

國 籍：(中文/英文)

1. 美國 / U.S.A.
2. 波蘭 / POLAND
3. 美國 / U.S.A.

四、聲明事項：

☐ 主張專利法第二十二條第二項 ☐ 第一款或 ☐ 第二款規定之事實，
其事實發生日期為： 年 月 日。

☒ 申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

☒ 有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1.美國、2006.09.22、60/846,418

2.美國、2006.09.28、60/848,004

3.美國、2007.04.10、60/922,646

☐ 無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

☐ 主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

☐ 主張專利法第三十條生物材料：

☐ 須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

☐ 不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明是有關於非-蛋白水解活化性凝血酶受體之激動劑，其可用於治療血管內皮功能不良（Endothelial dysfunction，ED）或 ED-相關的疾病以及病症之方法。

【先前技術】

發明背景

血管內皮功能不良（ED）是一種常見的老化結果，並且與許多疾病有關，包括高血壓、冠狀動脈疾病、中風、腦血管疾病、周圍血管疾病、糖尿病、勃起功能不良、動脈粥狀硬化症、氣喘、類風濕性關節炎、肺部高血壓、高高半胱胺酸血症（hyperhomocysteinemia）、鐮刀型紅血球疾病、子癇前症（pre-eclampsia）、慢性腎臟衰竭、敗血症以及多重器官衰竭。組織可修復它們自己以對於受傷或缺血或以對治療性介入反應的能力，似乎是由於內皮功能不良而大大地減低。

內皮功能不良可能是由於一氧化氮合酶（nitric oxide synthase，NOS）的減少表現、可阻斷細胞內信號傳遞事件的途徑之改變的活化、內源性一氧化氮合酶抑制劑（例如，非對稱性二甲基精胺酸）的增加水平、一氧化氮之增加的降解或轉換成過亞硝酸根（由於高水平的反應性氧所致）或可將 L-精胺酸轉換成尿素的精胺酸酶之增加的活性所造成，藉此限制 L-精胺酸作為一氧化氮合酶的基質之可利用率。

許多最近的研究顯示，精胺酸酶在 ED 以及 NOS 活性的調節中，係藉由調控細胞內的 L-精胺酸可利用率而扮演關鍵的角色。例如，在具有 ED 的老化血管中，精胺酸酶是向上調控的，但加入專一性的精胺酸酶抑制劑可使血管的內皮功能以及一氧化氮（nitric oxide, NO）的反應性復原。其中精胺酸酶抑制已顯示可克服 ED 之其他疾病包括氣喘（其中增加的精胺酸酶活性可促成 NO 的不足以及減少的氣道平滑肌鬆弛）、肺部高血壓以及自發性及鹽-誘發的高血壓。L-精胺酸的補充也已顯示可在豬的高血壓模式中、在由於缺血/再灌注所引起的擴張不足中完全或部分地反轉 ED，並且甚至已顯示可改善患有周邊動脈疾病的患者之行走能力。這些研究顯示，可以減少精胺酸酶向上調控或控制精胺酸酶活性的藥物，在許多血管疾病中之有潛力的治療角色。

近期的研究已顯示，組織缺氧以及特定的發炎介導劑（包括 $\text{TNF}\alpha$ ）都可增加精胺酸酶或減少內皮細胞一氧化氮合酶（endothelial cell nitric oxide synthase, eNOS）的活性。延長的發炎以及慢性缺血兩者似乎都可促成 ED。

對於可治療反應或促成許多疾病以及病症的內皮功能不良之方法，仍有需求。

【發明內容】

發明簡述

申請人已發現到，可刺激或活化非-蛋白水解活化性凝血酶受體（此後稱“NPAR”）之化合物，可藉由阻斷與

內皮功能不良有關的精胺酸酶之向上調控，以及藉由促進一氧化氮合酶的活化或向上調控以增加一氧化氮的製造，而反轉或抑制內皮功能不良。NPAR 激動劑 TP508 可阻斷由 $\text{TNF}\alpha$ 誘發的精胺酸酶之向上調控（實施例 2）。對 ARG1 表現的影響經顯示是劑量依賴性的。TP508 的處理也可在常氧（正常氧氣）以及低氧（1% 氧氣）的條件下培養的細胞中，增加 eNOS 的磷酸化作用（實施例 3）。此外，細胞的 TP508 刺激也可預防組織缺氧誘發之 eNOS 表現的向下調控，以將 eNOS 維持在可保持接近在常氧條件下培養的細胞中所觀察到之水平。TP508 對於 eNOS 磷酸化作用的影響是劑量依賴性的。

本發明是有關於在有需要的個體之部位治療內皮功能不良之方法，其包括將治療有效量的 NPAR 激動劑投予個體，其中該部位不是由血管形成術所傷害的動脈、慢性皮膚潰瘍、需要骨誘發（osteoiduction）的部位或需要心臟再血管化（revascularization）的部位。

更特別地，本發明包括（除以上列舉的例外外）在個體中治療內皮功能不良之方法，其中個體患有一種或多種選自由高血壓、鬱血性心臟衰竭、冠狀動脈疾病、中風、腦血管疾病、周圍血管疾病、糖尿病、勃起功能不良、動脈粥狀硬化症、氣喘、類風濕性關節炎、肺部高血壓、高高半胱胺酸血症、鐮刀型紅血球疾病、子癇前症、慢性腎臟衰竭、慢性腎臟功能不良、敗血症、多重器官衰竭、發炎性腸疾病以及放射性損傷所組成的族群中之疾病或病

症。

本發明也有關於在有需要治療的個體之部位治療內皮功能不良之方法，其包括將治療有效量的組合物投予個體，該組合物包括一種或多種 NPAR 激動劑以及一種或多種血管生成性生長因子，其中該部位不是由血管形成術所傷害的動脈、慢性皮膚潰瘍、需要骨誘發的部位或需要心臟再血管化的部位。

本發明也是在有需要治療的個體之部位治療內皮功能不良之方法，其包括將治療有效量的組合物投予個體，該組合物基本上由非-蛋白水解活化性凝血酶受體以及血管生成性生長因子所組成，其中該部位不是由血管形成術所傷害的動脈、慢性皮膚潰瘍、需要骨誘發的部位或需要心臟再血管化的部位。在這個方法中，血管生成性生長因子以及 NPAR 激動劑，是以在組合治療中唯一的治療活性作用劑而投予個體。

在部分具體實例中，NPAR 激動劑可全身性地投予個體，以及在其他具體實例中可經血管投予，以及在其他具體實例中可局部或地區性地投予。

在一具體實例中，NPAR 激動劑是此處所揭露的凝血酶胜肽衍生物。更特別地，一種凝血酶胜肽衍生物包括 Arg-Gly-Asp-Ala-Cys-X₁-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-X₂-Val (序列識別號 1) 的胺基酸序列，或其包括至少 6 個胺基酸的 C-端截斷片段。在另一特定具體實例中，凝血酶胜肽衍生物包括序列識別號 2 的胺基酸序列：Ala-Gly-Tyr-Lys-

Pro-Asp-Glu-Gly-Lys-Arg-Gly-Asp-Ala-Cys- X_1 -Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro- X_2 -Val、具有至少 14 個胺基酸的凝血酶胜肽衍生物之 N-端截斷片段、或包括至少 18 個胺基酸的凝血酶胜肽衍生物之 C-端截斷片段。 X_1 是 Glu 或 Gln，以及 X_2 是 Phe、Met、Leu、His 或 Val。在另一特定具體實例中，凝血酶胜肽衍生物是多肽序列識別號 3：H-Ala-Gly-Tyr-Lys-Pro-Asp-Glu-Gly-Lys-Arg-Gly-Asp-Ala-Cys-Glu-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-Phe-Val-NH₂ (TP508)。

在另一具體實例中，NPAR 激動劑是此處所揭露之經修飾的凝血酶胜肽衍生物。在特定具體實例中，經修飾的凝血酶胜肽衍生物包括序列識別號 4 的胺基酸序列：Arg-Gly-Asp-Ala-Xaa- X_1 -Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro- X_2 -Val，或其具有至少 6 個胺基酸的 C-端截斷片段。在另一特定具體實例中，經修飾的凝血酶胜肽衍生物包括序列識別號 5 的胺基酸序列：Ala-Gly-Tyr-Lys-Pro-Asp-Glu-Gly-Lys-Arg-Gly-Asp-Ala-Xaa- X_1 -Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro- X_2 -Val，或其包括序列識別號 5 的胺基酸 10-18 之片段。

在另一具體實例中，NPAR 激動劑是此處所揭露的兩個凝血酶胜肽衍生物之凝血酶胜肽衍生物二聚體。更特別地，二聚體的凝血酶胜肽衍生物包括胺基酸序列 Arg-Gly-Asp-Ala-Cys- X_1 -Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro- X_2 -Val (序列識別號 1)，或其具有至少 6 個胺基酸的 C-端截斷片段。在另一特定具體實例中，二聚體的凝血酶胜肽衍生物包括具有序列識別號 2 的胺基酸序列之多肽：Ala-Gly-Tyr-Lys-

Pro-Asp-Glu-Gly-Lys-Arg-Gly-Asp-Ala-Cys-X₁-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-X₂-Val，或其包括序列識別號 2 的胺基酸 10-18 之片段。在本發明的另一具體實例中，二聚體的凝血酶胜肽衍生物是多肽 H-Ala-Gly-Tyr- Lys-Pro-Asp-Glu-Gly-Lys-Arg-Gly-Asp-Ala-Cys-Glu-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-Phe-Val-NH₂（序列識別號 3）。在另一特定具體實例中，凝血酶胜肽衍生物二聚體是由結構式（IV）而表示。

在另一具體實例中，NPAR 激動劑是抗體或其可結合至互補胜肽的抗原結合片段，其中互補胜肽是由編碼凝血酶之一部分的核苷酸序列之互補物所編碼。

以上所指的凝血酶可以是哺乳動物的凝血酶，以及特別是人類的凝血酶。凝血酶之部分可以是凝血酶受體結合功能域或其部分。在一具體實例中，凝血酶受體結合功能域或其部分包括胺基酸序列 Ala-Gly-Tyr-Lys-Pro-Asp-Glu-Gly-Lys-Arg-Gly-Asp-Ala-Cys-Glu-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-Phe-Val（序列識別號 6）。凝血酶受體結合功能域的另一部分包括胺基酸序列 Glu-Gly-Lys-Arg-Gly-Asp-Ala-Cys- Glu-Gly（序列識別號 7）。

抗體或其可結合的抗原結合片段所結合之互補胜肽，可藉由反義 RNA 股的 5'-3' 序列而編碼，或可藉由反義 RNA 股的 3'-5' 序列而編碼。

在特定具體實例中，互補胜肽包括胺基酸序列 Lys-Gly-Ser-Pro-Thr-Val-Thr-Phe-Thr-Gly-Ile-Pro-Cys-Phe-Pro-Phe-Ile-Arg-Leu-Val-Thr-Ser（序列識別號 8）或 Thr-Phe-Thr-

Gly-Ile-Pro-Ser-Phe-Pro-Phe (序列識別號 9) 或 Arg-Pro-Met-Phe-Gly-Leu-Leu-Pro-Phe-Ala-Pro-Leu-Arg-Thr-Leu-Pro-Leu-Ser-Pro-Pro-Gly-Lys-Gln (序列識別號 10) 或 Lys-Pro-Phe-Ala-Pro-Leu-Arg-Thr-Leu-Pro (序列識別號 11)。

在本發明的方法中使用之 NPAR 激動劑可以是多株抗體或單株抗體或其抗原結合片段。在特定具體實例中，這些是人類抗體。在治療方法中使用作為 NPAR 激動劑的單株抗體，可以是人類化的抗體、嵌合抗體或任何上述的抗原結合片段，其可包括 Fab 片段、Fab' 片段、F(ab')₂ 片段以及 Fv 片段。

【實施方式】

發明詳述

內皮功能不良已牽連到許多疾病的病原學，包括高血壓、冠狀動脈疾病、中風、腦血管疾病、周圍血管疾病、糖尿病、勃起功能不良、動脈粥狀硬化症、氣喘、肺部高血壓、高高半胱胺酸血症、鐮刀型紅血球疾病、子癇前症、慢性腎臟衰竭及功能不良、敗血症、多重器官衰竭以及發炎性腸疾病。

申請人已發現到，可刺激或活化非-蛋白水解活化性凝血酶受體（此後稱“NPAR”）之化合物，可藉由阻斷與內皮功能不良有關的精胺酸酶之向上調控，以及藉由促進一氧化氮合酶的活化或向上調控以增加一氧化氮的製造，而反轉或抑制內皮功能不良。TP508 可阻斷由 TNF α 誘發

的精胺酸酶之向上調控。這個影響是劑量依賴性的。TP508 的處理也可在常氧（正常氧氣）以及低氧（1% 氧氣）的條件下培養的細胞中，增加內皮細胞一氧化氮合酶的磷酸化作用。此外，細胞的 TP508 刺激也可預防組織缺氧誘發之內皮細胞一氧化氮合酶表現的向下調控，以將內皮細胞一氧化氮合酶維持在可保持接近在常氧條件下培養的細胞中所觀察到之水平。TP508 對於內皮細胞一氧化氮合酶磷酸化作用的影響是劑量依賴性的（實施例 3）。

本發明包括在有需要的個體之部位治療內皮功能不良之方法以及治療內皮功能不良的後果之方法，其包括將治療有效量的非-蛋白水解活化性凝血酶受體之激動劑投予個體，其中該部位不是由血管形成術所傷害的動脈、慢性皮膚潰瘍、需要骨誘發的部位或需要心臟再血管化的部位。在特定具體實例中，被治療的個體是患有或已經患有一種或多種選自由高血壓、鬱血性心臟衰竭、冠狀動脈疾病、中風、腦血管疾病、周圍血管疾病、糖尿病、勃起功能不良、動脈粥狀硬化症、氣喘、類風濕性關節炎、肺部高血壓、高高半胱胺酸血症、鐮刀型紅血球疾病、子癇前症、慢性腎臟衰竭、慢性腎臟功能不良、敗血症、多重器官衰竭、發炎性腸疾病以及其他與內皮相關的疾病及病症所組成的族群中之疾病。

在一特定形態中，本發明是治療內皮功能不良之方法，藉此治療個體中受損的葡萄糖耐受性，其包括將治療有效量的非-蛋白水解活化性凝血酶受體之激動劑投予個體。具

有受損的葡萄糖耐受性之個體包括有發展成第 2 型糖尿病危險的個體。在另一形態中，本發明是治療內皮功能不良之方法，藉此治療個體中的糖尿病併發症，其包括將治療有效量的非-蛋白水解活化性凝血酶受體之激動劑投予個體。在這些形態中，個體不需要在由血管形成術所傷害的動脈、慢性皮膚潰瘍、需要骨誘發的部位或需要心臟再血管化的部位處之治療。

在另一形態中，本發明是治療個體動脈粥狀硬化症之方法，其包括將治療有效量的非-蛋白水解活化性凝血酶受體之激動劑投予個體。在這個形態中，個體不需要在由血管形成術所傷害的動脈、慢性皮膚潰瘍、需要骨誘發的部位或需要心臟再血管化的部位處之治療。

內皮功能不良是來自離子化放射線的毒性之病因。例如，在放射線照射的腸道中內皮細胞是耗盡的，導致黏膜屏障的崩解，其接著導致發炎、反應性氧的產生以及信息傳遞分子（例如， $TGF-\beta$ 及 $TNF-\alpha$ ）的釋放。這個發炎反應的影響是腺窩細胞增殖的減少、黏膜炎及分泌性腹瀉，以及間質細胞增殖的增加及膠原蛋白的產生，其導致纖維化以及留下傷疤。個體可能遭受到在高劑量治療放射線以處理各種形式的癌症之後的離子化放射線之損傷，或例如假設來自工業意外的放射線暴露之損傷。

在另一形態中，本發明是治療個體放射性損傷之方法，其包括將治療有效量的非-蛋白水解活化性凝血酶受體之激動劑投予個體。在這個形態中，個體不需要在由血管形成

術所傷害的動脈、慢性皮膚潰瘍、需要骨誘發的部位或需要心臟再血管化的部位處之治療。

NPAP 激動劑

可刺激 NPAP 的化合物稱之為 NPAP 激動劑。NPAP 是存在於大部分細胞表面上之高親合力的凝血酶受體。這個 NPAP 成分主要是負責將凝血酶、蛋白水解不活化的凝血酶以及凝血酶衍生的胜肽高親合力的結合至細胞。NPAP 似乎可介導許多由凝血酶啟動而不受其蛋白水解活性支配的細胞信息。該等信息的一個例子是膜聯蛋白 (annexin) V 以及藉由扣減雜合法所鑑定的其他分子之向上調控 (參見 Sower 等人, *Exp. Cell Res.* 247: 422 (1999))。因此, NPAP 的特徵在於其與細胞表面的凝血酶之高親合力的交互作用, 以及其藉由下述凝血酶的蛋白水解不活化衍生物及凝血酶衍生的胜肽激動劑之活化作用。NPAP 的活化作用可在次細胞分裂濃度的凝血酶或可活化蛋白質激酶 C 的分子之存在下, 當加入到纖維母細胞時, 根據分子可刺激細胞增殖的能力而評估, 如同在美國專利第 5,352,664 及 5,500,412 號之揭露。這些專利的完整教示是以引用方式納入本文中。NPAP 激動劑可藉由這個活化作用或藉由其可與 ^{125}I -凝血酶競爭結合到細胞的能力而鑑定。

凝血酶受體結合功能域是定義為多肽或多肽的部分, 其可直接地結合到凝血酶受體及/或競爭地抑制在高親合力凝血酶受體以及 α -凝血酶之間的結合。

本發明的 NPAR 激動劑包括凝血酶衍生的胜肽、經修飾之凝血酶衍生的胜肽、凝血酶衍生的胜肽二聚體以及對於此處所揭露的凝血酶互補胜肽之 NPAR 激動劑抗體。

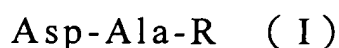
凝血酶衍生的胜肽

在 NPAR 激動劑中的是凝血酶胜肽衍生物(也稱為“凝血酶衍生的胜肽”)，其為具有至少部分衍生自凝血酶的胺基酸序列以及在非-蛋白水解活化性凝血酶受體處是活性的凝血酶之類似物。凝血酶胜肽衍生物包括，例如，由重組 DNA 方法所製造的胜肽、由凝血酶的酵素消化所製造的胜肽以及合成製造的胜肽，其可包括相較於凝血酶的胺基酸取代及/或經修飾的胺基酸，特別是在末端處。

本發明的 NPAR 激動劑包括說明於美國專利第 5,352,664 及 5,500,412 號之凝血酶衍生的胜肽。在一具體實例中，本發明的 NPAR 激動劑是凝血酶胜肽衍生物或生理功能的均等物，也就是，具有不超過約 50 個胺基酸的多肽，較佳是不超過約 30 個胺基酸，並且與對應到該多肽可活化 NPAR 的凝血酶胺基酸 508-530 (Ala-Gly-Tyr-Lys-Pro-Asp-Glu-Gly-Lys-Arg-Gly-Asp-Ala-Cys-Glu-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-Phe-Val；序列識別號 6) 之人類凝血酶片段具有足夠的同源性。此處所說明的凝血酶胜肽衍生物或經修飾的凝血酶胜肽衍生物或較佳具有約 12 至約 23 個胺基酸殘基，更佳是具有約 19 至約 23 個胺基酸殘基。

在另一具體實例中，本發明的 NPAR 激動劑是凝血酶

胜肽衍生物，其包括由結構式 (I) 所表示的分子部分：



R 是絲胺酸酯酶保守性的功能域。絲胺酸酯酶（例如，胰蛋白酶、凝血酶、胰凝乳蛋白酶等）具有高度保守性的區域。“絲胺酸酯酶保守性的功能域”是指具有這些保守性區域之一的胺基酸序列的多肽或與這些保守性區域之一有足夠同源性的多肽，使得凝血酶胜肽衍生物保留 NPAR 活化能力。

凝血酶衍生物之生理功能的均等物涵蓋與凝血酶衍生物在細目不同的分子，該等細目不會影響凝血酶受體結合功能域的功能或絲胺酸酯酶保守性的胺基酸序列。該等細目可包括，但並不限於，保守性的胺基酸取代（如以下對於 NPAR 激動劑之定義）以及修飾，例如，C-端的醯胺化作用、N-端的乙醯化作用、多肽連結至生理惰性的載體分子或與絲胺酸酯酶保守性序列一致的序列改變。

具有絲胺酸酯酶保守性序列的功能域可包括多肽序列，其包含先前在絲胺酸蛋白酶中顯示為高度保守性之十二肽的至少 4-12 個 N-端胺基酸之多肽序列（Asp-X₁-Cys-X₂-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-X₃-Val；序列識別號 13；其中 X₁ 是 Ala 或 Ser；X₂ 是 Glu 或 Gln；以及 X₃ 是 Phe、Met、Leu、His 或 Val）。

在一具體實例中，絲胺酸酯酶保守性序列包括序列識別號 14 的胺基酸序列（Cys-Glu-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-Phe-Val）或具有序列識別號 14 的胺基酸序列之多肽的 C-

端截斷片段。然而，應理解的是，在絲胺酸酯酶保守性序列中的 0、1、2 或 3 個胺基酸可能不同於在序列識別號 14 中對應的胺基酸。較佳地，在不同於在序列識別號 14 中對應的胺基酸之絲胺酸酯酶保守性序列中的胺基酸是如以下所定義之保守性的取代，以及更佳是高度保守性的取代。“C-端截斷片段”是指在從 C-端移除一個胺基酸或一組胺基酸之後所剩下的片段，該片段具有至少 6 個胺基酸，以及更佳具有至少 9 個胺基酸。

在另一具體實例中，絲胺酸酯酶保守性序列包括序列識別號 15 的胺基酸序列 (Cys-X₁-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-X₂-Val; X₁ 是 Glu 或 Gln; 以及 X₂ 是 Phe、Met、Leu、His 或 Val) 或其具有至少 6 個胺基酸的 C-端截斷片段，較佳是至少 9 個胺基酸。

在一較佳具體實例中，凝血酶胜肽衍生物包括絲胺酸酯酶保守性序列以及具有更專一性凝血酶胺基酸序列 Arg-Gly-Asp-Ala (序列識別號 16) 的多肽。這個類型的凝血酶胜肽衍生物的一個例子包括 Arg-Gly-Asp-Ala-Cys-X₁-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-X₂-Val (序列識別號 1)。X₁ 及 X₂ 是定義如上。凝血酶胜肽衍生物可包括序列識別號 6 的胺基酸序列 (Ala-Gly-Tyr-Lys-Pro-Asp-Glu-Gly-Lys-Arg-Gly-Asp-Ala-Cys-Glu-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-Phe-Val) 或其 N-端截斷片段，限制條件為在凝血酶胜肽衍生物中的位置 1-9 之 0、1、2 或 3 個胺基酸不同於在序列識別號 6 的對應位置之胺基酸。較佳地，在不同於序列識別號 6 的

對應胺基酸殘基之凝血酶胜肽衍生物中的胺基酸殘基是如以下對於 NPAR 激動劑定義之保守性的取代，以及更佳是高度保守性的取代。“N-端截斷片段”是指在從 N-端移除一個胺基酸或一組胺基酸之後所剩下的片段，較佳是一組不超過 6 個胺基酸，更佳是一組不超過 3 個胺基酸。

視需要地，此處所說明的凝血酶胜肽衍生物可在 C-端被醯胺化及/或在 N-端被乙醯化。在特定具體實例中，凝血酶胜肽衍生物包括 C-端的醯胺，以及視需要地包括乙醯化的 N-端，其中該 C-端的醯胺是由 $-C(O)NR_aR_b$ 所表示，其中 R_a 及 R_b 獨立地是氫、 C_1-C_{10} 經取代或未取代的脂肪族基團，或 R_a 及 R_b 與它們鍵結的氮一起形成 C_1-C_{10} 非-芳香族雜環基團，以及該 N-端的醯基是由 $R_cC(O)-$ 所表示，其中 R_c 是氫、 C_1-C_{10} 經取代或未取代的脂肪族基團或 C_1-C_{10} 經取代或未取代的芳香族基團。在另一特定具體實例中，凝血酶胜肽衍生物的 N-端是游離的（也就是未取代的），以及 C-端是游離的（也就是未取代的）或醯胺化的，較佳是如羧醯胺（也就是， $-C(O)NH_2$ ）。在特定具體實例中，凝血酶胜肽衍生物包括以下胺基酸序列：Ala-Gly-Tyr-Lys-Pro-Asp-Glu-Gly-Lys-Arg-Gly-Asp-Ala-Cys-Glu-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-Phe-Val（序列識別號 6）。在另一特定具體實例中，凝血酶胜肽衍生物包括 Arg-Gly-Asp-Ala-Cys-Glu-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-Phe-Val（序列識別號 17）的胺基酸序列。可選擇地，凝血酶胜肽衍生物也包括序列識別號 18 的胺基酸序列：Asp-Asn-Met-Phe-Cys-Ala-Gly-

Tyr-Lys-Pro-Asp-Glu-Gly-Lys-Arg-Gly-Asp-Ala-Cys-Glu-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-Phe-Val-Met-Lys-Ser-Pro-Phe。

包括序列識別號 6、17 或 18 的胺基酸之凝血酶胜肽衍生物，可視需要地在 C-端被醯胺化及/或在 N-端被乙醯化。較佳地，N-端是游離的（也就是未取代的）以及 C-端是游離的（也就是未取代的）或醯胺化的，較佳是羧醯胺（也就是， $-C(O)NH_2$ ）。然而，應理解的是，在凝血酶胜肽衍生物中的位置 1-9 以及 14-23 之 0、1、2 或 3 個胺基酸可不同於在序列識別號 6 中的對應胺基酸。也應理解的是，在凝血酶胜肽衍生物中的位置 1-14 以及 19-33 之 0、1、2 或 3 個胺基酸可不同於在序列識別號 18 中的對應胺基酸。較佳地，在不同於序列識別號 6 或序列識別號 18 的對應胺基酸殘基之凝血酶胜肽衍生物中的胺基酸殘基是如以下定義之保守性的取代，以及更佳是高度保守性的取代。可選擇地，具有至少 14 個胺基酸的凝血酶胜肽衍生物之 N-端截斷片段或具有至少 18 個胺基酸的凝血酶胜肽衍生物之 C-端截斷片段，是使用作為 NPAR 激動劑之凝血酶胜肽衍生物。

“C-端截斷片段”是指在從 C-端移除一個胺基酸或一組胺基酸之後所剩下的片段，以及“N-端截斷片段”是指在從 N-端移除一個胺基酸或一組胺基酸之後所剩下的片段。應理解的是，名詞“C-端截斷片段”以及“N-端截斷片段”涵蓋如上所述之 C-端的醯胺化作用及/或 N-端的乙醯化作用。

用於本發明方法中之較佳的凝血酶胜肽衍生物包括序列識別號 2 的胺基酸序列：Ala-Gly-Tyr-Lys-Pro-Asp-Glu-Gly-Lys-Arg-Gly-Asp-Ala-Cys- X_1 -Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro- X_2 -Val。用於本發明方法中之另一較佳的凝血酶胜肽衍生物包括序列識別號 19 的胺基酸序列：Asp-Asn-Met-Phe-Cys-Ala-Gly-Tyr-Lys-Pro-Asp-Glu-Gly-Lys-Arg-Gly-Asp-Ala-Cys- X_1 -Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro- X_2 -Val-Met-Lys-Ser-Pro-Phe。 X_1 是 Glu 或 Gln； X_2 是 Phe、Met、Leu、His 或 Val。序列識別號 2 以及序列識別號 19 的凝血酶胜肽衍生物可視需要地包括如上所述之 C-端的醯胺及/或乙醯化的 N-端。較佳地，N-端是游離的（也就是未取代的）以及 C-端是游離的（也就是未取代的）或醯胺化的，較佳是羧醯胺（也就是， $-C(O)NH_2$ ）。可選擇地，這些較佳的凝血酶胜肽衍生物之 N-端截斷片段、具有至少 14 個胺基酸的 N-端截斷片段、或這些較佳的凝血酶胜肽衍生物之 C-端截斷片段、具有至少 18 個胺基酸的 C-端截斷片段，也可用於本發明的方法中。

TP508 是凝血酶胜肽衍生物的例子，並且是 23 個胺基酸的長度，其中 N-端的胺基酸殘基 Ala 是未取代的，以及 C-端胺基酸 Val 的 COOH 被修飾成由 $-C(O)NH_2$ 所表示的醯胺（序列識別號 3）。凝血酶胜肽衍生物的另一個例子包括序列識別號 6 的胺基酸序列，其中 N-端以及 C-端都是未取代的（“去醯胺的 TP508”）。可用於本發明方法中之凝血酶胜肽衍生物的其他例子包括 TP508 的 N-端截斷片

段（或去醯胺的 TP508）、具有至少 14 個胺基酸的 N-端截斷片段、或 TP508 的 C-端截斷片段（或去醯胺的 TP508）、具有至少 18 個胺基酸的 C-端截斷片段。

此處所使用在多肽中之“保守性的取代”是將胺基酸以具有相同靜電荷以及大約相同大小及形狀的另一個胺基酸而替代。具有脂肪族或經取代的脂肪族胺基酸側鏈之胺基酸，當在它們側鏈中的碳以及雜原子總數差異不超過約 4 時，這些胺基酸具有大約相同的大小。當在它們側鏈中的分支數差異不超過 1 時，這些胺基酸具有大約相同的形狀。在它們側鏈中具有苯基或經取代的苯基之胺基酸，被視為具有大約相同的大小以及形狀。以下列舉的是五種胺基酸族群。在多肽中將胺基酸以相同族群的另一個胺基酸取代，導致保守性的取代。

族群 I：甘胺酸、丙胺酸、纈胺酸、白胺酸、異白胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、半胱胺酸以及具有 C1-C4 脂肪族或 C1-C4 羥基取代的脂肪族側鏈（直鏈或單分支）之非天然存在的胺基酸。

族群 II：麩胺酸、天冬胺酸以及具有羧酸取代的 C1-C4 脂肪族側鏈（未分支或一個分支點）之非天然存在的胺基酸。

族群 III：離胺酸、鳥胺酸、精胺酸以及具有胺基或胍基取代的 C1-C4 脂肪族側鏈（未分支或一個分支點）之非天然存在的胺基酸。

族群 IV：麩醯胺酸、天冬醯胺酸以及具有醯胺取代的

C1-C4 脂肪族側鏈（未分支或一個分支點）之非天然存在的胺基酸。

族群 V：苯丙胺酸、苯甘胺酸、酪胺酸以及色胺酸。

此處所使用在多肽中之“高度保守性的取代”是將胺基酸以側鏈中具有相同官能基以及幾乎相同大小及形狀的另一個胺基酸而替代。具有脂肪族或經取代的脂肪族胺基酸側鏈之胺基酸，當在它們側鏈中的碳以及雜原子總數差異不超過 2 時，這些胺基酸具有幾乎相同的大小。當在它們側鏈中具有相同的分支數時，這些胺基酸具有幾乎相同的形狀。高度保守性的取代的例子包括纈胺酸取代白胺酸、蘇胺酸取代絲胺酸、天冬胺酸取代麩胺酸以及苯甘胺酸取代苯丙胺酸。非高度保守性取代的例子包括丙胺酸取代纈胺酸、丙胺酸取代絲胺酸以及天冬胺酸取代絲胺酸。

經修飾的凝血酶勝肽衍生物

在本發明的具體實例中，NPAR 激動劑是以相對於上述的凝血酶勝肽衍生物而修飾，其中上述凝血酶勝肽衍生物的半胱胺酸殘基是以具有相似大小及電荷性質的胺基酸而取代，以將勝肽的二聚體化作用減到最小。適合的胺基酸的例子包括丙胺酸、甘胺酸、絲胺酸或 S-保護的半胱胺酸。較佳地，半胱胺酸是以丙胺酸而取代。經修飾的凝血酶勝肽衍生物具有與未經修飾的凝血酶勝肽衍生物大約相同的生物活性。參見公告案 US 2005/0158301 A1，其以引用方式納入本文中。

將可理解的是，此處所揭露之經修飾的凝血酶胜肽衍生物可視需要地包括如以上說明之 C-端的醯胺及/或 N-端的乙醯基。較佳地，凝血酶胜肽衍生物的 N-端是游離的（也就是未取代的）以及 C-端是游離的（也就是未取代的）或醯胺化的，較佳是羧醯胺（也就是， $-\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$ ）。

在特定具體實例中，經修飾的凝血酶胜肽衍生物包括多肽，其具有序列識別號 4 的胺基酸序列：Arg-Gly-Asp-Ala-Xaa-X₁-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-X₂-Val，或其包括至少 6 個胺基酸的 C-端截斷片段。更特別地，凝血酶胜肽衍生物包括序列識別號 20 的胺基酸序列：Ala-Gly-Tyr-Lys-Pro-Asp-Glu-Gly-Lys-Arg-Gly-Asp-Ala-Xaa-Glu-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-Phe-Val，或其包括序列識別號 20 的胺基酸 10-18 之片段。還要更特別地，凝血酶胜肽衍生物包括序列識別號 5 的胺基酸序列：Ala-Gly-Tyr-Lys-Pro-Asp-Glu-Gly-Lys-Arg-Gly-Asp-Ala-Xaa-X₁-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-X₂-Val，或其包括序列識別號 5 的胺基酸 10-18 之片段。Xaa 是丙胺酸、甘胺酸、絲胺酸或 S-保護的半胱胺酸。X₁ 是 Glu 或 Gln；以及 X₂ 是 Phe、Met、Leu、His 或 Val。較佳地，X₁ 是 Glu；X₂ 是 Phe；以及 Xaa 是丙胺酸。這個類型的凝血酶胜肽衍生物的一個例子是具有胺基酸序列 Ala-Gly-Tyr-Lys-Pro-Asp-Glu-Gly-Lys-Arg-Gly-Asp-Ala-Ala-Glu-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-Phe-Val（序列識別號 21）的多肽。這個類型的凝血酶胜肽衍生物的另一個例子是多肽 H-Ala-Gly-Tyr-Lys-Pro-Asp-Glu-Gly-Lys-Arg-Gly-

Asp-Ala-Ala-Glu-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-Phe-Val-NH₂(序列識別號 22) 。在凝血酶胜肽衍生物中的 0、1、2 或 3 個胺基酸是不同於在序列識別號 4、20、5、21 或 22 的對應位置之胺基酸，限制條件為 Xaa 是丙胺酸、甘胺酸、絲胺酸或 S-保護的半胱胺酸。較佳地，差異是保守性的，如同對於 NPAR 激動劑之保守性取代所定義者。

在另一特定具體實例中，凝血酶胜肽衍生物包括具有序列識別號 23 的胺基酸序列之多肽：Asp-Asn-Met-Phe-Xbb-Ala-Gly-Tyr-Lys-Pro-Asp-Glu-Gly-Lys-Arg-Gly-Asp-Ala-Xaa-Glu-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-Phe-Val-Met-Lys-Ser-Pro-Phe，或其包括胺基酸 6-28 的片段。更佳地，凝血酶胜肽衍生物包括具有序列識別號 24 的胺基酸序列之多肽：Asp-Asn-Met-Phe-Xbb-Ala-Gly-Tyr-Lys-Pro-Asp-Glu-Gly-Lys-Arg-Gly-Asp-Ala-Xaa-X₁-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-X₂-Val-Met-Lys-Ser-Pro-Phe，或其包括胺基酸 6-28 的片段。Xaa 以及 Xbb 獨立地是丙胺酸、甘胺酸、絲胺酸或 S-保護的半胱胺酸。X₁ 是 Glu 或 Gln；以及 X₂ 是 Phe、Met、Leu、His 或 Val。較佳地，X₁ 是 Glu；X₂ 是 Phe；以及 Xaa 及 Xbb 是丙胺酸。這個類型的凝血酶胜肽衍生物的一個例子是包括胺基酸序列 Asp-Asn-Met-Phe-Ala-Ala-Gly-Tyr-Lys-Pro-Asp-Glu-Gly-Lys-Arg-Gly-Asp-Ala-Ala-Glu-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-Phe-Val-Met-Lys-Ser-Pro-Phe (序列識別號 25) 的多肽。這個類型的凝血酶胜肽衍生物的另一個例子是多肽 H-Asp-Asn-Met-Phe-Ala-Ala-Gly-Tyr-Lys-

Pro-Asp-Glu-Gly-Lys-Arg-Gly-Asp-Ala-Ala-Glu-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-Phe-Val-Met-Lys-Ser-Pro-Phe-NH₂ (序列識別號 26)。在凝血酶胜肽衍生物中的 0、1、2 或 3 個胺基酸是不同於在序列識別號 23、24、25 或 26 的對應位置之胺基酸。Xaa 以及 Xbb 獨立地是丙胺酸、甘胺酸、絲胺酸或 S-保護的半胱胺酸。較佳地，差異是保守性的，如同 NPAR 激動劑之保守性取代。

“S-保護的半胱胺酸”是半胱胺酸殘基，其中硫基分子部分 (-SH) 的反應性是以保護基而阻斷。適合的保護基是在此技藝中已知的，並且揭露於例如 T.W. Greene 及 P.G.M. Wuts，有機合成中的保護基，第三版，John Wiley & Sons (1991)，第 454-493 頁，其完整教示在此以引用方式納入本文中。適合的保護基應為非毒性的、在醫藥調配物中是穩定的並且具有最小的其他官能性，以維持凝血酶胜肽衍生物的活性。游離的硫基可被保護成硫酸醚、硫酯，或可被氧化成非對稱性的二硫化物。較佳地，硫基是被保護成硫醚。適合的硫醚包括，但並不限於，S-烷基硫醚（例如，C₁-C₅ 烷基）以及 S-苄基硫醚（例如，半胱胺酸-S-S-第三-丁基）。較佳地，保護基是烷基硫醚。更佳地，S-保護的半胱胺酸是 S-甲基半胱胺酸。可選擇地，保護基可以是：1) 藉由雙硫鍵而附著到凝血酶胜肽衍生物的半胱胺酸硫基之半胱胺酸或包含半胱胺酸的胜肽（“保護的胜肽”）；或 2) 藉由在凝血酶胜肽衍生物的半胱胺酸硫基以及保護的胜肽的羧酸（例如，在天冬胺酸或麩胺酸的

C-端或側鏈)間之硫醯胺鍵而附著的胺基酸或胜肽(“保護的胜肽”)。保護的胜肽可以是生理上惰性的(例如,不超過約 50 個胺基酸的聚甘胺酸或聚丙胺酸,視需要以半胱胺酸中斷)或可具有想要的生物活性。

凝血酶胜肽衍生物二聚體

在本發明的部分形態中,本發明方法之 NPAR 激動劑是凝血酶胜肽衍生物二聚體。參見公告案 US 2005/0153893,其特此以引用方式納入本文中。二聚體基本上不會回復成單體,並且仍然具有與上述凝血酶胜肽衍生物單體大約相同的生物活性。“凝血酶胜肽衍生物二聚體”是包括兩個凝血酶胜肽衍生物的分子,係藉由在半胱胺酸殘基之間的共價鍵(較佳是雙硫鍵)而連結。凝血酶胜肽衍生物二聚體通常基本上無對應的單體,例如,大於 95 重量%無對應的單體,以及較佳地大於 99 重量%無對應的單體。較佳地,多肽是相同的,並且經由雙硫鍵而共價地連結。

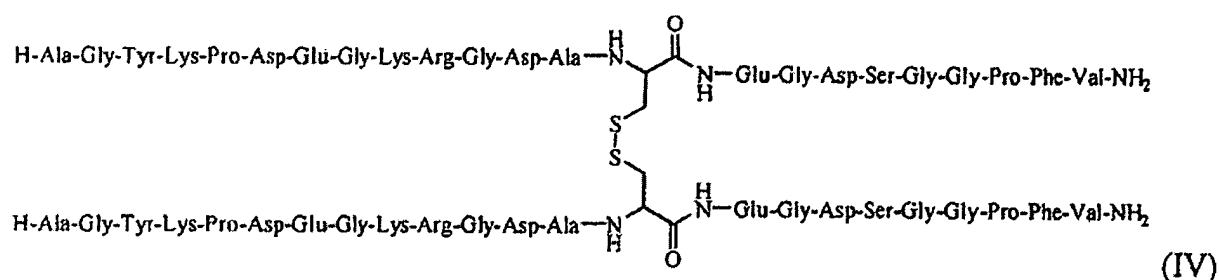
本發明的凝血酶胜肽衍生物二聚體包括上述的凝血酶胜肽衍生物。特別地,凝血酶胜肽衍生物具有少於約 50 個胺基酸,較佳地少於約 33 個胺基酸。凝血酶胜肽衍生物也與對應到凝血酶胺基酸殘基 508-530: Ala-Gly-Tyr-Lys-Pro-Asp-Glu-Gly-Lys-Arg-Gly-Asp-Ala-Cys-Glu-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-Phe-Val(序列識別號 6)的人類凝血酶之片段具有足夠的同源性,使得該多肽可活化 NPAR。

此處所說明的凝血酶胜肽衍生物二聚體是從通常具有至少 6 個胺基酸的多肽所形成，較佳是從約 12 至約 33 個胺基酸殘基的多肽所形成，以及更佳是從約 12 至約 23 個胺基酸殘基的多肽所形成。

在特定具體實例中，每一個包括二聚體的凝血酶胜肽衍生物都包括具有序列識別號 1 的胺基酸序列之多肽：Arg-Gly-Asp-Ala-Cys-X₁-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-X₂-Val，或其包括至少 6 個胺基酸的 C-端截斷片段。更特別地，每一個凝血酶胜肽衍生物都包括序列識別號 6 的胺基酸序列：Ala-Gly-Tyr-Lys-Pro-Asp-Glu-Gly-Lys-Arg-Gly-Asp-Ala-Cys-Glu-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-Phe-Val，或其包括序列識別號 5 的胺基酸 10-18 之片段。還要更特別地，凝血酶胜肽衍生物包括序列識別號 2 的胺基酸序列：Ala-Gly-Tyr-Lys-Pro-Asp-Glu-Gly-Lys-Arg-Gly-Asp-Ala-Cys-X₁-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-X₂-Val，或其包括序列識別號 2 的胺基酸 10-18 之片段。X₁ 是 Glu 或 Gln；以及 X₂ 是 Phe、Met、Leu、His 或 Val。較佳地，X₁ 是 Glu；以及 X₂ 是 Phe。這個類型的凝血酶胜肽衍生物的一個例子是包括胺基酸序列 Ala-Gly-Tyr-Lys-Pro-Asp-Glu-Gly-Lys-Arg-Gly-Asp-Ala-Cys-Glu-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-Phe-Val（序列識別號 6）的多肽。這個類型的凝血酶胜肽衍生物的另一個例子是具有胺基酸序列 H-Ala-Gly-Tyr-Lys-Pro-Asp-Glu-Gly-Lys-Arg-Gly-Asp-Ala-Cys-Glu-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-Phe-Val-NH₂（序列識別號 3）的多肽。在凝血酶胜肽衍生

物中的 0、1、2 或 3 個胺基酸是不同於在序列識別號 6、1、2 或 3 的對應位置之胺基酸。較佳地，差異是保守性的，如同 NPAR 激動劑之保守性取代。

本發明的凝血酶胜肽衍生物二聚體的一個例子是由式 (IV) 而表示：



在另一特定具體實例中，每一個包括二聚體的凝血酶胜肽衍生物都包括具有序列識別號 27 的胺基酸序列之多肽：Ala-Gly-Tyr-Lys-Pro-Asp-Glu-Gly-Lys-Arg-Gly-Asp-Ala-Cys-Glu-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-Phe-Val-Met-Lys-Ser-Pro-Phe-Asn-Asn-Arg-Trp-Tyr，或其具有至少 23 個胺基酸的 C-端截斷片段。更特別地，每一個凝血酶胜肽衍生物都包括序列識別號 28 的胺基酸序列：Ala-Gly-Tyr-Lys-Pro-Asp-Glu-Gly-Lys-Arg-Gly-Asp-Ala-Cys-X₁-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-X₂-Val-Met-Lys-Ser-Pro-Phe-Asn-Asn-Arg-Trp-Tyr，或其具有至少 23 個胺基酸的 C-端截斷片段。X₁ 是 Glu 或 Gln；以及 X₂ 是 Phe、Met、Leu、His 或 Val。較佳地，X₁ 是 Glu；以及 X₂ 是 Phe。這個類型的凝血酶胜肽衍生物的一個例子是包括胺基酸序列 Ala-Gly-Tyr-Lys-Pro-Asp-Glu-Gly-Lys-Arg-Gly-Asp-Ala-Cys-Glu-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-Phe-Val-Met-Lys-Ser-Pro-Phe-Asn-Asn-Arg-Trp-Tyr (序列識別號 27) 的多肽。這個類型的凝血酶

胜肽衍生物的另一個例子是包括胺基酸序列 H-Ala-Gly-Tyr-Lys-Pro-Asp-Glu-Gly-Lys-Arg-Gly-Asp-Ala-Cys-Glu-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-Phe-Val-Met-Lys-Ser-Pro-Phe-Asn-Asn-Arg-Trp-Tyr-NH₂ (序列識別號 29) 的多肽。在凝血酶胜肽衍生物中的 0、1、2 或 3 個胺基酸是不同於在序列識別號 27、28 或 29 的對應位置之胺基酸。較佳地，差異是保守性的，如同 NPAR 激動劑之保守性取代。

● NPAR 激動劑抗體

一種特定類型的 NPAR 激動劑包括可同時結合以及活化非-蛋白水解活化性凝血酶受體 (NPAR)，並可結合到如下所述的一種或多種互補胜肽之抗體以及抗原結合片段。可結合到凝血酶受體的激動劑抗體已在此技藝中被說明。例如，Frost 等人教示單株抗體 TR-9 可模擬凝血酶與高親合力凝血酶受體的高親合力交互作用之影響 (Frost G.H. 等人, J. Cell Biol. 105 (6 PT. 1): 2551-58 (1987))。

● 可以是 NPAR 激動劑的抗體或其抗原結合片段，可藉由它們結合到編碼部分凝血酶的核苷酸序列之互補物所編碼的互補胜肽而被發現。參見以下的分子辨認理論。在一個例子中，NPAR 激動劑抗體或抗原結合片段係結合到編碼部分凝血酶的核苷酸序列之互補物所編碼的互補胜肽。在另一個例子中，NPAR 激動劑抗體或抗原結合片段可藉由其結合到編碼部分凝血酶的核苷酸序列之互補物所編碼的互補胜肽而被發現。在一具體實例中，凝血酶或其部分

(係由正義或+RNA 股所編碼，並且是編碼抗體或抗原結合片段所結合的互補胜肽之 RNA 股的互補物)是哺乳動物凝血酶或哺乳動物凝血酶的部分。在另一具體實例中，凝血酶或其部分是人類凝血酶或人類凝血酶的部分。

可結合到互補胜肽的抗體或抗原結合片段，其中互補胜肽係藉由編碼凝血酶或其部分的核苷酸序列之互補物所編碼，可以是 NPAR 激動劑。在一具體實例中，凝血酶的部分(係由正義或+RNA 股所編碼，並且是編碼抗體或抗原結合片段所結合的互補胜肽之 RNA 股的互補物)是凝血酶受體結合功能域或其部分。此處所使用的凝血酶受體結合功能域或其部分是凝血酶的片段，其可選擇性地結合到高親合力之非-蛋白水解活化性凝血酶受體(NPAR)。該等凝血酶受體結合功能域包含部分的功能域(由人類凝血酶的胺基酸殘基 517-520 所表示；參見第 7 圖，描繪人類原-凝血酶的胺基酸序列(序列識別號 12)，與纖維網蛋白的三胜肽細胞結合功能域(Arg-Gly-Asp)具有序列同源性)。在一特定具體實例中，凝血酶受體結合功能域或其部分包括胺基酸序列 AGYKPDEGKRGDACEGDSGGPFV (也就是，人類凝血酶的胺基酸殘基 508-530 (序列識別號 6))。在另一具體實例中，凝血酶受體結合功能域或其部分是凝血酶受體結合功能域的一部分，並且包括胺基酸序列 EGKRGDACEG (序列識別號 7)。

如同此處之說明，藉由反義 RNA 股的 5'-3'序列以及反義 RNA 股的 3'-5'序列所編碼之凝血酶功能域的互補胜

肽，可用於製造本發明的 NPAR 激動劑抗體以及抗原結合功能域。因此，在一具體實例中，（抗體及抗原結合片段所結合的）互補胜肽是藉由反義 RNA 股的 5'-3' 序列所編碼。在另一具體實例中，互補胜肽是藉由反義 RNA 股的 3'-5' 序列所編碼。

在一個例子中，（本發明之 NPAR 激動劑抗體及抗原結合片段所結合的）互補胜肽包括胺基酸序列 KGSPTVTFTGIPCFPFIRLVTS（AC-23；序列識別號 30）。在另一個例子中，互補胜肽包括胺基酸序列 KGSPTVTFTGIPSFPFIRLVTS（23C53；序列識別號 31）。在另一個例子中，互補胜肽包括胺基酸序列 TFTGIPSFPF（C1053；序列識別號 32）。在另一個例子中，互補胜肽包括胺基酸序列 RPMFGLLPFAPLRTLPLSPPGKQ（AC-23rev（序列識別號 33），其為對應到 AC-23 的互補 5'-3' 胜肽）。在另一個例子中，互補胜肽包括胺基酸序列 LPFAPLRTLPL（C1053rev（序列識別號 34），其為對應到 C1053 的互補 5'-3' 胜肽）。

NPAR 激動劑抗體或其抗原結合片段的一個例子係結合到改變半胱胺酸的互補胜肽，其包括胺基酸序列 KGSPTVTFTGIPSFPFIRLVTS（23C53；序列識別號 31）。23C53（其與 AC-23 不同於單一的胺基酸）是 TP508 的互補胜肽，除了它具有單一的胺基酸從 Cys 改變成 Ser 之外。

在利用生物素連結的凝血酶之結合實驗中，凝血酶被發現可專一性地結合到 AC23 以及 23C53。生物素標示的

凝血酶與 AC-23 之半數最大結合是 $48 \pm 0.2 \text{ nM}$ ($n = 2 \pm \text{SD}$)。

加入 TP508 可抑制生物素標示的凝血酶與 AC-23 之專一性結合。多達 60% 的凝血酶與 AC-23 之結合，可藉由加入 TP508 而抑制。因此，凝血酶以及 TP508 都可結合到互補胜肽 AC-23。這顯示 AC-23 具有類似於細胞上的凝血酶-TP508 受體之三維結構。對抗 AC-23 以及凝血酶的其他互補胜肽之抗體，因此可用於定性被 TP508 活化的凝血酶結合部位，並且可用於此處所說明的治療以及其他方法中。

除了凝血酶受體結合功能域之外，刺激性（激動性）凝血酶多肽衍生物也具有與許多絲胺酸酯酶高度同源性的功能域（由人類凝血酶的胺基酸殘基 519-530 所表示）。然而，抑制性（拮抗性）凝血酶多肽衍生物則沒有包括絲胺酸酯酶功能域。

得自人類凝血酶的胺基酸殘基 508-530 之凝血酶胜肽衍生物，已被說明用於促進凝血酶受體介導的細胞刺激。此外，包含纖維網蛋白-及絲胺酸蛋白酶-同源性的功能域（人類凝血酶的殘基 508 至 530）之刺激性（激動性）凝血酶多肽衍生物，也以高親合力結合到凝血酶受體，並且取代 DIP- α -凝血酶作為受體佔有相關的細胞分裂信息之啟動劑。（DIP- α -凝血酶是凝血酶可保留受體結合活性之蛋白水解不活化的衍生物。）相對地，僅包含纖維網蛋白-同源性的功能域（p517-520）（但無絲胺酸蛋白酶-同源性的功能域）之抑制性（拮抗性）凝血酶多肽衍生物，則結合到凝血酶受體，而不會誘發細胞分裂。中間型的凝血酶

胜肽衍生物 (p519-530) 保留可介導細胞分裂的能力，但遠小於 p508-530 的程度。

分子辨認理論

Blalock 及 Smith (1984) 觀察到胺基酸殘基的親水特徵是有關於轉錄該胺基酸殘基的三個一組密碼子之中間字母的特性 (Blalock J.E. 及 Smith E.M., Biochem. Biophys. Res. Commun. 12: 203-07 (1984))。特別地，具有胸腺嘧啶 (T) 作為其中間鹼基的三個一組密碼子係編碼疏水性殘基，而腺嘌呤 (A) 則編碼親水性殘基。具有中間鹼基胞嘧啶 (C) 或鳥嘌呤 (G) 的三個一組密碼子，係編碼相當中性以及具有類似親水性分數的殘基。親水性是胺基酸對於極性環境的親合力指數；親水性殘基會產生更負向的分數，而疏水性殘基則顯示更正向的分數。Kyte 及 Doolittle (1982) 構想出一種被廣泛使用的親水性等級 (Kyte J. 及 Doolittle R.F., J. Mol. Biol. 5: 105-32 (1982))。三個一組密碼子的中間鹼基以及殘留親水性之間觀察到的關連性，使得由互補 DNA 編碼的胜肽將必須顯示出互補或反向的親水性紀錄。因為在互補 DNA 股中編碼的兩個胜肽序列顯示反向的親水性紀錄，因此，有提議指出它們可形成兩性的二級結構並且互相結合 (Bost K.L. 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 1372-75 (1985))。互補的胜肽已被報導可形成具有它們“正義”胜肽配對物的結合複合體，以用於許多不同的系統 (Root-Bernstein R.S. 及 Holsworthy

D.D., J. Theor. Biol. 190: 107-19 (1988))。例如, Gho 及 Chae 說明人類血管生成素的胜肽類似物, 其為藉由對應到血管生成素的受體結合位置之反義 RNA 序列所編碼的互補胜肽(Gho Y.S.及 Chae C.B., J. Biol. Chem. 272(39): 24294-99 (1997))。Chiso 等人說明互補於顯示抑制活性的血清朊抑素 C 的區域之胜肽(Chiso J.等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87(4): 1288-91 (1990)), 以及 Bost 及 Blalock 說明藉由以一對互補胜肽致免疫而製造抗-獨特型抗體(Bost K.L.及 Blalock J.E., J. Mol. Recognit. 1: 179-83 (1989))。

這個用於解釋蛋白質間交互作用的分析之範圍, 是由 Blalock 進一步開發以提出分子辨認理論(MRT)(Bost K.L. 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 1372-75 (1985); Blalock J.E., Nat. Med. 1: 876-78 (1995))。這個理論建議, 交互作用的“分子辨認”密碼係存在於由 DNA 的互補股所編碼的胜肽之間, 這是根據該等胜肽將顯示反向的親水性紀錄之觀察。分子辨認理論對於預測特定的結合交互作用者已證明是成功的。

Blalock 建議, 在一個序列中(而非特定殘基相同性的組合)是胺基酸親水性分數的線性模式, 其可定義二級結構的環境。此外, 他也建議具有反向親水性紀錄的序列是藉由反向力而形狀互補, 其可決定它們的空間關連性。

在 3'-5' 譯讀架構中衍生互補胜肽

作為 Blalock 原始創作的必然推論，他也堅決主張如同以通常的 5'-3'方向譯讀互補密碼子，以 3'-5'方向譯讀互補密碼子也將產生可顯示相反親水性紀錄的胺基酸序列（Bost K.L.等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82：1372-75（1985））。從該觀察中，這推斷三個一組密碼子的中間鹼基可決定其編碼的殘基之親水性指數，並且因此以反方向譯讀密碼子可改變相同性，但不會改變編碼的胺基酸之親水特性（表 1）。

表 1：胺基酸以及在互補股中編碼的殘基間之關連性

胺基酸以及在互補股譯讀 3'-5'中編碼的殘基間之關連性							
胺基酸	密碼子	互補密碼子	互補胺基酸	胺基酸	密碼子	互補密碼子	互補胺基酸
丙胺酸	GCA	CGU	精胺酸	絲胺酸	UCA	AGU	絲胺酸
	GCG	CGC			UCC	AGG	精胺酸
	GCC	CGG			UCG	AGC	絲胺酸
	GCU	CGA			UCU	AGA	精胺酸
					AGC	UCG	絲胺酸
					AGU	UCA	絲胺酸
精胺酸	CGG	GCC	丙胺酸	麩醯胺酸	CAA	GUU	纈胺酸
	CGA	GCU			CAG	GUC	纈胺酸
	CGC	GCG					
	CGU	GCA					
	AGG	UCC					
	AGA	UCU					
天冬胺酸	GAC	GUC	纈胺酸	甘胺酸	GGA	CCU	脯胺酸
	GAU	AUC			GGC	CCG	脯胺酸
					GGU	CCA	脯胺酸
					GGG	CCC	脯胺酸
天冬醯胺酸	AAC	UUG	白胺酸	組胺酸	CAC	GUG	纈胺酸
	AAU	UUA			GAU	GUA	纈胺酸
半胱胺酸	UGU	ACA	蘇胺酸	異白胺酸	AUA	UAU	酪胺酸
	UGC	ACG			AUC	UAG	終止
					AUU	UAA	終止
麩胺酸	GAA	CUU	白胺酸	白胺酸	CUG	GAC	天冬胺酸
	GAG	CUG			CUC	GAG	麩胺酸
					CUU	GAA	麩胺酸
					UUA	AAU	麩胺酸
					CUA	GAU	麩胺酸
					UUG	AAC	天冬醯胺酸
					CUG	GAC	天冬胺酸
						天冬胺酸	

離胺酸	AAA	UUU	苯丙胺酸	蘇胺酸	ACA	UGU	半胱胺酸
	AAG	UUC	苯丙胺酸		ACG	UGC	半胱胺酸
					ACC	UGG	色胺酸
					ACU	UGA	終止
甲硫胺酸	AUG	UAC	酪胺酸	色胺酸	UGG	ACC	蘇胺酸
苯丙胺酸	UUU	AAA	離胺酸	酪胺酸	UAC	AUG	甲硫胺酸
	UUC	AAG	離胺酸		UAU	AUA	異白胺酸
脯胺酸	CCA	GGU	甘胺酸	纈胺酸	GUA	CAU	組胺酸
	CCC	GGG	甘胺酸		GUG	CAC	組胺酸
	CCU	GGA	甘胺酸		GUC	CAG	麩醯胺酸
	CCG	GGC	甘胺酸		GUU	CAA	麩醯胺酸

抗體以及製造抗體的細胞

此處所指之 NPAR 激動劑涵蓋可結合此處所說明的互補胜肽並可活化非-蛋白水解活化性凝血酶受體之抗體及其抗原結合片段。此處所指的抗體可以是多株或單株的，以及名詞“抗體”是希望涵蓋多株以及單株抗體。名詞多株或單株是指抗體製備物的同質性程度，並且不希望被限制在特定的製造方法。在一具體實例中，抗體或抗原結合片段是單株的抗體或其抗原結合片段。此處所使用的名詞“單株抗體”或“單株抗體組成物”是指抗體分子的總體，其僅包含一種可與本發明多肽的特定抗原決定部位免疫反應之抗原結合位置。因此，單株抗體組成物通常對於與其免疫反應的本發明之特定多肽，顯示單一的結合親合力。

此處所使用的名詞“抗體”也涵蓋抗體的功能片段，其包括嵌合的、人類化的、靈長類化的、表面修飾的或單鏈的抗體之片段。功能片段包括可結合到互補胜肽的抗體之抗原結合片段，其中互補胜肽係由編碼凝血酶或其部分的核苷酸序列之互補物所編碼。例如，可結合到的互補胜

肽抗體片段包括，但並不限於，Fv、Fab、Fab'片段以及F(ab')₂片段。該等片段可藉由酵素切割或藉由重組技術而製造。例如，木瓜蛋白酶或胃蛋白酶的切割可分別產生Fab或F(ab')₂片段。抗體也可利用抗體基因而以各種截斷的形式而製造，在抗體基因中，一個或多個終止密碼子已被導入到天然終止位置的上游。例如，可設計編碼F(ab')₂重鏈部分的嵌合型基因，以納入編碼重鏈的CH₁功能域以及樞紐區域之DNA序列。

包括衍生自不同物種的部分之單鏈抗體以及嵌合的、人類化的或靈長類化的(CDR-移植的)或表面修飾的抗體，以及嵌合的、CDR-移植的或表面修飾的單鏈抗體，也被名詞“抗體”所涵蓋。這些抗體的不同部分可藉由傳統技術而化學地結合在一起，或可利用遺傳工程技術而製備成連續的蛋白質。例如，可表現編碼嵌合型或人類化鏈的核酸，以製造連續的蛋白質。例如，參見Cabilly等人，美國專利第4,816,567號；Cabilly等人，歐洲專利第0,125,023 B1號；Boss等人，美國專利第4,816,397號；Boss等人，歐洲專利第0,120,694 B1號；Neuberger M.S.等人，WO 86/01533；Neuberger M.S.等人，歐洲專利第0,194,276 B1號；Winter，美國專利第5,225,539號；Winter，歐洲專利第0,239,400 B1號；Queen等人，歐洲專利第0,451,216 B1號；以及Padlan E.A.等人，歐洲專利第0,519,596 A1號。也參見Newman等人，BioTech. 10: 1455-1460 (1992)，有關於靈長類化的抗體；以及Lander等人的美國專利第

4,946,778 號及 Bird R.E. 等人，Science 242：423-426 (1988)，有關於單鏈抗體。

人類化的抗體可使用標準方法的合成或重組 DNA 技術或其他適合的技術而製造。編碼人類化可變區的核酸(例如，cDNA)序列，也可利用 PCR 致突變法而構築，以改變編碼人類或人類化鏈的 DNA 序列，例如，得自先前人類化可變區的 DNA 模板(例如，參見 Kamman M. 等人，Nucl. Acids Res. 17: 5404 (1989)；Sato K. 等人，Cancer Res. 53：851-856 (1993)；Daugherty B.L. 等人，Nucl. Acids Res. 19(9)：2471-2476 (1991)；以及 Lewis A.P. 及 J.S. Crowe，Gene 101：297-302 (1991))。利用這些或其他適合的方法也可易於製造變異物。在一具體實例中，可將經選殖的可變區突變，並可篩選編碼具有所要專一性的變異物之序列(例如，從噬菌體資料庫；例如，參見 Krebber 等人，美國專利第 5,514,548 號；Hoogenboom 等人，WO 93/06213)。

抗體可以是包括一個或多個免疫球蛋白鏈的人類化抗體(例如，包括非人類來源的互補性決定區域(CDR)(例如，一個或多個衍生自非人類來源的抗體之 CDR)以及衍生自人類來源的輕鏈及/或重鏈之架構區域(例如，具有或不具有架構改變的 CDR 移植抗體)的抗體)。在一具體實例中，抗體或其抗原結合片段包括特定免疫球蛋白的輕鏈 CDR(CDR1、CDR2 及 CDR3)以及重鏈 CDR(CDR1、CDR2 及 CDR3)。在另一具體實例中，抗體或其抗原結合片段

更包括人類架構區域。

對於互補胜肽是專一性的抗體（其中互補胜肽係由編碼凝血酶或其部分的核苷酸序列之互補物所編碼），可針對適當的免疫原而引起，例如，合成或重組的互補胜肽或其部分。抗體也可藉由將適當的宿主（例如，小鼠）以可表現互補胜肽的轉染細胞致免疫而引起。該等細胞也可用於篩選可與其結合的抗體（例如，參見 Chuntharapai 等人，*J. Immunol.* 152：1783-1789（1994）；Chuntharapai 等人，美國專利第 5,440,021 號）。

致免疫的抗原之製備以及多株及單株抗體的製造，可利用任何適當的技術（例如，此處所例示的技術）而進行。許多的方法已被說明（例如，參見 Kohler 等人，*Nature* 256：495-497（1975）及 *Eur. J. Immunol.* 6：511-519（1976）；Milstein 等人，*Nature* 266：550-552（1977）；Koprowski 等人，美國專利第 4,172,124 號；Harlow E. 及 D. Lane（1988），*抗體：實驗室手冊*（冷泉港實驗室：冷泉港，紐約）；*分子生物學的現代方法*，第 2 卷（增刊 27，1994 夏季），Ausubel F.M. 等人編輯（John Wiley & Sons：紐約，紐約州），第 11 章（1991））。一般而言，融合瘤是藉由將適當的永生細胞系（例如，骨髓瘤細胞系，例如，SP2/0、P3X63Ag8.653 或異質性骨髓瘤）與製造抗體的細胞融合而製造。製造抗體的細胞可得自以互補胜肽致免疫的人類或其他適合的動物之周圍血液，或較佳是脾臟或淋巴結。融合的細胞（融合瘤）可利用選擇性的培養條件而

分離，並且藉由限制性稀釋而選殖。可製造具有想要專一性的抗體之細胞，可藉由適當的分析（例如，ELISA）而篩選。

可使用其他適合之製造及分離必要專一性的抗體（例如，人類抗體或抗原結合片段）之方法，其包括例如，從資料庫（例如，噬菌體展示資料庫）中篩選重組抗體之方法。可製造全部人類抗體的轉殖動物（例如，Xenomouse[®]（Abgenix，富立蒙，加州）），可利用適合的方法而製造（例如，參見 Jakobovits 等人，Proc. Natl. acad. Sci. USA 90：2551-2555（1993）；Jakobovits 等人，Nature，362：255-258（1993））。適合於製造轉殖動物（其可製造全部人類抗體）的其他方法已被說明（例如，Lonberg 等人，美國專利第 5,545,806 號；Surani 等人，美國專利第 5,545,807 號；Lonberg 等人，WO 97/13852）。

本發明也涵蓋雙專一性的抗體或其功能片段（例如， $F(ab')_2$ ），其可結合到此處所說明的互補胜肽以及至少一個其他的抗原（例如，腫瘤抗原、病毒抗原）。雙專一性的抗體可藉由三瘤體（trioma）以及雜合的融合瘤而分泌。一般而言，三瘤體是藉由將融合瘤與淋巴細胞（例如，分泌抗體的 B 細胞）融合而形成，以及雜合的融合瘤是藉由融合兩個融合瘤而形成。每一個融合細胞（也就是，融合瘤、淋巴細胞）都製造單專一性的抗體。然而，三瘤體以及雜合的融合瘤卻可製造包含可辨認不同抗原的抗原結合位置之抗體。可利用適當的分析（例如，ELISA）而對三

瘤體以及雜合的融合瘤的上清液分析雙專一性的抗體，以及雙專一性的抗體可利用傳統方法而純化（例如，參見美國專利第 5,959,084 號（Ring 等人）、美國專利第 5,141,736 號（Iwasa 等人）、美國專利第 4,444,878、5,292,668、5,523,210 號（都屬於 Paulus 等人）以及美國專利第 5,496,549 號（Yamazaki 等人））。

血管生成性生長因子

“血管生成性生長因子”是一種多肽，其可刺激血管的發育，例如，促進血管生成、內皮細胞生長、血管穩定性及/或脈管新生。例如，血管生成性因子包括，但並不限於，例如，VEGF 以及 VEGF 家族的成員、PIGF、PDGF 家族、纖維母細胞生長因子家族（FGF）、TIE 配體（血管蛋白質）、艾芙林素（ephrin）、ANGPTL3、ANGPTL4 等等。血管生成性因子也包括多肽，例如，生長激素、類胰島素的生長因子 I（IGF-I）、VIGF、表皮生長因子（EGF）、CTGF 及其家族成員以及 TGF- α 及 TGF- β 。例如，參見 Klagsbrun 及 D'Amore, *Annu. Rev. Physiol.* 53: 217-39 (1991); Streit 及 Detmar, *Oncogene* 22: 3172-3179 (2003); Ferrara 及 Alitalo, *Nat. Med.* 5(12): 1359-1364 (1999); Tonini 等人, *Oncogene* 22: 6549-6556 (2003); 以及 Sato, *Int. J. Clin. Oncol.* 8: 200-206 (2003)。

此處所使用的名詞“VEGF”（也稱為“VEGF-A”）是指血管內皮細胞生長因子蛋白質 A。此處所使用的名詞

“人類 VEGF”（也稱為“人類 VEGF-A”）是指任何人類血管內皮細胞生長因子的異構型。所說明的異構型（藉由獨特的 mRNA 剪接而產生）包括 121、145、148、165、165b、183、189 以及 206。例如，參見表 2，以及 Leung 等人，Science 246：1306（1989）以及 Houck 等人，Mol. Endocrin. 5：1806（1991）。“人類 VEGF”也包括人類 VEGF-A 之天然存在的對偶基因變異物，以及藉由轉譯後修飾的變化所產生的變異物。表 2 不希望是無所不包或限制性的。在表 2 中的血管生成性生長因子是人類的，除非有其他不同的指明。

表 2：VEGF 家族的血管生成性生長因子的例子

血管生成性生長因子	受體	染色體位置	GenBank 編號	參考文獻
人類 VEGF-A	VEGFR1 VEGFR2	6p12	NM_003376	
異構型： 121				
145				
148				
165				
165b				
183				
189				
206				
人類 VEGF-B	VEGFR1	11q13	NM_003377	
人類 VEGF-C	VEGFR3 VEGFR2	4q34.1-q34.3	NM_005429	
人類 VEGF-D	VEGFR3 VEGFR2	Xp22.31	NM_004469	
VEGF-E [口瘡病毒 (Orf virus) (D1701)]	VEGFR2		AF106020	
VEGF-E [口瘡病毒 (NZ2)]	VEGFR2		S67520	
VEGF-E [口瘡病毒 (NZ7)]	VEGFR2		S67522	
VEGF-E _{N27} /PIGF (嵌合型)	VEGFR2			1,2
VEGF-E/PIGF (嵌合型)	VEGFR2			3
PIGF	FLT1	14q22-q24.3	NM_002632	

VEGFR1			
異構型：			
PIGF1			
PIGF2			
PIGF3			
PIGF4			
VEGF-F (奎蛇)	VEGFR2		4
黑腹果蠅 PV1		NM_078683	5
黑腹果蠅 PVF2		NM_078775	5
黑腹果蠅 PVF3		NM_078776	5

參考文獻：

1. Zheng Y.等人，“嵌合型 VEGF-EN27/PIGF 經由 VEGFR2 促進血管生成，而無明顯血管通透性及發炎的增強”，*Arterioscler. Throm. Vasc. Biol.* 26：2019-2026（2006）。
2. Zheng Y.等人，“嵌合型 VEGF-EN27/PIGF 專一性地結合到 VEGFR-2 係經由新脈管化作用的增強而加速皮膚創傷愈合”，*Arterioscler. Throm. Vasc. Biol.* 27：503-511（2007）。
3. Inoue N.等人，“利用新穎的血管內皮生長因子-E/人類胎盤生長因子嵌合基因之治療性血管生成”，*Arterioscler. Throm. Vasc. Biol.* 27：99-105（2007）。
4. Suto K.等人，“得自蛇毒的新穎血管內皮生長因子（VEGF）之結晶結構：洞察選擇性 VEGF 結合到包含激酶插入功能域的受體但不會結合到類似 *fms* 的酪胺酸激酶-1”，*J. Biol. Chem.* 280(3)：2126-2131（2005）。
5. Duchek P.，“藉由果蠅 PDGF/VEGF 受體而引導細胞移動”，*Cell* 107(1)：17-26（2001）。

人類 VEGF-A 是以許多異構型而存在，其係由組織成

位於染色體 6 的 8 個外顯子 (exon) 之單一基因的 mRNA 之可選擇的剪接而引起 (例如, 參見 Ferrara N. 及 Davis Smyth T., *Endocr. Rev.* 18: 1-22 (1997); 以及 Henry 及 Abraham, “血管內皮生長因子對於治療性血管生成的前臨床以及臨床結果之回顧”, *Curr. Intervent. Cardiol. Rep.* 2: 228-241 (2000))。也參見美國專利第 5,332,671 及 6,899,882 號。在一具體實例中, VEGF₁₆₅ 是在本發明的方法中投予 (例如, 重組人類 VEGF₁₆₅)。VEGF₁₆₅ (最豐富的異構型) 是具有分子質量約 45,000 道耳吞 (Id) 之鹼性的、結合肝素的、二聚體的共價糖蛋白。VEGF₁₆₅ 同二聚體是由兩條 165 個胺基酸的鏈所組成。這個蛋白質具有兩個不同的功能域: 結合受體的功能域 (殘基 1-110) 以及結合肝素的的功能域 (殘基 110-165)。這兩個功能域是藉由 7 個分子內的雙硫鍵而穩定, 以及單體是藉由兩個鏈間的雙硫鍵而連接, 以形成天然的同二聚體。VEGF₁₂₁ 缺少結合肝素的的功能域 (例如, 參見美國專利第 5,194,596 號), 而 VEGF₁₈₉ (例如, 參見美國專利第 5,008,196、5,036,003 及 5,240,848 號) 以及 VEGF₂₀₆ 則在細胞外的基質中被隔離。

名詞“血管生成性生長因子”也包括以下在表 3 中的血管生成性生長因子。在表 3 中的名單不希望是無所不包或限制性的。

表 3

其他血管生成性生長因子的例子

血管生成素
血管蛋白質-1
Del-1
酸性纖維母細胞生長因子 (aFGF 或 FGF-1^{1,2})
鹼性纖維母細胞生長因子 (bFGF 或 FGF-2^{3,4})
纖維母細胞生長因子 4 (FGF4)
卵泡抑素
粒細胞群落刺激因子 (G-CSF)
肝細胞生長因子 (HGF) / 離散因子 (SF)
介百素-8 (IL-8)
萊普汀 (Leptin)
中期因子 (Midkine)
血小板衍生的內皮細胞生長因子 (PD-ECGF)
血小板衍生的生長因子-BB (PDGF-BB) (rhPDGF-BB 是 Regranex®)
多效蛋白 (PTN)
顆粒蛋白前體 (Progranulin)
增殖蛋白 (Proliferin)
轉形生長因子- α (TGF- α)
轉形生長因子- β (TGF- β)
腫瘤壞死因子- α (TNF- α)
血管內皮生長因子 (VEGF) / 血管通透因子 (VPF)
胸腺肽 β 4 (T β 4)
結締組織生長因子
骨橋蛋白 (Osteopontin)
胰島素生長因子 (IGF-1)

血管生成性生長因子	受體	染色體位置	GenBank 編號	參考文獻
PDGFD	PDGFR- α PDGFR- β	11q22.3	NM_025208	
PDGF- α		7p22	NM_002607	
PDGF2		22q12.3-q13.1	NM_002608	
異構型：				
1 (241 個胺基酸)				
2 (226 個胺基酸)				
PDGFC	PDGFR- α	4q32	NM_016205	

參考文獻：

1. Schumacher B. 等人， “藉由人類生長因子在缺血性心肌

中誘發新血管生成：冠狀動脈心臟疾病的新治療之第一臨床結果”，*Circulation* 97：645-650（1998）。

2. Stegmann T.J.等人，“藉由人類生長因子誘發心肌新血管生成：在冠狀動脈心臟疾病中的新治療選擇”，*Herz* 25：589-599（2000）。

3. Selke F.W.等人，“以鹼性纖維母細胞生長因子之治療性血管生成：技術以及早期結果”，*Ann. Thorac. Surg.* 65：1540-1544（1998）。

4. Laham R.J.等人，“鹼性纖維母細胞生長因子在經歷冠狀動脈繞道手術的患者中之局部周圍血管傳遞：第1期隨機化、雙盲、安慰劑對照的試驗之結果”，*Circulation* 100：1865-1871（1999）。

“天然的”多肽（例如，天然的血管生成性因子）是與從天然來源分離的多肽具有相同胺基酸序列的多肽。因此，天然的多肽可具有來自任何哺乳動物（例如，人類）之天然存在的多肽之胺基酸序列。該等天然的多肽可從自然界分離，或可藉由重組或合成的方法而製造。名詞天然的多肽涵蓋多肽之天然存在的截斷或分泌形式（例如，細胞外功能域序列）、命名為野生型的對偶基因形式、天然存在的變異形式（例如，可選擇地剪接異構型）以及多肽之天然存在的對偶基因變異物。

“多肽變異物”（例如，血管生成性因子的多肽變異物）是指生物活性的多肽，其與天然的多肽具有至少約 80

%的胺基酸序列同一性。該等“多肽變異物”包括，例如，相較於天然的多肽，其中一個或多個胺基酸殘基在多肽的胺基及/或 C-端被加入或刪除之多肽。通常，多肽變異物將與天然的多肽具有至少約 80%的胺基酸序列同一性、或至少約 90%的胺基酸序列同一性、或至少約 95%或更多的胺基酸序列同一性。多肽變異物包括含有一個或多個胺基酸取代、加入或刪除或任何與天然多肽的這些差異之組合的多肽。相較於天然的多肽，多肽變異物可具有例如數個（例如，5 至 10 個、1 至 5 個、或 4、3、2 或 1 個）胺基酸被取代、刪除或加入，以任何組合的形式。在一具體實例中，變異物具有沈默的取代、加入及/或刪除，相較於天然的多肽，其不會明顯改變多肽的性質以及活性。多肽變異物也可以是經修飾的多肽，其中一個或多個胺基酸殘基被修飾。多肽變異物可藉由許多在此技藝中熟知的方法而製備。與天然的多肽不同於胺基酸序列之多肽變異物，可藉由在編碼 DNA 中突變而製備。多肽變異物也包括與天然的多肽不同於糖基化作用或其他轉譯後修飾的多肽。

多肽變異物也可例如藉由在編碼天然多肽的 DNA 中之核苷酸的定點致突變或藉由噬菌體展示技術而製備，藉此製造編碼變異物的 DNA，並且之後在重組細胞培養物中表現 DNA。

胺基酸刪除的範圍一般是從約 1 至 30 個殘基，視需要地 1 至 10 個殘基，視需要地 1 至 5 個殘基或更少，並且通常是連續的。

胺基酸序列的加入包括從一個殘基到基本上未限制長度的多肽之胺基及/或 C-端融合，以及單一或多個胺基酸殘基的序列內插入。序列內加入（也就是，在天然的多肽序列之內加入）的範圍一般可從約 1 至 10 個殘基，視需要地 1 至 5 個殘基，或視需要地 1 至 3 個殘基。末端插入的例子包括將信息序列（無論對於宿主細胞是異源性或同源性）融合至 N-端，以促進從重組宿主中之分泌。

加入的多肽變異物是在天然的多肽中至少一個胺基酸殘基已被移除，並且在其位置插入不同的胺基酸殘基（取代）之多肽變異物。在血管生成性生長因子的多肽變異物中之保守性取代，可根據在表 4 中所示的取代而進行，其中例示以及較佳的取代是在血管生成性生長因子的多肽變異物中之保守性取代。多肽變異物也可包括如此處所說明之非天然的胺基酸。

胺基酸可根據它們側鏈的性質之相似性而分組（A.L. Lehninger，生物化學，第二版，第 73-75 頁，Worth 出版社，紐約（1975））：

（1）非極性：Ala（A）、Val（V）、Leu（L）、Ile（I）、Pro（P）、Phe（F）、Trp（W）、Met（M）；

（2）未帶電荷的極性：Gly（G）、Ser（S）、Thr（T）、Cys（C）、Tyr（Y）、Asn（N）、Gln（Q）；

（3）酸性：Asp（D）、Glu（E）；

（4）鹼性：Lys（K）、Arg（R）、His（H）。

可選擇地，天然存在的胺基酸也可根據共同的側鏈性

質而分組：

- (1) 疏水性：正白胺酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile；
- (2) 中性親水性：Cys、Ser、Thr、Asn、Gln；
- (3) 酸性：Asp、Glu；
- (4) 鹼性：His、Lys、Arg；
- (5) 可影響側鏈方向性的殘基：Gly、Pro；
- (6) 芳香性：Trp、Tyr、Phe。

表 4

原始的殘基	例示的取代	較佳的取代
Ala (A)	Val ; Leu ; Ile	Val
Arg (R)	Lys ; Gln ; Asn	Lys
Asn (N)	Gln ; His ; Asp ; Lys ; Arg	Gln
Asp (D)	Glu ; Asn	Glu
Cys (C)	Ser ; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn ; Glu	Asn
Glu (E)	Asp ; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn ; Gln ; Lys ; Arg	Arg
Ile (I)	Leu ; Val ; Met ; Ala ; Phe ; 正白胺酸	Leu
Leu (L)	正白胺酸 ; Ile ; Val ; Met ; Ala ; Phe	Ile
Lys (K)	Arg ; Gln ; Asn	Arg
Met (M)	Leu ; Phe ; Ile	Leu
Phe (F)	Trp ; Leu ; Val ; Ile ; Ala ; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val ; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr ; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp ; Phe ; Thr ; Ser	Phe
Val (V)	Ile ; Leu ; Met ; Phe ; Ala ; 正白胺酸	Leu

“天然存在的胺基酸殘基”（也就是由遺傳密碼所編碼的胺基酸殘基）可選自由以下所組成的族群中：丙胺酸（Ala）；精胺酸（Arg）；天冬醯胺酸（Asn）；天冬胺

酸 (Asp) ; 半胱胺酸 (Cys) ; 麩醯胺酸 (Gln) ; 麩醯胺酸 (Glu) ; 甘胺酸 (Gly) ; 組胺酸 (His) ; 異白胺酸 (Ile) ; 白胺酸 (Leu) ; 離胺酸 (Lys) ; 甲硫胺酸 (Met) ; 苯丙胺酸 (Phe) ; 脯胺酸 (Pro) ; 絲胺酸 (Ser) ; 蘇胺酸 (Thr) ; 色胺酸 (Trp) ; 酪胺酸 (Tyr) ; 以及纈胺酸 (Val) 。不同於以上列舉之天然存在的胺基酸殘基, “非天然存在的胺基酸殘基” 是指可經由胜肽鍵而結合到在多肽鏈中的相鄰胺基酸殘基之胺基酸殘基。非天然存在的胺基酸殘基的例子包括, 例如, 正白胺酸、鳥胺酸、正纈胺酸、高絲胺酸以及其他胺基酸殘基類似物, 例如, 在 Ellman 等人, Meth. Enzym. 202: 301-336 (1991) 以及美國專利申請案公告案 20030108885 及 20030082575 號中所說明的胺基酸殘基類似物。

“胺基酸序列同一性百分比 (%)” 在此是定義為在校準序列以及導入罰分 (如果需要的話) 以達到序列同一性的最大百分比並且不將任何保守性取代視為序列同一性的部分之後, 與所選擇序列中的胺基酸殘基相同的血管生成性生長因子的候選序列中之胺基酸殘基的百分比。為了決定胺基酸序列同一性的百分比的目的之校準, 可以許多在此技藝範圍內的方式而達到, 例如, 使用公開可利用的電腦軟體, 例如, BLAST、BLAST-2、ALIGN、ALIGN-2 或 Megalign (DNASTAR) 軟體。在此技藝中之人士可決定適當的參數以測量校準, 其包括在要比較的全長序列上為達到最大校準所需任何演算法。

為了此處之目的，指定胺基酸序列 A 對於指定胺基酸序列 B 之胺基酸序列同一性百分比（或可替代地表達為對於指定胺基酸序列 B 具有或包括特定％胺基酸序列同一性的指定胺基酸序列 A）係計算如下：100 乘以分數 X/Y ，其中 X 是以 A 及 B 的校準之相同配對所評分之胺基酸殘基的數目，以及其中 Y 是在 B 中的胺基酸殘基總數。應理解的是，當胺基酸序列 A 的長度不等於胺基酸序列 B 的長度時，A 對 B 的胺基酸序列同一性百分比將不等於 B 對 A 的胺基酸序列同一性百分比。

血管生成性生長因子的部分包括比對應天然多肽更短的多肽，並且包括對應天然多肽的至少 20 個連續胺基酸殘基，其與天然的多肽共享 75％至 100％的胺基酸序列同一性。在特定具體實例中，該等部分與天然的多肽共享 90％或 95％的胺基酸序列同一性。血管生成性生長因子的部分可被合成，並且可具有如它們存在於天然來源所分離的蛋白質中之 N-端的胺基以及 C-端的羧基，或可具有經修飾的 N-端（例如乙醯化的）及/或經修飾的 C-端（例如，醯胺化的）。血管生成性生長因子的部分可經由為了製造該等部分之目的所構築的基因之表現而產生。該等部分可以是環狀或線性的。在所有的例子中，血管生成性生長因子的部分都具有至少 50％的對應天然多肽之生物活性，係藉由適合於測量對應天然多肽的血管生成活性之分析而測量。

許多的分析先前已被用於測量血管生成性活性，並且

已被說明。不管是天然的多肽、多肽變異物、血管生成性生長因子的部分或血管新生生長因子的融合蛋白質，血管生成性生長因子都可利用此處所說明的一種或多種分析或其他適合的分析（例如，一般熟悉於此技藝中之人士已知的分析），藉由試管內或活體內的分析而測試以評估其活性。並不是所有的分析都適合於測量指定血管生成性生長因子的血管生成活性。

一種兔子的角膜分析已被說明，其中移植到角膜的血管生成性生長因子可刺激新微血管的生長。參見 Ziche 等人，*Lab. Invest.* 61：629-634（1989）。試管內的血管生成分析系統可提供被血管生成性生長因子刺激的內皮細胞之形態改變的觀察。參見 Montesano 等人，*J. Cell Biol.* 97：1648-1652（1983）。血管生成生長活性也可藉由分析對於血管生成性生長因子反應的細胞生長（Marconcini 等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96：9671-9676（1999））或藉由實施例 6 及 7 所說明的化學趨向分析而測量。

血管生成性生長因子的融合蛋白質包括生物活性的天然多肽或其生物活性的部分（如上所述）作為第一分子部分，其連結到不存在於天然多肽中的第二分子部分。因此，第二分子部分可以是胺基酸或多肽。第一分子部分可以是在 N-端位置、C-端位置或在融合蛋白質的內部。在一具體實例中，融合蛋白質包括由天然存在的血管生成性生長因子或其生物活性部分之胺基酸序列所組成的生物活性多肽作為第一分子部分，以及包括連接子序列及親合性配體的

第二分子部分。

血管生成性生長因子的融合蛋白質可藉由許多方法而製造。例如，融合蛋白質可藉由將編碼血管生成性生長因子或其部分的基因插入到適合的表現載體中而製造。可將所得到的構築導入至適合的宿主細胞以用於表現。在表現之後，可將融合蛋白質從細胞溶胞產物中藉由適合的親合性基質而純化，例如，參見分子生物學的現代方法，Ausubel F.M.等人編輯，第 16.4.1-16.7.8 頁，包含增刊 28 的補充（1994）。例如，參見 VEGF 融合（嵌合）蛋白質，Zheng 等人，*Arterioscler. Throm. Vasc. Biol.* 26：2019-2026（2006）以及 Inoue 等人，*Arterioscler. Throm. Vasc. Biol.* 27：99-105（2007）。

血管生成性生長因子可以是人類來源或非人類（較佳是哺乳動物）來源。人類血管生成性生長因子以及非人類物種的同源物是血管生成性生長因子，並可用於本發明的組合治療。同源物較佳地與人類血管生成性生長因子具有至少 70% 的胺基酸序列同一性，更佳是至少 80% 的序列同一性，以及還要更佳是至少 90% 的序列同一性。

根據本發明，“血管生成性生長因子”涵蓋上述之天然的血管生成性生長因子、血管生成性生長因子的部分、血管生成性生長因子的多肽變異物以及血管生成性生長因子的融合蛋白質。

以 NPAR 激動劑治療的方法

本發明是有關於在有需要的個體之部位治療內皮功能不良之方法，其包括將治療有效量的 NPAR 激動劑血管地投予個體，其中該部位不是由血管形成術所傷害的動脈、慢性皮膚潰瘍、需要骨誘發的部位或需要心臟再血管化的部位。該個體可能患有一種或多種各樣的疾病，該等疾病將受益於反轉或抑制內皮功能不良。該等疾病可包括，但並不限於，高血壓、冠狀動脈疾病、中風、腦血管疾病、周圍血管疾病、糖尿病、勃起功能不良、動脈粥狀硬化症、氣喘、類風濕性關節炎、肺部高血壓、高高半胱胺酸血症、鐮刀型紅血球疾病、子癇前症、慢性腎臟衰竭、慢性腎臟功能不良、敗血症、多重器官衰竭以及發炎性腸疾病。在一特定具體實例中，該疾病是高血壓。在另一特定具體實例中，該疾病是動脈粥狀硬化症。在另一特定具體實例中，該疾病是周圍血管疾病。在仍是另一特定具體實例中，該疾病是氣喘。

“個體”較佳是人類，但也可以是有需要以此處所揭露的 NPAR 激動劑而治療的動物，例如，伴侶動物（例如，狗、貓等等）、農場動物（例如，牛、豬、馬等等）以及實驗室動物（例如，大鼠、小鼠、天竺鼠等等）。

“有需要以 NPAR 激動劑治療”的個體，是患有可以 NPAR 激動劑治療的疾病及/或症狀之個體，以達到有利的治療及/或預防結果。有利的結果包括減少徵候的嚴重性或延緩徵候的發作、增加的壽命及/或更快速或更完全的解決疾病或症狀。

“有效量”是 NPAR 激動劑的數量，其可導致以 NPAR 激動劑治療的症狀之改善的臨床結果，係相較於沒有治療而言。所投予之 NPAR 激動劑的量將取決於疾病或症狀的程度、嚴重性及類型、治療所需要的量以及醫藥調配物的釋放特性而定。它也將取決於個體的健康、大小、重量、年齡、性別以及對於藥物的耐受性而定。通常，激動劑是投予一段足夠的期間，以達到所要的治療效果。通常，將約 $1\ \mu\text{g}/\text{天}$ 至約 $1\ \text{mg}/\text{天}$ 的 NPAR 激動劑（較佳是約 $5\ \mu\text{g}/\text{天}$ 至約 $100\ \mu\text{g}/\text{天}$ ）投予至有需要治療的個體，特別是對於局部投予的方式。NPAR 激動劑也可以約 $0.1\ \text{mg}/\text{kg}/\text{天}$ 至約 $1\ \text{mg}/\text{kg}/\text{天}$ 的劑量而投予，較佳是約 $0.2\ \text{mg}/\text{kg}/\text{天}$ 至約 $1\ \text{mg}/\text{kg}/\text{天}$ ，特別是對於全身性投予的方式。本發明的 NPAR 激動劑之通常劑量也是 $5\text{-}500\ \text{mg}/\text{天}$ ，較佳是 $25\text{-}250\ \text{mg}/\text{天}$ ，特別是對於全身性投予的方式。對於將 NPAR 激動劑與血管生成性生長因子的組合物投予至個體的方法，血管生成性生長因子（例如，VEGF-A）可以藉由一般熟悉於此技藝者根據疾病或病症的特性、治療部位、個體的年齡、性別、重量及其他條件而決定之劑量而投予。血管生成性生長因子的適當劑量是 $1\ \mu\text{g}/\text{kg}$ 至 $50\ \text{mg}/\text{kg}$ （例如， $0.1\text{-}20\ \text{mg}/\text{kg}$ ）。

“治療”是指在投予 NPAR 激動劑或包括 NPAR 激動劑的組成物一段期間之後，達到有利的治療及/或預防結果，其可包括減少徵候的嚴重性或延緩徵候的發作、增加的壽命及/或更快速或更完全的解決疾病或症狀、或其他改

善的臨床結果，係根據被觀察的部位或對特定疾病或病症測量的參數所測量。“治療”也包括抑制或延緩疾病、病症或醫學徵狀的發作，並且也可指減少在個體中發展該等疾病、病症或醫學徵狀的機率，其中個體是例如有發展該等疾病、病症或醫學徵狀的風險之個體。

所揭露的 NPAR 激動劑可藉由任何適合的途徑而局部（例如，地區性）或全身性投予，其包括例如非腸胃道投予。非腸胃道投予可包括，例如，肌肉內、靜脈內、皮下或腹膜內注射或血管投予，並且也可包括經皮貼片以及植入的緩釋裝置，例如，幫浦。局部投予可包括，例如，乳霜、凝膠、油膏或氣溶膠。呼吸投予可包括，例如，吸入或鼻內滴劑。對於特定的適應症，將 NPAR 激動劑直接注射或植入到治療部位是有利的。NPAR 激動劑可有利地在持續釋放的調配物中投予。NPAR 激動劑可長期地投予，其中激動劑是在一段長的時間（至少 60 天，但更常是至少 1 年），以間隔或藉由連續傳遞的方法而投予，以治療慢性或復發的疾病或症狀。

包括治療作用劑的組合物之投予，包括同步（同時）投予以及在一段治療期間中以任何順序的連續投予。作用劑可在一個組成物中一起投予，或可在分別的組成物中投予。NPAR 激動劑可經由與血管生成性生長因子相同的投予途徑而投予。NPAR 激動劑也可經由與血管生成性生長因子不同的投予途徑而投予。NPAR 激動劑以及血管生成性生長因子可具有相同或不同的投予時程。

NPARG 激動劑可結合可接受的醫藥載劑作為醫藥組成物的部分而投予至個體。醫藥組成物的調配物將根據所選擇的投予途徑而改變。適合的醫藥載劑可包含不會與化合物交互作用的惰性成分。載劑必須是生物可相容的，也就是，無毒性、無發炎性、無免疫原性以及投予部位沒有其他不想要的反應。醫藥可接受的載劑的例子包括，例如，鹽溶液、氣溶膠、市售的惰性膠體，或以白蛋白、甲基纖維素或膠原蛋白基質補充的液體。可使用標準的醫藥調配技術，例如，在雷明頓氏製藥科學（Mack 出版公司，伊士頓，賓州）中所說明的技術。

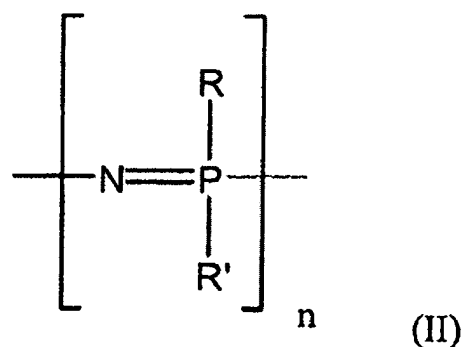
在本發明中用於治療內皮功能不良的組成物可另外包括醫藥載劑，其中凝血酶肽衍生物或 NPARG 激動劑是被溶解或懸浮的。醫藥可接受的載劑的例子包括，例如，鹽溶液、氣溶膠、市售的惰性膠體，或以白蛋白、甲基纖維素或膠原蛋白基質補充的液體。典型的該等調配物是凝膠。凝膠包括選自先前所述的油質基底、水或乳液-懸浮液基底之基底。將膠化劑加到基底，其可在基底形成基質，將其黏度增加至半固體的黏稠性。膠化劑的例子是羥丙基纖維素、丙烯酸聚合物等等。將活性成分以所要的濃度，於加入膠化劑之前的時間點加到調配物中，或活性成分可在膠化過程之後混合。

在一具體實例中，NPARG 激動劑是在持續釋放的調配物中而投予。聚合物通常用於形成持續釋放的調配物。這些聚合物的例子包括聚 α -羥基酯，例如，聚乳酸/聚乙醇

酸同聚物及共聚物、聚磷腈 (PPHOS)、聚酞以及聚(富馬酸丙烯酸酯)。

聚乳酸/聚乙醇酸 (PLGA) 同聚物及共聚物是在此技藝中熟知作為持續釋放的載劑。釋放的速率可由熟悉於此技藝者藉由聚乳酸對聚乙醇酸的比例之改變以及聚合物的分子量而調整(例如, Anderson 等人, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 28: 5 (1997), 其完整教示在此以引用方式納入本文中)。將聚(乙二醇)納入到聚合物中作為混合物以形成微顆粒載劑, 可使活性成分的釋放數量進一步的改變(參見 Cleek 等人, *J. Control Release* 48: 259 (1997), 其完整教示在此以引用方式納入本文中)。也可將陶瓷(例如, 磷酸鈣以及羥基磷灰石)納入到調配物中, 以改善機械性質。

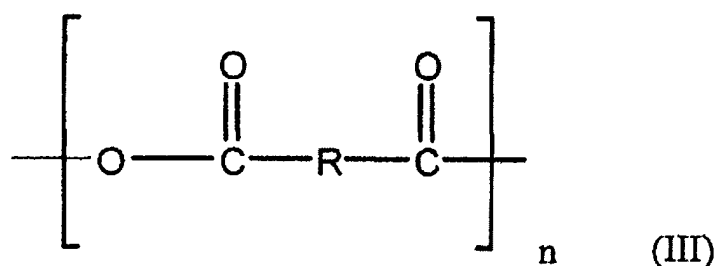
聚磷腈聚合物包含交替的氮及磷, 在聚合物骨架中沒有碳, 如以下結構式 (II) 所示:



聚合物的特性可藉由鍵結到聚合物骨架的側基團 R 及 R' 之適當改變而調整。例如, 藉由聚磷腈的藥物釋放之降解, 可藉由改變水解不穩定的側基團而控制。例如, 納入愈多咪唑基或乙基乙二醇取代的聚磷腈, 則觀察到增加的降解速率(參見 Laurencin 等人, *J. Biomed. Mater. Res.* 27: 963 (1993), 其完整教示在此以引用方式納入本文中), 藉

此而增加藥物釋放的速率。

在結構式 (III) 所示的聚酐具有已定義的降解以及釋放特性，其可藉由納入改變量的疏水性或親水性單體而控制，例如，癸二酸以及 1,3-雙(對-羧基苯氧基)丙烷 (參見 Leong 等人，*J. Biomed. Mater. Res.* 19: 941 (1985)，其完整教示在此以引用方式納入本文中)。為了改善機械強度，酐通常是與醯亞胺共聚合，以形成聚酐-共-醯亞胺。適合於整形外科施用的聚酐-共-醯亞胺的例子是聚(三-五甲基苯甲基醯亞胺基-甘胺酸-共-1,6-雙(羧基苯氧基)己烷)以及苯均四酸醯亞胺基丙胺酸：1,6-雙(對-羧基苯氧基)己烷共聚物。



可注射的傳遞調配物可靜脈內投予，或直接在有需要治療的部位投予。可注射的載劑可以是黏膠溶液或膠體。

傳遞調配物包括生理鹽溶液、抑菌鹽溶液 (包含約 0.9 % mg/ml 苺基醇的鹽溶液)、磷酸鹽緩衝溶液、漢克氏 (Hank's) 溶液、林格氏 (Ringer's) 乳酸鹽或以白蛋白、甲基纖維素或玻尿酸補充的液體。可注射的基質包括聚(氧化乙烯)的聚合物以及氧化乙烯及氧化丙烯的共聚物 (參見 Cao 等人，*J. Biomater. Sci.* 9: 475 (1998) 以及 Sims 等人，*Plast. Reconstr. Surg.* 98: 843 (1996)，其完整教示在此以引用方式納入本文中)。

用於將組成物包膠（例如，在硬明膠或環糊精的包膜中）之方法是在此技藝中已知的（Baker 等人，“生物活性作用劑的控制釋放”，John Wiley & Sons（1986））。

油膏通常是利用油質基底而製備，例如，包含固定油脂或碳氫化合物的油質基底（例如，白礦脂或礦物油），或利用可吸收的基底而製備，例如，其係由可吸收的無水物質所組成（例如，無水羊毛脂）。在形成基底之後，將活性成分以所要的濃度而加入。

乳霜一般包括油脂相（內部相），其通常包含固定油脂、碳氫化合物等等（例如，蠟、礦脂、礦物油等等），以及水溶液相（連續相），其包括水以及任何水溶性的物質（例如，添加的鹽類）。兩個相是藉由使用乳化劑而穩定，例如，界面活性劑（例如，硫酸月桂酯鈉）；親水性膠狀體（例如，阿拉伯膠膠狀黏土、蜂膠等等）。在形成乳液之後，將活性成分以所要的濃度而加入。

凝膠包含選自先前所述的油質基底、水或乳液-懸浮液基底之基底。將膠化劑加到基底，其可在基底形成基質，將其黏度增加至半固體的黏稠性。膠化劑的例子是羥丙基纖維素、丙烯酸聚合物等等。將活性成分以所要的濃度，於加入膠化劑之前的時間點加到調配物中，或活性成分可在膠化過程之後混合。

可藉由所揭露的 NPAR 激動劑治療的疾病及症狀，通常是伴隨著例如疼痛以及感染的徵候以及虛弱。在特定例子中，共同投予一種或多種額外的藥學活性作用劑連同

NPAR 激動劑以對付該等問題是有利的。例如，處理疼痛以及發炎可能需要共同投予止痛劑或抗發炎作用劑。處理感染可能需要共同投予抗微生物劑、抗生素或消毒作用劑。

NPAR 激動劑可單獨或併用一種或多種其他治療劑而投予個體，例如，降低膽固醇的作用劑、抗高血壓作用劑、 β -阻斷劑、抗凝血劑、血栓溶解作用劑、止痛劑、抗發炎作用劑、抗菌斑作用劑、胰島素、一氧化氮產生劑、抗病毒作用劑或抗生素。在一個方法中，NPAR 激動劑可併用精胺酸而投予個體，例如，連同精胺酸作為口服營養補充物。

凝血酶胜肽衍生物以及經修飾的凝血酶胜肽衍生物可藉由固相胜肽合成（例如，BOC 或 FMOC）方法、藉由溶液相合成或藉由其他適合的技術（包括上述方法的組合）而合成。已被建立並且廣泛使用的 BOC 以及 FMOC 方法是說明於 Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 88: 2149 (1963)；Meienhofer, 荷爾蒙蛋白質以及胜肽, C.H. Li 編輯，大學出版 (1983)，第 48-267 頁；以及 Barany 及 Merrifield, 胜肽, E. Gross 及 J. Meienhofer 編輯，大學出版，紐約 (1980)，第 3-285 頁。固相胜肽合成方法是說明於 Merrifield R.B., Science 232: 341 (1986)；Carpino L.A. 及 Han G.Y., J. Org. Chem. 37: 3404 (1972)；以及 Gauspohl H. 等人, Synthesis 5: 315 (1992)。這六篇文章完整內容的教示在此以引用方式納入本文中。

凝血酶胜肽衍生物二聚體可藉由單體的氧化作用而製備。凝血酶胜肽衍生物二聚體可藉由將凝血酶胜肽衍生物與過量的氧化劑反應而製備。熟知的適合氧化劑是碘。

此處所使用的“非-芳香族雜環基團”為非-芳香族的碳環系，其具有 3 至 10 個原子並且包括至少 1 個雜原子，例如，氮、氧或硫。非-芳香族雜環基團的例子包括哌嗪基、哌啶基、吡咯烷基、嗎啉基、硫嗎啉基。

名詞“芳基”包括碳環以及雜環芳香族環系。芳基的例子包括苯基、吡啶基、呋喃基以及咪唑基。

“脂肪族基團”是直鏈、分支或環狀非-芳香族的碳氫化合物。脂肪族基團可以是完全飽和的或可包含一個或多個未飽和的單元（例如，雙鍵及/或叁鍵），但較佳是飽和的，也就是烷基。通常，直鏈或分支的脂肪族基團具有 1 至約 10 個碳原子，較佳是 1 至約 4 個，以及環狀的脂肪族基團具有 3 至約 10 個碳原子，較佳是 3 至約 8 個。脂肪族基團包括，例如，甲基、乙基、正-丙基、異-丙基、正-丁基、第二-丁基、第三-丁基、戊基、環戊基、己基、環己基、辛基以及環辛基。

對於脂肪族基團、芳基或非-芳香族雜環基團之適合的取代基，是不會明顯降低 NPAR 激動劑的治療活性之取代基，例如，在天然存在的胺基酸上所發現的取代基。例子包括 -OH、鹵素（-Br、-Cl、-I 及 -F）、-O(R_e)、-O-CO-(R_e)、-CN、-NO₂、-COOH、=O、-NH₂-NH(R_e)、-N(R_e)₂、-COO(R_e)、-CONH₂、-CONH(R_e)、-CON(R_e)₂、-SH、-S(R_e)、脂肪族

基團、芳基以及非-芳香族雜環基團。每個 R_e 獨立地是烷基或芳基。經取代的脂肪族基團可具有超過 1 個的取代基。

本發明是藉由以下實施例而說明，該等實施例不希望以任何方式限制本發明。

實施例 1：材料及方法

內皮細胞培養

將人類冠狀動脈內皮細胞 (human coronary artery endothelial, HCAE 細胞, Cambrex Bio Science, 沃克維爾, 馬里蘭州) 於 5% CO_2 及 37°C 在內皮細胞生長培養液 (EGM) 中培養，其補充 2% 胎牛血清以及 Single Quot 補充物 (Clonetics, 聖地牙哥, 加州; 包含表皮生長因子、氫基可體松、血管內皮生長因子、纖維母細胞生長因子、胰島素生長因子、抗壞血酸、肝素、健大黴素以及兩性黴素 B)。將繼代 4 及 6 之間的細胞用於這些研究。將人類冠狀動脈內皮細胞以每個槽孔 50,000 個細胞的密度鋪在 12 槽孔的培養盤中，並且使其生長 3 天以達到匯合。將匯合後 2 天的細胞以 $TNF\alpha$ 或 TP508 處理。然後將細胞於常氧或 1% 低氧的條件下培養指定的時間。在部分實驗中，細胞是以 TP508 預先處理 1 小時，然後進行 $TNF\alpha$ 刺激。對於 RNA 萃取，將人類冠狀動脈內皮細胞培養於 6 槽孔的培養盤中。

RT-PCR

利用 Ambion 分離套組，如製造商之說明而將總 RNA 分離。

內皮一氧化氮合酶 (eNOS) 的 RT-PCR 是藉由立即可用的 RT-PCR 小珠 (Amersham Biosciences)，利用兩步驟的方法而進行。首先，cDNA 的合成是將 $1\mu\text{g}$ 的總 RNA 與 $1\mu\text{g}$ 的隨機六聚體 (pdN6) 作為引子以及 M.-MuLV 反轉錄酶，於 42°C 培養 60 分鐘而達成。接著，在 95°C 加熱 5 分鐘之後，執行 25 或 30 個循環的變性 (95°C 、30 秒)、煉回 (62°C 、30 秒) 以及延伸 (72°C 、30 秒)，以 72°C 、7 分鐘的單一最終延伸終結之 PCR。用於人類內皮一氧化氮合酶引子的序列如下：正義 5'-CCG CCG CCA AGA GGA CAC CAG T-3' (序列識別號 36) (Sitges M. 等人, Int. J. Cardiol. 105(1): 74-79 (2005))。18S 引子 (Ambion) 是用於擴增 18S 核糖體 RNA，以作為內部常態化的對照組。PCR 擴增的產物是藉由 1% 瓊脂糖膠體電泳而顯像。

SYBR 綠 (SYBR Green) 即時 PCR

即時定量的 PCR 是用於測定以 TP508 或 TNF 處理的內皮細胞中之內皮一氧化氮合酶 mRNA 的相對表現。將樣品編碼以提供盲的分析。利用 Taqman 反轉錄試劑套組 (ABI)，如製造商的具體說明而將 $1\mu\text{g}$ 的總 RNA 反轉錄。定量 PCR 擴增作用是在 SYBR 綠 PCR 總混合物中 (ABI)，利用 $2\mu\text{g}$ 的 cDNA 於 $25\mu\text{l}$ 的總體積，使用 SYBR 綠探針而完成。所有的 PCR 分析都是在 ABI Prism 7000 序

列偵測系統中進行。SYBR 綠 PCR 引子如下：人類內皮一氧化氮合酶正義：5'-GCG GCT GCA TGA CAT TGA G-3'（序列識別號 37）、反義：5'-GTC GCG GTA GAG ATG GTC AAG T-3'（序列識別號 38）。反轉錄的 cDNA 樣品循環閾值是從三重複的樣品中測定，並且常態化至 18S 的“管家”基因。

西方墨漬分析

將細胞溶胞產物於 10% 聚丙烯醯胺膠體中進行 SDS-PAGE，並且轉移到硝基纖維素膜（0.2 μ m，Invitrogen）。以 5% 牛奶阻斷之後，將膜與抗磷-內皮一氧化氮合酶（Ser 1177）及內皮一氧化氮合酶（Cell Signaling 科技公司，貝福禮，麻州）、人類第 1 型精胺酸酶（選殖株 9C5）（Cell Sciences，坎頓，麻州）或 GAPDH（Santa Cruz 生物科技公司，聖塔克魯茲，加州）的初級抗體，在 4°C 培養隔夜。使用結合 HRP 的抗-小鼠或抗-兔子抗體（Cell Signaling 科技公司）作為二次抗體（HRP，辣根過氧化酶）。利用 Immobilon 西方偵測試劑（Mipilore 公司）而將免疫墨漬展佈。

實施例 2：TP508 阻斷 TNF α 誘發的精胺酸酶 1 之向上調控

如上所述，內皮功能不良以及一氧化氮依賴性信息傳遞的損耗，可由一氧化氮合酶活性的減少或精胺酸酶活性

的增加（其可耗盡細胞的 L-精胺酸水平）而引起。在組織缺氧以及發炎中，已有報導指出 $\text{TNF}\alpha$ 的水平是上升的，並且被認為是藉由影響這些一氧化氮相關的活性之一或兩者而促成內皮功能不良。為了評估 TP508 對於內皮功能不良之可能的影響，我們在常氧條件下培養早期繼代的人類冠狀動脈內皮細胞（HCAE 細胞），並且以單獨的 $\text{TNF}\alpha$ 或 $\text{TNF}\alpha$ 與 TP508 之組合物而處理。

利用對於人類第 1 型精胺酸酶具有專一性的抗體，人類冠狀動脈內皮細胞溶胞產物的西方墨漬顯示出， $\text{TNF}\alpha$ 的處理會引起精胺酸酶 1（ARG1）相對於對照組培養物的表現之明顯增加（第 1 圖）。如第 1 及 2 圖所示，單獨的 TP508 處理對於精胺酸酶 1 的表現並沒有影響，但完全阻斷 $\text{TNF}\alpha$ 誘發的精胺酸酶 1 表現之增加。 $\text{TNF}\alpha$ 刺激的精胺酸酶 1 表現之 TP508 抑制是劑量依賴性的，具有發生在 $10\mu\text{g/ml}$ 的 TP508 濃度之半數最大抑制（第 2 圖）。因此，TP508 似乎阻斷了可導致精胺酸酶 1 增加之 $\text{TNF}\alpha$ 誘發的信號。這個 TP508 的抑制作用似乎對於 $\text{TNF}\alpha$ 作用的子集合是專一性的，因為 $\text{TNF}\alpha$ 刺激的 Erk1/2 以及 p70 S6 激酶之磷酸化作用並沒有被 TP508 所抑制。

實施例 3：TP508 刺激內皮一氧化氮合酶表現以及內皮一氧化氮合酶磷酸化作用

利用對於內皮一氧化氮合酶在 S1177 的磷酸化具有專一性的抗體，人類冠狀動脈內皮細胞溶胞產物的西方墨漬

顯示出，TNF α 的處理或將細胞於低氧條件（1% O₂）暴露 24 小時，可分別減少內皮一氧化氮合酶的表現 65% 以及 45%，相對於常氧條件（第 3 圖）。如圖所示，TP508 可避免內皮一氧化氮合酶因組織缺氧所引起的減少表現，以將一氧化氮合酶的表現水平保留在類似於常氧條件下培養的細胞中所觀察到水平。相反地，TP508 的加入連同 TNF α 並不能抑制內皮一氧化氮合酶表現之 TNF α 誘發的減少（未顯示）。在常氧以及低氧條件下，相較於常氧以及低氧對照組培養物，TP508 分別增加內皮一氧化氮合酶磷酸化作用 1.8 倍以及 2.5 倍（第 3 圖）。雖然這個磷酸化作用的部分可能是由於內皮一氧化氮合酶增加的表現所致，但增加的磷酸化作用不能被增加的表現單獨解釋。檢驗 TP508 對於在常氧條件下培養的細胞中之內皮一氧化氮合酶的表現以及磷酸化作用的影響之其他實驗，證實 TP508 可刺激內皮一氧化氮合酶的磷酸化作用，並且顯示這個影響是劑量依賴性的，具有約 10 μ g/ml 的半數最大反應（第 4 圖）。

實施例 4：TP508 向上調控內皮一氧化氮合酶 mRNA

與蛋白質表現數據一致，得自人類冠狀動脈內皮細胞的 mRNA 之 RT-PCR 分析顯示 TP508 向上調控內皮一氧化氮合酶 mRNA 表現（第 5 圖）。TP508 的這個作用是顯示於 25 個循環的 RT-PCR，其中內皮一氧化氮合酶 mRNA 的條帶是在 TP508 處理的細胞中觀察到，但並未在對照組細胞中觀察到。相反地，相較於對照組，TNF α 的處理大幅

地減少表現，係由 30 個循環的 RT-PCR 後而顯示。為了定量 TP508 的這個作用，我們使用反轉錄的 mRNA 樣品之 SYBR 綠即時 PCR 分析。如第 6 圖所示，在常氧條件下培養 24 小時之後，TP508 增加內皮一氧化氮合酶 mRNA 的水平 40%，相較於對照組 ($p < 0.05$)。相反地，TNF α 減少內皮一氧化氮合酶 mRNA 的水平約 80%。細胞暴露至組織低氧(1% 氧氣)24 小時，也減少內皮一氧化氮合酶 mRNA 的對照組水平約 60%。TP508 處理的這些細胞部分地避免組織低氧誘發的減少。如圖所示，TP508 處理的低氧細胞具有高於低氧對照組細胞約 40% 的內皮一氧化氮合酶 mRNA 水平 ($p < 0.05$)。

實施例 5：TP508 具有使 VEGF 可信息傳遞內皮一氧化氮合酶磷酸化作用的能力

將人類冠狀動脈內皮(HCAE)細胞(Lonza Walkersville 公司，沃克維爾，馬里蘭州)於常氧以及低氧(1% 氧氣)條件下，在含有或不含 TP508(50 μ g/ml)中培養 24 小時，然後以血管生成性生長因子人類 VEGF(50 ng/ml)刺激 1 或 5 分鐘。人類 VEGF 誘發的內皮一氧化氮合酶活化作用是藉由西方墨漬，利用辨認內皮一氧化氮合酶的活化形式之抗體(在 S1177 磷酸化)(Cell Signaling，丹弗，麻州)而測定。將膜以抗-GAPDH(Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase，甘油醛-3-磷酸脫氫酶)抗體再次探測，以顯示相等的蛋白質裝載。代表在不同處理之後活化的內皮

一氧化氮合酶西方墨漬之密度儀分析的柱狀圖是顯示於第 8 圖。

如第 8 圖所示，在常氧的細胞中，人類 VEGF 誘發內皮一氧化氮合酶在絲胺酸 1177 上的短暫磷酸化作用，以活化在 1 分鐘時最大（2 倍）並且在 5 分鐘刺激之後下降的酵素。如果將細胞在人類 VEGF 刺激之前以 TP508 預先處理的話，則內皮一氧化氮合酶的磷酸化作用可延長，並且在接近最大刺激處保持 5 分鐘。因此，TP508 藉由延伸最大刺激的期間，而具有使人類 VEGF 可信息傳遞內皮一氧化氮合酶磷酸化作用的能力。

在低氧的細胞中（在 1% 氧氣中培養 24 小時），人類 VEGF 刺激的內皮一氧化氮合酶磷酸化作用之水平在 1 分鐘處理時減少 4 倍，相較於常氧的細胞。因此，組織低氧明顯地減少人類 VEGF 刺激的內皮一氧化氮合酶之活化作用。然而，以 TP508 預先處理的低氧細胞則顯示等同於在常氧細胞中所觀察到的水平之人類 VEGF 誘發的內皮一氧化氮合酶之活化作用。因此，低氧細胞的 TP508 處理使人類 VEGF 可刺激內皮一氧化氮合酶活化作用的能力，復原至常氧細胞中所觀察到的水平。

實施例 6：TP508 增強內皮細胞朝向 VEGF 移動

試驗物質可吸引內皮細胞以及刺激它們通過在膜中的孔洞而移動之能力，係測定試驗物質的血管生成潛能的數種測試之一。第 9A 圖顯示用以測量內皮細胞朝向化學引

誘劑的移動之實驗設計。在移動分析之前，將細胞與 TP508 或不與 TP508 培養，以測定 TP508 對於內皮移動的影響。

將人類冠狀動脈內皮 (HCAE) 細胞 (Lonza Walkersville 公司，沃克維爾，馬里蘭州) 在不含 (對照組) 或含有 TP508 ($50 \mu\text{g/ml}$) (在第 9A 圖以及第 9B 圖的 “TP prep”) 中培養 24 小時。轉膜細胞移動分析是利用 BD FluoroBlok 鑲嵌物 (BD Bioscience，貝德福，麻州)，如販售商之說明而進行。將對照組細胞或 TP508 預先處理的細胞加到鑲嵌物上端。將人類 VEGF (10 ng/ml) (V) 或單獨的培養液 (C) 加到鑲嵌盤的底室作為化學引誘劑。內皮移動是在常氧或 1% 低氧條件下進行。在 22 小時的培養之後，將細胞以 Calcein AM 作移動後的標示，並且藉由偵測移動至鑲嵌膜底側的細胞之螢光而測量。

第 9B 圖顯示 TP508 的處理對於內皮細胞朝向血管生成性因子人類 VEGF (人類重組的 VEGF-A 165, R&D 系統公司，明尼波理斯，明尼蘇達州) 移動的影響。

結果顯示人類 VEGF 可刺激正常對照組內皮細胞移動約 2 倍，係相較於培養液對照組的細胞，當於常氧條件中分析時 (180%)，以及在低氧條件下是稍微較少的 (約 150%)，係相較於培養液對照組的細胞。當細胞是在常氧以及低氧條件下分析時，以 TP508 預先處理的內皮細胞分別顯示約 5 倍以及約 4 倍朝向人類 VEGF 的細胞移動，係相較於培養液的對照組。因此，TP508 的預先處理可增強 2 至 3 倍朝向人類 VEGF 的細胞移動，係相較於未處理的對

照組細胞。由於這個細胞移動分析是細胞之血管生成潛能的一種基準，因此，這些結果顯示在常氧條件以及低氧條件下，TP508的處理對於內皮細胞是超過2倍的人類 VEGF 之血管生成潛能，其中對於人類 VEGF 的血管生成反應是減少的。

實施例 7：TP508 增加內皮細胞對於人類 VEGF 的血管生成反應

內皮細胞通過基底膜膠體 (Matrigel) 基質的入侵，是用於測定試驗物質的血管生成潛能的許多分析之一，並且被認為是比通過開膜孔洞的簡單化學趨向分析更能預測活體內的血管生成，因為細胞必須降解並且入侵基質，以移動進入以及通過膜中的孔洞。第 10A 圖顯示用以測量內皮細胞通過基底膜膠體朝向化學引誘劑的入侵之實驗設計。

將人類冠狀動脈內皮 (HCAE) 細胞 (Lonza Walkersville 公司，沃克維爾，馬里蘭州) 在不含 (對照組) 或含有 TP508 ($50 \mu\text{g/ml}$) (TP prep) 中培養 24 小時。內皮細胞入侵分析是利用 BD Biocoat™ 血管生成系統 (BD Bioscience, 貝德福，麻州) 而進行，其係使用以 BD 基底膜膠體基質 (BD Bioscience, 貝德福，麻州) 覆蓋的 FluoroBlok 鑲嵌物。將對照組細胞或 TP508 預先處理的細胞加到鑲嵌物上端。將包含人類 VEGF (10 ng/ml 人類重組的 VEGF-A 165 胺基酸，R&D 系統公司，明尼波理斯，明尼蘇達州) (V)

的培養液或單獨的培養液（C）加到鑲嵌盤的底室作為化學引誘劑，以測定對人類 VEGF 的血管生成反應。內皮細胞入侵是在常氧或低氧（1% 氧氣）條件下進行。在 22 小時的培養之後，將細胞以 Calcein AM 作移動後的標示，並且藉由偵測移動至鑲嵌膜底側的細胞之螢光而測量。

第 10B 圖顯示 TP508 的處理對於內皮細胞朝向血管生成性因子 VEGF 入侵的影響。結果顯示，在常氧條件或低氧條件下分析的對照組內皮細胞，並沒有被人類 VEGF 刺激而降解基底膜膠體以及通過膜朝向人類 VEGF 移動。相反地，以 TP508 預先培養的內皮細胞則顯示比未以 TP508 預先處理的對照組細胞更增加之入侵性質。此外，這些細胞目前也對人類 VEGF 反應（比在 TP508 預先處理的細胞但無人類 VEGF 中所觀察到的多約 50% 的入侵，並且幾乎比對照組細胞朝向 VEGF 多 2 倍的入侵）。這些結果顯示，在無 TP508 處理的對照組細胞對於人類 VEGF 之處理絲毫沒有反應的條件下，TP508 的處理可增加內皮細胞對人類 VEGF 的血管生成反應之能力。

雖然本發明已以其例示的具體實例而特別顯示以及說明，但熟悉於此技藝者將理解到，各種形式以及細節的改變，都可在不脫離由附屬申請專利範圍所涵蓋的本發明之範圍而進行。

【圖式簡單說明】

第 1 圖顯示來自檢驗 TP508 對精胺酸酶 1 在含有或不

含 $\text{TNF}\alpha$ 培養的細胞中之表現水平的影響的實驗中，代表性的西方墨漬之 X 光片以及西方墨漬上的條帶之密度儀讀值的比例之對應柱狀圖。將人類冠狀動脈內皮（HCAE）細胞在不含（CTR）或含有 TP508（TP）之下培養 1 小時，然後以 $\text{TNF}\alpha$ 處理 24 小時。藉由免疫墨漬法，利用對於這個酵素具有專一性的抗體，而分析細胞溶胞產物的人類精胺酸酶 1 表現。在剝除（stripping）之後，將膜以 GAPDH 抗體再探測，以顯示蛋白質裝載。（甘油醛-3-磷酸脫氫酶（GAPDH）的水平不受到 $\text{TNF}\alpha$ 或組織缺氧所影響。）對應的密度儀數據代表 4 個獨立實驗的平均值 $\pm \text{SD}$ ($p < 0.05$ ；CTR 對 $\text{TNF}\alpha$ (*) 或 $\text{TNF}\alpha$ 對 TP + $\text{TNF}\alpha$ (#))。

第 2 圖顯示來自顯露 TP508 對精胺酸酶 1 藉由 $\text{TNF}\alpha$ 向上調控的劑量反應影響之西方墨漬實驗的 X 光片，以及西方墨漬上的條帶之密度儀讀值的比例之對應柱狀圖。將 HCAE 細胞以指定濃度的 TP508 預先處理 1 小時，然後以 $\text{TNF}\alpha$ 刺激 24 小時，並且藉由免疫墨漬法而分析細胞溶胞產物的精胺酸酶 1 表現。密度儀分析顯示精胺酸酶 1 表現的相對強度。

第 3 圖顯示來自顯露 TP508 對 eNOS 的表現及磷酸化作用（活化作用）的影響之實驗的西方墨漬的 X 光片，以及西方墨漬上的條帶之密度儀讀值的比例之對應柱狀圖。將 HCAE 細胞以 TP508 或 $\text{TNF}\alpha$ 刺激，並且在常氧或 1% 氧氣（低氧）條件下培養 24 小時。藉由免疫墨漬法，利用對於 eNOS 在 S1177 的磷酸化具有專一性的抗體，而分

析細胞溶胞產物的 eNOS 活化。在剝除之後，將膜以整體 eNOS 及 GAPDH 的抗體再探測。對應的密度儀數據代表 3 個獨立實驗的平均值 $\pm$ SD (*表示 $p < 0.05$; CTR 對 TP (*) (常氧); CTR 對 TP (*) (低氧))。

第 4 圖顯示顯示來自檢驗 TP508 對 eNOS 活化之劑量依賴性影響的實驗中，西方墨漬實驗的 X 光片以及西方墨漬上的條帶之密度儀讀值的比例之對應柱狀圖。將 eNOS 以指定濃度的 TP508 處理 24 小時，並且分析 eNOS 的活性以及表現，如第 3 圖。密度儀分析顯示在 TP508 處理之後，eNOS 磷酸化作用相對於整體 eNOS 的改變。

第 5 圖顯示來自設計用於研究 TP508 對 eNOS mRNA 的影響的實驗之 RT-PCR 產物的染色膠體。在以 $\text{TNF}\alpha$ 或 TP508 刺激 6 小時的細胞中，eNOS mRNA 表現的改變是利用 RT-PCR 分析。

第 6 圖是得自 eNOS mRNA 表現的定量分析之數據的柱狀圖。將 HCAE 細胞以 TP508 或 $\text{TNF}\alpha$ 刺激，並且在常氧或低氧 (1% 氧氣) 條件下培養 24 小時。利用 SYBR 綠即時 PCR 而分析 RNA 的 eNOS 表現。對於每個條件，當與無 TP508 (CTR) 比較時， $p < 0.05$ 。

第 7 圖描繪人類原-凝血酶之編碼的胺基酸序列 (序列識別號 12)。包含凝血酶受體結合功能域的胺基酸 508-530 是以畫底線表示。凝血酶是由原凝血酶的 C-端 579 個胺基酸殘基所組成。參見 GenBank 登錄編號 AJ972449。

第 8 圖是顯示在以 TP508、VEGF 或其組合處理之後

的 HCAE 細胞中，活化的內皮一氧化氮合酶（eNOS）之西方墨漬的密度儀分析之圖形。

第 9A 圖是顯示用以測量內皮細胞朝向化學引誘劑的移動的實驗裝置以及實驗設計的圖解。

第 9B 圖是顯示 TP508 的處理對於內皮細胞朝向血管生成因子 VEGF 移動的影響之柱狀圖。

第 10A 圖是顯示用以測量內皮細胞通過基底膜膠體朝向化學引誘劑的入侵實驗裝置以及實驗設計的圖解。

第 10B 圖是顯示 TP508 的處理對於內皮細胞朝向血管生成因子 VEGF 入侵的影響之柱狀圖。

【主要元件符號說明】

無

五、中文發明摘要：

內皮功能不良 (Endothelia dysfunction , ED) 與許多疾病以及病症有關。非-蛋白水解活化性凝血酶受體之激動劑可用於治療 ED 或 ED-相關的疾病以及病症之方法。

六、英文發明摘要：

Endothelia dysfunction (ED) is associated with a number of diseases and disorders. Agonists of the non-proteolytically activated thrombin receptor can be used in methods to treat ED or ED-related diseases and disorders.

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 (1) 圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

無

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

無

公告本

發明專利說明書

62年6月26日修正替換頁

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：96135320

※申請日期：96.9.21

※IPC 分類：

A61K 38/43

A61K 38/04

A61K 38/18

C07K 14/71

C12N 9/74

C12N 15/52

一、發明名稱：(中文/英文)

治療內皮功能不良之方法

METHOD OF TREATING ENDOTHELIAL DYSFUNCTION

二、申請人：(共 2 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

1. 德州系統大學，理事會 /

THE BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM

2. 德州農工大學體系 / The Texas A&M University System

代表人：(中文/英文)

1. 丹尼爾 H. 夏普宏 / SHARPHORN, Daniel H.

2. 珍妮 赫利 / HURLEY, Janie

住居所或營業所地址：(中文/英文)

1. 美國德州78701奧斯汀市第七西街201號

201 West 7th Street, Austin, Texas 78701, U.S.A.

2. 美國德州77843-3369學院市TAMU3369號

3369 TAMU, College Station, Texas 77843-3369, U.S.A.

國籍：(中文/英文)

1. 美國 / U.S.A.

2. 美國 / U.S.A.

三、發明人：(共 3 人)

姓名：(中文/英文)

1. 戴瑞爾 H 卡尼 / CARNEY, DARRELL H.

2. 芭芭拉 歐爾茲柴斯卡-帕茲德拉克 /

OLSZEWSKA-PAZDRAK, BARBARA

3. 泰瑞莎 W 芙桑 / FOSSUM, THERESA W.

102年8月5日修正

補充序列表

<110> 歐索羅巨克股份有限公司

德州農工大學體系

<120> 治療內皮功能不良之方法

<140> 096135320

<141> 2007-09-21

<150> US 60/846,418

<151> 2006-09-22

<150> US 60/848,004

<151> 2006-09-28

<150> US 60/922,646

<151> 2007-04-10

<160> 40

<170> FastSEQ視窗版4.0
版

<210> 1

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 凝血酶胜肽衍生物

<220>

<221> 變異體

<222> 6

<223> Xaa = Glu或Gln

<220>

<221> 變異體

<222> 13

<223> Xaa = Phe、Met、Leu、His或Val

<400> 1

Arg Gly Asp Ala Cys Xaa Gly Asp Ser Gly Gly Pro Xaa Val
1 5 10

<210> 2

<211> 23

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 凝血酶胜肽衍生物

<220>
<221> 變異體
<222> 15
<223> Xaa = Glu或Gln

<220>
<221> 變異體
<222> 22
<223> Xaa = Phe、Met、Leu、His或Val

<220>
<223> 位於位置1的Ala視需要被N-醯化

<220>
<223> 位於位置23的Val視需要被C-醯胺化

<400> 2
Ala Gly Tyr Lys Pro Asp Glu Gly Lys Arg Gly Asp Ala Cys Xaa Gly
1 5 10 15
Asp Ser Gly Gly Pro Xaa Val
20

<210> 3
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 凝血酶胜肽衍生物

<220>
<223> 位於位置1的Ala是未經修飾的

<220>
<223> 位於位置23的Val以-NH₂醯胺化

<400> 3
Ala Gly Tyr Lys Pro Asp Glu Gly Lys Arg Gly Asp Ala Cys Glu Gly
1 5 10 15
Asp Ser Gly Gly Pro Phe Val
20

<210> 4
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 凝血酶胜肽衍生物

<220>
<221> 變異體
<222> 5
<223> Xaa = Ala、Gly、Ser或S-經保護的Cys

<220>
<221> 變異體

<222> 6
 <223> Xaa = Glu或Gln

 <220>
 <221> 變異體
 <222> 13
 <223> Xaa = Phe、Met、Leu、His或Val

 <400> 4
 Arg Gly Asp Ala Xaa Xaa Gly Asp Ser Gly Gly Pro Xaa Val
 1 5 10

 <210> 5
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 凝血酶胜肽衍生物

 <220>
 <221> 變異體
 <222> 14
 <223> Xaa = Ala、Gly、Ser或S-經保護的Cys

 <220>
 <221> 變異體
 <222> 15
 <223> Xaa = Glu或Gln

 <220>
 <221> 變異體
 <222> 22
 <223> Xaa = Phe、Met、Leu、His或Val

 <400> 5
 Ala Gly Tyr Lys Pro Asp Glu Gly Lys Arg Gly Asp Ala Xaa Xaa Gly
 1 5 10 15
 Asp Ser Gly Gly Pro Xaa Val
 20

 <210> 6
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 凝血酶胜肽衍生物

 <220>
 <223> 位於位置1的Ala視需要被N-醯化

 <220>
 <223> 位於位置23的Val視需要被C-醯胺化

 <400> 6
 Ala Gly Tyr Lys Pro Asp Glu Gly Lys Arg Gly Asp Ala Cys Glu Gly
 1 5 10 15
 Asp Ser Gly Gly Pro Phe Val
 20

 <210> 7

<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 凝血酶胜肽衍生物

<400> 7
Glu Gly Lys Arg Gly Asp Ala Cys Glu Gly
1 5 10

<210> 8
<211> 22
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 凝血酶之功能域之互補胜肽

<400> 8
Lys Gly Ser Pro Thr Val Thr Phe Thr Gly Ile Pro Cys Phe Pro Phe
1 5 10 15
Ile Arg Leu Val Thr Ser
20

<210> 9
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 凝血酶之功能域之互補胜肽

<400> 9
Thr Phe Thr Gly Ile Pro Ser Phe Pro Phe
1 5 10

<210> 10
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 凝血酶之功能域之互補胜肽

<400> 10
Arg Pro Met Phe Gly Leu Leu Pro Phe Ala Pro Leu Arg Thr Leu Pro
1 5 10 15
Leu Ser Pro Pro Gly Lys Gln
20

<210> 11
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 凝血酶之功能域之互補胜肽

<400> 11
Lys Pro Phe Ala Pro Leu Arg Thr Leu Pro

1

5

10

<210> 12

<211> 622

<212> PRT

<213> 智慧人

<400> 12

Met	Ala	His	Val	Arg	Gly	Leu	Gln	Leu	Pro	Gly	Cys	Leu	Ala	Leu	Ala
1				5					10					15	
Ala	Leu	Cys	Ser	Leu	Val	His	Ser	Gln	His	Val	Phe	Leu	Ala	Pro	Gln
		20						25					30		
Gln	Ala	Arg	Ser	Leu	Leu	Gln	Arg	Val	Arg	Arg	Ala	Asn	Thr	Phe	Leu
		35					40					45			
Glu	Glu	Val	Arg	Lys	Gly	Asn	Leu	Glu	Arg	Glu	Cys	Val	Glu	Glu	Thr
	50					55					60				
Cys	Ser	Tyr	Glu	Glu	Ala	Phe	Gly	Ala	Leu	Glu	Ser	Ser	Thr	Ala	Thr
65					70					75					80
Asp	Val	Phe	Trp	Ala	Lys	Tyr	Thr	Ala	Cys	Glu	Thr	Ala	Arg	Thr	Pro
				85					90					95	
Arg	Asp	Lys	Leu	Ala	Ala	Cys	Leu	Glu	Gly	Asn	Cys	Ala	Glu	Gly	Leu
			100					105					110		
Gly	Thr	Asn	Tyr	Arg	Gly	His	Val	Asn	Ile	Thr	Arg	Ser	Gly	Ile	Glu
		115					120					125			
Cys	Gln	Leu	Trp	Arg	Ser	Arg	Tyr	Pro	His	Lys	Pro	Glu	Ile	Asn	Ser
	130					135					140				
Thr	Thr	His	Pro	Gly	Ala	Asp	Leu	Gln	Glu	Asn	Phe	Cys	Arg	Asn	Pro
145					150					155					160
Asp	Ser	Ser	Thr	Thr	Gly	Pro	Trp	Cys	Tyr	Thr	Thr	Asp	Pro	Thr	Val
				165					170					175	
Arg	Arg	Gln	Glu	Cys	Ser	Ile	Pro	Val	Cys	Gly	Gln	Asp	Gln	Val	Thr
			180					185					190		
Val	Ala	Met	Thr	Pro	Arg	Ser	Glu	Gly	Ser	Ser	Val	Asn	Leu	Ser	Pro
	195						200					205			
Pro	Leu	Glu	Gln	Cys	Val	Pro	Asp	Arg	Gly	Gln	Gln	Tyr	Gln	Gly	Arg
	210					215					220				
Leu	Ala	Val	Thr	Thr	His	Gly	Leu	Pro	Cys	Leu	Ala	Trp	Ala	Ser	Ala
225					230					235					240
Gln	Ala	Lys	Ala	Leu	Ser	Lys	His	Gln	Asp	Phe	Asn	Ser	Ala	Val	Gln
			245						250					255	
Leu	Val	Glu	Asn	Phe	Cys	Arg	Asn	Pro	Asp	Gly	Asp	Glu	Glu	Gly	Val
			260					265					270		
Trp	Cys	Tyr	Val	Ala	Gly	Lys	Pro	Gly	Asp	Phe	Gly	Tyr	Cys	Asp	Leu
	275						280					285			
Asn	Tyr	Cys	Glu	Glu	Ala	Val	Glu	Glu	Glu	Thr	Gly	Asp	Gly	Leu	Asp
	290					295					300				
Glu	Asp	Ser	Asp	Arg	Ala	Ile	Glu	Gly	Arg	Thr	Ala	Thr	Ser	Glu	Tyr
305					310					315					320
Gln	Thr	Phe	Phe	Asn	Pro	Arg	Thr	Phe	Gly	Ser	Gly	Glu	Ala	Asp	Cys
				325					330					335	
Gly	Leu	Arg	Pro	Leu	Phe	Glu	Lys	Lys	Ser	Leu	Glu	Asp	Lys	Thr	Glu
			340					345					350		
Arg	Glu	Leu	Glu	Ser	Tyr	Ile	Asp	Gly	Arg	Ile	Val	Glu	Gly	Ser	
	355						360					365			
Asp	Ala	Glu	Ile	Gly	Met	Ser	Pro	Trp	Gln	Val	Met	Leu	Phe	Arg	Lys
	370					375					380				
Ser	Pro	Gln	Glu	Leu	Leu	Cys	Gly	Ala	Ser	Leu	Ile	Ser	Asp	Arg	Trp
385					390					395					400
Val	Leu	Thr	Ala	Ala	His	Cys	Leu	Leu	Tyr	Pro	Pro	Trp	Asp	Lys	Asn
			405						410					415	
Phe	Thr	Glu	Asn	Asp	Leu	Leu	Val	Arg	Ile	Gly	Lys	His	Ser	Arg	Thr
			420					425					430		
Arg	Tyr	Glu	Arg	Asn	Ile	Glu	Lys	Ile	Ser	Met	Leu	Glu	Lys	Ile	Tyr
	435						440					445			

```

Ile His Pro Arg Tyr Asn Trp Arg Glu Asn Leu Asp Arg Asp Ile Ala
 450          455          460
Leu Met Lys Leu Lys Lys Pro Val Ala Phe Ser Asp Tyr Ile His Pro
465          470          475          480
Val Cys Leu Pro Asp Arg Glu Thr Ala Ala Ser Leu Leu Gln Ala Gly
          485          490          495
Tyr Lys Gly Arg Val Thr Gly Trp Gly Asn Leu Lys Glu Thr Trp Thr
          500          505          510
Ala Asn Val Gly Lys Gly Gln Pro Ser Val Leu Gln Val Val Asn Leu
          515          520          525
Pro Ile Val Glu Arg Pro Val Cys Lys Asp Ser Thr Arg Ile Arg Ile
          530          535          540
Thr Asp Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Lys Pro Asp Glu Gly Lys Arg
545          550          555          560
Gly Asp Ala Cys Glu Gly Asp Ser Gly Gly Pro Phe Val Met Lys Ser
          565          570          575
Pro Phe Asn Asn Arg Trp Tyr Gln Met Gly Ile Val Ser Trp Gly Glu
          580          585          590
Gly Cys Asp Arg Asp Gly Lys Tyr Gly Phe Tyr Thr His Val Phe Arg
          595          600          605
Leu Lys Lys Trp Ile Gln Lys Val Ile Asp Gln Phe Gly Glu
        610          615          620

```

<210> 13
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 絲胺酸酯酶保守性序列

<220>
 <221> 變異體
 <222> 2
 <223> Xaa = Ala或Ser

<220>
 <221> 變異體
 <222> 4
 <223> Xaa = Glu或Gln

<220>
 <221> 變異體
 <222> 11
 <223> Xaa = Phe、Met、Leu、His或Val

<400> 13
 Asp Xaa Cys Xaa Gly Asp Ser Gly Gly Pro Xaa Val
 1 5 10

<210> 14
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 絲胺酸酯酶保守性序列

<400> 14
 Cys Glu Gly Asp Ser Gly Gly Pro Phe Val
 1 5 10

<210> 15
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 絲胺酸酯酶保守性序列

<220>
<221> 變異體
<222> 2
<223> Xaa = Glu或Gln

<220>
<221> 變異體
<222> 9
<223> Xaa = Phe、Met、Leu、His或Val

<400> 15
Cys Xaa Gly Asp Ser Gly Gly Pro Xaa Val
1 5 10

<210> 16
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 凝血酶胜肽

<400> 16
Arg Gly Asp Ala
1

<210> 17
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 凝血酶胜肽衍生物

<220>
<223> 位於位置1的Arg視需要被N-醯化

<220>
<223> 位於位置14的Val視需要被C-醯胺化

<400> 17
Arg Gly Asp Ala Cys Glu Gly Asp Ser Gly Gly Pro Phe Val
1 5 10

<210> 18
<211> 33
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 凝血酶胜肽衍生物

<220>
<223> 位於位置1的Asp視需要被N-醯化

<220>
<223> 位於位置33的Phe視需要被C-醯胺化

<400> 18
Asp Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Lys Pro Asp Glu Gly Lys Arg Gly
1 5 10 15
Asp Ala Cys Glu Gly Asp Ser Gly Gly Pro Phe Val Met Lys Ser Pro
20 25 30
Phe

<210> 19
<211> 33
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 凝血酶胜肽衍生物

<220>
<221> 變異體
<222> 20
<223> Xaa = Glu或Gln

<220>
<221> 變異體
<222> 27
<223> Xaa = Phe、Met、Leu、His或Val

<220>
<223> 位於位置1的Asp視需要被N-醯化

<220>
<223> 位於位置33的Phe視需要被C-醯胺化

<400> 19
Asp Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Lys Pro Asp Glu Gly Lys Arg Gly
1 5 10 15
Asp Ala Cys Xaa Gly Asp Ser Gly Gly Pro Xaa Val Met Lys Ser Pro
20 25 30
Phe

<210> 20
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 凝血酶胜肽衍生物

<220>
<221> 變異體
<222> 14
<223> Xaa = Ala、Gly、Ser或S-經保護的Cys

<400> 20
Ala Gly Tyr Lys Pro Asp Glu Gly Lys Arg Gly Asp Ala Xaa Glu Gly
1 5 10 15
Asp Ser Gly Gly Pro Phe Val
20

<210> 21
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 凝血酶胜肽衍生物

<400> 21
 Ala Gly Tyr Lys Pro Asp Glu Gly Lys Arg Gly Asp Ala Ala Glu Gly
 1 5 10 15
 Asp Ser Gly Gly Pro Phe Val
 20

<210> 22
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 凝血酶胜肽衍生物

<220>
 <223> 位於位置1的Ala是未經修飾的

<220>
 <223> 位於位置23的Val以-NH₂醯胺化

<400> 22
 Ala Gly Tyr Lys Pro Asp Glu Gly Lys Arg Gly Asp Ala Ala Glu Gly
 1 5 10 15
 Asp Ser Gly Gly Pro Phe Val
 20

<210> 23
 <211> 33
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 凝血酶胜肽衍生物

<220>
 <221> 變異體
 <222> 5、19
 <223> Xaa = Ala、Gly、Ser或S-經保護的Cys

<400> 23
 Asp Asn Met Phe Xaa Ala Gly Tyr Lys Pro Asp Glu Gly Lys Arg Gly
 1 5 10 15
 Asp Ala Xaa Glu Gly Asp Ser Gly Gly Pro Phe Val Met Lys Ser Pro
 20 25 30
 Phe

<210> 24
 <211> 33
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>

<223> 凝血酶胜肽衍生物

<220>

<221> 變異體

<222> 5、19

<223> Xaa = Ala、Gly、Ser或S-經保護的Cys

<220>

<221> 變異體

<222> 20

<223> Xaa = Glu或Gln

<220>

<221> 變異體

<222> 27

<223> Xaa = Phe、Met、Leu、His或Val

<400> 24

Asp	Asn	Met	Phe	Xaa	Ala	Gly	Tyr	Lys	Pro	Asp	Glu	Gly	Lys	Arg	Gly
1				5				10					15		
Asp	Ala	Xaa	Xaa	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Pro	Xaa	Val	Met	Lys	Ser	Pro
			20				25						30		

Phe

<210> 25

<211> 33

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 凝血酶胜肽衍生物

<400> 25

Asp	Asn	Met	Phe	Ala	Ala	Gly	Tyr	Lys	Pro	Asp	Glu	Gly	Lys	Arg	Gly
1			5					10					15		
Asp	Ala	Ala	Glu	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Pro	Phe	Val	Met	Lys	Ser	Pro
			20				25						30		

Phe

<210> 26

<211> 33

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 凝血酶胜肽衍生物

<220>

<223> 位於位置1的Asp是未經修飾的

<220>

<223> 位於位置33的Phe以-NH₂醯胺化

<400> 26

Asp	Asn	Met	Phe	Ala	Ala	Gly	Tyr	Lys	Pro	Asp	Glu	Gly	Lys	Arg	Gly
1			5					10					15		
Asp	Ala	Ala	Glu	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Pro	Phe	Val	Met	Lys	Ser	Pro
			20				25						30		

Phe

<210> 27
 <211> 33
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 凝血酶胜肽衍生物

<400> 27
 Ala Gly Tyr Lys Pro Asp Glu Gly Lys Arg Gly Asp Ala Cys Glu Gly
 1 5 10 15
 Asp Ser Gly Gly Pro Phe Val Met Lys Ser Pro Phe Asn Asn Arg Trp
 20 25 30
 Tyr

<210> 28
 <211> 33
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 凝血酶胜肽衍生物

<220>
 <221> 變異體
 <222> 15
 <223> Xaa = Glu或Gln

<220>
 <221> 變異體
 <222> 22
 <223> Xaa = Phe、Met、Leu、His或Val

<400> 28
 Ala Gly Tyr Lys Pro Asp Glu Gly Lys Arg Gly Asp Ala Cys Xaa Gly
 1 5 10 15
 Asp Ser Gly Gly Pro Xaa Val Met Lys Ser Pro Phe Asn Asn Arg Trp
 20 25 30
 Tyr

<210> 29
 <211> 33
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 凝血酶胜肽衍生物

<220>
 <223> 位於位置1的Ala是未經修飾的

<220>
 <223> 位於位置33的Tyr以-NH₂醯胺化

<400> 29
 Ala Gly Tyr Lys Pro Asp Glu Gly Lys Arg Gly Asp Ala Cys Glu Gly
 1 5 10 15
 Asp Ser Gly Gly Pro Phe Val Met Lys Ser Pro Phe Asn Asn Arg Trp
 20 25 30
 Tyr

<210> 30
<211> 22
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 凝血酶之功能域之互補胜肽

<400> 30
Lys Gly Ser Pro Thr Val Thr Phe Thr Gly Ile Pro Cys Phe Pro Phe
1 5 10 15
Ile Arg Leu Val Thr Ser
20

<210> 31
<211> 22
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 凝血酶之功能域之互補胜肽

<400> 31
Lys Gly Ser Pro Thr Val Thr Phe Thr Gly Ile Pro Ser Phe Pro Phe
1 5 10 15
Ile Arg Leu Val Thr Ser
20

<210> 32
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 凝血酶之功能域之互補胜肽

<400> 32
Thr Phe Thr Gly Ile Pro Ser Phe Pro Phe
1 5 10

<210> 33
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 凝血酶之功能域之互補胜肽

<400> 33
Arg Pro Met Phe Gly Leu Leu Pro Phe Ala Pro Leu Arg Thr Leu Pro
1 5 10 15
Leu Ser Pro Pro Gly Lys Gln
20

<210> 34
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 凝血酶之功能域之互補胜肽

<400> 34
Leu Pro Phe Ala Pro Leu Arg Thr Leu Pro
1 5 10

<210> 35
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> PCR引子

<400> 35
gcaccggcat caccaggaag aaga 24

<210> 36
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> PCR引子

<400> 36
ccgccgccaa gaggacacca gt 22

<210> 37
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> PCR引子

<400> 37
gcggctgcat gacattgag 19

<210> 38
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> PCR引子

<400> 38
gtcgcggtag agatggtcaa gt 22

<210> 39
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 凝血酶胜肽衍生物

<220>
<221> 變異體
<222> 5
<223> Xaa = Ala、Gly、Ser或S-經保護的Cys

<400> 39

Arg Gly Asp Ala Xaa Glu Gly Asp Ser Gly Gly Pro Phe Val
1 5 10

<210> 40

<211> 23

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 凝血酶胜肽衍生物

<220>

<221> 變異體

<222> 15

<223> Xaa = Glu或Gln

<220>

<221> 變異體

<222> 22

<223> Xaa = Phe、Met、Leu、His或Val

<220>

<223> 位於位置1的Ala是未經修飾的

<220>

<223> 位於位置23的Val以-NH₂醯胺化

<400> 40

Ala Gly Tyr Lys Pro Asp Glu Gly Lys Arg Gly Asp Ala Cys Xaa Gly
1 5 10 15
Asp Ser Gly Gly Pro Xaa Val
20

十、申請專利範圍：

1. 一種非-蛋白水解活化性凝血酶受體之激動劑之用途，其係用於製備在有需要的個體的部位治療內皮功能不良的醫藥品，其中該部位不是由血管形成術所傷害的動脈、慢性皮膚潰瘍、需要骨誘發（osteoiduction）的部位或需要心臟再血管化（revascularization）的部位，其中該激動劑為凝血酶胜肽衍生物，該凝血酶胜肽衍生物包含 12 至 23 個胺基酸，及序列 Asp-Ala-R，其中 R 是絲胺酸酯酶保守性的序列 Cys-X1-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-X2-Val（序列識別號 15），或以單一字母編碼的 DACX1GDSGGPX2V，其中 X1 是 Glu 或 Gln 且 X2 是 Phe、Met、Leu、His 或 Val。

2. 根據申請專利範圍第 1 項之用途，其中個體患有一種或多種選自由高血壓、鬱血性心臟衰竭、冠狀動脈疾病、中風、腦血管疾病、周圍血管疾病、糖尿病、勃起功能不良、動脈粥狀硬化症、氣喘、類風濕性關節炎、肺部高血壓、高高半胱胺酸血症（hyperhomocysteinemia）、鐮刀型紅血球疾病、子癇前症（pre-eclampsia）、慢性腎臟衰竭、慢性腎臟功能不良、敗血症、多重器官衰竭、發炎性腸疾病、以及放射性損傷所組成的族群中之疾病或症狀。

3. 根據申請專利範圍第 1 項之用途，其中個體患有高血壓。

4. 根據申請專利範圍第 1 項之用途，其中個體患有動脈粥狀硬化症。

5. 根據申請專利範圍第 1 項之用途，其中個體患有周

圍血管疾病。

6. 根據申請專利範圍第 1 項之用途，其中該醫藥品是全身性投予。

7. 根據申請專利範圍第 1 項之用途，其中該醫藥品是長期地投予。

8. 根據申請專利範圍第 1 項之用途，其中該醫藥品阻斷與內皮功能不良有關的精胺酸酶之向上調控。

9. 根據申請專利範圍第 1 項之用途，其中該醫藥品促進內皮一氧化氮合酶的活化或向上調控。

10. 根據申請專利範圍第 1 項之用途，其中該醫藥品增加一氧化氮的製造。

11. 根據申請專利範圍第 1 項之用途，其中該絲胺酸酯酶保守性的序列包括 Cys-Glu-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-Phe-Val(序列識別號 14) 的胺基酸序列，或其具有至少 6 個胺基酸的 C-端截斷片段，限制條件為在絲胺酸酯酶保守性序列中的 0、1、2 或 3 個胺基酸不同於序列識別號 14 的對應位置。

12. 根據申請專利範圍第 1 項之用途，其中該絲胺酸酯酶保守性的序列包括 Cys-Glu-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-Phe-Val(序列識別號 14) 的胺基酸序列，或其具有至少 9 個胺基酸的 C-端截斷片段，限制條件為在絲胺酸酯酶保守性區域中的 0、1 或 2 個胺基酸是序列識別號 14 中的對應胺基酸之保守性取代。

13. 根據申請專利範圍第 1 項之用途，其中該凝血酶胜

肽 衍 生 物 包 括

Arg-Gly-Asp-Ala-Cys-Glu-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-Phe-Val (序列識別號 17) 的胺基酸序列，或其具有至少 6 個胺基酸的 C-端截斷片段，其中在胜肽中的 0、1、2 或 3 個胺基酸不同於序列識別號 17 的對應位置。

14. 根據申請專利範圍第 13 項之用途，其中該凝血酶胜肽衍生物包括 C-端的醯胺，以及視需要地包括乙醯化的 N-端，其中該 C-端的醯胺是由 $-C(O)NR_aR_b$ 所表示，其中 R_a 及 R_b 獨立地是氫、 C_1 - C_{10} 經取代或未取代的脂肪族基團，或 R_a 及 R_b 與它們鍵結的氮一起形成 C_1 - C_{10} 非-芳香族雜環基團，以及該 N-端的醯基是由 $R_cC(O)-$ 所表示，其中 R_c 是氫、 C_1 - C_{10} 經取代或未取代的脂肪族基團或 C_1 - C_{10} 經取代或未取代的芳香族基團。

15. 根據申請專利範圍第 13 項之用途，其中該凝血酶胜肽衍生物包括未取代的 N-端，以及未取代的 C-端或由 $-C(O)NH_2$ 所表示的 C-端醯胺。

16. 根據申請專利範圍第 15 項之用途，其中該凝血酶胜肽衍生物包括包括 Arg-Gly-Asp-Ala-Cys-Glu-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-Phe-Val (序列識別號 17) 的胺基酸序列之多肽或其具有至少 6 個胺基酸的 C-端截斷片段，其中在胜肽中的 0、1 或 2 個胺基酸是序列識別號 17 的對應胺基酸之保守性取代。

17. 根據申請專利範圍第 16 項之用途，其中該凝血酶胜肽衍生物包括具有

Arg-Gly-Asp-Ala-Cys- X_1 -Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro- X_2 -Val

(序列識別號 1) 的胺基酸序列之多肽，其中 X_1 是 Glu 或 Gln，以及 X_2 是 Phe、Met、Leu、His 或 Val。

18. 根據申請專利範圍第 17 項之用途，其中 X_1 是 Glu 以及 X_2 是 Phe。

19. 根據申請專利範圍第 15 項之用途，其中該凝血酶胜肽衍生物包括 Ala-Gly-Tyr-Lys-Pro-Asp-Glu-Gly-Lys-Arg-Gly-Asp-Ala-Cys-Glu-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-Phe-Val (序列識別號 6) 的胺基酸序列、具有至少 14 個胺基酸的凝血酶胜肽衍生物之 N-端截斷片段、或具有至少 18 個胺基酸的凝血酶胜肽衍生物之 C-端截斷片段，限制條件為在凝血酶胜肽衍生物中的位置 1-9 以及 14-23 之 0、1、2 或 3 個胺基酸不同於在序列識別號 6 的對應位置之胺基酸。

20. 根據申請專利範圍第 15 項之用途，其中該凝血酶胜肽衍生物包括 Ala-Gly-Tyr-Lys-Pro-Asp-Glu-Gly-Lys-Arg-Gly-Asp-Ala-Cys-Glu-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-Phe-Val (序列識別號 6) 的胺基酸序列、具有至少 14 個胺基酸的凝血酶胜肽衍生物之 N-端截斷片段、或具有至少 18 個胺基酸的凝血酶胜肽衍生物之 C-端截斷片段，限制條件為在凝血酶胜肽衍生物中的位置 1-9 以及 14-23 之 0、1 或 2 個胺基酸是序列識別號 6 的對應位置的胺基酸之保守性取代。

21. 根據申請專利範圍第 20 項之用途，其中該凝血酶

胜 肽 衍 生 物 包 括

Ala-Gly-Tyr-Lys-Pro-Asp-Glu-Gly-Lys-Arg-Gly-Asp-Ala-Cys-X₁-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-X₂-Val (序列識別號 2) 的胺基酸序列、具有至少 14 個胺基酸的凝血酶胜肽衍生物之 N-端截斷片段、或具有至少 18 個胺基酸的凝血酶胜肽衍生物之 C-端截斷片段，其中 X₁ 是 Glu 或 Gln，以及 X₂ 是 Phe、Met、Leu、His 或 Val。

22. 根據申請專利範圍第 20 項之用途，其中該凝血酶胜肽衍生物是多肽 H-Ala-Gly-Tyr-Lys-Pro-Asp-Glu-Gly-Lys-Arg-Gly-Asp-Ala-Cys-Glu-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-Phe-Val-NH₂ (序列識別號 3)。

23. 根據申請專利範圍第 1 項之用途，其中該凝血酶胜肽衍生物包括 Arg-Gly-Asp-Ala-Xaa-Glu-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-Phe-Val (序列識別號 39) 的胺基酸序列或具有至少 6 個胺基酸的 C-端截斷片段，其中在胜肽中的 0、1、2 或 3 個胺基酸不同於序列識別號 39 的對應位置，限制條件為 Xaa 是丙胺酸、甘胺酸、絲胺酸或 S-保護的半胱胺酸。

24. 根據申請專利範圍第 23 項之用途，其中該凝血酶胜肽衍生物包括 C-端的醯胺，以及視需要地包括乙醯化的 N-端，其中該 C-端的醯胺是由 -C(O)NR_aR_b 所表示，其中 R_a 及 R_b 獨立地是氫、C₁-C₁₀ 經取代或未取代的脂肪族基團，或 R_a 及 R_b 與它們鍵結的氮一起形成 C₁-C₁₀ 非-芳香族雜環

基團，以及該 N-端的醯基是由 $R_cC(O)-$ 所表示，其中 R_c 是氫、 C_1-C_{10} 經取代或未取代的脂肪族基團或 C_1-C_{10} 經取代或未取代的芳香族基團。

25. 根據申請專利範圍第 23 項之用途，其中該凝血酶胜肽衍生物包括未取代的 N-端，以及未取代的 C-端或由 $-C(O)NH_2$ 所表示的 C-端醯胺。

26. 根據申請專利範圍第 25 項之用途，其中該凝血酶胜肽衍生物包括 Arg-Gly-Asp-Ala-Xaa-Glu-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-Phe-Val (序列識別號 39) 的胺基酸序列或具有至少 6 個胺基酸的 C-端截斷片段，限制條件為在多肽中的 0、1 或 2 個胺基酸是序列識別號 39 的對應胺基酸之保守性取代。

27. 根據申請專利範圍第 26 項之用途，其中 Xaa 是丙胺酸。

28. 根據申請專利範圍第 25 項之用途，其中該凝血酶胜肽衍生物包括 Arg-Gly-Asp-Ala-Xaa- X_1 -Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro- X_2 -Val (序列識別號 4) 的胺基酸序列，其中 X_1 是 Glu 或 Gln，以及 X_2 是 Phe、Met、Leu、His 或 Val。

29. 根據申請專利範圍第 25 項之用途，其中該凝血酶胜肽衍生物包括胺基酸序列 Ala-Gly-Tyr-Lys-Pro-Asp-Glu-Gly-Lys-Arg-Gly-Asp-Ala-Xaa-Glu-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-Phe-Val (序列識別號 20)，或其包括序列識別號 20 的胺基酸 10-18 之片段，限制條件

為在凝血酶胜肽衍生物中的 0、1 或 2 個胺基酸不同於序列識別號 20 的對應位置之胺基酸。

30. 根據申請專利範圍第 25 項之用途，其中該凝血酶胜肽衍生物包括胺基酸序列 Ala-Gly-Tyr-Lys-Pro-Asp-Glu-Gly-Lys-Arg-Gly-Asp-Ala-Xaa-Glu-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-Phe-Val(序列識別號 20)，或其包括序列識別號 20 的胺基酸 10-18 之片段，限制條件為在凝血酶胜肽衍生物中的 0、1 或 2 個胺基酸是序列識別號 20 的對應位置的胺基酸之保守性取代。

31. 根據申請專利範圍第 30 項之用途，其中該凝血酶胜肽衍生物包括 Ala-Gly-Tyr-Lys-Pro-Asp-Glu-Gly-Lys-Arg-Gly-Asp-Ala-Xaa-X₁-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-X₂-Val(序列識別號 5)的胺基酸序列，或其包括序列識別號 5 的胺基酸 10-18 之片段，其中 X₁ 是 Glu 或 Gln，以及 X₂ 是 Phe、Met、Leu、His 或 Val。

32. 根據申請專利範圍第 31 項之用途，其中 Xaa 是丙胺酸。

33. 根據申請專利範圍第 25 項之用途，其中該凝血酶胜肽衍生物包括 Ala-Gly-Tyr-Lys-Pro-Asp-Glu-Gly-Lys-Arg-Gly-Asp-Ala-Xaa-X₁-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-X₂-Val(序列識別號 5)的胺基酸序列，其中 X₁ 是 Glu 或 Gln，以及 X₂ 是 Phe、Met、Leu、His 或 Val。

34. 根據申請專利範圍第 33 項之用途，其中 Xaa 是丙胺酸。

35. 根據申請專利範圍第 33 項之用途，其中 X₁ 是 Glu 以及 X₂ 是 Phe。

36. 根據申請專利範圍第 25 項之用途，其中該凝血酶胜肽衍生物是多肽 H-Ala-Gly-Tyr-Lys-Pro-Asp-Glu-Gly-Lys-Arg-Gly-Asp-Ala-Ala-Glu-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-Phe-Val-NH₂（序列識別號 22）。

37. 根據申請專利範圍第 1 項之用途，其中該激動劑是包括兩個凝血酶胜肽衍生物的胜肽二聚體，該等凝血酶胜肽衍生物獨立地包括序列識別號 17 的胺基酸序列（Arg-Gly-Asp-Ala-Cys-Glu-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-Phe-Val）或其具有至少 6 個胺基酸的 C-端截斷片段，限制條件為在多肽中的 0、1、2 或 3 個胺基酸不同於序列識別號 17 的對應位置；該等凝血酶胜肽衍生物視需要地包括 C-端的醯胺；以及該等凝血酶胜肽衍生物視需要地包括乙醯化的 N-端。

38. 根據申請專利範圍第 37 項之用途，其中該二聚體基本上不含單體。

39. 根據申請專利範圍第 38 項之用途，其中該等凝血酶胜肽衍生物是相同的。

40. 根據申請專利範圍第 39 項之用途，其中該等凝血酶胜肽衍生物是經由雙硫鍵而共價連結。

41. 根據申請專利範圍第 40 項之用途，其中該等凝血酶胜肽衍生物係由 12 至 23 個胺基酸所組成。

42. 根據申請專利範圍第 41 項之用途，其中該等凝血酶胜肽衍生物包括 C-端的醯胺，以及視需要地包括乙醯化的 N-端，其中該 C-端的醯胺是由 $-C(O)NR_aR_b$ 所表示，其中 R_a 及 R_b 獨立地是氫、 C_1 - C_{10} 經取代或未取代的脂肪族基團，或 R_a 及 R_b 與它們鍵結的氮一起形成 C_1 - C_{10} 非-芳香族雜環基團，以及該 N-端的醯基是由 $R_cC(O)-$ 所表示，其中 R_c 是氫、 C_1 - C_{10} 經取代或未取代的脂肪族基團或 C_1 - C_{10} 經取代或未取代的芳香族基團。

43. 根據申請專利範圍第 41 項之用途，其中該等凝血酶胜肽衍生物各自包括未取代的 N-端；以及未取代的 C-端或由 $-C(O)NH_2$ 所表示的 C-端醯胺。

44. 根據申請專利範圍第 43 項之用途，其中該等凝血酶胜肽衍生物包括 Arg-Gly-Asp-Ala-Cys-Glu-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-Phe-Val (序列識別號 17) 的胺基酸序列或其具有至少 6 個胺基酸的 C-端截斷片段，限制條件為在凝血酶胜肽衍生物中的 0、1 或 2 個胺基酸是序列識別號 17 的對應胺基酸之保守性取代。

45. 根據申請專利範圍第 43 項之用途，其中該等凝血酶胜肽衍生物包括 Arg-Gly-Asp-Ala-Cys- X_1 -Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro- X_2 -Val (序列識別號 1) 的胺基酸序列，其中 X_1 是 Glu 或 Gln，以

及 X_2 是 Phe、Met、Leu、His 或 Val。

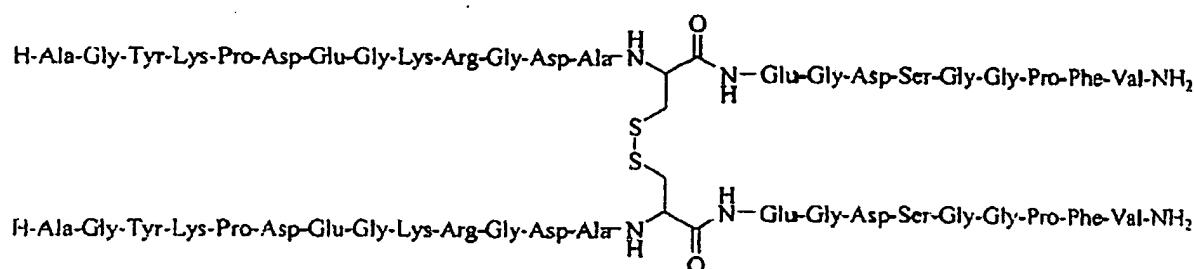
46. 根據申請專利範圍第 43 項之用途，其中該等凝血酶胜肽衍生物包括 Ala-Gly-Tyr-Lys-Pro-Asp-Glu-Gly-Lys-Arg-Gly-Asp-Ala-Cys-Glu-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-Phe-Val (序列識別號 6) 的胺基酸序列或其包括序列識別號 6 的胺基酸 10-18 之片段，限制條件為在凝血酶胜肽衍生物中的 0、1、2 或 3 個胺基酸不同於在序列識別號 6 的對應位置之胺基酸。

47. 根據申請專利範圍第 43 項之用途，其中該等凝血酶胜肽衍生物包括 Ala-Gly-Tyr-Lys-Pro-Asp-Glu-Gly-Lys-Arg-Gly-Asp-Ala-Cys-Glu-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-Phe-Val (序列識別號 6) 的胺基酸序列或其包括序列識別號 6 的胺基酸 10-18 之片段，限制條件為在凝血酶胜肽衍生物中的 0、1 或 2 個胺基酸是序列識別號 6 的對應位置的胺基酸之保守性取代。

48. 根據申請專利範圍第 43 項之用途，其中該等凝血酶胜肽衍生物包括胺基酸序列 Ala-Gly-Tyr-Lys-Pro-Asp-Glu-Gly-Lys-Arg-Gly-Asp-Ala-Cys- X_1 -Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro- X_2 -Val (序列識別號 2)，其中 X_1 是 Glu 或 Gln，以及 X_2 是 Phe、Met、Leu、His 或 Val，或其包括序列識別號 2 的胺基酸 10-18 之片段。

49. 根據申請專利範圍第 43 項之用途，其中該等凝血酶胜肽衍生物包括胺基酸序列 Ala-Gly-Tyr-Lys-Pro-Asp-Glu-Gly-Lys-Arg-Gly-Asp-Ala-Cy

54. 根據申請專利範圍第 1 項之用途，其中該激動劑是由以下結構式所表示的胜肽二聚體：



55. 根據申請專利範圍第 1 項之用途，其中該個體也投予治療有效量的人類 VEGF-A。

56. 根據申請專利範圍第 55 項之用途，其中該激動劑是由序列識別號 3 所組成的多肽。

57. 根據申請專利範圍第 56 項之用途，其中該血管生成性生長因子是人類 VEGF-A。

● 十一、圖式：

如次頁