



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109862905 A

(43)申请公布日 2019.06.07

(21)申请号 201780042664.6

(74)专利代理机构 北京柏杉松知识产权代理事

务所(普通合伙) 11413

(22)申请日 2017.06.09

代理人 刘继富 王春伟

(30)优先权数据

16174056.8 2016.06.10 EP

(51)Int.Cl.

A61K 38/27(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

A61K 38/31(2006.01)

2019.01.22

A61K 9/00(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

A61K 31/728(2006.01)

PCT/EP2017/064196 2017.06.09

A61P 19/02(2006.01)

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/212057 EN 2017.12.14

(71)申请人 雷吉拉克西斯公司

权利要求书2页 说明书17页

地址 法国罗曼维尔

序列表5页 附图3页

(72)发明人 克劳德·卡雷利

克里斯泰勒·韦图
拉法埃洛·保利尼

(54)发明名称

用于治疗骨关节炎的肽

(57)摘要

本发明涉及包含序列SEQ ID NO:1的肽，其
用于治疗骨关节炎。

1. 一种肽，其包含氨基酸序列SEQ ID NO:1或其片段或变体，其中SEQ ID NO:1如下：

X₁-Tyr-X₂-Leu-X₃-Ala-GIy-X₄-Lys-Asn-Phe-Phe-X₅ (SEQ ID NO:1)

其中：

-X₁是空缺的，或是缬氨酸，或选自以下的序列：

Z₁-Val

Asp-Z₁-Val

Ser-Asp-Z₁-Val (SEQ ID NO:5)

Z₂-Ser-Asp-Z₁-Val (SEQ ID NO:6)，和

Gly-Z₂-Ser-Asp-Z₁-Val (SEQ ID NO:7)

其中Z₁是精氨酸，Z₂是苏氨酸，或Z₁是Ser-Asp或Ser-Asn，Z₂是丙氨酸；

-X₂是选自Glu-Lys、Glu-Ser和Asp-Leu的序列；

-X₃是空缺的，或是赖氨酸，或选自以下的序列：

Lys-Asp

Lys-Asp-Leu

Lys-Asp-Leu-Glu (SEQ ID NO:8)

Lys-Asp-Leu-Glu-Glu (SEQ ID NO:9)

Lys-Asp-Leu-Glu-Glu-Gly (SEQ ID NO:10)

Lys-Asp-Leu-Glu-Glu-Gly-Ile (SEQ ID NO:11)

Lys-Asp-Leu-Glu-Glu-Gly-Ile-Gln (SEQ ID NO:12)

Lys-Asp-Leu-Glu-Glu-Gly-Ile-Gln-Z₃ (SEQ ID NO:13)，和

Lys-Asp-Leu-Glu-Glu-Gly-Ile-Gln-Z₃-Leu (SEQ ID NO:14)

其中Z₃是丙氨酸或苏氨酸；

-X₄是选自半胱氨酸、丝氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、丙氨酸和甘氨酸的氨基酸残基；和

-X₅是空缺的，或是色氨酸残基，或选自以下的序列：

Trp-Lys

Trp-Lys-Thr

Trp-Lys-Thr-Phe (SEQ ID NO:15)

Trp-Lys-Thr-Phe-Thr (SEQ ID NO:16)

Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser (SEQ ID NO:17)

Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-X₆ (SEQ ID NO:18)，和

Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-X₆-Lys-Gln-Ala (SEQ ID NO:19)

其中X₆是选自半胱氨酸、丝氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、丙氨酸和甘氨酸的氨基酸残基；

其用于治疗对象中的骨关节炎。

2. 根据权利要求1所述之用途的肽，其中所述肽由11个至50个氨基酸残基、优选20个至30个氨基酸残基的氨基酸序列组成。

3. 根据权利要求1至2中任一项所述之用途的肽，其中：

-X₁是Gly-Z₂-Ser-Asp-Z₁-Val；和

-X₅是Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-X₆。

4. 根据权利要求1至3中任一项所述之用途的肽,其中所述肽包含序列SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:20:

-Gly-Ala-Ser-Asp-Ser-Asp-Val-Tyr-Asp-Leu-Leu-Ala-Gly-Ser-Lys-Asn-Phe-Phe-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-Ser (SEQ ID NO:2)

-Gly-Ala-Ser-Asp-Ser-Asp-Val-Tyr-Asp-Leu-Leu-Lys-Ala-Gly-Ser-Lys-Asn-Phe-Phe-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-Ser (SEQ ID NO:3)

-Gly-Thr-Ser-Asp-Arg-Val-Tyr-Glu-Lys-Leu-Ala-Gly-Ser-Lys-Asn-Phe-Phe-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-Ser (SEQ ID NO:4)

-Gly-Ala-Ser-Asp-Ser-Asn-Val-Tyr-Asp-Leu-Leu-Lys-Ala-Gly-Ser-Lys-Asn-Phe-Phe-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-Ser (SEQ ID NO:20)。

5. 根据权利要求1至4中任一项所述之用途的肽,其中所述肽通过关节内注射施用到待治疗的关节。

6. 根据权利要求1至5中任一项所述之用途的肽,其中所述肽以在关节中最终浓度为10⁻³M至10⁻⁷M施用。

7. 一种药物组合物,其含有至少一种根据权利要求1至6中任一项所述之用途的肽和一种或多于一种药学上可接受的赋形剂。

8. 一种药物,其含有至少一种根据权利要求1至6中任一项所述之用途的肽。

9. 一种药物单位剂型,其含有至少一种根据权利要求1至6中任一项所述之用途的肽。

10. 根据权利要求9所述之用途的药物单位剂型,其中单位剂型是一次性的预填充、预定剂量的注射器,其用于在待治疗的关节处局部注射。

11. 根据权利要求7所述的药物组合物、根据权利要求8所述的药物、或根据权利要求9至10中任一项所述的药物单位剂型,还含有至少一种黏性补充剂。

12. 根据权利要求11所述的药物组合物、药物或药物单位剂型,其中所述至少一种黏性补充剂是透明质酸,优选其中所述透明质酸的浓度为0.1%至10%。

用于治疗骨关节炎的肽

技术领域

[0001] 本发明涉及骨关节炎的治疗。具体地，本发明涉及用于治疗骨关节炎的肽。

背景技术

[0002] 骨关节炎通常与一种使数百万人遭受痛苦的退行性关节疾病有关，导致关节软骨和潜在骨的破裂，引起有关对象关节疼痛、关节肿胀、僵硬和运动范围减小。虽然之前认为骨关节炎是衰老的正常结果，但现在认识到骨关节炎是由多种因素的复杂相互作用引起的结果，该因素包括关节完整性、遗传预先倾向性、局部炎症、机械作用力以及细胞和生化过程。在超过10%的病例中，损伤也会导致创伤后骨关节炎的发生，从而影响到任何年龄的个体。

[0003] 目前的治疗和研究针对减轻症状和预防残疾，但是没有有效和持久的药物治疗被证明可以预防由骨关节炎引起的关节损伤的进展。在目前可用的这些治疗中，身体活动被认为是治疗计划的重要部分。研究表明，简单的活动和/或伸展运动可以通过保持健康的体重和提高灵活性来减轻疼痛。超重确实会给承重关节如臀部、膝盖、脚和背部增加额外的压力。减肥可以帮助患有骨关节炎的人减轻疼痛并限制进一步的关节损伤。疼痛和抗炎药物，包括镇痛药、非甾体类抗炎药或皮质类固醇，也经常被考虑在缓解骨关节炎症状的治疗计划中。这些可以用作乳膏剂、片剂或关节内注射剂。最后，更严重的患者可以考虑手术选项如关节成形术、关节融合术或截骨术，来修复或更换受损的关节。

[0004] 最近，已开发出用于骨关节炎的基于细胞和生物学的疗法。例如，已经将自体软骨细胞移植用于治疗骨关节病数十年。基于软骨细胞的治疗已经显示出其能够减缓骨关节炎的进展并延迟关节置换手术，但是许多并发症仍然与如肥大、干扰融合、分层和移植失败有关。

[0005] 最后，基因疗法引起了科学家们的注意，针对的是疾病过程而不是症状。已经开发出病毒载体和非病毒载体以将治疗基因携带至自体软骨细胞，引起人们对病毒载体的免疫原性以及非病毒载体的低效和短期效率的严重关注。这些基因疗法旨在抑制炎症和分解代谢途径、刺激合成代谢途径以重建基质、阻止细胞衰老、避免骨赘的病理形成和/或防止细胞凋亡。迄今已鉴定出许多用于骨关节炎基因治疗的候选者，例如细胞因子白细胞介素-1 (IL-1)、肿瘤坏死因子受体 (TNFR) 和白细胞介素-4 (IL-4) 及其各自的拮抗剂；基质分解抑制剂、金属蛋白酶组织抑制剂 (TIMP)、纤溶酶原激活物抑制剂 (PAI) 或丝氨酸蛋白酶抑制剂；凋亡抑制剂B细胞淋巴瘤2 (Bcl-2)；软骨生长因子等等。

[0006] 但是，目前还没有有效、安全和易于实施的疗法。根据世界卫生组织的估计，有10%至15%的成年人患有某种程度的骨关节炎。由于人口老龄化和肥胖等相关因素的增加，这种患病率正在增加。据联合国统计，到2050年，全球将有1.3亿人患骨关节炎，其中4000万人将因该疾病而严重致残。这些数字揭示迫切需要开发一种新的疗法，其易于施用并且能够治愈而不是缓解症状。

[0007] 为了开发用于治疗骨关节炎的肽，申请人出人意料地发现，包含源自生长激素的

氨基酸序列的嵌合肽可以有效地诱导软骨细胞增殖和分化，并因此可以用于治疗骨关节炎，所述氨基酸序列在其C末端与源自生长抑素的氨基酸序列连接。

[0008] 因此，本发明涉及用于治疗骨关节炎的肽。

发明内容

[0009] 因此，本发明涉及包含氨基酸序列SEQ ID NO:1或其片段或变体的肽，其中SEQ ID NO:1如下：

[0010] X₁-Tyr-X₂-Leu-X₃-Ala-GIy-X₅-Lys-Asn-Phe-Phe-X₅ (SEQ ID NO:1)

[0011] 其中：

[0012] -X₁是空缺的，或是缬氨酸，或选自以下的序列：

[0013] Z₁-Val

[0014] Asp-Z₁-Val

[0015] Ser-Asp-Z₁-Val (SEQ ID NO:5)

[0016] Z₂-Ser-Asp-Z₁-Val (SEQ ID NO:6)，和

[0017] Gly-Z₂-Ser-Asp-Z₁-Val (SEQ ID NO:7)

[0018] 其中Z₁是精氨酸，Z₂是苏氨酸，或Z₁是Ser-Asp或Ser-Asn，Z₂是丙氨酸；

[0019] -X₂是选自Glu-Lys、Glu-Ser和Asp-Leu的序列；

[0020] -X₃是空缺的，或是赖氨酸，或选自以下的序列：

[0021] Lys-Asp

[0022] Lys-Asp-Leu

[0023] Lys-Asp-Leu-Glu (SEQ ID NO:8)

[0024] Lys-Asp-Leu-Glu-Glu (SEQ ID NO:9)

[0025] Lys-Asp-Leu-Glu-Glu-Gly (SEQ ID NO:10)

[0026] Lys-Asp-Leu-Glu-Glu-Gly-Ile (SEQ ID NO:11)

[0027] Lys-Asp-Leu-Glu-Glu-Gly-Ile-Gln (SEQ ID NO:12)

[0028] Lys-Asp-Leu-Glu-Glu-Gly-Ile-Gln-Z₃ (SEQ ID NO:13)，和

[0029] Lys-Asp-Leu-Glu-Gly-Ile-Gln-Z₃-Leu (SEQ ID NO:14)

[0030] 其中Z₃是丙氨酸或苏氨酸；

[0031] -X₄是选自半胱氨酸、丝氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、丙氨酸和甘氨酸的氨基酸残基；和

[0032] -X₅是空的，或是色氨酸残基，或选自以下的序列：

[0033] Trp-Lys

[0034] Trp-Lys-Thr

[0035] Trp-Lys-Thr-Phe (SEQ ID NO:15)

[0036] Trp-Lys-Thr-Phe-Thr (SEQ ID NO:16)

[0037] Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser (SEQ ID NO:17)

[0038] Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-X₆ (SEQ ID NO:18)，和

[0039] Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-X₆-Lys-Gln-Ala (SEQ ID NO:19)

[0040] 其中X₆是选自半胱氨酸、丝氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、丙氨酸和

甘氨酸的氨基酸残基；

[0041] 其用于治疗对象中的骨关节炎。

[0042] 在一个实施方案中，肽由11至50个氨基酸残基、优选20至30个氨基酸残基的氨基酸序列组成。

[0043] 在一个实施方案中， X_1 是Gly-Z₂-Ser-Asp-Z₁-Val； X_5 是Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-X₆。

[0044] 在一个实施方案中，肽包含序列SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:20：

[0045] -Gly-Ala-Ser-Asp-Ser-Asp-Val-Tyr-Asp-Leu-Leu-Ala-Gly-Ser-Lys-Asn-Phe-Phe-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-Ser (SEQ ID NO:2)

[0046] -Gly-Ala-Ser-Asp-Ser-Asp-Val-Tyr-Asp-Leu-Leu-Lys-Ala-Gly-Ser-Lys-Asn-Phe-Phe-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-Ser (SEQ ID NO:3)

[0047] -Gly-Thr-Ser-Asp-Arg-Val-Tyr-Glu-Lys-Leu-Ala-Gly-Ser-Lys-Asn-Phe-Phe-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-Ser (SEQ ID NO:4)

[0048] -Gly-Ala-Ser-Asp-Ser-Asn-Val-Tyr-Asp-Leu-Leu-Lys-Ala-Gly-Ser-Lys-Asn-Phe-Phe-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-Ser (SEQ ID NO:20)。

[0049] 在一个实施方案中，所述肽通过关节内注射施用到待治疗的关节。

[0050] 在一个实施方案中，所述肽以 10^{-3} M至 10^{-7} M或 10^{-4} M至 10^{-7} M的最终浓度在关节中施用。

[0051] 本发明还涉及一种药物组合物，其含有至少一种如本发明所述之用途的肽和一种或多于一种药学上可接受的赋形剂。

[0052] 本发明还涉及一种药物，其含有至少一种如本发明所述之用途的肽。

[0053] 本发明还涉及一种药物单位剂量，其含有至少一种如本发明所述之用途的肽。

[0054] 在一个实施方案中，所述单位剂量是一次性的预填充、预定剂量的注射器，其用于待治疗关节处的局部注射。

[0055] 本发明还涉及如上所述的药物组合物、药物或药物单位剂量，其中所述药物组合物、药物或药物单位剂量还含有至少一种黏性补充剂。

[0056] 在一个实施方案中，所述至少一种黏性补充剂是透明质酸，优选其中透明质酸的浓度为0.1%至10%。

[0057] 定义

[0058] 在本发明中，以下术语具有以下含义：

[0059] 术语“对象”是指哺乳动物，优选人。在本发明的一个实施方案中，对象还可以指马、牛或宠物，例如狗、猫、豚鼠、仓鼠、大鼠、小鼠、雪貂、兔子等。在一个实施方案中，对象可以是“患者”。

[0060] 术语“患者”指的是等待接受或正在接受医疗护理的对象，或者曾是/是/将是医疗程序的对象，或者是被监测疾病的发展的对象。

[0061] “老年个体”一词是指30岁以上的人类对象或患者(例如，超过40岁、50岁、60岁、70岁、80岁、90岁或以上)，或具有根据物种的相同年龄的非人类动物。

[0062] 术语“治疗”、“处理”或“缓解”是指治疗性处理和预防性或防止性措施，其目的是

预防或减缓(减轻)骨关节炎。需要治疗的患者包括已经患有骨关节炎的患者以及具有患骨关节炎倾向的患者或要预防骨关节炎的患者。如果在接受了本发明治疗量的肽之后,患者显示出在以下一种或多种中可观察到和/或可测量到的减少或不存在以下一种或多种:减少或减缓软骨结构的退化、维持或增加软骨厚度、在一定程度上缓解与骨关节炎相关的一种或多种症状、降低发病率和/或改善生活质量问题,则对象或者哺乳动物被成功地“治疗”骨关节炎。用于评估成功治疗和改善骨关节炎的上述参数可通过医生熟悉的常规程序容易地测量。

[0063] 术语“治疗有效量”是指针对以下目的且不会对目标对象产生显著的负面或不良副作用的药剂的水平或量:(1)延迟或预防骨关节炎的发作;(2)减缓或阻止骨关节炎的一种或多种症状的进展、加重或恶化;(3)改善骨关节炎的症状;(4)降低骨关节炎的严重程度或发生率;或(5)治疗骨关节炎。治疗有效量可以在骨关节炎发作之前施用,以用于预防性或防止性行为。替代地或另外地,治疗有效量可以在骨关节炎开始后施用,以用于治疗性行为。

[0064] 术语“药学上可接受的赋形剂”是指当施用于动物,优选人时,不会产生不利、过敏或其他不良反应的赋形剂。它包括任何和所有的溶剂、分散介质、包衣材料、抗菌剂和抗真菌剂、等渗和吸收延迟剂等。对人类施用,制剂应满足监管机构(例如FDA办公室或EMA)所要求的无菌性、致热原性、一般安全性和纯度标准。

[0065] 数字前面的术语“约”表示加上或减去所述数字的值的10%。

具体实施方式

[0066] 本发明涉及用于治疗骨关节炎的肽。事实上,申请人出人意料地证明,本发明的肽能够诱导软骨细胞增殖和分化的局部加速,因此可以用于治疗骨关节炎。

[0067] 在一个实施方案中,本发明的肽是合成肽,其包含生长激素(GH)序列(例如,特别是在待治疗对象是人的实施方案中是人GH序列)的片段,该生长激素序列的片段通过氨基键连接到生长抑素序列(例如,特别是在待治疗对象是人的实施方案中是人生长抑素序列)的片段。

[0068] 在一个实施方案中,本发明的肽包含SEQ ID NO:1或其片段或变体,或由SEQ ID NO:1或其片段或变体组成,其中SEQ ID NO:1如下:

[0069] X₁-Tyr-X₂-Leu-X₃-Ala-GIy-X₄-Lys-Asn-Phe-Phe-X₅ (SEQ ID NO:1)

[0070] 其中:

[0071] -X₁是空缺的,或是缬氨酸,或选自以下的序列:

[0072] Z₁-Val

[0073] Asp-Z₁-Val

[0074] Ser-Asp-Z₁-Val (SEQ ID NO:5)

[0075] Z₂-Ser-Asp-Z₁-Val (SEQ ID NO:6),和

[0076] Gly-Z₂-Ser-Asp-Z₁-Val (SEQ ID NO:7)

[0077] 其中Z₁是精氨酸,Z₂是苏氨酸,或Z₁是Ser-Asp或Ser-Asn,Z₂是丙氨酸;

[0078] -X₂是选自Glu-Lys、Glu-Ser和Asp-Leu的序列;

[0079] -X₃是空缺的,或是赖氨酸,或选自以下的序列:

- [0080] Lys-Asp
- [0081] Lys-Asp-Leu
- [0082] Lys-Asp-Leu-Glu (SEQ ID NO:8)
- [0083] Lys-Asp-Leu-Glu-Glu (SEQ ID NO:9)
- [0084] Lys-Asp-Leu-Glu-Glu-Gly (SEQ ID NO:10)
- [0085] Lys-Asp-Leu-Glu-Glu-Gly-Ile (SEQ ID NO:11)
- [0086] Lys-Asp-Leu-Glu-Glu-Gly-Ile-Gln (SEQ ID NO:12)
- [0087] Lys-Asp-Leu-Glu-Glu-Gly-Ile-Gln-Z₃ (SEQ ID NO:13), 和
- [0088] Lys-Asp-Leu-Glu-Glu-Gly-Ile-Gln-Z₃-Leu (SEQ ID NO:14)
- [0089] 其中Z₃是丙氨酸或苏氨酸;
- [0090] -X₄是选自半胱氨酸、丝氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、丙氨酸和甘氨酸的氨基酸残基; 和
- [0091] -X₅是空缺的, 或是色氨酸残基, 或选自以下的序列:
- [0092] Trp-Lys
- [0093] Trp-Lys-Thr
- [0094] Trp-Lys-Thr-Phe (SEQ ID NO:15)
- [0095] Trp-Lys-Thr-Phe-Thr (SEQ ID NO:16)
- [0096] Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser (SEQ ID NO:17)
- [0097] Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-X₆ (SEQ ID NO:18), 和
- [0098] Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-X₆-Lys-Gln-Ala (SEQ ID NO:19)
- [0099] 其中X₆是选自半胱氨酸、丝氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、丙氨酸和甘氨酸的氨基酸残基。
- [0100] 在一个实施方案中, X₁是Gly-Z₂-Ser-Asp-Z₁-Val (SEQ ID NO:7), 其中Z₁和Z₂如前所述; X₂、X₃和X₄如前所述; X₅是Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-X₆ (SEQ ID NO:18), 其中X₆如前所述。
- [0101] 在一个实施方案中, X₁是Gly-Z₂-Ser-Asp-Z₁-Val (SEQ ID NO:7), 其中Z₁是Ser-Asp, Z₂是丙氨酸; X₂是Asp-Leu; X₃空缺的; X₄是丝氨酸; X₅是Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-X₆ (SEQ ID NO:18), 其中X₆是丝氨酸。根据该实施方案, 本发明的肽包含SEQ ID NO:2、其片段或变体, 或由SEQ ID NO:2、其片段或变体组成, 其中SEQ ID NO:2如下:
- [0102] Gly-Ala-Ser-Asp-Ser-Asp-Val-Tyr-Asp-Leu-Leu-Ala-Gly-Ser-Lys-Asn-Phe-Phe-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-Ser (SEQ ID NO:2)。
- [0103] 在另一个实施方案中, X₁是Gly-Z₂-Ser-Asp-Z₁-Val (SEQ ID NO:7), 其中Z₁是Ser-Asp, Z₂是丙氨酸; X₂是Asp-Leu; X₃赖氨酸; X₄是丝氨酸; X₅是Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-X₆ (SEQ ID NO:18), 其中X₆是丝氨酸。根据该实施方案, 本发明的肽包含SEQ ID NO:3、其片段或变体, 或由SEQ ID NO:3、其片段或变体组成, 其中SEQ ID NO:3如下:
- [0104] Gly-Ala-Ser-Asp-Ser-Asp-Val-Tyr-Asp-Leu-Leu-Lys-Ala-Gly-Ser-Lys-Asn-Phe-Phe-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-Ser (SEQ ID NO:3)。
- [0105] 在另一个实施方案中, X₁是Gly-Z₂-Ser-Asp-Z₁-Val (SEQ ID NO:7), 其中Z₁是精氨酸, Z₂是苏氨酸; X₂是Glu-Lys; X₃是空缺的; X₄是丝氨酸; X₅是Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-X₆

(SEQ ID NO:18),其中X₆是丝氨酸。根据该实施方案,本发明的肽包含SEQ ID NO:4、其片段或变体,或由SEQ ID NO:4、其片段或变体组成,其中SEQ ID NO:4如下:

[0106] Gly-Thr-Ser-Asp-Arg-Val-Tyr-Glu-Lys-Leu-Ala-Gly-Ser-Lys-Asn-Phe-Phe-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-Ser (SEQ ID NO:4)。

[0107] 在另一个实施方案中,X₁是Gly-Z₂-Ser-Asp-Z₁-Val (SEQ ID NO:7),其中Z₁是Ser-Asn,Z₂是丙氨酸;X₂是Asp-Leu;X₃赖氨酸;X₄是丝氨酸;X₅是Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-X₆ (SEQ ID NO:18),其中X₆是丝氨酸。根据该实施方案,本发明的肽包含SEQ ID NO:20、其片段或变体,或由SEQ ID NO:20、其片段或变体组成,其中SEQ ID NO:20如下:

[0108] Gly-Ala-Ser-Asp-Ser-Asn-Val-Tyr-Asp-Leu-Leu-Lys-Ala-Gly-Ser-Lys-Asn-Phe-Phe-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-Ser (SEQ ID NO:20)。

[0109] 在一个实施方案中,本发明的肽由约11至约50个氨基酸残基、优选14至约40个氨基酸残基、更优选约20至约30个氨基酸残基的氨基酸序列组成。在一个实施方案中,本发明的肽由11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个、30个、31个、32个、33个、34个、35个、36个、37个、38个、39个、40个、41个、42个、43个、44个、45个、46个、47个、48个、49个或50个氨基酸组成。

[0110] 如本文所用,“氨基酸”由它们的全名,它们的三字母代码或它们的单字母代码表示,如本领域所熟知的。肽中氨基酸残基的缩写如下:苯丙氨酸是Phe或F;亮氨酸是Leu或L;异亮氨酸是Ile或I;蛋氨酸是Met或M;缬氨酸是Val或V;丝氨酸是Ser或S;脯氨酸是Pro或P;苏氨酸是Thr或T;丙氨酸是Ala或A;酪氨酸是Tyr或Y;组氨酸是His或H;谷氨酰胺是Gln或Q;天冬酰胺是Asn或N;赖氨酸是Lys或K;天冬氨酸是Asp或D;谷氨酸是Glu或E;半胱氨酸是Cys或C;色氨酸是Trp或W;精氨酸是Arg或R;甘氨酸是Gly或G。

[0111] 如本文所用的,术语“氨基酸”包括天然氨基酸和合成氨基酸,以及D氨基酸和L氨基酸两者。“标准氨基酸”或“天然存在的氨基酸”是指天然存在的肽中常见的20种标准L-氨基酸中的任何一种。“非标准氨基酸残基”是指除标准氨基酸外的任何氨基酸,无论其是合成制备的还是衍生自天然来源的。例如,萘基丙氨酸可以替代色氨酸以促进合成。其他可以被置换的合成氨基酸包括但不限于L-羟丙基,L-3,4-二羟苯丙氨酰基, α -氨基酸(例如L- α -羟赖氨酰基和D- α -甲基丙氨酰基,L- α -甲基丙氨酰基)、 β -氨基酸和异喹啉基。此外,苏氨酸、丙氨酸、色氨酸和苯丙氨酸残基可以属于D-型,以使得该肽对肽酶更具抗性。

[0112] 如本文所用,“氨基酸”还包括化学修饰的氨基酸,包括但不限于盐、氨基酸衍生物(例如酰胺)和取代物。包含在本发明的肽中的氨基酸,特别是羧基末端或氨基末端,可以通过甲基化、酰胺化、乙酰化或用其他化学基团取代来修饰,这些化学基团可以改变肽的循环半衰期而不会对它们的活性产生不利影响。另外,在本发明的肽中可以存在或不存在二硫键。

[0113] 可用于本发明的肽可以包含天然标准氨基酸或非标准氨基酸。肽类似物包括具有以下修饰的肽:i)其中一个或多于一个肽基-C(0)NR-键(化学键)已经由非肽键(例如-CH₂-氨基甲酸酯键(-CH₂OC(0)NR-)、磷酸酯键、-CH₂-磺酰胺(-CH₂-S(0)₂NR-)键、脲(-NHC(0)NH-)键、-CH₂-仲胺键)取代、或由烷基化的肽键(-C(0)NR-)取代,其中R是C₁-C₄烷基;ii)其中N-末端衍生为-NRR¹基团、-NRC(0)R基团、-NRC(0)OR基团、-NRS(0)₂R基团、-NHC(0)NHR基团的肽,其中R和R¹为氢或C₁-C₄烷基,条件是R和R¹不都是氢;iii)其中C末端衍生为-C(0)R²

的肽，其中R²选自C₁-C₄烷氧基和-NR³R⁴，其中R³和R⁴独立地选自氢和C₁-C₄烷基。

[0114] 在一个实施方案中，可以任选地保护用于本发明中的肽的N-末端和C-末端免于蛋白水解。例如，N-末端可以是乙酰基的形式，和/或C-末端可以是酰胺基的形式。

[0115] 因此，在一个实施方案中，本发明的肽包含以下氨基酸序列或由以下氨基酸序列组成：

[0116] Ac-Gly-Ala-Ser-Asp-Ser-Asp-Val-Tyr-Asp-Leu-Leu-Ala-Gly-Ser-Lys-Asn-Phe-Phe-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-Ser-NH₂ (N-末端用乙酰基保护且在C-末端用酰胺基保护的SEQ ID NO:2)；或者

[0117] Ac-Gly-Ala-Ser-Asp-Ser-Asp-Val-Tyr-Asp-Leu-Leu-Lys-Ala-Gly-Ser-Lys-Asn-Phe-Phe-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-Ser-NH₂ (N-末端用乙酰基保护且在C-末端用酰胺基保护的SEQ ID NO:3)；或者

[0118] Ac-Gly-Thr-Ser-Asp-Arg-Val-Tyr-Glu-Lys-Leu-Ala-Gly-Ser-Lys-Asn-Phe-Phe-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-Ser-NH₂ (N-末端用乙酰基保护且在C-末端用酰胺基保护的SEQ ID NO:4)；或者

[0119] Ac-Gly-Ala-Ser-Asp-Ser-Asn-Val-Tyr-Asp-Leu-Leu-Lys-Ala-Gly-Ser-Lys-Asn-Phe-Phe-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-Ser-NH₂ (N-末端用乙酰基保护且在C-末端用酰胺基保护的SEQ ID NO:20)。

[0120] 还设想了针对蛋白水解具有抗性的肽的内部修饰，例如，其中至少CONH-肽键被修饰并被(CH₂NH)还原键、(NHCO)逆-反键、(CH₂-O)亚甲基-氧键、(CH₂-S)硫代亚甲基键、(CH₂CH₂)亚乙基键、(CO-CH₂)酮亚甲基键、(CHOH-CH₂)羟基亚乙基键、(N-N)键、E-烯键或-CH=CH-键所取代。

[0121] 在本发明的一个实施方案中，如本文所述的多肽通过本领域熟知的方法进行修饰，例如通过添加一种或多于一种官能团，例如磷酸根、乙酸根、脂质或碳水化合物基团，和/或通过添加一种或多于一种保护基团进行修饰。

[0122] 例如，可以通过添加一种或多于一种官能团来修饰多肽，例如磷酸根、乙酸根、或各种脂质和碳水化合物。本发明的多肽也可以以多肽衍生物存在。术语“多肽衍生物”是指具有氨基(-NH-)的化合物，更特别的是具有肽键的化合物。多肽可以被认为是经取代的酰胺。与酰胺基团一样，肽键显示出高的共振稳定化程度。肽键中的C-N单键通常具有约40%的双键特征，而C=O双键具有约40%的单键特征。“保护基团”是指防止涉及未受保护的官能团的非所需反应(例如蛋白水解)的那些基团。氨基保护基团的具体实例包括甲酰基；三氟乙酰基；苄氧羰基；经取代的苄氧基羰基，例如(邻-或对-)氯苄氧基羰基和(邻-或对-)溴苄氧基羰基；和脂肪族氧羰基，例如叔丁氧羰基和特戊基氧羰基。氨基酸的羧基可以通过转化成酯基来保护。酯基包括苄基酯、经取代的苄基酯如甲氧基苄基酯；烷基酯如环己基酯；环庚基酯或叔丁基酯。胍基部分可以被硝基；或芳基磺酰基如甲苯磺酰基、甲氧基苯磺酰基或均三甲苯磺酰基保护，尽管胍基部分不需要保护基团。咪唑的保护基团包括甲苯磺酰基、苄基和二硝基苯基。色氨酸的吲哚基团可以被甲酰基保护或可以不被保护。

[0123] 还可以通过其C-末端或赖氨酸残基将用于本发明中的肽与聚乙二醇(PEG)分子，尤其是与1500mW或4000mW的PEG共价结合，以降低尿清除率和使用的治疗剂量，并提高水溶性、在溶液中的流动性和在血浆中的半衰期，所有这些都具有较低的免疫原性。PEG的结合

如Abuchowski等(J.Biol.Chem.,1977,252:3582-3586)所述。在本发明的另一方面,两个或多于两个PEG分子在每个锚定位点中结合。在另一个实施方案中,通过将肽包含在用于形成微球的药物递送系统的可生物降解和生物相容的聚合物材料中来增加肽半衰期。聚合物和共聚物是例如聚(D,L-丙交酯-co-乙交酯)(PLGA)(如US2007/0184015,SoonKap Hahn等人中所示出的)。

[0124] 用于防止由内肽酶或外肽酶来降解多肽的其他修饰实例包括N-末端修饰如乙酰化或糖基化、C-末端修饰如酰胺化和在多肽内特定位点使用非天然氨基酸(β -氨基酸和 α -三氟甲基氨基酸)。

[0125] 增加多肽分子大小的另一种替代方案是多肽与人 γ 免疫球蛋白的Fc结构域的遗传融合、或多肽与白蛋白的融合。

[0126] 在一个实施方案中,本发明的肽是SEQ ID NO:1的变体,优选SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:20的变体。

[0127] 本文使用的术语肽“变体”是通常在一个或多于一个置换、缺失、添加和/或插入中与本文具体公开的肽不同的肽。这种变体可以是天然存在的或可以是合成产生的,例如,通过修饰一种或多于一种上述肽序列并评估本文所述的肽的一种或多于一种生物活性,和/或使用本领域熟知的许多技术中的任何一种来合成产生本文所述的肽。可以在肽的结构中进行修饰,并仍然获得编码具有所需特征的肽的变体或衍生物的功能分子。

[0128] 当需要改变肽的氨基酸序列以产生本发明的配体的等同物或甚至改进的变体或部分时,本领域技术人员通常会改变编码DNA序列的一个或多于一个密码子。例如,某些氨基酸可以被蛋白质结构中的其他氨基酸置换,而不会明显丧失其结合细胞表面受体,优选细胞表面营养转运蛋白的能力。由于正是蛋白质的结合能力和性质决定了蛋白质的生物功能活性,因此可以在蛋白质序列中进行某些氨基酸序列置换,当然,也可以在其潜在DNA编码序列中进行,并仍然获得具有相似性质的蛋白质。因此设想可以在肽序列或编码所述肽的相应DNA序列中进行多种改变而不会明显丧失其生物学效用或活性。在许多情况下,肽变体会含有一个或多于一个保守性置换。“保守性置换”是其中氨基酸由具有相似性质的另一种氨基酸替代的置换,使得肽化学领域的技术人员会预期肽的二级结构和亲水性质基本上不变。如上所述,氨基酸置换因此通常基于氨基酸侧链取代基的相对相似性,例如它们的疏水性、亲水性、电荷、大小等。考虑到各种前述特征的示例性置换是本领域技术人员公知的,包括:精氨酸和赖氨酸;谷氨酸和天冬氨酸;丝氨酸和苏氨酸;谷氨酰胺和天冬酰胺;以及缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸。还可以基于残基的极性、电荷、溶解度、疏水性、亲水性和/或两亲性质的相似性进行氨基酸置换。例如,带负电荷的氨基酸包括天冬氨酸和谷氨酸;带正电荷的氨基酸包括组氨酸、赖氨酸和精氨酸;具有类似亲水性值的不带电荷的极性头部基团的氨基酸包括亮氨酸、异亮氨酸和缬氨酸;甘氨酸和丙氨酸;天冬酰胺和谷氨酰胺;以及丝氨酸、苏氨酸、苯丙氨酸和酪氨酸。可以表示保守性变化的其他氨基酸组包括:(1)ala、pro、gly、glu、asp、gln、asn、ser、thr;(2)cys、ser、tyr、thr;(3)val、ile、leu、met、ala、phe;(4)lys、arg、his;和(5)phe、tyr、trp、his。

[0129] 如本文所用,术语“保守性氨基酸置换”还可以定义为以下五组之一的氨基酸交换:

[0130] I. 小的脂肪族非极性或微极性残基:Ala、Ser、Thr、Pro、Gly;

- [0131] II. 极性的带负电荷的残基及其酰胺:Asp、Asn、Glu、Gln;
- [0132] III. 极性的带正电荷的残基:His、Arg、Lys;
- [0133] IV. 大的脂肪族非极性残基:Met、Leu、Ile、Val、Cys;
- [0134] V. 大的芳香族残基:Phe、Tyr、Trp。

[0135] 变体还可以或替代地包含非保守性变化。在优选的实施方案中，变体肽通过置换、缺失或添加1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个氨基酸而不同于天然序列。变体也可以(或替代地)通过例如缺失或添加对肽的免疫原性、二级结构和亲水性质具有最小影响的氨基酸来进行修饰。因此，在一个实施方案中，SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:20的变体是其中SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:20的各序列中的1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个氨基酸缺少的肽，或被任意氨基酸置换的肽，或其中添加了1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个(连续的或非连续的)氨基酸的肽。

[0136] 在一个实施方案中，SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:20的变体是具有SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:20的序列和在C末端和/或N末端具有1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个额外氨基酸的肽。

[0137] 在一个实施方案中，SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:20的变体是显示出分别与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:20具有至少约70%同一性的肽，优选至少约80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性或者更高同一性的肽。

[0138] 当在两个或多于两个多肽的序列之间的关系中使用时，术语“同一性”是指由两个或多于两个氨基酸残基串之间的匹配数确定的多肽之间的序列关联性程度。“同一性”衡量两个或多于两个序列中较小的序列之间相同匹配的百分比，其中空位比对(如果有的话)由特定数学模型或计算机程序(即“算法”)解决。可以通过已知方法容易地计算相关多肽的同一性。这些方法包括但不限于Computational Molecular Biology, Lesk, A.M. 编辑, Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W. 编辑, Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part 1, Griffin, A.M. 和 Griffin, H.G. 编辑, Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. 和 Devereux, J. 编辑, M. Stockton Press, New York, 1991; 和 Carillo等人, SIAM J. Applied Math. 48, 1073 (1988) 中描述的那些。设计用于确定同一性的优选方法以给出所测试的序列之间的最大匹配。确定同一性的方法在公开可用的计算机程序中描述。用于确定两个序列之间同一性的优选计算机程序方法包括GCG程序包，包括GAP(Devereux等人, Nucl. Acid. Res. \2, 387 (1984); Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, Wis.)、BLASTP、BLASTN和FASTA(Altschul等人, J. Mol. Biol. 215, 403-410 (1990))。BLASTX程序可从国家生物技术信息中心(NCBI)和其他来源(BLAST Manual, Altschul等人, NCB/NLM/NIH Bethesda, Md. 20894; Altschul等人, 如前)公开获得。众所周知的Smith Waterman算法也可以用于确定同一性。

- [0139] 在一个实施方案中，可以将肽的色氨酸残基连接至C₁-C₃烷基(甲基、乙基、丙基、异

丙基),以使肽耐氧化。例如,当X₅在如SEQ ID NO:1所示的序列中时,色氨酸残基可以存在,因此是在如SEQ ID NO:2所示序列中的19位;在如SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:20所示序列中的20位;在如SEQ ID NO:4所示的序列中的18位。

[0140] 如本领域所熟知的,本文所述的肽可以通过化学合成或酶促合成来合成产生。或者,可以将编码本发明肽的核苷酸序列引入蛋白质表达载体中,并在合适的宿主生物体(例如细菌、昆虫细胞等)中产生,然后纯化。在一个优选的实施方案中,肽是通过氨基酸残基的逐步缩合,或通过含有氨基酸序列的预先形成的片段以适当顺序缩合,或通过先前制备的几个片段的缩合而得到的,同时保护除缩合过程中参与肽键的氨基酸官能团之外的氨基酸官能团。特别地,肽可以根据Merrifield最初描述的方法合成。

[0141] 可以添加额外的多肽(“标签”)以纯化或识别或纯化肽。例如,蛋白质标签使得肽能够高亲和力地吸附到基质上,然后使得所述基质能够用合适的缓冲液严格地清洗,而不会使得复合物以任意显著的程度被洗脱,并且随后使得吸附的复合物被选择性地洗脱。本领域技术人员已知的蛋白质标签的实例是(His)₆标签、Myc标签、FLAG标签、血凝素标签、谷胱甘肽转移酶(GST)标签、具有亲和性几丁质结合标签的或麦芽糖结合蛋白(MBP)标签的内含肽。这些蛋白质标签可以位于N-末端、C-末端和/或在内部。

[0142] 有利地,与本领域的免疫原性肽(该免疫原性肽引起导致内源性GH中的和并因此导致生物活性中和的抗体产生)相比,即使以反复的方式施用时,本文所述的肽也不会诱导抗肽或抗GH抗体产生,。

[0143] 本发明还涉及包含至少一种包含如上所述的SEQ ID NO:1的肽(特别是具有序列SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:20的肽)或其片段或变体的组合物,或由其组成的组合物,或基本上由其组成的组合物。

[0144] 本发明还涉及包含至少一种包含如上所述的SEQ ID NO:1的肽(特别是具有序列SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:20的肽)或其片段或变体和至少一种药学上可接受的赋形剂的药物组合物,或由其组成的药物组合物,或基本上由其组成的药物组合物。

[0145] 本发明还涉及包含至少一种包含如上所述的SEQ ID NO:1的肽或其片段或变体的药物,或由其组成的药物,或基本上由其组成的药物。

[0146] 在一个实施方案中,本发明的组合物、药物组合物或药物用于治疗对其有所需求的对象的骨关节炎。

[0147] 如本文所用,关于本发明的组合物、药物组合物或药物,术语“基本上由……组成”是指本发明的至少一种肽是在所述组合物、药物组合物或药物中具有生物活性的唯一一种治疗剂或药剂。

[0148] 合适的赋形剂的实例包括但不限于水;盐水;林格氏溶液;右旋糖溶液;以及乙醇、葡萄糖、蔗糖、葡聚糖、甘露糖、甘露醇、山梨糖醇、聚乙二醇(PEG)、磷酸盐、乙酸盐、明胶、胶原蛋白、Carbopol®、植物油等的溶液。可以另外包括合适的防腐剂、稳定剂、抗氧化剂、抗微生物剂和缓冲剂,例如BHA、BHT、柠檬酸、抗坏血酸、四环素等。

[0149] 可以用于本发明组合物的药学上可接受的赋形剂的其他实例包括但不限于,离子交换剂、氧化铝、硬脂酸铝、卵磷脂、血清蛋白如人血清白蛋白、缓冲物质如磷酸盐、甘氨酸、山梨酸、山梨酸钾、饱和植物脂肪酸的偏甘油酯混合物、水、盐或电解质例如硫酸鱼精蛋白、

磷酸氢二钠、磷酸氢钾、氯化钠、锌盐、胶体二氧化硅、三硅酸镁、聚乙烯吡咯烷酮、纤维素基物质、聚乙二醇、羧甲基纤维素钠、聚丙烯酸酯、蜡、聚乙烯-聚氧丙烯-嵌段聚合物、聚乙二醇和羊毛脂。

[0150] 在一个实施方案中,本发明的组合物、药物组合物或药物可以包含一些赋形剂,例如表面活性剂(例如羟丙基纤维素);合适的载体,例如溶剂和分散介质包括例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)、其合适的混合物、以及植物油如花生油和芝麻油;等渗剂,例如糖或氯化钠;包衣剂,例如卵磷脂;延迟吸收剂,例如单硬脂酸铝和明胶;防腐剂,例如苯扎氯铵、苄索氯铵、氯丁醇、硫柳汞等;缓冲剂,例如硼酸、碳酸氢钠和碳酸氢钾、硼酸钠和硼酸钾、碳酸钠和碳酸钾、乙酸钠、磷酸二氢钠等;张度剂,例如葡聚糖40、葡聚糖70、右旋糖、甘油、氯化钾、丙二醇、氯化钠;抗氧化剂和稳定剂,例如亚硫酸氢钠、焦亚硫酸钠、硫代硫酸钠、硫脲等;非离子湿润剂或澄清剂,例如聚山梨醇酯80、聚山梨醇酯20、泊洛沙姆282和泰洛沙泊;黏度调节剂,例如葡聚糖40、葡聚糖70、明胶、甘油、羟乙基纤维素、羟甲基丙基纤维素、羊毛脂、甲基纤维素、矿脂、聚乙二醇、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、羧甲基纤维素;等等。

[0151] 在一个实施方案中,组合物、药物组合物或药物可以包含本发明的肽的药学上可接受的盐。

[0152] 药学上可接受的盐的实例包括与无机碱形成的盐、与有机碱形成的盐、与无机酸形成的盐、与有机酸形成的盐、与碱性或酸性氨基酸形成的盐等。与无机碱形成的盐的实例包括但不限于碱金属盐,如钠盐和钾盐;碱土金属盐,如钙盐和镁盐;铝盐;和铵盐。与有机碱形成的盐的实例包括但不限于与三甲胺、三乙胺、吡啶、甲基吡啶、2,6-二甲基吡啶、乙醇胺、二乙醇胺、三乙醇胺、环己胺、二环己胺和N,N'-二苄基乙二胺形成的盐。与无机酸形成的盐的实例包括但不限于与盐酸、硼酸、硝酸、硫酸和磷酸形成的盐。与有机酸形成的盐的实例包括但不限于与甲酸、乙酸、三氟乙酸、邻苯二甲酸、富马酸、草酸、酒石酸、马来酸、柠檬酸、琥珀酸、苹果酸、甲磺酸、苯磺酸和对甲苯磺酸形成的盐。与碱性氨基酸形成的盐的实例包括但不限于与精氨酸、赖氨酸和鸟氨酸形成的盐。与酸性氨基酸形成的盐的实例包括但不限于与天冬氨酸和谷氨酸形成的盐。合适的盐的名单公开在Remington's Pharmaceutical Sciences,第17版,Mack Publishing Company,Easton,Pa.,第1418页,1985中,其全部公开内容通过引用并入本文中。

[0153] 在一个实施方案中,本发明的组合物、药物组合物或药物中的本发明肽的量是治疗有效量,并且相对于本发明的组合物、药物组合物或药物的总体积,本发明的肽量的体积含量为约0.01%至90%,优选为0.1%至10%,更优选为1%至5%。在另一个实施方案中,治疗有效量为约 10^{-9} M至约 10^{-1} M,优选为约 10^{-8} M至约 10^{-2} M,更优选为约 10^{-7} M至约 10^{-3} M。这些量通常可由本领域技术人员进行调整,他们能够选择最佳量来施用于患者以实现恢复。

[0154] 根据一个实施方案,本文所述的肽与至少一种黏性补充剂一起施用。因此,在一个实施方案中,本发明的组合物、药物组合物或药物还包含至少一种黏性补充剂。

[0155] 黏性补充剂的实例包括但不限于糖胺聚糖,最常见的是非硫酸化糖胺聚糖,包括透明质酸、hylan、玻尿酸等。

[0156] 在优选的实施方案中,所述至少一种黏性补充剂是透明质酸,优选非交联透明质酸。在一个实施方案中,黏性补充剂是分子量为约100kDa至约5000kDa,优选约400kDa至约

1000kDa的透明质酸；优选分子量为约100kDa至约5000kDa，优选约400kDa至约1000kDa的非交联透明质酸。在一个实施方案中，黏性补充剂是分子量为约600kDa至约1000kDa的透明质酸，优选分子量为约600kDa至约1000kDa的非交联透明质酸。

[0157] 在一个实施方案中，黏性补充剂，优选透明质酸，以约0.1%至约10%，优选约0.25%至约5%，优选约0.25%至约2%，优选1%的浓度存在于本发明的组合物、药物组合物或药物中(百分比是相对于组合物总体积的重量，即1%对应于10mg/ml的浓度)。

[0158] 实际上，申请人示出了透明质酸诱导嵌合肽在水溶液中的显著稳定化(参见实施例)。拉曼光谱实验确实已经示出了具有如SEQ ID NO:1所示序列的肽在水中的不稳定结构，并通过在其中存在四种不同构象来反映，其中三种在数量上是等同的；而在透明质酸存在下具有SEQ ID NO:1所示序列的肽具有稳定的 β -发夹构象。不愿意受理论束缚，申请人提出这种构象使得生长抑素残基能够暴露以与它们的受体进行特异性和高亲和力结合。

[0159] 本发明还涉及本文所述的肽，任选地与黏性补充剂组合，用于治疗对其有所需求的对象的骨关节炎的用途。实际上，申请人证明了本文所述的肽直接作用于软骨细胞，使它们分化、增殖、扩散并产生质量更好的软骨基质。这些肽对关节的厚度以及软骨基质的质量显示出长期的有效性(长达注射后5个月)(参见实施例)。

[0160] 在一个实施方案中，对象受骨关节炎影响，优选诊断为患有骨关节炎。在第一方面，对象是患有骨关节炎的老年人(例如，超过30岁、40岁、50岁、60岁、70岁、80岁、90岁或更大年纪的个体)。在第二方面，对象是患有创伤后骨关节炎的受伤个体。

[0161] 在一个实施方案中，根据Kellgren-Lawrence等级(或K-L系统)，对象受0级、1级、2级、3级或4级骨关节炎的影响。根据这种评分工具，0级对应于缺乏骨关节炎的影像学特征；1级对应于可能的关节间隙变窄和骨赘形成；2级对应于明确的骨赘形成，伴随着可能的关节间隙变窄；3级对应于多个骨赘、明确的关节间隙变窄、硬化和可能的骨性畸形；4级对应于大的骨赘、明显的关节间隙变窄、严重硬化和明确的骨性畸形。

[0162] 在一个实施方案中，对象受0级、1级或2级骨关节炎的影响。在一个实施方案中，对象受0级或1级骨关节炎的影响。

[0163] 在一个实施方案中，本发明的肽、组合物、药物组合物或药物用于预防骨关节炎，优选用于预防有发展骨关节炎风险的对象中的骨关节炎。

[0164] 在一个实施方案中，对象有发展骨关节炎的风险。风险因素的实例包括但不限于遗传因素，骨关节炎的家族史，由先天性或致病性原因、创伤、机械损伤、体重过重和肥胖引起的骨骼错位，支撑关节的肌肉力量减弱，导致突然或不协调运动的周围神经受损，尿黑酸尿症，先天性关节疾病，糖尿病，埃勒斯-当洛斯综合征，血色素沉积症和威尔逊氏症，关节或韧带损伤，韧带退化或不稳定，马方综合征，关节感染等。

[0165] 在一个实施方案中，本发明的肽、组合物、药物组合物或药物用于治疗已经患有骨关节炎的对象中的骨关节炎。

[0166] 在一个实施方案中，本发明的肽、组合物、药物组合物或药物用于阻止已经患有骨关节炎的对象中的骨关节炎的恶化，例如，用于阻止患有根据K-L系统的0级、1级或2级骨关节炎的对象中的骨关节炎的恶化。

[0167] 在一个实施方案中，本发明的至少一种肽是通过或将要通过关节内注射施用到待治疗的关节。

[0168] 在一个实施方案中,施用后本发明的肽在靶关节内的目标浓度为约 10^{-9} M至约 10^{-2} M,优选约 10^{-8} M至约 10^{-3} M,更优选约 10^{-7} M至 10^{-3} M。在一个实施方案中,施用后本发明的肽在靶关节内的目标浓度为约 10^{-7} M至约 10^{-4} M。待施用以达到这种关节内浓度的治疗有效量的肽的浓度取决于关节的尺寸和其内部的滑液的体积。这些因素根据关节的性质、接受治疗的对象的年龄和种类物种而变化。这些参数是本领域技术人员,特别是医疗从业者和兽医所熟知的。例如,膝盖内滑液的体积在人体中通常为约6mL至7mL,对于兔子为约500μl,对于狗为约240μl。

[0169] 因此,在一个实施方案中,为了治疗人膝盖中的骨关节炎,可以在关节中注射2mL的包含本发明的肽(优选如SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:20所示的肽)和任选的透明质酸的组合物。在兽医病例中,可以根据物种调整该体积。

[0170] 在一个实施方案中,施用组合物、药物组合物或药物一次、两次、三次或多于三次,例如,4次、5次、6次、7次、8次、9次或10次,或直至完全治疗骨关节炎。

[0171] 在一个实施方案中,施用数次当组合物、药物组合物或药物时,两次施用之间的间隔为约1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天,或约1周、2周、3周、4周,或约1个月、2个月、3个月、4个月、5个月、6个月、7个月、8个月、9个月、10个月、11个月或12个月或更长时间。

[0172] 在一个实施方案中,以一周间隔施用三次本发明的组合物、药物组合物或药物。

[0173] 在一个实施方案中,在使用前,对本发明的肽进行灭菌,优选通过过滤或高压灭菌法进行灭菌。在另一个实施方案中,在使用前,对包含肽和黏性补充剂的本发明组合物进行灭菌,优选通过过滤或高压灭菌法进行灭菌。在另一个实施方案中,在混合和使用前对肽和黏性补充剂分别进行灭菌。

[0174] 在一个实施方案中,本文描述的肽包含在药物单位剂型中。优选地,该单位剂型是一次性使用的预填充、预定剂量的注射器,以用于待治疗关节的局部注射。因此,本发明还涉及包含本发明的肽和任选的黏性补充剂如透明质酸的单位剂型(例如,预填充注射器)。在一个实施方案中,药物单位剂型优选地通过过滤来灭菌。

[0175] 药物单位剂型中肽的浓度取决于关节的尺寸和其内部的滑液的体积。这些因素根据关节的性质、待接受治疗的对象的年龄和物种而变化。

[0176] 在一个实施方案中,所述药物单位剂型含有2mL的包含本发明的肽和任选的黏性补充剂(优选透明质酸)的组合物、药物组合物或药物,在所述组合物、药物组合物或药物包含中肽的浓度为适于肽的施用且在关节中最终浓度为 10^{-7} M至约 10^{-3} M或约 10^{-7} M至约 10^{-4} M。

[0177] 本发明还涉及试剂盒,其包含含有本发明的肽的第一药物单位剂型,和含有黏性补充剂的第二药物单位剂型。

[0178] 在一个实施方案中,所述试剂盒的两个单位剂型都是一次性的预填充、预定剂量的注射器。

[0179] 在另一个实施方案中,在试剂盒中,包含黏性补充剂的药物单位剂型是一次性的预填充、预定剂量注射器,其中黏性补充剂优选通过高压灭菌法灭菌,并且包含本发明的肽的药物单位剂型是小瓶,其中肽优选地通过过滤来灭菌。

[0180] 本发明还涉及在对其有所需求的对象中治疗骨关节炎的方法,其中所述方法包括向对象施用本发明的肽和任选的黏性补充剂(优选透明质酸)。优选地,向对象施用治疗有效量的本发明的肽。

[0181] 实际上,本文描述的肽直接作用于关节中的软骨细胞。如实施例中所示,从豚鼠获得的体内数据显示出对关节厚度以及软骨基质的质量的长期(5个月)有效性。此外,从兔获得的体内数据显示出对降低骨关节炎病变严重性和尺寸的短期有效性。

[0182] 因此,本发明还涉及分化软骨细胞和/或增殖软骨细胞和/或扩散软骨细胞和/或产生软骨基质的方法,其中所述方法包括施用本发明的肽和任选的黏性补充剂(优选透明质酸)。

[0183] 本发明还涉及减缓或预防对象中软骨退化的方法,其中所述方法包括向对象施用本发明的肽和任选的黏性补充剂(优选透明质酸)。在一个实施方案中,所述对象患有骨关节炎,优选患有0级、1级或2级骨关节炎。

[0184] 本发明还涉及维持或增加对象中软骨厚度的方法,其中所述方法包括向对象施用本发明的肽和任选的黏性补充剂(优选透明质酸)。在一个实施方案中,所述对象患有骨关节炎,优选患有0级、1级或2级骨关节炎。

[0185] 本发明还涉及降低骨关节炎病变的严重性或尺寸、或用于预防对象中骨关节炎病变的严重性或尺寸增加的方法,其中所述方法包括向对象施用本发明的肽和任选的黏性补充剂(优选透明质酸)。

附图说明

[0186] 图1是显示在豚鼠中进行的透明质酸相对于具有SEQ ID NO:4(“肽”)所示的序列的肽的体内有效性测试的一组图。(A) 直方图显示了代表关节中几种结构退化的分数之和,特别是骨赘的存在、基质蛋白多糖的降解、滑膜的降解、异常细胞的存在等结构退化。与对照组和单独的透明质酸相比,在具有SEQ ID NO:4所示序列的肽存在下,软骨结构显示出显著减少的降解。(B) 直方图显示在透明质酸或具有SEQ ID NO:4所示序列的肽存在下软骨厚度增加。 $*p < 0.05$ 。(C) 直方图显示出骨降低的赘评分。 $**p < 0.001$ 。

[0187] 图2是显示在透明质酸存在下具有SEQ ID NO:4(“肽”)所示序列的肽的稳定化的拉曼光谱。本文描述的肽不同于内源生长抑素或本领域已知的肽,并表现出 β -发夹分子构象,其稳定性取决于所用的生理介质和疏水介质。该图说明了单独的具有SEQ ID NO:4所示序列的肽、单独的透明质酸、和具有SEQ ID NO:4所示序列的肽和与透明质酸的混合物的拉曼数据。具有如SEQ ID NO:4所示序列的肽在水中具有不稳定的结构,并通过在其中存在四种不同构象来反映,其中三种在数量上是等同的;而具有SEQ ID NO:4所示序列的肽与透明质酸一起具有稳定的 β -发夹构象。这种构象可以使得生长抑素残基能够暴露以与它们的受体特异性和高亲和力结合。

[0188] 图3是显示在兔中进行的透明质酸(“HA”)相对于具有SEQ ID NO:4所示序列的肽与HA组合(“肽+HA”)的体内有效性测试的图。(A) 直方图示出了表示低分亚群(具有较不严重病变的动物)的宏观方面的病变严重性的全局宏观评分等级的总和。与对照组和单独的透明质酸(HA)两者相比,它显示在具有SEQ ID NO:4所示序列的肽与HA组合存在时评分等级显著下降。(B) 直方图显示在具有SEQ ID NO:4所示序列的肽存在的情况下全局宏观评分大小之和的下降。 $** = p - 值 < 0.01$ 。

[0189] 实施例

[0190] 通过以下实施例进一步说明本发明。

[0191] 实施例1:本发明的肽的体内作用

[0192] 样品制备

[0193] 将本发明的肽(对应于SEQ ID NO:4)以2.5mg/ml溶解在注射用水(CDM Lavoisier)中,以制备在-20°C保存的储备溶液。通过在使用前立即抽吸所准备的50μl肽工作溶液且在0.9%NaCl中以10⁻⁷M(测试了其他浓度)来准备注射器,并保持在冰上直至使用。

[0194] 动物IA注射

[0195] 该研究是在雄性Duncan-Hartley豚鼠(Harlan)上进行的,其特殊性是受到与膝关节骨性关节炎(OA)非常相似的膝关节自发性和进行性退化的年龄的影响。每组注射7只5个月大的动物(体重879g±58.1)。根据机构动物护理指南处理动物。用具有快速诱导装置(4%异氟烷)的麻醉模块(Minerva)麻醉动物,并使用豚鼠麻醉机(guinea coaxial)(2.5%异氟烷)中的特定装置面罩来维持麻醉。使用29G针将50μl本发明的肽或对照物——盐溶液或Hyalgan®(10mg/ml MW 500kDa至730kDa的透明质酸溶液——Laboratoire Expanscience,市售)注射到动物的每个后腿上,从侧面注入关节间隙。随后是被动膝关节运动,以促进溶液的关节内分布。

[0196] 组织学分析

[0197] 注射后5个月,将每只动物的两个膝关节在10%缓冲福尔马林中固定36至48小时,然后保持在70%乙醇中,然后在15%EDTA的磷酸盐缓冲液中脱钙。用苏木精和伊红对关节中央区域的石蜡切片(3-4μm)进行染色,以用于软骨结构的组织学分析,即:软骨基质丧失、细胞异常、关节软骨矿化前沿出现、骨赘和滑膜形成(显微镜:Nikon 80i)。使用半定量改进的Mankin组织学分级系统来评估OA严重性(Kraus等人,The OARSI histopathology initiative recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the Guinea Pig.Osteoarthritis Cartilage,2010(18 S3)S35-S52)。通过免疫组织化学来定量分析关节软骨区域(Pastoureaux等人,Cartilage, bone and synovial histomorphometry in animal models of osteoarthritis.Osteoarthritis Cartilage.2010年10月;18 Suppl 3:S106-12)。用单克隆抗体(单克隆抗鸡小鼠胶原蛋白II,6B3克隆-参考MAB887/250,Millipore)对豚鼠膝盖切片进行染色。用Color deconvolution H DAB和Siox进行关节软骨总面积的测量,并用ImageJ("Fit Ellipse"模块)测量关节高度。使用Kruskal-Wallis检验,然后使用PRISM软件进行Dunn检验来进行评分和定量结果的统计分析。

[0198] 结果

[0199] 然后引入多种组织形态学参数,所有参数均在在软骨、骨和滑膜水平上表达OA病理学。对于膝盖的内侧胫骨表面,软骨结构损伤和蛋白多糖损失两者最大严重性是明显的。

[0200] 结果如图1所示。

[0201] 与“虚假”组和“HA”组相比,软骨结构评分以及蛋白多糖和II型胶原蛋白含量没有显著差异,尽管HA组的软骨厚度最高。

[0202] 比较“肽”组与“虚假”组和“HA”组,在注射了本发明的肽的动物中发现,在膝盖内侧胫骨表面上软骨结构损伤和蛋白聚糖损失两者的最低严重性、以及减少的骨赘评分。最后,对于注射了本发明的肽的动物的膝关节,降解参数的总评分最低。此外,在施用本发明

的肽的豚鼠中,存在更持久的染色,该染色突出了II型胶原的更多的合成和软骨厚度的增加。总结来说,相比虚假注射和HA注射的动物,注射了本发明的肽的动物具有最高的厚度和更好的软骨质量。

[0203] 实施例2:本发明的肽的稳定性

[0204] 样品制备

[0205] 将浓度为0.9mM (2.5mg/ml) 的肽单独溶解在Millipore过滤器处理过的水中。肽+ HA溶液由在HA (1.8MDa) 的1% (10mg/ml) 水溶液中以0.9mM溶解的肽组成。

[0206] 拉曼散射测量

[0207] 将样品置于透明石英池 (5mm路径长度) 中,并通过488nm的Ar+激光器 (Spectra Physics, CA, 美国) 用约200mW的功率来激发样品。在配置有每毫米1200个凹槽的全息光栅和全息波滤波器的单光谱仪中的Jobin-Yvon T64000 (HORIBA Jobin-Yvon, 法国) 上分析直角的散射光。借助液氮冷却的CCD检测系统 (Spectrum One, Jobin-Yvon, 法国) 来收集斯托克斯 (Stokes) 拉曼数据。有效光谱狭缝宽度设置为约 5cm^{-1} 。每个所记录的光谱对应于1200秒的总采集时间。可以使用GRAMS/AI包 (Thermoage Galactic, MA, 美国) 对观察到的拉曼光谱进行缓冲减法 (buffer subtraction) 和平滑化。通过SigmaPlot包 (Systat Software Inc., CA, 美国) 进行这些光谱的最终呈现。

[0208] 结果

[0209] 结果如图2所示。

[0210] 图2A显示从肽和透明质酸 (HA) 的混合物的水溶液获得的拉曼光谱。肽谱不同于HA谱。 1669cm^{-1} 处的 β 标记拉曼谱带是在该区域中观察到的主要成分,且属于肽的H-键合的 β 链。

[0211] 图2A1显示了聚焦于在0.9mM肽-1%HA的水溶液中记录的拉曼光谱的光谱区域 1646cm^{-1} 。观察到属于肽的反平行 β 折叠结构的二级肽构象。

[0212] 图2B1显示了在1686和1645之间的光谱区中观察到的单独的肽的拉曼光谱的分解。若干 (4) 属于 β 型结构的二级肽构象可以通过带分解来证明: β -链残基意味着链间氢键 (在 1660cm^{-1} 处的标记) 和反平行的 β 折叠 (在约 1686cm^{-1} 至 1674cm^{-1} 的频率间隔处的双峰,在约 1645cm^{-1} 处的单峰) 的存在。

[0213] 图2B2显示了生长抑素在磷酸盐缓冲液中的拉曼光谱的示意性结果。在 1668cm^{-1} 处存在 β 标记拉曼带作为在该区域中观察到的独特部分且属于H-键合的 β -链。

[0214] 因此,与在水中的单独的肽所采用的构象 (4个主要带) 不同,肽HA保持单一的二级构象,作为典型的生长抑素的 β 折叠构象。

[0215] 实施例3:本发明的肽对骨关节软骨质量和数量的影响

[0216] 样品制备

[0217] 将本发明的肽 (对应于SEQ ID NO:4) 以 $74.6\mu\text{g}/\text{ml}$ 溶解于含有1% (10mg/ml) 透明质酸的0.9%NaCl溶液中。

[0218] 动物IA注射

[0219] 该研究是在雄性新西兰兔上进行的。通过右膝关节的前十字韧带的手术横切来诱导骨关节炎 (该动物模型称为ACLT模型,是经过充分验证的创伤性骨关节炎模型)。每组注射10只28周龄的动物。通过右膝关节的ACLT横切兔子。在从ACLT手术完全恢复 (即14天) 后,

将300 μ l的本发明的肽/HA混合物(“肽+HA组”,对应于注射约10⁻⁵M后的关节内的肽浓度)或盐溶液(对照组)或分子量为600kDa的市售透明质酸(HA600,“HA”组)经关节内注射施用于右膝内,每隔1周重复3次。在ACLT手术后8周对动物实施安乐死。

[0220] 关节结构的宏观评价

[0221] 对关节的四个隔室进行宏观评估:内侧和外侧股骨髁以及内侧和外侧胫骨坪。评估每个病变的等级(严重性,评分范围从0到4)及其大小(评分范围从0到7)。全局宏观评分对应于关节的所有隔室中的所有病变获得的评分的总和。分数可以分别视为大小×等级或单独的大小和等级。出于统计分析的目的,四个隔室被认为是独立的。

[0222] 结果

[0223] 分析了每组中的整个群体和低亚群(具有较不严重的病变)的全局宏观评分(大小×等级)。在整个群体中,施用本发明的肽与透明质酸的组合导致了病变的严重性以及病变的大小的降低,而单独的HA没有显示出任何效果。

[0224] 在兔的低亚群中,“对照”组和“HA”组中的全局宏观评分等级和大小没有显著差异。然而,将“肽+HA”组与“对照”组和“HA”组进行比较,发现在注射了本发明的肽与HA组合的动物中,全局宏观评分等级显著降低(图3A)。此外,在施用组合了HA的本发明的肽的兔子中,还发现全局宏观评分大小的略微降低,对于一些动物接近于零(图3B)。

[0225] 因此,这些结果证明了本发明的肽和透明质酸的组合在创伤性骨关节炎模型中的治疗潜力。

[0226] 实施例4:本发明的肽和透明质酸的组合对软骨形成的影响

[0227] 材料和方法

[0228] 将来自膝盖的正常人关节软骨细胞(NHAC-kn)以每孔0.22×10⁶个细胞接种到培养室(8个孔)中。在含有或不含有浓度为10 μ M的透明质酸(HA)的本发明的肽存在下,使用含有胎牛血清5%、庆大霉素/两性霉素-B 0.1%、人重组成纤维细胞生长因子- β 0.5%、R3-胰岛素样生长因子-1 0.2%、胰岛素0.2%、转铁蛋白0.1%的软骨细胞生长培养基来扩增NHAC-kn细胞。培养基每2天更换一次。孵育4天后,用甲醛固定细胞并用阿辛蓝染色。

[0229] 结果

[0230] 阿辛蓝染色显示,用测试的单独的肽处理的细胞的细胞簇的增加表明了对软骨形成的刺激。透明质酸的添加诱导细胞增殖的略微增加,但没有簇形成。添加与SEQ ID NO:2所示的肽组合的透明质酸(HA)诱导了更多的增殖,其对簇形成的影响比单独的肽更晚。因此,与测试的单独的肽相比,添加与肽的组合的透明质酸允许更好的细胞增殖和更好的长期效果。

序列表

<110> 雷古拉克西斯公司
 克劳德·卡雷利
 克里斯泰勒·韦图
 拉法埃洛·保利尼

<120> 用于治疗骨关节炎的肽

<130> CV - 634/PCT

<160> 20

<170> BiSSAP 1. 3. 6

<210> 1

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> 位点(SITE)

<222> 1

<223> X为空缺的或是V或是RV或是DRV或是SDV或是DSDV或是SEQ ID NO: 5-7中的任一个

<220>

<221> 位点(SITE)

<222> 3

<223> X 是EK、ES或DL

<220>

<221> 位点(SITE)

<222> 5

[0001] <223> X是空缺的或是K或是KD或是KDL或是SEQ ID NO: 8-14中的任一个

<220>

<221> 位点(SITE)

<222> 8

<223> X是C、S、Y、F、D、E、A或G

<220>

<221> 位点(SITE)

<222> 13

<223> X空缺的或是W或是WK或是WKT或是SEQ ID NO: 15-19中的任一个

<400> 1

Xaa	Tyr	Xaa	Leu	Xaa	Ala	Gly	Xaa	Lys	Asn	Phe	Phe	Xaa
1				5				10				

<210> 2

<211> 25

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> 嵌合肽

<400> 2

Gly	Ala	Ser	Asp	Ser	Asp	Val	Tyr	Asp	Leu	Leu	Ala	Gly	Ser	Lys	Asn
1				5				10				15			
Phe	Phe	Trp	Lys	Thr	Phe	Thr	Ser	Ser							
		20					25								

<210> 3

<211> 26

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> 嵌合肽

<400> 3
 Gly Ala Ser Asp Ser Asp Val Tyr Asp Leu Leu Lys Ala Gly Ser Lys
 1 5 10 15
 Asn Phe Phe Trp Lys Thr Phe Thr Ser Ser
 20 25

<210> 4
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> 嵌合肽

<400> 4
 Gly Thr Ser Asp Arg Val Tyr Glu Lys Leu Ala Gly Ser Lys Asn Phe
 1 5 10 15
 Phe Trp Lys Thr Phe Thr Ser Ser
 20

<210> 5
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> P嵌合肽的1位

<220>
 <221> 位点(SITE)
 <222> 3
 <223> X是R或SD或SN

<400> 5
 Ser Asp Xaa Val
 1
 [0002]

<210> 6
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <221> 位点(SITE)
 <222> 1
 <223> X是R(当X在4位时为T)或是SD或SN(当X在4位时为A)

<220>
 <223> 嵌合肽的1位

<220>
 <221> 位点(SITE)
 <222> 4
 <223> X是T(当X在1位时为R)或是A(当X在1位时为SD或SN)

<400> 6
 Xaa Ser Asp Xaa Val
 1 5

<210> 7
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> 嵌合肽的1位

<220>
 <221> 位点(SITE)
 <222> 2
 <223> X是R(当X在5位时为T)或是SD或SN(当X在5位时为A)

<220>
 <221> 位点(SITE)
 <222> 5
 <223> X是T(当X在2位时为R)或是A(当X在2位时为SD或SN)

<400> 7
 Gly Xaa Ser Asp Xaa Val
 1 5

<210> 8
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> 嵌合肽的5位

<400> 8
 Lys Asp Leu Glu
 1

<210> 9
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> 嵌合肽的5位

<400> 9
 Lys Asp Leu Glu Glu
 1 5

[0003] <210> 10
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> 嵌合肽的5位

<400> 10
 Lys Asp Leu Glu Glu Gly
 1 5

<210> 11
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> 嵌合肽的5位

<400> 11
 Lys Asp Leu Glu Glu Gly Ile
 1 5

<210> 12
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> 嵌合肽的位置5

<400> 12
 Lys Asp Leu Glu Glu Gly Ile Gln
 1 5

<210> 13

<211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> 嵌合肽的5位

<220>
 <221> 位点(SITE)
 <222> 9
 <223> X是A或T

<400> 13
 Lys Asp Leu Glu Glu Gly Ile Gln Xaa
 1 5

<210> 14
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> 嵌合肽的5位

<220>
 <221> 位点(SITE)
 <222> 9
 <223> X是A或T

<400> 14
 Lys Asp Leu Glu Glu Gly Ile Gln Xaa Leu
 1 5 10

<210> 15
 <211> 4
 <212> PRT

[0004] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> 嵌合肽的13位

<400> 15
 Trp Lys Thr Phe
 1

<210> 16
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> 嵌合肽的13位
 <400> 16
 Trp Lys Thr Phe Thr
 1 5

<210> 17
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> 嵌合肽的13位

<400> 17
 Trp Lys Thr Phe Thr Ser
 1 5

<210> 18
 <211> 7
 <212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 嵌合肽的13位

<220>

<221> 位点(SITE)

<222> 7

<223> X是C、S、Y、F、D、E、A或G

<400> 18

Trp Lys Thr Phe Thr Ser Xaa
1 5

<210> 19

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 嵌合肽的13位

[0005]

<220>

<221> 位点(SITE)

<222> 7

<223> X是C、S、Y、F、D、E、A或G

<400> 19

Trp Lys Thr Phe Thr Ser Xaa Lys Gln Ala
1 5 10

<210> 20

<211> 26

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 嵌合肽

<400> 20

Gly Ala Ser Asp Ser Asn Val Tyr Asp Leu Leu Lys Ala Gly Ser Lys
1 5 10 15
Asn Phe Phe Trp Lys Thr Phe Thr Ser Ser
20 25

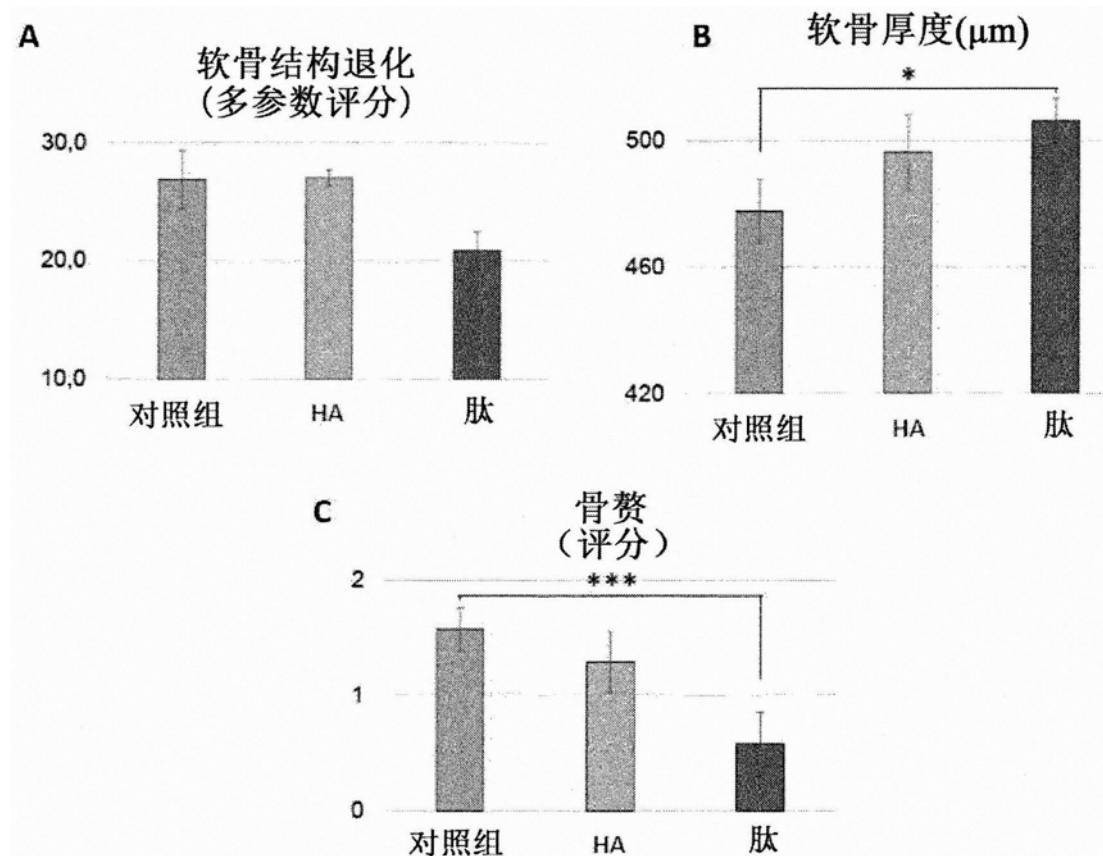


图1

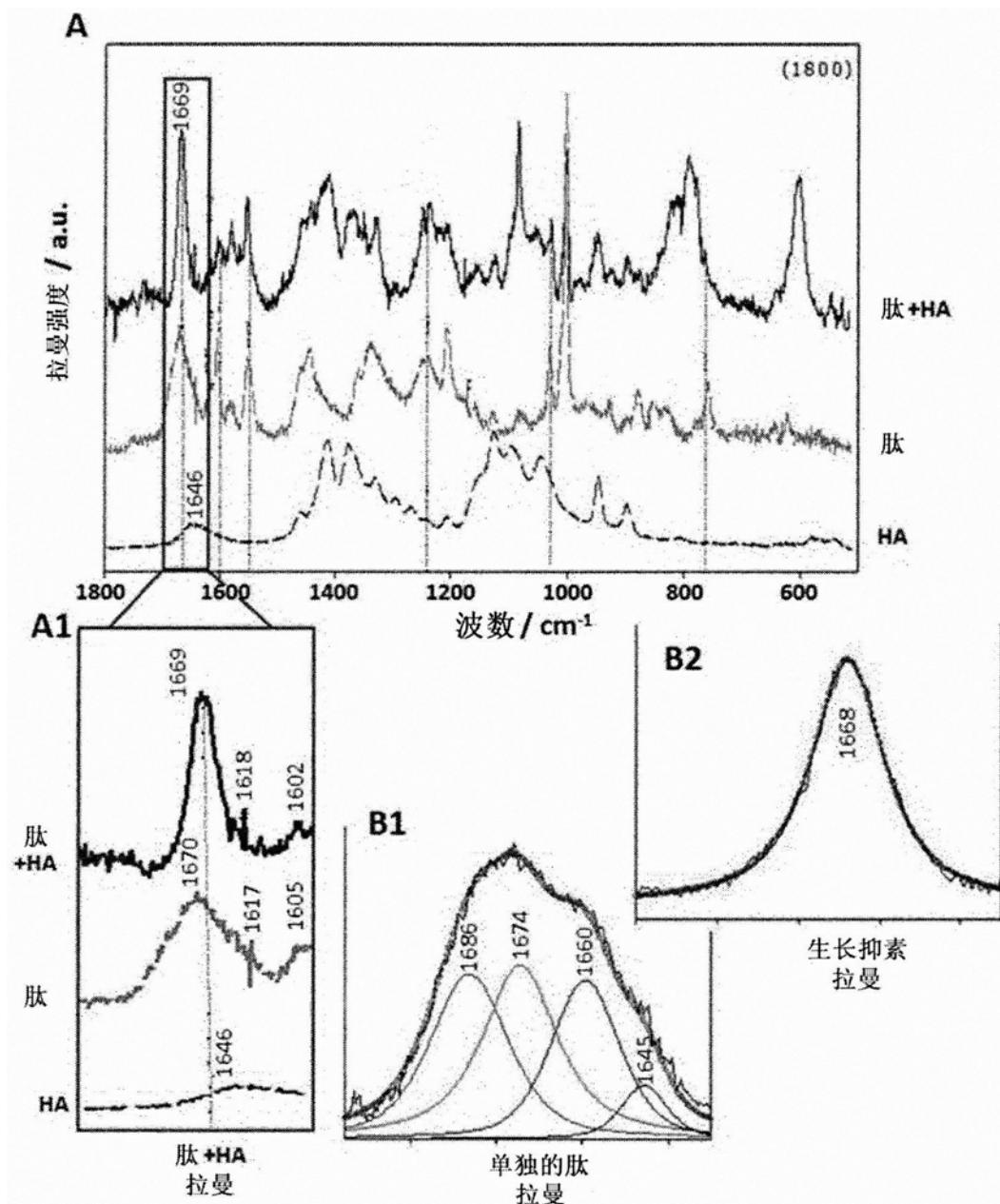


图2

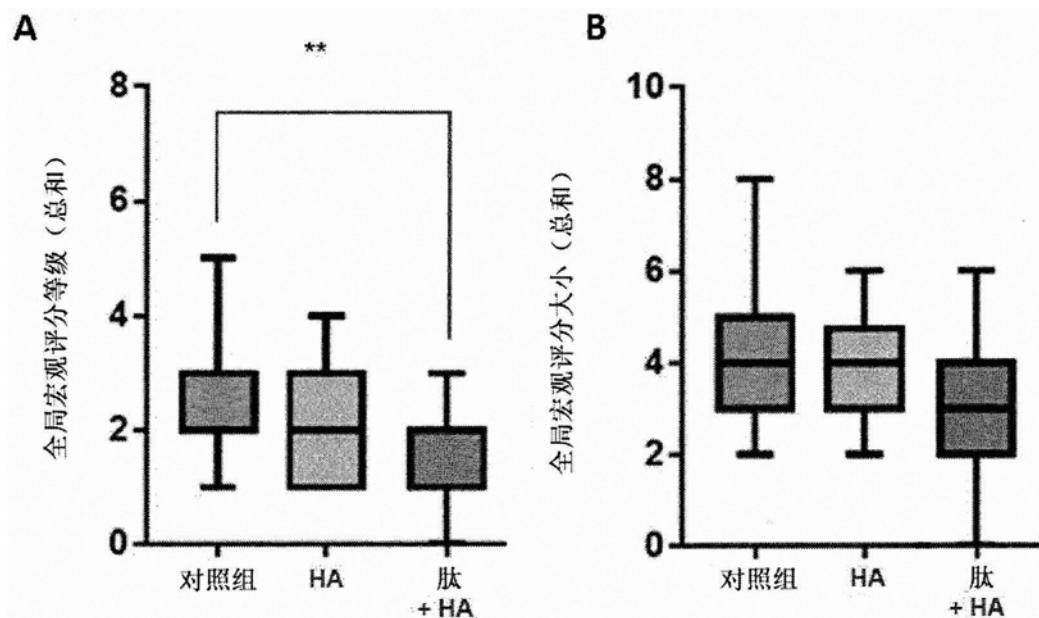


图3