



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116670174 A

(43) 申请公布日 2023. 08. 29

(21) 申请号 202180052676.3

(22) 申请日 2021.06.27

(30) 优先权数据

63/045,107 2020.06.28 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.02.24

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/IL2021/050783 2021.06.27

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/003674 EN 2022.01.06

(71) 申请人 耶路撒冷希伯来大学伊萨姆研发有限公司

地址 以色列, 耶路撒冷

申请人 哈达斯特医学研究与服务发展有限公司

(72) 发明人 Z·格拉诺特 Z·G·弗里德伦德 S·沃尔斯

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

专利代理师 丁秀云

(51) Int.Cl.

C07K 17/08 (2006.01)

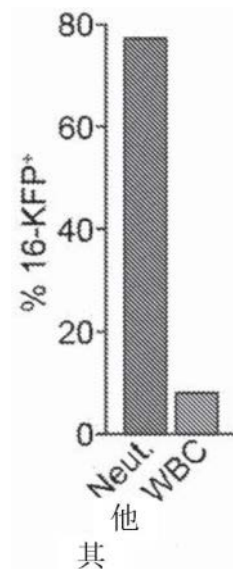
权利要求书3页 说明书43页
序列表5页 附图63页

(54) 发明名称

中性白细胞结合肽

(57) 摘要

公开了特异性结合中性白细胞的肽及其在包括癌症以及传染性、炎性和自身免疫性疾病或障碍在内的医学状况中用于靶向中性白细胞的药物或诊断剂的递送的用途。

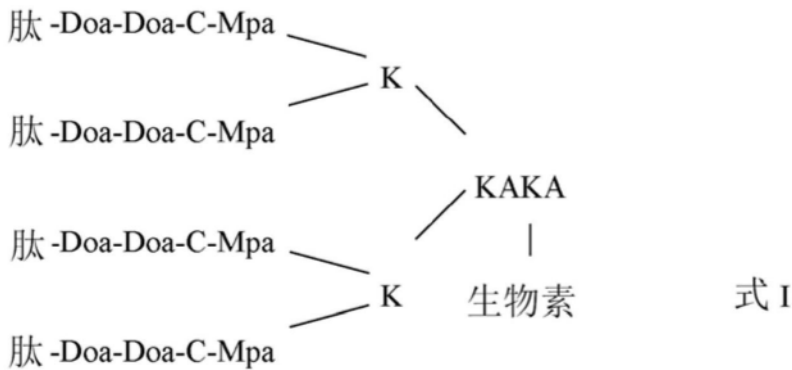


1. 包含选自以下的氨基酸序列的肽：
KFPDLDSRRLPHMSL (SEQ ID NO:1)；
LATTHMVFS PDH (SEQ ID NO:2)；
PSSNLESTPLSLL (SEQ ID NO:3)；
SSLMTTQLIATSI (SEQ ID NO:4)；
PELDSKPYFPPL (SEQ ID NO:5)；
ELVTASMPRPNN (SEQ ID NO:6)；
SLESSPMAQLPQ (SEQ ID NO:7)；
SELRSTPLL VPS (SEQ ID NO:8)；
LQIQSWSSSP (SEQ ID NO:9)；
STMTILGTGS (SEQ ID NO:10)；
TETSLRIVSTNP (SEQ ID NO:11)；
LSIVSGSALNHL (SEQ ID NO:12) 和
LTLVSRPMI (SEQ ID NO:13)。
2. 根据权利要求1所述的肽，其包含6-30个氨基酸。
3. 根据权利要求1所述的肽，其包含10-20个氨基酸。
4. 根据权利要求1所述的肽，由选自以下的氨基酸序列组成：SEQ ID NO:1-13。
5. 根据权利要求1至4中任一项所述的肽，其包含至少一个环化。
6. 根据权利要求1至5中任一项所述的肽，其包含选自以下的氨基酸序列：SEQ ID NO:1-8。
7. 根据权利要求1至5中任一项所述的肽，其包含选自以下的氨基酸序列：SEQ ID NO:9-13。
8. 根据权利要求1至7中任一项所述的肽，其中所述肽缀合至至少一个能够增加溶解度的部分并且任选地缀合至至少一个连接体或间隔物。
9. 根据权利要求8所述的肽，其中所述至少一个能够增加溶解度的部分是8-氨基-3,6-二氧代辛酸(Doa)残基。
10. 根据权利要求9所述的肽，其具有根据式III的结构：
肽-Doa-Doa-C(式III)
其中所述C是半胱氨酸残基，并且所述肽表示权利要求1-7中任一项所述的肽。
11. 根据权利要求8至10中任一项所述的肽，其中所述连接体包含3-马来酰亚胺基丙酸(Mpa)残基。
12. 肽多聚体，其包含根据权利要求1至11中任一项所述的多个相同或不同的肽。
13. 根据权利要求12所述的肽多聚体，其包含2-20个相同或不同的肽。
14. 根据权利要求13所述的肽多聚体，其包含2-4个相同或不同的肽。
15. 根据权利要求14所述的肽多聚体，其包含4个相同或不同的肽。
16. 根据权利要求12至15中任一项所述的肽多聚体，其中所述肽直接地或通过连接体或间隔物彼此共价连接、或者直接地或通过连接体或间隔物共价连接至支架。
17. 根据权利要求12至16中任一项所述的肽多聚体，其包含支化支架。
18. 根据权利要求17所述的肽多聚体，其中所述支化支架包含至少一个与所述肽直接

地连接、或通过间隔物或连接体连接的Lys残基。

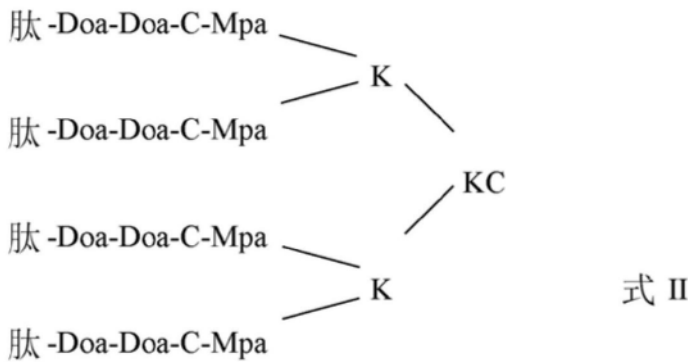
19. 根据权利要求12至18中任一项所述的肽多聚体,进一步包含共价附接到所述肽多聚体的生物素部分。

20. 根据权利要求19所述的肽多聚体,其具有根据式I的结构:



其中每个肽独立地表示权利要求1至7中任一项所述的肽。

21. 根据权利要求12至18中任一项所述的肽多聚体,其具有根据式II的结构:



其中每个肽独立地表示权利要求1至7中任一项所述的肽。

22. 根据权利要求20或21所述的肽多聚体,其包含至少两个不同的肽。

23. 根据权利要求22所述的肽多聚体,其包含四个相同的肽。

24. 肽复合物,其包含至少两个根据权利要求12至23中任一项的肽多聚体。

25. 根据权利要求1至11中任一项所述的肽、根据权利要求12至23中任一项所述的肽多聚体或根据权利要求24所述的肽复合物,其包含选自SEQ ID NO::1至8的氨基酸序列,用于靶向至人中性白细胞。

26. 根据权利要求1至11中任一项所述的肽、根据权利要求12至23中任一项所述的肽多聚体或根据权利要求24所述的肽复合物,其包含选自SEQ ID NO::9至13的氨基酸序列,用于靶向至鼠中性白细胞。

27. 组合物,其包含直接地或通过载体或连接体附接至治疗剂或诊断剂的根据权利要求1至11中任一项所述的肽、根据权利要求12至23中任一项的肽多聚体或根据权利要求24所述的肽复合物。

28. 包含纳米颗粒的组合物,所述纳米颗粒包含核心颗粒和附接于所述核心颗粒的外表面的根据权利要求1至11中任一项所述的肽、根据权利要求12至23中任一项所述的肽多聚体或根据权利要求24所述的肽复合物。

29. 根据权利要求28所述的组合物,其进一步包含治疗剂或诊断剂。

30. 根据权利要求27或29所述的组合物,其中所述治疗剂是中性白细胞修饰治疗剂。
31. 根据权利要求30所述的组合物,其中所述中性白细胞修饰治疗剂是中性白细胞细胞毒剂。
32. 根据权利要求27和29至31中任一项所述的组合物,其中所述治疗剂选自TGF- β 抑制剂、胞吐作用抑制剂和黄素酶抑制剂。
33. 根据权利要求32所述的组合物,其中所述TGF- β 抑制剂是SB431542,所述胞吐作用抑制剂是Nexinhib-20并且所述黄素酶抑制剂是氯化二亚苯基碘鎓(DPI)。
34. 药物组合物,其包含根据权利要求1至11中任一项所述的肽、根据权利要求12至23中任一项所述的肽多聚体、根据权利要求24所述的肽复合物或根据权利要求27至33中任一项所述的组合物,以及药学上可接受的载体、赋形剂或佐剂。
35. 根据权利要求34所述的药物组合物,其被配制用于全身施用或施用至炎症部位。
36. 根据权利要求34或35所述的药物组合物,其用于治疗中性白细胞相关疾病或状况。
37. 根据权利要求36所述的药物组合物,其用于治疗与患病或受伤组织或部位的中性白细胞积聚相关的疾病或状况。
38. 根据权利要求36或37所述的药物组合物,其中所述疾病或状况选自:癌症、炎性疾病或状况和炎性自身免疫性疾病或状况。
39. 根据权利要求38所述的药物组合物,其中所述疾病或状况是炎性疾病或状况。
40. 根据权利要求38或39所述的药物组合物,其中所述炎性疾病或状况选自慢性阻塞性肺病(COPD)、炎症性肠病(IBD)和腹膜炎。
41. 在有需要的受试者中治疗中性白细胞相关疾病或状况的方法,所述方法包括向所述受试者施用根据权利要求34或35所述的药物组合物。
42. 根据权利要求41所述的方法,其中所述疾病或状况选自:癌症、炎性疾病或状况和炎性自身免疫性疾病或状况。
43. 根据权利要求41或42所述的方法,其中所述疾病或状况是炎性疾病或状况。
44. 根据权利要求42或43所述的方法,其中所述炎性疾病或状况选自慢性阻塞性肺病(COPD)、炎症性肠病(IBD)和腹膜炎。

中性白细胞结合肽

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2020年6月28日提交的美国临时专利申请号63/045,107的优先权权益,其内容通过引用整体并入本文。

技术领域

[0003] 本发明涉及在包括癌症以及传染性、炎性和自身免疫性疾病或障碍在内的医学状况中,中性白细胞(嗜中性粒细胞,neutrophil)靶向的治疗剂或诊断剂的递送。

背景技术

[0004] 恶性细胞对于免疫系统基本上是可识别的。然而,肿瘤已经进化出机制来创建复杂的免疫抑制网络,其使免疫应答的效应臂瘫痪。肿瘤免疫抑制受抑制性细胞因子和更重要的特定细胞群的指导。这种免疫抑制网络的关键部分是骨髓细胞,特别是中性白细胞和巨噬细胞,它们被肿瘤微环境“再教育”以支持肿瘤生长。

[0005] 与免疫系统的其他细胞(如T细胞和巨噬细胞)相比,中性白细胞在癌症中的作用的研究广度要少得多。然而,越来越多的证据表明中性白细胞通过支持血管生成和肿瘤细胞生长促进肿瘤发生。另一方面,除了具有促肿瘤功能外,中性白细胞还被证明具有抗肿瘤特性和直接杀灭肿瘤细胞的能力,例如通过释放活性氧种类(reactive oxygen species)、蛋白酶、膜穿孔剂或细胞因子如TNF α 和白细胞介素-1 β (Tazzyman S,等人International journal of experimental pathology,2009,90(3),222-231)。

[0006] 除了它们的抗癌潜力外,中性白细胞还是广泛的感染、炎症和自身免疫状况中的有效的效应细胞。在患有这些状况的患者以及癌症患者中调节中性白细胞功能可能对疾病进展具有显著的治疗益处和影响。然而,中性白细胞的寿命非常短,这对这些细胞的离体(ex vivo)操作和随后的移植提出了重大挑战。

[0007] 体内操作中中性白细胞功能需要将活性剂特异地靶向中性白细胞群,以最小化脱靶效应(off-target effects)。对小鼠中性白细胞特异的抗体是可获得的(Daley,J Leukoc Biol.2008,83(1),64-70),但它们在体内施用时耗尽中性白细胞。

[0008] Mazzucchelli L等人(Blood,1999,93(5),1738-1748)公开了特异性结合人中性白细胞和单核细胞的肽。使用噬菌体展示文库鉴定肽序列。

[0009] CD177是中性白细胞特异性细胞外表面蛋白,其属于基因超家族,基因超家族共同特征是具备至少一个具有80个氨基酸(包括10个半胱氨酸)的LU结构域(Ly/uPAR)。当与小鼠CD177的C末端比对时,人类CD177是50%保守的。人类CD177含有LU结构域的2个直接重复,而小鼠CD177有4个。Miettinen等人2018(PLoS ONE 13(7):e0200444)公开了CD177介导的纳米颗粒,其通过结合从噬菌体展示文库中鉴定的肽来靶向人类和小鼠中性白细胞。

[0010] 对于用于治疗 and 诊断应用的独立于抗体、高度特异性靶向中性白细胞的安全、通用且不昂贵的平台的需求仍然未满足。

发明内容

[0011] 本发明提供特异性结合中性白细胞的新型肽序列、肽缀合物和包含所述肽序列的多聚体分子。肽、肽缀合物及其多聚体形式可用作靶向剂,用于将治疗剂和/或诊断剂特异性体内递送至中性白细胞,并且特别适用于患有癌症、传染病、炎性疾病或障碍或炎性自身免疫性疾病或障碍的患者。

[0012] 根据第一方面,提供了肽,其包含选自由以下的氨基酸序列:

[0013] KFPDLDSRRLPHMSL (SEQ ID NO:1);

[0014] LATTHMVFS PDH (SEQ ID NO:2);

[0015] PSSNLESTPLSLL (SEQ ID NO:3);

[0016] SSLMTTQLIATSI (SEQ ID NO:4);

[0017] PELDSKPYFPPL (SEQ ID NO:5);

[0018] ELVTASMPRPNN (SEQ ID NO:6);

[0019] SLESSPMAQLPQ (SEQ ID NO:7);

[0020] SELRSTPLL VPS (SEQ ID NO:8);

[0021] LQIQSWSSSP (SEQ ID NO:9);

[0022] STMTILGTGS (SEQ ID NO:10);

[0023] TETSLRIVSTNP (SEQ ID NO:11);

[0024] LSIVSGSALNHL (SEQ ID NO:12); 和

[0025] LTLVSRPMI (SEQ ID NO:13)。

[0026] 根据一些实施方式,肽包含6-30个氨基酸。

[0027] 根据一些实施方式,肽包含10-20个氨基酸。

[0028] 根据一些实施方式,肽由选自以下的氨基酸序列组成:SEQ ID NO:1-13。

[0029] 根据一些实施方式,肽包含至少一个环化。

[0030] 根据一些实施方式,肽包含选自以下的氨基酸序列:SEQ ID NO:1-8。

[0031] 根据一些实施方式,肽包含选自以下的氨基酸序列:SEQ ID NO:9-13。

[0032] 根据一些实施方式,肽缀合至至少一个能够增加溶解度的部分并且任选地缀合至至少一个连接体(linker)或间隔物(间隔区,spacer)。

[0033] 根据一些实施方式,该至少一个能够增加溶解度的部分是8-氨基-3,6-二氧代辛酸(8-amino-3,6-dioxaoctanoic acid) (Doa) 残基。

[0034] 根据一些实施方式,肽具有根据式III的结构:

[0035] 肽-Doa-Doa-C(式III)

[0036] 其中C是半胱氨酸残基,并且肽表示本发明的肽。

[0037] 根据一些实施方式,连接体包含3-马来酰亚胺基丙酸(maleimidopropionic acid) (Mpa) 残基。

[0038] 根据另一方面,提供了包含本发明的多个相同或不同肽的肽多聚体。

[0039] 根据一些实施方式,肽多聚体包含2-20个相同或不同的肽。

[0040] 根据一些实施方式,肽多聚体包含2-4个相同或不同的肽。

[0041] 根据一些实施方式,肽多聚体包含4个相同或不同的肽。

[0042] 根据一些实施方式,肽直接地或通过连接体或间隔物彼此共价连接、或直接地或

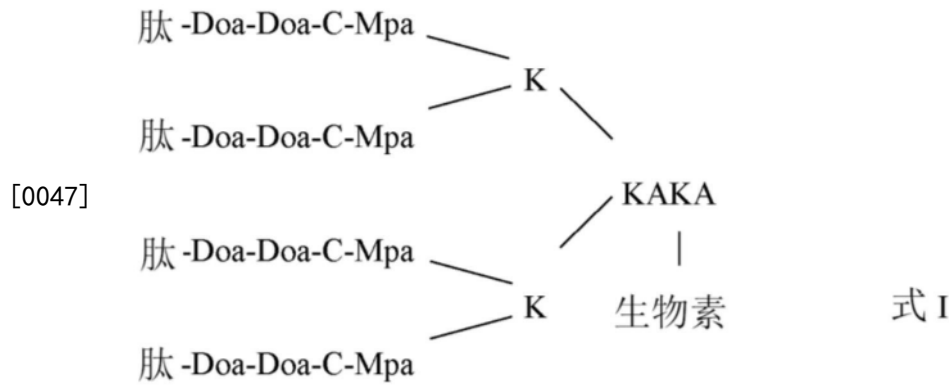
通过连接体或间隔物共价连接至支架。

[0043] 根据一些实施方式,肽多聚体包含支化支架。

[0044] 根据一些实施方式,支化支架包含至少一个Lys残基,所述Lys残基与肽直接地或通过间隔物或连接体连接。

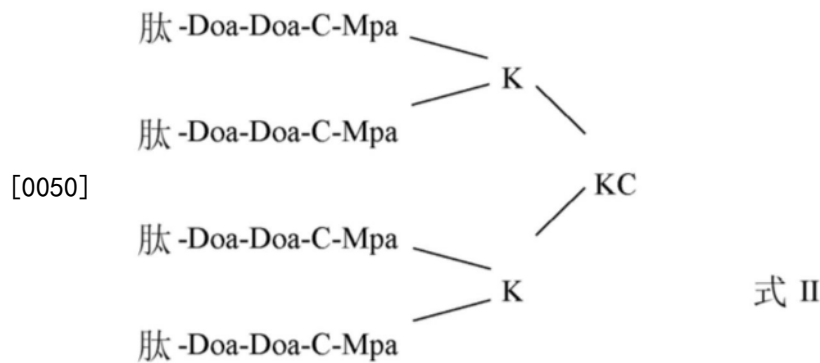
[0045] 根据一些实施方式,肽多聚体进一步包含共价附接到肽多聚体的生物素部分。

[0046] 根据一些实施方式,肽多聚体具有根据式I的结构:



[0048] 其中每个肽独立地表示本发明的肽。

[0049] 根据一些实施方式,肽多聚体具有根据式II的结构:



[0051] 其中每个肽独立地表示本发明的肽。

[0052] 根据一些实施方式,肽多聚体包含至少两个不同的肽。

[0053] 根据一些实施方式,肽多聚体包含四个相同的肽。

[0054] 根据另一方面,提供了包含至少两个本发明的肽多聚体的肽复合物。

[0055] 根据一些实施方式,本发明的肽、本发明的肽多聚体或本发明的肽复合物包含选自SEQ ID NO:1至8的氨基酸序列,用于靶向至人中性白细胞。

[0056] 根据一些实施方式,本发明的肽、本发明的肽多聚体或本发明的肽复合物包含选自SEQ ID NO:9至13的氨基酸序列,用于靶向至鼠中性白细胞。

[0057] 根据另一个方面,提供了组合物,其包含直接地或通过载体或连接体附接至治疗剂或诊断剂的本发明的肽、本发明的肽多聚体或本发明的肽复合物。

[0058] 根据另一个方面,提供了包含纳米颗粒的组合物,该纳米颗粒包含核心颗粒和附接于核心颗粒的外表面的本发明的肽、本发明的肽多聚体或本发明的肽复合物。

[0059] 根据一些实施方式,组合物进一步包含治疗剂或诊断剂。

[0060] 根据一些实施方式,治疗剂是中性白细胞修饰治疗剂。

[0061] 根据一些实施方式,中性白细胞修饰治疗剂是中性白细胞细胞毒剂。

- [0062] 根据一些实施方式,治疗剂选自TGF- β 抑制剂、胞吐作用抑制剂和黄素酶抑制剂。
- [0063] 根据一些实施方式,TGF- β 抑制剂是SB431542,胞吐作用抑制剂是Nexinhib-20并且黄素酶抑制剂是氯化二亚苯基碘鎓(二苯基氯化碘盐,diphenyleneiodonium chloride)(DPI)。
- [0064] 根据另一方面,提供了药物组合物,其包含本发明的肽、本发明的肽多聚体、本发明的肽复合物或本发明的组合物以及药学上可接受的载体、赋形剂或佐剂。
- [0065] 根据一些实施方式,药物组合物被配制用于全身施用或施用至炎症部位。
- [0066] 根据一些实施方式,药物组合物用于治疗中性白细胞相关疾病或状况。
- [0067] 根据一些实施方式,药物组合物用于治疗与患病或受伤组织或部位的中性白细胞积聚相关的疾病或状况。
- [0068] 根据一些实施方式,疾病或状况选自:癌症、炎性疾病或状况和炎性自身免疫性疾病或状况。
- [0069] 根据一些实施方式,疾病或状况是炎性疾病或状况。
- [0070] 根据一些实施方式,炎性疾病或状况选自慢性阻塞性肺病(COPD)、炎症性肠病(IBD)和腹膜炎。
- [0071] 根据另一个方面,提供了在有需要的受试者中治疗中性白细胞相关疾病或状况的方法,该方法包括向受试者施用本发明的药物组合物。
- [0072] 根据一些实施方式,疾病或状况选自:癌症、炎性疾病或状况以及炎性自身免疫性疾病或状况。
- [0073] 根据一些实施方式,疾病或状况是炎性疾病或状况。
- [0074] 根据一些实施方式,炎性疾病或状况选自慢性阻塞性肺病(COPD)、炎症性肠病(IBD)和腹膜炎。
- [0075] 根据下文给出的详细描述,本发明的其他实施方式和全部适用范围将变得明显。然而,应当理解,虽然指示了本发明的优选实施方式的详细描述和具体实例仅以示例方式给出,但根据本详细描述在本发明的精神和范围内的各种变化和修改对于本领域的技术人员来说将是明显的。

附图说明

- [0076] 图1A-图1D:针对小鼠中性白细胞选择的排名最高的肽序列的噬菌体结合的验证。(1A-B)从4T1荷瘤小鼠WBC分离,呈递LQIQSWSSSP(SEQ ID NO:9)肽的噬菌体与中性白细胞(Ly6G+CD11b+,红色直方图)和其他WBC(Ly6G-CD11b-,蓝色直方图)的结合使用抗-M13 PE-标记的抗体和(1A)流式细胞术分析或(1B)显微镜进行评估。(1C)LQI肽构建体的概述——噬菌体上的LQI肽序列插入噬菌体的蛋白VIII包被蛋白(橙色的LQI肽)内,并且描绘了相邻的氨基酸残基(重组LQI pVIII)。生成了未标记的、Cy5标记的、生物素标记的和包括来自包被蛋白VIII的邻近氨基酸以及甘氨酸连接体的LQI肽构建体和荧光素,并且测试了结合。(1D)LQI噬菌体结合和LQI肽构建体的竞争测定。中性白细胞与LQI呈递噬菌体(黑线)单独温育,或与LQI呈递噬菌体和不同的LQI肽构建体同时温育(蓝线)。使用抗M13-PE抗体(仅M13-PE=虚线)量化噬菌体与中性白细胞的结合。
- [0077] 图2A-图2I:(2A)四聚体LQI结构的示意图。(2B)FACS分析比较LQI四聚体(左)和

16-LQI (右) 与WBC的结合。(2C) LQI四聚体或16-LQI与中性白细胞和其他WBC结合的定量。(2D) 比较LQI四聚体与16-LQI以及比较LQI四聚体与16-对照肽的中性白细胞结合的滴度。(2E) 代表性直方图显示在体外温育和用链霉抗生物素-Cy3染色后, 如通过流式细胞术分析, 16-LQI与健康Balb/C小鼠中每个WBC群体的结合百分比。* = 基于光散射的门控(gating, 设门)。(2F) 代表性直方图显示如通过流式细胞术分析的, LQI四聚体与荷4T1-乳腺癌衍生肿瘤的Balb/C小鼠的高密度中性白细胞(HDN)的结合。Ly6G⁺群体代表HDN, Ly6G⁻细胞是其他WBC。(2G) 代表性直方图显示如通过流式细胞术分析的LQI四聚体肽与从4T1肿瘤分离的TAN结合。(2H) 条形图显示了如通过流式细胞术分析的LQI四聚体肽、对照肽或仅SA-Cy3与各种类型的中性白细胞结合效率的总结。(2I) Gr-1中性白细胞(绿色)与16-LQI(红色)结合的共聚焦显微镜的代表性图像。

[0078] 图3: 仅链霉抗生物素-Cy3(SA-CyTM3)、仅LQI四聚体和各种SA-Cy3:四聚体比例的SA-Cy3+LQI四聚体肽样品的聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)显微照片。

[0079] 图4: 条形图, 显示未包被或LQI四聚体包被的纳米球与来自4T1荷瘤小鼠中性白细胞或其他WBC的体外结合。通过流式细胞术进行分析。

[0080] 图5A-图5B: 条形图, 显示在(5A)腹膜炎诱发小鼠的血液和(5B)腹膜炎诱发小鼠的腹膜灌洗液中检测到的携带纳米球的中性白细胞(纳米球+中性白细胞)的百分比。每条代表一个小鼠。“cont.” = 未包被的纳米球。“Pep.” = LQI四聚体包被的纳米球。“Neut” = 中性白细胞。“其他” = 其他WBC。

[0081] 图6A-图6B: (6A)通过流式细胞术分析获得的直方图, 显示了患有结肠炎的小鼠中的中性白细胞摄取LQI四聚体包被的纳米球。(6B)使用台风激光扫描仪(Typhoon laser scanner)拍摄的显微照片显示切开并压平的远侧结肠的概览图像(左), 以及使用双目荧光显微镜获取的图像显示纳米球浸润的放大区域(右)。高亮的点代表高荧光区域。

[0082] 图7: 条形图, 显示在BSA/1×PBS缓冲液(对照)或小鼠血清(20、40或60分钟温育)中LQI四聚体的预温育后, SA-Cy3+细胞占纯化HDN总群体的百分比。通过流式细胞术进行分析。

[0083] 图8A-图8G: LQI-四聚体对中性白细胞功能的影响(8A)在存在或不存在的10、100和1000nM LQI四聚体的情况下, 将中性白细胞温育6.5小时。使用10nM PMA处理作为阳性对照。通过台盼蓝排斥法确定活力, 并且与未处理的对照中性白细胞进行比较, 如条形图所示。(8B-8C)条形图, 总结了(8B)膜联蛋白+和(8C)膜联蛋白+PI+中性白细胞在存在或不存在的10、100和1000nM LQI四聚体的情况下温育30min后的FACS分析。使用10nM PMA处理作为阳性对照。(8D)在存在或不存在的10、100和1000nM LQI四聚体的情况下温育30min后, 中性白细胞中CD11b表达的平均荧光强度(MFI)的条形图。使用10nM PMA处理作为阳性对照。(8E)在存在或不存在的(in the presence of absence of)10、100和1000nM LQI四聚体的情况下, 通过中性白细胞产生ROS的曲线图。使用100nM PMA处理作为阳性对照。(8F)中性白细胞向对照培养基或含有LQI-四聚体100nM和1μM的培养基迁移(博伊登盒(Boyden chamber))的条形图。数据代表5个高倍视野(HPF)的平均值。(8G)中性白细胞向对照培养基或仅含有CXCL2(100ng/μl)或补充有LQI-四聚体(100nM和1μM)的培养基迁移(博伊登盒)的条形图。LQI-四聚体(100nM和1μM LQI)被添加到上室的中性白细胞中。数据代表5个高倍视野(HPF)的平均值。

[0084] 图9:条形图,显示与仅HDN、HDN+LQI四聚体或HDN+KFP四聚体温育后,相对于未与HDN培养的对照细胞,死亡4T1细胞的百分比。

[0085] 图10:条形图,显示未用或用LQI四聚体肽、KFP四聚体或细胞松弛素B(阳性对照)处理的4T1细胞的基于刃天青(resazurin)的活力测定。

[0086] 图11:噬菌体库筛选、交替轮次的阳性选择(针对HDN)和阴性选择(针对单核低密度部分、LDF)的示意图。

[0087] 图12:显示空噬菌体(对照)和8种人肽噬菌体与循环中性白细胞的结合水平的代表性直方图。

[0088] 图13A-图13I:条形图,显示对于以下肽:1.1 (SEQ ID NO:1,图13A)、27 (SEQ ID NO:2,图13B)、4 (SEQ ID NO:3,图13C)、14 (SEQ ID NO:4,图13D)、PEL (SEQ ID NO:5,图13E)、ELV (SEQ ID NO:6,图13F)、SLE (SEQ ID NO:7,图13G)和SEL (SEQ ID NO:8,图13H),肽-噬菌体与来自不同健康个体的中性白细胞的结合百分比。M40、Z45、Z48、A38、T26、A25、R55和N27代表不同的个体。(13I)条形图,总结了表达不同肽的噬菌体与来自不同供体的CD66b+中性白细胞的结合(彩色圆圈)。空心黑色圆圈表示从总体平均值中排除的异常值。

[0089] 图14:条形图,显示肽-噬菌体与肺癌患者循环中性白细胞的结合百分比。空(Empty)=空噬菌体;peplmice=LQI (SEQ ID NO:9);3=阴性对照肽 (SSLMTTQLIATSI, SEQ ID NO:4)。

[0090] 图15A-图15F:(15A)16-KFP与来自健康供体的中性白细胞(SSC^高)和其他WBC (SSC^低)结合的代表性量化的条形图。(15B)曲线图,显示KFP-四聚体对中性白细胞ROS产生没有影响。(15C-15D)条形图,显示KFP-四聚体对中性白细胞活力没有影响,如通过(15C)显微镜或(15D)流式细胞术测量的。(15E)条形图,显示KFP-四聚体对中性白细胞没有化学吸引力(趋化性,chemoattractive)。(15F)条形图,显示KFP-四聚体对于中性白细胞对CXCL2的吸引没有影响。

[0091] 图16A-图16F:PLGANP的LQI四聚体包被的优化。(16A)点图,显示了所示NP配方的中性白细胞(高侧散射Q1+Q2)和其他WBC(低侧散射Q3+Q4)的NP摄取。(16B)对于与指定的NP配方一起温育的中性白细胞和其他WBC,PLGA-Cy5的MFI条形图。(16C)PLGACy5 MFI在中性白细胞和其他WBC之间的比例的条形图。(16D)用不同浓度的具有c-末端半胱氨酸的LQI四聚体修饰的PLGA-PEG-马来酰亚胺NP的结合的条形图。PLGA-Cy5 MFI针对中性白细胞门控。(16E)点图,显示中性白细胞(高侧散射Q1+Q2)和其他WBC(低侧散射Q3+Q4)对LQI-四聚体NP的NP摄取。(16F)未包被的NP和LQI四聚体包被的NP的电子显微镜图像。

[0092] 图17A-图17E:NSNP介导的中性白细胞功能的体外和体内调节。(17A)未包被的或LQI包被的NP与中性白细胞或其他WBC结合的代表性量化条形图。(17B)FACS点图,显示未包被(左)或LQI四聚体包被(右)的Cy5标记的PLGA NP与纯化的WBC的结合。具有高侧散射(SSC)的细胞代表中性白细胞。(17C)条形图,显示与单体包被的NP结合的中性白细胞和其他WBC的百分比。(17D)曲线图,显示PMA (50nM)在对照中性白细胞(Cont.)、用空(空NP)或含DPI的NSNP (DPI NP)或游离DPI (Conc.)处理的中性白细胞中诱导ROS产生。(17E)条形图,总结了在PMA (100nM)刺激之前(Cont.)或之后中性白细胞中CD11b表达的FACS分析。中性白细胞与运载体、空的NP或负载Nexinhib-20的LQI四聚体包被的NP预温育。

[0093] 图18A-图18G:(18A-18B)显微照片,显示蛋白质印迹分析检测HDN中的总Smad2/3

和phospho-Smad2, HDN, 其(18A)在添加TGF β 之前与空NP+TGF β 、或SB431542NP+TGF β 预温育或(18B)与仅TGF β (对照)、空NP+TGF β 、或SB431542NP+TGF β 温育。(18C)条形图,显示含有SB431542的NSNP限制了4T1荷瘤小鼠中循环低密度中性白细胞的繁殖,表明有效阻断了体内TGF β 。对照小鼠(Cont.)未经处理,并且用空NSNP(空NP)处理的小鼠用作NSNP注射的对照。(18D-18E)从4T1荷瘤小鼠分离的(18D)中性白细胞(Ly6G⁺)和(18E)非中性白细胞WBC(Ly6G⁻)与空NP、负载roscovitine的NP或游离Roscovitine一起温育的点图。随后分析细胞的膜联蛋白-V结合以量化凋亡细胞。(18F)空的或含有roscovitine的NSNP在施用NP后4小时对中性白细胞数量的影响的条形图。(18G)曲线图,显示静脉施用游离DPI、空NSNP或含有DPI的NSNP产生的PMA刺激的腹膜中性白细胞对H₂O₂产生的影响。

[0094] 图19A-图19E:体内NSNP分布。(19A)在用未包被或LQI-四聚体包被的NP静脉内注射,注射后4、8和24小时的健康Balb/C小鼠中量化含有NP的中性白细胞的曲线图。(19B) i.v.注射LQI四聚体包被的空NP、未包被的空NP或PBS作为对照后3小时,健康Balb/C小鼠中TyphoonTM生物分布成像。(19C)血管内携带荧光纳米珠(红色)的中性白细胞(绿色)的荧光染色(虚线)。(19D)来自健康小鼠(左)和患有DSS诱导的结肠炎的小鼠(右)的结肠的代表性TyphoonTM成像。(19E)在患有DSS诱导的结肠炎的小鼠的结肠中发炎病灶中积聚的NSNP的代表性荧光成像。

[0095] 图20A-图20K:脱颗粒和ROS产生的中性白细胞特异性靶向减弱了COPD的发展。(20A)实验时间线示意图。(20B-20E)组合图,显示(20B)总细胞、(20C) Ly6G⁺中性白细胞、(20D) CD3⁺T细胞和(20E)健康PBS处理、COPD空NP处理、COPD DPI-NP处理和COPD Nexinhib-20-NP处理的小鼠的F4/80BALF的定量。(20F)健康PBS处理(蓝色)、COPD空NP处理(红色)、COPD DPI-NP处理(绿色)和COPD Nexinhib-20NP处理小鼠(紫色)的平均压力-容积环曲线图。(20H-20G)健康PBS处理、COPD空NP处理、COPD DPI-NP处理和COPD Nexinhib-20-NP处理的小鼠的用力肺活量(FVC)以及(20H)用力呼气量0.05(FEV0.05)与FVC比例的混合图。(20I)代表性图像,显示健康小鼠(健康对照)和用空NP(COPD空NP)、含DPI的NP(COPD DPI NP)或含Nexinhib-20的NP(COPD Nexinhib-20NP)处理的COPD小鼠的肺中大(肺气肿的)肺泡。(20J)对照小鼠(Cont.)或用空NP(空)、含DPI的NP(DPI)或含Nexinhib-20的NP处理的COPD小鼠的每个肺区域的大(肺气肿的,在20I中以蓝色高亮的)肺泡平均频率的混合图。(20K)健康小鼠(健康对照)和用空NP(COPD空NP)、含DPI的NP(COPD DPI-NP)或含Nexinhib-20的NP(COPD Nexinhib-20-NP)处理的COPD小鼠的全肺的代表性H&E染色。

[0096] 图21A-图21G:(21A)蛋白质凝胶的显微银染色,显示使用固定化的16-LQI在中性白细胞裂解物上的LQI-肽配体CD177的下拉(pulldown)。(21B)通过16-LQI下拉富集的排名靠前(top-ranking)的蛋白质的表。(21C-21D)用(21C) Ly6G和CD177或(21D) CD177和16-LQI染色的分离白细胞的代表性点图。(21E) 16-LQI结合至对照HEK293T细胞(红色)、SA-Cy3结合至过表达鼠CD177蛋白的HEK293T细胞(绿色)和与16-LQI一起温育的过表达CD177的HEK293T细胞(蓝色)的FACS点图。(21F)具有CD177(绿色)和16-LQI(红色)染色的单个中性白细胞的代表性STORM成像,叠加明场(左)或细胞核的DAPI染色(右)。(21G)使用ImageJ相互作用因子插件对(E)中描述的图像进行CD177和16-LQI相互作用的量化。

[0097] 图22A-图22C:(22A)健康供体(2、6、10)、COPD患者(11、12)和肺癌患者(13)的16-KFP结合和中性白细胞CD177表达的条形图。(22B)不同供体中CD177表达与16-KFP结合之间

相关性的曲线图。(22C) 16-KFP与中性白细胞结合的条形图,其中CD177阻断抗体的量增加。

具体实施方式

[0098] 本发明提供特异性结合中性白细胞的肽序列、包含所述肽序列的单体或多聚体形式的分子、以及包含它们的复合物。在患有癌症以及传染病、炎性疾病或障碍或炎性自身免疫性疾病或与中性白细胞积聚相关的障碍的患者中,各种形式的肽可用于将治疗剂和/或诊断剂靶向地体内递送至患病或受伤的组织或部位的中性白细胞。在针对这些疾病或障碍的整体免疫应答中,中性白细胞具有显著作用,并且它们的调节是迄今为止未彻底研究的治疗途径。

[0099] 本发明部分地基于显示与中性白细胞高度特异性结合的几种特异性短肽序列的发现。肽的四聚体和更高水平的缀合显示了与健康以及患病小鼠和人类的循环中性白细胞的离体和体内结合,并且发现在疾病部位中积聚。还显示了,这些肽不影响中性白细胞的活力和功能。

[0100] 本发明进一步部分地基于以下发现:在全身TGF β 阻断后,肿瘤相关中性白细胞(TAN)的表型从肿瘤支持表型变为促炎肿瘤抑制表型,并且含有TGF β 抑制剂的纳米颗粒在高密度成熟中性白细胞(高密度中性白细胞-HDN)中完全阻断TGF β 信号传导。不受任何理论或机制的束缚,假设TGF β 抑制剂(例如SB-431542)与本发明的一种或多种多肽的组合可显著增强体内中性白细胞的抗肿瘤应答并且降低全身副作用。

[0101] 应该指出的是Fridlender, Z.G., 等人(Cancer cell, 2009, 16 (3) 183-194) 显示了, TGF β 的全身阻断导致中性白细胞表型从N2 TAN变为N1 TAN。将TGF β 抑制剂靶向中性白细胞,使用特定的肽和纳米颗粒作为载体,可以靶向方式有效地阻断体内TGF β 信号传导,而没有其他不期望的副作用。

[0102] 特别地,本发明提供了结合人类或鼠类中性白细胞的肽,及其在治疗或诊断中性白细胞相关医学状况中的用途。在一些实施方式中,医学状况选自癌症、传染病、炎性疾病或障碍和自身免疫性疾病或障碍。每种可能性代表本发明的单独实施方式。

[0103] 如本文所用,术语“中性白细胞”是指哺乳动物中数量最多的白细胞类型,其形成先天免疫系统的重要部分。中性白细胞与嗜碱细胞和嗜曙红细胞(嗜酸性粒细胞, eosinophil)一起构成多形核细胞(polymorphonuclear cells) (PMN) 家族的部分。中性白细胞通常存在于血流中。在炎症(特别是由于细菌感染)和某些形式的癌症的开始(急性)阶段期间,中性白细胞是首先朝向炎症/肿瘤部位迁移的免疫细胞之一。遵循化学信号如白细胞介素-8(IL-8)和C5a,它们通过血管,然后通过间质组织迁移。本文所用的术语“中性白细胞(嗜中性粒细胞, neutrophil)”涵盖所有类型的中性白细胞,成熟的、不成熟的、高密度的或低密度的,包括但不限于高密度中性白细胞-HDN和低密度中性白细胞(LDN)。

[0104] 术语“肽”是指通过肽键,即在一个氨基酸的羧基和相邻氨基酸的氨基之间形成的共价键,连接的短链氨基酸残基。术语“肽”是指具有上至50个氨基酸的短序列。长度超过50个氨基酸的氨基酸单体的链称为“多肽”。这样的多肽,当具有多于50个氨基酸残基时,也可以归类为蛋白质,更具体地,低或中等分子量的蛋白质。

[0105] 术语“肽”还涵盖术语“肽类似物”。术语“肽类似物”和“类似物”在本文中可互换使用并且指与原始肽具有至少80%同一性的肽的类似物,其中类似物保留了原始肽的活性。

因此,术语“类似物”和“活性类似物”可以互换使用。术语“类似物”是指在母肽的氨基酸序列中含有取代、重排、缺失、添加和/或化学修饰的肽。根据一些实施方式,肽类似物与原始肽具有至少80%、至少90%或至少95%序列同一性。根据一个实施方式,该类似物与原始肽具有约70%至约95%、约80%至约90%或约85%至约95%的序列同一性。根据一些实施方式,本发明的类似物包含原始肽的序列,其中进行了1或2个缺失、添加和/或取代。

[0106] 术语“肽”还涵盖术语“肽片段”。术语“片段”是指原始肽或其中已删除1个或2个氨基酸残基的其类似物的片段,其中所述片段保留原始肽或类似物的活性。因此,术语“片段”和“活性片段”可以互换使用。

[0107] 氨基酸的取代可以是保守或非保守取代。非保守取代涵盖一个氨基酸被任何其他氨基酸取代。在一个特定的实施方式中,氨基酸被非天然氨基酸取代。

[0108] 术语“类似物”还涵盖术语“保守类似物”。本领域技术人员已知的氨基酸的保守取代在本发明的范围内。保守氨基酸取代包括用具有相同类型的官能团或侧链,例如,脂肪族、芳香族、带正电荷、带负电荷,的另一个氨基酸置换一个氨基酸。本领域技术人员将认识到单独的取代是“保守修饰的类似物”,其中改变导致氨基酸被化学相似的氨基酸取代。提供功能相似氨基酸的保守取代表是本领域众所周知的。保守取代的一个典型例子提供如下。

[0109] 以下六组中的每组都含有彼此保守取代的氨基酸:(1)丙氨酸(A)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T);(2)天冬氨酸(D)、谷氨酸(E);(3)天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q);(4)精氨酸(R)、赖氨酸(K);(5)异亮氨酸(I)、亮氨酸(L)、甲硫氨酸(M)、缬氨酸(V);和(6)苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)、色氨酸(W)。在其他实施方式中,保守取代涵盖用化学上相似的非天然氨基酸取代。

[0110] 因此,在一些实施方式中,类似物是肽的保守类似物。根据一些实施方式,本发明的保守类似物包含其中进行了1或2个保守取代的原始肽的序列。根据另一个实施方式,类似物由其中进行了1或2个保守取代的原始肽的氨基酸序列组成。因此,类似物由具有1或2个保守取代的原始肽的氨基酸序列组成。

[0111] 本文所用的术语“氨基酸”是指同时包含胺和羧酸官能团的有机化合物,其可以是天然或非天然氨基酸。二十二种天然氨基酸是天冬氨酸(Asp)、酪氨酸(Tyr)、亮氨酸(Leu)、色氨酸(Trp)、精氨酸(Arg)、缬氨酸(Val)、谷氨酸(Glu)、甲硫氨酸(Met)、苯丙氨酸(Phe)、丝氨酸(Ser)、丙氨酸(Ala)、谷氨酰胺(Gln)、甘氨酸(Gly)、脯氨酸(Pro)、苏氨酸(Thr)、天冬酰胺(Asn)、赖氨酸(Lys)、组氨酸(His)、异亮氨酸(Ile)、半胱氨酸(Cys)、硒代半胱氨酸(Sec)和吡咯赖氨酸(Py1)。非天然氨基酸的非限制性实例包括二氨基丙酸(Dap)、二氨基丁酸(Dab)、鸟氨酸(Orn)、氨基己二酸、 β -丙氨酸、1-萘基丙氨酸、3-(1-萘基)丙氨酸、3-(2-萘基)丙氨酸、 γ -氨基丁酸(GABA)、3-(氨基甲基)苯甲酸、对-乙炔基-苯丙氨酸、对-炔丙基-氧-苯丙氨酸、间-乙炔基-苯丙氨酸、对-溴苯丙氨酸、对-碘苯丙氨酸、对-叠氮基苯丙氨酸、对-乙酰基苯丙氨酸、叠氮基正亮氨酸、6-乙炔基-色氨酸、5-乙炔基-色氨酸、3-(6-氯吡啶基)丙氨酸、3-(6-溴吡啶基)丙氨酸、3-(5-溴吡啶基)丙氨酸、叠氮基高丙氨酸、对-氯苯丙氨酸、 α -氨基辛酸、0-甲基-L-酪氨酸、N-乙酰半乳糖胺- α -苏氨酸和N-乙酰半乳糖胺- α -丝氨酸。根据一个实施方式,取代是用非天然氨基酸取代。

[0112] 根据一个方面,本发明提供了肽,其包含选自以下的氨基酸序列:

[0113] KFPDLDSRRLPHMSL (SEQ ID NO:1);

[0114] LATTHMVFSPDH(SEQ ID NO:2);

[0115] PSSNLESTPLSLL(SEQ ID NO:3);

[0116] SSLMTTQLIATSI(SEQ ID NO:4);

[0117] PELDSKPYFPPL(SEQ ID NO:5);

[0118] ELVTASMPRPNN(SEQ ID NO:6);

[0119] SLESSPMAQLPQ(SEQ ID NO:7);

[0120] SELRSTPLLVPS(SEQ ID NO:8);

[0121] LQIQSWSSSP(SEQ ID NO:9);

[0122] STMTILGTGS(SEQ ID NO:10);

[0123] TETSLRIVSTNP(SEQ ID NO:11);

[0124] LSIVSGSALNHL(SEQ ID NO:12);和

[0125] LTLVSRPMI(SEQ ID NO:13);

[0126] 或其盐。

[0127] 根据另一方面,本发明提供了上至30个氨基酸的肽,其中肽包含选自SEQ ID NO:1至9的氨基酸序列或其盐。

[0128] 根据另一方面,本发明提供了上至30个氨基酸的肽,其中肽包含选自SEQ ID NO:10至13的氨基酸序列或其盐。

[0129] 根据另一方面,本发明提供了用于靶向中性白细胞的上至30个氨基酸的肽,其中肽包含选自SEQ ID NO:1至13的氨基酸序列或其盐。

[0130] 根据一方面,本发明提供了结合人中性白细胞的上至30个氨基酸的肽,所述肽包含选自SEQ ID NO:1至8的氨基酸序列。

[0131] 根据另一方面,本发明提供了用于靶向人中性白细胞的肽,其中肽包含选自SEQ ID NO:1至8的氨基酸序列或其盐。

[0132] 根据另一方面,本发明提供了结合鼠中性白细胞的肽,所述肽包含选自SEQ ID NO:9至13的氨基酸序列或其盐。

[0133] 根据又一方面,本发明提供了用于靶向鼠中性白细胞的上至30个氨基酸的肽,其中肽包含选自SEQ ID NO:9至13的氨基酸序列或其盐。

[0134] 根据一些实施方式,结合鼠中性白细胞的肽由氨基酸序列LQIQSWSSSP(SEQ ID NO:9)或其盐组成。

[0135] 如本文所用,术语“盐”指肽分子的羧基盐和氨基或胍基的酸加成盐。羧基的盐可以通过本领域已知的方法形成,并且包括无机盐例如钠盐、钙盐、铵盐、铁盐或锌盐等,以及与有机碱的盐如例如与胺如三乙醇胺、哌啶、普鲁卡因等形成的盐。酸加成盐包括例如与无机酸如例如乙酸或草酸形成的盐。盐在这里也描述了添加到肽溶液中以增强水凝胶形成和/或钙矿物质矿化的离子成分。

[0136] 不受任何理论或机制的束缚,提出人-和鼠-中性白细胞结合肽分别经由人和小鼠CD177结合至中性白细胞。

[0137] 根据一些实施方式,本发明提供结合至小鼠CD177的肽,所述肽包含选自SEQ ID NO:9至13的氨基酸序列或其类似物或盐。

[0138] 根据其他实施方式,本发明提供结合至人CD177的肽,所述肽包含选自SEQ ID NO:

1至8的氨基酸序列、或其类似物或盐。

[0139] 不受任何理论或机制的束缚,假设不同的肽与人中性白细胞vs.鼠中性白细胞的结合是由人CD177和小鼠CD177的不同结构引起的。

[0140] 本发明的肽、类似物和盐可以通过本领域已知的任何方法——包括重组和合成方法——产生。合成方法包括纯固相合成法(exclusive solid phase synthesis)、部分固相合成法、片段缩合法或经典溶液合成法。固相肽合成法程序是本领域技术人员众所周知的。生产肽的合成方法包括但不限于FMOC固相肽合成法,例如在Fields G.B., Noble R., Int.J.Pept.Protein Res., 35:161-214, 1990中描述的。

[0141] 在一些实施方式中,通过制备型高效液相色谱法纯化合成肽,并且通过本领域技术人员已知的方法经由氨基酸测序确认肽序列。

[0142] 在一些实施方式中,本领域众所周知的重组蛋白技术用于产生本发明的肽和肽多聚体(由非支化结构组成)。

[0143] 根据一些实施方式,肽是中性白细胞结合肽。根据一些实施方式,中性白细胞是哺乳动物的中性白细胞。根据一些实施方式,中性白细胞是啮齿动物的中性白细胞。根据一些实施方式,中性白细胞是鼠中性白细胞。根据一些实施方式,中性白细胞是人中性白细胞。根据一些实施方式,肽是中性白细胞靶向肽。根据一些实施方式,肽是CD177结合肽。根据一些实施方式,肽是CD177靶向肽。根据一些实施方式,CD177是哺乳动物的CD177。根据一些实施方式,CD177是啮齿动物的CD177。根据一些实施方式,CD177是鼠的CD177。根据一些实施方式,CD177是人CD177。

[0144] 根据一些实施方式,肽包含至多500、450、400、350、300、250、200、150、100、90、80、70、60、50、45、40、35、30、25、20、15或10个氨基酸。每种可能性代表本发明的单独实施方式。在一些实施方式中,肽包含至多100个氨基酸。在一些实施方式中,肽包含至多50个氨基酸。在一些实施方式中,肽包含至多30个氨基酸。在一些实施方式中,肽包含上至30个氨基酸。在一些实施方式中,肽包含至多20个氨基酸。在一些实施方式中,肽包含至多15个氨基酸。

[0145] 根据一些实施方式,肽包含6-100、6-50、6-40、6-30、6-25、6-20、6-15、5-12、6-10、10-100、10-50、10-40、10-30、10-25、10-20、10-15、10-12、12-100、12-50、12-40、12-30、12-25、12-20、12-15、15-100、15-50、15-40、15-30、15-25或15-20个氨基酸。每种可能性代表本发明的单独实施方式。根据一些实施方式,肽包含至少6个氨基酸。根据一些实施方式,肽包含至少8个氨基酸。根据一些实施方式,肽包含至少10个氨基酸。根据一些实施方式,肽包含至少12个氨基酸。根据一些实施方式,肽包含至少15个氨基酸。

[0146] 根据一些实施方式,肽包含SEQ ID NO:1。根据一些实施方式,肽由SEQ ID NO:1组成。根据一些实施方式,肽包含SEQ ID NO:2。根据一些实施方式,肽由SEQ ID NO:2组成。根据一些实施方式,肽包含SEQ ID NO:3。根据一些实施方式,肽由SEQ ID NO:3组成。根据一些实施方式,肽包含SEQ ID NO:4。根据一些实施方式,肽由SEQ ID NO:4组成。根据一些实施方式,肽包含SEQ ID NO:5。根据一些实施方式,肽由SEQ ID NO:5组成。根据一些实施方式,肽包含SEQ ID NO:6。根据一些实施方式,肽由SEQ ID NO:6组成。根据一些实施方式,肽包含SEQ ID NO:7。根据一些实施方式,肽由SEQ ID NO:7组成。根据一些实施方式,肽包含SEQ ID NO:8。根据一些实施方式,肽由SEQ ID NO:8组成。根据一些实施方式,肽包含选自SEQ ID NO:1-8的氨基酸序列。根据一些实施方式,肽由选自SEQ ID NO:1-8的氨基酸序列

组成。在一些实施方式中,肽结合至人中性白细胞和/或人CD177,并且肽包含选自SEQ ID NO:1-8的氨基酸序列或由其组成。根据一些实施方式,肽包含选自SEQ ID NO:1-9的氨基酸序列。根据一些实施方式,肽由选自SEQ ID NO:1-9的氨基酸序列组成。

[0147] 根据一些实施方式,肽包含SEQ ID NO:9。根据一些实施方式,肽由SEQ ID NO:9组成。根据一些实施方式,肽包含SEQ ID NO:10。根据一些实施方式,肽由SEQ ID NO:10组成。根据一些实施方式,肽包含SEQ ID NO:11。根据一些实施方式,肽由SEQ ID NO:11组成。根据一些实施方式,肽包含SEQ ID NO:12。根据一些实施方式,肽由SEQ ID NO:12组成。根据一些实施方式,肽包含SEQ ID NO:13。根据一些实施方式,肽由SEQ ID NO:13组成。根据一些实施方式,肽包含选自SEQ ID NO:9-13的氨基酸序列。根据一些实施方式,肽由选自SEQ ID NO:9-13的氨基酸序列组成。在一些实施方式中,肽结合至人中性白细胞和/或人CD177,并且肽包含选自SEQ ID NO:9-13的氨基酸序列或由其组成。

[0148] 根据一些实施方式,肽包括至少一种环化。根据一些实施方式,本发明的肽是环肽。如本文所用,术语“环化”是指两个非相邻的氨基酸之间的分子内键。术语“环肽(cyclic peptide)”和“环肽(cyclopeptide)”在本文中可互换使用并且是指在两个非相邻的氨基酸之间具有分子内键的肽。环化可以通过共价键或非共价键进行。分子内键包括但不限于主链至主链、侧链至主链和侧链至侧链的键。根据一些实施方式,环化发生在N-末端和C-末端氨基酸之间。根据一些实施方式,环化经由间隔物发生。根据一些实施方式,肽是线性肽。

[0149] 根据一些实施方式,本发明的肽被缀合至至少一个能够增加溶解度的部分。根据一些实施方式,本发明的肽被缀合至至少一个能够增加渗透性的部分。根据一些实施方式,本发明的肽缀合至至少一个能够增加溶解度或渗透性的部分。根据一些实施方式,至少一个是多个部分。在一些实施方式中,多个是2个。在一些实施方式中,多个是至少2、3、4、5、6、7、8、9或10个。每种可能性代表本发明的单独实施方式。

[0150] 根据其他实施方式,本发明的肽缀合至至少一个连接体或间隔物。根据进一步的实施方式,本发明的肽缀合至至少一个能够增加溶解度或渗透性的部分并且任选地缀合至至少一个连接体或间隔物。根据又一实施方式,本发明的肽缀合至至少一个能够增加溶解度或渗透性的部分和缀合至至少一个连接体或间隔物。根据又一的实施方式,本发明的肽缀合至至少一个能够增加溶解度或渗透性的部分和缀合至至少一个连接体或间隔物,其中该至少一个能够增加溶解度或渗透性的部分和该至少一个连接体或间隔物彼此共价连接。

[0151] 在一些实施方式中,连接体是氨基酸连接体。在一些实施方式中,连接体是化学连接体。在一些实施方式中,连接体是键。在一些实施方式中,键是共价键。在一些实施方式中,键是肽键。在一些实施方式中,间隔物是氨基酸间隔物。在一些实施方式中,连接体或间隔物包含至少1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸。每种可能性代表本发明的单独实施方式。在一些实施方式中,连接体或间隔物是单个氨基酸。在一些实施方式中,连接体或间隔物包含至多1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、75、80、90或100个氨基酸。每种可能性代表本发明的单独实施方式。在一些实施方式中,连接体或间隔物包含至多1个氨基酸。在一些实施方式中,连接体或间隔物包含至多10个氨基酸。

[0152] 在一些实施方式中,连接体是半胱氨酸残基。在一些实施方式中,连接体是赖氨酸残基。在一些实施方式中,连接体是二肽赖氨酸-丙氨酸的至少一个重复。在一些实施方式中,连接体是二肽KA的至少两个重复。在一些实施方式中,连接体是二肽KA的两个重复。在

一些实施方式中,连接体包含KAKA(SEQ ID NO:16)或由其组成。

[0153] 在一些实施方式中,第一肽通过间隔物与第二肽分开。在一些实施方式中,第一肽通过连接体连接至第二肽。在一些实施方式中,肽通过间隔物与部分分开。在一些实施方式中,肽通过连接体而连接至部分。在一些实施方式中,第一部分和第二部分由间隔物分开。在一些实施方式中,第一部分和第二部分通过连接体连接。在一些实施方式中,连接是C-末端连接。在一些实施方式中,连接是N-末端连接。在一些实施方式中,连接不是N-末端连接。在一些实施方式中,不存在与肽的N-末端的连接。在一些实施方式中,肽包含游离的N-末端。

[0154] 根据一些实施方式,肽经由肽的C-末端缀合至至少一个部分。根据一些实施方式,肽经由肽的C-末端缀合至该至少一个连接体或间隔物。根据一些实施方式,肽的N-末端未被修饰。根据其他实施方式,肽在其N-末端具有游离氨基。不受任何理论或机制的束缚,推测肽的N-末端中的氨基可能参与与中性白细胞的结合。

[0155] 能够增加溶解度的部分是本领域众所周知的并且任何这样的部分都可以用于本发明的肽。能够增加溶解度的部分包括但不限于:8-氨基-3,6-二氧代辛酸(Doa)残基、任何长度的聚乙二醇(PEG)和包含氨基酸序列GGGS(SEQ ID NO:17)或GGGGS(SEQ ID NO:18)的肽。在一些实施方式中,部分是DOA残基。在一些实施方式中,部分是PEG。在一些实施方式中,连接体包含SEQ ID NO:17的至少一个重复。在一些实施方式中,连接体包含SEQ ID NO:18的至少一个重复。在一些实施方式中,连接体包含SEQ ID NO:17的至少1、2、3、4或5个重复或由其组成。每种可能性代表本发明的单独实施方式。在一些实施方式中,连接体包含SEQ ID NO:18的至少1、2、3、4或5个重复或由其组成。每种可能性代表本发明的单独实施方式。

[0156] 根据具体实施方式,能够增加溶解度的部分包含8-氨基-3,6-二氧代辛酸(Doa)残基。根据一些实施方式,肽缀合至1、2、3、4或5个Doa残基。每种可能性代表本发明的单独实施方式。根据一些实施方式,肽缀合至2个Doa残基。根据进一步的实施方式,Doa残基彼此共价连接、共价连接至肽序列和/或连接体。根据一些实施方式,肽缀合至彼此共价连接的两个单位的Doa残基。在一些实施方式中,共价连接是肽连接。在一些实施方式中,肽和残基在单个氨基酸链中。

[0157] 如本文所用的术语“缀合的”或“肽缀合物”是指其中直接地或经由连接体或间隔物,通过共价化学结合至至少一个肽或非肽分子,附接(即,偶联或连接)肽部分的分子。

[0158] 术语“连接体”和“间隔物”在本文中可互换使用并且是指共价结合并因此连接两个分子的任何分子。连接体的非限制性实例是氨基酸、肽或可用于允许两个连接分子之间的距离的任何其他有机物质。根据特定实施方式,连接体是柔性连接体。根据特定实施方式,连接体是柔性肽。根据进一步的具体实施方式,连接体是包含至少一个甘氨酸残基的柔性肽。根据特定实施方式,连接体包含多个赖氨酸残基。根据一些具体实施方式,连接体包含3至12个赖氨酸残基。根据特定实施方式,连接体包含3-马来酰亚胺基丙酸(Mpa)残基。

[0159] 根据一些实施方式,本发明提供包含至少一个选自SEQ ID NO:1至13的肽和至少一个能够增加溶解度的部分的肽缀合物。根据其他实施方式,本发明提供了肽缀合物,其包含至少一个选自SEQ ID NO:1至13的肽和至少一个连接体或间隔物。根据进一步的实施方式,肽缀合物包含至少一个选自SEQ ID NO:1至13的肽、至少一个能够增加溶解度的部分和

任选地至少一种连接体或间隔物。根据又一实施方式,肽缀合物包含至少一个选自SEQ ID NO:1至13的肽、至少一个能够增加溶解度的部分和至少一个连接体或间隔物。根据又一实施方式,肽缀合物包含至少一个能够增加溶解度的部分和至少一个连接体或间隔物,其中该至少一个能够增加溶解度的部分和至少一个连接体或间隔物彼此共价连接。

[0160] 根据一些实施方式,肽缀合物包含至少一个选自SEQ ID NO:1至13的肽和1、2、3、4或5个单位的Doa残基。每种可能性代表本发明的单独实施方式。根据进一步的实施方式,肽缀合物包含至少一个选自SEQ ID NO:1至13的肽和2、3、4或5个单位的Doa残基,其中Doa残基彼此共价连接至肽序列和/或共价连接至连接体。

[0161] 根据进一步的实施方式,肽缀合物包含至少一个选自SEQ ID NO:1至13的肽、至少一个Doa残基和至少一个Mpa残基。

[0162] 根据一些实施方式,本发明提供包含氨基酸序列LQIQSWSSSP (SEQ ID NO:9) 和至少一个能够增加溶解度的部分的肽缀合物。根据其他实施方式,本发明提供了包含SEQ ID NO:9和至少一个连接体或间隔物的肽缀合物。根据进一步的实施方式,肽缀合物包含SEQ ID NO:9、至少一个能够增加溶解度的部分和任选地至少一个连接体或间隔物。根据又一实施方式,肽缀合物包含SEQ ID NO:9、至少一个能够增加溶解度的部分和至少一个连接体或间隔物。

[0163] 根据一些实施方式,肽缀合物包含SEQ ID NO:9和1、2、3、4或5个单位的Doa残基。每种可能性代表本发明的单独实施方式。根据进一步的实施方式,肽缀合物包含SEQ ID NO:9和2、3、4或5个单位的Doa残基,其中Doa残基彼此共价连接、共价连接至肽序列和/或连接体。

[0164] 根据进一步的实施方式,肽缀合物包含SEQ ID NO:9、至少一个Doa残基和至少一个Mpa残基。

[0165] 根据一些实施方式,肽缀合物包含至少一个能够增加溶解度的部分,其中该至少一个部分经由肽的C-末端缀合至肽。根据一些实施方式,肽缀合物包含至少一个连接体或间隔物,其中该至少一个连接体或间隔物经由肽的C-末端缀合至肽。根据一些实施方式,肽缀合物的N-末端未被修饰。根据其他实施方式,肽缀合物在其N-末端具有游离胺基。

[0166] 根据一些实施方式,肽缀合物具有根据式III的结构:

[0167] 肽-Doa-Doa-C(式III)

[0168] 其中“C”是半胱氨酸残基,并且其中“肽”表示本发明的肽或其盐。在一些实施方式中,“肽”表示本发明的肽或其盐。

[0169] 根据另一方面,提供了肽多聚体,其包含多个本发明的肽。

[0170] 根据一些实施方式,多个肽是多个相同的肽。根据一些实施方式,多个肽是多个不同的肽。根据一些实施方式,肽是相同或不同的肽。根据一些实施方式,本发明提供了肽多聚体,其包含多个相同或不同的选自本发明的肽的肽或其盐。根据其他实施方式,本发明提供了用于靶向人中性白细胞的肽多聚体,其中肽多聚体包含多个相同或不同选自SEQ ID NO:1-8的肽或其盐。根据其他实施方式,本发明提供了用于靶向鼠中性白细胞的肽多聚体,其中肽多聚体包含多个相同或不同选自SEQ ID NO:9-13的肽或其盐。

[0171] 术语“肽多聚体”和“多聚体肽”在本文中可互换使用并且指含有多个(至少两个,通常至少三个或更多个)肽的构建体,肽不一定相邻。

[0172] 根据一些实施方式,肽多聚体是支化分子。根据其他实施方式,肽多聚体是非支化分子。根据其他实施方式,肽多聚体是线性分子。根据其他实施方式,肽多聚体是环状分子。

[0173] 根据一些实施方式,肽多聚体包含至多4、6、8、10、12、14、16、18、20、25、30、35、40、45或50个肽。每种可能性代表本发明的单独实施方式。根据一些实施方式,肽多聚体包含至少2、4、6、8、10、12、14或16个肽。每种可能性代表本发明的单独实施方式。根据一些实施方式,肽多聚体包含2-20、2-16、2-14、2-12、2-10、2-8、2-6或2-4个相同或不同的肽。每种可能性代表本发明的单独实施方式。根据一些实施方式,肽多聚体包含2-20、2-16、2-14、2-12、2-10、2-8、2-6或2-4个肽。每种可能性代表本发明的单独实施方式。根据一些实施方式,肽多聚体包含2-20个肽。根据一些实施方式,肽多聚体包含2-4个肽。根据一些实施方式,肽多聚体包含2个肽。根据一些实施方式,肽多聚体包含4个肽。根据一些实施方式,肽多聚体包含16个肽。根据具体实施方式,肽多聚体包含4个相同或不同的肽。

[0174] 根据一些实施方式,肽多聚体中的肽直接地或通过连接体或间隔物彼此共价连接。根据其他实施方式,肽多聚体中的肽直接地或通过连接体或间隔物共价连接至支架。

[0175] 根据一些实施方式,肽多聚体包含多个相同或不同的肽缀合物。根据一些实施方式,肽多聚体包含肽缀合物,该肽缀合物包含至少一个选自SEQ ID NO:1-8的肽。根据一些实施方式,肽多聚体包含肽缀合物,该肽缀合物包含至少一个选自SEQ ID NO:9-13的肽。根据其他实施方式,肽多聚体包含肽缀合物,该肽缀合物包含至少一个具有序列LQIQSWSSSP的肽。根据一些实施方式,肽多聚体包含2-20、2-16、2-14、2-12、2-10、2-8、2-6或2-4个相同或不同的肽缀合物,该肽缀合物包含至少一个选自SEQ ID NO:1-8的肽。根据其他实施方式,肽多聚体包含2-20、2-16、2-14、2-12、2-10、2-8、2-6或2-4个相同或不同的肽缀合物,该肽缀合物包含至少一个选自SEQ ID NO:9-13的肽。根据具体实施方式,肽多聚体包含4个相同或不同的肽缀合物。

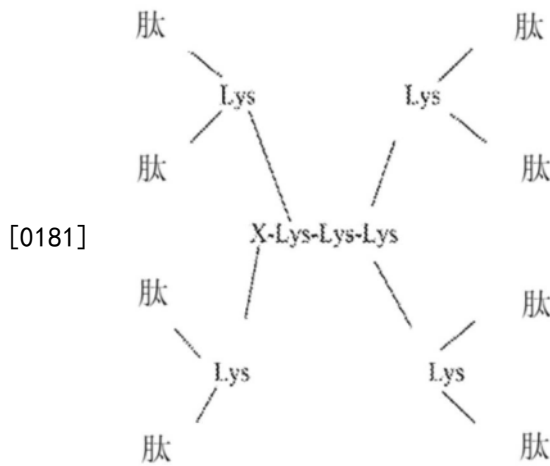
[0176] 根据一些实施方式,肽多聚体中的肽缀合物直接地或通过连接体或间隔物彼此共价连接。根据其他实施方式,肽多聚体中的肽缀合物直接地或通过连接体或间隔物共价连接至支架。根据进一步的实施方式,肽多聚体中的肽缀合物直接地或通过连接体或间隔物非共价连接至支架。根据一些实施方式,支架是支化支架。根据其他实施方式,支架是非支化支架。

[0177] 根据一些实施方式,肽或肽缀合物中的每个直接地或经由连接体或间隔物结合至支架。根据其他实施方式,肽或肽缀合物彼此共价附接,并且至少一种肽/肽缀合物直接地或经由连接体或间隔物结合至支架。

[0178] 根据一些实施方式,支架是肽或多肽的支架。根据其他实施方式,肽或多肽的支架将肽在支架中的单个位置上彼此连接、或将肽连接到支架上的不同位置。每种可能性代表本发明的单独实施方式。根据一些实施方式,支架包含至少一个赖氨酸(Lys)残基。根据其他实施方式,支架包含至少三个Lys残基。根据进一步的实施方式,该至少三个Lys残基通过酰胺键连接在一起,以形成支化的多聚体支架。根据一些实施方式,在Lys残基的 ϵ 胺与另一Lys残基的羧基之间形成至少一个酰胺键。

[0179] 根据特定的实施方式,肽多聚体包含分子Mpa-半胱氨酸-肽。

[0180] 根据特定的实施方式,肽多聚体包含以下方案的分子:



[0182] 其中X代表选自羧酸、酰胺或醇基团的肽的C-末端和任选的连接体或间隔物,并且每个“肽”独立地表示本发明的肽或其盐。

[0183] 根据一些具体实施方式,肽中的至少一个以多拷贝存在。根据一些实施方式,连接多个拷贝从而形成多靶肽多聚体。根据一些实施方式,肽拷贝通过连接体连接。根据其他实施方式,肽拷贝是直接地连接的。根据进一步的实施方式,多聚体包含直接地和经由连接体连接的拷贝。

[0184] 根据一些实施方式,肽多聚体包含多个以交替顺序聚合结构 $B(X_1X_2X_3\cdots X_m)_nB$ 或以嵌段共聚物结构 $B(X_1)_nZ(X_2)_nZ(X_3)_nZ\cdots(X_m)_n$ 排列的中性白细胞结合肽,其中B是1-10个氨基酸残基的任选序列;n在每次独立地出现时为2-50的整数;m为3-50的整数; $X_1、X_2\cdots X_m$ 中的每个是相同或不同的本发明的肽;每次出现的Z都是键或1-4个氨基酸残基的间隔物。每种可能性代表本发明的单独实施方式。

[0185] 术语“嵌段共聚物结构”意指多聚体中含有的单个肽的所有拷贝相邻地排列。

[0186] 根据一些实施方式,支架包含聚乙二醇(PEG)分子(一个或多个)或修饰的PEG分子(一个或多个)或由其形成。根据某些实施方式,支架包含支化的PEG分子。根据一些实施方式,支化分子包含至少两个可用于结合本发明的肽的位点。根据其他实施方式,支架包含2至100、3至90、4至60、5至50、6至40、7至35、8至30、9至25或10至20、或2至50个可用于结合肽的位点。

[0187] 根据一些实施方式,PEG分子是支化分子,其包含至少两个与肽的单独连接。根据其他实施方式,PEG结合至其他PEG分子。根据某些实施方式,多个PEG分子结合以提供多臂PEG分子。根据某些实施方式,肽通过在 NH_2 -PEG分子的氨基之间形成的酰胺键连接至PEG支架。根据另外的其他实施方式,至少一个肽通过Lys残基连接至PEG支架。

[0188] 根据一些实施方式,肽多聚体包含支化支架,其包含直接地或通过间隔物或连接体连接至肽或肽缀合物的至少一个Lys残基。根据具体的实施方式,肽多聚体包含支化支架,其包含直接地或通过间隔物或连接体连接至肽或肽缀合物的至少两个Lys残基。根据进一步的具体实施方式,肽多聚体包含支化支架,其包含直接地或通过间隔物或连接体连接至肽或肽缀合物的氨基酸序列Lys-Ala-Lys-Ala(KAKA, SEQ ID NO:16)。

[0189] 根据一些实施方式,肽多聚体进一步包含直接地或经由间隔物或连接体共价附接到所述肽多聚体的生物素部分。根据一些实施方式,生物素通过C-末端附接至所述肽多聚体。生物素部分使得肽多聚体可用于荧光检测和操作。根据其他实施方式,肽多聚体进一步

包含生物素部分,其中生物素部分非共价附接至所述肽多聚体。根据一些实施方式,肽多聚体进一步包含直接地或经由间隔物或连接体附接到所述肽多聚体的抗生物素蛋白(亲和素,avidin)部分。根据一些实施方式,肽多聚体进一步包含直接地或经由间隔物或连接体附接到所述肽多聚体的链霉抗生物素(链亲和素,streptavidin)部分。根据进一步的实施方式,肽多聚体包含通过生物素-抗生物素蛋白相互作用而彼此附接的生物素部分和抗生物素蛋白/链霉抗生物素部分。

[0190] 根据一些实施方式,多聚体肽是同形多聚体的(homo-multimeric)。根据其他实施方式,多聚体肽是异形多聚体的(hetero-multimeric)。

[0191] 如本文所用,术语“同形多聚体的”是指包含多个拷贝的单个肽的多聚体肽。根据一些实施方式,多聚体肽包含2-20、2-16、2-14、2-12、2-10、2-8、2-6或2-4个相同的肽。根据一些实施方式,多聚体肽包含2-20、2-16、2-14、2-12、2-10、2-8、2-6或2-4个拷贝的肽,该肽包含氨基酸序列KFPDLDSRRLPHMSL(SEQ ID NO:1)。每种可能性代表本发明的单独实施方式。根据一些实施方式,多聚体肽包含2-20、2-16、2-14、2-12、2-10、2-8、2-6或2-4个拷贝的肽,该肽包含氨基酸序列LATTHMVFSPDH(SEQ ID NO:2)。每种可能性代表本发明的单独实施方式。根据一些实施方式,多聚体肽包含2-20、2-16、2-14、2-12、2-10、2-8、2-6或2-4个拷贝的肽,该肽包含氨基酸序列PSSNLESTPLSLL(SEQ ID NO:3)。每种可能性代表本发明的单独实施方式。根据一些实施方式,多聚体肽包含2-20、2-16、2-14、2-12、2-10、2-8、2-6或2-4个拷贝的肽,该肽包含氨基酸序列SSLMTTQLIATSI(SEQ ID NO:4)。每种可能性代表本发明的单独实施方式。根据一些实施方式,多聚体肽包含2-20、2-16、2-14、2-12、2-10、2-8、2-6或2-4个拷贝的肽,该肽包含氨基酸序列PELDSKPYFPPL(SEQ ID NO:5)。每种可能性代表本发明的单独实施方式。根据一些实施方式,多聚体肽包含2-20、2-16、2-14、2-12、2-10、2-8、2-6或2-4个拷贝的肽,该肽包含氨基酸序列ELVTASMPRPNN(SEQ ID NO:6)。每种可能性代表本发明的单独实施方式。根据一些实施方式,多聚体肽包含2-20、2-16、2-14、2-12、2-10、2-8、2-6或2-4个拷贝的肽,该肽包含氨基酸序列SLESSPMAQLPQ(SEQ ID NO:7)。每种可能性代表本发明的单独实施方式。根据一些实施方式,多聚体肽包含2-20、2-16、2-14、2-12、2-10、2-8、2-6或2-4个拷贝的肽,该肽包含氨基酸序列SELRSTPLLVPS(SEQ ID NO:8)。每种可能性代表本发明的单独实施方式。根据一些实施方式,多聚体肽包含2-20、2-16、2-14、2-12、2-10、2-8、2-6或2-4个拷贝的肽,该肽包含氨基酸序列LQIQSWSSSP(SEQ ID NO:9)。每种可能性代表本发明的单独实施方式。根据一些实施方式,多聚体肽包含2-20、2-16、2-14、2-12、2-10、2-8、2-6或2-4个拷贝的肽,该肽包含氨基酸序列STMTILGTGS(SEQ ID NO:10)。每种可能性代表本发明的单独实施方式。根据一些实施方式,多聚体肽包含2-20、2-16、2-14、2-12、2-10、2-8、2-6或2-4个拷贝的肽,该肽包含氨基酸序列TETSLRIVSTNP(SEQ ID NO:11)。每种可能性代表本发明的单独实施方式。根据一些实施方式,多聚体肽包含2-20、2-16、2-14、2-12、2-10、2-8、2-6或2-4个拷贝的肽,该肽包含氨基酸序列LSIVSGSALNHL(SEQ ID NO:12)。每种可能性代表本发明的单独实施方式。根据一些实施方式,多聚体肽包含2-20、2-16、2-14、2-12、2-10、2-8、2-6或2-4个拷贝的肽,该肽包含氨基酸序列LTLVSRPMI(SEQ ID NO:13)。每种可能性代表本发明的单独实施方式。根据具体实施方式,多聚体肽是包含4个拷贝的肽的四聚体,该肽包含选自SEQ ID NO:1至13的氨基酸序列。每种可能性代表本发明的单独实施方式。根据具体实施方式,多聚体肽是包含4个拷贝的肽的四聚体,该肽包含选自SEQ

ID NO:1至8的氨基酸序列。根据具体实施方式,多聚体肽是包含4个拷贝的肽的四聚体,该肽包含选自SEQ ID NO:9至13的氨基酸序列。根据其他实施方式,多聚体肽是包含4个拷贝的肽的四聚体,该肽包含氨基酸序列KFPDLDSRRLPHMSL (SEQ ID NO:1)。根据其他实施方式,多聚体肽是包含4个拷贝的肽的四聚体,该肽包含氨基酸序列LQIQSWSSSP (SEQ ID NO:9)。

[0192] 如本文所用,术语“异形多聚体的”是指包含一个或多个拷贝的至少两种不同的肽的多聚体肽。术语“不同的肽”是指具有不同序列的肽,而不是指两个拷贝的相同的肽。根据一些实施方式,多聚体肽包含一个或多个拷贝的本发明的至少两种不同的肽。根据具体实施方式,多聚体肽包含一个或多个拷贝的本发明的至少两种不同的肽。

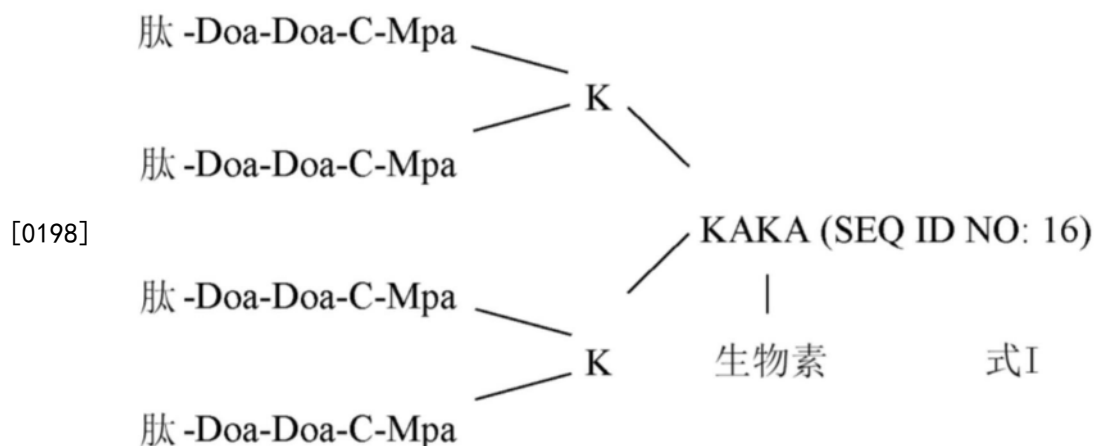
[0193] 根据一些实施方式,异形多聚体肽包含本发明的2、3、4、5、6、7或8种不同的肽序列或其盐。

[0194] 已经表明,包含4个拷贝的单个中性白细胞结合肽的肽多聚体比肽的单体更有效地结合至循环中性白细胞。不受任何理论或机制的束缚,据信包含至少两种基本上不同的肽的异形多聚体肽将比同形多聚体肽靶向甚至更高百分比的中性白细胞。

[0195] 根据一些实施方式,异形多聚体肽包含2-20、2-10或2-5个拷贝的至少一种不同的肽。根据其他实施方式,异形多聚体肽包含2-20、2-10或2-5个拷贝的至少两种不同肽。根据进一步的实施方式,异形多聚体肽包含2-20、2-10或2-5个拷贝的至少三种不同的肽。每种可能性代表本发明的单独实施方式。

[0196] 根据具体实施方式,肽多聚体是在4个分支上呈现中性白细胞结合肽的四聚体肽。根据进一步的实施方式,四聚体中的至少一个肽在其N-末端具有游离胺基。根据更进一步的实施方式,四聚体中的中性白细胞结合肽中的每个在N-末端具有游离胺基。根据具体实施方式,多聚体肽是四聚体肽,其在4个分支上呈现4个拷贝的一种中性白细胞结合肽。根据进一步的具体实施方式,多聚体肽是在4个分支上呈现4个拷贝的一种中性白细胞结合肽的四聚体肽,其中至少一个拷贝的中性白细胞结合肽在其N-末端具有游离胺基。根据进一步的实施方式,多聚体肽是在4个分支上呈现4个拷贝的一种中性白细胞结合肽的四聚体肽,其中中性白细胞结合肽的拷贝中的每个在其N-末端具有游离胺基。

[0197] 根据一些具体实施方式,肽多聚体包含根据式I的结构:



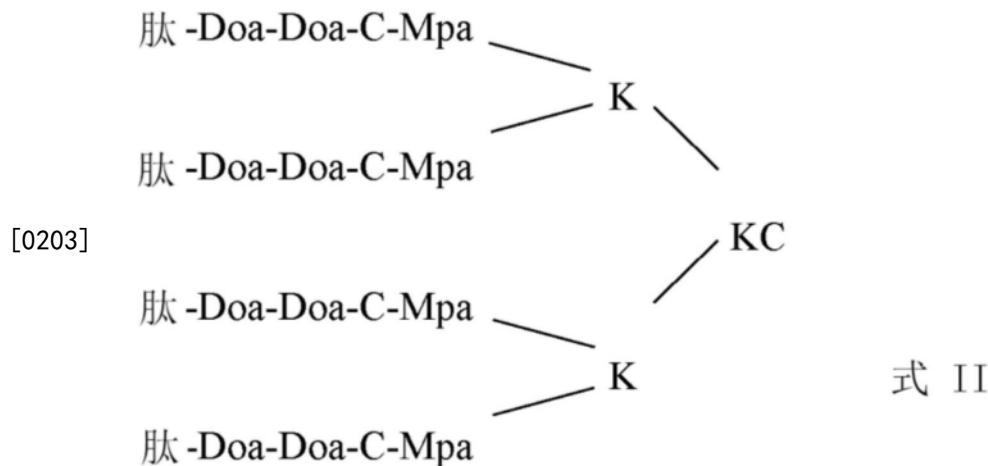
[0199] 其中每个“肽”独立地表示本发明的肽或其盐。

[0200] 根据一些实施方式,肽多聚体包含根据式I的结构,其中每个“肽”独立地表示本发明的肽或其盐,其中至少2个肽是不同的。根据其他实施方式,肽多聚体包含根据式I的结

构,其中每个“肽”独立地表示本发明的肽或其盐,其中至少3个肽是不同的。根据其他实施方式,肽多聚体包含根据式I的结构,其中每个“肽”独立地表示不同的肽序列,其中每个肽序列包含选自SEQ ID NO:1至13的序列或其盐。根据一些实施方式,肽多聚体包含根据式I的结构,其中每个“肽”独立地表示本发明的肽或其盐,其中至少2个肽是相同的。根据其他实施方式,肽多聚体包含根据式I的结构,其中每个“肽”独立地表示本发明的肽或其盐,其中至少3个肽是相同的。根据另外的其他实施方式,肽多聚体包含根据式I的结构,其中“肽”表示本发明的肽或其盐。根据其他实施方式,肽多聚体包含根据式I的结构,其中每个“肽”独立地表示本发明的肽或其盐,其中4个肽是相同的。

[0201] 根据一些实施方式,肽多聚体包含根据式I的结构,其中“肽”表示包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列或其盐的肽。根据一些实施方式,肽多聚体包含根据式I的结构,其中“肽”表示由SEQ ID NO:1的氨基酸序列或其盐组成的肽。根据一些实施方式,肽多聚体包含根据式I的结构,其中“肽”表示包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列或其盐的肽。根据一些实施方式,肽多聚体包含根据式I的结构,其中“肽”表示由SEQ ID NO:9的氨基酸序列或其盐组成的肽。

[0202] 根据一些具体的实施方式,肽多聚体包含根据式II的结构:



[0204] 其中每个“肽”独立地表示本发明的肽或其盐。

[0205] 根据一些实施方式,肽多聚体包含根据式II的结构,其中每个“肽”独立地表示本发明的肽或其盐,其中至少2个肽是不同的。根据其他实施方式,肽多聚体包含根据式II的结构,其中每个“肽”独立地表示本发明的肽或其盐,其中至少3个肽是不同的。根据其他实施方式,肽多聚体包含根据式II的结构,其中每个“肽”独立地表示不同的肽序列,其中每个肽序列包含选自SEQ ID NO:1至13的序列或其盐。根据一些实施方式,肽多聚体包含根据式II的结构,其中每个“肽”独立地表示本发明的肽或其盐,其中至少2个肽是相同的。根据其他实施方式,肽多聚体包含根据式II的结构,其中每个“肽”独立地表示本发明的肽或其盐,其中至少3个肽是相同的。根据另外的其他实施方式,肽多聚体包含根据式II的结构,其中“肽”表示本发明的肽或其盐。根据其他实施方式,肽多聚体包含根据式II的结构,其中每个“肽”独立地表示本发明的肽或其盐,其中4个肽是相同的。

[0206] 根据一些实施方式,肽多聚体包含根据式II的结构,其中“肽”表示包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列或其盐的肽。根据一些实施方式,肽多聚体包含根据式II的结构,其中“肽”表示由SEQ ID NO:1的氨基酸序列或其盐组成的肽。根据一些实施方式,肽多聚体包含根据式II的结构,其中“肽”表示包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列或其盐的肽。根据一些实施

方式,肽多聚体包含根据式II的结构,其中“肽”表示由SEQ ID NO:9的氨基酸序列或其盐组成的肽。

[0207] 根据另一方面,提供了包含至少两个本发明的肽多聚体的肽复合物。

[0208] 根据一些实施方式,本发明提供了包含至少两个肽多聚体的肽复合物。如本文所用,术语“肽复合物”是指含有多个(至少两个,通常至少三个或更多个)相同或不同的肽多聚体的构建体,肽多聚体不一定相邻。根据一些实施方式,肽复合物包含至少两个肽多聚体,其中肽多聚体包含至少一种本发明的肽或其盐。根据某些实施方式,本发明提供了用于靶向人中性白细胞的肽复合物,其中该肽复合物包含至少两个肽多聚体,其中该肽多聚体包含至少一种肽,该肽包含选自SEQ ID NO:1至13的序列或其盐。根据一些实施方式,肽复合物包含至少两个肽多聚体,其中肽多聚体包含至少两种肽,该肽包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列或其盐。根据一些实施方式,肽复合物包含至少两个肽多聚体,其中肽多聚体包含至少两种肽,该肽包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列或其盐。根据某些实施方式,本发明提供了用于靶向鼠中性白细胞的肽复合物,其中该肽复合物包含至少两个肽多聚体,其中该肽多聚体包含至少一个包含SEQ ID NO:9的肽或其盐。根据某些实施方式,本发明提供了用于靶向人中性白细胞的肽复合物,其中该肽复合物包含至少两个肽多聚体,其中该肽多聚体包含至少一个包含SEQ ID NO:1的肽或其盐。根据一些实施方式,肽复合物中的肽多聚体直接地或经由连接体或间隔物彼此共价连接。根据一些实施方式,连接体或间隔物选自但不限于氨基酸、肽和可用于允许两个连接分子之间的距离的任何其他有机物质。根据其他实施方式,肽复合物中的肽多聚体彼此非共价附接。根据一些实施方式,肽复合物中的肽多聚体通过生物素-抗生物素蛋白相互作用彼此非共价附接。根据一些实施方式,肽复合物包含至少两个生物素部分和抗生物素蛋白/链霉抗生物素部分,其中至少两个生物素部分共价附接至肽多聚体,并且其中抗生物素蛋白/链霉抗生物素部分非共价附接至生物素部分。根据具体实施方式,肽复合物包含4个肽多聚体和抗生物素蛋白/链霉抗生物素部分,其中肽多聚体中的每个共价附接至生物素部分,并且其中4个肽多聚体非共价附接至抗生物素蛋白/链霉抗生物素部分。

[0209] 根据另一方面,提供了包含本发明的肽、本发明的肽多聚体或本发明的肽复合物的组合物。

[0210] 根据一些实施方式,肽、肽多聚体或肽复合物附接至治疗剂。根据一些实施方式,肽、肽多聚体或肽复合物附接至诊断剂。根据一些实施方式,附接是直接附接。根据一些实施方式,附接是经由连接体附接。根据一些实施方式,附接是经由载体附接。根据一些实施方式,附接是共价连接。根据一些实施方式,附接是经由载体附接。根据一些实施方式,附接是非共价连接。

[0211] 根据一些实施方式,肽、肽多聚体或肽复合物直接地或通过载体或连接体附接至治疗剂或诊断剂。每种可能性代表本发明的单独实施方式。根据特定实施方式,肽、肽多聚体或肽复合物直接地或通过连接体或间隔物共价附接至治疗剂/诊断剂。每种可能性代表本发明的单独实施方式。根据其他实施方式,肽、肽多聚体或肽复合物非共价附接至治疗剂/诊断剂。根据一些实施方式,肽、肽多聚体或肽复合物通过载体附接至治疗剂或诊断剂,其中载体是颗粒,其中颗粒的尺寸在亚微米范围内。在一些实施方式中,载体是颗粒。在一些实施方式中,颗粒是亚微米尺寸的颗粒。在一些实施方式中,颗粒是纳米颗粒(NP)。根据

特定的实施方式,肽、肽缀合物、肽多聚体或肽复合物通过载体附接至治疗剂或诊断剂,其中载体是纳米颗粒。根据进一步的实施方式,肽、肽缀合物、肽多聚体或肽复合物通过载体附接至治疗剂或诊断剂,其中载体是包封所述治疗剂或诊断剂或用所述治疗剂或诊断剂包被的纳米颗粒。每种可能性代表本发明的单独实施方式。

[0212] 在本发明的上下文中,术语“纳米颗粒”是指具有上至约1000nm的平均尺寸的颗粒,如通过本领域已知的任何方法例如用于测定颗粒的流体动力学直径的动态光散射(DLS)和用于确定准确的几何纳米颗粒尺寸的透射电子显微镜(TEM)测定的。根据一些实施方式,纳米颗粒的尺寸在50-1000、100-1000、200-1000、250-1000、300-1000、500-1000、600-1000、700-1000、50-900、100-900、200-900、250-900、300-900、500-900、600-900、700-900、50-800、100-800、200-800、250-800、300-800、500-800、600-800、700-800、50-600、100-600、200-600、250-600、300-600、500-600或50-200nm的范围内。每种可能性代表本发明的单独实施方式。根据一些实施方式,纳米颗粒选自纳米球(nanosphere)和纳米棒(nanorod)。如本文所用,术语“纳米球”是指具有球形的纳米颗粒。术语“纳米棒”是指具有棒状形状的纳米颗粒。根据一些实施方式,纳米颗粒是脂质体。根据其他实施方式,纳米颗粒是聚合物纳米颗粒。根据另外的实施方式,聚合物纳米颗粒包含聚乳酸-羟基乙酸共聚物(聚(乳酸-共-乙醇酸),poly(lactic-co-glycolic acid))(PLGA)。根据另外的实施方式,纳米颗粒是金属纳米颗粒。根据特定实施方式,纳米颗粒是荧光标记的。根据一些实施方式,纳米颗粒用PEG修饰。根据一些实施方式,纳米颗粒包含PLGA核心。在一些实施方式中,纳米颗粒包被有活性剂。在一些实施方式中,活性剂适用于将肽、肽多聚体或肽复合物缀合至纳米颗粒。用于缀合的反应性基团在本领域中是众所周知的并且其实例在下文中提供。根据一些实施方式,反应性基团是结合基团或捕获基团。在一些实施方式中,结合或捕获基团用于结合或捕获肽或连接体或间隔物。在一些实施方式中,反应性基团是链霉抗生物素(SA)。在一些实施方式中,SA用于结合包含生物素的肽/多聚体/复合物。在一些实施方式中,反应性基团是硫醇。在一些实施方式中,硫醇用于结合包含半胱氨酸的肽/多聚体/复合物。在一些实施方式中,半胱氨酸是游离胱氨酸。在一些实施方式中,半胱氨酸在连接体中。在一些实施方式中,连接是马来酰亚胺连接。

[0213] 在一些实施方式中,纳米颗粒包封试剂(agent)。在一些实施方式中,纳米颗粒包含亲水性核心并且试剂在核心中。在一些实施方式中,纳米颗粒包含疏水核心并且试剂在核心中。在一些实施方式中,试剂与纳米颗粒的表面缔合。在一些实施方式中,试剂连接或缀合至纳米颗粒的表面。在一些实施方式中,试剂是疏水剂。在一些实施方式中,试剂是亲水剂。

[0214] 在一些实施方式中,试剂是中性白细胞修饰剂。在一些实施方式中,试剂是中性白细胞修饰治疗剂。在一些实施方式中,试剂阻断活性氧种类(ROS)的产生。在一些实施方式中,试剂是ROS抑制剂。在一些实施方式中,ROS抑制剂是黄素酶抑制剂。在一些实施方式中,试剂是胞吐作用抑制剂。在一些实施方式中,试剂阻断脱颗粒。在一些实施方式中,试剂是脱颗粒抑制剂。在一些实施方式中,试剂是细胞毒剂。在一些实施方式中,细胞性的(cytotoxic)是细胞毒性的。在一些实施方式中,细胞是中性白细胞。在一些实施方式中,试剂选自TGF- β 抑制剂、胞吐作用抑制剂和黄素酶抑制剂。

[0215] 根据一些实施方式,肽、肽多聚体或肽复合物直接地或通过载体附接至治疗剂,其

中治疗剂是TGFβ抑制剂。根据一些实施方式,治疗剂是TGFβ抑制剂。根据特定的实施方式,TGFβ抑制剂是SB-431542。TGFβ抑制剂在本领域中是众所周知的并且任何这样的抑制剂都可以用作治疗剂。

[0216] 根据一些实施方式,治疗剂是黄素酶抑制剂。根据一些实施方式,黄素酶是膜黄素酶。根据一些实施方式,膜黄素酶是烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)氧化酶。根据一些实施方式,NADPH氧化酶是抑制剂二亚苯基碘鎓(DPI)。根据一些实施方式,黄素酶抑制剂是DPI。根据一些实施方式,治疗剂选自青藤碱和银杏。根据一些实施方式,治疗剂是青藤碱。根据一些实施方式,治疗剂是银杏。黄素酶抑制剂是本领域众所周知的,并且任何此类抑制剂均可用作本发明的治疗剂。

[0217] 根据一些实施方式,治疗剂是胞吐作用抑制剂。在一些实施方式中,治疗剂是中性白细胞胞吐作用抑制剂。在一些实施方式中,胞吐作用抑制剂是Nexinhib-20。胞吐作用抑制剂是本领域熟知的,并且任何此类抑制剂均可用作本发明的治疗剂。

[0218] 根据一些实施方式,本发明的肽在37°C下在血清中稳定持续至少10、20、30、40、50或60分钟。每种可能性代表本发明的单独实施方式。

[0219] 血清包括主要属于凝血级联的各种蛋白酶,如因子XI或凝血酶。这些蛋白酶中的大多数是已知具有与胰蛋白酶相似的底物特异性的丝氨酸蛋白酶,即在带正电荷的氨基酸(Arg、Lys)后切割肽键。不受任何理论或机制的束缚,假设不包含带正电荷的氨基酸的本发明的肽(例如LQIQSWSSSP,SEQ ID NO:9)可以被排除在血清中的蛋白质降解之外。

[0220] 根据一些实施方式,本发明的肽缀合至稳定剂。

[0221] 本发明的肽、肽缀合物和肽多聚体不损害中性白细胞的活力或其他血细胞的活力。根据一些实施方式,肽、肽缀合物和肽多聚体不损害中性白细胞功能。根据具体实施方式,肽、肽缀合物和肽多聚体不损害中性白细胞活化、ROS产生、迁移和/或对癌细胞的细胞毒性。

[0222] 可通过本领域已知的方法,包括例如确定作为中性白细胞活化代表的CD11b的表面表达;用于测试中性白细胞迁移的博伊登盒测定;和基于鲁米诺以确定ROS产生程度的测定,来检查中性白细胞活化、迁移和ROS产生。

[0223] 根据一些实施方式,本发明提供了纳米颗粒,其包含核心颗粒和多个如本发明详述的肽或肽多聚体/复合物中的至少一种,其中肽或肽多聚体/复合物附接到所述核心颗粒的外表面。

[0224] 如本文所用,术语“核心颗粒”是指可以被本发明的肽或肽多聚体/复合物包围或包被的纳米颗粒。肽或肽多聚体/复合物可以经由共价键或非共价键附接到核心颗粒的外表面。

[0225] 根据特定的实施方式,本发明提供了包含核心颗粒和至少一种本发明的肽的纳米颗粒,其中该至少一种肽附接到所述核心颗粒的外表面。在一些实施方式中,至少一种是多种。

[0226] 根据一些实施方式,本发明提供了包含核心颗粒和至少一种包含氨基酸序列KFPDLDSRRLPHMSL(SEQ ID NO:1)的肽的纳米颗粒,其中肽直接地或通过连接体或间隔物附接到所述核心颗粒的外表面。在一些实施方式中,至少一种是多种。

[0227] 根据其他实施方式,本发明提供了包含核心颗粒和至少一种本发明的肽多聚体的

纳米颗粒,其中该至少一种肽多聚体附接至所述核心颗粒的外表面。在一些实施方式中,至少一种是多种。

[0228] 根据进一步的实施方式,本发明提供了包含核心颗粒和至少一种本发明的肽复合物的纳米颗粒,其中该至少一种肽复合物附接于所述核心颗粒的外表面。

[0229] 根据一些实施方式,本发明提供了包含核心颗粒和至少一种包含氨基酸序列 LQIQSWSSSP (SEQ ID NO:1) 的肽的纳米颗粒,其中该至少一种肽附接至所述核心颗粒的外表面。

[0230] 根据一些实施方式,核心颗粒选自:脂质体、固体脂质纳米颗粒、聚合物纳米颗粒和金属纳米颗粒。根据一些实施方式,核心颗粒是可生物降解的。

[0231] 用PEG修饰纳米颗粒表面可以增加体内循环时间并且减少巨噬细胞的摄取。因此,根据一些实施方式,纳米颗粒用PEG修饰。

[0232] 根据一些实施方式,核心颗粒是链霉抗生物素包被的纳米颗粒,并且肽、肽多聚体或复合物包含至少一个生物素部分,其中肽、肽多聚体或复合物通过生物素-链霉抗生物素相互作用附接至核心颗粒。根据具体实施方式,链霉抗生物素包被的颗粒是链霉抗生物素包被的荧光尼罗红颗粒。

[0233] 根据其他实施方式,核心颗粒是聚合物纳米颗粒,其中聚合物纳米颗粒选自但不限于:聚丙交酯-聚乙交酯共聚物(poly lactide-polyglycolide copolymer) (PLGA)、聚丙交酯、聚己内酯、聚丙烯酸酯、聚乙二醇(PEG)和丙二醇(PPG)纳米颗粒及其共聚物。

[0234] PLGA颗粒为药物递送平台提供了几个优势:

[0235] 1.生物降解性和生物相容性。

[0236] 2.FDA和欧洲药品管理局(European Medicine Agency)批准的用于肠胃外施用的药物递送系统。

[0237] 3.适用于各种类型的药物例如亲水性或疏水性小分子或大分子的详细描述配方和生产方法。

[0238] 4.防止药物降解。

[0239] 5.持续释放——降解时间可以从几个月到几年不等,这取决于分子量和共聚物比例——的可能性。

[0240] 6.修改表面特性以提供隐匿性(stealthness)和/或与生物材料更好的相互作用的可能性。

[0241] 7.将纳米颗粒靶向特定器官或细胞的可能性。

[0242] 根据具体实施方式,聚合物纳米颗粒是PLGA纳米颗粒。根据特定的实施方式,PLGA是酸封端的。根据进一步的实施方式,PLGA颗粒进一步包含PEG。在一些实施方式中,PLGA是PEG修饰的PLGA。在一些实施方式中,PLGA颗粒进一步包含马来酰亚胺。在一些实施方式中,颗粒是PLGA-PEG-马来酰亚胺颗粒。在一些实施方式中,马来酰亚胺是30%的马来酰亚胺。

[0243] 根据一些实施方式,核心颗粒是链霉抗生物素包被的PLGA纳米颗粒,并且该至少一种肽或肽多聚体/复合物包含至少一个生物素部分,其中多个所述至少一种肽或肽多聚体/复合物是通过生物素-链霉抗生物素相互作用附接至所述核心颗粒的外表面。

[0244] 根据其他实施方式,核心颗粒是包含酸封端的PLGA的PLGA颗粒,并且该至少一种肽或肽多聚体/复合物包含至少一种在C-末端具有游离胺基的肽序列,其中该多个至少一

种肽或肽多聚体/复合物通过共价酰胺键直接地缀合至所述核心颗粒的外表面。

[0245] 根据具体实施方式, 纳米颗粒包含PEG修饰的PLGA核心颗粒和多个四聚体肽, 该四聚体肽包含四个拷贝的或其盐肽, 该肽包含序列KFPDLDSRRLPHMSL (SEQ ID NO:1), 其中所述四个肽拷贝包含在C-末端的游离胺基。

[0246] 根据一些实施方式, 纳米颗粒包被有多个肽缀合物。根据一些实施方式, 纳米颗粒包被有多个具有根据式III的结构肽缀合物。根据一些实施方式, 纳米颗粒包含包被有多个肽缀合物的PLGA核心。根据一些实施方式, 纳米颗粒包含包被有多个具有根据式III的结构肽缀合物的PLGA核心。

[0247] 根据特定的实施方式, 纳米颗粒进一步包含治疗剂或诊断剂。每种可能性代表本发明的单独实施方式。

[0248] 治疗剂或诊断剂可以包封在纳米颗粒内(例如, 包封在脂质体或聚合物纳米颗粒中)或经由间隔物或连接体非共价或共价地附接到颗粒表面。

[0249] 根据某些实施方式, 纳米颗粒包含PEG修饰的PLGA核心颗粒; 至少一种本发明的肽和至少一个Doa部分; 和治疗剂; 其中该至少一种肽缀合物附接到核心纳米颗粒的外表面并且其中治疗剂被包封在核心颗粒内。根据一些实施方式, 该至少一种肽缀合物具有根据式III的结构。

[0250] 根据一些实施方式, 治疗剂选自TGFβ抑制剂和黄素酶抑制剂。根据一些实施方式, 治疗剂是TGFβ抑制剂。根据某些实施方式, 纳米颗粒包含PEG修饰的PLGA核心颗粒、包含选自SEQ ID NO:1至13的序列的至少一种肽或肽四聚体或其复合物、和TGFβ抑制剂, 其中该至少一种肽, 肽四聚体或其复合物附接至核心纳米颗粒的外表面, 并且其中TGFβ抑制剂被包封在核心颗粒内。可以使用任何TGFβ抑制剂, 包括但不限于小分子、肽、多肽和抗体。根据具体实施方式, TGFβ抑制剂是SB431542。

[0251] 根据一些方面, 本发明提供了包含本发明的肽或肽/多聚体的组合物。根据一些实施方式, 本发明提供了包含如上所述的实施方式中的纳米颗粒的组合物。

[0252] 根据一个实施方式, 该组合物是药物组合物。根据一些实施方式, 组合物包含药学上可接受的载体、赋形剂或佐剂。因此, 在一些实施方式中, 本发明提供了包含肽或肽多聚体/复合物和药学上可接受的赋形剂的药物组合物, 其中肽或肽多聚体/复合物包含至少一种选自SEQ ID NO:1至13的氨基酸序列或其盐。在其他实施方式中, 本发明提供了包含纳米颗粒和药学上可接受的赋形剂的药物组合物, 其中纳米颗粒包含核心颗粒和多个至少一种肽或肽多聚体/复合物, 该肽或肽多聚体/复合物包含至少一个选自SEQ ID NO:1至13的氨基酸序列或其盐。先前方面的所有定义、术语和实施方式均明确涵盖在这个方面中。在一些实施方式中, 由SEQ ID NO:1至13组成的组是由SEQ ID NO:1至8组成的组。应当理解, 当组合物用于治疗人时, 肽将包含选自SEQ ID NO:1至8的序列。

[0253] 根据具体实施方式, 药物组合物进一步包含与所述肽或肽多聚体/复合物缔合的治疗剂或诊断剂。本文所用的术语“试剂缔合的”是指各种类型的结合或复合形式, 包括但不限于直接或非直接(经由间隔物或连接体)的共价键、非共价键(如生物素-抗生物素蛋白相互作用)、与进一步共价或非共价连接至肽或肽多聚体或复合物的载体或纳米颗粒的复合(例如, 包被、包封)。

[0254] 根据一些实施方式, 药物组合物仅包含选自SEQ ID NO:1至13的单一肽序列或其

盐。根据其他实施方式,药物组合物包含至少两个选自SEQ ID NO:1至13的不同肽序列或其盐。

[0255] 药物组合物的配方可以根据应用进行调整。特别地,可以使用本领域已知的方法配制药物组合物,以便在施用于哺乳动物后,提供活性成分的快速、连续或延迟释放。例如,配方可以是选自散剂(powder)、糖浆、液体和溶液、气雾剂、乳剂、悬浮剂、输注剂、片剂、注射剂、酒精剂、胶囊剂和软或硬明胶胶囊中的任何一种。

[0256] 本文所用的术语“药学上可接受的载体”或“药学上可接受的赋形剂”或“药学上可接受的佐剂”是指与药物施用相容的任何和所有溶剂、分散介质、防腐剂、抗氧化剂、包衣、等渗和吸收延迟剂、表面活性剂、填充剂、崩解剂、粘合剂、稀释剂、润滑剂、助流剂、pH调节剂、缓冲剂、增强剂、润湿剂、增溶剂、表面活性剂、抗氧化剂等。合适的赋形剂的非限制性实例是水、盐水、磷酸盐缓冲盐水(PBS)、右旋糖、甘油、乙醇等及其组合。其他合适的载体是本领域技术人员众所周知的。用于药物活性物质的此类介质和试剂的用途在本领域是众所周知的。

[0257] 组合物可以含有提供补充、附加或增强的治疗功能的其他活性化合物。根据一些实施方式,本发明的肽或肽多聚体/复合物可以悬浮在无菌盐水溶液中用于治疗用途。许多合适的药物递送系统是已知的并且包括例如可植入药物释放系统、水凝胶、羟甲基纤维素、微胶囊、脂质体、微乳液、微球等。可以通过使用聚合物以复合或吸附根据本发明的分子来制备控释制剂。例如,生物相容性聚合物包括聚(乙烯-共-乙酸乙烯酯)基质和硬脂酸二聚体与癸二酸的聚酐共聚物基质。根据本发明的分子从这样的基质中释放的速率取决于分子的分子量、基质内分子的量和分散颗粒的大小。

[0258] 载体可占本文所述药物组合物重量的总计约0.1%至约99.99999%。

[0259] 根据另一方面,本发明提供了治疗其中中性白细胞参与发病机制的医学状况的方法,该方法包括向有此需要的受试者施用本发明的药物组合物。

[0260] 根据另一方面,提供了用于治疗其中中性白细胞参与发病机制的医学状况的本发明的肽、肽多聚体、肽复合物或组合物。

[0261] 在一些实施方式中,医学状况是疾病。在一些实施方式中,医学状况是状况。在一些实施方式中,医学状况是障碍。在一些实施方式中,医学状况是中性白细胞相关疾病或状况。在一些实施方式中,医学状况是与中性白细胞积聚相关的疾病或状况。在一些实施方式中,积聚是在患病组织或部位。在一些实施方式中,积聚是在受伤的组织或部位。在一些实施方式中,医学状况是炎性疾病或状况。在一些实施方式中,炎性疾病或状况是自身免疫性炎性疾病或状况。

[0262] 在一些实施方式中,医学状况是其中中性白细胞胞外网(NETosis)的释放是病理生理学的一部分的疾病。在一些实施方式中,医学状况是以过度的中性白细胞介导的组织损伤为特征的疾病。以过度的中性白细胞介导的组织损伤为特征的非限制性实例是肺病,如急性呼吸窘迫综合征(ARDS)和慢性阻塞性肺病(COPD)。在一些实施方式中,医学状况是ARDS。在一些实施方式中,医学状况是COPD。在一些实施方式中,疾病是COPD。在一些实施方式中,医学状况选自:癌症、炎性疾病、状况或障碍,以及自身免疫性疾病、状况或障碍。根据一些实施方式,自身免疫性疾病、状况或障碍是炎性自身免疫性疾病、状况或障碍。根据其他实施方式,医学疾病选自血栓形成、阿尔茨海默病和中性白细胞介导的皮肤病。根据

一些实施方式,医学状况是中性白细胞介导的皮肤病。根据一些实施方式,医学状况是癌症。根据一些实施方式,医学状况是炎症状况。根据一些实施方式,医学状况是炎症疾病。根据一些实施方式,炎症疾病或状况选自慢性阻塞性肺病(COPD)、炎症性肠病(IBD)和腹膜炎。根据一些实施方式,炎症疾病或状况是COPD。根据一些实施方式,炎症疾病或状况是IBD。根据一些实施方式,炎症疾病或状况是腹膜炎。在一些实施方式中,IBD包括结肠炎和克罗恩病(Chron's disease)。在一些实施方式中,IBD是结肠炎。在一些实施方式中,结肠炎是溃疡性结肠炎。

[0263] 根据一些方面和实施方式,本发明提供了治疗选自癌症、炎症疾病或障碍和自身免疫性疾病或障碍的医学状况的方法,该方法包括向有此需要的受试者施用本发明的药物组合物。

[0264] 根据一些实施方式,癌症选自实体瘤癌症和血液癌症。每种可能性代表本发明的单独实施方式。根据一些实施方式,实体瘤选自乳腺癌、肺癌、结肠癌、胰腺癌、肝癌、头颈癌和肾癌。根据一些实施方式,血液癌症是白血病。每种可能性代表本发明的单独实施方式。

[0265] 根据一些实施方式,炎症疾病是其中中性白细胞参与发病机制的疾病。根据一些实施方式,炎症疾病或障碍选自腹膜炎、结肠炎、血管炎、动脉粥样硬化、慢性阻塞性肺病(COPD)、急性呼吸窘迫综合征(ARDS)、支气管扩张、中性白细胞性哮喘、类风湿性关节炎(RA)、狼疮、囊性纤维化(CF)、败血症、多发性硬化症、牛皮癣和外伤。每种可能性代表本发明的单独实施方式。根据一些实施方式,疾病或障碍是系统性红细胞狼疮(Systemic Lupus Erythrocytes)(SLE)。根据一些实施方式,疾病或障碍是类风湿性关节炎(RA)。

[0266] 本发明的药物组合物可以通过任何已知的方法施用。可以使用本领域技术人员已知的多种方法中的一种对受试者进行术语“施用(administring或administration of)”物质、化合物或试剂。例如,可以通过静脉内、动脉、皮内、肌内、腹膜内、静脉内、皮下、眼部、舌下、口服(通过摄取)、鼻内(通过吸入)、脊柱内、脑内和经皮(通过吸收,例如,通过皮肤导管)施用化合物或试剂。也可以通过可充电或可生物降解的聚合物装置或其他装置例如膜片和泵,或提供化合物或试剂的延长、缓慢或控制释放的配方,适当地引入化合物或试剂。也可以例如一次、多次和/或在一个或多个延长的时期内进行施用。在一些实施方式中,施用包括直接施用和间接施用,直接施用包括自行施用,间接施用包括开药方的行为。例如,如本文所用,指导患者自行施用药物或通过他人施用药物和/或向患者提供药物处方的医师正在给患者施用药物。

[0267] 根据一些实施方式,药物组合物通过侵入性施用方式如肌肉内、静脉内、动脉内、关节内或肠胃外施用。根据具体实施方式,药物组合物被静脉内施用。根据一些实施方式,组合物被全身地施用。根据一些实施方式,将组合物被施用于炎症部位。根据一些实施方式,组合物被配制用于全身施用。根据一些实施方式,组合物被配制用于施用至炎症部位。

[0268] 对于本领域的普通技术人员明显的是,根据本发明的分子的治疗有效量尤其将取决于施用时间表、所施用的分子的单位剂量、分子是否与其他治疗剂组合施用、患者的免疫状态和健康状况、所施用分子的治疗活性以及治疗医师的判断。如本文所用,“治疗有效量”是指在一段时间内,减轻与正在治疗的障碍相关的一种或多种症状所需的分子地量。

[0269] 尽管本发明分子的合适剂量根据施用途径、分子类型(多肽、多核苷酸、有机分子等)、年龄、体重、性别或患者的状况而变化,但这最终将由医师确定。在达到有效量时的各

种考虑被描述,例如在Goodman and Gilman's:The Pharmacological Bases of Therapeutics,8th ed.,Pergamon Press,1990;and Remington's Pharmaceutical Sciences,17th ed.,Mack Publishing Co.,Easton,Pa.,1990中。

[0270] 根据一些实施方式,本发明提供了包含本发明的肽或肽多聚体/复合物的诊断或研究组合物。根据进一步的实施方式,本发明提供了包含纳米颗粒的诊断或研究组合物,该纳米颗粒包含本发明的肽或肽多聚体/复合物。根据具体实施方式,肽或肽多聚体/复合物包含氨基酸序列LQIQSWSSSP或其盐。

[0271] 本说明书中使用的术语“包含(comprising、comprise(s))”、“包括”、“具有(having、has)”、“含有”意指“至少部分地由……组成”。当解释包括术语“包含”的本说明书中每个陈述时,也可能存在该术语以外的或以该术语开头的特征。相关术语如“包含(comprise)”和“包含(comprises)”应以相同方式解释。术语“具有(have、has、having)”和“包含”也可以涵盖“由……组成”和“基本上由……组成”的含义,并且可以由这些术语代替。术语“由……组成”不包括未具体描述或列出的任何部件、步骤或程序。术语“基本上由……组成”意指组合物或组分可以包括其他成分,但前提是其他成分不实质性地改变要求保护的组合物或方法的基本和新颖特征。

[0272] 如本文所用,术语“约”在提及诸如量、持续时间等的可测量值时,意指在涵盖自指定值的+/-10%、或+/-5%、+/-1%、或甚至+/-0.1%的变化。

[0273] 尽管为了示例本发明已经针对其各种具体实施方式进行了描述,但是这些具体公开的实施方式不应被认为是限制性的。基于申请人本文公开的内容,本领域技术人员将想到许多其他具体实施方式,并且申请人建议仅受所附权利要求中限定的他们的发明的精神和范围的约束。

[0274] 实施例

[0275] 材料和方法

[0276] 细胞系:使用小鼠乳腺肿瘤乳腺癌细胞4T1,表达通过慢病毒感染引入的荧光素酶,和AB12肺癌细胞。

[0277] 动物实验:根据耶路撒冷希伯来大学动物伦理委员会(the Hebrew University of Jerusalem animal ethics committee)批准的动物使用协议进行动物实验。

[0278] 健康动物:通过心脏穿刺从健康Balb/C小鼠身上采集血液。通过对25 μ l全血进行RBC裂解来纯化白细胞(WBC)。用水进行RBC裂解持续30sec,并且通过添加2.5% BSA/5 \times PBS来停止。然后在0.5% BSA/1 \times PBS中稀释WBC,并且对细胞总数进行计数。

[0279] 荷瘤小鼠:麻醉后,将 1×10^6 个4T1肿瘤细胞注射到雌性小鼠的乳腺脂肪垫。允许乳腺肿瘤达到700-800 mm^3 的平均大小(15-21天)。通过心脏穿刺采集血液。血液用0.5% BSA/1 \times PBS稀释至6ml,并且覆盖在蔗糖梯度(3ml Histopaque 1119、3ml Histopaque 1077)上。为了获得纯中性白细胞群,从1.119和1.077g/ml Histopaque(约3ml标记)之间的界面层收集细胞。用水进行RBC裂解持续30sec,并且通过添加2.5% BSA/5 \times PBS来停止。需要时,从小鼠收集肿瘤,切碎,并且在含有0.2mg/ml I型胶原酶、0.1mg/ml II型胶原酶、0.2mg/ml IV型胶原酶、25 μ g/ml弹性蛋白酶和25 μ g/ml DNase I的L15培养基中在37 $^{\circ}$ C下消化1hr。RBC裂解后,剩余细胞用APC标记的Ly6G特异性抗体包被,并且按照制造商的说明使用Easy-sep柱进行纯化。

[0280] 血清制备:通过心脏穿刺从一只健康的Balb/C小鼠中提取血液,并且将其转移到1.7mL试管中。将血液在RT下放置1h以允许血液凝固。样品在4℃下以1,500g离心10min。从约850μl血液中,可获得380μl的血清。

[0281] 小鼠急性炎症模型

[0282] 腹膜炎模型:通过腹膜内(i.p.)注射1ml酵母聚糖/PBS(1mg/ml),在Balb/C小鼠中诱发了腹膜炎。诱导后4小时,经由尾静脉注射200μl肽-或未包被的-纳米球溶液。200μl纳米球大约相当于每只小鼠大约 4.7×10^{11} 个球体。2小时后,处死小鼠并收集血液和腹膜灌洗液并且检查球体阳性中性白细胞的存在。

[0283] 对于WBC分析,对25μl全血进行RBC裂解。通过腹膜灌洗分离腹膜细胞,即将5ml PBS注入腹膜中,轻轻传送并且用5ml注射器上的25G针头收集细胞。WBC和 0.5×10^6 个腹膜细胞用CD45-APC和Ly6G-Vio抗体染色,并且清洗后通过流式细胞术分析。

[0284] 结肠炎模型:通过连续5天向饮用水中添加4%DSS,在健康Balb/C小鼠中诱发了结肠炎。然后将饮用水改为自来水,直至实验结束。在整个实验过程中,对照小鼠都被给予自来水。由于在校准实验中发现炎症和中性白细胞浸润的峰值出现在第7天,因此在第7天注射200μl肽-或未包被的-纳米球溶液(200μl纳米球大约等于 4.7×10^{11} 个球体),等待2、5或24小时,并且分离血液和器官用于单细胞FACS分析和组织学切片。近侧结肠被切碎,并且在含有0.2mg/ml I型胶原酶、0.1mg/ml II型胶原酶、0.2mg/ml IV型胶原酶、25μg/ml弹性蛋白酶和25μg/ml DNaseI的L15培养基中在37℃下消化30min同时震荡。细胞悬浮液通过45μm细胞过滤器过滤。将 1×10^6 个细胞在4℃下用CD45和Ly6G抗体染色30min。清洗后,通过流式细胞术分析细胞。台风激光扫描仪用于可视化器官内荧光的分布。

[0285] 人体血液样品:人体实验是基于Hadassah's Helsinki批准进行的。

[0286] 抽血后,以1:1的比例将血液覆盖在0.9%NaCl中的3%葡聚糖上,并且在RT下放置25min以允许红细胞沉降。通过添加水持续30sec裂解残留的RBC,并且通过添加2.5%BSA/5×PBS停止。然后在0.5% BSA/1×PBS中稀释WBC,并且对细胞总数进行计数。纯中性白细胞(HDN)的纯化是通过在RBC沉降后以1:1的比例将血液覆盖在Histopaque-1077上来完成的。以400g离心30min后,在试管底部发现了纯中性白细胞(团状物)。单核细胞(LDF-低密度部分)沉淀在Histopaque-1077和0.9%盐水之间。

[0287] 流式细胞术分析:在通过FACS分析之前,所有样品均通过BD管的细胞滤网盖(35μm)过滤。使用BD LSR Fortessa流式细胞仪通过FACS分析研究细胞。使用FlowJo X软件(阿什兰,OR)进行数据分析。

[0288] 人类中性白细胞的噬菌体展示筛选:噬菌体文库包含(compromise)8个文库的混合物,其包括半胱氨酸成环和未成环形式的6、8、10和12聚体。文库原液具有 1×10^{12} pfu/ml的浓度,并且在0.5% BSA/1×PBS中按1:10稀释。将200μl与 2×10^7 纯化的HDN在RT下温育20min同时震荡。结合中性白细胞的噬菌体洗脱后,洗脱液在DH5αF+大肠杆菌(E.coli.)上扩增。扩增的噬菌体用于一轮阴性选择:扩增产物在0.5% BSA/1×PBS中按1:10稀释,并且200μl首先应用于健康供体的低密度部分(LDF)的分离细胞。来自健康供体的低密度细胞(1×10^7 个)仅含有淋巴细胞和单核细胞。LDF细胞与扩增产物一起在RT下搅拌温育20min。旋转减慢(300g,10min)后,如第一轮选择所述,将上清液应用于HDN。从这里开始,重复放大和选择步骤。对第三轮选择的洗脱液进行PCR。使用位于pVIII插入位点侧翼的引物,可以获得

包括编码不同肽的多种序列的PCR产物。在琼脂糖凝胶上进行质量控制和纯化后,通过MiSeq(Core Research Facility Unit Hadassah Ein Kerem)对PCR产物进行测序。对获得的序列进行生物信息学和基序分析。

[0289] 噬菌体滴定-斑块测定:DH5 α F⁺细菌在2ml LB培养基中生长过夜。将200 μ l细菌培养物添加到0.5%琼脂糖中,并且倒在预热的LB琼脂平板上。当琼脂糖是固体时,应用十倍连续稀释的噬菌体溶液。使用允许识别单个斑块的稀释度以计算原液中噬菌体的滴度。

[0290] 合成肽:肽是购买的或使用固相肽合成法合成的。

[0291] 小鼠肽构建体的序列: (LQIQSWSSSP (SEQ ID NO:9) Doa-Doa-C) 4- (Mpa) -4-Lys2-Lys- β -Ala-Lys (生物素) - β -Ala-OH。将LQI四聚体肽重悬在超纯水中并且调节至309 μ M的浓度。由于肽序列内存在氨基酸色氨酸,可以用纳米滴(MW 7.6kDa,消光系数 $\epsilon = 22760\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) 在280nm波长下测量其吸光度来量化LQI四聚体肽。

[0292] 为了形成LQI-四聚体-SA复合物,将1 μ L的四聚体肽的309 μ M储备溶液与300 μ L的3.3 μ g/mL SA-Cy3在RT下预温育30min。人肽构建体的序列: (KFPDLDSRRLPHMSL (SEQ ID NO:1) Doa-Doa-C) 4- (Mpa) -4-Lys2-Lys- β -Ala-Lys (生物素) - β -Ala-OH。

[0293] 刃天青活力测定:将4T1乳腺癌细胞以每孔50,000个细胞的密度平铺接种在96孔板中的10% FCS/DMEM中。在用不同浓度的LQI四聚体肽处理之前,允许细胞贴壁4小时。18小时后,添加等于培养基体积的10%的量的刃天青溶液。2小时后,测量荧光,使用刃天青染料的转化确定细胞数量(活力)作为代谢活动的函数。

[0294] FITC膜联蛋白V和PI染色:将来自4T1荷瘤小鼠的 1×10^6 纯化的HDN与不同浓度的LQI四聚体肽在100 μ L的10% FCS/RPMI中在37 $^{\circ}$ C下温育30min,并且根据制造商的说明(Invitrogen)用FITC膜联蛋白V染色。在流式细胞术分析前30sec,将0.5 μ L PI 1mg/ml添加到300 μ L的染色细胞悬浮液中。

[0295] ROS生产:将180 μ l含有 2×10^5 纯化HDN的Hank平衡盐溶液(不含酚红)(HBSS)置于白色96平底孔板的每个孔中。向每个孔添加20 μ l的500 μ M鲁米诺的PBS溶液。使用读板器,在5分钟的时间进程中以10sec的间隔测定持续1000msec的基础化学发光。然后,用不同量的LQI四聚体肽或10nM PMA处理细胞。处理后立即在读板器(InfmiteF200Pro,TECAN)中读取化学发光,持续35min的时间进程。

[0296] Transwell迁移试验:通过密度梯度离心法从4T1荷瘤小鼠的循环中分离出HDN,纯度 $>95\%$ 。将800 μ l的2% FCS/RPMI培养基置于24孔板中,然后将具有5 μ m孔径的Millicell[®]细胞培养插入物放入孔中并允许浸泡5min。将HDN在2% FCS/RPMI中悬浮至250,000个细胞/ml的密度,并且将200 μ l细胞悬浮液置于transwell插入物的上室中。通过将100ng/ml CXCL2添加到孔的底部室(考虑 $V = 800\mu$ l)来刺激迁移,并且将肽以两种不同浓度(3.09 μ M或309nM,考虑 $V = 200\mu$ l)添加到上室中的HDN。1.5hr后停止测定,并且用镊子移除插入物。每个条件一式三份进行测试。在相同坐标下每孔拍摄5张图片(中、上、下、左、右)。使用ImageJ对每个视野的细胞进行计数。

[0297] 监测分离的中性白细胞的抗肿瘤活性的体外荧光素酶测定(“杀灭测定”):将5,000个荧光素酶标记的4T1乳腺癌细胞接种在白色96-平底孔板的每个孔中的100 μ l含有2%热灭活FCS的OptiMem培养基中。接种肿瘤细胞后24小时,将从4T1荷瘤小鼠的循环中纯化的 1×10^5 HDN添加到50 μ l具有2% FCS的OptiMem中。将共培养物温育过夜。对照孔在不含中性

白细胞的50 μ l培养基中温育。对每个实验设置进行多次重复(12孔)。吸出上清液并且添加50 μ l细胞培养裂解缓冲液(Promega)。将板在轨道振荡器上温育15min,然后在读板器中读取。在测量期间,每孔注入50 μ l内部制备的荧光素酶测定溶液,并且每孔持续10sec读取化学发光。%肿瘤裂解通过下式计算:%肿瘤裂解=(1-[具有中性白细胞的样品的发光]/[培养基中样品的发光]) \times 100%。

[0298] LQI四聚体肽的检测测定:使用两种测定来检测LQI四聚体肽结合:

[0299] “单独的四聚体”:LQI四聚体肽与50 μ l中的 0.5×10^6 HDN在4 $^{\circ}$ C下温育30min。洗涤后,细胞用50 μ l 3.3 μ g/ml的链霉抗生物素-Cy3(SA-Cy3)染色。

[0300] “四聚体-链霉抗生物素复合物”:将1 μ l的309 μ M的四聚肽原液与300 μ l 3.3 μ g/ml SA-Cy3在RT下预温育30min。然后使用100 μ l的LQI四聚体-SA-Cy3混合物对 0.5×10^6 个细胞进行染色。

[0301] LQI四聚体肽和SA-Cy3的洗涤和稀释在0.5%BSA/1 \times PBS缓冲液中进行。

[0302] 天然聚丙烯酰胺凝胶和银染:天然聚丙烯酰胺凝胶是用4%浓缩胶和12.5%分离胶制备的。不使用SDS或 β -巯基乙醇,并且不加热样品以维持LQI四聚体肽和SA-Cy3之间的结合。

[0303] 将10 μ l的样品与10 μ l的2 \times 加载缓冲液(30%甘油、62.5mM Tris 6.8、溴酚蓝)混合。凝胶在200V下运行3小时。使用BioRad ChemiDoc MP成像系统和Image Lab 4.1软件对凝胶中的SA-Cy3成像。根据制造商的说明,使用Pierce Silver Stain Kit对凝胶进行染色。

[0304] 表1:凝胶组合物

成分	浓缩胶4%	分离胶12.5%
DDW	3.8ml	4.3ml
1.0M Tris pH 6.8	625 μ l	-
1.5M Tris pH 8.5	-	2.5ml
40%丙烯酰胺/0.25%Bis	525 μ l	3.1ml
10%APS	40 μ l	100 μ l
TEMED	7 μ l	5 μ l

[0306] 纳米球包被和i.v.注射:链霉抗生物素包被的荧光尼罗红颗粒(0.7-0.9 μ M)购自Spherotech, Inc., IL, US。将200 μ l的球体重悬在400 μ l的PBS中,并且添加5 μ l的309 μ M LQI四聚体肽溶液。用PBS清洗1 \times 后,将球体重悬于200 μ l PBS中并且经由尾静脉注射。

[0307] SA包被的PLGA颗粒的产生

[0308] 活化脂肪酸:将10mg硬脂酸溶解在10ml 0.1 \times PBS/2%脱氧胆酸盐缓冲液中,并且在相同缓冲液制备1:10稀释液。将3.45mg NHS(=30 μ mol)和2.33mg EDC(=15 μ mol)添加到10ml的100 μ g/ml硬脂酸(=3.52 μ mol)中。脂肪酸活化混合物在RT下温育1hr。

[0309] 脂肪酸和SA的缀合:将2.5mg SA(=41.5nmol)溶解在2.5ml活化脂肪酸溶液(约900nmol)中,并且将混合物在37 $^{\circ}$ C下温育2h,每20min倒置一次。将缀合物溶液转移至透析管(GeBaFlex管,截止值3.5kDa)并且在4 $^{\circ}$ C下在搅拌的同时针对4.5升1 \times PBS透析过夜。

[0310] PLGA颗粒生成:将从Axon Medchem购买的85mg PLGA(约45kDa)、5mg PLGA-Cy5和2mg SB-431542溶解在总体积为3ml的氯仿中。将2.5ml SA-脂质缀合物添加到50ml试管中

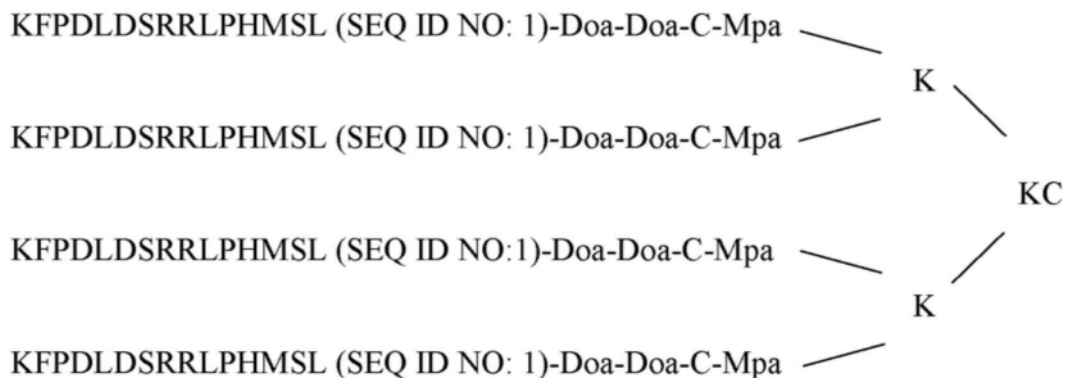
的23ml 2%PVA/PBS中,并且用5-6滴氯仿使溶液饱和。将尖端超声波仪(tip sonicator)放入50ml管中,并且将含有PLGA、PLGA-Cy5和SB-431542的氯仿溶液滴加到PVA溶液中,同时超声处理90sec。将乳液置于小烧杯中并且在化学通风橱下搅拌过夜以蒸发氯仿。NP制剂用45ml 1×PBS (20,000rpm持续20min,4℃)清洗两次,然后重悬于2ml 2%甘露醇/H₂O中。将悬浮液在-20℃乙醇浴中冷冻并且冻干48h。

[0311] SB-431542 PLGA纳米颗粒(NP)的制备:SB-431542,已知的TGFβ阻断剂(Laping NJ等人,Molecular pharmacology,2002,62(1),58-64)使用油/水单一乳液技术(oil/water single emulsion technique)包封到PLGA纳米颗粒中。简而言之,将2mg SB-431542和90mg pf PLGA(丙交酯:乙交酯比例为50:50,酸终止,约45kDa)溶解在3ml氯仿中。然后将溶液逐滴添加到2%聚乙烯醇(PVA)溶液(25ml)中,并且在冰浴上超声处理(使用尖端超声波仪)1min以形成油/水乳液。乳液在室温下(在通风橱中)搅拌过夜以移除氯仿,从而形成NP。用PBS(使用超速离心机)清洗NP以移除PVA和未包埋的SB-431542,并且保持在4℃下直至使用。不含药物的NP(空NP)通过相同的程序制备,省略了药物。

[0312] 含有PLGA NP的PEG修饰SB-431542的制备:使用油/水单一乳液技术将小分子TGFβ抑制剂SB-431542包封到PLGA纳米颗粒中。简而言之,将72mg PLGA(60%)、36mg PLGA-PEG-马来酰亚胺(30%)和12mg PLGA-Cy5(10%)溶解在3ml氯仿中。然后,将3mg SB-431542溶解在200μl DMSO中并且添加到PLGA混合物中。将PLGA-SB-431542溶液逐滴添加到2%聚乙烯醇(PVA)溶液(25ml)中,并且在冰浴上超声处理(使用尖端超声波仪)90sec以形成油/水乳液。乳液在室温下(在通风橱中)搅拌过夜以移除氯仿,从而形成NP。用PBS(使用超速离心机)清洗NP以移除PVA和未包埋的SB-431542。不含药物的NP(空NP)通过相同的程序制备,省略了药物。

[0313] 将人结合肽与含有PLGA NP的PEG修饰SB-431542偶联:将4mg KFP-SH四聚体(见下面的结构)重悬于2ml具有10mM EDTA的脱气乙酸钠缓冲液中,并且在RT下重悬20min。2ml肽添加到重悬于PBS中的10ml纳米颗粒中,然后在RT下温育5小时,然后在4℃下过夜。将12ml NP溶液转移到透析管中,截留值为300,000Da,然后以3000g旋转3×20min。每20min后,重悬NP。使用超速离心法收集NP并且用50ml PBS清洗两次。最后,将NP重悬于2ml%甘露醇中并且冷冻干燥。

[0314] KFP-SH四聚体结构:



[0316] NP表征:通过动态光散射(Malvern Zetasizer)、透射电子和扫描电子显微镜(TEM和SEM)来表征NP。为了量化载药量(drug loading),将1mg纳米颗粒溶解在50μl的DMSO中,DMSO分解纳米颗粒并且释放SB-431542。在325nm处测量溶液的吸收。根据标准曲线,确定

SB-431542的浓度。然后使用以下公式计算载药量：

$$[0317] \quad \text{载药量}(\%) = \frac{\text{纳米颗粒中药物的重量}}{\text{纳米颗粒的重量}} \times 100$$

[0318] 使用计算出的载药量，计算包封效率。

$$[0319] \quad \text{包封效率}(\%) = \frac{\text{纳米颗粒中药物的重量}}{\text{最初给药的重量}} \times 100$$

[0320] 使用以下公式计算纳米颗粒的产率：

$$[0321] \quad \text{纳米颗粒的产率}(\%) = \frac{\text{纳米颗粒的重量}}{\text{聚合物重量} + \text{药物} + \text{甘露醇重量}} \times 100$$

[0322] 使用BCA测定对肽偶联进行量化。在肽偶联和几个清洗步骤后，对来自具有和不具有肽连接的批次的1mg颗粒进行BCA测定。所确定的连接到纳米颗粒的肽的量，以及最初使用的量(4mg)用作以下公式的输入：

$$[0323] \quad \text{连接效率}(\%) = \frac{\text{纳米颗粒中肽的重量}}{\text{最初使用的肽的重量}} \times 100$$

[0324] 表2:材料规格

材料	MW	LA:GA, 描述	说明书/公司
PLGA	38,000-54,000 Da	50:50, 酸中止的	Resomer® RG 504 H Sigma/Evonik
PLGA-PEG-Mal	PLGA 30,000 PEG 5,000 Da	50:50	AI110 PolySciTech
PLGA-Cy5	45,000-55,000 Da	50:50	AV034 PolySciTech
KFP-SH 四聚体		KFPDLDSRRLPHMSL (SEQ ID NO: 1), 定制	Intavis AG

[0326] 实施例1与鼠中性白细胞结合的肽的鉴定和优化

[0327] 以与Mazzucchelli等人(Blood, 1999, 93(5), 1738-1748)进行的筛选类似的方式，进行了肽文库的噬菌体展示筛选。在当前筛选中，在其VIII蛋白上展示了 10^{12} 种不同肽的噬菌体文库被用于鉴定与鼠中性白细胞结合的肽。文库中的肽是线性或环状形式的6-12个氨基酸的随机序列(Ryvkin等人, 2018, Nucleic Acids Research, 2018, Vol. 46, No. 9e52)。使用鼠正常密度中性白细胞(NDN)进行筛选以进行阳性选择，而单核细胞和淋巴细胞用于阴性选择。在3轮阳性淘选和2轮交错阴性淘选后，洗脱出并且测序中性白细胞亲和力选择的噬菌体(图11)。表3列出了排名靠前的富集肽序列及其在最终洗脱液中的普及性(prevalence)(5次重复的平均值)。

[0328] 表3. 与小鼠中性白细胞结合的肽序列。

排名	序列	普及性(%)
1	LQIQSWSSSP (SEQ ID NO:9)	28.4
2	STMTILGTGS (SEQ ID NO:10)	10.4
3	TETSLRIVSTNP (SEQ ID NO:11)	4.1
4	LSIVSGSALNHL (SEQ ID NO:12)	2.9
5	LTLVSRPMI (SEQ ID NO:13)	1.5

[0330] 在筛选中获得的具有最佳结合的肽是肽LQI,其由氨基酸序列LQIQSWSSSP (SEQ ID NO:9)组成。呈现该肽的噬菌体显示出最高的特异性,与95%的中性白细胞结合,没有与单核细胞或淋巴细胞的可检测的结合(图1A-图1B)。

[0331] 通过用Cy5、生物素或荧光素标记LQI肽的N-末端,合成了几种LQI单体肽缀合物(图1C)。然后进行竞争测定以评估LQI及其缀合物与鼠中性白细胞的结合。对于竞争测定,首先将来自4T1荷瘤Ba1b/C小鼠的 1×10^6 密度梯度纯化的HDN与合成肽中的每种温育20min,然后与在其表面呈现LQI肽的 10^{10} 个噬菌体一起温育。使用M13-PE抗体通过流式细胞术检测噬菌体结合。

[0332] 从图1D中可以看出,虽然裸的合成肽能够与噬菌体竞争结合至中性白细胞,但未检测到肽缀合物的结合。这些结果表明肽的N-末端可能参与了与中性白细胞的结合。

[0333] 接下来,基于Li等人(Molecular cancer therapeutics,2009,8(5),1239-1249),设计了四聚体肽,其包含在支化四聚体核心上的4个拷贝的肽LQI(具有游离N-末端)。四聚肽的每个分支包含8-氨基-3,6-二氧化辛酸(Doa)以增加溶解度,马来酰亚胺基丙酸(Mpa)作为连接体,并且经由赖氨酸连接体连接到生物素标签,生物素标签使复合物可用于荧光检测和操作。图2A提供了四聚体肽的结构。通过上述针对LQI单体构建体的竞争测定来评估这种四聚体肽与鼠中性白细胞的结合亲和力。LQI-四聚体有效地结合约100%的中性白细胞(相对于LQI单体略有提高),然而,它同时结合约50%的其他白血细胞(WBC)(图2B,左侧和图2C)。

[0334] 实施例2 LQI四聚体-链霉抗生物素(SA)复合物对鼠中性白细胞显示更高的特异性

[0335] LQI四聚体与具有四个生物素结合位点的荧光标记SA一起温育。因此,LQI四聚体-SA复合物是LQI肽的16聚体(16-LQI)。将 $2.7 \mu\text{g}$ 的SA-Cy3与不同量的LQI四聚体肽在室温(RT)下温育20min,以形成复合物。然后将样品加载到12.5%天然聚丙烯酰胺凝胶(PAGE)上,并且在200V下运行3小时。使用荧光成像仪检测SA-Cy3荧光。如图3所示,观察到SA的分子量的变化,确认了复合物的形成。

[0336] 为了检查16-LQI与鼠中性白细胞的结合,将 $10 \mu\text{l}$ 单独的LQI四聚体或16-LQI与来自4T1荷瘤小鼠的 0.5×10^6 WBC在 4°C 下温育30分钟。清洗细胞并通过流式细胞术进行分析。对于单独的LQI四聚体测定,首先将细胞与LQI四聚体肽一起温育,清洗,然后用SA-Cy3染色。16-LQI显示100%的中性白细胞结合,仅约10%与其他白细胞结合(图2B,右和图2C)。

[0337] 进一步评估了LQI四聚体肽和16-LQI对鼠中性白细胞的结合亲和力。将来自4T1荷瘤小鼠的纯化HDN悬浮于 $100 \mu\text{l}$ 含有不同浓度的LQI四聚体肽、LQI四聚体-SA复合物或不结合鼠中性白细胞的对照肽(KFPDLDSRRLPHMSL,SEQ ID NO:1)的四聚体-SA复合物的0.5%BSA/ $1 \times \text{PBS}$ 。通过流式细胞术进行分析。

[0338] 从图2D中可以看出,虽然对照肽未显示与鼠中性白细胞的结合,但LQI四聚体肽显示 $3.3 \mu\text{M}$ 的 K_D ,而16-LQI显示 250nM 的 K_D 。因此,16-LQI对中性白细胞的亲和力比单独的LQI四聚体对中性白细胞的亲和力高75倍以上。

[0339] 为了排除在与LQI四聚体-SA复合物温育时,中性白细胞之间存在交联,分析了流式细胞术数据以评估在与LQI四聚体-SA复合物温育后双联体细胞是否增加。可以检查光散点图并且将电压脉冲(SSC-H、FSC-H)的高度信号与面积值(SSC-A、FSC-A;A=高度*宽度)进

行比较。如果双联体通过流式细胞仪中的激光束,则脉冲信号的宽度(对应于时间)将增加,因此面积(SSC-A和FSC-A)的值将增加。通过比较例如SSC-H和SSC-A可以识别双联体,因为它们是印迹中的异常值。LQI四聚体-SA-Cy3复合物结合的中性白细胞与仅用SA-Cy3染色的对照细胞之间的双联体百分比未检测到差异,表明中性白细胞没有交联。

[0340] 实施例3 LQI四聚体显示出与健康小鼠和荷瘤小鼠中性白细胞的特异性结合

[0341] 为了评估LQI四聚体肽与离体循环中性白细胞的特异性结合,从健康小鼠、荷乳腺癌肿瘤的小鼠(4T1)和荷肺肿瘤的小鼠(AB12)中采集血液。具体地,使用密度梯度离心法,从首次接受试验(naive)的Balb/C、首次接受试验(naive)的C57BL/6、4T1荷瘤Balb/C小鼠和AB12荷瘤C57BL/6小鼠的循环纯化HDN(纯度>95%)。将 0.5×10^6 纯化的HDN在4°C下在100 μ l预温育的3.3 μ g/ml 16-LQI-Cy3溶液中染色30min。为了评估全血中的结合,对来自4T1荷瘤小鼠的25 μ l全血进行RBC裂解,并且将剩余的WBC在4°C下重悬于3.3 μ g/ml LQI四聚体-SA-Cy3溶液中持续30min。染色后,清洗细胞并且通过流式细胞术分析。

[0342] 从图2E中可以看出,16-LQI与分离自健康小鼠的循环中性白细胞中的87%高效结合。检测到通过单核细胞的吞噬作用或背景结合,但平均荧光强度(MFI)较低。同样,16-LQI对4T1荷瘤小鼠中的循环中性白细胞(Ly6G⁺细胞)表现出强的特异性(图2F)。

[0343] 为了评估LQI四聚体与肿瘤相关中性白细胞(TAN)的结合,使用EasySepAPC选择试剂盒从4T1肿瘤中纯化TAN(纯度>90%)。将 0.5×10^6 纯化的TAN在4°C下在100 μ l预温育的3.3 μ g/ml LQI四聚体-SA-Cy3溶液中染色30min。染色后,清洗细胞并且通过流式细胞术分析。结果显示了LQI四聚体与TAN的显著高的结合效率(98%)(图2G)。

[0344] 图2H显示了LQI四聚体与所分析的所有不同类型的中性白细胞结合,以及对照测试(对照肽KFPDLDSRRLPHMSL(SEQ ID NO:1)和仅SA-Cy3)的总结。可以看出,LQI四聚体肽以非常高的效率结合到不同的中性白细胞。最后,使用共聚焦成像,证明了16-LQI被中性白细胞特异性吞噬(图2I)。

[0345] 实施例4 LQI四聚体包被的纳米球在体外显示出对中性白细胞的特异性靶向作用

[0346] 通过将20 μ l纳米球与5 μ l的30.9 μ M LQI四聚体溶液温育30min,然后通过以3000g离心10min进行洗涤,用LQI四聚体经由其生物素标签包被链霉抗生物素蛋白包被的荧光尼罗红纳米球(700-900nm)。然后在体外评估这些四聚体包被的纳米球对来自4T1荷瘤小鼠的纯化HDN的结合特异性。将来自4T1荷瘤Balb/C小鼠的 1×10^6 密度梯度纯化的HDN与20 μ l未包被的纳米球或LQI四聚体包被的纳米球在37°C下温育1小时。洗涤三次后,通过流式细胞术分析细胞。如图4A所示,与未包被纳米球的44%结合相比,LQI四聚体包被增加了中性白细胞结合上至92%。此外,四聚体包被减少了其他WBC的非特异性摄取。

[0347] 实施例5 LQI四聚体包被的纳米球显示了体内靶向来自具有炎性状况的小鼠的中性白细胞

[0348] 腹膜炎

[0349] 将未用LQI四聚体肽包被(对照)或用LQI四聚体肽包被(如实施例4所述)的链霉抗生物素包被的荧光尼罗红纳米球注射到患有腹膜炎的小鼠的尾部静脉中。2小时后,处死小鼠并收集血液和腹膜灌洗液,并且通过用CD45-APC和Ly6G-Vio抗体染色,然后洗涤并通过流式细胞术分析来检查球体阳性中性白细胞的存在。

[0350] 如图5A和图5B所示,在注射有LQI四聚体包被的球体的小鼠中,检测到在循环中

(图5A)增加百分比(30%)的纳米球阳性中性白细胞,而在腹膜中(图5B)在8-15%之间。注射有未包被的球体的小鼠显示在循环中仅2-9%的纳米球⁺中性白细胞,而在腹膜中0.5%至2%之间。

[0351] 结果还表明LQI四聚体包被的纳米球的体内稳定性。

[0352] 急性结肠炎

[0353] 通过在饮用水中施用葡聚糖硫酸钠(DSS)5天,然后改用普通自来水,在小鼠中诱发结肠炎。在第7天,小鼠被注射LQI四聚体包被的纳米球,并且在后一天被处死。通过用CD45和Ly6G抗体染色,然后洗涤并通过流式细胞术分析,来检查球体阳性中性白细胞的存在。

[0354] 如图6A所示,注射纳米球的小鼠在发炎的结肠中表现出荧光细胞的积聚,表明LQI四聚体包被的纳米球有效地靶向结肠浸润中性白细胞。使用台风荧光激光扫描仪以及荧光双目显微镜也可以在器官中可视化结肠中荧光信号的积聚(图6B)。

[0355] 还评估了循环内LQI四聚体包被的纳米球的摄取。结果显示,随着时间的推移,球体+Ly6G⁺中性白细胞的百分比下降。更具体地,注射后2h,8.4%的循环中性白细胞对球体摄取呈阳性,注射后5h,7.09%的循环中性白细胞对球体摄取呈阳性,并且检测后24h,只有1.3%的循环中性白细胞对球体摄取呈阳性。

[0356] 实施例6 LQI四聚体包被的纳米球在4T1荷瘤小鼠中的分散和到达肿瘤部位

[0357] 为了测试LQI四聚体包被的纳米球是否在肿瘤中积聚,用LQI四聚体包被的纳米球对4T1荷瘤小鼠进行i.v.注射。6.5小时后处死小鼠,并且检查肿瘤和全血中是否存在携带荧光纳米球的中性白细胞。在血液中检测到纳米球阳性中性白细胞,并且在从肿瘤制备的单细胞悬浮液中检测到低百分比的纳米球⁺中性白细胞。在纳米球施用后的其他时间点,上至注射后24和48小时,进一步检查LQI四聚体包被的纳米球在肿瘤中的积聚。

[0358] 实施例7 LQI四聚体肽在离体血清中表现出高稳定性

[0359] 为了评估LQI四聚体稳定性,将LQI四聚体肽(7.7 μ M)在小鼠血清中在37 $^{\circ}$ C下温育20min、40min或1小时。温育后,将150 μ l具有3.3 μ g/ml SA-Cy3和从荷瘤小鼠的循环纯化的 0.7×10^6 HDN的0.5% BSA/1 \times PBS缓冲液添加到40 μ l包括肽的血清中。作为稳定性读数,检查了LQI四聚体与HDN的结合能力。作为对照,将LQI四聚体在40 μ l 0.5% BSA/1 \times PBS缓冲液中在37 $^{\circ}$ C下温育20min。HDN在4 $^{\circ}$ C下温育30min,洗涤并通过流式细胞术进行分析。如图7中描绘的,中性白细胞的结合保持良好,在20min和40min温育后,所有HDN的结合从95%下降到1小时温育后的85%,表明LQI四聚体具有良好的稳定性。结合的轻微降低可能是由于肽的水解。

[0360] 实施例8 LQI四聚体肽不影响中性白细胞活力

[0361] 从荷4T1肿瘤的Balb/C小鼠的循环中分离出中性白细胞。然后用增加浓度的LQI四聚体肽(310nM、3.1 μ M和31 μ M)处理中性白细胞(0.5×10^6)并且在OptiMEM 0.5% FCS中温育6.5小时。对照中性白细胞在OptiMEM 0.5% FCS中接受相应量的水持续6.5小时。使用佛波醇12-肉豆蔻酸酯13-乙酸酯(PMA)作为阳性对照,其是刺激活性氧种类(ROS)产生的充分描述的分子。使用了两种评估中性白细胞存活的补充测定:通过台盼蓝排斥法计数活的中性白细胞,以及对膜联蛋白V⁺(凋亡)和PI⁺(正在死亡/死亡的)中性白细胞进行FACS分析。参照膜联蛋白/PI检测,温育时间仅为30min。根据制造商的说明用FITC膜联蛋白V对细胞进

行染色,在流式细胞术分析前30sec将0.5 μ l PI 1mg/ml添加到300 μ l染色细胞悬浮液中。如图8A(细胞计数)和图8B-图8C(FACS分析)所示,使用这两种策略,与对照细胞(未处理)相比,任何肽浓度的中性白细胞活力之间都没有显著差异。这表明LQI四聚体肽对中性白细胞活力没有显著影响。

[0362] 实施例9 LQI四聚体肽不影响中性白细胞功能

[0363] 为了评估将中性白细胞暴露于靶向中性白细胞的LQI四聚体肽的功能性结果,将从荷瘤小鼠中纯化的循环HDN与合成的LQI四聚体肽一起温育。然后评估了对中性白细胞活化、中性白细胞产生的活性氧种类(ROS)、中性白细胞迁移和中性白细胞介导的对4T1癌细胞的细胞毒性的影响。进一步,显示了LQI四聚体本身并不充当化学吸引剂(趋化剂, chemoattractant)(图8F)。

[0364] 活化

[0365] 从荷4T1肿瘤的Balb/C小鼠的循环中分离出中性白细胞。然后用增加浓度的LQI四聚体肽(310nM、3.1 μ M和31 μ M)或10nM PMA处理中性白细胞作为活化的阳性对照。向对照细胞(未处理)中添加了相应量的水。细胞在4 $^{\circ}$ C下用CD11b-FITC染色30min,然后洗涤并通过流式细胞术进行分析,以确定作为中性白细胞活化代表的CD11b的表面表达。图8D显示虽然PMA诱导CD11b表面表达显著增加,但与对照(H₂O处理)相比,用LQI四聚体肽处理的中性白细胞在CD11b表面表达方面没有显示任何显著差异。这表明LQI四聚体肽对中性白细胞活化没有显著影响。

[0366] ROS产生

[0367] 从荷4T1肿瘤的Balb/C小鼠分离出中性白细胞。然后用增加浓度的LQI四聚体肽(39nM、390nM和3.9 μ M)处理中性白细胞。用10nM PMA处理作为阳性对照,并且等体积的H₂O作为阴性对照。使用基于鲁米诺的测定来确定ROS产生的程度。简而言之,在用LQI四聚体肽或PMA处理后,将鲁米诺添加到细胞中,并且在35min的时间进程中测量化学发光的产生。测量的化学发光对应于ROS的产生,并且计算ROS的积聚。如图8E所示,发现虽然PMA诱导ROS产生显著增加,但与对照(H₂O处理)相比,用LQI四聚体肽处理的中性白细胞在ROS产生方面没有显示任何显著差异。这表明LQI四聚体肽对中性白细胞产生ROS没有显著影响。

[0368] 迁移

[0369] 从荷4T1肿瘤的Balb/C小鼠中分离出中性白细胞,并且在博伊登室(Boyden chamber)中测试LQI四聚体肽对其迁移的影响。将纯化的HDN置于transwell(微孔径5 μ m)上室中的2% FCS/RPMI培养基中。下室仅包含2% FCS/RPMI培养基或趋化因子CXCL2以诱导中性白细胞迁移。将两种不同浓度(3.09 μ M和309nM)的LQI四聚体肽添加到上室。温育1.5h后停止测定,每孔拍摄五张照片,计数并取平均值。实验一式三份进行。如图8G所示,将LQI四聚体肽添加到transwell上隔间的细胞中对中性白细胞迁移没有明显影响。

[0370] 对4T1癌细胞的细胞毒性

[0371] 为了排除LQI肽对HDN杀灭癌细胞的能力的可能影响,将LQI四聚体肽添加到4T1癌细胞和HDN的共培养物中,测量杀灭百分比并与没有LQI四聚体处理的相比较。更详细地,将5.000个荧光素酶标记的4T1乳腺癌细胞培养18小时。然后,添加从4T1荷瘤小鼠的循环中纯化的1 $\times 10^5$ HDN。将共培养物温育过夜。然后添加不同浓度的LQI四聚体以及用作对照的KFP四聚体(KFPDLDSRRLPHMSL,序列号1)。第二天,测量荧光素依赖性化学发光,并且与未与HDN

一起培养的对照孔相比计算杀灭百分比。对于每个样品,在培养基内,用相应浓度的肽处理不含HDN的对照4T1细胞。%肿瘤细胞裂解计算如下: %肿瘤裂解 = (1 - [具有中性白细胞的样品的发光] / [培养基中样品的发光]) x 100%。

[0372] 如图9所示,在不添加LQI四聚体的情况下,17.9%的4T1细胞在与HDN温育后被杀灭。处理样品(LQI四聚体或对照KFP四聚体)中的杀灭百分比在13.6-20%之间变化。杀灭中的这些差异均不显著,表明LQI四聚体肽不影响HDN杀灭癌细胞的能力。

[0373] 为了进一步检查LQI四聚体肽是否对细胞的活力有影响,将4T1细胞平铺并且在10%FCS/DMEM中温育4小时。然后,用不同浓度的LQI四聚体肽(31nM、310nM和3.1μM)或对照KFP四聚体(h肽,3.9μM)处理细胞。细胞毒性药物细胞松弛素B(Cyto)用作阳性对照。18小时后,添加等于培养基体积10%的量的刃天青溶液。2小时后,测量荧光作为细胞活力的指标(使用刃天青染料转化的代谢活性的函数)。

[0374] 如图10所示,LQI四聚体肽和对照KFP四聚体均不影响细胞活力。

[0375] 使用相同的测定来测试LQI四聚体对其他细胞例如正常上皮细胞、正常内皮细胞和成纤维细胞的细胞毒性。

[0376] 实施例10鉴定与人中性白细胞结合的肽

[0377] 通过使用如图11所示和上文所述的噬菌体文库筛选以及交替轮次的阳性选择(结合中性白细胞)和阴性选择(结合单核部分),已经发现了8种潜在的肽,它们具有特异性结合分离自健康个体的人中性白细胞的能力。在10个健康个体的池中测试文库,以消除个体影响并且找到与广泛的(a wide panel of)个体相关的肽。表4中提供了8种相关肽的序列。

[0378] 表4:与循环人中性白细胞高效结合的肽的序列

肽名称	SEQ ID NO:	肽序列
1.1 (KFP)	1	KFPDLDSRRLPHMSL
27 (LAT)	2	LATTHMVFSPDH
[0379] 4 (PSS)	3	PSSNLESTPLSLL
14 (SSL)	4	SSLMTTQLIATSI
PEL	5	PELDSKPYFPPL
ELV	6	ELVTASMPRPNN
SLE	7	SLESSPMAQLPQ
SEL	8	SELRSTPLLVPS

[0380] 将来自健康志愿者的全血与0.9%NaCl中的3%葡聚糖以1:1的比例混合,并且在RT下放置25min以使红细胞沉降。红细胞裂解后,将 0.5×10^6 WBC分别与每种噬菌体一起温育。使用来自同一个体的中性白细胞,检查了不同噬菌体的结合。中性白细胞被鉴定为CD66b⁺SSC^高,并且使用PE缀合的抗-M13抗体评估噬菌体结合水平。如图12所示,虽然发现空噬菌体以非常低的水平与循环中性白细胞结合,但观察到表达肽的噬菌体与中性白细胞的

显著结合。

[0381] 实施例11人中性白细胞结合肽显示与来自健康志愿者的循环中性白细胞的结合

[0382] 为了评估每种肽与人循环中性白细胞的结合效率,以及个体之间的变异水平,评估了每种肽与5-8名健康志愿者的个体结合。从健康志愿者身上抽取的血液以1:1的比例覆盖在0.9%NaCl中的3%葡聚糖上,并且在RT下放置25min以使红细胞沉降。残留的红细胞通过添加水裂解30sec,并且通过添加补充有2.5% BSA的PBSx5停止。红细胞裂解后, 0.5×10^6 个WBC分别与每种噬菌体温育。然后通过流式细胞术评估不同噬菌体与中性白细胞的结合水平。基于CD66b⁺SSC^高门控鉴定中性白细胞,并且使用PE缀合的抗-M13抗体进行特异性噬菌体染色评估噬菌体结合水平。如图13A-图13H所示,结果显示结合范围在30-70%之间,其取决于肽和个体。重要的是,对于所有受试者,所有噬菌体都与显著量的中性白细胞结合,并且各种肽平均都结合约60%的循环中性白细胞(图13I)。

[0383] 实施例12人中性白细胞结合肽显示对来自肺癌患者的循环中性白细胞具有高亲和力

[0384] 测试了噬菌体与分离自肺癌患者的中性白细胞的结合。将一名肺癌患者的全血与0.9%NaCl中的3%葡聚糖以1:1的比例混合,并且在RT下放置25min以允许红细胞沉降。残留的红细胞通过添加水30sec裂解,并且通过添加PBSx5+2.5% BSA停止。然后对细胞总数进行计数,并且将 0.5×10^6 个WBC与每种噬菌体温育。基于CD66b⁺SSC^高门控鉴定中性白细胞,并且使用PE缀合的抗M13抗体进行噬菌体染色,通过流式细胞术评估不同噬菌体的结合水平。空噬菌体以及包含肽LQI(结合鼠中性白细胞但不结合人中性白细胞)和表示为“3”的无关肽的四聚体构建体用作人类肽特异性的阴性对照。如图14所示,所有8种肽都显示出对循环中性白细胞的强亲和力。

[0385] 例13 KFP-四聚体多抗原的产生和表征

[0386] 以与16-LQI相同的方式生成生物素化的KFP-四聚体多抗原(命名为16-KFP)。在全血中,16-KFP结合约80%的人中性白细胞和小于10%的非中性白细胞WBC(图15A)。人16-KFP对中性白细胞活化(图15B)、活力(图15C-图15D)或趋化特性(图15E-图15F)没有显著影响。

[0387] 实施例14含有治疗剂的PLGA纳米颗粒

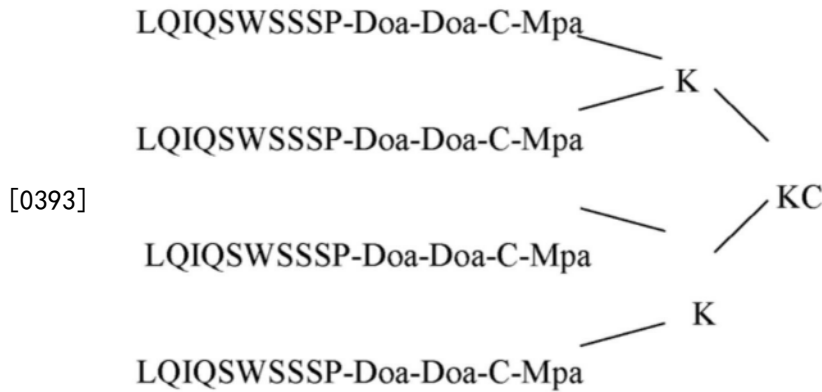
[0388] 对于中性白细胞特异性药物递送,假设用LQI-四聚体修饰纳米颗粒将使它们变为中性白细胞特异性的。生成了两种类型的聚(乳酸-共-乙醇酸)(PLGA)纳米颗粒:

[0389] 1. 包被SA的PLGA纳米颗粒(NP):

[0390] NP合成是经由脂肪酸尾部将SA锚定到PLGA颗粒进行的,这是基于Park等人(Journal of controlled release,2011,156(1),109-115)的策略。简而言之,硬脂酸(C-18脂肪酸)通过EDC/NHS化学在酸的羧基中活化,并且连接到SA内存在的游离氨基。当创建聚合物乳液时,在超声处理期间将脂肪酸连接的SA添加到聚合物混合物。将聚合物乳液在化学通风橱中搅拌过夜,以允许有机溶剂蒸发和纳米颗粒形成。SB-431542(TGFβ阻断剂)在合成过程期间被包封到PLGA纳米颗粒中(参见方法)。由于其疏水特性,脂肪酸锚定在PLGA颗粒内,在其表面呈现亲水性SA,从而能够与生物素标记的肽四聚体进一步缀合。纳米颗粒的流体动力学直径为300nm(+/-100),如通过动态光散射(DLS)测量的。

[0391] 2. 不含SA的PLGA纳米颗粒:

[0392] 另一种LQI四聚体肽,即在C-末端终止的半胱氨酸,设计如下:



[0394] 这种四聚体肽可以使用马来酰亚胺连接体经由半胱氨酸(C)残基与PLGA颗粒缀合。

[0395] PLGA颗粒用聚乙二醇(PEG)表面改性(见方法)制备,以增加体内循环时间并且减少巨噬细胞的摄取。制造的PLGA纳米颗粒(NP)含有PLGA-PEG-马来酰亚胺(30%),并且当PLGA-Cy5(10%)掺入NP配方中时,可以通过流式细胞术监测摄取纳米颗粒的检测。发现最有效的NP配方是PLGA-PEG-Ma1,因为它显示出非常高的中性白细胞摄取,而非中性白细胞WBC的摄取最少(图16A-图16E)。纳米颗粒的流体动力学直径为300nm(+/-100),如通过动态光散射(DLS)测量的,并且重要的是,使用电子显微镜,在LQI-四聚体包被和未包被的PLGA NP之间没有观察到尺寸差异(图16F)。

[0396] 事实上,用LQI-四聚体修饰NPs通过同时增加被中性白细胞摄取和减少被其他细胞摄取来赋予中性白细胞特异性(图17A-图17B)。当纳米球仅包被有LQI单体时,观察到类似的结果(图17C)。使用共聚焦成像的3D重建,清楚地显示出LQI四聚体修饰的NP被中性白细胞吸收。

[0397] 已知PLGA NP在细胞内逐渐降解,释放任何包封的有效载荷。因此,测试了是否可以通过将小分子抑制剂包封在中性白细胞特异性NP(NSNP)中,来调节中性白细胞脱颗粒ROS的产生。中性白细胞经由NADPH氧化酶复合物产生ROS,而NADPH氧化酶复合物可被二亚苯基碘鎓(Diphenyleneiodonium)(DPI)有效抑制。使用单一乳液包封工艺将DPI加载到LQI包被的纳米颗粒中。然后,用10u1空NP(空NP)、10u1 DPI加载的NP(NP+DPI)或1uM游离DPI预处理中性白细胞持续3小时。一次清洗后,用50nM PMA刺激中性白细胞以诱导ROS产生。PMA诱导的阳性对照是用运载体(空NP)预处理的中性白细胞。阴性对照(Cout.)是未经处理的中性白细胞。用PMA刺激中性白细胞显著增加ROS的产生(图17D)。虽然添加空的NSNP对PMA刺激的ROS产生没有影响,但游离DPI和更大程度上(to a larger extend)DPI-NSNP有效地阻断了PMA对ROS产生的影响(图17D)。

[0398] 使用类似的策略测试了NSNP是否可用于阻断中性白细胞的脱颗粒能力。这个过程可以被Nexinhib-20抑制。PMA刺激后中性白细胞脱颗粒,如通过CD11b表面表达增加所测量的。当用含有Nexinhib-20的NSNP预处理中性白细胞时,这个过程被完全阻断(图17E)。总之,这些观察结果证明了使用NSNP具体操纵ROS产生和脱颗粒的功效和特异性,这些过程对炎症至关重要。

[0399] 为检查含有SB-431542的PLGA纳米颗粒对鼠中性白细胞中TGFβ信号传导的影响,

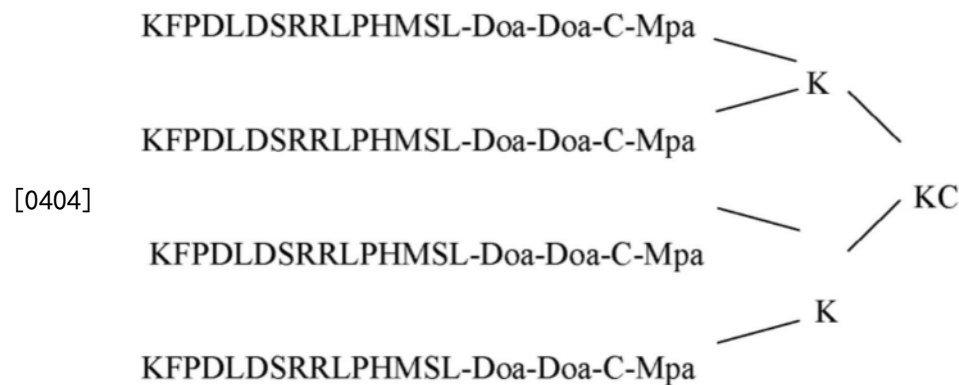
将从4T1荷瘤小鼠中分离的 5×10^6 HDN在100 μ l的10% FCS/RPMI中与6 μ g/ μ l空PEG修饰的PLGA纳米颗粒(NP)、0.6 μ g/ μ l空NP(1:10)、6 μ g/ μ l SB431542NP或0.6 μ g/ μ l SB431542NP(1:10)预温育4小时。温育后,彻底清洗中性白细胞以去除任何未结合的纳米颗粒,然后在存在或不存在TGF β (10ng/ μ l)的情况下温育30min,以诱导Smad2磷酸化。处理后,将细胞在40 μ l裂解缓冲液中裂解并且准备用于蛋白质印迹以检测总Smad2/3和phospho-Smad2。如图18A所示,虽然空纳米颗粒对TGF β 诱导的Smad2磷酸化没有影响,但含有SB431542的纳米颗粒完全阻断了TGF β 信号传导。值得注意的是,含有SB431542的纳米颗粒的1:10稀释仍然阻断中性白细胞中的TGF β 信号传导,表明较低的纳米颗粒浓度也可能有效。当中性白细胞同时暴露于SB431542 NP和TGF β 时,观察到类似的结果(图18B)。荷4T1肿瘤的小鼠也施用了含有SB431542的NSNP,并且发现循环低密度中性白细胞的增殖减少(图18C)。

[0400] Roscovitine是另一种治疗分子,其作用类似于SB431542。发现包封Roscovitine的NSNP也诱导了中性白细胞特异性细胞死亡,如通过流式细胞术(图18D-图18E)和显微术(图18D-图18F)所测量的。

[0401] 接下来,测试了装载有其他小分子的NSNP是否可以在体内修饰(改变,modify)中性白细胞功能。发现体内施用的含有DPI的NSNP显著降低了PMA诱导的ROS产生(图18G)。

[0402] 为了检查含有SB-431542的PLGA纳米颗粒对中性白细胞中TGF β 信号传导的影响,通过将具有以下结构的KFP-SH四聚体偶联到含有SB431542的PEG修饰的PLGA纳米颗粒,而将含有SB431542的纳米颗粒用人肽KFP(KFPDLDSRRLPHMSL)包被(见方法)。

[0403] KFP-SH四聚体结构:



[0405] 然后根据以下处理组处理中性白细胞:

[0406] 1. 没有处理

[0407] 2. 与空(没有SB431542)的肽包被的纳米颗粒温育

[0408] 3. 与含有SB431542的肽包被的纳米颗粒温育

[0409] 4. 与不含肽的含SB431542的纳米颗粒温育

[0410] 5. 与不含肽的空的纳米颗粒温育

[0411] 温育后,彻底清洗五个处理组以去除任何未结合的纳米颗粒,然后在存在或不存在TGF β (10ng/ml)的情况下温育30min、1小时、2小时或4小时,以激活TGF β 信号传导通路。处理后,细胞在40 μ l裂解缓冲液中裂解,并且准备用于蛋白质印迹以检测总Smad2/3和phospho-Smad2。确定了抑制TGF β 信号传导所需的最佳时间点和纳米颗粒的量。

[0412] 实施例15 LQI-PLGA纳米颗粒的生物分布

[0413] 注意到静脉内(i.v.)施用后4小时,60-80%的循环中性白细胞携带NSNP,而少于

30%的循环中性白细胞携带裸的NP(图19A)。NSNP迅速从循环中清除,其中半衰期大约为4小时(图19A)。然后使用Typhoon TM分析了NSNP的生物分布,并且发现当使用未包被的NP时,脾脏积聚显著更高,而当使用LQI-四聚体修饰的NP时,NP在肺中的积聚显著更高(图19B)。引人注目的是,我们注意到尾部中的i.v.注射位点显示LQI-四聚体修饰的NP的积聚,但未包被的NP没有积聚(图19B)表明NSNP被循环中性白细胞摄取并且携带他们到炎症位点。为了进一步检验这种可能性,使用了DSS诱导的结肠炎小鼠模型,并且发现NSNP被循环中性白细胞摄取(图19C)并且在患有结肠炎的小鼠结肠内的炎性病灶中积聚,但在健康小鼠的结肠中则不积聚(图19D-图19E)。

[0414] 实施例16 LQI-PLGA纳米颗粒治疗COPD

[0415] 最后,测试了靶向ROS产生(DPI)和脱颗粒(Nexinhib-20)的NSNP是否可治疗地用于慢性阻塞性肺疾病(COPD)的小鼠模型中(图20A)。发现DPI-NSNP和在较小程度上Nexinhib-20-NSNP减少了整体支气管肺泡灌洗液(BALF)细胞结构,表明炎症状态降低(图20B)。DPI-NSNP减少了BALF中性白细胞和T细胞,但对巨噬细胞数量没有显著影响。另一方面,Nexinhib-20-NSNP不影响这些细胞群中的任一种(图20C-图20E)。COPD严重程度最重要的生理指标在呼吸量测定法中表达,当比较健康小鼠(Cout.)与用空NSNP处理的COPD小鼠时,观察到P/V比显著增加(图20F)。用Nexinhib-20-NSNP处理小鼠显著降低了COPD的生理严重程度,而DPI-NSNP具有显著但较小的效果(图20F)。观察到Nexinhib-20-NSNP的作用比DPI-NSNP的作用更强,并且这也反映在其他呼吸参数如FVC(图20G)和FEV_{0.05}/FVC(图20H)中,其中Nexinhib-20优于DPI。使用DPI和Nexinhib-20-NSNP治疗患有COPD的小鼠的强大有益效果在组织学上清晰可见。来自用DPI和Nexinhib-20治疗的小鼠的肺显示肺气肿显著减少(图20I-图20K)。

[0416] 实施例17人类中性白细胞对KFP-PLGA纳米颗粒的摄取

[0417] 5×10^6 个白细胞(WBC)或25 μ l全血从血液健康供体分离,并且在室温下与不同体积的KFP-PLGA NP(参见实施例14)在运动下温育。将不同量的纳米颗粒添加到细胞持续30min。30min后,清洗细胞并且用针对CD45、CD66b和CD177的抗体染色,以鉴别WBC和中性白细胞。通过流式细胞术分析,确定纳米颗粒阳性群体的百分比。确定给出靶向中性白细胞与非中性白细胞的佳比例的纳米颗粒的量。此外,温育的细胞用1.6%PFA固定,并且使用细胞离心涂片器(cytospin)转移到显微镜载玻片。细胞用含DAPI的封固介质覆盖,并且使用共聚焦显微镜成像。

[0418] 分析了几个健康捐献者的血液中CD177的表达和纳米颗粒摄取的程度,之前确定了校准的纳米颗粒量。

[0419] 实施例18KFP-PLGA纳米颗粒对中性白细胞存活和功能的影响

[0420] 为了评估将人类中性白细胞暴露于KFP修饰的纳米颗粒的功能性结果(参见实施例13),通过密度梯度离心从几个健康供体的血液中纯化人中性白细胞。然后评估对中性白细胞存活、迁移、吞噬活性、活化和ROS产生的影响。在这些测定中,比较了以下处理组:

[0421] 1. 没有处理

[0422] 2. 与空的(没有SB431542)的肽包被的纳米颗粒温育

[0423] 3. 与含有SB431542的肽包被的纳米颗粒温育

[0424] 4. 与不含肽的含SB431542的纳米颗粒温育

[0425] 5. 与不含肽的空的纳米颗粒温育

[0426] 为了研究细胞内PLGA降解的影响,至少在两个不同的时间点——与纳米颗粒温育后1小时和4小时——进行了以下功能测定。

[0427] 存活

[0428] 五个处理组的中性白细胞在OptiMEM 0.5% FCS中温育2或6小时。然后根据台盼蓝染料排斥法计数活的中性白细胞。

[0429] 此外,还对Annexin V+(凋亡)和PI+(正在死亡/死亡的)中性白细胞进行FACS分析。分析了不同的温育时间(1小时、2小时、4小时、6小时)。

[0430] 迁移

[0431] 为了测试不同纳米颗粒对中性白细胞迁移的影响,测试了在博伊登室中的影响。将与纳米颗粒一起温育(1小时、4小时)的中性白细胞添加到transwell的上隔间,而已知的化学吸引剂(趋化剂,chemoattractant)CXCL2,放置在下腔室中。一小时后通过每孔拍摄五张照片并且对迁移的细胞进行计数来量化中性白细胞的迁移。

[0432] 吞噬作用

[0433] 根据制造商的说明,使用吞噬作用测定试剂盒(Phagocytosis Assay Kit(Cayman Chemical))测定中性白细胞吞噬活性。简而言之,将不同处理组的中性白细胞在添加有FITC标记的珠子的吞噬作用缓冲液中稀释,并且在37°C下温育2小时。使用FACS分析确定吞噬作用的程度。

[0434] 中性白细胞活化

[0435] 整合素CD11b的表达是中性白细胞活化的代表。在与纳米颗粒温育1、2、4和6小时后,分析五个中性白细胞处理组的CD11b表面表达。

[0436] ROS生产

[0437] 使用基于鲁米诺的测定法,在2个时间点(1小时、4小时)确定五个处理组中ROS产生的程度。每个处理组都在其静息状态下和在用佛波醇12-肉豆蔻酸酯13-乙酸酯(PMA)——其为刺激活性氧种类(ROS)产生的充分描述的分子——刺激时进行分析。

[0438] 实施例19鉴定CD177作为中性白细胞结合肽的肽结合配偶体(伴侣,partner)

[0439] 配体的下拉(Pulldown)

[0440] 接下来,确定了LQI肽在中性白细胞表面的结合配偶体。生物素化的LQI-四聚体与链霉抗生物素-琼脂糖珠结合,并与中性白细胞裂解物一起温育3小时。清洗后,通过将珠子在含有 β -巯基乙醇的蛋白质样品缓冲液中在95°C下温育10分钟来洗脱结合的蛋白质。使用银染法对凝胶进行染色。切下肽珠和对照珠的洗脱液泳道并通过质谱法进行分析。

[0441] 配体鉴定

[0442] 如图21A所示,使用生物素化的LQI-四聚体,在中性白细胞裂解物中鉴定了几种潜在的肽结合配体。分子量为87kDa的中性白细胞特异性表面蛋白CD177被确定为最重要的肽结合配体(图21B),结果肽/对照比例为7.89,如图21A中95kD条带的肽下拉富集所示。流式细胞术显示>99%的Ly6G+循环鼠中性白细胞也是CD177+,而Ly6G-细胞是CD177-(图21C)。重要的是,所有循环的CD177+细胞(中性白细胞)都结合16-LQI(图21D)。LQI肽仅与异位表达鼠CD177的HEK293T细胞结合这一事实证实了CD177是LQI肽结合所必需并且对于LQI肽结合是足够的(图21E)。最后,使用STORM发现CD177和16-LQI信号在>90%的簇中重叠,表明这

些分子处于非常紧密的相互作用(图21F-图21G)。

[0443] 类似地,人CD177被鉴定为结合至人中性白细胞的肽的结合配偶体(SEQ ID NOs: 1-8)。在下拉实验中使用KFP-四聚体作为诱饵,然后进行质谱分析,CD177被确定为16-KFP的结合配偶体。实际上,观察到CD177表达与KFP-四聚体结合至健康供体、COPD患者和肺癌患者的中性白细胞之间的强烈正相关(图22A-图22B)。有趣的是,发现了其中仅低百分比的中性白细胞被中性白细胞特异性噬菌体结合的单个健康供体(见图13I中的条形底部的空灰色圆圈)。该受试者被发现实际上是CD177亚效等位基因(约占人口的5%) (图22A)。尽管如此,KFP-四聚体结合的程度和CD177水平很好地符合相关图,并且支持CD177在介导KFP-四聚体与中性白细胞结合中的作用(图22B)。进一步证实CD177在此过程中的作用,证明增加浓度的人CD177抗体与结合或16-KFP有效地竞争(图22C)。有趣的是,尽管小鼠和人类CD177蛋白的分子量不同(分别为105kDa和54kDa)并且16-LQI和16-KFP不交叉结合(参见图2D, 16-Cont.),但是小鼠和人类CD177蛋白充当中性白细胞特异性肽的结合配偶体。

[0444] 如图24所示,添加游离DPI完全阻止了ROS产生(与单独的PMA相比)。用空的纳米颗粒处理对ROS的产生没有明显影响。相反,用含有DPI的纳米颗粒(NP+DPI)处理中性白细胞完全阻断了ROS产生。使用青藤碱和银杏作为有效载荷获得了类似的观察结果。

<212> PRT
 <213> 人工的
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 4
 Ser Ser Leu Met Thr Thr Gln Leu Ile Ala Thr Ser Ile
 1 5 10
 <210> 5
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人工的
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 5
 Pro Glu Leu Asp Ser Lys Pro Tyr Phe Pro Pro Leu
 1 5 10
 <210> 6
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人工的
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 6
 Glu Leu Val Thr Ala Ser Met Pro Arg Pro Asn Asn
 1 5 10
 <210> 7
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人工的
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 7
 Ser Leu Glu Ser Ser Pro Met Ala Gln Leu Pro Gln
 1 5 10
 <210> 8
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人工的
 <220>

<223> 合成的
 <400> 8
 Ser Glu Leu Arg Ser Thr Pro Leu Leu Val Pro Ser
 1 5 10
 <210> 9
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工的
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 9
 Leu Gln Ile Gln Ser Trp Ser Ser Ser Pro
 1 5 10
 <210> 10
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工的
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 10
 Ser Thr Met Thr Ile Leu Gly Thr Gly Ser
 1 5 10
 <210> 11
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人工的
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 11
 Thr Glu Thr Ser Leu Arg Ile Val Ser Thr Asn Pro
 1 5 10
 <210> 12
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人工的
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 12
 Leu Ser Ile Val Ser Gly Ser Ala Leu Asn His Leu

1
<210> 17
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工的
<220>
<223> 合成的
<400> 17
Gly Gly Gly Ser
1
<210> 18
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工的
<220>
<223> 合成的
<400> 18
Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

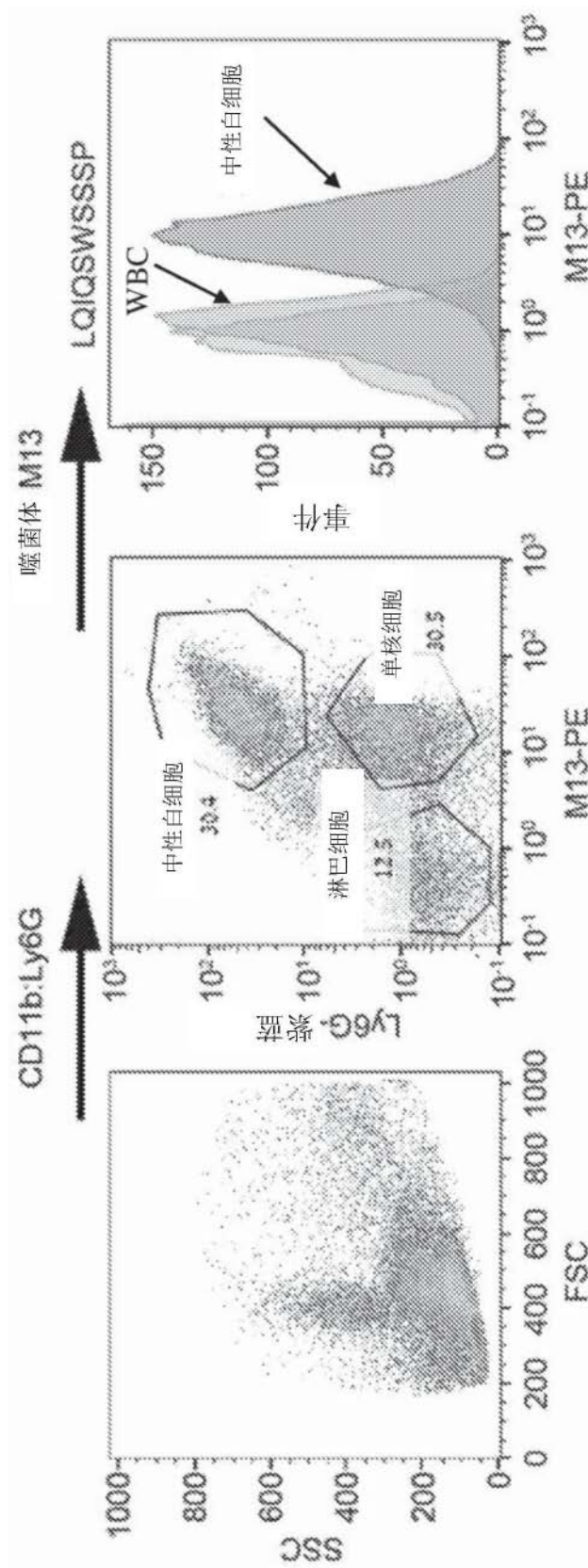


图1A

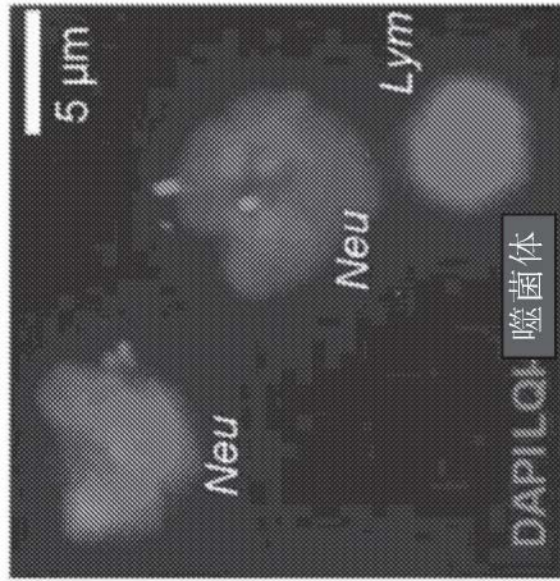


图1B

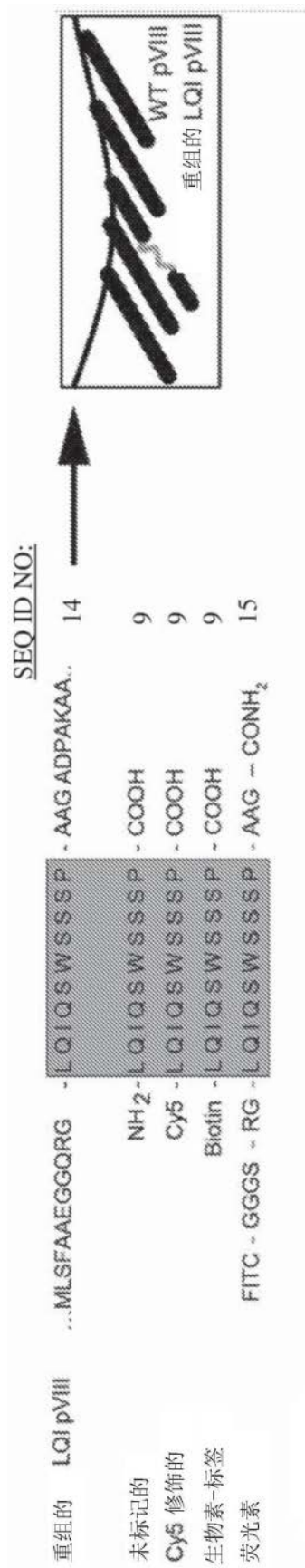


图1C

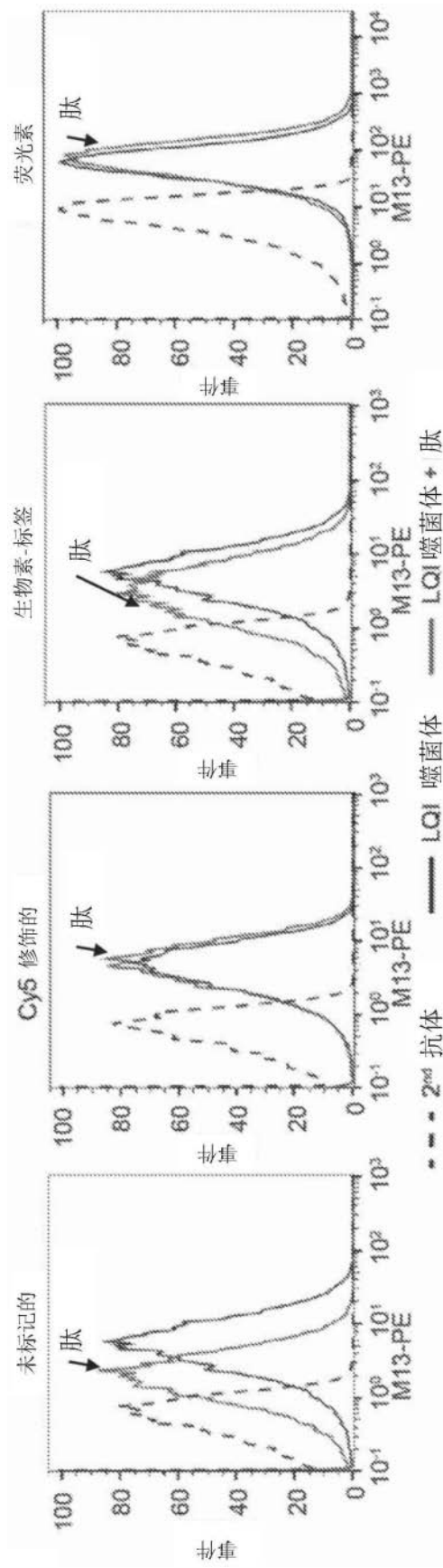


图1D

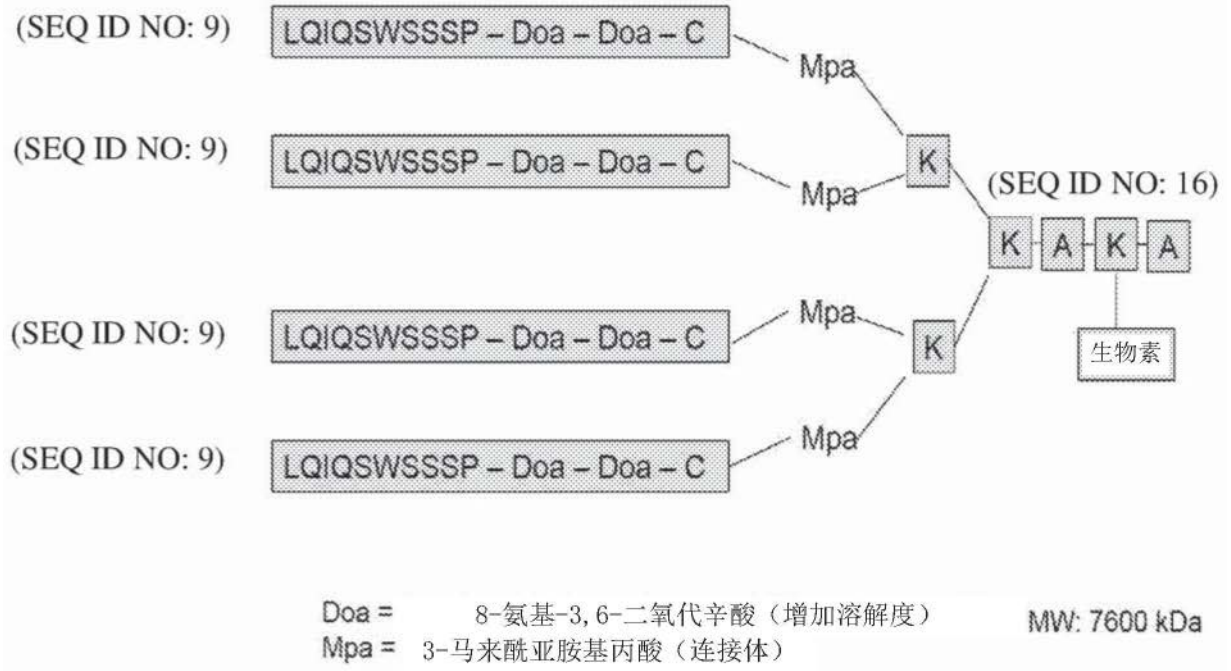


图2A

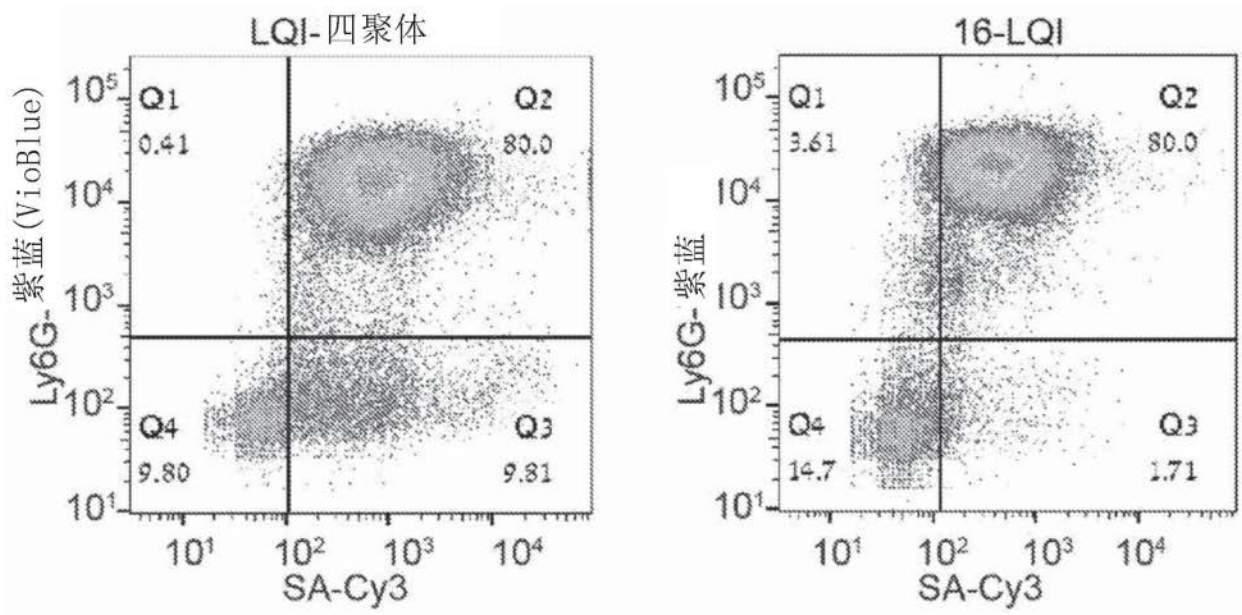


图2B

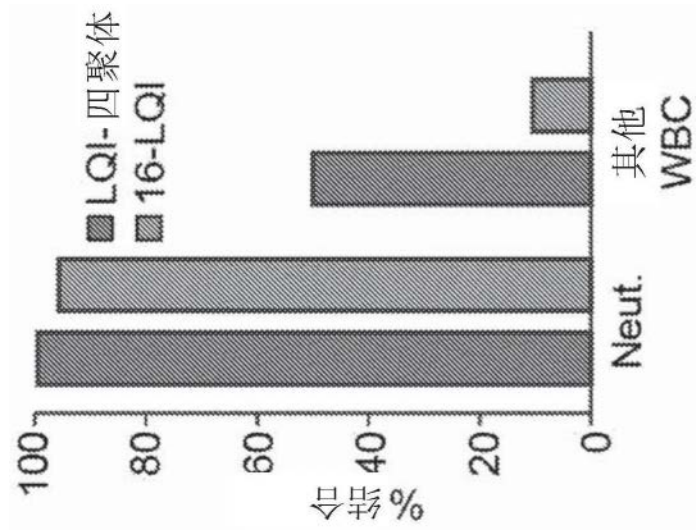


图2C

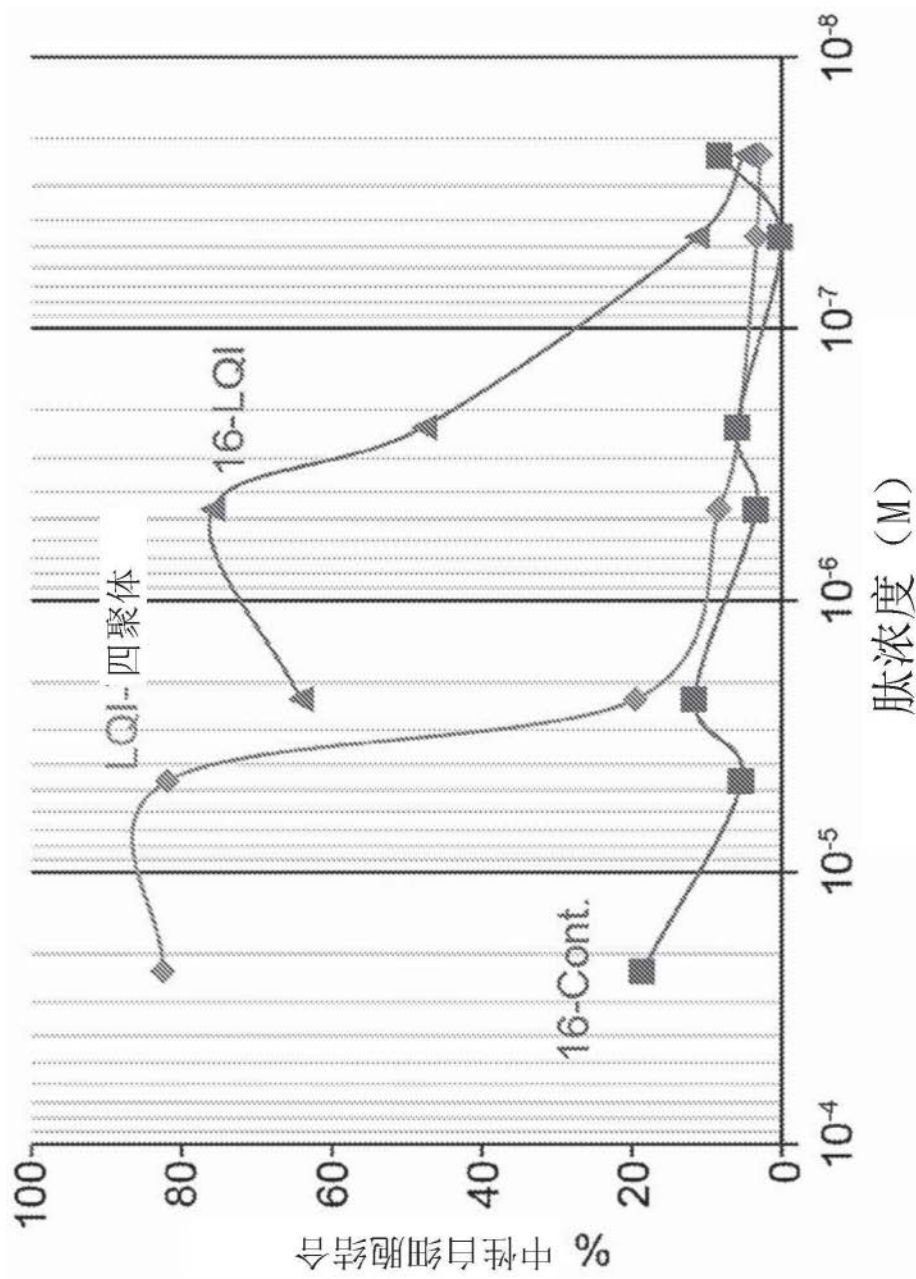


图2D

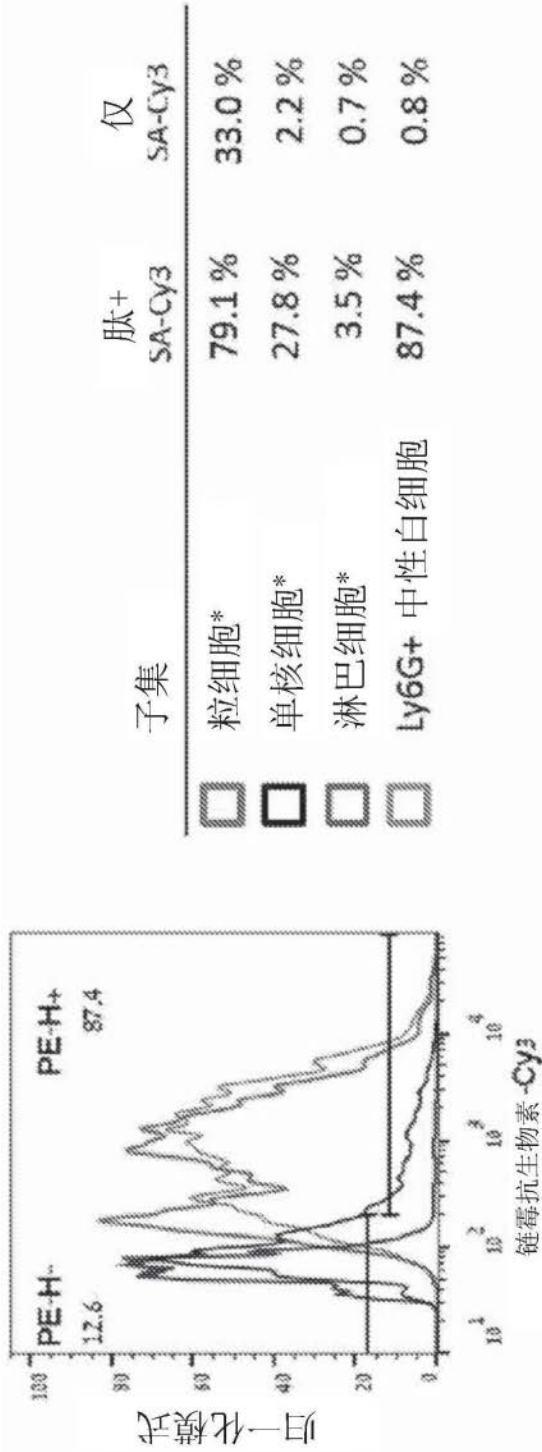


图2E

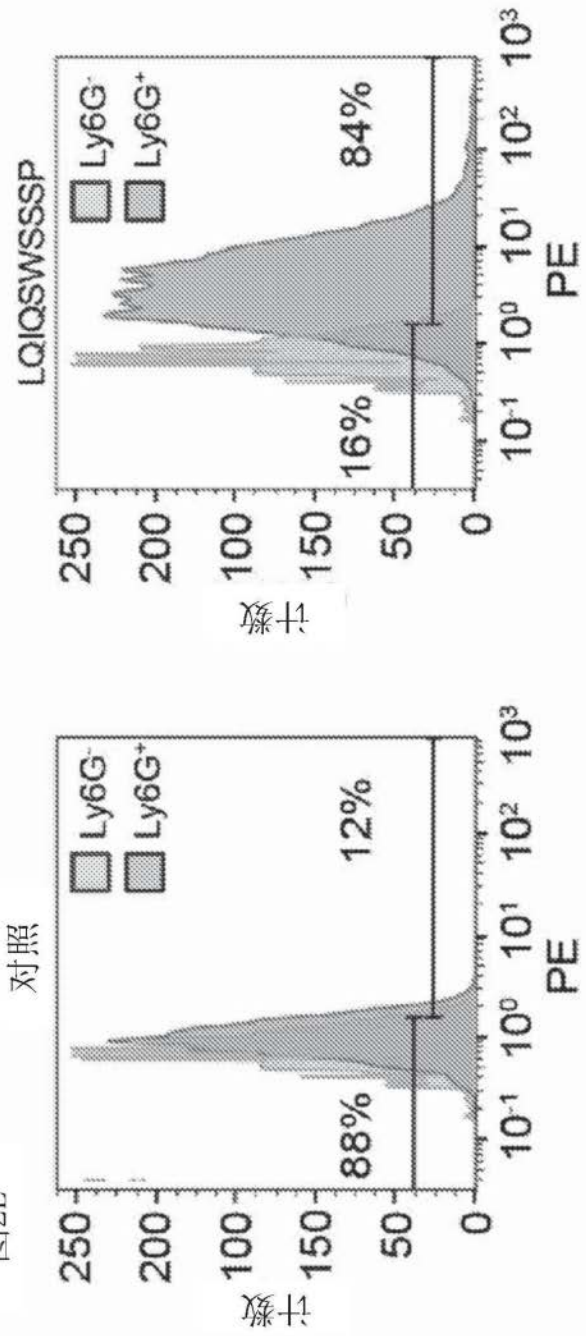


图2F

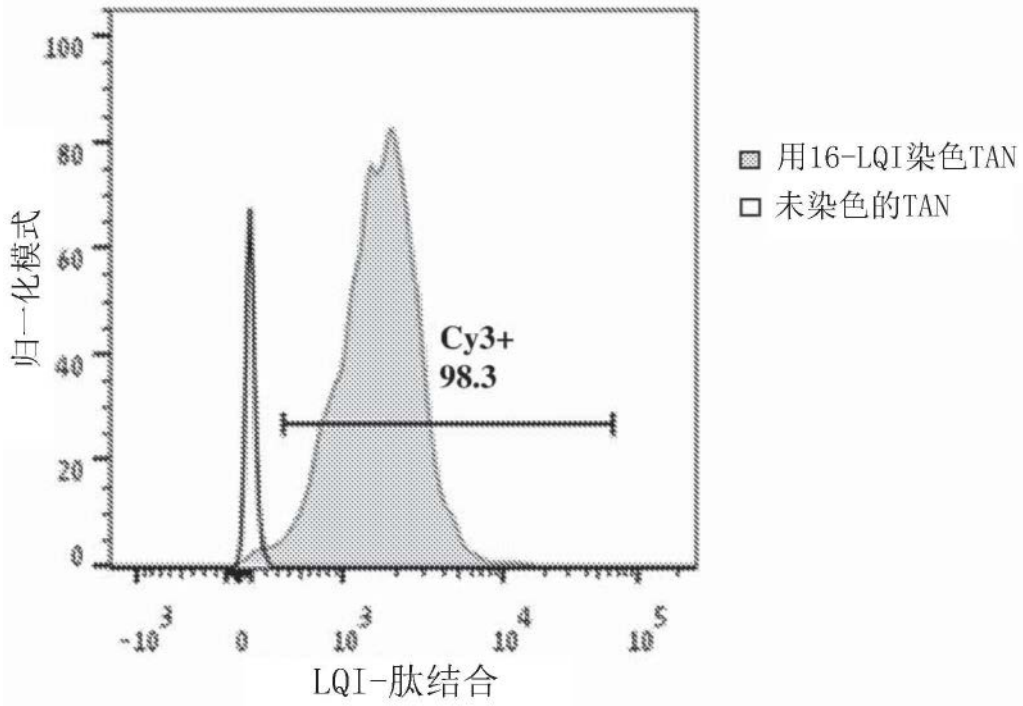


图2G

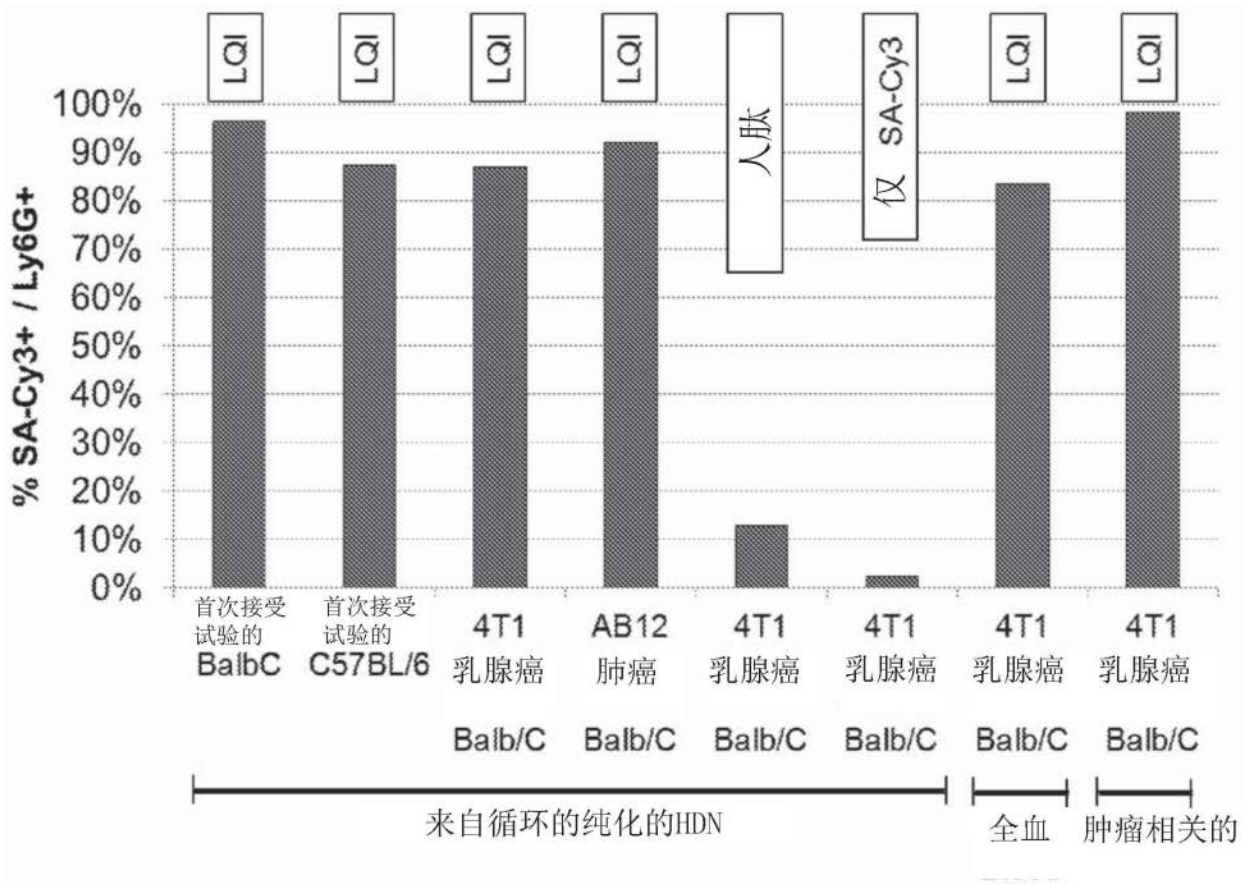


图2H

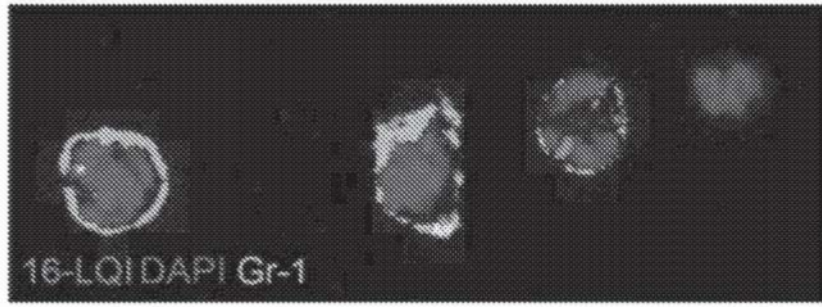


图2I

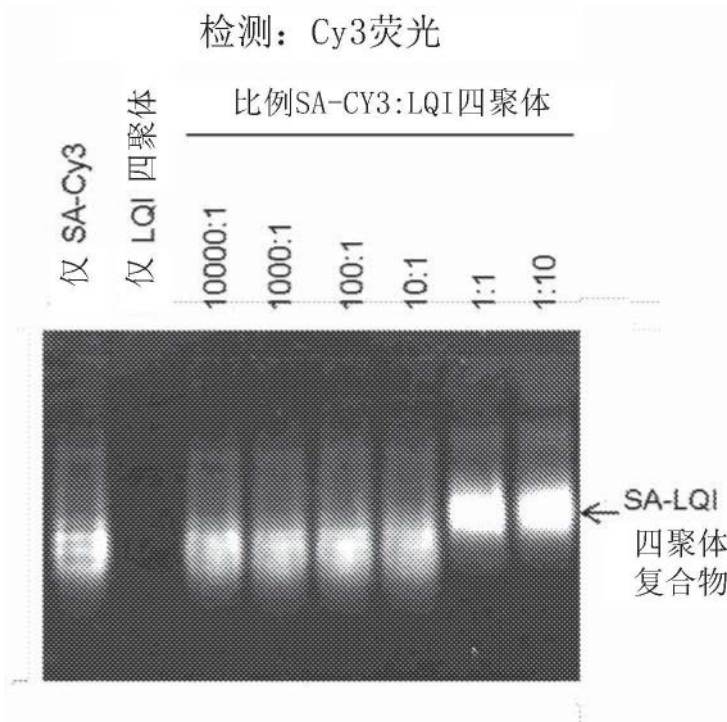


图3

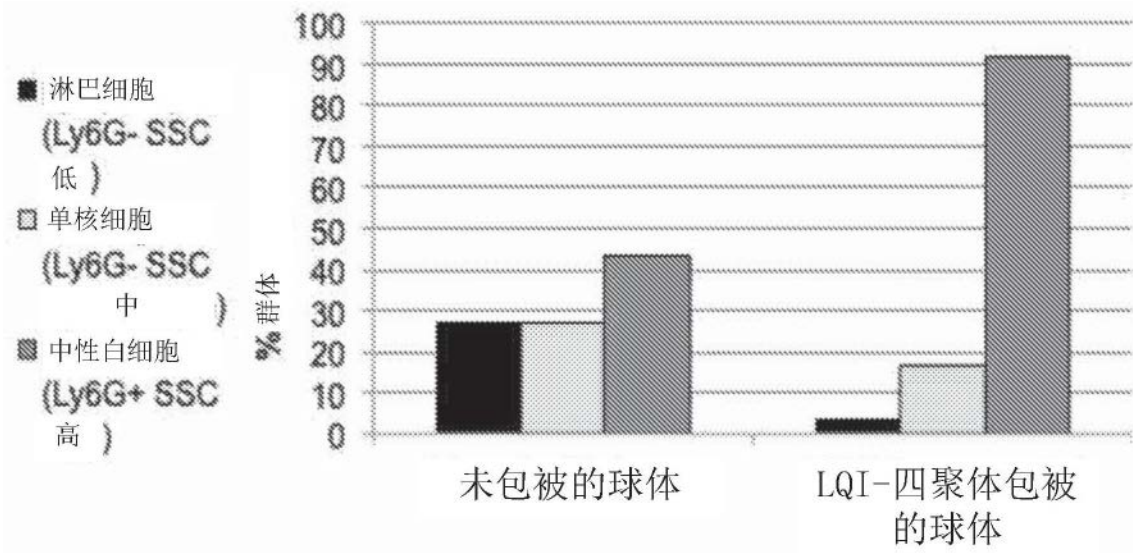


图4

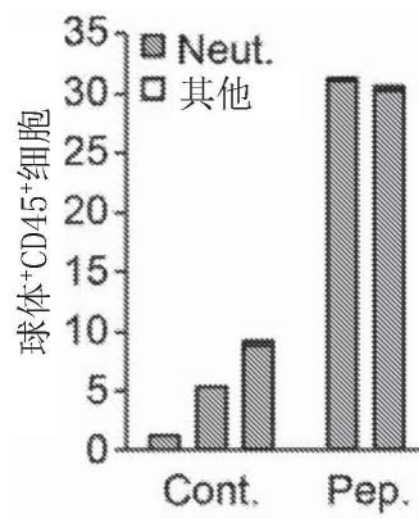


图5A

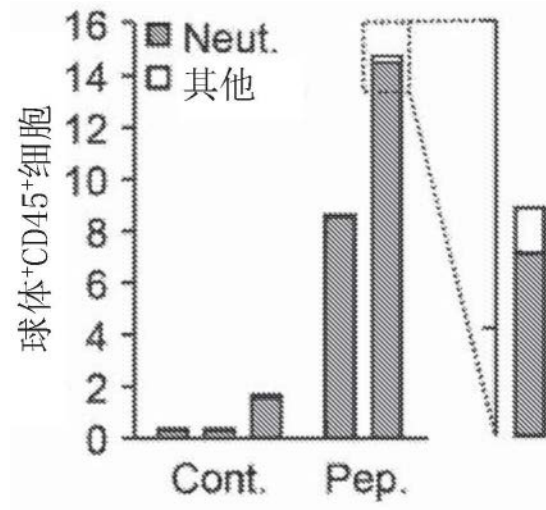


图5B

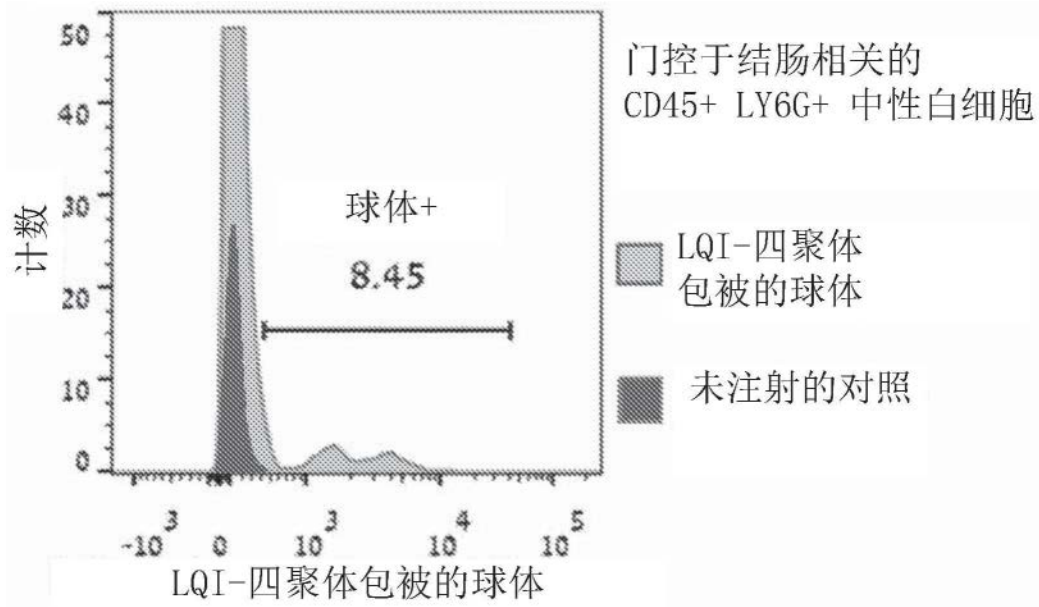


图6A

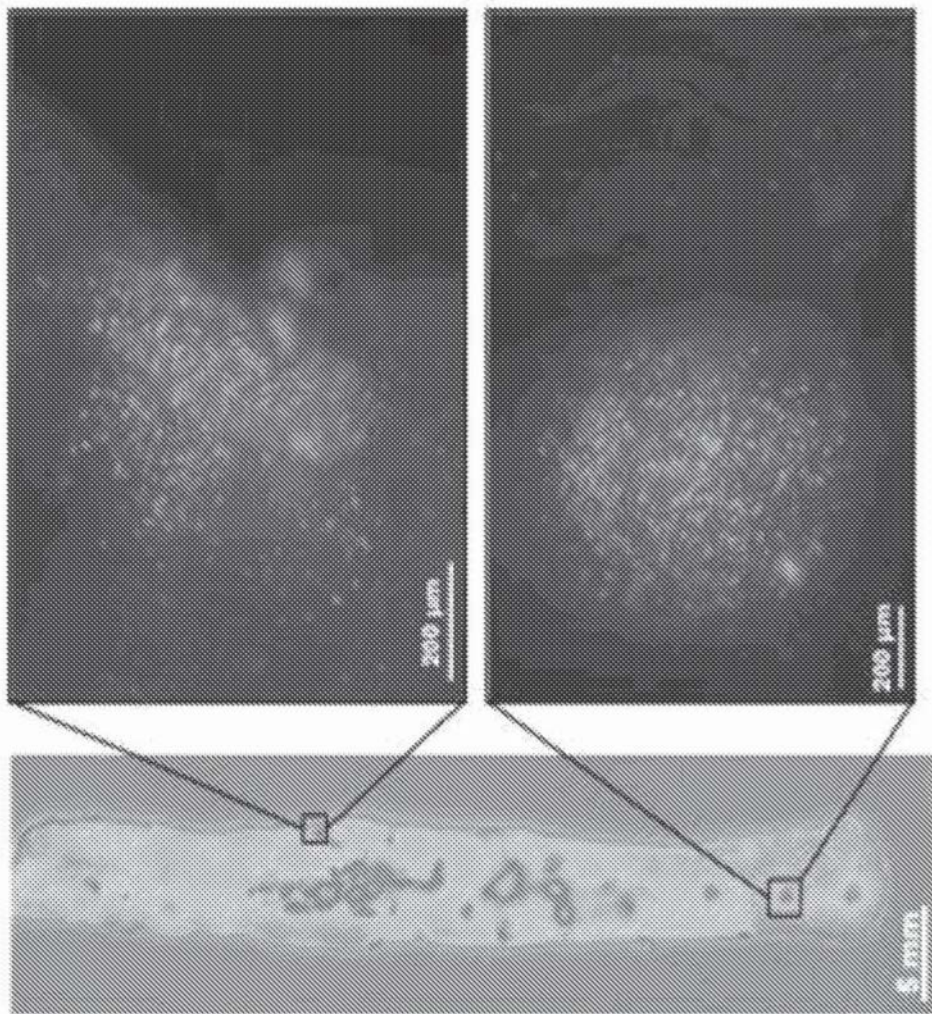


图6B

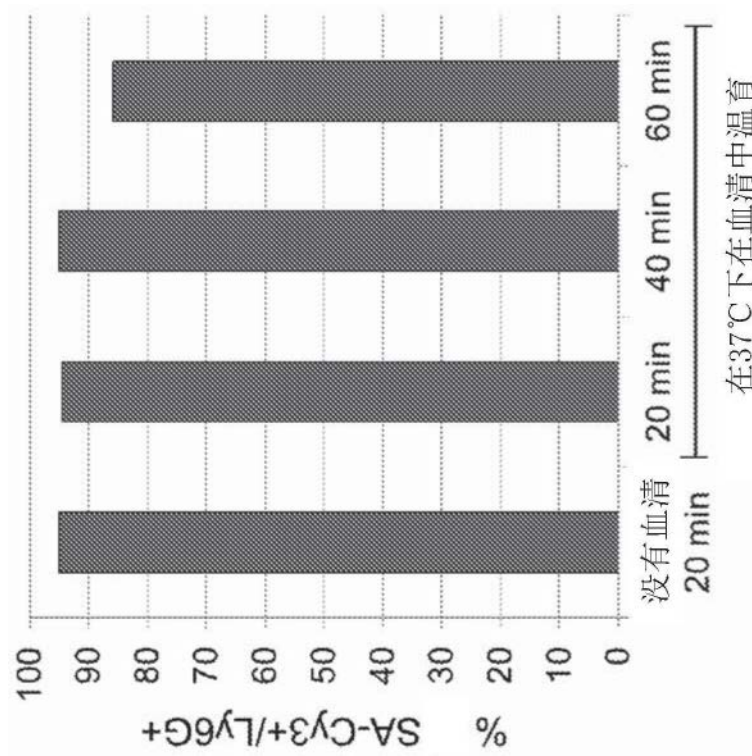


图7

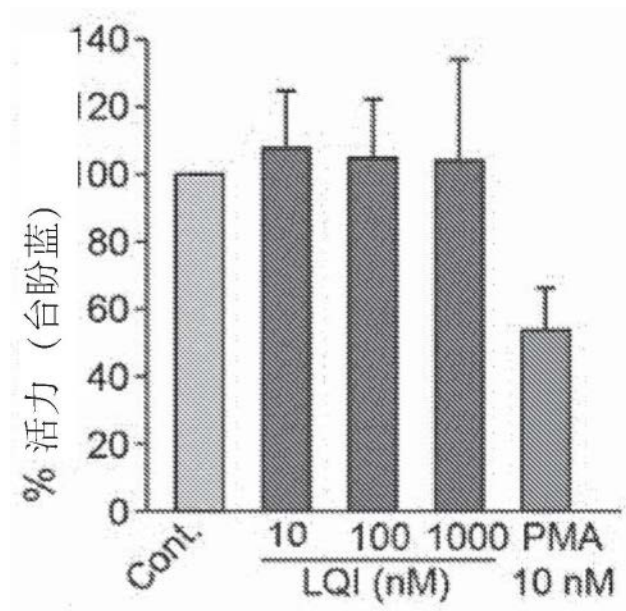


图8A

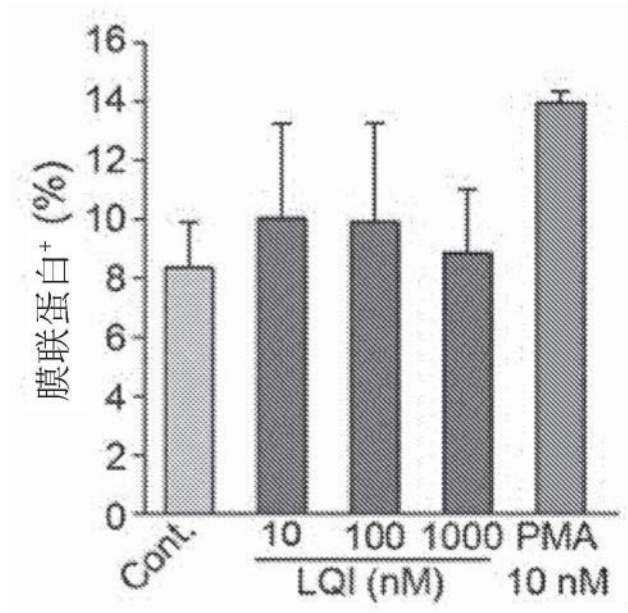


图8B

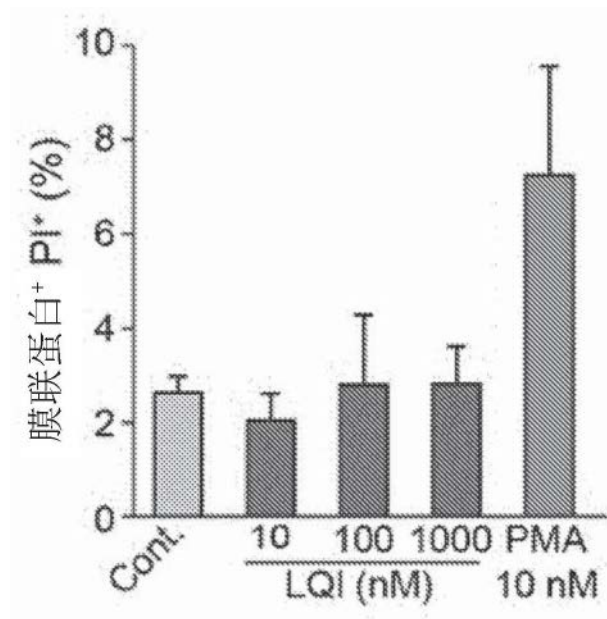


图8C

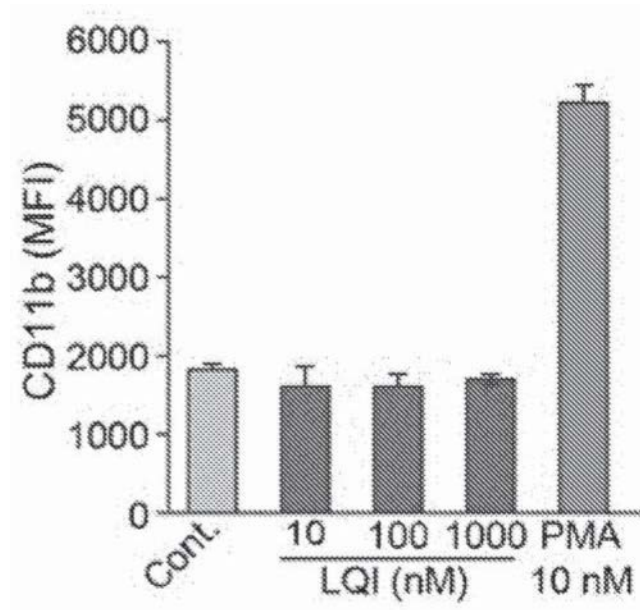


图8D

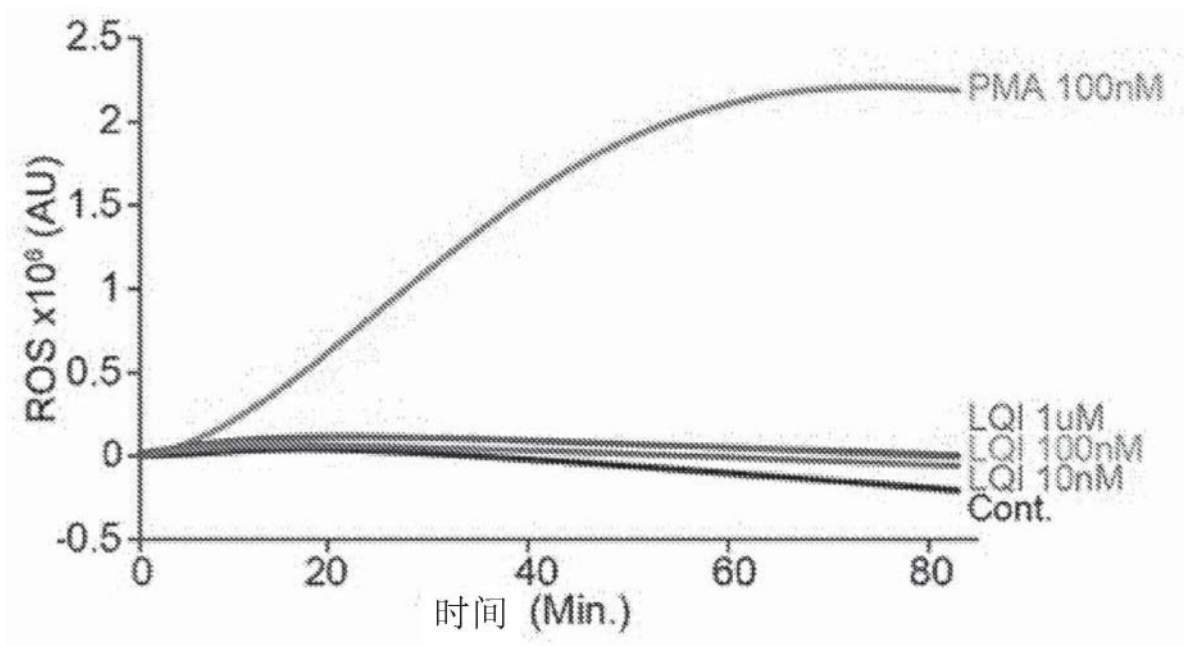


图8E

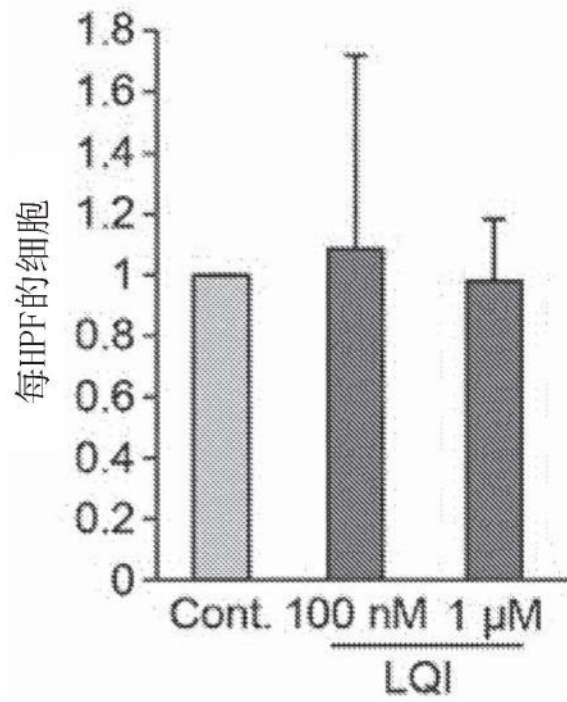


图8F

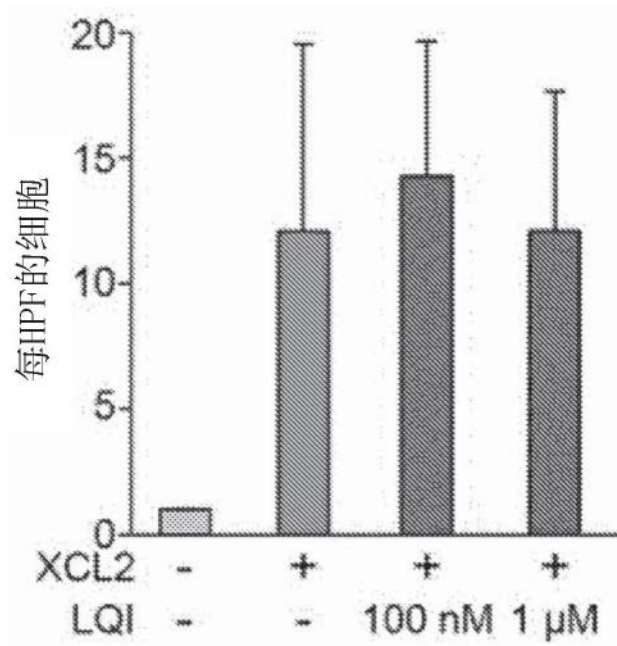


图8G

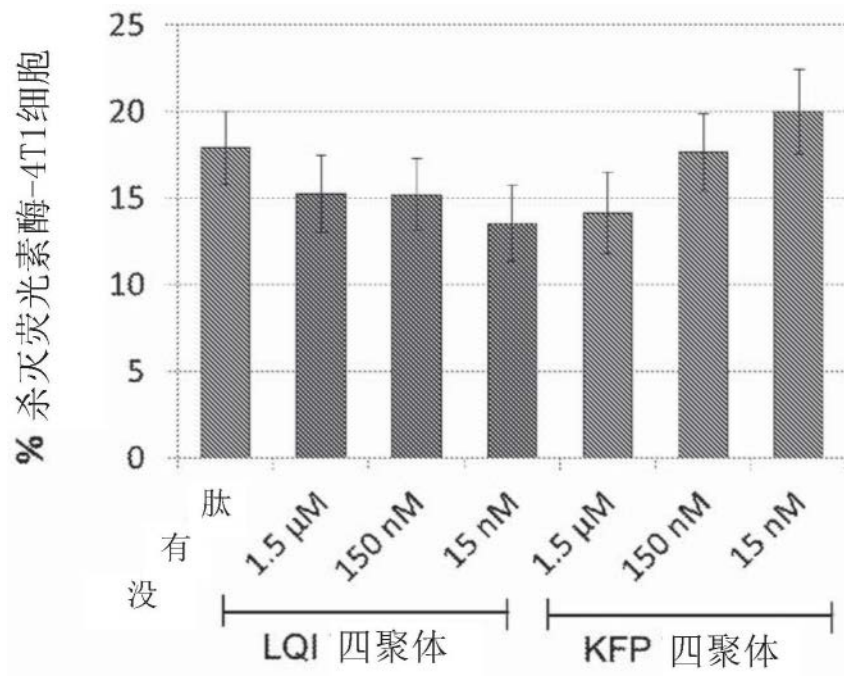


图9

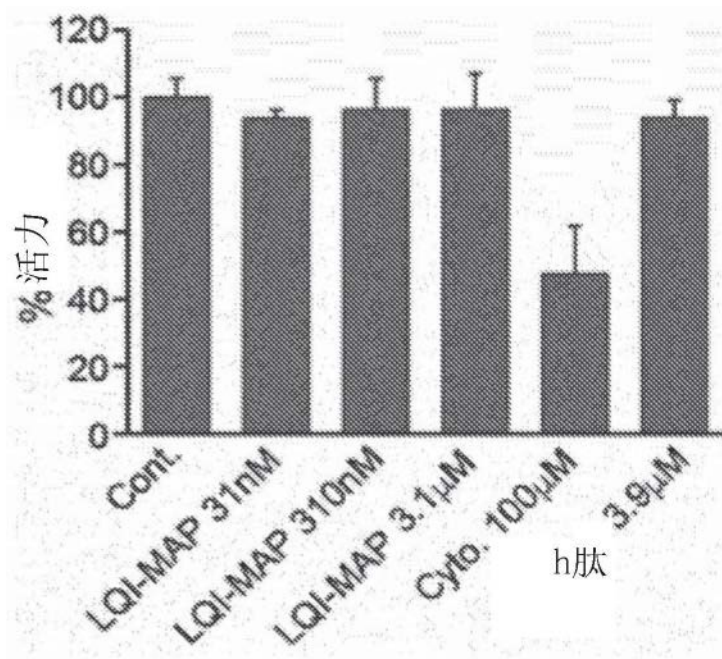


图10

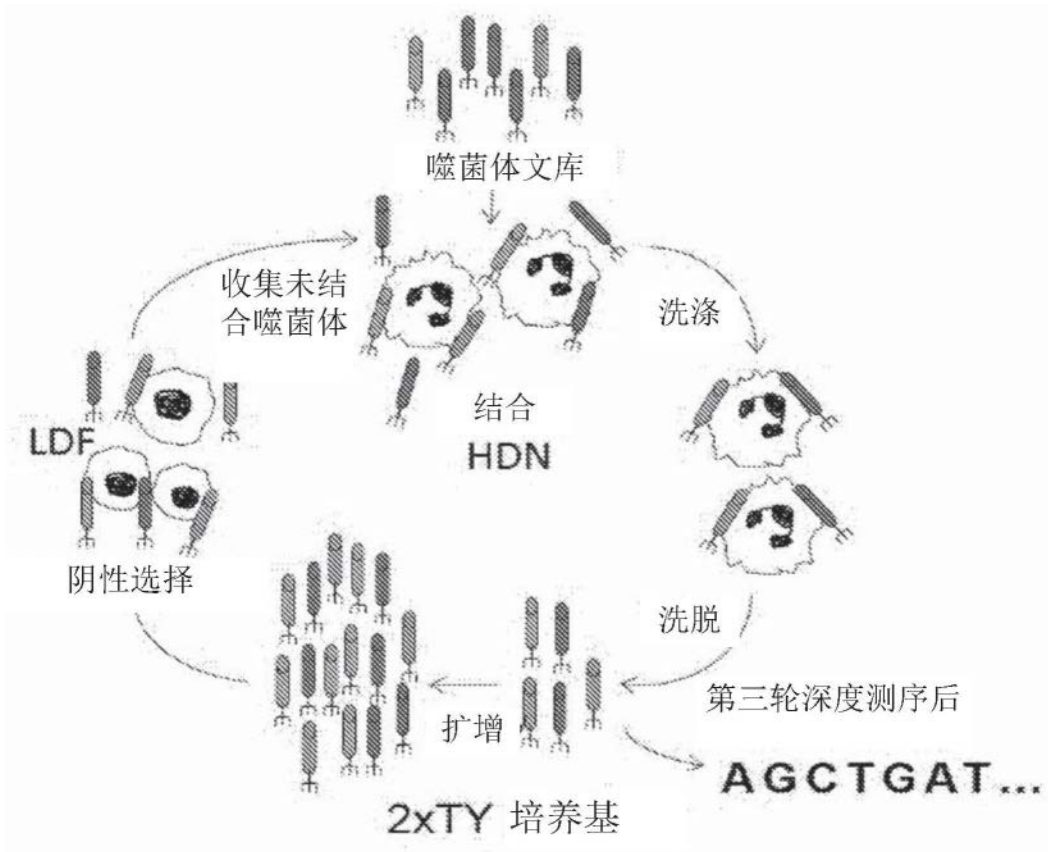


图11

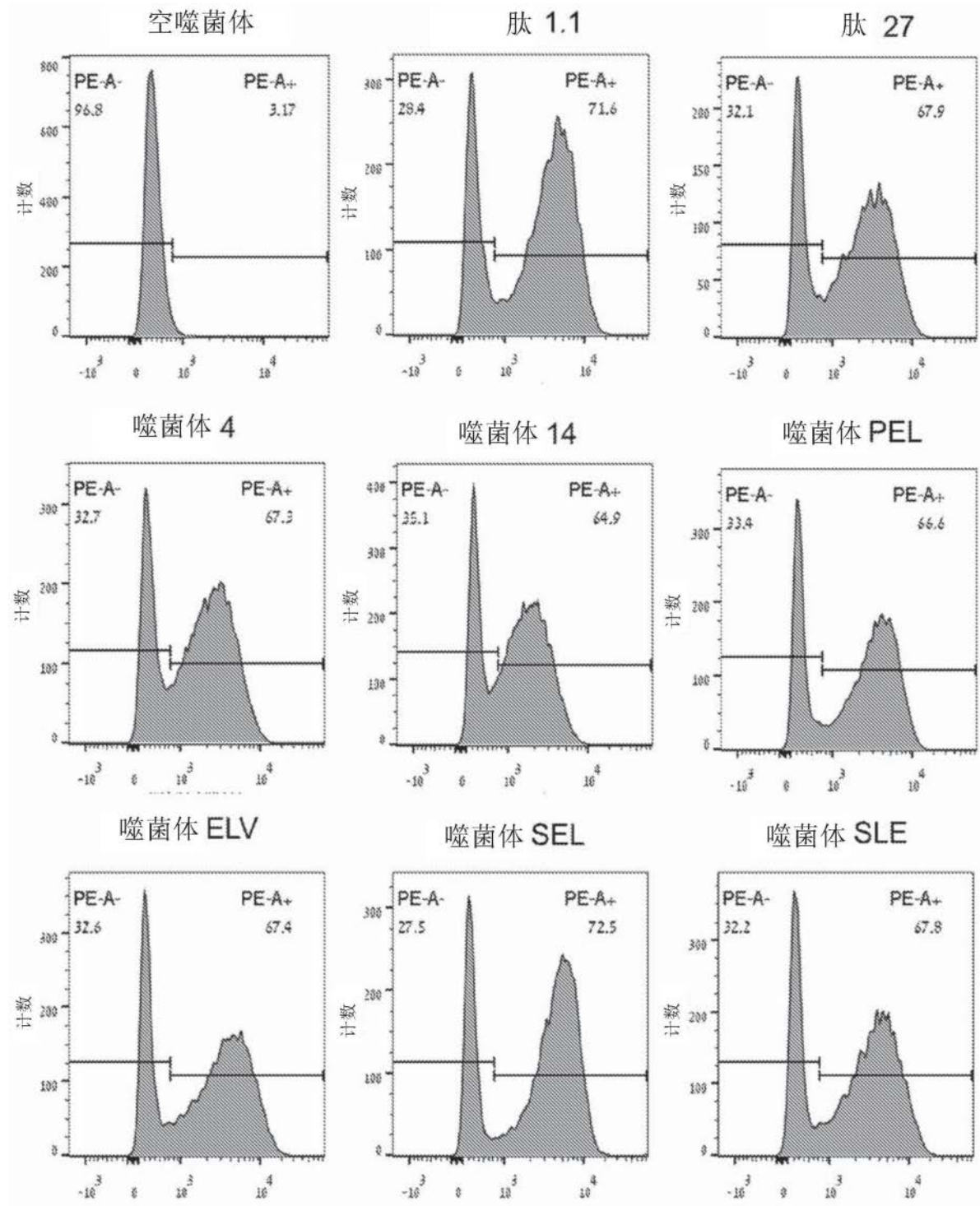


图12

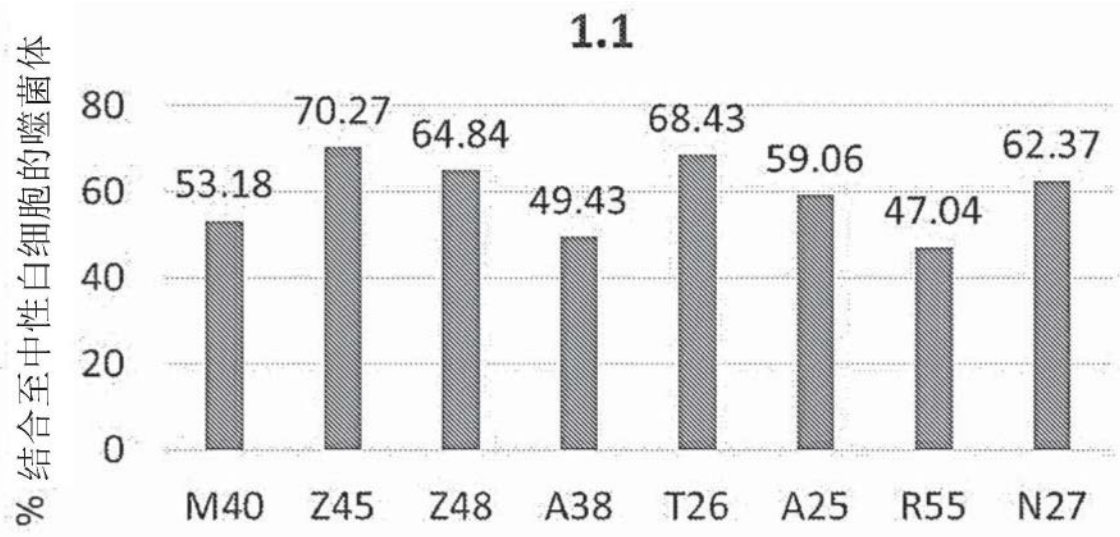


图13A

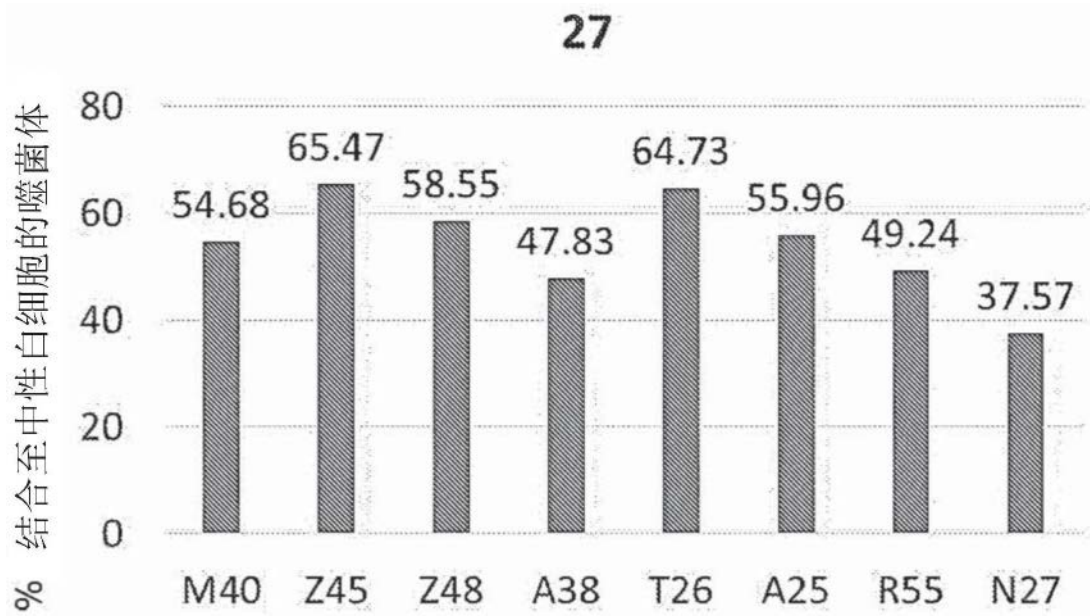


图13B

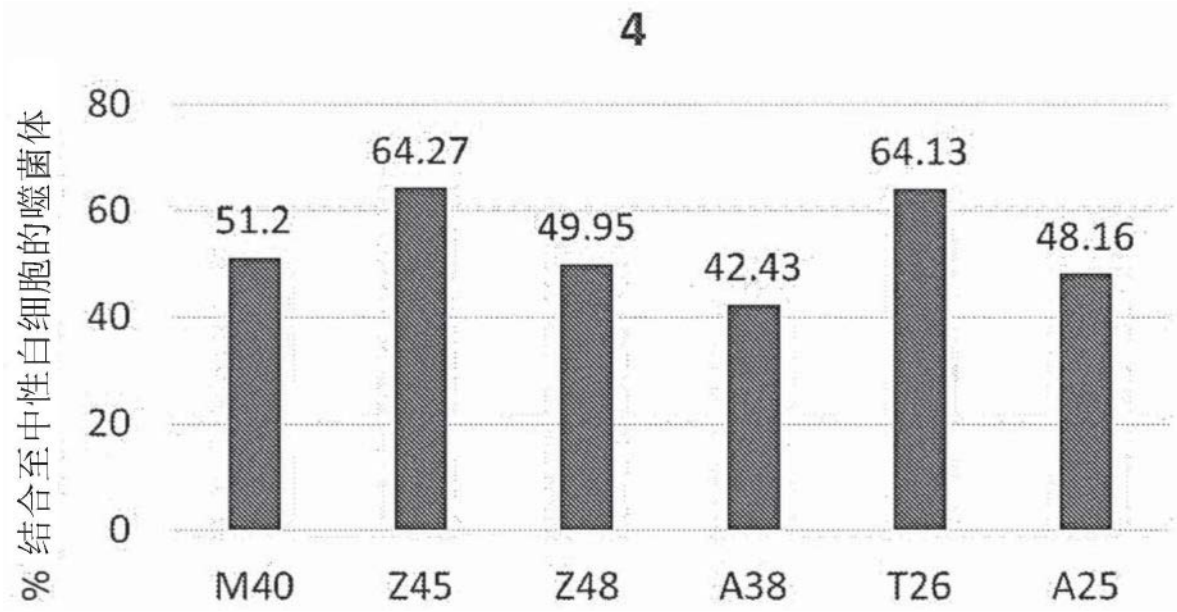


图13C

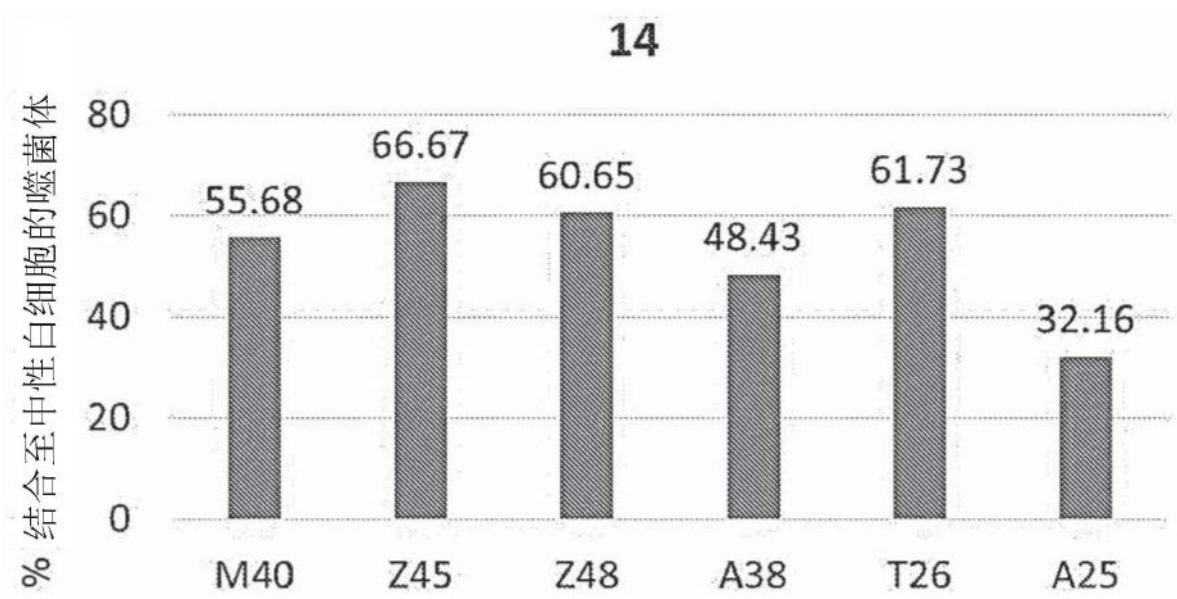


图13D

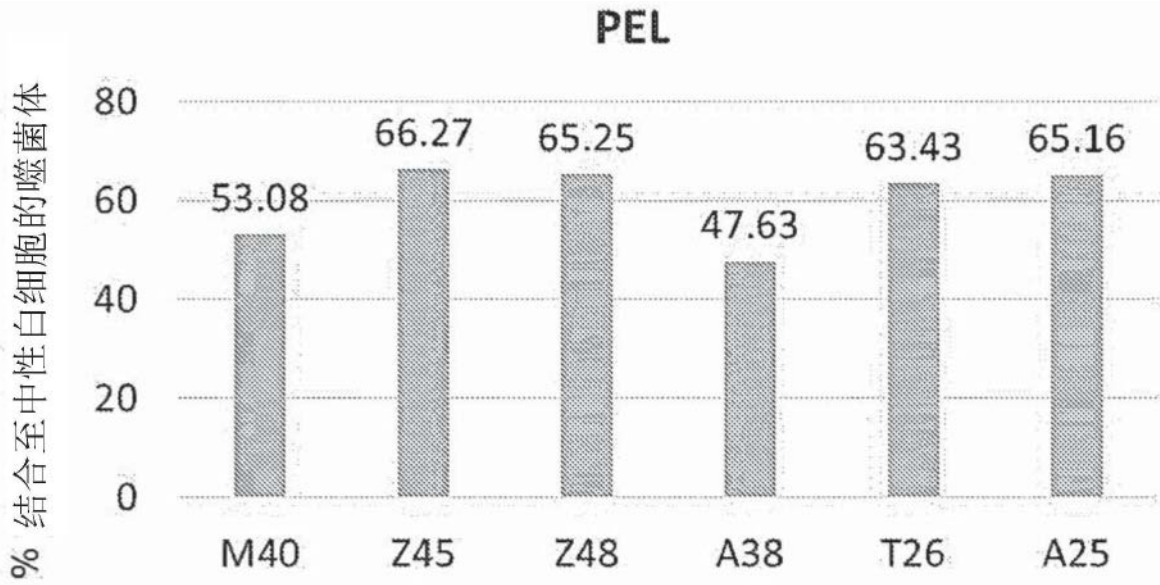


图13E

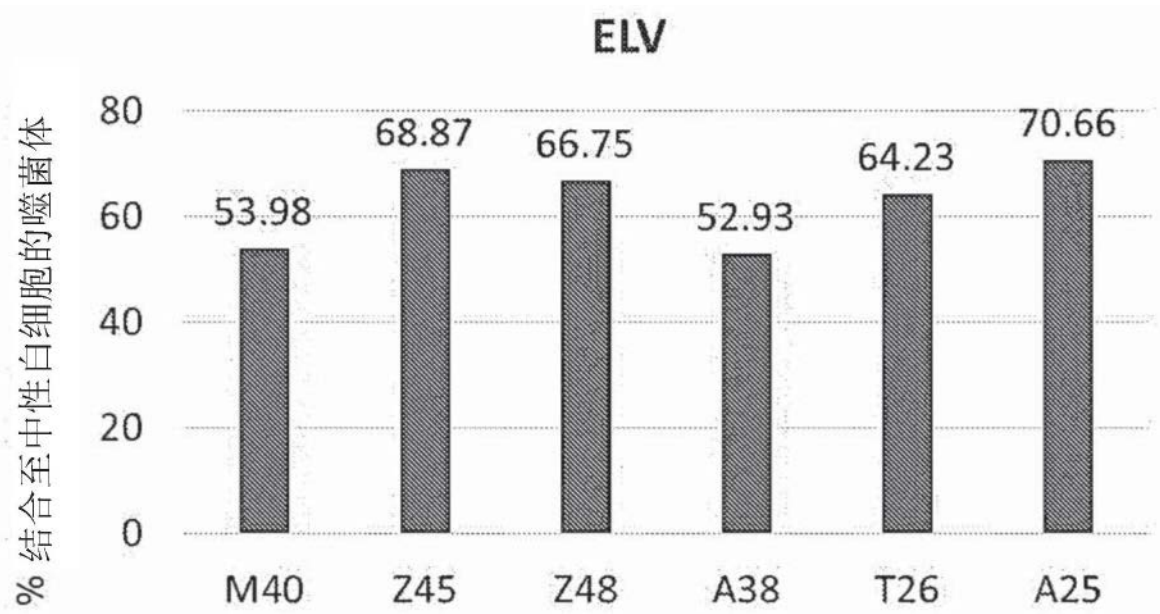


图13F

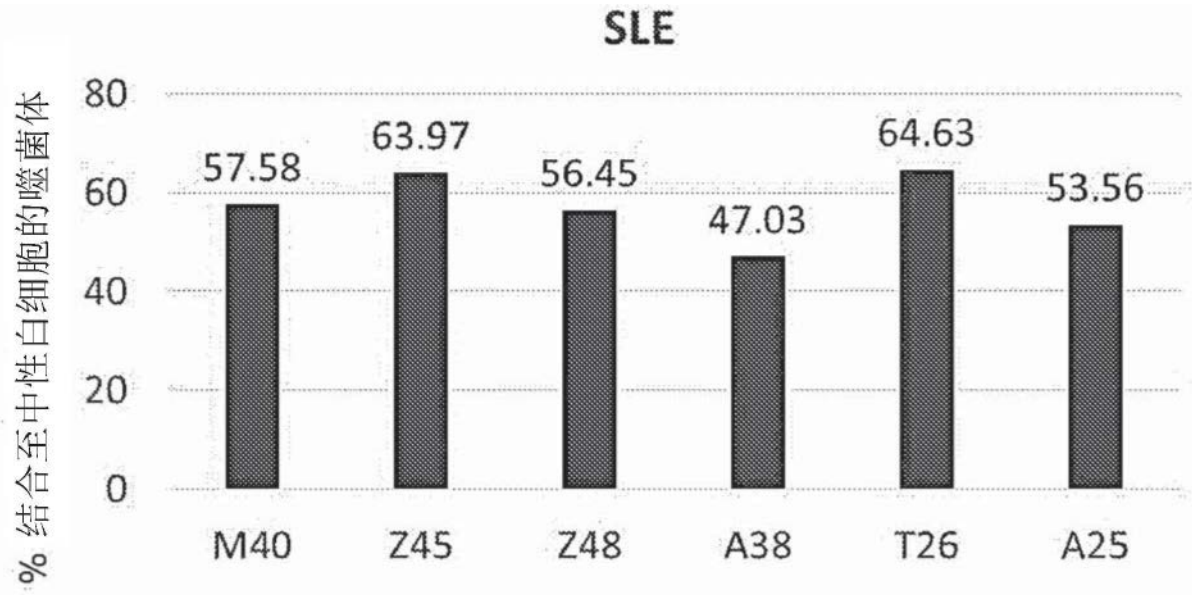


图13G

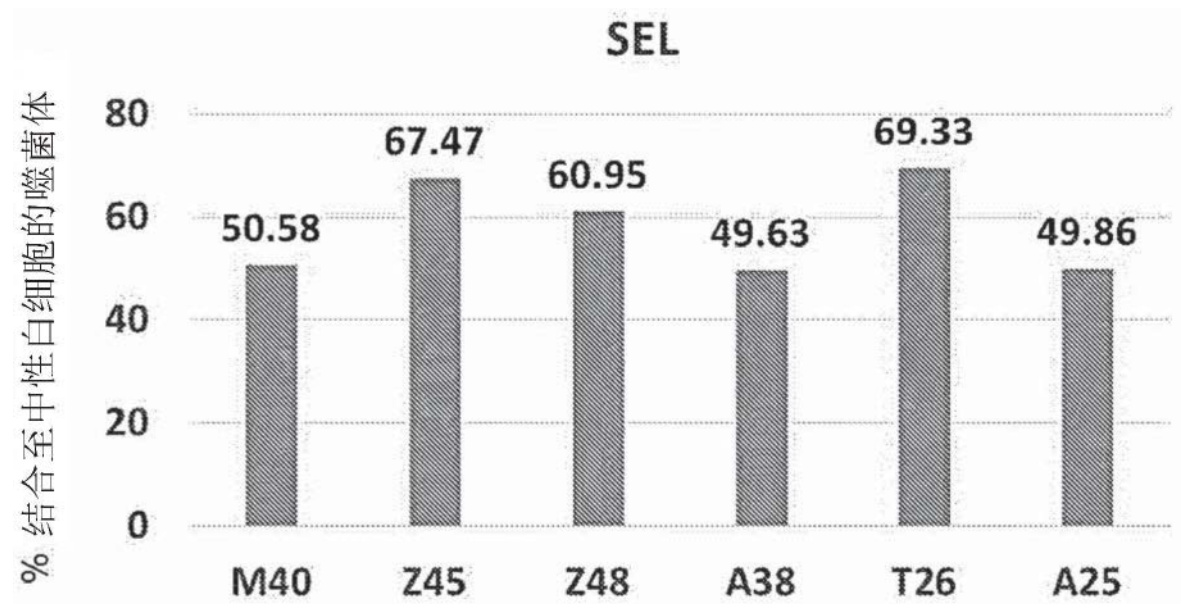


图13H

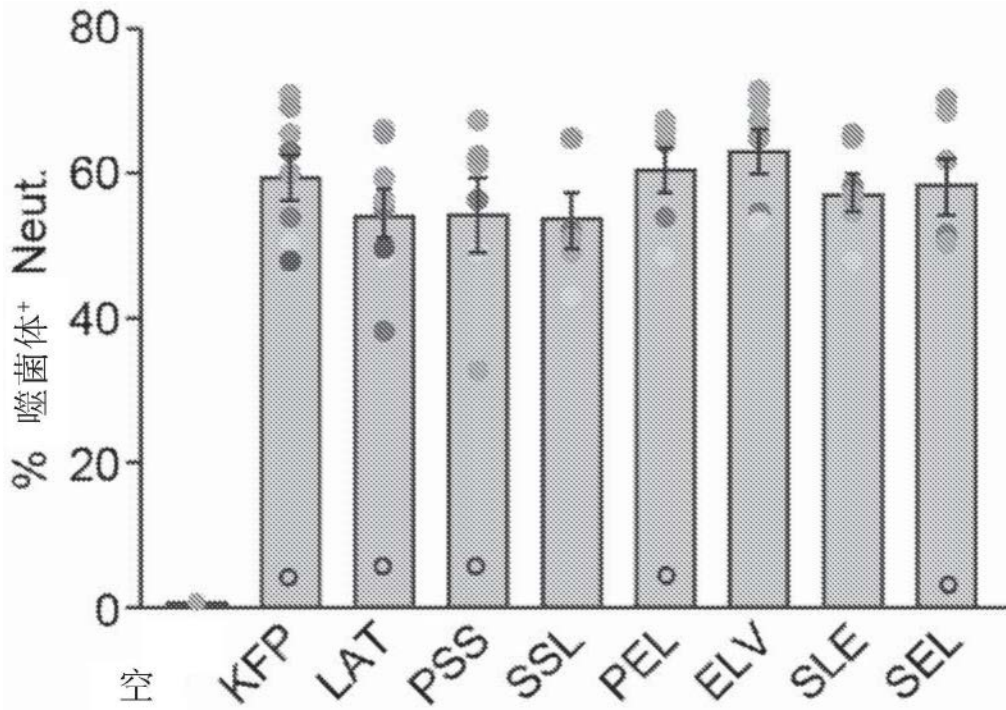


图13I

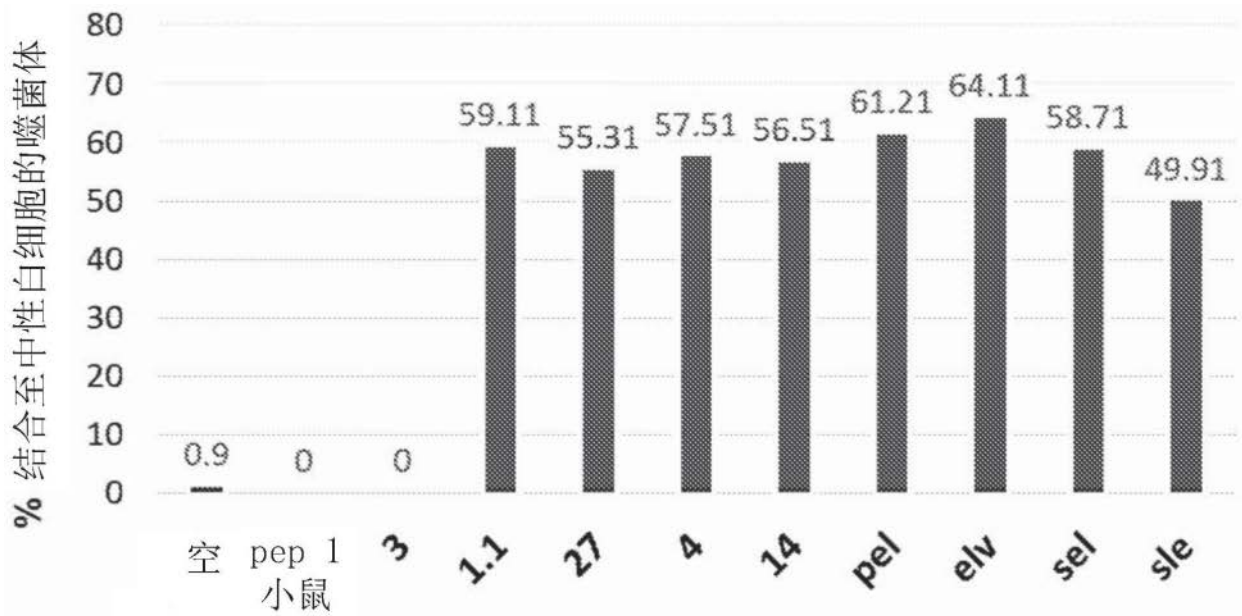


图14

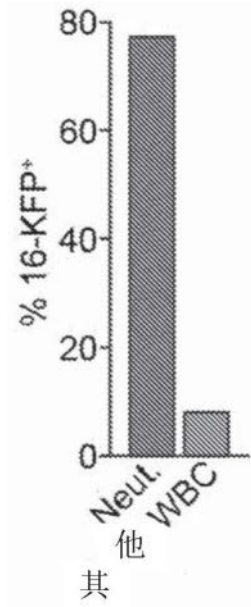


图15A

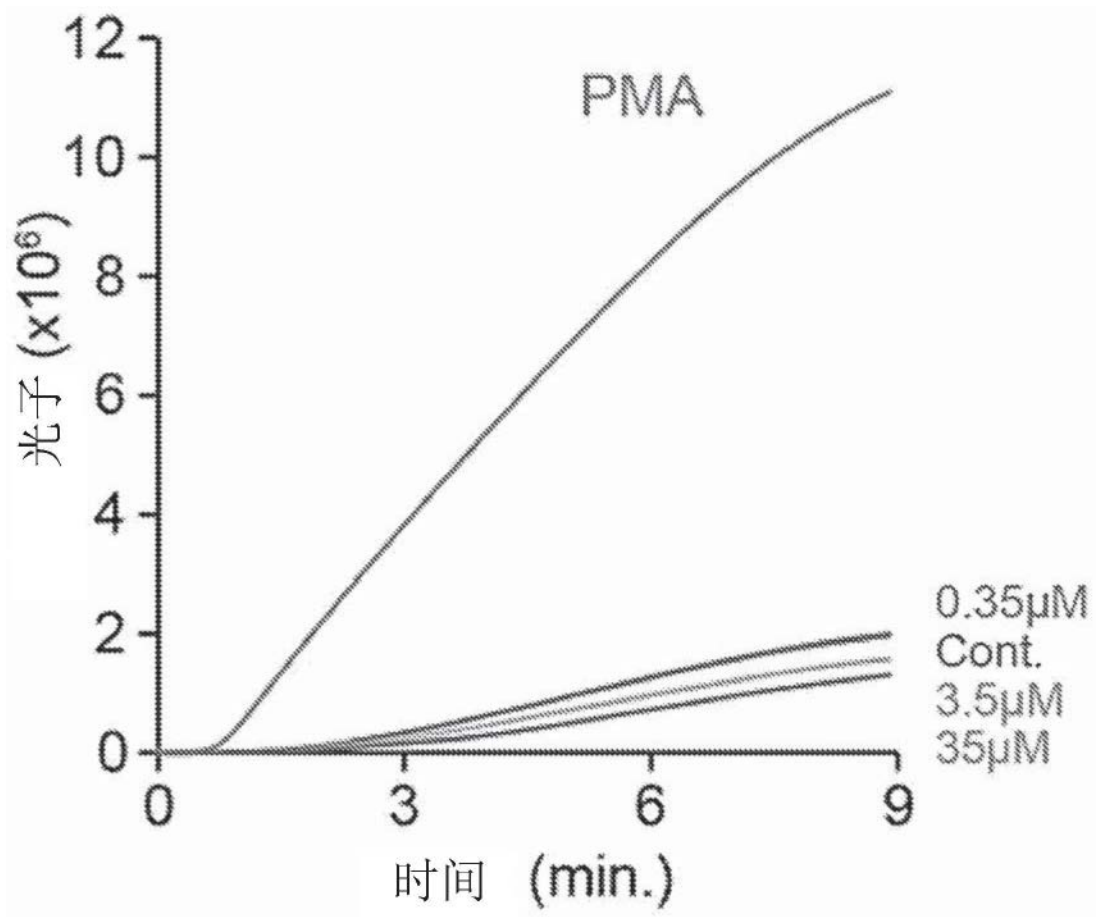


图15B

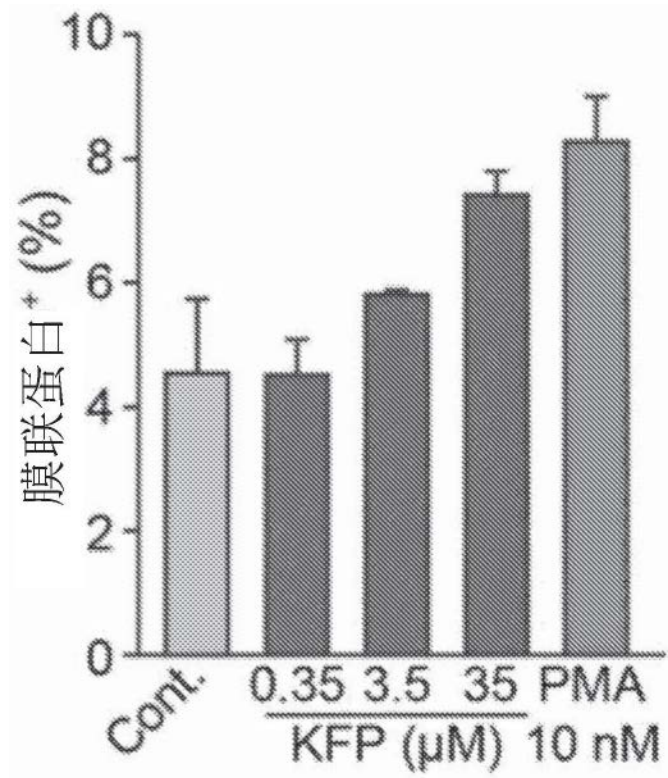


图15C

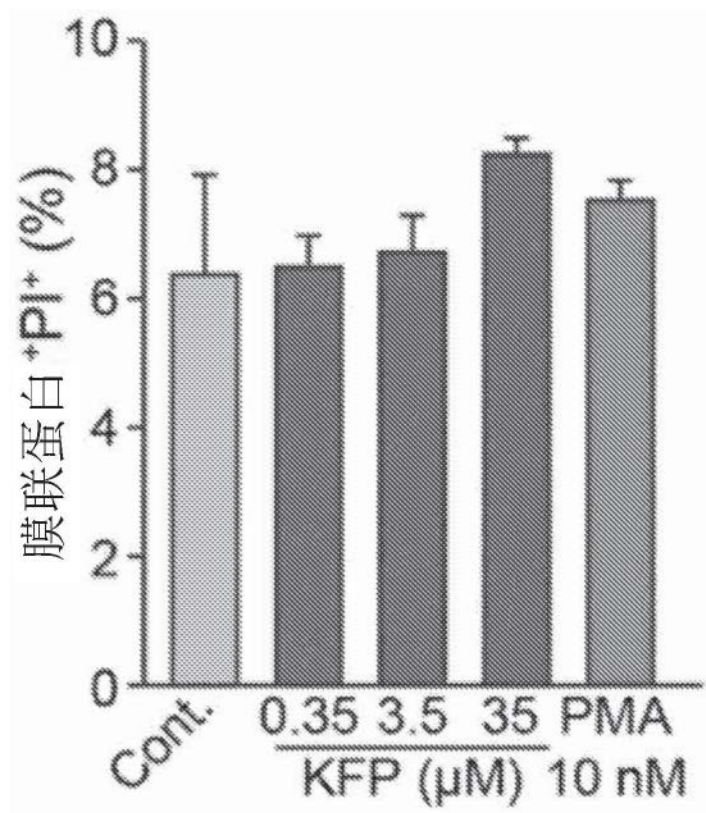


图15D

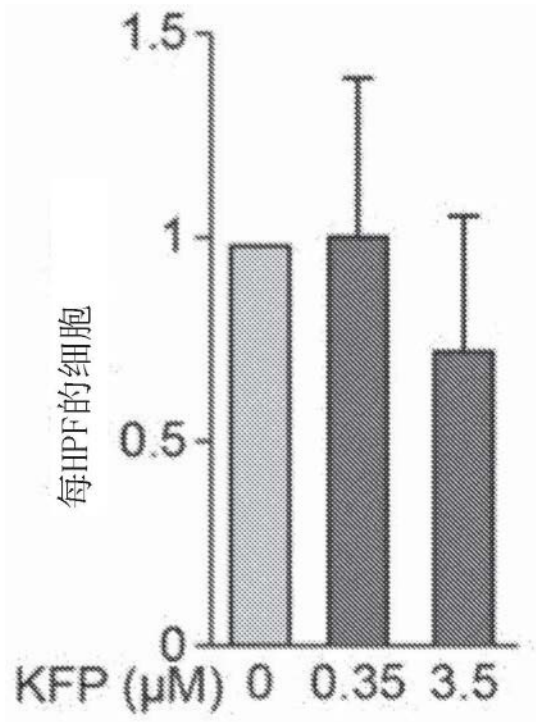


图15E

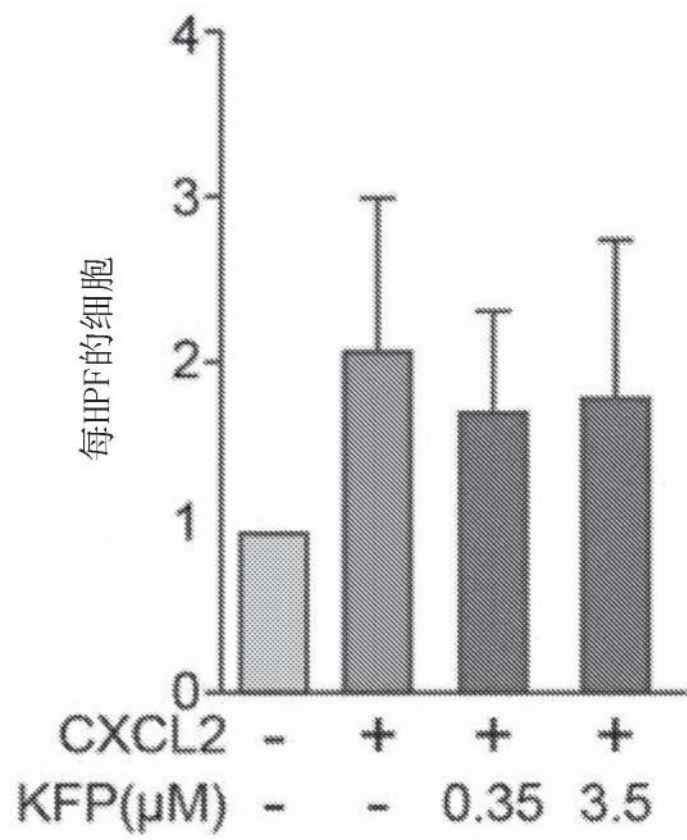


图15F

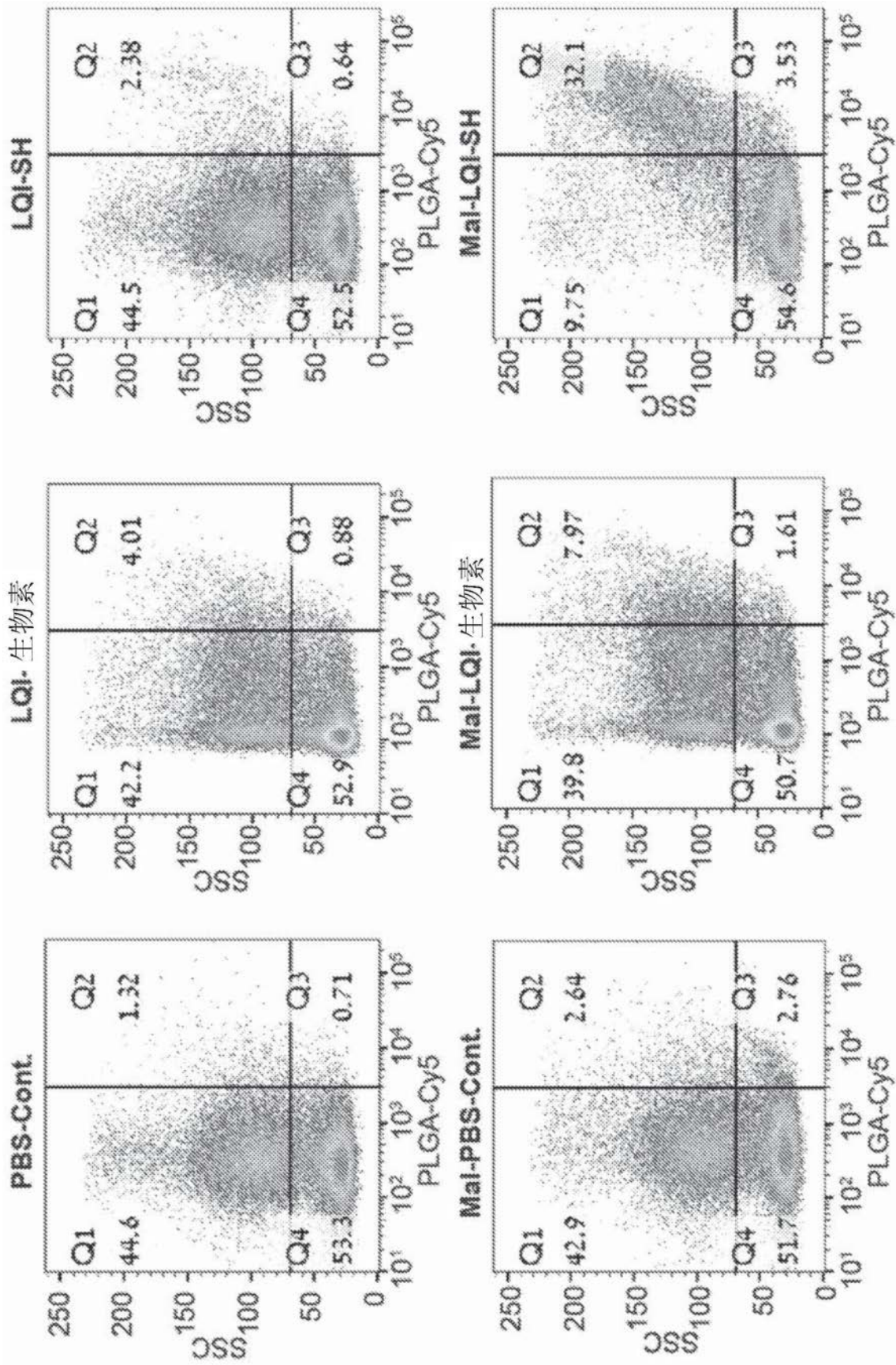


图16A

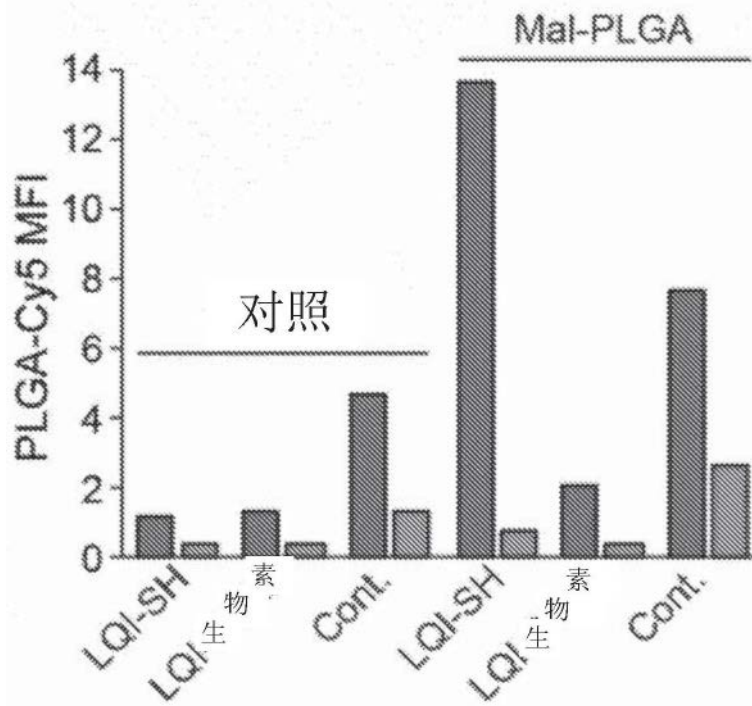


图16B

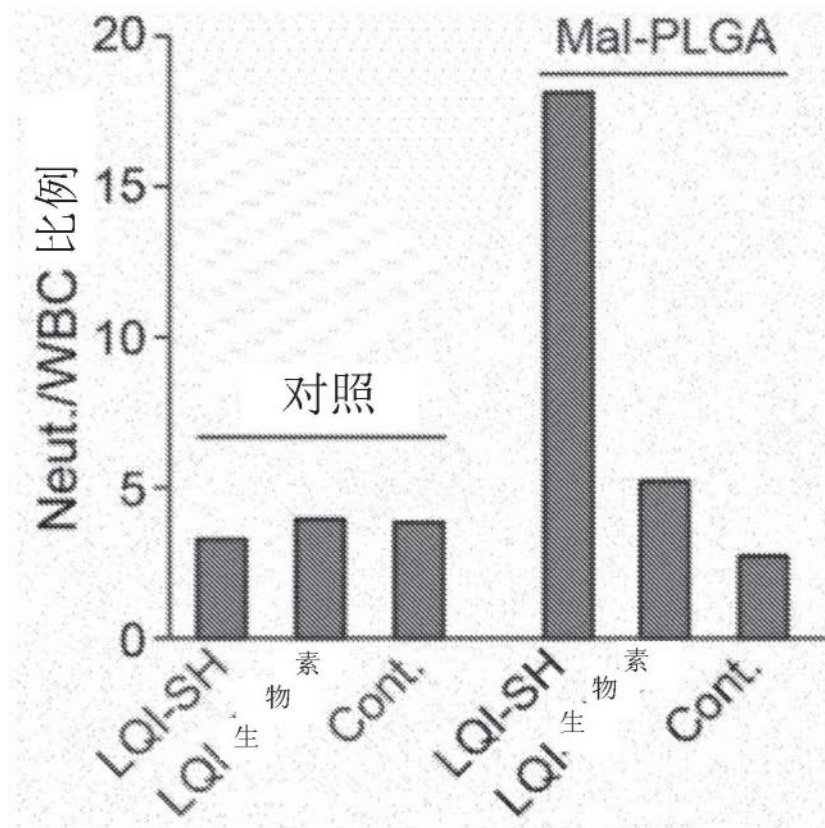


图16C

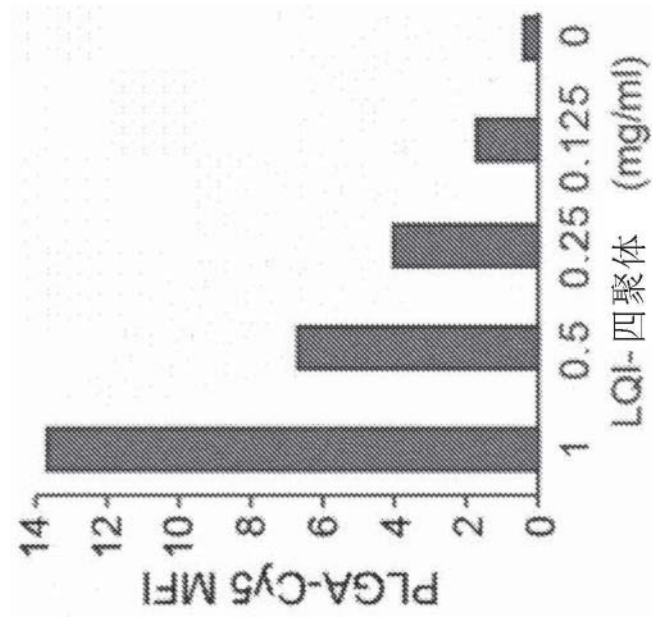


图16D

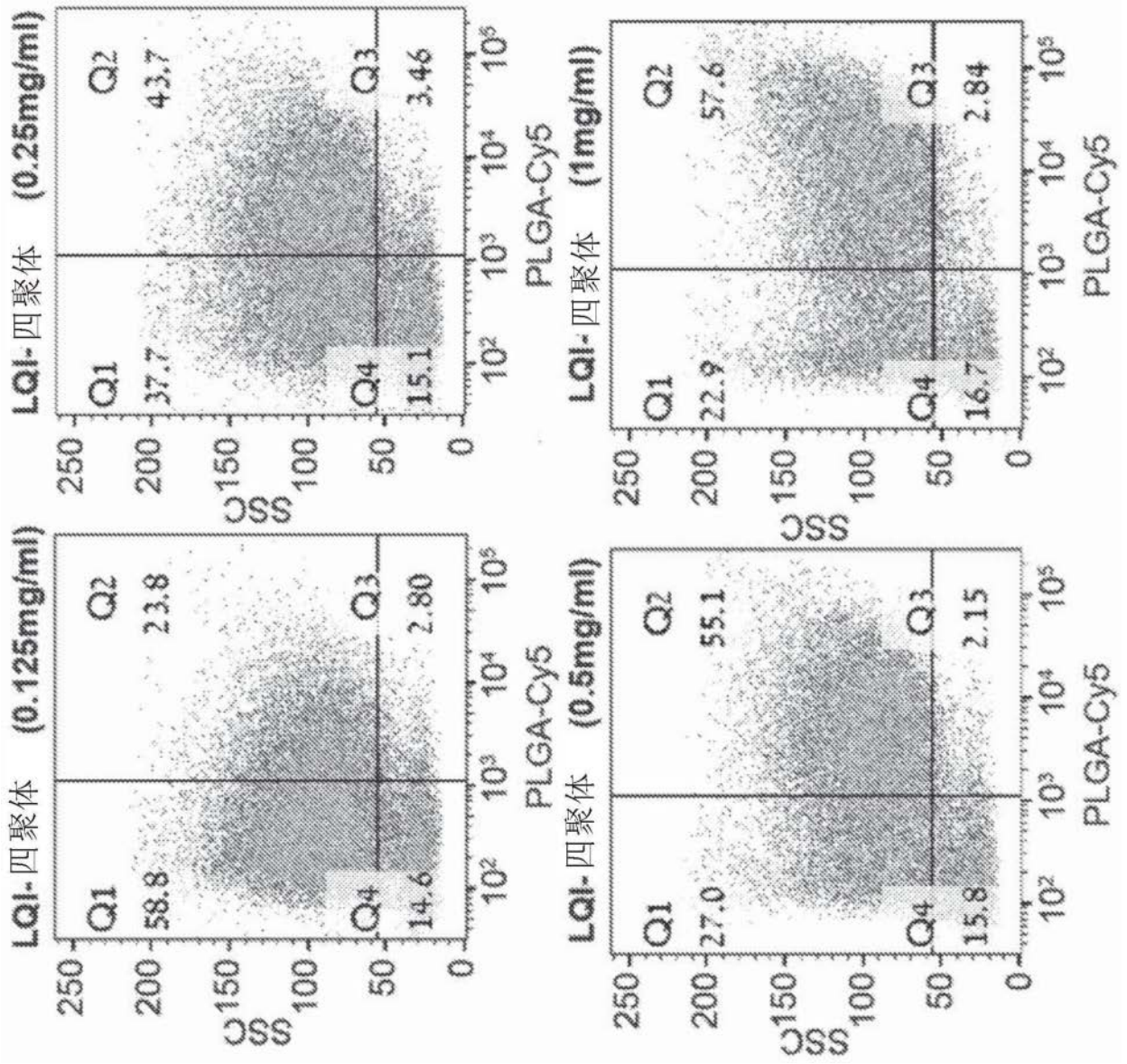


图16E

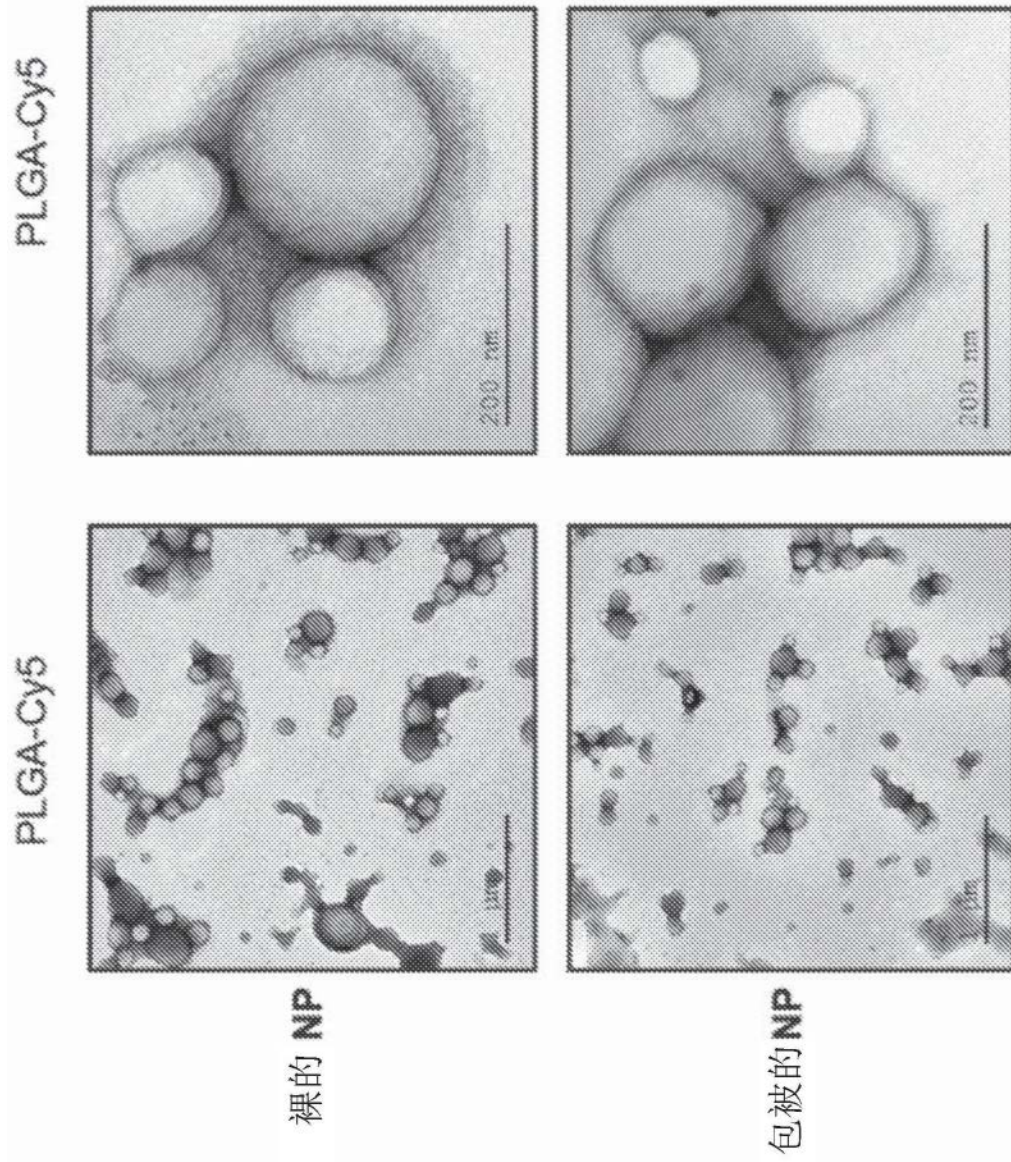


图16F

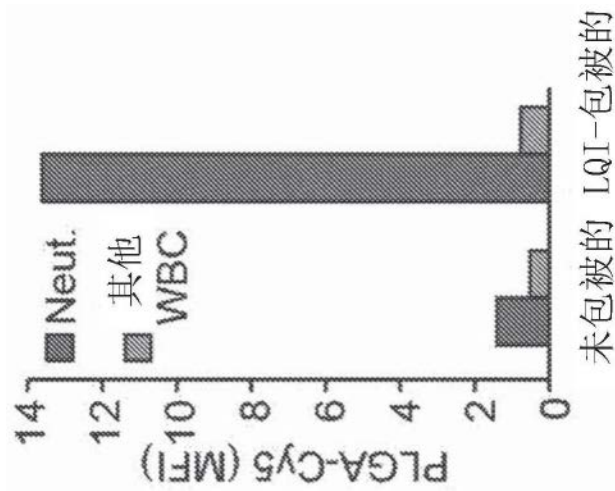


图17A

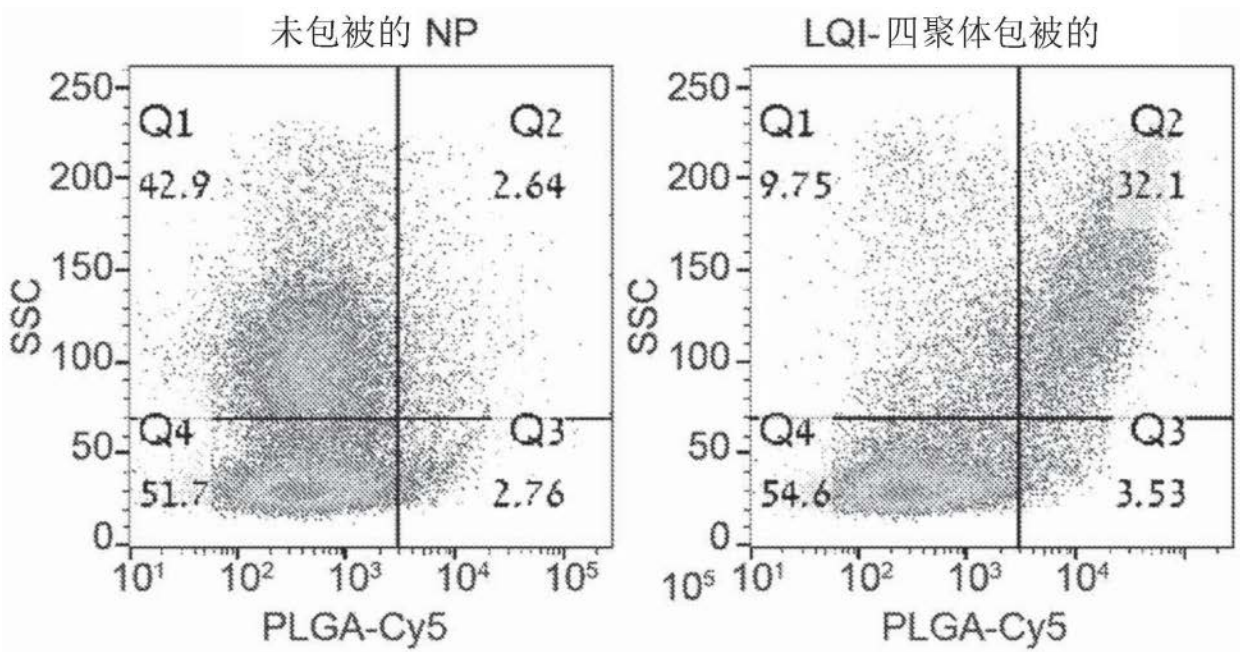


图17B

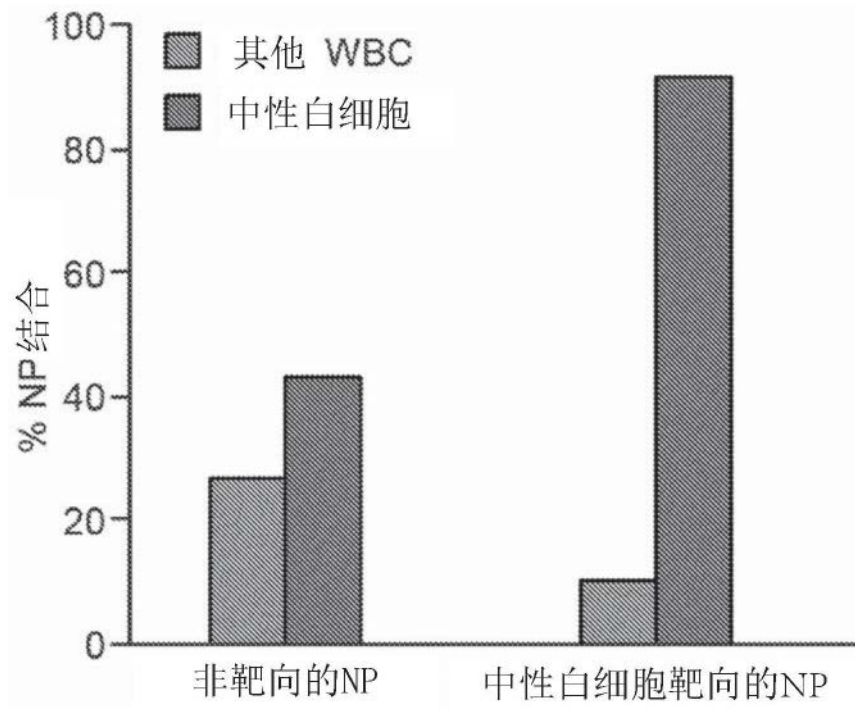


图17C

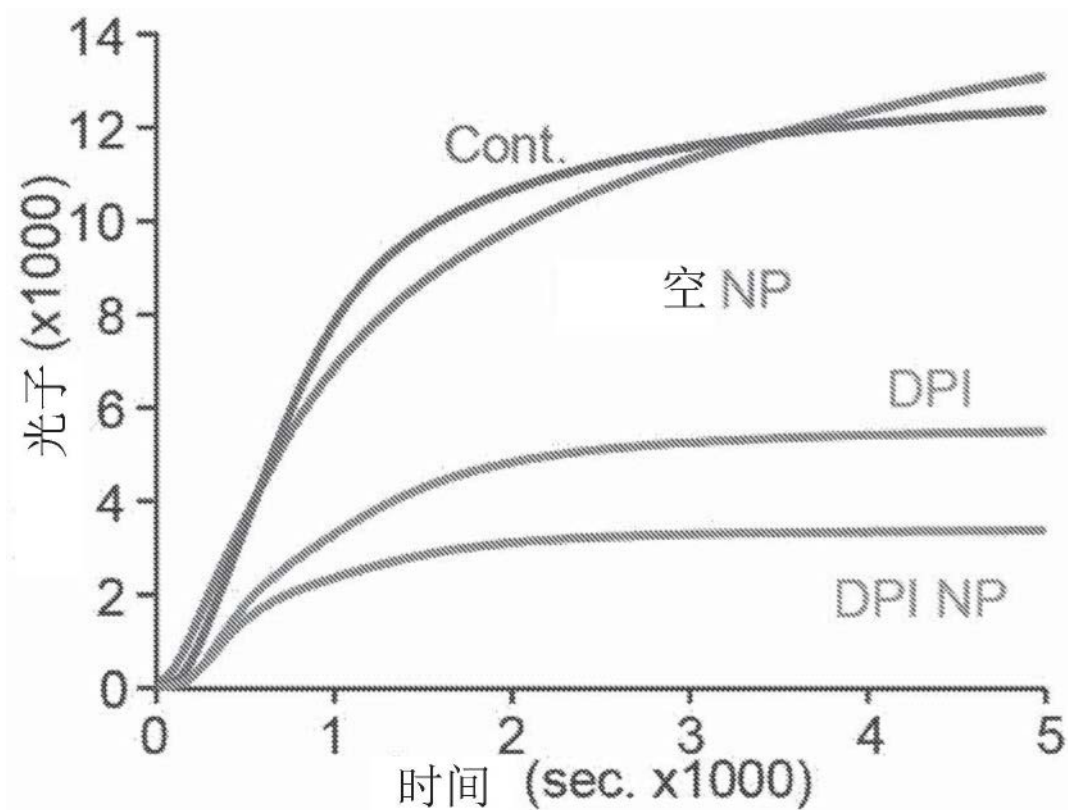


图17D

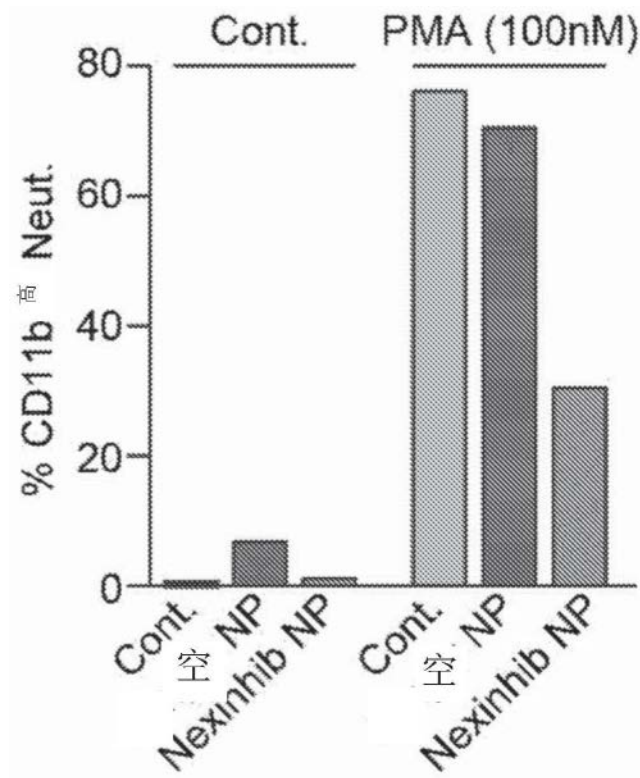


图17E

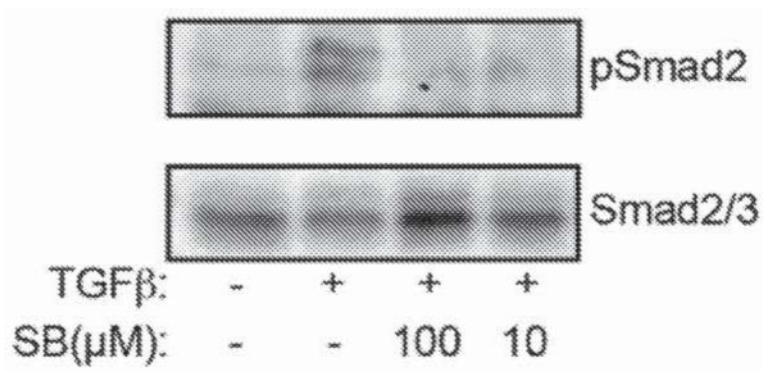


图18A

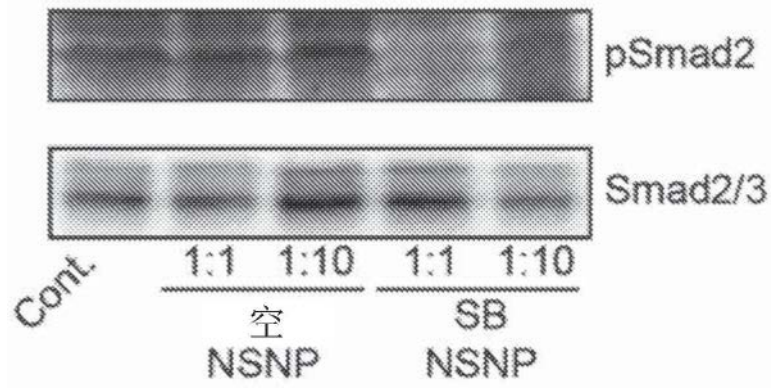


图18B

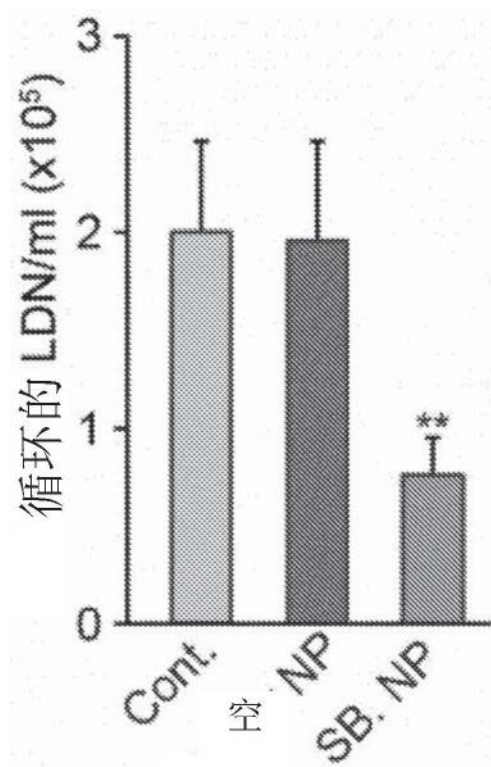


图18C

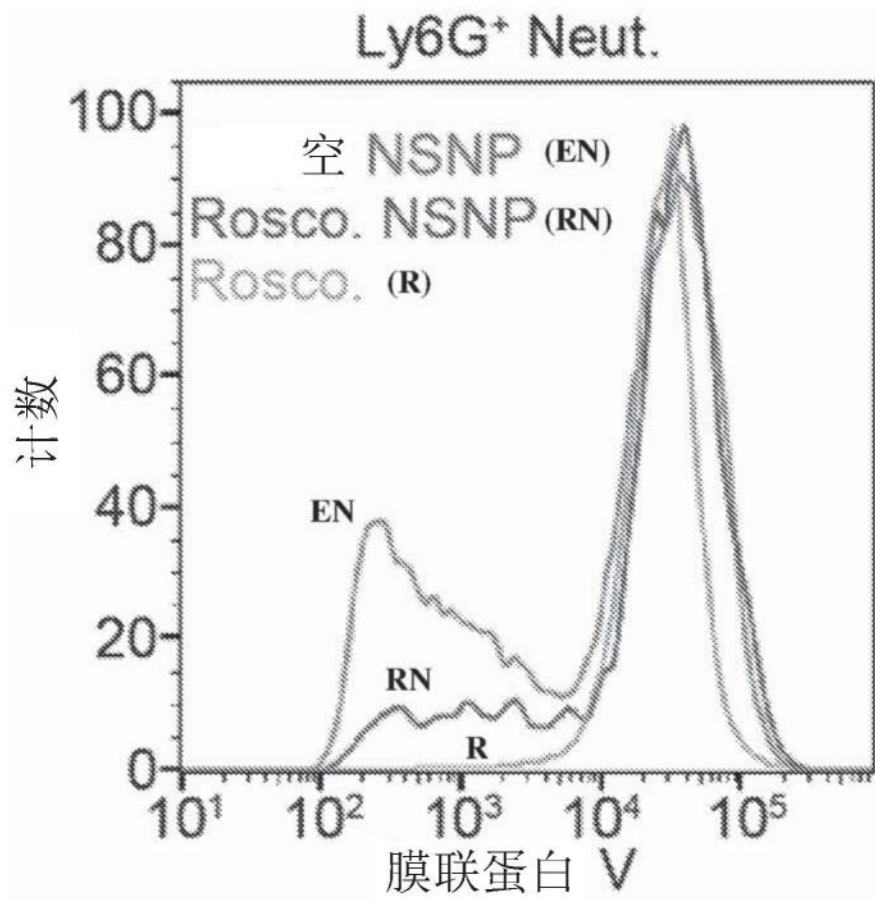


图18D

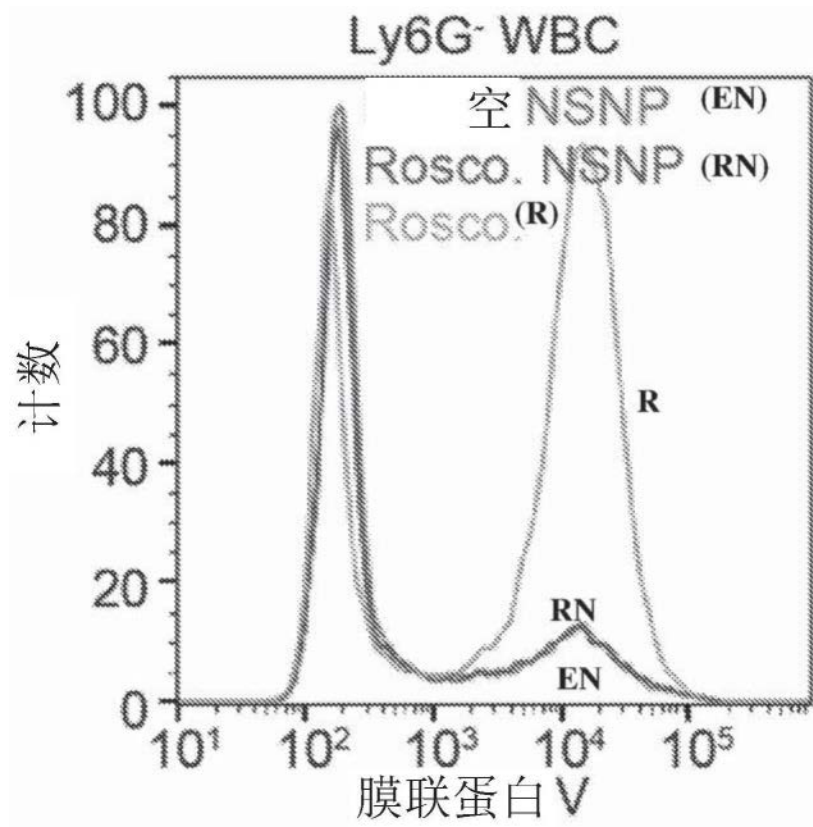


图18E

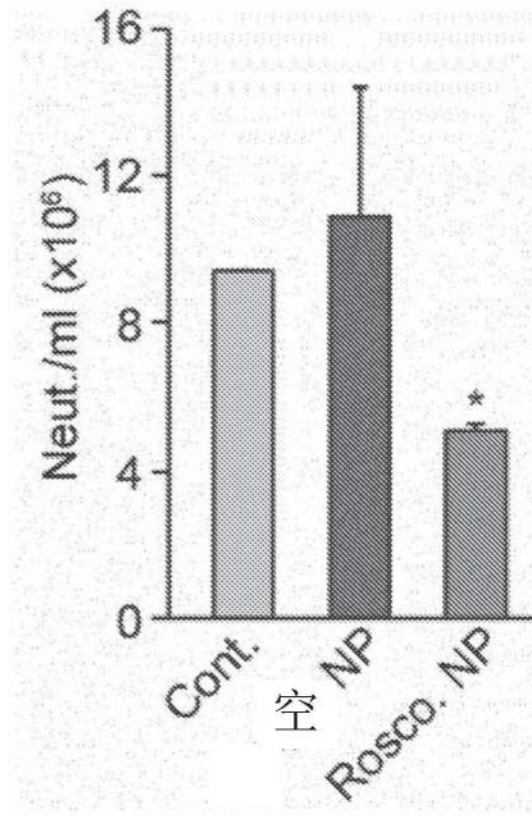


图18F

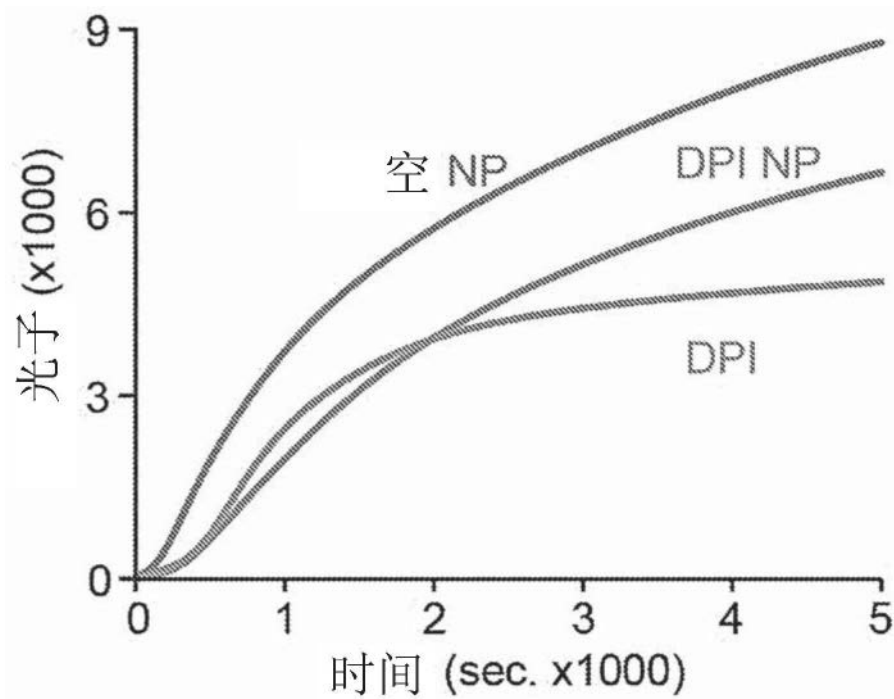


图18G

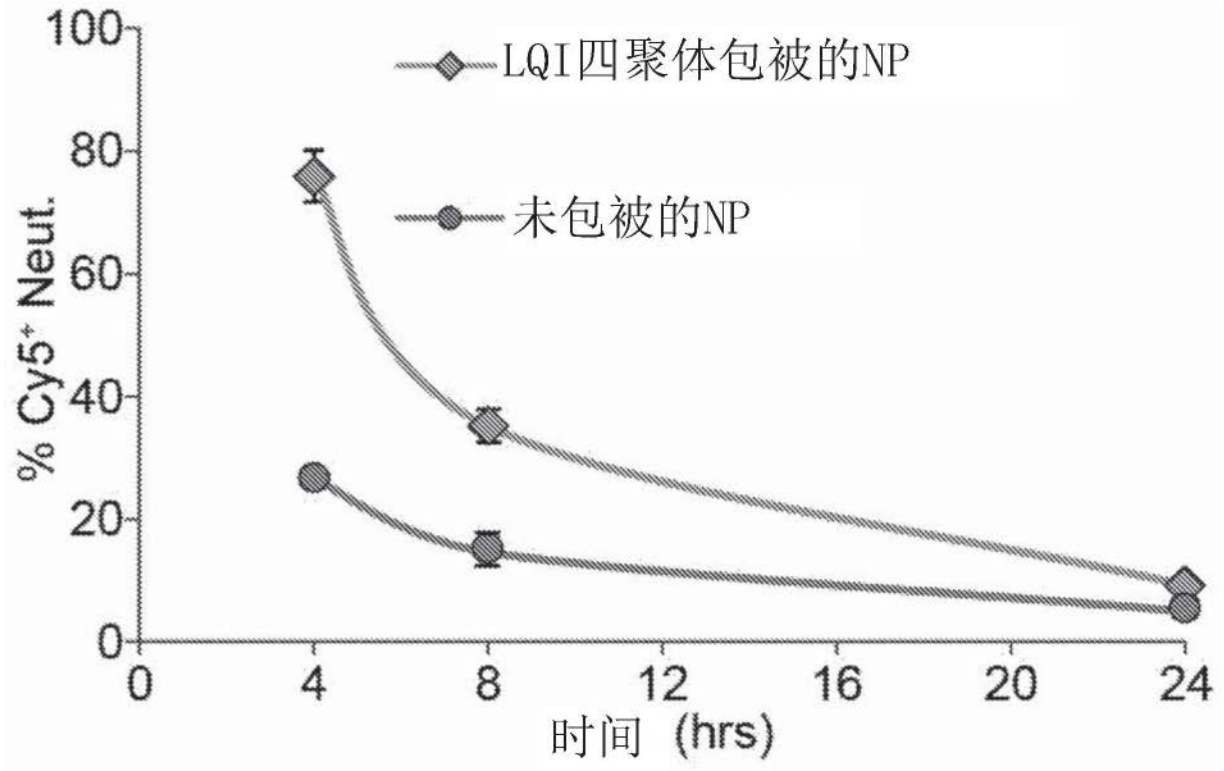


图19A

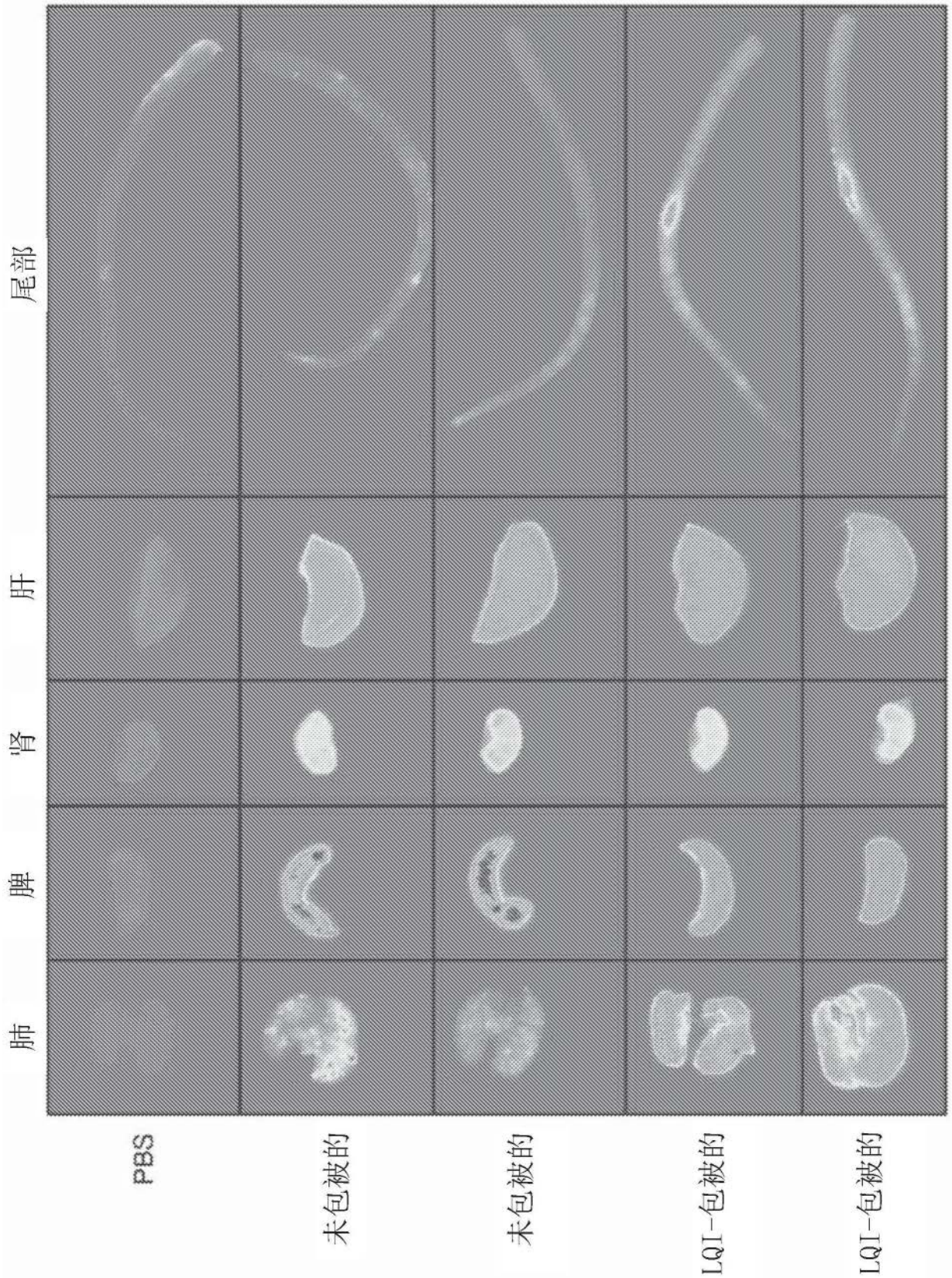


图19B

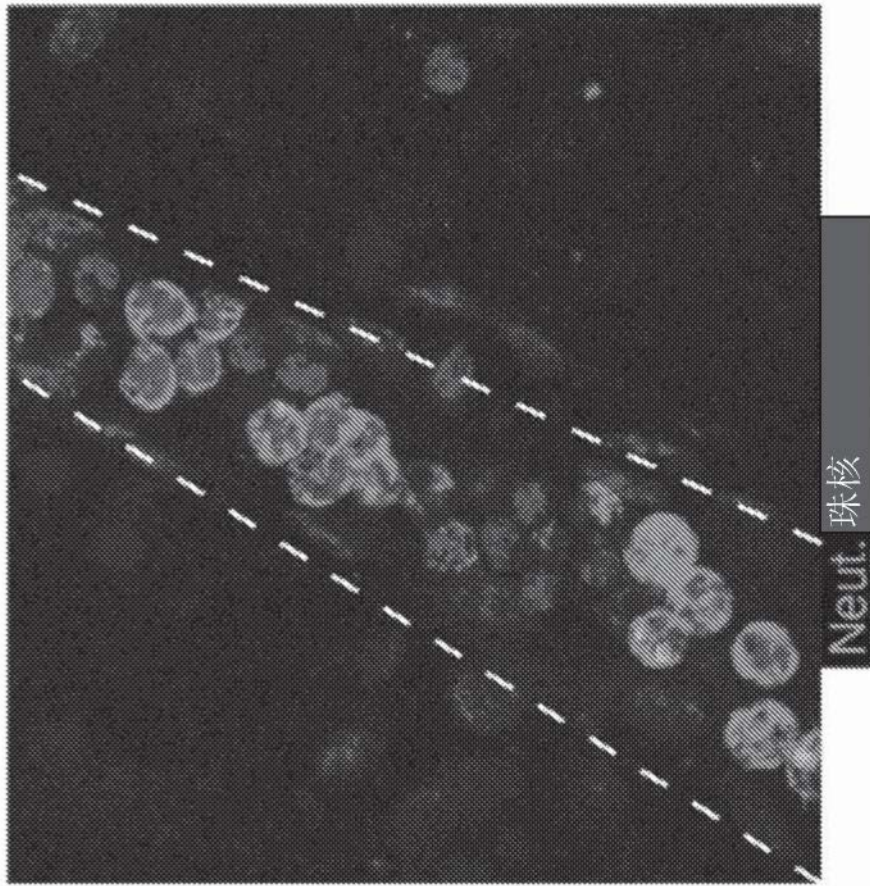


图19C

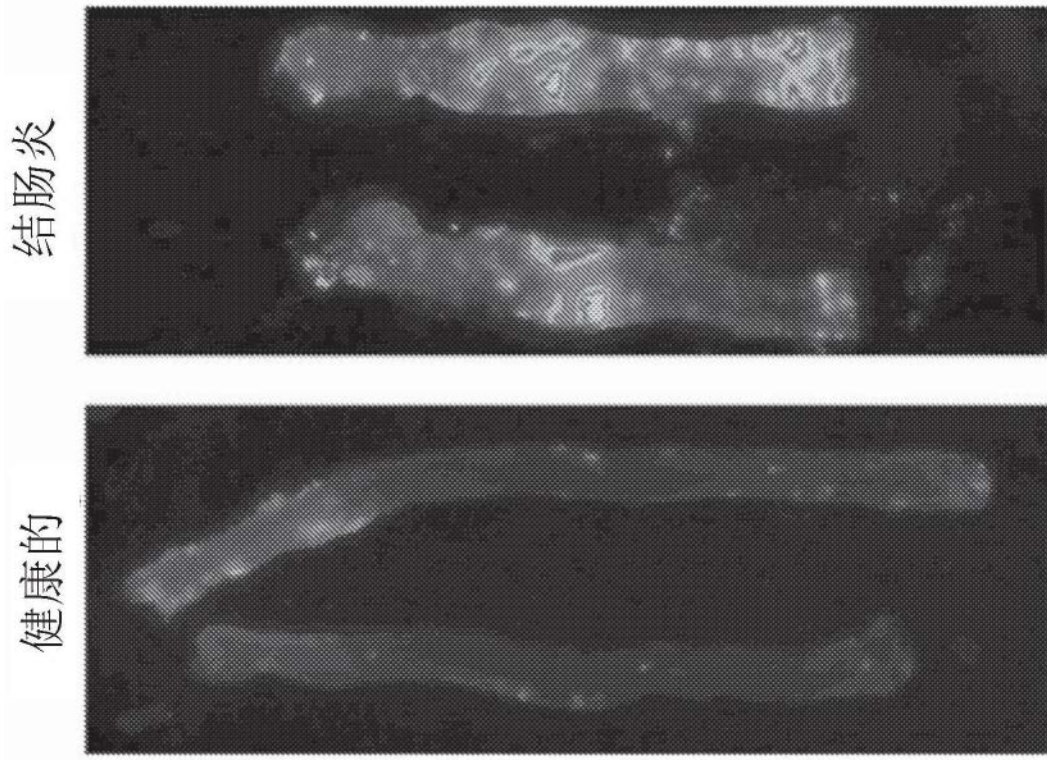


图19D

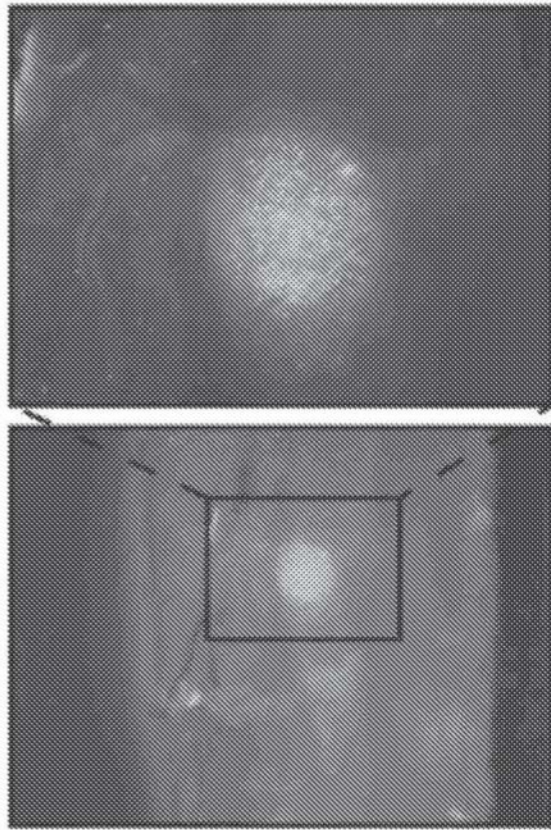


图19E

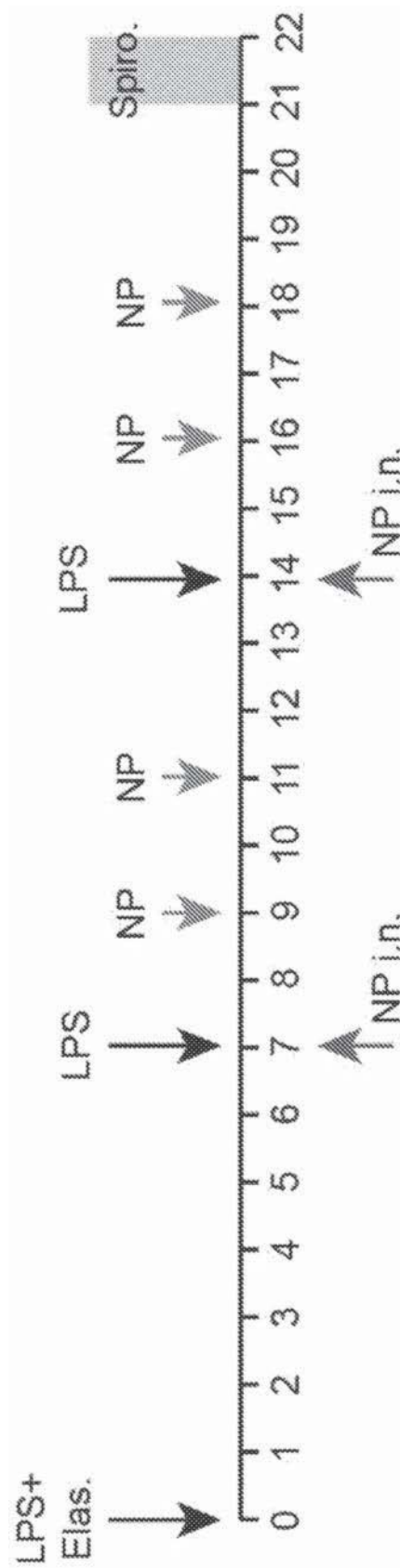


图20A

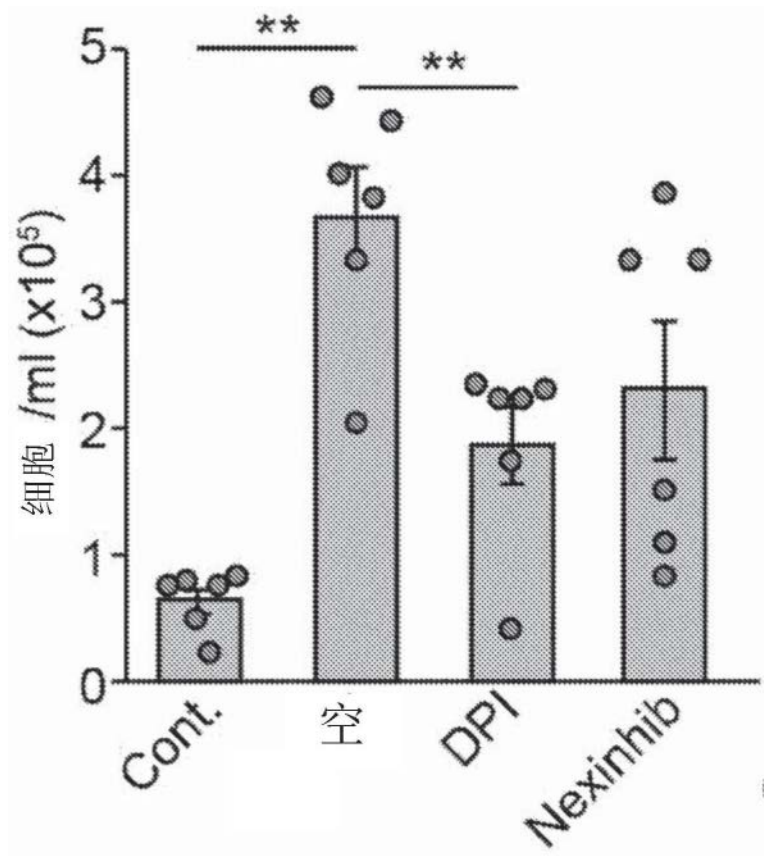


图20B

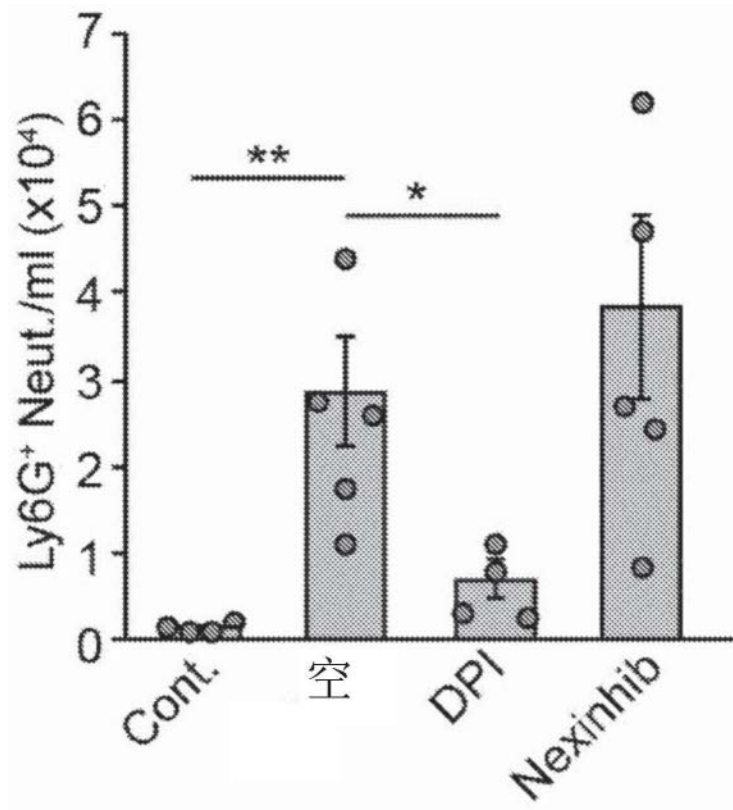


图20C

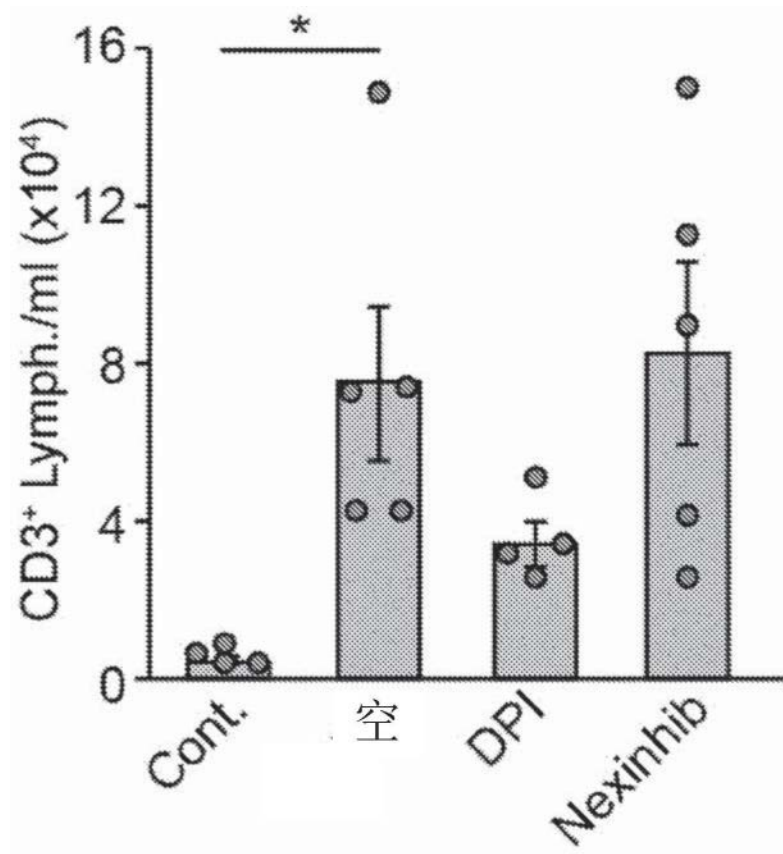


图20D

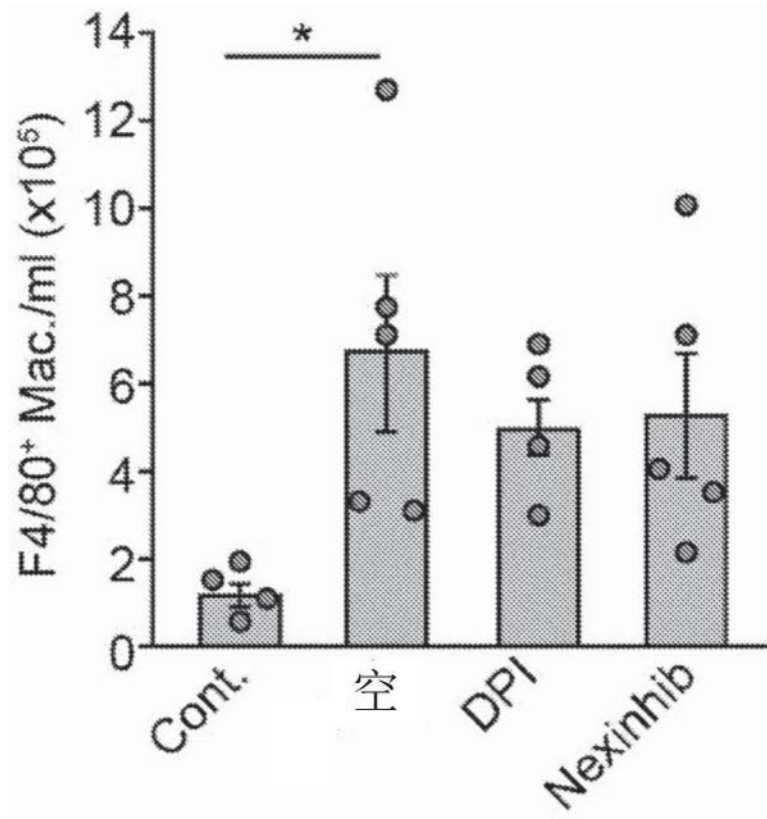


图20E

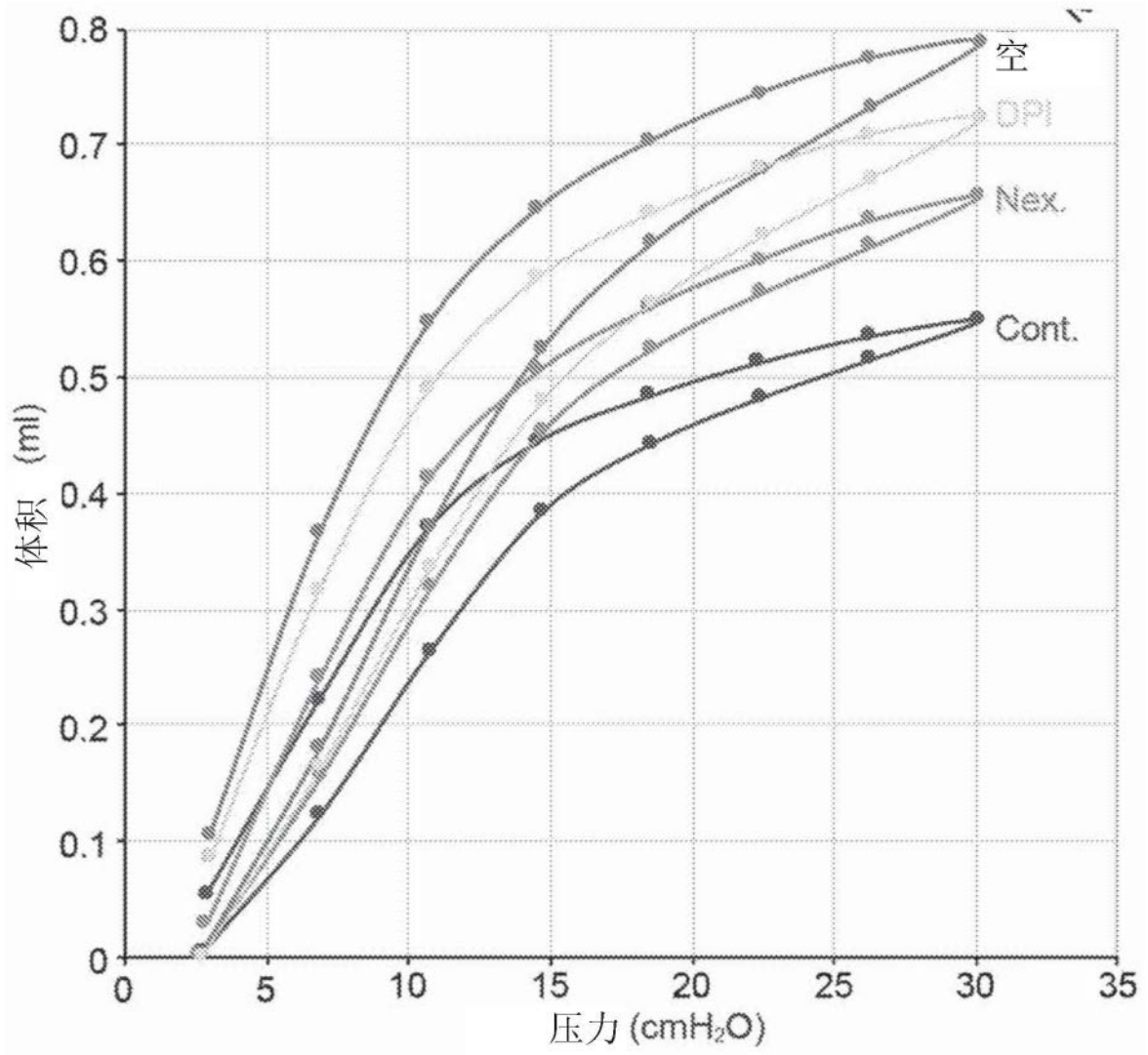


图20F

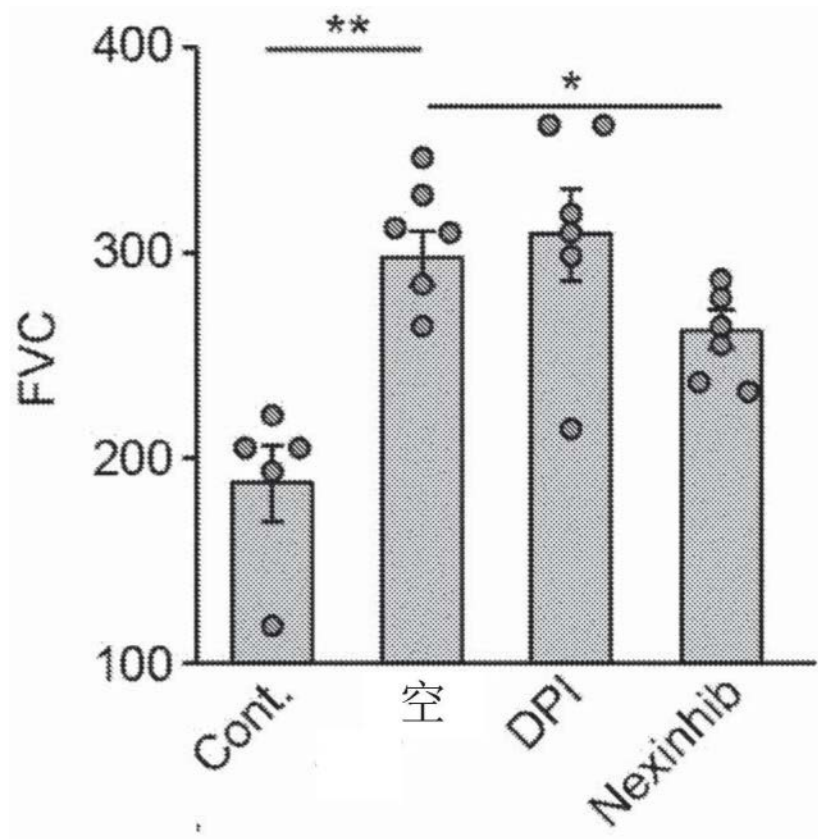


图20G

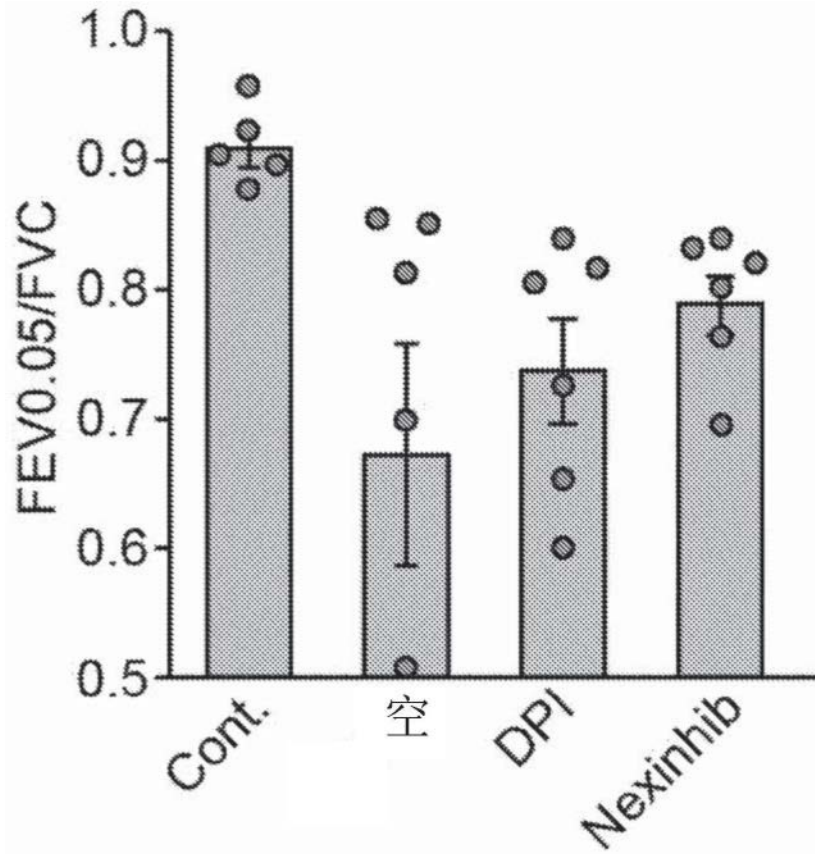


图20H

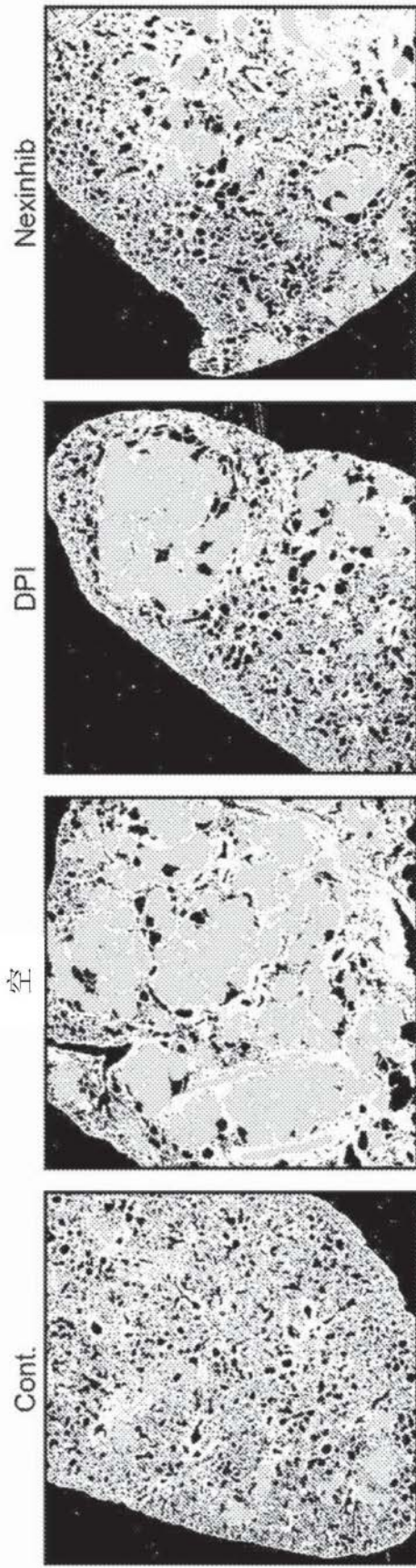


图201

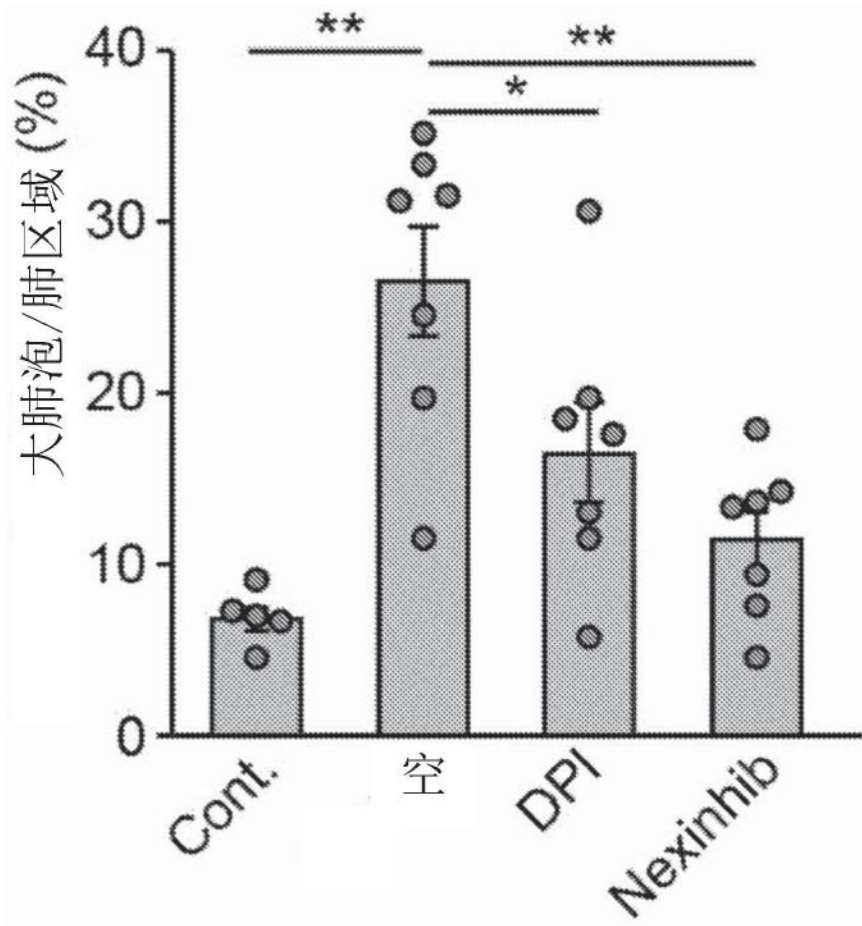


图20J

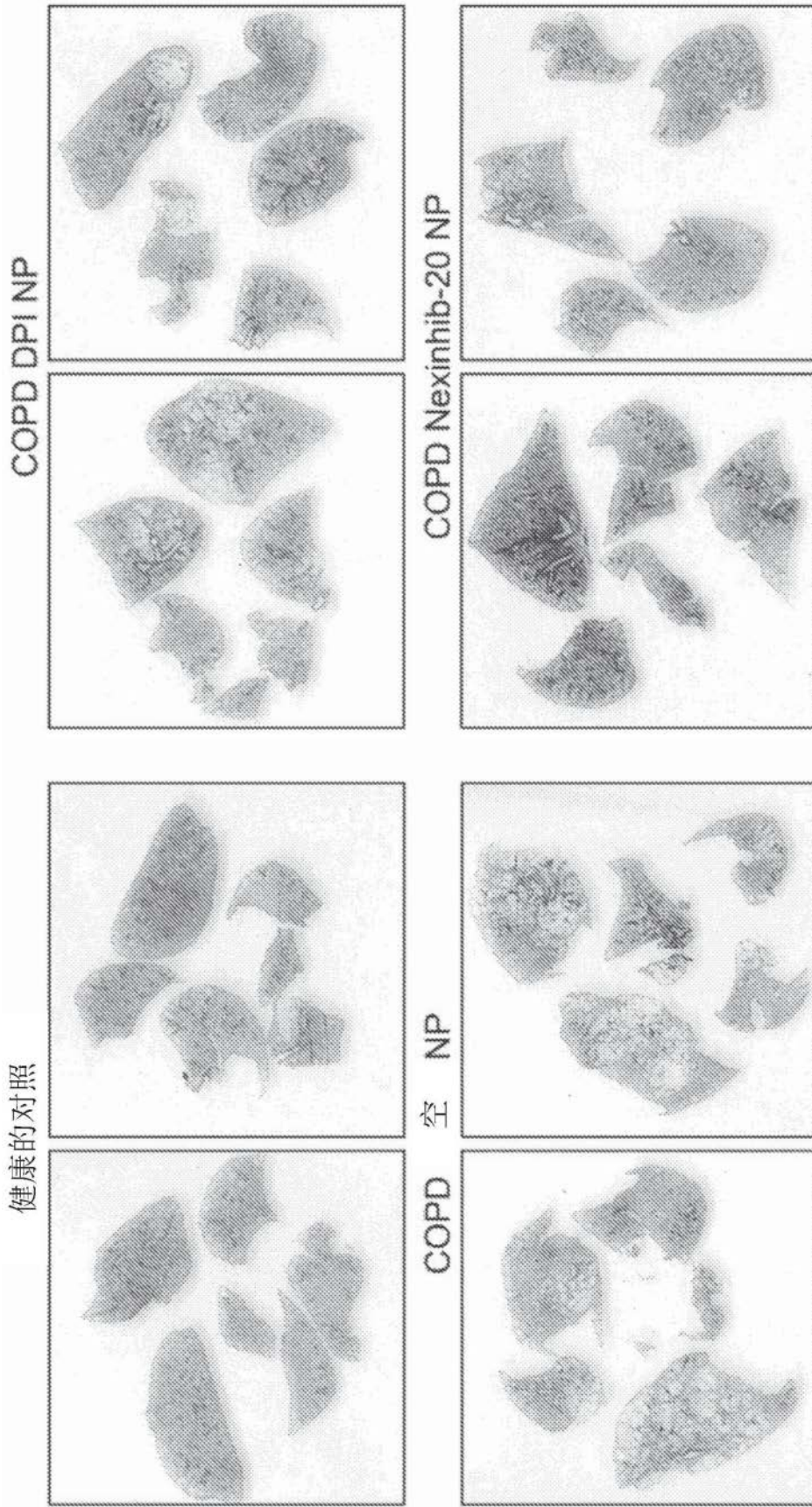


图20K

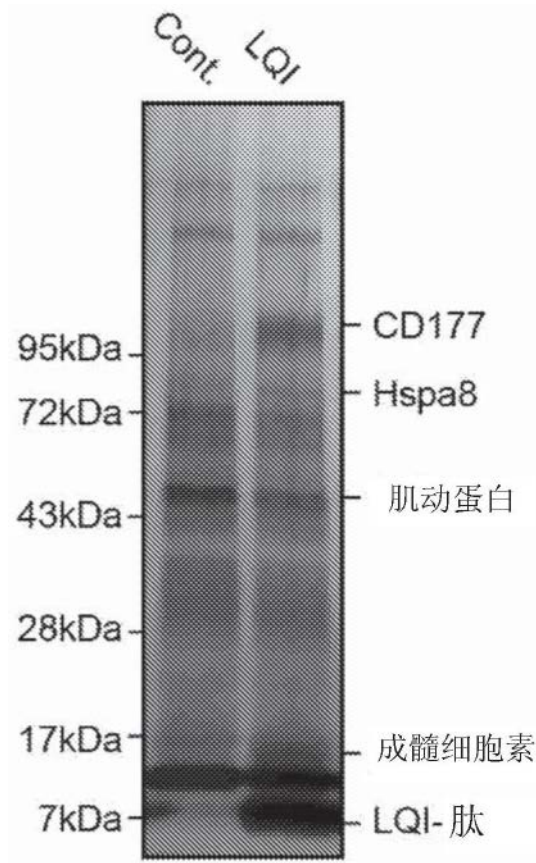


图21A

排名	描述	Σ 覆盖范围
1	CD177	21.91
2	成肌细胞素 (Myoblastin)	15.08
3	Hspa8	18.11
4	Glipr2	22.08
5	MCG1050941	11.05

图21B

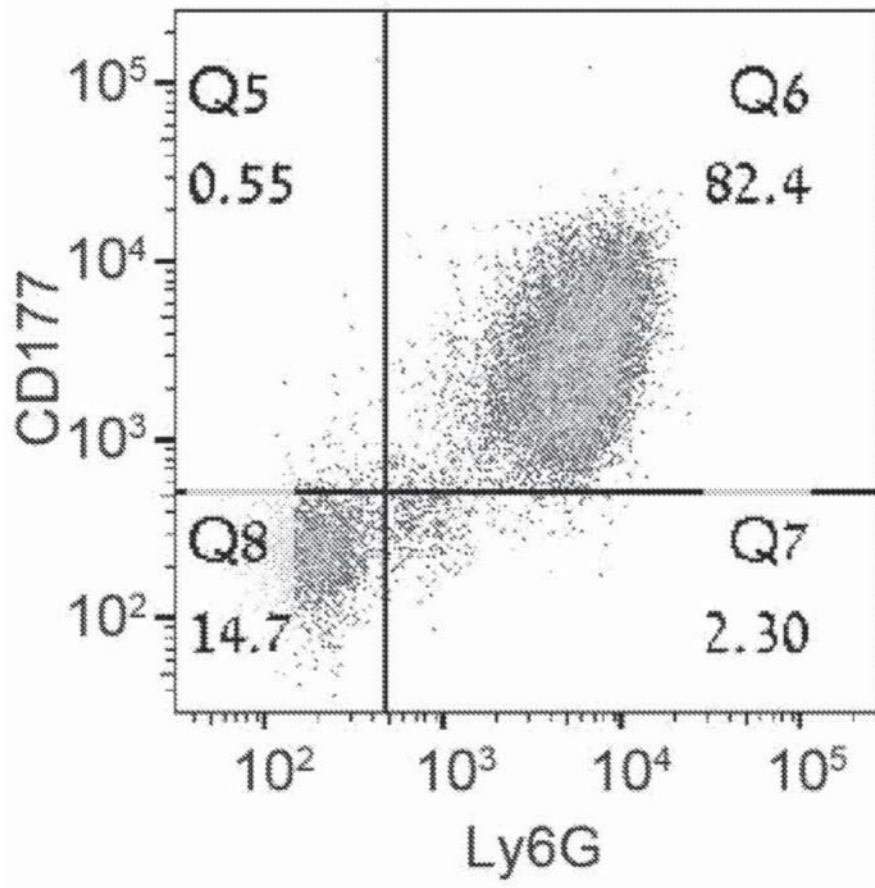


图21C

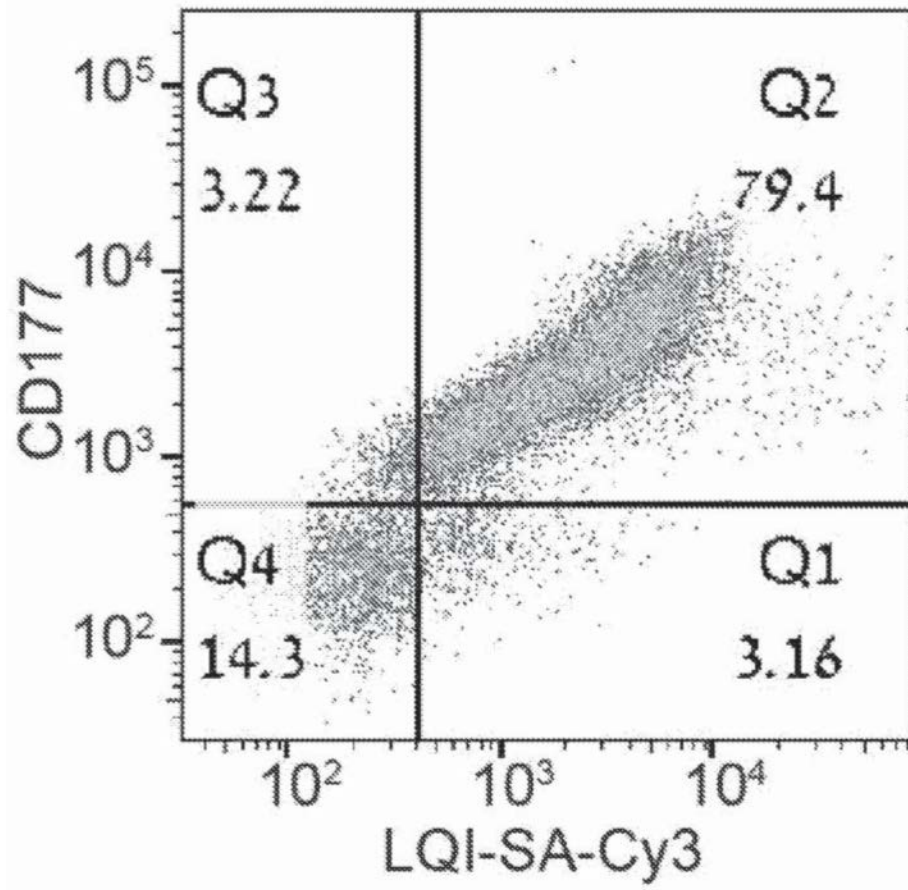


图21D

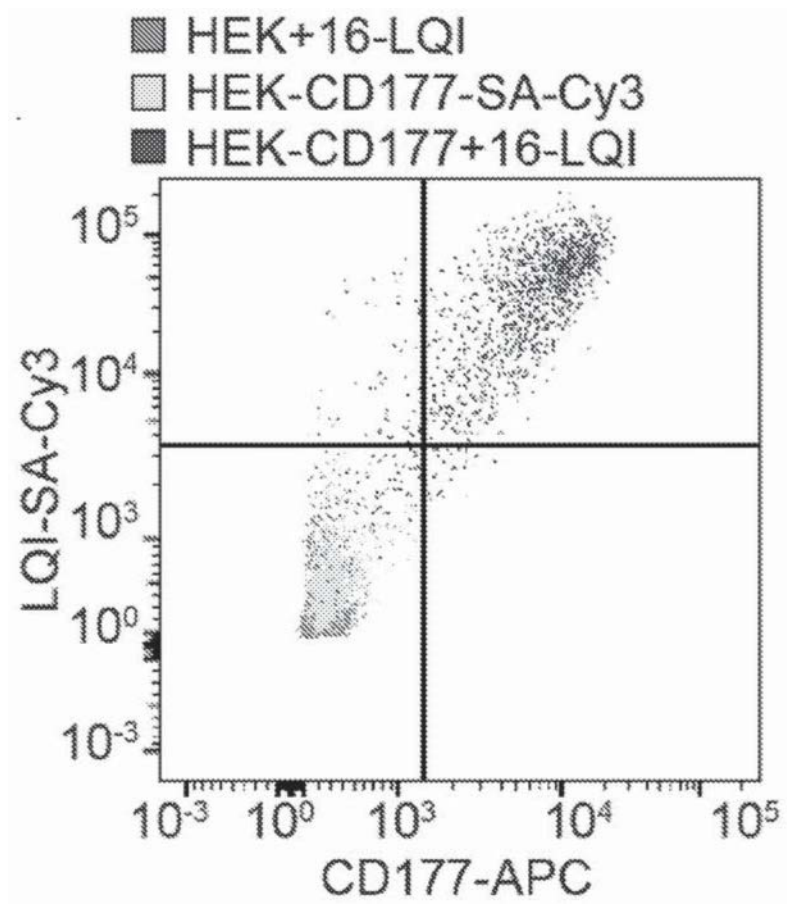


图21E

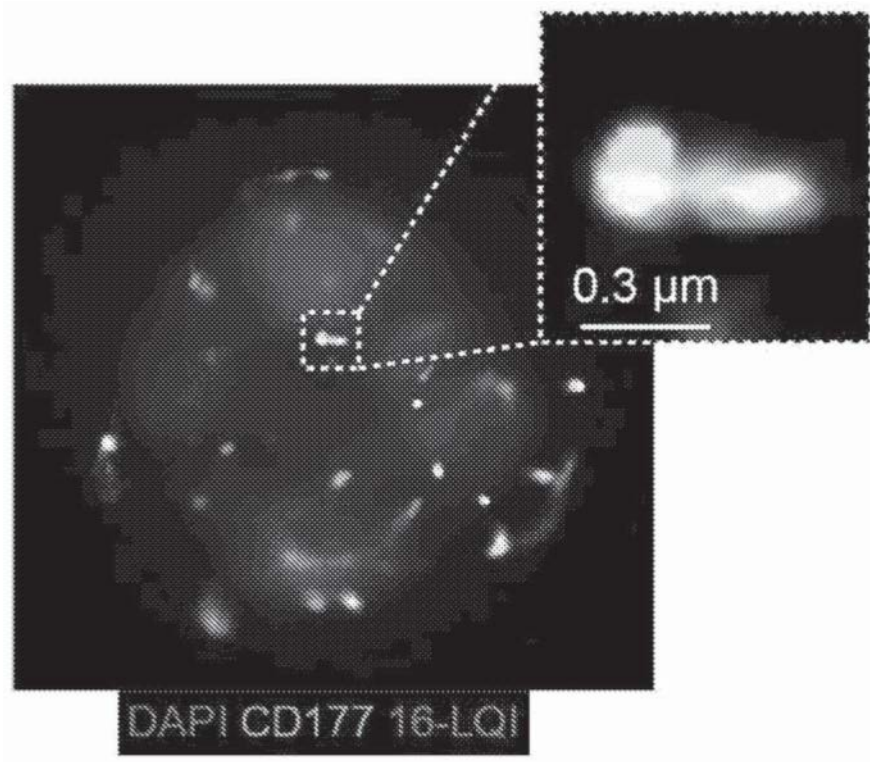


图21F

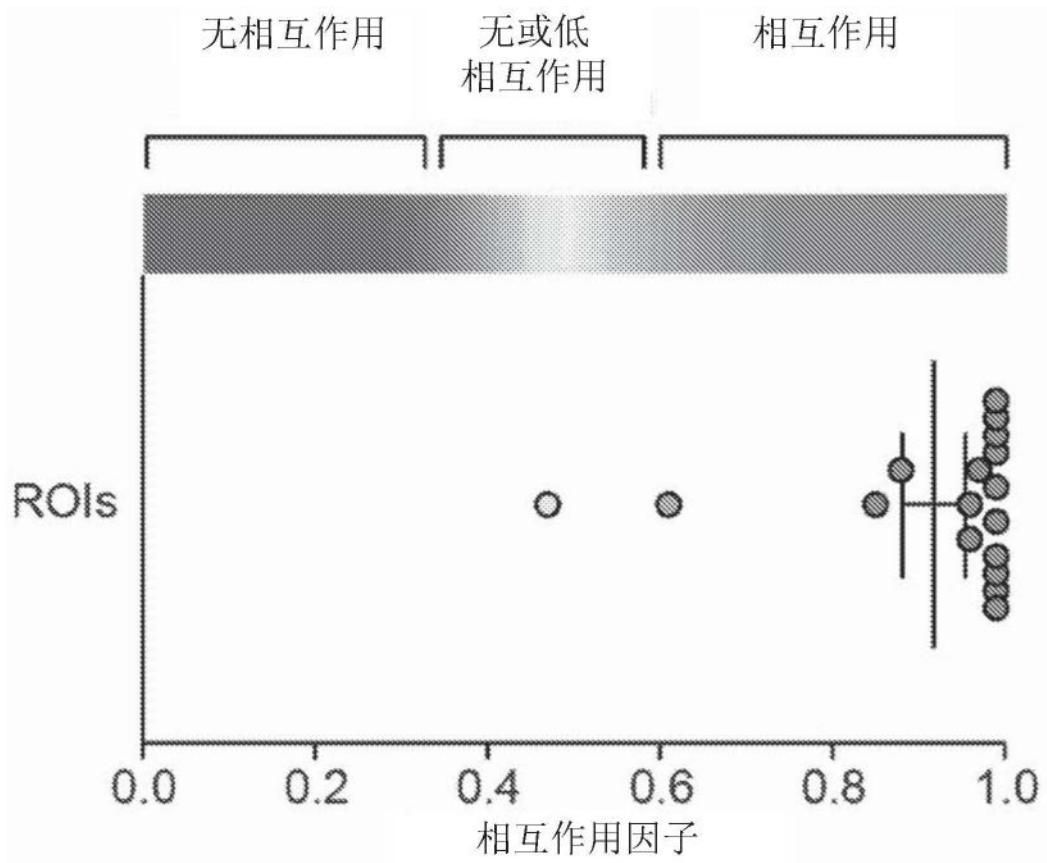


图21G

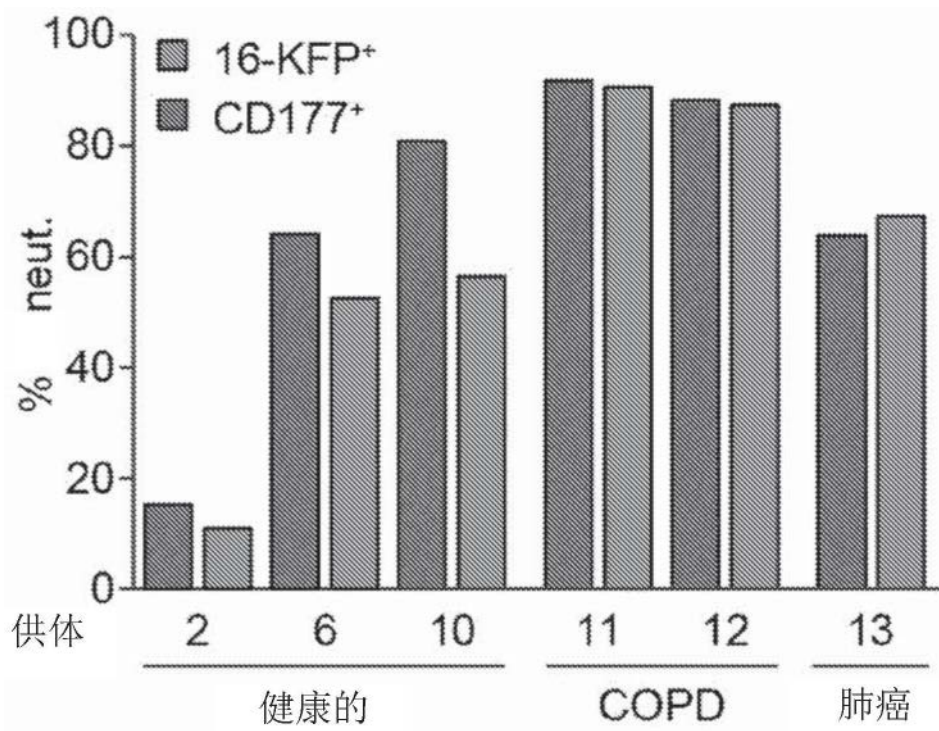


图22A

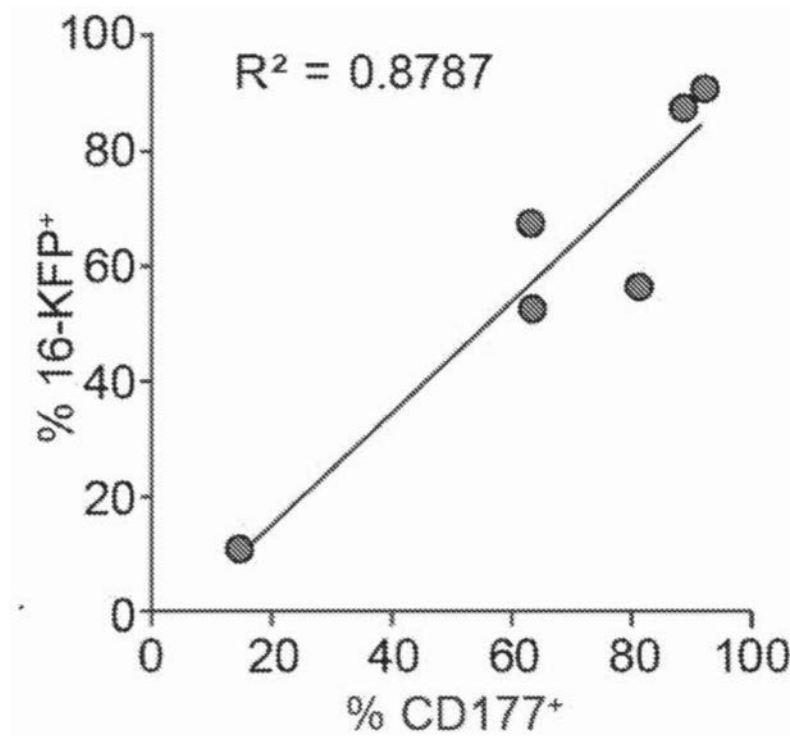


图22B

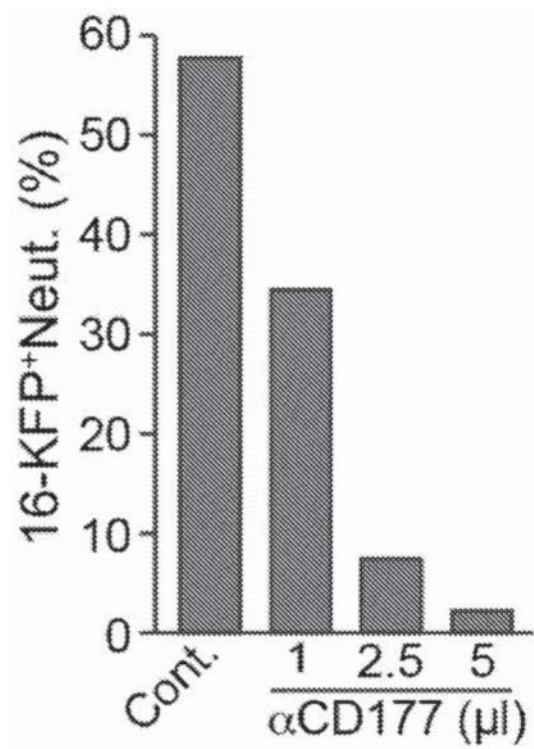


图22C