

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

A61K 38/22 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200910118323.X

[43] 公开日 2009 年 10 月 7 日

[11] 公开号 CN 101549148A

[22] 申请日 2002.8.29

[21] 申请号 200910118323.X

分案原申请号 02816688.4

[30] 优先权

[32] 2001.8.29 [33] US [31] 60/315,347

[71] 申请人 雷根内克斯生物制药有限公司

地址 美国波士顿

[72] 发明人 艾伦·L·戈尔德斯坦

小杰克·芬科尔斯坦

[74] 专利代理机构 北京律诚同业知识产权代理有限公司

代理人 徐金国 陈 红

权利要求书 1 页 说明书 6 页

[54] 发明名称

多肽在制备用于促进心内膜细胞向间质细胞转化的药物中的应用

[57] 摘要

本发明通过给予诸如胸腺素 $\beta 4$ 、胸腺素 $\beta 4$ 的同型物或氧化的胸腺素 $\beta 4$ 的血管生成诱导、抗炎肽，公开了多肽在促进心内膜细胞向间质细胞转化中的应用，并提供了一种含有多肽的组合物。所述多肽和组合物可促进冠状组织愈合或预防其损伤，用于治疗或预防与心肌事件相关的炎症和损伤。

- 1、多肽在制备用于促进心内膜细胞向间质细胞转化的药物中的应用，其中所述多肽含有 LKKTET 氨基酸序列或其保守变异体。
- 2、如权利要求 1 所述的应用，其中所述多肽包括 KLKKTET、LKKTETQ、胸腺素 β 4、胸腺素 β 4 的 C-末端变异体、胸腺素 β 4 的同型物、氧化的胸腺素 β 4 或胸腺素 β 4 硫氧化物。
- 3、如权利要求 1 所述的应用，其中将所述药物系统地给药。
- 4、如权利要求 1 所述的应用，其中将所述药物直接给药于冠状组织。
- 5、如权利要求 1 所述的应用，其中将所述药物通过静脉内、腹膜内、肌肉内、皮下、吸入、透皮或口服给药。
- 6、如权利要求 1 所述的应用，其中所述多肽是重组的或合成的。
- 7、如权利要求 1 所述的应用，其中所述多肽具有肌动蛋白螯合或结合能力。
- 8、如权利要求 1 所述的应用，其中所述多肽是一抗体。
- 9、如权利要求 8 所述的应用，其中所述抗体为多克隆抗体或单克隆抗体。
- 10、组合物在制备用于促进心内膜细胞向间质细胞转化的药物中的应用，其中所述组合物含有一药剂，所述药剂刺激血管生成诱导的抗炎多肽产生，所述多肽含有 LKKTET 氨基酸序列，或含有具有血管生成诱导的抗炎活性的其保守变异体。
- 11、如权利要求 10 所述的应用，其中所述多肽为胸腺素 β 4。
- 12、如权利要求 10 所述的应用，其中所述药剂为胸腺素 β 4 的拮抗剂。
- 13、一种用于促进促进心内膜细胞向间质细胞转化的组合物，包括一有效量的组合物，所述组合物包括一血管生成诱导的抗炎多肽，所述多肽含有 LKKTET 氨基酸序列或具有血管生成诱导的抗炎活性的其保守变异体。
- 14、如权利要求 13 所述的组合物，其中所述组合物含有 LKKTET 氨基酸序列的 N-末端或 C-末端变异体。
- 15、如权利要求 13 所述的组合物，其中所述组合物含有 LKKTET 或 LKKTETQ。
- 16、如权利要求 13 所述的组合物，其中所述组合物含有胸腺素 β 4、胸腺素 β 4 的同型物、氧化的胸腺素 β 4 或胸腺素 β 4 硫氧化物。

多肽在制备用于促进心内膜细胞向间质细胞转化的药物中的应用

本申请是中国专利申请 02816688.4 的分案申请。

发明背景

相关申请的交叉引用

本发明要求 2001 年 8 月 29 日提交的申请号为 No. 60/315, 347 的美国临时申请的权益。

1、发明领域

本发明涉及在心肌事件（例如：心肌梗塞）发生前、发生过程中或刚发生后治疗或预防发生在心脏、心瓣膜和中隔壁中的炎症、损伤和其他改变的领域。

2、背景技术描述

心肌血管和冠状血管和组织损伤的原因有很多，包括但不限于心肌缺血、凝块、血管堵塞、感染、发育缺陷或畸形以及其他这类心肌事件。心肌梗塞是由于心内的血管病变。发生在当供给心脏部分的血液减少或停止时（由冠状动脉的阻塞引起）。减少的血液供给引起心肌细胞损伤并且甚至杀死心肌细胞。对心脏血液供给的减少经常是由动脉粥样斑导致的心外膜的血管狭窄引起的。这些动脉粥样斑可能破裂导致出血、血栓形成、血纤维蛋白和血小板积聚以及血管的收缩。

在本技术领域一直需要改进在心肌事件发生前、其过程中或在其刚发生后用于治疗或预防炎症、损伤和其他改变的方法和组合物。

发明概述

按照本发明，用于促进与心肌事件相关的损伤的医治或预防的治疗方法涉及给药于需要这种治疗的患者或病人有效量的一组合物，该组合物包括一血管生成诱导的和抗炎的多肽，该多肽含有 LKKTET 的氨基酸序列或具有心肌事件抑制活性的其保守变异体。

发明详述

本发明是基于这样一个发现：含有 LKKTET 氨基酸序列或其保守变异体的诸如胸腺素 β 4 (T β 4) 的肌动蛋白螯合 (actin-sequestering) 肽和其他肌动蛋白螯合肽或肽片段促进与心肌事件相关的损伤和其他改变的治疗或预防。包括诸如 KLKKTET 和 LKKTETQ 的 N-或 C-末端变异体。在啮齿动物模型中已提示 T β 4 在血管生成中作为一个因子发挥作用。然而，迄今尚没有已知的迹象表明这类性质在治疗诸如心肌梗塞、血管闭塞和心瓣膜缺陷和损伤的心肌血管和冠状血管事件中有用。没有与任何特定的理论相结合，这些多肽可能具有促进修复的能力，通过具有诱导末端脱氧核酸转移酶 (一种无模板指导的 DNA 聚合酶)，来降低和调控一种或多种炎性细胞素 (cytokines) 或化学素 (chemokines) 的水平，并且为内皮细胞充当趋化因子和/或血管生成因子的能力而医治和预防，并因而在发生心肌事件的病人中治疗和预防变性改变。

本发明提供能增强或下调间质的上皮细胞分化并恢复因局部缺血、感染、老化和其他损伤或伤害导致的损伤的心肌组织和血管的功能。

在体外，胸腺素 β 4 最初是作为在内皮细胞迁移和分化的过程中上调的蛋白被鉴定。最初是从胸腺中分离的胸腺素 β 4，其是有 43 个氨基酸、4.9kDa 的多肽，该多肽在各种组织中均鉴定出普遍存在。几种角色都归于这种蛋白，包括在内皮细胞分化和迁移、T 细胞分化、肌动蛋白隔离 (sequestration) 和血管形成中的角色。

根据本发明的一个实施方案，一种用于促进与心肌事件相关的损伤和炎症的医治和预防的治疗方法，包括给药于需要这种治疗的患者有效量的一组合物，该组合物含有一血管生成诱导、抗炎的肽，该肽含有 LKKTET 氨基酸序列或具有血管生成诱导、抗炎活性的其保守变异体，所述肽优选为胸腺素 β 4、胸腺素 β 4 同型物、氧化的胸腺素 β 4、胸腺素 β 4 的硫氧化物、或胸腺素 β 4 的拮抗体。

按照本发明，可以使用的组合物包括胸腺素 β 4 (T β 4)、T β 4 同型物、氧化的 T β 4、胸腺素 β 4 的硫氧化物、具有肌动蛋白结合区的螯合 (sequestering) 的或集束 (bundling) 的多肽或任何其他肌动蛋白、或具有血管生成诱导、抗炎活性的包含或基本由 LKKTET 氨基酸序列或其保守变异体组成的肽片段。No.

PCT/US99/17282 的国际申请, 这里通过引用结合进来, 公开了按照本发明中可以有用的 T β 4 的同型物以及 LKKTET 氨基酸序列和具有血管生成诱导、抗炎活性的其保守变异体, 其可以用于本发明。No. PCT/GB99/00833 (W0 99/49883) 的国际申请, 这里通过引用结合进来, 公开了按照本发明可以利用的氧化的胸腺素 β 4。虽然本发明后面主要是描述有关 T β 4 和 T β 4 同型物, 应当理解的是下面的描述可以同样地应用于氨基酸序列 LKKTET、LKKTETQ、含有或基本上由 LKKTET 或 LKKTETQ 组成的肽和片段、具有血管生成诱导、抗炎活性的其保守变异体、以及氧化的胸腺素 β 4。

在一个实施方案中, 本发明提供通过用有效量的血管生成诱导、抗炎组合物接触损伤位点而医治和预防患者的炎症和损伤的方法, 该组合物含有 T β 4 或 T β 4 同型物。所述接触可以是直接的或系统的 (systemically) 接触。接触损伤位点包括用仅含有 T β 4 的组合物接触该位点、或以与至少一个增加 T β 4 渗透、或延迟或缓释 T β 4 肽进入要治疗区域的药剂联合的形式。给药形式可以包括, 例如, 静脉内、腹膜内、肌内或皮下注射、或吸入、透皮或口服给予含有 T β 4 或 T β 4 同型物等的组合物。患者可以是哺乳动物, 最好是人。

T β 4, 或其类似物、同型物或衍生物, 可以以任何适于心肌事件损伤抑制或减轻的量使用。例如, T β 4 可以以大约 0.1~50 微克的剂量来给予, 更优选的是以大约 1~25 微克的量给药。

按照本发明的组合物可以每天、每隔一天等用单次给予或每天多次给予的形式给药, 例如每天 2 次、3 次、4 次或更多次给药。

已鉴定了 T β 4 的同型物, 并具有与已知的 T β 4 氨基酸序列大约 70%、或大约 75%、或大约 80% 或更高的同源性。这类同型物包括, 例如, T β 4^{ala}、T β 9、T β 10、T β 11、T β 12、T β 13、T β 14 和 T β 15。与 T β 4 类似, T β 10 和 T β 15 同型物已显示出螯合肌动蛋白。T β 4、T β 10 和 T β 15 以及这类其他的同型物共同有一个氨基酸序列, LKKTET, 该序列似乎与介导肌动蛋白螯合或结合有关。虽然不希望与任何特定的理论结合, T β 4 同型物的活性可能部分由于调节肌动蛋白聚合的能力。 β -胸腺素似乎通过螯合自由的 G-肌动蛋白使 F-肌动蛋白解聚。T β 4 的调控肌动蛋白聚合的能力因此可能全部或部分由于其具有通过 LKKTET 序列与肌动蛋白结合或螯合的能力。因此, 就像用 T β 4, 如这里阐明的, 其他结合或螯合肌动蛋白的蛋白, 或调控肌动蛋白聚合的蛋白, 包括具有 LKKTET

氨基酸序列的 T β 4 同型物，单独或与 T β 4 联合使用似乎都有效。

因此，特别预期已知的 T β 4 同型物，例如 T β 4^{ala}、T β 9、T β 10、T β 11、T β 12、T β 13、T β 14 和 T β 15，以及尚未鉴定的 T β 4 同型物，将都在本发明的方法中有用。这类 T β 4 同型物在本发明的方法中有用，该方法包括在患者中使用的方法。因此本发明进一步提供含有 T β 4，以及 T β 4 同型物 T β 4^{ala}、T β 9、T β 10、T β 11、T β 12、T β 13、T β 14 和 T β 15，以及药学上可接受的载体的药物组合物。

另外，具有肌动蛋白螯合或结合能力的其他蛋白，或那些能动员或调控肌动蛋白聚合的蛋白，就像以适当地螯合、结合、动员或聚合分析所证实的，或通过诸如 LKKTET 的介导肌动蛋白结合的氨基酸序列的存在而鉴定的，都可同样地用于本发明方法中。这类蛋白包括例如（肌动蛋白）凝溶胶蛋白、维生素 D 结合蛋白（DBP）、（肌动蛋白）抑制蛋白、cofilin、adsevertin、前肌球蛋白（propomyosin）、fincilin、depactin、脱氧核糖核酸酶 I、villin、（肌动蛋白）片段化蛋白、severin、（肌动蛋白）加帽蛋白、 β -辅肌动蛋白、和 acumentin。由于这类方法包括那些在患者中实施的方法，本发明进一步提供含有上述（肌动蛋白）凝溶胶蛋白、维生素 D 结合蛋白（DBP）、（肌动蛋白）抑制蛋白、cofilin、depactin、脱氧核糖核酸酶 I、villin、（肌动蛋白）片段化蛋白、severin、（肌动蛋白）加帽蛋白、 β -辅肌动蛋白、和 acumentin 的药物组合物。因此本发明包括含有 LKKTET 氨基酸序列（可以是在其最初的氨基酸序列内）的血管生成诱导、抗炎多肽和其保守变异体的用途。

在此使用的术语“保守变异体”或其语法变化指用一个氨基酸残基代替另一个生物学上相类似的残基。保守变异的例子包括例如用异亮氨酸、缬氨酸、亮氨酸或甲硫氨酸的疏水残基代替另一个，用极性残基代替另一个，例如用精氨酸代替赖氨酸，用谷氨酸代替天冬氨酸，或用谷氨酰胺代替天冬酰胺等等。

已将 T β 4 定位于几个组织和细胞类型，并且因此可以加入刺激 T β 4 产生的药剂，或该药剂可以包含一组合物，以影响来自组织和/或细胞中的 T β 4 产生。这类药剂包括生长因子家族的成员，例如胰岛素样生长因子（IGF-1）、血小板衍生生长因子（PDGF）、表皮生长因子（EGF）、转化生长因子 β （TGF- β ）、碱性成纤维细胞生长因子（bFGF）、胸腺素 α 1（T α 1）和血管内皮生长因子（VEGF）。更优选的是，该药剂是转化生长因子 β （TGF- β ）或 TGF- β 总科的其他成员。本发明的 T β 4 组合物可以通过细胞外基质沉积、细胞的迁移和皮肤的血管形成实

现相连接组织的生长而降低心肌事件的影响。

按照本发明的一个实施方案,给患者用刺激在该患者中产生如上述的血管生成诱导、抗炎的肽的药剂治疗。

另外,可将帮助或刺激医治由心肌事件引起的损伤的药剂与 T β 4 或 T β 4 同型物一起加入到组合物中。这类药剂包括血管生成剂、生长因子、指导细胞分化的药剂。例如,并以非限制的方式,T β 4 或 T β 4 同型物可以单独或联合与有效量的下述药剂的任何一种或多种结合:VEGF、KGF、FGF、PDGF、TGF β 、IGF-1、IGF-2、IL-1、前胸腺素 α (prothymosin α) 和胸腺素 α 1。

本发明也包括在药学上可接受的载体中含有治疗有效量的 T β 4 或 T β 4 同型物的药物组合物。这类载体包括那些列举在肠胃外投药的参考资料中的载体。

医治或预防与心肌事件相关的炎症、损伤和退化的实际剂量、配方或组成成分可以取决于许多因素,包括患者的体型和健康状况。然而,本领域技术人员可以运用在 PCT/US99/17282 (见前) 中公开的,和其中引用的参考文献中描述的用于确定临床剂量的方法和技术的教导来确定使用的适当剂量。

合适的配方包括 T β 4 或 T β 4 同型物重量浓度范围在大约 0.001-10%,更优选在大约 0.01-0.1%重量浓度范围内,最优选为大约 0.05%重量浓度。

在这里描述的治疗途径涉及含有 T β 4 和本发明其他化合物的试剂或组合物的各种途径的给药或输送,包括任何常规的对患者的给药技术。可以按照使用的方法,通过与药学上可接受的无毒性赋形剂或载体混合,将含有 T β 4 和本发明其他化合物的组合物配制成药物组合物。

本发明包括与 T β 4 肽或其功能片段相互作用的抗体的用途。提供基本由具有不同表位特异性的混合的单克隆抗体以及性质不同的 (distinct) 单克隆抗体制剂组成的抗体。通过本领域技术人员已知的,如在 PCT/US99/17282 (见前) 中公开的方法,由含有蛋白片段的抗原制备单克隆抗体。在本发明中使用的术语抗体意在包括单克隆抗体和多克隆抗体。

在另一个实施方案中,本发明提供给予患者有效量的调控 T β 4 基因表达的药剂的治疗方法。术语“调控”指当 T β 4 过量表达时,T β 4 表达的阻碍或抑制,而在 T β 4 表达不足时,其表达的诱导。术语“有效量”意为在有效治疗中,调控 T β 4 基因表达中的 T β 4 药剂的量。调控 T β 4 或 T β 4 同型物基因表达的药剂可以是例如一多核苷酸。该多核苷酸可以是反义 (核酸)、三螺旋 (triplex)

剂、或核糖酶。例如，可以使用直接针对结构基因区域或针对 T β 4 启动子区域的反义（核酸）。

在另一个实施方案中，本发明提供使用调控 T β 4 活性的化合物的方法。影响 T β 4 活性（例如拮抗剂和促效剂）的化合物包括肽、肽模拟物（peptidomimetics）、多肽、化学化合物、例如锌的矿物、以及生物药剂。

不与任何特定的理论结合，本发明可以通过诱导末端脱氧核酸转移酶（一种无模板指导的 DNA 聚合酶）促进与心肌事件相关的炎症或损伤的医治或预防，通过诱导末端脱氧核酸转移酶以降低一种或多种炎性细胞素或化学素的水平，并且在内皮细胞中作为趋化性因子，因而促进在由心肌事件或其他变性或环境因子导致的、发生在心血管和组织中的变性改变的医治或预防。

下面的实施例进一步说明本发明，但不应作为其限制。

实施例

合成的 T β 4 和抗 T β 4 抗体由 RegeneRx 生物制药公司（3 Bethesda Metro Center, Suite 700, Bethesda, MD 20814）提供，并在胶原蛋白凝胶分析测试以测定它们由心内膜细胞向间质细胞转化的效果。已充分证实通过上皮一间质转化形成心瓣膜和其他心脏组织的发育，并证实在此过程中的缺陷可在发育过程中和终生导致严重的心血管畸形和损伤。在胶原蛋白凝胶分析中，生理浓度的 T β 4 明显增强心内膜细胞向间质细胞的转化。而且抗 T β 4 抗体抑制并阻断这种转化。在正常心脏组织形成和维护过程中和心瓣膜形成过程中，房室的心内膜向侵入的间叶细胞的转化是关键的。