



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119157997 A

(43) 申请公布日 2024. 12. 20

(21) 申请号 202411324616.4

(22) 申请日 2019.01.04

(30) 优先权数据

62/614,262 2018.01.05 US

16/184,129 2018.11.08 US

(62) 分案原申请数据

201980017176.9 2019.01.04

(71) 申请人 OP-T有限责任公司

地址 美国科罗拉多州

(72) 发明人 D·H·小瓦格纳 M·G·尤斯曼

C·W·亨利

(74) 专利代理机构 广州川墨知识产权代理事务

所(普通合伙) 44485

专利代理师 温建洲

(51) Int.Cl.

A61K 38/07 (2006.01)

A61K 38/08 (2019.01)

A61K 38/16 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

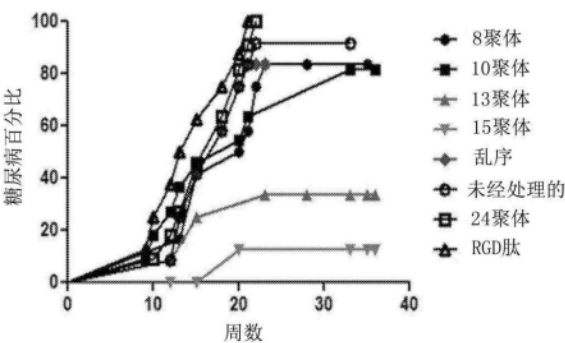
权利要求书1页 说明书37页 附图21页

(54) 发明名称

治疗自身免疫相关疾病的治疗性肽和方法

(57) 摘要

预防和调节动脉粥样硬化的方法和材料,特别是能够与CD40相互作用,从而干扰CD40与CD154相互作用的能力的小肽,其影响炎症和动脉粥样硬化。此类肽在减少动脉粥样硬化,特别是自身免疫炎症反应中的用途,可以是其驱动因素。使用此类短肽降低LDL胆固醇。检测表达CD40的T细胞(Th40细胞)的方法和材料。预防、调节、减少和/或逆转2型糖尿病和自身炎症性疾病的方法和材料。特别地,能够与CD40相互作用从而干扰CD40与CD154相互作用的能力的小肽,其影响炎症和2型糖尿病。此类肽在减少2型糖尿病,尤其是自身免疫炎症反应中的用途,可以是其驱动因素。使用此类短肽降低IL2、INF γ 和IL17a。使用此类肽增加葡萄糖转运蛋白(GLUT4)。检测表达CD40的T细胞(Th40细胞)的方法和材料。



1. 包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的肽,其用于预防、减少、治疗和/或逆转受试者中的2型糖尿病的方法,所述方法包括向受试者施用有效量的肽,其中肽的长度不超过25个氨基酸,并且通过抑制CD40与CD154的结合来影响CD40与CD154/CD40配体的相互作用。

2. 根据权利要求1所述的使用的肽,其中所述肽以不超过 10^{-6} M的Kd结合至CD40蛋白,可选地,其中所述肽在CD40与CD154相互作用的位点结合至CD40。

3. 根据前述权利要求中任一项所述的使用的肽,其中施用所述肽以防止Th40细胞扩增的方式影响CD40与CD154的相互作用,可选地,其中患者中的Th40细胞数目减少。

4. 根据前述权利要求中任一项所述的使用的肽,其中施用所述肽以改变被施用所述肽的受试者中的细胞群的细胞因子表达谱的方式影响CD40与CD154的相互作用。

5. 根据前述权利要求中任一项所述的使用的肽,其中所述肽包含选自SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:27组成的组的氨基酸序列。

6. 根据前述权利要求中任一项所述的使用的肽,其中所述肽由选自SEQ ID NO:4-9和24-30组成的组的氨基酸序列组成。

7. 根据前述权利要求中任一项所述的使用的肽,其中在施用肽后,受试者不产生对肽和/或CD154和/或GLUT 4有响应的自身抗体,并且可选地,其中受试者的T细胞不引起T细胞抗原回忆。

8. 根据前述权利要求中任一项所述的使用的肽,其中所述肽是使用选自以下的递送方法进行施用:肌肉内(IM)递送、静脉内(IV)递送、皮下(SC)递送、口服递送、管饲递送、排泄/皮肤递送或透皮贴剂。

9. 根据前述权利要求中任一项所述的使用的肽,其中所述肽是使用选自以下的扩展递送方法施用:可植入装置、亲水性聚合物制剂、可渗透性聚合物膜、可注射凝胶植入物、溶剂萃取系统、相转化系统、热敏凝胶、pH依赖原位凝胶、微粒、微球、纳米颗粒、纳米球、生物可降解的植入物或光活化仓库。

10. 根据前述权利要求中任一项所述的使用的肽,其中所述肽以足够减少或抑制干扰素- γ (IFN- γ)、白细胞介素-2(IL-2)和/或白细胞介素-17(IL-17)信号传导的量施用,其中INF- γ 、IL-2和/或IL-17信号传导与受试者中的2型糖尿病相关。

11. 根据前述权利要求中任一项所述的使用的肽,其中受试者患有2型糖尿病。

12. 根据权利要求11所述的使用的肽,其中施用治疗有效量的肽。

治疗自身免疫相关疾病的治疗性肽和方法

[0001] 本申请是申请号为201980017176.9,申请日为2019年1月4日,发明名称为“治疗性自体相关疾病的治疗性肽和方法”的分案申请。

技术领域

[0002] 本公开涉及在需要治疗有效量的抑制CD40和CD154相互作用的肽的受试者中预防、调节和减少心血管疾病和/或动脉粥样硬化的方法或用途,以及此类化合物在调节T细胞活性和治疗疾病中的用途。此外,本公开涉及通过施用治疗有效量的抑制、破坏、阻断和/或改变CD40和CD154的相互作用的CD40结合肽来预防、调节、减少、治疗和/或逆转2型糖尿病和/或自身炎症性疾病的方法。

背景技术

[0003] 自身免疫性疾病是由对正常身体部位的异常免疫反应引起的病状。由于免疫系统攻击身体自己的器官、组织和细胞,因此会发生超过80种疾病。1型糖尿病、类风湿关节炎、系统性红斑狼疮和炎症肠病是常见的自身免疫性疾病,影响广泛范围的整个人群。值得注意的是,上述自身免疫性疾病折磨着大量人,影响其日常生活和活动,并需要大量的金钱和医疗资源、医疗保健提供者的时间和护理。

[0004] 根据世界卫生组织(WHO),2015年估计有1770万人死于心血管疾病(CVD),占全球所有死亡人数的31%。CVD也可称为心脏和血管疾病,其包括许多问题,其中许多与称为动脉粥样硬化的过程有关。此外,根据由医疗研究与质量局(AHRQ)赞助的医疗成本与利用项目(HCUP),2011年,仅冠状动脉粥样硬化就占了超过104亿美元的医院成本。因此,2011年,仅冠状动脉粥样硬化就成为美国住院治疗最昂贵的十种疾病之一。

[0005] 心血管疾病和动脉粥样硬化

[0006] 动脉粥样硬化是由可能导致心脏病发作和中风的动脉斑块形成所定义。动脉斑块的形成是由细胞、物质、废物和细胞碎片的沉积引起的,包括但不限于:胆固醇、死细胞、树突状细胞、泡沫细胞、巨噬细胞、肥大细胞、单核细胞、平滑肌细胞、T-细胞、胶原蛋白、钙和纤维蛋白。动脉壁和斑块内的炎症变化可能在动脉粥样硬化疾病的发展中起关键和诱因作用。因此,已经研究了动脉粥样硬化作为自身免疫和炎症疾病的概念;但是,尚未建立治疗控制。目前针对自身免疫、炎症、心血管疾病和死亡的其他方面的临床试验强调了控制炎症的重要性。

[0007] 例如,CIRT(心血管炎症减少试验)正在尝试使用甲氨蝶呤靶向白介素6(IL-6),以测试甲氨蝶呤是否会降低2型糖尿病患者冠状动脉疾病患者的心肌梗塞、中风和心血管死亡的发生率。另一个示例包括CANTOS(卡那单抗(canakinumab)抗炎性血栓形成结果研究),其正在研究卡那单抗是否可以阻断促炎性细胞因子白介素-1 β (IL-1 β)以降低处于高风险的心脏病发作患者的复发性心肌梗塞、中风率和心血管死亡率。炎症生物标志物高敏C反应蛋白(hsCRP)水平升高可界定这种风险。这些研究承认,炎症在动脉粥样硬化血栓形成和动脉粥样硬化中起着至关重要的作用;然而,这些研究还认识到,抑制炎症本身是否会降低血管

事件率尚不清楚。

[0008] 哺乳动物和人动脉粥样硬化病变的特征是包含单核细胞、巨噬细胞、内皮细胞、平滑肌细胞、血小板和T细胞的血管壁的慢性炎性纤维增生性疾病。这些细胞类型中的每一种都可以表达CD40/CD154共刺激对中的一个或两个。该二分体负责增强免疫反应,并可能导致许多慢性炎性疾病,包括类风湿性关节炎、多发性硬化症和1型糖尿病(T1D)。但是,对于这种高度致动脉粥样硬化的二分体不存在可行的疗法。

[0009] 当炎症细胞(如嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、肥大细胞、巨噬细胞、血小板和内皮细胞)对炎症事件或有害刺激(如入侵微生物、受损细胞或其他刺激物)作出反应时,可能会发生炎症。人体的炎症反应是有益的,因为例如在入侵微生物的情况下,炎症反应是定位感染剂被免疫系统清除的重要步骤。然而,在自身免疫中没有感染,但是存在或持续存在严重炎症。在这种情况下,这种炎症被称为无菌慢性炎症(ACI),因为它会破坏正常组织,因此是有害的。这种无菌炎症的结果改变生命,在某些情况下甚至危及生命。而且,与急性炎症一样,该过程由免疫细胞(包括T细胞)介导。

[0010] 现代医学的主要关注点是如何控制例如自身免疫疾病期间发生的ACI,以及如何控制由创伤引起的急性炎症。慢性和急性炎症都会导致组织变性,并最终导致主要器官功能丧失。ACI不仅限于单一疾病,而且在许多自身免疫性疾病中起重要作用,包括但不限于:1型糖尿病(T1D)、多发性硬化症(MS)、系统性红斑狼疮(SLE)、类风湿性关节炎(RA)、克罗恩病(Crohn's disease)、炎性肠病(IBS)、包括自身免疫性哮喘类型的慢性阻塞性肺病(COPD)、动脉粥样硬化、血管炎、高血压、甲状腺炎(包括桥本氏病(Hashimoto's disease)和格雷夫斯病(Graves diseases))、原发性胆汁性肝硬化、佩吉特氏病(Paget's disease)、艾迪生氏病(Addison's disease)、急性呼吸窘迫综合征(ARDS)、急性肺损伤和器官移植相关性无菌慢性炎症(ACI)。

[0011] 自身免疫性疾病分为两种类型:器官特异性(主要针对一个器官)和非器官特异性(广泛分布于全身)。器官特异性自身免疫性疾病的实例是影响胰腺的胰岛素依赖型1型糖尿病(T1D);影响甲状腺的桥本氏甲状腺炎和格雷夫斯病;影响血液的恶性贫血;影响肾上腺的艾迪生氏病;影响肝脏的慢性活动性肝炎;影响肌肉的重症肌无力;影响神经系统组织的多发性硬化症(MS)。非器官特异性自身免疫性疾病的一个示例是类风湿性关节炎(RA)。自身免疫性疾病通常是慢性的、使人衰弱并危及生命。国立卫生研究院(NIH)估计,多达2350万美国人患有自身免疫性疾病,而且患病率正在上升。据估计,自身免疫性疾病是所有65岁以下年龄段妇女死亡的十大主要原因之一。

[0012] 在创伤或败血症期间观察到的急性炎症也是免疫细胞介导的。虽然尚未确定该过程中分子介体的全面、完整和详尽的清单,但强烈暗示了T细胞、淋巴细胞、嗜中性粒细胞、巨噬细胞、单核细胞、嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、肥大细胞和其他炎症细胞的重要作用。因此,调节这些细胞类型的过程可以控制炎症反应。

[0013] 2型糖尿病

[0014] CD40-CD154二分体构成在1型糖尿病(Waid DM,et al.Clin.Immunol.(2007)124(2):138-148)中期重要作用的主要的炎症途径(Schonbeck U,et al.Cell Mol.Life Sci.(2001)58(1):4-43)。历史上和科学上,2型糖尿病(T2D)基本上被归类为代谢性疾病;但是,2型糖尿病正在被重新定义为自身免疫性疾病,而不仅仅是代谢性疾病(Winer,D,et

al.Nature Medicine(2011)17:610-617)。

[0015] 根据美国疾病控制中心《2017年全国糖尿病统计报告》(可获自<https://www.cdc.gov/diabetes/pdfs/data/statistics/national-diabetes-statistics-report.pdf>),估计2015年所有年龄段的人口为3030万人,占美国人口的9.4%。估计有2300万人(或美国人口的7.2%)被诊断出患有糖尿病,而诊断出患有糖尿病的人中约有95%患有2型糖尿病。根据空腹血糖水平,2型糖尿病病例中有三分之一至一半未诊断和未治疗(Harris MI,Diabetes Care.(1998) 21[Suppl.3:C11-C14];Howard BV,et al.,Circulation.2002;105:e132-e137;Grundy SM,et al.,Circulation.1999;100:1134-1146)。

[0016] 尽管2型糖尿病最常发生在超过45岁的人群中,但从2001年到2009年,美国青年中2型糖尿病增加了21%,一项名为“青年糖尿病搜索”的大型研究发现,在2002年至2012年的研究期间,儿童和青少年中新诊断出的2型糖尿病每年增长约4.8% (“Rates of new diagnosed cases of type 1 and type 2 diabetes on the rise among children, teens”,国立卫生研究院,2017年4月13日,可获自<https://www.nih.gov/news-events/news-releases/rates-new-diagnosed-cases-type-1-type-2-diabetes-rise-among-children-teens>)。

[0017] 主要合并症使糖尿病复杂化,最常见的是心血管疾病(每千人中70.4例),包括患有缺血性心脏病和中风的人。总体而言,2012年,美国糖尿病协会估计,美国直接和间接的总费用估计为2450亿美元,其中包括1760亿美元的直接医疗费用和690亿美元的生产力下降(Yang,W.American Diabetes Association,2013,Diabetes Care,36(4):1033-46)。

[0018] 1型和2型糖尿病都是冠状动脉疾病(CAD)、中风和周围动脉疾病的强大且独立的危险因素(Schwartz CJ,et al.Diabetes Care.(1992) 15:1156-1167;Stamler,J.et al.Diabetes Care.(1993) 16:434-444;Beckman JA,et al.,Diabetes and atherosclerosis:epidemiology,pathophysiology,and management.JAMA(2002) 287:2570-2581)。动脉粥样硬化占北美糖尿病患者死亡总数的65%至80%,而在整个北美人群中,占全部死亡总数的33%(美国糖尿病协会.Diabetes Care.(1993) 16:72-78)。因此,从公共卫生的角度来看,有效且可以长期耐受的治疗方案对个人有益。理想的抗糖尿病药可以是纠正高血糖症、预防大血管并发症并纠正引起2型糖尿病(“T2D”)的病理生理障碍的药物。胰岛素抗性是T2D的基础,但最终会发生 β 细胞衰竭,胰岛素抗性和胰岛素分泌之间的失衡是进一步的并发症。因此,治疗上有益的治疗方法可能旨在逆转胰岛素抗性并改善 β 细胞功能。

[0019] T2D通常与肥胖症有关,但是遗传和环境因素在最近被描述为疾病的诱因(Comuzzie AG,Best Pract.Res.Clin.Endocrinol.Metab.(2002) 16(4):611-21.PubMed PMID:12468410;van Tilberg J.,et al.J.Med.Genet.(2001) 38(9):569-78.Pub Med PMID:11546824;PMCID:PMC 1734947)。此外,已经出现了其他研究,表明T2D与T1D一样,具有突出的炎症成分,这是T2D疾病开始、发展和进展的影响和/或驱动因素。CD40-CD154炎性二分子可作为分子驱动器来推动自身免疫炎症,影响二分体的过量水平可能是T2D的未知但有影响的因素。(Hseih CJ,et al.,Cir.J.(2009) 73(5) 948-54;Kutlu M,et al.,Clin.Invest.Med.(2009) 32(6):E244;Santilli F,et al.,J.Am.Coll.Cardiol.(2006) 47

(2):391-7;Santini,E,et al.J.Endocrinol Invest.2008;31(7):660-5;Varo N,et al., Circulation.2003;107(21):2664-9)。

[0020] 一般而言,当炎症细胞(如嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、肥大细胞、巨噬细胞、血小板、内皮细胞、以及包括但不限于T细胞和B细胞的淋巴细胞)对炎症事件或有害刺激(如入侵微生物、受损细胞或其他刺激物)作出反应时,可能会发生炎症。人体的炎症反应是有益的,因为例如在入侵微生物的情况下,炎症反应是定位感染剂被免疫系统清除的重要步骤。然而,在自身免疫中没有感染,但是存在或持续存在严重炎症。在这种情况下,这种炎症被称为无菌慢性炎症(ACI),因为它会破坏正常组织,因此是有害的。这种无菌炎症的结果改变生命,在某些情况下甚至危及生命。而且,与急性炎症一样,该过程由免疫细胞(包括T细胞)介导。

[0021] 现代医学的主要关注点是如何控制例如自身免疫疾病期间发生的ACI,以及如何控制由创伤引起的急性炎症。慢性和急性炎症都会导致组织变性,并最终导致主要器官功能丧失。ACI不仅限于单一疾病,而且在许多自身免疫性疾病中起重要作用,包括但不限于:1型糖尿病(T1D)、多发性硬化症、系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎、克罗恩病、炎性肠病、包括自身免疫性哮喘类型的慢性阻塞性肺病、动脉粥样硬化、血管炎、高血压、甲状腺炎(包括桥本氏病和格雷夫斯病)、原发性胆汁性肝硬化、佩吉特氏病、艾迪生氏病、急性呼吸窘迫综合征、急性肺损伤和器官移植相关性ACI。

[0022] 自身免疫性疾病分为两种类型:器官特异性(主要针对一个器官)和非器官特异性(广泛分布于全身)。器官特异性自身免疫性疾病的实例是影响胰腺的胰岛素依赖型1型糖尿病(T1D);影响甲状腺的桥本氏甲状腺炎和格雷夫斯病;影响血液的恶性贫血;影响肾上腺的艾迪生氏病;影响肝脏的慢性活动性肝炎;影响神经和肌肉交界处的受体的重症肌无力;影响神经系统组织的多发性硬化症。非器官特异性自身免疫性疾病的一个示例是类风湿关节炎。自身免疫性疾病通常是慢性的、使人衰弱并危及生命。国立卫生研究院(NIH)估计,多达2350万美国人患有自身免疫性疾病,而且患病率正在上升。据估计,自身免疫性疾病是所有65岁以下年龄段妇女死亡的十大主要原因之一。

[0023] 在创伤或败血症期间观察到的急性炎症也是免疫细胞介导的。虽然尚未确定该过程中分子介体的全面、完整和详尽的清单,但强烈暗示了T细胞、淋巴细胞、嗜中性粒细胞、巨噬细胞、单核细胞、嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、肥大细胞和其他炎症细胞的重要作用。因此,调节这些细胞类型的过程可以控制炎症反应。

[0024] 已显示独特的T细胞亚群在自身免疫性疾病的发展中起重要作用。这些细胞在表型上表征为CD41^{lo}CD40⁺(Waid,D.M.,et al.,Eur.J.of Immunol.,34:1488,2004;Vaitaitis,G.M.,et al.,Cutting Edge,J.Immunol.,170:3455,2003;Wagner,D.H.,Jr.,et al.,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA,99:3782,2002;Wagner,D.H.,Jr.,et al.,Int'l J.of Mol.Med.4:231,1999),并称为Th40细胞(Waid,D.M.,et al.(2004)Eur.J.of Immunol.34:1488;Vaitaitis,G.M.,et al.,Cutting Edge,J.Immunol.170:3455,2003;Wagner,D.H.,Jr.,et al.,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA99:3782,2002;Wagner,D.H.,Jr.,et al.,Int'l J.of Mol.Med.4:231,1999)。CD40的表达通常与抗原呈递细胞有关,并且大多数现有技术描述CD40在B细胞、巨噬细胞、单核细胞和其他细胞上表达;然而,CD40蛋白也在T细胞上表达(Waid,D.M.,et al.,2004.Eur.J.of Immunol.,34:1488,2004;Vaitaitis,G.M.,et

al., Cutting Edge, J. Immunol., 170:3455, 2003; Wagner, D.H., Jr., et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 99:3782, 2002; Wagner, D.H., et al., Int'l J. of Mol. Med., 4:231, 1999; Bourgeois, C., et al., Science, 297:2060, 2002; Fanslow, W.C., et al., J. of Immunol., 152:4262, 1994; Ramsdell, F., et al., J. of Immunol. 152:2190, 1994; Grabstein, K.H., et al., J. of Immunol., 150:3141, 1993; Armitage, R.J., et al., Sem. in Immun., 5:401, 1993; Cooper, C.J., et al., J of Immunol., 173:6532, 2004)。尽管Th40细胞在幼稚的非自身免疫小鼠(Waid, D.M., et al., Eur. J. of Immunol., 34:1488, 2004; Wagner, D.H., Jr., et al., Int'l J. of Mol. Med., 4:231, 1999)和在人(Waid, D.M., et al., Clin. Immunol. 124:138, 2007)中构成了一部分外周CD4+区域,在易发自身免疫的小鼠(Waid, D.M., et al., Eur. J. of Immunol. 34:1488, 2004; Wagner, D.H., Jr., et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 99:3782, 2002; Wagner, D.H., et al., Int'l J. of Mol. Med., 4:231, 1999)和人(Waid, D.M., et al., Eur. J. of Immunol. 34:1488, 2004; Waid, D.M., et al., Clin. Immunol. 124:138, 2007; Waid, D.M., et al., Clin. Immunol. 124:138, 2007)中,这一比例急剧增加至CD4+区域的50%。这些T细胞不表达早期激活标志物,并出现在未激发小鼠的幼稚表型中。

[0025] 在NOD(非肥胖型糖尿病)小鼠中,甚至在糖尿病发作之前,脾脏、淋巴结和胰腺中的Th40细胞的含量都过高(Waid, D.M., et al., Eur. J. of Immunol. 34:1488, 2004; Wagner, D.H., Jr., et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 99:3782, 2002)。与非自身免疫对照组和2型糖尿病患者相比,在1型糖尿病(T1D)患者的外周血中发现这些T细胞的数量和百分比升高(Waid, D.M., et al., Clin. Immunol., 124:138, 2007)。

[0026] 观察到的Th40细胞增加可能意味着那些T细胞对抗原有反应或CD40表达被诱导激活。此外,几个致糖尿病的T细胞克隆是CD40+ (Wagner, D.H., Jr., et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 99:3782, 2002)。从NOD小鼠和糖尿病前NOD(12周龄)小鼠中纯化的Th40原代细胞成功地将1型糖尿病转移至NOD/scid(非肥胖型糖尿病/重症联合免疫缺陷)受体小鼠,直接证明了Th40 T细胞亚群的致病性(Waid, D.M., et al., Eur. J. of Immunol. 34:1488, 2004; Wagner, D.H., Jr., et al., 2002. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 99:3782, 2002)。已经显示, Th40细胞渗透到胰岛 β 细胞中,破坏了胰岛素的产生,由此提示了胰岛抗原的特异性(Waid, D.M., et al., Eur. J. of Immunol. 34:1488, 2004; Wagner, D.H., Jr., et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 99:3782, 2002)。还显示出Th40细胞是糖尿病转移所需的。CD40耗竭,然后CD25, Treg耗竭的外周(脾和区域淋巴结)T细胞无法将糖尿病转移至Scid(重症联合免疫缺陷)接受者。即使除去Treg细胞,如果不存在自体攻击性CD40+T细胞亚群,也不会发生疾病转移。

[0027] 尽管Th40细胞在自身免疫的发展中是重要的,但另一个重要因素是CD40配体CD154的表达。响应于CD3/TCR刺激,在活化的T细胞上暂时诱导CD154(Lederman, S. et al., J. of Exp. Med., 175:1091, 1992)。还已经在血小板、单核细胞、嗜碱性粒细胞、嗜酸性粒细胞、树突细胞、成纤维细胞、平滑肌和内皮细胞上证实了CD154表达(Russo, S. et al., J. Immunol. 171:5489, 2003; Stumpf, C., et al., Eur. J. Heart Fail., 5:629, 2003; Schonbeck, U., et al., Cell Mol. Life Sci. 58:4, 2001)。CD154是肿瘤坏死因子(TNF)超家族的成员,并且已经描述了CD154的可溶形式(sCD154)(Russo, S., et al., J. Immunol. 171:5489 2003; Stumpf, C., et al., Eur. J. Heart Fail 5:629, 2003; Toubi, E., et al.,

Autoimmunity 37:457, 2004)。因此, sCD154可能起细胞因子的作用(Stumpf, C., et al., Eur. J. Heart Fail. 5:629, 2003)。即使CD154在T1D研究中尚未遗传关联, sCD154在T1D中显著升高, 并可能在疾病过程中起作用(Varo, N. et al., Circulation 107:2664, 2003; Cipollone, F., et al., Diabetologia 48:1216, 2005; Devaraj, S., et al., Diabetes 55:774, 2006)。已经确定了CD40-CD154相互作用在自身免疫中的重要性(Wagner, D.H., Jr., et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 99:3782, 2002; Kobata, T., et al., Rev. Immunogenet. 2:74, 2000; Homann, D., et al., Immunity 16:403, 2002; Goodnow, C.C., et al., Lancet 357:2115, 2001; Balasa, B., et al., J. of Immunol. 159:4620, 1997)。阻断CD40-CD154相互作用在NOD小鼠模型中可预防的胶原诱导的关节炎(Durie, F.H., et al., Science 281:1328, 1993)、实验性自身免疫性脑炎(Howard, L.M., et al., Autoimmunity 37:411, 2004)、前列腺炎(Grossman, M.E., et al., J. Immunother. 24:237, 2001)和1型糖尿病(Durie, F.H. et al., Science 281:1328, 1993; Balasa, B. et al., Journal of Immunology 159:4620, 1997; Howard, L.M., et al., Autoimmunity 37:411, 2004; Grossman, M.E. et al., J. Immunother. 24:237, 2001)。在糖尿病模型中, 必须在3周龄时向NOD小鼠施用CD154阻断抗体, 因为在9周时, 阻断抗体对糖尿病的预防没有作用(Balasa, B. et al., J. of Immunol. 159:4620, 1997)。

[0028] 先前的工作还证明, 当CD40参与时(Vaitaitis, G.M. et al., Cutting Edge, J. Immunol. 170:3455, 2003), Th40细胞亚群诱导RAG1和RAG2(重组激活基因)的转录、翻译和核易位(Vaitaitis, G.M., et al., Cutting Edge, J. Immunol. 170:3455, 2003)。CD3的参与不会在T细胞中诱导RAG1或RAG2(Vaitaitis, G.M., et al., Cutting Edge, J. Immunol. 170:3455, 2003)。RAG1/RAG2诱导后, 外周T细胞中发生CD40介导的T细胞受体(TCR)修正(Vaitaitis, G.M. et al., Cutting Edge, J. Immunol. 170:3455, 2003)CD40诱导的TCR修正取决于RAG。从TCR-Tg小鼠分离的T细胞在CD40参与时进行TCR修正, 但从TCR-Tg. RAG-/-小鼠分离的T细胞在CD40参与时没有TCR修正(Wagner, D.H., Jr. et al., Int'l J. of Mol. Med. 4:231, 1999)。

[0029] CD40是肿瘤坏死因子受体(TNF-R)家族的50-kDa整合膜蛋白。它组成上表示为同三聚体(Foy TM, et al., Ann. Rev. of Immunol., 14:591, 1996)。一般而言, 所有表达CD40的细胞类型的刺激都会诱导导致炎症的操作, 例如增强共刺激分子和粘附分子、以及蛋白水解酶的上调(Mach, F. et al., Atherosclerosis. 137Suppl:S89-95, 1998)。

[0030] CD40的配体-CD154是一种39-kDa的蛋白质, 属于肿瘤坏死因子(TNF)家族。CD40形成三聚体, 在三个单体的界面上结合CD154。CD154通常在表面表达的CD154以外的细胞上表达, 因为CD154也可能以激活后从细胞表面脱落的可溶性生物活性形式(sCD154)存在。sCD154的主要来源是血小板。(Foy TM, et al., Ann. Rev. of Immunol., 14:591, 1996)。

[0031] 由于野生型小鼠通常对动脉粥样硬化的发展和进展具有高度的抗性, 因此将基因操纵的小鼠模型用于与动脉粥样硬化和心血管疾病有关的研究和开发。先前的研究试图通过使用单克隆抗体来阻断CD40/CD154的相互作用, 这种方法在利用ApoE-/-或LDLR缺陷型动脉粥样硬化模型的多个小鼠模型研究中被证明是有效的。此外, 用CD154缺失构建的这些相同的小鼠模型的总体斑块形成明显减少, 也可能有助于产生更稳定的斑块表型。在临床上, 稳定的斑块是可识别的, 并表现为胶原和平滑肌含量增加, 纤维帽厚, T细胞、巨噬细胞

的明显减少,以及脂质积聚。

[0032] 基因操纵的小鼠模型被用于有关T2D的研究和开发,因为小鼠模型可以描绘胰岛素抗性和 β 细胞无法充分补偿,这是人T2D的特征。许多动物模型,包括用于T2D的小鼠模型都是肥胖的,反映了肥胖与T2D发展密切相关的人类状况。

[0033] 已经提出了多种治疗方案来解决和控制慢性和急性炎症。许多方法使用非甾体抗炎药(NSAIDS)攻击白细胞三烯和前列腺素的产生,白细胞三烯和前列腺素是引起局部炎症的细胞产物。其他方法使用更强大的免疫抑制剂药物,例如环磷酰胺、甲氨蝶呤和咪唑硫嘌呤,它们抑制免疫反应并阻止疾病的进展。还有其他治疗涉及使用单克隆抗体(mAb),该单克隆抗体被设计为改变对自身组织的免疫反应,如自身免疫性疾病。但是,所有这些治疗通常都具有严重的长期副作用。

[0034] 当前的免疫调节疗法可能依赖单克隆抗体治疗,这可能会引起并发症。例如,施用于受试者的抗体可能与意想不到的靶标发生交叉反应并引起严重的肾病并发症,那些特异性针对CD154的抗体可能引起栓塞并发症。此外,CD40-CD154相互作用可能在抗体生成中起重要作用,这可能表明单克隆抗体的施用可能诱导自身抗体生成和进一步的并发症,其可能抑制正常免疫功能的恢复(通常参见Banchereau,J.et al.,Annu.Rev.of Immunol.12:881,1994)。

[0035] 其他研究表明,通过使用单克隆抗体阻断CD154相互作用,或通过单克隆抗体限制CD40受体,可以消除动脉粥样硬化,并可以赋予以炎症和纤维化程度更高为特征的更有利的斑块表型。这些研究还表明,通过阻断CD154相互作用可以限制新生内膜形成和再狭窄。有关狼疮肾炎的研究可能已经表明,阻断CD40介导的信号可以减少抗双链DNA(抗dsDNA)抗体。而且,这些研究可能表明,抗dsDNA的降低与血清补体水平的提高和肾小球炎症的降低有关,这可以从临床的角度来看。但是,由于血栓栓塞事件(可能与CD154在血栓稳定中的功能有关),放弃了使用靶向CD40/CD154二分体的单克隆抗体。据推测,CD154通过与整联蛋白 α IIb β 3相互作用而稳定血栓,并且通过抑制CD154,血栓可能较不稳定,因此脱落的栓子引起血栓形成事件。

[0036] 还进行了小分子研究以试图抑制T细胞活化和有效免疫应答发展所需的重要CD40-CD154共刺激相互作用。例如,研究了苏拉明(一种对称的多磺化萘胺-苯甲酰胺脲衍生物)抑制CD154与其受体结合并阻止CD154诱导的人B细胞增殖的能力。然而,它具有许多可逆的毒性(嗜睡、皮疹、疲劳、贫血、高血糖、低血钙、凝血障碍、中性粒细胞减少症、肾和肝并发症)(Kaur,M.等人(2002年),Invest.New Drugs 20(2):209-19),在富含蛋白质的培养基中失去活性以及对正刺激机制的干扰(Margolles-Clark,E.et al.(2009) Biochem.Pharmacol.77(7):1236-45)使其与其他相关小分子候选人不太可能获得有效治疗CD40-CD154 dyad的资源。

[0037] 关于原发灶和不同组织的相对重要性,肝脏以及诸如脂肪、肌肉和胰岛 β 细胞等外周组织的代谢缺陷,都可能导致2型糖尿病的不确定性。高血糖症本身尚未完全理解,复杂且受遗传和环境影响所困扰,据信高血糖本身会阻碍胰腺 β 细胞功能(Cernea,S.等人 Biochem.Med.(Zagreb)2013;23(3):266-80)。

[0038] 因此,人类中的2型糖尿病通常是通过一系列破坏性的阶段性或阶段性发展而发展的。最初,糖尿病前期的特征是葡萄糖耐量受损,其中人体在进餐后难以清除葡萄糖(餐

后高血糖)和/或机体对胰岛素的敏感性可能降低。在第二阶段或第二阶段,会发生餐后高血糖和基础性高血糖,而胰腺中产生胰岛素的 β 细胞功能异常增加。在疾病进展的下一阶段,即使禁食后也会出现高血糖。最终,在疾病进展的最后阶段或终极阶段, β 细胞将不再产生和/或释放胰岛素,患者需要胰岛素替代治疗。

[0039] T2D在临床上以高血糖为特征,在病理学上以胰岛素抵抗伴有相对的胰岛素分泌障碍为特征。遗传上倾向于发展为T2D的个体可能在临床发作明显的糖尿病前15至25年或更长时间内经历胰岛素抵抗(最早可检测到的代谢缺陷)。(Kahn,CR,Diabetes。(1994)43:1066-1084)。T2D经典地已经与年龄和肥胖症相关。然而,对T2D青年的诊断增加表明,仅这两个因素并不是该疾病的唯一可靠预测因素。身体质量指数(BMI)也明显与T2D相关,但现在已将遗传因素和环境因素确定为(Wu Y,et al.Int.J.Med.Sci。(2014)11(11):1185-200.Epub 2014/09/06;Cefalu,WT,Diabetes。(2009)58(2):307-8;Donath,MY等人,Nat.Rev.Immunol。(2011)11(2):98-107)肥胖会引起炎症,肥胖或其他疾病引起的持续性炎症在T2D中可能很重要发育(Donath,MY等,Nat.Rev.Immunol。(2011)11(2):98-107;Donath,MY,Nat.Rev.Drug Discov。(2014)13(6):465-76)。

[0040] 因此,本领域中需要一种更安全,更有效的方法来治疗和预防与自身免疫和炎性途径有关的T2D和与CD40-CD154有关的二联体。本发明的发展可以通过描述治疗T2D的方法来满足这一需求。通过施用治疗有效量的CD40结合肽。

[0041] 因此,本领域中需要一种更安全,更有效的方法来治疗和预防由无菌性慢性炎症(ACI)引起的心血管疾病(CVD)和T2D。本研究成果可以通过描述治疗动脉粥样硬化的方法来满足这一需求。通过施用治疗有效量的影响、调节、阻断、抑制或调节CD40-CD154 dyad的肽。此外,本发明可以提供防止自身抗体产生的附加益处,并因此可以恢复正常的免疫功能。

[0042] 本背景说明仅出于提供信息的目的,并不旨在对所有潜在相关背景进行完整或详尽的说明。

发明内容

[0043] 本发明可以提供预防、调节和/或减少在体腔中发生的动脉粥样硬化的新方法。动脉粥样硬化可能是由于动脉壁中白细胞的慢性炎症反应而引起的。血液中的胆固醇和甘油三酸酯水平升高,高血压和吸烟可能会引起炎症反应和随后的动脉斑块积聚。

[0044] 本研究是基于CD40配体(CD154蛋白)与在T细胞(Th40细胞)上表达的CD40蛋白相互作用的知识,可能在动脉粥样硬化和自身免疫性疾病的发展中起重要作用。阐明对这种相互作用可能很重要的CD40和CD154中的关键残基。目前的发展涉及通过使用与CD40蛋白相互作用的小肽段来阻断CD40蛋白与CD154蛋白之间的相互作用。CD154蛋白通常会结合。目前的发展还涉及使用这样的肽降低Th40细胞的水平,从而降低疾病的严重性。

[0045] 本发明的一个实施例是一种预防动脉粥样硬化的方法,该方法包括使CD40蛋白与与CD40蛋白相互作用的肽接触。优选的肽可以是长度小于25个氨基酸且与CD40蛋白结合的那些肽,从而抑制其与CD154蛋白的相互作用;然而,不应将肽的长度视为对本文发展的限制,因为还有许多其他因素可能会影响肽执行其预期和期望结果的能力。

[0046] 本发明的一个实施例是一种预防、调节和/或减少动脉粥样硬化的方法,该方法包括用与CD40蛋白相互作用的肽抑制CD40蛋白和CD154蛋白之间的相互作用。优选的肽与

CD40蛋白相互作用。这些肽的长度优选小于25个氨基酸。甚至更优选的肽是选自SEQ ID NO 3-9和25-30的那些氨基酸序列。

[0047] 本发明的一个实施例是一种预防、调节和/或减少动脉粥样硬化的方法,该方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的影响CD40与CD154/CD40-配体相互作用的肽。这种发展的一个方面可能是该肽与CD40结合。在该实施例中,该肽可以与 K_d 大于 10^{-6} 的CD40蛋白结合。另外,优选的实施例可以抑制CD40与CD154的结合。此外,在该实施例中,该肽在CD40与CD154相互作用的位点结合CD40。在该实施例中,该肽影响CD40与CD154的相互作用。CD154以防止Th40细胞扩增的方式发生。在该实施例中,该肽以减少Th40细胞数量的方式影响CD40与CD154的相互作用。该肽以改变用该肽处理的细胞群的细胞因子表达谱的方式影响CD40与CD154的相互作用。

[0048] 本发明的一个实施例是一种调节和/或减少动物动脉粥样硬化的方法,该方法包括向该动物施用与CD40蛋白相互作用的肽,以调节IFN γ (干扰素 γ) 的方式。肽是与CD154结合位点上的CD40蛋白相互作用从而调节IFN γ 的肽。优选的肽通过将Th40细胞的水平降低到不超过总T细胞总数的25%来调节炎症。可以使用这种方法预防和/或减轻动脉粥样硬化和可能伴随心血管疾病的症状。

[0049] 本发明的一个实施例是一种鉴定具有发展为心血管疾病和/或动脉粥样硬化的风险的患者,该方法包括从待测患者获得含有T细胞的样品,使该样品与结合CD40蛋白的肽接触,检测CD-40结合的肽,并确定CD40结合的量中日的Th40细胞的水平,其中Th40细胞的水平大于总T细胞总数的25%表示患者处于形成风险中心血管疾病和/或形成中的动脉粥样硬化。

[0050] 本发明的又一个实施例是一种预防、调节或减少钙积累或血管壁钙化的方法,该方法包括向有此需要的受试者施用治疗有效量的在CD154结合位点特异性结合CD40呈递细胞的肽。

[0051] 本发明的另一个实施例是一种施用CD40结合肽以预防、调节和/或减少动脉粥样硬化的方法,其包括选择与CD40蛋白和CD154结合位点相互作用的肽,从包括如下的组中选择一种递送方法:肌肉(IM)递送、静脉内(IV)递送、皮下(SC)递送、口服递送、管饲递送、润肤剂/皮肤递送或透皮贴剂。

[0052] 本发明的另一个实施例是一种施用CD40结合肽以预防、调节和/或减少动物动脉粥样硬化的方法,其包括使用选自包括如下的组来选择与CD40蛋白和CD154结合位点相互作用的肽:亲水聚合物制剂、可渗透聚合物膜、可注射凝胶植入物、溶剂提取系统、相转化系统、热敏凝胶、pH依赖原位凝胶、微粒、微球、纳米颗粒、纳米球、可生物降解的植入物或光活化仓库。

[0053] 本发明的另一个实施例是一种降低受试者中LDL胆固醇的方法,该方法包括向有此需要的受试者施用治疗有效量的在CD154结合位点特异性结合CD40呈递细胞的肽。

[0054] 本发明可以提供预防、调节、减少、治疗和/或逆转在体内发生的T2D的新颖方法。此外,本文公开的开发是可以另外用于疾病、病症和病状,尤其是免疫和炎症疾病的预防、控制和治疗T2D的治疗方法。

[0055] 本研究是基于CD40配体(CD154蛋白)与在T细胞(Th40细胞)上表达的CD40蛋白相互作用的认识,在2型糖尿病和自身免疫性疾病的发展中可能很重要。基于阐明可能对这种

相互作用重要的CD40和CD154中的关键残基。本发明涉及通过使用小的合成肽来阻断和/或破坏CD40蛋白与CD154蛋白之间的相互作用,所述合成肽在CD154蛋白正常结合的位点与CD40蛋白相互作用和/或缔合。目前的进展还涉及使用这种肽降低Th40细胞的水平,从而降低疾病的严重程度。当前发展的肽可以以改变CD40功能的方式直接结合和/或可选择地与CD40分子结合。

[0056] 在自身免疫性疾病和病症中,CD40参与可促进炎症。因此,在本发明的一个实施例中,该肽可改变CD40信号,使其不再具有炎症性。因此,在一个实施例中,当前发育的肽可阻断、破坏、干扰和/或抑制CD40在包括但不限于Th40细胞、胰腺 β 细胞、内皮细胞、B细胞、单核细胞和/或巨噬细胞的位点发挥作用。干扰CD40可能存在的任何细胞的CD40信号通路,这些肽可能能够在特定部位发生干扰,具体取决于给药途径。

[0057] 本发明的一个实施例是预防、调节、减少和/或逆转2型糖尿病的方法,该方法包括使CD40蛋白与与CD40蛋白相互作用的肽接触。优选的肽是那些长度少于25个氨基酸的肽,并且与CD40蛋白结合,从而抑制其与CD154蛋白的相互作用。

[0058] 本发明的一个实施例是预防、调节、减少和/或逆转2型糖尿病的方法,该方法包括抑制CD40蛋白与CD154蛋白之间的相互作用以及与该CD40蛋白相互作用的肽的相互作用。在CD154结合位点上的CD40蛋白是优选的。这种肽的长度小于25个氨基酸。甚至更优选的肽是选自SEQ ID NO 3-9和25-30的那些氨基酸序列。

[0059] 在一个方面,本发明提供了一种用于调节和/或增加葡萄糖转运蛋白4 (GLUT4) 的方法,该方法包括向患者施用治疗上足够剂量的选自SEQ ID NO 3-9和25-30的肽。

[0060] 本发明的一个实施例是一种预防、调节、减少和/或逆转动物中的2型糖尿病的方法,该方法包括向所述动物施用以调节葡萄糖的方式与CD40蛋白相互作用的肽。转运蛋白4 (“GLUT4”)。首选的肽是与CD154结合位点上的CD40蛋白相互作用从而调节GLUT4的肽。与未经处理的人群相比,首选的肽可能在脂肪和肌肉组织中调节、上调或增加GLUT4。这种方法可以更普遍地用于预防和/或减少T2D和可能伴随T2D和自身免疫相关炎症的症状。

[0061] 本发明的另一个实施例是施用CD40结合肽以预防、调节、减少和/或逆转2型糖尿病的方法,包括选择与CD40蛋白和CD154结合位点相互作用的肽,选择递送方法。选自肌内(IM)递送、静脉内(IV)递送、皮下(SC)递送、口服递送、管饲递送、润肤剂/皮肤递送、透皮贴剂或鼻腔给药。

[0062] 本发明的另一个实施例是一种施用CD40结合肽以预防、调节、减少和/或逆转动物中的2型糖尿病的方法,包括使用以下方法选择与CD40蛋白和CD154结合位点相互作用的肽:可植入装置、亲水性聚合物制剂、可渗透性聚合物膜、可注射凝胶植入物、溶剂萃取系统、相转化系统、热敏凝胶、pH依赖原位凝胶、微粒、微球、纳米颗粒、纳米球、可生物降解的植入物或光活化仓库。

[0063] 本发明的另一个实施例是在受试者中调节、控制和/或增加GLUT4的方法,该方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的选自SEQ ID NO 3-9和25-30的肽。

[0064] 本发明的另一个实施例是一种调节、影响和/或减少细胞或受试者中白介素2信号传导的方法,其中细胞或受试者包括给药选自SEQ ID NO 3-9和25-30的肽的量以足以减少或抑制白细胞介素2信号传导,其中,更一般而言,白细胞介素2信号传导与选自包括以下组成的组中的条件相关联:I型糖尿病、多发性硬化症、系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎、克

罗恩病、炎症肠病、慢性阻塞性肺病的疾病有关、哮喘、动脉粥样硬化、血管炎、高血压、甲状腺炎、原发性胆汁性肝硬化、佩吉特氏病、艾迪生氏病、急性呼吸窘迫综合征、急性肺损伤和/或无菌慢性炎症。

[0065] 本发明的另一个实施例是一种调节和/或减少细胞或受试者中白介素2信号传导的方法,其中,细胞或受试者包括选自SEQ ID NO 3-9和25-30的肽,以足以减少或抑制白介素2信号传导,其中,白介素2信号传导与2型糖尿病有关。

[0066] 本发明的另一个实施例是在细胞或受试者中调节和/或减少IFN- γ 的方法,其包括以足以减少或抑制IFN- γ 信号传导的量施用选自SEQ ID NO 3-9和25-30的肽,其中,IFN- γ 信号传导与2型糖尿病相关。

[0067] 本发明的另一个实施例是一种在包括服用所选的肽SEQ ID NO 3-9和25-30中的氨基酸的细胞或受试者中调节、影响和/或诱导白介素21(IL-21)、白介素22(IL-22)、IFN- γ 、TNF α 、白介素6(IL-6)、细胞或对象中的粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、白细胞介素4(IL-4)、白细胞介素10(IL-10)和转化生长因子 β (TGF β),其量足以改变所述白介素21(IL-21)、白介素22(IL-22)、IFN- γ 、TNF α 、白介素6(IL-6)、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、白介素4(IL-4)、白介素10(IL-10)和转化生长因子 β (TGF β),其中所述白介素-21(IL-21)、白介素22(IL-22)、IFN- γ 、TNF α 、白介素6(IL-6)、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、白介素4(IL-4)、白介素10(IL-10)和转化生长因子 β (TGF β)信号传导与选自包括以下的组中的条件相关联:I型糖尿病、多发性硬化症、系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎、克罗恩病、炎症性肠病、慢性阻塞性肺疾病、哮喘、动脉粥样硬化、血管炎、高血压、甲状腺炎、原发性胆汁性肝硬化、佩吉特氏病、艾迪生氏病、急性更常见的是呼吸窘迫综合征、急性肺损伤、2型糖尿病和/或无菌慢性炎症。

[0068] 本发明的另一实施例包括一种调节和/或减少细胞或受试者中白介素17(IL-17)的方法,其中,细胞或受试者包括选自服用SEQ ID NO:3-9和25-30的量足以减少和抑制或抑制白介素17(IL-17)信号转导的肽(peptide)。其中IL-17信号转导与选自I型糖尿病、多发性硬化症、系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎、克罗恩病、炎症性肠病、慢性病的疾病相关阻塞性肺疾病、哮喘、动脉粥样硬化、血管炎、高血压、甲状腺炎、原发性胆汁性肝硬化、佩吉特氏病、艾迪生氏病、急性呼吸窘迫综合征、急性肺损伤和/或无菌慢性炎症。

[0069] 本发明的另一个实施例包括一种调节和/或减少细胞或受试者中白介素17(IL-17)的方法,细胞或受试者中白介素17(IL-17)包括选自SEQ ID NO:3-9和25-30以足以减少和抑制白介素17(IL-17)信号传导的量施用一种肽,其中IL-17与2型糖尿病有关。

[0070] 本发明的一个实施例是一种鉴定有患2型糖尿病风险的患者的方法,该方法包括从待测患者获得含有T细胞的样品,使该样品与结合CD40蛋白的肽接触,检测与CD-40结合的肽,并从结合的CD40的量确定Th40细胞的水平,其中Th40细胞的水平大于总T细胞总数的25%,表明该患者有患2型糖尿病的风险。

[0071] 本发明的一个实施例是SEQ ID NO:4、27、28、29和30中的小干扰肽的物质的组成。本发明的这些实施例可用于治疗选择的以下疾病:I型糖尿病、多发性硬化症、系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎、克罗恩病、炎症性肠病、慢性阻塞性肺疾病、哮喘、动脉粥样硬化、血管炎、高血压、甲状腺炎、原发性胆汁性肝硬化、佩吉特氏病、艾迪生氏病、急性呼吸窘迫综合征、急性肺损伤、2型糖尿病和/或无菌慢性炎症。

附图说明

[0072] 图1是CD154的各种肽对NOD小鼠中糖尿病发展的作用图。测试了8聚体 (SEQ ID NO:5)、10聚体 (SEQ NO:24)、13聚体 (SEQ ID NO:24)、15聚体 (SEQ ID NO:7) 和24聚体 (SEQ ID NO:26)。

[0073] 图2A是来自CD154的15聚体肽对NOD小鼠中CD4/CD8比率的影响的图。

[0074] 图2B是在切除、检查和评分的经处理的与对照的胰腺中15聚体肽对 β -胰岛浸润的作用的图。

[0075] 图3是使用来自CD154的15聚体肽在NOD小鼠中糖尿病逆转的图。

[0076] 图4是使用来自CD154的SIP-15聚体肽检测Th40细胞的点状图。

[0077] 图5是使用来自CD154的SIP-15聚体肽筛选B细胞的点状图。

[0078] 图6是显示比较糖尿病和非糖尿病小鼠中Th40细胞水平的图。

[0079] 图7是说明用15聚体肽治疗对胰腺胰岛素颗粒化作用的图。

[0080] 图8是显示15聚体肽中的突变对15聚体肽抑制NOD小鼠中的糖尿病发展的能力的影响的图。

[0081] 图9是表示不同小鼠模型中的CD3+CD4+CD40+的细胞数 ($\times 10^6$) 的图。

[0082] 图10是示出在对照和糖尿病受试者中人受试者中外周血中Th40细胞的百分比的图。

[0083] 图11是比较了通过流式细胞术获得的CD4+和CD40细胞数据的点图。Th40细胞 (CD4+CD40+) 位于右上象限。

[0084] 图12是显示小鼠模型的CD3+CD4+群体的Th40细胞的百分比的图。

[0085] 图13是显示C57B-6, 年轻的非糖尿病NOD小鼠和糖尿病NOD小鼠的小鼠主动脉内的CD3+CD4+群体的Th40细胞百分比的图。

[0086] 图14是显示了在ApoE^{-/-}小鼠模型中斑块的肩部区域中的200倍放大率的Th40细胞的图像。

[0087] 图15是干扰素 γ 控制Th40增殖的图。

[0088] 图16是在不存在/存在抗干扰素 γ 抗体 (α IFN γ) 的情况下CD40刺激的Th40细胞增殖的图, 表明干扰素 γ 介导了CD40诱导的增殖。

[0089] 图17是主动脉弓曲率较小的主动脉弓染色样本。

[0090] 图18是在在对照和治疗对象中主动脉弓弯曲较小的污点。

[0091] 图19是主动脉弓和斑块的较小曲率的面积测量图。

[0092] 图20-23是治疗 and 对照的ApoE小鼠受试者的图。

[0093] 图24是与正常凝血相比在存在15聚体肽的情况下来自人血液的血凝数据的表。

[0094] 图25A是提供通过ExPASy分析评估的相对肽稳定性的表。

[0095] 图25B是提供通过ExPASy分析评估的相对肽稳定性的表。

[0096] 图26是蛋白质印迹, 其比较了来自对象小鼠的对照和处理样品。

[0097] 图27是在治疗 and 未治疗的受试者中测得的LDL胆固醇的图。

[0098] 图28A是经KGY6处理的主动脉表面苏丹IV染色的图像。

[0099] 图28B是对照主动脉表面苏丹IV染色的图像。

[0100] 图29是表示苏丹IV染色的病变面积减少的图。

[0101] 图30是曲线下面积的斑块体积减少的曲线图。

- [0102] 图31是用于KGY6 (SEQ ID NO:29) 治疗和对照对象小鼠的噬斑组成的图。
- [0103] 图32A是经KGY6 (SEQ ID NO:29) 治疗的受试者的三色染色切片的图像。
- [0104] 图32B是对照受试者的三色染色切片的图像。
- [0105] 图33 (a) - (b) 是显示响应于SEQ ID NO:29的葡萄糖耐量 (GTT) 和胰岛素敏感性的统计学显著改善的图。
- [0106] 图34是GLUT4 (胰岛素调节的葡萄糖转运蛋白) 的蛋白质印迹分析。
- [0107] 图35是通过流式细胞术测量的在来自ApoE^{-/-}和C57BL/6小鼠的脾细胞中测量的体外淋巴细胞细胞因子的百分比变化的图。

具体实施方式

[0108] 本发明基于以下发现：表达CD40蛋白并因此被称为Th40细胞的T细胞的独特子集可能在自身免疫炎症中起作用。此外，Th40细胞参与自身免疫过程可能取决于T细胞表面表达的CD40蛋白和CD154蛋白之间的相互作用。CD40和CD154的相互作用导致激活信号在细胞之间传递，并随后激活Th40细胞。这种激活导致繁殖因此，抑制CD40/CD154相互作用可以调节Th40细胞的活性，从而影响炎症。因此，炎症和Th40细胞炎症反应的增加（例如，系统中存在的免疫细胞和免疫调节分子的数目增加）。因此，本主题涉及可影响CD40蛋白与CD154蛋白之间的相互作用，从而改变其功能的肽及其给药。此外，本主题涉及影响T细胞表面表达的CD40蛋白与CD154蛋白之间相互作用的肽，从而影响T细胞活性，控制炎症并因此预防、调节，本主题还包括使用这样的肽来检测Th40细胞。

[0109] 在进一步描述本发明之前，应当理解，本发明并不严格限于所描述的特定实施例，因为它们当然可以变化。还应当理解，本文所使用的术语是为了描述特定的目的。由于本发明的范围仅由权利要求书限制，因此仅是实施例，而无意于限制本发明。

[0110] 必须注意，如本文和所附权利要求书中所使用的，单数形式的“一个”，“一种”和“该”包括复数指示物，除非上下文另有明确指示。术语“一个”实体或“一个”实体是指一个或多个该实体。例如，核酸分子是指一个或多个核酸分子。因此，术语“一个”，“一个”，“一个”同样地，术语“包括”，“包含”和“具有”可以互换使用。

[0111] 除非另有定义，否则本文所使用的所有技术和科学术语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。尽管与本文所述的那些方法或材料相似或等同的任何方法和材料也可以用于本发明。实践或测试本发明，现在描述优选的方法和材料。本文提及的所有出版物通过引用并入本文以公开和描述与引用出版物有关的方法和/或材料。本文讨论的出版物为仅出于本申请的提交日期之前的公开内容而提供本公开。本文中的任何内容均不应解释为承认本发明由于在先发明而无权早于该公开。此外，提供的公开日期可以是与实际发布日期不同，可能需要独立确认。

[0112] 应当理解，为了清楚起见在单独的实施例的上下文中描述的本发明的某些特征也可以在单个实施例中组合提供。相反，为了简洁起见，描述了本发明的各种特征。在单个实施例的上下文中，还可以单独地或以任何合适的子组合提供这些实施例。实施例的所有组合都被本发明特别地涵盖，并且在本文中公开，就像每个组合和每个组合都被单独地并且明确地公开一样。另外，所有子组合也被本发明明确地涵盖，并且在本文中公开，就像每个和每个这样的子组合在本文中被单独地并且明确地公开一样。

[0113] 还应注意的是,权利要求书可以被起草以排除任何可选要素。因此,该陈述旨在作为与叙述相关地使用诸如“仅”,“仅”等排他性术语的先行基础。权利要求要素的使用或“负”限制的使用。

[0114] 此外,本文所用的术语动物是指脊椎动物,优选为哺乳动物,更优选为人。使用本发明方法的合适的哺乳动物包括但不限于农场动物、运动动物、宠物、灵长类动物、小鼠、大鼠、马、狗、猫和人。术语动物可以与术语受试者或患者互换使用。

[0115] 本发明的一个实施例是一种肽,其以防止动脉粥样硬化的方式与CD40蛋白相互作用。如本文所用,术语相互作用,相互作用等是指两个分子在物理上足够接近,使得它们引起炎症的调节。这种相互作用的一种类型是结合相互作用。在这种相互作用中,肽与CD40结合形成复合物。复合物形成的一个示例是抗原与抗体的结合。根据本主题,本文的肽与CD40蛋白的结合可以是可逆的(例如,非共价结合相互作用)或不可逆的(例如,共价结合相互作用)。此外,可逆的相互作用可以是强的或弱的,相互作用是由每种蛋白质在复合物中另一种蛋白质上施加的力(例如离子电荷、氢键、范德华兹相互作用等)决定的。两个分子之间相互作用的强度是本领域技术人员已知的。解离常数(Kd)是衡量两个分子(例如肽和蛋白质)之间结合强度的一种有用的量度。本发明优选的肽是那些以不大于约 1×10^{-6} M,约 1×10^{-7} M或约 1×10^{-8} M的Kd结合CD40蛋白的肽。特别优选的肽是Kd小于约 1×10^{-9} M的那些。在一个实施方案中,本文的肽以小于100nM,小于50nM,小于25nM,小于10nM,小于5nM,小于3nM,小于2nM,或小于1nM的Kd结合CD40蛋白。测量和分析肽与CD40蛋白之间的结合相互作用的方法是本领域技术人员已知的。

[0116] 如本文所用,存在于动物或T细胞培养物中的Th40细胞水平的变化可以指示炎症的调节。如本文所用,术语水平、数量、计数和浓度可以互换使用。炎症可能意味着在炎症环境中存在的Th40细胞数量增加或减少;但是,炎症的调节不应该局限于细胞数或细胞计数。因此,调节可以称为阳性或阴性。炎症的阳性调节(也称为上调)可能导致炎症数量增加。炎性环境中的Th40细胞。炎症的负调节(也称为下调)可能导致炎性环境中存在的Th40细胞数量减少Th40细胞的水平、数量或浓度可能不在炎性环境中指示炎症的一种肽。一种优选的肽可能是一种下调炎症的肽,从而减少了在炎性环境中存在的Th40细胞的数量。炎症的正负调节可能会或可能不会导致类型的改变。在某些情况下,Th40水平可能不会改变,但是那些细胞的活性会改变,从而使其不再发挥或增加炎症细胞因子和其他炎症生物标志物。因此,本文所用的调节炎症可以指改变在有毒的身体或样品中Th40的水平,数量或浓度,并且还可以更普遍地指可能与疾病,炎性细胞因子和/或细胞衍生的炎性介质分子有关的炎症变化。

[0117] 本领域技术人员将理解,动物的细胞培养系统和免疫系统均包含基础水平的免疫细胞和免疫调节分子。基础水平和正常水平的短语可以互换使用。如本文所用,一种动物系统的免疫细胞(例如,Th40细胞)或免疫调节分子的基础水平是指个体群体中存在的该细胞类型或免疫调节分子的平均数目。关于细胞培养系统,如本文所用,一种免疫细胞或免疫调节分子的基础水平是指被认为是健康的(即,没有代谢性、自身免疫性或传染性疾病)。存在于未激活的细胞群中的细胞类型或免疫调节分子。本领域技术人员能够确定T细胞或此类细胞群是否被激活。细胞分裂CD69、CD25和/或CD154蛋白表明该细胞已被激活。

[0118] 细胞或分子的基础水平可以是特定量(例如,特定浓度)或可以包含一定范围的量。免疫细胞和免疫调节分子的基础水平或范围是本领域技术人员已知的。例如,在一个健

康的个体中,人血中CD4⁺T细胞的正常水平为500-1500个细胞/ml。此测量的差异可能是由确定细胞计数所用的方法不同引起的。还可以报道细胞数量占总细胞数量的百分比。例如,在健康个体中,Th40细胞占总T细胞数量的不到25%。因此,如本文所用,术语炎症是指其中Th40细胞组成总T细胞群体的大于约25%、大于约30%、大于约35%、大于约40%、大于约45%、大于约50%、大于约55%、大于约60%、大于约65%、大于约70%、大于约75%或大于约80%的炎症环境。此外,本文优选的肽是一种将Th40细胞水平降低至小于约50%、小于约45%、小于约40%、小于约35%、小于约30%、小于约27%,或等于约25%的总T细胞群体的肽。测量T细胞群体中不同类型T细胞的方法是本领域技术人员已知的。此外,本文公开了使用本文的肽检测Th40细胞的新颖方法。

[0119] 如本文所用,短语炎症环境是指存在于细胞培养物或动物体内的免疫细胞和相关免疫调节分子的总体种群。因此,短语炎症环境包括以下类型:和/或存在于影响炎症反应的细胞培养物中或动物体内的免疫细胞和免疫调节分子(例如细胞因子)的相对数量。术语炎症环境涵盖的细胞实例包括但不限于:不限于T细胞、嗜中性粒细胞、巨噬细胞、粒细胞等。炎性环境涉及介导急性和慢性炎性的细胞和分子。本领域技术人员应理解,炎性环境是指在一个实施例中,该系统是细胞培养系统。在一个实施例中,该系统是整只动物。

[0120] 本文优选的肽是与溶液中的CD40蛋白选择性相互作用的肽,如使用诸如免疫吸附测定之类的测定所确定的,或在T细胞表面上。如本文所用,术语选择性、选择性、特异性和表示肽对CD40蛋白的亲和力比与CD40蛋白无关的蛋白更大。更具体地讲,术语“选择性”、“选择性”、“特异性”等表示该肽对CD40的亲和力在统计学上显着高于使用标准测定法(例如ELISA)测量的其与阴性对照(例如无关蛋白,例如白蛋白)的亲和力。测定肽与CD40蛋白质选择性相互作用的能力的合适技术是众所周知的这样的测定可以是体外或体内测定。有用的测定的实例包括但不限于酶联免疫测定、竞争性酶联免疫测定、放射线测定、免疫测定、荧光免疫测定、化学发光测定、侧向流动测定、流通测定、凝集测定、基于颗粒的测定(例如,使用诸如但不限于磁性颗粒或塑料聚合物之类的颗粒,例如如乳胶或聚苯乙烯珠)、免疫沉淀测定、免疫印迹测定(例如蛋白质印迹)、磷光测定、流通测定、色谱测定、基于聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)的测定、表面等离子体激元共振测定法、分光光度法测定法、基于颗粒的测定法、电子感觉测定法和流式细胞术测定法。进行这种测定法的方法是本领域技术人员众所周知的。可以设计成提供定性、定量或半定量结果的方法,具体取决于使用方法和所需结果的类型。

[0121] 心血管疾病(CVD)、动脉粥样硬化和胆固醇相关发展

[0122] 本文的一个实施例是一种肽,其以影响CD40蛋白与CD154蛋白的相互作用从而调节炎症的方式与CD40蛋白相互作用。该肽对CD40/CD154相互作用的作用可以是阳性的,也可以是阴性的。例如,该肽可以以增加CD40蛋白与CD154蛋白之间的相互作用强度的方式与CD40蛋白相互作用。可替代地,该肽可以与CD40蛋白相互作用,从而降低CD40蛋白与CD154蛋白之间相互作用的强度。本领域技术人员已知测量该肽与CD40蛋白之间结合强度的方法。优选的肽是降低相互作用强度的肽。在CD40蛋白和CD154蛋白之间。本文优选的肽使CD40蛋白和CD154蛋白之间的结合强度降低至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%。特别优选的肽是完全抑制CD40与CD154结合的肽。完全抑制CD40和CD154之间的结合是指当将其肽引入其中时。在通常允

许CD40和CD154相互作用的条件下与CD40蛋白和CD154蛋白接近,没有这种相互作用发生,并且在表达CD40的细胞中没有激活信号被刺激。因此,不会发生CD40/CD154介导的炎症调节。在一个实施例中,该肽与CD40蛋白相互作用,以减少系统中的炎症水平。在一个实施方案中,该肽以抑制系统中炎症发展的方式与CD40蛋白相互作用。

[0123] 尽管本文的肽可以与CD40蛋白上的任何位点相互作用,但优选的肽在与CD154结合位点重叠的位置与CD40蛋白相互作用。在一个实施例中,本文的肽在CD154结合位点与CD40蛋白相互作用。这种肽的实例是CD40配体竞争性拮抗剂。如本文所用,将干扰或抑制CD154蛋白与CD40蛋白结合的肽称为小干扰肽(SIP)。干扰肽是通过理化性质干扰CD40蛋白与CD154蛋白相互作用的肽,从而阻止激活信号传递至CD40承载细胞,从而限制CD40承载细胞的激活如本文所证明,这种干扰的后果是防止T细胞活化和繁殖,以及防止或减轻炎症。如本文所证明的,在某些情况下,这种抑制或阻止CD40和CD154之间相互作用的结果可以包括可观察到的数据,这些数据表明动脉粥样硬化以及与之相关的疾病的特征被预防、调节和/或减少。

[0124] 另外,小的干扰肽可能会通过其理化特性干扰CD40蛋白与CD154蛋白的相互作用,从而阻止激活信号传递至带有CD40的细胞,从而限制了CD40的激活如本文所证明的,这种干扰的后果是防止T细胞活化和繁殖,以及预防、减少或调节动脉粥样硬化的发展。

[0125] 可用于实施本发明方法的肽的大小应足以与CD40蛋白相互作用,以调节动脉粥样硬化的方式。本领域技术人员应理解,优选的肽相对较短,因为它们更容易和容易合成。优选的肽可以是长度小于25个氨基酸的那些。然而,在某些情况下,该肽的长度可以长于25个氨基酸。一种优选的肽可以是长度为4、6、8、10、13、15或24个氨基酸的肽。肽是选自SEQ ID NO:3(核心序列,参见表1)、SEQ ID NO:4(6聚体,参见表1)、SEQ ID NO:5(8聚体小鼠,参见表1)、SEQ ID NO:6(8聚体人类,参见表1)、SEQ ID NO:7(15聚体人类,参见表1)、SEQ ID NO:8(15聚体人类,参见表1)、SEQ ID NO:9(24聚体,参见表1)、SEQ ID NO:24(10聚体,参见表1)、SEQ ID NO:25(13聚体,表1)、SEQ ID NO:26(24聚体,表1)、SEQ ID NO:27(6聚体(形式2)见表1)、SEQ ID NO:28(6聚体(形式3)见表1)、SEQ ID NO:29(6聚体(形式4)参见表1)、SEQ ID NO:30(6聚体(形式4)参见表1)和SEQ ID NO:32(24聚体小鼠(形式2))的氨基酸。此类肽的序列如下所示在表1中。

[0126] 表1.

[0127]

SEQ ID NO	序列	描述
1	MIETYSQPSP RSVATGLPAS MKIFMYLLTV FLITQMIGSV LFAVYLHRR LDKVEEEVNLH EDFVFIKKLK RCNKGEGSL SLLNCEEMRRQ FEDLVKDITL NKEEKKENSF EMQRGDEDPO IAAHVSEAN SNAASVLQWA KKGYYTMKSN LVMLENGKQL TVKREGLYYV YTQVTFCSNR EPSSQRPFIV GLWLKPSSGS ERILLKAANT HSSSQLCEQQ SVHLGGVFEL QAGASVFVNV TEASQVIHRV GFSSFGLLKL	SwissPro 27548.2 小鼠 CD40 配体 (CD154 蛋白)

[0128]

2	MIETYNQTSP RSAATGLPIS MKIFMYLLTV FLITQMIGSA LFAVYLHRR LDKIEDERNLH EDFVFMKTIQ RCNTGERSLS LLNCEEIKSQ FEGFVKDIML NKEETKKENS FEMQKGDQNP QIAAHVISEA SSKTTSVLQW AEKGYTMSN NLVTLENGKQ LTVKRQGLYY IYAQVTFCSN REASSQAPFI ASLCLKSPGR FERILLRAAN THSSAKPCGQ QSIHLGGVFE LQPGASVFEVN VTDPSQVSHG TGFTSFGLLK L	SwissPro 29965 人 CD40 配体 (CD154 蛋白)
3	KGY Y	核心序列
4	KKGY Y T	6 聚体
5	AKKGY Y T M	8 聚体小鼠
6	AEKGY Y T M	8 聚体人类
7	VLQWAKKGY Y T M K S N	15 聚体小鼠
8	VLQWAEKGY Y T M S N N	15 聚体人类
9	NAASVLQWAKKGY Y T M K S N L V M L E	24 聚体
10	ISQAVHAAHAEINEAGR	卵清蛋白 15 聚体; 对照肽
11	G-L-Q-W-A-K-K-G-Y-Y-T-M-K-S-N	甘氨酸-1
12	V-G-Q-W-A-K-K-G-Y-Y-T-M-K-S-N	甘氨酸-2
13	V-L-G-W-A-K-K-G-Y-Y-T-M-K-S-N	甘氨酸-3
14	V-L-Q-G-A-K-K-G-Y-Y-T-M-K-S-N	甘氨酸-4
15	V-L-Q-W-G-K-K-G-Y-Y-T-M-K-S-N	甘氨酸-5
16	V-L-Q-W-A-G-K-G-Y-Y-T-M-K-S-N	甘氨酸-6
17	V-L-Q-W-A-K-G-G-Y-Y-T-M-K-S-N	甘氨酸-7
18	V-L-Q-W-A-K-K-G-G-Y-Y-T-M-K-S-N	甘氨酸-8
19	V-L-Q-W-A-K-K-G-Y-G-T-M-K-S-N	甘氨酸-9
20	V-L-Q-W-A-K-K-G-Y-Y-G-M-K-S-N	甘氨酸-10
21	V-L-Q-W-A-K-K-G-Y-Y-T-G-K-S-N	甘氨酸-11
22	ISQAVHAAHAEINEAGR	卵清蛋白 15 聚体; 对照肽
23	YVQGGKANLKS K L M Y T	乱序肽
24	WAKKGY Y T M K	10 聚体小鼠
25	VLQWAKKGY Y T M K	13 聚体小鼠
26	AASVLQW AKKGY Y T M K S N L V M L E N	24 聚体小鼠
27	KGY Y T M	6 聚体(形式 2)
28	AEKGY Y	6 聚体(形式 3)
29	AKKGY Y	6 聚体(形式 4)
30	AKGY Y T	6 聚体(形式 5)
31	YKNVKQMAYWLTGKS	乱序肽
32	AASVLQWAKKGY Y T M K S N L V M L E N	24 聚体小鼠(形式 2)

[0129] 已经显示CD40蛋白和CD154蛋白的相互作用发生在每种蛋白内的特定区域。发明人现在已经令人惊讶地表明,仅包含与CD40相互作用的CD154区的一小部分的肽能够结合至因此,一个实施例是一种肽,其包含CD154蛋白的氨基酸序列的至少一部分,从而该肽以调节动脉粥样硬化的方式与CD40蛋白相互作用。因此,该肽与CD40蛋白的相互作用导致动脉粥样硬化的负调节。在一方面,该肽包含SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的至少一部分。

[0130] 一方面,该肽尽可能短,但包含足够的CD154蛋白以允许以调节动脉粥样硬化的方式与CD40蛋白相互作用。在一个实施例中,其肽包含来自SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2中6、

13或15个连续氨基酸,并以调节动脉粥样硬化的方式与CD40相互作用。优选的肽包含赖氨酸-甘氨酸-酪氨酸-酪氨酸的核心序列(KGYY;SEQ ID NO:3),其对应于SEQ ID NO:1的氨基酸142-145和SEQ ID NO:2的氨基酸143-146。有用的肽可以包含来自SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的另外的序列区域。在肽的一个实施例中,肽包含至少一个选自SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30和SEQ ID NO:32,只要该肽以调节动脉粥样硬化的方式与CD40蛋白相互作用。在本发明的一个实施例中,本发明的肽是选自SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30和SEQ ID NO:32的序列。在本发明主题的一个实施例中,本文的肽是一种选自SEQ ID NO 3-9、25-30和32的序列。

[0131] 尽管本主题的肽可以完全选自或选自负责该肽与CD40蛋白相互作用的序列,但是它们还可以包含不与CD40蛋白相互作用但具有其他用途的氨基酸序列。任何有用的附加氨基酸序列都可以添加到CD40相互作用序列中,只要这些附加序列不会对CD40相互作用序列与CD40蛋白质相互作用的能力产生不良影响即可。除了负责与CD40蛋白相互作用的氨基酸序列外,其肽还可以包含可用于可视化或纯化该肽的氨基酸序列。这些序列可作为标记(例如酶)或标签(抗体结合位点)。这样的标签和标签的示例包括但不限于B-半乳糖苷酶、荧光素酶、谷胱甘肽-s-转移酶、硫氧还蛋白、HIS标签、生物素标签和荧光标签。用于标记和标记蛋白质的其他有用序列是本领域技术人员已知的。

[0132] 同样地,可以修饰本发明的肽,只要这种修饰不显着影响该肽调节动脉粥样硬化的能力即可。例如可以进行这种修饰以增加蛋白质的稳定性、溶解性或吸收性。修饰包括但不限于肽的聚乙二醇化、糖基化和化学修饰。

[0133] 本文的肽可以从自然界获得(例如,从植物、动物或微生物获得),或者可以在实验室中产生(例如,重组或合成)。优选的肽是合成的那些。天然的和合成的分子。用于产生和分离重组或合成的肽的一般方法是本领域技术人员已知的。应该注意的是,如本文所用,分离的或生物学上纯的分子是已经从天然和合成的分子中去除的分子。因此,术语分离的,生物学纯净的等不一定反映蛋白质被纯化的程度。

[0134] 如本文所述,CD40蛋白和CD154蛋白的相互作用对于Th40细胞参与动脉粥样硬化是必不可少的。实施例是减少CD40蛋白与CD154蛋白之间相互作用的方法,该方法包括将与CD40蛋白相互作用的肽引入到包含CD40蛋白和CD154蛋白的环境中,从而减少CD40蛋白与CD154蛋白之间的相互作用。CD40蛋白和CD154蛋白。在一方面,该肽将CD40蛋白与CD154蛋白之间的相互作用降低至少5%、至少10%、至少20%、至少30%、至少40%至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%。在一个实施例中,该肽将CD40蛋白与CD154蛋白之间的相互作用降低至少10、至少100、至少1,000、至少10,000倍。先前已经讨论了测量CD40蛋白与CD154蛋白之间相互作用强度的方法,这也是本领域技术人员已知的。

[0135] 本文的一个实施例是一种调节动脉粥样硬化的方法,其包括使CD40蛋白与以能调节炎症的方式与该CD40蛋白相互作用的肽接触。在一方面,该肽与CD40蛋白的相互作用将Th40细胞的数量减少至少5%、至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%。在一个实施例中,肽与CD40蛋白的相互作用将Th40细

胞的数量减少了至少10、至少100、至少1,000、至少10,000的倍数。

[0136] 本文当前发展的一个方面是一种调节动脉粥样硬化、心血管疾病和/或胆固醇水平的方法,该方法包括使CD40蛋白与与CD40蛋白相互作用的肽接触,从而减轻炎症。一个实施例是Th40水平不响应于使所述CD40蛋白与与CD40蛋白相互作用的肽接触而改变。一方面,用肽处理的Th40细胞可以停止、减慢、减少或延迟炎性细胞因子的产生。在这方面,Th40水平的数量可以保持相对不变。

[0137] 一个方面是一种减轻患者动脉粥样硬化的方法,该方法包括向患者施用其肽。在一个实施例中,该肽包含选自SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30和SEQ ID NO:31的氨基酸序列。在一个实施例中,该肽是选自SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30和SEQ ID NO:32。在一个优选的实施例中,肽与CD40蛋白的相互作用将Th40细胞数量降低至少5%、至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%。在另一个实施方案中,肽与CD40蛋白的相互作用将Th40细胞的数量减少了至少10、至少100、至少1,000、至少10,000的倍数。在一个优选的实施方案中,降低了Th40细胞的水平,使得Th40细胞占总T细胞群体的不超过约20%、约25%、约30%、约35%或约40%。

[0138] 本文的肽和方法适用于细胞培养以及用于治疗患者。本文所用的术语患者是指需要这种治疗的任何动物。该动物可以是人类或非人类动物。可以本身施用或施用肽,或以药物组合物的形式施用本发明的肽或其药物组合物,可以通过多种途径将其施用给患者,所述途径包括但不限于:通过注射(例如,静脉内、肌肉内、皮下、鞘内、腹膜内)、通过吸入、通过口服(例如,在丸剂、片剂、胶囊、粉剂、糖浆、溶液、悬浮液、薄膜、分散液或乳剂中)、透皮经鼻、经粘膜、肺、颊、鼻内、舌下、脑内、阴道内直肠或局部给药或通过本领域技术人员已知的任何其他方便的方法。

[0139] 可以通过本领域已知的标准临床技术确定将有效的本发明的肽和/或其药物组合物的量。该量除其他因素外还取决于所治疗的患者,包括但不限于根据患者的体重、年龄和病情,该化合物的预期效果,给药方式和开药医师的判断。此外,在这种情况下,应注意的是在治疗表现出以下症状的患者时感兴趣的是,施用治疗有效量的一种或多种这些药剂。治疗有效剂量是指导致减轻一种或多种症状或延长患者存活的化合物的量。

[0140] 本发明的肽或其药物组合物可以单独给药或与一种或多种其他药物试剂(包括本发明的其他化合物)组合给药。具体的药物组合物取决于所需的给药方式,这是技术人员众所周知的。

[0141] 因为该发展已经证明Th40细胞与自身免疫疾病、动脉粥样硬化和心血管疾病的发展密切相关,所以本文公开的肽和方法可用于影响由此类疾病引起的动脉粥样硬化。因此,本文的一个实施例是一种用于在需要这种治疗的患者中治疗动脉粥样硬化疾病,该方法包括向患者施用与CD40蛋白相互作用的肽,从而减少动脉粥样硬化。在一个实施例中,该肽与CD40蛋白相互作用以影响该疾病的方式。在一个优选的实施例中,该肽与CD40蛋白的相互作用将患者中的Th40细胞的数量减少到与在没有心血管疾病的受试者中观察到的水平相等的水平。研发适用于治疗任何患有自身免疫性疾病和/或心血管疾病的患者疾病的发展

取决于Th40细胞。更具体地讲,本文的肽适合于降低这类患者中Th40细胞的水平。在一个优选的实施例中,本文的肽降低患有Th40细胞的患者的Th40细胞的水平。在另一个实施例中,其肽降低炎症细胞因子水平,同时对患者的Th40水平没有影响。

[0142] 特别适合使用本发明的肽治疗的疾病的一个实例可以是动脉粥样硬化。在动脉粥样硬化中,发生动脉壁的炎性改变,从而导致动脉斑块的形成和积聚。因此,控制了炎症细胞和细胞。通过CD40-CD154相互作用的信号转导可能能够用于控制、调节和/或减少以血管壁慢性炎症纤维增生性疾病为特征的动脉粥样硬化病变。已经开发了几种T2D和/或动脉粥样硬化小鼠模型。在缺乏载脂蛋白E(ApoE)的转基因小鼠中可观察到病灶形成的进展,可通过测量主动脉弓、斑块的数量和类型来观察病灶的进展,并根据美国心脏协会的动脉粥样硬化分期对其进行表征,范围从AHA I型至AHA型V。AHA型I可能以早期或初期病变为特征,可能比较复杂由组织学上“正常”的细胞、巨噬细胞浸润和分离的泡沫细胞组成。V型AHA可能以晚期或复杂的军团为特征,包括但不限于以表面缺陷、血肿、出血和/或血栓形成为特征的内皮功能增高。因此,本发明的一个实施例是一种在具有发展成动脉粥样硬化风险的个体中预防动脉粥样硬化的方法,该方法包括向该个体施用一种肽以选择性地结合表达CD40的细胞。

[0143] 此外,动脉粥样硬化可能特别适合使用当前开发的肽进行治疗。动脉粥样硬化的风险可能是由家族因素(例如遗传)或其他因素(例如个体的身体状况)引起的。疾病的发生因人而异,具体取决于众多因素,例如活动水平、饮食、吸烟状况以及其他动态变化的因素(例如炎症水平)。动脉粥样硬化的某些风险评估方法是本领域技术人员已知的因此,在本发明的一个实施例中,所述治疗方法包括向有需要的患者施用包含选自SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:9的氨基酸序列的肽,只要该肽可以下调炎症。在一个实施例中,该肽是选自SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30和SEQ ID NO:32的氨基酸序列。

[0144] 令人惊奇的是,本文的进展还表明,本文的肽可用于逆转已经显示出动脉粥样硬化迹象的个体的疾病过程。因此,本发明的一个方面是逆转动脉粥样硬化的方法,其包括对诊断为患有动脉粥样硬化的患者给药。在一个实施例中,该肽包含选自SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:9的氨基酸序列。在一个实施例中,该肽是选自SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:9的氨基酸序列。本文所用的逆转动脉粥样硬化的短语是指将患有动脉粥样硬化的个体的主动脉弓浸润,斑块和病变减少到与可观察到的较低水平相当的水平,或者在某些情况下减少到非动脉粥样硬化个体中更常见的水平。

[0145] 如已经描述的,本发明的肽选择性地结合表达CD40的细胞。因此,本发明的肽可以用于鉴定Th40细胞。因此,本发明的一个实施例是一种检测Th40依赖性动脉粥样硬化的方法。包括使T细胞群体与本文的肽接触。在一个优选的实施例中,该肽用可检测的标记物标记,例如荧光素酶或碱性磷酸酶。这种检测可以使用本领域技术人员已知的测定技术进行。通常,使用本文的肽检测Th40细胞的测定法包括:(a)获得细胞样品;(b)在适合于使该肽与Th40细胞结合的条件下,使本发明的肽与所述细胞接触;(c)使用破坏非特异性相互作用并

去除未结合的肽的条件洗涤所述细胞；(d) 检测与肽结合的肽。结合的肽的检测可以直接或间接地实现。例如，如本文所公开的，可以使用使用可检测的标记物标记的肽来实现直接检测。然后简单筛选细胞中是否存在可检测标记物。细胞样品中可检测标记物的存在表明Th40细胞的存在，并因此表明Th40依赖性动脉粥样硬化。或者，间接检测涉及使用第二种分子，例如与肽结合的抗体。在间接检测分析中，在上面列出的洗涤步骤之后，将与肽结合的检测分子添加到细胞样品中，用可检测的标记物标记检测分子。分子，筛选细胞中是否存在可检测标记物。细胞样品中可检测标记物的存在表明Th40细胞的存在。因此，本文所描述的测定法是有用测定法的实例，并且可以采用其他测定法技术。合适的测定法是本领域技术人员已知的，并且还公开在例如《分子克隆：实验室手册》(Molecular Cloning: A Laboratory Manual), Sambrook, J., Fritsch, EF, 和 Maniatis, T, Cold Spring Harbor Laboratory Press; 第二版(1989年12月)。本文引用的所有参考文献均全文纳入本文。

[0146] 上述测定技术还可以用于鉴定影响CD40蛋白与CD154蛋白相互作用的其他分子，这类分子的示例包括但不限于蛋白质、肽和小分子。设计用于测试分子与本研究开发的肽竞争与Th40细胞结合的能力的方法。例如，可以将可检测标记物标记的肽与测试分子和已知含有在允许肽与Th40细胞结合的条件下，在合适的温育期后洗涤Th40细胞以去除未结合的肽，并筛选可检测标记物存在的细胞；或者，可以结合标记的肽首先将其转移到Th40细胞中，然后在洗涤步骤中去除未结合的肽后，可以将测试分子添加到含有结合肽的细胞中。在去除未结合分子或释放肽的步骤中，筛选细胞中是否存在可检测的标记物。无论哪种情况，细胞样品中都没有可检测的标记，表明测试分子能够与肽竞争与Th40细胞的结合，而可检测标记的存在将表明该测试分子不会抑制该肽与Th40细胞的结合。结合的抑制不必是100%，因为这种测定方法也可用于鉴定部分抑制Th40细胞结合的分子。本领域技术人员应理解，此类测定将涉及使用阳性对照(例如未标记的肽)和阴性对照(例如已知不与Th40细胞结合的蛋白质/分子)。

[0147] 由于增加的Th40细胞水平与自身免疫性疾病的发展有关，因此目前的发展可用于识别有发展为自身免疫性疾病和与自身免疫性相关的动脉粥样硬化和/或心血管疾病的风险的患者。因此，本发明的一个实施例在一种实施例中，通过从待测患者获得样品，使所述样品的T细胞部分与肽接触，来鉴定处于发展为动脉粥样硬化风险的患者。因此，确定样品中存在的Th40细胞水平，其中Th40细胞水平大于总T细胞群体的约25%表明患者处于发展为动脉粥样硬化疾病的危险中。在一个实施例中，该肽包含选自SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30和SEQ ID NO:32的氨基酸序列，只要该肽与CD40蛋白结合即可。在一个实施例中，该肽是选自SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30和SEQ ID NO:32的氨基酸序列。在优选的实施例中，肽用合适的可检测标记物标记，例如荧光素酶或碱性磷酸酶。

[0148] 本发明还包括用于实施本文公开的方法的试剂盒，该试剂盒包含以调节动脉粥样硬化的方式与CD40蛋白相互作用的肽。在一个实施例中，该肽包含选自SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:9的氨基酸序列，只要该肽可以下调动脉粥样硬化。在一个实施例中，该肽是一种选自SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:7、SEQ

ID NO:8和SEQ ID NO:9的氨基酸序列。另一个实施例是用于确定Th40细胞水平的试剂盒,该试剂盒包含与CD40蛋白相互作用的多肽,以及检测与CD40结合的多肽的方法。试剂盒还可以包含相关的试剂和成分,例如但不限于缓冲液、标签、容器、插入物、管材、小瓶、注射器等。

[0149] 2型糖尿病的相关发展

[0150] 本主题基于以下发现:T细胞的独特子集表达CD40蛋白,因此被称为Th40细胞,可能有助于自身免疫炎症,包括2型糖尿病等疾病。Th40细胞参与自身免疫过程可能取决于T细胞表面表达的CD40蛋白与CD154蛋白之间的相互作用。CD40和CD154的相互作用导致激活信号在细胞之间传递,并随后激活这种激活会导致Th40细胞增殖并增加炎症(例如,系统中存在的免疫细胞和免疫调节分子数量增加)。相应地,对CD40/CD154相互作用的抑制作用可以调节Th40细胞活性,从而影响炎症。因此,本发明涉及可能影响相互作用的肽及其给药。CD40蛋白和CD154蛋白可调节炎症反应。此外,本发明涉及影响T细胞表面表达的CD40蛋白与CD154蛋白之间相互作用的肽,从而影响T细胞活性,控制炎症并因此预防、调节、减少和/或逆转2型糖尿病。本主题还包括使用此类肽来检测Th40细胞。

[0151] 本发明的一个实施例是一种以预防2型糖尿病的方式与CD40蛋白相互作用的肽。如本文所用,术语相互作用,相互作用等是指两个分子在物理上足够接近。一种这样的相互作用类型是结合相互作用。在这种相互作用中,肽与CD40结合形成复合物。复合物形成的一个示例是抗原与抗体的结合。在本主题中,其肽与CD40蛋白的结合可以是可逆的(例如,非共价结合相互作用)或不可逆的(例如,共价结合相互作用)。此外,可逆的相互作用可以是强的或弱的。相互作用的强度取决于每种蛋白质在复合物中另一种蛋白质上施加的力(例如离子电荷、氢键、范德华兹相互作用等)。两个分子之间相互作用的强度是本领域技术人员已知的。解离常数(Kd)是衡量两个分子(例如肽和蛋白质)之间结合强度的一种有用的量度。本发明的优选的肽是那些以不大于约 1×10^{-6} M、约 1×10^{-7} M或约 1×10^{-8} M的Kd与CD40蛋白结合的肽。特别优选的肽是具有小于约 1×10^{-9} M的Kd的那些肽。在一个实施例中,其肽以小于100nM、小于50nM、小于25nM、小于10nM、小于5nM、小于3nM、小于2nM或小于1nM的Kd结合CD40蛋白。测量和分析肽与CD40蛋白之间的结合相互作用的方法是本领域技术人员已知的。

[0152] 如本文所用,存在于动物或T细胞培养物中的Th40细胞水平的变化可以指示炎症的调节。如本文所用术语,水平、数量、计数和浓度可以互换使用。炎症可能意味着在炎症环境中存在的Th40细胞数量增加或减少;但是,炎症的调节不应该局限于细胞数或细胞计数。因此,调节可以称为阳性或阴性。炎症的阳性调节(也称为上调)可能导致炎症环境中的Th40细胞数量增加。炎症的负调节(也称为下调)可能导致炎症环境中存在的Th40细胞数量减少。Th40细胞的水平、数量或浓度可能不在炎症环境中指示炎症的一种肽。一种优选的肽可能是一种下调炎症的肽,从而减少了在炎症环境中存在的Th40细胞的数量。炎症的正负调节可能会或不会导致炎症环境中存在的免疫调节分子的类型和数量发生变化。在某些情况下,Th40水平可能不会改变,但那些细胞的活性会发生改变因此,如本文所用,调节炎症可能是指体或样品中Th40水平、数量或浓度的变化,也可能是指变化。更普遍地讲,它与疾病、炎性细胞因子和/或细胞衍生的炎性介质分子有关。

[0153] 本领域技术人员将理解,动物的细胞培养系统和免疫系统均包含基础水平的免疫

细胞和免疫调节分子。基础水平和正常水平的短语可以互换使用。如本文所用,一种动物系统的免疫细胞(例如,Th40细胞)或免疫调节分子的基础水平是指个体群体中存在的该细胞类型或免疫调节分子的平均数目。关于细胞培养系统,如本文所用,一种免疫细胞或免疫调节分子的基础水平是指被认为是健康的(即,没有代谢性、自身免疫性或传染性疾病)。存在于未激活的细胞群中的细胞类型或免疫调节分子。本领域技术人员能够确定T细胞或此类细胞群是否被激活。细胞分裂CD69、CD25和/或CD154蛋白表明该细胞已被激活。

[0154] 细胞或分子的基础水平可以是特定量(例如,特定浓度)或可以包含一定范围的量。免疫细胞和免疫调节分子的基础水平或范围是本领域技术人员已知的。例如,在一个健康的个体中,人血中CD4+T细胞的正常水平为500-1500个细胞/ml。此测量的差异可能是由确定细胞计数所用的方法不同引起的。还可以报道细胞数量占总细胞数量的百分比。例如,在健康个体中,Th40细胞占总T细胞数量的不到25%。因此,本文所用术语“炎症”是指在其中Th40细胞组成总T细胞总数的大于约25%、大于约30%、大于约35%、大于约40%、大于约45%、大于约50%、大于约55%、大于约60%、大于约65%、大于约70%、大于约75%或大于约80%的炎症环境。此外,本文优选的肽是将Th40细胞水平降低至总T细胞总数的小于约50%、小于约45%、小于约40%、小于约35%、小于约30%、小于约27%或等于约25%。T细胞群是本领域技术人员已知的。此外,本文公开了使用本文的肽检测Th40细胞的新方法。

[0155] 如本文所用,短语炎症环境是指存在于细胞培养物或动物体内的免疫细胞和相关免疫调节分子的总体种群。因此,短语炎症环境包括以下类型:和/或存在于影响炎症反应的细胞培养物中或动物体内的免疫细胞和免疫调节分子(例如细胞因子)的相对数量。术语炎症环境涵盖的细胞实例包括但不限于:T细胞、嗜中性粒细胞、巨噬细胞、粒细胞等。炎性环境涉及介导急性和慢性炎性的细胞和分子。本领域技术人员应理解,炎性环境是指在一个实施例中,该系统是细胞培养系统。在一个实施例中,该系统是整只动物。

[0156] 本文优选的肽是与溶液中的CD40蛋白选择性相互作用的肽,如使用诸如免疫吸附测定之类的测定所确定的,或在T细胞表面上。如本文所用,术语选择性,选择性、特异性和表示肽对CD40蛋白的亲合力比与CD40蛋白无关的蛋白更大。更具体地讲,术语“选择性”、“选择性”、“特异性”等表示该肽对CD40的亲合力在统计学上显着高于使用标准测定法(例如ELISA)测量的其与阴性对照(例如无关蛋白,例如白蛋白)的亲合力。测定肽与CD40蛋白质选择性相互作用的能力的合适技术是众所周知的这样的测定可以是体外或体内测定。有用的测定的实例包括但不限于酶联免疫测定、竞争性酶联免疫测定、放射免疫测定、荧光免疫测定、化学发光测定、侧向流动测定、流通测定、凝集测定、基于颗粒的测定(例如,使用诸如但不限于磁性颗粒或塑料聚合物之类的颗粒,例如如乳胶或聚苯乙烯珠)、免疫沉淀测定、免疫印迹测定(例如蛋白质印迹)、磷光测定、流通测定、色谱测定、基于聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)的测定、表面等离子体激元共振测定法、分光光度法测定法、基于颗粒的测定法、电子感觉测定法和流式细胞术测定法。进行这种测定法的方法是本领域技术人员众所周知的。可以设计成提供定性、定量或半定量结果的方法,具体取决于使用方法和所需结果的类型。

[0157] 本文的一个实施例是一种肽,其以影响CD40蛋白与CD154蛋白的相互作用从而调节炎症的方式与CD40蛋白相互作用。该肽对CD40/CD154相互作用的作用可以是阳性的或例如,该肽可以与CD40蛋白相互作用,从而增加CD40蛋白与CD154蛋白之间的相互作用强度;

或者,该肽可以与CD40蛋白相互作用,从而强度CD40蛋白与CD154蛋白之间相互作用的强度降低。本领域技术人员已知测量该肽与CD40蛋白之间结合强度的方法。优选的肽是降低相互作用强度的肽。在本文中,优选的肽至少使CD40蛋白与CD154蛋白之间的结合强度降低至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%。特别优选的肽是完全抑制CD40与CD154结合的肽。CD40与CD154之间的结合被完全抑制是指当其肽在通常允许CD40和CD154相互作用的条件下与CD40蛋白和CD154蛋白接近时,不会发生这种相互作用和活化在表达CD40的细胞中没有刺激信号,因此不会发生CD40/CD154介导的炎症调节。在一个实施例中,该肽与CD40蛋白相互作用的方式是减少系统中的炎症水平。在一个实施例中,该肽以抑制系统中炎症发展的方式与CD40蛋白相互作用。一方面,该肽可以改变细胞与细胞间正常发生的其他分子相互作用的方式。这种细胞间相互作用可能是导致炎症的相互作用。其发展的肽可能破坏炎性体复合物,从而可能促进促炎性细胞因子白介素-1 β (IL-1 β) 和白介素-18 (IL-18) 的成熟。此外,本文的肽的一方面是这些肽可破坏胱天蛋白酶1、PYCARD、NALP、胱天蛋白酶5的炎性体复合物、核苷酸结合的寡聚结构域和富含亮氨酸的重复含有受体 (NLR) 和ALR (AIM2样受体)。

[0158] 本文描述的肽的一方面是施用肽可以改变细胞与其他分子相互作用的方式,所述其他分子通常在细胞间相互作用期间发生,这可以指示或导致炎症。本文描述的肽的一方面是这些肽可能会破坏炎症小体,从而改变炎症结果。

[0159] 尽管本文的肽可以与CD40蛋白上的任何位点相互作用,但优选的肽在与CD154结合位点重叠的位置与CD40蛋白相互作用。在一个实施例中,本文的肽在CD154结合位点与CD40蛋白相互作用。这种肽的实例是CD40配体竞争性拮抗剂。如本文所用,将干扰或抑制CD154蛋白与CD40蛋白结合的肽称为小干扰肽 (SIP)。干扰肽是通过理化性质干扰CD40蛋白与CD154蛋白相互作用的肽,从而阻止激活信号传递至CD40承载细胞,从而限制CD40承载细胞的激活如本文所证明,这种干扰的后果是防止T细胞活化和繁殖,以及防止或减轻炎症。

[0160] 另外,小的干扰肽可能会通过其理化特性来干扰CD40蛋白与CD154蛋白的相互作用,从而阻止激活信号传递至带有CD40的细胞,从而限制了CD40的激活如本文所证明的,这种干扰的后果是防止T细胞活化和繁殖,以及预防、减少、调节和逆转2型糖尿病的发展。

[0161] 可用于实施本发明方法的肽的大小应足以与CD40蛋白相互作用,从而调节2型糖尿病。本领域技术人员应理解,优选的肽相对较短,因为它们是优选的肽是长度小于20个氨基酸的那些肽。优选的肽是长度为4、6、8、10、13、15或24个氨基酸的肽。在一个实施例中,肽是选自SEQ ID NO:3 (核心序列,参见表1)、SEQ ID NO:4 (6聚体,参见表1)、SEQ ID NO:5 (8聚体小鼠) 参见表1)、SEQ ID NO:6 (8聚体人类,参见表1)、SEQ ID NO:7 (15聚体人类,参见表1)、SEQ ID NO:8 (15聚体人类,参见表1)、SEQ ID NO:9 (24聚体参见表1)、SEQ ID NO:24 (10聚体参见表1)、SEQ ID NO:25 (13聚体参见表1)、SEQ ID NO:26 (24聚体参见表1)、SEQ ID NO:27 (6聚体 (形式2) 参见表1)、SEQ ID NO:28 (6聚体 (形式3) 参见表1)、SEQ ID NO:29 (6聚体 (形式4) 见表1)、SEQ ID NO:30 (6聚体 (形式4) 见表1) 和SEQ ID NO:32 (24聚体小鼠 (表2) 的氨基酸。这种肽的序列在下表1中显示 (其与先前列出的表1完全相同,但是为了读者的方便在此重复)。

[0162] 表1.

[0163]

SE Q ID NO	序列	描述
1	MIETYSQPSP RSVATGLPAS MKIFMYLLTV FLITQMIGSV LFAVYLHRR L DKVEEEVNLH EDFVFIKKLK RCNKGEGSLS LLNCEEMRRQ FEDLVKDITL NKEEKKENSF EMQRGDEDPQ IAAHVVSEAN SNAASVLQWA KKGYYTMKSN LVMLENGKQL TVKREGLYYV YTQVTFCSNR EPSSQRPFIV GLWLKPSSGS ERILLKAANT HSSSQLCEQQ SVHLGGVFEL QAGASVFVNV TEASQVIHRV GFSSFGLLKL	SwissPro 27548.2 小鼠 CD40 配体 (CD154 蛋白)

[0164]

2	MIETYNQTSP RSAATGLPIS MKIFMYLLTV FLITQMIGSA LFAVYLHRR L DKIEDERNLH EDFVFMKTIQ RCNTGERSLS LLNCEEIKSQ FEGFVKDIML NKEETKKENS FEMQKGDQNP QIAAHVISEA SSKTTSVLQW AEKGYTMSN NLVTLENGKQ LTVKRQGLYY IYAQVTFCSN REASSQAPFI ASLCLKSPGR FERILLRAAN THSSAKPCGQ QSIHLGGVFE LQPGASVFVN VTDPSQVSHG TGFTSFGLLK L	SwissPro 29965 人 CD40 配体 (CD154 蛋白)
3	KGY Y	核心序列
4	KKGY Y T	6 聚体
5	AKKGY Y TM	8 聚体小鼠
6	AEKGY Y TM	8 聚体人类
7	VLQWAKKGY Y TMKSN	15 聚体小鼠
8	VLQWAEKGY Y TMSNN	15 聚体人类
9	NAASVLQWAKKGY Y TMKSNLVMLE	24 聚体
10	ISQAVHAAHAEINEAGR	卵清蛋白 15 聚体; 对照肽
11	G-L-Q-W-A-K-K-G-Y-Y-T-M-K-S-N	甘氨酸-1
12	V-G-Q-W-A-K-K-G-Y-Y-T-M-K-S-N	甘氨酸-2
13	V-L-G-W-A-K-K-G-Y-Y-T-M-K-S-N	甘氨酸-3
14	V-L-Q-G-A-K-K-G-Y-Y-T-M-K-S-N	甘氨酸-4
15	V-L-Q-W-G-K-K-G-Y-Y-T-M-K-S-N	甘氨酸-5
16	V-L-Q-W-A-G-K-G-Y-Y-T-M-K-S-N	甘氨酸-6
17	V-L-Q-W-A-K-G-G-Y-Y-T-M-K-S-N	甘氨酸-7
18	V-L-Q-W-A-K-K-G-G-Y-T-M-K-S-N	甘氨酸-8
19	V-L-Q-W-A-K-K-G-Y-G-T-M-K-S-N	甘氨酸-9
20	V-L-Q-W-A-K-K-G-Y-Y-G-M-K-S-N	甘氨酸-10
21	V-L-Q-W-A-K-K-G-Y-Y-T-G-K-S-N	甘氨酸-11
22	ISQAVHAAHAEINEAGR	卵清蛋白 15 聚体; 对照肽
23	YVQGKANLKSCLMYT	乱序肽
24	WAKKGY Y TMK	10 聚体小鼠
25	VLQWAKKGY Y TMK	13 聚体小鼠
26	AASVLQWAKKGY Y TMKSNLVMLEN	24 聚体小鼠
27	KGY Y TM	6 聚体(形式 2)
28	AEKGY Y	6 聚体(形式 3)
29	AKKGY Y	6 聚体(形式 4)
30	AKGY Y T	6 聚体(形式 5)
31	YKNVKQMAYWLTGKS	乱序肽
32	AASVLQWAKKGY Y TMKSNLVMLEN	24 聚体小鼠(形式 2)

[0165] 已经显示出CD40蛋白和CD154蛋白的相互作用发生在每种蛋白内的特定区域。发明人现在已经令人惊讶地表明,仅包含与CD40相互作用的CD154区的一小部分的肽能够结合至CD40蛋白,从而调节2型糖尿病。因此,本文的一个实施例是一种肽,其包含CD154蛋白的氨基酸序列的至少一部分,使得该肽以调节2型糖尿病的方式与CD40蛋白相互作用。在一个实施例中,该肽与CD40蛋白的相互作用导致2型糖尿病的负调节、减少或抑制。在一方面,该肽包含SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的至少一部分。

[0166] 一方面,该肽尽可能短,但包含足够的CD154蛋白以允许以调节2型糖尿病的方式与CD 40蛋白相互作用。在一个实施例中,其肽包含来自SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的6、13或15个连续氨基酸,并以调节2型糖尿病的方式与CD40相互作用。优选的肽包含赖氨酸-甘氨酸-酪氨酸-酪氨酸(KGYI;SEQ ID NO:3),其对应于SEQ ID NO:1的氨基酸142-145和SEQ ID NO:2的氨基酸143-146。此外,另一种优选的肽包含赖氨酸-甘氨酸-酪氨酸-酪氨酸的核心序列-苏氨酸-蛋氨酸(KGYITM;SEQ ID NO:27),对应于SEQ ID NO:1的氨基酸142-147和SEQ ID NO:2的氨基酸143-148。有用的肽可以包含来自以下序列的其他区域SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2与核心序列相邻,只要该肽能够调节2型糖尿病。在本文的一个实施例中,一种肽包含选自以下的至少一个序列:SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30和SEQ ID NO:32,只要该肽以调节2型糖尿病的方式与CD40蛋白相互作用。在一个实施中,本文的肽是选自SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30和SEQ ID NO:32的序列。

[0167] 尽管本主题的肽可以完全选自或选自负责该肽与CD40蛋白相互作用的序列,但是它们可以另外包含不与CD40蛋白相互作用但具有其他用途的氨基酸序列。任何有用的附加氨基酸序列都可以添加到CD40相互作用序列中,只要这些附加序列不会对CD40相互作用序列与CD40蛋白质相互作用的能力产生不良影响即可。除了负责与CD40蛋白相互作用的氨基酸序列外,其肽还可以包含可用于可视化或纯化该肽的氨基酸序列。这些序列可作为标记(例如酶)或标签(抗体结合位点)。另外,本文提出的发展表明,在15聚体的7-位(K)和15聚体的9-位(Y)以外的任何位置的氨基酸取代,并且可以保持肽的完整性和功能(参见图8)。因此,这些发展可以设想在保持肽的有益方面的同时进行许多取代。

[0168] 可以将任何有用的其他氨基酸序列添加到CD40相互作用序列中,只要这些附加序列不会对CD40相互作用序列与CD40蛋白相互作用的能力产生不良影响。在负责与CD40蛋白相互作用的氨基酸序列中,其肽可包含可用于可视化或纯化该肽的氨基酸序列。此类标记和标签的示例包括但不限于B-半乳糖苷酶、萤光素酶、谷胱甘肽-S-转移酶、硫氧还蛋白、HIS标签、生物素标签和荧光标签。此外,乙酰基和酰胺可以附加在N端或C端,其发展考虑了这些和其他可能增强的变化此类肽的稳定性或其他所需的性状。用于标记和标记蛋白质的其他有用序列是本领域技术人员已知的。

[0169] 同样地,本文的肽可以被修饰,只要这种修饰不显著影响该肽调节2型糖尿病的能力即可。例如可以进行这种修饰以增加蛋白质的稳定性、溶解性或吸收性。此类修饰的修饰包括但不限于肽的聚乙二醇化、糖基化和化学修饰。

[0170] 本文的肽可能来自自然界(例如,从植物、动物或微生物获得),或者它们可以在实验室中产生(例如,重组或合成)。优选的肽是合成的那些。也包括作为组合的肽。产生和分

离重组或合成肽的一般方法是本领域技术人员已知的。应注意,如本文所用,分离的或生物学上纯的分子是已被去除的分子。因此,术语分离的,生物学纯净的等不一定反映蛋白质被纯化的程度。

[0171] 本文的肽不是天然存在于有孔的体内,而是必须进行构建和合成以获得小的干扰肽。设计和合成的某些方面可能会影响肽的稳定性和执行其预期用途的能力。本文的肽长度可以不同,如SEQ ID NO:3中的四个氨基酸、SEQ ID NO:4、27、28、29和30中的五个氨基酸、六个氨基酸;SEQ ID NO:5和6中的七个氨基酸、8个氨基酸;SEQ ID NO:24中的9个氨基酸、10个氨基酸;SEQ ID NO:25中的长度为11个氨基酸、长度为12个氨基酸、13个氨基酸;SEQ ID NO:7、8、11、12、13、14、15、16、17、18和20中的长度为14个氨基酸、长度为15个氨基酸;SEQ ID NO:26和32中的长度为16个氨基酸、长度为17个氨基酸、长度为18个氨基酸、长度为19个氨基酸、长度为20个氨基酸、长度为21个氨基酸、长度为22个氨基酸、长度为23个氨基酸、长度为24个氨基酸、以及25个氨基酸。在一些情况下,该发育的实施例的长度可以高达五十个或更多个氨基酸,并且在这种情况下,SEQ ID NO:3的核心序列的重复可以出现1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多次。在其他情况下,该开发的实施例的长度可以是多达五十个或更多个氨基酸,并且在这种情况下,核心序列的重复SEQ ID NO:3的序列可以用已知能提供所需效果的其他序列例如SEQ ID NO:4-9、25-30和32的序列进行改变。然而,本文的发展设想了一种肽,该肽以改变、控制或影响受试者的炎症的方式维持其与CD40相互作用的预期用途。

[0172] 如本文所述,CD40蛋白和CD154蛋白的相互作用对于Th40细胞参与2型糖尿病是必需的。因此,使用本文的肽抑制CD40和CD154蛋白之间的相互作用是影响2型糖尿病的有用方法。因此,一个实施例是一种减少CD40蛋白与CD154蛋白之间相互作用的方法,该方法包括将与CD40蛋白相互作用的肽引入含有CD40蛋白和CD154蛋白的环境中,使得降低CD40蛋白和CD154蛋白之间的相互作用。在一方面,该肽使CD40蛋白和CD154蛋白之间的相互作用降低至少5%、至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%。在一个实施方案中,该肽将CD40蛋白与CD154蛋白之间的相互作用降低至少10%、至少100%、至少1,000%、至少10,000%。先前已经讨论了测量CD40蛋白与CD154蛋白之间相互作用的强度的方法,这也是本领域技术人员已知的。

[0173] 本文的一个实施例是一种调节2型糖尿病的方法,该方法包括使CD40蛋白与以与调节炎症的方式与CD40相互作用的肽相接触。一方面,该肽与CD40蛋白的相互作用增加Th40细胞的数量至少5%、至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%。在一个实施例中,肽与CD40蛋白的相互作用将Th40细胞的数量增加了至少10%、至少100%、至少1,000%、至少10,000%的倍数。

[0174] 一个方面是一种减少患者中的2型糖尿病的方法,该方法包括向该患者施用其肽。在一个实施例中,该肽包含选自SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30和SEQ ID NO:32。在一个实施例中,该肽是选自SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28和SEQ ID NO:29的氨基酸序列。在一个优选的实施例中,肽与CD40蛋白的相互作用将Th40细胞的数量减少了至少5%、至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至

少80%、至少90%或至少95%。在一个实施例中,肽与CD40蛋白的相互作用将Th40细胞的数量减少了至少10倍、至少100倍、至少1000倍、至少10倍。在一个优选的实施例中,降低了Th40细胞的水平,使得Th40细胞包含不超过总T细胞群体的约20%、约25%、约30%、约35%或约40%。

[0175] 本文的肽和方法适用于细胞培养以及用于治疗患者。本文所用的术语患者是指需要这种治疗的任何动物。该动物可以是人类或非人类动物。可以本身施用或施用肽,或以药物组合物的形式施用本发明的肽或其药物组合物,可以通过多种途径将其施用给患者,所述途径包括但不限于:通过注射(例如,静脉内、肌肉内、皮下、鞘内、腹膜内)、通过吸入、通过口服(例如,在丸剂、片剂、胶囊、粉剂、糖浆、溶液、悬浮液、薄膜、分散液或乳剂中)、透皮经鼻、经粘膜、肺、颊、鼻内、舌下、脑内、阴道内直肠或局部给药或通过本领域技术人员已知的任何其他方便的方法。

[0176] 可以通过本领域已知的标准临床技术确定将有效的本发明的肽和/或其药物组合物的量。该量除其他因素外还取决于所治疗的患者,包括但不限于根据患者的体重、年龄和病情、该化合物的预期效果、给药方式和开药医师的判断。此外,在这种情况下,应注意的是在治疗表现出以下症状的患者时感兴趣的是,施用治疗有效量的一种或多种这些药剂。治疗有效剂量是指导致减轻一种或多种症状或延长患者存活的化合物的量。

[0177] 本发明的肽或其药物组合物可以单独给药或与一种或多种其他药物试剂(包括本发明的其他化合物)组合给药。具体的药物组合物取决于所需的给药方式,这是技术人员众所周知的。

[0178] 因为发明人已经发现Th40细胞与自身免疫疾病和2型糖尿病的发展密切相关,所以本文公开的肽和方法可用于影响由此类疾病引起的调节。因此,本文的一个实施方案是一种在需要这种治疗的患者中治疗2型糖尿病的方法,该方法包括向患者施用与CD40蛋白相互作用的肽,从而减少2型糖尿病。在一个实施例中,该肽与CD40蛋白相互作用以影响,CD40和CD154的相互作用,从而减少2型糖尿病。在一个优选的实施例中,该肽与CD40蛋白的相互作用使患者中的Th40细胞数量减少到与在没有2型糖尿病的受试者中观察到的水平相等的水平。在另一个实施例中,该肽与CD40蛋白的相互作用降低了患者体内的炎性细胞因子水平。带有CD40蛋白的肽离子可将患者的炎性细胞因子水平降低至与未患有2型糖尿病的受试者所观察到的水平相同或相似。本发明适用于治疗任何自身免疫性疾病和/或与心血管疾病有关,其发展可能与Th40细胞相关、相关联或依赖。目前的发展也可能适用于治疗任何与自身免疫性疾病和/或心血管疾病无关的患者与Th40细胞计数、水平和/或浓度相关,或相关联。

[0179] 在一个实施例中,更具体地,本文的肽可以适合于降低此类患者中的Th40细胞的水平。在这一实施例中,本文的肽可以将患有自身免疫性疾病的患者中的Th40细胞的水平降低至不超过T细胞总数的25%。

[0180] 特别适合使用本发明的肽治疗的疾病的一个实例可以是2型糖尿病。在2型糖尿病中,葡萄糖耐量降低,胰岛素敏感性降低,血浆胰岛素水平升高。炎症细胞和通过CD40-CD154相互作用产生的细胞信号传导可能能够用于控制、调节、减轻和/或逆转以葡萄糖耐量下降,胰岛素抵抗和血浆胰岛素水平升高为特征的2型糖尿病症状。已经开发出了T2D和/或动脉粥样硬化的方法。为进行初步研究,选择ApoE^{-/-}小鼠是因为它们具有从高脂饮食中

发展2型糖尿病的能力,并对所有小鼠进行了糖耐量和胰岛素测试。通过静脉输注以1mg/kg的剂量每周向小鼠施用6聚体肽(SEQ ID NO:29)与对照组相比,肽治疗的ApoE缺陷小鼠表现出显着提高的葡萄糖耐量以及显着改善的胰岛素敏感性、改善的胰岛素抵抗和降低的血浆胰岛素水平。因此,本发明的一个实施例是一种预防2型的方法在具有发展为2型糖尿病风险的个体中的糖尿病的方法,该方法包括向该个体施用与CD40表达细胞选择性结合的肽。在这样的实施例中,该肽可以选自SEQ ID NO:3-9和24-30。

[0181] 本发明的发展还表明,令人惊奇地,本发明的肽可用于已经已经显示出2型糖尿病迹象的个体中逆转疾病过程。因此,本发明的一个方面是一种逆转2型糖尿病的方法,其包括向被诊断为患有2型糖尿病的患者施用所述肽。在一个实施例中,该肽包含选自SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:30的氨基酸序列,只要该肽可以下调或减轻炎症。在一个实施例中,该肽是选自SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:30的氨基酸序列。如本文所用,逆转2型糖尿病的短语是指增加葡萄糖耐量、降低胰岛素抵抗和将血浆胰岛素水平降低至接近或更高的水平。与在没有2型糖尿病的个体中观察到的结果相比具有可比性。

[0182] 在本发明的另一形成中,令人惊讶地,本发明的肽可用于逆转已经显示出2型糖尿病迹象的个体的疾病过程。因此,本主题的一个方面是一种逆转2型糖尿病的方法,该方法包括向诊断为患有2型糖尿病的患者施用其肽。在一个实施例中,该肽包含选自SEQ ID NO:3-9和24-30的氨基酸序列,只要该肽可以控制、调节、还原即可。在一个实施例中,该肽是选自SEQ ID NO:3-9和24-30的氨基酸序列,只要该肽可以控制、调节、减少和/或逆转2型糖尿病即可。此外,在该实施例的一个方面,本文的肽可将患有自身免疫疾病的患者中的Th40细胞水平降低至不超过总T细胞群体的约25%。在另一个实施例中,该肽的相互作用与CD40p蛋白质将患者中的Th40细胞数量减少到与未患有2型糖尿病的受试者中观察到的水平相同的水平。在另一个实施例中,肽与CD40蛋白的相互作用降低了患者中炎性细胞因子的水平。在一个实施例中,该肽与CD40蛋白的相互作用将患者中的炎性细胞因子水平降低至与在没有2型糖尿病的受试者中观察到的水平相等或相似的水平。本发明可能适用于治疗任何患有自身免疫性疾病的患者。疾病和/或心血管疾病的发展可能与Th40细胞有关、相关或依赖于本发明。本发明的发展也可能适用于治疗患有自身免疫性疾病和/或心血管疾病的任何患者,与Th40细胞计数、水平和/或浓度无关、无联系相关或不依赖。

[0183] 如已经描述的,本发明的肽选择性地结合CD40表达细胞。因此,本主题的肽可以用于鉴定Th40细胞。因此,本发明的一个实施例是一种检测Th40依赖性2型糖尿病的方法,所述方法包括使T细胞群体与本文的肽接触。在一个优选的实施例中,所述肽用可检测的标记物标记,例如荧光素、荧光素酶或碱性磷酸酶。这种检测可以使用已知的测定技术进行。通常,使用本文的肽检测Th40细胞的测定法包括:(a)获得细胞样品;(b)在适合于使该肽与Th40细胞结合的条件下,使本发明的肽与所述细胞接触;(c)使用破坏非特异性相互作用并去除未结合的肽的条件洗涤所述细胞;结合的肽的检测可以直接或间接地实现。例如,如本文所公开的,可以使用使用可检测的标记物标记的肽来实现直接检测。然后简单地筛选细胞中是否存在可检测的标记物。细胞样品中可检测到的标记物的存在表明Th40细胞的存在,从而表明Th40依赖性2型糖尿病的存在。或者,间接检测涉及使用第二种分子,例如在间

接检测分析中,在上面列出的洗涤步骤之后,将与肽结合的检测分子添加到细胞样品中,用可检测的标记物标记检测分子。未结合的检测分子,则筛选细胞中是否存在可检测标记物。细胞样品中可检测标记物的存在表明Th40细胞的存在。因此,本文所描述的测定法是有用测定法的实例,并且可以采用其他测定法技术。合适的测定法是本领域技术人员已知的,并且还公开在例如《分子克隆:实验室手册》(Molecular Cloning:A Laboratory Manual)中。Sambrook,J.,Fritsch,EF,和Maniatis,T,冷泉港实验室出版社。第二版(1989年12月)。本文引用的所有参考文献均全文纳入本文。

[0184] 上述测定技术还可以用于鉴定影响CD40蛋白与CD514蛋白相互作用的其他分子,此类分子的示例包括但不限于蛋白质、肽和小分子。设计用于测试分子与本研究开发的肽竞争与Th40细胞结合的能力的方法。例如,可以将可检测标记物标记的肽与测试分子和已知含有在允许肽与Th40细胞结合的条件下,在合适的温育期后洗涤Th40细胞以去除未结合的肽,并筛选可检测标记物存在的细胞;或者,可以结合标记的肽首先将其转移到Th40细胞中,然后在洗涤步骤中去除未结合的肽后,可以将测试分子添加到含有结合肽的细胞中。在去除未结合的分子或释放的肽的步骤中,筛选细胞中是否存在可检测的标记物。在任何一种情况下,细胞样品中都不存在可检测的标记物表明测试分子能够与该肽竞争与Th40细胞结合。虽然存在可检测的标记将表明测试分子不会抑制肽与Th40细胞的结合。结合的抑制不必是100%,因为这种测定方法也可用于鉴定部分抑制Th40细胞结合的分子。本领域技术人员应理解,此类测定将涉及使用阳性对照(例如未标记的肽)和阴性对照(例如已知不与Th40细胞结合的蛋白质/分子)。

[0185] 上述测定技术还可用于鉴定影响CD40蛋白与CD154蛋白相互作用的其他分子,此类分子的示例包括但不限于蛋白质、肽和小分子。设计用于测试分子与本发明开发的肽竞争与T细胞以外的细胞(例如嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、肥大细胞、巨噬细胞、血小板、内皮细胞和淋巴细胞)CD40蛋白结合的能力,包括天然杀伤细胞和B细胞。例如,在允许肽与CD40结合的条件下,可以将标记有可检测标记的肽与测试分子和已知含有CD40的细胞群体混合在适当的温育期后,洗涤细胞以去除未结合的肽,并筛选细胞中是否存在可检测的标记物。肽可以先结合到CD40携带的细胞上,然后在洗涤步骤中去除未结合的肽后,可以将测试分子添加到含有结合肽的细胞中。经过一个孵育期和洗涤步骤以去除未结合的分子或释放的肽后,在这两种情况下,如果细胞样品中都没有可检测标记,则表明测试分子能够与肽竞争结合CD40的细胞,而可检测标记的存在将表示受试分子不抑制肽与CD40结合细胞的结合。结合的抑制不必是100%,因为这样的测定也可用于鉴定部分抑制肽与CD40结合细胞的分子。本领域技术人员应理解,这种测定将涉及使用阳性对照(例如未标记的肽)和阴性对照(例如已知不结合CD40的细胞的蛋白质/分子)。

[0186] 由于Th40细胞水平升高与自身免疫性疾病的发展有关,因此目前的研究可用于鉴定有患自身免疫性疾病和自身免疫性2型糖尿病风险的患者。因此,本发明的一个实施方案是一种鉴定具有发展自身免疫相关的2型糖尿病风险的患者患者的方法。在一个实施例中,通过从待测患者获得样品,使所述样品的T细胞部分与本文的肽接触,并确定样品中存在的Th40细胞的水平来鉴定处于患2型糖尿病的风险的患者,其中Th40细胞的水平大于总T细胞总数的约25%表示患者处于发展2型糖尿病的风险中。在一个实施方案中,该肽包含选自以下的氨基酸序列:SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:4,SEQ ID NO:7,SEQ ID NO:8,SEQ ID NO:9,SEQ ID

NO:27,SEQ ID NO:28,SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:30,只要该肽与CD40蛋白结合即可。在一个实施方案中,该肽是选自SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:4,SEQ ID NO:7,SEQ ID NO:8,SEQ ID NO:9,SEQ ID NO:27,SEQ ID NO:28,SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:30的氨基酸序列。在一个优选的实施方案中,肽用合适的可检测标记物标记,例如荧光素、荧光素酶或碱性磷酸酶。在另一个实施方案中,该肽包含选自SEQ ID NO:4-9、24-30和32的氨基酸序列,只要该肽结合CD40蛋白即可。

[0187] 本发明还包括可用于实施本文公开的方法的试剂盒,该试剂盒包含以调节、减少、预防、治疗或以其他方式改善2型糖尿病症状的方式与CD40蛋白相互作用的肽。在一个实施例中,所述肽包含选自SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:30的氨基酸序列,只要该肽可以调节2型糖尿病。在一个实施例中,该肽是选自SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:30的氨基酸序列。另一个实施例是用于确定Th40细胞的水平的试剂盒,该试剂盒包含与CD40蛋白相互作用的肽,以及检测CD40结合肽的方法。该试剂盒还可以包含相关的试剂和成分,例如但不限于缓冲液、标记、容器、插入物、油管、小瓶、注射器等。

[0188] 本发明还包括可用于实施本文公开的方法的试剂盒,该试剂盒包含以调节、减少、预防、治疗或以其他方式改善2型糖尿病症状的方式与CD40蛋白相互作用的肽。在一个实施例中,该肽包含选自SEQ ID NO:3-9和24-30的氨基酸序列,只要该肽可以调节2型糖尿病。在一个实施例中,该肽是选自SEQ ID NO:3-9和24-30的氨基酸序列。另一个实施例是用于确定Th40细胞水平的试剂盒,该试剂盒包含与CD40蛋白相互作用的肽,以及检测与CD40结合的肽的方法。该试剂盒还可以包含相关试剂和组件,例如但不限于缓冲液、标签、容器、插入物、管材、小瓶、注射器等。

[0189] 提供以下实施例是为了说明的目的,并不旨在限制本发明的范围。

[0190] 示例

[0191] 示例1

[0192] 该实施例证明了NOD小鼠中CD154的各种肽片段对CD4/CD8比率的影响和糖尿病的发展。

[0193] 根据SwissPro数据库中小鼠CD154蛋白的氨基酸序列(SEQ ID NO:1)设计肽、肽(8聚体(SEQ ID NO:5;SEQ ID NO:6)、10聚体(SEQ ID NO:24)、13聚体(SEQ ID NO:25)、15聚体(SEQ ID NO:7)、24聚体(SEQ ID NO:26)、乱序(SEQ ID NO:23)和RGD,然后从New England Peptide订购RGD(Arginylglycylaspartic acid)。RGD肽是CD154序列中不包含CD40结合基序的15个氨基酸序列。冻干的肽以1mg/ml的浓度悬浮在无菌盐水中25然后将100 μ g(1mg/kg)的特定肽注射到6周龄的NOD小鼠的尾静脉中,对照组的小鼠接受了100u1的无菌盐水,这早于糖尿病(和动脉粥样硬化)发作之前,但是胰岛受损开始后,每周注射一次,将另外25ug肽(对于对照小鼠为100u1盐水)注射到尾静脉中。在10周大时,对小鼠进行监测连续三天血糖水平高于250mg/dL表示糖尿病的研究结果如图1所示。在这段时间里,血液还从尾静脉或下颌下颌骨采集静脉穿刺,并使用CD4蛋白和CD8蛋白抗体通过流式细胞术确定CD4+和CD8+细胞的水平。该分析的结果如图2A所示。

[0194] 切除胰腺并通过组织学检查细胞浸润情况,并根据可观察,可测量和可量化的数

据分配分数:0=无浸润;1=一极渗透;2=胰岛周围炎,双相浸润;3=75%渗透,4=完全渗透。分析结果如图2B所示。

[0195] 结果表明,用与CD154蛋白无关的肽治疗并不能减少NOD小鼠的糖尿病发展。相反,用源自CD154蛋白的15聚体肽治疗小鼠可以预防糖尿病的发作。源自CD154蛋白的13聚体肽对糖尿病的发展具有显著影响。此外,数据表明,由CD4/CD8比率确定,该15聚体肽不会导致免疫系统受损。

[0196] 示例2

[0197] 该实施例证明了15聚体肽对新糖尿病NOD小鼠中的高血糖症的作用。

[0198] 允许实施例1的六只未经治疗的小鼠随后患上糖尿病。向这些小鼠静脉注射100ug 15聚体肽,然后每周向这些小鼠的尾静脉注射15聚体肽,每周两次监测其血糖水平。共施用15聚体肽长达10周,之后停止治疗。本研究的结果如图3所示。

[0199] 这项研究表明向已经患有糖尿病的小鼠注射15聚体肽可以逆转高血糖症,也表明停止治疗会在5周内恢复高血糖症。

[0200] 示例3

[0201] 这项研究证明了15聚体肽与Th40细胞和B细胞结合的能力。

[0202] 从9周大的NOD小鼠中分离出总淋巴细胞,将淋巴细胞与抗CD4、抗CD8、抗CD40和FITC标记的15聚体肽一起孵育,然后通过流式细胞仪进行分析。包括CD4hi和CD4lo群体)和CD40与15聚体肽的比较分析结果如图4所示。

[0203] 从NOD小鼠的脾脏中分离出B细胞,从总淋巴细胞中纯化分离出的MHC-II+细胞,并用FITC标记的15聚体肽、抗CD40和B细胞标志物CD19和CD21对MHC-II+细胞进行染色。对MHC-II+细胞的CD19+和CD21+进行门控,然后测量15聚体肽对CD40抗体的影响。本研究的结果如图5所示。

[0204] 这项研究表明,绝大多数(90%)CD40+T细胞也结合15聚体肽,从而表明15聚体肽对CD40+细胞具有高度特异性;还表明,虽然90%的B细胞是CD40+T细胞。CD40阳性,只有8%的B细胞结合15聚体肽。

[0205] 示例4

[0206] 该实施例证实了I型糖尿病受试者和非糖尿病(对照)受试者的血液中CD40阳性细胞的水平。

[0207] 从每个个体中获取1ml全血,并与生物素偶联的15聚体肽孵育,然后将细胞暴露于辣根过氧化物酶(HRP)-亲和素中,洗涤并使用分光光度计测定405nm的吸光度。这项研究的结果如图6所示。

[0208] 这项研究表明,来自I型糖尿病患者的血细胞比非糖尿病对照组的血细胞具有更高的15聚体肽结合活性。

[0209] 示例5

[0210] 该实施例证实了在用15聚体肽或卵清蛋白肽处理的NOD小鼠的胰腺中观察到的胰岛素颗粒化水平。

[0211] 在糖尿病发作时,向六只NOD小鼠注射100ug/ml的15聚体肽,导致80%的受体发生高血糖逆转。高血糖逆转后六周,处死小鼠并胰腺固定胰腺,切成薄片,然后用能检测胰岛素颗粒的醛/fuschsin染色剂染色。将组织的肉芽打分如下:4=完全肉芽;3=75%的胰岛

颗粒化;2=50%的胰岛颗粒化,以及周围性胰岛炎;1=25%的胰岛颗粒化;0=未检测到胰岛素颗粒。分析结果如图7所示。

[0212] 该分析表明15聚体肽在大多数小鼠中保留了胰岛素颗粒,并且与接受无关肽的糖尿病小鼠相比,在肽反向糖尿病小鼠中该15聚体肽显着改善。

[0213] 示例6

[0214] 该实施例证实了15聚体肽中的突变对其预防糖尿病发作的能力的影响。图8提供了与该示例6有关的结果。

[0215] 如实施例1中所述设计和生产肽。生产各种肽,以使得在每个变体中,甘氨酸代替对应于SEQ ID NO:7的1-7位或9-12位氨基酸的氨基酸,如下所示:

[0216] Gly-1 G-L-Q-W-A-K-K-G-Y-Y-T-M-K-S-N(SEQ ID NO:11)

[0217] Gly-2 V-G-Q-W-A-K-K-G-Y-Y-T-M-K-S-N(SEQ ID NO:12)

[0218] Gly-3 V-L-G-W-A-K-K-G-Y-Y-T-M-K-S-N(SEQ ID NO:13)

[0219] Gly-4 V-L-Q-G-A-K-K-G-Y-Y-T-M-K-S-N(SEQ ID NO:14)

[0220] Gly-5 V-L-Q-W-G-K-K-G-Y-Y-T-M-K-S-N(SEQ ID NO:15)

[0221] Gly-6 V-L-Q-W-A-G-K-G-Y-Y-T-M-K-S-N(SEQ ID NO:16)

[0222] Gly-7 V-L-Q-W-A-K-G-G-Y-Y-T-M-K-S-N(SEQ ID NO:17)

[0223] Gly-9 V-L-Q-W-A-K-K-G-G-Y-T-M-K-S-N(SEQ ID NO:18)

[0224] Gly-10 V-L-Q-W-A-K-K-G-Y-G-T-M-K-S-N(SEQ ID NO:19)

[0225] Gly-11 V-L-Q-W-A-K-K-G-Y-Y-G-M-K-S-N(SEQ ID NO:20)

[0226] Gly-12 V-L-Q-W-A-K-K-G-Y-Y-T-G-K-S-N(SEQ ID NO:21)

[0227] 将NOD小鼠分为10组,每组的小鼠每周静脉注射25ug以上所列的野生型(WT; Legend)肽或变体肽(在PBS中,ph 7.2)。通过每周测量血糖水平进行监测。当血糖连续3次读数为250mg/dl或更高时,小鼠被视为“糖尿病”。从6周龄开始注射=糖尿病前期。

[0228] 本实施例证实了在1-7或9-12位的任何一个位置上的甘氨酸取代都会降低15聚体肽抑制糖尿病发展的能力,也表明这种突变并没有完全消除糖尿病的能力。突变的15聚体肽可抑制糖尿病的发生。Tyr位9、Thr位11和Met位12的取代证明具有高血糖预防活性的差异,如图8所示。因此,还假定第二个6聚体衍生物-SEQ ID NO:27-6聚体(形式2),SEQ ID NO:28-6聚体(形式3),SEQ ID NO:29-6聚体(形式4)和SEQ ID NO:30-6聚体(形式5)也可提供增强的治疗功效。

[0229] 示例7

[0230] 该实施例证实在人类1型糖尿病(T1D)中,在ApoE缺陷的动脉粥样硬化小鼠模型中Th40细胞水平的相同升高也显着升高。

[0231] 如图9所示,测量了外周血中NOD,NOR(非肥胖糖尿病抵抗性)和BALB/c(对照)小鼠中CD3+CD4+CD40+细胞总数的总量。并将其与用于对照、糖尿病/新发病例和长期糖尿病人群的人类受试者外周血Th40细胞(如图10所示)的百分比进行比较。此外,从9周龄的NOD小鼠中分离出淋巴细胞,将淋巴细胞与抗CD,抗CD8和FITC标记的15聚体肽一起孵育,然后通过流式细胞仪进行分析。对细胞进行CD4(包括CD4hi和CD4lo种群)和CD4与15聚体肽的门控,结果如图11所示。

[0232] 选择正常饮食的ApoE缺陷型小鼠,通过静脉内尾注射,在26周内每周3次,从9点开

始接受1mg/kg剂量的15聚体肽(SEQ ID NO:7)。在25周龄时,对动物进行安乐死,称重,然后取出血液、脾脏和胰腺进行分析,然后通过心脏穿刺术向其灌注4%多聚甲醛,并解剖主动脉弓。然后,以蔗糖梯度脱水,然后速冻。每只小鼠获得大约35个8 μ m的纵向切片用于各种染色程序。使用MACSQuant®Analyzer 10 (Miltenyi Biotec Inc.)进行流式细胞术。使用FlowJo®单细胞流式细胞仪软件(Becton Dickinson, Inc. 全资拥有的FlowJo, LLC)进行其他分析。

[0233] 如图12所示,C57BL/6和ApoE^{-/-}小鼠显示出高血糖之前相对于所有CD3+CD4+细胞的Th40细胞水平升高。

[0234] 此外,如图13所示,与对照和年轻的非糖尿病NOD小鼠群体相比,在这项研究中测试的NOD小鼠表现出主动脉中大量Th40浸润。

[0235] 使用油红-O,三色染色和免疫荧光在200倍放大倍数下观察到其中一个纵切面的示例性主动脉斑块,如图14所示。该显微镜和主动脉染色显示不仅Th40如图10-14所示,主动脉中的细胞与外周血相似,但在ApoE^{-/-}模型的斑块的肩部区域(斑块/动脉粥样硬化的生长区域)中也发现了Th40细胞。图14、10和20鉴定了代表CD3+、CD4+和CD40+的细胞(Th40细胞),其细胞内CD40。30证明Th40细胞具有细胞外表达,而在细胞内没有示范性CD40。40鉴定了CD3+、CD4+、CD40neg细胞。

[0236] 示例8

[0237] 这个示例表明CD3+CD4+CD40+细胞似乎大量产生干扰素 γ (INF γ)。此外,干扰素 γ 控制Th40增殖。

[0238] 选择正常饮食的ApoE缺陷型小鼠,通过静脉内尾注射,在26周内每周3次,从9点开始,接受1mg/kg剂量的15聚体肽(SEQ ID NO:7)。在25周龄时,对动物进行安乐死,称重,然后取血、脾脏和胰腺进行分析,然后通过心脏穿刺术向其灌注4%多聚甲醛,然后解剖主动脉弓。然后以蔗糖梯度脱水,然后急速冷冻。每只小鼠获得大约35个8 μ m的纵向切片用于各种染色程序。使用MACSQuant®Analyzer 10 (Miltenyi Biotec Inc.)进行流式细胞术。使用FlowJo® (Becton Dickinson, Inc. 全资拥有的FlowJo, LLC)单细胞流式细胞仪软件进行其他分析。

[0239] 如图14通过共聚焦显微镜所显示的,CD40可以在CD3+CD4+细胞内部或外部。进一步进行流式细胞术并证明尽管大多数CD3+细胞似乎具有产生CD40的能力,但CD3+CD4+CD40+细胞却可以出现流式细胞仪研究纳入了CD3、CD4、CD40和INF γ 的外部 and 内部染色。

[0240] 图16表明干扰素 γ 控制Th40增殖。分离的Th40细胞通过CD40抗体交联。图16中的图表示在缺乏/存在针对INF γ (α INF γ)的抗体和未刺激的对照(UN)的情况下,CD40刺激的(CD40XL:活化的)Th40细胞的增殖。此外,通过阻断INF γ ,活化的Th40细胞不会增殖。

[0241] 示例9

[0242] 该实施例证明KGYG₁₅ (15聚体-SEQ ID NO:7)和KGYG₆ (6聚体-SEQ ID NO:29)消除了动脉粥样硬化。

[0243] 选择正常饮食的ApoE缺陷型小鼠,通过静脉内尾注射,在26周内每周3次,从9点开始,接受1mg/kg剂量的15聚体肽(SEQ ID NO:7)。在25周龄时,对动物进行安乐死,称重,然后取血,脾脏和胰腺进行分析,然后通过心脏穿刺术向其灌注4%多聚甲醛。然后解剖主动脉弓,以蔗糖梯度脱水,然后速冻。

[0244] 图17是从主动脉流出(AO)向近侧定义的主动脉弓弯曲较小的示例。在三色染色中观察到的部分中,向远端测量的内膜距离为2.4mm。通过对所有小鼠的每个切片计算2.5mm的内膜拉伸,每只小鼠的主动脉弓内壁的最大面积用于计算每组的平均值。管腔表面(L),主动脉弓(AO)图17中标记了无名动脉(I)。

[0245] 图18显示了根据本实施例中概述的步骤,与用15聚体肽处理的小鼠的主动脉弓相比,对照ApoE小鼠的主动脉弓具有较小的曲率。

[0246] 图19显示了通过肽处理实现的总面积的减少2.5mm片段的总面积(如图17中所述)已大大减少。

[0247] 图20显示了斑块数量减少,包括早期病变和晚期斑块。治疗组中斑块总数明显减少。斑块根据早期病变的形态(可观察到的脂肪条纹,含有巨噬细胞衍生的泡沫细胞,脂质的沉积程度不同),而更高级的纤维动脉瘤(含有不同程度的脂质或坏死核心和纤维帽)。包括指定2.5mm段内的所有斑块,这些斑块的总数和类型均明显减少用肽处理。

[0248] 这项研究表明,施用该肽可消除动脉粥样硬化。

[0249] 示例10

[0250] 该实施例证实了KGY₁₅(15聚体-SEQ ID NO:7)的施用增加了帽形成,同时减少了现有疾病的发展。

[0251] 在这项研究中,六只ApoE^{-/-}小鼠从0到20周龄接受正常食物。20周龄时,三只小鼠被随机分配接受1mg/kg KGY₁₅(15聚体-SEQ ID NO:7)静脉注射尾巴,每周一次,持续4周,对照组仅接受媒介物,治疗4周后,对动物实施安乐死,然后通过心脏穿刺注入4%多聚甲醛进行灌注,然后在主动脉弓上切开主动脉弓每只小鼠获得大约50个8um的纵向切片,用三色染色剂处理玻片,并使用cellSens软件进行分析、测量总斑块,包括小2.5mm的曲率和无名的动脉。

[0252] 图20显示了与对照受试者相比,在治疗的受试者中个体早期斑块和晚期斑块的数量减少了。

[0253] 图21显示,与对照受试者相比,在治疗的受试者中晚期斑块的帽核比降低。

[0254] 图22显示,与对照对象相比,治疗对象的平均帽子宽度(帽子大小)更大。

[0255] 图23显示了与对照受试者相比,在用肽治疗的受试者中平均核心宽度(核心大小/斑块大小)降低了。

[0256] 该实施例表明,施用KGY₁₅(15聚体-SEQ ID NO:7)可增加帽形成,同时减少现有疾病的进展。此外,该研究进一步证明,施用KGY₁₅肽趋向于形成斑块稳定性。

[0257] 从上述情况可以很明显地看出,T1D与动脉粥样硬化共享CD40-CD154 dyad,后者驱动自身免疫炎症。NOD小鼠,人类T1D患者和ApoE^{-/-}小鼠的外周血Th40细胞水平升高。Th40细胞产生的炎性细胞因子IFN γ 的水平高于其他细胞,并驱动炎症。KGY₁₅肽以Th40细胞为靶标,指定的肽进一步消除并消除了ApoE^{-/-}小鼠斑块内的炎性细胞因子IFN γ 。调节动脉粥样硬化,这可能是由于Th40阻断或CD40的一般阻断所致。此外,特定肽的给药趋向于形成更稳定的斑块类型。

[0258] 示例11

[0259] 按照与鼠类研究相似的剂量水平,向全血施用该肽。

[0260] 图24提供了在人类中观察到的血块研究结果。

[0261] 这项研究表明,当将KGY₁₅肽施用于人体时,不会明显超出正常公认的水平而不会改变或改变全血的凝结。

[0262] 示例12

[0263] 该实施例证明,与未经治疗的受试者相比,经过基因修饰以获得动脉粥样硬化并进食高脂饮食并用6聚体肽治疗的ApoE^{-/-}小鼠的LDL胆固醇水平可能降低。

[0264] 在这项研究中,六只ApoE^{-/-}小鼠从0到20周龄接受正常食物。20周龄时,三只小鼠被随机分配接受1mg/kg KGY₆ (6聚体-SEQ ID NO:29),每周一次,静脉注射尾巴,共4周。对照组小鼠仅接受媒介物。

[0265] 从未经治疗的小鼠获得的数据与经过治疗的小鼠进行比较显示LDL胆固醇值具有统计学上的显著降低(>50%)。该数据如图27所示。

[0266] 示例13

[0267] 该实施例说明了用KGY₆ (6聚体-SEQ ID NO:29) 治疗时,ApoE^{-/-}小鼠经历了动脉粥样硬化的变化。ApoE^{-/-}小鼠接受了高脂饮食16周。小鼠随机分配接受剂量每周一次,通过静脉注射尾静脉注射1mg/kg KGY₆ (6聚体-SEQ ID NO:29),每周一次,持续4周。对照组小鼠仅接受媒介物。通过多种方法研究了动脉粥样硬化。苏丹IV染色(脂质染色)显示病变区域明显减少。图28A是经KGY₆处理的主动脉表面苏丹IV染色的图像,图28B是对照(未处理)的主动脉表面苏丹IV染色的图像。图29是表示苏丹IV染色的病变面积减少的图。

[0268] 此外,使用Paigen方法进行斑块面积和形态的测量,该方法从主动脉根开始到瓣膜小叶到升主动脉依次获得5μm的主动脉横截面,以50μm的间隔对载玻片进行染色,之后动脉粥样硬化区域测量病灶,将各个菌斑面积测量值与千分尺间隔作图,并建立一条曲线,曲线下面积(AUC)给出菌斑的总体积,这些结果以图格式显示在图30中,表明用KGY₆ (SEQ ID NO:29) 处理的小鼠在曲线下显示出斑块体积减少。

[0269] 此外,使用三色染色技术对噬斑组成或主动脉样品进行表征,这些结果以图形格式显示在图31中。实际上,图31的数据是使用Image Pro Plus软件分析生成的,量化并显示了发生斑块组成变化,包括增加胶原蛋白和减少平滑肌含量。

[0270] 图32A是经KGY₆处理的受试者的主动脉横截面的三色染色细胞的图像。图32B是对照对象的横截面的三色染色细胞的图像。在图32A中,50表示斑块形成的特征区域。60表示主动脉瓣小叶。在图32B中,对照的(未治疗的) 50个斑块特征区域(曲线下的区域) 大于用KGY₆肽治疗的受试者中的区域。

[0271] 示例15

[0272] 该实施例证实KGY₆ (6聚体-SEQ ID NO:29) 显著改善了葡萄糖耐量和胰岛素敏感性。

[0273] 给ApoE^{-/-}小鼠饲喂60%高脂饮食(研究饮食) 1周,然后向选定的小鼠群注射剂量为1mg/kg的6聚体肽,其余未经治疗并作为对照。禁食6小时进行葡萄糖耐量测试(GTT),然后腹膜内注射1g/kg体重的葡萄糖水溶液,分别在0、15分钟、30分钟、60分钟和2点测量血糖和血清胰岛素这项研究的结果显示在图33(a)和33(b)中。与对照组相比,用肽治疗的ApoE缺陷小鼠表现出显著提高的葡萄糖耐量以及显著改善的胰岛素敏感性和降低的血浆胰岛素水平。

[0274] 对经处理和未经处理的小鼠的脂肪和肌肉组织进行了Western分析,表明白色脂

肪组织中葡萄糖转运蛋白 (GLUT4) 的表达增加,如图34所示。肌肉组织显示GLUT4蛋白表达增加。GLUT4负责响应胰岛素的葡萄糖摄取,已知在2型糖尿病中表达降低。

[0275] 这项研究表明,服用该肽会影响葡萄糖耐量,胰岛素敏感性和GLUT4水平,每一种对于治疗2型糖尿病受试者可能都是重要的。

[0276] 示例16

[0277] 该实施例证实了KGY₆ (6聚体-SEQ ID NO:29) 的施用会影响IL2、INF γ 和IL17a的炎性细胞因子产生。

[0278] 处理来自ApoE小鼠和C57BL/6小鼠的脾脏中的淋巴细胞,给ApoE^{-/-}和C57BL/6小鼠喂养60%高脂饮食(研究饮食)1周,对脾淋巴细胞进行6聚体体外处理。24小时后,将细胞在存在不同浓度的6聚体肽的情况下放置于培养基中过夜。第二天早晨,施用布雷菲德菌素A4小时,对所有细胞进行CD3、CD4、CD40染色(Th40细胞)并通过使用流式细胞仪生产IL2、INF γ 和IL17a。这项研究的结果如图35所示。

[0279] 从前面的内容很容易看出,这里已经描述和说明了该方法的新的和有用的实现方式,它们以非常出乎意料的方式满足了许多需求。当然,应该理解,这样的修改,变更和修改很容易发生。面对本公开的技术人员意图在本公开的精神之内,其仅由所附权利要求的范围限制。

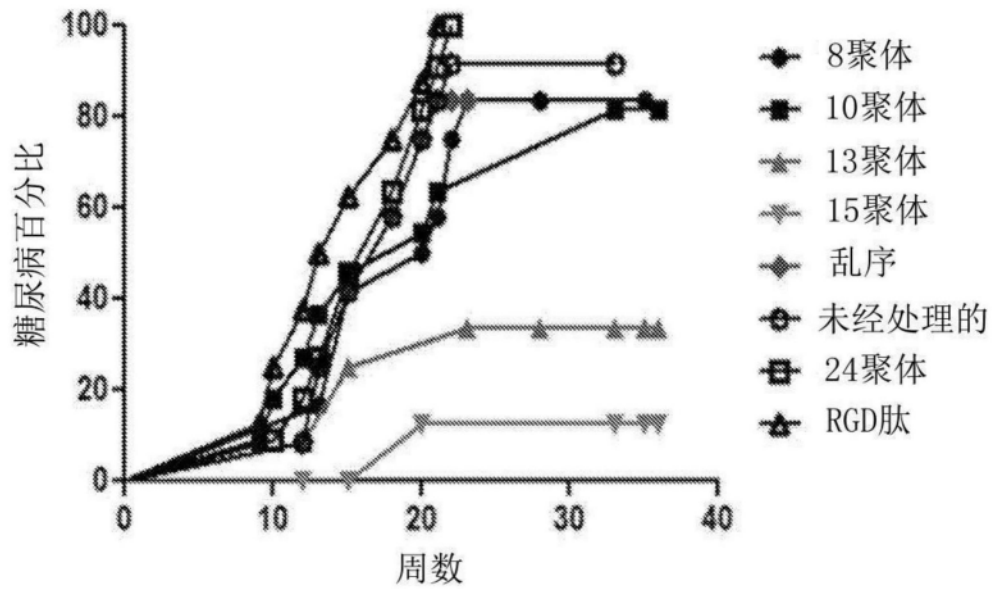


图1

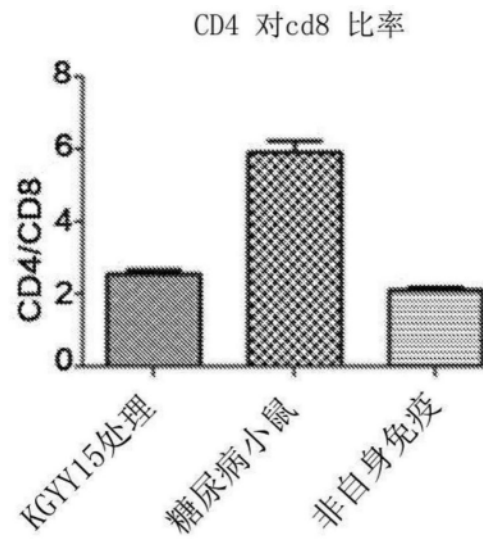


图2A

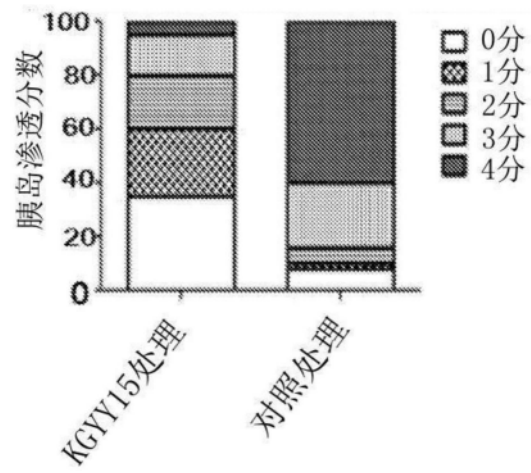


图2B

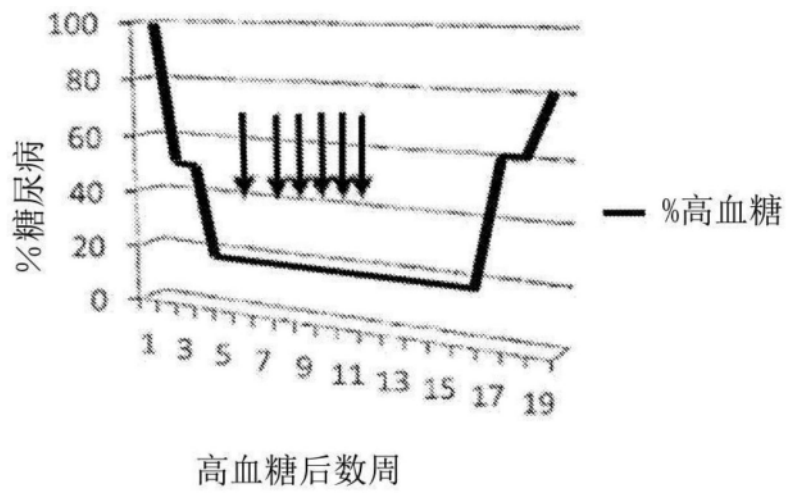


图3

T 细胞

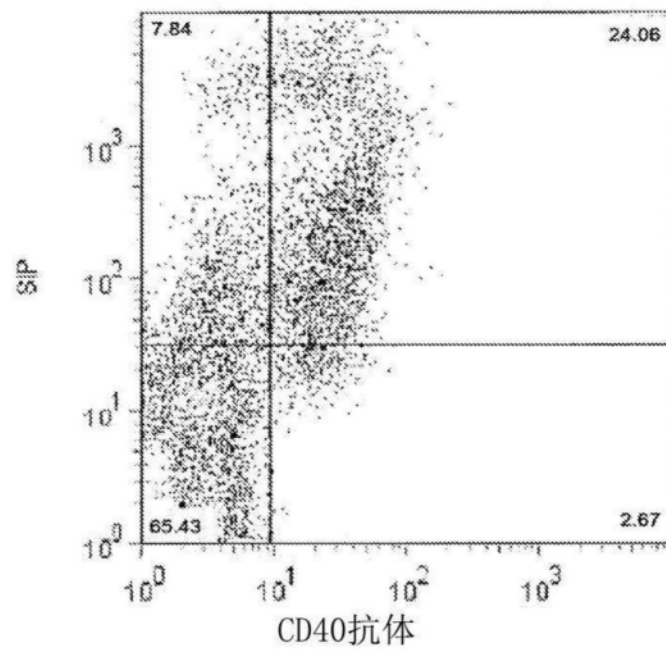


图4

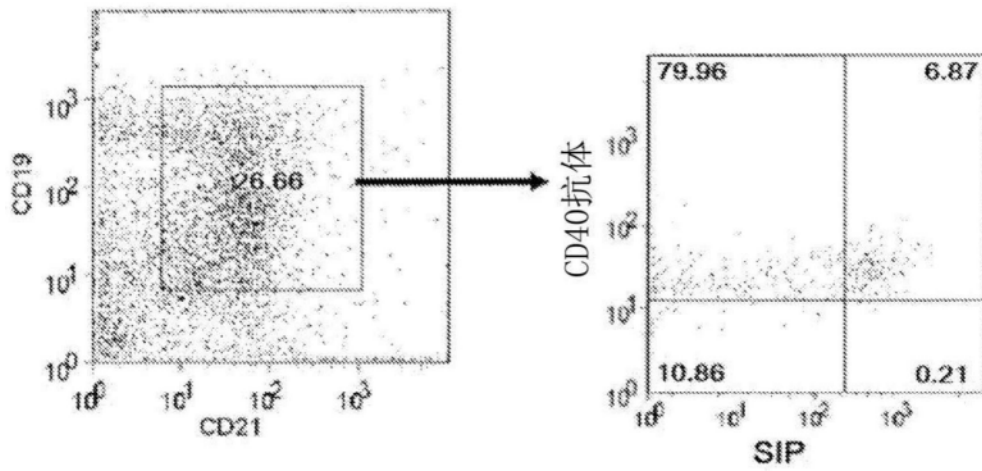


图5

ELISA法测定血液样本中的CD40

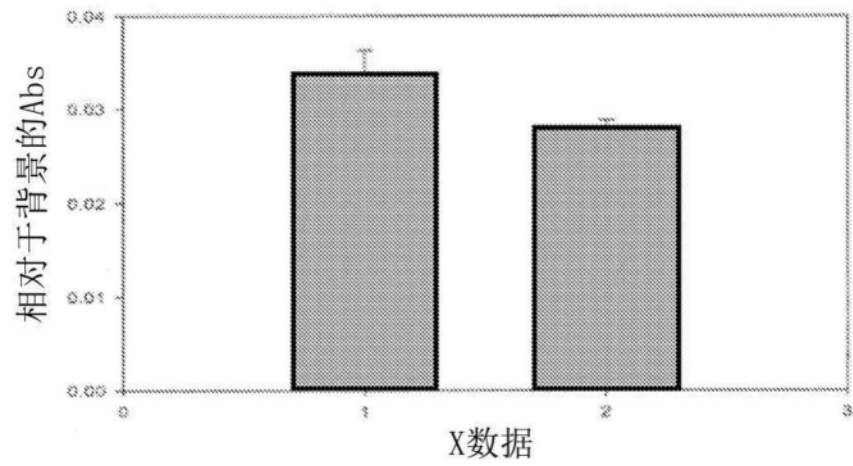


图6

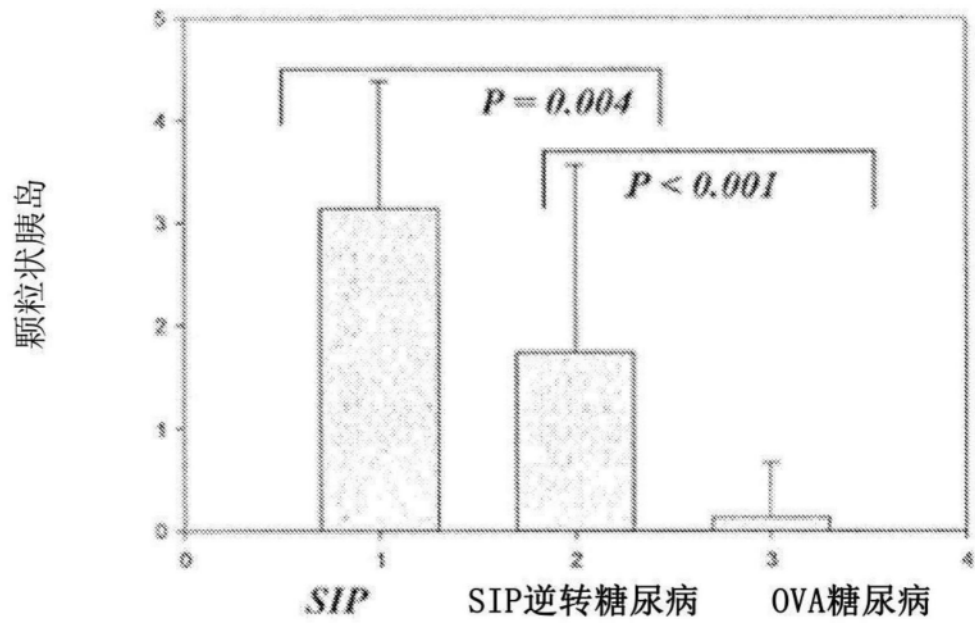


图7

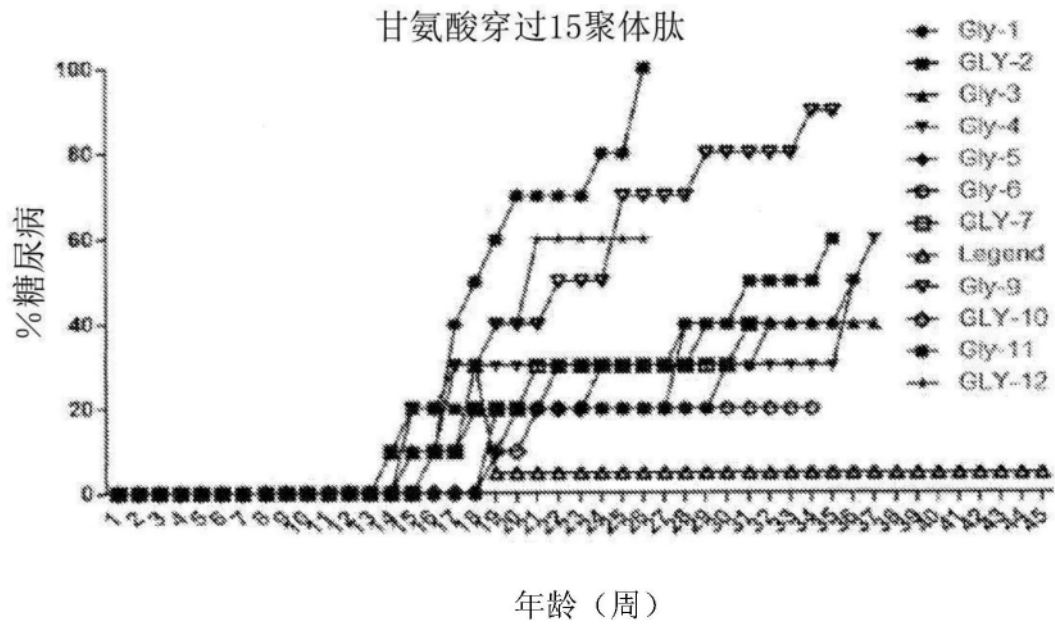


图8

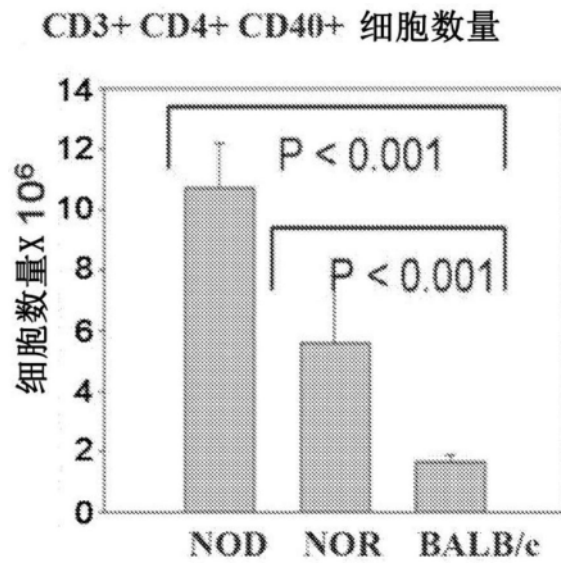


图9

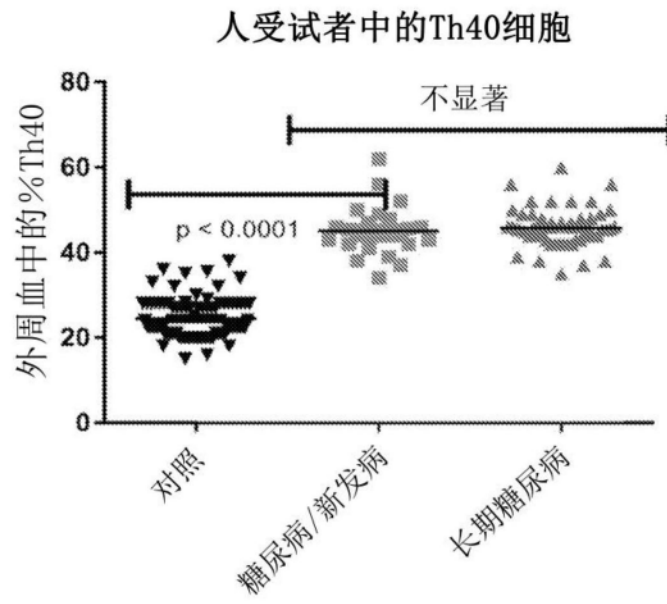


图10

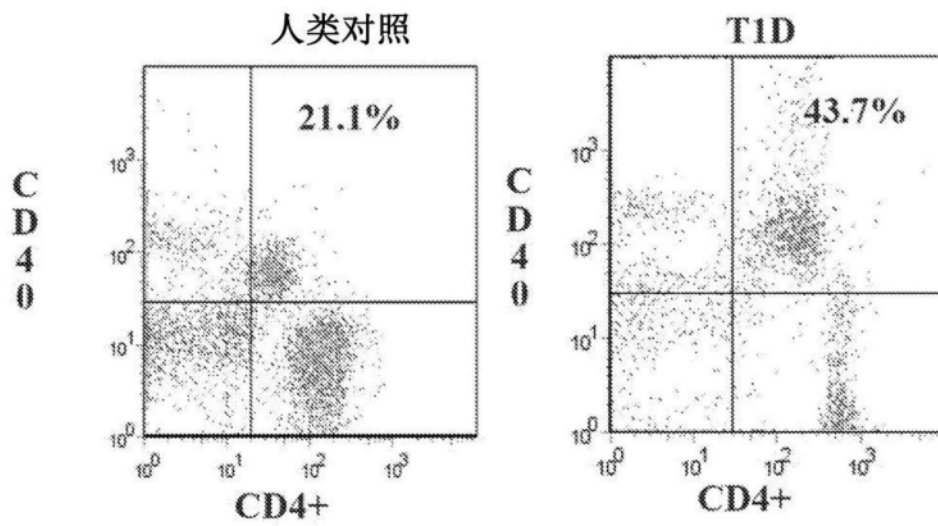


图11

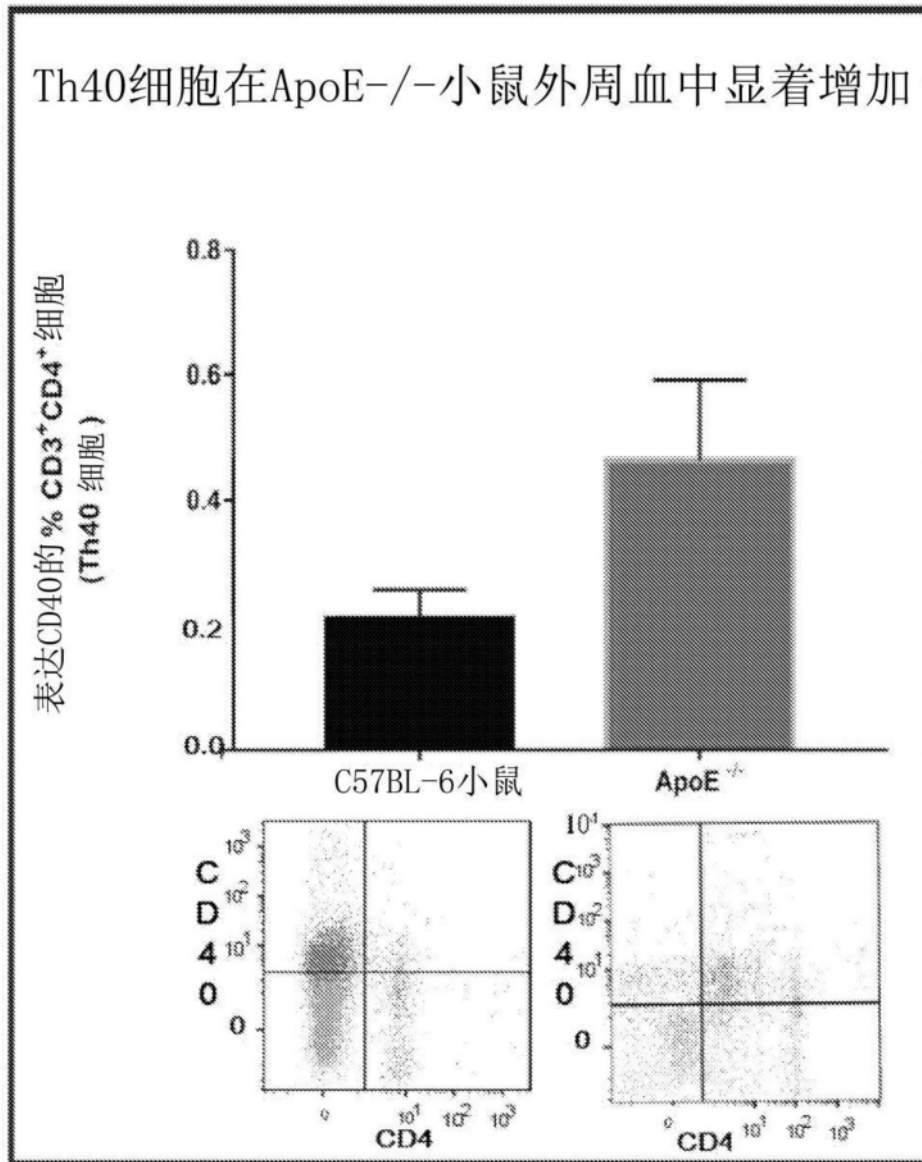


图12

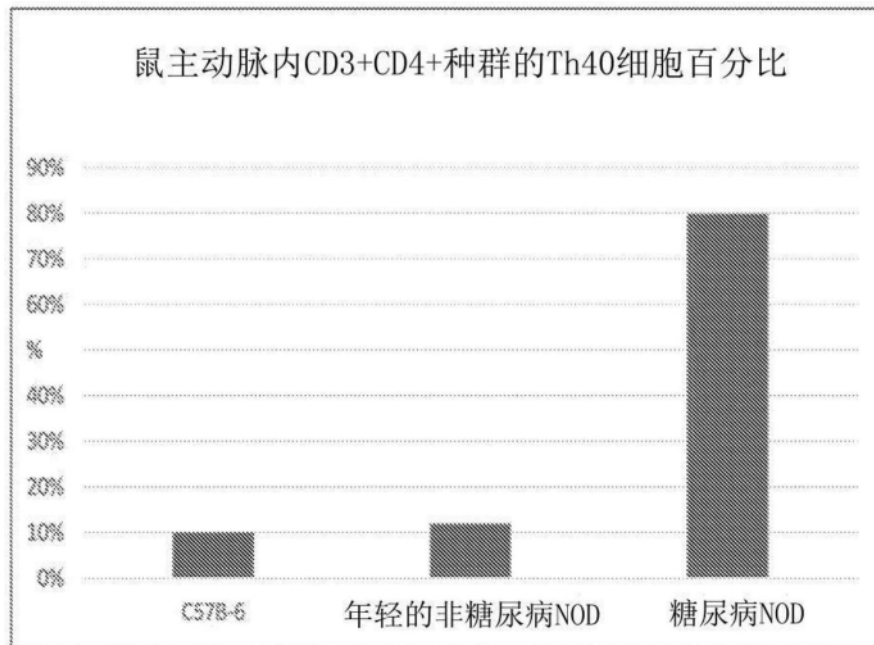


图13

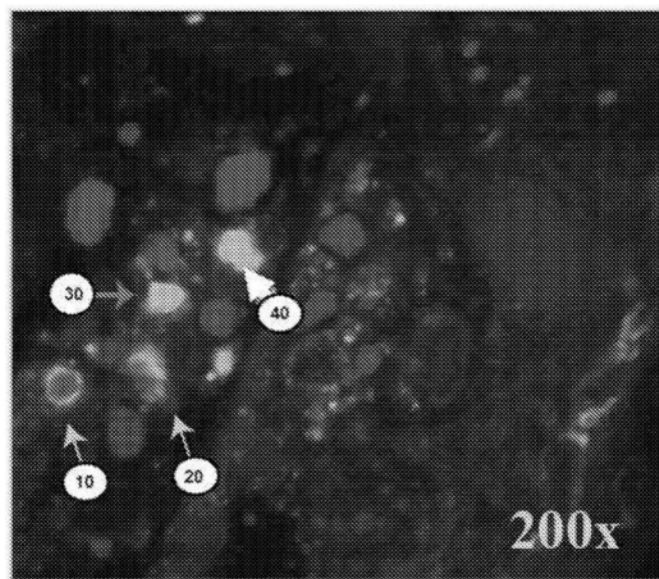


图14

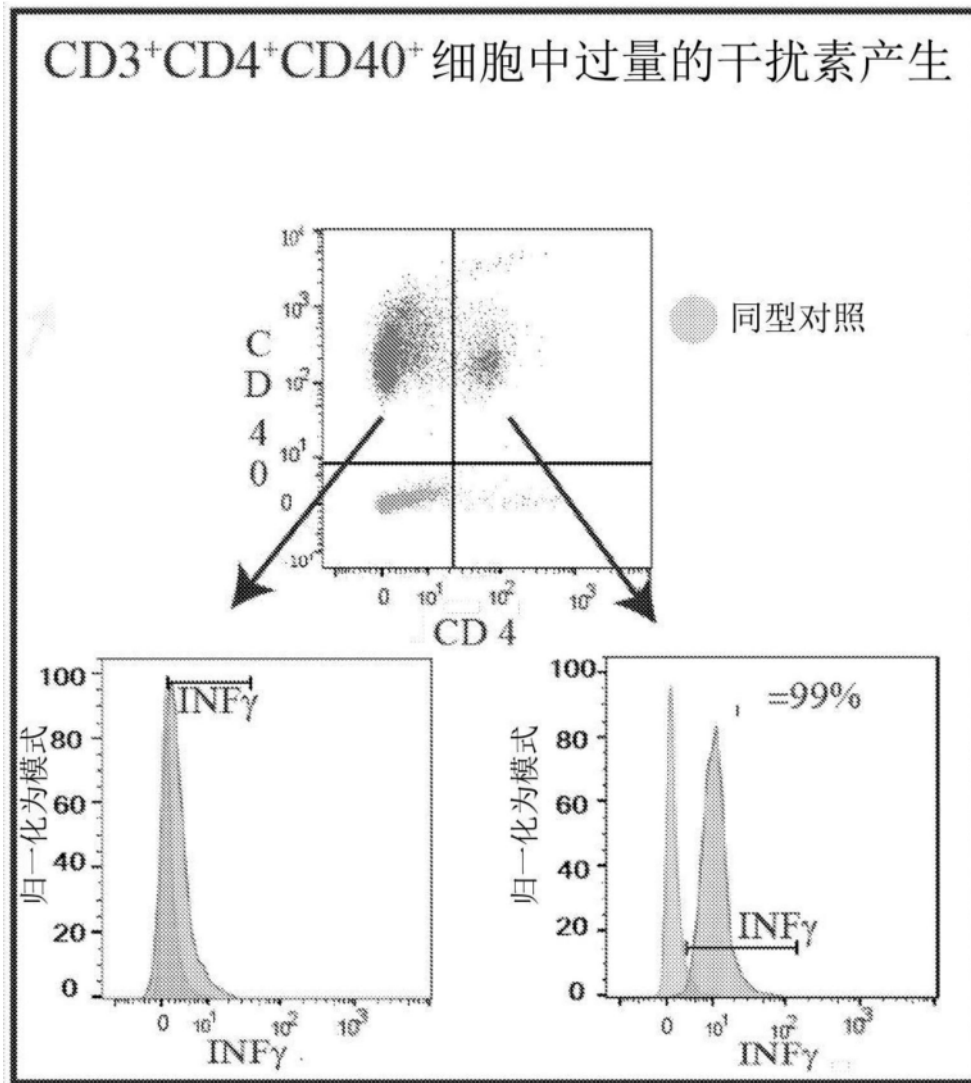


图15

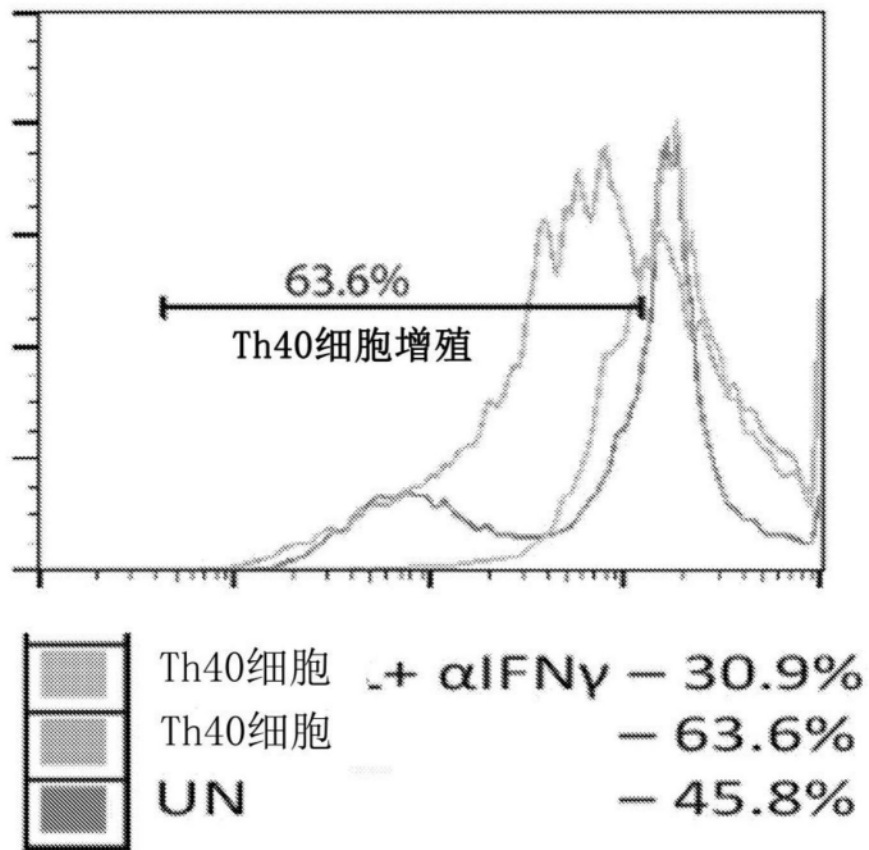
干扰素 γ 控制Th40增殖

图16

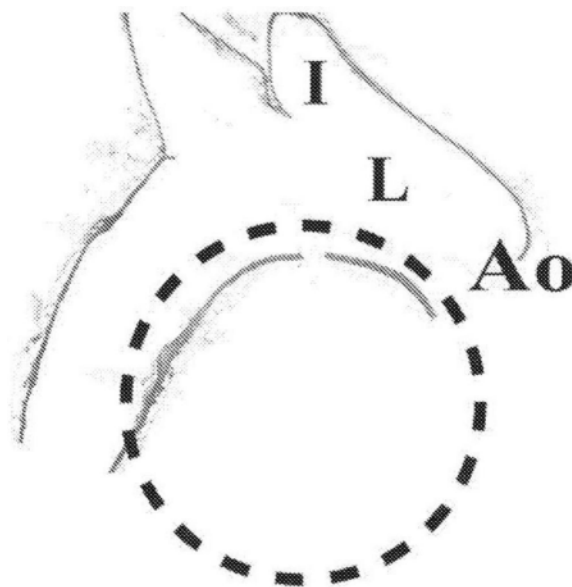


图17

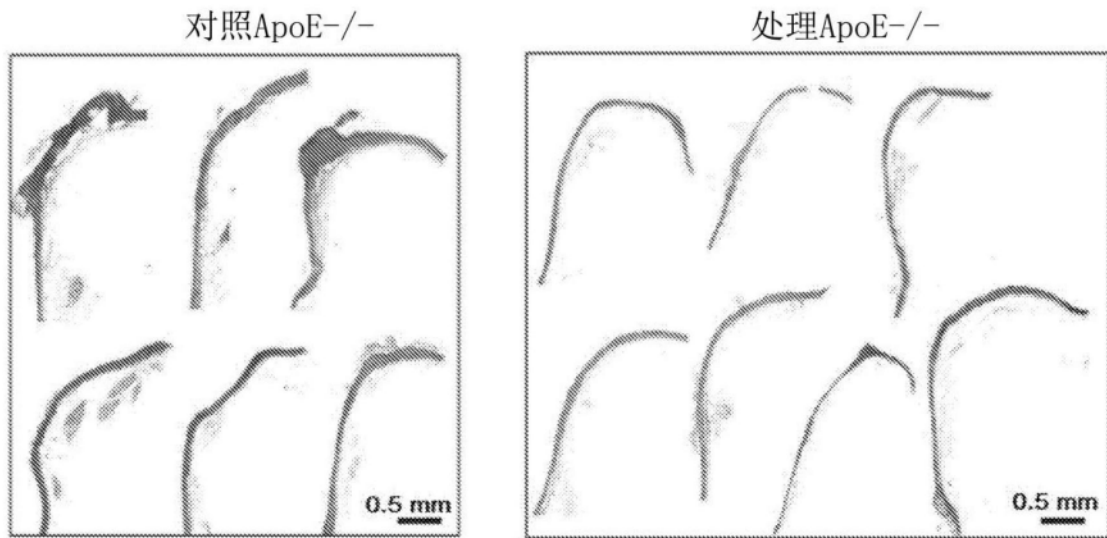


图18

面积测量主动脉弓小曲率

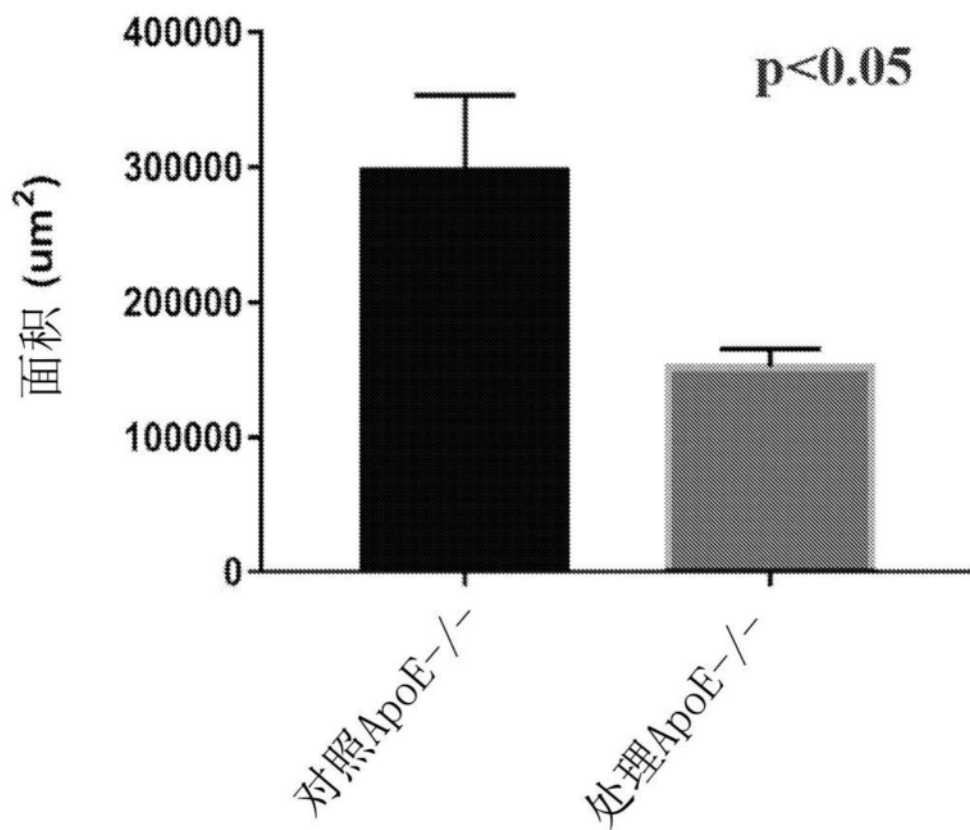


图19

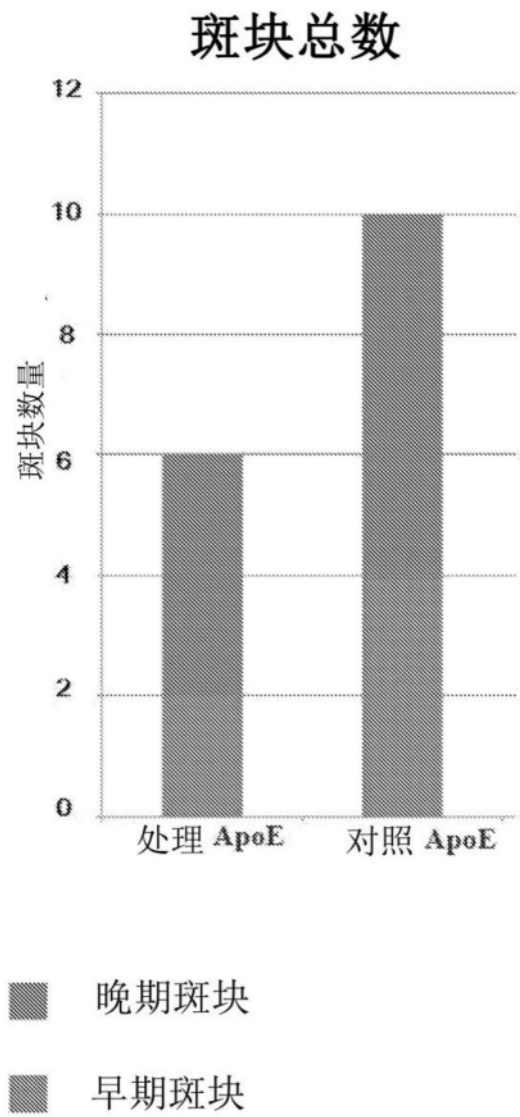


图20

晚期斑块的帽核比

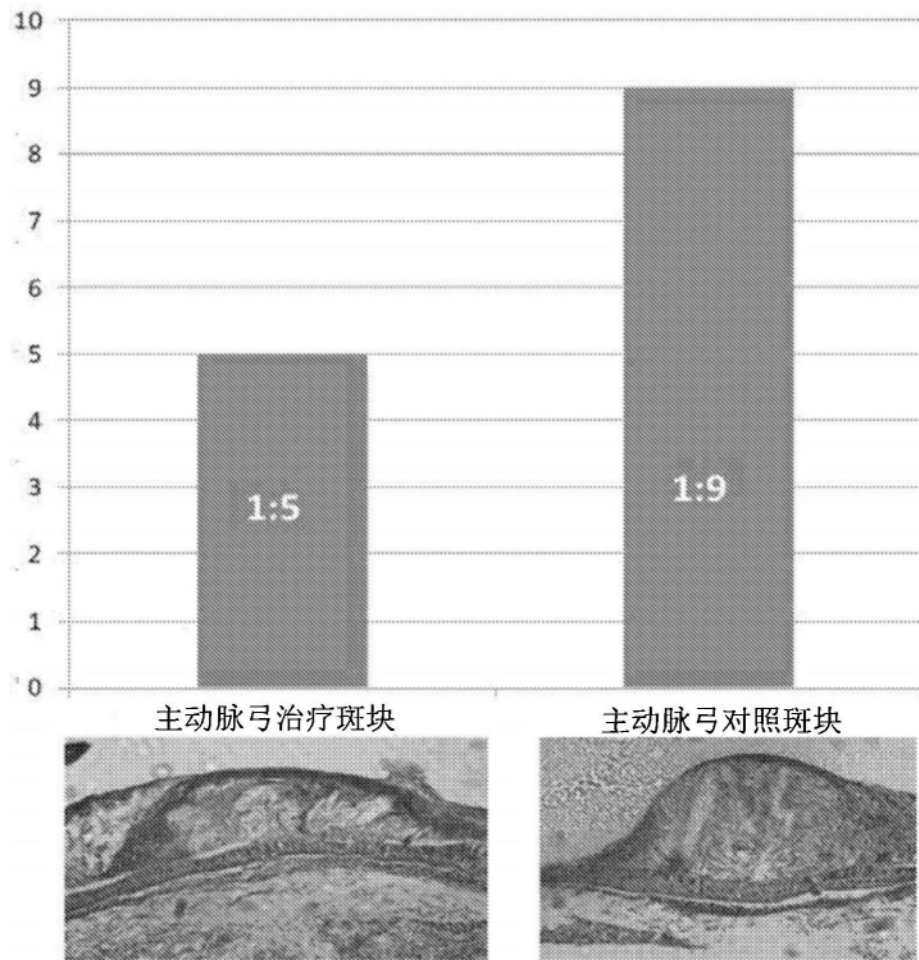


图21

平均帽子宽度

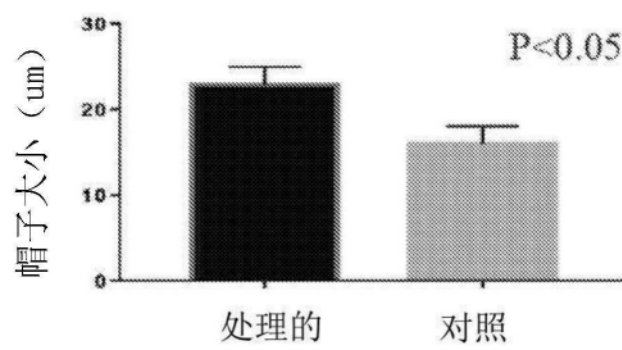


图22

平均核心宽度

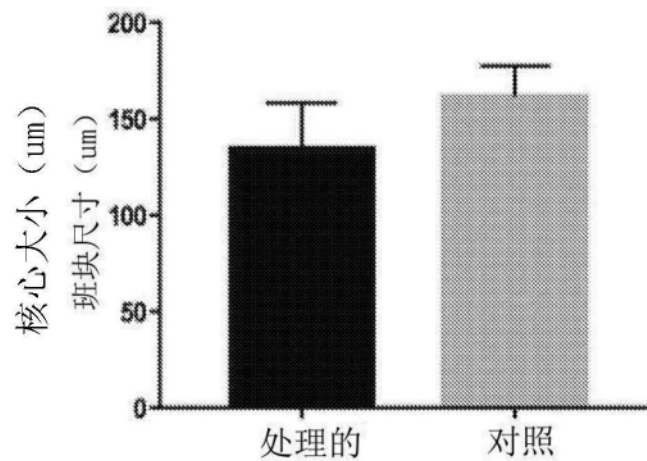


图23

	观察到的 (肽)	正常
凝结时间:	5.8 mins.	(5 - 10 mins.)
K:	2.0 mins.	(1 - 3 mins.)
角度:	62.5 deg.	(53 - 72 deg.)
MA:	60.0 mm	(50 - 70 mm)
LY30:	5.5%	(0 - 8 %)
LY60:	13.7%	(0 - 15 %)
TMA:		6 min.
G:	7.5 K d/sc	(4.5 K - 11.0 K)
CI:	-0.9	(-3 - 3)
TPI:	37.5 / sec.	(5 - 90 sec)

图24

SEQ ID NO: 32	24聚体	AASVLQWAKKGYYTMKSNLVMLEN	4.4 hrs.
SEQ ID NO: 7	15聚体	VLQWAKKGYYTMKSN	>100 hrs.
SEQ ID NO: 25	13聚体	VLQWAKKGYYTMK	100 hrs.
SEQ ID NO: 24	10聚体	WAKKGYYTMK	2.8 hrs.
SEQ ID NO: 5	8聚体	AKKGYYTM	4.4 hrs.
SEQ ID NO: 29	6聚体	AKKGYY	4.4 hrs.

图25A

SEQ ID NO	AA 序列	描述	ExPASy预期的半衰期
SEQ ID NO:4	KKGYYT	6聚体 (形式 1)	1.3 hrs.
SEQ ID NO:27	KGYYTM	6聚体 (形式 2)	1.3 hrs.
SEQ ID NO:28	AEKGY Y	6聚体 (形式 3)	4.4 hrs.
SEQ ID NO: 29	AKKGY Y	6聚体 (形式 4)	4.4 hrs.
SEQ ID NO: 30	AKGY YT	6聚体 (形式 5)	4.4 hrs.

图25B

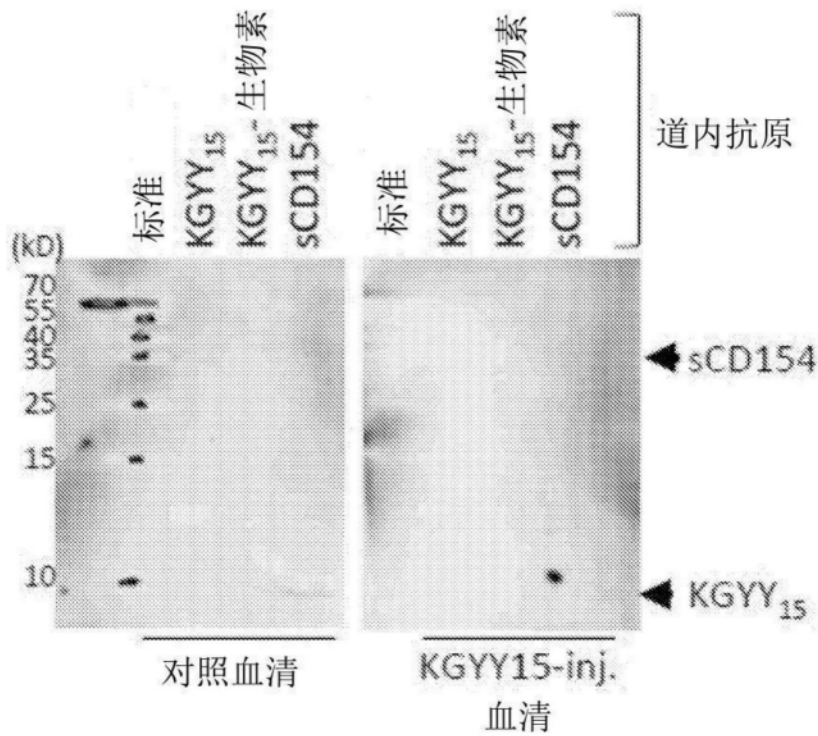


图26

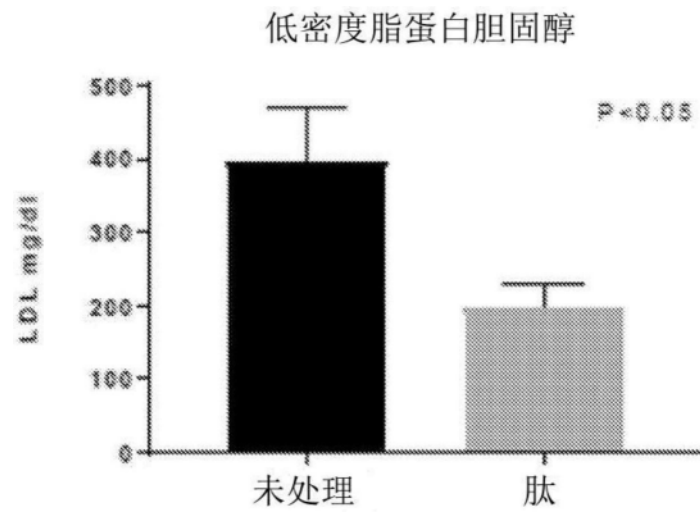


图27



图28A

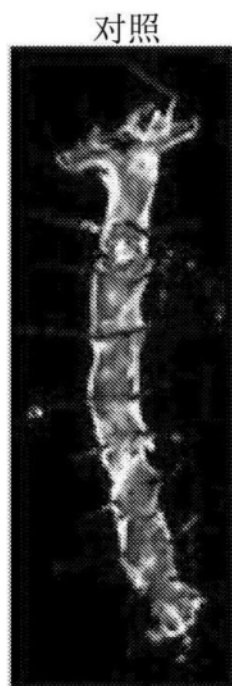


图28B

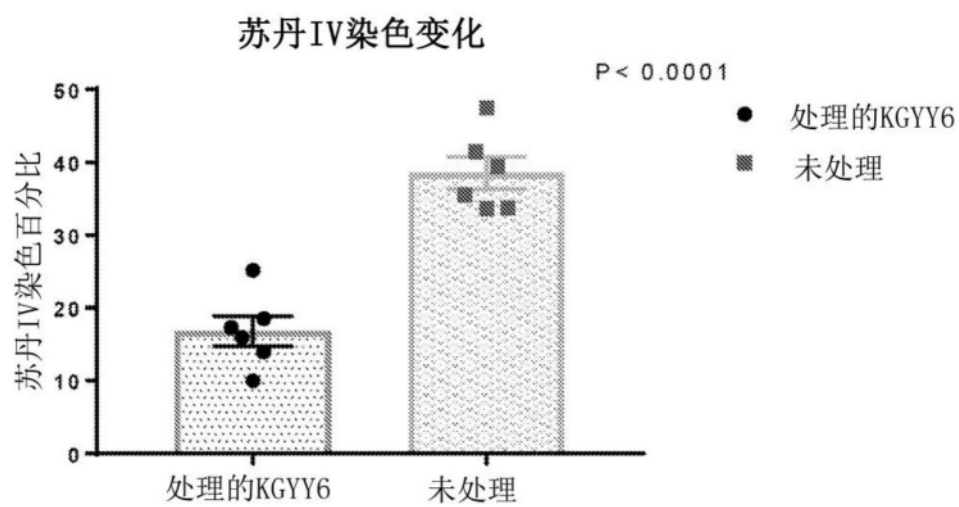


图29

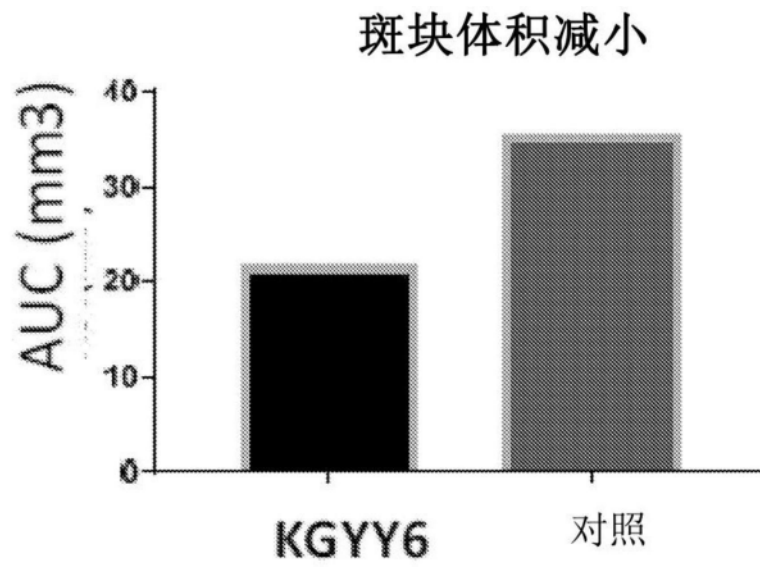


图30

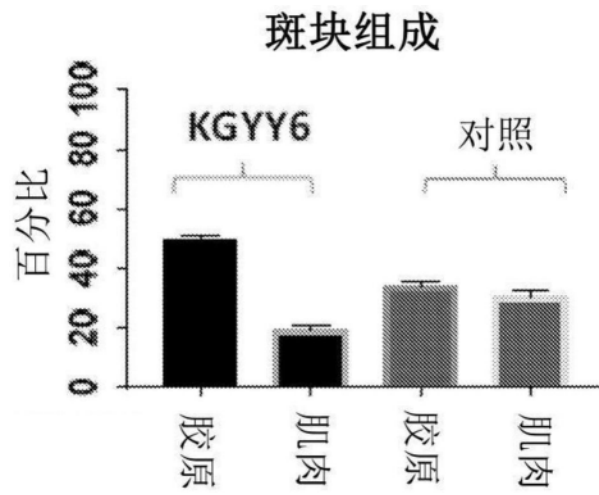


图31

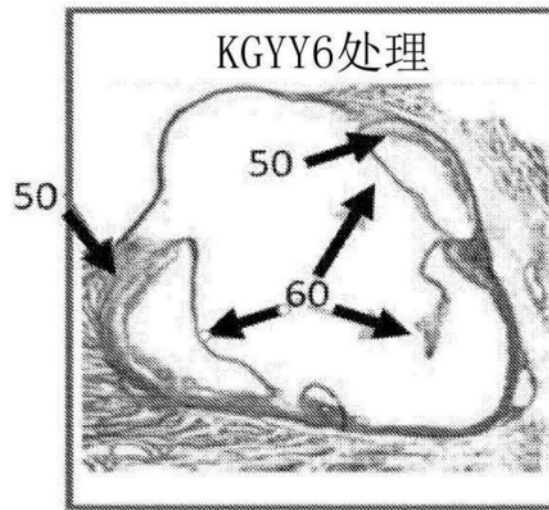


图32A

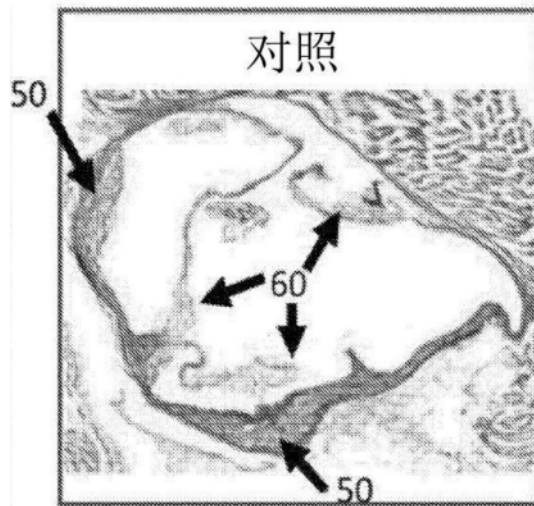


图32B

GTT期间的葡萄糖

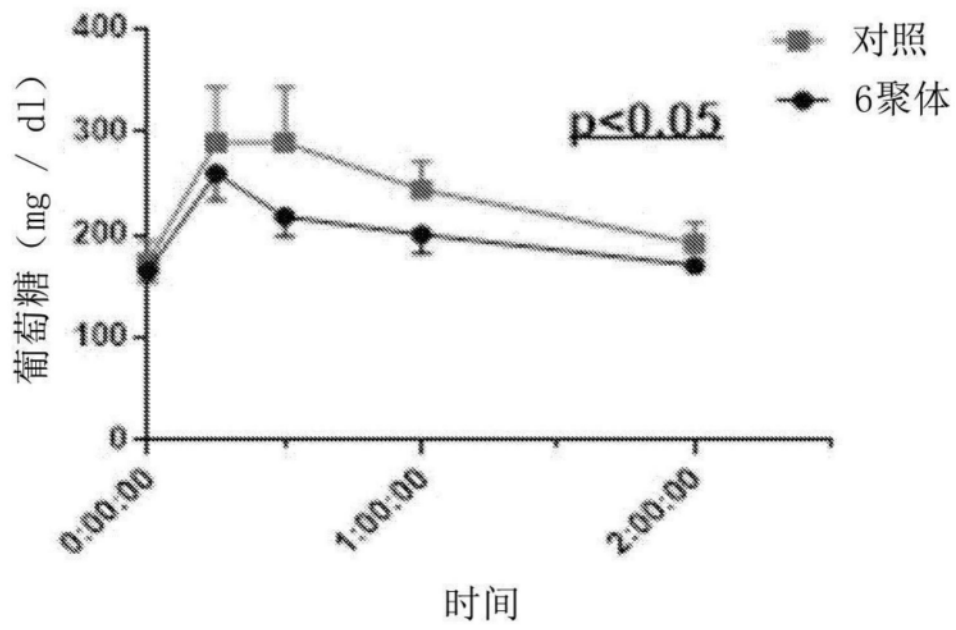


图33(a)

GTT期间的胰岛素

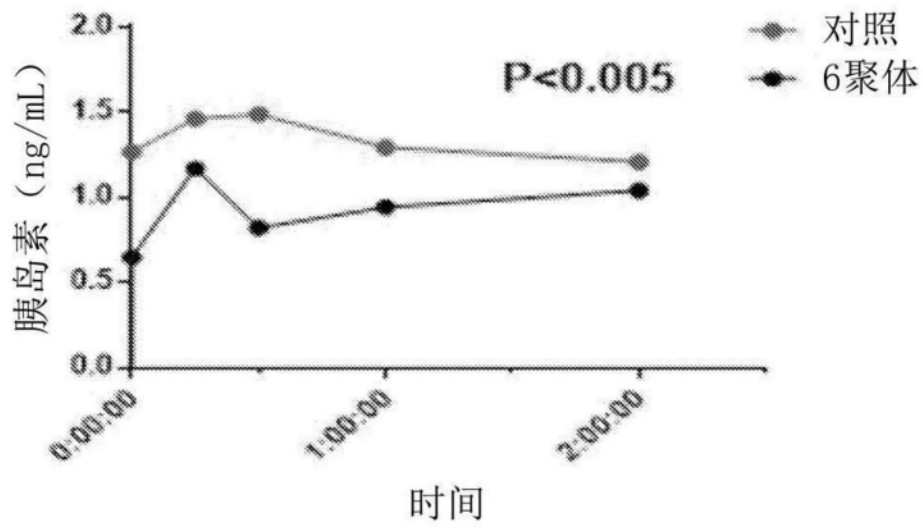


图33(b)

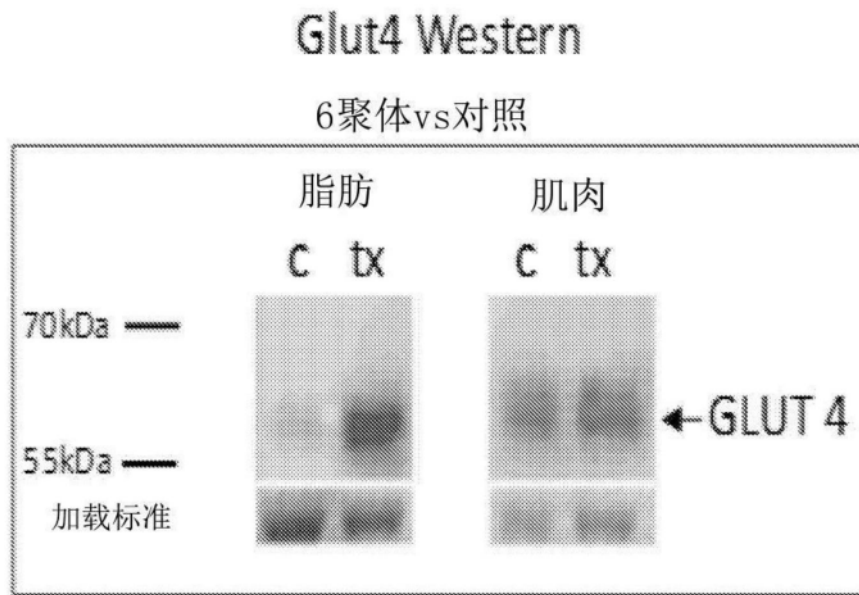


图34

肽浓度变化时体外淋巴细胞细胞因子的变化

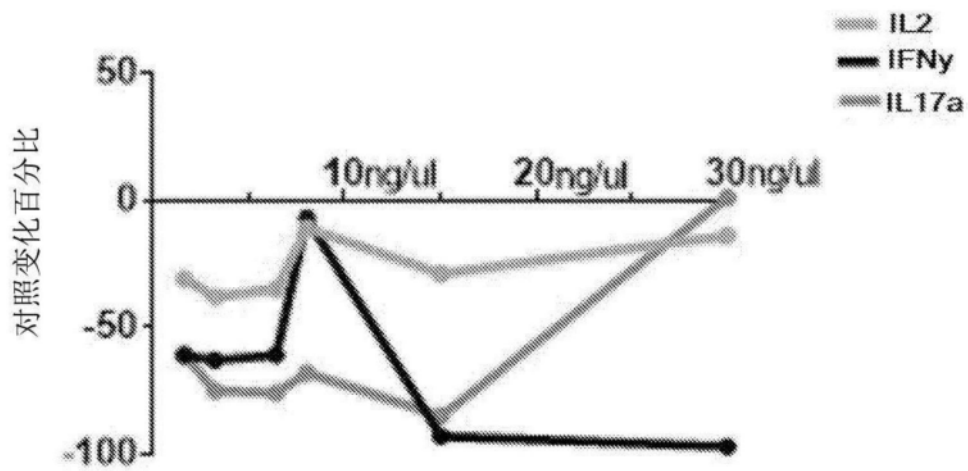


图35