



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110177563 A

(43)申请公布日 2019.08.27

(21)申请号 201780074408.5

阿勒克山德·S·波佩尔

(22)申请日 2017.10.04

约旦·J·格林

(30)优先权数据

62/403,786 2016.10.04 US

(74)专利代理机构 北京安杰律师事务所 11627

代理人 孙秀武

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.06.03

(51)Int.Cl.

A61K 38/00(2006.01)

A61K 38/10(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2017/055055 2017.10.04

A61K 38/39(2006.01)

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/067646 EN 2018.04.12

(71)申请人 阿斯克雷佩西治疗公司

地址 美国马里兰州

申请人 约翰·霍普金斯大学

(72)发明人 尼兰詹·B·潘迪

阿达姆·米兰多

权利要求书3页 说明书26页

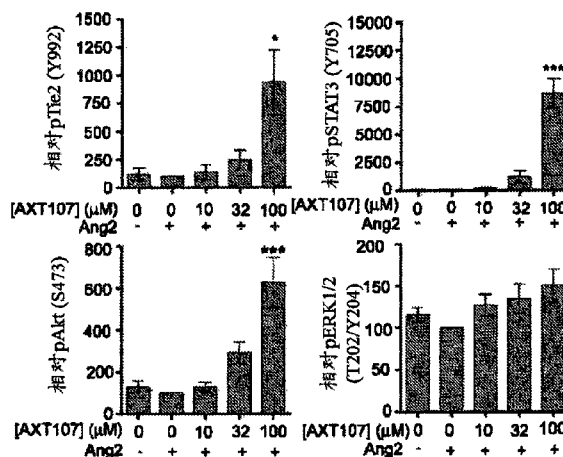
序列表20页 附图9页

(54)发明名称

用于激活TIE2信号传导的化合物和方法

(57)摘要

本发明在各个方面和实施方案中涉及用于通过施用一种或多种胶原蛋白IV衍生的仿生肽来治疗Tie2相关血管通透性的方法,并且涉及用于治疗Tie2相关血管通透性的包含一种或多种胶原蛋白IV衍生的仿生肽的组合物。此类肽可以促进血管生成素2(Ang2)的Tie2激动剂活性,从而稳定脉管系统和/或淋巴管。



1. 一种用于预防或治疗患者中涉及Tie-2相关血管或淋巴通透性的病状的方法,其包括:以有效降低Tie-2依赖性血管或淋巴通透性的量向所述患者施用胶原蛋白IV衍生的仿生肽。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述病状为糖尿病性黄斑水肿、视网膜静脉阻塞、湿性年龄相关性黄斑变性(湿性AMD)、背景型糖尿病性视网膜病变、癌症、流感、出血热或脑型疟。

3. 根据权利要求1所述的方法,其中所述病状为肿瘤生长或转移。

4. 根据权利要求1所述的方法,其中所述病状是涉及淋巴功能障碍的炎性病状。

5. 根据权利要求1所述的方法,其中所述病状是对癌症化疗之前的血管通透性。

6. 根据权利要求5所述的方法,其中所述肽以有效正常化肿瘤脉管系统的量施用,接着施用化疗。

7. 根据权利要求1所述的方法,其中所述病状为任选为NSCLC或SCLC的肺癌、肝癌、三阴性乳腺癌或成胶质细胞瘤。

8. 根据权利要求1所述的方法,其中所述病状为败血症。

9. 根据权利要求1所述的方法,其中所述病状为毛细血管渗漏综合征。

10. 根据权利要求1所述的方法,其中所述病状为肺部炎性病状,其任选为急性呼吸窘迫综合征、慢性哮喘或慢性阻塞性肺病(COPD)。

11. 根据权利要求1所述的方法,其中所述病状为血管性水肿。

12. 根据权利要求1所述的方法,其中所述病状为血管渗漏综合征。

13. 根据权利要求2所述的方法,其中按约100 μ g至约1000 μ g的所述肽的剂量并且注射频率不超过每月一次,通过玻璃体内注射向患有糖尿病性黄斑水肿、视网膜静脉阻塞、湿性年龄相关性黄斑变性(湿性AMD)或背景型糖尿病性视网膜病变的患者施用包含SEQ ID NO: 1-4的肽的组合物。

14. 根据权利要求13所述的方法,其中所述注射频率不超过约每隔一月一次。

15. 根据权利要求13所述的方法,其中所述注射频率不超过约每三个月一次。

16. 根据权利要求13所述的方法,其中在VEGF阻断或抑制剂疗法失败后施用所述肽。

17. 根据权利要求1-16中任一项所述的方法,其中所述病状是VEGF阻断或抑制剂疗法难治性的或仅部分响应的。

18. 根据权利要求17所述的方法,其中在VEGF阻断或抑制剂疗法失败后施用所述肽。

19. 根据权利要求18所述的方法,其中所述肽作为VEGF阻断或抑制剂疗法的替代物施用。

20. 根据权利要求19所述的方法,其中所述肽与VEGF阻断疗法组合施用。

21. 根据权利要求1-20中任一项所述的方法,其中所述肽包含SEQ ID NO:1-4中任一个的氨基酸序列。

22. 根据权利要求1-21中任一项所述的方法,其中所述肽衍生自胶原蛋白IV的 α 5原纤维或其仿生物。

23. 根据权利要求22所述的方法,其中所述肽为:

LRRFSTMPFMF (Abu) NINNV (Abu) NF (SEQ ID NO:5),

LRRFSTMPAMF (Abu) NINNV (Abu) NF (SEQ ID NO:6),

LRRFSTMPFAF (Abu) NINNV (Abu) NF (SEQ ID NO:7) ,
LRRFSTMPFMA (Abu) NINNV (Abu) NF (SEQ ID NO:8) ,
LRRFSTMPF (N1e) F (Abu) NINNV (Abu) NF (SEQ ID NO:9) ,
LRRFSTMPFM (4-C1Phe) (Abu) NINNV (Abu) NF (SEQ ID NO:10) ,
LRRFSTMPFMFSNINNVSNF (SEQ ID NO:11) ,
LRRFSTMPFMFANINNVANF (SEQ ID NO:12) ,
LRRFSTMPFMFININNVINF (SEQ ID NO:13) ,
LRRFSTMPFMFTNINNVTNF (SEQ ID NO:14) ,
LRRFSTMPFMF (A11yG1y) NINNV (A11yG1y) NF (SEQ ID NO:15) ,
LRRFSTMPFMFVNINNVNF (SEQ ID NO:16) ,
LRRFSTMPFdAFININNVINF (SEQ ID NO:17) ,
LRRFSTMPFAFININNVINF (SEQ ID NO:18) ,
LRRFSTAPFAFININNVINF (SEQ ID NO:19) ,
LRRFSTAPFdAFIDINDVINF (SEQ ID NO:20) ,
LRRFSTAPFAFIDINDVINW (SEQ ID NO:21) ,
dLRRdLRRFSTAPFAFIDINDVINF (SEQ ID NO:22) ,
LRRFSTAPFAFIDINDVINdF (SEQ ID NO:23) ,或
dLRRFSTAPFAFIDINDVINdF (SEQ ID NO:24) 。

24. 根据权利要求22所述的方法,其中所述肽为:

F (Abu) NINNV (Abu) N (SEQ ID NO:25) ,
FTNINNVTN (SEQ ID NO:26) ,
FININNVINF (SEQ ID NO:27) ,
FSNINNVSNF (SEQ ID NO:28) ,
FANINNVANF (SEQ ID NO:29) ,
F (A11yG1y) NINNV (A11yG1y) NF (SEQ ID NO:30) ,
FVNINNVNF (SEQ ID NO:31) ,
FIDINDVINF (SEQ ID NO:32) ,
FIDINDVINW (SEQ ID NO:33) ,
FTDINDVTN (SEQ ID NO:34) ,
A (Abu) NINNV (Abu) NF (SEQ ID NO:35) ,或
(4-C1Phe) (Abu) NINNV (Abu) NF (SEQ ID NO:36) 。

25. 根据权利要求1-24中任一项所述的方法,其中所述肽与纳米颗粒或微粒缀合或装载到纳米颗粒或微粒中。

26. 根据权利要求25所述的方法,其中所述纳米颗粒或微粒包含PLGA-PEG。

27. 一种肽或其颗粒制剂,所述肽具有SEQ ID NO:1-36中任一个的氨基酸序列,并且任选为具有选自SEQ ID NO:5-36的序列的肽。

28. 根据权利要求27所述的肽或颗粒制剂,其中所述制剂包含100 μ g至约1000 μ g的肽试剂。

29. 根据权利要求28所述的制剂,其中所述制剂不涉及包封到颗粒中。

30. 根据权利要求27所述的肽或颗粒制剂,其中所述制剂每剂包含约1mg至约10mg。

31. 根据权利要求30所述的肽或颗粒制剂,其中所述制剂涉及包封到微粒中,任选地含有游离肽。

用于激活TIE2信号传导的化合物和方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2016年10月4日提交的美国临时专利申请第62/403,786号的优先权,所述临时专利申请的全部内容通过引用并入本文。

[0003] 关于在联邦政府资助研究下所做发明的权利声明

[0004] 本发明根据美国国立卫生研究院 (National Institutes of Health) 授予的R01CA138264和1R21EY026148在政府支持下完成。政府拥有本发明的某些权利。

[0005] 序列表

[0006] 本申请含有序列表,其已经由EFS-Web以ASCII格式提交并且据此通过引用整体并入。于2017年10月1日创建的所述ASCII副本命名为ASX-002PC-SequenceListing_ST25.txt且大小为13,204字节。

背景技术

[0007] Tie2受体酪氨酸激酶信号传导途径及其配体血管生成素1 (Ang1) 和血管生成素2 (Ang2) 调节血管通透性。在患有黄斑水肿的患者,包括患有视网膜静脉阻塞 (RVO)、糖尿病性黄斑水肿 (DME)、湿性年龄相关性黄斑变性 (湿性AMD) 和背景型糖尿病性视网膜病变 (DR) 以及许多其它病状的患者中,血管通透性受损。Tie2还可以调节淋巴管完整性,尤其是在炎症期间。

[0008] Ang1结合Tie2并刺激磷酸化和下游信号传导,从而稳定血管。Ang2与Ang1竞争结合Tie2,从而降低Tie2的磷酸化,并因此它充当内源性Tie2拮抗剂。缺血或缺氧视网膜产生高水平的Ang2,并且在DME患者的眼部中,与VEGF水平一样,Ang2水平增加。Ang2增加视网膜血管对VEGF的响应性并促进血管渗漏和新血管形成。

[0009] Ang2也可以充当Tie2的弱激动剂,尤其是当Ang1水平较低时。具体地说,外源性Ang2激活内皮细胞 (EC) 中的Tie2和促迁移性 (promigratory)、促存活性 (prosurvival) PI3K/Akt途径,但具有比外源性Ang1更低的效力和更低的亲和力。EC产生Ang2但不产生Ang1。这种内源性Ang2维持Tie2、磷脂酰肌醇3-激酶和Akt活性,并促进EC存活、迁移和管形成。

[0010] 恢复Tie2激活可以在与水肿和血管完整性相关的病状,包括黄斑水肿、DME和其它病状中提供益处。

发明内容

[0011] 在各个方面和实施方案中,本发明提供了用于通过施用一种或多种胶原蛋白IV衍生的仿生肽来治疗Tie2相关血管通透性的方法和组合物。此类肽可以促进血管生成素2 (Ang2) 的Tie2激动剂活性,从而稳定脉管系统和/或淋巴管。在各个实施方案中,可以递送仿生肽用于治疗诸如黄斑水肿、湿性AMD的病状,及治疗或预防肿瘤生长或转移等。在一些实施方案中,所述病状是VEGF阻断疗法或激酶抑制剂疗法难治性的或仅部分响应的。例如,仿生肽可以在未成功的VEGF阻断疗法之后施用,即,在未观察到血管生成、淋巴管生成和/

或水肿显著减少的情况下。在一些实施方案中,所述肽作为VEGF阻断疗法的替代物施用或与VEGF阻断疗法组合施用。通过激活Tie2信号传导,仿生肽或肽试剂提供了用VEGF阻滞疗法或单独的VEGF阻断疗法无法观察到的治疗益处。

[0012] 胶原蛋白IV衍生的仿生肽衍生自IV型胶原的 $\alpha 5$ 原纤维。在一些实施方案中所述肽可以靶向 $\alpha 5\beta 1$ 和 $\alpha V\beta 3$ 整联蛋白(integrin),并且可以抑制通过多种受体的信号传导,包括血管内皮生长因子受体(VEGFR)、肝细胞生长因子受体(HGFR)、胰岛素样生长因子受体(IGFR)和表皮生长因子受体(EGFR)。如本文所公开的,胶原蛋白IV衍生的仿生肽进一步促进血管生成素2的Tie2激动剂活性,从而稳定脉管系统和/或淋巴管。

[0013] 可以例如使用多种药学上可接受的载体配制仿生肽或肽试剂用于局部递送至受影响的组织或全身递送。在一些实施方案中,将所述肽与聚合物纳米颗粒或微粒载体一起配制,所述聚合物纳米颗粒或微粒载体可包含具有一种或多种可降解连键的材料。所述肽可以与颗粒表面缀合,或者可以包封在颗粒内以持续释放。在一些实施方案中,颗粒包含与仿生肽共价连接的可调大小的聚(乳酸-羟基乙酸)共聚物聚乙二醇(PLGA-PEG)嵌段共聚物。可以设计颗粒以提供所需的药效学优势,包括循环性质、生物分布、降解动力学,包括表面性质的调节。

[0014] 在一些实施方案中,纳米颗粒还包含包封的用于治疗Tie2相关病状的活性剂。例如,颗粒可以是包封有效量的仿生肽的微粒,以提供长效药物贮库或提供仿生肽或肽试剂的持续释放。

[0015] 在某些方面,本发明提供了用于预防或治疗患者中涉及Tie-2相关血管通透性或淋巴管完整性的病状的方法。该方法包括以有效降低Tie2依赖性血管通透性或淋巴管完整性的量向患者施用胶原蛋白IV衍生的仿生肽或其颗粒制剂。恢复Tie2激活在与水肿或血管通透性相关的病状(包括黄斑水肿、糖尿病性黄斑水肿(DME))和其它病状(包括以急性或慢性炎症为特征的病状)中提供治疗益处。Tie2相关病状包括糖尿病性黄斑水肿、视网膜静脉阻塞、湿性AMD、背景型糖尿病性视网膜病变、癌症(包括用于减少、减缓或预防肿瘤生长或转移)、流感、出血热、脑型疟、阿尔茨海默病(Alzheimer's disease)、急性呼吸窘迫综合征、肺水肿、哮喘、呼吸道合胞病毒、COPD、SARS、肺炎、败血症等。

[0016] 本方明的其它方面和实施方案将从以下详细描述中显而易见。

附图说明

[0017] 图1显示AXT107(在图1中标识为SP2043)促进Ang2的激动剂活性以激活Tie2信号传导途径。

[0018] 图2A显示了用Ang2和AXT107处理的微血管内皮细胞(MEC)裂解物的蛋白质印迹(western blot),其显示了Tie2和下游效应子STAT3、Akt和Erk1/2的磷酸化,以GAPDH作为上样对照。图2B显示的图表说明了图2A中公开的蛋白质印迹的光密度分析并针对上样对照进行调整且相对于单独的Ang2对照进行呈现。单因素方差分析(One-way ANOVA);N=3;相对于单独的Ang2对照,分别*,*** $p \leq 0.05$ 和 0.001 。

[0019] 图3A显示了在AXT107的不同浓度下用0.1%在PBS中的BSA(左列)或200ng/ml Ang2(右列)处理15分钟并进行磷酸-Tie2(Y992)(绿色)和DAPI(蓝色)染色的单层MEC的免疫荧光图像。白色箭头表示交界性Tie2。图3B包括用各种生长因子和100 μ M AXT107或DMSO

媒介物处理,并分级成Triton X-100可溶性和Triton X-100不溶性库的MEC裂解物的蛋白质印迹。图3C是说明图3B中公开的蛋白质印迹的光密度分析的图表;每个柱表示AXT107处理的样品相对于相同生长因子的相应媒介物对照的百分比变化,并且按可溶性(左侧柱)和不溶性(右侧柱)分开。图3D是Triton X-100分级分离的裂解物的蛋白质印迹的代表性图像($n=3$),将所述裂解物针对Tie2免疫沉淀并针对磷酸-Tie2(上部)或总Tie2(下部)印迹。

[0020] 图4A和4C显示了用各种生长因子和 $100\mu\text{M}$ AXT107或DMSO媒介物处理并分级成Triton X-100可溶性和Triton X-100不溶性库,并且针对整联蛋白 α_5 (A)进行免疫印迹或针对整联蛋白 β_1 (C)进行免疫印迹的MEC裂解物的蛋白质印迹图4B和4D是分别说明来自图4A和图4C的条带的光密度分析的图表;每个柱表示AXT107处理的样品相对于相同生长因子的相应媒介物对照的百分比变化,并且按可溶性(左侧柱)和不溶性(右侧柱)分开。图4E显示了Triton X-100分级分离的裂解物的蛋白质印迹,将所述裂解物针对整联蛋白 α_5 进行免疫沉淀并针对整联蛋白 α_5 (上部)或针对整联蛋白 β_1 (下部)印迹。图4F显示了Duolink™测定的代表性图像的显微照片,其显示了用媒介物或用 $100\mu\text{M}$ AXT107处理的单层MEC中 α_5 和 β_1 整联蛋白之间的相互作用,并且图4G是量化每个任意区域的相互作用的图表。图4H和4I显示了Triton X-100分级分离的裂解物的蛋白质印迹的代表性图像($n=3$),将所述裂解物针对Tie2进行免疫沉淀并针对 α_5 整联蛋白印迹;图4H中的细胞经 200ng/ml 的Ang2处理而图4I中的细胞未用生长因子处理。 $N=3$ 。

[0021] 图5A显示了来自于在AXT107的不同浓度下用 200ng/ml Ang2处理3小时的单层MEC的VE-钙粘着蛋白的代表性蛋白质印迹;GAPDH作为上样对照而包括在内。图5B显示了用 200ng/ml Ang2和不同浓度的AXT107处理的单层MEC的免疫荧光图像的显微照片,单层MEC已经用靶向VE-钙粘蛋白(绿色)、F-肌动蛋白(红色)和DAPI(蓝色)的抗体染色,并且合并区域以黄色显示;箭头指示显示VE-钙粘蛋白分布转变的代表性区域。图5C是量化每个细胞中F-肌动蛋白的平均覆盖面积的图表;单因素方差分析; $N=3$;相对于单独的Ang2对照,分别*,** $p\leq 0.05$ 和 0.01 。图5D显示了来自于用 200ng/ml Ang2和不同浓度的AXT107处理的MEC的裂解物的代表性蛋白质印迹图像,所述裂解物针对pMLC2印迹并且以GAPDH作为上样对照。图5E是显示图5D所示数据的光密度分析的图表;单因素方差分析; $N=3$;相对于单独的Ang2对照,*** $p\leq 0.001$ 。图5F是实施例5中描述的跨内皮细胞通透性测定的示意图。图5G是显示如所示,用生长因子和AXT107处理后涂铺在半透性基质上的单层MEC上的FITC-葡聚糖(40kDa)迁移的定量的图表。学生双尾t检验; $N\geq 7$;* $p\leq 0.05$ 。

[0022] 图6包括AXT107介导的Tie2激活模型。

具体实施方式

[0023] 在各个方面和实施方案中,本发明提供了用于通过施用一种或多种胶原蛋白IV衍生的仿生肽来治疗Tie2相关血管或淋巴管通透性的方法和组合物。此类肽可以促进血管生成素2(Ang2)的Tie2激动剂活性,从而稳定脉管系统和/或淋巴管。

[0024] 胶原蛋白IV衍生的仿生肽衍生自IV型胶原的 α_5 原纤维。示例性肽包含氨基酸序列LRRFSTAPFAFIDINDVINP(SEQ ID NO:1)或其衍生物,由其组成或基本上由其组成。所述肽可以靶向 $\alpha_5\beta_1$ 和 $\alpha_V\beta_3$ 整联蛋白,并且抑制通过多种受体的信号传导,包括血管内皮生长因子受体(VEGFR)、肝细胞生长因子受体(HGFR)、胰岛素样生长因子受体(IGFR)和表皮生长因子

受体(EGFR)。如本文所公开的,胶原蛋白IV衍生的仿生肽进一步促进血管生成素2的Tie2激动剂活性,从而稳定脉管系统和/或淋巴管。

[0025] 胶原蛋白IV衍生的仿生肽包括US 9,056,923中描述的那些,其据此通过引用整体并入。例如,根据以下公开内容的肽包括含氨基酸序列LRRFSTXPXXXXNINNVXNF (SEQ ID NO: 2)的肽,其中X为标准氨基酸或非遗传编码的氨基酸。在一些实施方案中,位置7的X为M、A或G;位置9的X为F、A、Y或G;位置10的X为M、A、G、D-丙氨酸(dA)或正亮氨酸(Nle);位置11的X为F、A、Y、G或4-氯苯丙氨酸(4-C1Phe);位置12和位置18的X独立地选自2-氨基丁酸(Abu)、G、S、A、V、T、I、L或烯丙基甘氨酸(烯丙基Gly)。在各个实施方案中,所述肽含有约30个氨基酸或更少,或约25个氨基酸或更少,或约24个氨基酸,或约23个氨基酸,或约22个氨基酸,或约21个氨基酸,或约20个氨基酸。在其它实施方案中,SEQ ID NO:2的一个、两个、三个、四个或五个氨基酸缺失。

[0026] 在一些实施方案中,所述肽包含氨基酸序列LRRFSTAPFAFIDINDVIN (SEQ ID NO: 3)或其衍生物。SEQ ID NO:3的肽也称为AXT107或SP2043。SEQ ID NO:3的肽的衍生物包括相对于SEQ ID NO:3具有1至5个氨基酸取代、插入或缺失(例如,总共1、2、3、4或5个氨基酸取代、插入或缺失)的肽,但在一些实施方案中,保留了位置13和16的Asp。在一些实施方案中,在衍生物中保留序列DINDV。SEQ ID NO:3中的氨基酸取代可任选地处于SEQ ID NO:1的相应位置处被X占据的位置。即,所述肽可具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列:LRRFSTXPXXXXDINDVXNF,其中X为标准氨基酸或非遗传编码的氨基酸。在一些实施方案中,位置7的X为M、A或G;位置9的X为F、A、Y或G;位置10的X为M、A、G、D-丙氨酸(dA)或正亮氨酸(Nle);位置11的X为F、A、Y、G或4-氯苯丙氨酸(4-C1Phe);位置12和位置18的X独立地选自2-氨基丁酸(Abu)、G、S、A、V、T、I、L或烯丙基甘氨酸(烯丙基Gly)。

[0027] 在一些实施方案中,在SEQ ID NO:1、2、3或4的肽的任何位置产生氨基酸取代,其可以独立地选自保守性或非保守性取代。在这些或其它实施方案中,所述肽包括1至10个添加到一个或两个末端的氨基酸(总共)。N-和/或C-末端可任选被另一个化学基团(除胺或羧基外,例如酰胺或硫醇),并且其可用于缀合其它部分,包括PEG或PLGA-PEG共聚物,如本文进一步详细描述。

[0028] 例如,可基于所涉氨基酸残基的极性、电荷、大小、溶解性、疏水性、亲水性和/或两亲性质的相似性产生保守性取代。20种遗传编码的氨基酸可分为以下六个标准氨基酸类别:

- [0029] (1) 疏水性:Met、Ala、Val、Leu、Ile;
- [0030] (2) 中性亲水性:Cys、Ser、Thr、Asn、Gln;
- [0031] (3) 酸性:Asp、Glu;
- [0032] (4) 碱性:His、Lys、Arg;
- [0033] (5) 影响链取向的残基:Gly、Pro;以及
- [0034] (6) 芳族:Trp、Tyr、Phe。

[0035] 如本文所用,“保守性取代”定义为一种氨基酸被以上所示六个标准氨基酸类别中的相同类别中列出的另一种氨基酸交换。例如,Glu交换Asp在这样修饰的多肽中保留一个负电荷。另外,甘氨酸和脯氨酸可以基于其破坏 α -螺旋的能力而彼此取代。以上六个类别中的一些优选的保守性取代是以下亚类中的交换:(i) Ala、Val、Leu和Ile;(ii) Ser和Thr;

(iii) Asn和Gln; (iv) Lys和Arg; (v) Tyr和Phe。

[0036] 如本文所用,“非保守性取代”定义为一种氨基酸被以上所示六个标准氨基酸类别(1)至(6)中的不同类别中列出的另一种氨基酸交换。

[0037] 在各个实施方案中,仿生肽或肽试剂是约8至约30个氨基酸,或约10至约20个氨基酸的肽,并且具有SEQ ID NO:1或3的至少4个,至少5个或至少6个连续氨基酸。在一些实施方案中,所述肽含有至少一个、至少两个或至少三个D-氨基酸。在一些实施方案中,所述肽含有1至约5种(例如,1、2或3种)非遗传编码的氨基酸,其任选地选自2-氨基丁酸(Abu)、正亮氨酸(N1e)、4-氯苯丙氨酸(4-ClPhe)和烯丙基甘氨酸(AllylGly)。

[0038] 根据本公开的示例性仿生肽包括:

[0039] LRRFSTMPFMF (Abu) NINNV (Abu) NF (SEQ ID NO:5),

[0040] LRRFSTMPAMF (Abu) NINNV (Abu) NF (SEQ ID NO:6),

[0041] LRRFSTMPFAF (Abu) NINNV (Abu) NF (SEQ ID NO:7),

[0042] LRRFSTMPFMA (Abu) NINNV (Abu) NF (SEQ ID NO:8),

[0043] LRRFSTMPF (N1e) F (Abu) NINNV (Abu) NF (SEQ ID NO:9),

[0044] LRRFSTMPFM (4-ClPhe) (Abu) NINNV (Abu) NF (SEQ ID NO:10),

[0045] LRRFSTMPFMFSNINNVSNF (SEQ ID NO:11),

[0046] LRRFSTMPFMFANINNVANF (SEQ ID NO:12),

[0047] LRRFSTMPFMFININNVINF (SEQ ID NO:13),

[0048] LRRFSTMPFMFTNINNVTNF (SEQ ID NO:14),

[0049] LRRFSTMPFMF (AllylGly) NINNV (AnyGly) NF (SEQ ID NO:15),

[0050] LRRFSTMPFMFVNINNVVNF (SEQ ID NO:16),

[0051] LRRFSTMPFdAFININNVINF (SEQ ID NO:17),

[0052] LRRFSTMPFAFININNVINF (SEQ ID NO:18),

[0053] LRRFSTAPFAFININNVINF (SEQ ID NO:19),

[0054] LRRFSTAPFdAFIDINDVIN (SEQ ID NO:20),

[0055] LRRFSTAPFAFIDIDDVIDW (SEQ ID NO:21),

[0056] dLRRdLRRFSTAPFAFIDINDVIN (SEQ ID NO:22),

[0057] LRRFSTAPFAFIDINDVINdF (SEQ ID NO:23),

[0058] dLRRFSTAPFAFIDINDVINdF (SEQ ID NO:24)。

[0059] F (Abu) NINNV (Abu) N (SEQ ID NO:25),

[0060] FTNINNVTN (SEQ ID NO:26),

[0061] FININNVINF (SEQ ID NO:27),

[0062] FSNINNVSNF (SEQ ID NO:28),

[0063] FANINNVANF (SEQ ID NO:29),

[0064] F (AllylGly) NINNV (AllylGly) NF (SEQ ID NO:30),

[0065] FVNINNVVNF (SEQ ID NO:31),

[0066] FIDINDVIN (SEQ ID NO:32),

[0067] FIDINDVINW (SEQ ID NO:33),

[0068] FTDINDVTN (SEQ ID NO:34),

[0069] A (Abu)NINNV (Abu)NF (SEQ ID NO:35),或

[0070] (4-ClPhe) (Abu)NINNV (Abu)NF (SEQ ID NO:36)。

[0071] 仿生肽或肽试剂可以使用熟知的技术化学合成和纯化,诸如固相合成。参见US 9,051,349,其据此通过引用整体并入。

[0072] 在一些实施方案中,肽可以呈药学上可接受的盐的形式提供,或者与其它组分复合或包封在颗粒中,用于向特定组织靶向或持续递送。

[0073] 在一些实施方案中,将仿生肽或肽试剂配制成药学上可接受的盐。药学上可接受的盐通常是本领域普通技术人员所熟知的,并且举例来说,可以包括但不限于,乙酸盐、苯磺酸盐 (benzenesulfonate)、苯磺酸盐 (besylate)、苯甲酸盐、碳酸氢盐、酒石酸氢盐、溴化物、依地酸钙、右旋樟脑磺酸盐 (camsylate)、碳酸盐、柠檬酸盐、依地酸盐、乙二磺酸盐、丙酸酯月桂硫酸盐 (estolate)、乙磺酸盐 (esylate)、富马酸盐、葡庚糖酸盐 (gluceptate)、葡萄糖酸盐、谷氨酸盐、对羟乙酰氨基苯肿酸盐 (glycollylarsanilate)、己基间苯二酸盐 (hexylresorcinolate)、海巴盐 (hydrabamine)、氢溴酸盐、盐酸盐、羟基萘甲酸盐、碘化物、羟乙基磺酸盐 (isethionate)、乳酸盐、乳糖酸盐、苹果酸盐、马来酸盐、扁桃酸盐、甲磺酸盐、粘酸盐、萘磺酸盐、硝酸盐、扑酸盐 (pamoate) (双羟萘酸盐 (embonate))、泛酸盐、磷酸盐/二磷酸盐、聚半乳糖醛酸盐、水杨酸盐、硬脂酸盐、次乙酸盐、琥珀酸盐、硫酸盐、丹宁酸盐、酒石酸盐或茶氯酸盐 (teoclolate)。其它药学上可接受的盐可以在例如Remington: The Science and Practice of Pharmacy (第20版) Lippincott, Williams & Wilkins (2000) 中找到。药学上可接受的盐包括,例如乙酸盐、苯甲酸盐、溴化物、碳酸盐、柠檬酸盐、葡萄糖酸盐、氢溴酸盐、盐酸盐、马来酸盐、甲磺酸盐、萘磺酸盐、扑酸盐 (双羟萘酸盐)、磷酸盐、水杨酸盐、琥珀酸盐、硫酸盐或酒石酸盐。

[0074] 仿生肽或肽试剂可以配制用于局部或全身递送,例如,使用多种药学上可接受的载体,包括但不限于水、盐水、葡萄糖溶液、人血清白蛋白、脂质体、水凝胶、微粒和纳米颗粒。

[0075] 在一些实施方案中,仿生肽或肽试剂的有效量将在每剂约0.1至约50mg的范围内,或在一些实施方案中,每剂约0.5至约25mg,每剂约1至约10mg,或每剂约1至约5mg,或每剂约1至约3mg。确切剂量将取决于例如施用途径、所施用的化合物的形式,以及待治疗的医学病状和/或患者。在各个实施方案中,所述肽每天、每周或每月施用1至3次(例如,每天、每周或每月一次),或在一些实施方案中,不超过每隔一月一次,或不超过每三个月一次,或不超过每四个月一次。

[0076] 在一些实施方案中,通过玻璃体内注射施用仿生肽或肽试剂,例如,用于治疗糖尿病性黄斑水肿、视网膜静脉阻塞、湿性年龄相关性黄斑变性(湿性AMD)或糖尿病性视网膜病变。可以施用包含仿生肽或肽试剂的组合物,用于治疗VEGF阻断疗法或激酶抑制剂疗法难治性的或仅部分响应的病状。例如,仿生肽可以在未成功的VEGF阻断疗法后施用,和/或可以作为主要的一线疗法施用(无其它试剂)。在一些实施方案中,肽以约100 μ g至约1000 μ g的剂量施用,或在一些实施方案中,以约200 μ g至约800 μ g的剂量,或以约400至约800 μ g的剂量施用。在一些实施方案中,肽的剂量为约200 μ g、约400 μ g、约500 μ g、约600 μ g、约800 μ g或约1mg。所述肽剂量可以每月施用一次,每隔一月一次,或每三个月一次,或每四个月一次,或每六个月一次。因为裸肽可以在玻璃体内注射后形成贮库,所以可以大幅降低给药频率,需

要或不需要配制成颗粒。具有微粒的制剂可导致给药频率更低,并且在一些实施方案中,所述制剂包含游离和包封的蛋白质以提供初始剂量的活性剂,随后在数月内持续释放。即使在没有微粒制剂的情况下,也可以按约每月一次,或每隔一月一次或每三个月一次的频率进行玻璃体内注射。在一些实施方案中,所述肽制剂包含微粒,其包封剂量为1mg至约10mg的肽试剂,或在一些实施方案中,剂量为约1mg至5mg的肽,或在一些实施方案中,剂量为1mg至3mg的肽试剂。

[0077] 仿生肽可以配制用于多种施用模式,包括全身施用和局部施用或定位施用。技术和配方通常可以在Remington:The Science and Practice of Pharmacy (第20版) Lippincott,Williams&Wilkins (2000) 中找到。为了有助于生物利用度,本发明的组合物可以以纳米颗粒或微粒递送,或与聚乙二醇或其它PK增强缀合物缀合,诸如与抗体Fc结构域或白蛋白氨基酸序列融合。可以例如呈定时或持续释放形式递送试剂。配制和施用技术可以在Remington:The Science and Practice of Pharmacy (第20版) Lippincott, Williams&Wilkins (2000) 中找到。合适的途径可包括经口、经颊、通过吸入喷雾、舌下、经直肠、经皮、经阴道、经粘膜、经鼻腔或经肠道施用;胃肠外送递,包括肌内、皮下、髓内注射,以及鞘内、直接心室内、静脉内、关节内、胸骨内、滑膜内、肝内、病灶内、瘤内、颅内、腹腔内、鼻内或眼内(例如玻璃体内)注射或其它递送模式。

[0078] 对于注射,可以将仿生肽或肽试剂配制并稀释于水溶液中,诸如在生理上相容的缓冲液如Hank溶液、Ringer溶液或生理盐水缓冲液中。

[0079] 对于经粘膜施用,在制剂中可以使用适合待渗透屏障的渗透剂。此类渗透剂通常是本领域中熟知的。

[0080] 可以使用本领域熟知的药学上可接受的载体容易地将组合物配制成适于口服施用的剂量。此类载体使得仿生肽或肽试剂能够配制成片剂、丸剂、胶囊剂、液体剂、凝胶剂、糖浆剂、浆液剂、混悬剂等,供待治受试者(例如患者)口服摄取。

[0081] 对于鼻腔或吸入递送,仿生肽或肽试剂可以通过本领域技术人员已知的方法配制,并且可以包括,例如但不限于,溶解、稀释或分散物质的实例,诸如盐水、防腐剂(诸如苯甲醇)、吸收促进剂和碳氟化合物。

[0082] 在一些实施方案中,肽与聚合物纳米颗粒或微粒载体一起配制。例如,在一些实施方案中,微粒或纳米颗粒包含具有一种或多种可降解连键,诸如酯键、二硫键、酰胺键、酸酐键和易于酶促降解的连键的材料。在特定实施方案中,微粒或纳米颗粒包含生物可降解的聚合物或选自以下的聚合物的掺混物:聚(乳酸-乙醇酸)共聚物(PLGA)、聚(β -氨基酯)(PBAE)、聚己内酯(PCL)、聚乙醇酸(PGA)、聚乳酸(PLA)、聚(丙烯酸)(PAA)、聚-3-羟基丁酸酯(P3HB)和聚(羟基丁酸酯-羟基戊酸酯)共聚物。在一些实施方案中,颗粒包含PLGA和PBAE的掺混物。在其它实施方案中,将本领域中使用的不可降解的聚合物(诸如聚苯乙烯)与可降解聚合物或来自上面的聚合物掺混以产生共聚物体系。因此,在一些实施方案中,将不可降解的聚合物与生物可降解的聚合物掺混。

[0083] 在一些实施方案中,本发明提供了包含PLGA-PEG共聚物和缀合的仿生肽的纳米颗粒。缀合的肽可以是SEQ ID NO:1-36中任一个的肽。

[0084] 在一些实施方案中,纳米颗粒含有与纳米颗粒表面缀合的附加药物或靶向剂。例如,纳米颗粒可以由PLGA-PEG-X和PLGA-PEG-Y聚合物制成,其中X为仿生肽,Y为另一种药物

或靶向剂。靶向剂可以是组织选择性靶向剂,或者可以对所需细胞类型(包括癌细胞)具有选择性。这些实施方案中的纳米颗粒(具有缀合的肽和任选附加靶向剂)可用于治疗癌症,包括如上所述的实体瘤,并且包括成胶质细胞瘤或乳腺癌(包括三阴性乳腺癌)。

[0085] 另外或可替代地,可以使用其它靶结合剂(包括替代性整联蛋白结合部分),并且这些包括抗体及其抗原结合部分。靶结合的各种形式包括单结构域抗体、重组仅重链抗体(VHH)、单链抗体(scFv)、鲨鱼仅重链抗体(VNAR)、微蛋白(半胱氨酸扭结蛋白, knottin)、DARPin、四连接素(Tetranectin)、亲合体(Affibody);转移体(Transbody)、Anticalin、AdNectin、Affilin、微体(Microbody)、肽适体、菲乐体(phylomer)、斯塔都体(stradobody)、大抗体(maxibody)、伊维体(eVibody)、非那体(fynomer)、狢狢重复蛋白、Kunitz结构域、亲合体、阿曲体(atrimer)、普鲁体(proboby)、免疫体(immunobody)、三功能单抗(triomab)、特洛伊体(troybody)、派普体(pepbody)、疫苗体(vaccibody)、UniBody、DuoBody、Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂、肽模拟分子或合成分子或如以下美国专利号或专利申请号中所描述的:US 7,417,130、US 2004/132094、US 5,831,012、US 2004/023334、US 7,250,297、US 6,818,418、US 2004/209243、US 7,838,629、US 7,186,524、US 6,004,746、US 5,475,096、US 2004/146938、US 2004/157209、US 6,994,982、US 6,794,144、US 2010/239633、US 7,803,907、US 2010/119446和/或US 7,166,697,其内容据此通过引用整体并入。另见Storz MAbs.2011年5月至6月;3(3):310-317。

[0086] 在一些实施方案中,纳米颗粒由可调大小的聚(乳酸-乙醇酸)共聚物聚乙二醇(PLGA-PEG)嵌段共聚物合成,该嵌段共聚物与SEQ ID NO:1-36中任一个的肽,或其衍生物或如上所述的其它结合剂共价连接。任何比例的缀合和非缀合聚合物的混合物均可用于产生在表面上具有所需靶向剂密度的纳米颗粒。在一些实施方案中,仿生肽包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列(称为AXT107或SP2043)。

[0087] 在一些实施方案中,与颗粒缀合的肽具有SEQ ID NO:1-36的氨基酸序列,或其衍生物。在一些实施方案中,纳米颗粒由PLGA-PEG-肽缀合物形成,或在其它实施方案中,肽与预先形成的颗粒缀合。

[0088] 如本文所用,术语“纳米颗粒”是指具有至少一个尺寸在约1nm至约1000nm范围内,包括介于1nm至1000nm之间的任何整数值(包括约1、2、5、10、20、50、60、70、80、90、100、200、500和1000nm以及其间的所有整数和分数整数)的颗粒。在一些实施方案中,纳米颗粒具有至少一个约50至100nm的尺寸,例如直径。在一些实施方案中,纳米颗粒的直径为约70至100nm。

[0089] 在一些实施方案中,颗粒为微粒。术语“微粒”包括具有至少一个尺寸在至少约一微米(μm)范围内的颗粒。如本文所用的术语“颗粒”意在包括纳米颗粒和微粒。

[0090] 可以设计颗粒以提供所需的药效学优势,包括循环性质、生物分布和降解动力学。此类参数包括大小、表面电荷、聚合物组成、配体缀合化学和肽缀合密度等。例如,在一些实施方案中,颗粒具有PLGA聚合物核和由PLGA-PEG共聚物的PEG部分形成的亲水性壳,其中一部分PLGA-PEG聚合物具有肽末端附着。亲水性壳还可包含相对于官能团呈惰性的酯封端的PLGA-PEG聚合物,诸如PLGA-PEG-MeOH聚合物。在一些实施方案中,一些或所有未缀合的聚合物具有其它末端基团(诸如羧基)以提供对表面性质的微调。

[0091] 本文描述的肽可以使用任何可用的方法与颗粒化学缀合。用于肽缀合的官能团包

括PEG-COOH、PEG-NH₂、PEG-SH。参见,例如Hermanson, B10CONJUGATE TECHNIQUES, Academic Press, New York, 1996。激活官能团包括烷基和酰基卤、胺、巯基、醛、不饱和键、酰肼、异氰酸酯、异硫氰酸酯、酮和已知可激活以进行化学键合的其它基团。可替代地,肽可以通过使用小分子偶联试剂缀合。偶联剂的非限制性实例包括碳二亚胺、马来酰亚胺、N-羟基琥珀酰亚胺酯、二氯乙基胺、双官能醛(诸如戊二醛)、酸酐等。

[0092] 在一个示例性实施方案中,纳米颗粒具有核(PLGA),其可以针对体内特定的生物降解速率进行调整(通过调节PLGA聚合物的LA:GA比率和/或分子量)。在一些实施方案中,PLGA基于20:1至1:20的LA:GA比率,包括L/G的组成为:5/95、10/90、15/85、20/80、25/75、30/70、35/65、40/60、45/55、50/50、55/45、60/40、65/35、70/30、75/25、80/20、85/15、90/10或95/5。PLGA通过其酯键的水解而降解。PLGA降解所需的时间与单体比率有关:与主要为丙交酯的单元相比,乙交酯单元的含量越高,降解所需的时间越短。另外,酯封端的聚合物(与游离羧酸完全不同)具有更长的降解半衰期。

[0093] 在一些实施方案中,PLGA聚合物的分子量在约10K至约70K的范围内,例如约20K、约25K、约30K、约40K、约50K、约60K或约70K,以提供可调粒度。聚合物的PEG部分通常在2K至5K的范围内。在各个实施方案中,PLGA-PEG-肽和未缀合的PLGA-PEG的比率为约1:20至约20:1,诸如约1:15至约15:1,或约1:10至约10:1,或约1:5至约5:1,或约1:2至约2:1。在一些实施方案中,PLGA-PEG-肽与未缀合的共聚物的比率为约1:1。在一些实施方案中,至少50%的聚合物具有缀合的肽。在一些实施方案中,纳米颗粒的大小(平均直径)在约50至约200nm的范围内,或在约50至约100nm的范围内。在一些实施方案中,纳米颗粒在去离子水中的 ζ 电位在约-5mV至约-40mV的范围内,并且在一些实施方案中,在约-10mV至约-30mV的范围内(例如,约-20mV、约-25mV或约-30mV)。

[0094] 在一些实施方案中,纳米颗粒还包含包封的活性剂,其可以是本文公开的用于治疗Tie2相关病状的活性剂,所述病状诸如以微血管或淋巴渗漏为特征的病状,包括流感、阿尔茨海默病、出血热、脑型疟、肿瘤生长或转移,以及本文所述的其它病状。在这些实施方案中,纳米颗粒提供活性剂的持续释放。例如,在一些实施方案中,所述活性剂为化学治疗剂,诸如以下中的一种或多种:氨鲁米特(aminoglutethimide)、安吡啶(amsacrine)、阿那曲唑(anastrozole)、天冬酰胺酶(asparaginase)、比卡鲁胺(bicalutamide)、博来霉素(bleomycin)、布舍瑞林(buserelin)、白消安(busulfan)、喜树碱(camptothecin)、卡培他滨(capecitabine)、卡铂(carboplatin)、卡莫司汀(carmustine)、苯丁酸氮芥(chlorambucil)、顺铂(cisplatin)、克拉屈滨(cladribine)、氯膦酸盐(clodronate)、秋水仙碱(colchicine)、环磷酰胺、环丙孕酮(cyproterone)、阿糖胞苷(cytarabine)、达卡巴嗪(dacarbazine)、放线菌素D(dactinomycin)、柔红霉素(daunorubicin)、双烯雌酚(dienestrol)、己烯雌酚(diethylstilbestrol)、多西紫杉醇(docetaxel)、阿霉素(doxorubicin)、表柔比星(epirubicin)、雌莫司汀(estramustine)、依托泊苷(etoposide)、依西美坦(exemestane)、非格司亭(filgrastim)、氟达拉滨(fludarabine)、氟氢可的松(fludrocortisone)、氟尿嘧啶(flourouracil)、氟甲睾酮(flouxymerone)、氟他胺(flutamide)、吉西他滨(gemcitabine)、染料木黄酮(genistein)、戈舍瑞林(goserelin)、羟基脲、伊达比星(idarubicin)、异环磷酰胺(ifosfamide)、伊马替尼(imatinib)、伊立替康(irinotecan)、伊浓替康(ironotecan)、来曲唑(letrozole)、甲酰四

氢叶酸 (leucovorin)、亮丙瑞林 (leuprolide)、左旋咪唑 (levamisole)、洛莫司汀 (lomustine)、二氯甲基二乙胺 (mechlorethamine)、甲羟孕酮 (medroxyprogesterone)、甲地孕酮 (megestrol)、美法仑 (melphalan)、巯基嘌呤 (mercaptopurine)、美司钠 (mesna)、甲氨蝶呤 (methotrexate)、丝裂霉素 (mitomycin)、米托坦 (mitotane)、米托蒽醌 (mitoxantrone)、尼鲁米特 (nilutamide)、诺考达唑 (nocodazole)、奥曲肽 (octreotide)、奥沙利铂 (oxaliplatin)、紫杉醇 (paclitaxel)、帕米膦酸盐 (pamidronate)、喷司他丁 (pentostatin)、普卡霉素 (plicamycin)、卟吩姆 (porfimer)、丙卡巴肼 (procarbazine)、雷替曲塞 (raltitrexed)、利妥昔单抗 (rituximab)、链脲佐菌素 (streptozocin)、苏拉明 (suramin)、他莫昔芬 (tamoxifen)、替莫唑胺 (temozolomide)、替尼泊苷 (teniposide)、睾酮 (testosterone)、硫鸟嘌呤 (thioguanine)、塞替派 (thiotepa)、二氯二茂钛 (titanocene dichloride)、拓扑替康 (topotecan)、曲妥珠单抗 (trastuzumab)、维甲酸 (tretinoin)、长春碱 (vinblastine)、长春新碱 (vincristine)、长春地辛 (vindesine) 和长春瑞滨 (vinorelbine)。

[0095] 虽然在一些实施方案中纳米颗粒基本上为球形,但纳米颗粒可任选为非球形。

[0096] 有各种物理和化学性质可以影响材料与生物系统相互作用的方式。在基于微粒和纳米颗粒的材料的情况下,颗粒的材料选择、粒度分布和形状分布都是影响颗粒活性的关键参数。先前已经证实,颗粒的大小和形状都可以影响颗粒与身体各种细胞相互作用的方式。例如,颗粒的形状可以影响各种细胞类型摄取颗粒的程度,其中椭圆形颗粒对于细胞而言通常比球形颗粒更难摄取。因此,拉伸颗粒的形状可以减少不需要的颗粒摄取,例如免疫系统细胞对颗粒的摄取,从而延长颗粒在体内的半衰期。粒度也影响细胞摄取颗粒和与颗粒相互作用的能力。因此,可以通过调整颗粒的大小和形状分布来实现基于颗粒的系统的活性优化。

[0097] 在一些实施方案中,纳米颗粒的尺寸和/或用于拉伸颗粒的方法如W0 2013/086500中所公开的那样,其据此通过引用整体并入。

[0098] 在特定实施方案中,三维微粒或纳米颗粒包含长椭球体,其中沿x轴的尺寸(a)大于沿y轴的尺寸(b),并且其中沿y轴的尺寸(b)基本上等于沿z轴的尺寸(c),使得可以通过公式 $a > b = c$ 来描述长椭球体。在其它实施方案中,椭球体是三轴椭球体,其中沿x轴的尺寸(a)大于沿y轴的尺寸(b),并且其中沿y轴的尺寸(b)大于沿z轴的尺寸(c),使得可以通过公式 $a > b > c$ 来描述三轴椭球体。在其它实施例中,椭圆体是扁椭球体,其中沿x轴的尺寸(a)等于沿y轴的尺寸(b),并且其中沿y轴的尺寸(b)大于沿z轴的尺寸(c),使得可以通过公式 $a = b > c$ 来描述扁椭球体。然而,目前公开的不对称颗粒不包括其中 $a = b = c$ 的实施方案。

[0099] 在其它实施方案中,微粒或纳米颗粒的纵横比范围为约1.1至约5。在其它实施方案中,纵横比的范围为约5至约10。在一些实施方案中,纵横比的范围为约1.5至约3.5。

[0100] 在一些实施方案中,颗粒是包封药物货物(诸如本文所述的肽和/或另一种试剂)的微粒。在这些实施方案中,颗粒可以含有或不含有与其表面缀合的肽。在这些实施方案中,颗粒可以提供长效药物贮库,以提供肽的持续释放。示例性颗粒形式包括W0 2014/197892中描述的那些,其据此通过引用并入。在一些实施方案中,颗粒未掺入聚(β -氨基酯)(PBAE),因此聚合物基本上由PLGA-PEG嵌段共聚物组成。这些颗粒可用于眼内注射,例如,作为对黄斑变性(例如,湿性或干性年龄相关性黄斑变性)或糖尿病性黄斑水肿的治疗。在

一些实施方案中,所述货物允许将活性剂的组合递送至所需部位。在一些实施方案中,施用纳米颗粒用于治疗癌症。在这些或其它实施方案中,颗粒的大小(平均直径)在 $1\mu\text{m}$ 至 $500\mu\text{m}$ 的范围内,诸如在约 $1\mu\text{m}$ 至约 $250\mu\text{m}$ 的范围内。根据肽或药物持续释放的持续时间,可以注射颗粒每天约一次至约每六个月一次,或约每周一次或约每月一次。

[0101] 在某些方面,本发明提供了用于预防或治疗患者中涉及Tie-2相关血管通透性或淋巴管完整性的病状的方法。该方法包括以有效降低Tie-2-依赖性血管或淋巴管通透性的量向患者施用胶原蛋白IV衍生的仿生肽或其纳米颗粒制剂。恢复Tie2激活在与水肿或血管通透性相关的病状(包括黄斑水肿、糖尿病性黄斑水肿(DME))和其它病状(包括以急性或慢性炎症为特征的病状)中提供治疗益处。Tie2相关病状包括糖尿病性黄斑水肿、视网膜静脉阻塞、湿性AMD、背景型糖尿病性视网膜病变、癌症(包括用于减少、减缓或预防肿瘤生长或转移)、流感、出血热、脑型疟、阿尔茨海默病、急性呼吸窘迫综合征、肺水肿、哮喘、呼吸道合胞病毒、SARS、肺炎、败血症等。

[0102] 在各个实施方案中,对于血管内皮生长因子(VEGF)阻断或抑制剂疗法难治性的或仅部分响应的病状(包括黄斑水肿、湿性AMD、肿瘤生长或转移),可以递送仿生肽。阻断VEGF的药剂包括阿柏西普(aflibercept)、贝伐单抗(bevacizumab)、雷珠单抗(ranibizumab)和雷莫卢单抗(ramucirumab),以及为减缓或阻断血管生成而施用的类似试剂。靶向VEGF介导的生物活性的其它试剂包括激酶抑制剂,诸如帕唑帕尼(pazopanib)、索拉非尼(sorafenib)、舒尼替尼(sunitinib)、阿西替尼(axitinib)、帕纳替尼(ponatinib)、乐伐替尼(lenvatinib)、凡德他尼(vandetanib)、瑞格非尼(regorafenib)和卡博替尼(cabozantinib)。

[0103] 阿柏西普是一种用于治疗湿性黄斑变性(EYLEA)和转移性结直肠癌(ZALTRAP)的生物制药药物。阿柏西普是VEGF的抑制剂,并且是由来自于人VEGF受体1和2的细胞外结构域的血管内皮生长因子(VEGF)结合部分与人IgG1免疫球蛋白的Fc部分融合组成的重组融合蛋白。阿柏西普与循环VEGF结合并起到“VEGF陷阱”的作用,抑制血管内皮生长因子亚型VEGF-A和VEGF-B以及胎盘生长因子(PGF)的活性,分别抑制脉络膜毛细血管或肿瘤中新血管的生长。

[0104] 贝伐单抗(AVASTIN)是血管生成抑制剂,一种减缓新血管生长的药物。贝伐单抗是通过抑制VEGF-A来阻断血管生成的重组人源化单克隆抗体。施用贝伐单抗用于治疗某些转移癌,包括结肠癌、肺癌(例如,NSCLC)、肾癌、卵巢癌、乳腺癌和成胶质细胞瘤。贝伐单抗还可用于治疗眼病,包括AMD和糖尿病性视网膜病变。

[0105] 雷珠单抗(LUCENTIS)是单克隆抗体片段(Fab),并且施用用于治疗湿性AMD。在玻璃体内注射药物(注入眼部的玻璃体液中),约每月一次。雷珠单抗是通过抑制VEGF A来抑制血管生成的单克隆抗体,与贝伐单抗相似。

[0106] 因此,在一些实施方案中,VEGF抑制剂包含单克隆抗体或其抗原结合部分,或包含人VEGF受体1和/或2的细胞外结构域。例如,仿生肽可以在未成功的VEGF阻断疗法之后施用,即,在未观察到血管生成、淋巴管生成和/或水肿减少的情况下。在一些实施方案中,所述肽作为VEGF阻断疗法的替代物施用。在其它实施方案中,所述肽与VEGF阻断疗法组合,在VEGF阻断方案的同时、之前或之后施用。通过激活Tie2信号传导,仿生肽或肽试剂提供了用VEGF阻滞疗法或单独的VEGF阻断疗法无法观察到的治疗益处。

[0107] 在一些实施方案中,患者患有黄斑水肿。当液体和蛋白质沉积物聚集在眼部黄斑(视网膜的黄色中央区域)上或下方并使其变厚和肿胀时,发生黄斑水肿。黄斑水肿的原因包括慢性或不受控制的2型糖尿病(例如,糖尿病性视网膜病变),其中外周血管,包括视网膜的外周血管,使液体渗漏到视网膜中。其它原因和/或相关病症包括年龄相关性黄斑变性(AMD)、慢性葡萄膜炎、动脉粥样硬化、高血压和青光眼。在一些实施方案中,患者患有视网膜静脉阻塞或处于视网膜静脉阻塞的风险中,这可导致由于局部缺血和水肿引起的视网膜严重损伤和失明。在一些实施方案中,患者接受眼内注射肽或其颗粒制剂,与VEGF阻断疗法组合或作为VEGF阻断疗法的替代物。

[0108] 在一些实施方案中,患者患有流感或处于流感的风险中。流感(“flu”)是由流感病毒引起的感染性疾病。症状包括高烧、流涕、咽喉痛、肌肉痛、头痛、咳嗽和疲劳。这些症状通常在暴露于病毒后两天开始。可以通过检查咽喉、痰或鼻部是否存在病毒来确认感染。抗病毒药物,诸如神经氨酸酶抑制剂(例如,奥司他韦(oseltamivir)等)已用于治疗流感,并且虽然抗病毒药物已显示出适度的益处,但它们必须在感染早期使用(例如,症状出现后不久)才能提供益处。大约33%的流感患者是无症状的。流感症状可在感染后一到两天左右突然开始。通常,第一症状是寒战或畏寒,但在感染早期发烧也很常见。抗病毒治疗虽然有时提供适度的益处,却存在病毒抗性的风险,这在强大的流行毒株中尤其成问题。

[0109] 治疗病毒的有吸引力的替代方案是治疗宿主响应,这不太可能会导致对药物的抗性,并且可以提供更有效的窗口以允许治疗更晚期的疾病。宿主的主要反应之一是炎症响应,其导致肺微血管渗漏和肺损伤,有时导致呼吸衰竭。抑制微血管渗漏的消水肿剂可以改善流感的症状。

[0110] 在一些实施方案中,首先在流感症状出现之前施用肽或包含肽的药物组合物。例如,可以使用检测患者样品中病毒的存在实验室试验来诊断患者患有流感,或者患者在暴露于病毒后处于流感的风险中。暴露可以通过与受感染和/或有症状的个体的密切接触来确定。

[0111] 在其它实施方案中,首先在出现第一流感症状后施用所述肽或药物组合物。在一些实施方案中,在第一流感症状出现后的1至4天(诸如1天或2天)内施用所述肽或药物组合物。根据本发明的这个方面,所述肽减轻肺部与流感病毒相关的水肿,从而改善所述病状的症状和/或严重程度。在一些实施方案中,疾病的总长度可以减少一天、两天、三天、四天或更多天,和/或可以显著降低严重程度和不适。

[0112] 对于患有流感或有流感风险的患者的治疗,可以施用本文所述的肽或药物组合物,每天约1至约5次,诸如每天约1至约3次。在一些实施方案中,肽例如通过粉剂或溶液气溶胶局部施用于肺部,或者在其它实施方案中全身施用。

[0113] 在一些实施方案中,所述肽与一种或多种对流感有活性的抗病毒剂一起施用,或者可替代地与一种或多种抗炎剂一起,作为单独的制剂或作为共同配制的产品施用。示例性抗病毒剂包括**Tamiflu®**(磷酸奥司他韦)、**Relenza®**(扎那米韦(zanamivir))、Rapivab(帕拉米韦(peramivir))、金刚烷胺(amantadine)和金刚乙胺(rimantadine)。抗炎剂包括NSAID,诸如阿司匹林(aspirin)、布洛芬(ibuprofen)、对乙酰氨基酚(acetaminophen)和萘普生(naproxen)。

[0114] 在其它实施方案中,施用所述肽或药物组合物用于治疗阿尔茨海默病或减缓阿尔

茨海默病的进展。血脑屏障 (BBB) 限制血液衍生产物、病原体和细胞进入大脑,这对正常神经元功能和信息处理至关重要。死后组织分析表明阿尔茨海默病中的BBB受损。然而, BBB破坏的时间仍然难以捉摸。具有高时空分辨率以量化活体人脑中的区域性BBB通透性的高级动态对比增强MRI,已经证实海马中的年龄依赖性BBB破坏,海马是一个对学习和记忆至关重要,在阿尔茨海默病中早期受到影响的区域。这些数据表明, BBB破坏是老龄化人脑中开始于海马并且可导致认知障碍的一个早期事件。因此,抑制血脑损伤和由此引起的通透性增加的试剂可以减缓阿尔茨海默病的进展。在一些实施方案中,施用本文所述的肽或组合物维持血脑屏障的完整性,从而减缓或预防阿尔茨海默病的发作或进展。

[0115] 在一些实施方案中,患者正在用至少一种用于治疗阿尔茨海默病的附加试剂进行治疗,所述试剂可选自乙酰胆碱酯酶抑制剂(他克林(tacrine)、卡巴拉汀(rivastigmine)、加兰他敏(galantamine)和多奈哌齐(donepezil))或美金刚(memantine)。

[0116] 对于显示出阿尔茨海默病,尤其是早期疾病的潜在症状的患者的治疗,可以施用本文所述的肽或药物组合物每天约1至约5次,诸如每天约1至约3次以减缓疾病的发作或进展。早期疾病常常可作为学习和记忆障碍增加而被观察到,最终导致确诊。在某些情况下,语言、执行功能、感知(失认症)或活动执行(失用症)的困难比记忆问题更突出。语言问题的特征在于词汇减少和言语流畅性降低,导致口头和书面语言普遍贫乏。

[0117] 在其它实施方案中,患者患有由出血性病毒引起的出血热或出血综合征。这些中最臭名昭著的是埃博拉(Ebola)病毒和马尔堡(Marburg)病毒。患有登革热(Dengue fever)或拉沙热(Lassa fever)的人也会发生出血。在埃博拉病毒中,这种出血综合征在疾病稍晚期发生,通常是在死亡前24至48小时。出血的病例可以是急剧性的,可以从鼻部、口腔和身体的其它孔口发生。大致了解了导致出血的机制:病毒引起肝脏产生的凝血因子上调,凝血因子数量增加引起在小血管中形成凝块,因为肝脏受到病毒攻击,肝脏产生的凝血因子的供给被耗尽,超激活免疫系统会增加引起血管开始出血的炎性蛋白的产生,凝血因子不可用就意味着无法阻止出血。即使没有出血,也会发生许多死亡,但出血患者的死亡率非常高。在首次出现症状后施用的试剂可以终止或减少患者的微脉管系统出血,否则这些患者会进展为显示出血综合征。

[0118] 在一些实施方案中,患者有埃博拉病毒或马尔堡病毒。例如,患者可以有出血热的早期体征,诸如发烧和出血敏感性增加,和/或脸部和胸部潮红、红色或紫色小点(瘀点)。出血热的其它体征和症状包括不适感、肌肉痛、头痛、呕吐和腹泻。在一些实施方案中,确认患者样品中存在埃博拉病毒或其它出血热病毒。在一些实施方案中,患者正在用至少一种抗病毒剂或抗炎剂或用于治疗出血热的试剂(诸如静脉注射利巴韦林)进行治疗。对于患有出血热或有出血热风险的患者的治疗,可以施用本文所述的肽或药物组合物,每天约1至约5次,诸如每天约1至约3次,以减缓所述疾病的进展。

[0119] 在其它实施方案中,患者患有脑型疟(CM)或有脑型疟(CM)的风险。CM是恶性疟原虫(*Plasmodium falciparum*)疟疾最致命的并发症之一,并且占疟疾相关死亡的很大一部分。世界卫生组织(World Health Organization,WHO)将CM定义为昏迷(无法定位疼痛刺激或Blantyre昏迷评分 ≤ 2),在停止发作或对于存在无性恶性疟原虫(*P. falciparum*)寄生虫血症而无其它脑病病因存在的低血糖症进行矫正后持续至少1小时。高达75%的CM相关死亡发生在入院24小时内。多模态磁共振技术如成像、扩散、灌注、血管造影术、光谱法已经表

明在CM中发生血管损伤,包括血脑屏障破坏和出血。这些效应被认为是由炎症过程引起的。Penet等人,(J Neurosci.2005年8月10日;25(32):7352-8)已经表明使用CM小鼠模型,在CM中发生主要是水肿形成以及脑灌注减少,并且伴随缺血代谢特征,及高能磷酸减少和脑乳酸升高。他们还使用血管造影术,为主要血流动力学障碍提供了有说服力的证据。重要的是,他们发现水肿通过压迫脑动脉使缺血进一步恶化,随后导致血流衰竭,这最终成为死亡的原因。这些发现证明炎症和缺血性病变共存,并且证实水肿在实验性脑型疟的致命结果中的主要作用。抑制脑部水肿和/或缺血的试剂可以与直接靶向寄生虫的抗疟疾剂组合使用,以改善对这些患者的治疗。在一些实施方案中,患者接受选自氯喹、甲氟喹、强力霉素(doxycycline)或阿托伐醌(atovaquone)和盐酸氯胍(Malarone)的组的抗疟疾疗法。

[0120] 在这些实施方案中,所述肽维持脑型疟患者的血脑屏障和血管完整性。对于患有脑型疟或有脑型疟风险的患者的治疗,可以施用本文所述的肽或药物组合物,每天约1至约5次,诸如每天约1至约3次,以减缓所述疾病的进展和/或防止死亡。

[0121] 在其它方面,本发明提供了治疗癌症的方法,其包括使肿瘤脉管系统正常化以进行化疗,或预防或减缓肿瘤生长或转移。血管生成已被广泛视为治疗癌症的药物靶标。VEGF及其受体VEGFR2是血管生成的重要介质。贝伐单抗(一种螯合人VEGF的抗体),以及阿柏西普和雷珠单抗,和抑制VEGFR2的小分子酪氨酸激酶抑制剂,已被作为对各种类型的癌症的治疗而施用。除其熟知的促血管生成活性之外,VEGF还通过抑制树突细胞成熟而起到免疫抑制因子的作用。认为肿瘤会产生VEGF以通过减少成熟免疫细胞的数量和调节淋巴细胞内皮运输来吸引新血管系统并抑制免疫系统。在一些实施方案中,癌症对此类试剂无响应(例如,用一种或多种此类试剂治疗后),此类试剂包括阿柏西普、贝伐单抗、雷珠单抗、雷莫卢单抗、帕唑帕尼,索拉非尼,舒尼替尼、阿西替尼、帕纳替尼、乐伐替尼、凡德他尼、瑞格非尼和卡博替尼。

[0122] 在一些实施方案中,癌症是选自以下的肉瘤、癌或实体瘤癌症:生殖系肿瘤、中枢神经系统肿瘤、乳腺癌、前列腺癌、宫颈癌、子宫癌、肺癌、卵巢癌、睾丸癌、甲状腺癌、星形细胞瘤、胶质瘤、胰腺癌、胃癌、肝癌、结肠癌、黑素瘤(包括晚期黑素瘤)、肾癌、膀胱癌、食道癌、喉癌、腮腺癌、胆道癌、直肠癌、子宫内膜癌、鳞状细胞癌、腺癌、小细胞癌、神经母细胞瘤、间皮瘤、肾上腺皮质癌、上皮癌、硬纤维瘤、促纤维增生性小圆细胞瘤、内分泌肿瘤、尤文肉瘤(Ewing sarcoma)家族肿瘤、生殖细胞肿瘤、肝胚细胞瘤、肝细胞癌、淋巴瘤、黑素瘤、非横纹肌肉瘤软组织肉瘤、骨肉瘤、外周原发性神经外胚层肿瘤、成视网膜细胞瘤、横纹肌肉瘤和威尔姆氏瘤(Wilms tumor)。在一些实施方案中,癌症是非小细胞肺癌、黑素瘤、前列腺癌、转移性肾细胞癌。

[0123] 在一些实施方案中,癌症是三阴性乳腺癌(TNBC)、小细胞肺癌(SCLC)、成胶质细胞瘤或肝癌。

[0124] 在各个实施方案中,患者可患有早期癌症(例如,I期或II期),或处于晚期(III期或IV期)。I期癌症局限于身体的一部分。II期癌症是局部晚期癌症,III期癌症也是如此。将癌症指定为II期还是III期可取决于癌症的具体类型。例如,II期可以表示仅膈膜一侧的淋巴结受影响,而III期表示膈膜上方和下方的淋巴结均受影响。因此,II期和III期的具体标准根据诊断而不同。IV期癌症往往已经转移或扩散到其它器官或全身。可以施用所述肽或其颗粒制剂以预防I期或II期癌症进展,或减缓进展或抑制III期或IV期癌症进一步进展。

[0125] 在一些实施方案中,所述癌症是不可切除的,诸如不可切除的肝癌。不可切除的癌症是一种恶性肿瘤,由于转移病灶的数量,或者因为它处于手术危险区域,所以不能通过外科手术去除。

[0126] 在一些实施方案中,所述病状是对癌症化疗之前的血管通透性。例如,仿生肽或肽试剂的方案(例如,1至10个剂量)可以在接受癌症化疗之前至少一周或至少两周施用,以使肿瘤脉管系统和/或肿瘤微环境正常化。示例性化学治疗剂包括氨鲁米特、安吡啶、阿那曲唑、天冬酰胺酶、比卡鲁胺、博来霉素、布舍瑞林、白消安、喜树碱、卡培他滨、卡铂、卡莫司汀、苯丁酸氮芥、顺铂、克拉屈滨、氯膦酸盐、秋水仙碱、环磷酰胺、环丙孕酮、阿糖胞苷、达卡巴嗪、放线菌素D、柔红霉素、双烯雌酚、己烯雌酚、多西紫杉醇、阿霉素、表柔比星、雌二醇、雌莫司汀、依托泊苷、依西美坦、非格司亭、氟达拉滨、氟氢可的松、氟尿嘧啶、氟甲睾酮、氟他胺、吉西他滨、染料木黄酮、戈舍瑞林、羟基脲、伊达比星、异环磷酰胺、伊马替尼、干扰素、伊立替康、伊浓替康、来曲唑、甲酰四氢叶酸、亮丙瑞林、左旋咪唑、洛莫司汀、二氯甲基二乙胺、甲羟孕酮、甲地孕酮、美法仑、巯基嘌呤、美司钠、甲氨蝶呤、丝裂霉素、米托坦、米托蒽醌、尼鲁米特、诺考达唑、奥曲肽、奥沙利铂、紫杉醇、帕米膦酸盐、喷司他丁、普卡霉素、吡吩姆、丙卡巴肼、雷替曲塞、利妥昔单抗、链脲佐菌素、苏拉明、他莫昔芬、替莫唑胺、替尼泊苷、睾酮、硫鸟嘌呤、塞替派、二氯二茂钛、拓扑替康、曲妥珠单抗、维甲酸、长春碱、长春新碱、长春地辛和长春瑞滨等。在一些实施方案中,仿生肽或肽试剂通过肠胃外施用来施用,包括在一些实施方案中在肿瘤内施用。

[0127] 在一些实施方案中,患者患有涉及淋巴功能障碍的炎性病状,包括淋巴管炎(淋巴管炎症)和淋巴水肿(组织中淋巴液慢性汇集,这可以是一些外科手术的副作用)。淋巴系统在体内发挥三大功能:将多余的间质液和蛋白质排回到体循环;通过细胞和体液机制调节免疫响应;和从肠道吸收脂质。在恶性肿瘤、先天性畸形、胸部和腹部手术、创伤和感染性疾病之后见到淋巴病症。在手术室和重症监护室中遇到许多淋巴病症。施用所述肽可以帮助恢复或防止淋巴管完整性的持续下降。

[0128] 在一些实施方案中,所述病状是毛细血管渗漏综合征。全身性毛细血管渗漏综合征是液体和蛋白质从毛细血管中泄漏并流入周围组织,导致危险的低血压的一种病状。发作经常持续数天,需要紧急救护。

[0129] 在一些实施方案中,所述病状为败血症。败血症是在身体对感染的响应损伤其自身的组织和器官时出现的一种危及生命的病状。败血症是由感染触发的免疫响应引起的。感染最常见的是细菌,但也可来自于真菌、病毒或寄生虫。原发性感染的常见位置包括肺、脑、尿道、皮肤和腹部器官。败血症通常用静脉注射液和抗生素治疗。疾病严重程度部分决定了结果,具有高死亡风险。施用所述肽可以帮助恢复或防止血管完整性的持续下降以改善所述病状。

[0130] 在一些实施方案中,所述病状涉及急性或慢性肺部炎症,诸如急性呼吸窘迫综合征(ARDS)、急性肺损伤(ALI)、慢性哮喘或慢性阻塞性肺病(COPD)。在此类实施方案中,肽组合物可通过吸入局部施用或全身施用。

[0131] 急性呼吸窘迫综合征(ARDS)的特征在于广泛的肺部炎症,并且可由诸如创伤、肺炎和败血症等病理触发。ARDS是由肺部急性损伤引起的肺水肿形式,其导致微观气囊溢流,造成与肺中的毛细血管交换气体。在ARDS中,这些变化不是由于心力衰竭引起的。临床综合

征与病理学发现相关,包括肺炎、嗜酸细胞性肺炎、隐源性机化性肺炎、急性纤维机化性肺炎和弥漫性肺泡损伤(DAD)。其中,最常与ARDS相关的病理是DAD,其特征在于肺组织的弥漫性炎症。触发对组织的损害通常导致化学信号和局部上皮细胞和内皮细胞分泌的其它炎症介质的初次释放。炎症,诸如由败血症引起的炎症,引起内皮功能障碍、液体从毛细血管渗漏和肺部液体排出受损。在该阶段,提高吸入氧浓度常常成为必要,并且可以促进免疫细胞中的“呼吸爆发”。在第二阶段,内皮功能障碍引起细胞和炎性渗出物进入肺泡。这种肺水肿增加了肺泡毛细血管间隙的厚度,从而增加了氧气必须扩散到达血液中的距离,这会损害气体交换,导致缺氧,增加了呼吸功并最终诱导气室纤维化。

[0132] 在一些实施方案中,患者患有非心源性肺水肿,其任选地与哮喘或慢性阻塞性肺病(COPD)相关。

[0133] 在一些实施方案中,所述病状为血管性水肿或荨麻疹。血管性水肿是真皮、皮下组织、粘膜和粘膜下组织快速肿胀。荨麻疹,通常称为麻疹,发生在真皮上层。血管性水肿快速发展的病例是医疗紧急情况,因为可发生气道阻塞和窒息。在一些实施方案中,施用所述肽可以降低症状的严重程度。

[0134] 在一些实施方案中,患者患有血管渗漏综合征,其任选为免疫疗法的副作用。毛细血管渗漏综合征的特征在于自我逆转事件,认为在此期间衬于毛细血管的内皮细胞会分开几天,允许液体从循环系统渗漏到间隙,导致危险的血压过低(低血压)、血浓缩和白蛋白减少。

[0135] 在本公开的某些方面,本发明提供了制剂(包括颗粒制剂)的肽组合物。所述肽可具有SEQ ID NO:1-36中任一个的氨基酸序列,包括具有选自SEQ ID NO:5至36的序列的衍生肽。在一些实施方案中,所述制剂每单位剂量包含100 μ g至约1000 μ g的肽试剂,并且任选地不涉及包封到颗粒中。在一些实施方案中,所述制剂每单位剂量包含约1mg至约10mg(或在一些实施方案中,1至5mg或1至3mg),并且其可包含颗粒包封,任选地含有游离肽。提供包封肽和游离肽两者的制剂可提供初始剂量(例如,在100 μ g至约1000 μ g的范围内),而包封肽在几个月(例如,3至6个月或更长时间)内提供持续释放。在一些实施方案中,所述肽试剂具有SEQ ID NO:1、2、3或4的序列。

[0136] 如说明书和所附权利要求书中所用,除非上下文另外明确指出,否则单数形式“一”、“一种(个)”和“所述(该)”包括复数指示物。

[0137] 除非特别陈述或由上下文明显看出,否则如本文所用,术语“或”应理解为包括性的并且覆盖“或”和“和”两者。

[0138] 除非特别陈述或由上下文明显看出,否则如本文所用,术语“约”应理解为在本领域的正常公差范围内,例如正负10%。

[0139] 现将根据以下非限制性实施例进一步描述本发明。

[0140] 实施例

[0141] 在下面的实施例中,使用示例性整联蛋白结合性仿生肽AXT107来描述整联蛋白对Ang-Tie信号传导的调节功能。AXT107是衍生自IV型胶原蛋白的序列的二十聚体肽。AXT107与整联蛋白 $\alpha_5\beta_1$ 和整联蛋白 $\alpha_v\beta_3$ 紧密结合并至少破坏生长因子受体VEGFR2、cMet、PDGFR β 和IGF1R的活性(Lee等人,Sci Rep.2014;4:7139)。

[0142] 如本文所述,发现AXT107通过涉及Ang2和Tie2的新型机制抑制血管渗漏。AXT107

强烈促进Ang2的激动剂活性,导致内皮细胞中Tie2、Akt和Stat3的磷酸化增加,以加强脉管系统中内皮细胞之间的屏障。AXT107破坏IGF1R和 β_1 整联蛋白之间的相互作用并增强VEGFR2体外降解并抑制体内新生血管的生长和通透性。

[0143] 以下实施例证明用示例性整联蛋白结合性仿生肽处理使Ang2对体外和体内Tie2通常较弱的激动活性增强并特异性激活与EC存活和屏障功能相关的下游靶标。在机理上,AXT107处理使 α_5 整联蛋白和 β_1 整联蛋白解离,导致EC-EC连接处的Tie2易位和激活,并通过重组组织F-肌动蛋白和VE-钙粘蛋白而降低单层通透性。

[0144] 实施例1:AXT107强烈促进Ang2的激动剂活性

[0145] Tie2受体酪氨酸激酶信号传导途径及其配体血管生成素1 (Ang1) 和血管生成素2 (Ang2) 调节血管通透性,在黄斑水肿患者,包括患有视网膜静脉阻塞 (RVO)、糖尿病性黄斑水肿 (DME)、湿性年龄相关性黄斑变性 (湿性AMD) 和背景型糖尿病性视网膜病变 (DR) 的患者中血管通透性均受损。Ang1结合Tie2并刺激磷酸化和下游信号传导,从而稳定血管 (1,2)。Ang2与Ang1竞争结合Tie2,从而降低Tie2的磷酸化,并因此它充当内源性Tie2拮抗剂 (3)。缺血或缺氧视网膜产生高水平的Ang2 (4),并且在DME患者的眼部中,与VEGF水平一样,Ang2水平增加 (5)。Ang2增加视网膜血管对VEGF的响应性并促进血管渗漏和新血管形成 (6-9)。这些结果表明,恢复Tie2激活可以在与水肿相关 (包括黄斑水肿、DME等) 的病状中提供益处。

[0146] Tie2还可以调节淋巴管完整性,尤其是在炎症期间。具体而言,增强Tie2磷酸化的分子可以潜在地用于治疗炎症期间的淋巴功能障碍 (10)。

[0147] 其它数据表明,Ang2也可以充当Tie2的弱激动剂,尤其是当Ang1水平较低时 (11)。外源性Ang2激活内皮细胞 (EC) 中的Tie2和促迁移性、促活性PI3K/Akt途径,但具有比外源性Ang1更低的效力和更低的亲和力。EC产生Ang2但不产生Ang1。这种内源性Ang2维持Tie2、磷脂酰肌醇3-激酶和Akt活性,并促进EC存活、迁移和管形成。

[0148] AXT107是一种整联蛋白结合性抗血管生成仿生肽,其抑制多种促血管生成途径的信号传导,包括VEGF、PDGF、HGF和IGF1;它代表一类胶原蛋白IV衍生的仿生肽。抑制这些途径抑制了新血管形成,并且抑制VEGF途径尤其抑制了血管渗漏。如本文所述,发现AXT107通过涉及Ang2和Tie2的新型机制抑制血管渗漏。通常,在DME患者中VEGF水平和Ang2水平均增加,并且它们协调促进新血管形成和血管通透性。如图1所示,AXT107 (在图中标识为SP2043) 强烈促进Ang2的激动剂活性,导致内皮细胞中Tie2、Akt和Stat3的磷酸化增加,以加强脉管系统中内皮细胞之间的屏障。

[0149] 用EBM-2使汇合的单层人微血管内皮细胞 (HMEC) 进行血清饥饿过夜。用浓度为0、10、32和100 μ M的AXT107处理90分钟后,用1mM原钒酸钠处理细胞15分钟。接下来用血管生成素-2 (Ang-2) 以200ng/mL处理细胞15分钟。细胞裂解后,将裂解物针对pTie2 (Y992)、pSTAT3 (Y705) 和pAkt (S473) 进行免疫印迹。

[0150] 该结果表明AXT107和来自该类别的其它肽可通过同时抑制VEGF和其它促血管生成生长因子以及通过经由增加Ang2作为激动剂的效力而促进Tie2磷酸化来抑制患有DME和其它形式的黄斑水肿的患者中的血管渗漏。这也应用于血管通透性可能很重要的其它疾病,诸如癌症、流感、出血热、脑型疟等,其中水肿是通过增强Tie2信号传导活性的主要促成因素。

[0151] 参考文献

[0152] 1.Suri C,Jones PF,Patan S,et al.,Requisite role of angiopoietin-1,a ligand for the TIE2 receptor,during embryonic angiogenesis.Cell 1996;87:1171-80.

[0153] 2.Thurston G,Suri C,Smith K,et al.,Leakage-resistant blood vessels in mice transgenically overexpressing angiopoietin-1.Science 1999;286:2511-4.

[0154] 3.Maisonpierre PC.Suri C,Jones PF,et al.,Angiopoietin-2,a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis.Science 1997;277:55-60

[0155] 4.Hackett SF,Ozaki H,Strauss RW,et al.,Angiopoietin 2 expression in the retina:upregulation during physiologic and pathologic neovascularization.J Cell Physiol 2000;184:275-84.

[0156] 5.Patel JI,Hykin PG,Gregor ZJ,et al.,Angiopoietin concentrations in diabetic retinopathy.Br J Ophthalmol 2005;89:480-3.

[0157] 6.Hackett SF.Wiegand SJ.Yancopoulos G,Campochiaro P.Angiopoietin-2 plays an important role in retinal angiogenesis.J Cell Physiol 2002;192:182-7.

[0158] 7.Oshima Y,Dcering T,Oshima S,et al.,Angiopoietin-2 enhances retinal vessel sensitivity to vascular endothelial growth factor.J Cell Physiol 2004;199:412-7.

[0159] 8.Oshima Y.Oshima S,Nambu H,et al.,Different effects of angiopoietin-2 in different vascular beds:new vessels are most sensitive.FASEB J 2005;19:963-5.

[0160] 9.Rangasamy S,Srinivasan R,Maestas J,et al.,A potential role for angiopoietin 2 in the regulation of the blood-retinal barrier in diabetic retinopathy.Invest Ophthalmol Vis Sci 2011;52:3784-91.

[0161] 10.Kajiyama,K.Kidoya,H.,Sawane,M,Matsumoto-Okazaki,Y.,Yamanishi.H.,Furuse,M.,and Takakura,N.Promotion of Lymphatic Integrity by Angiopoietin-1/Tie2 Signaling during Inflammation.Am J Pathol 2012,180:1273-1282;DOI:10.1016/J.ajpath.2011.11.008

[0162] 11.Yuan,HT,Khankin,EV,Karunmanchi,SA,Parikh,SM.Angiopoietin 2 Is a Partial Agonist/Antagonist of Tie2 Signaling in the Endothelium Mol Cell Biol.2009 Apr,29(8):2011-22.doi:10.1128/MCB.01472-08.Epub 2009 Feb 17.

[0163] 实施例2:AXT107增强Ang2对Tie2的激活

[0164] 在该实施例中,使用示例性整联蛋白结合性仿生肽AXT107研究了整联蛋白对Ang-Tie信号传导的调节功能。

[0165] 为了研究整联蛋白抑制剂AXT107对Tie2信号传导的影响,用不同浓度的AXT107处理纤连蛋白包被的培养皿上汇合的单层微血管内皮细胞(MEC),然后将其暴露于Tie2配体Ang1或Ang2。单独的Ang1诱导Tie2磷酸化(数据未示出),而Ang2本身显示出显著的作用(图2A和图2B)。

[0166] 令人惊讶的是,尽管AXT107处理未显著影响Ang1活性(数据未示出),但在用AXT107和Ang2组合处理的细胞中观察到Tie2磷酸化显著的剂量依赖性增加(图2A第一行和图2B左上图)。随着Ang2和AXT107处理,下游促存活效应子STAT3和Akt的磷酸化也增加(图2A第二和第三行和图2B右上图和左下图)。然而,增殖相关因子Erk1/2的磷酸化在所有测试条件下保持不变(图2A第四行和图2B右下图)。对于所有情况,Tie2和下游靶标的总蛋白水平保持不变(数据未示出),并且在没有任一配体的情况下单独的肽不诱导磷酸化。

[0167] AXT107对整联蛋白的抑制显著减少许多RTK例如VEGFR2、c-Met、IGF1R和PDGFR β 的受体磷酸化和下游信号,以及通过增加受体降解来降低总受体水平(Lee等人,Sci Rep.2014;4:7139)。相比之下,AXT107明显增强了体外和体内Ang2对Tie2的激活并且不影响Tie2的总水平,表明对于Tie2而言受体降解增加不像对其它RTK那样发生。

[0168] 这些数据证明,用示例性整联蛋白结合性仿生肽处理使Ang2对Tie2通常较弱的激动活性增强,或将Ang2由Tie2拮抗剂转化为激动剂。因此,AXT107特异性激活与内皮细胞(EC)存活和屏障功能相关的下游靶标。

[0169] 实施例3:AXT107介导的Tie2细胞分布的变化影响受体激活

[0170] 发现AXT107增强Ang2介导的Akt和STAT3磷酸化但未增强ERK1/2磷酸化,表明AXT107特异性激活交界性Tie2而非细胞-细胞外基质(ECM)界面处的Tie2分子。因此,后续实验使用免疫荧光显微术评价AXT107在单层MEC中的细胞-细胞交界处而不是在EC-ECM界面处的作用。

[0171] 发现AXT107在被添加到培养基时会自组装成肽复合物;这种行为与在小鼠眼部中观察到的贮库相似(数据未示出)。在用单独的Ang2处理的样品中(图3A,顶行),磷酸-Tie2主要呈弱的点状分布存在于整个细胞表面。用Ang2和AXT107处理的样品的总荧光强度增加,并且磷酸-Tie2沿着细胞-细胞交界处重新分布成与AXT107肽复合物共定位的大簇(图3A,底部三行)。这些大的磷酸-Tie2簇不太可能是AXT107肽复合物与测试抗体之间非特异性相互作用的结果,因为在没有细胞的区域或用单独的二抗处理的孔中,对于肽复合物而言未观察到绿色荧光信号(数据未示出)。先前的报道强调了簇集在Ang2激活Tie2中的重要性,并且可以解释Ang2对Tie2磷酸化的增强作用以及血管稳定和静止的下游效应子的激活。

[0172] EC-EC交界处的Tie2形成富含肌动蛋白的复合物,该复合物不溶于基于Triton X-100的裂解缓冲液,但当分布在细胞表面上时是可溶的。因此,用AXT107、Ang1和Ang2的各种组合处理MEC单层,并通过它们在基于Triton X-100的裂解缓冲液中的溶解度来分级分离细胞裂解物。还进行了包括VEGF₁₆₅的实验,因为VEGFR2信号传导通常与Tie2的活性起反作用。在每个实验中,均使用100 μ M AXT107,因为它相对于较低浓度的AXT107提供了清晰的结果。

[0173] 与来自免疫荧光测定的观察结果一致(如图3A所示),在用AXT107处理的裂解物的不溶性级分中发现了增加量的Tie2;增加的量不依赖于特定生长因子处理(图3B和3C)。对于Tie1也获得了相似的结果(数据未示出),Tie1是最近证实对于交界性Tie2激活所必需的辅助受体(Korhonen等人,J Clin Invest.2016;126(9):3495-3510)。

[0174] 接下来,进行实验以确定Tie2重新定位到不溶性级分中对于Tie2受Ang2激活是否重要。使Tie2从在含或不合AXT107的情况下暴露于Ang2的分级分离的MEC裂解物中免疫沉

淀,然后针对磷酸-Tie2进行免疫印迹。有趣的是,仅在经肽处理的样品的不溶性级分中观察到磷酸化(图3D)。

[0175] 这些数据表明用AXT107肽处理导致Tie2易位至EC-EC交界处和激活Tie2。

[0176] 实施例4:AXT107破坏 α_5 和 β_1 整联蛋白亚基之间的相互作用

[0177] $\alpha_5\beta_1$ -整联蛋白异二聚体和 $\alpha_v\beta_3$ -整联蛋白异二聚体是AXT107的主要靶标。为了研究整联蛋白介导的调节Tie2的机制的可能性,将分级分离的MEC裂解物针对 α_5 整联蛋白亚基进行免疫印迹,揭示了一部分 α_5 整联蛋白亚基重新定位到用AXT107处理的样品中的不溶性级分中(图4A和4B);这个结果类似于对Tie2(图3D)和Tie1(数据未示出)观察到的结果。

[0178] 令人惊讶的是,尽管使用长时间暴露和高抗体浓度,但在不溶性级分中从未观察到 β_1 整联蛋白亚基(图4C至4E)。这表明用AXT107处理破坏了整联蛋白异二聚体中 α_5 整联蛋白亚基和 β_1 整联蛋白亚基之间的相互作用。因为 β_1 整联蛋白是唯一已知会与 α_5 整联蛋白亚基异二聚化的 β 亚基,所以这里在不溶性级分中观察到的 α_5 亚基不太可能来源于除 $\alpha_5\beta_1$ 以外的异二聚体整联蛋白。不幸的是,高本底削弱了通过免疫荧光对单独的 α_5 整联蛋白的可视化。考虑到AXT107使整联蛋白异二聚体解离这一意外发现,在几项独立测定中证实了这一发现。对Triton X-100分级分离的裂解物中 α_5 整联蛋白的免疫沉淀揭示,虽然在AXT107处理后可以在不溶性级分中观察到 α_5 整联蛋白,但是仅在可溶性级分中发现与 β_1 的相互作用(数据未示出)。因此,Tie2和异二聚化 $\alpha_5\beta_1$ 整联蛋白之间的相互作用似乎使Tie2保留在EC-ECM界面处。这与在没有 α_5 亚基的情况下Tie2不与 β_1 整联蛋白相互作用的报道一致(Cascone等人, *J Cell Biol.* 2005;170 (6):993-1004);这些整联蛋白异二聚体的破坏允许在EC-EC交界处和在大簇中形成含Tie2的复合物。

[0179] 另外, α_5 和 β_1 亚基之间的相互作用的变化使用Duolink™技术进一步研究,所述技术可以通过荧光显微术使 α_5 和 β_1 整联蛋白亚基之间单独相互作用可视化为不同斑点。与来自Triton X-100分级分离研究的结果一致(图4A至4E),与单独的媒介物相比,在用AXT107处理的单层中 α_5 和 β_1 整联蛋白亚基之间的相互作用显著减少(图4F和图4G)。

[0180] 最后,确定 α_5 整联蛋白亚基在与 β_1 整联蛋白解离后是否仍与Tie2复合。如图4H和图4I所示, α_5 整联蛋白可在Tie2免疫沉淀后在经肽处理的不溶性级分中观察到。

[0181] 这些数据表明用AXT107肽处理使 α_5 整联蛋白和 β_1 整联蛋白亚基从异二聚体解离。

[0182] 有趣的是,已经证实敲低(knockdown) β_1 整联蛋白会减少Akt磷酸化;这与来自 α_5 整联蛋白敲低或肽处理的结果形成对比。作为一种可能的解释, β_1 是整联蛋白中最混杂的,并且与相对特异性 α_5 整联蛋白敲低或整联蛋白水平保持不变但受到抑制的情况相比, β_1 蛋白水平降低可影响更多的Tie2依赖性和非Tie2依赖性细胞活性。总的来说,这些发现强调了整联蛋白在优先激活Tie2下游信号传导途径中的重要性。

[0183] 实施例5:用AXT107处理加强并窄化内皮细胞交界

[0184] 已经证明AXT107通过破坏 $\alpha_5\beta_1$ 整联蛋白中亚基之间的相互作用来增强Tie2的激活,进行以下实验以确定这种活性的功能结果。

[0185] Tie2信号传导是血管通透性的主要调节因子,并且已知这种活性的功能障碍会促成黄斑水肿和疾病进展增加。具体地说,Tie2通过与相邻细胞上的Tie2受体形成反式相互作用并且连续沿细胞-细胞交界重新组织VE-钙粘蛋白复合物来加强细胞-细胞交界。

[0186] 与先前关于Ang1激活Tie2的报道一致,在AXT107和Ang2处理3小时后,VE-钙粘蛋

白的总水平保持不变(图5A)。然而,免疫荧光成像揭示了VE-钙粘蛋白交界结构的明显变化。如图5B所示,在较低浓度下,VE-钙粘蛋白的分布在外观上不连续且为锯齿状,但随着AXT107浓度的增加逐渐变得更平滑。这些交界的锯齿状与细胞内肌动蛋白的结构有关。没有AXT107处理时(图5B,左列),径向肌动蛋白纤维排列在整个细胞中,但随着AXT107浓度的增加而变得更靠皮质(与图5B中其它列做比较;另见图5C)。径向肌动蛋白起到将细胞拉开以增加通透性的作用,而交界性肌动蛋白不会施加相同的拉力,从而导致血管通透性降低。

[0187] 已知Tie2磷酸化会刺激Rap1-GTP酶途径,导致与肌动蛋白重排相关的下游动力蛋白肌球蛋白轻链2(MLC2)的磷酸化减少。如图5D所示,在用AXT107和Ang2处理后,MLC2磷酸化以剂量依赖性方式减少。

[0188] 内皮细胞交界处VE-钙粘蛋白、肌动蛋白和Tie2通过AXT107重新组织表明用肽处理使细胞间相互作用稳定。这些交界的完整性对于通过控制细胞间开口的大小来调节单层通透性也很重要。通过FITC标记的葡聚糖穿过接种到可渗透Transwell®基质上的MEC单层的经内皮扩散情况进一步研究AXT107对EC通透性的影响。该测定的示意图示于图5F。

[0189] 如图5G所示,用单独的Ang2或AXT107处理影响FITC-葡聚糖穿过单层的扩散,而VEGF处理似乎单独地或与Ang2组合增加通透性(但不显著)。有趣的是,与单独用生长因子处理的细胞相比时,单独或与VEGF组合添加Ang2到用100 μ M AXT107预孵育的单层中显示FITC-葡聚糖向顶部腔室中的扩散显著减少。在存在和不存在肽的情况下,在VEGF中处理的单层之间也观察到类似但不显著的趋势。

[0190] 这些数据证明,用AXT107肽处理通过重新组织F-肌动蛋白和VE-钙粘蛋白而导致单层通透性降低。

[0191] 整联蛋白相互作用在调节Tie2信号传导中的重要性表明,可能存在这种相互作用在生物体内发生的天然机制。已经证实用软骨寡聚基质蛋白(COMP)-Ang1处理EC会诱导Tie2的交界性重新定位,表明它可以通过尚未知的机制刺激Tie2与 β 1整联蛋白解离。有趣的是,发现Ang1和Ang2的C末端的差异会改变它们与 β 1整联蛋白的相互作用,因此 β 1整联蛋白只可以被Ang2激活。

[0192] 不希望受理论约束,本文公开的数据提供了AXT107介导的Tie2激活的模型。如图6顶部所示,在没有AXT107的情况下(1) Ang2弱激活在EC-ECM界面处与整联蛋白 α ₅ β ₁异二聚体复合的Tie2,(2) 其优先激活增殖信号(例如,ERK1/2)。(3) 活性MLC激酶(MLCK)激活MLC3并导致在细胞内形成径向肌动蛋白应力纤维和在EC-EC细胞交界处形成张力。但是,在存在AXT107的情况下,在图6底部,(4) α ₅整联蛋白与 β ₁整联蛋白分开并且(5) 连同Tie2一起迁移到EC-EC交界处,以跨越交界处形成大的复合物和/或反式相互作用。(6) 这些复合物增强Tie2的磷酸化并激活(7) Akt-和STAT3-介导的存活途径。另外,(8) MLC磷酸酶经由RAP1或RAC1途径激活,导致MLC2活性降低、皮质肌动蛋白增加且交界稳定化。

[0193] 实施例6:在体内,示例性整联蛋白结合性仿生物增强Tie2磷酸化

[0194] 为研究AXT107对体内Tie2激活的影响,使用早产儿视网膜病变(ROP)小鼠模型。在该系统中,将P7幼崽置于75%O₂中5天,导致视网膜毛细血管密度因氧过多而降低,以及在幼崽恢复常氧条件后快速诱导新血管形成。这里,使用眼脉管系统模型证明了所述肽的体内潜力。玻璃体中Ang2水平提高促成各种视网膜病变中的血管渗漏和黄斑水肿。

[0195] 以上实施例中使用了以下示例性方法和材料:

[0196] 细胞培养和试剂

[0197] 在37℃和5%CO₂下将人真皮微血管内皮细胞(Lonza)维持在EBM-2MV培养基(Lonza)中并且在第2代至第7代之间使用。在适用情况下,使细胞在没有补充剂的EBM-2培养基(Lonza)中血清饥饿。对于FITC-葡聚糖通透性测定,使用无酚红培养基以避免自发荧光。AXT107在New England Peptide通过固态合成生产、冻干并溶于100%DMSO中。稀释后,优选DMSO浓度不超过0.25%。

[0198] 蛋白质印迹

[0199] 对于Ang1/2信号传导研究,将细胞培养皿(直径10cm)在37℃下用5μg/ml纤连蛋白(FN1;Sigma-Aldrich,St.Louis,MO)包被2小时。然后通过抽吸去除FN1溶液,并在EGM-2MV培养基(Lonza)中涂铺5x10⁶个微血管内皮细胞(MEC;Lonza,Walkersville,MD)并在37℃下培养48小时。然后将细胞在无血清EGM-2基础培养基(Lonza)中血清饥饿16小时。随后向每种培养物中添加AXT107(如所示,0-100μM)并在37℃下孵育75分钟。然后将培养物用1mM钒酸钠(New England Biolabs,Ipswich,MA)处理15分钟以增强磷酸-Tie2信号,接着用200ng/ml血管生成素(R&D Systems,Minneapolis,MN)再刺激15分钟。然后将细胞转移到冰上,用冰冷的含有Ca²⁺和Mg²⁺的Dulbecco磷酸盐缓冲液(dPBS)洗涤两次,并通过刮削收集到500μl的1x蓝色上样缓冲液(Cell Signaling,Danvers,MA)中。然后将裂解物样品进行超声处理、煮沸并通过SDS-PAGE解析。使用以下一抗通过蛋白质印迹来鉴定特异性蛋白质:Cell Signaling-磷酸-Tie2(Y992)(产品目录号:4221)、Tie2(产品目录号:7403)、磷酸-Stat3(Y705)(产品目录号:4113)、Stat3(产品目录号:4904)、磷酸-Akt(S473)(产品目录号:4058)、Akt(产品目录号:9272)、磷酸-p44/42MAPK(T202/Y204)(产品目录号:4370)、p44/42 MAPK(产品目录号:4695);BD Transduction Laboratories-β₁整联蛋白(产品目录号:610467);Millipore-α₅整联蛋白(产品目录号:AB1928),并用HRP缀合的山羊抗兔和绵羊抗小鼠二抗(GE healthcare)检测。

[0200] Triton X-100分级分离

[0201] 使用对先前描述的程序修改来进行Triton X-100可溶性和不溶性级分的分离(参见例如,Lampugnani等人,J Cell Biol.1995;129(1):203-217)。用2.5x10⁶个细胞接种FN1包被的六孔板并如上所述,培养48小时。然后将培养物在EBM-2培养基中血清饥饿90分钟,用100μM AXT107或DMSO媒介物处理,并用1mM钒酸钠处理15分钟。然后用100ng/ml VEGFA、400ng/ml Ang2或PBS刺激细胞15分钟。然后将板转移到冰上并用含有Ca²⁺和Mg²⁺的冷dPBS洗涤两次并且用EBM-2培养基洗涤两次。然后去除培养基并将细胞在冰上,在4℃下在200μl TritonX-100提取缓冲液(10mM Tris-HCl,pH7.5;150mM NaCl;2mM CaCl₂;1%NP-40;1% Triton C-100;和蛋白酶抑制剂混合物(Cell Signaling,产品目录号:5871))中边偶尔搅拌边孵育30分钟。将提取缓冲液轻轻收集并以12,000×g离心5分钟。然后将上清液与125μl 3x蓝色上样染料混合,煮沸并在-20℃下作为Triton X-100可溶性级分保存。将剩余的不溶性级分用洗涤缓冲液(10mM Tris-HCl,pH 7.5;150mM NaCl;cOmplete™迷你蛋白酶抑制剂片剂(Roehe))洗涤两次,并且如上所述,经刮削收集在375μl 1x蓝色上样染料中,接着离心并煮沸。将该裂解物作为Triton X-100不溶性级分保存在-20℃下。如上所述通过蛋白质印迹分析样品。

[0202] 对于下拉变异,改为将不溶性级分收集在用蛋白酶和磷酸酶抑制剂混合物(Cell

Signaling) 和5mM EDTA处理的RIPA缓冲液(Sigma)中。将裂解物短暂超声处理并用抗Tie2 (Cell Signaling, 产品目录号:4224) 或抗 α_5 整联蛋白(Millipore; 产品目录号:AB1928) 边翻滚式混合(end-over-end mixing) 边孵育1小时。随后, 添加20 μ l 蛋白琼脂糖A/G珠粒(Santa Cruz) 并将样品再孵育1小时。将珠粒通过在1,500xg和4 $^{\circ}$ C下离心收集, 用PBS洗涤4次, 重悬于基于SDS的蓝色上样染料(Cell Signaling) 中, 煮沸并通过SDS-PAGE解析。

[0203] 免疫荧光

[0204] 在37 $^{\circ}$ C下将具有半孔大小的玻璃底96孔板用10 μ g/ml FN1包被2小时。然后通过抽吸去除FN1溶液, 并为板接种 4×10^3 个于EGM-2MV培养基中的MEC。二十四小时后, 将细胞用含有 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 的dPBS洗涤一次以去除死细胞, 并让细胞再生长二十四小时。对于持续3小时的治疗(即VE-钙粘蛋白), 将细胞用含有 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 的dPBS洗涤两次并在EBM-2中血清饥饿90分钟。然后去除培养基, 并用100 μ l 含有200ng/ml Ang2或PBS和不同浓度的AXT107或DMSO的EBM-2培养基处理细胞3小时。对于处理15分钟的样品(即磷酸-Tie2), 将细胞在EBM-2培养基中血清饥饿165分钟, 在EBM-2中与不同浓度的AXT107或DMSO一起孵育90分钟, 最后用200ng/ml Ang2或PBS(补充有肽以保持相同浓度) 刺激15分钟。选择这些时间使得两个处理程序同时完成。然后将细胞用含有 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 的冷dPBS洗涤两次并在10%中性缓冲福尔马林中固定15分钟。然后去除福尔马林溶液, 将孔在含有 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 的dPBS中洗涤三次。然后将细胞在封闭缓冲液(5%正常山羊血清; 在含有 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 的dPBS中的0.3% Triton X-100) 中封闭并用1:150稀释于抗体稀释缓冲液(1% BSA; 在含有 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 的dPBS中的0.3% Triton X-100) 中的针对磷酸-Tie2(Y992) (R&D Systems; 产品目录号:AF2720) 或VE-钙粘蛋白(Cell Signaling; 产品目录号:2500) 的一抗染色16小时。然后用dPBS将孔洗涤三次, 并用1:300稀释于抗体稀释缓冲液中的Alexafluor 488-缀合的山羊抗兔二抗(Cell Signaling; 产品目录号:4412) 孵育1小时。然后将孔洗涤两次并用1:20稀释于PBS中的Alexafluor555-缀合的鬼笔环肽(phalloidin) (Cell Signaling; 产品目录号:8953) 染色20分钟。然后将细胞在dPBS中再洗涤两次, 用DAPI染色20分钟, 并用dPBS交换溶液用于成像。使用BD途径855系统和Attovision软件(BD Biosciences) 对细胞成像。

[0205] Duolink蛋白质相互作用分析

[0206] 如以上对于免疫荧光实验所述, 玻璃底96孔板用FN1包被, 接种MEC。生长48小时后, 将细胞血清饥饿3小时, 用100 μ M AXT107或DMSO媒介物处理90分钟, 用含有 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 的dPBS洗涤两次, 并在10%中性缓冲福尔马林中固定。将细胞在5%正常山羊血清; 在含有 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 的dPBS中的0.3% Triton X-100中封闭1小时并在4 $^{\circ}$ C下与兔抗 α_5 整联蛋白和小鼠抗 β_1 整联蛋白抗体在含有 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 及1% BSA和0.1% Triton X-100的PBS中一起孵育过夜。使用DUOLINK绿色检测试剂根据制造商的说明使相互作用斑点显影, 并使用BD途径855系统检测所述相互作用斑点。

[0207] FITC transwell通透性测定

[0208] 将Transwell, 二十四孔插入物(Corning) 用7.5 μ g/cm²FN1在37 $^{\circ}$ C下包被2小时, 抽吸, 然后在室温下干燥30分钟。然后为孔接种在100 μ l的EBM-2培养基(不含酚红) 中的 7.5×10^4 个MEC并使其在室温下静置30分钟。然后将1ml EGM-2培养基添加到底部腔室中, 并将另外200 μ l添加到顶部腔室中。将板在37 $^{\circ}$ C下孵育24小时, 之后抽吸培养基并如上所述, 在每个孔中再涂铺 7.5×10^4 个MEC。在37 $^{\circ}$ C下48小时后, 从两个腔室中抽吸出培养基, 并将细

胞在含有Ca²⁺和Mg²⁺的dPBS中洗涤两次,用EBM-2培养基(不含酚红)洗涤一次并且在37℃下在施加到两个腔室的EBM-2培养基中血清饥饿两小时。这次孵育后,添加100μM AXT107或等量的DMSO媒介物并且再孵育90分钟。在顶部腔室中,然后用200ng/ml Ang2、100ng/ml VEGFA、两者或PBS对照处理细胞,然后在底部腔室中,用25μg/ml FITC-葡聚糖(40kDa MW)处理细胞。还在两个腔室中添加AXT107以维持100μM的浓度。3小时后,从每个孔的顶部腔室取出10μl,并与透明底96孔板中的90μl水混合。使用Perkin Elmer读板仪计算每个样品的荧光值。

[0209] 参考文献

[0210] Eklund L, Kangas J and Saharinen P. Angiopoietin-Tie signalling in the cardiovascular and lymphatic systems. *Clin Sci (Lond)*. 2017;131(1):87-103.

[0211] Saharinen P, Eklund L and Alitalo K. Therapeutic targeting of the angiopoietin-TIE pathway. *Nat Rev Drug Discov*. 2017.

[0212] Davis S, Aldrich TH, Jones PF, Acheson A, Compton DL, Jain V, Ryan TE, Bruno J, Radziejewski C, Maisonpierre PC and Yancopoulos GD. Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning *Cell*. 1996;87(7):1161-1169.

[0213] Saharinen P, Eklund L, Miettinen J, Wirkkala R, Anisimov A, Winderlich M, Nottebaum A, Vestweber D, Deutseh U, Koh GY, Olsen BR and Alitalo K. Angiopoietins assemble distinct Tie2 signalling complexes in endothelial cell-cell and cell-matrix contacts. *Nat Cell Biol*. 2008;10(5):527-537.

[0214] Frye M, Dierkes M, Kuppers V, Vockel M, Tomm J, Zeuschner D, Rossaint J, Zarbock A, Koh GY, Peters K, Nottebaum AF and Vestweber D. Interfering with VE-PTP stabilizes endothelial junctions in vivo via Tie-2 in the absence of VE-cadherin. *J Exp Med*. 2015;212(13):2267-2287.

[0215] Dalton AC, Shlamkovitch T, Papo N and Barton WA. Constitutive Association of Tie1 and Tie2 with Endothelial Integrins is Functionally Modulated by Angiopoietin-1 and Fibronectin. *PLoS One*. 2016;11(10):e0163732.

[0216] Fiedler U, Scharpfenecker M, Koidl S, Hegen A, Grunow V, Schmidt JM, Kriz W, Thurston G and Augustin HG. The Tie-2 ligand angiopoietin-2 is stored in and rapidly released upon stimulation from endothelial cell Weibel-Palade bodies. *Blood*. 2004;103(11):4150-4156.

[0217] Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C, Compton D, McClain J, Aldrich TH, Papadopoulos N, Daly TJ, Davis S, Sato TN and Yancopoulos GD. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science*. 1997;277(5322):55-60.

[0218] Benest AV, Kruse K, Savant S, Thomas M, Laib AM, Loos EK, Fiedler U and Augustin HG. Angiopoietin-2 is critical for cytokine-induced vascular leakage. *PLoS One*. 2013;8(8):e70459.

[0219] Tabruyn SP, Colton K, Morisada T, Fuxe J, Wiegand SJ, Thurston G, Coyle AJ,

Connor J and McDonald DM. Angiopoietin-2-driven vascular remodeling in airway inflammation. *Am J Pathol.* 2010;177 (6) :3233-3243.

[0220] Daly C, Pasnikowski E, Burova E, Wong V, Aldrich TH, Griffiths J, Ioffe E, Daly TJ, Fandl JP, Papadopoulos N, McDonald DM, Thurston G, Yaneopoulos GD and Rudge JS. Angiopoietin-2 functions as an autocrine protective factor in stressed endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103 (42) :15491-15496

[0221] Yuan HT, Khankin EV, Karumanchi SA and Parikh SM. Angiopoietin 2 is a partial agonist/antagonist of Tie2 signaling in the endothelium. *Mol Cell Biol.* 2009;29 (8) :2011-2022.

[0222] Korhonen EA, Lampinen A, Giri H, Anisimov A, Kim M, Allen B, Fang S, D'Arnico G, Sipila TJ, Lohela M, Strandin T, Vahcric A, Yla-Herttuala S, Koh GY, McDonald DM, Alitalo K, et al., Tiel controls angiopoietin function in vascular remodeling and inflammation. *J Clin Invest.* 2016;126 (9) :3495-3510.

[0223] Shen J, Frye M, Lee BL, Reinardy JL, McClung JM, Ding K, Kojima M, Xia H, Seidel C, Lima e Silva R, Dong A, Hackett SF, Wang J, Howard BW, Vestweber D, Kontos CD, et al., Targeting VE-PTP activates TIE2 and stabilizes the ocular vasculature. *J Clin Invest.* 2014;124 (10) :4564-4576.

[0224] Singh H, Milner CS, Aguilar Hernandez MM, Patel N and Brindle NP. Vascular endothelial growth factor activates the Tie family of receptor tyrosine kinases. *Cell Signal.* 2009;21 (8) :1346-1350.

[0225] Cascone I, Napione L, Maniero F, Serini G and Bussolino F. Stable interaction between alpha5beta1 integrin and Tie2 tyrosine kinase receptor regulates endothelial cell response to Ang-1. *J Cell Biol.* 2005;170 (6) :993-1004.

[0226] Lee E, Lee SJ, Koskimaki JE, Han Z, Pandey NB and Popel AS. Inhibition of breast cancer growth and metastasis by a biomimetic peptide. *Sci Rep.* 2014;4: 7139.

[0227] Karagiannis ED and Popel AS. A systematic methodology for proteome-wide identification of peptides inhibiting the proliferation and migration of endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105 (37) :13775-13780.

[0228] Chen TT, Luque A, Lee S, Anderson SM, Scgura T and Iruela-Arispe ML. Anchorage of VEGF to the extracellular matrix conveys differential signaling responses to endothelial cells. *J Cell Biol.* 2010;188 (4) :595-609.

[0229] Soldi R, Mitola S, Strasly M, Defilippi P, Tarone G and Bussolino F. Role of alpha5beta3 integrin in the activation of vascular endothelial growth factor receptor-2. *EMBO J.* 1999;18 (4) :882-892.

[0230] Veevers-Lowe J, Ball SG, Shuttleworth A and Kielty CM. Mesenchymal stem cell migration is regulated by fibronectin through alpha5beta1-integrin-mediated activation of PDGFR-beta and potentiation of growth factor signals. *J*

Cell Sci.2011;124(Pt 8):1288-1300.

[0231] Rahman S,Patel Y,Murray J,Patel KV,Sumathipala R,Sobel M and Wijelath ES.Novel hepatocyte growth factor(HGF)binding domains on fibronectin and vitronectin coordinate a distinct and amplified Met-integrin induced signalling pathway in endothelial cells.BMC Cell Biol.2005;6(1):8.

[0232] Baron V and Schwartz M,Cell adhesion regulates ubiquitin-mediated degradation of the platelet-derived growth factor receptor beta.J Biol Chem.2000;275(50):39318-39323.

[0233] Campochiaro PA,Khanani A,Singer M,Patel S,Boyer D,Dugel P,Kherani S,Withers B,Gambino L,Peters K.Brigell M and Group T-S.Enhanced Benefit in Diabetic Macular Edema from AKB-9778 Tie2 Activation Combined with Vascular Endothelial Growth Factor Suppression.Ophthalmology.2016;123(8):1722-1730.

[0234] Orfanos SE,Kotanidou A,Glynos C,Athanasidou C.Tsigkos S,Dimopoulou L,Sotiropoulou C,Zakynthinos S,Armaganidis A.Papapetropoulos A and Roussos C.Angiopoietin-2 is increased in severe sepsis:correlation with inflammatory mediators.Crit Care Med.2007;35(1):199-206.

[0235] Ziegler T,Horstkotte J,Schwab C,Pfetsch V,Weinmann K,Dietzel S,Rohwedder I,Hinkel R,Gross L,Lee S,Hu J,Soehnlein O,Franz WM,Sprandio M,Pohl U,Thomas M,et al.,Angiopoietin 2 mediates microvascular and hemodynamic alterations in sepsis.J Clin Invest.2013.

[0236] Han S, Lee SJ, Kim KE, Lee HS, Oh N, Park I, Ko E, Oh SJ, Lee YS, Kim D, Lee S, Lee DH, Lee KH, Chae SY, Lee JH, Kim SJ, et al., Amelioration of sepsis by TIE2 activation-induced vascular protection.Sci Transl Med.2016;8(335):335 ra355.

[0237] Lampugnani MG,Corada M,Cavcda L,Breviario F,Ayalon O,Geigcr B and Dejana E.The molecular organization of endothelial cell to cell junctions:differential association of plakoglobin,beta-catenin,and alpha-catenin with vascular endothelial cadherin(VE-cadherin).J Cell Biol.1995;129(1):203-217.

<110> 阿斯克雷佩西治疗公司
约翰·霍普金斯大学

<120> 用于激活 TIE2 信号传导的化合物和方法

<130> AJ3171PT1901

<150> US 62/403,786

<151> 2016-10-04

<160> 36

<170> PatentIn 3.5 版

<210> 1

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0001] <220>

<223> 合成多肽

<400> 1

Leu Arg Arg Phe Ser Thr Ala Pro Phe Ala Phe Ile Asp Ile Asn Asp

1 5 10 15

Val Ile Asn Phe

20

<210> 2

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多肽

<220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (7)..(7)
 <223> M、A 或 G

<220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (9)..(9)
 <223> F、A、Y 或 G

<220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (10)..(10)
 <223> M、A、G、D-丙氨酸或正亮氨酸

<220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (11)..(11)
 <223> F、A、Y、G 或 4-氯苯丙氨酸

[0002] <220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (12)..(12)
 <223> 氨基丁酸、G、S、A、V、T、I、L 或烯丙基甘氨酸

<220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (18)..(18)
 <223> 氨基丁酸、G、S、A、V、T、I、L 或烯丙基甘氨酸

<400> 2

Leu Arg Arg Phe Ser Thr Xaa Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Asn Ile Asn Asn
 1 5 10 15

Val Xaa Asn Phe
 20

<210> 3
 <211> 20
 <212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多肽

<400> 3

Leu Arg Arg Phe Ser Thr Ala Pro Phe Ala Phe Ile Asp Ile Asn Asp

1 5 10 15

Val Ile Asn Phe

20

<210> 4

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

[0003] <223> 合成多肽

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (7)..(7)

<223> M、A 或 G

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (9)..(9)

<223> F、A、Y 或 G

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (10)..(10)

<223> M、A、G、D-丙氨酸或正亮氨酸

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (11)..(11)

<223> F、A、Y、G 或 4-氯苯丙氨酸

<220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (12)..(12)
 <223> 氨基丁酸、G、S、A、V、T、I、L或烯丙基甘氨酸

<220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (18)..(18)
 <223> 氨基丁酸、G、S、A、V、T、I、L或烯丙基甘氨酸

<400> 4

Leu Arg Arg Phe Ser Thr Xaa Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Asp Ile Asn Asp
 1 5 10 15

Val Xaa Asn Phe
 20

[0004]

<210> 5
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> 合成多肽

<220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (12)..(12)
 <223> 2-氨基丁酸

<220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (18)..(18)
 <223> 2-氨基丁酸

<400> 5

Leu Arg Arg Phe Ser Thr Met Pro Phe Met Phe Xaa Asn Ile Asn Asn

1 5 10 15

Val Xaa Asn Phe

20

<210> 6

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多肽

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (12)..(12)

<223> 2-氨基丁酸

[0005]

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (18)..(18)

<223> 2-氨基丁酸

<400> 6

Leu Arg Arg Phe Ser Thr Met Pro Ala Met Phe Xaa Asn Ile Asn Asn

1 5 10 15

Val Xaa Asn Phe

20

<210> 7

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多肽

<220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (12)..(12)
 <223> 2-氨基丁酸

<220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (18)..(18)
 <223> 2-氨基丁酸

<400> 7

Leu Arg Arg Phe Ser Thr Met Pro Phe Ala Phe Xaa Asn Ile Asn Asn
 1 5 10 15

Val Xaa Asn Phe
 20

[0006]

<210> 8
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> 合成多肽

<220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (12)..(12)
 <223> 2-氨基丁酸

<220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (18)..(18)
 <223> 2-氨基丁酸

<400> 8

Leu Arg Arg Phe Ser Thr Met Pro Phe Met Ala Xaa Asn Ile Asn Asn
 1 5 10 15

Val Xaa Asn Phe
 20

- <210> 9
- <211> 20
- <212> PRT
- <213> 人工序列(Artificial Sequence)

- <220>
- <223> 合成多肽

- <220>
- <221> 尚未归类的特征
- <222> (10)..(10)
- <223> 正亮氨酸

[0007]

- <220>
- <221> 尚未归类的特征
- <222> (12)..(12)
- <223> 2-氨基丁酸

- <220>
- <221> 尚未归类的特征
- <222> (18)..(18)
- <223> 2-氨基丁酸

- <400> 9

Leu Arg Arg Phe Ser Thr Met Pro Phe Xaa Phe Xaa Asn Ile Asn Asn
 1 5 10 15

Val Xaa Asn Phe
 20

- <210> 10

<211> 20
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> 合成多肽

<220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (11)..(11)
 <223> 4-氯苯丙氨酸

<220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (12)..(12)
 <223> 2-氨基丁酸

[0008] <220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (18)..(18)
 <223> 2-氨基丁酸

<400> 10

Leu Arg Arg Phe Ser Thr Met Pro Phe Met Xaa Xaa Asn Ile Asn Asn
 1 5 10 15

Val Xaa Asn Phe
 20

<210> 11
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> 合成多肽

<400> 11

Leu Arg Arg Phe Ser Thr Met Pro Phe Met Phe Ser Asn Ile Asn Asn
 1 5 10 15

Val Ser Asn Phe
 20

<210> 12

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多肽

<400> 12

Leu Arg Arg Phe Ser Thr Met Pro Phe Met Phe Ala Asn Ile Asn Asn
 1 5 10 15

[0009]

Val Ala Asn Phe
 20

<210> 13

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多肽

<400> 13

Leu Arg Arg Phe Ser Thr Met Pro Phe Met Phe Ile Asn Ile Asn Asn
 1 5 10 15

Val Ile Asn Phe
 20

<210> 14
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> 合成多肽

<400> 14

Leu Arg Arg Phe Ser Thr Met Pro Phe Met Phe Thr Asn Ile Asn Asn
 1 5 10 15

Val Thr Asn Phe
 20

[0010] <210> 15
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> 合成多肽

<220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (12)..(12)
 <223> 烯丙基甘氨酸

<220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (18)..(18)
 <223> 烯丙基甘氨酸

<400> 15

Leu Arg Arg Phe Ser Thr Met Pro Phe Met Phe Xaa Asn Ile Asn Asn
 1 5 10 15

Val Xaa Asn Phe
20

<210> 16
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成多肽

<400> 16

Leu Arg Arg Phe Ser Thr Met Pro Phe Met Phe Val Asn Ile Asn Asn
1 5 10 15

Val Val Asn Phe
20

[0011]

<210> 17
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成多肽

<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (10)..(10)
<223> D-丙氨酸

<400> 17

Leu Arg Arg Phe Ser Thr Met Pro Phe Xaa Phe Ile Asn Ile Asn Asn
1 5 10 15

Val Ile Asn Phe
20

<210> 18
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成多肽

<400> 18

Leu Arg Arg Phe Ser Thr Met Pro Phe Ala Phe Ile Asn Ile Asn Asn
1 5 10 15

Val Ile Asn Phe
20

[0012]

<210> 19
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成多肽

<400> 19

Leu Arg Arg Phe Ser Thr Ala Pro Phe Ala Phe Ile Asn Ile Asn Asn
1 5 10 15

Val Ile Asn Phe
20

<210> 20
<211> 20
<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多肽

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (10)..(10)

<223> D-丙氨酸

<400> 20

Leu Arg Arg Phe Ser Thr Ala Pro Phe Xaa Phe Ile Asp Ile Asn Asp

1 5 10 15

Val Ile Asn Phe

20

[0013]

<210> 21

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多肽

<400> 21

Leu Arg Arg Phe Ser Thr Ala Pro Phe Ala Phe Ile Asp Ile Asn Asp

1 5 10 15

Val Ile Asn Trp

20

<210> 22

<211> 23

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多肽

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (1)..(1)

<223> D-亮氨酸

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (4)..(4)

<223> D-亮氨酸

<400> 22

Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Phe Ser Thr Ala Pro Phe Ala Phe Ile Asp

1

5

10

15

[0014]

Ile Asn Asp Val Ile Asn Phe

20

<210> 23

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多肽

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (20)..(20)

<223> D-苯丙氨酸

<400> 23

Leu Arg Arg Phe Ser Thr Ala Pro Phe Ala Phe Ile Asp Ile Asn Asp

1

5

10

15

Val Ile Asn Xaa
20

<210> 24
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成多肽

<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (1)..(1)
<223> D-亮氨酸

[0015]

<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (20)..(20)
<223> D-苯丙氨酸

<400> 24

Xaa Arg Arg Phe Ser Thr Ala Pro Phe Ala Phe Ile Asp Ile Asn Asp
1 5 10 15

Val Ile Asn Xaa
20

<210> 25
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 合成多肽

<220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (2)..(2)
 <223> 2-氨基丁酸

<220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (8)..(8)
 <223> 2-氨基丁酸

<400> 25

Phe Xaa Asn Ile Asn Asn Val Xaa Asn
 1 5

<210> 26
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0016]

<220>
 <223> 合成多肽

<400> 26

Phe Thr Asn Ile Asn Asn Val Thr Asn
 1 5

<210> 27
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> 合成多肽

<400> 27

Phe Ile Asn Ile Asn Asn Val Ile Asn Phe
 1 5 10

<210> 28
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> 合成多肽

<400> 28

Phe Ser Asn Ile Asn Asn Val Ser Asn Phe
 1 5 10

<210> 29
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0017] <220>
 <223> 合成多肽

<400> 29

Phe Ala Asn Ile Asn Asn Val Ala Asn Phe
 1 5 10

<210> 30
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> 合成多肽

<220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (2)..(2)
 <223> 烯丙基甘氨酸

<220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (8)..(8)
 <223> 烯丙基甘氨酸

<400> 30

Phe Xaa Asn Ile Asn Asn Val Xaa Asn Phe
 1 5 10

<210> 31
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> 合成多肽

<400> 31

[0018]

Phe Val Asn Ile Asn Asn Val Val Asn Phe
 1 5 10

<210> 32
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> 合成多肽

<400> 32

Phe Ile Asp Ile Asn Asp Val Ile Asn Phe
 1 5 10

<210> 33
 <211> 10
 <212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多肽

<400> 33

Phe Ile Asp Ile Asn Asp Val Ile Asn Trp

1 5 10

<210> 34

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多肽

<400> 34

[0019] Phe Thr Asp Ile Asn Asp Val Thr Asn

1 5

<210> 35

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多肽

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (2)..(2)

<223> 2-氨基丁酸

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (8)..(8)

<223> 2-氨基丁酸

<400> 35

Ala Xaa Asn Ile Asn Asn Val Xaa Asn Phe
1 5 10

<210> 36

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成多肽

[0020] <220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (1)..(1)
<223> 4-氯苯丙氨酸

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (2)..(2)

<223> 2-氨基丁酸

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (8)..(8)

<223> 2-氨基丁酸

<400> 36

Xaa Xaa Asn Ile Asn Asn Val Xaa Asn Phe
1 5 10

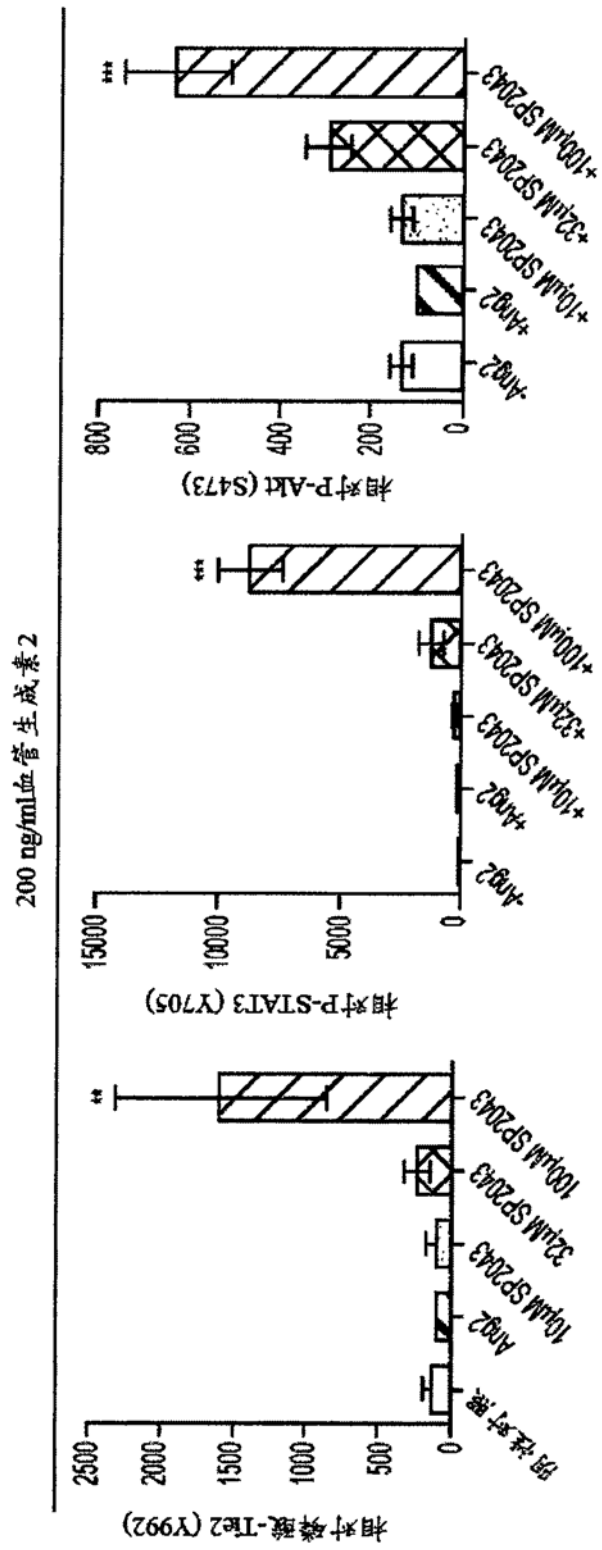


图1

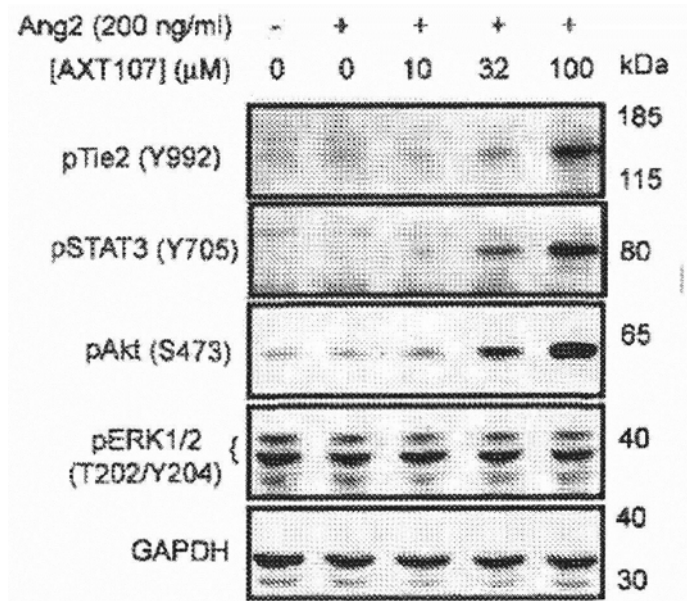


图2A

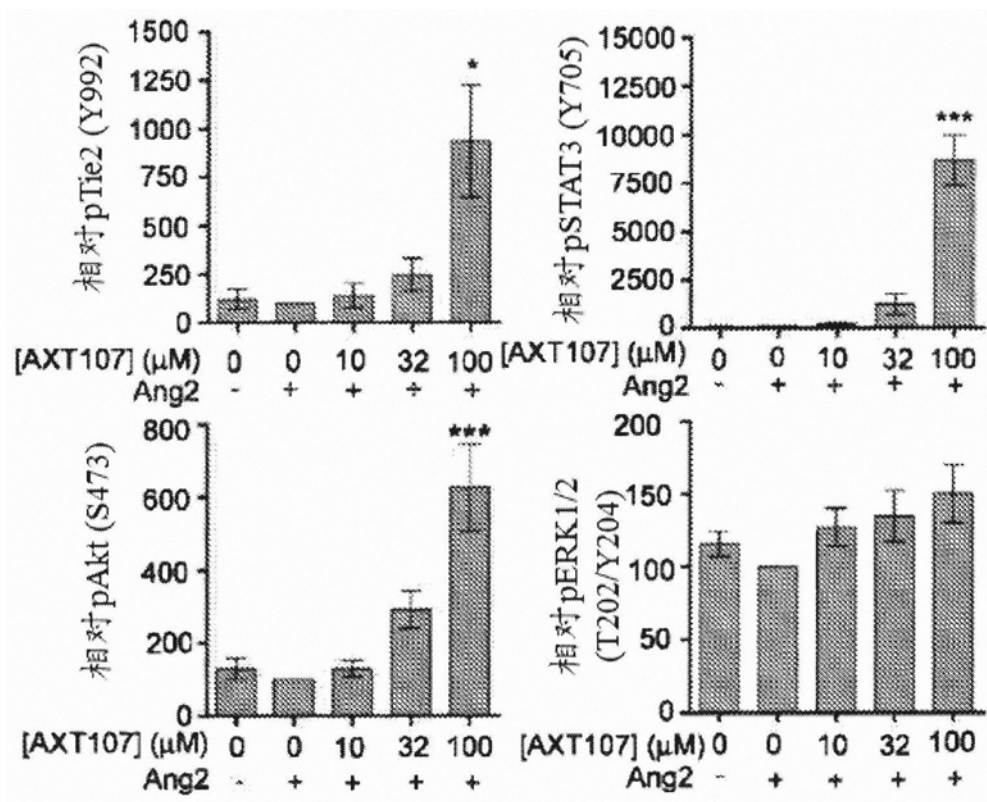


图2B

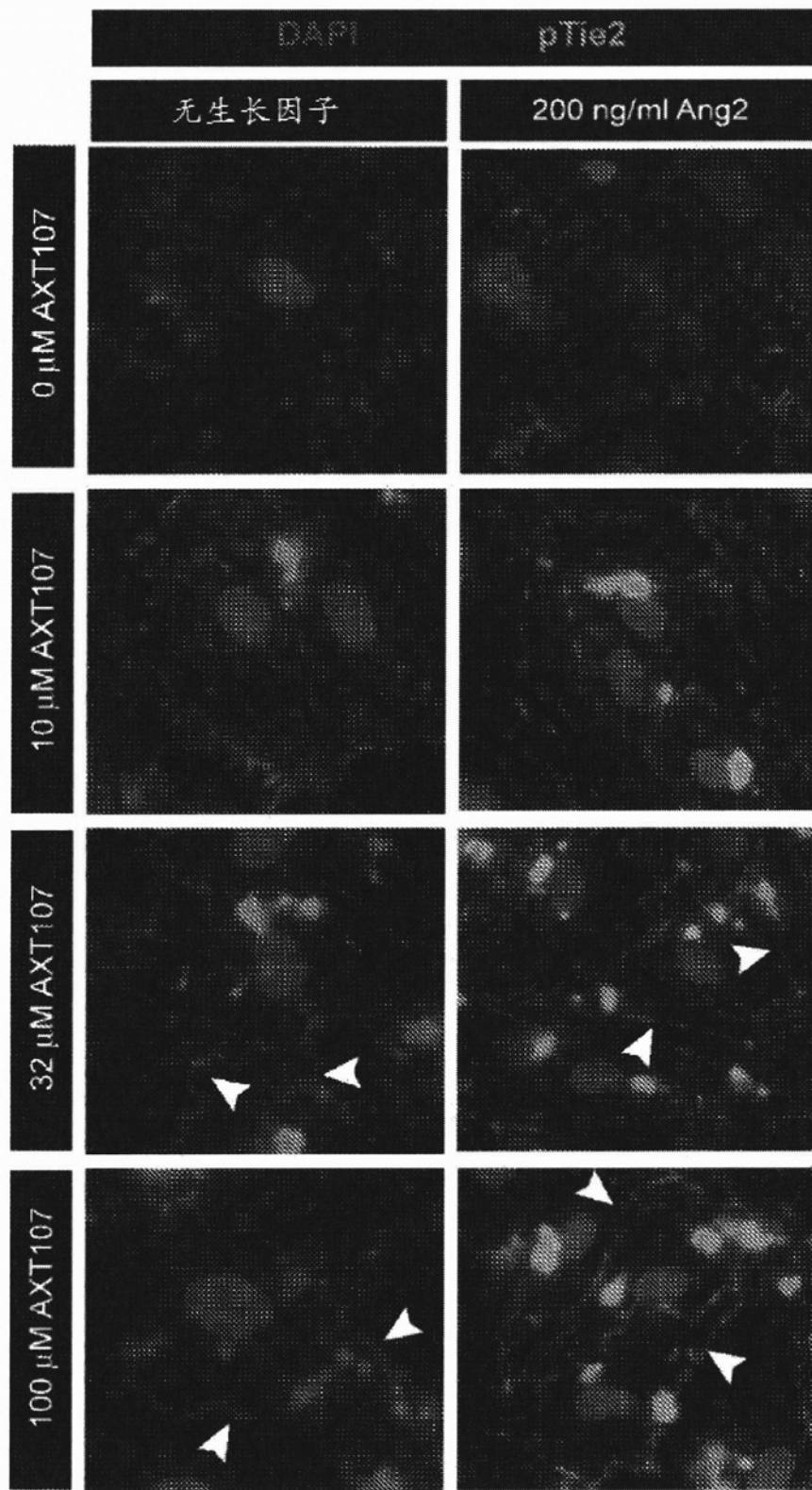


图3A

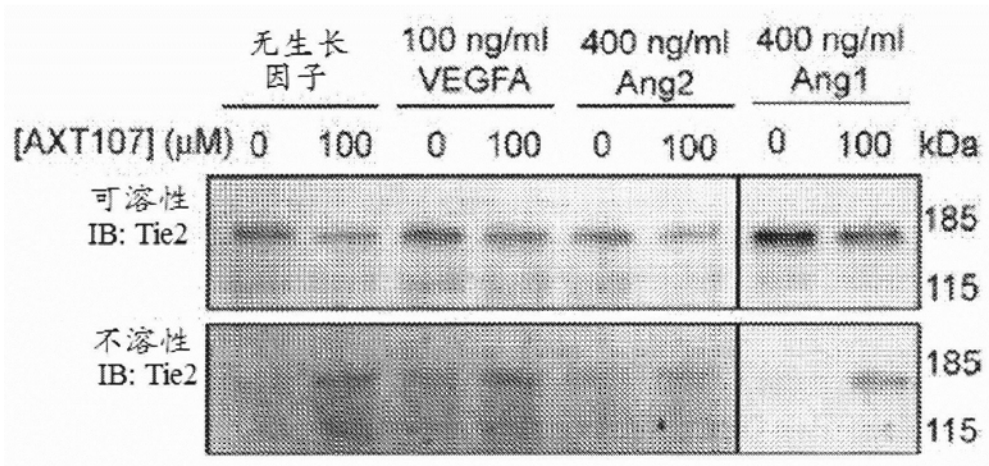


图3B

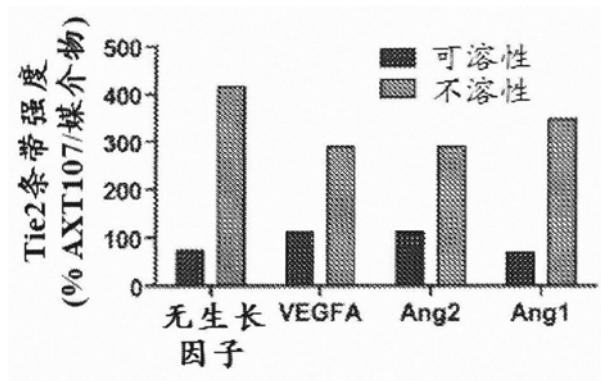


图3C

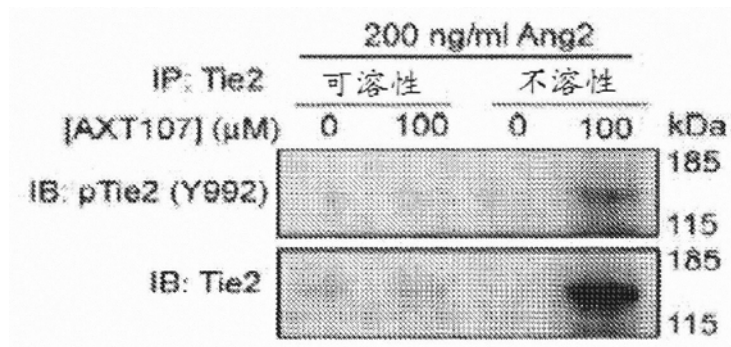


图3D

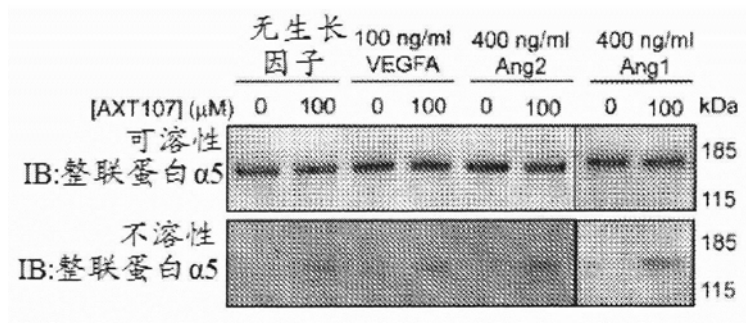


图4A

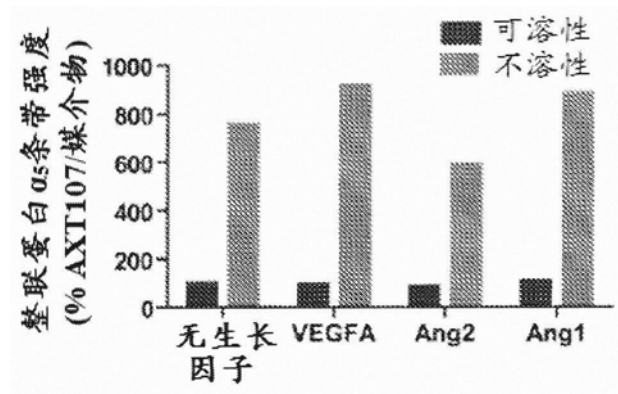


图4B

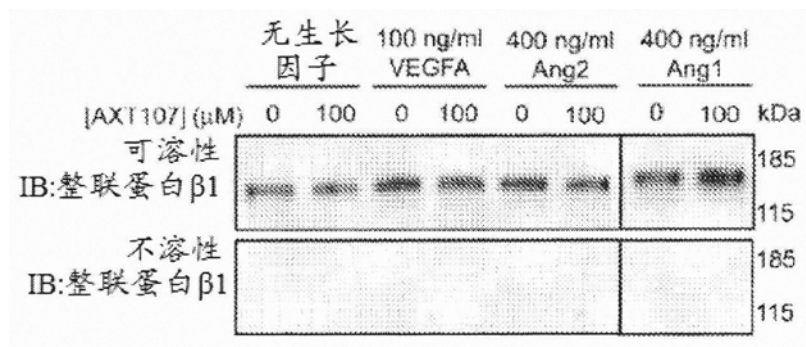


图4C

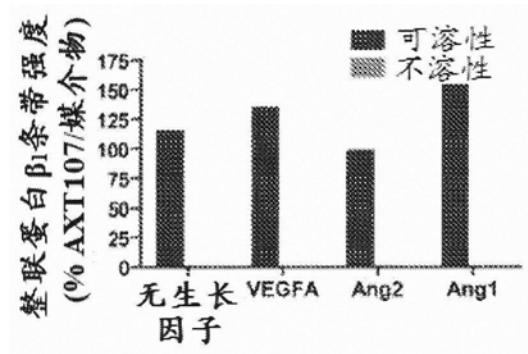


图4D

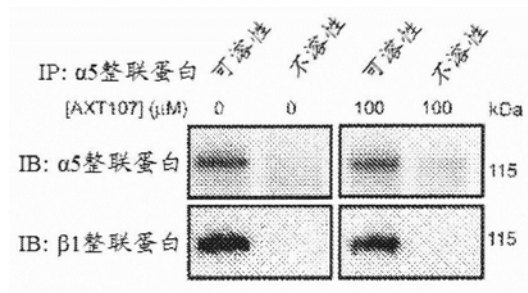


图4E

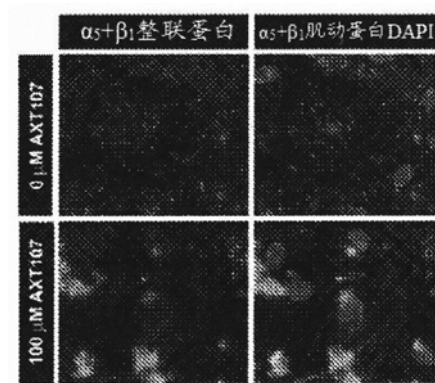


图4F

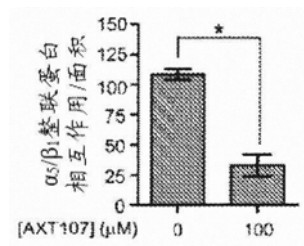


图4G

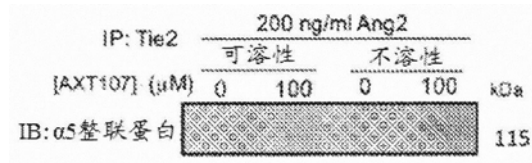


图4H

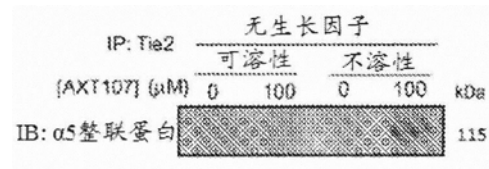


图4I

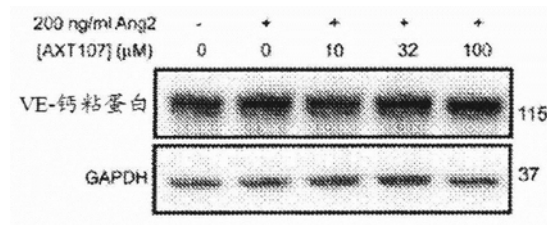


图5A

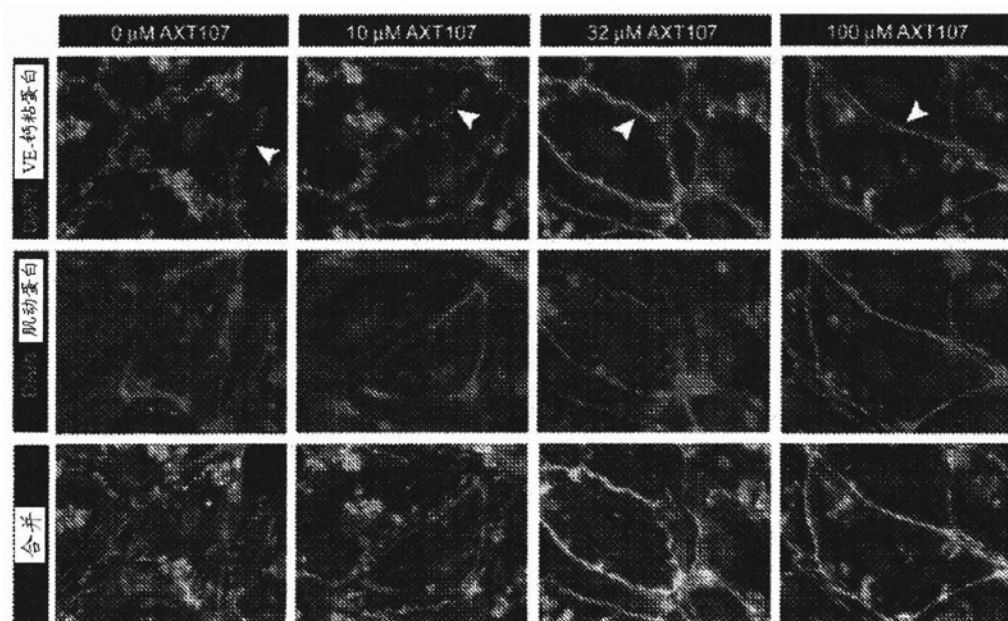


图5B

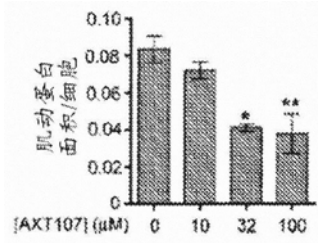


图5C

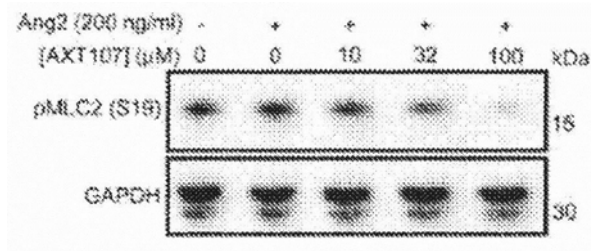


图5D

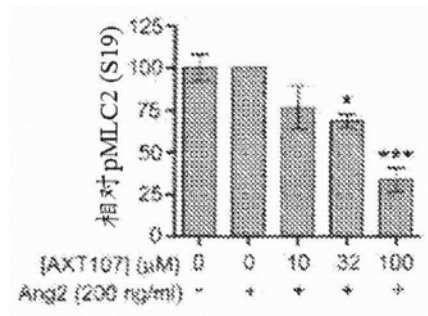


图5E

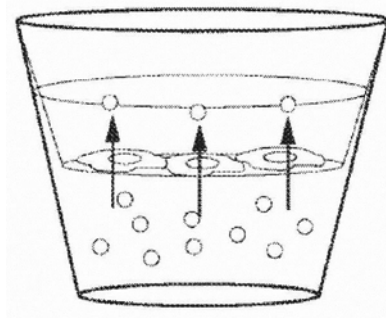


图5F

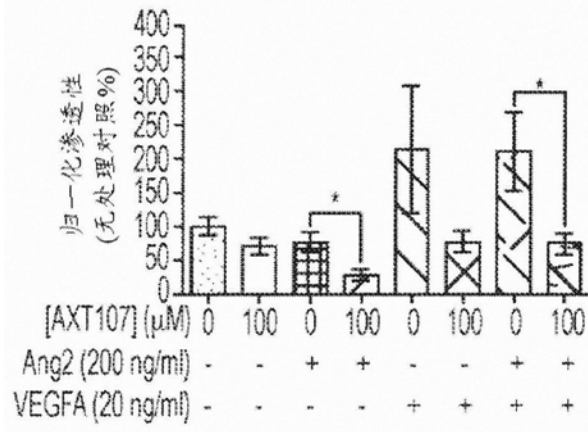


图5G

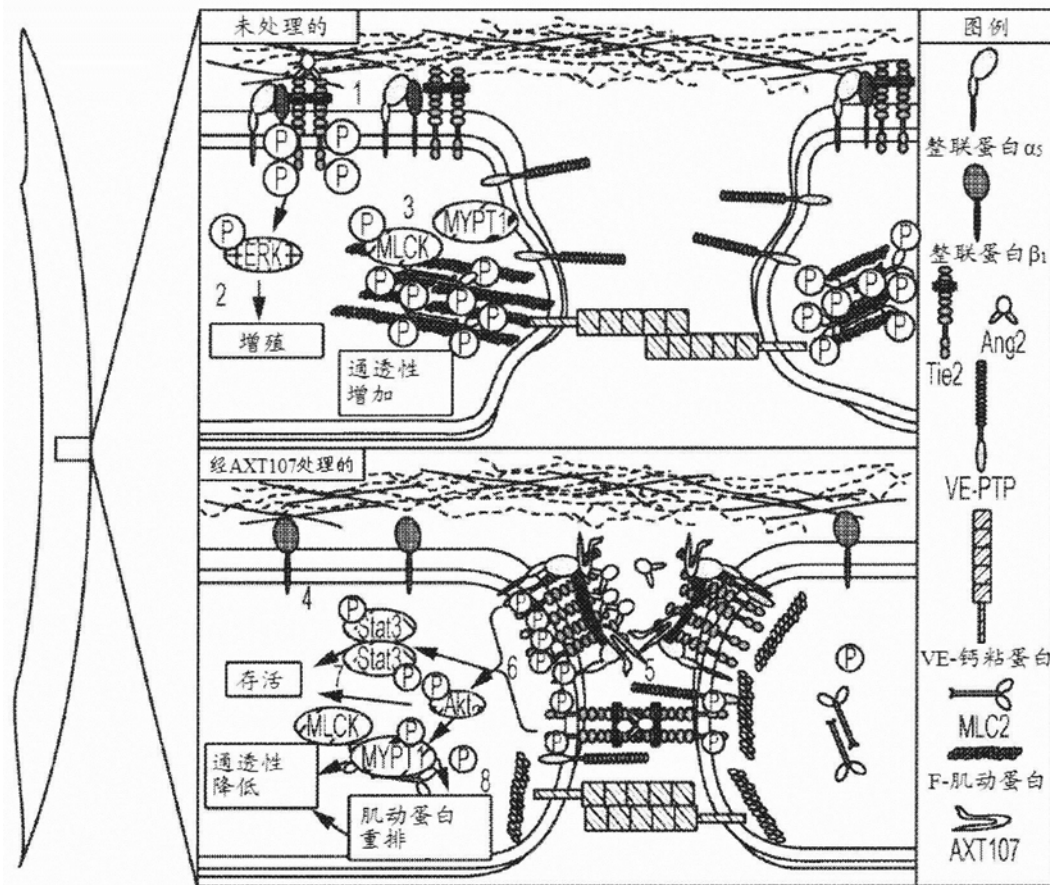


图6