



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101563102 B

(45) 授权公告日 2014. 12. 17

(21) 申请号 200780039878. 4

A61P 9/08 (2006. 01)

(22) 申请日 2007. 09. 21

A61P 9/10 (2006. 01)

(30) 优先权数据

60/846, 418 2006. 09. 22 US

60/848, 004 2006. 09. 28 US

60/922, 646 2007. 04. 10 US

(56) 对比文件

WO 03061689 A1, 2003. 07. 31, 说明书第 2 页第 2-3 段, 第 3 页第 2-4 段, 第 6 页第 3 段至第 7 页第 2 段, 第 10 页第 1-3 段, 实施例 1-5、权利要求 1-10.

(85) PCT 国际申请进入国家阶段日

2009. 04. 27

Jean Davignon et al.. Role of Endothelial Dysfunction in

(86) PCT 国际申请的申请数据

PCT/US2007/020445 2007. 09. 21

Atherosclerosis. 《Circulation》. 2004, 第 109 卷 III-27-III-32.

(87) PCT 国际申请的公布数据

W02008/036387 EN 2008. 03. 27

John J. Bosnjak et al.. Mechanism of thrombin-induced vasodilation in human coronary arterioles. 《Am J Physiol Heart Circ Physiol》. 2002, 第 284 卷 H1080-H1086.

(73) 专利权人 德克萨斯系统大学董事会

地址 美国德克萨斯州

专利权人 德克萨斯 A&M 大学体系

审查员 潘浩

(72) 发明人 D·H·卡尼

B·奥尔斯泽维斯卡-帕泽德雷克

T·W·福萨姆

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

代理人 陈文平 尚继栋

(51) Int. Cl.

A61K 38/48 (2006. 01)

C12N 9/74 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书36页

序列表17页 附图12页

(54) 发明名称

治疗内皮功能障碍的方法

(57) 摘要

内皮功能障碍 (ED) 与一系列疾病和紊乱有关。非蛋白水解激活的凝血酶受体的激动剂可以用于治疗 ED 或 ED 相关疾病和紊乱的方法中。

1. 治疗有效量的非蛋白水解激活的凝血酶受体的激动剂在制备用于在需要治疗的受试者的某一部位治疗内皮功能障碍的药物中的用途,其中所述激动剂是凝血酶肽衍生物 H-Ala-Gly-Tyr-Lys-Pro-Asp-Glu-Gly-Lys-Arg-Gly-Asp-Ala-Cys-Glu-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-Phe-Val-NH₂ (SEQ ID NO:3),且其中所述部位不是被血管成形术损伤的动脉、慢性皮肤溃疡、需要成骨诱导的部位或需要心血管再形成的部位,其中所述受试者正患有或已经患有的一种或多种疾病,该疾病选自:高血压、脑血管疾病、外周血管疾病、糖尿病、勃起功能障碍、哮喘、类风湿性关节炎、急性肺损伤、慢性阻塞性肺病 (COPD)、囊性纤维化、炎性肺病、高同型半胱氨酸血症、镰状细胞病、先兆子痫、慢性肾衰竭、慢性肾功能障碍、肾微血管疾病、肝再灌注损伤、神经病、阿尔茨海默氏症、甲状腺疾病、脓毒症、血栓症、多器官功能衰竭、炎性肠病和辐射损伤。

2. 权利要求 1 的用途,其中脑血管疾病是中风。
3. 权利要求 1 的用途,其中外周血管疾病选自动脉粥样硬化或肺动脉高压。
4. 权利要求 1 的用途,其中所述受试者患有高血压。
5. 权利要求 1 的用途,其中所述受试者患有动脉粥样硬化。
6. 权利要求 1 的用途,其中所述受试者患有外周血管疾病。
7. 权利要求 1 的用途,其中所述药物是系统给药的形式。
8. 权利要求 1 的用途,其中所述药物是长期给药的形式。
9. 权利要求 1 的用途,其中所述药物阻断与内皮功能障碍相关的精氨酸酶的上调。
10. 权利要求 1 的用途,其中该所述药物促进内皮一氧化氮合酶的激活或上调。
11. 权利要求 1 的用途,其中该所述药物增加一氧化氮的产生。
12. 权利要求 1 的用途,其中所述药物进一步包含治疗有效量的人 VEGF-A。

治疗内皮功能障碍的方法

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求 2006 年 9 月 22 日提交的美国临时申请 No. 60/846, 418、2006 年 9 月 28 日提交的美国临时申请 No. 60/848, 004 和 2007 年 4 月 10 日提交的美国临时申请 No. 60/922, 646 的优先权。上述申请的完整教导在此引入作为参考。

背景技术

[0003] 血管内皮功能障碍 (ED) 是一种常见的老化效应, 并且和许多疾病相关, 其中包括高血压、冠状动脉疾病、中风、脑血管疾病、外周血管疾病、糖尿病、勃起功能障碍、动脉粥样硬化、哮喘、类风湿性关节炎、肺动脉高压、高同型半胱氨酸血症、镰状细胞病、先兆子痫、慢性肾衰竭、脓毒症和多器官功能衰竭。组织响应于损伤或缺血而自身修复或治疗性干预做出反应的能力似乎因为 ED 而被大大降低了。

[0004] 内皮功能障碍可能是由于如下原因而导致的, 诸如一氧化氮合酶 (NOS) 的表达的降低, 阻断细胞内信号事件的途径激活的改变, 内源性 NOS 抑制物如不对称二甲基精氨酸 (ADMA) 水平的升高, NO 向过氧亚硝酸盐的降解或转换的增加 (由高水平的活性氧导致), 或负责将 L- 精氨酸转化成尿素的精氨酸酶的活性增加, 由此限制了作为 NOS 底物的 L- 精氨酸的可用性。

[0005] 最近的大量研究表明, 通过调节细胞内 L- 精氨酸的可用性, 精氨酸酶在 ED 和 NOS 活性调节中起着关键性的作用。例如在患有 ED 的老化血管中, 精氨酸酶是上调的, 但是添加特异性的精氨酸酶抑制剂能够恢复血管的内皮功能和一氧化氮 (NO) 反应性。其他已证明精氨酸酶抑制可克服 ED 的疾病包括哮喘, 其中精氨酸酶活性增加导致 NO 缺乏和气道平滑肌松弛降低; 肺动脉高压; 自发性高血压和盐诱导的高血压。在猪高血压模型、由缺血 / 再灌注引起的扩张缺陷中, 也已证明添加 L- 精氨酸能够完全或部分逆转 ED, 甚至已证明能够改善外周动脉疾病患者的行走能力。这些研究提示了降低精氨酸酶上调或控制精氨酸酶活性的药物在多种血管疾病中的潜在治疗作用。

[0006] 近期研究表明, 缺氧和一些炎症介质, 包括 $\text{TNF } \alpha$, 能增加精氨酸酶或降低内皮细胞一氧化氮合酶 (eNOS) 活性。长期炎症和慢性缺血似乎都会导致 ED。

[0007] 内皮功能障碍是许多疾病和紊乱的原因或者导致这些疾病, 亟需治疗内皮功能障碍的方法。

发明内容

[0008] 申请人发现了能够刺激或激活非蛋白水解激活的凝血酶受体 (下称 NPAR) 的化合物, 通过阻断与内皮功能障碍相关的精氨酸酶的上调, 并且通过促进一氧化氮合酶的激活或上调, 由此增加一氧化氮的产量, 能够逆转或抑制内皮功能障碍。NPAR 激动剂 TP508 能够阻断由 $\text{TNF } \alpha$ 诱导的精氨酸酶 1 (ARG1) 的上调 (实施例 2)。对 ARG1 表达的影响呈剂量依赖性。TP508 处理也能增加在常氧 (正常氧浓度) 和低氧 (1% 氧) 条件下培养的细胞中 eNOS 的磷酸化 (实施例 3)。此外, TP508 刺激细胞能防止低氧诱导的 eNOS 表达下调, 从而

使 eNOS 保持在接近于在常氧条件下培养的细胞中所观测到的水平上。TP508 对 eNOS 磷酸化的影响是剂量依赖性的。

[0009] 本发明涉及在需要治疗的受试者的某一部位治疗内皮功能障碍的方法,包括给受试者施用治疗性有效量的 NPAR 激动剂,其中所述部位不是被血管成形术损伤的动脉、慢性皮肤溃疡、需要成骨诱导的部位或需要心血管再形成的部位。

[0010] 更具体地讲,除了上述的情况外,本发明包括治疗受试者的内皮功能障碍的方法,其中所述受试者患有的一种或多种疾病或状况,该疾病或状况选自:高血压、充血性心力衰竭、冠状动脉疾病、中风、脑血管疾病、外周血管疾病、糖尿病、勃起功能障碍、动脉粥样硬化、哮喘、类风湿性关节炎、肺动脉高压、急性肺损伤、慢性阻塞性肺病 (COPD)、囊性纤维化、炎性肺病、高同型半胱氨酸血症、镰状细胞病、先兆子痫、慢性肾衰竭、慢性肾功能障碍、肾微血管疾病、肝再灌注损伤、神经病、阿尔茨海默氏症、甲状腺疾病、脓毒症、血栓症、多器官功能衰竭、炎性肠病和辐射损伤。

[0011] 本发明涉及在需要治疗的受试者的某一部位治疗内皮功能障碍的方法,包括给受试者施用治疗性有效量的包括一种或多种 NPAR 激动剂和一种或多种血管生长因子的组合,其中所述部位不是被血管成形术损伤的动脉、慢性皮肤溃疡、需要成骨诱导的部位或需要心血管再形成的部位。

[0012] 本发明还涉及一种在需要治疗的受试者的某一部位治疗内皮功能障碍的方法,包括给受试者施用治疗性有效量的一种组合,这种组合基本上由非蛋白水解激活的凝血酶受体的激动剂和血管生长因子组成,其中所述部位不是被血管成形术损伤的动脉、慢性皮肤溃疡、需要成骨诱导的部位或需要心血管再形成的部位。在本方法中,给受试者施用血管生长因子和 NPAR 激动剂,作为联合治疗中仅有的治疗活性剂。

[0013] 在一些实施方案中,NPAR 激动剂可以对受试者进行系统给药,并且在其他一些实施例中可以经血管给药,在其他一些实施例中可以进行局部给药。

[0014] 在一个实施方案中,NPAR 激动剂是一种在此公开的凝血酶肽衍生物。更具体地,一种凝血酶肽衍生物包含氨基酸序列 Arg-Gly-Asp-Ala-Cys-X₁-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-X₂-Val (SEQ ID NO :1),或其 C- 末端截短的包含至少六个氨基酸的片段。在另一个具体的实施方案中,凝血酶肽衍生物包含 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列 :Ala-Gly-Tyr-Lys-Pro-Asp-Glu-Gly-Lys-Arg-Gly-Asp-Ala-Cys-X₁-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-X₂-Val,具有至少十四个氨基酸的凝血酶肽衍生物的 N- 末端截短的片段,或包含至少十八个氨基酸的凝血酶肽衍生物的 C- 末端截短的片段。X₁ 是 Glu 或 Gln,X₂ 是 Phe、Met、Leu、His 或 Val。在另一个具体的实施方案中,凝血酶肽衍生物是多肽 SEQ ID NO :3 :H-Ala-Gly-Tyr-Lys-Pro-Asp-Glu-Gly-Lys-Arg-Gly-Asp-Ala-Cys-Glu-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-Phe-Val-NH₂ (TP508)。

[0015] 在另一个实施方案中,NPAR 激动剂是在此公开的一种修饰的凝血酶肽衍生物。在一个具体的实施方案中,修饰的凝血酶肽衍生物包含氨基酸序列 SEQ ID NO :4 :Arg-Gly-Asp-Ala-Xaa-X₁-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-X₂-Val,或其 C- 末端截短的具有至少六个氨基酸的片段。在另一个具体的实施方案中,修饰的凝血酶肽衍生物包含 SEQ ID NO :5 的氨基酸序列 :Ala-Gly-Tyr-Lys-Pro-Asp-Glu-Gly-Lys-Arg-Gly-Asp-Ala-Xaa-X₁-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-X₂-Val,或其包含 SEQ ID NO :5 的氨基酸 10-18 的片段。

[0016] 在另一个实施方案中,NPAR 是在此公开的由两个凝血酶肽衍生物形成的一种凝血

酶肽衍生物二聚体。更具体地,二聚体中的凝血酶肽衍生物包含氨基酸序列 Arg-Gly-Asp-Ala-Cys-X₁-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-X₂-Val (SEQ ID NO:1),或其 C-末端截短的具有至少六个氨基酸的片段。在另一个具体的实施方案中,二聚体中的凝血酶肽衍生物包括一种多肽,该多肽具有 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列:Ala-Gly-Tyr-Lys-Pro-Asp-Glu-Gly-Lys-Arg-Gly-Asp-Ala-Cys-X₁-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-X₂-Val,或其包含 SEQ ID NO:2 的氨基酸 10-18 的片段。在本发明的另一个实施方案中,二聚体中的凝血酶肽衍生物是多肽 H-Ala-Gly-Tyr-Lys-Pro-Asp-Glu-Gly-Lys-Arg-Gly-Asp-Ala-Cys-Glu-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-Phe-Val-NH₂ (SEQ ID NO:3),在另一个具体的实施方案中,凝血酶肽衍生物二聚体由结构式 (IV) 表示。

[0017] 在更进一步的实施方案中,NPAR 激动剂是能与互补肽结合的抗体或其抗原结合片段,其中互补肽由编码凝血酶一部分的核苷酸序列的互补序列编码。

[0018] 上面提及的凝血酶可以是哺乳动物的凝血酶,并且更特别地,是人凝血酶。凝血酶的部分可以是凝血酶受体结合域或其一部分。在一个实施方案中,凝血酶受体结合域或其部分包含氨基酸序列 Ala-Gly-Tyr-Lys-Pro-Asp-Glu-Gly-Lys-Arg-Gly-Asp-Ala-Cys-Glu-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-Phe-Val (SEQ ID NO:6)。凝血酶受体结合域的另一个部分包含氨基酸序列 Glu-Gly-Lys-Arg-Gly-Asp-Ala-Cys-Glu-Gly (SEQ ID NO:7)。

[0019] 能与抗体或其抗原结合片段结合的互补肽可由反义 RNA 链的 5' -3' 序列编码,或由反义 RNA 链的 3' -5' 序列编码。

[0020] 在具体的实施方案中,互补肽包含氨基酸序列 Lys-Gly-Ser-Pro-Thr-Val-Thr-Phe-Thr-Gly-Ile-Pro-Cys-Phe-Pro-Phe-Ile-Arg-Leu-Val-Thr-Ser (SEQ ID NO:8),或 Thr-Phe-Thr-Gly-Ile-Pro-Ser-Phe-Pro-Phe (SEQ ID NO:9),或 Arg-Pro-Met-Phe-Gly-Leu-Leu-Pro-Phe-Ala-Pro-Leu-Arg-Thr-Leu-Pro-Leu-Ser-Pro-Pro-Gly-Lys-Gln (SEQ ID NO:10),或 Lys-Pro-Phe-Ala-Pro-Leu-Arg-Thr-Leu-Pro (SEQ ID NO:11)。

[0021] 本发明方法中使用的 NPAR 激动剂可以是多克隆抗体,或单克隆抗体或其抗原结合片段。在特定的实施方案中,它们是人抗体。在治疗方法中作为 NPAR 激动剂使用的单克隆抗体可以是人源化抗体、嵌合抗体或任何前述抗体的抗原结合片段,可包括 Fab 片段、Fab' 片段、F(ab')₂ 片段和 Fv 片段。

附图说明

[0022] 图 1 显示来自于实验的代表性 Western Blot 的 X 射线胶片和相应的条图,该条图显示来自于 Western 印迹上条带的光密度分析读数的比值,该实验用来检验 TP508 对在有或无 TNF α 情况下培养的细胞中精氨酸酶 1 表达水平的影响。在不含 (CTR) 或存在 TP508 (TP) 的情况下将人冠状动脉内皮 (HCAE) 细胞培养 1h,之后使用 TNF α 处理 24 小时。通过使用该酶特异性的抗体进行免疫印迹实验来分析细胞裂解物的人精氨酸酶 1 表达。剥膜后,用 GAPDH 抗体重新探查该膜,以显示蛋白质载量。(甘油醛-3-磷酸脱氢酶 GAPDH 水平未受 TNF α 和低氧的影响)。相应光密度值数据代表四次独立实验的平均值 $\pm$ SD [$p < 0.05$; CTR 对 TNF α (*) 或 TNF α 对 TP+TNF α (#)]。

[0023] 图 2 显示来自于 Western Blot 实验的 X 射线胶片和相应的条图,该条图显示来自于 Western 印迹上条带的光密度分析读数的比值,显示出 TP508 对 TNF α 上调精氨酸酶 1 的

剂量-反应效应。在使用 TNF α 刺激 24h 之前, HCAE 细胞用指定浓度的 TP508 预处理 1h, 通过免疫印迹实验来分析细胞裂解物中精氨酸酶 1 的表达。光密度分析显示出精氨酸酶 1 表达的相对强度。

[0024] 图 3 显示来自于实验的 Western Blots 的 X 射线胶片和相应的条图, 该条图显示来自于 Western 印迹上的条带的光密度分析读数的比值, 该实验显示 TP508 对 eNOS 表达和磷酸化(激活)的影响。HCAE 细胞用 TP508 或 TNF α 刺激并在正常氧或 1% 氧(低氧)条件下孵育 24h。通过使用针对 S1177 位点处磷酸化的 eNOS 的特异性抗体进行免疫印迹实验, 分析细胞裂解物的 eNOS 激活。剥膜后, 用抗体再探查该膜的 eNOS 和 GAPDH 总量。相应光密度值数据代表三次独立实验的平均值 $\pm$ SD[* 代表 $p < 0.05$; CTR 对 TP(*) (常氧); CTR 对 TP(*) (低氧)]。

[0025] 图 4 显示来自于 Western Blot 实验的 X 射线胶片和相应的条图, 该条图显示来自于 Western 印迹上的条带的光密度分析读数的比值, 该实验用来检验 TP508 对 eNOS 激活的影响的剂量依赖性。HCAE 细胞用指定浓度的 TP508 处理 24h 后, 分析 eNOS 活性和表达, 如图 3 所示。光密度分析显示 TP508 处理后 eNOS 磷酸化相对于总 eNOS 的变化。

[0026] 图 5 显示设计用于研究 TP508 对 eNOS mRNA 影响的实验产生的 RT-PCR 产物的染色凝胶。用 TNF α 或 TP508 刺激 6h 的细胞内 eNOS mRNA 表达的变化使用 RT-PCR 进行分析。

[0027] 图 6 是 eNOS mRNA 表达的定量分析数据的条图。HCAE 细胞用 TP508 或 TNF α 刺激, 然后在正常氧或低氧(1% 氧)条件下孵育 24h。使用 SYBR Green 实时 PCR 来分析 RNA 的 eNOS 表达。每种条件下与缺少 TP508 (CTR) 相比 $p < 0.05$ 。

[0028] 图 7 显示了编码人凝血酶原的氨基酸序列 (SEQ ID NO:12)。氨基酸 508-530, 其含有凝血酶受体结合域, 用下划线表示。凝血酶由凝血酶原的 C-端 579 个氨基酸残基组成。参见 GenBank 登录号 AJ972449。

[0029] 图 8 显示用 TP508、VEGF 或其组合处理后 HCAE 细胞中激活的内皮一氧化氮合酶 (eNOS) 的 Western 印迹的光密度分析。

[0030] 图 9A 是一个示意图, 显示了测量内皮细胞向化学引诱剂迁移的实验装置和实验设计。

[0031] 图 9B 是一个条图, 显示了 TP508 处理对内皮细胞向血管生成因子 VEGF 迁移的影响。

[0032] 图 10A 是一个示意图, 显示了测量内皮细胞通过 Matrigel 向化学引诱剂侵入的实验装置和实验设计。

[0033] 图 10B 是一个条图, 显示了 TP508 处理对内皮细胞向血管生成因子 VEGF 侵入的影响。

[0034] 图 11 显示了在正常氧条件或低氧条件下, 使用 VEGF 或 TP508 处理的人心脏微血管内皮细胞中 VEGF mRNA 的增加。

[0035] 图 12 是测量大鼠主动脉环来评估 TP508 的松弛效果的数据图。

[0036] 图 13A-13D 显示了在所示条件下来自缺血心脏的冠状小动脉扩张的程度。图 13A-13B 显示内皮依赖性、一氧化氮介导的血管舒张。通过测量指定浓度的腺苷 (图 13A) 或 5-羟色胺 (图 13B) 引起的血管舒张程度作为最大扩张的百分比, 评估小动脉中内皮功能障碍的程度, 所述小动脉分离自安慰剂(缺血安慰剂)或 TP508 处理的(缺血 TP508)心脏的

正常氧对照左前降支动脉（非缺血）或缺血冠状动脉左旋支。^{*}与非缺血相比 $p < 0.05$ ；[#]与缺血安慰剂相比 $p < 0.05$ 。图 13C 和 13D 显示不依赖于内皮的一氧化氮介导的血管舒张。为了测量缺血和 TP508 对不依赖于氧化氮的血管舒张的潜在影响，分离的小动脉使用指定浓度的硝普盐（图 13C）或吡那地尔（图 13D）进行刺激。

[0037] 图 13E 是一个条图，显示了用安慰剂或 TP508 处理分离自非缺血和缺血心脏的小动脉并分析一氧化氮产量的结果。

具体实施方式

[0038] 内皮功能障碍与一系列疾病的病因学有关，这些疾病包括高血压、充血性心力衰竭、冠状动脉疾病、中风、脑血管疾病、外周血管疾病、糖尿病、勃起功能障碍、动脉粥样硬化、哮喘、类风湿性关节炎、肺动脉高压、急性肺损伤、慢性阻塞性肺病（COPD）、囊性纤维化、炎性肺病、高同型半胱氨酸血症、镰状细胞病、先兆子痫、慢性肾衰竭、慢性肾功能障碍、肾微血管疾病、肝再灌注损伤、神经病、阿尔茨海默氏症、甲状腺疾病、脓毒症、血栓症、多器官功能衰竭、炎性肠病和辐射损伤等。

[0039] 申请人发现了能够刺激或激活非蛋白水解激活的凝血酶受体（下称 NPAR）的化合物，通过阻断与内皮功能障碍相关的精氨酸酶的上调，并且通过促进一氧化氮合酶的激活或上调，由此增加一氧化氮的产量，能够逆转或抑制内皮功能障碍。TP508 能够阻断由 $\text{TNF } \alpha$ 诱导的精氨酸酶的上调。该效应是剂量依赖性的。TP508 处理也能增加在常氧（正常氧浓度）和低氧（1%氧）条件下培养的细胞中 eNOS 的磷酸化。此外，TP508 刺激细胞能防止低氧诱导的 eNOS 表达下调，从而使 eNOS 保持在接近于在常氧条件下培养的细胞中所观测到的水平上。TP508 对 eNOS 磷酸化的影响是剂量依赖性的（实施例 3）。

[0040] 本发明包括在需要治疗的受试者的某一部位治疗内皮功能障碍的方法，和治疗内皮功能障碍的后果的方法，包括给受试者施用治疗性有效量的非蛋白水解激活的凝血酶受体的激动剂，其中所述部位不是被血管成形术损伤的动脉、慢性皮肤溃疡、需要成骨诱导的部位或需要心血管再形成的部位。在具体的实施方案中，接受治疗的受试者正患有或已患有的一种或多种疾病，该疾病选自：高血压、充血性心力衰竭、冠状动脉疾病、中风、脑血管疾病、外周血管疾病、糖尿病、勃起功能障碍、动脉粥样硬化、哮喘、类风湿性关节炎、肺动脉高压、急性肺损伤、慢性阻塞性肺病（COPD）、囊性纤维化、炎性肺病、高同型半胱氨酸血症、镰状细胞病、先兆子痫、慢性肾衰竭、慢性肾功能障碍、肾微血管疾病、肝再灌注损伤、神经病、阿尔茨海默氏症、甲状腺疾病、脓毒症、血栓症、多器官功能衰竭、炎性肠病和辐射损伤等。

[0041] 在一个特定方面，本发明涉及一种治疗内皮功能障碍的方法，由此治疗受试者的降低的葡萄糖耐量，包括给受试者施用治疗性有效量的非蛋白水解激活的凝血酶受体的激动剂。葡萄糖耐量降低的受试者包括那些具有发展为 2 型糖尿病的风险的人。在另一方面，本发明涉及一种治疗内皮功能障碍的方法，由此治疗受试者的糖尿病的并发症，包括给受试者施用治疗性有效量的非蛋白水解激活的凝血酶受体的激动剂。在这些方面，受试者不需要在被血管成形术损伤的动脉、慢性皮肤溃疡、需要成骨诱导的部位或需要心血管再形成的部位接受治疗。

[0042] 在另一个方面，本发明涉及一种治疗受试者的动脉粥样硬化的方法，包括给受试者施用治疗性有效量的非蛋白水解激活的凝血酶受体的激动剂。在这些方面，受试者不需

要在被血管成形术损伤的动脉、慢性皮肤溃疡、需要成骨诱导的部位或需要心血管再形成的部位接受治疗。

[0043] 内皮功能障碍是电离辐射引起的毒性的一个原因。例如,在被照射的肠中,内皮细胞被消耗,导致粘膜屏障崩溃,接着导致炎症,产生活性氧类别,并释放信号分子如 TGF- β 和 TNF- α 。这种炎症反应的影响有隐窝细胞增殖的下降、粘膜炎、分泌型腹泻、以及间充质细胞增殖和胶原蛋白产生的增加,导致纤维化和结痂。例如,在治疗各种癌症形式的高剂量治疗性辐射后,或者在工业事故中受到辐射照射时,受试者可能会因电离辐射而受到损伤。

[0044] 在另一个方面,本发明涉及一种治疗受试者的辐射损伤的方法,包括给受试者施用治疗性有效量的非蛋白水解激活的凝血酶受体的激动剂。在这个方面,受试者不需要在被血管成形术损伤的动脉、慢性皮肤溃疡、需要成骨诱导的部位或需要心血管再形成的部位接受治疗。

[0045] NPAR 激动剂

[0046] 能够刺激 NPAR 的化合物称为 NPAR 激动剂。NPAR 是一种高亲和性凝血酶受体,存在于大部分细胞的表面。这种 NPAR 组分主要负责高亲和性地结合凝血酶、蛋白水解灭活的凝血酶以及凝血酶衍生肽至细胞上。NPAR 似乎介导一系列由凝血酶引发的细胞信号,并不依赖于它的蛋白水解活性。这些信号中的一个例子是通过扣除杂交确定的膜联蛋白 V 和其他分子的上调(参见 Sower 等, *Experimental Cell Research* 247 :422(1999))。因此 NPAR 的特征在于它与凝血酶在细胞表面的高亲和性相互作用,以及它可以被下述的蛋白水解灭活的凝血酶衍生物和凝血酶衍生肽激动剂激活。正如美国专利号 5, 352, 664 和 5, 500, 412 中所公开的那样,在存在亚促有丝分裂浓度的凝血酶或能激活蛋白激酶 C 的分子的情况下,在加至成纤维细胞后,基于分子刺激细胞增殖的能力可以分析 NPAR 的激活。这些专利的完整教导在此引入作为参考。NPAR 激动剂可以根据其激活或根据与 ^{125}I -凝血酶竞争结合到细胞上的能力来鉴定。

[0047] 凝血酶受体结合域被定义为一种多肽或一种多肽的部分,其可以直接结合至凝血酶受体和 / 或竞争性抑制高亲和力凝血酶受体和 α -凝血酶之间的结合。

[0048] 本发明的 NPAR 激动剂包括在此公开的凝血酶衍生肽、修饰的凝血酶衍生肽、凝血酶衍生肽二聚体和针对凝血酶互补肽的 NPAR 激动剂抗体。

[0049] 凝血酶衍生肽

[0050] 在 NPAR 激动剂中有凝血酶肽衍生物(也称作:“凝血酶衍生肽”),其属于凝血酶类似物,具有至少部分来自于凝血酶氨基酸序列的氨基酸序列,并且对于非蛋白水解激活的凝血酶受体具有活性。例如,凝血酶肽衍生物包括:由重组 DNA 方法产生的肽、通过酶消化凝血酶产生的肽和合成产生的肽,相对于凝血酶和 / 或修饰的氨基酸,这些肽可以含有氨基酸置换,特别是在末端处。

[0051] 本发明的 NPAR 激动剂包括美国专利号 5, 352, 664 和 5, 500, 412 中描述的凝血酶衍生肽。在一个实施方式中,本发明的 NPAR 激动剂是一种凝血酶肽衍生物或生理功能等价物,例如,一种不超过大约 50 个氨基酸的多肽,优选地不超过大约 30 个氨基酸,并且与对应于凝血酶氨基酸 508-530 (Ala-Gly-Tyr-Lys-Pro-Asp-Glu-Gly-Lys-Arg-Gly-Asp-Ala-Cys-Glu-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-Phe-Val ;SEQ ID NO :6) 的人凝血酶片段具有足以使该多肽激活 NPAR 的同源性。此处描述的凝血酶肽衍生物或修饰的凝血酶肽衍生物优选地具有

大约 12 个至大约 23 个氨基酸残基,更优选地从大约 19 个至大约 23 个氨基酸残基。

[0052] 在另一个实施方式中,本发明的 NPAR 激动剂是一种凝血酶肽衍生物,其包含由结构式 (I) 表示的部分:

[0053] Asp-Ala-R(I).

[0054] R 为丝氨酸酯酶保守域。丝氨酸酯酶,例如胰蛋白酶、凝血酶、胰凝乳蛋白酶等,具有高度保守的区域。“丝氨酸酯酶保守域”是指具有这些保守区域之一的氨基酸序列的多肽,或与这些保守区域之一有足够的同源性以便凝血酶肽衍生物能保留 NPAR 激活能力。

[0055] 凝血酶衍生物的生理功能等价物涵盖与凝血酶衍生物在一些细节上有所不同,但不影响凝血酶受体结合域的功能或丝氨酸酯酶保守氨基酸序列的分子。这些细节包括,但并不局限于,保守的氨基酸置换(如以下对 NPAR 激动剂所述的)和修饰,例如羧基末端的酰胺化、氨基末端的酰化、多肽与生理惰性载体分子的偶联,或依据丝氨酸酯酶保守序列的序列改变。

[0056] 具有丝氨酸酯酶保守序列的域可以包括含有十二肽的至少 4-12 个 N 末端氨基酸的多肽序列,该十二肽在丝氨酸蛋白酶中显示出高度保守性(Asp-X₁-Cys-X₂-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-X₃-Val;SEQ ID NO:13;其中 X₁ 是 Ala 或 Ser;X₂ 是 Glu 或 Gln;X₃ 是 Phe、Met、Leu、His、或 Val)。

[0057] 在一个实施方式中,丝氨酸酯酶保守序列包含 SEQ ID NO:14(Cys-Glu-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-Phe-Val) 的氨基酸序列,或具有 SEQ ID NO:14 氨基酸序列的多肽的 C-末端截短片段。但是,应当理解,丝氨酸酯酶保守序列中的零、一、二、或三个氨基酸可以和 SEQ ID NO:14 中的相应氨基酸序列不同。优选地,丝氨酸酯酶保守序列中和 SEQ ID NO:14 的相应氨基酸不同的氨基酸是如下所述的保守置换,并且更优选地是高度保守的置换。“C-末端截短的片段”是指从 C-末端移除一个氨基酸或一段氨基酸后剩余的片段,该片段具有至少六个并且更优选地至少九个氨基酸。

[0058] 在另一个实施方式中,丝氨酸酯酶保守序列包含 SEQ ID NO:15(Cys-X₁-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-X₂-Val;X₁ 是 Glu 或 Gln,X₂ 是 Phe、Met、Leu、His 或 Val) 的氨基酸序列,或其 C-末端截短的片段,该片段具有至少六个氨基酸,优选地具有至少九个氨基酸。

[0059] 在一个优选的实施方式中,凝血酶肽衍生物包含丝氨酸酯酶保守序列和更具具体的凝血酶氨基酸序列 Arg-Gly-Asp-Ala(SEQ ID NO:16) 的多肽。该类型的凝血酶肽衍生物的一个实例包含 Arg-Gly-Asp-Ala-Cys-X₁-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-X₂-Val(SEQ ID NO:1)。X₁ 和 X₂ 如上所述。该凝血酶肽衍生物可以包含氨基酸序列 SEQ ID NO:6(Ala-Gly-Tyr-Lys-Pro-Asp-Glu-Gly-Lys-Arg-Gly-Asp-Ala-Cys-Glu-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-Phe-Val),或其 N-末端截短的片段,条件是凝血酶肽衍生物的第 1-9 位的零、一、二或三个氨基酸与 SEQ ID NO:6 相应位点的氨基酸不同。优选地,凝血酶肽衍生物中和 SEQ ID NO:6 相应氨基酸残基不同的氨基酸残基是如下对于 NPAR 激动剂所述的保守置换,并且更优选地是高度保守的置换。“N-末端截短的片段”是指从 N-末端移除一个氨基酸或一段氨基酸后剩余的片段,优选地是不超过六个氨基酸的片段,更优选地是不超过三个氨基酸的片段。

[0060] 任选地,此处描述的凝血酶肽衍生物可以在 C-末端酰胺化和/或在 N-末端酰化。在一个具体的实施方式中,凝血酶肽衍生物包含 C-末端酰胺和任选地包含酰化的 N-末端,其中所述的 C-末端酰胺由 -C(O)NR_aR_b 表示,其中 R_a 和 R_b 独立地是氢、C₁-C₁₀ 取代的或非取

代的脂肪族基团,或 R_a 和 R_b 同与它们键合的氮一起形成一个 C_1-C_{10} 非芳香族杂环基团,并且所述的 N-末端酰基基团由 $R_cC(O)-$ 表示,其中 R_c 独立地是氢、 C_1-C_{10} 取代的或非取代的脂肪族基团,或 C_1-C_{10} 取代的或非取代的芳香族基团。在另一个具体的实施方式中,凝血酶肽衍生生物的 N-末端是自由的(即非取代的)并且 C-末端是自由的(即非取代的)或酰胺化的,优选地为甲酰胺(即 $-C(O)NH_2$)。在一个具体的实施方式中,凝血酶肽衍生物包含以下氨基酸序列:Ala-Gly-Tyr-Lys-Pro-Asp-Glu-Gly-Lys-Arg-Gly-Asp-Ala-Cys-Glu-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-Phe-Val (SEQ ID NO:6)。在另一个具体的实施方式中,凝血酶肽衍生物包含氨基酸序列 Arg-Gly-Asp-Ala-Cys-Glu-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-Phe-Val (SEQ ID NO:17)。可选择地,凝血酶肽衍生物包含氨基酸序列 SEQ ID NO:18:Asp-Asn-Met-Phe-Cys-Ala-Gly-Tyr-Lys-Pro-Asp-Glu-Gly-Lys-Arg-Gly-Asp-Ala-Cys-Glu-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-Phe-Val-Met-Lys-Ser-Pro-Phe。包含 SEQ ID NO:6,17 或 18 的氨基酸的凝血酶肽衍生物可以任选地在 C-末端酰胺化和/或在 N-末端酰化。优选地,N-末端是自由的(即非取代的)并且 C-末端是自由的(即非取代的)或酰胺化的,优选地为甲酰胺(即 $-C(O)NH_2$)。但是应当理解,凝血酶肽衍生生物的第 1-9 位点和第 14-23 位点的零、一、二或三个氨基酸可与 SEQ ID NO:6 中的相应氨基酸不同。同样应当理解,凝血酶肽衍生生物的第 1-14 位点和第 19-33 位点的零、一、二或三个氨基酸可与 SEQ ID NO:18 中的相应氨基酸不同。优选地。凝血酶肽衍生物中与 SEQ ID NO:6 或 SEQ ID NO:18 中相应氨基酸不同的氨基酸是如下所述的保守性置换,并且更优选地是高度保守性的置换。可选择地,具有至少十四个氨基酸的凝血酶肽衍生生物的 N-末端截短片段,或具有至少十八个氨基酸的凝血酶肽衍生生物的 C-末端截短片段,是将要用作 NPAR 激动剂的凝血酶肽衍生物。

[0061] “C-末端截短的片段”是指从 C-末端移除一个氨基酸或一段氨基酸后剩余的片段。“N-末端截短的片段”是指从 N-末端移除一个氨基酸或一段氨基酸后剩余的片段。如上所述,应当理解术语“C-末端截短的片段”和“N-末端截短的片段”可含有 N-末端的酰胺化和/或 C-末端的酰化。

[0062] 公开的方法中使用的一种优选的凝血酶肽衍生物包含氨基酸序列 SEQ ID NO:2:Ala-Gly-Tyr-Lys-Pro-Asp-Glu-Gly-Lys-Arg-Gly-Asp-Ala-Cys- X_1 -Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro- X_2 -Val。公开的方法中使用的另一种优选的凝血酶肽衍生物包含氨基酸序列 SEQ ID NO:19:Asp-Asn-Met-Phe-Cys-Ala-Gly-Tyr-Lys-Pro-Asp-Glu-Gly-Lys-Arg-Gly-Asp-Ala-Cys- X_1 -Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro- X_2 -Val-Met-Lys-Ser-Pro-Phe。 X_1 是 Glu 或 Gln; X_2 是 Phe、Met、Leu、His 或 Val。SEQ ID NO:2 和 SEQ ID NO:19 的凝血酶肽衍生物任选地可包含如上所述的 C-末端酰胺和/或酰化的 N-末端。优选地,N-末端是自由的(即非取代的)并且 C-末端是自由的(即非取代的)或酰胺化的,优选地为甲酰胺(即 $-C(O)NH_2$)。可选择地,这些优选的凝血酶肽衍生生物的 N-末端截短的片段、具有至少十四个氨基酸的 N-末端截短的片段、或这些优选的凝血酶肽衍生生物的 C-末端截短的片段、具有至少十八个氨基酸的 C-末端截短的片段,也可以在公开的方法中使用。

[0063] TP508 是凝血酶肽衍生物的一个实例,其长度为 23 个氨基酸残基,其中 N-末端氨基酸残基 Ala 未被置换,且 C-末端氨基酸 Val 的 COOH 被修饰成由 $-C(O)NH_2$ 表示的酰胺 (SEQ ID NO:3)。凝血酶肽衍生生物的另一个实例包含氨基酸序列 SEQ ID NO:6,其中 N-末端和 C-末端都未被取代(“脱酰胺 TP508”)。可在公开方法中使用的凝血酶肽衍生生物的其他

实例包括 TP508 的 N- 末端截短的片段（或脱酰胺 TP508）、具有至少十四个氨基酸的 N- 末端截短的片段、或 TP508 的 C- 末端截短的片段（或脱酰胺 TP508）、具有至少十八个氨基酸的 C- 末端截短的片段。

[0064] 此处使用的多肽的“保守性置换”是指一种氨基酸被另一种具有同样净电荷和近似大小和形状的氨基酸代替。当它们侧链中碳原子和杂原子总数相差不超过大约四个时，具有脂肪族或取代的脂肪族氨基酸侧链的氨基酸具有大约相同的大小。当它们侧链中的分枝数目不超过一个时，它们还具有大约相同的形状。侧链中含有苯基或取代的苯基基团的氨基酸被认为具有大约相同的大小和形状。下面列出了五组氨基酸。多肽中的一个氨基酸如果被另一个来自同组的氨基酸替换会导致保守性置换：

[0065] I 组：甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸以及非天然存在的具有 C1-C4 脂肪族或 C1-C4 羟基取代的脂肪族侧链（直链或单支链的）的氨基酸。

[0066] II 组：谷氨酸、天冬氨酸以及非天然存在的具有羧酸取代的 C1-C4 脂肪族侧链（非支链的或一个支链点）的氨基酸。

[0067] III 组：赖氨酸、鸟氨酸、精氨酸以及非天然存在的具有胺基或胍基取代的 C1-C4 脂肪族侧链（非支链的或一个支链点）的氨基酸。

[0068] IV 组：谷氨酰胺、天冬酰胺以及非天然存在的具有酰胺取代的 C1-C4 脂肪族侧链（非支链的或一个支链点）的氨基酸。

[0069] V 组：苯丙氨酸、苯甘氨酸、酪氨酸以及色氨酸。

[0070] 此处使用的多肽的“高度保守性置换”是指一种氨基酸被另一种具有同样侧链官能团以及近似相同的大小和形状的氨基酸代替。当它们侧链中碳原子和杂原子总数相差不超过两个时，具有脂肪族或取代的脂肪族氨基酸侧链的氨基酸具有大约相同的大小。当它们侧链中的分枝数目相同时，它们还具有大约相同的形状。高度保守性置换的实例包括缬氨酸替代亮氨酸、苏氨酸替代丝氨酸、天冬氨酸替代谷氨酸以及苯甘氨酸替代苯丙氨酸。不是高度保守性的置换的实例包括丙氨酸替代缬氨酸、丙氨酸替代丝氨酸以及天冬氨酸替代丝氨酸。

[0071] 修饰的凝血酶肽衍生物

[0072] 在本发明的一个实施方式中，相对于以上描述的凝血酶肽衍生物来说，NPAR 激动剂是修饰过的，其中上述的凝血酶肽衍生物的半胱氨酸残基被具有类似大小和电荷特性的氨基酸替代，以使肽的二聚化减至最少。适合的氨基酸的实例包括丙氨酸、甘氨酸、丝氨酸，或 S- 保护的半胱氨酸。优选地，半胱氨酸由丙氨酸替代。修饰的凝血酶肽衍生物与未修饰的凝血酶肽衍生物相比具有大约相同的生物活性。参见公开号为 US2005/0158301 A1 的申请，在此引入作为参考。

[0073] 应当理解，此处公开的修饰的凝血酶肽衍生物可以任选地包含 C- 末端酰胺和 / 或 N- 末端酰基基团，如上所述。优选地，凝血酶肽衍生物的 N- 端是自由的（即未取代的）以及 C- 端是自由的（即未取代的）或酰胺化的，优选地是甲酰胺（即 $-C(O)NH_2$ ）。

[0074] 在一个具体的实施方式中，修饰的凝血酶肽衍生物包含具有氨基酸序列 SEQ ID NO :4 的多肽：Arg-Gly-Asp-Ala-Xaa-X₁-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-X₂-Val，或其 C- 末端截短的含有至少六个氨基酸的片段。更优选地，凝血酶肽衍生物包含氨基酸序列 SEQ ID NO :

20 :Ala-Gly-Tyr-Lys-Pro-Asp-Glu-Gly-Lys-Arg-Gly-Asp-Ala-Xaa-Gly-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-Phe-Val,或其包含 SEQ ID NO :20 的氨基酸 10-18 的片段。更优选地,凝血酶肽衍生物包含氨基酸序列 SEQ ID NO :5 :Ala-Gly-Tyr-Lys-Pro-Asp-Glu-Gly-Lys-Arg-Gly-Asp-Ala-Xaa-X₁-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-X₂-Val,或其包含 SEQ ID NO :5 的氨基酸 10-18 的片段。Xaa 是丙氨酸、甘氨酸、丝氨酸或 S- 保护的半胱氨酸。X₁ 是 Glu 或 Gln 以及 X₂ 是 Phe、Met、Leu、His 或 Val。优选地 X₁ 是 Glu, X₂ 是 Phe,并且 Xaa 是丙氨酸。这种类型的凝血酶肽衍生物的一个实例是具有氨基酸序列 Ala-Gly-Tyr-Lys-Pro-Asp-Glu-Gly-Lys-Arg-Gly-Asp-Ala-Ala-Glu-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-Phe-Val (SEQ ID NO :21) 的多肽。这种类型的凝血酶肽衍生物的一个更进一步的实例是多肽 H-Ala-Gly-Tyr-Lys-Pro-Asp-Glu-Gly-Lys-Arg-Gly-Asp-Ala-Ala-Glu-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-Phe-Val-NH₂ (SEQ ID NO :22)。该凝血酶肽衍生物中的零、一、二或三个氨基酸与 SEQ ID NO :4, 20, 5, 21 或 22 的相应位置处的氨基酸不同,条件是 Xaa 是丙氨酸、甘氨酸、丝氨酸或 S- 保护的半胱氨酸。优选地,正如在 NPAR 激动剂的保守性置换中描述的,这种不同是保守性的。

[0075] 在另一个具体的实施方式中,凝血酶肽衍生物包含具有氨基酸序列 SEQ ID NO :23 :Asp-Asn-Met-Phe-Xbb-Ala-Gly-Tyr-Lys-Pro-Asp-Glu-Gly-Lys-Arg-Gly-Asp-Ala-Xaa-Gly-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-Phe-Val-Met-Lys-Ser-Pro-Phe 的多肽,或其包含氨基酸 6-28 的片段。更优选地,凝血酶肽衍生物包含具有氨基酸序列 SEQ ID NO :24 :Asp-Asn-Met-Phe-Xbb-Ala-Gly-Tyr-Lys-Pro-Asp-Glu-Gly-Lys-Arg-Gly-Asp-Ala-Xaa-X₁-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-X₂-Val-Met-Lys-Ser-Pro-Phe 的多肽,或其包含氨基酸 6-28 的片段。Xaa 和 Xbb 独立地是丙氨酸、甘氨酸、丝氨酸或 S- 保护的半胱氨酸。X₁ 是 Glu 或 Gln, X₂ 是 Phe、Met、Leu、His 或 Val。优选地 X₁ 是 Glu, X₂ 是 Phe,并且 Xaa 和 Xbb 是丙氨酸。这种类型的凝血酶肽衍生物的一个实例是包含氨基酸序列 Asp-Asn-Met-Phe-Ala-Ala-Gly-Tyr-Lys-Pro-Asp-Glu-Gly-Lys-Arg-Gly-Asp-Ala-Ala-Glu-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-Phe-Val-Met-Lys-Ser-Pro-Phe (SEQ ID NO :25) 的多肽。这种类型的凝血酶肽衍生物的另一个实例是多肽 H-Asp-Asn-Met-Phe-Ala-Ala-Gly-Tyr-Lys-Pro-Asp-Glu-Gly-Lys-Arg-Gly-Asp-Ala-Ala-Glu-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-Phe-Val-Met-Lys-Ser-Pro-Phe-NH₂ (SEQ ID NO :26)。该凝血酶肽衍生物中的零、一、二或三个氨基酸与 SEQ ID NO :23, 24, 25 或 26 相应位置处的氨基酸不同。Xaa 和 Xbb 独立地是丙氨酸、甘氨酸、丝氨酸或 S- 保护的半胱氨酸。优选地,正如在 NPAR 激动剂的保守性置换中描述的,这种不同是保守性的。

[0076] “S- 保护的半胱氨酸”是其中的巯基 -SH 的反应性被一个保护基团封闭的半胱氨酸残基。合适的保护基团在本领域中是众所周知的,并且例如在 T. W. Greene 和 P. G. M. Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, 3rd Edition, John Wiley & Sons, (1999), pp. 454-493 中公开,其教导在此引入作为参考。合适的保护基团应当是非毒性的、在药物制剂中稳定的、并且具有最小的额外功能性以维持凝血酶肽衍生物的活性。自由的巯基可以作为硫醚、硫酯被保护、或可被氧化成不对称的二硫化物。优选地巯基作为硫醚被保护。合适的硫醚包括,但不局限于, S- 烷基硫醚 (例如 C₁-C₅ 烷基), 和 S- 苯甲基硫醚 (例如半胱氨酸 -S-S-t-Bu)。优选地保护基团是烷基硫醚。更优选地, S- 保护的半胱氨酸是 S- 甲基半胱氨酸。或者,保护基团可以是: 1) 通过二硫键连接到凝血酶肽衍生物的半胱氨酸巯基上的半胱氨酸或含半胱氨酸的肽 (“保护性肽”); 或 2) 通过凝血酶肽衍生物的

半胱氨酸巯基和保护性肽的羧酸（例如，在天冬氨酸或谷氨酸的 C- 端或侧链）之间的硫酰胺键连接的氨基酸或肽（“保护性肽”）。保护性肽可以是生理惰性的（例如，不超过 50 个氨基酸的聚甘氨酸或聚丙氨酸，任选地被一个半胱氨酸打断），或可以具有理想的生物学活性。

[0077] 凝血酶肽衍生物二聚体

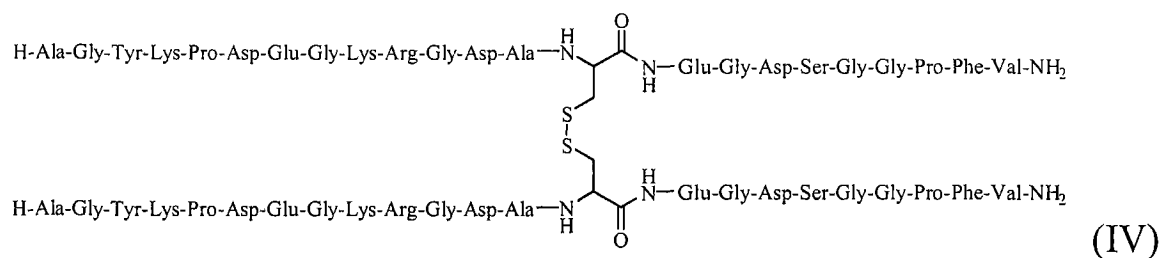
[0078] 本发明的一些方面，本方法的 NPAR 激动剂是凝血酶肽衍生物二聚体。参见公开 No. US2005/0153893，在此引入作为参考。二聚体基本上不会回转成单体并且具有与上述凝血酶肽衍生物单体大约相同的生物学活性。“凝血酶肽衍生物二聚体”是包含通过共价键（优选地是半胱氨酸残基之间的二硫键）连接的两个凝血酶肽衍生物分子。凝血酶肽衍生物二聚体典型地基本上不含相应的单体，例如，大于 95%（重量）不含相应单体，并且优选地 99%（重量）不含有单体。优选地，多肽是相同的且通过二硫键共价连接在一起。

[0079] 本发明的凝血酶肽衍生物二聚体包含上述凝血酶肽衍生物。具体地说，凝血酶肽衍生物具有少于大约五十个氨基酸，优选地少于大约三十三个氨基酸。凝血酶肽衍生物与对应于凝血酶氨基酸残基 508-530 :Ala-Gly-Tyr-Lys-Pro-Asp-Glu-Gly-Lys-Arg-Gly-Asp-Ala-Cys-Glu-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-Phe-Val (SEQ ID NO :6) 的人凝血酶片段也具有足够的同源性，使得该多肽能激活 NPAR。此处描述的凝血酶肽衍生物二聚体由多肽形成，这些多肽典型地具有至少六个氨基酸，优选地具有大约 12 个到大约 33 个氨基酸残基，并且更优选地具有大约 12 个到大约 23 个氨基酸残基。

[0080] 在一个具体的实施方式中，组成二聚体的每个凝血酶肽衍生物包含具有氨基酸序列 SEQ ID NO :1 :Arg-Gly-Asp-Ala-Cys-X₁-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-X₂-Val 的多肽，或其 C- 末端截短的包含至少六个氨基酸的片段。更优选地，每个凝血酶肽衍生物包含氨基酸序列 SEQ ID NO :6 :Ala-Gly-Tyr-Lys-Pro-Asp-Glu-Gly-Lys-Arg-Gly-Asp-Ala-Cys-Glu-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-Phe-Val，或其包含 SEQ ID NO. 5 的氨基酸 10-18 的片段。更优选地，凝血酶肽衍生物包含氨基酸序列 SEQ ID NO :2 :Ala-Gly-Tyr-Lys-Pro-Asp-Glu-Gly-Lys-Arg-Gly-Asp-Ala-Cys-X₁-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-X₂-Val，或其包含 SEQ ID NO :2 的氨基酸 10-18 的片段。X₁ 是 Glu 或 Gln，X₂ 是 Phe、Met、Leu、His 或 Val。优选地 X₁ 是 Glu，X₂ 是 Phe。这种类型的凝血酶肽衍生物的一个实例是一个包含氨基酸序列 Ala-Gly-Tyr-Lys-Pro-Asp-Glu-Gly-Lys-Arg-Gly-Asp-Ala-Cys-Glu-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-Phe-Val (SEQ ID NO :6) 的多肽。这种类型的凝血酶肽衍生物的另一个实例是包含氨基酸序列 H-Ala-Gly-Tyr-Lys-Pro-Asp-Glu-Gly-Lys-Arg-Gly-Asp-Ala-Cys-Glu-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-Phe-Val-NH₂ (SEQ ID NO :3) 的多肽。凝血酶肽衍生物中的零、一、二或三个氨基酸与 SEQ ID NO :6、1、2 或 3 相应位点的氨基酸不同。优选地，如 NPAR 激动剂的保守性置换一样，该不同也是保守性的。

[0081] 本发明的凝血酶肽衍生物二聚体的一个实例由结构式 (IV) 表示：

[0082]



[0083] 在另一个具体的实施方式中,组成二聚体的每个凝血酶肽衍生物包含具有氨基酸序列 SEQ ID NO:27:Ala-Gly-Tyr-Lys-Pro-Asp-Glu-Gly-Lys-Arg-Gly-Asp-Ala-Cys-Glu-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-Phe-Val-Met-Lys-Ser-Pro-Phe-Asn-Asn-Arg-Trp-Tyr 的多肽,或其 C-末端截短的具有至少 23 个氨基酸的片段。更优选地,每个凝血酶肽衍生物包含氨基酸序列 SEQ ID NO:28:Ala-Gly-Tyr-Lys-Pro-Asp-Glu-Gly-Lys-Arg-Gly-Asp-Ala-Cys-X₁-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-X₂-Val-Met-Lys-Ser-Pro-Phe-Asn-Asn-Arg-Trp-Tyr,或其 C-末端截短的包含至少 23 个氨基酸的片段。X₁ 是 Glu 或 Gln, X₂ 是 Phe、Met、Leu、His 或 Val。优选地 X₁ 是 Glu, X₂ 是 Phe。这种类型的凝血酶肽衍生物的一个实例是包含氨基酸序列 Ala-Gly-Tyr-Lys-Pro-Asp-Glu-Gly-Lys-Arg-Gly-Asp-Ala-Cys-Glu-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-Phe-Val-Met-Lys-Ser-Pro-Phe-Asn-Asn-Arg-Trp-Tyr (SEQ ID NO:27) 的多肽。这种类型的凝血酶肽衍生物的另一个实例是包含氨基酸序列 H-Ala-Gly-Tyr-Lys-Pro-Asp-Glu-Gly-Lys-Arg-Gly-Asp-Ala-Cys-Glu-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-Phe-Val-Met-Lys-Ser-Pro-Phe-Asn-Asn-Arg-Trp-Tyr-NH₂ (SEQ ID NO:29) 的多肽。凝血酶肽衍生物中的零、一、二或三个氨基酸与 SEQ ID NO:27、28 或 29 相应位点的氨基酸不同。优选地,如对于 NPAR 激动剂的保守性置换所述,该不同也是保守性的。

[0084] NPAR 激动剂抗体

[0085] 一种特定种类的 NPAR 激动剂包括能够结合至并激活非蛋白水解激活的凝血酶受体 (NPAR) 并且能结合至一种或多种下面描述的互补肽的抗体和抗原结合片段。结合至凝血酶受体的激动剂抗体在本领域中已有描述。例如, Fost 等教导了单克隆抗体 TR-9 能够模拟凝血酶与高亲和性凝血酶受体的高亲和性相互作用的效应 (Frost, G. H. 等, J. Cell Biol. 105(6 PT. 1):2551-58(1987))。

[0086] 作为 NPAR 激动剂的抗体或其抗原结合片段可通过它们与互补肽的结合来发现,该互补肽由编码一部分凝血酶的核苷酸序列的互补序列编码。参见下面的“分子识别理论”部分。在一种情况下, NPAR 激动剂抗体或抗原结合片段与互补肽结合,该互补肽由编码一部分凝血酶的核苷酸序列的互补序列编码。在另一种情况下, NPAR 激动剂的抗体或其抗原结合片段可通过它们与互补肽的结合来发现,该互补肽由编码一部分凝血酶的核苷酸序列的互补序列编码。在一个实施方式中,凝血酶或其部分(由正义或 +RNA 链编码并且与编码抗体或抗原结合片段所结合的互补肽的 RNA 链是互补的)是哺乳动物凝血酶或哺乳动物凝血酶的一部分。在另一个实施方式中,凝血酶或其部分是人凝血酶或人凝血酶的一部分。

[0087] 可与互补肽(其中互补肽由编码凝血酶或其部分的核苷酸序列的互补序列编码)结合的抗体或其抗原结合片段可以是 NPAR 激动剂。在一个实施方式中,凝血酶的部分(由正义或 +RNA 链编码并且与编码抗体或抗原结合片段所结合的互补肽的 RNA 链是互补的)是凝血酶受体结合域或其部分。如此处所使用的,凝血酶受体结合域或其部分是凝血酶的一个区段,它能够选择性地结合至高亲和性非蛋白水解激活的凝血酶受体 (NPAR)。

此类凝血酶受体结合域含有结构域的一部分（由人凝血酶氨基酸残基 517-520 表示，参见图 7，其显示了人凝血酶原的氨基酸序列（SEQ ID NO :12）），与纤连蛋白的三肽细胞结合域 Arg-Gly-Asp 有序列同源性。在一个特定的实施方式中，凝血酶受体结合域或其部分包含氨基酸序列 AGYKPDEGKRGDACEGDSGGPFV（即，人凝血酶的氨基酸 508-530（SEQ ID NO :6））。在另一个实施方式中，凝血酶受体结合域或其部分是凝血酶受体结合域的一部分并且包含氨基酸序列 EGKRGDACEG（SEQ ID NO :7）。

[0088] 正如此处所描述的，由反义 RNA 链 5' -3' 序列和反义 RNA 链 3' -5' 序列编码的凝血酶域的互补肽，都可以用于产生本发明的 NPAR 激动剂抗体和抗原结合域。因此，在一个实施方式中，互补肽（可结合抗体和抗原结合片段）由反义 RNA 链的 5' -3' 序列编码。在另一个实施方式中，互补肽由反义 RNA 链的 3' -5' 序列编码。

[0089] 在一个实例中，互补肽（可结合本发明的 NPAR 激动剂抗体和抗原结合片段）包含氨基酸序列 KGSPTVTFTGIPCFPFIRLVTS（AC-23 ;SEQID NO :30）。在另一个实例中，互补肽包含氨基酸序列 KGSPTVTFTGIPSFPFIRLVTS（23C53 ;SEQ ID NO :31）。在另一个实例中，互补肽包含氨基酸序列 TFTGIPSFPF（C1053 ;SEQ ID NO :32）。在另一个实例中，互补肽包含氨基酸序列 RPMFGLLPFAPLRTLPLSPPGKQ[AC-23rev（SEQ ID NO :33），它是相对于 AC-23 互补的 5' -3' 肽]。在另一个实例中，互补肽包含氨基酸序列 LPFAPLRTLPL[C1053rev（SEQ ID NO :34），它是相对于 C1053 互补的 5' -3' 肽]。

[0090] NPAR 激动剂抗体或其抗原结合片段的一个实例可以与包含氨基酸序列 KGSPTVTFTGIPSFPFIRLVTS（23C53 ;SEQ ID NO :31）的半胱氨酸改变的互补肽结合。23C53，其与 AC-23 有一个氨基酸不同，是 TP508 的互补肽，除了它拥有一个从 Cys 至 Ser 的单氨基酸改变以外。

[0091] 在使用生物素偶联的凝血酶的结合实验中，发现凝血酶可特异性地结合 AC23 和 23C53。生物素标记的凝血酶与 AC-23 的半数最大结合是 $4.8 \pm 0.2 \text{ nM}$ ($n = 2 \pm \text{SD}$)。

[0092] 添加 TP508 可抑制生物素标记的凝血酶与 AC-23 的特异性结合。通过加入 TP508，凝血酶与 AC-23 的结合可被抑制达 60%。因此，不论是凝血酶还是 TP508 都能结合互补肽 AC-23。这提示 AC-23 具有与细胞上凝血酶-TP508 受体相类似的三维结构。抗 AC-23 的抗体和凝血酶的其他互补肽因此可用于鉴定被 TP508 激活的凝血酶结合位点，并且可以用于此处描述的治疗方法和其他方法中。

[0093] 除凝血酶受体结合域之外，刺激性的（激动性的）凝血酶多肽衍生物拥有与许多丝氨酸酯酶有高度同源性的结构域（由人凝血酶的氨基酸残基 519-530 表示）。然而，抑制性的（拮抗性的）凝血酶肽衍生物并不包括丝氨酸酯酶域。

[0094] 来自于人凝血酶氨基酸残基 508-530 的凝血酶肽衍生物据描述可以促进凝血酶受体介导的细胞刺激。此外，含有纤连蛋白同源域和丝氨酸蛋白酶同源域（人凝血酶的残基 508-530）的刺激性的（激动性的）凝血酶多肽衍生物可高亲和性地结合凝血酶受体并替代 DIP- α -凝血酶作为引发与受体占据相关的有丝分裂信号的引发物（DIP- α -凝血酶是保留受体结合活性的蛋白水解失活的凝血酶衍生物）。相比之下，仅含有纤连蛋白同源域（p517-520）（而不含丝氨酸蛋白酶同源域）的抑制性的（拮抗性的）凝血酶多肽衍生物可结合至凝血酶受体但并不引发有丝分裂。一种中间凝血酶肽衍生物（p519-530）保留有介导有丝分裂的能力，但比 p508-530 的能力小很多。

[0095] 分子识别理论

[0096] Blalock 和 Smith(1984) 观察到,氨基酸残基的亲水特征与转录为它的三联密码子的中间字母的身份有关 (Blalock, J. E. 和 Smith, E. M., Biochem. Biophys. Res. Commun. 12 :203-07(1984))。具体地,中间碱基密码为胸腺嘧啶 (T) 的三联密码子编码疏水性残基,而中间碱基为腺嘌呤 (A) 的三联密码子编码亲水性残基。中间碱基为胞嘧啶 (C) 或鸟嘌呤 (G) 的三联密码子编码具有类似亲水得分且相对中性的残基。亲水性是氨基酸对于极性环境的亲和性的指标;亲水性残基产生一个更加负值的得分,而疏水性残基呈现更加正值的得分。Kyte 和 Doolittle(1982) 构思了一种亲水性分级,被广泛应用 (Kyte, J. 和 Doolittle, R. F., J. Mol. Biol. 5 :105-32(1982))。观测到的三联密码子中间碱基和残基亲水性之间的这种关系导致由互补 DNA 编码的肽将会呈现互补的或逆转的亲水性特征。据推测,由于两个由互补 DNA 链编码的肽序列显示出相反的亲水特征,它们可能会形成两亲性二级结构,并且会彼此结合 (Bost, K. L. 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 :1372-75(1985))。据报道互补肽可以与它们对于许多不同系统而言的“正义”肽对应物形成结合复合物 (Root-Bernstein, R. S. 和 Holsworthy, D. D., J. Theor. Biol. 190 :107-19(1988))。例如, Gho 和 Chae 描述了人血管生成素的肽拮抗剂,它们是由对应于血管生成素受体结合位点的反义 RNA 序列编码的互补肽 (Gho, Y. S. 和 Chae, C. B. J. Biol. Chem. 272(39) :24294-99(1997))。Ghisso 等描述了一种与胰蛋白酶抑制剂 C 的一个区域互补的肽,其呈现出抑制性活性 (Ghisso, J. 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87(4) :1288-91(1990)),并且 Bost 和 Blalock 描述了通过使用一对互补肽免疫从而产生了抗独特型抗体 (Bost, K. L. 和 Blalock, J. E., J. Molec. Recognit. 1 :179-83(1989))。

[0097] Blalock 提出了一种分子识别理论 (MRT),进一步发展了该分析用于解释蛋白质间相互作用的范围 (Bost, K. L. 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 :1372-75(1985); Blalock, J. E., Nature Med. 1 :876-78(1995))。基于由互补 DNA 链编码的肽会呈现出逆转的亲水特征这一观察,这种理论提出在肽之间存在着一种“分子识别”相互作用密码。MRT 已经被证明在预测特定结合相互作用子方面是成功的。

[0098] Blalock 提出正是序列中氨基酸亲水性得分的线性模式 (而非特定残基的组合) 决定了二级结构环境。而且,他提出具有相反亲水性特征的序列在形状上是互补的,这是由于相反的力决定了它们的空间关系。

[0099] 在 3' -5' 阅读框内衍生互补肽

[0100] 作为起始工作的结果, Blalock 主张正如以通常的 5' -3' 方向阅读一个互补密码子一样,以 3' -5' 方向阅读一个互补密码子将会产生一个呈现相反亲水性特征的氨基酸序列 (Bost, K. L. 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 :1372-75(1985))。这是根据以下发现得出的:三联密码子的中间碱基决定它所编码的残基的亲水指数,因此从相反方向阅读一个密码子会改变身份,但不会改变编码的氨基酸的亲水性质 (表 1)。

[0101] 表 1:互补链中编码的氨基酸和残基之间的关系

[0102]

互补链中编码的氨基酸和残基之间的关系

阅读方向 3' - 5'

氨基酸	密码子	互补密码子	互补氨基酸	氨基酸	密码子	互补密码子	互补氨基酸
丙氨酸	GCA	CGU	精氨酸	丝氨酸	UCA	AGU	丝氨酸
	GCG	CGC			UCC	AGQ	精氨酸
	GCC	CGG			UCG	AGC	丝氨酸
	GCU	CGA			UCU	AGA	精氨酸
精氨酸	CGG	GCC	丙氨酸	谷氨酰胺	CAA	GUU	缬氨酸
天冬氨酸	GAC	GUC	缬氨酸	甘氨酸	GGA	CCU	脯氨酸
天冬酰胺	AAC	UUG	亮氨酸	组氨酸	CAC	GUG	缬氨酸
半胱氨酸	UGU	ACA	苏氨酸	异亮氨酸	AUA	UAU	酪氨酸
谷氨酸	GAA	CUU	亮氨酸	亮氨酸	CUG	GAC	Asp
赖氨酸	AAA	UUU	苯丙氨酸	苏氨酸	ACA	UGU	半胱氨酸
甲硫氨酸	AUG	UAC	酪氨酸	色氨酸	UGG	ACC	苏氨酸
脯氨酸	CCA	GGU	甘氨酸	缬氨酸	GUA	CAU	组氨酸

[0103] 抗体和产生抗体的细胞

[0104] 此处所指的 NPAR 激动剂包括能结合此处描述的互补肽并激活非蛋白水解激活的凝血酶受体的抗体和其抗原结合片段。此处所指的抗体可以是多克隆抗体或单克隆抗体，并且术语“抗体”包括多克隆和单克隆抗体。术语多克隆和单克隆是指抗体制备物的均质性程度，并非有意限定于某种特定生产方法。在一个实施方式中，抗体或抗原结合片段是单克隆抗体或其抗原结合片段。此处使用的术语“单克隆抗体”或“单克隆抗体组分”，指一种抗体分子的群体，其仅含有一种类型的抗原结合位点，该抗原结合位点能够与本发明多肽的特定表位免疫反应。单克隆抗体组分因此通常呈现对与它免疫反应的本发明特定多肽的

单一结合亲和性。

[0105] 此处使用的术语“抗体”也包括抗体的功能性片段,包括嵌合的、人源化的、灵长类化的、镶饰的 (veneered) 或单链抗体。功能性片段包括可与互补肽结合的抗体的抗原结合片段,其中互补肽由编码凝血酶或其部分的核苷酸序列的互补序列编码。例如,能够结合互补肽的抗体片段包括,但并不局限于 Fv、Fab、Fab' 和 F(ab')₂ 片段。这些片段可通过酶解或重组技术产生。例如,木瓜蛋白酶或胃蛋白酶裂解可分别产生 Fab 或 F(ab')₂ 片段。其他具有必要的底物特异性的蛋白酶也可用于产生 Fab 或 F(ab')₂ 片段。应用在天然终止位点的上游已经引入一个或多个终止密码子的抗体基因,也可以产生多种截短形式的抗体。例如,编码 F(ab')₂ 重链部分的嵌合基因可以设计成包含编码重链 CH₁ 域和铰链区的 DNA 序列。

[0106] 单链抗体,以及嵌合的、人源化的或灵长类化的 (CDR- 移植的)、或镶饰的抗体,以及包含来源于不同物种的部分的嵌合的、CDR- 移植的或镶饰的单链抗体,也涵盖在术语抗体中。这些抗体的不同部分可以通过常规技术以化学方法结合在一起,或使用遗传工程技术制备成一个连续的蛋白质。例如,编码一个嵌合或人源化链的核酸可表达产生一个连续的蛋白质。例如参见, Cabilly 等,美国专利 No. 4, 816, 567 ;Cabilly 等,欧洲专利 No. 0, 125, 023 B1 ;Boss 等,美国专利 No. 4, 816, 397 ;Boss 等,欧洲专利 No. 0, 120, 694 B1 ;Neuberger, M. S. 等, WO 86/01533 ;Neuberger, M. S. 等,欧洲专利 No. 0, 194, 276 B1 ; Winter, 美国专利 No. 5, 225, 539 ;Winter, 欧洲专利 No. 0, 239, 400 B1 ;Queen 等,欧洲专利 No. 0 451 216B1 ;和 Padlan, E. A. 等, EP 0 519 596 A1。有关灵长类化的抗体亦可参见, Newman, R. 等, BioTechnology, 10 :1455-1460 (1992), 有关单链抗体,可参见 Ladher 等,美国专利 No. 4, 946, 778 和 Bird, R. E. 等, Science, 242 :423-426 (1988)。

[0107] 人源化抗体可通过标准方法或其他适当技术由合成或重组 DNA 技术产生。编码人源化可变区的核酸 (例如, cDNA) 序列也可通过 PCR 突变方法构建,从而改变编码人或人源化链的 DNA 序列,例如来自于早先人源化的可变区的 DNA 模板 (例如参见, Kamman, M. 等, Nucl. Acids Res., 17 :5404 (1989)) ;Sato, K. 等, Cancer Research, 53 :851-856 (1993) ; Daugherty, B. L. 等, Nucleic Acids Res., 19 (9) :2471-2476 (1991) ;和 Lewis, A. P. 和 J. S. Crowe, Gene, 101 :297-302 (1991))。使用这些或适当方法,也可以容易地制备变体。在一个实施方式中,可以突变克隆的可变区,并且可以选择编码具有所需特异性的变体的序列 (例如,从噬菌体文库选择 ;例如参见 Krebber 等, U. S. 5, 514, 548 ;Hoogenboom 等, WO 93/06213)。

[0108] 抗体可以是包含一个或多个免疫球蛋白链的人源化抗体 [例如,一种抗体,其包含非人来源的互补决定区 (CDR) (例如,来源于非人源抗体的一个或多个 CDR) 和来源于人源轻链和 / 或重链的框架区 (例如,具有或不具有框架改变的 CDR 移植抗体)]。在一个实施方式中,抗体或其抗原结合片段包含特定免疫球蛋白的轻链 CDRs (CDR1、CDR2 和 CDR3) 和重链 CDRs (CDR1、CDR2 和 CDR3)。在另一个实施方式中,抗体或抗原结合片段还包含一个人源框架区。

[0109] 可以产生对互补肽具有特异性的抗体 (其中互补肽由编码凝血酶或其一部分的核苷酸序列的互补序列编码),该抗体针对适当的免疫原,例如合成的或重组的互补肽或其一部分。通过使用能够表达互补肽的转染细胞免疫适当的宿主 (例如小鼠),也能产生抗

体。这些细胞也可以用于筛选与之结合的抗体（例如参见，Chuntharapai 等，J. Immunol.，152:1783-1789(1994)；Chuntharapai 等，美国专利 No. 5, 440, 021）。

[0110] 免疫抗原的制备，以及单克隆和多克隆抗体的产生，可使用任何适当的技术进行（例如，如此处例举的）。已经描述了许多方法（例如参见，Kohler 等，Nature，256:495-497(1975) 和 Eur. J. Immunol. 6:511-519(1976)；Milstein 等，Nature 266:550-552(1977)；Koprowski 等，美国专利 No. 4, 172, 124；Harlow，E. 和 D. Lane，1988，Antibodies:A Laboratory Manual，(Cold Spring Harbor Laboratory:Cold Spring Harbor, NY)；Current Protocols In Molecular Biology, Vol. 2(Supplement 27, Summer' 94)，Ausubel，F.M. 等，Eds.，(John Wiley & Sons:New York, NY)，Chapter 11，(1991))。总体上讲，通过将适当的永生细胞系（例如，骨髓瘤细胞系，如 SP2/0、P3X63Ag8.653 或杂合骨髓瘤 (heteromyeloma)）和抗体产生细胞融合而产生杂交瘤。抗体产生细胞可以从用互补肽免疫的人或其他适当动物的外周血获得，或优选地从其脾脏或淋巴结获得。融合的细胞（杂交瘤）可使用选择性培养条件分离，并且通过有限稀释来克隆。产生具有所需特异性的抗体的细胞可通过适当试验（例如，ELISA）来选择。

[0111] 可以使用其他产生或分离具有必要特异性的抗体（例如，人抗体或抗原结合片段）的适当方法，包括，例如从文库（例如，噬菌体展示文库）筛选重组抗体的方法。能产生全套人抗体的转基因动物（例如，**Xenomouse**[®] (Abgenix, Fremont, CA)）可以使用适当方法得到（参见，Jakobovits 等，Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551-2555(1993)；Jakobovits 等，Nature, 362:255-258(1993)）。其他适合产生能产生全套人抗体的转基因动物的额外方法已有描述（例如，Lonberg 等，美国专利 No. 5, 545, 806；Surani 等，美国专利 No. 5, 545, 807；Lonberg 等，W097/13852）。

[0112] 本发明还包括双特异性抗体，或其功能性片段（例如，F(ab')₂），其能结合此处描述的互补肽以及至少一种其他抗原（例如，肿瘤抗原，病毒抗原）。双特异性抗体可由三杂交瘤 (triomas) 和杂合杂交瘤分泌。一般来讲，三杂交瘤由一个杂交瘤和一个淋巴细胞（例如，抗体分泌 B 细胞）融合而成，杂合杂交瘤由两个杂交瘤融合而成。每种融合细胞（即，杂交瘤，淋巴细胞）产生一种单特异性抗体。但是，三杂交瘤和杂合杂交瘤能产生含有识别不同抗原的抗原结合位点的抗体。三杂交瘤和杂合杂交瘤的上清液可使用适当试验（例如 ELISA）检测双特异性抗体，并且双特异性抗体可使用常规方法纯化（例如参见，美国专利 No. 5, 959, 084 (Ring 等)，美国专利 No. 5, 141, 736 (Iwasa 等)，美国专利 Nos. 4, 444, 878, 5, 292, 668, 5, 523, 210（均为 Paulus 等）和美国专利 No. 5, 496, 549 (Yamazaki 等)）。

[0113] 血管生长因子

[0114] “血管生长因子”是一种多肽，其能刺激血管的发育，例如，促进血管生成、内皮细胞生长、血管的稳定性和/或血管发生。例如，血管生长因子包括，但并不局限于，例如 VEGF 和 VEGF 家族成员、PIGF、PDGF 家族、成纤维细胞生长因子家族 (FGFs)、TIE 配体（血管生成素）、ephrins、ANGPTL3、ANGPTL4 等。血管生长因子也包括诸如生长激素、胰岛素样生长因子 -I (IGF-I)、VIGF、表皮生长因子 (EGF)、CTGF 和它的家族成员，以及 TGF- α 和 TGF- β 等多肽。例如参见，Klagsbrun 和 D' Amore，Annu. Rev. Physiol.，53:217-39(1991)；Streit 和 Detmar，Oncogene，22:3172-3179(2003)；Ferrara 和 Alitalo，Nature Medicine 5(12):1359-1364(1999)；Tonini 等，Oncogene，22:6549-6556(2003)；和，Sato Int. J. Clin.

Oncol., 8 :200-206 (2003)。

[0115] 此处使用的术语“ VEGF”（也被称为“VEGF-A”）是指血管内皮细胞生长因子蛋白质 A。此处使用的术语“人 VEGF”（也被称为“人 VEGF-A”）是指人血管内皮细胞生长因子的任何同种型。描述的同种型（由不同的 mRNA 剪接导致）包括 121、145、148、165、165b、183、189 和 206。例如参见,表 2 和 Leung 等, Science 246 :1306 (1989), 以及 Houck 等, Mol. Endocrin. 5 :1806 (1991)。“人 VEGF”也包括天然存在的人 VEGF-A 等位基因变体和通过翻译后修饰中的变异导致的变体。表 2 并非全部或限制性的。除非另外指出,表 2 中的血管生长因子是人血管生长因子。

[0116] 表 2 VEGF 家族血管生长因子举例

血管生成生长因子	受体	染色体定位	GenBank 号	参考文献
人 VEGF-A	VEGFR1 VEGFR2	6p12	NM_003376	
同种型: 121				
145				
148				
165				
165b				
183				
189				
206				
人 VEGF-B	VEGFR1	11q13	NM_003377	
人 VEGF-C	VEGFR3 VEGFR2	4q34.1-q34.3	NM_005429	
人 VEGF-D	VEGFR3 VEGFR2	Xp22.31	NM_004469	
VEGF-E	VEGFR2		AF106020	
[Orf 病毒 (D1701)]				
[0117] VEGF-E	VEGFR2		S67520	
[Orf 病毒(NZ2)]				
VEGF-E	VEGFR2		S67522	
[Orf 病毒(NZ7)]				
VEGF-E _{N27} /PIGF	VEGFR2			1, 2
(嵌合)				
VEGF-E/PIGF	VEGFR2			3
(嵌合)				
PIGF	FLT1 VEGFR1	14q22-q24.3	NM_002632	
同种型: PIGF1				
PIGF2				
PIGF3				
PIGF4				
VEGF-F (蝰蛇)	VEGFR2			4
黑腹果蝇 PV1			NM_078683	5
黑腹果蝇 PVF2			NM_078775	5
黑腹果蝇 PVF3			NM_078776	5

[0118] 参考文献

[0119] 1. Zheng, Y. 等, "Chimeric VEGF-ENZ7/PIGF Promotes Angiogenesis Via VEGFR-2 Without Significant Enhancement of Vascular Permeability and Inflammation," Arterioscler. Throm. Vasc. Biol. 26 :2019-2026 (2006).

[0120] 2. Zheng, Y. 等, “Chimeric VEGF-ENZ7/P1GF Specifically Binding to VEGFR-2 Accelerates Skin Wound Healing via Enhancement of Neovascularization,” *Arterioscler. Throm. Vasc. Biol.* 27 :503-511 (2007).

[0121] 3. Inoue, N. 等, “Therapeutic Angiogenesis Using Novel Vascular Endothelial Growth Factor-E/Human Placental Growth Factor Chimera Genes,” *Arterioscler. Throm. Vasc. Biol.* 27 :99-105 (2007).

[0122] 4. Suto, K. 等, “Crystal structures of novel vascular endothelial growth factors (VEGF) from snake venoms: insight into selective VEGF binding to kinase insert domain-containing receptor but not to fms-like tyrosine kinase-1,” *J. Biol. Chem.* 280 (3) :2126-2131 (2005).

[0123] 5. Duchek, P., “Guidance of cell migration by the Drosophila PDGF/VEGF receptor,” *Cell* 107 (1) :17-26 (2001).

[0124] 人 VEGF-A 以多种同种型存在, 它们是由定位于染色体 6 上组织成 8 个外显子的单基因的 mRNA 选择性剪切产生的 (例如参见, Ferrara N, Davis Smyth T. *Endocr Rev* 18 :1-22 (1997), 以及 Henry 和 Abraham, *Review of Preclinical and Clinical Results with Vascular Endothelial Growth Factors for Therapeutic Angiogenesis, Current Interventional Cardiology Reports*, 2 :228-241 (2000)). 也参见, 美国专利 5, 332, 671 和 6, 899, 882。在一个实施方式中, 将 VEGF₁₆₅ 使用本发明的方法给药 (例如, 重组人 VEGF₁₆₅)。含量最高的同种型 VEGF₁₆₅ 是一种碱性的、肝素结合的、分子量大约为 45, 000 道尔顿 (Id) 的二聚共价糖蛋白。VEGF₁₆₅ 同型二聚体由两个 165 个氨基酸的链组成。该蛋白质具有两个不同的域: 一个受体结合域 (残基 1-110) 和一个肝素结合域 (残基 110-165)。这两个域被七个分子内二硫键稳定, 并且单体通过两个链间二硫键连接形成天然的同型二聚体。VEGF₁₂₁ 缺少肝素结合域 (例如参见, 美国专利 5, 194, 596), 而 VEGF₁₈₉ (例如参见, 美国专利 5, 008, 196 ; 5, 036, 003 ; 和 5, 240, 848) 和 VEGF₂₀₆ 被隔离在细胞外基质中。

[0125] 术语“血管生长因子”还包括以下表 3 中的那些。表 3 中的列表并非全部或限制性的。

[0126] 表 3

[0127]

其他血管生长因子实例

血管生成素

血管生成素-1

Del-1

酸性成纤维细胞生长因子(aFGF 或 FGF-1^{1,2})

基本成纤维细胞生长因子 (bFGF 或 FGF-2^{3,4})

成纤维细胞生长因子 4 (FGF 4)

滤泡抑素

粒细胞集落刺激因子 (G-CSF)

肝细胞生长因子 (HGF)/分散因子 (SF)

白细胞介素-8 (IL-8)

瘦素

肝素结合细胞因子 (Midkine)

血小板衍生的内皮细胞生长因子 (PD-ECGF)

血小板衍生的生长因子-BB (PDGF-BB) (rhPDGF-BB 是

Regranex®)

多效蛋白 (Pleiotrophin) (PTN)

颗粒蛋白前体 (Progranulin)

增殖蛋白 (Proliferin)

转化生长因子- α (TGF- α)

转化生长因子- β (TGF- β)

肿瘤坏死因子- α (TNF- α)

[0128]

血管内皮生长因子 (VEGF)/血管通透因子(VPF)
胸腺素β4 (Tβ4)
结缔组织生长因子
骨桥蛋白
胰岛素生长因子 (IGF-1)

血管生长因子	受体	染色体定位	GenBank 号	参考文献
PDGFD	PDGFR-α	11q22.3	NM_025208	
	PDGFR-β			
PDGF-α		7p22	NM_002607	
PDGF2		22q12.3-q13.1	NM_002608	
同种型:				
1 (241 个氨基酸)				
2 (226 个氨基酸)				
PDGFC	PDGF-α	4q32	NM_016205	

[0129] 参考文献

[0130] 1. Schumacher, B. 等, “Induction of neoangiogenesis in ischemic myocardium by human growth factors :first clinical results of a new treatment of coronary heart disease,” Circulation 97 :645-650 (1998).

[0131] 2. Stegmann, T. J. 等, “Induction of myocardial neoangiogenesis by human growth factors :a new therapeutic option in coronary heart disease,” Herz 25 : 589-599 (2000).

[0132] 3. Selke, F. W. 等, “Therapeutic angiogenesis with basic fibroblast growth factor :technique and early results,” Ann. Thorac. Surg. 65 :1540-1544 (1998).

[0133] 4. Laham, R. J. 等, “Local perivascular delivery of basic fibroblast growth factor in patients undergoing coronary bypass surgery :results of a phase 1 randomized, double-blind, placebo-controlled trial,” Circulation 100 : 1865-1871 (1999).

[0134] “天然的”多肽（例如，天然的血管生成因子）是与来自于天然来源的多肽具有相同氨基酸序列的多肽。因此，天然多肽可具有来自于任何哺乳动物如人的天然存在的多肽的氨基酸序列。该天然多肽可从自然中分离或通过重组或合成方法产生。术语天然多肽包括该多肽的天然存在的截短的或分泌形式（例如，胞外域序列）、指定为野生型的等位基因型、天然存在的变异型（例如，选择性剪接的同种型）和该多肽的天然存在的等位基因变体。

[0135] “多肽变体”（例如，血管生成因子的多肽变体）意指与天然多肽具有至少大约

80%的氨基酸序列同一性的生物活性多肽。例如,该“多肽变体”包括其中与天然多肽相比,在多肽的 N-端或 C-端添加或删除了一个或多个氨基酸残基的多肽。一般地,多肽变体与天然多肽具有至少大约 80%的氨基酸序列同一性,或至少大约 90%的氨基酸序列同一性,或至少大约 95%或更高的氨基酸序列同一性。多肽变体包括含有一个或多个氨基酸置换、添加或缺失或任何这些与天然多肽的差别的组合的多肽。与天然多肽相比,多肽变体可具有,例如,几个,诸如 5 至 10,1 至 5,或 4、3、2 或 1 个氨基酸的置换、缺失或添加的任意组合。在一个实施方式中,与天然多肽相比,变体具有静默的置换、添加和 / 或缺失,这些并不明显改变该多肽的性质和活性。多肽变体亦可为修饰的多肽,其中一个或多个氨基酸残基被修饰。多肽变体可通过本领域周知的多种方法来制备。与天然多肽的氨基酸序列不同的多肽变体可通过编码 DNA 的突变来制备。多肽变体也包括与天然多肽在糖基化或其他翻译后修饰方面不同的多肽。

[0136] 例如,多肽变体的制备可以是通过编码天然多肽的 DNA 中核苷酸的定点诱变或通过噬菌体展示技术,由此产生编码变体的 DNA,并且其后在重组细胞培养物中表达 DNA。

[0137] 氨基酸缺失一般为大约 1 至 30 个残基,任选地 1 至 10 个残基,任选地 1 至 5 个或更少,并且通常地是接续的。

[0138] 氨基酸序列添加包括从一个残基到基本上无限制长度的多肽的氨基和 / 或羧基末端融合,以及单个或多个氨基酸残基的序列内插入。序列内添加(即,在天然多肽序列内添加)一般地可在约 1 个至 10 个残基范围内,任选地 1 至 5 个,或任选地 1 至 3 个。末端插入的实例包括信号序列(相对于宿主细胞无论是异源性的还是同源性的)与 N-端的融合,以利于从重组宿主中分泌。

[0139] 其他的多肽变体是那些天然多肽中的至少一个氨基酸残基被移除并将不同的氨基酸残基插入到该位置(置换)的多肽。血管生长因子多肽变体中的保守性置换可以按照表 4 中显示的那样来获得,其中示例性的和优选的置换都是血管生长因子多肽变体中的保守性置换。多肽变体也可包含此处描述的非天然氨基酸。

[0140] 氨基酸可以按照其侧链性质的相似程度分组(A. L. Lehninger, Biochemistry, second ed., pp. 73-75, Worth Publishers, New York(1975)):

[0141] (1) 非极性的:Ala(A), Val(V), Leu(L), Ile(I), Pro(P), Phe(F), Trp(W), Met(M)

[0142] (2) 极性不带电的:Gly(G), Ser(S), Thr(T), Cys(C), Tyr(Y), Asn(N), Gln(Q)

[0143] (3) 酸性的:Asp(D), Glu(E)

[0144] (4) 碱性的:Lys(K), Arg(R), His(H)

[0145] 或者,天然存在的氨基酸基于共同的侧链性质可分成下面几组:

[0146] (1) 疏水性的:正亮氨酸, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

[0147] (2) 中性亲水性的:Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

[0148] (3) 酸性的:Asp, Glu;

[0149] (4) 碱性的:His, Lys, Arg;

[0150] (5) 影响链定向的残基:Gly, Pro;

[0151] (6) 芳香族的:Trp, Tyr, Phe。

[0152] 表 4

[0153]

原残基	示例性的置换	优选置换
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp; Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; 正亮氨酸	Leu
Leu (L)	正亮氨酸; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; 正亮氨酸	Leu

[0154] “天然存在的氨基酸残基”（即由遗传密码编码的氨基酸残基）可选自：丙氨酸 (Ala)；精氨酸 (Arg)；天冬酰胺 (Asn)；天冬氨酸 (Asp)；半胱氨酸 (Cys)；谷氨酰胺 (Gln)；谷氨酸 (Glu)；甘氨酸 (Gly)；组氨酸 (His)；异亮氨酸 (Ile)；亮氨酸 (Leu)；赖氨酸 (Lys)；甲硫氨酸 (Met)；苯丙氨酸 (Phe)；脯氨酸 (Pro)；丝氨酸 (Ser)；苏氨酸 (Thr)；色氨酸 (Trp)；酪氨酸 (Tyr)；和缬氨酸 (Val)。“非天然存在的氨基酸残基”指与上述列出的那些天然存在的氨基酸残基不同，可通过肽键与多肽链中的相邻氨基酸残基结合的氨基酸残基。非天然存在的氨基酸残基的实例包括，例如，正亮氨酸、鸟氨酸、正缬氨酸、高丝氨酸和其他氨基酸残基类似物，如 Ellman 等 Meth. Enzym. 202 :301-336 (1991) 和美国专利申请公开文本 20030108885 和 20030082575 中描述的那些。

[0155] 此处的“百分比(%)氨基酸序列同一性”定义为，在排比序列和引入缺口后，如果需要，为了获得最大百分比序列同一性，不将任何保守性置换视为序列同一性的一部分，血

管生长因子的候选序列中与所选序列中的氨基酸残基相同的氨基酸残基的百分比。用于确定百分比氨基酸序列同一性的排比可利用本领域中不同的方法来实现,例如使用可以公开获得的计算机软件,如 BLAST、BLAST-2、ALIGN、ALIGN-2 或 Megalign (DNASTAR) 软件。本领域技术人员可确定用于测量排比的适当的参数,包括在所比较的序列全长上取得最大排比所需的任何算法。

[0156] 为了此处的目的,指定的氨基酸序列 A 与或相对于指定氨基酸序列 B 的 %氨基酸序列同一性按如下方法计算(或者可以描述为指定氨基酸序列 A 与或相对于指定氨基酸序列 B 具有或含有一定的 %氨基酸序列同一性): $100 \times \frac{X}{Y}$, 其中 X 是通过 A 和 B 排比后评分为相同匹配的氨基酸残基数,其中 Y 是 B 中的氨基酸残基总数。应当注意氨基酸序列 A 的长度不同于氨基酸序列 B 的长度, A 与 B 的 %氨基酸序列同一性和 B 与 A 的 %氨基酸序列同一性将会不同。

[0157] 血管生长因子的部分包括比相应天然多肽短,并且包含相应天然多肽的至少 20 个相邻氨基酸残基,与天然多肽有 75%至 100%氨基酸序列同一性的多肽。在特定的实施方式中,该部分和天然多肽有至少 90%或 95%的氨基酸序列同一性。血管生长因子的部分可以是合成的,并且当存在于从天然来源分离的蛋白质中时可具有 N-末端氨基和 C-末端羧基,或可具有修饰的 N-端(例如,酰化的)和/或修饰的 C-端(例如,酰胺化的)。血管生长因子的部分可通过表达为产生该部分而构建的基因来产生。该部分可以是环状的或线性的。在所有情况中,血管生长因子的部分具有相应天然多肽的至少 50%的生物学活性,正如通过测定相应天然多肽的血管生成活性的适当试验方法所测定的。

[0158] 此前许多方法已经应用于测定血管生成活性并且已经描述。血管生长因子不论是天然多肽、多肽变体、血管生长因子的部分、还是血管生长因子的融合蛋白,都可以使用一个或多个此处描述的试验,或其他合适的试验,如本领域普通技术人员周知的试验,通过体内或体外试验来检测,以评估它的活性。并不是所有试验都适合测定给定血管生长因子的血管生成活性。

[0159] 已经描述了一个兔角膜试验,其中植入角膜内的血管生长因子刺激新毛细血管的生长。参见 Ziche 等, Lab. Invest. 61:629-634(1989)。一个体外血管生成试验系统允许我们观察由血管生长因子刺激的内皮细胞的形态改变。参见 Montesano 等, J. Cell Biol. 97:1648-1652(1983)。血管生长活性也可通过细胞响应血管生长因子生长的试验来测定 [Marconcini 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:9671-9676(1999)], 或通过实施例 6 和 7 中描述的趋化试验来测定。

[0160] 血管生长因子的融合蛋白包含生物活性天然多肽或其生物活性部分(如上所述)作为第一部分,该部分连接至在天然多肽中不存在的第二部分。因此,第二部分可以是一个氨基酸或多肽。第一部分可以位于融合蛋白的 N-末端位置、C-末端位置或中间。在一个实施方式中,融合蛋白包含由天然存在的血管生长因子的氨基酸序列或其生物活性部分组成的生物活性多肽作为第一部分,以及包含连接序列和亲和配体的第二部分。

[0161] 血管生长因子的融合蛋白可通过多种方法产生。例如,融合蛋白可以如下产生:通过将编码血管生长因子或其部分的基因插入到适当的表达载体中。将产生的构建体引入到适当的宿主细胞中进行表达。表达后,例如,可通过适当的亲和基质从细胞裂解物中纯化融合蛋白(例如参见, Current Protocols in Molecular Biology. Ausubel, F.M. 等,

eds., pp. 16.4.1-16.7.8, containing supplements up through Supplement 28, 1994)。VEGF 融合（嵌合）蛋白的例子参见 Zheng 等, *Arterioscler. Thromb. Vas. Biol.* 2006 ;26 : 2019-2026 and Inoue 等, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2007 ;27 :99-105。

[0162] 血管生长因子可以是人源的或非人源的（优选地来自于哺乳动物）。人血管生长因子以及非人物种同源物都是血管生长因子并且可在本发明的组合治疗中使用。一种同源物和人血管生长因子优选地具有至少 70% 的氨基酸序列同一性, 更优选地, 至少 80% 的序列同一性, 更加优选地, 至少 90% 的序列同一性。

[0163] 根据本发明, “血管生长因子”包括上述天然血管生长因子、血管生长因子的部分、血管生长因子的多肽变体和血管生长因子的融合蛋白。

[0164] 使用 NPAR 激动剂的治疗方法

[0165] 本发明涉及在需要治疗的受试者的某一部位治疗内皮功能障碍的方法, 包括给受试者经血管施用治疗性有效量的 NPAR 激动剂, 其中所述部位不是被血管成形术损伤的动脉、慢性皮肤溃疡、需要成骨诱导的部位或需要心血管再形成的部位。所述受试者可能患有一种或多种疾病或状况, 逆转或抑制内皮功能障碍将有益于该疾病或状况。这些疾病或状况可包括, 但并不局限于, 高血压、充血性心力衰竭、冠状动脉疾病、中风、脑血管疾病、外周血管疾病、糖尿病、勃起功能障碍、动脉粥样硬化、哮喘、类风湿性关节炎、肺动脉高压、急性肺损伤、慢性阻塞性肺病 (COPD)、囊性纤维化、炎性肺病、高同型半胱氨酸血症、镰状细胞病、先兆子痫、慢性肾衰竭、慢性肾功能障碍、肾微血管疾病、肝再灌注损伤、神经病、阿尔茨海默氏症、甲状腺疾病、脓毒症、血栓症、多器官功能衰竭、炎性肠病和辐射损伤等。在一个具体的实施方式中, 该疾病是高血压。在另一个具体的实施方式中, 该疾病是动脉粥样硬化。在另一个具体的实施方式中, 该疾病是外周血管疾病。在另一个具体的实施方式中, 该疾病是哮喘。

[0166] “受试者”优选地是需要用此处公开的 NPAR 激动剂治疗的人, 但也可以是动物, 例如, 宠物（例如, 狗、猫等）、农畜（例如, 牛、猪、马等）和实验室动物（例如, 大鼠、小鼠、豚鼠等）。

[0167] “需要用 NPAR 激动剂治疗”的受试者是指患有疾病和 / 或状况的受试者, 该疾病和 / 或状况可用 NPAR 激动剂治疗从而达到有益的治疗效果和 / 或预防效果。有益的结果包括症状严重程度降低或症状发作延缓、寿命延长和 / 或更快或更完全地缓解疾病或症状。

[0168] “有效量”是指与未经治疗相比, 应用 NPAR 激动剂治疗状况得到改善的临床结果的 NPAR 激动剂使用量。NPAR 激动剂给药量取决于疾病或状况的程度、严重性和类型、治疗需要的量、以及药物制剂的释放特性等。它还取决于受试者的健康情况、外形、体重、年龄、性别和耐药性。一般地, 为达到理想的治疗效果, 激动剂给药要持续足够长的一段时间。一般地, 给需要治疗的受试者施用大约每天 $1 \mu\text{g}$ 至大约每天 1mg 的 NPAR 激动剂（优选地大约每天 $5 \mu\text{g}$ 至大约每天 $100 \mu\text{g}$ ）, 特别是对于局部给药方法。NPAR 激动剂也可以以大约 $0.1\text{mg}/\text{kg}/\text{天}$ 至大约 $10\text{mg}/\text{kg}/\text{天}$ 的剂量给药, 优选大约 $0.2\text{mg}/\text{kg}/\text{天}$ 至大约 $1\text{mg}/\text{kg}/\text{天}$, 特别是对于系统给药方法。本发明 NPAR 激动剂的典型剂量也是 $5\text{--}500\text{mg}/\text{天}$, 优选 $25\text{--}250\text{mg}/\text{天}$, 特别是对于系统给药方法。对于给受试者施用 NPAR 激动剂和血管生长因子组合的方法, 血管生长因子（例如, VEGF-A）的给药剂量可由本领域普通技术人员按照疾病或紊乱的性质、治疗部位、受试者的年龄、性别、体重和其他状况来确定。血管生长因子的适当剂量是 $1 \mu\text{g}/\text{kg}$

至 50mg/kg (例如, 0.1-20mg/kg)。

[0169] “治疗”意指经过一段时间的 NPAR 激动剂或含有 NPAR 激动剂的组合物给药后, 根据观察部位或对特定疾病或紊乱测定的参数, 达到了有益的治疗效果和 / 或预防效果, 其可包括症状严重程度的降低或症状发作延缓或抑制、寿命延长和 / 或更快或更完全地缓解疾病或症状, 或其他改善的临床结果。在受试者中 – 其中该受试者是, 例如, 正处于疾病、紊乱或状况发展风险的受试者, “治疗”也包括抑制或延缓了疾病、紊乱或医学状况的发作, 也意味着降低了该疾病、紊乱或医学状况发展的可能性。

[0170] 公开的 NPAR 激动剂可以通过任何合适途径给药, 局部 (例如, 局部) 或系统地, 包括, 例如, 通过肠胃外给药。肠胃外给药可包括, 例如, 肌肉内、静脉内、皮下、或腹膜内注射或血管给药, 也可包括透皮贴剂和植入的缓释装置, 如泵。局部给药可包括, 例如, 霜剂、凝胶、软膏或气雾剂等。呼吸系统给药可包括, 例如, 吸入或鼻内滴注。对于特定适应症, 直接向治疗部位注射或植入 NPAR 激动剂是十分有利的。NPAR 激动剂有利地可以在缓释制剂中给药。NPAR 激动剂可以长期给药, 其中激动剂在一段长期的时间里 (至少 60 天, 一般至少一年) 间隔性地或通过连续给药方法给药, 以治疗慢性或复发性疾病或状况。

[0171] 包含治疗剂的组合的给药包括在一段治疗时间内以任何顺序同时 (共同) 给药以及连续给药。治疗剂可以在一种组合物中一起给药, 或可以在分开的组合物中给药。NPAR 激动剂可通过与血管生长因子相同的给药途径给药。NPAR 激动剂也可通过与血管生长因子不同的给药途径给药。NPAR 激动剂和血管生长因子可具有相同或不同的给药日程。

[0172] NPAR 激动剂可与作为药物组合物一部分的可接受的药物载体一起给药至受试者。依照选择的给药途径, 药物组合物的制剂将会作相应变化。合适的药物载体可含有不与化合物相互作用的惰性成分。载体应当是生物相容性的, 即非毒性、非炎性、非免疫原性的以及在给药部位不产生其他不希望的反应。药学上可接受的载体的实例包括, 例如盐水、气溶胶、可商购的惰性凝胶、或添加有白蛋白、甲基纤维素或胶原基质的液体。可采用标准的药物配剂技术, 诸如在 Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA 中描述的那些技术。

[0173] 本发明中用于治疗内皮功能障碍的组合物可另外包含一种药物载体, 其中凝血酶肽衍生物或 NPAR 激动剂溶解或悬浮在该载体中。药学上可接受的载体的实例包括, 例如盐水、气溶胶、可商购的惰性凝胶、或添加有白蛋白、甲基纤维素或胶原基质的液体。此类制剂中典型的是凝胶。如前所述, 凝胶由选自油性基质、水或乳剂 – 悬浮剂基质的基质组成。在基质中加入一种胶凝剂, 从而在该基质中形成基质环境 (matrix), 增加其粘度至半固体的稠度。胶凝剂的实例是羟丙基纤维素、丙烯酸聚合物等。在加入胶凝剂之前, 将活性成分以希望的浓度加至制剂内, 或者可以在胶凝过程后混合。

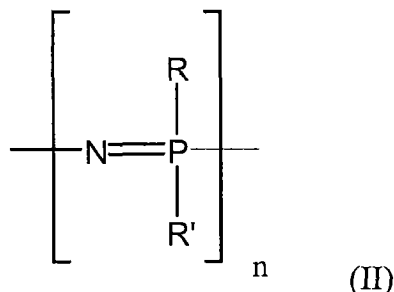
[0174] 在一个实施方式中, NPAR 激动剂在持续释放制剂中给药。通常利用聚合物形成持续释放制剂。这些聚合物的实例包括聚 α -羟酯, 诸如聚乳酸 / 聚乙醇酸均聚物和共聚物、聚磷腈 (PPHOS)、聚酞和聚 (丙烯延胡索酸酯)。

[0175] 聚乳酸 / 聚乙醇酸 (PLGA) 均聚物和共聚物是在本领域中众所周知的持续释放载体。通过改变聚乳酸与聚乙醇酸的比例和聚合物的分子量, 熟练技术人员可以调节释放的速率 (参见 Anderson 等, Adv. Drug Deliv. Rev. 28 :5 (1997), 整个教导在此引入作为参考)。在聚合物中加入聚 (乙二醇) 作为混合物形成微粒载体可进一步改变活性成分的释放谱

(参见 Cleek 等, J. Control Release 48 :259(1997), 整个教导在此引入作为参考)。陶瓷如磷酸钙和羟基磷灰石也可加入至制剂中来改善机械质量。

[0176] PPHOS 聚合物含有交替的氮和磷, 在聚合物骨架中没有碳原子, 如以下结构式 (II) 所示:

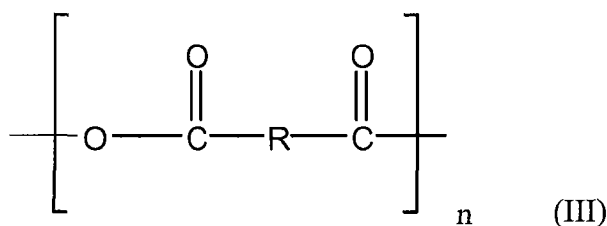
[0177]



[0178] 聚合物的性质可通过适当改变键合至聚合物骨架上的侧基 R 和 R' 而调整。例如, PPHOS 的降解和由其引起的药物释放可通过改变水解不稳定的侧基的量来控制。例如, 掺入更多咪唑基或乙二醇 (ethylglycol) 取代的 PPHOS, 就会观察到降解速率的增加 (参见 Laurencin 等, J Biomed Mater. Res. 27 :963(1993), 整个教导在此引入作为参考), 由此提高了药物释放的速率。

[0179] 结构式 (III) 显示的聚酐具有明确的降解和释放特性, 可通过引入不同量的疏水性或亲水性单体例如癸二酸和 1,3-二(对-羧基苯氧基)丙烷来控制 (参见 Leong 等, J. Biomed. Mater. Res. 19 :941(1985), 整个教导在此引入作为参考)。为改善机械强度, 酐通常与亚胺共聚合形成酐-酰亚胺共聚物。适合于整形外科应用的酐-酰亚胺共聚物的实例为偏苯三酸酐亚氨基-甘氨酸-1,6-二(羧基苯氧基)己烷共聚物 (poly(trimellitylimido-glycine-co-1,6-bis(carboxyphenoxy)hexane) 和均苯四酸酐亚氨基丙氨酸 (pyromellitylimidoalanine) :1,6-二(对-羧基苯氧基)己烷共聚物。

[0180]



[0181] 注射递送制剂可通过静脉给药或直接在需要治疗的部位给药。注射载体可以是粘性溶液或凝胶。

[0182] 递送制剂包括生理盐水、细菌抑制盐水 (含有大约 0.9% mg/mL 苯甲醇的盐水)、磷酸盐缓冲盐水、Hank's 液、Ringer's-乳酸盐、或添加有白蛋白、甲基纤维素或透明质酸的液体。注射基质包括聚环氧乙烷聚合物以及乙烯和环氧丙烷的共聚物 (参见 Cao 等, J. Biomater. Sci 9 :475(1998) 和 Sims 等, Plast Reconstr. Surg. 98 :843(1996), 整个教导在此引入作为参考)。

[0183] 包封组合物 (诸如包封于硬明胶包衣中或环糊精中) 的方法在本领域中众所周知 (Baker 等, "Controlled Release of Biological Active Agents", John Wiley and Sons, 1986)。

[0184] 一般利用油性基质来制备软膏,例如含有不挥发性油或碳氢化合物,诸如矿脂或矿物油、或吸收基质,例如由一种或多种吸收剂无水物质组成,例如无水羊毛脂。在形成基质后,活性成分以需要的浓度加入。

[0185] 霜剂通常包含油相(内部相),油相一般地含有不挥发性油、碳氢化合物等,诸如蜡、矿脂、矿物油等,以及水相(连续相),其包含水和任何水溶性物质,诸如添加的盐。两相通过使用化剂来稳定,例如,表面活性剂,诸如月桂基硫酸钠;亲水性胶体,诸如阿拉伯树胶、胶质粘土、蜂胶等。乳剂形成后,活性成分以需要的浓度加入。

[0186] 凝胶含有选自油性基质、水、或乳剂-悬浮剂基质的基质,如前所述。在基质中加入胶凝剂,从而在基质中形成一种基质环境(matrix),提高其粘度至半固体粘度。胶凝剂的实例是羟丙基纤维素、丙烯酸聚合物等。在加入胶凝剂之前将活性成分以希望的浓度加至制剂内。

[0187] 可用公开的 NPAR 激动剂治疗的疾病和状况经常伴有诸如疼痛和感染的症状和虚弱。为解决这些问题,在一些情况中,一种或多种额外的药理学活性剂与 NPAR 激动剂一起共同给药是十分有益的。例如,对抗疼痛和炎症可能需要与止痛药或抗炎药共同给药。对抗感染可能需要与抗微生物药、抗生素或消毒剂共同给药。

[0188] NPAR 激动剂可单独给药至受试者,或与一种或多种其他治疗剂组合给药,其他治疗剂例如是,降胆固醇剂、抗高血压剂、 β -阻断剂、抗凝血剂、溶血栓剂、止痛剂、消炎剂、抗斑剂(anti-plaque agent)、胰岛素、一氧化氮产生剂、抗病毒剂或抗生素。在一种方法中,NPAR 激动剂可与精氨酸组合给药至受试者,例如,应用精氨酸作为口服营养添加物。

[0189] 凝血酶肽衍生物和修饰的凝血酶肽衍生物可通过固相肽合成方法(例如 BOC 或 FMOC)、液相合成、或其他适当技术包括上述方法的组合来合成。BOC 和 FMOC 方法已被建立和广泛应用,在 Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 88 :2149(1963);Meienhofer, Hormonal Proteins and Peptides, C. H. Li, Ed., Academic Press, 1983, pp. 48-267;以及 Barany 和 Merrifield, in The Peptides, E. Gross and J. Meienhofer, Eds., Academic Press, New York, 1980, pp. 3-285 中描述。固相肽合成方法在 Merrifield, R. B., Science, 232 : 341(1986);Carpino, L. A. and Han, G. Y., J. Org. Chem., 37 :3404(1972) 和 Gauspohl, H. 等, Synthesis, 5 :315(1992) 中描述。这六篇文章的教导在此完整引入作为参考。

[0190] 凝血酶肽衍生物二聚体可通过单体的氧化而制备。凝血酶肽衍生物二聚体可通过凝血酶肽衍生物与过量的氧化剂反应而制备。一种众所周知的合适的氧化剂是碘。

[0191] 此处使用的“非芳香族杂环基团”是一个非芳香族碳环系统,具有 3 至 10 个原子并且包括至少一个杂原子,诸如氮、氧或硫。非芳香族杂环基团的实例包括哌嗪基、哌啶基、吡咯烷基、吗啉基、硫吗啉基。

[0192] 术语“芳基基团”包括碳环和杂环芳香环系统。芳基基团的实例包括苯基、吡啶基、呋喃基和咪唑基。

[0193] “脂肪族基团”是直链的、支链的或环形非芳香族烃。脂肪族基团可以是完全饱和的或含有一个或多个不饱和(例如,双键和/或三键),但优选地是饱和的,即烷基基团。典型地,一个直链或支链脂肪族基团具有 1 至大约 10 个碳原子,优选 1 至大约 4 个,一个环状脂肪族基团具有 3 至大约 10 个碳原子,优选 3 至大约 8 个。例如,脂肪族基团包括甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、仲丁基、叔丁基、戊基、环戊基、己基、环己基、辛基和环辛基等。

[0194] 脂肪族基团、芳基基团或非芳香族杂环基团的合适的取代基是那些不会明显降低 NPAR 激动剂治疗活性的取代基,例如在天然存在的氨基酸上发现的取代基。实例包括 -OH、卤素 (-Br、-Cl、-I 和 -F)、-O(R_e)、-O-CO-(R_e)、-CN、-NO₂、-COOH、=O、-NH₂-NH(R_e)、-N(R_e)₂、-COO(R_e)、-CONH₂、-CONH(R_e)、-CON(R_e)₂、-SH、-S(R_e)、脂肪族基团、芳基基团和非芳香族杂环基团。每个 R_e 独立地是烷基基团或芳基基团。取代的脂肪族基团可具有一个以上的取代基。

[0195] 本发明通过下述的实施例来阐述,这些实施例绝不是限制性的。

[0196] 实施例 1:材料和方法

[0197] 内皮细胞培养

[0198] 在 37℃ 和 5% CO₂ 下在内皮细胞生长培养基 (EGM) 中培养人冠状动脉内皮细胞 (HCAE 细胞, Cambrex Bio Science Walkersville, Walkersville, MD) 于,该培养基中补充有 2% 胎牛血清和 Single Quot 添加物 (Clonetics, San Diego, CA; 含有表皮生长因子、氢化可的松、血管内皮生长因子、成纤维细胞生长因子、胰岛素生长因子、抗坏血酸、肝素、庆大霉素, 和两性霉素 B)。这些研究使用传代在 4-6 代之间的细胞。将 HCAE 细胞在 12 孔板上以每孔 50,000 个细胞的密度铺板,并且生长 3 天达到铺满。铺满后两天的细胞用 TNF α 或 TP508 处理。然后将细胞在常氧或 1% 低氧条件下培养指定的时间。在一些实验中,在 TNF α 刺激之前先用 TP508 预处理细胞 1h。为了提取 RNA, HCAE 细胞需在 6 孔板中培养。

[0199] RT-PCR

[0200] 按照厂商描述使用 Ambion 分离试剂盒分离总 RNA。

[0201] 应用一个两步法方案使用 Ready-to-Go RT-PCR Beads (Amersham Biosciences) 进行 eNOS 的 RT-PCR 反应。首先,将 1 μg 总 RNA 和作为引物的 1 μg 随机六碱基序列 (pdN6) 以及 M⁻MuLV 逆转录酶在 42℃ 孵育 60min,来进行 cDNA 的合成。然后,在 95℃ 加热 5min 后,进行 25 或 30 个循环 (变性:95℃ 30s;退火 62℃ 30s;延伸 72℃ 30s) 的 PCR,最后以一个 72℃ 7min 的延伸结束。人 eNOS 引物序列如下:正义 5'-GCA CCG GCA TCA CCA GGA AGA AGA-3' (SEQ ID NO:35),反义 5'-CCG CCG CCA AGA GGA CAC CAG T-3' (SEQ ID NO:36) (Sitges, M. 等, Int. J. Cardiol. 105(1):74-79, 2005)。18S 引物 (Ambion) 用来扩增 18S 核糖体 RNA,作为内部标准化对照。PCR 扩增产物通过 1% 琼脂糖凝胶电泳来显示。

[0202] SYBR Green 实时 PCR

[0203] 实时定量 PCR 用来确定用 TP508 或 TNF 处理的内皮细胞中 eNOS mRNA 的相对表达。将样品编号以进行盲试。1 微克总 RNA 使用 Taqman 逆转录试剂盒 (ABI) 按照厂商规定进行逆转录。使用 2 μl cDNA 在 25 μl 的总体积,在 SYBR Green PCR Master Mix (ABI) 中使用 SYBR Green 探针,来进行定量 PCR 扩增。所有 PCR 实验均在 ABI Prism 7000 序列检测系统上运行。SYBR Green PCR 引物如下:人 eNOS 正义引物:5'-GCGGCT GCA TGA CAT TGA G-3' (SEQ ID NO:37),反义引物:5'-GTCGCG GTA GAG ATG GTC AAG T-3' (SEQ ID NO:38)。逆转录的 cDNA 样品循环阈值由三重复样本确定并对 18S “管家”基因标准化。

[0204] Western Blot 分析

[0205] 将细胞裂解物在 10% 聚丙烯酰胺凝胶中进行 SDS-PAGE 并且转移至硝酸纤维素膜上 (0.2-μm, Invitrogen)。用 5% 牛奶封闭后,在 4℃ 下膜与针对磷酸-eNOS (Ser 1177) 和 eNOS (Cell Signaling Technology, Beverly, MA)、人 I 型精氨酸酶 (克隆 9C5) (Cell

Sciences, Canton, MA) 或 GAPDH(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) 的第一抗体进行过夜孵育。HRP 偶联的抗小鼠抗体或抗兔抗体 (Cell Signaling Technology) 作为第二抗体使用 (HRP, 辣根过氧化物酶)。免疫印迹用 Immobilon Western Detection Reagents(Millipore Corporation) 来显色。

[0206] 实施例 2:TP508 阻断 TNF- α 诱导的精氨酸酶 I 上调

[0207] 如上所述, ED 和 NO 依赖的信号丧失可能是由于 NOS 活性的降低, 或精氨酸酶活性增加导致细胞 L- 精氨酸水平降低。在缺氧和炎症反应中, 据报道 TNF- α 水平升高且认为此升高会通过影响这一种或两种 NO 相关活性而导致 ED。为评估 TP508 对 ED 的潜在效应, 我们在正常氧条件下培养早期传代的人冠状动脉内皮细胞 (HCAE 细胞), 并使用单独的 TNF- α 或使用 TNF- α 和 TP508 之组合来处理细胞。

[0208] 使用人 1 型精氨酸酶特异性抗体, HCAE 细胞裂解物的 Western 印迹显示, 相对于对照培养物, TNF- α 处理导致了精氨酸酶 1 (ARG1) 表达的显著增加 (图 1)。如图 1 和图 2 所示, TP508 单独处理对 ARG1 表达没有影响, 但是完全阻断了 TNF- α 诱导的 ARG1 表达的增加。TP508 对 TNF- α 刺激的 ARG1 表达的抑制是剂量依赖性的, 半数最大抑制发生在 TP508 浓度为 10 μ g/ml 时 (图 2)。因此, TP508 似乎能够阻断 TNF- α 诱导的导致 ARG1 增加的信号。TP508 的这种抑制效应似乎对 TNF- α 效应的一个亚类是特异性的, 因为 TNF- α 刺激的 Erk1/2 和 p70 S6 激酶的磷酸化并没有被 TP508 抑制。

[0209] 实施例 3:TP508 刺激 eNOS 表达和 eNOS 磷酸化

[0210] 使用特异性针对在 S1177 位点磷酸化的 eNOS 的抗体, HCAE 细胞裂解物的 Western 印迹显示, TNF- α 处理或将细胞暴露于低氧条件 (1% O₂) 24h, 与正常氧对照相比, eNOS 表达分别减少了 65% 和 45% (图 3)。正如所显示的, TP508 防止了由缺氧造成的 eNOS 表达的降低, 使 eNOS 表达水平保持在与培养于正常氧条件下的细胞中类似的水平上。与此相反, TP508 与 TNF- α 同时添加不能抑制 TNF- α 诱导的 eNOS 表达降低 (未显示)。在常氧和低氧条件下, 相对于常氧和低氧对照培养物, TP508 分别能够增加 eNOS 磷酸化 1.8 倍和 2.5 倍 (图 3)。尽管这些磷酸化中的一些可能是由于 eNOS 表达的增加, 但是这些磷酸化的增加不能单独用表达的增加来解释。检测 TP508 对在常氧条件下培养的细胞中 eNOS 表达和磷酸化的影响的其他实验证实 TP508 刺激了 eNOS 的磷酸化, 并且显示这种影响是剂量依赖性的, 半数最大反应剂量在 $\sim$ 10 μ g/ml 时 (图 4)。

[0211] 实施例 4:TP508 上调 eNOS mRNA

[0212] 与蛋白质表达数据相一致, HCAE 细胞 mRNA 的 RT-PCR 分析显示 TP508 能上调 eNOS mRNA 表达 (图 5)。TP508 的这种效应在 RT-PCR 第 25 个循环显示出来, 此时 eNOS mRNA 条带在 TP508 处理的细胞中可见, 而在对照细胞中没有。与此相比, 在 30 个循环的 RT-PCR 之后证明, 与对照相比 TNF- α 处理明显地降低了表达。为定量 TP508 的该效应, 我们使用 SYBR Green 实时 PCR 分析逆转录的 mRNA 样本。如图 6 所示, 在正常氧条件下培养 24h 后, 与对照相比 TP508 增加 eNOS mRNA 水平达 40% ($p < 0.05$)。与此相比, TNF- α 降低 eNOS mRNA 水平达 $\sim$ 80%。细胞 24 小时暴露于低氧条件下 (1% 氧) 也降低 eNOS mRNA 对照水平达 $\sim$ 60%。TP508 处理这些细胞部分地防止了低氧诱导的降低。正如所显示的, TP508 处理的缺氧细胞具有比缺氧对照细胞高 $\sim$ 40% 的 eNOS mRNA 水平 ($p < 0.05$)。

[0213] 实施例 5:TP508 加强了 VEGF 发出 eNOS 磷酸化信号的能力

[0214] 人冠状动脉内皮 (HCAE) 细胞 (Lonza Walkersville, Inc., Walkersville, MD) 在常氧和低氧 [1% O₂] 条件下在有或无 TP508 [50 μg/ml] 条件下培养 24h, 然后用血管生长因子人 VEGF [50ng/ml] 刺激 1 或 5min。使用能识别激活形式 eNOS (在 S1177 处磷酸化) 的抗体 (Cell Signaling, Danvers, MA), 通过 Western 印迹法确定人 VEGF 诱导的 eNOS 激活。膜再次用抗 GAPDH (甘油醛-3-磷酸脱氢酶) 抗体探查, 来显示相等的蛋白质载量。图 8 中显示了一个代表在不同处理后激活的 eNOS Western 印迹的密度分析的条图。

[0215] 如图 8 所示, 在正常氧细胞中, 人 VEGF 在丝氨酸 1177 上诱导短暂的 eNOS 磷酸化来激活该酶, 其最大值在 1 分钟时 (2 倍), 在 5 分钟刺激后已经下降。如果细胞在人 VEGF 刺激前用 TP508 预处理, 则 eNOS 磷酸化可延长且保持近似最大刺激 5min。因此, 通过延长最大刺激的时间段, TP508 加强了 VEGF 发出 eNOS 磷酸化信号的能力。

[0216] 在缺氧细胞中 (培养于 1% O₂ 下 24 小时), 与正常氧细胞相比, 在 1min 处理时人 VEGF 刺激的 eNOS 磷酸化水平降低 ~ 4 倍。因此, 缺氧显著地减少了人 VEGF 刺激的 eNOS 激活。但是, 用 TP508 预处理的缺氧细胞显示人 VEGF 诱导的 eNOS 激活处于与正常氧细胞相当的水平上。因此, TP508 预处理缺氧细胞恢复了人 VEGF 刺激 eNOS 激活达到在正常氧细胞中观察到的水平的能力。

[0217] 实施例 6: TP508 增强了内皮细胞向 VEGF 的迁移

[0218] 待测物质吸引内皮细胞以及刺激它们通过膜上的孔迁移的能力, 是确定待测物质的血管生成潜力的几种测试之一。图 9A 显示了测量内皮细胞向化学引诱剂迁移的实验设计。在迁移试验之前, 细胞在有或无 TP508 条件下培养来确定 TP508 对内皮细胞迁移的影响。

[0219] 人冠状动脉内皮 (HCAE) 细胞 (Lonza Walkersville, Inc., Walkersville, MD) 在无 (对照) 或有 TP508 [50 μg/ml] (图 9A 和图 9B 中的“TP Pret”) 的条件下培养 24h。按照厂商说明使用 BD FluoroBlok 插入物 (BD Bioscience, Bedford, MA) 进行穿膜细胞迁移试验。将对照或 TP508 预处理的细胞添加至插入物的顶端。将人 VEGF [10ng/ml] (V) 或单独的培养基 (C) 添加至插入板的下面的腔室中作为化学引诱剂。内皮迁移在正常氧或 1% 低氧条件下进行。经过 22 小时孵育后, 细胞用钙黄绿素 AM 迁移后标记并且通过检测迁移至插入膜下方的细胞的荧光来进行测量。

[0220] 图 9B 显示了 TP508 处理对内皮细胞向血管生成因子人 VEGF (人重组 VEGF-A 165, R & D System, Minneapolis, MN) 迁移的影响。

[0221] 结果显示, 在正常氧条件下 (180%) 试验, 人 VEGF 刺激正常对照内皮细胞迁移是培养基对照细胞的 ~ 2 倍, 在低氧条件下相对于培养基对照细胞略微降低 (~ 150%)。当在正常氧和低氧条件下测试细胞时, 显示 TP508 预处理的内皮细胞向人 VEGF 的迁移分别是培养基对照的 ~ 5 倍和 ~ 4 倍。因此, 相对于未处理的对照细胞, TP508 预处理增强了内皮细胞向人 VEGF 的迁移达 2 至 3 倍。由于该细胞迁移试验是细胞血管生成潜力的一项测验, 这些结果证明, 在正常氧条件下, 以及在对人 VEGF 的血管生成反应减少的低氧条件下, TP508 处理将人 VEGF 对内皮细胞的血管生成能力提高了超过两倍。

[0222] 实施例 7: TP508 增强了内皮细胞对人 VEGF 的血管生成反应

[0223] 内皮细胞通过 Matrigel 基质的侵入是用来确定待测物质的血管生成潜力的许多试验中的一个, 并且被认为比简单的穿过膜孔的趋化试验更能预测体内的血管生成, 因为

细胞必须降解而后侵入基质,以移动进入且穿过膜上的孔。图 10A 显示了测量内皮细胞通过 Matrigel 向化学引诱剂侵入的实验设计。

[0224] 人冠状动脉内皮 (HCAE) 细胞 (Lonza Walkersville, Inc., Walkersville, MD) 在无 (对照) 或有 TP508 [50 μ g/ml] (TP pret) 的条件下培养 24h。使用包被有 BD Matrigel Matrix (BD Bioscience, Bedford, MA) 的 FluoroBlok 插入物,用 BD BioCoat™ Angiogenesis System (BD Bioscience, Bedford, MA) 进行内皮细胞侵入试验。将对照或 TP508 预处理的细胞添加至插入物顶端。将含人 VEGF [10ng/ml 人重组 VEGF-A 165aa, R & D System, Minneapolis, MN] 的培养基 (V) 或单独的培养基 (C) 添加至插入板的下面的腔室中,作为化学引诱剂来确定对人 VEGF 的血管生成反应。内皮细胞侵入在正常氧或低氧 (1% O₂) 条件下进行。经过 22 小时孵育后,细胞用钙黄绿素 AM 迁移后标记并且通过检测迁移至插入膜下方的细胞的荧光来进行测量。

[0225] 图 10B 显示了 TP508 处理对内皮细胞向人 VEGF 侵入的影响。结果显示在正常氧或低氧条件下检测的对照内皮细胞没有被人 VEGF 刺激以降解 Matrigel 并透过膜向人 VEGF 迁移。相反,相对于那些没有用 TP508 预处理的对照细胞,与 TP508 预孵育的内皮细胞显示出增加的侵入特性。另外,这些细胞现在对人 VEGF 产生反应 (比在没有人 VEGF 下在用 TP508 预处理的细胞中观察到的高约 50% 的侵入,以及向 VEGF 的侵入是对照细胞的接近两倍)。这些结果证明了在非 TP508 处理的对照细胞对人 VEGF 处理根本没有反应的条件下,TP508 处理增强内皮细胞对人 VEGF 血管生成反应能力的能力。

[0226] 实施例 8:TP508 对正常氧和缺氧的 HCMVE 细胞中 VEGF mRNA 表达的影响

[0227] 人心脏微血管内皮 (HCMVE) 细胞用 VEGF (10ng/ml) (V) 或 TP508 (50 μ g/ml) (TP) 处理,并培养于正常氧或 1% 低氧条件下 24h。实时 PCR 分析显示出处理后 VEGF mRNA 稳态水平的变化。来自一个三次重复的试验的数据显示在图 11 中,以均值 $\pm$ SD 表示。在正常氧下与对照 (C) 细胞相比 * $p < 0.01$ 。在低氧下与对照 (C) 细胞相比 # $p < 0.01$ 。

[0228] 实时 PCR 分析显示相对于培养于正常氧条件下的对照细胞,VEGF 刺激降低了 VEGF mRNA 表达 (2 倍)。正如预期的,相对于正常氧对照细胞,低氧增加了 VEGF mRNA (2.4 倍)。TP508 处理对正常氧细胞中 VEGF mRNA 稳态水平没有影响。但是,相对于对照缺氧或对照正常氧细胞,TP508 处理的缺氧细胞分别表达了 ~ 4 倍和 ~ 10 倍高水平的 VEGF mRNA (图 11)。相反,在缺氧细胞中,VEGF 刺激没有影响或降低了 VEGF mRNA。通过该实验,TP508 增强了缺氧上调 VEGF 表达的效应。

[0229] 实施例 9:TP508 预处理对氨甲酰胆碱诱导的松弛的影响

[0230] 制备大鼠主动脉环 (内皮细胞层完整)。用 1mM TP508 或不用 TP508 (对照) 处理该环 1 小时。使用 500nM 去甲肾上腺素收缩该环,紧接着增加氨甲酰胆碱的剂量 (0、1、10、100、500、750、1000 和 5000nM)。显示了均值 $\pm$ SEM; $n = 2$ 只动物。

[0231] 去甲肾上腺素收缩的带有完整内皮的环响应增加剂量的氨甲酰胆碱松弛 (Furchgott, R. F. 和 Zawadzki, J. V., Nature 288 :373-376 (1980))。如果 TP508 是一种平滑肌松弛剂,则与对照相比,在去甲肾上腺素-氨甲酰胆碱给药方案之前的 TP508 处理将会导致氨甲酰胆碱诱导的松弛增加,即相对于对照曲线,氨甲酰胆碱剂量反应曲线向左位移。

[0232] 图 12 证实在增加的氨甲酰胆碱浓度下 (大于 250nM; 长方形框), TP508 预处理的环与对照相比显示松弛增加。此外,TP508 预处理导致一个 Σ 形氨甲酰胆碱剂量反应曲线。

对照环产生线性氨甲酰胆碱剂量反应曲线。

[0233] 实施例 10 :人内皮细胞研究

[0234] HMVEC(人微血管内皮细胞)

[0235] 使用微阵列的实验显示, TP508 能防止如对低氧反应所预期的精氨酸酶 1 (ARG1) 表达的增加和内皮一氧化氮合酶 (eNOS) 表达的降低。例如, HMVEC 的研究与外周血管疾病和肾血管疾病相关。

[0236] HAE(人主动脉内皮细胞)

[0237] HAE 细胞用来研究下游调节元件。在常氧条件下孵育 30 分钟后, TP508 降低了细胞内信号调节激酶 1 和 2 (ERK1/2)、以及丝氨酸 / 苏氨酸激酶 p70S6 的磷酸化, 并且提高了粘着斑激酶 (FAK) 的磷酸化。

[0238] HAE 细胞用肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 处理, 增加了 ARG1 的表达。用 TP508 预处理仅抑制了 TNF- α 诱导的 ARG1 提高。这提示 TP508 可逆转细胞因子对一氧化氮 (NO) 途径的效应。在正常氧条件下, 无论是否有 TNF- α / 低氧处理, TP508 都增加了细胞中磷酸化的 eNOS (p-eNOS) 和 eNOS。

[0239] 例如, HAE 细胞研究与高血压、动脉粥样硬化、主动脉狭窄和主动脉瘤相关。

[0240] 表 5 :HAE 小结

[0241]

处理	反应		
TP508 处理的细胞 (正常氧)	ERK 1/2 激活 降低	P70S6 激活降 低	FAK 激活增 加
TP508 预处理然后用 TNF α 处理的细胞	抑制 TNF α 诱导 的 ARG1 增加	对 ERK1/2 磷 酸化没有影响	对 P70S6 磷酸 化没有影响
TP508 处理, 有或无 TNF α 处理	eNOS 表达增加	eNOS 激活增加	

[0242] HLME(人肺微血管内皮细胞 ;或者, HLMVE 细胞)

[0243] HLME 细胞用 VEGF、TP508 和去血清测试。用 VEGF 和 TP508 处理的细胞系都显示出存活率增加。单独的 VEGF 低水平增加了存活率, 单独的 TP508 几乎没有影响。

[0244] 在低氧和正常氧条件下观察 VEGF、eNOS、VEGFR1 和 VEGFR2 对 TP508 处理的反应。当在正常氧条件下研究 HLME 细胞时, 仅 eNOS 被 TP508 处理正调节。当在低氧条件下研究 HLME 细胞时, 与缺氧未处理对照相比, 所有四个基因均在 mRNA 水平上调节。

[0245] 表 6 :HLME 小结

[0246]

处理	反应	
细胞去血清, 用 VEGF 和 TP508 处理	单独 TP508 处理不 增加细胞存活率	VEGF 和 TP508 处理增加存 活率, 超过单独的 VEGF

TP508 处理 :正常氧	eNOS 表达上调	VEGF、VEGFR1 和 VEGFR2 表达 :没有影响
TP508 处理 :低氧	eNOS 表达上调	VEGF、VEGFR1 和 VEGFR2 表达上调

[0247] 例如, HLME 细胞研究与哮喘、急性肺损伤、肺动脉高血压、囊性纤维化和炎症肺疾病相关。

[0248] 实施例 11 :对分离的冠状小动脉中内皮功能 / 功能障碍的影响

[0249] 使用 Ameroid 缩窄器,使成年 Yucatan 猪冠状动脉左旋支 (LCX) 慢性闭塞,第 60 天从其心脏和从非缺血左前降支动脉 (LAD) 按照描述的分离冠状微血管 (小动脉)。从 LAD 或 LCX 上仔细剥离心外膜下小动脉分支 (60-100 μm 内径以及 1 至 1.5mm 长度,无分支,原位)。每个小动脉用玻璃微吸管插入且增压至 60cm H_2O 的管内压,不流动。血管内径在整个实验中都用影像显微镜技术结合 MacLab (ADI Instruments, Inc) 数据采集系统来测量。紧张度 (tone) 发展后 (自发收缩至最大直径的大约 70%),我们确定内皮依赖性 NO 介导的血管扩张剂腺苷 (0.1nM 至 10 μM) 和 5-羟色胺 (0.1nM 至 1 μM)、ATP 敏感的钾通道开启剂吡那地尔 (0.1 μM 至 3 μM)、以及内皮不依赖性血管扩张剂硝普钠 (1nM 至 0.1mM) 的浓度和直径的关系。在小动脉腔外孵育之前和之后建立对这些激动剂的血管扩张反应。实验结束后,每个血管用生理平衡的、含有乙二胺四乙酸 (EDTA, 1mM) 的无钙盐溶液中的 100 μM 硝普钠进行松弛,以在 60cm H_2O 的腔内压下达到它的最大直径。所有响应激动剂的直径变化都对该扩张进行标准化,且表达为最大扩张的百分比。

[0250] 为确定该 LCX 闭塞模型中慢性缺血是否产生了冠状动脉内皮功能障碍,以及 TP508 处理是否影响了 NO 信号产生,从 TP508 和安慰剂处理的心脏的左前降支动脉 (LAD) 非缺血分支以及闭塞、缺血的 LCX 分离冠状小动脉。然后用腺苷、5-羟色胺、硝普钠或吡那地尔离体处理分离的小动脉。如果小动脉具有内皮功能障碍且伴有 NO 产生受损,它们响应腺苷和 5-羟色胺 (其属于内皮依赖性 NO 介导的血管扩张剂) 的血管扩张降低,但对于硝普钠和吡那地尔则不是这样,这两者分别通过贡献 NO 来激活环化 GMP 和打开平滑肌细胞 ATP 敏感性钾离子通道来松弛平滑肌细胞,不依赖于内皮细胞反应。

[0251] 相对于非缺血血管,缺血小动脉对腺苷或 5-羟色胺显示出明显减小的扩张反应 (图 13A 和 13B)。如图所示,缺血在剂量反应曲线中导致右向的位移,即缺血小动脉需要高一个数量级的药物来达到与非缺血小动脉相同的扩张程度。当分离的血管暴露于硝普盐或吡那地尔时并未发现该缺氧效应 (图 13C 和 13D)。因此,缺氧小动脉响应于经由 NO 供体提供的 NO 和平滑肌松弛药物表现出正常的扩张,但是对于 5-羟色胺和腺苷却证明有经典的内皮功能障碍,内皮细胞产生 NO 的能力降低。

[0252] 与分离于安慰剂处理的缺血心脏的小动脉的响应相比, TP508 能显著地增加小动脉对腺苷和 5-羟色胺的响应 (图 13A 和 13B)。实际上,分离于 TP508 处理的缺血心脏的小动脉对腺苷的响应似乎被恢复至非缺血对照小动脉中可见的水平 (图 13A)。

[0253] 为证实该 TP508 对血管扩张的效应表现为这些小动脉中内皮功能障碍的逆转,我们确定了低氧以及 TP508 对这些小动脉产生 NO 的能力和 eNOS 表达水平的影响。如图 13E 所示,与从 LAD 分离的非缺血对照小动脉相比,从安慰剂处理的心脏的缺血 LCX 分离的小动

脉的 NO 产生降低。但是,从 TP508 处理的心脏的缺血 LCX 分离的小动脉,具有的 NO 产生水平超过了非缺血对照的水平。对来自这些有限数量的小动脉的 mRNA 进行的 PCR 分析显示,与非缺血对照小动脉相比,从缺血 LCX 分离的小动脉中 eNOS mRNA 表达降低(图 13F)。与其对 NO 产生的影响类似,TP508 处理使缺血小动脉中 eNOS mRNA 表达恢复至与非缺血小动脉类似或更高的水平。这些结果提示,通过包括上调 eNOS 使得更多 NO 产生的过程,TP508 逆转了这些小动脉中的内皮功能障碍。

[0254] 本发明已经参考实施方式实例进行了具体说明和描述,本领域技术人员应当理解,在没有偏离所附权利要求书涵盖的本发明范围的情况下,可在形式和细节上进行多种改变。

- [0001] 序列表
- [0002] <110>Orthologic Corp.
- [0003] The Texas A&M University System
- [0004] Carney, Darrell H.
- [0005] Olszewska-Pazdrak, Barbara
- [0006] Fossum, Theresa W.
- [0007] <120> 治疗内皮功能障碍的方法
- [0008] <130>3901.1001003
- [0009] <140>PCT/US2007/020445
- [0010] <141>2007-09-21
- [0011] <150>US 60/846,418
- [0012] <151>2006-09-22
- [0013] <150>US 60/848,004
- [0014] <151>2006-09-28
- [0015] <150>US 60/922,646
- [0016] <151>2007-04-10
- [0017] <160>40
- [0018] <170>FastSEQ for Windows Version 4.0
- [0019] <210>1
- [0020] <211>14
- [0021] <212>PRT
- [0022] <213> 人工序列
- [0023] <220>
- [0024] <223> 凝血酶肽衍生物
- [0025] <220>
- [0026] <221> 变体
- [0027] <222>6
- [0028] <223>Xaa = Glu 或 Gln
- [0029] <220>
- [0030] <221> 变体
- [0031] <222>13
- [0032] <223>Xaa = Phe, Met, Leu, His 或 Val
- [0033] <400>1
- [0034] Arg Gly Asp Ala Cys Xaa Gly Asp Ser Gly Gly Pro Xaa Val
- [0035] 1 5 10
- [0036] <210>2
- [0037] <211>23
- [0038] <212>PRT

- [0039] <213> 人工序列
- [0040] <220>
- [0041] <223> 凝血酶肽衍生物
- [0042] <220>
- [0043] <221> 变体
- [0044] <222>15
- [0045] <223>Xaa = Glu 或 Gln
- [0046] <220>
- [0047] <221> 变体
- [0048] <222>22
- [0049] <223>Xaa = Phe, Met, Leu, His 或 Val
- [0050] <220>
- [0051] <223> 位点 1 的 Ala 任选地被 N- 酰化
- [0052] <220>
- [0053] <223> 位点 23 的 Val 任选地被 C- 酰胺化
- [0054] <400>2
- [0055] Ala Gly Tyr Lys Pro Asp Glu Gly Lys Arg Gly Asp Ala Cys Xaa Gly
- [0056] 1 5 10 15
- [0057] Asp Ser Gly Gly Pro Xaa Val
- [0058] 20
- [0059] <210>3
- [0060] <211>23
- [0061] <212>PRT
- [0062] <213> 人工序列
- [0063] <220>
- [0064] <223> 凝血酶肽衍生物
- [0065] <220>
- [0066] <223> 位点 1 的 Ala 未被修饰
- [0067] <220>
- [0068] <223> 位点 23 的 Val 用 -NH₂ 酰胺化
- [0069] <400>3
- [0070] Ala Gly Tyr Lys Pro Asp Glu Gly Lys Arg Gly Asp Ala Cys Glu Gly
- [0071] 1 5 10 15
- [0072] Asp Ser Gly Gly Pro Phe Val
- [0073] 20
- [0074] <210>4
- [0075] <211>14
- [0076] <212>PRT
- [0077] <213> 人工序列

[0117]	20
[0118]	<210>6
[0119]	<211>23
[0120]	<212>PRT
[0121]	<213> 人工序列
[0122]	<220>
[0123]	<223> 凝血酶肽衍生物
[0124]	<220>
[0125]	<223> 位点 1 的 Ala 任选地被 N- 酰化
[0126]	<220>
[0127]	<223> 位点 23 的 Val 任选地被 C- 酰胺化
[0128]	<400>6
[0129]	Ala Gly Tyr Lys Pro Asp Glu Gly Lys Arg Gly Asp Ala Cys Glu Gly
[0130]	1 5 10 15
[0131]	Asp Ser Gly Gly Pro Phe Val
[0132]	20
[0133]	<210>7
[0134]	<211>10
[0135]	<212>PRT
[0136]	<213> 人工序列
[0137]	<220>
[0138]	<223> 凝血酶肽衍生物
[0139]	<400>7
[0140]	Glu Gly Lys Arg Gly Asp Ala Cys Glu Gly
[0141]	1 5 10
[0142]	<210>8
[0143]	<211>22
[0144]	<212>PRT
[0145]	<213> 人工序列
[0146]	<220>
[0147]	<223> 凝血酶结构域的互补肽
[0148]	<400>8
[0149]	Lys Gly Ser Pro Thr Val Thr Phe Thr Gly Ile Pro Cys Phe Pro Phe
[0150]	1 5 10 15
[0151]	Ile Arg Leu Val Thr Ser
[0152]	20
[0153]	<210>9
[0154]	<211>10
[0155]	<212>PRT

[0156]	<213> 人工序列		
[0157]	<220>		
[0158]	<223> 凝血酶结构域的互补肽		
[0159]	<400>9		
[0160]	Thr Phe Thr Gly Ile Pro Ser Phe Pro Phe		
[0161]	1	5	10
[0162]	<210>10		
[0163]	<211>23		
[0164]	<212>PRT		
[0165]	<213> 人工序列		
[0166]	<220>		
[0167]	<223> 凝血酶结构域的互补肽		
[0168]	<400>10		
[0169]	Arg Pro Met Phe Gly Leu Leu Pro Phe Ala Pro Leu Arg Thr Leu Pro		
[0170]	1	5	10 15
[0171]	Leu Ser Pro Pro Gly Lys Gln		
[0172]	20		
[0173]	<210>11		
[0174]	<211>10		
[0175]	<212>PRT		
[0176]	<213> 人工序列		
[0177]	<220>		
[0178]	<223> 凝血酶结构域的互补肽		
[0179]	<400>11		
[0180]	Lys Pro Phe Ala Pro Leu Arg Thr Leu Pro		
[0181]	1	5	10
[0182]	<210>12		
[0183]	<211>622		
[0184]	<212>PRT		
[0185]	<213> 人		
[0186]	<400>12		
[0187]	Met Ala His Val Arg Gly Leu Gln Leu Pro Gly Cys Leu Ala Leu Ala		
[0188]	1	5	10 15
[0189]	Ala Leu Cys Ser Leu Val His Ser Gln His Val Phe Leu Ala Pro Gln		
[0190]	20	25	30
[0191]	Gln Ala Arg Ser Leu Leu Gln Arg Val Arg Arg Ala Asn Thr Phe Leu		
[0192]	35	40	45
[0193]	Glu Glu Val Arg Lys Gly Asn Leu Glu Arg Glu Cys Val Glu Glu Thr		
[0194]	50	55	60

[0195]	Cys Ser Tyr Glu Glu Ala Phe Gly Ala Leu Glu Ser Ser Thr Ala Thr
[0196]	65 70 75 80
[0197]	Asp Val Phe Trp Ala Lys Tyr Thr Ala Cys Glu Thr Ala Arg Thr Pro
[0198]	85 90 95
[0199]	Arg Asp Lys Leu Ala Ala Cys Leu Glu Gly Asn Cys Ala Glu Gly Leu
[0200]	100 105 110
[0201]	Gly Thr Asn Tyr Arg Gly His Val Asn Ile Thr Arg Ser Gly Ile Glu
[0202]	115 120 125
[0203]	Cys Gln Leu Trp Arg Ser Arg Tyr Pro His Lys Pro Glu Ile Asn Ser
[0204]	130 135 140
[0205]	Thr Thr His Pro Gly Ala Asp Leu Gln Glu Asn Phe Cys Arg Asn Pro
[0206]	145 150 155 160
[0207]	Asp Ser Ser Thr Thr Gly Pro Trp Cys Tyr Thr Thr Asp Pro Thr Val
[0208]	165 170 175
[0209]	Arg Arg Gln Glu Cys Ser Ile Pro Val Cys Gly Gln Asp Gln Val Thr
[0210]	180 185 190
[0211]	Val Ala Met Thr Pro Arg Ser Glu Gly Ser Ser Val Asn Leu Ser Pro
[0212]	195 200 205
[0213]	Pro Leu Glu Gln Cys Val Pro Asp Arg Gly Gln Gln Tyr Gln Gly Arg
[0214]	210 215 220
[0215]	Leu Ala Val Thr Thr His Gly Leu Pro Cys Leu Ala Trp Ala Ser Ala
[0216]	225 230 235 240
[0217]	Gln Ala Lys Ala Leu Ser Lys His Gln Asp Phe Asn Ser Ala Val Gln
[0218]	245 250 255
[0219]	Leu Val Glu Asn Phe Cys Arg Asn Pro Asp Gly Asp Glu Glu Gly Val
[0220]	260 265 270
[0221]	Trp Cys Tyr Val Ala Gly Lys Pro Gly Asp Phe Gly Tyr Cys Asp Leu
[0222]	275 280 285
[0223]	Asn Tyr Cys Glu Glu Ala Val Glu Glu Glu Thr Gly Asp Gly Leu Asp
[0224]	290 295 300
[0225]	Glu Asp Ser Asp Arg Ala Ile Glu Gly Arg Thr Ala Thr Ser Glu Tyr
[0226]	305 310 315 320
[0227]	Gln Thr Phe Phe Asn Pro Arg Thr Phe Gly Ser Gly Glu Ala Asp Cys
[0228]	325 330 335
[0229]	Gly Leu Arg Pro Leu Phe Glu Lys Lys Ser Leu Glu Asp Lys Thr Glu
[0230]	340 345 350
[0231]	Arg Glu Leu Leu Glu Ser Tyr Ile Asp Gly Arg Ile Val Glu Gly Ser
[0232]	355 360 365
[0233]	Asp Ala Glu Ile Gly Met Ser Pro Trp Gln Val Met Leu Phe Arg Lys

[0234]	370	375	380
[0235]	Ser Pro Gln Glu Leu Leu Cys Gly Ala Ser Leu Ile Ser Asp Arg Trp		
[0236]	385	390	395 400
[0237]	Val Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Leu Tyr Pro Pro Trp Asp Lys Asn		
[0238]	405	410	415
[0239]	Phe Thr Glu Asn Asp Leu Leu Val Arg Ile Gly Lys His Ser Arg Thr		
[0240]	420	425	430
[0241]	Arg Tyr Glu Arg Asn Ile Glu Lys Ile Ser Met Leu Glu Lys Ile Tyr		
[0242]	435	440	445
[0243]	Ile His Pro Arg Tyr Asn Trp Arg Glu Asn Leu Asp Arg Asp Ile Ala		
[0244]	450	455	460
[0245]	Leu Met Lys Leu Lys Lys Pro Val Ala Phe Ser Asp Tyr Ile His Pro		
[0246]	465	470	475 480
[0247]	Val Cys Leu Pro Asp Arg Glu Thr Ala Ala Ser Leu Leu Gln Ala Gly		
[0248]	485	490	495
[0249]	Tyr Lys Gly Arg Val Thr Gly Trp Gly Asn Leu Lys Glu Thr Trp Thr		
[0250]	500	505	510
[0251]	Ala Asn Val Gly Lys Gly Gln Pro Ser Val Leu Gln Val Val Asn Leu		
[0252]	515	520	525
[0253]	Pro Ile Val Glu Arg Pro Val Cys Lys Asp Ser Thr Arg Ile Arg Ile		
[0254]	530	535	540
[0255]	Thr Asp Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Lys Pro Asp Glu Gly Lys Arg		
[0256]	545	550	555 560
[0257]	Gly Asp Ala Cys Glu Gly Asp Ser Gly Gly Pro Phe Val Met Lys Ser		
[0258]	565	570	575
[0259]	Pro Phe Asn Asn Arg Trp Tyr Gln Met Gly Ile Val Ser Trp Gly Glu		
[0260]	580	585	590
[0261]	Gly Cys Asp Arg Asp Gly Lys Tyr Gly Phe Tyr Thr His Val Phe Arg		
[0262]	595	600	605
[0263]	Leu Lys Lys Trp Ile Gln Lys Val Ile Asp Gln Phe Gly Glu		
[0264]	610	615	620
[0265]	<210>13		
[0266]	<211>12		
[0267]	<212>PRT		
[0268]	<213> 人工序列		
[0269]	<220>		
[0270]	<223> 丝氨酸酯酶保守序列		
[0271]	<220>		
[0272]	<221> 变体		

[0273]	<222>2
[0274]	<223>Xaa = Ala 或 Ser
[0275]	<220>
[0276]	<221> 变体
[0277]	<222>4
[0278]	<223>Xaa = Glu 或 Gln
[0279]	<220>
[0280]	<221> 变体
[0281]	<222>11
[0282]	<223>Xaa = Phe, Met, Leu, His 或 Val
[0283]	<400>13
[0284]	Asp Xaa Cys Xaa Gly Asp Ser Gly Gly Pro Xaa Val
[0285]	1 5 10
[0286]	<210>14
[0287]	<211>10
[0288]	<212>PRT
[0289]	<213> 人工序列
[0290]	<220>
[0291]	<223> 丝氨酸酯酶保守序列
[0292]	<400>14
[0293]	Cys Glu Gly Asp Ser Gly Gly Pro Phe Val
[0294]	1 5 10
[0295]	<210>15
[0296]	<211>10
[0297]	<212>PRT
[0298]	<213> 人工序列
[0299]	<220>
[0300]	<223> 丝氨酸酯酶保守序列
[0301]	<220>
[0302]	<221> 变体
[0303]	<222>2
[0304]	<223>Xaa = Glu 或 Gln
[0305]	<220>
[0306]	<221> 变体
[0307]	<222>9
[0308]	<223>Xaa = Phe, Met, Leu, His 或 Val
[0309]	<400>15
[0310]	Cys Xaa Gly Asp Ser Gly Gly Pro Xaa Val
[0311]	1 5 10

[0312]	<210>16
[0313]	<211>4
[0314]	<212>PRT
[0315]	<213> 人工序列
[0316]	<220>
[0317]	<223> 凝血酶肽
[0318]	<400>16
[0319]	Arg Gly Asp Ala
[0320]	1
[0321]	<210>17
[0322]	<211>14
[0323]	<212>PRT
[0324]	<213> 人工序列
[0325]	<220>
[0326]	<223> 凝血酶肽衍生物
[0327]	<220>
[0328]	<223> 位点 1 的 Arg 任选地被 N- 酰化
[0329]	<220>
[0330]	<223> 位点 14 的 Val 任选地被 C- 酰胺化
[0331]	<400>17
[0332]	Arg Gly Asp Ala Cys Glu Gly Asp Ser Gly Gly Pro Phe Val
[0333]	1 5 10
[0334]	<210>18
[0335]	<211>33
[0336]	<212>PRT
[0337]	<213> 人工序列
[0338]	<220>
[0339]	<223> 凝血酶肽衍生物
[0340]	<220>
[0341]	<223> 位点 1 的 Asp 任选地被 N- 酰化
[0342]	<220>
[0343]	<223> 位点 33 的 Phe 任选地被 C- 酰胺化
[0344]	<400>18
[0345]	Asp Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Lys Pro Asp Glu Gly Lys Arg Gly
[0346]	1 5 10 15
[0347]	Asp Ala Cys Glu Gly Asp Ser Gly Gly Pro Phe Val Met Lys Ser Pro
[0348]	20 25 30
[0349]	Phe
[0350]	<210>19

48

[0390]	<211>23
[0391]	<212>PRT
[0392]	<213> 人工序列
[0393]	<220>
[0394]	<223> 凝血酶肽衍生物
[0395]	<400>21
[0396]	Ala Gly Tyr Lys Pro Asp Glu Gly Lys Arg Gly Asp Ala Ala Glu Gly
[0397]	1 5 10 15
[0398]	Asp Ser Gly Gly Pro Phe Val
[0399]	20
[0400]	<210>22
[0401]	<211>23
[0402]	<212>PRT
[0403]	<213> 人工序列
[0404]	<220>
[0405]	<223> 凝血酶肽衍生物
[0406]	<220>
[0407]	<223> 位点 1 的 Ala 未被修饰
[0408]	<220>
[0409]	<223> 位点 23 的 Val 用 -NH ₂ 酰胺化
[0410]	<400>22
[0411]	Ala Gly Tyr Lys Pro Asp Glu Gly Lys Arg Gly Asp Ala Ala Glu Gly
[0412]	1 5 10 15
[0413]	Asp Ser Gly Gly Pro Phe Val
[0414]	20
[0415]	<210>23
[0416]	<211>33
[0417]	<212>PRT
[0418]	<213> 人工序列
[0419]	<220>
[0420]	<223> 凝血酶肽衍生物
[0421]	<220>
[0422]	<221> 变体
[0423]	<222>5, 19
[0424]	<223>Xaa = Ala, Gly, Ser 或 S- 保护的 Cys
[0425]	<400>23
[0426]	Asp Asn Met Phe Xaa Ala Gly Tyr Lys Pro Asp Glu Gly Lys Arg Gly
[0427]	1 5 10 15
[0428]	Asp Ala Xaa Glu Gly Asp Ser Gly Gly Pro Phe Val Met Lys Ser Pro

[0429]		20	25	30
[0430]	Phe			
[0431]	<210>24			
[0432]	<211>33			
[0433]	<212>PRT			
[0434]	<213> 人工序列			
[0435]	<220>			
[0436]	<223> 凝血酶肽衍生物			
[0437]	<220>			
[0438]	<221> 变体			
[0439]	<222>5, 19			
[0440]	<223>Xaa = Ala, Gly, Ser 或 S- 保护的 Cys			
[0441]	<220>			
[0442]	<221> 变体			
[0443]	<222>20			
[0444]	<223>Xaa = Glu 或 Gln			
[0445]	<220>			
[0446]	<221> 变体			
[0447]	<222>27			
[0448]	<223>Xaa = Phe, Met, Leu, His 或 Val			
[0449]	<400>24			
[0450]	Asp Asn Met Phe Xaa Ala Gly Tyr Lys Pro Asp Glu Gly Lys Arg Gly			
[0451]	1 5 10 15			
[0452]	Asp Ala Xaa Xaa Gly Asp Ser Gly Gly Pro Xaa Val Met Lys Ser Pro			
[0453]	20 25 30			
[0454]	Phe			
[0455]	<210>25			
[0456]	<211>33			
[0457]	<212>PRT			
[0458]	<213> 人工序列			
[0459]	<220>			
[0460]	<223> 凝血酶肽衍生物			
[0461]	<400>25			
[0462]	Asp Asn Met Phe Ala Ala Gly Tyr Lys Pro Asp Glu Gly Lys Arg Gly			
[0463]	1 5 10 15			
[0464]	Asp Ala Ala Glu Gly Asp Ser Gly Gly Pro Phe Val Met Lys Ser Pro			
[0465]	20 25 30			
[0466]	Phe			
[0467]	<210>26			

[0468]	<211>33
[0469]	<212>PRT
[0470]	<213> 人工序列
[0471]	<220>
[0472]	<223> 凝血酶肽衍生物
[0473]	<220>
[0474]	<223> 位点 1 的 Asp 未被修饰
[0475]	<220>
[0476]	<223> 位点 33 的 Phe 用 -NH ₂ 酰胺化
[0477]	<400>26
[0478]	Asp Asn Met Phe Ala Ala Gly Tyr Lys Pro Asp Glu Gly Lys Arg Gly
[0479]	1 5 10 15
[0480]	Asp Ala Ala Glu Gly Asp Ser Gly Gly Pro Phe Val Met Lys Ser Pro
[0481]	20 25 30
[0482]	Phe
[0483]	<210>27
[0484]	<211>33
[0485]	<212>PRT
[0486]	<213> 人工序列
[0487]	<220>
[0488]	<223> 凝血酶肽衍生物
[0489]	<400>27
[0490]	Ala Gly Tyr Lys Pro Asp Glu Gly Lys Arg Gly Asp Ala Cys Glu Gly
[0491]	1 5 10 15
[0492]	Asp Ser Gly Gly Pro Phe Val Met Lys Ser Pro Phe Asn Asn Arg Trp
[0493]	20 25 30
[0494]	Tyr
[0495]	<210>28
[0496]	<211>33
[0497]	<212>PRT
[0498]	<213> 人工序列
[0499]	<220>
[0500]	<223> 凝血酶肽衍生物
[0501]	<220>
[0502]	<221> 变体
[0503]	<222>15
[0504]	<223>Xaa = Glu 或 Gln
[0505]	<220>
[0506]	<221> 变体

[0507]	<222>22
[0508]	<223>Xaa = Phe, Met, Leu, His 或 Val
[0509]	<400>28
[0510]	Ala Gly Tyr Lys Pro Asp Glu Gly Lys Arg Gly Asp Ala Cys Xaa Gly
[0511]	1 5 10 15
[0512]	Asp Ser Gly Gly Pro Xaa Val Met Lys Ser Pro Phe Asn Asn Arg Trp
[0513]	20 25 30
[0514]	Tyr
[0515]	<210>29
[0516]	<211>33
[0517]	<212>PRT
[0518]	<213> 人工序列
[0519]	<220>
[0520]	<223> 凝血酶肽衍生物
[0521]	<220>
[0522]	<223> 位点 1 的 Ala 未被修饰
[0523]	<220>
[0524]	<223> 位点 33 的 Tyr 用 -NH ₂ 酰胺化
[0525]	<400>29
[0526]	Ala Gly Tyr Lys Pro Asp Glu Gly Lys Arg Gly Asp Ala Cys Glu Gly
[0527]	1 5 10 15
[0528]	Asp Ser Gly Gly Pro Phe Val Met Lys Ser Pro Phe Asn Asn Arg Trp
[0529]	20 25 30
[0530]	Tyr
[0531]	<210>30
[0532]	<211>22
[0533]	<212>PRT
[0534]	<213> 人工序列
[0535]	<220>
[0536]	<223> 凝血酶结构域的互补肽
[0537]	<400>30
[0538]	Lys Gly Ser Pro Thr Val Thr Phe Thr Gly Ile Pro Cys Phe Pro Phe
[0539]	1 5 10 15
[0540]	Ile Arg Leu Val Thr Ser
[0541]	20
[0542]	<210>31
[0543]	<211>22
[0544]	<212>PRT
[0545]	<213> 人工序列

[0546]	<220>
[0547]	<223> 凝血酶结构域的互补肽
[0548]	<400>31
[0549]	Lys Gly Ser Pro Thr Val Thr Phe Thr Gly Ile Pro Ser Phe Pro Phe
[0550]	1 5 10 15
[0551]	Ile Arg Leu Val Thr Ser
[0552]	20
[0553]	<210>32
[0554]	<211>10
[0555]	<212>PRT
[0556]	<213> 人工序列
[0557]	<220>
[0558]	<223> 凝血酶结构域的互补肽
[0559]	<400>32
[0560]	Thr Phe Thr Gly Ile Pro Ser Phe Pro Phe
[0561]	1 5 10
[0562]	<210>33
[0563]	<211>23
[0564]	<212>PRT
[0565]	<213> 人工序列
[0566]	<220>
[0567]	<223> 凝血酶结构域的互补肽
[0568]	<400>33
[0569]	Arg Pro Met Phe Gly Leu Leu Pro Phe Ala Pro Leu Arg Thr Leu Pro
[0570]	1 5 10 15
[0571]	Leu Ser Pro Pro Gly Lys Gln
[0572]	20
[0573]	<210>34
[0574]	<211>10
[0575]	<212>PRT
[0576]	<213> 人工序列
[0577]	<220>
[0578]	<223> 凝血酶结构域的互补肽
[0579]	<400>34
[0580]	Leu Pro Phe Ala Pro Leu Arg Thr Leu Pro
[0581]	1 5 10
[0582]	<210>35
[0583]	<211>24
[0584]	<212>DNA

[0585]	<213> 人工序列	
[0586]	<220>	
[0587]	<223>PCR 引物	
[0588]	<400>35	
[0589]	gcaccggcat caccaggaag aaga	24
[0590]	<210>36	
[0591]	<211>22	
[0592]	<212>DNA	
[0593]	<213> 人工序列	
[0594]	<220>	
[0595]	<223>PCR 引物	
[0596]	<400>36	
[0597]	ccgccgcaa gaggacacca gt	22
[0598]	<210>37	
[0599]	<211>19	
[0600]	<212>DNA	
[0601]	<213> 人工序列	
[0602]	<220>	
[0603]	<223>PCR 引物	
[0604]	<400>37	
[0605]	gcggctgcat gacattgag	19
[0606]	<210>38	
[0607]	<211>22	
[0608]	<212>DNA	
[0609]	<213> 人工序列	
[0610]	<220>	
[0611]	<223>PCR 引物	
[0612]	<400>38	
[0613]	gtcgcggtag agatggtcaa gt	22
[0614]	<210>39	
[0615]	<211>14	
[0616]	<212>PRT	
[0617]	<213> 人工序列	
[0618]	<220>	
[0619]	<223> 凝血酶肽衍生物	
[0620]	<220>	
[0621]	<221> 变体	
[0622]	<222>5	
[0623]	<223>Xaa = Ala, Gly, Ser 或 S- 保护的 Cys	

[0624]	<400>39
[0625]	Arg Gly Asp Ala Xaa Glu Gly Asp Ser Gly Gly Pro Phe Val
[0626]	1 5 10
[0627]	<210>40
[0628]	<211>23
[0629]	<212>PRT
[0630]	<213> 人工序列
[0631]	<220>
[0632]	<223> 凝血酶肽衍生物
[0633]	<220>
[0634]	<221> 变体
[0635]	<222>15
[0636]	<223>Xaa = Glu 或 Gln
[0637]	<220>
[0638]	<221> 变体
[0639]	<222>22
[0640]	<223>Xaa = Phe, Met, Leu, His 或 Val
[0641]	<220>
[0642]	<223> 位点 1 的 Ala 未被修饰
[0643]	<220>
[0644]	<223> 位点 23 的 Val 用 -NH ₂ 酰胺化
[0645]	<400>40
[0646]	Ala Gly Tyr Lys Pro Asp Glu Gly Lys Arg Gly Asp Ala Cys Xaa Gly
[0647]	1 5 10 15
[0648]	Asp Ser Gly Gly Pro Xaa Val
[0649]	20

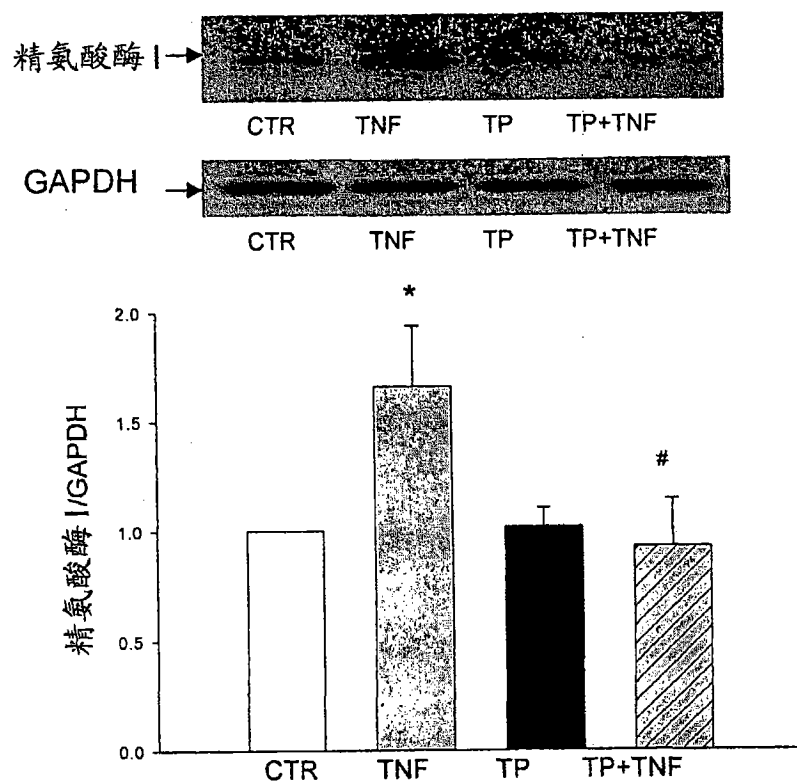


图 1

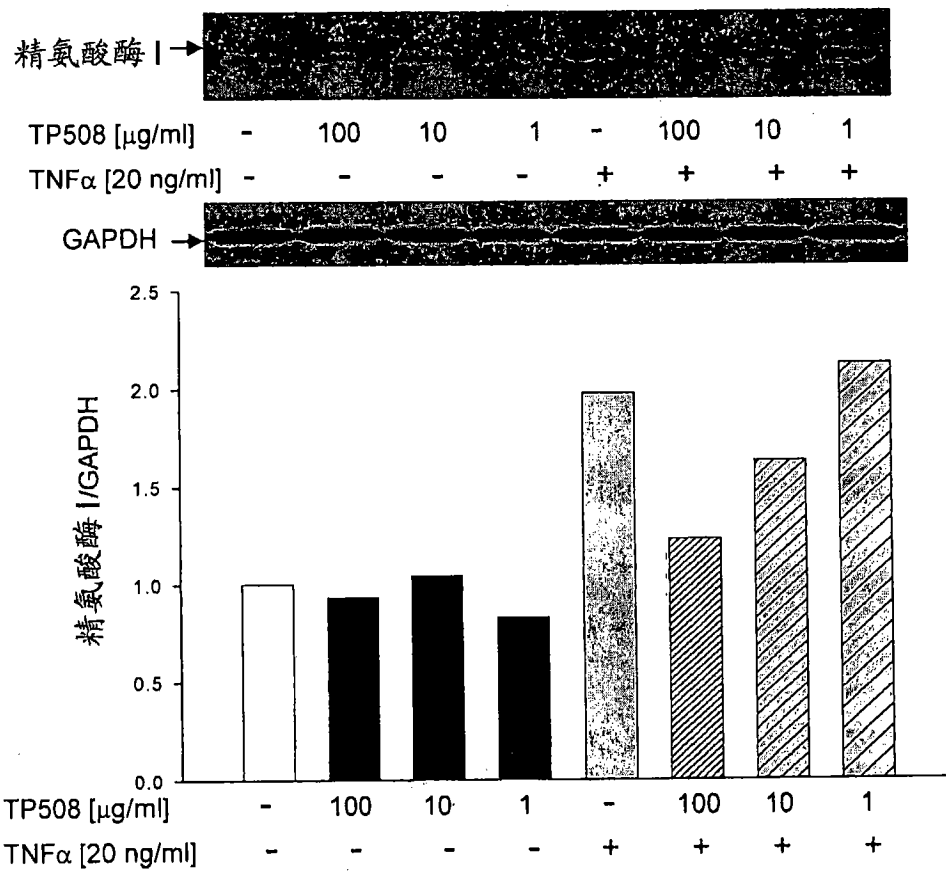


图 2

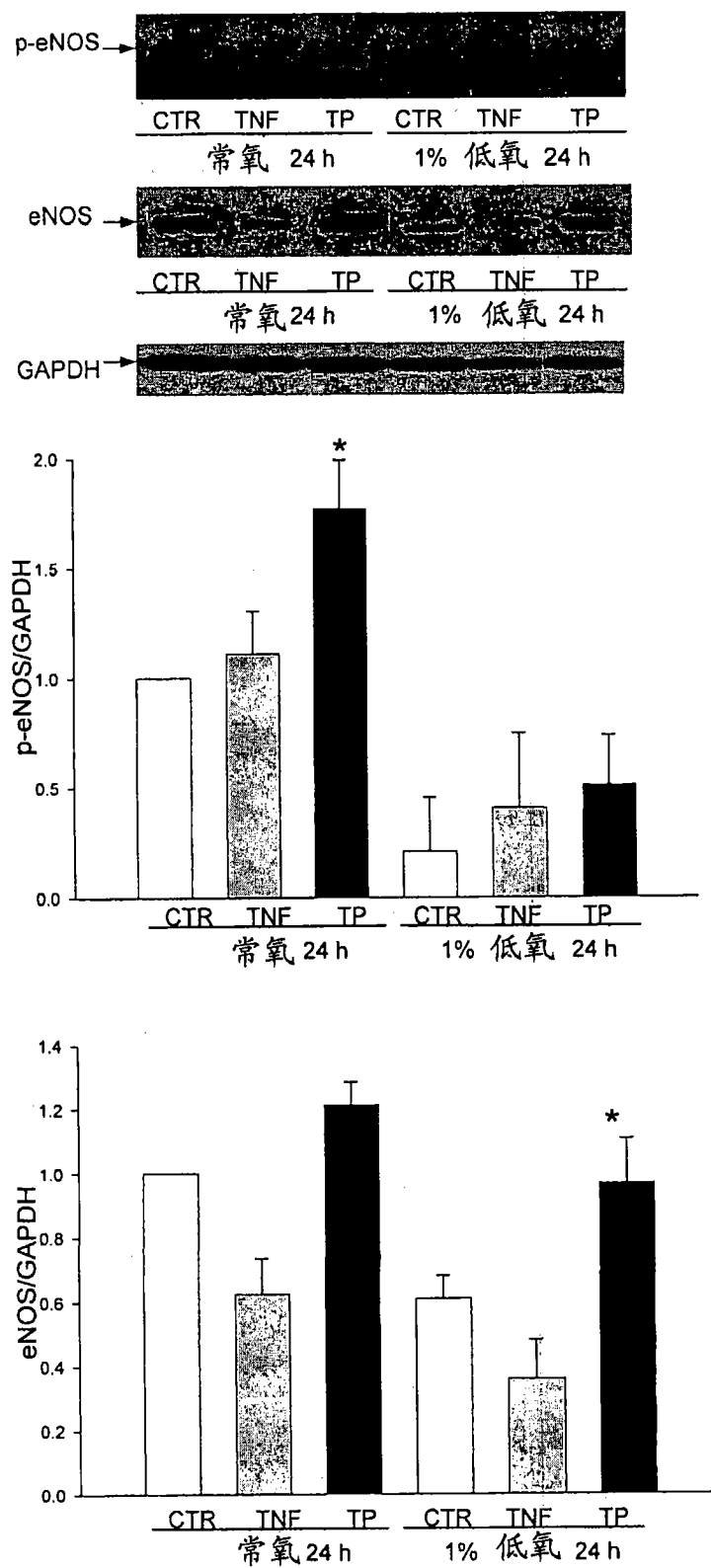


图 3

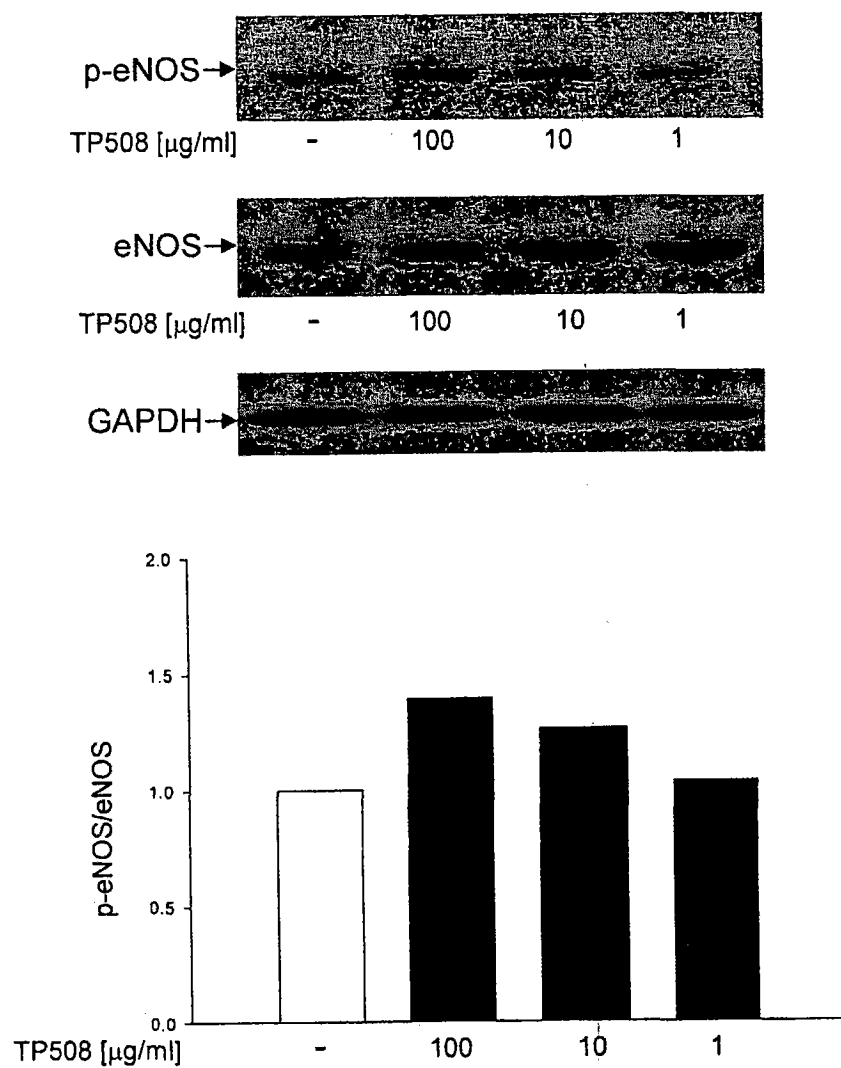


图 4

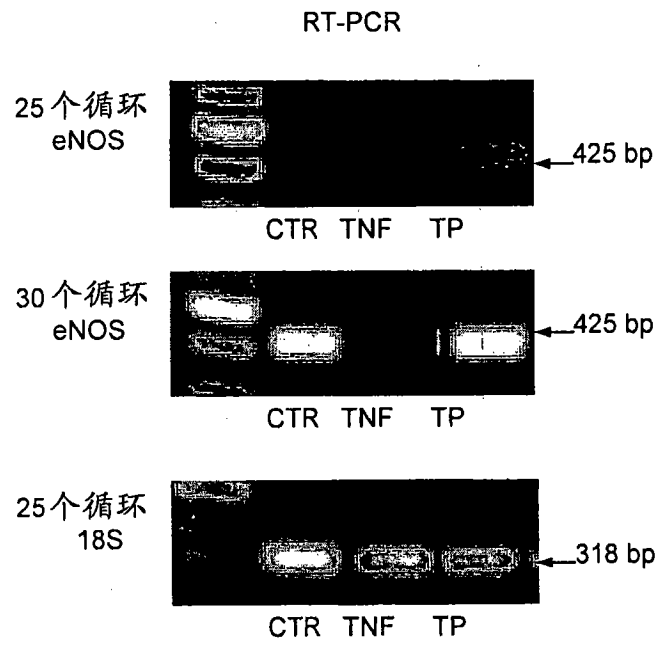


图 5

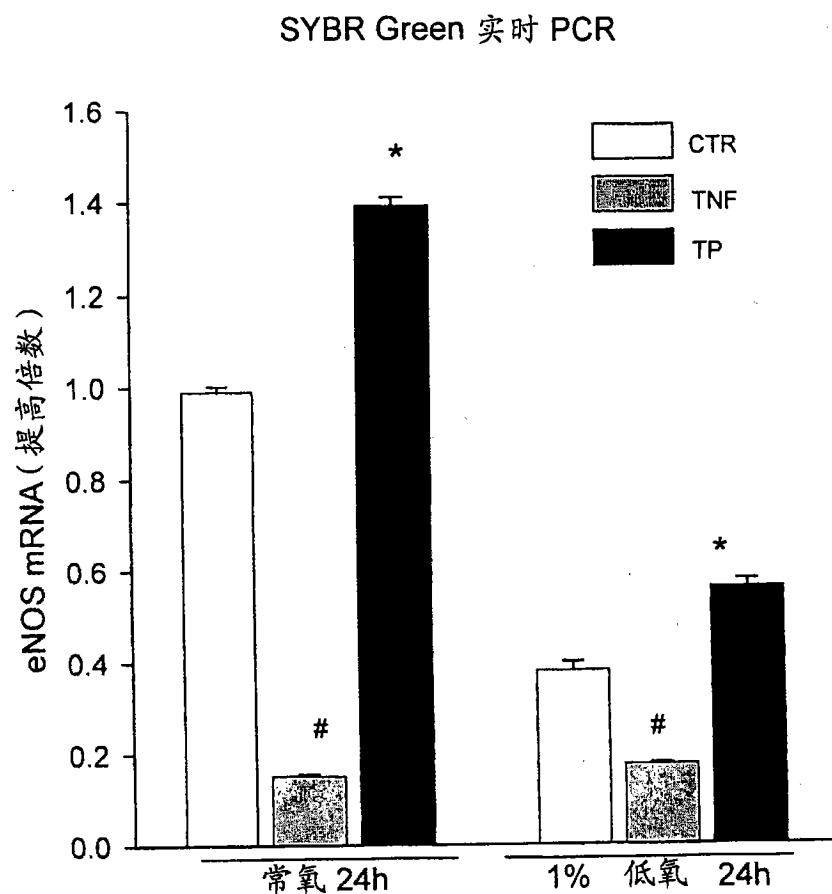


图 6

MAHVRGLQLPGCLALAAALCSLVHSQHVFAPQQARSLLQVRRA
 NTFLEEVKGNLERECVEETCSYEEAFGALESSTATDVFwakYTACETARTPRDKLAA
 CLEGNCAEGLGTNYRGHVNITRSGIECQLWRSRYPHKPEINSTTHPGADLQENFCRNP
 DSSTGPWCYTTPDPTVRRQECIPVCGQDQVTVMTPRSEGSSVNLSPPLEQCVPDGRG
 QQYQGR LAVTTHGLPCLAWASAQAKALSKHQDFNSAVQLVENFCRNPDGDEEGVWCYV
 AGKPGDFGYCDLNYCEEAVEEETGDGLDEDSRAIEGRTATSEYQTFNPRFTGSGEA
 DCGLRPLFEKKSLEDKTERELLESYIDGRIVEGSDAEIGMSPWQVMLFRKSPQELLCG
 ASLISDRWVLTAHCLLYPPWDKNFTENDLLVRIGKHSRTRYERNIEKISMLEKIYIH
 PRYNWRENLDRLDIALMKLKKPVAFSDYIHPVCLPDRETAASLLQAGYKGRVTGWGNLK
 ETWTANVGKGQPSVLQVVNLPIVERPVCKDSTRIRITDNMFCAGYKPDEGKRGDACEG
 DSGGPFV MKSPFNNRWYQMGIVSWGEGCDRDGKYGFYTHVFRLLKKWIQKVIDQFGE

图 7

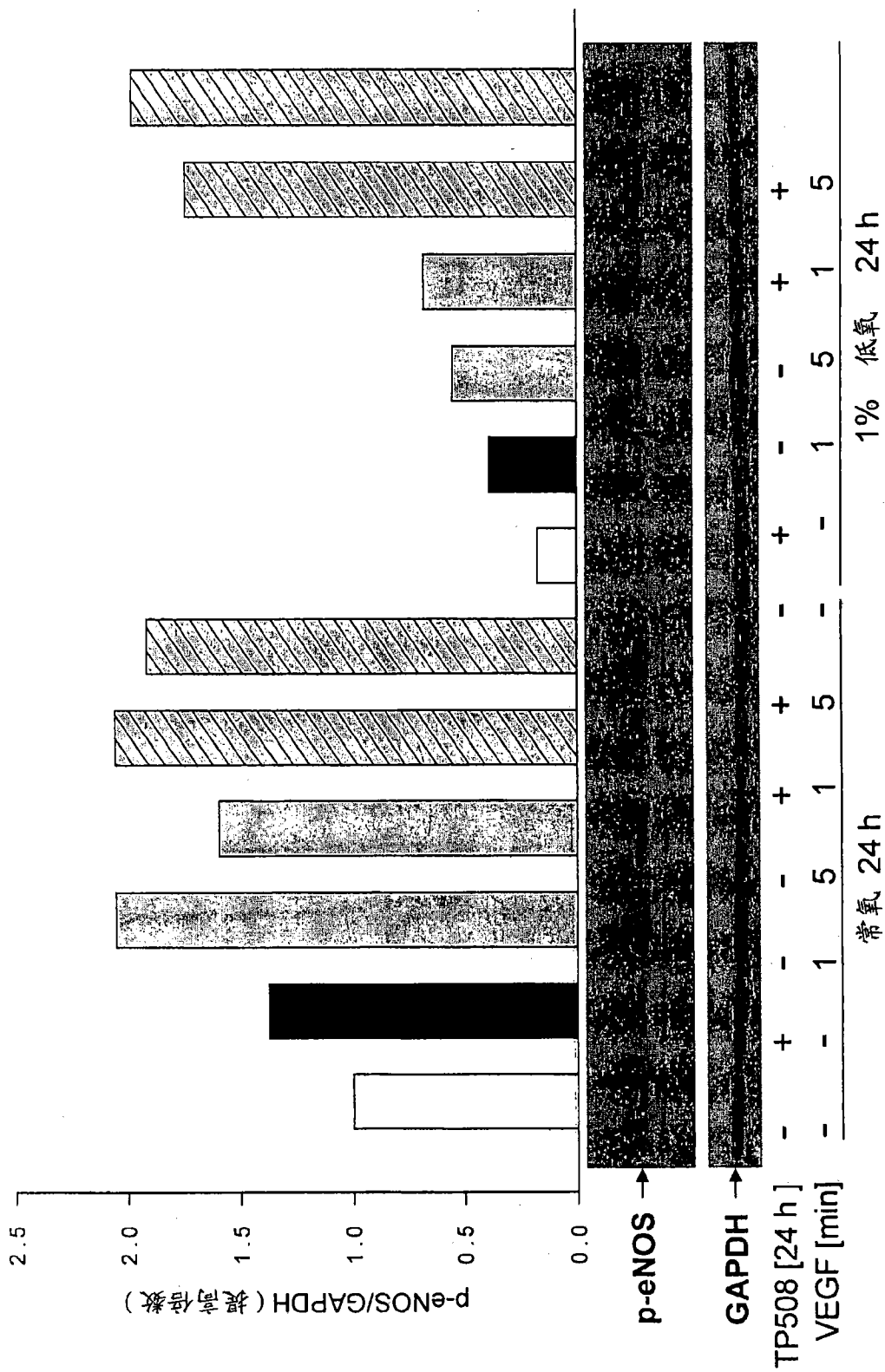


图 8

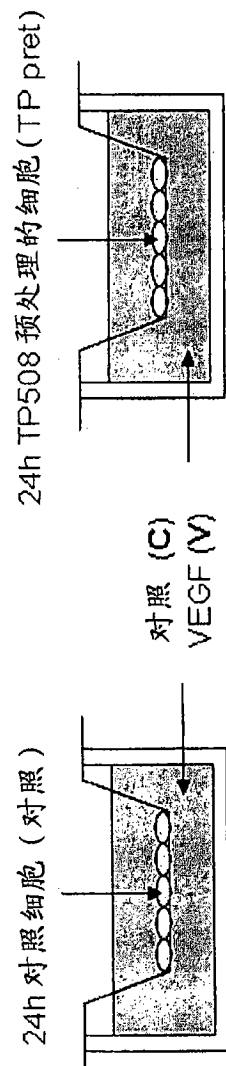


图 9A

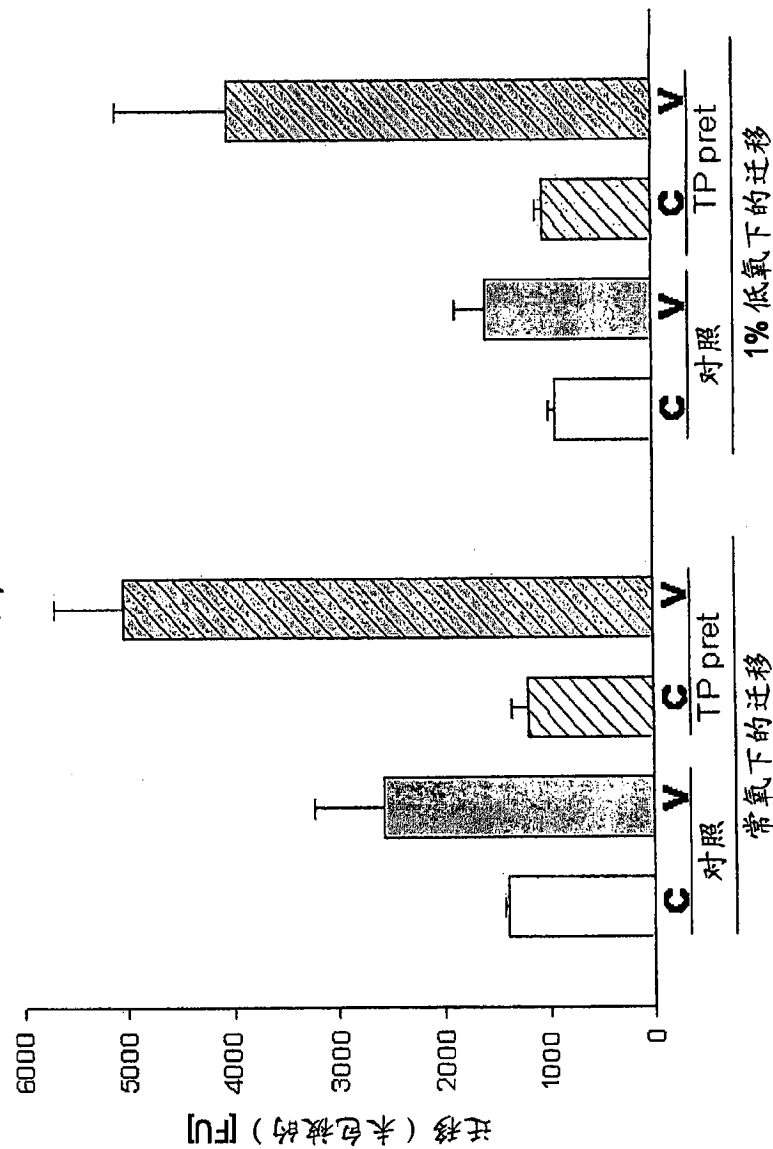


图 9B

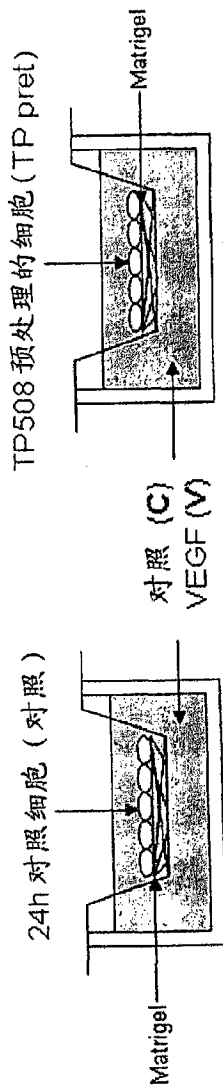


图 10A

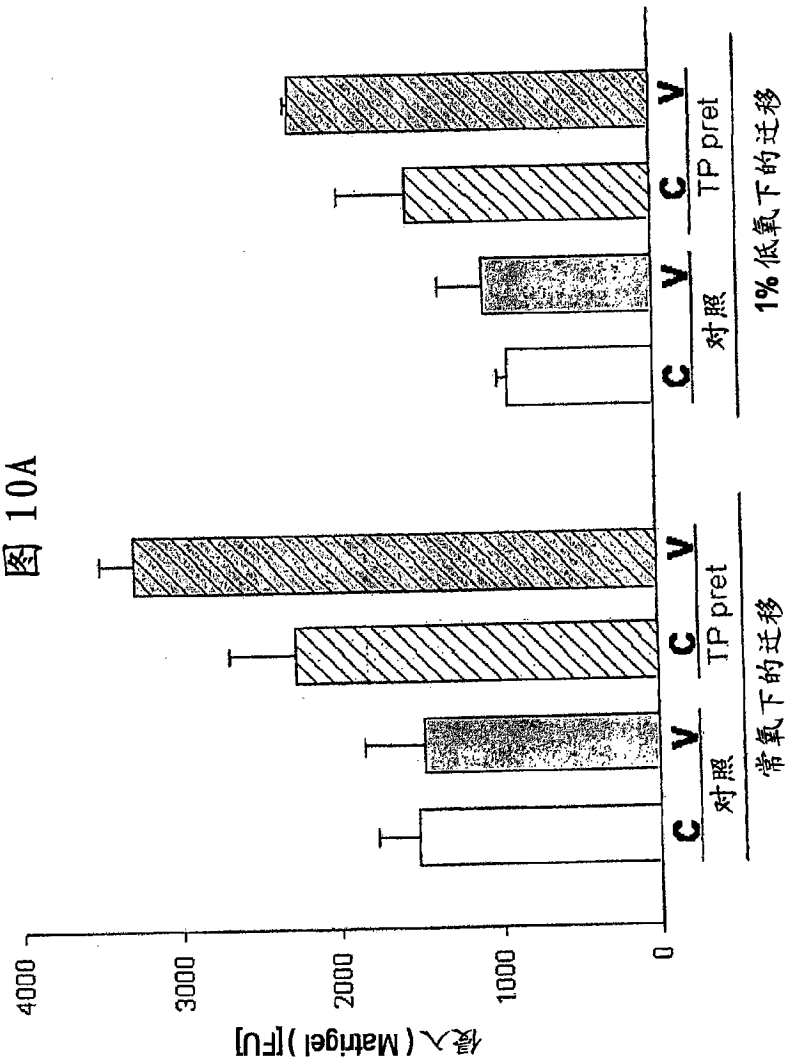


图 10B

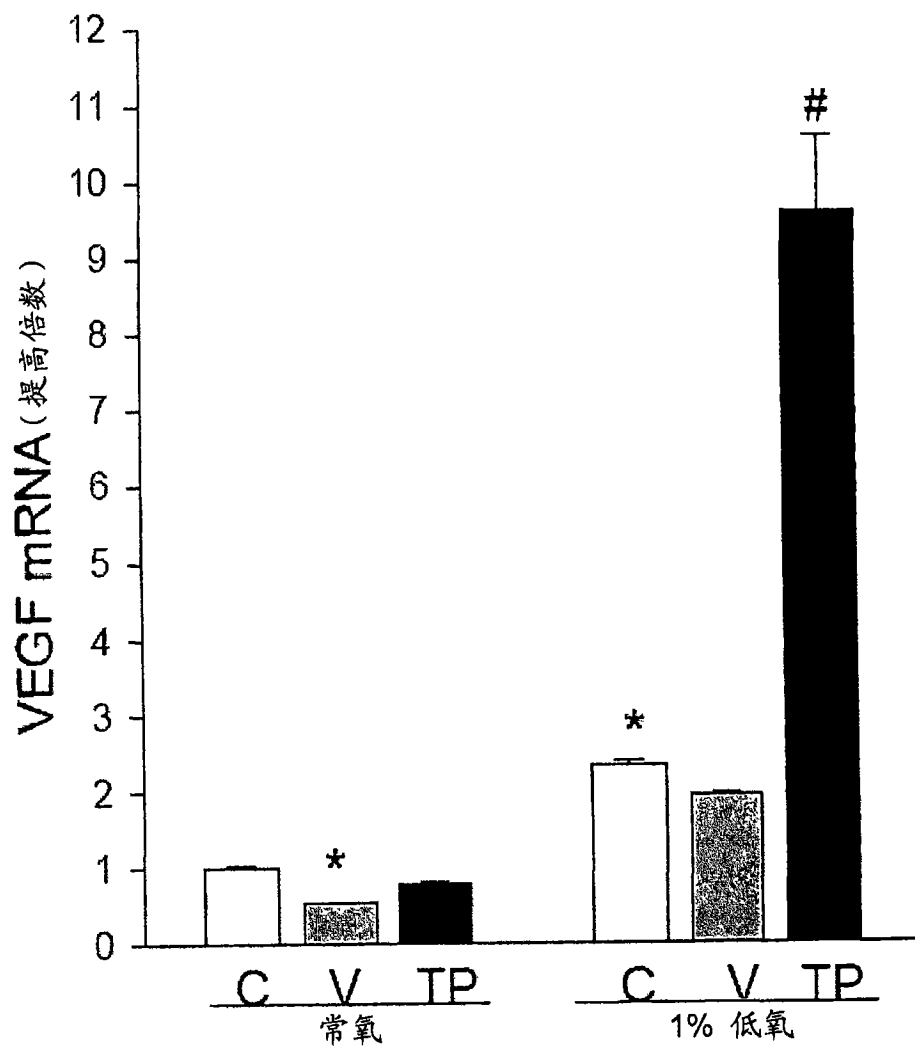


图 11

TP508 诱导的松弛:

TP508 预处理对氨甲酰胆碱诱导的松弛的影响

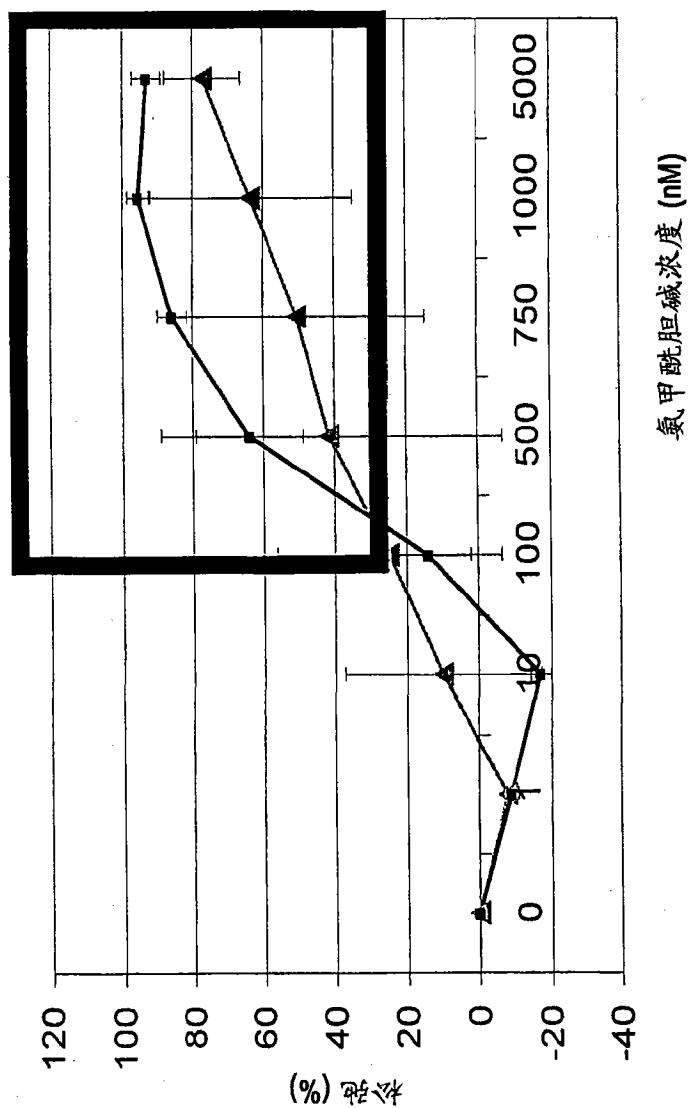


图 12

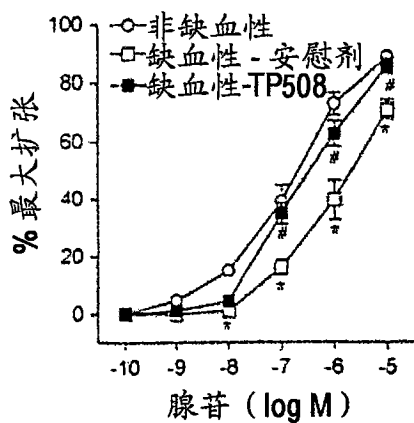


图 13A

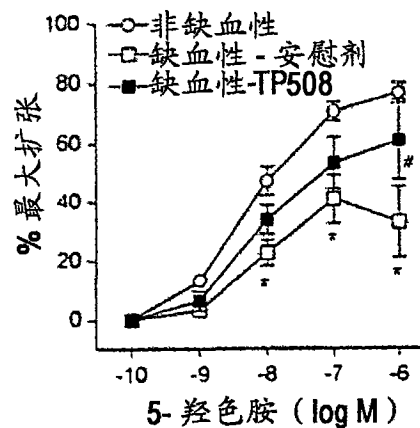


图 13B

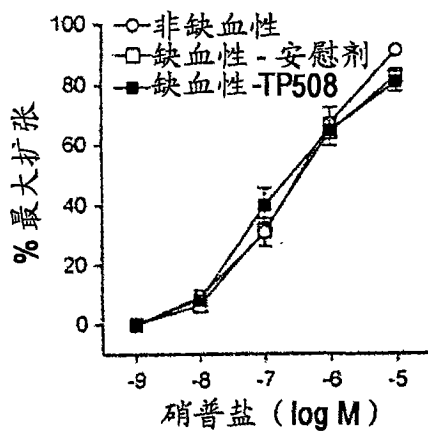


图 13C

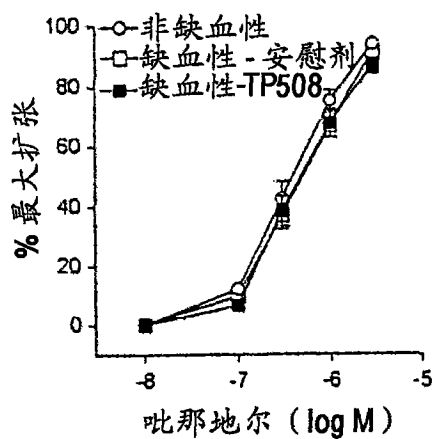


图 13D

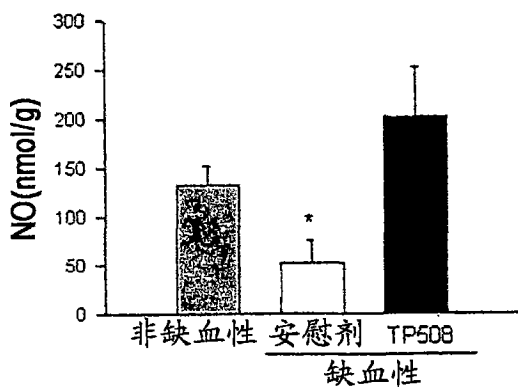


图 13E

图 13