(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119497719 A
(43)申请公布日 2025.02.21

(21)申请号 202380042370.9
(22)申请日 2023.04.27
(30)优先权数据
63/363,840 2022.04.29 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.11.22
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2023/066321 2023.04.27
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/212661 EN 2023.11.02
(71)申请人 赛品制药有限责任公司
地址 美国弗吉尼亚州
(72)发明人 C·格伯 西里尔·吉内斯特 达纳·奥斯汀
(74)专利代理机构 北京商专永信知识产权代理事务所(普通合伙) 11400
专利代理师 张函 邬玥
(51)Int.Cl.
C07K 14/81(2006.01)
A61K 38/55(2006.01)
A61P 29/00(2006.01)
A61P 31/12(2006.01)

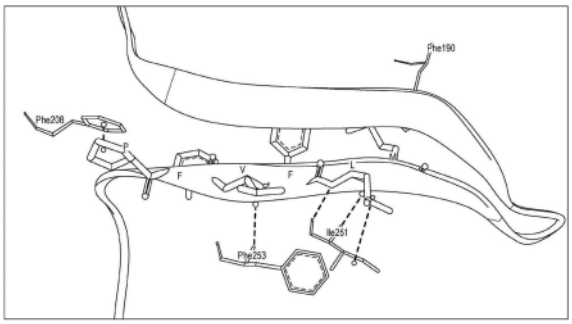
权利要求书5页 说明书36页
序列表（电子公布） 附图21页

(54)发明名称

SERPIN肽衍生物及其使用方法

(57)摘要

SERPIN衍生肽,如SP16和SP163M,可用于治疗与LRP1介导相关的多种病况。有必要开发新的SERPIN肽衍生物,以进一步提高现有SERPIN衍生肽的稳定性、生物利用度和/或疗效。本技术包括SERPIN肽衍生物、其制备方法、以及其用于治疗与LRP1介导相关的各种病况的用途。



CN 119497719 A

1.一种SERPIN肽衍生物,包含核心序列FVFLM(SEQ ID NO:1)、FVFL[Nle](SEQ ID NO:2)、PFVFLM(SEQ ID NO:8)、PFVFL[Nle](SEQ ID NO:9),以及下列一种或多种修饰:

(i)添加到核心序列N末端的极性头、添加到核心序列C末端的极性尾、或添加到核心序列N末端的极性头和添加到核心序列C末端的极性尾;

(ii)添加到核心序列N末端、核心序列的C末端、或核心序列N末端和C末端的一个或多个氨基酸残基,以使肽衍生物可以环化;

(iii)核心序列中的一个或多个氨基酸残基被与其相比具有更小疏水性的一个或多个替代氨基酸残基所置换;

(iv)核心序列中的一个或多个氨基酸残基被与其相比具有更大疏水性的一个或多个替代氨基酸残基所置换;以及

(v)核心序列中的一个或多个氨基酸残基缺失。

2.根据权利要求1所述的SERPIN肽衍生物,其中所述SERPIN肽衍生物是线性肽。

3.根据权利要求1所述的SERPIN肽衍生物,其中所述SERPIN肽衍生物是环化肽。

4.根据权利要求3所述的SERPIN肽衍生物,其中所述SERPIN肽衍生物通过在两个Cys残基之间形成的二硫键环化。

5.根据权利要求3所述的SERPIN肽衍生物,其中所述SERPIN肽衍生物通过两个氨基酸残基之间的连接体环化。

6.根据权利要求1-5中任一项所述的SERPIN肽衍生物,其中所述极性头或所述极性尾包括两个或多个带电荷的氨基酸,例如选自Arg、Lys、和His的带正电荷的氨基酸。

7.根据权利要求1-6中任一项所述的SERPIN肽衍生物,其中所述SERPIN肽衍生物的大小为小于15个氨基酸残基。

8.根据权利要求1-7中任一项所述的SERPIN肽衍生物,其中所述SERPIN肽衍生物的大小为7、8、9、10、11、或12个氨基酸残基。

9.根据权利要求1-8中任一项所述的SERPIN肽衍生物,其中一个或多个氨基酸残基是D-氨基酸。

10.一种SERPIN肽衍生物,包含氨基酸序列X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10-X11(SEQ ID NO:3),其中:

X1是亲水性氨基酸残基或无;

X2是亲水性氨基酸残基或无;

X3是亲水性氨基酸残基或无;

X4是Cys氨基酸残基或无;

X5是Pro氨基酸残基或无;

X6是第一疏水性氨基酸残基;

X7是短支链氨基酸残基;

X8是第二疏水性氨基酸残基;

X9是饱和疏水性氨基酸残基;

X10是D构型的亲水性氨基酸;以及

X11是允许所述SERPIN肽衍生物环化的任何氨基酸残基。

11.根据权利要求10所述的SERPIN肽,其中所述第一疏水性氨基酸残基和所述第二疏

水性氨基酸残基是芳香族氨基酸残基。

12.根据权利要求10或11所述的SERPIN肽,其中所述短支链氨基酸残基为Val或Thr。

13.根据权利要求10-12中任一项所述的SERPIN肽,其中所述饱和疏水氨基酸为Leu。

14.根据权利要求10-13中任一项所述的SERPIN肽,其中所述D构型的亲水性氨基酸是D构型的Asp、Glu、Lys、Dap、或Cys残基。

15.根据权利要求10-14所述的SERPIN肽,其中:

X1是显示正电荷的碱性残基或无;

X2是显示正电荷的碱性残基或无;以及

X3是显示正电荷的碱性残基或无。

16.根据权利要求10-15所述的SERPIN肽衍生物,其中:

X1是Arg、Lys、或His残基,或者无;

X2是Arg、Lys、或His残基,或者无;以及

X3是Arg、Lys、或His残基,或者无。

17.根据权利要求10-16中任一项所述的SERPIN肽衍生物,其中X6是Phe或Nal。

18.根据权利要求10-17中任一项所述的SERPIN肽衍生物,其中X8是Phe或Nal。

19.根据权利要求10-18中任一项所述的SERPIN肽衍生物,其中X6是Ala、Phe、或Nal,且X4是Nal。

20.根据权利要求10-19中任一项所述的SERPIN肽衍生物,其中X7是Asp、Glu、Lys、Dap、或Cys。

21.根据权利要求10-20中任一项所述的SERPIN肽衍生物,其中所述SERPIN肽衍生物是线性的或环化的。

22.根据权利要求10-21中任一项所述的SERPIN肽衍生物,其中所述SERPIN肽衍生物的大小为小于15个氨基酸残基。

23.根据权利要求10-22中任一项所述的SERPIN肽衍生物,其中所述SERPIN肽衍生物的大小为7、8、9、10、11、或12个氨基酸残基。

24.一种SERPIN肽衍生物,包含核心序列FVFLM(SEQ ID NO:1)、FVFL[Nle](SEQ ID NO:2)、PFVFLM(SEQ ID NO:8)、PFVFL[Nle](SEQ ID NO:9),及以下一种或多种修饰:

(i)添加到核心序列N末端的一个或多个Lys、Glu、或His残基,添加到核心序列C末端的极性尾,或添加到核心序列N末端的一个或多个Lys、Glu、或His残基和添加到核心序列C末端的极性尾;

(ii)添加到核心序列N末端、核心序列C末端、或核心序列的N末端和C末端的一个或多个氨基酸残基,使SERPIN肽衍生物可以通过在两个Cys残基之间形成的二硫键环化;

(iii)核心序列中的一个或多个氨基酸残基被一个或多个Thr氨基酸残基置换;以及

(iv)核心序列中的一个或多个氨基酸残基被比其疏水性更大的一个或多个替代氨基酸残基所置换。

25.根据权利要求24所述的SERPIN肽衍生物,其中所述SERPIN肽衍生物是线性肽。

26.根据权利要求24或25所述的SERPIN肽衍生物,其中所述SERPIN肽衍生物的大小为小于15个氨基酸残基。

27.根据权利要求24-26中任一项所述的SERPIN肽衍生物,其中所述SERPIN肽衍生物大

小为7、8、9、10、11、或12个氨基酸残基。

28.一种SERPIN肽衍生物,包含氨基酸序列X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10-X11(SEQ ID NO:3),其中:

X1是亲水性氨基酸残基或无;

X2是亲水性氨基酸残基或无;

X3是亲水性氨基酸残基或无;

X4是Cys氨基酸残基或无;

X5是Pro氨基酸残基或无;

X6是第一疏水性氨基酸残基;

X7是短支链氨基酸残基;

X8是第二疏水性氨基酸残基;

X9是饱和疏水性氨基酸残基;

X10是D构型的亲水性氨基酸;以及

X11是允许所述SERPIN肽衍生物环化的任何氨基酸残基;

其中X4是Cys,X5是Pro,X7是Thr,和/或X10是D-构型的Lys残基。

29.根据权利要求28所述的SERPIN肽,其中所述第一疏水性氨基酸残基和所述第二疏水性氨基酸残基是芳香族氨基酸残基。

30.根据权利要求28或29所述的SERPIN肽,其中所述短支链氨基酸残基为Val或Thr。

31.根据权利要求28-30中任一项所述的SERPIN肽,其中所述饱和疏水氨基酸为Leu。

32.根据权利要求28-31中任一项所述的SERPIN肽,其中所述D构型的亲水氨基酸是D构型的Asp、Glu、Lys、Dap、或Cys残基。

33.根据权利要求28-32中任一项所述的SERPIN肽,其中:

X1是显示正电荷的碱性残基或无;

X2是显示正电荷的碱性残基或无;以及

X3是显示正电荷的碱性残基或无。

34.根据权利要求28-33中任一项所述的SERPIN肽衍生物,其中:

X1是Arg、Lys、或His残基,或者无;

X2是Arg、Lys、或His残基,或者无;以及

X3是Arg、Lys、或His残基,或者无。

35.根据权利要求28-34中任一项所述的SERPIN肽衍生物,其中X6是Phe或Nal。

36.根据权利要求28-35任一项所述的SERPIN肽衍生物,其中X8是Phe或Nal。

37.根据权利要求28-36中任一项所述的SERPIN肽衍生物,其中X6是Ala、Phe、或Nal,且X4是Nal。

38.根据权利要求28-37中任一项所述的SERPIN肽衍生物,其中X7是Asp、Glu、Lys、Dap、或Cys。

39.根据权利要求28-38中任一项所述的SERPIN肽衍生物,其中所述SERPIN肽衍生物是线性的或环化的。

40.根据权利要求28-39中任一项所述的SERPIN肽衍生物,其中所述SERPIN肽衍生物的大小为小于15个氨基酸残基。

41.根据权利要求28-40中任一项所述的SERPIN肽衍生物,其中所述SERPIN肽衍生物的大小为7、8、9、10、11或12个氨基酸残基。

42.一种SERPIN肽衍生物,包含序列SEQ ID NO:10-20或23-62,其中所述SERPIN肽衍生物包含添加到核心序列N末端的极性头、添加到核心序列C末端的极性尾、或添加到核心序列N末端的极性头和添加到核心序列C末端的极性尾。

43.一种SERPIN肽衍生物,包含序列SEQ ID NO:15-17、或23-62,其中在核心序列N末端、核心序列C末端、或核心序列N末端和C末端添加一个或多个氨基酸残基,以使该肽衍生物可以环化。

44.一种SERPIN肽衍生物,包含序列SEQ ID NO:27-29、38、39、或42-62,其中核心序列中的一个或多个氨基酸残基被比其疏水性更小的一个或多个替代氨基酸残基所置换。

45.一种SERPIN肽衍生物,包含序列SEQ ID NO:30或31,其中核心序列中的一个或多个氨基酸残基被比其疏水性更大的一个或多个替代氨基酸残基所置换。

46.一种SERPIN肽衍生物,包含序列SEQ ID NO:41或47-53,其中核心序列中的一个或多个氨基酸残基缺失。

47.一种SERPIN肽衍生物,包含SEQ ID NO:10、11、13或14、35或36,其中在核心序列N末端添加一个或多个Lys、Glu或His残基,在核心序列C末端添加极性尾,或在核心序列N末端添加一个或多个Lys、Glu或His残基,并且在核心序列C末端添加极性尾。

48.一种SERPIN肽衍生物,包含序列SEQ ID NO:15-17或23-31,其中在核心序列N末端、核心序列C末端、或核心序列N末端和C末端添加一个或多个氨基酸残基,使得所述SERPIN肽衍生物可以通过在两个Cys残基之间形成的二硫键环化。

49.一种SERPIN肽衍生物,包含序列SEQ ID NO:27-29、38、39、47-55、或59-62,其中核心序列中的一个或多个氨基酸残基被一个或多个Thr氨基酸残基置换。

50.一种融合蛋白,包含根据权利要求1-49中任一项所述的SERPIN肽衍生物,及表位标签、半衰期延长物、或表位标签和半衰期延长物。

51.一种缀合物,包含根据权利要求1-49中任一项所述的SERPIN肽衍生物,及渗透增强剂。

52.一种药物组合物,包含根据权利要求1-49中任一项所述的SERPIN肽衍生物、根据权利要求50所述的融合蛋白、或根据权利要求51所述的缀合物。

53.根据权利要求52所述的药物组合物,还包含一种或多种额外的治疗剂。

54.根据权利要求52或53所述的药物组合物,还包含药学上可接受的载体、赋形剂、添加剂、防腐剂、或其组合。

55.根据权利要求52-53中任一项所述的药物组合物,还包含渗透增强剂。

56.根据权利要求52-55中任一项所述的药物组合物,其中所述药物组合物被配制成口服施用、透皮施用、或肠胃外施用。

57.一种融合蛋白,包含根据权利要求24-41、45、或47-49中任一项所述的SERPIN肽衍生物,及表位标签、半衰期延长物、或表位标签和半衰期延长物。

58.一种缀合物,包含根据权利要求24-41、45、或47-49中任一项所述的SERPIN肽衍生物,及渗透增强剂。

59.一种药物组合物,包含根据权利要求24-41、45、或47-49中任一项所述的SERPIN肽

衍生物、根据权利要求57所述的融合蛋白、或根据权利要求58所述的缀合物。

60.根据权利要求59所述的药物组合物,还包含一种或多种额外的治疗剂。

61.根据权利要求59或60所述的药物组合物,还包含药学上可接受的载体、赋形剂、添加剂、防腐剂、或其组合。

62.根据权利要求59-61中任一项所述的药物组合物,还包含渗透增强剂。

63.根据权利要求59-62中任一项所述的药物组合物,其中所述药物组合物被配制成口服施用、透皮施用、或肠胃外施用。

64.一种治疗患有与LRP1相关的疾病或病况的受试者的方法,包括向受试者施用有效量的根据权利要求1-49所述的SERPIN肽衍生物、根据权利要求50所述的融合蛋白、根据权利要求51所述的缀合物、或根据权利要求52-56中任一项所述的药物组合物,以治疗与LRP1相关的疾病或病况。

65.根据权利要求64所述的方法,其中施用所述SERPIN肽减少受试者的NFkB激活。

66.根据权利要求64或65所述的方法,其中施用所述SERPIN肽降低受试者的TNFa。

67.根据权利要求64-66中任一项所述的方法,其中施用所述SERPIN肽降低IL-6。

68.根据权利要求64-67中任一项所述的方法,其中所述与LRP1相关的疾病或病况是急性或神经性疼痛、伤害感受性疼痛、或炎症性疼痛。

69.根据权利要求64-68中任一项所述的方法,其中所述与LRP1相关的疾病或病况是由病毒感染引起的疾病或病况。

70.根据权利要求69所述的方法,其中施用所述SERPIN肽减少病毒复制。

71.根据权利要求64-67中任一项所述的方法,其中所述与LRP1相关的疾病或病况是嗜酸性粒细胞食管炎。

72.根据权利要求64-67中任一项所述的方法,其中所述与LRP1相关的疾病或病况是急性肺损伤。

73.一种治疗患有与LRP1相关的疾病或病况的受试者的方法,包括向受试者施用有效量的根据权利要求24-41、45、或47-49中任一项所述的SERPIN肽衍生物、根据权利要求57所述的融合蛋白、根据权利要求58所述的缀合物、或根据权利要求59-63中任一项所述的药物组合物,以治疗与LRP1相关的疾病或病况。

74.根据权利要求73所述的方法,其中施用所述SERPIN肽减少受试者的NFkB激活。

75.根据权利要求73或74所述的方法,其中施用所述SERPIN肽降低受试者的TNFa。

76.根据权利要求73-75中任一项所述的方法,其中施用所述SERPIN肽降低IL-6。

77.根据权利要求73-75中任一项所述的方法,其中所述与LRP1相关的疾病或病况是由病毒感染引起的疾病或病况。

78.根据权利要求77所述的方法,其中施用所述SERPIN肽减少病毒复制。

79.根据权利要求73-75中任一项所述的方法,其中所述与LRP1相关的疾病或病况是嗜酸性粒细胞食管炎。

80.根据权利要求73-75中任一项所述的方法,其中所述与LRP1相关的疾病或病况是急性肺损伤。

SERPIN肽衍生物及其使用方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2022年4月29日提交的美国临时专利申请第63/363,840号的权益和优先权,该申请的公开内容通过引用全文并入本文中。

[0003] 序列表

[0004] 本申请包含一份符合ST.26标准的序列表,该序列表以.xml格式通过专利中心同时提交,并通过引用全文并入本文中。该.xml副本创建于2023年4月26日,名为Serpin138536-8004WO00序列列表.xml,大小为78KB。

背景技术

[0005] 丝氨酸蛋白酶抑制剂(SERPIN)是一个庞大的蛋白质家族,参与多种生物功能,如纤维蛋白溶解、血液凝固和炎症反应。当SERPIN与目标丝氨酸蛋白酶结合以灭活酶活性时,会发生构象变化,暴露出一个独特的短肽基序(5-11个氨基酸)[8,43]。蛋白酶抑制剂复合物会在新暴露的短肽基序上与低密度脂蛋白受体相关蛋白(LRP1)结合,这一过程在整个丝氨酸蛋白酶抑制剂(SERPIN)谱中(如α-1抗胰蛋白酶(AAT)和抗凝血酶III(ATIII))都是保守的[22,25,43]。

[0006] 先前公开的是被发现与LRP1结合,并在其抗炎功能之外发挥治愈和稳态(homeostatic)功能的SERPIN衍生肽家族。参见,例如,美国专利号8,975,224;9,951,104;11,020,462;以及美国专利申请公开号2021/0188912和2021/0369822,其内容通过引用并入本文。SP16和SP163M等SERPIN衍生肽可用于治疗多种与LRP1介导相关的病况。有必要开发新型的SERPIN肽衍生物,以进一步提高现有SERPIN衍生肽的稳定性、生物利用度和/或疗效。

发明内容

[0007] 本技术的一个方面是一种SERPIN肽衍生物,其包括以下、基本上由以下组成、或由以下组成:具有氨基酸序列FVFLM(SEQ ID NO:1)、FVFL[Nle](SEQ ID NO:2)、PFVFLM(SEQ ID NO:8)、或PFVFL[Nle](SEQ ID NO:9)的五肽,以及以下一种或多种修饰:(i)添加到五肽N末端的极性头,添加到五肽C末端的极性尾,或两者;(ii)添加到五肽N末端、五肽C末端、或添加到两者的一个或多个氨基酸残基,使肽衍生物可以环化;(iii)五肽中的一个或多个氨基酸残基被更小疏水性的一个或多个氨基酸残基置换;(iv)五肽中的一个或多个氨基酸残基被更大疏水性的一个或多个氨基酸残基置换;以及(v)五肽中的一个或多个氨基酸残基缺失。

[0008] 在某些实施方案中,本技术的SERPIN肽衍生物是线性肽。在某些实施方案中,本技术的SERPIN肽衍生物是环化肽。在某些实施方案中,SERPIN肽衍生物通过在两个Cys残基之间形成的二硫键环化。在某些实施方案中,SERPIN肽衍生物通过两个氨基酸残基(例如五肽序列外的两个氨基酸残基)之间的连接体环化。在某些实施方案中,极性头部或极性尾部包括两个或多个带电荷的氨基酸,例如选自Arg、Lys和His的带正电荷的氨基酸。在某些实施

方案中,SERPIN肽衍生物与包含表位标签、半衰期延长物、或表位标签和半衰期延长物两者的一种或多种其他肽融合,以形成融合蛋白或融合肽。在某些实施方案中,SERPIN肽衍生物与渗透增强剂缀合。

[0009] 本技术的另一方面是一种组合物,它包含本技术的SERPIN肽衍生物、融合物、或缀合物,以及一种或多种药学上可接受的载体。在某些实施方案中,该组合物被配制成适合口服、透皮给药或肠胃外施用的剂型。

[0010] 本技术的另一方面是一种治疗与LRP1结合相关的各种病况或疾病的方法,例如呼吸道病毒或细菌感染(如COVID),以及炎症性疾病,如急性呼吸窘迫、哮喘、特应性皮炎、或嗜酸性粒细胞食管炎。其他疾病包括中枢和周围神经系统疾病,如周围神经损伤和神经退行性疾病。该方法需要向患有与LRP1结合相关的疾病的受试者施用有效量的一种或多种SERPIN肽衍生物、其融合物、或包含本技术的一种或多种SERPIN肽衍生物或其融合物的组合物。

[0011] 附图简要说明

[0012] 本申请至少包含至少一张彩色附图。根据请求并支付必要的费用,办公室将提供带有彩色附图的本申请的副本。

[0013] 图1显示了包含五肽序列(SEQ ID NO:8)的α_1-抗胰蛋白酶的晶体结构。

[0014] 图2显示了基于包含五肽序列(SEQ ID NO:8)的α_1-抗胰蛋白酶晶体结构的氨基酸之间的距离。

[0015] 图3以Lys-βAla-Glu 13C-C键为例说明了闭环策略。

[0016] 图4A-4B示出了源自SERPIN的肽衍生物SA1-SA8的结构-活性关系。图4A显示了不同浓度(0、1、10、50和100μg/mL)的肽衍生物SA1-SA8减少NFκB激活的活性。图4B比较了SA3和SA7与SP163M和SP22的活性。与先前公开的SERPIN肽SP163M相比,截短肽同时保留LRP1结合位点并添加精氨酸残基提高了NFκB报告基因试验中的活性。

[0017] 图5A-5B示出了肽衍生物A1-A15与SP163M相比的抗炎功能。在NFκB报告基因试验中对肽衍生物(50或100μg/ml)对LPS(5ng/ml)的反应进行了测试,并筛选了肽衍生物在IMG小胶质细胞中对LPS(大肠杆菌0111:B4)刺激(100ng/ml,24小时)反应的TNFα分泌。在NFκB报告细胞中,测量上清液中NFκB诱导的分泌型胚胎碱性磷酸酶(SEAP)。通过ELISA检测上清液中TNFα的分泌。

[0018] 图6A-6B示出了包含对环状结构的修饰和氨基酸置换的肽衍生物A2-1至A2-9的抗炎活性。图6A显示了经LPS(100ng/ml,24小时)激活后IMG小胶质细胞上清液中TNFα的减少。图6B显示了LPS刺激(5ng/ml,24小时)后NFκB激活减少的百分比。SP163M、SA7、A5和A15肽用于比较。

[0019] 图7A-7B示出了肽衍生物对NFκB和TNFα激活的剂量反应效果。肽衍生物的测试浓度分别为3.125、6.25、12.5、25、和50μg/ml。SP163M、SP16和SA7的浓度高达100μg/ml。剂量反应浓度以对数标度显示。肽衍生物A2-1、A2-2、A2-3、A2-4和A2-5的活性优于SA7、SP16和SP163M,且呈剂量依赖性。

[0020] 图8示出了IMG细胞(小胶质)的细胞毒性试验结果。用浓度达到或超过活性试验(图5-7)测试浓度的肽衍生物处理IMG细胞24小时。所有肽均未表现出任何细胞毒性效果。

[0021] 图9示出了肽衍生物A3-1至A3-16(包括进一步优化环状结构)对LPS刺激(5ng/ml,

24小时)下NFκB激活的效果。肽衍生物的测试浓度为1.56μg/ml至12.5μg/ml。SP163M和A2-5,以进行比较。SP163M的测试浓度为12.5μg/ml至100μg/ml。剂量反应以对数标度显示。

[0022] 图10示出了肽衍生物A3-1、A3-2、A3-3、A3-5、A3-6、A3-7、A3-9、A3-14、A3-15、和A3-16对减少LPS刺激(100ng/ml,24小时)后IMG中IL-6分泌的活性。通过ELISA测定IL-6的分泌。肽衍生物A2-5和SP163M用于比较。SP163M的测试浓度为12.5至100μg/ml。包括A2-5在内的肽衍生物的测试浓度最高为12.5μg/ml。剂量反应以对数标度显示。

[0023] 图11A-11B示出了NFκB报告细胞(图11A)和IMG小胶质细胞(图11B)的细胞毒性试验结果。肽衍生物A3-1、A3-2、A3-5、A3-6、A3-7、A3-9、A3-14、A3-15、和A3-16在均有效减少NFκB、细胞因子IL-6和TNFα的测试浓度(最高达12.5μg/ml)下未显示出细胞毒性效果。SP163M用于比较,在浓度高达100μg/ml时无细胞毒性作用。用SP163M或所示浓度的肽衍生物A3-1、A3-2、A3-5、A3-6、A3-7、A3-9、A3-14、A3-15、A3-16、或A2-5处理细胞24小时。

[0024] 图12示出了肽衍生物A15和A2-5阻断辣椒素诱导的小鼠疼痛行为的能力测试。小鼠在注射辣椒素(25ng)前1小时皮下施用肽衍生物。SP163M的施用剂量为50μg/小鼠,而肽衍生物A15和A2-5的施用剂量为5μg/小鼠。n=4-9小鼠/组。单因素方差分析。*p<0.05,**p<0.01.

[0025] 图13比较了在经SERPIN肽衍生物SA7或SERPIN肽SP163M处理的小胶质细胞中测得的细胞因子谱。SA7在减少包括IL-6和IL-1β在内的多种细胞因子方面表现出明显增强的活性。

[0026] 图14A-14B显示,在LPS诱导的神经炎症模型中,SERPIN肽衍生物SA7与载剂(LPS诱导)和SP163M(图14B)相比,降低了临床评分(每天用评分系统测量)(图14A),并减轻了体重减轻的严重程度。SP163M和SA7以100μg/只小鼠的剂量通过皮下注射施用,在施用LPS(1mg/kg)1小时后进行,连续四天。每天测量体重和临床评分,并在研究结束时收集并处理脑组织用于分析。评分标准如下0:明亮、机警、反应灵敏;1-4:轻微邋遢/驼背、不太活跃;5-10:驼背、昏睡、体重减轻;≥11濒死。

[0027] 图15显示,在图14的神经炎症模型中,用SA7处理的动物与用载剂和SP163M处理的动物相比,在脑裂解物中测得的许多细胞因子的水平(包括IL-17A、IL-12、TNFα和GM-CSF)有显著差异。IL-6的降幅最大,没有测量到可检测的水平。

[0028] 图16A-16B显示,在从先前披露的神经炎症模型中提取的脑裂解物中,对神经丝轻链(NfL)(神经元轴突特异性标志物)和抗胶质纤维酸性蛋白(GFAP)(星形胶质细胞活化特异性标志物)进行了蛋白质印迹分析。与载剂处理和SP163M动物相比,肽衍生物SA7显著提高了NfL的表达(图16A),而GFAP的表达则显著降低(图16B)。

[0029] 图17A-17B显示,SA7与SERPIN肽SP163M类似,在炎症过程中调节自噬。用SP163M或SA7处理小胶质细胞,然后将其暴露于LPS。LC3 II与LC3 1比率(自噬体形成的起始点--一种广泛用于检测自噬的生物标志物)的蛋白质印迹分析表明,与单独的LPS相比,SA7提高了自噬(图17A)和LRP1的表达(图17B),与SP163M相当。与SP163M相比,未经LPS处理,SA7也显著提高了LRP1的表达。

[0030] 图18显示了蛋白酶TMPRSS2活性,及SP163M和肽衍生物SA7的IC50,与SP163M相比,SA7在过表达细胞系统中显示出对TMPRSS2活性增强的抑制。

[0031] 图19A-19B表明,在OVA诱导的小鼠食道中,LRP1的表达减少,而SP163M则恢复了

LRP1蛋白的表达。此外,与对照细胞相比,SA7比SP163M更有效地抑制SPINK7敲除细胞中细胞因子TSLP的产生。

[0032] 图20A-20C表明,在OVA诱导的过敏性哮喘模型中,相比于OVA诱导的载剂处理的和SP163M小鼠二者,肽衍生物A2-5在更大程度上降低了肺匀浆中TSLP、肺总蛋白和TH-2介导的细胞因子IL-5、IL-4和IL-13。

[0033] 图21示出了包含本技术的肽衍生物(如A2-5,SEQ ID NO:42)和渗透增强剂的缀合物。

具体实施方式

[0034] 本技术包括SERPIN肽类似物及其变体和衍生物,以及它们通过靶向低密度脂蛋白受体相关蛋白-1(LRP-1)来预防或治疗各种病况的用途。如本文所用,术语"衍生物"是指与五肽FVFLM(SEQ ID NO:1)、FVFL[Nle](SEQ ID NO:2)、PFVFLM(SEQ ID NO:8)、或PFVFL[Nle](SEQ ID NO:9)具有氨基酸序列或结构相似性,并含有一种或多种修饰(包括插入、缺失或置换)以改善其稳定性、生物利用度和/或生物活性或疗效的肽。在本公开中,术语"衍生物"、"变体"、和"类似物"可以互换使用。

[0035] 促进炎症消退和减轻组织损伤需要对免疫反应进行精确协调,而靶向单一细胞因子或信号通路并不能解决某些疾病(如本文讨论的疾病)病理学中的所有致病因素。平衡的炎症反应在再生和修复中起着至关重要的作用,抗炎药物与再生和组织修复的相反作用相关[3]。

[0036] SERPIN肽先前被证明:(1)具有神经营养效果;(2)具有再生和愈合特性;(3)具有镇痛效果;(4)具有抗病毒和抗微生物特性;和/或(5)具有抗过敏作用。这种活性组合为治疗糖尿病周围神经病变、退行性疾病、肺损伤、过敏性疾病、和传染性疾病等与周围神经病变相关的病况提供了一种独特的机制。本技术的SERPIN肽类似物及其变体和衍生物具有改善的LRP1结合活性、改善的溶解性、和/或改善的药代动力学特性和口服生物利用度。例如,如工作实施例所示,本技术的SERPIN肽衍生物在神经炎症模型中显示出改善的抗炎效果和改善的疗效。

[0037] 因此,本技术包括SERPIN肽衍生物、包含SERPIN肽衍生物的药物组合物,以及使用其的方法,以治疗免疫反应失调或内吞功能受损的多种病况或病理与LRP1介导相关的疾病,例如与周围神经损伤及其导致的疼痛、肺损伤、传染性疾病和过敏性炎症相关的病况。

[0038] 在某些实施方案中,SERPIN肽衍生物是合成肽。在某些实施方案中,SERPIN肽衍生物是环化的。在某些实施方案中,SERPIN肽衍生物包含一个或多个亲水性氨基酸置换。在某些实施方案中,SERPIN肽衍生物包括一个或多个疏水性氨基酸置换。在某些实施方案中,SERPIN肽衍生物在N末端、C末端、或N末端和C末端二者包含一个或多个带正电荷的氨基酸。

[0039] SERPIN肽衍生物和修饰

[0040] 本技术包括旨在以更高的亲和力靶向LRP1的SERPIN肽衍生物,从而发挥更强的抗炎和细胞再生作用。这些肽衍生物是基于结构与活性关系研究和肽/LRP1相互作用的3D建模,从原始的SERPIN衍生肽修饰而来的。这些衍生物克服了与肽疗法相关的一些难题,如溶解性、血浆稳定性和口服生物利用度。与先前公开的SERPIN肽,如SP16(VKFNKPFVFLMIEQNTK)(SEQ ID NO:4)和SP163M(Ac-VKFNKPFVFL[Nle]IEQNTK-NH_2)(SEQ ID

NO:5)(其中Nle代表正亮氨酸)相比,本技术的肽衍生物不仅显现出改善的LRP1活性,还显现出改善的溶解性、药代动力学特性和生物利用度,尤其是口服和透皮生物利用度。

[0041] 先前的研究证实,α-1抗胰蛋白酶(SERPIN的原型)C末端的小肽片段能够与LRP1结合,发挥强大的细胞再生、组织保护和免疫调节功能。然而,α-1抗胰蛋白酶(AAT)的三级结构阻碍了它与LRP1的直接结合。相反,AAT只有在与靶蛋白酶相互作用时才能与LRP1结合,这是因为AAT发生了构象变化,暴露出短的5-11个氨基酸的结合基序。令人惊讶的是,整个高度保守的核心序列VKFNKPFVFLM(SEQ ID NO:6)对于肽衍生物的抗炎作用并不是必需的,对这些衍生物进行的结构活性关系研究证明了这一点。这些衍生物不含在SERPINS中高度保守的FNKP(SEQ ID NO:7)基序,同时保留了LRP1结合活性。然而,LRP1结合基序具有高度疏水性,在溶液中不稳定,因此需要对SERPIN肽序列进行修饰。

[0042] 因此,对SP16/SP163M肽,特别是对五肽中或五肽周围的肽进行了各种修饰,以产生性能改善的SERPIN肽衍生物。如本文所用,"五肽"是指SP16中的FVFLM(SEQ ID NO:1)序列或SPM163中的FVFL[Nle](SEQ ID NO:2)序列,其中Met残基被Nle残基置换。该五肽负责与LRP1的大部分相互作用。在本技术中,对五肽和/或五肽周围的序列进行各种修饰,以获得性能改善的新型SERPIN肽衍生物。例如,通过缺失、置换和/或环化对SP163M肽的序列进一步修饰,以进一步改善抗炎活性、溶解性、LRP1结合活性、和/或口服生物利用度。与SP16或SP163M的序列相比,开发了更短的肽衍生物,以在不影响抗炎活性或LRP1结合活性的前提下,获得更好的口服生物利用度和血脑屏障渗透性。在某些实施方案中,本技术的肽衍生物的大小为7、8、9、10、11、12、13、14、或15个氨基酸残基,优选为8、9、或10个氨基酸残基。例如,本技术的肽衍生物的大小为8个氨基酸残基、9个氨基酸残基或10个氨基酸残基。

[0043] 在某些实施方案中,在五肽的N末端加入包含具有带电荷侧链的两个或多个的氨基酸残基的极性头,在C末端加入包含具有带电荷侧链的两个或多个氨基酸残基的极性尾,或同时加入该极性头和该极性尾,以提高溶解度。在一些实施方案中,极性头或极性尾中的氨基酸残基带正电荷,包含Arg、His和Lys。极性头部或极性尾部可使用相同的带电荷氨基酸残基的组合或不同氨基酸残基的组合。例如,极性头部或极性尾部包括氨基酸序列RR、RRR、KK、KKK、HH、HHH、KRR、KR、或RRK。在一些实施方案中,极性头部或极性尾部的一个或多个带正电荷的氨基酸残基具有反向结构。例如,反向Lys是指Lys残基通过侧链中的α-碳所带的羧酸基团和ε-氨基而不是α-碳所带的氨基和羧酸基团二者结合到肽骨架中。反向Arg是指Arg残基通过α-碳而不是δ-碳所携带的胍基结合到肽骨架中。在一些实施方案中,在五肽的任一或两个末端添加两个或三个Arg残基。在一些实施方案中,在五肽的N末端添加两个或三个Arg残基。

[0044] 在某些实施方案中,本技术的肽衍生物被环化,例如,通过在两个Cys残基之间形成二硫键,或通过两个氨基酸残基之间的连接体。根据现有技术,可以在五肽的两个末端添加两个Cys残基,这样就可以通过二硫键获得环肽衍生物。将Cys残基置于在肽衍生物中的选定位置以获得具有优化环尺寸的所需环状结构在本领域普通技术人员的权限范围内。或者,还可以将其他天然、非天然或、经修饰的氨基酸残基添加到五肽的任一或两个末端,从而在这些氨基酸残基之间形成连接体。可以选择特定的氨基酸残基,并将其置于选定的位置,以实现具有优化的环尺寸的所需环状结构。根据酰胺、二硫化物、闭环复分解(RCM)、或烯烃复分解等环化策略,可以选择氨基酸残基置换进行环化,而不会明显丧失活性。例如,

侧链或C末端具有羧酸的氨基酸残基(包括但不限于Asp和Glu)或侧链或N末端具有氨基的氨基酸残基(包括但不限于Lys、Dab、和Dap)可用于酰胺环化,而Cys或侧链上带有巯基基团的任何非天然氨基酸可用于-S-S-环化。氨基酸可以被放置在肽衍生物的任何所需位置,这样就可以形成所需大小的环,而不会实质上包含肽衍生物的活性。在一些实施方案中,可形成头尾环化。在一些实施方案中,连接体包括β-Ala。在一些实施方案中,连接体包括2-[(2-氨基)-乙氧基]-乙氧基-乙酸(AEEA)。在某些实施方案中,氨基酸残基之间的闭环长度为5至15个C-C键,例如,约5、约6、约7、约8、约9、约10、约11、约12、约13、约14、或约15个C-C键。

[0045] 在某些实施方案中,本技术的肽衍生物包括五肽序列中的一个或多个置换,以提高血浆稳定性并实现对肽同源受体改善的结合亲和力。例如,可以用一个或多个亲水性氨基酸残基置换五肽中与LRP1没有相互作用或相互作用极小的一个或多个氨基酸残基。此外,与LRP1相互作用的五肽中的一个或多个氨基酸残基可被一个或多个具有相似但更显著的理化特性的氨基酸残基置换。例如,Phe残基的侧链上有一个芳香环。在肽衍生物1-5和1-6中,Phe残基可被Nal(萘丙氨酸)或Trp置换,其显示为萘环或吲哚环,而不是苯环。这些置换大大改善了氨基酸残基的芳香特性,使其具有更多的疏水性和更多的芳香性(π堆叠)相互作用。在一些实施方案中,五肽中的一个或多个氨基酸残基可被一个或多个天然或非天然氨基酸残基置换。在一些实施方案中,五肽中的一个或多个氨基酸残基具有D-构型。在一些实施方案中,五肽中一个或多个氨基酸残基的侧链经修饰。例如,肽衍生物A3-1包括Val到Thr的置换,以保留部分疏水性,同时引入一些氢键,以及Phe到Nal的置换,以增加疏水性和芳香性相互作用。在另一实施例中,肽衍生物A3-8包括Nle到D-Ser的置换。基于晶体结构的研究,Nle与LRP-1没有相互作用,而是处于水相中。Nle的侧链是疏水的线性烃链,需要能量才能使其溶解。用具有亲水性侧链的D-Ser置换Nle残基,可通过降低焓罚(enthalpic penalty),转化为更强的结合能,来促进溶解。因此,在一些实施方案中,五肽的Nle残基缺失。在一些实施方案中,五肽中的一个或多个疏水性残基被一个或多个疏水性更小的残基如Ala,或被一个或多个中性或亲水残基如Thr和Ser置换。在一些实施方案中,五肽中的一个或多个疏水性残基被一个或多个疏水性更大的残基如Nal置换。在一些实施方案中,五肽中的Nle残基被具有D-构型的氨基酸残基如D-Dap、D-Lys、和D-Asp置换。

[0046] 五肽中的Met或Nle残基具有长的线性疏水性侧链。用D构型的亲水性氨基酸置换Met或Nle大大提高了肽衍生物与LRP1的结合活性。用侧链中含有羧酸的氨基酸残基置换可在一定程度上改善结合活性,而用具有含有羟基(Ser)或氨基(Dap)的短侧链的氨基酸置换可达到最佳效果。

[0047] 在某些实施方案中,本技术的SERPIN肽衍生物可通过使用一种或多种非天然肽键或氨基酸,或通过连接到肽官能团,如聚乙二醇(PEG),来进一步改性以延长保质期和/或生物利用度。

[0048] 在某些实施方案中,本技术的肽衍生物包括以下、基本由以下组成、或由以下组成:具有氨基酸序列FVFLM(SEQ ID NO:1)或FVFL[Nle](SEQ ID NO:2)的五肽,以及添加到五肽N末端的极性头、添加到五肽C末端的极性尾、或两者。极性头或极性尾包含2-9个带电荷的氨基酸残基,如Arg、Lys、和His。在一些实施方案中,极性头或极性尾包含2或3个带电荷的氨基酸残基。使用表1所示肽衍生物的一些实例来研究带正电荷的氨基酸在改善溶解度和调节NFκB激活方面的作用,使用SP163M和SP22作为阳性对照。这些肽衍生物在LRP1结

合位点的任一或两个末端添加了不同的三肽序列。

[0049] 在一些实施方案中,肽衍生物包括具有以下氨基酸序列的肽、基本由具有以下氨基酸序列的肽组成、或由具有以下氨基酸序列的肽组成:HHHPFVFLMHHH(SEQ ID NO:10)、HHHPFVFL[Nle]HHH(SEQ ID NO:11)、RRRPFVFL[Nle]RRR(SEQ ID NO:12)、KKKPFVFL[Nle]KKK(SEQ ID NO:13)、EEEVKFNKPFVFL[Nle]EEE(SEQ ID NO:14)、RRRCPFVFL[Nle]CRRR(SEQ ID NO:15)、RRRCPFVFL[Nle]C(SEQ ID NO:16)、CPFVFL[Nle]CRRR(SEQ ID NO:17)、RRRVKFNKPFVFLMRRR(SEQ ID NO:18)、或VKFNKPFVFL[Nle]IEQNTK(SEQ ID NO:5)。

[0050]

表 1.具有各种三肽修饰的肽衍生物

肽	序列	SEQ ID NO
SA1	Ac- HHHPFVFLMHHH	10
SA2	Ac- HHHPFVFL[Nle]HHH	11
SA3	Ac-RRRPFVFL[Nle]RRR	12
SA4	Ac-KKKPFVFL[Nle]KKK	13
SA5	Ac-EEEVKFNKPFVFL[Nle]EEE	14
SA6	Ac-RRRCPFVFL[Nle]CRRR	15
SA7*	Ac-RRRCPFVFL[Nle]C (环状)	16
SA8	Ac-CPFVFL[Nle]CRRR	17
SP22	RRRVKFNKPFVFLMRRR	18
SP163M	Ac-VKFNKPFVFL[Nle]IEQNTK-NH_2	5

[0051] *下划线序列表示环化。C残基之间形成二硫键,使肽环化。

[0052] 如实施例1所证实,当向LRP1结合基序添加一个或多个带正电荷的氨基酸,如精氨酸(R)残基时,降低NFκB的活性会增加。然而,在LRP1结合位点两侧添加一个或多个其他带电荷的氨基酸,如带正电荷的氨基酸(例如组氨酸(H)或赖氨酸(K))或带负电荷的氨基酸(例如谷氨酸(E)),并不会赋予活性,这表明了精氨酸残基的重要性和独特性。

[0053] 在某些实施方案中,本技术的肽衍生物是一种环肽,包括以下、基本由以下组成、或由以下组成:具有氨基酸序列FVFLM(SEQ ID NO:1)或FVFL[Nle](SEQ ID NO:2)的五肽,及在该五肽N末端添加的极性头、在该五肽C末端添加的极性尾、或两者。环化可以在任意两个残基之间,例如,环化可以是头到尾的环化。可以插入额外的残基,如Cys,以促进S-S键的形成,以连接两个残基。在一些实施方案中,五肽中疏水性残基F、M或Nle的一个或多个被中性或亲水性残基置换。因此,设计了具有各种正电荷氨的基酸残基添加和/或氨基酸置换组合的肽衍生物(表2中示出了一些实例),以在不影响其NFκB调节活性的同时提高其溶解性、稳定性和/或口服生物利用度。

[0054] 在某些实施方案中,本技术的肽衍生物包含具有氨基酸序列FVFLM(SEQ ID NO:1)或FVFL[Nle](SEQ ID NO:2)的五肽,以及额外的脯氨酸("P")氨基酸残基。在一些方面,P氨基酸残基位于五肽的C末端,因此肽衍生物包含氨基酸序列PFVFLM(SEQ ID NO:8)或PFVFL[Nle](SEQ ID NO:9)。在一些方面,包含氨基酸序列PFVFLM(SEQ ID NO:8)或PFVFL[Nle](SEQ ID NO:9)的肽衍生物可以是环化的肽。在一些方面,包含氨基酸序列PFVFLM(SEQ ID NO:8)或PFVFL[Nle](SEQ ID NO:9)的肽衍生物可通过进一步包含Cys残基以促进S-S键的形成而环化,例如具有氨基酸序列CPFVFLMC(SEQ ID NO:19)或CPFVFL[Nle]C(SEQ ID NO:20)的肽衍生物。在一些方面,具有序列CPFVFLMC(SEQ ID NO:19)或CPFVFL[Nle]C(SEQ ID NO:20)的肽衍生物可进一步包含极性头,例如三个R氨基酸残基。在一些方面,肽衍生物可包含序列RRRCPFVFLMC(SEQ ID NO:21)或RRRCPFVFL[Nle]C(SEQ ID NO:22)。在一些方面,具有序列RRRCPFVFLMC(SEQ ID NO:21)或RRRCPFVFL[Nle]C(SEQ ID NO:22)的肽衍生物可进一步被乙酰化。在一些方面,肽衍生物可以是肽SA7。

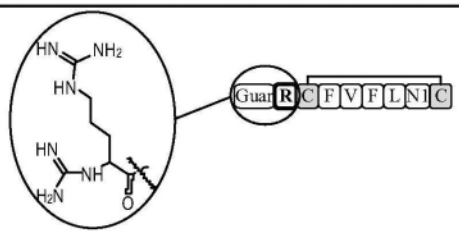
[0055] 在某些实施方案中,本技术的肽衍生物包括以下氨基酸序列、基本上由以下氨基酸序组成、或由以下氨基酸序列组成:RCFVFL[Nle]C(SEQ ID NO:23)、RRCFVFL[Nle]C(SEQ ID NO:24)、RRCFVFL[Nle]C(SEQ ID NO:25)、RRRCFVFL[Nle]C(SEQ ID NO:26)、RRRCFVFT[Nle]C(SEQ ID NO:27)、RRRCFTFL[Nle]C(SEQ ID NO:28)、或RRRCTVFL[Nle]C(SEQ ID NO:29)。

[0056]

表 2.为改善溶解度的肽衍生物

肽	序列	结构	SEQ ID NO

[0057]

A1*	Guar-RCFVFL[Nle]C (环状)		23
A2*	RRCFVFL[Nle]C (环状)		24
A3*	Ac-RRCFVFL[Nle]C (环状)		25
A4*	Ac-RRRCFVFL[Nle]C (环状)		26
A7*	Ac-RRRCFVFT[Nle]C (环状)		27
A8*	Ac-RRRCFTFL[Nle]C (环状)		28
A9*	Ac-RRRCTVFL[Nle]C (环状)		29

[0058] *下划线序列表示环化。C残基之间形成二硫键,使肽环化。

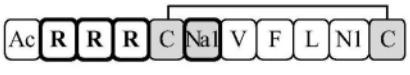
[0059] 如图1所示,五肽FVFLM(SEQ ID NO:1)的F、F和M残基指向一个方向,而V和L残基指向相反的方向。五肽N末端的P残基在结构上形成一个转折,但与LRP1没有相互作用。五肽的所有五个残基都不太可能与LRP1直接相互作用。此外,还设计了肽衍生物A7-A9,用亲水性较高的残基(如T)置换其中一个疏水性氨基酸残基(F、V、和L),以研究是否可以改善溶解性和/或活性。

[0060] 表3列出了一些具有一个F残基被1-萘丙氨酸置换的肽衍生物的实例,萘丙氨酸是一种带有额外芳香环的非天然氨基酸。萘丙氨酸(Nal)的置换增加了疏水性,可能会与LRP1产生更强的疏水相互作用。

[0061] 在某些实施方案中,本技术的肽衍生物包括以下氨基酸序列、基本上由以下氨基酸序组成、或由以下氨基酸序列组成:RRRCFV[Nal]L[Nle]C(SEQ ID NO:30)或RRRC[Nal]VFL[Nle]C(SEQ ID NO:31)。

[0062] **表 3.通过置换改善活性的肽衍生物**

[0063]

肽	序列	结构	SEQ ID NO:
A5*	Ac-RRRCFV[Nal]L[Nle]C (环状)		30
A6*	Ac-RRRC[Nal]VFL[Nle]C (环状)		31

[0064] *下划线序列表示环化。C残基之间形成二硫键,使肽环化。

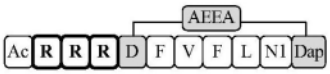
[0065] 还设计了额外的肽衍生物,以确定最佳的环尺寸。例如,可以用更长的连接体代替Cys-Cys桥,以改善环化。基于LRP1结合位点的晶体结构,测量了五肽FVFLM(SEQ ID NO:1)N末端氨基酸的α碳与C末端氨基酸的α碳之间的距离。假设C-C键的长度为1.5Å,将氨基酸之间的距离转换为C-C键的数量,可用于设计环化策略。例如,K368和I375的α碳之间的距离为22.4Å(约15个C-C-键),P369和I375的α碳之间的距离为20.2Å(约13.5个C-C-键)。见图2。为了使衍生物环化并模拟P369和I375之间的距离,可以使用具有13至14个C-C键的β-Ala连接体,将Lys残基的侧链与Glu残基的侧链连接起来,使肽衍生物环化,环的闭合长度为13个C-C键。见图3。

[0066] 在某些实施方案中,本技术的肽衍生物包括以下氨基酸序列、基本上由以下氨基酸序组成、或由以下氨基酸序列组成:RRRDFVFL[Nle][Dap](SEQ ID NO:32)、RRRDFVFL[Nle][Dap](SEQ ID NO:33)、RRRDFVFL[Nle][Dap](SEQ ID NO:34)、RRREFVFL[Nle]K(SEQ ID NO:35)、RRREFVFL[Nle]K(SEQ ID NO:36)、RRRFVFL[Nle]D(SEQ ID NO:37)。

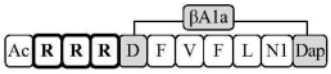
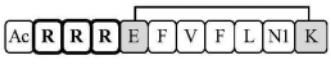
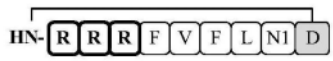
[0067] 表4举例说明了具有各种闭环设计的肽衍生物,其中使用了闭环连接体来置换Cys-Cys桥。

[0068]

表 4.具有各种闭环的肽衍生物

肽	序列	结构	闭环	SED ID No
A10*	Ac-RRRDFVFL[Nle][Dap] (环状)		Asp 与 2,3-二氨基丙酸(Dap)之间的连接体,具有 5 个 C-C 键的闭环长度。	32
A11*	Ac-RRRDFVFL[Nle][Dap] (环状)		Asp-2-[(2-氨基)-乙氧基]-乙氧基-乙酸(AEEA)-Dap 连接体具有 13 个	33

[0069]

			C-C 键的闭环长度。	
A12*	Ac-RRRDFVFL[Nle][Dap] (环状)		Asp-βAla-Dap 连接体具有 8 个 C-C 键的闭环长度。	34
A13*	Ac-RRREFVFL[Nle]K (环状)		Glu 和 Lys 之间的连接体具有 10 个 C-C 键的闭环长度。	35
A14*	Ac-RRREFVFL[Nle]K (环状)		Glu-βAla-Lys 连接体具有 13 个 C-C 键的闭环长度。	36
A15*	HN-RRRFVFL[Nle]D (环状)		N 末端氨基酸 Arg 的氨基与 C 末端氨基酸 Asp 侧链上的羧酸之间的头尾连接体，具有 12 个 C-C 键的闭环长度。	37

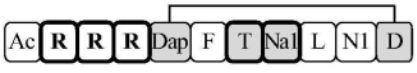
[0070] *下划线序列表示环化。

[0071] 实施例2表明,肽衍生物A5、A8、A10和A15在降低TNFα激活方面表现出改善的活性。表5列出了具有类似修饰的其他SERPIN肽衍生物的一些实例,以及在五肽中具有置换的肽衍生物。例如,五肽中的Nle被Ala置换或缺失,以确定Nle是否参与与LRP1的相互作用。此外,五肽的每个残基都被D-Ser(dS)置换,以改善溶解性和对蛋白酶的抗性。

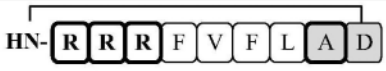
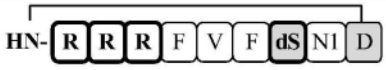
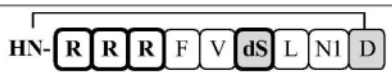
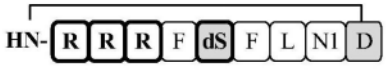
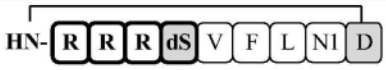
[0072] 在某些实施方案中,本技术的肽衍生物包括以下氨基酸序列、基本上由以下氨基酸序组成、或由以下氨基酸序列组成:RRR[Dap]FT[Nal]L[Nle]D(SEQ ID NO:38)、RRRFT[Nal]L[Nle]D(SEQ ID NO:39)、RRRFVFLAD(SEQ ID NO:40)、RRRFVFLD(SEQ ID NO:41)、RRRFVFL[dS]D(SEQ ID NO:42)、RRRFVF[dS][Nle]D(SEQ ID NO:43)、RRRFV[dS]L[Nle]D(SEQ ID NO:44)、RRRF[dS]FL[Nle]D(SEQ ID NO:45)或RRR[dS]VFL[Nle]D(SEQ ID NO:46)。

[0073]

表 5.具有不同闭环和 AA 置换的肽衍生物

肽	序列	结构	SEQ ID NO
A2-1*	Ac-RRR[Dap]FT[Nal]L[Nle]D (环状)		38

[0074]

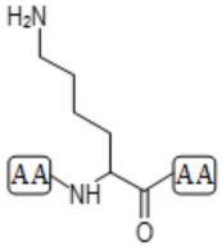
A2-2*	HN-RRRFT[Nal]L[Nle]D (环状)		39
A2-3*	HN-RRRFVFLAD (环状)		40
A2-4*	HN-RRRFVFLD (环状)		41
A2-5*	HN-RRRFVFL[dS]D (环状)		42
A2-6*	HN-RRRFVF[dS][Nle]D (环状)		43
A2-7*	HN-RRRFV[dS]L[Nle]D (环状)		44
A2-8*	HN-RRRF[dS]FL[Nle]D (环状)		45
A2-9*	HN-RRR[dS]VFL[Nle]D (环状)		46

[0075] *下划线序列表示环化。

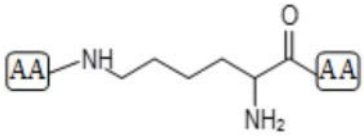
[0076] 如图7所示,肽衍生物A2-1、A2-2、A2-3、A2-4、和A2-5在降低TNFα和NFκB激活方面的活性优于SP163M和SA7。所测试的肽衍生物均未对所测试的细胞系表现出明显的毒性(图8)。

[0077] 在某些实施方案中,本技术的肽衍生物包括以下氨基酸序列、基本上由以下氨基酸序组成、或由以下氨基酸序列组成:RRRFT[Nal]LD(SEQ ID NO:47)、[rK]RRFT[Nal]LD(SEQ ID NO:48)、[rR]RRFT[Nal]LD(SEQ ID NO:49)、[rR][rR]FT[Nal]LD(SEQ ID NO:50)、RRR[Dap]FT[Nal]LD(SEQ ID NO:51)、RR[Dap]FT[Nal]LD(SEQ ID NO:52)RRRKFT[Nal]LD(SEQ ID NO:53)、RR[Dap]FT[Nal]L[dS]D(SEQ ID NO:54)、RRRFVFL[dDap]D(SEQ ID NO:56)、RRRFVFL[dK]D(SEQ ID NO:57)、RRRFVFL[dD]D(SEQ ID NO:58)、RRRFTF[Nal]A[Nle]D(SEQ ID NO:59)、RRRAT[Nal]L[Nle]D(SEQ ID NO:60)、RRRFT[Nal]L[dS]D(SEQ ID NO:61)、RRRFTWL[dS]D(SEQ ID NO:62)。

[0078] 表6提供了通过缺失缩短肽长度、优化环化和/或残基置换来进一步优化SERPIN肽衍生物的实例,以进一步改善溶解度、活性和/或口服利用度。在某些实施方案中,肽衍生物五肽中的一个或多个氨基酸残基缺失或被一个或多个天然或非天然氨基酸残基置换。例如,Nle残基可被Ala或Ser(D-Ser)等疏水性较小的氨基酸置换,以改善与LRP1结合的激动剂活性。在某些实施方案中,D-构型氨基酸可用于改变氨基酸在肽三维结构中的取向和/或赋予蛋白酶稳定性。在某些实施方案中,在五肽N末端添加两个带电荷的氨基酸残基,如Arg和/或Lys。在某些实施方案中,在五肽N末端添加三个带电荷的氨基酸残基,如Arg和/或Lys。如下例所示,带电荷的氨基酸可以具有"反向"的化学结构,以优化环的大小:

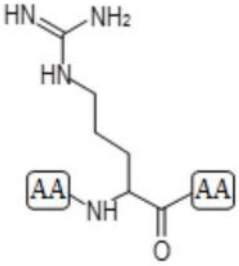


赖氨酸-Lys

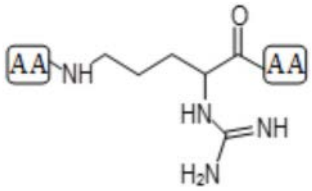


"反向"Lys-rLys

[0079]



精氨酸-Arg



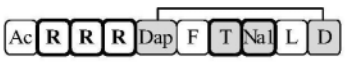
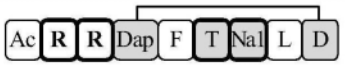
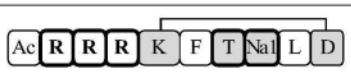
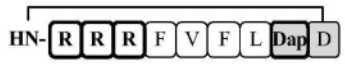
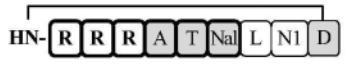
"反向"Arg-rArg

[0080]

表 6.带有其他修饰的肽衍生物

肽	序列	结构	修饰	SEQ ID NO
A3-1*	HN-RRRFT[Nal]LD (环状)		经优化的五肽序列，在从头尾的环化过程中缺失了 Nle。	47
A3-2*	HN-[rK]RRFT[Nal]LD (环状)		将赖氨酸侧链上的 ε-氨基基团与 Asp 的羧酸进行反向赖氨酸环化，以获得与含有 Nle 的衍生物相同大小的环。	48
A3-3*	HN-[rR]RRFT[Nal]LD (环状)		A3-2 的反向赖氨酸的 α-氨基被鸟苷酸化，得到 rArg，以提高溶解度。	49

[0081]

A3-4*	HN-[rR][rR]FT[Nal]LD (环状)		在删除一个 Arg 和 Nle 的同时，使用了两个 rArg，以保持环的大小和活性。	50
A3-5*	Ac-RRR[Dap]FT[Nal]LD (环状)		经优化的五肽序列，在 Dap-Asp 环化过程中缺失 Nle。	51
A3-6*	Ac-RR[Dap]FT[Nal]LD (环状)		删除了一个 Arg 残基，以缩短肽的长度。	52
A3-7*	Ac-RRRKFT[Nal]LD (环状)		Lys-Asp 环化被用来补偿由于 Nle 的缺失而损失的约 3 个 C-C 键的环尺寸。	53
A3-8*	Ac-RR[Dap]FT[Nal]L[dS]D (环状)		添加 D-Ser 残基以提高溶解度。	54
A3-9*	Ac-RR[Dap]FT[Nal]L[dS]D (环状) 与胺环化		使用仲胺代替酰胺键进行环化，以增加额外的碱性中心从而提高溶解度。	54
A3-10*	HN-RRRFVFL[dDap]D (环状)		用 D-Dap 置换，其侧链的形状和长度与 Ser 相同，但显示为氨基而不是羟基，以增加亲水性。	56
A3-11*	HN-RRRFT[Nal]LD (环状)		D-Lys 的侧链带有氨基，但距离肽骨架更远。	57
A3-12*	HN-[rK]RRFT[Nal]LD (环状)		D-Asp 侧链的形状和长度与 Ser 相同，但显示为羧酸基团而不是羟基，以增加亲水性。	58
A3-13*	HN-[rR]RRFT[Nal]LD (环状)		Leu 被 Ala 置换。	59
A3-14*	HN-[rR][rR]FT[Nal]LD (环状)		Phe 被 Ala 置换。	60
A3-15*	Ac-RRR[Dap]FT[Nal]LD (环状)		Phe 被非天然氨基酸 Nal 置换，以获得在该位置的疏水相互作用。	61

[0082]

A3-16*	Ac-RR[Dap]FT[Nal]LD (环状)		Phe 被一种天然氨基酸 Trp 置换，以获得在该位置的疏水相互作用。	62

[0083] *下划线序列表示环化。

[0084] 本技术的肽衍生物可进一步在酰胺键上被修饰,以改善蛋白酶的稳定性和吸收性,这些修饰包括但不限于肽键电子等排(isostere)、N-甲基化和/或D构型氨基酸置换。

[0085] 在某些实施方案中,公开了一种肽衍生物,其包括以下氨基酸序列、基本上由以下氨基酸序组成、或由以下氨基酸序列组成:X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10-X11(SEQ ID NO:3),其中:

[0086] X1是亲水性氨基酸残基或无;

[0087] X2是亲水性氨基酸残基或无;

[0088] X3是亲水性氨基酸残基或无;

[0089] X4是Cys氨基酸残基或无;

[0090] X5是Pro氨基酸残基或无;

[0091] X6是第一疏水性氨基酸残基;

[0092] X7是短支链氨基酸残基;

[0093] X8是第二疏水性氨基酸残基;

[0094] X9是饱和疏水性氨基酸残基;

[0095] X10是D构型的亲水性氨基酸;以及

[0096] X11是允许肽衍生物环化的任何氨基酸残基。

[0097] 在一些实施方案中,SEQ ID NO:3还包含以下的一个或多个:X4是Cys,X5是Pro,X7是Thr,X10是D构型的Lys残基。

[0098] 在一些实施方案中,X6和X8的第一和第二疏水性氨基酸残基是芳香族氨基酸残基。在一些实施方案中,X7的短支链氨基酸残基是Val或Thr。在一些实施方案中,X9的饱和疏水氨基酸是Leu。在一些实施方案中,X10的D构型亲水氨基酸是D构型的Asp、Glu、Lys、Dap、或Cys残基。

[0099] 在一些实施例中,X1是显示正电荷的碱性残基或无;X2是显示正电荷的碱性残基或无;X3是显示正电荷的碱性残基或无。在一些实施方案中,X1是Arg、Lys、或His残基、或无;X2是Arg、Lys、或His残基、或无;X3是Arg、Lys、或His残基、或无。

[0100] 在一些实施方案中,X6是Phe或Nal。在一些实施方案中,X8是Phe或Nal。在一些实施方案中,X6是Ala、Phe、或Nal,X4是Nal。在一些实施方案中,X7是Asp、Glu、Lys、Dap、或Cys。

[0101] 在一些实施方案中,肽衍生物是线性的或环化的。在一些实施方案中,肽衍生物的大小小于15个氨基酸残基。在一些实施方案中,肽衍生物的大小为7、8、9、10、11、或12个氨基酸残基。

[0102] 在某些实施方案中,本技术的肽衍生物在N末端被乙酰化,在C末端被酰胺化,或在N末端被乙酰化且在C末端被酰胺化。

[0103] 在某些实施方案中,肽衍生物用10个C-C键或等效物环化,以闭合SEQ ID NO:3的X4的α碳和X11之间的环。环化也可以发生在X11和SEQ ID NO:3的X4和X5之间添加的额外氨基酸残基之间。环化也可以发生在X11和SEQ ID NO:3的X5和X6之间添加的额外氨基酸残基之间。在该情况下,最佳的环是使用5个C-C键(或等效物)闭合的。在某些实施方案中,环化是头到尾的环化。

[0104] 在某些实施方案中,本技术的SERPIN肽衍生物具有5至30个氨基酸,例如5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个氨基酸的大小。在一些实施方案中,本技术的SERPIN肽衍生物的大小为20个氨基酸或更少。较长的肽可能具有降低的溶解度,而较短的肽可能具有降低的稳定性。在某些实施方案中,肽衍生物的大小为9个氨基酸残基;然而,具有8个氨基酸残基大小的肽衍生物结合优化的环化策略,其活性损失极小。

[0105] 在某些实施方案中,本技术的SERPIN肽衍生物与一种或多种其它肽或化合物融合,形成融合肽或融合蛋白。例如,一种或多种其它肽包括表位标签,如ALFA-标签、V5-标签、Myc-标签、HA-标签、Spot-标签、T7-标签、NE-标签,半衰期延长物,如聚(乙二醇)(PEG)、脂化、FC融合或白蛋白融合、或表位标签和半衰期延长物二者。

[0106] 在某些实施方案中,如图21所示,本技术的肽衍生物可与渗透增强剂(如油酸、胆酸、阳离子洗涤剂或内酰胺)缀合,以进一步提高透皮、经上皮、鼻腔、胃或局部的生物利用度。

[0107] 包含SERPIN肽衍生物的药物组合物

[0108] 在另一方面,本公开涉及一种药物组合物,包括本技术治疗有效量的一种或多种SERPIN肽衍生物或融合肽,或基本上由其组成、或由其组成。本技术的药物组合物可以配制成任何合适的剂型,用于经皮、舌下、鼻腔、口腔、吸入、直肠或眼部施用。在一些实施方案中,药物组合物进一步包含一种或多种额外的治疗剂,这些治疗剂不是本技术的肽衍生物。在一些实施方案中,药物组合物进一步包含一种或多种渗透增强剂,其用量为0.1%至5%(w/w量),以促进肽衍生物或融合肽渗透进皮肤、粘膜、鼻粘膜、或上皮层中。渗透增强剂的非限制性实例包括脂肪酸(如油酸)、胆汁酸(如胆酸)、阳离子洗涤剂(如十六烷基三甲基铵)、和内酰胺(如月桂氮酮)。在一些实施方案中,药物组合物还包括药学上可接受的载体、赋形剂、添加剂、防腐剂、或其组合。可接受载体的示例包括生理上可接受的溶液,如无菌生理盐水和无菌缓冲生理盐水。

[0109] 本文所用术语“有效量”是指能产生预期效果的组合物的量。有效量的组合物可用于对受试者产生预防或治疗效果,如预防或治疗目标病况、减轻与病况相关的症状或产生所需的生理效应。在这种情况下,组合物的有效量是“治疗有效量”、“治疗有效浓度”、或“治疗有效剂量”。精确的有效量或治疗有效量是指对给定的对象或细胞群体产生最有效疗效的组合物的量。该量的变化取决于多种因素,包括但不限于组合物的特性(包括活性、药代动力学、药效学和生物利用度)、细胞或受试者的生理状况(包括年龄、性别、疾病类型和阶段、一般身体状况、对给定剂量的反应性和药物类型)、制剂中药学上可接受的一种或多种载体的性质以及施用途径。此外,有效量或治疗有效量可能因组合物是单独施用还是与另一种组合物、药物、疗法或其他治疗方法或方式联合而有所不同。熟练掌握临床和药理学技术的人能够通过常规实验确定有效量或治疗有效量,即通过监测细胞或受试者对施用组合物的反应并相应地调整剂量。有关更多指导,请参阅雷明顿:《药学的科学与实践》,第21版,费城科学大学(USIP),Lippincott Williams&Wilkins,宾夕法尼亚州费城,2005年(Remington:The Science and Practice of Pharmacy,21st Edition,Univ.of Sciences in Philadelphia(USIP),Lippincott Williams&Wilkins,Philadelphia,PA,2005).

[0110] 在一些实施方式中,本技术的肽衍生物或药物组合物可配制成口服施用、肠胃外

施用(如静脉注射给药)、肌内施用、皮下施用(推注或通过输液泵等装置)、皮内施用、透皮施用、局部施用、和鼻内施用。在一些实施方式中,皮下注射泵可用于递送本技术的肽或药物组合物。肽或药物组合物可以多次施用。更具体地说,在首次施用后,可再给予一次或多次剂量作为增效剂。

[0111] 本技术的SERPIN肽衍生物、融合肽、或药物组合物具有各种功能。在某些实施方案中,本技术是一种用本公开的有效量的一种或多种SERPIN肽衍生物、融合肽、或药物组合物治疗有需要的受试者的方法。在一些实施方案中,受试者患有LRP1介导导致病理的疾病或病况,例如与周围神经损伤和由此引起的疼痛、肺损伤、感染性疾病和过敏性炎症(如嗜酸性粒细胞食管炎)相关的病况。在一些实施方案中,受试者患有与免疫反应失调相关的疾病,该疾病选自周围神经病、神经病理性疼痛、COVID-19感染、急性呼吸窘迫综合征(ARDS)、败血症、SARS-CoV-2、流感、甲病毒感染、和细胞因子风暴。

[0112] 本文所用的"治疗"某种病况可指预防该病况、减缓该病况的发生或发展速度、降低该病况发展的风险、预防或延缓与该病况相关的症状的发展、减轻或结束与该病况相关的症状、使该病况完全或部分消退,或以上几种情况的组合。治疗也可指对病况的预防性治疗。

[0113] 本文所用术语"受试者"是动物。在一些实施方式中,受试者是哺乳动物。在一些实施方式中,受试者是人类。在一些实施方式中,受试者在使用本技术的肽进行治疗之前,未接受过任何丝氨酸蛋白酶抑制剂治疗,如α-1-抗胰蛋白酶治疗。

[0114] 在一些实施方案中,肽可用于降低病理性TNF-α水平升高的人类个体血清中的TNF-α水平。当对人类受试者施用有效量的肽时,可使血清TNF-α水平下降75%。在某些实施方案中,当对人类受试者施用有效量的肽时,与施用肽前的水平相比,该肽导致血清TNF-α水平下降50%或75%。

[0115] 与LRP-1有关的疾病

[0116] LRP1是一种内吞和细胞信号转导受体,具有几种配体可诱导特定的细胞信号级联,从而有助于细胞存活和抗炎机制[5,18,22,25]。LRP1在许多不同器官中普遍表达,大量存在于脑、肺、心脏和免疫细胞中。由于这些独特的功能以及在组织和免疫细胞中的广泛表达,它在调节炎症、细胞新陈代谢和维持体内平衡方面发挥着至关重要的作用。例如,LRP1可调节炎症信号通路,如NFκB和JNK通路,从而诱导促炎症巨噬细胞(M1)向抗炎症巨噬细胞(M2)表型转化,调节细胞因子输出,并有助于有效迁移和吞噬[22,26,51]。在中性粒细胞中,LRP1依赖性机制可增强这些细胞的细胞粘附性、趋化性和抗菌作用,从而抵御免疫抑制[25]。在急性感染或损伤期间,LRP1还可通过清除垂死或损伤组织中的PAMPS和DAMPS来促进炎症消退,从而防止组织损伤循环[25]。LRP1还能在感染期间介导自噬,这一重要的新陈代谢过程最近被证明在多种疾病中发挥了重要的保护作用[4,10]。因此,由于LRP1具有调节炎症的多功能能力,因此靶向LRP1具有很大的潜力来减轻免疫反应的多个方面,而免疫反应对神经系统疾病、传染病和过敏性炎症等多种疾病的病理都有贡献。

[0117] 神经系统疾病

[0118] 就神经损伤和相关疼痛而言,周围神经系统损伤导致LRP1的表达增加。此前有研究表明,LRP1激动剂能够促进CNS的轴突生长,并能诱导脊髓损伤后的再生[53]。LRP1是多种配体(包括组织型纤溶酶原激活剂(tPA)、基质金属蛋白酶-9(MMP-9)和活化的α2-巨球蛋白)

的内吞受体[14]。这些配体能够诱导抗炎活性[39],激活许旺细胞修复程序[21],并转录激活与轴突再生相关的神经元中的细胞信号通路[38]。LRP1需要配体结合才能激活细胞信号传导,但不同的配体会引起不同的,有时是相反的细胞信号传导反应,这反映了不同配体组装独特的共受体复合物的能力。此外,许多LRP1配体是多域蛋白,对细胞生理有许多影响,但不涉及LRP1结合。例如,组织型纤溶酶原激活剂(tPA)与LRP1结合可促进许旺细胞(SC)的存活和迁移[23]。然而,通过与LRP1无关的活动,tPA会引起疼痛[1]。EI-tPA可促进人类iPSC衍生神经祖细胞(iNPC)的存活,将EI-tPA激活的iNPC移植到严重脊髓损伤的啮齿动物体内可改善运动功能的恢复[40]。神经损伤后的微环境失衡可能会产生严重后果,包括发展成慢性神经病理性疼痛状态[12]。在周围神经系统(PNS)损伤中,TNFα、IL-6和IL-1β等炎性细胞因子和IL-10等抗炎细胞因子在轴突再生和修复中发挥着核心作用[6]。

[0119] 对于阿尔茨海默病(AD)等神经退行性疾病,人们对LRP1的作用进行了广泛的研究。AD的特征是认知能力逐渐丧失,并在患者的海马和皮层形成主要由淀粉样β(Aβ)和称为神经纤维缠结(NFT)的tau蛋白聚集体组成的老年斑。在疾病进展过程中,蛋白聚集体的扩散是神经退行性疾病病理学的一个共同主题。作为内吞受体,LRP1被证明能调节大脑和全身淀粉样β-肽的清除、降解和产生[54]。由于LRP1介导的Aβ穿过血脑屏障(BBB)的清除是调节Aβ从脑到周围的转胞吞作用的关键事件,因此用本技术的一种或多种肽衍生物靶向LRP1可作为一种新型疗法。此外,形成NTF的tau蛋白聚集体在阿尔茨海默病的发病机制中起着核心作用。LRP1的功能是调节与病理学恶化相关的tau蛋白的内吞、聚集和扩散[32]。因此,本技术的SERPIN肽衍生物可作为一种干预措施,通过调节LRP1相关的tau蛋白和淀粉样蛋白aβ的蛋白聚集,修复斑块和纠结病理。

[0120] LRP1已被证明与神经退行性疾病的发展以及大脑和周围淀粉样β肽(Aβs)代谢的调节有关。神经炎症在阿尔茨海默病(AD)等神经退行性疾病中起着至关重要的作用。LRP1在CNS细胞中高表达,被证明在应激条件下对原代神经元的存活起着至关重要的作用[56,57]。小胶质细胞是大脑的常驻免疫细胞,起到维持环境稳态的作用。小胶质细胞被认为是CNS的原型组织驻留巨噬细胞样先天性免疫细胞[58]。这些细胞参与趋化、吞噬、抗原递呈和细胞因子的产生,然而,小胶质细胞受损或受到感染会导致神经炎症和神经变性[59]。反应性胶质细胞(如小胶质细胞)和相关的神经炎症在疾病的发生和发展中起着关键作用,通过对β淀粉样蛋白和其他损伤相关分子模式(DAMP)的失调清除而被激活[13]。AB沉积和tau过度磷酸化会导致小胶质细胞激活、NFκB炎症通路激活以及相关的促炎细胞因子,如TNFα、IL-6和IL-1β,从而导致神经元损伤和丧失。受损的自噬是一种降解和回收β淀粉样蛋白等蛋白的稳态过程,与AD有关[7]。LRP1已被证明能够介导与自噬相关的健康的溶酶体处理过程。因此,通过LRP1,本公开的SERPIN肽衍生物可以介导AD的多个方面,包括健康的细胞代谢以减少蛋白质聚集的扩散、减轻神经炎症、和改善神经元功能障碍,从而使这些细胞存活和可能的再生。

[0121] 急性肺损伤(急性呼吸窘迫综合征)

[0122] 导致急性呼吸窘迫综合征(ARDS)的急性肺损伤(ALI)可由肺炎、外伤、和/或感染等多种炎症损伤引发。ALI的一个关键起始步骤是对损伤相关或病原体相关分子模式(分别为DAMP或PAMP)的先天性免疫反应失调。肺泡巨噬细胞在Toll样和Nod样受体信号通路中被感染性微生物激活,导致巨噬细胞和循环中性粒细胞的进一步招募。中性粒细胞在肺部聚

集,释放促炎细胞因子和其他细胞毒性物质,导致损伤加重。肺上皮受到这些细胞的破坏,其分泌的产物导致肺水肿和潜在的呼吸窘迫(ARDS)。促炎细胞因子TNF-α、IL-1β、IL-6、IL-8、和IL-18的增加会导致"细胞因子风暴",这预示着败血症的发病率和死亡率。据报道,LRP1在败血症和ARDS中起着至关重要的作用,因为它调节肺部炎症和肺组织修复[49]。本技术中的SERPIN肽衍生物靶向LRP1,从而精确协调免疫反应,恢复稳态。因此,本公开的肽衍生物可通过诱导LRP1介导的特定信号通路启动多种机制,对减轻肺损伤和提高存活率产生重大影响。这些机制包括重新平衡细胞因子输出以促进炎症消退、介导自噬以恢复适当的细胞代谢过程、恢复免疫细胞功能以及清除受体以调节组织损伤循环。这些机制有助于清除感染,让宿主更好地抵抗感染。基于这些机制,所公开的SERPIN肽衍生物可用作免疫调节治疗剂,通过介导LRP1信号传导来预防或治疗ARDS。

[0123] 传染性疾病

[0124] 急性呼吸窘迫综合征(ARDS)是COVID-19重症患者的主要并发症。中国武汉的临床评估和回顾性研究显示,所有入院患者均出现肺炎,其中29%的患者出现了ARDS,而在非存活的重症患者中,绝大多数(81%)出现了ARDS[17,52]。因此,发生ARDS的患者死亡风险大大增加。通过Toll样受体(TLR)病毒介导的先天性免疫反应启动了消除感染所必需的炎症反应。在某些情况下,起始的病毒损害和触发因素被高度放大且不受控制,导致免疫细胞过度刺激和异常细胞因子释放(称为细胞因子风暴),造成可导致器官衰竭和死亡的组织损伤。细胞因子调节是防止过度活化的免疫反应产生有害影响的关键因素,控制细胞因子风暴可对病毒性肺炎发展为ARDS产生重大影响。就SARS-CoV-2而言,新的证据表明,对于一部分重症患者来说,细胞因子风暴是导致死亡的一个因素[27]。最近,白细胞介素-6抑制剂(IL-6)Kevzara(沙利鲁单抗)的临床试验已经启动,用于治疗冠状病毒感染的肺部并发症患者。IL-6是一种与肺炎患者较高死亡率相关的生物标志物。这些试验将为单一细胞因子靶向疗法的有效性提供关键见解。然而,从历史上看,在ARDS患者中靶向单一细胞因子或通路并不是一种有效的方法。

[0125] 由本技术的SERPIN肽衍生物介导的LRP1信号传导可能具有作为免疫调节策略的治疗潜力,通过调节肺部炎症的多种机制(包括抑制细胞因子风暴、改善细胞存活率、调节自噬和细胞代谢以清除感染,以及控制组织修复信号通路以促进正常愈合和防止纤维化)来改善COVID-19患者的预后。众所周知,LRP1可调节蛋白酶/抗蛋白酶活性并介导病毒进入[43]。新型冠状病毒利用蛋白酶(TMPRSS2)调节细胞进入和感染,使用其相应的蛋白酶抑制剂(如SERPIN)治疗阻断了肺细胞感染[16,24,28]。SARS-CoV-2病毒的进入依赖于引导参与宿主细胞进入的病毒S蛋白的丝氨酸蛋白酶TMPRSS2,这是病毒复制周期的第一步。甲磺酸卡莫司他是一种天然SEPPIN,具有TMPRSS2蛋白酶抑制剂的功能,能有效减少SARS-CoV-2病毒的进入,从而限制疾病的感染和传播[16]。本技术中的α-1抗胰蛋白酶衍生物,如SP163M,也能抑制TMPRSS2,可能是通过LRP1,并可能具有减少SARS-CoV-2病毒复制的作用。所公开的SERPIN肽衍生物可通过LRP1控制宿主蛋白酶/病毒蛋白相互作用来抑制病毒的进入的机制,从而减少SARS-CoV-2的复制。

[0126] 节肢动物传播的病毒是急性脑炎的重要病因,也是一个新出现的全球性问题,其传入新地区的风险与日俱增[11,31]。蚊子传播的脑炎α-病毒包括委内瑞拉(VEEV)、东部(EEEV)和西部马脑炎病毒(WEEV),这些病毒在美洲流行,导致脑脊髓炎爆发,并可能传播到美国。

VEEV在人类中会引起发热性疾病,典型症状是发烧、乏力和呕吐。在某些情况下,感染会发展到中枢神经系统(CNS)。神经系统病例的死亡率在儿童中高达35%,在成人中高达10%,幸存者通常会出现长期神经功能缺损[42]。患有神经系统后遗症的VEEV幸存者的总体估计为4-14%,但由于虫媒病毒脑炎的误诊,这一比例可能更高[33]。

[0127] 已知VEEV感染会抑制细胞转录和翻译,从而下调先天性免疫反应[45,48]。相反,在中枢神经系统(CNS)中,VEEV感染导致炎症反应和细胞凋亡途径中的许多基因上调[45,48]。具体来说,包括白细胞介素-1β(IL-1β)、IL-6、IL-12、和肿瘤坏死因子-α(TNF-α)在内的促炎细胞因子在VEEV发病机制中发挥作用[9,20,30,34,35]。对感染VEEV的小鼠脑组织中的基因表达变化进行了分析,发现参与抗原呈递、炎症、细胞凋亡和传统抗病毒反应的免疫通路发生了改变[36]。此外,在VEEV感染的小鼠脑内还观察到病毒对细胞外基质和粘附基因(如整合素、钙粘蛋白-1、钙粘蛋白-2、血管细胞粘附分子-1、和细胞内粘附分子-1(ICAM-1))的调节[37]。ICAM-1敲除小鼠的脑部炎症有所减轻,临床疾病的发病也随之推迟[37]。这些研究表明,甲病毒诱导的炎症在很大程度上造成了神经损伤,而控制炎症是一种可行的治疗策略。

[0128] 本技术的SERPIN肽衍生物可与LRP1结合,启动免疫调节级联。在缺血、组织损伤和病毒感染时,LRP1的表达会增加[2,22,25,43]。一种或多种已公开的肽衍生物与LRP1结合可抑制炎症反应,并通过蛋白激酶Akt的磷酸化诱导促生存信号传导。因此,靶向LRP1有可能成为感染性疾病的广谱治疗策略。

[0129] 通过LRP1引导的宿主介导机制,SERPIN肽衍生物可以抑制与严重COVID-19疾病相关的有害细胞因子风暴,激活保护性途径以防止肺损伤,和/或更快地清除感染,并对抑制病毒感染有直接影响。因此,SERPIN肽衍生物的双重抗炎和抗病毒机制可有效改善SARS-COV2引起的ARDS患者的存活率。

[0130] 嗜酸性粒细胞食管炎

[0131] 嗜酸性粒细胞食管炎(EoE)是一种主要由2型免疫介导的慢性过敏性炎症反应,与食管功能障碍和上皮屏障功能紊乱有关。食管炎症会导致吞咽困难、持续性胃灼热、胸痛和腹痛、体重减轻和食物嵌塞。其特征是大量嗜酸性粒细胞、蛋白酶、抗菌肽(cathelicidin)、丝氨酸蛋白酶(包括激肽释放酶(KLK5))、以及胸腺基质淋巴细胞生成素(TSLP),TSLP是一种细胞因子和局部环境中过敏性2型炎症反应的主要调节因子[41]。在食管上皮细胞中,丝氨酸肽酶抑制剂Kazal型7-SPINK7的功能丧失会导致蛋白酶活性失控,释放促炎细胞因子,如TNFα、CCL2、GM-CSF、IL-8、和CXCL10,并引发炎症。最近,发现丝氨酸蛋白酶KLK-5是上皮屏障功能的重要介质,是SPINK7的直接靶标,SPINK7的缺失主要通过失控的KLK-5蛋白酶活性介导EoE发病机制。有趣的是,SERPINα-1抗胰蛋白酶能够在体外抑制KLK5活性,在体内抑制过敏原诱导的食管嗜酸性粒细胞增多。然而,这种活性的机制尚不清楚,可能涉及LRP1而不是直接的蛋白水解抑制,或者除涉及直接的蛋白水解抑制外,可能还涉及LRP1。

[0132] 嗜酸性粒细胞哮喘患者的LRP1水平较低。此外,在过敏性气道疾病模型中,小鼠CD11b和CD11c树突状细胞的LRP1特异性缺失会导致过敏性炎症反应增强[29]。LRP1缺失的小鼠对抗原的摄取增加,嗜酸性粒细胞炎症、过敏致敏、Th2介导的细胞因子产生增加,T调节细胞减少[29]。因此,LRP1可帮助维持食管环境中蛋白酶/抑制剂的稳态,介导TH2反应并抑制炎症信号通路(NFκB、JNK),从而修复食管功能障碍。

[0133] 如本文所证实,所公开的SERPIN肽衍生物,如SA7(强效LRP1激动剂,不具有蛋白酶

抑制剂功能),可以降低TMPRSS2的表达。TMPRSS2已被证明在2型哮喘和过敏性鼻炎中的鼻腔和气道上皮细胞中的表达明显增加。研究还表明,TMPRSS2的表达与过敏反应中重要的TH2介导的免疫反应呈正相关。所公开的SERPIN肽衍生物通过介导对LRP1的控制,可能对缓解嗜酸性粒细胞食管炎具有重要意义。

[0134] 以下实施例旨在说明本技术的各种实施方案。因此,所讨论的具体实施方案并不构成对本技术范围的限制。显而易见的是,本领域技术人员在不脱离本技术范围的情况下,可以做出各种等效、改变、和修改,并且可以理解为,这些等效实施方案将包括在本文中。此外,本公开中引用的所有参考文献通过引用其全文并入本文,如同在此完全列出。

[0135] 下文第0096至0175段阐述了本技术的各种实施方案。

[0136] 一种SERPIN肽衍生物,包含核心序列FVFLM(SEQ ID NO:1)、FVFL[Nle](SEQ ID NO:2)、PFVFLM(SEQ ID NO:8)、PFVFL[Nle](SEQ ID NO:9),以及以下一种或多种修饰:

[0137] (i)添加到核心序列N末端的极性头、添加到核心序列C末端的极性尾、或添加到核心序列N末端的极性头及添加到核心序列C末端的极性尾;

[0138] (ii)添加到核心序列N末端、核心序列的C末端、或核心序列N末端和C末端的一个或多个氨基酸残基,使肽衍生物可以环化;

[0139] (iii)核心序列中的一个或多个氨基酸残基被相较于该核心序列中的一个或多个氨基酸残基具有更小疏水性的一个或多个替代氨基酸残基所置换;

[0140] (iv)核心序列中的一个或多个氨基酸残基被相较于该核心序列中的一个或多个氨基酸残基具有更大疏水性的一个或多个替代氨基酸残基所置换;以及

[0141] (v)核心序列中的一个或多个氨基酸残基缺失。

[0142] 根据第0096段的SERPIN肽衍生物,其中SERPIN肽衍生物是线性肽。

[0143] 根据第0096段的SERPIN肽衍生物,其中SERPIN肽衍生物是环化肽。

[0144] 根据第0098段的SERPIN肽衍生物,其中SERPIN肽衍生物通过在两个Cys残基之间形成的二硫键环化。

[0145] 根据第0098段的SERPIN肽衍生物,其中SERPIN肽衍生物通过两个氨基酸残基之间的连接体环化。

[0146] 根据第0096-0100段中任一段的SERPIN肽衍生物,其中极性头或极性尾包含两个或多个带电荷氨基酸,例如选自Arg、Lys、和His的带正电荷的氨基酸。

[0147] 根据第0096-0101段中任一段的SERPIN肽衍生物,其中SERPIN肽衍生物的大小小于15个氨基酸残基。

[0148] 根据第0096-0102段中任一段的SERPIN肽衍生物,其中SERPIN肽衍生物的大小为7、8、9、10、11、或12个氨基酸残基。

[0149] 根据第0096-0103段中任一段的SERPIN肽衍生物,其中一个或多个氨基酸残基是D-氨基酸。

[0150] 一种SERPIN肽衍生物,包含氨基酸序列X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10-X11(SEQ ID NO:3),其中:

[0151] X1是亲水性氨基酸残基或无;

[0152] X2是亲水性氨基酸残基或无;

[0153] X3是亲水性氨基酸残基或无;

[0154] X4是Cys氨基酸残基或无;

[0155] X5是Pro氨基酸残基或无;

[0156] X6是第一疏水性氨基酸残基;

[0157] X7是短支链氨基酸残基;

[0158] X8是第二疏水性氨基酸残基;

[0159] X9是饱和疏水性氨基酸残基;

[0160] X10是D构型的亲水性氨基酸;以及

[0161] X11是允许SERPIN肽衍生物环化的任何氨基酸残基。

[0162] 根据第0105段的SERPIN肽,其中第一和第二疏水性氨基酸残基是芳香族氨基酸残基。

[0163] 根据第0105-0106段中任一段的SERPIN肽,其中短支链氨基酸残基为Val或Thr。

[0164] 根据第0105-0107段中任一段的SERPIN肽,其中饱和疏水性氨基酸为Leu。

[0165] 根据第0105-0108段中任一段的SERPIN肽,其中D构型的亲水性氨基酸是D构型的Asp、Glu、Lys、Dap、或Cys残基。

[0166] 根据第0105-0109段的SERPIN肽,其中

[0167] X1是显示正电荷的碱性残基或无;

[0168] X2是显示正电荷的碱性残基或无;以及

[0169] X3是显示正电荷的碱性残基或无。

[0170] 根据第0105-0110段的SERPIN肽衍生物,其中

[0171] X1是Arg、Lys、或His残基,或者无;

[0172] X2是Arg、Lys、或His残基,或者无;以及

[0173] X3是Arg、Lys、或His残基,或者无。

[0174] 根据第0105-0111段中任一段的SERPIN肽衍生物,其中X6是Phe或Nal。

[0175] 根据第0105-0112段中任一段的SERPIN肽衍生物,其中X8是Phe或Nal。

[0176] 根据第0105-0113段中任一段的SERPIN肽衍生物,其中X6是Ala、Phe、或Nal,X4是Nal。

[0177] 根据第0105-0114段中任一段的SERPIN肽衍生物,其中X7是Asp、Glu、Lys、Dap、或Cys。

[0178] 根据第0105-0115段中任一段的SERPIN肽衍生物,其中SERPIN肽衍生物是线性的或环化的。

[0179] 根据第0105-0116段中任一段的SERPIN肽衍生物,其中SERPIN肽衍生物的大小小于15个氨基酸残基。

[0180] 根据第0105-0117段中任一段的SERPIN肽衍生物,其中SERPIN肽衍生物的大小为7、8、9、10、11、或12个氨基酸残基。

[0181] 一种SERPIN肽衍生物,包含核心序列FVFLM(SEQ ID NO:1)、FVFL[Nle](SEQ ID NO:2)、PFVFLM(SEQ ID NO:8)、PFVFL[Nle](SEQ ID NO:9),和以下一种或多种修饰:

[0182] (i)添加到核心序列N末端的一个或多个Lys、Glu、或His残基,添加到核心序列C末端的极性尾,或添加到核心序列N末端的一个或多个Lys、Glu、或His残基及添加到核心序列C末端的极性尾;

[0183] (ii)添加到核心序列N末端、核心序列C末端、或核心序列的N末端和C末端的一个或多个氨基酸残基,使SERPIN肽衍生物可以通过在两个Cys残基之间形成二硫键而环化;

[0184] (iii)核心序列中的一个或多个氨基酸残基被一个或多个Thr氨基酸残基置换;以及

[0185] (iv)核心序列中的一个或多个氨基酸残基被相较于该核心序列中的一个或多个氨基酸残基具有更大疏水性的一个或多个替代氨基酸残基所置换。

[0186] 根据第0119段的SERPIN肽衍生物,其中SERPIN肽衍生物是线性肽。

[0187] 根据第0119或0120段的SERPIN肽衍生物,其中SERPIN肽衍生物的大小小于15个氨基酸残基。

[0188] 根据第0119-0121段中任一段的SERPIN肽衍生物,其中SERPIN肽衍生物的大小为7、8、9、10、11、或12个氨基酸残基。

[0189] 一种SERPIN肽衍生物,包含氨基酸序列X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10-X11(SEQ ID NO:3),其中:

[0190] X1是亲水性氨基酸残基或无;

[0191] X2是亲水性氨基酸残基或无;

[0192] X3是亲水性氨基酸残基或无;

[0193] X4是Cys氨基酸残基或无;

[0194] X5是Pro氨基酸残基或无;

[0195] X6是第一疏水性氨基酸残基;

[0196] X7是短支链氨基酸残基;

[0197] X8是第二疏水性氨基酸残基;

[0198] X9是饱和疏水性氨基酸残基;

[0199] X10是D构型的亲水性氨基酸;以及

[0200] X11是允许SERPIN肽衍生物环化的任何氨基酸残基;

[0201] 其中X4是Cys,X5是Pro,X7是Thr,和/或X10是D-构型的Lys残基。

[0202] 根据第0123段的SERPIN肽,其中第一和第二疏水性氨基酸残基是芳香族氨基酸残基。

[0203] 根据第0123或0124段的SERPIN肽,其中短支链氨基酸残基是Val或Thr。

[0204] 根据第0123-0125段中任一段的SERPIN肽,其中饱和疏水性氨基酸为Leu。

[0205] 根据第0123-0126段中任一段的SERPIN肽,其中D构型的亲水性氨基酸是D构型的Asp、Glu、Lys、Dap、或Cys残基。

[0206] 根据第0123-0127段中任一段的SERPIN肽,其中

[0207] X1是显示正电荷的碱性残基或无;

[0208] X2是显示正电荷的碱性残基或无;以及

[0209] X3是显示正电荷的碱性残基或无。

[0210] 根据第0123-0128段中任一段的SERPIN肽衍生物,其中

[0211] X1是Arg、Lys或His残基,或者无;

[0212] X2是Arg、Lys或His残基,或者无;以及

[0213] X3是Arg、Lys或His残基,或者无。

[0214] 根据第0123-0129段中任一段的SERPIN肽衍生物,其中X6是Phe或Nal。

[0215] 根据第0123-0130段中任一段的SERPIN肽衍生物,其中X8是Phe或Nal。

[0216] 根据第0123-0131段中任一段的SERPIN肽衍生物,其中X6是Ala、Phe或Nal,X4是Nal。

[0217] 根据第0123-0132段中任一段的SERPIN肽衍生物,其中X7是Asp、Glu、Lys、Dap、或Cys。

[0218] 根据第0123-0133段中任一段的SERPIN肽衍生物,其中SERPIN肽衍生物是线性的或环化的。

[0219] 根据第0123-0134段中任一段的SERPIN肽衍生物,其中SERPIN肽衍生物的大小小于15个氨基酸残基。

[0220] 根据第0123-0135段中任一段的SERPIN肽衍生物,其中所述SERPIN肽衍生物的大小为7、8、9、10、11、或12个氨基酸残基。

[0221] 一种SERPIN肽衍生物,包括序列SEQ ID NO:10-20或23-62,其中SERPIN肽衍生物包括添加到核心序列N末端的极性头、添加到核心序列C末端的极性尾、或添加到核心序列N末端的极性头和添加到核心序列C末端的极性尾。

[0222] 一种SERPIN肽衍生物,包含序列SEQ ID NO:15-17或23-62,其中在核心序列N末端、核心序列C末端、或核心序列N末端C末端添加一个或多个氨基酸残基,从而使该肽衍生物可以环化。

[0223] 一种SERPIN肽衍生物,包含序列SEQ ID NO:27-29、38、39或42-62,其中核心序列中的一个或多个氨基酸残基被相较于该核心序列中的一个或多个氨基酸残基具有更小疏水性的一个或多个替代氨基酸残基所置换。

[0224] 一种SERPIN肽衍生物,包含序列SEQ ID NO:30或31,其中核心序列中的一个或多个氨基酸残基被相较于该核心序列中的一个或多个氨基酸残基具有更大疏水性的一个或多个替代氨基酸残基所置换。

[0225] 一种SERPIN肽衍生物,包含序列SEQ ID NO:41或47-53,其中核心序列中的一个或多个氨基酸残基被删除。

[0226] 一种SERPIN肽衍生物,包含序列SEQ ID NO:10、11、13或14、35或36,其中在核心序列N末端添加一个或多个Lys、Glu或His残基,在核心序列C末端添加极性尾,或在核心序列N末端添加一个或多个Lys、Glu或His残基且在核心序列C末端添加极性尾。

[0227] 一种SERPIN肽衍生物,包含序列SEQ ID NO:15-17或23-31,其中在核心序列N末端、核心序列C末端、或核心序列N末端和C末端添加一个或多个氨基酸残基,从而使SERPIN肽衍生物可以通过在两个Cys残基之间形成的二硫键环化。

[0228] 一种SERPIN肽衍生物,包含序列SEQ ID NO:27-29、38、39、47-55、或59-62的,其中核心序列中的一个或多个氨基酸残基被一个或多个Thr氨基酸残基置换。

[0229] 一种融合蛋白,包含第0096-0144段中任一段的SERPIN肽衍生物,及表位标签、半衰期延长物、或表位标签和半衰期延长物。

[0230] 一种缀合物,包含第0096-0144段中任一段的SERPIN肽衍生物,及渗透性增强剂。

[0231] 一种药物组合物,包含第0096-0144段中任一段的SERPIN肽衍生物、第0145段的融合蛋白、或第0146段的缀合物。

[0232] 根据第0147段的药物组合物,还包含一种或多种额外的治疗剂。

[0233] 根据第0147或0148段的药物组合物,还包含药学上可接受的载体、赋形剂、添加剂、防腐剂、或其组合。

[0234] 根据第0147-0149段中任一段的药物组合物,还包含渗透增强剂。

[0235] 根据第0147-0150段中任一段的药物组合物,其中药物组合物配制成口服施用、透皮施用、或肠胃外施用。

[0236] 一种融合蛋白,包含第0119-0136、0140、或0142-0144段中任一段的SERPIN肽衍生物,及表位标签、半衰期延长物、或表位标签和半衰期延长物。

[0237] 一种缀合物,包含第0119-0136、0140、或0142-0144段中任一段的SERPIN肽衍生物,及渗透增强剂。

[0238] 一种药物组合物,包含第0119-0136、0140、或0142-0144段中任一项的SERPIN肽衍生物,第0152段的融合蛋白,或第0153段的缀合物。

[0239] 根据第0154段的药物组合物,还包含一种或多种额外的治疗剂。

[0240] 根据第0154或0155段的药物组合物,还包含药学上可接受的载体、赋形剂、添加剂、防腐剂、或其组合。

[0241] 根据第0154-0156段中任一段的药物组合物,还包含渗透增强剂。

[0242] 根据第0154-0157段中任一段的药物组合物,其中药物组合物配制成口服施用、透皮施用、或肠胃外施用。

[0243] 一种治疗患有与LRP1相关的疾病或病况的受试者的方法,包括向受试者施用有效量的第0096-0144段的SERPIN肽衍生物、第0145段的融合蛋白、第0146段的缀合物、或第0147-0151段中任一段的药物组合物,以治疗与LRP1相关的疾病或病况。

[0244] 根据第0159段的方法,其中施用SERPIN肽减少受试者体内的NFkB激活。

[0245] 根据第0159或0160段的方法,其中施用SERPIN肽降低受试者体内的TNFa。

[0246] 根据第0159-0161段中任一段的方法,其中施用SERPIN肽降低IL-6。

[0247] 根据第0159-0162段中任一段的方法,其中与LRP1相关的疾病或病况是急性或神经性疼痛、伤害感受性疼痛、或炎症性疼痛。

[0248] 根据第0159-0163段中任一段的方法,其中与LRP1相关的疾病或病症是由病毒感染引起的疾病或病况。

[0249] 根据第0164段的方法,其中施用SERPIN肽减少病毒复制。

[0250] 根据第0159-0162段中任一段的方法,其中与LRP1相关的疾病或病况是嗜酸性粒细胞食管炎。

[0251] 根据第0159-0162段中任一段的方法,其中与LRP1相关的疾病或病况是急性肺损伤。

[0252] 一种治疗患有与LRP1相关的疾病或病况的受试者的方法,包括向受试者施用有效量的第0119-0136、0140、或0142-0144段中任一段的SERPIN肽衍生物、第0152段的融合蛋白、第0153段的缀合物、或第0154-0158段中任一段的药物组合物,以治疗与LRP1相关的疾病或病况。

[0253] 根据第0168段的方法,其中施用SERPIN肽减少受试者体内的NFkB激活。

[0254] 根据第0168或0169段的方法,其中施用SERPIN肽降低受试者体内的TNFa。

[0255] 根据第0168-0170段中任一段的方法,其中施用SERPIN肽降低IL-6。

[0256] 根据第0168-0170中任一段的方法,其中与LRP1相关的疾病或病况是由病毒感染引起的疾病或病况。

[0257] 根据第0172段的方法,其中施用SERPIN肽减少病毒复制。

[0258] 根据第0168-0170段中任一段的方法,其中与LRP1相关的疾病或病况是嗜酸性粒细胞食管炎。

[0259] 根据第0168-0170中任一段的方法,其中与LRP1相关的疾病或病况是急性肺损伤。

[0260] 实施例

[0261] 实施例1:SERPIN衍生衍生物的抗炎效果

[0262] 以SP163M和SP22为阳性对照,测试表1所列SERPIN肽衍生物SA1-SA8的抗炎效果。报告细胞(THP1-XBlue-MD2-CD14细胞)在受到LPS(5ng/ml)刺激之前,先用每种肽衍生物SA1-SA8以及SP22和SP163M(50μg/ml)处理,然后孵育过夜。在上清液中测量NFκB诱导的分泌型胚胎碱性磷酸酶(SEAP)并读取吸光度。如图1所示,与SP163M相比,保留了最短LRP1结合序列FVFL[Nle]和三肽RRR作为侧翼以提高溶解度的SERPIN肽衍生物(如SA3、SA6和SA7)在抑制NFκB方面表现出更高的活性。然而,以三肽HHH或KKK或带负电荷的三肽EEE作为侧翼的SERPIN肽衍生物(如SA1、SA2、SA4和SA5)表现出极低的NFκB抑制活性。

[0263] 该数据表明,可以制备缩短的肽(如SA3),而且缩短的肽在减少NFκB活化方面比SERPIN肽SP163M和SP22更有效,SP163M和SP22包含高度保守的核心序列,包括FNKP和LRP1结合基序(FVFLM/Nle)。

[0264] 实施例2:评估SERPIN肽衍生物的生物活性

[0265] 在体外筛选了各种SERPIN肽衍生物,以确定它们通过LRP-1激活减少TNFα和NFκB分泌的能力。在用LPS(5ng/ml)刺激NFκB报告细胞(THP1-XBlue-MD2-CD14细胞)并将其培养过夜之前,先用不同浓度的每种肽衍生物处理细胞(最高浓度为100μg/ml)。在上清液中测量NFκB诱导的分泌型胚胎碱性磷酸酶(SEAP)并读取吸光度。与于载剂(LPS刺激)细胞相比,NFκB激活减少的百分比如图所示。在LPS(100ng/ml)刺激24小时之前,用不同浓度的每种肽衍生物处理IMG小胶质细胞(最高浓度为100μg/ml)。用ELISA测定上清液中的TNFα(pg/ml)。

[0266] 如图5所示,对表2-4所列的SERPIN肽衍生物A1-A15进行了TNFα活性测试。具有氨基酸置换的肽衍生物A5和A8以及具有环闭合修饰的肽衍生物A10和A15在减少TNFα激活方面表现出改善的活性。

[0267] 图6显示,肽衍生物A2-1、A2-2、A2-3、A2-4、和A2-5在减少TNFα(图6A)和NFκB(图6B)活化方面表现出卓越的活性。这些肽衍生物的活性呈剂量依赖性,并显示出改善的效力(图7)。肽衍生物在高达50μg/mL的浓度下进行测试,而未经修饰的SP16、SP163M和SA7在高达100μg/mL的浓度下进行测试。所有肽衍生物均未显示出细胞毒性(图8)。在细胞毒性试验中,用SP163M或肽衍生物SA7、A5、A15、A2-1、A2-2、A2-3、A2-4、A2-5、A2-6、A2-7、A2-8和A2-9以高达100μg/mL的浓度处理细胞(NFκB报告细胞或IMG小胶质细胞)24小时,然后根据制造商的说明使用CellTiter-Glo®发光细胞活力试验测定细胞活力。

[0268] 图9显示肽衍生物A3-10和A3-14在减小NFκB激活方面表现出卓越的活性,图10显示肽衍生物A3-14在减小LPS刺激后IMG中IL-6的分泌方面表现出卓越的活性。由于合成相关的问题,肽衍生物A3-10没有被包括IL-6试验中。所测试的肽衍生物都没有显示出明显的

细胞毒性(图11)。

[0269] 下表7总结了本技术的一些肽衍生物的体外测试的EC50。

[0270]

表 7.各种肽衍生物的 EC50（μg/mL）			
肽	NFκB	TNFα	IL-6
A15	5.053	36.75	32.39

[0271]

A2-1	5.77	12.99	9.644
A2-3	2.647	11.76	3.379
A2-4	5.247	12.54	11.27
A2-5	1.465	2.386	1.399
A3-7	22.41	n/a	3.651
A3-10	2.162	34.59	58.46
A3-14	3.775	6	0.605
SP163M	41.51	125.9	134.5
SP16	151.9	~617.9	n/a
SA7	470	124.3	318.5

[0272] 实施例3:SERPIN肽衍生物的体内效果

[0273] 与SP163M相比,测试了SERPIN肽衍生物A15和A2-5减轻辣椒素诱导的小鼠疼痛相关行为的能力。将SP163M(50μg)、A15(5μg)、或A2.5(5μg)或辣椒素(25ng)注射到雄性小鼠的后爪中,观察10分钟与疼痛相关的行为,如退缩或舔舐。如图12所示,两种肽衍生物在5μg/小鼠的低剂量下的疼痛阻断效果与SP163M在更高剂量下的效果相似。

[0274] 实施例4:SERPIN肽衍生物对神经炎症的影响

[0275] 如图13所示,在用SERPIN肽衍生物SA7、SP163M或载剂对照处理的LPS诱导的小胶质细胞中,探索了细胞因子谱。细胞因子由LPS诱导并在上清液中测量。在小胶质细胞中,与肽SP163M相比,SA7能更有效地减少LPS介导的多种细胞因子,包括IL-6、TNFα、IL-1β、IL-12、和CXCL1。在添加或不添加LPS(100ng/mL)的情况下,用SA7(100μg/mL)、SP163M(100μg/mL)处理IMG小胶质细胞24小时。上清液中的细胞因子水平(pg/ml)通过多重检测法(multiplex assay)进行测定。

[0276] 接下来,在体内神经炎症模型中探索了肽衍生物SA7的功效。神经炎症的LPS模型已被大量研究用于了解神经退行性疾病[60-63]。这些研究证实,在C57BL/6小鼠中,LPS会导致认知障碍。此外,急性全身性LPS导致脑内小胶质细胞活化、淀粉样蛋白β清除受损、以及血液和脑促炎细胞因子的增加。因此,利用LPS诱导的神经炎症模型来测试肽衍生物SA7的活性。

[0277] 雌性C57BL/6小鼠(n=3-4)连续4天腹腔注射1mg/kgLPS(大肠杆菌0111:B4),然后每天在注射LPS1小时后皮下注射SP163M(100μg)或SA7(100μg)。每天记录体重和临床评估。研究结束时(第5天)(最后一次注射LPS24小时后),对小鼠进行称重、评分和处死。图3显示,与载剂和SP163M治疗的小鼠相比,SA7治疗小鼠的临床评分明显提高(图14A)。此外,SA7治疗的小鼠在体重减轻方面也有轻微的益处,而SP163M治疗的小鼠则没有(图14B)。

[0278] 脑匀浆使用LEGENDplex™小鼠炎症面板(使用荧光编码珠的流式多重检测)进行细胞因子分析评估。该面板可同时定量检测13种小鼠细胞因子,包括IL-1α、IL-1β、IL-6、IL-

10、IL-12p70、IL-17A、IL-23、IL-27、MCP-1、IFN-β、IFN-γ、TNF-α、和GM-CSF。图15显示,与载剂处理和SP163M处理的动物相比,SA7处理组在许多LPS诱导的细胞因子水平上确实显示出差异。例如,在载剂和SP163M的脑匀浆中测得了中等水平的IL-6,但在SA7处理的任何动物中均未测量到可检测水平的IL-6,而IL-17A、IL-12、TNFα、和GM-CSF也显示出较低的水平。这与SA7治疗后临床症状的改善相对应。

[0279] 接下来,分析脑匀浆中CNS损伤的两种生物标志物:神经元轴突中表达的神经丝蛋白轻链(NfL)和星形胶质细胞中表达的胶质纤维酸性蛋白(GFAP),后者是星形胶质细胞活化的标志物。有报告称,大脑皮层区域的炎症水平与血浆NfL水平呈负相关。研究发现,LPS选择性地减少神经元中神经丝蛋白轻链的表达。神经元再生、突触连接和神经元的平衡信号传导操作都需要NfL,这表明NfL的增加可能表明神经元免受LPS诱导的损伤。图16A显示,与载剂和SP163M相比,通过蛋白质印迹分析测定,肽衍生物SA7显著增加LPS激活神经炎症后脑匀浆中的NfL蛋白表达。GFAP的异常表达表明存在反应性星形胶质细胞和神经炎症。图16B显示,与SP163M和载剂处理的动物相比,通过蛋白质印迹分析测定,肽衍生物SA7显著降低了脑裂解物中GFAP的表达。这些结果表明肽衍生物具有很强的神经保护作用。

[0280] 实施例5:SERPIN肽衍生物对自噬的效果

[0281] 除神经炎症外,自噬(一种降解和回收β淀粉样蛋白等蛋白质的稳态过程)功能受损也与AD有关[7]。LRP1已被证明能够介导与自噬相关的健康溶酶体加工。因此,通过LRP1激动剂(如源自SERPIN肽的衍生物)有可能介导AD的多个方面,包括健康的细胞代谢以减少蛋白质聚集的扩散、减轻神经炎症、并改善神经元功能障碍,从而使这些细胞存活并可能再生。在小胶质细胞中测试了SP163M和肽衍生物SA7对自噬标记物的影响。在加入LPS(100ng/ml)24小时之前,用SP163M(100μg/ml)或SA7(100μg/ml)处理IMG小胶质细胞。收集裂解物并对LRP1和微管相关蛋白轻链3(LC3I和II)进行蛋白质印迹分析。确定了LC3II/I比率,这是自噬的常用标记,表示自噬通量。图17A显示,在LPS激活的小胶质细胞中,自噬通量降低,表明正常的溶酶体加工受损。在有LPS存在的情况下,用SP163M或肽衍生物SA7处理可使自噬功能恢复到接近基线水平。对LRP1蛋白表达进行了测量,图17B显示LPS导致蛋白表达水平下降(可能表明LRP1脱落增加)。SP163M和肽衍生物SA7增加了LPS激活的小胶质细胞中LRP1蛋白的表达。有趣的是,与SP163M相比,在没有LPS的情况下,用SA7处理显著增加了LRP1的表达。这些结果表明,SP163M对LRP1的调控有助于调节失调细胞过程的稳态平衡的另一种机制。

[0282] 实施例6:SERPIN肽衍生物对病毒感染的效果

[0283] 源自SERPIN的肽SP163M表现出抗病毒效果。SP163M能够显著减少神经炎甲病毒(如东部马脑炎(EEEV))的病毒复制。SP163M还能抑制新型冠状病毒SARS-CoV-2的病毒复制。众所周知,SARS-CoV-2和流感等其他病毒都利用宿主细胞蛋白酶用于病毒进入。TMPRSS2对SARS-CoV2包膜上的S蛋白进行加工,这一过程称为引导(priming)。S蛋白的引导是S蛋白与宿主受体ACE2结合的必要条件。众所周知,LRP1调节蛋白酶/抗蛋白酶的活性。蛋白酶抑制剂(如α-1抗胰蛋白酶)可降低TMPRSS2的蛋白水解活性,阻止S蛋白的引导,从而阻止病毒进入。此外,抑制TMPRSS2还能阻止ACE2的加工,从而降低冠状病毒的感染性。图18显示了不同浓度的SP163M和肽衍生物SA7对TMPRSS2的抑制作用。SP163M的IC50值为1125ng/mL,而SA7衍生物的IC50值为83ng/mL,效力更强。

[0284] 实施例7:SERPIN肽衍生物对嗜酸性粒细胞食管炎的效果

[0285] 就嗜酸性粒细胞食管炎(EoE)而言,A1AT已被证明可在小鼠模型和体外实验中减轻实验性EoE。目前尚不清楚A1AT效应是通过抑制蛋白水解活性还是通过激活LRP1信号传导介导的。嗜酸性粒细胞性哮喘患者的LRP1较低,在动物模型中,LRP1的缺失与过敏反应恶化有关。SP163M不含任何抗蛋白酶活性序列,可能是通过LRP1的介导而不是通过蛋白水解活性发挥作用。在嗜酸性粒细胞食管炎小鼠模型中,小鼠腹腔致敏卵清蛋白(OVA),然后分别在4天鼻腔挑战OVA,经蛋白质印迹分析测定,EoE诱导小鼠的食管裂解物显示LRP1蛋白表达水平较低。用源于SERPIN的肽SP163M处理小鼠后,LRP1水平升高(图19A)。有证据表明,食管中丝氨酸肽酶抑制剂卡扎尔7型(SPINK7)表达的丧失是EoE发病机制的上游事件。因此,测试了SP163M和肽衍生物SA7在减少胸腺基质淋巴细胞生成素(TSLP)的体外效果,TSLP是一种关键的免疫检查点细胞因子,在SPINK7缺失后参与刺激树突状细胞极化2型T细胞(Th2)的产生,这是参与EoE发病的关键细胞。图19B显示,SP163M通过SPINK7敲除EPC2细胞(人食管上皮细胞)抑制了聚肌苷酸胞苷酸(polyI:C)诱导的TSLP产生。SPINK7 KO细胞和对照细胞在高钙和高密度下铺板48小时,然后用SP163M或衍生物SA7(200μg/ml)和聚肌苷酸胞苷酸((5μg/ml,或未处理)处理8小时。通过ELISA测量上清液中TSLP的产生。

[0286] 此外,在过敏性哮喘小鼠模型中,通过两次腹腔注射含有佐剂明矾(先天性免疫反应和TH2介导的免疫反应的强诱导剂)的卵清蛋白,使小鼠对卵清蛋白过敏,然后分别在四天内通过鼻腔滴注卵清蛋白进行挑战,用肽衍生物A2-5治疗的小鼠显示炎症介质的减少。与非ova诱导的小鼠(生理盐水/生理盐水)相比,经载剂(载剂/OVA)处理的ova诱导的小鼠肺匀浆显示TSLP水平明显增加(p=0.001)。与用ova诱导的载剂处理的小鼠相比,用肽衍生物A2-5(A2-5/OVA)处理的ova诱导的小鼠显示出TSLP水平的明显降低(p=0.026)(图20A)。与未暴露于过敏原的动物相比,暴露于过敏原也会导致肺组织中的总蛋白增加。免疫细胞浸润到肺部可能是肺部总蛋白水平增加的原因。图20B显示,与载剂处理的动物相比,用SP163M(SP163M/OVA)、类固醇地塞米松(Dex/OVA)和肽衍生物A2-5处理的小鼠肺中的蛋白质水平显著降低(p<0.005)。在A2-5处理的小鼠中,与载剂处理的小鼠相比,这与肺组织中TH-2介导的细胞因子IL-5、IL-4和IL-13的减少有关(图20C)。

[0287] 参考文献

[0288] 下文所列的参考文献、专利和已公布的专利申请,以及上述说明书中引用的所有参考文献,其全部内容均以引用方式并入本文,如同在本文中完全列出一样。

[0289] 1.Berta,T.,Y.C.Liu,Z.Z.Xu,和R.R.Ji(2013)."Tissue plasminogen activator contributes to morphine tolerance and induces mechanical allodynia via astrocytic IL-1beta and ERK signaling in the spinal cord of mice(组织型纤溶酶原激活剂有助于吗啡耐受,并通过星形胶质细胞IL-1β和ERK信号传导在小鼠脊髓中诱导机械性异常性疼痛)."Neuroscience(神经科学)247:376-385.

[0290] 2.Christia,P.,M.Bujak,C.Gonzalez-Quesada,W.Chen,M.Dobaczewski,A.Reddy,和N.G.Frangogiannis(2013)."Systematic characterization of myocardial inflammation,repair,and remodeling in a mouse model of reperfused myocardial infarction(再灌注心肌梗死小鼠模型心肌炎症、修复和重塑的系统特征)."J Histochem Cytochem(组织化学与细胞化学杂志)61(8):555-570.

[0291] 3.Cooke,J.P.(2019)."Inflammation and Its Role in Regeneration and Repair(炎症及其在再生和修复中的作用)."Circ Res(流通研究)124(8):1166-1168.

[0292] 4.Feng,Y.,B.Liu,X.Zheng,L.Chen,W.Chen,和Z.Fang(2019)."The protective role of autophagy in sepsis(自噬在脓毒症中的保护作用)."Microb Pathog(微生物发病机制)131:106-111.

[0293] 5.Franchini,M.和M.Montagnana(2011)."Low-density lipoprotein receptor-related protein 1:new functions for an old molecule(低密度脂蛋白受体相关蛋白1:旧分子的新功能)."Clin Chem Lab Med(临床化学和检验医学)49(6):967-970.

[0294] 6.Fregnan,F.,L.Muratori,A.R.Simões,M.G.Giacobini-Robecchi,和S.Raimondo(2012)."Role of inflammatory cytokines in peripheral nerve injury(炎性细胞因子在周围神经损伤中的作用)."Neural regeneration research(神经再生研究)7(29):2259-2266.

[0295] 7.Gali,C.C.,E.Fanaee-Danesh,M.Zandl-Lang,N.M.Albrecher,C.Tam-Amersdorfer,A.Stracke,V.Sachdev,F.Reichmann,Y.Sun,A.Avdili,M.Reiter,D.Kratky,P.Holzer,A.Lass,K.K.Kandimalla,和U.Panzenboeck(2019)."Amyloid-beta impairs insulin signaling by accelerating autophagy-lysosomal degradation of LRP-1 and IR-βin blood-brain barrier endothelial cells in vitro and in 3XTg-AD mice(淀粉样蛋白β通过加速体外和3XTg-AD小鼠血脑屏障内皮细胞中LRP-1和IR-β的自噬溶酶体降解来损害胰岛素信号传导)."Molecular and Cellular Neuroscience(分子和细胞神经科学)99:103390.

[0296] 8.Gettins,P.G.W.和S.T.Olson(2016)."Inhibitory serpins.New insights into their folding,polymerization,regulation and clearance(抑制性丝蛋白。对其折叠、聚合、调节和清除的新认识)."The Biochemical journal(生化期刊)473(15):2273-2293.

[0297] 9.Griffin,D.,B.Levine,W.Tyor,S.Ubol,和P.Despres(1997)."The role of antibody in recovery from alphavirus encephalitis(抗体在甲型病毒性脑炎恢复中的作用)."Immunol Rev(免疫学研究)159:155-161.

[0298] 10.Grosso,R.A.,P.V.Subirada Caldarone,M.C.Sanchez,G.A.Chiabrando,M.I.Colombo,和C.M.Fader(2018)."Hemin induces autophagy in a leukemic erythroblast cell line through the LRP1 receptor(血红素通过LRP1受体诱导白血病成红细胞系的自噬)."Biosci Rep(生物科学报告).

[0299] 11.Gubler,D.J.(2002)."The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems(虫媒病毒病作为公共卫生问题在全球范围内的出现/复发)."Archives of Medical Research(医学研究档案)33(4):330-342.

[0300] 12.Hashizume,H.,J.A.DeLeo,R.W.Colburn,和J.N.Weinstein(2000)."Spinal glial activation and cytokine expression after lumbar root injury in the rat(大鼠腰根损伤后脊髓胶质细胞活化和细胞因子表达)."Spine(Phila Pa 1976)(脊柱(费城出版社1976年版))25(10):1206-1217.

[0301] 13.Hemonnot,A.-L.,J.Hua,L.Ulmann,和H.Hirbec(2019)."Microglia in

Alzheimer Disease:Well-Known Targets and New Opportunities(阿尔茨海默病中的小胶质细胞:众所周知的靶点和新的机遇)."Frontiers in Aging Neuroscience(老化神经科学前沿)11(233).

[0302] 14.Herz,J.和D.K.Strickland(2001)."LRP:a multifunctional scavenger and signaling receptor(LRP:一种多功能清道夫和信号受体)."J Clin Invest(临床研究杂志)108(6):779-784.

[0303] 15.Hoffmann,M.,H.Kleine-Weber,S.Schroeder,N.Krüger,T.Herrler,S.Erichsen,T.S.Schiergens,G.Herrler,N.-H.Wu,A.Nitsche,M.A.Müller,C.Drosten,和S.Pöhlmann(2020)."SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor(SARS-CoV-2细胞进入依赖于ACE2和TMPRSS2,并被临床证明的蛋白酶抑制剂阻断)."Cell(细胞).

[0304] 16.Hoffmann,M.,H.Kleine-Weber,S.Schroeder,N.Krüger,T.Herrler,S.Erichsen,T.S.Schiergens,G.Herrler,N.H.Wu,A.Nitsche,M.A.Müller,C.Drosten,和S.Pöhlmann(2020)."SARS-CoV-2Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor(SARS-CoV-2细胞进入依赖于ACE2和TMPRSS2,并被临床证明的蛋白酶抑制剂阻断)."Cell(细胞)181(2):271-280.e278.

[0305] 17.Huang,C.,Y.Wang,X.Li,L.Ren,J.Zhao,Y.Hu,L.Zhang,G.Fan,J.Xu,X.Gu,Z.Cheng,T.Yu,J.Xia,Y.Wei,W.Wu,X.Xie,W.Yin,H.Li,M.Liu,Y.Xiao,H.Gao,L.Guo,J.Xie,G.Wang,R.Jiang,Z.Gao,Q.Jin,J.Wang,和B.Cao(2020)."Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan,China(中国武汉2019年新型冠状病毒感染者的临床特征)."The Lancet(柳叶刀)395(10223):497-506.

[0306] 18.Joslin,G.,R.J.Fallon,J.Bullock,S.P.Adams,和D.H.Perlmutter(1991)."The SEC receptor recognizes a pentapeptide neodomain of alpha 1-antitrypsin-protease complexes(SEC受体识别α1-抗胰蛋白酶-蛋白酶复合物的五肽新结构域)."J Biol Chem(生物化学杂志)266(17):11282-11288.

[0307] 19.Kawamura,A.,D.Baitsch,R.Telgmann,R.Feuerborn,G.Weissen-Plenz,C.Hagedorn,K.Saku,S.M.Brand-Herrmann,A.von Eckardstein,G.Assmann,和J.R.Nofer(2007)."Apolipoprotein E interrupts interleukin-1beta signaling in vascular smooth muscle cells(载脂蛋白E阻断血管平滑肌细胞白细胞介素-1β信号传导)."Arterioscler Thromb Vasc Biol(动脉血栓血管生物学)27(7):1610-1617.

[0308] 20.Kehn-Hall,K.,A.Narayanan,L.Lundberg,G.Sampey,C.Pinkham,I.Guendel,R.Van Duyne,S.Senina,K.L.Schultz,E.Stavale,M.J.Aman,C.Bailey,和F.Kashanchi(2012)."Modulation of GSK-3beta activity in Venezuelan equine encephalitis virus infection(委内瑞拉马脑炎病毒感染中GSK-3β活性的调节)."PLoS One(美国科学公共图书馆)7(4):e34761.

[0309] 21.Landowski,L.M.,M.Pavez,L.S.Brown,R.Gasperini,B.V.Taylor,A.K.West,和L.Foa(2016)."Low-density Lipoprotein Receptor-related Proteins in a Novel Mechanism of Axon Guidance and Peripheral Nerve Regeneration(低密度脂蛋白受体相关蛋白在轴突引导和周围神经再生新机制中的作用)."The Journal of biological

chemistry(生物化学杂志)291(3):1092-1102.

[0310] 22.Lillis,A.P.,L.B.Van Duyn,J.E.Murphy-Ullrich,和D.K.Strickland(2008)."LDL receptor-related protein 1:unique tissue-specific functions revealed by selective gene knockout studies(LDL受体相关蛋白1:选择性基因敲除研究揭示的独特组织特异性功能)."Physiol Rev(生理学评论)88(3):887-918.

[0311] 23.Mantuano,E.,M.S.Lam,M.Shibayama,W.M.Campana,和S.L.Gonias(2015)."The NMDA receptor functions independently and as an LRP1 co-receptor to promote Schwann cell survival and migration(NMDA受体独立发挥作用,并作为LRP1共受体促进雪旺氏细胞存活和迁移)."Journal of Cell Science(细胞科学杂志)128(18):3478-3488.

[0312] 24.Matsuyama,S.,N.Nao,K.Shirato,M.Kawase,S.Saito,I.Takayama,N.Nagata,T.Sekizuka,H.Katoh,F.Kato,M.Sakata,M.Tahara,S.Kutsuna,N.Ohmagari,M.Kuroda,T.Suzuki,T.Kageyama,和M.Takeda(2020)."Enhanced isolation of SARS-CoV-2 by TMPRSS2-expressing cells(通过TMPRSS2表达细胞增强分离SARS-CoV-2)."Proceedings of the National Academy of Sciences(美国国家科学院院刊)117(13):7001.

[0313] 25.May,P.(2013)."The low-density lipoprotein receptor-related protein 1in inflammation(炎症中的低密度脂蛋白受体相关蛋白1)."Curr Opin Lipidol(脂质学的当前观点)24(2):134-137.

[0314] 26.May,P.,H.H.Bock,和J.R.Nofer(2013)."Low density receptor-related protein 1(LRP1)promotes anti-inflammatory phenotype in murine macrophages(低密度受体相关蛋白1(LRP1)促进小鼠巨噬细胞的抗炎表型)."CellTissueRes(细胞组织研究)354(3):887-889.

[0315] 27.Mehta,P.,D.F.McAuley,M.Brown,E.Sanchez,R.S.Tattersall,和J.J.Manson(2020)."COVID-19:consider cytokine storm syndromes and immunosuppression(COVID-19:考虑细胞因子风暴综合征和免疫抑制)."The Lancet(柳叶刀)395(10229):1033-1034.

[0316] 28.Meyer,M.和I.Jaspers(2015)."Respiratory protease/antiprotease balance determines susceptibility to viral infection and can be modified by nutritional antioxidants(呼吸蛋白酶/抗蛋白酶平衡决定对病毒感染的易感性,可通过营养抗氧化剂改变)."American journal of physiology.Lung cellular and molecular physiology(美国生理学杂志。肺细胞和分子生理学)308(12):L1189-L1201.

[0317] 29.Mishra,A.,X.Yao,A.Saxena,E.M.Gordon,M.Kaler,R.A.Cuento,A.V.Barochia,P.K.Dagur,J.P.McCoy,K.J.Keeran,K.R.Jeffries,X.Qu,Z.X.Yu,和S.J.Levine(2018)."Low-density lipoprotein receptor–related protein 1 attenuates house dust mite–induced eosinophilic airway inflammation by suppressing dendritic cell–mediated adaptive immune responses(低密度脂蛋白受体–相关蛋白1通过抑制树突状细胞–介导的适应性免疫反应减轻屋尘螨–诱导的嗜酸性粒细胞气道炎症)."Journal of Allergy and Clinical Immunology(过敏与临床免疫学杂志)142(4):1066-1079.e1066.

[0318] 30.Muehlenbein,M.P.,F.B.Cogswell,M.A.James,J.Koterski,和G.V.Ludwig(2006)."Testosterone correlates with Venezuelan equine encephalitis virus infection in macaques(睾酮与猕猴感染委内瑞拉马脑炎病毒的相关性)."Virol J(病毒学杂志)3:19.

[0319] 31.Olival,K.J.和P.Daszak(2005)."The ecology of emerging neurotropic viruses(新出现的神经性病毒生态学)."Journal of Neurovirology(神经病毒学杂志)11(5):441-446.

[0320] 32.Rauch,J.N.,G.Luna,E.Guzman,M.Audouard,C.Challis,Y.E.Sibih,C.Leshuk,I.Hernandez,S.Wegmann,B.T.Hyman,V.Gradinaru,M.Kampmann,和K.S.Kosik(2020)."LRP1 is a master regulator of tau uptake and spread(LRP1是tau吸收和扩散的主调节器)."Nature(自然)580(7803):381-385.

[0321] 33.Ronca,S.E.,K.T.Dineley,和S.Paessler(2016)."Neurological Sequelae Resulting from Encephalitic Alphavirus Infection(脑炎阿尔卑斯病毒感染导致的神经系统后遗症)."Front Microbiol(微生物学前沿)7:959.

[0322] 34.Schoneboom,B.A.,K.M.Catlin,A.M.Marty,和F.B.Grieder(2000)."Inflammation is a component of neurodegeneration in response to Venezuelan equine encephalitis virus infection in mice(炎症是委内瑞拉马脑炎病毒感染小鼠神经变性的一个组成部分)."J Neuroimmunol(神经免疫学杂志)109(2):132-146.

[0323] 35.Schoneboom,B.A.,J.S.Lee,和F.B.Grieder(2000)."Early expression of IFN-alpha/beta and iNOS in the brains of Venezuelan equine encephalitis virus-infected mice(委内瑞拉马脑炎病毒感染小鼠大脑中IFN-α/beta和iNOS的早期表达)."J Interferon Cytokine Res(干扰素细胞因子研究杂志)20(2):205-215.

[0324] 36.Sharma,A.,B.Bhattacharya,R.K.Puri,和R.K.Maheshwari(2008)."Venezuelan equine encephalitis virus infection causes modulation of inflammatory and immune response genes in mouse brain(委内瑞拉马脑炎病毒感染导致小鼠大脑中炎症和免疫反应基因的调节)."BMC Genomics(BMC基因组学)9:289.

[0325] 37.Sharma,A.,M.Bhomia,S.P.Honnold,和R.K.Maheshwari(2011)."Role of adhesion molecules and inflammation in Venezuelan equine encephalitis virus infected mouse brain(委内瑞拉马脑炎病毒感染小鼠大脑中粘附分子和炎症的作用)."Virology Journal (病毒学杂志)8:197-197.

[0326] 38.Shi,Y.,E.Mantuano,G.Inoue,W.M.Campana,和S.L.Gonias(2009)."Ligand binding to LRP1 transactivates Trk receptors by a Src family kinase-dependent pathway(配体结合到LRP1可通过Src家族激酶依赖性途径反式激活Trk受体)."Sci Signal(科学信号)2(68):ra18.

[0327] 39.Shi,Y.,T.Yamauchi,A.Gaultier,S.Takimoto,W.M.Campana,和S.L.Gonias(2011)."Regulation of cytokine expression by Schwann cells in response to alpha2-macroglobulin binding to LRP1(许旺细胞对α2-巨球蛋白与LRP1结合的细胞因子表达调控)."J Neurosci Res(神经科学研究杂志)89(4):544-551.

[0328] 40.Shiga,Y.,A.Shiga,P.Mesci,H.Kwon,C.Brifault,J.H.Kim,J.J.Jeziorski,

C.Nasamran,S.Ohtori,A.R.Muotri,S.L.Gonias,和W.M.Campana(2019)."Tissue-type plasminogen activator-primed human iPSC-derived neural progenitor cells promote motor recovery after severe spinal cord injury(组织型纤溶酶原激活剂刺激的人iPSC衍生神经祖细胞促进严重脊髓损伤后的运动恢复)."Scientific Reports(科学报告)9(1):19291.

[0329] 41.Simon,D.,B.Page,M.Vogel,C.Bussmann,C.Blanchard,A.Straumann,和H.-U.Simon(2018)."Evidence of an abnormal epithelial barrier in active,untreated and corticosteroid-treated eosinophilic esophagitis(活动性、未治疗和皮质类固醇治疗的嗜酸性粒细胞食管炎上皮屏障异常的证据)."Allergy(过敏)73(1):239-247.

[0330] 42.Steele,K.E.和N.A.Twenhafel(2010)."REVIEW PAPER:pathology of animal models of alphavirus encephalitis(评论文章:阿尔法病毒脑炎动物模型的病理学)."Vet Pathol(兽医病理学)47(5):790-805.

[0331] 43.Strickland,D.K.,S.C.Muratoglu,和T.M.Antalis(2011)."Serpin-Enzyme Receptors LDL Receptor-Related Protein 1(丝氨酸蛋白酶受体LDL受体相关蛋白1)."Methods Enzymol(酶学方法)499:17-31.

[0332] 44.Subramaniyam,D.,P.Glader,K.von Wachenfeldt,J.Burneckiene,T.Stevens,和S.Janciauskiene(2006)."C-36 peptide,a degradation product of alpha1-antitrypsin,modulates human monocyte activation through LPS signaling pathways(C-36肽,α1-抗胰蛋白酶的降解产物,通过LPS信号通路调节人类单核细胞活化)."Int J Biochem Cell Biol(国际生物化学与细胞生物学)38(4):563-575.

[0333] 45.Taylor,K.G.和S.Paessler(2013)."Pathogenesis of Venezuelan equine encephalitis(委内瑞拉马脑炎的发病机制)."Vet Microbiol(兽医微生物学)167(1-2):145-150.

[0334] 46.Toldo,S.,D.Austin,A.G.Mauro,E.Mezzaroma,B.W.Van Tassell,C.Marchetti,S.Carbone,S.Mogelsvang,C.Gelber,和A.Abbate(2017)."Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein-1 Is a Therapeutic Target in Acute Myocardial Infarction(低密度脂蛋白受体相关蛋白-1是急性心肌梗死的治疗靶点)."JACC Basic Transl Sci(Jacc基础转化科学)2(5):561-574.

[0335] 47.Wang,Y.,K.Jiang,Q.Zhang,S.Meng,和C.Ding(2018)."Autophagy in Negative-Strand RNA Virus Infection(负链RNA病毒感染中的自噬)."Frontiers in Microbiology(微生物学前沿)9(206).

[0336] 48.Weaver,S.C.,C.Ferro,R.Barrera,J.Boshell,和J.C.Navarro(2004)."Venezuelan equine encephalitis(委内瑞拉马脑炎)."Annu Rev Entomol(昆虫学年度回顾)49:141-174.

[0337] 49.Wujak,L.,P.Markart和M.Wygrecka(2016)."The low density lipoprotein receptor-related protein(LRP)1and its function in lung diseases(低密度脂蛋白受体相关蛋白(LRP)1及其在肺部疾病中的功能)."Histol Histopathol(组织病理学)31(7):733-745.

[0338] 50.Wujak,L.,J.Schnieder,L.Schaefer,和M.Wygrecka(2018)."LRP1:A

chameleon receptor of lung inflammation and repair(LRP1:肺部炎症和修复的变色龙受体)."Matrix Biology(基质生物学)68-69:366-381.

[0339] 51.Yang,L.,C.-C.Liu,H.Zheng,T.Kanekiyo,Y.Atagi,L.Jia,D.Wang,A.N'songo,D.Can,H.Xu,X.-F.Chen,和G.Bu(2016)."LRP1 modulates the microglial immune response via regulation of JNK and NF-κB signaling pathways(LRP1通过调控JNK和NF-κB信号通路调节小胶质细胞免疫反应)."Journal of Neuroinflammation(神经炎症杂志)13(1):304.

[0340] 52.Yang,X.,Y.Yu,J.Xu,H.Shu,J.a.Xia,H.Liu,Y.Wu,L.Zhang,Z.Yu,M.Fang,T.Yu,Y.Wang,S.Pan,X.Zou,S.Yuan,和Y.Shang(2020)."Clinical course and outcomes of critically ill patients with SARS-CoV-2pneumonia in Wuhan,China:a single-centered,retrospective,observational study(中国武汉SARS-CoV-2肺炎重症患者的临床过程和预后:一项单中心、回顾性、观察性研究)."The Lancet Respiratory Medicine(柳叶刀呼吸医学).

[0341] 53.Yoon,C.,E.A.Van Niekerk,K.Henry,T.Ishikawa,S.Orita,M.H.Tuszynski,和W.M.Campana(2013)."Low-density Lipoprotein Receptor-related Protein 1(LRP1)-dependent Cell Signaling Promotes Axonal Regeneration(低密度脂蛋白受体相关蛋白1(LRP1)依赖性细胞信号促进轴突再生)."Journal of Biological Chemistry(生物化学杂志)288(37):26557-26568.

[0342] 54.Zlokovic,B.V.,R.Deane,A.P.Sagare,R.D.Bell,和E.A.Winkler(2010)."Low-density lipoprotein receptor-related protein-1:a serial clearance homeostatic mechanism controlling Alzheimer's amyloidβ-peptide elimination from the brain(低密度脂蛋白受体相关蛋白-1:控制阿尔茨海默氏症淀粉样β肽从大脑中清除的连续清除平衡机制)."Journal of neurochemistry(神经化学杂志)115(5):1077-1089.

[0343] 55.Zurhove,K.,C.Nakajima,J.Herz,H.H.Bock,和P.May(2008)."Gamma-secretase limits the inflammatory response through the processing of LRP1(γ-分泌酶通过处理LRP1限制炎症反应)."Science signaling(科学信号)1(47):ra15-ra15.

[0344] 56.Yamauchi,K.,T.Yamauchi,E.Mantuano,K.Murakami,K.Henry,K.Takahashi和W.M.Campana(2013)."Low-density lipoprotein receptor related protein-1(LRP1)-dependent cell signaling promotes neurotrophic activity in embryonic sensory neurons(低密度脂蛋白受体相关蛋白-1(LRP1)依赖的细胞信号传导促进胚胎感觉神经元的神经营养活性)."PLoS One(公共科学图书馆期刊)8(9):e75497.

[0345] 57.Yoon,C.,E.A.Van Niekerk,K.Henry,T.Ishikawa,S.Orita,M.H.Tuszynski和W.M.Campana(2013)."Low-density lipoprotein receptor-related protein 1(LRP1)-dependent cell signaling promotes axonal regeneration(低密度脂蛋白受体相关蛋白1(LRP1)依赖的细胞信号传导促进轴突再生)."J Biol Chem(生物化学杂志)288(37):26557-26568.

[0346] 58.Prinz,M.,S.Jung和J.Priller(2019)."Microglia Biology:One Century of Evolving Concepts(小胶质细胞生物学:一个世纪的进化概念)."Cell(细胞)179(2):292-

311.

[0347] 59.Michell-Robinson,M.A.,H.Touil,L.M.Healy,D.R.Owen,B.A.Durafourt,A.Bar-Or,J.P.Antel和C.S.Moore(2015).“Roles of microglia in brain development,tissue maintenance and repair(小胶质细胞在大脑发育、组织维护和修复中的作用).”Brain(大脑)138(Pt 5):1138-1159.

[0348] 60.Liu,Y.,L.Qin,B.Wilson,X.Wu,L.Qian,A.C.Granholm,F.T.Crews和J.S.Hong(2008).“Endotoxin induces a delayed loss of TH-IR neurons in substantia nigra and motor behavioral deficits(内毒素诱导黑质TH-IR神经元延迟丧失和运动行为缺陷).”Neurotoxicology(神经毒理学)29(5):864-870.

[0349] 61.Cazareth,J.,A.Guyon,C.Heurteaux,J.Chabry和A.Petit-Paitel(2014).“Molecular and cellular neuroinflammatory status of mouse brain after systemic lipopolysaccharide challenge:importance of CCR2/CCL2 signaling(全身性脂多糖刺激后小鼠脑的分子和细胞神经炎症状态:CCR2/CCL2信号的重要性).”Journal of Neuroinflammation(神经炎症杂志)11(1):132.

[0350] 62.Meneses,G.,G.Gevorkian,A.Florentino,M.A.Bautista,A.Espinosa,G.Acero,G.Diaz,A.Fleury,I.N.Perez Osorio,A.Del Rey,G.Fragoso,E.Sciutto和H.Besedovsky(2017).“Intranasal delivery of dexamethasone efficiently controls LPS-induced murine neuroinflammation(地塞米松鼻内给药可有效控制lps诱导的小鼠神经炎症).”Clin Exp Immunol(临床试验免疫)190(3):304-314.

[0351] 63.Zhao,J.,W.Bi,S.Xiao,X.Lan,X.Cheng,J.Zhang,D.Lu,W.Wei,Y.Wang,H.Li,Y.Fu和L.Zhu(2019).“Neuroinflammation induced by lipopolysaccharide causes cognitive impairment in mice(脂多糖诱导的神经炎症可引起小鼠认知功能障碍).”Scientific Reports(科学报告)9(1):5790.

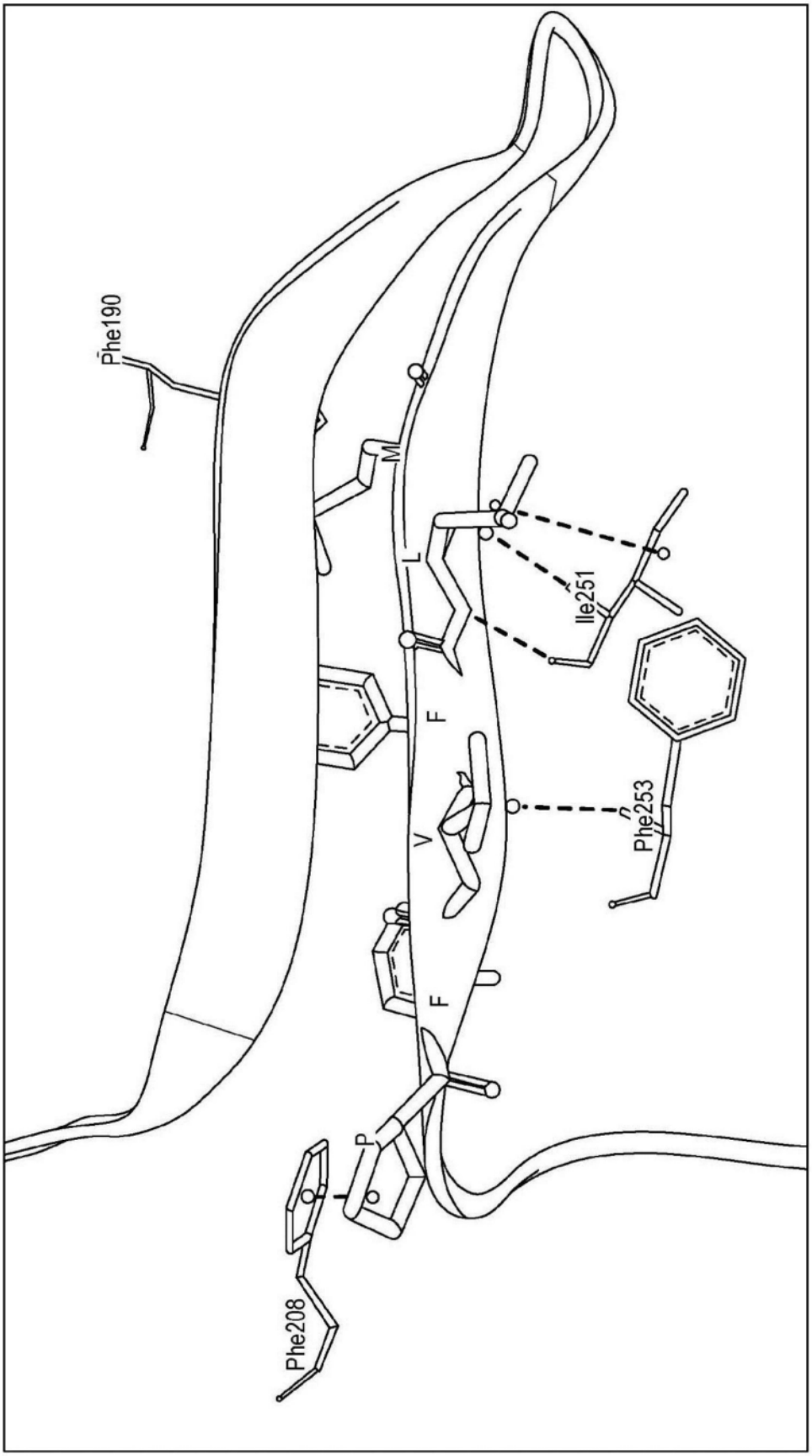


图1

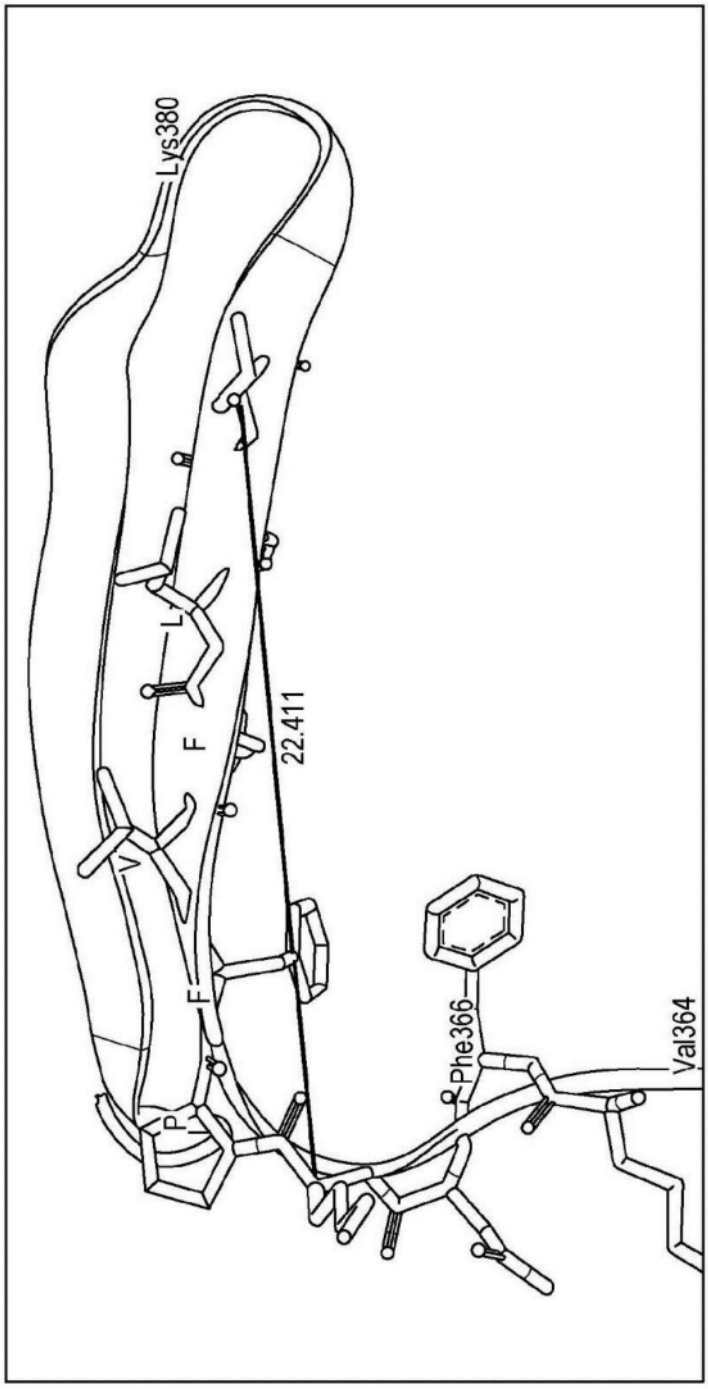


图2

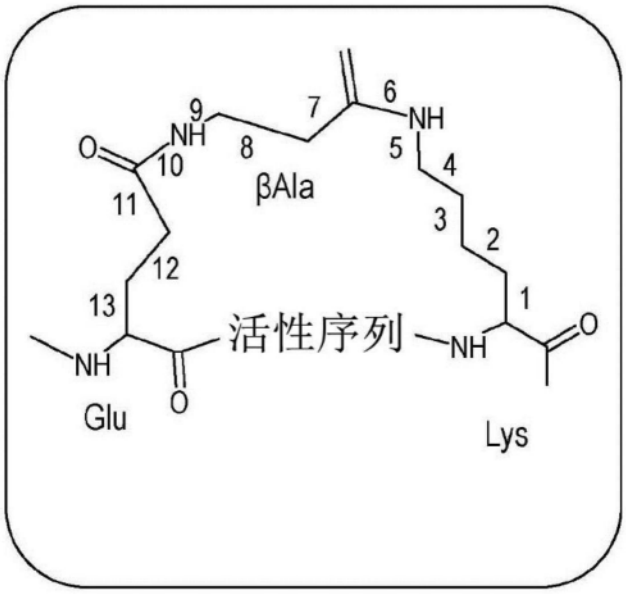


图3

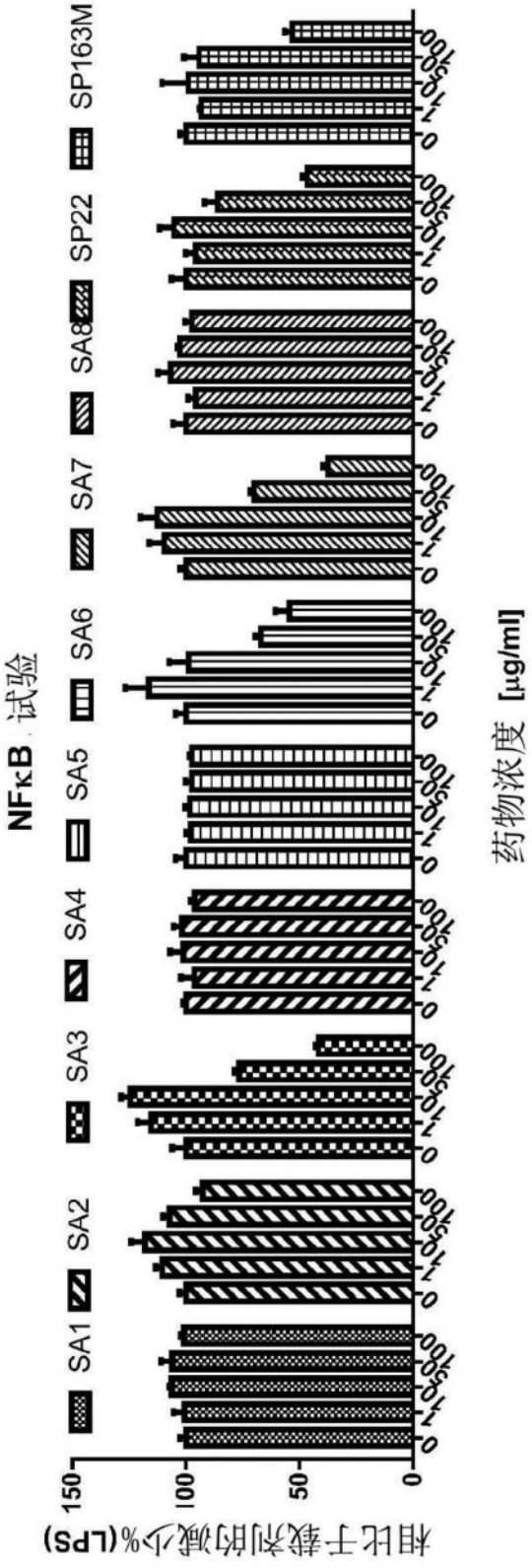

NFκB 试验
SA1
SA2
SA3
SA4
SA5
SA6
SA7
SA8
SP22
SP163M
0
1
3
10
30
100
150
100
50
0
相比于载剂的减少%(LPS)
药物浓度 [μg/ml]

图4A

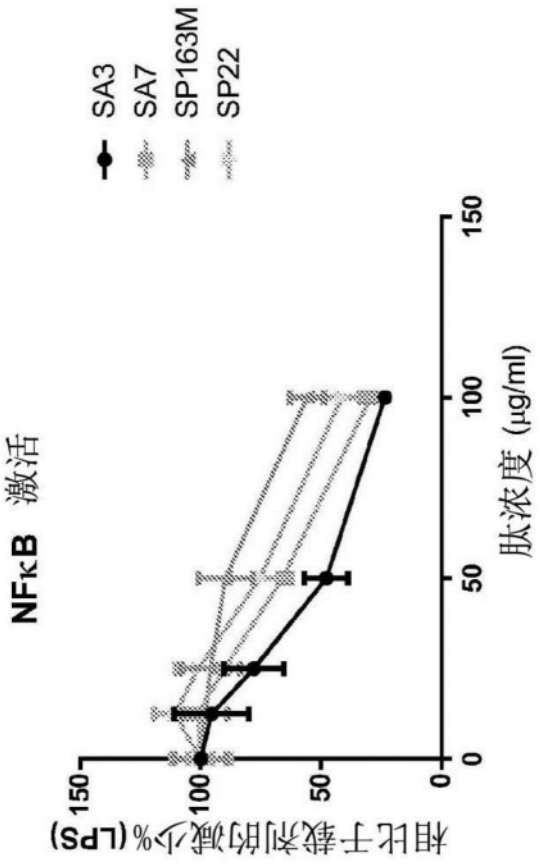


图4B

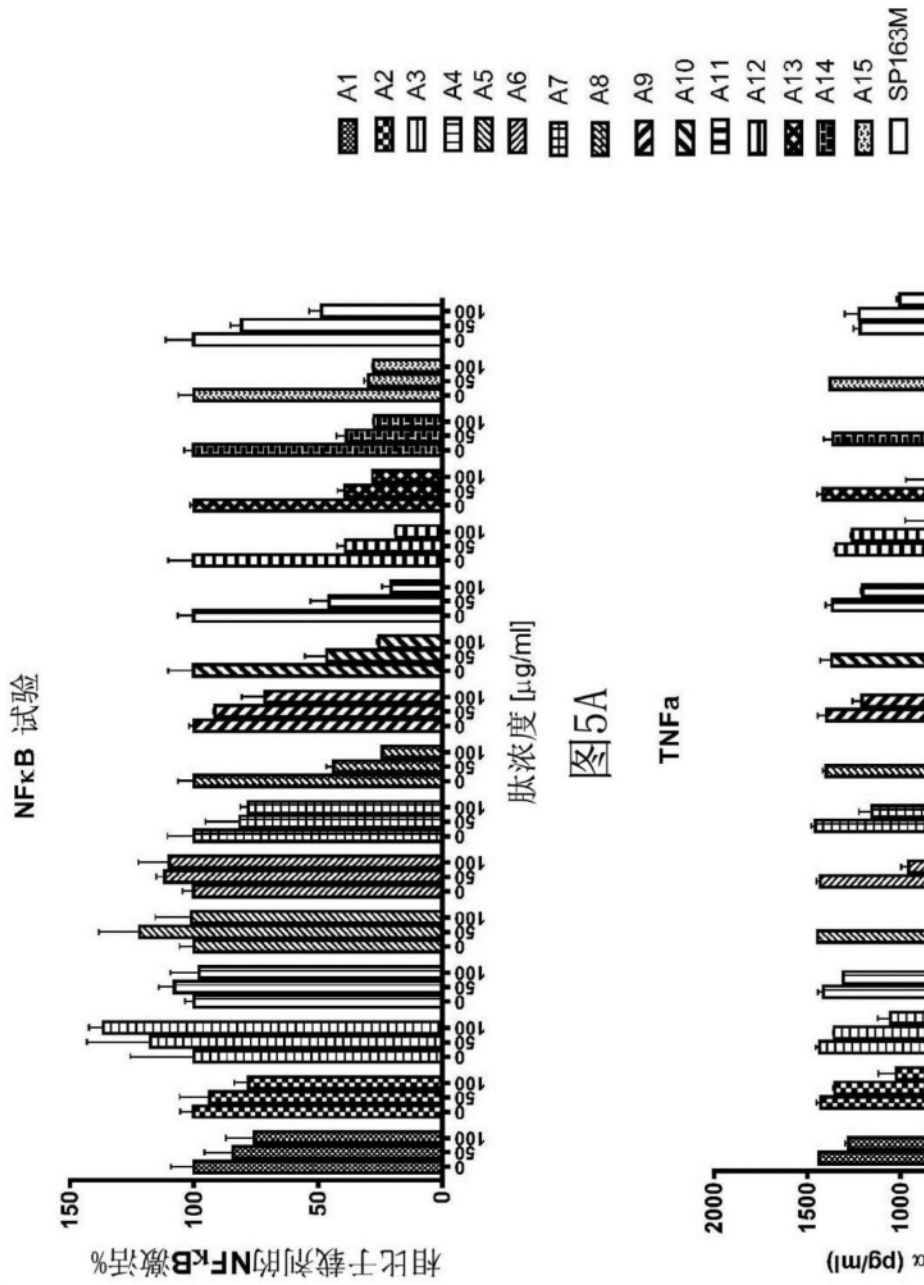
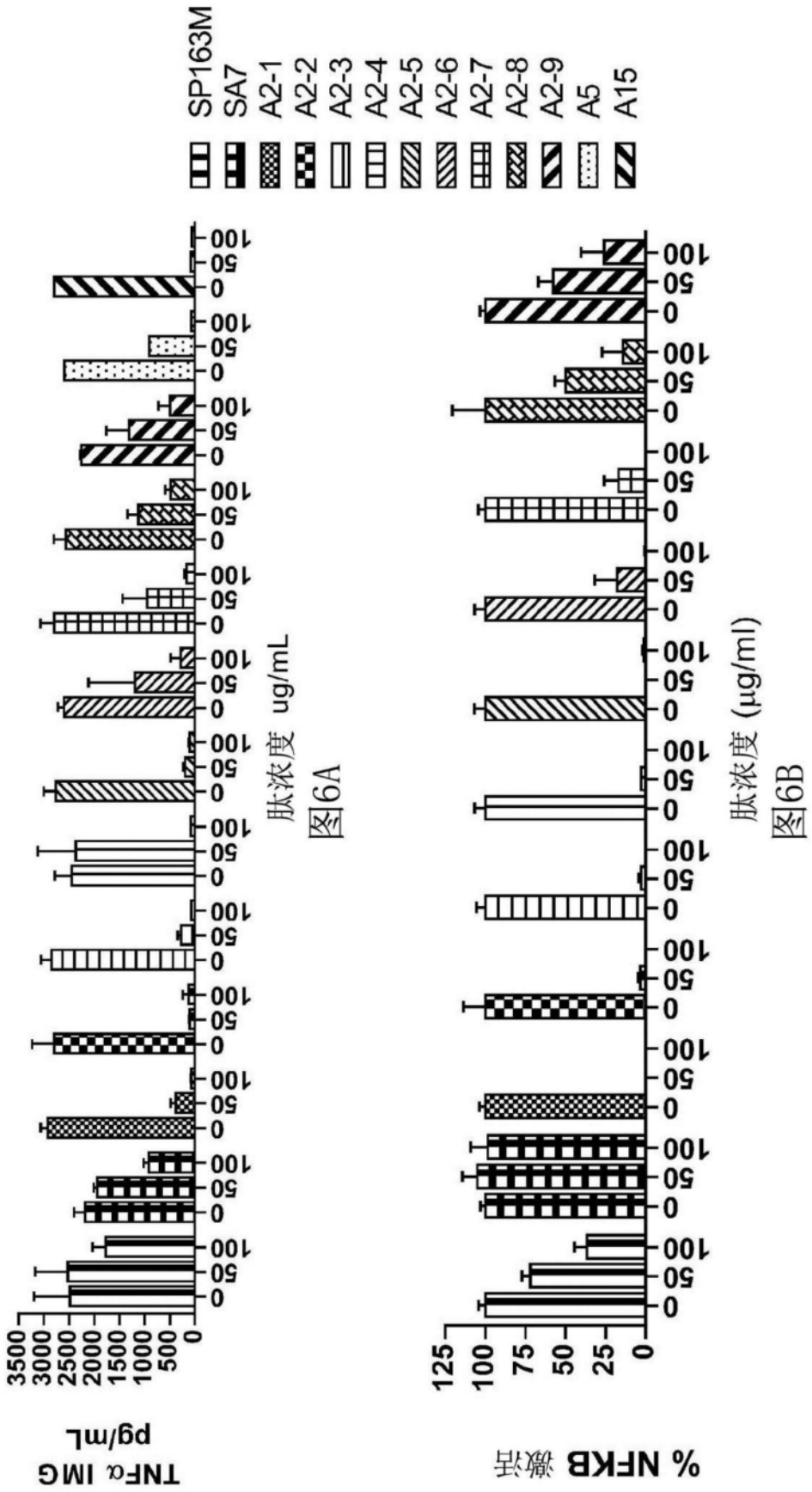

A1
A2
A3
A4
A5
A6
A7
A8
A9
A10
A11
A12
A13
A14
A15
SP163M
NFκB 试验
相比于载剂的NFκB激活%
肽浓度 [μg/ml]
TNFa
TNFα (pg/ml)
肽浓度 μg/ml]
ND

图5A 图5B


SP163M
SA7
A2-1
A2-2
A2-3
A2-4
A2-5
A2-6
A2-7
A2-8
A2-9
A5
A15
TNFα IMG pg/mL
肽浓度 ug/mL
图6A
% NFKB 激活
肽浓度 (μg/ml)
图6B

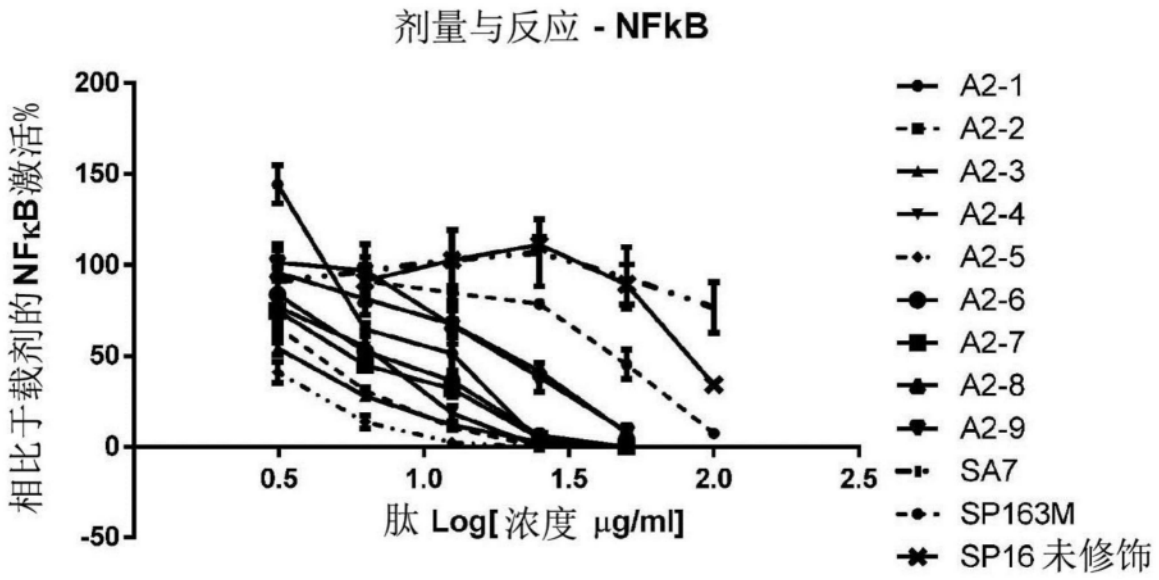

剂量与反应 - NFkB
相比于载剂的NFκB激活%
200
150
100
50
0
-50
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5
肽 Log[浓度 μg/ml]
A2-1
A2-2
A2-3
A2-4
A2-5
A2-6
A2-7
A2-8
A2-9
SA7
SP163M
SP16 未修饰

图7A

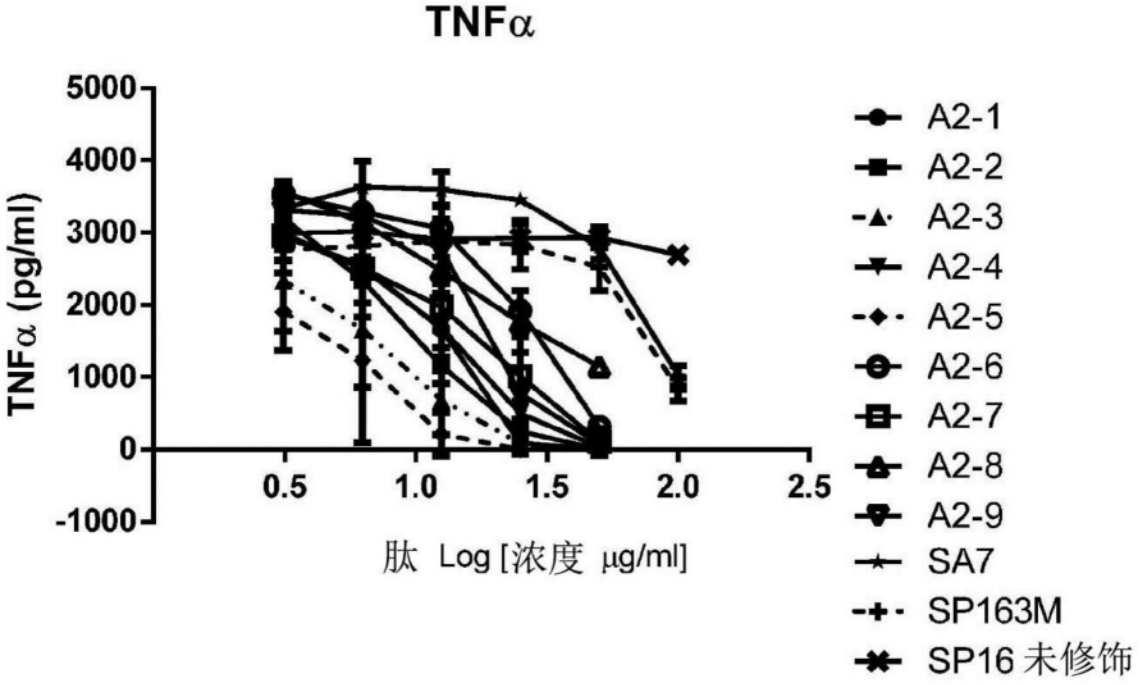

TNFα
TNFα (pg/ml)
5000
4000
3000
2000
1000
0
-1000
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5
肽 Log [浓度 μg/ml]
A2-1
A2-2
A2-3
A2-4
A2-5
A2-6
A2-7
A2-8
A2-9
SA7
SP163M
SP16 未修饰

图7B

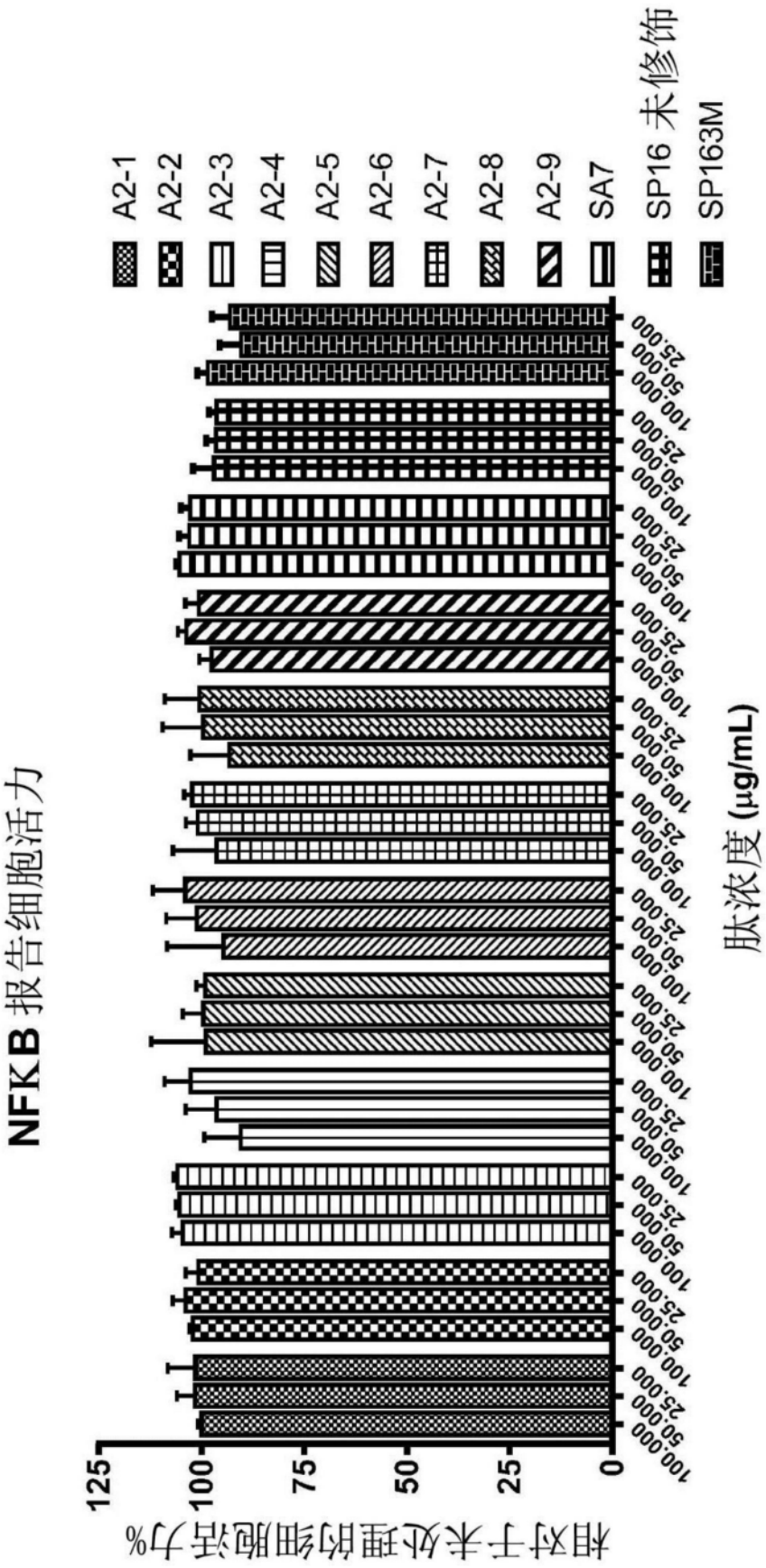

NFKB 报告细胞活力
相对于未处理的细胞活力%
125
100
75
50
25
0
肽浓度 (μg/mL)
A2-1
A2-2
A2-3
A2-4
A2-5
A2-6
A2-7
A2-8
A2-9
SA7
SP16 未修饰
SP163M
100.000
25.000
50.000

图8

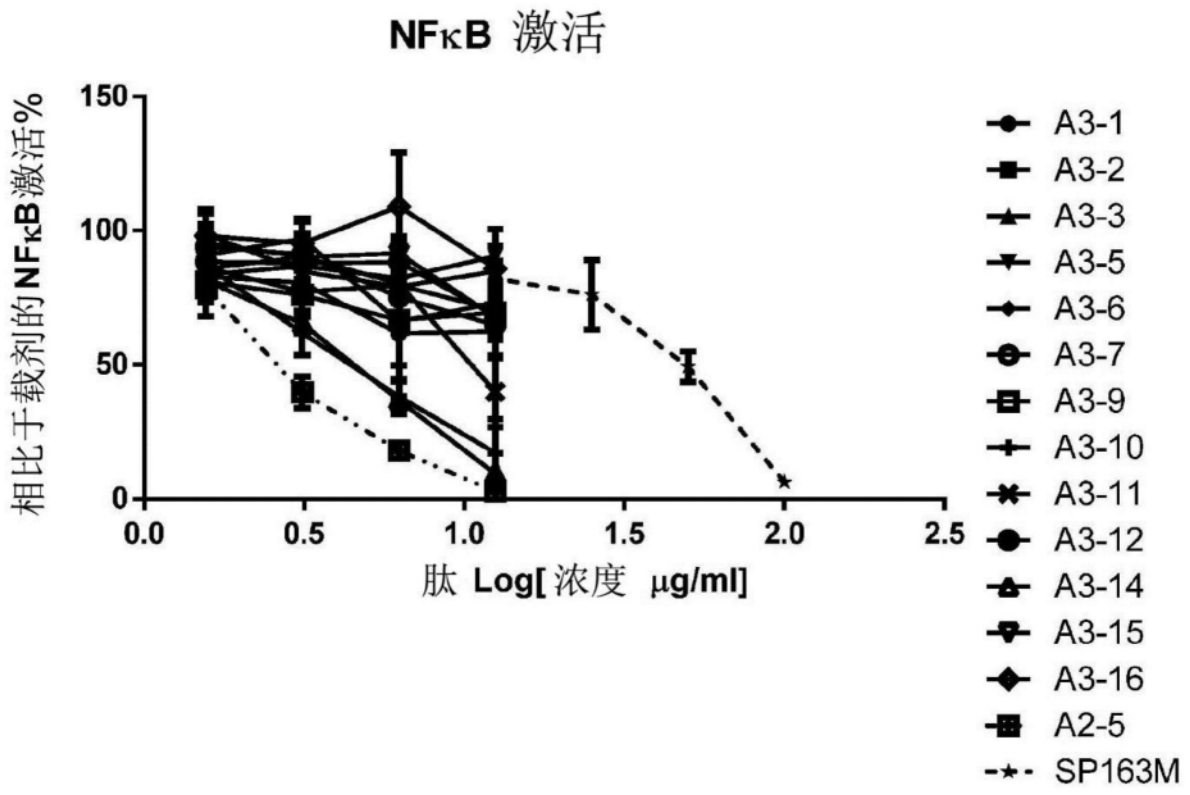

NFκB 激活
相比于载剂的NFκB激活%
150
100
50
0
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5
肽 Log[浓度 μg/ml]
A3-1
A3-2
A3-3
A3-5
A3-6
A3-7
A3-9
A3-10
A3-11
A3-12
A3-14
A3-15
A3-16
A2-5
SP163M

图9

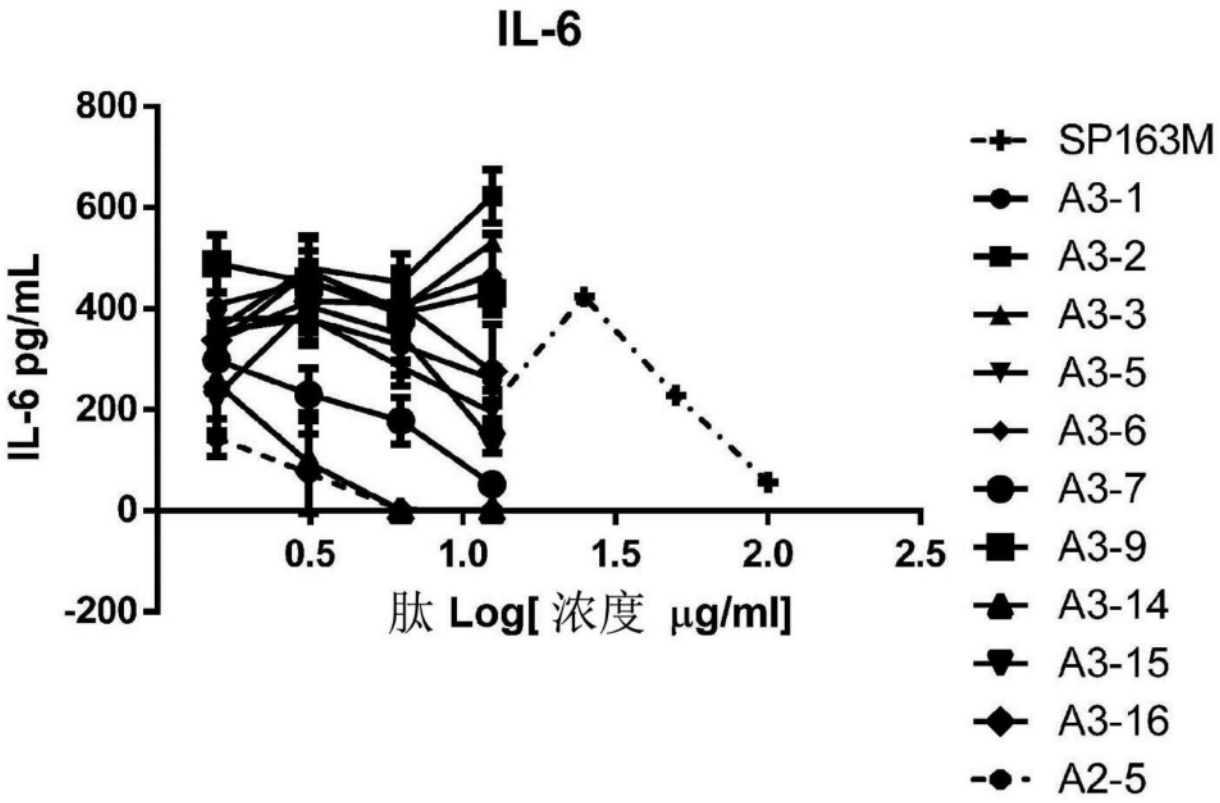

IL-6
IL-6 pg/mL
800
600
400
200
0
-200
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5
肽 Log[浓度 μg/ml]
SP163M
A3-1
A3-2
A3-3
A3-5
A3-6
A3-7
A3-9
A3-14
A3-15
A3-16
A2-5

图10

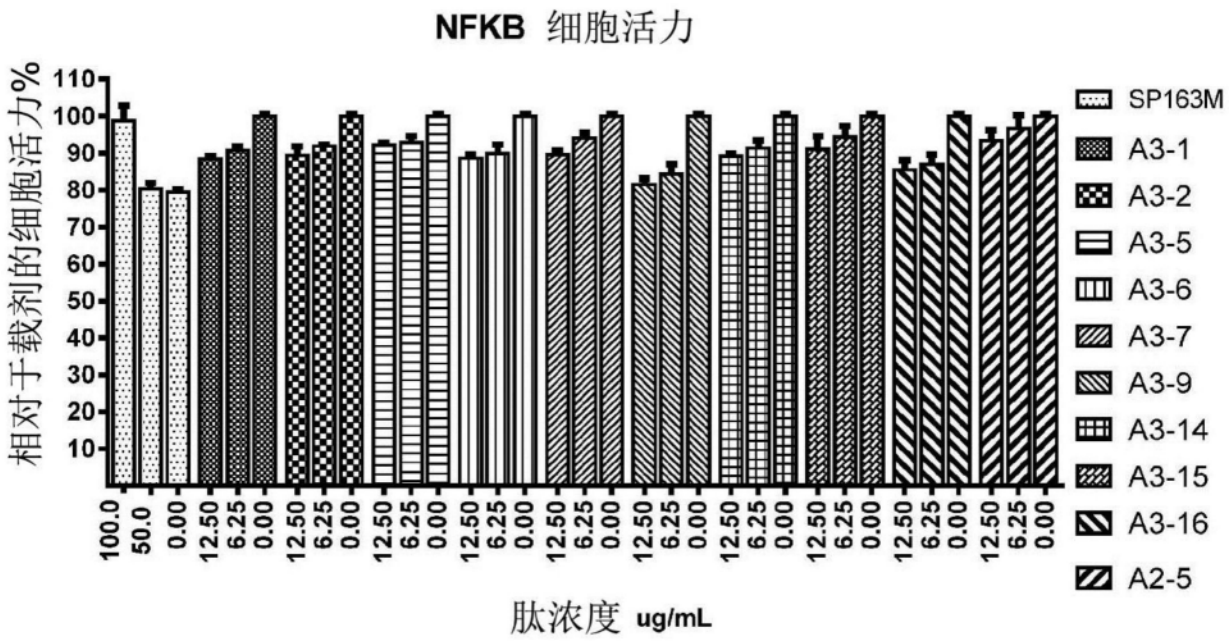

NFKB 细胞活力
相对于载剂的细胞活力%
肽浓度 ug/mL
SP163M
A3-1
A3-2
A3-5
A3-6
A3-7
A3-9
A3-14
A3-15
A3-16
A2-5

图11A

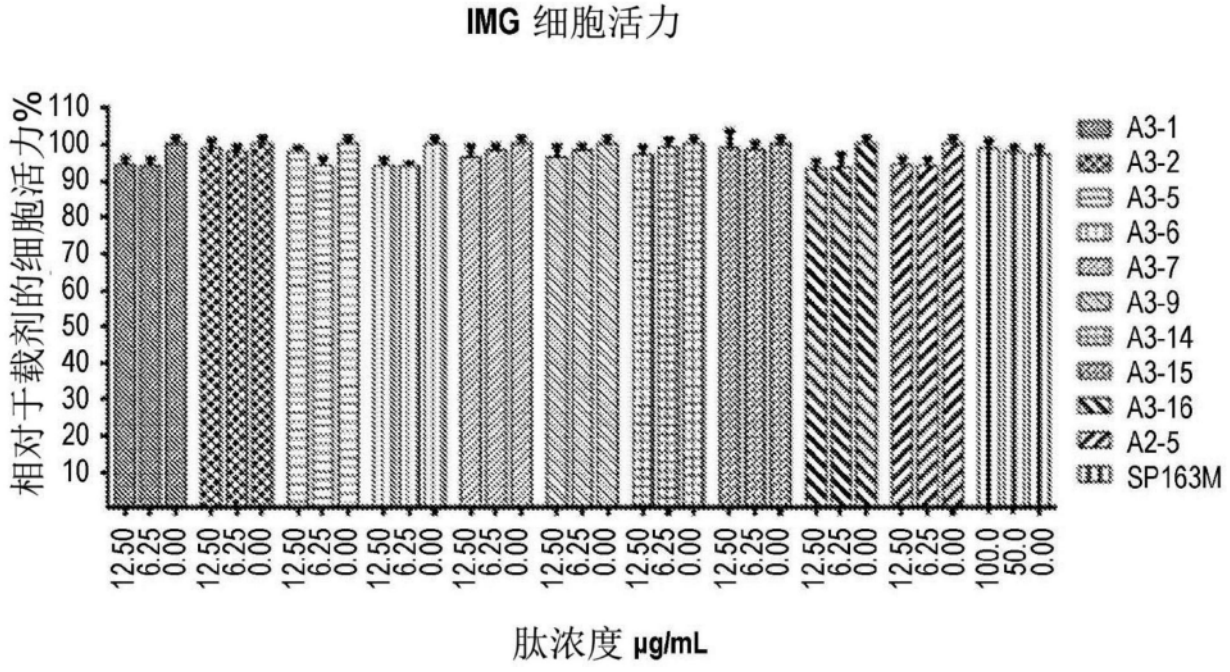

IMG 细胞活力
相对于载剂的细胞活力%
肽浓度 μg/mL
A3-1
A3-2
A3-5
A3-6
A3-7
A3-9
A3-14
A3-15
A3-16
A2-5
SP163M

图11B

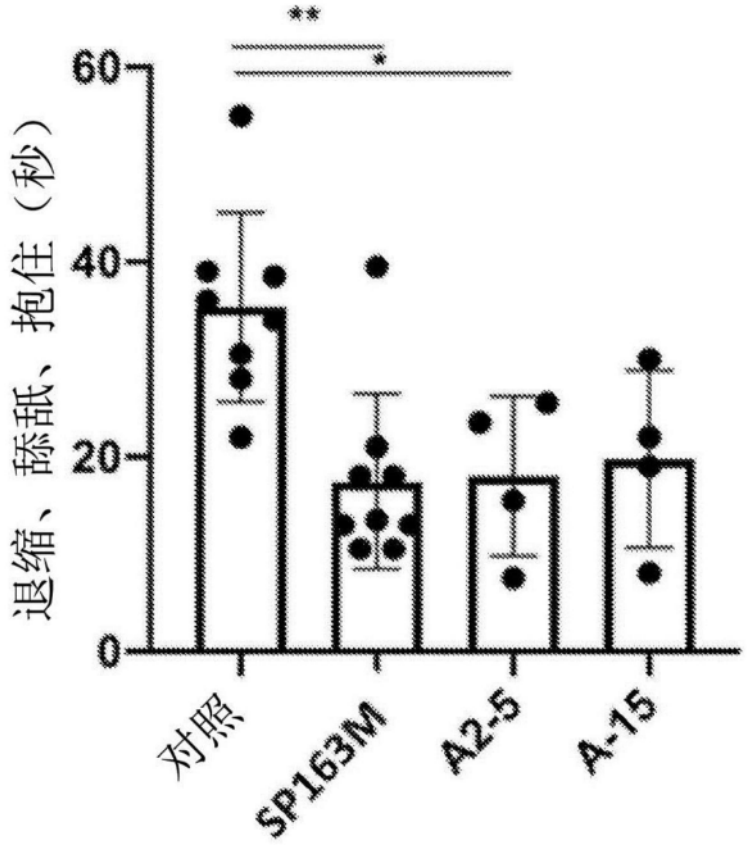


图12

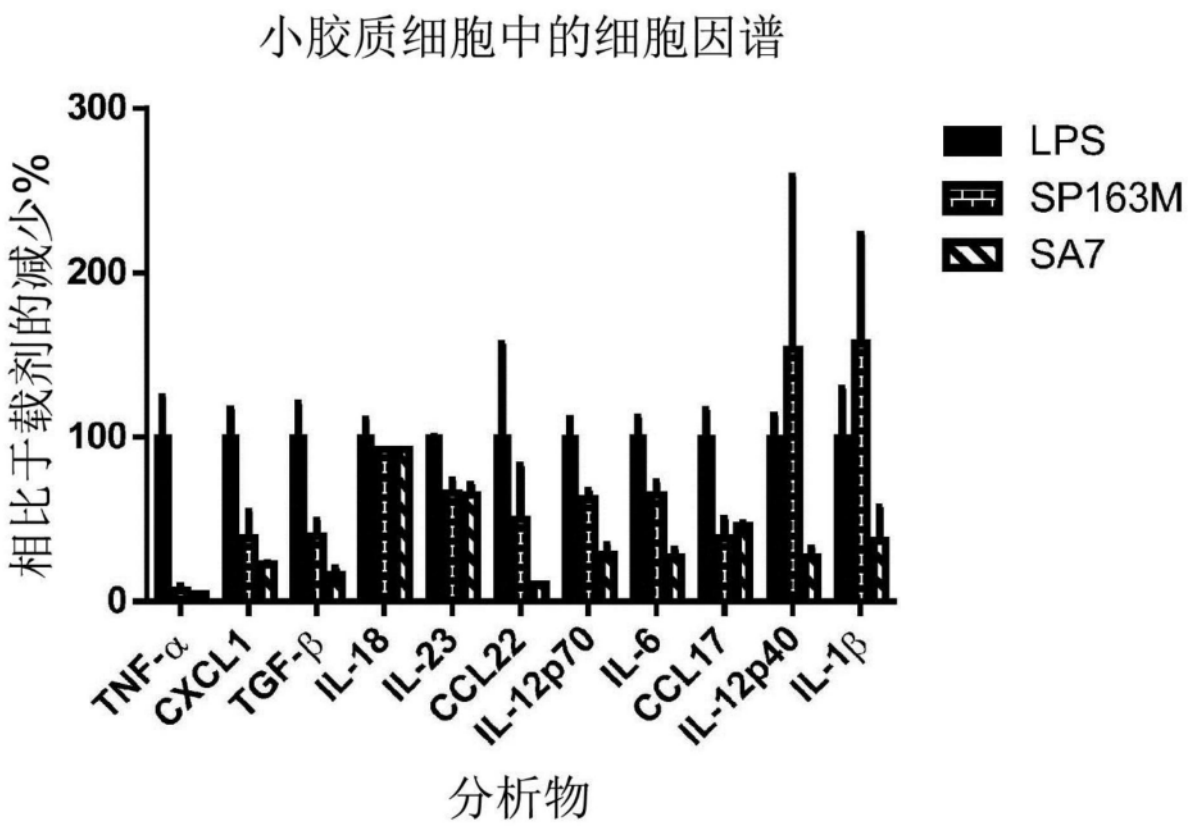

小胶质细胞中的细胞因谱
相比于载剂的减少%
300
200
100
0
LPS
SP163M
SA7
TNF-α
CXCL1
TGF-β
IL-18
IL-23
CCL22
IL-12p70
IL-6
CCL17
IL-12p40
IL-1β
分析物

图13

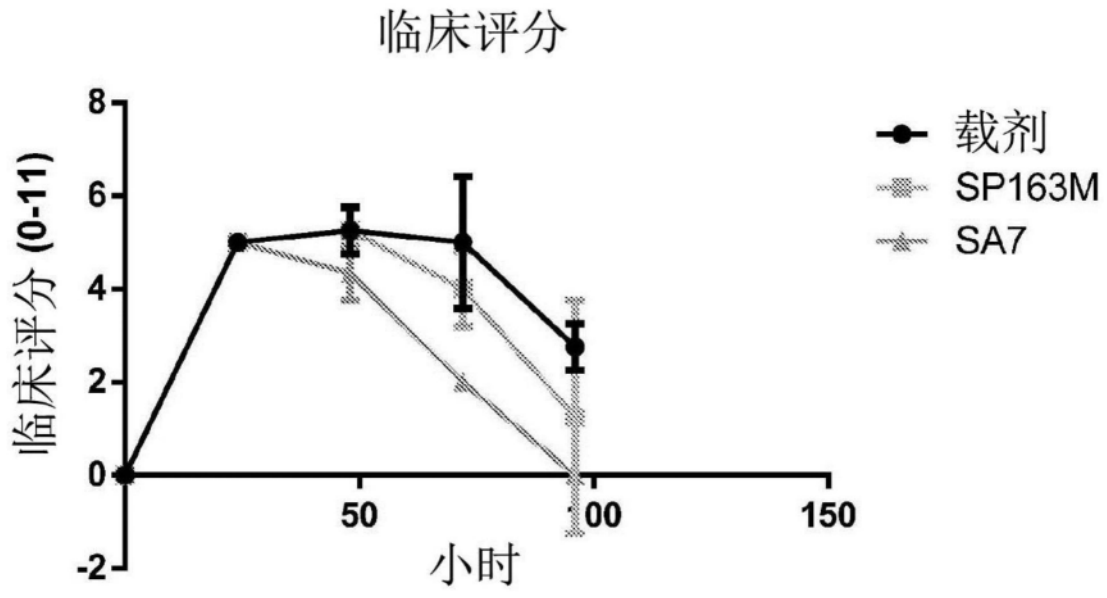

临床评分
临床评分 (0-11)
8
6
4
2
0
-2
50
100
150
小时
载剂
SP163M
SA7

图14A

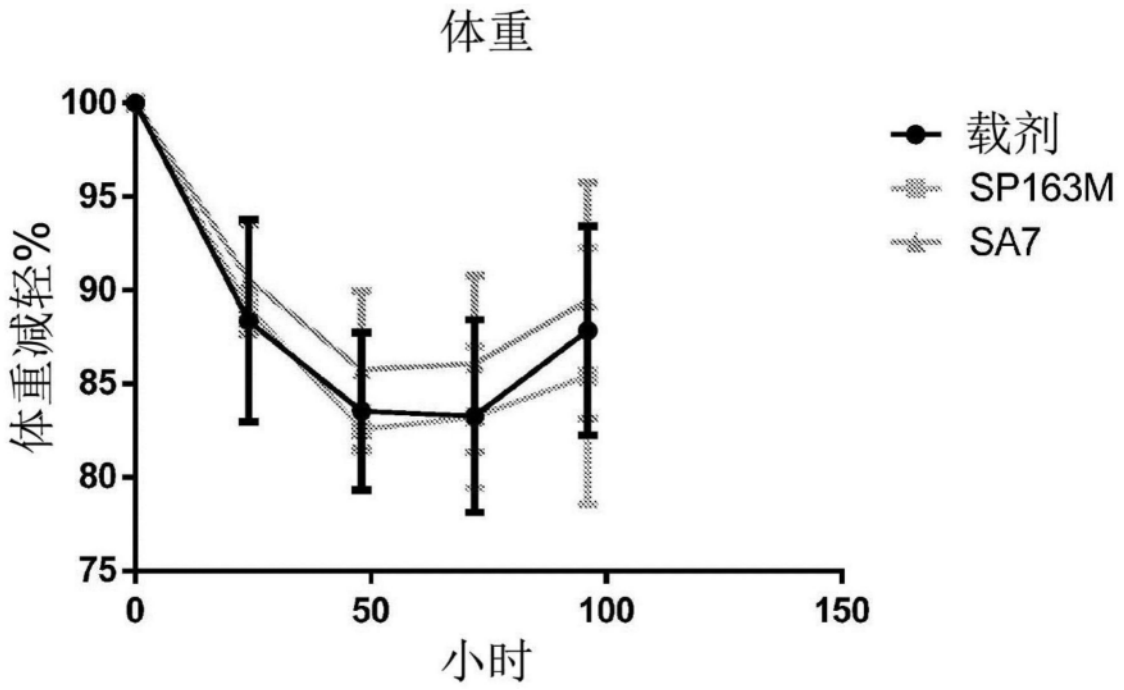


图14B

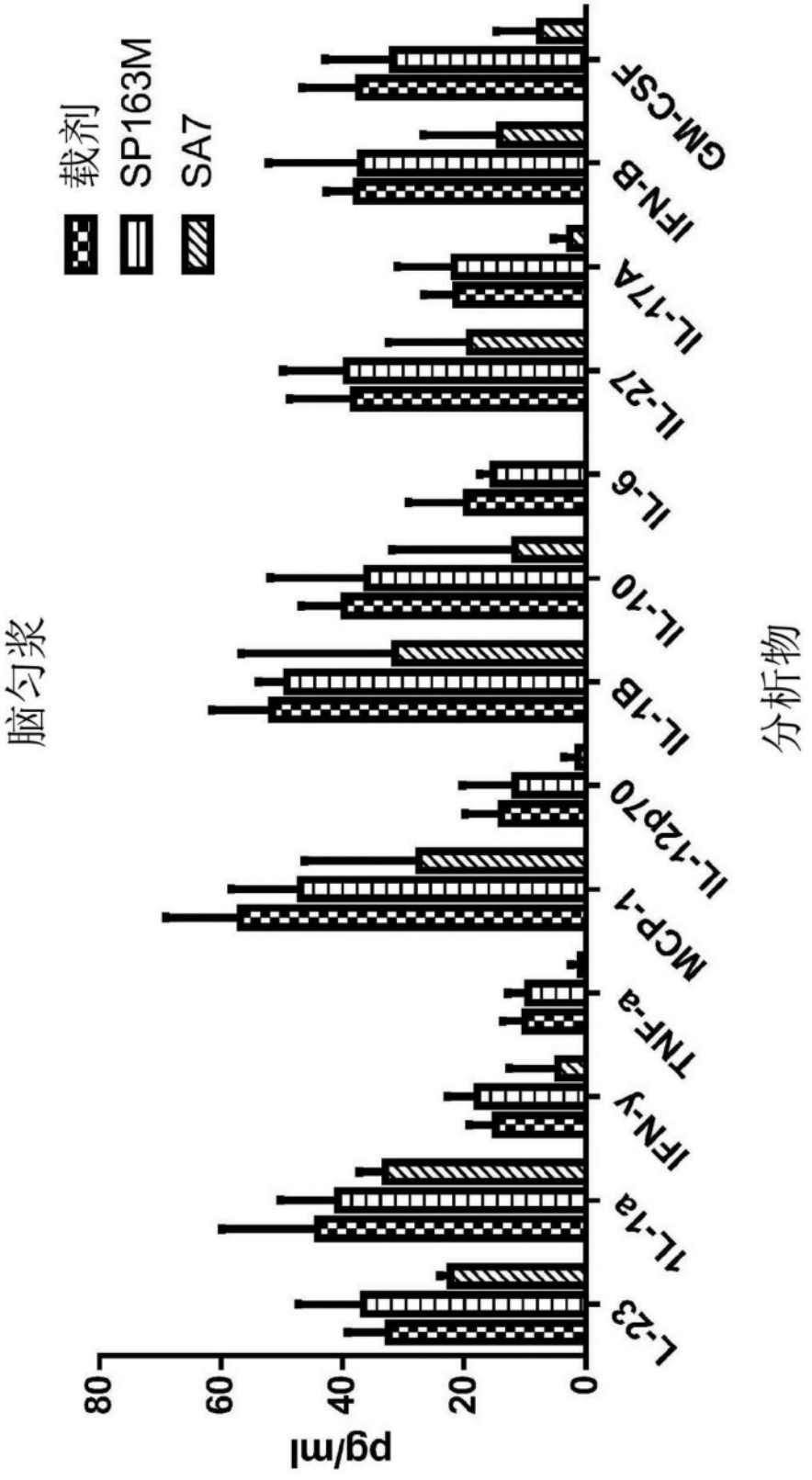

脑匀浆
载剂
SP163M
SA7
pg/ml
0
20
40
60
80
IL-23
IL-1a
IFN-γ
TNF-a
MCP-1
IL-12P70
IL-1B
IL-10
IL-6
IL-27
IL-17A
IFN-B
GM-CSF
分析物

图15

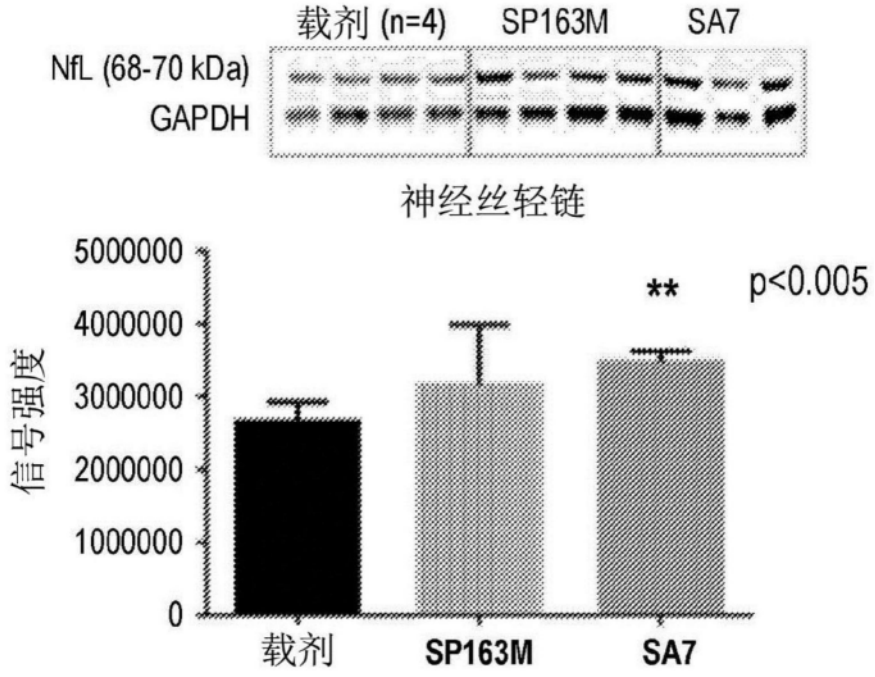

载剂 (n=4)
SP163M
SA7
NfL (68-70 kDa)
GAPDH
神经丝轻链
5000000
4000000
3000000
2000000
1000000
0
信号强度
**
p<0.005
载剂
SP163M
SA7

图16A

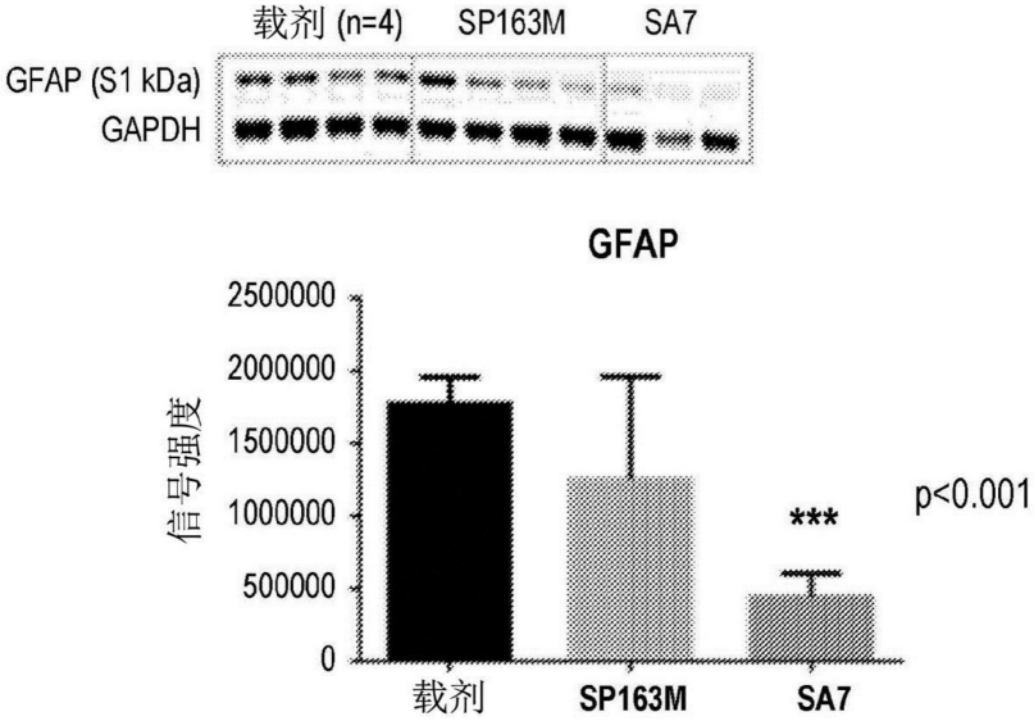

载剂 (n=4)
SP163M
SA7
GFAP (S1 kDa)
GAPDH
GFAP
2500000
2000000
1500000
1000000
500000
0
信号强度
***
p<0.001
载剂
SP163M
SA7

图16B

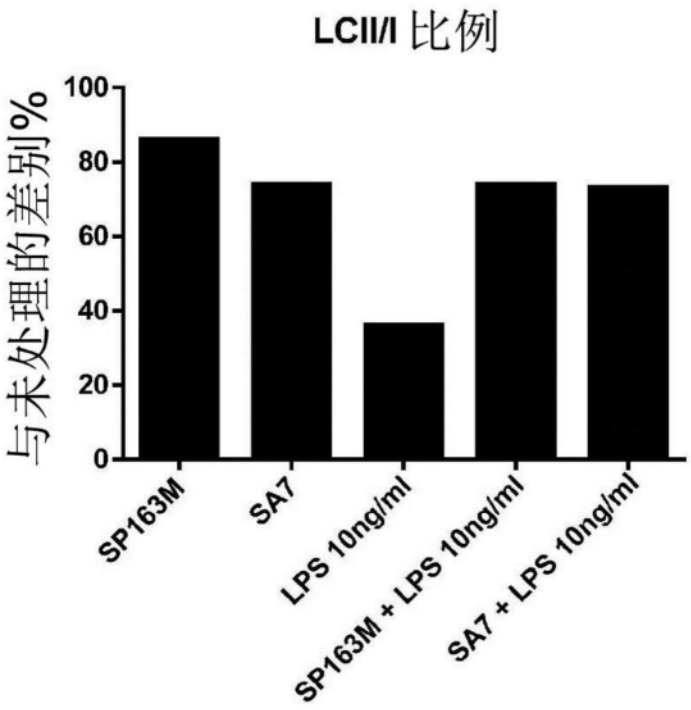

LCII/I 比例
与未处理的差别%
100
80
60
40
20
0
SP163M
SA7
LPS 10ng/ml
SP163M + LPS 10ng/ml
SA7 + LPS 10ng/ml

图17A

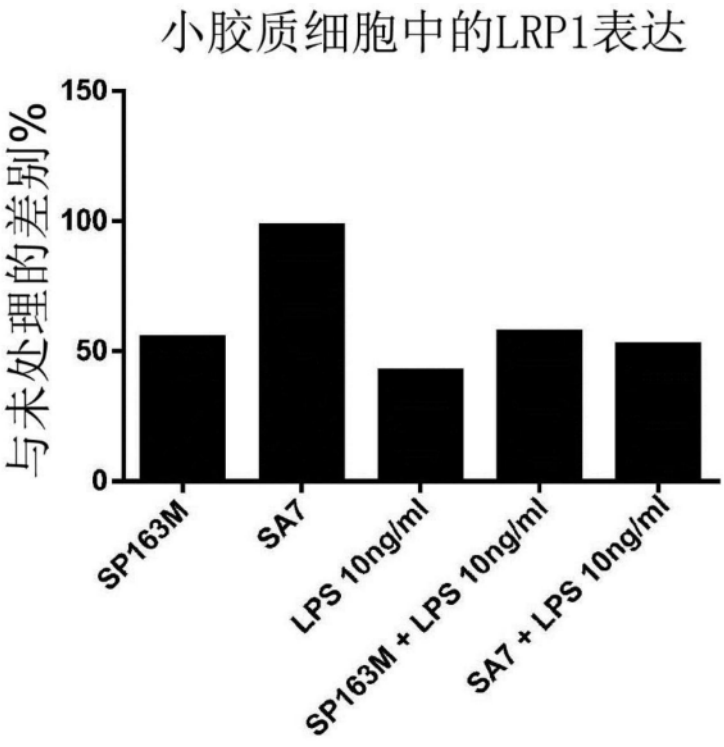

小胶质细胞中的LRP1表达
与未处理的差别%
150
100
50
0
SP163M
SA7
LPS 10ng/ml
SP163M + LPS 10ng/ml
SA7 + LPS 10ng/ml

图17B

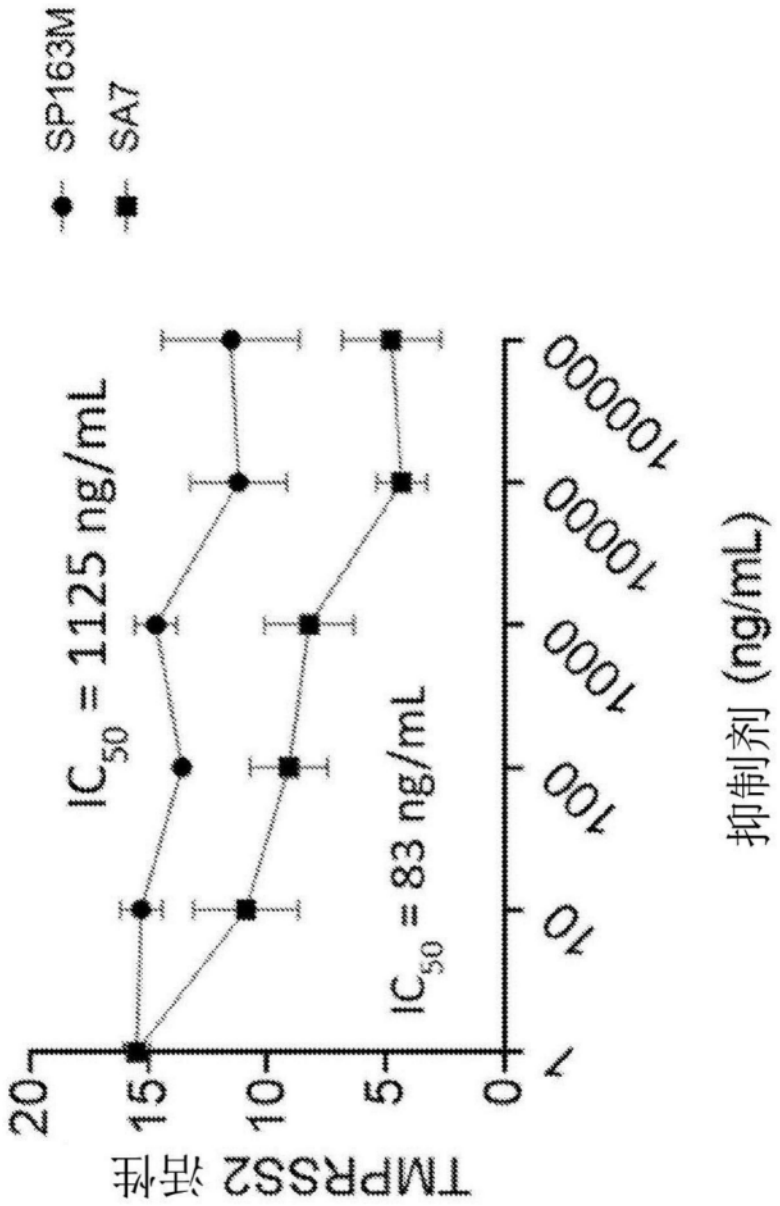

SP163M
SA7
IC50 = 1125 ng/mL
IC50 = 83 ng/mL
TMPRSS2 活性
20
15
10
5
0
1
10
100
1000
10000
100000
抑制剂 (ng/mL)

图18

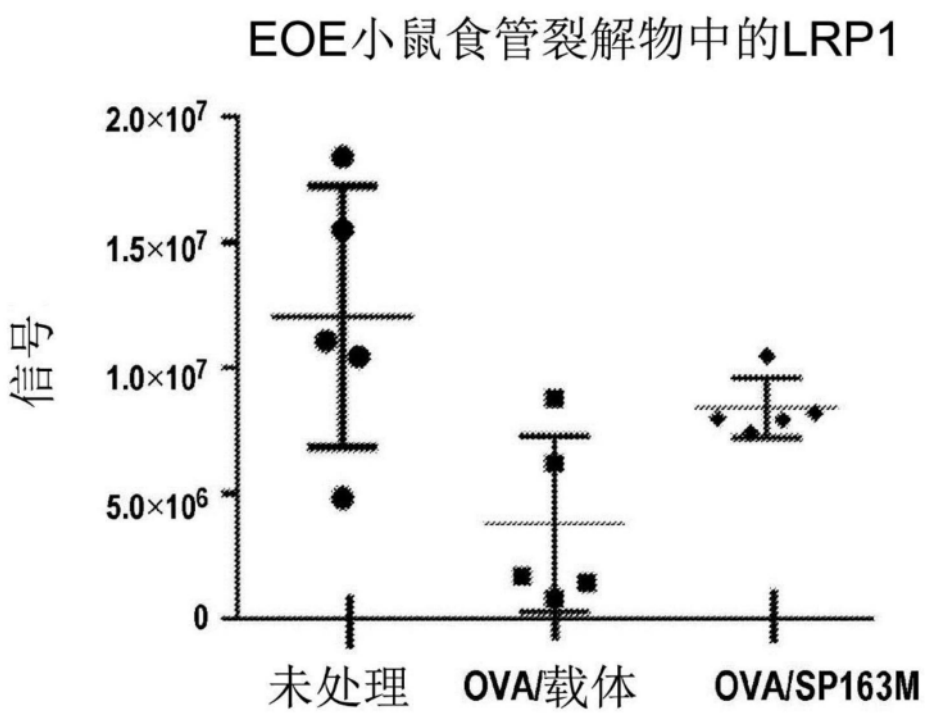

EOE小鼠食管裂解物中的LRP1
信号
2.0×10^7
1.5×10^7
1.0×10^7
5.0×10^6
0
未处理
OVA/载体
OVA/SP163M

图19A

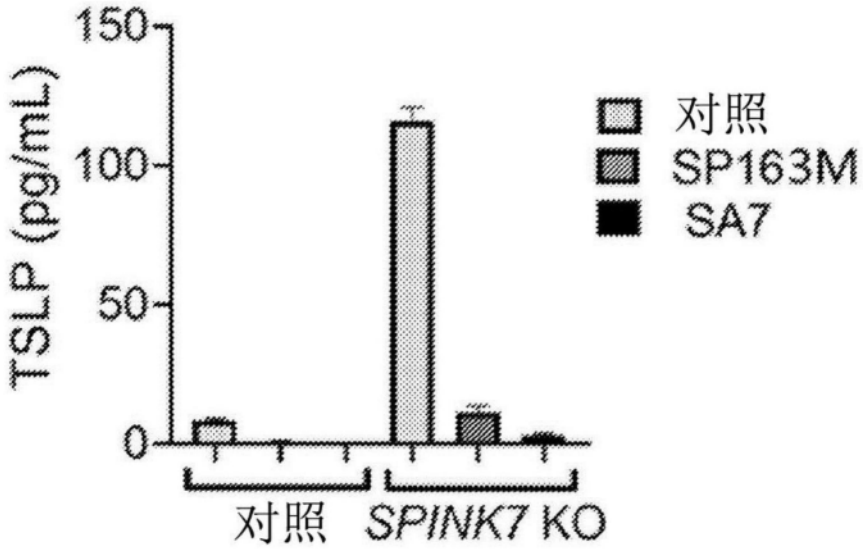

TSLP (pg/mL)
150
100
50
0
对照
SP163M
SA7
对照
SPINK7 KO

图19B

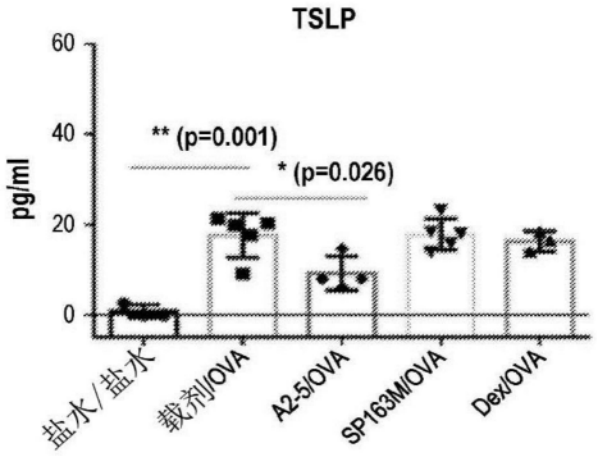


图20A

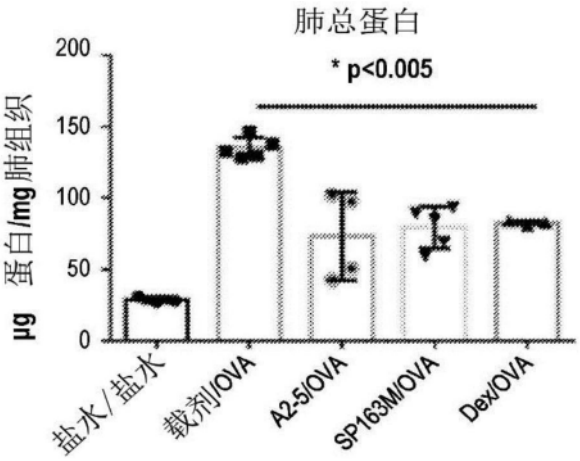


图20B

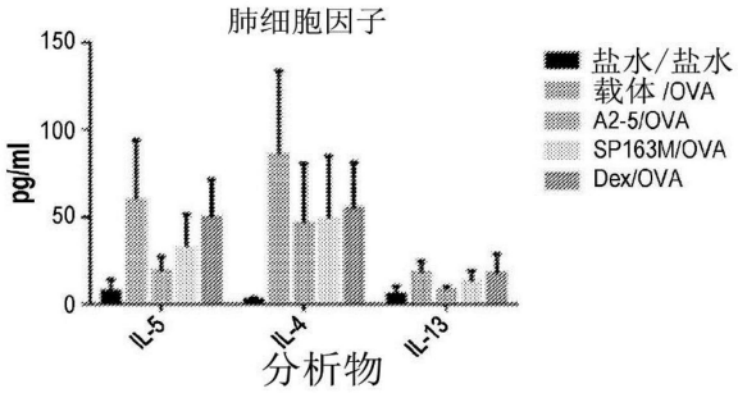


图20C

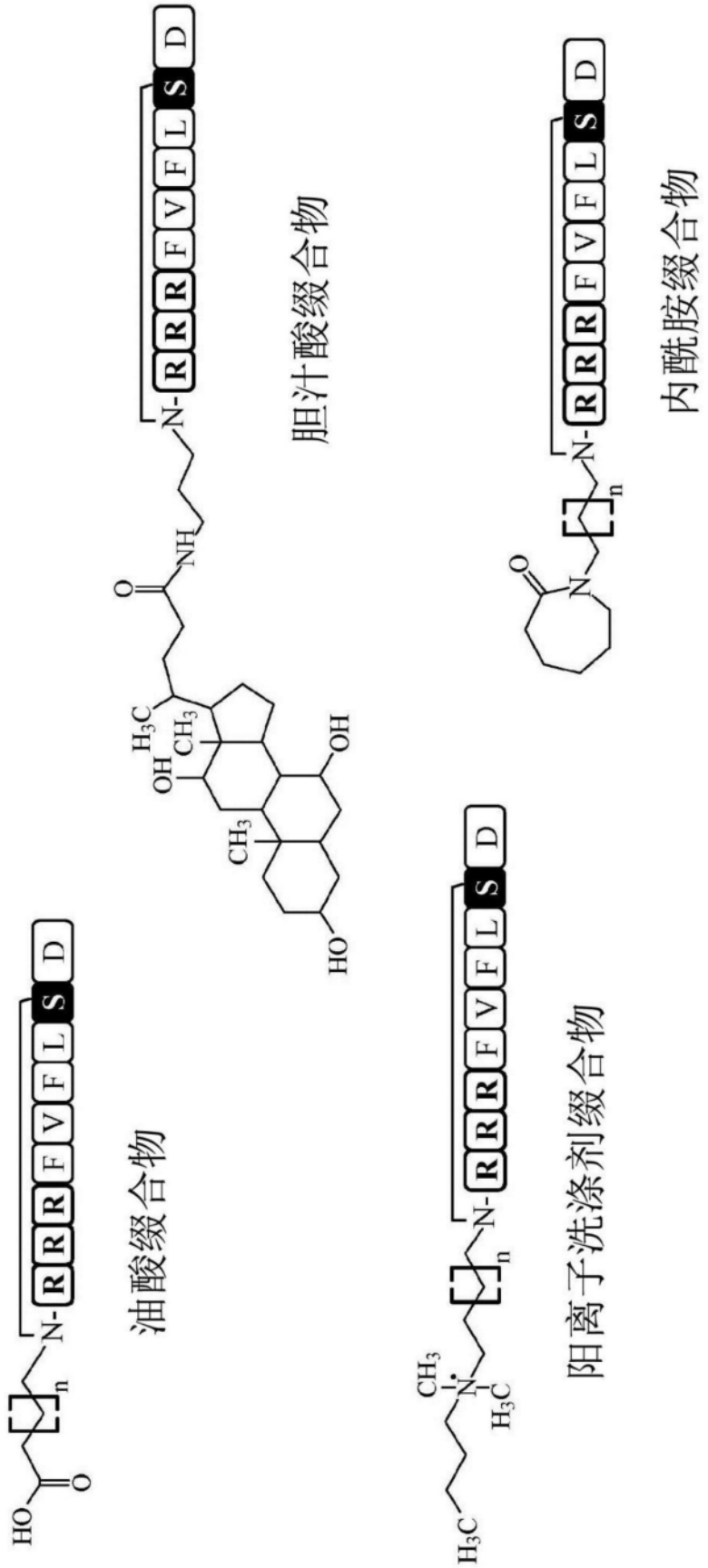


图21