(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105431134 A
(43)申请公布日 2016.03.23

(21)申请号 201480033617.1
(22)申请日 2014.04.11
(30)优先权数据
US61/811078 2013.04.11 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2015.12.11
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2014/033873 2014.04.11
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2014/169256 EN 2014.10.16
(71)申请人 范德比尔特大学
地址 美国田纳西州
(72)发明人 杜瓦·克雷格
埃文斯·布莱恩·康纳
布罗菲·科伦 霍金·凯尔
(74)专利代理机构 苏州创元专利商标事务所有限公司 32103
代理人 段晓玲
(51)Int.Cl.
A61K 8/91(2006.01)

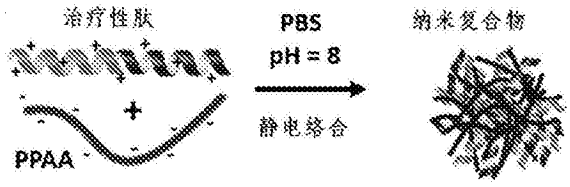
权利要求书2页 说明书39页
序列表2页 附图41页

(54)发明名称

复合物

(57)摘要

本发明涉及组合物，其包括(i)活性剂，其中该活性剂在预定pH下带电荷；(ii)聚合物，其中该聚合物在预定pH下带与活性剂相反的电荷；以及(iii)复合物，其包括在预定pH下静电结合在一起的该肽和聚合物。在一些实施例中，该活性剂是肽，比如，包括MAPKAP激酶II抑制肽，并且在一些实施例中，该肽包括细胞穿透肽。在另外的实施例中，本公开提供了用于通过对有需要的主体给予有效量的本公开组合物，治疗疾病的方法。



CN 105431134 A

1.一种组合物,包括 :

活性剂,其在预定 pH 下带电荷 ;以及

聚合物,其在所述预定 pH 下带与所述活性剂相反的电荷,在所述预定 pH 下,所述活性剂和所述聚合物之间形成静电键。

2.根据权利要求 1 所述的组合物,其特征在于 :

所述活性剂在所述预定 pH 下是阳离子,并且所述聚合物在所述预定 pH 下是阴离子。

3.根据权利要求 1 所述的组合物,其特征在于 :

所述活性剂在所述预定 pH 下是阴离子,并且所述聚合物在所述预定 pH 下是阳离子。

4.根据权利要求 1 所述的组合物,其特征在于 :

所述活性剂包括肽。

5.根据权利要求 4 所述的组合物,其特征在于 :

所述肽包括 MAPKAP 激酶 II 抑制肽。

6.根据权利要求 4 所述的组合物,其特征在于 :

所述肽包括选自 SEQ.ID.NOS:1-4 的一个或多个序列。

7.根据前述权利要求任一所述的组合物,其特征在于 :

该组合物还包括第二活性剂。

8.根据权利要求 7 所述的组合物,其特征在于 :

所述第二活性剂选自肽、聚核苷酸、及其组合。

9.根据权利要求 7 所述的组合物,其特征在于 :

所述第二活性剂选自 siRNA、DNA、及其组合。

10.根据前述权利要求任一所述的组合物,其特征在于 :

所述聚合物包括聚 ((C1-C6) 烷基 - 丙烯酸)、聚 ((C1-C6) 烷基 - 甲基丙烯酸)、聚 ((C1-C6) 烷基 - 乙基丙烯酸)、或其组合。

11.根据权利要求 10 所述的组合物,其特征在于 :

所述聚合物包括聚丙基丙烯酸 (PPAA)。

12.根据前述权利要求任一所述的组合物,其特征在于 :

所述聚合物还包括亲水嵌段。

13.根据权利要求 12 所述的组合物,其特征在于 :

所述亲水嵌段包括聚乙二醇 (PEG)、N-(2- 羟丙基) 甲基丙烯酰胺 (HPMA)、聚 (N,N- 二甲基丙烯酰胺)(pDMA)、聚 (PEG 甲基丙烯酰胺)(pPEGMA)、或其组合。

14.根据前述权利要求任一所述的组合物,其特征在于 :

所述预定 pH 是约 6.5 至约 8。

15.根据前述权利要求任一所述的组合物,其特征在于 :

所述肽和所述聚合物之间的所述静电健在活化 pH 下被打断。

16.根据权利要求 15 所述的组合物,其特征在于 :

所述活化 pH 是约等于或低于 6.5。

17.根据前述权利要求任一所述的组合物,其特征在于 :

所述聚合物与所述肽的电荷比是约 10 :1 至约 1 :10。

18.根据权利要求 17 所述的组合物,其特征在于 :

所述聚合物与所述肽的电荷比是约 1 :3。

19. 一种组合物，包括 ：

多种活性剂，其在预定 pH 下带电荷 ；以及

多种聚合物，其在所述预定 pH 下带与所述活性剂相反的电荷，所述多种肽和所述多种聚合物之间在所述预定 pH 下形成复合物，所述复合物包括静电键合至所述多种活性剂的所述多种聚合物。

20. 根据权利要求 19 所述的组合物，其特征在于 ：

所述活性剂包括肽。

21. 根据权利要求 19 所述的组合物，其特征在于 ：

所述活性剂在所述预定 pH 下是阳离子，并且所述聚合物在所述预定 pH 下是阴离子。

22. 根据权利要求 19 所述的组合物，其特征在于 ：

所述活性剂在所述预定 pH 下是阴离子，并且所述聚合物在所述预定 pH 下是阳离子。

23. 根据权利要求 19 所述的组合物，其特征在于 ：

所述复合物具有约 50nm 至约 500nm 的尺寸。

24. 一种药物组合物，包括 ：

权利要求 1 至 23 任一所述的组合物 ；以及

药学可接受载体。

25. 一种血管移植物，其特征在于 ：

所述血管移植物包括权利要求 1 至 23 任一所述的组合物。

26. 一种治疗血管疾病的方法，包括 ：

对有需要的主体进行有效剂量的权利要求 1 至 23 任一所述的组合物给药。

27. 根据权利要求 26 所述的方法，其特征在于 ：

所述血管疾病是内膜增生。

28. 根据权利要求 26 或 27 所述的方法，其特征在于 ：

所述给药步骤包括在有需要的主体中移植血管移植物，所述血管移植物包括权利要求 1 至 23 任一所述的组合物。

29. 一种用于合成权利要求 1 至 23 中任一所述的组合物的方法。

复合物

相关申请

[0001] 本申请要求2013年4月11日提交的序列号为61/811078的美国临时专利申请的优先权，该临时专利申请的全部公开内容通过引用并入本文中。

政府利益

[0002] 本公开的主题已获得美国政府的基金支持（基金号11SDG4890030），已被美国心脏协会(American Heart Association)授予基金（编号1R21HL110056-01），已由美国国立卫生研究院(National Institutes of Health)授奖和并授予DGE-090966号奖学金，已由美国国家科学基金会授奖。美国政府具有本发明的一些权利。

技术领域

[0003] 本公开的主题涉及复合物(polyplexes)。具体地，本公开的主题涉及包括复合物的组合物(composition)，该复合物包括带相反电荷的聚合物(polymer)和活性剂(active agent)，其中活性剂可以是肽(peptide)。

背景技术

[0004] 与合成小分子相比，肽对于更特效和/或更强效的药物的开发具有显著的潜力。然而，运输屏障(delivery barrier)限制了基于肽的药物的转化(translation)。例如，肽通常具有较大的分子量，并且比小分子药物更加亲水，抑制了肽直接穿过细胞膜扩散的能力。因此，肽通过胞内体途径(endosomal pathway)被内在化，这通常导致针对在溶酶体中降解的囊泡的截留(entrapment)，或导致对被胞吐(exocytosis)至细胞之外的囊泡的再循环。实际上，低效的细胞穿透性(cell penetration)和较差的细胞内药物代谢动力学一直是肽治疗剂(peptide therapeutics)在广泛临床转化上的主要限制，另外在其特异性、安全性和易于制造的基础上，亟需用于打断细胞内的蛋白质-蛋白质相互作用的药物。

[0005] 例如，MAPKAP激酶II抑制肽(MAPKAP Kinase II inhibitory peptide，以下简称MK2i)是具有作为药物的显著潜力的肽。MAPKAP激酶II(以下简称MK2)信号传递(signaling)发生在血管平滑肌细胞中(VSMC)。MK2的激活导致血管收缩和病理的VSMC增殖、迁移、过量的ECM生成，这导致移植物(graft)阻塞。因而认为MK2i在理论上减少人的隐静脉(HSV)中的血管收缩以及随后的内膜增生。

[0006] 对此，MK2的信号传递通常由环境和机械应力（比如，在外科移植期间植入移植物时所经历的）触发。因此，虽然采用自体导管的冠状动脉旁路移植术仍然是多血管冠状动脉心脏疾病的标准疗法，但这些隐静脉移植物中的近一半由于内膜增生而在前18个月之内失败。然而，由于现有组合物中的肽通常被隔离在内溶酶体的囊泡之内，该囊泡被转运来用于胞吐或溶酶体降解，现有的运输MK2i以治疗移植物所造成的内膜增生的方法一直没能成功。

[0007] 所以，亟需改进的组合物，以及对有需要的主体给予活性剂（具体地，肽）的方法。

发明内容

[0008] 本发明内容描述了本公开主题的数个实施例，并且在许多情况下列出了这些实施例的变化和排列。本发明内容仅仅是各种各样的实施例的示例。提及给定实施例的一个或多个代表性特征同样地是示例性的。此实施例通常可能具有或不具有所被提及的特征；同样地，无论是否在本发明内容中被列出，那些特征可被应用于本公开主题的其他实施例。为避免过多重复，本发明内容并未列出或提出所有可能的特征组合。

[0009] 在一些实施例中，本公开主题提供了一种组合物，其包括 (i) 活性剂，其中该活性剂在一预定 pH 下带电荷，和 (ii) 聚合物，其中该聚合物在预定 pH 下带与活性剂相反的电荷。在一些实施例中，在预定 pH 下活性剂和聚合物之间形成静电键，在一些实施例中，被键合的活性剂和聚合物被称为复合物。在一些实施例中，该预定 pH 在约 6.5 至约 8 之间。此外，在一些实施例中，活性剂（例如，肽）和聚合物之间的静电键在一活化 pH(activation pH) 下被打断，该活化 pH 可以是低于预定 pH 的或约低于 6.5。

[0010] 在一些实施例中，在预定 pH 下，活性剂是阳离子，而聚合物是阴离子；而在其他实施例中，在预定 pH 下，活性剂是阴离子，而聚合物是阳离子。在一些实施例中，活性剂包括肽（比如，MAPKAP 激酶 II 抑制肽）。在其他实施例中，该肽包括选自 SEQ.ID.NOS:1-4 中的一个或多个序列。在一些实施例中，组合物可进一步包括第二活性剂（比如，肽、多核苷酸及其组合），在一些实施例中该第二活性剂包括 siRNA、DNA 及其组合。

[0011] 在一些实施例中，该组合物包括聚合物，该聚合物包括聚 ((C1-C6) 烷基 - 丙烯酸) (poly((C1-C6)alkyl-acrylic acid))、聚 ((C1-C6) 烷基 - 甲基丙烯酸)(poly((C1-C6) alkyl-methacrylic acid))、聚 ((C1-C6) 烷基 - 乙基丙烯酸)(poly((C1-C6) alkyl-ethacrylic acid)) 或其组合。在某些实施例中，该聚合物包括聚丙基丙烯酸 (poly(propylacrylic acid),PPAA)。示例性的聚合物还可进一步包括亲水嵌段，该亲水嵌段可包括聚乙二醇 (polyethylene glycol,PEG)、N-(2- 羟丙基）甲基丙烯酰胺 (N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide,HPMA)、聚 N,N- 二甲基丙烯酰胺 (poly(N,N-dimethylacrylamide),pDMA)、聚 PEG 甲基丙烯酸酯 (poly(PEG methacrylate),pPEGMA) 或其组合。

[0012] 此外，本公开内容的一些实施例中，聚合物与肽的电荷比在约 10 :1 至约 1 :10 之间。进一步的，在某些实施例中，该聚合物与肽的电荷比是约 1 :3。

[0013] 在一些实施例中，该复合物至少一个维度（比如，直径）的尺寸为约 50nm 至约 500nm。

[0014] 在某些实施例中，本公开内容提供一种药物组合物以及一种药学可接受载体，该药物组合物包括本公开内容述及的任何组合物。

[0015] 在其他实施例中，本公开主题提供一种血管移植物，其中该血管移植物包括本文实施例述及的组合物。

[0016] 在又进一步的实施例中，本公开内容提供治疗疾病 (disease 或 condition)（比如，血管疾病）的方法。这些方法至少包括步骤：对有需要的主体给予有效量的本文述及的任何组合物。在某些实施例中，该血管疾病为内膜增生。

[0017] 最后，在某些实施例中，本发明提供了合成本文所描述的组合物的方法。

附图说明

[0018] 图 1 提供了用于复合物的实施例的合成的示意图，该复合物包括阳离子的肽（比如，包括 MAPKAP 激酶 2(MK2i) 的肽）和阴离子的可胞内体溶解的 (endosomolytic) 聚合物（比如，PPAA)。

[0019] 图 2 示出了溶血试验结果，该结果表明实施例的复合物能够被优化，通过 pH 依赖性的膜破坏机制从内溶酶体路径逸出。

[0020] 图 3 示出了与对照复合物和游离 MK2i 的对比，本公开的复合物的一些实施例对冠状动脉痉挛血管平滑肌细胞 (HCAVSMC) 中的白介素 -6(IL-6) 产生的消除。在图 3 中提供的所有数据按细胞数进行了归一化 (normalized)。此外，“NT”意思是未作处理。$^{*}p<0.05$，与 NT+TNFα 相比；$^{*}p<0.01$，与 NT+TNFα 相比；#$p<0.05$，与相同浓度下的 MK2i 相比；##$p<0.05$，与相同浓度的细胞穿透肽 (CPP) 复合物相比；$n = 4$。

[0021] 图 4 示出了说明用空白复合物、仅 MK2i、仅 PPAA 或者用包含 MK2i 的复合物的实施例进行处理的人隐静脉 (HSV) 样本的舒张百分比的增加的柱形图。$^{*}p<0.05$，与对照相比；$^{**}p<0.05$，与 100μm 的 MK2i 相比；$n = 3$。

[0022] 图 5 示出了未作处理的、仅用 MK2i 处理的、用各种 MK2i 的复合物的实施例处理的 HSV 样本的组织切片。红线标出了内膜厚度。比例尺是 100μm。

[0023] 图 6 示出了 HPLC 精制的 CPP-MK2i 融合肽 (SEQ. ID. NO. 1:YARAAARQARA-KALARQLGVAA) 的电喷射电离质谱分析法 (ESI-MS) 质谱图。该分子量为 2283.67g/mol。该质谱图示出了三个主峰，每个主峰对应于完整的肽序列的碎片。

[0024] 图 7 是聚丙烯酸 (PAA) 在 D_6MSO 中的 ^{1}H NMR 质谱图。通过将与链转移剂相关联的峰（即，PAA 对应峰 c、d，PPAA 对应峰 b) 的面积和与丙烯酸 / 丙基丙烯酸相关联的峰（即，PAA 对应峰 a，PPAA 对应峰 c) 的面积进行比较确定分子量：PAA 聚合度 = 106，PPAA 聚合度 = 190。

[0025] 图 8 是聚丙烯酸 (PAA) 的 GPC 色谱图：M_n = 10830(g/mol)，PDI = 1.27，dη/dC = 0.09(mL/g)。该轨迹示出了在聚合作用所利用的 4- 氰基 -4-（乙硫基硫代羰基）硫代戊酸 (ECT，4-cyano-4-(ethylsulfanylthiocarbonyl)sulfanylvpentanoic acid) 链转移剂中的三硫代碳酸盐 (trithiocarbonate) 部分的特征吸收峰 (310nm) 处的 UV 吸收度。

[0026] 图 9 是聚丙基丙烯酸 (PPAA) 在 D_6MSO 中的 ^{1}H NMR 质谱图。通过将与链转移剂相关联的峰（即，PAA 对应峰 c、d，PPAA 对应峰 b) 的面积和与丙烯酸 / 丙基丙烯酸相关联的峰（即，PAA 对应峰 a，PPAA 对应峰 c) 的面积比较确定分子量：PAA 聚合度 = 106，PPAA 聚合度 = 190。

[0027] 图 10 是聚丙基丙烯酸 (PPAA) 的 GPC 色谱图：M_n = 22010(g/mol)，PDI = 1.471，dη/dC = 0.087(mL/g)。该轨迹示出了在聚合作用所利用的 4- 氰基 -4-（乙硫基硫代羰基）硫代戊酸 (ECT) 链转移剂中的三硫代碳酸盐部分的特征吸收峰 (310nm) 处的 UV 吸收度。

[0028] 图 11 示出了对 MK2i 复合物的结构特点和功能特性的说明，其中 MK2iNP 被优化用作介导胞内体逸出以及细胞内释放肽治疗剂。

[0029] 图 12 示出了一种处理对照概要：MK2i-NP 以可胞内体溶解的 PPAA 聚合物配制，而 NE-MK2i-NP 以 PAA 聚合物配制，PAA 聚合物在结构上类似于 PPAA，但由于其较低的 pKa 不可

胞内体溶解。MK2i-NP 和 NE-MK2i-NP 两者均由具有所示序列的 MK2i 肽（顶行＝改性 TAT 模拟细胞穿透肽序列，底行＝ MK2 抑制序列）制成。

[0030] 图 13 示出了在不同电荷比（[NH3+]/[COO-]）下制备的复合物的 zeta 电位。为了成像和摄取研究，NP 由用 Alexa®-488 荧光基团标记的 MK2i 肽配制。E-NP 由非胞内体可溶解 (NE) 的 PAA 聚合物配制。所示的值是至少三个独立测量值的平均值。

[0031] 图 14 示出了直径为 119±26nm 的 MK2i-NP 的动态光散射 (DLS) 分析。

[0032] 图 15 示出了直径为 114±14nm 的 MK2i-NP 的动态光散射分析。

[0033] 图 16 示出了乙酸双氧铀复染色的 MK2i-NP 和 NE-MK2i-NP 的代表性的透射电子显微镜 (TEM) 图像。比例尺是 100μm。

[0034] 图 17 示出了在胞内体 pH 范围中经过 pH 触发分解的 MK2i-NP，其通过 DLS 分析被展示。

[0035] 图 18 示出了表示荧光标记的 MK2i、MK2i-NP 和 NE-MK2i-NP 的细胞摄取和滞留 (retention) 的量化的图表。*p ＜ 0.001，对比 MK2i ；tp<0.001，对比 NE-MK2i-NPs ；n ＝ 3。MK2i-NP 配方增加了细胞摄取，延长了细胞内滞留，并且减少了 MK2i 的内溶酶体共定位。

[0036] 图 19 示出了代表性的流式直方图，其证明通过 MK2i-NP 运输的荧光标记的 MK2i 肽的增加的细胞内摄取和更久的滞留。

[0037] 图 20 示出了红血细胞溶血试验的结果，其中 MK2i-NP 具有与 PPAA 聚合物类似的 pH 依赖的膜破坏活性 (disruptive activity)，但与 NE-MK2i-NP 和仅 MK2i 肽并不类似。

[0038] 图 21 示出了完整的血红细胞溶血数据集。血红细胞溶血试验示出了 MK2i-NP 具有与 PPAA 聚合物类似的 pH 依赖和剂量依赖的膜破坏活性，但与 NE-MK2i-NP 和仅 MK2i 肽并不类似。

[0039] 图 22 示出了经处理后 24 小时，Alexa Fluor®-488标记的 MK2i 以 Lyso Tracker® red 染色的共定位的代表性的共聚焦显微镜图像。该图像证明 MK2i-NP 具有降低的内溶酶体共定位。比例尺＝ 20μm。

[0040] 图23示出了显示经处理后在0小时、12小时和24小时时，以内溶酶体LysoTracker® red 染色的 MK2i 肽共定位的定量的图表。

[0041] 图 24 示出了在经过不同的肽配方处理后 24 小时，包括 MK2i 的细胞内隔室 (compartment) 的平均大小。该隔室面积以 ImageJ 软件进行定量。*p<0.001，对比 MK2i ；tp<0.001，对比 NE-MK2i-NP ；n ＝来自至少 2 个不同图形的 50 囊泡。

[0042] 图 25 示出了 MK2i-NP 配方增加了 Alexa® 568-MK2i 的 HSV 运输。

[0043] 图 26 示出了经 2 小时处理并维持器官培养 14 天的伟郝夫范吉森氏 (VVG，Verhoeff Van-Gieson) 染色的 HSV 切片的代表性显微镜图像，其示出 MK2i-NP 有效地阻止了新生内膜形成。红条线标出了内膜厚度。比例尺是 100μm。

[0044] 图 27 示出了 VVG 染色的组织切片的内膜厚度的定量；测量值是来自分开的供体的至少 3 个静脉环的 6-12 个放射状平行测量值的平均值。*p<0.01，对照 NT ；tp< 0.05，对照相同浓度的 MK2i。

[0045] 图 28 示出了经 2 小时处理然后维持器官培养 14 天的 HSV 外植体 (explant) 的内膜厚度测量值，n ≥至少 3 个不同供体。*p ≤ 0.01，与未作处理对照 (NT) 相比 ；**p ≤ 0.001，

与 NT 相比 ;†p≤0.05。

[0046] 图 29 示出了经 2 小时处理然后维持器官培养 1 天或 14 天的 HSV 环中的细胞活力，该细胞活力通过 MTT 试验进行评估。n ≥来自至少 3 个分开的供体的 3 个静脉环段。

[0047] 图 30 示出了西方墨点 (Western Blot) 分析的结果，该结果示出经 2 小时处理后，MK2i-NP 降低了人隐静脉中的 HnRNP A0 的磷酸化，*p ≤ 0.05，对比 NT。

[0048] 图 31 示出了西方墨点分析的结果，其中经 2 小时处理后，MK2i-NP 降低了人隐静脉中的 HnRNP A0 的磷酸化，*p ≤ 0.05，对比 NT。

[0049] 图 32 示出了 MK2i-NP 处理阻断了经 ANG II 刺激的 HCAVSMC 中的 TNFα 产生。所有数据按细胞数进行了归一化。“NT”意思是未作处理，*p ＜ 0.05，对比 NT+TNFα ;†p<0.05，对比相同浓度下的 MK2i ;#p<0.05，对比相同浓度下的 NE-MK2i-NP。MK2i-NP 配方提高了 HCAVSMC 中的 MK2i 生物活性。

[0050] 图 33 示出了经 ANG II 刺激 6 小时，经 MK2i-NP、NE-MK2i-NP 或仅 MK2i 肽处理 2 小时，并且在新鲜培养基中培养 24 小时的 HCAVSMC 中的 TNFα 产量。所有数据按细胞数进行了归一化。“NT”意思是未作处理。*p ＜ 0.05，与 NT+TNFα 组相比 ;†p<0.05，与相同浓度下的 MK2i 相比 ;#p<0.05，与相同浓度下的 NE-MK2i-NP 相比 ;n ＝ 4。

[0051] 图 34 示出了 MK2i-NP 部分地阻断了 HCAVSMC 中的由 TNFα 诱发的 IL-6 产生的增加。细胞经过 TNFα 刺激 6 小时，经 MK2i-NP 或仅 MK2i 肽处理 2 小时，并在新鲜培养基中培养 24 小时。所有数据按细胞数进行了归一化。“NT”意思是未作处理，*p ＜ 0.05，对比 NT+TNFα ;†p<0.05，对比相同浓度下的 MK2i ;#p<0.05，对比相同浓度下的 NE-MK2i-NP。

[0052] 图 35 示出了经 10μM 的 ANG II 刺激 6 小时，经 MK2i-NP、NE-MK2i-NP 或仅 MK2i 肽处理 2 小时，并且在新鲜培养基中培养 24 小时的 HCAVSMC 中的细胞活力。“NT”意思是未作处理，n ＝ 4 ;

[0053] 图 36 示出了经 TNFα 刺激 6 小时，经 MK2i-NP 或仅 MK2i 肽处理 2 小时，并且在新鲜培养基中培养 24 小时的 HCAVSMC 中的细胞活力，n ＝ 4。

[0054] 图 37 示出了 MK2i-NP 处理阻断了响应于 ANG II 刺激的 F 肌动蛋白应力纤维的形成。数据表示 n ≥来自两个分开试验的 3 个细胞，*p ＜ 0.05，对比 NT+TNFα ;†p<0.05，对比相同浓度下的 MK2i ;#p<0.05，对比相同浓度下的 NE-MK2i-NP。所有数据按细胞数进行了归一化。“NT”意思是未作处理，*p ＜ 0.05，对比 NT+TNFα ;†p<0.05，对比相同浓度下的 MK2i ;#p<0.05，对比相同浓度下的 NE-MK2i-NP。

[0055] 图 38 示出了以 MK2i-NP 或对照 (25μM MK2i) 处理 1 小时后，ANG II- 受激的 HCAVSMC 中的 F 肌动蛋白应力纤维形成的代表性的荧光显微镜图像。

[0056] 图 39 示出了 MK2i-NP 处理阻断了在划痕创伤形成后，以化学引诱物 PDGF-BB(50ng/mL) 刺激 24 小时的 HCAVSMC 中的迁移，n ≥ 3:*p<0.05，**p<0.01，对比 NT+PDGF ;†p<0.05，对比相同浓度下的 MK2i ;#p<0.05，对比相同浓度下的 NE-MK2i-NP。所有数据按细胞数进行了归一化。“NT”意思是未作处理，*p ＜ 0.05，对比 NT+TNFα ;†p<0.05，对比相同浓度下的 MK2i ;#p<0.05，对比相同浓度下的 NE-MK2i-NP。

[0057] 图 40 示出了在向胞膜上接种后 8 小时的博伊登室 (Boyden Chamber) 试验中，MK2i-NP 抑制了趋向化学引诱物 PDGF-BB 的细胞迁移，n ＝来自 7 个分开的博伊登室试验

的 4 张图像。*p<0.05,**p<0.01,对比 NT+PDGF ;†p<0.05,对比相同浓度下的 MK2i ;#p<0.05,对比相同浓度下的 NE-MK2i-NP。所有数据按细胞数进行了归一化。“NT”意思是未作处理,*p ＜ 0.05,对比 NT+TNF α ;†p<0.05,对比相同浓度下的 MK2i ;#p<0.05,对比相同浓度下的 NE-MK2i-NP。

[0058] 图 41 示出了已迁移穿过半透膜的细胞的代表性的显微镜图像。处理剂量为 100 μM 的 MK2i、MK2i-NP 或 NE-MK2i-NP ;PDGF-BB 剂量为 50ng/mL。

[0059] 图 42 示出了以仅 MK2i 肽、MK2i-NP 或 NE-MK2i-NP 刺激处理 30 分钟,并且在具有 (+) 或不具有 (-)50ng/mL PDGF-BB 的新型培养基中培养 24 小时的 HCAVSMC 中的细胞增殖。“NT”意思是未作处理,n ＝ 4。

[0060] 图 43 示出了 MK2i-NP 处理减少了如静脉移植物的 VVG 染色组织切片的代表性图像中所示的新生内膜形成。实际,用 MK2i-NP 的手术处理减少了新生内膜形成和所移植的静脉移植物中的活体内的巨噬细胞的存留。

[0061] 图 44 示出了在术后 28 天在灌注固定的颈静脉插入移植物中的内膜厚度的定量。*p<0.01,对比 NT ;†p<0.05, n ≥ 7 个移植物 / 处理组。

[0062] 图 45 示出了 MK2i-NP 处理还降低了如在静脉移植物上使用 RAM-11 免疫组织化学法所示的新生内膜中的巨噬细胞的留存。箭头划出了阳性染色细胞。左列比例尺＝ 100 μm,右列缩放图比例尺＝ 50 μm。

[0063] 图 46 示出了每组处理组的兔颈静脉移植物外植体的代表性的 RAM-11 染色图像。箭头划出了阳性染色细胞。左列比例尺＝ 100 μm,右列缩放图比例尺＝ 50 μm。

[0064] 图 47 示出了在颈静脉移植物切片中 RAM-11 阳性巨噬细胞染色的定量,n ＝来自 4 个静脉段的 16 个组织学图像,*p<0.05,对比 NT。

[0065] 图 48 示出了以不同电荷比 ($[NH_3^+]/[COO^-]$) 制备的复合物的 ζ 电位,该 ζ 电位在纳米粒度及电位分析仪 (Zetasizer Nano ZS) 上被确定。所示的值是至少三个独立测量的平均值。

[0066] 图 49 示出了以 $[NH_3^+]/[COO^-]$ 电荷比＝ 1 :3 制备的复合物的 pH 依赖的溶血试验。显著溶血在代表早期胞内体囊泡至晚期胞内体囊泡的 pH 值 (即, pH ＜ 6.8) 时呈现,但在生理 pH7.4 时未见显著溶血。仅 YARA-MK2i 肽和 AA 复合物两者均未在任何试验 pH 值时表现任何显著溶血。以 $[NH_3^+]/[COO^-]$ 电荷比＝ 1 :3 制备的复合物的试验 pH 依赖性尺寸的变化通过 DLS 分析进行分析。

[0067] 图 50 示出了在 pH7.4 时复合物呈现单峰粒度分布。如图所示,随着降低 pH,复合物开始游离成单独的 YARA-MK2i 肽和 PPAA 聚合物单聚体。

[0068] 图 51 示出了经 10 μM ANG II 刺激 6 小时,以 PPAA 复合物、AA 复合物或仅 YARA-MK2i 肽处理 2 小时,并且在新鲜培养基中培养 24 小时的 HCAVSMC 的细胞活力。“NT”意思是未作处理,n ＝ 4。

[0069] 图 52 示出了经 ANG II 刺激 6 小时,以 PPAA 复合物、AA 复合物或仅融合 MK2i 肽处理 2 小时,并且在新鲜培养基中培养 24 小时的 HCAVSMC 中的 TNF-α 产量。处理按照 10 μM、25 μM、50 μM 或 100 μM 的肽浓度进行归一化。所有数据按照通过 LDH 试验所确定的细胞数进行归一化。NT ＝未经处理。*p ＜ 0.05,与 NT+TNF α 组相比 ;*p<0.05,与相同浓度下的 MK2i 相比 ;**p<0.05,与相同浓度下的 AA 复合物相比。

[0070] 图 53 示出了通过曼德系数 (Mander's coefficient)M1 计算被确定的，绿色荧光团与红色荧光团共定位的百分比（基本上是，图像中与红色荧光重叠的绿色荧光的百分比（%），即，被包括在胞内体囊泡之内的肽的百分比）。对于所有样本，YARA-MK2i 剂量是 25 μM。所示的值是分开的 n = 3 图像的平均 ±SEM。*p<0.05，与同一时间点的 YARA-MK2i 相比；**p<0.01 与同一时间点的 YARA-MK2i 相比。该图表是 HCAVSMC 复合物摄取显微镜分析的结果，并且其示出复合物提高了 MK2i 肽的摄取和胞内体逸出。

[0071] 图 54 涉及图 53 中的数据，并且示出了用于量化共定位的代表性的荧光图像。左边的数字表示经过 2 小时处理后细胞在新型培养基中培养的时间，对于所获得所有图像，红色通道和绿色通道的增益保持恒定。

[0072] 图 55 示出了 PPAA 复合物随着时间变化的平均荧光强度的图表。

[0073] 图 56 示出了 PPAA 复合物随着时间变化的荧光强度的直方图。

[0074] 图 57 示出了仅 YARA-MK2i 肽随着时间变化的平均荧光强度的图表。

[0075] 图 58 示出了仅 YARA-MK2i 肽随着时间变化的荧光强度的直方图。

[0076] 图 59 示出了 AA 复合物随着时间变化的平均荧光强度的图表。

[0077] 图 60 示出了 AA 复合物随着时间变化的荧光强度的直方图。

[0078] 图 61 示出了显示在 HSV 环用苯肾上腺素 (PE,10^{-6}M) 收缩并且随后用 SNP(10^{-8}-10^{-6}M) 舒张之后，硝普化钠 (SNP) 舒张的百分比增加。HSV 环然后经 2 小时处理，并再次用 PE 使其收缩和用 SNP 舒张，来确定处理后舒张的增加。在后处理收缩之后，所有环用 KCI 使其收缩，来验证平滑肌活力。*p<0.05，与对照相比；**p<0.05，与 100 μm 的 MK2i 相比；n = 3。

[0079] 图 62 示出了经 2 小时处理并维持器官培养 24 小时的 HSV 环中的细胞活力，该细胞活力通过 MTT 试验进行评估，n = 1。

[0080] 图 63 示出了经 2 小时处理并维持器官培养 14 天的 HSV 环中的细胞活力，该细胞活力通过 MTT 试验进行评估。n = 1。

[0081] 图 64 示出了经 2 小时处理然后维持器官培养 14 天的 HSV 外植体的内膜厚度，n = 3；*p ≤ 0.01，与对照（未经处理）相比；**p ≤ 0.001，与对照相比，′ p ≤ 0.05。

[0082] 图 65 示出了经 2 小时处理然后维持器官培养 14 天的 HSV 外植体的内膜 / 中膜 (Medial) 比 (I/M) 的图表，n = 3。*p ≤ 0.01，与对照（未经处理）相比；**p ≤ 0.001，与对照相比，′ p ≤ 0.05。

[0083] 图 66 示出了以 3 :1 电荷比制备的 AZX-100((SEQ ID NO:2)) 复合物的 DLS 粒度分布；

[0084] 图 67 示出了乙酸双氧铀染色的 AZX-100 复合物的代表性 TEM 图像，该图像示出与 DLS 结果一致的粒度分布。

[0085] 图 68 示出了以各种电荷比制备的 AZX-100 复合物的 zeta 电位的汇总。zeta 电位被认为在电荷比高于 3 :1 时与电荷比成正比。可能因为大分子重排，可见 zeta 电位的突然变换发生在电荷比 3 :1 时。

[0086] 图 69 和图 70 示出了 AZX-100 复合物提高了人血管紧张素 II 刺激的人冠状动脉血管平滑肌细胞中应力纤维形成的 AZX-100 介导抑制。细胞经 1 小时处理，并且随后以血管紧张素 II 刺激 2 小时。肌动蛋白应力纤维以鬼笔环肽 (phalloidin) 染色的固定样本被

可视化，并且来自每个处理组的单个细胞的相对荧光强度被利用来为肌动蛋白应力纤维的形成定量。

[0087] 图 71 示出了经对照、AZ100 肽或 AZX 复合物处理的鼠主动脉平滑肌中发生的抑制的百分比；

[0088] 图 72 示出了鼠主动脉平滑肌的收缩。

[0089] 图 73 示出了经 AZX 复合物处理的鼠主动脉平滑肌中收缩的剂量依赖抑制。

[0090] 图 74 示出了鼠主动脉平滑肌中代表性的力的示踪和钙荧光示踪。

[0091] 图 75 示出了测量鼠主动脉平滑肌中所发生的力的抑制以及细胞内钙的变化幅度的累积数据。

[0092] 图 76 示出了经不同浓度的 AZX-100 肽或 AZX 复合物处理的 HSV 中所提高的舒张百分比。

[0093] 图 77 示出了 AZX-100NP 提高了人细支气管气道平滑肌的 AZX-100 介导舒张。

[0094] 图 78 示出了显示不同电荷比对含 RN22 的复合物的直径、多分散指数 (PDI) 以及 zeta 电位的影响的表格和图表。

[0095] 图 79 示出了显示不同电荷比对含 Penetratin-BAK-BH3 的复合物的直径、多分散指数 (PDI) 以及 zeta 电位的影响的表格和图表。

具体实施方式

[0096] 本公开主题的一个或多个实施例的细节在本文中被提出。本领域的普通技术人员在研究本文中所提供的信息之后，对本文中所描述的实施例的修改以及其他实施例将是显而易见的。本文中所提供的信息，尤其是所描述的示例性实施例的具体细节主要是为了提供清晰理解，而非从其中推断不必要的限制。若有冲突，以本说明书（包括定义）为准。

[0097] 每个示例作为本公开的说明被提供，并且绝非其限制。事实上，对于本领域技术人员，显然可以不脱离本公开的范围对本公开的教义作出各种修改和变化。例如，作为一个实施例的部分被示出或被描述的特征可与另一个实施例一起被用于产出又一个实施例。

[0098] 本公开的所有的单数特征或限制的引用应当包括对应的复数特征或限制，反之亦然，除非另有说明或在所参考的上下文中明显蕴含着相反意思。

[0099] 如本文所用的所有方法或处理步骤的组合能够以任何顺序来执行，除非另有说明或所参考的组合在上下文中明显蕴含着相反意思。

[0100] 本公开的方法和组合物，包括其组份，可以包括本文中所描述的实施例的基本元素和限制以及本文中所描述的或有用的任何额外或可选的组分或限制，或者由或本质上由本文中所描述的实施例的基本元素和限制以及本文中所描述的或有用的任何额外或可选的组分或限制组成。

[0101] 亟需用于运输活性剂（包括肽）的组合物和方法，其能够避免胞内体途径，具有细胞溶质靶向的改进通路，具有增加的细胞内滞留时间，以及具有提高的细胞内作用肽药物的生物活性。本公开的主题至少满足这些需要中的每一需要。

[0102] 本公开主题包括组合物，该组合物包括肽和聚合物，其中该肽和聚合物彼此静电键合，以在预定 pH 下形成复合物。术语“复合物 (polyplex)”在本文中被用于指形成为簇 (cluster)、颗粒或聚集物 (agglomeration) 等的静电键合的肽和聚合物。因此，本公开主

题的实施例包括的组合物包括肽和聚合物的复合物。

[0103] 聚合物

[0104] 本文采用的术语“聚合物(polymer)”是指通过单体(monomer)聚合而制备的聚合化合物,该单体不论是否为相同类型或不同类型。因此,通用术语“聚合物”包括术语均聚物(homopolymer)(由相同类型的单体单元形成的聚合物),以及术语共聚物(copolymer)(由两种或多种不同类型的单体单元形成的聚合物)。

[0105] 在一些实施例中,聚合物可包括选自(C_1-C_6)烷基-丙烯酸、(C_1-C_6)烷基-甲基丙烯酸和(C_1-C_6)烷基-乙基丙烯酸及其组合中的一种或多种单体。例如,在一些实施例中,(C_1-C_6)烷基-丙烯酸单体包括丙基丙烯酸(PAA)、丁基-丙烯酸等。相应的聚合物包括聚(C1-C6)烷基-丙烯酸、聚(C1-C6)烷基-甲基丙烯酸、聚(C1-C6)烷基-乙基丙烯酸或其组合,或由聚(C1-C6)烷基-丙烯酸、聚(C1-C6)烷基-甲基丙烯酸、聚(C1-C6)烷基-乙基丙烯酸或其组合构成。在特定实施例中,该聚合物是聚丙基丙烯酸(PPAA)聚合物。

[0106] 术语“烷基(alkyl)”指的是具有通式C_nH_{2n+1}(其中n=约1至约18或更大)的烷基。该基团可以是直链的或支链的。当在本文中使用时,烷基也包括“低级烷基(lower alkyl)”,其指的是具有通式C_nH_{2n+1}(其中n=1至约6)的烷基。在一些实施例中,n=1至约3。示例包括甲基、乙基、丙基、异丙基、正丁基、仲丁基、叔丁基、异丁基、正戊基、异戊基、新戊基、正己基等。就此而言,术语“环烷基(cycloalkyl)”指的是由至少3个碳原子组成的非芳香族的碳基环(比如,环丙基、环己基等)。术语烷基包括环烷基。

[0107] 在一些实施例中,单体的功能化形式可选地被用于该聚合物。本文所用的功能化单体是指包括被掩蔽(masked)的功能基团或非掩蔽(non-masked)的功能基团(例如,可在聚合后结合其它部分的基团)的单体。此基团的非限制性示例是伯氨基、羧基、巯基、羟基、叠氮化物和氰基。一些适合的掩蔽基团可供使用(例如,参见T.W.Greene,P.G.M.Wuts,有机合成中的保护基(第2版)(Protective Groups in Organic Synthesis(2nd edition)),J.Wiley&Sons出版,1991;P.J.Kocienski,保护基(Protecting Groups),GeorgThieme Verlag出版,1994)。

[0108] 在一些实施例中,上述聚合物是pH响应性(pH-responsive)聚合物。在特定实例中,如本文所用,术语聚合物包括pH响应性聚合物。pH响应性聚合物包括随其pH变化而发生电荷变化的聚合物。该聚合物可以是在预定pH下的阳离子或阴离子,该预定pH包括特定pH值、pH范围、在某pH值以上和/或在某pH值以下。例如,聚烷基丙烯酸包括羧酸基,并且聚丙基丙烯酸具有约6.7的酸离解常数(pKa)。当聚丙基丙烯酸所处pH高于其pKa时,聚丙基丙烯酸具有阴离子特性。然而,当羧酸基所处pH约为其pKa或低于其pKa时,羧酸基被质子化(protonated),并且聚丙基丙烯酸不再具有阴离子特性,或者至少不如其处于预定pH时的强阴离子特性。电荷上的变化使聚丙基丙烯酸和其他的聚烷基丙烯酸成为示例性的pH响应性聚合物。

[0109] 本领域的技术人员将能知晓包括根据聚合物环境的pH而带不同电荷的基团的其他聚合物。聚合物的电荷变化时所处于的pH可以是低于、等于或高于其pKa的pH。因此,在预定pH时具有带电基团的聚合物可适用于形成复合物,并且在本公开内容的特定实施例中,当处于生理pH时,该聚合物包括电荷。

[0110] 因此,在约生理pH和/或在约pH6.0、约pH7.0、约pH8.0、约胞内体pH(例如,约

pH5.0 至 pH6.0) 或其组合下，示例性单体和聚合物可以是阳离子或阴离子。在一些实施例中，该单体在低于约 pH7.4、低于约 pH7.0、低于约 pH6.5、低于约 pH6.0、低于约 pH5.0、低于约 pH4.5 或低于约 pH4.0 的 pH 中逐渐被质子化。

[0111] 该复合物的至少部分分解可将结合至该复合物的芯 (core) 的聚核苷酸暴露于周围环境中。因此，复合物的至少部分分解可允许聚核苷酸被运输给其最终目标。至少部分分解还可以将阳离子单体和 / 或疏水性单体暴露于周围环境，并且该阳离子单体和 / 或疏水性单体可具有膜破坏特性。因此，这些单体的暴露可诱导对膜的破坏，该膜容纳上述复合物。在一些实施例中，在复合物被摄取至细胞之中后，复合物可以至少部分地分解，以 pH 响应的方式将聚核苷酸运输给细胞溶质 (cytosol)。在一些实施例中，复合物约在胞内体 pH 或 pH 低于胞内体 pH 时至少部分分解，并且该至少部分分解的复合物可以破坏胞内体膜或脂质体膜，从而聚核苷酸可被运输给特定细胞的细胞溶质。

[0112] 就此而言，该单体和聚合物可具有膜破坏特性。因此，这些单体的暴露可诱导对容纳复合物的膜的破坏。在一些实施例中，在复合物被摄取至细胞之中后，复合物可以至少部分地分解，以 pH 响应的方式将聚核苷酸运输给细胞溶质 (cytosol)。在一些实施例中，复合物约在预定 pH(例如，胞内体 pH) 或 pH 低于预定 pH 时至少部分分解，并且该至少部分分解的复合物可以破坏胞内体膜或脂质体膜，从而聚核苷酸可被运输给特定细胞的细胞溶质。

[0113] 更进一步，聚合物的实例包括共聚物，该共聚物包括一个或多个亲水嵌段。术语“亲水嵌段 (hydrophilic block)”是指包括至少约 50mol％的可溶于水的单体和 / 或可分散于水的单体。在此实施例中，上述单体外的其余单体形成本文中所称的“pH 响应嵌段 (pH-responsive block)”。在一些实施例中，包括亲水嵌段的聚合物可形成包括冠 (corona) 和芯的颗粒 (例如，上述复合物)，该冠大体上包括聚合物的亲水嵌段，该芯大体上包括聚合物的 pH 响应嵌段。

[0114] 因此，聚合物的亲水嵌段和其余嵌段可将聚合物聚集成微胶束 (micelle)，该微胶束包括由亲水聚合物嵌段组成的亲水表面基团 (例如，冠)。亲水聚合物嵌段可包括选自聚乙二醇 (PEG)、N-(2- 羟丙基) 甲基丙烯酰胺 (HPMA)、聚 (N,N- 二甲基丙烯酰胺)(pDMA)、聚 (PEG 甲基丙烯酰胺)(pPEGMA) 及其组合中的单体。包括聚合物中的亲水嵌段的一些组合物可在通过静脉、动脉等给药时，达到更高的稳定性并且提高肽的运输。在一些实施例中，亲水单体相对其余单体 (即，pH 响应单体) 的摩尔比可以是约 10mol％、15mol％、20mol％、25mol ％、30mol ％、35mol ％、40mol ％、45mol ％、50mol ％、55mol ％、60mol ％、65mol ％、70mol％、75mol％、80mol％、85mol％和 / 或 90mol％。

[0115] 该聚合物可大小不同。该大小可取决于或不取决于所被处理的主体、所被运输的活性剂或形成该聚合物的单体等。示例性聚合物的大小可包括约 10000Da、15000Da、20000Da、25000Da、30000Da、35000Da、40000Da、45000Da 或 50000Da。在特定实施例中，聚合物包括亲水嵌段，亲水嵌段可以是约 500Da、5000Da、10000Da、15000Da 或 20000Da，并且 pH 响应嵌段可以是约 5000Da、10000Da、15000Da、20000Da、25000Da、30000Da、35000Da、40000Da、45000Da 或 50000Da。

[0116] 活性剂

[0117] 本公开内容的主题进一步包括活性剂，该活性剂用于结合本文开的聚合物的实例使用。在一些实施例中，该活性剂处于预定 pH、低于预定 pH 或高于预定 pH 时带静电荷。本

文所用术语“活性剂 (active agent)”指的是改变、促进、加速、延长、抑制、激活、消除或在其他方面影响主体中的生物事件或化学事件的化合物或实体 (entity)。在一些实施例中，本发明的复合物进一步包括第二活性剂或额外的活性剂。在某些实施例中，活性剂是肽、核苷酸 (例如，DNA、siRNA)、抗生素等。

[0118] 本文中的术语“多肽 (polypeptide)”、“蛋白质 (protein)”和“肽 (peptide)”可互换地被用来表示氨基酸或氨基酸类似物的聚合物，无论其大小或功能。虽然“蛋白质”通常指相对较大的多肽，并且“肽”通常指小的多肽，但这些术语在本领域中的使用可重叠并且变化。如本文中所用的术语“肽”指的是肽、多肽和蛋白质，除非另有说明。当提及基因制品时，术语“蛋白质”、“多肽”和“肽”在本文中可互换地被使用。因此，示例性多肽包括基因制品、自然生成的蛋白质、非自然生成的蛋白质、同系物 (homolog)、直系同源物 (ortholog)、旁系同源物 (paralog)、片段及其其他等同物、变体和类似物。此外，术语“融合多肽 (fusion polypeptide)”在本文中被用于通常指由两种或多种不同多肽所形成的多肽。

[0119] 在一些实施例中，作为活性剂的肽包括 MAPKAP 激酶 II 抑制肽 (MK2i)。不受其他理论或机制限制，MK2i 肽被认为具有抗炎活性，并且其抑制 F 肌动蛋白应力纤维形成，F 肌动蛋白应力纤维驱使平滑肌细胞迁移，这可使新生内膜形成以及血管收缩。MK2i 因此被认为加强血管舒张，并且减少新生内膜形成。所以，当结合血管移植 (尤其是隐静脉移植) 操作使用时，MK2i 是有益的。

[0120] 关于 MK2 肽和 / 或 MK2i 肽的其他信息，请参见公开号为 2012/0263680、2011/0288036 和 2008/0293640 的美国专利申请，这些专利申请通过全文引用被包括在本文中。

[0121] 肽可带静电荷。在一些实施例中，本文公开的肽在处于预定 pH 下带静电荷。例如，肽在预定 pH、低于预定 pH 或高于预定 pH 下可以是阳离子或阴离子。本领域的技术人员知悉具有功能基团 (例如，胺基) 的各种肽，该功能基团至少在肽处于低于、等于或高于该肽 pKa 的 pH 时带电荷。一些优选实施例中，肽在生理 pH 时带电 (例如，阳离子)。

[0122] 本文公开的组合物的一些示例性实施例包括 MK2i 肽，该 MK2i 肽包括伯胺，当 MK2i 处于低于该伯胺的 pKa 的 pH(即，约 pH 9 至 pH 12) 时，该伯胺赋予 MK2i 阳离子特性。其他示例性肽包括 Bak 的 BH3 模拟抑制剂，该抑制肽可被用于引发癌细胞凋亡，并且可在预定 pH 时带电荷。其他示例性肽包括 AZX100 肽 (SEQ ID NO:2)，其可被用于气道舒张。在其他实施例中，活性剂可以是促凋亡 (proapototic) 肽，包括但不限于 :RN22 肽 (SEQ ID NO:3) 和 Penetratin-Bak-BH3 肽 (SEQ ID NO:4)。因此，根据组合物中所使用的肽，该组合物可被用于治疗各种各样的不同疾病 (conditions and/or diseases)。

[0123] 在一些实施例中，肽可以是包括两种不同肽的融合肽。融合肽可包括第一肽和第二肽，该第一肽包括活性剂，该第二肽包括细胞穿透肽。细胞穿透肽通常是指引发、加速、激活或促进对该细胞穿透肽和 / 或任何其所结合至的分子的细胞摄取的肽。

[0124] 例如，在一些实施例中，该细胞穿透肽是“YARA”。YARA 可被结合至包含活性剂的第一肽。其他细胞穿透肽包括 TAT 肽、触足 (AntP,Antennapedia) 肽以及本领域已知的其他细胞穿透肽。在一些实施例中，细胞穿透肽和活性剂肽分别是 YARA 和 MK2i。如本文所用，“YARA-MK2i”(SEQ ID NO:1) 指的是包括细胞穿透肽 (YARA) 和 MAPKAP 激酶 II 抑制肽 (MK2i) 两者的肽。

[0125] 因此，在一些实施例中，活性剂是肽。在一些实施例中，肽进一步包括细胞穿透肽。该细胞穿透肽可以是来自不同活性剂肽的相同肽或分开的肽。此外，在一些实施例中，活性剂是融合肽，该融合肽的部分是活性剂肽、另一部分是细胞穿透肽。

[0126] 复合物

[0127] 本公开主题进一步包括复合物，该复合物包括本文中所描述的聚合物和活性剂。在一些实施例中，聚合物和活性剂在预定 pH 下分别带相反电荷，并且因而可以在该预定 pH 下静电结合来形成复合物。该预定 pH 可以高于活性剂（例如，肽）或聚合物中一者的 pKa，并且低于该活性剂和该聚合物中的另一个的 pKa。例如，该预定 pH 可以是约 pH6.5 至约 pH8.0，并且更具体地可以是约 pH6.5、约 pH6.6、约 pH6.7、约 pH6.8、约 pH6.9、约 pH7.0、约 pH7.1、约 pH7.2、约 pH7.3、约 pH7.4、约 pH7.5、约 pH7.6、约 pH7.7、约 pH7.8、约 pH7.9 或约 pH8.0。该预定 pH 还可以是主体的生理 pH。如本文所用的，术语“在预定 pH(at a predetermined pH)”可以指是特定 pH、低于特别的 pH、高于特别的 pH 或在某 pH 范围之内的 pH。

[0128] 该复合物的实例可由在预定 pH 下带相反电荷的特别的聚合物和活性剂形成。该复合物的实例的形成可在聚合物和活性剂两者均处于预定 pH 下发生。因此，在一些实施例中，复合物包括至少通过静电相互作用被结合在一起的聚合物和活性剂。如本文中所描述的，当 pH 从预定 pH 被改变为非预定 pH 时，该聚合物和 / 或活性剂所带的电荷可以中和、增强或者由正变负或由负变正。当这种情况发生时，聚合物和活性剂可变化，以不再具有相反电荷和 / 或一定程度减少相反电荷，从而允许该复合物的分解。

[0129] 就此而言，该复合物的至少部分分解可以将活性剂（例如，聚核苷酸）暴露于周围环境，该活性剂被结合至并包含于该复合物。因此，复合物的至少部分分解可允许活性剂被运输给其最终目标。如本文所描述的，至少部分分解还可使具有膜破坏特性的聚合物暴露。在一些实施例中，在复合物被摄取至细胞之中后，复合物可以至少部分地分解，以 pH 响应的方式将活性剂运输至细胞溶质。在一些实施例中，复合物约在胞内体 pH 或 pH 低于胞内体 pH 时至少部分分解，并且该至少部分分解的复合物可以破坏胞内体膜或脂质体膜，从而聚核苷酸可被运输给特定细胞的细胞溶质。因此，与活性剂一起形成复合物的聚合物的实施例是可胞内体溶解的，并且从而可以允许和 / 或提高已通过该复合物进入细胞的活性剂的细胞溶质运输。

[0130] 复合物的特定实例包括 MK2i 和聚丙基丙烯酸的组合物。在约 pH6.5 至约 8.5 的预定 pH 下，MK2i 是阴离子，并且聚丙基丙烯酸是阳离子。因此，当处于约 pH6.5 至约 8.5 的预定 pH 中时，该组合物可形成和 / 或可包含 MK2i 和聚丙基丙烯酸的复合物。

[0131] 该组合物可在活化 pH 作用下被激活。在一些实施例中，该活化 pH 低于该预定 pH。在一些实施例中，该活化 pH 约为主体的细胞的早期胞内体中的 pH。当该组合物处于该活化 pH 下时，肽和聚合物之间的静电键可以被打破（例如，被裂解）。每当该键被弱化或被消除，其被打破，从而上述两个或多个结合分子可彼此分离。

[0132] 例如，一些包括 MK2i 肽和聚丙基丙烯酸聚合物的组合物实例具有低于约 pH6.5 的活化 pH。因此，当 MK2i 和聚丙基丙烯酸聚合物被暴露于 pH6.5 或更低 pH 时，MK2i 和聚丙基丙烯酸可彼此分离。

[0133] 由于在活化 pH 下被激活，处于活化 pH 下的复合物的组合物可将活性剂从惰性结

合 (inert bound) 状态激活为活跃的未结合状态。聚合物和活性剂的分离还可以激活膜破坏活性，该膜破坏活性使胞内体相互作用和 / 或胞内体破坏和肽从内溶酶体途径或再循环途径逸出成为可能，这可允许肽从胞内体等被运输至细胞溶质之中。其后，活性剂可以将细胞之内的细胞溶质标的物或其他标的物作为靶点。

[0134] 因此，与现有组合物不同，并且不受其他理论或机制限制，本公开主题的实施例首先进入靶细胞的胞内体途径，然后能够被 pH 激活来至少部分地从该靶细胞的胞内体逸出至细胞溶质。这具有提高肽活性剂功效的优点。相对于肽单独给药或仅与细胞穿透肽结合给药，这还可以增加细胞内滞留时间，和 / 或增加该肽的生物活性。

[0135] 此外，组合物和 / 或复合物可包括各种不同浓度范围的活性剂和聚合物。在一些实施例中，活性剂和 / 或复合物的相对浓度可由活性剂上的带电基团与聚合物上的带电基团的电荷比或摩尔比确定。例如，如果组合物包括 MK2i 和聚丙烯酸，该电荷比可被确定为 $[NH_3^+]$:[COO] 的摩尔比。示例性组合物包括约 10 :1、约 9:1、约 8:1、约 7:1、约 6:1、约 5:1、约 4:1、约 3:1、约 2:1、约 1:1、约 1:2、约 1:3、约 1:4、约 1:5、约 1:6、约 1:7、约 1:8、约 1:9 或约 1:10 的电荷比。

[0136] 在一些实施例中，肽生物活性被显示为在血管平滑肌细胞中抑制响应于病理信号血管紧张素 II(Ang II) 的炎症信号生成 (TNF-alpha)。在人隐静脉 (HSV) 中，PPAA 复合物被显示为增强 HSV 的血管舒张，和减少 HSV 中新生内膜的形成。

[0137] 在某些实施例中，该预定 pH 根据肽活性剂中存在的伯胺和 / 或聚合物中存在的羧酸基的 pKa 值选取。在某些实施例中，肽的 pKa 在约 9 和约 12 之间，和 / 或聚合物的 pKa 在约 6 和约 7 之间。该混合形成复合物。

[0138] 在一些实施例中，本发明的组合物 / 化合物包括复合物，该复合物具有至少在纳米级或其他亚微米级上测量的尺寸。该复合物的尺寸可被优化用于细胞运输，尤其用于通过胞内体途径的细胞运输。在其他实施例中，该组合物可包括在至少一个维度上测量值为约 50nm、约 60nm、约 70nm、约 80nm、约 90nm、约 100nm、约 110nm、约 120nm、约 130nm、约 140nm、约 150nm、约 160nm、约 170nm、约 180nm、约 190nm、约 200nm、约 210nm、约 220nm、约 230nm、约 240nm、约 250nm、约 260nm、约 270nm、约 280nm、约 290nm、约 300nm、约 310nm、约 320nm、约 330nm、约 340nm、约 350nm、约 360nm、约 370nm、约 380nm、约 390nm、约 400nm、约 410nm、约 420nm、约 430nm、约 440nm、约 450nm、约 460nm、约 470nm、约 480nm、约 490nm 或约 500nm 的复合物。在某些实施例中，复合物至少在一个维度上 (比如，直径) 的大小为约 90nm 至约 200nm。因为某些复合物可以在纳米级上测量，故本文的复合物还可被称为纳米颗粒或纳米复合物。

[0139] 在一些实施例中，该聚合物包括亲水嵌段，该亲水嵌段可形成复合物的外壳 (冠)，并且可保护复合物。在一些实施例中，聚合物上的此嵌段可减少或消除复合物吸附蛋白质的程度。在示例性复合物上的亲水外壳还可抑制红血球的溶解或聚集、避免免疫刺激、提高循环时间、保护来自酶促降解的产物 (例如，活性剂)、提供胶质稳定性和“隐形 (stealth)”，或其组合。

[0140] 本公开的主题还进一步包括用于合成本文中所描述的任何组合物的方法，该组合物包括本文中所描述的复合物和 / 或其药物组合物。在一些实施例中，该方法包括在预定 pH 下混合聚合物和活性剂，以使聚合物和肽部分地或全部带相反电荷，并静电结合以形成

至少一个复合物。被用于形成该组合物的聚合物和肽的浓度不受特别限定。在一些实施例中，聚合物和肽以各浓度混合，从而该两个组分所取得的电荷的比是约 10 :1 至约 1 :10。在一些实施例中，聚合物和肽在缓冲液（比如，PBS 缓冲液）中混合。

[0141] 如上所述，在一些实施例中，活性剂可包括肽，该肽进一步包括细胞穿透肽。就此而言，用于合成包含细胞穿透肽的复合物的方法可包括在混合活性剂和聚合物的步骤之前，将活性剂（例如，肽）与细胞穿透肽融合的步骤。因此所产生的组合物至少包括复合物，该复合物包括聚合物以及活性剂肽和细胞穿透肽的融合肽。

[0142] 在一些实施例中，本公开内容针对合成复合物组合物的方法，其中该方法包括在预定 pH 下使活性剂（比如，肽（例如，YARA-MK2i 融合肽））和聚合物（比如，pH 响应性、可胞内体溶解的聚合物 PPAA）混合的步骤。

[0143] 在治疗应用或分解复合物期间，自预定 pH（可以是 pH 范围）下至活化 pH（其可以是 pH 范围）下，该复合物可转换。该转化可有助于构成复合物的聚合物和活性剂的至少部分分解。

[0144] 组合物和装置

[0145] 本公开主题进一步包括本文所描述的组合物、复合物、肽和 / 或聚合物的药物组合物。此外，本公开主题还包括本文所描述的化合物的任何药学可接受的盐、溶剂化物、生理学功能性衍生物和 / 或药学可接受衍生物。

[0146] 该药物组合物可包括药学可接受载体。就此而言，术语“药学可接受载体 (pharmaceutically-acceptable carrier)”指的是无菌的水性溶液或非水溶液、分散液 (dispersion)、悬浮液 (suspension) 或乳液 (emulsion) 以及无菌粉末，该无菌粉末在使用前重新构成无菌的可注射溶液或分散液。例如，可通过使用包衣材料（例如，卵磷脂）、在分散液中维持所需的颗粒大小以及使用表面活性剂维持适当的流动性 (fluidity)。这些组合物还可包含辅料 (adjuvant)，比如防腐剂、湿润剂、乳化剂和分散剂。可通过包含各种各样的抗菌剂和抗真菌剂（比如，对羟基本甲酸酯 (paraben)、氯丁醇、苯酚、山梨酸等）预防微生物作用。还需包含等渗剂 (isotonic agent)，比如糖类、氯化钠等。可以通过包含可延迟吸收的药剂（比如，单硬脂酸铝和明胶）而延长可注射药物剂型的吸收。可注射的贮存剂型通过在可生物降解聚合物（比如，聚乳酸交酯 - 聚乙交酯、聚原酸酯和聚酸酐）中形成药物微胶囊基体制造。根据药物与聚合物之比以及所采用的聚合物的性质，药物释放率可被控制。贮存可注射配方还通过将药物包埋在身体组织可兼容的微脂囊或微乳液中制备。例如，可注射配方可以以无菌固体组合物的形式通过细菌截留过滤器的过滤或通过纳入灭菌剂被杀菌，该无菌固体组合物可在使用之前被溶解于或分散于无菌水或其他无菌可注射媒介中。适当的惰性载体可包括糖类（比如，乳糖）。

[0147] 适当的配方包括无菌的水性可注射溶液或非水可注射溶液，该溶液可包括抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂、杀菌性抗菌药和使该配方与目标受体的体液等渗的溶质；以及水性无菌悬液和非水无菌悬浮液，其可包括混悬剂和增稠剂。

[0148] 该组合物可采用如油性或水性载体的悬浮液、溶液或者乳液的形式，并且可包含配制剂（比如，混悬剂、稳定剂和 / 或分散剂）。可替换地，活性成分可以是粉末形式，用于在使用前与适当的载体（比如，无菌无热原的水）组合。

[0149] 该配方可以存放于单位剂量容器或多剂量容器（例如，密封的安瓿和小瓶），并且

可被存储在冷冻或冷冻干燥（冻干）条件下，仅需要在使用前立即添加无菌液体载体。

[0150] 该组合物还可被配制以为移植或注射做准备。因此，例如，该组合物可以用适当的聚合材料或疏水材料配制（例如，被配制为可接受油中的乳液）。在一些实施例中，该组合物与移植物或其材料一起备用，或在移植物或移植物材料上备用。可与具体组合物一起使用的示例性移植物包括血管移植物（例如，隐静脉移植物），该移植物包含该组合物（比如，含 MK2i 的组合物）。该组合物可作为上述移植物的制备材料、形成在移植物的表面上等。包括该组合物的移植物的实例可具有将该组合物直接运输至该移植物可造成内膜增生的点的能力等。移植物可包括一系列广泛用于主体移植的医用器件。移植物还包括可被植入主体之中或之上的材料（包括生物材料）。

[0151] 本公开的主题进一步包括试剂盒 (kit)，该试剂盒可包括本文中所描述的组合物或药物组合物，与便于该组合物或药物组合物给药的器件包装在一起。本领域的技术人员或普通技术人员能够知悉，合适的辅助给药器件取决于所选择的组合物或药物组合物的配方，和 / 或期望的给药位置。例如，如果组合物的配方适合于主体注射，该器件可以是注射器。再例如，如果所期望的给药位置是细胞培养基，该器件可以是无菌移液管。又例如，如果所期望的给药位置是血管或动脉，该器件可以是移植物。

[0152] 此外，由于示例性组合物可增加相关联的肽的功效，组合物的一些实施例能够延长肽在主体中显示活性的时间周期。这对于在给药困难的位置或仅可以给药有限次数的位置上的应用尤其有益。例如，血管移植物通常仅一次（即，在手术和 / 或移植期间）以活性剂进行处理，并因此期望与血管移植物一起给药的组合物能够延长相关联的肽展现生物活性的时间周期。

[0153] 使用方法

[0154] 本公开的主题进一步包括采用组合物治疗疾病的方法。本公开的方法包括对主体给予文本所描述的任一组合物（例如，包括聚合物和活性剂的组合物）的有效量。在一些实施例中，所治疗的是血管疾病（比如，内膜增生）。本领域普通技术人员所知晓的各种影响血管系统以及其他系统的其他疾病，也可用本文所述的包括活性剂的组合物进行治疗。在一些实施例中，主体通过活性剂治疗疾病，该活性剂是肽，该肽是细胞穿透肽或包含细胞穿透肽。因此，某些实施例提供通过给药活性剂来治疗特定疾病的方法，该方法可增加活性剂的有效性、有效作用时间等。

[0155] 术语“给药 (administering)”指的是将组合物和 / 或其药物组合物提供给主体。此方法是本领域技术人员已知的，包括但不排除，口服给药、经皮给药、吸入给药、经鼻给药、局部给药、阴道给药、眼部给药、耳内给药、脑内给药、直肠给药和肠胃外给药（包括注射（比如，静脉内）给药、动脉内给药、肌肉给药和皮下给药）。给药可通常包括通过将所要处理的组织（比如，静脉）浸没在包括组合物的溶液中的局部施用药物。给药还可实现如下 :提供包括组合物或其药物组合物的器件或材料，然后将该器件或材料植入主体或提供给主体来实现。给药可以是连续的或间歇的。一方面，制剂 (preparation) 可在治疗上给药 ;也就是说，被给予来治疗既有的疾病（例如，内膜增生等）。另一方面，制剂可预防性给药 ;即，被给药用于预防疾病。

[0156] 在一些实施例中，主体被给予有效量的组合物。就此而言，术语“有效量 (effective amount)”指的是足以实现预期结果或足以对非预期疾病起作用的量。例如，

“治疗有效量(therapeutically effective amount)”指的是足以达到预期治疗效果或足以对非预期疾病起作用,但通常不足以引起副作用的量。对于任何特定患者,特定的治疗有效剂量水平将取决于各种各样的因素,这些因素包括所治疗的疾病以及该疾病的严重程度;所采用的具体组合物;患者的年龄、体重、总体健康状况、性别和饮食;给药的时间;给药途径;所采用的具体组合物的排泄速率;治疗的持续时间;与所采用的具体组合物结合使用或重合使用的药物,以及医学领域中所熟知的类似因素。例如,在本领域的技术范围内,有必要以比达到期望的治疗效果的剂量要低的组合物的剂量开始,并逐步增加剂量,直至实现期望的效果。如果需要,有效日剂量可因给药目的被分成多剂量。因此,单剂量组合物可包括此量或其约数(submultiple)来构成日剂量。如果发生禁忌症,剂量可由医生个人进行调整。剂量可以改变,并且可在一天或数天中,每天以一种或多种剂量给药。对于给定类别的药物制品的适宜剂量,指导可以在文献中找到。在其他各方面中,剂型可以“预防有效量(prophylactically effective amount)”被给药;即,对于疾病或病症的预防有效的量。

[0157] 此外,术语“主体(subject)”或“有需要的主体(subject in need thereof)”指的是给药目标,该目标可选地显示有特别的疾病、病理状态、病症(disorder)等相关的症状。本文中所公开的方法的主体可以是脊椎动物(比如,哺乳动物)、鱼类、鸟类、爬行动物或两栖动物。因此,本文中所公开方法的主体可以是人、非人灵长类动物、马、猪、兔、狗、绵羊、山羊、牛、猫、豚鼠或啮齿动物。该术语并不指定特定年龄或性别。因此,无论雄性或雌性的成年和新生的主体以及胎儿都旨在被涵盖。患者(patient)指的是患有疾病或病症的主体。术语“主体”包括人类主体和兽类主体。

[0158] 术语“处理、治疗、疗法(treatment)”或“处理或治疗(treating)”指的是以治疗、改善、稳定或预防疾病、病理状态或病症为目的对主体的医学管理。该术语包括积极疗法(active treatment),即,明确针对疾病、病理状况或病症的改善的治疗,并且还包括病因治疗(causal treatment),即,针对与疾病、病理状态或病症相关联的起因的除去的治疗。此外,此术语包括姑息疗法(palliative treatment),即,被设计用于症状的减轻而不是为了疾病、病理状况或病症的治愈的治疗;预防性治疗(preventative treatment),即,针对使与疾病、病理症状或病症相关联的发展最小化或者部分或完全抑制的治疗;以及支持性治疗(supportive treatment),即,被用于对另外的针对与疾病、病理症状或病症相关联的发展的特异疗法进行补充的治疗。

示例

[0159] 本公开的主题进一步通过以下非限制性示例进行说明。示例可包括数据汇编,该数据汇编表示与本公开主题相关的在开发和实验期间的不同时期收集的数据。

[0160] 本公开的发明人已开发了通过胞内体可溶解的纳米复合物(NP)的制备,用于治疗肽的细胞质递送和滞留的一般化的方法。例如,该技术可被用于运输抗炎的细胞穿透肽(CPP)(比如,MAPKAP激酶2(MK2i)的抑制剂)来阻断血管旁路移植物中的内膜增生(IH)。

[0161] MK2i(比如,许多CPP)作用的效力和有效作用时间遭受胞内体途径之内的截留以及有限的生物利用度到达细胞质目标。然而,配制成MK2i-NP已被发现显著增强肽摄入、胞内体逸出、细胞内半衰期以及体外生物活性。实际上,MK2i-NP在离体的人隐静脉中阻断炎症信号和抑制IH,并且在兔静脉移植模型中显著减少活体内的IH。因此,本公开的NP技术

提供一种新的运输平台，该平台对肽治疗剂的细胞内运输具有潜在的更广泛使用，并且本文所提出的前景广阔的 MK2i-NP 数据激发对本方法的持续的临床转化，用于减少静脉移植失败。

[0162] 在此，一种新的肽运输系统已被开发，其初步的重点是治疗主要杀手——冠心病 (CHD, coronary heart disease)。自体隐静脉和胸廓内动脉的冠状动脉旁路移植术是多支血管 CHD 治疗的现有标准；然而，隐静脉移植物中的近一半由于内膜增生 (IH) 而在 18 个月之内失败。IH 的根本原因中的一个是由于在获取期间以及移植后的动脉化 / 对于流经心脏的更快和更多的脉动性血流的适应，移植物上受到机械应力和生物化学应力，p38 裂原激活的蛋白激酶路径的激活。激活的 p38 使 MAPKAP 激酶 II(MK2) 磷酸化，触发磷酸化 MK2 从细胞核向细胞溶质易位，其中磷酸化 MK2 传播诱导炎症响应、血管收缩的信号以及病理 VSMC 表型，当结合时，导致 IH，并最终导致移植物闭塞和失败。在血管再生步骤期间，自体血管通常在移植前 30 分钟被分离。因此，在移植期间的处理提供局部治疗的情形，以增强向目标组织的运输，同时限制脱靶效应、全身效应。然而，该短暂的处理窗受益于治疗方法，该治疗方法使摄入和作用时间最大化，以保证贯穿整个静脉移植物动脉化 / 适应阶段的治疗效果。

[0163] p38 抑制剂的临床试验因为与阻断该上游介质的多效性 (pleotropic effect) 有关的毒性而失败。这促使了寻求 MK2 作为抗炎靶，但小分子 MK2 抑制剂也由于缺乏特异性和水溶性而未能获得 FDA 的批准。然而，有效的细胞穿透肽 (CPP)MK2 抑制剂 (MK2i) 已经被开发出来，其在人类隐静脉中具有一些活性；遗憾的是，MK2i 效力受阻于较差的细胞摄取和晚期胞内体 / 早期溶酶体的封存，造成对位于细胞质的激活 MK2 的低效的细胞内的生物利用度。

[0164] 在此，一种简单的转译方法被公开，用于配制可胞内体溶解的、静电络合的复合物，该复合物有效地将 MK2i 运输至血管细胞和组织之中，在体外 (in vitro)、离体 (ex vivo) 和体内 (invivo) 以数量级增强肽的生物活性。MK2i-NP 对于临床转化来提升血管旁路移植物的性能具有强大潜力，并且 NP 方法表现出制药技术上的重大突破，已准备好广泛用作生物活性肽的递送载体。

[0165] 示例 1

[0166] 聚丙基丙烯酸 (PPAA) 均聚物 (Mn = 22,000, PDI = 1.47) 通过可逆加成断裂链转移 (RAFT) 聚合作用被合成。MK2i 肽 (序列 :YARAAARQARAKALARQLGVAA) 通过标准 FMOC 化学过程被合成，并且通过反相高效液相色谱法 (HPLC) 被纯化。MK2i 肽和 PPAA 聚合物在 10 : 1 至 1 :10 的电荷比 (CR, 由 $[NH_3^+]/[COO^-]$ 定义) 范围内进行混合，以形成复合物。

[0167] 该复合物的大小、多分散性和 zeta 电位通过动态光散射 (DLS) 进行测量。电荷比 1 :3 被选择作为最适配方用于进一步研究，所制成的复合物具有约 119±27nm 的流体动力学直径 (hydrodynamic diameter) 以及约 -11.9±3.2mV 的 zeta 电位 (ζ)。该复合物的 pH 依赖性肽释放和膜破坏性 (即，可胞内体溶解的) 性质使用 DLS 和红血细胞溶血试验进行了表征。体外 MK2 抑制通过 ELISA 进行评估，以量化白细胞介素 -6(IL-6) 的生产对 TNFα 刺激的人冠状动脉平滑肌细胞 (HCAVSMC) 的下游抑制。人隐静脉 (HSV) 外植体从准许的人类患者处获得，并且 1 毫米 (mm) 厚的静脉环段的血管舒张使用肌肉浴 / 力传感器进行离体检测。

[0168] 环段分别用 MK2i 复合物、MK2i、对照物处理 2 小时，随后用苯肾上腺素 (10^{-6} to 10^{-7}M) 进行收缩，然后用累积记录剂量 (log dose) 的硝普钠进行舒张，以确定舒张百分率。其他的静脉环段被培养 14 天、固定、埋置于石蜡中、切片、用 Verhoeff-van Gieson 染剂染色，并且被用于对内膜和中膜厚度进行定量，以对复合物处理消除移植物内膜增生的能力进行评估。

[0169] 来自动态光散射的结果是复合物 (CR = 1:3) 在 pH7.4 时大小是约 119nm，并且证明在 pH6.8 或低于 pH6.8 时分解成单个聚合物和肽单聚体，提供在胞内体中自复合物释放肽的有效机制。复合物在 pH7.4 或 pH6.8 时未表现出溶血性，但在 pH6.2 和 pH5.6 时表现出类似开关 (switch-like) 的强 (robust) 溶血性。这些数据表明，在复合物分解和肽释放之后，胞内体囊泡的进一步酸化触发 pH 依赖性的可胞内体溶解 (endosomolytic) 活性，并且使肽细胞溶质运输成为可能 (图 2)。

[0170] MK2i 复合物在体外的生物活性被证实。应当观察到，与 MK2i 相比，包括 MK2i 的复合物抑制了 HCAVSMC 中 TNFα 诱发的 IL-6 分泌 (图 3)。

[0171] 经过 MK2i 复合物处理过的 HSV 外植体中的平滑肌生理机能比仅 MK2i 处理的 HSV 外植体的表现出更多的舒张 (relaxation)。此外，某些复合物在 10 倍低剂量时与 MK2i 达到相同水平的舒张增强。例如，如图 4 中所示的，包括约 10μM 的 MK2i 的复合物和 100μM 的非复合物的 MK2i 表现出约 15% -20%的舒张增加。

[0172] 图 5 示出了与 MK2i 相比，MK2i 复合物表现出较强的防止内膜增生的能力、较少的内膜厚度。在 14 天的器官培养之后，在 10μM 时，用 MK2i 复合物处理的 HSV 切片具有 63.8±8nm 的内膜厚度，而用非复合物的 MK2i 处理的 HSV 切片具有 89.5±13.9nm 的内膜厚度 ($p = 0.05$)。在 14 天的器官培养之后，在 10μM 时，MK2i 复合物处理的 HSV 的内膜 / 中膜比是 0.459±0.058，而用 MK2i 处理的 HSV 切片具有 0.736±0.132 的内膜 / 中膜比 ($p = 0.03$)。

[0173] 示例 2:MK2i-NP 的合成和物理化学特性

[0174] MK2i 肽 (YARAAARQARAKALARQLGVAA) 通过固相合成法进行合成，并且其纯度通过电喷射电离质谱分析法进行验证 (图 6)。可逆加成断裂链转移 (RAFT) 聚合被用于合成聚丙烯酸 (PAA) [M_n = 10,830(GPC), M_n = 7,640(H^1NMR), PDI = 1.27(GPC) (图 7 和图 8)]，以及聚丙基丙烯酸 (PPAA) [M_n = 22,010(GPC), M_n = 21,950(H^1NMR), PDI = 1.47(GPC) (图 9 和图 10)]。纳米复合物 (NP) 通过在 pH8.0 时将 PAA 或 PPAA 均聚物与 MK2i 肽在 PBS 中简单混合形成，上述的 pH8.0 在 MK2i 肽上的伯胺的 pKa 值和 PPAA 聚合物中羧酸基团的 pKa 值之间。PAA 被用作载体对照 (vector control)，因为 PAA 是具有类似于 PPAA 的结构但在生理相关范围中由于其较低的 pKa(pKa ～ 4.3) 而缺乏 pH 响应性的阴离子聚合物。

[0175] 为确定理想的复合物配方情况，MK2i-NP 库在一系列的电荷比 [即，CR = ($[NH_3^+]_{MK2i}$:$[COO^-]_{PPAA}$)] 时被制备，并且大小分布和颗粒表面电荷分别通过动态光散射 (DLS) 和 ζ 电位分析进行表征。MK2i-NP 的 ζ 电位与 CR 成正比，在 CR ～ 2:1 时具有明显的等电点 (图 13)。该 CR 还显著影响 MK2i-NP 的大小，仅很窄范围内的 CR 产生单峰尺寸分布 (即，CR = 1:2 和 1:3, 见表 1)。

表 1 通过 DLS 分析确定的在不同电荷比 ($[NH_3^+]/[COO^-]$) 时制备的 MK2i-NP 尺寸的总

结。星号 (*) 指多峰尺寸分布 (呈现多个峰)。1:3(Alexa) 复合物以用 Alexa-488 偶联的 MK2i 肽按配方进行制备,用于细胞摄取研究。1:3(NE) 复合物作为载体对照,用非胞内体可溶解的 (NE) 聚丙烯酸聚合物按配方进行制备,聚丙烯酸聚合物在胞内体 pH 范围内未表现出 pH 依赖的膜破坏活性。

NH2 ： COOH	Z-ave直径 (nm)	PDI
10 ： 1	10.32±2.63*	0.314
2 ： 1	52.1±46.86*	0.297
1 ： 1	970.6±662.4	0.41
1 ： 1.5	465.1±138.4*	0.5465
1 ： 2	474.2±32.59	0.239
1 ： 3	118.8±26.76	0.271
1 ： 4	607.4±285.2*	0.662
1 ： 5	213.0±67.95*	0.407
1 ： 10	21.57±9.89*	0.355
1 ： 3(FAM)	158±56.67	0.308
1 ： 3(AA)	113.7±14.47	0.577
1 ： 3(AA-FAM)	236.5±69.74	0.522

[0176] 在该示例中,1 ： 3 的 CR 被选择,因为该比率始终生成具有最小颗粒大小和多分散性 (d_h = 119±28nm, ζ = -11.9±3.2mV) 的单峰尺寸分布。非胞内体可溶解的 MK2i 纳米复合物 (NE-MK2i-NP) 作为载体对照用 PAA 按配方制备用于生物学研究。在 CR = 1 ： 3 时用 PAA 制备的 NE-MK2i-NP 具有在统计学上与可胞内体溶解的 MK2i-NP 等同的大小和 ζ 电位 (d_h = 114±38nm, ζ = -16.4±5.1mV)。为了使无标记的 NP 能够进行细胞内追踪和生产类似大小和电荷,荧光的 MK2i-NP 和 NE-MK2i-NP 在 CR1 ： 3 时用 Alexa®-488 偶联的 MK2i 肽进行制备。在 CR = 1 ： 3 时制备的 NP 进一步通过 TEM 成像进行表征 (图 14、图 15、图 16),其与 DLS 结果一致。

[0177] 在一系列 pH 时,在内溶酶体条件下的 MK2i-NP 解包 (unpackaging) 使用 DLS 进行评估,并且随着 pH 从细胞外 pH 逐渐降低至 PPAA 上的羧酸 pKa(pH ～ 6.7), MK2i-NP 分离,这还与早期胞内体条件有关 (图 17)。不受理论限制,在较低 pH 时, PPAA 聚合物被质子化 / 去离子化,并且肽上的净正电荷导致 MK2i-NP 的静电排斥和分解。在与早期胞内体相似条件下的 NP 分解减少了肽生物活性和 / 或 PPAA 胞内体膜破坏功能被聚合物 - 肽的相互作用立体位阻的可能。

[0178] 示例 3:MK2i-NP 细胞内在化、胞内体逸出以及细胞内滞留

[0179] 随着时间变化的 MK2i-NP 摄取和细胞内滞留的量通过 HCAVSMC(体外人冠状动脉血管平滑肌细胞)的流式细胞术进行评估,该 HCAVSMC 经过 2 小时处理、洗涤并在新鲜培养基中维持 5 天。与 NE-MK2i-NP 和 MK2i 相比,超过一个数量级的肽摄取增加在 MK2i-NP 处理过的细胞中被测量到(图 18)。由于 NE-MK2i-NP 摄取等同于游离肽,故这些数据表明细胞内在化方面的差异是由于 NP 组合物,并且不依赖于颗粒形态和电荷。此外,以 MK2i-NP 处理的 HCAVSMC 展示更稳定的肽的细胞滞留,而 NE-MK2i-NP 和 MK2i 处理的细胞更快地失去细胞内肽,很可能是由于肽在内溶酶体途径中的降解或由于胞吐作用转运至细胞外(图 19)。在处理/洗涤后经过首个 72 小时培养,MK2i-NP 表现出荧光强度增加。该结果不是因为与细胞的外膜结合的 MK2i-NP 延迟的内在化。假定该增加是因为 Alexa®-488 自猝灭(self-quenching),该机理在从 NP 到 MK2i 的逐步细胞内解包期间变少。

[0180] 红血细胞溶血试验被用于对 MK2i-NP 的 pH 依赖的膜破坏活性进行评估,该膜破坏活性是胞内体逸出功能的指标。PPAA 在其 pKa 或低于其 pKa 的 pH(～6.7)时破坏红细胞膜(图 20)。在细胞外 pH(7.4)和早期胞内体 pH(6.8)时,MK2i-NP 显示极小的膜破坏活性。然而,在代表晚期胞内体的 pH(6.2)和溶酶体的 pH(5.6)时,观察到溶血的显著增加。MK2i-NP 在晚期胞内体 pH/溶酶体 pH 时的溶血行为与聚合物浓度成正比(图 21),在 40 μg/mL MK2i-NP、pH5.6 时,>90％红细胞发生溶解。虽然配制成 NP 掩饰了在 pH6.8 时与游离 PPAA 有关的膜破坏活性,但 MK2i-NP 保持了 PPAA 聚合物固有的膜破坏活性。仅 MK2i 肽或非胞内体可溶解的 NE-MK2i-NP 配方在内溶酶体 pH 范围内都不显示膜破坏活性。

[0181] 对 MK2i-NP 的胞内体逸出在体外人冠状动脉血管平滑肌细胞(HCAVSMC)中进行成像和定量(图 22)。几乎所有(～90％)的 MK2i 作为游离肽进行运输,或通过 NE-MK2i-NP 与 LysoTracker®染料的共定位进行运输。然而,MK2i-NP 配方显著减少了 MK2i 的内溶酶体共定位。在 2 小时处理和洗涤后,MK2i/LysoTracker®共定位的纵向定量揭示了对于 MK2i-NP 配方,在所有时间点 MK2i/LysoTracker®共定位显著减少,以及通过具有 LysoTracker®的 NP 配方运输的 MK2i 共定位随着时间减少(图 23)。隔室大小的定量揭示了 NE-MK2i-NP 或 MK2i 处理的细胞显示在表示胞内体的较小囊泡之内的 MK2i 共定位,而通过 MK2i-NP 运输的 MK2i 被发现在较大的隔室之内,这些较大的隔室可表示渗漏的、肿胀的胞内体、微胞饮体或细胞溶质区(图 24)。

[0182] 示例 4:人隐静脉中内膜增生的抑制

[0183] 在静脉 IH 的离体器官培养模式中,人隐静脉(HSV)环段被处理 2 小时,并且随后被保持在高血清环境中来加速新生内膜形成。Alexa®-568 偶联的 MK2i 肽被用于评估 MK2i 向血管壁的运输,并且与体外结果类似的,MK2i-NP 始终相对于游离 MK2i 显示较强的摄取(图 25)。在培养 14 天后,在组织切片上进行了弹性膜的 Verhoeff-Van Gieson(VVG)染色(图 26)。来自多个供体的内膜厚度的量化揭示了 MK2i-NP 以剂量依赖的方式显著抑制 IH,并且在比游离 MK2i 低一个数量级的肽剂量时显著抑制 IH(图 27,完整数据集参见图 28)。100 μM MK2i 时的 MK2i-NP 治疗是完全消除 IH 的唯一疗法,所产生的内膜厚度在统计学上等于在获取后立即用于组织学检查的对照(control)组织($p = 0.49$)。MTT 试验在处理后 1 天和 14 天时进行,并且证实器官培养结果并未受到组织细胞毒性的影响(图 29)。

[0184] 示例 5:MK2i-NP 生物活性的机理阐释

[0185] MK2 的炎症作用通过下游效应子 (effector) 起作用，也即转录后基因调节子 (regulator)tristetraprolin(TTP) 以及异质性细胞核核糖蛋白 A0(hnRNP A0)，其稳定和提高炎性细胞因子 mRAN 的表达。为确认 MK2i-NP 通过阻断该机制起作用，对 HnRNP A0 的磷酸化进行评估。西方墨点法 (Western blots) 确认了 MK2i-NP 显著抑制了 HSV 中的 HnRNP A0 磷酸化 (图 30、图 31)。血管紧张素 -II 刺激的 HCAVSMC 中的细胞因子产生的体外 ELSA 分析确认了该机制，并且 MK2i-NP 有效地抑制了主要的 hnRNP A0 靶点 TNFα 的分泌 (图 32、图 33)。MK2i-NP 在低一个数量级剂量时取得等于 NE-MK2i-NP 和 MK2i 的 TNFα 抑制作用 (即，10μM MK2i 产生等于 100μM MK2i 的效果)，并且，100μM 的 MK2i-NP 完全消除了血管紧张素 -II 刺激的 TNFα 产生。与仅游离肽相比，MK2i-NP 在 TNFα 刺激的 HCAVSMC 中对白介素 -9 产生的抑制也表现出显著增加的生物活性 (图 34)。全部处理都未导致显著的毒性 (图 35、图 36)。

[0186] MK2i 活性还通过下游的 Lim 激酶 (LIM-K) 和热休克蛋白 27(HSP-27) 触发应力纤维形成和细胞迁移。应力纤维形成在血管紧张素 -II 刺激的 HCAVSMC 中被 MK2i-NP 显著抑制，证明与 NE-MK2i-NP 和 MK2i 相比，具有显著增强的生物活性 (图 37)。MK2i-NP 处理过的细胞表现出类似于未受激的对照细胞的皮层肌动蛋白染色，而 NE-MK2i-NP 和 MK2i 处理并未完全阻断应力纤维形成 (图 38)。为证实 MK2i-NP 阻止病理性 VSMC 的 IH 的迁移特性，划痕创伤 (scratch wound) 和博伊登室迁移试验 (Boyden chamber migration assays) 都在有 PDGF-BB 存在的 HCAVSMC 上进行 (图 39、图 40、图 41)。在这两个试验中，与游离 MK2i 肽相比，MK2i-NP 在低一个数量级的剂量时抑制细胞迁移。增殖试验 (proliferation assay) 确认了这些结果不是由于细胞增殖的处理效应 (treatment effects) 引起 (图 42)。

[0187] 示例 6：兔静脉移植物间置 (interposition) 模型中的体内生物活性

[0188] 体内 MK2i-NP 的治疗效果在兔双侧颈静脉移植物间置移植模型中进行评估，该模型采用聚合袖套法 (polymeric cuff method) 来诱导湍流血流和加速移植物 IH。在此模型中，颈静脉移植物进行 30 分钟离体处理，该时间为通常的血管再生过程中对该移植物进行移植的最小时间。对于每只兔，一个移植物被处理，并且对侧的移植物接受载体对照。移植物在手术后 28 天截取，并且 VVG 染色的组织切片被用于对内膜厚度进行量化 (图 43)。与未作处理的对照和游离 MK2i 肽相比，30μM MK2i-NP 的处理显著抑制了新生内膜生长 (图 44)，游离 MK2i 肽并未独自对内膜增生产生任何显著改变。

[0189] 为确认 MK2i-NP 在移植静脉移植物中的抗炎效果，用兔巨噬细胞特异性抗体 RAM-11 对组织切片进行染色 (图 45、图 46)。MK2 激活了对炎症性细胞因子 (比如，TNFα) 的生产进行上调的转录后基因调节子 hnRNP A0，并且 TNFα 的产生诱导单核细胞化学引诱物蛋白 -1(MCP-1) 在静脉移植物中的平滑肌细胞、内皮细胞、纤维母细胞和白血球中的表达。MCP-1 用于对炎症细胞循环的有效化学引诱物，并且 MCP-1 的 mRNA 水平已被证明甚至在静脉移植物移植 8 周时被提升，导致单核细胞和组织巨噬细胞聚集到静脉壁，并导致 IH 的发病 (pathogenesis)。为此目的，抑制后 4 周进行的巨噬细胞分析展示了 MK2i-NP 处理过的移植物中的内膜增生的持续显著减少，表现出通过 MCP-1 的 TNFα 诱导的巨噬细胞聚集的治疗性抑制 (图 47)。

[0190] 探讨

[0191] MK2i 肽的细胞摄取和生物活性以数量级进行增强，而未改变治疗肽的天然结构，

规避了对靶结合和生物活性的潜在有害效应。这些结果还突出了在 VSMC 向导致 IH 和移植物失败的激活表型、病态表型的转化过程中，p38MAPK/MK2 途径所起的作用。

[0192] 此外，CPP 能够被偶联至治疗肽以增加细胞摄取，然而，CPP 同一性已显示对靶专一性的显著影响，并且大部分 CPP 不能够从内溶酶体转运途径逸出。与使用带正电荷的 CPP 序列或聚合转染剂 (transfection agent) 来运输核酸的范例相反的，发现将带正电荷的、基于 CPP 的 MK2i 肽配制成带净负电荷的复合物配方显著增强了 VSMC 中的摄取。

[0193] VSMC 表达多种摄取带负电荷的颗粒 (例如，LDL) 的清道夫受体 (scavenger receptor)，并且血管应力上调这些受体的表达。体外结果表明通过 MK2i-NP 获得的高水平的 MK2i 的细胞内在化和从内溶酶体转运途径中逸出取决于 PPAA 的特定组合物，而不仅仅由复合物形态和电荷决定。从观察中可以推断，与 MK2i-NP 具有类似的大小和电荷的 NE-MK2i-NP 并未发现增加 MK2i 肽的细胞摄取。

[0194] 虽然不希望受理论的限制，MK2i-NP 的加速细胞内化可能是因为细胞表面的相互作用的变化和 / 或摄取机制的变化。虽然不希望受理论的限制，建议 MK2i-NP 通过多重内吞饮 (endocytotic) 路线进入平滑肌细胞，并且大胞饮 (macropinocytosis) 可在 MK2i-NP 内在化中是有效的，但对于 NE-MK2i-NP 或 MK2i 不是。本文建议基于 PPAA 的复合物可以生物模拟 (biomimic) 被报道过的腺病毒内在化机制，触发大胞饮和胞内体渗漏的组合，导致提高的细胞溶质进入。

[0195] 大胞饮被转运至酸化隔室，并且可比其他胞内体囊泡更加渗漏。与 PPAA 的 pH 依赖性的膜破坏活性结合的内在化路线可导致在通过 MK2i-NP 运输时，MK2i 的细胞内半衰期显著增加。

[0196] MK2i 的细胞内半衰期 ($T_{1/2}$) 通过被包括在 MK2i-NP 之中被增加 14 倍 (MK2i-NP $T_{1/2}$ = 57.8 天，对比 MK2i $T_{1/2}$ = 4.1 天；基于处理后 0 和 5 天的细胞内肽荧光度进行计算)。$T_{1/2}$ 的增加适用于静脉移植应用等，因为其可能使在移植的时候单一治疗的应用成为可能，将具有贯穿急性炎症和痊愈阶段两者的整个持续时间的持续治疗效果。

[0197] 由于 MK2i-NP 产生了预计的约 8 周的细胞内半衰期，在移植之前的单一处理可足以抑制静脉移植物适应期间的 IH，产生显著提升的长期性能。移植物的离体、手术中处理是有用的治疗策略，以增强向靶组织的运输和避免潜在的脱靶效应或全身毒性。

[0198] 本公开的主题证实了使用 PPAA 的复合物配方增强了 MK2i 肽的细胞内运输和生物活性，以及该系统作为血管移植物抑制期间抑制 IH 的预防治疗具有显著的临床潜力。

[0199] 材料和方法

[0200] 细胞渗透剂 MK2 抑制肽的合成

[0201] 具有序列 YARAAARQARA-KALARQLGVAA 的 MK2 抑制肽 (MK2i) 利用标准 FMOC 化学在 PS3 肽合成器 (蛋白质技术公司，图森，亚利桑那州 (Protein Technologies, Inc. Tucson, AZ)) 上被合成。N- 甲基吡咯烷酮 (NMP, 飞世尔科技 (Fischer Scientific)) 被用作肽合成中的溶剂。在存在 N- 甲基吡咯烷酮时，HCTU 被用作催化剂 (Chempep, 威灵顿，佛罗里达州 (Wellington, FL))。为了使产量和纯度最大化，所有的氨基酸都被双耦合。肽在 TFA/ 苯酚 /H_2O/ 三异丙基硅烷 (88/5/5/2) 中进行裂解 / 脱保护。然后，肽进一步在 Waters 1525 二元 HPLC 泵上通过反相 HPLC 进行纯化，该 HPLC 泵配备有扩充的流式试剂盒、Waters 2489UV/ 可见光检测器以及 phenomenex Luna C18(2) AXIA 填充柱 (100A, 250x 21.2mm, 5 微

米)。含0.05%甲酸的HPLC级水和HPLC级乙腈用作流动相,并且将肽利用90% A至90% B梯度在25分钟内(16mL/min)进行纯化。乙腈用旋转蒸发器从纯化组分中除去,然后该纯化的组分进行冷冻干燥。肽纯度在Waters SYNAPT ESI-MS上通过电喷雾电离质谱分析法(ESI-MS)进行验证。

[0202] 单体和聚合物合成

[0203] 所有试剂均购自Sigma,并且均是分析纯,除非另有说明。2-丙基丙烯酸根据由Ferrito等人所概述的过程,用丙基丙二酸二乙酯(Alfa Aesar)作为前体进行合成。4-氰基-4-(乙硫基硫代羰基)硫代戊酸(ECT)链转移剂(CTA)如先前所描述的进行合成。PPAA均聚物的RAFT聚合是在本体(in bulk)中,使用2,2'-偶氮-双-异丁腈(AIBN)作为自由基引发剂,在70℃氮气气氛下持续48小时进行。

[0204] 反应混合物通过三步冷冻-真空-解冻循环完成,并且在聚合之前以氮气净化30分钟。CTA与AIBN的摩尔比是1:1,并且单体与CTA比被设置,从而25000克/摩尔(g/mol)的分子量在100%转化时被实现。在聚合作用后,将所得聚合物溶解在DMF中,并在真空中干燥过夜之前在乙醚中沉淀5次。PAA均聚物的RAFT聚合是在蒸馏二氧六环中,使用AIBN作为自由基引发剂,在70℃氮气气氛下持续18小时进行。将反应混合物在聚合作用之前用氮气净化30分钟。CTA与AIBN的摩尔比是5:1,并且单体与CTA比被设置,从而8000g/mol的分子量在100%转化时被实现。在聚合作用后,将所得聚合物溶解在二氧六环中,并在真空中干燥过夜之前在乙醚中沉淀5次。凝胶渗透色谱法(GPC,安捷伦(Agilent))使用60℃的含0.1% LiBr的HPLC级DMF作为流动相,用于测定PPAA均聚物和PAA均聚物的分子量和多分散性(M_w/M_n,PDI)。分子量计算使用ASTRA V软件(怀雅特技术(Wyatt Technology))以及基于实验上确定的dn/dc值完成,该dn/dc值通过聚合物通过折光率检测器的脱机注入被确定(所计算出的PPAAdn/dc = 0.087毫升/克(mL/g),所计算出的PAA dn/dc = 0.09mL/g)。

[0205] MK2i纳米复合物(MK2i-NP)合成和特性

[0206] PPAA溶解在1M NaOH并且稀释至磷酸盐缓冲液(pH8)之中,得到储备溶液。纯化的MK2i肽溶解于磷酸盐缓冲液(pH8)中。MK2i肽和PPAA聚合物在$[NH_3^+]$:[COO$^-$] = 10:1至1:10的CR范围进行混合,以形成MK2i-NP。所得的复合物通过0.45μm的PTFE过滤器进行注射器式过滤,并且流体动力学直径和ζ电位在具有可重复使用的浸细胞试剂盒的Malvern Zetasizer Nano-ZS上进行表征(马尔文仪器有限公司,伍斯特郡,英国(Malvern Instruments Ltd.,Worcestershire,U.K.))。

[0207] 然后,1:3的CR被选择,并且被用于随后的体外、离体和体内研究。以相同的CR配制的具非胞内体可溶解的聚合物PAA的纳米复合物(即,NE-MK2i-NP)通过DLS进行分析,并用作载体对照。为了验证通过DLS分析所表明的大小,电荷比1:3的MK2i-NP和NE-MK2i-NP通过透射电子显微镜(TEM)成像进行可视化。TEM样本通过将碳支持膜铜网(carbon film-backed copper grid)(特德佩拉(TedPella))倒置在20μL的水性复合物悬液(1mg/mL)液滴之上进行制备,并被吸干。然后,所有的样本倒置在20μL的3%铀酰醋酸液滴之上并染色2分钟。在将样本吸干后,样品在200kV时运行的Philips CM20系统上成像之前,在真空中干燥处理2小时。图像使用具有AMT图像捕捉引擎软件(先进的显微技术,丹弗斯,马萨诸塞州(Advanced Microscopy Techniques,Danvers,MA))的CCD摄像

头进行采集。然后，CR 为 1:3 的复合物的 pH 依赖性的大小变化在 PBS-/- 中，在各种 pH 时（即，pH7.4、6.8、6.2 和 5.6）通过 DLS 分析进行定量。

[0208] pH 依赖的膜破坏溶血试验

[0209] 为了评估 MK2i-NP 的胞内体破坏潜力，红血细胞的溶血试验被用于测量脂质双层的 MK2i-NP pH 依赖性破坏。全部的人血从匿名捐赠者得到，并且血浆通过离心和盐水洗涤被去除。剩余的红血球用 150mM NaCl 洗涤三次，并且在相当于生理（pH7.4）环境、早期胞内体（pH6.8）环境、早期 / 晚期胞内体（pH6.2）环境和晚期胞内体 / 溶酶体（pH5.8）环境的磷酸盐缓冲液之中进行再悬浮。MK2i-NP、NE-MK2i-NP、仅 MK2i 肽（1-40 μg/mL）、PBS（阴性对照）或 1％的 Triton X-100（阳性对照）被加入到红血球悬浮液并在 37℃下培养 1 小时。完整的红细胞通过离心沉淀成小球，并且上清液转移到新的 96 孔板中。然后，上清液之中的血红蛋白含量通过 541nm 处的吸收度进行测量。百分比溶血相对于 Triton X-100 和 PBS 对照被确定。

[0210] 细胞培养

[0211] 主要的 HCAVSMC 从 Lonza 获得；HCAVSMC 在补充有 5％ FBS、人碱性纤维原细胞生长因子（bFGF,5ng/mL）、人胰岛素（5 μg/mL）、抗坏血酸（50 μg/mL）、L- 谷氨酰胺（10mM）、人表皮生长因子（EGF,5ng/mL）和 1％青霉素 - 链霉素的完全生长介质血管细胞基础培养基（ATCC）中进行培养。

[0212] 所有培养物在 37℃和 5％ CO_2环境下，保存在 75cm^2的聚苯乙烯组织培养瓶中，且细胞培养基隔天更换。在收获并传代之前，细胞生长至 80-90％细胞覆盖（confluence）。所有细胞根据每个特定实验的需要，以 20000-30000 个细胞 /cm^2的密度进行接种。仅来自早期传代（第 3-8 代）的细胞被用于实验。

[0213] 炎性细胞因子分析

[0214] 200 μL 的细胞悬液（10000 个细胞 / 孔）被接种在 96 孔板上，以产生每孔约 70％的覆盖。使细胞粘附到板过夜。

[0215] 肿瘤坏死因子 -α 的 ELISA

[0216] 细胞在低血清培养基（DMEM,1％ FBS 及 1％ P/S，以实现细胞静止）中以 10 μM 的 ANG- Ⅱ处理 4 小时，并且接着用 MK2i-NP、MK2i 或 NE-MK2i-NP 处理 2 小时。在处理后，每个孔吸入和补充新鲜培养基。24 小时后，100 μL 的上清液被收集并且在 -80℃进行冷冻，直至进行细胞因子分析。人 TNF-α（目录号：900-K25）的 ELISA 开发工具包（派普泰克公司制；洛基山，新泽西州（Peprotech；Rocky Hill,NJ））被用来根据制造商的方案测定从处理过的细胞中收集的上清液中的细胞因子水平。然后，所有数据按照细胞活力进行归一化，该细胞活力根据制造商的方案通过 CytoTox-ONE 均匀膜完整性测定法（Promega 公司）测定。

[0217] 白介素 -6 的 ELISA

[0218] 细胞在低血清培养基中以 20ng/mL 的 TNF-α 处理 4 小时，并且接着用 MK2i-NP、MK2i 或 NE-MK2i-NP 处理 2 小时。在处理后，每个孔吸入和补充新鲜培养基。24 小时后，100 μL 的上清液被收集并且在 -80℃进行冷冻，直至进行细胞因子分析。人 TNF-α（目录号：900-K16）的 ELISA 开发工具包（派普泰克公司制；洛基山，新泽西州）被用来根据制造商的方案测定从处理过的细胞中收集的上清液中的细胞因子水平。然后，所有数据按照细胞活力进行归一化，该细胞活力根据制造商的方案通过 CytoTox-ONE 均匀膜完整性测定法

(Promega 公司)测定。

[0219] F 肌动蛋白应力纤维试验

[0220] HCAVSMC 以 15000 个细胞 / 孔被接种在 Lab-Tek II 8 孔腔室盖玻片(赛默科技培养皿 (Thermo Scientific Nunc)) 中,并使其附着过夜。然后,细胞在治疗在低血清培养基中以 10μM、25μM 和 50μM 浓度的与 MK2i-NP、NE-MK2i-NP 或单独 MK2i 肽处理 1 小时。处理后,细胞以 PBS-/- 洗涤 2 次,并且随后用 1μM 的血管紧张素 II (西格玛奥瑞奇集团 (Sigma Aldrich)) 或 PBS-/-(阴性对照)处理 2 小时。在 ANG- II 刺激之后,细胞以 PBS 洗涤 2 次,在 4% 多聚甲醛中固定 5 分钟,用 0.4% 的 Triton-X100 进行 10 分钟通透化,并且用在 PBS-/- 中以 1% BSA 阻断 15 分钟。然后,细胞用 Hoechst 溶液 (1/5000 稀释于 PBS-/-) 染色 10 分钟,接着用 Alexa-488-Phallodin 染色 30 分钟。然后,染色盖玻片倒置在具有 ProLong Gold 抗淬灭封固剂 (Invitrogen) 的玻璃载玻片之上。载玻片在密封和成像之前被干燥 24 小时。处理过的细胞使用具有 NIS Elements 成像软件的 Nikon Eclipse Ti 倒置荧光显微镜(尼康仪器公司,梅尔维尔,纽约州 (Nikon Instruments Inc, Melville, NY)) 进行成像。增益设置和曝光时间的对所有拍摄的照片保持恒定。应力纤维形成使用 ImageJ 软件进行定量以自由手选单个细胞和并计算出来自每个治疗组的 2 个独立实验的 $n \geq 5$ 个细胞的相对荧光强度。

[0221] 趋药性迁移试验划痕创伤试验

[0222] HCAVSMC 在 250μl 低血清生长培养基中以 20000 个细胞 / 孔的密度被接种在 Lab-TEK II 8 孔腔室盖玻片中,并且使其附着过夜以达到几乎单层覆盖 (90-95%)。细胞以 MK2i-NP、NE-MK2i-NP、MK2i 肽或 PBS-/- 处理 30 分钟。处理后,划痕创伤用 10uL 移液枪头穿过每个细胞单层的中间制成。然后,培养基用含 CellTracker™ Green BODIPY® 染料 (Invitrogen) 的低血清生长培养基替换,根据制造商的方案染色三十分钟,以使细胞质染色用于使迁移细胞可视化。用染料处理后,培养基用含 50ng/ml 的 PDGF-BB 的低血清生长培养基进行替换(或用 PBS-/- 替换作为阴性对照)。然后,划痕创伤区域在 0 小时、3 小时、6 小时、12 小时和 24 小时使用具有 NIS Elements 成像软件的 Nikon Eclipse Ti 倒置荧光显微镜(尼康仪器有限公司,梅尔维尔,纽约)成像。创伤闭合通过用 ImageJ 软件对迁移细胞周围的划痕创伤面积量化进行计算,并按照最初的划痕创伤面积进行归一化。划痕创伤试验对每个治疗组在 3 个独立的实验进行。

[0223] 趋药性迁移试验博伊登室试验

[0224] HCAVSMC 被以 30000 细胞 / 孔的密度接种在 24 孔板的低血清培养基中,并使其附着过夜。细胞以 MK2i-NP、NE-MK2i-NP、MK2i 肽或 PBS-/- 处理 30 分钟。处理后,每个孔以 PBS-/- 洗涤 2 次,以胰蛋白酶消化 (trypsinized),再悬浮在 100μl 低血清生长培养基中,并且镀到 24 孔板中的 6.5mm、8μm 孔的聚碳酸酯插入物 (Corning) 中,该 24 孔板具有在下部腔室含 50ng/ml 的 PDGF-BB(或 PBS-/-,用于阴性对照)的 600μl 低血清生长培养基。细胞任其迁移 8 小时,然后每个插入物上侧上的细胞用棉签轻轻除去。然后将每个插入物的下侧上的细胞固定,并且使用改性吉姆萨差分快速染色试剂盒(自 Polysciences) 进行染色。简言之,将插入物固定在溶液 A 为至少 10 秒,在溶液 B 中浸泡 5 倍,然后在溶液 C 中浸泡 5 倍。4 张图像取自每个插入物的四个象限,并且细胞数 / 高倍视野通过对每个图像进行阈值转换和手动细胞计数在 ImageJ 中进行定量。每个处理以三份法完成,出来平均细胞

数 /HPF 被计算处。

[0225] 细胞增殖试验

[0226] HCAVSMC 被以 10000 细胞 / 孔的密度接种在 96 孔板中的低血清培养基中，并使其附着过夜。细胞以 MK2i-NP、NE-MK2i-NP、MK2i 肽或 PBS-/- 处理 30 分钟。每个处理组然后吸入并且替换以 100μl 低血清生长培养基 ±50ng/mL 的 PDGF-BB。在培养 24 小时后，CellTiter 96®水性非放射性细胞增殖试验 (Promega) 按照生产商的方案被执行。简言之，100μl 的吩嗪硫酸甲酯 (PMS) 溶液被加入至 2.0ml 的 MTS 溶液中并且进行混合。20μl 的 PMS/MTS 溶液随后加入到包括 100μl 培养基的 96 孔板中的每个孔中，并且该孔板在湿润的 5% CO_2 气氛中以 37℃下培养 4 小时。紧接着培养之后，每个孔的吸光度在 490nm 用 TECAN Infinite M1000Pro 读板仪 (plate reader) 进行记录，以确定处理组之间的相对增殖率。

[0227] 细胞摄取和细胞内转运的显微分析

[0228] 胺反应性的 Alexa-488 琥珀酰亚胺基酯溶于 DMSO 中，并以 1 至 3 的摩尔比与 MK2i 肽混合在 100mM 碳酸氢钠缓冲液中 (pH = 8.3)。未反应的荧光团和有机溶剂使用 PD-10miditrap G-10 脱盐柱进行去除，并且荧光标记的肽被冻干。PPAA 聚合物和 PAA 聚合物以 [NH_3^+]/[COO] = 1:3 的 CR 分别与荧光标记的 MK2i 肽混合，并且通过 0.45μm 的 PTFE 过滤器进行注射器过滤，以形成荧光的 MK2i-NP 和对照 NE-MK2i-NP。荧光的 MK2i-NP 和 NE-MK2i-NP 的流体动力学直径和表面电荷分别通过 DLS 和 Zeta 电位分析进行测量。荧光 MK2i-NP、NE-MK2i-NP 或仅 MK2i 肽以在补充有 1% FBS 和 1% P/S 的 DMEM 培养基中 10μMMK2i 肽的浓度被施用于在Lab-Tek II的8孔腔室盖玻片 (Thermo Scientific Nunc) 上生长的 HCAVSMC。细胞被处理 2 小时，以 PBS-/- 洗涤 2 次，并且培养基被替换。细胞然后在新鲜培养基中另外培养 0 小时、2 小时、4 小时、10 小时或 22 小时。为最后 2 小时的培养，50nM LysoTracker® Red DND-99(Invitrogen) 被加入到每个孔中，以使细胞内酸性胞内体 / 溶酶体囊泡可视化。在培养之后，细胞以 0.1% 台盼蓝 (trypan blue) 洗涤 1 分钟，紧接着以 PBS-/- 另外洗涤 2 次，以淬灭细胞外荧光。然后，细胞使用具有 ZEN 成像软件的 LSM710META 荧光显微镜 (卡尔蔡司索恩伍德，纽约 ((Carl Zeiss Thornwood,NY))) 进行成像。对于每一个治疗组中获得的所有图像，增益设置保持不变。

[0229] 所有的图像使用 ImageJ 软件进行处理，并且共定位使用 Just Another Colocalization Plugin(JACoP) 进行分析。然后，每个治疗组的 n ≥ 3 独立的图像计算曼德重叠系数 (Mander's overlap coefficient)(在两个荧光通道中具有正象素值的象素的级分)，以对共定位进行定量。为了确定对肽所被发现处的隔室大小的处理效应，ImageJ 中的自由手选择工具被用来对于每个处理组勾勒≥ 50 个个体的细胞内隔室，并且每个隔室的面积进行量化和平均。

[0230] 细胞内摄取和滞留的流式细胞术定量

[0231] HCAVSMC 生长至 80-90% 覆盖，进行收取，在 24 孔板中以 20000 细胞 / 孔进行接种，并且任其在低血清培养基中附着过夜。荧光 MK2i 肽、MK2i-NP 和 NE-MK2i-NP 如上所述进行合成用于显微分析，并且 HCAVSMC 以 10μM MK2i 的浓度处理 2 小时。在处理之后，细胞以 PBS-/- 洗涤，在室温下以 CellScrub 缓冲液 (Genlantis) 洗涤 10 分钟以除去细胞外的复合物和 / 或肽，以 PBS-/- 洗涤 2 次，并且培养基被更换为完全生长培养基。细胞然后另外培养 0 小时、12 小时、24 小时、72 小时或 120 小时。细胞然后以 PBS-/- 洗涤，以胰蛋白

酶消化，并且再悬浮在 PBS-/- 中的 0.1％台盼蓝中，用于在具有 BD CellQuest™ Pro 软件 (V5.2) 的 FACSCalibur 流式细胞计数器 (Becton Dickinson) 进行分析。数据被输出并且用 FlowJo 软件 (V 7.6.4) 进行分析。所有样本以三份法进行。

[0232] 人隐静脉

[0233] HSV 的去识别 (de-identified) 废弃段经接受冠状动脉或周围血管旁路移植手术患者的同意进行收集。在手术切除之后，HSV 段被储存在盐溶液中直到在手术过程结束，此时 HSV 段被放置在冷移植截取缓冲液 (100mM 钾乳糖酸盐、25mM KH_2PO_4、5mM $MgSO_4$、30mM 棉子糖、5mM 腺苷、3mM 谷胱甘肽、1mM 的别嘌呤醇、50g/L 羟乙基淀粉，pH 7.4) 中。所有 HSV 段在截取 24 小时内使用。HSV 段在无菌培养罩中利用无菌技术被转移到 60mm 皮氏培养皿 (Petri dish)。每个段的末端 (0.5mm) 用刀片除去，并且过量外膜和脂肪组织以最小操纵除去。HSV 段被切割成具有约 1.0mm 宽度的连续环，被用于器官培养或肌肉浴实验。来自每个段的两个环立即在 37℃下在 10％福尔马林中固定 30 分钟，以获得培养前内膜厚度测量值。

[0234] 离体 IH 的 HSV 器官培养和试验

[0235] 在测试静脉段功能性活力的准备中，HSV 环被称重，并且对其长度进行记录。然后，HSV 环被悬浮在包括碳酸氢盐缓冲液 (120mM NaCl、4.7mM KCl、1.0mM $MgSO_4$、1.0mM NaH_2PO_4、10mM 葡萄糖、1.5mM $CaCl_2$和 25mM Na_2HCO_3，pH 7.4) 中的肌肉浴，在 37℃下以 95％ O2 和 5％ CO2 进行平衡。该环被拉伸，并且长度逐步进行调整直到获得最大的张力。归一化反应性通过确定每个血管段的被动的长度－张力关系被获得。环保持处于 1g 的静止张力，该张力对收缩激动剂产生最大响应，并且该环在缓冲液中平衡 2 小时。力测量值使用与 Powerlab 数据采集系统和 Chart 软件 (公元仪器，科罗拉多斯普林斯，科罗拉多州 (AD Instruments,Colorado Springs,CO)) 相连接的 Radnoti 玻璃科技 (蒙罗维亚，加利福尼亚州 (RadnotiGlass Technology,Monrovia,CA)) 的力传感器 (159901A) 获得。

[0236] HSV 环首先用 110mM KCl (在碳酸氢盐缓冲液用 NaCl 进行等摩尔更换) 进行收缩，并且对所产生的力进行测量。110mM KCl 使膜去极化，导致包括功能性存活的平滑肌的血管收缩。在血管活力以多重 KCl 挑战进行验证之后，另外的环被切下和放置在 24 孔板中，并且在 37℃的具有 5％ CO2 的空气气氛中，在补充以 30％ FBS、1％ L- 谷氨酰胺和 1％青霉素 / 链霉素的 RPMI 1640 培养基中保持 14 天。环不作处理或者以 MK2i-NP、NE-MK2i-NP、MK2i 肽或仅缓冲液处理 2 小时，洗涤，并给予新鲜培养基。不作处理的培养基每 2 天更换一次，持续 14 天。

[0237] HSV 活力

[0238] MTT 试验在 HSV 环处理过之后 1 天和 14 天时执行。HSV 环按如上所述进行制备和处理，并且在器官培养 1 天或 14 天之后，HSV 环进行称重，然后置于 250 μL 的溶于 DPBS 中的 0.01％甲基四氮唑中。环放置在 37℃培养箱中 1 小时。通过将环置于蒸馏水中，反应停止。然后，环被放在 1mL 溶纤剂 (elloSolve) 中，并在 37℃温育过夜。培养之后，环在溶液中进行混合，并且溶纤剂被萃取并被放入在比色杯之中，570nm 处的光密度在该比色杯中被确定。相对活力计算基于光密度，该光密度按该环的湿重进行归一化。

[0239] 血管形态学

[0240] 在 14 天器官培养之后，静脉段在 37℃的 0.5ml 的 10％福尔马林中固定 30 分钟，

并且被包埋在石蜡中用于切片。在每个环的中部开始，间距相距 5μm 的 5 个横截切片从各个试样上被切下。然后，切片以 Verhoeff－van Gieson 染剂染色。组织学切片使用 Nikon Eclipse Ti 倒置荧光显微镜 (Nikon Instruments Inc,Melville,NY) 进行成像，并且内膜和中膜厚度的六个径向平行测量使用 NIS Elements 成像软件随机从每个切片中获得（每个环总计 6-12 个测量，N ≥ 3 个环 / 治疗组，该环来自不同的供体）。内膜由内弹性膜的腔侧上的组织或包括在其内的混沌组织细胞定义，而中膜层被包括在内膜层和外弹性膜之间。内膜和中膜增厚用显微镜计算机图像分析软件对 10 倍放大的每个切片进行测量。

[0241] MK2i 血管渗透

[0242] 在验证活力之后，HSV 环用 Alexa-568 标记的 MK2i 肽、MK2i-NP 或 NE-MK2i-NP 处理 30 分钟，在 PBS-/- 中洗涤 2 次，并且立即包埋在 OCT 化合物中以及在干冰上进行冷冻。5μm 冰冻切片从每个处理过的血管的中间截取，并且安装在显微镜载片上对运输到血管壁之中的肽进行分析。血管的渗透在 ImageJ 中通过计算每个切片的平均内膜荧光度，并且按照内膜面积进行归一化进行定量 (n = 3/ 治疗组，来自分开的供体）。

[0243] 西方墨点分析

[0244] 在处理 2 小时和在新鲜培养基中器官培养 24 小时之后，处理过的 HSV 环的部分用液氮进行速冻 (snap-frozen)、雾化并使用脲 -DTT-CHAPS 缓冲液进行均质化。裂解物进行离心 (6000g,20 分钟），并且上清液被收集用于评估 HnRNP A0 磷酸化。等量的蛋白质（每泳道 20μg) 被装载在 15％、10％或 4-20％ SDS-PAGE 凝胶上；蛋白质进行电泳分离，然后被转移至的 Immobilon 膜（密理博，比尔里卡，马萨诸塞州 (Millipore,Billerica,MA)) 上。膜在 4℃下，随着磷酸化 hnRNP A0 的一级抗体 (Millipore) 和未磷酸化 hnRNP A0 的一级抗体（圣克鲁斯 (Santa Cruz)) 进行探测过夜。在洗涤后，膜在室温下用适当的二级抗体 (Li-Cor) 进行温育 1 小时。二级抗体使用奥德赛 (Odyssey) 直接红外荧光成像系统 (Li-Cor) 成像，并且使用 2.1 版 LiCor Odyssey 软件在 800nm 和 680nm 波长处进行密度测定法 (densitometrically) 定量。

[0245] 兔双侧颈静脉移植物间置模型

[0246] 雄性新西兰白兔 (3.0-3.5kg；n = 24)，通过肌内注射用盐酸氯胺酮 (1.4mg/kg) 和赛拉嗪 (xylazine,0.2mg/kg) 进行麻醉。麻醉用气管插管并且吸入异氟醚 (2.0％-5.0％）进行维持。高剂量的静脉注射肝素丸 (250U/kg) 在颈动脉阻断之前立即给药。手术操作在光学放大（放大倍数 ×2.5) 下以无菌技术完成。

[0247] 静脉旁路移植物按如前所述的吻合袖套法进行构造。简单地说，包括 2.0-mm 主体环的聚合物袖套由 4-Fr 引入器鞘（泰尔茂医疗，埃尔克顿，马里兰州 (Terumo Medical,Elkton,MD)) 进行塑造。在更小的支流血管结扎之后，颈外静脉被获取 (3.0-4.0cm 长度），用于在颈总动脉之中建立间置移植物。颈静脉末端穿过袖套，被外翻，并以 6-0 丝固定。静脉移植物随后在 2mL 的包括 30μM MK2i-NP、30μM MK2i 肽或 or PBS（未作处理）的肝素血浆可分解溶液中处理 30 分钟。在处理之后，颈动脉腔以 2.0-cm 动脉切开术进行暴露，并且套袖的 (cuffed)、翻转静脉末端被插入。3-0 丝被用于围绕该袖套固定动脉。最后，1.0cm 的颈动脉后壁在该袖套之间被截掉，以允许静脉植入物外延。

[0248] 兔在手术后 28 天安乐死，并且静脉移植物用滚压泵在约 50 毫米汞柱压力（～50mm Hg) 下以 10％中性缓冲福尔马林进行原位灌注固定。为了顾及沿移植物的长度对形

态变异进行评价，静脉移植物随后被切除，并且被截为四段，避免组织覆盖袖带。组织学切片被制备，并且内膜厚度和中膜厚度通过对每个血管段的每个象限进行三次测量进行定量(12 次测量 / 段＝ 48 次测量 / 移植物)。分离的切片用兔巨噬细胞抗体 RAM-11(Dako) 进行染色，以评估将免疫细胞浸润到每个移植物的内膜之中的处理效应。内膜中的巨噬细胞阳性染色通过对染色的移植物切片的内膜中的阳性染色细胞数的手动计数进行定量。对于每个处理组，对不同移植物切片的组织学图像进行分析。

[0249] 统计学

[0250] 统计学分析用单向 ANOVA 完成，之后用 Tukey 事后检验 (post-hoc test) 对试验组进行比较。分析用 OriginPro 8 软件 (Originlab, 北安普顿，马萨诸塞州 (Northampton,MA)) 或 Minitab 16 软件 (州立大学，宾夕法尼亚 (State College,PA)) 完成。统计学显著性在 95％置信限之内可被接受。结果作为算术平均值 ±SEM 被用图表呈现，并且 p 值被包括在附图或附图说明中。

[0251] 其他的支持数据

[0252] 图 48 示出了以不同电荷比 ($[NH_3^+]/[COO^-]$) 制备的复合物的 ζ 电位，该 ζ 电位在 Zetasizer Nano ZS 上被确定。所示的值是至少三个独立测量的平均值。

[0253] 复合物 pH 依赖性的膜破坏表现被调整用于胞内体逸出，以促进细胞质肽运输和滞留。图 49 示出了以 [NH3+]/[COO-] 电荷比＝ 1 :3 制备的复合物的 pH 依赖的溶血试验。显著溶血在代表早期胞内体囊泡至晚期胞内体囊泡的 pH 值 (即，pH ＜ 6.8) 时呈现，但在生理 pH7.4 时未见显著溶血。仅 YARA-MK2i 或 AA 复合物在任何 pH 值都不显示任何显著溶血。以 [NH3+]/[COO-] 电荷比＝ 1 :3 制备的复合物的试验 pH 依赖性尺寸的变化通过 DLS 分析进行分析。

[0254] 图 50 示出了在 pH7.4 时复合物呈现单峰尺寸分布。随着降低 pH，复合物开始游离成单独的 YARA-MK2i 肽和 PPAA 聚合物单聚体。

[0255] 复合物处理并未对人冠状动脉血管平滑肌细胞 (HCAVSMC) 中的细胞活力产生显著影响。图 51 示出了经 10 μM ANG II 刺激 6 小时，以 PPAA 复合物、AA 复合物或仅 YARA-MK2i 肽处理 2 小时，并且在新鲜培养基中培养 24 小时的 HCAVSMC 的细胞活力。“NT”意思是未作处理，n ＝ 4。

[0256] 图 52 示出了经 ANG II 刺激 6 小时，以 PPAA 复合物、AA 复合物或仅融合 MK2i 肽处理 2 小时，并且在新鲜培养基中培养 24 小时的 HCAVSMC 中的 TNF-α 产量。处理按照 10 μM、25 μM、50 μM 或 100 μM 的肽浓度进行归一化。所有数据按照通过 LDH 试验所确定的细胞数进行归一化。NT ＝未经处理。$^{*}p < 0.05$，与 NT+TNFα 组相比；$^{*}p<0.05$，与相同浓度下的 MK2i 相比；$^{**}p<0.05$，与相同浓度下的 AA 复合物相比。

[0257] HCAVSMC 复合物摄取的显微分析显示复合物增强了 MK2i 肽的摄取和胞内体逸出。肽用绿色荧光团进行标记，用于追踪。在细胞成像之前，细胞用红色 LysoTracker® 染剂进行处理，该染剂标示出内溶酶体途径中的细胞内囊泡。该分析被完成，用于相对于以游离肽处理的细胞，对复合物增强内溶酶体转运途径逸出的能力进行评估。图 53 示出了通过曼德系数 M1 计算被确定的，绿色荧光团与红色荧光团共定位的百分比 (基本上是，图像中与红色荧光重叠的绿色荧光的百分比 (％)，即，被包括在胞内体囊泡之内的肽的％)，对于所有样本，YARA-MK2i 剂量＝ 25 μM。所示的值是分开的 n ＝ 3 图像的平均 ±SEM。$^{*}p<0.05$，与同

一时间点的 YARA-MK2i 相比 ;**p<0.01 与同一时间点的 YARA-MK2i 相比。该图表是 HCAVSMC 复合物摄取显微镜分析的结果，并且其示出复合物提高了 MK2i 肽的摄取和胞内体逸出。

[0258] 当通过新的复合物配方进行运输时，肽的摄取和细胞内半衰期在 HCAVSMC 中显著提高。研究分别使用荧光标记的肽和流式细胞术完成。PPAA 复合物（图 55、图 56）的、仅 YARA-MK2i 肽（图 57、图 58）的和 AA 复合物（图 59、图 60）的随时间变化的平均荧光强度的曲线以及随时间变化的荧光强度的直方图被制作。指数线适合每个数据集，以便确定每个处理组的荧光半衰期。与未处理对照相比，平均荧光强度值被报告为在 MFI 上的增加，n ＝ 3。

[0259] 与游离肽处理相比，复合物更有力地增强 HSV 血管舒张。复合物显著增强硝普化钠 (SNP) 诱发的人隐静脉外植体舒张。HSV 环以苯肾上腺素 (PE, 10^{-6}M) 进行收缩，并且随后以 SNP(10^{-8}-10^{-6}M) 进行舒张。HSV 环然后经 2 小时处理，并再次用 PE 使其收缩和用 SNP 舒张，来确定处理后舒张的增加。在后处理收缩之后，所有环用 KCI 使其收缩，来核实平滑肌活力。如图 61 中所示，*p<0.05，与对照相比 ;**p<0.05，与 100uM MK2i 相比 ;n ＝ 3。

[0260] 图 62 示出了经 2 小时处理并维持器官培养 24 小时的 HSV 环中的细胞活力，该细胞活力通过 MTT 试验进行评估。n ＝ 1。图 63 示出了经 2 小时处理并维持器官培养 14 天的 HSV 环中的细胞活力，该细胞活力通过 MTT 试验进行评估。n ＝ 1。

[0261] 图 64 示出了经 2 小时处理然后维持器官培养 14 天的 HSV 外植体的内膜厚度，n ＝ 3。*p ≤ 0.01，与对照（未经处理）相比 ;**p ≤ 0.001，与对照相比，′ p ≤ 0.05。

[0262] 图 65 提供了经 2 小时处理然后维持器官培养 14 天的 HSV 外植体的内膜 / 中膜比 (I/M) 的图表，n ＝ 3。*p ≤ 0.01，与对照（未经处理）相比 ;**p ≤ 0.001。

[0263] 示例 7:AZX-100 复合物特性概要

[0264] 图 66 示出了以 3 ： 1 电荷比制备的 AZX-100 复合物的 DLS 粒度分布。图 67 示出了乙酸双氧铀染色的 AZX-100 复合物的代表性 TEM 图像，该图像示出与 DLS 结果一致的粒度分布。图 68 示出了以各种电荷比制备的 AZX-100 复合物的 zeta 电位汇总。zeta 电位被认为在电荷比高于 3 ： 1 时与电荷比成正比。可能因为大分子重排，可见 zeta 电位的突然变换发生在电荷比 3 ： 1 时。

[0265] AZX-100 复合物提高了血管紧张素 II 刺激的人冠状动脉血管平滑肌细胞中应力纤维形成的 AZX-100 介导抑制。细胞处理 1 小时，然后随后以血管紧张素 II 刺激 2 小时。肌动蛋白应力纤维在鬼笔环肽中染色被可视化，来自每个处理组的单个细胞的固定样本和相对荧光强度被用来为肌动蛋白应力纤维的形成进行定量。图 69 和图 70 示出了 AZX-100 复合物增强了血管紧张素 II 刺激的人冠状动脉血管平滑肌细胞中应力纤维形成的 AZX-100 介导抑制作用。

[0266] 图 71-73 示出了一种示例的结果，在该示例中，鼠主动脉平滑肌被悬浮在肌肉浴装置 (muscle bath apparatus) 中。组织在碳酸氢盐缓冲液中进行平衡，并且用 KCl(110mM) 进行激发，以确认该组织的活力。在组织恢复基础张力后，平滑肌用 $5*10^{-8}$M 去氧肾上腺素进行激发，然后用碳酸氢盐缓冲液进行洗涤。然后，组织通过碳酸氢盐缓冲液的后续洗涤恢复基础张力，并且用对照、AZX-100 肽或 AZX 复合物进行处理。在温育 30 分钟后，组织用苯肾上腺素进行激发，并且将收缩力与初始收缩进行比较，以确定所发生的抑制百分比。当被添加至鼠主动脉平滑肌时，AZX-100 肽表现出剂量依赖的收缩抑制。AZX 复合物也具有剂量

依赖的收缩抑制，但相对可比剂量，具有更大的抑制（约 5 倍的增加）。(n = 6)。

[0267] 图 74 和图 75 示出了鼠主动脉平滑肌被悬浮在氟尿嘧啶 (Fluoroplex) 中的示例的结果。组织在碳酸氢盐缓冲液中进行平衡，并且在室温下以 5 μM Fura 2-AM 装填 4 小时。当用苯肾上腺素进行激发时，AZX 复合物的预温育并未抑制细胞内钙的升高。图 74 示出了代表性的力 (force) 的追踪和钙荧光追踪。图 75 提供了测量所发生的细胞内钙的变化幅度以及力的抑制的累积数据。

[0268] 图 76 示出了人隐静脉被悬浮在肌肉浴装置中的示例的结果。组织在碳酸氢盐缓冲液中进行平衡，并且用 KCl(110mM) 进行激发，以确认该组织的活力。在组织恢复基础张力后，平滑肌用 10^{-6}M 去氧肾上腺素进行激发，然后用硝普化钠 (10^{-7}M) 进行舒张。然后，组织通过碳酸氢盐缓冲液的后续洗涤恢复基础张力，并且用对照、AZX-100 肽或 AZX 复合物进行处理。在温育 30 分钟后，组织用苯肾上腺素进行激发，然后用硝普化钠进行舒张。舒张百分比与初始舒张进行比较，以确定舒张增强百分比。与对照相比，AZX-100 肽显示出剂量依赖性的舒张增强。AZX 复合物也具有剂量依赖性的舒张增强，但与仅肽相比，表现出更大的舒张（约 5 倍的增加）。(n = 3)。

[0269] 最后，图 77 和表 2 共同示出 AZX-100NP 增强了人细支气管气道平滑肌 (HASM) 的 AZX-100 介导舒张。

表 2 :HASM 舒张

	HASM 11	HASM17	HASM 18	HASM20	HASM 22
p20.5mM	24	10		36	40
P20 1mM		25	80	76	84
p-P20.5mM- 复合物	37	31	59		38
p-P20 1mM- 复合物			74		117

[0270] 虽然，本文中所用的下列术语被认为能被本领域普通技术人员很好地理解，但定义被阐述来帮助解释本公开的主题。

[0271] 除非另有说明，本文使用的所有技术术语和科学术语与本公开的主题所属领域中的普通技术人员所通常理解的具有相同的含义。虽然任何类似或等同于本文描述的方法、装置和材料可被用于本公开的主题的实施或试验，在此代表性的方法、装置和材料进行了描述。

[0272] 根据长期存在的专利法惯例，术语“一 (a 或 an)”和“该 (the)”当在本申请包括权利要求书中使用时指的是“一个或多个 (one or more)”。因此，例如，涉及“一种组合物 (a composition)”包括多个这样的组合物等。

[0273] 除非另有说明，在本说明书和权利要求书中所使用的所有表示数量、特性等的数字应理解为在所有情况中按术语“约 (about)”进行修改。因此，除非有相反说明，在本说明书和权利要求书中所阐述的数值参数和都是近似值，其可以根据旨在通过本公开的主题获得的期望属性而变化。

[0274] 如本文所用，术语“约 (about)”当指的是值或质量、重量、时间、体积、浓度或百

分比的量时，意思是包括在一些实施例中特定量 ±20％的变化，在一些实施例中特定量 ±10％的变化，在一些实施例中特定量 ±5％的变化，在一些实施例中特定量 ±1％的变化，在一些实施例中特定量 ±0.5％的变化，在一些实施例中特定量 ±0.1％的变化，照此该变化适合于执行所公开的方法。

[0275] 如本文所用，范围可以表示为从“约”一个特殊值，和 / 或到“约”另一个特殊值。应当可以理解，许多值在本文中被公开，并且每个值除了该值本身之外，在本文中也被公开为“约”该特殊值。例如，如果值“10”被公开，则“大约 10”也被公开。还可以理解的是，两个特殊单元之间的每个单元也被公开。例如，如果 10 和 15 被公开，则 11、12、13 和 14 也被公开。

参考文献

[0276] 在本文中，各种参考文献被提及。所有这些参考文献，包括下面列出的那些，在此通过参考并入本文：

1.Go,A.S. 等，心脏病和中风统计学 -2013 更新：来自美国心脏协会的报告 (Heart disease and stroke statistics--2013update:a report from the American Heart Association)，循环 (Circulation)127,e6-e245(2013)；

2.Alexander,J.H. 等，edifoligide(E2F 转录因子假性诱物）的疗效和安全性，用于预防冠状动脉旁路移植手术后的静脉移植失败：PREVENT IV：随机对照试验 (Efficacy and safety of edifoligide,an E2F transcription factor decoy,for prevention of vein graft failure following coronary artery bypass graft surgery:PREVENT IV:a randomized controlled trial)，美国医学会杂志 (JAMA):294,2446-2454(2005)；

3.Saunders,P.C. 等，静脉移植动脉化导致分裂原活化蛋白激酶的差异性活化 (Vein graft arterialization causes differential activation of mitogen-activated protein kinases)，胸心血管外科杂志 (J Thorac Cardiovasc Surg)：127,1276-1284(2004)；

4.Raingeaud,J. 等，促炎性细胞因子和环境应激导致通过酪氨酸和苏氨酸上的双重磷酸化的 p38 分裂原活化蛋白激酶活化 (Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine)，生物化学杂志 (J Biol Chem):270,7420-7426(1995)；

5.Zarubin,T. 与 Han,J.，p38MAP 激酶途径的激活与信令 (Activation and signaling of the p38MAP kinase pathway)，细胞研究 (Cell Res)：15,11-18(2005)；

6.Engel,K.,Kotlyarov,A. 及 Gaestel,M.，MAPKAP 激酶 2 的细霉素 B- 敏感的核输出通过磷酸化进行调控 (Leptomycin B-sensitive nuclear export of MAPKAP kinase 2is regulated by phosphorylation)，欧洲分子生物学组织杂志 (EMBO J):17,3363-3371(1998)；

7.Xu,J.J.,Hendriks,B.S.,Zhao,J. 及 de Graaf,D.，对乙酰氨基酚和 p38 抑制剂的多重功效：接近通路毒理学 (Multiple effects of acetaminophen and p38inhibitors:towards pathway toxicology)，欧洲生化学会联合会快报 (FEBS Lett):582,1276-1282(2008)；

8.Dambach,D.M.，与 p38alpha/beta MAP 激酶抑制相关联的潜在的不良反应(Potential adverse effects associated with inhibition of p38alpha/beta MAP kinases)，药物化学当前论题(Curr Top Med Chem):5,929-939(2005)；

9.Ward,B.,Seal,B.L.,Brophy,C.M. 及 Panitch,A.，生物活性细胞穿透肽的设计：当转导域不只是转导(Design of a bioactive cell-penetrating peptide:when a transduction domain does more than transduce)，肽科学杂志(Journal of Peptide Science):15,668-674(2009)；

10.Hayess,K. 及 Benndorf,R.，蛋白激酶抑制剂对哺乳动物小热休克蛋白(HSP25)激酶的活性的影响(Effect of protein kinase inhibitors on activity of mammalian small heat-shock protein(HSP25)kinase)，生化药理学(Biochem Pharmacol)：53,1239-1247(1997)；

11.Lopes,L.B. 等，新型 MAPKAP 激酶 II 的细胞渗透肽抑制剂抑制人隐静脉器官培养模型中的内膜增生(A novel cell permeant peptide inhibitor of MAPKAP kinase II inhibits intimal hyperplasia in a human saphenous vein organ culture model)，血管外科杂志(J Vasc Surg):52,1596-1607(2010)；

12.Flynn,C.R. 等;PTD 偶联的抗纤维化肽 --AZX100 在人真皮瘢痕疙瘩纤维母细胞中的内在化和细胞内运输(Internalization and intracellular trafficking of a PTD-conjugated anti-fibrotic peptide,AZX100,in human dermal keloid fibroblasts)，药学科学杂志(J Pharm Sci):99,3100-3121(2010)；

13.Jones,R.A. 等，聚(2-烷基丙烯酸)聚合物通过胞内体囊泡的 pH 敏感性破坏将分子运输到细胞质(Poly(2-alkylacrylic acid)polymers deliver molecules to the cytosol by pH-sensitive disruption of endosomal vesicles)，生物化学杂志(Biochem J):372,65-75(2003)；

14.Lackey,C.A.,Press,O.W.,Hoffman,A.S. 及 Stayton,P.S.，仿生的 pH 响应性聚合物指示胞吞抗体复合物的胞内体释放和细胞内运输(A Biomimetic pH-responsive polymer directs endosomal release and intracellular delivery of an endocytosed antibody complex)，生物共轭化学(Bioconjugate Chemistry):13,996-1001(2002)；

15.Murthy,N.,Robichaud,J.R.,Tirrell,D.A.,Stayton,P.S. 及 Hoffman,A.S.，用于真核生物膜破坏的聚合物的设计与合成(The design and synthesis of polymers for eukaryotic membrane disruption)，控制释放杂志(J Control Release):61,137-143(1999)；

16.Foster,S.,Duvall,C.L.,Crownover,E.F.,Hoffman,A.S. 及 Stayton,P.S.，具有胞内体释放聚合物的蛋白质抗原的细胞内运输增强 CD8T 细胞的生产以及预防性疫苗功效(Intracellular delivery of a protein antigen with an endosomal-releasing polymer enhances CD8T-cell production and prophylactic vaccine efficacy)，生物共轭化学(Bioconjug Chem):21,2205-2212(2010)；

17.Crownover,E.,Duvall,C.L.,Convertine,A.,Hoffman,A.S. 及 Stayton,P.S.，RAFT 合成的移植共聚物增强 pH 依赖性的膜去稳定化和蛋白循环时间(RAFT-synthesized graft copolymers that enhance pH-dependent membrane destabilization and protein

circulation times),控制释放杂志(J Control Release):155,167-174(2011);

18.Sorkin,A.及Von Zastrow,M.,信号转导和内吞作用:多种近距离遭遇(Signal transduction and endocytosis:close encounters of many kinds),自然综述分子细胞生物学(Nat Rev Mol Cell Biol):3,600-614(2002);

19.Evans,B.C.等,用于生物大分子药物的细胞溶质运输的pH响应性胞内体可溶解剂评价的离体红血细胞溶血测定法(Ex vivo red blood cell hemolysis assay for the evaluation of pH-responsive endosomolytic agents for cytosolic delivery of biomacromolecular drugs),可视化实验杂志(J Vis Exp),e50166(2013);

20.Humphries,W.H.t.及Payne,C.K.,使用自淬基板的活细胞溶酶体酶活性的成像(Imaging lysosomal enzyme activity in live cells using self-quenched substrates),分析化学和生物分析化学(Anal Biochem):424,178-183(2012);

21.Rousseau,S.等,SAPK2a/p38的抑制通过MAPKAP-K2及其与细胞因子mRNA的相互作用防止hnRNP A0磷酸化(Inhibition of SAPK2a/p38prevents hnRNP A0phosphorylation by MAPKAP-K2and its interaction with cytokine mRNAs),欧洲分子生物学组织杂志(EMBO J):21,6505-6514(2002);

22.Hitti,E.等,丝裂原激活蛋白激酶活化蛋白激酶2主要通过改变tristetraprolin的表达、稳定性及与富含腺嘌呤/尿苷成分的结合调节肿瘤坏死因子mRNA的稳定性和转录(Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2regulates tumor necrosis factor mRNA stability and translation mainly by altering tristetraprolin expression,stability,and binding to adenine/uridine-rich element),分子细胞生物学(Mol Cell Biol):26,2399-2407(2006);

23.Ronkina,N.等,炎症中的MAPKAP激酶MK2和MK3:通过tristetraprolin的表达和磷酸化进行TNF生物合成的复杂调控(MAPKAP kinases MK2and MK3in inflammation:complex regulation of TNF biosynthesis via expression and phosphorylation of tristetraprolin),生化药理学(Biochem Pharmacol):80,1915-1920(2010);

24.Chen,H.F.,Xie,L.D.及Xu,C.S.,热休克蛋白27磷酸化在血管平滑肌细胞迁移中的作用(Role of heat shock protein 27phosphorylation in migration of vascular smooth muscle cells),分子细胞生物学(Mol Cell Biol):327,1-6(2009);

25.Schleimer,K.等,精细显微外科技术训练:大鼠颈总动脉中外部颈静脉移植物的间置(Training a sophisticated microsurgical technique:interposition of external jugular vein graft in the common carotid artery in rats),可视化实验杂志(J Vis Exp),(2012);

26.Mueller,L.等,TNF-α在来自结直肠肝转移的纤维母细胞和正常肝纤维母细胞中类似诱导IL-6和MCP-1(TNF-alpha similarly induces IL-6and MCP-1in fibroblasts from colorectal liver metastases and normal liver fibroblasts),生物化学与生物物理研究通讯(Biochem Biophys Res Commun):397,586-591(2010);

27.Mitchell,R.N.及Libby,P.,移植血管病变中的血管重建(Vascular remodeling in transplant vasculopathy),循环研究(Circ Res):100,967-978(2007);

28. Stark, V. K., Hoch, J. R., Warner, T. F. 及 Hullett, D. A.，单核细胞趋化蛋白-1 的表达与静脉移植物内膜增生的发展相关联 (Monocyte chemotactic protein-1expression is associated with the development of vein graft intimal hyperplasia)，动脉硬化血栓形成与血管生物学 (Arterioscl Throm Vas):17, 1614-1621(1997)；

29. Walensky, L. D. 等，体内细胞凋亡通过烃化装订的 BH3 螺旋的激活 (Activation of apoptosis in vivo by a hydrocarbon-stapled BH3helix)，科学 (Science):305, 1466-1470(2004).

30. Heitz, F., Morris, M. C. 及 Divita, G.，细胞穿透肽的二十年：从分子机制到治疗 (Twenty years of cell-penetrating peptides:from molecular mechanisms to therapeutics)，英国药理学杂志 (British Journal of Pharmacology)：157, 195-206(2009)；

31. LaBelle, J. L. 等，装订 BIM 肽在血液肿瘤中克服凋亡抵抗 (A stapled BIM peptide overcomes apoptotic resistance in hematologic cancers)，临床调查杂志 (J Clin Invest):122, 2018-2031(2012)；

32. Walensky, L. D. 等，装订 BIM BH3 螺旋直接结合并激活 BAX(A stapled BID BH3helix directly binds and activates BAX)，分子细胞 (Mol Cell)：24, 199-210(2006)；

33. Okamoto, T. 等，使促凋亡 BIM BH3 螺旋 (BimSAHB) 稳定不一定提高亲和性或生物活性 (Stabilizing the pro-apoptotic BimBH3helix(BimSAHB)does not necessarily enhance affinity or biological activity)，生物共轭化学 (Bioconjug Chem):8, 297-302(2013)；

34. Mislick, K. A. 及 Baldeschwieler, J. D.，蛋白聚糖在阳离子介导的基因转移中的作用的证据 (Evidence for the role of proteoglycans in cation-mediated gene transfer)，美国国家科学院院刊 (Proc Natl Acad Sci U S A):93, 12349-12354(1996)；

35. Richard, J. P. 等，非共轭 TAT 肽的细胞摄取涉及网格蛋白依赖的内吞作用和硫酸乙酰肝素受体 (Cellular uptake of unconjugated TAT peptide involves clathrin-dependent endocytosis and heparan sulfate receptors)，生物化学杂志 (J Biol Chem):280, 15300-15306(2005)；

36. Mietus-Snyder, M., Friera, A., Glass, C. K. 及 Pitas, R. E.，通过蛋白激酶 C 调控平滑肌细胞中的清道夫受体表达：氧化应激的作用 (Regulation of scavenger receptor expression in smooth muscle cells by protein kinase C:a role for oxidative stress)，动脉粥样硬化、血栓和血管生物学 (Arterioscler Thromb Vasc Biol):17, 969-978(1997)；

37. Li, H., Freeman, M. W. 及 Libby, P.，在体内通过致动脉粥样化的饮食和在体外通过细胞因子调节体内平滑肌细胞清道夫受体表达 (Regulation of smooth muscle cell scavenger receptor expression in vivo by atherogenic diets and in vitro by cytokines)，临床调查杂志 (J Clin Invest):95, 122-133(1995)；

38. Voigt, J., Christensen, J. 及 Shastri, V. P.，内皮细胞通过具有胞膜窖亲和力的聚合电解质对纳米颗粒的差异性摄取 (Differential uptake of nanoparticles by

endothelial cells through polyelectrolytes with affinity for caveolae),美国国家科学院院刊(Proc Natl Acad Sci U S A):111,2942-2947(2014);

39.Alam,M.R.等,反义寡核苷酸的生物学效应取决于其胞吞路线和转运(The biological effect of an antisense oligonucleotide depends on its route of endocytosis and trafficking),寡核苷酸(Oligonucleotides):20,103-109(2010);

40.Meier,O.等,腺病毒引发巨胞饮和胞内体渗漏连同其网格蛋白介导的摄取(Adenovirus triggers macropinocytosis and endosomal leakage together with its clathrin-mediated uptake),细胞生物学杂志(J Cell Biol):158,1119-1131(2002);

41.Rossman,J.S.,Leser,G.P.及Lamb,R.A.,丝状流感病毒通过巨胞饮进入细胞(Filamentous influenza virus enters cells via macropinocytosis),细胞生物学杂志(J Cell Biol):86,10950-10960(2012);

42.Hewlett,L.J.,Prescott,A.R.&Watts,C.,被膜凹陷和巨胞饮途径满足不同的胞内体群体(The coated pit and macropinocytic pathways serve distinct endosome populations),细胞生物学杂志(J Cell Biol):124,689-703(1994);

43.Wadia,J.S.,Stan,R.V.及Dowdy,S.F.,可转换的TAT-HA的基因融合肽增强TAT融合蛋白在脂筏巨吞饮之后的逸出(Transducible TAT-HA fusogenic peptide enhances escape of TAT-fusion proteins after lipid raft macropinocytosis),自然杂志医学分刊(Nat Med):10,310-315(2004);

44.Muto,A.等,丝裂原活化蛋白激酶活化蛋白激酶II的MMI-0100抑制减少体外和体内的内膜增生(Inhibition of Mitogen Activated Protein Kinase Activated Protein Kinase II with MMI-0100reduces intimal hyperplasia ex vivo and in vivo),血管药理学(Vascul Pharmacol):56,47-55(2012);

45.Kalra,M.及Miller,V.M.,隐静脉移植物早期重塑:外膜细胞和中膜细胞的增殖、迁移和细胞凋亡与移植物的直径和血流量的变化同时发生(Early remodeling of saphenous vein grafts:proliferation,migration and apoptosis of adventitial and medial cells occur simultaneously with changes in graft diameter and blood flow),血管研究杂志(J Vasc Res):37,576-584(2000);

46.Zwolak,R.M.,Adams,M.C.及Clowes,A.W.,静脉移植物增生动力学:与切向应力有关(Kinetics of vein graft hyperplasia:association with tangential stress),血管外科杂志(J Vasc Surg):5,126-136(1987);

47.Alexander,J.H.等,通过转染IV的离体静脉移植物工程学项目(PREVENT IV)试验:研究原理、设计和基线患者特点(The PRoject of Ex-vivo Vein graft ENgineering via Transfection IV(PREVENT IV)trial:study rationale,design,and baseline patient characteristics),美国心脏杂志(Am Heart J):150,643-649(2005);

48.Goldberg,M.,Langer,R.及Jia,X.,纳米结构的材料在药物运输和组织工程学上的应用(Nanostructured materials for applications in drug delivery and tissue engineering),生物材料科学杂志:聚合物版(J Biomater Sci Polym Ed):18,241-268(2007);

49.Li,H.,Nelson,C.E.,Evans,B.C.及Duvall,C.L.,促凋亡疗法中细胞内作用生

物制剂的运输(Delivery of intracellular-acting biologics in pro-apoptotic therapies),当前药物设计(Curr Pharm Des):17,293-319(2011);

50.Ferrito,M.a.T.,学位论文:聚(2-乙基丙烯酸)(D.A.,Poly(2-ethylacrylic acid)),大分子合成(Macromolecular Syntheses):11,59-62(1992);

51.Convertine,A.J.,Benoit,D.S.,Duvall,C.L.,Hoffman,A.S.及Stayton,P.S.,用于siRNA运输的新型胞内体可溶解的二嵌段共聚物的开发(Development of a novel endosomolytic diblock copolymer for siRNA delivery),控制释放杂志(J Control Release):133,221-229(2009);

52.Henry,S.M.,El-Sayed,M.E.,Pirie,C.M.,Hoffman,A.S.及Stayton,P.S.,用于细胞内药物运输的pH响应的聚(苯乙烯-马来酸酐)烷基酰胺共聚物(pH-responsive poly(styrene-alt-maleic anhydride)alkylamide copolymers for intracellular drug delivery),生物大分子(Biomacromolecules):7,2407-2414(2006);

53.Bolte,S.及Cordelieres,F.P.,光学显微镜中亚细胞的共定位分析指引(A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy),牛津大学:显微镜学报(J Microsc-Oxford):224,213-232(2006);

54.Jiang,Z.等,新的静脉移植物模型:适应差异性流动环境(A novel vein graft model:adaptation to differential flow environments),美国生理学杂志:心脏与循环生理学(Am J Physiol Heart Circ Physiol):286,H240-245(2004);

55.Duvall等,分子药剂学(Mol Pharm.):2010,7(2):468-476。

通过引用并入

[0277] 本说明书中提及的所有出版物、专利和专利申请均通过引用并入本文,其程度如同每个单独的出版物、专利或专利申请被具体和单独地表明通过引用并入。

[0278] 应当理解,本公开主题的各种细节可以在不脱离本文所公开的主题范围的情况下进行改变。此外,前面的描述是为了说明目的,而不是为了限制的目的。

序列表

<110> 范德比尔特大学

<120> 复合物

<130> P15S345

<150> US 61/811078
<151> 2013-04-11

<160> 4

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 22
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> MK2i 序列

<400> 1

Tyr Ala Arg Ala Ala Ala Arg Gin Ala Arg Ala Lys Ala Leu Ala Arg
1 5 10 15

Gin Leu Gly Val Ala Ala
20

<210> 2
<211> 24
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> AZX-100 序列

<400> 2

Tyr Ala Arg Ala Ala Ala Arg Gin Ala Arg Ala Trp Leu Arg Arg Ala
1 5 10 15

Ser Ala Pro Leu Pro Gly Leu Lys
20

<210> 3
<211> 22
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> RN22 序列

<400> 3

Arg Arg Arg Lys Phe Val Arg Ser Arg Arg Pro Arg Thr Ala Ser Cys
1 5 10 15

Ala Leu Ala Phe Val Asn
20

<210> 4
<211> 35
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Penetratin—Bak-BH3 序列

<400> 4

Arg Gin Ile Lys Ile Trp Phe Gin Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys
1 5 10 15

Met Gly Gin Val Gly Arg Gin Leu Ala Ile Ile Gly Asp Asp Ile Asn
20 25 30

Arg Arg Tyr
35

[0001]

序列表

<110> 范德比尔特大学

<120> 复合物

<130> P15S345

<150> US 61/811078
<151> 2013-04-11

<160> 4

<170> Patentln version 3.5

<210> 1
<211> 22
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> MK2i 序列

<400> 1

Tyr Ala Arg Ala Ala Ala Arg Gin Ala Arg Ala Lys Ala Leu Ala Arg
1 5 10 15

Gin Leu Gly Val Ala Ala
20

<210> 2
<211> 24
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> AZX-100 序列

<400> 2

Tyr Ala Arg Ala Ala Ala Arg Gin Ala Arg Ala Trp Leu Arg Arg Ala
1 5 10 15

Ser Ala Pro Leu Pro Gly Leu Lys
20

<210> 3
<211> 22
<212> PRT
<213> 人工序列

[0002]

<220>
<223> RN22 序列

<400> 3

Arg Arg Arg Lys Phe Val Arg Ser Arg Arg Pro Arg Thr Ala Ser Cys
1 5 10 15

Ala Leu Ala Phe Val Asn
20

<210> 4
<211> 35
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Penetratin—Bak-BH3 序列

<400> 4

Arg Gin Ile Lys Ile Trp Phe Gin Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys
1 5 10 15

Met Gly Gin Val Gly Arg Gin Leu Ala Ile Ile Gly Asp Asp Ile Asn
20 25 30

Arg Arg Tyr
35

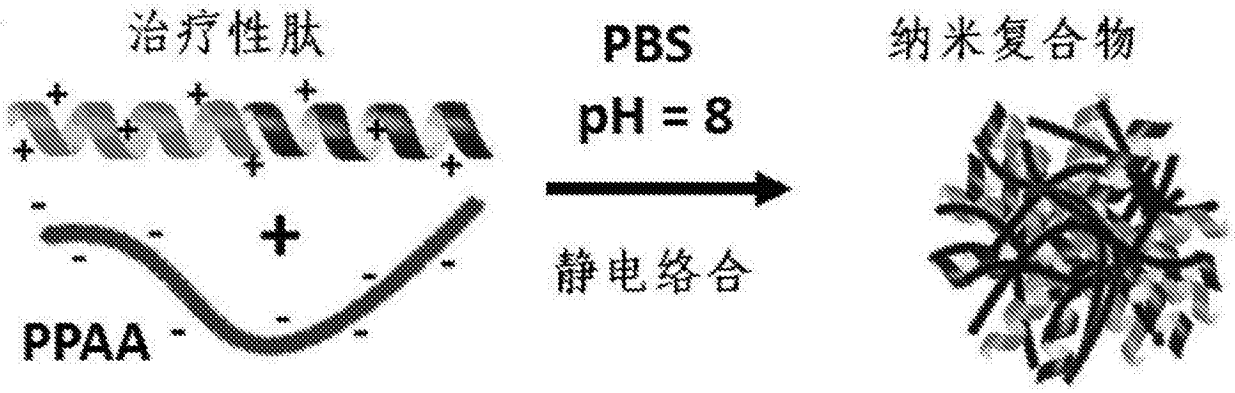

治疗性肽
PBS
pH = 8
静电络合
纳米复合物
PPAA

图 1

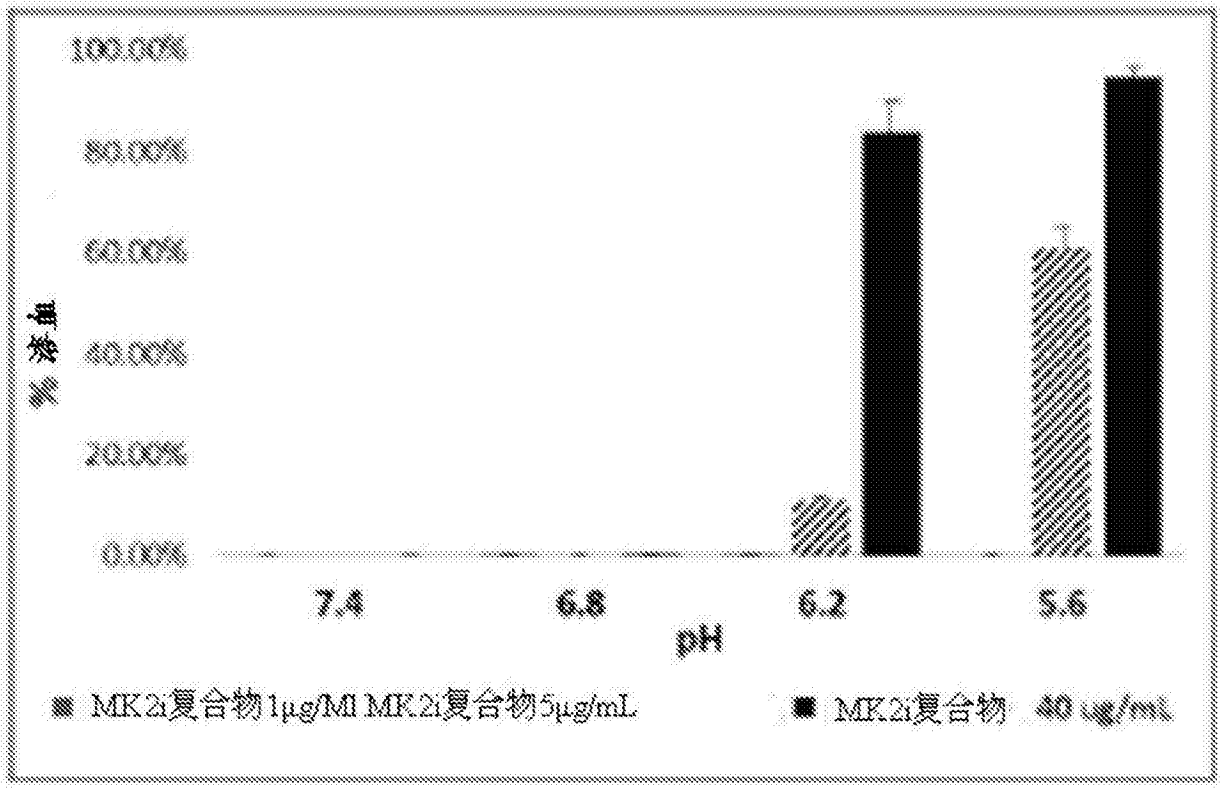

100.00%
80.00%
60.00%
40.00%
20.00%
0.00%
7.4
6.8
6.2
5.6
pH
MK2i复合物1μg/Ml MK2i复合物5μg/mL
MK2i复合物 40 μg/mL

图 2

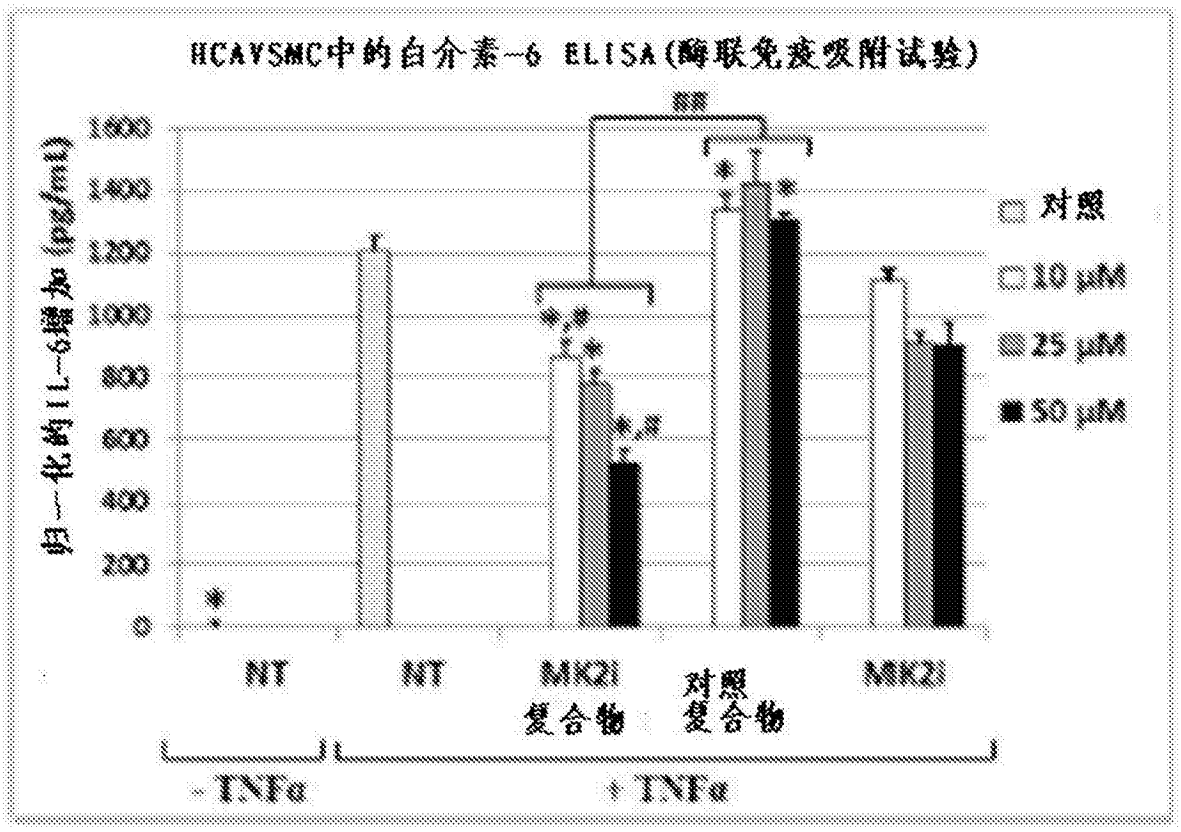

HCAVSMC中的白介素-6 ELISA(酶联免疫吸附试验)
归一化的IL-6增加(pg/mL)
1800
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
对照
10 μM
25 μM
50 μM
NT
NT
MK2i
复合物
对照
复合物
MK2i
-TNFα
+TNFα

图 3

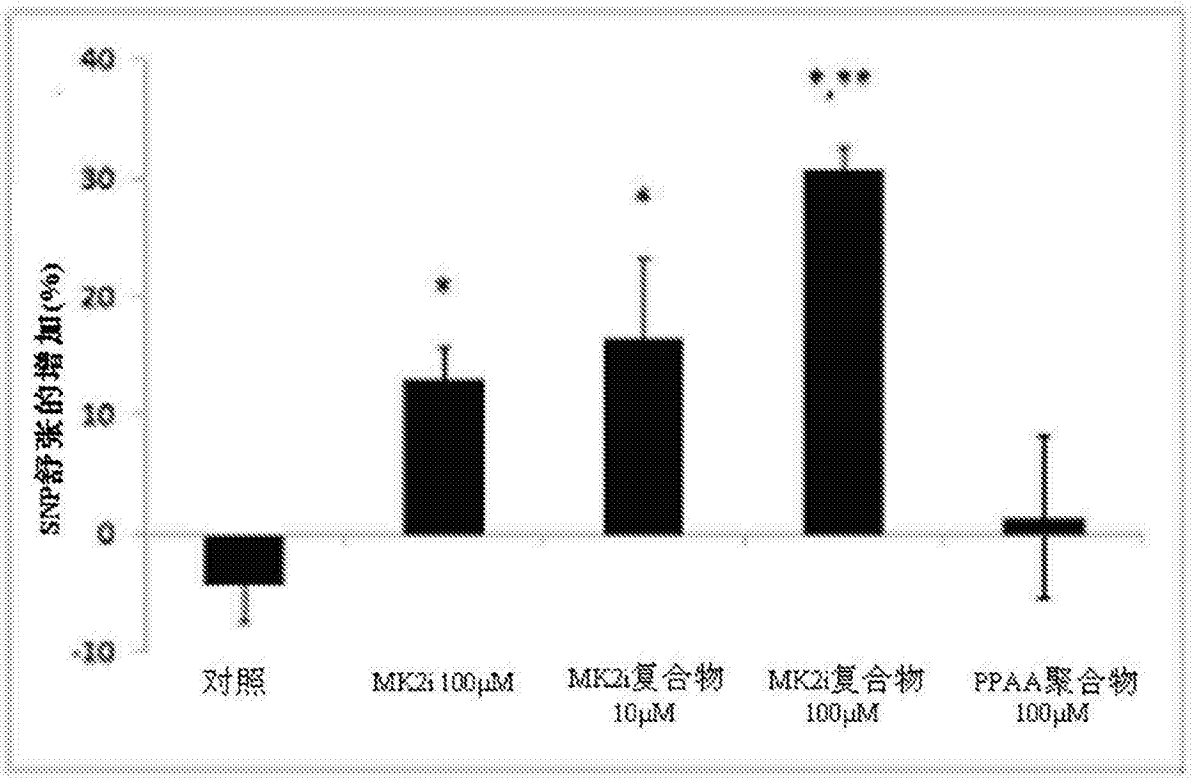

SNP舒张的增加(%)
40
30
20
10
0
-10
*
*
*,**
对照
MK2i 100μM
MK2i复合物 10μM
MK2i复合物 100μM
PPAA聚合物 100μM

图 4

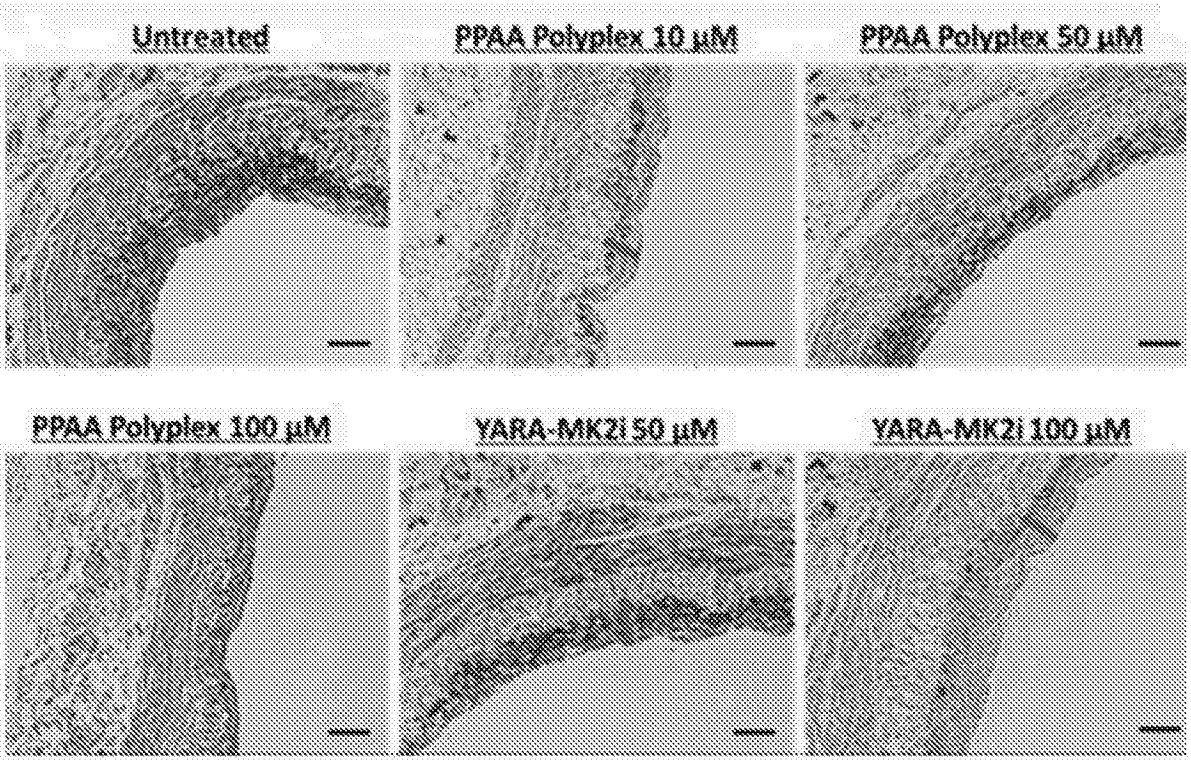

Untreated
PPAA Polyplex 10 μM
PPAA Polyplex 50 μM
PPAA Polyplex 100 μM
YARA-MK2i 50 μM
YARA-MK2i 100 μM

图 5

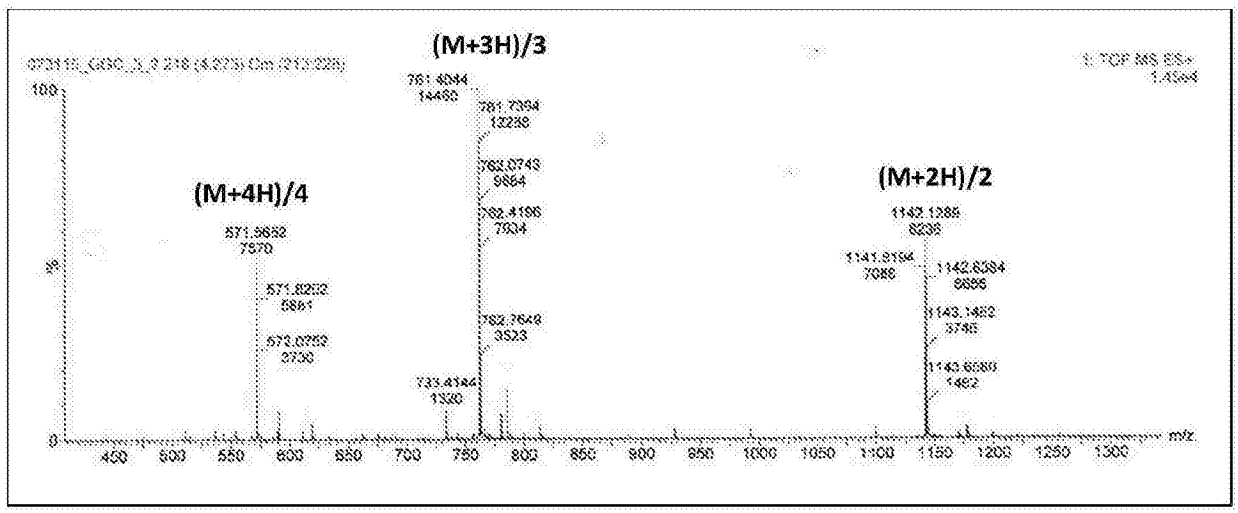


图 6

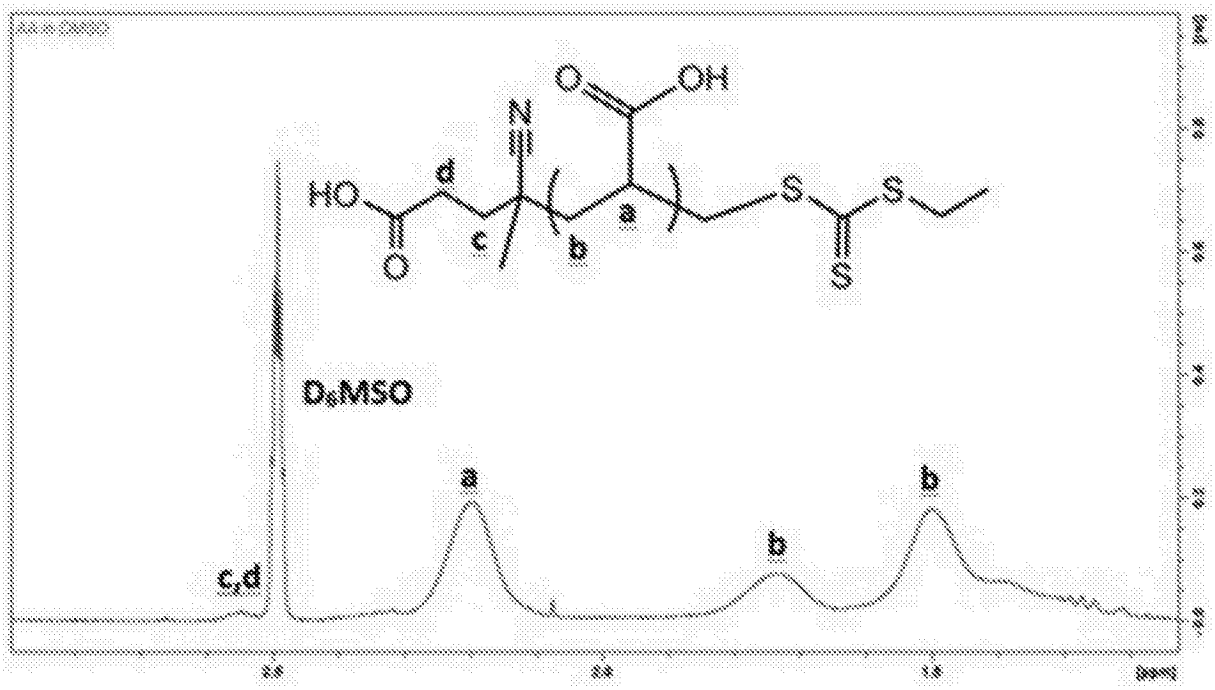


图 7

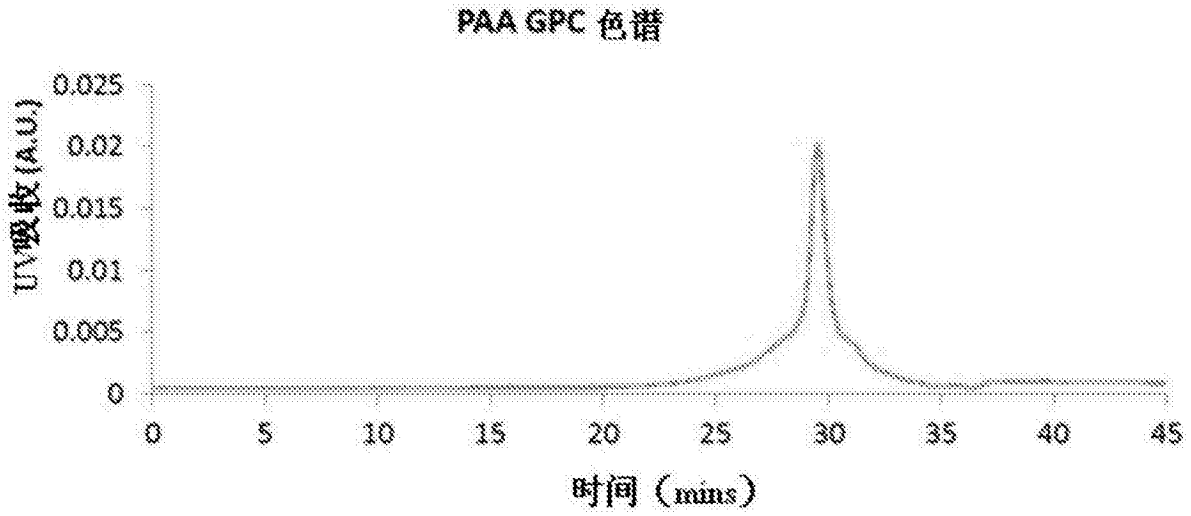

PAA GPC 色谱
UV吸收(A.U.)
0.025
0.02
0.015
0.01
0.005
0
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
时间（mins）

图 8

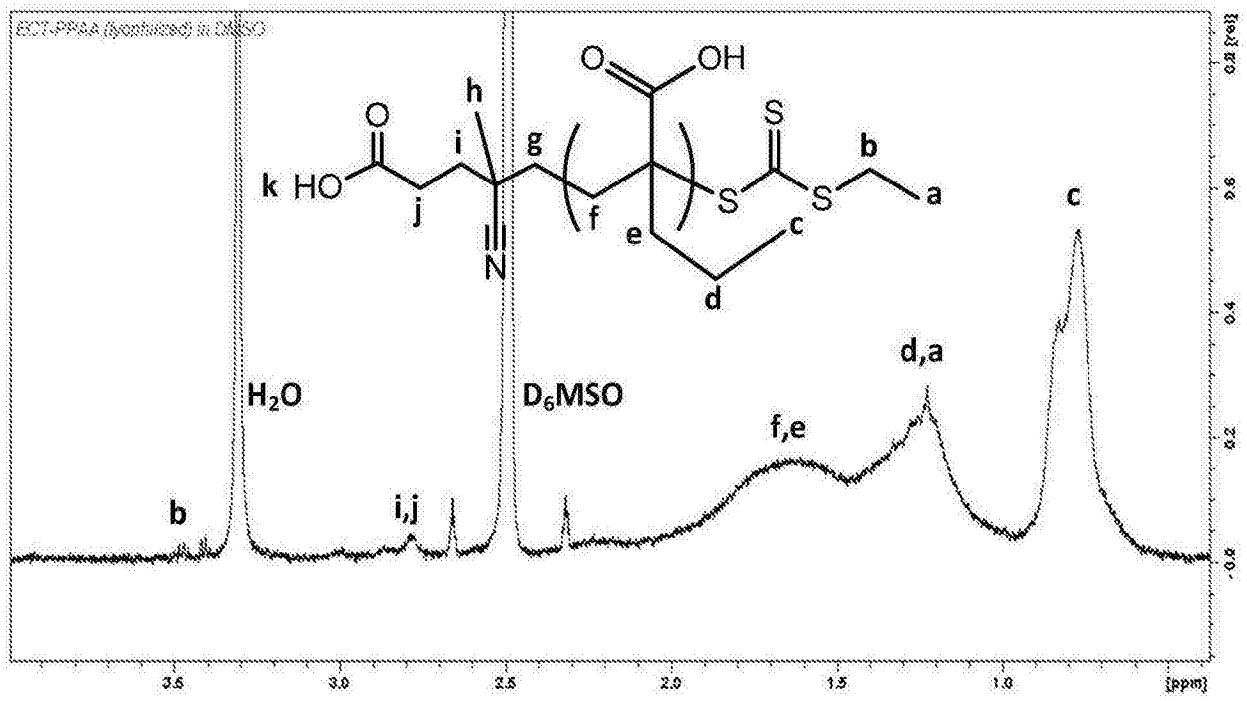

O
OH
h
i
g
S
b
k HO
j
f
S
S
a
e
c
N
d
c
d,a
H2O
D6MSO
f,e
b
i,j
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
[ppm]

图 9

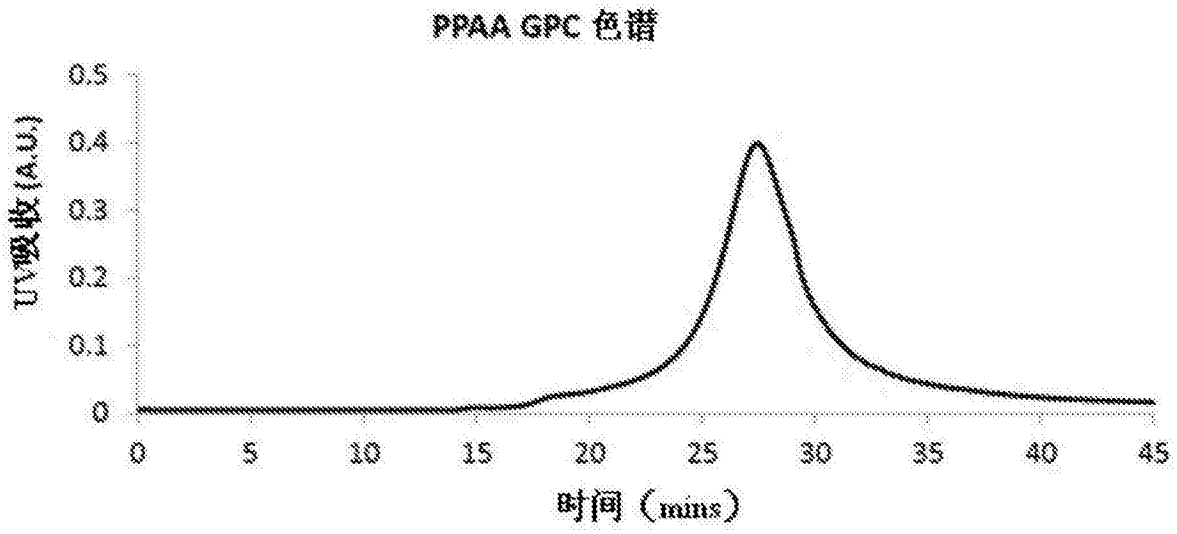

PPAA GPC 色谱
UV吸收(A.U.)
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
时间（mins）

图 10

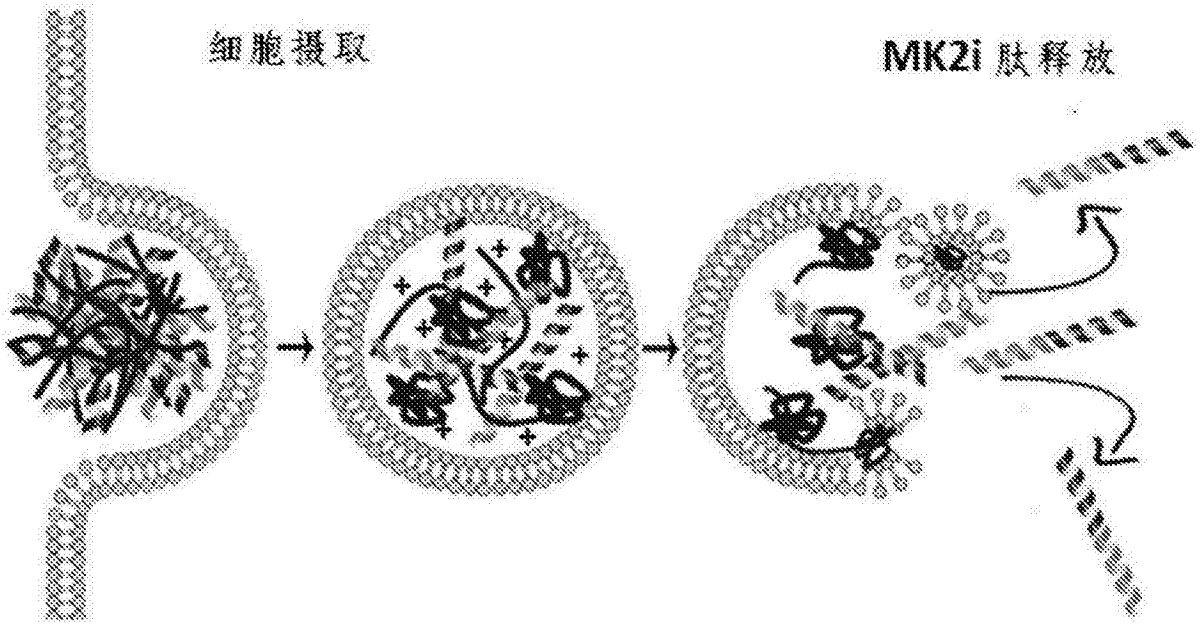

细胞摄取
MK2i 肽释放

图 11

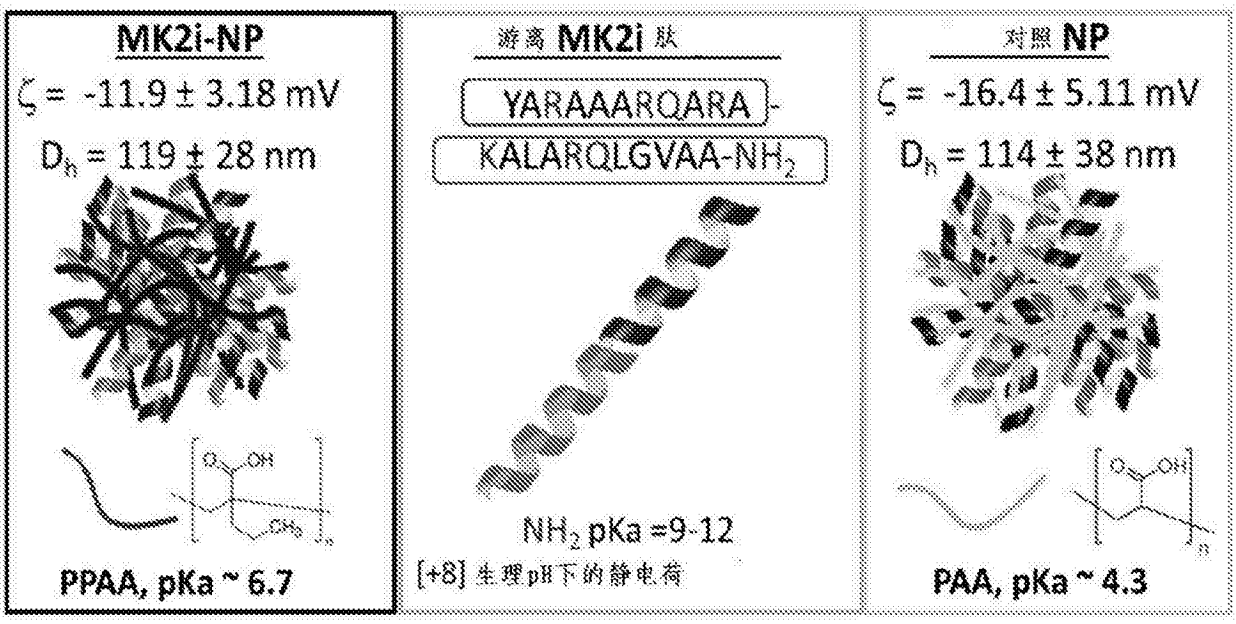

MK2i-NP
ζ = -11.9 ± 3.18 mV
Dh = 119 ± 28 nm
PPAA, pKa ~ 6.7
游离 MK2i 肽
YARAAARQARA-
KALARQLGVAA-NH2
NH2 pKa =9-12
[+8] 生理pH下的静电荷
对照 NP
ζ = -16.4 ± 5.11 mV
Dh = 114 ± 38 nm
PAA, pKa ~ 4.3

图 12

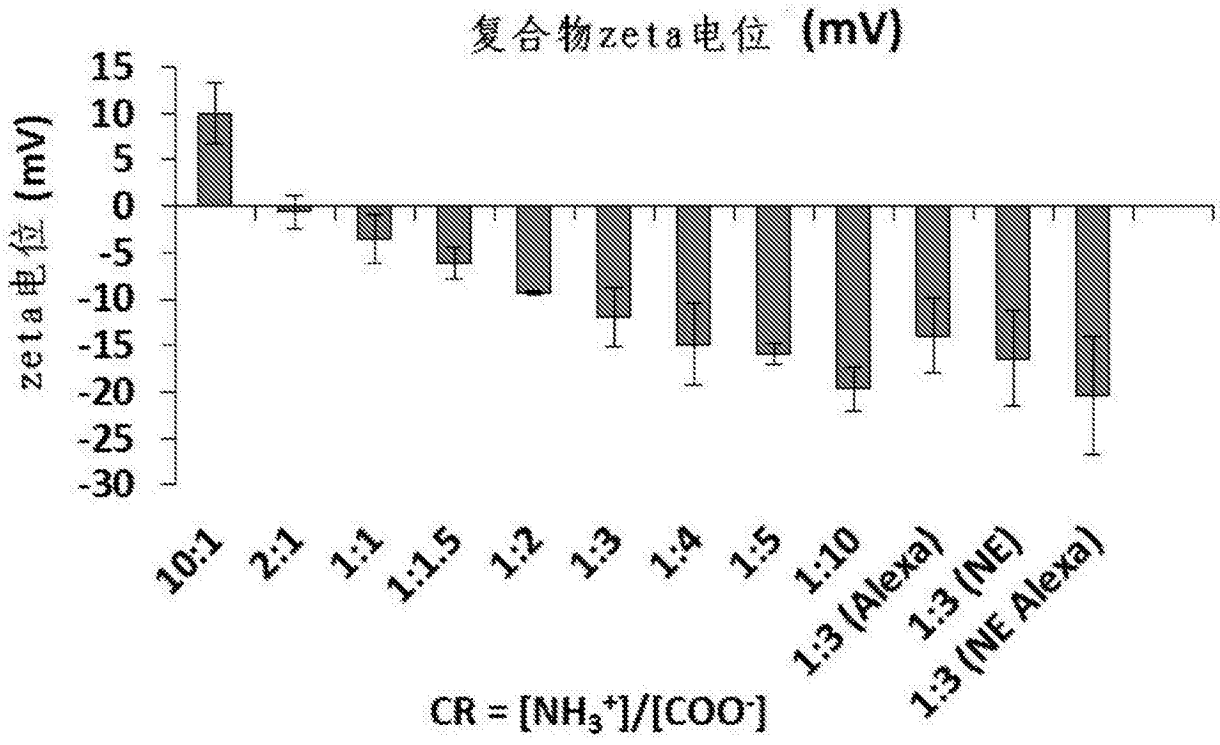

复合物zeta电位 (mV)
zeta电位 (mV)
15
10
5
0
-5
-10
-15
-20
-25
-30
10:1
2:1
1:1
1:1.5
1:2
1:3
1:4
1:5
1:10
1:3 (Alexa)
1:3 (NE)
1:3 (NE Alexa)
CR = [NH3+]/[COO-]

图 13

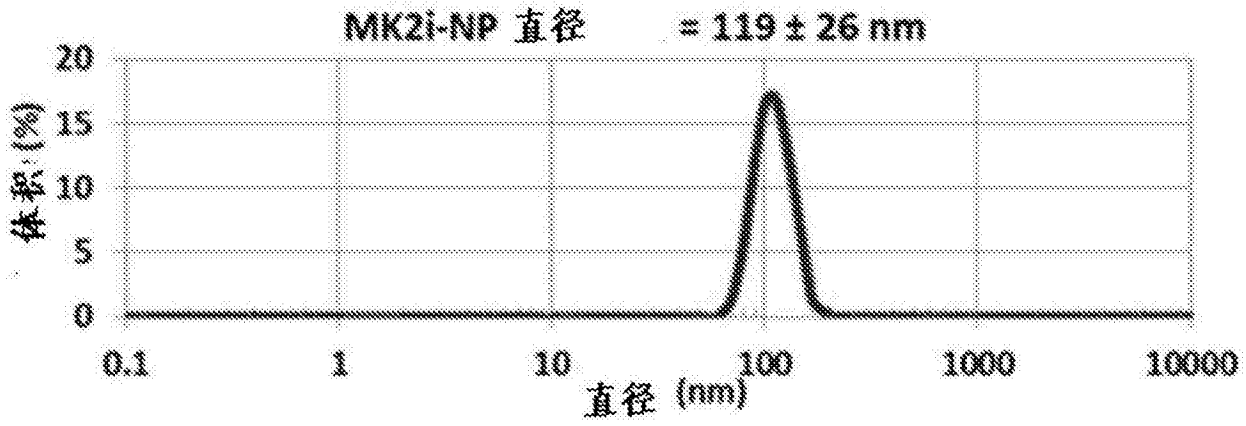

MK2i-NP 直径 = 119 ± 26 nm
体积 (%)
20
15
10
5
0
0.1
1
10
100
1000
10000
直径 (nm)

图 14

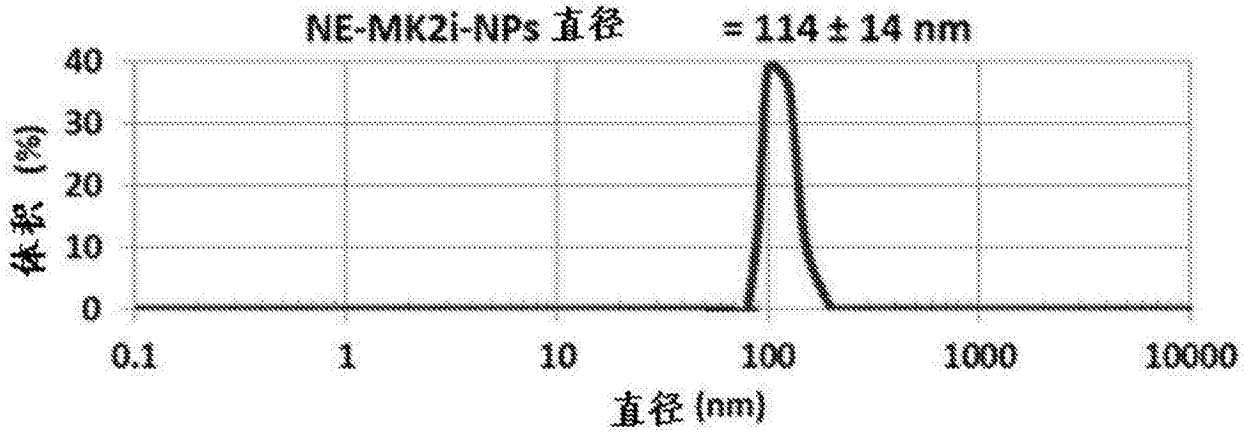

NE-MK2i-NPs 直径 = 114 ± 14 nm
体积 (%)
40
30
20
10
0
0.1
1
10
100
1000
10000
直径 (nm)

图 15

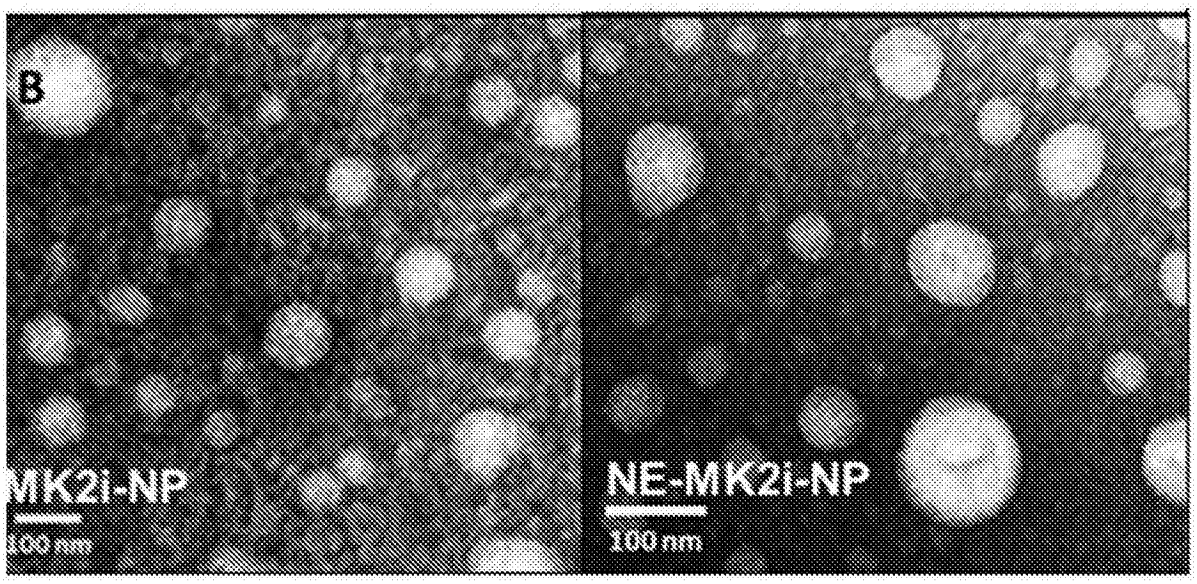

B
MK2i-NP
100 nm
NE-MK2i-NP
100 nm

图 16

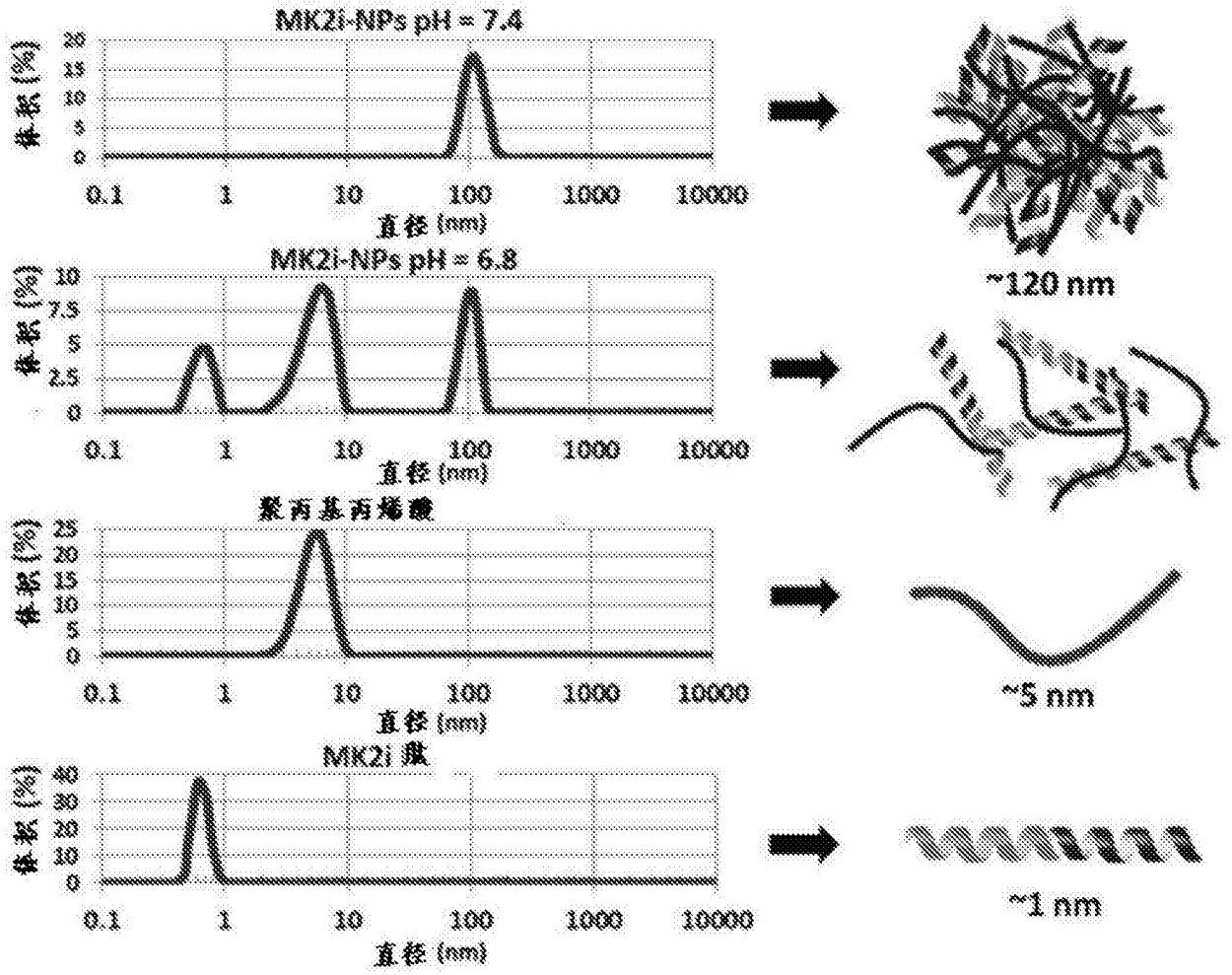

MK2i-NPs pH = 7.4
体积 (%)
直径 (nm)
~120 nm
MK2i-NPs pH = 6.8
聚丙基丙烯酸
~5 nm
MK2i 盐
~1 nm

图 17

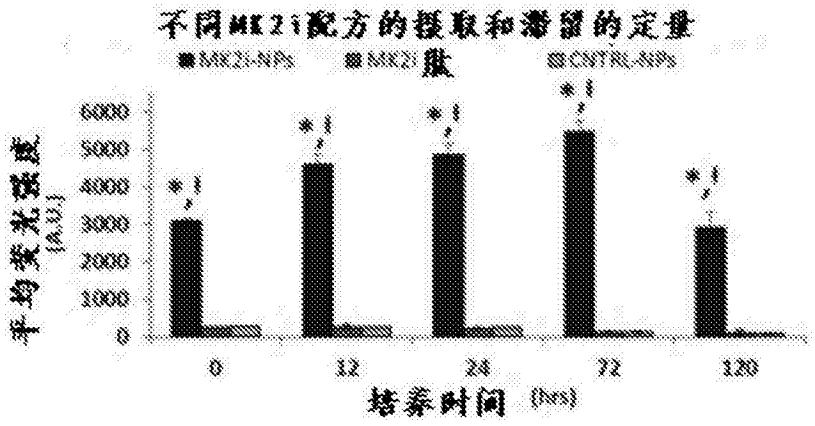

不同MK2i配方的摄取和滞留的定量
MK2i-NPs
MK2i 盐
CNTRL-NPs
平均荧光强度 (A.U.)
培养时间 (hrs)

图 18

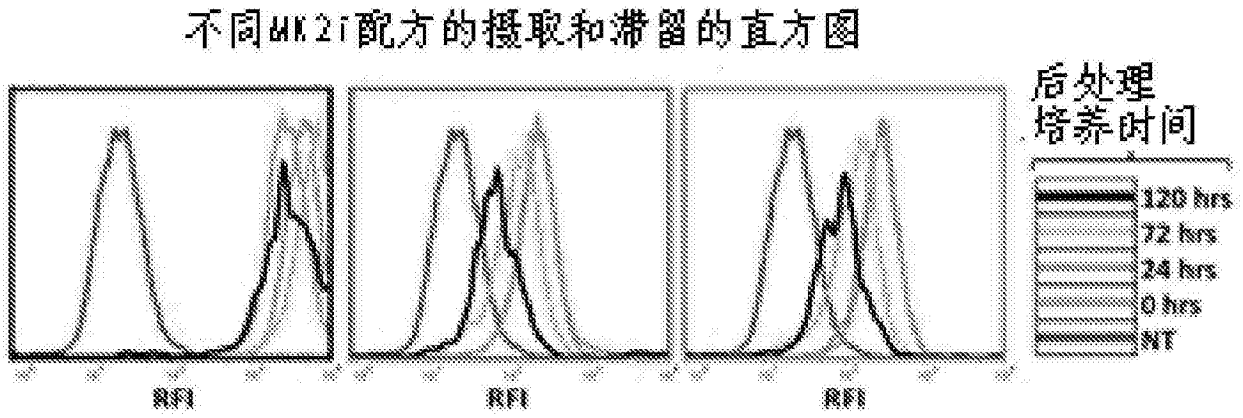

不同MK2i配方的摄取和滞留的直方图
后处理
培养时间
120 hrs
72 hrs
24 hrs
0 hrs
NT
RFI
RFI
RFI

图 19

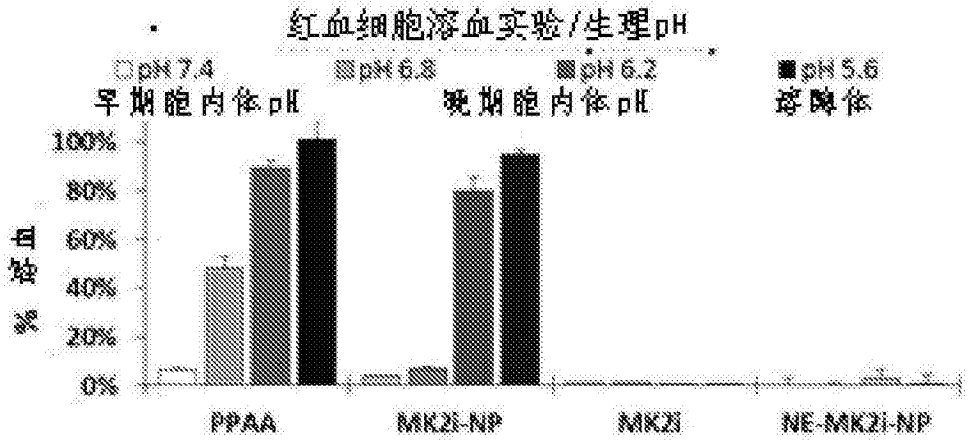

红血细胞溶血实验/生理pH
pH 7.4
pH 6.8
pH 6.2
pH 5.6
早期胞内体pH
晚期胞内体pH
溶酶体
100%
80%
60%
40%
20%
0%
PPAA
MK2i-NP
MK2i
NE-MK2i-NP

图 20

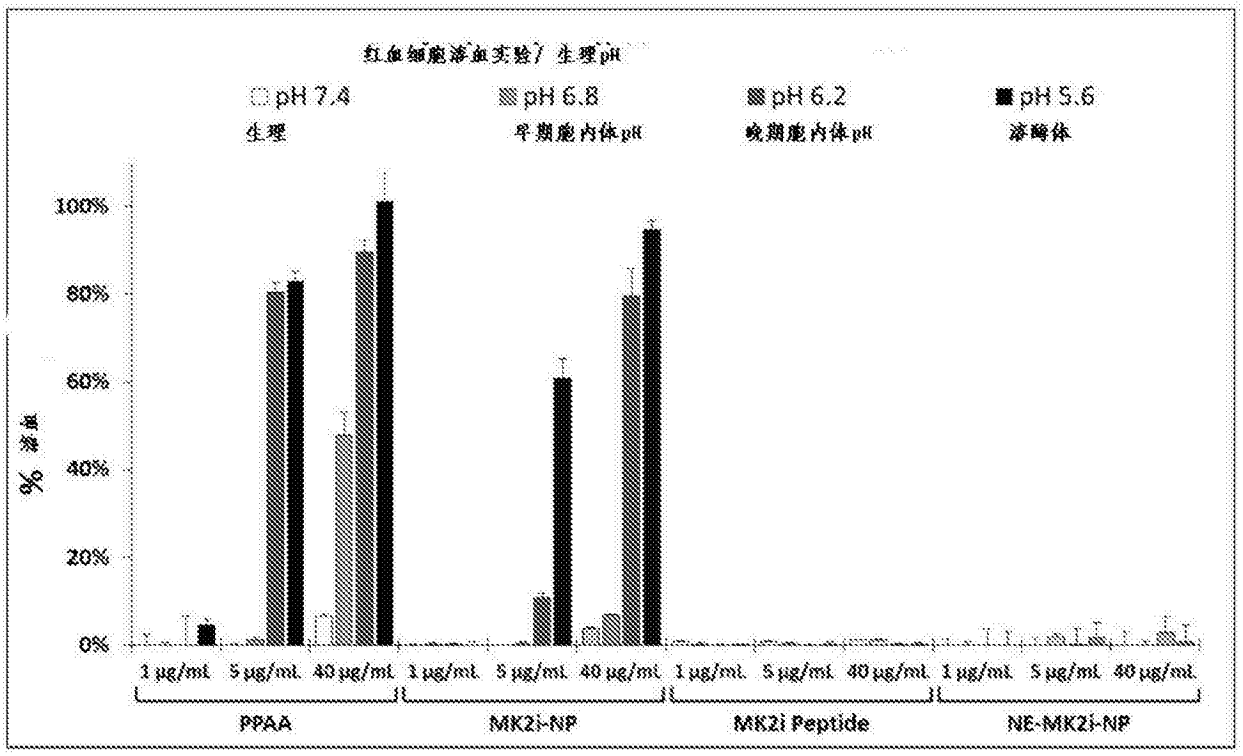

红血细胞溶血实验 / 生理pH
pH 7.4
pH 6.8
pH 6.2
pH 5.6
生理
早期胞内体pH
晚期胞内体pH
溶酶体
% 溶血
100%
80%
60%
40%
20%
0%
1 μg/mL
5 μg/mL
40 μg/mL
PPAA
MK2i-NP
MK2i Peptide
NE-MK2i-NP

图 21

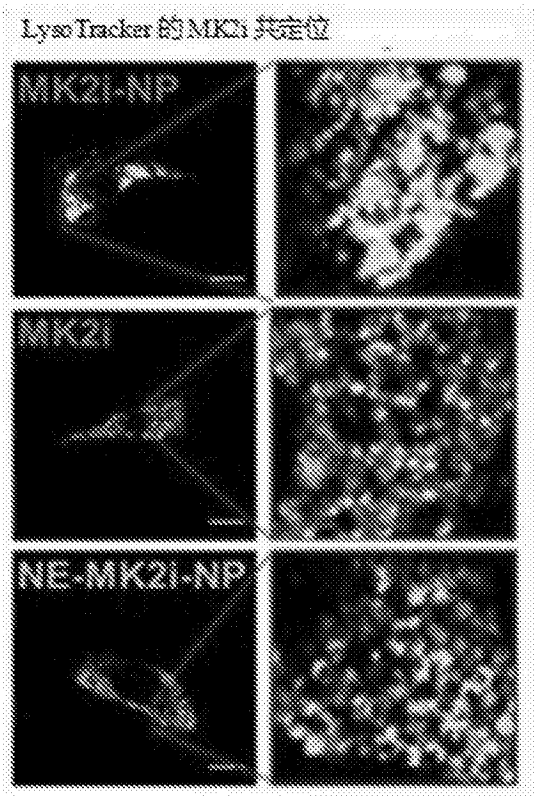

LysoTracker的MK2i共定位
MK2i-NP
MK2i
NE-MK2i-NP

图 22

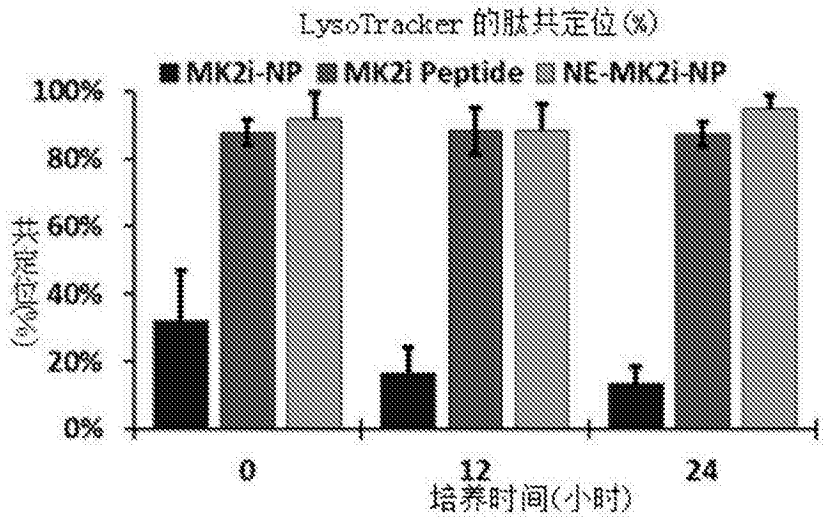

LysoTracker 的肽共定位(%)
MK2i-NP
MK2i Peptide
NE-MK2i-NP
100%
80%
60%
40%
20%
0%
0
12
24
培养时间(小时)

图 23

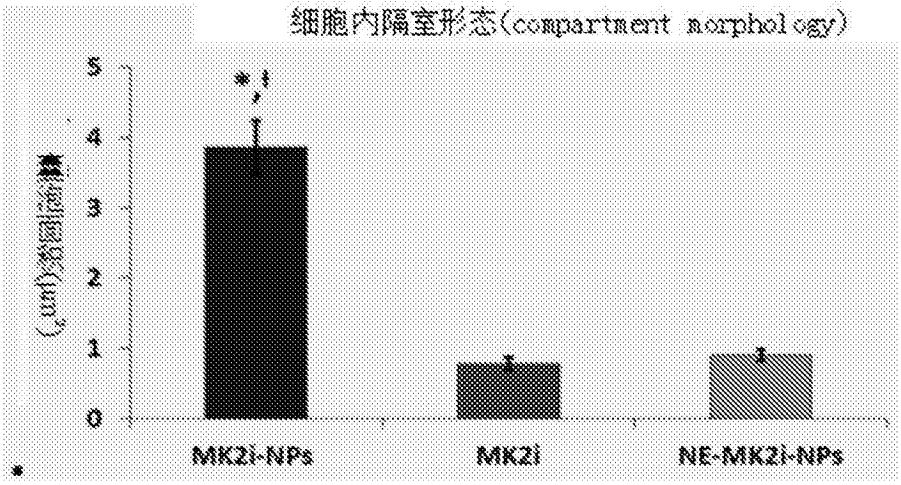

细胞内隔室形态(compartment morphology)
5
4
3
2
1
0
MK2i-NPs
MK2i
NE-MK2i-NPs

图 24

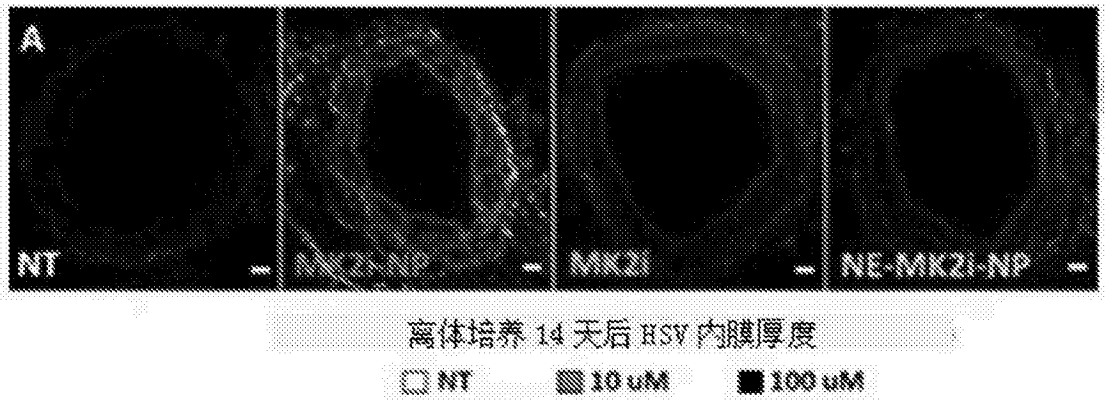

A
NT
MK2i
NE-MK2i-NP
离体培养 14 天后 HSV 内膜厚度
NT
10 uM
100 uM

图 25

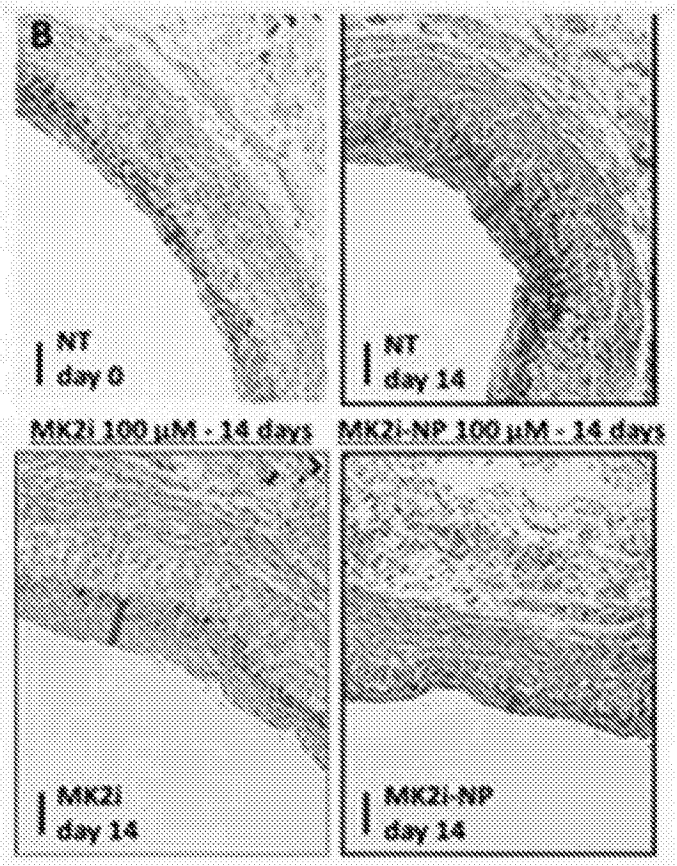

B
NT
day 0
NT
day 14
MK2i 100 μM - 14 days
MK2i-NP 100 μM - 14 days
MK2i
day 14
MK2i-NP
day 14

图 26

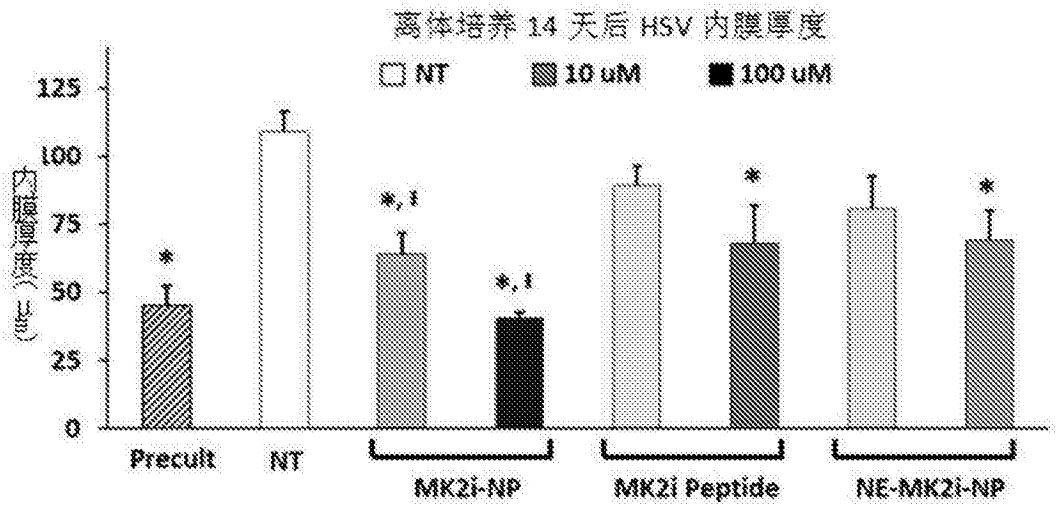

离体培养 14 天后 HSV 内膜厚度
NT
10 uM
100 uM
125
100
75
50
25
0
*
*, ‡
*, ‡
*
*
Precult
NT
MK2i-NP
MK2i Peptide
NE-MK2i-NP

图 27

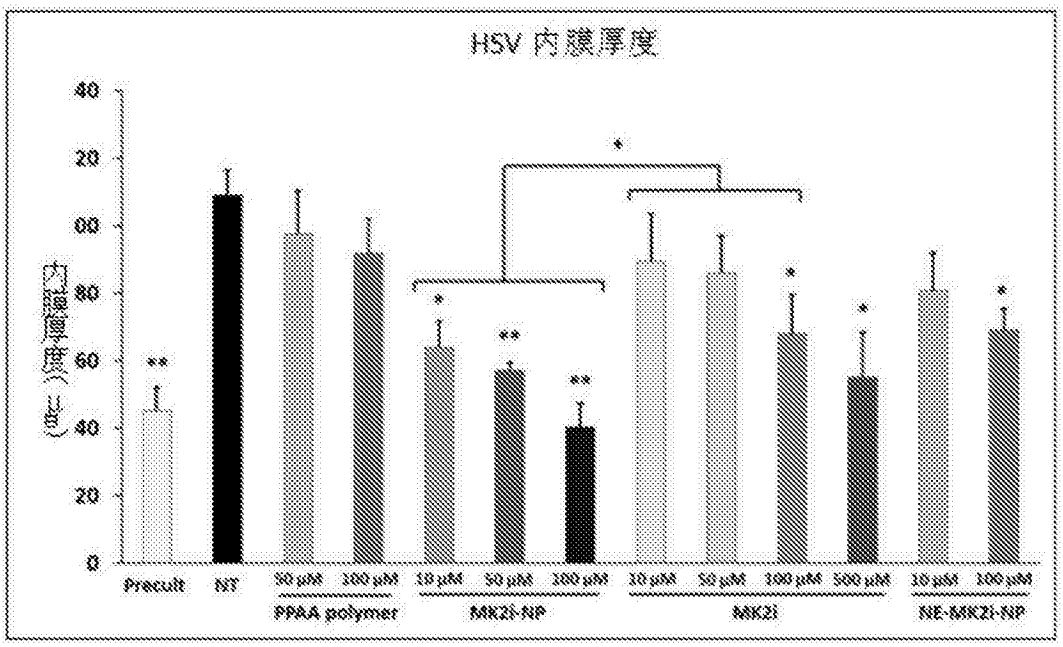

HSV 内膜厚度
内膜厚度(μm)
40
20
00
80
60
40
20
0
Precult
NT
50 μM
100 μM
PPAA polymer
10 μM
50 μM
100 μM
MK2i-NP
10 μM
50 μM
100 μM
500 μM
MK2i
10 μM
100 μM
NE-MK2i-NP

图 28

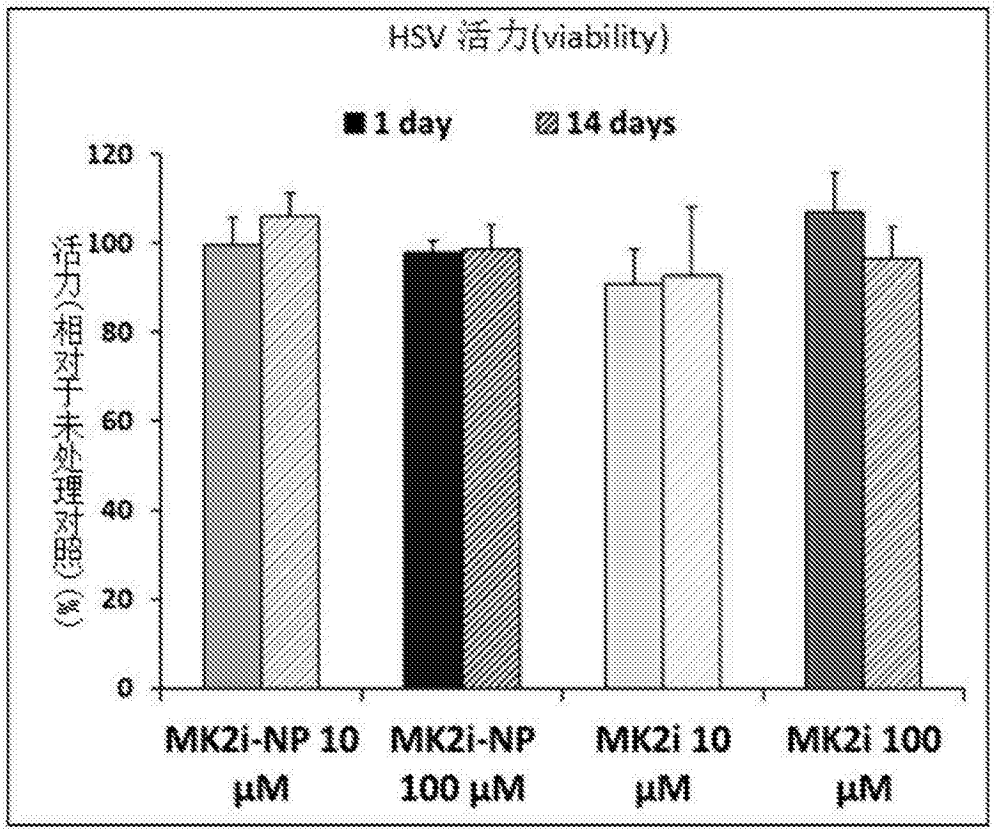

HSV 活力(viability)
1 day
14 days
活力(相对于未处理对照)(%)
120
100
80
60
40
20
0
MK2i-NP 10 μM
MK2i-NP 100 μM
MK2i 10 μM
MK2i 100 μM

图 29

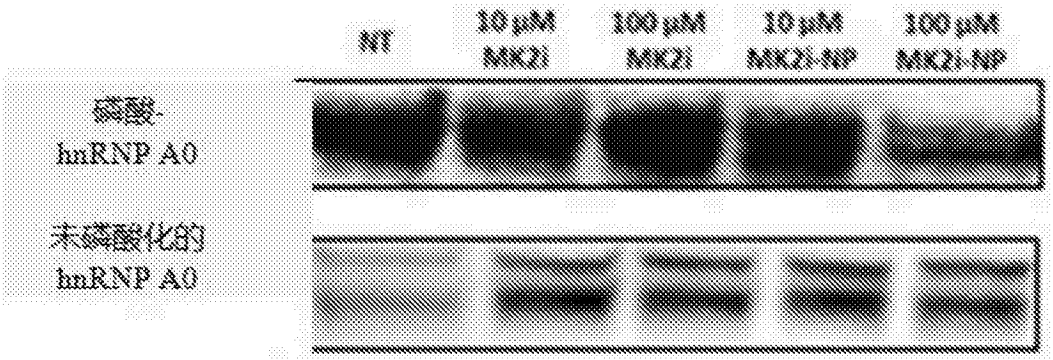

NT
10 μM MK2i
100 μM MK2i
10 μM MK2i-NP
100 μM MK2i-NP
磷酸-hnRNP A0
未磷酸化的 hnRNP A0

图 30

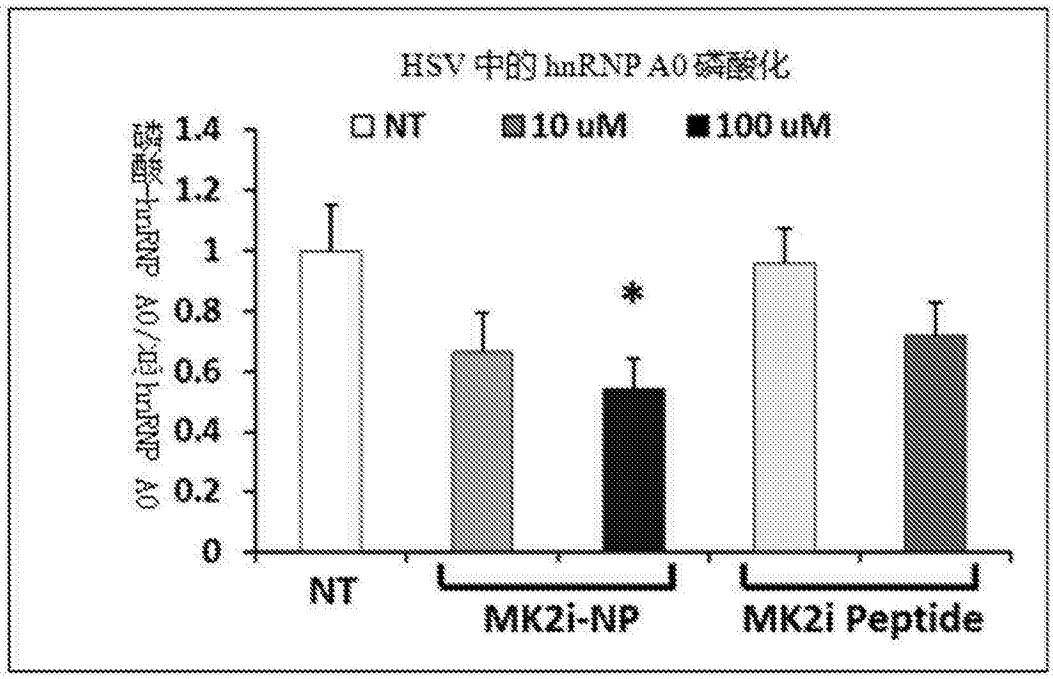

HSV 中的 hnRNP A0 磷酸化
NT
10 uM
100 uM
磷酸-hnRNP A0/未磷酸化 hnRNP A0
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
*
NT
MK2i-NP
MK2i Peptide

图 31

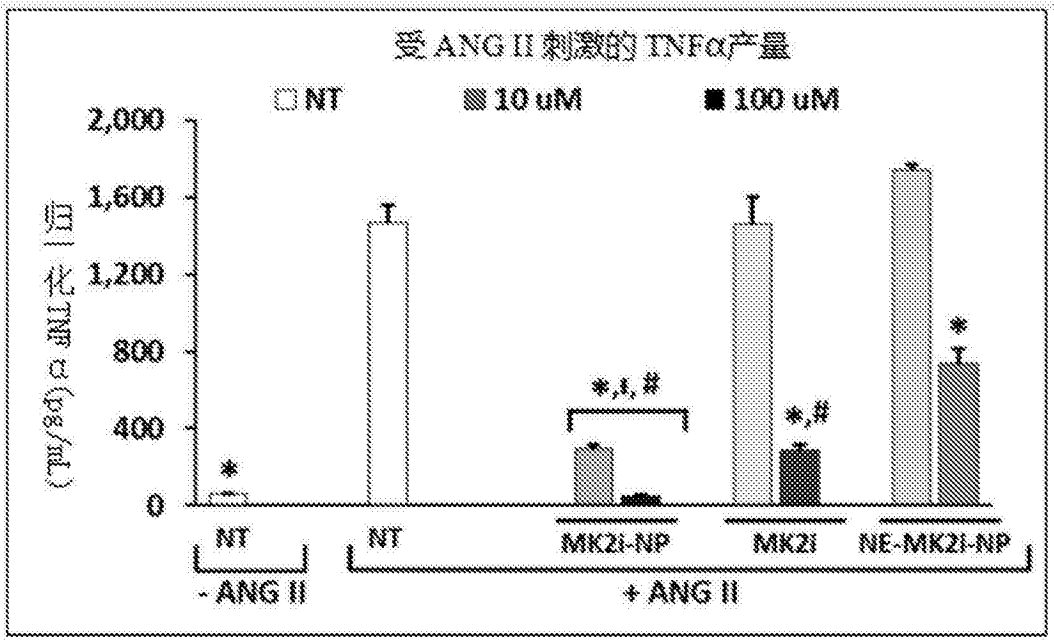

受 ANG II 刺激的 TNFα产量
NT
10 uM
100 uM
2,000
1,600
1,200
800
400
0
TNF α (pg/mL)
*
*,‡, #
*,#
*
NT
NT
MK2i-NP
MK2i
NE-MK2i-NP
- ANG II
+ ANG II

图 32

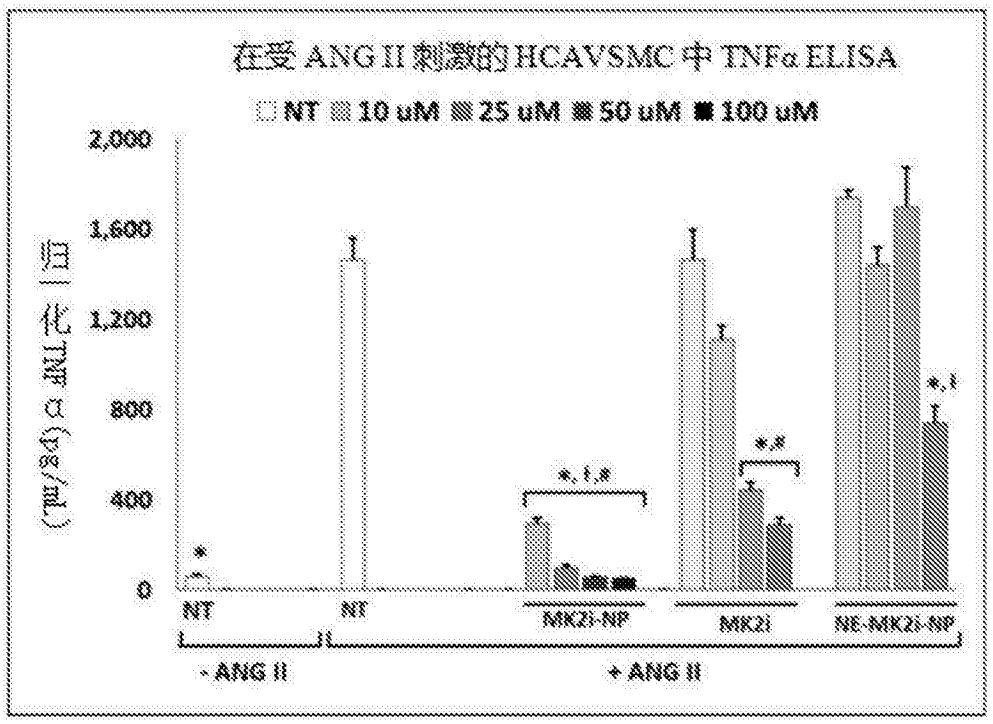

在受 ANG II 刺激的 HCAVSMC 中 TNFα ELISA
NT
10 uM
25 uM
50 uM
100 uM
2,000
1,600
1,200
800
400
0
TNF α (pg/mL)
*
*, ‡,#
*,#
*,‡
NT
NT
MK2i-NP
MK2i
NE-MK2i-NP
- ANG II
+ ANG II

图 33

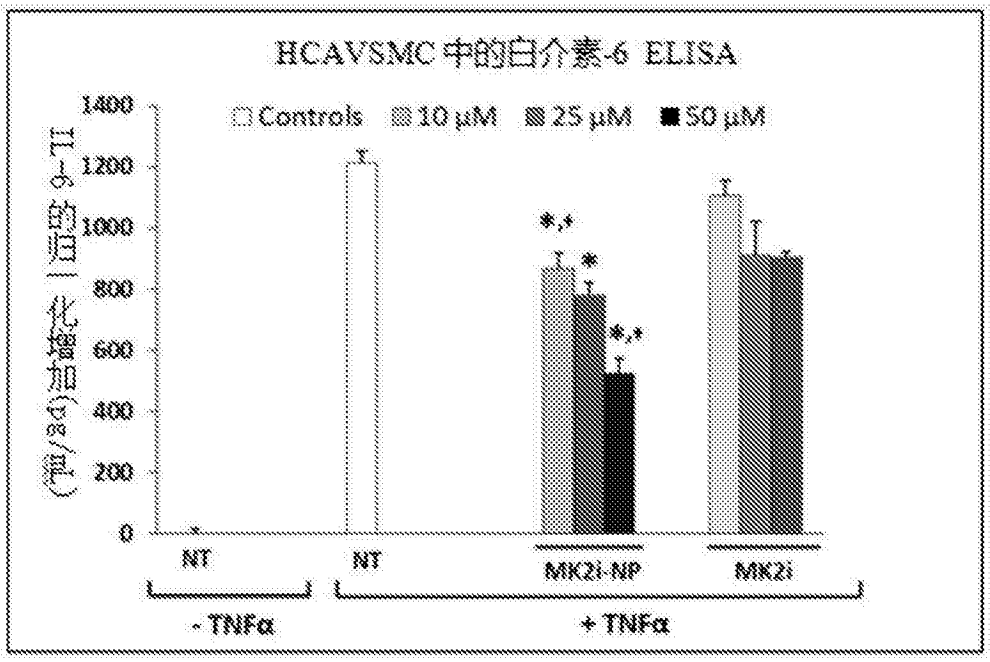

HCAVSMC 中的白介素-6 ELISA
Controls
10 μM
25 μM
50 μM
IL-6 的白介素含量(pg/毫升)
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
*,+
*
*,+
NT
NT
MK2i-NP
MK2i
- TNFα
+ TNFα

图 34

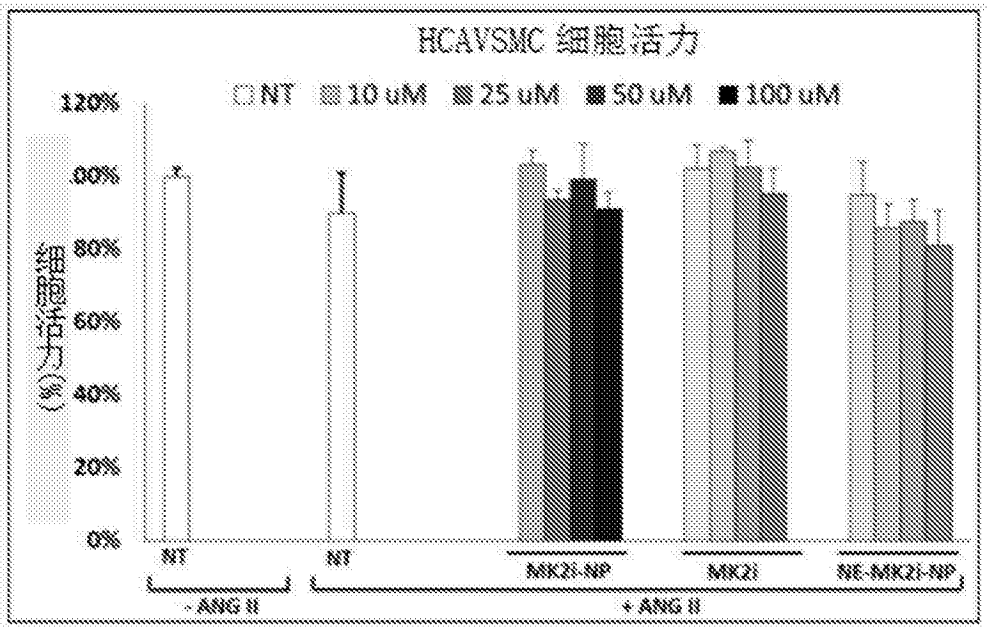

HCAVSMC 细胞活力
NT
10 uM
25 uM
50 uM
100 uM
细胞活力(%)
120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
NT
NT
MK2i-NP
MK2i
NE-MK2i-NP
- ANG II
+ ANG II

图 35

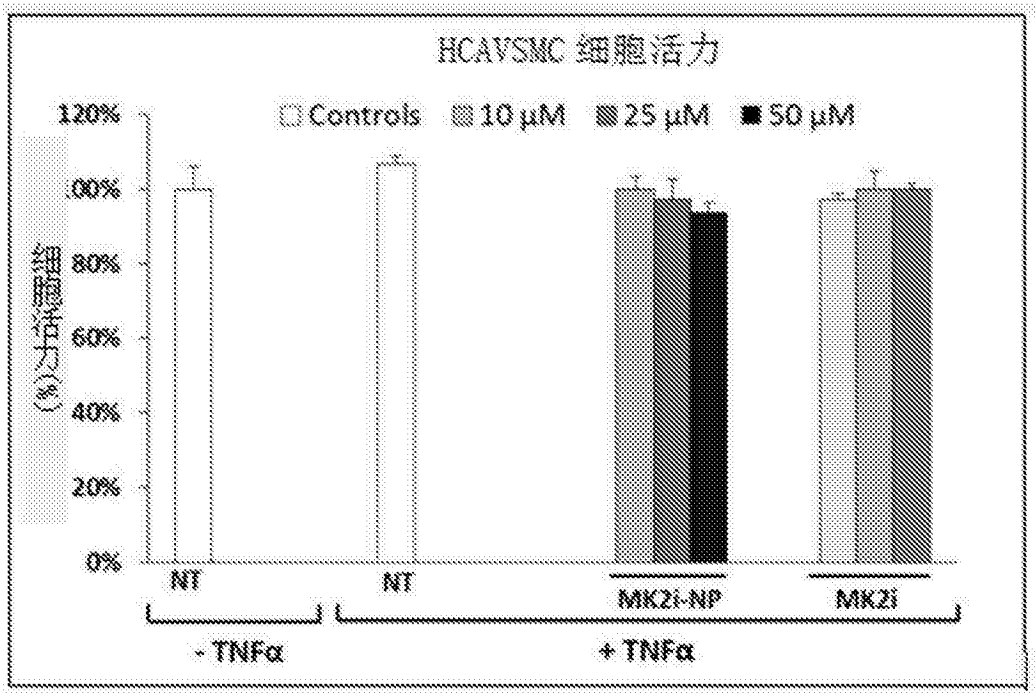

HCAVSMC 细胞活力
Controls
10 μM
25 μM
50 μM
120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
细胞活力(%)
NT
NT
MK2i-NP
MK2i
- TNFα
+ TNFα

图 36

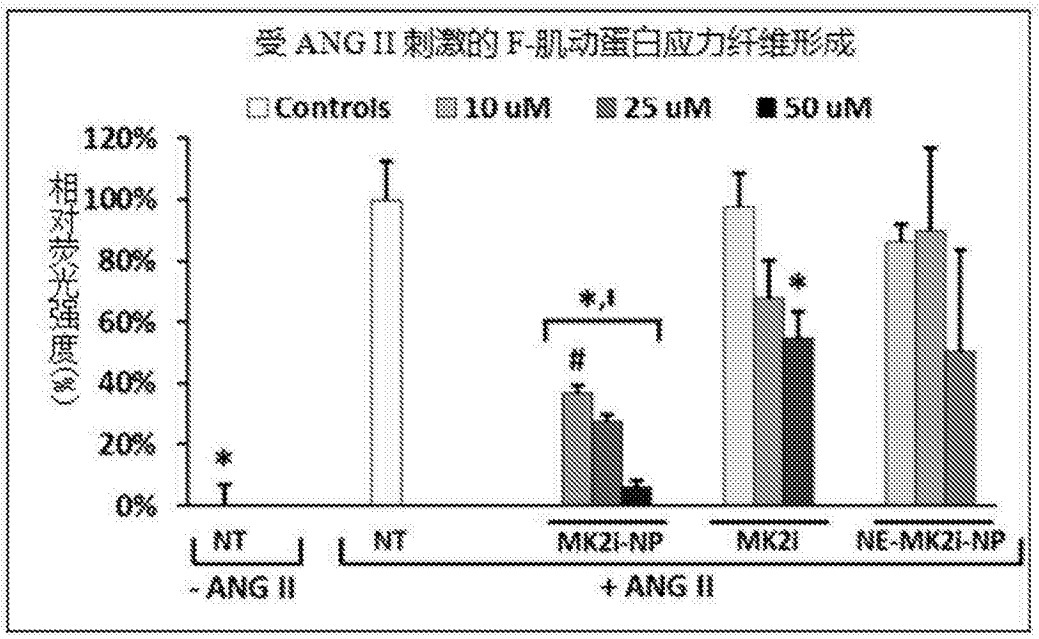

受 ANG II 刺激的 F-肌动蛋白应力纤维形成
Controls
10 uM
25 uM
50 uM
120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
相对荧光强度(%)
*
*,#
#
*
NT
NT
MK2i-NP
MK2i
NE-MK2i-NP
- ANG II
+ ANG II

图 37

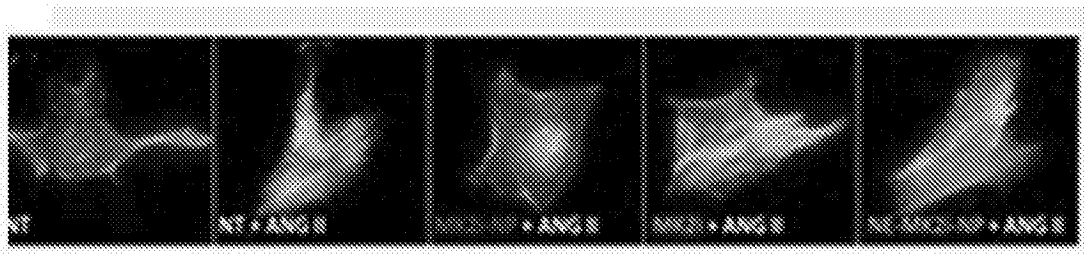


图 38

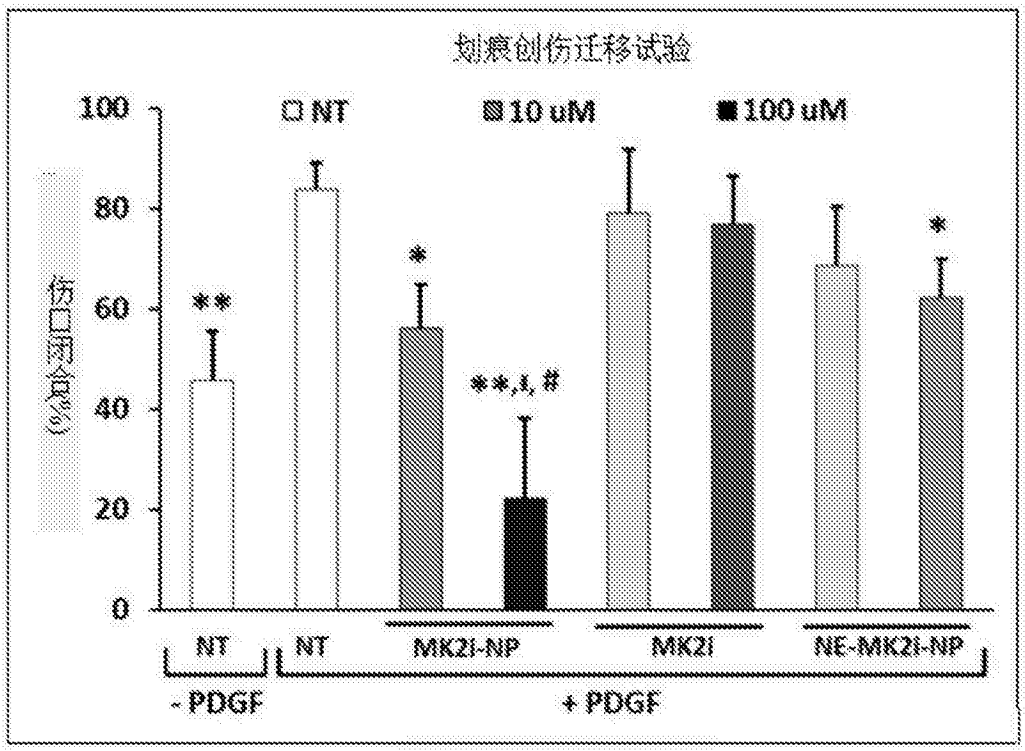

划痕创伤迁移试验
NT
10 uM
100 uM
伤口宽度(%)
100
80
60
40
20
0
**
*
**,‡, #
*
NT
NT
MK2i-NP
MK2i
NE-MK2i-NP
- PDGF
+ PDGF

图 39

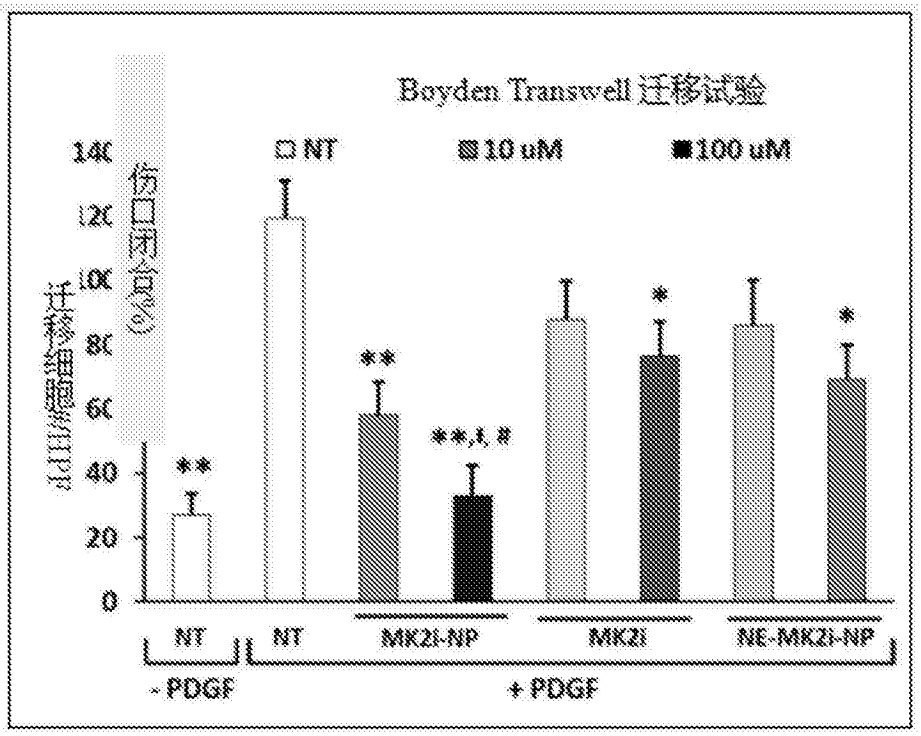

Boyden Transwell 迁移试验
□ NT
▨ 10 uM
■ 100 uM
14
12
10
8
6
40
20
0
**
**
**,‡, #
*
*
NT
NT
MK2i-NP
MK2i
NE-MK2i-NP
- PDGF
+ PDGF

图 40

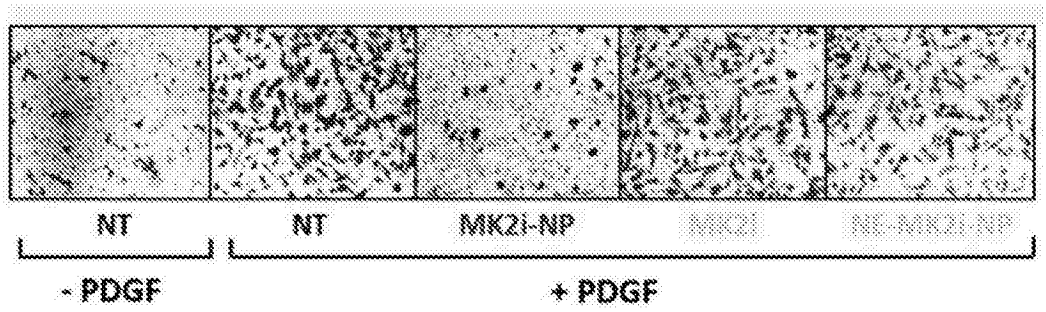

NT
NT
MK2i-NP
MK2i
NE-MK2i-NP
- PDGF
+ PDGF

图 41

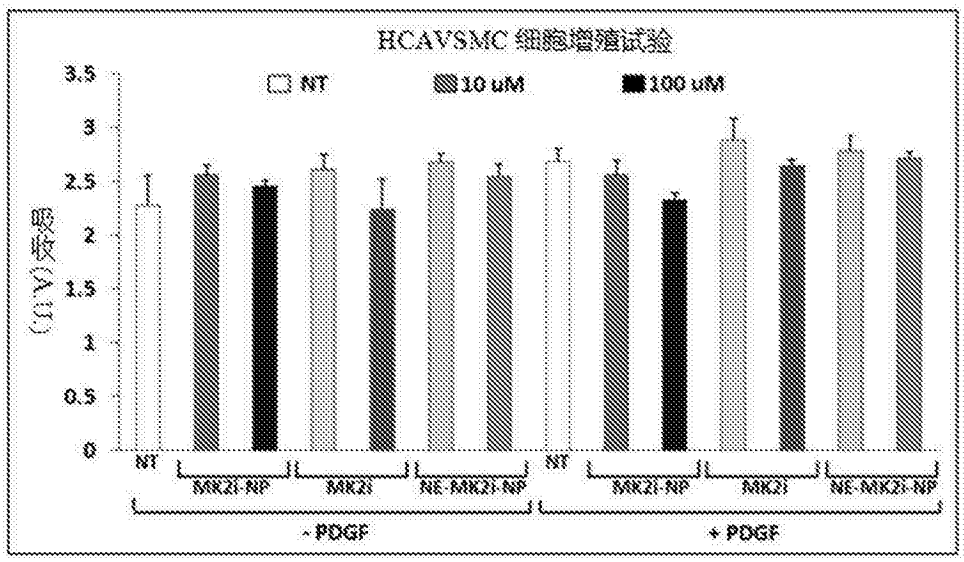

HCAVSMC 细胞增殖试验
NT
10 uM
100 uM
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
吸收(A.U.)
NT
MK2i-NP
MK2i
NE-MK2i-NP
NT
MK2i-NP
MK2i
NE-MK2i-NP
- PDGF
+ PDGF

图 42

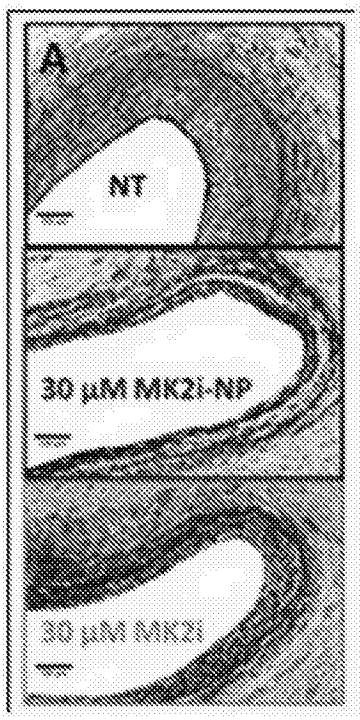

A
NT
30 μM MK2i-NP
30 μM MK2i

图 43

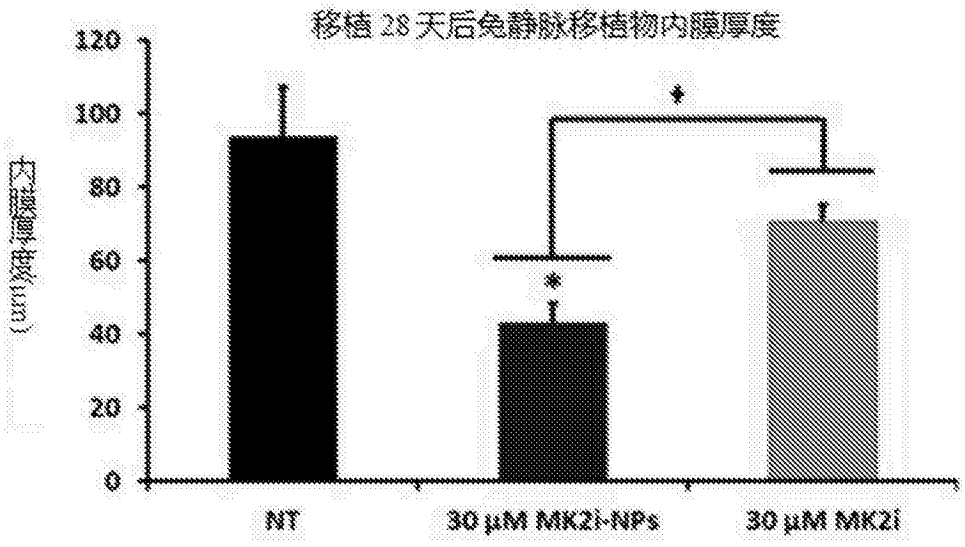

移植 28 天后兔静脉移植物内膜厚度
120
100
80
60
40
20
0
NT
30 μM MK2i-NPs
30 μM MK2i

图 44

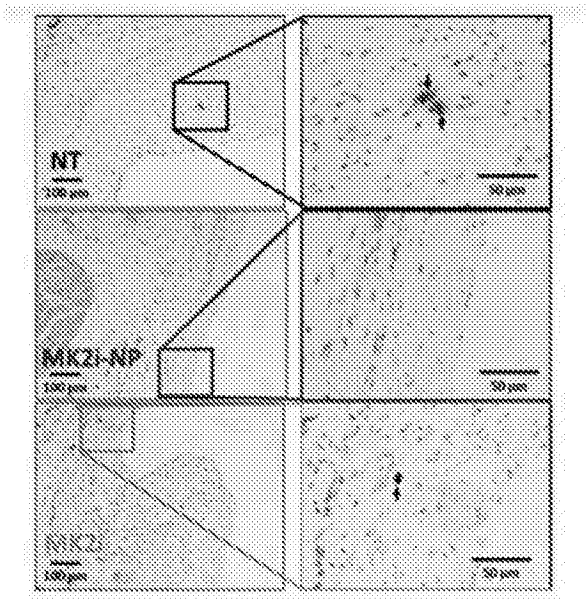

NT
MK2i-NP

图 45

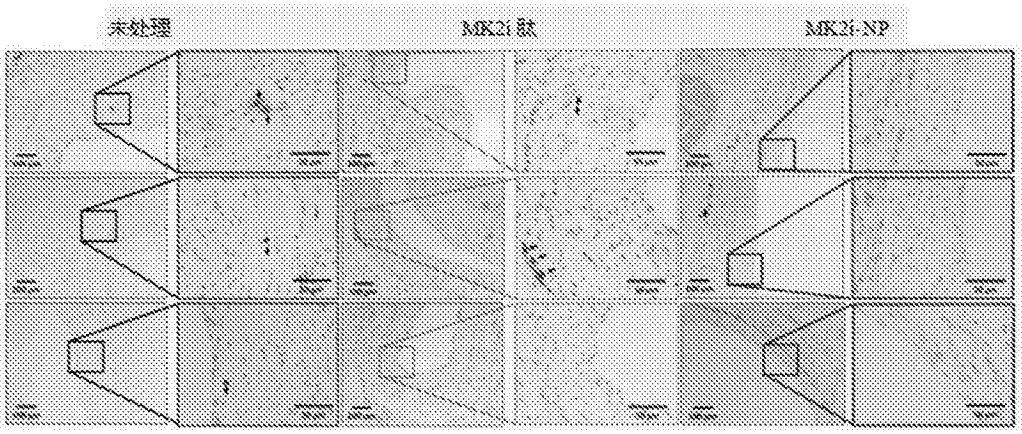

未处理
MK2i 缺
MK2i-NP

图 46

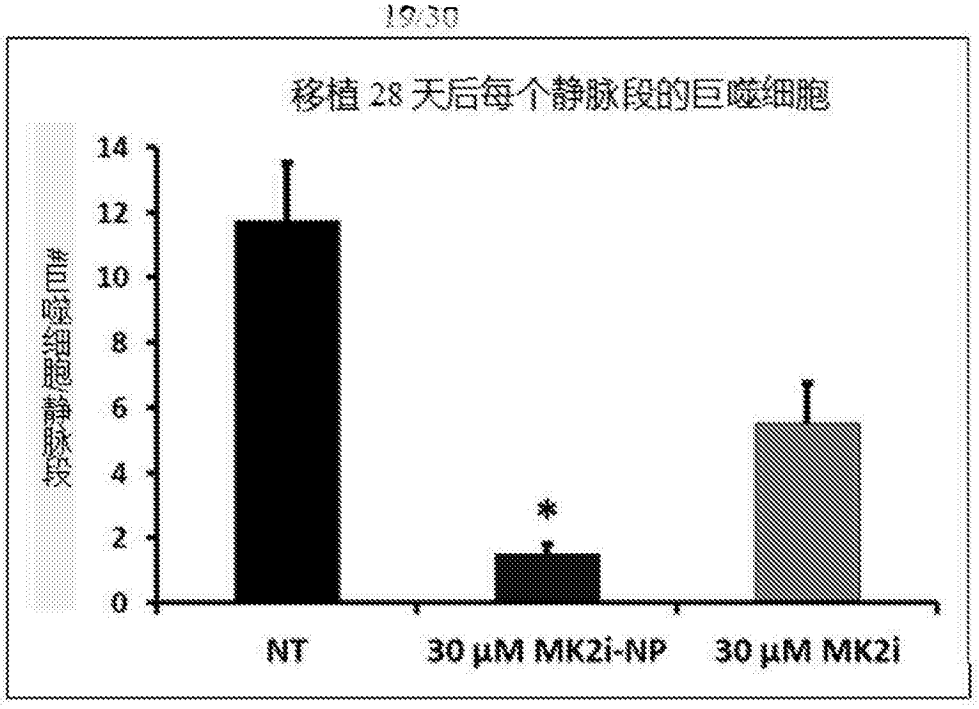

19/30
移植 28 天后每个静脉段的巨噬细胞
14
12
10
8
6
4
2
0
*
NT
30 μM MK2i-NP
30 μM MK2i

图 47

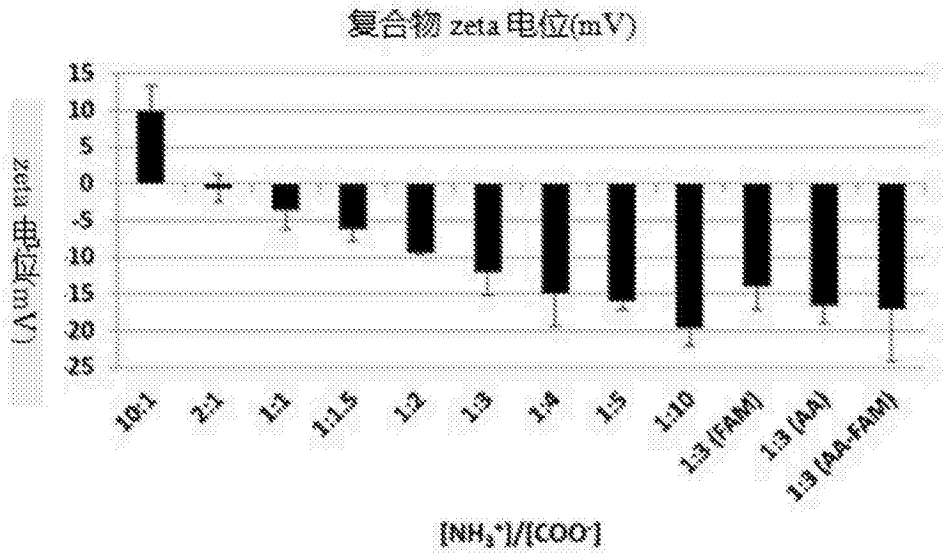

复合物 zeta 电位(mV)
zeta 电位(mV)
15
10
5
0
-5
-10
-15
-20
-25
10:1
2:1
1:1
1:1.5
1:2
1:3
1:4
1:5
1:10
1:3 (FAM)
1:3 (AA)
1:3 (AA-FAM)
[NH3+]/[COO-]

图 48

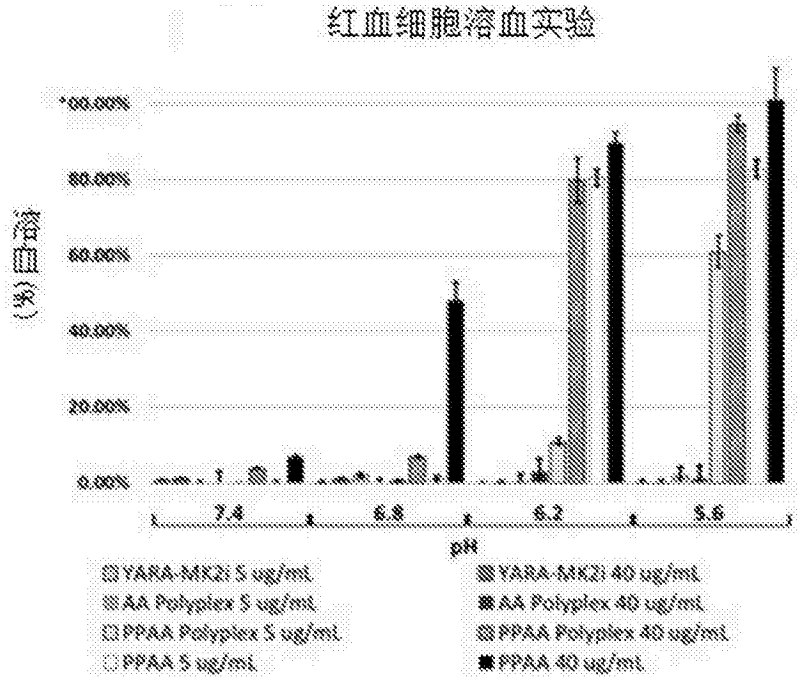

红血细胞溶血实验
溶血(%)
100.00%
80.00%
60.00%
40.00%
20.00%
0.00%
7.4
6.8
6.2
5.6
pH
YARA-MK2i 5 ug/mL
AA Polyplex 5 ug/mL
PPAA Polyplex 5 ug/mL
PPAA 5 ug/mL
YARA-MK2i 40 ug/mL
AA Polyplex 40 ug/mL
PPAA Polyplex 40 ug/mL
PPAA 40 ug/mL

图 49

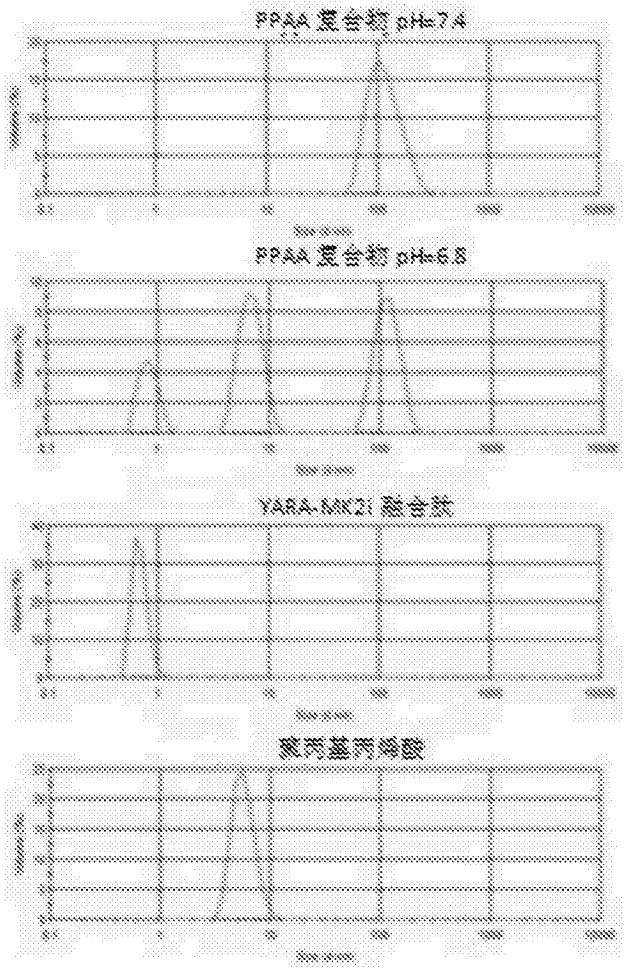


图 50

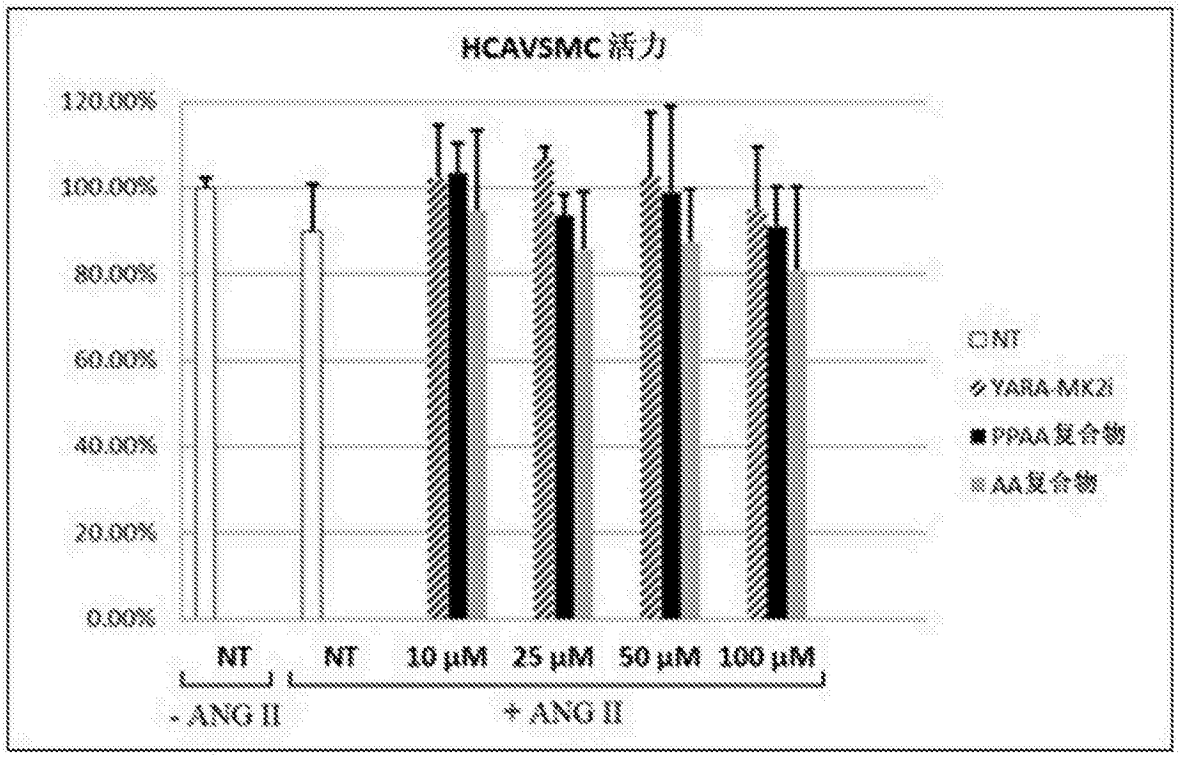

HCAVSMC 活力
120.00%
100.00%
80.00%
60.00%
40.00%
20.00%
0.00%
NT
YARA-MK2i
PPAA复合物
AA复合物
NT
NT
10 μM
25 μM
50 μM
100 μM
- ANG II
+ ANG II

图 51

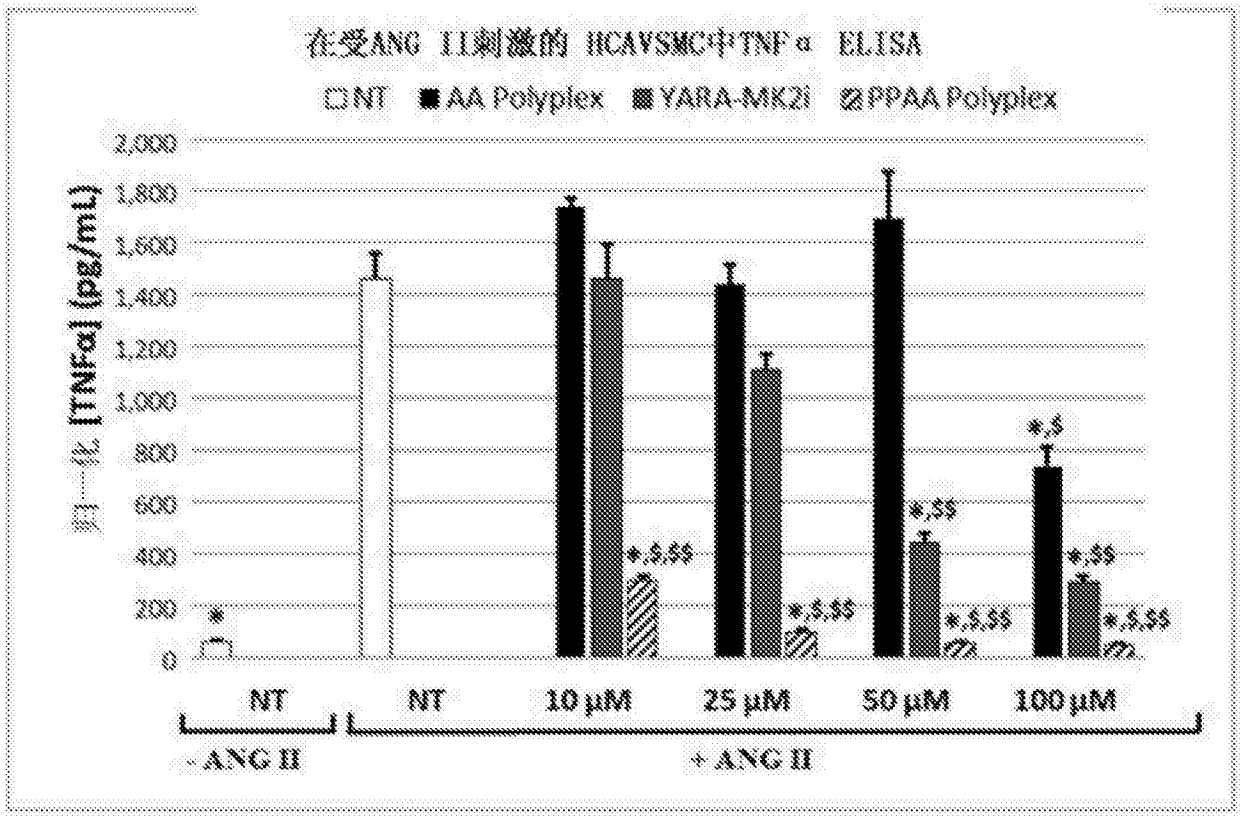

在受ANG II刺激的 HCAVSMC中TNF α ELISA
NT
AA Polyplex
YARA-MK2i
PPAA Polyplex
[TNFα] (pg/mL)
2,000
1,800
1,600
1,400
1,200
1,000
800
600
400
200
0
*
*,$,$$
*,$,$$
*,$,$$
*,$
*,$$
*,$$
*,$,$$
*,$,$$
NT
NT
10 μM
25 μM
50 μM
100 μM
- ANG II
+ ANG II

图 52

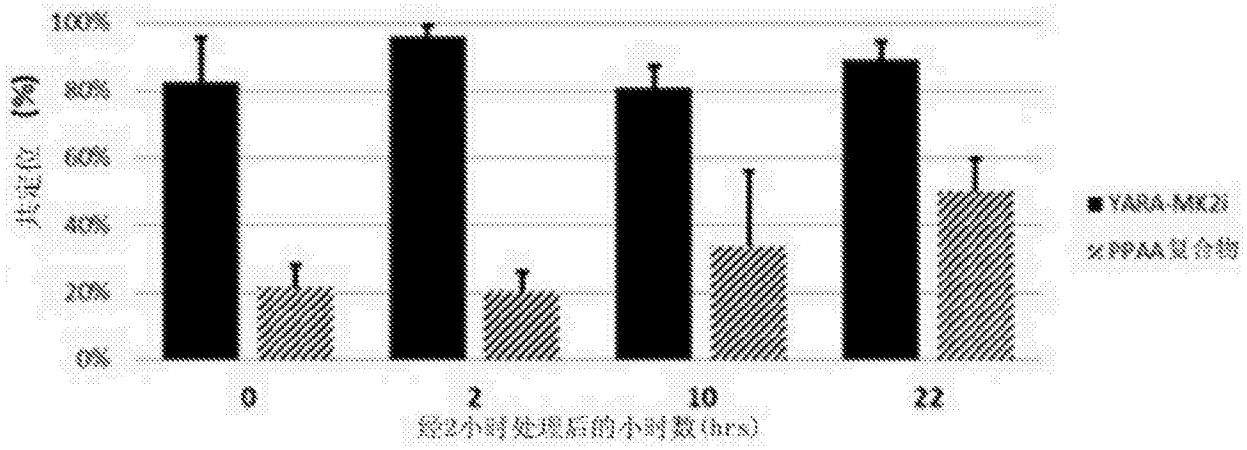

100%
80%
60%
40%
20%
0%
共定位(%)
0
2
10
22
给2小时处理后的小时数(hrs)
YARA-MK2i
PPAA复合物

图 53

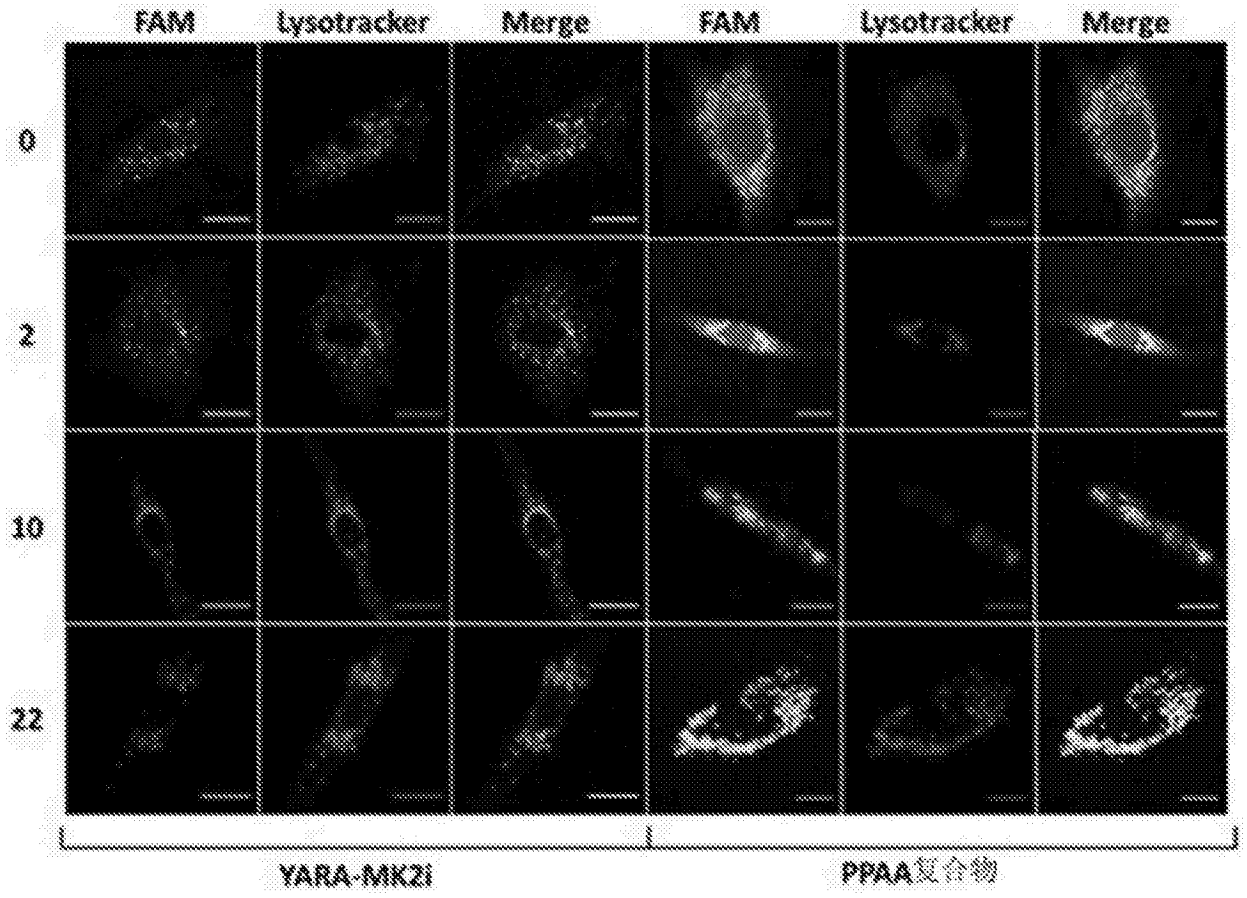

FAM
Lysotracker
Merge
FAM
Lysotracker
Merge
0
2
10
22
YARA-MK2i
PPAA复合物

图 54

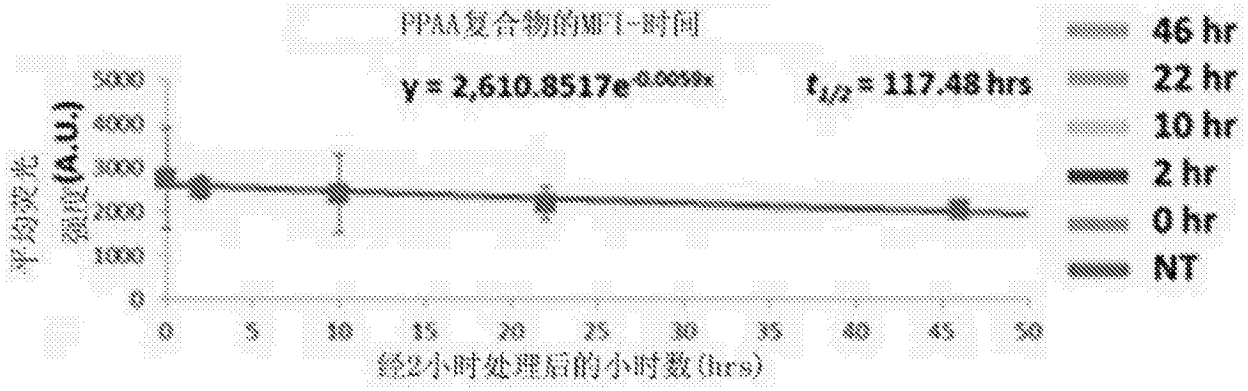

PPAA复合物的MFI-时间
y = 2,610.8517e^-0.009x
t1/2 = 117.48 hrs
平均荧光强度(A.U.)
5000
4000
3000
2000
1000
0
0 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50
经过小时处理后的小时数(hrs)
46 hr
22 hr
10 hr
2 hr
0 hr
NT

图 55

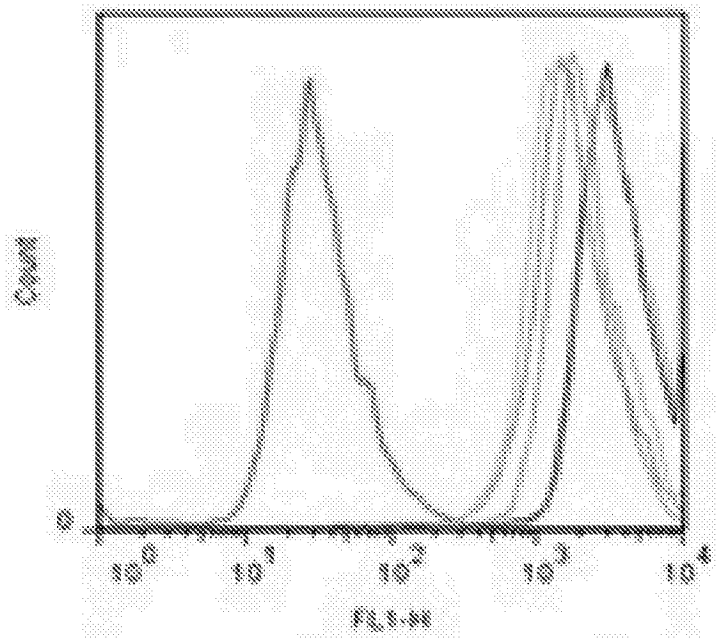

0
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4

图 56

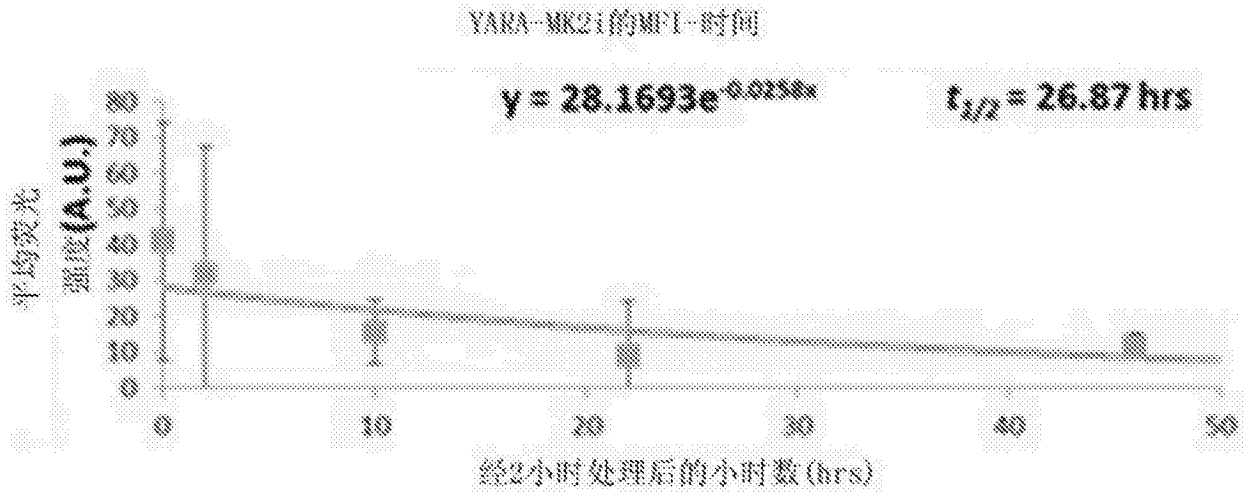

YARA-MK2i的MFI-时间
y = 28.1693e^-0.025Bx
t1/2 = 26.87 hrs
平均荧光强度(A.U.)
0
10
20
30
40
50
经2小时处理后的小时数(hrs)

图 57

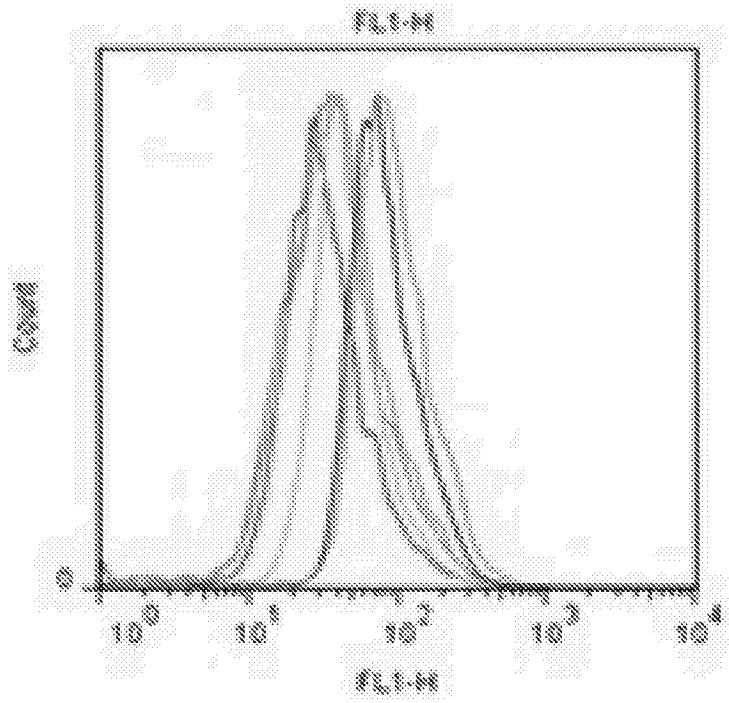

FL1-H
Count
0
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
FL1-H

图 58

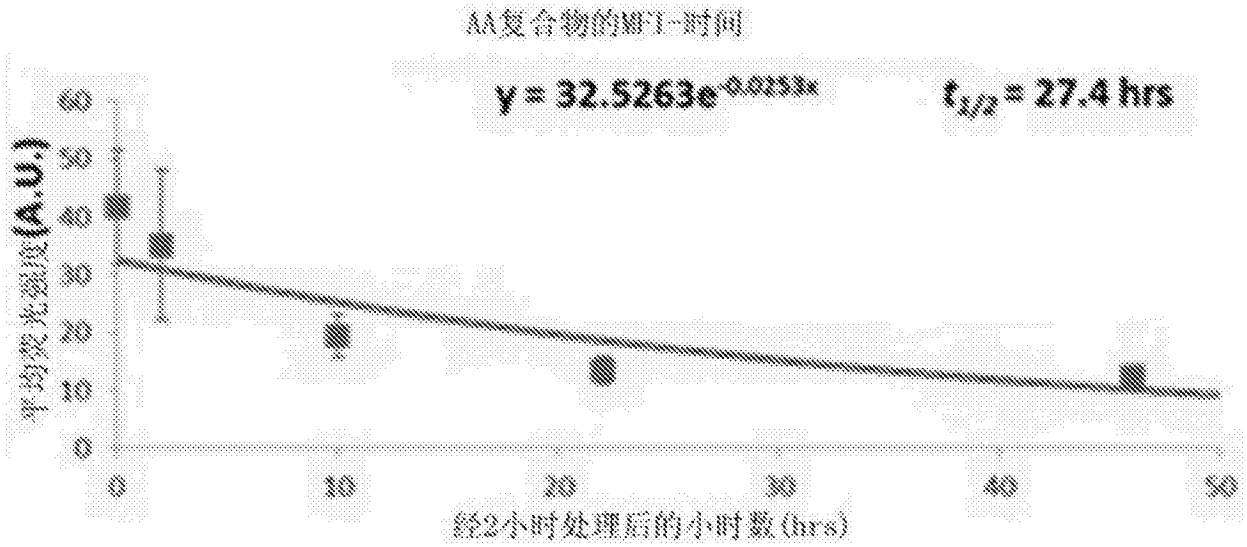

AA复合物的MFI-时间
y = 32.5263e-0.0253x
t1/2 = 27.4 hrs
平均荧光强度(A.U.)
60
50
40
30
20
10
0
0
10
20
30
40
50
经2小时处理后的小时数(hrs)

图 59

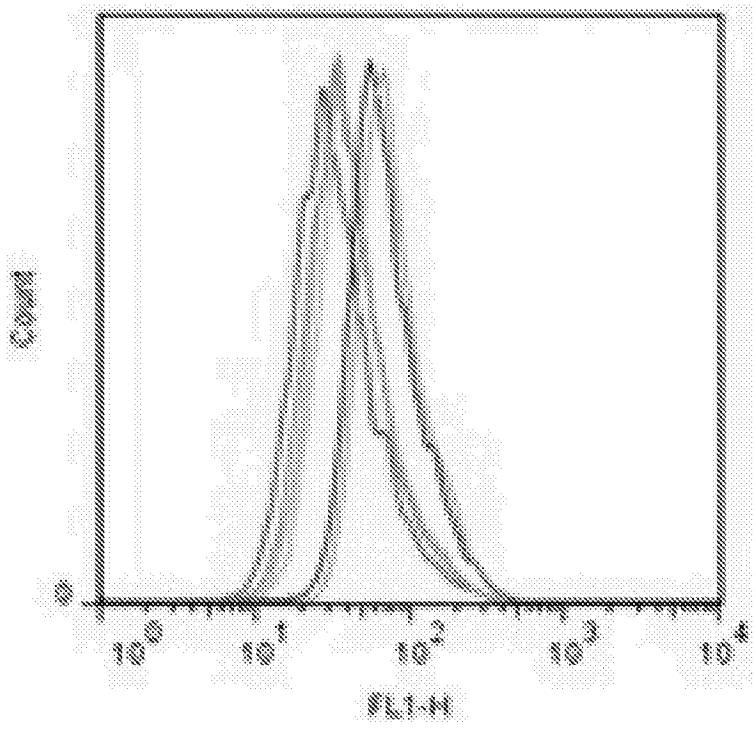

Count
0
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
FL1-H

图 60

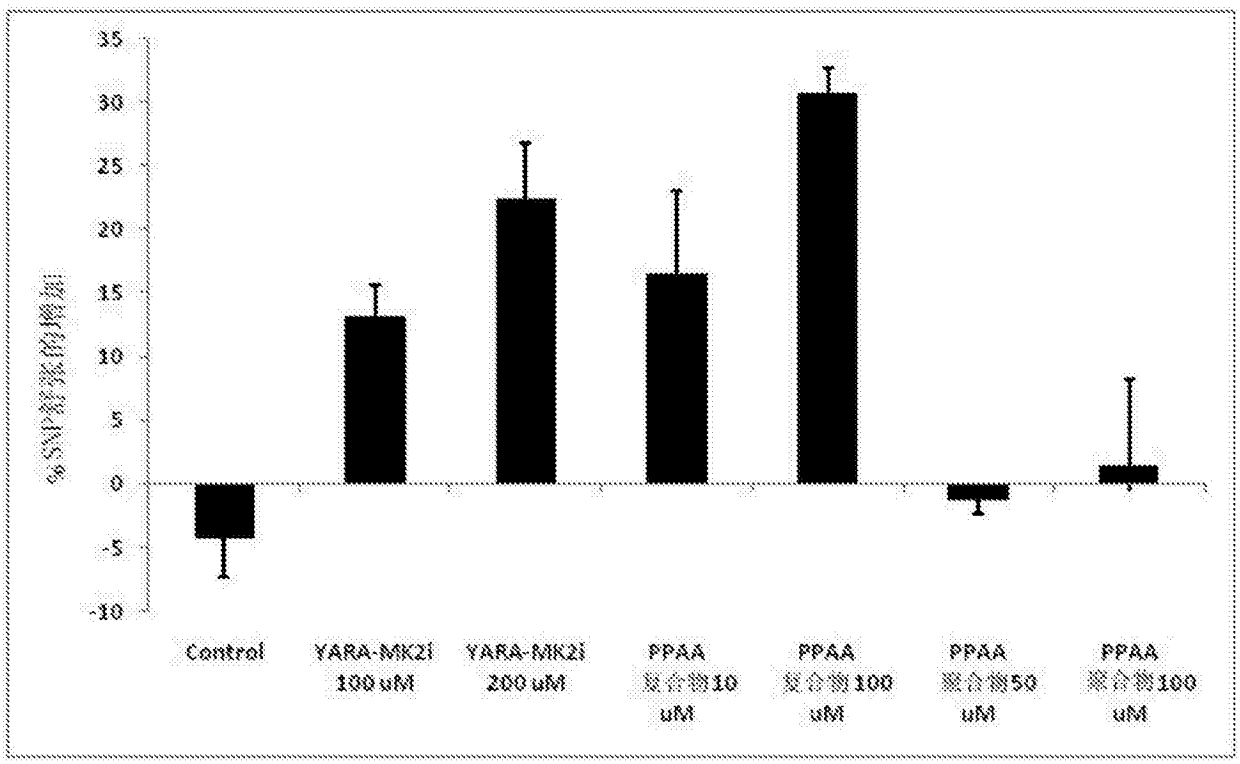

35
30
25
20
15
10
5
0
-5
-10
Control
YARA-MK2i 100 uM
YARA-MK2i 200 uM
PPAA 复合物10 uM
PPAA 复合物100 uM
PPAA 复合物50 uM
PPAA 复合物100 uM

图 61

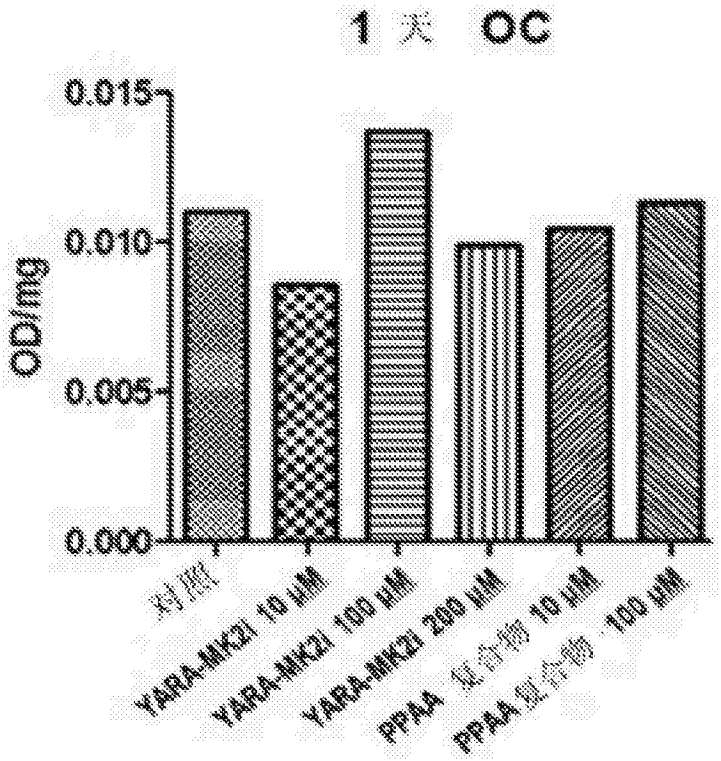

1 天 OC
0.015
0.010
0.005
0.000
OD/mg
对照
YARA-MK2i 10 uM
YARA-MK2i 100 uM
YARA-MK2i 200 uM
PPAA 复合物 10 uM
PPAA复合物 100 uM

图 62

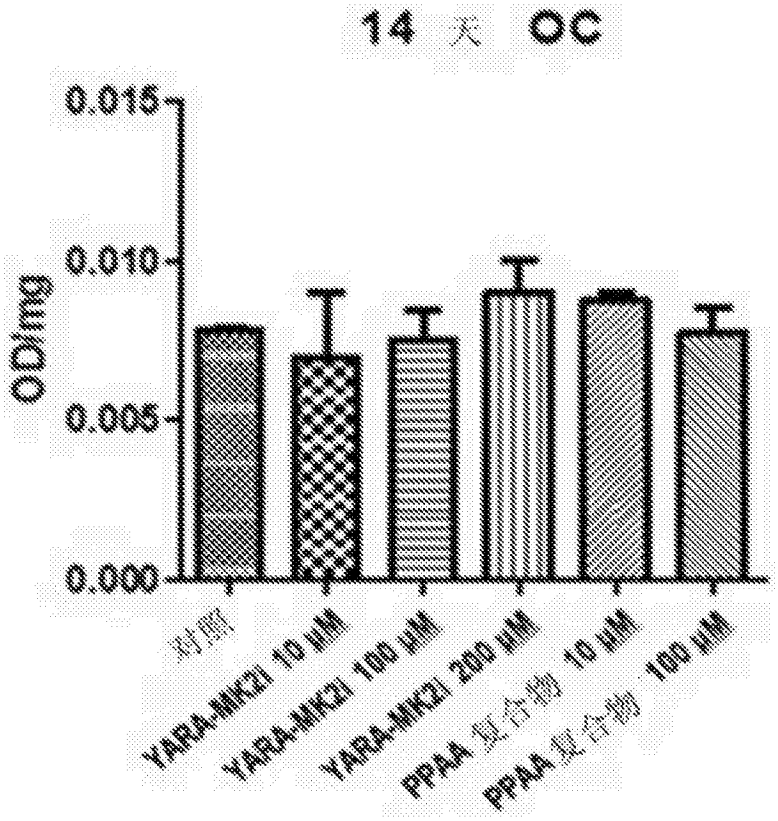

14 天 OC
0.015
0.010
0.005
0.000
OD/mg
对照
YARA-MK2i 10 μM
YARA-MK2i 100 μM
YARA-MK2i 200 μM
PPAA 复合物 10 μM
PPAA 复合物 100 μM

图 63

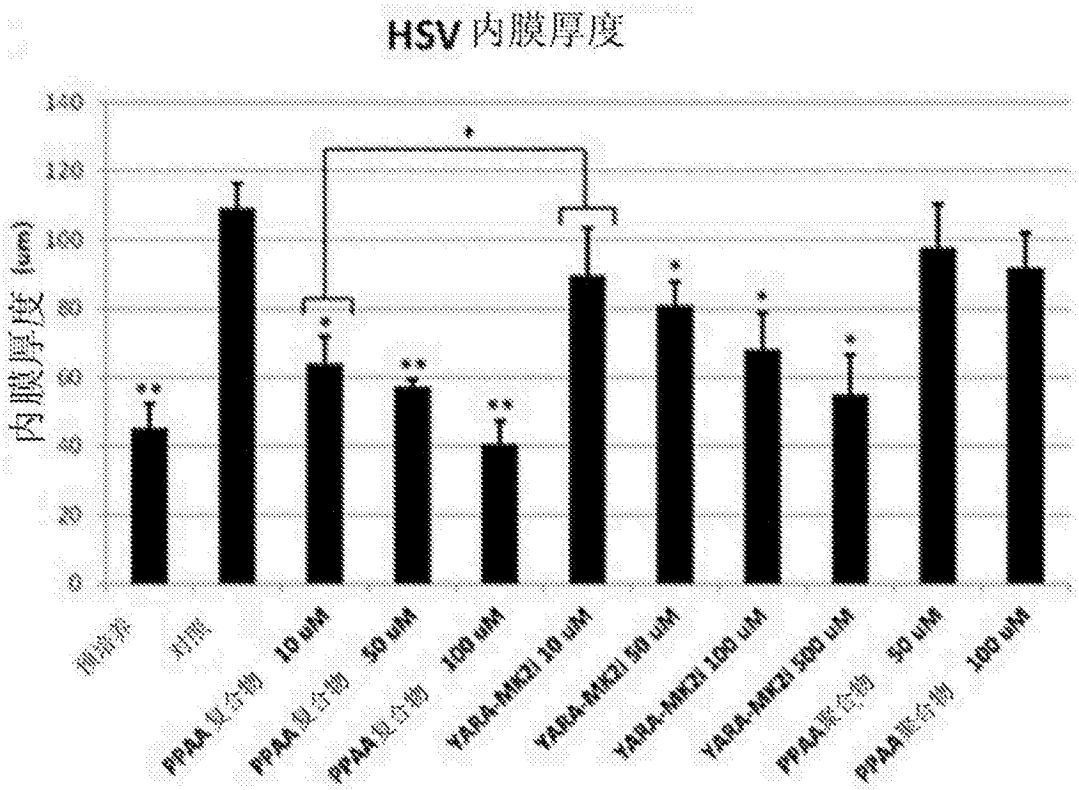

HSV 内膜厚度
内膜厚度 (um)
0
20
40
60
80
100
120
140
*
**
正常对照
对照
10 uM
50 uM
100 uM
PPAR 复合物
YARA-MRX21 10 uM
YARA-MRX21 50 uM
YARA-MRX21 100 uM
YARA-MRX21 500 uM
50 uM
100 uM

图 64

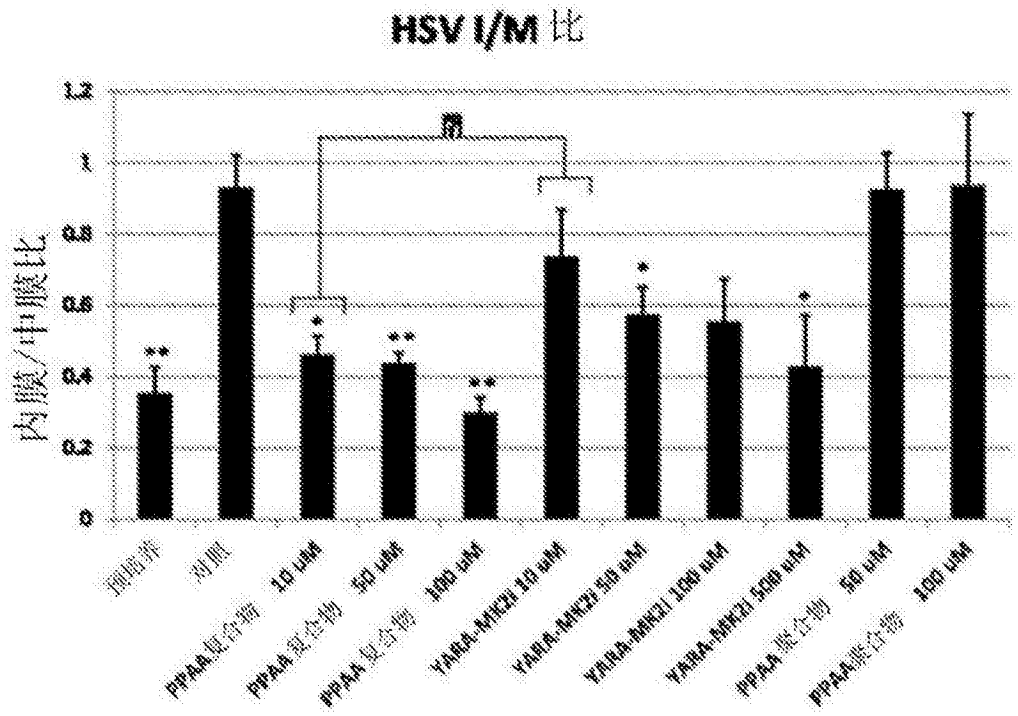

HSV I/M 比
内膜/中膜比
0
0.2
0.4
0.6
0.8
1
1.2
*
**
正常对照
对照
10 uM
50 uM
100 uM
PPAR 复合物
YARA-MRX21 10 uM
YARA-MRX21 50 uM
YARA-MRX21 100 uM
YARA-MRX21 500 uM
50 uM
100 uM

图 65

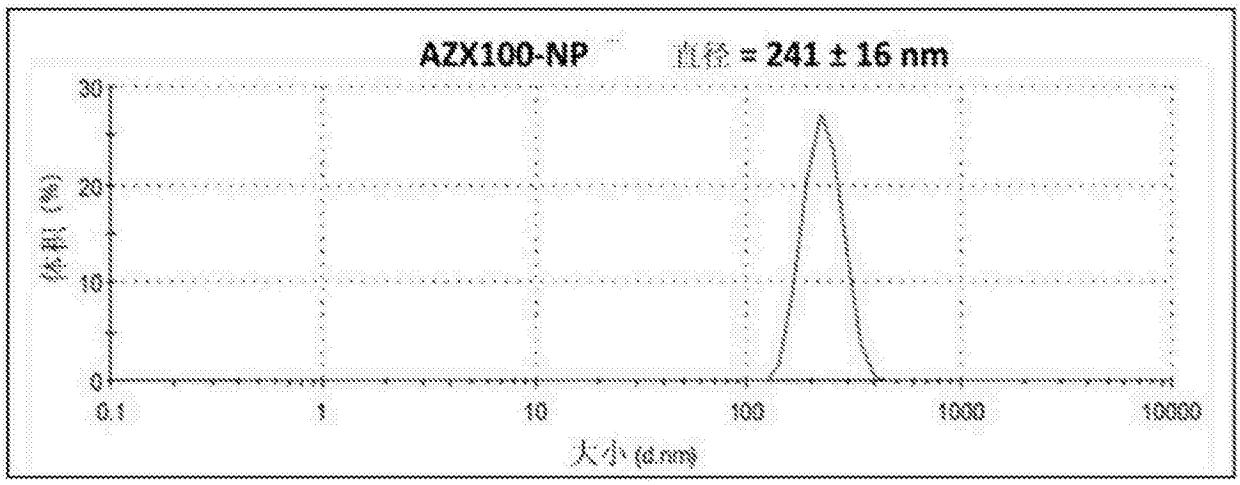

AZX100-NP
直径 = 241 ± 16 nm
30
20
10
0
0.1
1
10
100
1000
10000
大小 (d.nm)

图 66

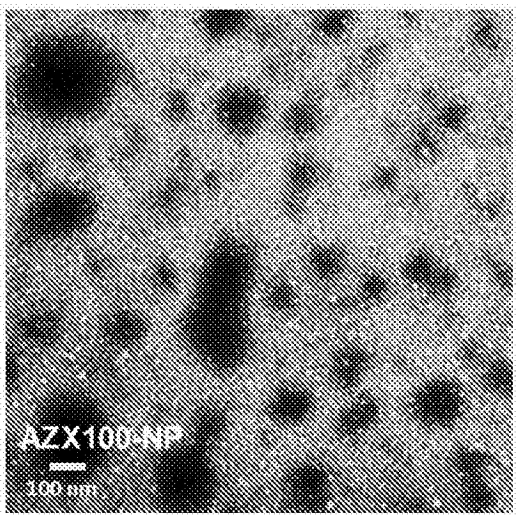

AZX100-NP
100 nm

图 67

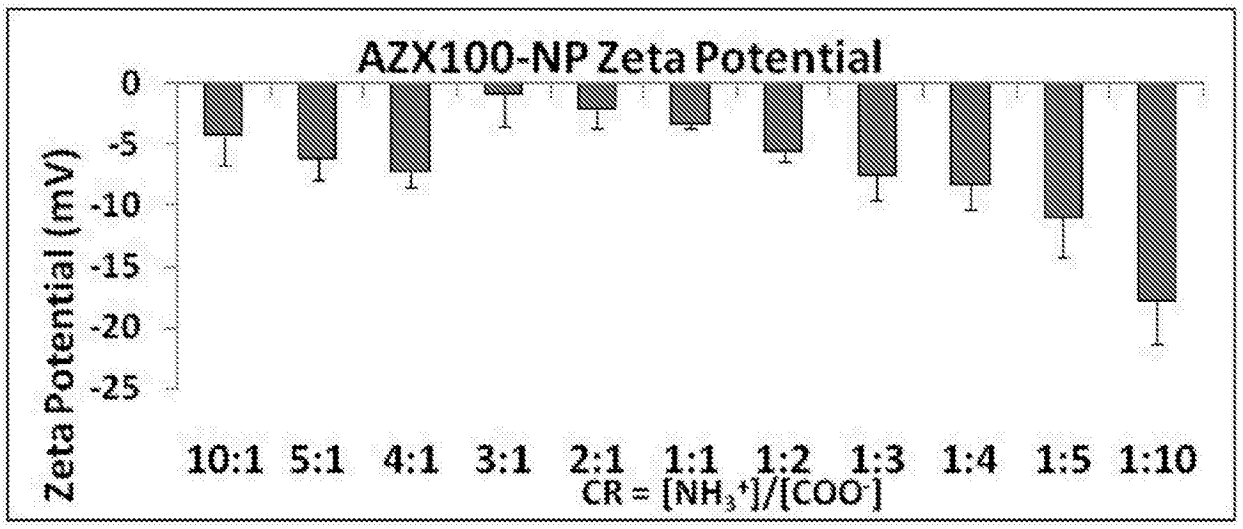

AZX100-NP Zeta Potential
Zeta Potential (mV)
0
-5
-10
-15
-20
-25
10:1 5:1 4:1 3:1 2:1 1:1 1:2 1:3 1:4 1:5 1:10
CR = [NH3+]/[COO-]

图 68

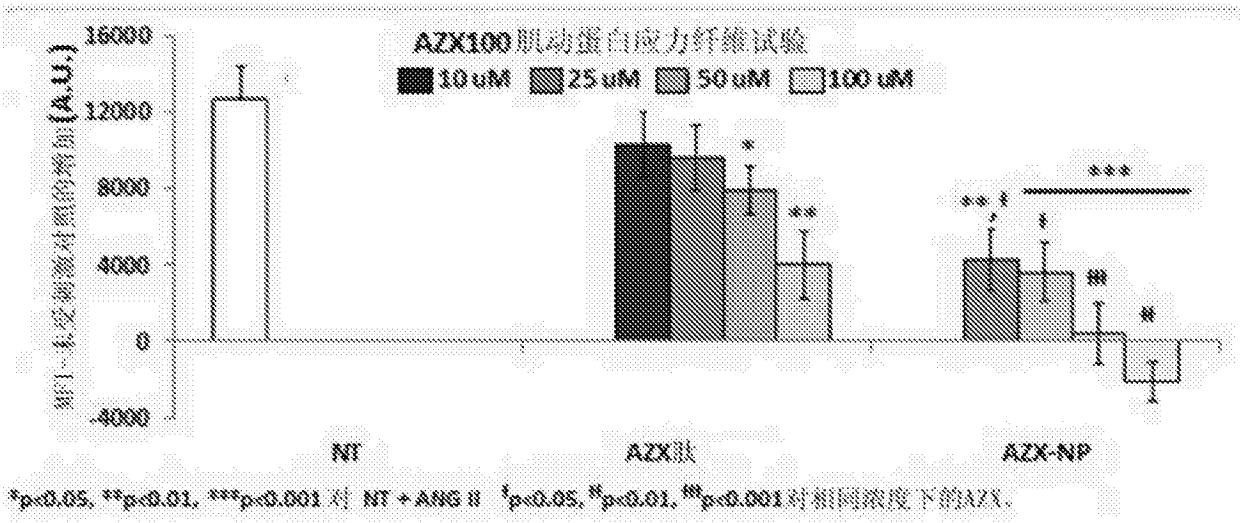

AZX100肌动蛋白应力纤维试验
10 uM
25 uM
50 uM
100 uM
16000
12000
8000
4000
0
-4000
NT
AZX肽
AZX-NP
*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 对 NT + ANG II
#p<0.05, ##p<0.01, ###p<0.001 对相同浓度下的AZX。

图 69

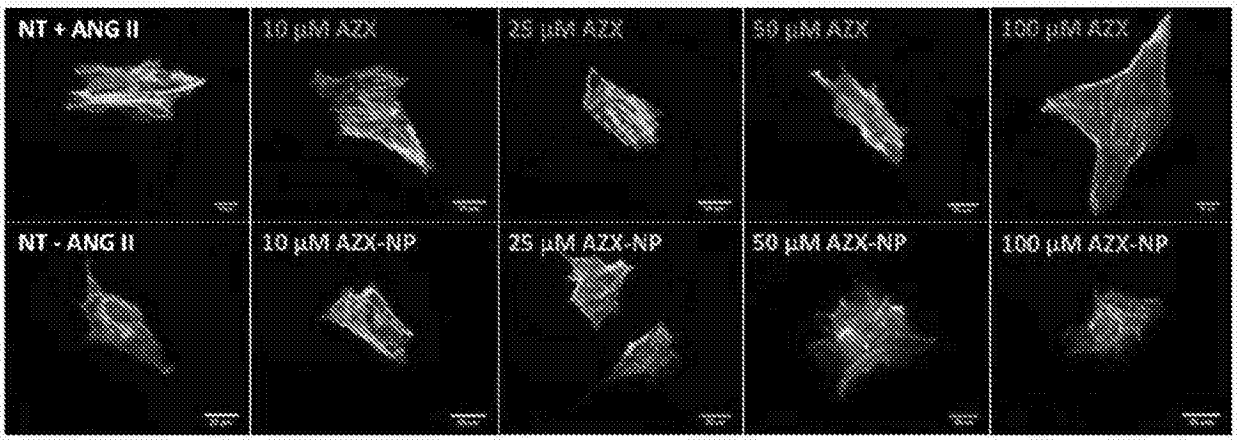

NT + ANG II
10 μM AZX
25 μM AZX
50 μM AZX
100 μM AZX
NT - ANG II
10 μM AZX-NP
25 μM AZX-NP
50 μM AZX-NP
100 μM AZX-NP

图 70

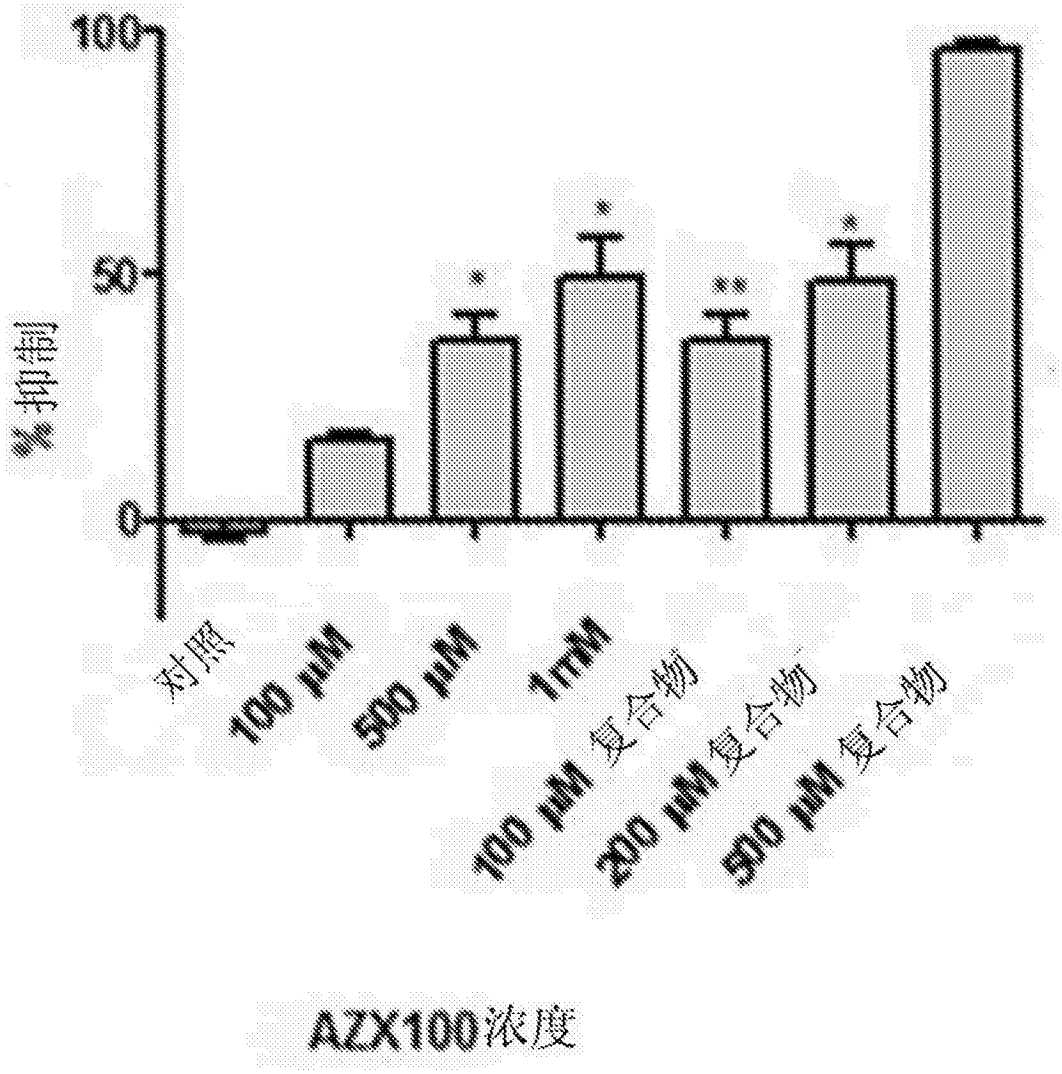

100
50
0
% 抑制
*
*
**
*
对照
100 μM
500 μM
1mM
100 μM 复合物
200 nM 复合物
500 nM 复合物
AZX100浓度

图 71

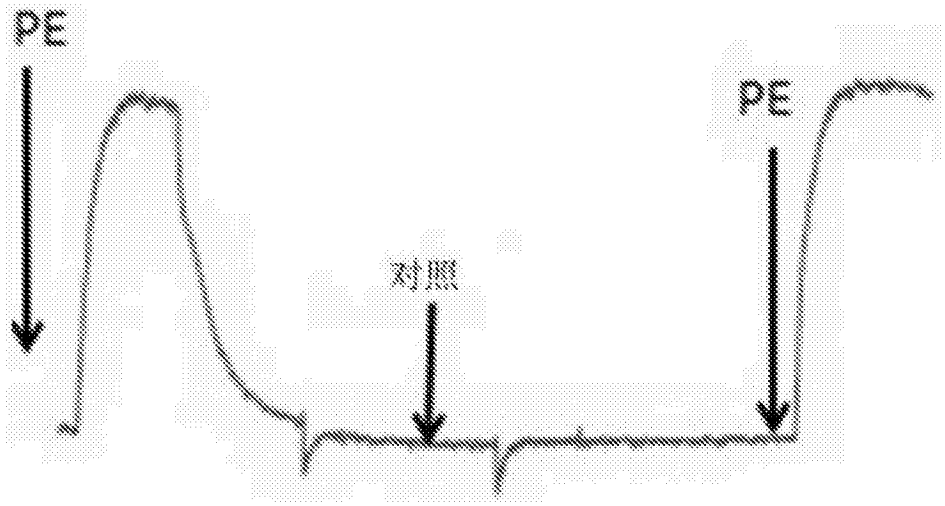


图 72

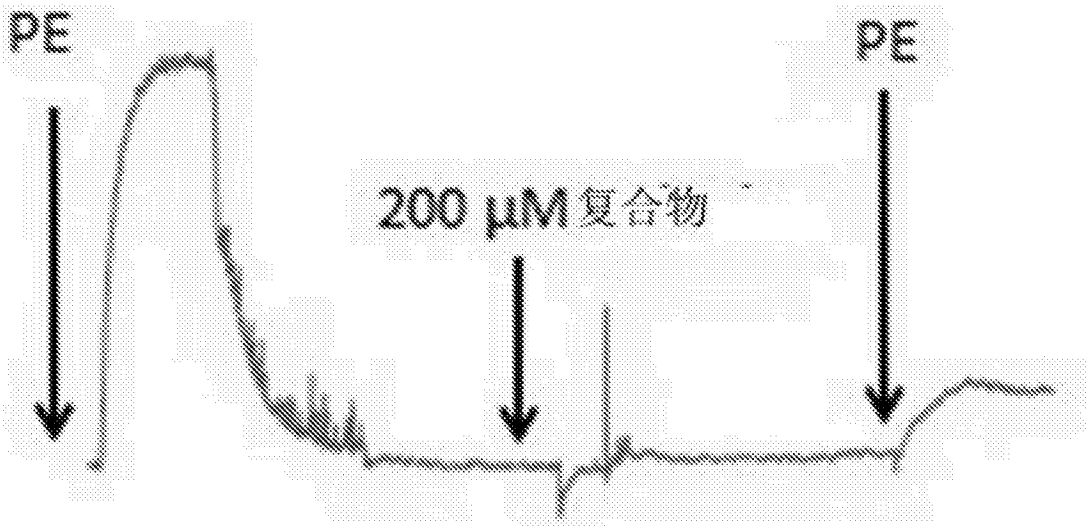


图 73

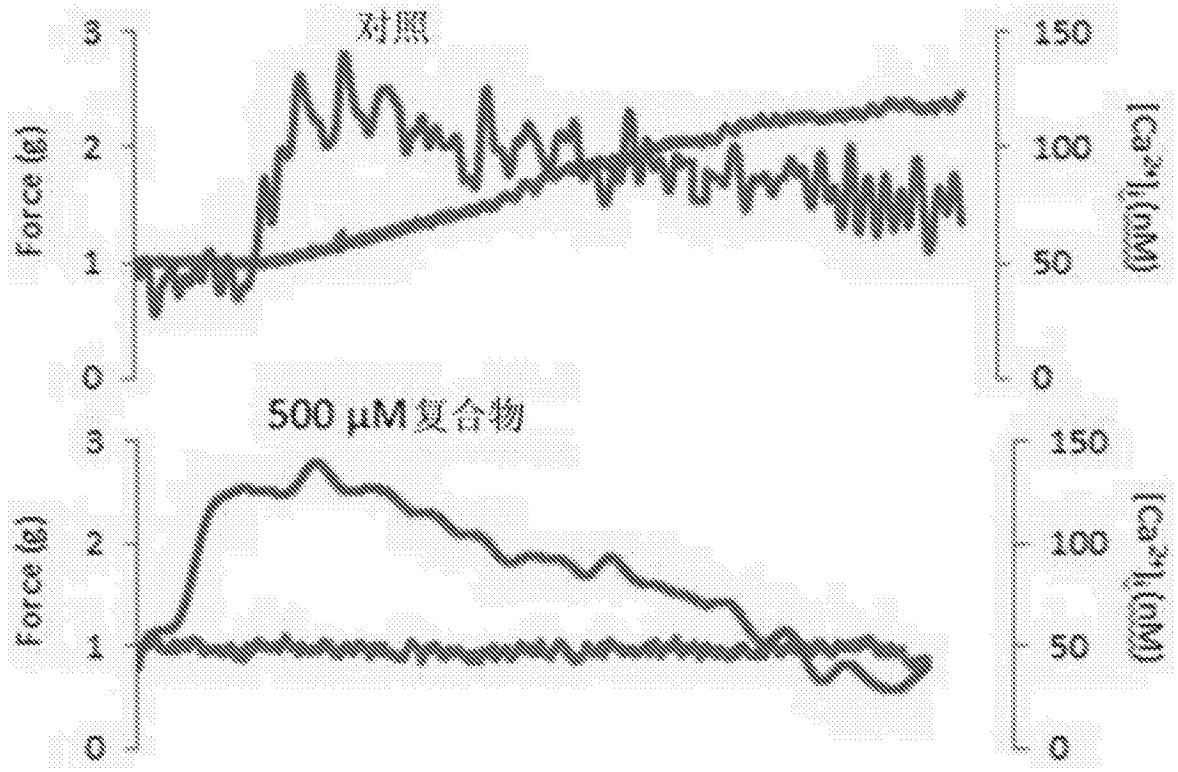

对照
Force (g)
3
2
1
0
150
100
50
0
[Ca2+]i (nM)
500 μM复合物
Force (g)
3
2
1
0
150
100
50
0
[Ca2+]i (nM)

图 74

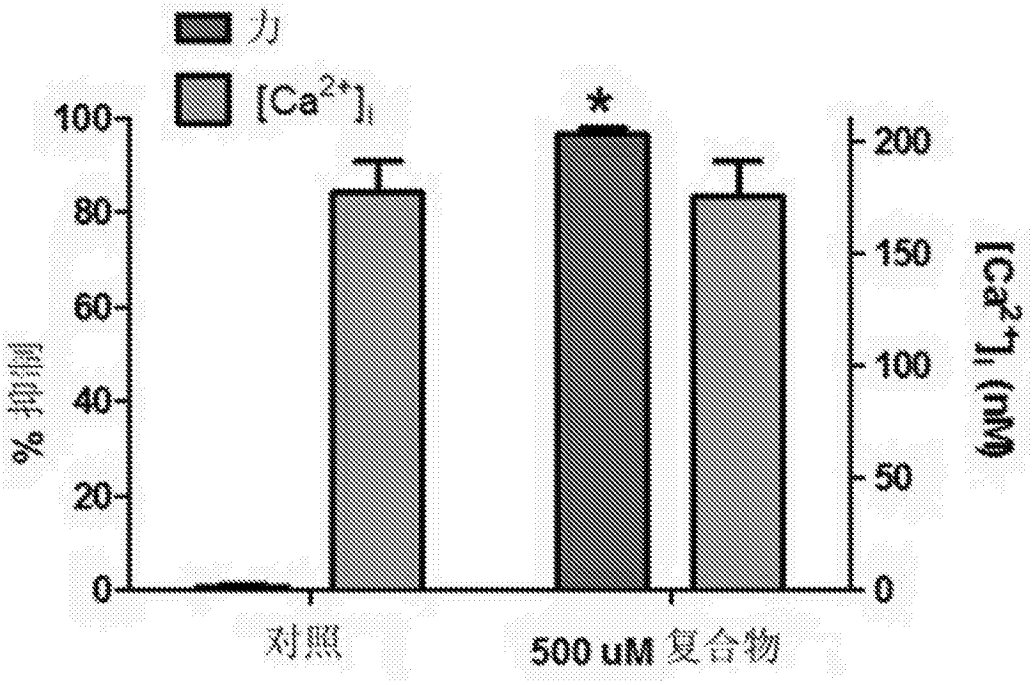

力
[Ca2+]i
*
% 抑制
100
80
60
40
20
0
200
150
100
50
0
[Ca2+]i (nM)
对照
500 uM 复合物

图 75

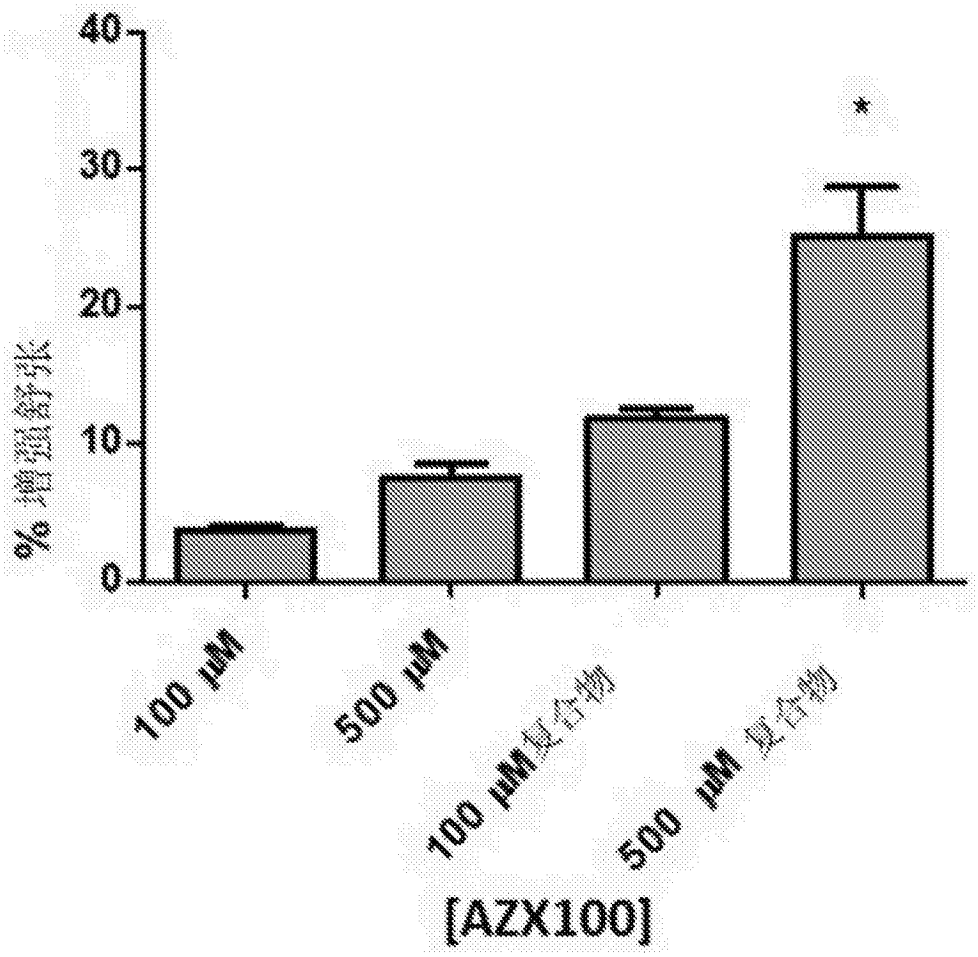


图 76

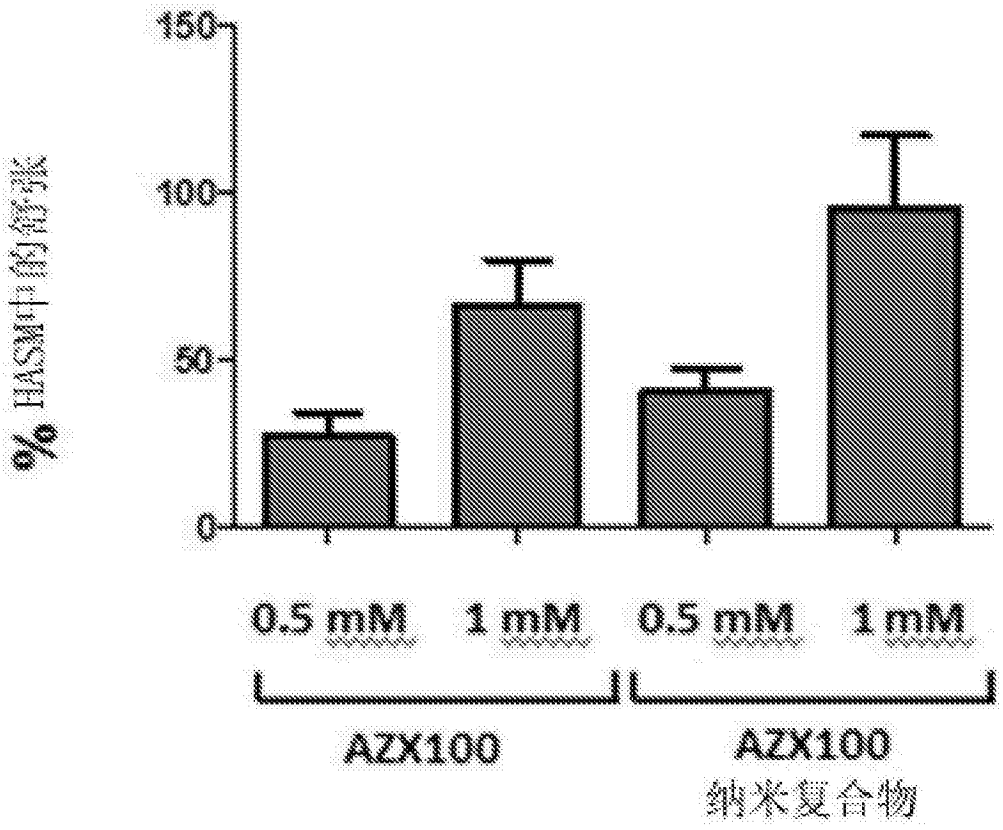


图 77

NH2:COOH	Z-ave直径 (nm)	PDI
10 to 1	37180 ± 25330 nm	1
5 to 1	1335 ± 94.78 nm	0.483
4 to 1	780.8 ± 821.2 nm*	0.656
3 to 1	11750 ± 6316 nm	1
2 to 1	3604 ± 1559 nm	0.567
1 to 1	10990 ± 3748 nm	1
1 to 2	660.5 ± 54.13 nm	0.242
1 to 3	155.4 ± 14.65 nm	0.251
1 to 4	193.0 ± 46.75 nm*	0.313
1 to 5	392.5 ± 91.81 nm*	0.458
1 to 10	261.8 ± 35.51 nm*	0.583

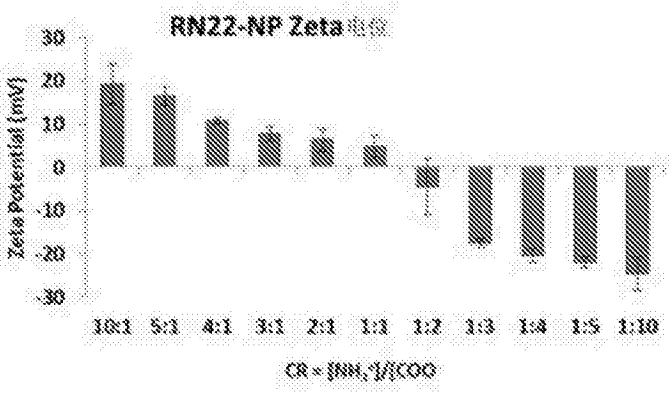


图 78

NH2:COOH	Z-ave 粒径 (nm)	PDI
10 to 1	3255 ± 1413	0.761
5 to 1	7809 ± 4860*	0.753
4 to 1	4594 ± 1662	0.958
3 to 1	5024 ± 2851	0.794
2 to 1	3888 ± 205*	0.803
1 to 1	1955 ± 929.7	0.452
1 to 2	230.6 ± 35.82	0.432
1 to 3	159.8 ± 9.405	0.298
1 to 4	197.6 ± 18.99*	0.469
1 to 5	202.9 ± 47.63*	0.784
1 to 10	1352 ± 798.5*	0.647

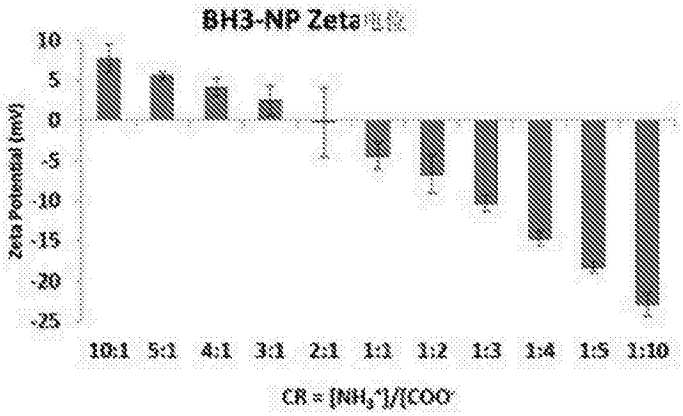


图 79