



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 112739367 B

(45) 授权公告日 2025. 06. 06

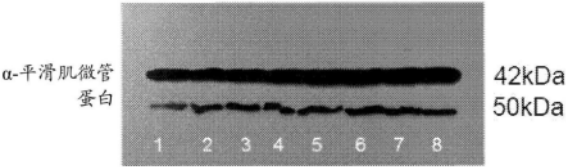
(21) 申请号 201980059209.6	(72) 发明人 D·克里斯滕森 J·J·科冷
(22) 申请日 2019.09.10	(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
(65) 同一申请的已公布的文献号 申请公布号 CN 112739367 A	专利代理师 黄登高 彭昶
(43) 申请公布日 2021.04.30	(51) Int.Cl.
(30) 优先权数据 62/728997 2018.09.10 US	A61K 38/08 (2019.01)
(85) PCT国际申请进入国家阶段日 2021.03.10	A61K 38/10 (2006.01)
(86) PCT国际申请的申请数据 PCT/US2019/050332 2019.09.10	A61K 38/16 (2006.01)
(87) PCT国际申请的公布数据 W02020/055812 EN 2020.03.19	A61K 38/17 (2006.01)
(73) 专利权人 莱恩治疗公司 地址 美国德克萨斯州	A61P 11/00 (2006.01)
	C07K 7/06 (2006.01)
	(56) 对比文件
	CN 107405379 A,2017.11.28
	审查员 白静
	权利要求书1页 说明书26页
	序列表10页 附图1页

(54) 发明名称

CAV-1蛋白的修饰的肽片段及其在纤维化治疗中的用途

(57) 摘要

本文提供了包含修饰的小窝蛋白1 (Cav-1) 肽的组合物。还提供了使用所述修饰的Cav-1肽治疗肺感染或急性或慢性肺损伤,特别是肺纤维化的方法。



1. 一种由氨基酸序列KASFTTFTVTKGS、aaEGKASFTTFTVTKGSaa-NH₂或Ac-aaEGKASFTTFTVTKGSaa-NH₂组成的肽。

2. 如权利要求1所述的肽,其中所述肽由氨基酸序列KASFTTFTVTKGS或aaEGKASFTTFTVTKGSaa-NH₂组成。

3. 由氨基酸序列Ac-aaEGKASFTTFTVTKGSaa-NH₂组成的肽。

4. 一种组合物,其包含如权利要求1-3中任一项所述的肽。

5. 如权利要求4所述的组合物,其中所述肽是至少95%纯的。

6. 如权利要求4或5所述的组合物,其中所述肽是至少98%纯的。

7. 如权利要求4或5所述的组合物,其中所述肽是纯的。

8. 一种药物组合物,其包含如权利要求1-3中任一项所述的肽和药学上可接受的载剂。

9. 如权利要求8所述的药物组合物,其中所述药物组合物被配制为雾化溶液。

10. 一种多核苷酸,其包含编码如权利要求1-3中任一项所述的肽的核酸序列。

11. 如权利要求3所述的肽在制备用于治疗或预防受试者的疾病的药物中的用途,其中向所述受试者施用有效量的所述肽,其中所述受试者患有非特异性间质性肺炎或特发性肺纤维化。

12. 如权利要求11所述的用途,其中所述受试者患有非特异性间质性肺炎。

13. 如权利要求11所述的用途,其中所述受试者患有特发性肺纤维化。

14. 如权利要求11-13中任一项所述的用途,其中所述肽通过雾化施用。

15. 如权利要求11-13中任一项所述的用途,其中所述肽被全身施用。

16. 如权利要求11-13中任一项所述的用途,其中所述肽被局部施用至患病组织。

17. 如权利要求11-13中任一项所述的用途,其中施用至少一种额外抗纤维化治疗剂。

18. 如权利要求17所述的用途,其中所述至少一种额外抗纤维化治疗剂是NSAID。

19. 如权利要求11-13中任一项所述的用途,其中还施用类固醇、DMARD、免疫抑制剂、生物反应调节剂或支气管扩张剂。

20. 如权利要求11-13中任一项所述的用途,其中所述受试者是人。

21. 包含如权利要求1-3中任一项所述的肽的干粉组合物。

22. 如权利要求21所述的干粉组合物,还包含药学上可接受的载剂。

23. 如权利要求21所述的干粉组合物,其中所述肽通过吸入施用。

24. 如权利要求21所述的干粉组合物在制备用于治疗或预防受试者的疾病的药物中的用途,其中向所述受试者施用有效量的所述肽,并且其中所述受试者患有非特异性间质性肺炎或特发性肺纤维化,其中所述肽由氨基酸序列Ac-aaEGKASFTTFTVTKGSaa-NH₂组成。

25. 如权利要求24所述的用途,其中所述受试者患有非特异性间质性肺炎。

26. 如权利要求24所述的用途,其中所述受试者患有特发性肺纤维化。

27. 如权利要求1-3中任一项所述的肽,其中所述肽可溶于水溶液。

CAV-1蛋白的修饰的肽片段及其在纤维化治疗中的用途

[0001] 本申请要求2018年9月10日提交的美国临时专利申请号62/728,997的权益,所述临时申请的全部内容以引用的方式并入本文。

[0002] 本发明是在制备本发明时已生效的联合研究协议范围内进行的结果。所述联合研究协议的当事人是德克萨斯大学系统和肺治疗学董事会 (Board of Regents of the University of Texas System and Lung Therapeutics)。

背景技术

[0003] 本发明总体上涉及分子生物学和医学领域。更具体地,本发明涉及用于将治疗性多肽组合物递送到受试者(诸如通过递送到呼吸系统)的组合物和方法。

[0004] 2. 相关技术说明

[0005] 在肺损伤期间,p53表达增加,从而诱导纤溶酶原活化物抑制剂1 (PAI-1),同时抑制尿激酶型纤溶酶原活化物 (uPA) 及其受体 (uPAR) 的表达,进而导致肺上皮细胞 (LEC) 凋亡。损伤的机制涉及uPA、uPAR、小窝蛋白1 (“Cav-1”) 与 β 1整合素之间的细胞表面信号传导相互作用 (Shetty等人,2005)。调节这些相互作用的组合物可在用于抑制受伤或受损的肺上皮细胞凋亡的方法和用于治疗急性肺损伤和随后的肺纤维化的方法中使用。因此,需要可用于预防或治疗肺损伤的多肽,并且特别是用于治疗性递送此类多肽的制剂和方法。

发明内容

[0006] 根据本公开,提供了一种包含氨基酸序列SEQ ID NO:2的肽,其中所述肽包含至少一个N末端或C末端添加。N末端或C末端添加可以是标准氨基酸、非标准氨基酸或化学修饰。提供了本公开的肽的肽多聚体。还提供了一种所述肽的药物组合物。本公开的肽可用于治疗肺损伤、感染或疾病。在其他方面,实施方案的肽可用于治疗纤维化病状(例如器官纤维化)或炎症。

[0007] 在一些实施方案中,本公开提供了一种包含氨基酸序列ASFTTFTVT (SEQ ID NO:3) 的肽,其中所述肽包含至少一个与SEQ ID NO:1缺乏同一性的N末端或C末端添加。在一些方面,所述肽包含至少一个添加到N末端的氨基酸。在一些方面,所述肽包含至少一个添加到C末端的氨基酸。在一些方面,所述肽包含至少一个添加到N末端和C末端的氨基酸。在一些方面,所述肽保持小窝蛋白1 (Cav-1) 的生物活性。在其他方面,实施方案的肽可包含一个或多个氧化残基。

[0008] 在一些方面,所述肽包含L-氨基酸。在一些方面,所述肽包含D-氨基酸。在一些方面,所述肽包含L-氨基酸和D-氨基酸两者。

[0009] 在一些方面,所述肽包含至少一个非标准氨基酸。在一些方面,所述肽包含2个或更多个非标准氨基酸。在一些方面,所述肽包含4个或更多个非标准氨基酸。在一些方面,所述非标准氨基酸是鸟氨酸。在一些方面,所述非标准氨基酸是D-丙氨酸。

[0010] 在一些方面,所述肽包含N末端或C末端修饰。在一些方面,所述肽包含N末端修饰。在一些方面,所述肽包含C末端修饰。在一些方面,所述肽包含N末端和C末端修饰。在一些方

面,所述N末端修饰是酰化。在一些方面,所述C末端修饰是酰胺化。

[0011] 在一些方面,所述肽包含氨基酸序列KASFTTFTVTKGS(SEQ ID NO:4)。在一些方面,所述肽包含氨基酸序列aaEGKASFTTFTVTKGSaa(SEQ ID NO:6)。在其他方面,所述肽包含氨基酸序列OASFTTFTVTOS(SEQ ID NO:9)。在其他方面,所述肽包含氨基酸序列aaEGKASFTTFTVTKGSaa-NH₂(SEQ ID NO:7)。在其他方面,所述肽包含氨基酸序列Ac-aaEGKASFTTFTVTKGSaa-NH₂(SEQ ID NO:8)。在其他方面,所述肽包含氨基酸序列OASFTTFTVTOS-NH₂(SEQ ID NO:10)。

[0012] 在一些方面,所述肽还包含细胞穿透肽(CPP)。在一些实施方案中,CPP包含选自包括以下的组的氨基酸序列:GRKKRRQRRPPQ(SEQ ID NO:21)、RQIKIWFQNRRMKWKK(SEQ ID NO:22)和GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRQQ(SEQ ID NO:23)。

[0013] 在一些实施方案中,本公开提供了一种包含至少两个如本文公开的肽的肽多聚体。在一些方面,所述至少两个肽的第一肽与所述至少两个肽的第二肽基本相同。在其他方面,所述至少两个肽的第一肽与所述至少两个肽的第二肽不相同。

[0014] 在一些实施方案中,本公开提供了一种包含本文公开的肽的组合物。在一些方面,所述肽是基本上纯的。在一些方面,所述肽是至少95%纯的、至少96%纯的、至少97%纯的、至少98%纯的或至少99%纯的。

[0015] 在一些实施方案中,本公开提供了一种药物组合物,其包含如本文公开的肽和药学上可接受的载剂。在一些方面,所述药物组合物被配制用于口服、静脉内、关节内、肠胃外、肠内、局部、皮下、肌肉内、经颊、舌下、直肠、阴道内、阴茎内、眼内、硬膜外、颅内或吸入施用。在一些方面,所述药物组合物被配制用于肺滴注。在一些方面,所述药物组合物被配制为雾化溶液。

[0016] 在一些实施方案中,本公开提供了一种多核苷酸,其包含编码如本文所述的肽的核酸序列。

[0017] 在某些方面,实施方案的肽组合物可用于治疗或预防受试者的疾病的方法。在一些方面,所述疾病是纤维化疾病或炎症性疾病。例如,所述纤维化疾病可以是器官纤维化疾病,可以是肾、肝、肺或心脏纤维化。在一些方面,所述炎症性疾病是炎症眼病。实施方案的组合物可全身或局部(例如在患病组织的部位)施用。

[0018] 在一些实施方案中,本公开提供了一种治疗或预防受试者的急性肺损伤、肺感染或肺病的方法,其包括向所述受试者施用有效量的如本文所述的肽。在一些方面,所述受试者患有肺部炎症。在一些方面,所述受试者正经受化学疗法或放射疗法。在一些方面,所述受试者患有急性肺损伤或感染。在一些方面,所述受试者患有化学诱导的肺损伤。在一些方面,所述受试者患有塑型性支气管炎、慢性阻塞性肺病、支气管炎、细支气管炎、闭塞性细支气管炎、哮喘、急性呼吸窘迫综合征(ARDS)或吸入性烟雾诱导的急性肺损伤(ISALI)。在一些方面,所述肺病是肺的纤维化病状。在一些方面,所述肺病是间质性肺病。在一些方面,所述肺病是特发性肺纤维化(IPF)或肺瘢痕。在一些方面,所述施用包括将包含所述肽的溶液雾化。在一些方面,所述方法还包括施用至少一种额外抗纤维化治疗剂。在一些方面,所述至少一种额外抗纤维化剂是NSAID、类固醇、DMARD、免疫抑制剂、生物反应调节剂或支气管扩张剂。在一些方面,所述受试者是人。

[0019] 预期的是,本文所述的任何方法或组合物可相对于本文所述的任何其他方法或组

合物来实施。本公开的其他目的、特征和优点将从以下详细描述中变得清楚。然而应当理解的是,虽然详细描述和具体实施例指示本公开的具体实施方案,但它们仅通过说明的方式给出,因为本公开的精神和范围内的各种变化和修改对于阅读此详细描述的本领域技术人员将变得清楚。

附图说明

[0020] 以下附图形成本说明书的一部分,并且被包括来进一步说明本发明的某些方面。可通过参考这些附图中的一个或多个并结合本文提出的具体实施方案的详细描述来更好地理解本发明。

[0021] 图1:使用Cav-1肽处理的SMA和微管蛋白特发性肺纤维化细胞的蛋白质印迹。用以下物质处理IPF细胞:1:未处理,2:10 μ M LTI-03,3:90 μ M LTI-03,4:10 μ M APi2350,5:10 μ M APi2354,6:10 μ M APi2355,7:10 μ M APi2356,以及8:DMSO,并且通过蛋白质印迹来评估SMA和微管蛋白表达。

[0022] 图2:用Cav-1肽处理在IPF细胞中相对于微管蛋白增加了SMA。接受指定治疗的细胞中SMA与微管蛋白比率的图形表示。

具体实施方式

[0023] 本公开通过提供修饰的小窝蛋白1 (Cav-1) 肽及其用于疾病治疗和预防 (特别是肺纤维化) 的用途来克服与现有技术相关的挑战。在一些方面,提供了修饰的Cav-1肽的药物制剂。例如,在一些方面,所述肽被配制用于递送到呼吸系统。例如,可制备肽,以用于通过在水性溶液中配制并使用雾化器雾化所述溶液来向受试者气道施用。在其他方面,肽可被配制用于注射。本文还提供了一种治疗肺损伤和疾病的方法,其通过向所述受试者 (例如经由气道) 施用治疗有效量的修饰的Cav-1肽来进行。

[0024] I. 定义

[0025] 如本文所用,就指定的组分而言,“基本上不含”在本文中用于意指没有将指定的组分故意地配制为组合物和/或仅作为污染物或以痕量存在因此,由组合物的任何意外污染导致的指定组分的总量远低于0.01%。使用标准分析方法不能检测到指定组分的量的组合物是最优选的。

[0026] 如本文说明书所用,“一个/一种 (a/an)”可意指一个 (种) 或多个 (种)。如本文的一个或多个权利要求中所用,当与词语“包含/包括 (comprising)”结合使用时,词语“一个/一种 (a/an)”可意指一个 (种) 或超过一个 (种)。

[0027] 虽然本公开支持仅是指替代方案和“和/或”的定义,但除非明确指出仅是指替代方案或者所述替代方案是互相排斥的,否则权利要求书中使用术语“或”用于意指“和/或”。如本文所用,“另一个 (种)”可意指至少第二个 (种) 或更多个 (种)。

[0028] 在整个本申请中,术语“约”用于表示值包括用于确定所述值的装置或方法的固有误差变化或存在于研究对象之间的变化。

[0029] 如本文所用,术语“肽”通常是指由通过肽键连接的氨基酸的单链组成的氨基酸序列。通常,除非另外定义,否则肽包含至少两个氨基酸残基并且长度小于约50个氨基酸。

[0030] “具有生物活性的”小窝蛋白1 (Cav-1) 肽是指在细胞 (诸如纤维化肺成纤维细胞)

中增加p53蛋白水平、减少尿激酶纤溶酶原活化物 (uPA) 和uPA受体 (uPAR) 和/或增加纤溶酶原活化物抑制剂1 (PAI-1) 表达的肽。在一些方面,所述具有生物活性的肽具有SEQ ID NO:1的天然Cav-1多肽的至少20%的生物或生物化学活性(例如,如通过体外或体内测定所测量)。在一些方面,与天然Cav-1多肽相比,所述具有生物活性的肽具有增加的生物或生物化学活性。

[0031] 术语“同一性”或“同源性”应被解释为意指在比对序列并引入空位(如果需要的话)以实现整个序列的最大同一性百分比并且不考虑将任何保守性取代作为序列同一性的一部分之后,候选序列中与被比较的对应序列的残基相同的氨基酸残基的百分比。N末端或C末端延伸或插入都不应被解释为减少同一性或同源性。用于比对的方法和计算机程序是本领域熟知的。序列同一性可使用序列分析软件来测量。

[0032] 术语“多肽”或“蛋白质”在其最广泛的意义中用于指两个或更多个亚基氨基酸、氨基酸类似物或拟肽物的化合物。所述亚基可通过肽键连接。在另一实施方案中,所述亚基可通过其他键(例如酯、醚等)连接。如本文所用,术语“氨基酸”是指天然和/或非天然或合成的氨基酸(包括甘氨酸和D或L光学异构体)以及氨基酸类似物和拟肽物。术语“拟肽物”或“肽模拟物”意指根据本发明的肽以这种方式修饰,使其包含至少一个非肽键,例如像脲键、氨基甲酸酯键、磺酰胺键、胍键或任何其他共价键。如果肽链较短,则三个或更多个氨基酸的肽通常称为寡肽。如果肽链较长,则肽通常称为多肽或蛋白质。

[0033] 术语“受试者”以及“个体”和“患者”在本文中可互换使用,并且是指向其提供使用如本文公开的药物组合物进行治疗(包括预防性治疗)的动物,例如人或非人动物(例如哺乳动物)。如本文所用,术语“受试者”是指人和非人动物。术语“非人动物”包括所有脊椎动物,例如哺乳动物诸如非人灵长类动物(特别是高等灵长类动物)、绵羊、狗、啮齿动物(例如小鼠或大鼠)、豚鼠、山羊、猪、猫、兔、牛,以及非哺乳动物诸如鸡、两栖动物、爬行动物等。在一个实施方案中,所述受试者是人。在另一实施方案中,所述受试者是作为疾病模型的实验动物或动物替代品。非人哺乳动物包括哺乳动物,诸如非人灵长类动物(特别是高等灵长类动物)、绵羊、狗、啮齿动物(例如小鼠或大鼠)、豚鼠、山羊、猪、猫、兔和牛。在一些方面,非人动物是伴侣动物诸如狗或猫。

[0034] “治疗”受试者的疾病或病状或“治疗”患有疾病或病状的患者是指使所述个体接受药物治疗,例如施用药物,使得所述疾病或病状的至少一种症状减轻或稳定。通常,当所述肽作为治疗进行治疗性施用时,向表现出具有肺损伤或肺纤维化的一种或多种症状的受试者施用所述肽。

[0035] “分离的”意指所述多肽已从任何天然环境诸如体液(例如血液)中分离,并与天然伴随所述肽的组分分离。

[0036] 分离的以及“基本上纯的”意指已与天然伴随它的组分分离并纯化到至少某种程度的多肽。通常,当多肽至少约60重量%或至少约70重量%、至少约80重量%、至少约90重量%、至少约95重量%或甚至至少约99重量%不含与其天然相关的蛋白质和天然存在的有机分子时,所述多肽是基本上纯的。例如,基本上纯的多肽可通过从天然来源提取,通过在通常不表达所述蛋白质的细胞中表达重组核酸,或通过化学合成来获得。

[0037] 如本文所用,术语“变体”是指与多肽或核酸相差一个或多个氨基酸或核酸的缺失、添加、取代或侧链修饰但仍保留天然存在的分子的一种或多种特定功能或生物活性的

多肽或核酸。氨基酸取代包括氨基酸被不同的天然存在或非常规的氨基酸残基置换的改变。此类取代可被分类为“保守的”，在这种情况下，多肽中所含有的氨基酸残基被另一种在极性、侧链官能性或大小方面具有类似特征的自然存在的氨基酸置换。此类保守性取代是本领域熟知的。本发明所涵盖的取代也可以是“非保守的”，其中存在于肽中的氨基酸残基被具有不同特性的氨基酸（诸如来自不同组的天然存在的氨基酸）取代（例如使用丙氨酸取代带电荷的或疏水的氨基酸），或者可替代地其中天然存在的氨基酸被非常规氨基酸取代。在一些实施方案中，氨基酸取代是保守的。当参考多核苷酸或多肽使用时术语变体中还涵盖，是指与参考多核苷酸或多肽相比（例如与野生型多核苷酸或多肽相比）可分别改变一级、二级或三级结构的多核苷酸或多肽。

[0038] 术语“插入”或“缺失”通常在约1至5个氨基酸的范围内。允许的变化可通过以合成方式产生肽，同时使用重组DNA技术系统地在序列中进行核苷酸的插入、缺失或取代来实验性地确定。

[0039] 当提及肽时术语“取代”是指针对不同实体（例如另一氨基酸或氨基酸部分）的氨基酸的变化。取代可以是保守性取代或非保守性取代。

[0040] 分子（诸如肽）的“类似物”是指功能与整个分子或其片段类似的分子。术语“类似物”还旨在包括等位基因种类和诱导的变体。类似物常常由于保守性取代而通常与天然存在的肽在一个或几个位置上不同。类似物通常与天然肽表现出至少80%或90%序列同一性。一些类似物还包含非天然氨基酸或N末端或C末端氨基酸的修饰。非天然氨基酸的实例是例如但不限于：双取代的氨基酸、N-烷基氨基酸、乳酸、4-羟基脯氨酸、 γ -羧基谷氨酸、 ϵ -N,N,N-三甲基赖氨酸、 ϵ -N-乙酰赖氨酸、O-磷酸丝氨酸、N-乙酰丝氨酸、N-甲酰甲硫氨酸、3-甲基组氨酸、5-羟基赖氨酸、 σ -N-甲基精氨酸。可如下所述在转基因动物模型中针对预防性或治疗性功效筛选片段和类似物。

[0041] “共价键合”意指通过共价化学键直接或间接（例如通过接头）连接。在本发明的所有实施方案的一些方面，融合肽是共价键合的。

[0042] 如本文所用，术语“融合蛋白”是指两种或更多种蛋白质的重组蛋白。融合蛋白可例如通过将编码一种蛋白质的核酸序列连接至编码另一种蛋白质的核酸，使得它们构成单个开放阅读框架来产生，所述开放阅读框架可在细胞中翻译成带有所有预期蛋白的单个多肽。蛋白质的排列顺序可以发生改变。融合蛋白可包含表位标签或半衰期延长剂。表位标签包括生物素、FLAG标签、c-myc、血凝素、His6、洋地黄毒苷、FITC、Cy3、Cy5、绿色荧光蛋白、V5表位标签、GST、 β -半乳糖苷酶、AU1、AU5和抗生物素蛋白。半衰期延长剂包括Fc结构域和清白蛋白。

[0043] 术语“气道”在本文中是指呼吸道的任何部分，包括上呼吸道、呼吸气道和肺。上呼吸道包括鼻子和鼻腔通道、嘴巴和咽喉。呼吸道包括喉、气管、支气管和细支气管。肺包括呼吸细支气管、肺泡管、肺泡囊和肺泡。

[0044] 术语“吸入性烟雾诱导的急性肺损伤”和“ISALI”在本文中可互换使用，并且是指由烟雾吸入引起的急性肺损伤（ALI）的一种形式。ALI也称为“轻度急性呼吸窘迫综合征；ARDS”。ARDS可通过发现受试者的以下状况中的一种或多种来定义：1) 胸部X光片上的双侧肺部浸润；2) 当如临床指示通过右心导管检查进行测量时，肺毛细血管楔压 $<18\text{mmHg}$ （ 2.4kPa ）；以及3) $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 300\text{mmHg}$ （ 40kPa ）。在一些实施方案中，ISALI的治疗包括以下状

况中的一种或多种的治疗:氧合减少、气道阻塞(包括严重气道阻塞)、纤维素性气道铸型或碎片以及肺泡纤维蛋白沉积。

[0045] 术语“雾化(nebulizing/nebulized)”和其他语法变化在本文中是指将液体转化成小气雾剂微滴的过程。在一些实施方案中,所述气雾剂微滴的中值直径为约2-10 μm 。在一些实施方案中,所述气雾剂微滴的中值直径为约2-4 μm 。

[0046] II.小窝蛋白1肽

[0047] 本公开的实施方案提供了小窝蛋白1(Cav-1)蛋白的肽变体。小窝蛋白1(Cav-1)支架结构域或多肽干扰Cav-1与Src激酶的相互作用,模拟uPA和抗 β 1整合素抗体的组合作用。天然人Cav-1的长度为178个氨基酸,并且分子量为22kDa。Cav-1的氨基酸序列示出在下文中(SEQ ID NO:1)。

[0048] 1 MSGGKYVDSE GHLYTVPIRE QGNIYKPNK AMADELSEKQ VYDAHTKEID LVNRDPKHLN
61 DDVVKIDFED VIAPEGTHS FDGIWKASFT TFTVTKYWFY RLLSALFGIP MALIWGIYFA
121 ILSFLHIWAV VPCIKSFLIE IQCISRVYSI YVHTVCDPLF EAVGKIFSNV RINLQKEI

[0049] 在一些方面,所述肽是支架结构域肽,其包含与SEQ ID NO:2FTTFTVT具有至少约40%、50%、60%、70%、80%、85%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。所述肽可包含相对于序列SEQ ID NO:1的1、2、3、4或更多个氨基酸取代、缺失或插入,从而获得3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18或19个残基的多肽。在特定方面,所述肽是天然Cav-1多肽的截短形式,诸如表1中示出的示例性多肽。

[0050] 表1:示例性Cav-1肽。

[0051]	序列	ID
	ASFTTFTVT	SEQ ID NO:3
[0052]	KASFTTFTVTKGS	SEQ ID NO:4
	KASFTTFTVTKGS-NH ₂	SEQ ID NO: 5
	aaEGKASFTTFTVTKGSaa	SEQ ID NO: 6
	aaEGKASFTTFTVTKGSaa-NH ₂	SEQ ID NO: 7
	Ac-aaEGKASFTTFTVTKGSaa-NH ₂	SEQ ID NO: 8
	OASFTTFTVTOS	SEQ ID NO: 9
	OASFTTFTVTOS-NH ₂	SEQ ID NO: 10
	FTTFTVT-NH ₂	SEQ ID NO: 11
	FTTFTVTK-NH ₂	SEQ ID NO: 12
	KASFTTFTVTK-NH ₂	SEQ ID NO: 13
	Ac-KASFTTFTVTK-NH ₂	SEQ ID NO: 14
	OASFTTFTVTK-NH ₂	SEQ ID NO: 15
	Ac-OASFTTFTVTK-NH ₂	SEQ ID NO: 16
	Ac-KASFTTFTVTKGS-NH ₂	SEQ ID NO: 17
	DSGKASFTTFTVTK-NH ₂	SEQ ID NO: 18
	Ac-DSGKASFTTFTVTK-NH ₂	SEQ ID NO: 19
	Ac-OASFTTFTVTOS-NH ₂	SEQ ID NO: 20

[0053] (a=D-丙氨酸,0=鸟氨酸)

[0054] 本公开提供的肽是具有生物活性的衍生物,其在结合或生物活性的体外或体内测定中具有天然CAV-1多肽的活性。在特定方面,所述肽在体外或体内抑制或预防由BLM诱导

的LEC的凋亡,其活性为天然CAV-1多肽活性的至少约20%,或至少约30%、40%、50%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、约95%、97%、99%以及其中可推导的任何范围,例如像约70%至80%,并且更优选地约81%至约90%;或者甚至更优选地约91%至约99%。所述肽可具有与天然CAV-1多肽相比100%或者甚至更高的活性。用于测试生物活性(例如抗纤维化活性,影响uPA、uPAR和PAI-1mRNA的表达的能力或抑制肺成纤维细胞增殖的能力)的测定是本领域熟知的。

[0055] 本公开的肽是天然Cav-1多肽或其修饰型式的肽。所述肽可以是使用本领域熟知的方法分离或产生的合成、重组或化学修饰的肽。可对N末端、C末端或内部的氨基酸进行修饰。N末端修饰可以是例如但不限于酰化、乙酰化或C末端酰胺化。肽可包含如下文所述的保守性或非保守性氨基酸变化。多核苷酸的变化可导致由参考序列编码的多肽中的氨基酸取代、添加、缺失、融合和截短。肽还可包含氨基酸的插入、缺失或取代,包括在作为修饰变体的基础的肽序列中通常不会出现的氨基酸(以及其他分子)的插入和取代,例如但不限于通常不会出现在人类蛋白质中的插入L-氨基酸或非标准氨基酸诸如鸟氨酸。当描述肽时,术语保守性取代是指所述肽的氨基酸组成的变化,其基本上不改变所述肽的活性。例如,保守性取代是指用氨基酸残基取代具有类似化学特性的不同氨基酸残基。保守性氨基酸取代包括用异亮氨酸或缬氨酸置换亮氨酸、用谷氨酸置换天冬氨酸、或用丝氨酸置换苏氨酸。

[0056] 保守性氨基酸取代是由一种氨基酸置换为具有类似结构和/或化学特性的另一种氨基酸,诸如用异亮氨酸或缬氨酸置换亮氨酸、用谷氨酸置换天冬氨酸、或用丝氨酸置换苏氨酸。因此,特定氨基酸序列的保守性取代是指取代对多肽活性不关键的那些氨基酸或者用具有类似特性(例如酸性、碱性、带正电荷或负电荷、极性或非极性等)的其他氨基酸取代氨基酸,使得甚至取代关键氨基酸也不会降低肽的活性。提供功能上类似的氨基酸的保守性取代表是本领域熟知的。例如,以下六个组各自包含彼此为保守性取代的氨基酸:1) 丙氨酸(A)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T);2) 天冬氨酸(D)、谷氨酸(E);3) 天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q);4) 精氨酸(R)、赖氨酸(K);5) 异亮氨酸(I)、亮氨酸(L)、甲硫氨酸(M)、缬氨酸(V);以及6) 苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)、色氨酸(W)。(还参见Creighton, Proteins, W.H. Freeman and Company (1984), 所述文献以引用的方式整体并入)。在一些实施方案中,如果变化不降低肽的活性,则改变、添加或缺失单个氨基酸或小百分比的氨基酸的个别取代、缺失或添加也可被认为是保守性取代。插入或缺失的范围通常为约1至5个氨基酸。保守性氨基酸的选择可基于肽中待取代的氨基酸的位置来选择,例如当氨基酸在肽的外部并暴露于溶剂中或在内部并且未暴露于溶剂中时。

[0057] 在替代性实施方案中,可基于现有氨基酸的位置(即其暴露于溶剂中(即如果与未暴露于溶剂中的内部定位的氨基酸相比,氨基酸暴露于溶剂中或存在于肽或多肽的外表面上))来选择将取代现有氨基酸的氨基酸。此类保守性氨基酸取代的选择是本领域熟知的,例如,如Dordo等人, J. Mol. Biol. 1999, 217, 721-739以及Taylor等人, J. Theor. Biol. 119 (1986); 205-218以及S. French和B. Robson, J. Mol. Evol. 19 (1983) 171中所公开。因此,可选择适用于蛋白质或肽外部的氨基酸(即暴露于溶剂中的氨基酸)的保守性氨基酸取代,例如但不限于,可使用以下取代:用F取代Y,用S或K取代T,用A取代P,用D或Q取代E,用D或G取代N,用K取代R,用N或A取代G,用S或K取代T,用N或E取代D,用L或V取代I,用Y取代F,用T或A取代S,用K取代R,用N或A取代G,用R取代K,用S、K或P取代A。

[0058] 在替代性实施方案中,还可选择适用于蛋白质或肽内部的氨基酸涵盖的保守性氨基酸取代,例如可使用在蛋白质或肽内部(即氨基酸未暴露于溶剂中)的氨基酸的合适保守性取代,例如但不限于,可使用以下保守性取代:其中用F取代Y,用A或S取代T,用L或V取代I,用Y取代W,用L取代M,用D取代N,用A取代G,用A或S取代T,用N取代D,用L或V取代I,用Y或L取代F,用A或T取代S并且用S、G、T或V取代A。在一些实施方案中,非保守性氨基酸取代也涵盖在术语变体内。

[0059] 在一些方面,所述多肽是天然Cav-1多肽的衍生物。如本文所用,术语“衍生物”是指已被化学修饰的肽,所述化学修饰例如但不限于通过技术诸如乙酰化、泛素化、标记、聚乙二醇化(使用聚乙二醇衍生化)、脂化、糖基化、酰胺化或添加其他分子来进行。当分子包含通常并非所述分子的一部分的额外化学部分时,所述分子也是另一种分子的“衍生物”。此类部分可改变pH或改善分子的溶解度、吸收、生物半衰期等。所述部分可以可替代地降低分子的毒性,消除或减弱分子的任何不期望的副作用等。能够介导此类作用的部分在Remington's Pharmaceutical Sciences,第18版,A.R.Gennaro编,MackPubl.,Easton,PA (1990)中公开,所述文献以引用的方式整体并入本文。

[0060] 当与“衍生物”或“变体”结合使用时,术语“功能性”是指生物活性(功能性或结构性)与作为其功能性衍生物或功能性变体的实体或分子的生物活性基本上类似的本发明的多肽。术语功能性衍生物旨在包括分子的片段、类似物或化学衍生物。

[0061] 在一些方面,氨基酸取代可在多肽的一个或多个位置上进行,其中所述取代是针对具有类似亲水性的氨基酸。在本领域中通常理解亲水氨基酸指数在赋予蛋白质相互作用生物学功能方面的重要性(Kyte和Doolittle,1982)。已公认的是,氨基酸的相对亲水特征促成所得蛋白质的二级结构,其继而定义了蛋白质与其他分子例如酶、底物、受体、DNA、抗体、抗原等的相互作用。因此,此类保守性取代可在多肽中进行,并且可能仅对其活性产生较小影响。如美国专利4,554,101中所详述,已将以下亲水性值分配给氨基酸残基:精氨酸(+3.0);赖氨酸(+3.0);天冬氨酸(+3.0±1);谷氨酸(+3.0±1);丝氨酸(+0.3);天冬酰胺(+0.2);谷氨酰胺(+0.2);甘氨酸(0);苏氨酸(-0.4);脯氨酸(-0.5±1);丙氨酸(0.5);组氨酸(-0.5);半胱氨酸(-1.0);甲硫氨酸(-1.3);缬氨酸(-1.5);亮氨酸(-1.8);异亮氨酸(-1.8);酪氨酸(-2.3);苯丙氨酸(-2.5);色氨酸(-3.4)。这些值可用作指导,并且因此亲水性值在±2内的氨基酸的取代是优选的,在±1内的氨基酸的取代是特别优选的,并且在±0.5内的氨基酸的取代是甚至更特别优选的。因此,本文所述的任何多肽都可通过将氨基酸取代成具有类似亲水性值的不同但同源的氨基酸来修饰。亲水性在+/-1.0或+/-0.5点内的氨基酸被认为是同源的。

[0062] 修饰的Cav-1肽可包含共翻译和翻译后(C末端肽裂解)修饰,例如像二硫键形成、糖基化、乙酰化、磷酸化、蛋白水解裂解(例如通过弗林蛋白酶或金属蛋白酶裂解)等,在一定程度上此类修饰不影响分离的肽的抗炎特性或其改善血糖控制的能力。

[0063] 在一些方面,修饰的Cav-1肽包含非天然存在的氨基酸。多肽可包含天然存在的氨基酸和非天然存在的氨基酸的组合,或者可仅包含非天然存在的氨基酸。非天然存在的氨基酸可包括合成的非天然氨基酸、取代的氨基酸或在某些情况下到肽(或除蛋白酶识别序列以外的组合物的其他组分)中为期望的一种或多种D-氨基酸。与含L-氨基酸的形式相比,含D-氨基酸的肽在体外或体内表现出增加的稳定性。因此,当期望或需要更大的体内或细

胞内稳定性时,掺入D-氨基酸的肽的构建可以是特别有用的。更具体地,D-肽对内源肽酶和蛋白酶具有抗性,从而在需要此类特性时提供更好的连接药物和缀合物的口服经上皮和经皮递送、改善的膜-永久复合物的生物利用度(参见下文进一步讨论)和延长的血管内和间质的寿命。使用D-异构体肽也可增强连接药物和其他载物分子的经皮和口服经上皮递送。此外,不能有效处理D-肽以用于主要组织相容性复合物I1类限制性呈递至T辅助细胞,并因此不太可能在整个生物体中诱导体液免疫反应。因此,肽缀合物可使用例如细胞穿透肽序列的D-异构体形式、裂解位点的L-异构体形式和治疗性肽的D-异构体形式来构建。

[0064] 除20个“标准”L-氨基酸外,本领域中已明确定义的D-氨基酸或非标准、修饰或不寻常的氨基酸也可预期用于本公开。磷酸化氨基酸(Ser、Thr、Tyr)、糖基化氨基酸(Ser、Thr、Asn)、 β -氨基酸、GABA、 ω -氨基酸进一步预期用于本公开。这些包括,例如包括 β -丙氨酸(β -Ala)和其他 ω -氨基酸,诸如3-氨基丙酸、2,3-二氨基丙酸(Dpr)、4-氨基丁酸等; α -氨基异丁酸(Aib); ϵ -氨基己酸(Aha); δ -氨基戊酸(Ava);N-甲基甘氨酸或肌氨酸(MeGly);鸟氨酸(Orn);瓜氨酸(Cit);叔丁基丙氨酸(t-BuA);叔丁基甘氨酸(t-BuG);N-甲基异亮氨酸(MeIle);苯甘氨酸(Phg);正亮氨酸(Nle);4-氯苯丙氨酸(Phe(4-Cl));2-氟苯丙氨酸(Phe(2-F));3-氟苯丙氨酸(Phe(3-F));4-氟苯丙氨酸(Phe(4-F));青霉胺(Pen);1,2,3,4-四氢异喹啉-3-羧酸(Tic);高精氨酸(hArg);N-乙酰赖氨酸(AcLys);2,4-二氨基丁酸(Dbu);2,4-二氨基丁酸(Dab);对氨基苯丙氨酸(Phe(pNH₂));N-甲基缬氨酸(MeVal);高半胱氨酸(hCys)、高苯丙氨酸(hPhe)和高丝氨酸(hSer);羟脯氨酸(Hyp)、高脯氨酸(hPro)、N-甲基化氨基酸和类肽(N-取代的甘氨酸)。

[0065] 羧基末端修饰包括与羧酸:甲酸、乙酸、丙酸、脂肪酸(肉豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸)、琥珀酸、苯甲酸、苄氧羰基(Cbz)的酰化;乙酰化和生物素化。氨基末端修饰包括:(i)与羧酸:甲酸、乙酸、丙酸、脂肪酸(肉豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸等)、琥珀酸、苯甲酸、苄氧羰基(Cbz)的酰化;(ii)生物素化;(iii)酰胺化;(iv)附接染料,诸如荧光素(FITC、FAM等)、7-羟基-4-甲基香豆素-3-乙酸、7-羟基香豆素-3-乙酸、7-甲氧基香豆素-3-乙酸和其他香豆素;罗丹明(5-羧基罗丹明110或6G、5(6)-TAMRA、ROX);N-[4-(4-二甲基氨基)苯基偶氮]苯甲酸(Dabcyl)、2,4-二硝基苯(Dnp)、5-二甲氨基萘-1-磺酸(Dansyl)和其他染料;以及(v)聚乙二醇。

[0066] 多肽可在其N末端和C末端分别用酰基(缩写为“Ac”)和酰胺基(缩写为“Am”)封端,例如在N末端用乙酰基(CH₃CO-)封端以及在C末端用酰胺基(-NH₂)封端。预期广泛的N末端封端官能团,优选与末端氨基键联,例如:甲酰基;

[0067] 具有1至10个碳原子的烷酰基,诸如乙酰基、丙酰基、丁酰基;

[0068] 具有1至10个碳原子的烯酰基,诸如己-3-烯酰基;

[0069] 具有1至10个碳原子的炔酰基,诸如己-5-炔酰基;

[0070] 芳酰基,诸如苯甲酰基或1-萘甲酰基;

[0071] 杂芳酰基,诸如3-吡咯基或4-喹啉基;

[0072] 烷基磺酰基,诸如甲磺酰基;

[0073] 芳基磺酰基,诸如苯磺酰基或磺胺酰基;

[0074] 杂芳基磺酰基,诸如吡啶-4-磺酰基;

[0075] 具有1至10个碳原子的取代的烷酰基,诸如4-氨基丁酰基;

- [0076] 具有1至10个碳原子的取代的烯酰基,诸如6-羟基-己-3-烯酰基;
- [0077] 具有1至10个碳原子的取代的炔酰基,诸如3-羟基-己-5-炔酰基;
- [0078] 取代的芳酰基,诸如4-氯苯甲酰基或8-羟基-萘-2-酰基;
- [0079] 取代的杂芳酰基,诸如2,4-二氧-1,2,3,4-四氢-3-甲基-喹唑啉-6-酰基;
- [0080] 取代的烷基磺酰基,诸如2-氨基乙烷磺酰基;
- [0081] 取代的芳基磺酰基,诸如5-二甲基氨基-1-萘磺酰基;
- [0082] 取代的杂芳基磺酰基,诸如1-甲氧基-6-异喹啉磺酰基;
- [0083] 氨基甲酰基或硫代氨基甲酰基;
- [0084] 取代的氨基甲酰基(R'-NH-CO)或取代的硫代氨基甲酰基(R'-NH-CS),其中R'是烷基、烯基、炔基、芳基、杂芳基、取代的烷基、取代的烯基、取代的炔基、取代的芳基或取代的杂芳基;
- [0085] 取代的氨基甲酰基(R'-NH-CO)和取代的硫代氨基甲酰基(R'-NH-CS),其中R'是烷酰基、烯酰基、炔酰基、芳酰基、杂芳酰基、取代的烷酰基、取代的烯酰基、取代的炔酰基、取代的芳酰基或取代的杂芳酰基,其均如上文定义。
- [0086] C末端封端官能团可与末端羧基处于酰胺键或酯键中。提供酰胺键的封端官能团被命名为NR¹R²,其中R¹和R²可独立地从以下基团中得到:氢;
- [0087] 优选地具有1至10个碳原子的烷基,诸如甲基、乙基、异丙基;
- [0088] 优选地具有1至10个碳原子的烯基,诸如丙-2-烯基;
- [0089] 优选地具有1至10个碳原子的炔基,诸如丙-2-炔基;
- [0090] 具有1至10个碳原子的取代的烷基,诸如羟基烷基、烷氧基烷基、巯基烷基、烷硫基烷基、卤代烷基、氰基烷基、氨基烷基、烷基氨基烷基、二烷基氨基烷基、烷酰基烷基、羧基烷基、氨基甲酰基烷基;
- [0091] 具有1至10个碳原子的取代的烯基,诸如羟基烯基、烷氧基烯基、巯基烯基、烷硫基烯基、卤代烯基、氰基烯基、氨基烯基、烷基氨基烯基、二烷基氨基烯基、烷酰基烯基、羧基烯基、氨基甲酰基烯基;
- [0092] 具有1至10个碳原子的取代的炔基,诸如羟基炔基、烷氧基炔基、巯基炔基、烷硫基炔基、卤代炔基、氰基炔基、氨基炔基、烷基氨基炔基、二烷基氨基炔基、烷酰基炔基、羧基炔基、氨基甲酰基炔基;
- [0093] 具有多达10个碳原子的芳酰基烷基,诸如苯甲酰基或2-苯甲酰基乙基;
- [0094] 芳基,诸如苯基或1-萘基;
- [0095] 杂芳基,诸如4-喹啉基;
- [0096] 具有1至10个碳原子的烷酰基,诸如乙酰基或丁酰基;
- [0097] 芳酰基,诸如苯甲酰基;
- [0098] 杂芳酰基,诸如3-喹啉基;
- [0099] OR'或NR'R'',其中R'和R''独立地是氢、烷基、芳基、杂芳基、酰基、芳酰基、磺酰基、亚磺酰基,或者SO₂-R''或SO-R'',其中R''是取代或未取代的烷基、芳基、杂芳基、烯基或炔基。
- [0100] 提供酯键的封端官能团被命名为OR,其中R可以是:烷氧基;芳氧基;杂芳氧基;芳烷氧基;杂芳烷氧基;取代的烷氧基;取代的芳氧基;取代的杂芳氧基;取代的芳烷氧基;或

取代的杂芳烷氧基。

[0101] N末端或C末端封端官能团或两者均可具有此类结构,使得封端分子充当前药(母体药物分子的药理学上无活性的衍生物),在体内进行自发的或酶促的转化,以释放活性药物,并且具有相对于母体药物分子改善的递送特性(Bundgaard H编:Design of Prodrugs, Elsevier, Amsterdam, 1985)。

[0102] 明智选择封端基团允许对肽添加其他活性。例如,与N末端或C末端帽连接的巯基的存在将允许衍生肽与其他分子缀合。

[0103] 而在另一方面,所述肽或其片段或衍生物可以是“逆向反转肽(retro-inverso peptide)”。“逆向反转肽”是指在至少一个位置上的肽键方向进行逆转的肽,即氨基末端和羧基末端相对于氨基酸的侧链进行逆转。因此,逆向反转类似物具有逆转的末端和逆转方向的肽键,同时大致保持了与天然肽序列中一样的侧链的拓扑结构。逆向反转肽可包含L-氨基酸或D-氨基酸,或L-氨基酸和D-氨基酸的混合物,最多所有氨基酸均为D-异构体。部分逆向反转肽类似物是仅部分序列被逆转并被对映体氨基酸残基置换的多肽。因为这种类似物的逆向反转部分具有逆转的氨基末端和羧基末端,因此与逆向反转部分侧接的氨基酸残基分别被侧链类似的 α -取代的偕-二氨基甲烷和丙二酸酯置换。已发现细胞穿透肽的逆向反转形式在跨膜转位方面与天然形式一样有效。逆向反转肽类似物的合成描述于Bonelli, F.等人, *Int J Pept Protein Res.* 24 (6):553-6 (1984); Verdini, A和Viscomi, G.C., *J.Chem.Soc.Perkin Trans.1*:697-701 (1985); 以及美国专利号6,261,569中,所述文献以引用的方式整体并入本文。已描述了部分逆向反转肽类似物的固相合成方法(EP 97994-B),其也以引用的方式整体并入本文。

[0104] 多核苷酸或多核苷酸区(或多肽或多肽区)与另一个序列具有一定百分比(例如80%、85%、90%或95%)的“序列同一性”或“同源性”,意指在比对时,在比较这两个序列时碱基(或氨基酸)相同的百分比。这种比对和同源性或序列同一性百分比可使用本领域中已知的软件程序来测定,例如在Current Protocols in Molecular Biology(F.M.Ausubel等人编,1987)第30增刊,第7.7.18节,表7.7.1中描述的那些。优选地,默认参数用于比对。优选的比对程序是BLAST,其使用默认参数。具体地说,优选的程序是BLASTN和BLASTP,其使用以下默认参数:遗传密码=标准;过滤器=无;链=两条;截留值=60;期望值=10;矩阵=BLOSUM62;描述=50个序列;排序方式=高分;数据库=非冗余,GenBank+EMBL+DDBJ+PDB+GenBank CDS翻译+SwissProtein+SPupdate+PIR。

[0105] A. 多聚体多肽

[0106] 本公开的实施方案还包括由修饰的Cav-1变体多肽的重复单元构建的较长多肽。多肽多聚体可包含多肽的不同组合。此类多聚体多肽可通过化学合成或通过如本文讨论的重组DNA技术来制备。当通过化学合成产生时,寡聚物优选地具有核心多肽序列的2-5个重复,并且多聚体中氨基酸的总数不应超过约160个残基,优选地不超过100个残基(或其当量,当包括接头或间隔区时)。

[0107] B. 拟肽物

[0108] 修饰的Cav-1肽可以是模拟天然Cav-1多肽的生物效应的拟肽物化合物。拟肽剂可以是非天然肽或非肽剂,其重新创建天然Cav-1多肽的结合元件的立体空间特性,从而使其具有天然Cav-1多肽的结合活性和生物活性。类似于天然Cav-1多肽或多肽多聚体,拟肽物

将具有结合面(其与天然Cav-1结合的任何配体相互作用)和非结合面。

[0109] 在一些方面,本公开还包括保留部分肽特征的化合物。例如,本发明的肽内任何蛋白水解不稳定的键可选择性地被非肽元件诸如等排物(N-甲基化;D-氨基酸)或还原的肽键置换,同时分子的其余部分保留其肽性质。

[0110] 已描述了多种生物活性肽/多肽诸如阿片类肽、VIP、凝血酶、HIV蛋白酶等的拟肽物化合物(无论是激动剂、底物还是抑制剂)。用于设计和制备拟肽物化合物的方法是本领域已知的(Hruby,VJ,Biopolymers 33:1073-1082(1993);Wiley,RA等人,Med.Res.Rev.13:327-384(1993);Moore等人,Adv.in Pharmacol 33:91-141(1995);Giannis等人,Adv.in Drug Res.29:1-78(1997)。某些模拟二级结构的模拟物描述于Johnson等人,In:Biotechnology and Pharmacy,Pezzuto等人,Chapman and Hall(编),NY,1993中。这些方法用于制备至少具有天然Cav-1多肽的结合能力和特异性并且优选地还具有生物活性的拟肽物。鉴于本公开,本领域技术人员可获得的肽化学和一般有机化学的知识足以用于设计和合成此类化合物。

[0111] 例如,此类拟肽物可通过检查本发明的游离的或与配体(例如可溶性uPAR或其片段)复合结合的多肽的三维结构来鉴定。可替代地,与其配体结合的本发明的多肽的结构可通过核磁共振光谱技术来获得。对所述肽与其配体或受体的相互作用的立体化学的更多知识将允许合理设计此类拟肽剂。在不存在配体的情况下,本发明的肽或多肽的结构还可提供用于设计模拟分子的支架。

[0112] C.PEG化

[0113] 修饰的Cav-1肽可与异源多肽区段或聚合物诸如聚乙二醇缀合。多肽可与PEG连接以增加酶的流体动力学半径,并因此增加血清持久性。多肽可与任何靶向剂(诸如具有特异性地且稳定地结合至外部受体的能力的配体)缀合(美国专利公布2009/0304666)。

[0114] 在某些方面,实施方案的方法和组合物涉及公开的多肽的PEG化。PEG化是将聚(乙二醇)聚合物链共价附接至另一分子(通常是药物或治疗性蛋白)的过程。PEG化常规地通过将PEG的反应性衍生物与靶大分子一起孵育来实现。PEG与药物或治疗性蛋白的共价附接可“掩盖”所述剂使其免于宿主的免疫系统的影响(降低免疫原性和抗原性),或增加所述剂的流体动力学大小(溶液中的大小),从而通过降低肾清除率而延长其循环时间。PEG化还可为疏水性药物和蛋白质提供水溶性。

[0115] PEG化的第一步是在一个或两个末端对PEG聚合物进行合适的官能化。在每个末端被相同反应性部分活化的PEG被称为“同双官能团”,而如果存在的官能团不同,那么PEG衍生物被称为“异双官能团”或“异官能团”。制备PEG聚合物的化学活性或活化衍生物以将PEG附接到所需分子。

[0116] PEG衍生物合适官能团的选择是基于将与PEG偶联的分子上的可用反应性基团的类型。对于蛋白质,典型反应性氨基酸包括赖氨酸、半胱氨酸、组氨酸、精氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸。还可使用N末端氨基和C末端羧酸。

[0117] 用于形成第一代PEG衍生物的技术通常是使PEG聚合物与可与羟基反应的基团(通常是酸酐、酰基氯、氯甲酸酯和碳酸酯)反应。在第二代PEG化的化学方法中,更有效的官能团诸如醛、酯、酰胺等可用于缀合。

[0118] 随着PEG化的应用变得越来越先进和复杂,对用于缀合的异双官能团PEG的需求也

在增加。这些异双官能团PEG在连接两个实体时非常有用,其中需要亲水性、柔性和生物相容性的间隔区。异双官能团PEG的优选端基是马来酰亚胺、乙烯基砜、吡啶基二硫化物、胺、羧酸和NHS酯。

[0119] 最常见的修饰剂或接头是基于甲氧基PEG (mPEG) 分子。它们的活性取决于在醇端添加蛋白质修饰基团。在一些情况下,聚乙二醇 (PEG 二醇) 被用作前体分子。随后在两端对二醇进行修饰,以制备异二聚体或同二聚体PEG连接的分子。

[0120] 蛋白质通常在亲核位点诸如未质子化的硫醇(半胱氨酰残基)或氨基处被PEG化。半胱氨酰特异性修饰试剂的实例包括PEG马来酰亚胺、PEG碘乙酸酯、PEG硫醇和PEG乙烯基砜。在温和条件下以及在中性至弱碱性pH下,所有四个实例都是强半胱氨酰特异性的,但各自都有一些缺点。与马来酰亚胺形成的硫醚可能在碱性条件下有些不稳定,因此使用此接头的制剂选项可能会有一些限制。与碘PEG形成的硫代氨基甲酸酯键联更稳定,但游离碘可在一些条件下修饰酪氨酸残基。PEG硫醇与蛋白质硫醇形成二硫键,但这种键联在碱性条件下也可能不稳定。与马来酰亚胺和碘PEG相比,PEG-乙烯基砜的反应性相对较慢;然而所形成的硫醚键联相当稳定。其较慢反应速率还可使PEG-乙烯基砜反应更易于控制。

[0121] 很少在天然半胱氨酰残基处进行位点特异性PEG化,因为这些残基通常呈二硫键形式或是生物活性所必需的。另一方面,定点诱变可用于掺入硫醇特异性接头的半胱氨酰PEG化位点。半胱氨酸突变必须被设计为使其可接近PEG化试剂,并且在PEG化后仍具有生物活性。

[0122] 胺特异性修饰剂包括PEG NHS酯、PEG三氟乙基磺酸酯(tresylate)、PEG醛、PEG异硫氰酸酯和若干其他修饰剂。所有反应都在温和条件下进行,并且对氨基非常有特异性。PEG NHS酯可能是反应性较高的剂之一;然而,其高反应性可使PEG化反应难以大规模控制。PEG醛与氨基形成亚胺,然后用氰基硼氢化钠还原为仲胺。与硼氢化钠不同,氰基硼氢化钠将不会还原二硫键。然而,此化学物质具有剧毒,并且必须谨慎处理,特别是在其会变得易挥发的较低pH下。

[0123] 由于大多数蛋白质上的多个赖氨酸残基,位点特异性PEG化可能是一个挑战。幸运的是,因为这些试剂与未质子化的氨基反应,因此通过在较低pH下进行反应可以将PEG化引导至较低pK的氨基。通常, α -氨基的pK比赖氨酸残基的 ϵ -氨基低1-2个pH单位。通过在pH 7或更低pH下使所述分子PEG化,时常可实现对N末端的高选择性。然而,只有当对于生物活性不需要蛋白质的N末端部分时这才是可行的。尽管如此,来自PEG化的药代动力学益处经常超过体外生物活性的重大损失,无论PEG化的化学方法如何,都导致产物具有更高的体内生物活性。

[0124] 开发PEG化程序时,应考虑若干个参数。幸运的是,通常存在不超过四个或五个关键参数。优化PEG化条件的“实验设计”方法可能是非常有用的。对于硫醇特异性的PEG化反应,应考虑的参数包括:蛋白质浓度、PEG与蛋白质的比率(以摩尔为基础)、温度、pH、反应时间,以及在一些情况下不包括氧气。(氧气可导致蛋白质形成分子间二硫化物,这将降低PEG化产物的产量)。对于胺特异性修饰,除了pH可能更关键以外,特别是当靶向N末端氨基时,应考虑相同的因素(氧气除外)。

[0125] 对于胺特异性修饰和硫醇特异性修饰两者,反应条件可影响蛋白质的稳定性。这可能会限制温度、蛋白质浓度和pH。此外,PEG接头的反应性应在开始PEG化反应前知道。例

如,如果PEG化剂仅具有70%的活性,则所用PEG的量应确保在蛋白质与PEG反应的化学计量中仅对活性PEG分子进行计数。

[0126] D. 融合蛋白

[0127] 本发明的某些实施方案涉及修饰的Cav-1肽的融合蛋白。这些分子可具有在N末端或C末端连接到异源结构域的实施方案的多肽。例如,融合还可使用来自其他物种的前导序列来允许蛋白质在异源宿主中重组表达。融合蛋白可包含半衰期延长剂。另一种有用的融合包括添加蛋白亲和标签,诸如血清白蛋白亲和标签或六个组氨酸残基,或添加免疫活性结构域,诸如优选地可裂解的抗体表位,以促进融合蛋白的纯化。非限制性亲和标签包括多组氨酸、几丁质结合蛋白(CBP)、麦芽糖结合蛋白(MBP)和谷胱甘肽-S-转移酶(GST)。

[0128] 在具体实施方案中,实施方案的肽可连接至增加体内半衰期的肽,诸如XTEN®多肽(Schellenberger等人,2009)、IgG Fc结构域、白蛋白或白蛋白结合肽。

[0129] 产生融合蛋白的方法是本领域技术人员熟知的。此类蛋白质可例如通过从头合成完全融合蛋白来产生,或通过附接编码异源结构域的DNA序列,然后表达完整融合蛋白来产生。

[0130] 可通过将基因与编码在串联连接的多肽之间剪接的肽接头的桥接DNA区段连接来促进恢复母体蛋白质的功能活性的融合蛋白的产生。所述接头将具有足够的长度以允许所得融合蛋白适当折叠。

[0131] 1. 接头

[0132] 在某些实施方案中,实施方案的多肽可使用双官能团交联试剂化学缀合或在蛋白质水平上使用肽接头融合。

[0133] 双官能团交联试剂已广泛用于多种目的,包括亲和基质的制备、各种结构的修饰和稳定、配体和受体结合位点的鉴定以及结构研究。合适的肽接头也可用于连接实施方案的多肽,诸如Gly-Ser接头。

[0134] 携带两个相同官能团的同双官能团试剂被证明非常有效地诱导相同与不同的大分子或大分子亚基之间的交联以及多肽配体与其特异性结合位点的连接。异双官能团试剂包含两个不同的官能团。通过利用两个不同官能团的差异反应性,可选择性地并依次地控制交联。双官能团交联试剂可根据它们的官能团(例如氨基、巯基、胍基、吡啶基、羧基特异性基团)的特异性来进行划分。这些交联试剂中,针对游离氨基的试剂因为其商业可获得性、易于合成以及其可施用的温和反应条件而变得特别流行。

[0135] 大多数异双官能团交联试剂包含伯胺反应性基团和硫醇反应性基团。在另一个实施例中,描述了异双官能团交联试剂和使用所述交联试剂的方法(美国专利号5,889,155,所述专利具体地以引用的方式整体并入本文)。交联试剂将亲核性酰肼残基与亲电性马来酰亚胺残基组合,在一个实例中,允许醛与游离硫醇偶联。可对交联试剂进行修饰以使各种官能团交联。

[0136] 此外,本领域技术人员已知的任何其他连接/偶联剂和/或机制可用于组合实施方案的多肽,例如像抗体-抗原相互作用、抗生物素蛋白生物素键联、酰胺键联、酯键联、硫酯键联、醚键联、硫醚键联、磷酸酯键联、磷酸酰胺键联、酸酐键联、二硫键联、离子和疏水相互作用、双特异性抗体和抗体片段或其组合。

[0137] 优选的是,将使用在血液中具有合理稳定性的交联剂。已知多种类型的含二硫键

接头,其可成功地用于缀合靶向剂和治疗剂/预防剂。含有作为空间位阻的二硫键的接头可证明在体内具有更高的稳定性。因此,这些接头是一组连接剂。

[0138] 除位阻交联剂以外,根基此情况,还可使用非位阻接头。被认为不包含或产生受保护的二硫化物的其他有用的交联剂包括SATA、SPDP和2-亚氨基硫烷(Wawrzynczak和Thorpe,1987)。此类交联剂的用途是本领域中熟知的。另一个实施方案涉及使用柔性接头。

[0139] 一旦发生化学缀合,通常会将肽纯化以将缀合物与非缀合剂和其他污染物分离。大量纯化技术可用于提供足够纯度的缀合物,以使其在临床上有用。

[0140] 基于大小分离的纯化方法(诸如凝胶过滤、凝胶渗透或高效液相色谱)通常将是最常用的。还可使用其他色谱技术,诸如蓝色-琼脂糖分离(Blue-Sepharose separation)。从包涵体中纯化融合蛋白的常规方法可以是有用的,诸如使用弱洗涤剂诸如N-月桂酰基-肌氨酸钠(SLS)。

[0141] 2.细胞穿透肽和膜易位肽

[0142] 此外,在某些方面,修饰的Cav-1肽还可包含细胞结合结构域或细胞穿透肽(CPP)。如本文所用,术语“细胞穿透肽”和“膜易位结构域”可互换使用,并且是指允许多肽穿过细胞膜(例如在真核细胞的情况下为质膜)的多肽序列的区段。CPP区段的实例包括但不限于衍生自HIV Tat(例如GRKKRRQRRRPQ(SEQ ID NO:21))、疱疹病毒VP22、果蝇(*Drosophila*)触角足同源盒基因产物、抗菌肽(protegrin) I、穿透肽(RQIKIWFQNRRMKWKK(SEQ ID NO:22))或蜂毒肽(GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ(SEQ ID NO:23))的区段。在某些方面,CPP包含T1(TKIESLKEHG(SEQ ID NO:24))、T2(TQIENLKEKG(SEQ ID NO:25))、26(AALEALAEALAEALAEALAEAAAA(SEQ ID NO:26))或INF7(GLFEAIEGFIENGWEGMIEGWYGC(GEQ ID NO:27))CPP序列。

[0143] III.使用方法

[0144] 本发明的一个方面涉及本文描述的多肽及其突变体、变体、类似物或衍生物用途。具体而言,这些方法涉及向受试者施用药学上可接受的载剂中的任一种本文所述的多肽或其药学上可接受的修饰,即用于治疗或预防肺的疾病、损伤或感染(例如肺的纤维化病状)的治疗中的组合物,所述组合物包含药学上可接受的载剂中的实施方案的多肽。

[0145] A.药物组合物

[0146] 预期的是,修饰的Cav-1肽可全身或局部施用以抑制细胞凋亡并用于治疗和对肺组织的损害。所述肽可静脉内、鞘内和/或腹膜内施用。在特定方面,多肽被局部递送到气道,诸如施用雾化制剂或干粉制剂以用于吸入。所述多肽可单独施用或与抗纤维化化合物组合施用。

[0147] 修饰的Cav-1肽可与用于肺纤维化的至少一种额外治疗剂组合、同时或依序施用。额外治疗剂可以是NSAID、类固醇、DMARD、免疫抑制剂、生物反应调节剂、支气管扩张剂或抗纤维化剂诸如吡非尼酮(pirfenedone)(其抗纤维化作用机制尚未完全了解,但可能涉及TGF- β 的阻断)、广义酪氨酸激酶阻断剂尼达尼布(nintedanib)或任何其他抗纤维化剂。合适的NSAID选自非选择性COX抑制剂乙酰水杨酸、美沙拉嗪(mesalazin)、布洛芬(ibuprofen)、萘普生(naproxen)、氟比洛芬(flurbiprofen)、非诺洛芬(fenoprofen)、芬布芬(fenbufen)、酮洛芬(ketoprofen)、吲哚洛芬(indoprofen)、吡洛芬(pirprofen)、卡洛芬(carprofen)、奥沙普嗪(oxaprozin)、普拉洛芬(pranoprofen)、米洛芬(mioprofen)、硫噻

洛芬(tioxaprofen)、舒洛芬(suprofen)、阿米洛芬(alminoprofen)、噻洛芬酸(tiaprofenic acid)、氟洛芬(fluprofen)、吲哚美辛(indomethacin)、舒林酸(sulindac)、托美汀(tolmetin)、佐美酸(zomepirac)、萘丁美酮(nabumetone)、双氯芬酸(diclofenac)、芬氯芬酸(fenclofenac)、阿氯芬酸(alclofenac)、溴芬酸(bromfenac)、异丁芬酸(ibufenac)、醋氯芬酸(aceclofenac)、阿西美辛(acemetacin)、芬替酸(fentiazac)、环氯茛酸(clidanac)、依托度酸(etodolac)、奥西平酸(oxpinac)、甲芬那酸(mefenamic acid)、甲氯芬那酸(meclofenamic acid)、氟芬那酸(flufenamic acid)、尼氟灭酸(nifluminic acid)、托芬那酸(tolfenamic acid)、二氟尼柳(diflunisal)、氟苯柳(flufenisal)、吡罗昔康(piroxicam)、替诺昔康(tenoxicam)、氯诺昔康(lornoxicam)和尼美舒利(nimesulide)及其药学上可接受的盐;选择性COX-2抑制剂美洛昔康(meloxicam)、塞来昔布(celecoxib)和罗非昔布(rofecoxib)及其药学上可接受的盐。合适的类固醇是泼尼松(prednisone)、泼尼松龙(prednisolone)、甲基泼尼松龙(methylprednisolone)、地塞米松(dexamethasone)、布地奈德(budenoside)、氟可龙(flucocortolone)和去炎松(triamcinolone)。合适的DMARD是柳氮磺胺吡啶、奥沙拉嗪(olsalazine)、氯喹(chloroquin)、金衍生物(金诺芬(Auranofin))、D-青霉胺和细胞抑制剂诸如甲氨蝶呤和环磷酰胺。合适的免疫抑制剂是环孢菌素A及其衍生物、霉酚酸酯(mycophenolatemofetil)、FK-506、OKT-3、ATG、15-脱氧司加林(desoxyspergualin)、咪唑立宾(mizoribine)、米索前列醇(misoprostol)、雷帕霉素(rapamycin)、来氟米特(reflunomide)和硫唑嘌呤(azathioprine)。合适的生物反应改性剂是干扰素 β 、抗TNF- α (依那西普(Etanercept))、IL-10、抗CD3或抗CD25。合适的支气管扩张剂是异丙托溴铵(ipratropiumbromide)、氧托溴铵(oxytropiumbromide)、噻托溴铵(tiotropiumbromide)、盐酸肾上腺素、沙丁胺醇(salbutamole)、硫酸特布他林(terbutalinsulfate)、氢溴酸非诺特罗(fenoterolhydrobromide)、沙美特罗(salmeterole)和福莫特罗(formoterole)。在此类组合中,可根据其常用剂量范围或低于其常用剂量范围的剂量来施用每种活性成分。组合的NSAID、类固醇、DMARD、免疫抑制剂和生物反应改性剂的剂量适当地为通常推荐的最低剂量的1/50至通常推荐剂量的1/1,优选地为1/20至1/2,并且更优选地为1/10至1/5。组合药物的通常推荐剂量应理解为例如在Rote Liste® 2002, Editio Cantor Verlag Aulendorf, Germany或Physician's Desk Reference中公开的剂量。

[0148] 在考虑临床应用的情况下,可能有必要以适合用于预期应用的形式制备包含蛋白质、抗体和药物的药物组合物。通常,药物组合物可包含有效量的溶解或分散在药学上可接受的载剂中的一种或多种实施方案的多肽或额外剂。短语“药学上或药理学上可接受的”是指在适当时当向动物(例如像人)施用时不产生副作用、过敏反应或其他不良反应的分子实体和组合物。根据本公开,本领域技术人员将知道包含至少一种通过本文所公开的方法分离的实施方案的多肽或额外活性成分的药物组合物的制备,如Remington's Pharmaceutical Sciences,第18版,1990所例证,所述文献以引用的方式并入本文。此外,对于动物(例如人)施用,应理解的是制品应符合如由FDA生物标准办公室(FDA Office of Biological Standards)所要求的无菌、产热原性、一般安全性以及纯度标准。

[0149] 如本文所用,“药学上可接受的载剂”包括任何和所有溶剂、分散介质、包衣、表面活性剂、抗氧化剂、防腐剂(例如抗细菌剂、抗真菌剂)、等渗剂、吸收延迟剂、盐类、防腐剂、

药物、药物稳定剂、凝胶、粘结剂、赋形剂、崩解剂、润滑剂、甜味剂、调味剂、染料等材料及其组合,如本领域普通技术人员已知的(参见例如Remington's Pharmaceutical Sciences,第18版,1990,所述文献以引用的方式并入本文)。除非任何常规载剂与活性成分不相容,否则考虑将其用于药物组合物中。

[0150] 本发明的某些实施方案可包括不同类型的载剂,这取决于它是以固体、液体或气雾剂形式施用,以及对于施用途径(诸如注射)是否需要无菌。所述组合物可静脉内、鞘内、皮内、经皮、鞘内、动脉内、腹膜内、鼻内、阴道内、直肠内、肌肉内、皮下、粘膜、口服、局部(topically)、局部(locally)、通过吸入(例如吸入雾化或干粉制剂)、通过注射、通过输注、通过连续输注、通过直接以脂质组合物(例如脂质体)局部灌注浸泡靶细胞(经由导管、经由灌洗)、或通过如本领域普通技术人员已知的其他方法或前述的任何组合来施用(参见例如Remington's Pharmaceutical Sciences,第18版,1990,所述文献以引用的方式并入本文)。

[0151] 可将修饰的多肽配制成呈游离碱、中性或盐形式的组合物。药学上可接受的盐包括酸加成盐,例如与蛋白质组合物的游离氨基形成的酸加成盐,或与无机酸例如像盐酸或磷酸或有机酸诸如乙酸、草酸、酒石酸或扁桃酸形成的酸加成盐。与游离羧基形成的盐也可衍生自无机碱例如像氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化铵、氢氧化钙或氢氧化铁;或有机碱诸如异丙胺、三甲胺、组氨酸或普鲁卡因(procaine)。在配制后,将以与剂量制剂相容的方式且以治疗上有效的量来施用溶液。所述制剂易于以多种剂型施用,诸如配制用于肠胃外施用诸如可注射溶液,或用于递送至肺的气雾剂,或配制用于饮食施用诸如药物释放胶囊等。

[0152] 进一步根据本发明的某些方面,适用于施用的组合物可提供在具有或不具有惰性稀释剂的药学上可接受的载剂中。载剂应当是可吸收的并且包括液体、半固体(即糊剂)或固体载剂。除非任何常规介质、剂、稀释剂或载剂对接受者或其中所含的组合物的治疗有效性有害,否则其在用于实施所述方法的可施用组合物中使用是适当的。载剂或稀释剂的实例包括脂肪、油、水、盐溶液、脂质、脂质体、树脂、粘结剂、填充剂等或其组合。所述组合物还可包含阻止一种或多种组分氧化的各种抗氧化剂。此外,预防微生物的作用可通过防腐剂来实现,所述防腐剂诸如各种抗细菌剂和抗真菌剂,包括但不限于对羟基苯甲酸酯(例如对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯)、氯丁醇、苯酚、山梨酸、硫柳汞或其组合。

[0153] 根据本发明的某些方面,所述组合物与所述载剂以任何便利且实用的方式(即通过溶解、混悬、乳化、混合、包囊化、吸收等)进行组合。此类程序对于本领域技术人员是常规的。

[0154] 在本发明的具体实施方案中,将所述组合物与半固体或固体载剂彻底地组合或混合。混合可以任何便利方式诸如研磨来进行。还可在混合过程中添加稳定剂,以便保护所述组合物使其免于丧失治疗活性,即在胃中变性。用于组合物的稳定剂的实例包括缓冲液、氨基酸(诸如甘氨酸和赖氨酸)、碳水化合物或冻干保护剂(诸如葡萄糖、甘露糖、半乳糖、果糖、乳糖、蔗糖、麦芽糖、山梨糖醇、甘露醇等)。

[0155] 在一些方面,药物制剂包含一种或多种表面活性剂。根据公开的方法使用的表面活性剂包括离子型表面活性剂和非离子型表面活性剂。代表性非离子型表面活性剂包括聚山梨酯,诸如TWEEN®-20和TWEEN-80®表面活性剂(Bridgewater, N.J.的ICI Americas公司);泊洛沙姆(poloxamer)(例如泊洛沙姆188);TRITON®表面活性剂

(St.Louis,Mo.的Sigma公司);十二烷基硫酸钠(SDS);月桂硫酸钠;辛基糖苷钠;月桂基磺基甜菜碱、肉豆蔻基磺基甜菜碱、亚油基磺基甜菜碱或硬脂基磺基甜菜碱;月桂基肌氨酸、肉豆蔻基肌氨酸、亚油基肌氨酸或硬脂基肌氨酸;亚油基甜菜碱、肉豆蔻基甜菜碱或十六烷基甜菜碱;月桂酰胺基丙基二甲胺、椰油酰胺基丙基二甲胺、亚油酰胺基丙基二甲胺、肉豆蔻酰胺基丙基二甲胺、棕榈酰胺基丙基二甲胺或(例如月桂酰胺基丙基);肉豆蔻酰胺基丙基二甲胺、棕榈酰胺基丙基二甲胺或异硬脂酰胺基丙基二甲胺;甲基椰油酰牛磺酸钠或甲基油酰基牛磺酸二钠;MONAQUAT™表面活性剂(Paterson,N.J.的Mona Industries公司);聚乙二醇;聚丙二醇;乙二醇和丙二醇的嵌段共聚物,诸如**PLURONIC®**表面活性剂(Mt.Olive,N.J.的BASF公司);寡聚(环氧乙烷)烷基醚;烷基(硫代)葡萄糖苷、烷基麦芽糖苷;以及磷脂。例如,表面活性剂可以约0.01%至约0.5%(表面活性剂的重量相对于制剂中其他固体组分总重量;“w/w”)、约0.03%至约0.5%(w/w)、约0.05%至约0.5%(w/w)或约0.1%至约0.5%(w/w)的量存在于所述制剂中。然而,在其他方面,实施方案的药物制剂基本上不含非离子型表面活性剂或基本上不含所有表面活性剂。

[0156] 关于本发明的治疗方法,预期施用一种或多种如本文所公开的肽或其突变体、变体、类似物或衍生物不局限于特定的施用方式、剂量或给药频率;本发明考虑了所有的施用方式,包括肌肉内、静脉内、腹膜内、血管内、关节内、病灶内、皮下或足以提供足以治疗炎症相关病症的剂量的任何其他途径。治疗剂可以单次剂量或多次剂量向所述患者施用。当施用多次剂量时,所述剂量可以彼此分开,例如一小时、三小时、六小时、八小时、一天、两天、一周、两周或一个月。例如,所述治疗剂可施用例如2、3、4、5、6、7、8、10、15、20或更多周。应理解的是,对于任何特定受试者,应根据个体需要和施用或监督组合物施用的人员的专业判断,随时间调整具体的给药方案。例如,如果较低的剂量不能提供足够的治疗活性,则可增加治疗剂量。

[0157] 虽然主治医生最终将决定适当的量和给药方案,但一种或多种如本文所公开的多肽或其突变体、变体、类似物或衍生物的治疗有效量可以0.0001、0.01、0.01 0.1、1、5、10、25、50、100、500或1,000mg/kg或g/kg的剂量提供。有效剂量可由来源于体外或动物模型测试生物测定或系统的剂量-反应曲线来外推。

[0158] 用于特定患者或受试者的剂量可由本领域普通技术人员使用常规考虑因素(例如通过适当的常规药理学方案)来确定。例如,医师可首先开出相对较低的剂量,随后增加剂量直到获得适当的反应。根据应用,向患者施用的剂量足以随时间在患者中产生有益的治疗反应,或例如减少症状,或产生其他适当的活性。剂量由特定制剂的功效,以及一种或多种如本文所公开的多肽或其突变体、变体、类似物或衍生物的活性、稳定性或血清半衰期和患者的病状,以及待治疗患者的体重或表面积来确定。

[0159] 在一些方面,给予受试者单次剂量,每天给予一次以治疗受试者(优选地哺乳动物,更优选地患有或易感由此引起的肺纤维化的人)的单次剂量为约0.2mg/kg与约250mg/kg之间,诸如约10mg/kg与约50mg/kg之间,例如经由滴注(通过吸入)。此剂量可在任何地方每天施用,持续约3天至一个或多个星期。长期施用也是可能的,虽然如本领域熟知的,剂量可能需要向下调整。然而,前述范围是提示性的,因为单个治疗方案中变量数目很大,并且预期与这些优选值有相当大的偏移。

[0160] 对于连续施用,例如通过泵系统(诸如下文描述的一些实验中所用的渗透泵),约

1-2周时程的总剂量优选地在1mg/kg至1g/kg,优选地20-300mg/kg,更优选地50-200mg/kg的范围内。在此连续给药方案后,活性化合物的总浓度优选地在约0.5 μ M至约50 μ M,优选地约1 μ M至约10 μ M的范围内。

[0161] 用于抑制或预防抑制体外细胞凋亡的活性化合物的有效浓度在约0.5nM至约100nM,更优选地约2nM至约20nM的范围内。有效剂量和最佳剂量范围可使用本文所述的方法在体外确定。

[0162] B. 气雾剂分散和雾化装置

[0163] 制剂可使用任何合适的装置来进行雾化,所述装置包括但不限于喷射式雾化器、超声雾化器、计量剂量吸入器(MDI)以及通过强行穿过喷射器或喷嘴使液体气雾化的装置(例如Hayward, Calif.的Aradigm公司的AERX®药物递送装置)。此外,所述化合物可配制成干粉以使用干粉吸入器装置进行递送。为了将制剂递送给受试者,如下文进一步所述,肺部递送装置还可包括呼吸机,任选地与面罩、咬嘴、薄雾吸入设备和/或引导使用者正确地吸入且在适当时间在呼吸中自动递送药物的平台组合。可根据本发明的方法使用的代表性气雾化装置包括但不限于美国专利号6,357,671;6,354,516;6,241,159;6,044,841;6,041,776;6,016,974;5,823,179;5,797,389;5,660,166;5,355,872;5,284,133;和5,277,175以及美国公布专利申请号20020020412和20020020409中描述的气雾化装置。

[0164] 使用喷射式雾化器,来自压缩机或医院空气管线的压缩气体穿过称为喷射器的狭窄收缩。这产生了低压区域,并且来自储液器的液体药物通过进料管被吸入并被气流破碎成微滴。仅最小的液滴直接离开雾化器,而大部分液滴撞击到挡板和壁上,并且返回到储液器中。因此,进行喷射雾化所需的时间根据待雾化的组合物的体积等因素而改变,并且此类时间可由本领域技术人员容易地调整。

[0165] 计量剂量吸入器(MDI)可用于以比通常使用雾化器递送的更浓缩的形式递送本发明的组合物。为了最佳效果,MDI递送系统需要适当的施用技术,其包括气雾剂递送与吸入的协调驱动、每秒约0.5-0.75升的缓慢吸入、接近深吸气量吸入的深呼吸以及至少4秒的屏气。当治疗受益于相对较短的治疗时间和较低的成本时,使用MDI进行肺部递送是方便且合适的。任选地,可在雾化期间将制剂加热到约25℃至约90℃以促进有效的微滴形成以及随后的递送。参见例如美国专利号5,299,566。

[0166] 所述实施方案的气雾剂组合物包含所述组合物的微滴,所述微滴的大小适用于在肺内有效递送。在一些情况下,将表面活性剂制剂递送到肺支气管,更优选地递送到细支气管,还更优选地递送到肺泡管,并且还更优选地递送到肺泡。气雾剂微滴的直径通常小于约15 μ m,直径小于约10 μ m,直径小于约5 μ m,或直径小于约2 μ m。为了有效地递送到人受试者的肺泡支气管,气雾剂组合物可优选地包含直径为约1 μ m至约5 μ m的微滴。

[0167] 微滴大小可使用本领域已知的技术,例如级联、碰撞、激光衍射和光学图案化来评估。参见McLean等人.(2000) Anal Chem 72:4796-804, Fults等人.(1991) J Pharm Pharmacol 43:726-8以及Vecellio None等人.(2001) J Aerosol Med 14:107-14。

[0168] 雾化后蛋白质稳定性可使用本领域已知的技术进行评估,所述技术包括尺寸排阻色谱;电泳技术;光谱技术(诸如UV光谱和圆二色谱)以及蛋白质活性(在体外或体内测量)。为了进行蛋白质稳定性的体外测定,可收集气雾剂组合物,并且然后蒸馏或吸收到过滤器上。为了进行体内测定或为了向受试者肺部施用组合物,用于雾化的装置适合于由

受试者吸入。例如,蛋白质稳定性可通过确定蛋白质聚集体水平来评估。优选地,本发明的气雾剂组合物基本上不含蛋白质聚集体。可溶性聚集体的存在可使用DLS (DynaPro-801TC, Charlottesville, Va.的ProteinSolutions公司) 和/或通过UV分光光度法来定性地确定。

[0169] 术语“振动网孔雾化器”在本文中是指根据使用具有多个孔的振动网孔或振动板(孔板)的一般原理进行操作以产生细颗粒的低速气雾剂的任何雾化器。一些雾化器可包含具有1000与7000个之间的孔的网孔/膜,所述网孔/膜在液体储液器的顶部振动(参见例如美国专利公布20090134235以及Waldrep和Dhand 2008,所述文献各自以引用的方式并入本文)。在一些实施方案中,所述振动网孔雾化器是 **AERONEB®** 专业雾化器、Omron **MICROAIR®**、Pari **EFLOW®**或EZ呼吸雾化器。在一些方面,振动网孔雾化器的振动频率在约50-250kHz、75-200kHz、100-150kHz或约120kHz之间。这些装置具有向肺递送气雾剂的高效率,并且残留在这些装置中的液体体积最小,这对于昂贵且有效的化合物如纤溶酶原活化剂来说是有利的。

[0170] 在某些方面,使用振动网孔雾化器生产所述实施方案的雾化组合物。例如,所述组合物可使用活动性振动网孔雾化器(例如**Aeroneb®**专业雾化器系统)来生产。此类系统及其操作的描述可见于例如美国专利号6,921,020;6,926,208;6,968,840;6,978,941;7,040,549;7,083,112;7,104,463;和7,360,536中,所述专利各自以引用的方式整体并入本文。又在其他方面,所述实施方案的组合物可使用被动振动网孔雾化器诸如Omron **MicroAir®**或EZ呼吸雾化器来生产。

[0171] IV. 治疗的肺部病状

[0172] 本发明的修饰的肽可用于治疗多种肺部病状。治疗的肺部病状可以是急性的或慢性的。急性肺部病状可以是急性肺损伤、感染或化学诱导的病状。慢性肺部病状可以是损伤、感染或疾病的结果。

[0173] A. 肺损伤

[0174] 在一些方面,所述受试者患有急性肺损伤(ALI)或感染或化学诱导的肺损伤。在具体方面,所述受试者患有急性呼吸窘迫综合征(ARDS)、吸入性烟雾诱导的急性肺损伤(ISALI)、支气管扩张、吸入性毒素诱导的气道疾病(例如氯气或其他诱导的气道疾病)、暴露于芥气、暴露于微粒物质(例如硅尘)、闭塞性细支气管炎、闭塞性细支气管炎机化性肺炎、药物诱导的肺病和加速的肺部纤维化(例如急性肺损伤后发生的纤维化,包括ARDS)。

[0175] 吸入性损伤引起的ALI已使用吸入的抗凝剂、类固醇、 β 激动剂、高频通气和体外膜氧合进行了治疗,其结果不同且总体未达到最佳。除了带有呼吸面罩的屏障外,没有有效的预防措施可用。ARDS的管理已取得显著进展,但很大程度上仍是支持性的且要注意等待内源愈合机制生效;并且住院死亡率仍超过40% (Matthay等人,2012)。ALI的幸存者常常患有慢性呼吸功能障碍且生活质量下降。可加速恢复和/或预防后续并发症诸如慢性呼吸功能不全和肺部纤维化的任何模式将是高度期望的。迫切需要改善ALI的早期诊断,并且更重要改善ALI的预防和治疗。由直接吸入性肺损伤或全身性疾病导致的ARDS引起的ALI的病理生理学是极其复杂和异质的,其涵盖全身性以及局部性心肺因素,诸如膜通透性增加、炎性细胞因子涌入、氧化性细胞损害、房室液体移位、离子通道错乱以及许多其他因素(Matthay等人,2012)。显然,需要新型疗法来治疗和预防肺部病症诸如ALI。

[0176] 在一些实施方案中,提供了一种治疗或预防受试者的急性肺损伤、肺感染或肺病的方法,其包括向所述受试者施用有效量的变体多肽,所述变体多肽包含相对于氨基酸序列FTTFTVT (SEQ ID NO:2) 的至少一个氨基酸取代、插入或缺失,其中所述变体多肽保持小窝蛋白1 (Cav-1) 的生物活性。在一些方面,施用所述实施方案的药物制剂的方法包括将包含变体多肽的溶液雾化。在具体方面,所述受试者是人。

[0177] B. 肺病

[0178] 肺病包括囊性纤维化、慢性阻塞性肺病 (COPD)、哮喘、闭塞性细支气管炎、塑型性支气管炎和肺部感染、胶原血管性肺病 (例如来自狼疮、硬皮病或混合性结缔组织病)、间质性肺病 (例如特发性肺纤维化或结节病) 以及导致纤维化的急性和慢性肺损伤 (Murray 等人, 1997; Rabe 等人, 2007; Tsushima 等人, 2009)。这些疾病构成全世界第三大死亡原因。

[0179] 囊性纤维化是主要影响消化系统和呼吸系统的外分泌腺和外分泌汗腺的遗传性疾病。这种疾病的特征通常为慢性呼吸道感染、胰腺功能不全、异常粘稠的粘性分泌物和过早死亡。囊性纤维化 (CF) 的特征为进行性气流阻塞。患有 CF 的个体亚群还对吸入的胆碱能激动剂产生气道高反应性 (Weinberger, 2002 以及 Mitchell 等人, 1978), 并且响应于支气管扩张剂而产生气流限制的可逆性 (van Haren 等人, 1991 以及 van Haren 等人, 1992)。支气管高反应性和气道阻塞的存在提示 CF 与其他气道狭窄疾病 (诸如哮喘或慢性阻塞性肺病 (COPD)) 之间可能有共同的疾病病因, 其中气道平滑肌功能障碍被认为会导致疾病进程。

[0180] 肺部感染可能是细菌感染。感染性细菌可以是铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、炭疽杆菌 (*Bacillus anthracis*)、单核细胞增生性李斯特氏菌 (*Listeria monocytogenes*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、沙门氏菌 (*Salmonellosis*)、鼠疫耶尔森菌 (*Yersinia pestis*)、麻风分枝杆菌 (*Mycobacterium leprae*)、非洲分枝杆菌 (*M. africanum*)、亚洲分枝杆菌 (*M. asiaticum*)、鸟细胞内分枝杆菌 (*M. avium-intracellulare*)、龟脓肿分枝杆菌 (*M. chelonae abscessus*)、诡诈分枝杆菌 (*M. fallax*)、特有分枝杆菌 (*M. fortuitum*)、堪萨斯分枝杆菌 (*M. kansasii*)、麻风分枝杆菌 (*M. leprae*)、马尔摩分枝杆菌 (*M. malmoense*)、施氏分枝杆菌 (*M. shimoidei*)、猿猴分枝杆菌 (*M. simiae*)、苏尔加分枝杆菌 (*M. szulgai*)、蟾蜍分枝杆菌 (*M. xenopi*)、结核分枝杆菌 (*M. tuberculosis*)、羊布鲁氏杆菌 (*Brucella melitensis*)、猪布鲁氏菌 (*Brucella suis*)、流产布鲁氏菌 (*Brucella abortus*)、犬布鲁氏菌 (*Brucella canis*)、嗜肺军团菌 (*Legionella pneumophila*)、土拉弗朗西斯菌 (*Francisella tularensis*)、卡氏肺孢子虫 (*Pneumocystis carinii*)、支原体或洋葱伯克霍尔德菌 (*Burkholderia cepacia*)。细菌感染可导致肺炎。

[0181] 慢性阻塞性肺病 (COPD) 是用于对以下两种主要气流阻塞病症进行分类的术语: 慢性支气管炎和肺气肿。大约 1600 万美国人患有 COPD, 其中 80% - 90% 的人在其一生大部分时间都是吸烟者。COPD 是美国的主要死亡原因, 在 2003 年占 122,283 例死亡。2003 年美国用于 COPD 的直接医疗保健费用成本为约 209 亿美元。慢性支气管炎是支气管气道的炎症。支气管气道连接气管与肺。当发炎时, 支气管分泌粘液, 引起慢性咳嗽。

[0182] 肺气肿时, 由于肺的弹性蛋白骨架受损, 导致肺泡囊过度膨胀。肺气肿性肺中的炎性细胞释放弹性蛋白酶, 所述酶降解或损害肺基质内的弹性蛋白纤维。肺气肿有多种原因, 包括吸烟、暴露于环境污染物、 α -1 抗胰蛋白酶缺乏和衰老。

[0183] 细支气管炎最常见地是由病毒性下呼吸道感染引起,并且其主要特征为急性炎症、水肿、小气道内的上皮细胞坏死和粘液产生增加(Ralston等人,2014)。体征和症状通常始于鼻炎和咳嗽,其可能会进展为呼吸急促、喘息、啰音、使用副肌和/或鼻翼煽动。

[0184] 闭塞性细支气管炎是由肺中小气道的异常重塑导致的进行性气流减少(Meyer等人,2014)。闭塞性细支气管炎综合征是肺移植的主要并发症,并且常常用于描述延迟性同种异体移植物功能障碍,其导致并非由其他已知原因引起的用力呼气量和力量持续下降(Meyer等人,2014)。

[0185] 术语“哮喘”可以是指急性哮喘、慢性哮喘、间歇性哮喘、轻度持续性哮喘、中度持续性哮喘、重度持续性哮喘、慢性持续性哮喘、轻度至中度哮喘、轻度至中度持续性哮喘、轻度至中度慢性持续性哮喘、过敏性(外源性)哮喘、非过敏性(内源性)哮喘、夜间哮喘、支气管哮喘、运动诱导性哮喘、职业性哮喘、季节性哮喘、无症状性哮喘、胃食管哮喘、特发性哮喘和咳嗽变异性哮喘。在哮喘期间,气道持续发炎,并可偶尔出现痉挛。

[0186] V. 实施例

[0187] 包括以下实施例以证明本发明的优选实施方案。本领域技术人员应理解,以下实施例中公开的技术表示由本发明人发现的在本发明实践中发挥良好作用的技术,并且因此可被认为构成其实践的优选模式。然而,根据本公开,本领域技术人员应理解,可以在不脱离本发明的精神和范围的情况下在公开的特定实施方案中做出许多改变并且仍获得相似或类似结果。

[0188] 实施例1-Cav-1肽溶解度

[0189] 为了确定哪种肽最易溶于液体制剂中,将50mg每种Cav-1肽溶解于5mL pH 7.51的Tris缓冲盐水中。将每个样品涡旋以帮助样品完全溶解。对于不溶性肽在肽溶解后立即测量600nm处的吸光度,或对于可溶性肽在10分钟后测量吸光度。除了分别在15分钟、5分钟或溶解后15分钟进行第二次测量的样品APi2348、APi2352、APi2353以外,其他不溶性肽在10分钟后再次测量吸光度。仅在溶解后20分钟后测量样品APi2345,因为溶解不完全(表2)。还在24小时后测试pH。

[0190] 与其他测试的肽相比,样品APi2350、APi2354、APi2355和APi2356在pH 7.51下的溶解度增加(表2)。在24小时后,所有样品的pH都保持稳定在大约pH 7.5下。

表 2. 溶解于 pH 7.51 的 TBS 中的肽的吸光度。

样 品 名称	肽序列	溶 解 (Y/N)	溶解时的 UV (Abs)	静置后的 UV (Abs)
APi23 44	FTTFTVT-NH2 (SEQ ID NO: 11)	N	2.409	1.437
APi23 45	FTTFTVTK-NH2 (SEQ ID NO: 12)	N		1.058
APi23 46	KASFTTFTVTK-NH2 (SEQ ID NO: 13)	N	1.648	1.622
APi23 47	Ac-KASFTTFTVTK-NH2 (SEQ ID NO: 14)	N	2.347	2.284
APi23 48	OASFTTFTVTK-NH2 (SEQ ID NO: 15)	N	0.846	0.530
APi23 49	Ac-OASFTTFTVTK-NH2 (SEQ ID NO: 20)	N	1.870	1.827
[0191] APi23 50	KASFTTFTVTKGS-NH2 (SEQ ID NO: 4)	Y		0.004
APi23 51	Ac-KASFTTFTVTKGS-NH2 (SEQ ID NO: 17)	N	2.523	2.377
APi23 52	DSGKASFTTFTVTK-NH2 (SEQ ID NO: 18)	N	2.468	2.398
APi23 53	Ac-DSGKASFTTFTVTK-NH2 (SEQ ID NO: 19)	N	3.000	3.000
APi23 54	aaEGKASFTTFTVTKGSaa-NH2 (SEQ ID NO: 7)	Y	0.008	0.007
APi23 55	Ac-aaEGKASFTTFTVTKGSaa-NH2 (SEQ ID NO: 8)	Y	0.000	0.000
APi23 56	OASFTTFTVTOS-NH2 (SEQ ID NO: 9)	Y	0.001	-0.002
APi23 57	Ac-OASFTTFTVTOS-NH2 (SEQ ID NO: 10)	N	2.293	2.149
*a=D-丙氨酸; O=鸟氨酸				

[0192] 实施例2-Cav-1肽增加平滑肌肌动蛋白的产生

[0193] 将Cav-1肽溶解于DMSO中,以制备10mM储备溶液。然后将每种肽的10mM储备溶液以HBSS稀释,以制备900 μ M工作储备溶液。将DMSO重悬的多肽以及工作储备液储存在-20℃下。对于培养基,将工作储备液加入到DMEM培养基中以使Cav-1肽的最终浓度为10 μ M。

[0194] 购买特发性肺纤维化 (IPF) 细胞系2051,并将第四代的IPF细胞接种到含有DMEM、10%FBS和1%P/S的100mm平板中。将IPF细胞用4mL DMEM+1%P/S洗涤,并且使其血清饥饿过夜。然后使用44uL HBSS (阴性对照)、10uM LTI-03 (SEQ ID NO:2)、90uM LTI-03 (阳性对照)、10uM APi2350、10uM APi2354、10uM APi2355、10uM APi2356或使用20uL DMSO (阴性对照) 处理细胞2天。

[0195] 处理2天后,将细胞在冷的无菌HBSS中洗涤一次。去除HBSS,并将150uL具有蛋白酶抑制剂混合物的裂解缓冲液加入到细胞中。将细胞与裂解缓冲液一起孵育10分钟。从平板上刮下细胞裂解物并收集。然后将细胞裂解物超声处理两次。超声处理后,将裂解物在13,000RPM下离心20分钟。然后将裂解物在液氮中速冻,解冻,涡旋,并在13,000RPM下再次离心30分钟。然后收集上清液并丢弃沉淀。然后通过BCA测定来测定细胞裂解物的浓度。

[0196] 进行蛋白质印迹以评估治疗效果的存在。简言之,将12ug每种裂解物在10%聚丙

烯酰胺凝胶上运行。然后将凝胶转移到膜上并洗涤。针对平滑肌肌动蛋白(SMA)和微管蛋白的第一抗体蛋白质印迹结果可见于图1中。图示泳道中每种裂解物的处理为:1:未处理,2:10 μ M LTI-03,3:90 μ M LTI-03,4:10 μ M APi2350,5:10 μ M APi2354,6:10 μ M APi 2355,7:10 μ M APi2356,以及8:DMSO。

[0197] 对蛋白质印迹拍照并用ImageJ分析以确定平滑肌肌动蛋白与微管蛋白的比率(图2)。正如预期的那样,相对于微管蛋白,LTI-03引起SMA产生增加。相对于微管蛋白,用Cav-1肽APi2350、APi2354、APi2355和APi2356处理也都增加了SMA的表达(图2)。

[0198] 实施例3-Cav-1肽保护纤维化肺活检物的AEC2细胞

[0199] 为了评估Cav-1肽APi2355(SEQ ID NO:8)对AEC2细胞活力的影响,获得了手术活检物用于制备非特异性间质性肺炎精密切割的肺切片(PCLS)。对一个患有非特异性间质性肺炎(NSIP)的个体和另一个患有晚期IPF的个体进行处理。进行Lysotracker染色,其染色活细胞中的酸性房室并选择性地积聚在肺AEC2细胞的板层体中(Van der Velden等人,2013)。将Cav-1肽悬浮在DMEM/5%FBS中,并使用10、100或500 μ M LTI-03或APi2355(Var55)处理PCLS切片(n=5个重复/处理组)。在单次处理后48小时,对NSIP PCLS进行Lysotracker染色(绿色DND-26,Promega)。观察到AEC2细胞活力的强烈剂量依赖性增加。此外,在每天用LTI-03或APi2355处理后第1、2、3、5和7天,对终末期IPF进行lysotracker染色(红DND-99,Promega)。在连续7天用LTI-03处理的IPF终末期活检物中,观察到AEC2细胞活力的剂量依赖性增加。在第3天观察到APi2355(Var55)的治疗效果。

[0200] ***

[0201] 根据本公开,可在不进行过度实验的情况下,制备和执行本文公开和要求保护的所有方法。虽然以优选实施方案的方式已描述了本发明的组合物和方法,但是对于本领域技术人员清楚的是,可在不脱离本发明的理念、精神和范围的情况下对本文所述的方法以及在本文描述的方法的步骤或步骤顺序中应用变化。更具体地,将清楚的是,化学和生理学相关的某些剂可取代本文描述的剂,同时将实现相同或类似的结果。对本领域技术人员来说清楚的所有此类类似取代和修改被认为处在如由随附权利要求书所限定的本发明的精神、范围以及理念内。

[0202] V. 参考文献

[0203] 以下参考文献在一定程度上提供了对本文列出的示例性程序或其他细节的补充,所述参考文献具体地以引用的方式并入本文。

[0204] Bonelli,F.et al.,Int J Pept Protein Res.24(6):553-6(1984) .

[0205] Bundgaard H,Ed:Design of Prodrugs,Elsevier,Amsterdam,1985

[0206] Current Protocols In Molecular Biology(F.M.Ausubel et al.,eds.,1987)

[0207] Dordo et al.J.Mol Biol,1999,217,721-739

[0208] Fults et al.(1991)J Pharm Pharmacol 43:726-8

[0209] Giannis et al.,Adv.in Drug Res.29:1-78(1997) .

[0210] Hruby,VJ,Biopolymers 33:1073-1082(1993)

[0211] Johnson et al.,In:Biotechnology and Pharmacy,in Pezzuto et al.,Chapman and Hall(Eds.),NY,1993

[0212] Kyte and Doolittle,J.Mol.Biol.,157(1):105-32,1982.

- [0213] McLean et al. (2000) Anal Chem 72:4796-804.
- [0214] Meyer et al., European Respiratory Journal, 44:1479-1503, 2014.
- [0215] Moore et al., Adv. in Pharmacol 33:91-141 (1995)
- [0216] Ralston et al., Pediatrics, 134(5):e1474-e1502, 2014.
- [0217] Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th edition, A.R. Gennaro, Ed., Mack Publ., Easton, PA (1990).
- [0218] S. French and B. Robson, J. Mol. Evol. 19(1983) 171
- [0219] Taylor et al, J. Theor. Biol. 119(1986); 205-218
- [0220] U.S. Patent No. 4,554,101
- [0221] U.S. Patent No. 5,277,175
- [0222] U.S. Patent No. 5,284,133
- [0223] U.S. Patent No. 5,355,872
- [0224] U.S. Patent No. 5,660,166
- [0225] U.S. Patent No. 5,797,389
- [0226] U.S. Patent No. 5,823,179
- [0227] U.S. Patent No. 5,889,155
- [0228] U.S. Patent No. 6,016,974
- [0229] U.S. Patent No. 6,041,776
- [0230] U.S. Patent No. 6,044,841
- [0231] U.S. Patent No. 6,241,159
- [0232] U.S. Patent No. 6,261,569
- [0233] U.S. Patent No. 6,261,569
- [0234] U.S. Patent No. 6,354,516
- [0235] U.S. Patent No. 6,357,671
- [0236] U.S. Patent No. 6,921,020
- [0237] U.S. Patent No. 6,926,208
- [0238] U.S. Patent No. 6,968,840
- [0239] U.S. Patent No. 6,978,941
- [0240] U.S. Patent No. 7,040,549
- [0241] U.S. Patent No. 7,083,112
- [0242] U.S. Patent No. 7,104,463
- [0243] U.S. Patent No. 7,360,536
- [0244] U.S. Patent Publication No. 2002/0020409.
- [0245] U.S. Patent Publication No. 2002/0020412
- [0246] U.S. Patent Publication No. 2009/0134235
- [0247] U.S. Patent Publication No. 2009/0304666
- [0248] Vecellio None et al. (2001) JAerosol Med 14:107-1
- [0249] Verdini, A and Viscomi, G.C, J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1:697-701, 1985.
- [0250] Waldrep and Dhand, Curr. Drug Deliv., 5(2):114-9, 2008.

- [0251] Wawrzynczak and Thorpe, Cancer Treat Res., 37:239-51, 1988.
- [0252] Wiley, RA et al., Med. Res. Rev. 13:327-384, 1993.

序列表

<110> 肺疾治疗有限责任公司
 <120> Cav-1 蛋白的修饰的肽片段及其在纤维化治疗中的用途
 <130> LUTX.P0009W0
 <150> US 62/728,997
 <151> 2018-09-10
 <160> 27
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 178
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)
 <400> 1
 Met Ser Gly Gly Lys Tyr Val Asp Ser Glu Gly His Leu Tyr Thr Val
 1 5 10 15
 Pro Ile Arg Glu Gln Gly Asn Ile Tyr Lys Pro Asn Asn Lys Ala Met
 20 25 30
 Ala Asp Glu Leu Ser Glu Lys Gln Val Tyr Asp Ala His Thr Lys Glu
 35 40 45
 Ile Asp Leu Val Asn Arg Asp Pro Lys His Leu Asn Asp Asp Val Val
 50 55 60
 Lys Ile Asp Phe Glu Asp Val Ile Ala Glu Pro Glu Gly Thr His Ser
 65 70 75 80
 Phe Asp Gly Ile Trp Lys Ala Ser Phe Thr Thr Phe Thr Val Thr Lys
 85 90 95
 Tyr Trp Phe Tyr Arg Leu Leu Ser Ala Leu Phe Gly Ile Pro Met Ala
 100 105 110
 Leu Ile Trp Gly Ile Tyr Phe Ala Ile Leu Ser Phe Leu His Ile Trp
 115 120 125
 Ala Val Val Pro Cys Ile Lys Ser Phe Leu Ile Glu Ile Gln Cys Ile
 130 135 140
 Ser Arg Val Tyr Ser Ile Tyr Val His Thr Val Cys Asp Pro Leu Phe
 145 150 155 160
 Glu Ala Val Gly Lys Ile Phe Ser Asn Val Arg Ile Asn Leu Gln Lys
 165 170 175
 Glu Ile

[0001]

<210> 2
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial sequence)
 <220>
 <223> 合成氨基酸
 <400> 2

[0002]

Phe Thr Thr Phe Thr Val Thr

1 5

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial sequence)

<220>

<223> 合成氨基酸

<400> 3

Ala Ser Phe Thr Thr Phe Thr Val Thr

1 5

<210> 4

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial sequence)

<220>

<223> 合成氨基酸

<400> 4

Lys Ala Ser Phe Thr Thr Phe Thr Val Thr Lys Gly Ser

1 5 10

<210> 5

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial sequence)

<220>

<223> 合成氨基酸

<400> 5

Lys Ala Ser Phe Thr Thr Phe Thr Val Thr Lys Gly Ser

1 5 10

<210> 6

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial sequence)

<220>

<223> 合成氨基酸

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(2)

<223> X=D-丙氨酸

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (18)..(19)

<223> X=D-丙氨酸

<400> 6

[0003]

Xaa Xaa Glu Gly Lys Ala Ser Phe Thr Thr Phe Thr Val Thr Lys Gly
 1 5 10 15
 Ser Xaa Xaa

<210> 7
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial sequence)
 <220>
 <223> 合成氨基酸
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1).. (2)
 <223> X=D-丙氨酸
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (18).. (19)
 <223> X=D-丙氨酸
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (19).. (19)
 <223> 存在 NH2 官能团
 <400> 7

Xaa Xaa Glu Gly Lys Ala Ser Phe Thr Thr Phe Thr Val Thr Lys Gly
 1 5 10 15
 Ser Xaa Xaa

<210> 8
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial sequence)
 <220>
 <223> 合成氨基酸
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1).. (1)
 <223> 存在乙酰基
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1).. (2)
 <223> X=D-丙氨酸
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (18).. (19)

<223> X=D-丙氨酸
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (19)..(19)
<223> 存在 NH2 官能团
<400> 8
Xaa Xaa Glu Gly Lys Ala Ser Phe Thr Thr Phe Thr Val Thr Lys Gly
1 5 10 15
Ser Xaa Xaa

<210> 9
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial sequence)
<220>
<223> 合成氨基酸
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> X=鸟氨酸
<220>
[0004] <221> MISC_FEATURE
<222> (11)..(11)
<223> X=鸟氨酸
<400> 9
Xaa Ala Ser Phe Thr Thr Phe Thr Val Thr Xaa Ser
1 5 10
<210> 10
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial sequence)
<220>
<223> 合成氨基酸
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> X=鸟氨酸
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (11)..(11)
<223> X=鸟氨酸
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (12)..(12)

[0005]

<223> 存在 NH2 官能团
<400> 10
Xaa Ala Ser Phe Thr Thr Phe Thr Val Thr Xaa Ser
1 5 10
<210> 11
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial sequence)
<220>
<223> 合成氨基酸
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7).. (7)
<223> 存在 NH2 官能团
<400> 11
Phe Thr Thr Phe Thr Val Thr
1 5
<210> 12
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial sequence)
<220>
<223> 合成氨基酸
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8).. (8)
<223> 存在 NH2 官能团
<400> 12
Phe Thr Thr Phe Thr Val Thr Lys
1 5
<210> 13
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial sequence)
<220>
<223> 合成氨基酸
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (11).. (11)
<223> 存在 NH2 官能团
<400> 13
Lys Ala Ser Phe Thr Thr Phe Thr Val Thr Lys
1 5 10
<210> 14

<211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial sequence)
 <220>
 <223> 合成氨基酸
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> 存在乙酰基
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (11)..(11)
 <223> 存在 NH2 官能团
 <400> 14
 Lys Ala Ser Phe Thr Thr Phe Thr Val Thr Lys
 1 5 10
 <210> 15
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial sequence)
 <220>
 <223> 合成氨基酸
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> X=鸟氨酸
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (11)..(11)
 <223> 存在 NH2 官能团
 <400> 15
 Xaa Ala Ser Phe Thr Thr Phe Thr Val Thr Lys
 1 5 10
 <210> 16
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial sequence)
 <220>
 <223> 合成氨基酸
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> 存在乙酰基
 <220>

[0006]

[0007]

<221> MISC_FEATURE

<222> (1).. (1)

<223> X=鸟氨酸

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (11).. (11)

<223> 存在 NH2 官能团

<400> 16

Xaa Ala Ser Phe Thr Thr Phe Thr Val Thr Lys

1 5 10

<210> 17

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial sequence)

<220>

<223> 合成氨基酸

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1).. (1)

<223> 存在乙酰基

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (13).. (13)

<223> 存在 NH2 官能团

<400> 17

Lys Ala Ser Phe Thr Thr Phe Thr Val Thr Lys Gly Ser

1 5 10

<210> 18

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial sequence)

<220>

<223> 合成氨基酸

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (14).. (14)

<223> 存在 NH2 官能团

<400> 18

Asp Ser Gly Lys Ala Ser Phe Thr Thr Phe Thr Val Thr Lys

1 5 10

<210> 19

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial sequence)

[0008]

<220>
 <223> 合成氨基酸
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1).. (1)
 <223> 存在乙酰基
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (14).. (14)
 <223> 存在 NH2 官能团
 <400> 19
 Asp Ser Gly Lys Ala Ser Phe Thr Thr Phe Thr Val Thr Lys
 1 5 10
 <210> 20
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial sequence)
 <220>
 <223> 合成氨基酸
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1).. (1)
 <223> 存在乙酰基
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1).. (1)
 <223> X=鸟氨酸
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (11).. (11)
 <223> X=鸟氨酸
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (12).. (12)
 <223> 存在 NH2 官能团
 <400> 20
 Xaa Ala Ser Phe Thr Thr Phe Thr Val Thr Xaa Ser
 1 5 10
 <210> 21
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial sequence)
 <220>
 <223> 合成氨基酸

<400> 21
 Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Pro Gln
 1 5 10
 <210> 22
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial sequence)
 <220>
 <223> 合成氨基酸
 <400> 22
 Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys
 1 5 10 15
 <210> 23
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial sequence)
 <220>
 <223> 合成氨基酸
 <400> 23
 Gly Ile Gly Ala Val Leu Lys Val Leu Thr Thr Gly Leu Pro Ala Leu
 1 5 10 15
 [0009] Ile Ser Trp Ile Lys Arg Lys Arg Gln Gln
 20 25
 <210> 24
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial sequence)
 <220>
 <223> 合成氨基酸
 <400> 24
 Thr Lys Ile Glu Ser Leu Lys Glu His Gly
 1 5 10
 <210> 25
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial sequence)
 <220>
 <223> 合成氨基酸
 <400> 25
 Thr Gln Ile Glu Asn Leu Lys Glu Lys Gly
 1 5 10
 <210> 26
 <211> 26
 <212> PRT

<213> 人工序列(Artificial sequence)
<220>
<223> 合成氨基酸
<400> 26
Ala Ala Leu Glu Ala Leu Ala Glu Ala Leu Glu Ala Leu Ala Glu Ala
1 5 10 15
Leu Glu Ala Leu Ala Glu Ala Ala Ala Ala
20 25
<210> 27
[0010] <211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial sequence)
<220>
<223> 合成氨基酸
<400> 27
Gly Leu Phe Glu Ala Ile Glu Gly Phe Ile Glu Asn Gly Trp Glu Gly
1 5 10 15
Met Ile Glu Gly Trp Tyr Gly Cys Gly
20 25

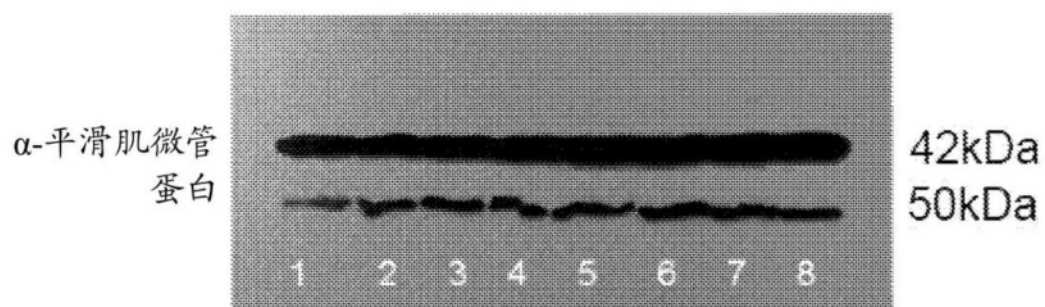


图1

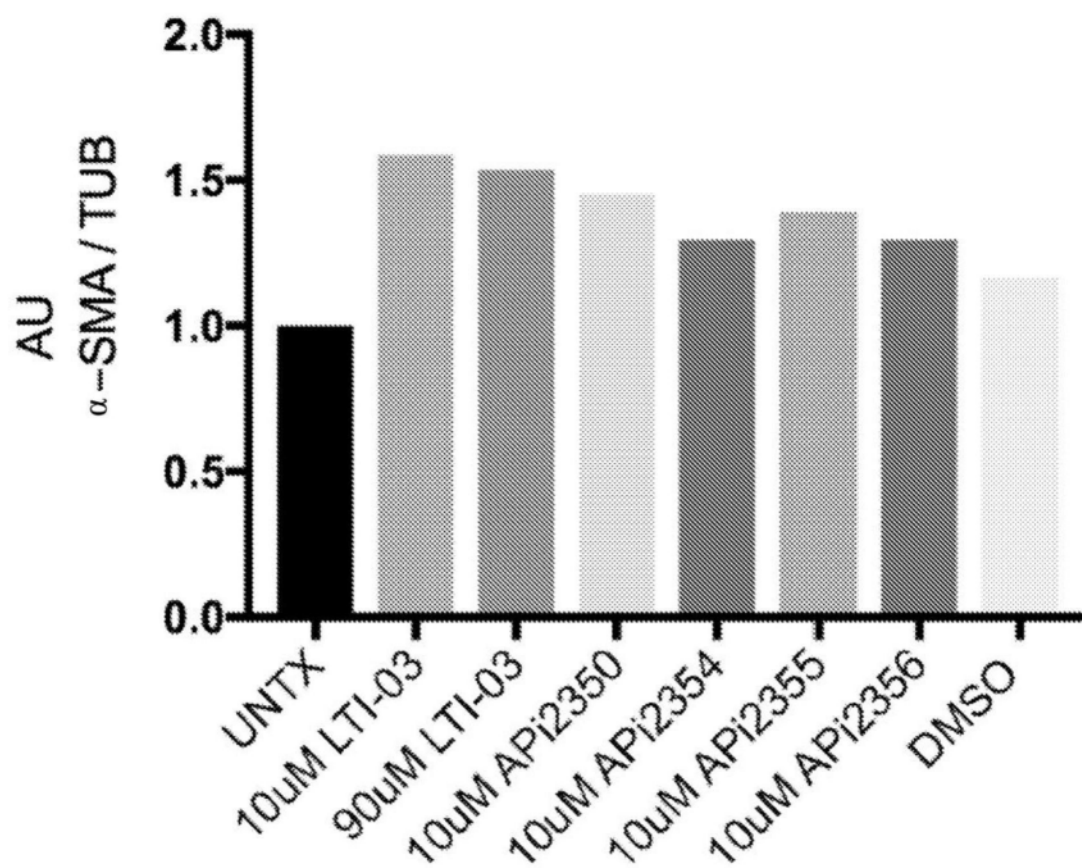


图2