



(12) 发明专利



(10) 授权公告号 CN 107849117 B

(45) 授权公告日 2022. 08. 26

(21) 申请号 201680044858.5

M • 麦吉 R • B • 霍尔茨

(22) 申请日 2016.06.03

(74) 专利代理机构 北京律盟知识产权代理有限公司
11287

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 107849117 A

专利代理师 王允方

(43) 申请公布日 2018.03.27

(51) Int.Cl.
C07K 14/78 (2006.01)

(30) 优先权数据
62/171,889 2015.06.05 US
62/257,607 2015.11.19 US

(56) 对比文件
WO 2011050311 A1,2011.04.28
CN 103890003 A,2014.06.25
Yukie Yamaguchi等.A Peptide Derived
from Endostatin Ameliorates Organ
Fibrosis.《Sci Transl Med》.2013,第4卷(第
136期),全文.

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2018.01.26

Ying Wan等.The anti-fibrotic effect
of betulinic acid is mediated through the
inhibition of NF-κB nuclear protein
translocation.《Chemico-biological
interactions》.2012,第195卷(第3期),全文.

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2016/035858 2016.06.03

(87) PCT国际申请的公布数据
W02016/197018 EN 2016.12.08

(73) 专利权人 艾比欧公司
地址 美国纽约州
专利权人 诺维奇生物科技有限责任公司
MUSC研究发展基金会

审查员 李颖

(72) 发明人 C • 费加利-博斯特威克
T • E • 瑞安 H • S • 帕吉特

权利要求书2页 说明书67页
序列表26页 附图40页

(54) 发明名称
用于治疗纤维化的内皮抑素片段和变体

(57) 摘要
本文中描述了使用含有内皮抑素的片段和
变体的多肽治疗纤维化的材料和方法。

1. 一种产生经分离的具有抗纤维化活性的融合多肽的方法,其中所述融合多肽由SEQ ID NO:16组成,所述方法包含:

将包含聚核苷酸的植物病毒载体引入到植物中,所述聚核苷酸编码SEQ ID NO:16的具有抗纤维化活性的融合多肽。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述引入包含真空渗入。

3. 根据权利要求1所述的方法,另外包含收获所述植物,其中所述植物包含具有抗纤维化活性的所述融合多肽。

4. 根据权利要求1所述的方法,另外包含提取SEQ ID NO:16的所述融合多肽。

5. 根据权利要求1所述的方法,另外包含纯化从所述植物提取的具有抗纤维化活性的SEQ ID NO:16的所述融合多肽。

6. 一种产生可溶的融合多肽的高分子量多聚体的方法,所述融合多肽由SEQ ID NO:16组成,其中所述融合多肽具有抗纤维化活性,所述方法包含:

(a) 将包括编码SEQ ID NO:16的所述融合多肽的聚核苷酸的植物病毒载体引入到植物中;

(b) 在一定条件维持所述植物并持续足够的时间以在至少一些植物细胞中表达所述聚核苷酸;并且

(c) 获得多个植物细胞的提取物。

7. 根据权利要求6所述的方法,其中所述植物是转基因植物。

8. 根据权利要求6所述的方法,其中所述植物是豆科植物、禾本科植物、茄科植物、伞形科植物、菊科植物或十字花科植物。

9. 根据权利要求8所述的方法,其中所述茄科植物包含番茄属植物、茄属植物、辣椒属植物或烟草属植物。

10. 根据权利要求6所述的方法,其中所述聚核苷酸可操作地连接于异源启动子。

11. 根据权利要求6所述的方法,其中所述聚核苷酸可操作地连接于在成熟植物、幼苗、萌芽或种子中表达的启动子。

12. 根据权利要求11所述的方法,其中所述植物是转基因植物。

13. 根据权利要求11所述的方法,其中所述引入包含真空渗入。

14. 根据权利要求11所述的方法,另外包含从所述植物细胞提取SEQ ID NO:16的所述融合多肽。

15. 根据权利要求11所述的方法,另外包含纯化来自所述提取物的SEQ ID NO:16的所述融合多肽。

16. 根据权利要求11所述的方法,其中所述聚核苷酸可操作地连接于异源启动子。

17. 根据权利要求11所述的方法,其中所述聚核苷酸可操作地连接于在成熟植物、幼苗、萌芽或种子中表达的启动子。

18. 根据权利要求11所述的方法,其中所述植物是豆科植物、禾本科植物、茄科植物、伞形科植物、菊科植物或十字花科植物。

19. 根据权利要求18所述的方法,其中所述茄科植物包含番茄属植物、茄属植物、辣椒属植物或烟草属植物。

20. 一种产生包含核酸表达载体的转基因植物的方法,所述核酸表达载体包含编码由

SEQ ID NO:16组成的融合多肽的聚核苷酸。

21. 根据权利要求20所述的方法,其中所述植物是豆科植物、禾本科植物、茄科植物、伞形科植物、菊科植物或十字花科植物。

22. 根据权利要求21所述的方法,其中所述茄科植物包含番茄属植物、茄属植物、辣椒属植物或烟草属植物。

23. 一种根据由SEQ ID NO:16所示的序列组成的融合多肽在制造用于在个体中治疗纤维化的药剂中的用途。

用于治疗纤维化的内皮抑素片段和变体

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2015年6月5日提交的美国临时申请第62/171,889号和2015年11月19日提交的美国临时申请第62/257,607号的优先权。

技术领域

[0003] 本文件涉及用于治疗纤维化的材料和方法,并且具体来说,涉及含有内皮抑素的片段和变体的多肽用于治疗纤维化的用途。

背景技术

[0004] 内皮抑素,一种对应于胶原蛋白18的C端的183个氨基酸的蛋白水解切割片段,具有抗肿瘤活性而没有毒性副作用(奥莱利(O'Reilly)等人(1997)细胞(Cell),88:277-285;基斯克(Kisker)等人(2001)癌症研究(Cancer Res),61:7669-7674;达汗巴尔(Dhanabal)等人(1999)癌症研究,59:189-197;尹(Yoon)等人(1999)癌症研究,59:6251-6256;佛克曼(Folkman)和卡卢里(Kalluri), (2003)癌症医学(Cancer Medicine),第6版,第161-194页.哈密尔顿:B.C.德克尔公司(Hamilton:B.C.Decker Inc.)).已经报道了这种蛋白质的许多抗血管生成活性,例如抑制内皮细胞增殖、迁移和小管形成。这种活性已经定位于内皮抑素的N端区。内皮抑素还抑制血管内皮生长因子(VEGF)诱导的血管通透性(高桥(Takahashi)等人(2003)美国实验生物学会联合会杂志(Faseb J),17:896-898)。内皮抑素通过结合于 $\alpha 5\beta 1$ 整合素抑制粘附斑激酶的磷酸化来抑制内皮细胞迁移(威克斯特龙(Wickstrom)等人(2002)癌症研究,62:5580-5589)。也已经表明,细胞表面磷脂酰肌醇蛋白聚糖是低亲和力的内皮抑素受体(卡鲁曼希(Karumanchi)等人(2001)分子细胞(Mol Cell),7:811-822)。内皮抑素已牵涉数个信号传导途径,如下调c-myc(七里(Shichiri)和平田(Hirata)(2001)美国实验生物学会联合会杂志,15:1044-1053)、细胞周期素-D1(花井(Hanai)等人(2002)生物化学杂志(J Biol Chem),277:16464-16469)和RhoA活性(威克斯特龙等人(2003)生物化学杂志,278:37895-37901)、阻断VEGF信号传导(哈吉斗(Hajitou)等人(2002)美国实验生物学会联合会杂志,16:1802-1804;金(Kim)等人(2002)生物化学杂志,277:27872-27879)和抑制wnt信号传导路径(花井等人(2002)细胞生物学杂志(J Cell Biol),158:529-539)。另外,已显示内皮抑素结合金属蛋白酶并使其失活(金等人(2000)癌症研究,60:5410-5413;尼贝里(Nyberg)等人(2003)生物化学杂志,278:22404-22411;李(Lee)等人(2002)欧洲生物化学学会联合会快报(FEBS Lett),519:147-152)并调节抑制血管生成的基因谱(阿卜杜拉汗(Abdollahi)等人(2004)分子细胞,13:649-663)。

[0005] 已经拆分了鼠类和人类内皮抑素的晶体结构(霍恩内斯特(Hohenester)等人(1998)欧洲分子生物学杂志(Embo J),17:1656-1664;丁(Ding)等人(1998)美国国家科学院院刊(Proc Natl Acad Sci USA),95:10443-10448),并且显示了在结晶所需的高浓度下非共价保留的二聚体(丁等人(1998)美国国家科学院院刊,95:10443-10448)。两个二硫键的存在产生高度折叠的结构。内皮抑素通过分子N端的三个组氨酸(组氨酸1、3和11)和天冬

氨酸76结合每个单体的一个锌原子。内皮抑素的肝素结合特性由聚集在分子的三维球状表面上的不连续的精氨酸介导(佐佐木(Sasaki)等人(1999)欧洲分子生物学杂志,18:6240-6248)。

[0006] 由器官成纤维细胞过度沉积细胞外基质(ECM)组分,如纤连蛋白(FN)和I型胶原蛋白(Coll α 1),被定义为纤维化。器官纤维化是导致末期器官衰竭的许多疾病的最后共同途径。然而,针对器官纤维化的有效疗法仍然不可用(参见例如波拉克(Bjoraker)等人,美国呼吸与重症护理医学杂志(Am.J.Respir.Crit.Care.Med)2000;157:199-203)。不可控制的伤口愈合反应,包括急性和慢性炎症、血管生成、驻留细胞的活化和ECM重塑,被认为涉及纤维化的发病机理(温(Wynn),临床研究杂志(J Clin Invest)2007;117:524-29;卡卢里等人,肾病学与高血压现代观点(Curr Opin Nephrol Hypertension)2000;9:413-8)。TGF- β 是在纤维化器官中增加的原型纤维化细胞因子,并且通过刺激ECM分子的合成、将成纤维细胞活化成表达 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)的肌成纤维细胞并且下调基质金属蛋白酶(MMP)而促成纤维化的发展(参见例如布瑞腾(Branton)等人,微生物与感染(Microbes Infect)1999;1:1349-65)。尽管期望很高,单克隆抗TGF- β 抗体在早期系统性硬化症(SSc)患者中的临床试验未能显示出任何疗效(瓦尔加(Varga)等人,自然评论风湿病学(Nature Reviews Rheumatology)2009;5:200-6)。因此,仍然需要其它的纤维化治疗。

发明内容

[0007] 本文件至少部分基于开发具有抗纤维化活性的C端内皮抑素片段及其变体,以及开发在植物中产生这种片段和变体的方法和使用所述片段和变体治疗有需要的个体的纤维化的方法。

[0008] 本文件还至少部分基于以下发现:将含有内皮抑素的E3区(例如SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:13的氨基酸133-180)的基于内皮抑素的多肽连接于Ig-Fc多肽可以形成与典型肽-Fc融合蛋白不同的高分子量(HMW)多聚体。HMW形式可以在纯化(例如,通过超滤或切向流动过滤(TFF))方面提供优势,并且还可以用于纤维化的治疗。

[0009] 在一个方面,本文件的特征在于一种经分离的多肽,其中所述多肽包含SEQ ID NO:14,并且当投与有需要的个体时具有抗纤维化活性。经分离的多肽可以另外包括分泌序列、肽标签(例如,6His标签、含有KDEL多肽的标签或两者)、在SEQ ID NO:14的C端的Ala-Ser-Lys序列、和/或IgG Fc结构域(例如,IgG1Fc结构域,如人类IgG1Fc结构域)、SEQ ID NO:17的氨基酸27至43。所述多肽可以包含SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:17。所述多肽可以是高分子量多聚体。

[0010] 在另一方面,本文件的特征在于一种经分离的多肽,其中所述多肽(a)包含SEQ ID NO:2的氨基酸133至180和分泌序列、肽标签、KDEL序列、在SEQ ID NO:2的氨基酸133至180的C端的Ala-Ser-Lys序列、IgG Fc结构域和/或SEQ ID NO:17的氨基酸27至43中的一或多个;和(b)当投与有需要的个体时具有抗纤维化活性。所述多肽可以包含SEQ ID NO:15。

[0011] 在另一方面,本文件的特征在于一种经分离的多肽,其中所述多肽(a)包含SEQ ID NO:13的氨基酸133至180和分泌序列、肽标签、KDEL序列、在SEQ ID NO:2的氨基酸133至180的C端的Ala-Ser-Lys序列、IgG Fc结构域和/或SEQ ID NO:17的氨基酸27至43中的一或多个;和(b)当投与有需要的个体时具有抗纤维化活性。

[0012] 在另一方面,本文件的特征在于一种编码如本文所公开的多肽的经分离的聚核苷酸,其中所述聚核苷酸可操作地连接于异源启动子。本文件的特征还在于一种含有所述经分离的聚核苷酸的表达载体。所述表达载体可以是启动载体(例如,病毒启动载体)。另外,本文件的特征在于一种包含所述表达载体的根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)细胞。

[0013] 在另一方面,本文件的特征在于包含SEQ ID NO:14并且当投与有需要的个体时具有抗纤维化活性的高分子量多聚体。

[0014] 在另一方面,本文件的特征在于一种医药组合物,其含有(a)如本文所述的多肽和/或多聚体,和(b)医药学上可接受的载剂。

[0015] 本文件的特征还在于一种用于制造如本文所公开的具有抗纤维化活性的多肽的方法。所述方法可以包括(a)将包括编码权利要求1、权利要求12、权利要求13或权利要求15的具有抗纤维化活性的多肽的聚核苷酸的植物病毒载体引入到植物中;和(b)在一定条件维持所述植物并持续足够的时间以在至少一些植物细胞中表达所述聚核苷酸。在一些实施例中,所述方法可以包括(a)将(i)包括来自第一植物病毒的功能性外壳蛋白编码组分的运载载体,和(ii)包括编码具有抗纤维化活性的多肽的聚核苷酸和至少一个来自第二植物病毒的组分、但缺乏功能性外壳蛋白基因的生产载体;或(i)包括来自第一植物病毒的功能性移动蛋白编码组分的运载载体,和(ii)包括编码具有抗纤维化活性的多肽的聚核苷酸和至少一个来自第二植物病毒的组分、但缺乏功能性移动蛋白基因的生产载体;或(i)包括来自第一植物病毒的功能性外壳蛋白编码组分的运载载体,和(ii)包括编码具有抗纤维化活性的多肽的聚核苷酸和至少一个来自第二植物病毒的组分、但缺乏通常在第二植物病毒中发现的一或多个功能性复制蛋白基因的生产载体引入到植物中; (b)在一定条件下维持所述植物并持续足够的时间以允许所述运载载体补充所述生产载体,使得所述生产载体在所述植物中系统性地移动;和(c)在一定条件维持所述植物并持续足够的时间以在至少一些植物细胞中表达所述聚核苷酸。

[0016] 引入步骤可以包括真空渗入。所述方法可以进一步包括收集植物,其中所述植物包含具有抗纤维化活性的多肽;从所述植物提取具有抗纤维化活性的多肽;和/或纯化具有抗纤维化活性的多肽。

[0017] 在另一方面,本文件的特征在于一种治疗具有纤维化的个体的方法。所述方法可以包括选择具有纤维化的个体,并且向所述个体投与治疗有效量的如本文所述的多肽,由此治疗具有纤维化的个体。所述个体可以具有肺纤维化。所述方法可以进一步包括向所述个体投与治疗有效量的另一种治疗剂(例如,选自以下组成的群组的治疗剂:皮质类固醇、免疫抑制剂、乙酰半胱氨酸、d-青霉胺(d-penicillamine)、秋水仙碱(colchicine)、松弛素(Relaxin)、类固醇、环孢霉素(cyclosporine)、甲氨蝶呤(methotrexate)、环磷酰胺(cyclophosphamide)、硫唑嘌呤(azathioprine)、霉酚酸酯(mycophenolate)、格列酮(glitazone)、内皮素受体拮抗剂和氟维司群(Fulvestrant))。皮质类固醇可以是泼尼松(prednisone)。免疫抑制剂可以是甲氨蝶呤或环孢霉素。投与可以包括经口投与或静脉内投与。

[0018] 在又一方面,本文件的特征在于一种包含医药学上可接受的载剂和如本文所述的多肽的组合物,其中所述组合物被配制用于经口或静脉内投与个体。所述多肽可以包括SEQ

ID NO:15、SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:17。

[0019] 除非另外定义,否则本文使用的所有技术和科学术语都具有与本发明所属领域的普通技术人员通常所理解的相同的含义。尽管与本文所述方法和材料类似或等效的方法和材料可以用于实践本发明,但是下文描述了合适的方法和材料。本文提及的所有公开、专利申请、专利和其它参考文献都以全文引用的方式并入。在有冲突的情况下,应以本说明书(包括定义)为准。另外,所述材料、方法和实例仅是说明性的并不打算是限制性的。

[0020] 在附图和下面的描述中阐述了本发明的一或多个实施例的详情。本发明的其它特征、目标和优势将从描述和附图以及权利要求书中显而易见。

附图说明

[0021] 图1A-1F. 在经重组内皮抑素(rE)和内皮抑素衍生的肽处理的成纤维细胞中联合TGF- β 刺激产生ECM。图1A:FN和Col1 α 1在单独用媒介(V)、rE或两者与先前TGF- β 刺激一起处理的人类正常肺成纤维细胞(NL)中的表达。用蛋白质印迹检测蛋白质。甘油醛e-磷酸脱氢酶(GAPDH)用作溶解物的上样对照。图1B:在来自健康对照、SSc患者和IPF患者的原代肺成纤维细胞中在TGF刺激后经内皮抑素多肽处理的肺成纤维细胞的FN和Col1 α 1表达。图1C:使用来自4名健康对照(NL)、3名SSc患者和3名IPF患者的成纤维细胞获得的肺成纤维细胞中FN和Col1 α 1表达的图形汇总。条带的强度归一化为GAPDH的强度,并表示为与媒介(V)的比率。使用配对t检验进行统计分析。 $*P<0.04$, $**P<0.01$ 。图1D:从硬斑病患者和SSc患者获得的人类皮肤成纤维细胞中FN和Col1 α 1水平的代表性结果。图1E:从单独用V、5 μ g/ml的rE或内皮抑素多肽处理的IPF患者获得的纤维化成纤维细胞中FN和Col1 α 1表达的代表性结果(左)。IPF成纤维细胞用不同浓度(5、10和20 μ g/ml)的E4处理。以与对应于20 μ g/ml E4的泳道中的体积相等的体积添加二甲亚砜(DMSO)(V)(右)。图1F:TGF- β 刺激后用内皮抑素多肽处理的正常肺成纤维细胞中的 α -SMA水平。

[0022] 图2A-2C. 离体人类皮肤纤维化器官培养模型。图2A:将重组TGF- β 或1 \times 磷酸盐缓冲液(PBS)(媒介)以1、10、50ng/ml的浓度皮内注射到人类皮肤外植体中。注射后1周收获皮肤。上排示出了代表性H&E(苏木精和伊红染色)图像,下排示出了马森三色(Masson trichrome)染色切片的图像。放大倍率,20 \times 。图2B:将重组内皮抑素(rE)以1、5、10 μ g/ml的浓度注射到人类皮肤中。使用1 \times PBS作为媒介对照(V)。示出了代表性H&E图像。放大倍率,20 \times 。图2C:将内皮抑素多肽(E-1、E-2、E-3和E-4;全部为10 μ g/ml)皮内注射到人类皮肤中。使用DMSO作为媒介对照(V)。示出了代表性H&E图像。放大倍率,20 \times 。

[0023] 图3A-3B. 重组内皮抑素对TGF- β 诱导的人类皮肤纤维化和皮肤厚度的影响。图3A:单独用媒介、10ng/ml TGF- β 或在与TGF- β (10ng/ml)组合的rE(1、5和10 μ g/ml)注射的人类皮肤的代表性H&E图像。注射后一周收获组织。放大倍率,20 \times 。图3B:皮肤厚度的图形表示。数据代表四个独立实验,一式三份,使用来自四个不同供体的人类皮肤外植体。使用曼-惠特尼U检验(Mann-Whitney U test)进行统计分析。 $*P<0.04$ 。

[0024] 图4A-4B. 内皮抑素多肽对TGF- β 诱导的人类皮肤纤维化和皮肤厚度的影响。图4A:单独用媒介、10ng/ml TGF- β 或在与TGF- β (10ng/ml)组合的E-1、E-2、E-3或E-4(10 μ g/ml)注射的人类皮肤的代表性H&E图像。放大倍率,20 \times 。图4B:图4A中所示的皮肤厚度数据的图形表示。数据代表使用来自两个供体的人类皮肤外植体的两个独立实验,并且每个实验一式

三份进行。使用曼-惠特尼U检验进行统计分析。 $*P<0.05$, $**P<0.02$ 。

[0025] 图5A-5B. E-1和E-4在TGF- β 诱导的纤维化中的剂量反应。图5A: 在TGF- β (10ng/ml) 存在下以1、5、10和20 μ g/ml浓度注射E-1 (上排) 或E-4 (下排) 的人类皮肤的代表性H&E图像。放大倍率, 20 \times 。图5B: 图5A中所示的皮肤厚度数据的图形分析。使用DMSO作为媒介对照。实验一式两份进行, 并且每个切片在6个视野测量皮肤厚度。使用曼-惠特尼U检验进行统计分析。 $*P<0.02$, $**P<0.01$ 。

[0026] 图6A-6B. 内皮抑素多肽在小鼠皮肤的体内纤维化发展中的作用。图6A: 单独用媒介、10ng/ml TGF- β 或用与TGF- β (10ng/ml) 组合的E-1、E-2、E-3和E-4 (10 μ g/ml) 对小鼠进行皮内注射。在注射后的1周后收获皮肤。切片用H&E染色。放大倍率, 20 \times 。图6B: 图6A中所示的皮肤厚度数据的图形汇总。数据代表四个独立实验, 每个实验一式两份进行。使用曼-惠特尼U检验进行统计分析。 $*P<0.04$, $**P<0.01$ 。

[0027] 图7A-7B. 内皮抑素多肽抑制MATRIGEL®中小管形成的能力。图7A: 用媒介、rE (50nM) 或E4 (50nM) 处理的HUVEC的MATRIGEL®培养物的代表性图像。使用等量的DMSO作为媒介。放大倍率40 \times 。图7B: 图7A中所示的管形成的图像量化。显示的数据汇总了三个独立实验的结果。 $*P<0.05$, 单因素方差分析, 然后是邦弗伦尼检验 (Bonferroni's test)。

[0028] 图8A-8B. 内皮抑素E-4对博来霉素 (bleomycin) 诱导的体内皮肤纤维化的作用。图8A: 每日给小鼠皮下注射作为媒介 (V) 的1 \times PBS或博来霉素 (Bleo; 20 μ g/小鼠)。在第一天将E-4 (10 μ g/ml) 与博来霉素混合, 并且继续每日投与博来霉素而无后续E4注射 (Bleo+E-4)。10天后收获皮肤。切片用H&E染色。放大倍率, 100 \times 。图8B: 图8A中所示的皮肤厚度数据的图形汇总。数据代表三个独立实验。使用曼-惠特尼U检验进行统计分析。 $*P<0.001$, $**P<0.00001$ 。E4投与引起博来霉素诱导的皮肤纤维化的显著减弱, 即使单次投与E4也是如此。

[0029] 图9. 即使在TGF- β 后3天投与, E4也能逆转TGF β 诱导的皮肤纤维化。第1天用TGF- β 并且在投与纤维化触发物和投与肽之间用E-4L或E-1L (这是滞后3天后投与的E-4和E-1处理小鼠皮肤。在第3天腹腔内 (IP) 投与E-1或E-4, 并在第7天收获。E4在第7天引起TGF- β 诱导的皮肤纤维化的显著降低。因此, E4预防 (图4-6) 和逆转 (图9) 由TGF- β 触发的皮肤纤维化。

[0030] 图10A-10C. E4减弱博来霉素诱导的体内肺纤维化。图10A: 将60 μ g博来霉素与作为媒介的DMSO (Bleo) 或E-4 (Bleo+E-4, 10 μ g/ml) 组合进行气管内投与。在一些小鼠中, 在博来霉素处理 (Bleo+E-4L) 后三天, 气管内 (IT) 投与E-4 (10 μ g/ml)。PBS用作博来霉素的媒介 (V)。处理后10天收获肺。用H&E (左图) 和马森三色 (右图) 染色的代表性图像是3个独立实验的代表。放大倍率, 100 \times 。E4与博来霉素同时投与或在博来霉素后三天投与导致纤维化和马森三色染色明显减少。图10B: 从用V、Bleo、Bleo+E-4和Bleo+E-4L处理的小鼠肺获得的酸性胶原蛋白的定量。来自三个独立实验的胶原蛋白水平以 μ g/mg (肺) 表示。使用未配对t检验进行统计分析。 $*P<0.05$ 。在博来霉素后3天给予的E4多肽显著降低小鼠肺中的胶原蛋白水平。图10C: 较低放大倍率 (2 \times) 的图9中所示的小鼠肺 (BLM+E4/E4L IT第10天)。对于Bleo+E4L, 首先投与Bleo, 然后在Bleo与E4投与之间存在三天的滞后)。

[0031] 图11. 无论是腹腔内 (IP) 还是气管内 (IT) 投与, E4都减弱博来霉素诱导的体内肺纤维化。在第1天IT投与博来霉素, 并且在第3天IP或IT投与E4。在第21天收获肺。在第21天, 无论是IP还是IT投与, E4都引起博来霉素诱导的肺纤维化的显著减弱。因此, 无论投与途径如何, E4都能有效减少纤维化。显示关于单独的媒介 (V)、单独的博来霉素 (Bleo)、IP投与的

博来霉素和E4以及IT投与的博来霉素和E4的结果。

[0032] 图12.E4通过降低赖氨酰氧化酶 (LOX) 水平来减少体内纤维化,从而减少胶原蛋白的交联并使其不太稳定并且更易于蛋白水解降解。将用具有或不具有E4的BLM处理的小鼠的肺切片用于免疫组织化学以检测LOX。显示的切片是对照IgG、磷酸盐缓冲盐水、博来霉素以及博来霉素,随后用E4处理。

[0033] 图13.E4通过阻断原代人类肺成纤维细胞中TGF- β 诱导的LOX产生来减少体外纤维化。第4传代中正常的肺成纤维细胞用媒介、E4、TGF- β 或TGF- β ,接着30分钟后由E4处理。48小时后,使用蛋白质印迹分析来分析由成纤维细胞调节的培养基。泳道1:媒介(DMSO);泳道2:E-4;泳道3:TGF- β ;泳道4:TGF- β ,随后E4。当通过实时PCR检查LOX mRNA水平时,获得了类似的结果。

[0034] 图14A-14B.图14A:E4通过在原代人类肺成纤维细胞中诱导MMP-2活性来减少体外纤维化,由此导致胶原蛋白和其它基质蛋白的降解增加。在TGF- β 后用E-4处理原代人类肺成纤维细胞时显示MMP-2活性增加的明胶酶谱凝胶的数字图像(泳道4)。泳道1:媒介(DMSO);泳道2:E-4;泳道3:TGF- β ;泳道4:TGF- β ,随后E4。图14B:显示在用TGF- β 和E-4处理的细胞中MMP-2总水平和活性水平增加的数字图像。这表明E-4增加了MMP-2酶原的水平,但也增加了活性基质金属蛋白酶(MMP-2,也称为金属蛋白酶-2)的水平。

[0035] 图15.E4通过诱导原代人类肺成纤维细胞中TGF- β 抑制剂ID1的表达来减少体外纤维化。进行实时PCR分析以确定指定条件下的ID1mRNA水平。

[0036] 图16.E-4通过降低原代人类肺成纤维细胞中主要转录因子Egr-1的水平来减少体外纤维化。Egr-1水平的降低与胶原蛋白、SMA和纤连蛋白的降低相似。泳道1:媒介(DMSO);泳道2:E4;泳道3:TGF β ,泳道4TGF β ,接着60分钟后E4。24小时后收获样品。

[0037] 图17A-17B.内皮抑素肽对人类皮肤中由TGF- β 触发的已建立的纤维化的作用。图17A:在投与10ng/ml TGF- β 后2天,再将媒介(DMSO)、E-1或E-4(10mg/ml)注射到人类皮肤(分别为V、E-1L和E-4L)。示出了人类皮肤的代表性H&E图像。放大倍率,20 \times 。图17B:A中所示的皮肤厚度数据的图形表示。数据代表使用来自两个供体的人类皮肤外植体的两个独立实验,并且每个实验一式两份进行。使用曼-惠特尼U检验进行统计分析。*P<0.01。

[0038] 图18.基于差异溶解度的未加标签的E3的纯化方案。

[0039] 图19.植物中产生的E3变体。

[0040] 图20.口服植物制药(PMP)E3变体预防博来霉素诱导的肺纤维化。

[0041] 图21.E3-Fc的静脉内给药与经口投与相当。

[0042] 图22.静脉内E3-Fc具有逆转肺纤维化的潜力。

[0043] 图23.示意图(左图)和蛋白质印迹(右图)中人类IgG Fc与E3融合物的表达。

[0044] 图24.人类IgG Fc与E3融合物的纯化。

[0045] 图25.人类IgA1、IgA2和IgM Fc与E3融合物是不可溶的或表达不良。

[0046] 图26.E3-Fc(SEQ ID NO:16)、E3(SEQ ID NO:20)和E4(SEQ ID NO:21)的氨基酸序列。

[0047] 图27.iBio-CFB03原料药制造工艺流程图。

[0048] 图28.用于表达iBio-CFB03的pGR-D4载体的示意图。

[0049] 图29.通过蛋白质A和TFF纯化的iBio-CFB03的十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电

泳 (SDS-PAGE)。

[0050] 图30.TFF纯化的iBio-CFB03的尺寸排阻色谱图。

[0051] 图31.iBio-CFB03的阳离子交换 (CEX) 色谱图。

[0052] 图32.iBio-CFB03CEX级分的SDS-PAGE凝胶图像。

[0053] 图33.CEX级分1A4 (顶部) 和1B2 (底部) 的尺寸排阻色谱图。

[0054] 图34.未还原的iBio-CFB03在220nm下的尺寸排阻高效液相色谱 (SE-HPLC) 色谱图。

[0055] 图35.还原的iBio-CFB03的基质辅助的激光解吸/电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF MS) 谱图。

[0056] 图36.iBio-CFB03在还原 (R) 和非还原 (NR) 条件下的SDS-PAGE凝胶图像。

[0057] 图37.具有突显与图38的相关性的胰蛋白酶肽片段的iBio-CFB03序列。

[0058] 图38.凝胶内胰蛋白酶消化的iBio-CFB03条带1 (还原) 的MALDI-TOF MS谱图。

[0059] 图39.博莱霉素模型中经口和静脉内投与的示意图。

[0060] 图40.用iBio-CFB03的经口和静脉内投与处理的小鼠肺的苏木精和伊红染色。

[0061] 图41.用经口和静脉内iBio-CFB03处理的博来霉素模型中小鼠肺的羟基脯氨酸分析。

[0062] 图42.用经口和静脉内iBio-CFB03处理的博来霉素模型的重复实验中小鼠肺的羟基脯氨酸分析。

[0063] 图43.用渗透泵皮下 (s.c.) 投与iBio-CFB03处理的小鼠皮肤的苏木精和伊红染色。

[0064] 图44.用渗透泵皮下投与iBio-CFB03处理的小鼠的皮肤厚度。

[0065] 图45.用iBio-CFB03处理的TGF- β 模型中人类皮肤的羟基脯氨酸分析。

[0066] 图46.E4内皮抑素肽的作用机制示意图。

[0067] 图47.用于总蛋白成像 (左图) 和通过蛋白质印迹用抗Fc抗体进行蛋白质印迹 (右图) 的E3Fc融合物E3-Fc (END-25)、E3-连接子-Fc (END-26) 和C67AE3-Fc (END-55) 溶解物的SDS-PAGE凝胶。

[0068] 图48.END-55模拟胃液 (胃蛋白酶) 消化。总蛋白的SDS-PAGE凝胶 (左图), 并且用鸡抗E3抗体 (中图) 或抗人类Fc抗体 (右图) 进行蛋白质印迹。

[0069] 序列表

[0070] 所附序列表中列出的核酸和氨基酸序列用核苷酸碱基的标准字母缩写和氨基酸的三字母代码示出, 如37C.F.R.1.822中所定义。仅显示了每条核酸序列的一条链, 但互补链被理解为包括在对所呈现的链的任何引用中。序列表作为ASCII文本文件[8123-84102-03Sequence_Listing.txt, 2012年4月4日, 12.5千字节]提交, 其以引用的方式并入本文中。在所附序列表中:

[0071] SEQ ID NO:1是编码人类内皮抑素的示例性核酸序列。

[0072] SEQ ID NO:2是人类内皮抑素的氨基酸序列。

[0073] SEQ ID NO:3是编码小鼠内皮抑素的示例性核酸序列。

[0074] SEQ ID NO:4是小鼠内皮抑素的氨基酸序列。

[0075] SEQ ID NO:5是编码人类免疫球蛋白 (Ig) G1蛋白的示例性核酸序列。

- [0076] SEQ ID NO:6是人类IgG1蛋白的氨基酸序列。
- [0077] SEQ ID NO:7是编码连接子的示例性核酸序列。
- [0078] SEQ ID NO:8是连接子的氨基酸序列。
- [0079] SEQ ID NO:9是大鼠内皮抑素多肽的一部分。
- [0080] SEQ ID NO:10是奶牛内皮抑素多肽的一部分。
- [0081] SEQ ID NO:11是人类胶原蛋白XV多肽的一部分。
- [0082] SEQ ID NO:12是编码内皮抑素的示例性核酸序列。
- [0083] SEQ ID NO:13是示例性内皮抑素多肽的氨基酸序列,其通过三个氨基酸取代而与SEQ ID NO:2不同。
- [0084] SEQ ID NO:14 (SYCETWRTEAPSATGQASSLLGGRLLGQSAASCHHAYIVLAIENSFMT) 是在下划线位置具有C→A突变的人类内皮抑素的一部分。
- [0085] SEQ ID NO:15是包括分泌序列、人类内皮抑素的一部分和肽标签的示例性氨基酸序列。
- [0086] SEQ ID NO:16是包括分泌序列、具有C67A突变的人类内皮抑素的一部分和IgG Fc结构域的示例性氨基酸序列。
- [0087] SEQ ID NO:17是包括分泌序列、胶原蛋白XVIII的一部分、具有C67A突变的人类内皮抑素的一部分和肽标签的示例性氨基酸序列。
- [0088] SEQ ID NO:18 (QKSVWHGSDPNGRRLTE) 是胶原蛋白XVIII的17个氨基酸部分。
- [0089] SEQ ID NO:19是四氨基酸内质网靶向序列。
- [0090] SEQ ID NO:20是人类内皮抑素的E3部分的氨基酸序列。
- [0091] SEQ ID NO:21是人类内皮抑素的E4部分的氨基酸序列。
- [0092] SEQ ID NO:22是E3_C67A-Fc_IgG2融合物的氨基酸序列。
- [0093] SEQ ID NO:23是E3_C67A-Fc_IgG3融合物的氨基酸序列。
- [0094] SEQ ID NO:24是E3_C67A-Fc_IgG4融合物的氨基酸序列。
- [0095] SEQ ID NO:25是E3_C67A-Fc_IgA1融合物的氨基酸序列。
- [0096] SEQ ID NO:26是E3_C67A-Fc_IgA2融合物的氨基酸序列。
- [0097] SEQ ID NO:27是E3_C67A-Fc_IgM融合物的氨基酸序列。
- [0098] SEQ ID NO:28是J-Chain_PVX_sgp36的氨基酸序列。
- [0099] SEQ ID NO:29是IgG1_Fc-E3_C67A C端融合物的氨基酸序列。

具体实施方式

[0100] 本文提供了C端内皮抑素多肽。在一些实施例中,这些多肽包括以下、基本上由以下组成或由以下组成:(1)如SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:2的氨基酸133-180所示的氨基酸序列的至少40个连续氨基酸;(2)如SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:2的氨基酸133-180所示的氨基酸序列的至少40个连续氨基酸,具有至多5个氨基酸取代;(3)如SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:2的氨基酸133-180所示的氨基酸序列;(4)如SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:2的氨基酸133-180所示的氨基酸序列,具有至多5个氨基酸取代;或(5)如SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列;其中所述多肽具有抗纤维化活性并且其中所述多肽不包括SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:2的氨基酸1-92。在一些实施例中,所述多肽在C端被酰胺化。还提供了制备这些多肽的方法。在

一些实施例中,所述多肽可以在植物中产生。另外,提供了编码所述多肽的聚核苷酸、用所述聚核苷酸转化的宿主细胞以及使用所述多肽和聚核苷酸的方法。所述方法可以包括治疗个体的纤维化。举例来说,提供了用于治疗肺和皮肤以及其它器官的纤维化病症(例如肝硬化、角膜纤维化和肾纤维化)的方法。在一些实施例中,本文公开的抗纤维化C端内皮抑素多肽可选择性抑制纤维化。在一些实例中,纤维化被抑制而不抑制血管生成。因此,可以使用C端内皮抑素多肽来更特异性和选择性地靶向不需要的纤维化,而不干扰血管生成,从而获得期望的治疗结果。

[0101] 术语

[0102] 除非另外指出,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本杰明勒温(Benjamin Lewin),基因V (GenesV),由牛津大学出版社(Oxford University Press)出版,1994(ISBN 0-19-854287-9);肯德鲁(Kendrew)等人(编),分子生物学百科全书(The Encyclopedia of Molecular Biology),由布莱克威尔科学公司(Blackwell Science Ltd.)出版,1994(ISBN 0-632-02182-9);和罗伯特A.迈尔(Robert A. Meyers)(编),分子生物学和生物技术:全面的案头参考(Molecular Biology and Biotechnology:A Comprehensive Desk Reference),由VCH出版公司(VCH Publishers, Inc.)出版,1995(ISBN 1-56081-569-8)。

[0103] 为了便于审查本公开的各种实施例,提供特定术语的以下解释:

[0104] 动物:活的多细胞脊椎动物生物体,包括例如哺乳动物和鸟类的类别。术语哺乳动物包括人类和非人类哺乳动物。类似地,术语“个体”包括人类和兽医学个体。

[0105] 酰胺化或酰胺衍生物:翻译后修饰以形成可增强多肽的生物学活性的酰胺。在酰胺化中,C端氨基酸(多肽-COOH)经修饰以形成酰胺(多肽-CONH₂)。酰胺可以通过翻译后C端酰胺化形成。经修饰的氨基酸后面可以是甘氨酸,其提供酰胺基。从前体前蛋白衍生的多肽的翻译后酰胺化过程被充分表征,并涉及三个酶促步骤(库提塔(Cuttitta),解剖学记录(The Anatomical Record),236:87-93,1993)。第一步涉及在蛋白质羧基端附近的一对碱性氨基酸处进行内切蛋白水解切割。第二步涉及羧肽酶介导的碱性残基去除。第三步是酰胺化反应,其涉及末端甘氨酸氧化形成邻近羧基端氨基酸的酰胺。甘氨酸是唯一已知的充当邻近氨基酸的酰胺供体的氨基酸。尽管多肽的游离酸和酰胺化形式难以在结构上区分,但是酰胺可以比多肽的游离酸形式具有100-1000倍以上的生物活性(库提塔,解剖学记录,236:87-93,1993)。C端酰胺化对许多多肽的生物活性是必不可少的。

[0106] cDNA(互补DNA):一段缺少内部非编码区段(内含子)和决定转录的调控序列的DNA。cDNA通过从细胞中提取的信使RNA的逆转录在实验室合成。

[0107] 胶原蛋白:在哺乳动物中以细长原纤维形式存在的蛋白质主要存在于如肌腱、韧带和皮肤等纤维组织中,并且在角膜、软骨、骨骼、血管、肠道和椎间盘也很丰富。原胶原蛋白或“胶原蛋白分子”是较大胶原蛋白聚集体(如原纤维)的亚基。它长约300nm,直径1.5nm,由三条多肽链(称为 α 链)组成,每条链都具有左旋螺旋的构象。在I型胶原蛋白中,每个三螺旋结合成称为胶原蛋白微原纤维的右旋超超螺旋。内皮抑素是胶原蛋白的前183个氨基酸。

[0108] 保守变体:“保守”氨基酸取代是那些基本上不影响或降低C端内皮抑素多肽活性、如多肽抑制纤维化的能力的取代。保守取代的具体非限制性实例包括以下:

[0109]	原始残基	保守取代
	Ala	Ser
	Arg	Lys
	Asn	Gln, His
	Asp	Glu
	Cys	Ser
	Gln	Asn
[0110]	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

[0111] 术语保守变异还包括使用经取代的氨基酸代替未经取代的亲本氨基酸,条件是针对经取代的多肽培养的抗体也与未经取代的多肽发生免疫反应。非保守取代是那些降低活性、如蛋白质抑制纤维化的能力的取代。

[0112] 基本上由……组成/由……组成:关于多肽,基本上由指定氨基酸序列组成的多肽不包括任何额外的氨基酸残基。然而,多肽可以包括额外的非肽组分,如标记(例如,荧光、放射性或固体颗粒标记)、糖或脂质,其不会实质上影响多肽的基本和新颖特征。由指定氨基酸序列组成的多肽不包括任何额外的氨基酸残基,也不包括额外的生物成分,如核酸脂质、糖,也不包括标记。由指定氨基酸序列组成或基本上由特定氨基酸序列组成的多肽可经糖基化或具有酰胺修饰。关于聚核苷酸,基本上由指定核酸序列组成的聚核苷酸不包括任何额外的核酸残基。然而,聚核苷酸可以包括额外的非核酸组分,如标记(例如,荧光、放射性或固体颗粒标记)或多肽,其不会实质上影响聚核苷酸的基本和新颖特征”。由指定核酸序列组成的聚核苷酸不包括任何额外的核酸残基,也不包括额外的生物组分或标记。

[0113] 简并变体:包括由于遗传密码而简并的序列的编码C端内皮抑素多肽的聚核苷酸。存在20种天然氨基酸,其中大多数是由不止一个密码子指定的。因此,只要由核苷酸序列编码的C端内皮抑素多肽的氨基酸序列不变,所有简并核苷酸序列都包括在本公开中。

[0114] 表达控制序列:调控与其可操作地连接的异源核酸序列的表达的核酸序列。当表达控制序列控制并调节核酸序列的转录和(适当时)翻译时,表达控制序列可操作地连接于核酸序列。因此,表达控制序列可以包括合适的启动子、增强子、转录终止子、蛋白质编码基因前的起始密码子(即ATG)(内含子的剪接信号,维持基因的正确阅读框以允许恰当翻译mRNA)和终止密码子。术语“控制序列”旨在至少包括其存在可以影响表达的组分,并且还可以包括其存在是有利的额外组分,例如前导序列和融合搭配物序列。表达控制序列可以包

括启动子。

[0115] 启动子是足以指导转录的最小序列。还包括那些足以使启动子依赖性基因表达可控的细胞类型特异性、组织特异性或可由外部信号或试剂诱导的启动子元件；这类元件可以位于基因的5'或3'区。包括组成型和诱导型启动子(参见例如比特(Bitter)等人,酶学方法(Meth Enzymol) 153:516-544,1987)。举例来说,当在细菌系统中克隆时,可以使用诱导型启动子,如噬菌体λ的pL、plac、ptrp、ptac(ptrp-lac杂合启动子)等。在一些实施例中,当在哺乳动物细胞系统中克隆时,可以使用源自于哺乳动物细胞的基因组(如金属硫蛋白启动子)或哺乳动物病毒(如逆转录病毒长末端重复序列;腺病毒晚期启动子;牛痘病毒7.5K启动子)的启动子。通过重组DNA或合成技术产生的启动子也可用于实现核酸序列的转录。

[0116] 内皮抑素:对应于胶原蛋白XVIII的C端的183个氨基酸的蛋白水解切割片段。内皮抑素的C端多肽包括来自C端区的连续氨基酸,其来自氨基酸93至氨基酸183。示例性人类内皮抑素多肽如SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:13所示。

[0117] 纤维化:与作为器官或组织的正常成分的纤维组织的形成相反,器官或组织中的过量纤维结缔组织形成或发展为修复或反应过程。皮肤和肺易于纤维化。示例性纤维化病症是硬皮病特发性肺纤维化、硬斑病、因移植物抗宿主病(GVHD)所致的纤维化、瘢痕瘤和肥厚性瘢痕、上皮下纤维化、心内膜心肌纤维化、子宫纤维化、骨髓纤维化、腹膜后纤维化、肾源性系统性纤维化、手术后的疤痕、哮喘、肝硬化/肝纤维化、异常伤口愈合、肾小球肾炎和多灶性纤维硬化。

[0118] 异源:源自不同的遗传来源或物种。与内皮抑素异源的多肽源自不编码内皮抑素的核酸。在具体的非限制性实例中,含有C端内皮抑素多肽和异源氨基酸序列的多肽包括Ig(如IgG1)β-半乳糖苷酶、麦芽糖结合蛋白和白蛋白、乙型肝炎表面抗原或免疫球蛋白氨基酸序列。一般,特异性结合于所关注蛋白(如内皮抑素)的抗体不会特异性结合于异源蛋白。

[0119] 宿主细胞:载体可以在其中繁殖并表达其DNA的细胞。细胞可以是原核或真核的。细胞可以是哺乳动物的,如人类细胞。所述术语还包括目标宿主细胞的任何子代。应理解,所有子代可能与亲本细胞不同,因为在复制期间可能存在突变。然而,当使用术语“宿主细胞”时,包括这类子代。

[0120] 特发性肺纤维化:也称为隐源性致纤维化性肺泡炎(CFA)的病症,其是以肺的支持框架(间质)的纤维化为特征的慢性、进行性肺病的形式。根据定义,所述术语仅在肺纤维化的原因未知(“特发性”)时使用。当IPF患者的肺组织在病理学家的显微镜下检查时,显示出一组特有的称为普通型间质性肺炎(UIP)的组织学/病理学特征。UIP的特征在于涉及肺的支持框架(间质)的两个肺的渐进性瘢痕形成。

[0121] 抑制或治疗疾病:抑制疾病(如纤维化)是指抑制疾病的完全发展。在若干实例中,抑制疾病是指减轻纤维化的症状,如形成瘢痕组织或增加运动范围或减轻疼痛。“治疗”是指改善疾病(如纤维化)的征兆或症状或与疾病相关的病理状态的治疗性干预。

[0122] 经分离:“经分离的”生物组分(如核酸或蛋白质或细胞器)已经基本上从天然存在所述组分的生物体细胞的其它生物组分,例如其它染色体和染色体外DNA和RNA、蛋白质和细胞器中分离或纯化出来。已“经分离的”核酸和蛋白质包括通过标准纯化方法纯化的核酸和蛋白质。所述术语还涵盖通过在宿主细胞中重组表达制备的核酸和蛋白质以及化学合成的核酸。

[0123] 瘢痕瘤 (Keloid或keloidal scar):根据其成熟度,疤痕类型主要由III型(早期)或I型(晚期)胶原蛋白组成。这是在愈合皮肤损伤部位肉芽组织(3型胶原蛋白)过度生长的结果,然后其慢慢地被1型胶原蛋白替代。瘢痕瘤是坚硬的橡胶状病变或有光泽的纤维结节,并且可以从粉红色变成肉色或红色变成深褐色。瘢痕瘤是良性的、非传染性的,并且通常伴有严重的瘙痒、剧烈的疼痛和质地变化。在严重的情况下,它可能影响皮肤的运动。瘢痕瘤不同于肥厚性瘢痕,肥厚性瘢痕是不会生长超出原始伤口的边界的凸出疤痕。

[0124] 标记:可检测的化合物或组合物,其直接或间接地结合到另一个分子以便于所述分子的检测。标记的具体非限制性实例包括荧光标签、酶促连接和放射性同位素。

[0125] 连接子序列:连接子序列是共价连接两个多肽结构域的氨基酸序列。连接子序列可以包括在本文公开的C端内皮抑素多肽之间以向连接的多肽结构域提供旋转自由度,从而促进适当的结构域折叠并呈递给MHC。举例来说,在含有两个C端内皮抑素多肽的重组多肽中,可以在它们之间提供连接子序列,如含有C端内皮抑素多肽-连接子-C端内皮抑素多肽的多肽。一般长度在2和25个氨基酸之间的连接子序列是所属领域中熟知的,并且包括(但不限于)由乔杜里 (Chaudhary) 等人,自然 (Nature) 339:394-397,1989所描述的甘氨酸(4)-丝氨酸间隔区($\times 3$)。

[0126] 赖氨酰氧化酶 (LOX):赖氨酰氧化酶是一种细胞外铜酶,其催化胶原蛋白和弹性蛋白前体中的赖氨酸残基形成醛。这些醛是高反应性的,并且与其它赖氨酰氧化酶衍生的醛残基或与未修饰的赖氨酸残基发生自发的化学反应。这产生交联的胶原蛋白和弹性蛋白,这对于胶原蛋白原纤维稳定性以及成熟弹性蛋白的完整性和弹性是必不可少的。

[0127] 哺乳动物:这一术语包括人类和非人类哺乳动物。类似地,术语“个体”包括人类和兽医学个体。

[0128] 基质金属蛋白酶-2:一种72kDa的IV型胶原蛋白酶,也被称为明胶酶A。基质金属蛋白酶 (MMP) 家族的蛋白质参与正常生理过程(如胚胎发育、繁殖和组织重塑)以及疾病过程(如关节炎和转移)中细胞外基质的分解。大多数MMP被分泌为无活性的前蛋白,其在被细胞外蛋白酶切割时活化。MMP-2降解IV型胶原蛋白,基膜的主要结构成分。MMP-2还降解其它底物,如天然和变性的胶原蛋白I和纤连蛋白(参见clip.ubc.ca/archive/mmp_timp_folder/mmp_substrates.shtml网站)。

[0129] 寡核苷酸:长度高达约100个核苷酸碱基的线性聚核苷酸序列。

[0130] 开放阅读框 (ORF):一系列编码氨基酸的核苷酸三联体(密码子),没有任何内部终止密码子。这些序列通常可以翻译成多肽。

[0131] 可操作地连接:当第一核酸序列与第二核酸序列处于功能关系时,第一核酸序列与第二核酸序列可操作地连接。举例来说,如果启动子影响编码序列(如编码C端内皮抑素多肽的序列)的转录或表达,那么启动子可操作地连接于编码序列。一般,可操作地连接的DNA序列是相邻的,并且在必要时将两个蛋白质编码区接合在相同的阅读框中。

[0132] 肽修饰:C端内皮抑素多肽包括本文所述多肽的合成实施例。另外,可以在本文所述的方法中使用这些蛋白质的类似物(非肽有机分子)、衍生物(以公开的多肽序列为起始物质获得的化学功能化多肽分子)和变体(同源物)。本公开的每种多肽由氨基酸序列构成,所述氨基酸可以是天然存在的和以其它方式存在的L-和/或D-氨基酸。

[0133] 可以通过多种化学技术来修饰肽以产生与未修饰的多肽具有基本上相同的活性

并且任选地具有其它期望的特性的衍生物。举例来说,无论是羧基端还是侧链,蛋白质的羧基都可以医药学上可接受的阳离子的盐形式提供或酯化形成 C_1-C_{16} 酯,或转化为式 NR_1R_2 的酰胺,其中 R_1 和 R_2 各自独立地为H或 C_1-C_{16} 烷基,或组合形成杂环,如5元或6元环。无论是氨基端还是侧链,多肽的氨基都可以呈医药学上可接受的酸加成盐形式,如HCl盐、HBr盐、乙酸盐、苯甲酸盐、甲苯磺酸盐、马来酸盐、酒石酸盐和其它有机盐,或可以被修饰成 C_1-C_{16} 烷基或二烷基氨基或进一步转化为酰胺。

[0134] 多肽侧链的羟基可以使用公认的技术转化为 C_1-C_{16} 烷氧基或 C_1-C_{16} 酯。多肽侧链的苯基和酚环可以经一或多个卤素原子(如氟、氯、溴或碘)或 C_1-C_{16} 烷基、 C_1-C_{16} 烷氧基、羧酸和其酯或这类羧酸的酰胺取代。多肽侧链的亚甲基可以扩展成同源的 C_2-C_4 亚烷基。硫醇可以用许多公认的保护基中的任何一种来保护,如乙酰胺基。所属领域的技术人员还将认识到将环状结构引入本发明的多肽中以选择和提供使得稳定性增强的结构的构象约束的方法。

[0135] 预想肽模拟物和有机模拟物的实施例,其中这类肽模拟物和有机模拟物的化学成分的三维排列模拟了多肽主链和组分氨基酸侧链的三维排列,使得这类C端内皮抑素多肽的肽模拟物和有机模拟物具有可测量的或增强的治疗纤维化的能力。对于计算机建模应用,药效团是对生物活性的结构要求的理想化的三维定义。肽模拟物和有机模拟物可以被设计为适合每个药效团与当前计算机建模软件(使用计算机辅助药物设计或CADD)。关于CADD中所用技术的说明,参见沃尔特斯(Walters),“药物的计算机辅助建模(Computer-Assisted Modeling of Drugs),”克勒格曼(Klegerman)和格罗夫斯(Groves),编,1993,医药学生物技术(Pharmaceutical Biotechnology),国际药品出版社(Interpharm Press):伊利诺斯州布法罗格罗夫(Buffalo Grove, Ill.),第165-174页和药理学原理(Principles of Pharmacology),曼森(Munson)(编)1995,第102章。还包括使用这类技术制备的模拟物。

[0136] 医药学上可接受的载剂:使用的医药学上可接受的载剂是常规的。雷明顿氏药物科学(Remington's Pharmaceutical Sciences),E.W.马丁(E.W.Martin)著,马克出版公司(Mack Publishing Co.),宾夕法尼亚州伊斯顿(Easton, Pa.),第15版(1975)描述适用于本文中所公开的融合蛋白的药物递送的组合物和配制品。

[0137] 一般来说,载剂的性质将取决于所采用的特定投与模式。举例来说,肠胃外配制品通常包括可注射流体,其包括医药学上和生理学上可接受的流体,如水、生理盐水、平衡盐溶液、右旋糖水溶液、甘油等作为媒剂。对于固体组合物(如散剂、丸剂、片剂或胶囊形式),常规的无毒固体载剂可以包括例如药物级的甘露醇、乳糖、淀粉或硬脂酸镁。除了生物学中性载剂之外,待投与的医药组合物可以含有少量的无毒辅助物质,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。

[0138] “治疗有效量”是在治疗个体中达到所需效果的组合物的量。举例来说,这可以是诱导免疫应答、抑制纤维化、减少瘢痕体积或可测量地改变纤维化病症的外部症状所必需的量。当投与个体时,一般将使用将达到目标组织浓度(例如,在皮肤细胞或肺组织中)的剂量,其已经显示出实现体外效果。

[0139] 聚核苷酸:术语聚核苷酸或核酸序列是指长度为至少10个碱基的核苷酸的聚合形式。重组聚核苷酸包括一种聚核苷酸,所述聚核苷酸不直接与其所在的生物体的天然存在的基因组中的两个紧邻的编码序列(一个在5'端和一个在3'端)邻接。因此,所述术语包括

例如重组DNA,其并入载体中;并入自主复制的质粒或病毒中;或并入原核生物或真核生物的基因组DNA中,或作为独立于其它序列的独立分子(例如,cDNA)存在。核苷酸可以是核糖核苷酸、脱氧核糖核苷酸或任一核苷酸的修饰形式。所述术语包括单链和双链形式的DNA。

[0140] 肽或多肽:不论长度或翻译后修饰(例如,糖基化或磷酸化)的任何氨基酸链。在一些实施例中,多肽是C端内皮抑素多肽。多肽的长度可以在5至60个氨基酸之间。在一些实施例中,多肽的长度为约10至约55个氨基酸。在另一个实施例中,多肽的长度为约20至约50个氨基酸。在又一个实施例中,多肽的长度为约50个氨基酸。关于多肽,词语“约”表示整数量。因此,在一个实例中,“约”50个氨基酸长度的多肽长度为49至51个氨基酸。在一些实施例中,多肽可以是多聚体形式。举例来说,多肽可以是包括多个如本文所述的内皮抑素片段和/或融合物的高分子量多聚体。高分子量多聚体可以具有例如大于500kDa的分子量(例如,500至750kDa、750kDa至1兆道尔顿(MDa)、1至1.5MDa、1.5至2MDa、2至2.5MDa或2.5至3MDa)。

[0141] 翻译后修饰:新形成的蛋白质的修饰;可涉及氨基酸的缺失、某些氨基酸的化学修饰(例如,酰胺化、乙酰化、磷酸化、糖基化、焦谷氨酸的形成、甲硫氨酸上的磺胺基的氧化/还原、或添加类似的小分子)至某些氨基酸。

[0142] 探针和引物:探针包括连接到可检测标记或报道分子的经分离的核酸。引物是短核酸,优选地DNA寡核苷酸,长度为约15个核苷酸或更多。引物可以通过核酸杂交退火到互补的目标DNA链上以在引物和目标DNA链之间形成杂交体,然后通过DNA聚合酶沿着目标DNA链延伸。引物对可用于扩增核酸序列,例如通过聚合酶链式反应(PCR)或所属领域中已知的其它核酸扩增方法。所属领域的技术人员应了解,特定探针或引物的特异性随其长度而增加。因此,例如,含有20个连续核苷酸的引物将以比仅15个核苷酸的相应引物更高的特异性退火结合到目标。因此,为了获得更高的特异性,可以选择含有约20、25、30、35、40、50或更多个连续核苷酸的探针和引物。

[0143] 纯化:本文公开的C端内皮抑素多肽可以通过所属领域中已知的任何方式纯化(和/或合成)(参见例如蛋白质纯化指南(Guide to Protein Purification),多伊彻(Deutscher)编,酶学方法(Meth.Enzymol.)185,学术出版社(Academic Press),圣地亚哥(San Diego),1990;和斯科普斯(Scopes),蛋白质纯化:原理和实践(Protein Purification:Principles and Practice),斯普林格出版社(Springer Verlag),纽约,1982)。基本上纯化是指从其它蛋白质或细胞组分中纯化。基本上纯化的蛋白质至少约60%、70%、80%、90%、95%、98%或99%纯。因此,在一个具体的非限制性实例中,基本上纯化的蛋白质是90%不含其它蛋白质或细胞组分。

[0144] 因此,术语纯化不需要绝对的纯度;相反,它意在作为一个相对的术语。举例来说,纯化的核酸是其中核酸比细胞内其天然环境中的核酸更富集的核酸。在额外实施例中,纯化核酸或细胞制备物,使得核酸或细胞分别占制备物的总核酸或细胞含量的至少约60%(如(但不限于)70%、80%、90%、95%、98%或99%)。

[0145] 重组:重组核酸是具有非天然存在的序列或具有通过人工组合两个以其它方式分离的序列区段而制成的序列的核酸。这种人工组合通常通过化学合成或者更通常地通过例如通过基因工程技术对核酸的分离区段的人工操作来完成。

[0146] 硬皮病:以纤维化(或硬化)、血管改变和自身抗体为特征的慢性自身免疫性疾病。

有两种主要形式,一种是系统形式,其包括局限性皮肤硬皮病,主要影响手、手臂和面部,但是肺动脉高压频繁。弥漫性皮肤硬皮病(或系统性硬化症)正在迅速发展并且影响大面积的皮肤和一或多个内部器官,通常是肾脏、食管、心脏和肺。两种形式的系统性硬皮病都可能是致命的。另一种形式的硬皮病是一种局部形式,有两种亚型:硬斑病和线性硬皮病。所公开的内皮抑素肽可以用于治疗任何形式的硬皮病。

[0147] 选择性杂交:在排除非相关核苷酸序列的中度或高度严格条件下进行杂交。

[0148] 在核酸杂交反应中,取决于所杂交的核酸的性质,用于达到特定水平的严格性的条件将变化。举例来说,在选择杂交条件时可以考虑核酸的杂交区的长度、互补性程度、核苷酸序列组成(例如,GC对AT含量)和核酸类型(例如,RNA对DNA)。额外的考虑因素是核酸中的一种是否固定在例如过滤器上。

[0149] 逐渐升高的严格性条件的具体实例如下:在约室温下,2×SSC/0.1%SDS(杂交条件);在约室温下,0.2×SSC/0.1%SDS(低严格性条件);在约42℃下,0.2×SSC/0.1%SDS(中等严格性条件);和在约68℃下,0.1×SSC(高严格性条件)。所属领域的技术人员可易于确定这些条件的变化(例如,分子克隆实验指南(Molecular Cloning: A Laboratory Manual),第2版,第1-3卷,萨布鲁克(Sambrook)等人编,冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory Press),纽约冷泉港(Cold Spring Harbor,N.Y.),1989)。可以仅使用这些条件中的一个,例如高严格性条件进行清洗,或者可以使用每个条件,例如每个10-15分钟,按照上面列出的顺序,重复列出的任何或所有步骤。然而,如上所述,最佳条件将根据所涉及的特定杂交反应而变化,并且可以凭经验确定。

[0150] 序列一致性:氨基酸序列之间的相似性以序列间的相似性表示,或称为序列一致性。序列一致性通常以百分比一致性(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,C端内皮抑素多肽的同源物或变体将具有相对高程度的序列一致性。

[0151] 用于比较的序列比对方法在所属领域中是众所周知的。各种程序和比对算法描述于:史密斯(Smith)和沃特曼(Waterman),应用数学进展(Adv.Appl.Math.)2:482,1981;尼德曼(Needleman)和翁施(Wunsch),分子生物学杂志(J.Mol.Biol.)48:443,1970;希金斯(Higgins)和沙普(Sharp),基因(Gene)73:237,1988;希金斯和沙普,CABIOS 5:151,1989;科尔佩(Corpet)等人,核酸研究(Nucleic Acids Research)16:10881,1988;和皮尔逊(Pearson)和利普曼(Lipman),美国国家科学院院刊85:2444,1988。阿尔丘尔(Altschul)等人,自然·遗传学(Nature Genet.)6:119,1994提出了序列比对方法和同源性计算的详细考虑。

[0152] NCBI基本局部比对搜索工具(BLAST)(阿尔丘尔等人,分子生物学杂志215:403,1990)可从若干来源获得,包括美国国家生物技术信息中心(NCBI,马里兰州贝塞斯达(Bethesda,Md))和互联网,以与序列分析程序blastp、blastn、blastx、tblastn和tblastx结合使用。有关如何使用此程序确定序列一致性的说明可在互联网上的NCBI网站获得。

[0153] C端内皮抑素多肽的同源物和变体的特征通常在于,使用NCBI Blast 2.0,带空位的blastp设置为默认参数,在与内皮抑素的氨基酸序列的全长比对上计算具有至少75%、例如至少80%的序列一致性。为了比较大于约30个氨基酸的氨基酸序列,使用Blast 2序列功能,使用设定成默认参数(空位存在成本为11,并且每个残基空位成本为1)的默认

BLOSUM62矩阵。当比对短肽(少于约30个氨基酸)时,应使用Blast 2序列功能,使用设定成默认参数(开放空位9,延伸空位1罚分)的PAM30矩阵进行比对。与参考序列具有甚至更大相似性的蛋白质在通过此方法评估时将显示增加的百分比一致性,如至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列一致性。当少于全部序列比较序列一致性时,同源物和变体将通常在10-20个氨基酸的短窗口内具有至少80%序列一致性,并且可以具有至少85%或至少90%或95%的序列一致性,取决于它们与参考序列的相似性。在这类短窗口内确定序列一致性的方法可以在互联网上的NCBI网站上获得。所属领域的技术人员应了解,仅出于指导目的而提供这些序列一致性范围;完全有可能获得超出所提供的范围的非常显著的同源物。

[0154] 治疗有效量:足以在所治疗的个体中达到所需效果的化合物(如C端内皮抑素多肽)的量。举例来说,这可以是治疗或改善个体的纤维化(如皮肤或肺纤维化)所必需的量。在一些实施例中,它是在一段时间内治疗个体达到可测量的量或可测量地抑制个体的疾病进展所必需的量。在其它实施例中,治疗有效量是预防性抑制疾病所必需的量。

[0155] 有效量的C端内皮抑素多肽可以在治疗过程中以单次剂量或以数次剂量(例如每日)投与。然而,有效量将取决于施用的化合物、所治疗的个体、病痛的严重程度和类型以及化合物的投与方式。

[0156] 经转导:经转导的细胞是通过分子生物学技术将核酸分子引入其中的细胞。如本文所用,术语转导涵盖可以将核酸分子引入到这类细胞中的所有技术,包括用病毒载体转染、用质粒载体转化、以及通过电穿孔、脂质转染和粒子枪加速引入裸DNA。

[0157] 载体:引入到宿主细胞中的核酸分子,从而产生经转化的宿主细胞。载体可以包括允许其在宿主细胞中复制的核酸序列,如复制起点。载体还可以包括一或多个可选标记基因和所属领域中已知的其它遗传元件。载体包括质粒载体,包括用于在革兰氏阴性和革兰氏阳性细菌细胞中表达的质粒。示例性载体包括用于在大肠杆菌和沙门氏菌属(*Salmonella*)中表达的载体。载体还包括病毒载体,如(但不限于)逆转录病毒、正痘(orthopox)、禽痘(avipox)、鸡痘(fowlpox)、羊痘(capripox)、猪痘(suipox)、腺病毒、疱疹病毒、 α 病毒、杆状病毒、辛德毕斯病毒(Sindbis virus)、牛痘病毒和脊髓灰质炎病毒载体。载体还包括用于在酵母细胞和昆虫细胞中表达的载体。

[0158] 除非另外说明,否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本公开所属领域的普通技术人员通常理解的相同的含义。除非上下文另有明确指示,否则单数术语“一(a/an)”和“所述”包括复数指代物。类似地,除非上下文另有明确指示,否则词语“或”旨在包括“和”。另外应理解的是,给出的核酸或肽的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是近似的,并且是为了描述而提供的。尽管与本文所述相似或等效的方法和材料可以用于本公开的实践或测试中,但是下文描述了合适的方法和材料。术语“包含”意指“包括”。本文提及的所有公开、专利申请、专利和其它参考文献都以全文引用的方式并入。如有冲突,以本说明书为准,包括对术语的解释。另外,所述材料、方法和实例仅是说明性的并不打算限制性的。

[0159] C端内皮抑素多肽

[0160] 本文公开了C端内皮抑素多肽及其变体。所述多肽可以抑制存在于纤维化病症,如(但不限于)硬皮病中的纤维化。所述多肽含有内皮抑素蛋白的C端氨基酸序列,但不包括全

长内皮抑素。内皮抑素蛋白可以是如来自人类、非人类灵长类动物、犬科动物、猫科动物、马科动物、牛科动物、绵羊、羊或啮齿类动物(例如,小鼠或大鼠)的哺乳动物蛋白。编码人类内皮抑素(如SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列)的示例性核苷酸序列是:

```
ATGCACAGCC ACCGCGACTT CCAGCCGGTG CTCCACCTGG TTGCGCTCAA CAGCCCCCTG
TCAGGCGGCA TGCGGGGCAT CCGCGGGGCC GACTTCCAGT GCTTCCAGCA GGCGCGGGCC
[0161] GTGGGGCTGG CGGGCACCTT CCGCGCCTTC CTGTCCTCGC GCCTGCAGGA CCTGTACAGC
ATCGTGCGCC GTGCCGACCG CGCAGCCGTG CCCATCGTCA ACCTCAAGGA CGAGCTGCTG
TTTCCCAGCT GGGAGGCTCT GTTCTCAGGC TCTGAGGGTC CGCTGAAGCC CGGGGCACGC
ATCTTCTCCT TTAACGGCAA GGACGTCCTG ACCCACCCCA CCTGGCCCCA GAAGAGCGTG
TGGCATGGCT CGGACCCCAA CGGGCGCAGG CTGACCGAGA GCTACTGTGA GACGTGGCGG
[0162] ACGGAGGCTC CCTCGGCCAC GGGCCAGGCC TACTCGCTGC TGGGGGGCAG GCTCCTGGGG
CAGAGTGCCG CGAGCTGCCA TCACGCCTAC ATCGTGCTAT GCATTGAGAA CAGCTTCATG
ACTGCCTCCA AGTAG (SEQ ID NO:1)
```

[0163] 另见 GENBANK® 登录号 NM030582.3; NM130444.2; NM130445.2, 其全部以引入的方式并入本文中。

[0164] 编码人类内皮抑素(如SEQ ID NO:13所示的氨基酸序列)的另一个示例性核苷酸序列是:

```
CACAGCCACCGC GACTTCCAGC CGGTGCTCCACCTGGTTGCG CTCAACAGCC CCCTGTCAGG
CGGCATGCGG GGCATCCGCG GGGCCGACTTCCAGTGCTTC CAGCAGGCGC GGGCCGTGGG
GCTGGCGGGC ACCTTCCGCG CCTTCCTGTCCTCGCGCCTG CAGGACCTGT ACAGCATCGT
GCGCCGTGCC GACCGCGCAG CCGTGCCCATCGTCAACCTC AAGGACGAGC TGCTGTTTCC
[0165] CAGCTGGGAG GCTCTGTTCT CAGGCTCTGAGGGTCCGCTG AAGCCCGGGG CACGCATCTT
CTCCTTTGAC GGCAAGGACG TCCTGAGGCACCCACCTGG CCCAGAAGA GCGTGTGGCA
TGGCTCGGAC CCCAACGGGC GCAGGCTGACCGAGAGCTAC TGTGAGACGT GGCGGACGGA
GGCTCCCTCG GCCACGGGCC AGGCCTCCTCGCTGCTGGGG GGCAGGCTCC TGGGGCAGAG
TGCCGCGAGC TGCCATCACG CCTACATCGTGCTCTGCATT GAGAACAGCT TCATGACTGC
CTCCAAGTAG (SEQ ID NO:12)
```

[0166] 由SEQ ID NO:1编码的示例性人类内皮抑素多肽序列是:

```
HSHRDFQPVL HLVALNSPLS GMRGIRGAD FQCFQQARAV GLAGTFRAFL SSRLQDLYSI
VRRADRAAVP IVNLKDELLF PSWEALFSGS EGPLKPGARI FSFNGKDVLT HPTWPQKSVW
[0167] HGSDPNGRRL TESYCETWRT EAPSATGQAYT SLLGGRLLGQ SAASCHHAYI VLTCIENSFMTASK
(SEQ ID NO:2)
```

[0168] 这一蛋白质的长度为183个氨基酸,与GENBANK®登录号AAF01310一致,只是缺少AAF01310的起始物甲硫氨酸。

[0169] 由SEQ ID NO:12编码的示例性人类内皮抑素多肽序列是:

```
HSHRDFQPVL HLVALHSPLS GMRGIRGAD FQCFQQARAV GLAGTFRAFL SSRLQDLYSI
VRRADRAAVP IVNLKDELLF PSWEALFSGS EGPLKPGARI FSFTDGKDVLR HPTWPQKSVW
[0170] HGSDPNGRRL TESYCETWRT EAPSATGQAST SLLGGRLLGQ SAASCHHAYI
VLTCIENSFMTASK (SEQ ID NO:13)
```

[0171] 另见 GENBANK® 登录号 CAB90482, 其以引入的方式并入本文中。

[0172] 除了上面 SEQ ID NO:2 和 13 中用下划线表示的三个氨基酸取代之外, SEQ ID NO:2 与 SEQ ID NO:13 一致。

[0173] 编码小鼠内皮抑素的示例性核苷酸序列是:

```
CATACTCATC AGGACTTTCA GCCAGTGCTC CACCTGGTGG CACTGAACAC CCCCCTGTCT
GGAGGCATGC GTGGTATCCG TGGAGCAGAT TTCCAGTGCT TCCAGCAAGC CCGAGCCGTG
GGGCTGTCGG GCACCTTCCG GGCTTTCCTG TCCTCTAGGC TGCAGGATCT CTATAGCATC
GTGCGCCGTG CTGACCGGGG GTCTGTGCCC ATCGTCAACC TGAAGGACGA GGTGCTATCT
CCCAGCTGGG ACTCCCTGTT TTCTGGCTCC CAGGGTCAAC TGCAACCCGG GGCCCGCATC
[0174] TTTTCTTTTG ACGGCAGAGA TGTCCTGAGA CACCCAGCCT GGCCGCAGAA GAGCGTATGG
CACGGCTCGG ACCCCAGTGG GCGGAGGCTG ATGGAGAGTT ACTGTGAGAC ATGGCGAACT
GAAACTACTG GGGCTACAGG TCAGGCCTCC TCCCTGCTGT CAGGCAGGCT CCTGGAACAG
AAAGCTGCGA GCTGCCACAA CAGCTACATC GTCCTGTGCA TTGAGAATAG CTTTCATGACC
TCTTTCTCCA AA (SEQ ID NO:3)
```

[0175] 由 SEQ ID NO:3 编码的示例性小鼠内皮抑素多肽序列是:

```
HTHQDFQPVL HLVALNTPLS GGMRGIRGAD FQCFQQARAV GLSGTFRAFL SSRLQDLYSI
VRRADRGSPV IVNLKDEVLS PSWDSLFSGS QGQLQPGARI FSPDGRDVLH HPAPWPQKSVW
[0176] HGSDPSGRRL MESYCETWRT ETTGATGQAS SLLSGRLLEQ KAASCHNSYI VLCIENSFMT
SFSK (SEQ ID NO:4)
```

[0177] 这一蛋白质与 GENBANK® 登录号 AAF69009 一致。来自其它物种的内皮抑素核苷酸和氨基酸序列也是公众可获得的。

[0178] 在一些实施例中, C 端内皮抑素多肽含有内皮抑素蛋白的 C 端区的约 10 至约 60 个连续氨基酸, 但不包括全长内皮抑素蛋白或内皮抑素蛋白的 N 端区。所述肽可以包括内皮抑素蛋白的 C 端区的约 10 至约 55 个连续氨基酸或约 20 至约 54 个连续氨基酸, 如内皮抑素蛋白 (如 SEQ ID NO:2) 的 C 端区的约 53 个连续氨基酸。举例来说, 所述肽可以包括内皮抑素蛋白的 C 端区的约 40 个、约 45 个、约 46 个、约 47 个、约 48 个、约 49 个、约 50 个、约 51 个、约 52 个或约 53 个连续氨基酸, 如 SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:13 或 SEQ ID NO:4 的内皮抑素序列的氨基酸 93 至 183。在氨基酸或核酸序列的情形下, “约” 意指在一个残基内 (比指定数目多一个或少一个)。

[0179] 内皮抑素肽可以包括内皮抑素蛋白的 C 端区的 40、45、46、47、48、49、50、51、52、53、40-45、45-50 或 50-55 个连续氨基酸。在一些实例中, 所述肽由内皮抑素多肽, 如 (但不限于) SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4 或 SEQ ID NO:13 的 C 端区的 40、45、46、47、48、49、50、51、52、53 个连续氨基酸组成。在一些实施例中, 所述肽包括内皮抑素或其具有抗纤维化活性的变体的氨基酸 133 至 180 的至少 30 个氨基酸或由所述氨基酸组成。

[0180] 内皮抑素肽可以包括如 SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4 或 SEQ ID NO:13 的内皮抑素蛋白的约氨基酸 120、125、130、131、132、133、134 或 135 至约氨基酸 175、180、181、182 或 183, 由所述氨基酸组成或基本上由所述氨基酸组成。在一些实例中, 所述肽包括 SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4 或 SEQ ID NO:13 的氨基酸 120 至 183、125 至 183、130 至 183、131 至 183、132 至 183、134 至 183、135 至 183、120 至 180、125 至 180、130 至 180、131 至 180、132 至 180、133 至 180、134 至 180

或135至180,由所述氨基酸组成或基本上由所述氨基酸组成。在具体实例中,所述肽包括SEQ ID NO:2的氨基酸133-180、SEQ ID NO:4的氨基酸133-180、SEQ ID NO:13的氨基酸133-180,由所述氨基酸组成或基本上由所述氨基酸组成。在此上下文中,“基本上由……组成”意思指肽不包括额外的氨基酸残基,但可以包括额外的组分,如标记。

[0181] 本文公开的其它内皮抑素肽变体可以包含与C端内皮抑素多肽具有至少约70%、80%、90%、95%、98%或99%一致性或同源性的氨基酸序列,由所述氨基酸序列组成或基本上由所述氨基酸序列组成。C端内皮抑素多肽不包括全长内皮抑素蛋白或内皮抑素蛋白的N端区(如SEQ ID NO:2的氨基酸1-92)。

[0182] 在一些非限制性实例中,C端内皮抑素多肽可以包括天然存在的C端内皮抑素多肽(参见SEQ ID NO:2、4或13)中的取代,如保守氨基酸取代,预期至多约1、2、3、4、5个取代将保留抗纤维化活性。C端内皮抑素多肽可以包括至多1个、至多2个、至多3个或至多4个氨基酸取代,如保守氨基酸取代。

[0183] 与上述序列相似的多肽可以含有取代、缺失或添加。差异可以例如在不同物种中不显著保守的多肽区中。这类区域可以通过比对来自不同动物物种的内皮抑素蛋白的氨基酸序列来鉴定。因此,内皮抑素肽可以包括如SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:13的氨基酸133-180所示的至少40个、至少45个、至少46个、至少47个、至少48个、至少50个、至少51个、至少52个或全部氨基酸,基本上由所述氨基酸组成或由所述氨基酸组成。或者,内皮抑素肽可以包括这些序列之一中的至多1、2、3、4或5个氨基酸取代,条件是所述肽具有抗纤维化活性。所述肽的长度可以是40、45、46、47、48、49、50、51、52、53、40-45、45-50或50-55个氨基酸。所述肽不包括内皮抑素的全部序列或如SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:13的N端区。在额外实施例中,所述肽的长度为至多40、45、46、47、48、49、50、51、52或53个氨基酸,如长度为40、45、46、47、48、49、50、51、52或53个氨基酸的肽。

[0184] 在一些实施例中,所述肽经修饰以包括C端酰胺。本文公开的任何C端内皮抑素多肽都可以包括C端酰胺。

[0185] C端内皮抑素多肽包括内皮抑素的氨基酸133-180中的三个半胱氨酸残基。在不受理论束缚的情况下,据信三个半胱氨酸残基中的两个参与形成对肽的三级结构重要的分子内二硫桥键。第三个半胱氨酸残基可以参与分子间相互作用。在一些实施例中,C端内皮抑素多肽可以包括半胱氨酸修饰。半胱氨酸修饰可以经任何氨基酸取代。在一些实施例中,半胱氨酸修饰可以是半胱氨酸至丙氨酸取代。在不受理论束缚的情况下,据信用丙氨酸取代半胱氨酸(例如,C67A)可增强如本文所述的C端内皮抑素多肽的溶解度。具有半胱氨酸至丙氨酸取代的示例性C端内皮抑素多肽如SEQ ID NO:14所示。

[0186] 以下是人类(氨基酸133-180)、小鼠、大鼠和奶牛胶原蛋白XVIII内皮抑素氨基酸序列和人类胶原蛋白XV的比对:

[0187] SEQ ID:

[0188]	人类	SYCETWRT EAPS ATGQASSLL G GRLL GQSA ASCH HAY IIVLCIENSFMT
		SYCETWRT E ATGQASSLL GRLL Q AASCH +YIVLCIENSFMT
	小鼠	SYCETWRT E TTG ATGQASSLL S GRLL EQKA ASCH NSY IIVLCIENSFMT
	大鼠	SYCETWRT E ATGV TGQASSLL S GRLL EQKA ESCH NSY IIVLCIENSFMT
	奶牛	SYCETWRT DSRA ATGQASSLL A GRLL EQKA GCH NAF IIVLCIENSFMT
	HumXV	<u>NYCEAWRTADTAVTGLASPLSTGKILDQKAYSCANRLIVLCIENSFMT</u>

[0189] 在内皮抑素序列之间,氨基酸133-141、145-153、155-158、162-166和169-180是保守的(上述第二行)。关于完整的人类内皮抑素序列,参见SEQ ID NO:2;关于完整的小鼠内皮抑素序列,参见SEQ ID NO:4;关于完整的大鼠内皮抑素序列,参见SEQ ID NO:9;并且关于完整的奶牛内皮抑素序列,参见SEQ ID NO:10。完整的人类胶原蛋白XV以SEQ ID NO:11提供。

[0190] 在一些实施例中,上述比对的第二行中的氨基酸示出了SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:13中可保守以保持多肽的抗纤维化活性的区域。在其它实施例中,应保留加下划线的氨基酸以保持多肽的抗纤维化活性。因此,在一些实施例中,C端内皮抑素多肽包括SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:13的氨基酸133-141、145-153、155-158、162-166和169-180。在一些实施例中,位置145处的A是保守的。

[0191] 在本文中称为E4的多肽是具有C端酰胺的人类内皮抑素的氨基酸133-180(参见SEQ ID NO:2的氨基酸133-180)。在一些实施例中,可以保留在肽中以保留抗纤维化活性的区域包括E4的前七个保守氨基酸中一个或两个潜在的磷酸化位点:SYCE和TWR(分别是E4的氨基酸1-4和5-7,还参见SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:13的氨基酸133-136和137-139)。在一些实施例中,可以保留在肽中以保留抗纤维化活性的区域包括一个或两个潜在的豆蔻酰化位点:GQaySL和GQsaAS(分别是E4的氨基酸15-20和27-32,参见SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:13的氨基酸147-152和氨基酸159-164)。因此,在一些实施例中,C端内皮抑素多肽在SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:13的氨基酸133-180中包括零个或至多1个、至多2个、至多3个、至多4个或至多5个取代,其中所述取代不在SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:13的氨基酸133-141、145-153、155-158、162-166和169-180内,并且包括C端酰胺。

[0192] 在其它实施例中,氨基酸可以在人类和小鼠序列之间进行不同的取代,而不影响抗纤维化活性。在其它实施例中,上述人类序列中显示的粗体和斜体的氨基酸是可以在保持抗纤维化活性的同时被取代的那些氨基酸。举例来说,可以在C端内皮抑素多肽中改变氨基酸序列的氨基酸142-144、154、159-161和181-183。这些氨基酸可经例如在另一物种中发现的氨基酸取代,如上所示(SEQ ID NO:9-10)。举例来说,C端内皮抑素多肽可以包括SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:13的氨基酸133-180,其中氨基酸142-144、154和氨基酸159-161经取代。此多肽可以包括C端酰胺。

[0193] 在这些或其它位置可经取代、插入或缺失的其它氨基酸可以通过与生物分析偶联的诱变研究来鉴定。以上比对仅作为指导而提供。

[0194] 本文还涵盖含有C端内皮抑素多肽(例如,E3)的多肽的多聚体,包括如下所述的融合多肽。在一些实施例中,多聚体可以是二聚体、三聚体或四聚体,各自包含C端内皮抑素片

段。

[0195] 本文还涵盖与异源肽(如可用于检测、纯化、稳定或溶解内皮抑素多肽的肽)融合的C端内皮抑素多肽。这些多肽不包括全长内皮抑素蛋白或内皮抑素蛋白的N端区。在一些实施例中,C端多肽可以在其N端连接于免疫球蛋白(Ig)恒定重链或轻链结构域或其部分。举例来说,多肽,如(但不限于)SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:13(例如,E4)或SEQ ID NO:14的氨基酸133-180,可以连接于重链的CH1、CH2和/或CH3结构域。如果恒定区来自轻链,那么它可以来自κ或λ轻链。如果恒定区来自重链,那么它可以来自以下任一抗体类别的抗体:IgG、IgA、IgE、IgD和IgM。IgG可以是IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。恒定结构域可以是Fc片段。恒定结构域可以来自哺乳动物抗体,如人类抗体。可溶性受体-IgG融合蛋白是常见的免疫学试剂并且其构建方法是所属领域中已知的(参见例如美国专利第5,225,538号、第5,726,044号、第5,707,632号、第750,375号、第5,925,351号、第6,406,697号和贝格尔(Bergers)等人科学(Science)1999 284:808-12)。在一个实例中,免疫球蛋白是人类IgG、特别是IgG1的重链恒定部分,其中两个重链之间的二聚化发生在铰链区。应认识到,包括Fc区的CH2和CH3结构域作为融合多肽的一部分增加了包含Fc区的多肽以及包含所述多肽的寡聚物或二聚体的体内循环半衰期。

[0196] 包括铰链区和结构域CH2和CH3的人类IgG1的Fc部分具有以下核苷酸序列:

```
GAG CCC AAA TCT TGT GAC AAA ACT CAC ACA TGC CCA CCG TGC CCA GCA CCT
GAA CTC CTG GGG GGA CCG TCA GTC TTC CTC TTC CCC CCA AAA CCC AAG GAC
ACC CTC ATG ATC TCC CGG ACC CCT GAG GTC ACA TGC GTG GTG GTG GAC GTG
AGC CAC GAA GAC CCT GAG GTC AAG TTC AAC TGG TAC GTG GAC GGC GTG GAG
GTG CAT AAT GCC AAG ACA AAG CCG CGG GAG GAG CAG TAC AAC AGC ACG TAC
CGT GTG GTC AGC GTC CTC ACC GTC CTG CAC CAG GAC TGG CTG AAT GGC AAG
[0197] GAG TAC AAG TGC AAG GTC TCC AAC AAA GCC CTC CCA GCC CCC ATC GAG AAA
ACC ATC TCC AAA GCC AAA GGG CAG CCC CGA GAA CCA CAG GTG TAC ACC CTG
CCC CCA TCC CGG GAT GAG CTG ACC AAG AAC CAG GTC AGC CTG ACC TGC CTG
GTC AAA GGC TTC TAT CCC AGC GAC ATC GCC GTG GAG TGG GAG AGC AAT GGG
CAG CCG GAG AAC AAC TAC AAG ACC ACG CCT CCC GTG CTG GAC TCC GAC GGC
TCC TTC TTC CTC TAC AGC AAG CTC ACC GTG GAC AAG AGC AGG TGG CAG CAG
GGG AAC GTC TTC TCA TGC TCC GTG ATG CAT GAG GCT CTG CAC AAC CAC TAC
ACG CAG AAG AGC CTC TCC CTG TCT CCG GGT AAA TGA (SEQ ID NO:5),
```

[0198] 其编码具有以下氨基酸序列的多肽:

[0199] Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys (SEQ ID NO:6)

[0200] 恒定Ig结构域还可以含有一或多个减少或消除一或多个效应子功能(例如结合于Fc受体和补体活化)的突变(参见例如莫里森(Morrison),免疫学年鉴(Annu.Rev.Immunol.),10,第239-65页(1992);邓肯(Duncan)和温特(Winter)(1988)自然332:738-740;和许(Xu)等人(1994)生物化学杂志269:3469-3474)。举例来说,提供了对应于人类IgG1的Leu 235和Pro 331的氨基酸分别至Glu和Ser的突变。这类构建体进一步描述于美国专利第6,656,728号中。

[0201] C端内皮抑素多肽还可以连接于如C端内皮抑素多肽和异源多肽之间具有凝血酶切割位点的连接子序列。编码这种位点的示例性核苷酸序列具有以下核苷酸序列:5'TCT AGA GGT GGT CTA GTG CCG CGC GGC AGC GGT TCC CCC GGG TTG CAG 3'(SEQ ID NO:7),其编码具有以下氨基酸序列的多肽:Ser Arg Gly Gly Leu Val Pro Arg Gly Ser Gly Ser Pro Gly Leu Gln(SEQ ID NO:8)。C端内皮抑素多肽也可以与信号序列融合。举例来说,当重组制备时,编码肽的核酸可以在其5'端连接于信号序列,使得肽从细胞分泌。

[0202] 肽可以作为基本上纯的制剂使用,如其中制剂中至少约90%的肽是所需肽。还可以使用包含至少约50%、60%、70%或80%的所需肽的组合物。肽可以是变性或未变性的,并且因此可以是聚集或未聚集的。

[0203] 本文涵盖的其它C端内皮抑素多肽是包括经修饰的氨基酸的那些。示例性肽是衍生肽,其可以通过糖基化、聚乙二醇化、磷酸化或任何类似的方法修饰的肽,保留了衍生它的肽的至少一种生物功能。肽也可以包含一或多个非天然存在的氨基酸。举例来说,非经典氨基酸或化学氨基酸类似物可以作为取代或添加引入到肽中。非经典氨基酸一般包括(但不限于)常见氨基酸的D-异构体、2,4-二氨基丁酸、 α -氨基异丁酸、4-氨基丁酸、Abu、2-氨基丁酸、 γ -Abu、 ϵ -Ahx、6-氨基己酸、Aib、2-氨基异丁酸、3-氨基丙酸、鸟氨酸、正亮氨酸、正缬氨酸、羟基脯氨酸、肌氨酸、瓜氨酸、高瓜氨酸、半胱氨酸、叔丁基甘氨酸、叔丁基丙氨酸、苯基甘氨酸、环己基丙氨酸、 β -丙氨酸、氟-氨基酸、设计氨基酸,如 β -甲基氨基酸、Ca-甲基氨基酸、Na-甲基氨基酸和氨基酸类似物。在一些实施例中,用硒甲硫氨酸取代可能是有用的(例如,用于X射线衍射分析)。此外,氨基酸可以是D(右旋)或L(左旋)。在其它具体实施

例中,提供了本文所列的肽的分支形式,如通过用具有能够与一或多个氨基酸形成肽键的自由侧链的氨基酸或氨基酸类似物取代序列内的一或多个氨基酸(并且因此能够形成“分支”)。也设想了环状肽。

[0204] 还包括在合成期间或之后通过苄基化、糖基化、乙酰化、磷酸化、酰胺化、聚乙二醇化、通过已知的保护/封闭基团衍生化、蛋白水解切割、与抗体分子或其它细胞配体连接等经差异修饰的肽衍生物。在具体实施例中,肽在N端乙酰化和/或在C端酰胺化。

[0205] 在一个实例中,肽包括羧基端酰胺。这种类型的C端内皮抑素多肽的一个具体的非限制性实例是E4(参见例如SEQ ID NO:13的氨基酸133-180),其在下文的实例部分中详细描述。这种肽或本文公开的任何C端内皮抑素多肽可以在C端酰胺化。

[0206] 还提供了C端内皮抑素多肽的衍生物,如经化学修饰的肽和肽模拟物。肽模拟物是基于或衍生自肽和蛋白质的化合物。肽模拟物可以通过使用非天然氨基酸对已知肽序列的结构修饰、构象约束、等排置换等来获得。主题肽模拟物构成肽和非肽合成结构之间的结构空间的连续体;因此,肽模拟物可用于描绘药效团和帮助将肽翻译成具有亲本肽活性的非肽化合物。

[0207] C端内皮抑素多肽的模拟物包括在本公开中。这类肽模拟物可以具有如不可水解(例如,增加对蛋白酶或降解相应肽的其它生理条件的稳定性)、增加刺激细胞分化的特异性和/或效价的属性。出于说明性目的,可以使用例如苯二氮卓类(例如,参见弗赖丁格(Freidinger)等人肽:化学和生物学(Peptides: Chemistry and Biology),G.R.马歇尔(G.R.Marshall)编,ESCOM出版社:荷兰莱顿(Leiden,Netherlands),1988)、经取代的 γ 内酰胺环(加维(Garvey)等人肽:化学和生物学,G.R.马歇尔编,ESCOM出版社:荷兰莱顿,1988,第123页)、C-7模拟物(霍夫曼(Huffman)等人肽:化学和生物学,G.R.马歇尔编,ESCOM出版社:荷兰莱顿,1988,第105页)、酮基-亚甲基假肽(艾文森(Ewenson)等人(1986)药物化学杂志(J Med Chem) 29:295;和艾文森等人肽:结构和功能(Peptides:Structure and Function)(第9届美国肽研讨会的会议记录)皮尔斯化学公司(Pierce Chemical Co.)伊利诺斯州罗克兰(Rockland,Ill.),1985)、 β -转角二肽核心(长井(Nagai)等人(1985)四面体通讯(Tetrahedron Lett) 26:647;和佐藤(Sato)等人(1986)化学学会学报柏尔金汇刊(J Chem Soc Perkin Trans) 1:1231)、 β -氨基醇(戈登(Gordon)等人(1985)生物化学与生物物理研究通讯(Biochem Biophys Res Commun) 126:419;和丹恩(Dann)等人(1986)生物化学与生物物理研究通讯134:71)、二氨基酮(纳塔拉安(Natarajan)等人(1984)生物化学与生物物理研究通讯124:141)和经修饰的亚甲基氨基(罗克(Roark)等人肽:化学和生物学,G.R.马歇尔编,ESCOM出版社:荷兰莱顿,1988,第134页)生成肽类似物。另外,一般参见会期III:分析和合成方法(Session III:Analytic and synthetic methods),肽:化学和生物学,G.R.马歇尔编,ESCOM出版社:荷兰莱顿,1988)。

[0208] 除了可以进行产生肽模拟物的多种侧链置换之外,本公开特别设想了使用肽二级结构的构象约束模拟物。已经开发了许多用于肽的酰胺键的替代物。经常用于酰胺键的替代物包括以下基团:(i)反式-烯炔,(ii)氟烯炔,(iii)亚甲基氨基,(iv)磷酰胺和(v)磺酰胺。另外,可以使用基于肽主链的更实质性修饰的肽模拟物。属于这一类的肽模拟物包括(i)逆反式类似物和(ii)N-烷基甘氨酸类似物(所谓的类肽)。此外,组合化学的方法可用于产生肽模拟物。举例来说,所谓的“肽变形”策略的一些实施例集中在随机产生包含宽范围

肽键替代物的肽类似物文库。在一示例性实施例中,肽模拟物可以作为肽的逆反式类似物而得到。可以根据所属领域中已知的方法制备这类逆反式类似物,如西斯托(Sisto)等人美国专利第4,522,752号所描述。逆反式类似物可以如例如PCT公开号W0 00/01720中所述产生。可以产生混合肽,如包括一些正常肽键的混合肽。作为一般指导,对蛋白水解最敏感的位点通常被改变,对于模拟转换不太敏感的酰胺键是任选的。最终产物或其中间物可以通过HPLC纯化。

[0209] 在一些实施例中,肽可以包括作为D立体异构体的至少一个氨基酸或每个氨基酸。其它肽可以包括至少一个经逆转的氨基酸。经逆转的氨基酸可以是D立体异构体。肽的每个氨基酸可以经逆转和/或每个氨基酸可以是D立体异构体。在另一个说明性实施例中,肽模拟物可以作为肽的逆转对映体类似物而得到。如例如PCT公开号W0 00/01720中所述,可以用市售D-氨基酸(或其类似物)和标准的固相或液相肽合成技术合成像这样的逆转对映体类似物。最终产物可以通过HPLC纯化,得到纯的逆转对映体类似物。在又一个说明性实施例中,可以制备主题肽的反式-烯烃衍生物。可以根据苏(Shue)等人(1987)四面体通讯28:3225和如PCT公开W0 00/01720中所述的方法合成反式-烯烃类似物。另外可能使通过上述方法合成的假二肽与其它假二肽偶合,以制备具有数个烯属官能团而不是酰胺官能团的肽类似物。另一类肽模拟衍生物包括磷酸酯衍生物。这类磷酸酯衍生物的合成可以根据已知的合成方案进行调整(参见例如鲁兹(Loots)等人肽:化学和生物学,(艾思康科学出版社(Escm Science Publishers),莱顿,1988,第118页));派翠罗(Petrillo)等人肽:结构和功能(第9届美国肽研讨会的会议记录,皮尔斯化学公司,伊利诺斯州罗克兰,1985)。

[0210] 许多其它肽模拟物结构是所属领域中已知的并且可以容易地适用于主题肽模拟物。举例来说,肽模拟物可以并入1-氮杂双环[4.3.0]壬烷替代物(参见金等人(1997)有机化学杂志(J.Org.Chem.)62:2847)、或N-酰基哌嗪酸(参见习(Xi)等人(1998)美国化学学会杂志(J.Am.Chem.Soc.)120:80)、或作为约束氨基酸类似物的2-取代的哌嗪部分(参见威廉姆斯(Williams)等人(1996)药物化学杂志39:1345-1348)。在其它实施例中,某些氨基酸残基可以经芳基和二芳基部分,如单环或双环芳族或杂芳族核、或联芳族、芳族-杂芳族或联杂芳族核置换。主题肽模拟物可以通过组合合成技术与高通量筛选相结合来优化。此外,模拟物的其它实例包括(但不限于)基于蛋白质的化合物、基于碳水化合物的化合物、基于脂质的化合物、基于核酸的化合物、天然有机化合物、合成衍生的有机化合物、抗独特型抗体和/或催化抗体或其片段。模拟物可以通过例如针对能够抑制纤维化的化合物筛选天然和合成化合物文库来获得。模拟物还可以例如从天然和合成化合物文库,特别是化学文库或组合文库(例如,序列或大小不同但具有相同结构单元的化合物文库)获得。也可以通过例如合理的药物设计来获得模拟物。在合理的药物设计程序中,可以通过例如核磁共振(NMR)或x射线晶体学来分析本发明化合物的三维结构。三维结构然后可用于通过例如计算机建模来预测潜在模拟物的结构。然后可通过例如化学合成、重组DNA技术或通过从天然来源(例如,植物、动物、细菌和真菌)中分离模拟物来产生预测的模拟物结构。

[0211] 所公开的方法中使用的所有C端内皮抑素多肽都具有抗纤维化活性。举例来说,如在本文所述的分析中,与对照相比,它们可以减少或抑制纤维化至少约50%、60%、70%、80%、90%或2倍、5倍、10倍、30倍或100倍的系数。

[0212] C端内皮抑素多肽(包括肽的酰胺化形式)可以通过所属领域中熟知的自动化固相

程序容易地合成。用于固相合成的技术和程序描述于固相肽合成:实践方法 (Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach), E.阿瑟顿 (E. Atherton) 和 R.C.谢泼德 (R.C. Sheppard) 著, 由 IRL 出版, 牛津大学出版社, 1989。或者, 这些肽可以通过区段缩合的方式制备, 如例如刘 (Liu) 等人, 四面体通讯 37:933-936, 1996; 巴卡 (Baca) 等人, 美国化学学会杂志 117:1881-1887, 1995; 塔姆 (Tam) 等人, 国际肽和蛋白质研究杂志 (Int. J. Peptide Protein Res.) 45:209-216, 1995; 施诺则 (Schnolzer) 和肯特 (Kent), 科学 256:221-225, 1992; 刘和塔姆, 美国化学学会杂志 116:4149-4153, 1994; 刘和塔姆, 美国国家科学院院刊 91:6584-6588, 1994; 和山城 (Yamashiro) 和李 (Li), 国际肽和蛋白质研究杂志 31:322-334, 1988) 中所述。其它可用于合成本发明的肽的方法描述于中川 (Nakagawa) 等人, 美国化学学会杂志 107:7087-7092, 1985。本公开的肽也可以容易地从合成肽的商业供应商处购买。这类供应商包括例如先进化学技术公司 (Advanced ChemTech) (肯塔基州路易斯维尔 (Louisville, Ky.))、应用生物系统公司 (Applied Biosystems) (加利福尼亚州福斯特市 (Foster City, Calif.))、阿娜斯派公司 (Anaspec) (加利福尼亚州圣何塞 (San Jose, Calif.)) 和细胞精华公司 (Cell Essentials) (马萨诸塞州波士顿 (Boston, Mass.))。

[0213] 编码C端内皮抑素多肽的聚核苷酸和宿主细胞

[0214] 还提供了编码本文公开的C端内皮抑素多肽的聚核苷酸。这些聚核苷酸包括编码所关注的肽的DNA、cDNA和RNA序列。编码序列中的沉默突变由遗传密码的简并性 (即冗余性) 引起, 由此多于一个密码子可编码相同的氨基酸残基。因此, 例如, 亮氨酸可以由CTT、CTC、CTA、CTG、TTA或TTG编码; 丝氨酸可以由TCT、TCC、TCA、TCG、AGT或AGC编码; 天冬酰胺可以由AAT或AAC编码; 天冬氨酸可以由GAT或GAC编码; 半胱氨酸可以由TGT或TGC编码; 丙氨酸可以由GCT、GCC、GCA或GCG编码; 谷氨酰胺可以由CAA或CAG编码; 酪氨酸可以由TAT或TAC编码; 以及异亮氨酸可以由ATT、ATC或ATA编码。显示标准遗传密码的表格可以在各种来源中找到 (参见例如斯特赖克 (Stryer), 1988, 生物化学 (Biochemistry), 第3版, W.H.5弗里曼公司 (W.H.5 Freeman and Co.), 纽约州)。

[0215] 编码C端内皮抑素多肽的核酸可以通过体外方法, 如聚合酶链式反应 (PCR)、连接酶链式反应 (LCR)、基于转录的扩增系统 (TAS)、自主序列复制系统 (3SR) 和QB复制酶扩增系统 (QB) 来克隆或扩增。举例来说, 编码蛋白质的聚核苷酸可以使用基于所述分子的DNA序列的引物通过cDNA的聚合酶链式反应分离。各种各样的克隆和体外扩增方法是所属领域的技术人员熟知的。PCR方法描述于例如美国专利第4,683,195号; 穆利斯 (Mullis) 等人, 冷泉港定量生物学专题讨论会 (Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.) 51:263, 1987; 和埃尔里奇 (Erlich) 编, PCR技术 (PCR Technology), (斯托克顿出版社 (Stockton Press), 纽约州, 1989)。聚核苷酸也可以通过在严格杂交条件下用选自所需聚核苷酸序列的探针筛选基因组或cDNA文库来分离。

[0216] 编码C端内皮抑素多肽的聚核苷酸包括重组DNA, 其并入到自主复制的质粒或病毒的载体中, 或原核生物或真核生物的基因组DNA中, 或作为单独的分子 (如cDNA) 独立于其它序列存在。核苷酸可以是核糖核苷酸、脱氧核糖核苷酸或任一核苷酸的修饰形式。所述术语包括单一和双重形式的DNA。

[0217] 在一些实施方案中, 载体用于在酵母, 如酿酒酵母 (*S. cerevisiae*) 或乳酸克鲁维酵母 (*Kluyveromyces lactis*) 中表达。已知数种启动子可用于酵母表达系统, 如组成型启

动子质膜 H^+ -ATP酶(PMA1)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GPD)、磷酸甘油酸激酶-1(PGK1)、醇脱氢酶-1(ADH1)和多效耐药泵(PDR5)。此外,许多诱导型启动子也是有用的,如GAL1-10(由半乳糖诱导)、PH05(由低细胞外无机磷酸盐诱导)和串联热休克HSE元件(由温度升高至37℃诱导)。响应于可滴定诱导物指导可变表达的启动子包括甲硫氨酸响应性MET3和MET25启动子和铜依赖性CUP1启动子。可以将这些启动子中的任何一个克隆到多拷贝(2 μ)或单拷贝(CEN)质粒中,以在表达水平上提供额外水平的控制。质粒可以包括用于在酵母中选择的营养标记(如URA3、ADE3、HIS1等)和用于在细菌中增殖的抗生素抗性(AMP)。在乳酸克鲁维酵母上表达的质粒是已知的,如pKLAC1。因此,在一个实例中,在细菌中扩增后,可以通过类似于细菌转化的方法将质粒引入相应的酵母营养缺陷体。聚核苷酸也可以设计成在昆虫细胞中表达。

[0218] C端内皮抑素多肽可以在多种酵母菌株中表达。举例来说,酵母宿主细胞中已经同时缺失了七种多效耐药转运蛋白YOR1、SNQ2、PDR5、YCF1、PDR10、PDR11和PDR15以及它们的活化转录因子PDR1和PDR3,从而使所得菌株对药物敏感。也可以使用质膜脂质组成改变的酵母菌株,如麦角甾醇生物合成缺陷的erg6突变体。对蛋白水解高度敏感的蛋白质可以在缺少主液泡内肽酶Pep4的酵母中表达,所述酶控制其它液泡水解酶的活化。如果相应的无效突变体不可行,那么可以使用携带温度敏感(ts)等位基因的菌株中的异源表达。

[0219] 还可以制备编码本文公开的C端内皮抑素多肽的病毒载体。已经构建了许多病毒载体,包括多瘤病毒、SV40(马德扎克(Madzak)等人,1992,普通病毒学杂志(J.Gen.Virol.),73:1533-1536)、腺病毒(伯克纳(Berkner),1992,微生物学与免疫学的当前主题(Cur.Top.Microbiol.Immunol.),158:39-6;柏林纳(Berliner)等人,1988,生物科技(Bio Techniques),6:616-629;高兹格力(Gorziglia)等人,1992,病毒学杂志(J.Virol.),66:4407-4412;昆廷(Quantin)等人,1992,美国国家科学院院刊,89:2581-2584;罗森费尔德(Rosenfeld)等人,1992,细胞,68:143-155;威尔金森(Wilkinson)等人,1992,核酸研究,20:2233-2239;斯特拉福德-佩里科代(Stratford-Perricaudet)等人,1990,人类基因治疗(Hum.Gene Ther.),1:241-256)、牛痘病毒(马克特(Mackett)等人,1992,生物技术(Biotechnology),24:495-499)、腺相关病毒(穆兹卡(Muzyczka),1992,微生物学与免疫学的当前主题158:91-123;昂(On)等人,1990,基因,89:279-282)、包括HSV和EBV的疱疹病毒(马格斯基(Margolskee),1992,微生物学与免疫学的当前主题,158:67-90;约翰逊(Johnson)等人,1992,病毒学杂志,66:2952-2965;芬克(Fink)等人,1992,人类基因治疗3:11-19;布里克菲尔德(Breakfield)等人,1987,分子神经生物学(Mol.Neurobiol.),1:337-371;弗海斯(Fresse)等人,1990,生物化学与药理学(Biochem.Pharmacol.)40:2189-2199)、辛德毕斯病毒(何微吉尔(Herweijer)等人,1995,人类基因治疗6:1161-1167;美国专利第5,091,309号和第5,217,879号)、甲型病毒(施莱辛格(Schlesinger),1993,生物技术趋势(Trends Biotechnol.)11:18-22;弗罗洛夫(Frolov)等人,1996,美国国家科学院院刊93:11371-11377)以及禽类(斑欧帕第亚(Brandyopadhyay)等人,1984,分子细胞生物学(Mol.Cell Biol.),4:749-754;派翠普洛斯(Petropoulos)等人,1992,病毒学杂志,66:3391-3397)、鼠类(米勒(Miller),1992,微生物学与免疫学的当前主题,158:1-24;米勒等人,1985,分子细胞生物学,5:431-437;佐尔格(Sorge)等人,1984,分子细胞生物学,4:1730-1737;曼(Mann)等人,1985,病毒学杂志,54:401-407)和人类来源(佩奇(Page)等人,

1990, 病毒学杂志, 64:5370-5276; 布奇坎彻 (Buchschalcher) 等人, 1992, 病毒学杂志, 66: 2731-2739) 的逆转录病毒。杆状病毒 (苜蓿银纹夜蛾 (*Autographa californica*) 多核多角体病毒; AcMNPV) 载体也是所属领域中已知的, 并且可以从商业来源获得 (如法民根公司 (PharMingen), 加利福尼亚州圣地亚哥; 蛋白质科学公司 (Protein Sciences Corp.), 康涅狄格州梅里登 (Meriden, Conn.); 斯塔津公司 (Stratagene), 加利福尼亚州拉荷亚 (La Jolla, Calif.))。

[0220] 因此, 在一些实施例, 编码C端内皮抑素多肽的聚核苷酸被包括在病毒载体中。合适的载体包括逆转录病毒载体、正痘载体、禽痘载体、鸡痘载体、羊痘载体、猪痘载体、腺病毒载体、疱疹病毒载体、 α 病毒载体、杆状病毒载体、辛德毕斯病毒载体、牛痘病毒载体和脊髓灰质炎病毒载体。具体的示例性载体是痘病毒载体, 如牛痘病毒、鸡痘病毒和高度减毒的牛痘病毒 (MVA)、腺病毒、杆状病毒等。

[0221] 使用的痘病毒包括正痘、猪痘、禽痘和羊痘病毒。正痘包括牛痘、鼠痘和浣熊痘。使用的正痘的一个实例是牛痘。禽痘包括鸡痘、金丝雀痘和鸽痘。羊痘包括山羊痘和绵羊痘。在一个实例中, 猪痘 (suipox) 是猪痘 (swinepox)。用于表达的痘病毒载体的实例如例如美国专利第6,165,460号中所述, 其以引入的方式并入本文中。可以使用的其它病毒载体包括其它DNA病毒, 如疱疹病毒和腺病毒, 以及RNA病毒, 如逆转录病毒和脊髓灰质炎。

[0222] 合适的载体公开在例如美国专利第6,998,252号中, 其以引入的方式并入本文中。在一个实例中, 重组痘病毒, 如重组牛痘病毒通过插入嵌合基因而以合成方式经修饰, 所述嵌合基因含有牛痘调控序列或与其功能等效的DNA序列, 侧翼在自然界中不与侧翼牛痘调控DNA序列邻接的编码C端内皮抑素多肽的DNA序列。含有这种嵌合基因的重组病毒在表达C端内皮抑素多肽方面是有效的。在一个实例中, 疫苗病毒载体包含 (A) 由 (i) 编码C端内皮抑素多肽的第一DNA序列和 (ii) 痘病毒启动子构成的区段, 其中痘病毒启动子邻近于编码C端内皮抑素多肽的DNA序列并对其施加转录控制; 以及侧翼所述区段的 (B) 来自痘病毒基因组的非必需区的DNA。病毒载体可以编码可选标记。在一个实例中, 痘病毒包括例如胸苷激酶基因 (参见美国专利第6,998,252号, 其以引入的方式并入本文中)。

[0223] 编码C端内皮抑素多肽的痘病毒载体包括操作地连接于编码C端内皮抑素多肽的核酸序列的至少一个表达控制元件。将表达控制元件插入痘病毒载体中以控制和调节核酸序列的表达。在这些载体中使用的表达控制元件的实例包括 (但不限于) lac系统、 λ 噬菌体的操纵子和启动子区、酵母启动子和衍生自多瘤病毒、腺病毒、逆转录病毒或SV40的启动子。额外的操作元件包括 (但不限于) 前导序列、终止密码子、聚腺苷酸化信号以及宿主系统中编码C端内皮抑素多肽的核酸序列的适当转录和随后翻译所需的任何其它序列。表达载体可以含有宿主系统中含有核酸序列的表达载体的转移和随后复制所需的额外元件。这类元件的实例包括 (但不限于) 复制起点和可选标记。所属领域的技术人员将进一步理解, 这类载体易于使用常规方法 (奥斯贝 (Ausubel) 等人, (1987) 现代分子生物学实验技术 (Current Protocols in Molecular Biology), 约翰·威利父子出版公司 (John Wiley and Sons), 纽约州纽约) 构建并且是可商购的。

[0224] 用于制备含有编码C端内皮抑素多肽的异源DNA序列的重组DNA病毒的基本技术是所属领域中已知的。这类技术涉及例如供体质粒中DNA序列侧翼的病毒DNA序列与亲本病毒中存在的同源序列之间的同源重组 (马克特等人, 1982, 美国国家科学院院刊 79:7415-

7419)。具体来说,重组病毒载体如痘病毒载体可用于递送基因。所述载体可以例如通过所属领域中已知的步骤构建,如与以引入的方式并入本文中的美国专利第5,093,258号中所述的用于产生鸡痘病毒的合成重组体的方法类似的步骤。其它技术包括使用天然存在的或人工插入亲本病毒载体中的独特的限制性内切核酸酶位点来插入异源DNA。

[0225] 编码C端内皮抑素多肽的DNA序列可以通过DNA转移到合适的宿主细胞中体外表达。细胞可以是原核或真核的。所述术语还包括目标宿主细胞的任何子代。应理解,所有子代可能与亲本细胞不同,因为在复制期间可能存在突变。稳定转移的方法,意味着外源DNA在宿主中持续保持,是所属领域中已知的。

[0226] 如上所述,编码C端内皮抑素多肽的聚核苷酸序列可以可操作地连接于表达控制序列。连接可操作地连接于编码序列的表达控制序列,使得在与表达控制序列相容的条件下实现编码序列的表达。表达控制序列包括(但不限于)合适的启动子、增强子、转录终止子、蛋白质编码基因前的起始密码子(即ATG)(内含子的剪接信号,维持基因的正确阅读框以允许恰当翻译mRNA)和终止密码子。

[0227] 宿主细胞可以包括微生物、酵母、昆虫和哺乳动物宿主细胞。

[0228] 在原核生物中表达具有真核或病毒序列的DNA序列的方法在所属领域中是众所周知的。合适的宿主细胞的非限制性实例包括细菌、古细菌、昆虫、真菌(例如酵母)、植物和动物细胞(例如哺乳动物细胞,如人类)。示例性的使用细胞包括大肠杆菌、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、酿酒酵母、鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)、SF9细胞、C129细胞、293细胞、脉孢菌(*Neurospora*)以及永生化的哺乳动物骨髓和淋巴细胞系。在培养中繁殖哺乳动物细胞的技术是众所周知的(参见雅各比(Jakoby)和帕斯坦(Pastan)(编),1979,细胞培养.酶学方法(*Cell Culture.Methods in Enzymology*),第58卷,学术出版公司(Academic Press,Inc.),乔万诺维奇出版社(Harcourt Brace Jovanovich),纽约州)。常用的哺乳动物宿主细胞系的实例是VERO和HeLa细胞、CHO细胞和WI38、BHK和COS细胞系,尽管可以使用细胞系,但是例如细胞经设计以提供更高表达期望的糖基化模式或其它特征。如上所述,用于转化酵母细胞的技术如聚乙二醇转化、原生质体转化和基因枪也是所属领域中已知的(参见杰兹(Gietz)和伍兹(Woods),酶学方法350:87-96,2002)。

[0229] 用重组DNA转化宿主细胞可以通过所属领域的技术人员熟知的常规技术进行。在宿主是原核生物的情况下,如(但不限于)大肠杆菌,可以从指数生长期后收获的细胞制备能够摄取DNA的感受态细胞,然后使用所属领域中熟知的程序通过CaCl₂方法处理。或者,可使用MgCl₂或RbCl。如果需要,也可以在形成宿主细胞的原生质体后或通过电穿孔进行转化。

[0230] 当宿主是真核生物时,可以使用如磷酸钙共沉淀物、常规机械程序(如显微注射)、电穿孔、插入包裹在脂质体中的质粒或病毒载体等DNA转染方法。真核细胞还可以用编码C端内皮抑素多肽的聚核苷酸序列和编码可选表型的第二外源DNA分子(如单纯疱疹胸苷激酶基因)共转化。另一种方法是使用真核病毒载体如猿猴病毒40(SV40)或牛乳头瘤病毒瞬时感染或转化真核细胞并表达蛋白质(参见例如真核生物病毒载体(*Eukaryotic Viral Vectors*),冷泉港实验室(Cold Spring Harbor Laboratory),格鲁兹曼(Gluzman)编,1982)。

[0231] 内皮抑素片段和变体也可以在植物中产生。举例来说,如例如美国专利第7,491,

509号(其以全文引用的方式并入本文中)中所述,可以使用IBIOLAUNCH™基因表达平台(iBio公司,特拉华州纽瓦克(Newark,DE))在植物中表达多肽。IBIOLAUNCH™平台可用于在非转基因植物中产生高水平的目标蛋白。此平台可以比使用动物细胞或微生物的方法以及需要转基因植物的系统有利。

[0232] 为了使用这一系统,将所需基因克隆到IBIOLAUNCH™载体中,将所述载体引入到植物叶片中(例如通过自动化真空渗入)。允许载体扩散到茎和叶中的细胞,其中所需蛋白质在接下来的4-7天以极高的水平表达。然后收获绿色植物材料并纯化蛋白质产物。整个IBIOLAUNCH™基因表达过程可以在同一设施中针对不同的蛋白质和新的植物作物进行重复,使得这一技术成为生产蛋白质药物和疫苗的最灵活和最快捷的方式。

[0233] 植物表达载体系统可以包括一或多种病毒载体组分。已知多种感染各种植物物种的病毒,并且可用于聚核苷酸表达。感染植物的病毒科包括(但不限于)烟草花叶病毒科(Tobamoviridae)、花椰菜病毒科(Caulimoviridae) (dsDNA)、双生病毒科(Geminiviridae) (ssDNA)、呼肠孤病毒科(Reoviridae)和分体病毒科(Partitiviridae) (dsRNA)、以及弹状病毒科(Rhabdoviridae)、布尼亚病毒科(Bunyaviridae)、雀麦花叶病毒科(Bromoviridae)和豇豆花叶病毒科(Comoviridae) (ssRNA)。附加信息可见于例如“病毒的分类和命名法,国际病毒分类学委员会第六次报告(The Classification and Nomenclature of Viruses, Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses)”(墨菲(Murphy)等人编),斯普林格出版社:纽约,1995,其全部内容以引入的方式并入本文中(另外参见,格里尔森(Grierson)等人,植物分子生物学(Plant Molecular Biology),布莱奇(Blackie),伦敦,第126-146页,1984;格鲁兹曼等人,分子生物学通讯:病毒载体(Communications in Molecular Biology:Viral Vectors),冷泉港实验室,纽约州,第172-189页,1988;和马修(Mathew),植物病毒在线(Plant Viruses Online)。

[0234] 为了成功建立局部(叶内)或系统感染,病毒必须能够复制。许多病毒含有编码参与复制过程的一或多种蛋白质(本文称为复制蛋白或复制酶蛋白)的基因。举例来说,许多RNA植物病毒编码RNA聚合酶。也可能需要额外的蛋白质,如解旋酶或甲基转移酶蛋白质。除编码复制蛋白的功能基因外,病毒基因组还可含有各种序列组分,复制蛋白也是复制所需的或便于复制的。

[0235] 根据本文所述的方法,可以使用感染植物的任何病毒来制备病毒载体或载体系统。ssRNA病毒可能是特别有用的,特别是具有(+)-链基因组的那些。用于操纵这类病毒中存在的遗传物质的技术和试剂包括所属领域中众所周知的那些。通常,例如,制备病毒基因组的DNA拷贝并克隆到微生物载体(例如细菌载体)中。某些ssDNA病毒,包括双生病毒,是特别有用的。应了解,载体和病毒基因组一般可以RNA或DNA形式存在。此外,在提及存在于DNA载体内的特征如RNA病毒的基因组或其部分的情况下,应理解所述特征作为RNA形式的DNA拷贝存在。

[0236] 可以使用许多不同类型的病毒。合适的病毒包括例如雀麦花叶病毒科(例如雀麦花叶病毒、苜蓿花叶病毒、黄瓜花叶病毒)和烟草花叶病毒科的成员。有用的病毒物种包括例如苜蓿花叶病毒(A1MV)、苹果褪绿叶斑病毒、苹果茎沟病毒、大麦条纹花叶病毒、大麦黄矮病毒、甜菜黄病毒、蚕豆斑驳病毒、蚕豆萎蔫病毒、雀麦草花叶病毒(BMV)、康乃馨潜伏病毒、康乃馨斑驳病毒、康乃馨环斑病毒、胡萝卜斑驳病毒、木薯潜伏病毒(CLV)、豇豆褪绿斑

驳病毒、豇豆花叶病毒(CPMV)、黄瓜绿斑驳花叶病毒、黄瓜花叶病毒、莴苣传染性黄病毒、玉米褪绿斑驳病毒、玉米雷亚多非纳病毒(Maize Rayado Fino Virus)、玉米条纹病毒(MSV)、欧洲防风草黄斑病毒、豌豆花叶病毒、马铃薯X病毒、马铃薯Y病毒、覆盆子矮化病毒、水稻坏死病毒(RNV)、水稻条纹病毒、水稻东格鲁球形病毒(RiceTungro Spherical Virus)、黑麦草花叶病毒、土传小麦花叶病毒、南方菜豆花叶病毒、烟草蚀刻病毒(TEV)、烟草花叶病毒(TMV)、烟草坏死病毒、烟草脆裂病毒、烟草环斑病毒、番茄丛矮病毒、番茄金色花叶病毒(TGMV)和芜菁黄花叶病毒(TYMV)。

[0237] 这些植物病毒的元件根据已知技术经基因工程改造(参见例如(参见例如萨布鲁克等人,分子克隆(Molecular Cloning),第2版,冷泉港出版社,纽约州,1989;克洛弗(Clover)等人,分子克隆,IRL出版社,牛津,1985;达森(Dason)等人,病毒学(Virology),172:285-292,1989;高松(Takamatsu)等人,欧洲分子生物学杂志6:307-311,1987;弗伦奇(French)等人,科学231:1294-1297,1986;高松等人,欧洲生物化学学会联合会快报269:73-76,1990;宇斯波夫(Yusibov)和罗斯彻-弗莱斯(Loesch-Fries),病毒学,208(1):405-7,1995;和斯匹辛(Spitsin)等人,美国国家科学院院刊,96(5):2549-53,1999)以产生用于所关注多肽(包括本文提供的内皮抑素多肽)的植物生产的病毒载体。使用至少两种载体,其中一种或两种不能系统感染,但它们一起提供支持至少一种载体的系统感染所需的全部功能,并允许在整个植物中表达所关注的聚核苷酸。因此,病毒组分可以反式互相补充以提供系统感染能力。

[0238] 具体来说,制备了生产载体。此载体包括在相关植物宿主中指导表达的调控序列控制下的所关注的聚核苷酸(例如,编码内皮抑素多肽的聚核苷酸)。在一些实施例中,将聚核苷酸置于病毒启动子(例如CP启动子)的控制下。举例来说,可能需要用所关注的聚核苷酸置换天然病毒CP基因。生产载体缺乏一或多个系统性移动所需的组分。举例来说,生产载体可能不含足以表达功能性CP(例如CP基因)的序列,但可以包括编码细胞到细胞移动蛋白的基因。生产载体可以含有一或多个序列元件(例如装配起点),其当以顺式存在时可能需要呈顺式以促进病毒传播。举例来说,生产载体可以含有来自与生产病毒相同类型的病毒或来自另一种病毒的CP活动所需或有助于CP活动的装配起点。这类序列元件可以包含CP的识别位点。在其它实施例中,生产载体可能缺乏足以表达功能性MP和/或复制酶蛋白的序列。在这些实施例中,生产载体可或缺少足以表达功能性CP的序列。

[0239] 也制备了运载载体。此载体补充生产载体,从而提供生产载体中缺失的系统感染所需的组分。举例来说,某些运载载体包括功能性外壳蛋白编码组分。这些运载载体适合于补充缺乏功能性外壳蛋白编码组分的生产载体。运载载体可缺少植物成功系统感染所需的至少一种病毒组分(例如,编码复制酶或移动蛋白的基因),只要这类组分在生产载体中也不存在即可。运载载体可以包括所关注的聚核苷酸(其可以与生产载体中所关注的聚核苷酸相同或不同)。在这种情况下,可能需要使用对于系统感染有缺陷的运载载体,例如因为它缺少一或多个必需的顺式作用序列,以使重组运载载体向非目标植物的传播减到最少。

[0240] 运载载体可以(但不一定)包括细胞到细胞移动组分(例如,编码细胞到细胞移动蛋白的基因或细胞到细胞移动所需的非编码组分)和/或可能缺乏一或多种复制酶蛋白编码组分。在运载载体不包括细胞到细胞移动组分(例如功能性MP编码部分)的实施例中,这类组分应该被包括在生产载体中。

[0241] 完整的载体组包括成功的系统性病毒感染和所关注的聚核苷酸表达所必需的所有组分。术语“组分”旨在包括蛋白质编码序列和非编码序列,如顺式作用序列(例如,启动子、装配起点、对应于mRNA中非翻译区的部分)。不同的载体或载体元件可能来源于不同的植物病毒。实际上,为了利用不同的病毒特征(例如,宿主范围、启动子活性水平、病毒粒子尺寸等),可能需要从不同病毒的元件制备载体。

[0242] 在一些实施例中,提供了包括所关注的聚核苷酸、复制酶基因和移动蛋白基因但缺乏功能性外壳蛋白编码组分的生产载体,并且提供了表达外壳蛋白基因的运载载体。举例来说,生产载体可以包括基于TMV的载体,其中在TMV CP启动子的控制下,TMVCP编码序列已经被所关注的聚核苷酸置换。这种生产载体不能够系统性移动。野生型A1MV载体可充当运载载体。A1MV载体含有功能性外壳蛋白编码组分。用生产和运载载体共同感染允许由A1MV载体CP编码序列产生的CP补充基于TMV的载体,导致基于TMV的载体的系统性移动和聚核苷酸在最初未感染的叶中的表达。或者,可以使用已除去了表达A1MV CP所需的那些以外的一或多种病毒组分的基于A1MV的载体(例如,缺乏功能性MP或复制蛋白编码组分的基于A1MV的载体),条件是存在功能性CP编码序列和可操作地连接的启动子。CP可以来自A1MV或另一种病毒。

[0243] 在一些实施例中,CP允许运载载体的系统性移动,而在其它实施例中,选择不允许运载载体的系统性移动但允许生产载体的系统性移动的CP。在运载载体缺少除了表达A1MV CP所需的那些以外的一或多种病毒组分的那些实施例中,生产载体可以补充运载载体。举例来说,生产载体可以提供如分别允许运载载体(以及在一些情况下也允许生产载体)细胞到细胞移动或复制的功能性MP或复制酶蛋白编码序列的组分。应了解,在生产者或运载者缺乏复制蛋白编码组分(例如,功能性RNA聚合酶编码组分)和另一个载体(分别为运载者或生产者)提供缺失的组分的情况下,常常需要将来自供应功能性复制组分的载体的启动子(例如,基因组启动子)插入到缺乏功能性复制蛋白编码组分的载体中以实现复制功能的有效反式互补。

[0244] 有用的病毒载体系统的另一个实例包括生产载体,其中所关注的聚核苷酸插入到A1MV载体中,替代天然的A1MV CP编码组分。将所关注的聚核苷酸置于A1MV CP启动子的控制下。这种生产载体不能系统感染,因为它缺乏CP,但能够在感染的叶子内复制并细胞到细胞移动。所述系统还包括基于花椰菜花叶病毒(CMV)的运载载体,其中将具有或不具有A1MV CP 3'UTR的A1MV CP编码部分插入到CMV载体中,替代天然存在的CMV基因组中发现的CMV CP编码组分。将A1MV CP编码组分置于CMV CP启动子的控制下。此载体表达A1MV CP。用生产和运载载体共同感染允许运载载体表达的CP反式补充生产载体缺乏功能性CP编码组分,从而允许生产载体的系统性移动。A1MV CP也允许运载载体的系统性移动。

[0245] 在一些实施例中,可能需要将来自运载载体的编码或非编码序列的一部分插入到生产载体中,或反之亦然。举例来说,某些序列可以增强复制或促进细胞到细胞或长距离移动。特别地,某些序列可以充当形成病毒转录物与CP之间的复合物(例如,装配起点)的识别位点。在这种情况下,如果使用从第二病毒载体反式提供的CP来实现第一病毒载体的系统性移动,那么可能需要将来自第二病毒载体的促进CP活性的这类序列插入到第一病毒载体中。这类序列可以包括例如病毒转录物3'UTR的部分或全部。在一些情况下,将A1MV的部分或全部的RNA 3'UTR插入到不同的病毒载体中,例如基于TMV的载体。将此组分包括在基于

TMV的载体中促进了A1MV CP反式补充缺乏功能性TMV CP编码部分的基于TMV的载体的能力。应了解,这个一般原理可以应用于任何包含反式互补载体的病毒载体系统,例如反式互补的生产和运载载体系统。

[0246] 如所属领域的一般技术人员应了解,只要载体组包括不能系统性病毒感染生产载体(例如,缺乏一或多种功能性复制蛋白、运动蛋白或外壳蛋白编码组分)以及提供生产载体中缺少的功能的运载载体,所述组就适于根据本文所述的方法使用。在一些实施例中,没有单独的载体能够系统性病毒感染,但作为一组,一个或两个载体能够进行这类感染和表达所关注的聚核苷酸。这类系统可以提供许多优点。举例来说,应了解,如果生产载体在不存在运载载体的情况下感染植物,那么将不会导致系统性感染。这减少了所关注的聚核苷酸将在非预期(非目标)植物,甚至是与目标植物相同的物种中表达的风险。具体来说,如果运载载体不能复制或细胞到细胞移动(因为它缺少复制或细胞到细胞移动所需的组分),或者如果它不能系统性感染(例如,因为它缺乏顺式作用序列,如长距离移动所需的装配起点),那么生产和运载载体共同感染非预期植物宿主的可能性将大大降低。

[0247] 一般,为了保存病毒功能以及简单地为了便于遗传操作,通过改变现有的植物病毒基因组(例如,通过除去特定的基因和/或通过破坏或取代特定的序列以灭活或取代它们)来制备载体。在这类情形中,载体将显示与天然病毒基因组非常高的序列一致性。当然,也可以制备全新的载体,例如通过分别分离单独的所需遗传元件并将它们连接在一起,任选地包含额外的元件。此外,应注意,在特定的载体被认为缺乏给定的基因、蛋白质或活性(例如,生产载体缺乏外壳蛋白基因)的情况下,如果在感染条件下不从载体表达这类蛋白质或活性就足够了,尽管载体仍然可以携带相关的编码序列。然而,一般来说,通常希望从载体除去相关的编码序列。

[0248] 类似地,当载体被认为是肯定地表达特定的蛋白质或活性时,相关基因与自然界中发现的相应基因不必是一致的。举例来说,已经发现,外壳蛋白有时可以容忍小的缺失(参见例如WO 00/46350,其以全文引用的方式并入本文中)。只要蛋白质具有功能性,就可以按照本文所述的方法使用。然而,与天然蛋白质非常高的序列一致性一般被认为是最有用的。举例来说,一般应避免大段缺失(例如,大于约25个氨基酸)。通常,病毒蛋白质将显示出与相应天然病毒蛋白质至少50%(例如,60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%)序列一致性。更确切地说,病毒蛋白质通常应与相关天然病毒蛋白质的关键功能部分(通常至少数个氨基酸,通常至少10、20、30、40、50或更多个氨基酸)具有100%一致性。

[0249] 注意到在许多蛋白质的情况下,可以进行许多氨基酸改变而不显著影响蛋白质的功能活性和/或各种其它特性,如稳定性等。具体来说,许多蛋白质容忍保守的氨基酸变化-用具有相似特性的不同氨基酸取代氨基酸,而没有显著的活性降低。保守氨基酸取代是所属领域中众所周知的,并且代表了一种获得具有与给定多肽相似或基本上相似的特性、同时改变氨基酸序列的多肽的方法。一般来说,氨基酸已经根据(1)电荷(正、负或不带电);(2)体积和极性;(3)格兰瑟姆氏物理化学距离(Grantham's physico-chemical distance);和这些的组合分类并划分成组。参见例如张(Zhang),分子进化杂志(J.Mol.Evol.),50:56-68,2000;格兰瑟姆(Grantham),科学,85:862-864,1974;达冈(Dagan)等人,分子生物学与进化(Mol.Biol.Evol.),19(7),1022-1025,2002;生物化学

(Biochemistry),第4版,斯特赖克等人,W.弗里曼公司(W.Freeman and Co.),1995;和美国专利第6,015,692号。举例来说,氨基酸可以根据体积和极性分为以下类别:特殊(C);中性和小(A、G、P、S、T);极性和相对小(N、D、Q、E)、极性和相对大(R、H、K)、非极性和相对小(I、L、M、V)以及非极性和相对大(F、W、Y)。保守氨基酸取代可以定义为用相同组中的氨基酸置换一个氨基酸的取代。因此,通过在给定的病毒蛋白质中进行一或多个保守氨基酸取代,可以得到多种功能等效的蛋白质。

[0250] 根据本文所述的方法,可以使用任何易受病毒感染的植物。一般,使用适于在限定的条件下,例如在温室和/或含水系统中生长的植物将通常是合乎需要的。选择通常不被人类或家养动物消耗和/或通常不是人类食物链的一部分的植物也是可取的,以使得它们可以在外部生长而不用担心所表达的聚核苷酸可能被不合需要地摄取。然而,在其它实施例中,使用可食用植物将是合乎需要的。

[0251] 通常,某些期望的植物特征将由待表达的特定聚核苷酸决定。仅举几个例子,当聚核苷酸编码将以高产率产生的蛋白质时(情况通常将是这样,例如当治疗性蛋白质将被表达时),通常希望选择具有相对高的生物质的植物(例如,具有高度易受病毒感染、具有短的生长期并且不在人类食物链中的附加优点的烟草)。当聚核苷酸编码全部活性需要特定翻译后修饰(或被其抑制)的蛋白质时,某些植物物种能够(或不能)完成相关修饰(例如特定的糖基化)可以指导选择。

[0252] 在一些实施例中,使用作物植物或作物相关植物。在一些实施例中,使用可食用植物。

[0253] 适合根据本文所述的方法使用的植物包括(但不限于)被子植物(Angiosperm)、苔藓植物(Bryophyte)(例如苔纲(Hepaticae)、藓纲(Musci)等)、蕨类植物(Pteridophyte)(例如蕨属(fern)、木贼属(horsetail)、石松属(lycopod))、裸子植物(裸子植)(例如松柏目(conifer)、苏铁属(cycase)、银杏(Ginko)、买麻藤目(Gnetale))和藻类(Algae)(例如绿藻纲(Chlorophyceae)、褐藻纲(Phaeophyceae)、红藻纲(Rhodophyceae)、粘藻纲(Myxophyceae)、黄藻纲(Xanthophyceae)和裸藻纲(Euglenophyceae))。在一些实施例中,豆科(Leguminosae)(Fabaceae;例如豌豆、苜蓿、大豆);禾本科(Gramineae)(Poaceae;例如玉米、小麦、水稻);茄科(Solanaceae),尤其番茄属(Lycopersicon)(例如番茄)、茄属(Solanum)(例如马铃薯、茄子)、辣椒属(Capsium)(例如胡椒)或烟草属(Nicotiana)(例如烟草);伞形科(Umbelliferae),尤其胡萝卜属(Daucus)(例如胡萝卜)、芹属(Apium)(例如芹菜)或芸香科(Rutaceae)(例如橙子);菊科(Compositae),尤其莴苣属(Lactuca)(例如莴苣);和十字花科(Brassicaceae/Cruciferae),尤其芸苔属(Brassica)或芥子属(Sinapis)的成员可以是特别有用的。举例来说,有用的十字花科成员包括油菜(Brassica campestris)、埃塞俄比亚芥(B.carinata)、芥菜(B.juncea)、欧洲油菜(B.napus)、黑芥(B.nigra)、甘蓝(B.oleraceae)、亚非芥(B.tournifortii)、白芥(Sinapis alba)和萝卜(Raphanus sativus)。

[0254] 表达系统可用于在包括例如成熟植物、幼苗、萌芽和种子的任何发育阶段在植物中感染和/或表达聚核苷酸。所述系统可用于感染植物的任何部分(例如根、叶、茎等)。在一些实施例中,所述系统用于感染萌芽。一般来说,当植物是不需要外部营养物或光或热量形式的能量超过达到正常发芽温度所需的幼苗时,就认为植物是萌芽。通常,小于两周龄并且

通常小于10天的幼苗被认为是萌芽。

[0255] 一般,病毒载体可根据已知技术递送至植物。举例来说,载体本身可以直接施用于植物(例如,通过研磨接种、机械喷雾接种、真空渗入、粒子轰击或电穿孔)。或者,可以制备病毒体(例如,从已经感染的植物中),并且可以根据已知技术将其施用于其它植物。

[0256] 如上所述,在一些实施例中,将病毒载体施用于萌芽(例如通过渗入或机械接种[喷雾])。

[0257] 在通过将病毒基因组直接施用于植物来完成感染的情况下,可以使用任何可用的技术来制备基因组。举例来说,根据本文所述的方法有效采用的许多病毒具有ssRNA基因组。ssRNA可以通过基因组的DNA拷贝的转录,或通过体内或体外的RNA拷贝的复制来制备。鉴于易于使用的体外转录系统(例如SP6、T7、网织红细胞溶解物等)的易得性以及维持RNA载体的DNA拷贝的便利性,预期ssRNA载体将经常通过体外转录来制备,特别是用T7或SP6聚合酶。

[0258] 在一些实施例中,将期望从表达它们的植物组织分离聚核苷酸表达产物。也可能期望配制这类经分离的产物用于其预期的用途(例如作为药物或诊断剂、作为试剂等)。在其它实施例中,将期望将产物与表达它们的一些或全部植物组织一起配制。

[0259] 为了将表达产物与表达它的一些或全部植物组织分离,可以使用任何可用的纯化技术。所属领域的一般技术人员熟悉各种分级和分离程序(参见例如斯科普斯等人,蛋白质纯化:原理和实践,第3版,詹森(Janson)等人,“蛋白质纯化:原理、高分辨率方法和应用(Protein Purification:Principles,High Resolution Methods,and Applications),”威利-VCH(Wiley-VCH),1998;施普林格出版社,纽约州,1993;和罗伊(Roe),蛋白质纯化技术(Protein Purification Techniques),牛津大学出版社,2001,其中的每一个以全文引用的方式并入本文中)。通常,将期望使产物纯度大于约50%、优选地大于约60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%。

[0260] 为了将产物与植物材料一起配制,通常需要使用对相关受体(例如人类或其它动物)无毒的植物。可以根据所属领域中已知的技术简单地收获和加工相关的植物组织(例如叶),同时适当考虑维持表达产物的活性。在一些实施例中,聚核苷酸可以在可食用植物中(并且具体地在植物的可食用部分中)表达,以便随后可以食用所述材料。举例来说,在聚核苷酸编码营养相关蛋白质或在口服递送后具有活性的治疗性蛋白质的情况下(当适当配制时),在可食用植物部分中产生蛋白质并将表达的聚核苷酸与表达聚核苷酸的一些或全部植物材料一起配制用于口服递送可能是有用的。

[0261] 在聚核苷酸编码或产生治疗剂的情况下,其可根据已知技术配制。举例来说,有效量的药物活性产物可以与一或多种有机或无机、液体或固体的医药学上合适的载剂材料一起配制。药物活性产物可以如片剂、胶囊、糖锭、分散液、悬浮液,溶液、胶囊、乳膏、软膏、气溶胶、散剂包、液体溶液、溶剂、稀释剂、表面活性剂、等渗剂、增稠剂或乳化剂、防腐剂和固体结合物的剂型使用,只要蛋白质的生物活性不被这类剂型破坏。

[0262] 可充当医药学上可接受的载剂的材料包括(但不限于)糖,如乳糖、葡萄糖和蔗糖;淀粉,如玉米淀粉和马铃薯淀粉;纤维素和其衍生物,如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和乙酸纤维素;粉末状黄芪胶;麦芽;明胶;滑石;赋形剂,如可可脂和栓剂蜡;油,如花生油、棉籽油、红花油、芝麻油、橄榄油、玉米油和大豆油;二醇,如丙二醇;酯,如油酸乙酯和月桂酸乙

酯;琼脂;缓冲剂,如氢氧化镁和氢氧化铝;海藻酸;无热原质水;等渗盐水;林格氏溶液(Ringer's solution);乙醇和磷酸盐缓冲溶液,以及其它无毒性相容的润滑剂,如月桂基硫酸钠和硬脂酸镁,以及着色剂、释放剂、包衣剂、甜味剂、调味剂和芳香剂、防腐剂和抗氧化剂也可以根据配制者的判断存在于组合物中(还参见雷明顿氏药物科学,第十五版,E.W. 马丁,马克出版公司,宾夕法尼亚州伊斯顿,1975)。举例来说,聚核苷酸表达产物可以作为医药组合物通过传统的混合制粒糖衣丸制备、溶解、冻干或类似的方法提供。

[0263] 在一些实施例中,通过减缓皮下或肌肉注射的药物活性产物(例如蛋白质)的吸收来延长药物制剂的效果可能是有用的。这可以通过使用水溶性差的结晶或无定形材料的液体悬浮液来实现。产物的吸收速率取决于其溶解速度,而溶解速度又取决于大小和形状。或者,肠胃外投与产物的延迟吸收通过将产物溶解或悬浮于油性媒剂中来实现。通过在可生物降解的聚合物如聚丙交酯-聚乙交酯中形成蛋白质的微胶囊基质来制备可注射储库形式。取决于产物与聚合物的比例以及所用特定聚合物的性质,可以控制释放速率。其它可生物降解的聚合物的实例包括聚(原酸酯)和聚(酸酐)。储库式可注射配制品可以通过将产物包裹在与身体组织相容的脂质体或微乳液中来制备。

[0264] 药物活性产物的肠溶投与制剂可以固体、半固体、悬浮液或乳液形式引入,并且可以与任何医药学上可接受的载剂(如水、悬浮剂和乳化剂)混合。表达产物还可以通过泵或持续释放形式投与,尤其是当作为预防措施投与时,以预防个体罹患疾病或改善或延缓已经建立的疾病。

[0265] 药物活性产物,任选地与植物组织一起,可以特别适合作为医药组合物经口投与。取决于所需治疗产品的特性及其所需形式,收获的植物材料可以各种方式(例如,空气干燥、冷冻干燥、提取等)中的任一种进行处理。在优选实施例中,如上所述的这类组合物单独口服或与食物或饲料或饮料一起摄入。经口投与的组合物包括以干燥粉末、食品、水性或非水性溶剂、悬浮液或乳液形式提供的经感染的植物;经感染的植物的提取物以及从经感染的植物中纯化的蛋白质。非水性溶剂的实例是丙二醇、聚乙二醇、植物油、鱼油和可注射的有机酯。水性载剂包括水、水-醇溶液、乳液或悬浮液,包括盐水和包括氯化钠溶液、林格氏右旋糖溶液、右旋糖加氯化钠溶液、含乳糖或不挥发油的林格氏溶液的缓冲内侧肠胃外媒剂。干燥粉末的实例包括已经干燥,例如冷冻干燥、空气干燥或喷雾干燥的任何经感染的植物生物物质。举例来说,植物可以通过将其置于约华氏120度的商用空气干燥器中进行空气干燥,直至生物物质含有小于5重量%的水分。干燥的植物可以作为散装固体储存用于进一步加工,或者通过研磨进一步加工成期望的网目大小的粉末。或者,冷冻干燥可用于对空气干燥敏感的产物。产物可以通过将其放入真空干燥器中冷冻干燥,并在真空下冷冻干燥直至生物物质含有小于约5重量%的水分。干燥的材料可以进一步加工。

[0266] 经感染的植物可以一或多种草药制剂形式或与一或多种草药制剂一起投与。有用的草药制剂包括液体和固体草药制剂。草药制剂的一些实例包括酊剂、提取物(例如水提取物、醇提取物)、煎煮剂、干燥制剂(例如空气干燥、喷雾干燥、冷冻或冷冻干燥)、粉末(例如冻干粉末)和液体。草药制剂可以任何标准递送媒介物提供,如胶囊、片剂、栓剂、液体剂型等。所属领域的技术人员应了解可应用的草药制剂的各种配制品和递送模式。

[0267] 所属领域的技术人员也应了解,获得期望的药物活性产物的特别有用的方法是通过提取。可以提取经感染的植物以从残余的生物物质中移出所需的产物,由此增加产物的浓

度和纯度。植物也可以在缓冲溶液中提取。

[0268] 举例来说,可以将新鲜收获的植物转移到一定量的已经用例如磷酸盐缓冲液缓冲的重量比为1:1的冰冷的水中。还可以根据需要添加蛋白酶抑制剂。通过在悬浮于缓冲溶液中的同时剧烈掺合或研磨可使植物破碎,并通过过滤或离心除去经提取的生物物质。溶液中携带的转基因产物可以通过额外的步骤进一步纯化,或通过冷冻干燥或沉淀转化为干燥粉末。提取也可以通过压制来进行。活的植物也可以通过在压机中压制或通过紧密间隔的辊上通过而被压碎来提取。根据所属领域中熟知的方法收集和加工从压碎的植物中表达的流体。通过压制提取允许以更浓缩的形式释放产物。然而,产物的总产率可能低于产物在溶液中提取的总产率。

[0269] 经感染的植物、提取物、粉末、干燥制剂和纯化的蛋白质产物等也可以呈具有或不具有如上所述的一或多种赋形剂的囊封形式。片剂、糖衣药丸、胶囊、丸剂和颗粒剂的固体剂型可以用包衣和外壳制备,如肠溶包衣、控释包衣和药物配制领域中众所周知的其它包衣。在这类固体剂型中,活性产物可以与至少一种惰性稀释剂(如蔗糖、乳糖或淀粉)混合。正常实践时,这类剂型还可包含除惰性稀释剂以外的其它物质,例如压片润滑剂和其它压片助剂,如硬脂酸镁和微晶纤维素。在胶囊、片剂和丸剂的情况下,剂型还可以包含缓冲剂。它们可以任选地含有乳浊剂,并且还可以具有使其任选地以延迟的方式仅仅或优先在肠道的某个部分释放活性成分的组成。可以使用的包埋组合物的实例包括聚合物物质和蜡。

[0270] 在一些实施例中,表达药物活性产物的经感染植物或经感染植物的生物物质作为药用食品经口投与。如果以固体形式生食,或者如果以液体形式饮用,那么这类可食用组合物被摄取。在一些实施例中,转基因植物材料在没有事先处理步骤或最少烹饪制备之后被直接摄入。举例来说,药物活性蛋白在可以直接食用的萌芽(例如苜蓿芽、绿豆芽、或菠菜或莴苣叶芽)中表达。在一些实施例中,加工植物生物物质并且摄入在加工步骤之后回收的材料。

[0271] 治疗方法和医药组合物

[0272] 本文公开的C端内皮抑素多肽或编码C端内皮抑素多肽的核酸可用于治疗纤维化。在数个实例中,C端内皮抑素多肽或编码这些多肽的核酸可用于减少如个体的纤维化。因此,在若干实施例中,所述方法包括向个体投与治疗有效量的一或多种本文公开的C端内皮抑素多肽或编码这些多肽的聚核苷酸,以减少纤维化。在一些实例中,C端内皮抑素多肽包含SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:14的氨基酸133-180或由所述氨基酸组成。然而,本文公开的任何C端内皮抑素多肽都可用于减少纤维化。在一些实施例中,肽可以作为单位剂量投与。在一些实施例中,多肽以多聚体形式投与。

[0273] 合适的个体包括具有皮肤或肺纤维化的那些个体,但是可以使用本文公开的方法治疗任何组织的纤维化。在一个实例中,个体患有硬皮病。在其它实例中,个体患有特发性肺纤维化、硬斑病、因移植物抗宿主病(GVHD)所致的纤维化、瘢痕瘤或肥厚性瘢痕、上皮下纤维化、心内膜心肌纤维化、子宫纤维化、骨髓纤维化、腹膜后纤维化、肾源性系统性纤维化、手术后的疤痕、哮喘、肝硬化/肝纤维化、异常伤口愈合、肾小球肾炎和多灶性纤维硬化。

[0274] 在其它实例中,所述方法用于治疗硬皮病的系统形式,如局限性皮肤硬皮病或弥漫性皮肤硬皮病(或系统性硬化症)。所述方法可用于治疗硬皮病的局部形式,包括硬斑病和线性硬皮病。

[0275] 所述方法可以包括选择需要治疗的个体,如患有纤维化疾病(如硬皮病、特发性肺

纤维化、硬斑病、瘢痕瘤、肥厚性瘢痕或上皮下纤维化)的个体。在示例性应用中,组合物以足以减少纤维化的量投与患有纤维化疾病(如硬皮病、特发性肺纤维化、硬斑病、瘢痕瘤、肥厚性瘢痕或上皮下纤维化或上文所列的任何病症)的个体。这种用途的有效量取决于疾病的严重程度、患者的一般健康状况以及患者免疫系统的强健性。在一个实例中,化合物的治疗有效量是如临床医生或其它有资格的观察者所指出的提供症状的主观缓解或客观可鉴别的改善的量。

[0276] 本文提供了用于降低皮肤厚度的方法。所述方法包括投与治疗有效量的C端内皮抑素多肽,由此降低皮肤厚度。在另一个实施例中,提供了减少肺纤维化的方法。所述方法包括投与治疗有效量的C端内皮抑素多肽,由此降低皮肤厚度。本文公开的任何C端内皮抑素多肽都可用于这些方法中。在一些实施例中,C端内皮抑素多肽包含SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:14的氨基酸133-180或由所述氨基酸组成。

[0277] 本文提供了用于降低赖氨酰氧化酶(LOX)、如转化生长因子(TGF)- β 诱导的LOX的方法。所述方法包括使细胞与有效量的C端内皮抑素多肽接触,由此降低LOX。所述方法可以在体内或体外实践。在一些实施例中,所述方法包括将由与C端内皮抑素多肽接触的细胞产生的LOX的量与对照进行比较。对照可以是标准值,或者由不与C端内皮抑素多肽接触的细胞(如与载剂接触的细胞)产生的LOX的量。

[0278] 本文提供了用于增加基质金属蛋白酶-2(MMP-2)的方法。所述方法包括使细胞与有效量的C端内皮抑素多肽接触,由此增加MMP-2产生。所述方法可以在体内或体外实践。在一些实施例中,所述方法包括将由与C端内皮抑素多肽接触的细胞产生的MMP-2的量与对照进行比较,对照可以是标准值,或者由不与C端内皮抑素多肽接触的细胞(如与载剂接触的细胞)产生的MMP-2的量。

[0279] C端内皮抑素多肽可以通过所属领域的技术人员已知的任何方式(参见班加(Banga),“治疗性肽和蛋白质的肠胃外受控递送(Parenteral Controlled Delivery of Therapeutic Peptides and Proteins),”治疗性肽和蛋白质(Therapeutic Peptides and Proteins),泰克诺米克出版公司(Technomic Publishing Co.,Inc.),宾夕法尼亚州兰卡斯特(Lancaster,Pa.),1995)局部或系统地投与,如通过皮内、鞘内、肌肉、皮下、腹膜内或静脉内注射,但也涵盖了甚至经口、经鼻、经皮或肛门投与。在一些实施例中,投与是通过皮下、皮内或肌肉注射。在另一个实施例中,投与是通过腹膜内或鞘内投与。为了延长肽或蛋白质可用于刺激应答的时间,肽或蛋白质可作为植入物、油性注射剂或颗粒系统提供。颗粒系统可以是微粒、微胶囊、微球、纳米粒子、纳米胶囊或类似粒子。(参见例如班加,见上文)。

[0280] 为了治疗皮肤,可以将治疗有效量的至少一种C端内皮抑素多肽或编码所述肽的核酸如以软膏的形式局部投与皮肤的患病区域。在一些实施例中,软膏是完全均质的半固体外用剂,其具有适合于容易施用于皮肤的硬度。这类软膏可以包括脂肪、脂肪油、羊毛脂、VASELINE®、石蜡、蜡、硬质软膏、树脂、塑料、二醇、高级醇、甘油、水或乳化剂和悬浮剂。使用这些成分作为基剂,可以均匀混合诱饵化合物。取决于基剂,混合物可以成油性软膏、乳化软膏或水溶性软膏形式,油性软膏使用如植物和动物油脂、蜡、VASELINE®和液体石蜡的基剂。乳化软膏由油性物质和水组成,用乳化剂乳化。它们可以采用水包油型(O/W)或油包水型(W/O)。水包油型(O/W)可以是亲水性软膏。油包水型(W/O)最初不含水相,并且可以包括亲水性VASELINE®和纯化羊毛脂,或者它可以含有吸水软膏(包括水相)和水合羊

毛脂。水溶性软膏可含有完全水溶性聚乙二醇 (Macrogol) 基剂作为其主要成分。

[0281] 医药学上可接受的载剂包括石油膏,如VASELINE®,其中石油膏含有5%硬脂醇或单独的石油膏或含有液体石蜡的石油膏。这类载剂能够使医药组合物以适合摄取的形式开处方,如片剂、丸剂、糖衣剂、胶囊、液体制剂、凝胶、软膏、糖浆、浆液和悬浮液。当局部投与患病区域或所关注组织中的细胞时,至少一种C端内皮抑素多肽或编码所述肽的聚核苷酸可以含有合成或天然亲水性聚合物作为载剂的组合物投与。这类聚合物的实例包括羟丙基纤维素和聚乙二醇。一或多种C端内皮抑素多肽或编码所述多肽的聚核苷酸可以与亲水性聚合物在适当的溶剂中混合。然后通过如空气干燥的方法除去溶剂,然后将其余部分成形为所需形式(例如薄片)并施用于目标部位。含有这类亲水性聚合物的配制品保存良好,因为它们具有低含水量。在使用时,它们吸收水,成为也储存良好的凝胶。在薄片的情况下,可以通过将多元醇与类似于上述的亲水性聚合物(如纤维素、淀粉及其衍生物)或合成聚合物混合来调节硬度。可使用由此形成的亲水性薄片。还可以将治疗有效量的一或多种C端内皮抑素多肽或编码所述肽的聚核苷酸并入绷带和敷料中。

[0282] 对于通过吸入投与,C端内皮抑素多肽或编码所述肽的聚核苷酸可以方便地以来自加压包装或雾化器的气溶胶喷雾呈现形式递送,其中使用合适的推进剂,如二氯二氟甲烷、三氯氟甲烷、二氯四氟乙烷、二氧化碳或其它合适的气体。在加压气溶胶的情况下,剂量单位可以通过提供递送计量数量的阀来确定。用于吸入器或吹入器的胶囊和药筒可以配制成含有化合物和合适的粉末基剂(如乳糖或淀粉)的粉末混合物。

[0283] 在一些实施例中,C端内皮抑素多肽,如(但不限于)E4,可以通过吸入投与。举例来说,C端内皮抑素多肽可以气溶胶化形式投与,如使用雾化器或定剂量吸入器。使用的技术包括微泵雾化器(如AEROGEN GO®系统)、设计用于产生大的细颗粒级分的喷射雾化器(如PARI LCSTAR®)、在雾化期间出现较少剪切的喷射雾化器(如HUDSON MICROMIST®)和超声波雾化器(如DeVilbiss ULTRA-NEB®)。

[0284] 可将内皮抑素多肽溶解于如盐水的载剂中,并使用上述装置雾化。相关的气溶胶可以使用NEXT GENERATION IMPACTOR® (NGI) (MSP公司,明尼苏达州肖维尤(Shoreview, Minn.))收集,其使用一系列空气动力学阶段来基于液滴大小将气溶胶分离并收集成单独的级分。由于液滴大小是肺部沉积位置的主要决定因素,所以这一装置允许我们特别隔离将沉积在小气道和肺泡中的液体气溶胶部分。

[0285] 气溶胶粒度通常以质量中值空气动力学直径(MMAD)表示,这是一个基于粒度、形状和密度的参数。对于球形粒子,MMAD等于MMD ($p^{1/2}$),其中MMD是质量中值直径并且r是容积密度。对于非球形粒子,MMAD等于MMD (p/x)^{1/2},其中X是形状因子。因此,比单位密度大的粒子的实际直径将小于它们的MMAD。

[0286] 呼吸道内粒子沉积的部位是根据粒度划分的。在一个实例中,使用约1至约500微米的粒子,如使用约25至约250微米或约10至约25微米的粒子。在其它实施例中,使用约1至50微米的粒子。为了用于定剂量吸入器中,为了向肺投与小于约10微米的粒子,可以使用如约2至约8微米、如约1至约5微米的粒子,如2至3微米的粒子。

[0287] 可以在医药学上可接受的载剂中投与治疗有效量的C端内皮抑素多肽或编码所述肽的聚核苷酸。药理学上可接受的载剂(例如生理学上或医药学上可接受的载剂)是所属领域中众所周知的,并且包括(但不限于)呈生理pH的缓冲溶液(例如约7.0至约8.0的pH,或约

7.4的pH)。生理学上相容的缓冲溶液的一个具体非限制性实例是磷酸盐缓冲盐水。其它药理学上可接受的载剂包括特别适用于旨在局部施用(例如施用于手术伤口以促进愈合)的药物配制品的渗透剂。

[0288] 本文公开的药理学组合物促进至少一种C端内皮抑素多肽或编码所述肽的聚核苷酸在体内或离体使用以减少纤维化。这类组合物可以适合于将活性成分递送至任何合适的个体,并且可以本身已知的方式,例如通过常规的混合、溶解、制粒、乳化、囊封、包覆或冻干方法来制造。药理学组合物可以使用一或多种药理学上(例如生理学上或医药学上)可接受的载剂以及促进将活性化合物加工成医药学上可用制剂的任选助剂以常规方式配制。适当配制品取决于所选投与途径。因此,为了注射,活性成分可以配制在水溶液中。对于经粘膜给药,在配制品中使用适合渗透屏障的渗透剂。这类渗透剂一般是所属领域中已知的。

[0289] 对于经口投与,可以将治疗有效量的至少一种C端内皮抑素多肽或编码所述肽的核酸与适于并入片剂、丸剂、胶囊、液体、凝胶、糖浆、浆液、悬浮液等的载剂组合。

[0290] 蛋白质药物通过如胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶和刷状缘肽酶等酶的作用在消化道中进行蛋白酶介导的降解,使得大蛋白质分子的经口投与通常不会产生预期的治疗效果(索尔特罗(Soltero)和艾库伯(Ekwruibe),2001年医药技术创新(2001Innovations in Pharmaceutical Technology),1:106-110)。令人惊讶的是,本文所述的C端内皮抑素多肽即使在通过口服途径投与时也能保持其活性和治疗效果。不受理论束缚,相信本文所述的C端内皮抑素多肽包括额外的特性,使其能够逃脱蛋白酶活性并且变得吸附在小肠中并且进入循环以提供治疗益处。

[0291] 在一些实施例中,对于肠胃外投与,可以通过注射,如通过快速注射或连续输注投与治疗有效量的至少一种C端内皮抑素多肽或编码所述肽的核酸。这类组合物可以采用在油性或水性媒剂中的悬浮液、溶液或乳液形式,并且可以含有配制剂,如悬浮剂、稳定剂和/或分散剂。其它药理学赋形剂是所属领域中已知的。

[0292] 任选地,至少一种C端内皮抑素多肽或编码所述肽的聚核苷酸可以包含在异源蛋白质、烃或脂质内或与其结合,无论是用于体外还是体内投与。共同投与可以使得至少一种C端内皮抑素多肽或编码所述肽的聚核苷酸在蛋白质、烃或脂质之前、基本上同时或之后投与。在一些实施例中,至少一种C端内皮抑素多肽或编码所述肽的聚核苷酸与蛋白质、烃或脂质基本上同时投与。

[0293] 其它递送系统可以包括定时释放、延迟释放或持续释放递送系统。这类系统可以避免重复投与上述本发明的组合物,从而增加对于个体和医师的便利性。许多类型的释放递送系统是可行的并且是所属领域的一般技术人员已知的。它们包括基于聚合物的系统,如聚(丙交酯-乙交酯)、共聚草酸酯、聚己内酯、聚酯酰胺、聚原酸酯、聚羟基丁酸和聚酸酐。含有药物的前述聚合物的微胶囊描述于例如美国专利第5,075,109号。递送系统还包括非聚合物系统,如脂质,包括固醇,如胆固醇、胆固醇酯和脂肪酸或中性脂肪,如甘油单酯、甘油二酯和甘油三酯;水凝胶释放系统;硅橡胶系统;基于肽的系统;蜡涂层;使用常规粘合剂和赋形剂的压制片剂;部分融合植入物;等等。具体实例包括(但不限于):(a) 侵蚀系统,其中以基质内的形式包含至少一种C端内皮抑素多肽或编码所述肽的聚核苷酸,如美国专利第4,452,775号;第4,667,014号;第4,748,034号;第5,239,660号和第6,218,371号中所述的那些;和(b) 扩散系统,其中活性组分以受控的速率从聚合物渗透,如美国专利第3,832,

253号和第3,854,480号中所述。另外,可以使用基于泵的硬件递送系统,其中一些适合于植入。

[0294] 长期持续释放植入物的使用可能特别适用于治疗慢性疾病,如硬皮病。如本文所用,长期释放意指植入物被构建和布置为递送治疗水平的活性成分至少30天,并且优选地60天。长期持续释放植入物是所属领域的一般技术人员所熟知的,并且包括上述的一些释放系统。已经描述了这些系统与寡脱氧核苷酸一起使用(参见美国专利第6,218,371号)。为了体内使用,核酸和肽优选地相对抗降解(如通过内切和外切核酸酶)。因此,可以使用修饰,如包含C端酰胺。

[0295] C端内皮抑素多肽或编码所述肽的聚核苷酸的治疗有效量将取决于C端内皮抑素多肽或编码所用肽的聚核苷酸、所治疗的个体、病痛的严重程度和类型以及投与方式。举例来说,编码肽的聚核苷酸的治疗有效量可以从约0.01 μ g每千克(kg)体重至约1g每千克体重变化,如每千克体重约1 μ g至约5mg,或者每千克体重约5 μ g至约1mg。所属领域的技术人员基于特定化合物的效价、个体的年龄、体重、性别和生理状况容易确定确切的剂量。

[0296] 关于核酸的投与,一种投与核酸的方法是用质粒DNA(如用哺乳动物表达质粒)直接处理。如上所述,可以将编码N端内皮抑素肽的核苷酸序列置于启动子的控制下以增加分子的表达。

[0297] 当使用病毒载体进行体内投与时,理想的是向受体提供组合物中在约 10^5 至约 10^{10} 个空斑形成单位/毫克哺乳动物的范围内的每种重组病毒的剂量,但可以投与更低或更高剂量。可以在任何癌症迹象之前将重组病毒载体的组合物引入到哺乳动物中,或者在患有癌症的哺乳动物中介导疾病的消退。用于将组合物投与哺乳动物的方法的实例包括(但不限于)将细胞离体暴露于重组病毒,或将组合物注射到患病组织或静脉内、皮下、皮内或肌肉内投与病毒。或者,重组病毒载体或重组病毒载体的组合可通过在医药学上可接受的载剂中直接注射到癌性病变中来局部投与。一般来说,携带待投与的一或多种C端内抑素多肽的核酸序列的重组病毒载体的数量基于病毒颗粒的效价。待投与的免疫原的示例性范围是每个哺乳动物(如人类) 10^5 至 10^{10} 个病毒颗粒。

[0298] 在一个具体的非限制性实例中,用于静脉内投与的医药组合物将包括每位患者每天约0.1 μ g至10mg的C端内皮抑素多肽。可以使用每位患者每天0.1至约100mg的剂量,特别是如果药剂被投与偏僻部位而不是进入循环或淋巴系统,如进入体腔或进入器官管腔。用于制备可投与的组合物实际方法对于所属领域的技术人员来说是已知的或显而易见的,并且在如雷明顿氏药物科学,第19版,马克出版公司,宾夕法尼亚州伊斯顿,1995的出版物中有更详细的描述。

[0299] 组合物的一次或多次投与取决于个体所需和所耐受的剂量和频率。在一些实施例中,剂量以推注形式一次投与,但在另一个实施例中可以定期施用,直到达到治疗结果。一般来说,剂量足以治疗或改善疾病的症状或病征,而不会对个体产生不可接受的毒性。可以使用全身或局部投与。

[0300] 在另一个方法中,投与其它药剂。在一个实例中,这种投与是依次。在其它实例中,其它药剂与C端内皮抑素多肽同时投与。

[0301] 对于硬皮病的治疗,可以与C端内皮抑素多肽一起使用的其它试剂的实例包括硝苯地平(nifedipine)、氨氯地平(amlodipine)、地尔硫(diltiazem)、非洛地平

(felodipine)或尼卡地平(nicardipine)。研究性药物GLEEVEC®也用于硬皮病的治疗。GLEEVEC®或其它酪氨酸激酶抑制剂可以与本文公开的C端内皮抑素多肽一起使用。肺部受累的硬皮病患者受益于氧气疗法;本文公开的C端内皮抑素多肽可以与此疗法一起投与。

[0302] 为了治疗皮肤纤维化和硬皮病,使用的其它药剂是d-青霉胺、秋水仙碱、松弛素、类固醇和环孢菌素。C端内皮抑素多肽还可以与免疫抑制剂组合使用。另外,C端内皮抑素多肽可与甲氨蝶呤、环磷酰胺、硫唑嘌呤、霉酚酸酯、格列酮、内皮素受体拮抗剂或氟维司群(ICI-182,780)一起使用。

[0303] 本发明将进一步描述在以下实例中,所述实例不限制权利要求书中所述的本发明的范围。

[0304] 实例

[0305] 由器官成纤维细胞过度沉积细胞外基质(ECM)组分,如纤连蛋白(FN)和I型胶原蛋白(Coll1 α 1),被定义为纤维化。器官纤维化是导致末期器官衰竭的许多疾病的最后共同途径。然而,针对器官纤维化的有效疗法仍然不可用(参见例如波拉克等人,美国呼吸与重症护理医学杂志2000;157:199-20;瓦尔加(Varga)和亚伯拉罕(Abraham),临床研究杂志2007;117:557-67;温,临床研究杂志2007;117:524-29)。不可控制的伤口愈合反应,包括急性和慢性炎症、血管生成、驻留细胞的活化和ECM重塑,被认为涉及纤维化的发病机理(温,临床研究杂志2007;117:524-29;卡卢里和苏克哈沙(Sukhatme),肾病学与高血压现代观点2000;9:413-8)。TGF- β 是在纤维化器官中增加的原型纤维化细胞因子,并且通过刺激ECM分子的合成、将成纤维细胞活化成表达 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)的肌成纤维细胞并且下调基质金属蛋白酶(MMP)而促成纤维化的发展(布瑞腾,微生物与感染1999;1:1349-65;瓦尔加和帕斯克(Pasche)自然评论风湿病学2009;5:200-6)。尽管期望很高,单克隆抗TGF- β 抗体在早期SSc患者中的临床试验未能显示出任何疗效(瓦尔加和帕斯克,自然评论风湿病学2009;5:200-6)。

[0306] 内皮抑素是胶原蛋白XVIII的羧基端的20-kDa内部片段。它最初在所培养的具有有效的抗血管生成活性的鼠类血管内皮瘤细胞系的上清液中鉴定出(奥莱利等人,细胞1997;88:277-85)。内皮抑素抑制体外内皮细胞增殖和小管形成,以及体内肿瘤生长(达汗巴尔等人,生物化学与生物物理研究通讯1999;258:345-52)。已经进行了研究以评估内皮抑素的抗肿瘤特性,包括临床试验(佛克曼,实验细胞研究(Exp Cell Res)2006;312:594-607)。已经报道内皮抑素的NH₂端结构域是负责抑制血管生成的功能结构域(金仁勋(Tjin Than Sjin)等人,癌症研究2005;65:3656-63)。尽管其作用的确切分子机制尚不清楚,但已经报道了整合素、磷脂酰肌醇蛋白聚糖、f1k-1和核仁素作为内皮抑素受体(舒德哈克(Sudhakar)等人,美国国家科学院院刊2003;100:4766-71;卡鲁曼希等人,分子细胞2001;7:811-22)。最新的研究已显示,从肺纤维化的IPF和SSc患者获得的血清和/或BALF中内皮抑素增加(例如,苏米(Sumi),临床实验室分析杂志(J Clin Lab Anal)2005;19:146-9)。

[0307] 在本文讨论的研究中,评估了内皮抑素对纤维化的作用。使用原代人类成纤维细胞,离体使用人类皮肤和体内用TGF- β 处理的小鼠皮肤评估内皮抑素和内皮抑素衍生的肽对体外纤维化的作用。令人惊讶的是,研究结果表明,内皮抑素的羧基端肽具有抗纤维化活性并且提供了纤维化病症的新疗法。

[0308] 实例1

[0309] 材料和方法

[0310] 试剂和抗体. 全长重组人类内皮抑素 (rE) 购自西格玛-奥德里奇公司 (Sigma-Aldrich) (密苏里州圣路易斯 (St. Louis, MO)). 重组人类TGF- β 来自安迪生物公司 (R&D Systems Inc.) (明尼苏达州明尼阿波利斯 (Minneapolis, MN)). 小鼠单克隆抗人类纤连蛋白 (FN) 抗体、山羊多克隆抗人类I型胶原蛋白 α I链 (Coll α 1) 抗体和小鼠单克隆抗人类GAPDH抗体来自圣克鲁兹生物技术公司 (Santa Cruz Biotechnology) (加利福尼亚州圣克鲁兹 (Santa Cruz, Calif.)). 小鼠单克隆抗人类 α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA) 抗体来自西格玛-奥德里奇公司。

[0311] 人类内皮抑素肽的合成. 使用FMOC合成方案, 通过自由微波合成仪 (Liberty Microwave Synthesizer) (CEM公司, 北卡罗来纳州马修斯 (Mathews, NC)) 上的固相合成肽。简而言之, 通过将活化的氨基酸从羧基端开始到氨基端逐步添加至固体支撑物 (Wang resin) 和PEG-PS) 来进行合成。氨基酸的活化通过DIPEA/HOBT/TBTU化学物质进行。在合成结束时, 用试剂R (90% TFA、5% 茴香硫醚、3% 乙二硫醇和2% 茴香醚) 将肽从树脂上切下并进行多次醚提取。粗肽经过分析, 表征并通过凝胶过滤 (G-25柱)、反相高效液相色谱法 (RP-HPLC, 486和600E, 沃特斯公司 (Waters Corporation)) 纯化。通过MALDI-TOF质谱 (Voyager-DE STR生物光谱测定工作站) 证实了正确的质量。肽的序列显示在表1中并且对应于氨基酸1-45 (E1)、71-115 (E2)、133-180 (E3)、133-180A (E4), E4存在羧基端酰胺而不同于E3。所有肽的纯度>98%。将所有肽以5mg/ml的浓度溶解于DMSO中, 并在1×PBS中稀释至1-20 μ g/ml。

[0312] 原代成纤维细胞培养. 培养人类原代肺和皮肤成纤维细胞。将正常器官供体、SSc或IPF患者的外植肺和SSc患者、硬斑病患者和健康供体的临床上涉及的皮肤用于原代成纤维细胞培养。切碎约2-cm的周围肺和皮肤小块, 并且如先前所述 (费格哈利 (Feghali) 等人, 关节炎与风湿病 (Arthritis Rheum) 1999;42:1451-7) 在补充有10% FBS、青霉素、链霉素和抗真菌剂的杜尔贝科氏改良伊格尔氏培养基 (Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM; 美的泰克 (Mediatech), 弗吉尼亚州赫恩登 (Herndon, Va.)) 中培养成纤维细胞。所有细胞都在第3-6代之间使用。

[0313] 蛋白质印迹分析. 如先前所述, 从培养的成纤维细胞获得细胞溶解物 (皮列维斯基 (Pilewski) 等人, 美国病理学杂志 (Am J Pathol) 2005;166:399-407)。简而言之, 将 2.0×10^5 个原代成纤维细胞在35-mm孔中在补充有10ng/ml人类重组TGF- β 或作为媒介对照的PBS的含0.5% FBS的培养基中培养24小时, 随后添加5 μ g/ml人类rE、内皮抑素肽 (E1-E4) 或DMSO (媒介) 持续48小时。在一些实验中, 在没有TGF- β 刺激的情况下使用内皮抑素肽。通过蛋白质印迹分析细胞溶解物。在与辣根过氧化物酶结合的二级抗体和化学发光剂 (珀金埃尔默生命科学公司 (Perkin Elmer Life Sciences, Inc.), 马萨诸塞州波士顿 (Boston, Mass.)) 一起培育后检测到信号。使用可在互联网 ([/rsb.info.nih.gov/ij/index.html](http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html)) 上获得的image/J®软件半定量分析具有预期分子大小的各个条带的强度, 并归一化为各个GAPDH强度。

[0314] 离体人类皮肤分析. 从矫正整形手术获得人类腹部皮肤。如先前所述 (安冈 (Yasuoka) 等人, 开放风湿病学杂志 (The Open Rheumatol J) 2008;2:17-22), 均匀地去除皮下脂肪组织, 并将皮肤组织切成1.5cm×1.5cm的切片。随后皮内注射总体积为100 μ l的1

×PBS:单独的rE (1-10 μ g/ml)、单独的内皮抑素肽 (10 μ g/ml)、rE或内皮抑素肽 (1-20 μ g/ml) 与TGF- β (10ng/ml) 的组合和单独的TGF- β (10ng/ml)。在一些实验中,首先用TGF- β 注射人类皮肤48小时,然后在与TGF- β 相同的注射部位投与重组内皮抑素 (rE)。一式两份或一式三份地进行独立实验,如图例中所示。含有完整的表皮和真皮层的外植体在气液界面中培养,其中表皮和角蛋白层面朝上并暴露于空气中。培养基每隔一天更换一次。1或2周后,使用一次性8-mm ACUPUNCH® (阿库德公司 (Acuderm, Inc.), 佛罗里达州劳德戴尔 (Lauderdale, FL)) 收获对应于以注射部位为中心的8-mm直径的区域的皮肤组织。在石蜡包埋之前将皮肤组织固定在10%福尔马林 (formalin) 中。

[0315] 体内小鼠实验. CB57BL6/J 雄性小鼠购自杰克逊实验室 (The Jackson Laboratory) (缅因州巴港 (Bar Harbor, ME))。将含人类rE (10 μ g/ml) 或内皮抑素肽 (10 μ g/ml) 与TGF- β (10ng/ml) 的组合或单独的TGF- β 的100 μ l总体积的1×PBS皮内注射于小鼠背部。小鼠在两个不同的皮肤部位进行注射并在注射后一周处死。收集注射部位周围的皮肤,并在石蜡包埋之前固定在10%福尔马林中。

[0316] 皮肤厚度的测量. 石蜡包埋的人类和小鼠皮肤组织的六微米切片用苏木精和伊红 (H&E) 染色。在一些实验中,切片用鉴定胶原蛋白的马森三色染色法进行染色。在尼康 (Nikon) Eclipse 800显微镜上拍摄图像。使用image/J®软件在每个切片的6个随机视野中测量皮肤厚度。数据以任意单位显示。

[0317] 小管形成分析. 在使用MATRIGEL®培养物的小管形成分析中检查内皮抑素肽抑制血管生成的能力。将人类脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 维持在补充有EBM-2 MV SINGLEQUOTS®的内皮细胞基础培养基-2 (EBM-2; 科龙迪克 (Clonetics), 加利福尼亚州圣地亚哥) 中。将HUVEC (5×10^4) 在24孔 MATRIGEL®板 (BD 生物科学公司 (BD Biosciences), 加利福尼亚州圣地亚哥) 上单独或在含rE或E4肽 (50nM) 的EBM-2存在下在37℃下一式两份地培养。使用DMSO作为媒介对照。24小时后,使用转换的显微镜拍摄图像。通过测量每孔6个随机视野中的管占据的面积来量化索形成的程度。进行了三个独立的实验。

[0318] 统计分析. 所有连续变量均以平均值±标准差表示。按需要使用配对t-检验或曼-惠特尼U检验对2组之间比较的统计显著性进行检验。使用ANOVA进行三组当中的比较,然后进行邦弗伦尼检验。

[0319] 实例2

[0320] 人类内皮抑素抑制体外经TGF- β 处理的人类原代肺和皮肤成纤维细胞中FN和Col1 α 1的产生

[0321] 为了评估内皮抑素是否调节成纤维细胞中ECM组分的产生,通过蛋白质印迹分析在正常人类肺成纤维细胞中检测FN和Col1 α 1表达。在用或不用人类TGF- β 预先刺激24小时的情况下,用5 μ g/ml rE处理细胞48小时。如图1A所示,rE显著降低了经TGF- β 预处理的成纤维细胞中的FN和Col1 α 1水平。为了定义介导抑制性作用的内皮抑素的功能结构域,合成对应于内皮抑素的不同区域的四种不同的肽 (表1)。

[0322] 表1

	人类内皮抑素片段的氨基酸序列.
[0323]	E1 (SEQ ID NO:2 的氨基酸 1-45) H- ¹ HSHRDFQPVLHLVALNSPLSGGMRGIRGADFQCFQQARAVGLAGT ⁴⁵ -OH

[0324]	E2 (SEQ ID NO:2 的氨基酸 71-115) H- ⁷¹ IVNLKDELLFPSWEALFSGSEGPLKPGARIFSFDGKDVLRHPTWP ¹¹⁵ -OH
	E3 (SEQ ID NO:20; SEQ ID NO:2 的氨基酸 133-180) H- ¹³³ SYCETWRTEAPSATGQASSLLGGRLLGQSAASCHHAYIVLCIENSFMT ¹⁸⁰ -OH
	E4 (SEQ ID NO:21; SEQ ID NO:2 的氨基酸 133-180A) H- ¹³³ SYCETWRTEAPSATGQASSLLGGRLLGQSAASCHHAYIVLCIENSFMT ¹⁸⁰ -CONH ₂

[0325] 如图1B和1C所示,与仅用TGF- β 处理的正常肺成纤维细胞相比,来自内皮抑素(E4)的羧基端的片段显著抑制了经TGF- β 处理的细胞中的FN和Col1 α 1产生(在两个比较中, $P=0.03$)。另一方面,位于内皮抑素的氨基端区的E1肽没有作用。除了健康的成纤维细胞之外,从具有临床肺纤维化的SSc和IPF患者获得的肺成纤维细胞被用于平行分析,其具有相似结果(图1B和1C)。已证明rE和E4在肺成纤维细胞中具有抗纤维化作用,因为皮肤是SSc中受纤维化影响的主要器官,所以检测这些肽对皮肤成纤维细胞的作用。用rE或E4处理从健康对照、系统性硬化症(SSc)或局限性硬皮病(硬斑病)患者的皮肤活动的原代成纤维细胞。与肺成纤维细胞类似,rE和E4减少了皮肤成纤维细胞中TGF- β 诱导的ECM产生。代表性结果显示在图1D中。

[0326] 实例3

[0327] 内皮抑素肽逆转来自SSc和IPF患者的原代肺成纤维细胞的纤维化表型

[0328] 由于已经显示TGF- β 在纤维化组织中上调,因此检查了在没有TGF- β 刺激的情况下,通过用内皮抑素肽处理是否改变了纤维化肺成纤维细胞中的基质产生。如图1E左图所示,经E4处理的成纤维细胞中FN和Col1 α 1水平均降低。另外,用不同浓度的E4处理相同的成纤维细胞以鉴定最佳的抗纤维化剂量。当与媒介对照相比时,E4剂量依赖性地降低Col1 α 1水平(图1E,右图),但对FN水平有适度的影响。ECM的减少比TGF- β 刺激后观察到的更适度。总之,结果表明E4可以减少来自纤维化环境的成纤维细胞中ECM组分的基线产生,从而逆转纤维化表型。

[0329] 肌成纤维细胞,即表达 α -SMA的活化成纤维细胞,由TGF- β 刺激诱导并在纤维化中起中心作用。因此,研究了内皮抑素肽对正常肺成纤维细胞中 α -SMA表达的影响。如图1F所示,TGF- β 刺激大大增加了 α -SMA的表达。有趣的是,E4和较小程度的E3降低了TGF- β 诱导的 α -SMA水平,这表明内皮抑素的羧基端区可以阻止成纤维细胞的激活和向肌成纤维细胞表型的转变。

[0330] 实例4

[0331] 内皮抑素降低皮肤厚度并预防人类皮肤中TGF- β 诱导的纤维化

[0332] 培养的人类皮肤外植体可以用作器官模型以评定纤维发生因子的作用,并评估抑制剂/疗法阻止纤维化进展并潜在地使其逆转的功效(安冈,开放风湿病学杂志2008;2:17-22)。为了评估内皮抑素作为纤维化的潜在治疗剂的功效,使用此离体人类皮肤模型。由于TGF- β 是众所周知的在纤维化中发挥中心作用的促纤维化因子,因此首先将人类重组TGF- β 皮内注射以评定纤维化水平。如图2A所示,在注射后一周,TGF- β 注射以剂量依赖性方式显著增加皮肤厚度。TGF- β (10ng/ml)的纤维化作用解决了两周。也个别地检测了rE (1、5和10 μ g/ml)或内皮抑素肽(10 μ g/ml)的基线效应。尽管rE和E1-4没有显著改变皮肤厚度,但是rE、E3和E4显示出降低人类皮肤厚度的趋势(图2B和2C)。确定rE是否能够抑制经TGF- β 处理的人类皮肤中的纤维化。TGF- β 和rE同时注射。投与后一周,与TGF- β 组合的rE以剂量依赖性方

式显著降低皮肤厚度(图3)。为了评定rE对逆转纤维化的作用,在投与TGF- β 后2天注射肽。类似于共同治疗,延迟的rE也显著改善了TGF- β 诱导的皮肤纤维化。研究结果表明,人类内皮抑素能够阻止纤维化的发展和进展,并且还能够逆转人类皮肤中TGF- β 诱导的纤维化。

[0333] 实例5

[0334] 内皮抑素肽减少离体人类皮肤中TGF- β 诱导的纤维化并逆转存在的纤维化

[0335] 为了确定内皮抑素的哪一部分负责抑制人类皮肤外植体中TGF- β 诱导的纤维化,在10ng/ml的TGF- β 存在下投与内皮抑素肽(10 μ g/ml)。代表性图像显示在图4A中。当与单独的TGF- β 比较时,E3和E4显著消除由皮肤厚度所测量的纤维化发展(分别为 $P=0.04$ 、 0.01 ;图4)。检查注射与TGF- β 组合的不同浓度的E1或E4的皮肤外植体的皮肤厚度。如图5所示,与E1不同,浓度为5-20 μ g/ml的E4明显改善TGF- β 诱导的皮肤纤维化,表明内皮抑素的C端可抑制纤维化(参见图17)。

[0336] 实例6

[0337] 内皮抑素肽减少小鼠皮肤中体内TGF- β 诱导的纤维化

[0338] 内皮抑素肽的抗纤维化作用进一步在体内评定。rE和内皮抑素肽与TGF- β 的组合被注射到小鼠的皮肤中。注射后一周,小鼠看起来健康并且没有出现痛苦迹象。如图6所示,人类TGF- β 强烈增加小鼠皮肤的皮肤厚度($P=0.004$)。来自人类内皮抑素肽羧基端的肽E3和E4预防由TGF- β 诱导的皮肤纤维化(分别为 $P=0.01$ 、 0.007)。另外,E2显著降低皮肤厚度($P=0.03$)。E1,即对应于内皮抑素氨基端的肽,不改变TGF- β 诱导的皮肤纤维化。这些结果证实了在我们的人类皮肤模型中获得的结果,并且强调了内皮抑素的C端结构域在体内和离体预防TGF- β 诱导的纤维化中的重要性。

[0339] 实例7

[0340] 内皮抑素的C端肽具有适度的抗血管生成活性

[0341] 内皮抑素的抗血管生成作用已归因于其氨基端结构域(金仁勋等人,癌症研究2005;65:3656-63)。为了评估内皮抑素的羧基端区的抗血管生成能力,使用基质胶检查了E4对体外小管形成的作用。如图7所示,rE抑制HUVEC形成小管结构的能力是显著的,证实了以前的报道。另一方面,E4抑制血管生成的能力是适度的,表明对应于E4的内皮抑素的区域对其抗血管生成活性没有显著贡献。

[0342] 因此,E4,即对应于内皮抑素羧基端区的肽,改善了TGF- β 诱导的纤维化,甚至逆转了它。E4在原代肺和皮肤成纤维细胞中抑制TGF- β 诱导的ECM产生和下调 α -SMA水平。体内和离体分析显示E4阻碍由TGF- β 触发的皮肤真皮厚度的增加。此外,E4的抗血管生成能力比rE低。总之,研究结果表明,负责抗纤维化和抗血管生成能力的内皮抑素的结构域是不同的。其它内皮抑素肽(例如E2和E3)显示具有抗纤维化活性。

[0343] 内皮抑素的抗血管生成活性已是许多针对抗肿瘤疗法发展的研究的焦点。最近,报道了在如特发性肺纤维化(IPF)和系统性硬化症(SSc)等纤维化病症中内皮抑素的血清和BALF水平升高。患有严重呼吸功能障碍的IPF患者和具有肺纤维化、严重皮肤纤维化和皮肤瘢痕的SSc患者中内皮抑素水平与没有那些临床表现的患者相比相对增加(苏米临床实验室分析杂志2005;19:146-9;里克特(Richter)等人,胸腔(Thorax)2009;64:156-61)。另外,在培养的SSc患者的皮肤成纤维细胞(谭(Tan)等人,关节炎与风湿病2005;52:865-76)和IPF患者的全肺提取物(杨(Yang)等人,美国呼吸与重症护理医学杂志2007;175:45-54)

中,胶原蛋白XVIII表达增加。在这点上,由于内皮抑素是由包括MMP和组织蛋白酶L的数种蛋白酶切割的胶原蛋白XVIII的蛋白水解产物(温等人,癌症研究1999;59:6052-6;菲尔博(Felbor),欧洲分子生物学杂志2000;19:1187-94),并且由于在SSc和IPF中MMP也上调(里克特等人,胸腔2009;64:156-61,托比(Toubi)等人,临床与实验风湿病学(Clin Exp Rheumatol)2002;20:221-4),所以经切割的内皮抑素水平在那些患者中升高的观察结果是合理的。然而,尚不清楚内皮抑素如何参与纤维化的发病机制。

[0344] 不受理论束缚,纤维化组织中增加的内皮抑素可构成负反馈调节回路,尽管不成功,但所述调节回路旨在阻止纤维化的进展。由于内皮抑素最初在异常的“血管生成”内皮癌细胞中被鉴定为可能控制/抑制其“血管生成”能力的产物(奥莱利等人,细胞1997;88:277-85),所以合理的是,纤维化中的内皮抑素起到类似的调节功能。

[0345] 报道了在使用创伤愈合模型的经重组内皮抑素处理的小鼠皮肤中结缔组织减少但血管密度正常(布洛赫(Bloch)等人,美国实验生物学会联合会杂志2000;14:2373-6)。此外,来自内皮抑素N端区的肽在小鼠模型中阻止了腹膜硬化的进展(田边(Tanabe)等人,国际肾脏学(Kidney Int)2007;71:227-38);所研究的肽对应于涵盖氨基酸1-27的内皮抑素的N端。

[0346] 相比之下,内皮抑素的C端区而不是N端在本文中显示为负责其抗纤维化作用。实际上,在一些分析中,对应于内皮抑素N端结构域的肽有助于纤维化表型。针对定义负责内皮抑素的抗血管生成能力的特定氨基酸序列的研究(里克特等人,胸腔2009;64:156-61;卡塔内奥(Cattaneo)等人,实验细胞研究2003;283:230-6;许等人,当前蛋白质与肽科学(Curr Protein Pept Sci)2008;9:275-83)已经显示内皮抑素的全部血管抑制活性位于N端结构域中的27个氨基酸的肽中(里克特等人,胸腔2009;64:156-61)。因此,介导其抗纤维化活性的内皮抑素的功能结构域与负责其抗血管生成能力的功能结构域不同,意味着抑制血管生成和纤维化的机制不同。因此,本文公开的抗纤维化C端内皮抑素多肽能够选择性抑制纤维化而不抑制血管生成。C端内皮抑素多肽可以用于更特异性和选择性地靶向不需要的纤维化,而不干扰可能影响期望治疗结果的血管生成。

[0347] C端内皮抑素多肽也降低了经TGF- β 处理的成纤维细胞中的 α -SMA表达。另外,E4对正常成纤维细胞的基质减少作用与纤维化的成纤维细胞相比是适度的。这表明内皮抑素C端肽在纤维化中的治疗作用部分可能是由于TGF- β 和其它促纤维化生长因子对成纤维细胞活化的阻碍。

[0348] 2005年,从大肠杆菌纯化的重组人类内皮抑素ENDSTAR®在中国被批准用于治疗非小细胞肺癌(孙(Sun)等人,临床肿瘤学杂志(J Clin Oncol)2005(ASCO年度会议记录);23:7138),其含有另外的作为加His标签的蛋白产生的9个氨基酸的序列。尽管有效,但治疗具有几个缺点,包括对高剂量的要求、蛋白质的半衰期短、稳定性较差和容易失活(参见例如克里丝塔(Crystal),自然·生物技术(Nat Biotechnol)1999;17:336-7;胡(Hu)等人,药学报(Acta Pharmacol Sin)2008;29:1357-69)。本文公开的小合成肽可以克服这些障碍。与rE甚至E3相比,E4在体外、体内和离体均显著抑制纤维化。此外,与rE相比,E4具有最小的抗血管生成活性,证实了内皮抑素的抗血管生成活性位于其N端结构域中。E3和E4之间的唯一区别是E4的C端存在酰胺键。不受理论束缚,此酰胺使肽对羧肽酶或其它降解分子的羧基降解更具抗性,从而使肽稳定并且可能保持其生物活性(杨等人美国呼吸与重症

护理医学杂志2007;175:45-54)。

[0349] 令人遗憾的是,没有有效针对器官纤维化的疗法。内皮抑素的C端结构域对应于具有酰胺键形成的氨基酸序列133-180,抑制了由原代皮肤和肺成纤维细胞产生ECM,并且改善了由人类皮肤中的体内和离体TGF- β 诱导的皮肤纤维化。本文呈现的研究结果表明E4可用于治疗纤维化病症,包括IPF、SSc、硬斑病以及移植物抗宿主病、瘢痕瘤和肥厚性瘢痕以及其它器官纤维化,如哮喘中的上皮纤维化。

[0350] 实例8

[0351] 证实E4的功效

[0352] 代表人类内皮抑素羧基端的肽E4可以减弱由多种纤维发生因子触发的纤维化。无论与纤维发生触发物同时还是之后投与,都可以检测到E4的抗纤维化作用。在四种纤维化的临床前模型中证实了E4的功效:a) 博来霉素在小鼠皮肤中体内诱导的皮肤纤维化,b) TGF- β 在小鼠皮肤中诱导的皮肤纤维化,和c) 博来霉素诱导的肺纤维化。E4肽或对照肽(E1;代表内皮抑素的氨基端区)与TGF- β 或博来霉素同时或在TGF- β 或博来霉素后3-4天投与。在TGF- β 引发皮肤纤维化后1周和2周并在博来霉素诱导的肺纤维化后两周和三周处死小鼠。还测试了E4肽的两种不同的投与模式。证实腹膜内和气管内投与是有效的。皮肤和IP注射的100 μ l总体积和IT投与的50 μ l总体积中投与的E4量为10 μ g/ml。

[0353] 对于这些研究,通过测量H&E皮肤切片(皮肤)上的皮肤厚度,通过马森三色染色(皮肤和肺)评定胶原蛋白水平以及通过瑟科分析(Sircol assay)(肺)测量胶原蛋白水平来评定纤维化。此外,为了证实E4发挥其抗纤维化作用的机制,评估了细胞外基质(ECM)组分的产生、促进基质稳定化并因此累积的酶的水平 and 降解ECM组分的那些酶的水平以及促纤维化触发物下游的转录因子水平。使用未配对t检验和三因素方差分析(针对ID1数据)评定结果。

[0354] 结果

[0355] 即使单次投与E4,E4也引起博来霉素诱导的皮肤纤维化的显著减弱(图8)。E4在第7天引起TGF- β 诱导的皮肤纤维化的显著降低。因此,E4预防(图8)和逆转(图9)由TGF- β 触发的皮肤纤维化。

[0356] 与博来霉素同时或在博来霉素后三天投与的E4导致纤维化和马森三色染色明显减少(参见图9和图10)。博来霉素后三天给予的E4肽显著降低小鼠肺中的胶原蛋白水平(图10B)。

[0357] 不管投与模式如何,E4均引起TGF- β 和博来霉素诱导的皮肤(图8)和肺纤维化(图10)的统计学显著降低。E4的腹腔内和气管内投与均有效阻断皮肤和肺纤维化。举例来说,无论腹膜内或气管内投与,E4在第21天均引起博来霉素诱导的肺纤维化的显著减弱(图11)。因此,E4在减少纤维化方面是有效的,与投与模式无关。

[0358] 结果也证明E4通过多种途径发挥其抗纤维化作用。E4降低赖氨酰氧化酶(LOX)和负责胶原蛋白、弹性蛋白和其它细胞外基质(ECM)分子交联的酶的水平并因此稳定ECM。E4可以使胶原蛋白不太稳定,更容易蛋白水解降解。图12显示在E4存在或不存在下用博来霉素处理的小鼠的肺切片。

[0359] 检测到E4介导的LOX降低,在体外也同样检测到。第4传代中正常的肺成纤维细胞用媒介、E4、TGF- β 或TGF- β ,接着30分钟后由E4处理(图13)。48小时后,使用蛋白质印迹分析

来分析由成纤维细胞调节的培养基。用E4处理显著降低了LOX的水平。当通过实时PCR检查LOX mRNA水平时,获得了类似的结果。

[0360] E4还通过诱导和激活基质金属蛋白酶(MMP-2)促进ECM组分的降解,基质金属蛋白酶是降解包括纤连蛋白以及天然和变性胶原蛋白的数种ECM分子的酶(图14)。另外,E4增加了抑制TGF- β 作用的转录因子分化抑制剂(ID)-1的水平(参见图15)。在蛋白质印迹分析中确定了E4降低经处理并在24小时后收获的原代人类肺成纤维细胞中主转换转录因子Egr-1的水平(参见图16)。Egr-1水平的降低平行于胶原、SMA和纤连蛋白的减少。已知Egr-1介导数种纤维化试剂(包括TGF- β 和博来霉素)的作用。

[0361] 因此,E4发挥显著的抗纤维化作用。这种肽无论是与这些纤维化触发物同时还是在纤维化起始后的几天投与都显著减弱了TGF- β 和博来霉素的纤维发生作用,表明E4和其它C端内皮抑素多肽在逆转已建立的纤维化方面也是有效的。E4无论是气管内还是腹膜内投与由博来霉素诱导肺纤维化和由TGF- β 诱导皮肤纤维化的小鼠都发现了抗纤维化作用。此外,E4通过多种途径发挥其抗纤维化作用,包括通过降低LOX使ECM去稳定并因此降低ECM交联、通过激活MMP-2诱导ECM降解、抑制Egr-1水平和增加转录因子ID-1。

[0362] 因此,数种体外分析和纤维化的四种体内和离体临床前模型表明,如E4所例示的C端内皮抑素多肽是一种有效的抗纤维化肽,其可以阻断和逆转肺和皮肤两种器官中的纤维化。内皮抑素特有的这些抗纤维化作用以及抗血管生成作用的缺乏使得E4成为有吸引力的器官纤维化的治疗性肽。

[0363] 实例9

[0364] 在植物中生产口服有效的抗纤维化蛋白质

[0365] 进行研究以评估表2中所示的E3-6His-KDEL、E3-Fc(C67A)和扩大的E3-6His-KDEL肽的表达、纯化和经口递送。

[0366] 方法

[0367] 使用IBIOLAUNCH™基因表达平台在植物中表达肽。给予C57BL/6小鼠气管内投与博来霉素联合静脉内(IV)投与END-55(在本文中也称为E3-Fc(C67A)和CFB03),或在博来霉素后八天接着IV投与END-55。在第12天处死小鼠,取出肺样品进行苏木精和伊红(H&E)染色和羟基脯氨酸分析。

[0368] 结果

[0369] 使用IBIOLAUNCH™平台在植物中表达E3肽。未加标签的E3肽基于差异溶解度进行纯化。参见图18。E3变体肽(E3-6His-KDEL、扩大的E3-6His-KDEL(C67A)和E3-Fc(C67A))中的每一种均成功产生并纯化。参见图19。

[0370] 使用博来霉素在小鼠中诱导肺纤维化。用E3变体或磷酸盐缓冲盐水(PBS)经口处理动物。检查肺组织学,显示经口递送的E3变体(E3-6His-KDEL和扩大的E3-6His-KDEL)预防博来霉素诱导的肺纤维化。参见图20。

[0371] 对于图21和22中所示的实验,使用博来霉素在小鼠中再次诱导肺纤维化。向对照物投与PBS,而实验样品也有经口或静脉内投与的END55(也称为E3-Fc(C67A))。在肺中测量羟基脯氨酸含量。

[0372] 与仅用博来霉素处理的小鼠相比,用100 μ g或200 μ g的END-55处理的小鼠具有减少的肺纤维化,如使用羟基脯氨酸分析所评定(图21)。以任一剂量静脉内投与的END-55显示

出具有与以50μg经口投与的END-55相似的功效。在博来霉素处理后8天(经口和静脉内)投与的END-55也显示出减少纤维化,尽管在这些组中每组只处理三只小鼠。因此,这些研究表明END55的经口和IV递送预防博来霉素诱导的肺纤维化,并且所述多肽的IV给药与经口投与相当。参见图21和22。此外,END-55无论是同时还是在纤维化触发物(表示为d8;图21)后投与均改善了博来霉素诱导的体内肺纤维化。因此,END55的IV投与有可能逆转肺纤维化。

[0373] 表2

构建体	序列	SEQ ID NO:	描述
END16	MGKMASLFATFLVVLVSLSLASESSASYC ETWRTEAPSATGQASSLLGGRLLGQSAASC HHAYIVLCIENSFMTHHHHHHKDEL	15	E3-6His-KDEL: 分泌前导肽(粗体); 用 6×His 和 KDEL 序列加标签(<i>斜体</i>)
END55	MGKMASLFATFLVVLVSLSLASESSASYC ETWRTEAPSATGQASSLLGGRLLGQSAASC HHAYIVLAIENSFMTEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	16	E3-Fc (C67A): 分泌前导肽(粗体); 第三个半胱氨酸变成丙氨酸(粗体, 带点划线) 并与人类免疫球蛋白 IgG1 Fc 结构域融合(<i>斜体</i>)
END56	MGKMASLFATFLVVLVSLSLASESSAQKS VWHGSDPNGRRLTESYCETWRTEAPSATG QAYSLGGRLLGQSAASCHHAYIVLAIENS FMTASKHHHHHHHKDEL	17	扩大的 E3-6His-KDEL (C67A): 分泌前导肽(粗体); 延伸 E3 肽的 N 端的来自胶原蛋白 XVIII 的额外 17 个氨基酸(突出显示); 来自天然内皮抑素变体的 S→Y 突变(粗体, 带下划线); 第三个半胱氨酸变成丙氨酸(粗体, 带点划线); 来自内皮抑素 C 端的三个额外残基(<i>斜体, 带下划线</i>); 并用 6×His KDEL 加标签(<i>斜体</i>)

[0376] 实例10-与E3融合的Ig分子

[0377] 表达与E3的各种Fc结构域融合物(E3-Fc (IgG1) 除外)。序列如下:

[0378] E3_C67A-Fc_IgG2:MGKMASLFATFLVVLVSLSLASESSASYCETWRTEAPSATGQASSLLGGRLLGQSAASCHHAYIVLAIENSFMTERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDISVEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:22)

[0379] E3_C67A-Fc_IgG3:MGKMASLFATFLVVLVSLSLASESSASYCETWRTEAPSATGQASSLLGGRLLGQSAASCHHAYIVLAIENSFMTELKTPLGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TFRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENNYNTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSVMHEALHNRTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:23)

[0380] E3_C67A-Fc_IgG4:MGKMASLFATFLVVLVSLSLASESSASYCETWRTEAPSATGQASSLLGGRLLGQAASCHHAYIVLAIENFSMTESKYGPPCPCPAPEFLGGPSVFLFPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLK (SEQ ID NO:24)

[0381] E3_C67A-Fc_IgA1:MGKMASLFATFLVVLVSLSLASESSASYCETWRTEAPSATGQASSLLGGRLLGQAASCHHAYIVLAIENFSMTVPCPVPSTPPTPSPSTPPTPSPSCCHPRLSLHRPALEDLLLGSEANLTCTLTGLRDASGVTFTWTPSSGKSAVQGPPELDLCGYSVSSVLPGCAEPWNHGKFTCTAAYPESKTPLTATLSKSGNTFRPEVHLLPPPSEELALNELVTLTCLARGFSPKDVLRWLQGSQELPREKYLTWASRQEPSQGTTTTFAVTSILRVAEEDWKKGDTFSCMVGHEALPLAFTQKTIDRLAGKPTHVNVSVVMAEVDGTCY (SEQ ID NO:25)

[0382] E3_C67A-Fc_IgA2:MGKMASLFATFLVVLVSLSLASESSASYCETWRTEAPSATGQASSLLGGRLLGQAASCHHAYIVLAIENFSMTVPCPVPPPPCCHPRLSLHRPALEDLLLGSEANLTCTLTGLRDASGATFTWTPSSGKSAVQGPPELDLCGYSVSSVLPGCAQPWNHGETFTCTAAHPELKTPLTANITKSGNTFRPEVHLLPPPSEELALNELVTLTCLARGFSPKDVLRWLQGSQELPREKYLTWASRQEPSQGTTTTFAVTSILRVAEEDWKKGDTFSCMVGEALPLAFTQKTIDRMAGKPTHVNVSVVMAEVDGTCY (SEQ ID NO:26)

[0383] E3_C67A-Fc_IgM:MGKMASLFATFLVVLVSLSLASESSASYCETWRTEAPSATGQASSLLGGRLLGQAASCHHAYIVLAIENFSMTVIAELPPKVSFVPPRDGFFGNPRKSKLICQATGFSPRQIQVSWLREGKQVSGVTTDQVQAEAKESGPTTYKVTSTLTIKESDWLGQSMFTCRVDHRGLTFQQNASSMCPDQDTAIRVFAIPPSFASIFLTKSTKLTVLTDLTYSVTISWTRQNGEAVKTHTNISESHPNATFSAVGEASICEDDWSNGERFTCTVTHTDLP SPLKQTI SRPKGVALHRPDVYLLPPAREQLNLRESATITCLVTGFSPADV FVQWMQRGQPLSPEKYVTSAPMPEPQAPGRYFAHSILTVSEEEWNTGETYTCVAHEALPNRVTERTVDKSTGKPTLYNVSLVMSDTAGTCY (SEQ ID NO:27)

[0384] J-Chain_PVX_sgp36:MGKMASLFATFLVVLVSLSLASESSAQEDERIVLVDNKCKCARITSRIIRSSSEDPNEDIVERNIRIIVPLNNRENISDPTSPLRTRFVYHLSLCKKCDPTEVELDNQIVTATQSNICDEDSATETCYTYDRNKCYTAVVPLVYGGETKMVETALTPDACYPD (SEQ ID NO:28)

[0385] IgG1_Fc-E3_C67A (C端融合物):MGKMASLFATFLVVLVSLSLASESSAEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGKSYCETWRTEAPSATGQASSLLGGRLLGQAASCHHAYIVLAIENFSMT (SEQ ID NO:29)

[0386] 如图23所示,E3与IgG2的Fc区的融合物表现出较差的表达并且不足以纯化,与-IgG3的融合物是可溶的并且纯化的,与-IgG4的融合物是可溶的并且纯化的,与-IgA1(±J链)的融合物不可溶,与-IgA2(±J链)的融合物不可溶,与-IgM(±J链)的融合物表现出较差的表达并且不足以纯化,而Fc-E3是可溶的并且纯化的。

[0387] 对于IgG Fc表达,澄清的植物溶解物在蛋白质印迹(基因纬(Genway)鸡E3抗体)上运行。融合物包括连接于铰链的N端+IgG2、IgG3或IgG4的Fc结构域或铰链的C端+IgG1的Fc结构域的E3(C67A)。IgG2融合物表现出低表达,而IgG3和IgG4融合物表现出中等表达。E3-IgG1融合物表达良好。非还原样品全部看起来形成大的结构,尽管可能不像END-55(iBioCFB03)HMW多聚体那样大(图24)。

[0388] 对于IgA/M表达,将澄清的植物溶解物在变性(全部)或非变性缓冲液(可溶)中研磨,并在蛋白质印迹(基因纬鸡E3抗体)上运行。融合物含有与铰链的N端+IgA1、IgA2或IgM的Fc结构域连接的E3(C67A)。IgA1和IgA2融合物不溶于正常的研磨缓冲液。IgM融合物具有极低的表达。J链共表达没有明显的作用。参见图25

[0389] 实例11-iBio-CFB03:高分子量多聚体

[0390] iBio-CFB03(在本文中也称为END55或E3-Fc(C67A))是由306个氨基酸长度的融合蛋白的多个亚基组成的高分子量多聚体,其中48个氨基酸的片段衍生自胶原蛋白XVIII的C端(E3的序列),含有添加的分泌前导肽[粗体;26个氨基酸;在通过ER定位信号肽酶将分子分泌到内质网(ER)期间被切割]并与人类免疫球蛋白IgG1Fc结构域(斜体;232)融合,如图26所示。此融合蛋白还含有在位置67处(加下划线并加粗)的半胱氨酸至丙氨酸突变和1个糖基化位点(斜体并加下划线)。非糖基化E3-Fc的预测分子量为31,153Da。

[0391] 化学性质、制造和对照

[0392] iBio-CFB03是一种约1.2兆道尔顿(MDa)的多聚体蛋白,其具有重复单体与31至33kDa之间的两种主要糖型。当在4℃下在磷酸盐缓冲盐水(PBS)中储存时,多聚体是可溶的和稳定的。

[0393] 制造方法

[0394] 使用IBIOLAUNCH™平台在卡利伯生物治疗有限公司(Caliber Biotherapeutics, LLC)(8800HSC Pkwy, Bryan, TX 77807)制造iBio-CFB03原料药,所述平台使用基于植物的瞬时表达系统,允许上游生产的农业规模化,然后是传统的下游纯化和配制过程。制造工艺的概述呈现在图27中。

[0395] 原料药制造工艺的汇总

[0396] 主细胞库(MCB)和工作细胞库(WCB)的产生

[0397] 密码子优化序列

[0398] 通过使用突变寡核苷酸的链重叠延伸(SOE)使E3肽中的最后一个半胱氨酸突变成丙氨酸来修饰内皮抑素E3肽的基因序列(人类胶原蛋白 α -1(XVIII)链前原蛋白的氨基酸1,466至1,513,GenBank NP_085059.02)。将所得E3肽突变体C67A序列通过SOE融合到皱叶烟草(Nicotiana glauca)伸展蛋白基因的信号肽(GenBank AAA34073.1)和人类免疫球蛋白G1Fc区(氨基酸216至447,GenBank: CAC20454)以形成候选基因iBio-CFB03(表3;图26)。使用烟草(Nicotiana glauca)密码子使用表对iBio-CFB03基因进行密码子优化以用于植物表达,并克隆到位于限制性位点PacI与XhoI之间的基于IBIOLAUNCH™烟草花叶病毒的载体pGR-D4中以产生载体pSM042(图28)。

[0399] 表3:iBio-CFB03序列描述

氨基酸位置	序列描述
1-26	皱叶烟草伸展蛋白信号肽
27-74	内皮抑素E3肽突变体C67A
75-89	人类IgG1重链的铰链区
90-306	人类IgG1重链的Fc区

[0401] 克隆到农杆菌载体菌株GV3101中

[0402] 然后通过电穿孔将表达载体pSM042与辅助质粒pSOUP一起移动到根癌杆菌菌株

GV3101中 (GenBank:EU048870.1) (海伦斯 (Hellens) 等人, 植物分子生物学 (Plant MolBiol.) 2000;42 (6):819-832)。pSoup编码RepA, 其反式作用于pGreen中所含的pSa Ori序列以允许其在农杆菌中复制。在卢里亚-贝尔塔尼 (Luria-Bertani, LB) 琼脂板上针对50mg/L卡那霉素 (kanamycin)、25mg/L利福平 (rifampicin) 和10mg/L四环素 (tetracycline) 选择农杆菌克隆。卡那霉素抗性由pGR-D4表达载体提供, 利福平抗性由GV3101农杆菌菌株提供, 并且四环素抗性由辅助载体pSOUP提供。在28℃培育3天后, 挑取单菌落接种液体LB培养基 (如上所述补充抗生素) 以在28℃、225rpm的振荡培育箱中扩增每种细菌培养物。通过聚合酶链式反应 (PCR) 鉴定每个克隆, 并使用在pGR-D4表达载体中插入片段上游结合的特异性引物通过测序确认特异性插入片段。一旦确认, 就产生初始农杆菌MCB和WCB并储存在-70℃下的两个独立的冷冻机中。

[0403] iBio-CFB03表达

[0404] 步骤1-托盘装配, 播种托盘

[0405] 使用标称为4英尺×3英尺大小的铝制植物生长托盘。在自动化真空针头播种机中对含有240个岩棉塞的泡沫聚苯乙烯插塞托盘进行播种。在每个铝萌发托盘中放置四个插塞托盘 (960株植物), 并将其运送到萌发室。

[0406] 步骤2-植物萌发生长

[0407] 在装有LED照明的垂直机架中, 植物在27℃下发芽3周, 调节光谱正确光的强度, 以优化光合作用和最佳植物生长。采用滴灌技术为水培生长提供具有所需矿物质的改良霍格兰氏溶液 (Hoagland's solution)。不使用土壤或其它材料来支持植物生长。

[0408] 步骤3-移植到较低密度托盘

[0409] 在生长3周时, 将含有发芽植物的插塞机械移植到4英尺×4英尺的生长托盘上, 每个托盘只有320个植物位置以允许叶子展开。植物在25℃下再生长2周。在这个阶段, 每株植物的叶生物物质约为8-10克。

[0410] 步骤4-农杆菌生长

[0411] 所选农杆菌克隆在含有补充有50mg/L卡那霉素、25mg/L利福平和10mg/L四环素的LB培养基的培养瓶中以在28℃下225rpm的搅拌下从工作细胞库生长。收集OD_{600nm}达到约1.5的培养物, 并在含有2mM MES缓冲液pH 5.6的反渗透纯化水中稀释50倍。

[0412] 步骤5-载体真空农杆菌渗入植物

[0413] 在农杆菌诱导1小时后, 将5周龄的植物在23英寸Hg表压下真空渗入。在真空渗入之前, 本氏烟草 (*Nicotiana benthamiana*) 植物在专有的红色/蓝色LED灯下在~27℃、相对湿度~50%下水培生长5周。将经农杆菌渗入的植物在恒定的LED光下在~25℃、相对湿度~50%下培育。

[0414] 步骤6-渗入后生长

[0415] 渗入后的室内水培生长条件使植物维持在25℃下经调节的光照方案。渗入后6天之后, 将植物自动运送到收获区域进行提取。

[0416] iBio-CFB03-纯化过程

[0417] 步骤7-植物收获-均化和离心澄清

[0418] 在水性酸化 (pH 4.8-5.2) 提取缓冲液 (50mM磷酸钠、150mM NaCl、5mM EDTA、60mM抗坏血酸和1mM PMSF) 中用瓦林 (Waring) 重型实验室级不锈钢掺合机机械均化表达iBio-

CFB03 (E3-Fc) 的本氏烟草生物质1分钟。通过离心使生物质部分澄清,然后用1N NaOH将pH调节至6.2。

[0419] 步骤8-深度过滤

[0420] 通过深度过滤(标称保留等级1.2/0.2 μ m)进一步澄清提取物。

[0421] 步骤9-超滤

[0422] 将澄清的提取物应用于含有1mm纤维的截留分子量(MWCO)孔径为750kDa的中空纤维切向流过滤(TFF)模块。通过750kDa MWCO以6,000-8,000sec⁻¹的剪切速率和5-7psi的跨膜压力过滤提取物。

[0423] 最初通过十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)评定iBio-CFB03的纯化。如图29可以看出,通过上述程序纯化的iBio-CFB03未能以非变性状态进入凝胶(没有热处理和 β -巯基乙醇;泳道6)。通过蛋白质A亲和色谱纯化的iBio-CFB03样品(泳道4)的行为与对照试剂(END-81)相似,对照试剂是融合到IgG1-Fc的与E3具有相同氨基酸组成但具有杂乱的一级序列的肽(泳道5),这些结果表明,iBio-CFB03在植物中产生时天然存在高分子量阵列,这种行为不是由于纯化方法,并且确实可能是具有类似的非极性N端序列的Fc融合蛋白所固有的。当在常规SDS-PAGE变性条件下(加热加上 β -巯基乙醇)进行电泳时,大部分纯化的iBio-CFB03(泳道3)分解成表观分子量 \sim 35kDa和 \sim 32kDa的两条带。对于通过蛋白质A亲和色谱纯化的iBio-CFB03(泳道1)和END-81对照试剂(泳道2)获得相似的结果。这些结果表明双带模式不是由于融合蛋白的E3相关部分的纯化方法或一级序列所致,并且可能是由于Fc融合搭配物的糖基化模式的差异。另外,在变性样品中也观察到具有与iBio-CFB03二聚体(\sim 70kDa)、三聚体(\sim 110kDa)和四聚体($>$ 150kDa)一致的表观分子量的条带,并且似乎如在对照试剂中一样与纯化方法无关。这些额外的条带表明高分子量阵列非常稳定并且抵抗常见的电泳变性条件,并且可能是疏水性肽与人类Fc的融合物的额外属性。由于这些行为,SDS-PAGE不是表征iBio-CFB03的优选方法。

[0424] 用尺寸排阻色谱(SEC)评估TFF保留物的纯度,并与未渗入的保留物比较(图30)。在天然非还原条件下,SEC色谱图在6分钟的保留时间(估计对应于1.2MDa的分子量)显示单一的iBio-CFB03峰,其在未渗入的生物质中完全不存在。保留物主要由iBio-CFB03产物构成,其中植物宿主细胞蛋白质贡献其余部分。产物以50mg/mL的水平可溶于PBS和生理盐水中。

[0425] 步骤10-阳离子交换色谱

[0426] 然后通过过滤制备TFF保留物用于阳离子交换(CEX)色谱(标称保留等级1.2/0.2 μ m),用1M乙酸将pH调节至5.3-5.7并且通过添加超纯水将电导率调节至4-6mS/cm。在CEX色谱期间,通过用至多250mM氯化钠洗涤除去剩余的杂质(图31CEX洗涤;图32泳道3-5和9,图33顶部),并且iBio-CFB03用550mM氯化钠以 \geq 95%的纯度洗脱(图31CEX洗脱;图32泳道6和10;图33底部)。

[0427] 使用SDS-PAGE评定CEX级分的含量(图32)。装载前,在泳道2-7中的样品在存在266mM β -巯基乙醇的情况下在70 $^{\circ}$ C下加热10分钟。泳道9和10中的样品不含 β -巯基乙醇并且在电泳之前不加热。泳道3-5分别对应于含有100、150和250mM NaCl的洗涤级分1A1、1A4和1A9(图29)泳道6显示了洗脱级分1B2(550mM NaCl),并且显示了当iBio-CFB03产物暴露于还原剂(例如加热和 β -巯基乙醇)时可观察到的单体(\sim 35kDa)、二聚体(\sim 70kDa)、三聚体

(~110kDa) 和四聚体 (~150kDa) 物种。当在不存在 β -巯基乙醇的情况下装载洗脱级分1B2并且在电泳之前不加热(泳道10)时, HMWiBio-CFB-03多聚体可以在凝胶的原点显现。

[0428] 步骤11-渗滤缓冲液更换和无菌过滤

[0429] 然后将iBio-CFB03CEX洗脱池材料浓缩至12.5mg/mL, 并且使用100kDa MWCOTFF(稳定的纤维素), 在2-4psi的跨膜压力下, 通过TFF将缓冲液更换为磷酸盐缓冲盐水。

[0430] 步骤12-散装原料药的包装

[0431] 散装原料药在生物安全柜内经无菌过滤并且包装在无菌袋内。散装产物被转移到选定的填充设施进行最终填充。

[0432] iBio-CFB03的表征

[0433] iBio-CFB03的SE-HPLC分析

[0434] 通过SE-HPLC分析iBio-CFB03样品以评定HMW多聚体的纯度。使用具有UV检测的1100系列HPLC系统在TSKgel G3000SW xL, 7.8mm \times 30cm, 5 μ m柱上进行SE-HPLC分析。用于SE-HPLC的流动相由50mM磷酸钠(一元, 一水合物)、磷酸钠(二元, 无水物)和0.3M氯化钠pH 7.0组成。在样品分析之前, 制备蛋白质混合标准物并将20 μ L注射到柱上。由甲状腺球蛋白(0.5mg/mL)、BSA(1mg/mL)、卵清蛋白(1mg/mL)、 α -乳清蛋白(1mg/mL)和抑肽酶(0.4mg/mL)组成的SE-HPLC蛋白质混合标准物用于确定样品色谱峰的分子量。流动相缓冲液用于空白注射。样品分析前, 色谱柱用流动相平衡。样品在柱上以1.0mL/min的流速分离, 总运行时间为15分钟。

[0435] 使用化学工作站数据分析软件(安捷伦技术(Agilent Technologies), A.01.04 025)进行数据分析。在220nm和280nm处记录吸光度。对每个样品的UV信号进行积分并确定每个检测峰的相对百分比丰度。所有相对丰度百分比 $\geq 0.1\%$ 的峰被考虑用于定量。

[0436] iBio-CFB03在非还原条件下的SE-HPLC分析在6分钟时显示出主峰, 其与来自蛋白质混合标准物的甲状腺球蛋白峰(1.2MDa)的二聚体清楚地重叠, 如图34所示, 表明iBio-CFB03作为高级蛋白质结构存在。还在10.2分钟观察到的另一个小峰, 其对应于用蛋白质混合标准物覆盖时约50kDa的峰。在12.6分钟和12.9分钟处的两个小峰在280nm下未被检测到, 并被认为是非蛋白杂质。分别对6分钟和10.2分钟保留时间的峰收集级分, 并进行胰蛋白酶消化以使用MALDI-TOF MS确定其身份。

[0437] iBio-CFB03的MALDI-TOF MS分析

[0438] 通过MALDI-TOF-MS在非还原和还原条件下分析iBio-CFB03样品以获得HMW多聚体的分子量, 然后通过胰蛋白酶消化进行序列确认。对于还原分析, 将样品用0.5MBME处理并在70 $^{\circ}$ C加热10分钟。使用MALDI-TOF MS, 将氰基-4-羟基肉桂酸(α -CHCA)(西格玛)和芥子酸基质分别用于胰蛋白酶肽和分子量测定。在30:70乙腈(ACN):0.1%三氟乙酸(TFA)中以10mg/mL制备芥子酸基质溶液, 并且在1:1:1乙醇:ACN:0.1%TFA中以10mg/mL制备 α -CHCA基质。然后将样品在0.5mL艾本德管(Eppendorf tube)中以1:9的比例混合, 并将1.5 μ L的混合物点样在MALDI板上用于分析。

[0439] 使样品在分析之前完全风干, 因为它们与基质共结晶约2-3分钟。然后将所述板装载到MALDI-TOF质谱仪中。手动采集用于肽分析, 并且将仪器模式设定成“反射镜”、“延迟”和“正”, 加速电压和电网分别设定成20kV和66-74%, 延迟时间为~125纳秒。拍摄/光谱设定成150, 其中质量范围是500-4,000Da并且低质量门是400Da。选择 α -CHCA基质来获取校准

和数据文件光谱。在采集开始之前,离子源和反射镜压力总是分别小于 5.0×10^{-7} 和 1.2×10^{-7} 托。将初始激光功率设定成1250进行校准,并在光谱采集过程中根据需要进行调整。使用在标准测试混合物中的ACTH (2,093.0867Da处的1-17片段) 拆分的质量峰和缓激肽 (904.4681Da处的2-9片段) 质量峰产生两点质量校准曲线,并将其应用于蛋白质样品分析,如标准操作程序(SOP)中所详述。通过重新获取测试混合物光谱来测试校准文件,并且如果任一肽的单同位素质量 $> \pm 0.2$ Da,那么文件被拒绝并重新获取。校准中使用每种肽的单同位素质量。

[0440] 类似地,对于分子量分析,仪器模式设定成“线性”、“延迟”和“正”模式,加速电压25kV,电网设定成66-74%并且延迟时间200纳秒。拍摄/光谱设定成200,其中质量范围是4,500-200,000Da并且低质量门是4,000Da。选择芥子酸基质来获取校准和数据文件光谱。将初始激光功率设定成1800进行校准,并在光谱采集过程中根据需要进行调整。使用肌红蛋白 (11,652.52Da) 平均质量峰产生一点校准曲线。

[0441] 在还原条件下,iBio-CFB03的MALDI谱显示分别代表非糖基化 (E3-Fc Non-gly) 和糖基化 (E3-Fc Gly) iBio-CFB03的 m/z 31,166.94 $[M+H]^+$ 和 m/z 33,068.88 $[M+H]^+$ (图35)。光谱显示了稳定多聚体的单体亚基。

[0442] 对iBio-CFB03的还原和非还原条带进行凝胶内胰蛋白酶消化以确认条带的身份(图36)。对于还原条件,根据分子量标记,条带1对应于 ~ 35 kDa,条带2对应 ~ 70 kDa,并且条带3对应于 ~ 100 kDa。然后使用来自每个条带的胰蛋白酶肽获得iBio-CFB03的序列覆盖率。对于非还原条件,条带1是从不离开孔的HMW多聚体。

[0443] iBio-CFB03还原条带1的凝胶内胰蛋白酶消化产生来自HMW多聚体的E3和Fc区的数种肽(图37)。在下面给出的iBio-CFB03序列中,E3肽以黄色突出显示。所有鉴定的肽在序列中都以颜色编码,其各自的质量在MALDI谱中突出显示(图38)。

[0444] iBio-CFB03的进一步表征

[0445] 使用额外分析表征iBio-CFB03。使用负染电子显微镜来评定iBio-CFB03的均匀性并确定可以导出分子量的估计值的分子直径。也进行了iBio-CFB03的糖基化模式的表征。

[0446] 其它质谱分析将使用连接到HPLC的四极杆飞行时间(Q-TOF)进行,以确定通过在RP HPLC柱上分离制备的iBio-CFB03的精确分子量。

[0447] 效价分析

[0448] 所提出的iBio-CFB03效价评定采用双峰方法评定参与纤维化的两种介体尿激酶纤溶酶原激活物(uPA)的活性和基质金属蛋白酶-1(MMP-1)的蛋白质含量。基于早期机制研究中的稳健性,uPA和MMP-1分析用于评估iBio-CFB03批次的效价。

[0449] 进行了大量的实验以确定iBio-CFB03的概念验证和具体的作用机制。这些研究和结果详细描述在本文中。大部分概念验证分析和作用机制实验都是用E3肽的酰胺化形式E4进行的。下面提出的效价分析将使用重组iBio-CFB03进行并鉴定。

[0450] uPA活性分析

[0451] 尿激酶纤溶酶原激活物连同其受体uPAR启动导致纤溶酶原向纤溶酶转化的蛋白水解级联反应(钟(Choong)等人,临床骨科及相关研究(Clin Orthop Relat Res.)2003;415:S46-58)。uPA通过其在纤溶酶原系统中的作用在细胞外蛋白水解中起重要作用,其激活下游酶并与细胞外基质(ECM)相互作用。此外,在选择器官中,uPA在化学计量上激活潜在

的抗纤维化因子HGF是重要的(奈蒂尼(Naldini)等人,生物化学杂志1995;270:603-611)。uPA是作为无活性的蛋白质在细胞外环境中蛋白水解活化或与uPAR结合时而产生的。在IPF患者中,uPA的水平显著降低(巩特尔(Gunther)等人,血栓形成与止血(Thrombosis and Haemostasis)2000;83:853-860),并且已报道了肺纤维化患者的支气管肺泡灌洗液中纤溶酶原活化受损。多个小组已经证实uPA在不同器官和动物模型中具有抗纤维化作用。举例来说,吸入的uPA减少哮喘小鼠模型中的气道重塑(藏本(Kuramoto)等人,美国生理学杂志-肺细胞和分子生理学(Am.J Physiol.-Lung Cell.Mol.Physiol.)2009;296:L337-346),并且uPA在小鼠肺中的转基因表达防止纤维化(西森(Sisson)等人,人类基因治疗1999;10:2315-2323;西森等人,美国生理学杂志-肺细胞和分子生理学2002;283:L1023-1032;艾德尔(Ide11),美国呼吸与重症护理医学杂志2003;168:1268-1269)。许等人已显示SSc和IPF患者的纤维化肺组织中uPA水平降低(关节炎与风湿病2011;63:783-794)。研究还表明E4增加uPA水平和活性。

[0452] 通过用人类重组TGF- β (10ng/ml) 或作为媒介对照的PBS与iBio-CFB03 (10 μ g/ml) 或DMSO (阴性对照) 培育原代人类成纤维细胞来进行分析。使用来自分子创新公司(Molecular Innovations)的uPA活性分析(人类uPA活性ELISA试剂盒目录号HUPAKT)来测量原代人类成纤维细胞中uPA的活性。所述分析是检测能够与人类PA-1共价结合的uPA的ELISA。所述分析的原理是样品中功能活性的uPA与结合于经抗生物素蛋白涂布的培养板的生物素化的人类PA-1形成共价复合物。结合的uPA随后用抗uPA初级抗体(Ab)检测,与辣根过氧化物酶二级Ab反应,随后在450nm下用四甲基联苯胺(TMB)底物检测。不结合并且检测不到无活性或复合的uPA。显色的量与样品中活性uPA的浓度成正比。由uPA标准曲线确定样品中活性uPA的浓度。

[0453] MMP-1蛋白和活性分析

[0454] MMP是切割ECM和其它蛋白质的依赖锌的蛋白酶(阿玛尼内(Amalinei)等人,2007)(帕克斯(Parks)等人,自然综述免疫学(Nature Reviews Immunology)2004;4:617-629)。MMP-1是原型间质胶原酶1,并且是降解人类组织纤维状胶原蛋白的关键酶(阿玛尼内等人,罗马尼亚形态与胚胎学杂志(Rom J Morphol Embryol)2007;48:323-334)。MMP的活性增加可以解决纤维化的证据来自使用广泛作用的金属蛋白酶抑制剂治疗各种癌症的临床试验报告,其中患者使用MMP抑制剂出现皮肤增厚和关节挛缩(综述于帕克斯等人,自然综述免疫学2004;4:617-629),两者都发生在SSc中。有支持MMP-1治疗潜力的科学证据,例如MMP-1的瞬时表达足以减轻肝纤维化(饭村(Iimuro)等人,胃肠病学(Gastroenterology)2003;124:445-458;在小鼠巨噬细胞中表达MMP-1的转基因小鼠具有减少的胶原沉积(transgenic mice expressing MMP-1in mouse macrophages have decreased collagen deposition George),临床科学(Clin Sci)(伦敦)2012;122:83-92;弗让吉(Foronjy),高血压研究(Hypertension Res.)2008;31:725-735;人类MMP-1的表达预防心肌纤维化(弗让吉等人,高血压研究2008;31:725-735);并且重组MMP-1解决肌肉纤维化(卡恩(Kaar)等人,生物材料学报(Acta Biomaterialia)2008;4:1411-1420)。山口(Yamaguchi)等人先前已经报道了E4降低赖氨酰氧化酶(LOX)的水平,所述酶是负责交联和稳定胶原蛋白的酶(科学·转化医学(Sci Transl Med.)2012;4:136ra171)。这些研究结果表明E4通过减少LOX来削弱ECM,从而通过增加MMP-1和-3水平来促进其降解。这也解释了E4通过MMP介导的基质降

解减少进行性纤维化的能力。已经充分证明通过纤溶酶原系统激活MMP-1和-3 (综述于格哈雷-卡曼尼 (Gharaee-Kermani) 等人, 关于研究药物的专家意见 (Exp.Op.Invest.Drugs) 2008;17:905-916)。MMP-1和-3也可以由HGF诱导 (金妮 (Jinnin) 等人, 核酸研究2005;33:3540-3549;包村 (Kanemura) 等人, 肝脏学研究 (HepatologyRes.) 2008;38:930-939;莫维生 (Monvoisin) 等人, 国际癌症杂志 (Int.J.Cancer) 2002;97:157-162;邓斯莫尔 (Dunsmore) 等人, 生物化学杂志1996;271:24576-24582;休伊特 (Huet) 等人, 生物化学与药理学 (Biochem.Pharmacol.) 2004;67:643-654)。

[0455] 其它研究显示E4诱导人类原代成纤维细胞中的MMP-1表达。数据还显示在用E4处理的成纤维细胞的上清液中MMP-1活性增加。作为iBio-CFB03效价测试的一部分, 使用市售的ELISA试剂盒 (西格玛-奥德里奇目录号RAB0362-1KT) 分析MMP-1水平以定量测量原代成纤维细胞中的MMP-1蛋白水平。简而言之, 将样品移液到涂布有固定的MMP-1抗体的96孔板中, 并在随后的洗涤后与生物素化的人类MMP-1抗体形成共价复合物。结合的MMP-1与辣根过氧化物酶反应, 然后用TMB底物溶液检测。不会结合并且不会检测到无活性或复合的MMP-1。显色的量与样品中MMP-1的浓度成正比, 总的色彩强度由450nm处的吸光度决定。

[0456] 原代成纤维细胞中的MMP-1活性水平也使用市售的抗体阵列试剂盒 (瑞博奥生物科技 (RayBiotech) 目录号AAH-MMP-1) 分析。简而言之, 将样品移液并在含有经抗体涂布的膜的8孔培养皿中培育。在后续洗涤后, 将样品与生物素化的抗体一起培育。结合的MMP-1与缀合有辣根过氧化物酶的抗生物素蛋白链菌素反应, 然后用检测缓冲液检测。信号强度与用FluorChemR成像系统 (蛋白质样品公司 (ProteinSimple)) 测量的样品中活性MMP-1的浓度成正比。

[0457] 稳定性评定

[0458] 在标记的至少三批植物产生的多肽 (DS) 以及为投与所配制的每批次的多肽 (DP) 的存储条件、冷冻条件和加速条件下, 评估iBio-CFB03的实时、实际条件稳定性。DS的稳定性研究持续时间为实时、实际条件和冷冻条件下12个月以及加速条件下6个月。DP的稳定性研究的持续时间为实时、实际条件和冷冻条件下36个月以及加速条件下6个月。DS在所有条件的测试频率是在释放时和每3个月进行。DP在实时、实际条件和冷冻条件下的测试频率是在释放时以及3、6、9、12、18、24和36个月进行, 以及在加速条件下在释放时和每3个月进行。在直立、倒立和水平位置评定DP的储存方向的稳定性。

[0459] 非临床

[0460] 非临床疗效研究总结

[0461] 用内皮抑素和化学合成的肽E3和E4进行的研究提供了抗纤维化作用的进一步证据。这些化学合成的肽不能形成如iBio-CFB03所见的高分子量多聚体。在SSc模型中观察到功效, 所述模型在人类皮肤离体模型中通过皮内注射TGF- β 或在C57BL/6小鼠中通过皮下 (s.c.) 投与TGF- β 或博来霉素诱导了纤维化。通过化学合成产生的E3和E4肽在皮内或皮下投与时减弱了这些模型中的纤维化, 其通过皮肤厚度、胶原蛋白含量和羟脯氨酸含量降低来证明。在博来霉素诱导的SSc小鼠模型中, 用预防性和介入给药方案实现了纤维化减少。这些肽在人类肺成纤维细胞的原代培养物中由TGF- β 处理或将博来霉素滴注到C57BL/6小鼠的肺中诱导的IPF模型中也是有效的。将肽投与成纤维细胞培养物, 或经口、静脉内或气管内给予小鼠。

[0462] 内皮抑素可用作抗纤维化剂。在通过机械创伤诱导的兔耳瘢痕模型中(志勇(Zhiyong)等人,国际下肢创伤杂志(Int J Low Extrem Wounds)2012;11(4):271-276;任(Ren)等人,浙江大学学报(J.Zhejiang Univ.Sci.)B.2013;14(3):224-230),在通过对大鼠进行气管内(i.t.)博来霉素投与而诱导的IPF模型中(万(Wan)等人,呼吸研究(Respir Res.)2013;14(1):56),在通过向小鼠投与四氯化碳而诱导的肝纤维化模型中(陈(Chen)等人,实验生物学与医学(Exp Biol Med.)2014;239(8):998-1006)以及在通过向大鼠投与链佐霉素而诱导的糖尿病/肾纤维化模型中(白(Bai)等人,公共科学图书馆·综合(Plos One.)2014;9(4):1-12),内皮抑素逆转了损伤参数。

[0463] 基于用肽E3和E4先前建立的模型,使用iBio-CFB03以各种剂量和给药方案进行体内研究。重组iBio-CFB03也用于效价分析。

[0464] 表4:内皮抑素和内皮抑素肽在纤维化模型中的功效汇总

模型	测试中的产品	测试产品投与途径	结果	参考文献
正常的人类肺成纤维细胞	内皮抑素	体外	腺病毒表达的内皮抑素明显降低了经 TGF- β 预处理的成纤维细胞中的纤连蛋白(FN)和 I 型胶原蛋白 α I 链(Coll α 1)蛋白水平。	山口等人, 科学转化医学 2012; 4:136ra171
人类皮肤外植体, TGF- β 诱导的 SSc 模型	E4 肽	离体	与 TGF- β 同时投与的单剂量 E4 显著降低皮肤厚度并减弱胶原蛋白增加。当在 TGF- β 投与后两天投与时, E4 也改善了纤维化。	山口等人, 科学转化医学 2012; 4:136ra171
小鼠 TGF- β SSc 的皮肤模型	E3 和 E4 肽	体外	与 TGF- β 同时投与的单剂量 E3 或 E4 肽显著降低皮肤厚度。	山口等人, 科学转化医学 2012; 4:136ra171
小鼠博来霉素 s.c. SSc 的皮肤模型	E4 肽	体外 s.c.	当以单剂量预防性投与时以及当初始暴露于博来霉素后 3 天开始以多剂量治疗方案给予时, E4 显著降低皮肤厚度。	山口等人, 科学转化医学 2012; 4:136ra171

模型	测试中的产品	测试产品投与途径	结果	参考文献
小鼠博来霉素 i.t.肺纤维化模型	E4 肽	体外 i.t.	当与博来霉素同时或在博来霉素后 3 天投与时, E4 显著降低肺纤维化, 其通过显微镜和肺样品中羟基脯氨酸/胶原蛋白定量评定。	山口等人, 科学转化医学 2012; 4:136ra171
小鼠博来霉素 i.t.肺纤维化模型	生物素化的 E4 肽	体外经口	当与博来霉素同时投与时, E4 显著减少肺纤维化, 其通过肺样品中羟基脯氨酸/胶原蛋白定量测量。	山口等人, 科学转化医学 2012; 4:136ra171
[0466] 小鼠博来霉素 i.t.肺纤维化模型	iBio-CFB03	体外 IV 经口	当以任一途径与博来霉素同时或在博来霉素后 8 天投与时, 与经媒剂处理的小鼠相比, iBio-CFB03 显著减少肺纤维化。	
小鼠博来霉素 s.c. SSc 的皮肤模型	iBio-CFB03	体外 s.c.	在博来霉素递送后连续投与 7 天时, iBio-CFB03 显著降低皮肤厚度, 如使用羟基脯氨酸/胶原蛋白定量分析所评定。	
人类皮肤外植体, TGF- β 诱导的 SSc 模型	iBio-CFB03	离体	与 TGF- β 同时投与的单剂量 iBio-CFB03 显著减弱了胶原蛋白增加, 如使用羟基脯氨酸/胶原蛋白定量分析所评定。	

[0467] SSc的体内小鼠模型

[0468] 已经建立了SSc的小鼠模型,其中气管内投与的博来霉素可以在12天的时间范围内诱导肺纤维化(参见图39)。此模型已被用于基于使用内皮抑素肽E3和E4减弱纤维化发展的经验来证明iBio-CFB03的功效(山口等人,科学·转化医学2012;4:136ra171)。在此模型中,在用博来霉素处理后10和21天用瑟科分析测量肺组织学和胶原蛋白含量(山口等人,科学·转化医学2012;4:136ra171)。

[0469] 羟基脯氨酸是胶原蛋白独有的氨基酸,并且传统上被用来定量这一蛋白质。所述方法提供每毫克湿组织中羟基脯氨酸总量的定量测定。所述技术提供了高通量和准确的方法来测量羟基脯氨酸,从而能够以多种格式定量胶原蛋白。在一些情况下,应使用三色染色技术(或合适的替代方案)通过纤维化的独立组织学测定来补充羟基脯氨酸含量分析以评定纤维化组织的比例和分布。

[0470] 为了评估组织纤维化/胶原沉积,进行了羟基脯氨酸定量分析。将肺样品取出并在1mL 6N HCl中在110℃下消化过夜。用6N NaOH中和后,将pH调节至6.0-9.0的范围内,并在室温下将样品与1mL氯胺T溶液(1.4%氯胺T、10%异丙醇、0.5M乙酸钠,pH 6.0)混合20分钟。用氯胺T溶液处理后,将样品与1mL欧利希氏溶液(Erlich's solution)(14.9%对二甲氨基苯甲醛、70%异丙醇、20%高氯酸;西格玛-奥德里奇公司)混合,并在65℃下培育15分钟。将等分试样转移至96孔板,并在570nm处测量吸光度。通过与顺式-4-羟基-L-脯氨酸(西格玛-奥德里奇公司)产生的标准曲线比较,使用1 μ g羟基脯氨酸相当于6.94 μ g的转换系数计算胶原蛋白含量。此分析已经用于下面描述的使用iBio-CFB03的研究中,并用于此小鼠模型的非临床研究中。

[0471] 博来霉素小鼠模型中iBio-CFB03的静脉内和经口投与

[0472] 向C57BL/6小鼠i.t.给予博来霉素联合iBio-CFB03静脉内(IV)投与或在博来霉素后八天接着IV投与iBio-CFB03。在第12天处死小鼠,取出肺样品进行H&E染色(图40)和羟脯氨酸分析(图41)。实验设计的图示可见于图39。与仅用博来霉素处理的小鼠相比,用100 μ g或200 μ g/小鼠的iBio-CFB03IV重复处理的小鼠减少了肺纤维化,如使用羟脯氨酸分析所评定。以任一剂量静脉内投与的iBio-CFB03显示出具有与以50 μ g经口投与的iBio-CFB03相似的功效。博来霉素处理(经口和静脉内)后8天投与的iBio-CFB03也显示出减少纤维化。然而,在这些组中每组只处理3只小鼠。因此,这些实验以200 μ g/小鼠(n=9)IV或以50 μ g/小鼠(n=9)经口投与iBio-CFB03来重复(图42)。与仅用博来霉素处理的小鼠相比,用100 μ g/小鼠iBio-CFB03IV处理的小鼠减少了肺纤维化。通过IV或经口途径投与似乎具有相似的功效。

[0473] 无论是同时还是在纤维化触发后(以d8表示)投与,iBio-CFB03都改善博来霉素诱导的体内肺纤维化。使用1 \times PBS作为媒剂。平均胶原蛋白值以每个肺的微克数表示。经口或静脉内(IV)投与iBio-CFB03。图41中的误差条代表平均值的标准差。使用克鲁斯卡尔-沃利斯检验(Kruskal-Wallis test)计算P值,然后进行曼-惠特尼U检验。

[0474] iBio-CFB03在SSc小鼠皮肤模型中的渗透泵投与

[0475] C57BL/6小鼠使用外科手术植入小鼠背部的微型渗透泵皮下递送博来霉素,给予33mU博来霉素七天。在第7天,将泵取出并用含有460 μ g的iBio-CFB03皮下给药另外七天的泵代替。在第35天将小鼠处死,切下泵部位相对侧的背部皮肤,福尔马林固定并包埋在石蜡中。皮肤切片用H&E染色(图43)并测量皮肤厚度(图44)。用iBio-CFB03处理的小鼠的皮肤厚度降低,如使用羟脯氨酸分析所评定。

[0476] SSc的离体人类皮肤模型

[0477] 在通过注射TGF- β 诱导的SSc的人类皮肤模型中评定iBio-CFB03的功效。TGF- β 诱导SSc皮肤特征的病理变化。当与TGF- β 同时投与时,iBio-CFB03减弱人类皮肤中的TGF- β 诱导的纤维化。当与10ng TGF- β 同时投与时,当通过羟脯氨酸分析评估给药后一周时,单次皮内剂量的100 μ g iBio-CFB03预防胶原蛋白的增加(图45)。

[0478] 人类皮肤是从腹部手术获得,修剪,清除脂肪并切成 $\sim 1 \times 1$ 英寸的块片。在气-液界面中的器官培养中维持块片。用100 μ l体积的媒剂(V)、TGF- β (T)或TGF- β +iBio-CFB03(T+iBio-CFB03)注射块片。剂量:媒剂=100 μ l的1 \times PBS;T=10ng的TGF- β ;T+iBio-CFB03=10ng TGF- β +100 μ g iBio-CFB03。一周(7天)后,获得3mm的皮肤打孔并测量皮肤打孔中的羟脯氨酸。数据代表n=3/组。*表示p<0.05。

[0479] 支持iBio-CFB03的E4数据的理由

[0480] 已经使用化学合成的E3和密切相关的肽E4进行了C端内皮抑素肽在临床前纤维化模型中的功效和作用机制的评估。E4与E3的不同之处在于添加C端酰胺以稳定E3肽。使用重组iBio-CFB03进行功效和机制研究以确认先前用化学合成的E3和E4证实的抗纤维化活性。iBio-CFB03提高了E3/E4的溶解性、稳定性和纯化性,并且在进一步的临床前测试中显示出有前景的结果。

[0481] E4肽的作用机制研究

[0482] 已经进行了数个实验来鉴定E4发挥其抗纤维化活性的机制。对从存在或不存在E4处理的用不同纤维化触发物刺激的原代人类肺成纤维细胞或小鼠肺组织提取的RNA进行基

于实时定量PCR (qPCR) 的阵列,以鉴定受内皮抑素肽影响的基因。

[0483] 阵列鉴定了数个受到E4处理影响的基因,其以前与纤维化相关。这些基因包括结缔组织生长因子 (CTGF)、胰岛素样生长因子结合蛋白 (IGFBP) -3、基质金属蛋白酶 (MMP) -1 和 MMP-3、尿激酶纤溶酶原激活物 (uPA)、纤溶酶原激活物抑制剂 (PAI) -1 和肝细胞生长因子 (HGF),在E4存在下其水平降低或增加,如表5所示。

[0484] 表5:由E4调控的基因

[0485]	基因	模型	方法	E4 肽的作用
	CTGF	用博莱霉素(HuF-bleo)或 TGF-β (HuF-T)作为纤维发生触发物处理的原代人类成纤维细胞	RT-qPCR	降低
	IGFBP-3	HuF-T	RT-qPCR 蛋白质表达水平	降低
	uPA	HuF-T	RT-qPCR 蛋白质表达水平 酶活性	增加
	PAI-I	HuF-T 肺纤维化的小鼠博莱霉素模型	RT-qPCR 蛋白质表达	降低
	HGF	HuF-T 肺纤维化的小鼠博莱霉素模型	RT-qPCR 蛋白质表达	增加
[0486]	MMP-1	HuF-T	RT-qPCR 蛋白质表达水平 酶谱法 MMP-1 活性分析	增加
	MMP-3	HuF-T	RT-qPCR 蛋白质表达水平 酶谱法	增加

[0487] 作用机制的总结和模型

[0488] 总之,在应用两种不同的纤维化触发物博莱霉素和TGF-β之后,来源于内皮抑素的肽E4在体外、体内和离体发挥抗纤维化作用(山口等人,科学·转化医学2012;4:136ra171)。E4降低促纤维化因子CTGF和IGFBP-3的水平,并诱导MMP-1和MMP-3的水平和活性增加。此外,E4激活纤溶酶原系统,增加uPA水平和活性,降低uPA抑制剂PAI-1的水平,并诱导促HGF转化为其活性链。E4通过PAI-1的下调和uPA活性的增加发挥抗纤维化作用,导致HGF活化,减少纤维化中间物CTGF和IGFBP-3,并通过诱导产生活性MMP-1和MMP-3增加ECM降解。目标特异性概括在图46所示的示意图中。

[0489] PK和毒理学研究

[0490] 药代动力学研究

[0491] 建立了生物样本(包括血清和皮肤)中iBio-CFB03的检测方法。在动物中评估iBio-CFB03的药代动力学和代谢。在小鼠中进行初步探索性研究,以确定iBio-CFB03的血清浓度,并开始建立有效IV剂量与循环药物水平之间的关系。在大鼠和兔子中也进行探索性PK研究以检查iBio-CFB03吸收中的潜在物种差异,并确定提议用于急性和慢性毒理学研究的两种物种中的iBio-CFB03的血清浓度。对大鼠和兔子中的iBio-CFB03进行更全面的PK/ADME评定以表征PK曲线和剂量线性。一些PK/ADME评定是在提议的毒理学研究的毒代动力学部分进行的。

[0492] 测试用于评定内皮抑素PK(托马斯(Thomas)等人,临床肿瘤学杂志2003;21(2):223-231)的可商购的多克隆酶免疫分析(EIA)96孔板分析(Accucyte,细胞免疫科学公司(Cytimmune Sciences Inc.),马里兰州科利奇帕克(College Park,MD))检测iBio-CFB03的能力。除了托马斯等人公开的方法外,还研究了使用免疫球蛋白Y(IgY)抗体进行免疫学研究的可行性。与抗体/抗原复合物均来自哺乳动物来源的系统相比,IgY抗体产生较低的针对哺乳动物抗原的交叉反应性和背景。另外,针对iBio-CFB03开发了鼠单克隆抗体,目的是构建针对组织或生物流体中的PK分析和其它量化需求的夹心ELISA。作为产生iBio-CFB03特异性免疫试剂的附加技术,鸡脾细胞用于产生多克隆IgY抗iBio-CFB03抗体,所述抗体作为起始材料以产生单链可变结合片段(scFv)或重组单克隆IgY抗体,其可经工程改造以产生结合和检测试剂。

[0493] 如果用于检测组织和生物流体中的iBio-CFB03的灵敏且特异的夹心ELISA是不可能的,那么使用多反应监测开发基于MS/MS的分析以选择性检测内皮抑素相关肽,其提供针对特定肽片段的高水平的灵敏度。理想地,这类分析集中于iBio-CFB03特有的肽片段以将其与天然水平的内皮抑素或其前体胶原蛋白分子区分开来。这种方法的成功还取决于能够在复杂的生物样品中检测这类片段,并且涉及特定的组织/生物流体制备和分离方案以使样品“去复合”,从而使检测和再现性达到最大。

[0494] 在一些情况下,采用表征iBio-CFB03的方法进行生物分析评定。这些方法包括基质辅助激光解吸/电离(MALDI)、免疫分析和LC/MS-MS。

[0495] 在对iBio-CFB03建立适当的生物分析方法之后,在小鼠中进行初步的试验性研究以评定iBio-CFB03的IV投与,并且开始建立从概念验证小鼠研究鉴定的有效剂量水平与血清和靶组织中药物水平之间的可能关系。在大鼠和兔子中的试验性PK研究也被用于确定iBio-CFB03在用于急性和慢性毒理学研究的两种物种中是有效的。此外,鉴定了iBio-CFB03吸收和PK曲线的潜在物种差异。

[0496] 在探索性研究之后,对大鼠和兔子中的iBio-CFB03进行更全面的PK/ADME评定,以表征PK曲线和剂量线性,并且在1期研究中支持剂量选择。这些研究的设计包括在给药前、给药后立即和给药后至多120小时采血。在取样过程中,动物组是交错排列的,或根据物种和取样频率预定最终采集(仅大鼠)。也从预定最终采集的大鼠采集皮肤。评定iBio-CFB03的血清和皮肤水平。

[0497] 在毒理学研究的毒代动力学部分中进行另外的PK/ADME评定,并且在单次和多次(每日/每周)剂量投与后评估iBio-CFB03的PK。

[0498] 单剂量毒理学

[0499] 在史泊格-多利大鼠(Sprague-Dawley rat)和新西兰白兔中进行非GLP单剂量毒理学研究以促进GLP动物毒理学研究的剂量选择,并且支持在1期研究中在健康志愿者中开始测试。

[0500] 非GLP急性大鼠毒理学研究

[0501] 在单次IV投与后,在雄性和雌性成年史泊格-多利大鼠中评定iBio-CFB03的毒性。评估IV投与的iBio-CFB03的三种剂量水平,并与给予单次IV投与的媒剂的一组大鼠作为对照进行比较。基于这种类型研究的标准实践,使用每组和每个性别三只大鼠,以提供对于潜在毒性和研究组当中的统计学差异的充分测定。

[0502] 评估包括死亡率、发病率、临床观察和体重变化的评定。采集血液样本用于血液学、临床化学和凝血参数评定。称量器官并检查是否有任何大的病理变化。对器官进行组织病理学检查直到确定总尸体解剖结果。

[0503] 使用皮肤样本和血清中的iBio-CFB03的测定来评估全身和靶器官暴露。测定皮肤样本和血清中的MMP-1和uPA水平用于这些SSc生物标志物的基线评定。

[0504] 大鼠被用于这些测试,因为它们是用来评定毒性的模型物种之一,并且是所有管理机构的毒性测试指南推荐用于这种目的的物种之一。

[0505] 非GLP急性兔子毒理学研究

[0506] iBio-CFB03的毒性也在新西兰雄性和雌性成年白兔中在单次IV投与后进行评定。评估静脉内投与的iBio-CFB03的三种剂量水平,并与给予单次IV投与的媒剂的一组兔子作为对照进行比较。基于这种类型研究的标准实践,使用每组和每个性别两只兔子,以提供对于潜在毒性和研究组当中的统计学差异的充分测定。

[0507] 评估包括死亡率、发病率、临床观察和体重变化的评定。采集血液样本用于血液学、临床化学和凝血参数评定。称量器官并检查是否有任何大的病理变化。对器官进行组织病理学检查直到确定总尸体解剖结果。

[0508] 使用皮肤样本和血清中的iBio-CFB03的测定来评估全身和靶器官暴露。测定皮肤样本和血清中的MMP-1和uPA水平用于这些SSc生物标志物的基线评定。

[0509] 兔子被用于这些测试,因为它们是用来评定毒性的另一种模型物种,并且是所有管理机构的毒性测试指南推荐用于这种目的的物种之一。

[0510] 重复剂量毒理学

[0511] 在史泊格-多利大鼠和新西兰白兔中进行二十八(28)天的重复剂量GLP毒理学研究以支持在1期研究中在健康志愿者中开始测试。

[0512] 二十八天重复剂量GLP大鼠毒理学研究

[0513] 在每隔一天(3×/周)的连续28天IV投与后,在雄性和雌性成年史泊格-多利大鼠中评定iBio-CFB03的毒性。评估IV投与的iBio-CFB03的三种剂量水平,并与给予单次IV投与的媒剂的一组大鼠作为对照进行比较。剂量选择是基于PK大鼠研究的研究结果,以及在试验性和单剂量大鼠毒理学研究中鉴定的最大耐受/可行和NOAEL剂量。

[0514] 除了主要的研究部分之外,动物的卫星组被包括在28天恢复期和毒代动力学分析中。

[0515] 研究设计汇总在表6中。

[0516] 表6:28天重复剂量GLP大鼠毒理学研究设计

[0517]

组	处理	剂量水平 (mg/kg)	动物数					
			主要研究		恢复		卫星 TK	
			雄性	雌性	雄性	雌性	雄性	雌性
1	对照	0	10	10	5	5		
2	iBio-CFB03	2.5 mg/kg	10	10			6	6
3	iBio-CFB03	5 mg/kg	10	10			6	6
4	iBio-CFB03	10 mg/kg	10	10	5	5	6	6

[0518] 每组和每个性别的大鼠数目是基于这种类型研究的标准实践,以提供对于潜在毒性和研究组当中的统计学差异的充分测定。

[0519] 评估包括死亡率、发病率、临床观察和体重变化的评定。采集血液样本用于血液学、临床化学和凝血参数评定。称量器官并检查是否有任何大的病理变化。对器官进行组织病理学检查直到确定总尸体解剖结果。

[0520] 使用皮肤样本和血清中的iBio-CFB03水平的测定来评估全身和靶器官暴露。测定皮肤样本和血清中的MMP-1和uPA水平用于这些SSc生物标志物的基线评定。

[0521] 大鼠被用于这些测试,因为它们是用来评定毒性的模型物种之一,并且是所有管理机构的毒性测试指南推荐用于这种目的的物种之一。

[0522] 二十八天重复剂量GLP兔子毒理学研究

[0523] iBio-CFB03的毒性在新西兰雄性和雌性成年白兔中在连续28天每天一次IV投与之后进行评定。评估IV投与的iBio-CFB03的三种剂量水平,并与给予单次IV投与的媒剂的一组兔子作为对照进行比较。剂量选择是基于PK兔子研究的研究结果,以及在试验性和单剂量兔子毒理学研究中鉴定的最大耐受/可行和NOAEL剂量。

[0524] 除了主要的研究部分之外,动物的卫星组被包括在28天恢复期和毒代动力学分析中。

[0525] 研究设计汇总在表7中。

[0526] 表7:28天重复剂量GLP兔子毒理学研究设计

组	处理	剂量水平 (mg/kg)	动物数					
			主要研究		恢复(任选)		卫星 TK (任选)	
			雄性	雌性	雄性	雌性	雄性	雌性
[0527] 1	对照	0	4	4	2	2		
2	iBio-CFB03	2.5 mg/kg	4	4			2	2
3	iBio-CFB03	5 mg/kg	4	4			2	2
4	iBio-CFB03	10 mg/kg	4	4	2	2	2	2

[0528] 每组和每个性别的兔子数目是基于这种类型研究的标准实践,以提供对于潜在毒性和研究组当中的统计学差异的充分测定。

[0529] 评估包括死亡率、发病率、临床观察和体重变化的评定。采集血液样本用于血液学、临床化学和凝血参数评定。称量器官并检查是否有任何大的病理变化。对器官进行组织病理学检查直到确定总尸体解剖结果。

[0530] 使用皮肤样本和血清中的iBio-CFB03的测定来评估全身和靶器官暴露。测定皮肤样本和血清中的MMP-1和uPA水平用于这些SSc生物标志物的基线评定。

[0531] 兔子被用于这些测试,因为它们是用来评定毒性的模型物种,并且是所有管理机构的毒性测试指南推荐用于这种目的的物种之一。

[0532] 非临床开发计划

[0533] iBio-CFB03的非临床开发包括评估纤维化模型中的功效,以确认先前酮结构相关的内皮抑素肽证实的抗纤维化活性。探索iBio-CFB03作用机制的研究也被用来进一步表征其抗纤维化活性。另外,评估iBio-CFB03的药代动力学。

[0534] 在大鼠和兔子中评估iBio-CFB03的抗药物抗体的免疫原性。进行初始筛选分析,并且使用确认分析重新测试筛选分析中测试为阳性的样品。还进行中和分析以测量任何中和抗体活性。

[0535] 在大鼠和兔子中评估iBio-CFB03的潜在毒性。在急性单剂量投与iBio-CFB03后,

基于动物耐受性和化合物可用性,使用初步试验性研究来探索实现最大耐受剂量的能力,或者另外建立最大可行剂量。还在大鼠和兔子中进行重复剂量研究以探索在依赖GLP的情况下重复剂量投与28天(每隔一天;3×/周)的iBio-CFB03的潜在毒性。等待单剂量和28天GLP重复剂量研究的结果,在6个月的重复剂量GLP研究中对啮齿类动物和非啮齿类动物物种进行慢性毒理学研究以支持长期使用。

[0536] 临床

[0537] 在晚期实体瘤患者的重组人类内皮抑素的1期PK和PD研究中,证明了内皮抑素基本上没有显著的药物相关毒性,并且当每日以至多300mg/m²剂量进行1小时静脉内输注时耐受性良好(托马斯等人,临床肿瘤学杂志2003;21(2):223-231)。

[0538] 在正常健康志愿者(NHV)和SSc患者中进行开放标签、两部分1期试验以评定静脉内投与的iBio-CFB03的安全性、免疫原性和药代动力学。A部分是单剂量、剂量递增的设计。数据安全监测委员会(DSMB)在完成这一部分后,审查PK和安全性数据以确定最大耐受剂量(MTD)。SSc患者被纳入研究的B部分,以重复剂量暴露在第一部分的MTD。第一次和第二次给药之间(1周)和/或给药时程(剂量2之后的第二天)的等待期在B部分中根据需要进行调整。

[0539] 基于小鼠-博来霉素模型中概念验证研究的结果,选择研究的A部分中评估的最大剂量5mg作为可能的治疗剂量。在那些研究中,观察到iBio-CFB-3的显著作用的最小剂量是每只动物20μg。使用FDA行业指导:估算治疗剂的初始临床试验中成年健康志愿者的最大安全起始剂量(2005年7月)中提供的换算因子,将此调整为人类等效剂量(HED),得出:

[0540] $[20\mu\text{g}/20\text{g小鼠}] \times 0.081 \times 60\text{kg人类} = 4.8\text{mg}/\text{剂量}$

[0541] 毒理学研究被设计成为1期临床试验提供比这一最大人类剂量高10倍的安全系数。

[0542] 免疫原性取样

[0543] 因为iBio-CFB03是一种治疗性蛋白质,所以监测参与临床研究的志愿者抗药物抗体(ADA)的发生率。在最初剂量投与之前,在最终剂量(仅B部分参与者)投与之前,在最终剂量投与后14天和28天,采集用于ADA筛选的血清样品。

[0544] 药代动力学取样

[0545] 在研究的A部分中,在以下时间点采集用于评定iBio-CFB03药代动力学(C_{max}、AUC_{0-∞}、血清浓度、消除常数、清除率)的血清样品:

[0546] • 0min(给药前基线)

[0547] • 5min

[0548] • 15min

[0549] • 30min

[0550] • 1h

[0551] • 2h

[0552] • 6h

[0553] • 12h

[0554] 在研究的B部分中,根据上述相同的取样计划从参与的SSc患者采集剂量1PK血清样品。对于随后的研究剂量,在最接近A部分中观察到的T_{max}的时间点采集单个血清PK样品。

[0555] 药理学活性

[0556] 通过连续皮肤活组织检查来评定参与B部分的SSc患者可能的iBio-CFB03的药理学活性。在基线、四周和十二周进行皮肤活检。在基线获取两个活检体,每个手臂一个。一个手臂进行四周活检,另一个手臂进行十二周活检。在每个单独的手臂上以图8模式获取两个皮肤活检体。一种用于适当染色的组织学以评定皮肤厚度或胶原蛋白组织的任何变化(例如,H&E、马森三色染色、伟郝夫-范吉森染色(Verhoeff-Van Gieson)),另一种用于羟基脯氨酸分析。

[0557] 临床开发计划

[0558] 进行开放标签2a期研究以评定iBio-CFB03在弥漫性SSc患者中通过静脉内投与的安全性、PK和初步效果。这项研究是一个重复剂量的开放标签试验,被设计成评估剂量效应和剂量耐受关系,以及确定适当的给药方案。基于1期研究和用相同投与途径进行的非临床毒理学研究的数据,选择用于此2a期研究的剂量水平。在2a期研究之后,使用iBio-CFB03的静脉内投与进行3-6个月的2b期研究以评定安全性和有效性,随后在弥漫性SSc患者中进行iBio-CFB03的安慰剂对照的3期研究。临床开发计划(CDP)的汇总显示在表8中。

[0559] 表8:临床开发计划

期	描述	群体	样本大小	主要目标	次要和探索目标
1 期	PK, 免疫原性和安全性研究 (1 个月) A 部分: 单剂量, 剂量递增设计 B 部分: 重复剂量, 固定剂量水平	A 部分: 正常健康成人 (> 18 岁) 志愿者 B 部分: 弥漫性 SSc 患者	A 部分: 20 名个体 B 部分: 20 名个体	静脉投与的 iBio-CFB03 的安全性和耐受性 评估 iBio-CFB03 的免疫原性	评估 iBio-CFB03 的药代动力学曲线 确定达到潜在治疗血清水平所需的剂量 血清/血浆和皮肤中药效学生物标志物的潜力评定
[0560] 2a 期	多剂量, 剂量递增, PK/PD 和安全性研究 (~3 个月)	患者(弥漫性 SSc; 早期 <18 个月)	TBD	静脉投与的 iBio-CFB03 的安全性和耐受性 药代动力学曲线 基于罗德南 (Rodnan) 皮肤得分的初步功效	定义剂量效应和剂量耐受关系 确定适当的剂量和给药方案 基于罗德南皮肤得分的初步功效数据 皮肤活检以确定潜在标志物(uPA; MMP-1) 探索性血清生物标志物
2b 期	高与低剂量, 功效研究 (3-6 个月)	患者(弥漫性 SSc; 早期肺或早期肾脏受累)	TBD	功效(高与低剂量)	风险/收益分析 探索性: 肺部改善
3 期	随机对照试验	患者(弥漫性 SSc; 早期, 18 个月)	TBD	相对比较剂(安慰剂)的功效	功效 皮肤活检: 看各种标志物 探索性: 肺部改善

[0561] 开发经口投与途径

[0562] 初步的数据表明用iBio-CFB03经口给药至少与IV投与途径一样有效。基于这些数据和经口投与途径将可能长期使用的益处,开发了iBio-CFB03的经口配制品。如果确定经口配制品对程序有益,那么在将经口配制品引入临床研究之前进行表9中概述的研究。

[0563] 表9:支持经口投与的非临床研究

[0564]	研究	模型	给药途径	目标
	口服生物利用度	小鼠和大鼠	经口和 IV	确定经口投与的 iBio-CFB03 与 IV 投与相比的血清水平
	食物影响	大鼠	经口	确定食物对 iBio-CFB03 药代动力学的影响
	90 天重复剂量毒理学	大鼠	经口	评估 iBio-CFB03 的潜在毒性；恢复和 TK 参数

[0565] 实例12-经口递送Fc融合蛋白

[0566] 在SDS-PAGE凝胶上运行E3-Fc (END-25)、E3-连接子-Fc (END-26) 和C67A E3-Fc (END-55) 溶解物,对总蛋白进行成像(图47,左图),并通过蛋白质印迹用抗Fc抗体探测(图47,右图)。

[0567] 在模拟胃液 (SGF) 中消化等量的来自诺维兹 (Novici) (PEG纯化) 或卡利伯 (蛋白质 A纯化) 的经纯化的END-55持续0、5、30、45、60或300秒。用160mM碳酸钠终止反应。然后将样品在4-20%SDS-PAGE凝胶上运行并在无染色凝胶成像器上针对总蛋白进行成像(图48,左图)。然后将凝胶转移到硝化纤维素上,用鸡抗E3抗体(图48,中图)或抗人类Fc抗体(图48,右图)进行探测以用于蛋白质印迹。E3加上可能Fc的铰链区确实似乎从Fc分子中释放出来,但是在300秒的时间点大部分被降解。卡利伯和诺维兹样品之间的差异似乎是~14kD带,这在卡利伯材料的早期时间点和卡利伯样品中糖基化较少的E3-Fc是更突出的。卡利伯样品中~10kD E3阳性带稍弱。所有图像缩放并彼此对齐。

[0568] 其它实施例

[0569] 应了解,尽管本发明已经结合其具体实施方式进行了描述,但是前述说明旨在说明而非限制本发明的范围,本发明的范围由所附权利要求书的范围限定。其它方面、优势和修改在所附权利要求书的范围内。

序列表

<110> 艾比欧公司
 诺维奇生物科技有限责任公司
 MUSC研究发展基金会
 <120> 用于治疗纤维化的内皮抑素片段和变体
 <130> 24990-0065W01
 <140> PCT/US2016/035858
 <141> 2016-06-03
 <150> US 62/171,889
 <151> 2015-06-05
 <150> US 62/257,607
 <151> 2015-11-19
 <160> 29
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 555
 <212> DNA
 <213> 智人

[0001]

<400> 1
 atgcacagcc accgcgactt ccagccggtg ctccacctgg ttgcgctcaa cagccccctg 60
 tcaggcggca tgcggggcat ccgcggggcc gacttccagt gcttccagca ggcgcgggcc 120
 gtggggctgg cgggcacctt ccgcgccttc ctgtcctcgc gcctgcagga cctgtacagc 180
 atcgtgcgcc gtgccgaccg cgcagccgtg cccatcgtca acctcaagga cgagctgctg 240
 ttccccagct gggaggctct gttctcaggc tctgagggtc cgctgaagcc cggggcacgc 300
 atcttctcct ttaacggcaa ggacgtcctg acccacccea cctggcccca gaagagcgtg 360
 tggcatggct cggaccccaa cgggcgcagg ctgaccgaga gctactgtga gacgtggcgg 420
 acggaggctc cctcgccac gggccaggcc tactcgctgc tggggggcag gtcctgggg 480
 cagagtgccg cgagctgcca tcacgcctac atcgtgctat gcattgagaa cagcttcatg 540
 actgcctcca agtag 555

<210> 2
 <211> 183
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 2

	His Ser His Arg Asp Phe Gln Pro Val Leu His Leu Val Ala Leu Asn 1 5 10 15	
	Ser Pro Leu Ser Gly Gly Met Arg Gly Ile Arg Gly Ala Asp Phe Gln 20 25 30	
	Cys Phe Gln Gln Ala Arg Ala Val Gly Leu Ala Gly Thr Phe Arg Ala 35 40 45	
	Phe Leu Ser Ser Arg Leu Gln Asp Leu Tyr Ser Ile Val Arg Arg Ala 50 55 60	
	Asp Arg Ala Ala Val Pro Ile Val Asn Leu Lys Asp Glu Leu Leu Phe 65 70 75 80	
	Pro Ser Trp Glu Ala Leu Phe Ser Gly Ser Glu Gly Pro Leu Lys Pro 85 90 95	
	Gly Ala Arg Ile Phe Ser Phe Asn Gly Lys Asp Val Leu Thr His Pro 100 105 110	
[0002]	Thr Trp Pro Gln Lys Ser Val Trp His Gly Ser Asp Pro Asn Gly Arg 115 120 125	
	Arg Leu Thr Glu Ser Tyr Cys Glu Thr Trp Arg Thr Glu Ala Pro Ser 130 135 140	
	Ala Thr Gly Gln Ala Tyr Ser Leu Leu Gly Gly Arg Leu Leu Gly Gln 145 150 155 160	
	Ser Ala Ala Ser Cys His His Ala Tyr Ile Val Leu Cys Ile Glu Asn 165 170 175	
	Ser Phe Met Thr Ala Ser Lys 180	
	<210> 3	
	<211> 552	
	<212> DNA	
	<213> 小家鼠	
	<400> 3	
	catactcattc aggactttca gccagtgtc caccgtgtgg cactgaacac cccctgtct	60
	ggaggcatgc gtggtatccg tggagcagat ttccagtgtc tccagcaagc ccgagccgtg	120

```

gggctgtcgg gcaccttccg ggctttcctg tcctctaggc tgcaggatct ctatagcatc 180
gtgcgccgtg ctgaccgggg gtctgtgccc atcgtcaacc tgaaggacga ggtgctatct 240
cccagctggg actccctgtt ttctggctcc cagggtcaac tgcaaccggg ggcccgcac 300
ttttcttttg acggcagaga tgtcctgaga caccagcct ggccgcagaa gagcgtatgg 360
cacggctcgg accccagtgg gcggaggctg atggagagtt actgtgagac atggcgaact 420
gaaactactg gggctacagg tcaggcctcc tccctgctgt caggcaggct cctggaacag 480
aaagctgcga gctgccacaa cagctacatc gtcctgtgca ttgagaatag cttcatgacc 540
tctttctcca aa 552

```

<210> 4
 <211> 184
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 4

His Thr His Gln Asp Phe Gln Pro Val Leu His Leu Val Ala Leu Asn
 1 5 10 15

[0003]

Thr Pro Leu Ser Gly Gly Met Arg Gly Ile Arg Gly Ala Asp Phe Gln
 20 25 30

Cys Phe Gln Gln Ala Arg Ala Val Gly Leu Ser Gly Thr Phe Arg Ala
 35 40 45

Phe Leu Ser Ser Arg Leu Gln Asp Leu Tyr Ser Ile Val Arg Arg Ala
 50 55 60

Asp Arg Gly Ser Val Pro Ile Val Asn Leu Lys Asp Glu Val Leu Ser
 65 70 75 80

Pro Ser Trp Asp Ser Leu Phe Ser Gly Ser Gln Gly Gln Leu Gln Pro
 85 90 95

Gly Ala Arg Ile Phe Ser Phe Asp Gly Arg Asp Val Leu Arg His Pro
 100 105 110

Ala Trp Pro Gln Lys Ser Val Trp His Gly Ser Asp Pro Ser Gly Arg
 115 120 125

Arg Leu Met Glu Ser Tyr Cys Glu Thr Trp Arg Thr Glu Thr Thr Gly
130 135 140

Ala Thr Gly Gln Ala Ser Ser Leu Leu Ser Gly Arg Leu Leu Glu Gln
145 150 155 160

Lys Ala Ala Ser Cys His Asn Ser Tyr Ile Val Leu Cys Ile Glu Asn
165 170 175

Ser Phe Met Thr Ser Phe Ser Lys
180

<210> 5
<211> 699
<212> DNA
<213> 智人

[0004] <400> 5
gagcccaaat cttgtgacaa aactcacaca tgcccaccgt gcccagcacc tgaactcctg 60
gggggaccgt cagtcttctt cttcccccca aaacccaagg acaccctcat gatctcccgg 120
acccctgagg tcacatgcgt ggtggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagtgc 180
aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaaga caaagccgcg ggaggagcag 240
tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat 300
ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc cagcccccat cgagaaaacc 360
atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccgg 420
gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc 480
gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct 540
cccgtgctgg actccgacgg ctcttcttct ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc 600
aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac 660
tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggtaaata 699

<210> 6
<211> 227
<212> PRT
<213> 智人

<400> 6

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
1 5 10 15

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
20 25 30

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
35 40 45

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
50 55 60

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Tyr
65 70 75 80

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Asp Trp
85 90 95

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
100 105 110

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Pro Arg Glu Pro
115 120 125

[0005]

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
130 135 140

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
145 150 155 160

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
165 170 175

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
180 185 190

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
210 215 220

Pro Gly Lys
225

<210> 7
 <211> 48
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>
 <223> 编码凝血酶切割位点的核苷酸序列

<400> 7
 tctagaggtg gtctagtgcc gcgcggcagc gggtcccccg gggtgcag

48

<210> 8
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 凝血酶切割位点

<400> 8

Ser Arg Gly Gly Leu Val Pro Arg Gly Ser Gly Ser Pro Gly Leu Gln
 1 5 10 15

[0006]

<210> 9
 <211> 48
 <212> PRT
 <213> 褐家鼠

<400> 9

Ser Tyr Cys Glu Thr Trp Arg Thr Glu Ala Thr Gly Val Thr Gly Gln
 1 5 10 15

Ala Ser Ser Leu Leu Ser Gly Arg Leu Leu Glu Gln Lys Ala Glu Ser
 20 25 30

Cys His Asn Ser Tyr Ile Val Leu Cys Ile Glu Asn Ser Phe Met Thr
 35 40 45

<210> 10
 <211> 48
 <212> PRT
 <213> 家牛

<400> 10

Ser Tyr Cys Glu Thr Trp Arg Thr Asp Ser Arg Ala Ala Thr Gly Gln
 1 5 10 15

Ala Ser Ser Leu Leu Ala Gly Arg Leu Leu Glu Gln Lys Ala Ala Gly

	20	25	30
	Cys His Asn Ala Phe Ile Val	Leu Cys Ile Glu Asn Ser	Phe Met Thr
	35	40	45
<210>	11		
<211>	48		
<212>	PRT		
<213>	智人		
<400>	11		
	Asn Tyr Cys Glu Ala Trp Arg Thr Ala Asp Thr Ala Val Thr Gly Leu		
	1	5	10
	Ala Ser Pro Leu Ser Thr Gly Lys Ile Leu Asp Gln Lys Ala Tyr Ser		
	20	25	30
	Cys Ala Asn Arg Leu Ile Val	Leu Cys Ile Glu Asn Ser	Phe Met Thr
	35	40	45
[0007]	<210> 12		
	<211> 552		
	<212> DNA		
	<213> 智人		
	<400> 12		
	cacagccacc gcgacttcca gccggtgctc cacctggttg cgctcaacag cccctgtca		60
	ggcgcatgc ggggcatccg cggggccgac ttccagtgt tccagcaggc gcgggccgtg		120
	gggctggcgg gcaccttccg cgcttccctg tcctcgcgcc tgcaggacct gtacagcatc		180
	gtgcgccgtg ccgaccggcg agccgtgccc atcgtaacc tcaaggacga gctgctgttt		240
	cccagctggg aggtctgtgt ctcaggctct gagggctccg tgaagcccgg ggcacgcatc		300
	ttctcctttg acggcaagga cgtcctgagg caccacacct ggccccagaa gagcgtgtgg		360
	catggctcgg accccaacgg gcgcaggctg accgagagct actgtgagac gtggcggacg		420
	gaggctccct cggccacggg ccaggcctcc tcgtgtctgg ggggcaggct cctggggcag		480
	agtgccgca gctgcatca cgcctacatc gtgctctgca ttgagaacag cttcatgact		540
	gcctccaagt ag		552
	<210> 13		
	<211> 183		
	<212> PRT		
	<213> 智人		

<400> 13

His Ser His Arg Asp Phe Gln Pro Val Leu His Leu Val Ala Leu His
1 5 10 15

Ser Pro Leu Ser Gly Gly Met Arg Gly Ile Arg Gly Ala Asp Phe Gln
20 25 30

Cys Phe Gln Gln Ala Arg Ala Val Gly Leu Ala Gly Thr Phe Arg Ala
35 40 45

Phe Leu Ser Ser Arg Leu Gln Asp Leu Tyr Ser Ile Val Arg Arg Ala
50 55 60

Asp Arg Ala Ala Val Pro Ile Val Asn Leu Lys Asp Glu Leu Leu Phe
65 70 75 80

Pro Ser Trp Glu Ala Leu Phe Ser Gly Ser Glu Gly Pro Leu Lys Pro
85 90 95

Gly Ala Arg Ile Phe Ser Phe Asp Gly Lys Asp Val Leu Arg His Pro
100 105 110

[0008]

Thr Trp Pro Gln Lys Ser Val Trp His Gly Ser Asp Pro Asn Gly Arg
115 120 125

Arg Leu Thr Glu Ser Tyr Cys Glu Thr Trp Arg Thr Glu Ala Pro Ser
130 135 140

Ala Thr Gly Gln Ala Ser Ser Leu Leu Gly Gly Arg Leu Leu Gly Gln
145 150 155 160

Ser Ala Ala Ser Cys His His Ala Tyr Ile Val Leu Cys Ile Glu Asn
165 170 175

Ser Phe Met Thr Ala Ser Lys
180

<210> 14

<211> 48

<212> PRT

<213> 智人

<400> 14

Ser Tyr Cys Glu Thr Trp Arg Thr Glu Ala Pro Ser Ala Thr Gly Gln
1 5 10 15

Ala Ser Ser Leu Leu Gly Gly Arg Leu Leu Gly Gln Ser Ala Ala Ser
20 25 30

Cys His His Ala Tyr Ile Val Leu Ala Ile Glu Asn Ser Phe Met Thr
35 40 45

<210> 15

<211> 84

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 包括分泌序列、人类内皮抑素的一部分和肽标签的氨基酸序列

<400> 15

Met Gly Lys Met Ala Ser Leu Phe Ala Thr Phe Leu Val Val Leu Val
1 5 10 15

[0009]

Ser Leu Ser Leu Ala Ser Glu Ser Ser Ala Ser Tyr Cys Glu Thr Trp
20 25 30

Arg Thr Glu Ala Pro Ser Ala Thr Gly Gln Ala Ser Ser Leu Leu Gly
35 40 45

Gly Arg Leu Leu Gly Gln Ser Ala Ala Ser Cys His His Ala Tyr Ile
50 55 60

Val Leu Cys Ile Glu Asn Ser Phe Met Thr His His His His His His
65 70 75 80

Lys Asp Glu Leu

<210> 16

<211> 306

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 包括分泌序列、具有C67A突变的人类内皮抑素的一部分和IgG Fc结构域的E3-Fc氨基酸序列

<400> 16

Met	Gly	Lys	Met	Ala	Ser	Leu	Phe	Ala	Thr	Phe	Leu	Val	Val	Leu	Val
1				5					10					15	
Ser	Leu	Ser	Leu	Ala	Ser	Glu	Ser	Ser	Ala	Ser	Tyr	Cys	Glu	Thr	Trp
			20					25					30		
Arg	Thr	Glu	Ala	Pro	Ser	Ala	Thr	Gly	Gln	Ala	Ser	Ser	Leu	Leu	Gly
		35					40					45			
Gly	Arg	Leu	Leu	Gly	Gln	Ser	Ala	Ala	Ser	Cys	His	His	Ala	Tyr	Ile
	50					55					60				
Val	Leu	Ala	Ile	Glu	Asn	Ser	Phe	Met	Thr	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp
65					70					75					80
Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly
				85					90					95	
Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile
			100					105					110		
Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu
		115					120					125			
Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His
	130					135					140				
Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg
145					150					155					160
Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys
				165					170					175	
Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu
			180					185					190		
Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr
		195					200					205			
Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu
	210					215					220				

[0010]

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
225 230 235 240

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
245 250 255

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
260 265 270

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
275 280 285

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
290 295 300

Gly Lys
305

<210> 17

<211> 104

<212> PRT

<213> 人工

[0011]

<220>

<223> 包括分泌序列、胶原蛋白XVIII的一部分、具有C67A突变的人类内皮抑素的一部分和肽标签的氨基酸序列

<400> 17

Met Gly Lys Met Ala Ser Leu Phe Ala Thr Phe Leu Val Val Leu Val
1 5 10 15

Ser Leu Ser Leu Ala Ser Glu Ser Ser Ala Gln Lys Ser Val Trp His
20 25 30

Gly Ser Asp Pro Asn Gly Arg Arg Leu Thr Glu Ser Tyr Cys Glu Thr
35 40 45

Trp Arg Thr Glu Ala Pro Ser Ala Thr Gly Gln Ala Tyr Ser Leu Leu
50 55 60

Gly Gly Arg Leu Leu Gly Gln Ser Ala Ala Ser Cys His His Ala Tyr
65 70 75 80

Ile Val Leu Ala Ile Glu Asn Ser Phe Met Thr Ala Ser Lys His His
85 90 95

His His His His Lys Asp Glu Leu
100

<210> 18
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 胶原蛋白XVIII的氨基酸部分

<400> 18

Gln Lys Ser Val Trp His Gly Ser Asp Pro Asn Gly Arg Arg Leu Thr
1 5 10 15

Glu

<210> 19
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工

[0012] <220>
<223> 内质网靶向序列

<400> 19

Lys Asp Glu Leu
1

<210> 20
<211> 48
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> E3氨基酸序列

<400> 20

Ser Tyr Cys Glu Thr Trp Arg Thr Glu Ala Pro Ser Ala Thr Gly Gln
1 5 10 15

Ala Ser Ser Leu Leu Gly Gly Arg Leu Leu Gly Gln Ser Ala Ala Ser
20 25 30

Cys His His Ala Tyr Ile Val Leu Cys Ile Glu Asn Ser Phe Met Thr

45

<400> 21

Ala Ser Ser Leu Leu Gly Gly Arg Leu Leu Gly Gln Ser Ala Ala Ser
20 25 30

<400> 22

Gly Arg Leu Leu Gly Gln Ser Ala Ala Ser Cys His His Ala Tyr Ile
50 55 60

	Val	Leu	Ala	Ile	Glu	Asn	Ser	Phe	Met	Thr	Glu	Arg	Lys	Cys	Cys	Val	
	65					70					75					80	
	Glu	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	
					85					90					95		
	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	
				100					105						110		
	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	
			115					120					125				
	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	
		130					135					140					
	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Phe	Arg	Val	Val	Ser	Val	
	145					150					155					160	
	Leu	Thr	Val	Val	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	
					165					170					175		
[0014]	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	
				180					185					190			
	Lys	Thr	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	
			195					200					205				
	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	
		210					215					220					
	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ser	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	
	225					230					235					240	
	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Met	Leu	Asp	Ser	Asp	
				245						250					255		
	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	
				260					265					270			
	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	
			275					280					285				
	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys			

	290	295	300
	<210> 23 <211> 353 <212> PRT <213> 人工		
	<220> <223> E3_C67A-Fc_IgG3融合物		
	<400> 23		
	Met Gly Lys Met	Ala Ser Leu Phe Ala Thr Phe Leu Val Val Leu Val	
	1	5	10 15
	Ser Leu Ser	Leu Ala Ser Glu Ser Ser Ala Ser Tyr Cys Glu Thr Trp	
		20	25 30
	Arg Thr Glu Ala Pro Ser Ala Thr Gly Gln Ala Ser Ser Leu Leu Gly		
		35	40 45
	Gly Arg Leu Leu Gly Gln Ser Ala Ala Ser Cys His His Ala Tyr Ile		
	50	55	60
[0015]	Val Leu Ala Ile Glu Asn Ser Phe Met Thr Glu Leu Lys Thr Pro Leu		
	65	70	75 80
	Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys		
		85	90 95
	Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp		
		100	105 110
	Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr		
		115	120 125
	Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro		
		130	135 140
	Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser		
	145	150	155 160
	Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp		
		165	170 175

Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
180 185 190

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Phe Arg Val
195 200 205

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
210 215 220

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
225 230 235 240

Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
245 250 255

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
260 265 270

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
275 280 285

[0016] Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu
290 295 300

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
305 310 315 320

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
325 330 335

Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
340 345 350

Lys

<210> 24

<211> 303

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> E3_C67A-Fc_IgG4融合物

<400> 24

Met Gly Lys Met Ala Ser Leu Phe Ala Thr Phe Leu Val Val Leu Val
 1 5 10 15
 Ser Leu Ser Leu Ala Ser Glu Ser Ser Ala Ser Tyr Cys Glu Thr Trp
 20 25 30
 Arg Thr Glu Ala Pro Ser Ala Thr Gly Gln Ala Ser Ser Leu Leu Gly
 35 40 45
 Gly Arg Leu Leu Gly Gln Ser Ala Ala Ser Cys His His Ala Tyr Ile
 50 55 60
 Val Leu Ala Ile Glu Asn Ser Phe Met Thr Glu Ser Lys Tyr Gly Pro
 65 70 75 80
 Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val
 85 90 95
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 100 105 110
 [0017]
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu
 115 120 125
 Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 130 135 140
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 145 150 155 160
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 165 170 175
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile
 180 185 190
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 195 200 205
 Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 210 215 220

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
225 230 235 240

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
245 250 255

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
260 265 270

Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
275 280 285

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
290 295 300

<210> 25

<211> 329

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> E3_C67A-Fc_IgA1融合物

[0018]

<400> 25

Met Gly Lys Met Ala Ser Leu Phe Ala Thr Phe Leu Val Val Leu Val
1 5 10 15

Ser Leu Ser Leu Ala Ser Glu Ser Ser Ala Ser Tyr Cys Glu Thr Trp
20 25 30

Arg Thr Glu Ala Pro Ser Ala Thr Gly Gln Ala Ser Ser Leu Leu Gly
35 40 45

Gly Arg Leu Leu Gly Gln Ser Ala Ala Ser Cys His His Ala Tyr Ile
50 55 60

Val Leu Ala Ile Glu Asn Ser Phe Met Thr Val Pro Cys Pro Val Pro
65 70 75 80

Ser Thr Pro Pro Thr Pro Ser Pro Ser Thr Pro Pro Thr Pro Ser Pro
85 90 95

Ser Cys Cys His Pro Arg Leu Ser Leu His Arg Pro Ala Leu Glu Asp
100 105 110

Leu Leu Leu Gly Ser Glu Ala Asn Leu Thr Cys Thr Leu Thr Gly Leu
115 120 125

Arg Asp Ala Ser Gly Val Thr Phe Thr Trp Thr Pro Ser Ser Gly Lys
130 135 140

Ser Ala Val Gln Gly Pro Pro Glu Arg Asp Leu Cys Gly Cys Tyr Ser
145 150 155 160

Val Ser Ser Val Leu Pro Gly Cys Ala Glu Pro Trp Asn His Gly Lys
165 170 175

Thr Phe Thr Cys Thr Ala Ala Tyr Pro Glu Ser Lys Thr Pro Leu Thr
180 185 190

Ala Thr Leu Ser Lys Ser Gly Asn Thr Phe Arg Pro Glu Val His Leu
195 200 205

Leu Pro Pro Pro Ser Glu Glu Leu Ala Leu Asn Glu Leu Val Thr Leu
210 215 220

[0019]

Thr Cys Leu Ala Arg Gly Phe Ser Pro Lys Asp Val Leu Val Arg Trp
225 230 235 240

Leu Gln Gly Ser Gln Glu Leu Pro Arg Glu Lys Tyr Leu Thr Trp Ala
245 250 255

Ser Arg Gln Glu Pro Ser Gln Gly Thr Thr Thr Phe Ala Val Thr Ser
260 265 270

Ile Leu Arg Val Ala Ala Glu Asp Trp Lys Lys Gly Asp Thr Phe Ser
275 280 285

Cys Met Val Gly His Glu Ala Leu Pro Leu Ala Phe Thr Gln Lys Thr
290 295 300

Ile Asp Arg Leu Ala Gly Lys Pro Thr His Val Asn Val Ser Val Val
305 310 315 320

Met Ala Glu Val Asp Gly Thr Cys Tyr
325

<210> 26
 <211> 316
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> E3_C67A-Fc_IgA2融合物

<400> 26

Met Gly Lys Met Ala Ser Leu Phe Ala Thr Phe Leu Val Val Leu Val
 1 5 10 15

Ser Leu Ser Leu Ala Ser Glu Ser Ser Ala Ser Tyr Cys Glu Thr Trp
 20 25 30

Arg Thr Glu Ala Pro Ser Ala Thr Gly Gln Ala Ser Ser Leu Leu Gly
 35 40 45

Gly Arg Leu Leu Gly Gln Ser Ala Ala Ser Cys His His Ala Tyr Ile
 50 55 60

[0020] Val Leu Ala Ile Glu Asn Ser Phe Met Thr Val Pro Cys Pro Val Pro
 65 70 75 80

Pro Pro Pro Pro Cys Cys His Pro Arg Leu Ser Leu His Arg Pro Ala
 85 90 95

Leu Glu Asp Leu Leu Leu Gly Ser Glu Ala Asn Leu Thr Cys Thr Leu
 100 105 110

Thr Gly Leu Arg Asp Ala Ser Gly Ala Thr Phe Thr Trp Thr Pro Ser
 115 120 125

Ser Gly Lys Ser Ala Val Gln Gly Pro Pro Glu Arg Asp Leu Cys Gly
 130 135 140

Cys Tyr Ser Val Ser Ser Val Leu Pro Gly Cys Ala Gln Pro Trp Asn
 145 150 155 160

His Gly Glu Thr Phe Thr Cys Thr Ala Ala His Pro Glu Leu Lys Thr
 165 170 175

Pro Leu Thr Ala Asn Ile Thr Lys Ser Gly Asn Thr Phe Arg Pro Glu
 180 185 190

Val His Leu Leu Pro Pro Pro Ser Glu Glu Leu Ala Leu Asn Glu Leu
195 200 205

Val Thr Leu Thr Cys Leu Ala Arg Gly Phe Ser Pro Lys Asp Val Leu
210 215 220

Val Arg Trp Leu Gln Gly Ser Gln Glu Leu Pro Arg Glu Lys Tyr Leu
225 230 235 240

Thr Trp Ala Ser Arg Gln Glu Pro Ser Gln Gly Thr Thr Thr Phe Ala
245 250 255

Val Thr Ser Ile Leu Arg Val Ala Ala Glu Asp Trp Lys Lys Gly Asp
260 265 270

Thr Phe Ser Cys Met Val Gly His Glu Ala Leu Pro Leu Ala Phe Thr
275 280 285

Gln Lys Thr Ile Asp Arg Met Ala Gly Lys Pro Thr His Val Asn Val
290 295 300

[0021]

Ser Val Val Met Ala Glu Val Asp Gly Thr Cys Tyr
305 310 315

<210> 27

<211> 422

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> E3_C67A-Fc_IgM融合物

<400> 27

Met Gly Lys Met Ala Ser Leu Phe Ala Thr Phe Leu Val Val Leu Val
1 5 10 15

Ser Leu Ser Leu Ala Ser Glu Ser Ser Ala Ser Tyr Cys Glu Thr Trp
20 25 30

Arg Thr Glu Ala Pro Ser Ala Thr Gly Gln Ala Ser Ser Leu Leu Gly
35 40 45

Gly Arg Leu Leu Gly Gln Ser Ala Ala Ser Cys His His Ala Tyr Ile
50 55 60

Val Leu Ala Ile Glu Asn Ser Phe Met Thr Val Ile Ala Glu Leu Pro
65 70 75 80

Pro Lys Val Ser Val Phe Val Pro Pro Arg Asp Gly Phe Phe Gly Asn
85 90 95

Pro Arg Lys Ser Lys Leu Ile Cys Gln Ala Thr Gly Phe Ser Pro Arg
100 105 110

Gln Ile Gln Val Ser Trp Leu Arg Glu Gly Lys Gln Val Gly Ser Gly
115 120 125

Val Thr Thr Asp Gln Val Gln Ala Glu Ala Lys Glu Ser Gly Pro Thr
130 135 140

Thr Tyr Lys Val Thr Ser Thr Leu Thr Ile Lys Glu Ser Asp Trp Leu
145 150 155 160

Gly Gln Ser Met Phe Thr Cys Arg Val Asp His Arg Gly Leu Thr Phe
165 170 175

[0022]

Gln Gln Asn Ala Ser Ser Met Cys Val Pro Asp Gln Asp Thr Ala Ile
180 185 190

Arg Val Phe Ala Ile Pro Pro Ser Phe Ala Ser Ile Phe Leu Thr Lys
195 200 205

Ser Thr Lys Leu Thr Cys Leu Val Thr Asp Leu Thr Thr Tyr Asp Ser
210 215 220

Val Thr Ile Ser Trp Thr Arg Gln Asn Gly Glu Ala Val Lys Thr His
225 230 235 240

Thr Asn Ile Ser Glu Ser His Pro Asn Ala Thr Phe Ser Ala Val Gly
245 250 255

Glu Ala Ser Ile Cys Glu Asp Asp Trp Asn Ser Gly Glu Arg Phe Thr
260 265 270

Cys Thr Val Thr His Thr Asp Leu Pro Ser Pro Leu Lys Gln Thr Ile
275 280 285

Ser Arg Pro Lys Gly Val Ala Leu His Arg Pro Asp Val Tyr Leu Leu
290 295 300

Pro Pro Ala Arg Glu Gln Leu Asn Leu Arg Glu Ser Ala Thr Ile Thr
305 310 315 320

Cys Leu Val Thr Gly Phe Ser Pro Ala Asp Val Phe Val Gln Trp Met
325 330 335

Gln Arg Gly Gln Pro Leu Ser Pro Glu Lys Tyr Val Thr Ser Ala Pro
340 345 350

Met Pro Glu Pro Gln Ala Pro Gly Arg Tyr Phe Ala His Ser Ile Leu
355 360 365

Thr Val Ser Glu Glu Glu Trp Asn Thr Gly Glu Thr Tyr Thr Cys Val
370 375 380

Ala His Glu Ala Leu Pro Asn Arg Val Thr Glu Arg Thr Val Asp Lys
385 390 395 400

[0023]

Ser Thr Gly Lys Pro Thr Leu Tyr Asn Val Ser Leu Val Met Ser Asp
405 410 415

Thr Ala Gly Thr Cys Tyr
420

<210> 28
<211> 163
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> J-链_PVX_sgp36

<400> 28

Met Gly Lys Met Ala Ser Leu Phe Ala Thr Phe Leu Val Val Leu Val
1 5 10 15

Ser Leu Ser Leu Ala Ser Glu Ser Ser Ala Gln Glu Asp Glu Arg Ile
20 25 30

Val Leu Val Asp Asn Lys Cys Lys Cys Ala Arg Ile Thr Ser Arg Ile
35 40 45

Ile Arg Ser Ser Glu Asp Pro Asn Glu Asp Ile Val Glu Arg Asn Ile
 50 55 60
 Arg Ile Ile Val Pro Leu Asn Asn Arg Glu Asn Ile Ser Asp Pro Thr
 65 70 75 80
 Ser Pro Leu Arg Thr Arg Phe Val Tyr His Leu Ser Asp Leu Cys Lys
 85 90 95
 Lys Cys Asp Pro Thr Glu Val Glu Leu Asp Asn Gln Ile Val Thr Ala
 100 105 110
 Thr Gln Ser Asn Ile Cys Asp Glu Asp Ser Ala Thr Glu Thr Cys Tyr
 115 120 125
 Thr Tyr Asp Arg Asn Lys Cys Tyr Thr Ala Val Val Pro Leu Val Tyr
 130 135 140
 Gly Gly Glu Thr Lys Met Val Glu Thr Ala Leu Thr Pro Asp Ala Cys
 145 150 155 160

[0024]

Tyr Pro Asp

<210> 29
 <211> 306
 <212> PRT
 <213> 人工
 <220>
 <223> IgG1_Fc-E3_C67A C端融合物
 <400> 29

Met Gly Lys Met Ala Ser Leu Phe Ala Thr Phe Leu Val Val Leu Val
 1 5 10 15
 Ser Leu Ser Leu Ala Ser Glu Ser Ser Ala Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 20 25 30
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 35 40 45
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile

	50	55	60	
	Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu 65 70 75 80			
	Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His 85 90 95			
	Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg 100 105 110			
	Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys 115 120 125			
	Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu 130 135 140			
	Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr 145 150 155 160			
[0025]	Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu 165 170 175			
	Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp 180 185 190			
	Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val 195 200 205			
	Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp 210 215 220			
	Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His 225 230 235 240			
	Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro 245 250 255			
	Gly Lys Ser Tyr Cys Glu Thr Trp Arg Thr Glu Ala Pro Ser Ala Thr 260 265 270			
	Gly Gln Ala Ser Ser Leu Leu Gly Gly Arg Leu Leu Gly Gln Ser Ala 275 280 285			

Ala Ser Cys His His Ala Tyr Ile Val Leu Ala Ile Glu Asn Ser Phe
290 295 300

[0026]

Met Thr
305

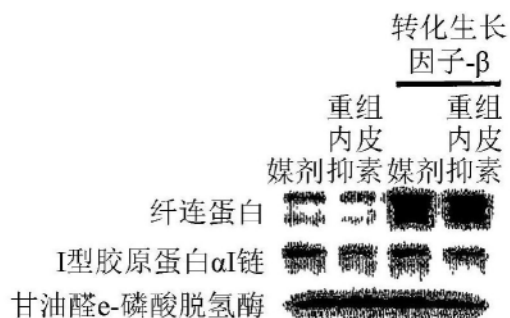


图1A

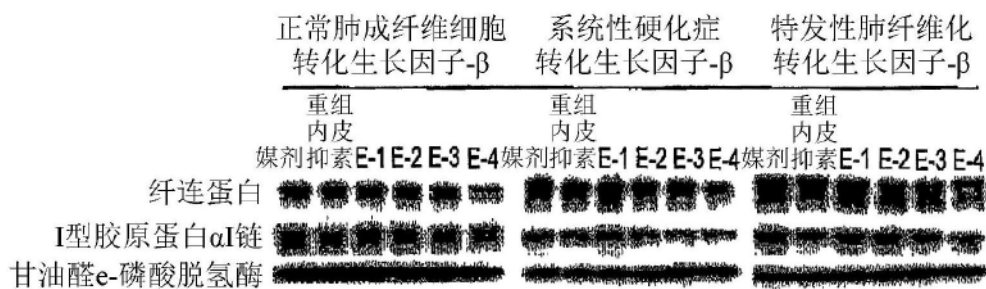


图1B

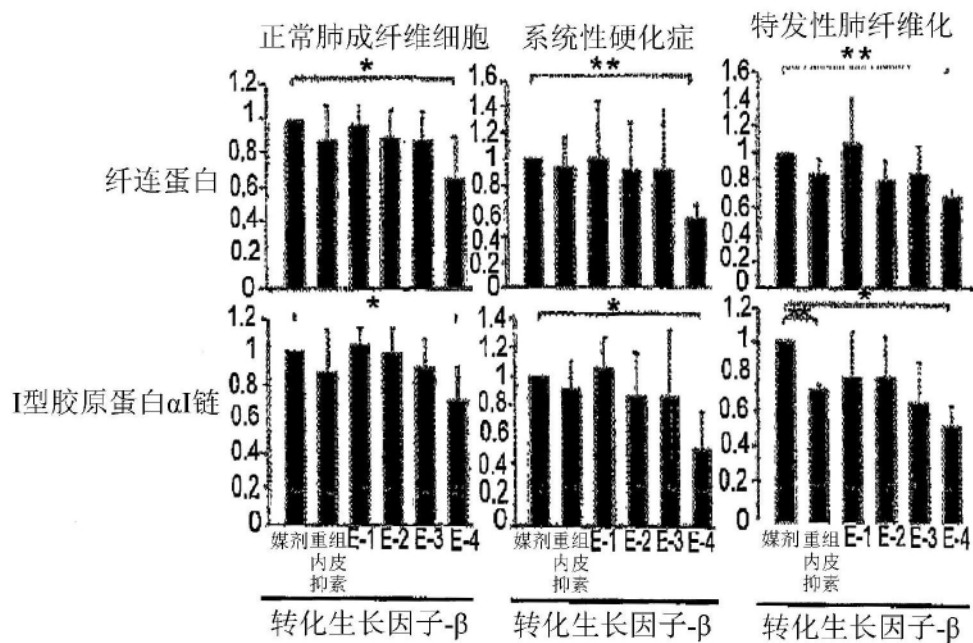


图1C

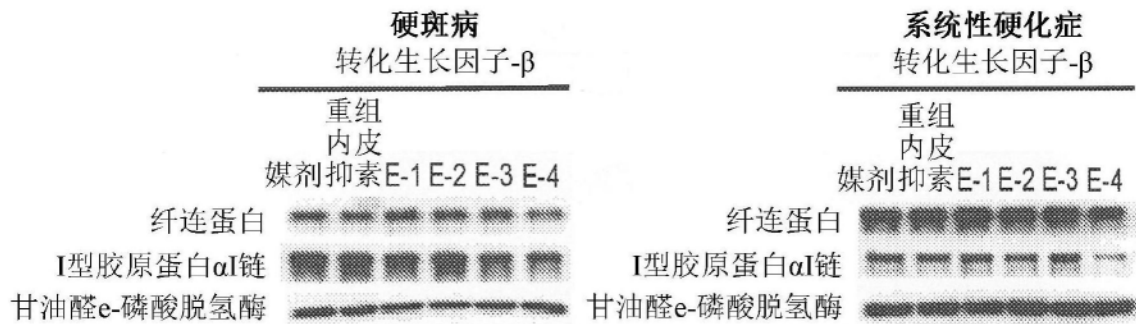


图1D

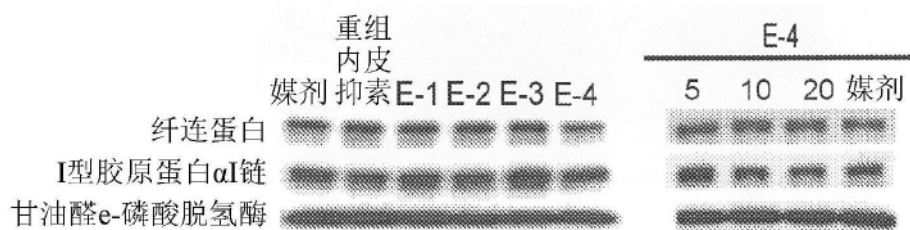


图1E

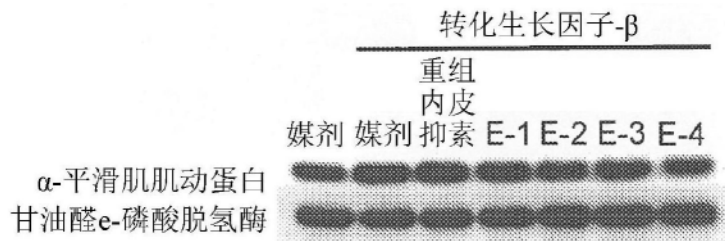


图1F

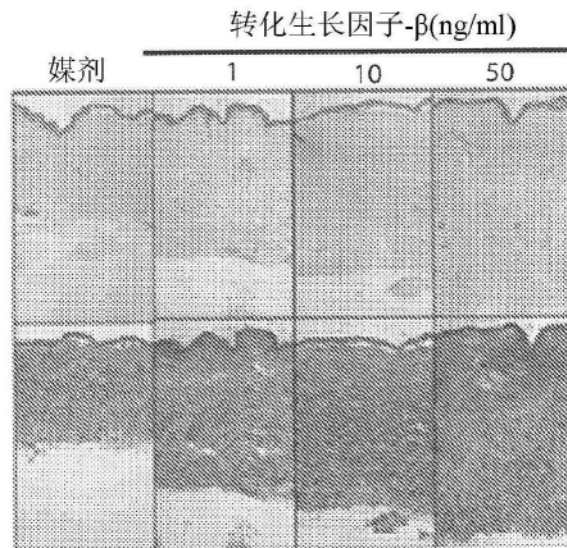


图2A

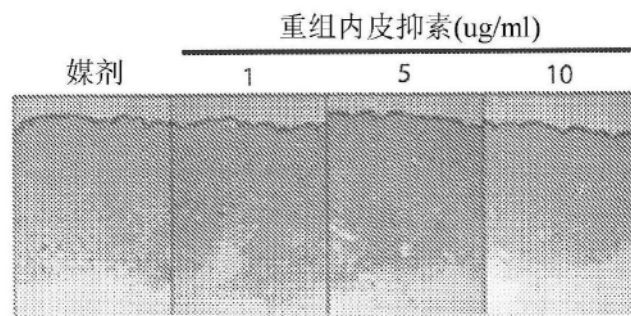


图2B

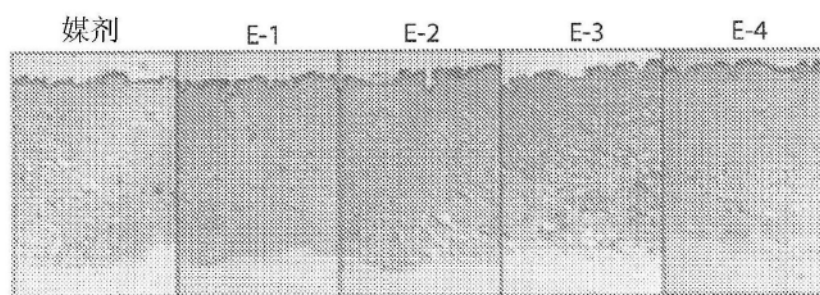


图2C

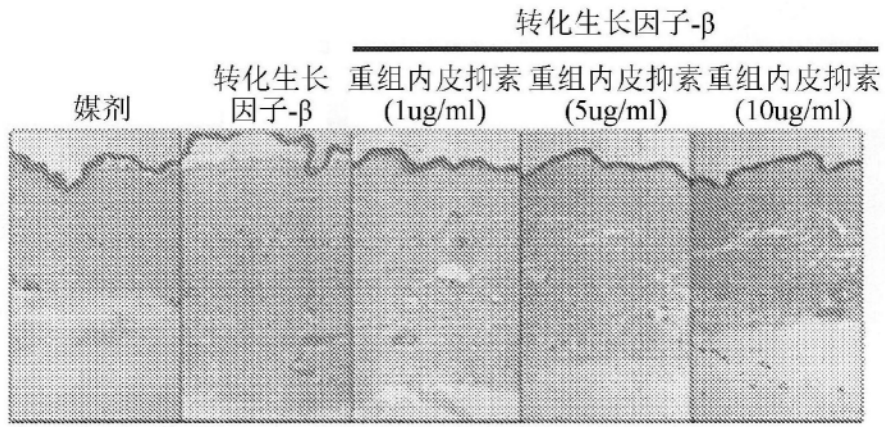


图3A

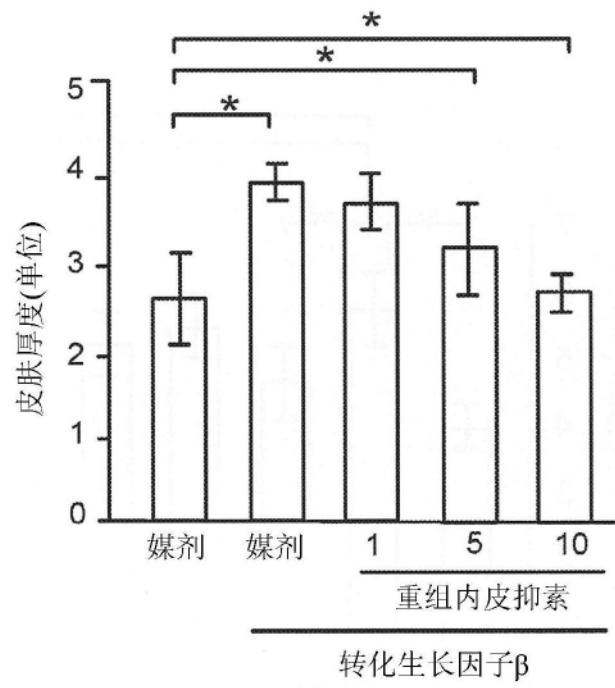


图3B

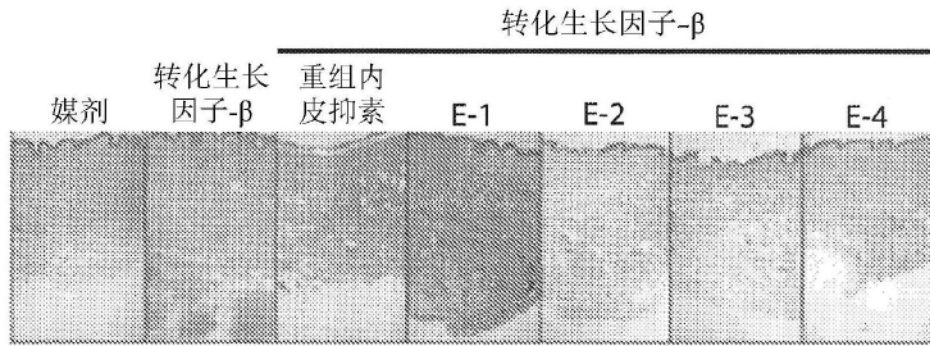


图4A

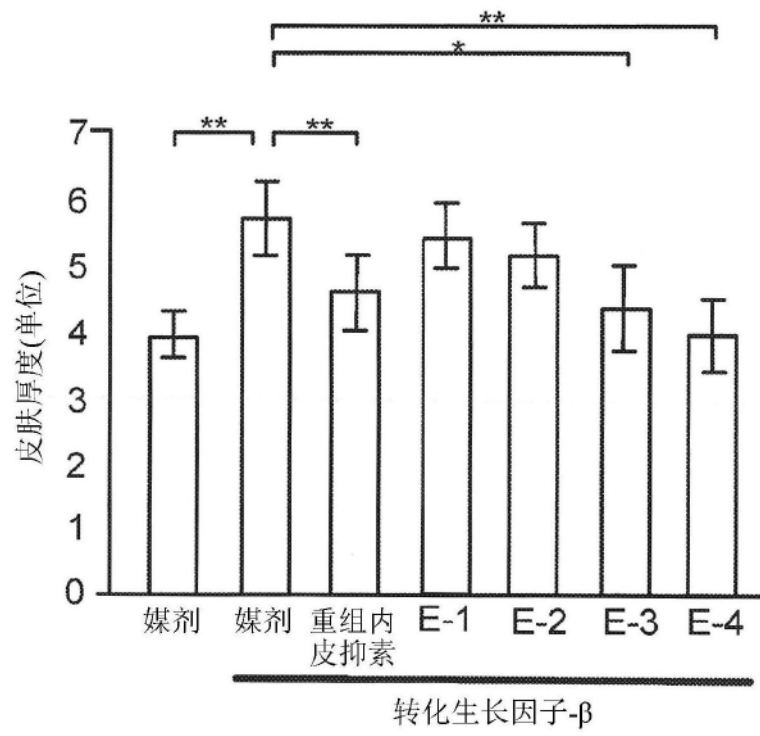


图4B

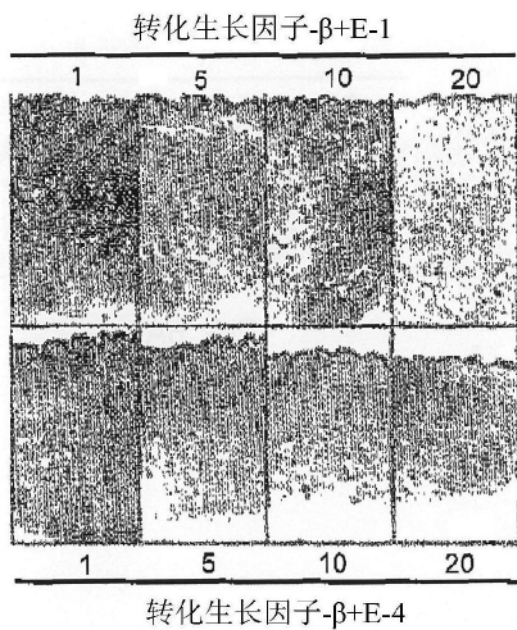


图5A

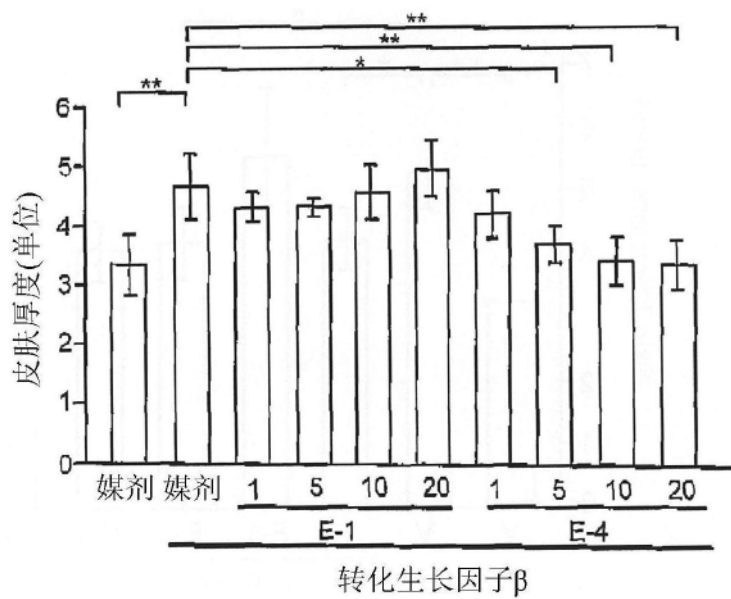


图5B

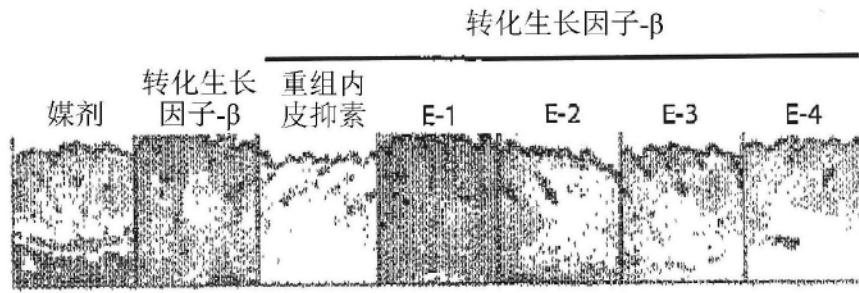


图6A

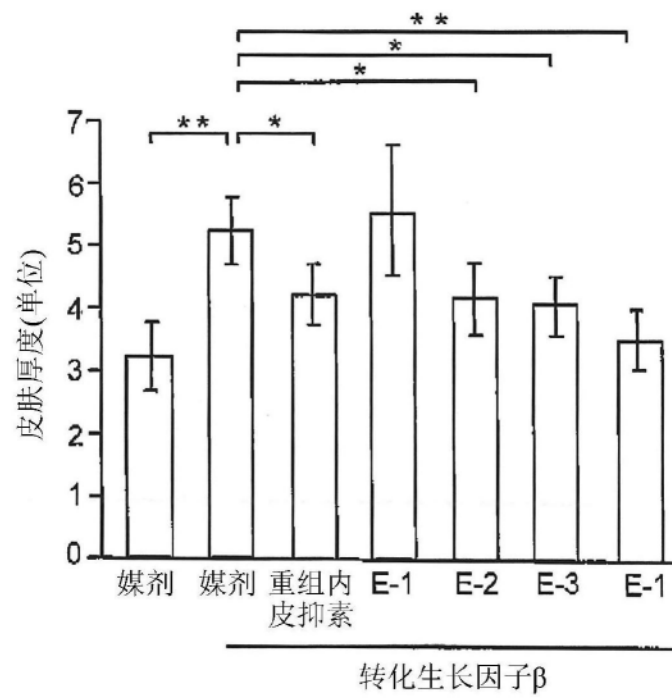


图6B

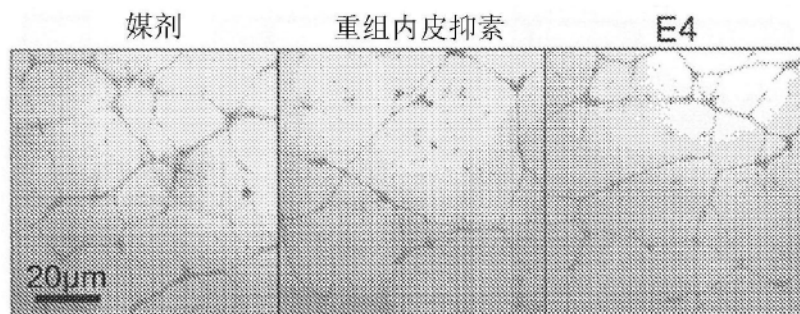


图7A

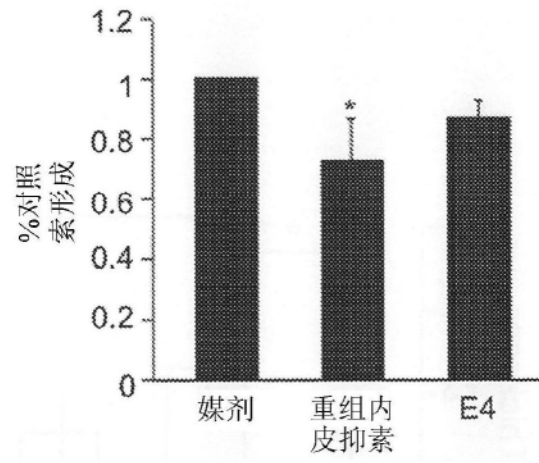


图7B

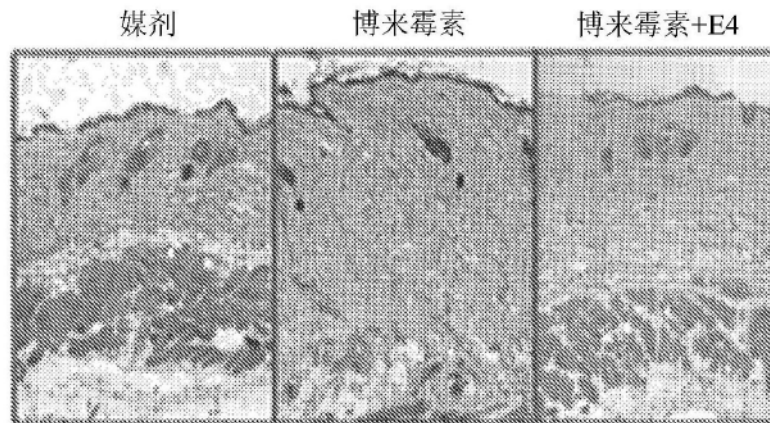


图8A

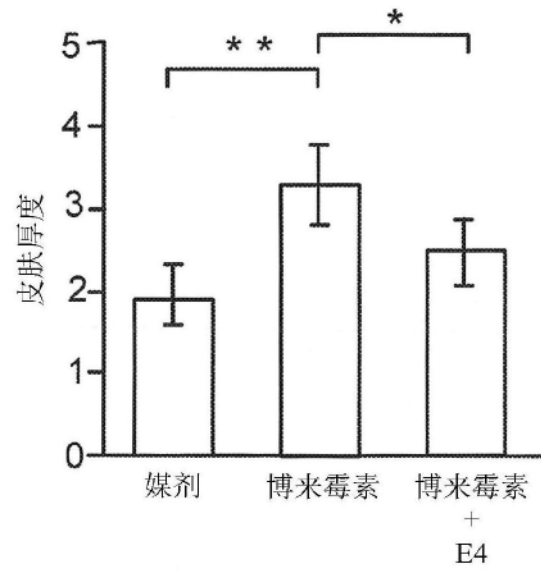


图8B

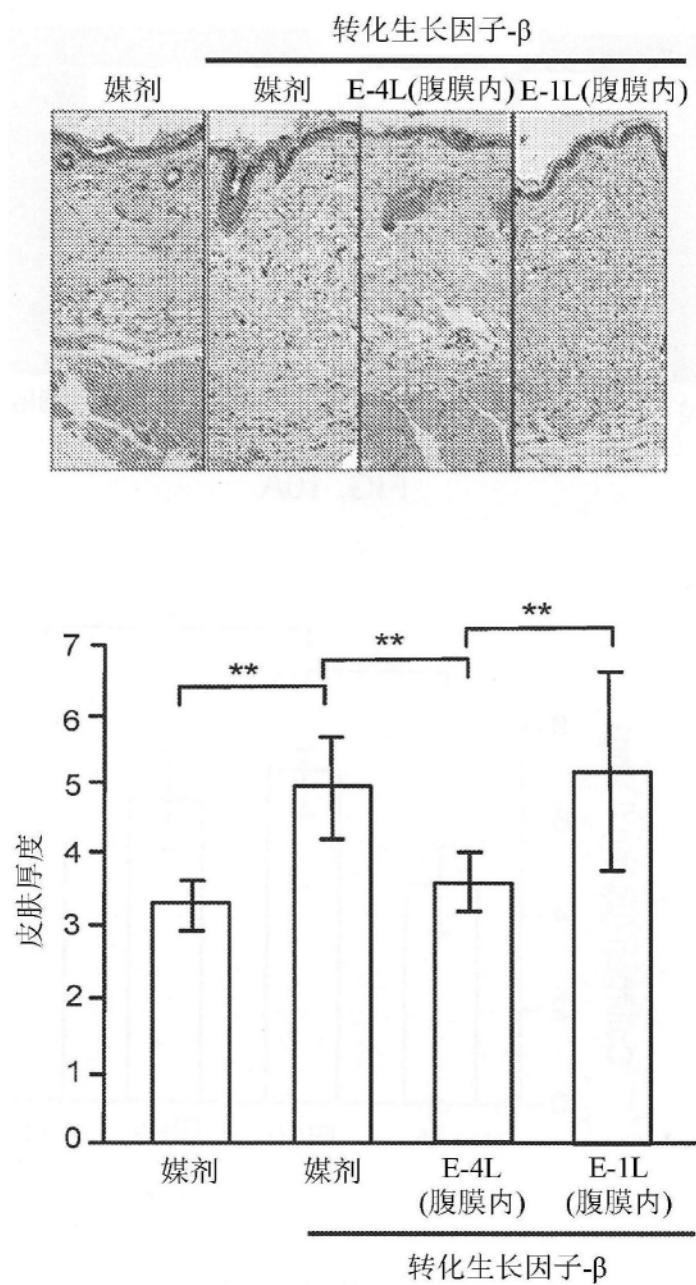


图9

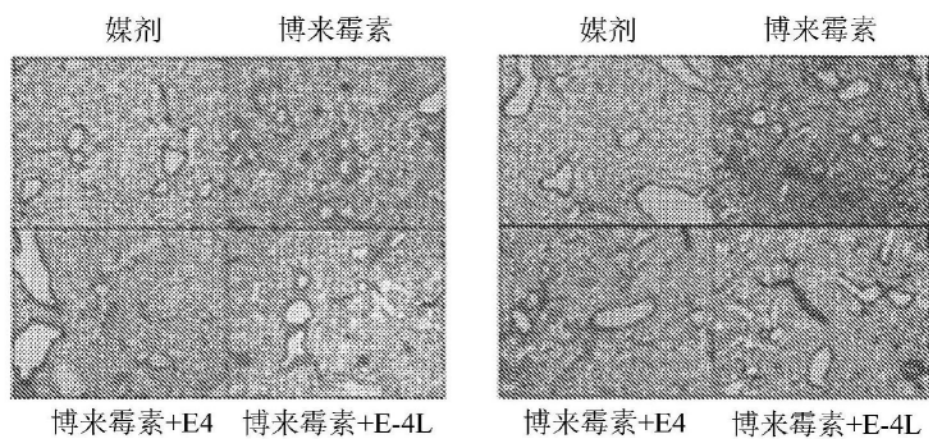


图10A

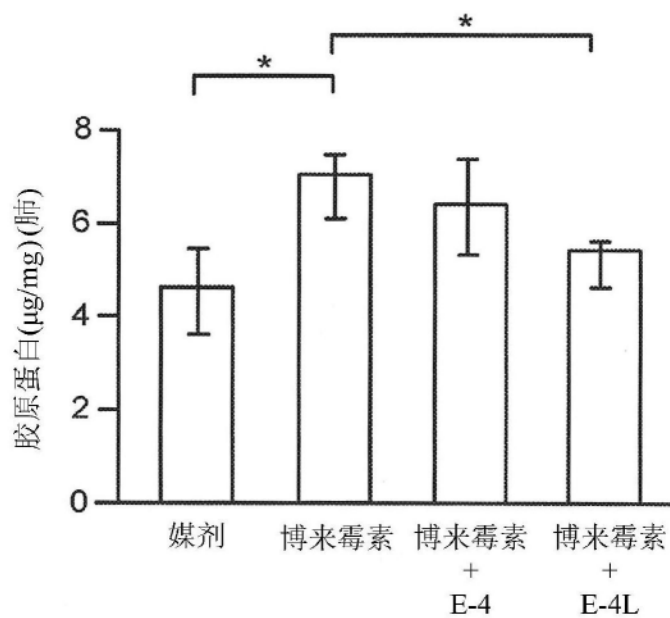


图10B

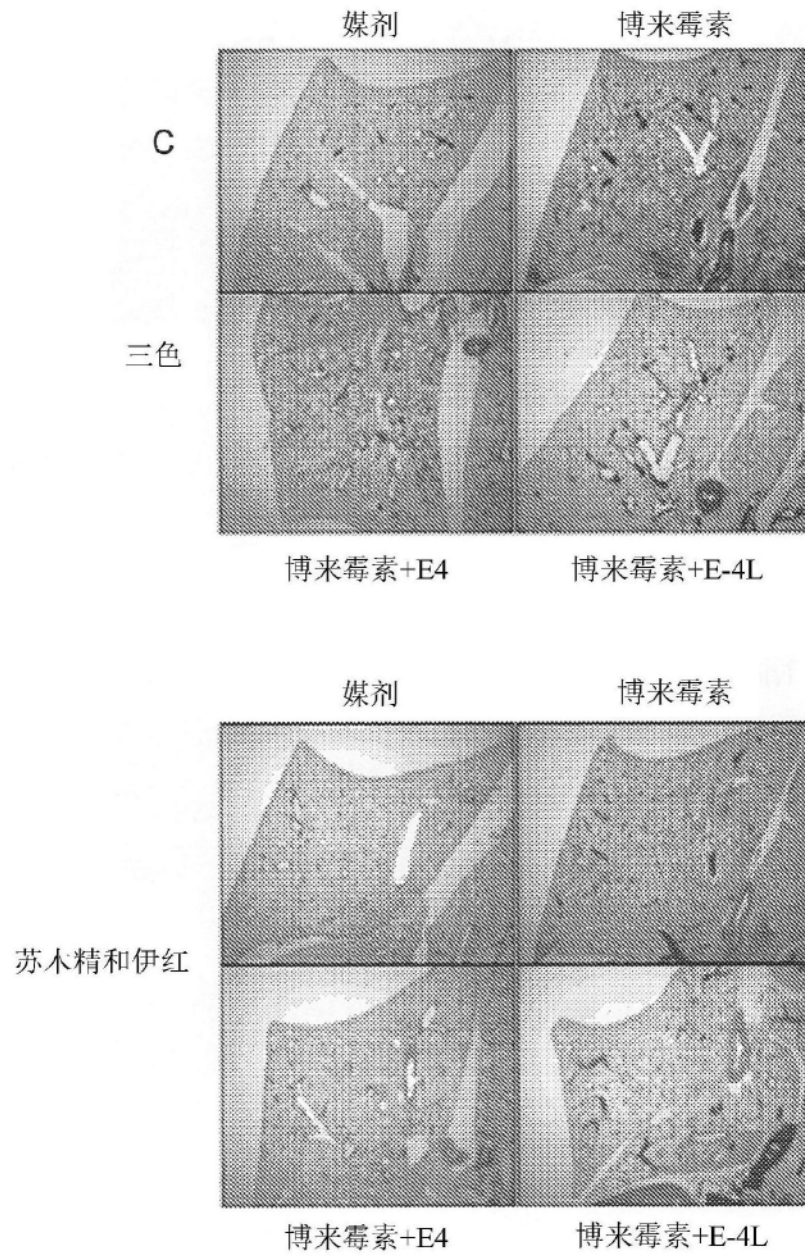


图10C

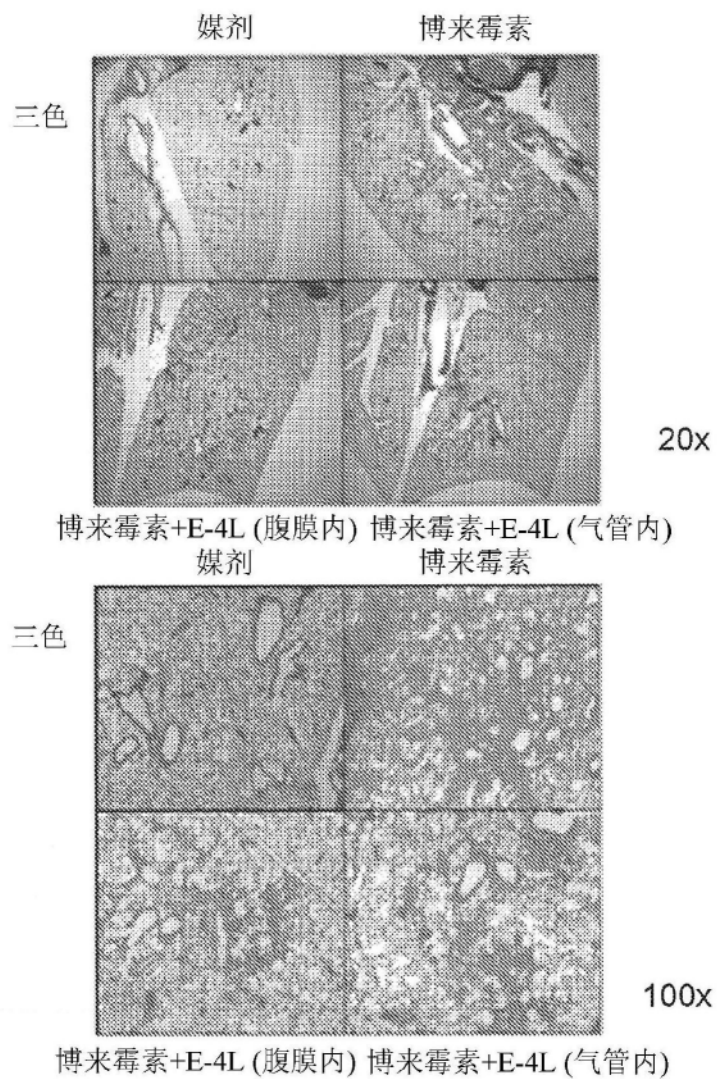


图11

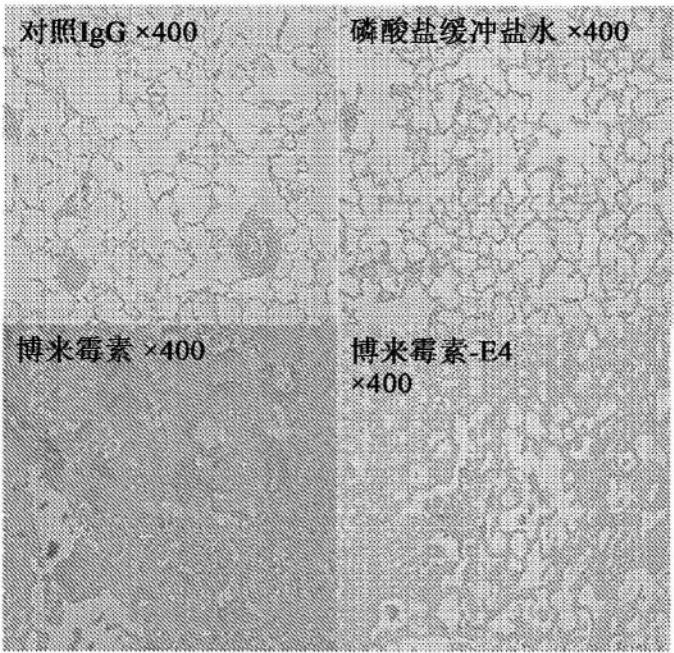


图12

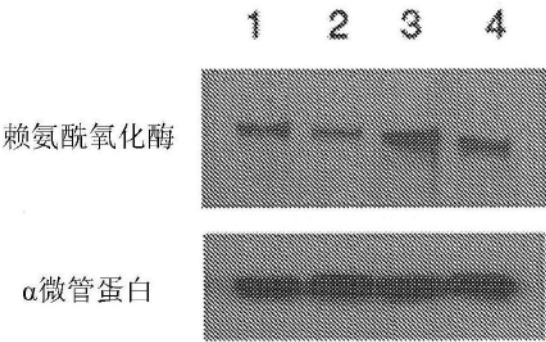


图13

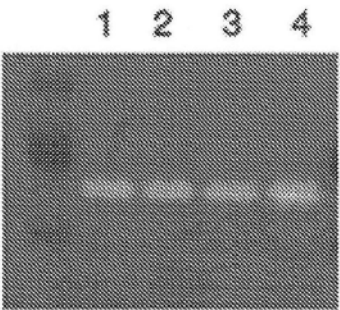


图14A

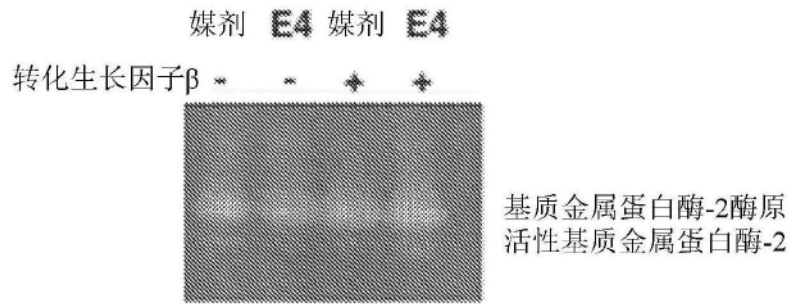


图14B

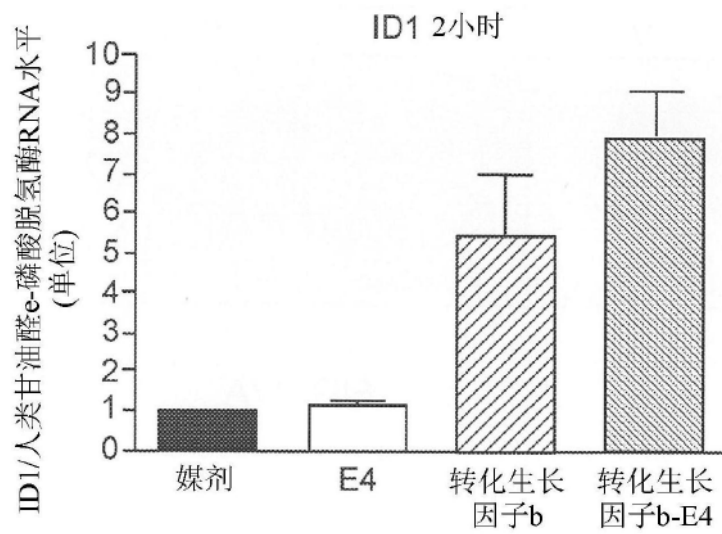


图15

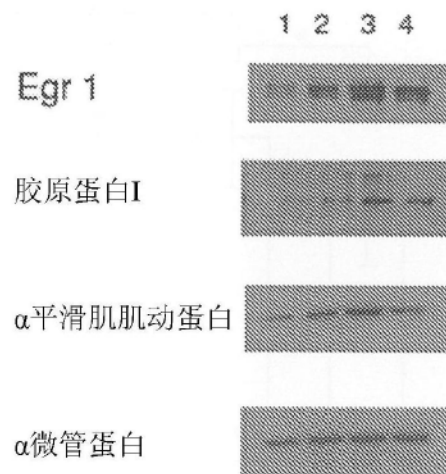


图16

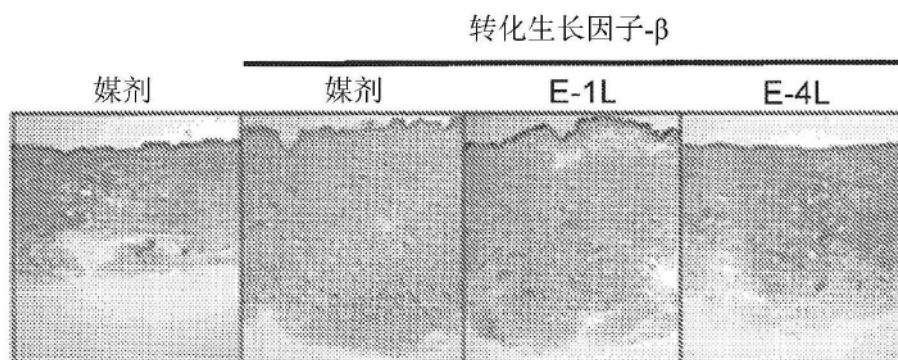


图17A

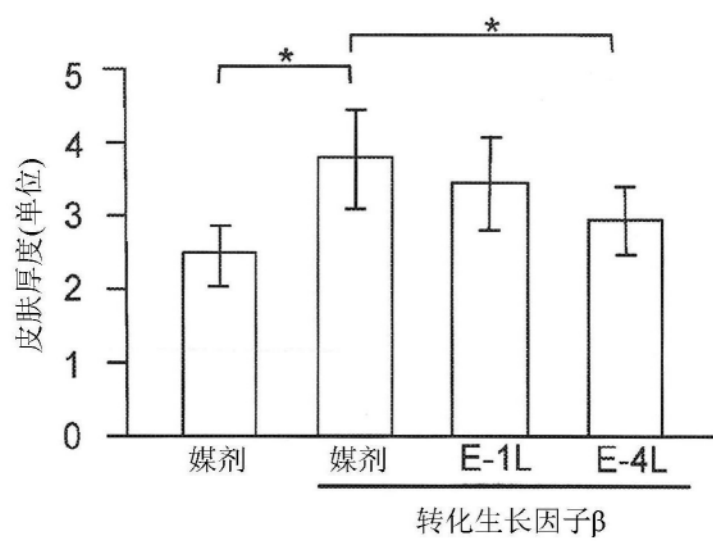


图17B

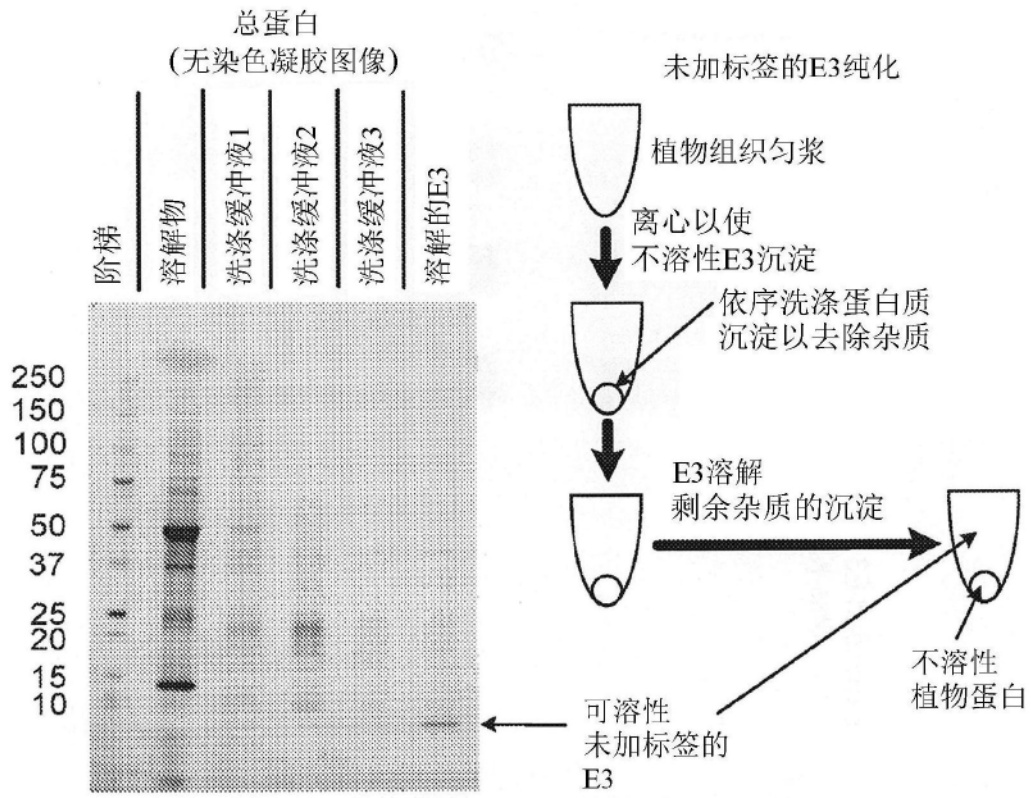


图18

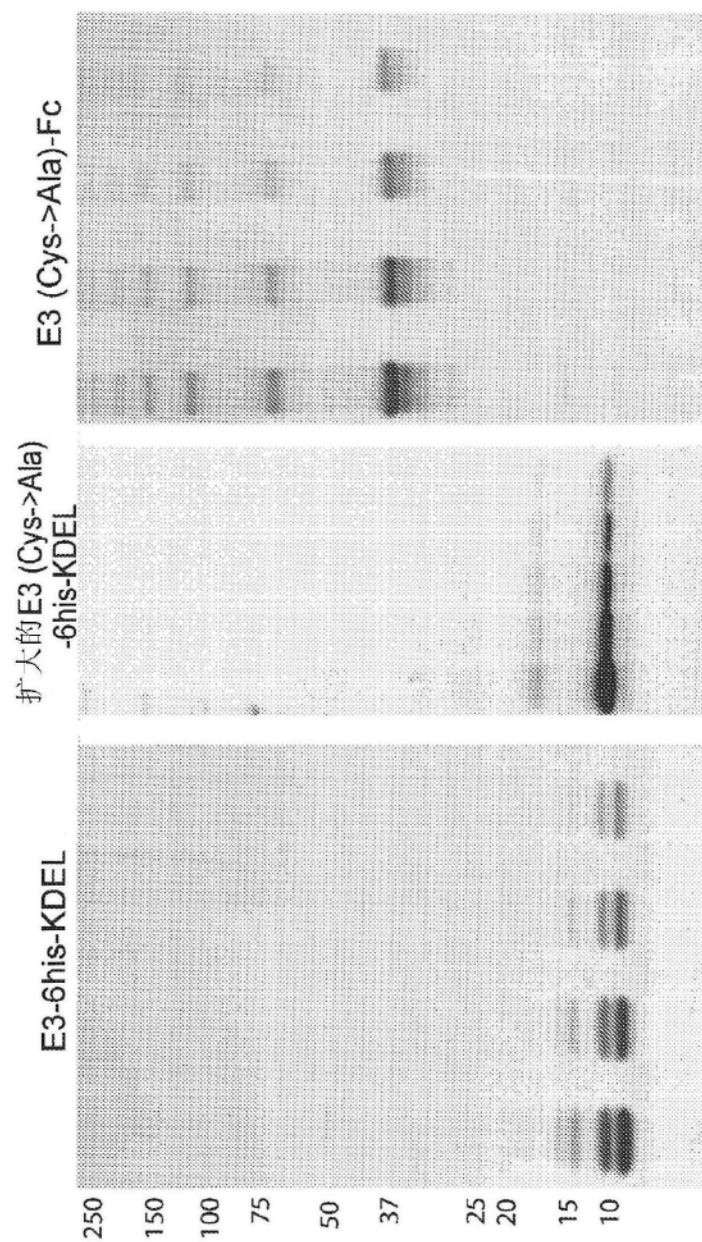


图19

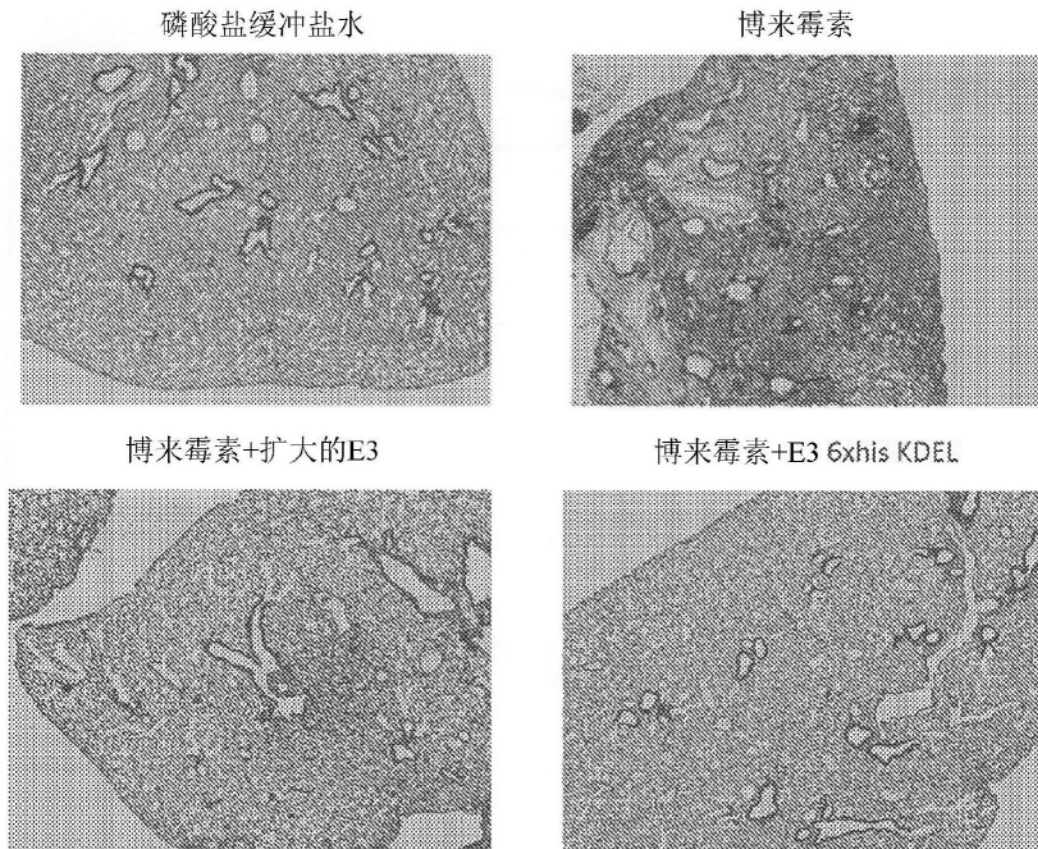


图20

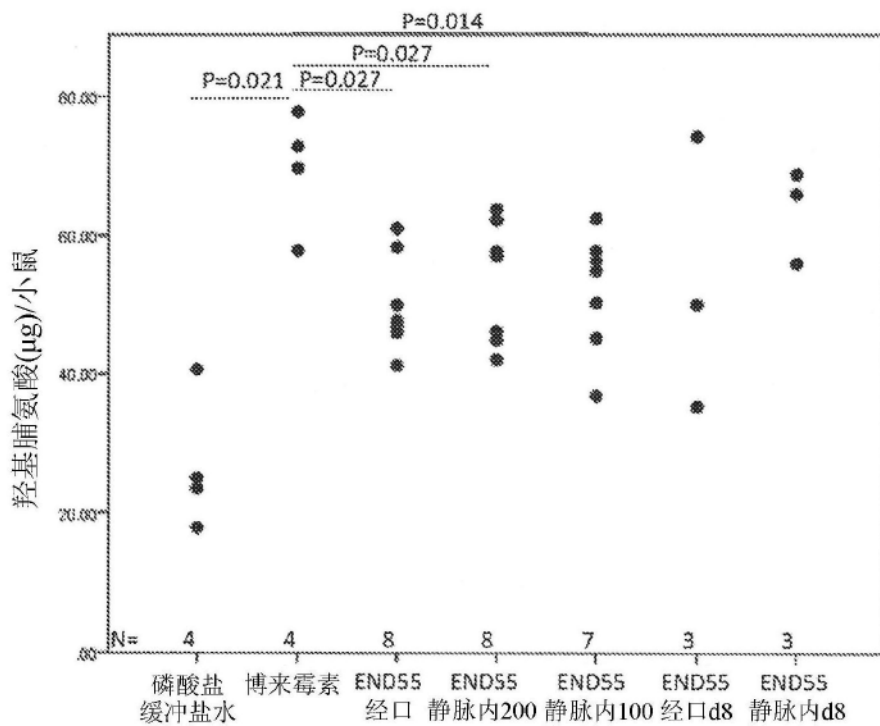
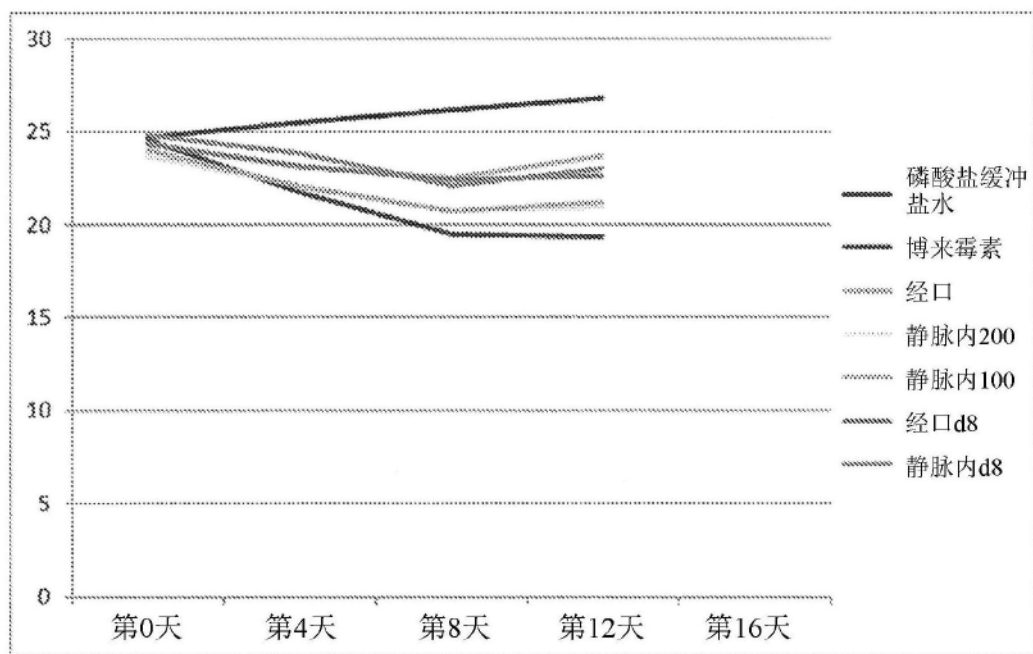


图21

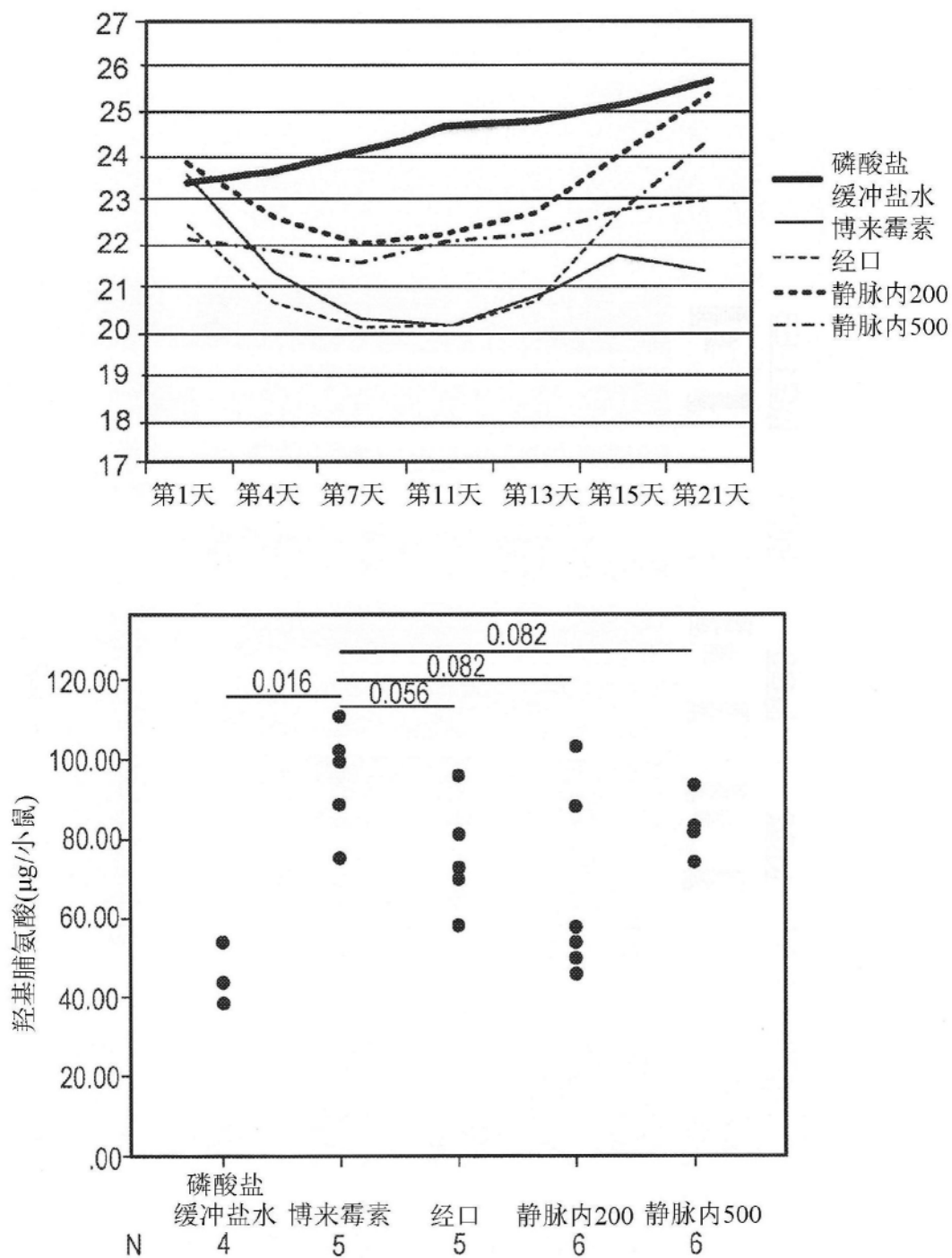


图22

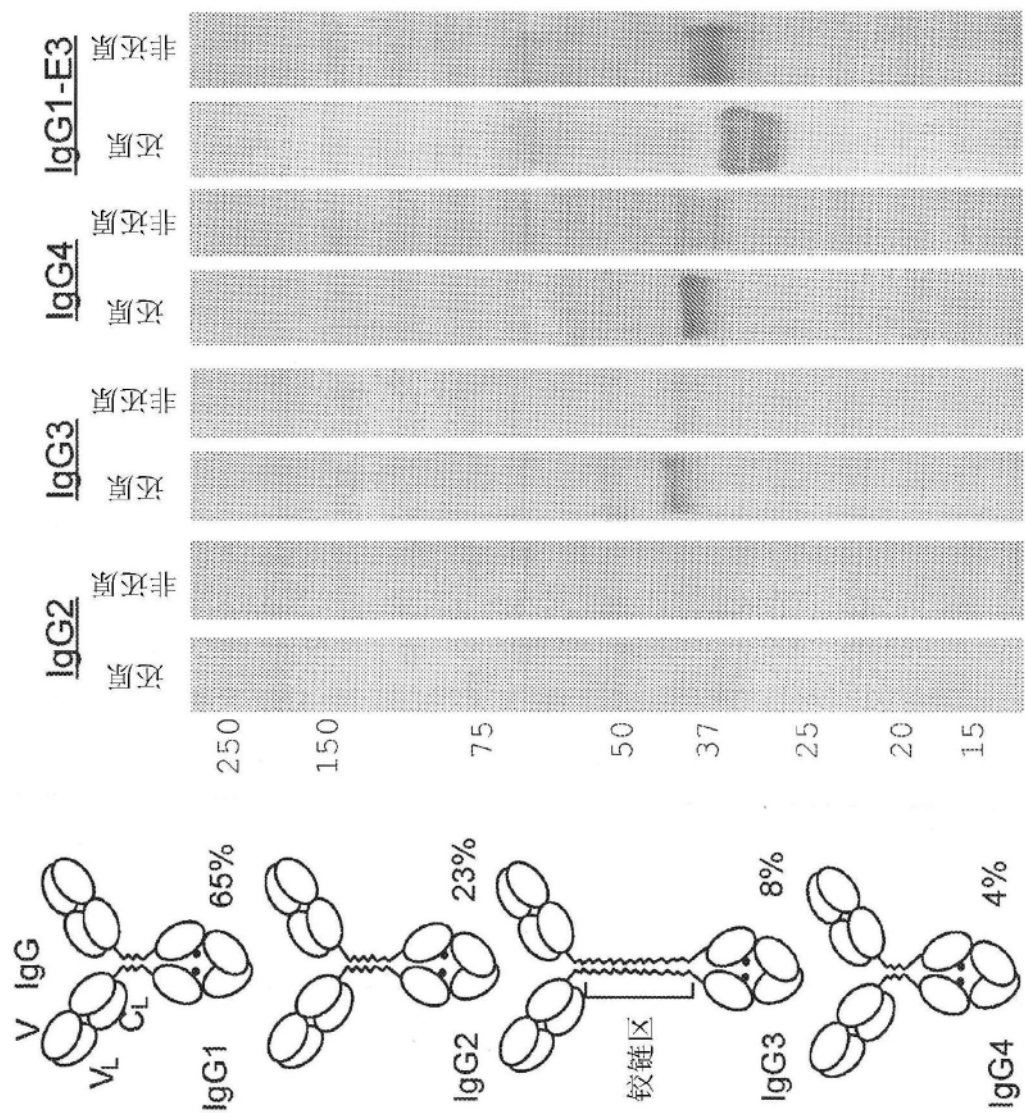


图23

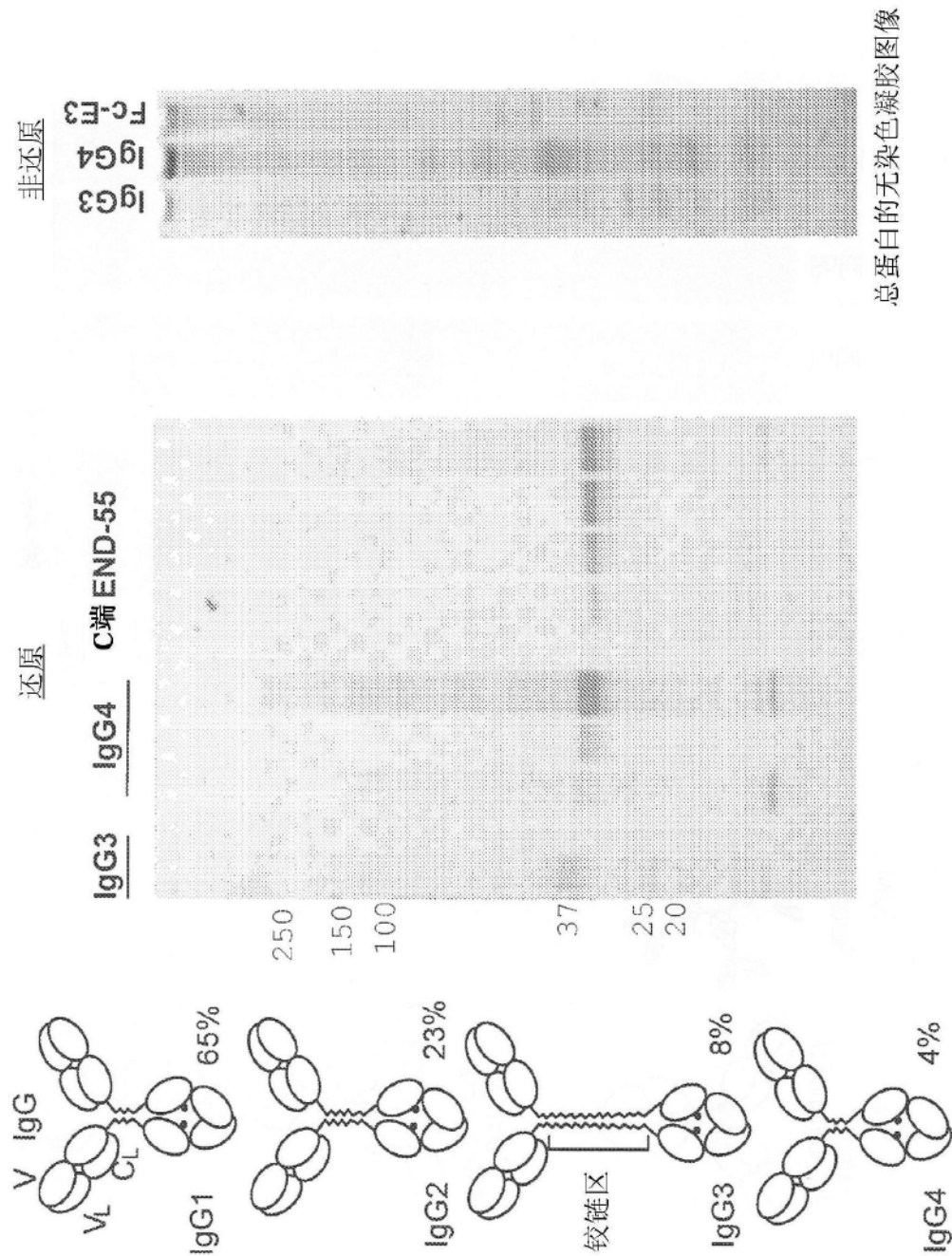


图24

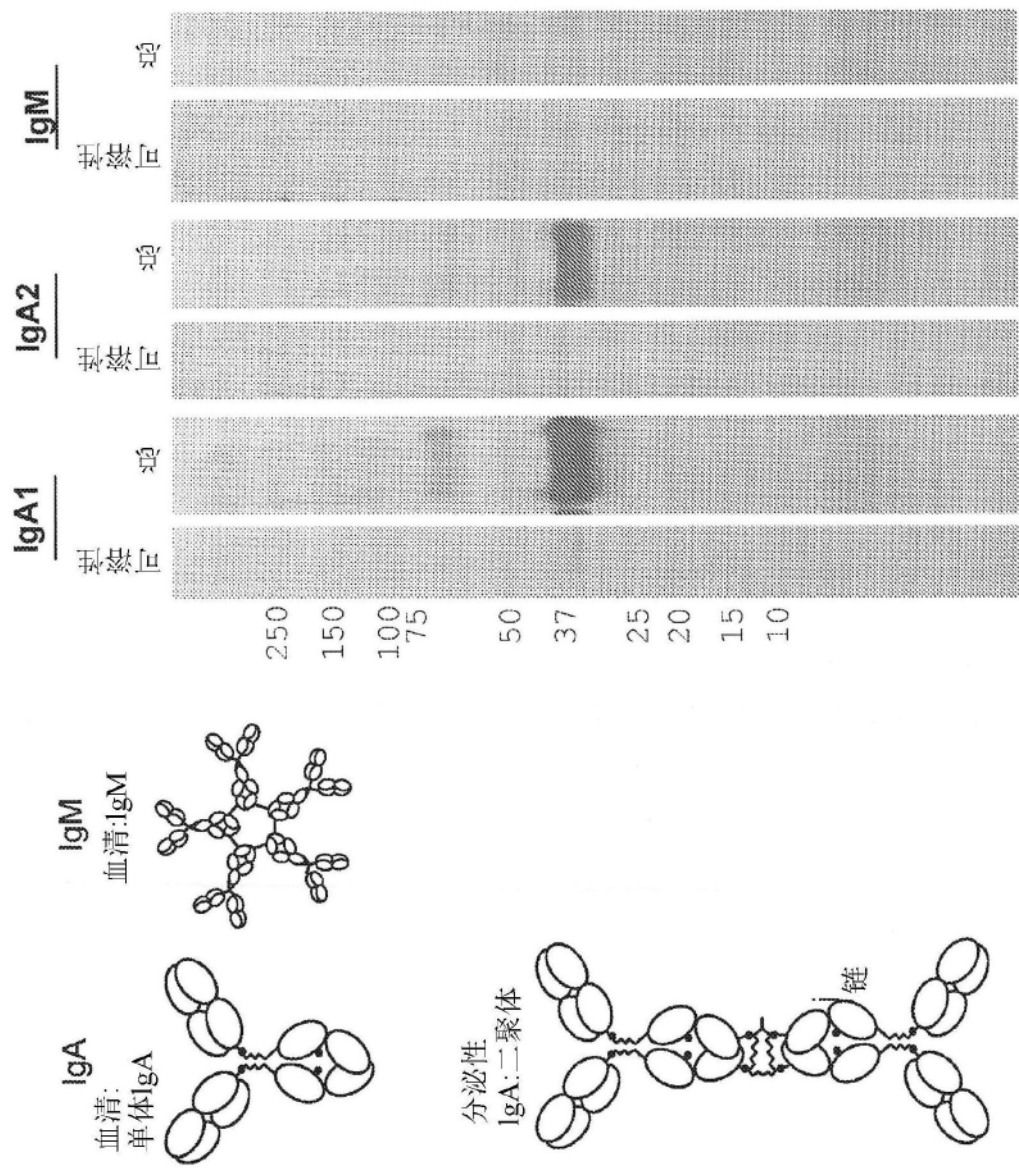


图25

E3-Fc序列:

MGKMASLFATFLVVLVSLSLASESSASYCETWRTEAPSATGQASSLL
GGRLLGQSAASCHHAYIVLAIENSFMT**EPK**SCDKTHTCPPCPAPELLGG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN
AKTKPREEQY**NST**YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
ENNYKTTTPVLDSFGSFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHY
TQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:16)

E3序列:

SYCETWRTEAPSATGQASSLLGGRLLGQSAASCHHAYIVLCIENSFMT
(SEQ ID NO:20)

E4序列:

SYCETWRTEAPSATGQASSLLGGRLLGQSAASCHHAYIVLCIENSFMT-
 $R_nE(O)_xNR'_2$ (SEQ ID NO:21)

图26



图27

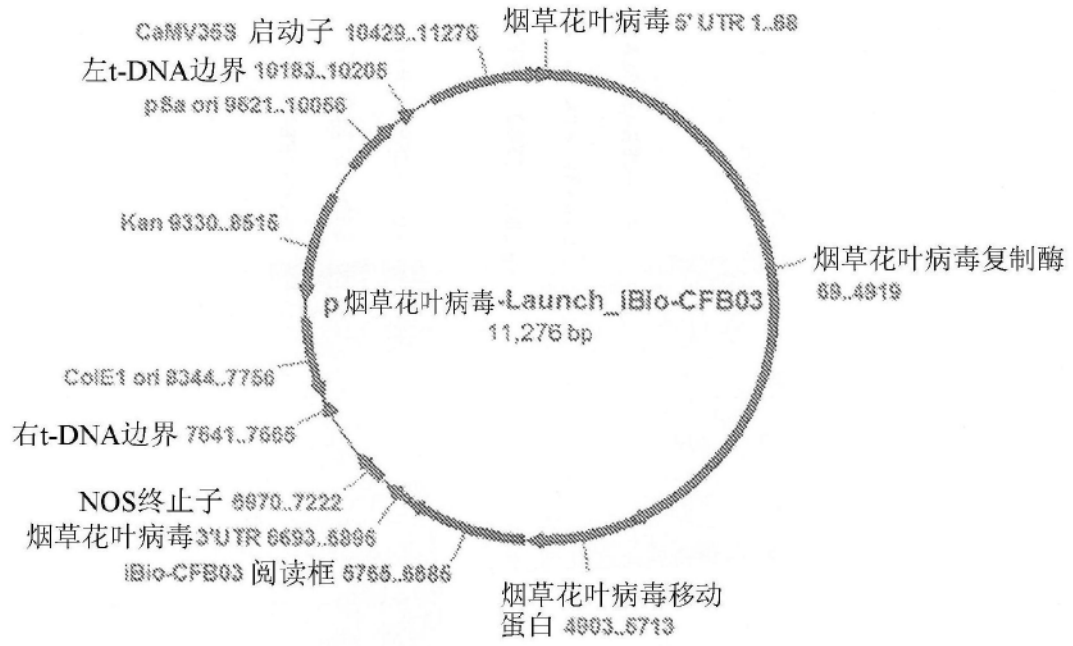


图28

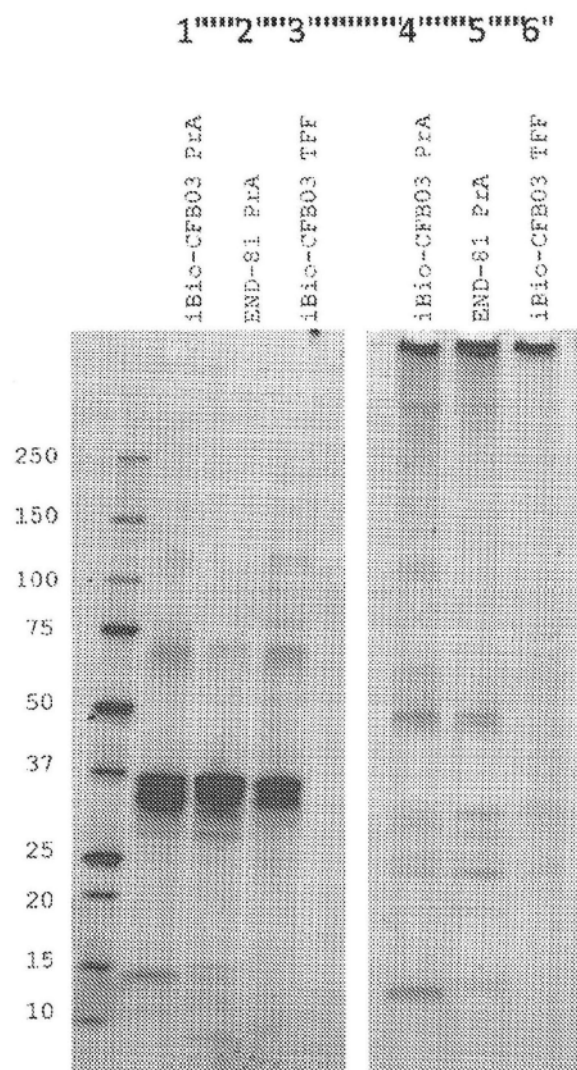


图29

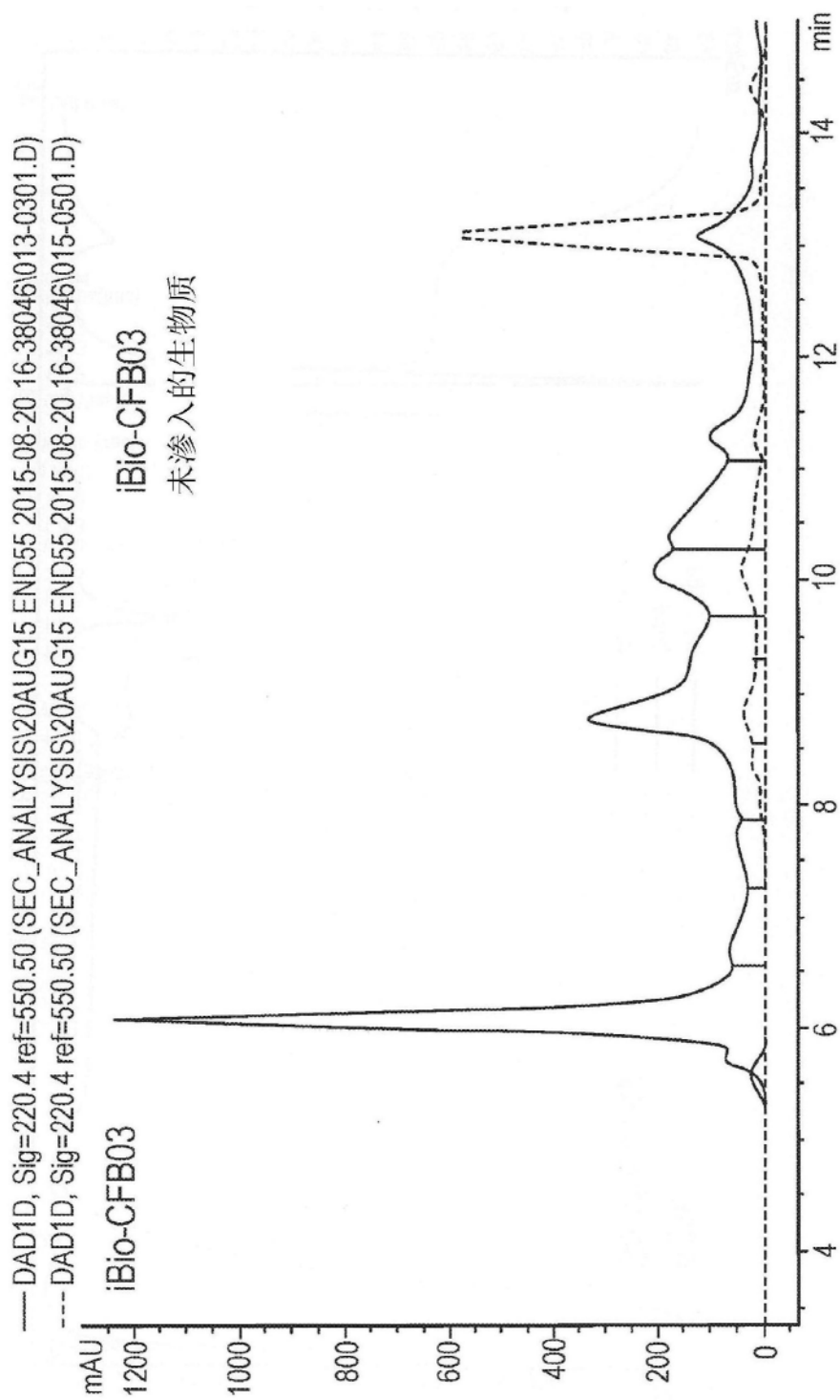


图30

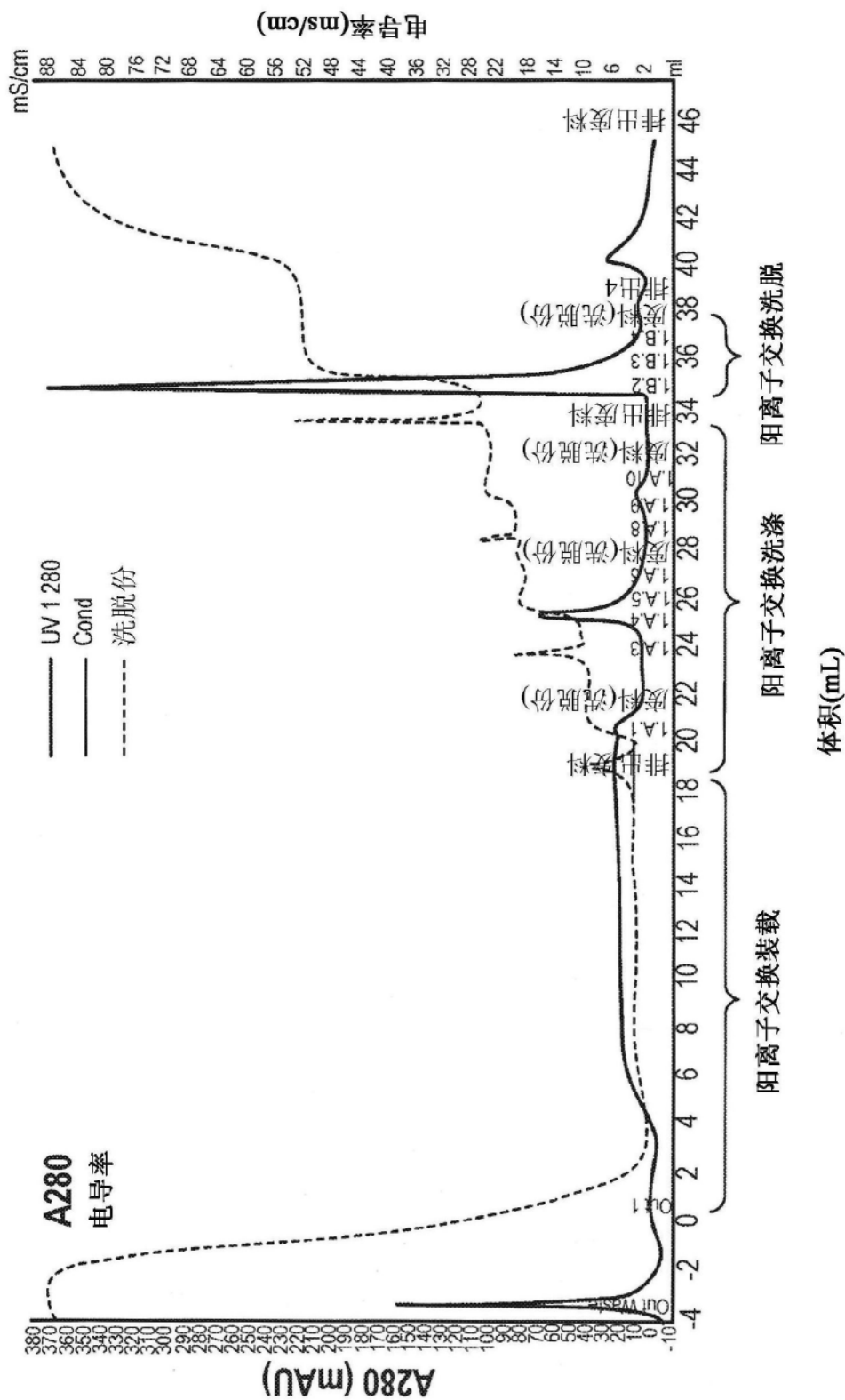


图31

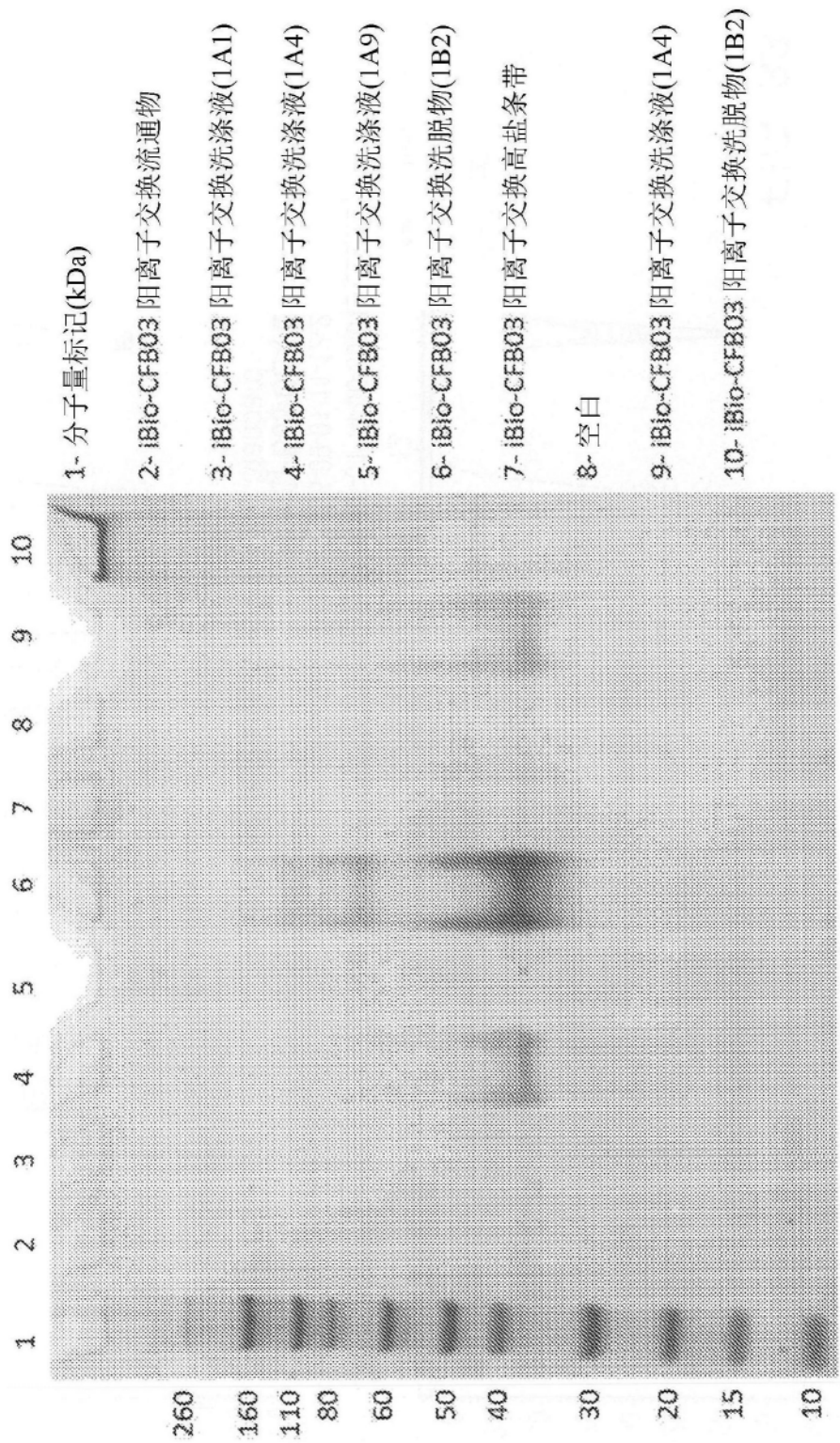


图32

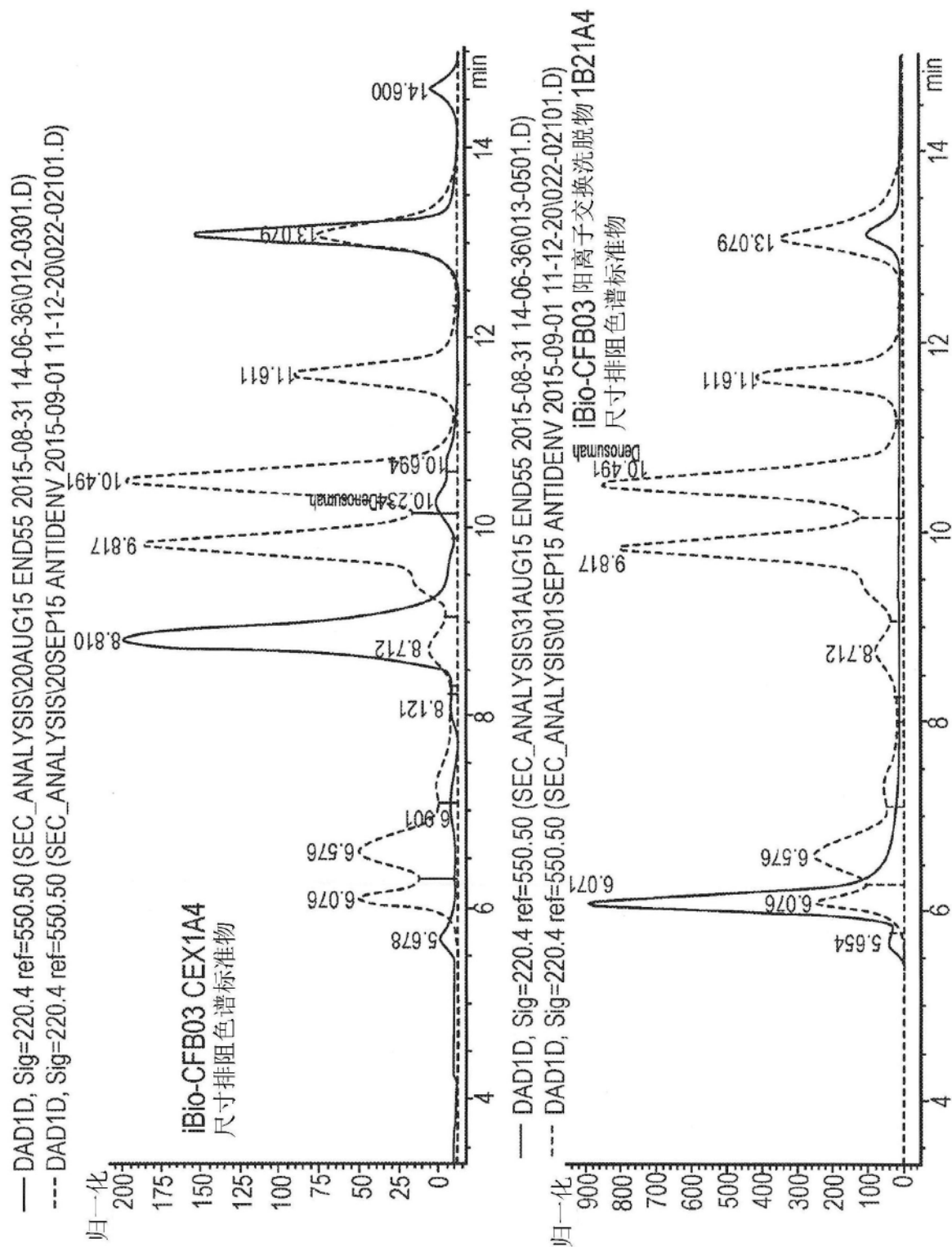


图33

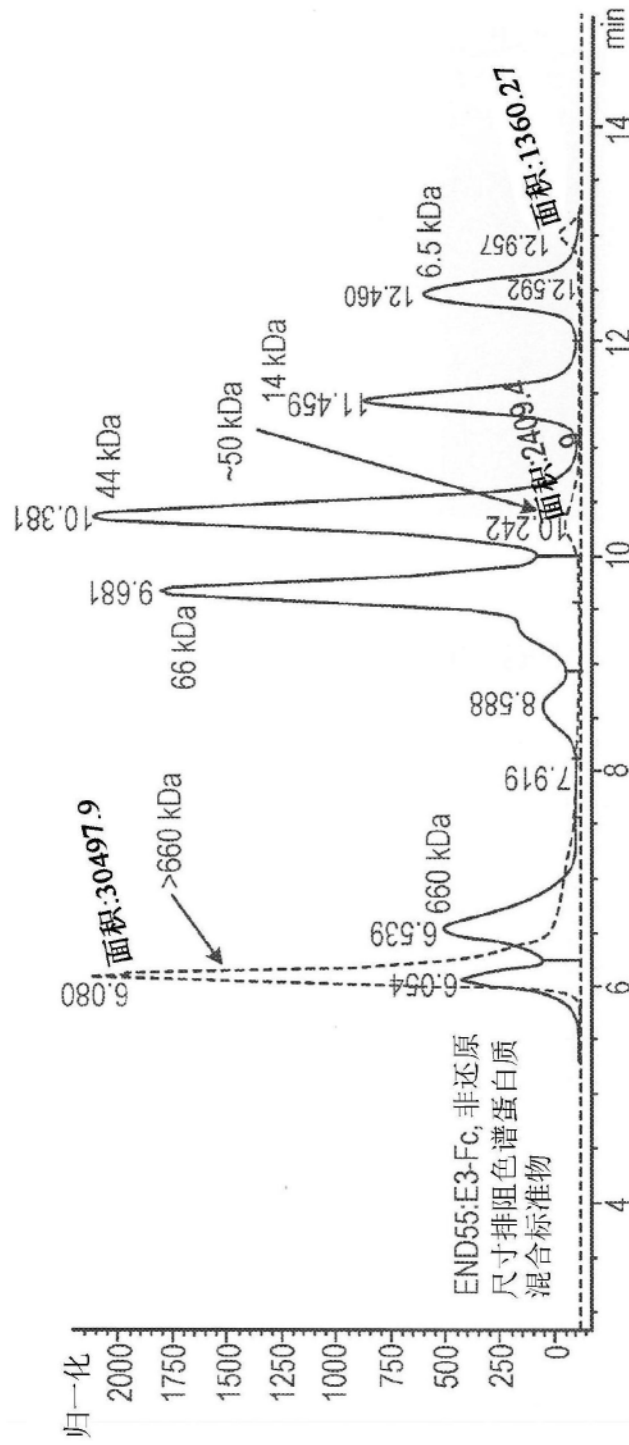


图34

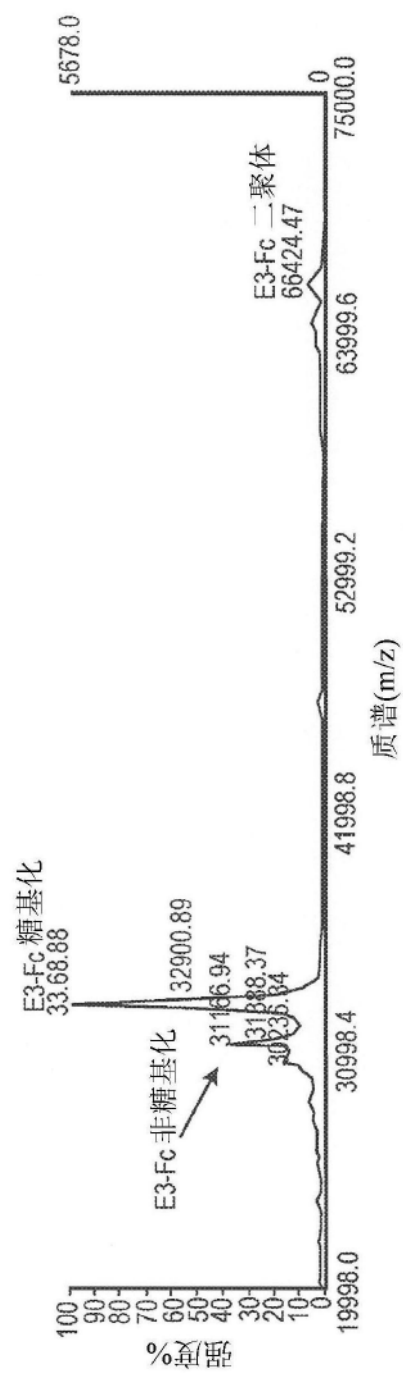


图35

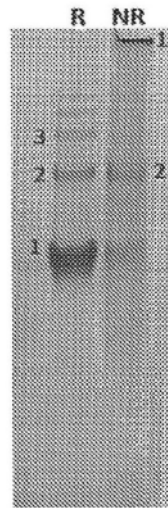


图36

SYCETWRTEA	PSATGQASSL	LGGRLLGQSA	ASCHHAYIVL	AIENSFMTEP
KSCDKTHTCP	PCPAPELLGG	PSVFLFPPKP	KDTLMISRTP	EVTCVVVDVS
HEDPEVKFNW	YVDGVEVHNA	KTKPREEQYN	STYRVVSVLT	VLHQDWLNGK
EYKCKVSNKA	LPAPIEKTIS	KAKGQPREPQ	VYTLPPSRDE	LTKNQVSLTC
LVKGFYPSDI	AVEWESNGQP	ENNYKTPPV	LDSDGSFFLY	SKLTVDKSRW
QOQNVFSCSV	MHEALHNHYT	QKSLSLSPGK		

图37

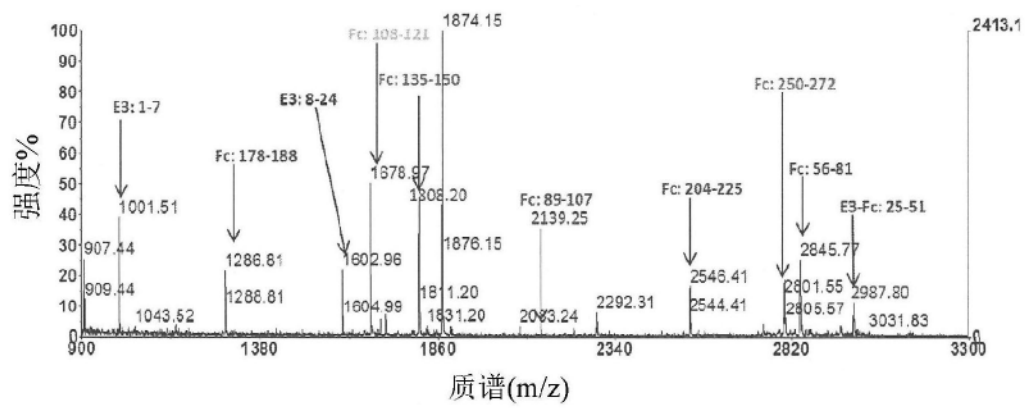


图38

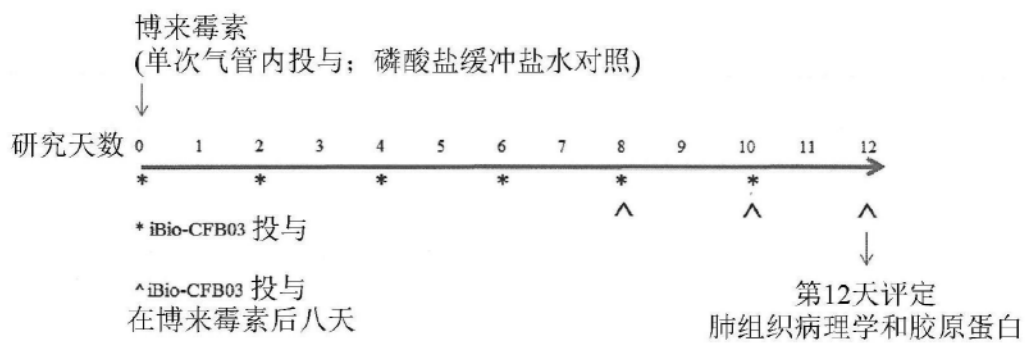


图39

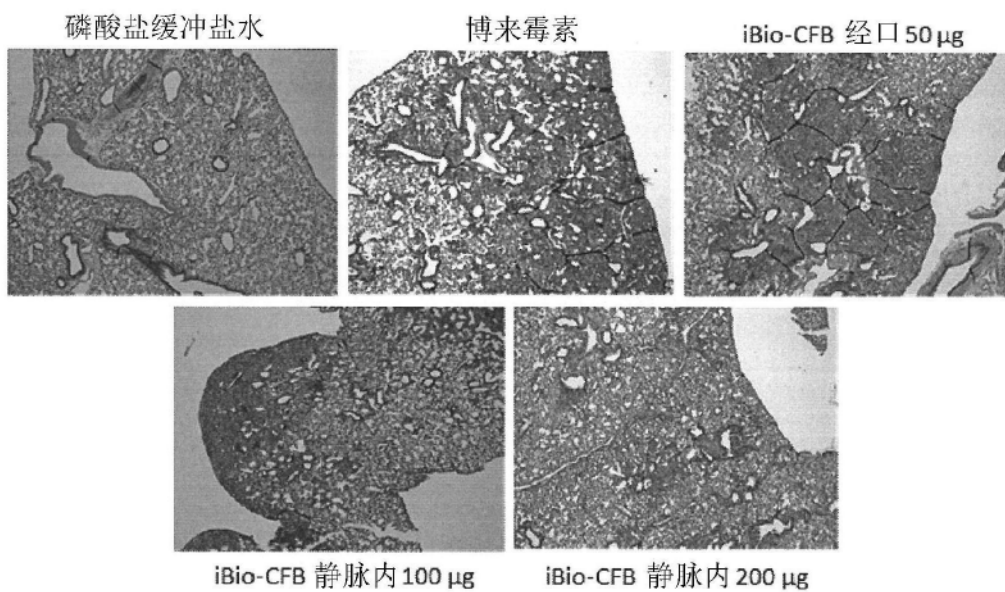


图40

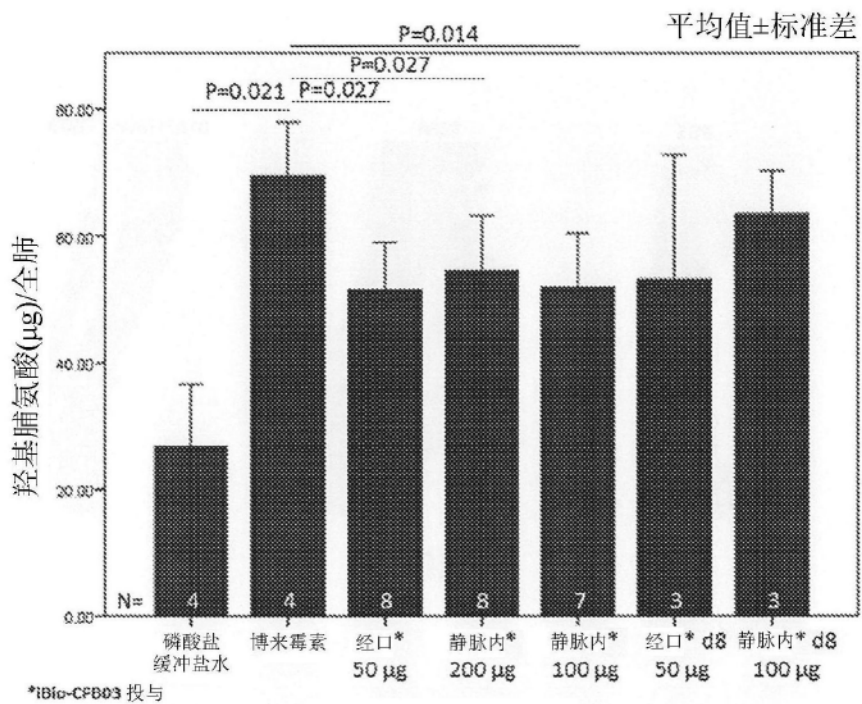


图41

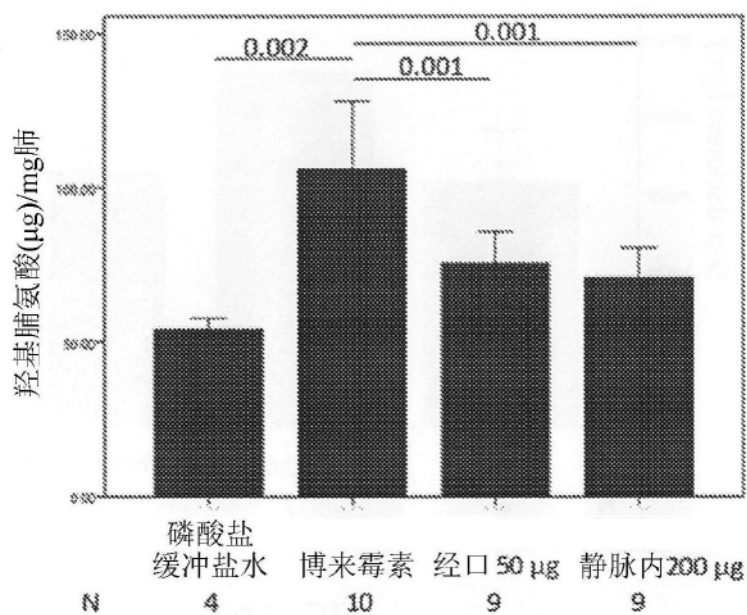


图42

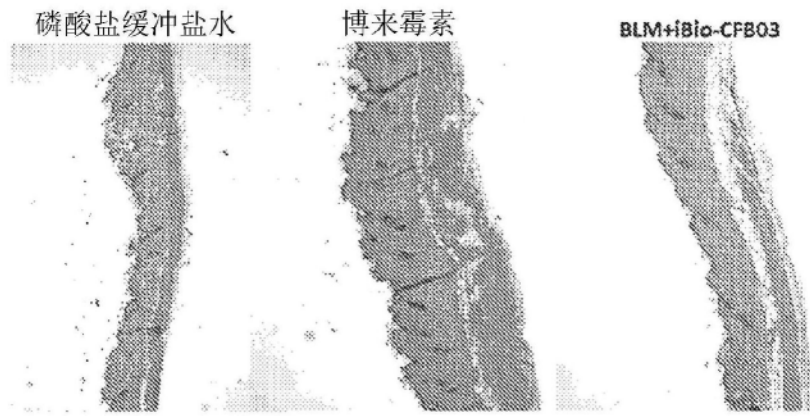


图43

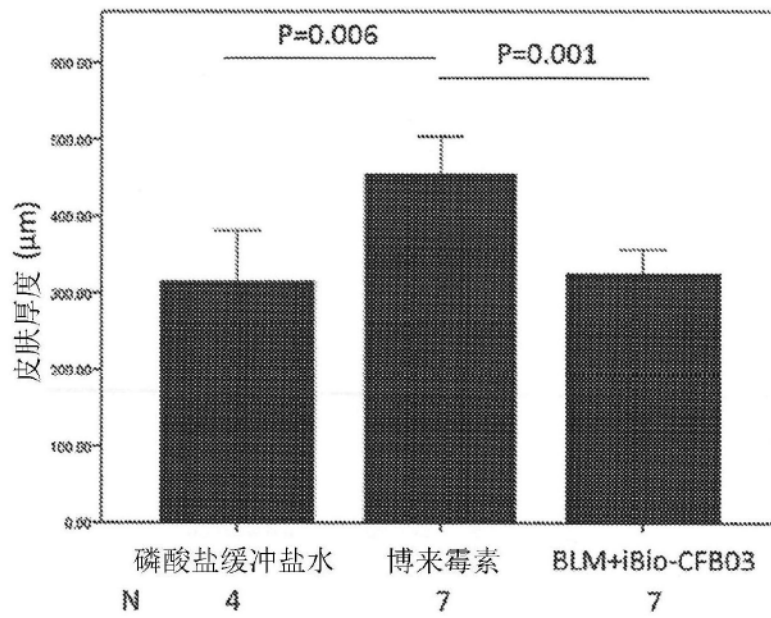


图44

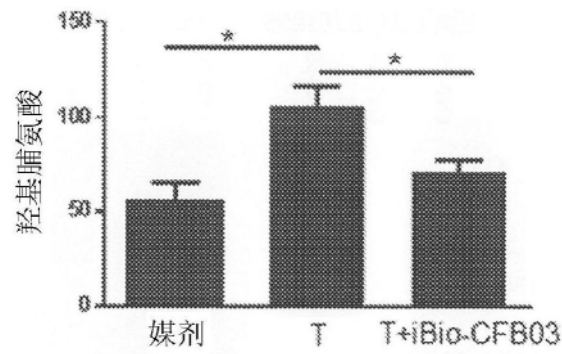


图45

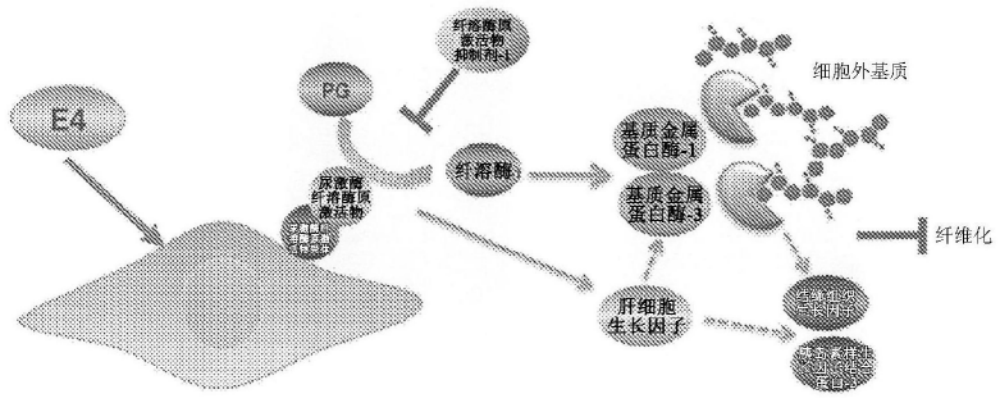


图46

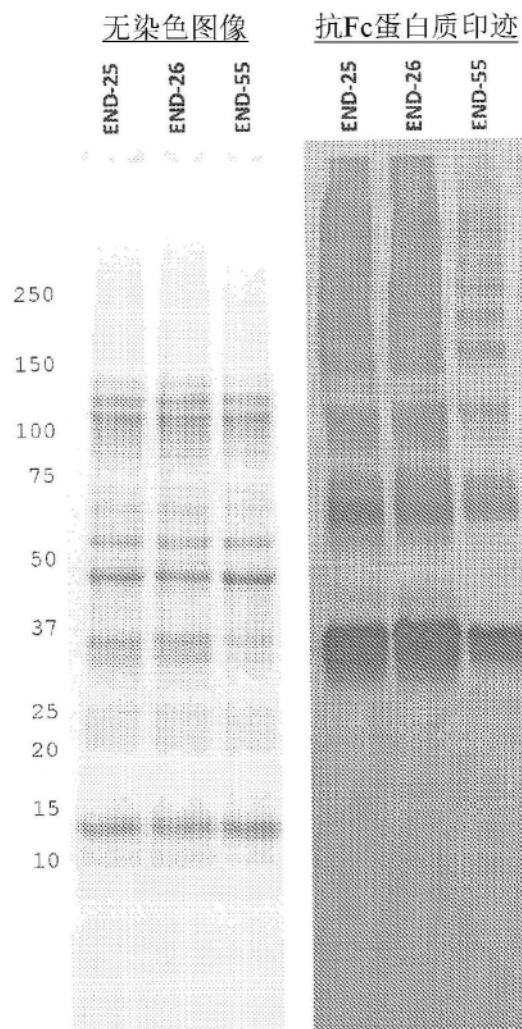


图47

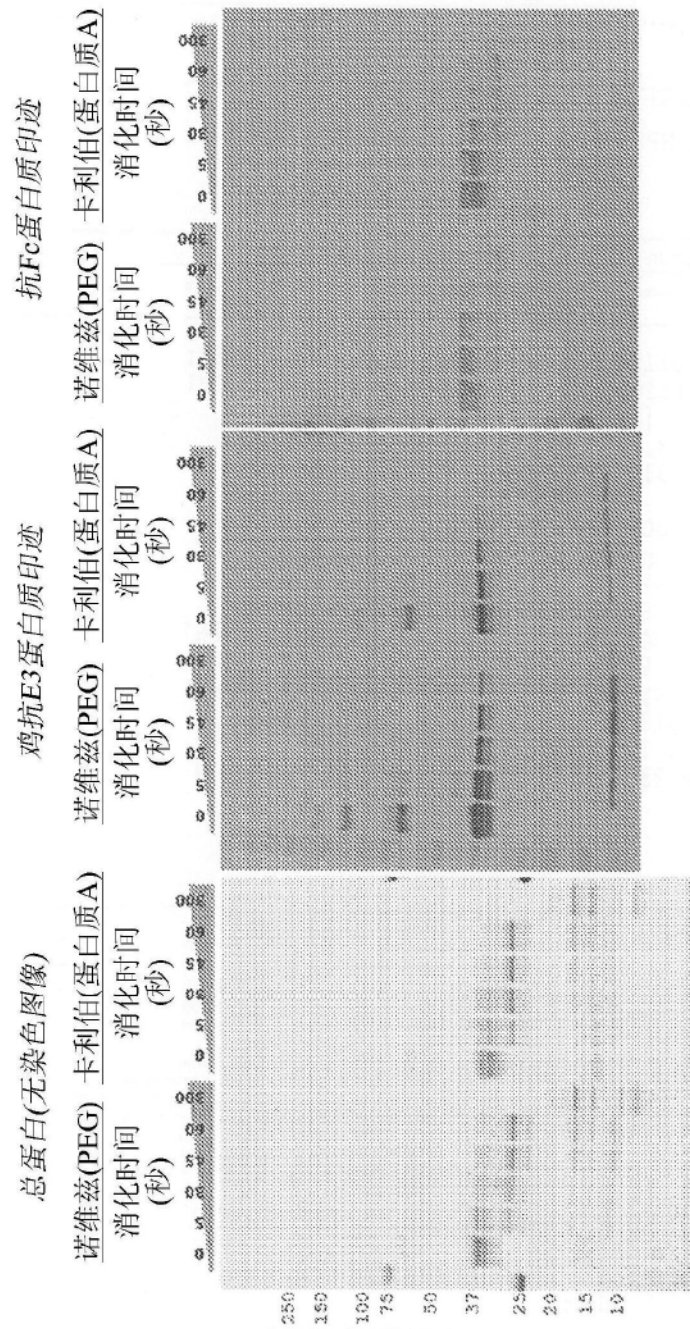


图48