糖核苷亚基聚合物或低聚物。核苷亚基可以通过各种亚基间键来连接,包含但不限于磷酸二酯、磷酸三酯、甲基膦酸脂、P3'→N5'磷酰胺酯、N3'→P5'磷酰胺酯、N3→P5'硫代磷酰胺酯和硫代磷酸酯键。所述术语还包含具有糖(例如,2'取代)、碱基、以及3'和5'端的修饰的此类聚合物或低聚物。在寡核苷酸部分包含多个亚基间键的实施例中,每个键可以使用同一化学物质或键化学物质的混合物形成。当寡核苷酸由字母序列,如“ATGUCCTG”表示时,应当理解的是,核苷酸呈从左到右5'→3'顺序。以此方式表示寡核苷酸的碱基序列并不暗示在寡核苷酸中使用任何特定类型的核苷间亚基。

[0029] “核碱基”包含:(i)天然DNA和RNA核碱基(尿嘧啶、胸腺嘧啶、腺嘌呤、鸟嘌呤和胞嘧啶);(ii)经修饰的核碱基或核碱基类似物(例如,5-甲基胞嘧啶、5-溴尿嘧啶或肌苷);以及(iii)核碱基类似物。核碱基类似物是分子结构模拟典型的DNA或RNA碱基的分子结构的化合物。

[0030] 术语“脂质”在本文中广泛地用于涵盖在有机溶剂中可溶但在水(如果有的话)中微溶的物质。术语脂质包含但不限于烃、油、脂肪(如脂肪酸和甘油酯)、固醇、类固醇以及这些化合物的衍生物形式。在一些实施例中,脂质是脂肪酸及其衍生物;烃及其衍生物;以及固醇,如胆固醇。脂肪酸通常在直链中含有偶数个碳原子(通常为12-24个碳),并且可以是饱和或不饱和的,并且可以含有或可以被改性成含有多种取代基。为了简单起见,术语“脂肪酸”还涵盖脂肪酸衍生物,如脂肪或酯。在一些实施例中,术语“脂质”还包含含有脂质和亲水性部分两者的两亲性化合物。

[0031] “个体”或“患者”或“受试者”可以是哺乳动物,如任何常见的实验室模型生物体。哺乳动物包含但不限于人和非人灵长类动物、农场动物、运动动物、宠物、小鼠、大鼠和其它啮齿动物。在一些实施例中,个体或患者或受试者是人。在某些实施例中,受试者或患者在某些实施例之前先前未接受端粒酶抑制剂疗法,此类患者“未用端粒酶抑制剂治疗过”。

[0032] “有效量”或“治疗有效量”或“临床有效量”是指作为单一剂量或一系列剂量的一部分施用于哺乳动物受试者的端粒酶抑制剂的有效产生所期望的治疗效果的量。

[0033] 如本文所使用的,术语“肿瘤”或“肿瘤形成”或“肿瘤”是指异常的新细胞生长。与增生不同,即使在没有原始刺激的情况下,肿瘤增生也会持续存在。“肿瘤细胞”是指表现出相对自主生长的细胞,使得它们表现出特征在于细胞增生的控制的显著丧失的异常生长表型。肿瘤细胞包括可以活跃地复制或处于暂时非复制静息状态(G_1 或 G_0)的细胞;类似地,肿瘤细胞可以包括具有分化良好的表型、分化不良的表型或两种类型细胞的混合物的细胞。

因此,并不是所有肿瘤细胞都是在给定时间点必须复制的细胞。“肿瘤细胞”涵盖良性肿瘤中的此类细胞和恶性肿瘤中的细胞。“肿瘤祖细胞”是指具有变成肿瘤的能力的细胞组合物的细胞。

[0034] “增生性病征”是其中细胞比正常组织生长更快速增生的任何细胞病症。因此,“增生细胞”是比正常细胞增生更快的细胞。增生性病征包含但不限于肿瘤。“肿瘤”是异常的组织生长,通常形成明显的团块,其通过细胞增生比正常组织生长更快地生长。肿瘤显示部分或全部缺乏与正常组织的结构组织和功能协调。这些可以大致分为三种主要类型。源于上皮结构的恶性肿瘤被称为癌,源于结缔组织如肌肉、软骨、脂肪或骨的恶性肿瘤被称为肉瘤,并且影响包含免疫系统的组成部分的造血结构(与血细胞形成有关的结构)的恶性肿瘤被称为白血病和淋巴瘤。肿瘤是疾病癌症的肿瘤生长。如本文所用,肿瘤(neoplasm),也被称为“肿瘤(tumor)”,旨在涵盖造血肿瘤以及实体肿瘤。其他增生性病征包含但不限于神经纤维瘤病。

[0035] 如本文所使用的,除非另有说明,否则单数形式“一种(a)”、“一种(an)”和“所述(the)”包含复数指示物。

[0036] 贯穿本说明书给出的每个最大数值限制旨在包含每个较低的数值限制,如同这种较低的数值限制在本文中明确写出一样。贯穿本说明书给出的每一小数值限制将包含每一较高数值限制,如同这种较高的数值限制在本文中明确写出一样。贯穿本说明书给出的每一数值范围将包含落在这样的较宽数值范围内的每一较窄数值范围,如同这种较窄数值范围在本文中明确写出一样。

[0037] 在进一步描述本发明之前,应理解的是,本发明不限于所描述的特定实施例,因为这些实施例当然可以变化。还应理解,本文所使用的术语仅出于描述特定实施例的目的,而并不希望进行限制,因为本发明的范围将仅由所附权利要求书限制。

[0038] 在提供了值范围的情况下,应当理解的是,介于所述范围的上限与下限之间的每个中间值(到下限的单位的十分之一,除非另外明确说明)以及所述范围中的任何其它所陈述或中间值均涵盖于本发明内。这些较小范围的上限和下限可以独立地包含在更小的范围中,并且也涵盖在本发明内,这受制于所陈述的范围中的任何明确排除的限值。在所陈述范围包含限制中的一个或两个的情况下,排除那些被包含在内的限制中的任一个或两个的范围也包含在本发明中。

[0039] 应当理解,为了清楚起见,在单独实施例的背景下描述的本发明的某些特征还可以以组合形式提供在单个实施例中。相反地,为了简便起见,在单个实施例的背景下描述的本发明的不同特征也可以单独地或以任何适合的子组合提供。与本发明有关的实施例的所有组合被本发明具体地涵盖并且公开于本文中,正如同每个组合单独且明确地公开一样,在某种程度上,此类组合涵盖例如作为稳定化合物的化合物的本发明的物质(即,可以被制备、分离、表征和测试生物活性的化合物)。另外,本发明还具体地涵盖了各个实施例及其元素(例如,描述此类变量的实施例中所列出的化学组的元素)的所有子组合并且公开于本文中,就如同每个子组合和每个这种子组合在本文中单独且明确地公开一样。

[0040] 除非另外定义,否则本文中所使用的所有技术术语和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常所理解的含义相同的含义。尽管与本文中描述的方法和材料类似或相当的任何方法和材料也可以用于实践或测试本发明,但现在描述的是所关注方法和材

料。在此提及的所有公开是通过引用结合在此,以结合所引用的这些公开来公开和描述这些方法和/或材料。

[0041] 必须注意,除非上下文另外明确指示,否则如在本文和所附权利要求中所使用的,单数形式“一种”、“一种”和“所述”包含复数指代物。另外注意,权利要求可以撰写为排除任何任意的要素。因此,此陈述旨在充当结合权利要求要素的叙述使用如“单独(solely)”、“仅(only)”等排他性术语或使用“否定型(negative)”限制的前置基础。

[0042] 应当理解,为了清楚起见,在单独实施例的背景下描述的本发明的某些特征还可以以组合形式提供在单个实施例中。相反地,为了简便起见,在单个实施例的背景下描述的本发明的不同特征也可以单独地或以任何适合的子组合提供。

[0043] 本文讨论的出版物仅仅是为了它们在本申请的提交日期之前的公开内容而提供。本文中的任何内容都不应解释为承认本发明由于在先发明而无权先于这种公开。另外,所提供的公开日期可能与实际公开日期不同,实际公开日期可能需要独立地确认。

[0044] 本文所描述的化合物可以通过本领域已知方法中的任何方法纯化,所述方法包含色谱方法,如高效液相色谱(HPLC)、制备型薄层色谱、快速柱色谱和离子交换色谱。可以使用包含正相和反相以及离子树脂在内的任何合适的固定相。参见例如,《现代液相色谱导论(Introduction至Modern Liquid Chromatography)》,第2版,L.R.Snyder和J.J.Kirkland编辑、约翰·威利父子出版社(John Wiley和Sons),1979;以及《薄层色谱(Thin Layer Chromatography)》,E.Stahl编辑,施普林格出版社(Springer-Verlag),纽约,1969。

[0045] 本文所述的化合物可以含有一个或多个手性中心和/或双键,并且因此可以作为立体异构体存在,如双键异构体(即,几何异构体)、对映异构体或非对映异构体。因此,化合物的所有可能的对映异构体和立体异构体,包含立体异构纯形式(例如,几何学纯的、对映异构体纯的或非对映异构体纯的)以及对映异构体和立体异构体混合物都包含在本文的化合物的描述中。对映异构体和立体异构体混合物可以使用本领域的技术人员熟知的分离技术或手性合成技术拆分成其组分对映异构体或立体异构体。化合物还可以以若干互变异构体形式存在,包含烯醇形式、酮形式及其混合物。因此,本文所描绘的化学结构涵盖所展示化合物的所有可能的互变异构体形式。所描述的化合物还包含同位素标记的化合物,其中一个或多个原子的原子质量与通常在自然界中常规发现的原子质量不同。可以并入到本文所公开的化合物中的同位素的实例包含但不限于²H、³H、¹¹C、¹³C、¹⁴C、¹⁵N、¹⁸O、¹⁷O等。化合物可以以非溶剂化形式以及溶剂化形式,包含水合形式存在。通常,化合物可以是水合的或溶剂化的。某些化合物可以以多种晶态或无定形形式存在。通常,所有物理形式对于本文所设想的用途是等效的,并且旨在处于本公开的范围之内。

具体实施方式

[0046] 皮下端粒酶抑制剂组合物

[0047] 本公开的方面包含配制成用于皮下施用的端粒酶抑制剂组合物。术语“皮下”在本文中以其常规意义使用,以指代皮肤的皮下层,如皮下组织层。皮下间质基质由糖胺聚糖的粘弹性凝胶中的纤维状蛋白质组成。皮下组织中的糖胺聚糖包含glycoHyaluronan(HA),一种非硫酸化的重复线性二糖。

[0048] 本公开的组合物包含透明质酸酶。在一些实施例中,透明质酸酶是哺乳动物类型

的透明质酸酶,如以四糖和六糖作为主要终产物的内切- β -N-乙酰己糖胺酶。在一些情况下,哺乳动物透明质酸酶具有水解和转糖苷酶活性,并且可以降解透明质烷(hyaluronan)和硫酸软骨素。在其它实施例中,透明质酸酶是细菌透明质酸酶,如通过 β 消除产生二糖终产物的内切- β -N-乙酰己糖胺酶。在其他实施例中,透明质酸酶是一种内切- β -葡萄糖醛酸酶,其通过 β -1-3键的水解产生四糖和六糖终产物。在一些实施例中,主题端粒酶抑制剂组合物中的透明质酸酶包含具有中性活性部位或酸性活性部位的哺乳动物透明质酸酶。在某些实施例中,感兴趣的组合物包含重组人透明质酸酶。在某些情况下,重组人透明质酸酶是PH20重组人透明质酸酶(rHuPH20)。在一些实施例中,端粒酶抑制剂皮下组合物包含一种或多种可溶性透明质酸酶糖蛋白(sHASEGP)。在一些实施例中,透明质酸酶(例如,可溶性透明质酸酶糖蛋白)促进主题组合物的皮下施用。在一些情况下,透明质酸酶以在细胞外空间中快速解聚透明质烷的量存在,并降低间质的粘度,增加水力传导率并允许将更大的体积施用到皮下组织中。在某些实施例中,由透明质酸酶通过降低的间质粘度诱导的增加的水力传导率允许更大的分散,增加了皮下施用的本文所述的端粒酶抑制剂的全身生物利用度。

[0049] 在某些实施例中,组合物包含一种或多种透明质酸酶(例如,可溶性透明质酸酶糖蛋白),如在国际专利公开号W02004/078140和W0 2006/091871以及美国专利第7,767,429号中描述的那些,它们的公开通过引用并入本文。

[0050] 在一些实施例中,透明质酸酶是重组人透明质酸酶的变体或片段,其具有活性并且可以降解透明质烷。野生型人PH20透明质酸酶的序列(SEQ ID NO:1)在下表1中示出。

[0051] 表1——前体的氨基酸序列,包含野生型人PH20透明质酸酶的信号序列(SEQ IDNO:1)

[0052]

```

MGVLKFKHIFFRSFKSSGVSQIVFTFLLIPCCCLTLNFRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFCLG
KFDEPLDMSLFSEFIGSPRINATGQGVTFYVDRLGYYPYIDSITGVTVNGGIPQKISLQDHL
DKAKKDITFYMPVDNLGMAVIDWEEWRPTWARNWPKDVYKNRSIELVQQQNVQLSLTEATE
KAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRPNHLWGYYLFPDCYNHYYKPGYNGSCFNVEIKRND
LSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRNRVREAIRVSKIIPDAKSPLPVFAYTRIVFTD
QVLKFLSQDELVYTFGETVALGASGIVIWGTLSIMRSMKSCLLLDNYMETILNPYIINVTLA
AKMCSQVLCQEQGVCIRKNWNSSDYHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPTLEDLEQFSEKFY
CSCYSTLSCKEKADVKDTDAVDVCIADGVCIDAFLKPPMETEEPQIFYNASPSTLSATMFIV
SILFLIISSVASL

```

[0053] 在某些实施例中,透明质酸酶是可溶性透明质酸酶。可溶性透明质酸酶包含在来自细胞的表达和分泌后以可溶性形式存在的任何酶。此类可溶性透明质酸酶包含但不限于非人类可溶性透明质酸酶、细菌可溶性透明质酸酶、牛PH20、羊PH20及其变体。在可溶性透明质酸酶中包含已经被修饰为可溶的人PH20多肽。例如,含有糖磷脂酰肌醇(GPI)锚定物的透明质酸酶,如人PH20,可以通过截短和去除全部或部分GPI锚定物而变得可溶。在一个实例中,通常经由GPI锚定物被膜锚定的人透明质酸酶PH20通过截短和去除C末端处的全部或部分GPI锚定物而变得可溶。

[0054] 可溶性透明质酸酶也包含中性活性透明质酸酶,如可溶性人PH20多肽。在特定的实例中,用于本文的组合物、组合和方法中的透明质酸酶是可溶性中性活性透明质酸酶。示例性的透明质酸酶包含来自任何物种的PH20的可溶性形式,如PH20的可溶性形式。PH20的可溶性形式是本领域已知的,这些包含羊和牛的PH20多肽,以及SEQ ID NO:1的人PH20的可溶性形式。SEQ ID NO:1的人PH20的可溶性形式。只要透明质酸酶是可溶的(在表达时分泌的)并保持透明质酸酶活性,此类可溶性形式包含其缺少全部或部分C末端GPI锚定物的截短形式。此类形式通常也是成熟形式,当在细胞中表达时,该成熟形式缺乏信号肽。全长成熟人PH20(SEQ ID NO:1的残基36-509)作为GPI锚定的多肽存在。如本领域已知的,通过在C末端截短使其可溶。这样的截短可以除去所有的GPI锚定物附着序列,或者可以仅除去一些GPI锚定物附着。然而,产生的多肽是可溶的。在其中可溶性透明质酸酶保留GPI锚定物附着信号序列的一部分的情况下,GPI锚定物附着信号序列中的1、2、3、4、5、6、7或更多个氨基酸残基可以被保留,只要该多肽是可溶的。含有GPI锚定物的一个或多个氨基酸的多肽被称为延伸的可溶性透明质酸酶。本领域技术人员可以使用本领域熟知的方法确定多肽是否是GPI锚定的。此类方法包含但不限于,使用已知算法来预测GPI锚定物附着信号序列和 ω 部位的存在和位置,以及在用磷脂酰肌醇特异性磷脂酶C(PI-PLC)或D(PI-PLD)消化之前和之后进行溶解度分析。

[0055] 示例性的可溶性透明质酸酶是可溶性人PH20。可溶性形式的重组人PH20已经产生,并且可以用于本文所述的组合物、组合和方法中。PH20的此类可溶性形式的描述和生产描述于例如美国专利号7,767,429、8,202,517、8,431,380、8,431,124、8,450,4708,765,685、8,772,246、7,871,607、7,846,431、7,829,081、8,105,586、8,187,855、8,257,699、8,580,252、9,677,061和9,677,062中,它们通过引用并入本文。

[0056] 重组可溶性形式的人PH20已经产生,并且可以用于本文提供的组合物、组合和方法中。例如,参考SEQ ID NO:1,其列出了全长前体PH20的序列,包含信号序列(残基1-35),可溶性形式包含但不限于在SEQ ID NO:1中列出的人PH20的C末端截短多肽,其具有SEQ ID NO:1中给出的氨基酸的序列的C末端氨基酸残基467、468、469、470、471、472、473、474、475、476、477、478、479、480、481、482、483、484、485、486、487、488、489、490、491、492、493、494、495、496、497、498、499or 500,或与其显示至少85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多序列同一性的多肽,在中性pH下具有活性,并且是可溶的(当在哺乳动物细胞中表达时分泌到培养基中)。人PH20的可溶性形式通常包含那些含有SEQ ID NO:1中列出的氨基酸36-464的形式。例如,当在哺乳动物细胞中表达时,35个氨基酸的N末端信号序列在加工期间被切割,并且成熟形式的蛋白质被分泌。因此,成熟的可溶性多肽包含那些含有SEQ ID NO:1的氨基酸36至467、468、469、470、471、472、473、474、475、476、477、478、479、480、481、482和483的多肽。示例性的可溶性透明质酸酶是长度为442、443、444、445、446或447个氨基酸的可溶性人PH20多肽,如可溶性PH20多肽,其具有如SEQ ID NO:1的氨基酸残基36-482、36-477、366-478、36-479、36-480、36-481和36-483所示的氨基酸的序列;及其变体,其保持透明质酸酶活性并且与如SEQ ID NO:1的氨基酸残基36-482、36-477、366-478、36-479、36-480、36-481和36-483所列出的氨基酸的序列具有例如至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%or 99%的序列同一性。重组人PH20的此类可溶性形式描述于例如美国专利号7,767,429、8,202,

517、8,431,380、8,431,124、8,450,470 8,765,685、8,772,246、7,871,607、7,846,431、7,829,081、8,105,586、8,187,855、8,257,699、8,580,252、9,677,061和9,677,062中,它们通过引用并入本文。由于糖基化对于透明质酸酶的催化活性和稳定性是重要的,所以通常PH20的可溶性形式是使用促进正确的N-糖基化以确保多肽保持活性的蛋白质表达系统产生的。此类细胞包含例如中国仓鼠卵巢(CHO)细胞(例如DG44 CHO细胞)。

[0057] 可溶性重组人PH20可以重组产生,其包含重组形式的人PH20。一种此类产品被称为rHuPH20;rHuPH20是指在细胞(如CHO细胞)中表达编码SEQ ID NO:1的残基36-482的核酸时产生的组合物,通常与天然或异源信号序列(SEQ ID NO:1的残基1-35)相连。rHuPH20通过核酸分子的表达产生,如编码氨基酸1-482(在SEQ ID NO:1中列出)。翻译后加工去除35个氨基酸的信号序列,留下多肽或多肽的混合物。当在培养基中生产时,在C末端处存在异质性,使得指定为rHuPH20的产物包含以各种丰度终止于残基477、478、479、480、481和482(参考SEQ ID NO:1)的物种的混合物。透明质酸酶rHuPH20选自由参考SEQ ID NO:1的多肽组成的组,其对应于氨基酸残基36-477;氨基酸残基36-478、氨基酸残基36-479、氨基酸残基36-480、氨基酸残基36-481和氨基酸残基36-482。通常,最丰富的物种是对应于SEQ ID NO:1的残基36-481的446氨基酸多肽。

[0058] 所述可溶性人PH20多肽包含那些被称为延伸的可溶性透明质酸酶的多肽。延伸的可溶性透明质酸酶可以通过对任何天然GPI锚定的透明质酸酶进行C末端截短来产生,使得所得到的多肽是可溶的,并且含有来自GPI锚定物附着信号序列的一个或多个氨基酸残基(参见,例如,美国专利第8,927,249号)。延伸的可溶性人PH20多肽包含那些终止于SEQ ID NO:1的约495-500残基中的任一个的多肽。成熟形式始于残基36。延伸的可溶性人PH20多肽是中性活性的、可溶性的。它们可以含有氨基酸取代,并且与延伸的可溶性PH20多肽具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%。

[0059] 透明质酸酶可以重组产生,或者可以从天然来源中如例如从睾丸提取物中纯化或部分纯化。用于生产重组蛋白(包含重组透明质酸酶)的方法是本领域熟知的。可溶性PH20在促进正确的N-糖基化以保持活性的细胞(如CHO细胞(例如DG44 CHO细胞))中产生。

[0060] 一些透明质酸酶(包含可溶性PH20透明质酸酶)的糖基化(包含N-连接的糖基化和O-连接的糖基化)对于它们的催化活性和稳定性可能是重要的。对于一些透明质酸酶,去除N-连接的糖基化可以导致透明质酸酶活性几乎完全失活。N-连接的寡糖分为几种主要类型(甘露寡糖、复合寡糖、杂合寡糖、硫酸化寡糖),所有类型都具有(Man)₃-GlcNAc-GlcNAc-核心,这些核心经由属于-Asn-Xaa-Thr/Ser-序列(其中Xaa不是Pro)的Asn残基的酰胺氮连接。已经报告凝血蛋白C在-Asn-Xaa-Cys部位处的糖基化。在一些情况下,透明质酸酶(如PH20透明质酸酶)可以含有N-糖苷键和O-糖苷键。例如,PH20具有O-连接的寡糖以及N-连接的寡糖。在SEQ ID NO:1中举例说明的人PH20的N82、N166、N235、N254、N368、N393处存在六个潜在的N-连接的糖基化部位。

[0061] 在某些实施例中,透明质酸酶是对野生型PH20的氨基酸序列具有一个或多个氨基酸残基添加、缺失或取代的透明质酸酶PH20的变体或片段,如对成熟野生型PH20的氨基酸序列具有一个或多个氨基酸残基添加、缺失或取代的透明质酸酶PH20的变体或片段。在一些实施例中,透明质酸酶PH20的变体或片段包含位于PH20的 α -螺旋8区的一个或多个氨基酸取代、添加或缺失。在一些实施例中,透明质酸酶PH20的变体或片段包含位于PH20的 α -螺

旋7和 α -螺旋8之间的接头区域中的一个或多个氨基酸取代、添加或缺失。在某些实施例中，透明质酸酶PH20的变体或片段包含野生型PH20的L36至S490的氨基酸序列(即SEQ ID NO:1的L36至S490)。

[0062] 在实施例中，PH20变体或其片段与SEQ ID NO:1的野生型PH20酶的氨基酸序列具有至少80%的氨基酸序列同源性，如至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%并且包含至少99%。

[0063] 在一些实施例中，透明质酸酶PH20的变体或片段在选自T341至N363的一个或多个位置，如选自T341、L342、S343、I344、M345、S347、M348、K349、L352、L353、L354、D355、N356、E359、I361和N363的一个或多个位置(但不限于此)处包含一个或多个氨基酸残基取代。例如，在选自T341、L342、S343、I344、M345、S347、M348、K349、L352、L353、L354、D355、N356、E359、I361和N363的一个或多个位置处的氨基酸残基取代可以是选自T341A、T341C、T341D、T341G、T341S、L342W、S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、D355K、E359D、I361T和N363G的一个或多个氨基酸残基取代，但不限于此。在实施例中，氨基酸残基取代由代码数字和字母描述，如“T455S”，这意味着给定SEQ ID.的数字位置455处的氨基酸残基苏氨酸(“T”)被氨基酸残基丝氨酸(“S”)取代。在某些实施例中，透明质酸酶PH20的变体或片段包含一个或多个选自T341S、L342W、S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D和I361T的氨基酸残基取代。在某些实施例中，透明质酸酶PH20的变体或片段包含一个或多个选自M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D和I361T的氨基酸残基取代，并且可以进一步包含一个或多个选自T341A、T341C、T341D、T341G、T341S、L342W、S343E、I344N和N363G组成的组的氨基酸残基取代，但不限于此。

[0064] 在一些实施例中，透明质酸酶PH20的变体或片段包含一个或多个选自以下的氨基酸残基取代：(a) T341S、L342W、S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D和I361T；(b) L342W、S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D和I361T；(c) M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D、I361T和N363G；(d) T341G、L342W、S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D和I361T；(e) T341A、L342W、S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D和I361T；(f) T341C、L342W、S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D和I361T；(g) T341D、L342W、S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D和I361T；(h) I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D和I361T；和(i) S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D和I361T。

[0065] 在一些实施例中，透明质酸酶PH20的变体或片段包含在N末端F38之前截短SEQ ID NO:1的氨基酸序列。在一些情况下，透明质酸酶PH20的变体或片段包含在选自M1至P42的氨基酸残基之前截短SEQ ID NO:1的氨基酸序列。例如，透明质酸酶PH20的变体或片段在N末端的氨基酸残基L36、N37、F38、R39、A40、P41或P42之前包含截短，使得N末端的一个或多个氨基酸残基缺失。在实施例中，短语在N末端选自M1至P42的氨基酸残基之前截短意指在N末

端紧邻氨基酸残基M1至P42之前的氨基酸残基被切割和删除。

[0066] 在一些实施例中,透明质酸酶PH20的变体或片段包含在选自V455至S490的氨基酸之后截短SEQ ID NO:1的氨基酸序列。例如,透明质酸酶PH20的变体或片段包含在氨基酸残基V455、C458、D461、C464、I465、D466、A467、F468、K470、P471、P472、M473、E474、T475、E476、E477、P478、Q479、I480、F481、Y482、N483、A484、P486、T488或S490之后截短SEQ ID NO:1的氨基酸序列,使得在C末端的一个或多个氨基酸残基被缺失。在实施例中,短语在C末端处选自V455至S490的氨基酸残基之后的截短意指在C末端处紧接在氨基酸残基V455至S490之后的氨基酸残基被切割和删除。

[0067] 在一些实施例中,透明质酸酶PH20的变体或片段可以具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列,并且可以包含选自T341S、L342W、S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D和I361T的一个或多个氨基酸残基取代,以及在N末端处在F38之前的截短,和在C末端处在F468之后的截短(参见HP46,SEQ ID NO:99,下表2)。在一些情况下,透明质酸酶PH20的变体或片段可以具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列,并且可以包含选自T341A、T341C、T341G、S343E、M345T、K349E、L353A、L354I、N356E和I361T的一个或多个氨基酸残基取代。在某些情况下,一个或多个氨基酸残基取代位于 α -螺旋8区域(S347至C381)和/或 α -螺旋7和 α -螺旋8之间的接头区域(A333至R346)。例如, α -螺旋7和 α -螺旋8之间的接头区域中的氨基酸取代可以包含由氨基酸残基T341至N363、T341至I361、L342至I361、L342至I361、S343至I361、I344至I361、M345至I361或M345至N363组成的区域中的一个或多个氨基酸残基的取代。

[0068] 在一些实施例中,透明质酸酶PH20的变体或片段具有位于野生型PH20(例如,成熟野生型PH20)的 α -螺旋8区域(S347至C381)和/或 α -螺旋7和 α -螺旋8之间的接头区域(A333至R346)的一个或多个氨基酸残基取代,并且可以被具有序列ID NO:2的如表2和3所示的人HYAL1的区域的氨基酸序列的一些氨基酸残基取代。2.

[0069] 表2——野生型人HYAL1(SEQ ID NO:2)的氨基酸序列

```

MAAHLLPICALFLTLLDMAQGFGRGPLLPNRPFTTVWNANTQWCLERHGVDVDVSVFD
WVANPGQTFRGPDMTIFYSSQLGTYPYYTPTGEPVFGGLPQNASLIAHLARTFQDILAAIPAP
DFSGLAVIDWEAWRPRWAFNWDTKDIYRQRSRALVQAQHPDWPAPQVEAVAQDQFQG
AARAWMAGTLQLGRALRPRGLWGFYGFPCYNYDFLSPNYTGQCPSGIRAQNDQLGWL
WGQSRALYPSIYMPAVLEGTGKSQMYVQHRVAEAFRVAVAAGDPNLPVLPYVQIFYDTTN
HFLPLDELEHSLGESAAQGAAGWLVVSWENTRTKESCQAIKEYMDTTLGPFILNVTSGALL
CSQALCSGHGRCVRRRTSHPKALLLNPAFSIQLTPGGGPLSLRGALSLEDQAQMAVEFKCR
CYPGWQAPWCERKSMW

```

[0070]

[0071] 表3——PH20和HYAL1之间的 α -螺旋和氨基酸序列比较

[0072]	α 螺旋	PH20 的氨基酸序列	HYAL1 的氨基酸序列
	α-螺旋 1	P56-D65	N39-G48
[0073]	α-螺旋 3	S119-M135	S101-I117
	α-螺旋 4'	K161-N176	K144-H159
	α-螺旋 4	S180-R211	P163-R194
	α-螺旋 5	F239-S256	P222-S239
	α-螺旋 6	A274-D293	K257-G277
	α-螺旋 7	S317-G332	P299-G314
	α-螺旋 8	S347-C381	T329-C363

[0074] 在某些实施例中,透明质酸酶PH20的变体或片段具有选自SEQ ID NOS:60至115的氨基酸序列,如表4所示。

[0075] 表4

变体或片段的名称	SEQ ID NO.	取代	氨基酸序列
[0076]	HM1	M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D、I361T 和 N363G 的 12 个氨基酸取代	LNFRAPPV I PNV PFLWAWNAPSEFCLGKFDEPLDM SLFSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGYYPIIDSI TGVTVNGGI PQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNL GMAVIDWEEWRPTWARNWPKDVYKNRSIELVQQQ NVQLSLTEATEKAKQEFKAGKDFLVETIKLGKLL RPNHLWGYYLFPDCYNHYYKKPGYNGSCFNVEIKR NDDL SWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRN RVREAIRVSKI PDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKF LSQDELVYTFGETVALGASGIVIWGTLSTI TRTKES CQAIKEYMDTTLG PYIINVTLAARKMCSQVLCQEQG VCIRKNWNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGK PTLEDLEQFSEKFCSCYSTLSCKEKADVKD TDAV DVC IADGVCIDAF LKPPMETE EPQIFYNASPSTLS
	HM2	Y365F、I367L、L371S、A372G、K374L、M375L 和 V379A 的 7 个氨基酸取代	LNFRAPPV I PNV PFLWAWNAPSEFCLGKFDEPLDM SLFSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGYYPIIDSI TGVTVNGGI PQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNL GMAVIDWEEWRPTWARNWPKDVYKNRSIELVQQQ NVQLSLTEATEKAKQEFKAGKDFLVETIKLGKLL RPNHLWGYYLFPDCYNHYYKKPGYNGSCFNVEIKR NDDL SWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRN RVREAIRVSKI PDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKF LSQDELVYTFGETVALGASGIVIWGTLSTI TRTKES CQAIKEYMDTTLNPFILNVTSGALLCSQALC QEQG VCIRKNWNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGK PTLEDLEQFSEKFCSCYSTLSCKEKADVKD TDAV DVC IADGVCIDAF LKPPMETE EPQIFYNASPSTLS

[0077]

HM3	62	M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D、I361T、N363G、Y365F、I367L、L371S、A372G、K374L、M375L 和 V379A 的 19 个氨基酸取代	<p>LNFRAPPV I PNV PFLWAWNAPSEFCLGKFDEPLDM SLFSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGYYPIIDSI TGVTVNGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNL GMAVIDWEEWRPTWARNWPKPDVYKNRSIELVQQQ NVQLSLTEATEKAKQEFKAGKDFLVETIKLGKLL RPNHLWGYLFPDCYNHYYKPGYNGSCFNVEIKR NDDL SWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRN RVREAIRVSKI PDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKF LSQDELVYTFGETVALGASGIVIWGTLSTITRTKES COAIKEYMDTTLGPFILNVTSGALLCSQALCQEQG VCIRKNWNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGK PTLEDLEQFSEKFYCSYSTLSCKEKADV KDTDAV DVC IADGVC IDAFLKPPMETE EPQIFYNASPSTLS</p>
HM4	63	G340V、T341S、L342W、S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D、I361T 和 N363G 的 17 个氨基酸取代	<p>LNFRAPPV I PNV PFLWAWNAPSEFCLGKFDEPLDM SLFSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGYYPIIDSI TGVTVNGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNL GMAVIDWEEWRPTWARNWPKPDVYKNRSIELVQQQ NVQLSLTEATEKAKQEFKAGKDFLVETIKLGKLL RPNHLWGYLFPDCYNHYYKPGYNGSCFNVEIKR NDDL SWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRN RVREAIRVSKI PDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKF LSQDELVYTFGETVALGASGIVIWVSWENTRTKES COAIKEYMDTTLGPIIINVTLAAKMCSQVLCQEQG VCIRKNWNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGK PTLEDLEQFSEKFYCSYSTLSCKEKADV KDTDAV DVC IADGVC IDAFLKPPMETE EPQIFYNASPSTLS</p>
HM6	64	M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D 和 I361T 的 11 个氨基酸取代	<p>LNFRAPPV I PNV PFLWAWNAPSEFCLGKFDEPLDM SLFSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGYYPIIDSI TGVTVNGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNL GMAVIDWEEWRPTWARNWPKPDVYKNRSIELVQQQ NVQLSLTEATEKAKQEFKAGKDFLVETIKLGKLL RPNHLWGYLFPDCYNHYYKPGYNGSCFNVEIKR NDDL SWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRN RVREAIRVSKI PDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKF LSQDELVYTFGETVALGASGIVIWGTLSTITRTKES COAIKEYMDTTLNPIIINVTLAAKMCSQVLCQEQG VCIRKNWNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGK PTLEDLEQFSEKFYCSYSTLSCKEKADV KDTDAV DVC IADGVC IDAFLKPPMETE EPQIFYNASPSTLS</p>

[0078]

HM7	65	G340V、T341S、L342W、S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D 和 I361T 的 16 个氨基酸取代	LNFRAPPVVPNV PFLWAWNAPSEFCLGKFDEPLDM SLFSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGYYPIIDSI TGVTVNGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNL GMAVIDWEEWRPTWARNWKPKDVYKNRSIELVQQQ NVQLSLTEATEKAKQEFKAGKDFLVETIKLGKLL RPNHLWGYYLFPDCYNHHYKPGYNGSCFNVEIKR NDDL SWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRN RVREAIRVSKIPDAKSPVPFAYTRIVFTDQVLKF LSQDELVYTFGETVALGASGIVIW SWENTRTKES COAIKEYMDTTLN PI INVTLAAKMCSQVLCQEQG VCIRKNWNSDYLHLNPDNF AIQLEKGGKFTVRGK PTLEDLEQFSEKFCSCYSTLSCKEKADV KDTDAV DVC IADGVC IDAFLKPPMETE EPQIFYNASPSTLS
HM8	66	I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D 和 I361T 的 12 个氨基酸取代	LNFRAPPVVPNV PFLWAWNAPSEFCLGKFDEPLDM SLFSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGYYPIIDSI TGVTVNGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNL GMAVIDWEEWRPTWARNWKPKDVYKNRSIELVQQQ NVQLSLTEATEKAKQEFKAGKDFLVETIKLGKLL RPNHLWGYYLFPDCYNHHYKPGYNGSCFNVEIKR NDDL SWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRN RVREAIRVSKIPDAKSPVPFAYTRIVFTDQVLKF LSQDELVYTFGETVALGASGIVIWGTL SNTRTKES COAIKEYMDTTLN PI INVTLAAKMCSQVLCQEQG VCIRKNWNSDYLHLNPDNF AIQLEKGGKFTVRGK PTLEDLEQFSEKFCSCYSTLSCKEKADV KDTDAV DVC IADGVC IDAFLKPPMETE EPQIFYNASPSTLS
HM9	67	S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D 和 I361T 的 13 个氨基酸取代	LNFRAPPVVPNV PFLWAWNAPSEFCLGKFDEPLDM SLFSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGYYPIIDSI TGVTVNGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNL GMAVIDWEEWRPTWARNWKPKDVYKNRSIELVQQQ NVQLSLTEATEKAKQEFKAGKDFLVETIKLGKLL RPNHLWGYYLFPDCYNHHYKPGYNGSCFNVEIKR NDDL SWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRN RVREAIRVSKIPDAKSPVPFAYTRIVFTDQVLKF LSQDELVYTFGETVALGASGIVIWGTL ENTRTKES COAIKEYMDTTLN PI INVTLAAKMCSQVLCQEQG VCIRKNWNSDYLHLNPDNF AIQLEKGGKFTVRGK PTLEDLEQFSEKFCSCYSTLSCKEKADV KDTDAV DVC IADGVC IDAFLKPPMETE EPQIFYNASPSTLS

[0079]

HM10	68	L342W、S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D 和 I361T 的 14 个氨基酸取代	<p>LNFRAPPV I PNV PFLWAWNAPSEFCLGKFDEPLDM SLFSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGYYPIIDSI TGVTVNGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNL GMAVIDWEEWRPTWARNWKPKDVYKNRSIELVQQQ NVQLSLTEATEKAKQEFKAGKDFLVETIKLGKLL RPNHLWGYYLFPDCYNHYYKPGYNGSCFNVEIKR NDDL SWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRN RVREAIRVSKI PDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKF LSQDELVYTFGETVALGASGIVIWGTWENTRTKES <u>COAIKEYMDTTLN</u>PYI INVTLAAKMCSQVLCQEQG VCIRKNWNS SDYLHLNPDNF AIQLEKGGKFTVRGK PTLEDLEQFSEKFYCSYSTLSCKEKADV KDTDAV DVC IADGVC IDAFLKPPMETEEPQIFYNASPSTLS</p>
HM11	69	M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D、I361T、Y365F 和 I367L 的 13 个氨基酸取代	<p>LNFRAPPV I PNV PFLWAWNAPSEFCLGKFDEPLDM SLFSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGYYPIIDSI TGVTVNGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNL GMAVIDWEEWRPTWARNWKPKDVYKNRSIELVQQQ NVQLSLTEATEKAKQEFKAGKDFLVETIKLGKLL RPNHLWGYYLFPDCYNHYYKPGYNGSCFNVEIKR NDDL SWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRN RVREAIRVSKI PDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKF LSQDELVYTFGETVALGASGIVIWGTLSTRTKES <u>COAIKEYMDTTLNPFIL</u>NVTLAAKMCSQVLCQEQG VCIRKNWNS SDYLHLNPDNF AIQLEKGGKFTVRGK PTLEDLEQFSEKFYCSYSTLSCKEKADV KDTDAV DVC IADGVC IDAFLKPPMETEEPQIFYNASPSTLS</p>
HM12	70	M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D、I361T、Y365F、I367L、L371S 和 A372G 的 15 个氨基酸取代	<p>LNFRAPPV I PNV PFLWAWNAPSEFCLGKFDEPLDM SLFSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGYYPIIDSI TGVTVNGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNL GMAVIDWEEWRPTWARNWKPKDVYKNRSIELVQQQ NVQLSLTEATEKAKQEFKAGKDFLVETIKLGKLL RPNHLWGYYLFPDCYNHYYKPGYNGSCFNVEIKR NDDL SWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRN RVREAIRVSKI PDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKF LSQDELVYTFGETVALGASGIVIWGTLSTRTKES <u>COAIKEYMDTTLNPFILNVTSGA</u>KMCSQVLCQEQG VCIRKNWNS SDYLHLNPDNF AIQLEKGGKFTVRGK PTLEDLEQFSEKFYCSYSTLSCKEKADV KDTDAV DVC IADGVC IDAFLKPPMETEEPQIFYNASPSTLS</p>

[0080]

HM13	71	M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D 和 I361T 的 11 个氨基酸取代, 以及在 N 末端处的 F38 之前的截短	FRAPPVIPNV PFLWAWNAPSEFCLGKFDEPLDMSL FSFIGSPRINATGQGVTFYVDRDLGYYPYIDSITG VTVNGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNLGM AVIDWEEWRPTWAR NWKPKDVYKNRSIELVQQNV QLSLTEATEKAKQEF EKAGKDFLVETIKLGKLLRP NHLWGYYLFPDCYNH HYKKPGYNGSCFNVEIKRND DLSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRNRV REAIRVSKI PDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLS QDELVYTFGETVALGASGIVIWGTLSTRTKESQ <u>AIKEYMDTTLN</u> PYIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVC IRKNWNSSDYLHLNPDNF AIQLEKGGKFTVRGKPT LEDLEQFSEKFYCSYSTLSCKEKADV KDTDAVDV CIADGVCIDAF LKPPMETE EPQIFYNASPSTLS
HM14	72	M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D 和 I361T 的 11 个氨基酸取代, 以及在 C 末端处的 I465 之后的截短	LNFRAPPVIPNV PFLWAWNAPSEFCLGKFDEPLDM SLFSFIGSPRINATGQGVTFYVDRDLGYYPYIDSI TGVTVNGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNL GMAVIDWEEWRPTWAR NWKPKDVYKNRSIELVQQQ NVQLSLTEATEKAKQEF EKAGKDFLVETIKLGKLL RPNHLWGYYLFPDCYNH HYKKPGYNGSCFNVEIKR NDDL SWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRN RVREAIRVSKI PDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKF LSQDELVYTFGETVALGASGIVIWGTLSTRTKES <u>QAIKEYMDTTLN</u> PYIINVTLAAKMCSQVLCQEQG VCIRKNWNSSDYLHLNPDNF AIQLEKGGKFTVRGK PTLEDLEQFSEKFYCSYSTLSCKEKADV KDTDAV DVCIDAGVCI
HM15	73	M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D 和 I361T 的 11 个氨基酸取代, 以及在 C 末端处的 F468 之后的截短	LNFRAPPVIPNV PFLWAWNAPSEFCLGKFDEPLDM SLFSFIGSPRINATGQGVTFYVDRDLGYYPYIDSI TGVTVNGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNL GMAVIDWEEWRPTWAR NWKPKDVYKNRSIELVQQQ NVQLSLTEATEKAKQEF EKAGKDFLVETIKLGKLL RPNHLWGYYLFPDCYNH HYKKPGYNGSCFNVEIKR NDDL SWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRN RVREAIRVSKI PDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKF LSQDELVYTFGETVALGASGIVIWGTLSTRTKES <u>QAIKEYMDTTLN</u> PYIINVTLAAKMCSQVLCQEQG VCIRKNWNSSDYLHLNPDNF AIQLEKGGKFTVRGK PTLEDLEQFSEKFYCSYSTLSCKEKADV KDTDAV DVCIDAGVCI DAF

[0081]

HM16	74	M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D 和 I361T 的 11 个氨基酸取代,以及在 C 末端处的 P471 之后的截短	LNFRAFPV I PNV PFLWAWNAPSEFCLGKFDEPLDM SLFSFIGSPRINATGQGVTI FYVDRLGYYPYIDSI TGVTVNGGI PQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNL GMAVIDWEEWRPTWARNWPKDVYKNRSIELVQQQ NVQLSLTEATEKAKQEFKAGKDFLVETIKLGKLL RPNHLWGYLLFPDCYNHYYKPGYNGSCFNVEIKR NDDL SWLWNE STALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRN RVREAIRVSKI PDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKF LSQDELVYTFGETVALGASGIVIWGTLSI <u>TRTKES</u> <u>COAIKEYMDTT</u> LNPI I INVTLAAKMCSQVLCQEQG VCIRKNWNSSDYLHLNPDNF AIQLEKGGKFTVRGK PTLEDLEQFSEKFCSCYSTLSCKEKADV KD TD AV DVC IADGVC I DAFLKP
HM17	75	用 FRGPLLPNR 取代 L36~V47, 以及 M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D 和 I361T 的氨基酸取代	<u>FRGPLLPNR</u> PFLWAWNAPSEFCLGKFDEPLDMSLF SFIGSPRINATGQGVTI FYVDRLGYYPYIDSITGV TVNGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNLGMA VIDWEEWRPTWARNWPKDVYKNRSIELVQQQNVQ L SL TEATEKAKQEFKAGKDFLVETIKLGKLLRPN HLWGYLLFPDCYNHYYKPGYNGSCFNVEIKRND L SWLWNE STALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRNRVR EAIRVSKI PDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQ DELVYTFGETVALGASGIVIWGTLSI <u>TRTKESCOA</u> <u>IKEYMDTT</u> LNPI I INVTLAAKMCSQVLCQEQGVC RKNWNSSDYLHLNPDNF AIQLEKGGKFTVRGKPTL EDLEQFSEKFCSCYSTLSCKEKADV KD TD AV DVC IADGVC I DAFLKPPMETEEOIFYNASPSTLS
HM18	76	用 FRGPLLPNRPFTTV 取代 L36~A52, 以及 M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D 和 I361T 的氨基酸取代	<u>FRGPLLPNRPFTTV</u> WNAWAPSEFCLGKFDEPLDMSLF SFIGSPRINATGQGVTI FYVDRLGYYPYIDSITGV TVNGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNLGMA VIDWEEWRPTWARNWPKDVYKNRSIELVQQQNVQ L SL TEATEKAKQEFKAGKDFLVETIKLGKLLRPN HLWGYLLFPDCYNHYYKPGYNGSCFNVEIKRND L SWLWNE STALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRNRVR EAIRVSKI PDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQ DELVYTFGETVALGASGIVIWGTLSI <u>TRTKESCOA</u> <u>IKEYMDTT</u> LNPI I INVTLAAKMCSQVLCQEQGVC RKNWNSSDYLHLNPDNF AIQLEKGGKFTVRGKPTL EDLEQFSEKFCSCYSTLSCKEKADV KD TD AV DVC IADGVC I DAFLKPPMETEEOIFYNASPSTLS

[0082]

<p>HM19</p>	<p>77</p>	<p>L342W、S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D 和 I361T 的 14 个氨基酸取代，在 N 末端处的 F38 之前的截短以及在 C 末端处的 K470 之后的截短</p>	<p>FRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFCLGKFDEPLDMSL FSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGYYPYIDSITG VTVNGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNLGM AVIDWEEWRPTWARNWPKDVKYKNRSIELVQQQNV QLSLTEATEKAKQEFKAGKDFLVETIKLGKLLRP NHLWGYYLFPDCYNHYYKPGYNGSCFNVEIKRND DLSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRNRV REAIRVSKI PDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLS QDELVYTFGETVALGASGIVIWGT<u>WENTRTKES</u><u>CO</u> <u>AIKEYMDTTL</u>NLPYI INVTLAAKMCSQVLCQEQGVC IRKNWNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPT LEDLEQFSEKFYCSCYSTLSCKEKADVKTDAVDV CIADGVCIDAF</p>
<p>HM20</p>	<p>78</p>	<p>L342W、S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D 和 I361T 的 14 个氨基酸取代，在 N 末端处的 F38 之前的截短以及在 C 末端处的 F468 之后的截短</p>	<p>FRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFCLGKFDEPLDMSL FSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGYYPYIDSITG VTVNGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNLGM AVIDWEEWRPTWARNWPKDVKYKNRSIELVQQQNV QLSLTEATEKAKQEFKAGKDFLVETIKLGKLLRP NHLWGYYLFPDCYNHYYKPGYNGSCFNVEIKRND DLSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRNRV REAIRVSKI PDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLS QDELVYTFGETVALGASGIVIWGT<u>WENTRTKES</u><u>CO</u> <u>AIKEYMDTTL</u>NLPYI INVTLAAKMCSQVLCQEQGVC IRKNWNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPT LEDLEQFSEKFYCSCYSTLSCKEKADVKTDAVDV CIADGVCIDAF</p>
<p>HM21</p>	<p>79</p>	<p>T341S、L342W、S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D 和 I361T 的 15 个氨基酸取代</p>	<p>LNFRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFCLGKFDEPLDM SLFSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGYYPYIDSI TGVTVNGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNL GMAVIDWEEWRPTWARNWPKDVKYKNRSIELVQQQ NVQLSLTEATEKAKQEFKAGKDFLVETIKLGKLL RPNHLWGYYLFPDCYNHYYKPGYNGSCFNVEIKR NDDLWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRN RVREAIRVSKI PDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKF LSQDELVYTFGETVALGASGIVIWG<u>SWENTRTKES</u> <u>COAIKEYMDTTL</u>NLPYI INVTLAAKMCSQVLCQEQG VCIRKNWNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGK PTLEDLEQFSEKFYCSCYSTLSCKEKADVKTDAV DVCIDGVCIDAFKPPMETEEPQIFYNASPSTLS</p>

[0083]

HM24	80	M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D 和 I361T 的 11 个氨基酸取代, 以及在 N 末端处的 A40 之前的截短	<p>APPV I PNV PFLWAWNAPSEFCLGKFDEPLDMSLFS FIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGYYPYIDSITGVT VNGGI PQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNLGMAV</p> <p>IDWEEWRPTWARNWPKPKDVYKNRSIELVQQQNVQL SLTEATEKAKQEF EKAGKDFLVETIKLGKLLRPNH LWGYLLFPDCYNHHYKPGYNGSCFNVEIKRNDL SWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRNRVRE AIRVSKI PDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQD ELVYTFGETVALGASGIVIWGTLSI<u>TRTKES</u><u>QAI</u> <u>KEYMDT</u><u>TLN</u>PI INVTLAAKMCSQVLCQEQQVCIR KNWNSDYLLHLNPDNF AIQLEKGGKFTVRGKPTLE DLEQFSEKFYCSCYSTLSCKEKADV KDTDAVDVCI ADGVCIDAFLKPPMETE EEPQIFYNASPSTLS</p>
HM25	81	M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D 和 I361T 的 11 个氨基酸取代, 在 N 末端处的 P42 之前的截短	<p>PV I PNV PFLWAWNAPSEFCLGKFDEPLDMSLFSFI GSPRINATGQGVTIFYVDRLGYYPYIDSITGVTVN GGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNLGMAVID WEEWRPTWARNWPKPKDVYKNRSIELVQQQNVQLSL TEATEKAKQEF EKAGKDFLVETIKLGKLLRPNHLW GYLLFPDCYNHHYKPGYNGSCFNVEIKRNDL SW LWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRNRVREAI RVSKI PDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQDEL VYTFGETVALGASGIVIWGTLSI<u>TRTKES</u><u>QAIKE</u> <u>YMDT</u><u>TLN</u>PI INVTLAAKMCSQVLCQEQQVCIRKN WNSDYLLHLNPDNF AIQLEKGGKFTVRGKPTLEDL EQFSEKFYCSCYSTLSCKEKADV KDTDAVDVCIAD GVCIDAFLKPPMETE EEPQIFYNASPSTLS</p>
HM29	82	L342W、S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D 和 I361T 的 14 个氨基酸取代, 在 N 末端处的 L36 之前的截短, 以及在 C 末端处的 A467 之后的截短	<p>LNFRAPPV I PNV PFLWAWNAPSEFCLGKFDEPLDM SLFSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGYYPYIDSI TGVTVNGGI PQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNL GMAVIDWEEWRPTWARNWPKPKDVYKNRSIELVQQQ NVQLSLTEATEKAKQEF EKAGKDFLVETIKLGKLL RPNHLWGYLLFPDCYNHHYKPGYNGSCFNVEIKR NDDL SWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRN RVREAIRVSKI PDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKF LSQDELVYTFGETVALGASGIVIWGT<u>WENTR</u><u>TKES</u> <u>QAIKEYMDT</u><u>TLN</u>PI INVTLAAKMCSQVLCQEQQ VCIRKNWNSDYLLHLNPDNF AIQLEKGGKFTVRGK PTLEDLEQFSEKFYCSCYSTLSCKEKADV KDTDAV DVCIDA</p>

[0084]

HM30	83	L342W、S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D 和 I361T 的 14 个氨基酸取代，在 N 末端处的 L36 之前的截短，以及在 C 末端处的 C464 之后的截短	LNFRAPPVI PNV PFLWAWNAPSEFCLGKFDEPLDM SLFSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGYYPIIDSI TGVTVNGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNL GMAVIDWEEWRPTWARNWKPKDVYKNRSIELVQQQ NVQLSLTEATEKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLL RPNHLWGYYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFNVEIKR NDDL SWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRN RVREAIRVSKI PDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKF LSQDELVYTFGETVALGASGIVIWGT WENTRTKES COAIKEYMDTTLN PYI INVTLAAKMCSQVLCQEQG VCIRKNWNSDY LHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGK PTLEDLEQFSEKFCSCYSTLSCKEKADV KDTDAV DVC IADGVC
HM31	84	L342W、S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D 和 I361T 的 14 个氨基酸取代，在 N 末端处的 L36 之前的截短，以及在 C 末端处的 D461 之后的截短	LNFRAPPVI PNV PFLWAWNAPSEFCLGKFDEPLDM SLFSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGYYPIIDSI TGVTVNGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNL GMAVIDWEEWRPTWARNWKPKDVYKNRSIELVQQQ NVQLSLTEATEKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLL RPNHLWGYYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFNVEIKR NDDL SWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRN RVREAIRVSKI PDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKF LSQDELVYTFGETVALGASGIVIWGT WENTRTKES COAIKEYMDTTLN PYI INVTLAAKMCSQVLCQEQG VCIRKNWNSDY LHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGK PTLEDLEQFSEKFCSCYSTLSCKEKADV KDTDAV DVC IAD
HM32	85	L342W、S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D 和 I361T 的 14 个氨基酸取代，在 N 末端处的 L36 之前的截短，以及在 C 末端处的 C458 之后的截短	LNFRAPPVI PNV PFLWAWNAPSEFCLGKFDEPLDM SLFSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGYYPIIDSI TGVTVNGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNL GMAVIDWEEWRPTWARNWKPKDVYKNRSIELVQQQ NVQLSLTEATEKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLL RPNHLWGYYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFNVEIKR NDDL SWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRN RVREAIRVSKI PDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKF LSQDELVYTFGETVALGASGIVIWGT WENTRTKES COAIKEYMDTTLN PYI INVTLAAKMCSQVLCQEQG VCIRKNWNSDY LHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGK PTLEDLEQFSEKFCSCYSTLSCKEKADV KDTDAV DVC

[0085]

HM33	86	L342W、S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D 和 I361T 的 14 个氨基酸取代，在 N 末端处的 L36 之前的截短，以及在 C 末端处的 V455 之后的截短	LNFRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFCLGKFDEPLDM SLFSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGYYPIIDSI TGVTVNGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNL GMAVIDWEEWRPTWARNWPKPDVYKNRSIELVQQQ NVQLSLTEATEKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLL RPNHLWGYYLFPDCYNHHYKPKGYNGSCFNVEIKR NDDL SWLWNE STALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRN RVREAIRVSKI PDAK SPLPVFAYTRIVFTDQVLKF LSQDELVYTFGETVALGASGIVIWGT <u>WENTRTKES</u> <u>COAIKEYMDTTLN</u> PI INVTLAAKMCSQVLCQEQG VCIRKNWNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGK PTLEDLEQFSEKFYCSYSTLSCKEKADVKD TDAV
HP34	87	T341S、L342W、S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D 和 I361T 的 15 个氨基酸取代，在 N 末端处的 F38 之前的截短，以及在 C 末端处的 K470 之后的截短	FRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFCLGKFDEPLDMSL FSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGYYPIIDSI TGVTVNGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNLGM AVIDWEEWRPTWARNWPKPDVYKNRSIELVQQQNV QLSLTEATEKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRP NHLWGYYLFPDCYNHHYKPKGYNGSCFNVEIKRND DLSWLWNE STAL YPSIYLNTQQSPVAATLYVRNRV REAIRVSKI PDAK SPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLS QDELVYTFGETVALGASGIVIWG <u>SWENTRTKES</u> CO <u>AIKEYMDTTLN</u> PI INVTLAAKMCSQVLCQEQGVC IRKNWNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPT LEDLEQFSEKFYCSYSTLSCKEKADVKD TDAVDV CIADGVCIDAFLK
HM35	88	L342W、S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D 和 I361T 的 14 个氨基酸取代，在 N 末端处的 F38 之前的截短，以及在 C 末端处的 P472 之后的截短	FRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFCLGKFDEPLDMSL FSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGYYPIIDSI TGVTVNGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNLGM AVIDWEEWRPTWARNWPKPDVYKNRSIELVQQQNV QLSLTEATEKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRP NHLWGYYLFPDCYNHHYKPKGYNGSCFNVEIKRND DLSWLWNE STAL YPSIYLNTQQSPVAATLYVRNRV REAIRVSKI PDAK SPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLS QDELVYTFGETVALGASGIVIWGT <u>WENTRTKES</u> CO <u>AIKEYMDTTLN</u> PI INVTLAAKMCSQVLCQEQGVC IRKNWNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPT LEDLEQFSEKFYCSYSTLSCKEKADVKD TDAVDV CIADGVCIDAFLKPP

[0086]

HM36	89	L342W、S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D 和 I361T 的 14 个氨基酸取代，在 N 末端处的 F38 之前的截短，以及在 C 末端处的 M473 之后的截短	FRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFCLGKFDEPLDMSL FSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGYYPIIDSITG VTVNGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNLGM AVIDWEEWRPTWARNWKPKDVYKNRSIELVQQQNV QLSLTEATEKAKQEFKAGKDFLVETIKLGKLLRP NHLWGYLLFPDCYNHHYKPGYNGSCFNVEIKRND DLSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRNRV REAIRVSKI PDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLS QDELVYTFGETVALGASGIVIWGT <u>WENTRTKESCQ</u> <u>AIKEYMDTTLN</u> PY I INVTLAAKMCSQVLCQEQGVC IRKNWNSSDYLHLNPDNF AIQLEKGGKFTVRGKPT LEDLEQFSEKFYCSCYSTLSCKEKADVKD TDAVDV CIADGVCIDAFLKPPM
HM37	90	L342W、S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D 和 I361T 的 14 个氨基酸取代，在 N 末端处的 F38 之前的截短，以及在 C 末端处的 E474 之后的截短	FRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFCLGKFDEPLDMSL FSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGYYPIIDSITG VTVNGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNLGM AVIDWEEWRPTWARNWKPKDVYKNRSIELVQQQNV QLSLTEATEKAKQEFKAGKDFLVETIKLGKLLRP NHLWGYLLFPDCYNHHYKPGYNGSCFNVEIKRND DLSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRNRV REAIRVSKI PDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLS QDELVYTFGETVALGASGIVIWGT <u>WENTRTKESCQ</u> <u>AIKEYMDTTLN</u> PY I INVTLAAKMCSQVLCQEQGVC IRKNWNSSDYLHLNPDNF AIQLEKGGKFTVRGKPT LEDLEQFSEKFYCSCYSTLSCKEKADVKD TDAVDV CIADGVCIDAFLKPPME
HM38	91	L342W、S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D 和 I361T 的 14 个氨基酸取代，在 N 末端处的 F38 之前的截短，以及在 C 末端处的 T475 之后的截短	FRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFCLGKFDEPLDMSL FSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGYYPIIDSITG VTVNGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNLGM AVIDWEEWRPTWARNWKPKDVYKNRSIELVQQQNV QLSLTEATEKAKQEFKAGKDFLVETIKLGKLLRP NHLWGYLLFPDCYNHHYKPGYNGSCFNVEIKRND DLSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRNRV REAIRVSKI PDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLS QDELVYTFGETVALGASGIVIWGT <u>WENTRTKESCQ</u> <u>AIKEYMDTTLN</u> PY I INVTLAAKMCSQVLCQEQGVC IRKNWNSSDYLHLNPDNF AIQLEKGGKFTVRGKPT LEDLEQFSEKFYCSCYSTLSCKEKADVKD TDAVDV CIADGVCIDAFLKPPMET

[0087]

HM39	92	L342W、S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D 和 I361T 的 14 个氨基酸取代，在 N 末端处的 F38 之前的截短，以及在 C 末端处的 E476 之后的截短	<p>FRAPPV I PNV PFLWAWNAPSEFCLGKFDEPLDMSL F S F I G S P R I N A T G Q G V T I F Y V D R L G Y Y P Y I D S I T G V T V N G G I P Q K I S L Q D H L D K A K K D I T F Y M P V D N L G M A V I D W E E W R P T W A R N W K P K D V Y K N R S I E L V Q Q Q N V Q L S L T E A T E K A K Q E F E K A G K D F L V E T I K L G K L L R P</p> <p>N H L W G Y Y L F P D C Y N H H Y K K P G Y N G S C F N V E I K R N D D L S W L W N E S T A L Y P S I Y L N T Q Q S P V A A T L Y V R N R V R E A I R V S K I P D A K S P L P V F A Y T R I V F T D Q V L K F L S Q D E L V Y T F G E T V A L G A S G I V I W G T <u>W E N T R T K E S C Q</u> <u>A I K E Y M D T T L N P Y I I N V T L A A K M C S Q V L C Q E Q G V C</u> I R K N W N S S D Y L H L N P D N F A I Q L E K G G K F T V R G K P T L E D L E Q F S E K F Y C S C Y S T L S C K E K A D V K D T D A V D V C I A D G V C I D A F L K P P M E T E</p>
HM40	93	M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D 和 I361T 的 11 个氨基酸取代，以及在 N 末端处的 N37 之前的截短	<p>NFRAPPV I PNV PFLWAWNAPSEFCLGKFDEPLDMS L F S F I G S P R I N A T G Q G V T I F Y V D R L G Y Y P Y I D S I T G V T V N G G I P Q K I S L Q D H L D K A K K D I T F Y M P V D N L G M A V I D W E E W R P T W A R N W K P K D V Y K N R S I E L V Q Q Q N V Q L S L T E A T E K A K Q E F E K A G K D F L V E T I K L G K L L R P N H L W G Y Y L F P D C Y N H H Y K K P G Y N G S C F N V E I K R N D D L S W L W N E S T A L Y P S I Y L N T Q Q S P V A A T L Y V R N R V R E A I R V S K I P D A K S P L P V F A Y T R I V F T D Q V L K F L S Q D E L V Y T F G E T V A L G A S G I V I W G T L S I <u>T R T K E S C</u> <u>Q A I K E Y M D T T L N P Y I I N V T L A A K M C S Q V L C Q E Q G V</u> C I R K N W N S S D Y L H L N P D N F A I Q L E K G G K F T V R G K P T L E D L E Q F S E K F Y C S C Y S T L S C K E K A D V K D T D A V D V C I A D G V C I D A F L K P P M E T E E P Q I F Y N A S P S T L S</p>
HM41	94	M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D 和 I361T 的 11 个氨基酸取代，以及在 N 末端处的 R39 之前的截短	<p>RAPPV I PNV PFLWAWNAPSEFCLGKFDEPLDMSL F S F I G S P R I N A T G Q G V T I F Y V D R L G Y Y P Y I D S I T G V T V N G G I P Q K I S L Q D H L D K A K K D I T F Y M P V D N L G M A V I D W E E W R P T W A R N W K P K D V Y K N R S I E L V Q Q Q N V Q L S L T E A T E K A K Q E F E K A G K D F L V E T I K L G K L L R P N H L W G Y Y L F P D C Y N H H Y K K P G Y N G S C F N V E I K R N D D L S W L W N E S T A L Y P S I Y L N T Q Q S P V A A T L Y V R N R V R E A I R V S K I P D A K S P L P V F A Y T R I V F T D Q V L K F L S Q D E L V Y T F G E T V A L G A S G I V I W G T L S I <u>T R T K E S C Q A</u> <u>I K E Y M D T T L N P Y I I N V T L A A K M C S Q V L C Q E Q G V C I</u> R K N W N S S D Y L H L N P D N F A I Q L E K G G K F T V R G K P T L E D L E Q F S E K F Y C S C Y S T L S C K E K A D V K D T D A V D V C I A D G V C I D A F L K P P M E T E E P Q I F Y N A S P S T L S</p>

[0088]

HM42	95	M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D 和 I361T 的 11 个氨基酸取代，以及在 N 末端处的 P41 之前的截短	PPVIPNV PFLWAWNAPSEFCLGKFDEPLDMSLFSF IGS PRINATGQGVTIFYVDRLGYYPIYIDSITGVTV NGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNLGMAVI DWEEWRPTWARNWKPKDVYKNRSIELVQQQNVQLS LTEATEKAKQEFKAGKDFLVETIKLGKLLRPNHL WGYLFPDCYNHYYKPGYNGSCFNVEIKRNDLDS WLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRNRVREA IRVSKI PDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQDE LVYTFGETVALGASGIVINGTSLIT TRTKE SC QAIK EYMDT TL NPYI INVTLAAKMCSQVLCQEQQGVCIRK NWNSSDYLHLNPDNF AIQLEKGGKFTVRGKPTLED LEQFSEKFYCSCYSTLSCKEKADV KDTDAVDVCI A DGVCIDAF LKPPMETEEPQIFYNASPSTLS
HM43	96	L342W、S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D 和 I361T 的 14 个氨基酸取代，在 N 末端处的 F38 之前的截短，以及在 C 末端处的 I465 之后的截短	FRAPPV I PNV PFLWAWNAPSEFCLGKFDEPLDMSL F S F I G S P R I N A T G Q G V T I F Y V D R L G Y Y P I Y I D S I T G V T V N G G I P Q K I S L Q D H L D K A K K D I T F Y M P V D N L G M A V I D W E E W R P T W A R N W K P K D V Y K N R S I E L V Q Q Q N V Q L S L T E A T E K A K Q E F E K A G K D F L V E T I K L G K L L R P N H L W G Y Y L F P D C Y N H H Y K K P G Y N G S C F N V E I K R N D D L S W L W N E S T A L Y P S I Y L N T Q Q S P V A A T L Y V R N R V R E A I R V S K I P D A K S P L P V F A Y T R I V F T D Q V L K F L S Q D E L V Y T F G E T V A L G A S G I V I N G S WENTRTKE SC Q AIKEYMDT TL NPYI INVTLAAKMCSQVLCQEQQGVC I R K N W N S S D Y L H L N P D N F A I Q L E K G G K F T V R G K P T L E D L E Q F S E K F Y C S C Y S T L S C K E K A D V K D T D A V D V C I A D G V C I
HM44	97	L342W、S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D 和 I361T 的 14 个氨基酸取代，在 N 末端处的 F38 之前的截短，以及在 C 末端处的 D466 之后的截短	FRAPPV I PNV PFLWAWNAPSEFCLGKFDEPLDMSL F S F I G S P R I N A T G Q G V T I F Y V D R L G Y Y P I Y I D S I T G V T V N G G I P Q K I S L Q D H L D K A K K D I T F Y M P V D N L G M A V I D W E E W R P T W A R N W K P K D V Y K N R S I E L V Q Q Q N V Q L S L T E A T E K A K Q E F E K A G K D F L V E T I K L G K L L R P N H L W G Y Y L F P D C Y N H H Y K K P G Y N G S C F N V E I K R N D D L S W L W N E S T A L Y P S I Y L N T Q Q S P V A A T L Y V R N R V R E A I R V S K I P D A K S P L P V F A Y T R I V F T D Q V L K F L S Q D E L V Y T F G E T V A L G A S G I V I N G S WENTRTKE SC Q AIKEYMDT TL NPYI INVTLAAKMCSQVLCQEQQGVC I R K N W N S S D Y L H L N P D N F A I Q L E K G G K F T V R G K P T L E D L E Q F S E K F Y C S C Y S T L S C K E K A D V K D T D A V D V C I A D G V C I D

[0089]

HM45	98	L342W、S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D 和 I361T 的 14 个氨基酸取代，在 N 末端处的 F38 之前的截短，以及在 C 末端处的 A467 之后的截短	FRAPPV I PNV PFLWAWNAPSEFCLGKFDEPLDMSL FSFIGSPRINATGQGVTIFYVDR LGYYPYIDSITG VTVNGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNLGM AVIDWEEWRPTWARNWKPKDVYKNRSIELVQQQNV QLSLTEATEKAKQEF EKAGKDFLVETIKLGKLLRP NHLWGYLLFPDCYNH HYKKPGYNGSCFNVEIKRND DLSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRNRV REAIRVSKI PDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLS QDELVYTFGETVALGASGIVIWGS <u>WENTRTKESQ</u> <u>AIKEYMDTTLN</u> P Y I I N V T L A A K M C S Q V L C Q E Q G V C IRKNWNSSDYLHLNPDNF A I Q L E K G G K F T V R G K P T LEDLEQFSEKFYCS CYSTLSCKEKADVKD T D A V D V CIADGVCIDA
HP46	99	T341S、L342W、S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D 和 I361T 的 15 个氨基酸取代，在 N 末端处的 F38 之前的截短，以及在 C 末端处的 F468 之后的截短	FRAPPV I PNV PFLWAWNAPSEFCLGKFDEPLDMSL FSFIGSPRINATGQGVTIFYVDR LGYYPYIDSITG VTVNGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNLGM AVIDWEEWRPTWARNWKPKDVYKNRSIELVQQQNV QLSLTEATEKAKQEF EKAGKDFLVETIKLGKLLRP NHLWGYLLFPDCYNH HYKKPGYNGSCFNVEIKRND DLSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRNRV REAIRVSKI PDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLS QDELVYTFGETVALGASGIVIWGS <u>SWENTRTKESQ</u> <u>AIKEYMDTTLN</u> P Y I I N V T L A A K M C S Q V L C Q E Q G V C IRKNWNSSDYLHLNPDNF A I Q L E K G G K F T V R G K P T LEDLEQFSEKFYCS CYSTLSCKEKADVKD T D A V D V CIADGVCIDAF
HM47	100	L342W、S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D 和 I361T 的 14 个氨基酸取代，在 N 末端处的 F38 之前的截短，以及在 C 末端处的 P478 之后的截短	FRAPPV I PNV PFLWAWNAPSEFCLGKFDEPLDMSL FSFIGSPRINATGQGVTIFYVDR LGYYPYIDSITG VTVNGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNLGM AVIDWEEWRPTWARNWKPKDVYKNRSIELVQQQNV QLSLTEATEKAKQEF EKAGKDFLVETIKLGKLLRP NHLWGYLLFPDCYNH HYKKPGYNGSCFNVEIKRND DLSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRNRV REAIRVSKI PDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLS QDELVYTFGETVALGASGIVIWGT <u>WENTRTKESQ</u> <u>AIKEYMDTTLN</u> P Y I I N V T L A A K M C S Q V L C Q E Q G V C IRKNWNSSDYLHLNPDNF A I Q L E K G G K F T V R G K P T LEDLEQFSEKFYCS CYSTLSCKEKADVKD T D A V D V CIADGVCIDAF L K P P M E T E E P

[0090]

HM48	101	L342W、S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D 和 I361T 的 14 个氨基酸取代，在 N 末端处的 F38 之前的截短，以及在 C 末端处的 I480 之后的截短	FRAPPV I PNV PFLWAWNAPSEFCLGKGFDEPLDMSL FSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGYYYPYIDSITG VTVNGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNLGM AVIDWEEWRPTWARNWKPKDVYKNRSIELVQQQNV QLSLTEATEKAKQEF EKAGKDFLVETIKLGKLLRP NHLWGYLLFPDCYNHHYKPKGYNGSCFNVEIKRND DLSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRNRV REAIRVSKI PDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLS QDELVYTFGETVALGASGIVIWGT <u>WENTRTKESQ</u> <u>AIKEYMDTTLN</u> PY I INVTLAAKMCSQVLCQEQQVC IRKNWNSSDYLHLNPDNF AIQLEKGGKFTVRGKPT LEDLEQFSEKFYCSYSTLSCKEKADV KDTDAVDV CIADGVCIDAF LKPPMETEEPQI
HM49	102	L342W、S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D 和 I361T 的 14 个氨基酸取代，在 N 末端处的 F38 之前的截短，以及在 C 末端处的 Y482 之后的截短	FRAPPV I PNV PFLWAWNAPSEFCLGKGFDEPLDMSL FSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGYYYPYIDSITG VTVNGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNLGM AVIDWEEWRPTWARNWKPKDVYKNRSIELVQQQNV QLSLTEATEKAKQEF EKAGKDFLVETIKLGKLLRP NHLWGYLLFPDCYNHHYKPKGYNGSCFNVEIKRND DLSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRNRV REAIRVSKI PDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLS QDELVYTFGETVALGASGIVIWGT <u>WENTRTKESQ</u> <u>AIKEYMDTTLN</u> PY I INVTLAAKMCSQVLCQEQQVC IRKNWNSSDYLHLNPDNF AIQLEKGGKFTVRGKPT LEDLEQFSEKFYCSYSTLSCKEKADV KDTDAVDV CIADGVCIDAF LKPPMETEEPQIF Y
HM50	103	L342W、S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D 和 I361T 的 14 个氨基酸取代，在 N 末端处的 F38 之前的截短，以及在 C 末端处的 A484 之后的截短	FRAPPV I PNV PFLWAWNAPSEFCLGKGFDEPLDMSL FSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGYYYPYIDSITG VTVNGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNLGM AVIDWEEWRPTWARNWKPKDVYKNRSIELVQQQNV QLSLTEATEKAKQEF EKAGKDFLVETIKLGKLLRP NHLWGYLLFPDCYNHHYKPKGYNGSCFNVEIKRND DLSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRNRV REAIRVSKI PDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLS QDELVYTFGETVALGASGIVIWGT <u>WENTRTKESQ</u> <u>AIKEYMDTTLN</u> PY I INVTLAAKMCSQVLCQEQQVC IRKNWNSSDYLHLNPDNF AIQLEKGGKFTVRGKPT LEDLEQFSEKFYCSYSTLSCKEKADV KDTDAVDV CIADGVCIDAF LKPPMETEEPQIF YNA

[0091]

HM51	104	L342W、S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D 和 I361T 的 14 个氨基酸取代，在 N 末端处的 F38 之前的截短，以及在 C 末端处的 P486 之后的截短	FRAPPV I PNV PFLWAWNAPSEFCLGKFDEPLDMSL FSFIGSPRINATGQGVTIFYVDR LGYYPYIDSITG VTVNGGIPQKISLQDHL DKAKKDITFYMPVDNLGM AVIDWEEWRPTWARNWKPKDVYKNRSIELVQQQNV QLSLTEATEKAKQEF EKAGKDFLVETIKLGKLLRP NHLWGYLLFPDCYNH H YKKPGYNGSCFNVEIKRND DLSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRNRV REAIRVSKI PDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLS QDELVYTFGETVALGASGIVIWGT WENTRTKESQ AIKEYMDTTLN PY I INVTLAAKMCSQVLCQEQQVC IRKNWNSSDY LHLNPDNF AIQLEKGGKFTVRGKPT LEDLEQFSEKFYCS CYSTLSCKEKADV KDTDAVDV CIADGVCIDAFLKPPMETE E P Q I FYNASP
HM52	105	L342W、S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D 和 I361T 的 14 个氨基酸取代，在 N 末端处的 F38 之前的截短，以及在 C 末端处的 T488 之后的截短	FRAPPV I PNV PFLWAWNAPSEFCLGKFDEPLDMSL FSFIGSPRINATGQGVTIFYVDR LGYYPYIDSITG VTVNGGIPQKISLQDHL DKAKKDITFYMPVDNLGM AVIDWEEWRPTWARNWKPKDVYKNRSIELVQQQNV QLSLTEATEKAKQEF EKAGKDFLVETIKLGKLLRP NHLWGYLLFPDCYNH H YKKPGYNGSCFNVEIKRND DLSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRNRV REAIRVSKI PDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLS QDELVYTFGETVALGASGIVIWGT WENTRTKESQ AIKEYMDTTLN PY I INVTLAAKMCSQVLCQEQQVC IRKNWNSSDY LHLNPDNF AIQLEKGGKFTVRGKPT LEDLEQFSEKFYCS CYSTLSCKEKADV KDTDAVDV CIADGVCIDAFLKPPMETE E P Q I FYNASPST
HM53	106	T341G、L342W、S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D 和 I361T 的 15 个氨基酸取代，在 N 末端处的 L36 之前的截短，以及在 C 末端处的 S490 之后的截短	LNFRAPPV I PNV PFLWAWNAPSEFCLGKFDEPLDM SLFSFIGSPRINATGQGVTIFYVDR LGYYPYIDSI TGVTVNGGIPQKISLQDHL DKAKKDITFYMPVDNL GMAVIDWEEWRPTWARNWKPKDVYKNRSIELVQQQ NVQLSLTEATEKAKQEF EKAGKDFLVETIKLGKLL RPNHLWGYLLFPDCYNH H YKKPGYNGSCFNVEIKR NDDL SWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRN RVREAIRVSKI PDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKF LSQDELVYTFGETVALGASGIVIWG GWENTRTKES QAIKEYMDTTLN PY I INVTLAAKMCSQVLCQEQQ VCIRKNWNSSDY LHLNPDNF AIQLEKGGKFTVRGK PTLEDLEQFSEKFYCS CYSTLSCKEKADV KDTDAV DVCIA DGVCIDAFLKPPMETE E P Q I FYNASPSTLS

[0092]

HM54	107	T341A、L342W、S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D 和 I361T 的 15 个氨基酸取代,在 N 末端处的 L36 之前的截短,以及在 C 末端处的 S490 之后的截短	<p>LNFRAPPVVPNV PFLWAWNAPSEFCLGKFDEPLDM SLFSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGYYPIIDSI TGVTVNGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNL GMAVIDWEEWRPTWARNWKPKDVYKNRSIELVQQQ NVQLSLTEATEKAKQEF EKAGKDFLVETIKLGKLL RPNHLWGYLLFPDCYNHHYKPKGYNGSCFNVEIKR NDDL SWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRN RVREAIRVSKI PDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKF LSQDELVYTFGETVALGASGIVIWGAWENTRTKES CQAIKEYMDTTLNPYI INVTLAAKMCSQVLCQEQG VCIRKNWNSSDYLLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGK PTLEDLEQFSEKFYCSCYSTLSCKEKADVKD TDAV DVC IADGVC IDAFLKPPMETE EPQIFYNASPSTLS</p>
HM55	108	T341C、L342W、S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D 和 I361T 的 15 个氨基酸取代,在 N 末端处的 L36 之前的截短,以及在 C 末端处的 S490 之后的截短	<p>LNFRAPPVVPNV PFLWAWNAPSEFCLGKFDEPLDM SLFSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGYYPIIDSI TGVTVNGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNL GMAVIDWEEWRPTWARNWKPKDVYKNRSIELVQQQ NVQLSLTEATEKAKQEF EKAGKDFLVETIKLGKLL RPNHLWGYLLFPDCYNHHYKPKGYNGSCFNVEIKR NDDL SWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRN RVREAIRVSKI PDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKF LSQDELVYTFGETVALGASGIVIWGCWENTRTKES CQAIKEYMDTTLNPYI INVTLAAKMCSQVLCQEQG VCIRKNWNSSDYLLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGK PTLEDLEQFSEKFYCSCYSTLSCKEKADVKD TDAV DVC IADGVC IDAFLKPPMETE EPQ109IFYNASPS TLS</p>
HM56	109	T341D、L342W、S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D 和 I361T 的 15 个氨基酸取代,在 N 末端处的 L36 之前的截短,以及在 C 末端处的 S490 之后的截短	<p>LNFRAPPVVPNV PFLWAWNAPSEFCLGKFDEPLDM SLFSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGYYPIIDSI TGVTVNGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNL GMAVIDWEEWRPTWARNWKPKDVYKNRSIELVQQQ NVQLSLTEATEKAKQEF EKAGKDFLVETIKLGKLL RPNHLWGYLLFPDCYNHHYKPKGYNGSCFNVEIKR NDDL SWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRN RVREAIRVSKI PDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKF LSQDELVYTFGETVALGASGIVIWGDWENTRTKES CQAIKEYMDTTLNPYI INVTLAAKMCSQVLCQEQG VCIRKNWNSSDYLLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGK PTLEDLEQFSEKFYCSCYSTLSCKEKADVKD TDAV DVC IADGVC IDAFLKPPMETE EPQIFYNASPSTLS</p>

[0093]

HP57	110	I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D 和 I361T 的 12 个氨基酸取代，在 N 末端处的 F38 之前的截短，以及在 C 末端处的 F468 之后的截短	FRAPPVIPNVPLWAWNAPSEFCLGKFDEPLDMSL FSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGYYPYIDSITG VTVNGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNLGM AVIDWEEWRPTWARNWKPKDVYKNRSIELVQQQNV QLSLTEATEKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRP NHLWGYLLFPDCYNHHYKPKGYNGSCFNVEIKRND DLSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRNRV REAIRVSKI PDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLS QDELVYTFGETVALGASGIVIWGTLSENTRTKESCQ <u>AIKEYMDTT</u> LNOPYI INVTLAAKMCSQVLCQEQGVC IRKNWNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPT LEDLEQFSEKFYCSYSTLSCKEKADVKTDAVDV CIADGVCIDAF
HP58	111	S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D 和 I361T 的 13 个氨基酸取代，在 N 末端处的 F38 之前的截短，以及在 C 末端处的 F468 之后的截短	FRAPPVIPNVPLWAWNAPSEFCLGKFDEPLDMSL FSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGYYPYIDSITG VTVNGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNLGM AVIDWEEWRPTWARNWKPKDVYKNRSIELVQQQNV QLSLTEATEKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRP NHLWGYLLFPDCYNHHYKPKGYNGSCFNVEIKRND DLSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRNRV REAIRVSKI PDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLS QDELVYTFGETVALGASGIVIWGTLSENTRTKESCQ <u>AIKEYMDTT</u> LNOPYI INVTLAAKMCSQVLCQEQGVC IRKNWNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPT LEDLEQFSEKFYCSYSTLSCKEKADVKTDAVDV CIADGVCIDAF
HP59	112	T341A、L342W、S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D 和 I361T 的 15 个氨基酸取代，在 N 末端处的 F38 之前的截短，以及在 C 末端处的 F468 之后的截短	FRAPPVIPNVPLWAWNAPSEFCLGKFDEPLDMSL FSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGYYPYIDSITG VTVNGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNLGM AVIDWEEWRPTWARNWKPKDVYKNRSIELVQQQNV QLSLTEATEKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRP NHLWGYLLFPDCYNHHYKPKGYNGSCFNVEIKRND DLSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRNRV REAIRVSKI PDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLS QDELVYTFGETVALGASGIVIWGAWENTRTKESCQ <u>AIKEYMDTT</u> LNOPYI INVTLAAKMCSQVLCQEQGVC IRKNWNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPT LEDLEQFSEKFYCSYSTLSCKEKADVKTDAVDV CIADGVCIDAF

[0094]

HP60	113	T341G、L342W、S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D 和 I361T 的 15 个氨基酸取代,在 N 末端处的 F38 之前的截短,以及在 C 末端处的 F468 之后的截短	FRAPPV I PNV PFLWAWNAPSEFCLGKFDEPLDMSL FSFIGSPRINATGQGVTIFYVDR LGYYYPYIDSITG VTVNGG I PQK I SLQDHL D KAKK D I T FYMPVDNLGM AVIDWEEWRPTWARNWKPKDVYK NRS I ELVQQQNV QLSLTEATEKAKQEF EKAGKDFLVETIKLGKLLRP NHLWGYYLFPDCYNH H Y K K P G Y N G S C F N V E I K R N D DLSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRNRV REAIRVSKI P D A K S P L P V F A Y T R I V F T D Q V L K F L S QDELVYT FGETVALGASGIVIWG <u>GWENTRTKESQ</u> <u>AIKEYMDTT</u> LN P Y I I N V T L A A K M C S Q V L C Q E Q G V C IRKNWNSSDY L H L N P D N F A I Q L E K G G K F T V R G K P T LEDLEQFSEK F Y C S C Y S T L S C K E K A D V K D T D A V D V CIADGVCIDAF
HP61	114	A40G、T341S、L342W、S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D 和 I361T 的 16 个氨基酸取代,在 N 末端处的 F38 之前的截短,以及在 C 末端处的 F468 之后的截短	FRGPPV I PNV PFLWAWNAPSEFCLGKFDEPLDMSL FSFIGSPRINATGQGVTIFYVDR LGYYYPYIDSITG VTVNGG I PQK I SLQDHL D KAKK D I T FYMPVDNLGM AVIDWEEWRPTWARNWKPKDVYK NRS I ELVQQQNV QLSLTEATEKAKQEF EKAGKDFLVETIKLGKLLRP NHLWGYYLFPDCYNH H Y K K P G Y N G S C F N V E I K R N D DLSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRNRV REAIRVSKI P D A K S P L P V F A Y T R I V F T D Q V L K F L S QDELVYT FGETVALGASGIVIWG <u>SWENTRTKESQ</u> <u>AIKEYMDTT</u> LN P Y I I N V T L A A K M C S Q V L C Q E Q G V C IRKNWNSSDY L H L N P D N F A I Q L E K G G K F T V R G K P T LEDLEQFSEK F Y C S C Y S T L S C K E K A D V K D T D A V D V CIADGVCIDAF
HP62	115	去除 P42, T341S、L342W、S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D 和 I361T 的 15 个氨基酸取代,在 N 末端在 F38 之前的截短以及在 C 末端在 F468 之后的截短	FRGPPV I PNV PFLWAWNAPSEFCLGKFDEPLDMSL FSFIGSPRINATGQGVTIFYVDR LGYYYPYIDSITG VTVNGG I PQK I SLQDHL D KAKK D I T FYMPVDNLGM AVIDWEEWRPTWARNWKPKDVYK NRS I ELVQQQNV QLSLTEATEKAKQEF EKAGKDFLVETIKLGKLLRP NHLWGYYLFPDCYNH H Y K K P G Y N G S C F N V E I K R N D DLSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRNRV REAIRVSKI P D A K S P L P V F A Y T R I V F T D Q V L K F L S QDELVYT FGETVALGASGIVIWG <u>SWENTRTKESQ</u> <u>AIKEYMDTT</u> LN P Y I I N V T L A A K M C S Q V L C Q E Q G V C IRKNWNSSDY L H L N P D N F A I Q L E K G G K F T V R G K P T LEDLEQFSEK F Y C S C Y S T L S C K E K A D V K D T D A V D V CIADGVCIDAF

[0095] 在一些实施例中,透明质酸酶的变体或片段是透明质酸酶,其中N末端进一步包含具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列MATGSRTSLLLAFGLLCLPWLQEGSA的人生长激素信号肽,具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列MKWVTFISLLFLFSSAYS的人血清白蛋白信号肽,或具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列MAAHLLPICALFLTLDDMAQG的人Hya11信号肽,如下表5所示,代替由M1至T35组成的野生型PH20的信号肽,但不限于此。在实施例中,野生型PH20的信号肽(氨基酸残基M1至T35)被部分或完全缺失。在一些实施例中,在N末端的一部分被进一步缺失的情况下,例如,在其中在发生N37、F38、R39、A40、P41或P42残基之前发生切割的情况,使得N末端的额外缺失与野生型PH20的信号肽的缺失一起发生。

[0096] 表5——人生长激素、人血清白蛋白或人Hyal1的信号肽的氨基酸序列

[0097]	氨基酸序列	SEQ ID NO.
人生长激素	MATGSRTSLLLAFLGLLCLPWLQEGSA	3
人血清白蛋白	MKWVTFISLLFLFSSAYS	4
人HYAL1	MAAHLIPICALFLTLLDMAQG	5

[0098] 在一些实施例中,透明质酸酶的变体或片段包含具有连接6×His标签的C末端的变体(表示为HM),没有6×His标签的变体(表示为HP),具有连接6×His标签的C末端的成熟野生型PH20(L36-S490)(表示为WT),以及不含6×His标签并具有在Y482之后发生切割的C末端的成熟野生型PH20(L36-Y482)(表示为WT)。

[0099] 在某些实施例中,组合物包含透明质酸酶的一种或多种变体或片段,如在欧洲专利公开号EP3636752A1和国际专利公开号WO 2020/197230中所述的那些,其公开通过引用并入本文。

[0100] 在实施例中,组合物中存在的透明质酸酶的量可以变化并且可以是100U或更多,如250U或更多,如500U或更多,如750U或更多,如1000U或更多,如1500U或更多,如2000U或更多,如2500U或更多,如3000U或更多,如3500U或更多,如4000U或更多,如4500U或更多、如5000U或更多、如10,000U或更多、如20,000U或更多、如30,000U或更多、如40,000U或更多并且包含50,000U或更多的透明质酸酶。在一些实施例中,组合物包含约500U的透明质酸酶,约600U、约700U、约800U、约900U、约1,000U、约1,100U、约1,200U、约1,300U、约1,400U、约1,500U、约1,600U、约1,700U、约1,800U、约1,900U、约2,000U、约2,100U、约2,200U、约2,300U、约2,400U、约2,500U、约2,600U、约2,700U、约2,800U、约2,900U、约3,000U、约3,100U、约3,200U、约3,300U、约3,400U、约3,500U、约3,600U、约3,700U、约3,800U、约3,900U、约4,000U、约4,100U、约4,200U、约4,300U、约4,400U、约4,500U、约4,600U、约4,700U、约4,800U、约4,900U或约5,000U的透明质酸酶。例如,组合物中透明质酸酶的量可以在50U至50,000U、如100U至45,000U、如250U至40,000U、如500U至35,000U、如750U至30,000U、如1000U至25,000U、如1500U至20,000U、如2000U至15,000U、如2500U至10,000U的范围内,并且包含3000U至5000U的透明质酸酶。例如,组合物中透明质酸酶的量可以在50U至50,000U、如100U至40,000U、如300U至30,000U、如500U至20,000U、如700U至10,000U、如800U至5,000U、如900U至4,000U、如1,000U至3,000U、如1,500U至2,500U的范围内,并且包含1,700U至2,200U的透明质酸酶。

[0101] 在某些实施例中,组合物中透明质酸酶的浓度是50U/mL或更多、如100U/mL或更多、如250U/mL或更多、如500U/mL或更多、如750U/mL或更多、如1000U/mL或更多、如2000U/mL或更多、如2500U/mL或更多、如3000U/mL或更多、如3500U/mL或更多、如4000U/mL或更多、如4500U/mL或更多、如5000U/mL或更多。在一些情况下,透明质酸酶的浓度是约100U/mL、200U/mL、300U/mL、400U/mL、500U/mL、约600U/mL、约700U/mL、约800U/mL、约900U/mL、约1,000U/mL、约1,100U/mL、约1,200U/mL、约1,300U/mL、约1,400U/mL、约1,500U/mL、约1,600U/mL、约1,700U/mL、约1,800U/mL、约1,900U/mL、约2,000U/mL、约2,100U/mL、约2,200U/mL、约2,300U/mL、约2,400U/mL、约2,500U/mL、约2,600U/mL、约2,700U/mL、约2,800U/mL、约2,900U/mL、约3,000U/mL、约3,100U/mL、约3,200U/mL、约3,300U/mL、约3,400U/mL、约3,500U/mL、约3,600U/mL、约3,700U/mL、约3,800U/mL、约3,900U/mL、约4,000U/mL、约4,100U/mL、约

4, 200U/mL、约4, 300U/mL、约4, 400U/mL、约4, 500U/mL、约4, 600U/mL、约4, 700U/mL、约4, 800U/mL、约4, 900U/mL或约5, 000U/mL。例如, 组合中透明质酸酶的浓度可以在50U/mL至5000U/mL、如100U/mL至4500U/mL、如250U/mL至4000U/mL、如500U/mL至3500U/mL、如750U/mL至3000U/mL、包含1000U/mL至2000U/mL并且包含1500U/mL至2500U/mL的范围内。

[0102] 根据实施例的组合物还包含具有寡核苷酸和与寡核苷酸的5'端和/或3'端连接的脂质部分的端粒酶抑制剂。在实施例中, 如本文所使用的术语端粒酶抑制剂是指能够降低或抑制哺乳动物细胞中的端粒酶逆转录酶活性的化合物。在一些实例中, 所关注的端粒酶抑制剂包含包括寡核苷酸的hTR模板抑制剂。“hTR模板抑制剂”是阻断人端粒酶的RNA组分的模板区并且可以抑制酶的活性的化合物。在一些实施例中, 寡核苷酸包含有效与此区的更具体部分杂交的序列, 所述序列具有序列为5'-CUAACCCUAAC-3'。

[0103] 所关注的端粒酶抑制剂包含寡核苷酸和与所述寡核苷酸的5'和/或3'端连接的脂质部分。在一些实施例中, 端粒酶抑制剂包含具有“抗核酸酶键”的寡核苷酸, 其中所述抗核酸酶键具有拥有亚基键的主链, 所述亚基键基本上抗由胞外和胞内核酸酶以非杂交或杂交形式进行的核酸酶切割。在一些实例中, 寡核苷酸在生理条件下显示很少或没有核酸酶切割。

[0104] 在一些实施例中, 靶向hTR序列的治疗性寡核苷酸的区与对应的hTR序列互补。在某些实施例中, 寡核苷酸的碱基序列包含与hTR靶标互补的5个或更多个核苷酸的序列, 如与hTR靶标互补的8个或更多个核苷酸, 如10个或更多个核苷酸, 如12个或更多个核苷酸, 如15个或更多个核苷酸。在某些实施例中, 本公开的端粒酶抑制剂中的寡核苷酸与hTR靶序列完全互补, 如其中寡核苷酸的全长与hTR靶序列互补。

[0105] 端粒酶抑制剂包含核苷间键, 如磷酸二酯、磷酸三酯、甲基磷酸脂、P3'→N5'磷酸酯、N3'→P5'磷酸酯、N3'→P5'硫代磷酸酯和硫代磷酸酯键。在某些实施例中, 感兴趣的端粒酶抑制剂包含至少一个N3'→P5'磷酸酯(NP)或N3'→P5'硫代磷酸酯(NPS)键, 所述键可以由以下结构表示: 3'-(NH-P(=O)(-XR)-O)-5', 其中X表示O或S, 并且R选自自由以下组成的组: 氢、烷基和芳基; 及其药学上可接受的盐, 当XR是OH或SH时。在其它实施例中, 寡核苷酸包含所有NP, 或在一些实施例中, 包含所有NPS键。在一个实施例中, hTR模板抑制剂寡核苷酸的序列是与SEQ ID NO: 6 (GGGUUGCGAGGGUGGGCCUGGGAGGGUGGUGCCAUUUUUUGUCUAAACCCUAACUGAGAAGGGCGUAGGCGCCGUGCUUUUGUCUCCCCGCGCGUGUUUUUCUCGUGACUUCAGCGGGCGGAAAAGCCUCGGCCUGCCGCCUCCACCGUUCUUCUAGAGCAAACAAAAAUGUCAGCUGCUGGCCGUUCGCCUCCCCGGGACCUGCGGCGGGUCGCCUGCCCAGCCCCGAACCCCGCCUGGAGCCGCGGUCGGCCCCGGCUUCUCCGAGGCACCCACUGCCACCGCAAGAGUUGGGCUCUGUCAGCCGCGGGUCUCUGGGGGCGAGGGCGAGGUUCACCGUUUCAGGCCGAGGAAGAGGAACGGAGCGAGUCCCGCCGCGCGGAUUCUCCUGAGCUGUGGGACGUGCACCCAGGACUCGGCUCACACAUGCAGUUCGUUCCUGUUGGUGGGGGAAACGCCGAUCGUGCGCAUCC GUCACCCUCGCCGAGUGGGGGCUUGUGAACCCCAAAACCGACUGACUGGGCCAGUGUGCU)的核苷酸42-54互补的序列。在某些实施例中, 寡核苷酸包含与具有序列5'-CUAACCCUAAC-3'的11-核苷酸区的一些部分互补或接近互补的序列。具有此序列(TAGGGTTAGACAA; SEQ ID NO: 17)和N3'→P5'硫代磷酸酯(NPS)键的寡核苷酸在本文中被指定为GRN163。参见例如Asai等人,《癌症研究(Cancer Research)》63:3931-3939(2003)以及Gryaznov等人,《核苷、核苷酸和核酸(Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids)》22(5-8):577-81(2003)。另一个靶区是跨越

hTR的核苷酸137-179的区(参见Pruzan等人,《核酸研究(Nucl.Acids Research)》,30:559-568,2002)。在此区内,跨越141-153的序列是优选的靶标。PCT公开WO 98/28442描述了使用长度为至少7个核苷酸的寡核苷酸来抑制端粒酶,其中寡核苷酸被设计成与模板区之外的hTR序列的可接近部分,包含hTR的核苷酸137-196、290-319和350-380互补。下文给出了优选的hTR靶向序列,并且通过SEQ ID NO:7-27进行识别。在某些实施例中,端粒酶抑制剂的寡核苷酸具有靶向人端粒酶RNA(hTR)的序列,包括但不限于以下序列:

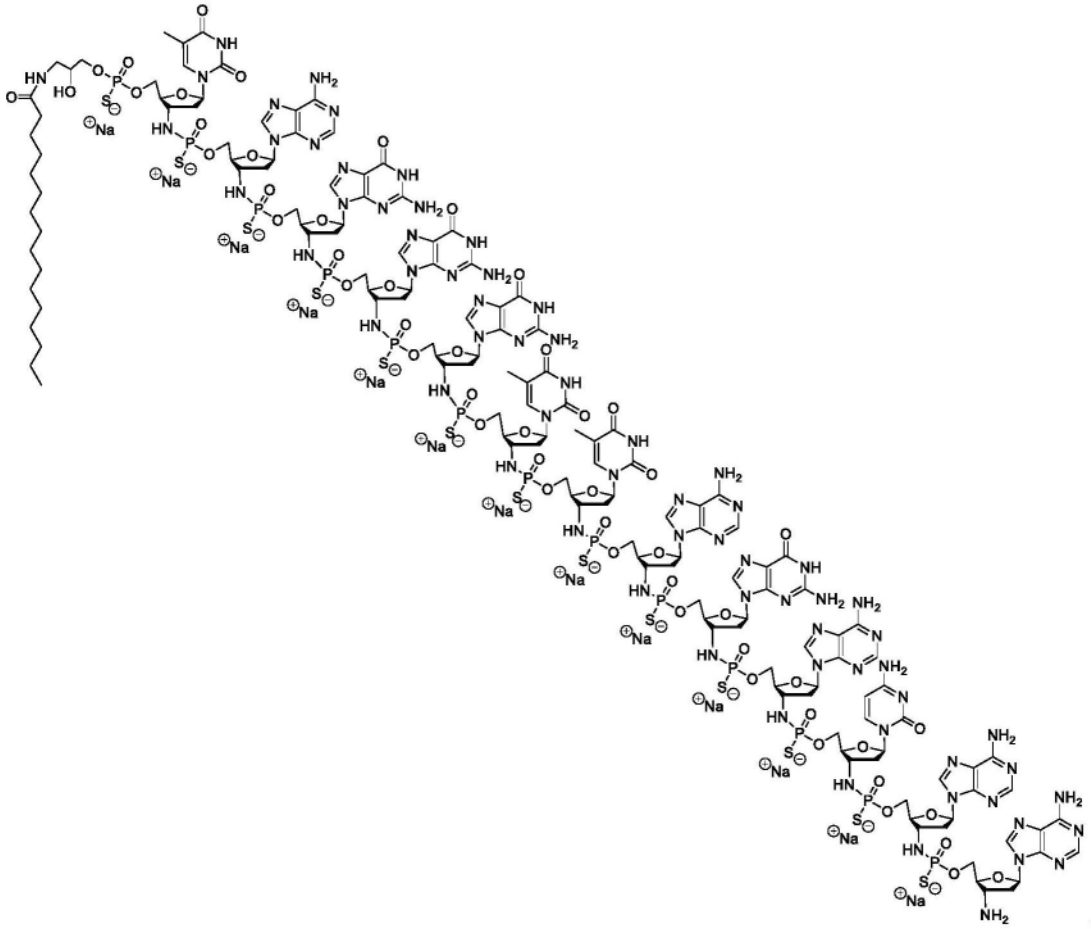
[0106]

hTR靶向序列	SEQ ID NO:6的区域	SEQ ID NO:
ACATTTTTTGTGGCTCTAG	160-179	7
GCTCTAGAATGAACGGTGAAGGCGGCAGG	137-166	8
GTGGAGGCGGCAGG	137-151	9
GGAAGGCGGCAGG	137-149	10
GTGGAAGGCGCA	139-151	11
GTGGAAGGCGG	141-151	12
CGGTGGAAGGCGG	141-153	13
ACGGTGAAGGCG	142-154	14
AACGGTGAAGGCGC	143-155	15
ATGAACGGTGAAGGCGG	144-158	16
TAGGGTTAGACAA	42-54	17
CAGTTAGGGTTAG	46-58	18
TAGGGTTAGACA	42-53	19
TAGGGTTAGAC	42-52	20
GTTAGGGTTAG	46-56	21
GTTAGGGTTAGAC	44-56	22
GTTAGGGTTAGACAA	42-56	23
GGGTTAGAC	44-52	24
CAGTTAGGG	50-58	25
CCCTTCTCAGTT	54-65	26
CGCCCTTCTCAG	56-67	27

[0107] 本公开的端粒酶抑制剂包含与寡核苷酸的5'和/或3'端连接的脂质部分。在一些实例中,结构基团提供了优异的细胞摄取性质,使得与未经修饰的形式相比,使用更少量的缀合的寡核苷酸可以获得等效的生物效应。脂质部分可以是脂肪族烃或脂肪酸,如烃和脂肪酸的衍生物。例如,脂质部分可以是具有14-20个碳的饱和直链化合物,如肉豆蔻酸(十四烷酸)、棕榈酸(十六烷酸)和硬脂酸(十八烷酸)及其对应的脂肪族烃形式—十四烷、十六烷和十八烷。其它脂质部分的实例包含固醇,如胆固醇,以及经取代的脂肪酸和烃,特别是这些基团的多氟化形式。在某些实施例中,脂质部分包含脂质部分的一种或多种衍生物,如胺、酰胺、酯和氨基甲酸酯衍生物。在一个实例中,脂质部分是棕榈酰基(C16)部分,如棕榈酰酰胺。脂质部分可以通过连接子,如甘油或氨基甘油连接子与寡核苷酸缀合。

[0108] 在一些实施例中,端粒酶抑制剂是如在美国专利第9,375,485号中所描述的化合物,所述美国专利的公开内容通过引用并入本文。在某些实施例中,端粒酶抑制剂是伊美司

他(由序列5'-TAGGGTTAGACAA-3' SEQ ID NO:17构成的5'棕榈酰化13-聚硫代磷酸酰胺酯寡核苷酸)或其药学上可接受的盐,如伊美司他钠:



[0110] 在一些实施例中,皮下组合物中的端粒酶抑制剂(如伊美司他或伊美司他钠)的量为约0.5至约5mg、约5至约10mg、约10至约15mg、约15至约20mg、约20至约25mg、约20至约50mg、约25至约50mg、约50至约75mg、约50至约100mg、约75至约100mg、约100至约125mg、约125至约150mg、约150至约175mg、约175至约200mg、约200至约225mg、约225至约250mg、约250至约300mg、约300至约350mg、约350至约400mg、约400至约450mg或约450至约500mg、约500mg至约600mg、约600mg至约700mg、约700mg至约800mg、约800mg至约900mg、约900mg至约1000mg、约1100mg至约1200mg、约1200mg至约1300mg、约1300mg至约1400mg、约1400mg至约1500mg、约1500mg至约1600mg、约1600mg至约1700mg、约1700mg至约1800mg、约1800mg至约1900mg、约1900mg至约2000mg、约2000mg至约2100mg、约2100mg至约2200mg、约2200mg至约2300mg、约2300mg至约2400mg、约2400mg至约2500mg。

[0111] 在一些实施例中,端粒酶抑制剂的量为单位剂型,所述单位剂型具有在约5mg至约1000mg,5mg至约500mg,如约30mg至约300mg或约50mg至约200mg的范围内的量。在一些实施例中,端粒酶抑制剂的量为单位剂型,所述单位剂型具有在约200mg至约3000mg,750mg至约2500mg,如约1000mg至约2000mg或约500mg至约2000mg的范围内的量。单位剂型可以是液体或冻干的。

[0112] 在一些实施例中,组合物端粒酶抑制剂的浓度是稀释的(约0.1mg/ml)或浓缩的(约300mg/ml),包含例如以下中的任一个:约0.1至约300mg/ml、0.1至约200mg/ml、约0.1至

约180mg/ml、约0.1至约160mg/ml、约0.1至约140mg/ml、约0.1至约120mg/ml、约0.1至约100mg/ml、约0.1至约80mg/ml、约0.1至约60mg/ml、约0.1至约40mg/ml、约0.1至约20mg/ml、约0.1至约10mg/ml、约2至约40mg/ml、约4至约35mg/ml、约6至约30mg/ml、约8至约25mg/ml、约10至约20mg/ml、约12至约15mg/ml、或以下中的任一个：约0.1mg/ml、0.2mg/ml、0.3mg/ml、0.4mg/ml、0.5mg/ml、0.6mg/ml、0.7mg/ml、0.8mg/ml、0.9mg/ml、1mg/ml、1.1mg/ml、1.2mg/ml、1.3mg/ml、1.4mg/ml、1.5mg/ml、1.6mg/ml、1.7mg/ml、1.8mg/ml、1.9mg/ml、2mg/ml、2.1mg/ml、2.2mg/ml、2.3mg/ml、2.4mg/ml或2.5mg/ml。在一些实施例中，端粒酶抑制剂的浓度为至少约以下中的任一个：0.1mg/ml、0.2mg/ml、0.3mg/ml、0.4mg/ml、0.5mg/ml、1.3mg/ml、1.5mg/ml、2mg/ml、3mg/ml、4mg/ml、5mg/ml、6mg/ml、7mg/ml、8mg/ml、9mg/ml、10mg/ml、11mg/ml、12mg/ml、13mg/ml、14mg/ml、15mg/ml、16mg/ml、17mg/ml、18mg/ml、19mg/ml、20mg/ml、21mg/ml、22mg/ml、23mg/ml、24mg/ml、25mg/ml、26mg/ml、27mg/ml、28mg/ml、29mg/ml、30mg/ml、31mg/ml、32mg/ml、33mg/ml、33.3mg/ml、34mg/ml、35mg/ml、36mg/ml、37mg/ml、38mg/ml、39mg/ml、40mg/ml、50mg/ml、60mg/ml、70mg/ml、80mg/ml、90mg/ml、100mg/ml、110mg/ml、120mg/ml、130mg/ml、140mg/ml、150mg/ml、160mg/ml、170mg/ml、180mg/ml、190mg/ml、200mg/ml、210mg/ml、220mg/ml、230mg/ml、240mg/ml或250mg/ml、260mg/ml、270mg/ml、280mg/ml、290mg/ml、300mg/ml。

[0113] 在某些实施例中，所述组合物被配制成包含端粒酶抑制剂，如伊美司他或伊美司他钠，剂量范围为约2.0mg/kg至约20.0mg/kg、如约3.0mg/kg至约15.0mg/kg、如约4.0mg/kg至约10mg/kg、如约6mg/kg至约14mg/kg、如约7mg/kg至约13mg/kg、如约8mg/kg至约12mg/kg、如约7.5mg/kg至9.4mg/kg、包含约9mg/kg至约11mg/kg并且包含约11mg/kg至约14mg/kg。在一些实施例中，组合物被配制成包含约7.5mg/kg至约9.4mg/kg剂量范围的端粒酶抑制剂，如伊美司他或伊美司他钠。例如，端粒酶抑制剂的剂量可以为4.0mg/kg、4.1mg/kg、4.2mg/kg、4.3mg/kg、4.4mg/kg、4.5mg/kg、4.6mg/kg、4.7mg/kg、4.8mg/kg、4.9mg/kg、5.0mg/kg、5.1mg/kg、5.2mg/kg、5.3mg/kg、5.4mg/kg、5.5mg/kg、5.6mg/kg、5.7mg/kg、5.8mg/kg、5.9mg/kg、6.0mg/kg、6.1mg/kg、6.2mg/kg、6.3mg/kg、6.4mg/kg、6.5mg/kg、6.6mg/kg、6.7mg/kg、6.8mg/kg、6.9mg/kg、7mg/kg、7.1mg/kg、7.2mg/kg、7.3mg/kg、7.4mg/kg、7.5mg/kg、7.6mg/kg、7.7mg/kg、7.8mg/kg、7.9mg/kg、8mg/kg、8.1mg/kg、8.2mg/kg、8.3mg/kg、8.4mg/kg、8.5mg/kg、8.6mg/kg、8.7mg/kg、8.8mg/kg、8.9mg/kg、9mg/kg、9.1mg/kg、9.2mg/kg、9.3mg/kg、9.4mg/kg、9.5mg/kg、9.6mg/kg、9.7mg/kg、9.8mg/kg、9.9mg/kg、10mg/kg、10.1mg/kg、10.2mg/kg、10.3mg/kg、10.4mg/kg、10.5mg/kg、10.6mg/kg、10.7mg/kg、10.8mg/kg、10.9mg/kg、11mg/kg、11.1mg/kg、11.2mg/kg、11.3mg/kg、11.4mg/kg、11.5mg/kg、11.6mg/kg、11.7mg/kg、11.8mg/kg、11.9mg/kg、12mg/kg、12.1mg/kg、12.2mg/kg、12.3mg/kg、12.4mg/kg、12.5mg/kg、12.6mg/kg、12.7mg/kg、12.8mg/kg、12.9mg/kg、13mg/kg、10.5mg/kg、11.0mg/kg、11.5mg/kg、12.0mg/kg、12.5mg/kg、13.0mg/kg、13.5mg/kg、14.0mg/kg、14.5mg/kg、15.0mg/kg、15.5mg/kg、16.0mg/kg、16.5mg/kg、17.0mg/kg、17.0mg/kg、17.5mg/kg、18.0mg/kg、18.5mg/kg、19.0mg/kg、19.5mg/kg或20.0mg/kg。

[0114] 在一些实施例中，皮下端粒酶抑制剂组合物还包含一种或多种药学上可接受的载剂。示例性的药学上可接受的载剂可以包含溶剂、分散介质、包衣、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂、水性载剂或非水性载剂或其组合。在某些实施例中，组合物可以进一步

包含一种或多种药学上可接受的赋形剂作为药物组合物的一部分。赋形剂可以包含但不限于碳水化合物、无机盐、抗微生物剂、稳定剂、抗氧化剂、表面活性剂、氨基酸、缓冲液、酸、碱及其组合。例如,适合于皮下注射组合物的赋形剂可以包含水、醇、多元醇、单糖、多糖、稳定剂、缓冲液、氨基酸和表面活性剂中的一种或多种。每种药学上可接受的赋形剂或载剂的量可以变化,并且可以在1mM至1000mM、如2mM至900mM、如3mM至800mM、如4mM至700mM、如5mM至600mM、如6mM至500mM、如7mM至400mM、如8mM至300mM、如9mM至200mM并且包含10mM至100mM的范围内。

[0115] 在一些实施例中,组合物包含缓冲液。可以使用的缓冲液的实例是乙酸、柠檬酸、甲酸、琥珀酸、磷酸、碳酸、苹果酸、天冬氨酸、组氨酸、硼酸、Tris缓冲液、HEPPSO和HEPES。在一些情况下,缓冲液以使组合物保持在预定的pH的量存在于组合物中。例如,一种或多种缓冲液可以存在于组合物中,以将组合物保持在3.0至9.0的pH,如3.5至8.5的pH,如4.0至8.0的pH,如4.5至7.5的pH,如5.0至7.0的pH,并且包含5.5至7.5的pH。例如,组合物可以具有3.0的pH、3.1的pH、3.2的pH、3.3的pH、3.4的pH、3.5的pH、3.6的pH、3.7的pH、3.8的pH、3.9的pH、4.0的pH、4.1的pH、4.2的pH、4.3的pH、4.4的pH、4.5的pH、4.6的pH、4.7的pH、4.8的pH、4.9的pH、5.0的pH、5.1的pH、5.2的pH、5.3的pH、5.4的pH、5.5的pH、5.6的pH、5.7的pH、5.8的pH、5.9的pH、6.0的pH、6.1的pH、6.2的pH、6.3的pH、6.4的pH、6.5的pH、6.6的pH、6.7的pH、6.8的pH、6.9的pH、7.0的pH、7.1的pH、7.2的pH、7.3的pH、7.4的pH、7.5的pH、7.6的pH、7.7的pH、7.8的pH、7.9的pH、8.0的pH、8.1的pH、8.2的pH、8.3的pH、8.4的pH、8.5的pH、8.6的pH、8.7的pH、8.8的pH、8.9的pH或9.0的pH。缓冲液可以以1mM至1000mM、如2mM至900mM、如3mM至800mM、如4mM至700mM、如5mM至600mM、如6mM至500mM、如7mM至400mM、如8mM至300mM、如9mM至200mM并且包含10mM至100mM的量存在于组合物中。例如,缓冲液可以以约10mM、约20mM、约30mM、约40mM、约50mM、约75mM、100mM、约110mM、约120mM、约130mM、约140mM、约150mM、约160mM、约170mM、约180mM、约190mM、约200mM、约210mM、约220mM、约230mM、约240mM、约250mM、约260mM、约270mM、约280mM、约290mM、约300mM、约310mM、约320mM、约330mM、约340mM、约350mM、约360mM、约370mM、约380mM、约390mM、约400mM、约410mM、约420mM、约430mM、约440mM、约450mM、约460mM、约470mM、约480mM、约490mM或约500mM的浓度存在于组合物中。

[0116] 在一些实施例中,组合物包含碳水化合物,如糖。糖的实例包含单糖、二糖、三糖、多糖、糖醇、还原糖、非还原糖如葡萄糖、蔗糖、海藻糖、乳糖、果糖、麦芽糖、葡聚糖、甘油、葡聚糖、赤藓糖醇、甘油、阿拉伯糖醇、木糖醇、山梨醇、甘露醇、蜜二糖、松三糖、棉子糖、甘露三糖、水苏糖、麦芽糖、乳果糖、麦芽酮糖、葡萄糖醇、麦芽糖醇、乳糖醇或异麦芽酮糖。在一些情况下,组合物包含蔗糖。在其他情况下,组合物包含海藻糖。碳水化合物(例如,糖如蔗糖或海藻糖)可以以1mM至1000mM、如2mM至900mM、如3mM至800mM、如4mM至700mM、如5mM至600mM、如6mM至500mM、如7mM至400mM、如8mM至300mM、如9mM至200mM并且包含10mM至100mM的量存在于组合物中。例如,碳水化合物(例如,糖如蔗糖或海藻糖)可以以约10mM、约20mM、约30mM、约40mM、约50mM、约75mM、100mM、约110mM、约120mM、约130mM、约140mM、约150mM、约160mM、约170mM、约180mM、约190mM、约200mM、约210mM、约220mM、约230mM、约240mM、约250mM、约260mM、约270mM、约280mM、约290mM、约300mM、约310mM、约320mM、约330mM、约340mM、约350mM、约360mM、约370mM、约380mM、约390mM、约400mM、约410mM、约420mM、约

430mM、约440mM、约450mM、约460mM、约470mM、约480mM、约490mM或约500mM的浓度存在于组合物中。

[0117] 在一些实施例中,组合物包含一种或多种氨基酸。氨基酸的实例包含组氨酸、异亮氨酸、甲硫氨酸、甘氨酸、精氨酸、赖氨酸、L-亮氨酸、三亮氨酸、丙氨酸、谷氨酸、L-苏氨酸和2-苯胺。在一些情况下,组合物包含甲硫氨酸。在其他情况下,组合物包含组氨酸。氨基酸(例如,甲硫氨酸或组氨酸)可以以0.1mg/mL至约5mg/mL、如0.1mg/mL至约2.5mg/mL、如1mg/mL至约2mg/mL、如4mM至700mM、如5mM至600mM、如6mM至500mM、如7mM至400mM、如8mM至300mM、如9mM至200mM并且包含10mM至100mM的量存在于组合物中。例如,氨基酸(例如,甲硫氨酸或组氨酸)可以以约0.5mg/mL、约1mg/mL、约1.1mg/mL、约1.2mg/mL、约1.3mg/mL、约1.4mg/mL、约1.5mg/mL、约1.6mg/mL、约1.7mg/mL、约1.8mg/mL、约1.9mg/mL、约2.0mg/mL、约2.1mg/mL、约2.2mg/mL、约2.3mg/mL、约2.4mg/mL、约2.5mg/mL、约2.6mg/mL、约2.7mg/mL、约2.8mg/mL、约2.9mg/mL、约3mg/mL、约3.5mg/mL、约4mg/mL、约4.5mg/mL或约5mg/mL的浓度存在于组合物中。在某些实施例中,组合物包含约0.5mg/mL、约1mg/mL、约1.1mg/mL、约1.2mg/mL、约1.3mg/mL、约1.4mg/mL、约1.5mg/mL、约1.6mg/mL、约1.7mg/mL、约1.8mg/mL、约1.9mg/mL、约2.0mg/mL、约2.1mg/mL、约2.2mg/mL、约2.3mg/mL、约2.4mg/mL、约2.5mg/mL、约2.6mg/mL、约2.7mg/mL、约2.8mg/mL、约2.9mg/mL、约3mg/mL、约3.5mg/mL、约4mg/mL、约4.5mg/mL或约5mg/mL的量的组氨酸。在其他实施例中,组合物包含约0.5mg/mL、约1mg/mL、约1.1mg/mL、约1.2mg/mL、约1.3mg/mL、约1.4mg/mL、约1.5mg/mL、约1.6mg/mL、约1.7mg/mL、约1.8mg/mL、约1.9mg/mL、约2.0mg/mL、约2.1mg/mL、约2.2mg/mL、约2.3mg/mL、约2.4mg/mL、约2.5mg/mL、约2.6mg/mL、约2.7mg/mL、约2.8mg/mL、约2.9mg/mL、约3mg/mL、约3.5mg/mL、约4mg/mL、约4.5mg/mL或约5mg/mL的量的甲硫氨酸。

[0118] 在一些实施例中,组合物包含一种或多种表面活性剂。表面活性剂的实例包含聚山梨醇酯(例如,聚山梨醇酯-20或聚山梨醇酯-80);泊洛沙姆(polyoxamer)(例如泊洛沙姆188);Triton;辛基糖苷钠;月桂基磺基甜菜碱、肉豆蔻基磺基甜菜碱、亚油基磺基甜菜碱或硬脂基磺基甜菜碱;月桂基肌氨酸、肉豆蔻基肌氨酸、亚油基肌氨酸或硬脂基肌氨酸;亚油基甜菜碱、肉豆蔻基甜菜碱或鲸蜡基甜菜碱;月桂酰胺基丙基甜菜碱、椰油酰胺基丙基甜菜碱、油酰胺基丙基甜菜碱、肉豆蔻酰胺基丙基甜菜碱、棕榈酰胺基丙基甜菜碱、或异硬脂酰胺基丙基甜菜碱(例如,月桂酰胺基丙基);肉豆蔻酰胺丙基二甲胺、棕榈酰胺基丙基二甲胺、或异硬脂酰胺丙基二甲胺;甲基椰油基牛磺酸钠或甲基油基牛磺酸二钠;以及MONAQUA™系列(Mona Industries, Inc., Paterson, N.J.)、聚乙二醇、聚丙二醇以及乙二醇和丙二醇的共聚物(例如,PLURONICS™、PF68等)。在一些情况下,组合物包含聚山梨醇酯表面活性剂。表面活性剂可以以1mM至1000mM、如2mM至900mM、如3mM至800mM、如4mM至700mM、如5mM至600mM、如6mM至500mM、如7mM至400mM、如8mM至300mM、如9mM至200mM并且包含10mM至100mM的量存在于组合物中。例如,表面活性剂可以以约10mM、约20mM、约30mM、约40mM、约50mM、约75mM、100mM、约110mM、约120mM、约130mM、约140mM、约150mM、约160mM、约170mM、约180mM、约190mM、约200mM、约210mM、约220mM、约230mM、约240mM、约250mM、约260mM、约270mM、约280mM、约290mM、约300mM、约310mM、约320mM、约330mM、约340mM、约350mM、约360mM、约370mM、约380mM、约390mM、约400mM、约410mM、约420mM、约430mM、约440mM、约450mM、约460mM、约470mM、约480mM、约490mM或约500mM的浓度存在于组合物中。

[0119] 组合物可以包含一种或多种药学上可接受的盐。药学上可接受的盐可以是(1)与无机酸如盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、磷酸等形成的酸加成盐;或者与有机酸形成的酸加成盐,所述有机酸如乙酸、丙酸、己酸、环戊烷丙酸、乙醇酸、丙酮酸、乳酸、丙二酸、琥珀酸、苹果酸、马来酸、富马酸、酒石酸、柠檬酸、苯甲酸,3(4-羟基苯甲酰基)苯甲酸、肉桂酸、扁桃酸、甲磺酸、乙磺酸、1,2-乙烷二磺酸、2-羟基乙磺酸、苯磺酸、4-氯苯磺酸、2-萘磺酸、4-甲苯磺酸、樟脑磺酸、4-甲基双环[2.2.2]辛-2-烯-1-羧酸、葡萄糖庚酸、3-苯基丙酸、三甲基乙酸、叔丁基乙酸、月桂基硫酸、葡萄糖酸、谷氨酸、羟基萘甲酸、水杨酸、硬脂酸、粘康酸等;或(2)当化合物中存在的酸性质子被金属离子,例如碱金属离子、碱土金属离子或铝离子取代时形成的盐;或者与有机碱如乙醇胺、二乙醇胺、三乙醇胺、N-甲基葡糖胺等配位。在某些实施例中,组合物包含氯化钠盐或其他药学上可接受的盐,如硫酸镁。药学上可接受的盐可以以1mM至1000mM、如2mM至900mM、如3mM至800mM、如4mM至700mM、如5mM至600mM、如6mM至500mM、如7mM至400mM、如8mM至300mM、如9mM至200mM并且包含10mM至100mM的量存在于组合物中。例如,药学上可接受的盐可以以约10mM、约20mM、约30mM、约40mM、约50mM、约75mM、100mM、约110mM、约120mM、约130mM、约140mM、约150mM、约160mM、约170mM、约180mM、约190mM、约200mM、约210mM、约220mM、约230mM、约240mM、约250mM、约260mM、约270mM、约280mM、约290mM、约300mM、约310mM、约320mM、约330mM、约340mM、约350mM、约360mM、约370mM、约380mM、约390mM、约400mM、约410mM、约420mM、约430mM、约440mM、约450mM、约460mM、约470mM、约480mM、约490mM或约500mM的浓度存在于组合物中。

[0120] 酸或碱也可以存在于主题组合物中。例如,酸可以包含但不限于盐酸、乙酸、磷酸、柠檬酸、苹果酸、乳酸、甲酸、三氯乙酸、硝酸、高氯酸、磷酸、硫酸、富马酸及其任何组合。碱的实例包含但不限于氢氧化钠、乙酸钠、氢氧化铵、氢氧化钾、乙酸铵、乙酸钾、磷酸钠、磷酸钾、一水合碳酸钠、柠檬酸钠、甲酸钠、硫酸钠、硫酸钾、富马酸钾及其任何组合。酸或碱可以以1mM至1000mM、如2mM至900mM、如3mM至800mM、如4mM至700mM、如5mM至600mM、如6mM至500mM、如7mM至400mM、如8mM至300mM、如9mM至200mM并且包含10mM至100mM的浓度存在于组合物中。例如,酸或碱可以以约10mM、约20mM、约30mM、约40mM、约50mM、约75mM、100mM、约110mM、约120mM、约130mM、约140mM、约150mM、约160mM、约170mM、约180mM、约190mM、约200mM、约210mM、约220mM、约230mM、约240mM、约250mM、约260mM、约270mM、约280mM、约290mM、约300mM、约310mM、约320mM、约330mM、约340mM、约350mM、约360mM、约370mM、约380mM、约390mM、约400mM、约410mM、约420mM、约430mM、约440mM、约450mM、约460mM、约470mM、约480mM、约490mM或约500mM的浓度存在于组合物中。

[0121] 在一些实施例中,组合物包含一种或多种抗氧化剂。可以减少或防止组合物的氧化并且因此减少或防止组合物的劣化的抗氧化剂可以包含例如抗坏血酸棕榈酸酯(ascorbyl palmitate)、丁基化羟基茴香醚、丁基化羟基甲苯、次磷酸、甲硫氨酸、单硫代甘油、没食子酸丙酯、亚硫酸氢钠、甲醛合次硫酸氢钠(sodium formaldehyde sulfoxylate)、焦亚硫酸钠及其任何组合。抗氧化剂可以以1mM至1000mM、如2mM至900mM、如3mM至800mM、如4mM至700mM、如5mM至600mM、如6mM至500mM、如7mM至400mM、如8mM至300mM、如9mM至200mM并且包含10mM至100mM的浓度存在于组合物中。例如,抗氧化剂可以以约10mM、约20mM、约30mM、约40mM、约50mM、约75mM、100mM、约110mM、约120mM、约130mM、约140mM、约150mM、约160mM、约170mM、约180mM、约190mM、约200mM、约210mM、约220mM、约230mM、约240mM、约

250mM、约260mM、约270mM、约280mM、约290mM、约300mM、约310mM、约320mM、约330mM、约340mM、约350mM、约360mM、约370mM、约380mM、约390mM、约400mM、约410mM、约420mM、约430mM、约440mM、约450mM、约460mM、约470mM、约480mM、约490mM或约500mM的浓度存在于组合物中。

[0122] 在一些实施例中,组合物包含一种或多种防腐剂。防腐剂(其可以减少或防止组合物的降解,如由微生物生长引起的降解)可以包含例如抗氧化剂、抗微生物剂和螯合剂,并且可以包含对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸乙酯、对羟基苯甲酸丙酯和对羟基苯甲酸丁酯,芳基酸和烷基酸,柠檬酸,山梨酸,山梨酸钠、山梨酸钾和山梨酸钙,苯甲酸,苯甲酸钠、苯甲酸钾和苯甲酸钙、苯甲醇、偏亚硫酸氢钠、溴硝醇、丙二醇(15-30%)、BHT(丁基化羟基甲苯)、BHA(丁基化羟基茴香醚)、没食子酸丙酯、EDTA、三氯叔丁醇、苯甲醛、苯酚、间甲酚、氯甲酚、氯化苄基二甲基代苯(benzylkonium chloride)、苜索氯铵和汞化合物,如硫柳汞、硝酸苯汞及其任何组合。防腐剂可以以1mM至1000mM、如2mM至900mM、如3mM至800mM、如4mM至700mM、如5mM至600mM、如6mM至500mM、如7mM至400mM、如8mM至300mM、如9mM至200mM并且包含10mM至100mM的浓度存在于组合物中。例如,防腐剂可以以约10mM、约20mM、约30mM、约40mM、约50mM、约75mM、100mM、约110mM、约120mM、约130mM、约140mM、约150mM、约160mM、约170mM、约180mM、约190mM、约200mM、约210mM、约220mM、约230mM、约240mM、约250mM、约260mM、约270mM、约280mM、约290mM、约300mM、约310mM、约320mM、约330mM、约340mM、约350mM、约360mM、约370mM、约380mM、约390mM、约400mM、约410mM、约420mM、约430mM、约440mM、约450mM、约460mM、约470mM、约480mM、约490mM或约500mM的浓度存在于组合物中。

[0123] 可以用于本主题的端粒酶抑制剂组合物的药物赋形剂和其他赋形剂描述于A.Gennaro(2000)“《雷明顿:药学的科学与实践(Remington:The Science and Practice of Pharmacy)》”,第20版,利平科特·威廉斯·威尔金斯出版社(Lippincott,Williams,& Wilkins);《药物剂型和药物递送系统(Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems)》(1999)H.C.Ansel等人编辑,第7版,利平科特·威廉斯·威尔金斯出版社;以及《药物赋形剂手册(Handbook of Pharmaceutical Excipients)》(2000)A.H.Kibbe等人编辑,第3版,美国药剂师协会(Amer.Pharmaceutical Assoc.),其公开通过引用并入本文。

[0124] 用于皮下施用端粒酶抑制剂组合物的方法

[0125] 本公开的方面还包含用于向受试者皮下施用端粒酶抑制剂组合物的方法。在实施根据某些实施例的方法时,将如本文所述的具有端粒酶抑制剂和透明质酸酶的一种或多种组合物皮下施用于受试者。在一些实施例中,通过皮下注射或皮下输注向受试者施用组合物。在其他实施例中,组合物可以从植入的装置(如皮下植入的导管)施用于受试者。在某些实施例中,使用皮下团注注射器将端粒酶抑制剂组合物施用于受试者,所述皮下团注注射器被配置以将预定量的组合物皮下递送至受试者。

[0126] 在一些实施例中,方法包含向受试者皮下施用一种或多种如本文所述的具有端粒酶抑制剂和透明质酸酶的组合物以治疗肿瘤。在一些实施例中,肿瘤可以是实体肿瘤癌症。根据本公开的实施例的用于治疗癌症的实例可以包含但不限于,例如肾上腺皮质癌、肛门癌、阑尾癌、星形细胞瘤、非典型畸胎样/横纹肌样瘤、基底细胞癌、胆管癌(肝外)、膀胱癌、骨癌(例如,尤文肉瘤、骨肉瘤和恶性纤维组织细胞瘤等)、脑干神经胶质瘤、脑肿瘤(例如,星形细胞瘤、中枢神经系统胚胎肿瘤、中枢神经系统生殖细胞肿瘤、颅咽管瘤、室管膜瘤

等)、乳腺癌(例如,女性乳腺癌、男性乳腺癌、儿童乳腺癌等)、支气管肿瘤、类癌瘤(例如,儿童、胃肠道等)、未知原发癌、心脏(心脏)肿瘤、宫颈癌、结肠癌、结肠直肠癌、颅咽管瘤、导管(例如,胆管、肝外等)、导管原位癌(DCIS)、胚胎肿瘤、子宫内膜癌、室管膜瘤、食道癌、嗅神经母细胞瘤、尤因肉瘤、颅外生殖细胞瘤、性腺外生殖细胞瘤、肝外胆管癌、眼癌(例如,眼内黑色素瘤、视网膜母细胞瘤等),骨的纤维组织细胞瘤(例如,恶性、骨肉瘤等)、胆囊癌、胃(胃)癌、胃肠道类癌瘤、胃肠道间质瘤(GIST)、生殖细胞瘤(例如,颅外、性腺外、卵巢、睾丸等)、妊娠滋养细胞疾病、神经胶质瘤、毛细胞白血病、头颈癌、心脏癌、肝细胞(肝)癌、组织细胞增生症(例如,朗格汉斯细胞)等)、下咽癌、眼内黑色素瘤、胰岛细胞瘤(例如,胰腺神经内分泌肿瘤等)、肾癌(例如,肾细胞瘤、肾母细胞瘤、儿童肾肿瘤等)、朗格汉斯细胞组织细胞增生症、喉癌、唇和口腔癌、肝癌(原发性)、小叶原位癌(LCIS)、肺癌(例如非小细胞、小细胞等)、骨的恶性纤维组织细胞瘤和骨肉瘤、黑色素瘤、梅克尔细胞癌、间皮瘤、具有隐匿原发性的转移性鳞状颈部癌、口腔癌、多发性内分泌瘤综合征、鼻腔和副鼻窦癌、鼻咽癌、成神经细胞瘤、非小细胞肺癌、口腔癌(Oral Cancer)、口腔癌(Oral Cavity Cancer)(例如唇癌等)、口咽癌、骨肉瘤和骨的恶性纤维组织细胞瘤、卵巢癌(例如,上皮、生殖细胞肿瘤、低恶性潜能肿瘤等)、胰腺癌、胰腺神经内分泌肿瘤(胰岛细胞瘤)、乳头状瘤病、副神经节瘤、副鼻窦和鼻腔癌、甲状旁腺癌、阴茎癌、咽癌、嗜铬细胞瘤、垂体瘤、胸膜肺母细胞瘤、前列腺癌、直肠癌、肾细胞(肾)癌、肾盂和输尿管、移行细胞癌、视网膜母细胞瘤、横纹肌肉瘤、唾液腺癌、塞泽里综合征、皮肤癌(例如,儿童、黑色素瘤、梅克尔细胞癌、非黑色素瘤等)、小细胞肺癌、小肠癌、软组织肉瘤、鳞状细胞癌、鳞状颈癌(例如,具有隐匿性原发、转移性等)、胃(胃)癌、睾丸癌、咽喉癌、胸腺瘤和胸腺癌、甲状腺癌、肾盂和输尿管的移行细胞癌、输尿管和肾盂癌、尿道癌、子宫癌(例如,子宫内膜癌等)、子宫肉瘤、阴道癌、外阴癌、Waldenström 巨球蛋白血症、肾母细胞瘤等。在某些实施例中,方法包含如在美国专利第7,494,982号中所述治疗患有肿瘤的受试者。

[0127] 在一些实施例中,方法包含向受试者皮下施用一种或多种如本文所述的具有端粒酶抑制剂和透明质酸酶的组合物,以治疗血液肿瘤。在一些情况下,治疗血液肿瘤包含诱导血液肿瘤细胞的凋亡,如体外诱导血液肿瘤细胞的凋亡。在其他情况下,治疗血液肿瘤包含诱导受试者的血液肿瘤细胞的凋亡。在一些实施例中,血液肿瘤细胞是恶性造血干细胞(HSC)。在其它实施例中,血液肿瘤细胞是恶性造血祖细胞(HPC)。

[0128] 在一些实施例中,方法包含向受试者皮下施用一种或多种如本文所述的具有端粒酶抑制剂和透明质酸酶的组合物,以治疗骨髓增生性肿瘤。在一些实例中,治疗骨髓增生性肿瘤包含诱导骨髓增生性肿瘤细胞的细胞凋亡,如体外诱导骨髓增生性肿瘤细胞的细胞凋亡。在其它实例中,治疗骨髓增生性肿瘤包含诱导受试者的骨髓增生性肿瘤细胞的细胞凋亡。在一些实施例中,所述骨髓增生性肿瘤细胞是恶性造血干细胞(HSC)。在其它实施例中,所述骨髓增生性肿瘤细胞是恶性造血祖细胞(HPC)。根据本发明的方法治疗的骨髓增生性肿瘤可以包含例如骨髓纤维化(MF),如原发性骨髓纤维化,或在先前的ET或PV(ETMF后或PVMF后)之后的骨髓纤维化。在其它实施例中,所述骨髓增生性肿瘤包含原发性血小板增多症(ET)、真性红细胞增多症(PV)、慢性骨髓性白血病(CML)、慢性嗜中性粒细胞白血病、慢性嗜酸性粒细胞白血病和急性髓性白血病(AML)。

[0129] 在其他实施例中,血液肿瘤是骨髓增生异常综合征(MDS)。在仍其它实施例中,血

液肿瘤是具有分离的非del(5q)的骨髓增生异常综合征(MDS)。骨髓增生异常综合征(MDS)包含疾病,如难治性贫血、具有过度母细胞的难治性贫血、具有多谱系发育异常的难治性血细胞减少症、具有单谱系发育异常的难治性血细胞减少症和慢性骨髓单核细胞白血病(CMML)。在其它实施例中,血液肿瘤是淋巴肿瘤。

[0130] 根据某些实施例的方法还包含诊断肿瘤。在一些实施例中,方法包含诊断受试者患有实体肿瘤。在一些实施例中,方法包含诊断受试者患有血液肿瘤。在一些实施例中,方法包含诊断受试者患有骨髓增生性肿瘤。在一个实例中,方法包含将受试者诊断为患有骨髓纤维化,如原发性骨髓纤维化。在一些实施例中,受试者先前尚未施用端粒酶抑制剂(例如,未用端粒酶抑制剂治疗过)。在一些实施例中,受试者是对促红细胞生成素刺激剂(ESA)复发或难治的具有较低风险输血依赖性MDS的受试者。在一些实施例中,受试者未接受用低甲基化药剂(HMA)的预先治疗。在一些实施例中,受试者未接受用来那度胺的预先治疗。在一些实施例中,受试者是非del(5q)的受试者。在一些实施例中,受试者是对Janus激酶(JAK)抑制剂复发或难治的受试者。在一些实施例中,所述受试者方法包含治疗患有骨髓增生性肿瘤的受试者,如在美国专利第9,375,485号和国际专利公开号WO 2019/023667和WO 2020/028261中所述,它们的公开通过引用结并入本文。

[0131] 在一些实施例中,淋巴肿瘤(例如淋巴瘤)是B细胞肿瘤。B细胞肿瘤的实例包含但不限于前体B细胞肿瘤(例如,前体B淋巴母细胞白血病/淋巴瘤)和外周B细胞肿瘤(例如,B细胞慢性淋巴细胞白血病、前淋巴细胞白血病、小淋巴细胞淋巴瘤(小淋巴细胞(SL)NHL)、淋巴浆细胞样淋巴瘤/免疫细胞瘤、套细胞淋巴瘤、滤泡中心淋巴瘤、滤泡淋巴瘤(例如,细胞学等级:I(小细胞)、II(混合小细胞和大细胞)、III(大细胞)和/或亚型:弥漫型和主要小细胞型)、非霍奇金淋巴瘤(NHL)、低级别/滤泡型非霍奇金淋巴瘤(NHL)、中高级别/滤泡型NHL、边缘区B细胞淋巴瘤(例如,结外(例如,MALT型+/-单核细胞样B细胞)和/或结内(例如,+/-单核细胞样B细胞))、脾边缘区淋巴瘤(例如,+/-绒毛淋巴细胞),毛细胞白血病、浆细胞瘤/浆细胞骨髓瘤(例如,骨髓瘤和多发性骨髓瘤)、弥漫性大B细胞淋巴瘤(例如,原发性纵隔(胸腺)B细胞淋巴瘤)、中级弥漫性NHL、伯基特淋巴瘤、高级别B细胞淋巴瘤、伯基特样、高级别免疫母细胞性NHL、高级别淋巴母细胞性NHL、高级别小无裂细胞NHL、巨大疾病性NHL、AIDS相关淋巴瘤和Waldenstrom巨球蛋白血症)。

[0132] 在一些实施例中,淋巴肿瘤(例如淋巴瘤)是T细胞和/或推定的NK细胞肿瘤。T细胞和/或推定的NK细胞肿瘤的实例包含但不限于前体T细胞肿瘤(前体T淋巴母细胞淋巴瘤/白血病)和外周T细胞和NK细胞肿瘤(例如,T细胞慢性淋巴细胞白血病/前淋巴细胞白血病和大颗粒淋巴细胞白血病(LGL)(例如,T细胞型和/或NK细胞型)、皮肤T细胞淋巴瘤(例如,蕈样肉芽肿/Sezary综合征)、未指明的原发性T细胞淋巴瘤(例如,细胞学类别(例如,中等大小细胞、混合中等和大细胞)、大细胞、淋巴上皮样细胞、亚型肝脾 γ δ T细胞淋巴瘤和皮下脂膜炎性T细胞淋巴瘤)、血管免疫母细胞性T细胞淋巴瘤(AILD)、血管中心性淋巴瘤、肠T细胞淋巴瘤(例如,+/-肠病相关),成人T细胞淋巴瘤/白血病(ATL)、间变性大细胞淋巴瘤(ALCL)(例如,CD30+、T细胞和空细胞型)、间变性大细胞淋巴瘤和霍奇金淋巴瘤)。

[0133] 在一些实施例中,淋巴肿瘤(例如淋巴瘤)是霍奇金病。例如,霍奇金病可以是淋巴细胞优势、结节性硬化、混合细胞性、淋巴细胞耗竭和/或富含淋巴细胞。

[0134] 在一些实施例中,癌症是白血病。在一些实施例中,白血病是慢性白血病。慢性白

血病的实例包含但不限于慢性骨髓性I(粒细胞)白血病、慢性髓细胞性和慢性淋巴细胞性白血病(CLL)。在一些实施例中,白血病是急性白血病。急性白血病的实例包含但不限于急性淋巴细胞性白血病(ALL)、急性髓细胞性白血病、急性淋巴细胞性白血病和急性髓细胞性白血病(例如,成髓细胞性、前髓细胞性、髓单核细胞性、单核细胞性和红白血病(erythroleukemia))。

[0135] 在一些实施例中,癌症是液体肿瘤或浆细胞瘤。浆细胞瘤包含但不限于骨髓瘤。骨髓瘤包含但不限于髓外浆细胞瘤、孤立性骨髓瘤和多发性骨髓瘤。在一些实施例中,浆细胞瘤是多发性骨髓瘤。

[0136] 在一些实施例中,癌症是多发性骨髓瘤。多发性骨髓瘤的实例包含但不限于IgG多发性骨髓瘤、IgA多发性骨髓瘤、IgD多发性骨髓瘤、IgE多发性骨髓瘤和非分泌型多发性骨髓瘤。在一些实施例中,多发性骨髓瘤是IgG多发性骨髓瘤。在一些实施例中,多发性骨髓瘤是IgA多发性骨髓瘤。在一些实施例中,多发性骨髓瘤是闷烧性或惰性多发性骨髓瘤。在一些实施例中,多发性骨髓瘤是进行性多发性骨髓瘤。在一些实施例中,多发性骨髓瘤可能对药物有抗性,所述药物如但不限于硼替佐米(bortezomib)、地塞米松(Dex-)、阿霉素(Dox-)和美法仑(LR)。

[0137] 在描述本发明的方法时,术语“受试者”意指皮下施用了端粒酶抑制剂组合物的人或生物体。因此,本发明的受试者可以包含但不限于哺乳动物,例如人类和其他灵长类动物,如黑猩猩和其他猿和猴物种;和类似物,其中在某些实施例中,受试者是人。受试者可以是已经被诊断患有骨髓增生性肿瘤的受试者,其中受试者可以是已经被健康护理专业人员诊断患有该病状的受试者。

[0138] 皮下施用于受试者的端粒酶抑制剂,如伊美司他或伊美司他钠的剂量可以在以下范围内变化:约2.0mg/kg至20.0mg/kg、如约3.0mg/kg至约15.0mg/kg如约4.0mg/kg至约10mg/kg、如约6mg/kg至约14mg/kg、如约7mg/kg至约13mg/kg、如约8mg/kg至约12mg/kg、如约7.5mg/kg至9.4mg/kg并且包含约9mg/kg至约11mg/kg并且包含约11mg/kg至约14mg/kg。在一些实施例中,施用于受试者的端粒酶抑制剂的剂量为约7.5mg/kg到约9.4mg/kg。在一些实施例中,施用于受试者的端粒酶抑制剂的剂量为约9mg/kg到约11mg/kg。在一些实施例中,施用于受试者的端粒酶抑制剂的剂量为约11mg/kg到约14mg/kg。例如,端粒酶抑制剂的剂量可以为4.0mg/kg、4.1mg/kg、4.2mg/kg、4.3mg/kg、4.4mg/kg、4.5mg/kg、4.6mg/kg、4.7mg/kg、4.8mg/kg、4.9mg/kg、5.0mg/kg、5.1mg/kg、5.2mg/kg、5.3mg/kg、5.4mg/kg、5.5mg/kg、5.6mg/kg、5.7mg/kg、5.8mg/kg、5.9mg/kg、6.0mg/kg、6.1mg/kg、6.2mg/kg、6.3mg/kg、6.4mg/kg、6.5mg/kg、6.6mg/kg、6.7mg/kg、6.8mg/kg、6.9mg/kg、7mg/kg、7.1mg/kg、7.2mg/kg、7.3mg/kg、7.4mg/kg、7.5mg/kg、7.6mg/kg、7.7mg/kg、7.8mg/kg、7.9mg/kg、8mg/kg、8.1mg/kg、8.2mg/kg、8.3mg/kg、8.4mg/kg、8.5mg/kg、8.6mg/kg、8.7mg/kg、8.8mg/kg、8.9mg/kg、9mg/kg、9.1mg/kg、9.2mg/kg、9.3mg/kg、9.4mg/kg、9.5mg/kg、9.6mg/kg、9.7mg/kg、9.8mg/kg、9.9mg/kg、10mg/kg、10.1mg/kg、10.2mg/kg、10.3mg/kg、10.4mg/kg、10.5mg/kg、10.6mg/kg、10.7mg/kg、10.8mg/kg、10.9mg/kg、11mg/kg、11.1mg/kg、11.2mg/kg、11.3mg/kg、11.4mg/kg、11.5mg/kg、11.6mg/kg、11.7mg/kg、11.8mg/kg、11.9mg/kg、12mg/kg、12.1mg/kg、12.2mg/kg、12.3mg/kg、12.4mg/kg、12.5mg/kg、12.6mg/kg、12.7mg/kg、12.8mg/kg、12.9mg/kg、13mg/kg、13.5mg/kg、14.0mg/kg、14.5mg/kg、15.0mg/kg、

15.5mg/kg、16.0mg/kg、16.5mg/kg、17.0mg/kg、17.0mg/kg、17.5mg/kg、18.0mg/kg、18.5mg/kg、19.0mg/kg、19.5mg/kg或20.0mg/kg。在某些实施例中，施用于受试者的端粒酶抑制剂的剂量为约9.4mg/kg。

[0139] 端粒酶抑制剂(如伊美司他或伊美司他钠)的剂量可以以每隔一天一次、每周一次、每两周一次(14天)、每三周一次(21天)或每四周一次(28天)、每6周一次、每8周一次、每10周一次、每12周一次的周期施用于受试者。在所述方法的某些实施例中，施用伊美司他，持续1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个或多于8个剂量周期，每个周期包括：每三周一次静脉内施用约2-11mg/kg伊美司他，每四周一次静脉内施用约2-11mg/kg伊美司他，每两周一次静脉内施用约2-11mg/kg伊美司他或每三周一次静脉内施用约7.5-9.4mg/kg伊美司他。在某些情况下，每个剂量周期包括每四周一次静脉内施用约7.5-9.4mg/kg伊美司他。在一些情况下，每个剂量周期包括约每三周一次静脉内施用约9.4mg/kg伊美司他。在一些情况下，每个剂量周期包括约每四周一次静脉内施用约7.5mg/kg伊美司他。在所述方法的某些实施例中，施用伊美司他，持续1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个或多于8个剂量周期，每个周期包括：每三周一次静脉内施用约5-14mg/kg伊美司他，每四周一次静脉内施用约5-14mg/kg伊美司他，每两周一次静脉内施用约5-14mg/kg伊美司他或每三周一次静脉内施用约7.5-14mg/kg伊美司他。在某些情况下，每个剂量周期包括每四周一次静脉内施用约7.5-14mg/kg伊美司他。在一些情况下，每个剂量周期包括约每三周一次静脉内施用约14mg/kg伊美司他。在一些情况下，每个剂量周期包括约每四周一次皮下施用约12mg/kg伊美司他。

[0140] 在一些实施例中，施用于个体的端粒酶抑制剂，如伊美司他或伊美司他钠的量为约0.5至约5mg、约5至约10mg、约10至约15mg、约15至约20mg、约20至约25mg、约20至约50mg、约25至约50mg、约50至约75mg、约50至约100mg、约75至约100mg、约100至约125mg、约125至约150mg、约150至约175mg、约175至约200mg、约200至约225mg、约225至约250mg、约250至约300mg、约300至约350mg、约350至约400mg、约400至约450mg或约450至约500mg、约500mg至约600mg、约600mg至约700mg、约700mg至约800mg、约800mg至约900mg、约900mg至约1000mg、约1100mg至约1200mg、约1200mg至约1300mg、约1300mg至约1400mg、约1400mg至约1500mg、约1500mg至约1600mg、约1600mg至约1700mg、约1700mg至约1800mg、约1800mg至约1900mg、约1900mg至约2000mg、约2000mg至约2100mg、约2100mg至约2200mg、约2200mg至约2300mg、约2300mg至约2400mg、约2400mg至约2500mg。

[0141] 在一些实施例中，以有效量施用于个体的端粒酶抑制剂的量(例如，单位剂型)在约5mg至约1000mg、5mg至约500mg如约30mg至约300mg或约50mg至约200mg的范围内。在一些实施例中，端粒酶抑制剂的量在单位剂型中，所述单位剂型具有在约500mg至约3000mg、750mg至约2500mg，如约1000mg至约2000mg或约50mg至约200mg的范围内。单位剂型可以是液体或冻干的。在所述方法的某些实施例中，伊美司他被施用持续1、2、3、4、5、6、7、8个或多于8个给药周期，每个周期包括：每三周一次皮下施用约200-3000mg伊美司他，每四周一次皮下施用约200-3000mg伊美司他，每三周一次皮下施用约750-2500mg伊美司他，或每四周一次皮下施用约750-2500mg伊美司他。

[0142] 在一些实施例中，施用于个体的端粒酶抑制剂的浓度是稀释的(约0.1mg/ml)或浓缩的(约300mg/ml)，包含例如以下中的任一个：约0.1至约300mg/ml、约0.1至约200mg/ml、约0.1至约180mg/ml、约0.1至约160mg/ml、约0.1至约140mg/ml、约0.1至约120mg/ml、约0.1

至约100mg/ml、约0.1至约80mg/ml、约0.1至约60mg/ml、约0.1至约40mg/ml、约0.1至约20mg/ml、约0.1至约10mg/ml、约2至约40mg/ml、约4至约35mg/ml、约6至约30mg/ml、约8至约25mg/ml、约10至约20mg/ml、约12至约15mg/ml,或以下中的任一个:约0.1mg/ml、0.2mg/ml、0.3mg/ml、0.4mg/ml、0.5mg/ml、0.6mg/ml、0.7mg/ml、0.8mg/ml、0.9mg/ml、1mg/ml、1.1mg/ml、1.2mg/ml、1.3mg/ml、1.4mg/ml、1.5mg/ml、1.6mg/ml、1.7mg/ml、1.8mg/ml、1.9mg/ml、2mg/ml、2.1mg/ml、2.2mg/ml、2.3mg/ml、2.4mg/ml或2.5mg/ml。在一些实施例中,端粒酶抑制剂的浓度为至少约以下中的任一个:0.1mg/ml、0.2mg/ml、0.3mg/ml、0.4mg/ml、0.5mg/ml、1.3mg/ml、1.5mg/ml、2mg/ml、3mg/ml、4mg/ml、5mg/ml、6mg/ml、7mg/ml、8mg/ml、9mg/ml、10mg/ml、11mg/ml、12mg/ml、13mg/ml、14mg/ml、15mg/ml、16mg/ml、17mg/ml、18mg/ml、19mg/ml、20mg/ml、21mg/ml、22mg/ml、23mg/ml、24mg/ml、25mg/ml、26mg/ml、27mg/ml、28mg/ml、29mg/ml、30mg/ml、31mg/ml、32mg/ml、33mg/ml、33.3mg/ml、34mg/ml、35mg/ml、36mg/ml、37mg/ml、38mg/ml、39mg/ml、40mg/ml、50mg/ml、60mg/ml、70mg/ml、80mg/ml、90mg/ml、100mg/ml、110mg/ml、120mg/ml、130mg/ml、140mg/ml、150mg/ml、160mg/ml、170mg/ml、180mg/ml、190mg/ml、200mg/ml、210mg/ml、220mg/ml、230mg/ml、240mg/ml、250mg/ml、260mg/ml、270mg/ml、280mg/ml、290mg/ml或300mg/ml。

[0143] 在实施例中,每个剂量的端粒酶抑制剂组合物每7天或更长时间,如每10天或更长时间,如每14天或更长时间,如每21天或更长时间,如每28天或更长时间并且包含每35天或更长时间,皮下施用受试者一次。在一些实施例中,端粒酶抑制剂组合物每隔一天皮下施用于受试者一次。在一些实施例中,端粒酶抑制剂组合物每周一次皮下施用于受试者。在一些实施例中,端粒酶抑制剂组合物每两周一次皮下施用于受试者。在其他实施例中,端粒酶抑制剂组合物每三周一次皮下施用于受试者。在其他实施例中,端粒酶抑制剂组合物每4周一次被皮下施用。

[0144] 试剂盒

[0145] 还提供了试剂盒,其中试剂盒至少包含一种或多种,例如多种,如上所述的主题皮下端粒酶抑制剂组合物。在某些实施例中,试剂盒中的主题皮下端粒酶抑制剂组合物可以在包装中提供。例如,试剂盒的每种组合物可以存在于单独的小袋、瓶子或类似的容器中,以保存组合物直到使用。试剂盒可以进一步包含用于实施本主题方法的其它组分,如在施用一种或多种本主题的组合物之前冲洗皮肤的施用装置或流体。在某些实施例中,试剂盒包含皮下注射器,其被配置为向受试者递送治疗有效量的组合物。在一些情况下,注射器(injector)包含注射器(syringe)和针头。在其他实施例中,注射器是被配置成皮下递送预定量的组合物的团注注射器(bolus injector)。在某些实施例中,将端粒酶抑制剂组合物预装载到皮下注射器中。试剂盒还可以包含纱布垫或可以用于实践本主题方法的用于清洁注射部位的其它装置。在一些实施例中,端粒酶抑制剂组合物被配制成固体或冻干物,并且试剂盒可以进一步包含一种或多种缓冲组合物或溶剂,以用于重构用于皮下注射的主题组合物。

[0146] 此外,试剂盒还可以包含如何使用本主题的端粒酶抑制剂组合物的说明书,其中说明书可以包含关于如何施用组合物、给药方案和用于实施治疗方案的记录保存装置的信息。说明书被记录在合适的记录介质上。例如,说明书可以印刷在基底(如纸或塑料等)上。因此,说明书可以作为包装插页存在于试剂盒中,存在于试剂盒或其组分的容器的标签中

(即与包装或子包装相关联)等。在其他实施例中,说明书作为电子存储数据文件存在于合适的计算机可读存储介质(例如CD-ROM、磁盘等)上。在其他实施例中,在试剂盒中不存在实际的说明书,但是提供了从远程来源(例如经由互联网)获得说明书的手段。该实施例的实例是试剂盒,其包含其中可以查看说明书和/或下载说明书的网址。与说明书一样,用于获得说明书的方案可以记录在合适的基底上。

[0147] 实例

[0148] 提出以下实例以便向本领域普通技术人员提供如何制造和使用本发明的完整公开和描述,并且不旨在限制诸位发明人考虑作为其发明的范围,也不旨在表示以下实验是进行的全部或仅有的实验。已经做出努力来确保关于所使用的数字(例如,量、温度等)的准确性,但仍应考虑一些实验误差和偏差。除非另外指明,否则份数是重量份,分子量是重均分子量,温度是以摄氏度为单位,并且压力是在大气压下或接近大气压。用“平均”意指算术平均值。可以使用标准缩写,例如,bp:碱基对;kb:千碱基;pl:皮升;s或sec:秒;min:分钟;h或hr:小时;aa:氨基酸;kb:千碱基;bp:碱基对;nt,核苷酸;i.m.:肌肉(地);i.p.:腹膜内(地);s.c.:皮下(地);等。

[0149] 实例1-经由皮下和静脉途径在大鼠中进行的伊美司他钠的生物利用度研究

[0150] 材料与amp;方法

[0151] 用伊美司他钠对4只雄性Sprague-Dawley大鼠(约250g-260g)进行静脉给药(IV体积37.5μL;30mg/kg)和4只雄性Sprague-Dawley大鼠(约250g-260g)进行皮下给药(SC体积113μL;90mg/kg)。伊美司他钠是由序列5'-TAGGGTTAGACAA-3'构成的5'棕榈酰化13-聚硫代磷酸酯寡核苷酸。在给药前立即将伊美司他钠溶于水中。

[0152] 在0.083小时(约5分钟)、0.25小时(15分钟)、1小时、2小时、4小时、8小时和24小时的时间点从每只大鼠收集血液。收集了1.5mL-2.0mL的全血,产生约700μL至1000μL的血浆。通过二级导管在IV给药的大鼠(不同于用于IV给药的大鼠)中收集血液。

[0153] 血液样品收集在EDTA管中,并且在收集后立即离心。将收集的血浆样品转移到单独的小瓶中。通过LC/MS/MS分析伊美司他钠的血浆浓度。

[0154] 结果

[0155] 在图1中描绘了在24小时时间段内分析的伊美司他钠的血浆浓度。通过非房室PK分析来分析伊美司他钠的血浆浓度。皮下(s.c.)生物利用度基于以下公式计算: $F = (AUC(s.c.) / 剂量(s.c.)) / (AUC(i.v.) / 剂量(i.v.)) \times 100\%$ 。伊美司他的计算的皮下生物利用度为约95.8%。在重复的实验中,计算出的大鼠体内伊美司他的皮下生物利用度为约81.5%。

[0156] 结论

[0157] 图1所示的结果表明,在皮下施用途径之后,伊美司他钠被吸收到全身性循环中,并且与IV施用相比,显示出约80-95%的生物利用度,这支持了将伊美司他组合物用于皮下施用的用途。

[0158] 实例2-与透明质酸酶一起温育的伊美司他钠的相容性和稳定性

[0159]

缩写词	定义
DS	原料药
EDP	Enhanze (rHuPH20) 药物产品

NA	不适用
RH	相对湿度
RRT	相对保留时间
RT	报告阈值

[0160] 预先研究:

[0161] 与rHuPH20共同配制的伊美司他的相容性的证明

[0162] 由作为以下主要相容性和稳定性研究的预先研究进行的初步可行性测试产生的数据表明,为该预先研究制备的由配方D、F和G(如以下定义)代表的伊美司他+rHuPH20的共同配方的结果与用于制备共同配方的不含rHuPH20的伊美司他原料药批次的结果相似,为与rHuPH20共同配制的伊美司他的相容性提供了支持(参见下表)。

[0163] 制备了以下配方

配方	基质	重构的伊美司他 (mg/mL)	rHuPH20 (U/mL)
D	0.9%氯化钠	33	2,000
F	0.9%氯化钠	100	2,000
G	EDP缓冲液	33	2,000

测试	仅伊美司他 ¹	伊美司他+rHuPH20 共同配方		
		配方 D	配方 F	配方 G
重构的溶液的外观	清澈的溶液、无可见	清澈的溶液、无	清澈的溶液、无	清澈的溶液、无

测试	仅伊美司他 ¹	伊美司他+rHuPH20 共同配方		
		可见污染物	可见污染物	可见污染物
通过 UV 的测定 (µg/mg)	1033	1028	961	1040
水含量	4.2%	4.02713%	4.02713%	4.02713%
pH (4mL, 玻璃)		7.6	7.5	7.2
pH (1mL, 塑料)	8.0	7.6	7.5	7.2

[0167] ¹数据反映了用于制备伊美司他+rHuPH20共同配方的一批伊美司他原料药的最新稳定性数据。

测试	仅伊美司他 ¹	伊美司他+rHuPH20 共同配方						
		配方 D		配方 F		配方 G		
通过 RP-HPLC/UV 的纯度	93.1%	93.0 %		93.0 %		93.0 %		
通过 RP-HPLC/UV 的单独的杂质:								
	RRT	面积%	RRT	面积%	RRT	面积%	RRT	面积%
非脂化的物种	0.42	0.26%	0.42	0.23%	0.42	0.24%	0.42	0.25%
前峰	0.98	0.35%	0.98	0.43%	0.98	0.44%	0.98	0.45%
后峰 1	1.04	5.04%	1.04	4.89%	1.04	4.89%	1.04	4.87%
后峰 2	1.08	0.53%	1.08	0.51%	1.08	0.51%	1.08	0.51%
后峰 3	1.12	<0.2%	1.09	0.11%	1.09	0.11%	1.09	0.11%
任何单独的未指明的峰	ND	ND	0.94	0.16%	0.94	0.16%	0.94	0.16%
通过 RP-HPLC/UV 的总杂质	6.9%		7.0 %		7.0 %		7.0 %	

[0169] ¹数据反映了用于制备伊美司他+rHuPH20共同配方的一批伊美司他原料药的最新

稳定性数据。

[0170] 主要研究：

[0171] 目的

[0172] 本研究的目的是证明rHuPH20与伊美司他钠的共同配方在不同储存条件下的相容性和稳定性。

[0173] 材料

[0174] • 伊美司他钠

[0175] • rHuPH20 Enhanze药物产品 (EDP) :1mg/mL、110,000U/mL、5℃储存

[0176] • 0.9%氯化钠

[0177] • L-组氨酸(≥99% (TLC))

[0178] • L-甲硫氨酸(试剂等级, ≥98% (HPLC))

[0179] • Polysorbate 80

[0180] • NaCl (ACS等级)

[0181] • 浓盐酸(ACS试剂, 37%)

[0182] • 水

[0183] • 尼龙47mm滤膜0.2μm

[0184] 样品配方

配方	基质	重构的伊美司他 (mg/mL)	rHuPH20 (U/mL)
A (伊美司他对照)	0.9%氯化钠	33	0
B (rHuPH20 盐水对照)	0.9%氯化钠	0	2,000
C (伊美司他EDP缓冲液对照)	EDP缓冲液	33	0
D	0.9%氯化钠	33	2,000
E	0.9%氯化钠	33	1,000
F	0.9%氯化钠	100	2,000
G	EDP缓冲液	33	2,000

[0186] 样品制备

配方	基质	重构的伊美司他 (mg/mL)	从 1 mg/mL 贮备液中加入的 rHuPH20 的体积 (mL)	伊美司他的体积 (mL)	伊美司他基质的体积 (mL)
A (伊美司他对照)	0.9%氯化钠	33	0.0	150	0
B (rHuPH20 盐水对照)	0.9%氯化钠	0	2.7	0	147.3
[0187] C (伊美司他 EDP 缓冲液对照)	EDP 缓冲液	33	0.0	150	0
D	0.9%氯化钠	33	2.7	147.3	0
E	0.9%氯化钠	33	1.4	148.6	0
F	0.9%氯化钠	100	2.7	147.3	0
G	EDP 缓冲液	33	2.7	147.3	0

[0188] rHuPH20 Enhanze药物产品 (EDP) 缓冲液的制备

[0189] 向500mL容量瓶中加入约450mL水。向容量瓶中加入约776mg (±15mg) L-组氨酸、约3.80g NaCl (±75mg) 和约746mg (±15mg) L-甲硫氨酸。使用搅拌棒将组分完全溶解。目视检查用于验证组分是否溶解。

[0190] 向溶液中加入1mL的10.0%聚山梨醇酯80组合物至容量瓶中。用搅拌棒混合所述组合物。使用浓HCl将pH调节至 6.5 ± 0.3 的最终pH。足量至500mL的最终体积。将组合物通过 $0.2\mu\text{m}$ 的尼龙47mm滤膜过滤,并储存在 5°C 下,并且在至少2周内是稳定的。

[0191] 将组合物储存在 5°C 在直立方向、在 25°C 在直立方向和在 37°C 在直立方向的20mL硼硅酸盐玻璃闪烁小瓶中。

[0192] 稳定性方案时间表

[0193] 下表总结了在每个间隔/条件/配方设定的样品的数量(初始间隔样品储存在 -20°C 条件下)

稳定性区间	5°C 直立方向	25°C 直立方向	37°C 直立方向
初始	6		
4 小时	2	2	2
8 小时	2	2	2
24 小时	2	2	--
48 小时	2	2	--
[0194] 1 周	2	2	--
2 周	2	2	--
3 个月	2	2	--
6 个月	2	2	--
9 个月	2	2	--
12 个月	2	2	--
保留	2	2	0
总计	28	22	4

[0195] 稳定性拉动和测试方案

[0196] 按照指定的时间间隔和条件对设定的样品进行测试,以便评估伊美司他+rHuPH20的共同配方的相容性和稳定性(参见下表)。测试方法包含评估外观、pH、寡聚物浓度(UV)、通过HPLC的纯度、通过LC/MS的测定、rHuPH20酶活性和通过TRAP测定的伊美司他的端粒酶活性(Mender和Shay,《生物学方案(Bio Protoc.)》,2015:5(22))。

稳定性区间	5°C 直立方向	25°C 直立方向	37°C 直立方向
初始	ABC		
4 小时	NA	NA	A
8 小时	A	A	AB
24 小时	A	A	NA
[0197] 48 小时	A	A	NA
1 周	A	A	NA
2 周	AB	AB	NA
3 个月	R	R	NA
6 个月	R	R	NA
9 个月	R	R	NA
12 个月	R	R	NA

[0198] 对于条件A、D和F, $T=0$ 的样品的一个等分试样将在收集后通过TRAP测定进行评估;第二份等分试样与来自其他条件和/或时间点的样本一起保留,以用于将来可能的分析。A=外观、pH、寡聚物浓度(UV)、RP-HPLC、rHuPH20的酶活性测定

[0199] B=LC/MS

[0200] C=伊美司他的端粒酶活性 (TRAP) 测定

[0201] R=根据需要测试的样品

[0202] 为了测试rHuPH20与伊美司他混合时是否对伊美司他端粒酶抑制活性具有任何影响,在TRAP (端粒酶重复扩增方案) 测定中测试了如在上表样品配方中所示的三种配方A、D和F,即单独的伊美司他钠 (配方A) 或与rHuPH20共混合的伊美司他钠 (配方D和F) 的伊美司他活性。简而言之,癌细胞系He1a细胞在体外用七 (7) 种不同浓度 (0.1、1、5、7.5、10、25和50 μM) 的每种测试配方和一 (1) 种非药物对照以一式三份处理24小时。裂解细胞沉淀用于蛋白质提取和定量,并且通过TRAP测定测试来自用每种浓度的配方处理的细胞的相同量的蛋白质。每个定量聚合酶链式反应 (qPCR) 结果的相对端粒酶活性 (RTA) 由标准曲线确定,该标准曲线由来自未处理的He1a细胞的蛋白质裂解物的系列稀释液的TRAP测定产生。对于每个浓度的给定配方,计算来自复制品的平均RTA,并与非药物对照的平均RTA值进行比较,以产生端粒酶活性抑制的百分比 (%),并且针对处理浓度绘图,以确定每个配方实现50%端粒酶活性抑制 (IC_{50} 值) 的药物浓度。图2中的结果显示,所有3种配方的 IC_{50} 值非常相似并且接近于1 (10 μM) 的对数值,表明伊美司他钠与rHuPH20的共混合不影响伊美司他的端粒酶抑制活性。

[0203] 实例3-伊美司他和rHuPH20的配方中rHuPH20活性的测定

[0204] 概述

[0205] 在作为上述实例2中所述的主要相容性和稳定性研究的预先研究而进行的额外可行性测试中,测试了具有与rHuPH20共混合的伊美司他的配方的rHuPH20活性。提供了来自基于rHuPH20与生物素化的透明质酸 (HA) 的反应的测定结果,并证明在共混合的样品中存在伊美司他的情况下可以测量rHuPH20活性。

[0206] 结果

[0207] 生物素化的透明质酸用于确定在存在和不存在伊美司他的情况下rHuPH20的活性。用生物素化的透明质酸测定在盐水中含有2000U/mL的rHuPH20的组合物,以测量rHuPH20对透明质酸的降解水平,并且与含有100mg/mL伊美司他和2000U/mL rHuPH20的组合物进行比较。在每个伊美司他+rHuPH20组合物的样品中检测到的rHuPH20活性接近基于在单独的rHuPH20样品中观察到的活性的量 (下表)。

[0208]	在测定中的靶标 U/mL	在盐水中的 2000 U/mL rHuPH20		具有 2000 U/mL rHuPH20 的 100 mg/mL 伊美司他	
		功效 (U/mL)	恢复% (2000 U/mL)	功效 (U/mL)	恢复% (2000 U/mL)
	1	1526	76%	1022	51%
	0.33	1860	93%	2394	120%
	0.11	2124	106%	2916	146%
[0209]	0.037	1944	97%	2592	130%
	0.012	2268	113%	3078	154%
	0.004	3402	170%	3402	170%

[0210] 实例4-在大鼠中,在含或不含rHuPH20的伊美司他的单剂量皮下生物利用度和局部耐受性研究

[0211] 目的

[0212] 本研究的目的是评估在大鼠中在单独的单次皮下 (SC) 注射或与rHuPH20 (一种与伊美司他共同配制的重组人透明质酸酶产品) 联合注射后伊美司他的全身性吸收 (根据血浆水平) 和局部 (注射部位) 耐受性。伊美司他的皮下生物利用度通过包含一组接受IV剂量的该测试制品来确定。该研究被设计成证明与rHuPH20共同配制的伊美司他是可耐受的, 并提供了伊美司他的药代动力学概况, 表明了与rHuPH20共同配制的伊美司他的临床应用, 以经由皮下施用途径递送含有足够剂量的伊美司他的所需液体体积。

[0213] 动物

[0214] Sprague-Dawley大鼠, 每只在研究开始时具有标准年龄。

[0215] 测试制品

[0216] 在有rHuPH20和没有rHuPH20的情况下测试伊美司他。

[0217] 研究设计/给药

[0218] 在第1天通过缓慢推注静脉注射 (组1) 或SC注射 (组2) 以单剂量给予伊美司他。与rHuPH20共同配制的伊美司他在第1天通过SC注射以单剂量给予 (组3a和3b)。用于伊美司他的媒介物在不同的SC部位 (对照注射部位) 同时给予组2动物。同样, 将与rHuPH20共同配制的伊美司他的媒介物在单独的对照注射部位给予组3a和3b的动物。

[0219] 组分配在下表中示出。

组编号	途径	剂量		溶液浓度		给药体积	
		伊美司他 (mg/kg)	伊美司他 (mg/mL)	rHuPH20 (单位/mL)	伊美司他 (mL/kg)	媒介物对照注射 (mL)	
[0220] 1	IV	20-30	15	-	1.3-2	N/A	
2	SC	20-30	100	-	0.2-0.3	与测试制品的体积相同*	
3a	SC	20-30	3	2000	6.6-10	与测试制品的体积相同**	
3b	SC	20-30	100	2000	0.2-0.3		

[0221] SC: 皮下

[0222] *: 用于伊美司他的媒介物对照制品, 其在不同于伊美司他剂量的SC部位给予 (与单独的伊美司他的剂量体积相同)

[0223] **: 用于伊美司他/rHuPH20共同配方的媒介物对照制品, 其在不同于伊美司他/rHuPH20共同配方给药的SC部位给予。

[0224] 观察结果和样品收集

[0225] 临床观察结果: 研究观察结果包含标准临床观察结果、局部注射部位评估、食物消耗和体重。

[0226] PK样品:

[0227] 在给药后5分钟至8小时的不同时间, 在含K₂EDTA的管中从所有动物收集血液样品。在冷藏条件下将样品加工成血浆, 并且所得的血浆深度冷冻储存。

[0228] PK样本生物分析和数据解释:

[0229] 使用经验证的杂交ELISA方法分析大鼠血浆样品的伊美司他浓度。在适当情况下, 计算血浆中的伊美司他的PK参数, 如AUC_{0-t}、AUC_{0-inf}、C_{max}、T_{max}、K_{el}、CL、V_d和t_{1/2}。

[0230] 实例5-猴子中的单剂量皮下药代动力学和局部耐受性研究

[0231] 目的

[0232] 本研究的目的是评估在食蟹猴中在单独的单次皮下注射或与rHuPH20(一种重组人透明质酸酶产品,其与伊美司他共同配制)联合后伊美司他的全身性吸收(根据血浆水平)和局部(注射部位)耐受性。该研究被设计成证明与rHuPH20共同配制的伊美司他是可耐受的,并提供了伊美司他的药代动力学概况,表明了与rHuPH20共同配制的伊美司他的临床应用,以经由皮下施用途径递送含有足够剂量的伊美司他的所需液体体积。

[0233] 动物

[0234] 研究开始时的标准年龄和体重的食蟹猴。

[0235] 测试制品

[0236] 在有rHuPH20和没有rHuPH20的情况下测试伊美司他。

[0237] 研究设计/给药

[0238] 在第1天通过SC注射以单剂量给予伊美司他(组1),并且在第1天通过皮下注射以单剂量给予与rHuPH20共同配制的伊美司他(组2)。用于伊美司他的媒介物在不同的皮下部位(对照注射部位)同时给予组1的动物。同样,用于伊美司他和rHuPH20的共同配方的媒介物在单独的对照部位给予组2的动物。

[0239] 组分配在下表中示出。

[0240]	组编号	途径	剂量	溶液浓度		给药体积	
			伊美司他 (mg/kg)	伊美司他 (mg/mL)	rHuPH20(单 位/mL)	伊美司他 (mL/kg)	媒介物对照注 射(mL)
[0241]	1	SC	15	100	-	0.15	与测试制品的 体积相同*
	2	SC	15	100	2000	0.15	与测试制品的 体积相同**

[0242] SC:皮下

[0243] *:用于伊美司他的媒介物对照制品,其在不同于媒介物给药的SC部位给予。

[0244] **:用于伊美司他/rHuPH20共同配方的媒介物对照制品,其在不同于伊美司他/rHuPH20共同配方给药的SC部位给予。

[0245] 观察结果和样品收集

[0246] 临床观察结果:

[0247] 研究观察结果包含标准临床观察结果、局部注射部位评估(包含组织病理学检查)、食物消耗和体重。

[0248] PK样品:

[0249] 在给药后5分钟至24小时的不同时间,在含K₂EDTA的管中从所有动物收集血液样品。在冷藏条件下将样品加工成血浆,并且所得的血浆深度冷冻储存。

[0250] PK样本生物分析和数据解释:

[0251] 使用经验证的杂交ELISA方法分析猴子血浆样品的伊美司他浓度。在适当情况下,计算血浆中的伊美司他的PK参数,如AUC_{0-t}、AUC_{0-inf}、C_{max}、T_{max}、K_{el}、CL、V_d和t_{1/2}。

[0252] 实例6-健康志愿者或患者的安全性和药代动力学研究

[0253] 目的

[0254] 本研究的目的是评估在皮下(SC)和静脉内(IV)施用后的安全性、耐受性和药代动力学。该研究被设计成证明,伊美司他与rHuPH20的共同配方,提供含有足够剂量的伊美司

他的必要液体体积的皮下递送,以证明经由皮下施用途径伊美司他的可接受安全性、耐受性和药代动力学概况。

[0255] 研究设计的总结

[0256] 这项研究分两部分进行。部分1是皮下施用伊美司他的剂量递增阶段。在部分1中,计划了高达约4个群组。受试者仅参与1个群组。在每个群组中,受试者在第1天接受单一皮下剂量的伊美司他。部分2是开放的标签,随机,2治疗,交叉或平行研究设计。部分2的剂量是在审查来自部分1的安全性和药代动力学数据后选择的。

[0257] 如果部分2是交叉设计,则在第1期和第2期的第1天,按照随机时间表交替皮下或静脉给药伊美司他,然后进行药代动力学采样持续48小时。在交叉设计的部分2中,在伊美司他剂量之间存在经计划的洗脱期。如果部分2为平行设计,则患者被随机化以在第1天接受皮下或静脉剂量的伊美司他,然后进行药代动力学采样持续48小时。

[0258] 剂量、剂型、途径和剂量方案

[0259] 皮下伊美司他与透明质酸酶 (rHuPH20) 在适当的媒介物中被配制成共混合物。IV伊美司他不含透明质酸酶,并且被配制在0.9%氯化钠中。

[0260] 部分1:

[0261] 在部分1中施用单次皮下剂量。基于对来自大鼠和猴子中的临床前药代动力学和局部耐受性研究的安全性和药代动力学数据的审查,选择群组剂量。

[0262] 部分2:

[0263] 受试者以下列顺序之一皮下或IV施用伊美司他:

[0264] 序列A(交叉设计):在第1天皮下单次皮下剂量的伊美司他,然后在适当的洗脱期后单次IV剂量的伊美司他;或者

[0265] 序列B(交叉设计):在第1天单次IV剂量的伊美司他,然后在适当的洗脱期后单次SC剂量的伊美司他;或者

[0266] 序列C(平行设计):在第1天向一个群组的受试者施用单次皮下剂量的伊美司他,并在第1天向另一群组的受试者施用单次IV剂量的伊美司他。

[0267] 皮下剂量是在一个部位作为单次注射给予的,并且IV剂量是作为2小时注射给予的。

[0268] 评估

[0269] 药代动力学:

[0270] 在给药前以及皮下给药后或开始输注后0.5至48小时的不同时间采集用于血浆浓度的伊美司他的血液样品。

[0271] 在适当的情况下,计算了血浆中伊美司他的下列PK参数: AUC_{0-t} 、 AUC_{0-inf} 、 $AUC\%_{extrap}$ 、 C_{max} 、 T_{max} 、 K_{el} 、 C_L 、 $C_{L/F}$ 和 $t_{1/2}$ 。

[0272] 安全性:

[0273] 通过标准程序(其可以包含心电图(ECG)、体格检查、生命体征测量、临床实验室测试和AE)监测安全性和耐受性的评估。可以计算被认为临床上适当的汇总统计数据。

[0274] 尽管为了清楚理解的目的,已经通过说明和实例的方式对前述发明进行了一些详细描述,但是根据本发明的教导,对于本领域普通技术人员来说显而易见的是,在不脱离所附权利要求的精神或范围的情况下,可以对其进行某些改变和修改。

[0275] 因此,前面仅仅说明了本发明的原理。因此将理解,所属领域的技术人员将能够设计各种布置,所述布置虽然没有在本文中明确地描述或示出,但体现本发明的原理并且被包含在其精神和范围内。此外,本文中叙述的所有实例和条件语言主要旨在帮助读者理解本发明的原理和由发明人为促进本领域所贡献的概念,并且应被解释为不限于这些专门叙述的实例和条件。此外,本文叙述本发明的原理、方面和实施例及其具体实例的所有陈述旨在涵盖其结构等同物和功能等同物两者。此外,旨在是此类等同物包含当前已知的等同物和将来开发的等同物两者,即开发的执行相同功能的任何要素,而不管结构如何。此外,本文中所公开的任何内容均不希望奉献给公众,无论权利要求书中是否明确地陈述此公开。

[0276] 因此,本发明的范围并不旨在局限于本文所示和所述的示例性实施例。而是,本发明的范围和精神由所附权利要求体现。在权利要求中,35U.S.C. §112 (f) 或35U.S.C. §112 (6) 被明确定义为仅当在权利要求中的这种特征的开头引用确切短语“用于……的装置”或确切短语“用于……的步骤”时,才被援引用于该权利要求中的特征;如果在权利要求的特征中没有使用这种确切的短语,则不援引35U.S.C. §112 (f) 或35U.S.C. §112 (6)。

[0277] 本发明的其他实施例可以包含:

[0278] 1. 一种配制成用于皮下施用的组合物,所述组合物包括:

[0279] 端粒酶抑制剂,其包括寡核苷酸和连接到寡核苷酸的5'端和/或3'端的脂质部分;
和

[0280] 透明质酸酶。

[0281] 2. 根据段落1所述的组合物,其中所述透明质酸酶是重组人透明质酸酶。

[0282] 3. 根据段落2所述的组合物,其中所述透明质酸酶是rHuPH20。

[0283] 4. 根据段落1所述的组合物,其中所述组合物包括PH20透明质酸酶的变体或片段。

[0284] 5. 根据段落4所述的组合物,其中PH20的变体或片段包括一个或多个氨基酸残基取代,所述氨基酸残基取代选自具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的野生型PH20中的T341A、T341C、T341G、S343E、M345T、K349E、L353A、L354I、N356E和I361T组成的组。

[0285] 6. 根据段落5所述的组合物,其中PH20的变体或片段包括一个或多个选自T341A、T341C、L354I和N356E组成的组的氨基酸残基取代。

[0286] 7. 根据段落4所述的组合物,其中PH20的变体或片段在对应于具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的野生型PH20中的 α -螺旋区域或接头区域的区域中包括一个或多个氨基酸残基取代。

[0287] 8. 根据段落7所述的组合物,其中 α -螺旋区域是包括氨基酸残基S347至C381的 α -螺旋8区,并且接头区域是包括 α -螺旋7和 α -螺旋8之间的氨基酸残基A333至R346的接头区域。

[0288] 9. 根据段落7所述的组合物,其中 α -螺旋区域和接头区域包括氨基酸残基T341至N363、T341至I361、L342至I361、S343至I361、I344至I361、M345至I361或M345至N363。

[0289] 10. 根据段落7所述的组合物,其中 α -螺旋8区和 α -螺旋7与 α -螺旋8之间的接头区域被Hyal1的相应区域的一个或多个氨基酸残基取代。

[0290] 11. 根据段落4所述的组合物,其中PH20的变体或片段在选自T341、L342、S343、I344、M345、S347、M348、K349、L352、L353、D355、E359、I361和N363组成的组的一个或多个位置处包括一个或多个氨基酸残基取代。

[0291] 12. 根据段落11所述的组合物,其中PH20的变体或片段包括以下的氨基酸残基取代:

[0292] L354I和N356E中的一种或多种;和

[0293] 选自由T341A、T341C、T341D、T341G、T341S、L342W、S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、D355K、E359D、I361T和N363G组成的组的一个或多个氨基酸残基取代。

[0294] 13. 根据段落12所述的组合物,其中PH20的变体或片段包括

[0295] (i) 取代M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D和I361T;

[0296] (ii) 取代T341A、T341C、T341D、T341G、T341S、L342W、S343E、I344N和N363G;或者

[0297] (iii) 选自下列氨基酸残基取代组的任何一种氨基酸残基取代:

[0298] (a) T341S、L342W、S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D和I361T;

[0299] (b) L342W、S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D和I361T;

[0300] (c) M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D、I361T和N363G;

[0301] (d) T341G、L342W、S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D和I361T;

[0302] (e) T341A、L342W、S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D和I361T;

[0303] (f) T341C、L342W、S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D和I361T;

[0304] (g) T341D、L342W、S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D和I361T;

[0305] (h) I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D和I361T;和

[0306] (i) S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D和I361T。

[0307] 14. 根据段落4至13中任一者所述的组合物,其中PH20的变体或片段的N末端氨基酸残基或C末端氨基酸残基中的一个或多个被缺失。

[0308] 15. 根据段落14所述的组合物,其中所述切割

[0309] (i) 被定位在N末端处选自由M1至P42组成的组的氨基酸残基之前,使得在N末端处的一个或多个残基被缺失;

[0310] (ii) 被定位在N末端处的氨基酸残基L36、N37、F38、R39、A40、P41或P42之前,使得在N末端处的一个或多个残基被缺失;

[0311] (iii) 被定位在C末端处选自由V455至L509组成的组的氨基酸残基之后,使得在C末端处的一个或多个氨基酸残基被缺失;或者

[0312] (iv) 被定位在C末端处选自V455、C458、D461、C464、I465、D466、A467、F468、K470、

P471、P472、M473、E474、T475、E476、E477、P478、Q479、I480、F481、Y482、N483、A484、P486、T488或S490的氨基酸残基之后,使得在C末端处的一个或多个氨基酸残基被缺失;

[0313] 16. 根据段落4至15中任一者所述的组合物,其中N末端包括具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列MATGSRTSLLAFGLLCLPWLQEGSA的人生长激素衍生的信号肽,具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列MKWVTFISLLFLFSSAYS的人血清白蛋白衍生的信号肽,或具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列MAAHLLPICALFLTLLDMAQG的人Hya11衍生的信号肽。

[0314] 22. 根据段落4至21中任一者所述的组合物,其中PH20的变体或片段

[0315] (i) 是与如SEQ ID NO:1所列出的氨基酸的序列或SEQ ID NO:1的氨基酸残基36-482、36-477、366-478、36-479、36-480、36-481和36-483具有至少90%序列同一性的肽;

[0316] (ii) 是与如SEQ ID NO:1所列出的氨基酸的序列或SEQ ID NO:1的氨基酸残基36-482、36-477、366-478、36-479、36-480、36-481和36-483具有至少95%序列同一性的肽;

[0317] (iii) 由选自SEQ ID NOs:60至115的氨基酸序列组成;

[0318] (iv) 具有SEQ ID NO:99的氨基酸序列。

[0319] 23. 根据段落1至22中任一者所述的组合物,其中所述透明质酸酶以100U至50,000U的量存在于所述组合物中。

[0320] 24. 根据段落1至23中任一者所述的组合物,其中所述透明质酸酶以100U/mL至50,000U/mL的量存在于所述组合物中。

[0321] 25. 根据段落1至24中任一项所述的组合物,其中所述组合物进一步包括一种或多种药学上可接受的赋形剂。

[0322] 26. 根据段落1至25中任一者所述的组合物,其中所述组合物进一步包括一种或多种糖。

[0323] 27. 根据段落26所述的组合物,其中一种或多种糖包括单糖。

[0324] 28. 根据段落26至27中任一者所述的组合物,其中一种或多种糖包括多糖。

[0325] 29. 根据段落28所述的组合物,其中所述一种或多种多糖选自由海藻糖和蔗糖组成的组。

[0326] 30. 根据段落26至29中任一者所述的组合物,其中所述一种或多种糖以10mM至500mM的量存在于组合物中。

[0327] 31. 根据段落1至30中任一者所述的组合物,其中所述组合物进一步包括一种或多种氨基酸。

[0328] 32. 根据段落31所述的组合物,其中氨基酸选自甲硫氨酸和组氨酸。

[0329] 33. 根据段落31至32中任一者所述的组合物,其中所述一种或多种氨基酸以1mM至100mM的量,任选地以1mM至50mM的量存在于组合物中。

[0330] 34. 根据段落1至33中任一者所述的组合物,其中所述组合物进一步包括缓冲液。

[0331] 35. 根据段落34所述的组合物,其中所述缓冲液以足以将所述组合物维持在3.0至9.0的pH的量存在于所述组合物中,任选地以足以将所述组合物维持在5.5至7.5的pH的量存在于所述组合物中。

[0332] 36. 根据段落34至35中任一项所述的组合物,其中所述缓冲液以1至100mM的量,任选地以1mM至50mM的量存在于所述组合物中。

[0333] 37. 根据段落1至36中任一者所述的组合物,其中所述端粒酶抑制剂的寡核苷酸包

括至少一个N3'→P5'硫代磷酸酯核苷间键。

[0334] 38. 根据段落1至37中任一项所述的组合物,其中所述端粒酶抑制剂的脂质部分经由接头连接到所述寡核苷酸的5'端和/或3'端,任选地,其中所述接头是甘油或氨基甘油接头。

[0335] 39. 根据段落1至38中任一者所述的组合物,其中端粒酶抑制剂的脂质部分是棕榈酰(C16)部分。

[0336] 40. 根据段落1至39中任一项所述的组合物,其中所述端粒酶抑制剂是伊美司他或其药学上可接受的盐,任选地其中所述端粒酶抑制剂是伊美司他钠。

[0337] 41. 根据段落1至40中任一者所述的组合物,其中端粒酶抑制剂以以下剂量存在于组合物中:

[0338] (i) 约2.0mg/kg至20.0mg/kg;

[0339] (ii) 约3mg/kg至约15mg/kg;

[0340] (iii) 约9mg/kg至约11mg/kg;或者

[0341] (iv) 约11mg/kg至约14mg/kg。

[0342] 42. 根据段落1至41所述的组合物,其中所述组合物是冻干的。

[0343] 43. 一种治疗患有肿瘤的受试者的方法,所示方法包括向所述受试者皮下施用组合物,所述组合物包括:

[0344] 端粒酶抑制剂,其包括寡核苷酸和连接到寡核苷酸的5'端和/或3'端的脂质部分;
和

[0345] 透明质酸酶。

[0346] 44. 根据段落43所述的方法,其中所述肿瘤是选自骨髓纤维化(MF)、骨髓增生异常综合征(MDS)、原发性血小板增多症(ET)、真性红细胞增多症(PV)、慢性髓性白血病(CML)、慢性嗜中性粒细胞白血病、慢性嗜酸性粒细胞白血病和急性髓性白血病(AML)的血液肿瘤。

[0347] 45. 根据段落43至44中任一者所述的方法,其进一步包括将受试者诊断为患有血液肿瘤。

[0348] 46. 根据段落43至45中任一者所述的方法,其中所述组合物被皮下施用于所述受试者

[0349] (i) 每隔一天一次;

[0350] (ii) 每7天一次;

[0351] (iii) 每21天一次;或

[0352] (iv) 每28天一次。

[0353] 47. 根据段落43至46中任一者所述的方法,其中所述方法重复1次或更多次,任选地5次或更多次。

[0354] 48. 根据段落43至47中任一者所述的方法,其中所述端粒酶抑制剂以以下剂量被施用于所述受试者:

[0355] (i) 约2.0mg/kg至20.0mg/kg;

[0356] (ii) 约3mg/kg至约15mg/kg;

[0357] (iii) 约9mg/kg至约11mg/kg;或者

[0358] (iv) 约11mg/kg至约14mg/kg。

[0359] 49. 根据段落43至48中任一者所述的方法,其中所述透明质酸酶是重组人透明质酸酶,任选地是rHuPH20。

[0360] 50. 根据段落43至48中任一者所述的方法,其中所述组合物包括PH20透明质酸酶的变体或片段。

[0361] 51. 根据段落50所述的方法,其中所述PH20的变体或片段包括选自由具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的野生型PH20中的T341A、T341C、T341G、S343E、M345T、K349E、L353A、L354I、N356E和I361T组成的组的一个或多个氨基酸残基取代,任选地,其中PH20的变体或片段包括选自由T341A、T341C、L354I和N356E组成的组的一个或多个氨基酸残基取代。

[0362] 52. 根据段落50所述的方法,其中PH20的变体或片段在对应于具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的野生型PH20中的 α -螺旋区或接头区域的区域中包括一个或多个氨基酸残基取代。

[0363] 53. 根据段落52所述的方法,其中

[0364] (i) α -螺旋区域是包括氨基酸残基S347至C381的 α -螺旋8区域,并且接头区域是包括 α -螺旋7和 α -螺旋8之间的氨基酸残基A333至R346的接头区域;

[0365] (ii) α -螺旋区域和接头区域包括氨基酸残基T341至N363、T341至I361、L342至I361、S343至I361、I344至I361、M345至I361或M345至N363;或者

[0366] (iii) α -螺旋8区域和 α -螺旋7与 α -螺旋8之间的接头区域被Hyal1的相应区域的一个或多个氨基酸残基取代。

[0367] 54. 根据段落50所述的方法,其中PH20的变体或片段在选自由T341、L342、S343、I344、M345、S347、M348、K349、L352、L353、D355、E359、I361和N363组成的组的一个或多个位置处包括一个或多个氨基酸残基取代。

[0368] 55. 根据段落54所述的方法,其中PH20的变体或片段包括以下氨基酸残基取代:

[0369] L354I和N356E中的一种或多种;和

[0370] 选自由T341A、T341C、T341D、T341G、T341S、L342W、S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、D355K、E359D、I361T和N363G组成的组的一个或多个氨基酸残基取代,

[0371] 任选地,其中PH20的变体或片段包括取代M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D和I361T。

[0372] 56. 根据段落55所述的方法,其中PH20的变体或片段包括

[0373] (i) 取代T341A、T341C、T341D、T341G、T341S、L342W、S343E、I344N和N363G;或者

[0374] (ii) 选自下列氨基酸残基取代组的任何一种氨基酸残基取代:

[0375] (a) T341S、L342W、S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D和I361T;

[0376] (b) L342W、S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D和I361T;

[0377] (c) M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D、I361T和N363G;

[0378] (d) T341G、L342W、S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D和I361T;

[0379] (e) T341A、L342W、S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D和I361T;

[0380] (f) T341C、L342W、S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D和I361T;

[0381] (g) T341D、L342W、S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D和I361T;

[0382] (h) I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D和I361T;和

[0383] (i) S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D和I361T。

[0384] 57. 根据段落50至56中任一者所述的方法,其中PH20的变体或片段的N末端氨基酸残基或C末端氨基酸残基中的一个或多个被缺失。

[0385] 58. 根据段落57所述的方法,其中切割被定位

[0386] (i) 在N末端处选自由M1至P42组成的组的氨基酸残基之前,使得在N末端处的一个或多个残基被缺失;

[0387] (ii) 在N末端处的氨基酸残基L36、N37、F38、R39、A40、P41或P42之前,使得在N末端处的一个或多个残基被缺失;

[0388] (iii) 定位在C末端处选自由V455至L509组成的组的氨基酸残基之后,使得在C末端处的一个或多个氨基酸残基被缺失;或者

[0389] (iv) 在C末端处选自V455、C458、D461、C464、I465、D466、A467、F468、K470、P471、P472、M473、E474、T475、E476、E477、P478、Q479、I480、F481、Y482、N483、A484、P486、T488或S490的氨基酸残基之后,使得在C末端处的一个或多个氨基酸残基被缺失。

[0390] 59. 根据段落50至58中任一者所述的方法,其中N末端包括具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列MATGSRTSLLLAFGLLCLPWLQEGSA的人生长激素衍生的信号肽,具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列MKWVTFISLLFLFSSAYS的人血清白蛋白衍生的信号肽,或具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列MAAHLLPICALFLTLLDMAQG的人Hya11衍生的信号肽。

[0391] 60. 根据段落50至59中任一者所述的方法,其中PH20的变体或片段

[0392] (i) 是与如SEQ ID NO:1所列出的氨基酸的序列或SEQ ID NO:1的氨基酸残基36-482、36-477、366-478、36-479、36-480、36-481和36-483具有至少90%序列同一性的肽;

[0393] (ii) 是与如SEQ ID NO:1所列出的氨基酸的序列或SEQ ID NO:1的氨基酸残基36-482、36-477、366-478、36-479、36-480、36-481和36-483具有至少95%序列同一性的肽;

[0394] (iii) 由选自SEQ ID NOs:60至115的氨基酸序列组成;或者

[0395] (iv) 具有SEQ ID NO:99的氨基酸序列。

[0396] 61. 根据段落43至60中任一者所述的方法,其中所述透明质酸酶以100U至50,000U的量存在于所述组合物中。

[0397] 62. 根据段落43至61中任一者所述的方法,其中所述透明质酸酶以100U/mL至50,000U/mL的量存在于所述组合物中。

[0398] 63. 根据段落43至62中任一者所述的方法,其中所述组合物进一步包括一种或多种药学上可接受的赋形剂。

- [0399] 64. 根据段落43至63中任一者所述的方法,其中所述组合物进一步包括一种或多种糖。
- [0400] 65. 根据段落64所述的方法,其中一种或多种糖包括单糖。
- [0401] 66. 根据段落64至65中任一者所述的方法,其中一种或多种糖包括多糖。
- [0402] 67. 根据段落66所述的方法,其中所述一种或多种多糖选自由海藻糖和蔗糖组成的组。
- [0403] 68. 根据段落64至67中任一者所述的方法,其中所述一种或多种糖以10mM至500mM的量,任选地以100mM至300mM的量存在于组合物中。
- [0404] 69. 根据段落43至68中任一者所述的方法,其中所述组合物进一步包括一种或多种氨基酸。
- [0405] 70. 根据段落69所述的方法,其中氨基酸选自甲硫氨酸和组氨酸。
- [0406] 71. 根据段落69至70中任一者所述的方法,其中所述一种或多种氨基酸以1mM至100mM的量,任选地以1mM至50mM的量存在于组合物中。
- [0407] 72. 根据段落43至71中任一者所述的方法,其中所述组合物进一步包括缓冲液。
- [0408] 73. 根据段落72所述的方法,其中所述缓冲液以足以将所述组合物维持在3.0至9.0的pH的量存在于所述组合物中,任选地以足以将所述组合物维持在5.5至7.5的pH的量存在于所述组合物中。
- [0409] 74. 根据段落72至73中任一者所述的方法,其中所述缓冲液以1至100mM的量,任选地以1mM至50mM的量存在于所述组合物中。
- [0410] 75. 根据段落72至74中任一者所述的方法,其中缓冲液包括组氨酸。
- [0411] 76. 根据段落43至75中任一者所述的方法,其中所述端粒酶抑制剂的寡核苷酸包括至少一个N3'→P5'硫代磷酸酯核苷间键。
- [0412] 77. 根据段落43至76中任一者所述的方法,其中所述端粒酶抑制剂的脂质部分经由接头连接到所述寡核苷酸的5'端和/或3'端。
- [0413] 78. 根据段落77所述的方法,其中接头是甘油或氨基甘油接头。
- [0414] 79. 根据段落43至78中任一者所述的方法,其中端粒酶抑制剂的脂质部分是棕榈酰(C16)部分。
- [0415] 80. 根据段落43至79和158中任一者所述的方法,其中所述端粒酶抑制剂是伊美司他或其药学上可接受的盐,任选地伊美司他钠。
- [0416] 81. 一种单位剂型,其包括透明质酸酶和端粒酶抑制剂,所述端粒酶抑制剂包括寡核苷酸和与所述寡核苷酸的5'端和/或3'端连接的脂质部分。
- [0417] 82. 根据段落81所述的单位剂型,其中透明质酸酶是重组人透明质酸酶。
- [0418] 83. 根据段落82所述的单位剂型,其中透明质酸酶是rHuPH20。
- [0419] 84. 根据段落83所述的单位剂型,其中所述组合物包括PH20透明质酸酶的变体或片段。
- [0420] 85. 根据段落84所述的单位剂型,其中PH20的变体或片段包括
- [0421] (i) 在具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的野生型PH20中选自由T341A、T341C、T341G、S343E、M345T、K349E、L353A、L354I、N356E和I361T组成的组的一个或多个氨基酸残基取代;

- [0422] (ii) 选自由T341A、T341C、L354I和N356E组成的组的一个或多个氨基酸残基取代；或者
- [0423] (iii) 对应于具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的野生型PH20中 α -螺旋区域或接头区域的区域中的一个或多个氨基酸残基取代。
- [0424] 86. 根据段落85所述的单位剂型，其中所述 α -螺旋区域是包括氨基酸残基S347至C381的 α -螺旋8区域，并且所述接头区域是包括在 α -螺旋7和 α -螺旋8之间的氨基酸残基A333至R346的接头区域。
- [0425] 87. 根据段落85所述的单位剂型，其中 α -螺旋区域和接头区域包括氨基酸残基T341至N363、T341至I361、L342至I361、S343至I361、I344至I361、M345至I361或M345至N363。
- [0426] 88. 根据段落86所述的单位剂型，其中 α -螺旋8区域和 α -螺旋7与 α -螺旋8之间的接头区域被Hya11的相应区域的一个或多个氨基酸残基取代。
- [0427] 89. 根据段落84所述的单位剂型，其中PH20的变体或片段包括
- [0428] (i) 在选自由T341、L342、S343、I344、M345、S347、M348、K349、L352、L353、D355、E359、I361和N363组成的组的一个或多个位置处的一个或多个氨基酸残基取代；
- [0429] (ii) 以下的氨基酸残基取代：
- [0430] L354I和N356E中的一种或多种；和
- [0431] 选自由T341A、T341C、T341D、T341G、T341S、L342W、S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、D355K、E359D、I361T和N363G组成的组的一个或多个氨基酸残基取代，任选地，其中PH20的变体或片段包括取代M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D和I361T；
- [0432] (iii) 取代T341A、T341C、T341D、T341G、T341S、L342W、S343E、I344N和N363G；或者
- [0433] (iv) 选自下列氨基酸残基取代组的任何一种氨基酸残基取代：
- [0434] (a) T341S、L342W、S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D和I361T；
- [0435] (b) L342W、S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D和I361T；
- [0436] (c) M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D、I361T和N363G；
- [0437] (d) T341G、L342W、S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D和I361T；
- [0438] (e) T341A、L342W、S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D和I361T；
- [0439] (f) T341C、L342W、S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D和I361T；
- [0440] (g) T341D、L342W、S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D和I361T；
- [0441] (h) I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D和I361T；和

[0442] (i) S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D和I361T。

[0443] 90. 根据段落84至89中任一者所述的单位剂型,其中PH20的变体或片段的N末端氨基酸残基或C末端氨基酸残基中的一个或多个被缺失。

[0444] 91. 根据段落90所述的单位剂型,其中切割被定位

[0445] (i) 在N末端处选自由M1至P42组成的组的氨基酸残基之前,使得在N末端处的一个或多个残基被缺失;

[0446] (ii) 在N末端处的氨基酸残基L36、N37、F38、R39、A40、P41或P42之前,使得在N末端处的一个或多个残基被缺失;

[0447] (iii) 在C末端处选自由V455至L509组成的组的氨基酸残基之后,使得在C末端处的一个或多个氨基酸残基被缺失;

[0448] (iv) 在C末端处选自由V455、C458、D461、C464、I465、D466、A467、F468、K470、P471、P472、M473、E474、T475、E476、E477、P478、Q479、I480、F481、Y482、N483、A484、P486、T488或S490的氨基酸残基之后,使得在C末端处的一个或多个氨基酸残基被缺失。

[0449] 92. 根据段落84至91中任一者所述的单位剂型,其中N末端包括具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列MATGSRTSLLLAFGLLCLPWLQEGSA的人生长激素衍生的信号肽,具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列MKVWTFISLLFLFSSAYS的人血清白蛋白衍生的信号肽,或具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列MAAHLIPICALFLTLLDMAQG的人Hyal1衍生的信号肽。

[0450] 93. 根据段落84至92中任一者所述的单位剂型,其中PH20的变体或片段

[0451] (i) 是与如SEQ ID NO:1所列出的氨基酸的序列或SEQ ID NO:1的氨基酸残基36-482、36-477、366-478、36-479、36-480、36-481和36-483具有至少90%序列同一性的肽;

[0452] (ii) 是与如SEQ ID NO:1所列出的氨基酸的序列或SEQ ID NO:1的氨基酸残基36-482、36-477、366-478、36-479、36-480、36-481和36-483具有至少95%序列同一性的肽;

[0453] (iii) 由选自SEQ ID NOs:60至115的氨基酸序列组成;或者

[0454] (iv) 具有SEQ ID NO:99的氨基酸序列。

[0455] 94. 根据段落81至93中任一者所述的单位剂型,其中所述透明质酸酶以100U至50,000U的量存在于所述组合物中。

[0456] 95. 根据段落81至94中任一者所述的单位剂型,其中所述透明质酸酶以100U/mL至50,000U/mL的量存在于所述组合物中。

[0457] 96. 根据段落81至95中任一者所述的单位剂型,其中所述组合物进一步包括一种或多种药学上可接受的赋形剂。

[0458] 97. 根据段落81至96中任一者所述的单位剂型,其中所述组合物进一步包括一种或多种糖。

[0459] 98. 根据段落97所述的单位剂型,其中一种或多种糖包括单糖。

[0460] 99. 根据段落97至98中任一者所述的单位剂型,其中一种或多种糖包括多糖。

[0461] 100. 根据段落99所述的单位剂型,其中所述一种或多种多糖选自由海藻糖和蔗糖组成的组。

[0462] 101. 根据段落97至100中任一者所述的单位剂型,其中所述一种或多种糖以10mM至500mM的量存在于组合物中。

- [0463] 102. 根据段落81-100中任一者所述的单位剂型,其中所述组合物进一步包括一种或多种氨基酸。
- [0464] 103. 根据段落102所述的单位剂型,其中氨基酸选自甲硫氨酸和组氨酸。
- [0465] 104. 根据段落102至103中任一者所述的单位剂型,其中所述一种或多种氨基酸以1mM至100mM的量,任选地以1mM至50mM的量存在于组合物中。
- [0466] 105. 根据段落81至104中任一者所述的单位剂型,其中所述组合物进一步包括缓冲液。
- [0467] 106. 根据段落105所述的单位剂型,其中所述缓冲液以足以将所述组合物维持在3.0至9.0的pH的量存在于所述组合物中,任选地以足以将所述组合物维持在5.5至7.5的pH的量存在于所述组合物中。
- [0468] 107. 根据段落105至106中任一者所述的单位剂型,其中所述缓冲液以1至100mM的量,任选地以1mM至50mM的量存在于所述组合物中。
- [0469] 108. 根据段落81至107中任一者所述的单位剂型,其中所述端粒酶抑制剂的寡核苷酸包括至少一个N3'→P5'硫代磷酸酯核苷间键。
- [0470] 109. 根据段落81至108中任一者所述的单位剂型,其中所述端粒酶抑制剂的脂质部分经由接头连接到所述寡核苷酸的5'端和/或3'端。
- [0471] 110. 根据段落109所述的单位剂型,其中接头是甘油或氨基甘油接头。
- [0472] 111. 根据段落81至110中任一者所述的单位剂型,其中端粒酶抑制剂的脂质部分是棕榈酰(C16)部分。
- [0473] 112. 根据段落81至111中任一者所述的单位剂型,其中所述端粒酶抑制剂是伊美司他或其药学上可接受的盐,任选地伊美司他钠。
- [0474] 113. 根据段落81至112中任一者所述的单位剂型,其中所述端粒酶抑制剂以以下剂量存在于所述组合物中:
- [0475] (i) 约2.0mg/kg至20.0mg/kg;
- [0476] (ii) 约3mg/kg至约15mg/kg;
- [0477] (iii) 约9mg/kg至约11mg/kg;或者
- [0478] (iv) 约11mg/kg至约14mg/kg。
- [0479] 114. 根据段落81-113所述的单位剂型,其中组合物是液体。
- [0480] 115. 一种试剂盒,其包括:
- [0481] 包括透明质酸酶的组合物,和
- [0482] 包括端粒酶抑制剂的组合物,所述端粒酶抑制剂包括寡核苷酸和与所述寡核苷酸的5'端和/或3'端连接的脂质部分。
- [0483] 116. 根据段落115所述的试剂盒,其进一步包括注射器。
- [0484] 117. 根据段落115至116所述的试剂盒,其中包括端粒酶抑制剂的组合物是冻干的。
- [0485] 118. 根据段落115至117所述的试剂盒,其中该试剂盒进一步包括用于产生重构的液体组合物的缓冲液。
- [0486] 119. 根据段落115至118中任一者所述的试剂盒,其中所述皮下注射器包括针和注射器。

- [0487] 120. 根据段落115至119中任一者所述的试剂盒,其中所述皮下注射器是被配置为皮下递送预定量的组合物的团注射器。
- [0488] 121. 根据段落115至120中任一者所述的试剂盒,其中透明质酸酶是重组人透明质酸酶。
- [0489] 122. 根据段落121所述的试剂盒,其中透明质酸酶是rHuPH20。
- [0490] 123. 根据段落115至121中任一者所述的试剂盒,其中所述组合物包括PH20透明质酸酶的变体或片段。
- [0491] 124. 根据段落123所述的试剂盒,其中PH20的变体或片段包括
- [0492] (i) 在具有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的野生型PH20中选自由T341A、T341C、T341G、S343E、M345T、K349E、L353A、L354I、N356E和I361T组成的组的一个或多个氨基酸残基取代;
- [0493] (ii) 选自由T341A、T341C、L354I和N356E组成的组的一个或多个氨基酸残基取代;
- [0494] (iii) 对应于具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的野生型PH20中 α -螺旋区域或接头区域的区域中的一个或多个氨基酸残基取代。
- [0495] 125. 根据段落124所述的试剂盒,其中所述 α -螺旋区域是包括氨基酸残基S347至C381的 α -螺旋8区域,并且所述接头区域是包括 α -螺旋7和 α -螺旋8之间的氨基酸残基A333至R346的接头区域。
- [0496] 126. 根据段落124所述的试剂盒,其中 α -螺旋区域和接头区域包括氨基酸残基T341至N363、T341至I361、L342至I361、S343至I361、I344至I361、M345至I361或M345至N363。
- [0497] 127. 根据段落124所述的试剂盒,其中 α -螺旋8区域和 α -螺旋7与 α -螺旋8之间的接头区域被Hya11的相应区域的一个或多个氨基酸残基取代。
- [0498] 128. 根据段落123所述的试剂盒,其中PH20的变体或片段在选自由T341、L342、S343、I344、M345、S347、M348、K349、L352、L353、D355、E359、I361和N363组成的组的一个或多个位置处包括一个或多个氨基酸残基取代。
- [0499] 129. 根据段落128所述的试剂盒,其中PH20的变体或片段包括
- [0500] (i) 以下的氨基酸残基取代:
- [0501] L354I和N356E中的一种或多种;和
- [0502] 选自由T341A、T341C、T341D、T341G、T341S、L342W、S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、D355K、E359D、I361T和N363G组成的组的一个或多个氨基酸残基取代;
- [0503] (ii) 取代M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D和I361T;
- [0504] (iii) 取代T341A、T341C、T341D、T341G、T341S、L342W、S343E、I344N和N363G;或者
- [0505] (iv) 选自下列氨基酸残基取代组的任何一种氨基酸残基取代:
- [0506] (a) T341S、L342W、S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D和I361T;
- [0507] (b) L342W、S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D和I361T;

[0508] (c) M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D、I361T和N363G；

[0509] (d) T341G、L342W、S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D和I361T；

[0510] (e) T341A、L342W、S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D和I361T；

[0511] (f) T341C、L342W、S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D和I361T；

[0512] (g) T341D、L342W、S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D和I361T；

[0513] (h) I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D和I361T；和

[0514] (i) S343E、I344N、M345T、S347T、M348K、K349E、L352Q、L353A、L354I、D355K、N356E、E359D和I361T。

[0515] 130. 根据段落123至129中任一者所述的试剂盒，其中PH20的变体或片段的N末端氨基酸残基或C末端氨基酸残基中的一个或多个被缺失。

[0516] 131. 根据段落130所述的试剂盒，其中切割被定位在N末端处选自由M1至P42组成的组的氨基酸残基之前，使得在N末端处的一个或多个残基被缺失。

[0517] 132. 根据段落131所述的试剂盒，其中切割被定位

[0518] (i) 在N末端处的氨基酸残基L36、N37、F38、R39、A40、P41或P42之前，使得在N末端处的一个或多个残基被缺失；

[0519] (ii) 在C末端处选自由V455至L509组成的组的氨基酸残基之后，使得在C末端处的一个或多个氨基酸残基被缺失；或者

[0520] (iii) 在C末端处选自V455、C458、D461、C464、I465、D466、A467、F468、K470、P471、P472、M473、E474、T475、E476、E477、P478、Q479、I480、F481、Y482、N483、A484、P486、T488或S490的氨基酸残基之后，使得在C末端处的一个或多个氨基酸残基被缺失。

[0521] 133. 根据段落123至132中任一者所述的试剂盒，其中N末端包括具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列MATGSRTSLLLAFGLLCLPWLQEGSA的人生长激素衍生的信号肽，具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列MKVWTFISLLFLFSSAYS的人血清白蛋白衍生的信号肽，或具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列MAAHLLPICALFLTLLDMAQG的人Hyal11衍生的信号肽。

[0522] 134. 根据段落123至133中任一者所述的试剂盒，其中PH20的变体或片段

[0523] (i) 是与如SEQ ID NO:1所列出的氨基酸的序列或SEQ ID NO:1的氨基酸残基36-482、36-477、366-478、36-479、36-480、36-481和36-483具有至少90%序列同一性的肽；

[0524] (ii) 是与如SEQ ID NO:1所列出的氨基酸的序列或SEQ ID NO:1的氨基酸残基36-482、36-477、366-478、36-479、36-480、36-481和36-483具有至少95%序列同一性的肽；

[0525] (iii) 由选自SEQ ID NOs:60至115的氨基酸序列组成；或者

[0526] (iv) 具有SEQ ID NO:99的氨基酸序列。

[0527] 135. 根据段落115至134中任一者所述的试剂盒，其中所述透明质酸酶以100U至50,000U的量存在于所述组合物中。

- [0528] 136. 根据段落115至135中任一者所述的试剂盒,其中所述透明质酸酶以100U/mL至50,000U/mL的量存在于所述组合物中。
- [0529] 137. 根据段落115至136中任一者所述的试剂盒,其中所述组合物进一步包括一种或多种药学上可接受的赋形剂。
- [0530] 138. 根据段落115至137中任一者所述的试剂盒,其中所述组合物进一步包括一种或多种糖。
- [0531] 139. 根据段落138所述的试剂盒,其中一种或多种糖包括单糖。
- [0532] 140. 根据段落138至139中任一者所述的试剂盒,其中一种或多种糖包括多糖。
- [0533] 141. 根据段落140所述的试剂盒,其中所述一种或多种多糖选自由海藻糖和蔗糖组成的组。
- [0534] 142. 根据段落140至141中任一者所述的试剂盒,其中所述一种或多种糖以10mM至500mM的量,任选地以100mM至300mM的量存在于组合物中。
- [0535] 143. 根据段落115至142中任一者所述的试剂盒,其中所述组合物进一步包括一种或多种氨基酸。
- [0536] 144. 根据段落143所述的试剂盒,其中所述组合物包括甲硫氨酸。
- [0537] 145. 根据段落143至144中任一者所述的试剂盒,其中所述一种或多种氨基酸以1mM至100mM的量,任选地以1mM至50mM的量存在于组合物中。
- [0538] 146. 根据段落115至145中任一者所述的试剂盒,其中所述组合物进一步包括缓冲液。
- [0539] 147. 根据段落146所述的试剂盒,其中所述缓冲液以足以将所述组合物维持在3.0至9.0的pH的量存在于所述组合物中,任选地以足以将所述组合物维持在5.5至7.5的pH的量存在于所述组合物中。
- [0540] 148. 根据段落146至147中任一者所述的试剂盒,其中所述缓冲液以1至100mM的量,任选地以1mM至50mM的量存在于所述组合物中。
- [0541] 149. 根据段落146至148中任一者所述的试剂盒,其中缓冲液包括组氨酸
- [0542] 150. 根据段落115至149中任一者所述的试剂盒,其中所述端粒酶抑制剂的寡核苷酸包括至少一个N3'→P5'硫代磷酸酯核苷间键。
- [0543] 151. 根据段落115至150中任一者所述的试剂盒,其中所述端粒酶抑制剂的脂质部分经由接头连接到所述寡核苷酸的5'端和/或3'端。
- [0544] 152. 根据段落151的试剂盒,其中接头是甘油或氨基甘油接头。
- [0545] 153. 根据段落115至152中任一者所述的试剂盒,其中端粒酶抑制剂的脂质部分是棕榈酰(C16)部分。
- [0546] 154. 根据段落115至153中任一者所述的试剂盒,其中所述端粒酶抑制剂是伊美司他或其药学上可接受的盐,任选地伊美司他钠。
- [0547] 155. 根据段落115至154中任一者所述的试剂盒,其中所述端粒酶抑制剂以以下剂量存在于组合物中
- [0548] (i) 约2.0mg/kg至20.0mg/kg;
- [0549] (ii) 约3mg/kg至约15mg/kg;
- [0550] (iii) 约9mg/kg至约11mg/kg;或者

[0551] (iv) 约11mg/kg至约14mg/kg。

[0552] 156. 根据段落115至154中任一者所述的试剂盒, 其中端粒酶抑制剂以以下剂量存在于组合物中

[0553] (i) 约200mg至3000mg;

[0554] (ii) 约750mg至约2500mg;

[0555] (iii) 约1000mg至约2000mg; 或者

[0556] (iv) 约500mg至约2000mg。

[0557] 157. 根据段落1至40中任一者所述的组合物, 其中端粒酶抑制剂以以下剂量存在于组合物中

[0558] (i) 约200mg至3000mg;

[0559] (ii) 约750mg至约2500mg;

[0560] (iii) 约1000mg至约2000mg; 或者

[0561] (iv) 约500mg至约2000mg。

[0562] 158. 根据段落43至47中任一者所述的方法, 其中端粒酶抑制剂以以下剂量存在于组合物中

[0563] (i) 约200mg至3000mg;

[0564] (ii) 约750mg至约2500mg;

[0565] (iii) 约1000mg至约2000mg; 或者

[0566] (iv) 约500mg至约2000mg。

[0567] 159. 根据段落81至112中任一者所述的方法, 其中端粒酶抑制剂以以下剂量存在于组合物中

[0568] (i) 约200mg至3000mg;

[0569] (ii) 约750mg至约2500mg;

[0570] (iii) 约1000mg至约2000mg; 或者

[0571] (iv) 约500mg至约2000mg。

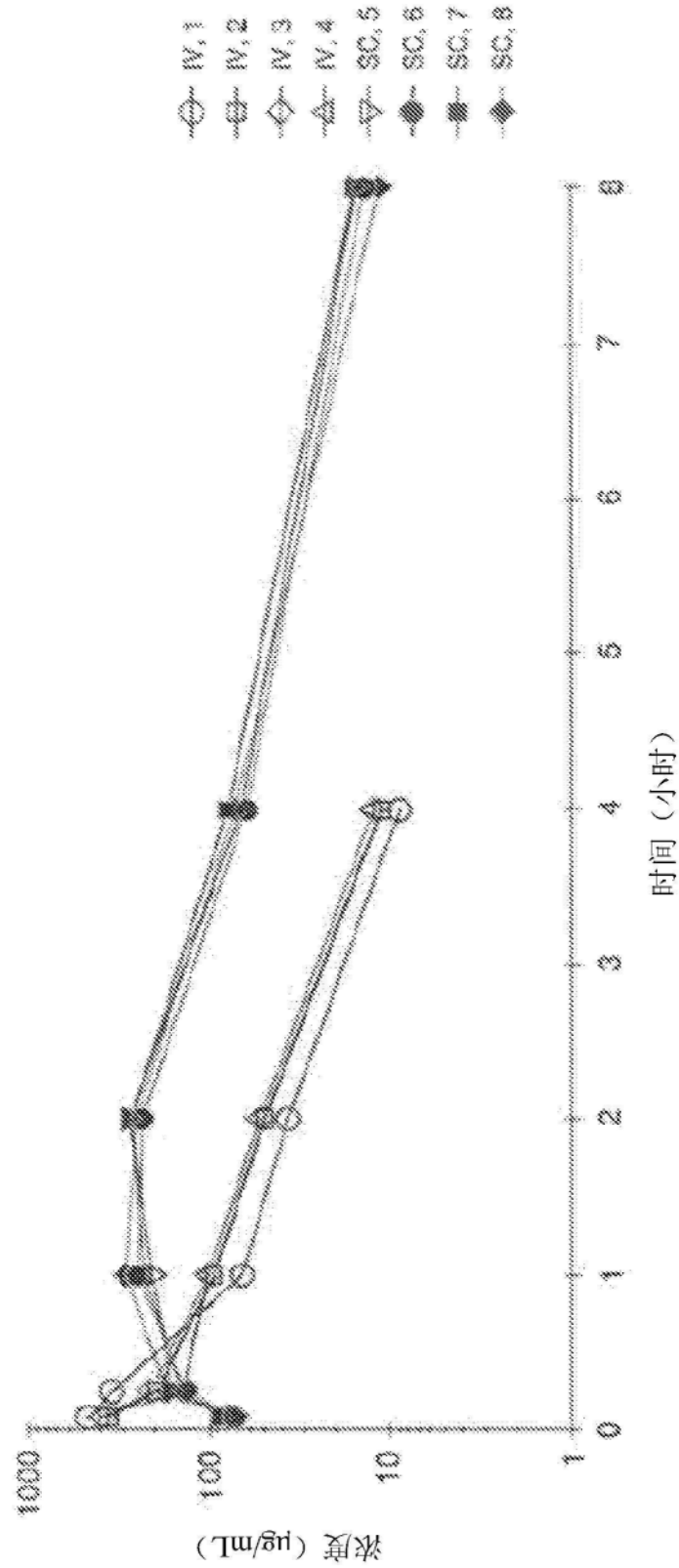


图1

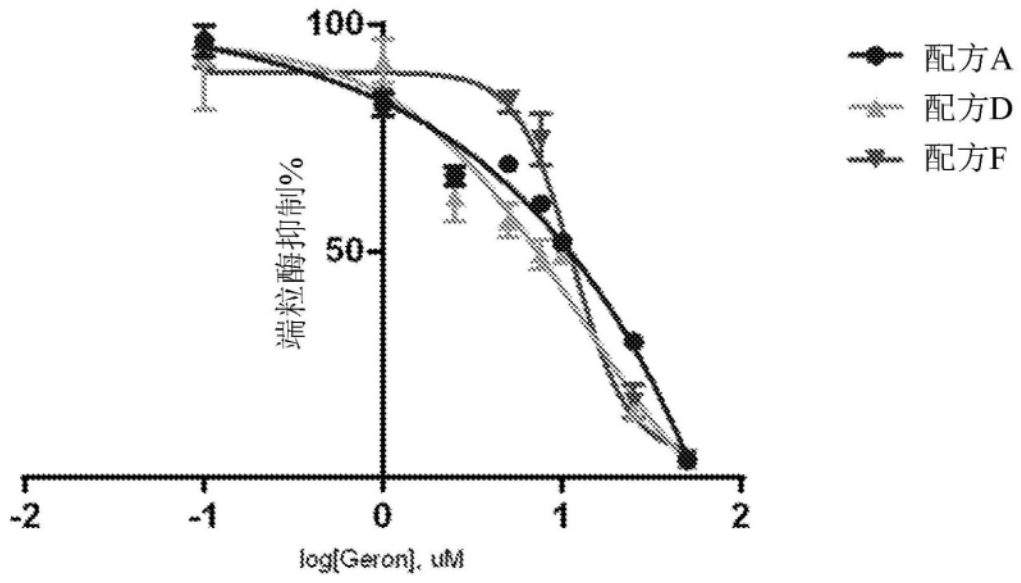


图2