(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 113038965 B
(45)授权公告日 2025.02.07

(21)申请号 201980069480.8

(22)申请日 2019.10.18

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 113038965 A

(43)申请公布日 2021.06.25

(30)优先权数据
62/748,711 2018.10.22 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2021.04.21

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2019/056955 2019.10.18

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2020/086400 EN 2020.04.30

(73)专利权人 联邦高等教育系统匹兹堡大学
地址 美国宾夕法尼亚州

(72)发明人 A·H·威尔斯

(74)专利代理机构 北京华睿卓成知识产权代理事务所(普通合伙) 11436
专利代理师 程淼

(51)Int.Cl.
C07K 14/52(2006.01)
A61K 38/19(2006.01)
A61K 38/04(2006.01)

(56)对比文件
CA 3039316 A1,2018.05.31
US 2007116669 A1,2007.05.24
US 2016058852 A1,2016.03.03
WO 2018191438 A1,2018.10.18
Alan Wells等.A CXCR3-Activating Peptide Increases Tear Break Up Time and Corrects Corneal haze in a Rabbit Model of Environmental Dry Eye.J Pharm Pharmacol Res..2024,第8卷(第2期),第23-27页.
贺朴等.生物标志物在特发性肺纤维化中的研究新进展.中国现代医药杂志.2024,第26卷(第7期),第105-110页.

审查员 王琳

权利要求书2页 说明书16页
序列表12页 附图2页

(54)发明名称

CXCR3的可切割激活剂及其使用方法

(57)摘要

描述了重组C-X-C基序趋化因子配体(CXCL)肽,其经修饰以引入蛋白酶,例如在炎症反应过程中激活的蛋白酶的切割位点。CXCL肽具有激活CXCR3的能力,直到被蛋白酶切割为止。CXCL肽的蛋白水解切割使促炎反应最小化并抑制纤维化发展。

CN 113038965 B

1. 一种重组C-X-C基序趋化因子配体(CXCL)肽,其中相对于野生型CXCL氨基酸序列,所述肽经修饰以引入蛋白酶的切割位点,其中所述肽的氨基酸序列包括SEQ ID NO: 2或由其组成。

2.根据权利要求1所述的重组CXCL肽,其中所述蛋白酶是组织蛋白酶G或中性粒细胞弹性蛋白酶。

3.根据权利要求1所述的重组CXCL肽,其中所述肽的长度为约12个至约30个氨基酸。

4.根据权利要求1所述的重组CXCL肽,其中所述肽的长度为约18个至约25个氨基酸。

5.根据权利要求1所述的重组CXCL肽,其中所述肽的长度为21个或22个氨基酸。

6.根据权利要求1所述的重组CXCL肽,其中所述肽包括至少一种化学修饰。

7.根据权利要求6所述的重组CXCL肽,其中所述至少一种化学修饰包括在所述肽的N端的修饰、在所述肽的C端的修饰或两者。

8.根据权利要求7所述的重组CXCL肽,其中在N端的修饰包括甲酰化、乙酰化、丙酰化、焦谷氨酸形成、肉豆蔻酰基化、棕榈酰化、S-棕榈酰化、单甲基化、二甲基化、三甲基化或其任何组合。

9.根据权利要求7所述的重组CXCL肽,其中在C端的修饰包括甲基化、α-酰胺化或其组合。

10.根据权利要求6所述的重组CXCL肽,其中所述至少一种化学修饰包括非标准肽连接。

11.根据权利要求1所述的重组CXCL肽,其包括至少一种D-氨基酸。

12.根据权利要求1所述的重组CXCL肽,其包括至少一种非典型氨基酸。

13.根据权利要求12所述的重组CXCL肽,其中所述至少一种非典型氨基酸是修饰的非典型氨基酸。

14.根据权利要求13所述的重组CXCL肽,其中所述肽在所述肽的N端、在所述肽的C端或两者包括修饰的非典型氨基酸。

15.根据权利要求14所述的重组CXCL肽,其中所述肽在N端包括修饰的非典型氨基酸,并且所述修饰包括甲酰化、乙酰化、丙酰化、焦谷氨酸形成、肉豆蔻酰化、棕榈酸化、S-棕榈酰化、单甲基化、二甲基化、三甲基化或其任何组合。

16.根据权利要求14所述的重组CXCL肽,其中所述肽在C端包括修饰的非典型氨基酸,并且所述修饰包括甲基化、α-酰胺化或其组合。

17.根据权利要求12所述的重组CXCL肽,其中所述至少一种非典型氨基酸是甲基化氨基酸、与聚乙二醇聚合物缀合的氨基酸、与生物素缀合的氨基酸、与异硫氰酸荧光素(FITC)缀合的氨基酸、与载体蛋白缀合的氨基酸、放射性同位素标记的氨基酸或其任何组合。

18.包含根据权利要求1所述的重组CXCL肽的缓释制剂。

19.根据权利要求18所述的缓释制剂,其中所述缓释制剂包括聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)、水凝胶或凝聚层。

20.一种组合物,所述组合物包括权利要求1的重组CXCL肽和药学上可接受的载体。

21.根据权利要求20所述的组合物,其被配制用于局部、鼻内、吸入、静脉内、玻璃体内、肌内、皮内或皮下施用。

22.根据权利要求20所述的组合物,其被配制用于通过雾化或喷雾器递送至肺。

23.根据权利要求20所述的组合物,其被配制用于通过导管和滴注递送至膀胱。

24.根据权利要求20所述的组合物,其为单位剂量形式。

25.权利要求1的CXCL肽在制备用于抑制受试者纤维化的药物中的用途,其中所述受试者患有创伤、自身免疫性疾病、炎性疾病或病症、或者医源性疾病或病症,其中所述自身免疫性疾病是糖尿病、硬皮病或自身免疫性纤维化,其中所述炎性疾病或病症是特发性肺纤维化(IPF),其中所述医源性疾病或病症是药物诱导的肺纤维化、卡介菌(BCG)治疗诱导的膀胱纤维化或化疗诱导的膀胱纤维化。

26.权利要求1的CXCL肽在制备用于抑制受试者血管生成的药物中的用途,其中所述受试者患有眼部血管生成性病症,其中所述眼部血管生成性病症是湿性黄斑变性、糖尿病性视网膜病、早产儿视网膜病、青光眼治疗后再狭窄、新生血管性青光眼或角膜新生血管形成。

CXCR3的可切割激活剂及其使用方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2018年10月22日提交的美国申请号62/748,711的权益,其全部内容通过引用并入本文。

技术领域

[0003] 本公开涉及C-X-C趋化因子受体3(CXCR3)的肽激活剂,其可被存在于炎症部位的蛋白酶切割,及其使用方法,例如用于抑制纤维化而不引起炎症。

背景技术

[0004] 趋化因子受体CXCR3是C-X-C趋化因子受体家族中的G蛋白偶联受体。CXCR3主要在激活的T淋巴细胞和自然杀伤(NK)细胞上表达。CXCR3的配体包括C-X-C基序趋化因子配体4(CXCL4)、CXCL9、CXCL10和CXCL11。这些配体与CXCR3结合产生多效作用,包括对粘附细胞的抗纤维化作用,以及对先天免疫系统细胞的促炎和纤维化作用。当通过在成纤维细胞、内皮细胞和其他贴壁细胞上表达的CXCR3受体信号传导时,CXCR3的激活剂可限制纤维化和血管生成。然而,免疫细胞上CXCR3的激活可促进炎症性瘢痕形成和纤维化。

发明内容

[0005] 本文描述了重组C-X-C基序趋化因子配体(CXCL)肽,其经修饰以引入蛋白酶(例如在炎症反应过程中激活的蛋白酶)的切割位点。公开的肽具有激活CXCR3的能力,直到被蛋白酶切割为止。CXCL肽的蛋白水解切割使促炎反应最小化并抑制纤维化发展。

[0006] 本文提供了相对于野生型CXCL氨基酸序列经修饰的重组CXCL肽,以引入蛋白酶的切割位点。在一些实施方式中,CXCL是C-X-C趋化因子受体3(CXCR3)的配体,例如CXCL10、CXCL4、CXCL9或CXCL11。在一些实施方式中,蛋白酶是组织蛋白酶、弹性蛋白酶或基质金属蛋白酶(MMP)。

[0007] 还提供了组合物,其包括本文公开的重组CXCL肽。组合物可以被配制,例如,用于局部、鼻内、吸入、静脉内、玻璃体内、肌内、皮内或皮下施用。在一些实施方式中,组合物为单位剂量形式。

[0008] 还提供了抑制受试者纤维化的方法。在一些实施方式中,该方法包括向受试者施用本文公开的CXCL肽或组合物。在一些实例中,受试者患有创伤、自身免疫性疾病、炎性疾病或病症、或者医源性疾病或病症。

[0009] 进一步提供了抑制受试者中血管生成的方法。在一些实施方式中,该方法包括向受试者施用本文公开的CXCL肽或组合物。在一些实例中,所述受试者患有眼部血管生成性疾病。

[0010] 通过以下参考附图进行的详细描述,本发明的前述和其他目的、特征和优点将变得更加显而易见。

附图说明

[0011] 图1A-1B:CXCL10衍生的可切割肽在阻断脉络膜新生血管形成(CNV)中的功效。在CNV的小鼠模型中检测修饰的肽110(SEQ ID NO:2)。向小鼠施用溶媒、肽110、阳性对照肽(肽102、105或107)或相应的乱序肽作为对照。肽以1μg(图1A)或3μg(图1B)的剂量施用。Exp=实验肽;CTRL=乱序对照肽。

[0012] 序列表

[0013] 使用核苷酸碱基的标准字母缩写和氨基酸的三个字母代码(如37C.F.R.1.822所定义)显示在所附序列表中列出的核酸和氨基酸序列。每个核酸序列仅显示一条链,但是互补链应理解为包括任何参考显示链的内容。序列表以ASCII文本文件的形式提交,创建于2019年10月16日,13.2KB,其通过引用并入本文。在所附序列表中:

[0014] SEQ ID NO:1是野生型CXLC10肽的氨基酸序列。

[0015] SEQ ID NO:2-7是修饰的CXCL10肽的氨基酸序列。每个肽的C端脯氨酸残基任选地被酰胺化或甲基化。

[0016] SEQ ID NO:8是人CXCL10的氨基酸序列。

[0017] SEQ ID NO:9是人CXCL4的氨基酸序列。

[0018] SEQ ID NO:10是人CXCL9的氨基酸序列。

[0019] SEQ ID NO:11是人CXCL11的氨基酸序列。

[0020] SEQ ID NO:12是组织蛋白酶G识别位点的氨基酸序列。

[0021] SEQ ID NO:13是中性粒细胞弹性蛋白酶识别位点的氨基酸序列。

[0022] SEQ ID NO:14-16是野生型CXLC4肽的氨基酸序列。

[0023] SEQ ID NO:17-23是修饰的CXCL4肽的氨基酸序列。

[0024] SEQ ID NO:24-26是野生型CXLC11肽的氨基酸序列。

[0025] SEQ ID NO:27-34是修饰的CXCL11肽的氨基酸序列。

[0026] SEQ ID NO:35是组织蛋白酶K识别位点的氨基酸序列。

[0027] SEQ ID NO:36是MMP2识别位点的氨基酸序列。

具体实施方式

[0028] I.缩略语

[0029]	BCG	卡介菌(Bacillus Calmette-Guerin)
[0030]	CNV	脉络膜新生血管
[0031]	CXCR3	C-X-C趋化因子受体3
[0032]	CXCL4	趋化因子(C-X-C基序)配体4
[0033]	CXCL9	趋化因子(C-X-C基序)配体9
[0034]	CXCL10	趋化因子(C-X-C基序)配体10
[0035]	CXCL11	趋化因子(C-X-C基序)配体11
[0036]	FITC	异硫氰酸荧光素
[0037]	IP-10	干扰素-γ诱导的10kDa蛋白
[0038]	IPF	特发性肺纤维化
[0039]	MMP	基质金属蛋白酶

[0040] NV 新生血管形成

[0041] PLGA 聚乳酸-羟基乙酸共聚物

[0042] II.术语和方法

[0043] 除非另有说明,否则根据常规用法使用技术术语。分子生物学中常用术语的定义可见于Benjamin Lewin,基因X,由Jones&Bartlett出版社出版,2009年;和Meyers等(编辑),细胞生物学和分子医学百科全书,由Wiley-VCH出版,第16卷,2008年;以及其他类似的参考资料。

[0044] 如本文所用,单数形式“a”、“an”和“the”既指单数也指复数,除非上下文另外明确指出。例如,术语“一种抗原”包括单个或多个抗原,并且可以被认为等同于短语“至少一种抗原”。如本文所用,术语“包括(comprises)”是指“包括(includes)”。进一步应理解的是,除非另外指出,否则针对核酸或多肽给出的任何和所有碱基大小或氨基酸大小,以及所有分子量或分子质量值均为近似值,并且被提供用于描述性目的。尽管可以使用与本文描述的那些相似或等同的许多方法和材料,但是本文描述了特定的合适的方法和材料。在冲突的情况下,以本说明书(包括术语解释)为准。另外,材料、方法和实施例仅是说明性的,并不旨在限制。为了便于查看各种实施方式,提供以下术语解释:

[0045] 施用:通过选择的途径将组合物(例如蛋白质或肽)引入受试者。例如,如果选择的途径是静脉内,则通过将组合物引入受试者的静脉中来施用组合物。示例性施用途径包括但不限于注射(例如眼内、玻璃体内、皮下、肌内、皮内、腹腔和静脉内)、口服、管内、舌下、经皮、鼻内、局部、吸入途径和通过医用植入物。

[0046] 血管生成:涉及从既存血管生长新生血管的生理过程。血管生成是生长和发育以及创伤愈合和肉芽组织中的正常且至关重要的过程。然而,这也是肿瘤从休眠状态转变为恶性状态的基本步骤,许多其他疾病是由异常血管生成引起的。“异常血管生成”是指在许多不同疾病中存在的不受控的或病理性血管生成,包括眼部疾病,例如,青光眼治疗后再狭窄、湿性黄斑变性、糖尿病性视网膜病变、早产儿视网膜病变或新生血管性青光眼。

[0047] 血管生成性病症:由异常血管生成引起的任何病状、疾病或病症。血管生成性病症的实例包括,例如,癌症、糖尿病性视网膜病、黄斑变性、早产儿视网膜病、角膜新生血管形成和新生血管性青光眼。该术语还包括由医学干预导致的异常病理性血管生成所导致的病状,例如青光眼治疗后再狭窄和角膜移植导致的血管生成。

[0048] 眼部血管生成性病症:包括任何眼内或眼外血管生成性病症。例如,眼内血管生成性病症包括眼内病症,例如糖尿病性视网膜病、湿性黄斑变性、早产儿视网膜病、青光眼治疗后再狭窄和新生血管性青光眼。眼外血管生成性病症在眼睛外部,例如角膜新生血管形成。

[0049] 自身免疫性疾病:免疫系统对内源性抗原产生免疫应答(例如B细胞或T细胞应答),从而对组织造成损伤的病症。自身免疫性疾病包括但不限于1型糖尿病、类风湿性关节炎、银屑病、多发性硬化症、系统性红斑狼疮、炎性肠病、爱迪生氏病、格雷夫斯病、肖格伦综合征、桥本氏甲状腺炎、重症肌无力和乳糜泻疾病。

[0050] 载体蛋白:可以连接到另一分子(例如肽、小分子或有机化合物)的免疫原性蛋白质,以促进该分子的免疫原性。载体蛋白的实例包括但不限于牛血清白蛋白、卵清蛋白和匙孔血蓝蛋白。

[0051] 组织蛋白酶:一种蛋白酶。组织蛋白酶家族的蛋白酶包括丝氨酸蛋白酶(组织蛋白酶A、组织蛋白酶G)、半胱氨酸蛋白酶(组织蛋白酶B、组织蛋白酶C、组织蛋白酶F、组织蛋白酶H、组织蛋白酶K、组织蛋白酶L1、组织蛋白酶L2、组织蛋白酶O、组织蛋白酶S、组织蛋白酶W、组织蛋白酶Z)和天冬氨酰蛋白酶(组织蛋白酶D、组织蛋白酶E)。

[0052] 组织蛋白酶G:一种丝氨酸蛋白酶,已知在消除细胞内病原体和分解炎症部位的组织中起作用。组织蛋白酶G是在中性粒细胞和其他免疫细胞中发现的储存的嗜苯胺蓝颗粒。

[0053] 凝聚层:通过疏水力保持在一起的胶体液滴的球形聚集体。凝聚液滴的直径通常为约1至100μm。

[0054] 保守变体:“保守”氨基酸取代是基本上不影响或降低蛋白或肽的活性或抗原性的那些取代。例如,本文公开的肽可以包括至多约1个、至多约2个、至多约3个、至多约4个或至多约5个保守取代(例如1、2、3、4或5个保守取代,并保留生物学活性,例如结合CXCR3的能力。保守取代的具体非限制性实例包括以下实例:

[0055]

原始残基	保守取代
Ala	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln，His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
His	Asn；Gln
Ile	Leu，Val
Leu	Ile；Val
Lys	Arg；Gln；Glu
Met	Leu；Ile
Phe	Met；Leu；Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp；Phe
Val	Ile；Leu

[0056]

[0057] 术语保守变体还包括使用取代的氨基酸代替未取代的亲本氨基酸。非保守取代是降低活性或抗原性的那些取代。

[0058] 角膜新生血管形成:由于氧气吸收不足,导致血管从角膜缘血管丛进入角膜过度向内生长。最常见的原因之一是戴隐形眼镜,特别是长期戴隐形眼镜。角膜新生血管形成也是对眼损伤的常见反应,并且也可以在角膜移植后发生。

[0059] 趋化因子(C-X-C基序)配体4(CXCL4):属于CXC趋化因子家族的小细胞因子。CXCL4也称为血小板因子4(PF4)。CXCL4是一种70个氨基酸的蛋白质,从激活的血小板的α-颗粒释

放,并与肝素高度结合。它的主要生理作用似乎是中和血管内皮表面上的肝素样分子,从而抑制局部抗凝血酶III活性并促进凝血。作为中性粒细胞和成纤维细胞的强化学引诱物,CXCL4被认为在炎症和创伤修复中发挥作用。已知CXCL4结合CXCR3(CXCR3-B)的B同工型。CXCL4的序列可公开获得(例如,参见GENBANK™基因ID 5196)。示例性人CXCL4序列在本文如SEQ ID NO:9所示。

[0060] 趋化因子(C-X-C基序)配体9(CXCL9):CXC趋化因子家族的成员。CXCL9蛋白被认为与T细胞运输有关。CXCL9与CXCR3结合,并且是淋巴细胞的化学引诱物,而不是中性粒细胞的化学引诱物。CXCL4的序列可公开获得(例如,参见GENBANK™基因ID 4283)。示例性人CXCL4序列在本文如SEQ ID NO:10所示。

[0061] 趋化因子(C-X-C基序)配体10(CXCL10):CXC亚家族的趋化因子和受体CXCR3的配体。CXCL10也被称为干扰素-γ诱导型10kDa蛋白(IP-10)。该蛋白与CXCR3的结合产生多效作用,包括刺激单核细胞、自然杀伤和T细胞迁移,调节粘附分子表达并抑制血管形成。CXCL10序列可公开获得,例如通过GENBANK™(例如,有关人IP-10序列参见基因ID 3627;另见GENBANK™登录号P02778)。示例性人CXCL10序列在本文如SEQ ID NO:8所示。

[0062] 趋化因子(C-X-C基序)配体11(CXCL11):CXC亚家族的趋化因子和受体CXCR3的配体。CXCL11蛋白在激活的T细胞中诱导趋化反应,并且是CXCR3的主要配体。编码该蛋白的基因包括4个外显子和至少3个聚腺苷酸化信号,这可能反映细胞特异性表达调控。IFN-γ是该基因转录的有效诱导物。CXCL11的序列可公开获得(例如,参见GENBANK™基因ID 6373)。示例性人CXCL11序列在本文如SEQ ID NO:11所示。

[0063] CXCR3(C-X-C趋化因子受体3):G蛋白偶联受体,对四种趋化因子CXCL4/PF4(血小板因子4)、CXCL9/Mig(干扰素-γ诱导的单核细胞因子)、CXCL10/IP-10(干扰素-γ诱导的10kDa蛋白)和CXCL11/I-TAC(干扰素诱导型T细胞α-化学引诱物)具有选择性。趋化因子与该蛋白的结合诱导与白细胞运输有关的细胞反应,最明显的是整联蛋白激活、细胞骨架变化和趋化性迁移。已经发现该基因的编码不同同工型的剪接的转录变体。一种同工型(CXCR3-B)显示与趋化因子CXCL4的高亲和力结合。

[0064] 糖尿病性视网膜病变:由于糖尿病的并发症导致视网膜受损的病症。增生性视网膜病通常发生在该疾病的晚期,其特征是在玻璃体表面上新生血管的异常形成,延伸到玻璃体腔中。

[0065] 弹性蛋白酶:分解弹性蛋白的丝氨酸蛋白酶。弹性蛋白酶包括胰凝乳蛋白酶样弹性蛋白酶、胰凝乳蛋白酶弹性蛋白酶、中性粒细胞弹性蛋白酶和巨噬细胞弹性蛋白酶。中性粒细胞弹性蛋白酶能够分解细菌膜蛋白和毒力因子。

[0066] 纤维化:与结缔组织增厚和瘢痕有关的疾病。通常,纤维化是对损伤的反应,例如由于损害组织的疾病或病状引起。纤维化是严重的创伤愈合反应,严重时会干扰正常的器官功能。纤维化几乎可以发生在身体的任何组织中,包括肺部(肺纤维化、囊性纤维化、放射性肺损伤)、肝(肝硬化、胆道闭锁)、心脏(动脉纤维化、心内膜纤维化、既往心肌梗塞)、脑、皮肤(硬皮病、硬化症)、肾脏、关节和肠(克罗恩病)。

[0067] 青光眼:一种眼部病症,其中视神经受到损害,受累眼睛的视力永久受损,如果不加以治疗,则进展为完全失明。它通常与眼睛中液体(房水)的压力增加有关。

[0068] 水凝胶:由交联的聚合物链网络组成的高分子聚合物凝胶。

[0069] 医源性疾病或病症:由医学或诊断程序引起的疾病或病症。示例性医源性疾病/病症包括药物诱导的(例如博来霉素诱导的)肺纤维化、卡介菌(BCG)治疗诱导的膀胱纤维化和化疗诱导的膀胱纤维化。

[0070] 炎性疾病或病症:以炎症为特征的疾病或病症。实例包括但不限于特发性肺纤维化、过敏、哮喘、自身免疫性疾病、腹腔疾病、肝炎、炎性肠病、再灌注损伤和移植排斥。

[0071] 黄斑变性:导致黄斑萎缩或变性的病况。与年龄有关的黄斑变性是老年人视力丧失的主要原因。黄斑变性有两种不同形式,称为干性和湿性形式。在萎缩性黄斑变性(干性形式)中,在黄斑区域有色素沉着,但在黄斑区域没有黄斑瘢痕增高,也没有出血或渗出。相反,在渗出性黄斑变性(湿性形式)中,形成脉络膜新生血管形成的视网膜下网络。

[0072] 基质金属蛋白酶(MMP):钙依赖性含锌内肽酶。MMP能够分解细胞外基质的成分,并且还已知在细胞表面受体的切割、凋亡配体(例如FAS配体)的释放以及趋化因子/细胞因子的失活中发挥作用。

[0073] 新生血管性青光眼:一种很难治疗的青光眼。该病状通常是由增生性糖尿病视网膜病变或视网膜中央静脉阻塞引起的。新生血管性青光眼也可能由导致视网膜或睫状体缺血的其他病状触发。眼部血液流动不良的人极有可能患上这种疾病。当新生的异常血管开始在眼角发展并开始阻塞引流时导致新生血管性青光眼。患有该病状的患者开始迅速失去视力。有时,这种病极快出现,特别是在白内障手术后。

[0074] 非典型氨基酸:不是遗传密码中三联体密码子直接编码的二十个氨基酸之一的氨基酸。非典型氨基酸也称为“非标准”氨基酸。

[0075] 肽或多肽:其中的单体是通过酰胺键连接在一起的氨基酸残基的聚合物。当氨基酸是α-氨基酸时,可以使用L-光学异构体或D-光学异构体,其中L-异构体是优选的。本文所用的术语“多肽”、“肽”或“蛋白质”旨在涵盖任何氨基酸序列,并包括修饰的序列,例如糖蛋白。术语“多肽”和“肽”特别用于涵盖天然存在的蛋白质以及重组或合成产生的蛋白质。在一些实施方式中,肽的长度为10至200个氨基酸,包括长度为10至100个、10至50个、10至30个、15至50个、15至30个或18至25个氨基酸。在特定实例中,该肽的长度为约21个或约22个氨基酸。“残基”是指通过酰胺键或酰胺键模拟物掺入多肽中的氨基酸或氨基酸模拟物。

[0076] 药学上可接受的载体:使用的药学上可接受的载体是常规的。Remington's Pharmaceutical Sciences,by E.W.Martin,Mack Publishing Co.,Easton,PA,15th Edition,1975描述了适用于药物递送本文公开的肽的组合物和制剂。通常,载体的性质将取决于所采用的特定施用方式。例如,肠胃外制剂通常包括注射液,该注射液包括药学上和生理学上可接受的流体,例如水、生理盐水、平衡盐溶液、右旋糖水溶液、甘油等作为溶媒。对于固体组合物(例如,粉末、丸剂、片剂或胶囊剂形式),常规的无毒固体载体可以包括,例如,药用级甘露醇、乳糖、淀粉或硬脂酸镁。除生物学中性载体外,待施用的药物组合物还可以包含少量的无毒助剂,例如润湿剂或乳化剂、防腐剂和pH缓冲剂等,例如乙酸钠或脱水山梨糖醇单月桂酸酯。为了局部施用于眼睛,可以将试剂与例如人工泪液和其他乳剂混合。

[0077] 聚乳酸-乙醇酸共聚物(PLGA):乙醇酸和乳酸的可生物降解和生物相容性共聚物。

[0078] 蛋白酶:水解(分解)蛋白质和多肽的酶。

[0079] 再狭窄:狭窄再次发生、血管变窄、导致血流受限。狭窄(或再狭窄)是一种对损伤的反应形式,导致壁增厚、管腔变窄以及特定通道提供的组织功能丧失。介入手术(例如青

光眼手术)过程中的身体损伤导致管上皮内膜损坏。身体损伤后的组织修复涉及再生(用相同类型的细胞替换受损细胞)和纤维化(用结缔组织替换受损细胞)。除其他事件外,纤维化过程包括新生血管的形成(血管生成)。

[0080] 早产儿视网膜病变:影响早产婴儿的眼病。据认为是由于视网膜血管生长紊乱引起的,可能导致瘢痕形成和视网膜脱离。该疾病可以是轻度的并且可以自发缓解,但是在严重的情况下可导致失明。

[0081] 序列同一性:氨基酸序列之间的相似性以序列之间的相似性表示,也称为序列同一性。序列同一性经常用百分比同一性(或相似性或同源性)来衡量。百分比越高,两个序列越相似。当使用标准方法比对时,特定多肽的同源物或变体将具有较高程度的序列同一性。

[0082] 用于比较的序列比对方法是本领域公知的。各种程序和比对算法如下所述:Smith and Waterman,Adv.Appl.Math.2:482,1981;Needleman and Wunsch,J.Mol.Biol.48:443,1970;Pearson and Lipman,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.85:2444,1988;Higgins and Sharp,Gene 73:237,1988;Higgins and Sharp,CABIOS 5:151,1989;Corpet et al.,Nucleic Acids Research 16:10881,1988;and Pearson and Lipman,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.85:2444,1988。另外,Altschul et al.,Nature Genet.6:119,1994提出了序列比对方法和同源性计算的详细考量。

[0083] NCBI碱基本地比对检索工具(BLAST)(Altschul et al.,J.Mol.Biol.215:403,1990)可从多种渠道获得,包括美国国家生物技术信息中心(NCBI,Bethesda,MD)和互联网上,与blastp、blastn、blastx、tblastn和tblastx序列分析程序结合使用。互联网上的NCBI网站上提供了有关如何使用此程序确定序列同一性的说明。

[0084] 使用NCBI Blast 2.0,将缺口的blastp设置为默认参数,与多肽的氨基酸序列比对,多肽的同源物和变体通常以在全长上具有至少约75%,例如至少约80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性为特征。为了比较大于约30个氨基酸的氨基酸序列,采用Blast 2序列函数,使用设置为默认参数的默认BLOSUM62矩阵(缺口存在成本为11,每个残基缺口成本为1)。比对短肽(少于30个氨基酸)时,应使用Blast 2序列函数进行比对,采用将PAM30矩阵设置为默认参数(空位9,延伸位1罚分)。当通过这种方法评估时,与参考序列具有更高相似性的蛋白质将显示出越来越高的同一性百分比,例如至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性。当比较少于整个序列的序列同一性时,同源物和变体通常在10-20个氨基酸的短窗口内具有至少80%的序列同一性,并且可能具有至少85%或至少90%或95%的序列同一性(取决于它们与参考序列的相似性)。在这样的短窗口上确定序列同一性的方法可见于互联网上的NCBI网站。本领域的技术人员将意识到,这些序列同一性范围仅用于指导。完全有可能获得超出所提供范围的非常重要的同源物。

[0085] 受试者:活的多细胞脊椎动物,包括人和兽类受试者(包括人和非人哺乳动物)的类别。

[0086] 治疗有效量:足以在待接受该试剂治疗的受试者、细胞或培养物中获得预期效应的指定试剂(例如CXCL肽)的量。

[0087] III.几个实施方式的概述

[0088] 细胞表面G蛋白偶联受体CXCR3的激活剂可以限制甚至逆转通过这些受体作用于

成纤维细胞、内皮细胞、周细胞和其他贴壁细胞的纤维化和血管生成。CXCR3的激活既可以通过m-钙蛋白酶抑制作用来阻止迁移,又可以通过μ-钙蛋白酶对β3整联蛋白的切割而在内皮细胞中引起失巢凋亡。可以利用这两种作用来限制瘢痕形成并预防或逆转包括血管病变(包括眼部血管病变)。CXCR3激活剂的作用比纤维化和血管生成的促进剂明显。

[0089] 产生免疫应答的细胞也表达CXCR3受体,但以促迁移方式产生的应答向这些配体趋化。这造成潜在的混淆情况,其中CXCR3激活剂可能通过对贴壁细胞(如成纤维细胞、内皮细胞和上皮细胞)的作用来限制即时瘢痕形成,同时通过吸引和激活免疫细胞(白细胞、淋巴细胞、巨噬细胞等)促进晚期瘢痕形成。实际结局取决于这两个细胞群的定量平衡。在急性和进行性炎症的情况下,晚期促炎反应的风险最高。

[0090] 为了消除这种风险,本文描述了CXCR3的激活剂(配体),其可以通过在活动性炎症期间存在的细胞外蛋白酶的切割而失活。炎性瘢痕形成通过产生蛋白酶实现,该蛋白酶降解静态基质以将其替换为瘢痕基质。这些蛋白酶包括多种组织蛋白酶和弹性蛋白酶。使用对CXCR3敏感的CXCR3配体,这些配体对这些蛋白酶的切割敏感,因此可以消除非期望的促炎信号,因为该配体在存在急性炎症时失活。

[0091] 公开的肽可用于治疗纤维化和血管生成性疾病,包括用于治疗瘢痕、血管病、硬皮病和自身免疫性纤维化。这些疾病和病症可以发生在身体的任何器官中,例如皮肤、肺、肝、肾、心脏和眼睛。该疾病还包括由创伤、自身免疫病理学、糖尿病引起的疾病,以及病因不明的疾病,例如与年龄相关的湿性黄斑变性(AMD)和特发性肺纤维化(IPF)。

[0092] 本文提供了重组C-X-C基序趋化因子配体(CXCL)肽,其相对于野生型CXCL氨基酸序列经修饰以引入蛋白酶的切割位点。在一些实施方式中,CXCL是C-X-C趋化因子受体3(CXCR3)的配体。在一些实例中,CXCL是CXCL10、CXCL4、CXCL9或CXCL11。在特定的非限制性实例中,CXCL是CXCL10。

[0093] 在一些实施方式中,蛋白酶是在炎症反应(例如急性炎症反应)期间被激活的蛋白酶。在一些实例中,蛋白酶是组织蛋白酶、弹性蛋白酶或基质金属蛋白酶(MMP)。在特定实例中,该组织蛋白酶是组织蛋白酶G或组织蛋白酶K。在其他特定实例中,该MMP是MMP2。在其他特定实例中,该弹性蛋白酶是中性粒细胞弹性蛋白酶。

[0094] 在一些实施方式中,该肽的长度为约12个至约30个氨基酸,例如长度为约18个至约25个氨基酸,例如长度为约20个至约23个氨基酸,例如长度为约21个或22个氨基酸。在一些实例中,该肽的长度为12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个氨基酸。

[0095] 在一些实施方式中,肽的氨基酸序列与SEQ ID NO:2-7、17-23和27-34中的任一项具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性。在一些实例中,该肽的氨基酸序列包括SEQ ID NO:2-7、17-23和27-34中的任一项或由其组成。

[0096] 在一些实施方式中,该肽包括经酰胺化或甲基化的C端脯氨酸。

[0097] 在一些实施方式中,该肽包括至少一种化学修饰。例如,可以引入化学修饰以抑制肽的降解和/或增加肽的半衰期。在一些实例中,至少一种修饰包括在肽的N端的修饰、在肽的C端的修饰或两者。在特定的非限制性实例中,在N端的修饰包括甲酰化、乙酰化、丙酰化、焦谷氨酸形成、肉豆蔻酰化、棕榈酰化、S-棕榈酰化、单甲基化、二甲基化、三甲基化或其任

何组合。在其他特定的非限制性实例中,在C端的修饰包括甲基化、α-酰胺化或其组合。在其他实施方式中,至少一种修饰包括非标准肽连接。

[0098] 在一些实施方式中,重组CXCL肽包括至少一种D-氨基酸。在一些实例中,CXCL肽包括多种D-氨基酸,例如至少2种、至少3种、至少4种、至少5种、至少6种、至少7种、至少8种、至少9种、至少10种、至少11种、至少12种、至少13种、至少14种、至少15种、至少16种、至少17种、至少18种、至少19种、至少20种、或至少21种D-氨基酸。

[0099] 在一些实施方式中,重组CXCL肽包括至少一种非典型氨基酸。在一些实例中,至少一种非典型氨基酸是修饰的非典型氨基酸。该肽可以在肽的N端、在肽的C端或两者包括修饰的非典型氨基酸。在特定的非限制性实例中,该肽在N端包括修饰的非典型氨基酸,并且该修饰包括甲酰化、乙酰化、丙酰化、焦谷氨酸形成、肉豆蔻酰基化、棕榈酰化、S-棕榈酰化、单甲基化、二甲基化、三甲基化或其任何组合。在其他特定的非限制性实例中,该肽在C端包括修饰的非典型氨基酸,并且该修饰包括甲基化、α-酰胺化或其组合。

[0100] 在一些实施方式中,至少一种非典型氨基酸是甲基化氨基酸、与聚乙二醇聚合物缀合的氨基酸、与生物素缀合的氨基酸、与异硫氰酸荧光素(FITC)缀合的氨基酸、与载体蛋白缀合的氨基酸、放射性同位素标记的氨基酸或其任何组合。在一些实例中,甲基化氨基酸是单甲基化氨基酸、二甲基化氨基酸或三甲基化氨基酸。在一些实例中,载体蛋白是牛血清白蛋白、卵清蛋白或匙孔血蓝蛋白。在一些示例中,放射性同位素为^{2}H、^{15}N、^{13}C或^{15}N和^{13}C两者

[0101] 在一些实施方式中,重组CXCL肽在缓释制剂中。在一些实例中,缓释制剂包括聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)、水凝胶或凝聚层。

[0102] 本文还提供了组合物,该组合物包括本文公开的重组CXCL肽和药学上可接受的载体。在一些实施方式中,该组合物被配制用于局部、鼻内、吸入、静脉内、玻璃体内、肌内、皮内或皮下施用。在一些实例中,该组合物被配制用于通过雾化或雾化器递送至肺,例如用于治疗囊性纤维化。在其他实例中,该组合物被配制用于通过导管和滴注递送至膀胱。纤维化是早期膀胱癌治疗和慢性膀胱感染的主要并发症,导致膀胱易激综合征。因此,配制用于递送至膀胱的组合物可用于治疗这些病状。

[0103] 在一些实施方式中,该组合物以单位剂量形式提供。

[0104] 在一些实施方式中,该组合物可以包括蛋白酶抑制剂、防腐剂、张度剂、缓冲剂、pH调节剂、无菌溶剂或其任何组合。在一些实施方式中,蛋白酶抑制剂可以包括但不限于TIMP1、奥达卡替尼(odanacatib)、钙蛋白酶、巴马司他(batimastat)、伊洛马司他(ilomastat)或其任何组合。在一些实施方式中,张度剂可以包括但不限于等渗缓冲剂,例如氯化钠。在一些实施方式中,缓冲剂可以包括但不限于磷酸、乙酸、柠檬酸、磷酸盐缓冲剂、组氨酸、氨丁三醇、葡萄糖酸、乳酸、酒石酸、天冬氨酸、谷氨酸、酒石酸、琥珀酸、苹果酸、富马酸、α-酮戊二酸或其组合。在一些实施方式中,pH调节剂可以包括但不限于盐酸。在一些实施方式中,无菌溶剂可以包括但不限于无菌水。在一些实施方式中,该组合物还可以包括稳定剂,例如但不限于海藻糖。在一些实施方式中,该组合物还可以包括表面活性剂,例如聚山梨酯。

[0105] 本文进一步提供了抑制受试者纤维化的方法。在一些实施方式中,该方法包括向受试者施用本文公开的CXCL肽或组合物。在一些实例中,受试者患有创伤、自身免疫性疾

病、炎性疾病或病症、或者医源性疾病或病症。在特定实例中,自身免疫性疾病是糖尿病、硬皮病或自身免疫性纤维化。在其他特定实例中,炎性疾病或病症是特发性肺纤维化(IPF)。在其他特定实例中,医源性疾病或病症是药物诱导的(例如博来霉素诱导的)肺纤维化、卡介菌(BCG)治疗诱导的膀胱纤维化或化疗诱导的膀胱纤维化。

[0106] 本文还提供了抑制受试者血管生成的方法。在一些实施方式中,该方法包括向受试者施用本文公开的CXCL肽或组合物。在一些实例中,该受试者患有眼部血管生成性病症。在特定实例中,眼部血管生成性病症是湿性黄斑变性、糖尿病性视网膜病、早产儿视网膜病、青光眼治疗后再狭窄、新生血管性青光眼或角膜新生血管形成。

[0107] IV.肽序列

[0108] 本公开内容描述了衍生自充当CXCR3的配体的CXCL蛋白的修饰的肽。公开的肽的长度为约12个至约30个氨基酸,例如长度为约18个至约25个氨基酸,例如长度为约12个、约13个、约14个、约15个、约16个、约17个、约18个、约19个、约20个、约21个、约22个、约23个、约24个、约25个、约26个、约27个、约28个、约29个或约30个氨基酸。肽经修饰以包括蛋白酶切割位点,从而在识别结合的切割位点的蛋白酶存在下使肽失活。在一些实例中,切割位点是组织蛋白酶(例如组织蛋白酶G或组织蛋白酶K)、弹性蛋白酶(例如中性粒细胞弹性蛋白酶)或MMP(例如MMP2)的切割位点。本领域技术人员能够确定适当的蛋白酶切割位点,例如借助在线工具,例如ExPASy生物信息学资源门户网站或蛋白酶特异性预测服务器(PROSPER;另见Song et al.,PLoS One 7(11):e50300,2012)。

[0109] 本领域技术人员能够识别并引入导致蛋白酶切割位点的合适的氨基酸取代。例如,已知组织蛋白酶G识别-/V/L/LHF†S/-S/A/V(SEQ ID NO:12),已知组织蛋白酶K识别-/-/LPV/EA†GE/-/-/-(SEQ ID NO:35),并且已知MMP2识别-/P/-/-†LI/-/-/-(SEQ ID NO:36)(Song et al.,PLoS One 7(11):e50300,2012);已知中性粒细胞弹性蛋白酶可以识别FIRW(SEQ ID NO:13)(Schulenburg et al.,Analyst 141(5):1645-1648,2016)。

[0110] 在一些实施方式中,该肽衍生自人CXCL10,在本文如SEQ ID NO:8所示。该肽可以由CXCL10的任何部分组成,该部分包括SEQ ID NO:8的约18个至约25个连续氨基酸,其中一个或更多个氨基酸被取代以引入所选蛋白酶的切割位点,其中修饰的肽(在不存在蛋白酶的情况下)保留激活CXCR3的能力。

[0111] CXCL10(GENBANK™登录号NP_001565.3;SEQ ID NO:8)

[0112] MNQTAILICCLIFLTLSGIQGVPLSRTVRCTCISISNQPVNPRSLEKLEIIPASQFCPRVEIIATMKKKGEKRCLNPESKAIKNLLKAVSKERSKRSP

[0113] 在本文的一些实施方式中,CXCL10肽基于C端肽:

[0114] PESKAIKNLLKAVSKERSKRSP(WT;SEQ ID NO:1)

[0115] SEQ ID NO:1经修饰以引入蛋白酶切割位点,例如组织蛋白酶G、中性粒细胞组织蛋白酶或中性粒细胞弹性蛋白酶切割位点。以下提供了基于人CXCL10的修饰的肽的非限制性实例。

[0116] 具有组织蛋白酶G和中性粒细胞弹性蛋白酶切割位点序列的示例性肽:

[0117] PESKAIKNLLKAV**H**KE**M**SKRSP (肽 110；SEQ ID NO: 2)
_ESKAIKNLLKAV**H**KE**M**SKRSP (肽 112；SEQ ID NO: 3)
PESKAIKNLLKAV**H**KERSKRSP (肽 116；SEQ ID NO: 4)
_ESKAIKNLLKAV**H**KERSKRSP (肽 117；SEQ ID NO: 5)

[0118] 具有中性粒细胞组织蛋白酶切割位点的肽：

[0119] PESKAIKNLLKAVS**EVL**SKRSP (肽 121；SEQ ID NO: 6)

[0120] 具有中性粒细胞弹性蛋白酶切割位点的肽：

[0121] PES**FIRW**NLLKAVSKE**M**SKRSP (肽 131；SEQ ID NO: 7)

[0122] 对于SEQ ID NO:2、3和7的肽，精氨酸(R)取代为蛋氨酸(M)与引入蛋白酶切割位点的突变无关。

[0123] 在一些实施方式中，该肽衍生自人CXCL4，在本文如SEQ ID NO:9所示。该肽可以由CXCL4的任何部分组成，该部分包括SEQ ID NO:9的约18个至约25个连续氨基酸。一个或更多个氨基酸被取代以引入所选蛋白酶的切割位点，其中修饰的肽(在不存在蛋白酶的情况下)保留激活CXCR3的能力。

[0124] CXCL4(GENBANK™登录号NP_002610.1;SEQ ID NO:9)

[0125] MSSAAGFCASRPGLLFLGLLLLPLVVAFASAEAEEDGDLQCLCVKTTSQVRPRHITSLEVIKAGPHCPTAQLIATLKNGRKICLDLQAPLYKKIIKKLLES

[0126] 在一些实施方式中，修饰的CXCL4肽基于以下CXCL4肽中的一种：

[0127] DLQCLCVKTTSQVRPRHITSLEVIKAGPH(SEQ ID NO:14)

[0128] PLYKKIIKKLLES(SEQ ID NO:15)

[0129] LDLQAPLYKKIIKKLLES(SEQ ID NO:16)

[0130] SEQ ID NO:14、15或16经修饰以引入蛋白酶切割位点，例如组织蛋白酶K或基质金属蛋白酶2(MMP2)切割位点。以下提供了基于人CXCL4的修饰肽的非限制性实例。

[0131] 具有组织蛋白酶K切割位点序列的示例性肽：

[0132] DLQCLCVKTTSQVRPRHITSLE**G**IKAGPH (SEQ ID NO: 17)
DLQCLCVKTTSQVRPRHITSLE**E**IKAGPH (SEQ ID NO: 18)
PLYKKIIKKL**E**ES (SEQ I DNO: 19)
LDLQAPLYKKIIKKL**E**ES (SEQ ID NO: 20)

[0133] 具有MMP2切割位点序列的示例性肽：

[0134] DLQCLCVKTTSQVRPR**L**ITSLEVIKAGPH (SEQ ID NO: 21)
PLY**P**KIIKKLLES (SEQ ID NO: 22)
LDLQAPLY**P**KIIKKLLES (SEQ ID NO: 23)

[0135] 在一些实施方式中，该肽衍生自人CXCL9，在本文如SEQ ID NO:10所示。该肽可以由CXCL9的任何部分组成，该部分包括SEQ ID NO:10的约18个至约25个连续氨基酸，其中一个或更多个氨基酸被取代以引入所选蛋白酶的切割位点，其中修饰的肽(在不存在蛋白酶的情况下)保留激活CXCR3的能力。

[0136] CXCL9(GENBANK™登录号NP_002407.1;SEQ ID NO:10)

[0137] MKKSGVLFLLGIILLVLIGVQGTPVVRKGRCSCISTNQGTIHLQSLKDLKQFAPSPSCEKIEIIATLKNGVQTCLNPDSADVKELIKKWEKQVSQKKKQKNGKKHQKKKVLKVRKSQRSRQKKTT

[0138] 在一些实施方式中,该肽衍生自人CXCL11,在本文如SEQ ID NO:11所示。该肽可以由CXCL11的任何部分组成,该部分包括SEQ ID NO:11的约18个至约25个连续氨基酸,其中一个或更多个氨基酸被取代以引入所选蛋白酶的切割位点,其中修饰的肽(在不存在蛋白酶的情况下)保留激活CXCR3的能力。

[0139] CXCL11(GENBANK™登录号NP_005400.1;SEQ ID NO:11)

[0140] MSVKGMAIALAVILCATVVQGFPMFKRGRCLCIGPGVKAVKVADIEKASIMYPSNNCDKIEVIITLKENKGQRCLNPKSKQARLIIKKVERKNF

[0141] 在一些实施方式中,修饰的CXCL1肽基于以下CXCL11肽中的一种:

[0142] PKSKQARLIIKKVERKNF(SEQ ID NO:24)

[0143] LNPKSKQARLIIKKVERKNF(SEQ ID NO:25)

[0144] DKIEVIITLKENKGQR(SEQ ID NO:26)

[0145] SEQ ID NO:24、25或26可经修饰以引入蛋白酶切割位点,例如组织蛋白酶K或MMP2切割位点。以下提供了基于人CXCL11的修饰肽的非限制性实例。

[0146] 具有组织蛋白酶K切割位点序列的示例性肽:

[0147] PKSKQARLIIKKVEEKNF(SEQ ID NO:27)

[0148] PKSKQARLIIKKVEGKNF(SEQ ID NO:28)

[0149] LNPKSKQARLIIKKVEEKNF(SEQ ID NO:29)

[0150] LNPKSKQARLIIKKVEGKNF(SEQ ID NO:30)

[0151] DKIEVIITLEENKGQR(SEQ ID NO:31)

[0152] 具有MMP2切割位点序列的示例性肽:

[0153] PKSKPARLIIKKVERKNF(SEQ ID NO:32)

[0154] LNPKSKPARLIIKKVERKNF(SEQ ID NO:33)

[0155] DKPEVIITLKENKGQR(SEQ ID NO:34)

[0156] V.示例性实施方式

[0157] 1.一种重组C-X-C基序趋化因子配体(CXCL)肽,其中相对于野生型CXCL氨基酸序列,所述肽经修饰以引入蛋白酶的切割位点。

[0158] 2.根据实施方式1所述的重组CXCL肽,其中所述CXCL是C-X-C趋化因子受体3(CXCR3)的配体。

[0159] 3.根据实施方式1或实施方式2所述的重组CXCL肽,其中所述CXCL是CXCL10、CXCL4、CXCL9或CXCL11。

[0160] 4.根据实施方式1-3中任一项所述的重组CXCL肽,其中所述蛋白酶是组织蛋白酶、弹性蛋白酶或基质金属蛋白酶(MMP)。

[0161] 5.根据实施方式4所述的重组CXCL肽,其中所述组织蛋白酶是组织蛋白酶G。

[0162] 6.根据实施方式4所述的重组CXCL肽,其中所述组织蛋白酶是组织蛋白酶K。

[0163] 7.根据实施方式4所述的重组CXCL肽,其中所述弹性蛋白酶是中性粒细胞弹性蛋白酶。

[0164] 8.根据实施方式4所述的重组CXCL肽,其中所述MMP是MMP2。

[0165] 9.根据实施方式1-8中任一项所述的重组CXCL肽,其中所述肽的长度为约12个至约30个氨基酸。

[0166] 10.根据实施方式1-9中任一项所述的重组CXCL肽,其中所述肽的长度为约18个至约25个氨基酸。

[0167] 11.根据实施方式1-10中任一项所述的重组CXCL肽,其中所述肽的长度为21个或22个氨基酸。

[0168] 12.根据实施方式1-11中任一项所述的重组CXCL肽,其中所述肽的氨基酸序列与SEQ ID NO:2-7、17-23和27-34中的任一序列具有至少90%同一性。

[0169] 13.根据实施方式1-11中任一项所述的重组CXCL肽,其中所述肽的氨基酸序列与SEQ ID NO:2-7、17-23和27-34中的任一序列具有至少95%同一性。

[0170] 14.根据实施方式1-11中任一项所述的重组CXCL肽,其中所述肽的氨基酸序列包括SEQ ID NO:2-7、17-23和27-34中的任一序列或由其组成。

[0171] 15.根据实施方式1-14中任一项所述的重组CXCL肽,其中所述肽的氨基酸序列包括SEQ ID NO:2或由其组成。

[0172] 16.根据实施方式1-15中任一项所述的重组CXCL肽,其中所述肽包括至少一种化学修饰。

[0173] 17.根据实施方式16所述的重组CXCL肽,其中所述至少一种化学修饰包括在所述肽的N端的修饰、在所述肽的C端的修饰或两者。

[0174] 18.根据实施方式17所述的重组CXCL肽,其中在N端的修饰包括甲酰化、乙酰化、丙酰化、焦谷氨酸形成、肉豆蔻酰基化、棕榈酰化、S-棕榈酰化、单甲基化、二甲基化、三甲基化或其任何组合。

[0175] 19.根据实施方式17或实施方式18所述的重组CXCL肽,其中在C端的修饰包括甲基化、α-酰胺化或其组合。

[0176] 20.根据实施方式16所述的重组CXCL肽,其中所述至少一种化学修饰包括非标准肽连接。

[0177] 21.根据实施方式1-20中任一项所述的重组CXCL肽,其包括至少一种D-氨基酸。

[0178] 22.根据实施方式1-21中任一项所述的重组CXCL肽,其包括至少一种非典型氨基酸。

[0179] 23.根据实施方式22所述的重组CXCL肽,其中所述至少一种非典型氨基酸是修饰的非典型氨基酸。

[0180] 24.根据实施方式23所述的重组CXCL肽,其中所述肽在所述肽的N端、在所述肽的C端或两者包括修饰的非典型氨基酸。

[0181] 25.根据实施方式24所述的重组CXCL肽,其中所述肽在N端包括修饰的非典型氨基酸,并且所述修饰包括甲酰化、乙酰化、丙酰化、焦谷氨酸形成、肉豆蔻酰化、棕榈酸化、S-棕榈酰化、单甲基化、二甲基化、三甲基化或其任何组合。

[0182] 26.根据实施方式24或实施方式25所述的重组CXCL肽,其中所述肽在C端包括修饰的非典型氨基酸,并且所述修饰包括甲基化、α-酰胺化或其组合。

[0183] 27.根据实施方式22所述的重组CXCL肽,其中所述至少一种非典型氨基酸是甲基化氨基酸、与聚乙二醇聚合物缀合的氨基酸、与生物素缀合的氨基酸、与异硫氰酸荧光素

(FITC)缀合的氨基酸、与载体蛋白缀合的氨基酸、放射性同位素标记的氨基酸或其任何组合。

[0184] 28.根据实施方式1-27中任一项所述的重组CXCL肽在缓释制剂中。

[0185] 29.根据实施方式28所述的重组CXCL肽,其中所述缓释制剂包括聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)、水凝胶或凝聚层。

[0186] 30.一种组合物,所述组合物包括实施方式1-29中任一项的重组CXCL肽和药学上可接受的载体。

[0187] 31.根据实施方式30所述的组合物,其被配制用于局部、鼻内、吸入、静脉内、玻璃体内、肌内、皮内或皮下施用。

[0188] 32.根据实施方式30所述的组合物,其被配制用于通过雾化或喷雾器递送至肺。

[0189] 33.根据实施方式30所述的组合物,其被配制用于通过导管和滴注递送至膀胱。

[0190] 34.根据实施方式30-33中任一项所述的组合物,其为单位剂量形式。

[0191] 35.一种抑制受试者纤维化的方法,所述方法包括向所述受试者施用实施方式1-29中任一项的CXCL肽或实施方式30-34中任一项的组合物。

[0192] 36.根据实施方式35所述的方法,其中所述受试者患有创伤、自身免疫性疾病、炎性疾病或病症、或者医源性疾病或病症。

[0193] 37.根据实施方式36所述的方法,其中所述自身免疫性疾病是糖尿病、硬皮病或自身免疫性纤维化。

[0194] 38.根据实施方式36所述的方法,其中所述炎性疾病或病症是特发性肺纤维化(IPF)。

[0195] 39.根据实施方式36所述的方法,其中所述医源性疾病或病症是药物诱导的肺纤维化、卡介菌(BCG)治疗诱导的膀胱纤维化或化疗诱导的膀胱纤维化。

[0196] 40.一种抑制受试者血管生成的方法,所述方法包括向所述受试者施用实施方式1-29中任一项的CXCL肽或实施方式30-34中任一项的组合物。

[0197] 41.根据实施方式40所述的方法,其中所述受试者患有眼部血管生成性病症。

[0198] 42.根据实施方式41所述的方法,其中所述眼部血管生成性病症是湿性黄斑变性、糖尿病性视网膜病、早产儿视网膜病、青光眼治疗后再狭窄、新生血管性青光眼或角膜新生血管形成。

[0199] 提供以下实施例以说明某些特定特征和/或实施方式。这些实施例不应被解释为将本公开限制为所描述的特定特征或实施方式。

[0200] 实施例

[0201] 实施例1:对蛋白酶切割敏感的修饰的肽

[0202] 本实施例描述了经工程化而易于被急性炎症反应的细胞外蛋白酶切割的肽。

[0203] 先前的研究表明,CXCR3(例如CXCL10)天然配体的线性肽片段能够结合并激活CXCR3(参见美国专利号9,180,167、9,452,200和9,872,889,其全部内容通过引用并入本文)。通过CXCR3发出信号的趋化因子既可以诱导对贴壁细胞的抗纤维化作用,又可以促进对先天免疫系统细胞的炎症和纤维化作用。为了限制炎症反应期间CXCR3激活剂的纤维化作用,设计了在急性炎症反应期间易于被蛋白酶切割的肽。因此,在诱导炎症反应时,经工程化的肽被切割,从而限制了其促纤维化作用。

[0204] 肽110(SEQ ID NO:2)是人CXCL10(也称为IP-10)的修饰片段。与野生型人序列(SEQ ID NO:1)相比,肽110包含精氨酸取代为蛋氨酸,并用组氨酸取代丝氨酸残基。后一种取代导致组织蛋白酶G和中性粒细胞弹性蛋白酶切割位点的引入。取代的残基以粗体下划线表示:

[0205] 人序列:PESKAIKNLLKAVSKERSKRSP(SEQ ID NO:1)

[0206] 肽110:PESKAIKNLLKAV**H**KE**M**SKRSP (SEQ ID NO: 2)

[0207] 由于组氨酸取代为丝氨酸是非保守的氨基酸变化,因此进行实验以确认工程化的肽在脉络膜新生血管形成(CNV)的小鼠模型中保留阻断血管生成和纤维化的能力。

[0208] 激光诱导的CNV

[0209] 如前所述,小鼠CNV是由激光光凝诱导的Bruch膜破裂引起的。简而言之,用盐酸氯胺酮(100mg/kg体重)麻醉7至8周龄雌性C57BL/6J小鼠,并用1%的托吡卡胺扩瞳。使用OcuLight GL二极管激光器的裂隙灯传输系统(Iridex,Mountain View,CA),对每个视网膜进行532nm二极管激光光凝的3次灼伤(光斑大小为75mm;持续时间为0.1sec;功率为120mW),使用盖玻片作为隐形眼镜查看视网膜。在视网膜后极的9、12和3点钟位置进行灼伤。激光时产生气泡(表明Bruch膜破裂)是获得脉络膜新生血管形成(NV)的重要因素,因此,该研究仅包括产生气泡的灼伤。

[0210] 激光处理后,立即向小鼠的一只眼睛以1μl的体积注射1μg(图1A)或3μg(图1B)的110肽(SEQ ID NO:2)或三种阳性对照肽中的一种(肽102、肽105或肽107),并向对侧眼睛注射乱序肽作为对照。其他对照小鼠仅注射溶媒。注射后,使用抗生素药膏保护角膜。激光处理七天后,对小鼠实施安乐死。将眼睛摘除并在10%PBS缓冲的福尔马林中固定3小时。解剖脉络膜并将其置于1.5ml Eppendorf管中,并用FITC缀合的GSA-凝集素IB4(1:150,Vector,Frederick,MD)染色,在4℃下旋转过夜。用PBST洗涤3次后,将脉络膜固定在载玻片上,并通过荧光显微镜检查。使用三色CCD摄像机和图像采集卡将图像数字化。使用图像分析软件(Image-Pro Plus;MediaCybernetics,Silver Spring,MD)测量每个破裂部位脉络膜NV的总面积。

[0211] 如图1A-1B所示,肽110保留了其抗血管生成活性,这在两种剂量的肽的脉络膜新生血管形成显著减少中得到证明。

[0212] 实施例2:具有工程化蛋白酶切割位点的CXCR3激活肽

[0213] 本实施例描述了基于人CXCL10、人CXCL4或人CXCL11的序列的另外的肽,其被设计为包含一个或更多个在急性炎症期间被激活的蛋白酶的切割位点。

[0214] 具有组织蛋白酶G和中性粒细胞弹性蛋白酶切割位点的CXCL10衍生肽:

[0215]
PESKAIKNLLKAV**H**KEMSKRSP (肽 110; SEQ ID NO: 2)
_ESKAIKNLLKAV**H**KEMSKRSP (肽 112; SEQ ID NO: 3)
PESKAIKNLLKAV**H**KERSKRSP (肽 116; SEQ ID NO: 4)
_ESKAIKNLLKAV**H**KERSKRSP (肽 117; SEQ ID NO: 5)

[0216] 具有中性粒细胞组织蛋白酶切割位点的CXCL10衍生肽:

[0217] PESKAIKNLLKAVS**EVL**SKRSP (肽 121; SEQ ID NO: 6)

[0218] 具有中性粒细胞弹性蛋白酶切割位点的CXCL10衍生肽:

[0219] PES**FIRW**NLLKAVSKEMSKRSP (肽131；SEQ ID NO: 7)

[0220] 肽具有组织蛋白酶K切割位点序列的CXCL4衍生肽：

[0221] DLQCLCVKTTSQVRPRHITSLE**G**IKAGPH (SEQ ID NO: 17)
DLQCLCVKTTSQVRPRHITSLE**E**IKAGPH (SEQ ID NO: 18)
PLYKKIIKKL**E**ES (SEQ I DNO: 19)
LDLQAPLYKKIIKKL**E**ES (SEQ ID NO: 20)

[0222] 具有MMP2切割位点序列的CXCL4衍生肽：

[0223] DLQCLCVKTTSQVRPR**L**ITSLEVIKAGPH (SEQ ID NO: 21)
PLY**P**KIIKKLLES (SEQ ID NO: 22)

[0224] LDLQAPLY**P**KIIKKLLES (SEQ ID NO: 23)

[0225] 具有组织蛋白酶K切割位点序列的CXCL11衍生肽：

[0226] PKSKQARLIIKKVE**E**KNF (SEQ ID NO: 27)
PKSKQARLIIKKVE**G**KNF (SEQ ID NO: 28)
LNPKSKQARLIIKKVE**E**KNF (SEQ ID NO: 29)
LNPKSKQARLIIKKVE**G**KNF (SEQ ID NO: 30)
DKIEVIITL**E**ENKGQR (SEQ ID NO: 31)

[0227] 具有MMP2切割位点序列的CXCL11衍生肽：

[0228] PKSK**P**ARLIIKKVERKNF (SEQ ID NO: 32)
LNPKSK**P**ARLIIKKVERKNF (SEQ ID NO: 33)
DK**P**EVIITLKENKGQR (SEQ ID NO: 34)

[0229] 鉴于可以应用公开的主题的原则可适用于许多可能的实施方式，应当认识到，所示出的实施方式仅是本公开内容的优选实例，并不应被视为限制本公开内容的范围。相反，本公开内容的范围由以下权利要求限定。因此，我们要求保护落入这些权利要求的范围和精神内的所有内容作为我们的发明。

[0001] 序列表

[0002] <110> 联邦高等教育系统匹兹堡大学

[0003] <120> CXCR3的可切割激活剂及其使用方法

[0004] <130> 8123-101089-02

[0005] <150> US 62/748,711

[0006] <151> 2018-10-22

[0007] <160> 36

[0008] <170> PatentIn 3.5版

[0009] <210> 1

[0010] <211> 22

[0011] <212> PRT

[0012] <213> 智人

[0013] <400> 1

[0014] Pro Glu Ser Lys Ala Ile Lys Asn Leu Leu Lys Ala Val Ser Lys Glu

[0015] 1 5 10 15

[0016] Arg Ser Lys Arg Ser Pro

[0017] 20

[0018] <210> 2

[0019] <211> 22

[0020] <212> PRT

[0021] <213> 人工序列

[0022] <220>

[0023] <223> 合成肽

[0024] <400> 2

[0025] Pro Glu Ser Lys Ala Ile Lys Asn Leu Leu Lys Ala Val His Lys Glu

[0026] 1 5 10 15

[0027] Met Ser Lys Arg Ser Pro

[0028] 20

[0029] <210> 3

[0030] <211> 21

[0031] <212> PRT

[0032] <213> 人工序列

[0033] <220>

[0034] <223> 合成肽

[0035] <400> 3

[0036] Glu Ser Lys Ala Ile Lys Asn Leu Leu Lys Ala Val His Lys Glu Met

[0037] 1 5 10 15

[0038] Ser Lys Arg Ser Pro

[0039] 20

[0040] <210> 4

[0041] <211> 22

[0042] <212> PRT

[0043] <213> 人工序列

[0044] <220>

[0045] <223> 合成肽

[0046] <400> 4

[0047] Pro Glu Ser Lys Ala Ile Lys Asn Leu Leu Lys Ala Val His Lys Glu

[0048] 1 5 10 15

[0049] Arg Ser Lys Arg Ser Pro

[0050] 20

[0051] <210> 5

[0052] <211> 21

[0053] <212> PRT

[0054] <213> 人工序列

[0055] <220>

[0056] <223> 合成肽

[0057] <400> 5

[0058] Glu Ser Lys Ala Ile Lys Asn Leu Leu Lys Ala Val His Lys Glu Arg

[0059] 1 5 10 15

[0060] Ser Lys Arg Ser Pro

[0061] 20

[0062] <210> 6

[0063] <211> 22

[0064] <212> PRT

[0065] <213> 人工序列

[0066] <220>

[0067] <223> 合成肽

[0068] <400> 6

[0069] Pro Glu Ser Lys Ala Ile Lys Asn Leu Leu Lys Ala Val Ser Glu Val

[0070] 1 5 10 15

[0071] Leu Ser Lys Arg Ser Pro

[0072] 20

[0073] <210> 7

[0074] <211> 22

[0075] <212> PRT

[0076] <213> 人工序列

[0077] <220>

[0078] <223> 合成肽

[0079] <400> 7

[0080] Pro Glu Ser Phe Ile Arg Trp Asn Leu Leu Lys Ala Val Ser Lys Glu

[0081] 1 5 10 15

[0082] Met Ser Lys Arg Ser Pro

[0083] 20

[0084] <210> 8

[0085] <211> 98

[0086] <212> PRT

[0087] <213> 智人

[0088] <400> 8

[0089] Met Asn Gln Thr Ala Ile Leu Ile Cys Cys Leu Ile Phe Leu Thr Leu

[0090] 1 5 10 15

[0091] Ser Gly Ile Gln Gly Val Pro Leu Ser Arg Thr Val Arg Cys Thr Cys

[0092] 20 25 30

[0093] Ile Ser Ile Ser Asn Gln Pro Val Asn Pro Arg Ser Leu Glu Lys Leu

[0094] 35 40 45

[0095] Glu Ile Ile Pro Ala Ser Gln Phe Cys Pro Arg Val Glu Ile Ile Ala

[0096] 50 55 60

[0097] Thr Met Lys Lys Lys Gly Glu Lys Arg Cys Leu Asn Pro Glu Ser Lys

[0098] 65 70 75 80

[0099] Ala Ile Lys Asn Leu Leu Lys Ala Val Ser Lys Glu Arg Ser Lys Arg

[0100] 85 90 95

[0101] Ser Pro

[0102] <210> 9

[0103] <211> 101

[0104] <212> PRT

[0105] <213> 智人

[0106] <400> 9

[0107] Met Ser Ser Ala Ala Gly Phe Cys Ala Ser Arg Pro Gly Leu Leu Phe

[0108] 1 5 10 15

[0109] Leu Gly Leu Leu Leu Leu Pro Leu Val Val Ala Phe Ala Ser Ala Glu

[0110] 20 25 30

[0111] Ala Glu Glu Asp Gly Asp Leu Gln Cys Leu Cys Val Lys Thr Thr Ser

[0112] 35 40 45

[0113] Gln Val Arg Pro Arg His Ile Thr Ser Leu Glu Val Ile Lys Ala Gly

[0114] 50 55 60

[0115] Pro His Cys Pro Thr Ala Gln Leu Ile Ala Thr Leu Lys Asn Gly Arg

[0116] 65 70 75 80

[0117] Lys Ile Cys Leu Asp Leu Gln Ala Pro Leu Tyr Lys Lys Ile Ile Lys
[0118] 85 90 95
[0119] Lys Leu Leu Glu Ser
[0120] 100
[0121] <210> 10
[0122] <211> 125
[0123] <212> PRT
[0124] <213> 智人
[0125] <400> 10
[0126] Met Lys Lys Ser Gly Val Leu Phe Leu Leu Gly Ile Ile Leu Leu Val
[0127] 1 5 10 15
[0128] Leu Ile Gly Val Gln Gly Thr Pro Val Val Arg Lys Gly Arg Cys Ser
[0129] 20 25 30
[0130] Cys Ile Ser Thr Asn Gln Gly Thr Ile His Leu Gln Ser Leu Lys Asp
[0131] 35 40 45
[0132] Leu Lys Gln Phe Ala Pro Ser Pro Ser Cys Glu Lys Ile Glu Ile Ile
[0133] 50 55 60
[0134] Ala Thr Leu Lys Asn Gly Val Gln Thr Cys Leu Asn Pro Asp Ser Ala
[0135] 65 70 75 80
[0136] Asp Val Lys Glu Leu Ile Lys Lys Trp Glu Lys Gln Val Ser Gln Lys
[0137] 85 90 95
[0138] Lys Lys Gln Lys Asn Gly Lys Lys His Gln Lys Lys Lys Val Leu Lys
[0139] 100 105 110
[0140] Val Arg Lys Ser Gln Arg Ser Arg Gln Lys Lys Thr Thr
[0141] 115 120 125
[0142] <210> 11
[0143] <211> 94
[0144] <212> PRT
[0145] <213> 智人
[0146] <400> 11
[0147] Met Ser Val Lys Gly Met Ala Ile Ala Leu Ala Val Ile Leu Cys Ala
[0148] 1 5 10 15
[0149] Thr Val Val Gln Gly Phe Pro Met Phe Lys Arg Gly Arg Cys Leu Cys
[0150] 20 25 30
[0151] Ile Gly Pro Gly Val Lys Ala Val Lys Val Ala Asp Ile Glu Lys Ala
[0152] 35 40 45
[0153] Ser Ile Met Tyr Pro Ser Asn Asn Cys Asp Lys Ile Glu Val Ile Ile
[0154] 50 55 60
[0155] Thr Leu Lys Glu Asn Lys Gly Gln Arg Cys Leu Asn Pro Lys Ser Lys

[0156] 65 70 75 80

[0157] Gln Ala Arg Leu Ile Ile Lys Lys Val Glu Arg Lys Asn Phe

[0158] 85 90

[0159] <210> 12

[0160] <211> 8

[0161] <212> PRT

[0162] <213> 人工序列

[0163] <220>

[0164] <223> 合成肽

[0165] <220>

[0166] <221> MISC_FEATURE

[0167] <222> (1)..(1)

[0168] <223> Xaa = 任何氨基酸

[0169] <220>

[0170] <221> MISC_FEATURE

[0171] <222> (4)..(4)

[0172] <223> Xaa = Leu、His或Phe

[0173] <220>

[0174] <221> MISC_FEATURE

[0175] <222> (6)..(6)

[0176] <223> Xaa = Ser或无氨基酸

[0177] <400> 12

[0178] Xaa Val Leu Xaa Ser Xaa Ala Val

[0179] 1 5

[0180] <210> 13

[0181] <211> 4

[0182] <212> PRT

[0183] <213> 人工序列

[0184] <220>

[0185] <223> 合成肽

[0186] <400> 13

[0187] Phe Ile Arg Trp

[0188] 1

[0189] <210> 14

[0190] <211> 29

[0191] <212> PRT

[0192] <213> 智人

[0193] <400> 14

[0194] Asp Leu Gln Cys Leu Cys Val Lys Thr Thr Ser Gln Val Arg Pro Arg

[0195] 1 5 10 15

[0196] His Ile Thr Ser Leu Glu Val Ile Lys Ala Gly Pro His

[0197] 20 25

[0198] <210> 15

[0199] <211> 13

[0200] <212> PRT

[0201] <213> 智人

[0202] <400> 15

[0203] Pro Leu Tyr Lys Lys Ile Ile Lys Lys Leu Leu Glu Ser

[0204] 1 5 10

[0205] <210> 16

[0206] <211> 18

[0207] <212> PRT

[0208] <213> 智人

[0209] <400> 16

[0210] Leu Asp Leu Gln Ala Pro Leu Tyr Lys Lys Ile Ile Lys Lys Leu Leu

[0211] 1 5 10 15

[0212] Glu Ser

[0213] <210> 17

[0214] <211> 29

[0215] <212> PRT

[0216] <213> 人工序列

[0217] <220>

[0218] <223> 合成肽

[0219] <400> 17

[0220] Asp Leu Gln Cys Leu Cys Val Lys Thr Thr Ser Gln Val Arg Pro Arg

[0221] 1 5 10 15

[0222] His Ile Thr Ser Leu Glu Gly Ile Lys Ala Gly Pro His

[0223] 20 25

[0224] <210> 18

[0225] <211> 29

[0226] <212> PRT

[0227] <213> 人工序列

[0228] <220>

[0229] <223> 合成肽

[0230] <400> 18

[0231] Asp Leu Gln Cys Leu Cys Val Lys Thr Thr Ser Gln Val Arg Pro Arg

[0232] 1 5 10 15

[0233] His Ile Thr Ser Leu Glu Glu Ile Lys Ala Gly Pro His

[0234] 20 25

[0235] <210> 19

[0236] <211> 13

[0237] <212> PRT

[0238] <213> 人工序列

[0239] <220>

[0240] <223> 合成肽

[0241] <400> 19

[0242] Pro Leu Tyr Lys Lys Ile Ile Lys Lys Leu Glu Glu Ser

[0243] 1 5 10

[0244] <210> 20

[0245] <211> 18

[0246] <212> PRT

[0247] <213> 人工序列

[0248] <220>

[0249] <223> 合成肽

[0250] <400> 20

[0251] Leu Asp Leu Gln Ala Pro Leu Tyr Lys Lys Ile Ile Lys Lys Leu Glu

[0252] 1 5 10 15

[0253] Glu Ser

[0254] <210> 21

[0255] <211> 29

[0256] <212> PRT

[0257] <213> 人工序列

[0258] <220>

[0259] <223> 合成肽

[0260] <400> 21

[0261] Asp Leu Gln Cys Leu Cys Val Lys Thr Thr Ser Gln Val Arg Pro Arg

[0262] 1 5 10 15

[0263] Leu Ile Thr Ser Leu Glu Val Ile Lys Ala Gly Pro His

[0264] 20 25

[0265] <210> 22

[0266] <211> 13

[0267] <212> PRT

[0268] <213> 人工序列

[0269] <220>

[0270] <223> 合成肽

[0271] <400> 22

[0272] Pro Leu Tyr Pro Lys Ile Ile Lys Lys Leu Leu Glu Ser

[0273] 1 5 10

[0274] <210> 23

[0275] <211> 18

[0276] <212> PRT

[0277] <213> 人工序列

[0278] <220>

[0279] <223> 合成肽

[0280] <400> 23

[0281] Leu Asp Leu Gln Ala Pro Leu Tyr Pro Lys Ile Ile Lys Lys Leu Leu

[0282] 1 5 10 15

[0283] Glu Ser

[0284] <210> 24

[0285] <211> 18

[0286] <212> PRT

[0287] <213> 智人

[0288] <400> 24

[0289] Pro Lys Ser Lys Gln Ala Arg Leu Ile Ile Lys Lys Val Glu Arg Lys

[0290] 1 5 10 15

[0291] Asn Phe

[0292] <210> 25

[0293] <211> 20

[0294] <212> PRT

[0295] <213> 智人

[0296] <400> 25

[0297] Leu Asn Pro Lys Ser Lys Gln Ala Arg Leu Ile Ile Lys Lys Val Glu

[0298] 1 5 10 15

[0299] Arg Lys Asn Phe

[0300] 20

[0301] <210> 26

[0302] <211> 16

[0303] <212> PRT

[0304] <213> 智人

[0305] <400> 26

[0306] Asp Lys Ile Glu Val Ile Ile Thr Leu Lys Glu Asn Lys Gly Gln Arg

[0307] 1 5 10 15

[0308] <210> 27

[0309] <211> 18

[0310] <212> PRT

[0311] <213> 人工序列

[0312] <220>

[0313] <223> 合成肽

[0314] <400> 27

[0315] Pro Lys Ser Lys Gln Ala Arg Leu Ile Ile Lys Lys Val Glu Glu Lys

[0316] 1 5 10 15

[0317] Asn Phe

[0318] <210> 28

[0319] <211> 18

[0320] <212> PRT

[0321] <213> 人工序列

[0322] <220>

[0323] <223> 合成肽

[0324] <400> 28

[0325] Pro Lys Ser Lys Gln Ala Arg Leu Ile Ile Lys Lys Val Glu Gly Lys

[0326] 1 5 10 15

[0327] Asn Phe

[0328] <210> 29

[0329] <211> 20

[0330] <212> PRT

[0331] <213> 人工序列

[0332] <220>

[0333] <223> 合成肽

[0334] <400> 29

[0335] Leu Asn Pro Lys Ser Lys Gln Ala Arg Leu Ile Ile Lys Lys Val Glu

[0336] 1 5 10 15

[0337] Glu Lys Asn Phe

[0338] 20

[0339] <210> 30

[0340] <211> 20

[0341] <212> PRT

[0342] <213> 人工序列

[0343] <220>

[0344] <223> 合成肽

[0345] <400> 30

[0346] Leu Asn Pro Lys Ser Lys Gln Ala Arg Leu Ile Ile Lys Lys Val Glu

[0347] 1 5 10 15

[0348] Gly Lys Asn Phe

[0349] 20

[0350] <210> 31

[0351] <211> 16
[0352] <212> PRT
[0353] <213> 人工序列
[0354] <220>
[0355] <223> 合成肽
[0356] <400> 31
[0357] Asp Lys Ile Glu Val Ile Ile Thr Leu Glu Glu Asn Lys Gly Gln Arg
[0358] 1 5 10 15
[0359] <210> 32
[0360] <211> 18
[0361] <212> PRT
[0362] <213> 人工序列
[0363] <220>
[0364] <223> 合成肽
[0365] <400> 32
[0366] Pro Lys Ser Lys Pro Ala Arg Leu Ile Ile Lys Lys Val Glu Arg Lys
[0367] 1 5 10 15
[0368] Asn Phe
[0369] <210> 33
[0370] <211> 20
[0371] <212> PRT
[0372] <213> 人工序列
[0373] <220>
[0374] <223> 合成肽
[0375] <400> 33
[0376] Leu Asn Pro Lys Ser Lys Pro Ala Arg Leu Ile Ile Lys Lys Val Glu
[0377] 1 5 10 15
[0378] Arg Lys Asn Phe
[0379] 20
[0380] <210> 34
[0381] <211> 16
[0382] <212> PRT
[0383] <213> 人工序列
[0384] <220>
[0385] <223> 合成肽
[0386] <400> 34
[0387] Asp Lys Pro Glu Val Ile Ile Thr Leu Lys Glu Asn Lys Gly Gln Arg
[0388] 1 5 10 15
[0389] <210> 35

[0390] <211> 8

[0391] <212> PRT

[0392] <213> 人工序列

[0393] <220>

[0394] <223> 合成肽

[0395] <220>

[0396] <221> misc_feature

[0397] <222> (1)..(2)

[0398] <223> Xaa可以是任何天然氨基酸

[0399] <220>

[0400] <221> MISC_FEATURE

[0401] <222> (3)..(3)

[0402] <223> Xaa = Leu、Pro或Val

[0403] <220>

[0404] <221> MISC_FEATURE

[0405] <222> (4)..(4)

[0406] <223> Xaa = Glu或Ala

[0407] <220>

[0408] <221> MISC_FEATURE

[0409] <222> (5)..(5)

[0410] <223> Xaa = Gly或Glu

[0411] <220>

[0412] <221> misc_feature

[0413] <222> (6)..(8)

[0414] <223> Xaa可以是任何天然氨基酸

[0415] <400> 35

[0416] Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

[0417] 1 5

[0418] <210> 36

[0419] <211> 8

[0420] <212> PRT

[0421] <213> 人工序列

[0422] <220>

[0423] <223> 合成肽

[0424] <220>

[0425] <221> misc_feature

[0426] <222> (1)..(1)

[0427] <223> Xaa可以是任何天然氨基酸

[0428] <220>

[0429] <221> misc_feature

[0430] <222> (3)..(4)

[0431] <223> Xaa可以是任何天然氨基酸

[0432] <220>

[0433] <221> MISC_FEATURE

[0434] <222> (5)..(5)

[0435] <223> Xaa = Leu或Ile

[0436] <220>

[0437] <221> misc_feature

[0438] <222> (6)..(8)

[0439] <223> Xaa可以是任何天然氨基酸

[0440] <400> 36

[0441] Xaa Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

[0442] 1 5

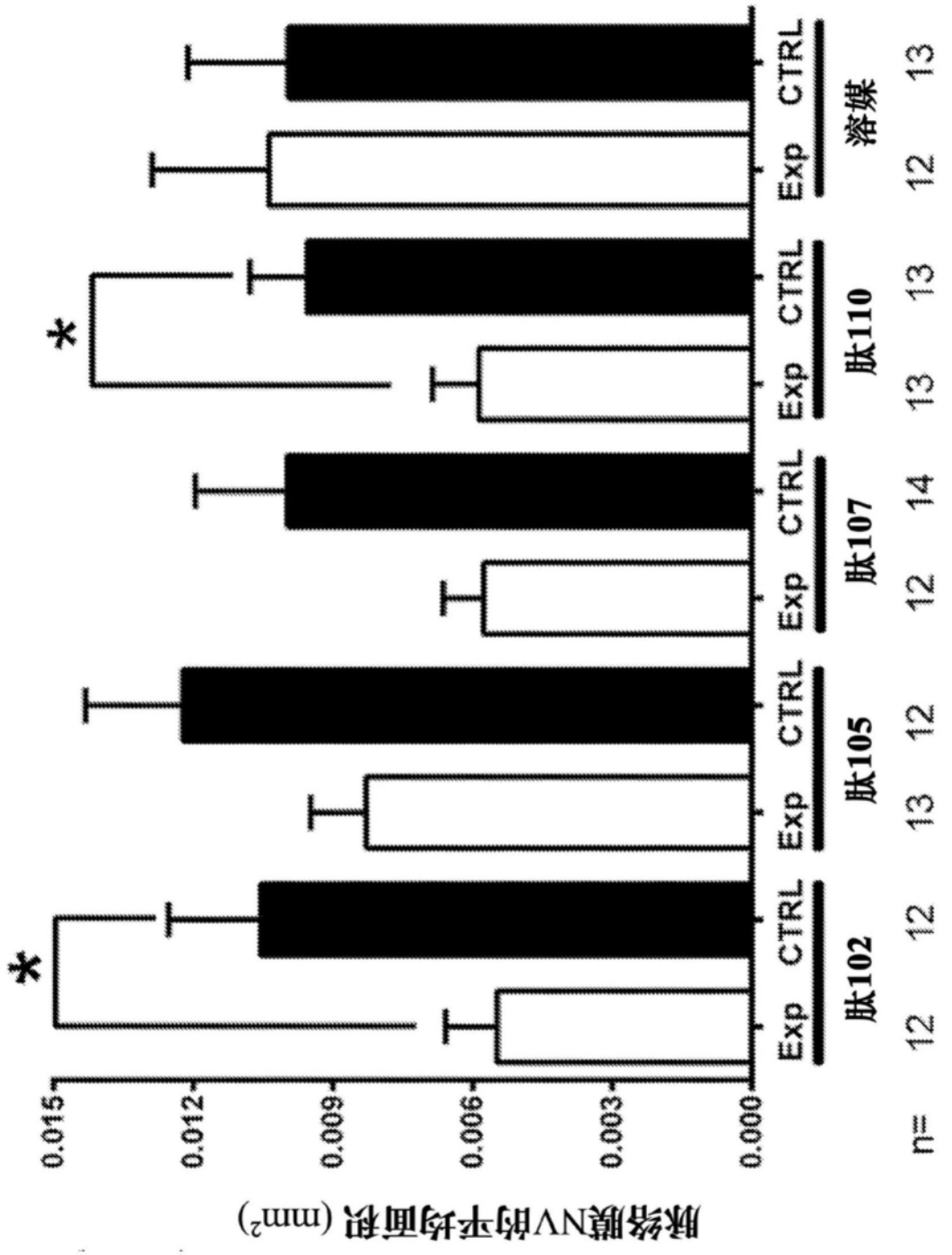

脉络膜NV的平均面积 (mm²)
0.015
0.012
0.009
0.006
0.003
0.000
n=
12 12 13 12 12 14 13 13 12 13
Exp CTRL Exp CTRL Exp CTRL Exp CTRL Exp CTRL
肽102
肽105
肽107
肽110
溶媒
*
*

图1A

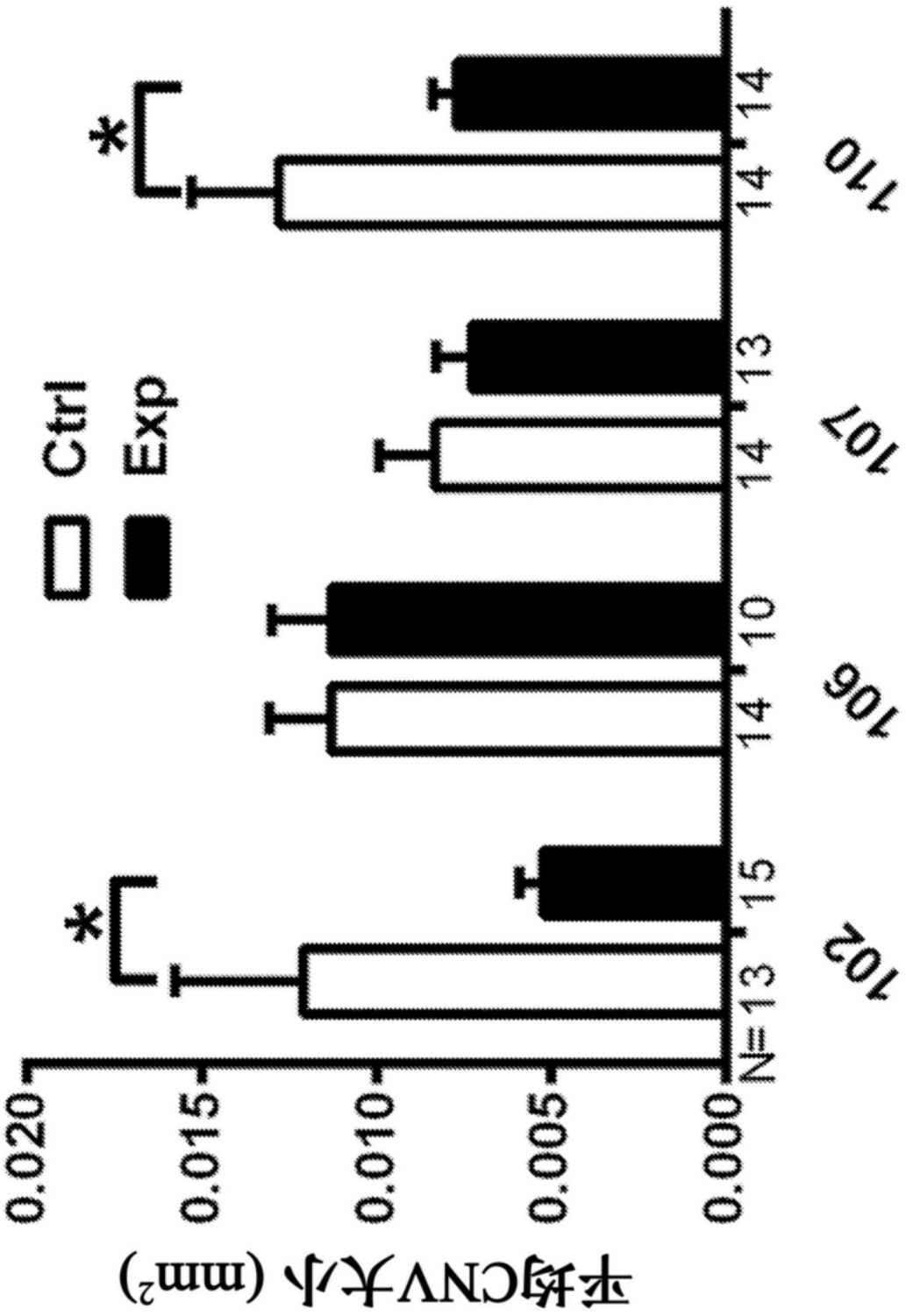

平均CNV大小 (mm²)
0.020
0.015
0.010
0.005
0.000
N=13
15
14
10
14
13
14
14
14
102
106
107
110
*
*
Ctrl
Exp

图1B