



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107427549 B

(45) 授权公告日 2022.01.11

(21) 申请号 201680012874.6  
(22) 申请日 2016.03.02  
(65) 同一申请的已公布的文献号  
    申请公布号 CN 107427549 A  
(43) 申请公布日 2017.12.01  
(30) 优先权数据  
    62/126,968 2015.03.02 US  
(85) PCT国际申请进入国家阶段日  
    2017.08.30  
(86) PCT国际申请的申请数据  
    PCT/US2016/020443 2016.03.02  
(87) PCT国际申请的公布数据  
    W02016/141053 EN 2016.09.09  
(73) 专利权人 伊利诺伊大学受托管理委员会  
    地址 美国伊利诺伊州  
(72) 发明人 Y.A.科马洛娃 M.罗森布拉特  
    A.B.马利克

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所  
    11105  
    代理人 宋莉 秦剑

(51) Int.Cl.  
    A61K 38/08 (2019.01)  
    A61K 38/10 (2006.01)  
    A61P 9/00 (2006.01)  
    A61P 35/00 (2006.01)  
    A61P 35/04 (2006.01)  
    A61P 27/02 (2006.01)  
    A61P 27/14 (2006.01)  
    A61P 27/06 (2006.01)  
    C07K 7/08 (2006.01)  
    C07K 7/06 (2006.01)

(56) 对比文件  
    WO 2006/015385 A2,2006.02.09  
    CN 102286101 A,2011.12.21  
    WO 2012/174028 A,2012.12.20  
    WO 2012/174028 A,2012.12.20

审查员 李娟娟

权利要求书1页 说明书22页  
    序列表6页 附图11页

(54) 发明名称  
    用于抑制血管生成的肽

(57) 摘要  
    本发明涉及用于抑制血管生成的肽。本发明还涉及使用本发明的肽抑制血管生成的方法、以及治疗与VEGF诱导的血管通透性相关的病症的方法。

1. 经分离的肽用于制备用于抑制有需要的患者中的血管生成的药剂的用途,其中所述肽由KFARLWTEIPTAIT (SEQ ID NO:1) 或FTEIPTI (SEQ ID NO:3) 的氨基酸序列组成,其中所述患者患有视力损害或视力丧失(失明)、黄斑变性、视网膜中央静脉阻塞、视网膜分支静脉阻塞增殖性糖尿病视网膜病变、新生血管性年龄相关性黄斑变性(AMD)、早产儿视网膜病变、缺血性视网膜病变、眼内新生血管形成、角膜新生血管形成、视网膜新生血管形成、脉络膜新生血管形成、糖尿病性黄斑水肿、糖尿病性视网膜缺血、糖尿病性视网膜水肿和增殖性糖尿病视网膜病变、虹膜红变、新生血管性青光眼、视网膜母细胞瘤、葡萄膜炎或角膜移植物新生血管形成。

2. 根据权利要求1所述的用途,其中所述患者患有与VEGF诱导的通透性相关的病症或癌症。

3. 经分离的肽用于制备用于治疗与VEGF诱导的血管通透性相关的病症的药剂的用途,其中所述经分离的肽由KFARLWTEIPTAIT (SEQ ID NO:1) 或FTEIPTI (SEQ ID NO:3) 的氨基酸序列组成,其中所述病症为视力损害或视力丧失(失明)、黄斑变性、视网膜中央静脉阻塞、视网膜分支静脉阻塞增殖性糖尿病视网膜病变、新生血管性年龄相关性黄斑变性(AMD)、早产儿视网膜病变、缺血性视网膜病变、眼内新生血管形成、角膜新生血管形成、视网膜新生血管形成、脉络膜新生血管形成、糖尿病性黄斑水肿、糖尿病性视网膜缺血、糖尿病性视网膜水肿和增殖性糖尿病视网膜病变、虹膜红变、新生血管性青光眼、视网膜母细胞瘤、葡萄膜炎或角膜移植物新生血管形成。

4. 根据权利要求1-3中任一项所述的用途,其中所述肽与载体肽连接。

5. 根据权利要求4所述的用途,其中所述载体肽是触角足肽(AP)、穿膜肽、TAT、转运素或聚精氨酸。

6. 根据权利要求1-5中任一项所述的用途,其中所述肽与脂肪酸缀合。

7. 根据权利要求6所述的用途,其中所述肽是肉豆蔻酰化的。

8. 根据权利要求1-7中任一项所述的用途,其中所述经分离的肽与一种或多种VEGF抑制剂组合施用。

9. 根据权利要求1-7中任一项所述的用途,其中所述经分离的肽与眼病的激光治疗组合施用。

10. 根据权利要求1-7中任一项所述的用途,其中所述经分离的肽与类固醇组合施用。

11. 根据权利要求1-10中任一项所述的用途,其中所述经分离的肽、VEGF抑制剂或类固醇经由玻璃体内注射或局部进行递送。

## 用于抑制血管生成的肽

[0001] 本专利申请要求2015年3月2日提交的美国临时专利申请号62/126,968的优先权,所述美国临时专利申请以引用的方式全文并入本文。

### 技术领域

[0002] 本发明涉及用于抑制血管生成的肽。本发明还涉及使用本发明的肽抑制血管生成的方法、以及治疗与VEGF诱导的血管通透性相关的病症的方法。

### 背景技术

[0003] 微管(MT)细胞骨架提供了内皮屏障调控的重要控制点;然而,这一关键细胞骨架元素的作用尚未得到很好的研究。MT稳定药物紫杉醇已显示减轻小鼠肺部炎症模型中的内皮血管渗漏,提示MT在介导肺血管通透性增加中可能是重要的。然而,紫杉醇展示一般毒性,使其成为对于医生及其患者不方便的药物。

[0004] 微管末端结合蛋白是高度保守的微管加上末端跟踪辅助因子,其与生长中的微管(MT)结合并且抑制MT灾难性事件。两种这样的末端结合蛋白EB1和EB3在调节内皮细胞骨架动力学和细胞形态变化中发挥作用,所述内皮细胞骨架动力学和细胞形态变化是内皮屏障通透性的主要决定因素。

[0005]  $Ca^{2+}$ 是调节内皮通透性和血管稳态的高度通用的第二信使。在促炎介质下游的磷脂酶C $\beta$ (PLC $\beta$ )活化促进磷脂酰肌醇二磷酸(PIP $_2$ )水解成肌醇1,4,5-三磷酸(IP $_3$ )和二酰基甘油(DAG)。IP $_3$ 刺激来自IP $_3$ 敏感的细胞内储库即内质网(ER)的 $Ca^{2+}$ 释放。来自ER储库的 $Ca^{2+}$ 耗尽由ER膜上的IP $_3$ R活化介导,并且导致细胞内 $Ca^{2+}$ 的瞬时增加。 $Ca^{2+}$ 进入或“流入”由对各种阳离子(包括 $Ca^{2+}$ 和 $Mg^{2+}$ )可渗透的经典瞬时受体电位(TRPC)通道介导。TRPC1和4是通过ER耗尽活化的内皮肺微血管细胞中的储库操作的 $Ca^{2+}$ 通道(SOC)。

[0006]  $Ca^{2+}$ 的细胞内浓度中的增加上调蛋白激酶C $\alpha$ (PKC $\alpha$ )的活性。PKC $\alpha$ 是对多种介质包括血管内皮生长因子(VEGF)的内皮通透性应答的关键调节剂。PKC $\alpha$ 使p120-连环蛋白磷酸化并且介导其与VE-钙粘蛋白的解离,因此导致VE-钙粘蛋白内化。PKC $\alpha$ 还通过使p115RhoGEF和GDI-1磷酸化而在RhoA活化的上游起作用。RhoA依次又通过活化Rho激酶(ROCK)来促进磷酸化诱导的肌球蛋白轻链磷酸酶(MLCP)的抑制。MLCP的抑制伴随着MLCK的 $Ca^{2+}$ /钙调蛋白依赖性活化,这导致MLC的磷酸化,并且响应于促炎介质如凝血酶和组胺以及生长因子而诱导肌动球蛋白的收缩。

[0007] MT细胞骨架的完整性是IP $_3$ 诱导的来自ER储库的 $Ca^{2+}$ 释放所必需的。通过MT去稳定化或MT稳定剂(诺考达唑、秋水仙素和紫杉醇)改变MT动力学抑制IP $_3$ 门控的 $Ca^{2+}$ 释放,提示MT动力学是IP $_3$ R完全活化所必需的。MT细胞骨架涉及ER的重塑,因此确保响应于外部刺激的 $Ca^{2+}$ 波的组构和传播。通过EB1和EB3与基质相互作用分子1(STIM1)的直接相互作用,ER与MT生长末端附着并且连同MT生长末端一起延长。HeLa中的EB1耗尽(HeLa细胞不表达EB3)减少ER突出事件,然而,不抑制通过毒胡萝卜素的SOC活化,提示一些其他机制涉及在上皮细胞中的SOC活化和钙信号传导的传播。在内皮细胞中,IP $_3$ R在细胞质膜微囊中的定位对于ER

Ca<sup>2+</sup> 储库耗尽和SOC活化两者均至关重要。这指示IP<sub>3</sub>R的活化和/或其对IP<sub>3</sub>的应答性是钙信号传导的重要元素。与以前的发现一致,我们发现MT细胞骨架响应于IP<sub>3</sub>正面调节IP<sub>3</sub>R活化,并且因此在细胞各处传递细胞外信号,引发生理应答。EB3而不是EB1与IP<sub>3</sub>R直接相互作用,并且这种相互作用提供了用于内皮细胞中的钙信号组构的关键控制点。

[0008] 血管内皮生长因子(VEGF)已知经由直接和间接方法促进血管生成。已知VEGF致使微血管内皮细胞具有高通透性,使得血浆蛋白质溢出到血管外空间内,导致由于纤维蛋白凝胶沉积的外渗性纤维蛋白原凝固。血管外纤维蛋白充当支撑新血管和其他间充质细胞向内生长的基质,其他间充质细胞生成成熟的血管化基质。因此,VEGF诱导的血管通透性的抑制将导致血管生成的抑制。需要新型疗法来预防VEGF诱导的血管通透性并且抑制血管生成。

[0009] 肿瘤的血管网络的形成,即新生血管形成,通过帮助肿瘤生长和转移,在肿瘤发展自始至终起重要作用。一旦肿瘤病变直径超过几毫米,缺氧和营养剥夺就触发“血管生成开关”。肿瘤细胞释放血管内皮生长因子(VEGF),其刺激内皮细胞的发芽和增殖。目前FDA批准了用于癌症的几种抗血管生成疗法,包括针对VEGF-A的人源化功能阻断抗体片段、阿瓦斯汀(贝伐珠单抗)和酪氨酸激酶抑制剂、索拉非尼和舒尼替尼,其靶向几种生长受体。因此,控制肿瘤相关血管生成的治疗是限制癌症进展和转移的有希望的策略。

[0010] 内部内皮血液-视网膜屏障的丧失和由此导致的黄斑水肿和损伤是老年人中的眼病症和失明的主要原因。目前,这些状况也称为年龄相关性黄斑变性(AMD)是无法治愈的。另外,AMD的新生血管形式的特征在于来自脉络膜的血管生长,其穿过布鲁赫膜进入视网膜下区域。阻止新生血管性AMD的常见根本原因的一些有效疗法是有限的,目的是通过破坏在脉络膜中产生的新血管来阻碍视力丧失。尽管使用玻璃体内注射皮质类固醇和抗VEGF剂的目前治疗有效延缓了眼病的进展,但它们无法完全消除失明的风险。因此,需要用于治疗眼病症和预防视力丧失的新型和更有力的疗法或组合治疗方法。

## 发明内容

[0011] 本文提供了经分离的肽。该肽可包含KFARLWTEIPTAIT (SEQ ID NO:1)、FTEIPTI (SEQ ID NO:3)、其片段或其变体。该肽还可由KFARLWTEIPTAIT (SEQ ID NO:1)、FTEIPTI (SEQ ID NO:3)、其片段或其变体组成。变体可包含保守取代。变体可包含含有Ser/Thr-x-Ile-Pro序列 (SEQ ID NO:5) (最小EB结合共有基序序列)的任何肽序列。肽可与脂肪酸缀合,即肉豆蔻酰化,或与载体肽连接。载体肽可为触角足肽(AP)、触角足肽、穿膜肽、TAT、转运素或聚精氨酸。肽可为药物制剂的部分,所述药物制剂可包括药学可接受的赋形剂。

[0012] 本发明提供了抑制血管生成的方法,所述方法包括向有此需要的患者施用包含KFARLWTEIPTAIT (SEQ ID NO:1)、FTEIPTI (SEQ ID NO:3)的氨基酸序列或其片段的经分离的肽。该方法包括施用治疗有效量的本发明的肽,例如有效抑制血管生成的量。另外,该方法包括施用包含治疗有效量的本发明的肽的药物组合物。本发明提供了治疗方法,其中有需要的患者患有癌症或与VEGF诱导的通透性相关的病症,例如视力损害或视力丧失(失明)、黄斑变性、视网膜中央静脉阻塞、视网膜分支静脉阻塞增殖性糖尿病视网膜病变、新生血管性年龄相关性黄斑变性(AMD)、早产儿视网膜病变、缺血性视网膜病变、眼内新生血管形成、角膜新生血管形成、视网膜新生血管形成、脉络膜新生血管形成、糖尿病性黄斑水肿、

糖尿病性视网膜缺血、糖尿病性视网膜水肿和增殖性糖尿病视网膜病变、虹膜红变、新生血管性青光眼、视网膜母细胞瘤、葡萄膜炎和角膜移植植物新生血管形成。

[0013] 本发明还提供了治疗与VEGF诱导的血管通透性相关的病症的方法,所述方法包括向有此需要的患者施用包含KFARLWTEIPTAIT (SEQ ID NO:1)、FTEIPTI (SEQ ID NO:3)的氨基酸序列或其片段的经分离的肽。该方法包括施用治疗有效量的本发明的肽,例如有效抑制VEGF诱导的血管通透性的量。另外,该方法包括施用包含治疗有效量的本发明的肽的药物组合物。本发明提供了治疗方法,其中有需要的患者患有癌症或与VEGF诱导的通透性相关的病症,例如视力损害或视力丧失(失明)、黄斑变性、视网膜中央静脉阻塞、视网膜分支静脉阻塞增殖性糖尿病视网膜病变、新生血管性年龄相关性黄斑变性(AMD)、早产儿视网膜病变、缺血性视网膜病变、眼内新生血管形成、角膜新生血管形成、视网膜新生血管形成、脉络膜新生血管形成、糖尿病性黄斑水肿、糖尿病性视网膜缺血、糖尿病性视网膜水肿和增殖性糖尿病视网膜病变、虹膜红变、新生血管性青光眼、视网膜母细胞瘤、葡萄膜炎和角膜移植植物新生血管形成。

[0014] 在任何前述方法中,所施用的肽可连接到载体肽,例如触角足肽(AP)、触角足肽、穿膜肽、TAT、转运素或聚精氨酸。另外,在任何前述方法中,所施用的肽可与脂肪酸缀合,例如肉豆蔻酰化。

[0015] 在任何前述方法中,包含KFARLWTEIPTAIT (SEQ ID NO:1)、FTEIPTI (SEQ ID NO:3)的氨基酸序列或其片段的经分离的肽与一种或多种VEGF抑制剂组合施用,其中“VEGF抑制剂”指抑制VEGF和/或VEGFR的活性或信号传导途径的抗VEGF抗体及其片段、抗VEGF受体(抗VEGFR)抗体及其片段、拮抗肽和小分子。示例性VEGF抑制剂包括贝伐珠单抗(阿瓦斯汀)、雷珠单抗(Lucentis)、哌加他尼(Macugen)、阿柏西普(Eylea)、索拉非尼(Nexvar)、舒尼替尼(Sutent)、帕唑帕尼(Votrient)、阿西替尼(Inlyta)、PTK787/ZK222584、ZD-6474、SU6668、PD-547,632、VEGF-Trap、CEP-7055、NM-3或SU11248。

[0016] 在本发明的任何前述方法中,包含KFARLWTEIPTAIT (SEQ ID NO:1)、FTEIPTI (SEQ ID NO:3)的氨基酸序列或其片段的经分离的肽可与用于眼病的激光治疗组合施用,其中“眼病”指视力损害或视力丧失(失明)、黄斑变性、视网膜中央静脉阻塞、视网膜分支静脉阻塞增殖性糖尿病视网膜病变、新生血管性年龄相关性黄斑变性(AMD)、早产儿视网膜病变、缺血性视网膜病变、眼内新生血管形成、角膜新生血管形成、视网膜新生血管形成、脉络膜新生血管形成、糖尿病性黄斑水肿、糖尿病性视网膜缺血、糖尿病性视网膜水肿和增殖性糖尿病视网膜病变、虹膜红变、新生血管性青光眼、视网膜母细胞瘤、葡萄膜炎和角膜移植植物新生血管形成。

[0017] 在本发明的任何前述方法中,包含KFARLWTEIPTAIT (SEQ ID NO:1)、FTEIPTI (SEQ ID NO:3)的氨基酸序列或其片段的经分离的肽可与类固醇或任何目前的眼病治疗方法组合施用。

[0018] 另外,在本发明的任何方法中,本发明的经分离的肽、VEGF抑制剂、类固醇或任何其他治疗可通过玻璃体内注射或局部,例如以滴眼剂的形式施用。

[0019] 本发明还提供了经分离的肽用于制备用于抑制有需要的患者中的血管生成的药剂的用途,其中所述肽包含KFARLWTEIPTAIT (SEQ ID NO:1)、FTEIPTI (SEQ ID NO:3)的氨基酸序列或其片段。本发明的用途包括本发明的经分离的肽用于制备药剂的用途,所述药剂

包含治疗有效量的本发明的肽,例如有效抑制血管生成的量。另外,本发明提供了本发明的经分离的肽用于制备包含组合物的药剂的用途,所述组合物包含治疗有效量的本发明的肽。本发明提供了本发明的经分离的肽用于制备药剂的用途,所述药剂施用于患有癌症或与VEGF诱导的通透性相关的病症,例如视力损害或视力丧失(失明)、黄斑变性、视网膜中央静脉阻塞、视网膜分支静脉阻塞增殖性糖尿病视网膜病变、新生血管性年龄相关性黄斑变性(AMD)、早产儿视网膜病变、缺血性视网膜病变、眼内新生血管形成、角膜新生血管形成、视网膜新生血管形成、脉络膜新生血管形成、糖尿病性黄斑水肿、糖尿病性视网膜缺血、糖尿病性视网膜水肿和增殖性糖尿病视网膜病变、虹膜红变、新生血管性青光眼、视网膜母细胞瘤、葡萄膜炎和角膜移植物新生血管形成。

[0020] 本发明还提供了经分离的肽用于制备用于治疗VEGF诱导的血管病症的药剂的用途,其中所述肽包含KFARLWTEIPTAIT (SEQ ID NO:1)、FTEIPTI (SEQ ID NO:3)的氨基酸序列或其片段。本发明的用途包括本发明的经分离的肽用于制备药剂的用途,所述药剂包含治疗有效量的本发明的肽,例如有效抑制VEGF诱导的血管通透性的量。另外,本发明提供了本发明的经分离的肽用于制备包含组合物的药剂的用途,所述组合物包含治疗有效量的本发明的肽。本发明提供了本发明的肽用于制备药剂的用途,所述药剂施用于患有癌症或与VEGF诱导的通透性相关的病症的患者,例如视力损害或视力丧失(失明)、黄斑变性、视网膜中央静脉阻塞、视网膜分支静脉阻塞增殖性糖尿病视网膜病变、新生血管性年龄相关性黄斑变性(AMD)、早产儿视网膜病变、缺血性视网膜病变、眼内新生血管形成、角膜新生血管形成、视网膜新生血管形成、脉络膜新生血管形成、糖尿病性黄斑水肿、糖尿病性视网膜缺血、糖尿病性视网膜水肿和增殖性糖尿病视网膜病变、虹膜红变、新生血管性青光眼、视网膜母细胞瘤、葡萄膜炎和角膜移植物新生血管形成。

[0021] 在本发明的任何前述用途中,所施用的经分离的肽可连接到载体肽,例如触角足肽(AP)、触角足肽、穿膜肽、TAT、转运素或聚精氨酸。另外,在任何前述方法中,所施用的经分离的肽可与脂肪酸缀合,例如肉豆蔻酰化。

[0022] 在任何前述用途中,包含KFARLWTEIPTAIT (SEQ ID NO:1)、FTEIPTI (SEQ ID NO:3)的氨基酸序列或其片段的经分离的肽与一种或多种VEGF抑制剂组合施用,其中“VEGF抑制剂”指抑制VEGF或VEGFR的活性或信号传导途径的抗VEGF抗体及其片段、抗VEGFR抗体及其片段、拮抗肽和小分子。示例性VEGF抑制剂包括贝伐珠单抗(阿瓦斯汀)、雷珠单抗(Lucentis)、哌加他尼(Macugen)、阿柏西普(Eylea)、索拉非尼(Nexvar)、舒尼替尼(Sutent)、帕唑帕尼(Votrient)、阿西替尼(Inlyta)、PTK787/ZK222584、ZD-6474、SU6668、PD-547,632、VEGF-Trap、CEP-7055、NM-3或SU11248。

[0023] 在本发明的任何前述用途中,包含KFARLWTEIPTAIT (SEQ ID NO:1)、FTEIPTI (SEQ ID NO:3)的氨基酸序列或其片段的药剂可与用于眼病的激光治疗组合施用,其中“眼病”指视力损害或视力丧失(失明)、黄斑变性、视网膜中央静脉阻塞、视网膜分支静脉阻塞增殖性糖尿病视网膜病变、新生血管性年龄相关性黄斑变性(AMD)、早产儿视网膜病变、缺血性视网膜病变、眼内新生血管形成、角膜新生血管形成、视网膜新生血管形成、脉络膜新生血管形成、糖尿病性黄斑水肿、糖尿病性视网膜缺血、糖尿病性视网膜水肿和增殖性糖尿病视网膜病变、虹膜红变、新生血管性青光眼、视网膜母细胞瘤、葡萄膜炎和角膜移植物新生血管形成。

[0024] 在本发明的任何前述用途中,该药剂可与类固醇或任何目前的眼病治疗方法组合施用。

[0025] 此外,在本发明的任何用途中,药剂可通过玻璃体内注射或局部,例如以滴眼剂的形式施用。

[0026] 本发明提供了用于抑制血管生成的经分离的肽,其中所述肽包含KFARLWTEIPTAIT (SEQ ID NO:1)、FTEIPTI (SEQ ID NO:3)的氨基酸序列或其片段。

[0027] 本发明还提供了用于抑制血管生成的包含治疗有效量的本发明的肽的组合物。本发明提供了用于抑制受试者中的血管生成的经分离的肽或包含治疗有效量的肽的组合物,所述受试者患有癌症或与VEGF诱导的通透性相关的病症,例如视力损害或视力丧失(失明)、黄斑变性、视网膜中央静脉阻塞、视网膜分支静脉阻塞增殖性糖尿病视网膜病变、新生血管性年龄相关性黄斑变性(AMD)、早产儿视网膜病变、缺血性视网膜病变、眼内新生血管形成、角膜新生血管形成、视网膜新生血管形成、脉络膜新生血管形成、糖尿病性黄斑水肿、糖尿病性视网膜缺血、糖尿病性视网膜水肿和增殖性糖尿病视网膜病变、虹膜红变、新生血管性青光眼、视网膜母细胞瘤、葡萄膜炎和角膜移植物新生血管形成。

[0028] 本发明还提供了用于抑制患有与VEGF诱导的血管通透性相关的病症的患者中的血管生成的经分离的肽,其中所述经分离的肽包含KFARLWTEIPTAIT (SEQ ID NO:1)、FTEIPTI (SEQ ID NO:3)的氨基酸序列或其片段。

[0029] 本发明还提供了用于抑制VEGF诱导的血管通透性的包含治疗有效量的本发明的经分离的肽的组合物。本发明提供了用于抑制受试者中的VEGF诱导的血管通透性的经分离的肽或包含治疗有效量的肽的组合物,所述受试者患有癌症或与VEGF诱导的通透性相关的病症,例如视力损害或视力丧失(失明)、黄斑变性、视网膜中央静脉阻塞、视网膜分支静脉阻塞增殖性糖尿病视网膜病变、新生血管性年龄相关性黄斑变性(AMD)、早产儿视网膜病变、缺血性视网膜病变、眼内新生血管形成、角膜新生血管形成、视网膜新生血管形成、脉络膜新生血管形成、糖尿病性黄斑水肿、糖尿病性视网膜缺血、糖尿病性视网膜水肿和增殖性糖尿病视网膜病变、虹膜红变、新生血管性青光眼、视网膜母细胞瘤、葡萄膜炎和角膜移植物新生血管形成。

[0030] 本发明还提供了用于治疗与VEGF诱导的血管通透性相关的病症的经分离的肽。例如,VEGF相关的血管病症是视力损害或视力丧失(失明)、黄斑变性、视网膜中央静脉阻塞、视网膜分支静脉阻塞增殖性糖尿病视网膜病变、新生血管性年龄相关性黄斑变性(AMD)、早产儿视网膜病变、缺血性视网膜病变、眼内新生血管形成、角膜新生血管形成、视网膜新生血管形成、脉络膜新生血管形成、糖尿病性黄斑水肿、糖尿病性视网膜缺血、糖尿病性视网膜水肿和增殖性糖尿病视网膜病变、虹膜红变、新生血管性青光眼、视网膜母细胞瘤、葡萄膜炎和角膜移植物新生血管形成。

[0031] 用于抑制血管生成或用于治疗与VEGF诱导的血管通透性相关的病症的本发明的任何肽都可与载体肽连接,所述载体肽例如触角足肽(AP)、触角足肽、穿膜肽、TAT、转运素或聚精氨酸。另外,用于抑制血管生成或治疗与VEGF诱导的血管通透性相关的病症的本发明的任何经分离的肽都可与脂肪酸缀合,例如肉豆蔻酰化。

[0032] 本发明的任何经分离的肽或组合物都可与一种或多种VEGF抑制剂组合施用,其中“VEGF抑制剂”指抑制VEGF或VEGFR的活性或信号传导途径的抗VEGF抗体及其片段、抗VEGFR

抗体及其片段、拮抗肽和小分子。示例性VEGF抑制剂包括贝伐珠单抗(阿瓦斯汀)、雷珠单抗(Lucentis)、哌加他尼(Macugen)、阿柏西普(Eylea)、索拉非尼(Nexvar)、舒尼替尼(Sutent)、帕唑帕尼(Votrient)、阿西替尼(Inlyta)、PTK787/ZK222584、ZD-6474、SU6668、PD-547,632、VEGF-Trap、CEP-7055、NM-3或SU11248。另外,肽或VEGFR通过玻璃体内注射或局部,例如以滴眼剂的形式施用。

[0033] 本发明的任何经分离的肽或组合物都可与用于眼病的激光治疗组合施用,其中“眼病”指视力损害或视力丧失(失明)、黄斑变性、视网膜中央静脉阻塞、视网膜分支静脉阻塞增殖性糖尿病视网膜病变、新生血管性年龄相关性黄斑变性(AMD)、早产儿视网膜病变、缺血性视网膜病变、眼内新生血管形成、角膜新生血管形成、视网膜新生血管形成、脉络膜新生血管形成、糖尿病性黄斑水肿、糖尿病性视网膜缺血、糖尿病性视网膜水肿和增殖性糖尿病视网膜病变、虹膜红变、新生血管性青光眼、视网膜母细胞瘤、葡萄膜炎和角膜移植新生血管形成。

[0034] 本发明的经分离的肽或组合物可与类固醇或任何目前的眼病治疗方法组合施用。

[0035] 另外,本发明的经分离的肽或组合物可通过玻璃体内注射或局部,例如以滴眼剂的形式施用。

## 附图说明

[0036] 图1显示了EB3在炎症诱导的内皮屏障高通透性中的作用。EB3建立了生长中的MT端与 $IP_3R_3$ 的瞬时相互作用,使 $IP_3R_3$ 敏感,并且在炎症期间正面调节来自储库的 $Ca^{2+}$ 释放和SOC依赖性 $Ca^{2+}$ 进入两者。这导致通过PKC $\alpha$ 介导的p120-连环蛋白磷酸化和肌动球蛋白收缩性的 $Ca^{2+}$ 信号传导扩增和通透性增加。

[0037] 图2显示了人 $IP_3R_3$ 受体( $IP_3R_3$  3型的794-814aa)与EB结合基序(突出显示的)的比对。 $IP_3R_3$ 肽(SEQ ID NO:1)显示在比对下方。

[0038] 图3显示了EB3结构(品红色)和对接到EB3的EB3疏水结合槽中的 $IP_3R_3$ 衍生肽(SEQ ID NO:1)的带状表示;显示了180°旋转。使用与Discovery Studio 3.0软件结合的Z-Dock程序对接 $IP_3R_3$ 衍生肽。肽和EB3之间的结合能计算为-68.882千卡/摩尔。

[0039] 图4显示了 $IP_3R_3$ 肽(SEQ ID NO:1)抑制响应于PAR-1活化来自ER的 $Ca^{2+}$ 释放。A.用AP附着的 $IP_3R_3$ 肽或对照(AP)肽预处理的HMVEC装载有Fura 2-AM,并且在细胞外 $Ca^{2+}$ 的不存在和存在下,用凝血酶(50nM)刺激细胞后计算340/380比。箭头,凝血酶添加时间。B.图显示了计算为超过基础值的最大增加的凝血酶诱导的 $Ca^{2+}$ 释放和进入的平均值 $\pm$ SD。将该增加针对来自相同实验(n=4)的对照未处理的细胞进行标准化。

[0040] 图5显示了在具有EBIN(SEQ ID NO:3)和 $IP_3R_3$ 肽(SEQ ID NO:1)的复合物中EB3的带状表示。计算的结合能对于IPR和EBIN分别为-68.882和-60.251。

[0041] 图6A-6B小图A显示了通过皮内注射VEGF诱导的白蛋白结合的伊文思蓝染料的皮下血管渗漏,并且小图B定量了如在620nm处分光光度计测量的血管渗漏。

[0042] 图7A-7D小图A显示了EBIN在基质胶涂布的孔中抑制小管生成(tubulogenesis)(比例尺200 $\mu$ m)。小图B显示了分支数目/面积;UT=未处理的;对照=对照肽;\*\*p<0.001(n=3个孔/组)。小图C显示了体内基质胶塞的苏木精和伊红(HE)染色。在0、36和60小时,组1用对照肽进行处理,并且组3用Myr-EBIN进行处理;组2仅接受36和60小时处理。小图D显示

了血管数目/ $\text{mm}^2$ ;\*\*\* $p < 0.001$  ( $n = 15$ /组)。比例尺,  $200\mu\text{m}$ 。

[0043] 图8A-8B显示了EBIN处理对肿瘤生长曲线和新生血管形成的作用。小图A绘制了在异种移植模型中的肿瘤生长曲线;显示了平均值; $n = 8$ 只小鼠/组。小图B绘制了在肿瘤外计数的血管数目/面积; $n = 25$ 个视野/小鼠; $N = 5$ 只小鼠;\* $p < 0.05$ ;\*\* $p < 0.01$ 。

[0044] 图9显示了在下述中的脉络膜新生血管形成(CNV)诱导的动物模型的概述:(a)眼的横截面视图,证实聚焦在视网膜的色素上皮上的激光束以诱导布鲁赫膜的激光烧伤和破裂,(b)布鲁赫膜的破裂诱导脉络膜和CNV病变中的血管增殖进入视网膜内。

[0045] 图10显示了组1-3的激光诱导的CNV、眼部相干断层扫描(OCT)、荧光素眼底血管造影术、处理和组织收获的时间表的概括(如表4所示)。

[0046] 图11显示了EBIN处理对CNV的作用。通过玻璃体内注射对照肽(Myrr-FAEIPTI)、EBIN(Myrr-FTEIPTI)和小鼠抗VEGF抗体(LEAF<sup>TM</sup>)处理的小鼠中血管渗漏(a)和病变(b-c)的相关分析。在激光凝固后第15天时的荧光素眼底血管造影术(a)和相应的眼部相干断层扫描(b)的代表性图像;黄色数字指示相应的CNV病变。渗漏面积与病变大小相关联。(c)使用视网膜色素上皮/脉络膜/巩膜的平面固定,通过对于同工凝集素B4的染色来检测CNV病变。使用(a)和(c)所示的图像定量荧光素渗漏面积(d)和病变面积(e); $n = 6-9$ 只小鼠/组;\*\* $p < 0.01$ 。比例尺,(a)和(c)分别为 $200\mu\text{m}$ 和 $100\mu\text{m}$ 。使用ANOVA执行组间比较。抗VEGF处理显著改变损伤区域的伤口愈合/结痂,而用EBIN处理不影响愈合过程。

[0047] 图12显示了关于EBIN的7天急性毒性研究的效应。在用EBIN( $1\mu\text{g}$ /眼)的玻璃体内处理的第8天时,荧光素眼底血管造影术(a)和相应的眼部相干断层扫描(b)的代表性图像。注意,EBIN在各种肿瘤内部形成小晶体/沉淀物;未检测到视网膜血管系统和视网膜色素上皮、脉络膜、巩膜中的可见变化。

## 具体实施方式

[0048] 发明人已取得令人惊奇的发现,源自肌醇1,4,5-三磷酸( $\text{IP}_3$ )受体3型( $\text{IP}_3\text{R}_3$ )的EB3相互作用结构域的肽降低了末端结合蛋白3(EB3)和 $\text{IP}_3\text{R}_3$ 之间的相互作用,并且抑制VEGF诱导的血管通透性或VEGF诱导的微血管渗漏。本发明的肽证实各种炎症疾病中的屏障保护性质,并且在体外和体内证实抗血管生成性质。

[0049] 通过MT细胞骨架在调节来自ER储库和EB3的 $\text{IP}_3$ 门控的 $\text{Ca}^{2+}$ 释放中的作用提议的先前工作是ER  $\text{Ca}^{2+}$ 耗尽所需的。 $\text{IP}_3\text{R}_3$ 含有EB结合共有基序Ser/Thr-x-Ile-Pro(SxIP)(SEQ ID NO:5)。基于 $\text{IP}_3\text{R}_3$ 序列(KFARLWTEIPTAIT--SEQ ID NO:1)的短肽显示了对EB3的高结合活性(参见实例1)。这些研究证实 $\text{IP}_3\text{R}_3$ 与EB3之间的相互作用在 $\text{IP}_3\text{R}_3$ 活化机制中至关重要。

[0050] EB3在炎症诱导的内皮屏障高通透性中的作用集中于其建立生长中的MT末端与 $\text{IP}_3\text{R}_3$ 的瞬时相互作用的能力。因此,EB3使 $\text{IP}_3\text{R}_3$ 对 $\text{IP}_3$ 敏感,并且正面调节来自内质网(ER)的 $\text{Ca}^{2+}$ 释放。这导致SOC依赖性 $\text{Ca}^{2+}$ 进入和 $\text{Ca}^{2+}$ 信号传导的放大。细胞溶质 $\text{Ca}^{2+}$ 的浓度增加诱导PKC $\alpha$ 介导的p120-连环蛋白的磷酸化,导致VE-钙粘着蛋白粘连的分解。它还促进RhoA依赖性肌动球蛋白收缩性,导致细胞形状变化。参见图1。该工作在国际申请号PCT/US2012/042118和美国专利号8,912,139中详细描述,所述申请和专利以引用的方式全文并入。

[0051] 下文描述的方法和材料预防或抑制VEGF诱导的微血管渗漏,并且因此可用于抑制血管生成和治疗病症例如黄斑变性、糖尿病视网膜病变、癌症、视网膜中央静脉阻塞和视网

膜分支静脉阻塞,仅举几个例子。

[0052] 定义

[0053] 本文使用的术语仅用于描述特定实施例的目的,而不预期是限制性的。如在说明书和所附权利要求中使用的,除非上下文另有明确说明,否则单数形式“一个”、“一种”和“该/所述”包括复数所指对象。

[0054] 对于本文数目范围的叙述,明确考虑具有相同精确度的两者之间的每个插入数目。例如,对于6-9的范围,除6和9之外还考虑数目7和8,并且对于范围6.0-7.0,明确考虑数目6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9和7.0。

[0055] 如本文使用的,“血管生成”指通过其从预先存在的血管形成新血管的过程。例如,细胞因子和细胞外基质蛋白酶在内皮细胞从现有血管迁移以形成新的血管的准备中诱导组织重塑。

[0056] 如本文使用的,“片段”可意指参考肽或多肽或核酸序列的一部分。

[0057] 如本文在两个或更多个多肽或核苷酸序列的上下文中使用的,“相同的”或“同一性”可意指该序列具有在指定区域上相同的指定百分比的残基或核苷酸。百分比可通过下述进行计算:最佳比对两个序列,比较在指定区域上的两个序列,确定在其处相同残基在两个序列中均出现的位置数目,以产生匹配位置数目,将匹配位置数目除以指定区域中的总位置数目,并且将结果乘以100,以产生序列同一性的百分比。在其中两个序列具有不同长度,或者比对产生一个或多个交错末端,并且比较的指定区域仅包括单个序列的情况下,单个序列的残基包括在计算的分母而不是分子中。

[0058] 如本文使用的,“肽”或“多肽”可指氨基酸的连接序列,并且可为天然的、合成的、或天然和合成的修饰或组合。

[0059] 如本文使用的,“基本上相同的”可意指第一蛋白质或核苷酸序列和第二蛋白质或核苷酸序列在6-100个或更多个氨基酸核苷酸的区域上至少50%-99%相同。

[0060] “治疗(Treating)”、“治疗(treatment)”或“治疗(to treat)”可意指在瞬时或持续基础上,缓解、抑制、遏制、消除、预防或减缓状况或病症的症状、临床体征或潜在病理学的出现。预防状况或病症涉及在疾病开始之前,向受试者施用本发明的试剂。抑制状况或病症涉及在状况或病症诱导之后但在其临床出现之前,向受试者施用本发明的试剂。遏制状况或病症涉及在疾病的临床出现之后,向受试者施用本发明的试剂。

[0061] 术语“治疗有效的”取决于受试者的状况和施用的具体化合物。该术语指有效实现所需临床效应的量。治疗有效量随着被治疗状况的性质、活性需要的时间长度以及受试者的年龄和状况而变化,并且最终由医疗保健提供者确定。在一个方面,治疗有效量的肽或组合物是有效抑制、降低或预防VEGF诱导的血管通透性和/或血管生成的量。

[0062] “变体”意指通过氨基酸的插入、缺失或保守取代在氨基酸序列中不同,但保留至少一种生物活性的肽或多肽。“生物活性”的代表性例子包括结合末端结合蛋白(toll-样受体(TLR))并且由特异性抗体结合的能力。变体还可意指具有保留至少一种生物活性的氨基酸序列的蛋白质,所述氨基酸序列与参考蛋白质的氨基酸序列基本上相同。氨基酸的保守取代,即用具有相似性质(例如,荷电区域的亲水性、程度和分布)的不同氨基酸替换氨基酸在本领域中公认为通常涉及微小变化。这些微小变化可部分通过考虑氨基酸的亲水指数来鉴定,如本领域理解的。Kyte等人,J.Mol.Biol.157:105-132(1982)。氨基酸的亲水指数是

基于其疏水性和电荷的考虑。本领域已知,相似亲水指数的氨基酸可被取代并且仍保留蛋白质功能。在一个方面,具有±2的亲水指数的氨基酸被取代。氨基酸的亲水性也可用于揭示导致蛋白质保留生物功能的取代。在肽的上下文中,氨基酸的亲水性的考虑允许计算该肽的最大局部平均亲水性,这是已报道与抗原性和免疫原性良好关联的有用量度。美国专利号4,554,101以引用的方式完全并入本文。具有相似亲水性值的氨基酸的取代可导致肽保留生物活性例如免疫原性,如本领域所理解的。可用亲水性值彼此在±2之内的氨基酸执行取代。氨基酸的疏水性指数和亲水性值两者均受该氨基酸的特定侧链的影响。与该观察一致,应理解与生物功能相容的氨基酸取代取决于氨基酸的相对相似性,且特别是那些氨基酸的侧链,如通过疏水性、亲水性、电荷、大小和其他性质揭示的。

[0063] 本文提供的肽可包含氨基酸序列KFARLWTEIPTAIT (SEQ ID NO:1)、KFARLWAEIPTAIT (SEQ ID NO:2) (本文也称为IP<sub>3</sub>R<sub>3</sub>肽)、FTEIPTI (SEQ ID NO:3) (本文中也称为末端结合抑制肽或“EBIN”)、本文表1中公开的肽、其片段或其变体。该变体可包含保守取代。该肽可包含EB结合共有基序序列,例如IP<sub>3</sub>R<sub>3</sub>的EB结合共有序列或其片段。IP<sub>3</sub>R<sub>3</sub>的EB结合共有序列可为Ser/Thr-x-Ile-Pro (SEQ ID NO:5)。该肽可由下述组成:KFARLWTEIPTAIT (SEQ ID NO:1)、KFARLWAEIPTAIT (SEQ ID NO:2)、FTEIPTI (SEQ ID NO:3)、包含Ser/Thr-x-Ile-Pro (SEQ ID NO:5)的共有序列、本文表1中公开的肽、前述的片段或前述的保守变体。该变体可包含含有Ser/Thr-x-Ile-Pro序列 (SEQ ID NO:5) (最小EB结合共有基序序列)的任何肽序列。

[0064] 肽可包含KFARLWTEIPTAIT (SEQ ID NO:1)、KFARLWAEIPTAIT (SEQ ID NO:2) (本文中也称为IP<sub>3</sub>R<sub>3</sub>肽)、FTEIPTI (SEQ ID NO:3) (本文中也称为末端结合抑制肽或“EBIN”)、本文表1中公开的肽、其片段或其变体的氨基酸序列,其中所述肽或包含该肽的多肽为7个氨基酸残基、8个氨基酸残基、9个氨基酸残基、10个氨基酸残基、11个氨基酸残基、12个氨基酸残基、13个氨基酸残基、14个氨基酸残基、15个氨基酸残基、16个氨基酸残基、17个氨基酸残基、18个氨基酸残基、19个氨基酸残基、20个氨基酸残基、21个氨基酸残基、22个氨基酸残基、23个氨基酸残基、24个氨基酸残基、25个氨基酸残基、26个氨基酸残基、27个氨基酸残基、28个氨基酸残基、29个氨基酸残基、30个氨基酸残基、35个氨基酸残基、40个氨基酸残基、45个氨基酸残基、50个氨基酸残基、55个氨基酸残基、60个氨基酸残基、65个氨基酸残基、70个氨基酸残基、75个氨基酸残基、80个氨基酸残基、85个氨基酸残基、90个氨基酸残基、95个氨基酸残基或100个氨基酸残基。

[0065] 肽可进行修饰,使得氨基酸序列具有一个或多个氨基酸取代、氨基酸插入、氨基酸缺失、羧基末端截短或氨基末端截短。

[0066] 肽也可是糖基化、磷酸化、硫酸化、糖基化、氨基化、羧化、乙酰化的。例如,C末端可用酰胺化、添加肽醇和醛、添加酯、添加对硝基苯胺 (p-nitorailine) 和硫酯以及多抗原肽 (multipelantigen) 进行修饰。N-末端和侧链可通过聚乙二醇化、乙酰化、甲酰化、添加脂肪酸、添加苯甲酰基、添加溴乙酰基、添加焦谷氨酰基、琥珀酰化、添加四丁氧基羰基和添加3-巯基丙基、酰化 (例如脂肽)、生物素化、磷酸化、硫酸化、糖基化、引入马来酰亚胺基、螯合部分、发色团和荧光团进行修饰。

[0067] 肽可与脂肪酸缀合,例如,该肽是肉豆蔻酰化的。例如,脂肪酸可与肽的N末端缀合,这种脂肪酸包括辛酸 (C8)、癸酸 (C10)、月桂酸 (C12)、肉豆蔻酸 (C14)、棕榈酸 (C16) 或硬

脂酸(C18)等。此外,肽中的半胱氨酸可为棕榈酰化的。

[0068] 肽可被缀合或连接到另一种肽,例如载体肽。载体肽可促进细胞穿透,例如触角足肽、穿膜肽、TAT、转运素或聚精氨酸。

[0069] 肽可为环状的。本文公开的肽可通过加入单个或多个二硫键、在N-和C-末端之间加入单个或多个酰胺键、加热至尾部环化、侧链环化(例如内酰胺桥、硫酯)、烃-固定肽进行环化。

[0070] 肽可用重同位素标记(例如<sup>15</sup>N、<sup>13</sup>C)、FITC、与载体蛋白缀合、与成像剂缀合、具有荧光团/淬灭剂对的FRET底物、肽-DNA缀合、肽-RNA缀合和肽酶标记进行标记。

[0071] 肽可在融合蛋白内,例如与下述融合:促进寡聚化的多肽或肽,例如亮氨酸拉链链结构域;增加稳定性或增加半衰期的多肽或肽,例如免疫球蛋白恒定区;以及具有不同于本发明的肽的治疗活性的多肽、化学治疗剂、用于组织特异性靶向的抗体或蛋白质,

[0072] 可在多肽的氨基末端或羧基末端处进行融合。融合蛋白可为直接的,不含接头或衔接子分子,或间接的,使用接头或衔接子分子。接头或衔接子分子可为一个或多个氨基酸残基,通常至多约20至约50个氨基酸残基。接头或衔接子分子也可被设计为具有用于蛋白酶的切割位点,以允许融合部分的分离。例如,肽可与人IgG的Fc区的一个或多个结构域融合以增加肽的半衰期,或加入Fab可变结构域以缩短肽的半衰期。

[0073] 治疗方法

[0074] 本文提供的是抑制、预防或减少血管生成的方法。血管生成与肿瘤生长、癌症进展和转移、失明和黄斑变性、糖尿病视网膜病变有关,仅举几个例子。

[0075] 本发明提供了抑制涉及肿瘤生长、癌症进展和转移的血管生成的方法。本发明还提供了治疗、抑制和预防肿瘤生长和癌症的方法,所述肿瘤和癌症例如脑肿瘤(包括脑膜瘤、多形性成胶质细胞瘤、间变性星形细胞瘤、小脑星形细胞瘤、其他高级或低级星形细胞瘤、脑干胶质瘤、少突神经胶质瘤、混合神经胶质瘤、其他神经胶质瘤、脑神经母细胞瘤、颅咽管瘤、间脑胶质瘤、生殖细胞瘤、髓母细胞瘤、室管膜瘤、脉络丛肿瘤、松果体实质肿瘤、神经节神经胶质瘤、神经上皮肿瘤、神经元或混合神经元胶质瘤)、肺肿瘤(包括小细胞癌、表皮样癌、腺癌、大细胞癌、类癌瘤、支气管腺肿瘤、间皮瘤、肉瘤或混合肿瘤)、前列腺癌(包括腺癌、鳞状细胞癌、移行细胞癌、前列腺囊癌或癌肉瘤)、乳腺癌(包括腺癌或类癌瘤)、或者胃癌、肠癌或结肠癌(包括腺癌、浸润性导管癌、浸润性或侵袭性小叶癌、髓原癌、原位导管癌、原位小叶癌、乳头状胶质癌或乳头佩吉特氏病)、皮肤癌(包括黑素瘤、鳞状细胞癌、人皮肤角化细胞的肿瘤进展、基底细胞癌、血管外皮细胞瘤和卡波济氏肉瘤)、淋巴瘤(包括霍奇金氏病和非霍奇金氏淋巴瘤)、肉瘤(包括骨肉瘤、软骨肉瘤和纤维肉瘤)以及神经系统病症的治疗。

[0076] 本发明的肽的施用可与其他癌症疗法、抗肿瘤剂和化学治疗剂组合,如芳香酶抑制剂、抗雌激素、抗雄激素、促性腺激素激动剂、拓扑异构酶I抑制剂、拓扑异构酶II抑制剂、微管活性剂、烷基化剂、类视色素、类胡萝卜素、生育酚、环氧合酶抑制剂、MMP抑制剂、mTOR抑制剂、抗代谢药、铂化合物、甲硫氨酸氨基肽酶抑制剂、双膦酸盐、抗增殖性抗体、乙酰肝素酶抑制剂、Ras致癌同种型的抑制剂、端粒酶抑制剂、蛋白酶体抑制剂、用于治疗血液恶性肿瘤的化合物、Flt-3抑制剂、Hsp90抑制剂、驱动蛋白纺锤体蛋白抑制剂、MEK抑制剂、抗肿瘤抗生素、亚硝基脲、靶向/减少蛋白质或脂质激酶活性的化合物、靶向/减少蛋白质或脂质

磷酸酶活性的化合物、任何进一步的抗血管生成化合物及其组合。抗肿瘤剂的具体例子包括但不限于阿扎胞苷、硫唑嘌呤、贝伐珠单抗、博来霉素、卡培他滨、卡铂、氯氮芥、顺铂、环磷酰胺、阿糖胞苷、柔红霉素、多西紫杉醇、去氧氟尿苷、多柔比星、表柔比星、依托泊苷、氟尿嘧啶、吉西他滨、赫赛汀、伊达比星、氮芥、美法仑、巯嘌呤、氨甲蝶呤、米托蒽醌、奥沙利铂、紫杉酚、他氟泊苷、替尼泊苷、硫鸟嘌呤、视黄酸、戊柔比星、长春碱、长春新碱、长春地辛、长春瑞滨、受体酪氨酸激酶抑制剂及其组合。抗肿瘤剂或化学治疗剂的其他例子是本领域已知的。

[0077] 本发明提供了治疗黄斑变性包括湿性黄斑变性和干性黄斑变性的方法，所述方法包括施用本发明的肽。当异常血管在黄斑后生长时，发生湿性黄斑变性。这些血管是脆弱的，并且可渗漏液体和血液，这导致黄斑的结痂，并且提高快速、严重损伤的可能性。布鲁赫膜破裂，通常在玻璃疣沉积物附近。这是其中发生新血管生长或新生血管形成的地方。中心视力可在短时间段内，有时在数天内变得扭曲或完全丧失。

[0078] 对于治疗黄斑变性的方法，考虑了本发明的肽的眼部施用。另外，肽的施用可与其他治疗剂组合，如其他抗血管生成药物如贝伐珠单抗（阿瓦斯汀）、雷珠单抗（Lucentis）、哌加他尼（Macugen）、阿柏西普（Eylea）、Lodamin（TNP-470的聚合物制剂）、维替泊芬（Visudyne）（光动力疗法或PDT）、寡核苷酸疗法、针对Dr5的抗体、靶向c-Met的小分子激酶调节剂、喹诺酮衍生物、稠合双环吡啶和吡嗪衍生物、或作为CDK4/6抑制剂的吡咯并嘧啶化合物。另外的治疗剂是本领域已知的。另外，用于治疗黄斑变性的本发明的肽的施用可与其他操作如可植入望远镜、激光凝固和黄斑易位手术组合。

[0079] 本文提供的是治疗与VEGF诱导的血管通透性相关的病症的方法。例如，本发明提供了治疗下述的方法：视力损害或视力丧失（失明）、黄斑变性、视网膜中央静脉阻塞、视网膜分支静脉阻塞增殖性糖尿病视网膜病变、新生血管性年龄相关性黄斑变性（AMD）、早产儿视网膜病变、缺血性视网膜病变、眼内新生血管形成、角膜新生血管形成、视网膜新生血管形成、脉络膜新生血管形成、糖尿病性黄斑水肿、糖尿病性视网膜缺血、糖尿病性视网膜水肿和增殖性糖尿病视网膜病变、虹膜红变、新生血管性青光眼、视网膜母细胞瘤、葡萄膜炎和角膜移植植物新生血管形成。

[0080] 受试者

[0081] 受试者可为哺乳动物，其可为人。在诊断之前，由于暴露于一种或多种危险因素或者具有发展癌症的遗传风险，受试者可处于癌症的风险中。一种或多种危险因素可包括例如受试者具有癌症家族史、年龄、吸烟、阳光暴露、饮用酒精饮料、缺乏体力活动、肥胖和/或饮食缺陷。

[0082] 在诊断之前，因为暴露于一种或多种危险因素或者具有发展黄斑变性的遗传风险，受试者可处于发生黄斑变性的风险中。一种或多种危险因素可包括例如受试者具有黄斑变性家族史、年龄、吸烟、长时间阳光暴露、高脂饮食、饮食缺陷、高血压、肥胖和/或浅色眼睛。

[0083] 施用

[0084] 施用生理学可接受的组合物，例如包含本文所述的化合物和/或胶束的药物组合物的合适方法，是本领域众所周知的。尽管多于一条途径可用于施用肽，但特定途径可提供比另一种途径更立即和更有效的反应。根据情况，将包含该肽的药物组合物应用于或滴注

到体腔内、通过皮肤或粘膜吸收、摄入、吸入和/或引入循环内。例如,在某些情况下,期望经口递送药物组合物;通过经由静脉内、肿瘤内、腹膜内、脑内(脑实质内)、脑室内、肌内、眼内、动脉内、门静脉内、损伤内、髓内、鞘内、心室内、经皮、皮下、腹膜内、鼻内、肠内、局部、舌下、尿道、阴道或直肠手段注射或输注;通过控制、延迟、持续或其他修改的释放系统;或通过植入装置。在一个方面,可通过随着时间过去维持恒定的药物血浆浓度来优化药物暴露。这种稳定状态一般在临床环境中通过以取决于药物清除和要维持的血浆浓度的剂量连续药物输注来实现。需要时,组合物经由瘤内施用、鞘内施用、脑内(脑实质内)施用、脑室内施用或靶向目的区域的动脉内或静脉内施用来局部施用。可替代地,经由植入基质、膜、海绵或在其上已吸收或包封所需化合物的另一种适当材料来局部施用肽。当使用植入装置时,在一个方面,该装置植入任何合适的组织或器官内,并且所需化合物的递送例如经由扩散、定时释放丸剂或连续施用。

[0085] 可使用眼内植入剂、玻璃体内注射、全身施用、局部应用、纳米颗粒、微粒、滴眼剂、生物粘附性凝胶或纤维蛋白密封剂、多糖来进行肽的眼部施用,以调节上皮细胞屏障复合物的通透性,肽增强角膜药物递送,粘膜施用例如使用生物载体聚合物的施用,水性眼科喷雾剂和电动眼部喷雾治疗。在一个特定实施例中,肽可通过玻璃体内注射或局部,例如以滴眼剂的形式施用。

[0086] 肽可作为单一疗法或者与其他治疗同时或有规律地(metronomically)进行施用,所述其他治疗可为手术或肿瘤摘除。如本文使用的,术语“同时的”或“同时地”意指肽和其他治疗在彼此48小时内,优选24小时内,更优选12小时内,还更优选6小时内,且最优选3小时内或更短时间内施用。如本文使用的,术语“有规律地”意指在不同于其他治疗的时间且以相对于重复施用的一定频率施用肽。例如,本发明的肽可与一种或多种VEGF抑制剂一起施用。例如,本发明的肽可与一种或多种VEGF抑制剂或者与用于视力丧失的激光治疗组合施用。

[0087] 肽可在另一种治疗之前的任何点施用,包括约120小时、118小时、116小时、114小时、112小时、110小时、108小时、106小时、104小时、102小时、100小时、98小时、96小时、94小时、92小时、90小时、88小时、86小时、84小时、82小时、80小时、78小时、76小时、74小时、72小时、70小时、68小时、66小时、64小时、62小时、60小时、58小时、56小时、54小时、52小时、50小时、48小时、46小时、44小时、42小时、40小时、38小时、36小时、34小时、32小时、30小时、28小时、26小时、24小时、22小时、20小时、18小时、16小时、14小时、12小时、10小时、8小时、6小时、4小时、3小时、2小时、1小时、55分钟、50分钟、45分钟、40分钟、35分钟、30分钟、25分钟、20分钟、15分钟、10分钟、9分钟、8分钟、7分钟、6分钟、5分钟、4分钟、3分钟、2分钟和1分钟。肽可在肽的第二次治疗之前的任何点施用,包括约120小时、118小时、116小时、114小时、112小时、110小时、108小时、106小时、104小时、102小时、100小时、98小时、96小时、94小时、92小时、90小时、88小时、86小时、84小时、82小时、80小时、78小时、76小时、74小时、72小时、70小时、68小时、66小时、64小时、62小时、60小时、58小时、56小时、54小时、52小时、50小时、48小时、46小时、44小时、42小时、40小时、38小时、36小时、34小时、32小时、30小时、28小时、26小时、24小时、22小时、20小时、18小时、16小时、14小时、12小时、10小时、8小时、6小时、4小时、3小时、2小时、1小时、55分钟、50分钟、45分钟、40分钟、35分钟、30分钟、25分钟、20分钟、15分钟、10分钟、9分钟、8分钟、7分钟、6分钟、5分钟、4分钟、3分钟、2分钟和1分钟。

[0088] 肽可在另一种治疗之后的任何点施用,包括约1分钟、2分钟、3分钟、4分钟、5分钟、6分钟、7分钟、8分钟、9分钟、10分钟、15分钟、20分钟、25分钟、30分钟、35分钟、40分钟、45分钟、50分钟、55分钟、1小时、2小时、3小时、4小时、6小时、8小时、10小时、12小时、14小时、16小时、18小时、20小时、22小时、24小时、26小时、28小时、30小时、32小时、34小时、36小时、38小时、40小时、42小时、44小时、46小时、48小时、50小时、52小时、54小时、56小时、58小时、60小时、62小时、64小时、66小时、68小时、70小时、72小时、74小时、76小时、78小时、80小时、82小时、84小时、86小时、88小时、90小时、92小时、94小时、96小时、98小时、100小时、102小时、104小时、106小时、108小时、110小时、112小时、114小时、116小时、118小时和120小时。肽可在肽的第二次治疗之后的任何点施用,包括约120小时、118小时、116小时、114小时、112小时、110小时、108小时、106小时、104小时、102小时、100小时、98小时、96小时、94小时、92小时、90小时、88小时、86小时、84小时、82小时、80小时、78小时、76小时、74小时、72小时、70小时、68小时、66小时、64小时、62小时、60小时、58小时、56小时、54小时、52小时、50小时、48小时、46小时、44小时、42小时、40小时、38小时、36小时、34小时、32小时、30小时、28小时、26小时、24小时、22小时、20小时、18小时、16小时、14小时、12小时、10小时、8小时、6小时、4小时、3小时、2小时、1小时、55分钟、50分钟、45分钟、40分钟、35分钟、30分钟、25分钟、20分钟、15分钟、10分钟、9分钟、8分钟、7分钟、6分钟、5分钟、4分钟、3分钟、2分钟和1分钟。

#### [0089] 制剂

[0090] 该方法可包括施用该肽。本文提供的肽可为以常规方式配制的片剂或锭剂的形式。例如,用于经口施用的片剂和胶囊可含有常规赋形剂,可为结合剂、填料、润滑剂、崩解剂和润湿剂。结合剂包括但不限于糖浆、阿拉伯胶(accacia)、明胶、山梨糖醇、黄蓍胶、淀粉和聚乙烯吡咯烷酮的粘液。填料可为乳糖、糖、微晶纤维素、玉米淀粉、磷酸钙和山梨糖醇。润滑剂包括但不限于硬脂酸镁、硬脂酸、滑石、聚乙二醇和二氧化硅。崩解剂可为马铃薯淀粉和淀粉乙醇酸钠。润湿剂可为十二烷基硫酸钠。片剂可根据本领域众所周知的方法进行包衣。

[0091] 本文提供的肽还可为液体制剂,例如水性或油性悬浮液、溶液、乳剂、糖浆剂和酞剂。肽也可配制为干燥产品,用于在使用前用水或其他合适的媒介物构建。这种液体制剂可含有添加剂例如悬浮剂、乳化剂、非水性媒介物和防腐剂。悬浮剂可为山梨糖醇糖浆、甲基纤维素、葡萄糖/糖浆、明胶、羟乙基纤维素、羧甲基纤维素、硬脂酸铝凝胶和氢化食用脂肪。乳化剂可为卵磷脂、脱水山梨糖醇单油酸酯和阿拉伯胶。非水性媒介物可为食用油、杏仁油、分馏椰子油、油性酯、丙二醇和乙醇。防腐剂可为对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯和山梨酸。特别地,本发明的肽可为用于局部施用例如以滴眼剂形式的水性制剂。

[0092] 本文提供的肽也可配制成栓剂,其可含有栓剂基质如可可脂或甘油酯。本文提供的肽还可配制用于吸入,其可为可作为干粉施用的形式例如溶液、悬浮液或乳液,或可为使用推进剂如二氯二氟甲烷或三氯氟甲烷的气溶胶形式。本文提供的肽还可配制为包含水性或非水性媒介物的经皮制剂,例如乳膏、软膏、洗剂、糊剂、含药膏、贴剂或膜。本文提供的肽还可配制用于肠胃外施用,例如通过注射、肿瘤内注射或连续输注。用于注射的制剂可为在油性或水性媒介物中的悬浮液、溶液或乳液的形式,并且可含有配制试剂,包括但不限于悬浮剂、稳定剂和分散剂。肽还可以用于用合适媒介物重建的粉末形式提供,所述媒介物包括但不限于无菌的无热原水。

[0093] 本文提供的肽也可配制为长效制剂,其可通过植入或通过肌肉注射进行施用。肽可用合适的聚合物或疏水性材料(例如作为在可接受的油中的乳液)、离子交换树脂或作为微溶衍生物(例如作为微溶盐)进行配制。

#### [0094] 剂量

[0095] 该方法可包括向有此需要的患者施用治疗有效量的肽。用于治疗所需的治疗有效量随着被治疗的状况的性质、活化TLR活性所需的时间长度和患者的年龄/状况而变化。然而,一般而言,用于成人治疗的剂量通常在0.001mg/kg至约200mg/kg/天的范围内。剂量可为约0.05mg/kg至约10g/kg/天。所需剂量可方便地以单一剂量施用,或作为以适当间隔施用的多个剂量,例如作为每天两个、三个、四个或更多个亚剂量施用。可能需要或要求多个剂量。

[0096] 剂量可为任意剂量,例如约0.05 $\mu$ g/kg、0.06 $\mu$ g/kg、0.07 $\mu$ g/kg、0.08 $\mu$ g/kg、0.09 $\mu$ g/kg、0.1 $\mu$ g/kg、0.2 $\mu$ g/kg、0.3 $\mu$ g/kg、0.4 $\mu$ g/kg、0.5 $\mu$ g/kg、0.6 $\mu$ g/kg、0.7 $\mu$ g/kg、0.8 $\mu$ g/kg、0.9 $\mu$ g/kg、1 $\mu$ g/kg、1.5 $\mu$ g/kg、2 $\mu$ g/kg、3 $\mu$ g/kg、4 $\mu$ g/kg、5 $\mu$ g/kg、10 $\mu$ g/kg、15 $\mu$ g/kg、20 $\mu$ g/kg、25 $\mu$ g/kg、50 $\mu$ g/kg、75 $\mu$ g/kg、100 $\mu$ g/kg、125 $\mu$ g/kg、150 $\mu$ g/kg、175 $\mu$ g/kg、200 $\mu$ g/kg、225 $\mu$ g/kg、250 $\mu$ g/kg、275 $\mu$ g/kg、300 $\mu$ g/kg、325 $\mu$ g/kg、350 $\mu$ g/kg、375 $\mu$ g/kg、400 $\mu$ g/kg、425 $\mu$ g/kg、450 $\mu$ g/kg、475 $\mu$ g/kg、500 $\mu$ g/kg、525 $\mu$ g/kg、550 $\mu$ g/kg、575 $\mu$ g/kg、600 $\mu$ g/kg、625 $\mu$ g/kg、650 $\mu$ g/kg、675 $\mu$ g/kg、700 $\mu$ g/kg、725 $\mu$ g/kg、750 $\mu$ g/kg、775 $\mu$ g/kg、800 $\mu$ g/kg、825 $\mu$ g/kg、850 $\mu$ g/kg、875 $\mu$ g/kg、900 $\mu$ g/kg、925 $\mu$ g/kg、950 $\mu$ g/kg、975 $\mu$ g/kg。

[0097] 剂量可为任何剂量,例如约0.05mg/kg、0.06mg/kg、0.07mg/kg、0.08mg/kg、0.09mg/kg、0.1mg/kg、0.2mg/kg、0.3mg/kg、0.4mg/kg、0.5mg/kg、0.6mg/kg、0.7mg/kg、0.8mg/kg、0.9mg/kg、1mg/kg、25mg/kg、50mg/kg、75mg/kg、100mg/kg、125mg/kg、150mg/kg、175mg/kg、200mg/kg、225mg/kg、250mg/kg、275mg/kg、300mg/kg、325mg/kg、350mg/kg、375mg/kg、400mg/kg、425mg/kg、450mg/kg、475mg/kg、500mg/kg、525mg/kg、550mg/kg、575mg/kg、600mg/kg、625mg/kg、650mg/kg、675mg/kg、700mg/kg、725mg/kg、750mg/kg、775mg/kg、800mg/kg、825mg/kg、850mg/kg、875mg/kg、900mg/kg、925mg/kg、950mg/kg、975mg/kg、1g/kg、2g/kg、3g/kg、4g/kg、5g/kg、6g/kg、7g/kg、8g/kg、9g/kg或10g/kg。

#### [0098] 试剂盒

[0099] 本文提供的是可用于治疗与VEGF诱导的血管通透性或血管生成相关的病症的试剂盒。试剂盒可包含一种或多种肽。肽可为药物组合物的部分。试剂盒还可包括使用试剂盒并且进行肽或制剂施用的说明书。

[0100] 试剂盒还可包含一个或多个容器,例如小瓶或瓶子,其中每个容器含有分开的试剂。该试剂盒还可包括书面说明书,其可描述如何执行或解释本文描述的方法。

#### [0101] 实例

##### [0102] 实例1

[0103] EB3与IP3R相互作用在IP3门控的Ca<sup>2+</sup>释放机制中的作用

[0104] 确定用本发明的肽(SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:3)变构调节EB3功能是否抑制VEGF诱导的血管渗漏和血管生成两者。通过皮下注射基质胶、肿瘤细胞或布鲁赫膜的激光烧伤,用VEGF或血管生成来攻击小鼠。

[0105] IP<sub>3</sub>R<sub>5</sub>含有EB结合共有基序Ser/Thr-x-Ile-Pro (SxIP) (SEQ ID NO:5)。基于IP<sub>3</sub>R<sub>3</sub>

序列(KFARLWTEIPTAIT--SEQ ID NO:1)的短肽(图2)显示了具有-68.882千卡/摩尔的自由能结合的对于EB3的高结合活性(图3)。最近由Geyer等人,Cell Rep 12(1):79-89;2015描述了EB3和IP<sub>3</sub>R<sub>3</sub>之间的相互作用的作用。用以10nM附着至细胞渗透剂触角足肽(AP)的C末端的IP<sub>3</sub>R<sub>3</sub>序列预处理细胞显著降低响应于凝血酶来自储库的Ca<sup>2+</sup>释放(图4A),提示IP<sub>3</sub>R<sub>3</sub>和EB3之间的相互作用在IP<sub>3</sub>R<sub>3</sub>活化机制中至关重要。比较IP<sub>3</sub>R<sub>3</sub>肽和紫杉醇在调节Ca<sup>2+</sup>释放中的效应。发现在凝血酶刺激之前用5μg/ml紫杉醇预处理细胞20分钟抑制来自ER的Ca<sup>2+</sup>释放至与IP<sub>3</sub>R<sub>3</sub>肽相同的程度(图4B)。

[0106] 实例2

[0107] 末端结合抑制肽(EBIN)的基于结构的设计

[0108] 基于计算的计算机模拟丙氨酸扫描和IPR肽与EB结合口袋的完全柔性对接来设计末端结合抑制肽,即EBIN(表2和3)。结合自由能(ΔG)用于确定每个残基在肽与EB蛋白相互作用的稳定中的贡献。

[0109] 使用以下标准:ΔG值.gtoreq.1=稳定残基ΔG值.gtoreq.-1=失稳残基ΔG值<-1至0至<1=中性残基丙氨酸扫描揭示了稳定(具有0.50Kj/摩尔或更高的正结合能;以黑色显示)和失稳(具有-1的负结合能,以蓝色显示)残基。

[0110] 表1:在围绕IP<sub>3</sub>R<sub>3</sub>的Thr-x-Pro基序的氨基酸残基截短后,结合自由能中的计算变化

[0111]

肽序列	自由结合能(-千卡/摩尔)	SEQ ID NO
KFARLWTEIPTAIT (IP <sub>3</sub> R <sub>3</sub> 肽)	-68.882	1
FARLWTEIPTAIT	-68.809	6
RLWTEIPTAIT	-46.571	7
LWTEIPTAIT	-54.443	8
WTEIPTAIT	-42.886	9
TEIPTAIT	-37.16	10
TEIPTAI	-39.337	11
TEIPTA	-41.234	12
TEIPT	-34.5	13
FARLWTEIPTAI	-51.42	14
TEIP	-45.071	15
RTEIPTI	-49.74	16
FRTEIPTI	-40.728	17
FTKIPTI	-55.469	18
KFARTKIPTAIT	-57.32	19
FARTEIPTAI	-33.415	20
KFARTEIPTAIT	-55.736	21

[0112] 表2:在使IP<sub>3</sub>R<sub>3</sub>的每个氨基酸残基突变为丙氨酸后,结合自由能中的计算变化:K

<sub>1</sub><sup>1</sup>F<sub>2</sub><sup>2</sup>A<sub>3</sub><sup>3</sup>R<sub>4</sub><sup>4</sup>L<sub>5</sub><sup>5</sup>W<sub>6</sub><sup>6</sup>T<sub>7</sub><sup>7</sup>E<sub>8</sub><sup>8</sup>I<sub>9</sub><sup>9</sup>P<sub>10</sub><sup>10</sup>T<sub>11</sub><sup>11</sup>A<sub>12</sub><sup>12</sup>I<sub>13</sub><sup>13</sup>T<sub>14</sub><sup>14</sup>

[0113]

氨基酸	ΔG
K1	0.25

F2	0.52
R4	0.01
L5	-1.03
W6	-1.08
T11	0.91
I13	1.33
T14	0.40

[0114] 表3:在使EBIN的每个氨基酸残基突变为丙氨酸后,结合自由能中的计算变化。

氨基酸	$\Delta G$
F1	1.64
T2	1.07
E3	0.02
I4	0.68
T11	0.98
I7	0.94

[0116] 因此,14个氨基酸的IPR肽被降低为7个氨基酸的末端结合抑制肽(EBIN;FTEIPTI (SEQ ID NO:3)。图5证实了EB3与EBIN之间的相互作用。类似于 $IP_3R_3$ (在图5中以黄色棒显示),EBIN结合EB酸性尾部和复合螺旋结构域之间的疏水性凹槽。EBIN与EB3的计算结合能为-60.251千卡/摩尔,这类似于IPR和EB3之间的结合能。在EBIN的第2位处的苏氨酸在结合EB3界面中起关键作用,因为该残基突变为丙氨酸完全取消结合。因此,单个氨基酸突变T→A肽,FAEIPTI (SEQ ID NO:4),用作结合丧失对照。

[0117] 实例6

[0118] EBIN预防VEGF诱导的微血管渗漏

[0119] VE-钙粘蛋白是将内皮细胞桥接成连续单层的内皮细胞间连接的主要粘附蛋白,以便维持血管壁对富含蛋白质的流体的限制性屏障。VEGF和Ang2两者均直接通过诱导VE-钙粘蛋白的酪氨酸磷酸化并且靶向VE-钙粘蛋白用于内化和降解,或者间接借助于由于响应于细胞内的力的VE-钙粘着蛋白粘附破坏而使VE-钙粘着蛋白粘附失稳。

[0120] 最近描述了VE-钙粘着蛋白粘附和微管细胞骨架之间的关键交叉相互作用(Komarova等人,Molecular Cell 48(6):914-25;2012.)。钙神经素,钙依赖性磷酸酶,被发现是这种交叉相互作用中的主要信号传导参与者,因为它使EB3脱磷酸,促进EB3依赖性MT细胞骨架重组,并且因此提供了用于破坏VE-钙粘蛋白附着的前馈机制。

[0121] 进行调查EBIN注射是否预防血管内皮生长因子(VEGF)诱导的微血管渗漏的研究。Balb/cJ小鼠用EBIN肽(1 $\mu$ M/kg)或对照肽(2T→A突变)进行预处理,然后皮内注射人VEGF(50ng/kg体重),以诱导白蛋白结合的伊文思蓝的血管渗漏(参见图6A)。另外,在620nm处分光光度法定量甲酰胺萃取的伊文思蓝,并且对于血红蛋白(740nm)和皮肤重量进行校正(参见图6B)。图6中提供的数据证实用EBIN肽处理动物显著抑制如通过皮内注射人VEGF诱导的皮下血管渗漏,并且因此完全支持EBIN可代表用于抑制血管生成和治疗与VEGF诱导的血管通透性相关的病症的新型有力疗法。

[0122] 实例7

[0123] EBIN取消血管生成模型中的血管生长

[0124] 使用基质胶模型研究了EBIN对体外小管生成和体内血管生成的作用。在 $1\mu\text{M}$  EBIN或对照肽存在下,将人脐静脉内皮细胞的单细胞悬浮液铺平板在基质胶包被的孔上;16小时后评价管形成。如图7A和7B所示,在该体外二维基质胶模型中,EBIN显著取消了管的形成。

[0125] 还调查了在异位基质胶血管生成的体内模型中EBIN对血管向内生长的作用。生长基质胶中的血管与肝素和VEGF预混合,但不与内皮细胞预混合,并且i.p.注射到小鼠的下腹部内。存在两个 $400\mu\text{L}$ 塞/小鼠。在用对照肽处理的小鼠中(组1),新近形成的血管生长到基质胶内(图7C,1)。这些血管是功能性的,并且灌注有血液,这由血管内红细胞的存在而显而易见。另外,在基质胶注射时(图7C,2;组2)或基质胶后36小时(图7C,3;组3),用EBIN处理小鼠。在96小时去除基质胶塞,固定并用HE染色,以评价血管形成。血管数目明显减少,指示血管向内生长中的显著减少,具有99%置信度。应该指出,后处理与处理一样有效,提示与抗VEGF治疗和紫杉醇类似,EBIN可促使血管退化。尽管,EBIN并未诱导内皮细胞死亡或细胞周期停滞(数据未示出)。

[0126] 实例8

[0127] EBIN抑制肿瘤细胞生长

[0128] 使用异种移植模型调查了EBIN对三阴性(雌激素受体[ER]、孕酮受体[PR]和人表皮生长因子受体-2[HER-2]在该细胞系中不表达)人乳腺癌细胞的生长速率的作用。将裸鼠( $n=8$ 只小鼠/组)用 $3\times 10^6$ 个MDA-MB-231人乳腺癌细胞注射到左上乳房脂肪垫内。所有小鼠到第13天的时候都发展肿瘤。在该时间点,将小鼠随机化且分为5组,并且每组接受治疗。研究在第24天终止,当时肿瘤达到大小 $2000\text{mm}^3$ 。每天执行用对照肽和EBIN的治疗共7天。经由尾静脉注射递送EBIN和对照肽。对照肽以 $5\mu\text{M}/\text{kg}$ 体重进行注射。EBIN以 $1\mu\text{M}/\text{kg}$ 和 $5\mu\text{M}/\text{kg}$ 体重进行注射。

[0129] 用紫杉醇的治疗经由以 $10\mu\text{M}/\text{kg}$ 体重的腹膜内注射执行4天。肿瘤大小每周测量3次。如图8A所示,观察到紫杉醇组中的肿瘤生长的显著延迟,在4次治疗后观察到EBIN治疗组中肿瘤大小的减少。尽管这种效应相当短暂,但与对照未治疗组相比,EBIN治疗组中的肿瘤大小明显更小。用 $1\mu\text{M}/\text{kg}$  EBIN治疗的小鼠以与未治疗的小鼠相同的速率发展肿瘤,提示低剂量是无效的。

[0130] 为了将EBIN治疗的效应与肿瘤新生血管形成相关联,收集肿瘤组织,固定并且用苏木精和伊红(H&E)染色。对肿瘤块外的细胞数目进行评分且进行标准化/面积。与肿瘤生长曲线一致,仅在紫杉醇和EBIN( $5\mu\text{M}/\text{kg}$ )-治疗组中,肿瘤外的血管数目显著降低。与紫杉醇相比,EBIN显示优异效应(参见图8B)。所有其他组与未治疗组相比均未显示差异。这些数据提示EBIN证实抗血管生成性质,并且可用于治疗病理性血管生成。仅用紫杉醇和EBIN以剂量 $5\mu\text{M}/\text{kg}$ 体重治疗显著减少肿瘤外的血管数目。

[0131] 实例9

[0132] 确定EBIN治疗激光诱发的脉络膜新生血管形成(CNV)的体内模型的功效

[0133] 新生血管性AMD的特征在于来自脉络膜的血管生长,其穿过布鲁赫膜进入视网膜下区域。激光诱导的脉络膜新生血管形成(CNV)的小鼠模型是良好建立的AMD渗出形式的模型。通过激光束破坏布鲁赫膜促进新的脉络膜血管生长到视网膜内,因此模拟AMD的病理状

况(图9)。该模型已成功用于预测VEGF疗法对于新生血管性AMD的临床功效。

[0134] 为了评价EBIN的屏障保护和抗血管生成活性,在CNV的鼠模型中测试了EBIN。除用EBIN治疗之外,还使用LEAF<sup>TM</sup>抗体(针对小鼠VEGF-A的单克隆大鼠抗体)和对照肽(Myr-FAEIPTI)分别作为阳性和阴性实验对照。

[0135] C57/BL6小鼠(6-8周龄)购自Charles River Laboratory,并且根据批准的方案使用。用氯胺酮/赛拉嗪(100mg/5mg/kg IP)的混合物麻醉小鼠,并且用Cyclomydril(Alcon Laboratories, Fort Worth, TX)的局部应用扩大其瞳孔。用成像相机观察眼底,并且使用图像引导激光系统(Micron IV, Phoenix Research Laboratories, Pleasanton, CA)诱导激光凝固。通过用波长532nm、固定直径50 $\mu$ m、持续时间70ms和功率水平210-250mW的绿色氩激光脉冲,在右眼中逐个诱导与视神经处于相等距离的四个激光灼伤。在激光点处出现气泡或小视网膜下出血(直径<1mm)作用于指示布鲁赫膜的破裂以及激光诱导的CNV的确认。该操作仅对每只小鼠的右眼执行。激光诱导的光凝固和处理方案的时间表显示于图10中。用对照和EBIN肽(1 $\mu$ g/眼)和针对小鼠VEGF-A的抗体(2 $\mu$ g/眼;LEAF<sup>TM</sup>;低内毒素,无叠氮化物)的治疗,在激光凝固后经由玻璃体内注射(2 $\mu$ l)向右眼施用一次。用无菌盐水轻轻冲洗眼睛,以去除润滑滴眼剂并且用抗生素软膏红霉素(Fougera, Melville, NY)治疗。然后在激光处理后,将小鼠置于在35 $^{\circ}$ C下的预热的加温板上,直至其醒来。在第8天和第15天时,通过眼部相干断层扫描(OCT)评估EBIN抗血管生成功效,仅在第15天时执行血管造影(图10)。执行荧光素血管造影术和OCT用于使视网膜血管系统成像,类似于临床上常规用于患者的操作。这经由通过小鼠尾静脉的静脉内注射10 $\mu$ l 0.2%荧光染料执行。基于Gong等人, PLoS One 2015, 10 (7) :e 0132643中确定的参数,每个治疗组的10只小鼠的样本大小提供足够的能力来检测假设的血管渗漏(病变面积)中的10%差异。

[0136] 表4列出了十个治疗组(n=10只CNV小鼠/治疗组,总共30只小鼠)、药物方案和用于测量对治疗的应答的预期终点。组1小鼠接受Myr-对照肽,组2小鼠用Myr-EBIN治疗,并且组3小鼠用作为阳性对照的LEAF<sup>TM</sup>抗体治疗。如图10概述的,所有治疗都经由玻璃体内途径在CNV时作为单次注射递送。

[0137] 表4:用于测量小鼠中对CNV治疗的应答的治疗组、药物方案和终点测定。

组	N	药物	方案	终点测定
[0138]	1	Myr-对照肽 (1 $\mu\text{g}/\text{眼}$ )	在 1 $\mu\text{l}$ 中的 1 $\mu\text{g}/\text{眼}$ 的玻璃体内注射; 在第 1 天时 (在 CNV 时)	1. 在第 15 天时的荧光素血管造影术以及在
	2	Myr-EBIN 玻璃体内 (1 $\mu\text{g}/\text{眼}$ )	在 1 $\mu\text{l}$ 中的 1 $\mu\text{g}/\text{眼}$ 的玻璃体内注射; 在第 1 天时 (在 CNV 时)	第 8 和 15 天时的 OCT
	3	LEAF <sup>TM</sup> 抗体	在 1 $\mu\text{l}$ 中的 2 $\mu\text{g}/\text{眼}$ 的玻璃体内注射 (等价于在 人中的 2.5 mg 剂量); 在第 1 天时 (在 CNV 时)	2. 眼收集用于在第 15 天时的组织病理学检查
总计	30			

[0139] 图11a和11b显示了对于EBIN、抗VEGF抗体或对照肽治疗的CNV小鼠,在激光凝固后第15天时,荧光素眼底血管造影术(a)和相应的眼部相干断层扫描(b)的图像(数目指示相应的CNV病变)。EBIN类似于抗VEGF治疗减少CNV病变,并且因此提供了眼病如黄斑变性的目前治疗的有效替代方案。实验在第15天时终止,此时用氯胺酮/赛拉嗪(100mg/5mg/kg IP)处死动物,随后为颈椎脱位,并且收集眼组织用于免疫荧光染色和病理分析。视网膜/脉络膜/巩膜的平面固定制剂用于由来自西非单叶豆(*Bandeiraea simplicifolia*) (B4)的Alexa594标记的凝集素进行染色,用于CNV区域的事后分析(图11c)。

[0140] 使用先前研究中建立的排除标准执行数据分析(Gong等人,PLoS One2015,10(7): e 0132643)。排除严重出血的病例,例如不仅损伤布鲁赫膜还损伤脉络膜和视网膜色素上皮的过度激光烧伤,融合病变,在相同实验条件下损伤是病变平均值的多于5倍大的病变。使用MetaMorph软件,使用荧光素血管造影术图像和凝血素B4的CNV染色的共聚焦图像,来定量血管渗漏和CNV的面积。使用Sigma Plot软件绘制数据(图11d和11e),并且使用Prism 6(GraphPad, San Diego, CA)通过单因素ANOVA进行分析。

[0141] 进一步研究

[0142] 与对照肽治疗的小鼠相比,用EBIN治疗小鼠显著降低血管渗漏和CNV病变两者(图11)。EBIN的效应类似于LEAF<sup>TM</sup>治疗,提示EBIN可提供目前可用的AMD抗VEGF治疗(如贝伐珠单抗和阿柏西普)的有成本效益和有效的替代方案。

[0143] 可替代地,经由滴眼剂途径递送EBIN。在这种情况下,治疗在激光凝固前一天开始,并且小鼠每天治疗两次,直到激光凝固后15天。治疗和观察的持续时间为15天。另外,EBIN经由玻璃体内注射和/或经由滴眼剂途径与LEAF<sup>TM</sup>抗体组合递送。在所有情况下,经由玻璃体内注射来施用LEAF<sup>TM</sup>抗体。如先前所述,在激光诱导的CNV后8和15天时,通过荧光素血管造影术和眼部相干断层扫描(OCT)评估EBIN抗血管生成功效。另外,在第15天时收获眼组织。

[0144] 表5列出了十个治疗组 (n=10只CNV小鼠/治疗组, 总共100只小鼠)、药物方案和用于测量用于未来研究的对治疗的应答的预期终点测定。组1小鼠用作为阳性对照的LEAF™抗体治疗, 并且组2小鼠接受LEAF™纯化的大鼠IgG2a, κ同种型对照, 作为组1的对照。组3和4分别用小鼠VEGF的诱饵受体 (阳性对照2) 或阴性Myr-对照肽治疗。所有LEAF™抗体、诱饵受体和对照肽都经由玻璃体内途径在CNV时作为单次注射递送。组5和6分别经由玻璃体内途径接受0.1μg/眼或1μg/眼的Myr-EBIN。组7和8分别经由滴眼剂接受0.5μg/眼或5μg/眼的Myr-EBIN, 每天两次。组9小鼠用与LEAF™抗体组合的Myr-EBIN (0.1μg/眼) 治疗, 两者均经由玻璃体内途径递送。组10用与LEAF™抗体组合的Myr-EBIN滴眼剂 (0.5μg/眼) 经由玻璃体内途径治疗。

[0145] 表5: 用于测量小鼠中对CNV治疗的应答的未来治疗组、药物方案和终点测定。

组	N	药物	方案	终点测定
[0146] 1	10	LEAF™抗体	在 1ul 中的 2 μg/眼的玻璃体内注射 (等价于在人中的	1. 在第 15 天时的荧光素血管造影术以及在第 8 和 15

[0147]

			2.5 mg 剂量); 在第 1 天时 (在 CNV 时)	天时的 OCT 2. 眼收集用于在第 15 天时的组织病理学检查
2	10	LEAF™纯化的大鼠 IgG2a, κ 同种型对照	在 1ul 中的 2 μg/眼的玻璃体内注射 (等价于在人中的 2.5 mg 剂量); 在第 1 天时 (在 CNV 时)	
3	10	小鼠 VEGF 的诱饵受体	在 1ul 中的 2 μg/眼的玻璃体内注射 在第 1 天时 (在 CNV 时)	
4	10	Myr-对照肽 (1 μg/眼)	在 1ul 中的 1 μg/眼的玻璃体内注射; 在第 1 天时 (在 CNV 时)	
5	10	Myr-EBIN 玻璃体内 (0.1 μg/眼)	在 1ul 中的 0.1 μg/眼的玻璃体内注射; 在第 1 天时 (在 CNV 时)	
6	10	Myr-EBIN 玻璃体内 (1 μg/眼)	在 1ul 中的 1 μg/眼的玻璃体内注射; 在第 1 天时 (在 CNV 时)	
7	10	Myr-EBIN 滴眼剂 (0.5 μg/眼)	滴眼剂, 0.5 μg/眼; 每天两次	
8	10	Myr-EBIN 滴眼剂 (5 μg/眼)	滴眼剂, 5 μg/眼; 每天两次	
9	10	Myr-EBIN 玻璃体内 (0.1 μg/眼) + LEAF™抗体玻璃体内	与组#5 组合的组#1	
10	10	Myr-EBIN 滴眼剂	与组#7 组合的组#1	

[0148]		剂 (0.5 $\mu\text{g}/\text{眼}$ ) + LEAF™抗体玻 璃体内		
总计	100			

[0149] 实例10

[0150] 体内EBIN的急性毒性测试

[0151] 短期研究设计为评价体内施用的安全性。将C57BL/6小鼠 ( $n=10$ , 5只小鼠/组/治疗途径) 随机化且分为两组。第一组经由每天两次递送的滴眼剂在右眼中用EBIN治疗,  $5\mu\text{g}/\text{眼}$  ( $10\mu\text{l}$ ), 并且第二组在第一天时用最大剂量在右眼中玻璃体内注射的EBIN治疗,  $1\mu\text{g}/\text{眼}$  ( $2\mu\text{l}$ )。玻璃体内注射在氯胺酮/赛拉嗪 ( $100\text{mg}/5\text{mg}/\text{kg}$ ) 麻醉下执行。对于8天的时期每天监测两组的一般健康, 包括体重以及任何眼异常, 包括不透明度、突眼、凹眼、结膜炎、异常分泌物或结痂、以及角膜溃疡。随后使动物经受荧光素血管造影术和OCT成像。在用连同或不连同CNV诱导的EBIN治疗后, 未观察到毒性 (图12)。



[0039] <213> 人工序列  
[0040] <220>  
[0041] <223> 合成肽  
[0042] <400> 4  
[0043] Phe Ala Glu Ile Pro Thr Ile  
[0044] 1 5  
[0045] <210> 5  
[0046] <211> 4  
[0047] <212> PRT  
[0048] <213> 人工序列  
[0049] <220>  
[0050] <223> 共有基序序列  
[0051] <220>  
[0052] <221> MISC\_FEATURE  
[0053] <222> (1) .. (1)  
[0054] <223> Xaa是Ser或Thr  
[0055] <220>  
[0056] <221> MISC\_FEATURE  
[0057] <222> (2) .. (2)  
[0058] <223> Xaa是任何氨基酸  
[0059] <400> 5  
[0060] Xaa Xaa Ile Pro  
[0061] 1  
[0062] <210> 6  
[0063] <211> 13  
[0064] <212> PRT  
[0065] <213> 人工序列  
[0066] <220>  
[0067] <223> 合成肽  
[0068] <400> 6  
[0069] Phe Ala Arg Leu Trp Thr Glu Ile Pro Thr Ala Ile Thr  
[0070] 1 5 10  
[0071] <210> 7  
[0072] <211> 11  
[0073] <212> PRT  
[0074] <213> 人工序列  
[0075] <220>  
[0076] <223> 合成肽  
[0077] <400> 7

[0078] Arg Leu Trp Thr Glu Ile Pro Thr Ala Ile Thr  
[0079] 1 5 10  
[0080] <210> 8  
[0081] <211> 10  
[0082] <212> PRT  
[0083] <213> 人工序列  
[0084] <220>  
[0085] <223> 合成肽  
[0086] <400> 8  
[0087] Leu Trp Thr Glu Ile Pro Thr Ala Ile Thr  
[0088] 1 5 10  
[0089] <210> 9  
[0090] <211> 9  
[0091] <212> PRT  
[0092] <213> 人工序列  
[0093] <220>  
[0094] <223> 合成肽  
[0095] <400> 9  
[0096] Trp Thr Glu Ile Pro Thr Ala Ile Thr  
[0097] 1 5  
[0098] <210> 10  
[0099] <211> 8  
[0100] <212> PRT  
[0101] <213> 人工序列  
[0102] <220>  
[0103] <223> 合成肽  
[0104] <400> 10  
[0105] Thr Glu Ile Pro Thr Ala Ile Thr  
[0106] 1 5  
[0107] <210> 11  
[0108] <211> 7  
[0109] <212> PRT  
[0110] <213> 人工序列  
[0111] <220>  
[0112] <223> 合成肽  
[0113] <400> 11  
[0114] Thr Glu Ile Pro Thr Ala Ile  
[0115] 1 5  
[0116] <210> 12

- [0117] <211> 6  
[0118] <212> PRT  
[0119] <213> 人工序列  
[0120] <220>  
[0121] <223> 合成肽  
[0122] <400> 12  
[0123] Thr Glu Ile Pro Thr Ala  
[0124] 1 5  
[0125] <210> 13  
[0126] <211> 5  
[0127] <212> PRT  
[0128] <213> 人工序列  
[0129] <220>  
[0130] <223> 合成肽  
[0131] <400> 13  
[0132] Thr Glu Ile Pro Thr  
[0133] 1 5  
[0134] <210> 14  
[0135] <211> 12  
[0136] <212> PRT  
[0137] <213> 人工序列  
[0138] <220>  
[0139] <223> 合成肽  
[0140] <400> 14  
[0141] Phe Ala Arg Leu Trp Thr Glu Ile Pro Thr Ala Ile  
[0142] 1 5 10  
[0143] <210> 15  
[0144] <211> 4  
[0145] <212> PRT  
[0146] <213> 人工序列  
[0147] <220>  
[0148] <223> 合成肽  
[0149] <400> 15  
[0150] Thr Glu Ile Pro  
[0151] 1  
[0152] <210> 16  
[0153] <211> 7  
[0154] <212> PRT  
[0155] <213> 人工序列

- [0156] <220>  
[0157] <223> 合成肽  
[0158] <400> 16  
[0159] Arg Thr Glu Ile Pro Thr Ile  
[0160] 1 5  
[0161] <210> 17  
[0162] <211> 8  
[0163] <212> PRT  
[0164] <213> 人工序列  
[0165] <220>  
[0166] <223> 合成肽  
[0167] <400> 17  
[0168] Phe Arg Thr Glu Ile Pro Thr Ile  
[0169] 1 5  
[0170] <210> 18  
[0171] <211> 7  
[0172] <212> PRT  
[0173] <213> 人工序列  
[0174] <220>  
[0175] <223> 合成肽  
[0176] <400> 18  
[0177] Phe Thr Lys Ile Pro Thr Ile  
[0178] 1 5  
[0179] <210> 19  
[0180] <211> 12  
[0181] <212> PRT  
[0182] <213> 人工序列  
[0183] <220>  
[0184] <223> 合成肽  
[0185] <400> 19  
[0186] Lys Phe Ala Arg Thr Lys Ile Pro Thr Ala Ile Thr  
[0187] 1 5 10  
[0188] <210> 20  
[0189] <211> 10  
[0190] <212> PRT  
[0191] <213> 人工序列  
[0192] <220>  
[0193] <223> 合成肽  
[0194] <400> 20



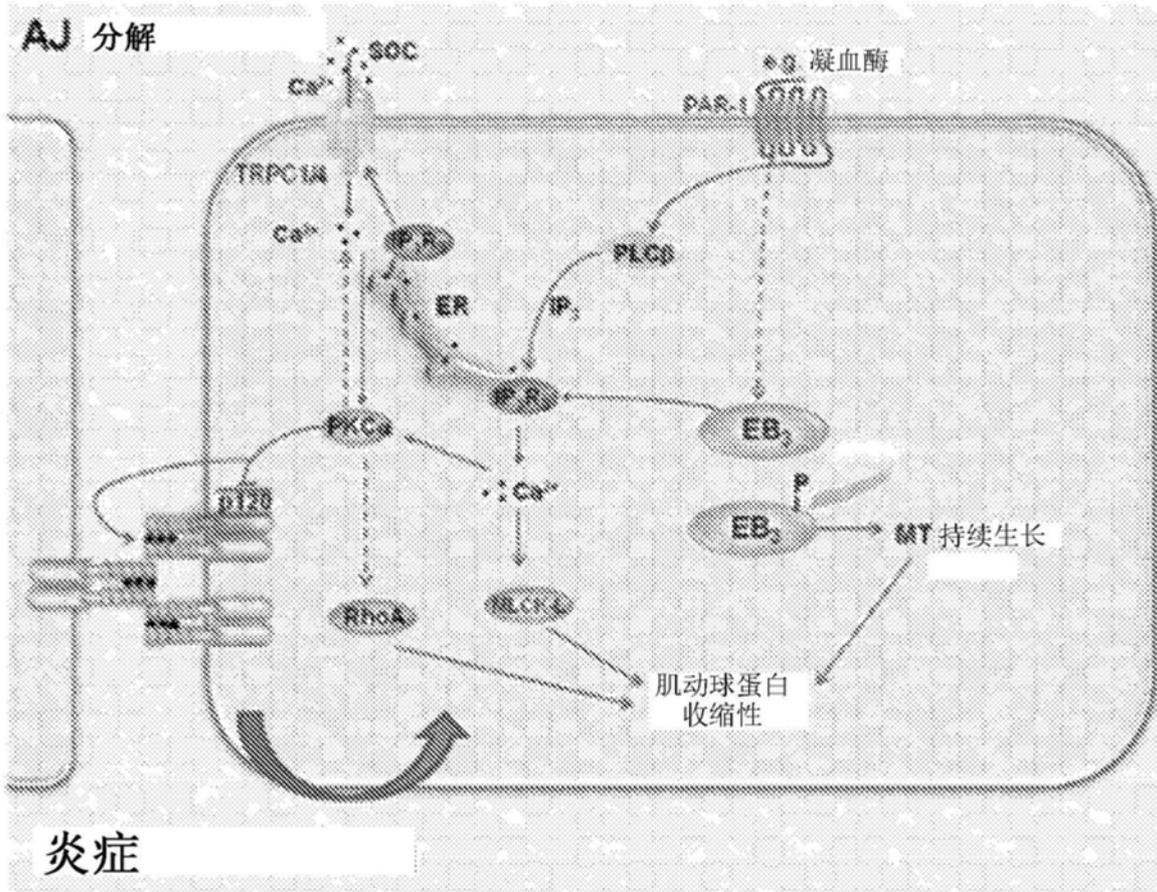


图1

IP <sub>3</sub> R <sub>1</sub> 同种型1	VTPVKYARLWSEIPSEIAIDD
IP <sub>3</sub> R <sub>1</sub> 同种型2	VTPVKYARLWSEIPSEIAIDD
IP <sub>3</sub> R <sub>2</sub>	VVPVRYARLWTEIPTKITIHE
IP <sub>3</sub> R <sub>3</sub>	VTPVKFARLWTEIPTAITIKD
EB 结合	-----S/TxIP-----
SEQ ID NO: 1 IP <sub>3</sub> R <sub>2</sub> 肽	KFARLWTEIPTAIT

图2

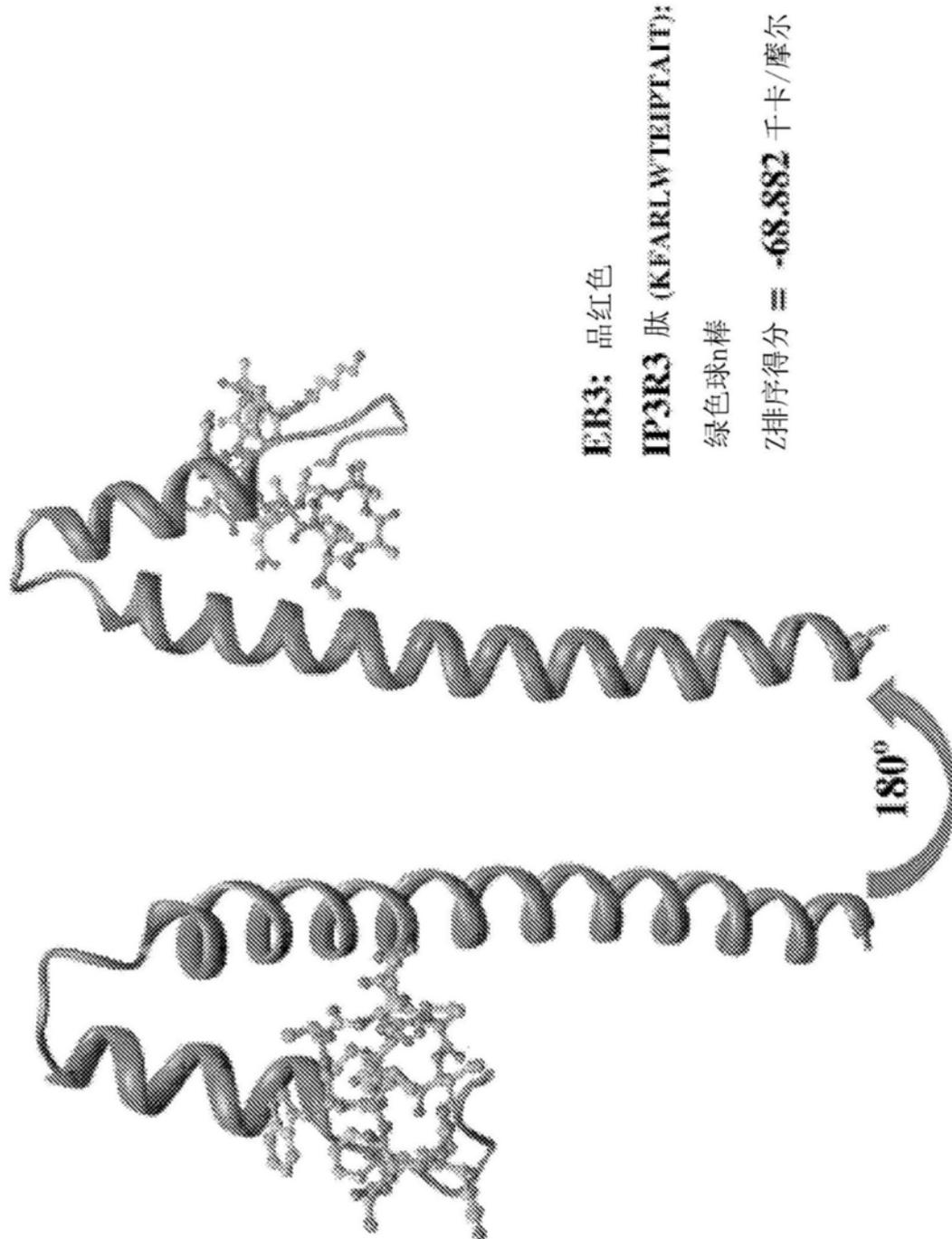


图3

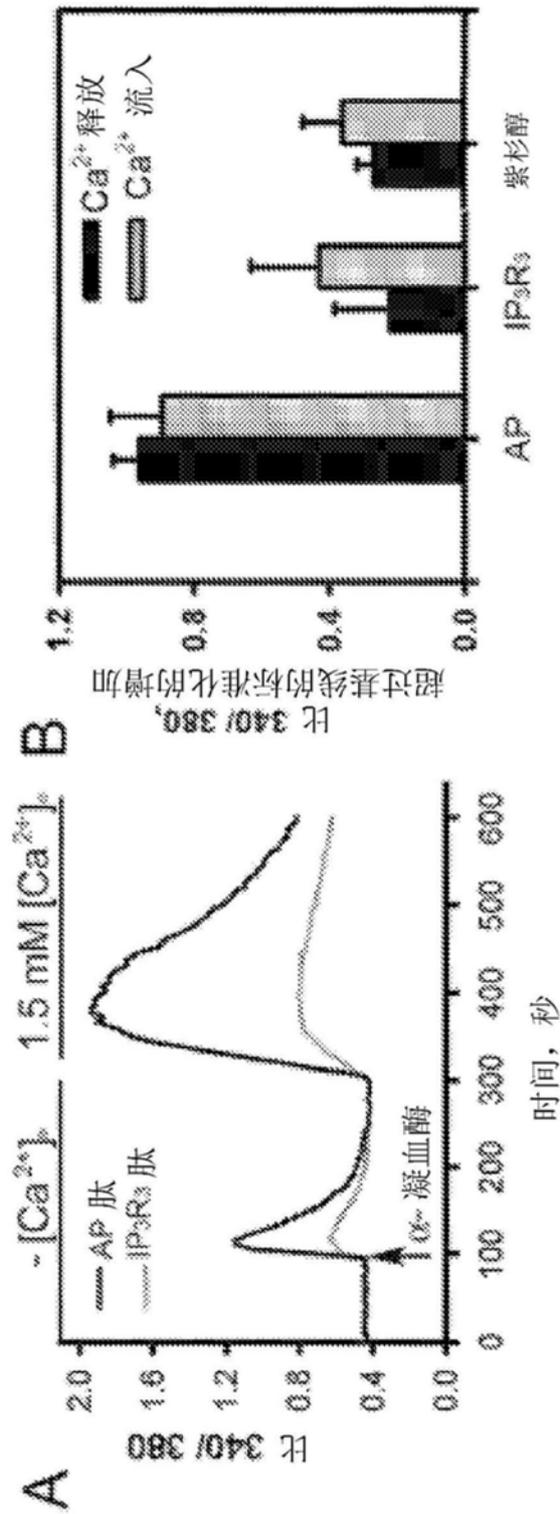


图4

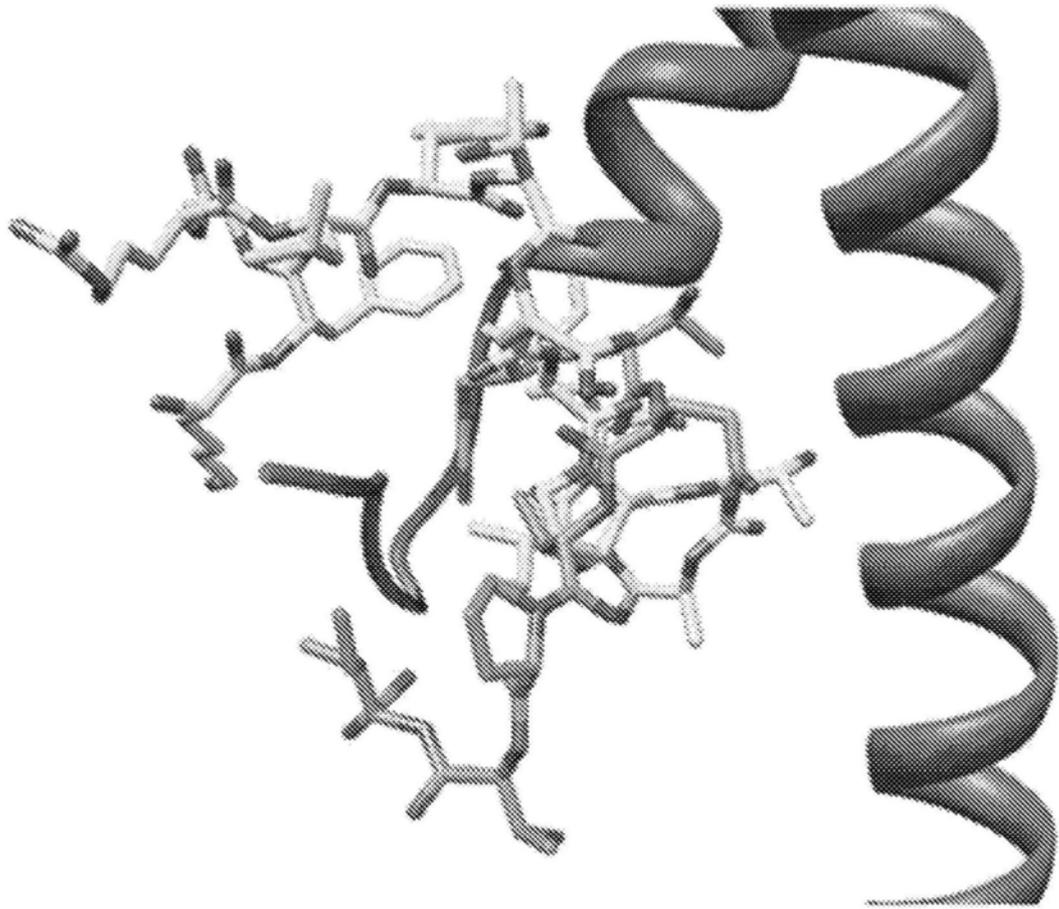


图5

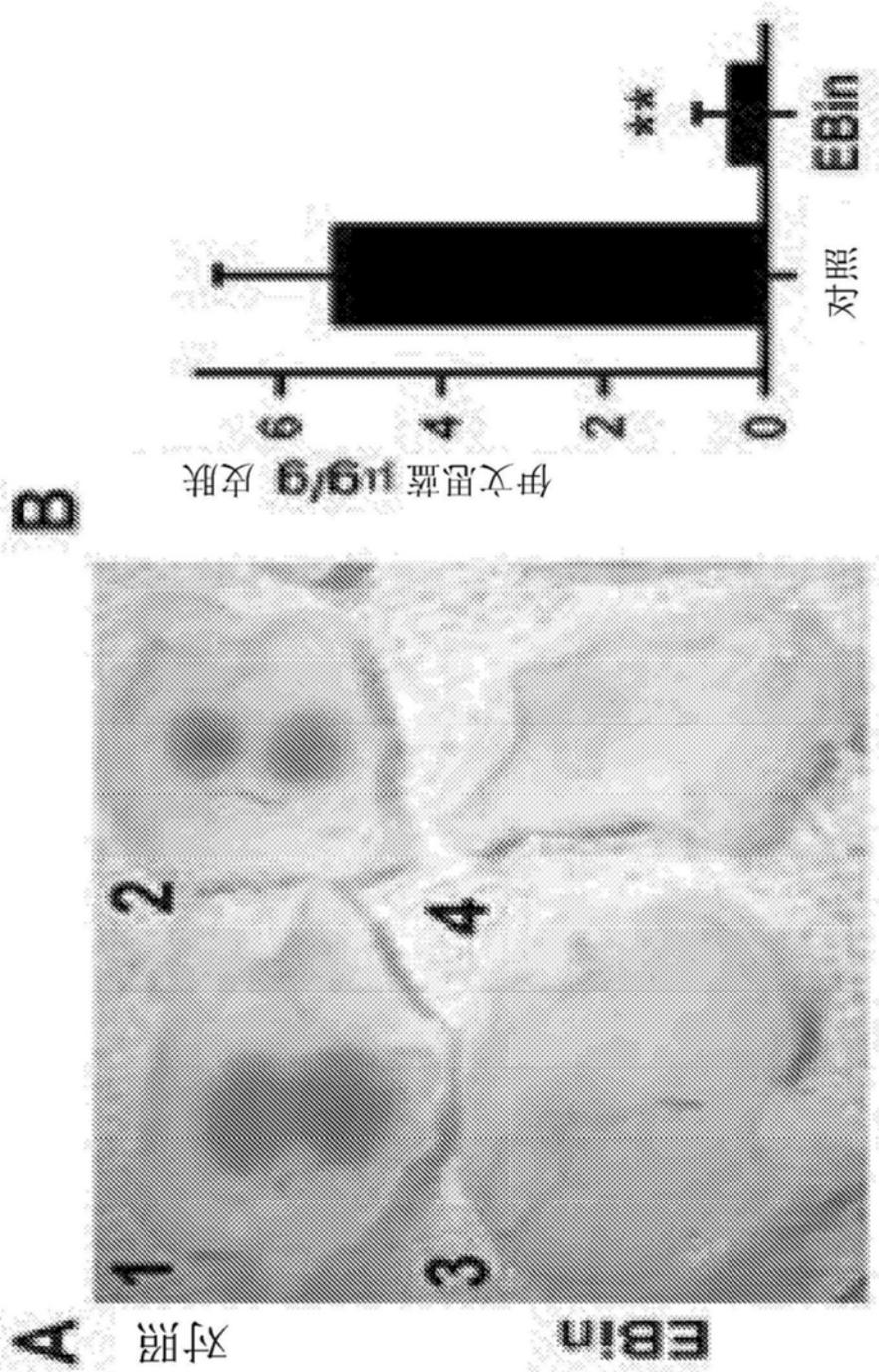


图6

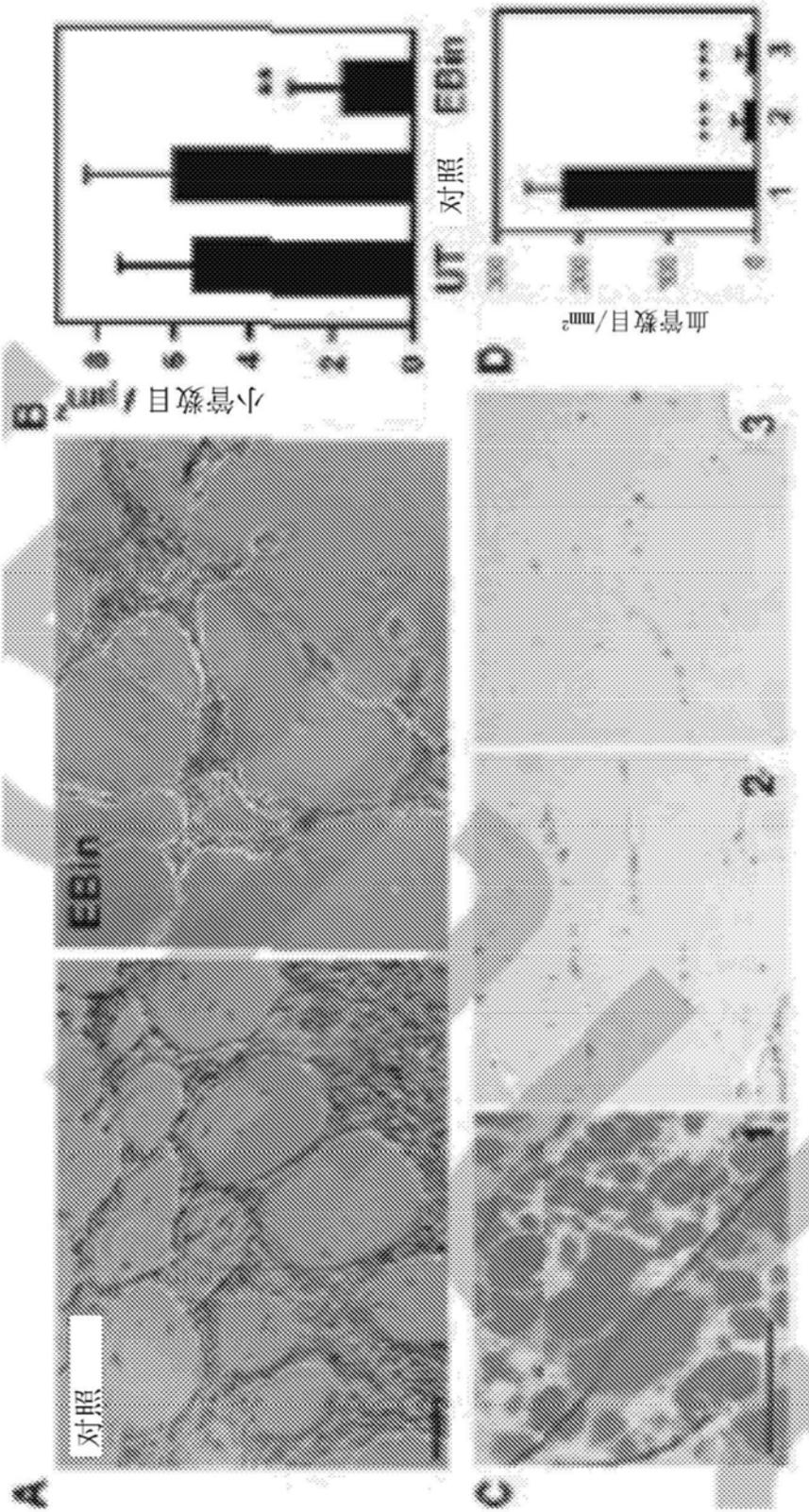


图7

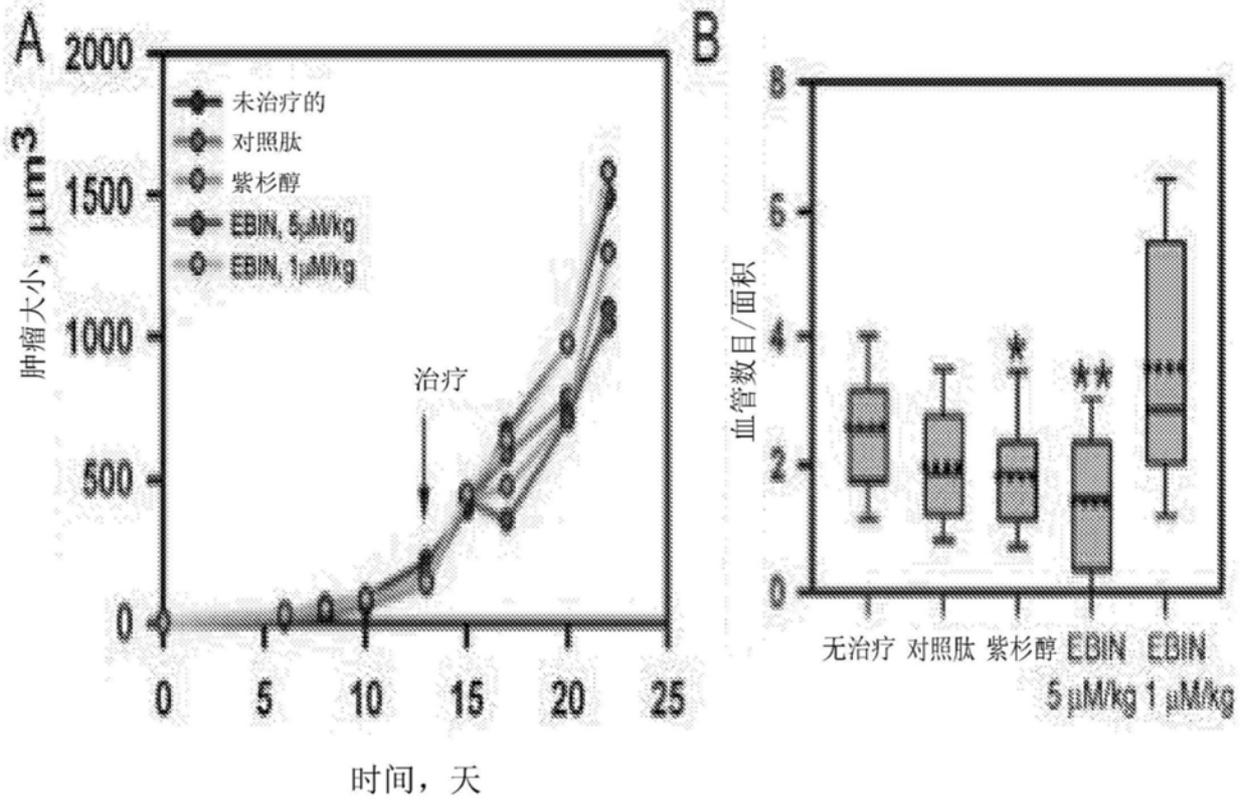


图8

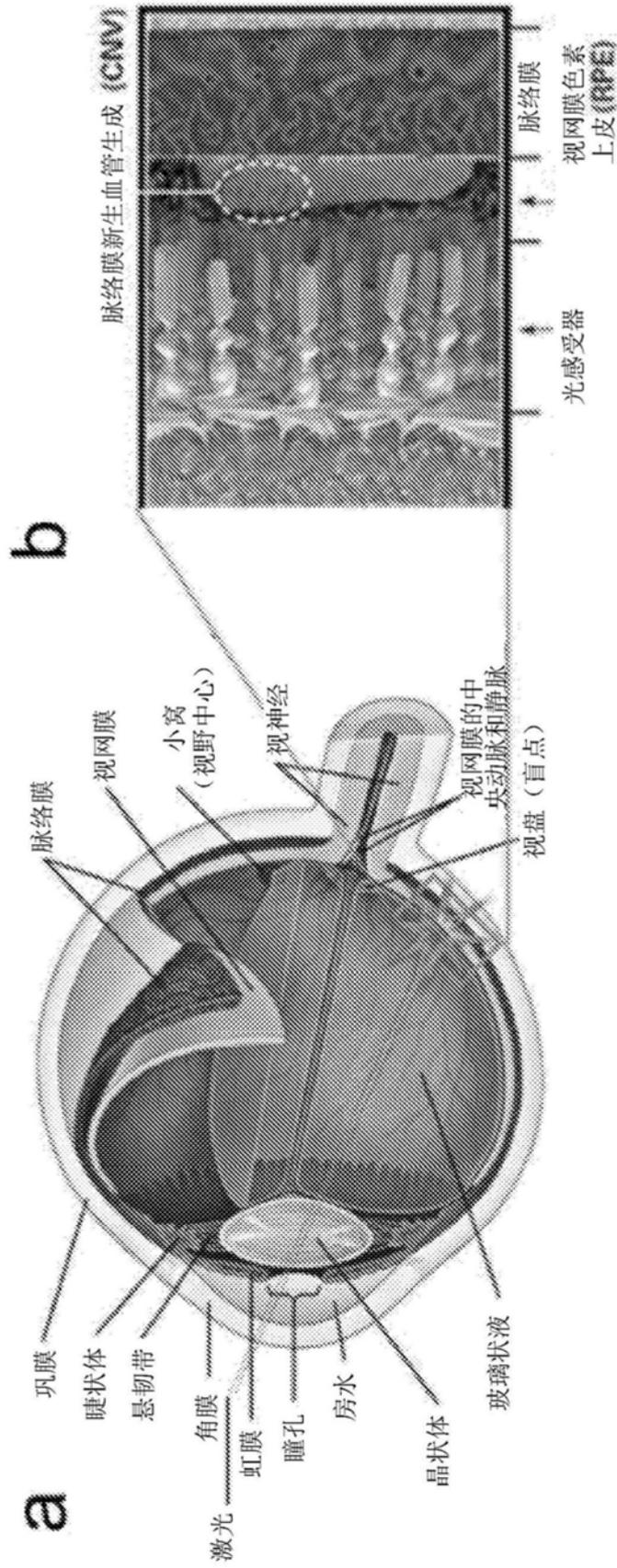


图9

激光诱导的CNV和治疗时间表:

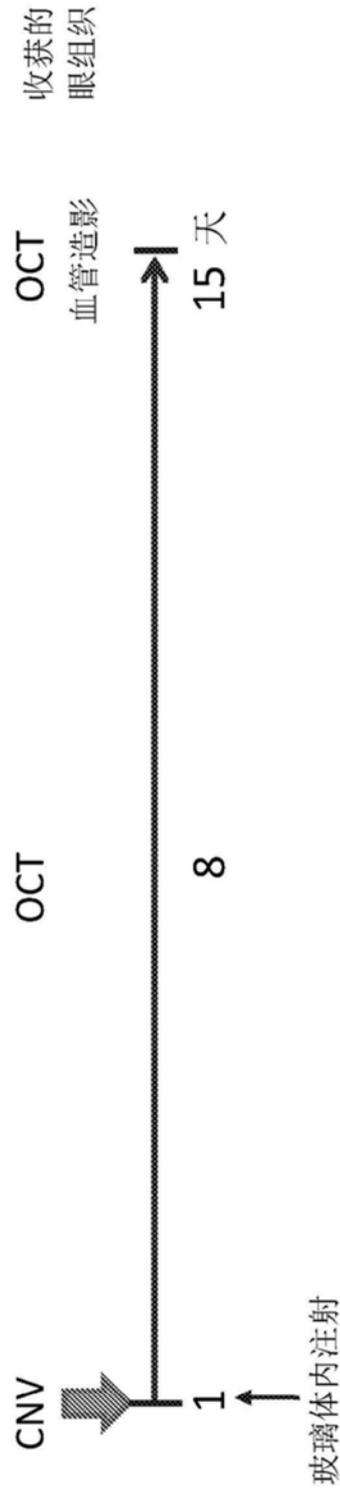


图10

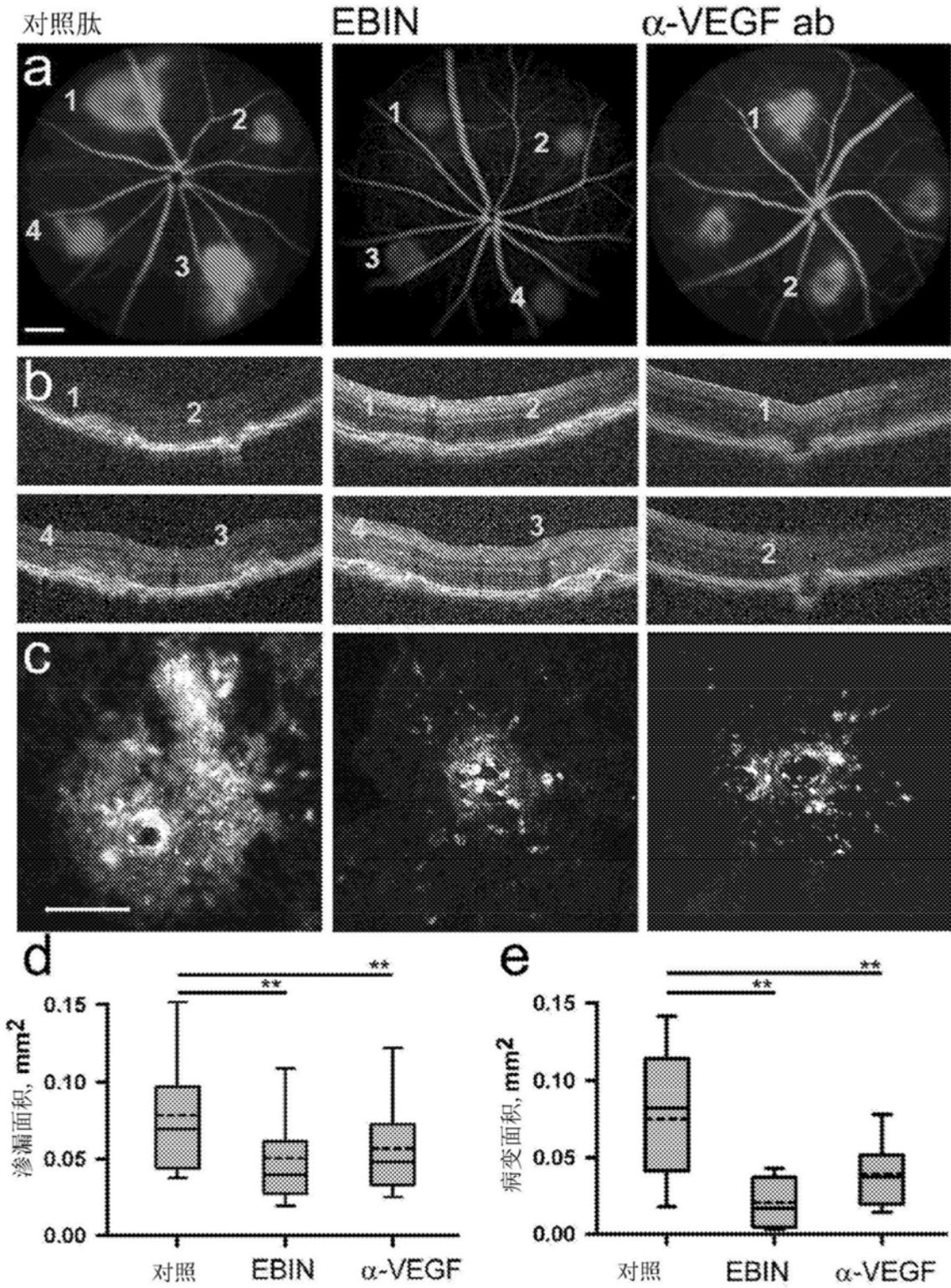


图11

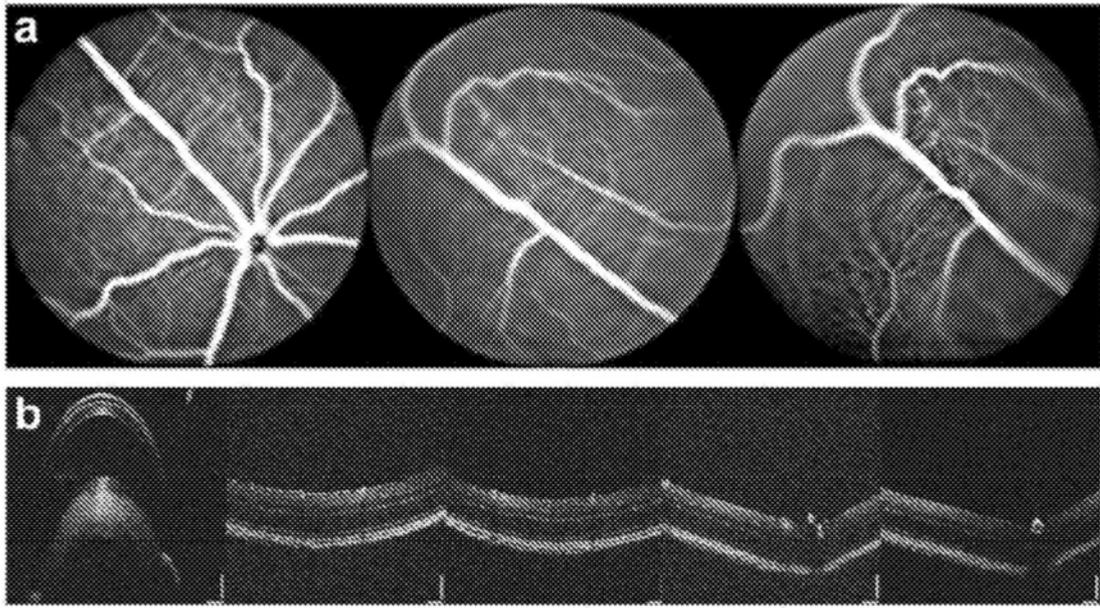


图12