(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103764669 B
(45)授权公告日 2017.08.15

(21)申请号 201280028984.3
(22)申请日 2012.06.15
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 103764669 A
(43)申请公布日 2014.04.30
(30)优先权数据
61/497,270 2011.06.15 US
13/524,381 2012.06.15 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2013.12.12
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2012/042699 2012.06.15
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2012/174397 EN 2012.12.20

(73)专利权人 雷索特制药公司
地址 丹麦霍尔特
(72)发明人 安杰洛·P·孔萨尔沃
诺泽·M·梅赫塔 毛罗·佩雷蒂
杰蒙德·达利
(74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227
代理人 彭鲲鹏 卢蓓

(51)Int.Cl.
C07K 14/00(2006.01)
A61K 38/00(2006.01)
审查员 劳芳

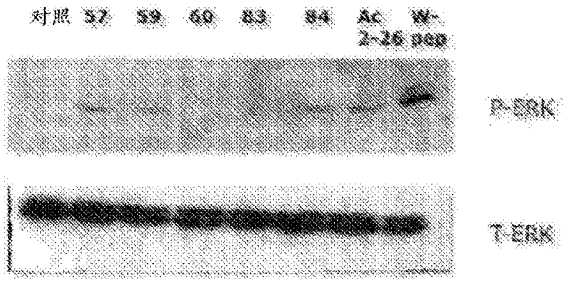
权利要求书1页 说明书15页
序列表8页 附图8页

(54)发明名称

抗炎药物产品

(57)摘要

本发明提供了与人膜联蛋白1的N末端50个残基的区域有同源性的多肽以作为抗炎剂用于医学用途。所述多肽中的一些与人膜联蛋白1的N末端48个残基(尤其是其2-48位和11-48位残基)有同源性。在一些实施方案中,通过在对应于人膜联蛋白1的11、22、25和/或36位残基的残基处的至少一个修饰和/或通过对所述多肽的C末端酰胺化改进这些化合物的性质。人膜联蛋白1的2-26位氨基酸的类似物(特别是在N末端乙酰化和/或在C末端酰胺化以及在11和/或22位具有修饰的)也被公开作为抗炎剂用于医学用途。



CN 103764669 B

1.多肽,其中所述多肽选自SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:8之一。

2.包含权利要求1所述多肽的药物组合物。

3.权利要求1所述的多肽在制备用于治疗炎症的药物中的用途。

4.根据权利要求1所述的多肽,其中与24位具有缬氨酸的多肽相比,所述多肽在切割膜联蛋白1的蛋白酶PR3和切割膜联蛋白1的蛋白酶HNE的存在下具有增加的稳定性。

5.根据权利要求1所述的多肽,其中所述多肽能够活化FPR2。

抗炎药物产品

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求2011年6月15日提交的美国临时申请序列号61/497,270和2012年6月15日提交的美国申请13/524,381的优先权，针对其中的教导，这些申请的全部内容通过引用并入本文。

技术领域

[0003] 本文公开的实施方案涉及具有所定义的与人膜联蛋白1具有结构同源性的抗炎化合物，其药物组合物，以及这些化合物和组合物作为抗炎剂的医学治疗和用途。

背景技术

[0004] 膜联蛋白超家族由具有显著的生物学和结构同源性的13个钙磷脂结合蛋白组成。膜联蛋白从结构上划分为高度保守的核心结构域和可变的N-末端结构域。膜联蛋白1(ANXA1，37kDa)是一种抗炎蛋白，其抑制血液来源的多形核白细胞(PMN)外渗进入周围组织。所述蛋白质结合到FPR2(或FPR-L1)受体，起始信号转导事件的级联。在炎症刺激之后，血液来源的多形核白细胞(PMN)迁移到周围组织中。PMN的迁移或者外渗由控制促炎和抗炎过程的调节物(比如黏附分子、细胞因子和蛋白酶)调节。PMN的破坏可能性高并且可能自我破坏。因此，控制PMN的外渗和炎症应答是重要的。

[0005] 为了作为抗炎剂的治疗性目的，完整的膜联蛋白1蛋白质与其功能性片段或经修饰版本相比拥有众多缺点。蛋白质的大尺寸使得它更难以通过对较小多肽来说是可能的技术(例如，经皮或经粘膜)来实现。为了治疗眼睛的炎症，预期小分子能够更好地穿透角膜上皮。此外，蛋白水解性降解的易感性对所有的肽药物来说都是要特别关注的，尤其是大的肽药物，尤其是如果预期经口递送(许多患者优选的)的话。

[0006] 一些在多肽的N末端侧缺乏显著区域的膜联蛋白1衍生物已显示出在炎症及介体释放的一些测定中缺乏显著作用，而全长的N末端的N乙酰基膜联蛋白1(2-26)在几个体系中被认为具有生物学活性。主要衍生自膜联蛋白1蛋白质的独特N端部分的多种肽已显示出具有抗炎性质。

[0007] 研究最广泛的膜联蛋白A1肽之一是肽Ac2-26，其模拟了54个氨基酸的N-末端区域的第2至第26位氨基酸。像Ac1-188片段(和天然蛋白质)，它具有N末端乙酰化，以增加其稳定性，并有可能增加它的半衰期。已经表明，膜联蛋白1和它的N末端肽(Ac2-26)通过FPR2/氧脂素(Lipoxin)A4(FPR2/Alx)受体发挥其大部分的抗炎作用。在体内，Ac2-26肽已经显示出在心肌缺血再灌注(I/R)、肠系膜I/R、糖原腹膜炎和IL1气囊(airpouch)模型中发挥抗炎作用，其中据报告称其显著减少中性粒细胞募集至损伤/炎症部位。该肽的抗炎特性并不仅仅限于炎症的急性模型。在关节炎模型中，Ac2-26肽的关节内施用显示出通过嗜中性粒细胞募集的减少来降低疾病的严重程度。

[0008] Ac2-26肽的更短版本，诸如肽Ac2-12和Ac2-6，也已显示在炎症的急性模型中引发一定程度的抗炎作用。许多实验室进行的工作已表明，衍生自完全独立于膜联蛋白A1蛋白

之N-末端的区域，更精确地(在蛋白质的核心区的第三重复中)被称为抗炎素多肽-2(antiflammin-2,AF2)247-253位氨基酸，也具有抗炎性质。

[0009] 发明概述

[0010] 本文公开的实施方案涉及抗炎药物产品，以及更具体地涉及多肽、包含所述多肽的药物组合物、和治疗或预防炎症的方法。本公开内容的抗炎药物产品具有包括但不限于下列的品质：良好的抗炎效力、稳定性和/或易施用性，如本文详述的。

[0011] 根据本文举例说明的一些方面，提供了如SEQ ID NO:4中所示的多肽。

[0012] 根据本文举例说明的一些方面，提供了如SEQ ID NO:5中所示的多肽。

[0013] 根据本文举例说明的一些方面，提供了如SEQ ID NO:6中所示的多肽。

[0014] 根据本文举例说明的一些方面，提供了如SEQ ID NO:7中所示的多肽。

[0015] 根据本文举例说明的一些方面，提供了如SEQ ID NO:8中所示的多肽。

[0016] 根据本文举例说明的一些方面，提供了如SEQ ID NO:9中所示的多肽。

[0017] 根据本文举例说明的一些方面，提供了如SEQ ID NO:10中所示的多肽。

[0018] 根据本文举例说明的一些方面，提供了如SEQ ID NO:11中所示的多肽。

[0019] 根据本文举例说明的一些方面，提供了如SEQ ID NO:12中所示的多肽。

[0020] 根据本文举例说明的一些方面，提供了如SEQ ID NO:13中所示的多肽。

[0021] 根据本文举例说明的一些方面，提供了如SEQ ID NO:14中所示的多肽。

[0022] 根据本文举例说明的一些方面，提供了如SEQ ID NO:15中所示的多肽。

[0023] 根据本文举例说明的一些方面，提供了如SEQ ID NO:16中所示的多肽。

[0024] 根据本文举例说明的一些方面，提供了多肽，所述多肽具有47-50个氨基酸并且在其分子结构中包含与SEQ ID NO:1的2-48位残基有至少90％同一性的同源性区域，其中所述多肽的24位残基对应于SEQ ID NO:1的25位残基，并且其中多肽的24位残基不是缬氨酸。在一个实施方案中，所述多肽的同源性区域与SEQ ID NO:1的2-48位残基具有至少94％同一性。在一个实施方案中，多肽的同源性区域与SEQ ID NO:1的2-23位残基具有100％同一性。

[0025] 根据本文举例说明的一些方面，提供了多肽，所述多肽具有25-26个氨基酸并且在其分子结构中包含与SEQ ID NO:1的2-26位残基有至少90％同一性的同源性区域，其中所述多肽的10位残基对应于SEQ ID NO:1的11位残基，所述多肽的10位残基是除丙氨酸以外的任意氨基酸，并且其中所述肽的21位残基是除缬氨酸以外的任意氨基酸。

[0026] 根据本文举例说明的一些方面，提供了多肽，所述多肽具有37至45个氨基酸并在其分子结构中包含与SEQ ID NO:1的12-24位残基有100％同一性以及与SEQ ID NO:1的26-48位残基有100％同一性的同源性区域，其中或者所述多肽的14位残基对应于SEQ ID NO:1的25位残基且不是缬氨酸，或者所述多肽的21位残基对应于SEQ ID NO:1的25位残基且不是缬氨酸。

[0027] 根据本文举例说明的一些方面，提供了多肽，所述多肽具有47至50个氨基酸并在其分子结构中包含与SEQ ID NO:1的2-48位残基有100％同一性的同源性区域，其中所述多肽在其C末端酰胺化。

[0028] 根据本文举例说明的一些方面，提供了多肽，所述多肽具有37-51个氨基酸残基并且在其分子结构中包含与SEQ ID NO:2有至少90％同一性的同源性区域，其中所述多肽的

同源性区域具有至少下列特征之一：(a)所述多肽对应于SEQ ID NO:2的1位残基的残基不是丙氨酸，(b)所述多肽对应于SEQ ID NO:2的12位残基的残基不是缬氨酸，(c)所述多肽对应于SEQ ID NO:2的15位残基的残基不是缬氨酸，或者(d)所述多肽对应于SEQ ID NO:2的26位残基的残基不是缬氨酸。

[0029] 根据本文举例说明的一些方面，提供了多肽，所述多肽具有47-48个氨基酸并且与SEQ ID NO:1的1-48位残基有至少90％同一性。

[0030] 根据本文举例说明的一些方面，提供了多肽，所述多肽具有47至51个氨基酸残基并在其分子结构中包含与人膜联蛋白1的2-48位残基有100％同一性的47个氨基酸残基之区域。

[0031] 根据本文举例说明的一些方面，提供了多肽，所述多肽具有49至51个氨基酸残基并在其分子结构中包含与人膜联蛋白1的2-48位残基有100％同一性的47个氨基酸残基之区域。

[0032] 根据本文举例说明的一些方面，提供了多肽，所述多肽与SEQ ID NO:11具有至少96％同一性，其中或者10位残基不是丙氨酸或者21位残基不是缬氨酸。在一些实施方案中，10位残基不是丙氨酸并且21位残基不是缬氨酸。

[0033] 根据本文举例说明的一些方面，提供了多肽，所述多肽具有如SEQ ID NO:11中所示的氨基酸序列，其中或者10位残基不是丙氨酸或者21位残基不是缬氨酸。在一些实施方案中，10位残基不是丙氨酸并且21位残基不是缬氨酸。

[0034] 根据本文举例说明的一些方面，提供了治疗或者预防炎症的方法，所述方法包括向需要这样的治疗或者预防的患者施用治疗有效量的本公开的抗炎多肽。

[0035] 根据本文举例说明的一些方面，本公开内容的多肽可用于制备用来治疗或者预防炎症的药物。在一个实施方案中，所述药物包括一种或更多种药学上可接受的赋形剂、稀释剂或载体。

[0036] 在一个实施方案中，本公开的药物组合物包括但不限于，片剂或胶囊形式的组合物，所述组合物包含至少一种药学上可接受的酸，其中在片剂或胶囊中所述酸以下述量存在，如果将片剂或者胶囊加入到10毫升0.1M的碳酸氢钠水溶液，则所述量足以使所述溶液的pH值降低至不高于5.5。剂型的其他优选在下文中示出。

[0037] 在本公开的范围内设想了兽医用途和人中的用途。本文讨论的剂量预期对于人或兽医的用途来说是相同的，基于动物的相对重量对将施用的本公开之药物进行按比例调整除外。

附图说明

[0038] 参照附图进一步解释本发明公开的实施方案，其中在多个视图中用类似数字表示类似结构。所示附图不一定是按比例的，而是一般将重点放在举例说明本发明公开的实施方案的原理。

[0039] 图1A和图1B显示蛋白质印迹(western blotting)分析，比较了本公开的5种多肽相对于Ac-ANAX1(2-26)-OH通过FPR2受体激活p-ERK的效力。图1A是对于p-ERK和t-ERK的典型印迹。图1B显示了p-ERK相对于t-ERK水平的光密度结果。

[0040] 图2A至2C是一系列图，其报告了来自流动室(flow chamber)分析的数据以确定本

公开的5种多肽和Ac-ANAX1(2-26)-OH减少PMN与活化的HUVEC单层相互作用的抑制能力。图2A显示以PMN捕获计的PMN与HUVEC的相互作用程度的定量。图2B显示以PMN粘附计的PMN与HUVEC的相互作用程度的定量。图2C显示以滚动计的PMN与HUVEC的相互作用程度的定量。

[0041] 图3A和图3B是一系列柱状图，比较了本公开的三种多肽相对于仅载剂(vehicle)之对照的抗炎效果。图3A示出细胞计数以及图3B显示考虑GR1+ve细胞时的效果。

[0042] 图4A至4C是一系列柱状图，报告了本公开的三种多肽在不同的浓度针对三个不同参数提供的百分比抑制。(捕获-图4A；滚动-图4B；以及黏附-图4C)

[0043] 图5是一系列柱状图，报告了本公开的三种多肽在不同浓度时模拟膜联蛋白A1诱导对凋亡细胞的吞噬之性能的能力。

[0044] 图6是一系列柱状图，显示了，相对于仅载剂的对照，本公开的多肽在不同浓度时降低再灌注损伤之风险的能力。

[0045] 图7是一系列柱状图，显示了，相对于仅载剂的对照，本公开的两种多肽在不同浓度时降低再灌注损伤之风险的能力。

[0046] 图8是本公开的三个多肽UGP022(SEQ ID NO:5)、UGP025(SEQ ID NO:7)和UGP026(SEQ ID NO:8)在PR3(参与膜联蛋白1体内切割的蛋白酶)的存在下随时间降解的对数图。

[0047] 图9是本公开的三个多肽UGP022(SEQ ID NO:5)、UGP025(SEQ ID NO:7)和UGP026(SEQ ID NO:8)在HNE(参与膜联蛋白1体内切割的蛋白酶)的存在下降解随时间的对数图。

[0048] 发明详述

[0049] 在所附的序列表中：

[0050] SEQ ID NO:1是人膜联蛋白1的前50个氨基酸。

[0051] SEQ ID NO:2是经变化(variable)修饰的人膜联蛋白1的11-48位氨基酸，所述变化可以是相当于SEQ ID NO:2的1、12、15和26位的11、22、25和36位的任一天然氨基酸(相对于人膜联蛋白1)。

[0052] SEQ ID NO:3几乎与SEQ ID NO:2相同，差别仅在于SEQ ID NO:3缺少了SEQ ID NO:2的第一个残基。

[0053] SEQ ID NO:4是本公开之多肽的一个实施方案，UGP021。UGP021的长度为50个氨基酸。UGP021是人膜联蛋白1的2-50位氨基酸，其中所述多肽的50位是甘氨酸。在一个实施方案中，UGP021被称为ANXA1(2-50)Gly51-OH。

[0054] SEQ ID NO:5是本公开之多肽的一个实施方案，UGP022。UGP022的长度为49个氨基酸。UGP022是人膜联蛋白1的2-50位氨基酸，其中所述多肽在其C末端酰胺化。在一个实施方案中，UGP022被称为ANXA1(2-50)-NH2。

[0055] SEQ ID NO:6是本公开之多肽的一个实施方案，UGP024。UGP024的长度为49个氨基酸。UGP024是人膜联蛋白1的2-50位氨基酸。在一个实施方案中，UGP024被称为ANXA1(2-50)-OH。

[0056] SEQ ID NO:7是本公开之多肽的一个实施方案，UGP025。UGP025的长度为47个氨基酸。UGP025是人膜联蛋白1的2-48位氨基酸，其中所述多肽在其C末端酰胺化，并且其中所述多肽的24位残基为亮氨酸而不是对应的SEQ ID NO:1的25位残基。在一个实施方案中，UGP025被称为Leu25-ANXA1(2-48)-NH_2。

[0057] SEQ ID NO:8是本公开之多肽的一个实施方案，UGP026。UGP026的长度为49个氨基

酸。UGP026是人膜联蛋白1的2-50位氨基酸，其中所述多肽在其C末端酰胺化并且其中所述多肽的24位残基是亮氨酸而不是对应的SEQ ID NO:1的25位残基缬氨酸。在一个实施方案中，UGP026被称为Leu25-ANXA1(2-50)-NH_2。

[0058] SEQ ID NO:9是本公开之多肽的一个实施方案，UGP027。UGP027的长度为44个氨基酸。UGP027是人膜联蛋白1的5-48位氨基酸，其中所述多肽在其C末端酰胺化并且其中所述多肽的21位残基是亮氨酸而不是对应的SEQ ID NO:1的25位残基缬氨酸。在一个实施方案中，UGP027被称为Leu25-ANXA1(5-48)-NH_2。

[0059] SEQ ID NO:10是本公开之多肽的一个实施方案，UGP028。UGP028的长度为37个氨基酸。UGP028是人膜联蛋白1的12-48位氨基酸，其中所述多肽在其C末端酰胺化并且其中所述多肽的14位残基是亮氨酸而不是对应的SEQ ID NO:1的25位残基缬氨酸。在一个实施方案中，UGP028被称为Leu25-ANXA1(12-48)-NH_2。

[0060] SEQ ID NO:11是本公开之多肽的一个实施方案。SEQ ID NO:11的长度为25个氨基酸。SEQ ID NO:11是经变化修饰的人膜联蛋白1的2-26位氨基酸，所述变化可以是所述多肽的10和21位残基(其相当于SEQ ID NO:1的11和22位)的任一天然氨基酸。

[0061] SEQ ID NO:12是本公开之多肽的一个实施方案，Pep57。Pep57的长度为25个氨基酸。Pep57是人膜联蛋白1的2-26位氨基酸，其中所述多肽的10位残基是亮氨酸而不是对应的SEQ ID NO:1的11位残基丙氨酸，其中所述多肽的21位残基是亮氨酸而不是对应的SEQ ID NO:1的22位残基缬氨酸，并且其中所述多肽的1位残基是乙酰化的。在一个实施方案中，Pep57被称为Leu11,22-Ac-ANAX1(2-26)-OH。

[0062] SEQ ID NO:13是本公开之多肽的一个实施方案，Pep59。Pep59的长度为25个氨基酸。Pep59是人膜联蛋白1的2-26位氨基酸，其中所述多肽的10位残基是天冬氨酸而不是对应的SEQ ID NO:1的11位残基丙氨酸，其中所述多肽的21位残基为天冬氨酸而不是对应的SEQ ID NO:1的22位残基缬氨酸，并且其中所述多肽的1位残基是乙酰化的。在一个实施方案中，Pep59被称为Asp11,22-Ac-ANAX1(2-26)-OH。

[0063] SEQ ID NO:14是本公开之多肽的一个实施方案，Pep84。Pep84的长度为25个氨基酸。Pep84是人膜联蛋白1的2-26位氨基酸，其中所述多肽的10位残基是甲硫氨酸而不是对应的SEQ ID NO:1的11位残基丙氨酸，其中所述多肽的21位残基为甲硫氨酸而不是对应的SEQ ID NO:1的22位残基缬氨酸，并且其中多肽的1位残基是乙酰化的。在一个实施方案中，Pep84被称为Met11,22-Ac-ANAX1(2-26)-OH。

[0064] SEQ ID NO:15是本公开之多肽的一个实施方案，Pep60。Pep60的长度为25个氨基酸。Pep60是人膜联蛋白1的2-26位氨基酸，其中所述多肽的10位残基是谷氨酸而不是对应的SEQ ID NO:1的11位残基丙氨酸，其中是多肽的21位残基是谷氨酸而不是对应的SEQ ID NO:1的22位残基缬氨酸，并且其中多肽的1位残基是乙酰化的。在一个实施方案中，Pep60被称为Glu11,22-Ac-ANAX1(2-26)-OH。

[0065] SEQ ID NO:16是本公开之多肽的一个实施方案，Pep83。Pep83的长度为25个氨基酸。Pep83是人膜联蛋白1的2-26位氨基酸，其中所述多肽的10位残基是异亮氨酸而不是对应的SEQ ID NO:1的11位残基丙氨酸，其中所述多肽的21位残基是异亮氨酸而不是对应的SEQ ID NO:1的22位残基缬氨酸，其中所述多肽的1位残基是乙酰化的。在一个实施方案中，Pep83被称为Ile11,22-Ac-ANAX1(2-26)-OH。

[0066] 除非另有指明或从上下文来看十分清楚地，本文的剂量是指活性化合物的重量，其不受药物赋形剂、稀释剂、载体或其他成分的影响，尽管期望包括这样的额外成分，如在下文更详细地讨论的。在制药工业中常用的用于递送肽活性剂的任何剂型(胶囊、片剂、注射剂等)对本文的用途来说是适宜的，并且术语“赋形剂”、“稀释剂”或“载体”包含此类非活性成分，如同在该工业中此类非活性成分通常与活性成分一起被包含在此类剂型中那样。经口剂型在下文中更详细地讨论，但是其不被认为是施用本发明的活性剂的唯一模式。在一些实施方案中，两种或更多种本发明的多肽活性剂的混合物可用于同一药物组合物或剂型中。

[0067] 如本文所用，术语“多肽”指氨基酸的聚合物，并且其不限于特定长度的分子。该术语包括肽、寡肽和蛋白质。术语“多肽”还包括所述多肽的修饰，例如，酰胺化、糖基化、乙酰化、磷酸化、环化等。包括在定义内的有，例如，含有一个或更多个氨基酸类似物(包括例如，非天然氨基酸等)的多肽，具有替换的连接的多肽以及本领域已知的天然的和非天然的其他修饰。所述多肽可以通过本领域已知的任何多肽合成技术来产生，包括但不限于化学合成或通过重组DNA技术。

[0068] 如本文所用，术语“百分比同一性”是指氨基酸序列，而不考虑给定的氨基酸是否被额外取代基(而非额外氨基酸)修饰。例如，对于该目的，半胱氨酸被认为等同于乙酰半胱氨酸。同样，对于该目的，已经与另一个半胱氨酸形成二硫桥的半胱氨酸会被认为等同于没有形成该桥的半胱氨酸。如那些本领域技术人员将会理解，具有多个半胱氨酸残基的肽经常在这样的两个半胱氨酸残基之间形成二硫桥。本文所示的所有这些肽被定义为任选地包含一个或更多个这样的二硫桥。如本文所用，术语“百分比同一性”也考虑了肽大小的不同。例如，其他方面与33个残基的肽相同的34个残基的肽(除了其具有一个额外的氨基酸)在本文中被认为与33个残基的肽具有97％同一性。

[0069] 如本文所用，提及“炎症”或“炎症应答/疾病”是指任何炎症应答或疾病，包括但不限于眼的炎症、痛风、痛风性关节炎、类风湿性关节炎、哮喘、再灌注损伤或损害、卒中、心肌梗死、败血性休克、或炎症性皮肤疾病(如银屑病或湿疹)。

[0070] 本文所述的任何优选可以与本文所述的任何其他优选联合使用，除非从上下文中清楚显示将导致不一致。

[0071] 申请人已发现与人膜联蛋白1的2-48或2-50位残基具有显著同源性的较长类似物中一些显著的优点，特别是具有37至51个残基并且包含与人膜联蛋白1的11-48位残基具有显著同源性之区域的多肽，特别是与SEQ ID NO:2有显著同源性的区域。

[0072] 在一个实施方案中，对应于SEQ ID NO:2的本发明多肽的同源性区域具有下列特征至少之一(在一些实施方案中，具有更多个)：(a)所述多肽对应于SEQ ID NO:2之1位残基的残基是精氨酸，(b)所述多肽对应于SEQ ID NO:2之12位残基的残基是赖氨酸，(c)所述多肽对应于SEQ ID NO:2之15位残基的残基是亮氨酸，或者(d)所述多肽对应于SEQ ID NO:2之26位残基的残基是赖氨酸。在一个实施方案中，同源性区域与SEQ ID NO:2有至少94％同一性，以及在一些实施方案中，为100％同一性。

[0073] 在一个实施方案中，对应于SEQ ID NO:2的所述多肽之同源性区域与SEQ ID NO:2的不同在于所述多肽对应于SEQ ID NO:2之15位残基的不是缬氨酸，以及在一些实施方案中，其为亮氨酸。

[0074] 在一个实施方案中，当本公开的多肽具有47至48个氨基酸并且与SEQ ID NO:1的1-48位残基有至少90％的同一性时，所述多肽具有下列特征至少之一(以及在一些实施方案中，具有更多个)：(a)所述多肽对应于SEQ ID NO:1之11位残基的残基不是丙氨酸(以及在一些实施方案中是精氨酸)，(b)所述多肽对应于SEQ ID NO:1之22位残基的残基不是缬氨酸(以及在一些实施方案中是赖氨酸)，(c)所述多肽对应于SEQ ID NO:1之25位残基的残基是不是缬氨酸(以及在一些实施方案中是亮氨酸)，或(d)所述多肽对应于SEQ ID NO:1之36位残基的残基是不是缬氨酸(以及在一些实施方案中是赖氨酸)。

[0075] 尽管本公开的肽可以以游离酸形式存在，但是在本公开的一些多肽中，C-末端氨基酸被酰胺化。在一个实施方案中，这样的酰胺化有助于所述肽的效力和/或生物利用度。在一个实施方案中，本发明的C-末端酰胺化的多肽(如SEQ ID NO:5)显示出比游离酸前体(如SEQ ID NO:4)更好的结果。不希望受理论的束缚，这样的多肽更稳定可能是因为酰胺基提供了对羧肽酶作用的某些抗性。

[0076] 本公开的肽可以是N末端乙酰化的，特别是对于膜联蛋白1(2-26)的类似物，例如SEQ ID NO:11的多肽。在一个实施方案中，SEQ ID NO:11的10和21位残基独立地选自天冬氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、亮氨酸、异亮氨酸和谷氨酸。在一个实施方案中，SEQ ID NO:11的10和21位残基独立地选自亮氨酸、天冬氨酸、甲硫氨酸、异亮氨酸和谷氨酸。在一个实施方案中，SEQ ID NO:11的10和21位残基独立地选自亮氨酸、天冬氨酸和甲硫氨酸。在一个实施方案中，在SEQ ID NO:11的10和21位氨基酸是相同的。

[0077] 如本文所述，发现本公开的UGP021肽(SEQ ID NO:4)和本公开的UGP024肽(SEQ ID NO:6)比Ac-ANXA1(2-26)-OH和全长ANXA1更有效。已经使用流动室(flow-champ)分析评估了并且已经使用小鼠气囊(air-pouch)炎症模型体内测试了这些肽UGP021和UGP024抑制嗜中性粒细胞-内皮相互作用的能力。出乎意料的是，发现在这些测定中本公开的UGP022肽(SEQ ID NO:5)(C-末端酰胺)比本公开的UGP021肽(SEQ ID NO:4)或本公开的UGP024肽(SEQ ID NO:6)更有力。

[0078] 为了尝试改进本公开的UGP022肽(SEQ ID NO:5)的效力和增加其半衰期，进行了一系列体外PR3和HNE消化。两种丝氨酸蛋白酶的主要切割位点都在Ala10(对于膜联蛋白1来说是Ala11)和Val21(对于膜联蛋白1来说是Val22)切割本公开的UGP022肽，而仅HNE在Val35(对于膜联蛋白1来说是Val36)切割。出乎意料地，两种蛋白酶都在Val24(对于膜联蛋白1来说是Val25)切割本公开的UGP022肽。据信这个切割位点尚未在文献中被鉴定。

[0079] 制备了两个Leu24(对于膜联蛋白1来说是Leu25)的类似物，本公开的UGP025肽(SEQ ID NO:7)和本公开的UGP026肽(SEQ ID NO:8)。已经证明UGP025和UGP026两个肽都比本公开的UGP022肽(SEQ ID NO:5)对PR3和HNE更有抗性。

[0080] 本公开的三种多肽UGP022(SEQ ID NO:5)、UGP025(SEQ ID NO:7)和UGP026(SEQ ID NO:8)在PR3(牵涉膜联蛋白1体内切割的蛋白酶)的存在下的降解测试，表明在24位具有亮氨酸替换的多肽相对于缺乏这一特征的多肽来说稳定性更好。24位对应于膜联蛋白1的25位，这是因为所有的被测试多肽缺乏天然膜联蛋白的1位甲硫氨酸。47个残基的多肽表现优于其他方面相同的49个残基的多肽。在HNE存在下的降解测试中获得了相似的结果。

[0081] 在所测试的Ac2-26肽变体中，观察到本公开的三种肽(即本公开的Pep57肽、本公开的Pep59肽和本公开的Pep84肽)导致经FPR受体家族的下游信号转导。显示出Pep57和

Pep84在流动室模型中显著地抑制PMN-HUVEC相互作用，活性下降至10pM。当在气囊模型中进行体内测试时，两个多肽都通过显著地抑制白细胞浸润表现出抗炎性质，Pep84更大程度地抑制这一炎症读出。

[0082] 在图1A和图1B中报告其结果的实验涉及确定所测试的5种多肽中哪个最佳地类似于亲本肽Ac-ANAX1(2-26)-OH地经FPR2受体激活p-ERK。HEK-FPR2细胞与10μM的新型Ac2-26多肽共孵育8分钟，随后将细胞在细胞裂解液中裂解和重悬。然后，将100ng总蛋白上样到10％聚丙烯酰胺凝胶上。在电泳、转膜和封闭后，先用抗p-ERK抗体作为探针探查膜，然后去除，使用抗总ERK的抗体作为探针再次探查。t-ERK印迹显示所有样品中等量的ERK，而观察到用Pep57、59和84活化的p-ERK是最高的，类似于由亲本Ac2-26引起的活化并且低于第二对照(W-肽)。图1A是p-ERK和t-ERK的代表性印迹，以及图1B显示出p-ERK相对于t-ERK水平的光密度结果。数据由3个独立实验的平均值和SEM表示，其使用ANOVA进行统计学分析(*=P<0.05，相对于CT)。

[0083] 图2A至2C是一系列图表，报告了来自流动室分析的数据以确定本公开的5种多肽和Ac-ANAX1(2-26)-OH减少PMN与激活的HUVEC单层相互作用的抑制能力。PMN($5x10^6$)与10μM的各个肽在37℃孵育10分钟。然后使得PMN以1达因/厘米流动8分钟，随后均以PMN捕获(图2A)、黏附(图2B)和滚动(图2C)的形式对PMN与HUVEC的相互作用程度进行量化。结果表明了在这个实验中只有Pep57、60和84显示抑制性质的事实。数据是3个独立实验(用不同的PMN和HUVEC制剂)的平均值±SEM，*=P<0.05，相对于CT组，使用单因素ANOVA分析数据。与p-ERK数据一致地，Pep57和Pep84表现出类似于那些在亲本Ac2-26肽中观察到的抑制性质。Pep59，其也显示出非常高的p-ERK激活潜力，并没有在这一测定中表现出任何抑制性质，然而，另一方面对于磷酸化ERK并非那样有效的Pep60，表现出类似于亲本AC2-26肽所表现出的有力的抑制性质。

[0084] 图3A和图3B是一系列柱状图，比较了本公开的三种多肽相对于仅载剂之对照的抗炎作用。小鼠静脉内接受每个动物200μl盐水+DMSO或者50μg剂量的三种Ac2-26衍生肽之一，然后立即局部注射小鼠IL-1β进入6天龄的气囊。四个小时后，在气囊洗涤和使用Gr1标记物对迁移的细胞染色之后，确定细胞迁移的程度。当对细胞进行计数时(图3A)，观察到Pep57和84表现出抗炎性质，当考虑GR1+ve细胞时，Pep57失去了所观察到的该作用(图3B)。数据是每组5只小鼠的平均值±SEM。相对于载剂组*P<0.05(单因素ANOVA)。Pep57和Pep84在模型中显示出抑制性潜力。Pep84更有力。

[0085] 图4A至4C在流动室分析中对UGP022、UGP025和UGP026进行了直接比较，给出了分析中三个参数的抑制程度(捕获(图4A)、滚动(图4B)和黏附(图4C))。所有三个UGP肽都能够减少与活化的内皮发生相互作用的人PMN的数目，特别地通过FPR受体发挥作用。尽管UGP025在所测试的更高浓度时活性较低，其相比于UGP022肽似乎在100fM浓度时略微更具活性。

[0086] 近些年，已认为膜联蛋白A1具有重要的消炎(pro-resolving)性质，即通过巨噬细胞和类似细胞诱导对凋亡细胞的吞噬。这一作用也依赖于FPR2并且共享其他重要的消炎调节物(包括脂氧素和消炎脂(resolvins))。考虑到在多个生物学测定中显示的效力，进行实验，以确定UGP022和衍生物是否也能模拟膜联蛋白A1的这种作用。

[0087] 图5是一系列柱状图，报告了本公开的三种多肽在不同的浓度模拟膜联蛋白A1诱

导凋亡细胞吞噬之性质的能力。从图5可以看出所有三种肽(UGP022、UGP025和UGP026)促进凋亡PMN的吞噬,UGP022表现出更高的诱导这一过程的能力。至于一些更长的膜联蛋白A1N末端肽(例如49和47个残基的多肽),UGP021、UGP022和UGP024的每个都可通过导致ERK磷酸化和细胞内钙流来活化FPR1和FPR2二者。观察到UGP021和UGP022二者在纳摩尔范围内都具有对FPR2的结合亲和力,UGP022显示最高的亲和力。还观察到所有三种肽在白细胞募集的体内测定中都具有抗炎活性,UGP022在抑制白细胞募集到发炎的气囊方面又是更有力的。

[0088] UGP022对人PMN发挥显著的抗炎性质,直至1pM。观察到FPR2介导UGP022对人PMN的这些作用。在体内,UGP022在发炎的微循环中引发有力的抗炎性质,其效力相当于人重组膜联蛋白A1。这些作用是由FPR2的小鼠直系同源物(orthologue)介导的。UGP022在急性心肌损伤的小鼠模型中表现出有力的组织保护性质。

[0089] UGP025和UGP026保留了相比FPR1对FPR2更高的亲和力。相比于UGP026,UGP25对FPR2似乎有更高的亲和力。UGP025和UGP026在体外和体内都具有抗炎性质,UGP025似乎又是更有力的。发现了这些肽的新性质,即对清除死亡细胞(efferocytosis)(凋亡细胞的吞噬)的消炎作用。UGP022、UGP025和UGP026的该消炎作用以Fpr2依赖性方式发生。与UGP025和UGP026的简要生物学特征谱一致地,这两个肽都可保留UGP022的组织保护性质,提供心脏保护。

[0090] 图6是一系列柱状图,显示了本公开的多肽在不同浓度时相对于仅载剂的对照降低再灌注损伤之风险的能力。缺血(左冠状动脉前降支闭塞,[LADCA])25分钟和120分钟再灌注后C57/B16小鼠(体重约30克)中梗死面积。在再灌注开始时静脉内(在5秒内推注)施用载剂或UGP022。再闭塞和注射伊文思蓝染料后测量风险区域。风险区域的NBT染色后确定梗死面积。结果为每组4只小鼠的平均值±SEM;＊＊P<0.01。

[0091] 图7是一系列柱状图,显示了本公开的两种多肽在不同浓度相对于仅载剂的对照降低再灌注损伤之风险的能力。缺血(LADCA闭塞)25分钟和120分钟再灌注后C57/B16小鼠(体重约30克)中梗死面积。在再灌注开始时静脉内(在5秒内推注)施用载剂、UGP025(5μg)或者UGP026(5μg)。再闭塞和注射伊文思蓝染料后测量风险区域。风险区域的NBT染色后确定梗死面积。结果为每组4只小鼠的平均值±SEM;＊＊P<0.01。

[0092] 图8是在PR3(涉及体内切割膜联蛋白1的蛋白酶)的存在下本公开的三种多肽UGP022、UGP025和UGP026随时间降解的对数图。观察到在24位具有亮氨酸替换(对应于膜联蛋白1的25位,这是因为所测试的所有多肽缺少天然膜联蛋白1位的甲硫氨酸)的多肽相对于缺少该特征的多肽具有更好的稳定性。此外,47个残基的在其C-末端酰胺化的多肽表现优于其他方面相同的在其C-末端酰胺化的49个残基的多肽。

[0093] 图9是在HNE(涉及体内切割膜联蛋白1的蛋白酶)的存在下本公开的三种多肽UGP022、UGP025和UGP026随时间降解的对数图。观察到在24位具有亮氨酸替换(对应于膜联蛋白1的25位,这是因为所测试的所有多肽缺少天然膜联蛋白1位的甲硫氨酸)的多肽相对于缺少该特征的多肽具有更好的稳定性。此外,47个残基的在其C-末端酰胺化的多肽表现优于其他方面相同的在其C-末端酰胺化的49个残基的多肽。

[0094] 认为本公开多肽的重组生产是比本领域内其他已知技术在成本上更经济的,尽管也可以使用这些其他技术。优选地,本公开的肽在其C末端是酰胺化的,尽管游离酸的形式也是考虑的。用于制造本公开之肽的酰胺化版本的技术是按照已知的技术使前体(在期望

酰胺化产物的C末端氨基处具有甘氨酸)在肽基甘氨酸α-酰胺化单加氧酶的存在下反应,其中前体在例如美国专利4,708,934号和欧洲专利申请0308067和0382403号中所描述的反应中转化为酰胺化产物。重组生产对于前体和催化前体向鲑鱼降钙素转变的酶二者来说都是优选的。这样的重组生产在Biotechnology,11卷(1993)第64-70页中被讨论,其还描述了前体到酰胺化产物的转变。酰胺化产物的生产也可以使用以下文献中所述的方法和酰胺化酶完成:Consalvo等人U.S.专利7,445,911号,Miller等U.S.专利申请2006/0292672号,Ray等,2002,Protein Expression and Purification,26:249-259("Ray"),以及Mehta,2004,Biopharm.International,July,第44-46页("Mehta")。

[0095] 本公开的酰胺化多肽的生产可以例如通过如下所述方式进行,在大肠杆菌中生产与谷胱甘肽-S-转移酶融合的可溶性融合蛋白形式的谷氨酸延伸前体,或者按照美国专利6,103,495号中的描述直接表达所述前体。这样的甘氨酸延伸前体具有与所期望的酰胺化产物相同(除了C末端)的分子结构(其中所述产物终止于-X-NH_2,而该前体终止于-X-gly,X是所述产物的C-末端氨基酸残基)。在上述出版物中描述的α-酰胺化酶催化前体到产物的转变。该酶优选重组生产,例如在中国仓鼠卵巢(CHO)细胞中,如Biotechnology和Biopharm中描述的。文章引用同上。

[0096] 本公开的肽活性剂的游离酸形式可用相似的方法生产,除了不包括"前体"上的C末端甘氨酸,而是该前体就是最终的肽产物,不需要酰胺化步骤。

[0097] 下面的描述提供了本公开的ANXA1肽和类似物之克隆和表达的方法的一个实施方案。本公开的ANXA1肽和类似物被设计为使用在大肠杆菌中细胞外表达的质粒进行克隆和表达。通过DNA2.0(Menlo Park,CA)使用其密码子优化算法,随后在所述构建体中使用PCR的单氨基酸修饰,来合成所设计的基因。用于这些构建体的载体设计基于在Ray中给出的载体,使得目的基因编码于双盒中,每个盒包括:双启动子和目的基因之前的信号序列,以及目的基因之后的双转录终止序列。

[0098]

基因	来源	基因修饰
ANXA1(2-50)-OH	DNA 2.0	NA
ANXA1(2-50)Gly51-OH	DNA 2.0	NA
ANXA1(2-48)Gly49-OH	DNA 2.0	ANXA1(2-50)Gly51-OH的经优化密码子
Leu25-ANXA1(2-48)Gly49	ANXA1(2-50)基因模板	PCR, Val至Leu@25并入PCR引物
Leu25-ANXA1(2-50)Gly51-OH	ANXA1(2-50)基因模板	PCR, Val至Leu@25并入PCR引物

[0099] 使用每个类似物的双基因质粒构建体转化申请人所有的大肠杆菌宿主菌株BLM6L(具有保藏编号PTA-5500),产生每个类似物构建体的表达菌株。用卡那霉素抗性筛选这些重组细胞系并在半限定接种培养基(如在Ray中描述的)中在37℃生长,使用诊断用限制酶酶切作图确认质粒构建体,并且在摇瓶实验中使用其他地方描述的AEX-HPLC分析针对目的肽的细胞外生产筛选最终的分离株。在实验室规模发酵中进一步评估选定的分离株。每个发酵以底物限制的分批补料形式进行,使用掺入补料的化学诱导剂IPTG实现重组蛋白的诱导。发酵在标准条件(32℃、pH值6.6、以及通过在培养基中补充O_2实现的80%溶解氧,如在Ray中描述的)运行。对这些发酵进行测定并且在一些情况下,诱导后23至31小时进行收获。

为了纯化，对发酵进行酸化和冷却，通过离心收获条件培养基，以用于下游处理。

[0100]

ANXA1肽	细胞系命名	发酵滴度 (mg/L)*
ANXA1(2-50)-OH	UGL945	110
ANXA1(2-50)Gly51-OH	UGL946	202
ANXA1(2-48)Gly49-OH	UGL962	110
Leu25-ANXA1(2-48)Gly49-OH	UGL977	91
Leu25-ANXA1(2-50)Gly51-OH	UGL978	121
*通过AEX-HPLC确定发酵产率值		

[0101] 在本公开的一个实施方案中，从1升条件发酵培养基中纯化重组肽。通过用2N H_2SO_4酸化至约pH2从条件培养基中沉淀每一种肽。以10,000rpm离心1小时收集沉淀。在25mM pH7.8的NaH_2PO_4中重悬沉淀，2-8℃过夜。将重悬液以10,000rpm离心30分钟。用2N NaOH将上清液pH调节至8.5。将每一经pH调节的上清液上样至用25mM pH8.5的TRIS平衡的Q-Sepharose Big Beads(GE Healthcare)阴离子交换柱(4.4X13.5cm)。该柱以30ml/分钟的流速运行并且在280nm处监测柱流出物的UV吸光度。用pH8.5的25mM TRIS、100mM NaCl将ANXA1肽从柱中洗脱。通过AEX-HPLC和RP-HPLC筛选收集的级分。

[0102] 使用重组肽酰基甘氨酸α-酰胺化单加氧酶(rPAM)进行C-末端α-酰胺化(如果需要)。甘氨酸延长的ANXA1肽的α-酰胺化以0.5mg/mL，在25mM TRIS pH7.0(JT Baker)、0.5μM $CuSO_4$(JT Baker)、1％乙醇、125U/mL黑曲霉(aspergius niger)过氧化氢酶(BBI Enzymes)、3mM抗坏血酸和20,000U/mL rPAM的存在下进行。反应在37℃孵育2至3小时。通过快速冷冻终止反应。

[0103] 将α-酰胺化的输出物上样到使用0.1％TFA、2％MeCN平衡的Amberchrom CG300(Dow Chemical)RP柱(1.1×13.7cm)。柱以2.85mL/分钟的流速运行，在280nm处监测柱流出物的UV吸光度。柱经历使用0.1％TFA、16％MeCN和0.1％TFA、24％MeCN的分步梯度，以移去杂质。使用0.1％TFA、40％MeCN从柱洗脱ANXA1肽。通过AEX-HPLC和RP-HPLC筛选收集的级分。

[0104] 使用配有真空控制器和外部干冰/丙酮冷凝器的VirTis Freeze Mobile Consol1.5(Gardiner,NY)将ANAX1肽冻干至干燥。通过AEX/RP-HPLC评估ANXA1肽的最终纯度为>95％。

[0105] 通过AEX-HPLC测定ANAX1肽的纯度和发酵生产率(滴度)。在使用10mM TRIS,25％MeCN pH8.0平衡的Hydrocell QA1500柱(BioChrom Labs)4.6x250mm上进行色谱。使用从0％A(10mM TRIS、25％MeCN pH8.0)至20％B(10mM TRIS、0.5M NaCl、25％MeCN pH8.0)的线性梯度经20分钟实现分离。在环境温度以1.2mL/分钟的流速运行柱。在220nm处监测柱流出物的UV吸光度。根据每种肽的标准曲线确定生产率值。

[0106] 经RP-HPLC测定ANAX1肽的纯度。在使用0.1％TFA、18％MeCN平衡的Thermo Electron BDS Hypersil C18柱(Thermo Fisher Scientific)，4.6×250mm、5μm、120Å上进行分离。使用线性梯度从20％B至70％B(流动相A:0.1％TFA，流动相B:0.08％TFA、90％MeCN)经20分钟实现分离。在环境温度以1.2mL/分钟的流速运行柱。在220nm处监测柱流出物的UV吸光度。

[0107] 据估计，本公开的肽应以适当的剂量使用，以维持患者中肽的血清水平在0.1至

100纳克/毫升，优选在5至50纳克/毫升。可以通过本领域中已知的放射免疫测定技术来检测血清水平。主治医生可以监测病人的应答，并可以随后根据各个患者的代谢和应答来改变剂量。

[0108] 在本发明公开中使用的化合物优选地制备成用作药物。可以通过在制药工业中常用的任何合适途径施用所述多肽，包括但不限于经口、肠胃外、肌肉内、经皮或经粘膜递送。静脉内(IV)输注也可以在一些实施方案中使用。滴眼液可在眼睛治疗中使用。在一些实施方案中，所述多肽可以与其他抗炎剂联合施用。

[0109] 虽然可以使用其他的递送方法，本公开的肽可被配制成用于经口递送，例如，在美国专利6,086,018号或美国专利申请2009/0317462号中所述。根据本公开的一种经口剂型在下面的表1中列出(举例而不限于此)：

[0110] 表1

[0111] 固体剂型制剂的成分

[0112]

活性剂或赋形剂	功能
UGP025（SEQ ID NO：7的多肽）	用于抑制炎症的活性剂
包被葡萄糖聚合物（麦芽糖糊精）的柠檬酸颗粒	蛋白酶抑制剂
月桂酰肉碱	吸收增强剂
非离子聚合物	副包衣（Subcoat）
Endragit L30D-55	肠溶包衣

[0113] 虽然给出SEQ ID NO:7的肽作为例子，本文所讨论的任何肽活性剂可取而代之以作为活性剂。两种或更多种此类试剂的组合也可取而代之。

[0114] 本公开的片剂包含本公开的多肽和至少一种药学上可接受的酸，其中存在于片剂中的酸的量为，如果将片剂加入到10毫升0.1M的碳酸氢钠水溶液，将足以降低溶液pH值至不高于5.5。优选的酸包括包被有药学上可接受的非酸性并且其在水中的溶解度至少为室温下1克/100毫升水之保护涂层的酸颗粒。在一些实施方案中，该片剂的外表面是抗酸性保护载剂，所述载剂(例如，常见的药物肠溶包衣(enteric coating))有效地将片剂运输通过患者的胃同时防止活性多肽和胃蛋白酶之间的接触。优选地，这样的片剂具有将包被的酸与保护性载剂分开的水溶性屏障层。当存在时，所述水溶性的屏障层或者(a)将药物组合物的重量增加至少3%，任何酸保护载剂不计算在内，和/或(b)包含在室温具有超过11克/100毫升水之水溶性的材料。优选地，所述肽剂和酸在组合物的相同层或唯一层中。现有技术肽之经口递送的先前经验表明如本文所述的经口递送可提供多达1%至5%的生物利用度。

[0115] 施用可以通过每日单剂量或者多剂量。不考虑所使用的活性剂，优选在每次施用时使用单剂量形式(例如，当利用经口施用时单个胶囊或片剂)，因为单个胶囊或者片剂最好地提供了肽活性剂、酸(用作蛋白酶抑制剂)和吸收增强剂的同时释放。这是非常期望的，因为当酸在与活性剂释放临近的时间释放时，酸能最好地减少非期望的对肽活性剂的蛋白

水解攻击。

[0116] 通过单个丸剂(pill)或者胶囊施用本公开的所有成分能最好地实现几乎同时释放。然而，本公开还包括，例如将所需活性成分的量分为两个或更多个片剂或胶囊，所述片剂或胶囊可以一起施用使得他们一起提供必要量的所有成分。如本文所用“药物组合物”，包括但不限于适合于特定的施用至患者的完整的剂量，无论在给定施用时推荐一个还是更多个片剂或胶囊剂(或其他剂型)。

[0117] 根据本公开的肽也可以通过业界内其他常用技术来递送，所述技术在施用模式之间具有正常的剂量变化。例如，当通过注射施用时，1至100微克/天的剂量范围(优选5至50微克/天)被认为可能是足够的。当然，主治医师应监测个体患者的反应，并相应地调整剂量。

[0118] 在用于注射的药物组合物中，本公开的肽活性剂优选地以10微克/毫升至1000微克/毫升的浓度存在。

[0119] 本公开的药物组合物可以包括典型的药物赋形剂、稀释剂或载体，如水、盐水、甘油、乙醇等。另外地或可选地，辅助性物质，如润湿剂或乳化剂、pH缓冲物质等，可以存在于这样的载剂中。赋形剂的其他非限制性实例包括但不限于药学上可接受的赋形剂，如0.1M的PBS(pH值7.4)、0.2M $NaHCO_3$或其他这样的药学上可接受的流体。该组合物可以制备成可注射的液体溶液或悬浮液。也可以制备适于在注射之前溶解或悬浮在液体载剂中的固体形式。该制剂也可被乳化或封装在例如脂质体中。

[0120] 用作药物的组合物包含有效量的所述化合物，以及根据需要，任何其他以上提及的组分。“有效量”意为，以单一剂量或者作为一系列的一部分将该量施用给个体对于治疗或预防炎症是有效的。

[0121] 这个量的变化取决于被治疗个体的健康、年龄和身体状况、被治疗个体的分类(例如，非人灵长类，灵长类等)、和其他常见的影响主治临床医生评估剂量需求的因素。

[0122] 在一个实施方案中，本公开的多肽具有47至50个氨基酸并在其分子结构中包含与SEQ ID NO:1的2-48位残基有至少90％同一性的同源性区域，其中所述多肽的24位残基对应于SEQ ID NO:1的25位残基，并且其中所述多肽的24位残基不是缬氨酸。

[0123] 在一个实施方案中，本公开的多肽具有25至26个氨基酸并在其分子结构中包含与SEQ ID NO:1的2-26位残基有至少90％同一性的同源性区域，其中所述多肽的10位残基对应于SEQ ID NO:1的11位残基，其中所述多肽的10位残基是除丙氨酸以外的任意氨基酸，并且其中所述肽的21位残基是除缬氨酸以外的任意氨基酸。

[0124] 在一个实施方案中，本公开的多肽具有37至45个氨基酸并在其分子结构中包含与SEQ ID NO:1的12-24位残基有100％同一性以及与SEQ ID NO:1的26-48位残基有100％同一性的同源性区域，其中或者所述多肽的14位残基对应于SEQ ID NO:1的25位残基且不是缬氨酸，或者所述多肽的21位残基对应于SEQ ID NO:1的25位残基且不是缬氨酸。

[0125] 在一个实施方案中，本公开的多肽具有47至50个氨基酸并在其分子结构中包含与SEQ ID NO:1的2-48位残基有100％同一性的同源性区域，其中所述多肽在其C末端酰胺化。

[0126] 在一个实施方案中，本公开的多肽具有37至51个氨基酸残基并且在其分子结构中包含与SEQ ID NO:2有至少90％同一性的同源性区域，其中所述多肽的同源性区域具有下列特征中至少一个：(a)对应于SEQ ID NO:2之1位残基的所述多肽之10位残基不是丙氨，

(b)对应于SEQ ID NO:2之12位残基的所述多肽之21位残基不是缬氨酸,(c)对应于SEQ ID NO:2之15位残基的所述多肽之24位残基不是缬氨酸,或者(d)对应于SEQ ID NO:2之26位残基的所述多肽之35位残基不是缬氨酸。在一个实施方案中,所述多肽的同源性区域具有下列特征中至少两个:(a)对应于SEQ ID NO:2之1位残基的所述多肽之10位残基不是丙氨酸,(b)对应于SEQ ID NO:2之12位残基的所述多肽之21位残基不是缬氨酸,(c)对应于SEQ ID NO:2之15位残基的所述多肽之24位残基不是缬氨酸,或者(d)对应于SEQ ID NO:2之26位残基的所述多肽之35位残基不是缬氨酸。在一个实施方案中,所述多肽的同源性区域具有下列特征中至少三个:(a)对应于SEQ ID NO:2之1位残基的所述多肽之10位残基不是丙氨酸,(b)对应于SEQ ID NO:2之12位残基的所述多肽之21位残基不是缬氨酸,(c)对应于SEQ ID NO:2之15位残基的所述多肽之24位残基不是缬氨酸,或者(d)对应于SEQ ID NO:2之26位残基的所述多肽之35位残基不是缬氨酸。在一个实施方案中,所述多肽的同源性区域具有下列特征中的每一个:(a)对应于SEQ ID NO:2之1位残基的所述多肽之10位残基不是丙氨酸,(b)对应于SEQ ID NO:2之12位残基的所述多肽之21位残基不是缬氨酸,(c)对应于SEQ ID NO:2之15位残基的所述多肽之24位残基不是缬氨酸,或者(d)对应于SEQ ID NO:2之26位残基的所述多肽之35位残基不是缬氨酸。在一个实施方案中,对应于SEQ ID NO:2之15位残基的所述多肽之24位残基不是缬氨酸。在一个实施方案中,对应于SEQ ID NO:2之15位残基的所述多肽之24位残基是亮氨酸。在一个实施方案中,所述多肽的同源区域与SEQ ID NO:2有至少94%同一性。在一个实施方案中,所述多肽的同源区域与SEQ ID NO:2有100%同一性。在一个实施方案中,所述多肽在其C-末端是酰胺化的。

[0127] 在一个实施方案中,本公开的多肽具有47至48个氨基酸并且与SEQ ID NO:1的1-48位残基有至少90%的同一性。在一个实施方案中,所述多肽具有下列特征中至少一个:(a)对应于SEQ ID NO:1之11位残基的所述多肽之10位残基不是丙氨酸,(b)对应于SEQ ID NO:1之22位残基的所述多肽之21位残基不是缬氨酸,(c)对应于SEQ ID NO:1之25位残基的所述多肽之24位残基不是缬氨酸,或者(d)对应于SEQ ID NO:1之36位残基的所述多肽之35位残基不是缬氨酸。

[0128] 在一个实施方案中,本公开的多肽与SEQ ID NO:11有至少96%的同一性,其中或者10位残基不是丙氨酸或者21位残基不是缬氨酸。在一个实施方案中,所述多肽的10位和21位残基独立地选自天冬氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、亮氨酸、异亮氨酸和谷氨酸。在一个实施方案中,所述多肽的10位和21位残基独立地选自亮氨酸、天冬氨酸、甲硫氨酸、异亮氨酸和谷氨酸。在一个实施方案中,所述多肽的10位和21位残基独立地选自亮氨酸、天冬氨酸和甲硫氨酸。在一个实施方案中,所述多肽在10和21位具有相同的氨基酸。在一个实施方案中,所述多肽的1位残基是乙酰化的。

[0129] 在一个实施方案中,本公开的多肽具有如在SEQ ID NO:11中所示的氨基酸序列,其中或者10位残基不是丙氨酸或者21位残基不是缬氨酸。在一个实施方案中,所述多肽的10位和21位残基独立地选自天冬氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、亮氨酸、异亮氨酸和谷氨酸。在一个实施方案中,所述多肽的10位和21位残基独立地选自亮氨酸、天冬氨酸、甲硫氨酸、异亮氨酸和谷氨酸。在一个实施方案中,所述多肽的10位和21位残基独立地选自亮氨酸、天冬氨酸和甲硫氨酸。在一个实施方案中,所述多肽在10和21位具有相同的氨基酸。在一个实施方案中,所述多肽的1位残基是乙酰化的。

[0130] 在一个实施方案中，本公开的多肽具有47至51个氨基酸残基并且在其分子结构中包含与人膜联蛋白1的2-48位残基有100％同一性的47个氨基酸残基之区域。在一个实施方案中，所述多肽具有49至51个氨基酸残基。在一个实施方案中，所述多肽在其C-末端是酰胺化的。

[0131] 在一个实施方案中，本公开的药物组合物包含本公开的多肽。在一个实施方案中，所述药物组合物是片剂或胶囊的形式。在一个实施方案中，所述片剂或胶囊包含至少一种药学上可接受的酸。在一个实施方案中，所述酸以下述量存在于片剂或胶囊中，所述量使得如果将片剂或胶囊加入到10毫升0.1M的碳酸氢钠水溶液，将足以降低溶液pH至不高于5.5。在一个实施方案中，所述酸包括包被有药学上可接受的保护涂层的酸颗粒。在一个实施方案中，所述保护涂层是非酸性的。在一个实施方案中，所述保护性涂层在水中具有在室温至少1克/100毫升水的溶解度。在一个实施方案中，本公开的片剂或胶囊的外表面是抗酸性保护载剂，所述载剂有效地将片剂或胶囊运输通过患者的胃，同时防止活性多肽和胃蛋白酶之间的接触。在一个实施方案中，本公开的片剂或胶囊包含将片剂或胶囊中经包被的酸与所述保护性载剂分开的水溶性屏障层，其中水溶性屏障层或者(i)将药物组合物的重量增加至少3％，任何酸保护载剂不计算在内，或者(ii)包含在室温具有超过11克/100毫升水之水溶性的材料。

[0132] 本文引用的所有专利、专利申请和发表的参考文献其整体通过引用并入本文。可以理解，一些上述公开和其他的特征和功能或其替代物可按需要组合成许多其他不同的系统或应用。各种目前无法预见或无法预期的替换、修饰、变化或改进，其中可以由本领域技术人员随后完成的也视为被下列权利要求所涵盖。

序 列 表

IP1352633P

<110> 尤尼基因实验室有限公司
安杰洛·P·孔萨尔沃
诺泽·M·梅赫塔
毛罗·佩雷蒂
杰蒙德·达利

<120> 抗炎药物产品

<130> 133302-465122

<140> Not Yet Assigned
<141> 2012-06-15

<150> 13/524,381
<151> 2012-06-15

<150> 61/497,270
<151> 2011-06-15

<160> 16

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 50
<212> PRT
<213> 人

[0001] <400> 1

Met Ala Met Val Ser Glu Phe Leu Lys Gln Ala Trp Phe Ile Glu Asn
1 5 10 15

Glu Glu Gln Glu Tyr Val Gln Thr Val Lys Ser Ser Lys Gly Gly Pro
20 25 30

Gly Ser Ala Val Ser Pro Tyr Pro Thr Phe Asn Pro Ser Ser Asp Val
35 40 45

Ala Ala
50

<210> 2
<211> 38
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 与人膜联蛋白1有一些同源性的合成序列

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> Xaa 可以是天然氨基酸

<220>

<221> MISC_FEATURE
<222> (12)..(12)
<223> Xaa 可以是天然氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (15)..(15)
<223> Xaa 可以是天然氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (26)..(26)
<223> Xaa 可以是天然氨基酸

<400> 2

Xaa Trp Phe Ile Glu Asn Glu Glu Gln Glu Tyr Xaa Gln Thr Xaa Lys
1 5 10 15

Ser Ser Lys Gly Gly Pro Gly Ser Ala Xaa Ser Pro Tyr Pro Thr Phe
20 25 30

Asn Pro Ser Ser Asp Val
35

<210> 3
<211> 37
<212> PRT
[0002] <213> 人工序列

<220>
<223> 与人膜联蛋白1有一些同源性的合成序列

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (11)..(11)
<223> Xaa 可以是天然氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (14)..(14)
<223> Xaa 可以是天然氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (25)..(25)
<223> Xaa 可以是天然氨基酸

<400> 3

Trp Phe Ile Glu Asn Glu Glu Gln Glu Tyr Xaa Gln Thr Xaa Lys Ser
1 5 10 15

Ser Lys Gly Gly Pro Gly Ser Ala Xaa Ser Pro Tyr Pro Thr Phe Asn
20 25 30

Pro Ser Ser Asp Val

35

<210> 4
<211> 50
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 与人膜联蛋白1有一些同源性的合成序列

<400> 4

Ala Met Val Ser Glu Phe Leu Lys Gln Ala Trp Phe Ile Glu Asn Glu
1 5 10 15

Glu Gln Glu Tyr Val Gln Thr Val Lys Ser Ser Lys Gly Gly Pro Gly
20 25 30

Ser Ala Val Ser Pro Tyr Pro Thr Phe Asn Pro Ser Ser Asp Val Ala
35 40 45

Ala Gly
50

<210> 5
<211> 49
[0003] <212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 与人膜联蛋白1有一些同源性的合成序列

<220>
<221> MOD_RES
<222> (49)..(49)
<223> 酰胺化

<400> 5

Ala Met Val Ser Glu Phe Leu Lys Gln Ala Trp Phe Ile Glu Asn Glu
1 5 10 15

Glu Gln Glu Tyr Val Gln Thr Val Lys Ser Ser Lys Gly Gly Pro Gly
20 25 30

Ser Ala Val Ser Pro Tyr Pro Thr Phe Asn Pro Ser Ser Asp Val Ala
35 40 45

Ala

<210> 6
<211> 49

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 与人膜联蛋白1有一些同源性的合成序列

<400> 6

Ala Met Val Ser Glu Phe Leu Lys Gln Ala Trp Phe Ile Glu Asn Glu
1 5 10 15

Glu Gln Glu Tyr Val Gln Thr Val Lys Ser Ser Lys Gly Gly Pro Gly
20 25 30

Ser Ala Val Ser Pro Tyr Pro Thr Phe Asn Pro Ser Ser Asp Val Ala
35 40 45

Ala

<210> 7
<211> 47
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 与人膜联蛋白1有一些同源性的合成序列

[0004]

<220>
<221> MOD_RES
<222> (47)..(47)
<223> 酰胺化

<400> 7

Ala Met Val Ser Glu Phe Leu Lys Gln Ala Trp Phe Ile Glu Asn Glu
1 5 10 15

Glu Gln Glu Tyr Val Gln Thr Leu Lys Ser Ser Lys Gly Gly Pro Gly
20 25 30

Ser Ala Val Ser Pro Tyr Pro Thr Phe Asn Pro Ser Ser Asp Val
35 40 45

<210> 8
<211> 49
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 与人膜联蛋白1有一些同源性的合成序列

<220>
<221> MOD_RES

<222> (49)..(49)
<223> 酰胺化

<400> 8

Ala Met Val Ser Glu Phe Leu Lys Gln Ala Trp Phe Ile Glu Asn Glu
1 5 10 15

Glu Gln Glu Tyr Val Gln Thr Leu Lys Ser Ser Lys Gly Gly Pro Gly
20 25 30

Ser Ala Val Ser Pro Tyr Pro Thr Phe Asn Pro Ser Ser Asp Val Ala
35 40 45

Ala

<210> 9
<211> 44
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 与人膜联蛋白1有一些同源性的合成序列

[0005]

<220>
<221> MOD_RES
<222> (44)..(44)
<223> 酰胺化

<400> 9

Ser Glu Phe Leu Lys Gln Ala Trp Phe Ile Glu Asn Glu Glu Gln Glu
1 5 10 15

Tyr Val Gln Thr Leu Lys Ser Ser Lys Gly Gly Pro Gly Ser Ala Val
20 25 30

Ser Pro Tyr Pro Thr Phe Asn Pro Ser Ser Asp Val
35 40

<210> 10
<211> 37
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 与人膜联蛋白1有一些同源性的合成序列

<220>
<221> MOD_RES
<222> (37)..(37)
<223> 酰胺化

<400> 10

Trp Phe Ile Glu Asn Glu Glu Gln Glu Tyr Val Gln Thr Leu Lys Ser
1 5 10 15

Ser Lys Gly Gly Pro Gly Ser Ala Val Ser Pro Tyr Pro Thr Phe Asn
20 25 30

Pro Ser Ser Asp Val
35

<210> 11
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 与人膜联蛋白1有一些同源性的合成序列

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (10)..(10)
<223> Xaa 可以是天然氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
[0006] <222> (21)..(21)
<223> Xaa 可以是天然氨基酸

<400> 11

Ala Met Val Ser Glu Phe Leu Lys Gln Xaa Trp Phe Ile Glu Asn Glu
1 5 10 15

Glu Gln Glu Tyr Xaa Gln Thr Val Lys
20 25

<210> 12
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 与人膜联蛋白1有一些同源性的合成序列

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> 乙酰化

<400> 12

Ala Met Val Ser Glu Phe Leu Lys Gln Leu Trp Phe Ile Glu Asn Glu
1 5 10 15

Glu Gln Glu Tyr Leu Gln Thr Val Lys
20 25

<210> 13
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 与人膜联蛋白1有一些同源性的合成序列

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> 乙酰化

<400> 13

Ala Met Val Ser Glu Phe Leu Lys Gln Asp Trp Phe Ile Glu Asn Glu
1 5 10 15

Glu Gln Glu Tyr Asp Gln Thr Val Lys
20 25

<210> 14
<211> 25
<212> PRT
[0007] <213> 人工序列

<220>
<223> 与人膜联蛋白1有一些同源性的合成序列

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> 乙酰化

<400> 14

Ala Met Val Ser Glu Phe Leu Lys Gln Met Trp Phe Ile Glu Asn Glu
1 5 10 15

Glu Gln Glu Tyr Met Gln Thr Val Lys
20 25

<210> 15
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 与人膜联蛋白1有一些同源性的合成序列

<220>
<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)
<223> 乙酰化

<400> 15

Ala Met Val Ser Glu Phe Leu Lys Gln Glu Trp Phe Ile Glu Asn Glu
1 5 10 15

Glu Gln Glu Tyr Glu Gln Thr Val Lys
20 25

<210> 16
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列

[0008]

<220>
<223> 与人膜联蛋白1有一些同源性的合成序列

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> ACETYLATION

<400> 16

Ala Met Val Ser Glu Phe Leu Lys Gln Ile Trp Phe Ile Glu Asn Glu
1 5 10 15

Glu Gln Glu Tyr Ile Gln Thr Val Lys
20 25

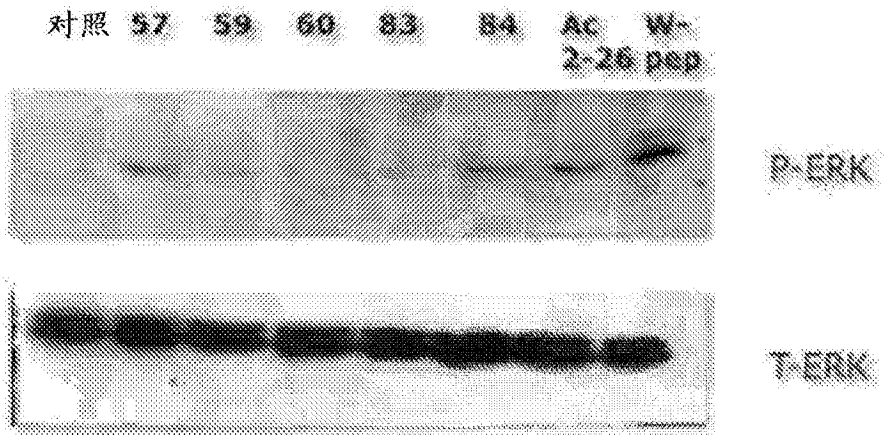

对照
57
59
60
83
84
Ac 2-26
W-pep
P-ERK
T-ERK

图1A

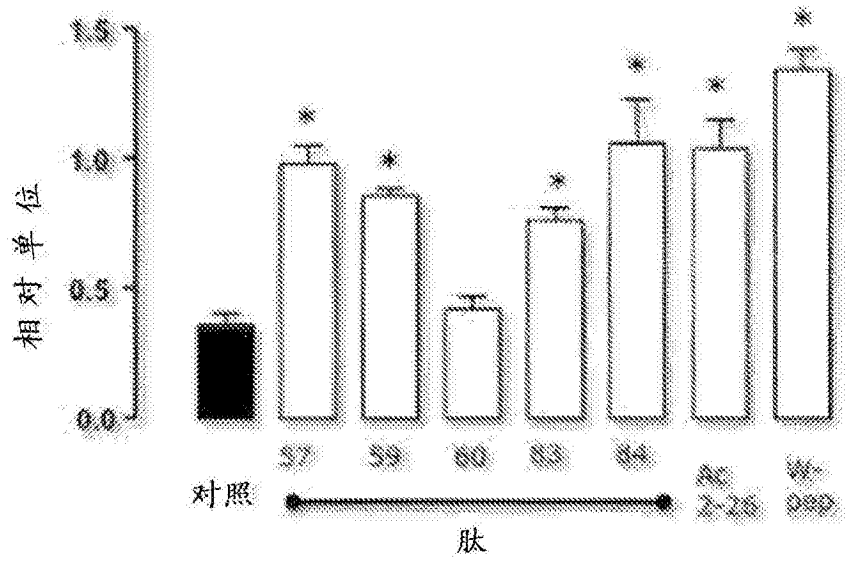

相对单位
1.5
1.0
0.5
0.0
对照
57
59
60
83
84
Ac 2-26
W-pep
肽

图1B

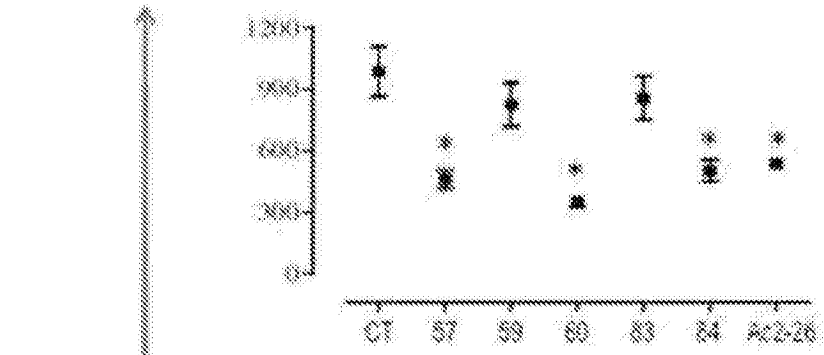

CT
57
59
60
63
64
Ac2-26

图 2A

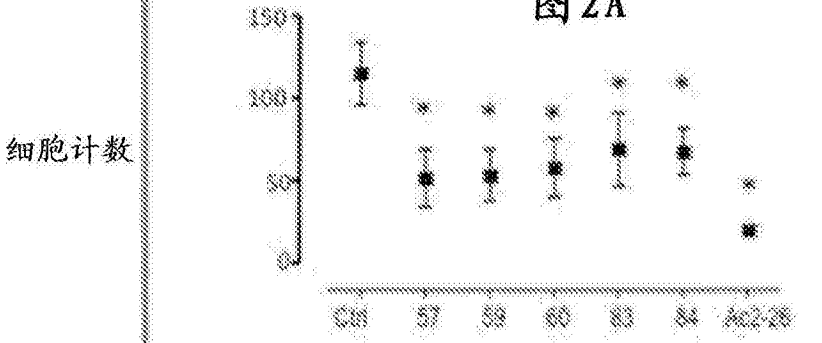

CT
57
59
60
63
64
Ac2-26

图 2B

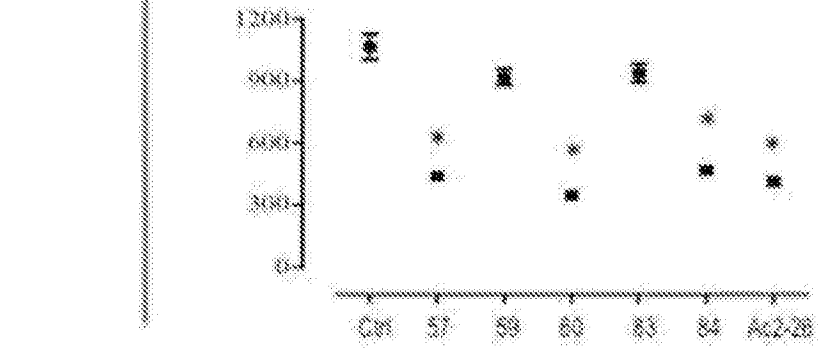

细胞计数
CT
57
59
60
63
64
Ac2-26
肽

图 2C

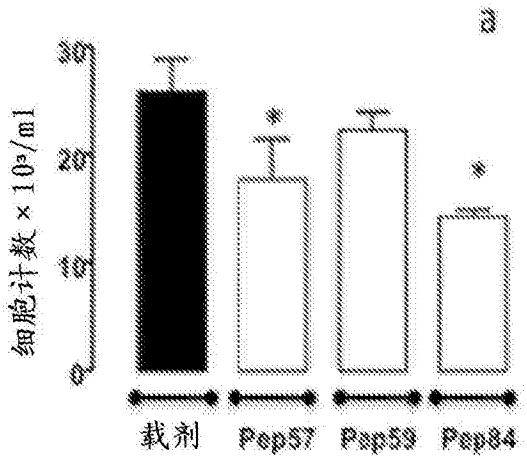

a
细胞计数 × 10³/ml
30
20
10
0
*
*
载剂
Pep57
Pep59
Pep84

图3A

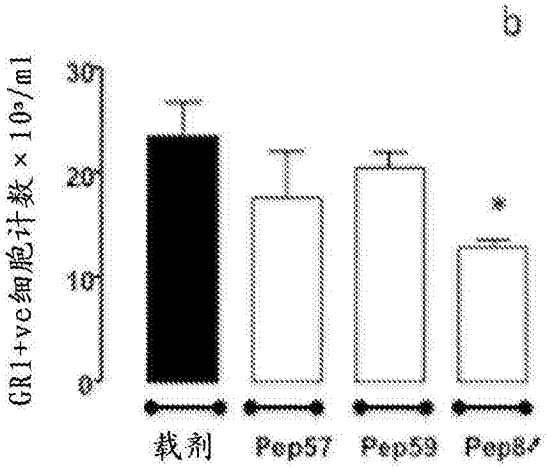

b
GR1+vc细胞计数 × 10³/ml
30
20
10
0
*
载剂
Pep57
Pep59

图3B

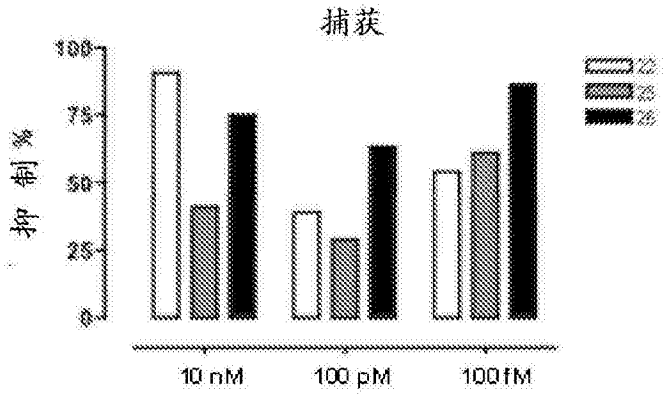

捕获
抑制%
100
75
50
25
0
10 nM
100 pM
100 fM

图4A

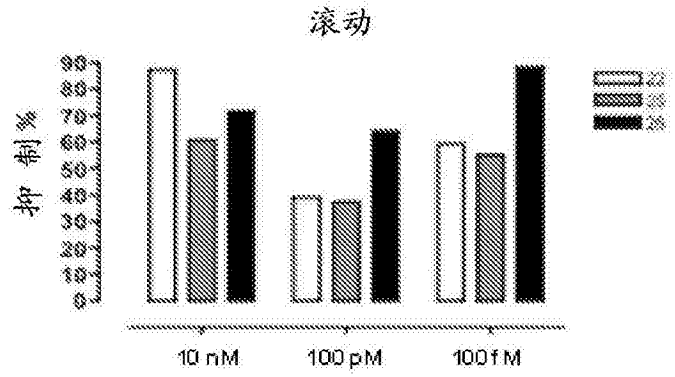

滚动
抑制%
10 nM
100 pM
100 fM

图4B

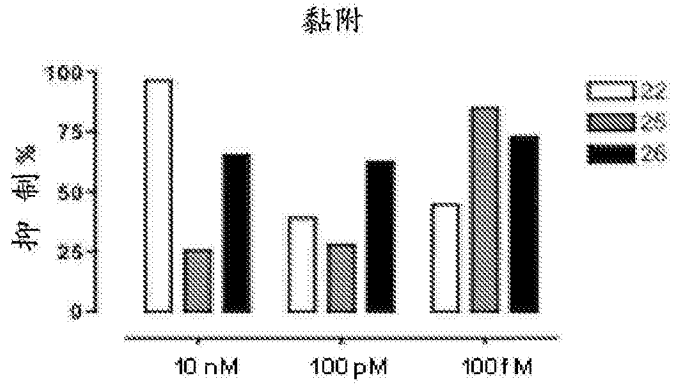

黏附
抑制%
10 nM
100 pM
100 fM

图4C

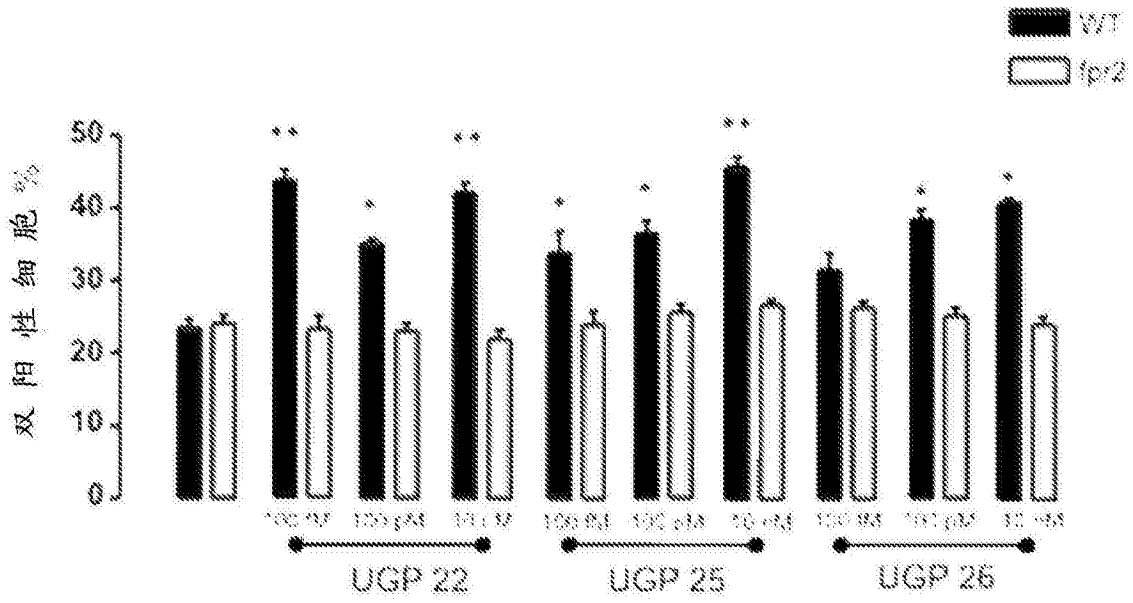

双阳性细胞%
UGP 22
UGP 25
UGP 26

图5

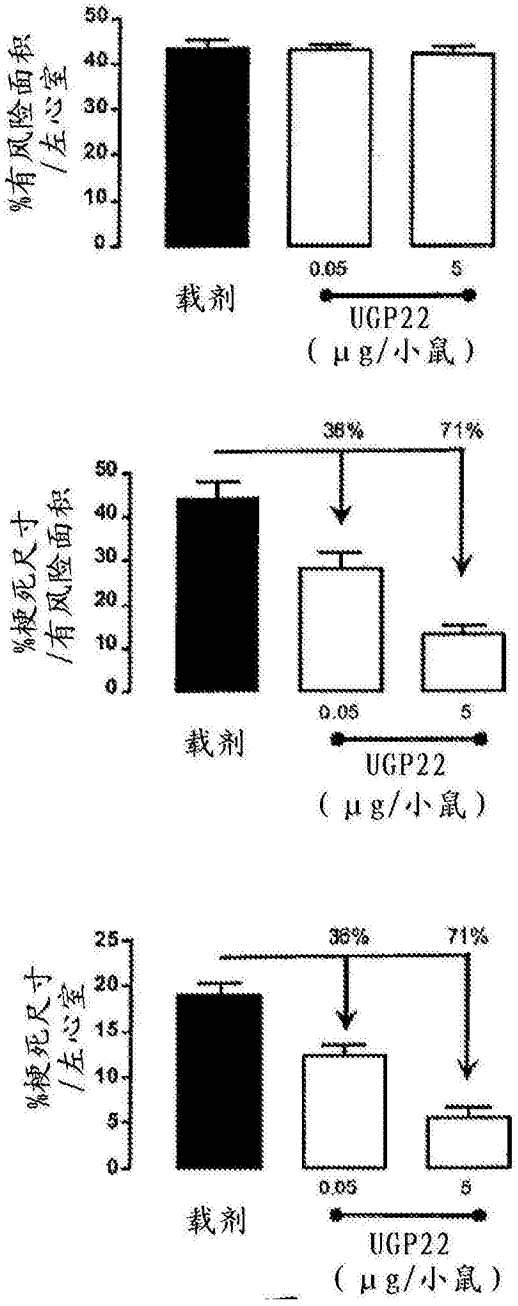

%有风险面积/左心室
50
40
30
20
10
0
0.05
5
载剂
UGP22
(μg/小鼠)
%梗死尺寸/有风险面积
36%
71%
50
40
30
20
10
0
0.05
5
载剂
UGP22
(μg/小鼠)
%梗死尺寸/左心室
36%
71%
25
20
15
10
5
0
0.05
5
载剂
UGP22
(μg/小鼠)

图6

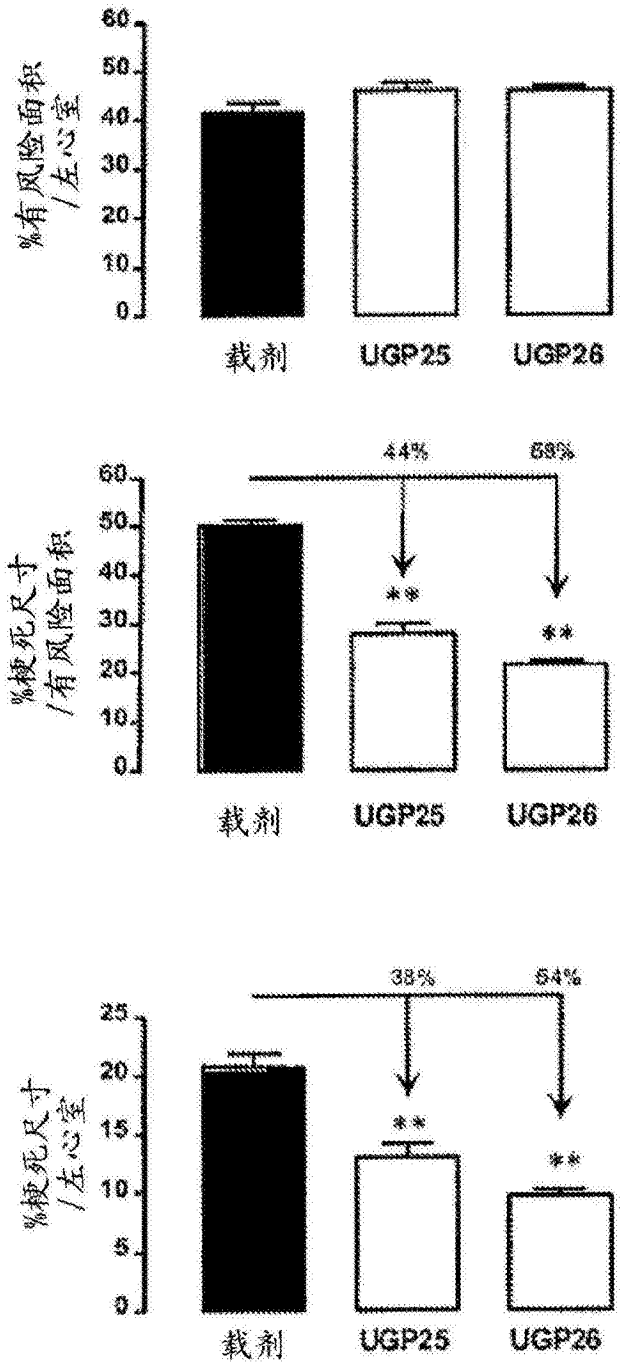

%有风险面积
/左心室
60
50
40
30
20
10
0
载剂
UGP25
UGP26
%梗死尺寸
/有风险面积
44%
68%
**
**
载剂
UGP25
UGP26
%梗死尺寸
/左心室
38%
54%
25
20
15
10
5
0
**
**
载剂
UGP25
UGP26

图7

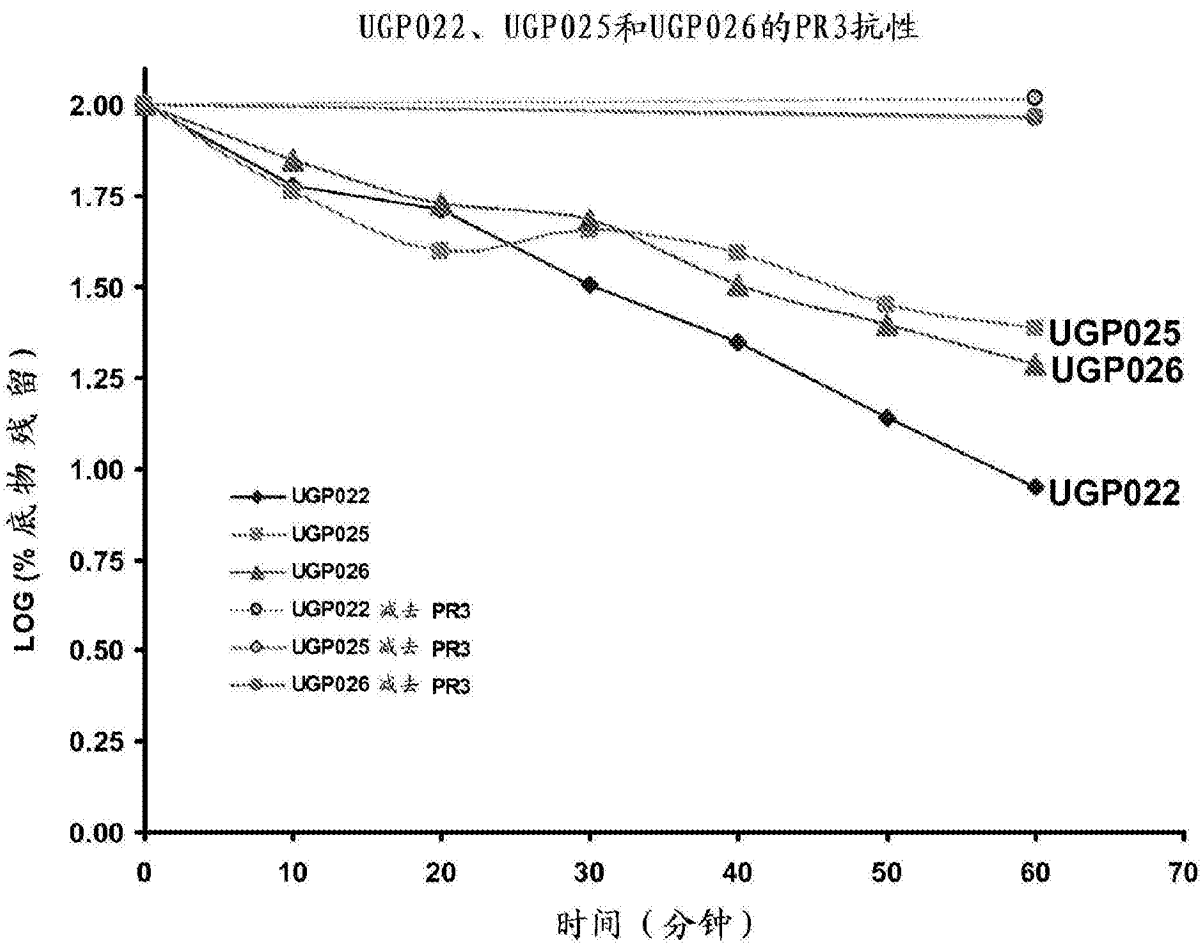

UGP022、UGP025和UGP026的PR3抗性
LOG (% 底物残留)
2.00
1.75
1.50
1.25
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
0
10
20
30
40
50
60
70
时间（分钟）
UGP022
UGP025
UGP026
UGP022 减去 PR3
UGP025 减去 PR3
UGP026 减去 PR3
UGP025
UGP026
UGP022

图8

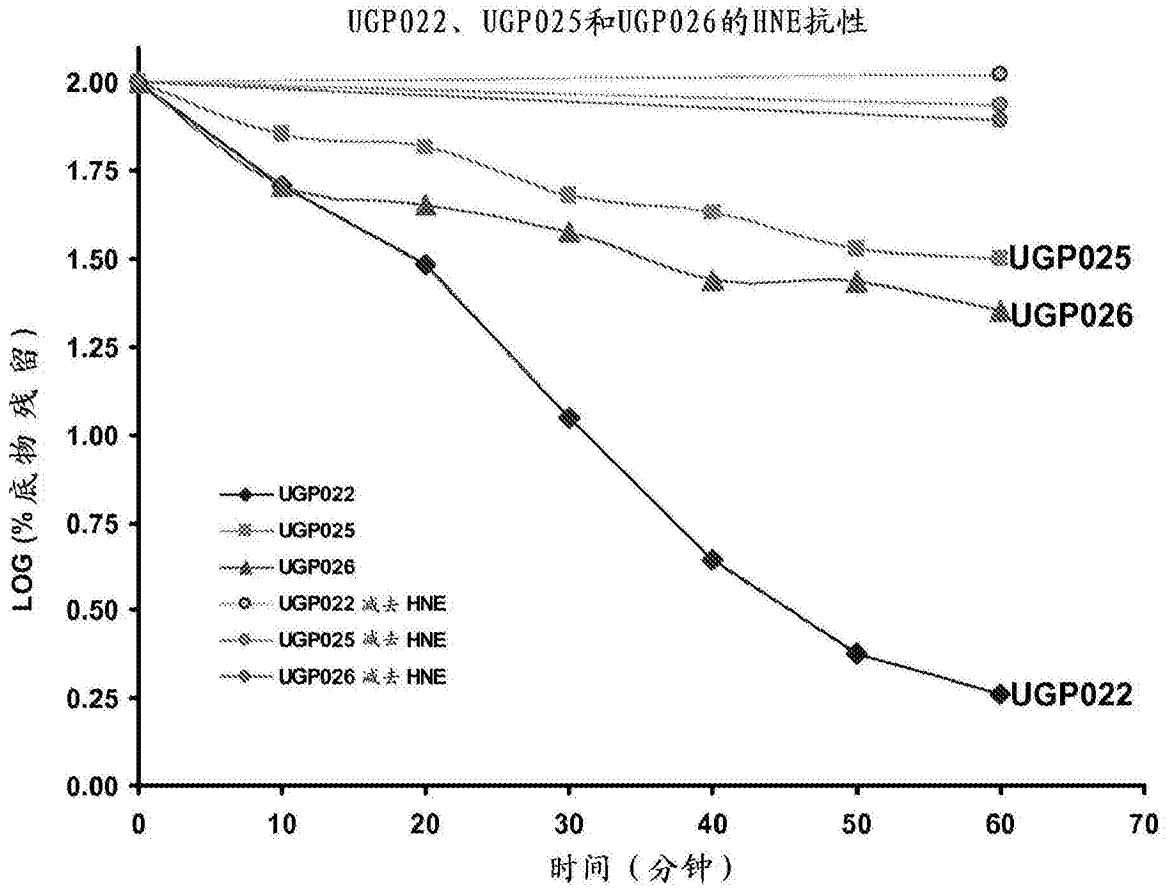

UGP022、UGP025和UGP026的HNE抗性
LOG (% 底物残留)
2.00
1.75
1.50
1.25
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
0
10
20
30
40
50
60
70
时间（分钟）
UGP022
UGP025
UGP026
UGP022 减去 HNE
UGP025 减去 HNE
UGP026 减去 HNE
UGP025
UGP026
UGP022

图9