



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 119053620 A

(43) 申请公布日 2024.11.29

(21) 申请号 202380035128.9

L·勒盖内克

(22) 申请日 2023.03.15

(74) 专利代理机构 北京英创嘉友知识产权代理
事务所(普通合伙) 11447

(30) 优先权数据

22305312.5 2022.03.16 EP

专利代理师 桑传标

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.10.18

(51) Int.Cl.

C07K 16/26 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2023/056642 2023.03.15

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/175022 EN 2023.09.21

(71) 申请人 INSERM(法国国家健康医学研究院)

地址 法国巴黎

申请人 法国国家科学研究中心

巴黎西岱大学

权利要求书1页 说明书30页

序列表(电子公布) 附图14页

(72) 发明人 S·布尔杜卢 J·齐韦里

(54) 发明名称

治疗传染病的新方法

(57) 摘要

本发明涉及传染病的治疗。在这项研究中,发明人确定了在细菌感染期间维持脑血管完整性的潜在保护机制,发明人对分离自人皮肤(HDMECs)或脑(HBMECs)微血管的原代内皮细胞进行了RNA分析,这些细胞未被感染或在体外被脑膜炎球菌感染。他们发现在感染后,特别是在脑内皮细胞中有40个基因被特异性调控,尤其是血管生成素样蛋白4(ANGPTL4)。他们表明,在脓毒症的背景下,ANGPTL4是一种主要的屏障稳定蛋白,可以保护机体免受细菌感染。他们还证明了ANGPTL4(或衍生肽)作为辅助治疗减少细菌诱导的血管功能障碍和死亡率的潜力。因此,本发明涉及从ANGPTL4蛋白衍生的肽及其在治疗传染病中的用途。

1. 一种衍生自蛋白质ANGPTL4的肽,其包含或由氨基酸序列 X_1 SALERRLSACGSX X_{14} X_{15} 或其功能保守变体组成,其中, X_1 为无氨基酸或亮氨酸(L), X_{14} 为无氨基酸或丙氨酸(A), X_{15} 为无氨基酸或半胱氨酸(C)。

2. 根据权利要求1所述的衍生自蛋白质ANGPTL4的肽,其中,所述肽包含或由SEQ ID NO:1中第66位至第80位的氨基酸残基组成,其中,第76和80位的氨基酸是任意天然存在的氨基酸(肽P9或肽P9')或其功能保守变体。

3. 根据权利要求2所述的衍生自蛋白质ANGPTL4的肽,其中,所述肽包含或由SEQ ID NO:1中第65位至第80位的氨基酸残基组成,其中,第76和80位的氨基酸是任意天然存在的氨基酸(肽P6或肽P6')或其功能保守变体。

4. 根据权利要求2所述的衍生自蛋白质ANGPTL4的肽,其中,所述肽包含或由SEQ ID NO:1中第56位至第83位的氨基酸残基组成,其中,第76和80位的氨基酸是任意天然存在的氨基酸(肽P4或肽P4')或其功能保守变体。

5. 根据权利要求2所述的衍生自蛋白质ANGPTL4的肽,其中,所述肽包含或由SEQ ID NO:1中第38位至第83位的氨基酸残基组成,其中,第76和80位的氨基酸是任意天然存在的氨基酸(肽P1或肽P1')或其功能保守变体。

6. 根据权利要求2所述的衍生自蛋白质ANGPTL4的肽,其中,所述肽包含或由SEQ ID NO:1中第26位至第164位的氨基酸残基组成,其中,第76和80位的氨基酸是任意天然存在的氨基酸(nANGPTL4或nANGPTL4')或其功能保守变体。

7. 根据权利要求2所述的衍生自蛋白质ANGPTL4的肽,其中,所述肽包含或由SEQ ID NO:1中1位至406位的氨基酸残基组成,其中,第76和80位的氨基酸是任意天然存在的氨基酸(ANGPTL4或ANGPTL4')或其功能保守变体。

8. 根据权利要求1-7所述的衍生自蛋白质ANGPTL4的肽,其中,第76和80位的氨基酸可为选自半胱氨酸(Cys或C)或丙氨酸(Ala或A)或丝氨酸(Ser或S)的氨基酸。

9. 根据权利要求1-8所述的衍生自蛋白质ANGPTL4的肽,其中,所述肽由SEQ ID NO:1或8至30或37至64中所示的氨基酸序列组成。

10. 编码权利要求1-9所述的肽的核酸序列。

11. 权利要求1-9所述的肽或权利要求10所述的核酸在治疗有需要的受试者的传染病中的用途。

12. 根据权利要求11所述的肽或核酸,其中,所述传染病是细菌感染。

13. 权利要求12所述的肽或核酸在治疗由细菌感染引起的脓毒症中的用途。

14. 一种治疗有需要的受试者的传染病的方法,包括向有需要的受试者施用治疗有效量的本发明的肽、蛋白质、核酸、载体或宿主细胞。

15. i) 权利要求1-9所述的肽或权利要求10所述的核酸,和ii) 至少一种抗病原体感染剂,作为组合制剂,同时、单独或顺序使用,以治疗有需要的受试者的传染病。

16. 一种治疗组合物,其包含本发明的抗体或肽、蛋白质、核酸、载体或宿主细胞,用于治疗有需要的受试者的传染病。

治疗传染病的新方法

技术领域

[0001] 本发明涉及衍生自蛋白质ANGPTL4的肽及其在治疗传染病中的用途。

背景技术

[0002] 脓毒症是全球最常见的致命疾病之一,现已被世界卫生组织确认为全球健康优先事项[1]。全球每小时约有1000人死于脓毒症,脓毒症病例数量持续大幅增加。这是少数几种在资源贫乏地区和发达国家同样猛烈袭击的条件之一。在全球范围内,每年有超过4900万人患有脓毒症,导致1100万患者死亡[1,2]。患有这些疾病的患者通常在医院的重症监护室接受治疗,估计每年花费240亿美元。经通胀调整后,治疗因这种疾病住院的患者的总费用平均每年增长19%。尽管治疗费用高昂,脓毒症往往是致命的。那些在严重脓毒症中幸存下来的人更有可能出现永久性器官损伤、认知障碍和身体残疾。

[0003] 血管内皮细胞是体内最早接触循环细菌和/或细菌分子的细胞之一,是脓毒症诱导事件的主要靶点[1-3]。微生物毒力因子和活化血细胞释放的促炎介质的混合极大地改变了人类的血管系统。大多数内皮生理功能受到干扰,导致血管通透性增加、凝血激活并参与炎症反应。严重的内皮功能障碍会导致不同器官的缺氧损伤,导致多器官衰竭[3]。弥漫性血管内凝血也是脓毒症的主要并发症。

[0004] 脓毒症患者的治疗方案包括抗生素治疗、清除感染源以及血液动力学、呼吸和代谢支持的组合。积极的液体复苏和血液动力学支持用于恢复组织灌注和正常化细胞代谢[2]。然而,严重脓症患者或感染性休克患者的死亡率仍然很高。到目前为止,旨在控制严重感染中宿主炎症反应和凝血障碍的多项临床试验取得了有限的临床成功[1]。因此,迫切需要新的策略来支持血管完整性/屏障功能,实施内皮细胞保护机制,并限制有害的止血和炎症过程。

[0005] 血脑屏障(BBB)是一种严格调节中枢神经系统稳态的严格限制性屏障,具有调节炎症和止血的内在能力[4,5]。BBB是由连续的无窗孔特化内皮细胞形成的,这些内皮细胞表达细胞间紧密连接蛋白,限制细胞旁扩散,以及特定的转运蛋白,调节物质从血液到大脑的选择性运输和代谢[6,7]。周细胞和平滑肌细胞的高覆盖率构成了额外的屏障[8]。最后,与星形胶质细胞足突紧密接触的厚基底膜也形成了界膜[9]。这些特定特征有助于保护大脑免受入侵病原体的侵害。然而,感染过程中维持血脑屏障完整性所涉及的细胞保护机制仍然知之甚少。

[0006] 脑膜炎奈瑟菌(Nm,脑膜炎球菌)是一种侵袭性细菌病原体,能够引起严重的脓毒症和脑膜炎。脑膜炎奈瑟菌是一种仅限于人类的细胞外革兰氏阴性双球菌,通常作为无症状携带者存在于约10%的人群的鼻咽中。这种细菌的侵袭性感染会导致严重的感染性休克[10]。一旦进入血液循环,Nm就会附着在内皮细胞的顶端细胞表面,特别是在微循环中,血流速度比大血管慢,这有助于细菌附着[11]。Nm与人类微血管的相互作用导致内皮功能障碍综合征,在最严重的情况下,会导致爆发性紫癜,这是一种危及生命的综合征,将脓毒性休克与血管渗漏、广泛血栓形成和30%的患者死亡相关[4]。此外,Nm与脑微血管内皮细

胞相互作用。在脑的蛛网膜下腔、脑实质以及脉络丛中定植于脑毛细血管[12],使细菌能够突破这一紧密的屏障,到达脑膜和脑脊液中进行复制,引起脑膜炎。与在外周观察到的相反,这一步骤发生时BBB完整性损失最小,没有血管内凝血或血管渗漏的迹象。

发明内容

[0007] 发明概述:

[0008] 为了确定在细菌感染期间维持脑血管完整性的潜在保护机制,发明人对分离自人皮肤(HDMECs)或脑(HBMECs)微血管的原代内皮细胞进行了RNA分析,这些细胞未被感染或在体外被脑膜炎球菌感染。他们发现了40个在感染后在脑内皮细胞中特异性调节的基因。与他们的假设一致,这些基因包括先天免疫反应的负调节因子,它们可能提供对过度炎症的保护,以及具有潜在血管稳定活性的因素,可能有助于脑血管保护。

[0009] 为了寻找可能支持BBB的旁分泌和近交激肽分子/信号传导,他们将兴趣集中在ANGPTL4(血管生成素样4)上,ANGPTL4是一种分泌型糖蛋白,在血管通透性、血管生成、葡萄糖稳态、脂质代谢和炎症中具有多效作用[13]。ANGPTL4是促血管生成素样蛋白家族(ANGPTL 1-8)的成员,其与可切割连接区分隔的N-末端卷曲螺旋结构域和C-末端纤维蛋白原样结构域具有相似的结构。特别是,ANGPTL4与ANGPTL3和ANGPTL8具有高度的序列同源性和相关功能。长期以来,ANGPTL4被认为是一种孤儿配体,因为它不与促血管生成素酪氨酸激酶受体Tie1和Tie2结合,最近的研究表明ANGPTL4有许多结合伴侣,如脂蛋白脂酶、整合素、钙粘蛋白或多配体聚糖[13]。迄今为止,它在血管完整性中的作用尚不清楚。已知ANGPTL4是由缺氧诱导的,在缺血性疾病中由血管细胞产生,已被证明具有血管生成和抗血管生成的双重作用[14,15],并根据病理生理条件、组织环境和/或其结合配体、释放和蛋白水解增加或减少血管通透性[16-20]。

[0010] 发明人在这项研究中表明,在脓毒症的背景下,ANGPTL4是一种主要的屏障稳定蛋白,可以保护人体免受细菌感染。他们还证明了ANGPTL4(或衍生肽)作为辅助治疗减少细菌诱导的血管功能障碍和死亡率的潜力。

[0011] 因此,本发明涉及衍生自蛋白质ANGPTL4的肽及其在治疗传染病中的用途。特别地,本发明由其权利要求书限定。

具体实施方式

[0012] 本发明的肽或蛋白质

[0013] 本发明的第一方面涉及衍生自蛋白质ANGPTL4的肽,其包含氨基酸序列 X_1 SALERRLSACGSX $_{14}$ X $_{15}$ (SEQ ID NO:65)或其功能保守变体或由其组成,其中 X_1 为无氨基酸或亮氨酸(L), X_{14} 为无氨基酸或丙氨酸(A), X_{15} 为无氨基酸或半胱氨酸(C)。

[0014] 在特定实施方案中, X_1 是亮氨酸(L), X_{14} 为无氨基酸, X_{15} 为无氨基酸(肽P12)。

[0015] 在特定实施方案中, X_1 是亮氨酸(L), X_{14} 是丙氨酸(A), X_{15} 是半胱氨酸(C)(肽P9)。

[0016] 在特定实施方案中, X_1 为无氨基酸, X_{14} 是丙氨酸(A), X_{15} 是半胱氨酸(C)(肽P13)。

[0017] 在特定实施方案中, X_1 是亮氨酸(L), X_{14} 是丙氨酸(A), X_{15} 为无氨基酸。

[0018] 在具体实施方式中,衍生自蛋白质ANGPTL4的肽包含SEQ ID NO:1中第66位至第78位的氨基酸残基或由其组成,其中,第76位的氨基酸是任意天然存在的氨基酸(肽P12或肽

P12')或其功能保守变体。

[0019] 在具体实施方式中,肽包含氨基酸序列LSALERRLSACGS (SEQ ID NO:55) (肽12) 或由其组成。

[0020] 在具体实施方式中,衍生自蛋白质ANGPTL4的肽包含SEQ ID NO:1中第67位至第80位的氨基酸残基或由其组成,其中,第76和80位的氨基是任意天然存在的氨基酸(肽P13或肽P13')或其功能保守变体。

[0021] 在具体实施方式中,肽包含氨基酸序列SALERRLSACGSAC (SEQ ID NO:58) (肽13) 或由其组成。

[0022] 在具体实施方式中,衍生自蛋白质ANGPTL4的肽包含SEQ ID NO:1中第66位至第80位的氨基酸残基或由其组成,其中,第76和80位的氨基是任意天然存在的氨基酸(肽P9或肽P9')或其功能保守变体。

[0023] 因此,本发明的第二方面涉及一种衍生自蛋白质ANGPTL4的肽,其包含SEQ ID NO:1中第66位至第80位的氨基酸残基或由其组成,其中第76和80位的氨基酸是任意天然存在的氨基酸(肽P9或肽P9')或其功能保守变体。

[0024] 换句话说,本发明的第一方面涉及衍生自蛋白质ANGPTL4的肽,其包含氨基酸序列LSALERRLSAX¹¹GSAX¹⁵ (SEQ ID NO:2,肽P9或肽P9')或由其组成,其中X¹¹和X¹⁵是任意天然存在的氨基酸或其功能保守变体。

[0025] 在一个具体实施方式中,根据本发明的所有肽或蛋白质,第76和80位的氨基酸可以是选自半胱氨酸(Cys或C)或丙氨酸(Ala或A)或丝氨酸(Ser或S)组成的组的氨基酸。

[0026] 因此,在一个具体实施方式中,本发明涉及一种衍生自蛋白质ANGPTL4的肽,其包含SEQ ID NO:1中第66位至第80位的氨基酸残基或由其组成,其中,第76和80位的氨基酸是选自半胱氨酸(Cys或C)或丙氨酸(Ala或A),或丝氨酸(Ser或S)组成的组的氨基酸或其功能保守变体。

[0027] 换句话说,本发明涉及衍生自蛋白质ANGPTL4的肽,其包含氨基酸序列LSALERRLSAX¹¹GSAX¹⁵ (SEQ ID NO:2) 或由其组成,其中X¹¹和X¹⁵是选自半胱氨酸(Cys或C)或丙氨酸(Ala或A)、丝氨酸(Ser或S)组成的组的氨基酸或其功能保守变体。

[0028] 如本文所使用的,术语“ANGPTL4”表示“血管生成素样4”,表示直接调节脂质和葡萄糖代谢的血清激素。天然全长ANGPTL4可以通过分子间二硫键形成高级的结构。ANGPTL4的N-末端区域(nANGPTL4)负责其组装。全长ANGPTL4在接头区域进行蛋白水解切割,释放nANGPTL4和ANGPTL4的单体C-末端部分(cANGPTL4)。基因序列的Entrez基因参考号为:51129;对于蛋白质,UniProt参考号为:Q9BY76。

[0029] 人ANGPTL4的氨基酸序列(SEQ ID NO:1):

[0030] MSGAPTAGAALMLCAATAVLLSAQGGPVQSKSPRFASWDEMNVLAHGLLQLGQGLREHAERTRSQLSALERRLSACGSACQGTEGSTDLPLAPESRVDPEVLHSLQTQLKAQNSRIQQLFHKVAQQQRHLEKQHLRIQHLQSQFGLDHKHLDHEVAKPARRKRLPEMAQPVDPAHNVSRHLRLPRDCQELFQVGERQSGLFEIQPQGSPPFLVNCKMTSDGGWTVIQRRHDGSVDFNRPWEAYKAGFGDPHGFEWLGLEKVHSITGDRNSRLAVQLRDWDGNAELLQFSVHLGGEDTAYSLQLTAPVAGQLGATTVPSPGLSVPFSTWDQDHLRRDKNCAKSLSGGWWFGTCSHNSLNGQYFRSIPQQRQKLKKGIFWKTWRGRYYPLQATTMLIQPMAAEAAS

[0031] 在另一个具体实施方式中,本发明涉及衍生自蛋白质ANGPTL4的肽,其包含或由

SEQ ID NO:1中第65位至第80位的氨基酸残基组成,其中,第76和80位的氨基酸是任意天然存在的氨基酸(肽P6或肽P6')或其功能保守变体。

[0032] 换句话说,在一个具体实施方式中,本发明涉及一种衍生自蛋白质ANGPTL4的肽,其包含或由以下氨基酸序列组成:QLSALERRLSAX¹²GSAX¹⁶(SEQ ID NO:3,肽P6或肽P6'),其中,X¹²和X¹⁶是任意天然存在的氨基酸或其功能保守变体。

[0033] 在另一个具体实施方式中,本发明涉及衍生自蛋白质ANGPTL4的肽,其包含SEQ ID NO:1中第65位至第80位的氨基酸残基或由其组成,其中,第76和80位的氨基酸是选自半胱氨酸(Cys或C)或丙氨酸(Ala或A)或丝氨酸(Ser或S)组成的组的氨基酸或其功能保守变体。

[0034] 换句话说,在一个具体实施方式中,本发明涉及一种衍生自蛋白质ANGPTL4的肽,其包含或由以下氨基酸序列组成:QLSALERRLSAX¹²GSAX¹⁶(SEQ ID NO:3),其中X¹²和X¹⁶是选自半胱氨酸(Cys或C)或丙氨酸(Ala或A)或丝氨酸(Ser或S)组成的组的氨基酸或其功能保守变体。

[0035] 在另一个具体实施方式中,本发明涉及衍生自蛋白质ANGPTL4的肽,其包含SEQ ID NO:1中第56位至第83位的氨基酸残基或由其组成,其中,第76和80位的氨基酸是任意天然存在的氨基酸(肽P4或肽P4')或其功能保守变体。

[0036] 换句话说,在另一个具体实施方式中,本发明涉及一种衍生自蛋白质ANGPTL4的肽,其包含或由以下氨基酸序列组成:REHAERTRSLSALERRLSAX²¹GSAX²⁵QGT(SEQ ID NO:4,肽P4或肽P4'),其中X¹²和X¹⁶是任意天然存在的氨基酸或其功能保守的变体。

[0037] 在另一个具体实施方式中,本发明涉及衍生自蛋白质ANGPTL4的肽,其包含SEQ ID NO:1中第56位至第83位的氨基酸残基或由其组成,其中,第76和80位的氨基酸是选自半胱氨酸(Cys或C)或丙氨酸(Ala或A)或丝氨酸(Ser或S)组成的组的氨基酸或其功能保守变体。

[0038] 换句话说,在另一个具体实施方式中,本发明涉及一种衍生自蛋白质ANGPTL4的肽,其包含或由以下氨基酸序列组成:REHAERTRSLSALERRLSAX²¹GSAX²⁵QGT(SEQ ID NO:4),其中X²¹和X²⁵是选自半胱氨酸(Cys或C)或丙氨酸(Ala或A)或丝氨酸(Ser或S)组成的组的氨基酸或其功能保守变体。

[0039] 在另一个具体实施方式中,本发明涉及衍生自蛋白质ANGPTL4的肽,其包含SEQ ID NO:1中第38位至第83位的氨基酸残基或由其组成,其中,第76和80位的氨基酸是任意天然存在的氨基酸(肽P1或肽P1')或其功能保守变体。

[0040] 换句话说,在另一个具体实施方式中,本发明涉及一种衍生自ANGPTL4的肽,其包含或由以下氨基酸序列组成:WDEMNVLAHGLLQLGQGLREHAERTRSLSALERRLSAX³⁹GSAX⁴³QGT(SEQ ID NO:5,肽P1或肽P1'),其中X³⁹和X⁴³是任意天然存在的氨基酸或其功能保守的变体。

[0041] 在另一个具体实施方式中,本发明涉及衍生自蛋白质ANGPTL4的肽,其包含SEQ ID NO:1中第38位至第83位的氨基酸残基或由其组成,其中,第76和80位的氨基酸是选自半胱氨酸(Cys或C)或丙氨酸(Ala或A)或丝氨酸(Ser或S)组成的组的氨基酸或其功能保守变体。

[0042] 换句话说,在另一个具体实施方式中,本发明涉及衍生自ANGPTL4的肽,其包含或由以下氨基酸序列组成:WDEMNVLAHGLLQLGQGLREHAERTRSLSALERRLSAX³⁹GSAX⁴³QGT(SEQ ID NO:5),其中X³⁹和X⁴³是选自半胱氨酸(Cys或C)或丙氨酸(Ala或A)或丝氨酸(Ser或S)组成的组的氨基酸或其功能保守变体。

[0043] 在另一个具体实施方式中,本发明涉及衍生自蛋白质ANGPTL4的肽,其包含SEQ ID NO:1中第26位至第164位的氨基酸残基或由其组成,其中,第76和80位的氨基酸是任意天然存在的氨基酸(nANGPTL4或nANGPTL4')或其功能保守变体。

[0044] 换句话说,在另一个具体实施方式中,本发明涉及一种衍生自ANGPTL4的肽,其包含或由以下氨基酸序列组成:GPVQSKSPRFASWDEMNVLAHGLLQLGQGLREHAERTRSQLSALERRLS AX⁵¹GSAX⁵⁵QGTEGSTDLPLAPESRVDPEVLHSLQTQLKAQNSRIQQLFHK VAQQQRHLEKHLRIQHLQSQFGLLD HKHLDHEVAKPARRK (SEQ ID NO:6, nANGPTL4或nANGPTL4'),其中X⁵¹和X⁵⁵是任意天然存在的氨基酸或其功能保守的变体。

[0045] 在另一个具体实施方式中,本发明涉及衍生自蛋白质ANGPTL4的肽,其包含SEQ ID NO:1中第26位至第164位的氨基酸残基或由其组成,其中,第76和80位的氨基酸是选自半胱氨酸(Cys或C)或丙氨酸(Ala或A)或丝氨酸(Ser或S)组成的组的氨基酸或其功能保守变体。

[0046] 换句话说,在另一个具体实施方式中,本发明涉及一种衍生自ANGPTL4的肽,其包含或由以下氨基酸序列组成:GPVQSKSPRFASWDEMNVLAHGLLQLGQGLREHAERTRSQLSALERRLS AX⁵¹GSAX⁵⁵QGTEGSTDLPLAPESRVDPEVLHSLQTQLKAQNSRIQQLFHK VAQQQRHLEKQHLRIQHLQSQFGLLD HKHLDHEVAKPARRK (SEQ ID NO:6),其中X⁵¹和X⁵⁵是选自半胱氨酸(Cys或C)或丙氨酸(Ala或A)或丝氨酸(Ser或S)组成的组的氨基酸或其功能保守变体。

[0047] 在另一个具体实施方式中,本发明涉及衍生自蛋白质ANGPTL4的蛋白质,其包含SEQ ID NO:1中的第1位至第406位的氨基酸残基或由其组成,其中,第76和80位的氨基酸是任意天然存在的氨基酸(ANGPTL4或ANGPTL4')或其功能保守变体。

[0048] 换句话说,在另一个具体实施方式中,本发明涉及一种衍生自ANGPTL4的肽,其包含或由以下氨基酸序列组成:MSGAPTAGAALMLCAATAVLLSAQGGPVQSKSPRFASWDEMNVLAHGL LQLGQGLREHAERTRSQLSALERRLSAX⁷⁶GSAX⁸⁰QGTEGSTDLPLAPESR VDPEVLHSLQTQLKAQNSRIQQLFHK VAQQQRHLEKQHLRIQHLQSQFGLLDHKHLDHEVAKPARRKRLPEMAQPVDPAHNVSRHLRHLPRDCQELFQVGERQ SGLFEIQPQGSPFLVNCKMTSDGGWTVIQRHDGSVDFNRPWEAYKAGFGDPHGEFWLGLEKVHSITGDRNSRLA VQLRDWDGNAELLQFSVHLGGEDTAYSLQLTAPVAGQLGATTVPVPSGLSVPFSTWDQDHLRRDKNCAKSLSGGWW FGTCSHSNLNGQYFRSIPQQRQKLKKGIFWKTWRGRYYPLQATTMLIQPMAAEEAAS (SEQ ID NO:7, ANGPTL4或ANGPTL4'),其中X⁷⁶和X⁸⁰是任意天然存在的氨基酸或其功能保守的变体。

[0049] 在另一个具体实施方式中,本发明涉及衍生自蛋白质ANGPTL4的蛋白质,其包含SEQ ID NO:1中的第1位至第406位的氨基酸残基或由其组成,其中,第76和80位的氨基酸是选自半胱氨酸(Cys或C)、丙氨酸(Ala或A)、丝氨酸(Ser或S)的氨基酸,或者是其功能保守变体。

[0050] 换句话说,在另一个具体实施方式中,本发明涉及衍生自ANGPTL4的肽,其包含或由以下氨基酸序列组成:MSGAPTAGAALMLCAATAVLLSAQGGPVQSKSPRFASWDEMNVLAHGL LQLGQGLREHAERTRSQLSALERRLSAX⁷⁶GSAX⁸⁰QGTEGSTDLPLAPESR VDPEVLHSLQTQLKAQNSRIQQLFHKVAQQQRHLEKQHLRIQHLQSQFGLLDHKHLDHEVAKPARRKRLPEMAQPVDPAHNVSRHLRHLPRDCQELFQVGERQSGLFEIQPQGSPFLVNCKMTSDGGWTVIQRHDGSVDFNRPWEAYKAGFGDPHGEFWLGLEKVHSITGDRNSRLAVQLRDWDGNAELLQFSVHLGGEDTAYSLQLTAPVAGQLGATTVPVPSGLSVPFSTWDQDHLRRDKNCAKSLSGGWWFGTC SHSNLNGQYFRSIPQQRQKLKKGIFWKTWRGRYYPLQATTMLIQPMAAEEAAS (SEQ ID NO:7),其中X⁷⁶和X⁸⁰是选自半胱氨酸(Cys或C)或丙氨酸(Ala或A)或丝氨酸(S)组成的组的氨基酸或其功能保守

变体。

[0051] 在一个具体实施方式中,本发明的肽或蛋白质包含或由SEQ ID NO:1和8至30以及37至64中所示的氨基酸序列组成。

- [0052] 肽P9:LSALERRLSACGSAC (SEQ ID NO:8)
- [0053] 肽P9 C76A,C80A:LSALERRLSAAGSAA (SEQ ID NO:9)
- [0054] 肽P9 C76A:LSALERRLSAAGSAC (SEQ ID NO:10)
- [0055] 肽P9 C80A:LSALERRLSACGSAA (SEQ ID NO:11)
- [0056] 肽P9 C76S,C80S:LSALERRLSASGSAS (SEQ ID NO:37)
- [0057] 肽P9 C76S:LSALERRLSASGSAC (SEQ ID NO:38)
- [0058] 肽P9 C80S:LSALERRLSACGSAS (SEQ ID NO:39)
- [0059] 肽P6:QLSALERRLSACGSAC (SEQ ID NO:12)
- [0060] 肽P6 C76A,C80A:QLSALERRLSAAGSAA (SEQ ID NO:13)
- [0061] 肽P6:C76A:QLSALERRLSAAGSAC (SEQ ID NO:14)
- [0062] 肽P6 C80A:QLSALERRLSACGSAA (SEQ ID NO:15)
- [0063] 肽P6 C76S,C80S:QLSALERRLSASGSAS (SEQ ID NO:40)
- [0064] 肽P6 C76S:QLSALERRLSASGSAC (SEQ ID NO:41)
- [0065] 肽P6 C80S:QLSALERRLSACGSAS (SEQ ID NO:42)
- [0066] 肽P4:REHAERTRSLSALERRLSACGSACQGT (SEQ ID NO:16)
- [0067] 肽P4 C76A,C80A:REHAERTRSLSALERRLSAAGSAAQGT (SEQ ID NO:17)
- [0068] 肽P4 C76A:REHAERTRSLSALERRLSAAGSACQGT (SEQ ID NO:18)
- [0069] 肽P4 C80A:REHAERTRSLSALERRLSACGSAAQGT (SEQ ID NO:19)
- [0070] 肽P4 C76S,C80S:REHAERTRSLSALERRLSASGSASQGT (SEQ ID NO:43)
- [0071] 肽P4 C76S:REHAERTRSLSALERRLSASGSACQGT (SEQ ID NO:44)
- [0072] 肽P4 C80S:REHAERTRSLSALERRLSACGSASQGT (SEQ ID NO:45)
- [0073] 肽P1:
- [0074] WDEMNVLAHGLLQLGQGLREHAERTRSLSALERRLSACGSACQG T (SEQ ID NO:20)
- [0075] 肽P1 C76A,C80A:
- [0076] WDEMNVLAHGLLQLGQGLREHAERTRSLSALERRLSAAGSAAQG T (SEQ ID NO:21)
- [0077] 肽P1 C76A:
- [0078] WDEMNVLAHGLLQLGQGLREHAERTRSLSALERRLSAAGSACQG T (SEQ ID NO:22)
- [0079] 肽P1 C80A:
- [0080] WDEMNVLAHGLLQLGQGLREHAERTRSLSALERRLSACGSAAQG T (SEQ ID NO:23)
- [0081] 肽P1 C76S,C80S:
- [0082] WDEMNVLAHGLLQLGQGLREHAERTRSLSALERRLSASGSASQGT (SEQ ID NO:46)
- [0083] 肽P1 C76S:
- [0084] WDEMNVLAHGLLQLGQGLREHAERTRSLSALERRLSASGSACQG T (SEQ ID NO:47)
- [0085] 肽P1 C80S:
- [0086] WDEMNVLAHGLLQLGQGLREHAERTRSLSALERRLSACGSASQG T (SEQ ID NO:48)
- [0087] 肽nANGPTL4:

[0088] GPVQSKSPRFASWDEMNVLAHGLLQLGQGLREHAERTRSQLSALER RLSACGSACQGTEGSTDPLA PESRVDPEVLHSLQTQLKAQNSRIQQLFH KVAQQQRHLEKQHLRIQHLQSQFGLLDHKHLDHEVAKPARRK (SEQ ID NO:24)

[0089] 肽_nANGPTL4 C76A,C80A:

[0090] GPVQSKSPRFASWDEMNVLAHGLLQLGQGLREHAERTRSQLSALER RLSAAGSAAQGTEGSTDPLA PESRVDPEVLHSLQTQLKAQNSRIQQLFH KVAQQQRHLEKQHLRIQHLQSQFGLLDHKHLDHEVAKPARRK (SEQ ID NO:25)

[0091] 肽_nANGPTL4 C76A:

[0092] GPVQSKSPRFASWDEMNVLAHGLLQLGQGLREHAERTRSQLSALER RLSAAGSACQGTEGSTDPLA PESRVDPEVLHSLQTQLKAQNSRIQQLFH KVAQQQRHLEKQHLRIQHLQSQFGLLDHKHLDHEVAKPARRK (SEQ ID NO:26)

[0093] 肽_nANGPTL4 C80A:

[0094] GPVQSKSPRFASWDEMNVLAHGLLQLGQGLREHAERTRSQLSALER RLSACGSAAQGTEGSTDPLA PESRVDPEVLHSLQTQLKAQNSRIQQLFH KVAQQQRHLEKQHLRIQHLQSQFGLLDHKHLDHEVAKPARRK (SEQ ID NO:27)

[0095] 肽_nANGPTL4 C76S,C80S:

[0096] GPVQSKSPRFASWDEMNVLAHGLLQLGQGLREHAERTRSQLSALER RLSASGSASQGTEGSTDPLA PESRVDPEVLHSLQTQLKAQNSRIQQLFHK VAQQQRHLEKQHLRIQHLQSQFGLLDHKHLDHEVAKPARRK (SEQ ID NO:49)

[0097] 肽_nANGPTL4 C76S:

[0098] GPVQSKSPRFASWDEMNVLAHGLLQLGQGLREHAERTRSQLSALER RLSASGSACQGTEGSTDPLA PESRVDPEVLHSLQTQLKAQNSRIQQLFH KVAQQQRHLEKQHLRIQHLQSQFGLLDHKHLDHEVAKPARRK (SEQ ID NO:50)

[0099] 肽_nANGPTL4 C80S:

[0100] GPVQSKSPRFASWDEMNVLAHGLLQLGQGLREHAERTRSQLSALER RLSACGSASQGTEGSTDPLA PESRVDPEVLHSLQTQLKAQNSRIQQLFH KVAQQQRHLEKQHLRIQHLQSQFGLLDHKHLDHEVAKPARRK (SEQ ID NO:51)

[0101] 蛋白质ANGPTL4 C76A,C80A:

[0102] MSGAPTAGAALMLCAATAVLLSAQGGPVQSKSPRFASWDEMNVLAHGLLQLGQGLREHAERTRSQLSA LERRLSAAGSAAQGTEGSTDPLAPESRVDPEVLHSLQTQLKAQNSRIQQLFHKVAQQQRHLEKQHLRIQHLQSQF GLLDHKHLDEHEVAKPARRKRLPEMAQPVDPAHNVSRHLRHLPRDCQELFQVGERQSGLFEIQPQGSPPFLVNCKMTS DGGWTVIQRRHDGSDVFNRPWEAYKAGFGDPHGEFWLGLEKVHSITGDRNSRLAVQLRDWDGNAELLQFSVHLGGE DTAYSLQLTAPVAGQLGATTVPSPGLSVPFSTWDQDHLRRDKNCAKSLSGGWWFGTCSHSNLNGQYFRSIPQQRQ KLKKGIFWKTWRGRYYPLQATTMLIQPMAAEAAS (SEQ ID NO:28)

[0103] 蛋白质ANGPTL4 C76A:

[0104] MSGAPTAGAALMLCAATAVLLSAQGGPVQSKSPRFASWDEMNVLAHGLLQLGQGLREHAERTRSQLSA LERRLSAAGSACQGTEGSTDPLAPESRVDPEVLHSLQTQLKAQNSRIQQLFHKVAQQQRHLEKQHLRIQHLQSQF GLLDHKHLDEHEVAKPARRKRLPEMAQPVDPAHNVSRHLRHLPRDCQELFQVGERQSGLFEIQPQGSPPFLVNCKMTS DGGWTVIQRRHDGSDVFNRPWEAYKAGFGDPHGEFWLGLEKVHSITGDRNSRLAVQLRDWDGNAELLQFSVHLGGE

DTAYSLQLTAPVAGQLGATTVPPSGLSVPFSTWDQDHLRRDKNCAKSLSGGWWFGTCSHSNLNGQYFRSIPQQRQ
KLKKGIFWKTWRGRYYPLQATTMLIQPMAAEAAS (SEQ ID NO:29)

[0105] 蛋白质ANGPTL4 C80A:

[0106] MSGAPTAGAALMLCAATAVLLSAQGGPVQSKSPRFASWDEMNVLAHGLLQLGQGLREHAERTRSQLSA
LERRLSACGSAAQGTEGSTDLPLAPESRVDPEVLHSLQTQLKAQNSRIQQLFHKVAQQQRHLEKQHLRIQHLQSQF
GLLDHKHLDHEVAKPARRKRLPEMAQPVDPAHNVSRHLRDLRDCQELFQVGERQSGLFEIQPQGSPPFLVNCKMST
DGGWTVIQRRHDGSDVFNRPWEAYKAGFGDPHGEFWLGLEKVHSITGDRNSRLAVQLRDWDGNAELLQFSVHLGGE
DTAYSLQLTAPVAGQLGATTVPPSGLSVPFSTWDQDHLRRDKNCAKSLSGGWWFGTCSHSNLNGQYFRSIPQQRQ
KLKKGIFWKTWRGRYYPLQATTMLIQPMAAEAAS (SEQ ID NO:30)

[0107] 蛋白质ANGPTL4 C76S,C80S:

[0108] MSGAPTAGAALMLCAATAVLLSAQGGPVQSKSPRFASWDEMNVLAHGLLQLGQGLREHAERTRSQLSA
LERRLSASGSASQGTEGSTDLPLAPESRVDPEVLHSLQTQLKAQNSRIQQLFHKVAQQQRHLEKQHLRIQHLQSQF
GLLDHKHLDHEVAKPARRKRLPEMAQPVDPAHNVSRHLRDLRDCQELFQVGERQSGLFEIQPQGSPPFLVNCKMST
DGGWTVIQRRHDGSDVFNRPWEAYKAGFGDPHGEFWLGLEKVHSITGDRNSRLAVQLRDWDGNAELLQFSVHLGGE
DTAYSLQLTAPVAGQLGATTVPPSGLSVPFSTWDQDHLRRDKNCAKSLSGGWWFGTCSHSNLNGQYFRSIPQQRQ
KLKKGIFWKTWRGRYYPLQATTMLIQPMAAEAAS (SEQ ID NO:52)

[0109] 蛋白质ANGPTL4 C76S:

[0110] MSGAPTAGAALMLCAATAVLLSAQGGPVQSKSPRFASWDEMNVLAHGLLQLGQGLREHAERTRSQLSA
LERRLSASGSACQGTEGSTDLPLAPESRVDPEVLHSLQTQLKAQNSRIQQLFHKVAQQQRHLEKQHLRIQHLQSQF
GLLDHKHLDHEVAKPARRKRLPEMAQPVDPAHNVSRHLRDLRDCQELFQVGERQSGLFEIQPQGSPPFLVNCKMST
DGGWTVIQRRHDGSDVFNRPWEAYKAGFGDPHGEFWLGLEKVHSITGDRNSRLAVQLRDWDGNAELLQFSVHLGGE
DTAYSLQLTAPVAGQLGATTVPPSGLSVPFSTWDQDHLRRDKNCAKSLSGGWWFGTCSHSNLNGQYFRSIPQQRQ
KLKKGIFWKTWRGRYYPLQATTMLIQPMAAEAAS (SEQ ID NO:53)

[0111] 蛋白质ANGPTL4 C80S:

[0112] MSGAPTAGAALMLCAATAVLLSAQGGPVQSKSPRFASWDEMNVLAHGLLQLGQGLREHAERTRSQLSA
LERRLSACGSASQGTEGSTDLPLAPESRVDPEVLHSLQTQLKAQNSRIQQLFHKVAQQQRHLEKQHLRIQHLQSQF
GLLDHKHLDHEVAKPARRKRLPEMAQPVDPAHNVSRHLRDLRDCQELFQVGERQSGLFEIQPQGSPPFLVNCKMST
DGGWTVIQRRHDGSDVFNRPWEAYKAGFGDPHGEFWLGLEKVHSITGDRNSRLAVQLRDWDGNAELLQFSVHLGGE
DTAYSLQLTAPVAGQLGATTVPPSGLSVPFSTWDQDHLRRDKNCAKSLSGGWWFGTCSHSNLNGQYFRSIPQQRQ
KLKKGIFWKTWRGRYYPLQATTMLIQPMAAEAAS (SEQ ID NO:54)

[0113] 肽12:LSALERRLSACGS (SEQ ID NO:55)

[0114] 肽12C76A:LSALERRLSAAGS (SEQ ID NO:56)

[0115] 肽12C76S:LSALERRLSASGS (SEQ ID NO:57)

[0116] 肽13:SALERRLSACGSAC (SEQ ID NO:58)

[0117] 肽13C76A,C80A:SALERRLSAAGSAA (SEQ ID NO:59)

[0118] 肽13C76A:SALERRLSAAGSAC (SEQ ID NO:60)

[0119] 肽13C80A:SALERRLSACGSAA (SEQ ID NO:61)

[0120] 肽13C76S,C80S:SALERRLSASGSAS (SEQ ID NO:62)

[0121] 肽13C76S:SALERRLSASGSAC (SEQ ID NO:63)

[0122] 肽13C80S:SALERRLSACGSAS (SEQ ID NO:64)

[0123] 根据本发明,本发明的肽或蛋白质还可以具有突变S67R和/或R72L。

[0124] 如本文所使用的,术语“功能保守变体”是指蛋白质或酶中的给定氨基酸残基已被改变(插入、删除或替换)而不改变多肽的整体构象和功能的变体。此类变体包括具有氨基酸改变的蛋白质,如缺失、插入和/或替换。“缺失”是指蛋白质中缺少一个或多个氨基酸。“插入”是指在蛋白质中添加一个或多个氨基酸。“替换”是指蛋白质中的一个或多个氨基酸被另一个氨基酸残基替换。通常,给定的氨基酸被具有相似性质(例如极性、氢键电位、酸性、碱性、疏水性、芳香性等)的氨基酸所取代。除被指示为保守的氨基酸之外,蛋白质中的其他氨基酸可能不同,以至于具有相似功能的任何两种蛋白质之间的蛋白质或氨基酸序列相似性百分比可能不同,例如,根据诸如聚类方法Cluster Method这样的对齐方案确定,相似度基于MEGALIGN算法,从70%到99%不等。“功能保守变体”还包括一种多肽,它通过BLAST或FASTA算法确定至少有60%的氨基酸一致性,特别是至少75%,更特别是至少85%,仍然特别是至少90%,甚至更特别是至少95%,并且其具有与所比较的天然或亲本蛋白质相同或基本相似的性质或功能。当两个氨基酸序列中超过80%,特别是超过85%,特别是超过90%的氨基酸是相同的,或大于约超过90%,特别是超过95%的氨基酸是相似的(功能相同)时,两个氨基酸序列被认为是“基本同源”或“基本相似”。特别地,通过使用例如GCG (Genetics Computer Group遗传学计算机组,Program Manual for the GCG Package GCG软件包程序手册,Version 7第7版,Madison,Wisconsin)序列比对程序或任何序列比较算法(如BLAST、FASTA等)进行比对来确定相似或同源序列。

[0125] 在一个具体实施方式中,本发明的肽可以具有少于150、149、148、147、146、145、144、143、142、141、140、139、138、137、136、135、134、133、132、131、130、129、128、127、126、125、124、123、122、121、120、119、118、117、116、115、114、113、112、111、110、109、108、107、106、105、104、103、102、101、100、99、98、97、96、95、94、93、92、91、90、89、88、87、86、85、84、83、82、81、80、79、78、77、76、75、74、73、72、71、70、69、68、67、66、65、64、63、62、61、60、59、58、57、56、55、54、53、52、51、50、49、48、47、46、45、44、43、42、41、40、39、38、37、36、35、34、33、32、31、30、29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14或13个氨基酸的氨基酸序列。

[0126] 在一个具体实施方式中,本发明的肽与本发明中描述的肽或蛋白质(SEQ ID NO:1至30和37至64,特别是1和8至30以及37至64)具有至少70%的同一性,甚至更特别地至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性,并且仍然能够有效地降低细菌性疾病中的血管改变、血管内凝血的发生率,并减少脓毒症的严重后果。

[0127] 通常,本发明包括包含或由SEQ ID NO:1至30和37至64,特别是1和8至30以及37至64中所示的氨基酸序列组成的肽或蛋白质,其中一个或多个残基已被功能相似的残基保守替换,并显示了本发明肽或蛋白质的功能方面,即仍然能够降低细菌疾病中血管改变、血管内凝血的发生率,并减少脓毒症的严重死亡。

[0128] 保守替换的例子包括用一个非极性(疏水性)残基如异亮氨酸、缬氨酸、亮氨酸或甲硫氨酸取代另一个,用一个极性(亲水性)残基如在精氨酸和赖氨酸之间、在谷氨酰胺和天冬酰胺之间、在甘氨酸和丝氨酸之间进行替换,用一个碱性残基如赖氨酸、精氨酸或组氨

酸替换另一个碱性残基,或用一个酸性残基如天冬氨酸或谷氨酸替换另一个酸性残基。

[0129] 术语“保守替换”还包括使用化学衍生残基代替非衍生残基。“化学衍生物”是指具有一个或多个通过功能性侧基的反应进行化学衍生的残基的肽。此类衍生分子的实例包括,例如,其中游离氨基已被衍生化形成胺盐酸盐、对甲苯磺酰基、苄氧羰基、叔丁氧羰基、氯乙酰基或甲酰基的分子。游离羧基可以衍生形成盐、甲酯和乙酯或其他类型的酯或酰肼。游离羟基可以衍生形成O-酰基或O-烷基衍生物。组氨酸的咪唑氮可以衍生形成N-苄基组氨酸。化学衍生物还包括含有二十种标准氨基酸的一种或多种天然氨基酸衍生物的肽。例如:4-羟基脯氨酸可以代替脯氨酸;5-羟赖氨酸可以替代赖氨酸;3-甲基组氨酸可以取代组氨酸;高丝氨酸可以替代丝氨酸;鸟氨酸可以代替赖氨酸。

[0130] 在一个实施方式中,本发明的肽或蛋白质可以包含标签。标签是一个含表位的序列,可用于肽的纯化。它通过多种技术附着,如亲和层析,用于使用免疫标记技术在细胞或组织样本内定位所述肽或多肽,通过免疫印迹等检测所述肽和多肽。本领域常用的标签的例子是GST(谷胱甘肽-S-转移酶)标签、FLAGTM标签、Strep-tagTM标签、V5标签、myc标签、His标签等。

[0131] 在一个实施方式中,本发明的肽或蛋白质可以用荧光染料标记。染料标记的荧光肽是细胞研究中的重要工具。肽可以标记在N-末端侧或C-末端侧。

[0132] 使用胺反应性荧光染料标记N-末端肽:

[0133] 胺反应性荧光探针广泛用于修饰肽或蛋白质的N-末端或赖氨酸残基。已经开发了許多荧光氨基活性染料来标记各种肽,所得偶联物广泛应用于生物应用。目前,三类主要的胺反应性荧光试剂用于标记肽:琥珀酰亚胺酯(SE)、异硫氰酸酯和磺酰氯。

[0134] 使用含胺荧光染料标记C-末端:

[0135] 含胺染料用于使用水溶性碳二亚胺(如EDC)修饰肽,将肽的羧基转化为酰胺基。NHS或NHSS均可用于提高EDC介导的蛋白质-羧酸偶联的偶联效率。

[0136] 在具体实施方式中,预期本发明治疗方法中使用的肽或蛋白质被修饰以提高它们的疗效。对治疗性化合物的这种修饰可用于降低毒性、增加循环时间或改变生物分布。例如,通过与各种改变生物分布的药物载体结合,可以显著降低潜在重要治疗化合物的毒性。

[0137] 提高药物活性的策略是利用水溶性聚合物。各种水溶性聚合物已被证明可以改变生物分布,改善细胞摄取模式,改变通过生理屏障的渗透性;并改变从体内清除的速度。为了实现靶向或持续缓释效果,已经合成了水溶性聚合物,其中药物部分作为末端基团、骨架的一部分或聚合物链上的侧基。

[0138] 聚乙二醇(PEG)因其高度的生物相容性和易于修饰的特点而被广泛用作药物载体。与各种药物、蛋白质和脂质体的结合已被证明可以改善停留时间并降低毒性。PEG可以通过链末端的羟基和其他化学方法与活性剂偶联;然而,PEG本身被限制为每个分子最多只能连接两种活性剂。在另一种方法中,PEG和氨基酸的共聚物被探索为新型生物材料,它将保留PEG的生物相容性,但具有每个分子多个附着点(提供更大的药物负载)的额外优势,并且可以合成设计以适应各种应用。

[0139] 本领域技术人员知道用于有效修饰药物的聚乙二醇化技术。例如,VectraMed(Plainsboro,NJ)使用了由PEG和赖氨酸等三官能单体交替聚合物组成的药物递送聚合物。PEG链(通常为2000道尔顿或更低)通过稳定的氨基甲酸酯键与赖氨酸的 α -和 ϵ -氨基连接。

这种共聚物保留了PEG的理想性能,同时沿聚合物链以严格控制 and 预定的间隔提供反应性侧基(赖氨酸的羧基)。反应性侧基可用于衍生、交联或与其他分子结合。这些聚合物可用于通过改变聚合物的分子量、PEG链段的分子量以及药物和聚合物之间可断裂键,用于生产稳定的、长循环的前药。PEG片段的分子量影响药物/连接基团复合物的间距和每单位缀合物分子量的药物量(较小的PEG片段提供较大的药物负载)。一般来说,增加嵌段共聚物缀合物的总分子量将增加缀合物的循环半衰期。然而,缀合物必须易于降解,或者分子量低于限制肾小球滤过的阈值(例如,小于45kDa)。

[0140] 此外,由于聚合物主链在维持循环半衰期和生物分布方面很重要,连接体可用于将治疗剂维持在前药形式,直到通过特定的触发因素(通常是靶组织中的酶活性)从主链聚合物中释放出来。例如,这种类型的组织激活药物递送在需要递送到特定的生物分布部位并且治疗剂在病理部位或其附近释放的情况下特别有用。用于活化药物递送的连接基团文库是本领域技术人员已知的,并且可以基于酶动力学、活性酶的普遍性和所选疾病特异性酶的切割特异性(参见例如由VectraMed, Plainsboro, NJ建立的技术)。此类连接体可用于修饰本文所述的衍生肽,以用于治疗递送。

[0141] 在一个具体实施方式中,本发明的肽可以是拟肽。如本文所用,术语“拟肽”是指设计用于模拟肽(如本发明的肽)的多肽。术语“拟肽”也指非肽化学部分。肽是由肽(酰胺)键连接的氨基酸单体的短链,当一种氨基酸的羧基与另一个氨基酸的氨基反应时形成的共价化学键。最短的肽是二肽,由2个氨基酸通过一个肽键连接而成,其次是三肽、四肽等。拟肽化学部分可以包括非氨基酸化学部分。拟肽化学部分还可以包括由一个或多个非氨基酸化学单元分隔的一个或多个氨基酸。拟肽化学部分在其化学结构的任何部分都不含通过肽键连接的两个或多个相邻氨基酸。本文使用的术语“氨基酸”是指甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、甲硫氨酸、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、色氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺或瓜氨酸。

[0142] 根据本发明,肽或蛋白质可以通过常规的自动化肽/蛋白质合成方法或通过重组表达来生产。设计和制备肽/蛋白质的一般原理是本领域技术人员熟知的。

[0143] 本发明的肽或蛋白质可以根据常规技术在溶液或固体支持物上合成。市场上有各种自动合成器,可以根据Stewart and Young; Tam et al., 1983; Merrifield, 1986 and Barany and Merrifield, Gross and Meienhofer, 1979中描述的已知协议使用。本发明的肽也可以通过固相技术合成,所述固相技术使用示例性肽合成器,例如来自Applied Biosystems Inc.的433A型;通过自动肽合成或通过重组方法产生的任何给定蛋白质的纯度可以使用反相HPLC分析来确定。每种肽的化学真实性可以通过本领域技术人员熟知的任何方法来建立。

[0144] 作为自动化肽/蛋白质合成的替代方案,可以采用重组DNA技术,其中将编码所选蛋白质的核苷酸序列插入表达载体中,转化或转染到合适的宿主细胞中,并在适合表达的条件下培养,如下所述。重组方法特别优选用于生产较长的多肽。

[0145] 可以利用各种表达载体/宿主系统来包含和表达肽或蛋白质编码序列。这些包括但不限于如用重组噬菌体、质粒或粘粒DNA表达载体转化的微生物(细菌);用酵母表达载体转化的酵母(Giga-Hama et al., 1999);感染病毒表达载体(如杆状病毒,见Ghosh et al., 2002)的昆虫细胞系统;用病毒表达载体(例如花椰菜花叶病毒, CaMV; 烟草花叶病毒, TMV)

转染或用细菌表达载体(如Ti或pBR322质粒;参见例如Babe et al.,2000)转化的植物细胞系统;或动物细胞系统。本领域技术人员知道用于优化哺乳动物蛋白质表达的各种技术,参见例如Kaufman,2000;Colosimo et al.,2000。可用于重组蛋白生产的哺乳动物细胞包括但不限于VERO细胞、HeLa细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞系、COS细胞(如COS-7)、W138、BHK、HepG2、3T3、RIN、MDCK、A549、PC12、K562和293细胞。本领域技术人员已知在细菌、酵母和其他无脊椎动物中肽底物或融合多肽重组表达的示例性方案,并在下文中简要描述。U.S.Pat.No.6569645;U.S.Pat.No.6043344;U.S.Pat.No.6074849;和U.S.Pat.No.6579520提供了重组生产肽的具体实例,这些专利通过引用明确并入本文以用于教导。用于表达重组蛋白的哺乳动物宿主系统也是本领域技术人员熟知的。可以选择宿主细胞株以用于特定的加工表达蛋白质的能力或产生某些翻译后修饰,这些修饰将有助于提供蛋白质活性。多肽的这种修饰包括但不限于乙酰化、羧基化、糖基化、磷酸化、脂质化和酰化。切割蛋白质“前体”形式的翻译后处理对于正确插入、折叠和/或功能也可能很重要。不同的宿主细胞,如CHO、HeLa、MDCK、293、W138等,具有特定的细胞机制和翻译后活性的特征机制,并且可能被选择以确保正确修饰和处理引入的外来蛋白质。

[0146] 在本发明的肽或蛋白质的重组生产中,需要使用包含编码肽衍生物的多核苷酸分子的载体。制备此类载体以及生产用此类载体转化的宿主细胞的方法是本领域技术人员熟知的。在这种试验中使用的多核苷酸分子可以连接到一个载体上,载体通常包括选择性标记和一个复制起点,用于在宿主中繁殖。表达构建体的这些元素是本领域技术人员熟知的。通常,表达载体包括编码给定蛋白质的DNA,其可操作地连接到合适的转录或翻译调控序列,例如那些衍生自哺乳动物、微生物、病毒或昆虫基因的序列。调控序列的例子包括转录启动子、操作子或增强子、mRNA核糖体结合位点以及控制转录和翻译的适当序列。

[0147] 术语“表达载体”、“表达构建体”或“表达盒”在本说明书中可互换使用,意在包括任意类型的基因构建体,其包含编码基因产物的核酸,其中部分或全部核酸编码序列能够被转录。

[0148] 用于表达本发明肽或多肽的合适表达载体的选择当然取决于所使用的特定宿主细胞,并且在本领域普通技术人员的技术范围内。构建哺乳动物表达载体的方法公开于例如Okayama和Berg,1983;Cosman et al.,1986;Cosman et al.,1984;EP-A-0367566;和WO 91/18982。生产表达载体的其他考虑因素详见例如Makrides et al.,1999年;Kost et al.,1999年;Wurm et al.,1999年作为教学因素引入本文,以供在哺乳动物细胞中大规模瞬时表达以用于重组蛋白生产时的考虑因素。

[0149] 表达要求在载体中提供合适的信号,例如来自病毒和哺乳动物来源的增强子/启动子,可用于驱动宿主细胞中感兴趣核酸的表达。通常,表达的核酸受启动子的转录控制。“启动子”是指启动基因特异性转录所需的细胞合成机制或引入的合成机制识别的DNA序列。当调控序列在功能上与编码目标肽(即4N1K、变体等)的DNA相关时,核苷酸序列是可操作连接的。因此,如果启动子核苷酸序列指导序列的转录,则启动子核苷酸序列可操作地连接到给定的DNA序列。

[0150] 同样,短语“转录控制下”意味着启动子相对于核酸处于正确的位置和方向,以控制RNA聚合酶的启动和基因的表达。可以使用任何能够驱动核酸表达的启动子。用于控制目标核酸序列表达的特定启动子并不重要,只要它能够指导靶细胞中核酸的表达。因此,在靶

向人细胞时,优选将核酸编码区定位在能够在人细胞中表达的启动子附近并受其控制。一般来说,这种启动子可能包括人类或病毒启动子。常见的启动子包括,例如,人巨细胞病毒(CMV)即刻早期基因启动子、SV40早期启动子、劳斯肉瘤病毒长末端重复序列、[β]-肌动蛋白、大鼠胰岛素启动子、磷酸甘油激酶启动子和甘油醛-3-磷酸脱氢酶启动子,所有这些启动子都是本领域技术人员熟知且容易获得的,可用于获得感兴趣的编码序列的高水平表达。也可以考虑使用本领域熟知的其他病毒或哺乳动物细胞或细菌噬菌体启动子来实现感兴趣的编码序列的表达,只要表达水平足以产生可恢复的感兴趣蛋白质产量。通过使用具有公知特性的启动子,可以优化转染或转化后感兴趣蛋白质的表达水平和模式。也可以使用诱导型启动子。

[0151] 用于蛋白质表达的另一个调节元件是增强子。这些是遗传元件,可以增加位于同一DNA分子上远处位置的启动子的转录。当表达构建体采用cDNA插入片段时,人们通常希望包含多聚腺苷酸化信号序列,以实现基因转录物的适当多聚腺苷化。所选转基因动物物种的细胞识别的任何多聚腺苷酸化信号序列都适用于本发明的实践,例如人或牛生长激素和SV40多聚腺苷酸化信号。

[0152] 在一个实施方案中,本发明的肽或蛋白质与至少一种细胞穿透肽连接。

[0153] 术语“细胞穿透肽”或“CPP”可互换使用,指的是阳离子细胞穿透肽,也称为转运肽、载体肽或肽转导结构域。如本文所示, CPP具有在给定细胞培养群体中30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%的细胞内诱导与CPP融合的肽穿透细胞的能力,包括其间的所有整数,并允许大分子在全身给药后在体内多个组织内易位。细胞穿透肽还可以指在适当条件下与细胞接触时,从外部环境进入细胞内环境(包括细胞质、线粒体等细胞器或细胞核)的肽,其进入程度显著高于被动扩散。这种穿透肽可以是在Fonseca S.B.et al., *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2009, 61:953-964, Johansson et al., *Methods in Molecular Biology*, 2011, Vol. 683, Chapter 17, in W02004/011595 and in W02003/011898描述。

[0154] 在一个实施方式中, CPP选自但不限于Tat肽、聚精氨酸肽、HA2-R9肽、渗透肽、转运蛋白肽、Vectocell®肽、毛钙素肽、脱赖氨酸肽、HIV-Tat衍生的PTD4肽、乙型肝炎病毒易位基序(PTM)肽、mPrPrP1-28肽、POD、pVEC、EB1、Rath、CADY、组蛋白5、Antp肽、Cyt86-101肽。

[0155] 为了验证本发明的肽或蛋白质是否仍然能够降低细菌性疾病中血管病变、血管内凝血的发生率,并减少脓毒症的严重程度,可以对每种肽进行测试。例如,本领域技术人员可以使用脂多糖(LPS)诱导的内毒素血症和/或脑膜炎球菌感染的体内模型,在体外测试肽或蛋白质保护原代人皮肤微血管细胞(HDMEC)完整性免受脑膜炎菌感染的能力,和/或防止血管病变、血栓形成和体内器官衰竭进展的能力。

[0156] 核酸、载体、重组宿主细胞

[0157] 本发明的第三个方面涉及编码本发明肽或蛋白质(如ANGPTL4)的核酸序列。

[0158] 本发明的第四方面涉及一种表达载体,其包含编码本发明肽或蛋白质(ANGPTL4)的核酸序列。

[0159] 根据本发明,适用于本发明的表达载体可以包含至少一个与核酸序列可操作连接的表达控制元件。表达控制元件插入载体中以控制和调节核酸序列的表达。表达控制元件的实例包括但不限于(乳糖操纵子) lac系统、噬菌体 λ 的操纵子和启动子区域、酵母启动子

和衍生自多瘤、腺病毒、逆转录病毒、慢病毒或SV40的启动子。其他优选或所需的操作元件包括但不限于前导序列、终止密码子、聚腺苷酸化信号以及在宿主系统中适当转录和随后翻译核酸序列所需或优选的任何其他序列。本领域技术人员将理解,所需或优选的表达控制元件的正确组合将取决于所选择的宿主系统。还应理解的是,表达载体应包含在宿主系统中转移和随后复制含有核酸序列的表达载体所需的附加元件。此类元素的示例包括但不限于复制起点和可选标记。本领域技术人员将进一步理解,这种载体易于使用常规方法构建或可商购获得。

[0160] 本发明的第五方面是一种宿主细胞,其包含如上所述的表达载体。

[0161] 根据本发明,可使用的宿主细胞的实例是真核细胞,如动物、植物、昆虫和酵母细胞,以及原核生物细胞,如大肠杆菌。将携带基因的载体引入细胞的方法包括但不限于显微注射、电穿孔、转导或使用DEAE葡聚糖的转染、脂质转染、磷酸钙或本领域技术人员已知的其他方法。

[0162] 在一个具体实施方式中,使用在真核细胞中起作用的真核表达载体。此类载体的实例包括但不限于病毒载体,如逆转录病毒、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒、痘苗病毒、痘病毒、脊髓灰质炎病毒;慢病毒、细菌表达载体、质粒,如pcDNA3或杆状病毒转移载体。优选的真核细胞系包括但不限于COS细胞、CHO细胞、HeLa细胞、NIH/3T3细胞、293细胞(ATCC# CRL1573)、T2细胞、树突状细胞或单核细胞。

[0163] 本发明的肽或蛋白质的用途

[0164] 本发明的第六方面涉及根据本发明的肽、蛋白质、核酸、载体或宿主细胞在治疗有需要的受试者的传染病中的用途。

[0165] 根据本发明,传染病可能是由细菌、病毒、原生动物、朊病毒、类病毒或真菌等病原体引起的。特别地,任何诱导血管病变的病原体促进的感染都可以用本发明的肽或蛋白质治疗。

[0166] 特别是,原生动物可以是恶性疟原虫。

[0167] 特别地,病毒可以是流感病毒,如甲型流感病毒(IAV)或乙型流感病毒(IAB)、腺病毒、偏肺病毒、巨细胞病毒、副流感病毒(如hPIV-1、hPIV-2、hPIV-3、hPIV-4)、人鼻病毒(HRV)、人呼吸道合胞病毒(HRSV)或冠状病毒。

[0168] 如本文所使用的,术语“冠状病毒”在本领域具有一般含义,是指冠状病毒科的任何成员。冠状病毒是一种病毒,其基因组是长度约为27kb至33kb的正链RNA,具体长度取决于特定的病毒。病毒颗粒RNA在5'端有一个帽结构,在3'端有一个聚腺苷酸尾。RNA的长度使冠状病毒成为最大的RNA病毒基因组。特别地,冠状病毒RNA编码:(1)RNA依赖性RNA聚合酶;(2)N-蛋白;(3)三种包膜糖蛋白;加上(4)三种非结构蛋白。特别地,冠状病毒颗粒至少包含四种典型结构蛋白E(包膜蛋白)、M(膜蛋白)、N(核衣壳蛋白)和S(刺突蛋白)。S蛋白被切割成3条链:刺突蛋白S1、刺突蛋白S2和刺突蛋白S2'。复制酶蛋白的产生是通过-1核糖体移码机制翻译ORF1a和ORF1ab启动的。这种机制产生两种大型病毒多聚蛋白pp1a和pp1ab,它们被两种病毒编码的半胱氨酸蛋白酶进一步加工,木瓜蛋白酶样蛋白酶(PLpro)和3C样蛋白酶(3CLpro),有时被称为主蛋白酶(Mpro)。冠状病毒感染多种哺乳动物和鸟类。它们会引起呼吸道感染(常见)、肠道感染(主要发生在12个月以上的婴儿中),并可能导致神经系统综合征。冠状病毒通过呼吸道分泌物的气溶胶传播。冠状病毒的例子包括但不限于人肠道冠

状病毒(ATCC登录号VR-1475)、人冠状病毒229E(ATCC登录号VR-740)、人病毒OC43(ATCC登录号VR-920)、中东呼吸综合征相关冠状病毒(MERS-coV)和SARS冠状病毒(疾病控制中心),特别是SARS-Cov1和SARS-Cov2。

[0169] 根据本发明,冠状病毒可以是MERS-CoV、SARS-CoV、SARS-CoV-2或任何未来新的该病毒家族成员。

[0170] 特别地,病原体可以是细菌。因此,在这种情况下,本发明涉及根据本发明的肽、蛋白质、核酸、载体或宿主细胞在治疗有需要的受试者的细菌感染(或细菌性疾病)中的用途。

[0171] 发明人特别表明(见实施例部分)细菌感染,特别是脑膜炎奈瑟菌感染,会引起血管功能障碍(或血管损伤或改变)。他们表明,本发明的肽或蛋白质(ANGPTL4或源自ANGPTL4的肽或蛋白)对感染细菌(特别是脑膜炎奈瑟菌)的内皮细胞单层的完整性具有保护作用,保持内皮细胞连接的完整性,防止在细菌感染(如脑膜炎球菌血症)期间发生血管病变、血栓形成和炎症的发生,以及进展为器官衰竭和死亡,因此可以用作主要的血管稳定因子,对细菌感染和由感染样细菌感染引起的脓毒症提供保护。

[0172] 因此,本发明还涉及根据本发明的肽、蛋白质、核酸、载体或宿主细胞,用于在细菌感染期间保护内皮细胞连接的完整性,保护血管病变、血栓形成和炎症的发生。

[0173] 在一个具体实施方式中,本发明还涉及根据本发明的肽、蛋白质、核酸、载体或宿主细胞,用于保护原代人皮肤微血管内皮细胞(HDMEC)或原代人脑微血管内皮细胞(HBMEC)。

[0174] 特别地,本发明涉及根据本发明的肽、蛋白质、核酸、载体或宿主细胞在治疗脓毒症中的用途,特别是由于细菌感染引起的脓毒症。

[0175] 如本文所用,术语“脓毒症”是指由微生物毒力因子(如毒素)和促炎介质混合引起的疾病,其引入或积聚是由感染或创伤引起的,包括早期脓毒症、严重脓毒症和脓毒性休克的急性期。

[0176] “早期脓毒症”一词是指出现严重传染病临床症状的疾病阶段,通常包括发冷、大量出汗、不规则缓解的发烧、虚脱等。

[0177] “严重脓毒症”一词是指除具有早期脓毒症临床症状外,还具有持续发热、淋巴细胞减少、弥散性血管内凝血、呼吸窘迫综合征、多器官衰竭和导致休克的低血压等临床症状的阶段。

[0178] 术语“脓毒性休克急性期”是指外周循环衰竭,导致血流动力学、代谢和内脏疾病,几乎总是导致死亡。

[0179] 特别地,用于治疗脓毒症的肽可以是SEQ ID NO:1至30和37至64中所示的肽,特别是1和8至30以及37至64所示的肽。

[0180] 根据本发明,细菌感染是革兰氏阴性细菌感染或革兰氏阳性细菌感染。

[0181] 术语“革兰氏阴性”细菌感染是指革兰氏阴性细菌的局部或全身感染。变形杆菌是革兰氏阴性菌的主要类群,包括大肠杆菌(*E. coli*)、沙门氏菌、志贺氏菌和其他肠杆菌科、假单胞菌、莫拉氏菌、幽门螺旋杆菌、嗜麦芽窄食单胞菌、蛭弧菌、醋杆菌、军团菌等。其他值得注意的革兰氏阴性菌群包括蓝藻、螺旋菌、绿硫菌和绿色非硫菌。医学上相关的革兰氏阴性球菌包括四种引起性传播疾病(淋病奈瑟菌)、脑膜炎(脑膜炎奈瑟球菌)和呼吸道症状(卡他莫拉菌、流感嗜血杆菌)的类型。医学上相关的革兰氏阴性杆菌包括许多种类。其中一

些主要引起呼吸道问题(肺炎克雷伯氏菌、嗜肺军团菌、铜绿假单胞菌),主要引起泌尿系统问题(大肠杆菌、奇异变形杆菌、阴沟肠杆菌、粘质沙雷氏菌),以及主要引起胃肠道问题(幽门螺杆菌、肠炎沙门氏菌、鼠伤寒沙门氏菌)。与医院获得性感染相关的革兰氏阴性菌包括鲍曼不动杆菌,在医院重症监护室引起菌血症、继发性脑膜炎和呼吸机相关性肺炎。

[0182] 在本发明的另一个具体实施方式中,本发明的革兰氏阴性菌选自大肠杆菌、假单胞菌属、沙门氏菌属、克雷伯菌属、不动杆菌属、嗜蚀艾肯菌和流感嗜血杆菌。

[0183] 在本发明的一个更具体的实施方式中,本发明的革兰氏阴性菌是假单胞菌属、不动杆菌属和克雷伯氏菌属。

[0184] 术语“假单胞菌”在本领域中具有一般含义,是指在人类和其他动物的肺部正常存在或作为病原体存在的细菌。术语“假单胞菌”是指但不限于革兰氏阴性菌假单胞菌属细菌,例如;铜绿假单胞菌组的细菌,如铜绿假单胞杆菌组。

[0185] 特别地,本发明的假单胞菌是铜绿假单胞菌。

[0186] 铜绿假单胞菌是一种常见的革兰氏阴性菌,可导致动物(包括人类)患病。柠檬酸盐、过氧化氢酶和氧化酶呈阳性。它存在于土壤、水中、皮肤菌群和世界上大多数人造环境中。它不仅在正常大气中成长,也在缺氧的大气中成长,因此,它在许多自然和人工环境中都有分布。它使用各种有机材料制作食物;在动物中,它的多功能性使生物体能够感染受损组织或免疫力降低的组织。这种感染的症状是全身炎症和脓毒症。如果这种细菌的定植发生在关键的身体器官,如肺、泌尿道和肾脏,结果可能是致命的(Balcht, et al., Informa Health Care, 1994)。由于这种细菌在潮湿的表面上生长旺盛,因此这种细菌也存在于包括导管在内的医疗设备上和设备内部,在医院和诊所引起交叉感染。

[0187] 术语“克雷伯氏菌”在本领域中具有一般含义,是指在人类和其他动物的肺部正常存在或作为病原体存在的细菌。术语“克雷伯氏菌”是指但不限于革兰氏阴性得克雷伯菌属细菌,例如:肺炎克雷伯菌组的细菌,如肺炎克雷伯菌群、肉芽肿克雷伯杆菌、产酸克雷伯氏菌、密歇根克雷伯氏菌、肺炎克雷贝氏菌(种型)、臭鼻克雷伯氏菌亚种、肺炎克雷伯氏菌亚种、鼻硬肺炎克雷伯菌亚种、类肺炎克雷伯菌、类肺炎克雷伯菌亚种、类似肺炎克雷伯菌亚种、变种克雷伯菌。

[0188] 特别地,本发明的克雷伯氏菌是肺炎克雷伯菌。

[0189] 术语“不动杆菌属细菌”在本领域中具有一般含义,是指正常或致病性地存在于人类和其他动物肺部的细菌。术语“不动杆菌”是指但不限于革兰氏阴性菌不动杆菌,例如鲍曼不动杆菌群中的一种细菌,如鲍曼不动菌、醋酸钙不动杆菌、第3基因组不动杆菌和第13基因组不动杆菌(Ingela Tjernberg et Jan Ursing),这些被归类在一起,称为“醋酸钙不动杆菌-鲍曼不动杆菌复合体”。

[0190] 特别地,本发明的不动杆菌是鲍曼不动杆菌。

[0191] “革兰氏阳性”细菌感染一词是指革兰氏阳性细菌的局部或全身感染。革兰氏阳性细菌是在革兰氏染色试验中呈阳性结果的细菌,传统上用于根据其细胞壁将细菌快速分为两大类。革兰氏阳性细菌会吸收测试中使用的结晶紫染色,然后在显微镜下看起来是紫色的。这是因为在测试的脱色阶段,细菌细胞壁中的厚肽聚糖层在从样品的其余部分洗掉后保留了染色。

[0192] 从经典意义上讲,六个革兰氏阳性属通常对人类具有致病性。其中两个属,链球菌

属和葡萄球菌属是球菌(球形)。其余的生物体是杆菌(杆状),可以根据其形成孢子的能力进行细分。非孢子形成菌是棒杆菌属和李斯特菌属(一种球菌),而芽孢杆菌属和梭菌芽孢杆菌属产生孢子(Gladwin, et al (2007). Miami, Florida: MedMaster. pp.4-5. ISBN 978-0-940780-81-1)。

[0193] 在本发明的具体实施方式中,本发明的革兰氏阳性细菌选自葡萄球菌属、链球菌属、梭菌属、李斯特菌属、芽孢杆菌属和棒杆菌属。

[0194] 在本发明的另一个具体实施方式中,本发明的革兰氏阳性细菌是选自金黄色葡萄球菌群(银白色葡萄球菌、金黄色葡萄球菌、施韦策葡萄球菌、猿猴葡萄球菌)、耳葡萄球菌群、表皮葡萄球菌属(头状葡萄球菌、山羊葡萄球菌、表皮葡萄杆菌、解糖葡萄球菌)和溶血葡萄球菌属群(北方葡萄球菌(*S. borealis*)、德氏葡萄球菌(*S. devriesei*)、溶血葡萄球菌、人型葡萄球菌)的葡萄球菌;猪葡萄球菌-中间葡萄球菌群(*S. hyicus intermedius*) (凝聚葡萄球菌(*S. agnetis*), 产色葡萄球菌(*S. chromogenes*), 康沃尔葡萄球菌(*S. cornubiensis*), 猫葡萄球菌(*S. felis*), 海豚葡萄球菌(*S. delphini*), 猪葡萄球菌(*S. hyicus*), 中间葡萄球菌(*S. intermedius*), 水獭葡萄球菌(*S. lutrae*), 鼯鼠葡萄球菌(*S. microti*), 蝇葡萄球菌(*S. muscae*), 伪中间葡萄球菌(*S. pseudintermedius*), 喙状葡萄球菌(*S. rostri*), 施氏葡萄球菌(*S. schleiferi*))、路邓葡萄球菌群(路邓葡萄球菌);松鼠葡萄球菌群(*S. sciuri* group) (弗氏葡萄球菌(*S. fleurettii*), 缓慢葡萄球菌(*S. lentus*), 松鼠葡萄球菌(*S. sciuri*), 斯氏葡萄球菌(*S. stepanovicii*), 小牛葡萄球菌(*S. vitulinus*)), 模仿葡萄球菌群(模仿葡萄球菌)和沃纳葡萄球菌群(巴斯德葡萄球菌(*S. pasteurii*), 沃纳葡萄球菌)。

[0195] 在更具体的实施方式中,本发明的革兰氏阳性细菌是金黄色葡萄球菌群。

[0196] 如本文所使用的,术语“治疗”或“处理”是指预防性或预防性治疗,也指以及治疗性或疾病改善性治疗,包括治疗有感染疾病风险或疑似感染疾病的受试者,以及患病或被诊断患有疾病或疾病的受试者,并包括抑制临床复发。这种治疗可以施用于患有疾病或最终可能患上疾病的受试者,以预防、治愈、延缓疾病或复发性疾病的发作、减轻其严重程度或改善其一种或多种症状,或延长受试者的生存期,使其超过没有此类治疗时的预期。“治疗方案”是指治疗疾病的模式,例如治疗期间使用的给药模式。治疗方案可以包括诱导方案和维持方案。“诱导方案”或“诱导期”一词是指用于疾病初始治疗的治疗方案(或治疗方案的一部分)。诱导方案的总体目标是在治疗方案的初始阶段为受试者提供高水平的药物。诱导方案可以(部分或全部)采用“负荷方案”,其中可能包括比医生在维持方案期间使用的剂量更大的药物,比医生在维持方案期间更频繁地给药,或两者兼而有之。“维持方案”或“维持期”一词是指在治疗疾病期间用于维持受试者的治疗方案(或治疗方案的一部分),例如,使受试者长时间(数月或数年)处于缓解状态。维持方案可以采用连续治疗(例如,定期给药,如每周、每月、每年等)或间歇治疗(例如中断治疗、间歇治疗、复发治疗或达到特定预定标准[如疾病表现等]后的治疗)。

[0197] 本发明还涉及一种治疗有需要的受试者的传染病的方法,包括向有需要的受试者施用治疗有效量的本发明的肽、蛋白质、核酸、载体或宿主细胞。

[0198] 成套组件

[0199] 本发明的第七方面涉及i)本发明的肽、蛋白质、核酸、载体或宿主细胞,和ii)至少

一种抗病原体感染剂,作为组合制剂,用于同时、单独或顺序使用,治疗有需要的受试者的传染病。

[0200] 特别地,抗病原体感染剂可以是抗病毒感染剂、抗菌感染剂、抗原生动物感染剂、抗朊病毒感染剂、抗类病毒感染剂或抗真菌感染剂。

[0201] 因此,本发明还涉及i)本发明的肽、蛋白质、核酸、载体或宿主细胞,和ii)至少一种抗菌感染剂,作为组合制剂,用于同时、单独或顺序使用,治疗有需要的受试者的细菌感染。

[0202] 根据本发明,抗菌感染剂可以是抗生素。

[0203] 如本文所使用,术语“抗生素”和“抗菌化合物”可互换使用,指的是降低微生物存活率或抑制微生物生长或繁殖的化合物。术语“抗生素”在本领域中具有一般含义,是指抗菌剂,如US2013/0029981中所述。

[0204] 合适的主要抗生素类别包括但不限于:

[0205] 1、 β -内酰胺类抗生素(β -内酰胺类抗生素)是在其分子结构中含有 β -内氨基环并含有 β -内酰胺官能团的抗生素。这些 β -内酰胺类抗生素包括青霉素及其衍生物(青霉素类)、头孢菌素类(头孢类)、单酰胺菌素类、碳青霉烯类和碳头孢烯类。大多数 β -内酰胺类抗生素通过抑制细菌体内的细胞壁生物合成起作用,是使用最广泛的抗生素组(2003年,使用的所有市售抗生素中有一半以上是 β -内酰胺类化合物)。

[0206] “头孢菌素”(cephems)在本文中是指最初来源于真菌顶孢菌的 β -内酰胺类抗生素的一个亚群。与头孢霉素一起,它们构成了 β -内酰胺类抗生素的一个亚类,称为头孢烯类。头孢菌素类包括头孢他啶。

[0207] “单酰胺菌素类”在本文中是指 β -内酰胺类抗生素的一个亚组,其为单环的并且 β -内酰胺环不与另一个环稠合。单酰胺菌素类包括氨曲南。

[0208] “碳青霉烯类”在本文中是指 β -内酰胺类抗生素的一个亚群,它们通过与青霉素结合蛋白(CBP)结合而具有杀菌作用,从而抑制细菌细胞壁合成。这类抗生素通常用于已知或疑似多药耐药性(MDR)细菌感染。碳青霉烯类包括亚胺培南。

[0209] “青霉素”和“青霉素衍生物”(青霉烷类)在本文中是指 β -内酰胺类抗生素的一个亚群,最初来源于被称为青霉菌的常见霉菌;其中包括青霉素G(静脉注射)、青霉素V(口服)、普鲁卡因青霉素和苄星青霉素(肌肉注射)。青霉素类抗生素是首批对葡萄球菌和链球菌引起的许多细菌感染有效的药物之一。它们至今仍被广泛使用,尽管许多类型的细菌在广泛使用后产生了耐药性。有几种增强型青霉素家族对其他细菌有效;这些包括抗葡萄球菌青霉素、氨基青霉素和抗假青霉素。它们来源于青霉菌。

[0210] 天然青霉素的例子:青霉素G、青霉素K、青霉素N、青霉素O、青霉素V。

[0211] β -内酰胺酶耐药青霉素衍生物的例子:甲氧西林、萘夫西林、苯唑西林、氯唑西林、双氯西林、氟氯唑西林。

[0212] 氨基青霉素类的例子:氨苄西林、阿莫西林、匹氨西林、海他西林、巴氨西林、美他西林、酞氨西林、依匹西林。

[0213] 羧青霉素的例子:羧苄西林、替卡西林、替莫西林。

[0214] 脲基青霉素类的例子:美洛西林、哌拉西林、阿洛西林。

[0215] β -内酰胺酶抑制剂青霉素衍生物的例子:克拉维酸、舒巴坦、他唑巴坦。

[0216] 2、氨基糖苷是针对革兰氏阴性菌的抗生素,可抑制蛋白质合成(靶向30S的小核糖体亚基),分子中含有氨基修饰的糖苷(Mingeot-Leclercq MP, et al (1999) .Antimicrob. Agents Chemother. 43(4):727-37)。术语“氨基糖苷”也可以更一般地指任何含有氨基糖亚结构的有机分子。氨基糖苷类抗生素对革兰氏阴性需氧菌和一些尚未产生耐药性的厌氧杆菌显示出杀菌活性,但通常对革兰氏阳性和厌氧革兰氏阴性菌没有杀菌活性。

[0217] 链霉素是第一类氨基糖苷类抗生素。它来源于灰色链霉菌,是最早用于治疗结核病的现代药物。链霉素缺乏该类大多数其他成员中常见的2-脱氧链霉胺部分。氨基糖苷类的其他例子包括含脱氧链霉胺的试药物、卡那霉素、妥布霉素、庆大霉素和新霉素。

[0218] 3、抑制核酸合成的抗生素

[0219] -阻断DNA旋转酶(细菌特有的拓扑异构酶)的抗生素:氨基香豆素和喹诺酮类。

[0220] -阻断细菌RNA聚合酶的抗生素:利福平。

[0221] 4、抑制蛋白质合成的抗生素(氨基糖苷除外)

[0222] -阻断肽键形成的抗生素:酰胺醇类(例如:氯霉素、甲砒霉素、叠氮霉素和氟苯尼考)。

[0223] -阻断多肽链延长的抗生素:四环素类(例如:四环素、多西环素、金霉素、依拉环素、沙雷环素、奥马环素)、大环内酯类(例如,红霉素、阿奇霉素)和酮内酯类(示例:泰利霉素、喹红霉素和索利霉素)。

[0224] 5、抑制叶酸代谢的抗生素

[0225] 磺胺类药物(Sulfonamides),也称为磺胺类药物(sulphonamides)、磺胺类药物(sulfa drugs)或磺胺类药物(sulpha drugs)(例如:磺胺甲恶唑)和对氨基苯磺酰胺类。

[0226] 6、糖肽家族的抗生素,如万古霉素。

[0227] 7、新型抗生素化合物

[0228] 在2000年代末和2010年代初,四类新的抗生素已投入临床使用:环脂肽(如达托霉素)、甘氨酸环素(如替加环素)、恶唑烷酮(如利奈唑胺)和脂质霉素(如非达霉素)。

[0229] 在一个具体实施方式中,本发明的抗生素是头孢噻肟和氨基糖苷类(阿米卡星)。

[0230] 根据本发明,在脓毒症的情况下,可以使用抗脓毒症剂。

[0231] 因此,在这种情况下,本发明涉及i)本发明的肽、蛋白质、核酸、载体或宿主细胞,和ii)至少一种抗脓毒症剂,作为组合制剂,用于同时、单独或顺序使用,治疗有需要的受试者的脓毒症。

[0232] 如本文所使用,术语“抗脓毒症剂”表示能够对抗脓毒症的化合物,例如抗生素、血管加压药(如去甲肾上腺素或多巴胺)、氢化可的松和氟氢可的松。

[0233] 如本文所使用,术语“同时使用”表示同时使用本发明的肽、蛋白质、核酸、载体或宿主细胞和至少一种抗菌感染剂。

[0234] 如本文所使用,术语“单独使用”表示本发明的肽、蛋白质、核酸、载体或宿主细胞和至少一种抗菌感染剂不同时使用。

[0235] 如本文所使用,术语“顺序使用”表示按照顺序使用本发明的肽、蛋白质、核酸、载体或宿主细胞以及至少一种抗菌感染剂。

[0236] 治疗成分

[0237] 本发明的另一个目的涉及一种治疗组合物,其包含本发明的抗体或肽、蛋白质、核酸、载体或宿主细胞,用于治疗有需要的受试者的传染病。

[0238] 在一个具体实施方式中,本发明涉及一种治疗组合物,其包含本发明的肽、蛋白质、核酸、载体或宿主细胞,用于治疗有需要的受试者的脓毒症。

[0239] 本发明的任何治疗剂都可以与药学上可接受的赋形剂和任选的缓释基质(如可生物降解的聚合物)组合,形成治疗组合物。

[0240] “药学上”或“药学上可接受的”是指在给哺乳动物,特别是人类服用时不会产生不良、过敏或其他不利反应的分子实体和组合物。药学上可接受的载体或赋形剂是指任何类型的无毒固体、半固体或液体填料、稀释剂、包封材料或制剂助剂。

[0241] 药物组合物的形式、给药途径、剂量和方案自然取决于待治疗的病症、疾病的严重程度、患者的年龄、体重和性别等。

[0242] 本发明的药物组合物可以配制用于局部、口服、鼻内、胃肠外、眼内、静脉内、鞘内、肌肉内或皮下给药或肺雾化等。

[0243] 优选地,药物组合物包含可用于能够注射的制剂的药学上可接受的载体。这些特别可以是等渗、无菌的生理盐水溶液(磷酸一钠或磷酸二钠、氯化钠、氯化钾、氯化钙或氯化镁等或此类盐的混合物),或干燥的,特别是冷冻干燥的组合物,根据情况,添加无菌水或生理盐水后,可以构成可注射溶液。

[0244] 用于给药的剂量可以根据各种参数进行调整,特别是根据所使用的给药方式、相关病理或所需的治疗持续时间进行调整。

[0245] 此外,其他药学上可接受的形式包括,例如口服片剂或其他固体;缓释胶囊;目前可以使用任何其他形式。

[0246] 本发明的药物组合物可以包含另一种治疗活性剂。本发明还涉及一种试剂盒,其包含本发明表达的激动剂、拮抗剂或抑制剂以及另一种治疗活性剂。

[0247] 例如,抗菌感染剂如抗生素或抗脓毒症(如上所述)剂可以如下所述添加到药物组合物中。

[0248] 本发明将通过以下附图和实例进一步说明。然而,这些示例和附图不应以任何方式解释为限制本发明的范围。

附图说明

[0249] 图1:外源性ANGPTL4对脑膜炎奈瑟菌感染的皮肤微血管内皮细胞具有保护作用。A、用Nm 2C4.3感染HDMECs 30min,用1 μ g/mL重组人ANGPTL4处理2h30min。固定细胞并对细胞肌动蛋白、血管内皮钙粘蛋白和DAPI进行染色,并通过荧光显微镜进行分析。使用Image J软件对30个视野进行了细胞间连接处血管内皮钙粘蛋白富集和细胞间隙面积的定量。Kruskal-Wallis检验** $P < 0.001$;*** $P < 0.0001$ 。B、HDMEC未感染或感染脑膜炎奈瑟菌2C4.3 30分钟,用1 μ g mL⁻¹的重组人ANGPTL4、其N-末端部分(nANGPTL4)或其C-末端部分(cANGPTL4)处理2小时30分钟。加入Caspase-3/7试剂,使用IncuCyte®活细胞分析系统在9小时内实时检测细胞凋亡。

[0250] 图2:ANGPTL4的N-末端部分赋予血管保护。A、ANGPTL4结构示意图。ANGPTL4包含一个N-末端部分(nANGPTL4, aa 26-164),通过可切割的接头连接到C-末端部分(cANGPTL4, aa

164-406)。nANGPTL4包含一个高度保守的脂蛋白脂酶(LPL)结合结构域(aa 44-55)、参与蛋白质寡聚化的76和80位上的两个半胱氨酸以及一个卷曲螺旋结构域(aa100-143)。C-末端部分编码纤维蛋白原样结构域。B、用Nm 2C4.3感染HDMECs 30min,用1 μ g/mL的重组人ANGPTL4、nANGPTL4或cANGPTL4处理2h30min。固定细胞并对细胞肌动蛋白、血管内皮钙粘蛋白和DAPI进行染色,并通过荧光显微镜进行分析。B、用Image J软件对30个视野进行细胞间连接处血管内皮钙粘蛋白富集和细胞间隙面积的定量。Kruskal-Wallis检验** $P < 0.001$,*** $P < 0.0001$,这些结果来自于四次独立实验,每个实验都进行了三次重复。

[0251] 图3:ANGPTL4 N-末端部分存在的一种新型结合基序(aa 66-80)赋予血管保护。A、所示肽衍生自nANGPTL4。B、用Nm 2C4.3感染HDMECs30min,并用每种肽1 μ g/mL处理。使用Image J软件对30个视野进行了细胞间连接处血管内皮钙粘蛋白富集的定量分析。

[0252] 图4:nANGPTL4与Syndecan-4的相互作用赋予血管保护。A、用Nm2C4.3感染HDMECs 30min,并在无或有抗SDC4抗体的情况下用1 μ g/mL的重组人ANGPTL4、nANGPTL4或cANGPTL4治疗2h30min。固定细胞并对细胞肌动蛋白、血管内皮钙粘蛋白和DAPI进行染色,并通过荧光显微镜进行分析。使用Image J软件对30个视野进行了细胞间连接处血管内皮钙粘蛋白富集和细胞间隙面积的定量。Kruskal-Wallis检验** $P < 0.001$,*** $P < 0.00001$,ns1 $P = 0.2172$;ns2 $P > 0.999$,这些结果来自于四次独立实验,每个实验都进行了三次重复。B、用针对SDC4的小干扰RNA(siRNA)或非靶向siRNA对照转染HDMECs 48小时,用Nm 2C4.3感染30min,用1 μ g/mL重组人ANGPTL4处理2h30min。使用Image J软件对30个视野进行了细胞间连接处血管内皮钙粘蛋白富集和细胞间隙面积的定量。Kruskal-Wallis检验** $P < 0.001$,*** $P < 0.0001$,这些结果来自于两次次独立实验,每个实验都进行了三次重复。

[0253] 图5:脑内皮细胞中SDC4的抗体中和诱导了脑膜炎球菌感染后内皮完整性的丧失。HCMECs/D3用Nm 2C4.3感染30min,在无或有抗SDC4抗体或抗ANGPTL4抗体作为阳性对照的情况下,用10 μ g/mL的抗ANGPTL4-抗体治疗2h30min。A、使用Image J软件对30个视野进行了细胞间连接处VE钙粘蛋白富集和细胞间隙面积的定量。Kruskal-Wallis检验** $P < 0.001$,*** $P < 0.0001$ 。B、人原代人脑微血管内皮细胞(HBMECs)在细胞过滤器上生长。细胞用Nm 2C4.3感染30min,在没有或有抗SDC4抗体的情况下,用10 μ g/mL的抗ANGPTL4-抗体处理2h30min。测量经内皮电阻(TEER)。所示为两个独立实验中的一个代表性实验的结果,一式三份。Kruskal-Wallis检验** $P < 0.001$ 。

[0254] 图6:ANGPTL4保护皮肤微血管内皮细胞免受肺炎链球菌感染。用肺炎链球菌TIGR4感染HDMEC 30min,用1 μ g/mL重组人ANGPTL4处理2h。固定细胞并对细胞肌动蛋白、血管内皮钙粘蛋白和DAPI进行染色,并通过荧光显微镜进行分析。使用Image J软件对30个视野进行了细胞间连接处VE-cadherin富集的定量分析。Kruskal-Wallis检验*** $P < 0.0001$ 。

[0255] 图7:ANGPTL4可减少血栓形成、血管损伤和炎症的迹象。A-D,移植有人类皮肤的SCID小鼠静脉注射Nm 2C4.3野生型菌株(5×10^6 个细菌)或保持未感染状态。细菌攻击后30min或2h,小鼠静脉注射1 μ g重组人ANGPTL4、nANGPTL4或cANGPTL4,或作为对照的载体。在攻击后4小时杀死小鼠。该实验进行了两次,每组n=3或4只小鼠,使用来自两个不同供体的皮肤。A、体内使用的方案的示意图。B、感染后4h控制菌血症(平均值 \pm 标准误差)。C、通过免疫荧光分析评估的皮肤移植物内的细菌定植情况,使用ImageJ软件进行定量,作为细菌表面定植与血管管腔表面之间的比率。每只小鼠共分析了30-50条血管。误差条显示平均值 \pm

s.e.m.D,通过免疫荧光分析评估皮肤移植物内的血栓形成,并使用ImageJ作为血栓表面与血管管腔表面之间的比率进行定量。每只小鼠共分析了30-50条血管。误差条显示平均值±标准误差;*** $P < 0.0001$;ns $P = 0.0541$ 双尾学生t检验。

[0256] 图8:ANGPTL4单独或与抗生素联合使用可改善脑膜炎球菌感染的结果。A-D、SCID小鼠移植人皮肤后静脉注射Nm 2C4.3野生型菌株(5×10^6 个细菌);细菌攻击后2h,小鼠单独接受重组人ANGPTL4($1\mu\text{g}$,静脉注射)、头孢噻肟(200mg kg^{-1} ,腹腔注射)或与ANGPTL4或载体联合使用,或者接受载体作为对照。细菌攻击后18h,重新给药ANGPTL4($1\mu\text{g}$)和头孢噻肟(200mg kg^{-1})。该实验进行了两次,每组 $n = 3$ 或4只小鼠,使用来自两个不同供体的皮肤。A、体内使用的方案示意图。B、感染后4、18、48和72h的细菌血症(平均值±标准误差)。C、生存曲线:* $P = 0.0275$;双侧对数秩Mantel-Cox生存分析。D、感染后4h,通过免疫荧光分析评估皮肤移植物内的血栓形成,并如图8所示进行定量(误差条显示平均值±标准误差;每只小鼠分析40条血管;每组 $n = 4$ 只小鼠;*** $P < 0.001$;双尾Student t检验)。

[0257] 图9:ANGPTL4通过预防血管功能障碍和器官衰竭来预防LPS诱导的内毒素血症。A-B,Balb/c小鼠接受LPS(5mg kg^{-1} ,i.p.);LPS攻击后30min,小鼠接受重组人ANGPTL4($2\mu\text{g}$,静脉注射)或接受载体作为对照。A、所用方案的示意图。B、存活曲线(每组16只小鼠):**** $P < 0.0001$;双侧对数秩Mantel-Cox生存分析。C、D、Balb/C小鼠接受LPS(5mg kg^{-1} ,i.p.);LPS攻击后30min,小鼠接受nANGPTL4($2\mu\text{g}$,静脉注射)或接受载体作为对照。C、所用方案的示意图。D、生存曲线(每组 $n = 6$ 只小鼠):** $P = 0.0033$;双侧对数秩Mantel-Cox生存分析。E、F、Balb/c小鼠接受LPS(5mg kg^{-1} ,i.p.);LPS攻击后30min,小鼠接受肽1($2\mu\text{g}$,静脉注射)或接受载体作为对照。E、所用方案的示意图。F、生存曲线(每组 $n = 6$ 只小鼠):* $P = 0.0163$;双侧对数秩Mantel-Cox生存分析。G、Balb/c小鼠接受LPS(5mg kg^{-1} ,i.p.);LPS攻击后30min,小鼠接受重组人肽P9($2\mu\text{g}$,静脉注射)或接受载体作为对照。生存曲线(每组6只小鼠)。*** $P < 0.001$;双侧对数秩Mantel-Cox生存分析。H、Balb/c小鼠接受LPS(4mg kg^{-1} ,i.p.)和抗ANGPTL4阻断抗体($10\mu\text{g kg}^{-1}$,i.v)或接受载体作为对照。LPS攻击后18h,用伊文思蓝灌注小鼠1h,处死并提取脑组织。伊文思蓝外渗的定量分析(每组 $n = 4$ 只小鼠)。条形图和误差条形图分别显示了两个独立实验的平均值±s.e.m.*** $P < 0.001$;NS,无显著性差异($P > 0.05$)。单因素方差分析Tukey多重比较检验。

| 肽 | 长度 (aa) | 位置 (aa) | 序列 | 连接稳定性 |
|-----------------|------------|------------|--|-------|
| P1 | 46 | 38-83 | WDEMNVLAHGLLQLGQGLREHA ERTRSQLSALERRLSACGSACQGT (SEQ ID NO: 20) | + |
| P2 | 50 | 84-148 | PEVLHSLQTQLKAQNSRIQQLFHK VAQQQRHLEKQHLRIQHLQSQFG LLD (SEQ ID NO: 31) | - |
| P1 C76A/C80A | 46 | 38-83 | WDEMNVLAHGLLQLGQGLREHA ERTRSQLSALERRLSAAGSAAQGT (SEQ ID NO: 21) | + |
| P3 | 18 | 38-55 | WDEMNVLAHGLLQLGQGL (SEQ ID NO: 32) | - |
| P4 | 28 | 56-83 | REHAERTRSQLSALERRLSACGSA CQGT (SEQ ID NO: 16) | + |
| [0258] P5 | 19 | 56-73 | REHAERTRSQLSALERRL (SEQ ID NO: 33) | - |
| P6 | 16 | 65-80 | QLSALERRLSACGSAC (SEQ ID NO: 12) | + |
| P7 | 15 | 61-75 | RTRSQLSALERRLSA (SEQ ID NO: 34) | - |
| P8 | 10 | 66-75 | LSALERRLSA (SEQ ID NO: 35) | - |
| P9 | 15 | 66-80 | LSALERRLSACGSAC (SEQ ID NO: 8) | + |
| P10 | 12 | 67-78 | SALERRLSACGS (SEQ ID NO: 36) | - |
| P12 | 13 | 66-78 | LSALERRLSACGS (SEQ ID NO: 55) | + |
| P13 | 14 | 67-80 | SALERRLSACGSAC (SEQ ID NO: 58) | + |

[0259] 表1:nANGPTL4衍生肽对内皮细胞连接稳定性的影响

[0260] 实施例:

[0261] 材料和方法

[0262] 抗体、重组蛋白和试剂

[0263] 抗IV型胶原 (ab6311) 小鼠单克隆抗体和抗CD41 (ab33611) 大鼠单克隆抗体购自Abcam。抗血管内皮钙粘蛋白F-8Alexa **Fluor**®647小鼠单克隆抗体 (sc-9989) 购自Santa Cruz。抗Syndecan 4兔多克隆抗体购自Invitrogen (36-3100)。抗Angpt14兔多克隆抗体购自Thermo science (40-9800)。先前已经描述了针对脑膜炎球菌2C4.3菌株的多克隆抗血清 [22]。用于免疫荧光标记和免疫印迹的二级抗体来自于Jackson immuno research

Laboratories和Thermoscientific Lab。

[0264] 重组人ANGPTL4(rhANGPTL444487-AN)、C-末端片段(cANGPTL43485 AN)、N-末端片段(nANGPTL48249-AN),rhANGPTL3(3829-AN)或rhANGPTL8(9983-AN)购自R&D Systems。大肠杆菌LPS(0111:B4)购自Sigma-Aldrich。所有肽均由Covalab(Lyon,France)合成,纯度>98%。

[0265] 细菌菌株和感染

[0266] 脑膜炎奈瑟菌(Nm)2C4.3菌株(以前的克隆12)是血清群C型脑膜炎球菌临床分离株8013的一种菌毛包裹的Opa-0pc变体[23]。细菌菌株在-80°C下冷冻储存,并在含有Kellogg's补充剂的GC琼脂平板(Difco)上在37°C、5%CO₂下常规生长。

[0267] 感染当天,将GCB琼脂平板上过夜培养的细菌悬浮液调节至OD₆₀₀=0.05,并在37°C的预热细胞培养基中孵育2h。以每细胞100个细菌(OD=0.1)的感染复数(MOI)感染细胞30min,洗涤两次以去除非粘附细菌,并允许感染持续不同时间。然后洗涤细胞并用4%多聚甲醛固定以进行免疫荧光分析。

[0268] 细胞系

[0269] 人脑微血管内皮细胞(HCMECs/D3)是来源于人脑毛细血管的完全分化的脑内皮细胞系,在我们的实验室中进行了工程改造,它概括了血脑屏障的主要表型特征[13,24]。HCMEC/D3在37°C、5%CO₂条件下,生长在涂有I型大鼠胶原的培养皿(R&D)中,培养基为内皮细胞基础培养基-2(Lonza),并添加了5%的FCS、1.4μM的氢化可的松(Lonza)、5μg/mL的抗坏血酸(Lonza)和1ng/mL的b-FGF(Lonza)。

[0270] 从儿童脑肿瘤健康区域的脑活检中分离出的原代人脑微血管内皮细胞(HBMECs)及其特定的内皮细胞生长培养基,在37°C、5%CO₂中生长。

[0271] 从幼年包皮和成人皮肤(不同位置)的真皮中分离出原代人皮肤微血管内皮细胞(HDMECs),并购买其特定的内皮细胞生长培养基(PromoCell),在37°C、5%CO₂中生长。当需要时,HDMECs在通道载玻片上分裂(μ-slide0.4I Luer from ibidi),生长2天达到融合,然后进行层流剪切应力(10dyn cm⁻²)4天(ibidi Pump System,ibidi)。

[0272] 共聚焦免疫荧光显微镜

[0273] 细胞在Thermanox盖玻片(Thermo Fischer Scientific)上生长至融合。感染后,将细胞在4%多聚甲醛中固定10min,用PBS洗涤三次,用0.2%Triton X-100在PBS中透化10min。用3%BSA在PBS中封闭细胞30min,并用一抗孵育2h。用PBS洗涤三次后,将细胞与CY3偶联的抗小鼠IgG和CY2偶联的抗兔IgG(Jackson Immunochemicals)一起孵育1h。图像采集是在共聚焦显微镜(spinning disk Leica DMI6000,×20)上进行的。使用ImageJ软件(NIH)进行图像分析。每个实验至少重复三次。

[0274] 人皮移植SCID小鼠的感染。

[0275] 六周龄的CB17/Icr-Prkdcscid雌性小鼠购自Janvier Labs。人体皮肤组织取自Service de Chirurgie Plastique et Reconstructive of the Groupe Hospitalier Saint-Joseph接受整形手术的成年患者。根据法国法律,已告知患者且患者未拒绝参与研究。实验程序如前所述[25],按照国家卫生与医学研究所的指导方针进行,并符合欧洲伦理立法(Directive 2010/63/EU)。实验方案已获得巴黎笛卡尔大学动物实验伦理委员会的批准(consent forms CEEA34.0.J.L.039.12and 2018012515596498)。简而言之,在腹腔注射

氯胺酮(100mg kg^{-1})和甲苯噻嗪(10mg kg^{-1})后,通过剃除背部和腹部的毛发来为小鼠的移植做准备。创建皮瓣,并将全厚度人体皮肤移植物放置在伤口床上。用6-0非吸收性单丝缝合材料将移植体固定,然后将皮瓣缝合在移植体上方。移植的小鼠在人类皮肤移植后4-6周被感染。脑膜炎奈瑟菌在 37°C 下在不含铁并补充了 $15\mu\text{M}$ 去铁胺(Desferal,Novartis)的GCB琼脂平板上生长过夜。收集细菌菌落,在含有1%BSA培养基和 $0.06\mu\text{M}$ 去铁胺的RPMI培养基中培养,轻轻搅拌,达到指数生长阶段。然后将细菌重新悬浮在生理盐水溶液中。小鼠静脉注射 $200\mu\text{l}$ (5×10^6 个细菌)这种细菌悬浮液。在感染前腹腔注射 10mg 剂量的人全转铁蛋白(R&D Systems)。感染后4h处死小鼠。使用无菌切割器仔细收集人体皮肤移植物。组织在PBS中洗涤,并在 4°C 的4%多聚甲醛磷酸盐缓冲液中固定过夜。在磷酸盐缓冲液中洗涤后,将标本包埋在OCT培养基中,然后在 -80°C 下冷冻。真皮切片($7\mu\text{m}$ 厚)固定在Superfrost Plus显微镜载玻片上,并进行免疫荧光分析。将切片与第一抗体在PBS/3%BSA中孵育1h,然后将DAPI加入Alexa偶联的第二抗体中1h。进一步洗涤后,将盖玻片装入甘油(Dako)中,并使用玻片扫描仪(Lamina,Perkin-Elmer)进行进一步分析。使用ImageJ软件(NIH)对图像进行分析。

[0276] 脂多糖诱导的小鼠脓毒症

[0277] 从Janvier Labs获得的雌性BALB/c小鼠,9-10周龄,以 5mg/kg 的剂量腹腔注射LPS,并监测存活72h(每组 $n=12$)。将BALB/c小鼠随机分为2组:LPS组和LPS+Angpt14组。LPS攻击后30min静脉注射Angpt14($2\mu\text{g/小鼠}$)或载体(生理盐水溶液)。在一些实验中,在LPS攻击后18h收集血清、肾脏和肺部。肾脏和肺部用4%PFA固定,石蜡包埋,从每个块上切下 $5\mu\text{m}$ 切片,用H&E染色。使用玻片扫描仪(Lamina,Perkin-Elmer)观察并获取染色切片。使用ImageJ软件(NIH)对图像进行分析。

[0278] 统计分析

[0279] 使用Prism软件(GraphPad软件)检查数据的显著性。统计显著性采用学生t检验和单因素方差分析进行评估。使用ImageJ软件对3个独立实验进行了定量分析。

[0280] 结果

[0281] 内源性ANGPTL4保护脑微血管内皮细胞免受脑膜炎奈瑟菌的感染。

[0282] 通过对未感染或体外感染脑膜炎球菌的人类原发性皮肤(HDMECs)或脑微血管(HBMECs)进行转录分析,我们观察到,与HDMECs相比,HBMECs中ANGPTL4的mRNA水平更丰富,在脑膜炎菌感染后,HBMECs中ANGPTL4的mRNA水平进一步升高,而在HDMECs中保持不变(数据未显示)。这些差异在蛋白质水平上得到了证实(数据未显示)。

[0283] 因此,我们使用hCMEC/D3细胞分析了内源性ANGPTL4产生对脑内皮细胞完整性的影响,这是一种来源于脑微血管的人内皮细胞系,保留了原代脑内皮细胞的大部分结构和功能特征[12,13]。对于原代脑内皮细胞,hCMEC/D3细胞组成性表达ANGPTL4,并且在脑膜炎球菌感染后进一步诱导了这种表达(数据未显示)。虽然这些细胞对脑膜炎球菌的感染抵抗了3h,并保持血管内皮钙粘蛋白的连接点组织,这是控制血管通透性的粘附物连接点的主要成分,但添加抗ANGPTL4阻断抗体导致血管内皮钙粘蛋白的连接分布丧失和单层完整性丧失(数据未显示)。这些结果表明,脑微血管细胞分泌的ANGPTL4在脑膜炎奈瑟菌感染后保持了内皮的完整性。

[0284] 外源性ANGPTL4保护皮肤微血管内皮细胞免受脑膜炎球菌感染

[0285] 与抵抗脑膜炎球菌感染的脑微血管内皮细胞不同,皮肤微血管内皮细胞(HDMECs)单层的完整性在感染后受到严重损害,如观察到的粘附物连接和细胞分离的丧失(数据未显示)。由于与HBMEC相比,HDMEC产生ANGPTL4的能力较差(数据未显示),我们分析了添加重组人ANGPTL4是否可能对这些细胞产生保护作用。虽然ANGPTL4治疗对HDMECs形成的粘附连接的组织没有显著影响,但在感染开始后30min加入ANGPTL4,完全保留了单层的完整性,显著降低了Src激酶和血管内皮钙粘蛋白磷酸化(图1A),并抑制了脑膜炎球菌感染诱导的细胞凋亡(图1B)。此外,虽然感染伴随着炎性细胞因子(TNF- α 、IL-6、IL-8)、血管炎症标志物(E-选择素、ICAM-1、VCAM-1)和内皮细胞改变标志物(内皮糖蛋白、血栓调节蛋白)的大量释放,但所有这些标志物在用ANGPTL4治疗后都降低了35%至80%(数据未显示)。尽管ANGPTL4与ANGPTL3和ANGPTL8[6]具有序列同源性、生化和功能特性,但添加rhANGPTL3或rhANGPTL8对感染的HDMECs没有保护作用(数据未显示),表明这种作用是ANGPTL4特有的。总之,这些结果确立了ANGPTL4对脑膜炎球菌诱导的内皮功能障碍的强效细胞保护作用。

[0286] 血管保护是由ANGPTL4 N末端的一个新结合基序赋予的。

[0287] 内皮细胞产生的ANGPTL4在接头区域(赖氨酸164)被前蛋白转化酶进行蛋白水解处理[14],释放N-末端部分(nANGPTL4, aa 26-164)和C-末端部分(cANGPTL4, aa 164-406)(图2A)(氨基酸的编号根据ANGPTL4的整个序列(SEQ ID NO:1))。nANGPTL4包含一个高度保守的脂蛋白脂酶(LPL)结合结构域(aa 44-55),可以抑制调节脂质代谢的LPL活性[15],76和80位上的两个半胱氨酸通过分子间二硫键参与蛋白质寡聚化,这是功能性LPL抑制所必需的,以及一个卷曲螺旋结构域(aa 100-143),其功能未知;而单体C末端部分编码一个纤维蛋白原样结构域,该结构域参与与各种受体(细胞外基质蛋白、整合素)的蛋白质相互作用,并被证明可以增加血管生成、血管通透性和ROS(活性氧)的产生[16]。然后,我们分析了这些结构域在ANGPTL4对感染诱导的内皮改变的保护作用中的各自作用。如全长蛋白所示,添加重组人nANGPTL4足以在感染后保持细胞单层的完整性(图2B)。相反,添加重组人cANGPTL4对单层完整性没有显著的保护作用,单层完整性在感染后仍会发生变化(图2B)。

[0288] 为了确定促进血管保护作用所需的nANGPTL4的最小相互作用基序,我们分析了衍生肽的作用(图3A)。首先,测试了两种肽:P1(aa 38-83)含有保守的LPL结合结构域和2个半胱氨酸76和80,P2(aa 99-149)含有卷曲螺旋结构域。P1足以像全长蛋白一样有效地防止感染引起的粘附物连接和细胞分离的丧失,而P2没有显著影响(图3B)。有趣的是,丙氨酸中两种半胱氨酸(P1C76A、C80A)的含P1肽突变也有效地对感染诱导的损伤提供了细胞保护,表明不需要肽寡聚来确保这一功能(图3B)。然后,我们研究了两种P1衍生肽的作用:P3(aa 38-55)没有保护作用,表明保守的LPL结合基序不参与这一过程,而P4(aa 56-83)在提供保护方面与P1一样有效(图3B)。使用PSIPRED对P4的序列图分析预测了包含aa 65-80的潜在膜相互作用结构域。包含该潜在结构域的P6(aa 65-80)和P9(aa66-80)完全抑制了感染诱导的损伤,而P5(aa 56-73)、P7(60-75)或两个较短的肽P8(aa 66-75)和P10(aa 67-78)没有效果(图3B),肽P11(aa 69-80)的合成失败,很可能是由于序列中的疏水性导致分子间或分子内聚集或二级结构形成。然后,我们发现肽P12(aa 66-78)和P13(aa 67-80)也能抑制感染引起的损伤。

[0289] 这些结果(总结在表1中)提供了证据,表明外源性ANGPTL4可以对感染脑膜炎奈瑟菌的内皮细胞单层的完整性发挥主要的保护作用,并且这种作用是由我们在蛋白质的N-末

端部分鉴定出的一种新的结合基序(aa 66-80)赋予的。

[0290] 血管保护是通过nANGPTL4与Syndecan-4的相互作用实现的。

[0291] 由于ANGPTL4的N-末端部分先前已被证明与硫酸乙酰肝素蛋白多糖结合[14],特别是与Syndecan-4(SDC4)结合[17],我们研究了SDC4在ANGPTL4保护作用中的潜在作用。有趣的是,SDC4 mRNA和蛋白质在脑(HBMECs、hCMEC/D3)和皮肤(HDMECs)微血管内皮细胞中均有表达,并在感染脑膜炎奈瑟菌后增加,HDMECs的诱导作用更强(数据未显示),这与SDC4与ANGPTL4的相互作用增加有关,如富集的共免疫沉淀所示(数据未显示)。

[0292] 将HDMECs与ANGPTL4、nANGPTL4以及抗SDC4抗体共同处理,消除了ANGPTL4和nANGPTL4对感染引起的血管病变的保护作用,而单独使用抗SDC4单克隆抗体对未感染细胞没有有害影响(图4A)。抗SDC4抗体也消除了肽P1和P6的保护作用(数据未显示),而抗SDC1抗体对用ANGPTL4、nANGPTL4或衍生肽处理的HDMECs没有拮抗作用(数据没有显示),表明这种作用是SDC4特有的。此外,感染前siRNA介导的HDMECs中SDC4的缺失也消除了ANGPTL4的保护作用(图4B)。总之,这些结果表明,nANGPTL4通过其结合基序与SDC4相互作用(aa 66-80),对感染脑膜炎奈瑟菌的内皮细胞单层的完整性具有保护作用。

[0293] 同样,在HCMEC/D3细胞中添加抗SDC4抗体会导致血管内皮钙粘蛋白的连接分布丧失和单层完整性丧失,以响应脑膜炎球菌感染,而对未感染的单层细胞中没有观察到有害影响(图5A)。使用原代脑内皮细胞进一步证实了这些作用。虽然脑膜炎球菌感染3h仅部分影响了HBMECs形成的屏障的强度和完整性,但根据经内皮电阻(TEER)仅降低50%和血管内皮钙粘蛋白的连接组织维持情况进行评估,在感染开始30min后添加抗ANGPTL4或抗SDC4阻断抗体同样将TEER降低了80%,并导致连接中断(图5B)。这进一步表明SDC4和ANGPTL4在脑内皮细胞中的功能相互作用对细菌感染具有保护作用。

[0294] 总之,这些数据共同证明了ANGPTL4对脑膜炎球菌感染引起的内皮细胞改变的保护作用。为了确定ANGPTL-4是否也能提供针对革兰氏阳性细菌的血管保护,我们研究了ANGPTL-4对暴露于革兰氏阳性细菌肺炎链球菌感染的HDMECs的影响,肺炎链球菌是肺炎、脓毒症、脑膜炎和其他疾病的主要病原体之一。虽然肺炎链球菌感染会导致内皮细胞连接组织的丧失,但添加重组人ANGPTL4可以保持内皮的完整性(图6)。这些结果表明,ANGPTL4是一种有效的血管稳定因子,可以保护患者免受革兰氏阴性和革兰氏阳性细菌感染。

[0295] ANGPTL4可防止体内血管病变的形成。

[0296] 因此,我们使用一种经过验证且可靠的人源化脑膜炎球菌感染小鼠模型,研究了ANGPTL4在体内对脑膜炎奈瑟菌诱导的血管病变的潜在保护作用,该模型由移植有人类皮肤的严重联合免疫缺陷(SCID)小鼠组成,这些小鼠能够复制出与患者观察到的紫癜性病变相似的血管病变[18,19](图7A)。静脉注射 5×10^6 细菌后,以模拟脑膜炎球菌血症患者的情况(图7B),感染后4h,细菌大量定植在皮肤移植物内的人体皮肤血管中(图7C)。如前所述[20,21],这种血管定植与大量血小板和红细胞聚集、血管闭塞(数据未显示)和内皮完整性受损的迹象有关,通过连接标记血管内皮钙粘蛋白的缺失进行评估(数据未示出)。感染开始后30min或2h静脉注射重组人ANGPTL4蛋白(1 μ g/只)(图7A),在感染后4h后,用ANGPTL4治疗的小鼠和对照组小鼠之间的菌血症和血管定植情况是相似的(图7B)。然而,ANGPTL4治疗大大减少了血管血栓形成(图7D),并且通过血管内皮钙粘蛋白的连续染色评估显示,其保留了内皮细胞连接的完整性(数据未显示)。此外,尽管感染诱导小鼠血清中促炎因子(TNF-

α 、IL-6和IL-8)以及血管炎症的生物标志物(可溶性E-选择素、ICAM-1、VCAM-1)或血管病变(血管生成素-2、血栓调节蛋白)的释放,但ANGPTL4治疗使所有这些标志物的血清水平降低了60-80%(数据未显示)。在感染后30min或2h服用ANGPTL4同样可以减少血管病变和血栓形成,而早期服用是为了防止炎症因子的释放,因为在2h服用后不再观察到对这些炎症标志物的影响(数据未显示)。

[0297] 有趣的是,我们注意到,给予ANGPTL4的N-末端和C-末端结构域(1 μ g/只小鼠)都能减少感染引起的血管血栓形成(图7D),对血管定植没有影响(图7C);虽然nANGPTL4的给药保持了内皮细胞连接的完整性(数据未显示),但cANGPTL4在预防促炎因子和血管炎症生物标志物的产生方面最有效(数据未显示),表明ANGPTL4的双重功能依赖于其两个不同的功能域。正如预期的那样,在用ANGPTL3或ANGPTL8治疗后,没有观察到对血管病变、血栓形成或炎症标志物释放的保护作用(数据未显示),表明这些作用是ANGPTL4特有的。这些数据表明,ANGPTL4对脑膜炎球菌血症期间血管病变、血栓形成和炎症的发生具有明显的保护作用。

[0298] ANGPTL4改善脑膜炎球菌感染的预后

[0299] 然后,我们研究了ANGPTL4是否改善了感染小鼠的结果(图8A)。在对照组小鼠中,通过静脉感染 1×10^6 个细菌,导致感染后18小时细菌血症持续上升,平均每毫升血液中的细菌数达到 10^6 至 5×10^6 个(图8B),并且所有小鼠在两天内死亡(感染后20至40h)(图8C)。感染后2h静脉注射重组人ANGPTL4(1 μ g/只小鼠,静脉注射)后,感染后4h和18h的菌血症与赋形剂治疗的对照小鼠相似(图8B),ANGPTL4治疗的小鼠在稍后的时间点(30h至50h之间)死亡,15%的小鼠在感染后存活(图8C)。与受感染的对照移植植物不同,其中人类皮肤血管大量定植,管腔内血栓闭塞,在死亡时(感染后20至40h)出现内皮完整性受损的迹象,来自ANGPTL4治疗移植植物的人类皮肤血管血栓形成和血管渗漏的迹象减少(数据未显示)。

[0300] 然后,我们分析了ANGPTL4在与抗生素一起使用时是否可以提供有益的效果。如前所述[20],抗生素(200mg kg⁻¹头孢噻肟)治疗产生了强烈的杀菌效果(图8B),并与对小鼠存活率相关(图8C),但它并不能防止感染后4h触发的血栓形成(图8D),也不能防止感染后72h红细胞外渗和多形核中性粒细胞大量浸润相关的血管病变(数据未显示)。在与抗生素联合使用ANGPTL4治疗后,感染的血管出现了纤溶作用的迹象,与较小的血栓、巨噬细胞浸润和血管完整性保持相关,这是血栓溶解的标志(数据未显示)。总之,这些数据表明ANGPTL4对恢复血管通畅性和降低与脑膜炎球菌感染相关的病理和死亡率具有有益作用。他们还通过减少血管的病变证明了ANGPTL4对抗生素治疗的辅助作用。

[0301] ANGPTL4通过预防血管功能障碍和器官衰竭来预防致命性脓毒症。

[0302] 由于严重的内皮功能障碍导致止血失调和血管功能障碍,是脓毒症进展为器官衰竭的核心,我们使用脂多糖(LPS)诱导的内毒素血症分析了ANGPTL4是否可以在脓毒症中发挥保护作用(图9A)。LPS攻击(5mg kg⁻¹, i.p.)后,所有小鼠在两天内死亡(图9B)。与赋形剂治疗的对照组小鼠相比,注射重组人ANGPTL4(2 μ g/只小鼠,静脉注射)显著降低了与脓毒症相关的死亡率,80%的小鼠在感染后存活下来(图9B)。与赋形剂处理的对照组相比,ANGPTL4处理组的总体体重下降没有显著降低,但ANGPTL4治疗组的体温迅速稳定(数据未显示)。

[0303] 然后,我们评估了ANGPTL4对LPS激发后18h对LPS诱导的急性肺和肾损伤的影响。

LPS诱导后,用赋形剂处理的对照小鼠肺部出现明显的组织病理学变化,包括血管壁增厚、肺泡囊塌陷和肺泡内出血,而ANGPTL4处理的小鼠肺部没有观察到病理学体征(数据未显示)。同样,虽然LPS在赋形剂处理的对照小鼠中诱导了严重的肾出血,但在ANGPTL4处理的小鼠中没有检测到出血迹象(数据未显示)。这些数据表明,ANGPTL4通过预防严重的内皮功能障碍和器官衰竭和死亡的进展,对LPS诱导的急性肺和肾损伤提供了有效的保护。正如预期的那样,施用nANGPTL4(2 μ g/小鼠,静脉注射)和衍生肽P1或P9与全长蛋白一样有效地降低了脓毒症相关的死亡率(图9C-9F,9G),而施用cANGPTL4或肽P10(2 μ g/小鼠,静脉注射液)并没有显著提高存活率(数据未显示),这进一步证实了这种作用依赖于ANGPTL4的N-末端部分保持血管完整性的能力。与之形成鲜明对比的是,LPS攻击(4mg kg⁻¹,i.p.)并没有损害BBB的完整性,这是通过LPS治疗的小鼠大脑中缺乏伊文思蓝染料外渗来评估的(图9H)。用抗ANGPTL4阻断抗体(10 μ g kg⁻¹,i.v)与LPS联合处理诱导了明显的伊文思蓝染料外渗(图9H),表明中枢神经系统水平内源性ANGPTL4的产生可以防止LPS诱导的血脑屏障破坏。

[0304] 总的来说,这些结果表明ANGPTL4是一种主要的血管稳定因子,可以保护细菌感染。使用人重组ANGPTL4(或衍生肽)可以降低细菌性疾病中血管病变、血管内凝血的发生率,并减脓毒症的严重死亡人数。

[0305] 参考文献:

[0306] 在本申请中,各种参考文献描述了本发明所属的现有技术。这些参考文献的公开内容通过引用并入本公开。

[0307] 1.Cavaillon,J.M.,M.Singer,and T.Skirecki,Sepsis therapies:learning from 30years of failure of translational research to propose new leads.EMBO Mol Med,2020.12(4):p.e10128.

[0308] 2.Jarczak,D.,S.Kluge,and A.Nierhaus,Sepsis-Pathophysiology andTherapeutic Concepts.Front Med(Lausanne),2021.8:p.628302.

[0309] 3.Angus,D.C.and T.van der Poll,Severe sepsis and septic shock.N Engl JMed,2013.369(21):p.2063.

[0310] 4.Coureuil,M.,et al.,Invasive meningococcal disease:a disease of theendothelial cells.Trends Mol Med,2014.20(10):p.571-8.

[0311] 5.Coureuil,M.,et al.,AJourney into the brain:insight into how bacterialpathogens cross blood-brain barriers.Nat Rev Microbiol,2017.15(3): p.149-159.

[0312] 6.Wolburg,H.and A.Lippoldt,Tight junctions of the blood-brain barrier:development,composition and regulation.Vascul Pharmacol,2002.38(6): p.323-37.

[0313] 7.Abbott,N.J.,et al.,Structure and function of the blood-brain barrier.Neurobiol Dis,2010.37(1):p.13-25.

[0314] 8.Daneman,R.,et al.,Pericytes are required for blood-brain barrier integrityduring embryogenesis.Nature,2010.468(7323):p.562-6.

[0315] 9.Abbott,N.J.,L.Ronnback,and E.Hansson,Astrocyte-endothelialinteractions at the blood-brain barrier.Nat Rev Neurosci,2006.7

(1):p.41-53.

[0316] 10.Caugant,D.A.and M.C.Maiden,Meningococcal carriage and disease--population biology and evolution.Vaccine,2009.27 Suppl 2:p.B64-70.

[0317] 11.Mairey,E.,et al.,Cerebral microcirculation shear stress levels determine *Neisseria meningitidis* attachment sites along the blood-brain barrier.J Exp Med,2006.203(8):p.1939-50.

[0318] 12.Pron,B.,et al.,Interaction of *Neisseria meningitidis* with the components of the blood-brain barrier correlates with an increased expression of PilC.J Infect Dis,1997.176(5):p.1285-92.

[0319] 13.Yang,X.,Y.Cheng,and G.Su,A review of the multifunctionality of angiopoietin-like 4 in eye disease.Biosci Rep,2018.38(5).

[0320] 14.Chong,H.C.,et al.,Angiopoietin-like 4 stimulates STAT3-mediated iNOS expression and enhances angiogenesis to accelerate wound healing in diabetic mice.Mol Ther,2014.22(9):p.1593-604.

[0321] 15.Le Jan,S.,et al.,Angiopoietin-like 4 is a proangiogenic factor produced during ischemia and in conventional renal cell carcinoma.Am J Pathol, 2003.162(5):p.1521-8.

[0322] 16.Huang,R.L.,et al.,ANGPTL4 modulates vascular junction integrity by integrin signaling and disruption of intercellular VE-cadherin and claudin-5 clusters.Blood,2011.118(14):p.3990-4002.

[0323] 17.Li,L.,et al.,Angiopoietin-like 4 Increases Pulmonary Tissue Leakiness and Damage during Influenza Pneumonia.Cell Rep,2015.10(5):p.654-663.

[0324] 18.Zhang,B.,et al.,Protective effects of angiopoietin-like 4 on the blood-brain barrier in acute ischemic stroke treated with thrombolysis in mice.Neurosci Lett,2017.645:p.113-120.

[0325] 19.Galaup,A.,et al.,Angiopoietin-like 4 prevents metastasis through inhibition of vascular permeability and tumor cell motility and invasiveness.Proc Natl Acad Sci U S A,2006.103(49):p.18721-6.

[0326] 20.Bouletti,C.,et al.,Protective effects of angiopoietin-like 4 on cerebrovascular and functional damages in ischaemic stroke.Eur Heart J, 2013.34(47):p.3657-68.

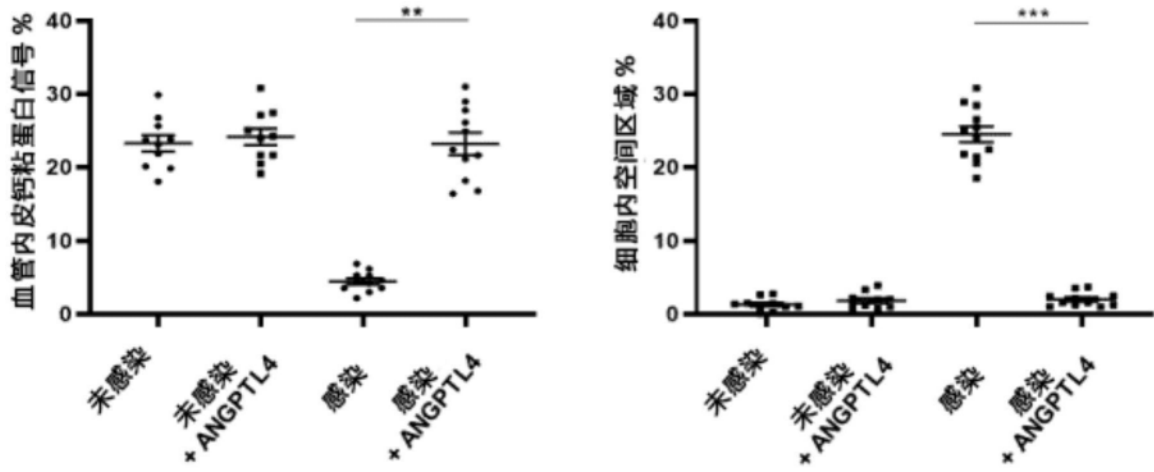


图1A

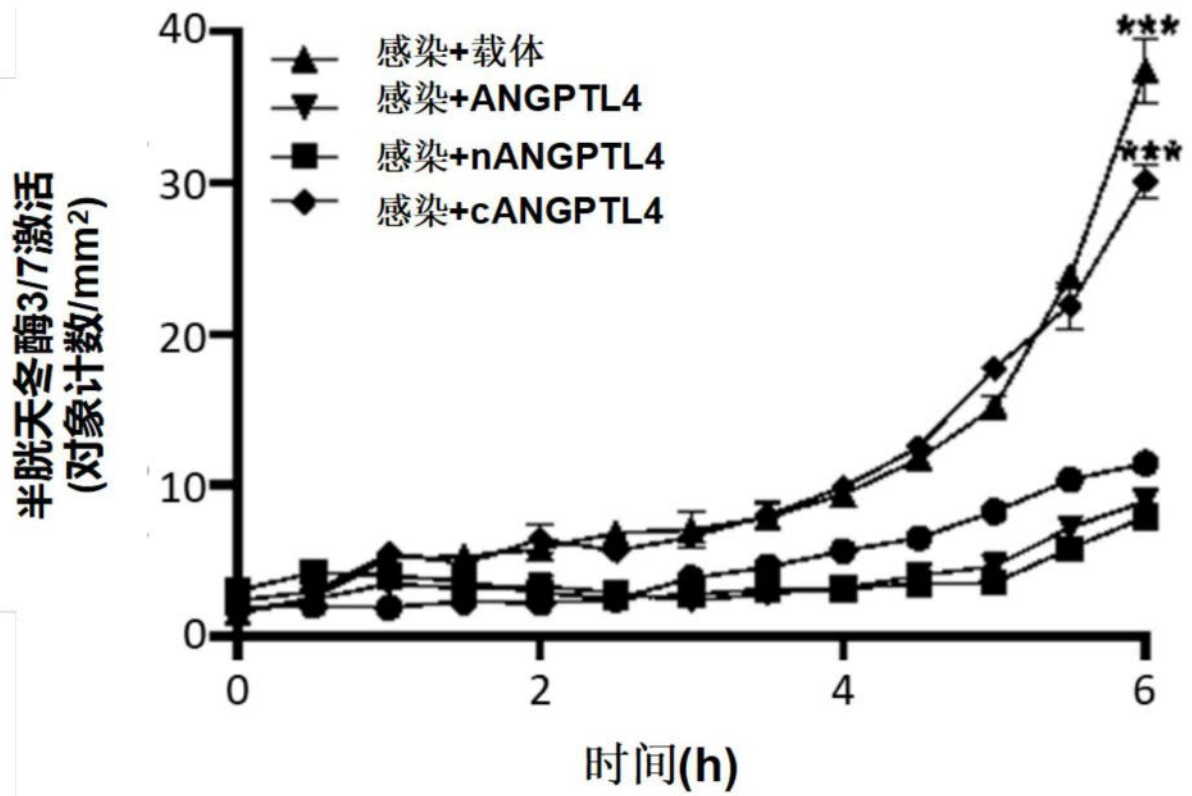


图1B

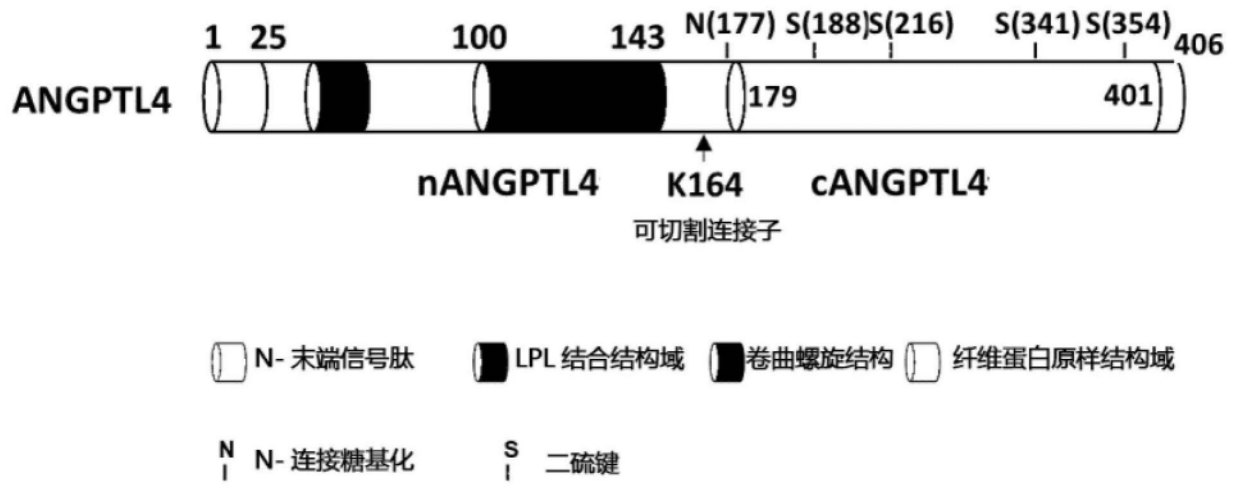


图2A

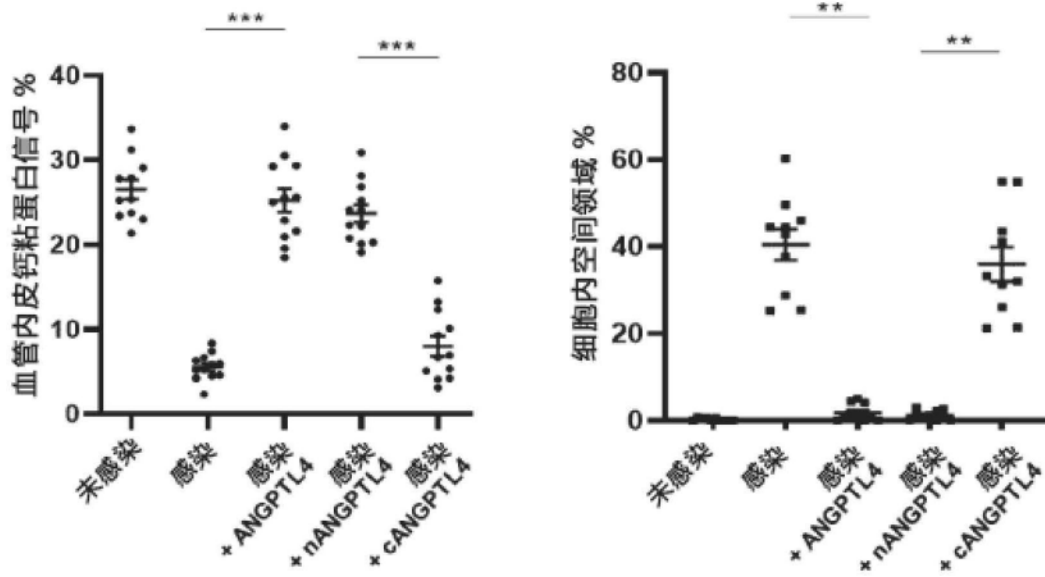


图2B

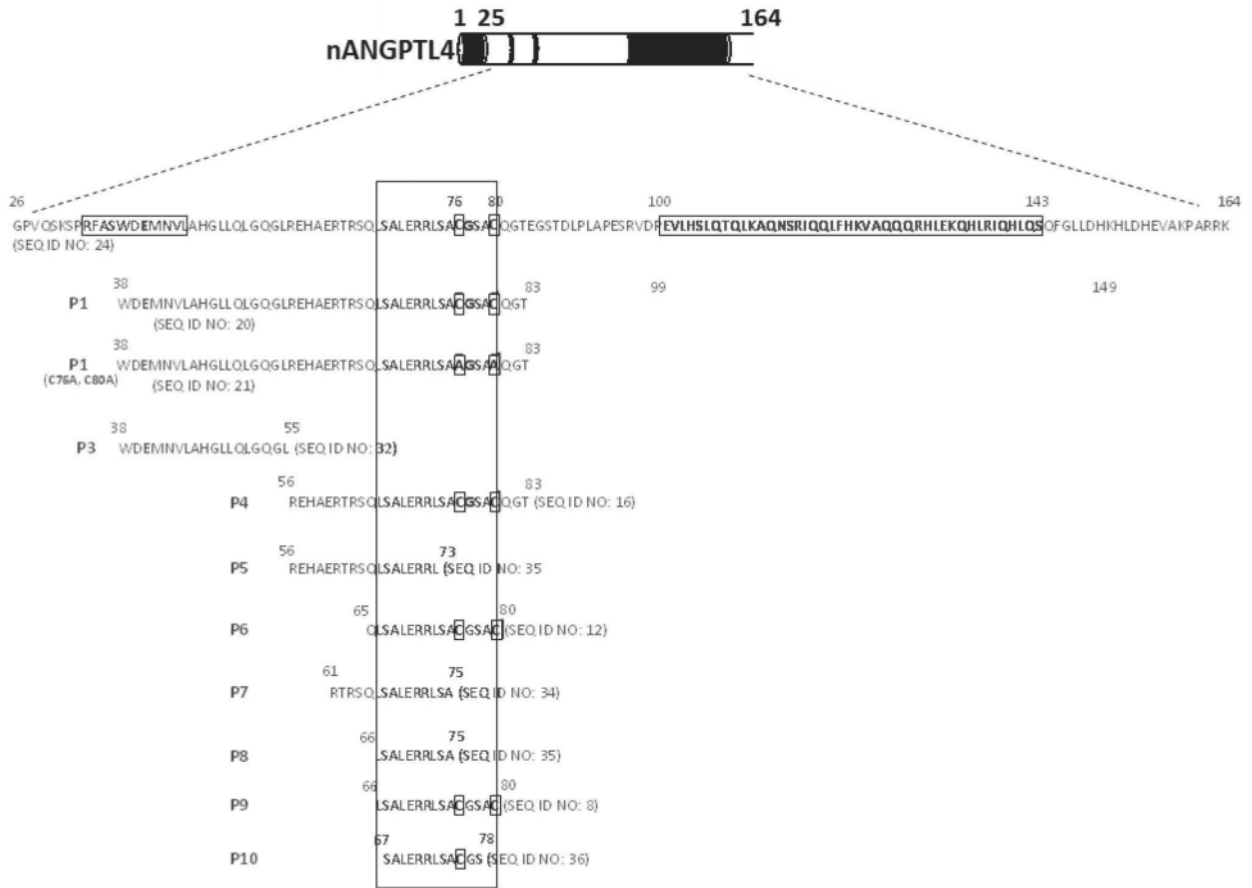


图3A

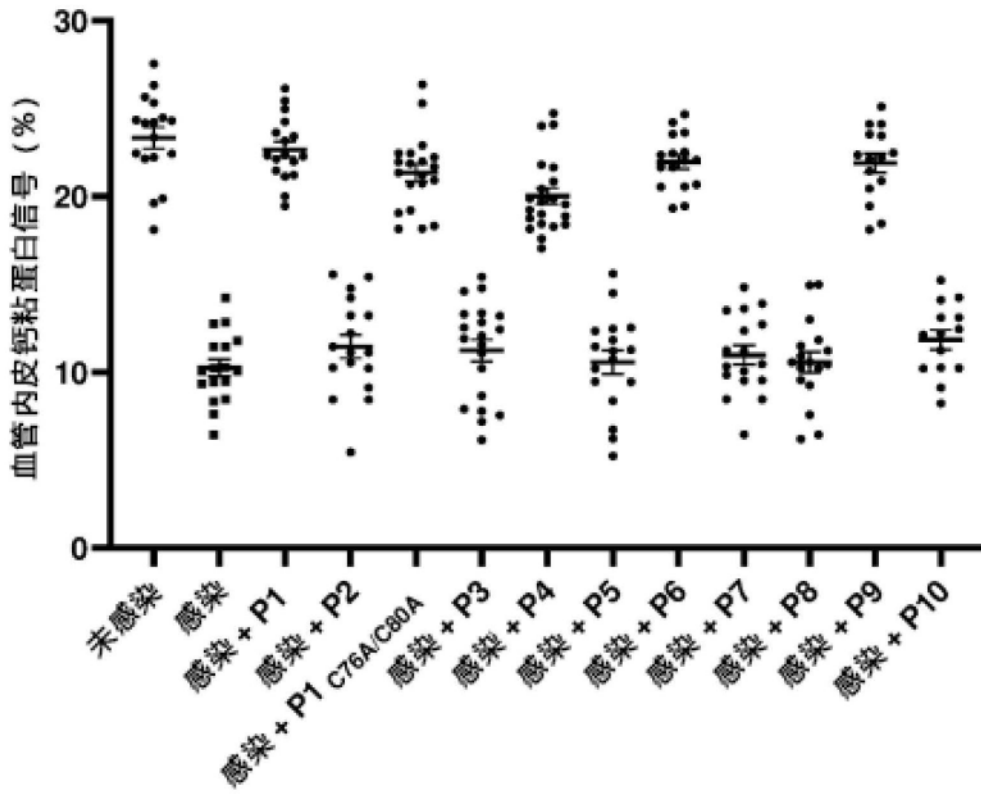


图3B

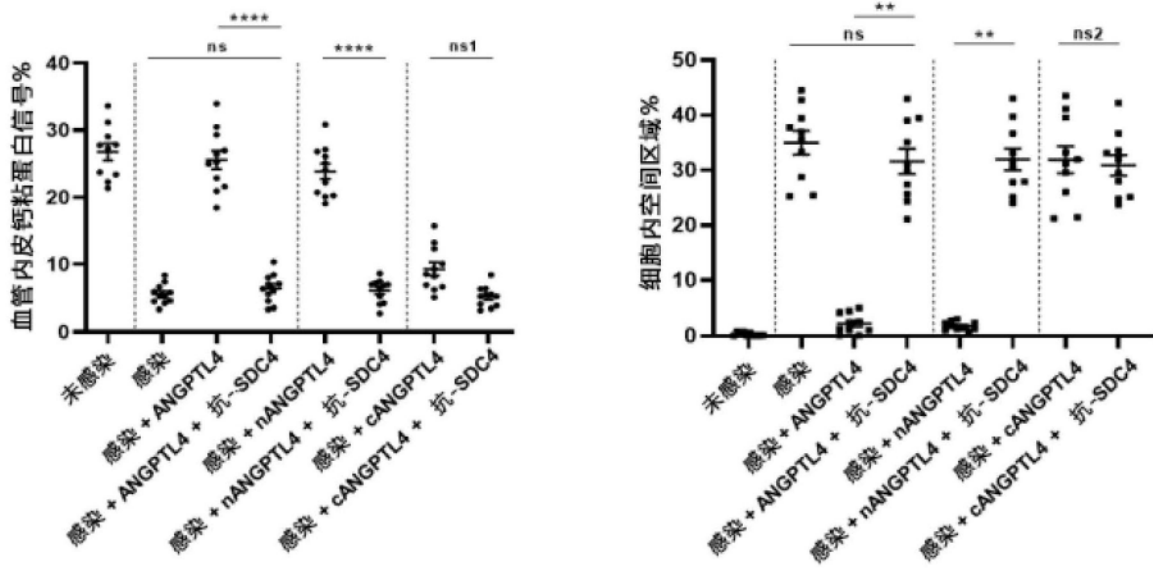


图4A

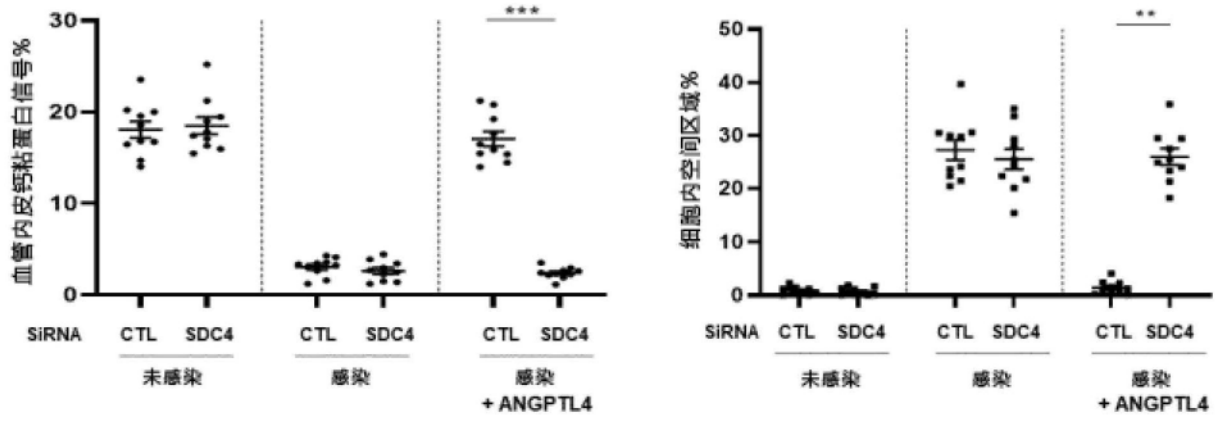


图4B

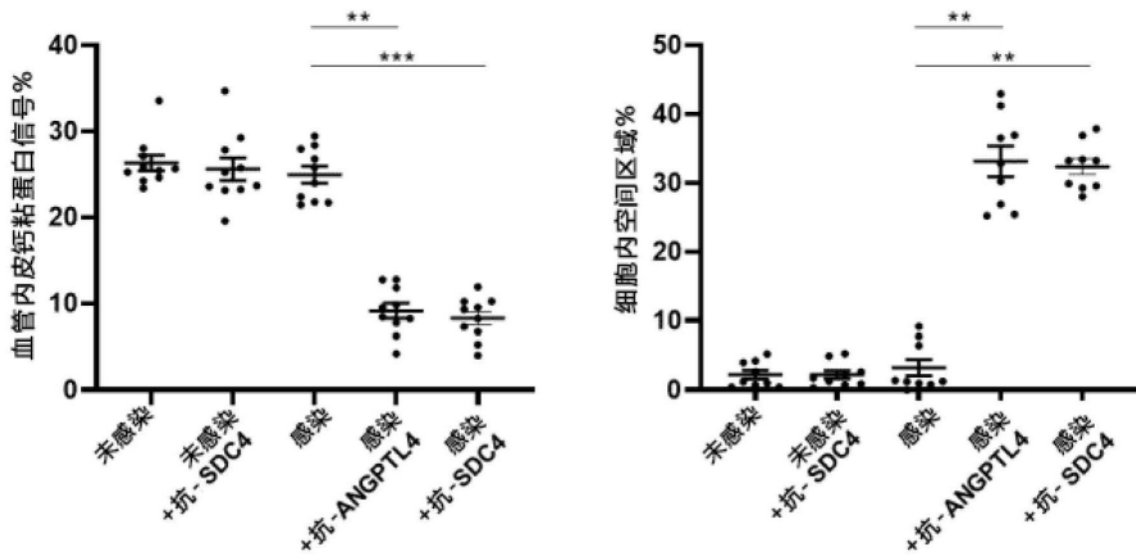


图5A

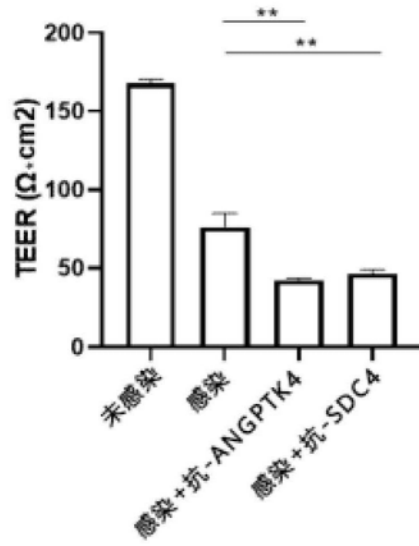


图5B

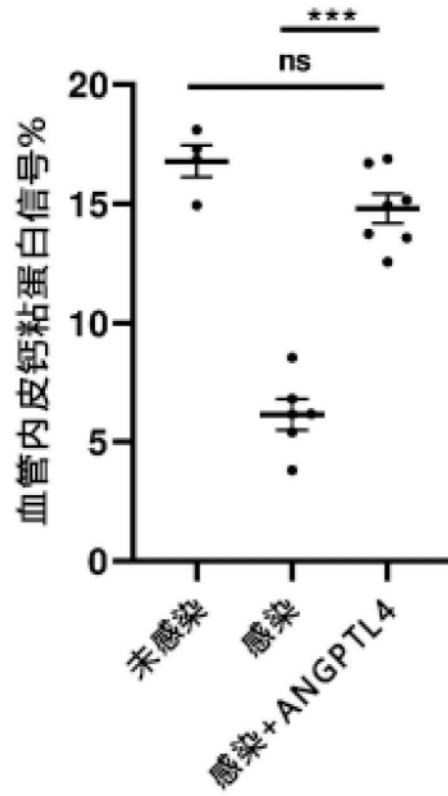


图6

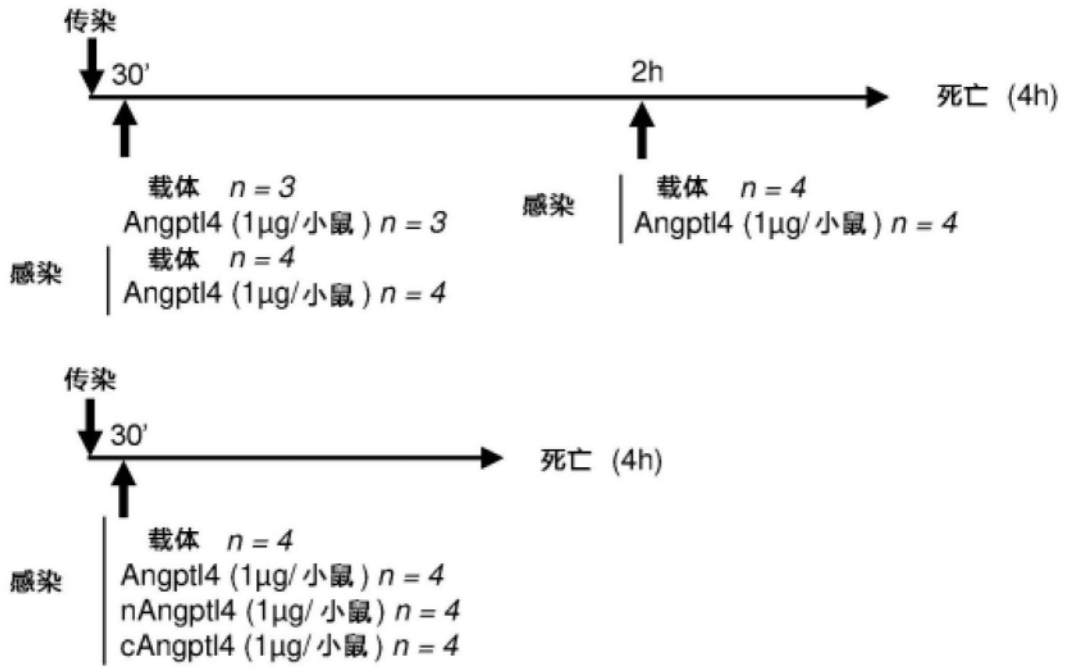


图7A

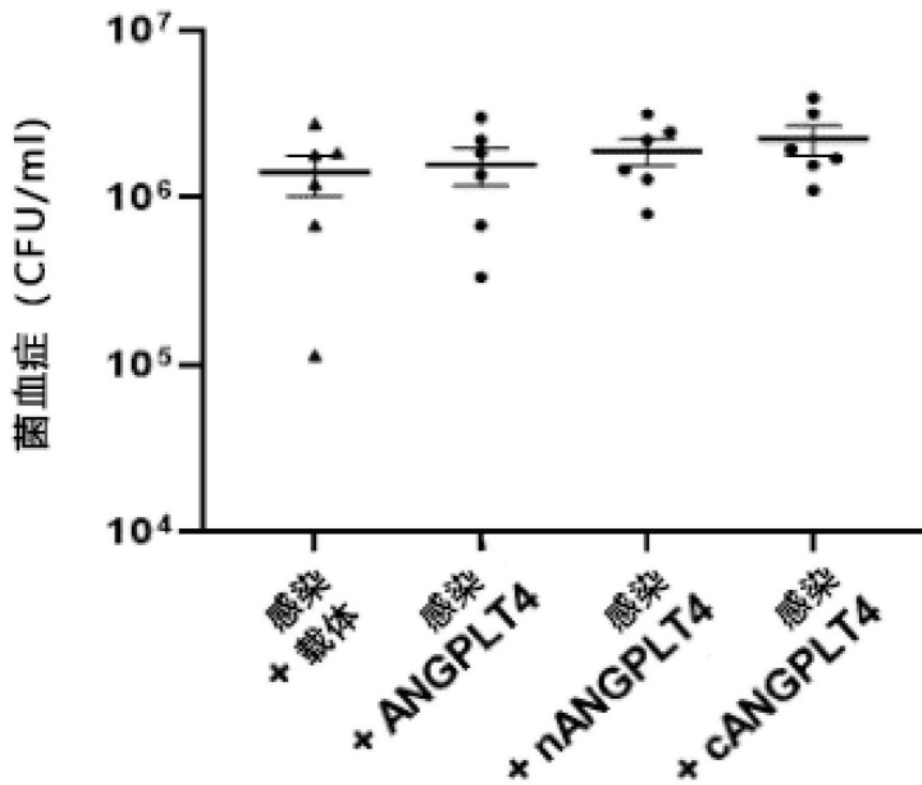


图7B

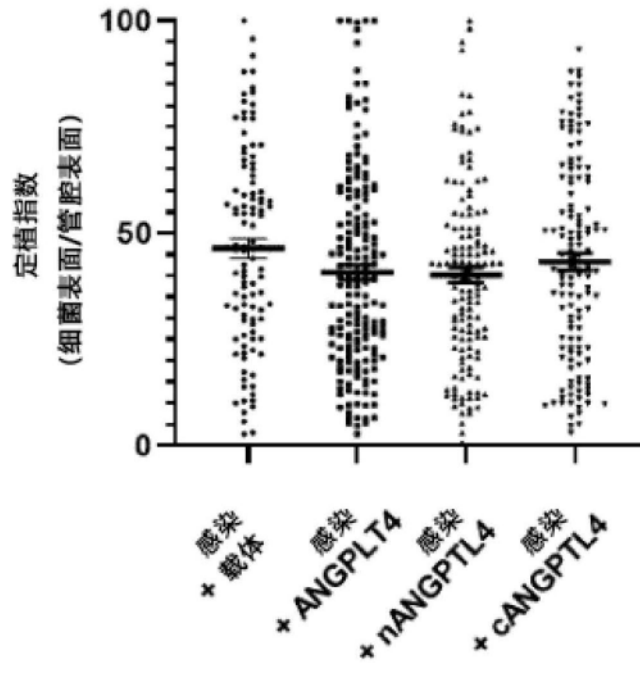


图7C

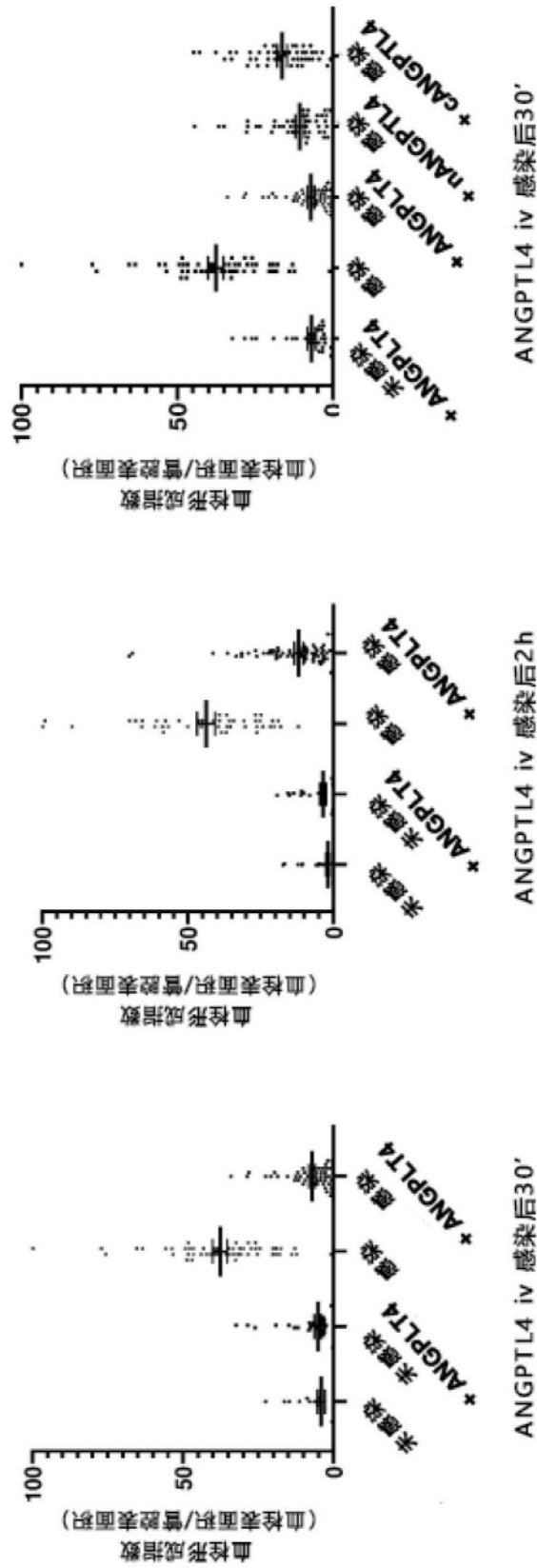


图7D

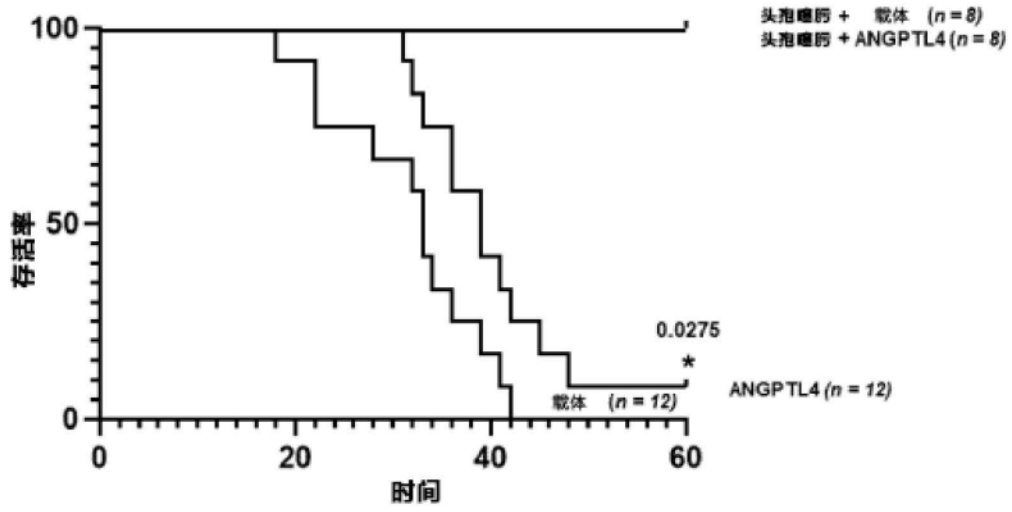


图8C

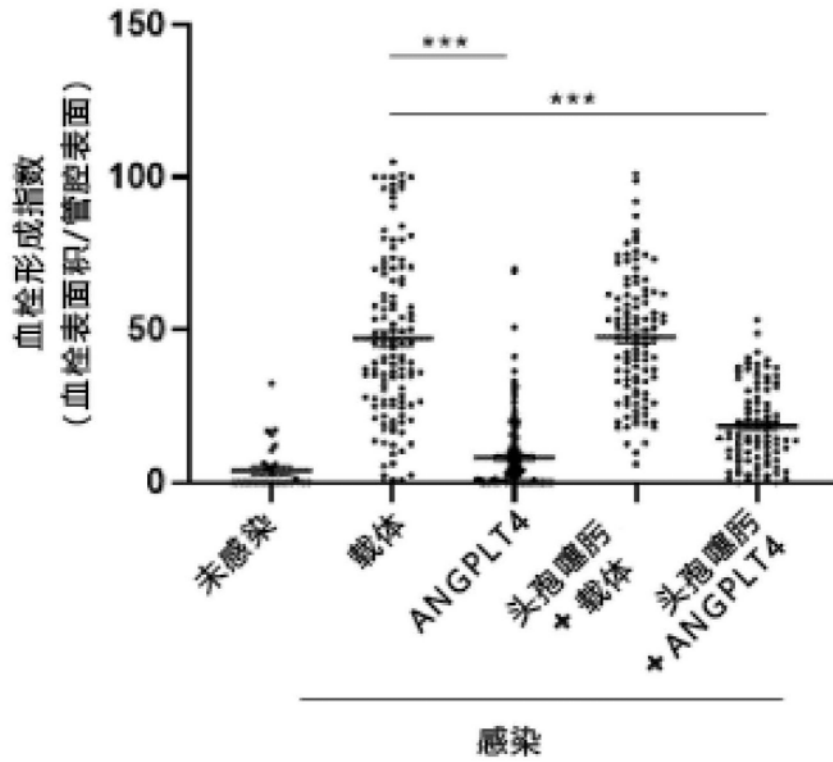


图8D

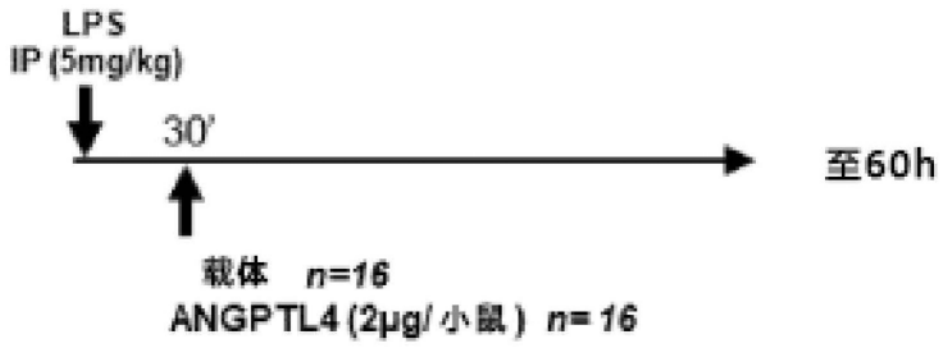


图9A

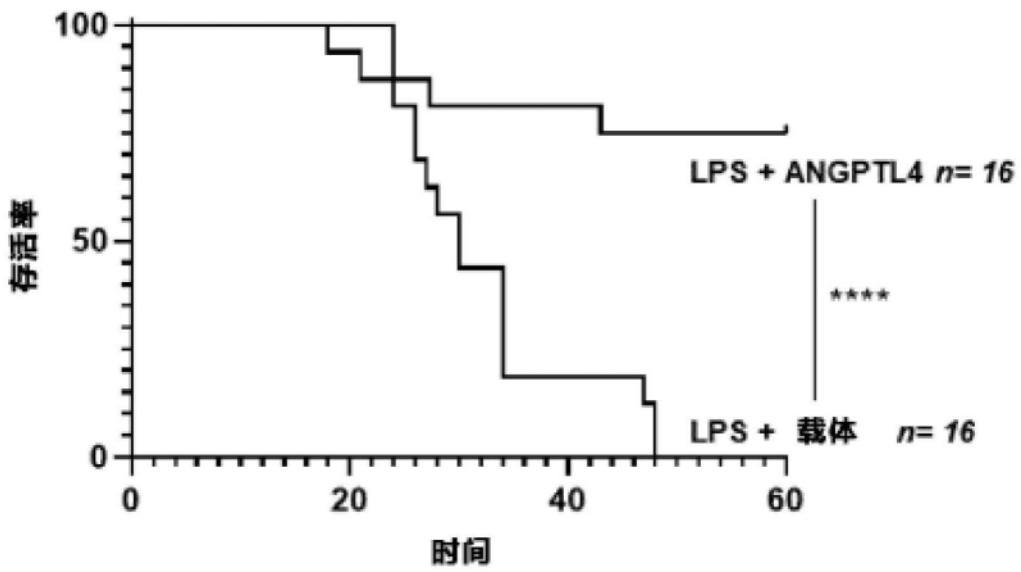


图9B

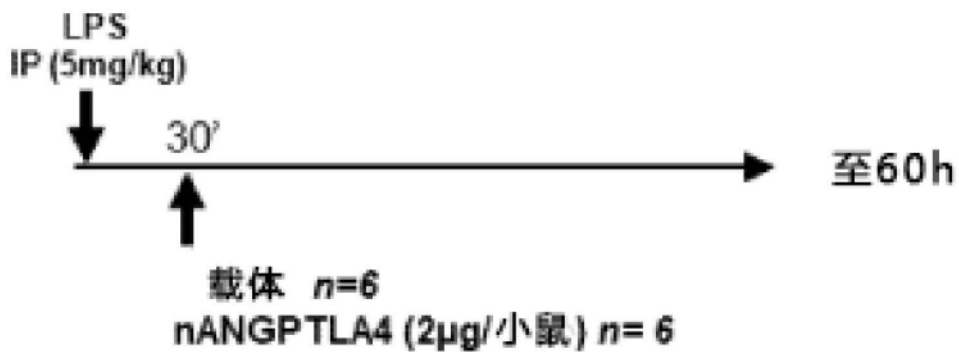


图9C

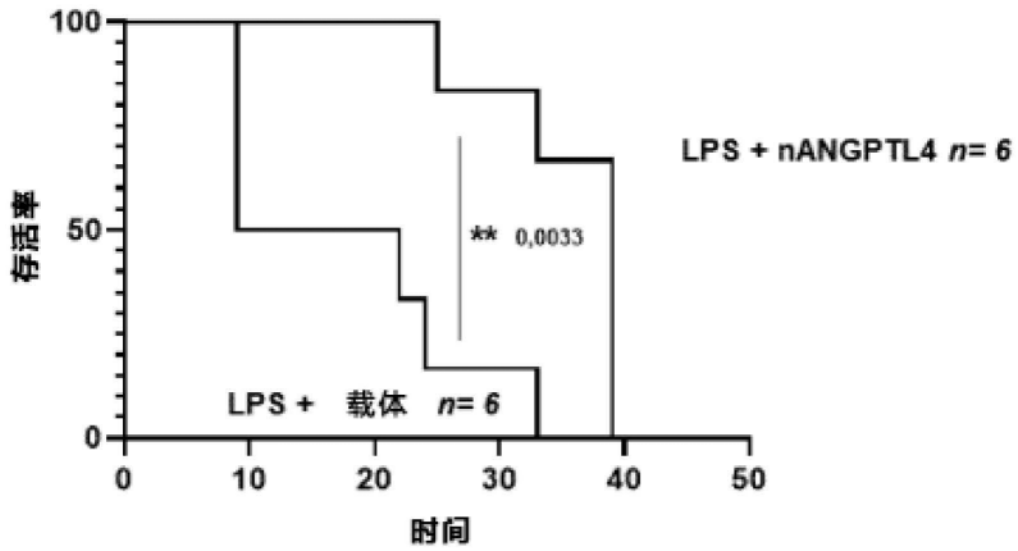


图9D

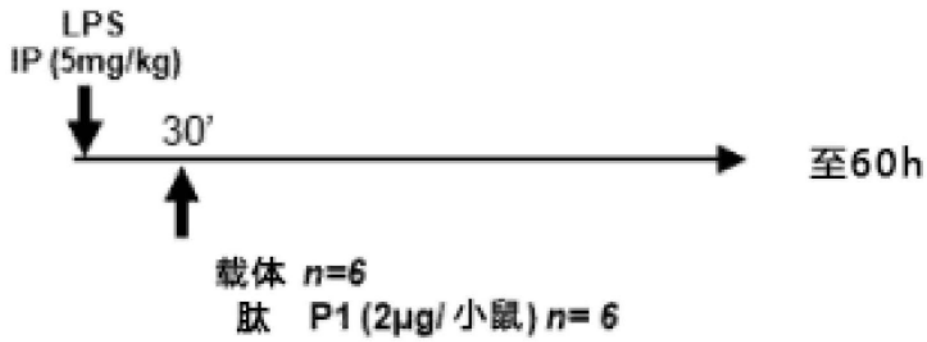


图9E

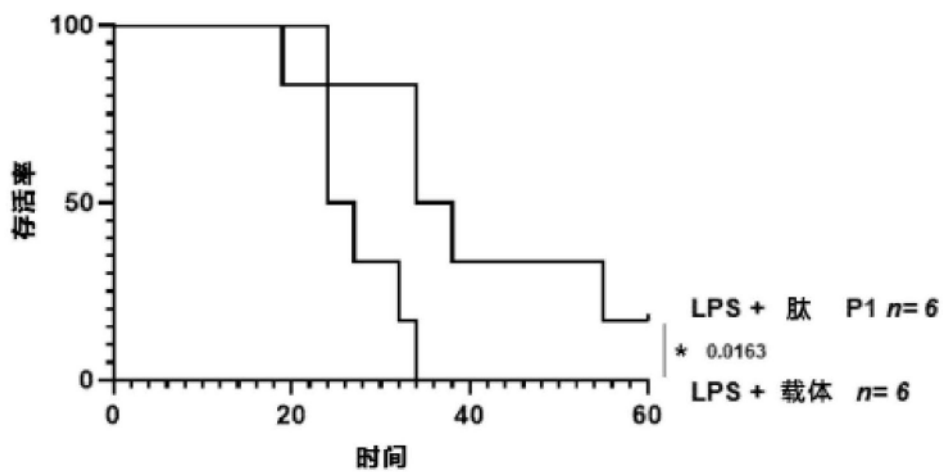


图9F

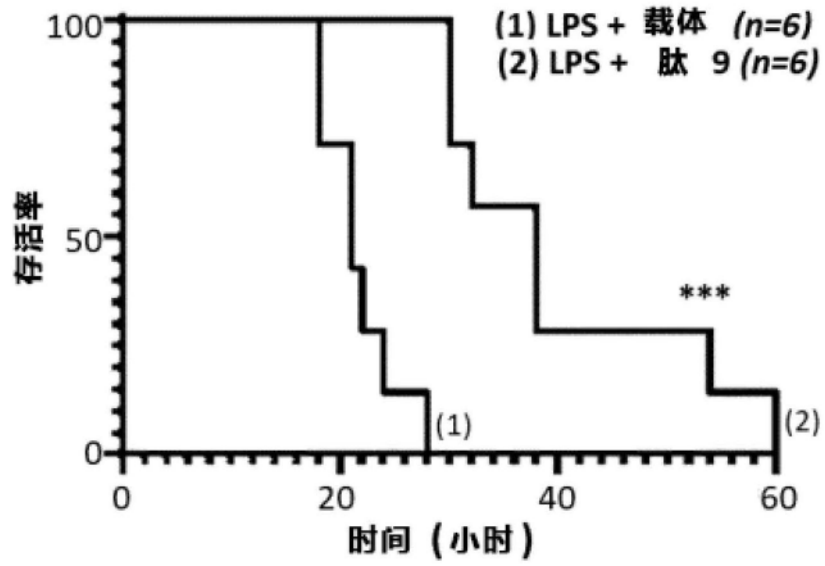


图9G

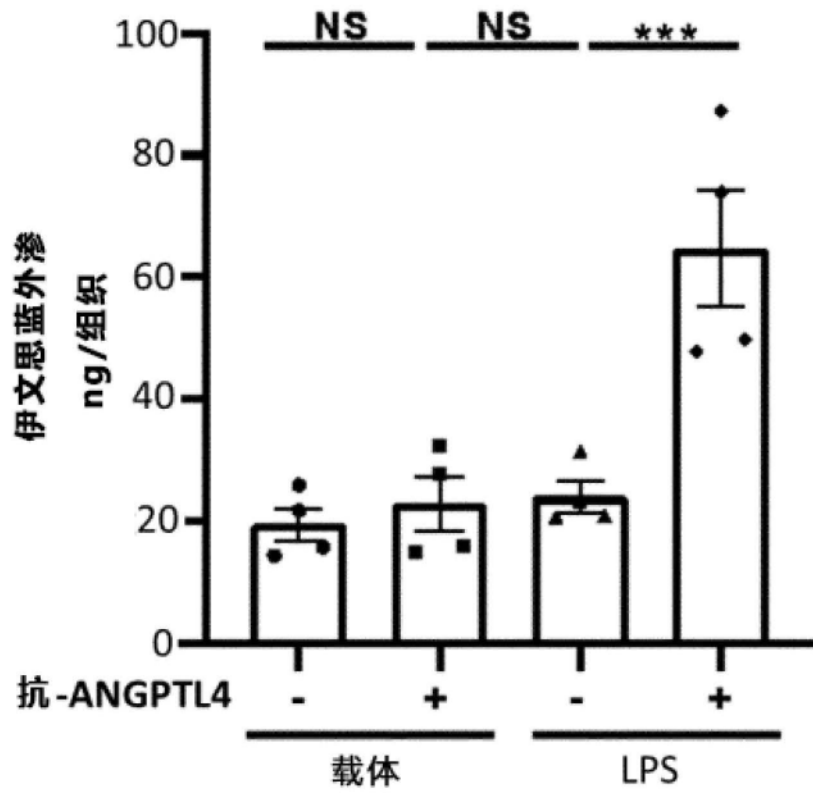


图9H