



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102482323 A

(43) 申请公布日 2012. 05. 30

(21) 申请号 201080035995. 5

A61K 38/08 (2006. 01)

(22) 申请日 2010. 02. 12

(30) 优先权数据

10-2009-0075142 2009. 08. 14 KR

(85) PCT申请进入国家阶段日

2012. 02. 13

(86) PCT申请的申请数据

PCT/KR2010/000907 2010. 02. 12

(87) PCT申请的公布数据

W02011/019123 EN 2011. 02. 17

(71) 申请人 因首太克株式会社

地址 韩国大田

(72) 发明人 金海镇 文银贞 金亮瑄 权永准

(74) 专利代理机构 北京律诚同业知识产权代理

有限公司 11006

代理人 梁挥

(51) Int. Cl.

C07K 7/06 (2006. 01)

A61P 35/00 (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 10 页

序列表 1 页 附图 2 页

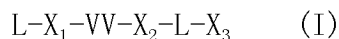
(54) 发明名称

新型肽及其应用

(57) 摘要

本发明提供了一种包括 SEQ ID NO :1 的氨基酸序列的肽、其变体及药学上可接受的盐。本发明的新型肽、其变体及药学上可接受的盐有效治疗和 / 或预防退变性椎间盘疾病, 治疗身体器官纤维化、治疗癌症和 / 或治疗肾小球硬化症, 并且有效抑制 TGF- β 1 信号途径。

1. 一种包括 SEQ ID NO :1 的氨基酸序列的肽或其变体或药学上可接受的盐。
2. 根据权利要求 1 所述的肽或其变体或药学上可接受的盐,其中所述肽或其变体具有通式 (I)



其中 :X₁ 是 Q 或 N ;X₂ 是 Y、F 或 W ;X₃ 是 H、K 或 R ;L 是亮氨酸、Q 是谷氨酰胺、N 是天冬酰胺、V 是缬氨酸、Y 是酪氨酸、F 是苯丙氨酸、W 是色氨酸、H 是组氨酸、K 是赖氨酸以及 R 是精氨酸。

3. 一种治疗和预防退变性椎间盘疾病的组合物,所述组合物包括权利要求 1 或 2 所述的肽或其变体或药学上可接受的盐。

4. 一种治疗身体器官纤维化的组合物,所述组合物包括权利要求 1 或 2 所述的肽或其变体或药学上可接受的盐。

5. 根据权利要求 4 所述的组合物,其中身体器官纤维化的治疗是通过抑制 TGF-β 1 信号途径来进行的。

6. 一种治疗癌症的组合物,所述组合物包括权利要求 1 或 2 所述的肽或其变体或药学上可接受的盐。

7. 根据权利要求 6 所述的组合物,其中癌症的治疗是通过抑制 TGF-β 1 信号途径来进行的。

8. 一种治疗肾小球硬化症的组合物,所述组合物包括权利要求 1 或 2 所述的肽或其变体或药学上可接受的盐。

9. 根据权利要求 8 所述的组合物,其中肾小球硬化症的治疗是通过抑制 TGF-β 1 信号途径来进行的。

10. 权利要求 1 或 2 所述的肽或其变体或药学上可接受的盐作为药物的应用。

11. 权利要求 1 或 2 所述的肽或其变体或药学上可接受的盐在制备用于治疗 and 预防退变性椎间盘疾病的药物中的应用。

12. 权利要求 1 或 2 所述的肽或其变体或药学上可接受的盐在制备用于治疗身体器官纤维化的药物中的应用。

13. 权利要求 1 或 2 所述的肽或其变体或药学上可接受的盐在制备用于治疗癌症的药物中的应用。

14. 权利要求 1 或 2 所述的肽或其变体或药学上可接受的盐在制备用于治疗肾小球硬化症的药物中的应用。

15. 一种治疗以及预防退变性椎间盘疾病的方法,包括向受试者给予权利要求 1 或 2 所述的肽或其变体或药学上可接受的盐。

16. 一种治疗身体器官纤维化的方法,包括向受试者给予权利要求 1 或 2 所述的肽或其变体或药学上可接受的盐。

17. 一种治疗癌症的方法,包括向受试者给予权利要求 1 或 2 所述的肽或其变体或药学上可接受的盐。

18. 一种治疗肾小球硬化症的方法,包括向受试者给予权利要求 1 或 2 所述的肽或其变体或药学上可接受的盐。

新型肽及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及有效治疗和 / 或预防退变性椎间盘疾病、治疗身体器官纤维化、治疗癌症、治疗肾小球硬化症或类似疾病的新型肽。

背景技术

[0002] 退变性椎间盘疾病 (DDD) 是慢性下背疼痛的原因,是一种伴随下背疼痛的病理状态,由于椎间盘(特别是在髓核中)老化脱水,使椎间盘退变或椎间盘缩短,从而导致椎间盘的破裂和裂纹,因此引起所述下背疼痛。椎间盘退变的特征在于异常的神经增加和血管增生,以及细胞数量和功能的变化(细胞簇生成、坏死、凋亡等)。退变的椎间盘的分子学特征之一是聚集蛋白聚糖的减少。聚集蛋白聚糖对椎间盘的承重起重要作用,聚集蛋白聚糖的丢失导致椎间盘渗透压下降从而不再能保持水分,因此加剧了既有的椎间盘退变,椎间盘包括存在的纤维环,并对其他的脊柱结构和功能产生重大的影响,如小面关节和黄韧带退变和肥大。

[0003] 作为目前治疗包括退变性椎间盘疾病的病理性慢性下背疼痛的疗法,有包括止痛、康复训练治疗及类似的医疗方法。遗憾的是,这些治疗方法都遭遇疾病频繁复发,需要花长时间和巨大的努力来治疗有关的疾病,以及由于延长的药物治疗引起的可能的并发症的风险。

[0004] 如果即使用这种长期的、保守的疗法治疗疾病后,仍没有良好的效果,患者将不可避免地接受手术疗法。典型的手术治疗包括常规的腰椎融合手术以及最近设计的人造椎间盘嵌入,常规的腰椎融合手术包括彻底去除受影响的椎间盘组织以及将骨移植物嵌入到目标损伤部位。然而,这些手术方法具有各种缺陷,例如相对昂贵并且还有手术引起的手术早期和晚期并发症的潜在的风险。例如,由于邻近的椎间盘的退变,腰椎融合手术往往需要定期重做。为了减小这种缺点而研发的人造椎间盘在长期的后续研究中并没有提供令人满意的结果。所以,目前并没有普遍进行人造椎间盘手术。如上所述,治疗由退变性椎间盘疾病引起的慢性下背疼痛非常困难。为了处理这种情况,作为保守疗法和手术疗法的替换方法,已经尝试了各种实验性的疗法,以在使椎间盘自身的退变最小化的同时实现椎间盘再生。

[0005] 近年来,已经尝试了一些治疗椎间盘退变的生物疗法,例如,上调重要的基质蛋白质(例如聚集蛋白聚糖)生成的方法、下调由促炎细胞因子(例如白介素-1(IL-1)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α))诱导的分解代谢的方法(Ahn, SH et al., Spine 27 :911-917, 2002 ; Burke JG et al., Spine 28 :2685-2693, 2003 ; Kang JD et al., Spine 21 :271-277, 1996 ; Weiler C et al., Spine 30 :44-53, 2005 ; Igarashi T et al., Spine 25 :2975-2980, 2000 ; Olmarker K et al., Spine 23 :2538-2544, 1998 ; Le Maitre CL et al., Arthritis Res Ther 7 :R732R745, 2005 ; 以及 Seguin CA et al., Spine 30 :1940-1948, 2005)。

[0006] 这些生物治疗方法主要一直在国外进行。引起极大兴趣的、受欢迎的方法是直接将骨生长因子(骨形态发生蛋白, BMP)注射到椎间盘里或移植注射了治疗基因的椎间盘细胞(Masuda K et al., Spine 31 :742-745, 2006 ; Imai Y et al., Spine 32 :1197-1205,

2007 ;Zhang Y et al., Spine 33 :831-838, 2008)。然而,这种方法仅仅是一种通过人体再生达到椎间盘结构的物理改变的方法,并不能缓解或解除患者的疼痛,并且如果椎间盘过度生长,由于挤压到神经,可导致神经状态的恶化。

[0007] 同时,已知 TGF- β 1 信号途径与纤维化、凋亡、血管再生、肿瘤细胞的侵入和转移有关,因此抑制 TGF- β 1 信号途径可能是治疗身体器官纤维化、癌症和 / 或肾小球硬化症的可行措施 (Prud' homme GJ, Lab Invest 87 :1077-1091, 2007)。

[0008] 为此,需要研发新的生物材料,所述新的生物材料通过在使椎间盘自身的退变最小化的同时促进椎间盘再生而对退变性椎间盘疾病有疗效,且并能够通过抑制 TGF- β 1 信号途径来治疗身体器官纤维化、癌症、肾小球硬化症、或类似的疾病。

发明内容

[0009] 技术问题

[0010] 本发明意图提供一种能够在使椎间盘自身的退变最小化的同时,促进椎间盘再生的新型肽。

[0011] 进一步地,本发明意图提供一种治疗身体器官纤维化、癌症、或肾小球硬化症的有效组合物。

[0012] 技术方案

[0013] 本发明提供一种包括 SEQ ID NO :1 的氨基酸序列 (LQVVYLH) 的肽或其变体或药学上可接受的盐。

[0014] 在 SEQ ID NO :1 的氨基酸序列中, L、Q、V、Y 和 H 分别代表亮氨酸 (Leu)、谷氨酸 (Gln)、缬氨酸 (Val)、酪氨酸 (Tyr) 和组氨酸 (His)。

[0015] 所述肽的各个氨基酸组分可以是 L 型、D 型、和 / 或 DL 型,它们都包含在本发明的肽的氨基酸组分中。

[0016] 变体是一种形式,其中本发明的肽结构由于自发变化或人工变化而部分地改变且同时不引起肽的主要活性的任何改变。例如,可以是此种形式,即,其中 SEQ ID NO :1 的氨基酸序列中的谷氨酰胺、酪氨酸和组氨酸中的一个或多个氨基酸被其它氨基酸替代。优选的一种形式是在 SEQ ID NO :1 的氨基酸序列中用天冬酰胺替代谷酰胺、用苯丙氨酸或色氨酸替代酪氨酸,和 / 或用赖氨酸或精氨酸替代组氨酸。谷氨酰胺和天冬酰胺属于含有末端酰胺基的氨基酸组。酪氨酸、苯丙氨酸和色氨酸属于含有芳香侧链的芳香氨基酸组。组氨酸、赖氨酸和精氨酸属于含有强极性侧链的碱性氨基酸组,所述极性侧链使它们高度亲水。同组的氨基酸被认为具有相同或相似的生化特征 (大小、形状、电荷、形成氢键的能力或化学反应性)。

[0017] 肽及其变体可具有通式 (I) :

[0018] $L-X_1-VV-X_2-L-X_3$ (I)

[0019] 其中, X_1 是 Q 或 N ; X_2 是 Y、F 或 W ; X_3 是 H、K 或 R ; L 是亮氨酸、Q 是谷氨酰胺、N 是天冬酰胺、V 是缬氨酸、Y 是酪氨酸、F 是苯丙氨酸、W 是色氨酸、H 是组氨酸、K 是赖氨酸以及 R 是精氨酸。

[0020] 药学上可接受的盐的实例可包括氯化物、硫酸盐、磷酸盐、乳酸盐、马来酸盐、延胡索酸盐、草酸盐、甲磺酸盐、对甲苯磺酸盐等。

[0021] 进一步地,本发明提供一种本发明的肽或其变体或药学上可接受的盐的医药的应用。医药应用包括退变性椎间盘疾病的治疗和 / 或预防应用、身体器官纤维化的治疗应用、癌症的治疗应用,和肾小球硬化症的治疗应用。通过抑制转化生长因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) 的信号途径来治疗身体器官纤维化、癌症、或肾小球硬化症。

[0022] 已知 TGF- β 是一种高度多效性的细胞因子,在细胞凋亡调控、血管再生、伤口愈合、免疫调节和肿瘤生物学中起重要作用。TGF- β 存在三种亚型:TGF- $\beta 1$ 、TGF- $\beta 2$ 和 TGF- $\beta 3$ 。三种亚型都使用相同的受体。TGF- β 受体具有三个组分:I 型 (RI 或 ALK5)、II 型 (RII) 和 III 型 (RIII 或 β 聚糖)。TGF- β (所有亚型) 结合 RIII 并募集 RII,然后使 RI 磷酸化以形成异型四聚体丝氨酸 / 苏氨酸蛋白激酶复合物。RI 依次使 Smad2 和 Smad3 (受体关联的 Smads (R-Smads)) 磷酸化,然后与 Smad4 形成异聚复合物,所述异聚复合物转位到细胞核中与 DNA 结合并调节转录 (Prud' homme GJ, Lab Invest 87:1077-1091, 2007)。

[0023] 本发明使用术语“抑制 TGF- $\beta 1$ 信号途径”是指 TGF- $\beta 1$ 未能结合受体,然后 Smad2 和 Smad3 未能经历磷酸化,因此未能与 Smad4 形成复合物,结果该复合物未能转位到细胞核中和调节转录。

[0024] 本发明提供一种治疗和 / 或预防退变性椎间盘疾病的组合物,所述组合物包括本发明的肽或其变体或药学上可接受的盐。

[0025] 进一步地,本发明提供一种治疗身体器官纤维化的组合物,所述组合物包括本发明的肽或其变体或药学上可接受的盐。

[0026] 进一步地,本发明提供一种治疗癌症的组合物,所述组合物包括本发明的肽或其变体或药学上可接受的盐。

[0027] 进一步地,本发明提供一种治疗肾小球硬化症的组合物,所述组合物包括本发明的肽或其变体或药学上可接受的盐。

[0028] 本发明的肽能够通过常用于肽合成的方法来制备。例如,所述肽能够通过 Schroder 和 Lubke (The Peptides, Vol. 1, Academic Press, New York, 1965) 所述的那些方法及类似的方法来制备,并且能够通过液相合成法或固相合成法来制备。

[0029] 形成肽键的方法的实例包括叠氮物法、酰氯法、对称酸酐法、混合酸酐法、碳二亚胺法、碳二亚胺-添加剂法、活化酯法、羰基二咪唑法、氧化-还原法和使用伍德沃德氏试剂 K 的方法。在肽的合成中,能够通过使用胱氨酸衍生物来形成胱氨酸基团,或通过常规方法形成肽链后,使肽链中的半胱氨酸基团转化成胱氨酸基团。

[0030] 进行合成反应之前,能够将不参与反应的羧基、氨基、胍基、羟基等基团保护起来,并且能够通过本领域已知的方法将参与合成反应的羧基和氨基活化。

[0031] 羧基的保护基团的实例可包括形成酯的基团,例如甲基、乙基、苯甲基、对硝基苯甲基、叔丁基和环己基。

[0032] 氨基的保护基团的实例可包括苯甲基氧羰基、叔丁氧羰基、异冰片基氧羰基和 / 或 9- 芴甲氧羰基。

[0033] 胍基的保护基团的实例可包括硝基、苯甲基氧羰基、甲苯磺酰基、对甲氧苯磺酰基和 / 或 4- 甲氧基-2,3,6- 三甲基苯磺酰基。

[0034] 羟基的保护基团实例可包括叔丁基、苯甲基、四氢吡喃基和 / 或乙酰基。

[0035] 羧基活化形式的实例可包括对称的酸酐、叠氮物和活化酯 (与醇形成的酯,例如

五氯苯酚、2,4-二硝基酚、羟基乙腈、对硝基酚、N-羟基-5-降冰片烯-2,3-二甲酰亚胺、N-羟基琥珀酰亚胺、N-羟基邻苯二甲酰亚胺和1-羟基苯并三唑)。

[0036] 活化的氨基的一个实例是磷酸胺。

[0037] 反应在诸如氯仿、二氯甲烷、乙酸乙酯、N,N-二甲基甲酰胺、二甲亚砜、嘧啶、二氧杂环己烷、四氢呋喃、水、甲醇或它们的混合物的溶剂中进行。

[0038] 反应的温度可在大约-30至50°C的所述反应通常采用的范围内。

[0039] 去除本发明的肽的保护基团的反应可根据保护基团的类型而不同,但应该是能够去除保护基团且不带给肽键合任何影响的反应。

[0040] 保护基团能够通过酸处理来去除,例如用氯化氢、溴化氢、氟化氢、甲磺酸、三氟甲磺酸、三氟醋酸或这些酸的混合物进行处理。进一步地,能够用液态氨中的金属钠进行还原或用钨碳进行催化还原。

[0041] 在通过上述酸处理来去除保护基团的反应中,可采用诸如苯甲醚、苯酚或茴香硫醚的添加剂。

[0042] 反应完成之后,本发明所制备的肽能够通过肽纯化的常规工艺进行回收,例如,提取、分配、再沉淀、再结晶或柱层析。

[0043] 进一步地,能够用常规的方法将本发明的肽转化成如上所述的肽的变体、或肽的药学上可接受的盐。

[0044] 本发明的肽可通过自动肽合成仪合成,或可通过基因工程技术生成。例如,可以通过基因操作来制备编码融合蛋白的融合基因,所述融合蛋白由融合伴侣和本发明的肽组成,用所述融合基因转染寄主微生物,在寄主微生物中以融合蛋白的形式表达期望的肽,并用蛋白酶或化合物从融合蛋白中分开并分离本发明的肽。

[0045] 本发明使用的氨基酸根据 IUPAC_IUB 命名法,缩写如下:

[0046]

| 氨基酸 | 缩写 |
|------|----|
| 丙氨酸 | A |
| 精氨酸 | R |
| 天冬酰胺 | N |
| 天冬氨酸 | E |
| 半胱氨酸 | C |
| 谷氨酸 | D |
| 谷氨酰胺 | Q |
| 甘氨酸 | G |
| 组氨酸 | H |
| 异亮氨酸 | I |
| 亮氨酸 | L |
| 赖氨酸 | K |
| 甲硫氨酸 | M |
| 苯丙氨酸 | F |
| 脯氨酸 | P |
| 丝氨酸 | S |
| 苏氨酸 | T |
| 色氨酸 | W |
| 酪氨酸 | Y |
| 缬氨酸 | V |

[0047] 所述肽或其变体或药学上可接受的盐的剂量范围为每天 50 μ g 至 1mg, 优选非经肠道给药每天 0.5mg 至 1mg。对于口服给药, 剂量是非经肠道给药剂量的 1.2 至 1.5 倍。对于直肠给药, 剂量是非经肠道给药剂量的 2 至 5 倍。本发明的肽主要是通过非经肠道途径给药, 例如局部注射 (针对退变性椎间盘疾病的椎间盘内注射, 以及针对其它身体器官纤维化和癌症的局部病灶内注射)、静脉 / 肌肉或皮下注射、脑室内或脊柱内给药或经鼻给药和直肠内给药。进一步地, 如果需要, 可采用口服给药。

[0048] 本发明的肽或组合物, 与药学上可接受的载体结合能够配制成期望的剂型, 例如注射剂、栓剂、散剂、鼻滴剂、颗粒剂、片剂等。

[0049] 药学上可接受的载体能够根据本领域技术人员公知的若干因素来制备, 例如, 考虑到以下非限制性的因素: 要使用的特殊生理活性的材料及其浓度、稳定性和预期的生物利用度; 治疗的疾病、失调或健康状况; 治疗的受试者及其年龄、体重和整体状况; 以及组

合物的预期的给药途径,例如经鼻的、口服的、经眼的、局部的、经皮的和肌肉内的。通常,除口服施药途径外,用于生理活性材料给药的、药学上可接受的载体的实例可包括 D5W(5%葡萄糖水),一种含有 5% 体积或更少的葡萄糖的水溶液,以及生理盐水。如果是局部病灶内注射,可用各种可注射的水凝胶来加强治疗效果和增长药效的持续时间。此外,药学上可接受的载体可含有能够增强活性成分的稳定性的额外成分,例如防腐剂和抗氧化剂。优选地,根据要治疗的疾病和组合物的组分,用本领域公知的任何适当的方法,例如“Remington's Pharmaceutical Sciences”(Mack Publishing Co., Easton, PA(最新版本))中公开的方法,可将本发明的肽或组合物配制成期望的剂型。

[0050] 本发明的肽能够贮存在生理盐水溶液中,并且加入甘露醇和山梨醇后,能够在安瓿中冷冻干燥。使用前可将已冷冻干燥的肽溶解在生理盐水或类似物中进行复原。

[0051] 进一步地,本发明提供作为药物的一种肽或其变体或药学上可接受的盐。

[0052] 进一步地,本发明提供一种肽或其变体或药学上可接受的盐作为药物的应用,所述药物治疗和/或预防退变性椎间盘疾病、身体器官纤维化、癌症和/或肾小球硬化症。

[0053] 进一步地,本发明提供一种治疗和/或预防退变性椎间盘疾病、身体器官纤维化、癌症和/或肾小球硬化症的方法,包括向受试者(哺乳动物,包括人类)给予本发明的肽或其变体或药学上可接受的盐。

[0054] 可通过抑制 TGF- β 1 信号途径来治疗身体器官纤维化、癌症、和/或肾小球硬化症。

[0055] 有益效果

[0056] 本发明的新型肽或其变体或药学上可接受的盐有效治疗和/或预防退变性椎间盘疾病、身体器官纤维化、癌症和/或肾小球硬化症,并且有效抑制 TGF- β 1 信号途径。

附图说明

[0057] 图 1 示出正常椎间盘组织、给予了 DMSO 的退变性椎间盘组织、以及给予了实施例 1 的肽的退变性椎间盘组织染色后所摄的图片。

[0058] 图 2 示出表示与作为参照的正常椎间盘组相比较,在椎间盘退变性模型中,给予了 DMSO 的退变性椎间盘组的以及给予了实施例 1 的肽的退变性椎间盘组的聚集蛋白聚糖基因的表达水平的图。

[0059] 图 3 示出蛋白质印迹分析的结果,所述蛋白质印迹分析用来证实在未处理的 HepG2 细胞中、在 TGF- β 1 处理的细胞中、在 TGF- β 1/SB431542 处理的细胞中、在 TGF- β 1/实施例 1 的肽处理的细胞中,以及在 TGF- β 1/DMSO 处理的细胞中表达的磷酸化的 Smad2。

具体实施方式

[0060] 现在,将参考以下实施例,更详细地描述本发明。提供这些实施例仅用来说明本发明,并不应理解为限制本发明的范围和精神。

[0061] 实施例 1:肽的制备

[0062] Pepton 公司(韩国)在本发明人的要求下制备具有 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列的肽(LQVVYLH:SEQ ID NO:1)。具体地,通过 Fmoc SPPS(9-芴甲氧羰基固相多肽合成法),使用自动肽合成仪(ASP48S, Pepton 公司)从 C 末端起将氨基酸单元一个一个地连接。

[0063] 采用 $\text{NH}_2\text{-His(Trt)-2-氯代-三苯甲基树脂}$, 其中肽的 C 末端的第一个氨基酸粘附到树脂上。用于合成肽的所有氨基酸都是用三苯甲基 (Trt)、叔丁氧羰基 (Boc)、叔丁基 (t-Bu) 等保护的氨基酸, 因此 N 末端是用 9- 芴甲氧羰基进行保护的, 并在酸中去除所有残基。采用 2-(1H- 苯并三唑-1-基)-1,1,3'-3'-四甲基硫尿六氟磷酸盐 (HBTU)/ 羟基苯并三唑 (HOBt)/N- 甲基吗啉 (NMM) 作为偶联剂。(1) 将被保护的氨基酸 (8 当量) 和偶联剂 HBTU (8 当量)/HOBt (8 当量)/NMM (16 当量) 溶解于二甲基甲酰胺 (DMF) 中, 在室温下反应 2 小时。(2) 通过加入含 20% 吡啶的 DMF, 然后在室温下反应 5 分钟, 并重复两次来去除 9- 芴甲氧羰基。重复进行反应 (1) 和 (2) 以制备基本的肽骨架, 并用三氟醋酸 (TFA)/1, 2- 乙烷二硫醇 (EDT)/ 苯硫基甲烷 / 三异丙基硅烷 (TIS)/ $\text{H}_2\text{O} = 90/2.5/2.5/2.5/2.5$ 将肽与树脂分离。通过反相高压液相色谱, 使用 Vydac Everest C18 柱 (250mm 22mm, 10 μm) 来纯化肽, 然后通过含 0.1% (v/v) 三氟醋酸的水-乙腈线性梯度 (10-75% (v/v) 的乙腈) (洗脱) 进行分离。使用 LC/MS (Agilent HP1100 series) 来确认已纯化的肽的分子量, 然后进行冷冻干燥。

[0064] 实施例 2: 椎间盘的再生效果的确认

[0065] 2-1、制备椎间盘退变的动物模型以及收集实验的椎间盘

[0066] 准备 30 只重 3 至 3.5kg 的兔 (新西兰白兔, Orient Bio 公司), 不论雌雄。

[0067] 向兔通过肌肉注射 5mg/kg 的甲苯噻嗪 (Rompun, Bayer) 以及 35mg/kg 的盐酸氯胺酮 (Ketalar, Pfizer) 进行麻醉。程序开始之前, 先用荧光检查装置 (型号 VPX-200; Toshiba 公司) 获得侧位 X 光片以确立椎间盘的注射前基线高度。基线对照是指用于椎间盘间隙的测量的标准。将兔放置在实验桌上后, 用所述仪器确认椎间盘节段 L23、L34、L45 和 L56, 并用 18G 的针将纤维环刺入到椎间盘节段 L23、L45 和 L56 的后侧。动物从麻醉中复苏后, 在以下条件下饲养于笼子中: 温度为 20 至 25°C、湿度为 10% 至 50%、以及明/暗 (L/D) 周期: (08:00a. m. 至 20:00p. m. 为明)。所有动物每天喂食一次。在初次刺环后的 2 和 4 周拍摄 X 光片。X 光片在麻醉后拍摄。根据 X 光片的结果, 测得椎间盘高度 (IVD 高度)。由测量的结果, 通过对 Lu 等公开的方法 (Spine. 22:1828-34, 1997.) 的改进对椎间盘的退变程度进行定量。

[0068] 此后, 对两个独立的组, 即给予了 DMSO 的对照组和给予了实施例 1 的肽的实验组进行实验, 并根据计划的时间表, 通过注射克他命 (25mg/kg) 和戊巴比妥钠 (1.2g/kg, Nembutal, Ovation) 将兔无痛处死, 然后取出椎间盘分别进行组织学分析和生物化学分析。

[0069] 2-2、通过椎间盘组织染色来测定椎间盘的再生效果

[0070] 将 2-1 节中的椎间盘退变的兔分成两组。一组通过两次局部椎间盘内注射给予二甲基亚砷 (DMSO) (0.5mM/只), 一组通过两次局部椎间盘内注射给予实施例 1 的肽 (0.5mM/只)。每组的给药时间点是在诱导椎间盘退变后 4 周和再往后 2 周。第二次给药后, 动物分别饲养 2、4 和 8 周。在初次分别给予实施例 1 的肽和 DMSO 后的 4、6 和 10 周, 取出相应的各个椎间盘组织并固定在福尔马林中。将已固定的椎间盘组织埋入石蜡中, 然后制备沿矢状面有 4 μm 厚的连续切片。这些切片中的两个中间矢状面切片用苏木素与伊红 (H&E) 进行染色。为了与正常的椎间盘组织对比, 根据上述相同的方法, 从未经椎间盘退变诱导的兔中取出椎间盘、进行处理并染色。

[0071] 图 1 是在第 10 周时取出和染色的单个椎间盘组织的显微结果。A 和 B: 正常椎间

盘组织, C 和 D : 给予了 DMSO 的退变的椎间盘组织, 以及 E 和 F : 给予了实施例 1 的肽的退变的椎间盘组织。A、C 和 E : 40 倍放大, B、D 和 F : 400 倍放大。在 400 倍放大的图片中, 箭头指示椎间盘细胞核。

[0072] 结果, 观察到在正常椎间盘细胞中可明确区分髓核和纤维环, 而且有大量的细胞外基质成分 (图 1 中的 A 和 B)。另外, 在正常的椎间盘组织中观察到细胞核独特的染色 (图 1 中的 B)。

[0073] 另一方面, 给予了 DMSO 的椎间盘组织显示出椎间盘的缩小、纤维环和髓核间模糊不清, 而且细胞外基质成分稀少 (图 1 中的 C 和 D)。进一步地, 在髓核区域难以找到染色的细胞核 (图 1 中的 D)。即, 这些结果表明曾经存在于髓核里的是死细胞。已知细胞死亡是由于椎间盘退变, 且细胞的缺乏导致无细胞外基质成分的生成, 因此进一步恶化椎间盘退变。

[0074] 给予了实施例 1 的肽的椎间盘组织与给予了 DMSO 的椎间盘组织相比, 显示出椎间盘增大、显示出可辨别髓核和纤维环、且有大量的细胞外基质成分 (图 1 中的 E 和 F)。此外, 在髓核区域观察到细胞核的鲜艳的染色 (图 1 中的 F)。

[0075] 这些结果证明实施例 1 的肽通过防止由于椎间盘退变导致的细胞外基质成分的减少和细胞死亡而具有治疗椎间盘的效果。

[0076] 实施例 3 : 椎间盘组织中聚集蛋白聚糖的基因表达增强的确认

[0077] 进行实时 PCR 以检测聚集蛋白聚糖基因的表达水平, 所述聚集蛋白聚糖是椎间盘组织中的代表性的细胞外基质成分。

[0078] 以与实施例 2-1 中的方法相同的方法准备动物并分成两组, 一组通过局部椎间盘内注射给予 DMSO (0.5mM/ 只), 一组通过局部椎间盘内注射给予实施例 1 的肽 (0.5mM/ 只)。各组的给药时间点是在椎间盘退变诱导后 4 周和再往后 2 周, 第二次给药后, 动物分别饲养 2、4 和 8 周。在初次分别给予实施例 1 的肽和 DMSO 后的第 4、6 和 10 周, 取出相应的各个椎间盘组织, 将髓核和纤维环分离并放置在试管中, 然后在液氮中快速冷冻并贮存在 -70°C 的超低温冰箱中。

[0079] 用 Trizol 试剂 (Invitrogen) 从被快速冷冻并贮存的椎间盘组织中提取总 RNA。用提取的总 RNA (2 μg)、寡脱氧胸苷酸 (oligo dT) 以及 MMLV- 反转录酶 (Invitrogen) 合成 cDNA。

[0080] 用 Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems 公司), 通过 Prism 7900HT (ABI) 来检测 GAPDH 和聚集蛋白聚糖的 mRNA 的量。将 25ng 的 cDNA、3 μl 的 10 μM 引物以及 2 \times PowerSYBR Green PCR Master Mix 混合, 使总体积为 10 μl 。在以下反应条件下进行实时 PCR : 在 50°C 下 2 分钟并且在 95°C 下 10 分钟以诱导酶活性 ; 然后进行 45 个循环, 每个循环由在 95°C 下 15 秒的反应和在 60°C 下 1 分钟的反应组成 ; 然后是测量各阈值循环 (CT) 值。选择 GAPDH 作为对照基因, 并计算对照基因和聚集蛋白聚糖之间的 CT 值差异 (ΔCT)。此外, 还计算了正常椎间盘和给予了实施例 1 的肽的椎间盘 (或给予了 DMSO 的椎间盘) 间的 CT 值差异 ($\Delta\Delta\text{CT}$)'。然后, 计算 $2^{(-\Delta\Delta\text{CT})}$ 并表达为相对于正常椎间盘数值的百分数。

[0081] 图 2 给出实时 PCR 的结果。图 2 是表示与作为参照的正常椎间盘组相比较, 在椎间盘退变模型中, 给予了 DMSO 的椎间盘组的以及给予了实施例 1 的肽的椎间盘组的聚集蛋

白聚糖基因表达水平随时间变化的图。如上述图所示,能够看出在 4 周时,与给予了 DMSO 的椎间盘组织相比较,给予了实施例 1 的肽的椎间盘组织显示出聚集蛋白聚糖基因表达的增强。在 6 周和 10 周时,给予了实施例 1 的肽的椎间盘组织显示出的聚集蛋白聚糖表达水平与给予了 DMSO 的椎间盘组织的相似。因为只在 0 周和 2 周时给予动物实施例 1 的肽,然后不再给药,所以可以说,在 4 周时的聚集蛋白聚糖基因表达的增强是由于实施例 1 的肽的效力所致,然而实施例 1 的肽的效力没有将聚集蛋白聚糖的基因表达维持到 6 周和 10 周。从这些结果能够看出,本发明的肽通过增强聚集蛋白聚糖的基因表达,显示出椎间盘再生的作用,所述聚集蛋白聚糖是椎间盘组织中对椎间盘再生非常重要的一种代表性细胞外基质成分;并且所述肽增强聚集蛋白聚糖基因表达的作用的持续时间不会过长,从而排除由于聚集蛋白聚糖基因表达过度增强而导致的可能的副作用。

[0082] 实施例 4 :TGF- β 1 信号途径抑制的确认

[0083] 按以下实验方法来确认实施例 1 的肽抑制 TGF- β 1 信号途径。

[0084] 已知用 TGF- β 1 处理 HepG2 细胞导致细胞凋亡,其间,Smad2 最先被磷酸化 (Park T.J. et al., Mol Carcinog. 47 :784-796,2008 ;以及 Gressner AM. et al., J Hepatol. 26 :1079-1092,1997)。利用这些性质,实验如下进行。将 1×10^6 个 HepG2 细胞 (ATCC ;美国标准生物品收藏中心) 接种于 60mm 的培养皿中,稳定过夜,然后用无血清的培养基 (SFM) 培养 24 小时以耗尽营养素。在用实施例 1 的肽处理细胞之前,将 5ng/mL 的 TGF- β 1 (PromoKine, 德国) 和上述肽 (1,5 和 25 μ M) 在 37 $^{\circ}$ C 下预孵化 1 小时。而且, DMSO (2 μ l/mL) 也和 TGF- β 1 (5ng/mL) 在 37 $^{\circ}$ C 下预孵化 1 小时。然后,用所述预孵化过的溶液处理细胞 30 分钟,然后提取蛋白质。此外,细胞仅用 10 μ M SB431542 (TOCRIS, 美国) 预先处理,然后孵化 1 小时,然后用 TGF- β 1 (5ng/mL) 处理 30 分钟,所述 SB431542 是 TGF- β 受体的抑制剂。然后,细胞在放射性免疫沉淀 (RIPA) 的裂解缓冲液 (Millipore) {50mM Tris-HCl (pH 7.4)、150mM NaCl、0.25% 去氧胆酸、1% NP-40、1mM 乙二胺四乙酸 (EDTA)、1mM 苯甲基磺酰氟 (PMSF)、40mM NaF、1mM Na_3VO_4 、1mM 二硫苏糖醇 (DTT)} 中、于冰上混匀。匀浆用 BRANSON SONIFIER 450 超声处理 5 次,输出控制为 2.56、占空比 (%) 为 20、时间设定为 6。细胞的裂解产物在 4 $^{\circ}$ C 下、12000rpm 离心 10 分钟,并将上清液用于蛋白质印迹分析。用 Bradford 法测定蛋白质浓度。将 30 μ g 的蛋白质加入到含 2- 巯基乙醇的 SDS 样品缓冲液中。在 95 $^{\circ}$ C 下放置 5 分钟后,用 10% 的 SDS-PAGE 进行分离,然后进行蛋白质印迹分析。为了进行蛋白质印迹分析,将分离的蛋白质转移到硝化纤维膜 (Bio-Rad Lab) 上,并用含 5% 脱脂牛奶的 PBS-T 进行封闭,然后与用含 5% 脱脂牛奶的 PBS-T、按 1 : 3000 稀释的第一抗体在 4 $^{\circ}$ C 下反应过夜。然后用 PBS-T 洗涤膜三次,每次 5 分钟,再用用含 5% 脱脂牛奶的 PBS-T、按 1 : 5000 稀释的辣根过氧化物酶 (HRP) 结合的抗兔第二抗体 (Bio-Rad Lab, 1706515) 在室温下处理 1 小时,并用 ECL (Amersham Pharmacia) 显色。因为 Smad2 最先被磷酸化的同时, TGF- β 1 与 TGF- β 受体结合,因此将能够检测磷酸化的 Smad2 的磷-Smad2 (ser465/467) 抗体 (Cell Signaling, 3101, 8) 用作第一抗体。

[0085] 结果在图 3 中示出。图 3 示出蛋白质印迹的结果 (泳道 1 :未处理的 HepG2 细胞 ;泳道 2 :TGF- β 1 处理的细胞 ;泳道 3 :TGF- β 1/SB431542 处理的细胞 ;泳道 4、5 和 6 :分别用 1、5 和 25 μ M 的肽 /TGF- β 1 处理的细胞 ;以及泳道 7 :TGF- β 1/DMSO 处理的细胞)。在图 3 中,符号 '+' 代表经对象材料处理的,和 '-' 代表未经对象材料处理的。图 3 的底部示出在

蛋白质印迹中使用的膜的考马斯蓝染色结果,表明所有泳道中的蛋白质的量是相同的。

[0086] 参照图 3,泳道 1 显示出提取自未处理的 HepG2 细胞的蛋白质的非常少的磷酸化,而泳道 2 显示出由于 TGF- β 1 的缘故导致的蛋白质的显著的磷酸化。此外,还观察到泳道 3 显示出 SB431542 完全抑制磷酸化。当分别用 1 μ M、5 μ M 和 25 μ M 浓度的实施例 1 的肽处理时,证实了磷酸化程度以剂量依赖的方式下降。DMSO 处理的泳道 7 显示出和 TGF- β 1 处理相同的谱图。

[0087] 从这些结果能够看出,由于本发明的肽显示出对 TGF- β 1 信号途径的剂量依赖性的抑制,所以能够治疗通过上述对 TGF- β 1 信号途径的抑制可治愈的疾病,例如身体器官纤维化、癌症、和 / 或肾小球硬化症 (Prud' homme GJ, Lab Invest 87 :1077-1091, 2007)。进一步地,能够看出实施例 1 的肽,不像 SB431542 那样完全抑制 TGF- β 1 信号途径。由于 TGF- β 1 信号途径是人体内重要的调节机制,像用 SB431542 那样对 TGF- β 1 信号途径完全抑制可导致副作用。然而,本发明的肽以剂量依赖的方式减弱 TGF- β 1 信号途径,因此当所述肽用于治疗相关疾病时,能够有利地调节所述肽的浓度,从而减少可能的副作用。

[0088] 工业应用

[0089] 本发明的新型肽或其变体或药学上可接受的盐有效地治疗和 / 或预防退变性椎间盘疾病、身体器官纤维化、癌症和 / 或肾小球硬化症,并有效抑制 TGF- β 1 信号途径,因此是工业适用的。

[0001]

1248-043. 11P4序列表

<110> 因首太克株式会社
<120> 一种新型肽及其应用
<130> 1248-043. 11P4
<160> 1
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(7)
<223> 肽

<400> 1
Leu Gln Val Val Tyr Leu His
1 5

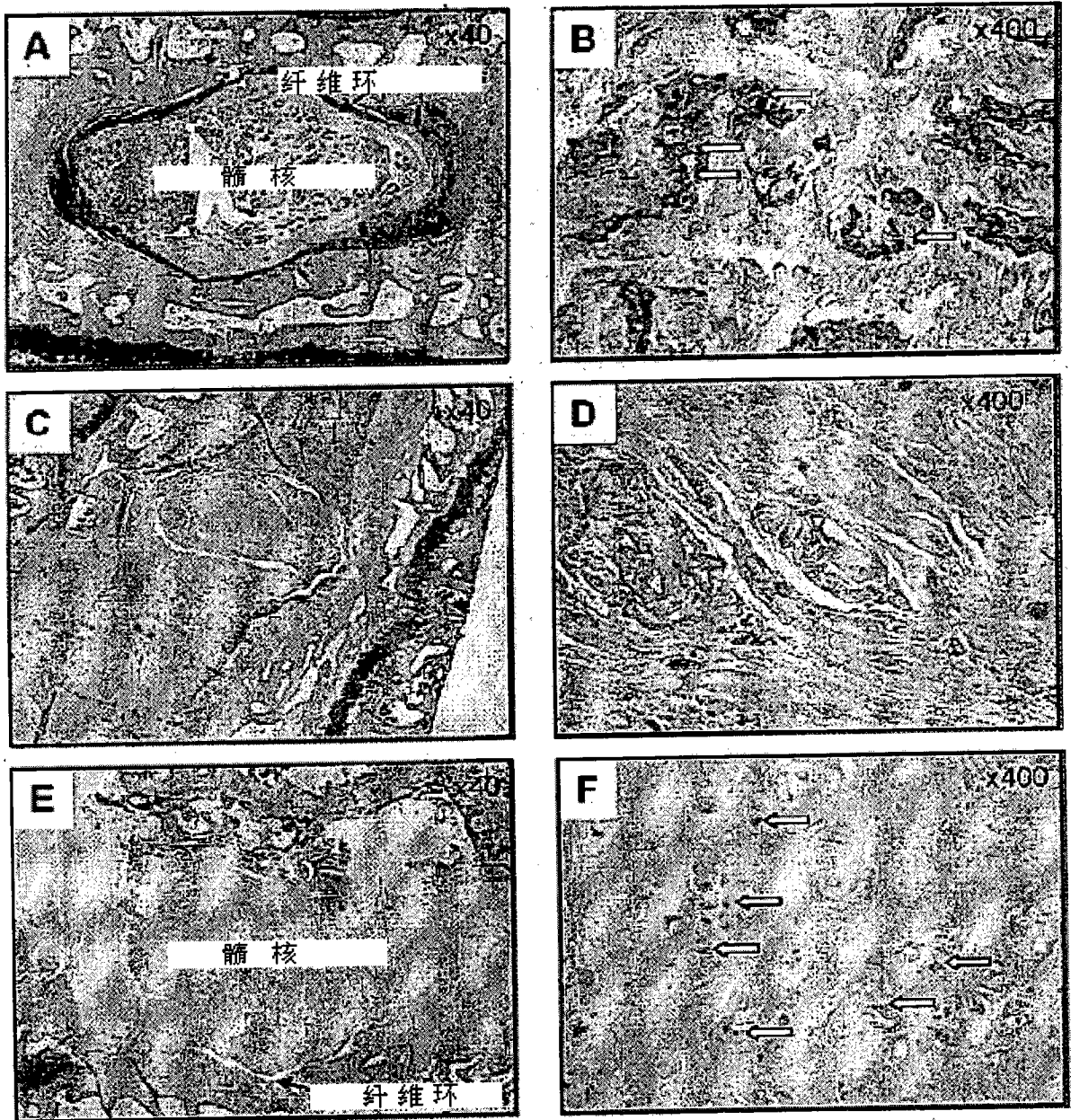


图 1

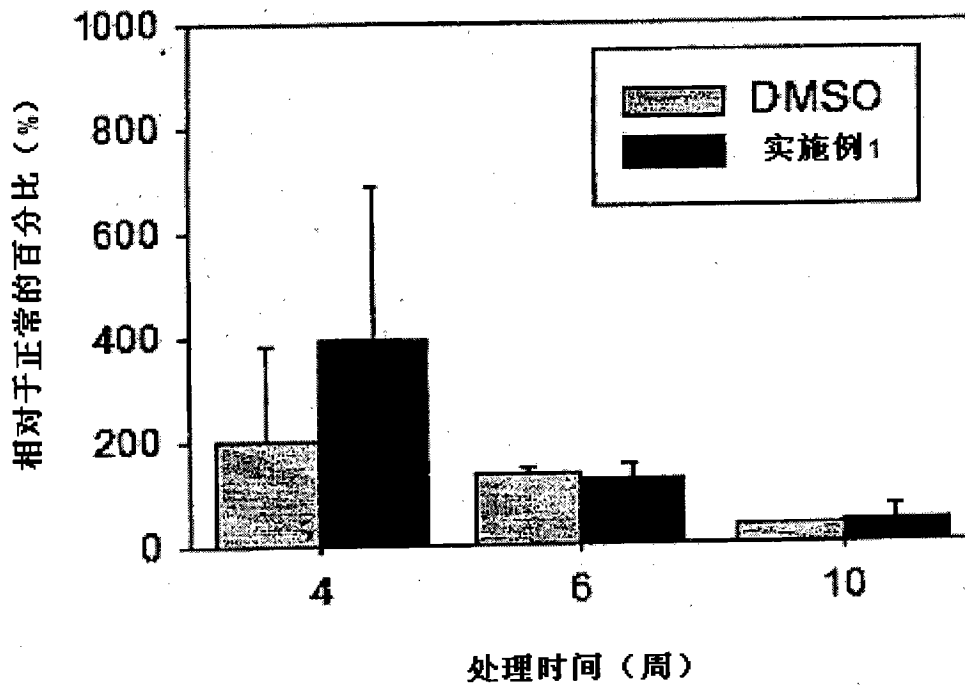


图 2

| | | | | | | | |
|------------------|---|---|---|---|---|----|---|
| TGF-β 1 (5ng/ml) | - | + | + | + | + | + | + |
| SB431542 (10μM) | - | - | + | - | - | - | - |
| 实施例1 (uM) | - | - | - | 1 | 5 | 25 | - |
| DMSO (2ul/ml) | - | - | - | - | - | - | + |

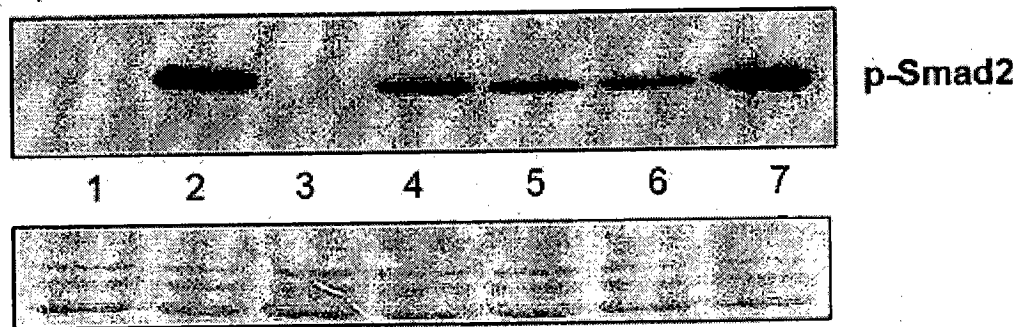


图 3