(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 110234760 B
(45)授权公告日 2024.08.06

(21)申请号 201780079765.0
(22)申请日 2017.12.21
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 110234760 A
(43)申请公布日 2019.09.13
(30)优先权数据
2016-249020 2016.12.22 JP
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2019.06.21
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/JP2017/046044 2017.12.21
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2018/117244 JA 2018.06.28
(73)专利权人 第一三共株式会社
地址 日本东京都
(72)发明人 西宫大祐 桥本隆二 佐藤俊之 木村贵子 山崎淳史 井上达也
(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
专利代理师 梁谋 黄登高
(51)Int.Cl.
C12N 15/09(2006.01)
A61K 38/55(2006.01)
A61K 45/00(2006.01)
A61K 45/06(2006.01)
A61P 9/00(2006.01)
A61P 19/02(2006.01)
A61P 27/02(2006.01)
A61P 29/00(2006.01)
A61P 43/00(2006.01)
C07K 16/38(2006.01)
C07K 19/00(2006.01)
C12N 1/15(2006.01)
C12N 1/19(2006.01)
C12N 1/21(2006.01)
C12N 5/10(2006.01)
C12P 21/02(2006.01)
C12Q 1/37(2006.01)
(56)对比文件
CN 101173314 A,2008.05.07
CN 103920142 A,2014.07.16
审查员 李杏
权利要求书1页 说明书46页
序列表23页 附图41页

(54)发明名称

用于治疗年龄相关性黄斑变性的肽

(57)摘要

提供了一种新型肽,其包含由SEQ ID NO:30所示的氨基酸序列并抑制蛋白酶活性。

CN 110234760 B

1.一种抑制人HTRA1的蛋白酶活性的SPINK2突变体肽,其中所述肽由在SEQ ID NO:24、23、25-27、9、15、3、5、7、11、13、17、19、21、28和29中的任一个中所示的氨基酸序列组成。

2.一种多核苷酸,其包含编码根据权利要求1的肽中所包含的氨基酸序列的核苷酸序列。

3.一种载体,其包含根据权利要求2的多核苷酸。

4.一种细胞,其包含根据权利要求2的多核苷酸或根据权利要求3的载体,或生产根据权利要求1的肽。

5.一种用于生产抑制HTRA1的蛋白酶活性的SPINK2突变体肽的方法,所述方法包括下述步骤i和ii:

i培养根据权利要求4的细胞;和

ii从培养物回收SPINK2突变体肽。

6.一种缀合物,其包含与一个额外部分连接的根据权利要求1的肽或根据权利要求5所述的方法得到的肽。

7.根据权利要求6的缀合物,所述缀合物是多肽。

8.一种抗体或其功能片段,其结合根据权利要求1的肽或根据权利要求5所述的方法得到的肽,其中所述肽由SEQ ID NO:24、23、25-27、9、15、3、5、7、11、13、17、19、21、28和29中的任一个组成。

9.一种组合物,其包含根据权利要求1的肽、根据权利要求5所述的方法得到的肽、根据权利要求2的多核苷酸、根据权利要求3的载体、根据权利要求4的细胞、根据权利要求6或7的缀合物、和/或根据权利要求8的抗体或其功能片段。

10.一种药物组合物,其包含根据权利要求1的肽或根据权利要求5所述的方法得到的肽、根据权利要求2的多核苷酸、根据权利要求3的载体、根据权利要求4的细胞或生产根据权利要求6或7的缀合物的细胞,和/或根据权利要求6或7的缀合物。

11.根据权利要求10药物组合物,其中所述药物组合物包含一种或两种或更多种另外药物。

12.根据权利要求10的药物组合物用于制备药物的用途,所述药物用于治疗或预防湿性年龄相关性黄斑变性和/或干性年龄相关性黄斑变性。

13.根据权利要求12的药物组合物的用途,其中所述药物组合物包含一种或两种或更多种另外药物。

14.根据权利要求12的药物组合物的用途,其中所述药物与一种或两种或更多种另外药物联合施用。

15.根据权利要求12的药物组合物的用途,其中所述药物组合物为视网膜保护剂。

用于治疗年龄相关性黄斑变性的肽

技术领域

[0001] 本发明涉及肽、多核苷酸、载体、细胞、用于生产所述肽的方法、通过所述方法得到的肽、包含所述肽的组合物、包含所述肽的药物组合物、用于治疗或预防多种疾病的包含所述肽的药物组合物、所述肽用于治疗或预防多种疾病的用途、包括施用所述肽的步骤的用于治疗多种疾病的方法,等。

背景技术

[0002] 高温必需A丝氨酸肽酶1 (HTRA1)是一种胰蛋白酶-样丝氨酸蛋白酶(PRSS11;Clan PA, 家族S1),且由一个N-端结构域(由一个IGFBP-样模块和一个Kazal-样模块组成)、一个蛋白酶结构域和一个C-端PDZ结构域构成。HTRA1属于HTRA家族(包括HTRA2、HTRA3和HTRA4)且可逆地表现出活性和无活性结构,以如其它HTRA分子相同的方式(非专利文献1和2)。它的表达在人体中错误分布(maldistributed),并在软骨、滑膜、胎盘等中以相当高的水平存在。已知的是,HTRA1会切割许多细胞外基质组分诸如淀粉样前体蛋白、纤调蛋白聚糖、簇集蛋白、ADAM9和玻连蛋白作为底物且与以关节炎和骨钙化为典型的疾病有关(非专利文献3、4、5和6)。进一步已知,如果HTRA1启动子区域具有基因多态性(rs11200638),HTRA1转录水平会升高。全基因组关联分析也已经揭示,所述多态性与年龄相关性黄斑变性(在下文中,被称作AMD)强相关(非专利文献7和8)。

[0003] AMD是一种与老化有关的慢性退行性疾病且以中央视觉的丧失为特征。该疾病在美国是后天性盲的主要原因,并且在日本是在青光眼、糖尿病性视网膜病变和色素性视网膜炎之后的后天性盲的第四最常见原因(非专利文献12)。HTRA1的mRNA和蛋白水平在AMD患者的淋巴细胞或视网膜色素上皮细胞中升高(非专利文献13)。还已经报道,HTRA1蛋白的表达在脉络膜小疣或变性的视网膜色素上皮细胞(其为AMD的前体病灶)或新生血管膜中升高(非专利文献11和14-16)。还已经报道,在与视网膜脱离、视网膜静脉闭塞、玻璃体积血、黄斑裂孔等相关的玻璃体液中检测到HTRA1蛋白,且它的值与血管生成标志物VEGF同步(非专利文献17)。此外,已经在HTRA1转基因小鼠中观察到构成基膜的蛋白(诸如纤蛋白 5或原弹性蛋白)的分解和布鲁赫膜的弹性层的片段化(非专利文献9)。但是,尚未直接表明HTRA1的蛋白酶活性的抑制对于治疗上面描述的疾病和保护视网膜而言是有效的还是无效的。

[0004] SPINK2 (丝氨酸蛋白酶抑制剂Kazal-型2)是一种具有三个二硫键的Kazal-样结构域并作为胰蛋白酶/顶体蛋白抑制剂起作用(非专利文献10)。但是,尚未阐明它与AMD的关系。

[0005] 已知小鼠和兔模型是用于评价AMD的动物模型(非专利文献18、19和20)。关于更优选的作为可以外推至人眼疾病的模型的兔(非专利文献21),常规模型仅仅用于观察视网膜和脉络膜中的异常发现,且在评价视网膜色素上皮细胞(RPE细胞)的异常功能等中具有困难。其另一个问题是模型形成所需的长达8个月的阶段(非专利文献20)。

[0006] 引文列表

[0007] 非专利文献

[0008] 非专利文献1: Truebestein L, 等人, 2011, Nat Struct Mol Biol., 第18卷(第3期): 第386-8页

[0009] 非专利文献2: Eigenbrot C, 等人, 2012, Structure, 第20卷(第6期): 第1040-50页

[0010] 非专利文献3: Grau S, 等人, 2005, Proc Natl Acad Sci U S A., 第102卷(第17期): 第6021-26页

[0011] 非专利文献4: Grau S, 等人, 2006, J Biol Chem., 第281卷(第10期): 第6124-29页

[0012] 非专利文献5: Hadfield KD, 等人, 2008, J Biol Chem., 第283卷, (第9期): 第5928-38页

[0013] 非专利文献6: An E, 等人, 2010, Invest Ophthalmol Vis Sci., 第51卷(第7期): 第3379-86页

[0014] 非专利文献7: Yang Z, 等人, 2006, Science, 第314卷(第5801期): 第992-93页

[0015] 非专利文献8: Tang NP, 等人, 2009, Ann Epidemiol., 第19卷(第10期): 第740-45页

[0016] 非专利文献9: Vierkotten S, 等人, 2011, PLoS One, 第6卷(第8期): 第页e22959

[0017] 非专利文献10: Chen T, 等人, 2009, Proteins, 第77卷(第1期): 第209-19页

[0018] 非专利文献11: Yang Z等人, Science, 2006, 第314卷, 第5801期: 第992-93页

[0019] 非专利文献12: Kimihiro Nakae, 等人, 2007 Annual report of the Research Committee on Chorioretinal Degenerations and Optic萎缩, Research on Measures for Intractable Diseases, 日本健康、劳动和福利部(2007)

[0020] 非专利文献13: Black JR和Clark SJ, Genet. Med., 2016, 第18卷, 第4期: 第283-89页

[0021] 非专利文献14: Cameron DJ, 等人, Cell Cycle, 2007, 第6卷, 第9期: 第1122-25页

[0022] 非专利文献15: Chan CC等人, Trans. Am. Soc., 2007, 第105卷: 第92-97页

[0023] 非专利文献16: Tuo J等人, 2008, 第115卷, 第11期: 第1891-98页

[0024] 非专利文献17: Ng TK等人, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci, 2011, 第52卷, 第6期: 第3706-12页

[0025] 非专利文献18: Espinosa-Haidemann D.G, 等人, Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2006, 第47卷(第2期): 第729-37页

[0026] 非专利文献19: Pons M, 等人, American Journal of Pathology, 2010, 第177卷: 第1198-1213页

[0027] 非专利文献20: Trivino A, 等人, Experimental Eye Research, 2006, 第83卷: 第357-366页

[0028] 非专利文献21: Zernii E.Y, 等人, CNS & Neurological Disorders-Drug

Targets, 2016, 第15卷: 第267-291页。

[0029] 发明概述

[0030] 技术问题

[0031] 本发明的一个目的是,提供一种新颖的高温必需A丝氨酸肽酶1 (HTRA1)抑制剂。

[0032] 问题的解决方案

[0033] 本发明涉及:

[0034] (1) 一种SPINK2突变体肽,其包含在SEQ ID NO: 30中所示的氨基酸序列(图42)且抑制人HTRA1的蛋白酶活性;

[0035] (2) 根据(1)的肽,其中第一Xaa (X_1)是Asp、Glu、Ser、Gly或Ile,第二Xaa (X_2)是Ala、Gly、Leu、Ser或Thr,第三Xaa (X_3)是Asp、His、Lys、Met或Gln,第四Xaa (X_4)是Asp、Phe、His、Ser或Tyr,第五Xaa (X_5)是Ala、Asp、Glu、Met或Asn,第六Xaa (X_6)是Met或Trp,第七Xaa (X_7)是Gln、Trp、Tyr或Val,第八Xaa (X_8)是Phe、Leu或Tyr,第九Xaa (X_9)是Phe或Tyr,第十Xaa (X_{10})是Ala、Glu、Met或Val,且第十一Xaa (X_{11})是Ala、Thr或Val;

[0036] (3) 根据(1)或(2)的肽,其包含在SEQ ID NO: 3、5、7、9、11、13、15、17、19、21和23-29 (图15、17、19、21、23、25、27、29、31、33和35-41)中的任一个中所示的氨基酸序列;

[0037] (4) 根据(1)至(3)中的任一项的肽,其包含由1-3个氨基酸与在SEQ ID NO: 30中所示的氨基酸序列(图42)的氨基端侧的肽键制备的氨基酸序列;

[0038] (5) 根据(1)至(4)中的任一项的肽,其包含由1或2个氨基酸与在SEQ ID NO: 30中所示的氨基酸序列(图42)的羧基端侧的肽键制备的氨基酸序列;

[0039] (6) 根据(1)至(5)中的任一项的肽,其具有特征在于具有3个二硫键且包含环结构、α螺旋和β折叠的三维结构;

[0040] (7) 一种多核苷酸,其包含编码根据(1)至(6)中的任一项的肽中所包含的氨基酸序列的核苷酸序列;

[0041] (8) 一种载体,其包含根据(7)的多核苷酸;

[0042] (9) 一种细胞,其包含根据(7)的多核苷酸或根据(8)的载体或生产根据(1)至(6)中的任一项的肽;

[0043] (10) 一种用于生产抑制HTRA1的蛋白酶活性的SPINK2突变体肽的方法,所述方法包括下述步骤(i)和(ii):

[0044] (i)培养根据(9)的细胞;和

[0045] (ii)从培养物回收SPINK2突变体肽;

[0046] (11) 通过根据(10)的方法得到的SPINK2突变体肽;

[0047] (12) 一种缀合物,其包含与一个额外部分连接的根据(1)至(6)和(11)中的任一项的肽;

[0048] (13) 根据(12)的缀合物,所述缀合物是多肽;

[0049] (14) 一种抗体,其结合根据(1)至(6)和(11)中的任一项的肽或其功能片段;

[0050] (15) 一种组合物,其包含根据(1)至(6)和(11)中的任一项的肽、根据(7)的多核苷酸、根据(8)的载体、根据(9)的细胞、根据(12)或(13)的缀合物、和/或根据(14)的抗体或其功能片段;

[0051] (16) 一种药物组合物,其包含根据(1)至(6)和(11)中的任一项的肽和/或根据

(12)或(13)的缀合物;

[0052] (17) 根据(16)的药物组合物,其用于治疗或预防HTRA1相关疾病;

[0053] (18) 根据(17)的药物组合物,其中所述HTRA1相关疾病是一种或两种或更多种选自以下的疾病:湿性年龄相关性黄斑变性、干性年龄相关性黄斑变性、地图样萎缩、糖尿病性视网膜病变、早产儿视网膜病变、息肉状脉络膜血管病、类风湿性关节炎和骨关节炎;

[0054] (19) 根据(16)至(18)中的任一项的药物组合物,其包含一种或两种或更多种另外药物;

[0055] (20) 根据(16)至(18)中的任一项的药物组合物,其与一种或两种或更多种另外药物联合使用;

[0056] (21) 根据(16)至(20)中的任一项的药物组合物,其为视网膜保护剂;

[0057] (22) 一种用于鉴别年龄相关性黄斑变性的治疗药物或预防药物的方法,所述方法包括下述步骤1-3:

[0058] [步骤1]在有和没有测试物存在下温育HTRA1蛋白酶和底物;

[0059] [步骤2]在有和没有测试物存在下检测HTRA1蛋白酶活性;和

[0060] [步骤3]当在有所述测试物存在下的HTRA1蛋白酶活性小于在没有所述测试物存在下的HTRA1蛋白酶活性时,确定所述测试物是阳性的;

[0061] (23) 一种用于鉴别视网膜保护剂的方法,所述方法包括下述步骤1-3:

[0062] [步骤1]在有和没有测试物存在下温育HTRA1蛋白酶和底物;

[0063] [步骤2]在有和没有测试物存在下检测HTRA1蛋白酶活性;和

[0064] [步骤3]当在有所述测试物存在下的HTRA1蛋白酶活性小于在没有所述测试物存在下的HTRA1蛋白酶活性时,确定所述测试物是阳性的;

[0065] (24) 一种用于制备视网膜损伤模型兔的方法,所述方法包括下述步骤:给兔饲喂含有氢醌的高脂肪饮食3-6个月,其中所述模型兔的视网膜色素上皮细胞与正常兔的视网膜色素上皮细胞相比过度生长;

[0066] (25) 通过根据(24)的方法制备的视网膜损伤模型兔,其中所述视网膜损伤模型兔具有与正常兔相比过度生长的视网膜色素上皮细胞;

[0067] (26) 一种用于鉴别年龄相关性黄斑变性的治疗药物或预防药物或视网膜保护剂的方法,所述方法包括下述步骤(i)和(ii):

[0068] (i)在有和没有测试物施用的情况下测量根据(25)的兔中的视网膜色素上皮细胞的过度生长;和

[0069] (ii)当在测试物施用下视网膜色素上皮细胞的过度生长与没有施用测试物下视网膜色素上皮细胞的过度生长相比受到抑制时,确定所述测试物是阳性的;

[0070] (27) 根据(26)的方法,其中所述步骤(i)中的测量是视网膜色素上皮细胞的平均面积或过度生长的视网膜色素上皮细胞的数目的测量;

[0071] (28) 根据(16)至(18)中的任一项的药物组合物,其用于治疗或预防干性年龄相关性黄斑变性;和

[0072] (29) 根据(16)至(18)中的任一项的药物组合物,其用于治疗或预防湿性年龄相关性黄斑变性;等。

[0073] 发明的有利效果

[0074] 本发明提供的肽和包含所述肽的药物组合物具有HTRA1抑制活性且可用于年龄相关性黄斑变性的治疗或预防等。

[0075] 附图简述

[0076] 图1(A)是显示对比人、小鼠、大鼠和猴HTRA1之间的序列相似性的结果的简图。虚线描绘了酶活性结构域(204Gly至364Leu)。

[0077] 图1(B)是显示对比人、小鼠、大鼠和猴HTRA1之间的序列相似性的结果的简图(续)。

[0078] 图2是显示使用肽底物的分解速率作为指标评价HTRA1抑制肽的HTRA1 (cat)抑制活性的结果的简图。小图A至C各自显示了每种抑制肽的评价结果,且小图D显示了对照野生型SPINK2的评价结果。

[0079] 图3是显示使用肽底物的分解速率作为指标评价HTRA1抑制肽的HTRA1 (全)抑制活性的结果的简图(小图A至C)。

[0080] 图4(A)是显示使用人玻连蛋白的分解作为指标评价HTRA1抑制肽的HTRA1 (cat)抑制活性的结果的简图。使用人玻连蛋白抗体(R&D Systems, Inc.; MAB2349)通过蛋白质印迹进行分析。

[0081] 图4(B)是显示使用人玻连蛋白的分解作为指标评价HTRA1抑制肽的HTRA1 (cat)抑制活性的结果的简图(续)。

[0082] 图5(A)是显示使用肽底物的分解作为指标评价HTRA1抑制肽与每种蛋白酶的交叉反应性的结果的简图(部分1)。关于使用的每种蛋白酶的名称和它的浓度以及底物的名称和它的浓度等,参见实施例3。

[0083] 图5(B)是显示使用肽底物的分解作为指标评价HTRA1抑制肽与每种蛋白酶的交叉反应性的结果的简图(部分2)。

[0084] 图5(C)是显示使用肽底物的分解作为指标评价HTRA1抑制肽与每种蛋白酶的交叉反应性的结果的简图(部分3)。

[0085] 图5(D)是显示使用肽底物的分解作为指标评价HTRA1抑制肽与每种蛋白酶的交叉反应性的结果的简图(部分4)。

[0086] 图6是显示通过X-射线晶体学得到的HTRA1 (cat)/HTRA1抑制肽复合物的简图。所述抑制肽与由HTRA1 (cat)形成的HTRA1三聚体的每个分子结合。

[0087] 图7是显示通过X-射线晶体学得到的作为单体的HTRA1 (cat)/HTRA1抑制肽复合物的简图。所述抑制肽与含有HTRA1 (cat)的活性中心的区域结合。

[0088] 图8显示了H2-Opt的氨基酸序列(SEQ ID NO: 54)。N-端“Mca-I”是指N-(4-甲基香豆基-7-酰胺)-异亮氨酸,C-端“(Dnp)K”是指Nε-(2,4-二硝基苯基)-赖氨酸。

[0089] 图9的简图表明,在通过光暴露诱导的视网膜损伤大鼠模型的玻璃体液中的HTRA1表达增加。使用人HTRA1/PRSS11抗体(R&D Systems, Inc.; AF2916)通过蛋白质印迹进行分析。

[0090] 图10的简图表明,通过光暴露诱导的视网膜损伤的大鼠模型的HTRA1抑制肽施用组抑制了在视网膜的横截面上的外核层中的核计数的减少。对于生理盐水施用组,n = 4,和对于其它组,n = 5。

[0091] 图11是显示使用肽底物的分解速率作为指标评价5种HTRA1抑制肽衍生物的HTRA1

(cat)抑制活性的结果的简图。

[0092] 图12是显示通过免疫沉淀方法评价3种HTRA1抑制肽与HTRA1 (cat)的结合的结果的简图。

[0093] 图13显示了人SPINK2的氨基酸序列(SEQ ID NO: 1)。

[0094] 图14显示了编码人SPINK2的氨基酸序列的核苷酸序列(SEQ ID NO: 2)。

[0095] 图15显示了肽H218的氨基酸序列(SEQ ID NO: 3)。

[0096] 图16显示了编码肽H218的氨基酸序列的核苷酸序列(SEQ ID NO: 4)。

[0097] 图17显示了肽H223的氨基酸序列(SEQ ID NO: 5)。

[0098] 图18显示了编码肽H223的氨基酸序列的核苷酸序列(SEQ ID NO: 6)。

[0099] 图19显示了肽H228的氨基酸序列(SEQ ID NO: 7)。

[0100] 图20显示了编码肽H228的氨基酸序列的核苷酸序列(SEQ ID NO: 8)。

[0101] 图21显示了肽H308的氨基酸序列(SEQ ID NO: 9)。

[0102] 图22显示了编码肽H308的氨基酸序列的核苷酸序列(SEQ ID NO: 10)。

[0103] 图23显示了肽H321的氨基酸序列(SEQ ID NO: 11)。

[0104] 图24显示了编码肽H321的氨基酸序列的核苷酸序列(SEQ ID NO: 12)。

[0105] 图25显示了肽H322的氨基酸序列(SEQ ID NO: 13)。

[0106] 图26显示了编码肽H322的氨基酸序列的核苷酸序列(SEQ ID NO: 14)。

[0107] 图27显示了肽衍生物H308AT的氨基酸序列(SEQ ID NO: 15)。

[0108] 图28显示了编码肽衍生物H308AT的氨基酸序列的核苷酸序列(SEQ ID NO: 16)。

[0109] 图29显示了肽衍生物H321AT的氨基酸序列(SEQ ID NO: 17)。

[0110] 图30显示了编码肽衍生物H321AT的氨基酸序列的核苷酸序列(SEQ ID NO: 18)。

[0111] 图31显示了肽衍生物H322AT的氨基酸序列(SEQ ID NO: 19)。

[0112] 图32显示了编码肽衍生物H322AT的氨基酸序列的核苷酸序列(SEQ ID NO: 20)。

[0113] 图33显示了肽M7的氨基酸序列(SEQ ID NO: 21)。

[0114] 图34显示了编码肽M7的氨基酸序列的核苷酸序列(SEQ ID NO: 22)。

[0115] 图35显示了肽衍生物H308_S16A的氨基酸序列(SEQ ID NO: 23)。

[0116] 图36显示了肽衍生物H308_D1G_S16A的氨基酸序列(SEQ ID NO: 24)。

[0117] 图37显示了肽衍生物H308_D1S_S16A的氨基酸序列(SEQ ID NO: 25)。

[0118] 图38显示了肽衍生物H308_D1E_S16A的氨基酸序列(SEQ ID NO: 26)。

[0119] 图39显示了肽衍生物H308_D1SLI_S16A的氨基酸序列(SEQ ID NO: 27)。

[0120] 图40显示了肽衍生物H321AT_D1S_S16A的氨基酸序列(SEQ ID NO: 28)。

[0121] 图41显示了肽衍生物H322AT_D1S_S16A的氨基酸序列(SEQ ID NO: 29)。

[0122] 图42显示了HTRA1抑制肽的通式(SEQ ID NO: 30)。X_1至X_{11}各种代表任意氨基酸。

[0123] 图43显示了由S标签和一个接头组成的氨基酸序列(SEQ ID NO: 31)。

[0124] 图44显示了C-端六聚体的氨基酸序列(SEQ ID NO: 32)。

[0125] 图45显示了引物1的的核苷酸序列(SEQ ID NO: 33)。

[0126] 图46显示了引物2的核苷酸序列(SEQ ID NO: 34)。

[0127] 图47显示了引物3的核苷酸序列(SEQ ID NO: 35)。

[0128] 图48显示了引物4的核苷酸序列(SEQ ID NO: 36)。

[0129] 图49显示了引物5的核苷酸序列(SEQ ID NO: 37)。

[0130] 图50显示了引物6的核苷酸序列(SEQ ID NO: 38)。

[0131] 图51显示了引物7的核苷酸序列(SEQ ID NO: 39)。

[0132] 图52显示了引物8的核苷酸序列(SEQ ID NO: 40)。

[0133] 图53显示了引物9的核苷酸序列(SEQ ID NO: 41)。

[0134] 图54显示了引物10的核苷酸序列(SEQ ID NO: 42)。

[0135] 图55显示了引物11的核苷酸序列(SEQ ID NO: 43)。

[0136] 图56显示了引物12的核苷酸序列(SEQ ID NO: 44)。

[0137] 图57显示了引物13的核苷酸序列(SEQ ID NO: 45)。

[0138] 图58显示了引物14的核苷酸序列(SEQ ID NO: 46)。

[0139] 图59显示了引物15的核苷酸序列(SEQ ID NO: 47)。

[0140] 图60显示了引物16的核苷酸序列(SEQ ID NO: 48)。

[0141] 图61显示了引物17的核苷酸序列(SEQ ID NO: 49)。

[0142] 图62显示了引物18的核苷酸序列(SEQ ID NO: 50)。

[0143] 图63显示了引物19的核苷酸序列(SEQ ID NO: 51)。

[0144] 图64显示了引物20的核苷酸序列(SEQ ID NO: 52)。

[0145] 图65显示了人HTRA1 (全)的氨基酸序列(SEQ ID NO: 53)。

[0146] 图66(A)是显示使用肽底物的分解速率作为指标评价HTRA1抑制肽的HTRA1 (cat)抑制活性的结果的简图。

[0147] 图66(B)是显示使用肽底物的分解速率作为指标评价HTRA1抑制肽的HTRA1 (全)抑制活性的结果的简图。

[0148] 图67是显示使用人玻连蛋白的分解作为指标评价HTRA1抑制肽的HTRA1 (cat)抑制活性的结果的简图。使用人玻连蛋白抗体(R&D Systems, Inc.; MAB2349)通过蛋白质印迹进行分析。

[0149] 图68(A)是显示使用肽底物的分解作为指标评价HTRA1抑制肽与每种蛋白酶的交叉反应性的结果的简图(部分1)。

[0150] 图68(B)是显示使用肽底物的分解作为指标评价HTRA1抑制肽与每种蛋白酶的交叉反应性的结果的简图(部分2)。

[0151] 图68(C)是显示使用肽底物的分解作为指标评价HTRA1抑制肽与每种蛋白酶的交叉反应性的结果的简图(部分3)。

[0152] 图68(D)是显示使用肽底物的分解作为指标评价HTRA1抑制肽与每种蛋白酶的交叉反应性的结果的简图(部分4)。

[0153] 图68(E)是显示使用肽底物的分解作为指标评价HTRA1抑制肽与每种蛋白酶的交叉反应性的结果的简图(部分5)。

[0154] 图69是显示通过免疫沉淀方法评价3种HTRA1抑制肽与HTRA1 (cat)的结合的结果的简图。

[0155] 图70(A)的简图表明,通过光暴露诱导的视网膜损伤的大鼠模型的HTRA1抑制肽H308_D1G_S16A施用组抑制了在视网膜的横截面上的外核层中的核计数的减少。对于所有组,n = 6。HTRA1抑制肽H308_D1G_S16A的剂量是0.2和1 μg/眼。

[0156] 图70(B)的简图表明,通过光暴露诱导的视网膜损伤的大鼠模型的HTRA1抑制肽H321AT_D1G_S16A施用组抑制了在视网膜的横截面上的外核层中的核计数的减少。对于所有组,n = 6。HTRA1抑制肽H321AT_D1G_S16A的剂量是0.2和1 μg/眼。

[0157] 图70(C)的简图表明,通过光暴露诱导的视网膜损伤的大鼠模型的HTRA1抑制肽H322AT_D1G_S16A施用组抑制了在视网膜的横截面上的外核层中的核计数的减少。对于所有组,n = 6。HTRA1抑制肽H322AT_D1G_S16A的剂量是0.2和1 μg/眼。

[0158] 图71(A)是显示用ZO-1抗体(Thermo Fisher Scientific Inc.)免疫染色12-周龄兔、3-岁兔和负载HFD-HQ的3-岁兔中的RPE细胞的结果的简图。

[0159] 图71(B)显示了12-周龄兔、3-岁兔和负载HFD-HQ的3-岁兔中的RPE细胞的平均面积。

[0160] 图71(C)是显示负载HFD-HQ的3-岁兔的视网膜组织中的补体第3组分“C3”(其为AMD相关因子)的mRNA的增加表达的简图。

[0161] 图71(D)是显示负载HFD-HQ的3-岁兔的RPE/脉络膜组织中补体第3组分“C3”(其为AMD相关因子)的mRNA的增加表达的简图。

[0162] 图71(E)是显示通过LC-MS/MS测量12-周龄兔、3-岁兔和负载HFD-HQ的3-岁兔的玻璃体液中的HTRA1浓度的结果的简图。

[0163] 图72(A)的简图表明,负载HFD-HQ的3-岁兔的HTRA1抑制肽H308施用组表现出对RPE细胞的过度生长的抑制作用。对于所有组,n = 5。使用平均面积作为指标。

[0164] 图72(B)的简图表明,负载HFD-HQ的3-岁兔的HTRA1抑制肽H308施用组表现出对RPE细胞的过度生长的抑制作用。对于所有组,n = 5。将具有1500 μm^2或更大的细胞面积的RPE细胞的数目用作指标。

[0165] 图73是显示在人、猴、兔、小鼠和大鼠HTRA1之间对比序列相似性的结果的简图。虚线描绘了酶活性结构域(204Gly至364Leu)。

[0166] 图74的简图表明,HTRA1抑制肽表现出对在人视网膜色素上皮细胞系ARPE-19中通过加入H_2O_2、正常人血清补体和HTRA1诱导的VEGF mRNA的抑制作用。

[0167] 图75的简图表明,HTRA1抑制肽表现出对血清诱导的人脐静脉内皮细胞(HUVEC)的迁移的抑制作用。

[0168] 图76显示了引物21的核苷酸序列。

[0169] 图77显示了引物22的核苷酸序列。

[0170] 在本发明中,短语“SEQ ID NO: X (图Y)”或“图Y (SEQ ID NO: X)”是指所述序列显示在SEQ ID NO: X中或显示在图Y中。

[0171] 实施方案的描述

[0172] 1. 定义

[0173] 在本发明中,术语“基因”用于指这样的核酸分子:其包含编码在蛋白中所包含的氨基酸序列的核苷酸序列或其互补链。所述基因由单链、双链或三条或更多条链组成。在“基因”的含义中也包括DNA链和RNA链的结合、共存在一条链上的核糖核苷酸和脱氧核糖核苷酸和包括这样的链的双链或三链或更多链的核酸分子。

[0174] 在本发明中,术语“基因”、“多核苷酸”和“核酸分子”是彼此同义的,且不以任何方式受限于它们的组分单元诸如核糖核苷酸、脱氧核糖核苷酸、核苷酸和核苷的数目。例如,

DNA、RNA、mRNA、cDNA、cRNA、探针、寡核苷酸、引物等也被包括在其范围中。“核酸分子”也缩写为“核酸”。

[0175] 在本发明中,术语“多肽”、“肽”和“蛋白”是彼此同义的。抑制或遏制靶分子X的一种或两种或更多种活性或功能(在下文中,这些抑制或遏制作用被统称为“X抑制活性”)的肽可以被称作“X-抑制肽”。

[0176] 术语“SPINK2”用于指丝氨酸蛋白酶抑制剂Kazal-型2。7 kDa的该蛋白由具有3个二硫键的Kazal-样结构域组成。SPINK2优选地是人衍生的。在本发明中,人SPINK2被简称作“SPINK2”,除非另外指出。

[0177] 术语“HTRA1”用于指高温必需A丝氨酸肽酶1。该蛋白由一个N-端结构域(由一个IGFBP-样模块和一个Kazal-样模块组成)、一个蛋白酶结构域和一个C-端PDZ结构域构成,且属于HTRA家族。HTRA1优选地是人衍生的。在本发明中,人HTRA1也被简称为“HTRA1”,除非另外指出。

[0178] 术语“HTRA1抑制肽”用于指抑制或遏制HTRA1的一种或两种或更多种活性或功能的肽。在“HTRA1抑制肽”的范围内包括所述肽的片段、所述肽与一个额外部分的加成化合物、或维持HTRA1抑制活性的所述肽的缀合物。具体地,在“HTRA1抑制肽”的范围内也包括维持HTRA1抑制活性的所述肽的片段、加成化合物和修饰形式。

[0179] 在本发明中,术语“细胞”用于包括从动物个体、传代培养的细胞、原代培养的细胞、细胞系、重组细胞、酵母、微生物等衍生出的各种细胞。

[0180] 在本发明中,术语肽结合的“位点”(即,被肽识别的“位点”)用于指在肽要结合或识别的靶分子上的连贯的或断续的部分氨基酸序列或部分构象。在本发明中,这样的位点可以被称作在靶分子上的表位或结合位点。

[0181] 术语“SPINK2突变体”用于指包含如下从野生型SPINK2的氨基酸序列衍生出的氨基酸序列的肽:用不同于野生型肽的氨基酸置换一个或两个或更多个氨基酸,缺失一个或两个或更多个野生型氨基酸,插入在野生型中不存在的一个或两个或更多个氨基酸,和/或将在野生型中不存在的氨基酸添加至野生型的氨基端(N端)和/或羧基端(C端) (在下文中,被统称为“突变”)。在HTRA1抑制肽中包括具有HTRA1抑制活性的“SPINK2突变体”。在本发明中,“插入”也可以被包括在“添加”中。

[0182] 在本发明中,在短语“一个或几个”中的术语“几个”表示3-10个。

[0183] 在本发明中,短语“在严谨条件下杂交”用于指在特定条件下进行杂交,其中在含有5×SSC的溶液中在65℃进行杂交,然后将所得物在含有2×SSC和0.1%SDS的水溶液中在65℃洗涤20分钟,在含有0.5×SSC和0.1%SDS的水溶液中在65℃洗涤20分钟,和在含有0.2×SSC和0.1%SDS的水溶液中在65℃洗涤20分钟,或与其等同的条件。SSC是指150 mM NaCl和15 mM柠檬酸钠的水溶液,且n×SSC是指SSC的n倍浓度。

[0184] 在本发明中,术语“特异性的”和“特异性”是同义的且分别是与术语“选择性的”和“选择性”可互换的。例如,HTRA1-特异性的抑制肽是与HTRA1-选择性的抑制肽同义的。

[0185] 2. 肽

[0186] 2-1. 氨基酸

[0187] 术语“氨基酸”用于指含有氨基基团和羧基基团的有机化合物,且用于指作为组分单元优选地被包含在蛋白中和更优选地被包含在天然蛋白中的α-氨基酸。在本发明中,氨

基酸更优选地是Ala、Arg、Asn、Asp、Cys、Gln、Glu、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr和Val。术语“氨基酸”用于指这共20种氨基酸,除非另外指出。这共20种氨基酸可以被称作“天然氨基酸”。本发明的HTRA1抑制肽优选地含有天然氨基酸。

[0188] 在本发明中,术语“氨基酸残基”也被称作“氨基酸”。

[0189] 在本发明中,氨基酸可以是L-氨基酸、D-氨基酸或其混合物(DL-氨基酸),且除非另外指出,否则是指L-氨基酸。

[0190] 基于侧链的共同性质可以将天然氨基酸分成例如以下组:

[0191] (1)疏水氨基酸组: Met、Ala、Val、Leu和Ile;

[0192] (2)中性亲水氨基酸组: Cys、Ser、Thr、Asn和Gln;

[0193] (3)酸性氨基酸组: Asp和Glu;

[0194] (4)碱性氨基酸组: His、Lys和Arg;

[0195] (5)影响主链的方向的氨基酸组:Gly和Pro;和

[0196] (6)芳族氨基酸组: Trp、Tyr和Phe。

[0197] 但是,天然氨基酸的分类不限于此。

[0198] 在本发明中,每个天然氨基酸可以接受保守氨基酸置换。

[0199] “保守氨基酸置换”是指用在功能上等同或类似的氨基酸置换。在肽中的保守氨基酸置换会实现肽的氨基酸序列的静态变化。例如,具有类似极性的一个或两个或更多个氨基酸置换在功能上等同地起作用并在肽的氨基酸序列中实现静态变化。一般而言,在某个组内的置换可以视作在结构和功能上保守的。但是,如本领域技术人员显而易见的,通过它在含有氨基酸的分子的三维结构中的参与,可以确定特定氨基酸残基的作用。例如,半胱氨酸残基可以呈具有比还原(硫醇)形式更低的极性的氧化(二硫化物)形式。精氨酸侧链的长脂族部分能够构成在结构上和在功能上重要的特征。可替换地,含有芳族环(色氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸)的侧链能够促成离子-芳族相互作用或阳离子-π相互作用。在这样的情况下,即使属于酸性或非极性基团的氨基酸对具有这些侧链的氨基酸的置换也可以是在结构上和在功能上保守的。残基诸如脯氨酸、甘氨酸和半胱氨酸(二硫化物形式)可能对主链的三维结构具有直接影响,并且不可经常在没有结构扭曲的情况下置换。

[0200] 如下面所示,保守氨基酸置换包括基于侧链相似性的特定置换(L. Lehninger, Biochemistry, 第2版, 第73-75页, Worth Publisher, New York (1975))和典型置换。

[0201] (1)非极性氨基酸组: 丙氨酸(在下文中,被称作“Ala”或简称“A”)、缬氨酸(在下文中,被称作“Val”或简称“V”)、亮氨酸(在下文中,被称作“Leu”或简称“L”)、异亮氨酸(在下文中,被称作“Ile”或简称“I”)、脯氨酸(在下文中,被称作“Pro”或简称“P”)、苯丙氨酸(在下文中,被称作“Phe”或简称“F”)、色氨酸(在下文中,被称作“Trp”或简称“W”),和甲硫氨酸(在下文中,被称作“Met”或简称“M”)

[0202] (2)不带电荷的极性的氨基酸组: 甘氨酸(在下文中,被称作“Gly”或简称“G”)、丝氨酸(在下文中,被称作“Ser”或简称“S”)、苏氨酸(在下文中,被称作“Thr”或简称“T”)、半胱氨酸(在下文中,被称作“Cys”或简称“C”)、酪氨酸(在下文中,被称作“Tyr”或简称“Y”)、天冬酰胺(在下文中,被称作“Asn”或简称“N”),和谷氨酰胺(在下文中,被称作“Gln”或简称“Q”)

[0203] (3)酸性氨基酸组: 天冬氨酸(在下文中,被称作“Asp”或简称“D”)和谷氨酸(在下

文中,被称作“Glu”或简称“E”)

[0204] (4)碱性氨基酸组:赖氨酸(在下文中,被称作“Lys”或简称“K”)、精氨酸(在下文中,被称作“Arg”或简称“R”),和组氨酸(在下文中,被称作“His”或简称“H”)

[0205] 在本发明中,氨基酸可以是除了天然氨基酸以外的氨基酸。其实例可以包括硒代半胱氨酸、N-甲酰基甲硫氨酸、吡咯赖氨酸、焦谷氨酸、胱氨酸、羟脯氨酸、羟赖氨酸、甲状腺素、O-磷酸丝氨酸、锁链素、β-丙氨酸、肌氨酸、鸟氨酸、肌酸、γ-氨基丁酸、冠瘿氨基酸(opine)、茶氨酸、口蘑酸、红藻氨酸、软骨藻酸和阿洛蜜酸(acromelic acid),它们存在于天然的肽或蛋白中,且可以包括:N-端保护的氨基酸诸如正亮氨酸、Ac-氨基酸、Boc-氨基酸、Fmoc-氨基酸、Trt-氨基酸和Z-氨基酸;C-端保护的氨基酸诸如氨基酸的叔丁基酯、苄基酯、环己基酯和劳基酯;和在自然界中没有发现的其它氨基酸,包括氨基酸的二胺、ω氨基酸、β氨基酸、γ氨基酸、Tic衍生物、和氨基膦酸。除了20种“天然氨基酸”以外的氨基酸不限于此且为了方便在本发明中被统称为“非天然氨基酸”。

[0206] 2-2. HTRA1抑制肽

[0207] 本发明的HTRA1抑制肽是至少部分地维持SPINK2的框架(在下文中,被称作“SPINK2突变体”)并抑制或遏制HTRA1或保留它的酶活性的片段(在下文中,被称作“功能片段”)的蛋白酶活性的SPINK2突变体(在下文中,这样的抑制和遏制被统称为“HTRA1抑制活性”)。

[0208] 作为本发明的抑制肽的靶标的HTRA1优选地是哺乳动物HTRA1,更优选灵长类动物HTRA1,且更优选人HTRA1。全长成熟人HTRA1 (在下文中,被称作“HTRA1 (全)”)的氨基酸序列具有在SEQ ID NO: 53中所示的氨基酸序列(图65)。该氨基酸序列由位置23-480组成且不含有由位置1-22组成的信号序列。人HTRA1的功能片段(在下文中,被称作“HTRA1(cat)”)的氨基酸序列没有特别限制,只要所述功能片段保留蛋白酶活性。其实例可以包括由SEQ ID NO: 53的158Gly至373Lys组成的功能片段(图65),和包含其158Gly至373Lys的功能片段。作为本发明的抑制肽的靶标的HTRA1或其功能片段也被称作HTRA1蛋白酶。HTRA1蛋白酶优选地是脊椎动物衍生的,更优选地是哺乳动物衍生的,更优选地是灵长类动物衍生的,且最优选地是人衍生的,且可以通过从这些动物中的任一种的组织或细胞纯化来制备,或通过本领域技术人员已知作为蛋白制备方法的方法(诸如基因重组、体外翻译或肽合成)来制备。HTRA1或其功能片段可以连接至信号序列、免疫球蛋白Fc区、标签、标记等。

[0209] 通过使用HTRA1的蛋白酶活性作为指标,可以评价HTRA1抑制活性。例如,允许HTRA1或其功能片段、底物和本发明的抑制肽或其候选物彼此共存。在该情况下,当HTRA1的蛋白酶活性与在有对照存在下或在没有抑制剂或其候选物存在下的活性相比是70%或更少、50%或更少、30%或更少、20%或更少、10%或更少、5%或更少、1%或更少或0%时,HTRA1的抑制分别与30%或更多、50%或更多、70%或更多、80%或更多、90%或更多、95%或更多、99%或更多或100%的抑制活性一起发生。HTRA1抑制活性可以随反应条件、底物的类型、浓度等而变化。反应条件的例子可以包括、但不限于在实施例中描述的那些。可以如下评价酶活性:将底物肽或底物蛋白加给给定浓度的HTRA1并使混合物反应给定的时间,随后检测底物肽的荧光或通过SDS-PAGE、蛋白质印迹、液相色谱法等检测底物蛋白。例如,磷酸盐缓冲盐水(在下文中,被称作“PBS”)、硼酸盐缓冲液(50 mM硼酸盐,pH 7-9,例如,pH 8.5)或Tris缓冲液(50 mM Tris, pH 6-9,例如,pH 8.0)可以用作缓冲溶液。可以将NaCl (50-300 mM,例如,150

mM)或表面活性剂诸如CHAPS或辛基β-D-吡喃葡萄糖苷加入反应系统,尽管添加剂不限于此。

[0210] HTRA1蛋白酶的底物的例子包括,但是没有特别限制为,内源底物、外源底物和合成底物。人内源底物的例子可以包括玻连蛋白。合成底物的例子可以包括,但是没有特别限制为,H2-Opt (Mca-IRRVSYSFK(Dnp)K)、β-酪蛋白和其它HTRA1底物。本发明的肽的HTRA1抑制活性(IC_{50}或K_i)是1 μM或更低,更优选100 nM或更低。

[0211] 优选的是,本发明的抑制肽应当不会抑制或遏制除了HTRA1以外的蛋白酶的活性,或应当具有相对弱的此类活性的抑制或遏制程度。换而言之,本发明的抑制肽优选地具有高HTRA1特异性。优选地,本发明的抑制肽不会抑制或遏制蛋白酶诸如胰蛋白酶、α-糜蛋白酶、类胰蛋白酶、纤溶酶、凝血酶、蛋白裂解酶、蛋白C、组织型纤溶酶原激活物(tPA)、尿激酶(uPA)、纤溶酶和血浆激肽释放酶的活性,或具有相对弱的此类活性的抑制或遏制程度。本发明的这样的优选肽不会表现出由其它蛋白酶的活性的抑制或遏制造成的不利反应,且可以优选地用作HTRA1相关疾病(在后面提及)的治疗药物或预防药物。

[0212] 如上所述,作为本发明的肽的靶标的HTRA1优选地是脊椎动物衍生的,更优选地是哺乳动物衍生的,更优选地是灵长类动物衍生的,且最优选地是人衍生的。可替换地,为本发明的肽的靶标的HTRA1可以源自非人动物,例如,啮齿动物诸如大鼠或小鼠,或灵长类动物诸如食蟹猴、绢毛狨或恒河猴。对非人动物-衍生的HTRA1具有抑制活性的肽可以用在非人动物的HTRA1相关疾病的诊断、检查、治疗或预防等中。当这样的肽也抑制人HTRA1时,非人动物可以用在作为人HTRA1相关疾病的治疗药物或预防药物的肽的非临床研究和开发中,以进行药理学测试或药代动力学测试(使用所述非人动物作为疾病的动物模型)、或安全性测试、毒性测试等(使用所述非人动物作为健康动物)。

[0213] 本发明的HTRA1抑制肽具有优点诸如比其它生物分子(诸如在本领域中用作药物和诊断药物的抗体)的分子量更小的分子量,其相对容易生产(在后面提及),在组织穿透、贮存稳定性、热稳定性等方面的优秀物理性能,和用作药物组合物(在后面提及)时关于施用途径、施用方法、制备等的宽选择范围。通过应用已知方法诸如生物分子或聚合物的添加和由此增加肽的分子量,可以将用作药物组合物的本发明的肽在血液中的半衰期调节为更长。本发明的这样的HTRA1抑制肽的分子量小于10,000,优选地小于8,000,且更优选约7,000-7,200。由SEQ ID NO: 23的15Cys至31Cys组成的可变环部分(图29)或由其15Cys至63Cys组成(在下文中,被称作“含有6个Cys残基的部分”)且具有HTRA1抑制活性的部分也被包括在本发明的HTRA1抑制肽中。可变环部分的分子量小于2,500,且优选约1,800-2,000。含有6个Cys残基的部分的分子量小于6,000,且优选约5,300-5,500。

[0214] 被包括在本发明的HTRA1抑制肽的范围中的、至少部分地维持SPINK2的框架的SPINK2突变体(在下文中,被称作“SPINK2突变体”)可以结合HTRA1且能够结合优选哺乳动物HTRA1,更优选灵长类动物HTRA1,且更优选人HTRA1。这样的结合HTRA1的肽会识别或结合HTRA1的部分肽、部分构象等(在下文中,这样的识别和结合效应被统称为“靶标结合活性”)。

[0215] 在一个方面,本发明的抑制肽能够结合HTRA1的免疫原性片段。HTRA1的免疫原性片段具有一个或两个或更多个表位、模拟位或其它抗原决定簇且因此能够诱导免疫应答或能够造成针对要产生的片段的抗体。

[0216] 通过使用本领域技术人员已知的方法,诸如可检测的结合亲和力的测量(ELISA、表面等离子体共振(在下文中,被称作“SPR”)分析(也被称作“BIAcore”方法)、等温滴定量热法(在下文中,被称作“ITC”)、流式细胞计量术、免疫沉淀方法等),可以评价、测量或确定根据本发明的SPINK2突变体与HTRA1或其免疫原性片段的结合。

[0217] ELISA的例子包括这样的方法:其包括检测已经识别和结合固定化在平板上的HTRA1的HTRA1抑制肽。HTRA1的固定化可以采用生物素-抗生蛋白链菌素,以及,例如,用于固定化的抗体,所述抗体识别与HTRA1融合的标签。HTRA1抑制肽的检测可以采用经标记的抗生蛋白链菌素,以及,例如,用于检测的经标记的抗体,其识别与HTRA1抑制肽融合的标签。所述标记可以采用生物素以及在生化分析中可行的方法,诸如HRP、碱性磷酸酶或FITC。使用酶标记的检测可以采用生色底物诸如TMB (3,3',5,5'-四甲基联苯胺)、BCIP (5-溴-4-氯-3-吲哚基磷酸酯)、p-NPP (对-硝基苯基磷酸酯)、OPD (邻-苯二胺)、ABTS (3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)或SuperSignal ELISA Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher Scientific Inc.)、荧光底物诸如QuantaBlu(TM) Fluorogenic Peroxidase Substrate (Thermo Fisher Scientific Inc.)和化学发光底物。检测信号的测量可以采用吸光度平板读数器、荧光平板读数器、发光平板读数器、RI液体闪烁计数器等。

[0218] 用在SPR分析中的器械的例子可以包括BIAcore(TM) (GE Healthcare)、ProteOn (TM) (Bio-Rad Laboratories、Inc.)、SPR-Navi(TM) (Oy BioNavis Ltd.)、Spreeta(TM) (Texas Instruments Inc.)、SPRi-PlexII(TM) (HORIBA、Ltd.)和Autolab SPR(TM) (Metrohm AG)。用在BLI中的器械的例子可以包括Octet(TM) (Pall Corp.)。

[0219] 免疫沉淀方法的例子包括这样的方法:其包括检测已经识别和结合固定化在珠子上的HTRA1抑制肽的HTRA1。磁珠、琼脂糖珠子等可以用作珠子。HTRA1抑制肽的固定化可以采用生物素-抗生蛋白链菌素以及识别所述肽或与所述肽融合的标签的抗体、蛋白A或蛋白G等。使用磁体、离心等分离珠子,且通过SDS-PAGE或蛋白质印迹检测用所述珠子沉淀的HTRA1。HTRA1的检测可以采用经标记的抗生蛋白链菌素,以及,例如,用於檢測的经标记的抗体,其识别与HTRA1融合的标签。所述标记可以采用生物素以及在生化分析中可行的方法,诸如HRP、碱性磷酸酶或FITC。使用酶标记的检测可以采用与在ELISA中相同的底物。检测信号的测量可以采用ChemiDoc(TM) (Bio-Rad Laboratories, Inc.)、LuminoGraph (ATTO Corp.)等。

[0220] 在本发明中,术语“特异性识别”(即,“特异性结合”)用于指不是非特异性吸附的结合。用于确定结合是否是特异性的判据的例子可以包括在ELISA中的结合活性EC_{50}。确定的判据的其它例子可以包括解离常数(在下文中,被称作“K_D”)。根据本发明的HTRA1抑制肽对HTRA1的K_D值是1×10^{-4} M或更低、1×10^{-5} M或更低、5×10^{-6} M或更低、2×10^{-6} M或更低或1×10^{-6} M或更低、更优选地5×10^{-7} M或更低、2×10^{-7} M或更低或1×10^{-7} M或更低、更优选地5×10^{-8} M或更低、2×10^{-8} M或更低或1×10^{-8} M或更低、进一步优选地5×10^{-9} M或更低、2×10^{-9} M或更低或1×10^{-9} M或更低。确定的判据的其它例子可以包括通过免疫沉淀方法进行的分析的结果。将根据本发明的优选HTRA1抑制肽固定化在珠子上,且向其添加HTRA1。然后,将珠子分离,并检测与珠子一起沉淀的HTRA1。在该情况下,检测HTRA1的信号。

[0221] 尽管有以上描述,结合HTRA1或其免疫原性片段的能力不是充当本发明的抑制肽的SPINK2突变体所必需的,只要SPINK2突变体具有HTRA1抑制活性即可。

[0222] 本发明的抑制肽在蛋白酶底物与HTRA1的结合中可以是竞争性的。

[0223] 在某些优选的方面,本发明的抑制肽具有视网膜保护作用。例如,本发明的优选抑制剂可以遏制光暴露诱导的视网膜损伤模型中的外核层的核计数减少,其在实施例中详细描述。已经在该模型的光暴露组的玻璃体液中检测到与非暴露组相比更大量的HTRA1蛋白。因而,本发明公开了:HTRA1参与视网膜损伤;且HTRA1抑制活性实现视网膜保护作用。

[0224] 充当本发明的抑制肽的SPINK2突变体可以具有如上所述的活性、性能、功能、特征等,而它的全长氨基酸序列与人野生型SPINK2的氨基酸序列具有高序列同一性。本发明的SPINK2突变体与人SPINK2的氨基酸序列(SEQ ID NO: 1: 图13)具有60%或更高、70%或更高、75%或更高、80%或更高、85%或更高、90%或更高、95%或更高、98%或更高或99%或更高序列同一性。

[0225] 术语“同一性”用于指表示2个序列之间的相似性程度或关系的性质。通过将相同氨基酸或氨基酸残基的数目除以氨基酸或氨基酸残基的总数并将得到的数值乘以100,计算氨基酸序列的同一性(%)。

[0226] 术语“缺口”用于指在2个或多个序列之间的比对的空白,这是由于在2个或多个序列中的至少一个中的缺失和/或添加。

[0227] 具有完全相同的氨基酸序列的2个氨基酸序列之间的同一性是100%。假如所述氨基酸序列之一与其它氨基酸序列相比具有一个或两个或更多个氨基酸或氨基酸残基的置换、缺失或添加,那么这2个氨基酸序列之间的同一性低于100%。考虑到缺口的用于确定2个序列之间的同一性的算法或程序的例子可以包括本领域技术人员已知的那些,诸如BLAST(Altschul, 等人, Nucleic Acids Res., 第25卷, 第3389-3402页, 1997), BLAST2(Altschul, 等人, J. Mol. Biol., 第215卷, 第403-410页, 1990),和Smith-Waterman(Smith, 等人, J. Mol. Biol., 第147卷, 第195-197页, 1981)。

[0228] 在本发明中,术语“突变的”用于指,与天然存在的核酸分子或肽相比,在核苷酸序列或氨基酸序列中的一个或两个或更多个核苷酸或核苷酸残基或氨基酸或氨基酸残基被置换、缺失或插入。与人SPINK2的氨基酸序列相比,本发明的SPINK2突变体的氨基酸序列具有一个或两个或更多个突变的氨基酸或氨基酸残基。

[0229] 在本发明的一个方面,SPINK2突变体的氨基酸序列可以具有在人SPINK2的氨基酸序列(SEQ ID NO: 1: 图13)中的以下任一种:

[0230] 其它氨基酸或氨基酸残基对从16Ser至22Gly的1、2、3、4、5、6或7个氨基酸的置换;

[0231] 其它氨基酸或氨基酸残基对从24Pro至28Asn的1、2、3、4或5个氨基酸的置换;

[0232] 其它氨基酸或氨基酸残基对从39Ala至43Thr的1或2个氨基酸的置换,

[0233] 或者可能具有这些氨基酸作为野生型序列(2个氨基酸或氨基酸残基被包括在α螺旋中),只要由在位置16-30等处的氨基酸残基构成的环的基本链的三级结构能够至少部分地发挥HTRA1抑制活性;与在野生型中一样,为了维持天然的二硫键,15Cys、23Cys、31Cys、42Cys、45Cys和63Cys中的每一个优选地是Cys。为了缺失天然的二硫键或产生非天然的二硫键,其中1、2、3、4、5或6个可以被其它氨基酸置换。在本发明的SPINK2突变体中的一些优选的HTRA1抑制肽维持在这6个位置处的Cys,与在天然的SPINK2中一样,并保留二硫键。在这样的抑制肽的某些更优选的形式中,15Cys-45Cys、23Cys-42Cys和31Cys-63Cys分别形成二硫键。

[0234] 当这样的SPINK2突变体的氨基酸序列被包含在HTRA1抑制肽中时,优选的是,应当维持在野生型SPINK2的氨基酸序列中所包含的三维结构至可以发挥HTRA1抑制活性的程度,例如,所述三维结构由以下组分构成:由16Ser至30Val组成的环结构,由31Cys和32Gly组成的β链(1)和由57Ile至59Arg组成的β链(2)所构成的β折叠,由41Glu至51Gly组成的α螺旋,或与其类似或至少部分地与其(或与这些位置)对应的环结构、β折叠或α螺旋。

[0235] 将在下面提及在本发明的SPINK2突变体中的一些HTRA1抑制肽的氨基酸序列。如上所述,在本发明中,术语"氨基酸残基"也简称为"氨基酸"。

[0236] 在SEQ ID NO: 30中所示的氨基酸序列(图42)的第一个至第十一Xaa中的每一个(它们分别与X1至X11相同)是任何任意氨基酸,没有特别限制,只要得到的突变体结合HTRA1并抑制HTRA1活性。在下文中,将描述X1至X11的优选氨基酸。但是,这些氨基酸可以包括天然氨基酸,即,与野生型人SPINK2的氨基酸序列中的那些氨基酸相同的氨基酸。

[0237] 在位置1处的X1优选地是Asp、Glu、Gly、Ser或Ile,更优选Asp或Gly,且更优选Gly;

[0238] 在位置16处的X2优选地是Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Lys、Leu、Met、Gln、Arg、Ser、Thr或Tyr,更优选Ala、Asp、Gly、His、Lys、Leu、Met、Gln、Arg、Ser或Thr,更优选Ala、Gly、Lys、Leu、Ser或Thr,进一步优选Ala、Gly、Leu、Ser或Thr,和更进一步优选Ala或Ser;

[0239] 在位置17处的X3优选地是Ala、Asp、Glu、Gly、His、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr或Tyr,更优选Asp、Gly、His、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr或Tyr,更优选Asp、His、Lys、Met或Gln,和进一步优选Asp或Gln;

[0240] 在位置18处的X4优选地是Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp或Tyr,更优选Asp、Phe、His、Met、Asn、Gln、Ser或Tyr,更优选Asp、Phe、His、Ser或Tyr,和进一步优选Phe或His;

[0241] 在位置19处的X5优选地是Ala、Asp、Glu、Gly、His、Ile、Lys、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val或Tyr,更优选Ala、Asp、Glu、Gly、His、Lys、Met、Asn、Gln、Arg、Ser或Val,更优选Ala、Asp、Glu、Met或Asn,和进一步优选Ala、Asp或Glu;

[0242] 在位置21处的X6优选地是Ala、Glu、Phe、Gly、Ile、Leu、Met、Gln、Arg、Ser、Trp或Tyr,更优选Glu、Phe、Ile、Leu、Met、Gln、Arg或Trp,更优选Met或Trp,进一步优选Met;

[0243] 在位置24处的X7优选地是Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Lys、Leu、Met、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp或Tyr,更优选Asp、Glu、His、Pro、Gln、Ser、Thr、Val、Trp或Tyr,更优选Gln、Trp、Tyr或Val,和进一步优选Tyr或Val;

[0244] 在位置26处的X8优选地是Ala、Asp、Glu、Phe、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Val或Tyr,更优选Ala、Phe、His、Ile、Leu、Met、Gln、Arg、Ser、Val或Tyr,更优选Phe、Leu或Tyr,和进一步优选Phe或Leu;

[0245] 在位置27处的X9优选地是Glu、Phe、Leu、Ser、Thr或Tyr,更优选Phe、Leu、Ser、Thr或Tyr,更优选Phe或Tyr,进一步优选Tyr;

[0246] 在位置39处的X10优选地是Ala、Glu、Met或Val,且更优选Ala或Glu;和

[0247] 在位置43处的X11优选地是Ala、Thr或Val,更优选Thr或Val。

[0248] 野生型X1至X11分别是Asp、Ser、Gln、Tyr、Arg、Pro、Pro、His、Phe、Ala和Thr。位置20是Leu,位置22是Gly,位置25是Arg,和位置28是Asn。

[0249] 在本发明中,可以将一个或几个或更多个氨基酸进一步添加至第一个氨基酸的N-

端侧。这样的要添加的氨基酸的例子可以包括Ser-Leu以及由S标签和一个接头组成的氨基酸序列(SEQ ID NO: 31: 图43)。

[0250] 可以将一个或几个氨基酸进一步添加至位于C端处的63Cys。这样的氨基酸序列的例子可以包括通过添加Gly-Gly而具有在C端处的64Gly的氨基酸序列和具有在C端处的65Gly的氨基酸序列。这样的要添加的氨基酸的例子可以包括Gly-Gly和C-端六聚体(SEQ ID NO: 32: 图44)。

[0251] 通过向在SEQ ID NO: 30中所示的氨基酸序列(图42)或从SEQ ID NO: 30衍生出的氨基酸序列的N端和/或C端添加其它氨基酸而制备的氨基酸序列的一种更优选形式包括在SEQ ID NO: 3、5、7、9、11、13、15、17、19、21和23-29 (图15、17、19、21、23、25、27、29、31、33和35-41)中的任一个中所示的氨基酸序列和由SEQ ID NO: 4、6、8、10、12、14、16、18、20和22(图16、18、20、22、24、26、28、30、32和34)中的任一个所示的核苷酸序列编码的氨基酸序列。其一种更优选形式包括在SEQ ID NO: 24、28和29 (图36、40和41)中的任一个中所示的氨基酸序列。

[0252] 在本发明中,通过在SPINK2突变体肽中、向SPINK2突变体肽或从SPINK2突变体肽置换、添加和/或缺失一个或两个或更多个氨基酸而制备的肽或SPINK2突变体肽(在下文中,被称作“母体肽”)的N-端和/或C-端加成化合物也被称作“母体肽的衍生物”或“母体肽衍生物”(例如,实施例6)。这样的“衍生物”也被包括在本发明的“肽”的范围内。

[0253] 在本发明的抑制肽的范围内包括的SPINK2突变体的氨基酸序列可以包含在野生型人SPINK2的氨基酸序列(SEQ ID NO: 1: 图13)中在除了X1至X11以外的部分(即,2Pro至15Cys、20Pro、22Gly、23Cys、25Arg、28Asn至38Tyr、41Glu、42Cys和44Thr至63Cys的位置)处的天然氨基酸或突变的氨基酸或氨基酸序列。例如,SPINK2突变体可以具有在一个或两个或更多个位置处的突变,只要HTRA1抑制活性或折叠至少部分地不受障碍也不受干扰。通过使用本领域技术人员已知的标准方法达到这样的突变。在氨基酸序列中的突变的典型例子可以包括一个或两个或更多个氨基酸的置换、缺失或添加。置换的例子可以包括保守置换。保守置换将某个氨基酸残基用不仅在体积方面而且在极性方面在化学特性上与其类似的氨基酸残基置换。保守置换的例子描述在本说明书的其它部分中。另一方面,除了X1至X11以外的部分可以接受一个或两个或更多个氨基酸的非保守置换,只要HTRA1抑制活性或折叠至少部分地不受障碍也不受干扰。

[0254] 在充当本发明的抑制肽的SPINK2突变体的氨基酸序列中,X1至X11优选地分别是在SEQ ID NO: 3、5、7、9、11、13、15、17、19、21和23-29 (图15、17、19、21、23、25、27、29、31、33和35-41)中的任一个中的氨基酸X1至X11,且更优选SEQ ID NO: 24、28和29 (图36、40和41),且除了X1至X11以外的部分可以具有至少部分地不阻碍也不干扰HTRA1抑制活性或折叠的氨基酸或氨基酸序列。

[0255] 充当本发明的HTRA1抑制肽的SPINK2突变体的氨基酸序列的例子可以包括下述氨基酸序列(a)至(e)中的任一个:

[0256] (a)在SEQ ID NO: 3、5、7、9、11、13、15、17、19、21和23-29 (图15、17、19、21、23、25、25、29、31、33和35-41)中的任一个中所示的氨基酸序列;

[0257] (b)由核苷酸序列编码的氨基酸序列,所述核苷酸序列在严谨条件下与编码氨基酸序列(a)的核苷酸序列的互补核苷酸序列杂交且编码在具有HTRA1抑制活性的肽中所包

含的氨基酸序列;

[0258] (c)通过1-20、1-15、1-10、1-8、1-6、1-5、1-4、1-3、1或2或1个氨基酸的置换、缺失、添加和/或插入从氨基酸序列(a)衍生出且被包含在具有HTRA1抑制活性的肽中的氨基酸序列;

[0259] (d)与氨基酸序列(a)具有60%、70%、80%、85%、90%、92%、94%、96%、97%、98%或99%或更高同一性且被包含在具有HTRA1抑制活性的肽中的氨基酸序列;和

[0260] (e)由SEQ ID NO: 4、6、8、10、12、14、16、18、20和22(图16、18、20、22、24、26、28、30、32和34)中的任一个所示的核苷酸序列编码的氨基酸序列。

[0261] 但是,编码HTRA1抑制肽的核酸分子不限于(a)至(e)。每种包含核苷酸序列的核酸分子被包括在编码HTRA1抑制肽的核酸分子的范围内,所述核苷酸序列编码在具有HTRA1抑制活性的SPINK2突变体中所包含的氨基酸序列,且优选在SEQ ID NO: 30中所示的氨基酸序列(图42)。

[0262] 为了改善它的折叠稳定性、热稳定性、贮存稳定性、在血液中的半衰期、水溶性、生物活性、药理学活性、继发效应等的目的,可以将突变引入本发明的抑制肽中。例如,通过突变可以向其中引入新的反应基团诸如Cys,以便将抑制肽缀合至另外的物质诸如聚乙二醇(PEG)、羟乙基淀粉(HES)、生物素、肽或蛋白。在本发明中,可以将HTRA1抑制肽添加、连接或结合至一个额外部分。这样的缀合物被统称为“HTRA1抑制肽的缀合物”。在本发明中,术语“缀合物”用于指添加、连接或结合至一个额外部分的本发明的肽的分子或其片段。术语“缀合物”或“缀合”包括这样的形式:其中某个部分经由适合将所述某个部分连接至氨基酸的侧链的试剂等(包括化学物质诸如交联剂)通过合成化学方案、基因工程方案等连接或结合至本发明的肽的N端和/或C端。用于改善在血液中的半衰期的这样的“部分”的例子可以包括聚亚烷基二醇分子诸如聚乙二醇(PEG)、羟乙基淀粉、脂肪酸分子诸如棕榈酸、免疫球蛋白Fc区、免疫球蛋白CH3结构域、免疫球蛋白CH4结构域、白蛋白或其片段、白蛋白-结合肽、白蛋白-结合蛋白诸如链球菌的蛋白G和转铁蛋白。可替换地,所述“部分”可以经由接头(诸如肽接头)连接至本发明的肽。

[0263] 为了发挥或增强药理学活性,可以给本发明的HTRA1抑制肽缀合一种额外药物。在抗体领域中,本领域技术人员已知的作为抗体-药物缀合物(ADC)的技术或形式通过用本发明的肽替换所述抗体而构成本发明的一些方面。

[0264] 本发明的HTRA1抑制肽可以进一步包含一个或两个或更多个对除了HTRA1以外的靶分子发挥结合亲和力、抑制活性、拮抗活性、激动活性等的部分,或可以与这样的部分缀合。“部分”的例子可以包括抗体或其片段,和具有非抗体框架的蛋白,诸如SPINK2突变体或其片段。在抗体领域中,本领域技术人员已知作为多特异性抗体和双特异性抗体的技术或形式通过用本发明的肽替换其中所包含的两个或更多个“抗体”中的至少一个而构成本发明的缀合物的一些方面。

[0265] 本发明的肽或其前体可以包含信号序列。存在于或添加在某种多肽或其前体的N端处的信号序列可用于将多肽递送至细胞的特定隔室,例如,大肠杆菌的周质或真核细胞的内质网。许多信号序列是本领域技术人员已知的,且可以根据宿主细胞选择信号序列。用于将期望的肽分泌进大肠杆菌的周质中的信号序列的例子可以包括OmpA。在本发明的缀合物的一些方面还可以包括包含信号序列的形式。

[0266] 可以将本发明的肽预先标记,并由此通过亲和色谱法纯化。本发明的肽可以包含例如在它的C-端处的生物素、Strep标签(TM)、Strep标签II(TM)、寡组氨酸诸如His6、聚组氨酸、免疫球蛋白结构域、麦芽糖-结合蛋白、谷胱甘肽-S-转移酶(GST)、钙调蛋白-结合肽(CBP)、半抗原诸如地高辛配基或二硝基苯酚、表位标签诸如FLAG(TM)、myc标签或HA标签(在下文中,被统称为"亲和标签")。在本发明的缀合物的一些方面还可以包括经标记的形式。本发明的缀合物作为整体可以是肽(多肽)。

[0267] 本发明的肽可以包含用于标记的部分。具体地,本发明的肽可以与标记部分诸如酶标记、放射性标记、有色标记、荧光标记、着色标记、发光标记、半抗原、地高辛配基、生物素、金属络合物、金属或胶体金缀合。在本发明的缀合物的一些方面还可以包括包含用于标记的部分的形式。

[0268] 本发明的抑制肽可以在它的肽部分中包含天然氨基酸和非天然氨基酸中的任一种,且可以包含L-氨基酸和D-氨基酸作为天然氨基酸。

[0269] 本发明的抑制肽的氨基酸序列可以包含天然氨基酸和非天然氨基酸中的任一种,且可以包含L-氨基酸和D-氨基酸作为天然氨基酸。

[0270] 本发明的抑制肽可以作为单体、二聚体或三聚体或更高寡聚体或多聚体存在。二聚体或三聚体或更高寡聚体或多聚体可以是由单一单体构成的同型形式和由两种或更多种不同单体构成的异型形式中的任一种。所述单体可以快速地扩散并例如优秀地渗透进组织中。二聚体、寡聚体和多聚体可以具有优秀方面,例如,对靶分子的高局部亲或结合活性、慢解离速率或高HTRA1抑制活性。除了自发的二聚化、寡聚化和多聚化以外,通过向本发明的抑制肽引入jun-fos结构域、亮氨酸拉链等实现有意的二聚化、寡聚化和多聚化。

[0271] 以单体、二聚体或三聚体或更高寡聚体或多聚体的形式,本发明的抑制肽可以结合一种或两种或更多种靶分子或抑制靶分子的活性。

[0272] 本发明的抑制肽可以呈现的形式的例子可以包括,但不限于:分离的形式(冷冻干燥的制品、溶液等)、上面提及的缀合物、和与其它分子结合的形式(固定化的形式,与不同的分子结合,与靶分子结合的形式,等)。可以任意选择与表达、纯化、使用、贮存等相容的形式。

[0273] 3. HTRA1抑制肽的鉴别

[0274] 使用起始原料诸如SPINK2的氨基酸序列或本发明的HTRA1抑制肽的氨基酸序列(例如,选自SEQ ID NO: 3、5、7、9、11、13、15、17、19、21和23-29或图15、17、19、21、23、25、27、29、31、33和35-41的氨基酸序列)、编码所述氨基酸序列的核苷酸序列、或包含所述核苷酸序列的核酸分子,通过本领域技术人员众所周知的方法可以鉴别HTRA1抑制肽。作为一个优选例子,通过使用HTRA1抑制活性作为指标(其可以与作为另一个指标的HTRA1结合活性组合),可以从人SPINK2突变体文库鉴别HTRA1抑制肽。

[0275] 例如,可以将充当起始原料的核酸分子诱变处理并通过使用重组DNA技术转移进适当的细菌宿主或真核宿主中。已知SPINK2突变体文库是用于鉴别靶分子的结合剂或抑制剂的技术。例如,WO2012/105616的公开内容也通过引用整体并入本文。在适当的宿主中表达诱变处理的核苷酸序列以后,可以从文库中富集和/或选择这样的克隆并鉴别:其中具有期望的性能、活性、功能等的SPINK2突变体与它的基因型连接。克隆的富集和/或选择采用本领域技术人员已知的方法,诸如细菌展示方法(Francisco, J.A., 等人, (1993),

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 第90卷, 第10444-10448页)、酵母展示方法(Boder, E.T., 等人, (1997), Nat. Biotechnol., 第15卷, 第553-557页)、哺乳动物细胞展示方法(Ho M, 等人, (2009), Methods Mol Biol., 第525卷: 第337-52页)、噬菌体展示方法(Smith, G.P. (1985), Science., 第228卷, 第1315-1317页)、核糖体展示方法(Mattheakis LC, 等人, (1994), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 第91卷, 第19期, 第9022-9029页)、核酸展示方法诸如mRNA展示(Nemoto N, 等人, (1997), FEBS Lett., 第414卷, 第2期, 第405-408页)或集落筛选方法(Pini, A. 等人, (2002), Comb. Chem. High Throughput Screen., 第5卷, 第503-510页)。可以确定如此选择和鉴别的克隆中所包含的SPINK2突变体的核苷酸序列,以确定由所述核苷酸序列编码的氨基酸序列作为在所述克隆中所包含的SPINK2突变体的氨基酸序列,即,HTRA1抑制肽。

[0276] 例如,通过诱变处理天然的SPINK2,可以得到本发明的SPINK2突变体。术语“诱变”用于指,在某个氨基酸序列的各自位置处的一个或两个或更多个氨基酸可以用其它氨基酸置换或缺失,或可以向其中添加或插入在所述氨基酸序列中缺失的氨基酸。这样的缺失或这样的添加或插入可以改变序列长度。在本发明的SPINK2突变体中,所述诱变可以优选地发生在SEQ ID NO: 30中所示的氨基酸序列(图42)的X1至X11中的一个或两个或更多个位置。

[0277] 但是,在突变体的范围内也包括在这样的优选诱变以后在X1至X11的一个或两个或更多个位置处维持天然氨基酸(即,与在天然氨基酸序列中的特定位置处存在的氨基酸相同的氨基酸)的形式,只要至少一个氨基酸在整体中发生突变即可。同样地,在本发明的一个方面,在突变体的范围内也包括在诱变以后在除了X1至X11以外的部分的一个或多个位置处维持这些位置处的天然氨基酸(即,与在天然氨基酸序列中的特定位置处存在的氨基酸相同的氨基酸)的形式,只要至少一个氨基酸在整体中发生突变即可。

[0278] 术语“随机诱变”用于指,关于序列上的特定位置,通过诱变将一个或两个或更多个不同氨基酸以给定的概率引入所述位置。至少2个不同氨基酸的引入的概率不一定是相同的。本发明不从包括天然存在的氨基酸(作为氨基酸之一)排除所述至少2个不同氨基酸。这样的情况也被包括在术语“随机诱变”的范围内。

[0279] 本领域技术人员已知的标准方法可以用作用于在特定位置处的随机诱变的方法。例如,使用合成寡核苷酸(包括在序列中的特定位置处的简并核苷酸组成)的混合物,通过PCR (聚合酶链式反应)可以实现诱变。例如,密码子NNK或NNS (N = 腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶或胸腺嘧啶;K = 鸟嘌呤或胸腺嘧啶;和S =鸟嘌呤或胞嘧啶)的应用会造成诱变引入所有20种天然氨基酸中的任一种以及终止密码子,而密码子VVS (V = 腺嘌呤、鸟嘌呤或胞嘧啶)的应用会消除引入Cys、Ile、Leu、Met、Phe、Trp、Tyr和Val的可能性并造成诱变引入剩余12种天然氨基酸中的任一种。例如,密码子NMS (M = 腺嘌呤或胞嘧啶)的应用会消除引入Arg、Cys、Gly、Ile、Leu、Met、Phe、Trp和Val的可能性并造成诱变引入剩余11种天然氨基酸中的任一种。特定密码子、人工密码子等可以用于诱变以引入非天然氨基酸。

[0280] 通过使用在含有构象的靶标和/或针对衍生出肽的靶标或野生型肽的肽上的结构信息还可以执行定位诱变。在本发明中,通过使用结构信息(包括关于针对靶标或野生型SPINK2的靶标HTRA1和/或SPINK2突变体或在二者之间的复合物的高级信息)可以引入定位突变。在一个例子中,鉴别出具有HTRA1抑制活性的SPINK2突变体。随后,得到HTRA1和

SPINK2突变体的结晶复合物并进行X-射线晶体学。基于分析结果,鉴别出在SPINK2突变体所结合的HTRA1分子上的位点和在SPINK2突变体中参加与所述位点的相互作用的氨基酸残基。可以发现通过这样的操作得到的结构信息与HTRA1抑制活性的关联。基于这样的结构-活性关联,可以设计特定氨基酸对特定位置处的氨基酸的置换、氨基酸向特定位置的插入或缺失等以实际上证实HTRA1活性。

[0281] 例如,使用具有经修饰的碱基对特异性的核苷酸组分单元,诸如肌苷,也可以得到诱变。

[0282] 此外,通过例如使用缺少错误纠正功能并产生高错误率的DNA聚合酶(诸如Taq DNA聚合酶)的易出错PCR,或化学诱变,实现在随机位置处的诱变。

[0283] 通过使用细菌展示、酵母展示、哺乳动物细胞展示、噬菌体展示、核糖体展示、核酸展示、集落筛选等,可以从适合每种筛选方法且本领域技术人员已知的文库(诸如噬菌体文库或集落文库)富集和/或选择HTRA1抑制肽。使用适合每种文库且本领域技术人员已知的载体和方法(诸如用于噬菌体文库的噬粒或用于集落筛选的粘粒),可以构建这些文库。这样的载体可以是感染原核细胞或真核细胞的病毒或病毒载体。通过本领域技术人员已知的方法,诸如遗传操作,可以制备这些重组载体。

[0284] 细菌展示是将期望的蛋白与例如大肠杆菌外膜脂蛋白(Lpp)的部分和外膜蛋白OmpA融合并在大肠杆菌的表面上展示期望的蛋白的技术。将通过编码某种蛋白的氨基酸序列的核苷酸序列的随机诱变得到的DNA组插入适合用于细菌展示的载体中,且可以用所述载体转化细菌细胞以得到在经转化的细菌细胞表面上展示随机诱变处理的蛋白组的文库(Francisco, J.A., 等人, (1993), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 第90卷, 第10444-10448页)。

[0285] 酵母展示是将期望的蛋白与外壳蛋白(诸如α-凝集素,其在酵母的细胞表面上)融合并在酵母的表面上展示期望的蛋白的技术。α-凝集素包含C-端疏水区域,该区域具有假定的糖基磷脂酰肌醇(GPI)锚附着信号、信号序列、活性结构域、细胞壁结构域等。通过其操作可以在酵母的细胞表面上展示期望的蛋白。将通过编码某种蛋白的氨基酸序列的核苷酸序列的随机诱变得到的DNA组插入适合用于酵母展示的载体中,且可以用所述载体转化酵母细胞以得到在经转化的酵母的细胞表面上展示随机诱变处理的蛋白组的文库(Ueda, M.和Tanaka, A., Biotechnol. Adv., 第18卷, 第121-页, 2000; Ueda, M.和Tanaka, A., J. Biosci. Bioeng., 第90卷, 第125-页, 2000;等)。

[0286] 动物细胞展示是将期望的蛋白与例如以血小板-衍生的生长因子受体(PDGFR)为代表的膜蛋白的跨膜区域融合并在哺乳动物细胞(例如,HEK293和中国仓鼠卵巢(CHO)细胞)的表面上展示期望的蛋白的技术。将通过编码某种蛋白的氨基酸序列的核苷酸序列的随机诱变得到的DNA组插入适合用于动物细胞展示的载体中,且可以用所述载体转染动物细胞以得到在经转化的动物细胞表面上展示随机诱变处理的蛋白组的文库(Ho M, 等人, (2009), Methods Mol Biol. 第525卷: 第337-52页)。

[0287] 可以将在细胞(诸如酵母细胞、细菌细胞或动物细胞)上展示的期望文库在有靶分子存在下温育或与靶分子接触。例如,将在文库中包含的细胞与用生物素等修饰的HTRA1一起温育给定的时间。然后,向其中加入支持物诸如磁珠,并将细胞从支持物分离。随后,可以将支持物洗涤以除去非特异性吸附的物质和结合的物质,以便回收展示肽、肽集合的细胞

组或与支持物(其具有与之结合的HTRA1)结合的富集肽集合。同样地,分别在加入磁珠以后通过磁性激活的细胞分选(MACS),或在使用抗-HTRA1抗体的细胞染色以后通过FACS,可以回收展示肽、肽集合的细胞组或与支持物(其具有与之结合的HTRA1)结合的富集肽集合、或者展示肽、肽集合的细胞组或与HTRA1结合的富集肽集合。例如,可以封闭(饱和)非特异性的吸附位点和/或结合位点。可以在本文中并入封闭步骤,只要所述封闭通过适当的方法执行。回收如此得到的表达的肽、肽集合或富集的肽集合的载体,并可以确定插入载体中的多核苷酸的核苷酸序列以确定由所述核苷酸序列编码的氨基酸序列。此外,可以将所述载体再次转移给宿主细胞,并可以将上述的操作循环重复一次至几次以高度富集结合靶分子的肽集合。

[0288] 在噬菌体展示的情况下,例如,噬粒是含有质粒复制起点以及从单链细菌噬菌体衍生出的第二复制起点的细菌质粒。具有噬粒的细胞可以通过用M13或与其类似的辅助细菌噬菌体共感染经由单链复制模式复制所述噬粒。具体地,将单链噬粒DNA包装进被细菌噬菌体外壳蛋白包被的感染性颗粒中。以此方式,噬粒DNA可以在被感染的细菌中形成为克隆双链DNA质粒,而噬粒可以从共感染的细胞的培养物上清液形成为细菌噬菌体-样颗粒。将细菌噬菌体-样颗粒注射进具有F-菌毛的细菌中用于用DNA感染所述细菌,使得所述颗粒本身可以重新形成为质粒。

[0289] 将融合基因(其包含具有编码测试肽的氨基酸序列的核苷酸序列的多核苷酸和细菌噬菌体外壳蛋白基因)插入噬粒中,并用得到的噬粒感染细菌。培养所述细胞,使得所述肽可以在细菌上或在噬菌体-样颗粒上表达或展示,或可以生产为具有外壳蛋白的融合蛋白在噬菌体颗粒中或在细菌的培养物上清液中。

[0290] 例如,将包含多核苷酸和细菌噬菌体外壳蛋白基因gpIII的融合基因插入噬粒中,并用得到的噬粒和M13或与其类似的辅助噬菌体共感染大肠杆菌,使得包含所述肽和所述外壳蛋白的融合蛋白可以生产在大肠杆菌的培养物上清液中。

[0291] 在使用各种环状或非环状载体(例如,病毒载体)替代噬粒的情况下,根据本领域技术人员已知的方法,可以将肽(其具有由插入载体中的多核苷酸的核苷酸序列编码的氨基酸序列)在携带所述载体的细胞或病毒样颗粒上表达或展示,或可以生产并释放至细胞的培养物上清液中。

[0292] 可以将如此得到的表达肽的文库在有靶分子存在下温育,或与靶分子接触。例如,将HTRA1-固定化的支持物与含有文库的流动相一起温育给定的时间。然后,将流动相与支持物分离。随后,将支持物洗涤以除去非特异性吸附的物质和结合的物质。通过洗脱可以回收肽、肽集合或与支持物(其具有与之结合的HTRA1)结合的富集肽集合。所述洗脱可以非选择性地执行,例如,在有相对高的离子强度、低pH、中等变性条件或离液盐存在下,或可以通过加入可溶性靶分子(诸如HTRA1、结合靶分子的抗体、天然配体、底物等)并与固定化的靶分子竞争而选择性地执行。例如,可以封闭非特异性的吸附位点和/或结合位点。可以在本文中并入封闭步骤,只要所述封闭通过适当的方法执行。

[0293] 将如此得到的表达的肽、肽集合或富集肽集合的载体回收,并可以确定插入载体中的多核苷酸的核苷酸序列以确定由所述核苷酸序列编码的氨基酸序列。此外,可以将所述载体再次转移至宿主细胞中,并可以将上述的操作循环重复一次至几次以高度富集结合靶分子的肽集合。

[0294] 核糖体展示是使用例如编码期望的蛋白且缺乏终止密码子的mRNA和无细胞蛋白合成系统并由此在体外合成期望的蛋白分子、它的编码mRNA和彼此连接的核糖体的技术。通过使用由编码某种蛋白的氨基酸序列的核苷酸序列的随机诱变得到的mRNA组和无细胞蛋白合成系统,可以得到在核糖体上展示随机诱变处理的蛋白组的文库(Mattheakis LC,等人,(1994) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 第91卷,第19期,第9022-9029页)。

[0295] 核酸展示(也称为mRNA展示)是使用例如接头(诸如在结构上类似于酪氨酰tRNA的3'末端的嘌呤霉素)并由此合成期望的蛋白的分子、它的编码mRNA和彼此连接的核糖体的技术。该技术采用无细胞蛋白合成系统,不是活细胞,且因此允许*体外*合成。通过使用由编码某种蛋白的氨基酸序列的核苷酸序列的随机诱变得到的mRNA组、接头诸如嘌呤霉素和无细胞蛋白合成系统,可以得到在核糖体上展示随机诱变处理的蛋白组的文库(Nemoto N,等人,(1997),FEBS Lett.,第414卷,第2期,第405-408页)。

[0296] 可以将经由无细胞合成系统(诸如核糖体展示或核酸展示)得到的肽展示文库在有靶分子存在下温育或与靶分子接触。例如,将HTRA1-固定化的支持物与含有文库的流动相一起温育给定的时间。然后,将流动相与支持物分离。随后,将支持物洗涤以实现除去非特异性吸附的物质和结合的物质。通过洗脱可以回收肽、肽集合或与支持物(其具有与之结合的HTRA1)结合的富集肽集合。所述洗脱可以非选择性地执行,例如,在有相对高的离子强度、低pH、中等变性条件或离液盐存在下,或可以通过加入可溶性靶分子(诸如HTRA1、结合靶分子的抗体、天然配体、底物等)并与固定化的靶分子竞争而选择性地执行。例如,可以封闭非特异性的吸附位点和/或结合位点。可以在本文中并入封闭步骤,只要所述封闭通过适当的方法执行。

[0297] 将如此得到的表达的肽、肽集合或富集肽集合的核酸回收。在mRNA的情况下,在反转录反应成cDNA以后可以确定核苷酸序列以确定由所述核苷酸序列编码的氨基酸序列。此外,将回收的核酸转录成mRNA,并可以将上述的操作循环重复一次至几次以高度富集结合靶分子的肽集合。

[0298] 假如用亲和标签预先缀合肽、肽集合或富集肽集合,可以有效地纯化肽或集合。例如,用蛋白酶底物作为标签预先缀合肽集合,使得通过蛋白酶活性切割可以洗脱所述肽。

[0299] 基于得到的肽的序列信息和功能等,可以将得到的克隆或文库进一步诱变处理,并可以从突变的文库得到在它的功能(例如,HTRA1抑制活性)、物理性能(热稳定性、贮存稳定性等)、*体内*动力学(分布和在血液中的半衰期)等方面改善的肽。

[0300] 通过确定得到的肽是否具有HTRA1抑制活性,可以鉴别HTRA1抑制肽。

[0301] HTRA1抑制肽优选地能够维持在野生型SPINK2的氨基酸序列中所包含的三维结构至可以发挥HTRA1抑制活性的程度,所述三维结构例如由以下组分构成:由16Ser至30Val组成的环结构,由31Cys和32Gly组成的β链(1)和由57Ile至59Arg组成的β链(2)所构成的β折叠,和由41Glu至51Gly组成的α螺旋,或与其类似或至少部分地与其(或与这些位置)对应的环结构、β折叠或α螺旋。通过使用这样的三维结构(完整结构或部分结构)作为指标的部分,可以鉴别更优选的HTRA1抑制肽。

[0302] 4. 编码HTRA1抑制肽的核酸分子,包含所述核酸分子的载体,包含所述核酸分子或所述载体的细胞,和用于生产重组HTRA1抑制肽的方法。

[0303] 本发明也提供了一种多核苷酸,其包含编码在HTRA1抑制肽中所包含的氨基酸序

列的核苷酸序列(在下文中,被称作“编码HTRA1抑制肽的核酸分子”),具有所述基因的插入物的重组载体,携带所述基因或所述载体的细胞(在下文中,被称作“含有编码HTRA1抑制肽的核酸分子的细胞”),或生产HTRA1抑制肽的细胞(在下文中,被称作“HTRA1抑制肽生产细胞”)。

[0304] 编码本发明的HTRA1抑制肽的核酸分子的一些优选例子可以包括:包含下述核苷酸序列(a)至(e) (在下文中,被称作“HTRA1抑制肽的核苷酸序列”)中的任一种的核酸分子,由包含抗体基因序列的核苷酸序列组成的核酸分子,和由抗体基因序列组成的核酸分子:

[0305] (a)编码在SEQ ID NO: 3、5、7、9、11、13、15、17、19、21和23-29 (图15、17、19、21、23、25、25、29、31、33和35-41)中的任一个中所示的氨基酸序列的核苷酸序列;

[0306] (b)在SEQ ID NO: 4、6、8、10、12、14、16、18、20和22 (图16、18、20、22、24、26、28、30、32和34)中的任一个中所示的核苷酸序列;

[0307] (c)在严谨条件下与核苷酸序列(a)或(b)的互补核苷酸序列杂交且编码在具有HTRA1抑制活性的肽中所包含的氨基酸序列的核苷酸序列;

[0308] (d)通过1-20个、1-15个、1-10个、1-8个、1-6个、1-5个、1-4个、1-3个、1或2个或1个核苷酸或核苷酸残基的置换、缺失、添加和/或插入而从核苷酸序列(a)或(b)衍生出且编码在具有HTRA1抑制活性的肽中所包含的氨基酸序列的核苷酸序列;和

[0309] (e)与核苷酸序列(a)或(b)具有60%、70%、80%、85%、90%、92%、94%、96%、97%、98%或99%或更高同一性且编码在具有HTRA1抑制活性的肽中所包含的氨基酸序列的核苷酸序列。

[0310] 但是,编码HTRA1抑制肽的核酸分子不限于核苷酸序列(a)至(e)。在编码HTRA1抑制肽的核酸分子的范围内包括这样的每种核酸分子:其包含编码在具有HTRA1抑制活性的SPINK2突变体中所包含的氨基酸序列且优选在SEQ ID NO: 30中所示的氨基酸序列(图42)的核苷酸序列。

[0311] 一个或两个或更多个与每个氨基酸对应的密码子可以用于设计编码氨基酸序列的核苷酸序列。因此,编码某种肽的单个氨基酸序列的核苷酸序列可以具有多个变体。关于这样的密码子的选择,根据用于表达的宿主细胞的密码子选择可以适当地选择密码子,以携带包含核苷酸序列的多核苷酸或包含多核苷酸的载体,或可以适当地调节使用的多个密码子的频率或比率。例如,在使用大肠杆菌细胞作为宿主细胞的情况下,使用在大肠杆菌中具有高使用频率的密码子可以设计核苷酸序列。

[0312] 编码HTRA1抑制肽的核酸分子可以在功能上连接至一个或两个或更多个调节序列。短语“在功能上连接”用于指,连接的核酸分子可以被表达,或在所述分子中所包含的核苷酸序列是可表达的。所述调节序列包括包含关于转录调节和/或翻译调节的信息的序列元件。尽管调节序列随物种变化,但是调节序列通常包括启动子且包括参与转录和翻译起始的5’非编码序列,例如,原核-35/-10盒子和Shine-Dalgarno序列或真核TATA框、CAAT序列和5’加帽序列。该序列可以包含增强子元件和/或阻遏物元件和可翻译的信号序列、前导序列等,用于将天然的或成熟的肽递送至宿主细胞内部或外部的特定隔室。调节序列还可以包括3’非编码序列,且该序列可以包含参与转录终止或多腺苷酸化等的元件。但是,当在特定宿主细胞中不充分起作用时,与转录终止有关的序列可以被适合所述细胞的序列替换。

[0313] 启动子序列的例子可以包括原核tet启动子、lacUV5启动子和T7启动子,以及SV40启动子和CMV启动子(对于真核细胞)。

[0314] 编码HTRA1抑制肽的核酸分子可以呈分离形式,或呈被包含在载体或另一种克隆媒介物(在下文中,简称为"载体";质粒、噬粒、噬菌体、杆状病毒、粘粒等)中或染色体中的形式,尽管形式不限于此。除了HTRA1抑制肽的核苷酸序列和调节序列以外,所述载体还可以包含适合用于表达的宿主细胞的复制序列和控制序列以及选择性标志物,所述选择性标志物赋予允许通过转化等选择携带核酸分子的细胞的表型。

[0315] 通过本领域技术人员已知的方法,诸如转化,可以将编码HTRA1抑制肽的核酸分子或包含HTRA1抑制肽的核苷酸序列的载体转移给能够表达所述肽或所述核苷酸序列的宿主细胞。可以将携带所述核酸分子或所述载体的宿主细胞在适合表达所述肽或所述核苷酸序列的条件下培养。所述宿主细胞可以是原核和真核细胞中的任一种。原核生物的例子可以包括大肠杆菌和枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)。真核细胞的例子可以包括酵母诸如酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)和巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)的细胞,昆虫细胞诸如SF9和High 5,和动物细胞诸如HeLa细胞、CHO细胞、COS细胞和NS0。通过使用宿主细胞诸如真核细胞表达的本发明的肽可以经历期望的翻译后修饰。翻译后修饰的例子可以包括官能团诸如糖链的添加、肽或蛋白的添加、和氨基酸的化学性质的转化。可替换地,可以根据需要人工地修饰本发明的肽。所述肽的这样的修饰形式也被包括在本发明的"肽"的范围内。

[0316] 本发明还包括一种用于生产HTRA1抑制肽的方法。所述方法包括:培养宿主细胞或表达HTRA1抑制肽的细胞的步骤1,所述宿主细胞携带编码HTRA1抑制肽的核酸分子或包含HTRA1抑制肽的核苷酸序列的载体;和/或从在步骤1中得到的培养物回收HTRA1抑制肽的步骤2。本领域技术人员已知的操作,诸如分级分离、色谱法或纯化,可以应用于步骤2。例如,使用以后提及的本发明的抗体的亲和纯化适用于此。

[0317] 在本发明的一些方面,HTRA1抑制肽具有分子内二硫键。可能优选的是,具有分子内二硫键的肽应当通过使用信号序列等递送至具有氧化性氧化还原环境的细胞间隔。所述氧化性环境可以由革兰氏阴性细菌诸如大肠杆菌的周质、革兰氏阳性细菌的细胞外环境、真核细胞的内质网腔等提供。这样的环境能够促进结构二硫键的形成。可替换地,可以在宿主细胞(诸如大肠杆菌细胞)的细胞质中制备具有分子内二硫键的肽。在该情况下,所述肽可以以可溶性的折叠状态直接获得,或以包涵体的形式回收并随后在体外重构。此外,选择具有氧化性细胞内环境的宿主细胞,还可以在其细胞质中制备具有分子内二硫键的肽。另一方面,当HTRA1抑制肽不具有分子内二硫键时,可以在具有还原性氧化还原环境的细胞间隔(例如,革兰氏阴性细菌的细胞质)中制备所述肽。

[0318] 通过本领域技术人员已知的其它方法,诸如化学合成,例如,Merrifield, 等人的固相肽合成方法,和使用叔丁氧基羰基(Boc)或9-芴基甲氧基羰基(Fmoc)的有机合成化学肽合成方法,以及体外翻译,也可以生产本发明的HTRA1抑制肽。

[0319] 在一些方面,本发明提供了具有HTRA1抑制活性的结合SPINK2突变体肽的抗体和其功能片段。所述抗体可以是多克隆抗体和单克隆抗体中的任一种。单克隆抗体没有特别限制,只要所述单克隆抗体是免疫球蛋白或从其衍生出。所述抗体的功能片段没有限制,只要所述功能片段具有抗原结合活性,即,针对SPINK2突变体肽的结合活性。其例子包括重链

和轻链二者或之一或其片段,缺乏恒定区或Fc区的抗体片段,和与用于标记的另一种蛋白或物质的缀合物。这样的抗体和其功能片段可以通过本领域技术人员已知的方法制备,且可用于例如通过亲和色谱法纯化SPINK2突变体肽,与包含所述肽的药物组合物或其应用有关的临床检查,在诊断等中检测所述肽,和免疫测定。使用所述抗体结合的本发明的肽,可以通过亲和色谱法纯化本发明的抗体。

[0320] 5. 药物组合物

[0321] 本发明也提供了包含HTRA1抑制肽或其缀合物的药物组合物。

[0322] 包含本发明的HTRA1抑制肽或其缀合物的药物组合物可用于治疗和/或预防多种由HTRA1诱导或加重的疾病,并允许通过抑制或遏制HTRA1的表达或功能来抑制所述诱导或所述加重,治愈、维持或改善症状,避免继发疾病等(在下文中,这些疾病被称作"HTRA1相关疾病")。所述HTRA1相关疾病也包括多种这样的疾病:其允许通过视网膜保护作用来遏制诱导或加重,治愈、维持或改善症状,避免继发疾病等。HTRA1抑制肽具有视网膜保护作用且可用于治疗和/或预防这些HTRA1相关疾病。

[0323] HTRA1相关疾病的例子可以包括、但不限于年龄相关性黄斑变性、早产儿视网膜病变、息肉状脉络膜血管病、类风湿性关节炎和骨关节炎。年龄相关性黄斑变性的例子可以包括、但不限于湿性年龄相关性黄斑变性、干性年龄相关性黄斑变性和地图样萎缩。并且,本发明的药物组合物可以用作感光细胞保护剂、视网膜保护剂等(被统称为"视网膜保护剂")。

[0324] 年龄相关性黄斑变性被分成湿型和干型。所述湿型进一步分类成典型的年龄相关性黄斑变性(典型AMD)、息肉状脉络膜血管病(PCV)和视网膜血管瘤性增生(RAP)。对于湿型,存在治疗方法诸如抗-VEGF药物和光动力学疗法(PDT),但是它们不总是足够。对于干型,实践了基于年龄相关的眼病研究(AREDS)的饮食调整或补充物摄入。

[0325] 本发明的药物组合物可以用于治疗或预防年龄相关性黄斑变性,例如,如从表明以下事实的结果所见:在通过光暴露诱导的视网膜损伤的大鼠模型的对照组中的外核层核计数减少,而在光暴露之前或之后施用本发明的HTRA1抑制肽遏制了大鼠模型的施用组中的外核层核计数的减少(实施例5、10和14);并且视网膜色素上皮细胞(RPE细胞)的面积或具有等于或大于给定值的细胞面积的RPE细胞的数目在通过饲喂高脂肪饮食和氢醌而制备的兔视网膜损伤模型(在后面提及)的对照组中增加,而本发明的HTRA1抑制肽的施用遏制了兔模型的施用组中的这种增加(实施例11)。兔视网膜损伤模型考虑了人干性年龄相关性黄斑变性的风险因素,且因此作为模型(具体地,干性年龄相关性黄斑变性的模型)是优秀的。

[0326] 在使用视网膜色素上皮(RPE)细胞的VEGF mRNA诱导测试中,证实了HTRA1抑制肽的施用会遏制VEGF mRNA的表达(实施例12)。来自视网膜色素上皮细胞的VEGF诱导参与湿性年龄相关性黄斑变性的发病机制(Klettner A. 等人, (2009), Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol., 第247卷: 第1487-1492页)。另外,认为这样的病态VEGF诱导也参与病理学状况的维持,从而指示本发明的HTRA1抑制肽可用于治疗和预防干性年龄相关性黄斑变性和湿性年龄相关性黄斑变性。

[0327] 在人脐静脉内皮细胞(HUVEC)的迁移测试中,证实了HTRA1抑制肽的施用会遏制迁移(实施例13),从而指示本发明的HTRA1抑制肽可用于治疗和预防以血管生成为特征的湿

性年龄相关性黄斑变性。

[0328] 湿性年龄相关性黄斑变性是渐进的。尽管抗-VEGF药物的施用可以暂时地遏制疾病状态,高频率的重复复发是有问题的(Yand S, 等人, Drug Des Devel Ther., 第2卷, 第10期: 第1857-67页, 2016)。近年来新发现的药物的问题是在湿性年龄相关性黄斑变性患者中的萎缩的发展和视敏度的下降(Berg K, 等人, Acta Ophthalmologica, 第95卷, 第8期: 第796-802页, 2017)。单独的或与抗-VEGF药物组合使用的本发明的HTRA1抑制肽的施用可以对湿性年龄相关性黄斑变性(包括息肉状脉络膜血管病和视网膜血管瘤性增生)产生治疗效果。另外,所述肽的预防性施用可以预防或延迟疾病状态的复发并延迟例如抗-VEGF药物治疗的开始或重新开始。此外,所述肽对湿性年龄相关性黄斑变性患者中的萎缩的发展起遏制作用,且因此能够实现在视敏度方面的长期益处。

[0329] 本发明的HTRA1抑制肽在组织穿透方面是优秀的(实施例11),并且在物理性能、稳定性、安全性、施用后的动力学、生产力等方面也是优秀的,且因此可以优选地作为活性成分包含在药物组合物中。

[0330] 本发明的药物组合物可以含有治疗或预防有效量的HTRA1抑制肽或其缀合物和药学上可接受的稀释剂、载体、增溶剂、乳化剂、防腐剂和/或佐剂。

[0331] 术语“治疗或预防有效量”用于指通过剂型和施用途径对特定疾病产生治疗或预防效果的量,并且与“药理学有效量”同义。

[0332] 本发明的药物组合物可以含有用于改变、维持或保留其中所包含的本发明的组合物或肽或其缀合物的pH、渗透压、粘度、透明性、颜色、等渗性、无菌度或稳定性、可溶性、持续释放速率、吸收性、穿透、剂型、强度、性能、形状等的物质(在下文中,被称作“药用物质”)。所述药用物质没有特别限制,只要所述物质是药理学上可接受的。例如,没有或低毒性是药用物质优选地具有的性质。

[0333] 药用物质的例子可以包括下述物质,但不限于: 氨基酸诸如甘氨酸、丙氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸和赖氨酸;抗微生物剂;抗氧化剂诸如抗坏血酸、硫酸钠和亚硫酸氢钠;缓冲剂诸如磷酸盐、柠檬酸盐或硼酸盐缓冲剂、碳酸氢钠和Tris-HCl溶液;填充剂诸如甘露醇和甘氨酸;螯合剂诸如乙二胺四乙酸(EDTA);络合剂诸如咖啡因、聚乙烯基吡咯烷、β-环糊精和羟丙基-β-环糊精;填充剂诸如葡萄糖、甘露糖和糊精;其它烃诸如单糖、二糖、葡萄糖、甘露糖和糊精;着色剂;矫味剂;稀释剂;乳化剂;亲水聚合物诸如聚乙烯基吡咯烷;低分子量多肽;形成盐的抗衡离子;杀菌剂诸如苯扎氯铵、苯甲酸、水杨酸、硫柳汞、苯乙醇、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、氯己定、山梨酸和过氧化氢;溶剂诸如甘油、丙二醇和聚乙二醇;糖醇诸如甘露醇和山梨醇;助悬剂;表面活性剂诸如PEG、脱水山梨糖醇酯、聚山梨酯诸如聚山梨酯20和聚山梨酯80、triton、氨丁三醇、卵磷脂和胆固醇;稳定性增强剂诸如蔗糖和山梨醇;弹性增强剂诸如氯化钠、氯化钾、甘露醇和山梨醇;运输剂;稀释剂:赋形剂;和/或药用佐剂。

[0334] 这样的药用物质以比HTRA1抑制肽的重量高0.001-1000倍、优选0.01-100倍和更优选0.1-10倍的量加给HTRA1抑制肽。

[0335] 含有HTRA1抑制肽或其缀合物的脂质体、或含有修饰形式(其包含与脂质体缀合的HTRA1抑制肽或其缀合物)的药物组合物也被包括在本发明的药物组合物中。

[0336] 赋形剂或载体没有特别限制,只要赋形剂或载体通常是液体或固体,并且是用于

用在口服施用或胃肠外施用的制品中的注射用水、生理盐水、人工脑脊液或其它物质。生理盐水的例子可以包括中性生理盐水或含有血清白蛋白的生理盐水。

[0337] 缓冲液的例子可以包括制备成使药物组合物的最终pH达到7.0-8.5的Tris缓冲液,制备成使其最终pH达到4.0-5.5的乙酸盐缓冲液,制备成使其最终pH达到5.0-8.0的柠檬酸盐缓冲液,和制备成使其最终pH达到5.0-8.0的组氨酸缓冲液。

[0338] 本发明的药物组合物是固体、液体、混悬液等。本发明的药物组合物的另一个例子可以包括冷冻干燥的制品。使用赋形剂诸如蔗糖,可以形成冷冻干燥的制品。

[0339] 本发明的药物组合物的施用途径可以是眼滴注、肠内施用、局部施用和胃肠外施用中的任一种。其实例可以包括结膜滴注、玻璃体内施用、静脉内施用、动脉内施用、肌肉内施用、真皮内施用、皮下施用、腹膜内施用、透皮施用、骨内施用和关节内施用。

[0340] 根据施用方法、HTRA1抑制肽的HTRA1结合亲和力等,可以确定药物组合物的配方。对靶HTRA1具有较强抑制活性(较小IC_{50}值)或对HTRA1蛋白具有较高亲和力(较低K_D值)的本发明的HTRA1抑制肽能够在较低剂量产生它的医疗效果。

[0341] 本发明的HTRA1抑制肽或其缀合物的剂量没有限制,只要所述剂量是药理学有效量即可。根据个体的物种、疾病的类型、症状、性别、年龄、预存病症、所述肽对HTRA1蛋白的结合亲和力或它的生物活性、以及其它因素,可以适当地确定所述剂量。所述剂量通常是0.01-1000 mg/kg,且优选0.1-100 mg/kg,其可以每天至每180天施用一次,或者每天施用2次或3次或更多次。

[0342] 药物组合物的形式的例子可以包括注射剂(包括冷冻干燥制品和点滴输注剂)、栓剂、经鼻吸收制品、透皮吸收制品、舌下试剂、胶囊剂、片剂、软膏剂、颗粒、气雾剂、丸剂、粉剂、混悬液、乳剂、滴眼剂和生物植入制剂。

[0343] 包含HTRA1抑制肽或其缀合物作为活性成分的药物组合物可以与另外药物并行地或分开地施用。例如,包含HTRA1抑制肽或其缀合物作为活性成分的药物组合物可以在另外药物施用之后施用,或另外药物可以在所述药物组合物施用之后施用。可替换地,所述药物组合物和所述另外药物可以并行地施用。对于并行施用,可以将HTRA1抑制肽或其缀合物和另外药物包含在单一制品中,或可以包含在单独制品(多个制品)中。

[0344] 与本发明的药物组合物联合使用的另外药物的例子可以包括抗-VEGF剂、抗炎剂、炎症性细胞因子-中和剂和补体激活途径抑制剂。所述抗-VEGF剂被分类为抗-VEGF抗体、VEGF抑制剂、VEGF受体拮抗剂和可溶性VEGF受体等,且包括贝伐珠单抗、雷珠单抗、阿柏西普、培加尼布、brolucizumab等。所述抗炎剂没有特别限制,只要所述抗炎剂可以局部施用以抑制眼内或关节内炎症即可。炎症性细胞因子-中和剂的例子包括抗-TNFα抗体、抗-白介素-6 (在下文中,被称作“IL-6”)抗体、抗-IL-6受体抗体和可溶性TNF受体,且可以具体地包括英夫利昔单抗、阿达木单抗、戈利木单抗、塞妥珠单抗、托珠单抗和依那西普。补体激活途径抑制剂的例子可以包括lampalizumab。这些药物适合用于治疗或预防HTRA1相关疾病,并且也可以与本发明的药物组合物组合用于治疗或预防除了HTRA1相关疾病以外的疾病。

[0345] 可以使用这些另外药物之一,或可以施用或接受其中两种或三种或更多种。这些方案被统称为本发明的药物组合物“与另外药物联合使用”或“与另外药物组合”。除了本发明的抗体、其结合片段、或所述抗体或所述片段的修饰形式以外还包含另外药物或与另外疗法联合使用的本发明的药物组合物也被包括在本发明中作为“与另外药物联合使用”或

“与另外药物组合”的方面。

[0346] 本发明也提供了一种用于治疗或预防HTRA1相关疾病诸如年龄相关性黄斑变性的方法,所述方法包括施用HTRA1抑制肽或其缀合物的步骤,本发明的HTRA1抑制肽或其缀合物用于制备药物组合物的用途,所述药物组合物用于治疗或预防所述疾病,和HTRA1抑制肽或其缀合物用于治疗或预防所述疾病的用途。本发明还包括包含本发明的HTRA1抑制肽或其缀合物的用于治疗或预防的试剂盒。

[0347] 本发明进一步提供了一种多核苷酸,其包含编码HTRA1抑制肽或其缀合物的氨基酸序列的核苷酸序列,包含所述多核苷酸的载体,和包含所述多核苷酸或所述载体或包含表达本发明的HTRA1抑制肽或其缀合物的细胞的药物组合物。例如,通过使用已知的方案,可以将所述多核苷酸和所述载体应用于HTRA1相关疾病的基因治疗。通过使用已知的方案,可以将所述细胞应用于HTRA1相关疾病的细胞疗法。并且,可以将所述多核苷酸和所述载体转移给例如自体细胞或同种异体细胞(同源细胞)以准备用于细胞疗法的细胞。这样的多核苷酸和载体也被包括作为用于本发明中的细胞疗法药物制品的组合物。但是,包含所述多核苷酸、所述载体、所述细胞等的本发明的药物组合物的形式不限于上述的那些。

[0348] 6. 用于诊断的组合物和用于检测和分离HTRA1的方法

[0349] 本发明的HTRA1抑制肽或其缀合物可以具有除了HTRA1蛋白酶抑制活性以外的HTRA1结合活性,且可以用在不同的研究中诸如在检索HTRA1抑制剂的研究中用作阳性对照、HTRA1的检测、使用所述检测的检查和诊断、HTRA1的分离、试剂和其它目的。对于HTRA1的检测或分离,可以将本发明的肽和HTRA1中的至少一种固定化。

[0350] 本发明提供了包含结合HTRA1的本发明的肽或其缀合物的用于检测或用于诊断的组合物(在下文中,被统称为“用于诊断的组合物”)。

[0351] 本发明的用于诊断的组合物可用在HTRA1相关疾病的检查或诊断、HTRA1表达等中。在本发明中,检查或诊断的例子包括、但不限于:获得疾病的风险的确定或测量,疾病的存在或不存在的确定,进展或加重的程度的测量,使用包含HTRA1抑制肽或其缀合物的药物组合物的药物治疗的效果的测量或确定,除了药物以外的治疗的效果的测量或确定,复发的风险的测量,和复发的存在或不存在的确定。

[0352] 本发明的用于诊断的组合物可用于鉴别以下物质的受体个体:本发明的肽或其缀合物,包含所述肽或其缀合物的组合物,或包含所述肽或其缀合物的药物组合物。

[0353] 用于诊断的组合物可以含有pH缓冲液、渗透压调节剂、盐、稳定剂、防腐剂、显影剂、敏化剂、聚集阻止剂等。

[0354] 本发明也提供了一种用于检查或诊断HTRA1相关疾病的方法,本发明的肽用于制备疾病诊断所用的组合物的用途,和结合HTRA1的本发明的肽或其缀合物用于检查或诊断疾病的用途。本发明还包括包含本发明的肽或其缀合物的用于检查或诊断的试剂盒。

[0355] 包含结合HTRA1的本发明的肽的检查或诊断方法理想地是夹心ELISA。可替换地,可以使用常见检测方法诸如ELISA、RIA、ELISPOT、斑点印迹、Ouchterlony方法、CIE、CLIA或流式细胞计量术。也通过基于免疫沉淀方法的方法实现检查或诊断。

[0356] 本发明也提供了一种用于检测或测量测试样品中的HTRA1的方法。这样的检测或测量方法可以采用本发明的用于诊断的组合物。可以如下检测测试样品中的HTRA1:使HTRA1抑制肽或其缀合物与测试样品接触(步骤1);和随后测量与所述肽结合的HTRA1的量

(步骤2)。步骤1可以包括,例如,经由蛋白G将HTRA1抑制肽与免疫球蛋白Fc区的缀合物固定化至磁珠上,和向其中加入测试样品。步骤2可以包括,例如,分离所述磁珠,和通过SDS-PAGE或蛋白质印迹分析与所述珠子一起沉淀的可溶性蛋白以检测HTRA1。除了人-或非人动物-衍生的样品以外,甚至可以对人工处理的样品诸如重组蛋白进行该测量。生物个体-衍生的测试样品的例子可以包括、但不限于血液、滑液、腹水液、淋巴液、脑脊液、支气管肺泡灌洗液、唾液、痰、组织匀浆物上清液和组织切片。

[0357] 不仅可以在体外而且可以在体内进行HTRA1检测。在诊断成像的情况下,可以使用用药学上可接受的放射性核素或发光体标记的HTRA1抑制肽或其缀合物。步骤1可以包括,例如,将经标记的肽或其缀合物施用给测试受试者。步骤2可以包括,例如,通过使用诊断成像技术诸如PET/CT得到图像,和确定或检查HTRA1的存在。

[0358] 在本发明的用于诊断的组合物中所包含的肽或其缀合物会结合HTRA1,且优选地具有HTRA1-特异性的结合活性。

[0359] 本发明还包括一种用于鉴别本发明的药物组合物的接受者个体的方法。在这样的鉴别方法中,使用本发明的HTRA1-结合肽测量从个体衍生出的样品中的HTRA1,当在所述样品中检测到HTRA1时,或当在其中检测到与在从健康个体衍生出的样品中检测到的HTRA1的量相比更大量的HTRA1时,可以确定所述个体是阳性的。该方法可以采用本发明的用于诊断的组合物。

[0360] 在鉴别方法的一个优选方面,所述个体具有HTRA1相关疾病或具有获得所述疾病的风险。

[0361] 在一个方面,可以将本发明的药物组合物施用给在鉴别方法中确定为阳性的个体。

[0362] 使用具有HTRA1-特异性的结合活性的本发明的肽或其缀合物,可以从HTRA1与其它组分在其中共存的样品中特异性地分离HTRA1。HTRA1从所述肽的释放可以非选择性地执行,例如,在有相对高的离子强度、低pH、中等变性条件或离液盐存在下,且优选地在不减弱HTRA1的蛋白酶活性的情况下执行。

[0363] 7. 用于鉴别HTRA1相关疾病的治疗药物或预防药物的方法

[0364] 在一个方面,本发明提供了通过使用HTRA1抑制活性作为指标来鉴别HTRA1相关疾病和优选年龄相关性黄斑变性的治疗药物或预防药物或其候选物的方法。所述方法可以包括:在有或没有测试物存在下(或在有媒介物存在下)温育HTRA1蛋白酶和底物的步骤1;在有和没有测试物存在下确定HTRA1蛋白酶活性的步骤2;和/或当在有所述测试物存在下的HTRA1蛋白酶活性小于在没有所述测试物存在下的HTRA1蛋白酶活性时,将所述测试物确定为年龄相关性黄斑变性的治疗药物或预防药物或其候选物的步骤3。所述测试物可以是肽或非肽。所述肽测试物不限于SPINK2突变体。其例子可以包括、但不限于:抗体,具有非-免疫球蛋白蛋白框架的除了SPINK2突变体以外的肽,和HTRA1底物类似物。非肽测试物的例子可以包括、但不限于合成的低分子化合物和核酸。在用于鉴别具有视网膜保护作用的物质或其候选物的方法中也可以优选地包括上述的步骤中的一个或两个或更多个。本发明也涉及用于鉴别具有视网膜保护作用的物质或其候选物的方法。

[0365] 8.兔视网膜损伤模型

[0366] 本发明也提供了通过负载含有氢醌(在下文中,被称作“HQ”)的高脂肪饮食(在下

文中,被称作“HFD”)造成的视网膜损伤的兔模型,用于制备所述模型的方法,使用所述模型的测试方法,等。

[0367] 该模型可以采用2岁或更大的任意白兔,诸如NZW或JW,不论性别。

[0368] HFD可以含有任意量的任意脂肪或油,例如,0.1-2%(w/v)胆固醇、1-10%(w/v)椰子油、1-10%(w/v)花生油、1-10%(w/v)大豆油、10-20%(w/v)牛油、10-50%(w/v)猪油或1-10%(w/v)玉米油,尽管组分不限于此,只要所述组分适合用于制备所述模型即可。

[0369] 在HQ-HFD中所包含的HQ的量是0-4%(w/v),优选0.5-3.5%(w/v),更优选1.0-3.0%(w/v),更优选2.2-2.8%(w/v),和最优选2.4%(w/v)。

[0370] HQ-HFD的饲喂期是3-6个月,优选3.5-5个月,且更优选4个月。应当避免8个月或更长的连续饲喂。

[0371] 本发明的模型是优选的,因为与小鼠模型相比,所述模型在眼球的大小和功能方面更类似于人类(非专利文献18和19)。常规兔模型(非专利文献20)需要8个月完成它们的制备。相反,本发明的模型可以在更短阶段中制备,此外,作为年龄相关性黄斑变性模型是更优选的,因为所述模型可以诱导RPE细胞的过度生长,这在常规模型中是不清楚的。

[0372] 本发明的模型的视网膜色素上皮细胞(RPE细胞)与正常兔的RPE细胞相比是过度生长的,从而显现年龄相关性黄斑变性的早期病理学状况。另一方面,当用HQ-HFD饲喂与常规兔模型(非专利文献20)类似的10-周龄兔4个月时,RPE细胞过度生长不能在视觉上确认。

[0373] 通过使用显示病理学状况的该模型可以鉴别年龄相关性黄斑变性的治疗药物和/或预防药物或视网膜保护剂。所述鉴别方法可以包含以下步骤:(i)在有或没有测试物施用的情况下测量该模型的兔的视网膜色素上皮细胞的过度生长;和(ii)当在测试物施用下视网膜色素上皮细胞的过度生长与没有施用测试物下视网膜色素上皮细胞的过度生长相比受到抑制时,确定所述测试物是阳性的。步骤(i)中的测量优选地是视网膜色素上皮细胞的平均面积和/或过度生长的视网膜色素上皮细胞的数目的测量。

实施例

[0374] 在下文中,将参考实施例更详细地描述本发明的一些方面。但是,本发明不限于这些实施例。

[0375] 在下述实施例中,除非另外指出,否则根据在“Molecular Cloning”(Sambrook, J., Fritsch, E. F. 和Maniatis, T., Cold Spring Harbor Laboratory Press在1982年或1989年出版)中描述的方法,或在本领域技术人员使用的实验手册中描述的其它方法,进行关于遗传操作的各个操作,或者当使用商购可得的试剂或试剂盒时,根据在商购可得的产品中包括的说明书进行实施例。

[0376] 实施例1. HTRA1抑制肽的制备

[0377] (1-1) HTRA1抑制肽表达载体的构建

[0378] (1-1-1) pET 32a (经修饰的)_HTRA1抑制肽的构建

[0379] 首先,构建具有SPINK2支架作为主链的HTRA1抑制肽表达载体。使用下述引物和KOD-plus- (Toyobo Co., Ltd.),

[0380] 引物1: 5’-AAAAGAATTCTGATCCGCAGTTTGGTCTGTTTAG-3’

[0381] 引物2: 5’-AAAACTCGAGTTATGCGGCCGCAGACGCGCCGCACGGACC-3’

[0382] 用每种抑制肽的核苷酸序列(SEQ ID NO: 4、6、8、10、12、14、16、18、20和22)和用SPINK2的核苷酸序列(SEQ ID NO: 2)作为模板,通过PCR ((94℃保持15秒、60℃保持30秒和68℃保持30秒)×30个循环)扩增抑制剂片段。

[0383] 对每个扩增的片段进行琼脂糖凝胶电泳。然后,从凝胶切离期望的DNA片段,并使用QIAquick凝胶提取试剂盒(Qiagen N.V.)制备DNA。将制备的DNA片段和pET 32a (经修饰的)各自用限制酶EcoRI (New England BioLabs Inc.)和XhoI (New England BioLabs Inc.)在37℃处理1小时或更久。琼脂糖凝胶电泳以后,将期望的DNA片段从凝胶切离并使用QIAquick PCR纯化试剂盒(Qiagen N.V.)纯化。使纯化的片段在16℃反应过夜用于使用T4 DNA连接酶(New England BioLabs Inc.)的连接反应。将连接溶液加给大肠杆菌JM109 (Toyobo Co., Ltd.),并将混合物在冰上静置30分钟,然后在42℃热处理45秒,进一步在冰上静置5分钟,并接种至含有0.1 mg/ml氨苄西林的2YT平板,随后在37℃静止培养过夜以转化大肠杆菌。在次日,将经转化的大肠杆菌接种至含有0.1 mg/ml氨苄西林的Terrific Broth培养基(Invitrogen Corp.)并在37℃培养过夜。然后,使用QIAprep 96 Turbo Miniprep Kit (Qiagen N.V.)回收质粒DNA(在下文中,该处理被称作“微制备(miniprep)处理”)并进行序列分析以构建“pET 32a (经修饰的)_HTRA1抑制肽”。

[0384] (1-1-2) pET 32a_HTRA1抑制肽_Kex2的构建

[0385] 同样地,使用下述引物和KOD-plus- (Toyobo Co., Ltd.)

[0386] 引物3: 5’-AAAAGGATCCCTGGACAAACGTGATCCGCAGTTTGGTCTGTTTAG-3’

[0387] 引物4: 5’-AAAACTCGAGTTAGCCGCCGCACGGACCATTGCGAATAATTTTA-3’

[0388] 用每种抑制剂的序列(序列表)和用SPINK2的核苷酸序列作为模板,通过PCR ((94℃保持15秒、60℃保持30秒、和68℃保持30秒)×30个循环)扩增抑制剂片段。对每个扩增的片段进行琼脂糖凝胶电泳。然后,将期望的DNA片段从凝胶切离,并使用QIAquick凝胶提取试剂盒(Qiagen N.V.)制备DNA。将制备的DNA片段和pET 32a (Novagen)各自用限制酶BamHI (New England BioLabs Inc.)和XhoI (New England BioLabs Inc.)在37℃处理1小时或更久。琼脂糖凝胶电泳以后,将期望的DNA片段从凝胶切离并使用QIAquick PCR纯化试剂盒(Qiagen N.V.)纯化。使纯化的片段在16℃反应过夜用于使用T4 DNA连接酶(New England BioLabs Inc.)的连接反应。将连接溶液加给大肠杆菌JM109 (Toyobo Co., Ltd.),并将混合物在冰上静置30分钟,然后在42℃热处理45秒,进一步在冰上静置5分钟,并接种至含有0.1 mg/ml氨苄西林的2YT平板,随后在37℃静止培养过夜以转化大肠杆菌。培养经转化的大肠杆菌,并然后进行微制备和序列分析以构建“pET 32a_HTRA1抑制肽_Kex2”。根据在(1-1-1)中描述的方法执行所述操作。

[0389] (1-2) HTRA1抑制肽的表达和纯化

[0390] 将大肠杆菌Origami B (DE3) (Novagen)用在(1-1-1)中构建的载体pET 32a (经修饰的)_HTRA1抑制肽转化,并使用含有0.1 mg/ml氨苄西林的2YT培养基在37℃培养。然后,向其中加入IPTG (终浓度: 1 mM),并将大肠杆菌在16℃培养过夜。次日,通过离心(3,000 g, 20 min, 4℃)收获以后,使用BugBuster Master Mix (Novagen)制备裂解物,并将目标His标签融合蛋白使用TALON金属亲和树脂(Clontech Laboratories, Inc.)纯化。接着,将硫氧还蛋白标签和期望的蛋白使用凝血酶切割捕获试剂盒(Novagen)切割并使用TALON纯化。将所得物进行凝胶过滤色谱法(Superdex 75 10/300 GL)或反相色谱法(YMC-

Pack ODS-AM)以制备HTRA1抑制肽。使得到的肽在它的N端与由S标签和接头组成的部分(SEQ ID NO: 31: 图43)缀合并在它的C端与替代Gly-Gly的C-端六聚体(SEQ ID NO: 32: 图44)缀合。

[0391] 同样地,将大肠杆菌Origami B (DE3) (Novagen)用在(1-1-2)中构建的载体pET 32a_HTRA1抑制肽_Kex2转化,并使用含有0.1 mg/ml氨苄西林的2YT培养基在37℃培养。然后,向其中加入IPTG (终浓度: 1 mM),并将大肠杆菌在16℃培养过夜。次日,通过离心(3,000 g, 20 min, 4℃)收获以后,使用BugBuster Master Mix (Novagen)制备裂解物,并使用TALON金属亲和树脂(Clontech Laboratories, Inc.)纯化目标His标签融合蛋白。接着,将硫氧还蛋白标签和期望的蛋白使用Kex2 (酿酒酵母: Accession CAA96143)切割并使用TALON纯化。将所得物进行凝胶过滤色谱法(Superdex 75 10/300 GL)或反相色谱法(YMC-Pack ODS-AM)以制备HTRA1抑制肽(N端和C端都没有缀合标签、接头等)。

[0392] 实施例2. 针对HTRA1抑制活性评价HTRA1抑制肽

[0393] 人、小鼠、大鼠和猴HTRA1之间的序列相似性显示在图1中。构成HTRA1蛋白酶结构域(204Gly至364Leu)(其为酶活性结构域)的基本序列在人和猴之间是完全相同的。人和小鼠或大鼠HTRA1蛋白酶结构域序列相差1个残基。但是,该残基在结构上位于与酶活性中心相对的侧面上且因此推测对酶活性中心没有影响(图1)。因此,HTRA1蛋白酶结构域具有实际相同的序列,不论物种(人/小鼠/大鼠/猴)。因而,关于物种没有特别提及。

[0394] (2-1) HTRA1蛋白酶结构域HTRA1 (cat)的制备

[0395] (2-1-1) pET 21b_HTRA1 (cat)的构建

[0396] 使用人HTRA1 (Q92743)的蛋白酶结构域(158Gly至373Lys)(除了N-端结构域和PDZ结构域以外)作为HTRA1 (cat)以构建HTRA1 (cat)表达载体。使用下述引物和KOD-plus- (Toyobo Co., Ltd.),

[0397] 引物5: 5'-AAACATATGGGGCAGGAAGATCCCAACAGTTTGC-3'

[0398] 引物6: 5'-AAACTCGAGTTTGGCCTGTCGGTCATGGGACTC-3'

[0399] 用人HTRA1插入的质粒(GeneCopoeia, Inc.; GC-M0558)作为模板,通过PCR ((94℃保持15秒、60℃保持30秒、和68℃保持45秒)×30个循环)扩增期望的DNA片段。对扩增的片段进行琼脂糖凝胶电泳。然后,将期望的DNA片段从凝胶切离,并使用QIAquick凝胶提取试剂盒(Qiagen N.V.)制备DNA。将制备的DNA片段和pET 32a (Novagen)各自用限制酶NdeI (New England BioLabs Inc.)和XhoI (New England BioLabs Inc.)在37℃处理1小时或更久。琼脂糖凝胶电泳以后,将期望的DNA片段从凝胶切离并使用QIAquick PCR纯化试剂盒(Qiagen N.V.)纯化。使纯化的片段在16℃反应过夜用于使用T4 DNA连接酶(New England BioLabs Inc.)的连接反应。将连接溶液加给大肠杆菌JM109 (Toyobo Co., Ltd.),并将混合物在冰上静置30分钟,然后在42℃热处理45秒,进一步在冰上静置5分钟,并接种至含有0.1 mg/ml氨苄西林的2YT平板,随后在37℃静止培养过夜以转化大肠杆菌。培养经转化的大肠杆菌,并然后进行微制备和序列分析以构建"pET 21b_HTRA1 (cat)"。根据在(1-1-1)中描述的方法执行所述操作。

[0400] (2-1-2) HTRA1 (cat)的制备

[0401] 将大肠杆菌BL21 (DE3) (Novagen)用构建的pET 21b_HTRA1 (cat)转化并使用含有0.1 mg/ml氨苄西林的2YT培养基在37℃培养。然后,向其中加入IPTG (终浓度: 1 mM),

并将大肠杆菌在28℃培养过夜。收获以后,通过悬浮于在含有1 mg/ml溶菌酶的磷酸盐缓冲液(50 mM磷酸钠和300 mM NaCl)中和超声处理来制备裂解物,并使用TALON (Clontech Laboratories, Inc.)回收期望的His标签融合蛋白。将所得物进行凝胶过滤色谱法(Superdex 200 10/300 GL)以纯化HTRA1 (cat)。

[0402] (2-2) 全长HTRA1 (HTRA1 (全))的制备

[0403] (2-2-1) pcDNA3.1_HTRA1 (全)_His的构建

[0404] 使用下述引物和KOD-plus- (Toyobo Co., Ltd.),

[0405] 引物7: 5'-AAAAGAATTCGCCACCATGCAGATTCCTAGAGCCG-3'

[0406] 引物8: 5'-AAAACTCGAGTCAGTGGTGATGGTGGTGGTGGCCGG-3'

[0407] 用合成的人HTRA1 (Q92743) DNA (GeneArt)作为模板,通过PCR ((94℃保持15秒、60℃保持30秒、和68℃保持90秒)×30个循环)扩增期望的DNA片段。

[0408] 对扩增的片段进行琼脂糖凝胶电泳。然后,将期望的DNA片段从凝胶切离,并使用QIAquick凝胶提取试剂盒(Qiagen N.V.)制备DNA。将制备的DNA片段和pcDNA3.1 (Thermo Fisher Scientific Inc.)各自用限制酶EcoRI (New England BioLabs Inc.)和XhoI (New England BioLabs Inc.)在37℃处理1小时或更久。琼脂糖凝胶电泳以后,将期望的DNA片段从凝胶切离并使用QIAquick PCR纯化试剂盒(Qiagen N.V.)纯化。使纯化的片段在16℃反应过夜用于使用T4 DNA连接酶(New England BioLabs Inc.)的连接反应。将连接溶液加给大肠杆菌JM109 (Toyobo Co., Ltd.),并将混合物在冰上静置30分钟,然后在42℃热处理45秒,进一步在冰上静置5分钟,并接种至含有0.1 mg/ml氨苄西林的2YT平板,随后在37℃静止培养过夜以转化大肠杆菌。培养经转化的大肠杆菌,并然后进行微制备和序列分析以构建"pcDNA3.1_HTRA1 (全)_His"。根据在(1-1-1)中描述的方法执行所述操作。

[0409] (2-2-2) pcDNA3.3_HTRA1 (全)_FLAG_His的构建

[0410] 使用下述引物和KOD-plus- (Toyobo Co., Ltd.),

[0411] 引物7

[0412] 引物9: 5'-CTTGTCGTCATCGTCCTTGTAGTCGCCGGGGTCGATTTCCTC-3'

[0413] 用在(2-2-1)中构建的pcDNA3.1_HTRA1 (全)_His作为模板,通过PCR ((94℃保持15秒、60℃保持30秒、和68℃保持90秒)×30个循环)扩增片段A。

[0414] 接着,使用下述引物和KOD-plus- (Toyobo Co., Ltd.)

[0415] 引物10: 5'-GCGACTACAAGGACGATGACGACAAGCACCACCACCATCATCAC-3'

[0416] 引物11: 5'-AAAAACTCGAGCTAGTGATGATGGTGGTGGTGCTTGTCGTC-3'

[0417] 通过PCR ((94℃保持15秒、60℃保持30秒、和68℃保持10秒)×30个循环)扩增片段B。

[0418] 使用引物7和11和KOD-plus- (Toyobo Co., Ltd.),用片段A和片段B作为模板,通过PCR ((94℃保持15秒、60℃保持30秒、和68℃保持90秒)×30个循环)扩增期望的DNA片段。对扩增的片段进行琼脂糖凝胶电泳。然后,将期望的DNA片段从凝胶切离,并使用QIAquick凝胶提取试剂盒(Qiagen N.V.)制备DNA。将制备的DNA片段和pcDNA3.3 (Thermo Fisher Scientific Inc.)各自用限制酶EcoRI (New England BioLabs Inc.)和XhoI (New England BioLabs Inc.)在37℃处理1小时或更久。琼脂糖凝胶电泳以后,将期望的DNA片段从凝胶切离并使用QIAquick PCR纯化试剂盒(Qiagen N.V.)纯化。使纯化的片段在

16℃反应过夜用于使用T4 DNA连接酶(New England BioLabs Inc.)的连接反应。将连接溶液加给大肠杆菌JM109 (Toyobo Co., Ltd.),并将混合物在冰上静置30分钟,然后在42℃热处理45秒,进一步在冰上静置5分钟,并接种至含有0.1 mg/ml氨苄西林的2YT平板,随后在37℃静止培养过夜以转化大肠杆菌。培养经转化的大肠杆菌,并然后进行微制备和序列分析以构建“pcDNA3.3_HTRA1 (全)_FLAG_His”。根据在(1-1-1)中描述的方法执行所述操作。

[0419] (2-2-3) HTRA1 (全)的制备

[0420] 使用聚乙烯亚胺Max (Polysciences, Inc.),将FreeStyle 293F (Thermo Fisher Scientific Inc.)用在(2-2-2)中构建的pcDNA3.3_HTRA1 (全)_FLAG_His转染。6天以后,回收培养物上清液。使用HisTrap excel (GE Healthcare)回收His标签融合蛋白,并使用抗-FLAG M2亲和琼脂糖凝胶(Sigma-Aldrich Co. LLC)进一步纯化HTRA1 (全)。

[0421] (2-3) 无活性的HTRA1突变体HTRA1 (S328A)的制备

[0422] (2-3-1) pcDNA3.3_HTRA1(S328A)_FLAG_His的构建

[0423] 为了构建无活性的HTRA1突变体HTRA1 (S328A)表达载体,使用下述引物和QuikChange II定位诱变试剂盒(Agilent Technologies Japan, Ltd.),

[0424] 引物21: 5’-CCATCATCAACTACGGCAACGCGGGCGGACCCCTCGTGAACC-3’ (SEQ ID NO: 55: 图76)

[0425] 引物22: 5’-GGTTCACGAGGGGTCCGCCCGCGTTGCCGTAGTTGATGATGG-3’ (SEQ ID NO: 56: 图77)

[0426] 用在实施例(2-2-2)中构建的载体“pcDNA3.3_HTRA1 (全)_FLAG_His”作为模板进行PCR ((95℃保持30秒、55℃保持1 min和68℃保持7 min)×18个循环)。

[0427] PCR反应以后,根据试剂盒附带的方案用DpnI处理过的PCR反应溶液转化大肠杆菌JM109 (Toyobo Co., Ltd.)。培养经转化的大肠杆菌,并然后进行微制备和序列分析以构建“pcDNA3.3_HTRA1(S328A)_FLAG_His”。根据在(1-1-1)中描述的方法执行所述操作。

[0428] (2-3-2) HTRA1 (S328A)的制备

[0429] 根据在(2-2-3)中描述的方法使用FreeStyle 293F表达HTRA1 (S328A),并通过亲和纯化来制备HTRA1 (S328A)。

[0430] 实施例3. 针对HTRA1抑制活性来评价HTRA1抑制肽

[0431] (3-1)使用肽底物评价HTRA1抑制肽的HTRA1抑制活性

[0432] 将底物肽H2-Opt (Mca-IRRVSYSFK(Dnp)K) (Peptide Institute, Inc.: SEQ ID NO: 54, 图8)以10 mM溶解在DMSO中,用测定缓冲液(50 mM硼酸盐和150 mM NaCl, pH 8.5)稀释,并在10 μM的终浓度使用。将用测定缓冲液稀释的HTRA1 (HTRA1 (cat)或HTRA1 (全))和每种HTRA1抑制肽在各25 μL混合并在37℃反应20分钟。然后,向其中加入50 μL用测定缓冲液稀释的底物。使用Enspire (PerkinElmer, Inc.)测量荧光信号(在328 nm激发/在393 nm发射)。HTRA1的终浓度是100 nM,且HTRA1抑制肽的终浓度是1.875-1,000 nM。在反应和测量中使用PROTEOSAVE(R) SS96F黑色平板(Sumitomo Bakelite Co., Ltd.)。

[0433] 计算HTRA1抑制肽在每种浓度的底物肽分解速率。当将在0 nM的抑制剂浓度时的分解速率定义为100%时,评价每种HTRA1抑制肽的HTRA1 (cat)和HTRA1 (全)抑制活性(图2和3)。作为使用GraphPad Prism (5.0版; GraphPad Software Inc.)计算50%抑制浓度

(IC50)的结果,发现所有的HTRA1抑制肽在低浓度抑制HTRA1 (cat)和HTRA1 (全)酶活性(图2A至2C和图3)。通过对照,野生型SPINK2 (wt)没有表现出HTRA1抑制活性(图2D)。

[0434] HTRA1抑制肽的HTRA1抑制活性

[表1]

ID	HTRA1 (cat)的IC50 (nM)	HTRA1 (全)的IC50 (nM)
H218	72	55
H223	41	66
H228	71	38
H308	37	15
H321	48	29
H322	50	17
H308AT	49	31
H321AT	46	18
H322AT	45	25
M7	43	24

[0435]

[0436] (3-2)使用蛋白底物评价HTRA1抑制肽的HTRA1抑制活性

[0437] 用人玻连蛋白作为蛋白底物评价HTRA1抑制肽的HTRA1抑制活性。将用测定缓冲液(50 mM Tris和150 mM NaCl, pH 8.0)稀释的HTRA1 (cat)和每种HTRA1抑制肽混合并在37℃反应1小时。接着,向其中加入用测定缓冲液稀释的人玻连蛋白(BD Biosciences; 354238)并在37℃反应2小时。向其中加入SDS样品缓冲液,并通过在99℃处理5分钟终止酶反应。然后,通过SDS-PAGE和蛋白质印迹分析评价人玻连蛋白的分解。HTRA1抑制肽的终浓度是0-25 μM,HTRA1 (cat)的终浓度是1 μM,且人玻连蛋白的终浓度是1 μM。对于蛋白质印迹分析,使用人玻连蛋白抗体(R&D Systems, Inc.; MAB2349)作为第一抗体,并使用抗-小鼠IgG、HRP-连接的完整Ab绵羊(GE Healthcare; NA931)作为第二抗体。

[0438] 如在(3-1)中,当使用人玻连蛋白作为底物时,HTRA1抑制肽也强烈地表现出HTRA1(cat)的抑制(图4)。

[0439] (3-3)评价HTRA1抑制肽的特异性

[0440] 使用底物肽的切割作为指标评价了对其它蛋白酶的特异性。以与在(3-1)中所述的方法相同的方式,将用测定缓冲液稀释的每种蛋白酶和每种样品(终浓度: 1 μM)各在25 μL混合,并在37℃反应20分钟。然后,向其中加入50 μL用测定缓冲液稀释的每种底物。使用Enspire (PerkinElmer, Inc.)测量荧光信号(在380 nm激发/在460 nm发射)。在HTRA2活性的评价中使用与在实施例2中相同的测定缓冲液(50 mM硼酸盐和150 mM NaCl, pH 8.5)。在除了HTRA2活性以外的蛋白酶活性的评价中使用测定缓冲液(50 mM Tris和150 mM NaCl, pH 8.0)。在所述反应和所述测量中使用PROTEOSAVE(R) SS96F黑色平板(Sumitomo Bakelite Co., Ltd.)。在特异性评价中使用的蛋白酶和底物的组合如下。

[0441] 牛胰蛋白酶抑制活性评价; 5 nM (终浓度)胰蛋白酶(Pierce; 20233)和100 μM (终浓度)底物肽Boc-VPR-AMC发荧光肽底物(R&D Systems, Inc.; ES011)

[0442] 牛α-糜蛋白酶抑制活性评价; 10 nM (终浓度)糜蛋白酶(Worthington Biochemical Corporation; LS001434)和100 μM (终浓度)底物肽Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA (Peptide Institute, Inc.; 3120-v)

[0443] 人类胰蛋白酶抑制活性评价; 1 nM (终浓度)类胰蛋白酶(Sigma-Aldrich Co. LLC; T7063)和100 μM (终浓度)底物肽Boc-Phe-Ser-Arg-MCA (Peptide Institute, Inc.; 3107-v)

[0444] 人胃促胰酶抑制活性评价; 100 nM (终浓度)胃促胰酶(Sigma-Aldrich Co. LLC; C8118)和100 μM (终浓度)底物肽Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA (Peptide Institute, Inc.; 3120-v)

[0445] 人纤溶酶抑制活性评价; 50 nM (终浓度)纤溶酶(Sigma-Aldrich Co. LLC; P1867)和100 μM (终浓度)底物肽Boc-Val-Leu-Lys-MCA (Peptide Institute, Inc.; 3104-v)

[0446] 人凝血酶抑制活性评价; 1 nM (终浓度)凝血酶(Sigma-Aldrich Co. LLC; T6884)和100 μM (终浓度)底物肽Boc-VPR-AMC发荧光肽底物(R&D Systems, Inc.; ES011)

[0447] 人蛋白裂解酶抑制活性评价; 1 nM (终浓度) 蛋白裂解酶 (R&D Systems, Inc.; E3946-SE)和100 μM (终浓度)底物肽Boc-QAR-AMC发荧光肽底物(R&D Systems, Inc.; ES014)

[0448] 人蛋白C抑制活性评价; 100 nM (终浓度)蛋白C (Sigma-Aldrich Co. LLC; P2200)和100 μM (终浓度)底物肽Boc-Leu-Ser-Thr-Arg-MCA (Peptide Institute, Inc.; 3112-v)

[0449] 人tPA抑制活性评价; 10 nM (终浓度) tPA (Sigma-Aldrich Co. LLC; T0831)和100 μM (终浓度)底物肽Pyr-Gly-Arg-MCA (Peptide Institute, Inc.; 3145-v)

[0450] 人uPA抑制活性评价; 10 nM (终浓度) uPA (Sigma-Aldrich Co. LLC; T0831)和100 μM (终浓度)底物肽Pyr-Gly-Arg-MCA (Peptide Institute, Inc.; 3145-v)

[0451] 人血浆激肽释放酶抑制活性评价; 0.125 μg/ml (终浓度)血浆激肽释放酶(Sigma-Aldrich Co. LLC; T0831)和100 μM (终浓度)底物肽Z-Phe-Arg-MCA (Peptide Institute, Inc.; 3095-v)

[0452] 人HTRA2抑制活性评价; 200 nM (终浓度) HTRA2 (R&D Systems, Inc.; 1458-HT)和50 μM (终浓度)底物肽H2-Opt (Peptide Institute, Inc.)

[0453] 以与在(3-2)中相同的方式使用肽底物的分解作为指标评价与除了HTRA1以外的蛋白酶的交叉反应性。每种HTRA1抑制肽在1 μM的最终抑制剂浓度没有遏制所述蛋白酶中的任一种的蛋白酶活性,从而指示HTRA1抑制肽具有HTRA1-特异性的抑制作用(图5)。

[0454] 实施例4. 使用X-射线晶体结构分析HTRA1抑制肽

[0455] (4-1) HTRA1 (cat)/HTRA1抑制肽复合物的制备

[0456] 根据在(1-2)和(2-1)中描述的方法,分别制备HTRA1 (cat)和具有在SEQ ID NO: 3中所示的氨基酸序列的HTRA1抑制肽。将这些在20 mM Tris-HCl和150 mM NaCl(pH 7.6)

的条件下混合。然后,将复合物分离并通过凝胶过滤色谱法(Superdex 200 10/300 GL)纯化。

[0457] (4-2) X-射线晶体学

[0458] 将在(4-1)中制备的复合物溶液浓缩至18 mg/ml,并然后与蓄池溶液(1.0 M LiCl, 7.5%PEG6000,和0.1 M Tris/HCl (pH 8.5))以1:1比率混合,并将混合物通过蒸汽扩散方法结晶。将得到的立方体单晶浸入含有20%乙二醇的蓄池溶液中并然后在液氮中冷冻。将冷冻的晶体在低温气流下暴露于X-射线以得到衍射图像(光子工厂BL5A: High Energy Accelerator Research Organization)。通过使用HKL2000的分析得到具有2.6埃的最大分辨率的定标数据。使用丝氨酸蛋白酶HTRA1 (PDB ID: 3NZI)作为模板,通过分子替换方法确定相。在结构精化以后,在2.6埃的分辨率确定HTRA1 (cat)和肽的结晶复合物。HTRA1和SPINK2分子中的每一个被包含在晶胞中。关于SPINK2分子,基于序列信息和观察到的电子密度构建含有与HTRA1 (cat)的相互作用位点的部分分子模型。证实HTRA1抑制肽结合含有HTRA1酶的活性中心的区域(图6和7)。

[0459] 实施例5. 在通过光暴露诱导的视网膜损伤的大鼠模型中通过HTRA1的抑制实现的视网膜保护作用

[0460] (5-1) 通过光暴露诱导的视网膜损伤的大鼠模型的制备

[0461] 通过光暴露诱导的视网膜损伤的大鼠模型是通过光暴露诱导视网膜感光细胞的细胞死亡的模型,并被普遍用作视网膜变性的模型动物(Daniel T. Organisciak等人,(1996) Invest Ophthalmol Vis Sci. 第37卷(第11期): 第2243-2257页)。将0.5%(W/V)托吡卡胺-0.5%盐酸去氧肾上腺素眼溶液在暗适应下经眼滴给适应黑暗72小时的大鼠。然后,将大鼠暴露于5500 Lux的白光3小时。使如此暴露的大鼠再次适应黑暗约24小时,并然后在普通饲养的光照-黑暗条件下饲养2天。安乐死以后,将眼球切离并通过浸入3.7%(W/V)甲醛-0.5-1%(W/V)甲醇-0.2%(W/V)苦味酸固定剂中24小时或更久中进行固定。石蜡包埋以后,制备薄切片。将切片用苏木精-曙红染色,并确定在视网膜的横截面处外核层中的核计数以评价视网膜损伤。发现通过光暴露诱导的视网膜损伤的大鼠模型具有由光暴露引起的外核层中的核计数的显著减少。

[0462] (5-2) 在视网膜损伤时细胞外HTRA1的表达的证实

[0463] 为了检查HTRA1在通过光暴露诱导的视网膜损伤的大鼠模型中的参与,从在(5-1)中制备的模型大鼠收集玻璃体液并通过蛋白质印迹分析评价HTRA1表达水平。对玻璃体液进行在还原条件下的SDS-PAGE。使用第一抗体人HTRA1/PRSS11抗体(R&D Systems, Inc.; AF2916)和第二抗体绵羊IgG辣根过氧化物酶-缀合的抗体(R&D Systems, Inc.; HAF016)检测大鼠HTRA1。与非暴露组相比,在光暴露组中证实了在玻璃体液中增加的HTRA1的量,从而提示,在该模型中,HTRA1参与由光暴露造成的视网膜损伤的过程(图9)。

[0464] (5-3) HTRA1抑制肽在通过光暴露诱导的视网膜损伤的大鼠模型中的视网膜保护作用

[0465] 在即将大鼠光暴露之前,在麻醉下在玻璃体内施用5 μL的HTRA1抑制肽H308,其具有0.04 mg/mL或0.2 mg/mL的浓度。对于生理盐水施用组,n = 4,和对于其它组,n = 5。光暴露减少了生理盐水施用组中在视网膜的横截面处外核层的核计数,而在HTRA1抑制肽施用组中证实了抑制外核层的核计数减少的作用(图10)。这些结果证实,HTRA1抑制肽对由

HTRA1造成的组织损伤表现出治疗效果。

[0466] 实施例6. HTRA1抑制肽衍生物的评价

[0467] (6-1) pET 32a_HTRA1抑制肽H308_S16A_Kex2的构建

[0468] 用HTRA1抑制肽H308作为模板,制备具有这样的氨基酸序列的衍生物S16A:其中在SEQ ID NO: 9中所示的氨基酸序列(图21)中的16Ser被Ala置换。使用下述引物和KOD-plus- (Toyobo Co., Ltd.),

[0469] 引物12: 5'-CCGCAGTTTGGTCTGTTTAGCAAATATCGTACCCCGAATTGT-3'

[0470] 引物13: 5'-GCCATACCAGCATGGTCCGCACAATTCGGGGTACGATATTTGC-3'

[0471] 通过PCR ((94℃保持15秒、60℃保持30秒、和68℃保持15秒)×30个循环)扩增片段C。

[0472] 接着,使用下述引物和KOD-plus- (Toyobo Co., Ltd.),

[0473] 引物14: 5'-GCGGACCATGCTGGTATGGCATGTGTTGCTCTGTATGAAC-3'

[0474] 引物15: 5'-AAAACTCGAGTTAGCCGCCGCACGGACCATTGCGAATAA-3'

[0475] 用HTRA1抑制肽H308作为模板,通过PCR ((94℃保持15秒、60℃保持30秒、和68℃保持20秒)×30个循环)扩增片段D。

[0476] 使用片段C和D、下述引物和KOD-plus- (Toyobo Co., Ltd.),

[0477] 引物16: 5'-AAAAGGATCCCTGGACAAACGTGATCCGCAGTTTGGTCTGTTTAG-3'

[0478] 引物15

[0479] 通过PCR ((94℃保持15秒、60℃保持30秒、和68℃保持20秒)×30个循环)扩增期望的DNA片段。

[0480] 对扩增的片段进行琼脂糖凝胶电泳。然后,将期望的DNA片段从凝胶切离,并使用QIAquick凝胶提取试剂盒(Qiagen N.V.)制备DNA。将制备的DNA片段和pET 32a (Novagen)各自用限制酶BamHI (New England BioLabs Inc.)和XhoI (New England BioLabs Inc.)在37℃处理1小时或更久。琼脂糖凝胶电泳以后,将期望的DNA片段从凝胶切离并使用QIAquick PCR纯化试剂盒(Qiagen N.V.)纯化。使纯化的片段在16℃反应过夜用于使用T4 DNA连接酶(New England BioLabs Inc.)的连接反应。将连接溶液加给大肠杆菌JM109 (Toyobo Co., Ltd.),并将混合物在冰上静置30分钟,然后在42℃热处理45秒,进一步在冰上静置5分钟,并接种至含有0.1 mg/ml氨苄西林的2YT平板,随后在37℃静止培养过夜以转化大肠杆菌。培养经转化的大肠杆菌,并然后进行微制备和序列分析以构建"pET 32a_HTRA1抑制肽H308_S16A_Kex2"。根据在(1-1-1)中描述的方法执行所述操作。

[0481] (6-2) HTRA1抑制肽_N-端衍生物表达载体的制备

[0482] 为了制备HTRA1抑制肽的4种N-端序列衍生物(分别命名为D1G、D1S、D1E和D1SLI),它们具有这样的氨基酸序列:其中在SEQ ID NO: 9中所示的氨基酸序列(图21)中的1Asp被Gly、Ser、Glu或Ser-Leu-Ile置换,通过与在(6-1)中相同的方案构建表达载体。使用片段C和D、下述引物和KOD-plus- (Toyobo Co., Ltd.),

[0483] D1G制备引物

[0484] 引物17: 5'-AAAAGGATCCCTGGACAAACGTGGCCCGCAGTTTGGTCTGTTTAG-3'

[0485] 引物15

[0486] D1S制备引物

[0487] 引物18: 5'-AAAAGGATCCCTGGACAAACGTAGCCCGCAGTTTGGTCTGTTTAG-3'

[0488] 引物15

[0489] D1E制备引物

[0490] 引物19: 5'-AAAAGGATCCCTGGACAAACGTGAACCGCAGTTTGGTCTGTTTAG-3'

[0491] 引物15

[0492] D1SLI制备引物

[0493] 引物20: 5'-AAAAGGATCCCTGGACAAACGTAGCCTGATTCCGCAGTTTGGTCTGTTTAG-3'

[0494] 引物15

[0495] 通过PCR ((94℃保持15秒、60℃保持30秒、和68℃保持20秒)×30个循环)分别扩增四种目标片段。

[0496] 对四种扩增的片段中的每一种进行琼脂糖凝胶电泳。然后,将期望的DNA片段从凝胶切离,并使用QIAquick凝胶提取试剂盒(Qiagen N.V.)制备DNA。将制备的DNA片段和pET 32a (Novagen)各自用限制酶BamHI (New England BioLabs Inc.)和XhoI (New England BioLabs Inc.)在37℃处理1小时或更久。琼脂糖凝胶电泳以后,将期望的DNA片段从凝胶切离并使用QIAquick PCR纯化试剂盒(Qiagen N.V.)纯化。使纯化的片段在16℃反应过夜用于使用T4 DNA连接酶(New England BioLabs Inc.)的连接反应。将连接溶液加给大肠杆菌JM109 (Toyobo Co., Ltd.),并将混合物在冰上静置30分钟,然后在42℃热处理45秒,进一步在冰上静置5分钟,并接种至含有0.1 mg/ml氨苄西林的2YT平板,随后在37℃静止培养过夜以转化大肠杆菌。培养经转化的大肠杆菌,并然后进行微制备和序列分析以构建"pET 32a_HTRA1抑制肽H308_D1G_S16A_Kex2"、"pET 32a_HTRA1抑制肽H308_D1S_S16A_Kex2"、"pET 32a_HTRA1抑制肽H308_D1E_S16A_Kex2"和"pET 32a_HTRA1抑制肽H308_D1SLI_S16A_Kex2"。根据在(1-1-1)中描述的方法执行所述操作。

[0497] (6-3) HTRA1抑制肽衍生物的制备

[0498] 将大肠杆菌Origami B (DE3) (Novagen)用在(6-1)和(6-2)中构建的五种载体中的每一种转化,并使用含有0.1 mg/ml氨苄西林的2YT培养基在37℃培养。然后,向其中加入IPTG (终浓度: 1 mM),并将大肠杆菌在16℃培养过夜。次日,通过离心(3,000 g, 20 min, 4℃)收获以后,使用BugBuster Master Mix (Novagen)制备裂解物,并使用TALON金属亲和树脂(Clontech Laboratories, Inc.)纯化目标His标签融合蛋白。接着,使用Kex2 (上述)切割硫氧还蛋白标签和期望的蛋白,并使用TALON纯化。将所得物进行凝胶过滤色谱法(Superdex 75 10/300 GL)或反相色谱法(YMC-Pack ODS-AM)以制备5种HTRA1抑制肽衍生物。衍生物的氨基酸序列显示在SEQ ID NO: 23-27 (图35-39)中。

[0499] (6-4) HTRA1抑制肽衍生物的评价

[0500] 作为根据在(3-1)中描述的方法测量HTRA1 (cat)抑制活性的结果,所有衍生物具有与H308的抑制活性等同的抑制活性(图11)。

[0501] 实施例7. 针对HTRA1 (cat)的结合活性评价HTRA1抑制肽

[0502] 使用在实施例(1-2)中制备的3种HTRA1抑制肽(H308、H321AT和H322AT)和在(2-1)中制备的HTRA1 (cat),通过免疫沉淀方法评价了结合活性。使2.5 μg每种HTRA1抑制肽和10 μg HTRA1 (cat)在室温反应30分钟。然后,向其中加入10 μL TALON金属亲和树脂(Clontech Laboratories, Inc.)。进一步反应30分钟以后,将树脂回收为免疫沉淀(IP)级

分并进行SDS-PAGE以评价结合活性。将PBS用作反应中的缓冲液。

[0503] 当3种HTRA1抑制肽中的每一种或HTRA1 (cat)与TALON反应时,仅His标签融合的HTRA1 (cat)的带在输入泳道中检测到。另一方面,每种抑制肽和酶的带仅在IP泳道(在此处抑制肽与HTRA1 (cat)反应)中检测到。因此,证实了3种HTRA1抑制肽中的每一种结合HTRA1 (cat)。

[0504] 实施例8. 评价HTRA1抑制肽的HTRA1抑制活性

[0505] (8-1)使用肽底物评价HTRA1抑制肽的HTRA1抑制活性

[0506] 使用底物肽H2-Opt针对它们的HTRA1 (cat)或HTRA1 (全)抑制活性评价了在实施例6中构建的3种HTRA1抑制肽(H308_D1G_S16A、H321AT_D1G_S16A和H322AT_D1G_S16A) (n = 3)。将底物肽H2-Opt (Mca-IRRVSYSFK(Dnp)K) (Peptide Institute, Inc.: SEQ ID NO: 54, 图8)以10 mM溶解在DMSO中,用测定缓冲液(50 mM Tris, 150 mM NaCl,和0.25% CHAPS, pH 8.0)稀释,并在10 μM的终浓度使用。将用测定缓冲液稀释的HTRA1 (HTRA1 (cat)或HTRA1 (全);实施例2)和每种HTRA1抑制肽各在25 μL混合,并在37℃反应20分钟。然后,向其中加入50 μL用测定缓冲液稀释的底物。使用Enspire (PerkinElmer, Inc.)测量荧光信号(在328 nm激发/在393 nm发射)。HTRA1的终浓度是100 nM,且HTRA1抑制肽的终浓度是1.875-1,000 nM。在所述反应和所述测量中使用PROTEOSAVE(R) SS96F黑色平板(Sumitomo Bakelite Co., Ltd.)。

[0507] 计算在每种浓度的HTRA1抑制肽的底物肽分解速率。当将在0 nM的抑制剂浓度的分解速率定义为100%时,评价了每种HTRA1抑制肽的HTRA1 (cat)和HTRA1 (全)抑制活性。

[0508] 作为使用GraphPad Prism (5.0版; GraphPad Software Inc.)计算50%抑制浓度(IC50)的结果,发现所有的HTRA1抑制肽在低浓度抑制HTRA1 (cat)和HTRA1 (全)酶活性(图66)。

[0509] HTRA1抑制肽的HTRA1抑制活性

[表2]

[0510]

	HTRA1 (cat)的IC50 (nM)	HTRA1 (全)的IC50 (nM)
H308_D1G_S16A	7.9±1.3	9.1±1.4
H321AT_D1G_S16A	9.0±0.6	12.0±1.9
H322AT_D1G_S16A	12.9±0.2	12.2±2.2

[0511] (8-2)使用蛋白底物评价HTRA1抑制肽的HTRA1抑制活性

[0512] 用人玻连蛋白作为蛋白底物评价了HTRA1抑制肽的HTRA1抑制活性。操作遵循实施例(3-2)。

[0513] 如在(8-1)中,当将人玻连蛋白用作底物时,HTRA1抑制肽也强烈地表现出HTRA1(cat)的抑制(图67)。

[0514] (8-3)评价HTRA1抑制肽的特异性

[0515] 使用底物肽的切割作为指标评价了对其它蛋白酶的特异性。关于牛胰蛋白酶、牛α-糜蛋白酶、蛋白C、类胰蛋白酶、胃促胰酶、凝血酶、纤溶酶、tPA、血浆激肽释放酶、蛋白裂

解酶、uPA和HTRA2的操作遵循在实施例(3-3)中描述的方法(n = 3)。测量对其它蛋白酶的抑制活性以及蛋白酶和底物的组合的操作如下。

[0516] 在反应和测量中使用PROTEOSAVE(R) SS96F黑色平板(Sumitomo Bakelite Co., Ltd.)。将用测定缓冲液稀释的每种蛋白酶和每种样品(终浓度: 1 μM)各在25 μL混合并在37℃反应20分钟。然后,向其中加入50 μL用测定缓冲液稀释的每种底物。使用Enspire(PerkinElmer, Inc.)测量荧光信号。

[0517] 人胰蛋白酶抑制活性评价; 1 nM (终浓度)胰蛋白酶(Sigma-Aldrich Co. LLC; T6424)和100 μM (终浓度)底物肽Boc-VPR-AMC发荧光肽底物(R&D Systems, Inc.; ES011), 荧光信号: 在380 nm激发/在460 nm发射。

[0518] 人糜蛋白酶抑制活性评价; 10 nM (终浓度)糜蛋白酶(Sigma-Aldrich Co. LLC; C8946)和10 μM (终浓度)底物肽Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA (Peptide Institute, Inc.; 3120-v), 荧光信号: 在380 nm激发/在460 nm发射。

[0519] 人因子XIIa抑制活性评价; 100 nM (终浓度) Factor Alpha-XIIa (酶Research Laboratories Inc.)和100 μM (终浓度)底物肽Pyr-Gly-Arg-MCA (Peptide Institute, Inc.; 3145-v), 荧光信号: 在380 nm激发/在460 nm发射。

[0520] 人MMP-2抑制活性评价; 1 nM (终浓度)类胰蛋白酶(Calbiochem; PF023)和100 μM (终浓度)底物肽MOCAx-KPLGL-A2pr(Dnp)-AR (Peptide Institute, Inc.; 3226-v), 荧光信号: 在328 nm激发/在393 nm发射。

[0521] 人TPP1抑制活性评价; 0.5 μg/mL (终浓度) TPP1 (Calbiochem; 2237-SE)和200 μM (终浓度)底物肽AAF-MCA (Peptide Institute, Inc.; 3201-v), 荧光信号: 在380 nm激发/在460 nm发射。

[0522] 使用肽底物的分解作为指标,评价了与HTRA1以外的蛋白酶的交叉反应性。每种HTRA1抑制肽在1 μM的终浓度没有遏制所述蛋白酶中的任一种的蛋白酶活性,从而指示HTRA1抑制肽具有HTRA1-特异性的抑制作用(图68)。

[0523] 实施例9. 评价HTRA1抑制肽对HTRA1 (cat)的结合活性

[0524] 使用在实施例6中制备的3种HTRA1抑制肽和在(2-1)中制备的HTRA1 (cat),根据实施例7的操作通过免疫沉淀方法评价了结合活性。

[0525] 当3种HTRA1抑制肽中的每一种或HTRA1 (cat)与TALON反应时,仅His标签融合的HTRA1 (cat)的带在输入泳道中检测到。另一方面,每种抑制肽和酶的带仅在IP泳道(在此处抑制肽与HTRA1 (cat)反应)中检测到。因此,证实了3种HTRA1抑制肽中的每一种结合HTRA1 (cat) (图69)。

[0526] 实施例10. 在通过光暴露诱导的视网膜损伤的大鼠模型中通过HTRA1的抑制实现的视网膜保护作用(部分2)

[0527] 使用在实施例(5-1)中构建的通过光暴露诱导的视网膜损伤的大鼠模型,评价了在实施例6中制备的3种HTRA1抑制肽的视网膜保护作用。操作遵循实施例5。对于所有组,n = 6。

[0528] 在病理学上评价视网膜的结果显示在图70中。3种HTRA1抑制肽表现出关于光暴露造成的外核层中的核计数减少的显著抑制作用。

[0529] 实施例11. 在通过负载含有氢醌的高脂肪饮食造成的视网膜损伤的兔模型中

HTRA1的抑制对视网膜色素上皮细胞的保护作用

[0530] (11-1)通过负载含有氢醌的高脂肪饮食制备兔视网膜损伤模型

[0531] 使用高脂肪饮食(HFD)和氢醌(HQ)制备的视网膜损伤模型是其中用促氧化剂诱导氧化性应激以造成视网膜损伤的模型。这些模型仅关于小鼠进行了报道(Diego G. Espinosa-Heidmann等人, (2006) Invest Ophthalmol Vis Sci., 第47卷(第2期): 第729-737页)。因此,将3-岁JW兔用含有1.5%(W/V)椰子油-0.25%(W/V)胆固醇-1.5%(W/V)花生油-2.4%(W/V)氢醌(HFD-HQ)的RC4 (Oriental Yeast Co., Ltd.)饮食饲喂4个月以构建兔视网膜损伤模型。安乐死以后,将眼球切离,并将眼的前段通过约5 mm的外部切口从角膜缘取出。进一步分离玻璃体。然后,通过在4%(W/V)低聚甲醛固定剂中浸渍24小时或更久,固定视网膜-脉络膜-巩膜。固定以后,将脉络膜分离并使用第一抗体ZO-1单克隆抗体(ZO1-1A12) (Thermo Fisher Scientific Inc.; 33-9100)和第二抗体鸡抗-小鼠IgG (H+L)交叉吸附的第二抗体Alexa Fluor 594 (Thermo Fisher Scientific Inc.; A-21201)进行免疫染色。在荧光显微镜(BZ-9000; Keyence Corp.)下观察染色的脉络膜。确定染色的视网膜色素上皮(RPE)细胞的面积以评价RPE细胞损伤。

[0532] 图71显示了12-周龄兔、3-岁兔和负载HFD-HQ的3-岁兔的RPE细胞的染色图像(图71(A))和RPE细胞的平均面积的图(图71(B))。证实了RPE细胞在3-岁兔中比在12-周龄兔中更过度生长,并被HFD-HQ负载进一步过度生长。证实了损伤出现在RPE细胞中。已经在年龄相关性黄斑变性患者的眼球中观察到类似的变化(Ding JD等人, (2011) Proc Natl Acad Sci U S A., 第108卷(第28期): 第279-87页)。

[0533] (11-2)在视网膜损伤时AMD相关因子C3表达水平的增加

[0534] 为了评价AMD相关因子的表达,分别从兔视网膜损伤模型的视网膜和RPE/脉络膜收集组织。使用RNeasy微型试剂盒(Qiagen N.V.)提取mRNA,并然后使用TaqMan Gene Expression Master Mix (Thermo Fisher Scientific Inc.)进行反转录反应。使用7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Inc.)通过TaqMan Gene Expression Assay (Oc03397832_g1和Oc03824857_g1; Thermo Fisher Scientific Inc.)定量地分析补体组分3 (C3)的mRNA水平和内部标准品β-肌动蛋白。对于3-岁兔,在n = 4进行分析,对于负载HFD-HQ的3-岁兔,n = 10。

[0535] 在视网膜中以及在RPE细胞和脉络膜中的C3表达水平显示在图71 (C)和(D)中。对于两种组织,证实了C3的表达水平在施用HFD-HQ的兔组中增加。

[0536] (11-3)在视网膜损伤时HTRA1蛋白水平的增加

[0537] 为了检查HTRA1在兔视网膜损伤模型中的参与,从在(11-1)中制备的模型兔收集玻璃体液,并用胰蛋白酶/Lys-C Mix (Promega Corp.)酶促地消化。然后,使用LC (EASY-nLC 1000; Thermo Fisher Scientific Inc.)-MS (TripleTOF 6600; AB Sciex Pte. Ltd)定量HTRA1的肽片段。发现HTRA1蛋白水平在施用HFD-HQ的兔的玻璃体液中增加(图71(E))。从这些结果,证实了RPE细胞的过度生长和增加的AMD相关因子C3和HTRA1的表达,从而指示兔视网膜损伤模型可用于研究年龄相关的视网膜疾病。

[0538] (11-4) HTRA1抑制剂在兔视网膜损伤模型中的视网膜保护作用

[0539] 使用兔模型评价了在实施例1中制备的HTRA1抑制肽H308的视网膜保护作用。从饲喂HFD-HQ开始2个月以后,在麻醉下将50 μL的40 mg/mL H308溶液玻璃体内地施用至一只

眼。将生理盐水玻璃体内地施用至对侧眼。对于所有组,n = 5。

[0540] 从饲喂开始4个月以后,评价模型动物中的RPE细胞过度生长。结果显示在图72中。HTRA1抑制剂表现出对RPE细胞的过度生长的抑制作用,如从以下两种指标所见:即,RPE细胞的平均面积(图72(A))和具有1500 μm^2或更大的细胞面积的过度生长RPE细胞的数目(图72(B))。如在图71(E)中所示,在模型的玻璃体液中证实了HTRA1的增加,从而提示HTRA1在由HFD-HQ引起的RPE细胞损伤过程中的参与。因而,HTRA1抑制肽可用作抗-年龄相关性黄斑变性药剂。该测试指示HTRA1抑制肽可用于具体地预防干性年龄相关性黄斑变性。

[0541] 在施用HTRA1抑制肽的正常兔的视网膜中证实了HTRA1抑制肽的存在,从而指示HTRA1抑制肽的高组织穿透。

[0542] 实施例12. HTRA1抑制肽在使用人视网膜色素上皮细胞ARPE-19的VEGF mRNA诱导测试中的遏制作用

[0543] 使用含有10%胎牛血清(FBS)和青霉素-链霉素(Thermo Fisher Scientific Inc.)的DMEM/F-12培养基(Wako Pure Chemical Industries, Ltd.),在37℃和5%CO_2的条件下在具有0.4μm Pore Polyester Membrane Insert, Sterile (Corning Inc.)的12 mm Transwell中培养ARPE-19细胞至汇合。然后,将细胞在无FBS的DMEM/F-12中培养5天。将H_2O_2(终浓度: 500 μM)加入腔室的上层和下层,并将正常人血清补体(Quidel Corp.) (终浓度: 25%)加入腔室的上层。将HTRA1 (实施例2-2)、无活性的HTRA1蛋白酶突变体HTRA1(S328A) (实施例2-3)或HTRA1抑制肽H308_D1G_S16A (实施例6)各自在1 μM的终浓度进一步加入腔室的上层和下层。4小时以后,除去培养物上清液,并将细胞用PBS洗涤。然后,使用SuperPrep(TM) Cell Lysis & RT Kit for qPCR (Toyobo Co., Ltd.)提取mRNA并进行反转录反应。使用7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Inc.)通过TaqMan Gene Expression Assays (Hs000900055_m1和Hs02786624_g1; Thermo Fisher Scientific Inc.)定量地分析VEGF的mRNA水平。在mRNA水平的校正中使用GAPDH。

[0544] 结果显示在图74中。与包含加入H_2O_2、正常人血清补体和无活性HTRA1突变体HTRA1(S328A)的条件相比,H_2O_2、正常人血清补体和HTRA1的加入显著地增加了VEGF的mRNA水平。证实了HTRA1抑制肽H308_D1G_S16A的共同加入会遏制VEGF的表达。据报道,来自视网膜色素上皮细胞的VEGF诱导对于湿性年龄相关性黄斑变性的发病机制是重要的(Klettner A.等人, (2009) Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol., 第247卷: 第1487-1492页)。另外,考虑这样的病态VEGF诱导不仅参与发病机制而且参与病理学状况的维持。因而,本发明的肽诸如HTRA1抑制肽H308_D1G_S16A的施用对于湿性年龄相关性黄斑变性的预防和治疗是有效的。

[0545] 实施例13. HTRA1抑制肽H308_D1G_S16A对人脐静脉内皮细胞(HUVEC)迁移的遏制作用

[0546] (13-1) HUVEC迁移测试

[0547] 将HUVEC (Kurabo Industries Ltd.)在培养基(含有0.1%BSA的无血清EGM)中在37℃和5%CO_2的条件下培养18小时,其中给含有0.1%BSA的EBM(TM)-2基础培养基(Lonza Walkersville, Inc.)补充除了血清和VEGF以外的EGM(TM)-2 SingleQuots(TM)添加因子集合。然后,用含有0.1%BSA的无血清EGM将细胞调至4×10^5个细胞/mL。将4×10^5个细胞/mL的HUVEC混悬液以50 μL/孔加入Corning FluoroBlok HTS 96 Well Multiwell Permeable

Support System(其含有具有明胶包被的膜的3.0 μm高密度PET膜(Corning Inc.))的腔室的上层。然后,将下面描述的每种样品(培养基1、2或3)以210 μL/孔加入腔室的下层(n = 3)。将含有0.1%BSA的无血清EGM以50 μL/孔加入腔室的上层,不加入HUVEC,并将含有0.1%BSA的无血清EGM以210 μL/孔加入腔室的下层(n = 3)。

[0548] 培养基1;含有0.1%BSA的无血清EGM

[0549] 培养基2;补充了所有EGM(TM)-2 SingleQuots(TM)添加因子的EBM(TM)-2培养基(EGM生长培养基)

[0550] 培养基3;含有300 nM H308_D1G_S16A的EGM生长培养基

[0551] 将补充了细胞和样品的FluoroBlok HTS 96 Well Multiwell Support System在37℃和5%CO_2的条件下温育2小时。将迁移至下层的HUVEC用PBS洗涤,并然后用含有0.1%BSA的无血清EGM(其含有4 μg/mL钙黄绿素-AM (Thermo Fisher Scientific Inc.))染色15分钟。然后,用PBS替换培养基。使用平板读数器(ARVO-MX, PerkinElmer, Inc.)测量每个孔的荧光强度(激发波长/荧光波长:485 nm/535 nm),并根据下述表达式为每个孔计数迁移的细胞。

[0552] 迁移的细胞= 含有HUVEC的孔的平均荧光强度(n = 3) -空白孔的平均荧光强度(n = 3).

[0553] 结果显示在图75中。证实了HTRA1抑制肽H308_D1G_S16A对在含血清的培养基中诱导的HUVEC的迁移具有抑制作用。因此,发现本发明的肽表现出对血管生成(湿性年龄相关性黄斑变性的一个特征)的抑制作用。

[0554] 实施例14. HTRA1抑制肽在兔视网膜损伤模型中的视网膜保护作用(部分2)

[0555] 使用在实施例(11-1)至(11-3)中制备和评价的兔视网膜损伤模型,针对它对视网膜损伤的治疗效果评价了在实施例1中制备的HTRA1抑制肽H308或在实施例6中制备的3种HTRA1抑制肽之一。在麻醉下将50 μL的40 mg/mL抑制肽溶液玻璃体内地施用至每只模型动物的一只眼,并将动物饲养2个月。将生理盐水玻璃体内地施用至对侧眼。对于所有组,n = 5。

[0556] 在生理盐水施用组中会发现RPE细胞面积的增加或RPE细胞计数的增加,而在HTRA1抑制肽施用组中会抑制RPE细胞面积的增加或RPE细胞计数的增加。因而,可以证实HTRA1抑制肽可用作抗-年龄相关性黄斑变性药剂。在该实施例中,可以证实HTRA1抑制肽可用于具体地治疗干性年龄相关性黄斑变性。

[0557] 工业适用性

[0558] 本发明提供的肽和包含所述肽的药物组合物可用于年龄相关性黄斑变性等的治疗或预防等。

[0559] 序列表自由正文

[0560] SEQ ID NO: 1 -人SPINK2 (图13)的氨基酸序列

[0561] SEQ ID NO: 2 - 编码人SPINK2的氨基酸序列的核苷酸序列(图14)

[0562] SEQ ID NO: 3 - 肽H218的氨基酸序列(图15)

[0563] SEQ ID NO: 4 - 编码肽H218的氨基酸序列的核苷酸序列(图16)

[0564] SEQ ID NO: 5 - 肽H223的氨基酸序列(图17)

[0565] SEQ ID NO: 6 - 编码肽H223的氨基酸序列的核苷酸序列(图18)

[0566] SEQ ID NO: 7 - 肽H228的氨基酸序列(图19)

[0567] SEQ ID NO: 8 - 编码肽H228的氨基酸序列的核苷酸序列(图20)

[0568] SEQ ID NO: 9 - 肽H308的氨基酸序列(图21)

[0569] SEQ ID NO: 10 - 编码肽H308的氨基酸序列的核苷酸序列(图22)

[0570] SEQ ID NO: 11 - 肽H321的氨基酸序列(图23)

[0571] SEQ ID NO: 12 - 编码肽H321的氨基酸序列的核苷酸序列(图24)

[0572] SEQ ID NO: 13 - 肽H322的氨基酸序列(图25)

[0573] SEQ ID NO: 14 - 编码肽H322的氨基酸序列的核苷酸序列(图26)

[0574] SEQ ID NO: 15 - 肽衍生物H308AT的氨基酸序列(图27)

[0575] SEQ ID NO: 16 - 编码肽衍生物H308AT的氨基酸序列的核苷酸序列(图28)

[0576] SEQ ID NO: 17 - 肽衍生物H321AT的氨基酸序列(图29)

[0577] SEQ ID NO: 18 -编码肽衍生物H321AT的氨基酸序列的核苷酸序列(图30)

[0578] SEQ ID NO: 19 - 肽衍生物H322AT的氨基酸序列(图31)

[0579] SEQ ID NO: 20 - 编码肽衍生物H322AT的氨基酸序列的核苷酸序列(图32)

[0580] SEQ ID NO: 21 - 肽M7的氨基酸序列(图33)

[0581] SEQ ID NO: 22 - 编码肽M7的氨基酸序列的核苷酸序列(图34)

[0582] SEQ ID NO: 23 - 肽衍生物H308_S16A的氨基酸序列(图35)

[0583] SEQ ID NO: 24 - 肽衍生物H308_D1G_S16A的氨基酸序列(图36)

[0584] SEQ ID NO: 25 - 肽衍生物H308_D1S_S16A的氨基酸序列(图37)

[0585] SEQ ID NO: 26 - 肽衍生物H308_D1E_S16A的氨基酸序列(图38)

[0586] SEQ ID NO: 27 - 肽衍生物H308_D1SLI_S16A的氨基酸序列(图39)

[0587] SEQ ID NO: 28 - 肽衍生物H321AT_D1G_S16A的氨基酸序列(图40)

[0588] SEQ ID NO: 29 - 肽衍生物H322AT_D1G_S16A的氨基酸序列(图41)

[0589] SEQ ID NO: 30 - HTRA1抑制肽的通式(图42)

[0590] SEQ ID NO: 31-由S标签和接头组成的氨基酸序列(图43)

[0591] SEQ ID NO: 32 - C-端六聚体的氨基酸序列(图44)

[0592] SEQ ID NO: 33 - 引物1的核苷酸序列(图45)

[0593] SEQ ID NO: 34 - 引物2的核苷酸序列(图46)

[0594] SEQ ID NO: 35 - 引物3的核苷酸序列(图47)

[0595] SEQ ID NO: 36 - 引物4的核苷酸序列(图48)

[0596] SEQ ID NO: 37 - 引物5的核苷酸序列(图49)

[0597] SEQ ID NO: 38 - 引物6的核苷酸序列(图50)

[0598] SEQ ID NO: 39 - 引物7的核苷酸序列(图51)

[0599] SEQ ID NO: 40 - 引物8的核苷酸序列(图52)

[0600] SEQ ID NO: 41 - 引物9的核苷酸序列(图53)

[0601] SEQ ID NO: 42 - 引物10的核苷酸序列(图54)

[0602] SEQ ID NO: 43 - 引物11的核苷酸序列(图55)

[0603] SEQ ID NO: 44 - 引物12的核苷酸序列(图56)

[0604] SEQ ID NO: 45 - 引物13的核苷酸序列(图57)

[0605] SEQ ID NO: 46 - 引物14的核苷酸序列(图58)

[0606] SEQ ID NO: 47 - 引物15的核苷酸序列(图59)

[0607] SEQ ID NO: 48 - 引物16的核苷酸序列(图60)

[0608] SEQ ID NO: 49 - 引物17的核苷酸序列(图61)

[0609] SEQ ID NO: 50 - 引物18的核苷酸序列(图62)

[0610] SEQ ID NO: 51 - 引物19的核苷酸序列(图63)

[0611] SEQ ID NO: 52 - 引物20的核苷酸序列(图64)

[0612] SEQ ID NO: 53 -人HTRA1 (全)的氨基酸序列(图65)

[0613] SEQ ID NO: 54 - H2-Opt的氨基酸序列(图8)

[0614] SEQ ID NO: 55 - 引物21的核苷酸序列(图76)

[0615] SEQ ID NO: 56 - 引物22的核苷酸序列(图77)。

序列表

<110> DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED

<120> 用于治疗年龄相关性黄斑变性的肽

<130> FP1726

<150> JP2016-249020
<151> 2016-12-22

<160> 56

<170> PatentIn 3.5版

<210> 1
<211> 63
<212> PRT
<213> 智人

<400> 1

Asp Pro Gln Phe Gly Leu Phe Ser Lys Tyr Arg Thr Pro Asn Cys Ser
1 5 10 15

Gln Tyr Arg Leu Pro Gly Cys Pro Arg His Phe Asn Pro Val Cys Gly
20 25 30

[0001]

Ser Asp Met Ser Thr Tyr Ala Asn Glu Cys Thr Leu Cys Met Lys Ile
35 40 45

Arg Glu Gly Gly His Asn Ile Lys Ile Ile Arg Asn Gly Pro Cys
50 55 60

<210> 2
<211> 192
<212> DNA
<213> 智人

<400> 2
gatccgcagt ttggtctgtt tagcaaatat cgtaccccga attgtagcca gtatcgtctg 60

cctggttgtc cgcgtcattt taatccggtt tgtggtagcg atatgagcac ctatgcaaat 120

gaatgtaccc tgtgcatgaa aattcgtgaa ggtggccata atattaaaat tattcgcaat 180

ggtccgtgct aa 192

<210> 3
<211> 65
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> 人工的

<400> 3

Asp Pro Gln Phe Gly Leu Phe Ser Lys Tyr Arg Thr Pro Asn Cys Leu
1 5 10 15

Lys Ser Glu Gly Met Ala Cys Tyr Ala Tyr Tyr Glu Pro Val Cys Gly
20 25 30

Ser Asp Met Ser Thr Tyr Ala Asn Glu Cys Thr Leu Cys Met Lys Ile
35 40 45

Arg Glu Gly Gly His Asn Ile Lys Ile Ile Arg Asn Gly Pro Cys Gly
50 55 60

Gly
65

[0002]

<210> 4
<211> 198
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工的

<400> 4
gatccgcagt ttggtctgtt tagcaaatat cgtaccccga attgtctgaa atctgaaggt 60

atggcttgtt acgcttacta cgaaccggtt tgtggtagcg atatgagcac ctatgcaaat 120

gaatgtaccc tgtgcatgaa aattcgtgaa ggtggccata atattaaaat tattcgcaat 180

ggtccgtgcg gcggctaa 198

<210> 5
<211> 65
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工的

<400> 5

Asp Pro Gln Phe Gly Leu Phe Ser Lys Tyr Arg Thr Pro Asn Cys Thr

1 5 10 15

Met Asp Met Gly Met Ala Cys Trp Ala Phe Tyr Glu Pro Val Cys Gly
20 25 30

Ser Asp Met Ser Thr Tyr Ala Asn Glu Cys Thr Leu Cys Met Lys Ile
35 40 45

Arg Glu Gly Gly His Asn Ile Lys Ile Ile Arg Asn Gly Pro Cys Gly
50 55 60

Gly
65

<210> 6
<211> 198
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工的

<400> 6

[0003] gatccgcagt ttggtctgtt tagcaaatat cgtaccccga attgtactat ggacatgggt 60

atggcttgtt gggctttcta cgaaccggtt tgtggtagcg atatgagcac ctatgcaaat 120

gaatgtaccc tgtgcatgaa aattcgtgaa ggtggccata atattaaaat tattcgcaat 180

ggtccgtgcg gcggctaa 198

<210> 7
<211> 65
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工的

<400> 7

Asp Pro Gln Phe Gly Leu Phe Ser Lys Tyr Arg Thr Pro Asn Cys Gly
1 5 10 15

His Tyr Asn Gly Trp Ala Cys Gln Ala Phe Phe Glu Pro Val Cys Gly
20 25 30

Ser Asp Met Ser Thr Tyr Ala Asn Glu Cys Thr Leu Cys Met Lys Ile

35 40 45

Arg Glu Gly Gly His Asn Ile Lys Ile Ile Arg Asn Gly Pro Cys Gly
50 55 60

Gly
65

<210> 8
<211> 198
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工的

<400> 8
gatccgcagt ttggtctgtt tagcaaatat cgtaccccga attgtggtca ttacaacggt 60

tgggcttgtc aggctttctt cgaaccggtt tgtggtagcg atatgagcac ctatgcaaat 120

gaatgtaccc tgtgcatgaa aattcgtgaa ggtggccata atattaaaat tattcgcaat 180

ggtccgtgcg gcggctaa 198

[0004]

<210> 9
<211> 65
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工的

<400> 9

Asp Pro Gln Phe Gly Leu Phe Ser Lys Tyr Arg Thr Pro Asn Cys Ser
1 5 10 15

Asp His Ala Gly Met Ala Cys Val Ala Leu Tyr Glu Pro Val Cys Gly
20 25 30

Ser Asp Met Ser Thr Tyr Glu Asn Glu Cys Val Leu Cys Met Lys Ile
35 40 45

Arg Glu Gly Gly His Asn Ile Lys Ile Ile Arg Asn Gly Pro Cys Gly
50 55 60

Gly

65

<210> 10
<211> 198
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工的

<400> 10
gatccgcagt ttggtctgtt tagcaaatat cgtaccccga attgtagcga ccatgctggt 60

atggcatgtg ttgctctgta tgaaccggtt tgtggtagcg atatgagcac ctatgaaaat 120

gaatgtgttc tgtgcatgaa aattcgtgaa ggtggccata atattaaaat tattcgcaat 180

ggtccgtgcg gcggctaa 198

<210> 11
<211> 65
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
[0005] <223> 人工的

<400> 11

Asp Pro Gln Phe Gly Leu Phe Ser Lys Tyr Arg Thr Pro Asn Cys Ser
1 5 10 15

Asp Phe Asp Gly Met Ala Cys Tyr Ala Phe Tyr Glu Pro Val Cys Gly
20 25 30

Ser Asp Met Ser Thr Tyr Met Asn Glu Cys Ala Leu Cys Met Lys Ile
35 40 45

Arg Glu Gly Gly His Asn Ile Lys Ile Ile Arg Asn Gly Pro Cys Gly
50 55 60

Gly
65

<210> 12
<211> 198
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工的

<400> 12
gatccgcagt ttggtctgtt tagcaaatat cgtaccccga attgtagcga cttcgacggt 60

atggcatgtt acgctttcta tgaaccggtt tgtggtagcg atatgagcac ctatatgaat 120

gaatgtgctc tgtgcatgaa aattcgtgaa ggtggccata atattaaaat tattcgcaat 180

ggtccgtgcg gcggctaa 198

<210> 13
<211> 65
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工的

<400> 13

Asp Pro Gln Phe Gly Leu Phe Ser Lys Tyr Arg Thr Pro Asn Cys Ser
1 5 10 15

[0006] Gln His Glu Gly Met Ala Cys Tyr Ala Leu Tyr Glu Pro Val Cys Gly
20 25 30

Ser Asp Met Ser Thr Tyr Val Asn Glu Cys Ala Leu Cys Met Lys Ile
35 40 45

Arg Glu Gly Gly His Asn Ile Lys Ile Ile Arg Asn Gly Pro Cys Gly
50 55 60

Gly
65

<210> 14
<211> 198
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工的

<400> 14
gatccgcagt ttggtctgtt tagcaaatat cgtaccccga attgtagcca gcatgaaggt 60

atggcatgtt acgctctgta tgaaccggtt tgtggtagcg atatgagcac ctatgttaat 120

gaatgtgctc tgtgcatgaa aattcgtgaa ggtggccata atattaaaat tattcgcaat 180

ggtccgtgcg gcggctaa 198

<210> 15
<211> 65
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工的

<400> 15

Asp Pro Gln Phe Gly Leu Phe Ser Lys Tyr Arg Thr Pro Asn Cys Ser
1 5 10 15

Asp His Ala Gly Met Ala Cys Val Ala Leu Tyr Glu Pro Val Cys Gly
20 25 30

Ser Asp Met Ser Thr Tyr Ala Asn Glu Cys Thr Leu Cys Met Lys Ile
35 40 45

[0007] Arg Glu Gly Gly His Asn Ile Lys Ile Ile Arg Asn Gly Pro Cys Gly
50 55 60

Gly
65

<210> 16
<211> 198
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工的

<400> 16
gatccgcagt ttggtctgtt tagcaaatat cgtaccccga attgtagcga ccatgctggt 60

atggcatgtg ttgctctgta tgaaccggtt tgtggtagcg atatgagcac ctatgcaaat 120

gaatgtaccc tgtgcatgaa aattcgtgaa ggtggccata atattaaaat tattcgcaat 180

ggtccgtgcg gcggctaa 198

<210> 17
<211> 65
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> 人工的

<400> 17

Asp Pro Gln Phe Gly Leu Phe Ser Lys Tyr Arg Thr Pro Asn Cys Ser
1 5 10 15

Asp Phe Asp Gly Met Ala Cys Tyr Ala Phe Tyr Glu Pro Val Cys Gly
20 25 30

Ser Asp Met Ser Thr Tyr Ala Asn Glu Cys Thr Leu Cys Met Lys Ile
35 40 45

Arg Glu Gly Gly His Asn Ile Lys Ile Ile Arg Asn Gly Pro Cys Gly
50 55 60

Gly
65

[0008]

<210> 18
<211> 198
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工的

<400> 18
gatccgcagt ttggtctgtt tagcaaatat cgtaccccga attgtagcga cttcgacggt 60

atggcatgtt acgctttcta tgaaccggtt tgtggtagcg atatgagcac ctatgcaaat 120

gaatgtaccc tgtgcatgaa aattcgtgaa ggtggccata atattaaaat tattcgcaat 180

ggtccgtgcg gcggctaa 198

<210> 19
<211> 65
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工的

<400> 19

Asp Pro Gln Phe Gly Leu Phe Ser Lys Tyr Arg Thr Pro Asn Cys Ser

1 5 10 15

Gln His Glu Gly Met Ala Cys Tyr Ala Leu Tyr Glu Pro Val Cys Gly
20 25 30

Ser Asp Met Ser Thr Tyr Ala Asn Glu Cys Thr Leu Cys Met Lys Ile
35 40 45

Arg Glu Gly Gly His Asn Ile Lys Ile Ile Arg Asn Gly Pro Cys Gly
50 55 60

Gly
65

<210> 20
<211> 198
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工的

[0009]

<400> 20
gatccgcagt ttggtctgtt tagcaaatat cgtaccccga attgtagcca gcatgaaggt 60

atggcatgtt acgctctgta tgaaccggtt tgtggtagcg atatgagcac ctatgcaaat 120

gaatgtaccc tgtgcatgaa aattcgtgaa ggtggccata atattaaaat tattcgcaat 180

ggtccgtgcg gcggctaa 198

<210> 21
<211> 65
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工的

<400> 21

Asp Pro Gln Phe Gly Leu Phe Ser Lys Tyr Arg Thr Pro Asn Cys Ser
1 5 10 15

Asp His Ala Gly Met Ala Cys Val Ala Phe Tyr Glu Pro Val Cys Gly
20 25 30

Ser Asp Met Ser Thr Tyr Ala Asn Glu Cys Thr Leu Cys Met Lys Ile

35 40 45

Arg Glu Gly Gly His Asn Ile Lys Ile Ile Arg Asn Gly Pro Cys Gly
50 55 60

Gly
65

<210> 22
<211> 198
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工的

<400> 22
gatccgcagt ttggtctgtt tagcaaatat cgtaccccga attgtagcga ccatgctggt 60

atggcatgtg ttgcttttta tgaaccggtt tgtggtagcg atatgagcac ctatgcaaat 120

gaatgtaccc tgtgcatgaa aattcgtgaa ggtggccata atattaaaat tattcgcaat 180

ggtccgtgcg gcggctaa 198

[0010]

<210> 23
<211> 65
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工的

<400> 23

Asp Pro Gln Phe Gly Leu Phe Ser Lys Tyr Arg Thr Pro Asn Cys Ala
1 5 10 15

Asp His Ala Gly Met Ala Cys Val Ala Leu Tyr Glu Pro Val Cys Gly
20 25 30

Ser Asp Met Ser Thr Tyr Glu Asn Glu Cys Val Leu Cys Met Lys Ile
35 40 45

Arg Glu Gly Gly His Asn Ile Lys Ile Ile Arg Asn Gly Pro Cys Gly
50 55 60

Gly

65

<210> 24
<211> 65
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工的

<400> 24

Gly Pro Gln Phe Gly Leu Phe Ser Lys Tyr Arg Thr Pro Asn Cys Ala
1 5 10 15

Asp His Ala Gly Met Ala Cys Val Ala Leu Tyr Glu Pro Val Cys Gly
20 25 30

Ser Asp Met Ser Thr Tyr Glu Asn Glu Cys Val Leu Cys Met Lys Ile
35 40 45

Arg Glu Gly Gly His Asn Ile Lys Ile Ile Arg Asn Gly Pro Cys Gly
50 55 60

[0011]

Gly
65

<210> 25
<211> 65
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工的

<400> 25

Ser Pro Gln Phe Gly Leu Phe Ser Lys Tyr Arg Thr Pro Asn Cys Ala
1 5 10 15

Asp His Ala Gly Met Ala Cys Val Ala Leu Tyr Glu Pro Val Cys Gly
20 25 30

Ser Asp Met Ser Thr Tyr Glu Asn Glu Cys Val Leu Cys Met Lys Ile
35 40 45

Arg Glu Gly Gly His Asn Ile Lys Ile Ile Arg Asn Gly Pro Cys Gly

50 55 60

Gly
65

<210> 26
<211> 65
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工的

<400> 26

Glu Pro Gln Phe Gly Leu Phe Ser Lys Tyr Arg Thr Pro Asn Cys Ala
1 5 10 15

Asp His Ala Gly Met Ala Cys Val Ala Leu Tyr Glu Pro Val Cys Gly
20 25 30

Ser Asp Met Ser Thr Tyr Glu Asn Glu Cys Val Leu Cys Met Lys Ile
35 40 45

[0012]

Arg Glu Gly Gly His Asn Ile Lys Ile Ile Arg Asn Gly Pro Cys Gly
50 55 60

Gly
65

<210> 27
<211> 67
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工的

<400> 27

Ser Leu Ile Pro Gln Phe Gly Leu Phe Ser Lys Tyr Arg Thr Pro Asn
1 5 10 15

Cys Ala Asp His Ala Gly Met Ala Cys Val Ala Leu Tyr Glu Pro Val
20 25 30

Cys Gly Ser Asp Met Ser Thr Tyr Glu Asn Glu Cys Val Leu Cys Met

35 40 45

Lys Ile Arg Glu Gly Gly His Asn Ile Lys Ile Ile Arg Asn Gly Pro
50 55 60

Cys Gly Gly
65

<210> 28
<211> 65
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工的

<400> 28

Gly Pro Gln Phe Gly Leu Phe Ser Lys Tyr Arg Thr Pro Asn Cys Ala
1 5 10 15

Asp Phe Asp Gly Met Ala Cys Tyr Ala Phe Tyr Glu Pro Val Cys Gly
20 25 30

[0013]

Ser Asp Met Ser Thr Tyr Ala Asn Glu Cys Thr Leu Cys Met Lys Ile
35 40 45

Arg Glu Gly Gly His Asn Ile Lys Ile Ile Arg Asn Gly Pro Cys Gly
50 55 60

Gly
65

<210> 29
<211> 65
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工的

<400> 29

Gly Pro Gln Phe Gly Leu Phe Ser Lys Tyr Arg Thr Pro Asn Cys Ala
1 5 10 15

Gln His Glu Gly Met Ala Cys Tyr Ala Leu Tyr Glu Pro Val Cys Gly

20 25 30

Ser Asp Met Ser Thr Tyr Ala Asn Glu Cys Thr Leu Cys Met Lys Ile
35 40 45

Arg Glu Gly Gly His Asn Ile Lys Ile Ile Arg Asn Gly Pro Cys Gly
50 55 60

Gly
65

<210> 30
<211> 63
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工的

[0014]

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> 任何氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (16)..(19)
<223> 任何氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (21)..(21)
<223> 任何氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (24)..(24)
<223> 任何氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (26)..(26)
<223> 任何氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (27)..(27)
<223> 任何氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE

<222> (39)..(39)
<223> 任何氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (43)..(43)
<223> 任何氨基酸

<400> 30

Xaa Pro Gln Phe Gly Leu Phe Ser Lys Tyr Arg Thr Pro Asn Cys Xaa
1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Gly Xaa Ala Cys Xaa Ala Xaa Xaa Glu Pro Val Cys Gly
20 25 30

Ser Asp Met Ser Thr Tyr Xaa Asn Glu Cys Xaa Leu Cys Met Lys Ile
35 40 45

Arg Glu Gly Gly His Asn Ile Lys Ile Ile Arg Asn Gly Pro Cys
50 55 60

<210> 31
[0015] <211> 39
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的肽

<400> 31

Gly Ser Gly Met Lys Glu Thr Ala Ala Ala Lys Phe Glu Arg Gln His
1 5 10 15

Met Asp Ser Pro Asp Leu Gly Thr Asp Asp Asp Asp Lys Ala Met Ala
20 25 30

Asp Ile Gly Ser Ala Asn Ser
35

<210> 32
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的肽

<400> 32

Gly Ala Ser Ala Ala Ala
1 5

<210> 33
<211> 34
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 33
aaaagaattc tgatccgcag tttggtctgt ttag 34

<210> 34
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 34
[0016] aaaactcgag ttatgcggcc gcagacgcgc cgcacggacc 40

<210> 35
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 35
aaaaggatcc ctggacaaac gtgatccgca gtttggtctg tttag 45

<210> 36
<211> 44
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 36
aaaactcgag ttagccgccg cacggaccat tgcgaataat ttta 44

<210> 37
<211> 34

〈212〉 DNA
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 引物

〈400〉 37
aaacatatgg ggcaggaaga tcccaacagt ttgc 34

〈210〉 38
〈211〉 33
〈212〉 DNA
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 引物

〈400〉 38
aaactcgagt ttggcctgtc ggtcatggga ctc 33

〈210〉 39
〈211〉 35
〈212〉 DNA
〈213〉 人工序列

[0017]

〈220〉
〈223〉 引物

〈400〉 39
aaaagaattc gccaccatgc agattcctag agccg 35

〈210〉 40
〈211〉 36
〈212〉 DNA
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 引物

〈400〉 40
aaaactcgag tcagtggtga tggtggtggt ggccgg 36

〈210〉 41
〈211〉 42
〈212〉 DNA
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 引物

〈400〉 41
cttgtcgtca tcgtccttgt agtcgccggg gtcgatttcc tc 42

〈210〉 42
〈211〉 44
〈212〉 DNA
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 引物

〈400〉 42
gcgactacaa ggacgatgac gacaagcacc accaccatca tcac 44

〈210〉 43
〈211〉 41
〈212〉 DNA
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 引物

〈400〉 43
aaaaactcga gctagtgatg atggtggtgg tgcttgtcgt c 41

[0018]

〈210〉 44
〈211〉 42
〈212〉 DNA
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 引物

〈400〉 44
ccgcagtttg gtctgtttag caaatatcgt accccgaatt gt 42

〈210〉 45
〈211〉 43
〈212〉 DNA
〈213〉 人工序列

〈220〉
〈223〉 引物

〈400〉 45
gccataccag catggtccgc acaattcggg gtacgatatt tgc 43

〈210〉 46
〈211〉 40
〈212〉 DNA
〈213〉 人工序列

〈400〉 46

gcggaccatg ctggtatggc atgtgttgct ctgtatgaac 40

<210> 47
<211> 39
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 47
aaaactcgag ttagccgccg cacggaccat tgcgaataa 39

<210> 48
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 48
aaaaggatcc ctggacaaac gtgatccgca gtttggtctg tttag 45

[0019]

<210> 49
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 49
aaaaggatcc ctggacaaac gtggcccgca gtttggtctg tttag 45

<210> 50
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 50
aaaaggatcc ctggacaaac gtagcccgca gtttggtctg tttag 45

<210> 51
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 51
aaaaggatcc ctggacaaac gtgaaccgca gtttggtctg tttag 45

<210> 52
<211> 51
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 52
aaaaggatcc ctggacaaac gtagcctgat tccgcagttt ggtctgttta g 51

<210> 53
<211> 458
<212> PRT
<213> 智人

<400> 53

[0020]

Gln Leu Ser Arg Ala Gly Arg Ser Ala Pro Leu Ala Ala Gly Cys Pro
1 5 10 15

Asp Arg Cys Glu Pro Ala Arg Cys Pro Pro Gln Pro Glu His Cys Glu
20 25 30

Gly Gly Arg Ala Arg Asp Ala Cys Gly Cys Cys Glu Val Cys Gly Ala
35 40 45

Pro Glu Gly Ala Ala Cys Gly Leu Gln Glu Gly Pro Cys Gly Glu Gly
50 55 60

Leu Gln Cys Val Val Pro Phe Gly Val Pro Ala Ser Ala Thr Val Arg
65 70 75 80

Arg Arg Ala Gln Ala Gly Leu Cys Val Cys Ala Ser Ser Glu Pro Val
85 90 95

Cys Gly Ser Asp Ala Asn Thr Tyr Ala Asn Leu Cys Gln Leu Arg Ala
100 105 110

Ala Ser Arg Arg Ser Glu Arg Leu His Arg Pro Pro Val Ile Val Leu
115 120 125

```
Gln Arg Gly Ala Cys Gly Gln Gly Gln Glu Asp Pro Asn Ser Leu Arg
    130                 135                 140

His Lys Tyr Asn Phe Ile Ala Asp Val Val Glu Lys Ile Ala Pro Ala
145                 150                 155                 160

Val Val His Ile Glu Leu Phe Arg Lys Leu Pro Phe Ser Lys Arg Glu
                165                 170                 175

Val Pro Val Ala Ser Gly Ser Gly Phe Ile Val Ser Glu Asp Gly Leu
            180                 185                 190

Ile Val Thr Asn Ala His Val Val Thr Asn Lys His Arg Val Lys Val
        195                 200                 205

Glu Leu Lys Asn Gly Ala Thr Tyr Glu Ala Lys Ile Lys Asp Val Asp
    210                 215                 220

Glu Lys Ala Asp Ile Ala Leu Ile Lys Ile Asp His Gln Gly Lys Leu
225                 230                 235                 240
```

[0021]

```
Pro Val Leu Leu Leu Gly Arg Ser Ser Glu Leu Arg Pro Gly Glu Phe
                245                 250                 255

Val Val Ala Ile Gly Ser Pro Phe Ser Leu Gln Asn Thr Val Thr Thr
            260                 265                 270

Gly Ile Val Ser Thr Thr Gln Arg Gly Gly Lys Glu Leu Gly Leu Arg
        275                 280                 285

Asn Ser Asp Met Asp Tyr Ile Gln Thr Asp Ala Ile Ile Asn Tyr Gly
    290                 295                 300

Asn Ser Gly Gly Pro Leu Val Asn Leu Asp Gly Glu Val Ile Gly Ile
305                 310                 315                 320

Asn Thr Leu Lys Val Thr Ala Gly Ile Ser Phe Ala Ile Pro Ser Asp
                325                 330                 335

Lys Ile Lys Lys Phe Leu Thr Glu Ser His Asp Arg Gln Ala Lys Gly
            340                 345                 350
```

```
Lys Ala Ile Thr Lys Lys Lys Tyr Ile Gly Ile Arg Met Met Ser Leu
        355                 360                 365

Thr Ser Ser Lys Ala Lys Glu Leu Lys Asp Arg His Arg Asp Phe Pro
    370                 375                 380

Asp Val Ile Ser Gly Ala Tyr Ile Ile Glu Val Ile Pro Asp Thr Pro
385                 390                 395                 400

Ala Glu Ala Gly Gly Leu Lys Glu Asn Asp Val Ile Ile Ser Ile Asn
                405                 410                 415

Gly Gln Ser Val Val Ser Ala Asn Asp Val Ser Asp Val Ile Lys Arg
            420                 425                 430

Glu Ser Thr Leu Asn Met Val Val Arg Arg Gly Asn Glu Asp Ile Met
        435                 440                 445

Ile Thr Val Ile Pro Glu Glu Ile Asp Pro
    450                 455
```

[0022]

```
<210>  54
<211>  10
<212>  PRT
<213>  人工序列

<220>
<223>  合成的肽


<220>
<221>  结合
<222>  (1)..(1)
<223>  N-(4-甲基香豆基-7-酰胺)-异亮氨酸

<220>
<221>  结合
<222>  (10)..(10)
<223>  Nε-(2,4-二硝基苯基)-赖氨酸

<400>  54

Xaa Arg Arg Val Ser Tyr Ser Phe Lys Xaa
1               5                   10


<210>  55
```

<211> 42
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 55
ccatcatcaa ctacggcaac gcgggcggac ccctcgtgaa cc 42

[0023]

<210> 56
<211> 42
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 56
ggttcacgag gggtccgccc gcgttgccgt agttgatgat gg 42

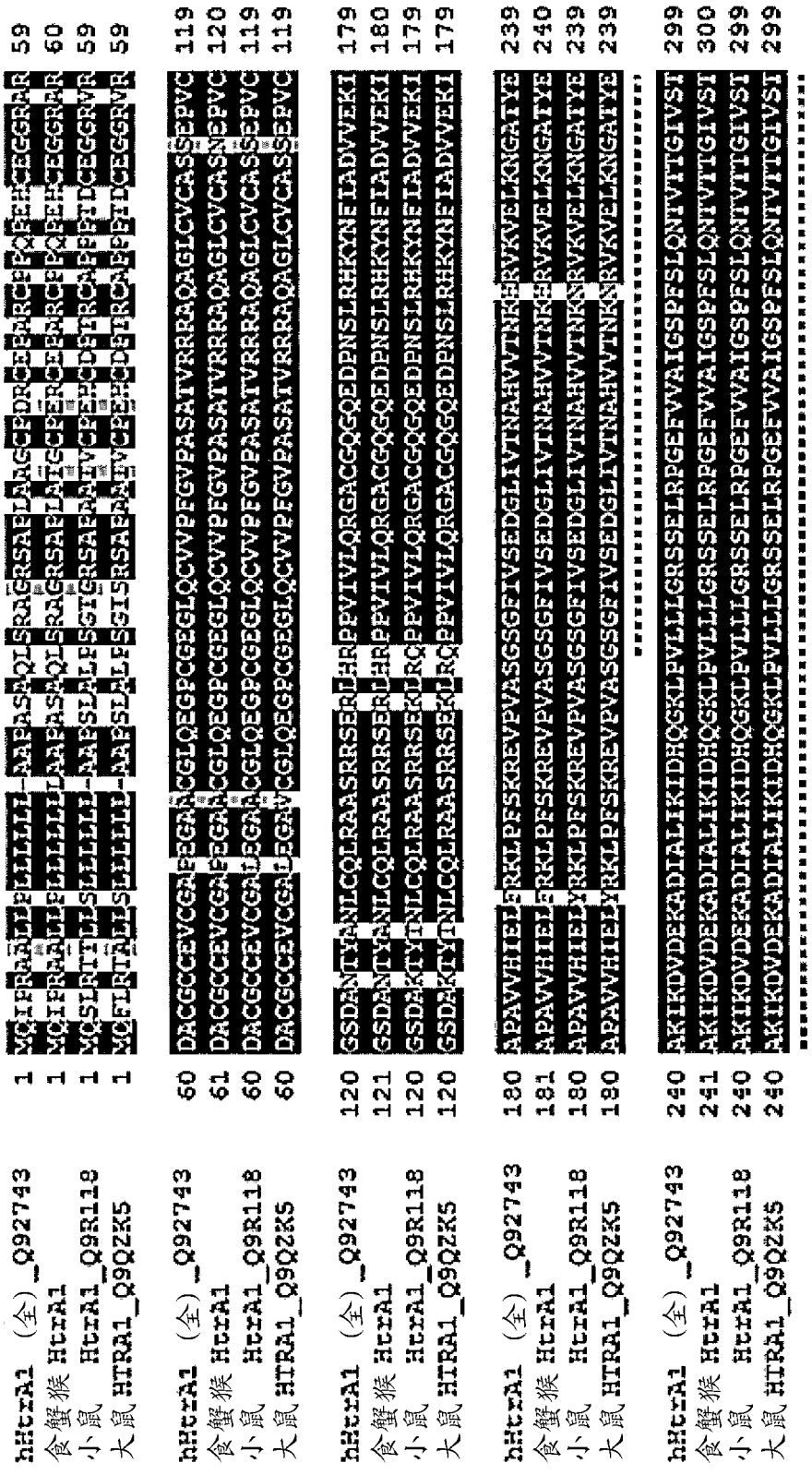


图 1(A)

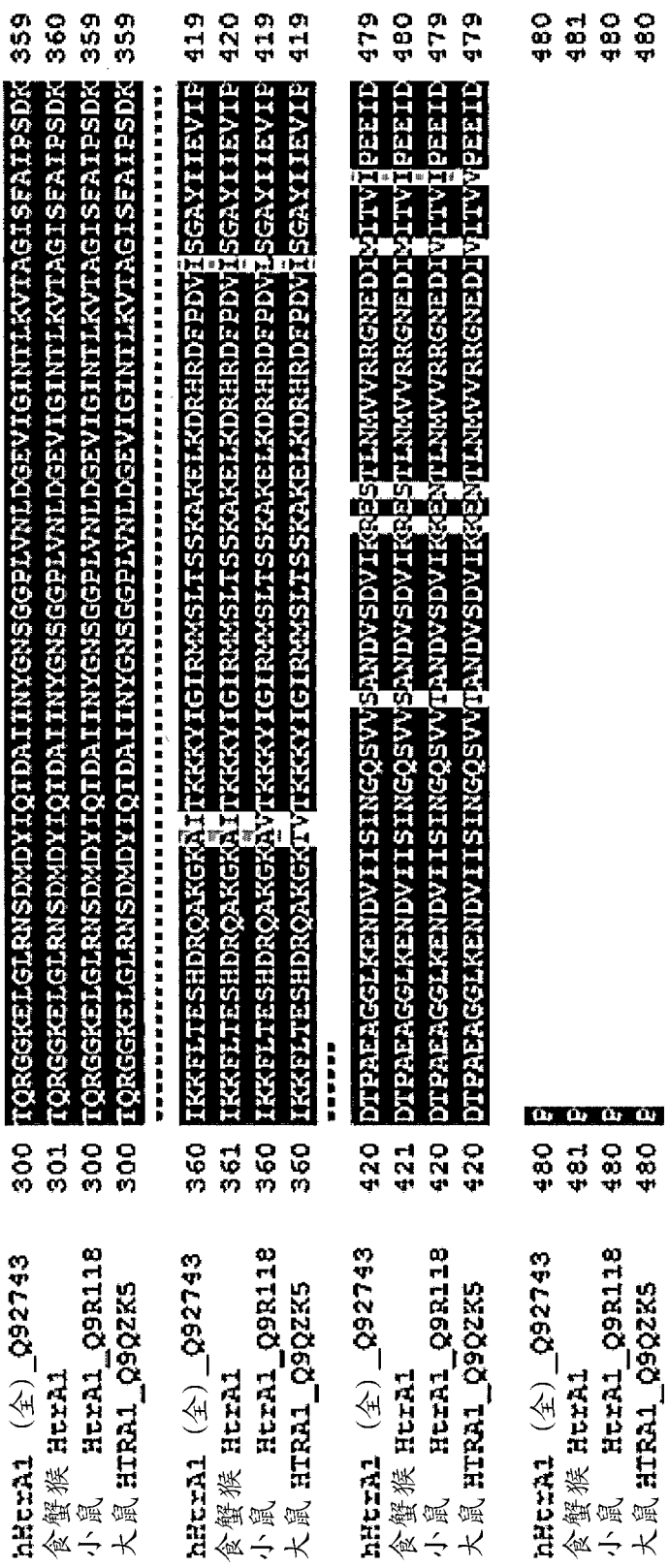

hHtrA1 (全)_Q92743 300 IQRGGKELGLRNSDMDYIQIDAIINYGNSGGPLVNLDGEVIGINTLKVTAGISFAIPSDK 359
食蟹猴 HtrA1 301 IQRGGKELGLRNSDMDYIQIDAIINYGNSGGPLVNLDGEVIGINTLKVTAGISFAIPSDK 360
小鼠 HtrA1_Q9R118 300 IQRGGKELGLRNSDMDYIQIDAIINYGNSGGPLVNLDGEVIGINTLKVTAGISFAIPSDK 359
大鼠 HTRA1_Q9QZK5 300 IQRGGKELGLRNSDMDYIQIDAIINYGNSGGPLVNLDGEVIGINTLKVTAGISFAIPSDK 359
hHtrA1 (全)_Q92743 360 IKKFLTESHDRQAKGKAITKKKYIGIRMMSLTSSKAKELKDRHRDFPDVISGAYIIEVIP 419
食蟹猴 HtrA1 361 IKKFLTESHDRQAKGKAITKKKYIGIRMMSLTSSKAKELKDRHRDFPDVISGAYIIEVIP 420
小鼠 HtrA1_Q9R118 360 IKKFLTESHDRQAKGKAVTKKKYIGIRMMSLTSSKAKELKDRHRDFPDVISGAYIIEVIP 419
大鼠 HTRA1_Q9QZK5 360 IKKFLTESHDRQAKGKTVTKKKYIGIRMMSLTSSKAKELKDRHRDFPDVISGAYIIEVIP 419
hHtrA1 (全)_Q92743 420 DTPAEAGGLKENDVIISINGQSVVSANDVSDVIKRSSTLNMVVRRGNEDITVIPEEID 479
食蟹猴 HtrA1 421 DTPAEAGGLKENDVIISINGQSVVSANDVSDVIKRSSTLNMVVRRGNEDIVITVIPEEID 480
小鼠 HtrA1_Q9R118 420 DTPAEAGGLKENDVIISINGQSVVTANDVSDVIKRSNTLNMVVRRGNEDIVITVIPEEID 479
大鼠 HTRA1_Q9QZK5 420 DTPAEAGGLKENDVIISINGQSVVTANDVSDVIKRSNTLNMVVRRGNEDIVITVVPEEID 479
hHtrA1 (全)_Q92743 480 E
食蟹猴 HtrA1 481 E
小鼠 HtrA1_Q9R118 480 E
大鼠 HTRA1_Q9QZK5 480 E

图 1(B)

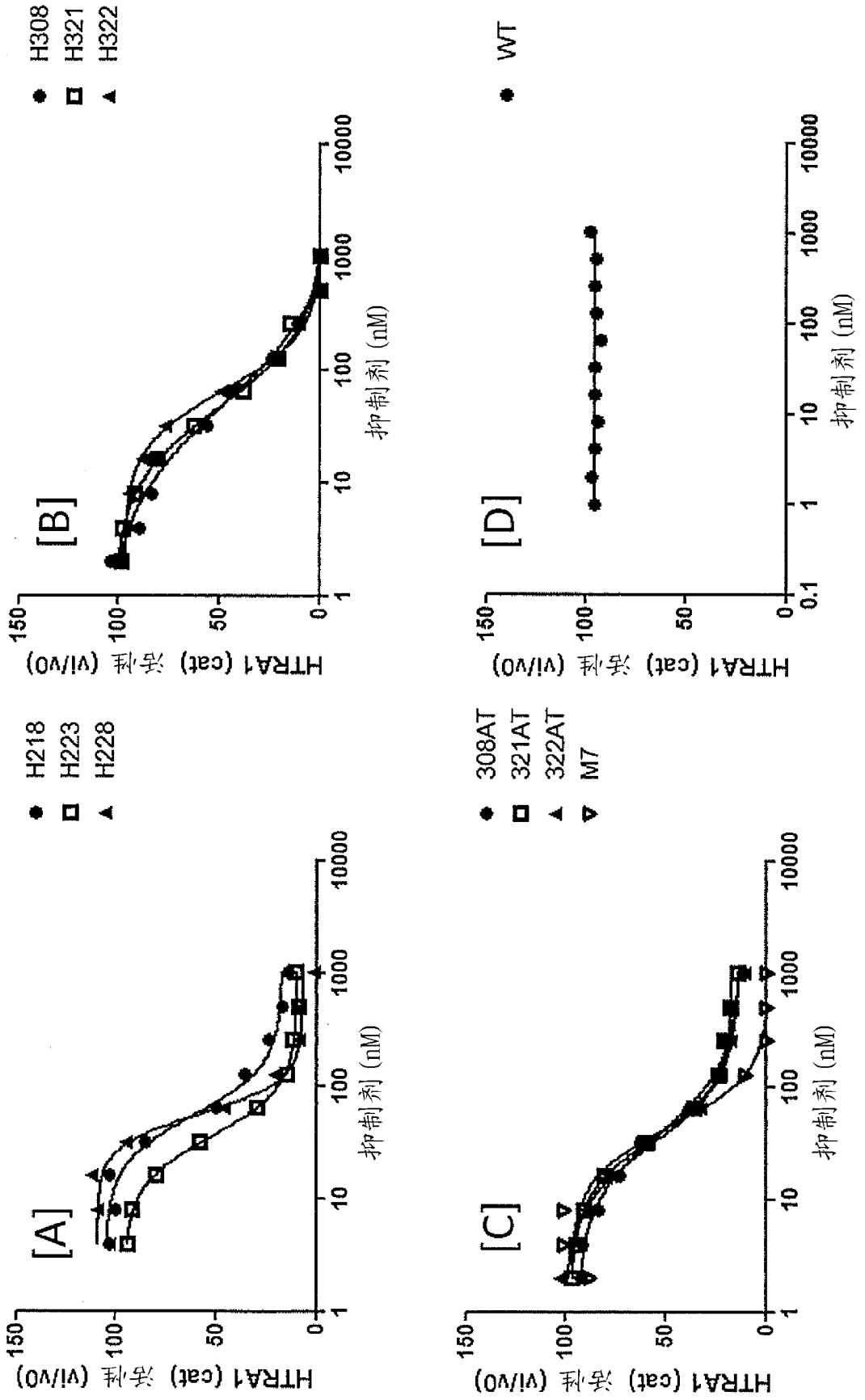

[A]
H218
H223
H228
HTRA1 (cat) 活性 (vi/v0)
抑制剂 (nM)
[B]
H308
H321
H322
[C]
308AT
321AT
322AT
M7
[D]
WT

图 2

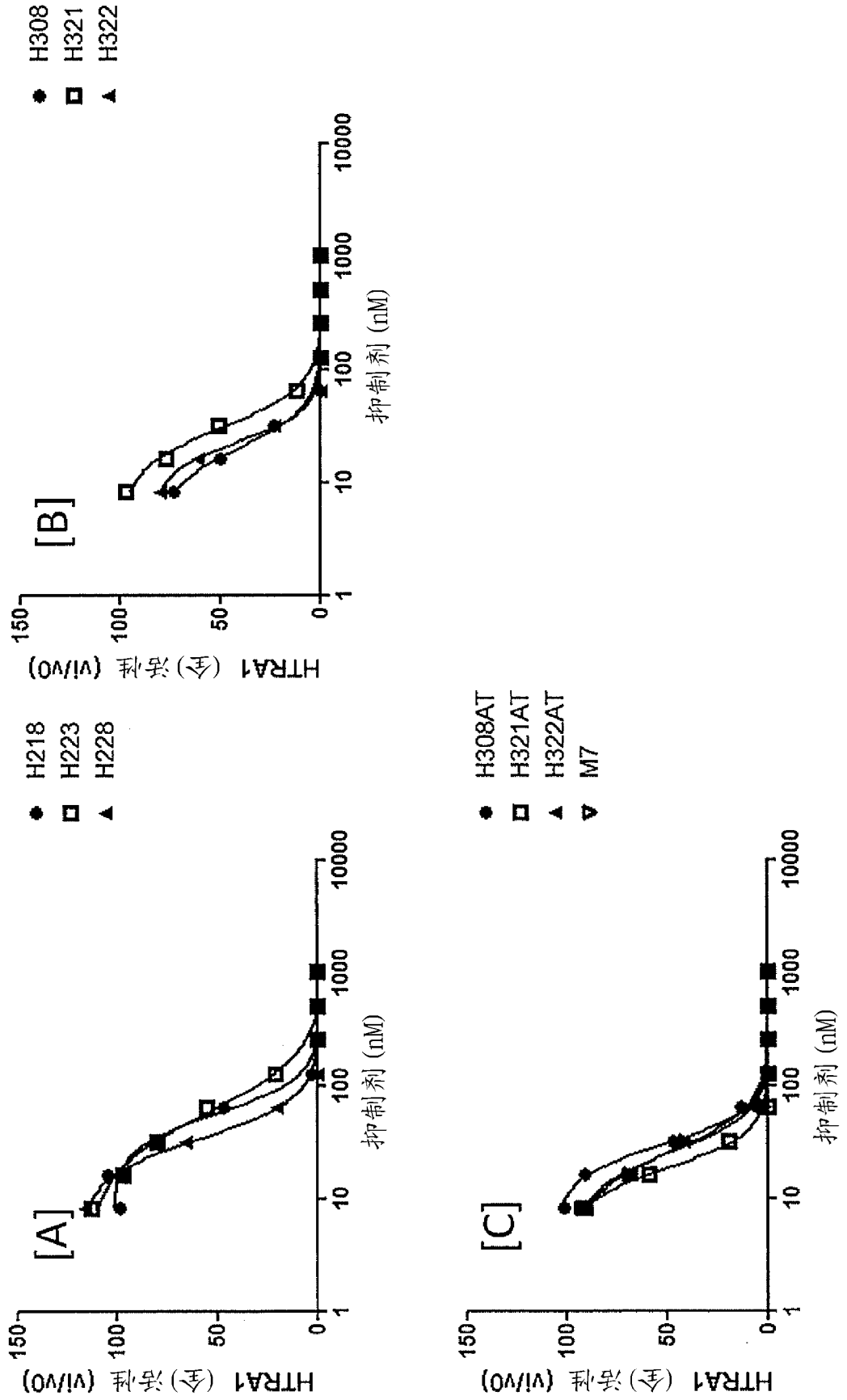

[A]
H218
H223
H228
HTRA1 (全)活性 (vi/vo)
抑制剂 (nM)
[B]
H308
H321
H322
HTRA1 (全)活性 (vi/vo)
抑制剂 (nM)
[C]
H308AT
H321AT
H322AT
M7
HTRA1 (全)活性 (vi/vo)
抑制剂 (nM)

图 3

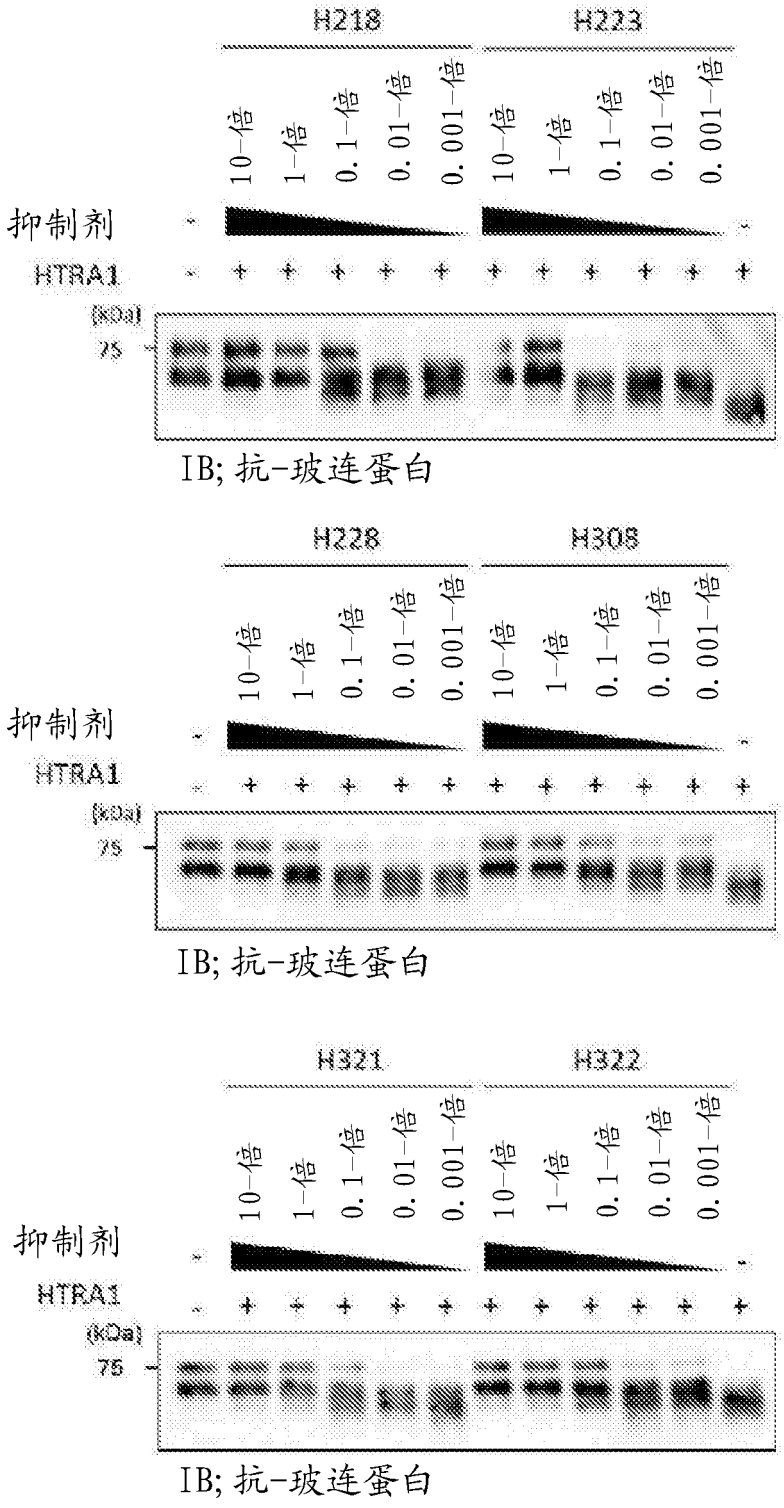
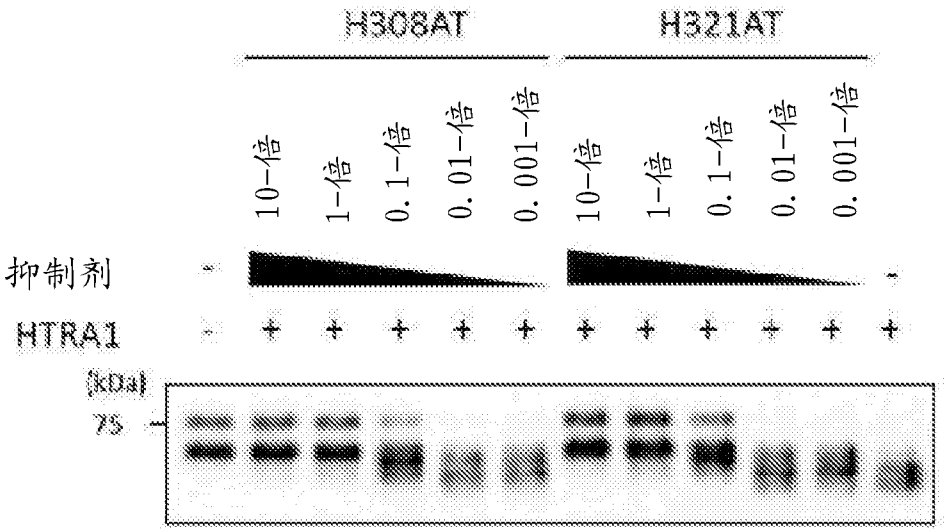

H218
H223
10-倍
1-倍
0.1-倍
0.01-倍
0.001-倍
抑制剂
HTRA1
(kDa)
75
IB; 抗-玻连蛋白
H228
H308
IB; 抗-玻连蛋白
H321
H322
IB; 抗-玻连蛋白

图 4(A)


H308AT
H321AT
10-倍
1-倍
0.1-倍
0.01-倍
0.001-倍
抑制剂
HTRA1
(kDa)
75
IB; 抗-玻连蛋白

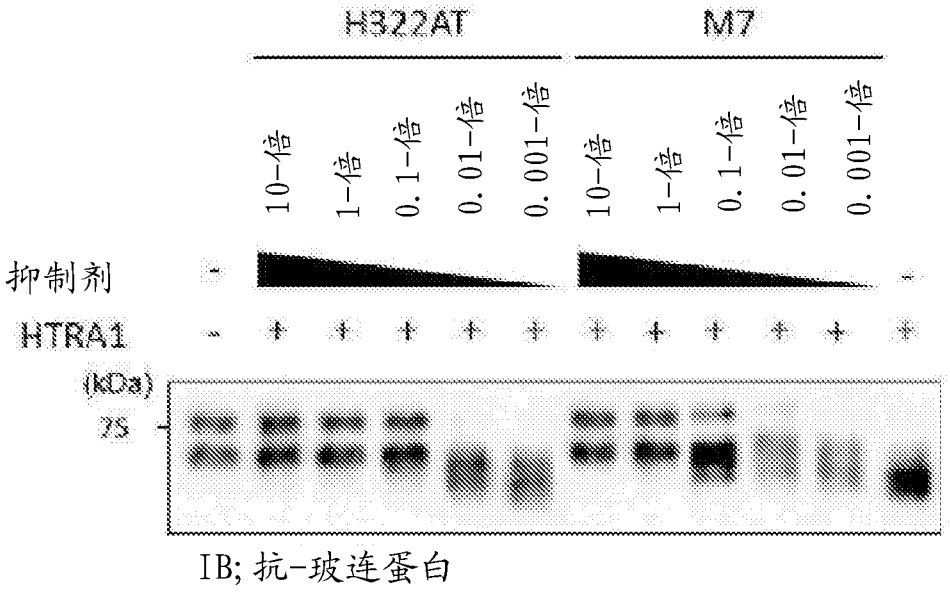

H322AT
M7
10-倍
1-倍
0.1-倍
0.01-倍
0.001-倍
抑制剂
HTRA1
(kDa)
75
IB; 抗-玻连蛋白

图 4(B)

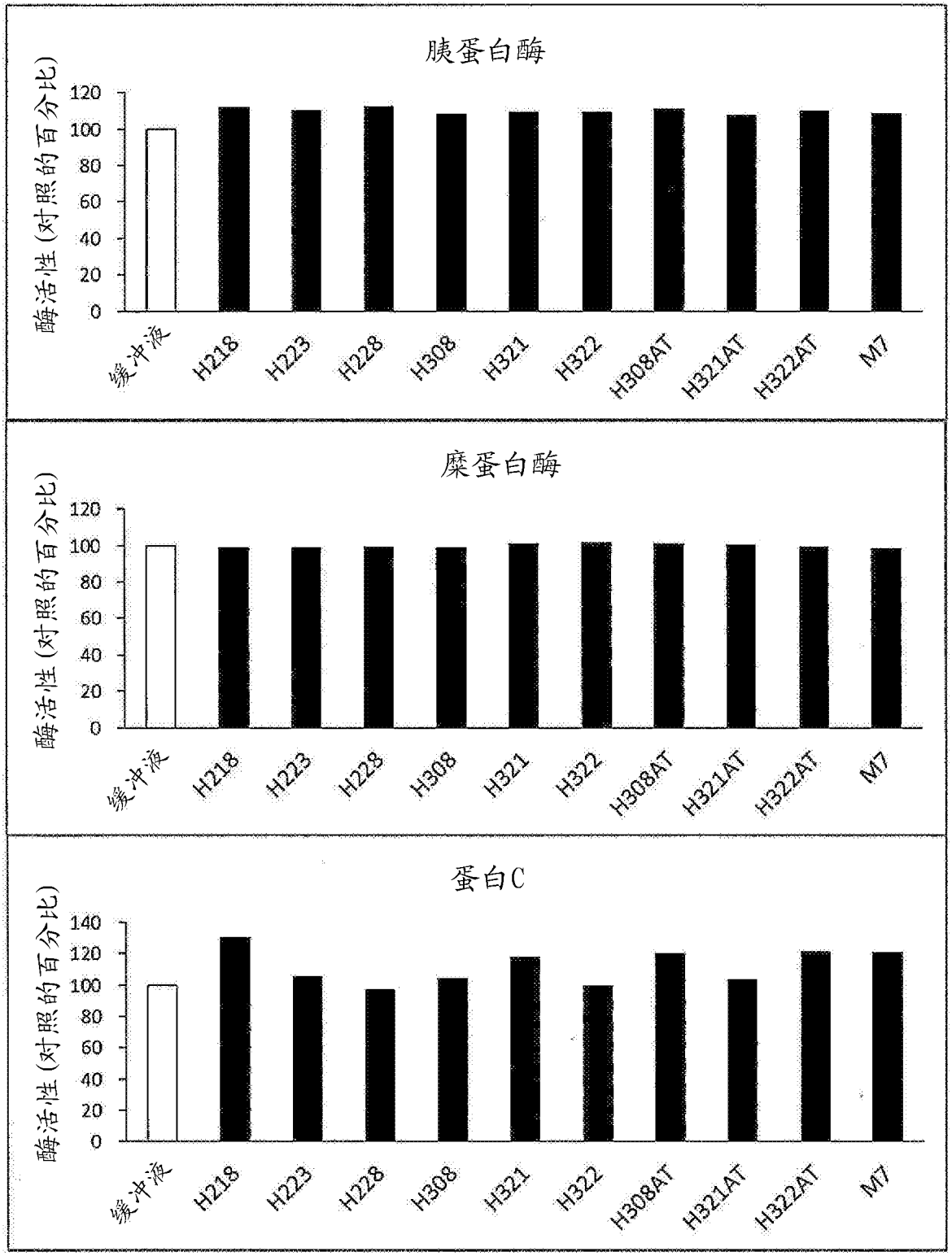

胰蛋白酶
酶活性(对照的百分比)
120
100
80
60
40
20
0
缓冲液
H218
H223
H228
H308
H321
H322
H308AT
H321AT
H322AT
M7
糜蛋白酶
酶活性(对照的百分比)
120
100
80
60
40
20
0
缓冲液
H218
H223
H228
H308
H321
H322
H308AT
H321AT
H322AT
M7
蛋白C
酶活性(对照的百分比)
140
120
100
80
60
40
20
0
缓冲液
H218
H223
H228
H308
H321
H322
H308AT
H321AT
H322AT
M7

图 5(A)

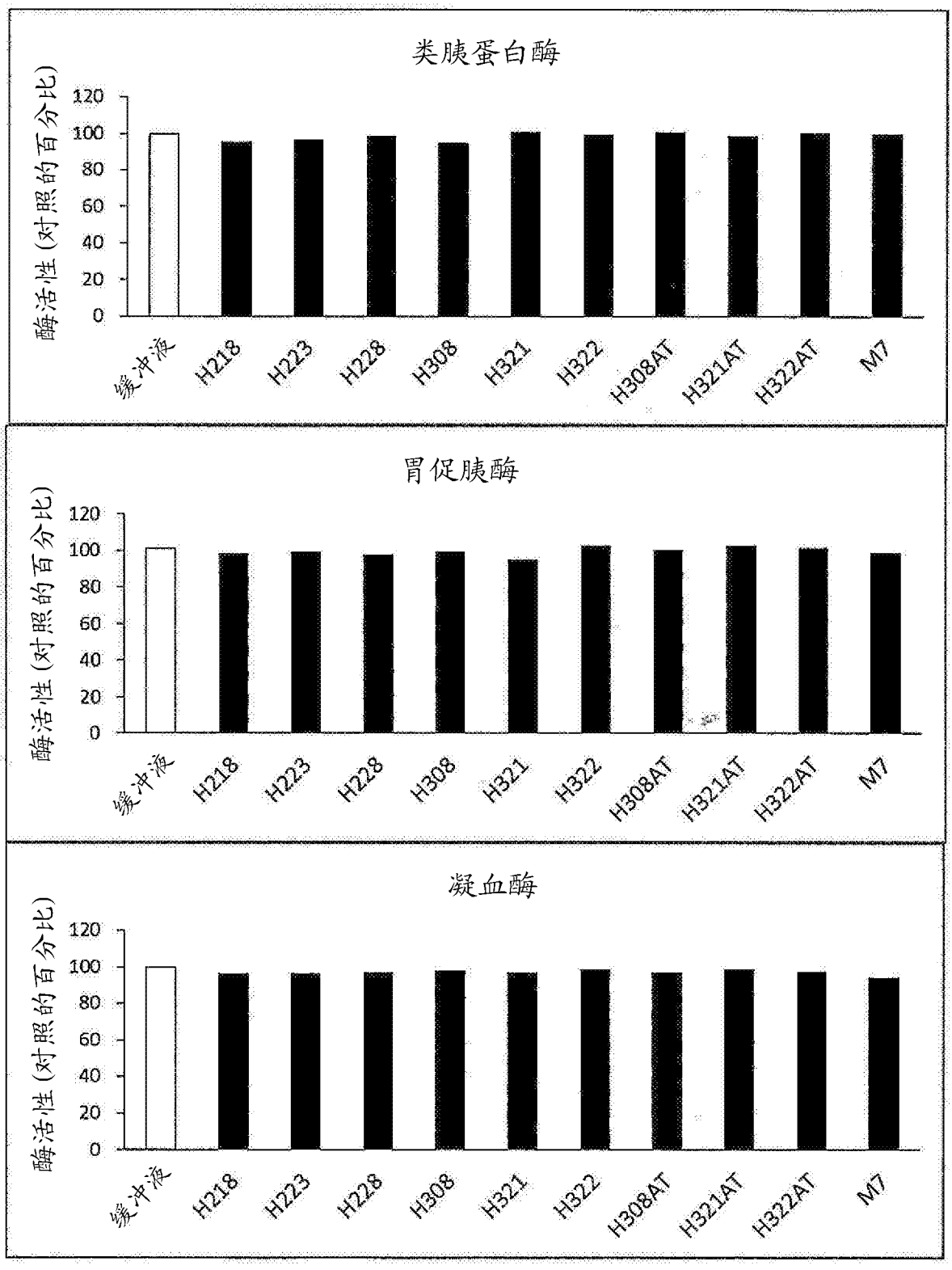

类胰蛋白酶
酶活性(对照的百分比)
120
100
80
60
40
20
0
缓冲液
H218
H223
H228
H308
H321
H322
H308AT
H321AT
H322AT
M7
胃促胰酶
酶活性(对照的百分比)
120
100
80
60
40
20
0
缓冲液
H218
H223
H228
H308
H321
H322
H308AT
H321AT
H322AT
M7
凝血酶
酶活性(对照的百分比)
120
100
80
60
40
20
0
缓冲液
H218
H223
H228
H308
H321
H322
H308AT
H321AT
H322AT
M7

图 5(B)

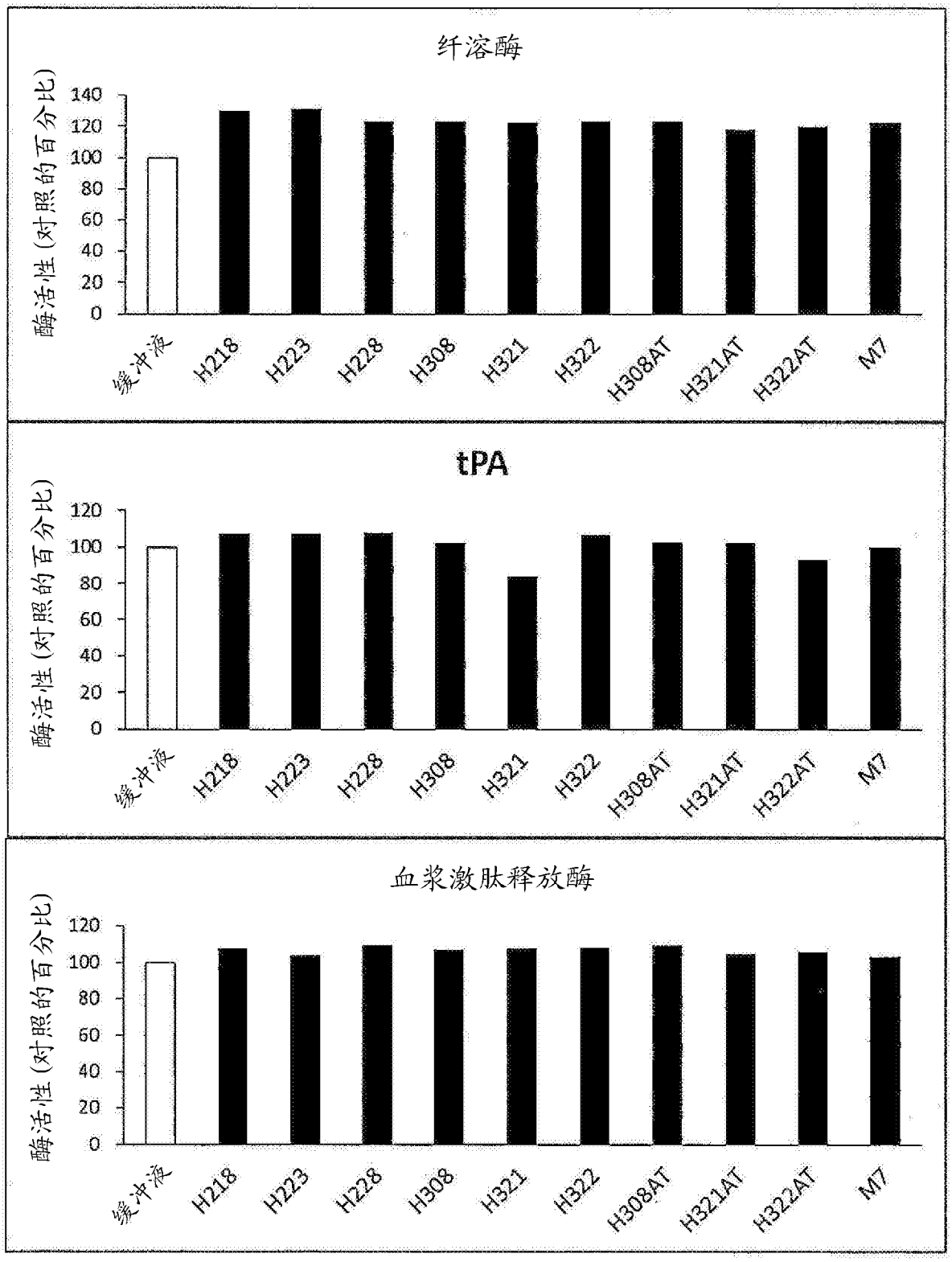

纤溶酶
酶活性(对照的百分比)
140
120
100
80
60
40
20
0
缓冲液
H218
H223
H228
H308
H321
H322
H308AT
H321AT
H322AT
M7
tPA
酶活性(对照的百分比)
120
100
80
60
40
20
0
缓冲液
H218
H223
H228
H308
H321
H322
H308AT
H321AT
H322AT
M7
血浆激肽释放酶
酶活性(对照的百分比)
120
100
80
60
40
20
0
缓冲液
H218
H223
H228
H308
H321
H322
H308AT
H321AT
H322AT
M7

图 5(C)

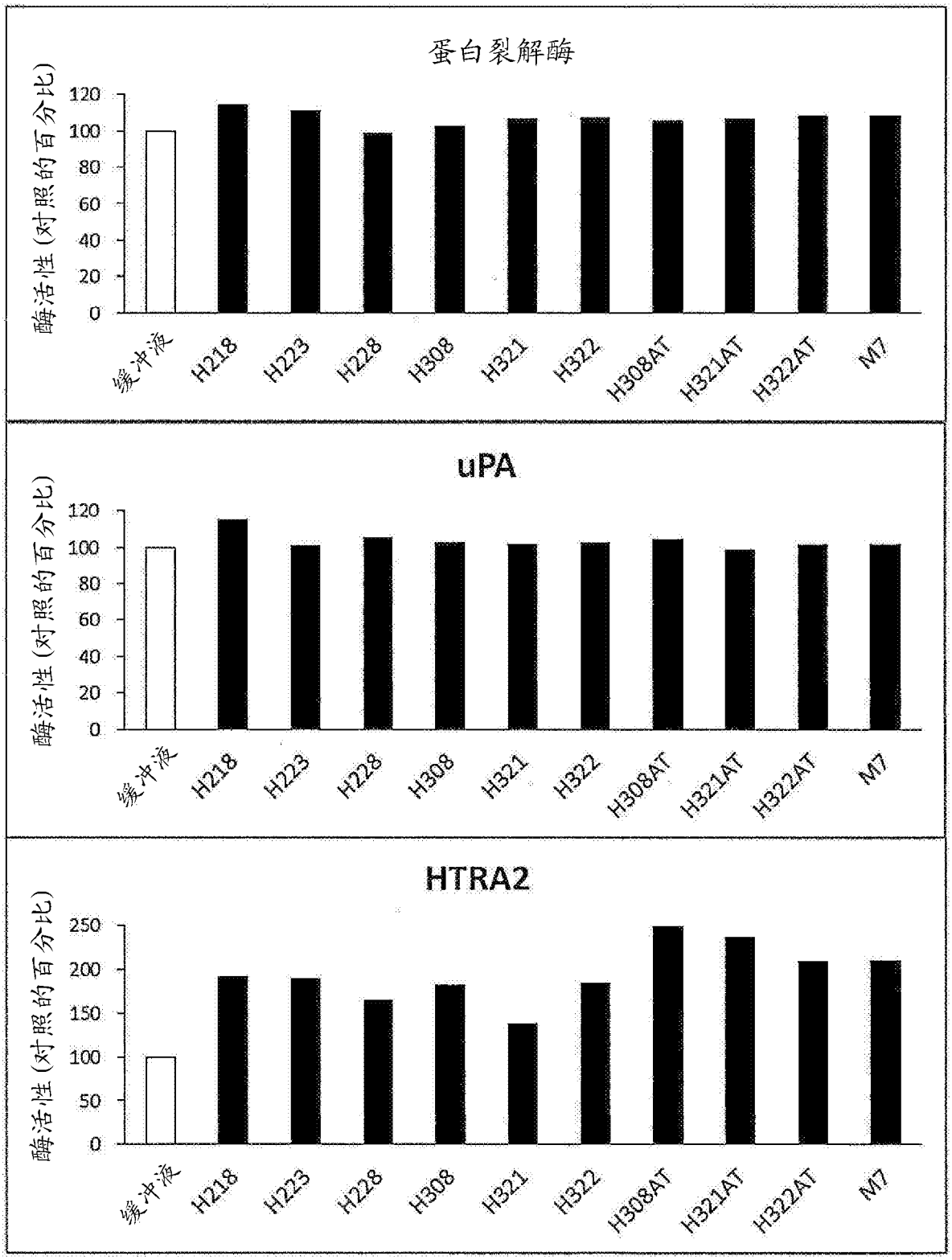

蛋白裂解酶
酶活性(对照的百分比)
120
100
80
60
40
20
0
缓冲液
H218
H223
H228
H308
H321
H322
H308AT
H321AT
H322AT
M7
uPA
酶活性(对照的百分比)
120
100
80
60
40
20
0
缓冲液
H218
H223
H228
H308
H321
H322
H308AT
H321AT
H322AT
M7
HTRA2
酶活性(对照的百分比)
250
200
150
100
50
0
缓冲液
H218
H223
H228
H308
H321
H322
H308AT
H321AT
H322AT
M7

图 5(D)

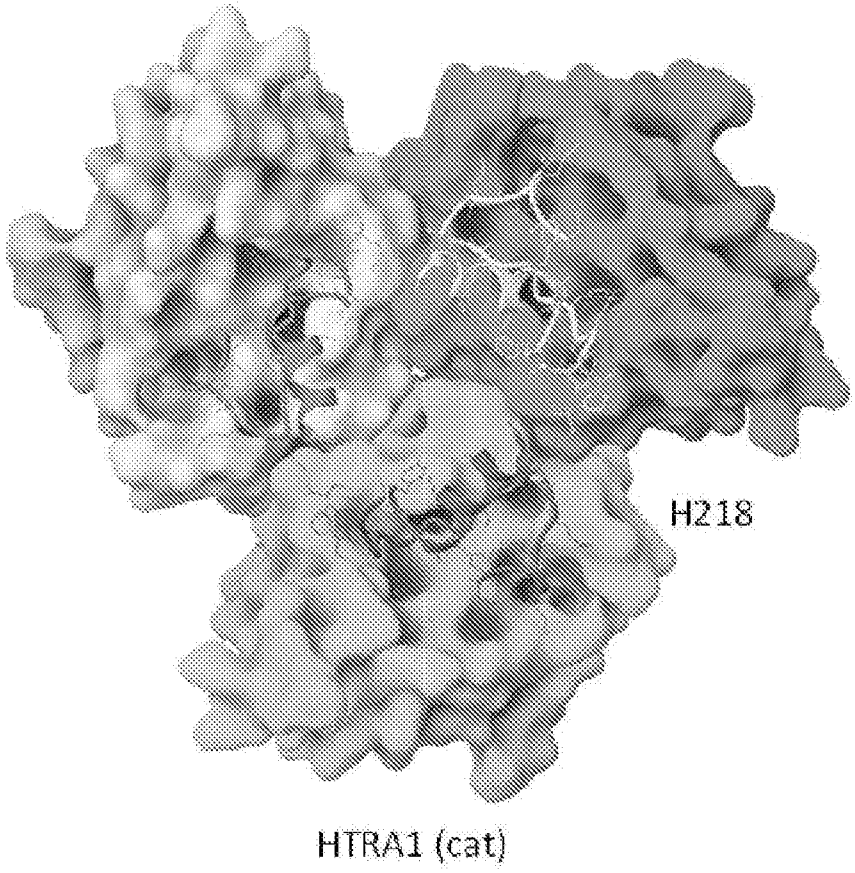


图 6

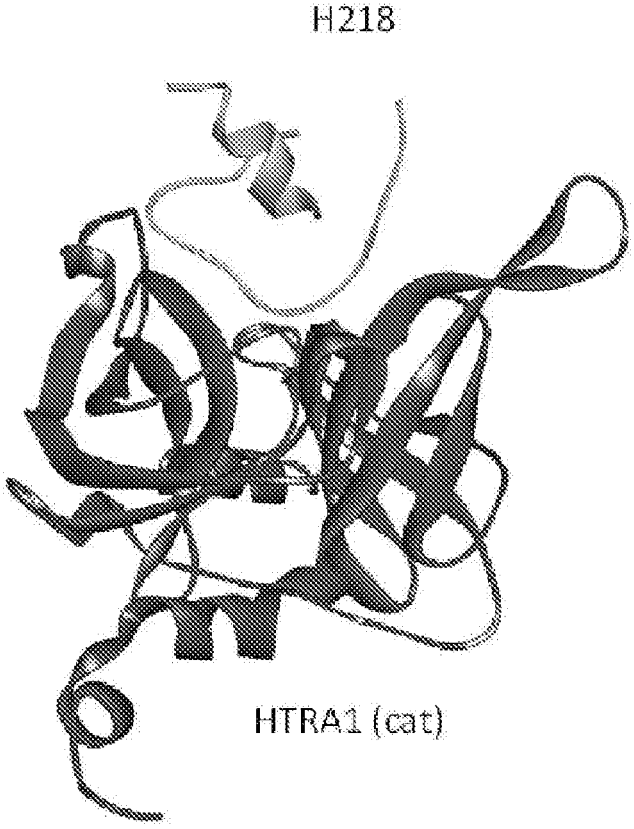


图 7

H2－Opt
Mca－IRRVSYSFK（Dnp）K （SEQ ID NO:54）

图 8

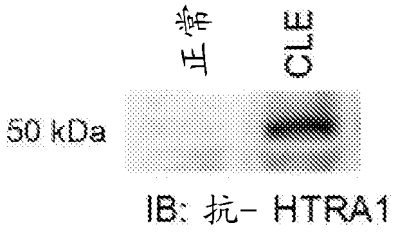


图 9

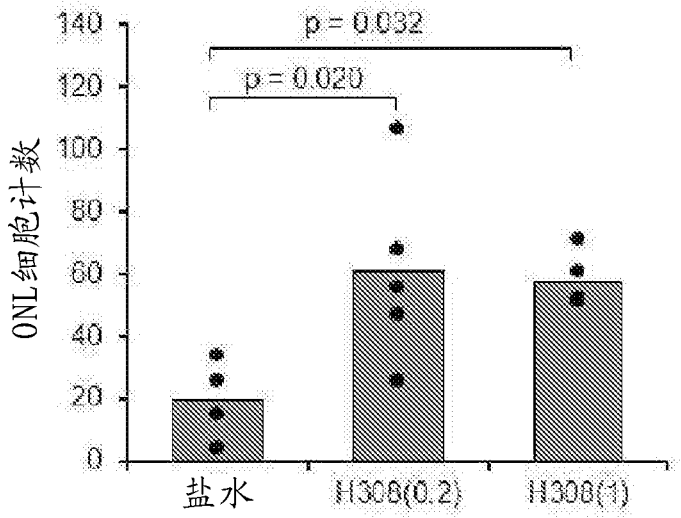

p = 0.032
p = 0.020
ONL细胞计数
140
120
100
80
60
40
20
0
盐水
H308(0.2)
H308(1)

图 10

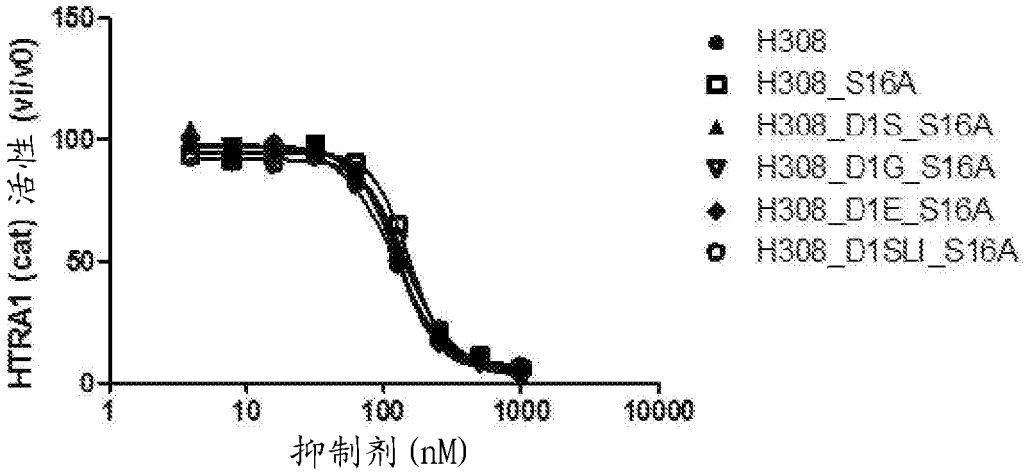

HTRA1 (cat) 活性 (vi/v0)
150
100
50
0
1
10
100
1000
10000
抑制剂 (nM)
H308
H308_S16A
H308_D1S_S16A
H308_D1G_S16A
H308_D1E_S16A
H308_D1SLI_S16A

图 11

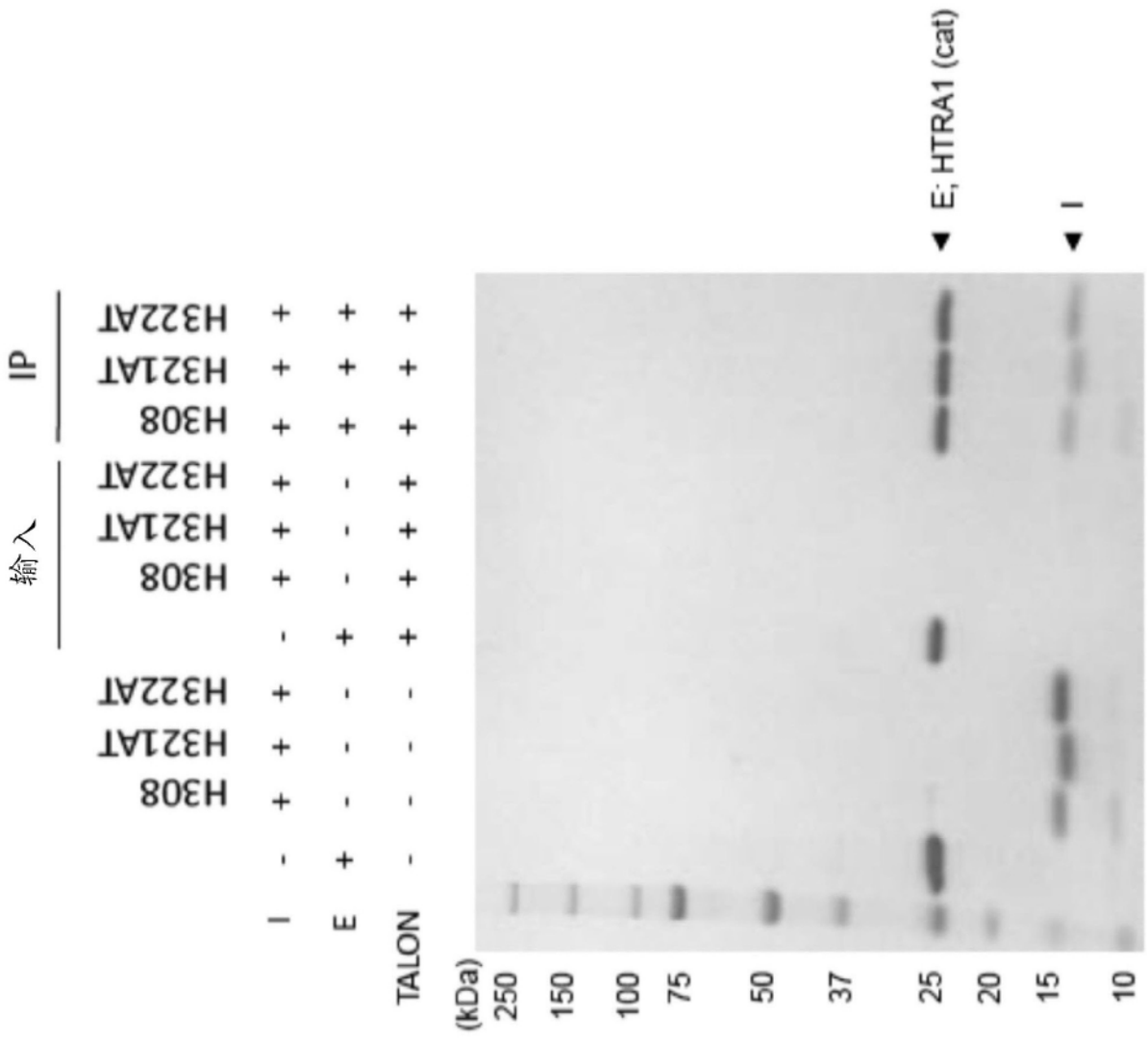


图 12

人 SPINK2
DPQFGLFSKYRTPNCSQYRLPGCPRHFNPVCGSDM
STYANECTLCMKIREGGHNIKIIRNGPC（SEQ ID
NO：1）

图 13

人SPINK2

GATCCGCAGTTTGGTCTGTTTAGCAAATATCGTAC
CCCGAATTGTAGCCAGTATCGTCTGCCTGGTTGTC
CGCGTCATTTTAATCCGGTTTGTGGTAGCGATATG
AGCACCTATGCAAATGAATGTACCCTGTGCATGAA
AATTCGTGAAGGTGGCCATAATATTAAAATTATTC
GCAATGGTCCGTGCTAA（SEQ ID NO：2）

图 14

HTRA1－抑制肽 H218

DPQFGLFSKYRTPNCLKSEGMACYAYYEPVCGSDM
STYANECTLCMKIREGGHNIKIIRNGPCGG（SEQ
ID NO：3）

图 15

HTRA1－抑制肽 H218

GATCCGCAGTTTGGTCTGTTTAGCAAATATCGTAC
CCCGAATTGTCTGAAATCTGAAGGTATGGCTTGTT
ACGCTTACTACGAACCGGTTTGTGGTAGCGATATG
AGCACCTATGCAAATGAATGTACCCTGTGCATGAA
AATTCGTGAAGGTGGCCATAATATTAAAATTATTC
GCAATGGTCCGTGCGGCGGCTAA(SEQ ID NO:4)

图 16

HTRA1－抑制肽 H223

DPQFGLFSKYRTPNCTMDMGMACWAFYEPVCGSDM
STYANECTLCMKIREGGHNIKIIRNGPCGG（SEQ
ID NO：5）

图 17

HTRA1－抑制肽 H223

GATCCGCAGTTTGGTCTGTTTAGCAAATATCGTAC
CCCGAATTGTACTATGGACATGGGTATGGCTTGTT
GGGCTTTCTACGAACCGGTTTGTGGTAGCGATATG
AGCACCTATGCAAATGAATGTACCCTGTGCATGAA
AATTCGTGAAGGTGGCCATAATATTAAAATTATTC
GCAATGGTCCGTGCGGCGGCTAA(SEQ ID NO:6)

图 18

HTRA1－抑制肽 H228

DPQFGLFSKYRTPNCGHYNGWACQAFFEPVCGSDM
STYANECTLCMKIREGGHNIKIIRNGPCGG (SEQ
ID NO: 7)

图 19

HTRA1－抑制肽 H228

GATCCGCAGTTTGGTCTGTTTAGCAAATATCGTAC
CCCGAATTGTGGTCATTACAACGGTTGGGCTTGTC
AGGCTTTCTTCGAACCGGTTTGTGGTAGCGATATG
AGCACCTATGCAAATGAATGTACCCTGTGCATGAA
AATTCGTGAAGGTGGCCATAATATTAAAATTATTC
GCAATGGTCCGTGCGGCGGCTAA(SEQ ID NO:8)

图 20

HTRA1－抑制肽 H308

DPQFGLFSKYRTPNCSDHAGMACVALYEPVCGSDM
STYENECVLCMKIREGGHNIKIIRNGPCGG (SEQ
ID NO: 9)

图 21

HTRA1－抑制肽 H308

GATCCGCAGTTTGGTCTGTTTAGCAAATATCGTAC
CCCGAATTGTAGCGACCATGCTGGTATGGCATGTG
TTGCTCTGTATGAACCGGTTTGTGGTAGCGATATG
AGCACCTATGAAAATGAATGTGTTCTGTGCATGAA
AATTCGTGAAGGTGGCCATAATATTAAAATTATTC
GCAATGGTCCGTGCGGCGGCTAA(SEQ ID NO:10)

图 22

HTRA1－抑制肽 H321

DPQFGLFSKYRTPNCSDFDGMACYAFYEPVCGSDM
STYMNECALCMKIREGGHNIKIIRNGPCGG (SEQ
ID NO:11)

图 23

HTRA1－抑制肽 H321

GATCCGCAGTTTGGTCTGTTTAGCAAATATCGTAC
CCCGAATTGTAGCGACTTCGACGGTATGGCATGTT
ACGCTTTCTATGAACCGGTTTGTGGTAGCGATATG
AGCACCTATATGAATGAATGTGCTCTGTGCATGAA
AATTCGTGAAGGTGGCCATAATATTAAAATTATTC
GCAATGGTCCGTGCGGCGGCTAA(SEQ ID NO:12)

图 24

HTRA1－抑制肽 H322

DPQFGLFSKYRTPNCSQHEGMACYALYEPVCGSDM
STYVNECALCMKIREGGHNIKIIRNGPCGG (SEQ
ID NO:13)

图 25

HTRA1－抑制肽 H322

GATCCGCAGTTTGGTCTGTTTAGCAAATATCGTAC
CCCGAATTGTAGCCAGCATGAAGGTATGGCATGTT
ACGCTCTGTATGAACCGGTTTGTGGTAGCGATATG
AGCACCTATGTTAATGAATGTGCTCTGTGCATGAA
AATTCGTGAAGGTGGCCATAATATTAAAATTATTC
GCAATGGTCCGTGCGGCGGCTAA(SEQ ID NO:14)

图 26

HTRA1－抑制肽 H308AT

DPQFGLFSKYRTPNCSDHAGMACVALYEPVCGSDM
STYANECTLCMKIREGGHNIKIIRNGPCGG (SEQ
ID NO:15)

图 27

HTRA1－抑制肽 H308AT

GATCCGCAGTTTGGTCTGTTTAGCAAATATCGTAC
CCCGAATTGTAGCGACCATGCTGGTATGGCATGTG
TTGCTCTGTATGAACCGGTTTGTGGTAGCGATATG
AGCACCTATGCAAATGAATGTACCCTGTGCATGAA
AATTCGTGAAGGTGGCCATAATATTAAAATTATTC
GCAATGGTCCGTGCGGCGGCTAA(SEQ ID NO:16)

图 28

HTRA1－抑制肽 H321AT

DPQFGLFSKYRTPNCSDFDGMACYAFYEPVCGSDM
STYANECTLCMKIREGGHNIKIIRNGPCGG (SEQ
ID NO:17)

图 29

HTRA1－抑制肽 H321AT
GATCCGCAGTTTGGTCTGTTTAGCAAATATCGTAC
CCCGAATTGTAGCGACTTCGACGGTATGGCATGTT
ACGCTTTCTATGAACCGGTTTGTGGTAGCGATATG
AGCACCTATGCAAATGAATGTACCCTGTGCATGAA
AATTCGTGAAGGTGGCCATAATATTAAAATTATTC
GCAATGGTCCGTGCGGCGGCTAA(SEQ ID NO:18)

图 30

HTRA1－抑制肽 H322AT
DPQFGLFSKYRTPNCSQHEGMACYALYEPVCGSDM
STYANECTLCMKIREGGHNIKIIRNGPCGG（SEQ
ID NO：19）

图 31

HTRA1－抑制肽 H322AT
GATCCGCAGTTTGGTCTGTTTAGCAAATATCGTAC
CCCGAATTGTAGCCAGCATGAAGGTATGGCATGTT
ACGCTCTGTATGAACCGGTTTGTGGTAGCGATATG
AGCACCTATGCAAATGAATGTACCCTGTGCATGAA
AATTCGTGAAGGTGGCCATAATATTAAAATTATTC
GCAATGGTCCGTGCGGCGGCTAA(SEQ ID NO:20)

图 32

HTRA1－抑制肽 M7
DPQFGLFSKYRTPNCSDHAGMACVAFYEPVCGSDM
STYANECTLCMKIREGGHNIKIIRNGPCGG（SEQ
ID NO：21）

图 33

HTRA1－抑制肽 M7

GATCCGCAGTTTGGTCTGTTTAGCAAATATCGTAC
CCCGAATTGTAGCGACCATGCTGGTATGGCATGTG
TTGCTTTTTATGAACCGGTTTGTGGTAGCGATATG
AGCACCTATGCAAATGAATGTACCCTGTGCATGAA
AATTCGTGAAGGTGGCCATAATATTAAAATTATTC
GCAATGGTCCGTGCGGCGGCTAA（SEQ ID NO：2
2）

图 34

HTRA1－抑制肽 H308__S16A

DPQFGLFSKYRTPNCADHAGMACVALYEPVCGSDM
STYENECVLCMKIREGGHNIKIIRNGPCGG（SEQ
ID NO：23）

图 35

HTRA1－抑制肽 H308__D1G__S16A

GPQFGLFSKYRTPNCADHAGMACVALYEPVCGSDM
STYENECVLCMKIREGGHNIKIIRNGPCGG（SEQ
ID NO：24）

图 36

HTRA1－抑制肽 H308__D1S__S16A

SPQFGLFSKYRTPNCADHAGMACVALYEPVCGSDM
STYENECVLCMKIREGGHNIKIIRNGPCGG（SEQ
ID NO：25）

图 37

HTRA1－抑制肽H308_D1E_S16A
EPQFGLFSKYRTPNCADHAGMACVALYEPVCGSDM
STYENECVLCMKIREGGHNIKIIRNGPCGG（SEQ
ID NO：26）

图 38

HTRA1－抑制肽H308_D1SLI_S16A
SLIPQFGLFSKYRTPNCADHAGMACVALYEPVCGS
DMSTYENECVLCMKIREGGHNIKIIRNGPCGG（SE
Q ID NO：27）

图 39

H321AT_D1G_S16A
GPQFGLFSKYRTPNCADFDGMACYAFYEPVCGSDM
STYANECTLCMKIREGGHNIKIIRNGPCGG（SEQ
ID NO：28）

图 40

H322AT_D1G_S16A
GPQFGLFSKYRTPNCAQHEGMACYALYEPVCGSDM
STYANECTLCMKIREGGHNIKIIRNGPCGG（SEQ
ID NO：29）

图 41

HTRA1－抑制肽的通式
X_1PQFGLFSKYRTPNC$X_2X_3X_4X_5$GX_6ACX_7AX_8X_9EP
VCGSDMSTYX_{10}NECX_{11}LCMKIREGGHNIKIIRNG
PC（SEQ ID NO：30）

图 42

S标签+接头
GSGMKETAAAKFERQHMDSPDLGTDDDDKAMADIG
SANS（SEQ ID NO：31）

图 43

C－端六聚体
GASAAA（SEQ ID NO：32）

图 44

引物1
AAAAGAATTCTGATCCGCAGTTTGGTCTGTTTAG
（SEQ ID NO：33）

图 45

引物2
AAAACTCGAGTTATGCGGCCGCAGACGCGCCGCAC
GGACC（SEQ ID NO：34）

图 46

引物3
AAAAGGATCCCTGGACAAACGTGATCCGCAGTTTG
GTCTGTTTAG（SEQ ID NO：35）

图 47

引物4
AAAACTCGAGTTAGCCGCCGCACGGACCATTGCGA
ATAATTTTA（SEQ ID NO：36）

图 48

引物5

AAACATATGGGGCAGGAAGATCCCAACAGTTTGC（SEQ ID NO：37）

图 49

引物6

AAACTCGAGTTTGGCCTGTCGGTCATGGGACTC（SEQ ID NO：38）

图 50

引物7

AAAAGAATTCGCCACCATGCAGATTCCTAGAGCCG（SEQ ID NO：39）

图 51

引物8

AAAACTCGAGTCAGTGGTGATGGTGGTGGTGGCCGG（SEQ ID NO：40）

图 52

引物9

CTTGTCGTCATCGTCCTTGTAGTCGCCGGGGTCGATTTCCTC（SEQ ID NO：41）

图 53

引物10

GCGACTACAAGGACGATGACGACAAGCACCACCACCATCATCAC（SEQ ID NO：42）

图 54

引物11

AAAAACTCGAGCTAGTGATGATGGTGGTGGTGCTTGTCGTC（SEQ ID NO：43）

图 55

引物12

CCGCAGTTTGGTCTGTTTAGCAAATATCGTACCCCGAATTGT（SEQ ID NO：44）

图 56

引物13

GCCATACCAGCATGGTCCGCACAATTCGGGGTACGATATTTGC（SEQ ID NO：45）

图 57

引物14

GCGGACCATGCTGGTATGGCATGTGTTGCTCTGTATGAAC（SEQ ID NO：46）

图 58

引物15

AAAACTCGAGTTAGCCGCCGCACGGACCATTGCGAATAA（SEQ ID NO：47）

图 59

引物16

AAAAGGATCCCTGGACAAACGTGATCCGCAGTTTGGTCTGTTTAG（SEQ ID NO：48）

图 60

引物17

AAAAGGATCCCTGGACAAACGTGGCCCGCAGTTTG
GTCTGTTTAG（SEQ ID NO：49）

图 61

引物18

AAAAGGATCCCTGGACAAACGTAGCCCGCAGTTTG
GTCTGTTTAG（SEQ ID NO：50）

图 62

引物19

AAAAGGATCCCTGGACAAACGTGAACCGCAGTTTG
GTCTGTTTAG（SEQ ID NO：51）

图 63

引物20

AAAAGGATCCCTGGACAAACGTAGCCTGATTCCGC
AGTTTGGTCTGTTTAG（SEQ ID NO：52）

图 64

人 HTRA1 (全)

QLSRAGRSAPLAAGCPDRCEPARCPPQPEHCEGGR
ARDACGCCEVCGAPEGAACGLQEGPCGEGLQCVVP
FGVPASATVRRRAQAGLCVCASSEPVCGSDANTYA
NLCQLRAASRRSERLHRPPVIVLQRGACGQGQEDP
NSLRHKYNFIADVVEKIAPAVVHIELFRKLPFSKR
EVPVASGSGFIVSEDGLIVTNAHVVTNKHRVKVEL
KNGATYEAKIKDVDEKADIALIKIDHQGKLPVLLL
GRSSELRPGEFVVAIGSPFSLQNTVTTGIVSTTQR
GGKELGLRNSDMDYIQTDAIINYGNSGGPLVNLDG
EVIGINTLKVTAGISFAIPSDKIKKFLTESHDRQA
KGKAITKKKYIGIRMMSLTSSKAKELKDRHRDFPD
VISGAYIIEVIPDTPAEAGGLKENDVIISINGQSV
VSANDVSDVIKRESTLNMVVRRGNEDIMITVIPEE

IDP (SEQ ID NO:53)

图 65

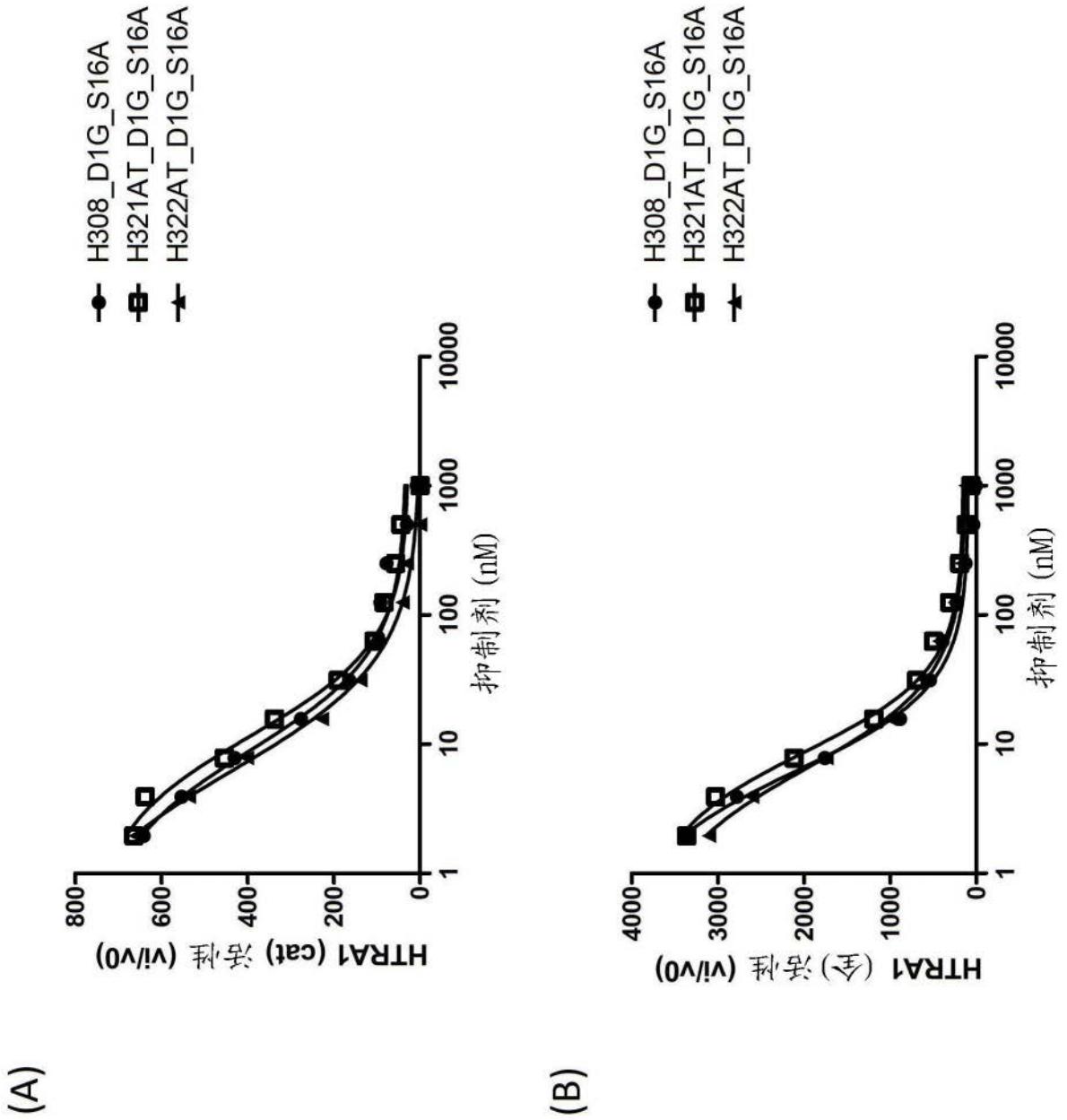

(A)
H308_D1G_S16A
H321AT_D1G_S16A
H322AT_D1G_S16A
HTRA1 (cat) 活性 (vi/v0)
0
200
400
600
800
1
10
100
1000
10000
抑制剂 (nM)
(B)
H308_D1G_S16A
H321AT_D1G_S16A
H322AT_D1G_S16A
HTRA1 (全) 活性 (vi/v0)
0
1000
2000
3000
4000
1
10
100
1000
10000
抑制剂 (nM)

图 66

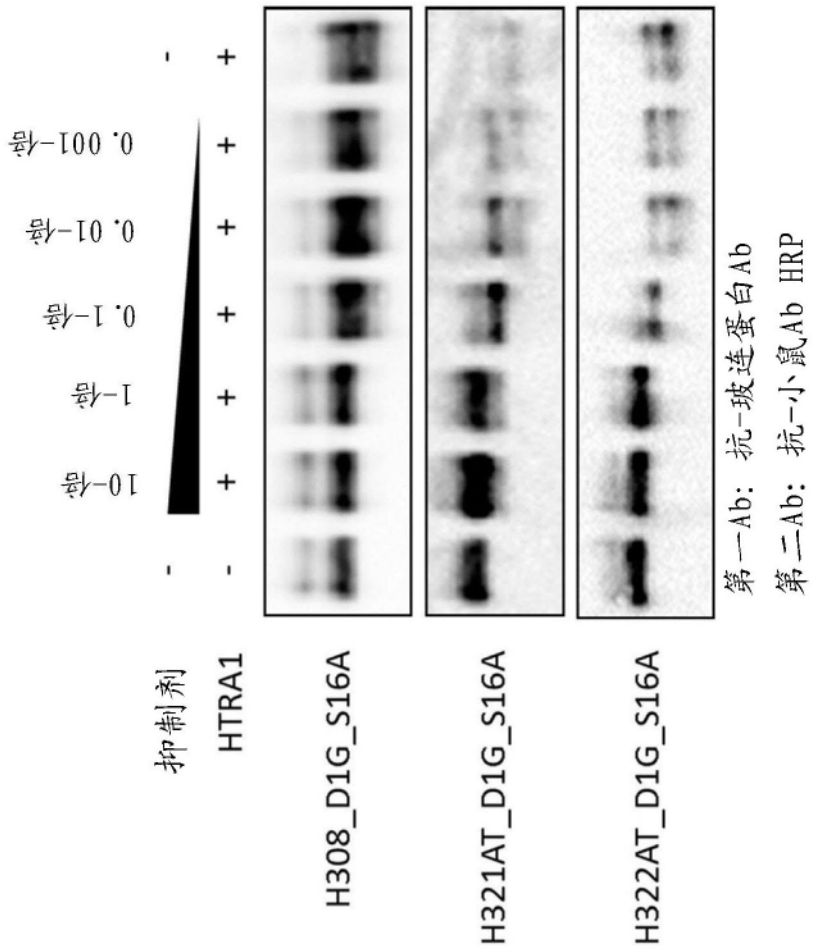

抑制剂
HTRA1
H308_D1G_S16A
H321AT_D1G_S16A
H322AT_D1G_S16A
10-倍
1-倍
0.1-倍
0.01-倍
0.001-倍
第一Ab：抗-玻连蛋白Ab
第二Ab：抗-小鼠Ab HRP

图 67

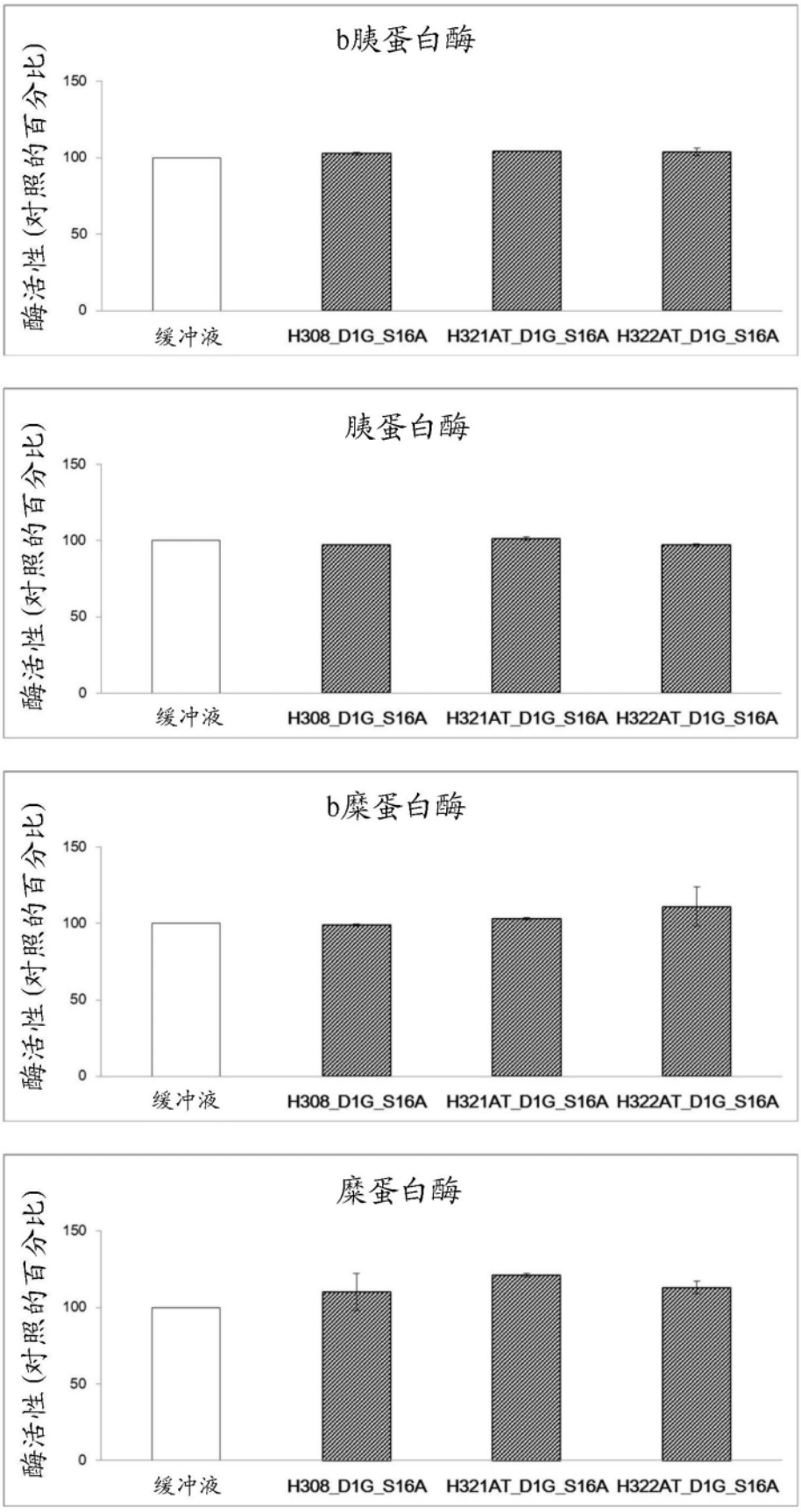

b胰蛋白酶
胰蛋白酶
b糜蛋白酶
糜蛋白酶
酶活性(对照的百分比)
150
100
50
0
缓冲液
H308_D1G_S16A
H321AT_D1G_S16A
H322AT_D1G_S16A

图 68(A)

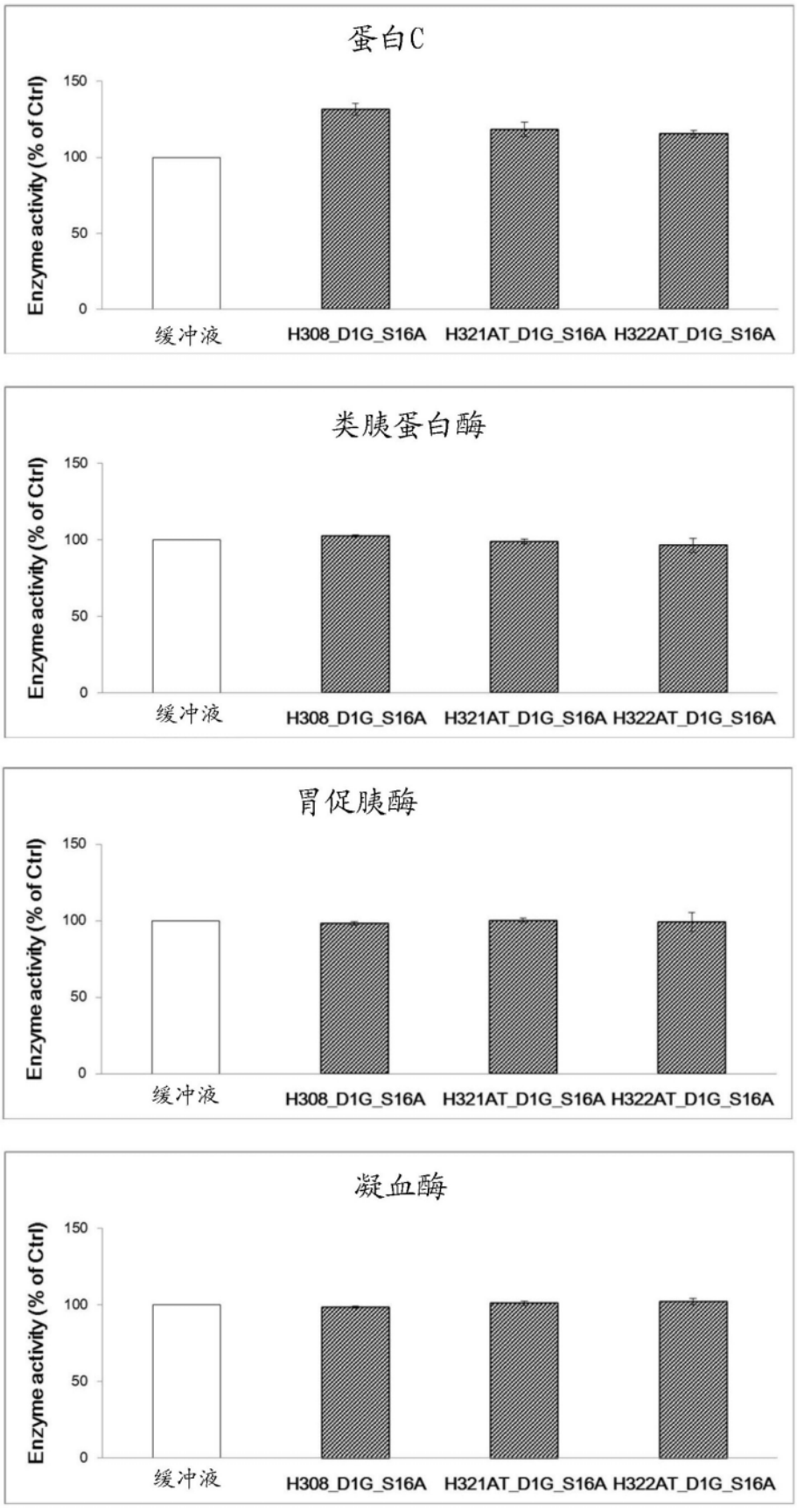

蛋白C
Enzyme activity (% of Ctrl)
150
100
50
0
缓冲液
H308_D1G_S16A
H321AT_D1G_S16A
H322AT_D1G_S16A
类胰蛋白酶
Enzyme activity (% of Ctrl)
150
100
50
0
缓冲液
H308_D1G_S16A
H321AT_D1G_S16A
H322AT_D1G_S16A
胃促胰酶
Enzyme activity (% of Ctrl)
150
100
50
0
缓冲液
H308_D1G_S16A
H321AT_D1G_S16A
H322AT_D1G_S16A
凝血酶
Enzyme activity (% of Ctrl)
150
100
50
0
缓冲液
H308_D1G_S16A
H321AT_D1G_S16A
H322AT_D1G_S16A

图 68(B)

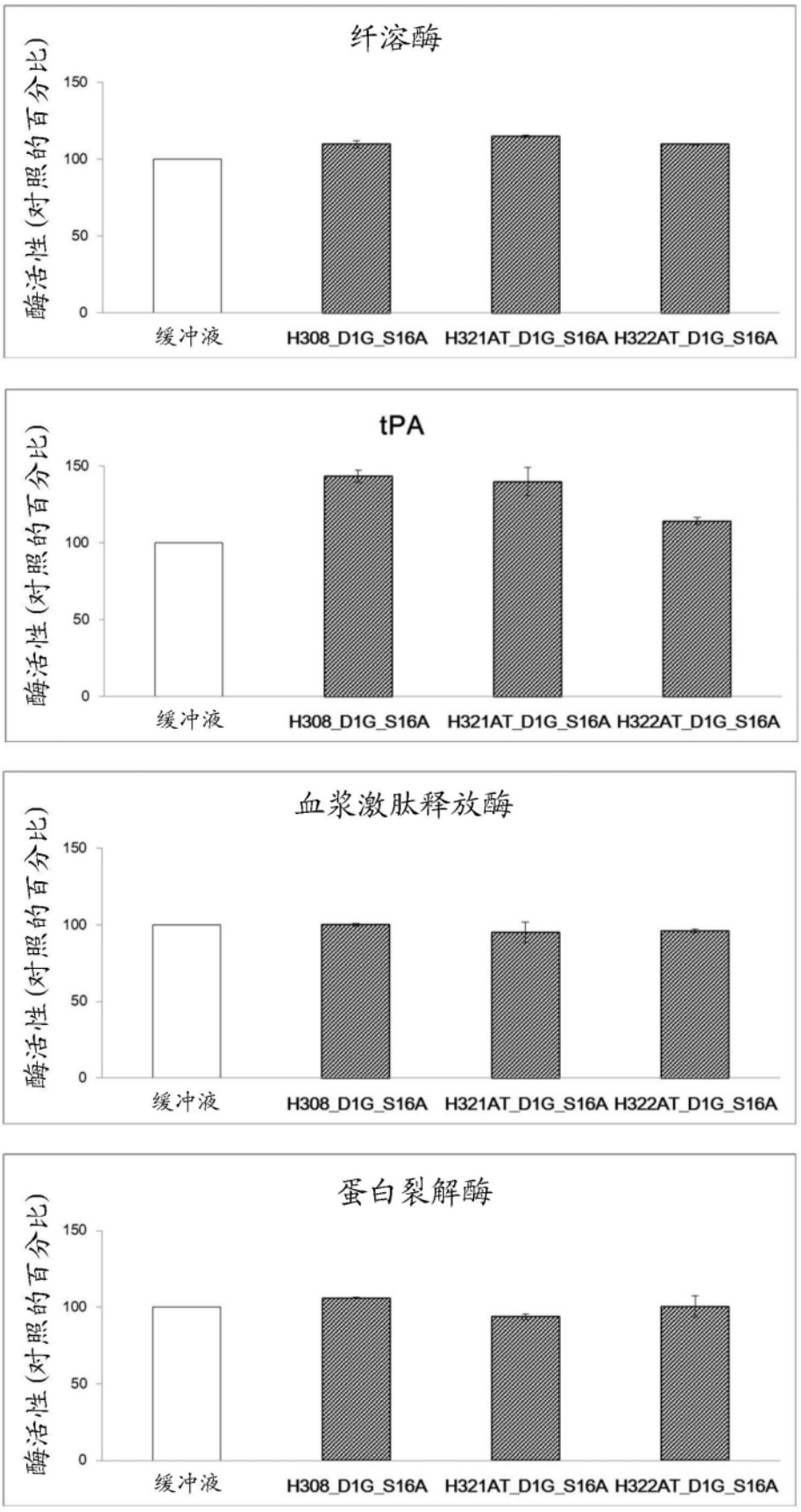

纤溶酶
酶活性(对照的百分比)
150
100
50
0
缓冲液
H308_D1G_S16A
H321AT_D1G_S16A
H322AT_D1G_S16A
tPA
酶活性(对照的百分比)
150
100
50
0
缓冲液
H308_D1G_S16A
H321AT_D1G_S16A
H322AT_D1G_S16A
血浆激肽释放酶
酶活性(对照的百分比)
150
100
50
0
缓冲液
H308_D1G_S16A
H321AT_D1G_S16A
H322AT_D1G_S16A
蛋白裂解酶
酶活性(对照的百分比)
150
100
50
0
缓冲液
H308_D1G_S16A
H321AT_D1G_S16A
H322AT_D1G_S16A

图 68(C)

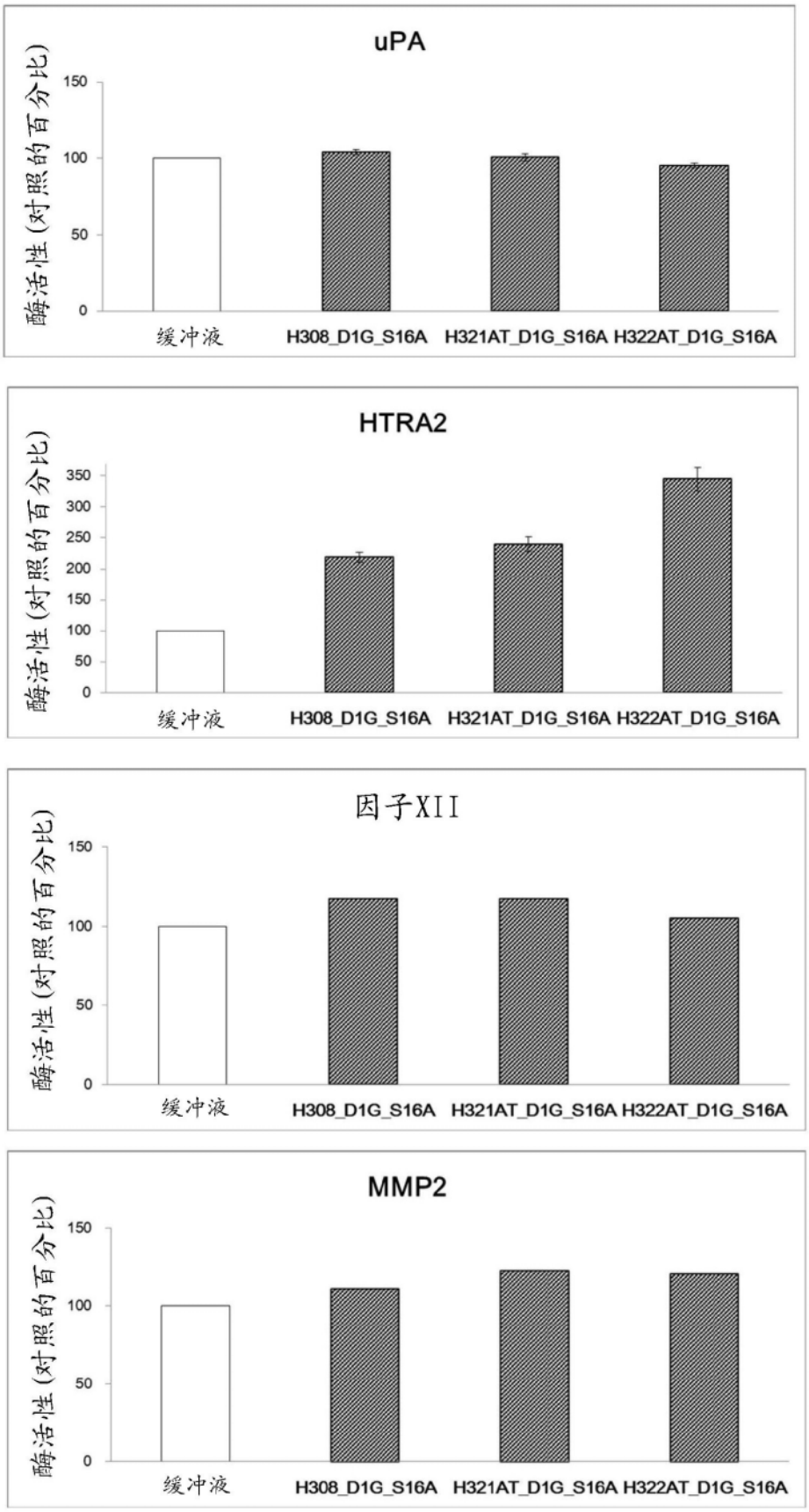

uPA
酶活性(对照的百分比)
150
100
50
0
缓冲液
H308_D1G_S16A
H321AT_D1G_S16A
H322AT_D1G_S16A
HTRA2
酶活性(对照的百分比)
350
300
250
200
150
100
50
0
缓冲液
H308_D1G_S16A
H321AT_D1G_S16A
H322AT_D1G_S16A
因子XII
酶活性(对照的百分比)
150
100
50
0
缓冲液
H308_D1G_S16A
H321AT_D1G_S16A
H322AT_D1G_S16A
MMP2
酶活性(对照的百分比)
150
100
50
0
缓冲液
H308_D1G_S16A
H321AT_D1G_S16A
H322AT_D1G_S16A

图 68(D)

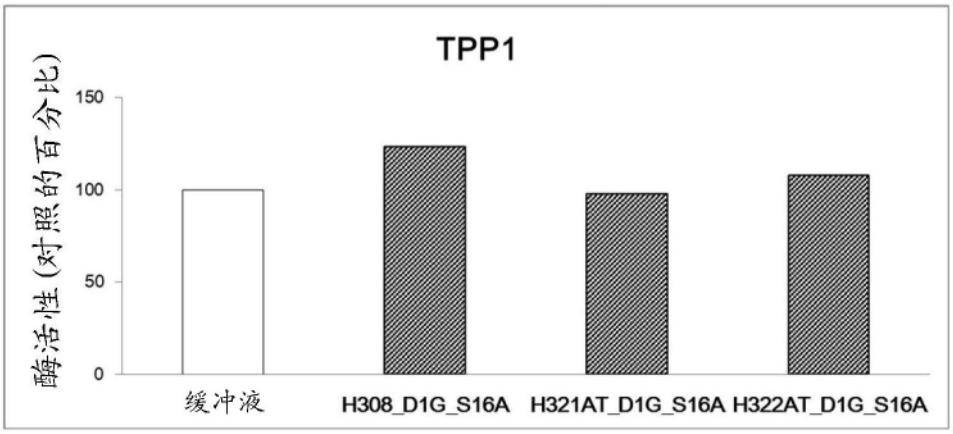

TPP1
酶活性(对照的百分比)
150
100
50
0
缓冲液
H308_D1G_S16A
H321AT_D1G_S16A
H322AT_D1G_S16A

图 68(E)

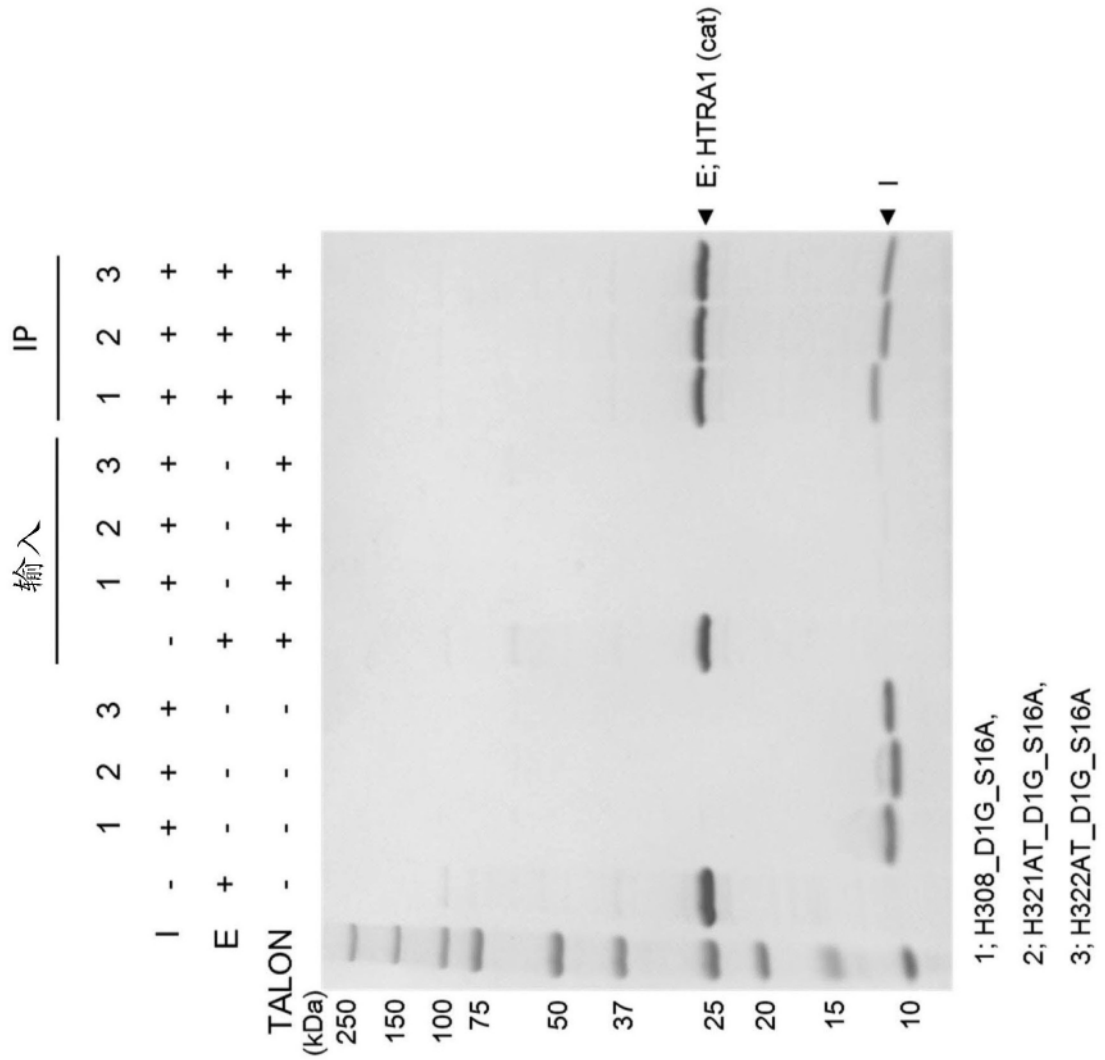

E; HTRA1 (cat)
I
IP
输入
1 2 3 1 2 3
I - + + + + + + + +
E + - - - - - + + +
TALON - - - - - - + + +
(kDa)
250
150
100
75
50
37
25
20
15
10
1; H308_D1G_S16A,
2; H321AT_D1G_S16A,
3; H322AT_D1G_S16A

图 69

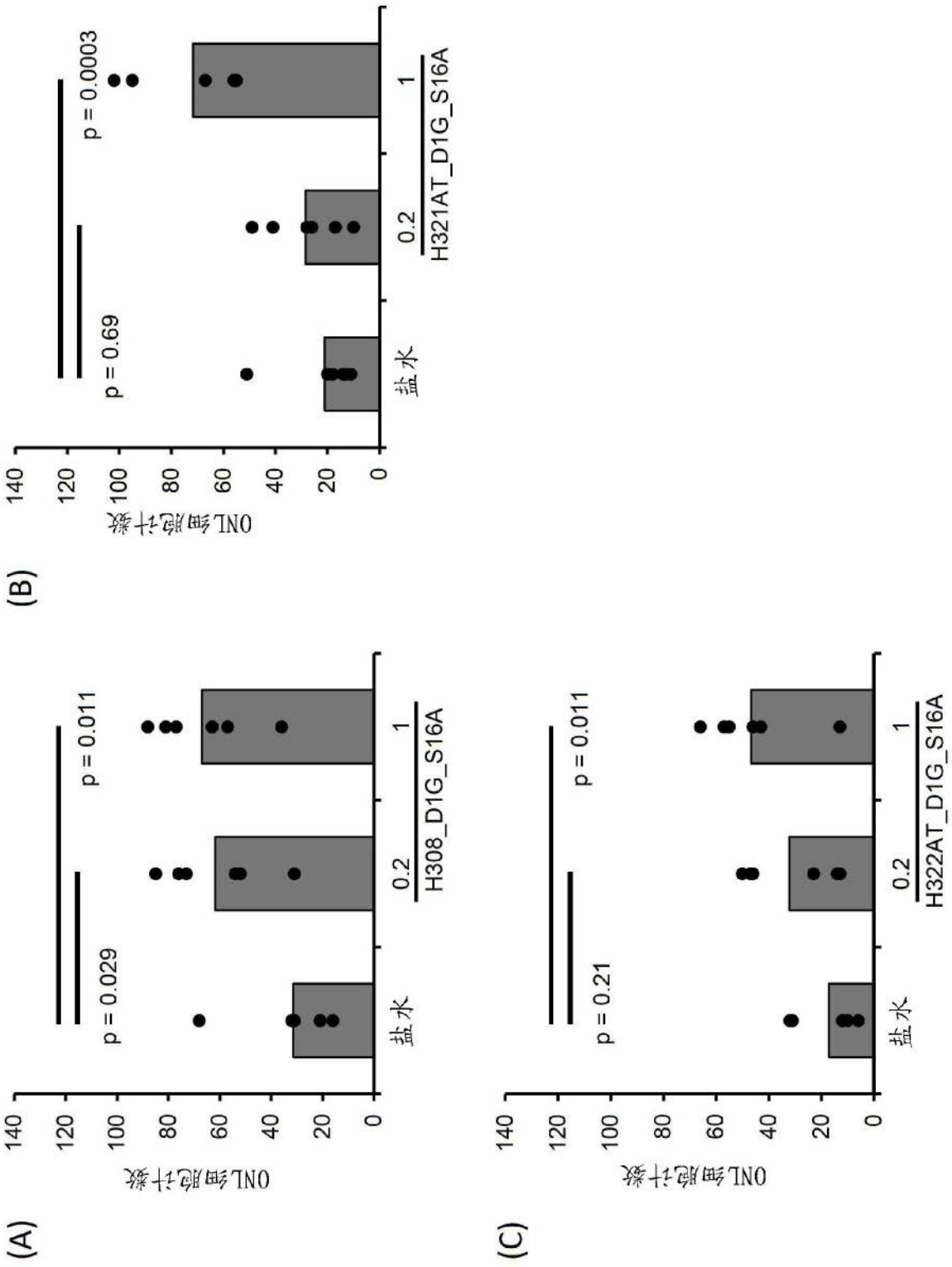
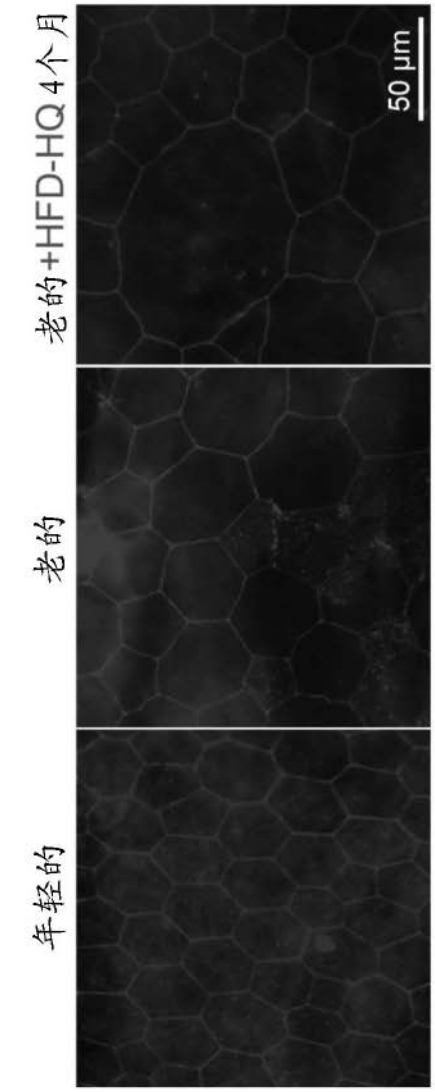
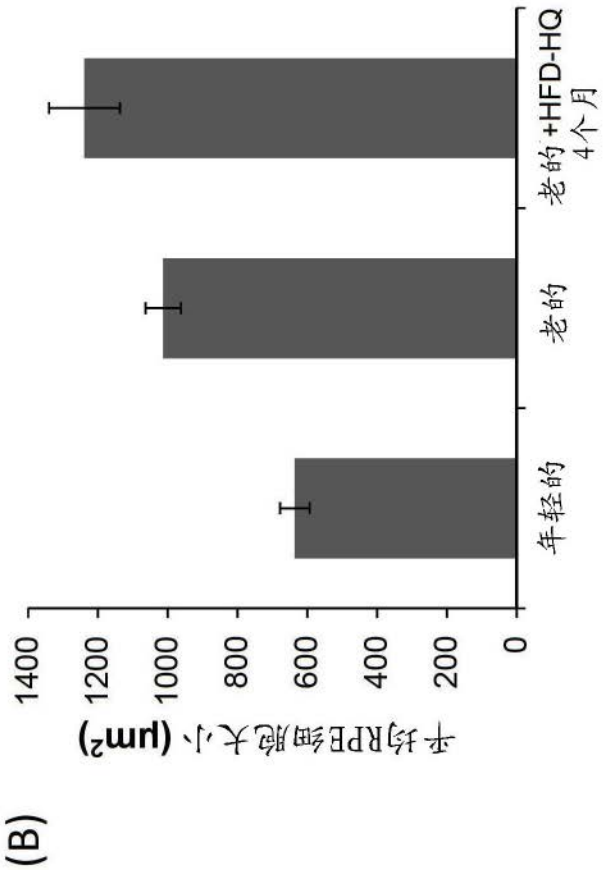

(A)
ONL细胞计数
140
120
100
80
60
40
20
0
p = 0.029
p = 0.011
盐水
0.2
1
H308_D1G_S16A
(B)
ONL细胞计数
140
120
100
80
60
40
20
0
p = 0.69
p = 0.0003
盐水
0.2
1
H321AT_D1G_S16A
(C)
ONL细胞计数
140
120
100
80
60
40
20
0
p = 0.21
p = 0.011
盐水
0.2
1
H322AT_D1G_S16A

图 70


(A)
年轻的
老的
老的+HFD-HQ 4个月
50 μm


(B)
平均RPE细胞大小 (μm²)
0
200
400
600
800
1000
1200
1400
年轻的
老的
老的+HFD-HQ 4个月

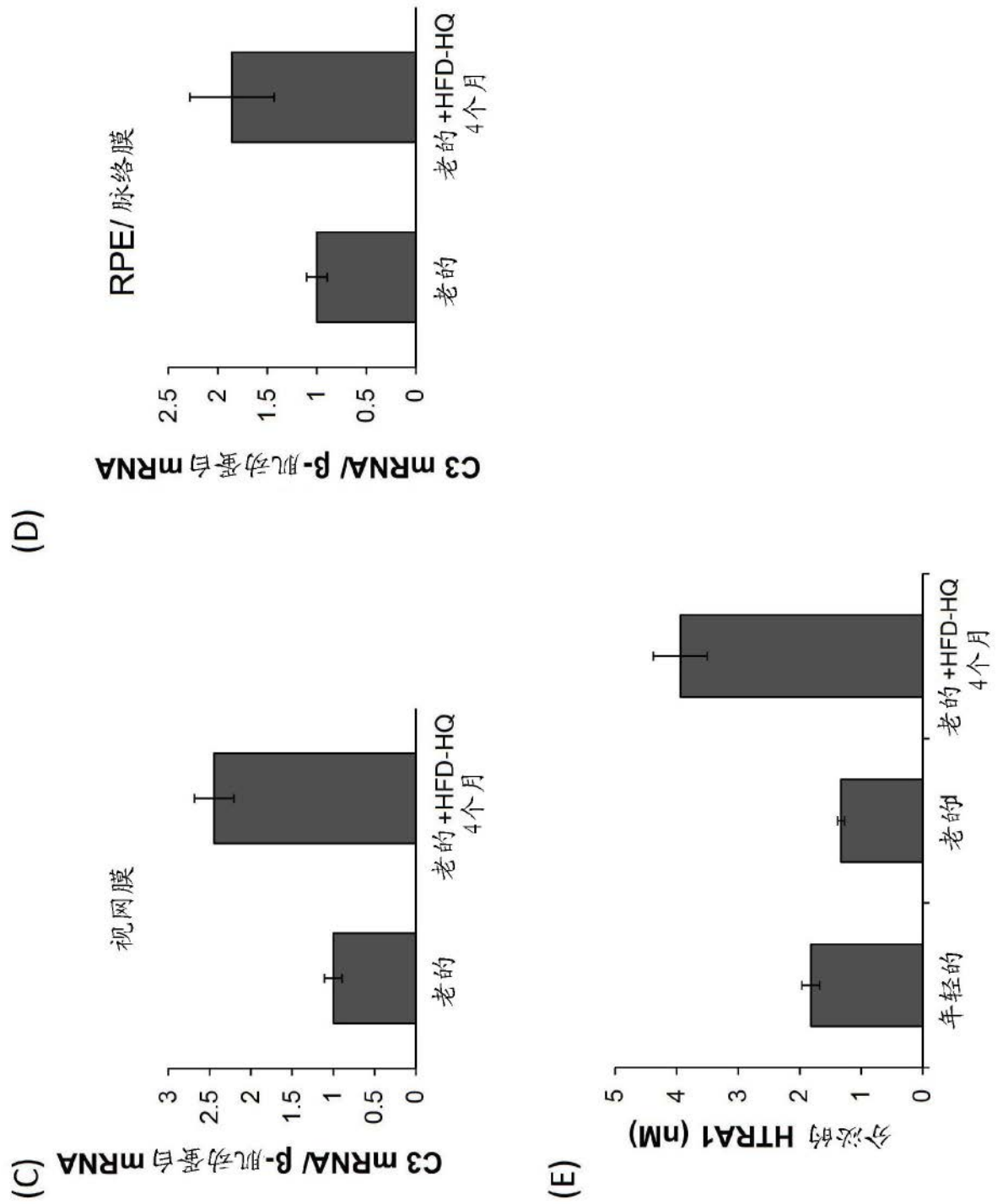

(D)
RPE/脉络膜
C3 mRNA/ β-肌动蛋白 mRNA
2.5
2
1.5
1
0.5
0
老的
老的 +HFD-HQ
4个月
(C)
视网膜
C3 mRNA/ β-肌动蛋白 mRNA
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
老的
老的 +HFD-HQ
4个月
(E)
分泌的 HTRA1 (nM)
5
4
3
2
1
0
年轻的
老的
老的 +HFD-HQ
4个月

图 71

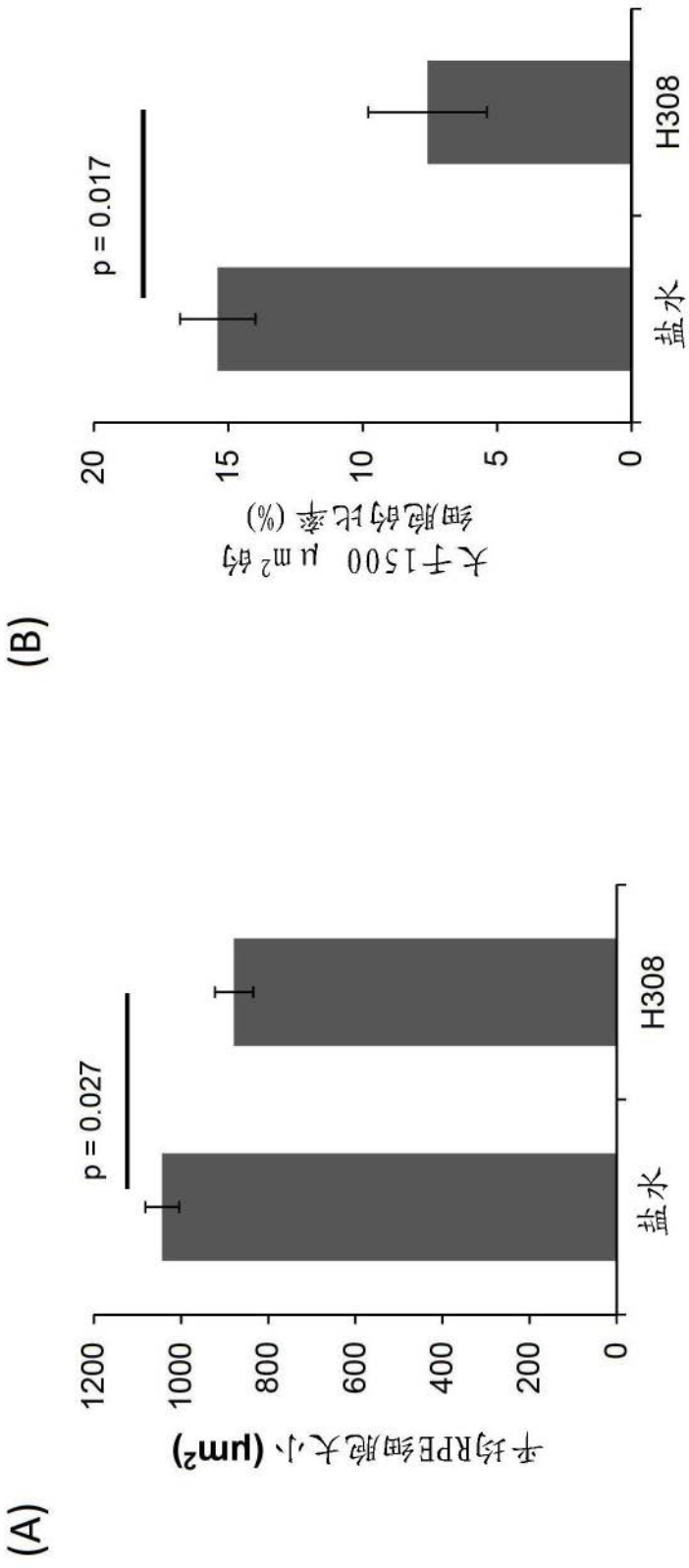

(A)
平均RPE细胞大小 (μm²)
1200
1000
800
600
400
200
0
p = 0.027
盐水
H308
(B)
大于1500 μm²的
细胞的比率 (%)
20
15
10
5
0
p = 0.017
盐水
H308

图 72

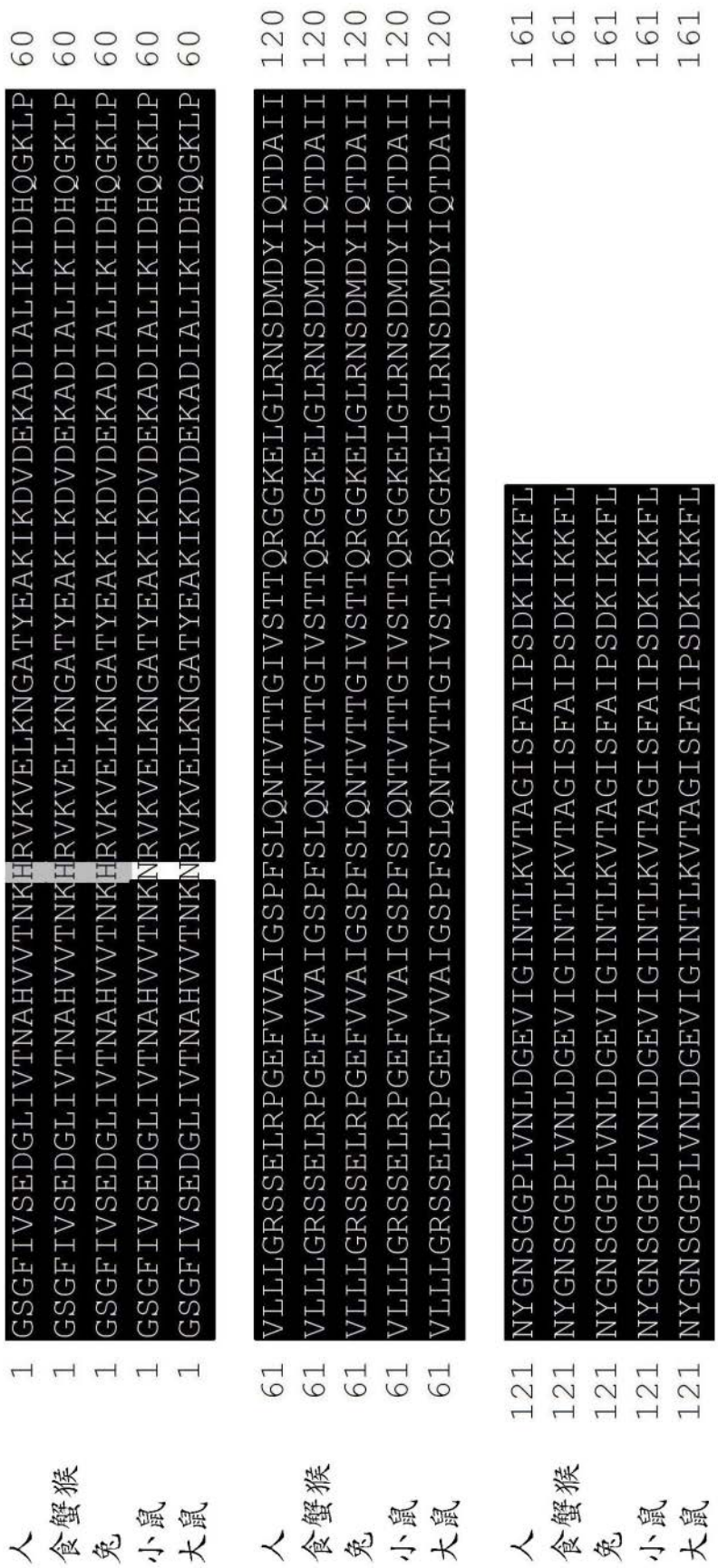

人 1 GSGFIVSEDGLIVTNAHVVTNKHRVKVELKNGATYEAKIKDVDEKADIALIKIDHQGKLP 60
食蟹猴 1 GSGFIVSEDGLIVTNAHVVTNKHRVKVELKNGATYEAKIKDVDEKADIALIKIDHQGKLP 60
兔 1 GSGFIVSEDGLIVTNAHVVTNKHRVKVELKNGATYEAKIKDVDEKADIALIKIDHQGKLP 60
小鼠 1 GSGFIVSEDGLIVTNAHVVTNKNRVKVELKNGATYEAKIKDVDEKADIALIKIDHQGKLP 60
大鼠 1 GSGFIVSEDGLIVTNAHVVTNKNRVKVELKNGATYEAKIKDVDEKADIALIKIDHQGKLP 60
人 61 VLLLGRSSELRPGEFVVAIGSPFSLQNTVTTGIVSTTQRGGKELGLRNSDMDYIQTDAII 120
食蟹猴 61 VLLLGRSSELRPGEFVVAIGSPFSLQNTVTTGIVSTTQRGGKELGLRNSDMDYIQTDAII 120
兔 61 VLLLGRSSELRPGEFVVAIGSPFSLQNTVTTGIVSTTQRGGKELGLRNSDMDYIQTDAII 120
小鼠 61 VLLLGRSSELRPGEFVVAIGSPFSLQNTVTTGIVSTTQRGGKELGLRNSDMDYIQTDAII 120
大鼠 61 VLLLGRSSELRPGEFVVAIGSPFSLQNTVTTGIVSTTQRGGKELGLRNSDMDYIQTDAII 120
人 121 NYGNSGGPLVNLDGEVIGINTLKVTAGISFAIPSDKIKKFL 161
食蟹猴 121 NYGNSGGPLVNLDGEVIGINTLKVTAGISFAIPSDKIKKFL 161
兔 121 NYGNSGGPLVNLDGEVIGINTLKVTAGISFAIPSDKIKKFL 161
小鼠 121 NYGNSGGPLVNLDGEVIGINTLKVTAGISFAIPSDKIKKFL 161
大鼠 121 NYGNSGGPLVNLDGEVIGINTLKVTAGISFAIPSDKIKKFL 161

图 73

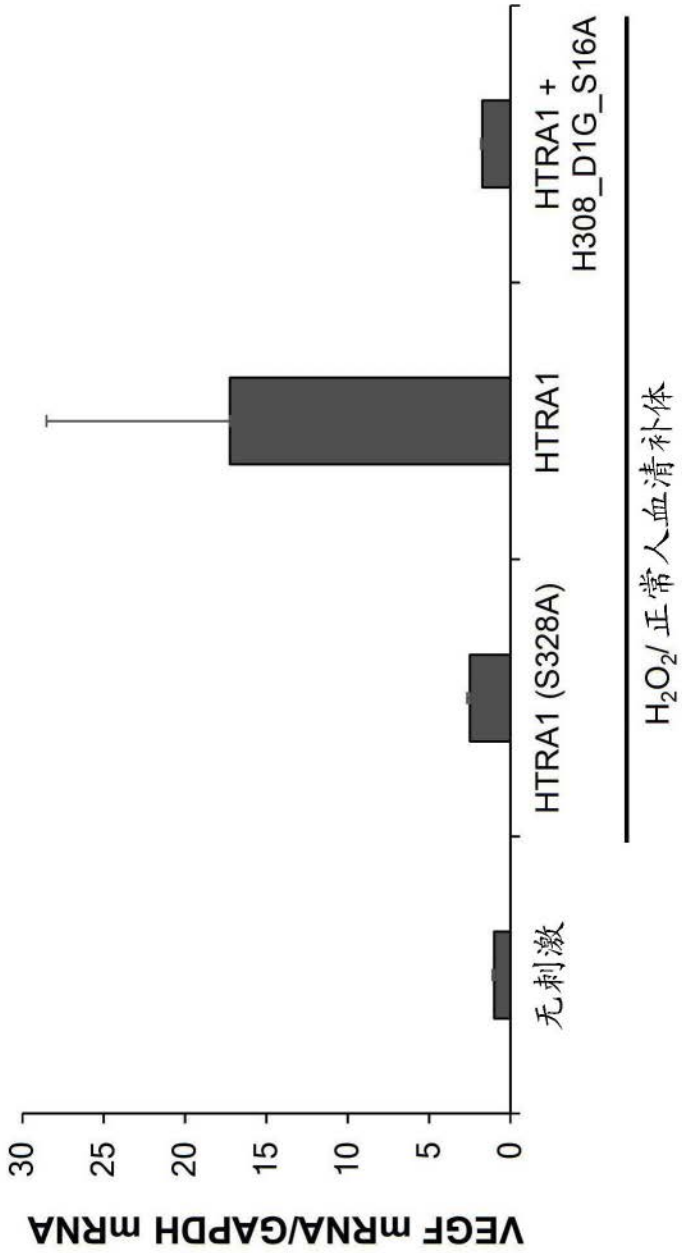

VEGF mRNA/GAPDH mRNA
30
25
20
15
10
5
0
无刺激
HTRA1 (S328A)
HTRA1
HTRA1 + H308_D1G_S16A
H2O2/ 正常人血清补体

图 74

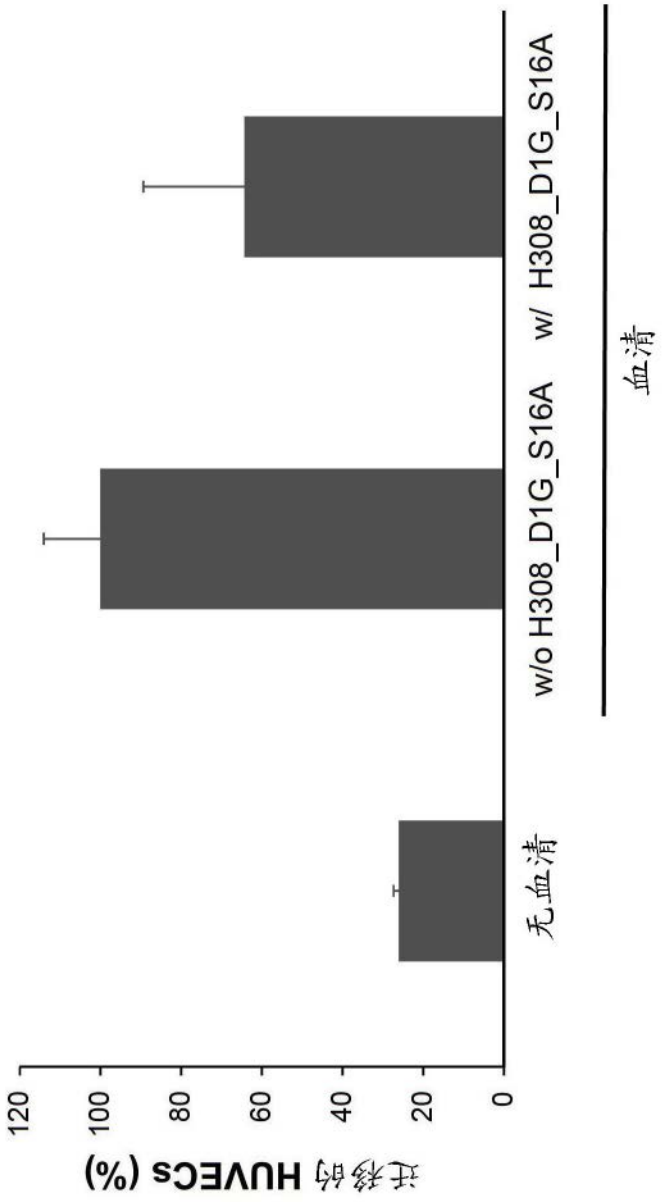


图 75

引物21

CCATCATCAACTACGGCAACGCGGGCGGACCCCTC

GTGAACC（SEQ ID NO：55）

图 76

引物22

GGTTCACGAGGGGTCCGCCCGCGTTGCCGTAGTTG
ATGATGG（SEQ ID NO：56）

图 77