



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 114258317 B

(45) 授权公告日 2025. 03. 14

(21) 申请号 202080058199.7

(22) 申请日 2020.06.17

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 114258317 A

(43) 申请公布日 2022.03.29

(30) 优先权数据
62/862,977 2019.06.18 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2022.02.17

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2020/038036 2020.06.17

(87) PCT国际申请的公布数据
W02020/257221 EN 2020.12.24

(73) 专利权人 斯克里普斯研究院
地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 劳拉·D·希利
劳伦特·O·莫尼耶
约翰·H·格里芬

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227
专利代理师 张福誉 刘振佳

(51) Int.Cl.
C07K 14/705 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)

(56) 对比文件
CN 101801462 A, 2010.08.11
CN 104470943 A, 2015.03.25
审查员 吕健

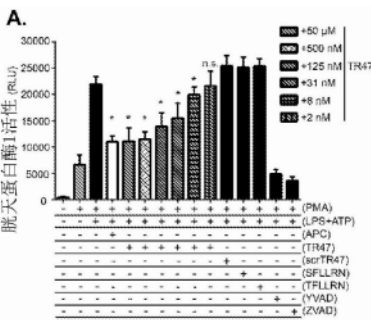
权利要求书3页 说明书32页
序列表20页 附图5页

(54) 发明名称

用于治疗炎症性疾病的方法和组合物

(57) 摘要

本发明提供了用于抑制炎症以及用于治疗炎症性疾病的新的组合物。这些组合物包含至少一种PARS来源的抗炎肽或多肽和/或至少一种PARI来源的抗炎肽或多肽。PARS来源和/或PARI来源的肽通常包含模拟活化蛋白C切割的PARS或PARI (例如, 在人PARS中的残基Arg41处的活化蛋白C切割之后和在人PARI中的残基Arg⁴⁶之后) 的各自N端序列的氨基酸序列。本发明还提供了使用本文中所述的抗炎组合物来抑制不期望的炎症以及治疗炎症性疾病的治疗方法。本发明中另外地提供了筛选候选化合物以鉴定新的抗炎剂的方法。



1. 组合物,其包含PAR3来源的抗炎肽和PAR1来源的抗炎肽,其中所述PAR3来源的肽由SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:10组成,并且所述PAR1来源的肽由SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:49或SEQ ID NO:50组成。

2. 权利要求1所述的组合物,其中所述PAR3来源的肽的量与所述PAR1来源的肽的量的比例为至少2:1。

3. 权利要求1所述的组合物,其中所述PAR3来源的肽的量与所述PAR1来源的肽的量的比例为至少4:1。

4. 权利要求1所述的组合物,其中所述PAR3来源的肽的量与所述PAR1来源的肽的量的比例为至少6:1。

5. 权利要求1所述的组合物,其中所述PAR3来源的肽的量与所述PAR1来源的肽的量的比例为至少8:1。

6. 权利要求1所述的组合物,其中所述PAR3来源的肽的量与所述PAR1来源的肽的量的比例为至少10:1。

7. 权利要求1所述的组合物,其中所述PAR3来源的肽与所述PAR1来源的肽缀合。

8. 权利要求7所述的组合物,其中所述PAR3来源的肽通过接头部分或载体部分与所述PAR1来源的肽缀合。

9. 权利要求1所述的组合物,其包含(a)由SEQ ID NO:36所示序列组成的PAR1来源的肽,和(b)由SEQ ID NO:9所示序列组成的PAR3来源的肽,其中(a)和(b)通过肽部分连接。

10. 权利要求9所述的组合物,其包含SEQ ID NO:61所示序列。

11. 权利要求1所述的组合物,其配制成用于经口、静脉内、皮下、肌内、鼻内、眼内、表面或腹膜内施用于对象。

12. 权利要求1所述的组合物,其包含各自日剂量为所述组合物预期用于的对象组平均体重的至多0.25mg/kg的两种肽。

13. 权利要求1所述的组合物,其包含各自日剂量为所述组合物预期用于的对象组平均体重的至多0.1mg/kg的两种肽。

14. 权利要求1所述的组合物,其包含各自日剂量为所述组合物预期用于的对象组平均体重的至多0.05mg/kg的两种肽。

15. 权利要求1所述的组合物,其包含各自日剂量为所述组合物预期用于的对象组平均体重的至多0.025mg/kg的两种肽。

16. 权利要求1所述的组合物,其包含各自日剂量为所述组合物预期用于的对象组平均体重的至多0.01mg/kg的两种肽。

17. 权利要求1所述的组合物,其包含各自日剂量为所述组合物预期用于的对象组平均体重的至多0.005mg/kg的两种肽。

18. 权利要求1所述的组合物,其包含各自日剂量为所述组合物预期用于的对象组平均体重的至多0.0025mg/kg的两种肽。

19. 权利要求1所述的组合物,其包含各自日剂量为所述组合物预期用于的对象组平均体重的至多0.001mg/kg的两种肽。

20. 权利要求1所述的组合物,其包含各自日剂量为所述组合物预期用于的对象组平均

体重的至多0.0005mg/kg的两种肽。

21. 权利要求1所述的组合物,其包含各自日剂量为所述组合物预期用于的对象组平均体重的至多0.00025mg/kg的两种肽。

22. 权利要求1所述的组合物,其包含各自日剂量为所述组合物预期用于的对象组平均体重的低于0.00025mg/kg的两种肽。

23. 权利要求1所述的组合物,其包含(1)各自日剂量为所述组合物预期用于的对象组平均体重的至多0.25mg/kg的两种肽之一,以及(2)日剂量为所述组合物预期用于的对象组平均体重的至少0.01mg/kg的另一种肽。

24. 权利要求23所述的组合物,其包含(1)各自日剂量为所述组合物预期用于的对象组平均体重的至多0.1mg/kg的两种肽之一。

25. 权利要求23所述的组合物,其包含(1)各自日剂量为所述组合物预期用于的对象组平均体重的至多0.05mg/kg的两种肽之一。

26. 权利要求23所述的组合物,其包含(1)各自日剂量为所述组合物预期用于的对象组平均体重的至多0.025mg/kg的两种肽之一。

27. 权利要求23所述的组合物,其包含(1)各自日剂量为所述组合物预期用于的对象组平均体重的至多0.01mg/kg的两种肽之一。

28. 权利要求23所述的组合物,其包含(1)各自日剂量为所述组合物预期用于的对象组平均体重的至多0.005mg/kg的两种肽之一。

29. 权利要求23所述的组合物,其包含(1)各自日剂量为所述组合物预期用于的对象组平均体重的至多0.0025mg/kg的两种肽之一。

30. 权利要求23所述的组合物,其包含(1)各自日剂量为所述组合物预期用于的对象组平均体重的至多0.001mg/kg的两种肽之一。

31. 权利要求23所述的组合物,其包含(1)各自日剂量为所述组合物预期用于的对象组平均体重的至多0.0005mg/kg的两种肽之一。

32. 权利要求23所述的组合物,其包含(1)各自日剂量为所述组合物预期用于的对象组平均体重的至多0.00025mg/kg的两种肽之一。

33. 权利要求23所述的组合物,其包含(1)各自日剂量为所述组合物预期用于的对象组平均体重的低于0.00025mg/kg的两种肽之一。

34. 权利要求23至33中任一项所述的组合物,其包含(2)日剂量为所述组合物预期用于的对象组平均体重的至少0.025mg/kg的另一种肽。

35. 权利要求23至33中任一项所述的组合物,其包含(2)日剂量为所述组合物预期用于的对象组平均体重的至少0.05mg/kg的另一种肽。

36. 权利要求23至33中任一项所述的组合物,其包含(2)日剂量为所述组合物预期用于的对象组平均体重的至少0.1mg/kg的另一种肽。

37. 权利要求23至33中任一项所述的组合物,其包含(2)日剂量为所述组合物预期用于的对象组平均体重的至少0.25mg/kg的另一种肽。

38. 权利要求23至33中任一项所述的组合物,其包含(2)日剂量为所述组合物预期用于的对象组平均体重的至少0.5mg/kg的另一种肽。

39. 权利要求23至33中任一项所述的组合物,其包含(2)日剂量为所述组合物预期用于

的对象组平均体重的至少1mg/kg的另一种肽。

40. 权利要求23至33中任一项所述的组合物,其包含(2)日剂量为所述组合物预期用于的对象组平均体重的至少2.5mg/kg的另一种肽。

41. 权利要求23至33中任一项所述的组合物,其包含(2)日剂量为所述组合物预期用于的对象组平均体重的至少5mg/kg的另一种肽。

42. 权利要求23至33中任一项所述的组合物,其包含(2)日剂量为所述组合物预期用于的对象组平均体重的至少10mg/kg的另一种肽。

43. 权利要求23至33中任一项所述的组合物,其包含(2)日剂量为所述组合物预期用于的对象组平均体重的至少25mg/kg的另一种肽。

44. 权利要求23至33中任一项所述的组合物,其包含(2)日剂量为所述组合物预期用于的对象组平均体重的高于25mg/kg的另一种肽。

45. 用于鉴定抗炎剂的方法,其包括(1)培养人THP-1细胞组群,(2)使所培养细胞与炎症诱导剂接触,(3)使所培养细胞分别与候选剂和PAR3来源或PAR1来源的抗炎肽接触,(4)分别在已与所述候选剂接触的细胞中和已与所述PAR3来源或PAR1来源的抗炎肽接触的细胞中测量炎症相关活性;其中在与所述候选剂接触的细胞中测量的炎症活性值等于或小于在与所述PAR3来源或PAR1来源的抗炎肽接触的细胞中测量的炎症活性值,则将所述候选剂鉴定为抗炎剂,其中所述PAR3来源或PAR1来源的抗炎肽是P3R (SEQ ID NO:4) 或TR47 (SEQ ID NO:7),或其经保守修饰变体,并且其中所述候选剂是模拟Met¹-Arg⁴¹缺失的人PAR3胞外结构域SEQ ID NO:3或Met¹-Arg⁴⁶缺失的人PAR1胞外结构域SEQ ID NO:6的N端序列的肽或多肽,肽或多肽的变体、衍生物或模拟化合物。

46. 权利要求45所述的方法,其中所述炎症相关活性是胱天蛋白酶1酶活性。

47. 权利要求45所述的方法,其中所述炎症相关活性是IL-1 β 释放。

48. 权利要求45所述的方法,其中所述炎症诱导剂是脂多糖LPS。

用于治疗炎性病症的方法和组合物

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本专利申请要求美国临时专利申请号62/862,977(2019年6月18日提交)的优先权权益。优先权申请的全部公开内容通过引用整体并入本文并用于所有目的。

[0003] 政府支持声明

[0004] 本发明在由国立卫生研究院(National Institutes of Health)授予的基金号HL052246、HL104165和HL142975的政府支持下完成。政府对本发明享有某些权利。

背景技术

[0005] 炎症根本上是保护性应答,身体通过其对多种损伤、感染和应激作出响应。其最终目标是消除损伤诱导剂(可以是微生物、物理刺激物、化学剂等)、防止组织损伤和/或启动修复过程。炎症可以是局部的或全身的,并且可以是急性的或慢性的。虽然炎性应答对于应激应答、抵御感染和愈合伤口至关重要,但炎症也可具有破坏性。实际上,炎症是许多疾病和病症的致病过程的重要组分。另外,在许多疾病(例如癌症)中炎症的存在指示不那么良好的预后。最后,在极端情况下,如果治疗不当,炎症可导致危及生命的全身性应答。

[0006] 丝氨酸蛋白酶活化蛋白C(activated protein C,APC)除了其传统的抗凝血功能之外,还对多种细胞类型和器官发挥保护作用。APC可通过抑制NLRP3炎性小体而具有抗炎性。炎性小体通过促进促炎细胞因子白介素(interleukin,IL)-1 β 和IL-18的成熟和释放而在固有免疫系统驱动的炎症中发挥核心作用。过多的炎症会导致许多疾病,包括心血管疾病,这表明在固有免疫系统的背景下限制炎性小体的发挥(elaboration)对人疾病可能是有益的。例如,在康纳单抗抗炎性血栓形成结果研究(Canakinumab Anti-inflammatory Thrombosis Outcome Study,CANTOS研究)中,抗IL-1 β 单克隆抗体降低总体非致死性心肌梗死、卒中和心血管死亡。

[0007] 目前用于治疗炎症的方法是不充分的,并且炎症通常保持未被治疗或未被有效治疗。作为结果,患有异常炎症的对象可受到相当大的伤害,并且甚至可危及对象的生命。因此,本领域对于对抗炎症和炎性疾病的更好或替代手段的需求未得到满足。本发明解决了本领域中的这个和其他未满足的需求。

发明内容

[0008] 在一个方面,本发明提供了用于在对象中抑制不期望的炎症和/或治疗炎性病症的方法。这些方法包括向对象施用包含来源于蛋白酶激活受体3(protease activated receptor-3,PAR3)的抗炎肽的药物组合物。在多个实施方案中,PAR3来源的抗炎肽包含(1)Met¹-Arg⁴¹缺失的人PAR3胞外结构域(SEQ ID NO:3)或其经保守修饰变体的N端片段,所述片段由SEQ ID NO:3的至少前4个N端残基组成;或者(2)人PAR3来源的肽P3R(SEQ ID NO:4)或其经保守修饰变体的至少4个连续氨基酸残基,所述至少4个连续氨基酸残基包含SEQ ID NO:4的Phe¹⁰-Phe¹²。

[0009] 在一些实施方案中,所用的PAR3来源的抗炎肽还具有APC样细胞保护活性。在一些

实施方案中,所用的PAR3来源的肽包含SEQ ID NO:3的至少前6、7、8、9、10、11、12、13或更多个N端残基。在一些实施方案中,所用的PAR3来源的肽包含GAPPNSFEEFPFS (SEQ ID NO:8) 或GAPPNSFEEFPFSALEGWTGATIT (SEQ ID NO:4)。在一些实施方案中,所用的PAR3来源的肽包含SEQ ID NO:4的包含Phe¹⁰-Phe¹²的至少6个连续氨基酸残基。在这些实施方案中的一些中,PAR3来源的肽包含FPFSALEGW (SEQ ID NO:10) 或FPFSALEGW GATIT (SEQ ID NO:9)。在一些实施方案中,所用的PAR3来源的肽与载体部分缀合。例如,载体部分可以是载体蛋白、免疫球蛋白、Fc结构域或PEG分子。

[0010] 本发明的一些方法还包括向对象施用来源于蛋白酶激活受体-1 (protease activated receptor-1, PAR1) 的抗炎肽。在多个实施方案中,施用的PAR1来源的肽包含(1) Met¹-Arg⁴⁶缺失的人PAR1胞外结构域 (SEQ ID NO:6) 或其经保守修饰变体的至少前4个N端残基,或者(2) 在其N端具有至少一个残基的缺失或替换的人PAR1来源的肽TR47 (SEQ ID NO:7) 的变体。在这些实施方案中的一些中,施用的PAR1来源的肽包含人PAR1来源的肽TR47 (SEQ ID NO:7) 的前4、5、6、7、8、9、10或更多个N端残基。在一些实施方案中,施用的PAR1来源的肽包含具有经替换N端残基的TR47变体。在这些实施方案中的一些中,所用的TR47变体包含SEQ ID NO:49 (TR47 ΔQ) 或SEQ ID NO:50 (TR47 ΔA)。在一些实施方案中,施用的PAR1来源的肽包含具有一个或更多个N端残基缺失的TR47变体。在这些实施方案中的一些中,所用的TR47变体包含SEQ ID NO:47 (TR47 (N-1)) 或SEQ ID NO:48 (TR47 (N-5))。

[0011] 在包括施用PAR3来源的肽和PAR1来源的肽二者的一些方法中,两种肽以任何顺序依次施用于对象。在一些其他方法中,将两种肽同时施用于对象。在这些实施方案中的一些中,将包含PAR3来源的肽和PAR1来源的肽二者的药物组合物施用于需要治疗的对象。在这些实施方案中的一些中,PAR3来源的肽与PAR1来源的肽缀合。例如,PAR3来源的肽可与PAR1来源的肽共价键合(例如,SEQ ID NO:61)。在这些实施方案中的一些中,接头部分可用于将PAR3来源的肽(例如,SEQ ID NO:9) 与PAR1来源的肽(例如,SEQ ID NO:36) 共价连接,如本文中所示例的。在一些实施方案中,PAR3来源的肽和/或PAR1来源的肽与载体部分缀合。在这些实施方案中的一些中,PAR3来源的肽与PAR1来源的肽的比例为至少约2:1、4:1、6:1、8:1或10:1。

[0012] 在包括施用PAR3来源的肽和PAR1来源的肽二者的一些方法中,PAR3来源的肽和PAR1来源的肽中的每一种以对象体重的至多约0.25mg/kg、0.1mg/kg、0.05mg/kg、0.025mg/kg、0.01mg/kg、0.005mg/kg、0.0025mg/kg、0.001mg/kg、0.0005mg/kg、0.00025mg/kg或更低的每日量施用于对象。在一些其他方法中,向对象施用对象体重的至多约0.25mg/kg、0.1mg/kg、0.05mg/kg、0.025mg/kg、0.01mg/kg、0.005mg/kg、0.0025mg/kg、0.001mg/kg、0.0005mg/kg、0.00025mg/kg或更低的每日量的一种肽,以及对象体重的至少约0.01mg/kg、0.025mg/kg、0.05mg/kg、0.1mg/kg、0.25mg/kg、0.5mg/kg、1mg/kg、2.5mg/kg、5mg/kg、10mg/kg、25mg/kg或更高的每日量的另一种肽。

[0013] 在多个实施方案中,本发明的方法旨在治疗炎性疾病。待治疗的炎性疾病可以是选自以下的任何一种:哮喘、自身免疫病、慢性炎症、慢性前列腺炎、肾小球肾炎、超敏性、炎性肠病、盆腔炎、再灌注损伤、类风湿性关节炎、无菌性炎症、移植排斥、病毒相关炎症和血管炎。在一些实施方案中,本发明的方法旨在治疗与不期望的免疫激活或不期望的免疫应答相关的病症。例如,与不期望的免疫激活或不期望的免疫应答相关的待治疗病症可以是

神经病理学状况、病毒感染或疟疾。在一些方法中,待用本发明的方法治疗的对象患有或怀疑患有急性神经炎症、慢性神经炎症或疟疾炎症。

[0014] 在另一方面,本发明提供了组合物,其包含PAR3来源的抗炎肽和PAR1来源的抗炎肽。在这些实施方案中的一些中,PAR3来源的抗炎肽包含(1)Met¹-Arg⁴¹缺失的人PAR3胞外结构域(SEQ ID NO:3)或其经保守修饰变体的N端片段,所述片段由SEQ ID NO:3的至少前4个N端残基组成,或者(2)PAR3来源的肽P3R(SEQ ID NO:4)或其经保守修饰变体的至少4个连续氨基酸残基,所述至少4个连续氨基酸残基包含SEQ ID NO:4的Phe¹⁰-Phe¹²;并且PAR1来源的抗炎肽包含(1)Met¹-Arg⁴⁶缺失的人PAR1胞外结构域(SEQ ID NO:6)或其经保守修饰变体的N端片段,其中所述片段由SEQ ID NO:6的至少前4个N端残基组成,或者(2)在其N端具有至少一个残基的缺失或替换的人PAR1来源的肽TR47(SEQ ID NO:7)的变体。

[0015] 在一些实施方案中,所用的PAR3来源的肽包含SEQ ID NO:3或其经保守修饰变体的至少前13个N端残基,并且PAR1来源的肽包含SEQ ID NO:6或其经保守修饰变体的至少前8个N端残基。在多个实施方案中,所用的PAR3来源的肽包含SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10,或其经保守修饰变体,并且PAR1来源的肽包含SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50,或其经保守修饰变体。在本发明的一些组合物中,PAR3来源的肽的量与PAR1来源的肽的量的比例为至少约2:1、4:1、6:1、8:1或10:1。在一些组合物中,PAR3来源的肽与PAR1来源的肽缀合。在一些组合物中,PAR3来源的肽通过接头部分或载体部分与PAR1来源的肽缀合。例如,PAR1来源的肽(例如,SEQ ID NO:36)可通过甘氨酸接头与PAR3来源的肽(例如,SEQ ID NO:9)共价键合,如本文中的SEQ ID NO:61所示例的。本发明的一些组合物配制成用于经口、静脉内、皮下、肌内、鼻内、眼内、表面或腹膜内施用于对象。

[0016] 本发明的一些组合物包含各自日剂量为组合物预期用于的对象组平均体重的至多约0.25mg/kg、0.1mg/kg、0.05mg/kg、0.025mg/kg、0.01mg/kg、0.005mg/kg、0.0025mg/kg、0.001mg/kg、0.0005mg/kg、0.00025mg/kg或更低的两种肽。本发明的一些其他组合物包含(1)各自日剂量为组合物预期用于的对象组平均体重的至多约0.25mg/kg、0.1mg/kg、0.05mg/kg、0.025mg/kg、0.01mg/kg、0.005mg/kg、0.0025mg/kg、0.001mg/kg、0.0005mg/kg、0.00025mg/kg或更低的两种肽之一,以及(2)日剂量为组合物预期用于的对象组平均体重的至少约0.01mg/kg、0.025mg/kg、0.05mg/kg、0.1mg/kg、0.25mg/kg、0.5mg/kg、1mg/kg、2.5mg/kg、5mg/kg、10mg/kg、25mg/kg或更高的另一种肽。

[0017] 在另一个方面,本发明提供了用于在对象中抑制炎症和治疗炎性病症的方法。这些方法需要向对象施用包含治疗有效量的来源于蛋白酶激活受体1(PAR1)的抗炎肽的药物组合物。在一些方法中,施用的PAR1来源的抗炎肽包含(1)Met¹-Arg⁴⁶缺失的人PAR1胞外结构域(SEQ ID NO:6)或其经保守修饰变体的至少前4个N端残基,或者(2)在其N端具有至少一个残基的缺失或替换的人PAR1来源的肽TR47(SEQ ID NO:7)的变体。在一些实施方案中,所用的PAR1来源的肽包含人PAR1来源的肽TR47(SEQ ID NO:7)的前4、5、6、7、8、9、10或更多个N端残基。在一些方法中,所用的PAR1来源的肽包含含有经替换N端残基的TR47变体。在这些方法中的一些中,所用的TR47变体包含SEQ ID NO:49(TR47 ΔQ)或SEQ ID NO:50(TR47 ΔA)。在一些方法中,所用的PAR1来源的肽包含含有一个或多个N端残基缺失的TR47变体。在一些这些方法中,所用的TR47变体包含SEQ ID NO:47(TR47(N-1))或SEQ ID NO:48(TR47

(N-5))。

[0018] 在又一个方面,本发明提供了用于鉴定抗炎剂的方法。该方法需要(1)培养人THP-1细胞组群,(2)使所培养细胞与炎症诱导剂接触,(3)使所培养细胞分别与候选剂和PAR3来源或PAR1来源的抗炎肽接触,(4)分别在已与候选剂接触的细胞中和已与PAR3来源或PAR1来源的抗炎肽接触的细胞中测量炎症相关活性。如果在与候选剂接触的细胞中测量的炎症活性值等于或小于在与PAR3来源或PAR1来源的抗炎肽接触的细胞中测量的炎症活性值,则将该候选剂鉴定为抗炎剂。在一些方法中,所用的PAR3来源或PAR1来源的抗炎肽是P3R (SEQ ID NO:4) 或TR47 (SEQ ID NO:7),或其经保守修饰变体。在多个方法中,所用的候选剂是模拟Met¹-Arg⁴¹缺失的人PAR3胞外结构域 (SEQ ID NO:3) 或Met¹-Arg⁴⁶缺失的人PAR1胞外结构域 (SEQ ID NO:6) 的N端序列的肽或多肽,肽或多肽的变体、衍生物或模拟化合物。在一些方法中,待测量的炎症相关活性是胱天蛋白酶1酶活性。在一些其他方法中,待测量的炎症相关活性是IL-1 β 释放。在一些方法中,所用的炎症诱导剂是脂多糖 (LPS)。

[0019] 可以通过参考说明书和权利要求书的其余部分来实现对本发明的性质和优点的进一步理解。

附图说明

[0020] 图1示出了PAR1来源的肽TR47和PAR3来源的肽P3R的抗炎活性。将THP1-null (THP1) 细胞以 1×10^6 /mL的最终浓度平板接种在96孔板中,并与PMA (0.5 μ M) 在补充的RPMI中37 $^{\circ}$ C孵育3小时。随后每24小时更换培养基,持续3天。选择多个孔亚组,并在37 $^{\circ}$ C下在无血清RPMI中用以下处理细胞60分钟:(A) APC (4 μ g/mL)、TR47 (50 μ M至2nM)、scrTR47 (50 μ M)、SFLLRN (50 μ M)、TFLLRN (50 μ M); (B) P3R (50 μ M至500nM)、P3K (50 μ M); (C) APC (4或1 μ g/mL)、TR47 (8nM)、P3R (500nM) 或TR47+P3R (分别为8nM和500nM); (D) TR47 (0至128nM) (●) $\pm$ P3R (500nM) (□); (E) P3R (0至500nM) (●) $\pm$ TR47 (1nM) (□)。在DPBS洗涤之后,将细胞与LPS (1 μ g/mL) 在无血清RPMI中在37 $^{\circ}$ C下孵育3小时。在DPBS洗涤之后,在存在或不存在10 μ M YVAD (胱天蛋白酶1抑制剂) 或2.5 μ M ZVAD (泛胱天蛋白酶抑制剂) 的情况下,将细胞与ATP (5mM) 在37 $^{\circ}$ C下孵育45分钟,然后按照制造商的说明书测量发光 (相对发光单位 (relative luminescent unit), RLU) 来进行胱天蛋白酶1活性测定。(D和E) 将实验性胱天蛋白酶1活性相对于YVAD (胱天蛋白酶1抑制剂) 发光单位进行归一化。(A至E) 数据点表示至少3次独立实验的平均值 $\pm$ S.D.。*P<0.05 (与LPS+ATP相比); #P<0.05 (与LPS+ATP和APC、TR47或P3R相比); **P<0.005 (与LPS+ATP和TR47+500nM P3R相比); n.s.不显著。

[0021] 图2示出了APC以及PAR1来源和PAR3来源的肽部分通过EPCR、PAR1和PAR3降低了NLRP3驱动的炎性小体胱天蛋白酶1活性。将THP1或(A) NLRP3缺陷型细胞 (THP1-defNLRP3) 细胞以 1×10^6 /mL的最终浓度平板接种在96孔板中,并与PMA (0.5 μ M) 在补充的RPMI中37 $^{\circ}$ C孵育3小时。随后每24小时更换培养基,持续3天。简言之,所选择的孔用APC (4 μ g/mL)、TR47 (50 μ M) 或P3R (50 μ M) 处理1小时,用DPBS洗涤,并与LPS (1 μ g/mL) 在无血清RPMI中在37 $^{\circ}$ C下孵育3小时。在DPBS洗涤之后,在存在或不存在10 μ M YVAD (胱天蛋白酶1抑制剂) 或2.5 μ M ZVAD (泛胱天蛋白酶抑制剂) 的情况下,将细胞与ATP (5mM) 在37 $^{\circ}$ C下孵育45分钟。在(B) 中,在PMA分化之后,将选择孔用APC (4 μ g/mL)、TR47 (50 μ M) 或P3R (50 μ M) 处理1小时,用DPBS洗涤,并与LPS (1 μ g/mL) 在无血清RPMI中在37 $^{\circ}$ C下孵育3小时。将细胞用DPBS洗涤,然后用NLRP3抑制剂

MCC950 (10 μ M) 或DMSO处理30分钟。再次将细胞用DPBS洗涤,并在存在或不存在10 μ M YVAD (胱天蛋白酶1抑制剂) 或2.5 μ M ZVAD (泛胱天蛋白酶抑制剂) 的情况下与ATP (5mM) 孵育45分钟,然后按照制造商的说明书测量发光来进行胱天蛋白酶1活性。在(C至F)中,在APC、TR47或P3R处理之前,将细胞与抗体或抑制剂一起孵育。其中,将细胞与(C)阻断EPCR抗体RCR-252 (50 μ g/mL); (D) 针对PAR3的小鼠单克隆抗体克隆19b (克隆19b; 25 μ g/mL) 一起孵育30分钟。在(E)中,将细胞用针对PAR1、WEDE15 (20 μ g/mL) 或ATAP2 (10 μ g/mL) 的小鼠单克隆抗体处理15分钟。在(F)中,将细胞用小分子PAR1抑制剂SCH79797 (SCH; 20 μ M) 处理20分钟。在抗体或小分子处理(C至F)之后,将所选择的孔用APC (4 μ g/mL)、TR47 (50 μ M) 或P3R (50 μ M) 处理1小时,用DPBS洗涤,并与LPS (1 μ g/mL) 在无血清RPMI中在37 $^{\circ}$ C下孵育3小时。在DPBS洗涤之后,在存在或不存在10 μ M YVAD (胱天蛋白酶1抑制剂) 或2.5 μ M ZVAD (泛胱天蛋白酶抑制剂) 的情况下,将细胞与ATP (5mM) 在37 $^{\circ}$ C下孵育45分钟,然后按照制造商的说明书测量发光(相对发光单位,RLU) 来进行胱天蛋白酶1活性测定。(A至F) 数据点表示至少3次独立实验的平均值 $\pm$ SD。* $P < 0.05$ (与LPS+ATP相比); # $P < 0.05$ (与LPS+ATP和APC、TR47或P3R相比); ## $P < 0.005$ (与LPS+ATP和APC、TR47或P3R相比); n.s. 不显著。

[0022] 图3示出了APC以及PAR1来源和PAR3来源的肽降低了IL-1 β 释放。将THP1细胞以 1×10^6 /mL的最终浓度平板接种在96孔板中,并与PMA (0.5 μ M) 在补充的RPMI中37 $^{\circ}$ C孵育3小时。随后每24小时更换培养基,持续3天。所选择的孔用APC (4 μ g/mL)、TR47 (50 μ M)、P3R (50 μ M) 或TR47/P3R (分别为8nM和500nM) 处理1小时,用DPBS洗涤,并与LPS (1 μ g/mL) 在无血清RPMI中在37 $^{\circ}$ C下孵育3小时。将细胞用DPBS洗涤,并在存在或不存在10 μ M YVAD (胱天蛋白酶1抑制剂) 的情况下与ATP (5mM) 孵育45分钟,并将所得细胞上清液遵循制造商(R&D) 的指示测量发光来用于IL-1 β Quantikine ELISA,并且在测量标准曲线之后计算IL-1 β 的浓度。数据点表示至少3次独立实验的平均值 $\pm$ SEM。* $P < 0.05$ (与LPS+ATP相比)。

[0023] 图4示出了PAR3来源的肽P3R的多种片段的抗炎活性。THP1细胞以 1×10^6 /mL的最终浓度平板接种在96孔板中,并与PMA (0.5 μ M) 在补充的RPMI中37 $^{\circ}$ C孵育3小时。随后每24小时更换培养基,持续3天。所选择的孔用APC (4 μ g/mL) (A) 50 μ M或(B) 2 μ M的P3R、P3Rm、P3R 51-65、P3R 51-59、P3R 54-59或P3R 59-65处理1小时,用DPBS洗涤,并与LPS (1 μ g/mL) 在无血清RPMI中在37 $^{\circ}$ C下孵育3小时。将细胞用DPBS洗涤,并在存在或不存在10 μ M YVAD (胱天蛋白酶1抑制剂; C1i) 或2.5 μ M ZVAD (泛胱天蛋白酶抑制剂; pCi) 的情况下与ATP (5mM) 在37 $^{\circ}$ C下孵育45分钟,然后按照制造商的说明书测量发光(相对发光单位,RLU) 来进行胱天蛋白酶1活性测定。(C) 示出了PAR3序列、肽序列和相对(抗炎) 活性的图。这些包括P3R (SEQ ID NO:4)、P3Rm (SEQ ID NO:8)、P3R 51-65 (SEQ ID NO:9)、P3R 51-59 (SEQ ID NO:10)、P3R 54-59 (SEQ ID NO:54) 和P3R 59-65 (SEQ ID NO:55) 的序列。

[0024] 图5示出了PAR1来源的肽TR47的变体的抗炎活性。将THP1细胞以 1×10^6 /mL的最终浓度平板接种在96孔板中,并与PMA (0.5 μ M) 在补充的RPMI中37 $^{\circ}$ C孵育3小时。随后每24小时更换培养基,持续3天。所选择的孔用APC (4 μ g/mL), 50 μ M或10nM的TR47、在(A) 中的9聚体 (TR479聚体; NPNDKYEPF (SEQ ID NO:36)) 或者Ac-TR47 (酰化TR47), 或者(B) 50 μ M的16聚体-TR47、8聚体-TR47、6聚体-TR47、TR47 N-1、TR47 N-2、TR47 N-5、TR47 Δ Q、TR47 Δ D、TR47 Δ A或TR48-54处理1小时,用DPBS洗涤,并与LPS (1 μ g/mL) 在无血清RPMI中在37 $^{\circ}$ C下孵育3小时。将细胞用DPBS洗涤,并在存在或不存在10 μ M YVAD (胱天蛋白酶1抑制剂; C1i) 或2.5 μ M ZVAD

(泛胱天蛋白酶抑制剂;pCi)的情况下与ATP(5mM)在37°C下孵育45分钟,然后按照制造商的说明书测量发光(相对发光单位,RLU)来进行胱天蛋白酶1活性测定。#P<0.001(与LPS+ATP相比),**P<0.005(与LPS+ATP相比),*P<0.05(与LPS+ATP相比)。(C)示出了PAR1序列、肽序列和相对(抗炎)活性的图。这些包括TR47(SEQ ID NO:7)、Ac-TR47(SEQ ID NO:56)、16聚体-TR47(SEQ ID NO:43)、9聚体-TR47(SEQ ID NO:36)、8聚体-TR47(SEQ ID NO:35)、6聚体-TR47(SEQ ID NO:33)、TR47 N-1(SEQ ID NO:47)、TR47 N-2(SEQ ID NO:51)、TR47 N-5(SEQ ID NO:48)、TR47 ΔQ(SEQ ID NO:49)、TR47 ΔD(SEQ ID NO:52)、TR47 ΔA(SEQ ID NO:50)和TR48-54(SEQ ID NO:53)的序列。

[0025] 图6示出了PAR3来源和PAR1来源的肽变体表现出协同性以降低胱天蛋白酶1活性。将THP1细胞以 1×10^6 /mL的最终浓度平板接种在96孔板中,并与PMA(0.5μM)在补充的RPMI中37°C孵育3小时。随后每24小时更换培养基,持续3天。在(A)中,在存在或不存在TR47(1nM)的情况下,将选择孔用P3(42-65)或P3(42-54)(0或16nM)在37°C下处理60分钟。在(B)中,在存在或不存在500nM P3R的情况下,将选择孔用TR47(0或4nM)或TR47(N-1)(0或4nM)在37°C下处理60分钟。将细胞用DPBS洗涤,并与LPS(1μg/mL)在无血清RPMI中在37°C下孵育3小时。将细胞用DPBS洗涤,并在存在或不存在10μM YVAD(胱天蛋白酶1抑制剂;C1i)或2.5μM ZVAD(泛胱天蛋白酶抑制剂;pCi)的情况下与ATP(5mM)在37°C下孵育45分钟,然后按照制造商的说明书测量发光(相对发光单位,RLU)来进行胱天蛋白酶1活性测定。

[0026] 图7示出了PAR1来源的肽或PAR3来源的肽的变体协同降低胱天蛋白酶1活性。将THP-1-null(来自Invivogen的THP-1)细胞以 1×10^6 /mL的最终浓度平板接种在96孔板中,并与PMA(0.5μM)在补充的RPMI中37°C孵育3小时。随后每24小时更换培养基,持续3天。选择孔亚组并在37°C下在无血清RPMI中用以下处理细胞60分钟:(A)APC(4μg/mL)或者50μM的包括如以下所示的肽:“TR47”(PAR1(47-66);SEQ ID NO:7)、“TR47 ΔQ”(PAR1(N47Q)-66;SEQ ID NO:49)、“P3R”(PAR3(42-65);SEQ ID NO:4)或“P3Rm”(PAR3(42-54);SEQ ID NO:8);(B)TR47(0至16nM)单独(■)或与P3R(500nM)(□)或者TR47 ΔQ(0至16nM)单独(▲)或与P3R(500nM)(▽);(C)P3R(0至16nM)单独(■)或与TR47(1nM)(□)或者P3Rm(0至16nM)单独(▲)或与TR47(1nM)(▽);或者(D)选择孔亚组并在37°C下在无血清RPMI中用P3R(0至16nM)(●)±TR47(1nM)(○)或P3R51-65(SEQ ID NO:9)(0至16nM)(▲;虚线)±TR47(1nM)(△;虚线)处理细胞60分钟。在DPBS洗涤之后,将细胞与LPS(1μg/mL)在无血清RPMI中在37°C下孵育3小时。在DPBS洗涤之后,在存在或不存在10μM YVAD(胱天蛋白酶1抑制剂)或2.5μM ZVAD(泛胱天蛋白酶抑制剂)的情况下,将细胞与ATP(5mM)在37°C下孵育45分钟,然后按照制造商的说明书测量发光(相对发光单位,RLU)来进行胱天蛋白酶1活性测定。将实验性胱天蛋白酶1活性相对于YVAD(胱天蛋白酶1抑制剂)发光单位的值进行归一化。(B)、(C)和(D):将实验性胱天蛋白酶1活性相对于YVAD(胱天蛋白酶1抑制剂)发光单位的值进行归一化。对于(A至C):数据点表示至少3次独立实验的平均值±S.D.。*P<0.005(与LPS+ATP相比或者与LPS+ATP和TR47或P3R单独或变体相比);#P<0.05(与LPS+ATP和单独的P3R或单独的P3(42-54)相比);n.s.不显著。对于(D),*P<0.05(与LPS+ATP和单独的P3肽相比);**P<0.005(LPS+ATP和单独的P3肽);n.s.不显著。

[0027] 图8示出了PAR1:PAR3共价连接肽降低胱天蛋白酶1活性。将THP-1细胞以 1×10^6 /

mL的最终浓度平板接种在96孔板中,并与PMA (0.5 μ M) 在补充的RPMI中37 $^{\circ}$ C孵育3小时。随后每24小时更换培养基,持续3天。所选择的孔用PAR1 9聚体肽P1 (47-55) (SEQ ID NO:36) (0至500nM) (○)、PAR3肽P3 (51-65) (SEQ ID NO:9) (0至500nM) (▽)或Gly10连接的PAR1/PAR3融合肽“G10” (0至500nM) (□) 在37 $^{\circ}$ C下处理60分钟。将细胞用DPBS洗涤,并与LPS (1 μ g/mL) 在无血清RPMI中在37 $^{\circ}$ C下孵育3小时。将细胞用DPBS洗涤,并在存在或不存在10 μ M YVAD (胰天蛋白酶1抑制剂) 的情况下与ATP (5mM) 在37 $^{\circ}$ C下孵育45分钟,然后按照制造商的说明书测量发光(相对发光单位,RLU) 来进行胰天蛋白酶1活性测定,然后将实验性胰天蛋白酶1活性针对胰天蛋白酶1抑制剂发光单位进行调整并表示为胰天蛋白酶1活性。数据点表示至少3次独立实验的平均值 $\pm$ S.D.* $P < 0.05$ (与LPS+ATP相比)。

[0028] 图9示出了PAR1来源的、PAR3来源的和PAR1/PAR3融合肽抑制凝血酶诱导的内皮屏障破坏。图中每幅图的底部曲线标记为对于单独的凝血酶的IIa,并且表示在不存在肽的情况下观察到的凝血酶 (IIa) 的作用。在每幅图中,对于添加的每种肽,IIa始终存在。每幅图中的数字表示相应曲线的每种肽的浓度。0的肽浓度由标记为“IIa”的底部曲线表示。(A) TER随时间的剂量响应抑制,由PAR1来源的肽P1 (47-66) 或TR47 (使用5至50nM浓度) 的归一化细胞指数 (Normalized Cell Index, NCI) 来表示。(B) PAR3来源的肽P3 (42-65) 或P3R (使用5至50nM浓度范围) 的NCI的随时间的剂量响应抑制。(C) 短序列PAR1来源的肽P1 (47-55) (使用50nM至100 μ M肽的浓度范围) 的随时间的NCI剂量响应抑制。(D) 短序列PAR3来源的肽P3 (42-54) (使用1 μ M至200 μ M肽的浓度范围) 的随时间的NCI剂量响应抑制。(E) 杂交肽G10 (其中C图中所描述的P1 (47-55) 肽通过使用10个Gly残基与PAR3肽P3 (51-65) 连接) 的随时间的NCI剂量响应抑制。在这种情况下,研究剂量响应抑制的浓度范围为3至50nM肽。通过获得每种肽稀释液的曲线下面积 (Area under the Curve, AUC) 与不存在任何肽的情况下单独凝血酶的AUC值相比较,可对在存在凝血酶的情况下每种肽稀释液的活性百分比的估计值进行量化。这些值用于计算每种PAR肽的效力。

具体实施方式

[0029] I. 概述

[0030] 本发明涉及来来源于PAR1和PAR3的多种肽或多肽的抗炎活性。本发明部分基于本发明人的发现,即模拟PAR3和PAR1的N端序列 (其在各自的非典型位点处被APC切割) 的一些肽具有抗炎活性。出乎意料地,还发现在观察到的PAR3来源的肽和PAR1来源的肽之间的抗炎活性中存在强烈的协同作用。

[0031] 活化蛋白C (APC) 是在Arg⁴¹和Arg⁴⁶二者处切割PAR1的蛋白酶。APC在Arg⁴¹处切割PAR3。已知APC切割具有细胞保护和抗凋亡作用。本发明的核心是以下发现。基于APC对PAR1中Arg⁴⁶和Asn⁴⁷之间的肽键的切割,模拟以N端残基Asn⁴⁷开始的PAR1部分序列 (例如残基47-NPNDKYEPFWEDEEKNESGL-66 (“TR47”或“P1 (47-66)”) 的肽引起抗炎性细胞信号传导,这通常可涉及对炎性小体的抑制。另外,基于PAR3中Arg⁴¹和Gly⁴²之间肽键的APC切割,模拟以N端残基Gly⁴²开始的PAR3部分序列 (例如残基42-GAPPNSFEEFPFSALEGWTGATIT-65 (“P3R”) 的肽也引起抗炎性细胞信号传导。

[0032] 如本文中所详述,本发明人描述了EPCR、PAR1和PAR3在使用诱导的人巨噬细胞样细胞系增强APC的抗炎活性中的作用。本发明人发现TR47 (PAR1来源的肽) 和P3R (PAR3来源

的肽)各自单独具有抗炎作用,并且这两种肽的组合可协同发挥抗炎作用。具体地,本发明人通过使用在历史上用于研究炎性小体和APC的细胞保护活性二者的THP1模型细胞系评估了在人免疫系统中APC对炎性小体的抑制的相关性。胱天蛋白酶1是NLRP3炎性小体中的半胱氨酸蛋白酶,用于炎性小体活化的诊断。本发明人监测了活化的THP1细胞的胱天蛋白酶1活性,以评价APC对人细胞的抗炎作用。本发明人还评价了蛋白酶激活受体(PAR1来源和PAR3来源的肽,其分别模拟这两种G蛋白偶联受体(G-protein-coupled-receptor,GPCR)即TR47和P3R中APC的非典型切割)是否在人THP1细胞中发挥抗炎活性。发现在人THP1细胞系中,APC、TR47和P3R各自可限制NLRP3炎性小体,如通过胱天蛋白酶1活性和IL-1 β 释放所测量的。出乎意料地,观察到这两种肽可协同抑制炎性小体活性。PAR肽的抗炎作用指向其作为新的抗炎药理剂的效用。

[0033] 为了进一步证明所观察到的协同作用,本发明人还通过将PAR1来源的肽与PAR3来源的肽共价连接产生了PAR1/PAR3融合肽,并检测了其抗炎效力。并不意外地,发现共价连接的PAR1/PAR3肽在一定浓度下显著降低胱天蛋白酶1活性,而单独的每种组分肽的抗炎作用较小。重要的是,还观察到共价连接的PAR1/PAR3融合肽还抑制凝血酶诱导的跨内皮电阻(transendothelial electrical resistance,TEER)的降低。这些数据进一步提供了PAR1来源和PAR3来源的肽可以以协同方式发挥抗炎活性和细胞保护活性(例如,防止凝血酶诱导的内皮屏障破坏)的证据。

[0034] 根据这些发现,本发明提供了抑制或阻抑炎症的新的方法,以及用于治疗炎性疾病或病症的方法。本文中还提供了可用于实施本发明治疗方法的治疗组合物。

[0035] 除非另有说明,否则本发明可使用标准操作,如例如在以下中所述的来进行:Methods in Enzymology,第289卷:Solid-Phase Peptide Synthesis,J.N.Abelson,M.I.Simon,G.B.Fields(编辑),Academic Press;第1版(1997)(ISBN-13:978-0121821906);美国专利No.4,965,343和5,849,954;Maniatis等,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.,USA(1982);Sambrook等,Molecular Cloning:A Laboratory Manual(第2版),Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.,USA(1989);Davis等,Basic Methods in Molecular Biology,Elsevier Science Publishing,Inc.,New York,USA(1986);或Methods in Enzymology:Guide to Molecular Cloning Techniques第152卷,S.L.Berger and A.R.Kimmerl编辑,Academic Press Inc.,San Diego,USA(1987);Current Protocols in Protein Science(CPPS)(John E.Coligan等,编辑,John Wiley and Sons,Inc.),Current Protocols in Cell Biology(CPCB)(Juan S.Bonifacino等编辑,John Wiley and Sons,Inc.)和Culture of Animal Cells:AManual of Basic Technique by R.Ian Freshney,Publisher:Wiley-Liss;第5版(2005),Animal Cell Culture Methods(Methods in Cell Biology,第57卷,Jennie P.Mather and David Barnes编辑,Academic Press,第1版,1998)。以下章节为实践本发明的组合物和方法提供了另外的指导。

[0036] II.定义

[0037] 除非另外定义,否则本文中使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的含义。以下参考文献为技术人员提供了本发明中使用的许多

术语的一般定义:Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology,Smith等(编辑),Oxford University Press(修订版,2000);Dictionary of Microbiology and Molecular Biology,Singleton等(编辑),John Wiley&Sons(3PrdP ed.,2002);和A Dictionary of Biology(Oxford Paperback Reference),Martin和Hine(编辑),Oxford University Press(4PthP ed.,2000)。此外,提供以下定义以帮助读者实施本发明。

[0038] 除非上下文另外明确指示,否则没有数量词修饰的名词表示一个/种或更多个/种。类似地,除非上下文另外明确指示,否则词语“或”旨在包括“和”。

[0039] 本文中使用的术语肽的“氨基酸”是指天然存在的和合成的氨基酸,以及以类似于天然存在的氨基酸的方式起作用的氨基酸类似物和氨基酸模拟物。天然存在的氨基酸是由遗传密码编码的氨基酸,以及后来被修饰的那些氨基酸,例如羟脯氨酸、 γ -羧基谷氨酸和O-磷酸丝氨酸。氨基酸类似物是指具有与天然存在的氨基酸相同的基本化学结构,即与氢结合的碳、羧基、氨基和R基的化合物,例如高丝氨酸、正亮氨酸、甲硫氨酸亚砷、甲硫氨酸甲基砷。这样的类似物具有经修饰的R基团(例如正亮氨酸)或经修饰的肽骨架,但保留与天然存在的氨基酸相同的基本化学结构。本发明的PAR1来源的保护性多肽包括已用非天然编码氨基酸修饰的衍生物或类似物。

[0040] 本文中使用的术语“包括”或“包含”用于提及对于本发明而言必需的组合物、方法及其相应组分,但对包含未指定的要素而言是开放的,无论其是否必需。

[0041] 本文中使用的术语“基本上由……组成”是指给定实施方案所需的那些要素。该术语允许存在实质上不影响本发明的该实施方案的基本和新的或功能特征的要素。

[0042] 术语“由……组成”是指本文中所述的组合物、方法及其相应组分,其不包括在实施方案的描述中未列举的任何要素。

[0043] 术语“经保守修饰变体”或“经保守替换变体”适用于氨基酸和核酸序列二者。对于特定的核酸序列,经保守修饰变体是指编码相同或基本上相同的氨基酸序列的那些核酸,或在核酸不编码氨基酸序列的情况下是指基本上相同的序列。由于遗传密码的简并性,大量的功能相同的核酸编码任何给定的蛋白质。例如,密码子GCA、GCC、GCG和GCU都编码氨基酸丙氨酸。因此,在通过密码子指定的丙氨酸的每个位置处,可将密码子改变为任何所述相应密码子而不改变编码的多肽。这样的核酸变异是“沉默变异”,其是一种经保守修饰的变异。本文中每个编码多肽的核酸序列也描述了该核酸的每个可能的沉默变异。本领域技术人员将认识到,核酸中的每个密码子(除了通常是甲硫氨酸的唯一密码子的AUG和通常是色氨酸的唯一密码子的TGG之外)可被修饰以产生功能相同的分子。因此,编码多肽的核酸的每个沉默变异隐含在每个描述的序列中。

[0044] 对于多肽序列,“经保守修饰变体”是指具有保守氨基酸替换,即氨基酸残基被替代为具有带相似电荷的侧链的其他氨基酸残基的变体。本领域已经定义了具有带相似电荷的侧链的氨基酸残基家族。这些家族包括具有以下侧链的氨基酸:碱性侧链(例如,赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、酸性侧链(例如,天冬氨酸、谷氨酸)、不带电荷极性侧链(例如,甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸)、非极性侧链(例如,丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸)、 β -支化侧链(例如,苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和芳香族侧链(例如,酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。

[0045] 本文中使用的参考分子(例如本文中公开的抗炎肽)的“衍生物”是相对于参考分

子进行了化学修饰同时基本上保留生物活性的分子。修饰可以是例如寡聚或聚合、氨基酸残基或肽骨架的修饰、交联、环化、缀合、融合至另外的异源氨基酸序列,或者显著改变肽的稳定性、溶解度或其他特性的其他修饰。

[0046] 术语“降低(decrease)”、“减少的(reduced)”、“减少(reduction)”、“降低”或“抑制”在本文中通常全部用于意指统计学上显著的量的减少。然而,为了避免疑问,与参照水平相比,“减少的”、“减少”或“降低”或“抑制”意指与参照水平相比降低至少10%,例如与参照水平相比降低至少约20%、或至少约30%、或至少约40%、或至少约50%、或至少约60%、或至少约70%、或至少约80%、或至少约90%或者多至并且包括100%的降低(例如,与参照样品相比不存在的水平)、或者10%至100%的任意降低。

[0047] 术语“经改造细胞”或“重组宿主细胞”(或简称“宿主细胞”)是指其中已引入重组表达载体的细胞。应理解,这样的术语不仅旨在是指特定的对象细胞,而且还指这样的细胞的子代。因为某些修饰可能由于突变或环境影响而后代中发生,所以这样的子代实际上可能与亲本细胞不同,但仍包括在本文中使用的术语“宿主细胞”的范围内。

[0048] 术语“片段”是指具有比其氨基酸残基序列在本文中所述的全长多肽更短的氨基酸残基序列的任何肽或多肽。与其亲本全长PAR1相比,PAR1的分离肽被缩短或截短。相对于全长PAR1序列,本发明的PAR3或PAR1来源的多肽或肽通常分别在保守的Arg⁴¹和Arg⁴⁶残基之后具有N端截短,并且可能具有如本文中所述的另外的N端缺失或替换。这些片段可另外包含C端截短(例如,多至50、100、200、300或更多个C端残基的截短)和/或还有内部缺失。

[0049] “炎症”或“炎性应答”是指当组织受到细菌、创伤、毒素、热或任何其他原因的损伤时发生的固有免疫应答。受损组织释放化合物,包括组胺、缓激肽和5-羟色胺。炎症是指急性应答(即其中炎性过程活跃的应答)和慢性应答(即以缓慢进展和新结缔组织形成为特征的应答)二者。急性和慢性炎症可通过所涉及的细胞类型来区分。急性炎症通常涉及多形核中性粒细胞;而慢性炎症通常以淋巴组织细胞和/或肉芽肿性应答为特征。炎症包括特异性和非特异性防御系统二者的反应。特异性防御系统反应是针对抗原(可能包括自身抗原)的特异性免疫系统反应应答。非特异性防御系统反应是由不具有免疫记忆能力的白细胞介导的炎性应答。这样的细胞包括粒细胞、巨噬细胞、中性粒细胞和嗜酸性粒细胞。

[0050] 炎性疾病是由异常调节的炎性应答引起的疾病,例如类风湿性关节炎、枯草热和动脉粥样硬化。炎症或炎性应答是指当组织受到细菌、创伤、毒素、热或任何其他原因的损伤时发生的固有免疫应答。受损组织释放化合物,包括组胺、缓激肽和5-羟色胺。炎症包括急性应答(即其中炎性过程活跃的应答)和慢性应答(即以缓慢进展和新结缔组织形成为特征的应答)二者。急性和慢性炎症可通过所涉及的细胞类型来区分。急性炎症通常涉及多形核中性粒细胞;而慢性炎症通常以淋巴组织细胞和/或肉芽肿性应答为特征。炎症包括特异性和非特异性防御系统二者的反应。特异性防御系统反应是针对抗原(可能包括自身抗原)的特异性免疫系统反应应答。非特异性防御系统反应是由不具有免疫记忆能力的白细胞介导的炎性应答。这样的细胞包括粒细胞、巨噬细胞、中性粒细胞和嗜酸性粒细胞。

[0051] 术语“分离的”意指蛋白质从其自然环境中去除。然而,与其一起发现的一些组分可继续与“分离的”蛋白质一起存在。因此,“分离的多肽”不是其在自然界中出现的那样,但可以是基本上低于100%的纯蛋白质。

[0052] 在两个或更多个核酸或多肽序列的上下文中,术语“相同的”或百分比“同一性”是

指两个或更多个相同的序列或子序列。当两个序列在比较窗口或指定区域进行比较和比对以获得最大对应性时,如果两个序列具有指定百分比的相同氨基酸残基或核苷酸(即,在指定区域或者当未指定时在整个序列上60%的同一性,任选65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或99%同一性),如使用以下序列比较算法之一或通过手动对齐和目视检查所测量的,则两个序列是“基本上相同的”。任选地,同一性存在于长度为至少约50个核苷酸(或10个氨基酸)的区域,或更优选地存在于长度为100至500或1000或更多个核苷酸(或者20、50、200或更多个氨基酸)的区域。

[0053] 用于比较的序列比对方法是本领域公知的。可进行用于比较的序列的最佳比对,例如,通过Smith and Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482c, 1970的局部同源算法;通过Needleman and Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443, 1970的同源比对算法;通过检索Pearson and Lipman, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 85:2444, 1988的相似性方法;通过这些算法的计算机化实施(Wisconsin Genetics软件包, Genetics Computer Group, Madison, WI中的GAP、BESTFIT、FASTA和TFASTA);或通过手动比对和目视检查(参见,例如, Brent等, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc. (ringbou ed., 2003))。适用于确定序列同一性和序列相似性百分比的算法的两个实例是BLAST和BLAST 2.0算法,其分别在Altschul等, *Nuc. Acids Res.* 25:3389-3402, 1977;和Altschul等, *J. Mol. Biol.* 215:403-410, 1990中描述。

[0054] 除了上述序列同一性百分比之外,两个核酸序列或多肽基本上相同的另一个指示是由第一核酸编码的多肽与针对由第二核酸编码的多肽产生的抗体存在免疫交叉反应,如下所述。因此,例如,在两种肽仅通过保守替换而不同的情况下,一种多肽通常与第二种多肽基本上相同。两个核酸序列基本上相同的另一个指示是两个分子或其互补物在严格条件下彼此杂交,如下所述。两个核酸序列基本上相同的另一个指示是相同的引物可用于扩增该序列。

[0055] 除非另有说明,否则术语“多肽”和“肽”在本文中可互换使用(例如,“PAR3来源的抗炎多肽”和“PAR1来源的抗炎肽”)以指氨基酸残基的聚合物。其包括短寡肽(例如,少于约25个残基的肽)和更长的多肽分子(例如,多于约25或30个氨基酸残基的聚合物)二者。通常,本发明的抗炎肽(寡肽)或多肽可包含长度为约4个氨基酸残基至约350个或更多个氨基酸残基。在一些实施方案中,肽或多肽包含长度为约8个氨基酸残基至约60个氨基酸残基。本发明的抗炎肽或多肽包括天然存在的氨基酸聚合物和非天然存在的氨基酸聚合物,以及其中一个或更多个氨基酸残基是相应的天然存在氨基酸的人工化学模拟物的氨基酸聚合物。除非另有说明,否则特定的多肽序列也隐含地包括其经保守修饰变体。

[0056] 本文中使用的术语“肽模拟物”是指参考肽(例如,本文中公开的抗炎多肽)的生物学模拟肽功能的衍生化合物。通常来说,本发明的PAR1来源的抗炎多肽的肽模拟物衍生物具有参考多肽的至少50%、至少75%或至少90%的生物活性(例如,抑制胰天蛋白酶1活性)。

[0057] 术语“可操作地连接”是指两个或更多个多核苷酸(例如, DNA)区段之间的功能关系。通常来说,其是指转录调控序列与转录序列的功能关系。例如,如果启动子或增强子序列在适当的宿主细胞或其他表达系统中刺激或调节编码序列的转录,则它与编码序列可操作地连接。通常来说,与转录序列可操作地连接的启动子转录调控序列与转录序列是物理

上连续的,即它们是顺式作用的。然而,一些转录调控序列,例如增强子,不需要是物理上连续的或不需位于其增强转录的编码序列附近。

[0058] 本文中使用的术语“直系同源物”或“同源物”是指来自不同物种或生物体的共有基本序列同一性并具有相同或相似功能的多肽。例如,分别来自人、兔、大鼠、小鼠和许多其他动物物种的PAR3和PAR1是直系同源物,因为其序列和功能相似。

[0059] 短语“信号转导途径”或“信号传导活性”(例如,APC、PAR3或PAR1介导的细胞保护信号传导)是指至少一个生化反应,但更常见的是一系列生化反应,其是由细胞与刺激性化合物或试剂的相互作用产生的。因此,刺激性化合物(例如,PAR3来源或PAR1来源的肽)与细胞的相互作用产生了通过信号转导途径传递的“信号”,最终导致细胞应答。

[0060] 术语“对象”包括人和非人动物。非人动物包括所有脊椎动物,例如哺乳动物和非哺乳动物,例如非人灵长类、绵羊、狗、牛、鸡、两栖动物和爬行动物。除非另有说明,否则术语“患者”或“对象”在本文中可互换使用。

[0061] 术语“试剂”包括任何物质、分子、元素、化合物、实体,或其组合。其包括但不限于例如蛋白质、多肽、有机小分子、多糖、多核苷酸等。其可以是天然产物、合成化合物或化学化合物,或两种或更多种物质的组合。除非另有说明,否则术语“试剂”、“物质”和“化合物”在本文中可互换使用。

[0062] 与一种或更多种其他治疗剂“联合”施用包括以任何顺序同时(并行)和连续施用。

[0063] 术语“接触”具有其正常含义并且是指组合两种或更多种试剂(例如,多肽或小分子化合物)或组合试剂与细胞。接触可在体外发生,例如在试管或其他容器中组合两种或更多种试剂或者组合试剂与细胞或细胞裂解物。接触也可在细胞中或原位发生,例如,通过在细胞中或在细胞裂解物中共表达编码两种多肽的重组多核苷酸使细胞中的所述两种多肽接触。接触也可在对象体内发生,例如,通过向对象施用随后与预期靶标(例如,组织或细胞)相互作用的试剂。

[0064] 蛋白酶激活受体(PAR)是通过切割其胞外结构域的一部分而被活化的相关G蛋白偶联受体的亚家族。其在血小板以及还在内皮细胞、肌细胞和神经元中高表达。有4种已知的蛋白酶激活受体,PAR1、PAR2、PAR3和PAR4。它们是七跨膜G蛋白偶联受体超家族的成员。PAR由丝氨酸蛋白酶例如凝血酶(作用于PAR1、3和4)、活化蛋白C(作用于PAR1、2和3)、胰蛋白酶(作用于PAR2)或其他蛋白酶在N端的作用而活化,以显示束缚配体。PAR信号传导的限速步骤由N端的蛋白水解效率所决定,所述N端的蛋白水解效率受到变构结合位点、辅因子、膜定位和受体二聚化的调节。这最终控制了PAR信号传导的启动。另外,这些因素还通过将信号传导引导至G蛋白或 β -拘留蛋白途径来控制细胞应答。内皮细胞上的PAR1信号传导受到活化蛋白酶以及PAR2或PAR3的异二聚化的控制。凝血酶的细胞作用由蛋白酶激活受体(PAR)介导。血小板中的凝血酶信号传导有助于止血和血栓形成。

[0065] PAR1不仅在所有类型的血细胞中表达,而且还在上皮、神经元、星形胶质细胞和免疫细胞中表达。PAR1最初被确定为凝血酶受体,但后来鉴定了其他激动剂,例如活化蛋白C(APC)。这些蛋白酶激动剂蛋白水解去除了PAR1的部分N端胞外区,产生新的束缚配体,其与受体本体相互作用以诱导跨膜信号传导,从而触发广泛的信号传导途径。例如,PAR1参与调节血管紧张和内皮细胞的通透性。在血管平滑肌中,其介导收缩、增殖和肥大。PAR1有助于在动脉粥样硬化和再狭窄中观察到的促炎性应答。

[0066] 蛋白酶激活受体3 (PAR3) 也被称为凝血因子II受体样2 (F2RL2) 和凝血酶受体样2, 是在人中由F2RL2基因编码的蛋白质。PAR3通过其胞外氨基端的蛋白水解切割而被活化。如同PAR1, PAR3的新氨基端作为束缚配体发挥作用并激活受体。已知PAR3是小鼠血小板中凝血酶激活PAR4的辅因子, 同时PAR3可促进人细胞中PAR1的活化。如同PAR1, PAR3也在血管内皮细胞上表达。类似的低水平但可检测到的PAR3表达在人血小板中也很明显。

[0067] 本文中使用的“治疗”或“改善”是指(i)防止病理状况(例如, 炎症性疾病)发生(例如, 预防); (ii)抑制病理状况或阻滞其发展; 和(iii)缓解与病理状况相关的症状。因此, “治疗”包括施用本文中所述的治疗化合物或组合物以预防或延缓本文中所述疾病的症状、并发症或生化指标的发作, 减轻或改善疾病、病症或障碍的症状或者阻滞或抑制疾病、病症或障碍的进一步发展。“治疗”还指成功治疗或改善或者预防本文中所述的疾病、病症或障碍的任何标志, 包括任何客观或主观参数, 例如减轻; 缓解; 减弱症状或使疾病状况对于患者更可忍受; 使退化或衰退的速率减慢; 或使退化的终点不那么使人衰弱。用于治疗或改善疾病或其症状的详细操作可基于客观或主观参数, 包括医师检查的结果。

[0068] 本文中使用的术语“变体”是指包含与参考分子的序列基本上相同的序列的分子(例如, 多肽或多核苷酸)。例如, 参考分子可以是N端截短的PAR3或PAR1多肽(例如, SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:5)或者编码所述多肽的多核苷酸。参考分子也可以是本文中公开的PAR3或PAR1来源的抗炎多肽或者编码所述抗炎多肽(例如P3R或TR47)的多核苷酸。在一些实施方案中, 变体可与参考分子共有至少50%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%或更多的序列同一性。在一些其他实施方案中, 变体与参考分子的不同之处在于具有一个或多个保守氨基酸替换。在一些其他实施方案中, 参考分子(例如, 抗炎多肽P3R或TR47)的变体具有改变的氨基酸序列(例如, 具有一个或多个保守氨基酸替换)但基本上保留了参考分子的生物活性(例如, 激活PAR3或PAR1信号传导)。保守氨基酸替换是本领域技术人员公知的。

[0069] 术语“载体”旨在是指能够转运已与其连接的另一多核苷酸的多核苷酸分子。一种类型的载体是“质粒”, 其是指另外的DNA区段可连接到其中的环状双链DNA环。另一种类型的载体是病毒载体, 其中另外的DNA区段可连接到病毒基因组中。某些载体能够在引入它们的宿主细胞中自主复制(例如, 具有细菌复制起点的细菌载体和游离型哺乳动物载体)。另一些载体(例如, 非游离型的哺乳动物载体)在引入到宿主细胞中之后可整合到宿主细胞的基因组中, 并从而与宿主基因组一起复制。此外, 某些载体能够指导与其可操作连接的基因的表达。这样的载体在本文中被称为“重组表达载体”(或简称为“表达载体”)。

[0070] III. PAR3来源和PAR1来源的抗炎肽和衍生化合物

[0071] 本发明提供了与使用PAR3来源和PAR1来源的抗炎肽或多肽来抑制炎症和治疗炎症病症或疾病相关的方法和组合物。PAR3来源和PAR1来源的抗炎肽分别是指具有抗炎活性并且来源于PAR3和PAR1的通过APC在非典型切割位点切割之后的N端序列或其片段的肽或多肽。在多个实施方案中, PAR3来源和PAR1来源的抗炎肽也可具有细胞保护活性。肽的细胞保护活性包括由APC信号传导途径介导的任何非抗凝保护性细胞活性, 特别是与抑制凋亡和促进细胞存活有关的活性。其包括激活PI3K-Akt存活途径、预防凝血酶诱导的内皮屏障破坏、抑制内皮细胞凋亡(例如, 通过阻断p53的促凋亡活性或通过其他机制)、巨噬细胞分泌TNF- α 、降低内皮细胞中的细胞NF κ B活化、防止白细胞黏附到活化的内皮细胞、通过1磷酸鞘氨醇释放或1磷酸鞘氨醇受体1 (S1P1) 激活或者通过Tie2激活诱导内皮细胞屏障完整性

的稳定。这样的活性可使用本领域公知的方法容易地评估,例如内皮屏障测定和体内血管通透性测定。参见,例如,Mosnier等,Blood.120:5237-5246,2012;Burnier and Mosnier, Blood 122:807-816,2013;和Stavenuiter and Mosnier,Blood 124:3480-3489,2014。

[0072] 如本文中用肽P3R和TR47或其多种片段分别示例的,PAR3来源和PAR1来源的抗炎肽与模拟以第42位残基开始的PAR1序列的肽(所谓的TRAP试剂)或模拟以第39位残基开始的PAR3序列的肽(P3K试剂)相比不同地激活PAR1和PAR3,并引起不同种类的细胞信号传导。来源于PAR3和PAR1的通过APC在非典型切割位点切割之后的N端序列的任何PAR3来源和PAR1来源的抗炎肽均可用于本发明。具体地,PAR1在Arg⁴¹的典型位点处被APC(和其他蛋白酶,特别是凝血酶)切割。模拟在Arg⁴¹处切割时产生的新N端的肽通常被称为凝血酶受体激活肽(Thrombin Receptor Activating Peptide, TRAP)。PAR1的凝血酶切割或用TRAP处理细胞通常是促炎性的,并且通常可能对细胞或动物有害,这取决于动物的细胞、器官或环境。APC还在非典型位点Arg⁴⁶处切割PAR1,产生新的N端,如肽TR47(在本文中又称为“P1(47-66)”) (47-NPNDKYEPFWEDEEKNESGL-66;SEQ ID NO:7)所示。TRAP和TR47是PAR1活化的激动剂。然而,已表明TR47充当激动剂,其活性谱与TRAP的明显不同。PAR3在典型位点(Lys38)处被蛋白酶(例如凝血酶)切割。模拟在Lys38发生切割时产生的新N端的肽(例如,以Thr39开始的序列,例如肽“P3K”)可在激活凝血酶介导的途径中充当PAR3的激动剂。与PAR1类似,PAR3也可在非典型位点(Arg⁴¹)处被切割,产生新的N端,如肽P3R(本文中也被称为“P3(42-65)”) (42-GAPPNSFEEFPFSALEGWTGATIT-65;SEQ ID NO:4)所示。肽P3R和P3K是PAR3激活的激动剂。然而,已表明P3R显示出充当具有与P3K明显不同的活性谱的激动剂。

[0073] 如本文中所示例的,模拟以N端残基Asn⁴⁷开始的PAR1部分序列的PAR1来源的抗炎肽(例如肽TR47)能够引起抗炎细胞信号传导。抗炎细胞信号传导可通过例如抑制炎症小体和/或抑制胱天蛋白酶1活化的活性来表明。类似地,模拟以N端残基Gly⁴²开始的PAR3部分序列的PAR3来源的抗炎肽(例如,肽P3R)或其一些片段也能够引起抗炎细胞信号传导。P3R和P3K是PAR3活化的激动剂。实例表明,P3R显示出充当具有与P3K明显不同的活性谱的激动剂。

[0074] 通常来说,用于实施本发明的PAR3来源的抗炎肽包含(1)Met¹-Arg⁴¹缺失的人PAR3序列(SEQ ID NO:2)或其经保守修饰变体的至少前4个N端残基,或者(2)人PAR3来源的肽P3R(SEQ ID NO:4)或其经保守修饰变体的至少4个连续氨基酸残基,所述至少4个连续氨基酸残基包含SEQ ID NO:3的Phe¹⁰-Phe¹²基序。在一些实施方案中,肽具有来源于可溶的、Met¹-Arg⁴¹缺失的人PAR3胞外序列(SEQ ID NO:3)的N端残基的序列。在这些实施方案中的一些中,抗炎PAR3来源的多肽包含SEQ ID NO:3或经保守修饰变体序列的前25个或更多个N端残基。在一些实施方案中,抗炎PAR3来源的多肽包含肽P3R(SEQ ID NO:4)或经保守修饰变体序列的前4、5、6、7、8、9、10、11、12或更多个N端残基。在一些实施方案中,抗炎PAR3来源的多肽包含肽P3R(SEQ ID NO:4)或经保守修饰变体序列的前13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23或24个N端残基。在一些实施方案中,抗炎PAR3来源的多肽包含SEQ ID NO:4或其经保守修饰变体的至少5、6、7、8、9、10、11、12或更多个连续氨基酸残基,其包含Phe¹⁰-Phe¹²基序。在一些实施方案中,抗炎PAR3来源的多肽包含SEQ ID NO:4或其经保守修饰变体的至少13、14、15、16、17、18、19、20、21、22或更多个连续氨基酸残基,其包含Phe¹⁰-Phe¹²基序。这些PAR3来源的肽中的一些包含含有Phe¹⁰-Trp¹⁸基序的序列(SEQ ID NO:10)或经保守修饰

变体。适用于本发明的PAR3来源的抗炎多肽的数个具体实例是P3R (SEQ ID NO:4)、P3Rm或P3 (42-54) (GAPPNSFEEFPFS;SEQ ID NO:8)、P3R51-65或P3 (51-65) (FPFSALEGWTGATIT;SEQ ID NO:9),和P3R51-59或P3 (51-59) (FPFSALEGW;SEQ ID NO:10),或其经保守修饰变体。PAR3来源的抗炎多肽的另外的一些实例包括GAPPNSFEEFPFSA (SEQ ID NO:11), GAPPNSFEEFPFSAL (SEQ ID NO:12), GAPPNSFEEFPFSALE (SEQ ID NO:13), GAPPNSFEEFPFSALEG (SEQ ID NO:14), GAPPNSFEEFPFSALEGW (SEQ ID NO:15), GAPPNSFEEFPFSALEGWT (SEQ ID NO:16), GAPPNSFEEFPFSALEGWTG (SEQ ID NO:17), GAPPNSFEEFPFSALEGWTGA (SEQ ID NO:18), GAPPNSFEEFPFSALEGWTGAT (SEQ ID NO:19), GAPPNSFEEFPFSALEGWTGATI (SEQ ID NO:20), FPFSALEGWT (SEQ ID NO:21), FPFSALEGWTG (SEQ ID NO:22), FPFSALEGWTGA (SEQ ID NO:23), FPFSALEGWTGAT (SEQ ID NO:24), FPFSALEGWTGATI (SEQ ID NO:25), FPFSALEG (SEQ ID NO:26), FPFSALE (SEQ ID NO:27), FPFSA (SEQ ID NO:28), EFPFSAL (SEQ ID NO:29),和EEFPFSAL (SEQ ID NO:30),或其经保守修饰变体。在本发明的用于抑制炎症和/或用于治疗炎症病症的方法中,任何这些PAR3来源的肽可单独使用或与本文中所述的PAR1来源的肽组合使用。

[0075] 通常来说,用于实践本发明的PAR1来源的抗炎肽具有与Met¹-Arg⁴⁶缺失的人PAR1序列 (SEQ ID NO:5)、变体 (例如,具有保守替换的Met¹-Arg⁴⁶缺失的人PAR1序列)、直系同源物 (例如,具有相似缺失的非人PAR1序列)的相应N端残基基本上相同的至少前4或5个N端残基,或者是具有进一步N端修饰 (氨基酸替换或缺失)的TR47 (又称为P1 (47-66)) (SEQ ID NO:7)变体。优选地,肽具有来源于可溶的、Met¹-Arg⁴⁶缺失的人PAR1胞外序列 (SEQ ID NO:6)的N端残基的序列。在一些实施方案中,抗炎PAR1来源的多肽具有与SEQ ID NO:6的相应N端残基基本上相同的至少前4个N端残基。在这些实施方案中的一些中,抗炎PAR1来源多肽包含SEQ ID NO:6或经保守修饰变体序列的前21个或更多个N端残基。在一些优选的实施方案中,PAR1来源的抗炎肽包含肽TR47 (SEQ ID NO:7)或经保守修饰变体序列的前6、7、8、9、10、11、12或更多个N端残基。如本文中以TR47 8聚体、TR47 9聚体和TR47 16聚体所示例的,这些肽相对于TR47保持实质性抗炎活性。在一些实施方案中,PAR1来源的抗炎肽包含SEQ ID NO:7或经保守修饰变体序列的前13、14、15、16、17、18、19或更多个N端残基。在一些其他实施方案中,PAR1来源的抗炎肽是在N端具有突变的TR47变体。这些包括在N端具有前1、2、3、4、5、6、7、8个或更多个残基缺失的TR47变体。其还包括在N端具有一个或更多个氨基酸替换的TR47变体。如本文中以TR47 (N-1)、TR47 (N-5)、TR47 ΔQ和TR47 ΔA所示例的,这些TR47变体肽相对于TR47也保持显著的抗炎活性。

[0076] 适用于本发明的PAR1来源的抗炎多肽的一些具体实例示出于SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:7 (肽TR47),以及肽

[0077] NPND (SEQ ID NO:31), NPNDK (SEQ ID NO:32), NPNDKY (SEQ ID NO:33), NPNDKYE (SEQ ID NO:34), NPNDKYEP (SEQ ID NO:35), NPNDKYEPF (SEQ ID NO:36), NPNDKYEPFW (SEQ ID NO:37), NPNDKYEPFWE (SEQ ID NO:38), NPNDKYEPFWED (SEQ ID NO:39), NPNDKYEPFWEDE (SEQ ID NO:40), NPNDKYEPFWEDEE (SEQ ID NO:41), NPNDKYEPFWEDEEK (SEQ ID NO:42), NPNDKYEPFWEDEEKN (SEQ ID NO:43), NPNDKYEPFWEDEEKNE (SEQ ID NO:44), NPNDKYEPFWEDEEKNES (SEQ ID NO:45), NPNDKYEPFWEDEEKNESG (SEQ ID NO:46), PNDKYEPFWEDEEKNESGL (SEQ ID NO:47), NDKYEPFWEDEEKNESGL (SEQ ID NO:51),

DKYEPFWEDEEEKNESGL (SEQ ID NO:57), KYEPFWEDEEEKNESGL (SEQ ID NO:58), YEPFWEDEEEKNESGL (SEQ ID NO:48), EPFWEDEEEKNESGL (SEQ ID NO:59), PFWEDEEEKNESGL (SEQ ID NO:60), QPNDKYEPFWEDEEEKNESGL (SEQ ID NO:49) 和 APNDKYEPFWEDEEEKNESGL (SEQ ID NO:50)。

[0078] 在本发明的用于抑制炎症和/或用于治疗炎症病症的方法中,任何这些PAR1来源的肽可单独使用或与本文中所述的PAR3来源的肽组合使用。

[0079] 除上述肽之外,适用于本发明的抗炎化合物还包括来源于本文中示例的来源于PAR3来源和PAR1来源的抗炎肽或多肽的相关或衍生化合物。这些相关或衍生化合物包括变体、类似物、模拟物、复合物或融合分子(包含该肽或多肽),以及来源于PAR3来源和PAR1来源的抗炎肽或多肽的其他化合物。在一些优选的实施方案中,衍生化合物具有与本文中示例的PAR3来源和PAR1来源的抗炎肽或多肽(例如,P3R和TR47肽)基本上相同的化学或生物活性。相关或衍生化合物可包括例如具有基本上相同的序列的肽或多肽,例如经保守修饰变体。其还包括分别来源于非人直系同源物PAR3和PAR1序列的肽或多肽。适用于本发明的相关或衍生化合物还包括变体、类似物、多聚体、肽模拟物、与其他分子(例如载体部分)的融合物,或可从本文中示例的PAR3来源和PAR1来源的抗炎多肽(例如,肽P3R和TR47)产生的其他衍生物。可对这些衍生化合物实施适当的测定或筛选方法以鉴定具有优化活性的抗炎化合物。在一些实施方案中,衍生化合物是通过保守氨基酸替换产生的示例性肽的经修饰形式。在一些其他实施方案中,衍生化合物是通过非保守替换(其程度是其基本上保留了那些肽的活性)产生的变体。可使用本领域常规实施的标准技术对抗炎肽进行修饰(例如,美国专利申请20080090760和20060286636)。

[0080] 在一些实施方案中,本发明的示例性PAR-3和PAR1来源的抗炎多肽(例如肽P3R或TR47)的衍生化合物是类似物,或其包含一种或更多种天然存在的二十种标准氨基酸的氨基酸衍生物,例如,4-羟脯氨酸、5-羟赖氨酸、3-甲基组氨酸、高丝氨酸、鸟氨酸或羧基谷氨酸,并且可包含不通过多肽键连接的氨基酸。类似地,其也可以是环状多肽和其他构象受限的结构。用于修饰多肽以产生类似物和衍生物的方法是本领域公知的,例如,Roberts and Vellaccio, *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*, Gross and Meinhofer编辑,第5卷,第341页,Academic Press, Inc., New York, N.Y. (1983); 和Burger's *Medicinal Chemistry and Drug Discovery*, Manfred E. Wolff编辑,第15章,第619-620页, John Wiley & Sons Inc., New York, N.Y. (1995)。

[0081] 示例性PAR3来源和PAR1来源的抗炎多肽的一些其他衍生化合物是肽模拟物。基于PAR3来源和PAR1来源的抗炎肽(例如肽P3R或TR47)的肽模拟物基本上保留了参考肽的活性。其包括结构与肽模拟物所来源的参考多肽或肽基本上相同的经化学修饰的肽或多肽、包含非天然存在氨基酸的多肽样分子、类肽等(参见,例如,Burger's *Medicinal Chemistry and Drug Discovery*, 1995, 同上)。例如,肽模拟物可具有一个或更多个通过官能侧基反应而化学衍生化的残基。除侧基衍生化之外,化学衍生物可具有一个或更多个骨架修饰,包括 α -氨基取代,例如N-甲基、N-乙基、N-丙基等,以及 α -羰基取代,例如硫酯、硫代酰胺、胍等。通常来说,当与参考多肽相比时,肽模拟物显示出相当程度的结构同一性,并表现出可识别或者已知来源于参考多肽或与参考多肽相关的特征。肽模拟物包括,例如表现出与参考多肽类似特性(例如电荷和电荷间隔特征)的有机结构。肽模拟物还可包括受限结

构以保持氨基酸官能团的最佳间隔和电荷相互作用。

[0082] 在一些实施方案中,本文中所述的PAR3来源和PAR1来源的抗炎肽或多肽的衍生化合物是具有通过任何常规方法与载体部分共价或非共价缀合的肽或多肽的分子。“载体部分”(“载体”或“载体分子”)是能够增强多肽的免疫原性的缀合配偶体。合适的载体通常是大的、缓慢代谢的大分子,例如蛋白质;多糖(例如乳胶官能化的SEPHAROSE™、琼脂糖、纤维素、纤维素珠等);聚合氨基酸(如聚谷氨酸、聚赖氨酸等);氨基酸共聚物;和无活性的病毒颗粒或减毒细菌,例如沙门氏菌(*Salmonella*)。在多个实施方案中,载体部分可以是载体蛋白、免疫球蛋白、Fc结构域、PEG分子或其他聚合物。在一些实施方案中,载体部分是蛋白质。来自例如大肠杆菌(*E. coli*)和其他细菌的整合膜蛋白是有用的缀合配偶体。特别有用的载体蛋白是血清白蛋白、匙孔咸血蓝蛋白(keyhole limpet hemocyanin, KLH)、某些免疫球蛋白分子、甲状腺球蛋白、卵白蛋白、牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)、破伤风类毒素(tetanus toxoid, TT)和白喉类毒素(CRM)。在一些其他实施方案中,载体部分可以是除蛋白质或多肽之外的聚合物。这样的聚合物的实例包括例如碳水化合物,例如葡聚糖、甘露糖或甘露聚糖。

[0083] 在一些实施方案中,本文中所述的PAR3来源和PAR1来源的抗炎肽、变体或衍生物是二聚化或多聚化分子。在这些实施方案中的一些中,抗炎剂的二聚化或多聚化可通过与至少一个接头部分共价连接来实现。在组合治疗的一些实施方案中,PAR3来源的肽或变体(例如,P3R或P3R(51-59))可与PAR1来源的肽或变体(例如,TR47或TR47 8聚体)缀合。PAR3来源和/或PAR1来源的肽的同源多聚化或异源多聚化可通过多种合适的方式实现。例如,肽可通过重组技术共价连接。在一些实施方案中,本发明的多聚化分子可利用上述载体部分。在这些实施方案中的一些中,载体分子或部分可用于将PAR3来源的肽(例如,P3R或P3R(51-59))与PAR1来源的肽(例如,TR47或TR47 8聚体)缀合。在一些实施方案中,肽或多肽还可与C₁₋₁₂连接部分缀合,该C₁₋₁₂连接部分任选地以一个或两个-NH-键联终止并且任选地在一个或更多个可用碳原子处被低级烷基取代基取代。

[0084] 本文中所述的PAR3和/或PAR1来源的肽可通过其他化学键键联来连接,例如通过二硫键或通过化学桥的键联。在一些其他实施方案中,本文中所述的抗炎肽可以以串联方式物理连接以形成PAR3来源或PAR1来源的肽的聚合物。构成这样的聚合物的肽可通过肽接头彼此隔开。例如,PAR3来源的肽可通过甘氨酸接头与PAR1来源的肽共价键合,如本文中所示例的。在多个实施方案中,甘氨酸接头可包含约2至约20个甘氨酸残基。在这些实施方案中,PAR3来源的肽可通过接头与PAR1来源的肽的N端或C端键合。在一些实施方案中,可使用本领域公知的其他分子生物学技术来产生肽聚合物。在一些实施方案中,聚乙二醇(PEG)可用作使两种肽单体二聚化的接头。例如,包含两个反应性官能团的单个PEG部分可同时与肽二聚体的两条肽链的N端连接。这些肽在本文中被称为“聚乙二醇化肽”。在一些实施方案中,本发明的肽单体可使用生物素/链霉亲和素系统进行寡聚化。

[0085] 在这些缀合方案中的任何一种中,PAR3来源的肽(例如,P3R或P3R(51-59))和PAR1来源的肽(例如,P3R或P3R(51-59))的不同拷贝可在异源多聚化的分子中连接。在这些实施方案中的一些中,对于连接的PAR1来源肽的每个拷贝,PAR3来源肽的多个拷贝与载体部分连接。例如,多聚化分子可包含载体部分,其中PAR3来源的肽和PAR1来源的肽以至少约20:1、15:1、12:1、10:1、8:1、6:1、4:1或2:1的比例连接。在一些其他实施方案中,对于连接的

PAR3来源肽的每个拷贝,PAR1来源肽的多个拷贝与载体部分连接。例如,多聚化分子可包含载体部分,其中PAR1来源的肽和PAR3来源的肽以至少约20:1、15:1、12:1、10:1、8:1、6:1、4:1或2:1的比例连接。根据如本文中所述的两种肽或其衍生化合物要达到的具体剂量,这些缀合比例中的任何一种可用于构建异源多聚化分子以实施本发明的方法。

[0086] 本领域已知的用于稳定肽的方法可与本文中所述的方法和组合物一起使用。例如,使用D-氨基酸、使用还原的酰胺键作为肽骨架,以及使用非肽键连接侧链,包括但不限于吡咯啉酮和糖模拟物,都可提供稳定性。糖支架肽模拟物的设计和合成在本领域中有所描述,例如,Hirschmann等,J. Med. Chem. 36, 2441-2448, 1996。此外,基于吡咯啉酮的肽模拟物在具有改善的生物利用度特征的稳定背景上呈现肽药效团。参见,例如,Smith等,J. Am. Chem. Soc. 122, 11037-11038, 2000。

[0087] 在一些实施方案中,示例性抗炎PAR3和PAR1肽或多肽的衍生化合物包括序列内的修饰,例如通过末端-NH₂酰化(例如乙酰化)的修饰,或通过末端羧基酰胺化的巯基乙酸酰胺化修饰,例如用氨、甲胺等末端修饰。还可修饰本文中所述多肽的氨基和/或羧基端。末端修饰可用于降低蛋白酶消化的敏感性,并且因此可用于延长多肽在溶液中,特别是在其中可存在蛋白酶的生物流体中的半衰期。氨基端修饰包括甲基化(例如,-NHCH₃或-N(CH₃)₂)、乙酰化(例如,用乙酸或其卤代衍生物,例如 α -氯乙酸、 α -溴乙酸或 α -碘乙酸)、添加苄氧羰基(Cbz)基团、或用包含由RCOO-限定的羧酸酯官能性或由R-SO₂-限定的磺酰基官能性的任何封闭基团封闭氨基端,其中R选自烷基、芳基、杂芳基、烷基芳基等,以及类似的基团。也可在N端并入脱氨基酸(使得没有N端氨基)以降低对蛋白酶的敏感性或限制肽化合物的构象。在一些实施方案中,N端用乙酸或乙酸酐乙酰化。

[0088] 羧基端修饰包括用羧酰胺基团代替游离酸或在羧基端处形成环状内酰胺以引入结构约束。还可环化本文中所述的肽,或在肽的末端并入脱氨基或脱羧基残基,使得不存在末端氨基或羧基,以降低对蛋白酶的敏感性或限制肽的构象。环肽合成的方法是本领域已知的,例如,在美国专利申请No. 20090035814;以及Muralidharan and Muir, Nat. Methods, 3: 429-38, 2006中。本文中所述的肽的C端官能团包括酰胺、酰胺低级烷基、酰胺二(低级烷基)、低级烷氧基、羟基和羧基,及其低级酯衍生物,及其可药用盐。

[0089] 本文中所述的PAR3来源和PAR1来源的抗炎肽或多肽化合物也作用于具有相似生物活性的非肽化合物的结构模型。有多种技术可用于构建与PAR3来源和PAR1来源的肽具有相同或相似的期望生物活性,但在溶解度、稳定性以及对水解和蛋白水解的敏感性方面具有更有利的活性的化合物。参见,例如,Morgan and Gainor, Ann. Rep. Med. Chem. 24: 243-252, 1989。这些技术包括但不限于用由膦酸盐/酯、酰胺化物、氨基甲酸盐/酯、磺酰胺、仲胺和N-甲基氨基酸构成的骨架代替肽骨架。

[0090] IV. PAR3来源和PAR1来源的抗炎肽和相关化合物的合成

[0091] 本文中所述的PAR3来源和PAR1来源的抗炎多肽,包括其变体和衍生物,可通过本领域公知的标准化学或生物化学方法化学合成和纯化。上文中描述了用于产生PAR3来源和PAR1来源的抗炎多肽的类似物或衍生化合物的一些方法。可用于产生本发明的抗炎多肽及其衍生化合物的其他方法包括例如固相肽合成。例如,可使用本领域中描述的t-Boc(叔丁氧基羰基)或FMOC(9-芴基甲氧基羰基)保护基团来合成肽。参见,例如,Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85: 2149-2154, 1963; Methods in molecular biology第298卷, John Howl

编辑中的“Peptide synthesis and applications”;N.Leo Benoiton的“Chemistry of Peptide Synthesis”,2005,CRC Press,(ISBN-13:978-1574444544);和P.Lloyd-Williams等的“Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins”,1997,CRC-Press,(ISBN-13:978-0849391422),Methods in Enzymology,第289卷:Solid-Phase Peptide Synthesis,J.N.Abelson,M.I.Simon,G.B.Fields(编辑),Academic Press;第1版(1997)(ISBN-13:978-0121821906);美国专利No.4,965,343和5,849,954。

[0092] 在一些实施方案中,可使用肽合成机器通过固相合成获得肽。商业肽合成机器可用于固相肽合成。例如,Advanced Chemtech Model 396多个肽合成仪和Applied Biosystems Model 432A肽合成仪是合适的。有商业公司可定制合成肽,例如Abbiotec、Abgent、AnaSpec Global Peptide Services,LLC、Invitrogen和rPeptide,LLC。

[0093] 在一些实施方案中,PAR3来源和PAR1来源的抗炎多肽及其衍生物也可通过本领域公知的分子方法合成和纯化。重组多肽可在细菌、哺乳动物、昆虫、酵母或植物细胞中表达。例如,使用全长PAR3或PAR1 cDNA序列作为PCR克隆的模板,常规聚合酶链反应(polymerase chain reaction,PCR)克隆技术可用于克隆编码PAR3来源或PAR1来源的肽或多肽的多核苷酸。或者,编码核酸的有义和反义链可以以合成方式制备,并随后一起退火以形成双链编码核酸。理想地,限制性酶切识别位点应设计在有义链和反义链的末端,以促进连接到克隆载体或其他载体中。或者,出于本领域公知的TA克隆的目的,可包括3' A-突出端。这样的具有3' A-突出端的编码核酸可容易地连接到Invitrogen拓扑异构酶辅助的TA载体,例如pCR-TOPO、pCR-Blunt II-TOPO、pENTR/D-TOPO和pENTR/SD/D-TOPO中。可将编码核酸克隆到通用克隆载体,例如pUC19、pBR322、pBluescript载体(Stratagene Inc.)或来自Invitrogen Inc.的pCR-TOPO中。然后可将所得的携带编码PAR3或PAR1肽的多核苷酸的重组载体用于进一步的分子生物学操作。这些包括,例如,变体PAR1肽的定点诱变和/或降低肽的免疫原性特性或改善异源表达系统中的蛋白质表达。编码序列也可亚克隆到蛋白质表达载体或病毒载体中用于合成包含PAR1肽的融合蛋白和在多种蛋白质表达系统中合成蛋白质。这些包括基于选自哺乳动物细胞系、昆虫细胞系、酵母、细菌和植物细胞的宿主细胞的表达系统。

[0094] 在一些相关的实施方案中,本发明提供了编码本文中所述的PAR3来源和PAR1来源的抗炎多肽的分离的或基本上纯化的多核苷酸(DNA或RNA),包括包含PAR3来源的肽和PAR1来源的肽二者的异源多聚体(例如,二聚体)。本发明还提供了表达载体和包含用于表达编码多肽的多核苷酸的载体的经改造宿主细胞。编码抗炎多肽(例如,P3R(51-59)/TR47 8聚体的多聚体)的多核苷酸与表达载体中的启动子可操作地连接。表达构建体还可包含有助于从细胞培养基中纯化肽的分泌序列。引入了载体的宿主细胞可以是本领域公知的多种表达宿主细胞中的任一种,例如细菌(例如大肠杆菌)、酵母细胞或哺乳动物细胞。

[0095] 不同宿主细胞中的重组蛋白表达可以是组成型的或用诱导剂(例如硫酸铜或糖(例如半乳糖)、甲醇、甲胺、硫胺素、四环素或IPTG)可诱导的。在蛋白质在宿主细胞中表达之后,裂解宿主细胞以释放表达的蛋白质用于纯化。一种优选的纯化方法是亲和色谱,例如使用镍、钴或锌亲和树脂用于经组氨酸标记肽的离子-金属亲和色谱。Clontech使用其Talon®钴树脂以及Novagen在其pET系统手册第10版中描述了纯化经组氨酸标记的重组蛋白的方法。另一种优选的纯化策略是通过免疫亲和色谱,例如,抗Myc抗体缀合树脂可用于亲和纯化经Myc标记的肽。用丝氨酸蛋白酶(例如凝血酶和肠激酶)进行酶消化,从组氨酸

或Myc标签中切割并释放肽,从亲和树脂中释放重组肽,而组氨酸标签和Myc标签仍附着在亲和树脂上。

[0096] 无细胞表达系统也可用于产生本发明的抗炎多肽。与传统的基于细胞的表达方法相比,无细胞表达系统具有数项优势,包括易于修改反应条件以有利于蛋白质折叠、降低对产物毒性的敏感性以及适用于高通量策略,例如快速表达筛选或大量蛋白质产生,因为降低了反应体积和处理时间。无细胞表达系统可使用质粒或线性DNA。此外,翻译效率的提高导致产量超过一毫克蛋白质/毫升反应混合物。Spirin等,Science 242:1162,1988描述了能够以高产率产生蛋白质的无细胞翻译系统的一个实例。该方法使用在整个反应混合物中包含氨基酸、三磷酸腺苷(ATP)和三磷酸鸟苷(GTP)的进料缓冲液的连续流动设计,以及翻译的多肽产品的连续移出。该系统使用大肠杆菌裂解物提供无细胞连续进料缓冲液。这种连续流动系统与原核和真核表达载体二者均相容。Chang等,Science 310:1950-3,2005描述了大规模无细胞蛋白质产生的一个实例。

[0097] 其他可商购获得的无细胞表达系统包括Expressway™无细胞表达系统(Invitrogen),其利用基于大肠杆菌的体外系统进行有效的、偶联的转录和翻译反应以管式反应形式产生多至毫克量的活性重组蛋白质;快速翻译系统(Rapid Translation System,RTS)(Roche Applied Science),其也使用基于大肠杆菌的体外系统;以及TNT偶联网织红细胞裂解系统(Promega),其使用基于兔网织红细胞的体外系统。

[0098] V.抑制炎症和治疗炎性疾病

[0099] 本文中所述的抗炎PAR3来源和PAR1来源的抗炎肽和衍生化合物,包括变体、类似物和肽模拟物,可用于许多治疗或预防应用中以抑制或阻抑不期望的炎症,以及治疗许多炎性疾病或病症。在一些实施方案中,向需要治疗的对象施用治疗有效量的本文中所述的PAR3来源的抗炎肽或多肽或衍生化合物。在一些实施方案中,向需要治疗的对象施用治疗有效量的本文中所述的PAR1来源的抗炎肽或多肽或衍生化合物。在一些其他实施方案中,向需要治疗的对象施用本文中所述的PAR3来源的抗炎肽或多肽或衍生化合物和PAR3来源的抗炎肽或多肽或衍生化合物二者。如本文中所详述的,两种化合物的组合,即使在非常低的剂量下,也可在阻抑或抑制炎症方面实现协同作用。如下文所详述的,可将具有或不具有同源或异源多聚化(缀合或融合)的抗炎肽(例如,P3R或TR47)配制在药物组合中以用于本文中公开的治疗或预防应用。

[0100] 在一个方面,本发明提供了用于抑制炎症和治疗患有炎性疾病的对象的方法。本文中所述的PAR3来源和PAR1来源的抗炎肽、变体和模拟物可用于抑制或改善与不期望的炎症相关的症状,以及用于治疗与不期望的炎性应答相关或由不期望的炎性应答介导的多种疾病或病症。这些包括以不期望的免疫激活或不期望的免疫应答为特征或与之相关的病症,例如同种异体移植排斥、自身免疫病(例如狼疮和多发性硬化)、过敏反应(例如哮喘)、表皮炎性疾病(湿疹)、类风湿关节炎、无菌性炎症和枯草热。具体的疾病或病症包括例如移植物抗宿主病、类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、桥本甲状腺炎、多发性硬化、重症肌无力、视神经脊髓炎(NMO)、I型或II型糖尿病和与之相关的疾病、血管炎、恶性贫血、舍格伦综合征(Sjogren's syndrome)、葡萄膜炎、银屑病、格雷夫斯眼病、斑秃等;变应性疾病,例如变应性哮喘、特应性皮炎、变应性鼻炎/结膜炎、变应性接触性皮炎;任选具有潜在异常反应的炎性疾病,例如,炎性肠病、克罗恩病(Crohn's disease)或溃疡性结肠炎、内源性哮喘、

炎性肺损伤、炎性肝损伤、炎性肾小球损伤、动脉粥样硬化、骨关节炎、刺激性接触性皮炎和进一步的湿疹性皮炎、脂溢性皮炎、免疫介导疾病的皮肤表现、炎性眼病、角膜结膜炎和急性呼吸窘迫综合征。以不期望的免疫激活或不期望的免疫应答为特征或与之相关的病症还包括病毒感染,包括例如基孔肯亚病毒、HIV-1、冠状病毒和流感病毒的感染。

[0101] 在多个实施方案中,本发明的方法旨在治疗炎性病症和感染性疾病。适用于本发明预后方法的炎性疾病包括与异常炎症相关的任何疾病或病症,并且特别是由I型IFN扩增途径和细胞因子风暴介导或与之相关的病症。这些包括例如哮喘、自身免疫病、慢性炎症、慢性前列腺炎、肾小球肾炎、超敏性、炎性肠病、盆腔炎、再灌注损伤、类风湿性关节炎、移植排斥和血管炎。具体炎性病症的实例包括但不限于类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS)、斑秃、强直性脊柱炎、抗磷脂综合征、自身免疫性艾迪生病(autoimmune Addison's disease)、自身免疫性溶血性贫血、自身免疫性肝炎、自身免疫性内耳疾病、自身免疫性淋巴增生综合征(autoimmune lymphoproliferative syndrome, alps)、自身免疫性血小板减少性紫癜(autoimmune thrombocytopenic purpura, ATP)、白塞病(Blehcet's disease)、大疱性类天疱疮、心肌病、腹型斯泼卢腹泻皮炎(celiac sprue-dermatitis)、慢性疲劳综合征免疫缺陷综合征(chronic fatigue syndrome immune deficiency syndrome, CFIDS)、慢性炎性脱髓鞘性多发性神经病、瘢痕性类天疱疮、冷凝集素病、Crest综合征、克罗恩病、Dego病、皮炎、幼年皮炎、盘状狼疮、特发性混合性冷球蛋白血症(essential mixed cryoglobulinemia)、纤维肌痛-纤维肌炎、格雷夫斯病(grave's disease)、格林-巴利(guillain-barre)、桥本甲状腺炎、特发性肺纤维化、特发性血小板减少性紫癜(idiopathic thrombocytopenia purpura, ITP)、IgA肾病、胰岛素依赖型糖尿病(1型)、幼年型关节炎、梅尼埃病(Meniere's disease)、混合性结缔组织病、多发性硬化、重症肌无力、寻常型天疱疮、恶性贫血、结节性多动脉炎、多软骨炎、多腺性综合征、风湿性多肌痛、多肌炎和皮炎、原发性无丙种球蛋白血症、原发性胆汁性肝硬化、银屑病、雷诺现象、莱特尔综合征(Reiter's syndrome)、风湿热、结节病、硬皮病、脓毒症、舍格伦综合征、僵人综合征、系统性炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS)、大动脉炎、颞动脉炎/巨细胞性动脉炎、溃疡性结肠炎、葡萄膜炎、血管炎、白癜风和韦格纳肉芽肿病(Wegener's granulomatosis)。

[0102] 在一些实施方案中,待治疗的不期望的炎症或炎性病症与胰天蛋白酶1活化相关、由之介导或表现出来。在一些实施方案中,待治疗的不期望的炎症或炎性病症与炎性小体形成相关、由之介导或表现出来。在一些实施方案中,待治疗的对象是患有或怀疑患有已表明适合用APC治疗的病症或疾病的对象。这些包括,例如,脑、心脏和肾的缺血/再灌注;肺、肾和胃肠道炎症;脓毒症;埃博拉病毒;糖尿病;和总致死的身体辐射。参见,例如,Griffin等, Blood 125:2898-2907, 2015。

[0103] 在一些实施方案中,本发明的治疗方法包括向对象施用药物组合物,其包含本文中所述的PAR3来源的抗炎肽,例如P3R。在一些实施方案中,所述方法包括向对象施用药物组合物,其包含本文中所述的PAR1来源的抗炎肽,例如TR47。在一些其他实施方案中,向需要治疗的对象施用本文中所述的PAR3来源的抗炎肽和本文中所述的PAR1来源的抗炎肽的组合。在这些实施方案中的一些中,PAR3来源的抗炎肽和PAR1来源的抗炎肽同时施用于对象。在一些其他实施方案中,可将两种肽依次施用于对象。在多个实施方案中,两种肽可各

自独立地与如上所述的载体部分缀合。在一些实施方案中,同时施用的PAR3来源和PAR1来源的肽彼此缀合,例如通过共价肽融合物。在这些实施方案中,PAR3来源的肽可在PAR1来源的肽的N端或C端融合。在这些实施方案中的一些中,两种肽可通过接头部分,例如接头或间隔肽连接。在一些实施方案中,具有不同比例的两种肽可与载体部分,例如上述载体蛋白、Fc结构域或PEG分子缀合。

[0104] 优选地,本发明的治疗方法旨在治疗哺乳动物对象。在这些实施方案中的一些中,对象是人患者。本发明的一些实施方案涉及抑制或阻抑不期望的炎症或炎性应答,这些炎症或炎性应答强调本文中所述的任何炎性疾病或病症或与之相关。本发明的一些实施方案涉及治疗患有或怀疑患有自身免疫病的人对象。适用于本发明方法的自身免疫病和相关疾病的实例包括例如急性播散性脑脊髓炎(Acute disseminated encephalomyelitis, ADEM)、艾迪生病、斑秃、强直性脊柱炎、抗磷脂抗体综合征(Antiphospholipid antibody syndrome, APS)、自身免疫性溶血性贫血、自身免疫性肝炎、自身免疫性内耳疾病、大疱性类天疱疮、白塞病、乳糜泻、查加斯病(Chagas disease)、慢性阻塞性肺病、克罗恩病、皮炎、1型糖尿病、糖尿病相关炎症、子宫内膜异位症、古德帕斯丘综合征(Goodpasture's syndrome)、格雷夫斯病、移植物抗宿主病(graft versus host disease, GVHD)、格林-巴利综合征(Guillain-Barré syndrome, GBS)、桥本病、化脓性汗腺炎、川崎病、特发性血小板减少性紫癜、间质性膀胱炎、红斑狼疮、混合性结缔组织病、硬斑病、多发性硬化(MS)、重症肌无力、发作性睡病、神经性肌强直、寻常型天疱疮、恶性贫血、银屑病、银屑病关节炎、多肌炎、原发性胆汁性肝硬化、类风湿性关节炎、精神分裂症、硬皮病、舍格伦综合征、僵人综合征、颞动脉炎(又名“巨细胞性动脉炎”)、溃疡性结肠炎、血管炎、白癜风、显微镜下多血管炎、肾小球肾炎和韦格纳肉芽肿病。

[0105] 在一些实施方案中,待用本发明的方法治疗的对象是患有或怀疑患有神经炎症的对象。患有急性神经炎症或慢性神经炎症的对象都适用于治疗。已知神经炎症会导致急性和慢性神经病理学状况。这些包括卒中、创伤后脑损伤、阿尔茨海默病(Alzheimer's disease)、肌萎缩性侧索硬化症、帕金森病(Parkinson's disease)、亨廷顿病(Huntington's disease)、额颞痴呆、路易体痴呆、脑疟疾和朊病毒病。其他具有过度炎症的中枢神经系统病理学包括CNS感染性疾病,例如寨卡病毒、HIV和西尼罗病毒、冠状病毒感染和引起脑膜炎的细菌感染。参见例如Voet等,EMBO Mol. Med. 11:e10248, 2019; Heneka等, Nat. Rev. Neurosci. 19:610-621, 2018; Ismael等, Sci. Rep. 8:5971, 2018。用本发明的方法治疗将有利于治愈或改善与神经炎症相关的多种神经病理学状况的症状。通过基本上阻抑或抑制所列病症中的潜在炎症,患有这些神经病理学状况中的任一种的对象可从使用本发明方法的治疗中获得显著益处。在一些其他实施方案中,待用本发明的方法治疗的对象是患有疟疾炎症或处于发生疟疾炎症风险之中的对象。疟疾是由疟原虫红细胞感染引起的,是具有由受感染的红细胞同步破裂以释放子寄生虫引起的特征性周期性发热的高度炎性疾病。通过基本上阻抑或抑制潜在的炎症,患有疟疾的对象可从使用本发明方法的治疗中获得巨大的益处。

[0106] VI. 用于鉴定抗炎剂的筛选方法

[0107] 本文中所述的PAR3来源和/或PAR1来源的抗炎肽和体外测定可用于鉴定具有抗炎活性的新药剂。在一些实施方案中,本发明提供了使用示例性肽(例如, P3R和/或TR47)作为

阳性对照以针对抗炎活性来筛选候选剂的方法。任何已知的用于鉴定抗炎剂的筛选方法或平台都可适用于并入本文中所述的抗炎肽作为阳性对照。这些包括任何动物模型或其他体内平台、离体筛选方法以及体外筛选方法。这样的方法在本领域中有所描述,例如,del Palacio等, *J. Biomole. Screening* 21:567-578, 2016; Jiang等, *PLoS One*. 9:e96214, 2014; Hall等, *Disease Models & Mechanisms* 7:1069-1081, 2014; Phanse等, *J. App. Pharm. Sci.* 2:19-33, 2012; Giddings and Maitra, *J. Biomole. Screening* 15:1204-1210, 2010; Singh等, *Clinical Chemistry* 51:2252-2256, 2005; Maurer等, *J. Anal. Toxicol.* 25:237-44, 2001; Alener & Bingoul, *Intl. J. Crude Drug Res.* 26:197-207, 1988; Famaey and Whitehouse, *Biochem. Pharmacol.* 24:1609-1616, 1975; VanArman, *Clin. Pharmacol. Ther.* 16:900-904, 1974; Carrano等, *J. Pharm. Sci.* 61:1450-1454, 1972; Riesterer等, *Agents and Action* 2, 27-32, 1971; Winter等, *Fed. Proc.* 23, 284, 1964; 和 Winter and Portar, *J. Amer. Pharm. Sci. Ed.* 46:515-519, 1957。

[0108] 本发明的一些筛选方法涉及使用体外培养的细胞系来监测炎症相关活性。在这些实施方案中的一些中,待监测的炎症相关活性涉及炎性小体的组装和活化以及胱天蛋白酶1的炎性小体依赖性活化,例如胱天蛋白酶1的酶活性或IL-1 β 的分泌。炎性小体是大的胞内多蛋白复合物,其在炎症驱动的疾病状态中起着不可或缺的作用。炎性小体可涉及胱天蛋白酶1的活化,已知其可催化白介素(IL)-1 β 和pro-IL-1 β 的成熟和加工。在康纳单抗用于动脉粥样硬化性疾病(CANTOS)试验中通过单克隆抗体中和IL-1 β (参见,例如, Ridker等, *N. Engl. J. Med.* 377:1119-1131, 2017)已证明不伴随脂质水平变化的炎症的减少降低了动脉粥样硬化血栓形成的风险,并且是指向炎症广泛范围的有力证据,尤其是IL-1 β 在心血管疾病中的病理作用。炎性小体在宿主防御中发挥保护作用,但活化也可导致缺血再灌注损伤(I/RI)和自身炎症。在小鼠模型中,已表明APC可限制在心肌I/RI之后炎性小体的活化,从而证明APC在炎性小体过程中具有抗炎作用。

[0109] 在一些实施方案中,在本发明的筛选方法中使用培养的人THP-1细胞系。THP-1细胞是能够分化成巨噬细胞的人单核细胞系。如本文中所示,在THP-1细胞中使用选择激动剂是诱导炎性小体和/或胱天蛋白酶I活性并最终诱导炎症的有效体外手段。本发明的这些筛选方法需要通过炎症诱导剂(例如本文中示例的LPS)在THP-1细胞中诱导炎性小体和/或胱天蛋白酶I依赖性的炎症,并评估候选剂针对示例性抗炎肽(例如, P3R或TR47)的潜在抗炎活性。如果在抑制炎症方面具有相似或更强的活性,如通过炎症相关活性或表现出炎性小体活化和/或胱天蛋白酶1活性的表型(例如胱天蛋白酶1活性或IL-1 β 分泌)所证明的,则将其鉴定为新的抗炎剂。

[0110] 可用于本发明筛选方法的候选剂可具有任何化学性质。这些包括例如,肽包括多肽、 β -转角模拟物(beta-turn mimetic)、多糖、磷脂、激素、前列腺素、类固醇、嘌呤、嘧啶、寡聚N-取代的甘氨酸、寡聚氨基甲酸酯、糖类、脂肪酸,以及其衍生物、结构类似物或组合。在一些实施方案中,用于本发明筛选方法的候选剂是小分子有机化合物。在这些实施方案中的一些中,可使用小分子候选剂的组合文库来筛选治疗剂。这样的化合物库是本领域公知的,例如,如在Schultz等, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 8:2409-2414, 1988; Weller等, *Mol Divers.* 3:61-70, 1997; Fernandes等, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2:597-603, 1998; 和 Sittampalam等, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 1:384-91, 1997中所述。候选剂包括无环和无支链

的有机小分子,以及其他有机化合物,例如芳香族化合物、杂环化合物和苯二氮草类。

[0111] 在一些实施方案中,待在本发明方法中筛选的候选剂是本文中所述的PAR3来源或PAR1来源的肽或多肽、变体、类似物、肽模拟物或其他相关或衍生化合物。在这些实施方案中的一些中,用本发明的方法筛选的候选剂可以是模拟本文中所述的Met¹-Arg⁴¹缺失的人PAR3胞外结构域(SEQ ID NO:3)或Met¹-Arg⁴⁶缺失的人PAR1胞外结构域(SEQ ID NO:6)的N端序列的肽或多肽的变体、衍生物或模拟化合物。例如,候选剂可以是来源于具有多种C端或内部缺失的SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:6的多肽。在一些实施方案中,P3R肽(SEQ ID NO:4)或TR47肽(SEQ ID NO:7)可用作支架以产生变体或类似物肽和肽模拟物的文库。基于参考肽或多肽(例如,P3R肽)的候选剂文库可使用如本文中所述的常规实践方法容易地产生。相对于参考肽(例如,P3R或TR47)或多肽(例如,SEQ ID NO:3或6),候选剂也可以是包含一个或更多个氨基酸替换的变体肽或多肽的文库。

[0112] 用于制备包含不同群体的肽、类肽和模拟肽的文库的方法是本领域公知的,并且多种文库是可商购获得的。参见,例如,Ecker and Crooke,Biotechnology 13:351-360,1995;和Blondelle等,Trends Anal.Chem.14:83-92,1995;和其中引用的参考文献。另见Goodman and Ro,Peptidomimetics for Drug Design,在"Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery"第1卷(编辑M.E.Wolff;John Wiley&Sons 1995),第803-861页中;和Gordon等,J.Med.Chem.37:1385-1401(1994)。本领域技术人员理解肽可直接在体外产生或者可由可在体外产生的核酸表达。肽分子文库也可例如通过从目的组织收集的mRNA构建cDNA表达文库来产生。用于产生这样的文库的方法是本领域公知的(参见,例如,Sambrook等,Molecular Cloning:A laboratory manual(Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989))。

[0113] 设计肽衍生物和模拟物以及筛选功能性肽模拟物的方法是本领域技术人员公知的。设计模拟已知蛋白质或肽的分子的一种基本方法是首先鉴定已知蛋白质的活性区域(例如,在抗体-抗原相互作用的情况下,鉴定抗体的哪个或哪些区域允许与抗原的结合),然后寻找模拟活性区域的模拟物。尽管已知多肽的活性区域相对较小,但预期模拟物将比蛋白质更小(例如,在分子量方面),并且相应地更容易且更便宜地合成和/或关于稳定性或其他有利的药代动力学方面具有益处。这样的模拟物可用作参考多肽(例如,SEQ ID NO:3)或肽(例如,P3R)的方便替代物,作为与靶分子(例如,PAR3)相互作用的试剂。例如,Reineke等(Nat.Biotech.17:271-275,1999)设计了模拟分子,其使用大的短合成肽文库来模拟白介素10蛋白的结合位点,其中每种肽都对应于白介素10的短的段。然后通过测定技术单独测试这些肽中的每一种与靶标(在该情况下是针对白介素10的抗体)的结合,以鉴定潜在的相关肽。可使用肽的噬菌体展示文库和丙氨酸扫描方法。

[0114] 用于设计特定肽或蛋白质的肽模拟物的其他方法包括在以下中所述的那些方法:欧洲专利EP1206494、Goede等,BMC Bioinformatics,7:11,2006的SuperMimic程序;和Campbell等,Microbiol.and Immunol.46:211-215,2002的MIMETIC程序。SuperMimic程序旨在鉴定模拟蛋白质的部分的化合物,或蛋白质中适合插入模拟物的位置。该应用程序提供的文库一方面包含肽模拟物构建单元(building block),并且另一方面包含蛋白质结构。为给定肽寻找有前景的肽模拟接头是基于肽与模拟物的数个构象异构体的叠加。可导入新的合成元件或蛋白质并用于检索。W.Campbell等,2002教导了MIMETIC计算机程序,其

生成一系列与目标肽序列相互作用的肽。James R.Damewood Jr.在Reviews in Computational Chemistry,2007年1月,第9卷,编辑:Kenny B.Lipkowitz,Donald B.Boyd (John Wiley&Sons,Inc.)中的"Peptide Mimetic Design with the Aid of Computational Chemistry"中以及在Tselios等,Amino Acids,14:333-341,1998中对该主题的深入讨论进行了综述。

[0115] 一旦制备了候选剂文库,就可针对相对于参考多肽的活性的优化或改善的抗炎活性容易地对这些候选剂进行筛选。可筛选候选剂以改善本文中公开的参考多肽的任何抗炎活性,例如抑制或阻抑胱天蛋白酶1酶活性或IL-1 β 的分泌(参见下文实施例)。用这样的筛选方法优化的基于参考PAR3来源或PAR1来源的抗炎肽(例如,P3R或TR47)的变体或类似物化合物可用于本文中所述的多种治疗应用。

[0116] VII. 治疗组合物和剂量

[0117] 本发明提供了用于实施本文中所述的治疗或预防方法的治疗或药物组合物。本文中所述的PAR3来源和/或PAR1来源的抗炎肽和具有抗炎活性的相关化合物(例如,变体、衍生物和模拟物)以及本文中公开的其他治疗剂可直接施用于需要治疗的对象。然而,这些治疗化合物优选以药物组合物的形式施用于对象,所述药物组合物以单位剂型包含肽、变体或模拟物和/或其他活性剂以及可药用载体、稀释剂或赋形剂。因此本发明提供了包含一种或更多种本文中公开的抗炎肽或衍生化合物的药物或治疗组合物。本发明还提供了这些肽或相关化合物在制备用于治疗或预防由不期望的炎症介导或与不期望的炎症相关的上述疾病或医学病症的药物组合物或药物中的用途。

[0118] 本发明的一些组合物包含一种本文中所述的PAR3来源的抗炎肽或相关化合物(例如,变体、衍生物和模拟物)。这些组合物中的一些是药物组合物,其包含治疗有效量或剂量的本文中所述的PAR3来源的抗炎肽(例如,P3R)或衍生化合物,以及可药用载体。本发明的一些组合物包含一种本文中所述的PAR1来源的抗炎肽或相关化合物。这些组合物中的一些是药物组合物,其包含治疗有效量或剂量的本文中所述的PAR1来源的抗炎肽(例如,TR47)或衍生化合物,以及可药用载体。

[0119] 本发明的其它组合物还包含本文中所述的PAR3来源的抗炎肽或相关化合物和PAR1来源的抗炎肽或相关化合物。这些组合物中的一些是药物组合物,其包含治疗有效量或剂量的本文中所述的PAR3来源的抗炎肽和PAR1来源的抗炎肽二者或者本文中所述的相关或衍生化合物,以及可药用载体。如上所述,PAR3来源的抗炎肽和PAR1来源的抗炎肽可在组合物中作为单独的肽、以单体或多聚体形式提供。或者,肽可在如上所述的组合物中作为异二聚体或异多聚体彼此缀合。在多个实施方案中,组合物中的单体、异源或同源二聚体和异源或同源多聚体肽可通过共价或非共价键联进一步与本文中所述的一种或更多种载体部分缀合。在一些组合物中,PAR3来源的肽或相关化合物和PAR1来源的肽或相关化合物可以如本文中所述的以不同比与载体部分缀合。

[0120] 可药用载体是在生物学或其他方面不是不期望的试剂。这些试剂可与PAR3来源和/或PAR1来源的肽一起施用于对象,而不会引起任何不期望的生物学效应或不会以有害方式与药物组合物的任何组分相互作用。组合物可另外包含其他适合治疗或预防不期望的炎症或炎症性疾病的治疗剂。药学载体增强或稳定组合物或促进组合物的制备。可药用载体包括生理上相容的溶剂、分散介质、包衣、抗菌剂和抗真菌剂、等张剂和吸收延迟剂等。所

用的可药用载体应适用于本文中所述的多种施用途径。本领域提供了用于选择合适的可药用载体的另外的指导,例如Remington:The Science and Practice of Pharmacy,Mack Publishing Co.,第20版,2000。除抗炎肽和可药用载体之外,本发明的药物组合物还可包含用于抑制信息或其他活性或非活性剂和用于治疗特定炎症性疾病的已知药物。例如,药物组合物可包含已知的抗炎剂和镇痛药。这样的药剂的实例包括糖皮质激素、非甾体抗炎药(non-steroidal anti-inflammatory drug,NSAID)、对乙酰氨基酚、阿片类药物、地普喹酮(diproqualone)和局部利多卡因。

[0121] 包含本文中所述的PAR3来源和/或PAR1来源的抗炎肽或衍生化合物和/或其他治疗剂的药物组合物可通过本领域已知的多种方法施用,例如经口施用。施用途径和/或方式根据期望结果而变化。根据施用途径,活性治疗剂可包被在材料中以保护化合物免受酸和可使药剂失活的其他天然条件的作用。可采用常规药学实践来提供合适的制剂以将这样的组合物施用于对象。可采用任何合适的施用途径。这些包括但不限于经口、静脉内、肠胃外、经皮、皮下、腹膜内、肌内、颅内、眶内、脑室内、肺内、囊内和脊柱内施用。根据待治疗对象的具体情况,治疗剂的全身或局部递送可用于治疗。

[0122] 当体内施用于对象时,药物组合物通常包含治疗有效量或剂量的活性抗炎化合物。治疗有效量是达到期望抗炎作用的抗炎化合物的总量。有效剂量或剂量根据许多不同的因素而变化,包括施用方式、靶部位、患者的生理状态、患者是人还是动物、施用的其他药物以及治疗是预防性的还是治疗性的。通常,患者是人,但也可治疗非人哺乳动物。需要调整治疗剂量以优化安全性和效力。作为一般指导,剂量为宿主体重的约0.0001至100mg/kg,并且更通常为0.01至5mg/kg。例如剂量可以是1mg/kg体重或10mg/kg体重或在1至10mg/kg的范围内。

[0123] 在一些实施方案中,组合物中的每种肽或衍生化合物以至少10nM、25nM、50nM、100nM、250nM、500nM、1 μ M、2.5 μ M、5 μ M、10 μ M、25 μ M或更高的浓度提供。根据具体情况,对对象的每次施用可包括约0.5ml、1ml、2.5ml、5ml、10ml、25ml、50ml、100ml或更多的组合物的剂量。在一些实施方案中,每种施用的肽或衍生化合物的剂量可以为每个患者约10ng至1g、100ng至100mg、1 μ g至10mg或30至300 μ g。在一些实施方案中,调整每种施用的抗炎肽或衍生物的剂量以达到1至1000 μ g/ml的血浆浓度,并且在一些实施方案中为25至300 μ g/ml。在一些实施方案中,可调整每种施用的抗炎肽或衍生物的剂量以达到约0.01 μ g/ml至约1.6 μ g/ml,优选约0.01 μ g/ml至约0.5 μ g/ml的血浆浓度。以低于达到期望治疗效果所需的水平开始剂量并逐渐提高剂量直至达到期望效果也在本领域的技术范围内。确定变体的最佳浓度以在本发明的体外和离体制剂中实现期望的效果同样在本领域的技术范围内。根据初始测定结果,最佳浓度可在例如约1至1,000nM或约1至200 μ M的范围内,这取决于化合物的一般性质。

[0124] 示例性治疗方案包括每天一次、每隔一天一次、每周一次、每两周一次、每月一次或每3至6个月一次施用。在一些方法中,同时施用两种或更多种抗炎肽(例如,P3R和TR47)或其相应衍生物,在这种情况下,施用的每种治疗性肽的剂量落入所示范围内。药物组合物通常以多次施用。如上所述,单次剂量之间的间隔可以是每周、每月或甚至每年。如通过在患者中测量抗炎肽或包含肽的衍生化合物(例如,包含肽和载体部分的复合物)的血液水平所指示的,间隔也可以是不规则的。或者,PAR3来源和/或PAR1来源的肽可作为持续释放制

剂施用,在这种情况下需要较少的施用频率。剂量和施用频率也可根据所施用化合物在患者中的半衰期而变化。施用的剂量和频率可根据治疗是预防性的还是治疗性的而变化。在预防性应用中,在较长时间段内以相对不频繁的间隔施用相对低的剂量。一些患者在其余生中继续接受治疗。在治疗应用中,有时需要以相对短的间隔施用相对高的剂量,直到疾病的进展降低或终止,并且优选直到患者表现出对疾病症状的部分或完全改善。此后,可向患者施用预防性方案。

[0125] 本发明的一些方法涉及施用PAR3来源的抗炎肽和PAR1来源的抗炎肽或本文中所描述的其相应衍生化合物的组合。如本文用肽P3R和TR47所示例的,两种肽之一的极低剂量足以实现协同作用。因此,在一些实施方案中,在药物组合物中两种肽各自以至多约500nM、250nM、50nM、25nM、10nM、5nM、2.5nM、1nM或更低的浓度提供。在一些实施方案中,药物组合物的施用为两种肽各自提供宿主体重的至多约0.25mg/kg、0.1mg/kg、0.05mg/kg、0.025mg/kg、0.01mg/kg、0.005mg/kg、0.0025mg/kg、0.001mg/kg、0.0005mg/kg、0.00025mg/kg或更低的日剂量。根据对象(人或非人动物、成人或青少年)的平均体重,将适当量(体积)的组合物施用于对象以达到本文中所述的期望的总日剂量。因此,例如,75kg的平均体重可用于计算对于具有相似体重的成人对象或动物各自每天施用的肽的总量。类似地,可使用60kg、50kg、40kg、30kg、20kg、15kg、10kg、7.5kg、5kg或更低的平均体重计算对于具有相似体重的不同年龄组的非成人(例如,15至18、11至14、7至10、4至6、2至3、1至2或更年轻的年龄组)或动物各自每天施用的肽的总量。

[0126] 在一些其他实施方案中,药物组合物可包含一种肽(例如,PAR3来源的肽)或衍生化合物,其剂量远高于其他肽(例如,PAR1来源的肽)或衍生化合物。例如,待施用于对象的组合物可包含浓度为至少约10nM、25nM、50nM、100nM、250nM、500nM、1 μ M、2.5 μ M、5 μ M、10 μ M、25 μ M或更高的一种肽(例如,P3R或者P3R变体或衍生物)。在这样的组合物中的其他肽(例如,TR47或者TR47变体或衍生物)的浓度可以为至多约500nM、250nM、50nM、25nM、10nM、5nM、2.5nM、1nM或更低。在这些实施方案中的一些中,待向对象施用的两种肽之一的剂量可以是宿主体重的至少约0.01mg/kg、0.025mg/kg、0.05mg/kg、0.1mg/kg、0.25mg/kg、0.5mg/kg、1mg/kg、2.5mg/kg、5mg/kg、10mg/kg、25mg/kg或更高的每日量。这些实施方案的药物组合物中另一种肽的剂量可以是宿主体重的至多约0.25mg/kg、0.1mg/kg、0.05mg/kg、0.025mg/kg、0.01mg/kg、0.005mg/kg、0.0025mg/kg、0.001mg/kg、0.0005mg/kg、0.00025mg/kg或更低的每日量。同样,用于这些实施方案的组合物中肽的总量可根据对象的平均体重来确定。例如,75kg的平均体重可用于计算对于具有相似体重的成人对象或动物各自每天施用的肽的总量。类似地,可使用60kg、50kg、40kg、30kg、20kg、15kg、10kg、7.5kg、5kg或更低的平均体重计算对于具有相似体重的不同年龄组的非成人(例如,15至18、11至14、7至10、4至6、2至3、1至2或更年轻的年龄组)或动物各自每天施用的肽的总量。

[0127] 本发明的药物组合物可根据本领域公知和常规实施的方法制备。参见,例如,参见,例如,Goodman&Gilman's The Pharmacological Bases of Therapeutics,Hardman等,编辑,McGraw-Hill Professional(10th•ed.,2001);Remington:The Science and Practice of Pharmacy,Gennaro,ed.,Lippincott Williams&Wilkins(20th•ed.,2003);Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems,Ansel等(编辑),Lippincott Williams&Wilkins(7th•ed.,1999);和Sustained and Controlled Release

Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978. 药物组合物优选在GMP条件下制备。

[0128] 实施例

[0129] 提供以下实施例以进一步举例说明本发明而不是限制其范围。本发明的其他变体对于本领域普通技术人员来说将是显而易见的并且被所附权利要求书所涵盖。

[0130] 实施例1 PAR1来源和PAR3来源的肽的协同抗炎活性

[0131] 我们首先观察到APC处理在用LPS和ATP处理的人PMA分化的THP1-null1细胞中降低胰天蛋白酶1活性(图1A)。APC通过非典型残基Arg46处切割PAR1表现出偏向信号传导,并且模拟来源于Arg46切割的新N端的PAR1来源的20个氨基酸肽TR47在体外诱导内皮细胞中的保护性信号传导并在体内降低血管渗漏。50 μ M的TR47最初是根据之前发表的体内数据进行测试的,并且我们发现50 μ M TR47以及更低的浓度类似地降低胰天蛋白酶1活性,而加扰的TR47以及类似于由凝血酶在Arg41处的PAR1切割产生的新N端氨基酸序列的肽SFLLRN或TFLLRN都对胰天蛋白酶1活性没有任何作用(图1A)。APC的保护性信号传导可跟随其在内皮细胞上Arg41处PAR3的切割,并且PAR3来源的肽P3R在体内产生保护作用并在体外降低中性粒细胞胞外陷阱形成。与APC和TR47类似,P3R肽降低胰天蛋白酶1活性。对照肽P3K,即代表在Lys38处凝血酶切割的PAR3肽,没有在THP1细胞中显著改变胰天蛋白酶1活性(图1B)。

[0132] 我们假设尽管低浓度的TR47或P3R不足以通过降低胰天蛋白酶1活性来发挥抗炎活性,但这两种GPCR激动剂的组合可协同降低胰天蛋白酶1活性。当存在500nM P3R的情况下<10nM的TR47与THP1细胞一起孵育然后诱导胰天蛋白酶1活性时,观察到胰天蛋白酶1活性降低,这与在相对于胰天蛋白酶1抑制条件归一化之后不存在P3R的情况下TR47的作用形成对比(图1C和1D)。此外,当浓度 $\leq$ 500nM的P3R与1nM TR47一起孵育时,观察到经归一化的胰天蛋白酶1活性显著降低,这与不存在TR47的情况下的P3R形成对比(图1E)。由APC、TR47、P3R或肽组合引发的胞内信号传导在多种人细胞类型中是否相似或保守仍有待解决。TR47和P3R的抗炎协同作用表明PAR1和PAR3可作为异二聚体GPCR复合物存在于促进抗炎胞内信号传导的相互作用组中。很容易想象连接这两种GPCR激动剂肽可能在选定炎症疾病中具有治疗前景。

[0133] 进行了另外的研究以进一步证实所观察到的协同活性。在这些研究中,对已制备并显示出保留其抗炎活性的PAR肽的另外的变体(图4、5和7A)进行了关于保持抗炎活性的协同性的测试(图7),如PAR1来源的TR47和PAR3来源的P3R组合所示(图1D至E)。对于这样的研究的一个实例,考虑PAR3肽P3(51-65)(在本文中也称为肽“P3R51-65”),其单独在相对高浓度(例如50 μ M)下具有抗炎作用。当对其存在或不存在1nM肽P1(47-66)(在本文中被称作肽“TR47”)的情况下以0至16nM的浓度进行测试时,只有在1nM P1(47-66)存在下见到胰天蛋白酶1活性显著降低(图7D),如肽P3(42-65)(本文中被称为肽“P3R”)所观察到的那样(图1E)。这些发现(图7B至D)表明PAR3肽配体从N端的变异或者改变序列或长度可导致协作的、协同的抗炎应答。

[0134] 图7B至D中的数据显示出与用于给定研究组合的任何单一肽单独的抗炎活性相比,不同的PAR1来源和PAR3来源的肽的组合提供增强的抗炎活性效力。对于生物效力,这强调了多种不同的PAR1来源和PAR3来源肽的组合相对于每种肽单独的价值。这些数据表明,可对PAR肽的序列或长度做出变化,并且仍然会产生协作的、协同的抗炎应答(图1D至E和图

7B至D)。

[0135] 实施例2 PAR1来源和PAR3来源的肽的抗炎活性机制

[0136] NLRP3是对炎症小体形成而言主要的典型传感器蛋白,并且值得注意的是,NLRP3的突变在人中导致慢性自身炎症性疾病。²³NLRP3缺陷型(defNLRP3)THP1细胞或使用NLRP3抑制剂MCC950对THP1-null细胞进行NLRP3的抑制在所有测试的处理中导致胰天蛋白酶1活性显著降低(图2A和2B)。这些数据表明,被APC、TR47和P3R抑制的胰天蛋白酶1活性的产生需要NLRP3。

[0137] 对于由APC诱导的非典型、偏向信号传导,EPCR是PAR1和PAR3的非典型切割所必需的重要的APC结合细胞受体。在APC或TR47处理之前用抗EPCR单克隆抗体RCR-252阻断EPCR导致其对胰天蛋白酶1活性的抑制显著丧失,而P3R研究虽然有趋势,但没有达到显著性(图2C)。为了测试PAR3是否有助于APC、TR47和P3R的抗炎作用,在处理之前使用阻断抗体来抑制PAR3。^{16,26}阻断PAR3非常显著地降低了APC和P3R的抗炎活性,并且没那么显著地降低了TR47的活性(图2D)。通过PAR1的APC起始的信号传导被广泛认为对许多细胞类型的有益效果至关重要。使用阻断性单克隆抗体WEDE15和ATAP2或者PAR1小分子拮抗剂SCH79797(SCH)抑制PAR1,¹⁷显著抑制了APC对胰天蛋白酶1活性的降低(图2E)。TR47的作用被SCH79797和WEDE15抑制,但不被ATAP2抑制;然而,WEDE15表位部分包含TR47的序列。PAR1靶向抑制剂均未在统计学上显著降低PAR3肽激动剂P3R的抗炎活性(图2E和2F)。

[0138] IL-1 β 是由NLRP3炎症小体产生的关键细胞因子。APC、TR47、P3R以及TR47和P3R的组合显著抑制了实施上述关于胰天蛋白酶1活性方案的THP1细胞的IL-1 β 的产生和释放(图3)。这证实了基于降低炎症的两种广泛认可的生物标志物,这些药剂是具有抗炎作用的。

[0139] 实施例3 PAR1来源和PAR3来源肽的抗炎活性的结构要求

[0140] 为了确定肽的序列和活性之间的关系,我们接下来试图测试从N端或C端开始的多种长度的肽。首先,我们测试了从之前描述的13聚体P3Rmed(P3Rm)开始的P3R肽变体。¹⁶在50 μ M时,类似于24聚体P3R(第42至65位残基;24聚体),观察到胰天蛋白酶1活性显著降低,并且这种作用在2 μ M时丧失(图4A至C)。随后,从N端缩短肽,P3R 51-65或51-59二者在50 μ M时都表现出类似的在2 μ M时丧失的胰天蛋白酶1活性降低(图4)。进一步缩短3或8个氨基酸的肽(分别为P3R 54-59或59-65)仅在50 μ M时部分降低了胰天蛋白酶1活性(图4A),表明了Phe、Pro、Phe序列对于抗炎活性可能是至关重要的(图4C),并且APC介导的切割之后PAR3的隐蔽(cryptic)N端可能不是关键的信号传导部分,这潜在地挑战了PAR(至少对于PAR3)的活化和信号传导的范式。

[0141] 接下来,我们试图限定对介导TR47介导的胰天蛋白酶1活性降低至关重要的序列。我们的初步实验表明,先前公布的TR47的9聚体(NPNDKYEPF;SEQ ID NO:36)在50 μ M时降低了胰天蛋白酶1活性,这与20聚体TR47类似(图5A)。相比之下,当TR47的N端被酰化时,在等摩尔浓度下没有观察到胰天蛋白酶1活性的降低,表明了游离胺N端可能对于TR47介导的抗炎活性至关重要。接下来,我们测试了另外的C端缩短的TR47肽,包括先前公布的8聚体TR47(NPNDKYEP;SEQ ID NO:35),其类似于16聚体TR47显著降低了胰天蛋白酶1活性,而6聚体TR47丧失其抑制活性,表明了长于6个氨基酸的肽对于PAR1的抗炎活性是必需的(图5B)。接下来,我们试图测试TR47的抗炎活性需要N端Asn(N)的范式。从N端丢失1个氨基酸(TR47 N-1)仍降低胰天蛋白酶1活性,而去除2个氨基酸(TR47 N-2)导致丧失了对胰天蛋白酶1活性

的抑制。奇怪的是,在从N端去除5个氨基酸(TR47 N-5)的情况下观察到胰天蛋白酶1活性降低,表明了APC介导的切割之后PAR1的隐蔽N端并不完全负责有益的信号传导作用(图5B)。接下来,N端第47位残基的点突变显示N端的电荷对TR47介导的胰天蛋白酶1活性降低具有不同的作用。TR47中N→Q(Asn到Gln,一个碳碳键在侧链上更长)或N→A的突变产生类似降低胰天蛋白酶1活性的肽。然而,第47位残基的N→D(Asn到Asp)的突变导致胰天蛋白酶1活性降低的丧失(图5B)。最后,去除自N端的一个氨基酸和部分C端二者的截短的TR肽TR48-54并没有降低胰天蛋白酶1活性,表明了该肽在两端都有最小长度要求,并且观察到的TR47的完全抗炎作用可能需要不同的识别内部序列(图5B至C)。

[0142] 还检测了变体肽的协同抗炎活性。一些示例性结果在图6中示出。这些包括在PAR1来源的肽TR47和PAR3来源的肽P3R变体P3Rm的组合(图6A)以及在PAR1来源的肽TR47变体TR47(N-1)和PAR3来源的肽P3R的组合的情况下观察到的协同(图6B)。

[0143] 实施例4 PAR1肽/PAR3肽缀合物的抗炎活性

[0144] 本实施例描述了示出了PAR1肽和PAR3肽的共价键联改善抗炎活性的研究。

[0145] 使用PAR19聚体肽P1(47-55)(第47至55位残基;SEQ ID NO:36)和PAR3肽P3(51-65)(SEQ ID NO:9),其各自单独在相对高浓度下具有抗炎作用。为了表明共价连接的PAR1来源的肽和PAR3来源的肽的抗炎效力,通过用由10个甘氨酸残基构成的接头共价键联来产生PAR1/PAR3融合肽(“G10”)NPNDKYEPFGGGGGGGGGFPFSALEGWTGATIT(SEQ ID NO:61)。然后测试融合肽及其两种组分肽的抗炎活性。

[0146] 在测试浓度(0至500nM)下,在存在“G10”肽的情况下,在2nM至20nM下观察到胰天蛋白酶1活性显著降低,而分离的PAR1来源的肽和分离的PAR3来源的肽在200nM下均不具有任何抗炎作用(图8)。如所预期的那样,在相对较高的浓度下,单独的P1(47-55)肽在500nM下具有抗炎作用(图8)。

[0147] 结果进一步强调了PAR1和PAR3激动剂肽的协同活性。虽然这两种肽中的每一种都独立地具有抗炎作用,但组合比单独的任一种肽都更有效。

[0148] 实施例5 PAR1/PAR3融合肽促进内皮屏障稳定性

[0149] 本实施例描述了显示出PAR1来源的、PAR3来源的和共价连接的PAR1/PAR3融合(“G10”)肽抑制凝血酶诱导的内皮屏障破坏的研究。

[0150] 使用基于跨内皮电阻(TER)的测定来监测由凝血酶引起的内皮屏障完整性的破坏。使用iCELLigence机器(ACEA Biosciences Inc, San Diego, CA)实时追踪不同PAR肽在培养的内皮细胞(EA.hy926)上防止凝血酶诱导的血管渗漏的抗炎、血管保护作用。将EA.hy926细胞以10,000/孔的密度移液到镀金微电极传感器(L8, Acea Biosciences)的孔中。随后,随着细胞在微电极上生长并铺展开,监测电阻的提高,以获得连接至实时检测每个孔的TER变化的记录仪器的TER板上的汇合(达到平台)。当在添加凝血酶之前30分钟添加每种肽稀释液(所有孔中最终为0.25nM)时,测试了指定浓度下不同PAR来源肽对凝血酶作用的剂量响应抑制的作用。抑制百分比与TER信号随时间的增加成正比。在按照制造商的说明添加凝血酶之前,对反映TER信号的细胞指数值进行归一化。

[0151] 研究结果在图9中示出。结果表明,异二价PAR1:PAR3激动剂肽G10显示出其稳定内皮细胞屏障完整性的能力的显著效力,这类似于通过降低胰天蛋白酶1活性(图8)的能力所确定的其有效抗炎活性,其中在约6nM G10肽(SEQ ID NO:61)下观察到半数最大活性。在图

9中,G10肽的效力是长PAR1肽TR47的约8倍高(例如,比较6nM G10的作用(图9E)与50nM单独的PAR1肽P1(47-56)的作用(图9A),并且G10肽(图9E)与单独的PAR3肽P3(42-54)(图9D)相比保护内皮屏障完整性更有效>100倍。与3至50nM肽G10(图9E)的非常显著的作用相比,另一种包含47-55序列的PAR3肽P3(42-65)在5至50nM下(图9B)测试时没有显著作用。

[0152] 实施例6一些示例性方法

[0153] 胱天蛋白酶1测定。将THP1-null(野生型细胞)或NLRP3-缺陷型THP1-(defNLRP3)细胞以 1×10^6 /mL的最终浓度平板接种在96孔板中,并与PMA(0.5 μ M)在补充的RPMI中37°C孵育3小时。随后每24小时更换培养基,持续3天。选择多个孔亚组,并在37°C下在无血清RPMI中用多种浓度的APC、TR47或P3R处理细胞60分钟。在DPBS洗涤之后,将细胞与LPS(脂多糖)(1 μ g/mL)在无血清RPMI中在37°C下孵育3小时以引发炎性小体。在DPBS洗涤之后,为了完全激活胱天蛋白酶1活性,在存在或不存在10 μ M YVAD(胱天蛋白酶1抑制剂)和2.5 μ M ZVAD(泛胱天蛋白酶抑制剂)的情况下,将细胞与ATP(5mM)在37°C下孵育45分钟,然后按照制造商(Promega)的说明进行胱天蛋白酶1活性测定;以由底物水解引起的发光变化监测胱天蛋白酶1活性,并将其报告为相对发光单位(RLU)。¹⁵在选择实验中,将实验条件的胱天蛋白酶1活性相对于YVAD(胱天蛋白酶1抑制剂)条件进行归一化并表示为经归一化的胱天蛋白酶1活性。

[0154] IL-1 β ELISA。将THP1细胞以 1×10^6 /mL的最终浓度平板接种在96孔板中,并与PMA(0.5 μ M)在补充的RPMI中37°C孵育3小时。随后每24小时更换培养基,持续3天。所选择的孔用APC(4 μ g/mL)、TR47(50 μ M)、P3R(50 μ M)或TR47/P3R的组合(分别为8nM和500nM)处理1小时。然后将细胞用DPBS洗涤,然后与LPS(1 μ g/mL)在无血清RPMI中在37°C下孵育3小时。将细胞用DPBS洗涤,并与ATP(5mM)一起孵育45分钟。小心收集细胞上清液并冷冻,直至使用IL-1 β Quantikine ELISA按照制造商(R&D Systems)的说明进行测定,测量吸光度。根据制造商的说明测量标准曲线之后计算IL-1 β 的浓度。

[0155] ***

[0156] 尽管出于清楚理解的目的已经通过举例说明和实例的方式对前述发明进行了一些详细的描述,但对于本领域普通技术人员来说将非常明显的是,根据本发明的教导,在不脱离所附权利要求书的精神或范围的情况下,可对其进行某些改变和修改。

[0157] 本说明书中引用的所有出版物、数据库、GenBank序列、专利和专利申请通过引用并入本文,如同每个都被明确地和单独地表明通过引用并入一样。

[0158] 一些示例性多肽序列

[0159] SEQ ID NO:1.人PAR3

[0160] MKALIFAAAG LLLLLPTFCQ SGMENDTNL AKPTLPIKTF RGAPPNSFEE
 PPFSALEGWT GATITVKIKC PEESASHLHV KNATMGYLTS SLSTKLIPAI
 YLLVFVVGVP ANAVTLWMLF FRTRSICCTV FYTNLAIADF LFCVTLPFKI
 AYHLNGNNWV FGEVLCRATT VIFYGNMYCS ILLACISIN RYLAIVHPFT
 YRGLPKHTYA LVTCGLVWAT VFLYMLPFFI LKQEYYLVQP DITTCHDVHN
 TCESSSPFQL YYFISLAFFG FLIPFVLIY CYAAIIRTLN AYDHRWLWYV
 KASLLILVIF TICFAPSNII LIIHHANYYY NNTDGLYFIY LIALCLGSLN
 SCLDPFLYFL MSKTRNHSTA YLTK

[0161] SEQ ID NO:2.人PAR3 Met¹-Arg⁴¹缺失片段

GAPPNSFEE

[0162] PPFSALEGWT GATITVKIKC PEESASHLHV KNATMGYLTS SLSTKLIPAI
 YLLVFVVGVP ANAVTLWMLF FRTRSICCTV FYTNLAIADF LFCVTLPFKI
 AYHLNGNNWV FGEVLCRATT VIFYGNMYCS ILLACISIN RYLAIVHPFT
 YRGLPKHTYA LVTCGLVWAT VFLYMLPFFI LKQEYYLVQP DITTCHDVHN
 TCESSSPFQL YYFISLAFFG FLIPFVLIY CYAAIIRTLN AYDHRWLWYV
 KASLLILVIF TICFAPSNII LIIHHANYYY NNTDGLYFIY LIALCLGSLN
 SCLDPFLYFL MSKTRNHSTA YLTK

[0163] SEQ ID NO:3.人PAR3 Met¹-Arg⁴¹缺失胞外结构域

[0164] GAPPNSFEE PPFSALEGWT GATITVKIKC PEESASHLHV KNATMGYLTS SLST

[0165] SEQ ID NO:4. PAR3来源的肽P3R (SEQ ID NO:3的前24个残基)

[0166] GAPPNSFEE PPFSALEGWT GATIT

[0167] SEQ ID NO:5.人PAR1 Met¹-Arg⁴⁶缺失片段

47 NPND KYEPFWEDEE
 61 KNESGLTEYR LVSINKSSPL QKQLPAFISE DASGYLTSSW LTLFVPSVYT
 111 GV FV VSLPLN IMAIVVFILK MKVKKPAVVY MLHLATADVL
 151 FVSVLPFKIS YYFSGSDWQF GSELCRFVTA AFYCNMYASI
 191 LLMTVISIDR FLAVVYPMQS LSWRTLGRAS FTCLAIWALA

[0168] 231 IAGVVPLLLK EQTIQVPGLN ITTCHDVLNE TLLEGYYAAY
 271 FSAFSAVFFF VPLIISTVCY VSIIRCLSS AVANRSKKSR ALFLSAAVFC
 321 IFIICFGPTN VLLIAHYSFL SHTSTTEAAY FAYLLCVCVS SISCCIDPLI
 371 YYYASSECQR YVYSILCCKE SSDPSSYNSS GQLMASKMDT
 411 CSSNLNNSIY KLLT

[0169] SEQ ID NO:6.人PAR1 Asn⁴⁷-Trp¹⁰⁰ (Met¹-Arg⁴⁶缺失胞外结构域)

[0170] NPND KYEPFWEDEE KNESGLTEYR LVSINKSSPL QKQLPAFISE DASGYLTSSW

[0171] SEQ ID NO:7.人PAR1来源的肽TR47 (SEQ ID NO:6的前20个残基)

[0172] NPND KYEPFWEDEE KNESGL

序列表

<110> The Scripps Research Institute

<120> 用于治疗炎症病症的方法和组合物

<130> 1952.1PC

<140> PC/US2020/038036

<141> 2020-06-17

<150> US 62/862,977

<151> 2019-06-19

<160> 61

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 374

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 1

[0001]

Met Lys Ala Leu Ile Phe Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Leu Pro
1 5 10 15

Thr Phe Cys Gln Ser Gly Met Glu Asn Asp Thr Asn Asn Leu Ala Lys
20 25 30

Pro Thr Leu Pro Ile Lys Thr Phe Arg Gly Ala Pro Pro Asn Ser Phe
35 40 45

Glu Glu Phe Pro Phe Ser Ala Leu Glu Gly Trp Thr Gly Ala Thr Ile
50 55 60

Thr Val Lys Ile Lys Cys Pro Glu Glu Ser Ala Ser His Leu His Val
65 70 75 80

Lys Asn Ala Thr Met Gly Tyr Leu Thr Ser Ser Leu Ser Thr Lys Leu
85 90 95

Ile Pro Ala Ile Tyr Leu Leu Val Phe Val Val Gly Val Pro Ala Asn
100 105 110

Ala Val Thr Leu Trp Met Leu Phe Phe Arg Thr Arg Ser Ile Cys Thr
115 120 125

Thr	Val	Phe	Tyr	Thr	Asn	Leu	Ala	Ile	Ala	Asp	Phe	Leu	Phe	Cys	Val
130						135					140				
Thr	Leu	Pro	Phe	Lys	Ile	Ala	Tyr	His	Leu	Asn	Gly	Asn	Asn	Trp	Val
145					150					155					160
Phe	Gly	Glu	Val	Leu	Cys	Arg	Ala	Thr	Thr	Val	Ile	Phe	Tyr	Gly	Asn
				165					170					175	
Met	Tyr	Cys	Ser	Ile	Leu	Leu	Leu	Ala	Cys	Ile	Ser	Ile	Asn	Arg	Tyr
			180					185					190		
Leu	Ala	Ile	Val	His	Pro	Phe	Thr	Tyr	Arg	Gly	Leu	Pro	Lys	His	Thr
		195					200					205			
Tyr	Ala	Leu	Val	Thr	Cys	Gly	Leu	Val	Trp	Ala	Thr	Val	Phe	Leu	Tyr
	210					215					220				
Met	Leu	Pro	Phe	Phe	Ile	Leu	Lys	Gln	Glu	Tyr	Tyr	Leu	Val	Gln	Pro
225					230					235					240
Asp	Ile	Thr	Thr	Cys	His	Asp	Val	His	Asn	Thr	Cys	Glu	Ser	Ser	Ser
				245					250					255	
Pro	Phe	Gln	Leu	Tyr	Tyr	Phe	Ile	Ser	Leu	Ala	Phe	Phe	Gly	Phe	Leu
			260					265					270		
Ile	Pro	Phe	Val	Leu	Ile	Ile	Tyr	Cys	Tyr	Ala	Ala	Ile	Ile	Arg	Thr
		275					280					285			
Leu	Asn	Ala	Tyr	Asp	His	Arg	Trp	Leu	Trp	Tyr	Val	Lys	Ala	Ser	Leu
	290					295					300				
Leu	Ile	Leu	Val	Ile	Phe	Thr	Ile	Cys	Phe	Ala	Pro	Ser	Asn	Ile	Ile
305					310					315					320
Leu	Ile	Ile	His	His	Ala	Asn	Tyr	Tyr	Tyr	Asn	Asn	Thr	Asp	Gly	Leu
				325					330					335	
Tyr	Phe	Ile	Tyr	Leu	Ile	Ala	Leu	Cys	Leu	Gly	Ser	Leu	Asn	Ser	Cys
			340					345					350		

[0002]

Leu Asp Pro Phe Leu Tyr Phe Leu Met Ser Lys Thr Arg Asn His Ser
 355 360 365

Thr Ala Tyr Leu Thr Lys
 370

<210> 2
 <211> 333
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 2

Gly Ala Pro Pro Asn Ser Phe Glu Glu Phe Pro Phe Ser Ala Leu Glu
 1 5 10 15

Gly Trp Thr Gly Ala Thr Ile Thr Val Lys Ile Lys Cys Pro Glu Glu
 20 25 30

Ser Ala Ser His Leu His Val Lys Asn Ala Thr Met Gly Tyr Leu Thr
 35 40 45

[0003]

Ser Ser Leu Ser Thr Lys Leu Ile Pro Ala Ile Tyr Leu Leu Val Phe
 50 55 60

Val Val Gly Val Pro Ala Asn Ala Val Thr Leu Trp Met Leu Phe Phe
 65 70 75 80

Arg Thr Arg Ser Ile Cys Thr Thr Val Phe Tyr Thr Asn Leu Ala Ile
 85 90 95

Ala Asp Phe Leu Phe Cys Val Thr Leu Pro Phe Lys Ile Ala Tyr His
 100 105 110

Leu Asn Gly Asn Asn Trp Val Phe Gly Glu Val Leu Cys Arg Ala Thr
 115 120 125

Thr Val Ile Phe Tyr Gly Asn Met Tyr Cys Ser Ile Leu Leu Leu Ala
 130 135 140

Cys Ile Ser Ile Asn Arg Tyr Leu Ala Ile Val His Pro Phe Thr Tyr
 145 150 155 160

Arg Gly Leu Pro Lys His Thr Tyr Ala Leu Val Thr Cys Gly Leu Val
165 170 175

Trp Ala Thr Val Phe Leu Tyr Met Leu Pro Phe Phe Ile Leu Lys Gln
180 185 190

Glu Tyr Tyr Leu Val Gln Pro Asp Ile Thr Thr Cys His Asp Val His
195 200 205

Asn Thr Cys Glu Ser Ser Ser Pro Phe Gln Leu Tyr Tyr Phe Ile Ser
210 215 220

Leu Ala Phe Phe Gly Phe Leu Ile Pro Phe Val Leu Ile Ile Tyr Cys
225 230 235 240

Tyr Ala Ala Ile Ile Arg Thr Leu Asn Ala Tyr Asp His Arg Trp Leu
245 250 255

Trp Tyr Val Lys Ala Ser Leu Leu Ile Leu Val Ile Phe Thr Ile Cys
260 265 270

[0004]

Phe Ala Pro Ser Asn Ile Ile Leu Ile Ile His His Ala Asn Tyr Tyr
275 280 285

Tyr Asn Asn Thr Asp Gly Leu Tyr Phe Ile Tyr Leu Ile Ala Leu Cys
290 295 300

Leu Gly Ser Leu Asn Ser Cys Leu Asp Pro Phe Leu Tyr Phe Leu Met
305 310 315 320

Ser Lys Thr Arg Asn His Ser Thr Ala Tyr Leu Thr Lys
325 330

<210> 3
<211> 53
<212> PRT
<213> 智人

<400> 3

Gly Ala Pro Pro Asn Ser Phe Glu Glu Phe Pro Phe Ser Ala Leu Glu
1 5 10 15

Gly Trp Thr Gly Ala Thr Ile Thr Val Lys Ile Lys Cys Pro Glu Glu

	20	25	30
	Ser Ala Ser His Leu His Val Lys Asn Ala Thr Met Gly Tyr Leu Thr 35 40 45		
	Ser Ser Leu Ser Thr 50		
	<210> 4 <211> 24 <212> PRT <213> 智人 <400> 4		
	Gly Ala Pro Pro Asn Ser Phe Glu Glu Phe Pro Phe Ser Ala Leu Glu 1 5 10 15		
	Gly Trp Thr Gly Ala Thr Ile Thr 20		
[0005]	<210> 5 <211> 379 <212> PRT <213> 智人 <400> 5		
	Asn Pro Asn Asp Lys Tyr Glu Pro Phe Trp Glu Asp Glu Glu Lys Asn 1 5 10 15		
	Glu Ser Gly Leu Thr Glu Tyr Arg Leu Val Ser Ile Asn Lys Ser Ser 20 25 30		
	Pro Leu Gln Lys Gln Leu Pro Ala Phe Ile Ser Glu Asp Ala Ser Gly 35 40 45		
	Tyr Leu Thr Ser Ser Trp Leu Thr Leu Phe Val Pro Ser Val Tyr Thr 50 55 60		
	Gly Val Phe Val Val Ser Leu Pro Leu Asn Ile Met Ala Ile Val Val 65 70 75 80		
	Phe Ile Leu Lys Met Lys Val Lys Lys Pro Ala Val Val Tyr Met Leu 85 90 95		

His Leu Ala Thr Ala Asp Val Leu Phe Val Ser Val Leu Pro Phe Lys
100 105 110

Ile Ser Tyr Tyr Phe Ser Gly Ser Asp Trp Gln Phe Gly Ser Glu Leu
115 120 125

Cys Arg Phe Val Thr Ala Ala Phe Tyr Cys Asn Met Tyr Ala Ser Ile
130 135 140

Leu Leu Met Thr Val Ile Ser Ile Asp Arg Phe Leu Ala Val Val Tyr
145 150 155 160

Pro Met Gln Ser Leu Ser Trp Arg Thr Leu Gly Arg Ala Ser Phe Thr
165 170 175

Cys Leu Ala Ile Trp Ala Leu Ala Ile Ala Gly Val Val Pro Leu Leu
180 185 190

Leu Lys Glu Gln Thr Ile Gln Val Pro Gly Leu Asn Ile Thr Thr Cys
195 200 205

[0006]

His Asp Val Leu Asn Glu Thr Leu Leu Glu Gly Tyr Tyr Ala Tyr Tyr
210 215 220

Phe Ser Ala Phe Ser Ala Val Phe Phe Phe Val Pro Leu Ile Ile Ser
225 230 235 240

Thr Val Cys Tyr Val Ser Ile Ile Arg Cys Leu Ser Ser Ser Ala Val
245 250 255

Ala Asn Arg Ser Lys Lys Ser Arg Ala Leu Phe Leu Ser Ala Ala Val
260 265 270

Phe Cys Ile Phe Ile Ile Cys Phe Gly Pro Thr Asn Val Leu Leu Ile
275 280 285

Ala His Tyr Ser Phe Leu Ser His Thr Ser Thr Thr Glu Ala Ala Tyr
290 295 300

Phe Ala Tyr Leu Leu Cys Val Cys Val Ser Ser Ile Ser Cys Cys Ile
305 310 315 320

Asp Pro Leu Ile Tyr Tyr Tyr Ala Ser Ser Glu Cys Gln Arg Tyr Val
325 330 335

Tyr Ser Ile Leu Cys Cys Lys Glu Ser Ser Asp Pro Ser Ser Tyr Asn
340 345 350

Ser Ser Gly Gln Leu Met Ala Ser Lys Met Asp Thr Cys Ser Ser Asn
355 360 365

Leu Asn Asn Ser Ile Tyr Lys Lys Leu Leu Thr
370 375

<210> 6

<211> 54

<212> PRT

<213> 智人

<400> 6

Asn Pro Asn Asp Lys Tyr Glu Pro Phe Trp Glu Asp Glu Glu Lys Asn
1 5 10 15

[0007] Glu Ser Gly Leu Thr Glu Tyr Arg Leu Val Ser Ile Asn Lys Ser Ser
20 25 30

Pro Leu Gln Lys Gln Leu Pro Ala Phe Ile Ser Glu Asp Ala Ser Gly
35 40 45

Tyr Leu Thr Ser Ser Trp
50

<210> 7

<211> 20

<212> PRT

<213> 智人

<400> 7

Asn Pro Asn Asp Lys Tyr Glu Pro Phe Trp Glu Asp Glu Glu Lys Asn
1 5 10 15

Glu Ser Gly Leu
20

<210> 8

<211> 13
<212> PRT
<213> 智人

<400> 8

Gly Ala Pro Pro Asn Ser Phe Glu Glu Phe Pro Phe Ser
1 5 10

<210> 9
<211> 15
<212> PRT
<213> 智人

<400> 9

Phe Pro Phe Ser Ala Leu Glu Gly Trp Thr Gly Ala Thr Ile Thr
1 5 10 15

<210> 10
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 10

[0008]

Phe Pro Phe Ser Ala Leu Glu Gly Trp
1 5

<210> 11
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人

<400> 11

Gly Ala Pro Pro Asn Ser Phe Glu Glu Phe Pro Phe Ser Ala
1 5 10

<210> 12
<211> 15
<212> PRT
<213> 智人

<400> 12

Gly Ala Pro Pro Asn Ser Phe Glu Glu Phe Pro Phe Ser Ala Leu
1 5 10 15

<210> 13
<211> 16

<212> PRT
<213> 智人

<400> 13

Gly Ala Pro Pro Asn Ser Phe Glu Glu Phe Pro Phe Ser Ala Leu Glu
1 5 10 15

<210> 14
<211> 17
<212> PRT
<213> 智人

<400> 14

Gly Ala Pro Pro Asn Ser Phe Glu Glu Phe Pro Phe Ser Ala Leu Glu
1 5 10 15

Gly

[0009] <210> 15
<211> 18
<212> PRT
<213> 智人

<400> 15

Gly Ala Pro Pro Asn Ser Phe Glu Glu Phe Pro Phe Ser Ala Leu Glu
1 5 10 15

Gly Trp

<210> 16
<211> 19
<212> PRT
<213> 智人

<400> 16

Gly Ala Pro Pro Asn Ser Phe Glu Glu Phe Pro Phe Ser Ala Leu Glu
1 5 10 15

Gly Trp Thr

<210> 17
<211> 20

<212> PRT
<213> 智人

<400> 17

Gly Ala Pro Pro Asn Ser Phe Glu Glu Phe Pro Phe Ser Ala Leu Glu
1 5 10 15

Gly Trp Thr Gly
20

<210> 18
<211> 21
<212> PRT
<213> 智人

<400> 18

Gly Ala Pro Pro Asn Ser Phe Glu Glu Phe Pro Phe Ser Ala Leu Glu
1 5 10 15

Gly Trp Thr Gly Ala
20

[0010]

<210> 19
<211> 22
<212> PRT
<213> 智人

<400> 19

Gly Ala Pro Pro Asn Ser Phe Glu Glu Phe Pro Phe Ser Ala Leu Glu
1 5 10 15

Gly Trp Thr Gly Ala Thr
20

<210> 20
<211> 23
<212> PRT
<213> 智人

<400> 20

Gly Ala Pro Pro Asn Ser Phe Glu Glu Phe Pro Phe Ser Ala Leu Glu
1 5 10 15

Gly Trp Thr Gly Ala Thr Ile
20

<210> 21
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 21

Phe Pro Phe Ser Ala Leu Glu Gly Trp Thr
1 5 10

<210> 22
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<400> 22

Phe Pro Phe Ser Ala Leu Glu Gly Trp Thr Gly
1 5 10

<210> 23
<211> 12
<212> PRT
<213> 智人

[0011]

<400> 23

Phe Pro Phe Ser Ala Leu Glu Gly Trp Thr Gly Ala
1 5 10

<210> 24
<211> 13
<212> PRT
<213> 智人

<400> 24

Phe Pro Phe Ser Ala Leu Glu Gly Trp Thr Gly Ala Thr
1 5 10

<210> 25
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人

<400> 25

Phe Pro Phe Ser Ala Leu Glu Gly Trp Thr Gly Ala Thr Ile
1 5 10

<210> 26
<211> 8
<212> PRT
<213> 智人

<400> 26

Phe Pro Phe Ser Ala Leu Glu Gly
1 5

<210> 27
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人

<400> 27

Phe Pro Phe Ser Ala Leu Glu
1 5

<210> 28
<211> 6
<212> PRT
<213> 智人

[0012]

<400> 28

Phe Pro Phe Ser Ala Leu
1 5

<210> 29
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人

<400> 29

Glu Phe Pro Phe Ser Ala Leu
1 5

<210> 30
<211> 8
<212> PRT
<213> 智人

<400> 30

Glu Glu Phe Pro Phe Ser Ala Leu
1 5

<210> 31
<211> 4
<212> PRT
<213> 智人

<400> 31

Asn Pro Asn Asp
1

<210> 32
<211> 5
<212> PRT
<213> 智人

<400> 32

Asn Pro Asn Asp Lys
1 5

<210> 33
<211> 6
<212> PRT
<213> 智人

[0013] <400> 33

Asn Pro Asn Asp Lys Tyr
1 5

<210> 34
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人

<400> 34

Asn Pro Asn Asp Lys Tyr Glu
1 5

<210> 35
<211> 8
<212> PRT
<213> 智人

<400> 35

Asn Pro Asn Asp Lys Tyr Glu Pro
1 5

<210> 36

<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 36

Asn Pro Asn Asp Lys Tyr Glu Pro Phe
1 5

<210> 37
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 37

Asn Pro Asn Asp Lys Tyr Glu Pro Phe Trp
1 5 10

<210> 38
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<400> 38

[0014]

Asn Pro Asn Asp Lys Tyr Glu Pro Phe Trp Glu
1 5 10

<210> 39
<211> 12
<212> PRT
<213> 智人

<400> 39

Asn Pro Asn Asp Lys Tyr Glu Pro Phe Trp Glu Asp
1 5 10

<210> 40
<211> 13
<212> PRT
<213> 智人

<400> 40

Asn Pro Asn Asp Lys Tyr Glu Pro Phe Trp Glu Asp Glu
1 5 10

<210> 41
<211> 14

<212> PRT
<213> 智人

<400> 41

Asn Pro Asn Asp Lys Tyr Glu Pro Phe Trp Glu Asp Glu Glu
1 5 10

<210> 42
<211> 15
<212> PRT
<213> 智人

<400> 42

Asn Pro Asn Asp Lys Tyr Glu Pro Phe Trp Glu Asp Glu Glu Lys
1 5 10 15

<210> 43
<211> 16
<212> PRT
<213> 智人

<400> 43

[0015] Asn Pro Asn Asp Lys Tyr Glu Pro Phe Trp Glu Asp Glu Glu Lys Asn
1 5 10 15

<210> 44
<211> 17
<212> PRT
<213> 智人

<400> 44

Asn Pro Asn Asp Lys Tyr Glu Pro Phe Trp Glu Asp Glu Glu Lys Asn
1 5 10 15

Glu

<210> 45
<211> 18
<212> PRT
<213> 智人

<400> 45

Asn Pro Asn Asp Lys Tyr Glu Pro Phe Trp Glu Asp Glu Glu Lys Asn
1 5 10 15

Glu Ser

<210> 46
<211> 19
<212> PRT
<213> 智人

<400> 46

Asn Pro Asn Asp Lys Tyr Glu Pro Phe Trp Glu Asp Glu Glu Lys Asn
1 5 10 15

Glu Ser Gly

<210> 47
<211> 19
<212> PRT
<213> 智人

<400> 47

[0016] Pro Asn Asp Lys Tyr Glu Pro Phe Trp Glu Asp Glu Glu Lys Asn Glu
1 5 10 15

Ser Gly Leu

<210> 48
<211> 15
<212> PRT
<213> 智人

<400> 48

Tyr Glu Pro Phe Trp Glu Asp Glu Glu Lys Asn Glu Ser Gly Leu
1 5 10 15

<210> 49
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成序列

<400> 49

Gln Pro Asn Asp Lys Tyr Glu Pro Phe Trp Glu Asp Glu Glu Lys Asn
1 5 10 15

Glu Ser Gly Leu
20

<210> 50
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成序列

<400> 50

Ala Pro Asn Asp Lys Tyr Glu Pro Phe Trp Glu Asp Glu Glu Lys Asn
1 5 10 15

Glu Ser Gly Leu
20

[0017] <210> 51
<211> 18
<212> PRT
<213> 智人

<400> 51

Asn Asp Lys Tyr Glu Pro Phe Trp Glu Asp Glu Glu Lys Asn Glu Ser
1 5 10 15

Gly Leu

<210> 52
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成序列

<400> 52

Asp Pro Asn Asp Lys Tyr Glu Pro Phe Trp Glu Asp Glu Glu Lys Asn
1 5 10 15

Glu Ser Gly Leu

20

<210> 53
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人

<400> 53

Pro Asn Asp Lys Tyr Glu Pro
1 5

<210> 54
<211> 6
<212> PRT
<213> 智人

<400> 54

Ser Ala Leu Glu Gly Trp
1 5

[0018] <210> 55
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人

<400> 55

Trp Thr Gly Ala Thr Ile Thr
1 5

<210> 56
<211> 20
<212> PRT
<213> 智人

<400> 56

Asn Pro Asn Asp Lys Tyr Glu Pro Phe Trp Glu Asp Glu Glu Lys Asn
1 5 10 15

Glu Ser Gly Leu
20

<210> 57
<211> 17
<212> PRT
<213> 智人

<400> 57

Asp Lys Tyr Glu Pro Phe Trp Glu Asp Glu Glu Lys Asn Glu Ser Gly
1 5 10 15

Leu

<210> 58

<211> 16

<212> PRT

<213> 智人

<400> 58

Lys Tyr Glu Pro Phe Trp Glu Asp Glu Glu Lys Asn Glu Ser Gly Leu
1 5 10 15

<210> 59

<211> 14

<212> PRT

<213> 智人

<400> 59

[0019]

Glu Pro Phe Trp Glu Asp Glu Glu Lys Asn Glu Ser Gly Leu
1 5 10

<210> 60

<211> 13

<212> PRT

<213> 智人

<400> 60

Pro Phe Trp Glu Asp Glu Glu Lys Asn Glu Ser Gly Leu
1 5 10

<210> 61

<211> 34

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 61

Asn Pro Asn Asp Lys Tyr Glu Pro Phe Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Phe Pro Phe Ser Ala Leu Glu Gly Trp Thr Gly Ala Thr
20 25 30

[0020]

Ile Thr

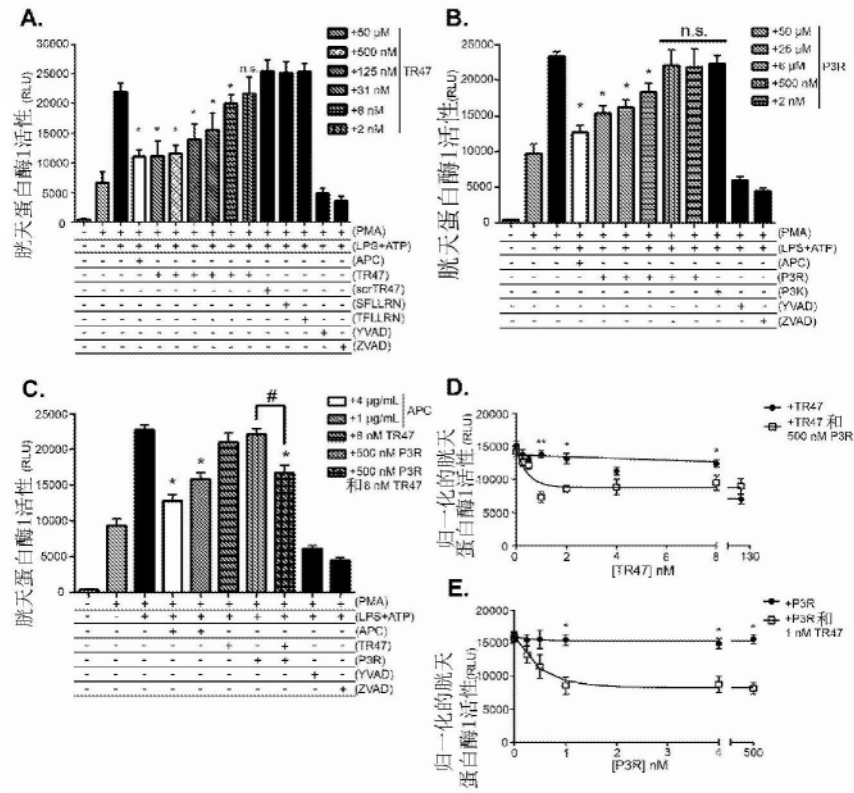


图1

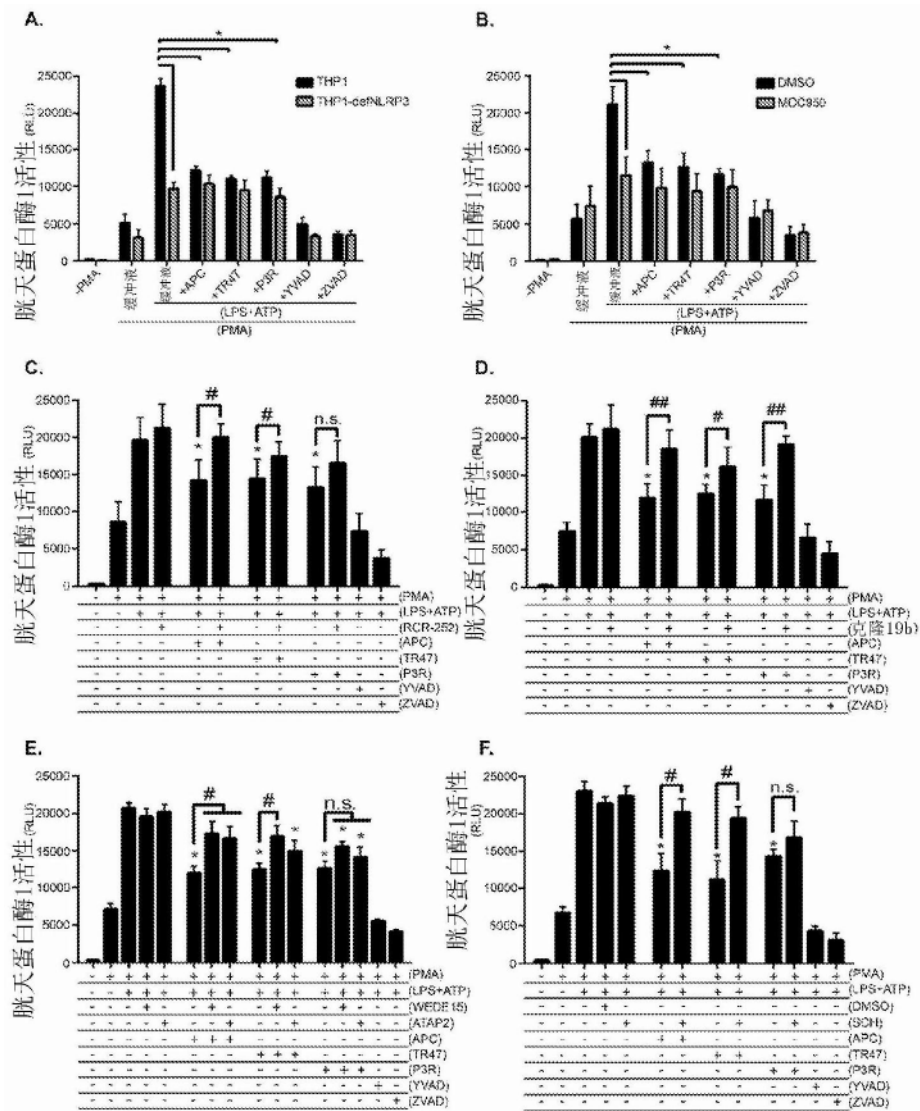


图2

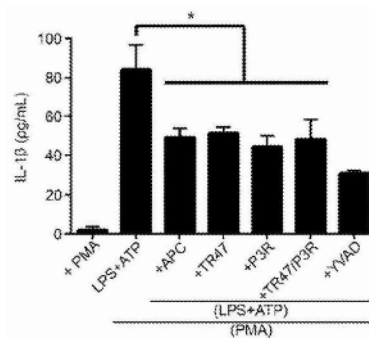


图3



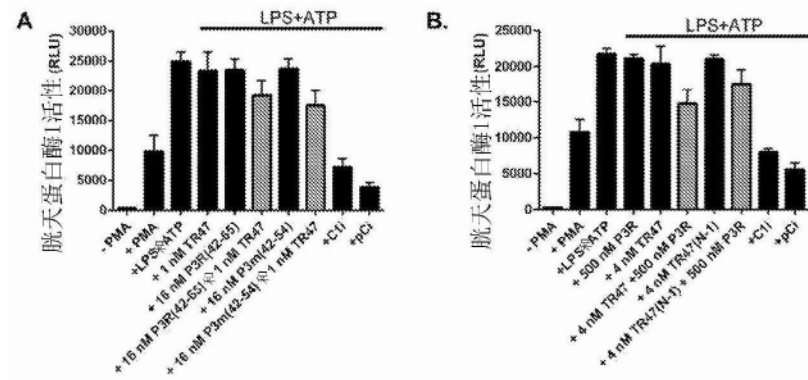


图6

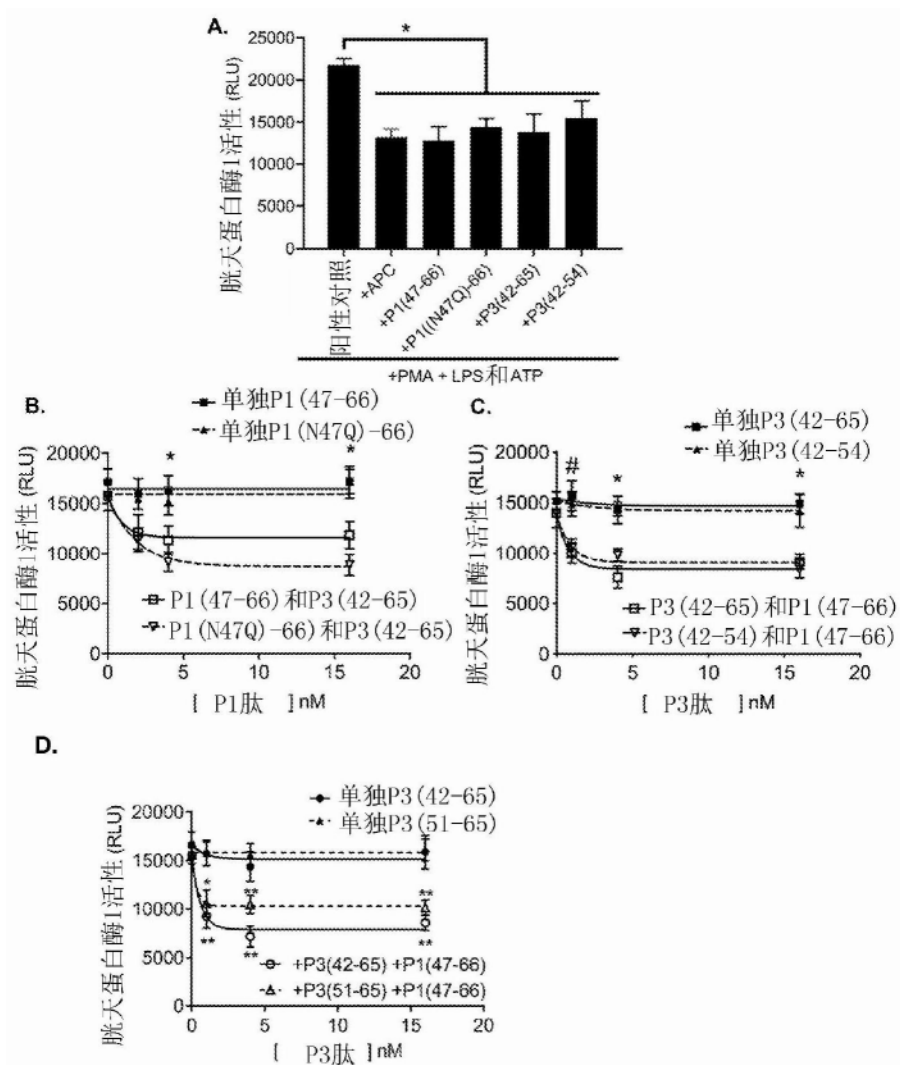


图7

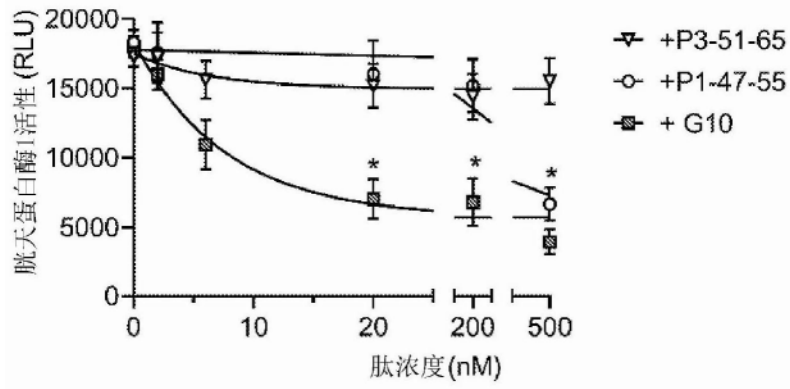


图8

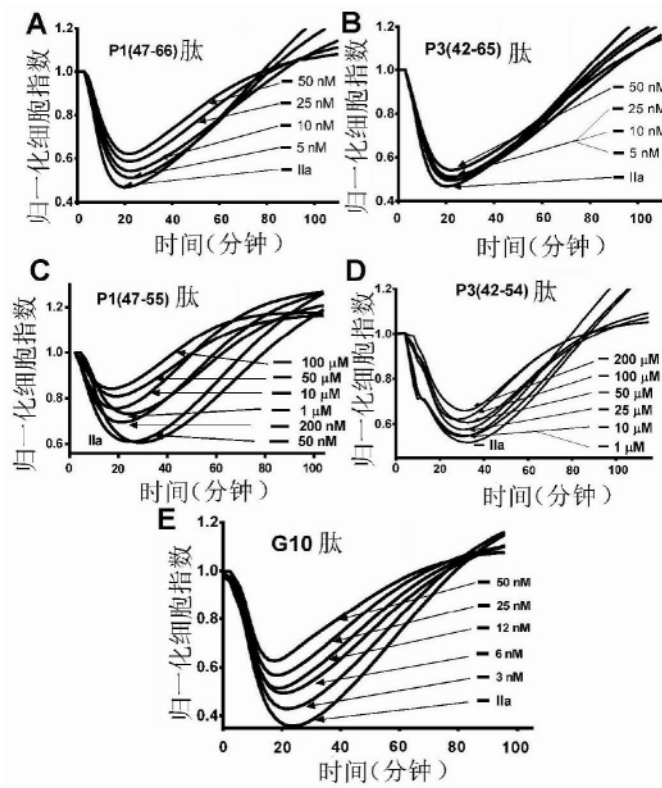


图9