



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102892776 B

(45) 授权公告日 2014. 07. 16

(21) 申请号 201180004884. 2

(22) 申请日 2011. 06. 22

(30) 优先权数据

10-2010-0062467 2010. 06. 30 KR

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2012. 06. 08

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/KR2011/004541 2011. 06. 22

(87) PCT国际申请的公布数据

W02012/002668 EN 2012. 01. 05

(73) 专利权人 因首太克株式会社

地址 韩国大田广域市

(72) 发明人 金海镇 李济旭 权永准 文银贞

(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 19/00 (2006. 01)

A61K 38/08 (2006. 01)

(56) 对比文件

W0 00/02916 A2, 2000. 01. 20, 全文.

EP 1400252 A1, 2004. 03. 24, 全文.

US 2009/0074876 A1, 2009. 03. 19, 全文.

CN 101611051 A, 2009. 12. 23, 全文.

审查员 皇甫洁琼

权利要求书1页 说明书12页

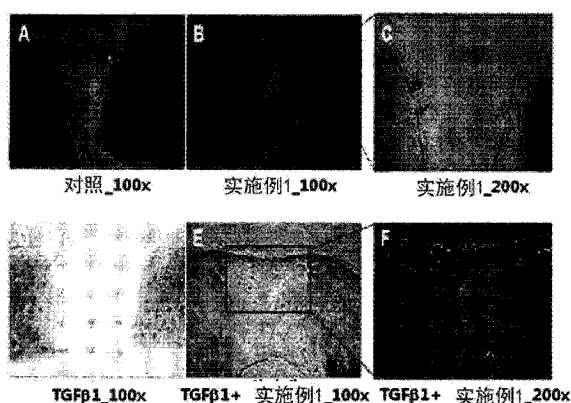
序列表4页 附图6页

(54) 发明名称

新型肽及其用途

(57) 摘要

本发明提供了由式 (I) 的 $X_1\text{-Leu-X}_2\text{-Leu-X}_3$ 所示的肽, 其中 X_1 表示 Glu 或 Asp, X_2 表示 His、Lys 或 Arg, X_3 表示 Asp 或 Glu; Glu、Asp、Leu、His、Lys 和 Arg 分别为谷氨酸、天门冬氨酸、亮氨酸、组氨酸、赖氨酸和精氨酸; 或其药学上可接受的盐; 一种用于治疗或预防软骨损伤和关节炎中的至少一种的组合物, 所述组合物包含所述肽或其药学上可接受的盐作为活性成分; 以及一种包含所述肽或其药学上可接受的盐和 TGF β 1 的组合物。上述肽或其药学上可接受的盐可有效地用于治疗 and / 或预防软骨损伤和 / 或关节炎, 并且能够显示出再生软骨组织、抑制软骨组织基质降解酶的表达和 / 或抑制软骨组织骨化的作用。



1. 一种如式(I)所示的肽：



其中, X_1 表示 Glu, X_2 表示 His, X_3 表示 Asp; Glu、Asp、Leu、His 分别为谷氨酸、天门冬氨酸、亮氨酸、组氨酸,或其药学上可接受的盐。

2. 一种用于治疗或预防软骨损伤和关节炎中至少一种的组合物,包含权利要求 1 所述的肽或其药学上可接受的盐作为活性成分。

3. 如权利要求 2 所述的组合物,其中所述治疗或预防是通过软骨组织再生、抑制软骨组织基质降解酶的表达和抑制软骨组织骨化中的至少一种。

4. 如权利要求 2 所述的组合物,其中所述关节炎是伴有软骨与软骨下骨退变的关节病。

5. 如权利要求 2 所述的组合物,其中所述组合物是药物组合物。

6. 一种组合物,包含权利要求 1 所述的肽或其药学上可接受的盐和转化生长因子 $\beta 1$ (TGF $\beta 1$)。

新型肽及其用途

技术领域

[0001] 本发明涉及一种新型肽。具体地,本发明涉及一种有效用于治疗和 / 或预防软骨损伤或关节炎的新型肽。

背景技术

[0002] 软骨组织是由基质和软骨细胞组成。其中,基质的胶原蛋白纤维(胶原蛋白、蛋白多糖)以及非胶原蛋白将水吸入或排出软骨,从而在保持软骨独特的物理性质中发挥重要作用。关节疾病中常伴有软骨组织损伤,关节的软骨组织大致可分为四个区域,即最外层的浅表切线区(STZ)、中间区、深区和钙化区(Clouet J et al., Drug Discovery Today (2009) 14 :19/20, 913-925)。浅表切线区是一个基质比例相对较低的区域,其中的胶原纤维沿关节面密集排列并出现细胞形态薄且扁平的软骨细胞,该区可吸收关节运动的剪切力。中间区比浅表切线区厚,是由厚胶原蛋白纤维和球形软骨细胞组成,用于承受负荷,因为具有高比例的含蛋白多糖和水的基质。深区含有丰富的多糖和非胶原蛋白以及最高含量的基质成分,但含水量最低,用于通过纵向排列相对少量的接近球形的软骨细胞和胶原蛋白纤维来赋予组织稳定性。钙化区具有被称为潮标的特殊结构,并且发挥将软骨组织固定在骨组织上的功能。

[0003] 构成关节的软骨组织受损引起关节炎的发作,伴随有肿胀、发热和疼痛。关节炎的发作是不分种族的,根据其致病原因可被划分为约 100 种类型。关节炎的最常见形式是骨关节炎,一种主要由老化引起的退变性关节病。其它的关节炎实例包括自身免疫性疾病的类风湿关节炎和银屑病关节炎,以及由感染引起的化脓性关节炎。特别地,退变性关节炎是一种老年人的代表性疾病,关节的老化是退变性关节炎的主要致病原因。此外,由于退变性关节炎的发病率也与各种因素结合的相互作用有关,如遗传因素、营养不均衡、缺乏运动、过度运动或损伤、以及向关节施加沉重的负荷的行为,例如劳累过度或习惯性不良姿势及由于肥胖引起的超负荷,因此退变性关节炎也是一种高频率见于年轻人群的疾病(Gegout PP et al., Joint Bone Spine (2008) 669-671)。

[0004] 因外伤或退变性变化引起的关节支撑组织弱化,导致用于吸收冲击的软骨组织受伤,从而增加了骨与骨的摩擦引起疼痛和炎症。炎症加速关节周围形成骨赘,限制了关节的活动性并导致更严重的疼痛。

[0005] 关节炎是一种发病率高、覆盖年龄范围广的疾病,并且受损组织不易于自发性再生或修复。因此,关节炎是患者的社会活动长期受到限制和生活质量恶化的主要原因。

[0006] 目前可用的治疗措施大致可分为保守疗法,如运动疗法,包括控制体重、饮食疗法、注射疗法和药物疗法;以及手术疗法,如使用生长因子的组织再生、植入人工培养的细胞以及用于关节严重受损时的人工关节置换(Clouet J et al., Drug Discovery Today (2009) 14 :19/20, 913-925)。

[0007] 对关节不产生沉重负荷范畴内的运动疗法有加强关节周围组织的作用,可延缓症状进一步加重,但并不会使损伤组织再生,且在病情严重的情况下,由于疼痛,运动疗法难

以开展。

[0008] 为了促进关节的组织再生或减轻炎症,已经使用软骨组成成分,如葡萄糖胺或软骨素、具有抗炎作用的鱼油以及其他中药成分 (Derfoul A et al., *Osteoarthritis Cartilage* (2007) 15,646-655;Tiralocche G et al., *Arthritis Rheum.* (2005) 52, 1118-1128;McAlindon TE et al., *JAMA* (2000) 283(11):1469-147;和 Zainal Z et al., *Osteoarthritis Cartilage* (2009) 17(7):896-905)。

[0009] 此外,也已经使用注射透明质酸 (HA) 的方法,通过减少损伤区域的摩擦来缓解疼痛和预防症状加重,所述透明质酸是一种关节滑液成分 (Waddell DD et al., *Arthroscopy* (2010) 26(1):105-11;and Wang CT et al., *J. Bone Joint Surg. Am.* (2004) 86-A 538-545)。

[0010] 虽然,据报道有些保守疗法具有有利的治疗效果,但其疼痛缓解或治疗效果是微不足道的或机制尚不完全清楚。因此,有必要从这些疗法的治疗应用的角度作进一步检验 (McAlindon TE et al., *JAMA* (2000) 283(11):1469-147)。

[0011] 阿司匹林、对乙酰氨基酚或各种非甾体类抗炎药 (NSAIDs) 和甾体类药物,如可的松,已被用于缓解炎症或疼痛。然而,这些药物疗法并不是能实现修复损伤组织的基础疗法。此外,据报道长期服用这类药物具有如胃肠道、组织或骨损伤等不良副作用 (Clouet J et al., *Drug Discovery Today* (2009) 14:19/20,913-925;Glass GG *Dis. Mon.* (2006) 343-362;Zhang W et al., *Ann. Rheum. Dis.* (2004) 63,901-907);Frampton JE et al., *Drugs* (2007) 67(16):2433-72;and McDonough AL. *Phys Ther.* (1982) 62(6):835-9)。

[0012] 为了再生或修复损伤的软骨组织,有人试图使用含有芹菜苷元、或生长因子或其一部份,如 FGF、BMP7/OP-1 或 TGF β 1 的组合物 (Clouet J et al., *Drug Discovery Today* (2009) 14:19/20,913-925;Shi S et al., *J. Biol. Chem.* (2009) 284(1):6697-6704;and Moore EE et al., *Osteoarthritis Cartilage* (2005) 13,623-631)。然而,由于直接且重复地给关节炎患者注射由高分子量蛋白质组成的生长因子具有局限性,这种生长因子实际应用给患者还需要对其给药方式进行进一步研究。

[0013] 当上述保守疗法没有疗效或剧烈疼痛持续时,可以使用人工关节来置换损伤关节的手术治疗。然而,人工关节有一个约 10 年的有限寿命,所以在适当情况下需要再次手术。在这种情况下,再次手术有其局限性,因为去除骨头间狭窄的人工关节具有难度,需要植入一个更大的人工关节和需要更广泛的周围骨组织。由于存在这些问题,将人工关节置换应用于年轻人时应当更加谨慎。

[0014] 随着人工细胞培养技术的进步,最近报道了一些方法,包括从多能干细胞或自体骨髓间质干细胞人工培养软骨细胞以及植入所培养的软骨细胞 (Csaki C et al., *Ann Anat.* (2008) 190(5):395-412)。不幸的是,软骨细胞植入仍然有大量的问题需要解决,如不容易获得足够数量的自体细胞、以及将其应用于大量患者的技术和成本问题,如植入细胞的附着、再生效率和安全性。

[0015] 随着我们进入老龄化社会,患有关节炎的老齡人群正在不断增加。此外,由于过度运动、营养失衡、肥胖等,关节疾病的发病率在年轻人群中也在增加。为了减少造成的经济损失和社会开支并且提高老齡人群的生活质量,迫切需要开发一种先进的抗关节炎药物,其能够实现软骨组织基本的更加方便、安全、根本的再生和修复,而不是传统的减轻炎症或

疼痛的保守饮食疗法或药物疗法,也不是如人工关节置换或植入人工培养的软骨细胞等手术疗法。

发明内容

[0016] 技术问题

[0017] 本发明的目的是提供了一种新型肽或其药学上可接受的盐。

[0018] 进一步地,本发明的目的是提供一种用于治疗 and / 或预防软骨损伤和关节炎中的至少一种的组合物。

[0019] 进一步地,本发明的目的是提供一种有效治疗软骨损伤或关节炎的组合物。

[0020] 技术方案

[0021] 本发明提供一种由式 (I) 表示的肽:

[0022] $X_1\text{-Leu-X}_2\text{-Leu-X}_3$ (I)

[0023] 其中, X_1 表示 Glu 或 Asp, X_2 表示 His、Lys 或 Arg, X_3 表示 Asp 或 Glu; Glu、Asp、Leu、His、Lys 和 Arg 分别为谷氨酸、天门冬氨酸、亮氨酸、组氨酸、赖氨酸和精氨酸;或其药学上可接受的盐。

[0024] 所述肽优选为肽 (SEQ ID NO:1; Glu-Leu-His-Leu-Asp), 其中 X_1 表示 Glu, X_2 表示 His, X_3 表示 Asp。

[0025] 根据 R 基团 (同时连接到氨基酸上的羧基、氨基和氢原子以外的可变基团) 的属性将氨基酸分类。Glu 或 Asp 被归类为酸性氨基酸, 具有带负电荷的 (酸性) R 基团; 而 His、Lys 或 Arg 被归类为碱性氨基酸, 具有带正电荷的 (碱性) R 基团。酸性氨基酸具有在 pH 7.0 带负电荷的 R 基团, 并且还具有一个羧基。碱性氨基酸具有在 pH 7.0 带正电荷的 R 基团。属于相同类别的氨基酸具有相似的性质。

[0026] 所述肽的每个组成氨基酸可能是 L- 型、D- 型和 / 或 DL- 型, 本发明的肽的组成氨基酸包含了所有这些形式。

[0027] 所述药学上可接受的盐的实例包括盐酸盐、硫酸盐、磷酸盐、乳酸盐、马来酸盐、富马酸盐、草酸盐、甲磺酸盐和对甲苯磺酸盐。

[0028] 此外, 本发明提供本发明的肽或其药学上可接受的盐在用于治疗 and / 或预防软骨损伤或关节炎中的用途。

[0029] 因此, 本发明提供一种组合物, 所述组合物包含本发明的肽或其药学上可接受的盐作为活性成分, 用于治疗 and / 或预防软骨损伤和关节炎中的至少一种。

[0030] 所述“治疗和 / 或预防”可通过选自再生软骨组织、抑制软骨组织基质降解酶的表达和抑制软骨组织骨化中的至少一种来实现, 并且所述关节炎优选为伴随有软骨和软骨下骨退变的关节病。

[0031] 此外, 本发明提供一种含有本发明的肽或其药学上可接受的盐和转化生长因子 $\beta 1$ (TGF $\beta 1$) 的组合物。

[0032] 所述组合物中的肽或其药学上可接受的盐和 TGF $\beta 1$ 的重量比例范围可以是 1 : 20-40。

[0033] 本发明的组合物可以是药物组合物, 所述药物组合物可以通过添加药学上可接受的载体配制而成。

[0034] 本发明的肽可以通过常用的肽合成工艺制备而成。例如,可以用 Schroder 和 Lubke(The Peptides, Vol.1, Academic Press, New York, 1965) 所述的制备方法以及类似的方法,也可以用液相合成法或固相合成法来制备。

[0035] 形成肽键的方法的实例包括叠氮法、酸氯化法、对称酸酐法、混合酸酐法、碳二亚胺法、亚胺加成法、活化酯法、羰基二咪唑法、氧化还原法以及采用 Woodward 试剂 K 的方法。

[0036] 在进行偶联反应之前,可将不参与反应的羧基、氨基等基团保护起来,参与偶联反应的羧基和氨基可通过本领域中已知的方法进行活化。

[0037] 羧基保护基团的实例包括成酯基团,如甲基、乙基、苄基、对硝基苄基、叔丁基和环己基。

[0038] 氨基保护基团的实例包括苄氧羰基、叔丁氧羰基、异冰片基氧羰基和 / 或 9- 芴甲氧羰基。

[0039] 羧基的活化形式的实例包括对称酸酐、叠氮化物和活性酯(醇酯,如五氯苯酚、2,4- 二硝基酚、氰甲基醇、对硝基苯酚、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或 1- 羟基苯骈三氮唑)。

[0040] 活化的氨基的实例是酰胺磷酸盐。

[0041] 所述反应是在溶剂,如氯仿、二氯甲烷、乙酸乙酯、N, N- 二甲基甲酰胺、二甲基亚砷、吡啶、二氧六环、四氢呋喃、水、甲醇或它们的混合物中进行。

[0042] 反应温度范围可以是约 -30 至 50℃,该温度范围是所述反应通常采用的。

[0043] 去除肽保护基团的反应可根据保护基团的种类而变化,但应该是一种能够去除保护基团而又不影响肽键产生任何影响的方法。

[0044] 可以通过酸处理来去除保护基团,例如用氯化氢、溴化氢、氟化氢、甲磺酸、三氟甲磺酸、三氟乙酸或这些酸的混合物进行处理。此外,可以在液氨中用金属钠还原或用钨碳催化还原。

[0045] 通过酸处理进行去除保护基团的反应时,可以使用添加剂,如苯甲醚、苯酚或苯甲硫醚。

[0046] 反应完成后,本发明制备的肽可以通过传统的肽纯化工艺回收,例如,提取、分离、再沉淀、再结晶或柱层析。

[0047] 此外,可使用传统的方法将本发明的肽转化为变体或其药学上可接受的盐。

[0048] 本发明的肽可以通过自动化肽合成仪合成或通过基因工程技术生成。例如,目标肽可以通过以下方法生成:通过基因操纵制备编码由融合头和本发明的肽组成的融合蛋白的融合基因;将所述融合基因转化宿主微生物;在宿主微生物中以融合蛋白形式表达所述目标肽;然后用蛋白酶或化合物从所述融合蛋白中裂解并分离本发明的肽。

[0049] 所述肽或其药学上可接受的盐的剂量范围为肠外给药 150 μ g/ 天至 1mg/ 天,优选 0.5mg/ 天至 1mg/ 天。口服给药的剂量比肠外给药高 1.2 至 1.5 倍。

[0050] 本发明的肽或组合物主要通过肠外途径给药,例如局部注射(关节腔内注射)、静脉注射或皮下注射、或经鼻给药。此外,视需要,也可采用口服给药。

[0051] 本发明的肽或其药学上可接受的盐或本发明的组合物结合药学上可接受的载体可以制备成所需的剂形,如注射剂、粉末剂、滴鼻剂、颗粒剂、或片剂。

[0052] 所述药学上可接受的载体可以根据本领域的技术人员所熟知的多种因素制备,

如考虑到以下的非限制性因素：要使用的有特定生理活性的物质及其浓度、稳定性和预期的生物利用度；接受治疗的疾病、障碍或情况；接受治疗的主体及其年龄、大小和综合情况；以及组合物的拟施药途径，例如局部给药、静脉注射、肌肉注射、透皮、口服或经鼻给药。通常，用于施用生理活性物质的药学上可接受的载体实例，除口服给药途径外，可包括：D5W(5%葡萄糖水溶液)、含5%体积或更少的葡萄糖的水溶液、以及生理盐水。在局部病灶内注射时，可采用多种注射水凝胶来加强治疗效果和提高药物疗效的持续时间。此外，药学上可接受的载体可包含加强活性成分稳定性的其他成分，如防腐剂或抗氧化剂。本发明的肽或组合物可根据本领域中已知的任何适当方法，根据要治疗的疾病和成份优选地制备成所需的剂型，例如“Remington's Pharmaceutical Sciences”中所述的方法(Mack Publishing Co., Easton, PA(latest edition))。

[0053] 本发明的肽可储存于生理盐水溶液中并可加入甘露醇或山梨醇后冷冻干燥于安瓿中。所述冻干的肽可在使用前溶于生理盐水或类似的溶液中以便重建。

[0054] 进一步地，本发明提供一种用于治疗 and / 或预防软骨损伤或关节炎的方法，包括向有需要的哺乳动物，包括人类，施用本发明的肽或其药学上可接受的盐。

[0055] 进一步地，本发明提供一种本发明的肽或其药学上可接受的盐的医药用途，优选用于治疗 and / 或预防软骨损伤或关节炎。

[0056] 本发明的肽或其药学上可接受的盐或本发明的组合物中所述的详细内容应当适用于本发明的用途以及治疗 and / 或预防的方法，只要它们之间没有相互矛盾。

[0057] 有益效果

[0058] 本发明的肽或其药学上可接受的盐可有效用于治疗 and / 或预防软骨损伤或关节炎，并对软骨组织再生、抑制软骨组织基质降解酶的表达 and / 或抑制软骨组织骨化显示出效果。

附图说明

[0059] 图1显示本发明的一个实施方式中损伤软骨组织的变化的照片。

[0060] 图2显示本发明的一个实施方式中以苏木素-伊红染色观察到的软骨组织再生效果的结果。

[0061] 图3显示本发明的一个实施方式中以胶原蛋白染色观察到的软骨组织再生效果的结果。

[0062] 图4显示本发明的一个实施方式中以苏木素-伊红染色观察到的软骨组织再生效果的结果。

[0063] 图5显示本发明的一个实施方式中培养的软骨组织细胞中II型胶原蛋白的基因表达变化结果。

[0064] 图6显示本发明的一个实施方式中培养的软骨组织细胞中MMP13的基因表达变化结果。

[0065] 图7显示本发明的一个实施方式中培养的软骨组织细胞中X型胶原蛋白的基因表达变化结果。

[0066] 图8显示本发明的一个实施方式中通过肉眼观察退变性关节炎模型确认的软骨再生效果的结果的照片。

[0067] 图 9 显示本发明的一个实施方式中对退变性关节炎模型以苏木素-伊红染色确认的软骨再生效果的结果。

[0068] 图 10 显示本发明的一个实施方式中对退变性关节炎模型以番红 O 染色确认的软骨再生效果的结果。

[0069] 图 11 显示本发明的一个实施方式中对退变性关节炎模型以 Masson 三色染色确认的软骨再生效果的结果。

具体实施方式

[0070] 现参考下面的实施例对本发明进行更详细的描述。这些实施例仅用于说明本发明,不应解释为限制本发明的范围和精神。

[0071] 【实施例 1】肽的制备

[0072] 应本发明人的要求,由 Pepton 公司 (South Korea) 制备具有 SEQ ID NO. 1 (Glu-Leu-His-Leu-Asp) 所示的氨基酸序列的肽。具体地,采用自动化肽合成仪 (ASP48S, Pepton Inc.), 通过 Fmoc SPPS (9- 芴甲氧羰基固相肽合成法) 将氨基酸单元从 C- 末端逐个连接。

[0073] 使用 $\text{NH}_2\text{-His(Trt)-2-氯-三苯甲基树脂}$, 将肽 C- 末端的第一个氨基酸连接到树脂上。用于合成肽的所有氨基酸都被三苯甲基 (Trt)、叔丁氧羰基 (Boc)、叔丁基 (t-Bu) 等保护, 其中 N- 末端被 Fmoc 保护, 且在酸中去除所有残基。使用 2-(1H- 苯并三唑-1-基)-1, 1, 3, 3- 四甲基脲六氟磷酸盐 (HBTU) / 羟基苯并三唑 (HOBT) / N- 甲基吗啡啉 (NMM) 作为耦合试剂。(1) 将被保护的氨基酸 (8 当量) 和耦合试剂 HBTU (8 当量) / HOBT (8 当量) / NMM (16 当量) 溶解于二甲基甲酰胺 (DMF) 中, 然后在室温下反应 2 小时。(2) 通过在 DMF 中加入 20% 哌啶, 然后在室温下反应 5 分钟, 重复两次来去除 Fmoc。重复步骤 (1) 和 (2) 的反应来制备肽骨架, 并使用三氟乙酸 (TFA) / 1, 2- 乙二硫醇 (EDT) / 苯甲硫醚 / 三异丙基硅烷 (TIS) / 水 = 90/2.5/2.5/2.5/2.5 将肽从树脂上分离。将肽用 Vydac Everest C18 柱 (250mm×22mm, 10 μm) 通过反相 HPLC 纯化, 然后用含 0.1% (v/v) 三氟乙酸的水-乙腈线性梯度 (10% 至 75% 乙腈 (v/v)) 进行分离。使用 LC/MS (Agilent HP1100 系列) 确认纯化肽的分子量, 然后将其冷冻干燥。

[0074] 【实施例 2-12】肽的制备

[0075] 用与实施例 1 相同的方法来制备实施例 2-12 的肽, 区别是用下表 1 中所列的氨基酸序列来代替实施例 1 中的氨基酸序列。

[0076] 表 1

[0077]

实施例序号	氨基酸序列	SEQ ID NO
实施例 2	Glu-Leu-His-Leu-Glu	2
实施例 3	Glu-Leu-Lys-Leu-Asp	3
实施例 4	Glu-Leu-Lys-Leu-Glu	4

实施例 5	Glu-Leu-Arg-Leu-Asp	5
实施例 6	Glu-Leu-Arg-Leu-Glu	6
实施例 7	Asp-Leu-His-Leu-Asp	7
实施例 8	Asp-Leu-His-Leu-Glu	8
实施例 9	Asp-Leu-Lys-Leu-Asp	9
实施例 10	Asp-Leu-Lys-Leu-Glu	10
实施例 11	Asp-Leu-Arg-Leu-Asp	11
实施例 12	Asp-Leu-Arg-Leu-Glu	12

[0078] 【实施例 13】用损伤的软骨组织外植体确认软骨再生效果

[0079] 从在区域屠宰场（位于 Ojeong-dong, Daejeon, South Korea）宰杀的一小时内、年龄不到 3 岁的母牛的蹄关节来制备关节软骨外植体。为此，使用手术刀将骨头以外的软骨部分从关节处均匀切下，并切成大小约 3mmx3mm，以制备软骨组织外植体。使用尖端被截断并打磨的注射器（21G），通过在外植体中心的表面均匀地扎垂直孔来制备损伤区域。

[0080] 将穿孔的组织外植体分为包括对照组在内的 4 组。将各组置于补以抗坏血酸盐（50 μ g/ml, Sigma）以及 10% 胎牛血清（FBS, Invitrogen）的达尔伯克氏改良伊格尔培养基/F12（DMEM/F12, 1 : 1, Welgene）中；然后分别用 25 μ M 的实施例 1 的肽、2ng/ml 的转化生长因子 β 1（TGF β 1, Promokine）、以及 25 μ M 的实施例 1 的肽与 2ng/ml 的 TGF β 1 的混合物进行处理。将各组再细分为两个亚组，然后孵育 1 或 6 个星期。对于孵育 6 周的组，每周在显微镜下检查损伤区域并拍摄照片。此外，分别将孵育 1 周的组织外植体和孵育 6 周的组织外植体在 3.7% 甲醛 / 磷酸盐缓冲液（3.7% 甲醛 / PBS）中固定。然后，按照标准组织化学实验方法制备石蜡切片，接着用苏木素 - 伊红（H&E）染色并用显微镜检查细胞形状和形态学上的分布。胶原蛋白经过 Masson 三色染色，并在显微镜下检查组织中的细胞形状和分布。为进行比较，对照组的处理方式和使用实施例 1 的肽进行处理的组相同，区别是未用实施例 1 的肽处理。

[0081] 结果如附图 1-4 所示。

[0082] 图 1 显示了用实施例 1 或实施例 1+TGF β 1 处理之后关节软骨外植体随时间变化的显微图。

[0083] 如图 1 所示，当仅用实施例 1 处理时，2 周后损伤区域逐渐减小，4 周后细胞开始附着到损伤区域的周围，6 周后损伤区域显著减小，由此证明实施例 1 的肽显示出损伤区域的再生（图 1F 至 J）。此外，当用实施例 1 的肽联合 TGF β 1 处理时，3 周后细胞开始在孔周围增殖，且 6 周后损伤区域完全被细胞填满（图 1P-T）。与仅使用实施例 1 的肽处理相比，TGF β 1 与实施例 1 的肽的联合处理可使损伤区域提早一周再生，并且在第 3 周先前仅出现在孔周围的细胞在第 4 周时已完全填满了损伤区域。

[0084] 图 2 显示了用实施例 1 或者实施例 1+TGF β 1 处理的软骨组织外植体在培养一周

后,用苏木素-伊红染色观察到的组织再生效果的结果。图3显示了胶原蛋白染色的结果。图4显示了用实施例1或者实施例1+TGF β 1处理的软骨组织外植体在培养六周后,用苏木素-伊红染色观察到的组织再生效果的结果。图2和图3中的箭头表示软骨组织外植体的浅表层。图4C和4F分别是图4B和4E中方框部分的局部放大图,其中箭头表示软骨组织外植体的浅表层。

[0085] 如图2和图3所示,与对照组相比,实施例1的肽和TGF β 1的联合处理使软骨组织外植体的浅表层厚度增加了2倍(图2D和图3D),且胶原蛋白染色更为强烈,由此证明实施例1的肽导致胶原蛋白的合成增加(图3D)。

[0086] 此外,如图4所示,当用实施例1的肽处理6周时,损伤区域缩小且新的细胞附着到损伤区域的周围(图4B和4C)。当用实施例1的肽联合TGF β 1处理时,可以看到软骨组织包括浅表层(如图4F中的箭头所示)再生到原来的形状并且软骨组织外植体的损伤区域完全被再生的软骨组织填满(图4E和4F)。另一方面,对照组和TGF β 1单独处理组则显示外植体的损伤区域中基本没有变化(图4A和4D)。

[0087] 从这些结果可以看出,实施例1的肽能够通过促进软骨细胞向/在损伤区域的附着和增殖提供损伤软骨的再生,同时增加了主要基质成分-胶原蛋白的合成;还可以看出TGF β 1进一步加速损伤软骨的再生速度。此外,实施例2-12的肽,它们是具有与实施例1的肽相似的氨基酸序列的变体,也表现出类似的效果。

[0088] **【实施例14】用关节软骨颗粒确认软骨再生的效果**

[0089] 实施例1的肽对基因表达的影响

[0090] 为了确保关节软骨保持与生物组织相似的细胞特性,使细胞形成颗粒并培养。

[0091] 从在区域屠宰场(位于Ojeong-dong,Daejeon,South Korea)宰杀的1小时内、年龄不到3岁的母牛的蹄关节制备软骨组织。为此,用手术刀将骨头以外的软骨部分切下并收集备用。将软骨组织切成各边约1mm长的六面体并置于补以链酶蛋白酶(1mg/ml,Roche)的DMEM/F12(Welgene)中,然后在5%CO₂孵育箱中于37℃反应1.5小时。将链酶蛋白酶处理过的组织用PBS(磷酸盐缓冲液)洗涤两次,然后用DMEM/F12洗涤一次。将洗涤过的软骨组织置于补以5%FBS(胎牛血清)(Invitrogen)、胶原蛋白酶P(0.25mg/ml,Roche)和DNase I(20 μ g/ml,Sigma)的DMEM/F12中,并在5%CO₂孵育箱中于37℃反应8至12小时,使得组织完全降解。降解完成后,500xg离心15分钟收集细胞并用PBS洗涤两次。将所述细胞以2x10⁶个细胞/ml的细胞密度悬浮在补以10%FBS和抗坏血酸盐(50 μ g/ml,Sigma)的DMEM/F12中,并将每管1ml的细胞分配到15毫升的锥形管中。500xg离心10分钟使细胞形成颗粒并在5%CO₂孵育箱中于37℃培养2天,从而制备固体的细胞颗粒。将颗粒转移到24孔板并培养5天。然后,将颗粒分别用二甲基亚砜(DMSO)、2ng/ml转化生长因子 β 1(TGF β 1,Promokine)、25 μ M实施例1的肽与2ng/ml TGF β 1的混合物、以及25 μ M实施例1的肽处理,然后再培养5天。在第13天,将细胞在无血清培养基中培养24小时。在第14天,将细胞分别在补以2ng/ml TGF β 1、25 μ M实施例1的肽与2ng/ml TGF β 1的混合物、或25 μ M实施例1的肽的无血清培养基中培养24小时。

[0092] 用TRIZOL(Invitrogen)从培养的颗粒中分离RNA并通过260nm处的吸光度进行定量。采用随机六聚体和5x Reverse Transcriptase Master premix(Elpis Biotech,South Korea)从2.25 μ g RNA合成cDNA。用1 μ L合成的cDNA,通过聚合酶链反应(PCR)

进行扩增以研究基因的表达水平。待研究的基因如下：软骨细胞特征性的 II 型胶原蛋白基因 (COL2A1)，作为确认关节软骨组织再生的基因；基质金属蛋白酶 13 (MMP13) 基因，它在损伤软骨组织中过度表达并且参与基质降解，作为确认是否能够防止额外的软骨损伤的基因；以及参与关节组织骨化的肥大软骨细胞特有的 X 型胶原蛋白基因 (COL10A1)，作为确认它是否过度活化和进展至骨化的基因。

[0093] 用于扩增各个基因的 PCR 引物序列和 PCR 产物的大小如下：

[0094] II 型胶原蛋白 (产物大小 :381bp)

[0095] 正向引物 :5' -CAGGACCAAAGGGACAGAAA-3' (SEQ ID NO :13)

[0096] 反向引物 :5' -GGTTGCCTTGAAATCCTTGA-3' (SEQ ID NO :14)

[0097] MMP13 (产物大小 :600bp)

[0098] 正向引物 :5' -ATGGACCCTCTGGTCTGTTG-3' (SEQ ID NO :15)

[0099] 反向引物 :5' -CGTGTTTTGGAAATCCCAGT-3' (SEQ ID NO :16)

[0100] X 型胶原蛋白 (产物大小 :454bp)

[0101] 正向引物 :5' -CAGTCAAGGGCCTTAATGGA-3' (SEQ ID NO :17)

[0102] 反向引物 :5' -CCTGAAGCCTGATCCAGGTA-3' (SEQ ID NO :18)

[0103] 甘油醛 -3- 磷酸脱氢酶 (GAPDH) (产物大小 :345bp)

[0104] 正向引物 :5' -ACCCAGAAGACTGTGGATGG-3' (SEQ ID NO :19)

[0105] 反向引物 :5' -CCCAGCATCGAAGGTAGAAG-3' (SEQ ID NO :20)

[0106] 具体地，PCR 是在以下反应条件下进行。用 1 μ L cDNA、10 μ L 2xTaqpolymerase master mix (Solgent)、0.5 μ L 各引物对 (10pmole/ μ L)、8 μ L 蒸馏水进行 PCR 反应。PCR 扩增包括：94 $^{\circ}$ C 变性 2 分钟，然后在 94 $^{\circ}$ C 下反应 30 秒，在 58 $^{\circ}$ C 下反应 45 秒和在 72 $^{\circ}$ C 下反应 1 分钟，分别地，II 型胶原蛋白、X 型胶原蛋白和 MMP13 为 32 个循环，而 GAPDH 为 26 个循环。将 PCR 扩增产物在 1% 琼脂糖凝胶上进行电泳并用溴化乙锭 (EtBr, 2 μ g/ml) 染色 15 分钟，然后在紫外光下确认。用图像处理程序 Image J (NIH) 将各个基因的表达水平标准化到 GAPDH 表达水平，然后比较它们之间的相对表达水平。

[0107] 结果如图 5 至图 7 所示。图 5 显示了用实施例 1 的肽处理关节软骨细胞时，II 型胶原蛋白 (COL2A1) 的表达变化的结果。图 6 显示 MMP13 表达变化的结果。图 7 显示 X 型胶原蛋白 (COL10A1) 表达变化的结果。在图 5 至图 7 的每个图中，上栏是 PCR 扩增产物于 1% 琼脂糖凝胶上的电泳照片，下栏是用图像处理程序 Image J (NIH) 对电泳条带的定量图表。图表中，y 轴表示当对照组的强度视为 100% 时，与对照组相比，实施例样品的相对带强度的 % 值。

[0108] 如图 5 至图 7 所示，与对照组相比，实施例 1 的肽使与软骨组织的再生相关的 II 型胶原蛋白的表达与对照组相比增加 55%。与单独用 TGF β 1 处理的组相比，实施例 1 的肽与 TGF β 1 的联合处理使 II 型胶原蛋白的表达增加 27% (图 5)。此外，与对照组相比，实施例 1 的肽使参与软骨组织的基质降解的基质金属蛋白酶 13 (MMP13) 的表达下降 10%。与 TGF β 1 处理组相比，实施例 1 的肽与 TGF β 1 的联合处理使 MMP13 的表达下降 150% (图 6)。与对照组相比，实施例 1 的肽以使参与关节组织骨化的肥大软骨细胞特有的 X 型胶原蛋白 (COL10A1) 的表达下降 69%，它的过度活化引起关节组织的骨化。与 TGF β 1 处理组相比，实施例 1 的肽与 TGF β 1 的联合处理使 COL10A1 的表达下降 78% (图 7)。

[0109] 这些结果表明,实施例 1 的肽活化软骨组织的软骨细胞从而促进构成软骨的主要基质蛋白质的合成,并抑制主要基质降解酶的表达,从而有效地促进了损伤的关节软骨组织的再生。此外,实施例 1 的肽除了促进软骨细胞的活化,实施例 1 的肽还抑制肥大软骨细胞的分化,所述分化可发展成关节组织骨化(骨赘形成),因此具有促进损伤组织再生为正常组织的作用。

[0110] 实施例 2-12 的肽对基因表达的影响

[0111] 用与“实施例 1 的肽对基因表达的影响”部分相同的方式来评估肽的影响,区别是分别用实施例 2-12 的肽代替实施例 1 的肽。下表 2 的实验结果显示了实施例 2-12 的肽对软骨的软骨细胞中 II 型胶原蛋白的表达的影响。

[0112] 表 2

[0113]

样品	II 型胶原蛋白的相对表达 (%) (平均值 $\pm$ SD)
无	100 $\pm$ 10
实施例 1	155 $\pm$ 12
实施例 2	163 $\pm$ 19
实施例 3	161 $\pm$ 29
实施例 4	124 $\pm$ 12
实施例 5	149 $\pm$ 27
实施例 6	158 $\pm$ 38
实施例 7	190 $\pm$ 38
实施例 8	115 $\pm$ 42
实施例 9	147 $\pm$ 41
实施例 10	166 $\pm$ 26
实施例 11	157 $\pm$ 34
实施例 12	159 $\pm$ 28

[0114] 表 2 显示了实施例 2-12 的肽之间,软骨组织培养细胞中 II 型胶原蛋白表达变化的对比结果,实施例 2-12 的肽是变体,具有与实施例 1 的肽相似的氨基酸序列。提供这些未处理的结果作为参考。表 2 中的数值是以平均标准偏差表示,每组的样品数为 3。用统计程序 PASW Statistics(ver. 17.0, SPSS 公司)进行数据计算。平均值 $\pm$ 标准偏差采用单向方差分析, $P < 0.05$ 的水平,实验组平均值间的显著性通过最低显著性差异(LSD)进行

测试。与实施例 1 相似,与未处理组相比,实施例 2-12 的肽也显示出 II 胶原蛋白表达的显著增加。结果表明,实施例 2-12 的肽(实施例 1 的氨基酸序列的变体)也显示出对 II 型胶原蛋白表达的影响,与类似实施例 1 肽的影响相似,所述 II 型胶原蛋白是软骨的主要细胞外基质(ECM)成分(表 2)。因此,可以看出实施例 1-12 的肽都显示出软骨再生作用。

[0115] 【实施例 15】在退变性关节炎模型中肽化合物的软骨再生作用

[0116] 以体重 3 至 3.5 公斤,购自 Orient Bio 公司(韩国)的 18-22 周龄雄性新西兰白兔(N=10)作为实验动物。动物实验按照动物保护机构以及三星生物医学研究所(SBRI, Seoul, South Korea)应用委员会批准的实验动物资源研究所(ILAR)的指南进行。通过手术解剖兔子的髌骨前十字韧带来诱导关节软骨退变,并将动物在笼子里饲养 4 周。将动物分成对照组和实验组。

[0117] 通过肌肉注射 2.5mg/kg 甲苯噻嗪(Rompun, Bayer)和 8mg/kg 噻环乙胺/唑氟氮草(Zoletil, Virbac)使兔子全身麻醉。然后,将动物右后肢的髌骨关节剃刮并消毒。将髌骨皮肤和关节囊切除并拨开髌骨以暴露前十字韧带。之后,用刀片(11 号)切除韧带并且缝合关节囊和皮肤。手术完成后,将兔子在笼子里饲养 4 周,同时允许其进行常规的活动。动物的饲养条件如下:温度 20 至 25℃;湿度 10% - 至 50%;光/暗(L/D)周期:08:00 a.m. 至 20:00 p.m. 为光照期。所有动物每天喂食一次。在手术后 4 周,将兔子分为两组,然后进行关节腔内注射。对照组给予注射载体(5%乳糖/生理盐水)。对于实验组,注射 200 μ l 52.5 μ M 肽溶液,其中向该组施予 30 μ M 的实施例 1 的肽;以及 200 μ l 157.5 μ M 肽溶液,其中向该组施予 90 μ M 的实施例 1 的肽。临用前,用 5%的乳糖/生理盐水为溶剂制备上述肽。每周注射一次,共持续 4 周。最后一次注射后的 1 周和 5 周(第一次手术后第 8 周和 12 周),在深麻醉下经血管注射 1 至 2mM/kg KCl 使实验动物安乐死。

[0118] 将髌骨关节骨的近端部分(股区)切除。与正常组织相比,另外还将左边的正常关节区切除,然后用肉眼检查并拍照。切除的关节区在 10%福尔马林中固定,用脱钙液(CalciClear Rapid, National Diagnostics)进行脱钙,然后制成石蜡块。将关节骨的正面切成 4 μ m 厚,从而制备切片。为了考察细胞的结构和分布,进行苏木素-伊红(H&E)染色。为了考察蛋白多糖在基质中的分布,进行番红 O 染色。为了考察胶原蛋白的分布,进行 Masson 三色染色。将切片用二甲苯和 100%、90%、70%的乙醇连续脱水,每次 10 分钟,之后用 Harris 苏木素(Melrose J. et al., Spine(2002)1756-1764)进行 H&E 染色。通过将切片以与 H&E 染色相同的方式脱水进行番红 O 染色,将切片置于 0.02%快绿(Fast green)中 3 分钟、在 0.1%醋酸中 30 秒以及在 0.1%番红 O 中 5 分钟进行染色,并且将切片连续 10 次在 70%、90%、100%的乙醇及二甲苯中浸泡和脱水。用三色进行 Masson 三色染色(Melrose J. et al., Eur. Spine J. (2007)2193-2205)。按正常组、对照组(施用乳糖组)和实验组(施用实施例 1 的肽组)来制备切片并在显微镜下检查。

[0119] 用肉眼观察到的结果如图 8 所示。如图 8 所示,正常组的关节软骨组织是平滑有光泽的;而退变性骨关节炎模型的对照组(施用乳糖组)显示出部分软骨组织被损伤和去除,且光泽度下降。另一方面,实验组(施用实施例 1 的肽组;30 μ M, 90 μ M)的关节软骨组织显示出与正常状态接近的平滑表面和光泽度,这是损伤的软骨组织再生的结果。

[0120] H&E 染色结果如图 9 所示。如图 9 所示,只有对照组(施用乳糖组)在软骨组织表层上显示出纤维软骨细胞(强烈染色),而实验组(施用实施例 1 的肽组)显示出与正常组

相似的染色模式,并且显示出由于细胞活化使细胞大小增加。因此,可以看出在实验组中实施例 1 的肽活化了关节软骨细胞。

[0121] 软骨基质中蛋白多糖的(番红 O)染色结果如图 10 所示。如图 10 所示,与正常组相比,对照组(施用乳糖组)显示出中间层和深层中蛋白多糖的合成显著下降。另一方面,实验组(施用实施例 1 的肽组)则显示出剂量依赖性的蛋白多糖合成的增加。因此表明,实验组中实施例 1 的肽增加了蛋白多糖的合成,所述蛋白多糖是关节软骨组织的主要基质成分,从而促进损伤软骨组织的再生。

[0122] 胶原蛋白染色(Masson 三色染色)的结果如图 11 所示。如图 11 所示,正常组和实验组(施用实施例 1 的肽组)显示相似的染色模式,而对照组(施用乳糖组)的损伤区域则显示强烈的染色,这反映出损伤区域的纤维软骨细胞合成增加。因此表明实施例 1 的肽促进了具有正常表面的软骨组织的再生(透明软骨,主要是 II 型胶原蛋白),而对照组(施用乳糖组)显示出纤维软骨细胞(主要是 I 型胶原蛋白)合成增加,所述纤维软骨细胞容易受到损害,是由于在退变性变化的适应过程中其物理性质削弱所导致的。

[0123] 从对照组(施用乳糖组)的胶原蛋白染色结果中观察到的纤维胶原蛋白合成增加与浅表层纤维软骨增加的结果一致,后者是在进行 H&G 染色时从对照组的损伤区域中观察到的,从而表明退变性变化的适应过程中不诱导正常组织再生,而实施例 1 的肽会诱导实验组中正常组织的再生。

[0124] 结果表明,在退变性骨关节炎模型的实验中,实施例 1 的肽促进了软骨细胞的活化和软骨基质成分(蛋白多糖,II 型胶原蛋白)的合成,因此具有使损伤组织再生为类似正常组织的优良效果。

[0125] 工业应用性

[0126] 本发明提供了一种肽或其药学上可接受的盐、一种含有所述肽或其药学上可接受的盐作为活性成分的组合物、以及一种含所述肽或其药学上可接受的盐和 TGF β 1 的组合物,用于治疗和/或预防软骨损伤和关节炎中的至少一种。上述肽或其药学上可接受的盐可有效地用于治疗 and/或预防软骨损伤和/或关节炎,并且能够显示出再生软骨组织、抑制软骨组织基质降解酶的表达和/或抑制软骨组织骨化的作用,因此具有工业应用性。

[0001]

Sequence Listings.txt

<110> 因首太克株式会社
<120> 新型肽及其用途
<130> A0PI1002
<150> KR10-2010-0062467
<151> 2010-06-30
<160> 20
<170> KopatentIn 1.71
<210> 1
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽

<400> 1
Glu Leu His Leu Asp
1 5

<210> 2
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽

<400> 2
Glu Leu His Leu Glu
1 5

<210> 3
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽

<400> 3
Glu Leu Lys Leu Asp
1 5

<210> 4
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽

<400> 4
Glu Leu Lys Leu Glu
1 5

<210> 5
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽

[0002]

Sequence Listings.txt

<400> 5
Glu Leu Arg Leu Asp
1 5

<210> 6
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽

<400> 6
Glu Leu Arg Leu Glu
1 5

<210> 7
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽

<400> 7
Asp Leu His Leu Asp
1 5

<210> 8
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽

<400> 8
Asp Leu His Leu Glu
1 5

<210> 9
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽

<400> 9
Asp Leu Lys Leu Asp
1 5

<210> 10
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽

<400> 10
Asp Leu Lys Leu Glu
1 5

[0003]

Sequence Listings.txt

<210> 11
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽

<400> 11
Asp Leu Arg Leu Asp
1 5

<210> 12
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽

<400> 12
Asp Leu Arg Leu Glu
1 5

<210> 13
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> II型胶原蛋白的正向引物

<400> 13
caggaccaaa gggacagaaa

20

<210> 14
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> II型胶原蛋白的反向引物

<400> 14
ggttgcccttg aaatccttg

20

<210> 15
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> MMP13的正向引物

<400> 15
atggaccctc tggctctgttg

20

<210> 16
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> MMP13的反向引物

[0004]

Sequence Listings.txt

<400> 16
cggtgttttg aaatcccagt 20

<210> 17
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> X型胶原蛋白的正向引物

<400> 17
cagtcaggg ccttaatgga 20

<210> 18
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> X型胶原蛋白的反向引物

<400> 18
cctgaagcct gatccaggta 20

<210> 19
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> GAPDH的正向引物

<400> 19
accagaaga ctgtggatgg 20

<210> 20
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> GAPDH的反向引物

<400> 20
cccagcatcg aaggtagaag 20

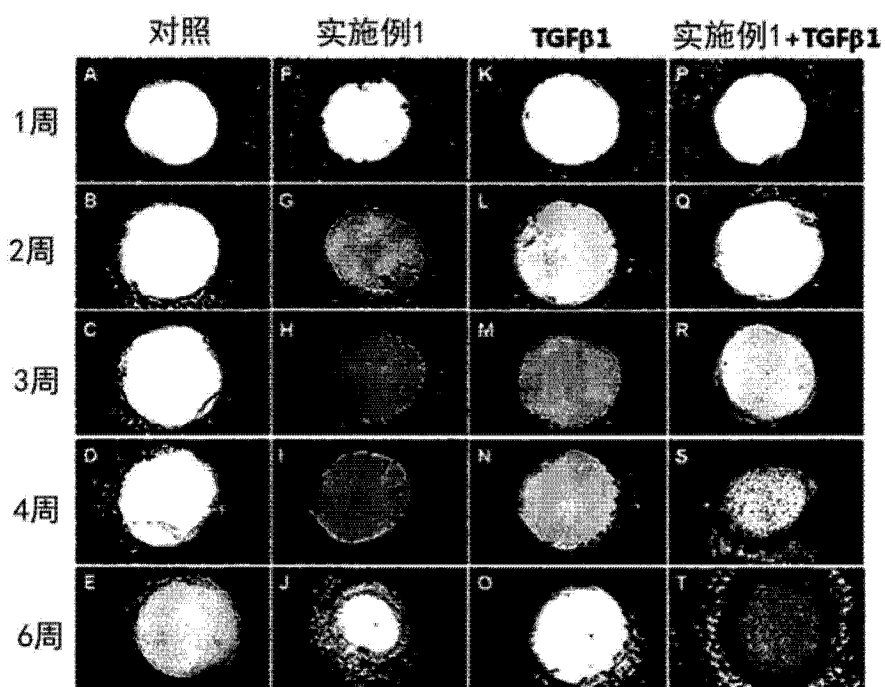


图 1

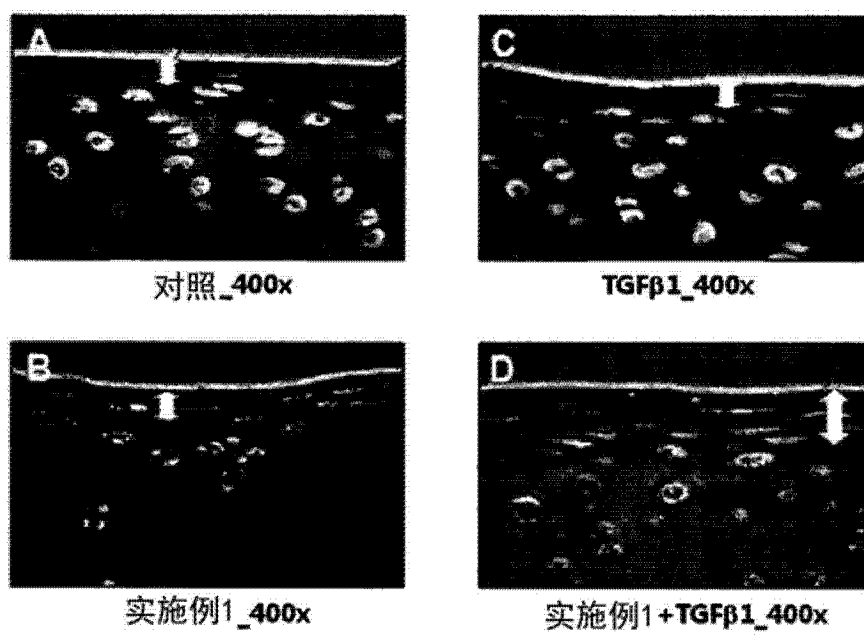


图 2

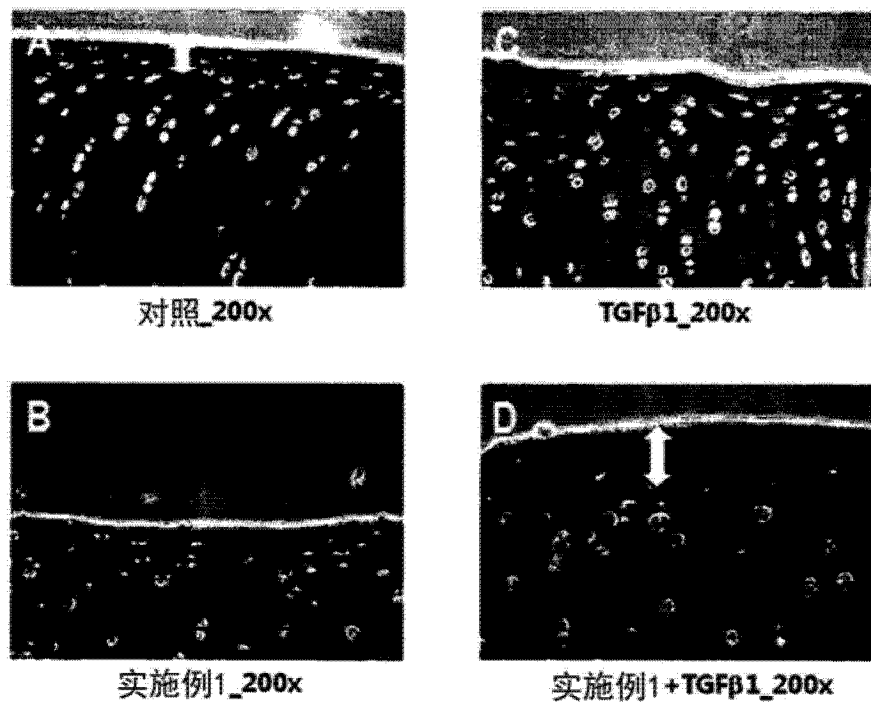


图 3

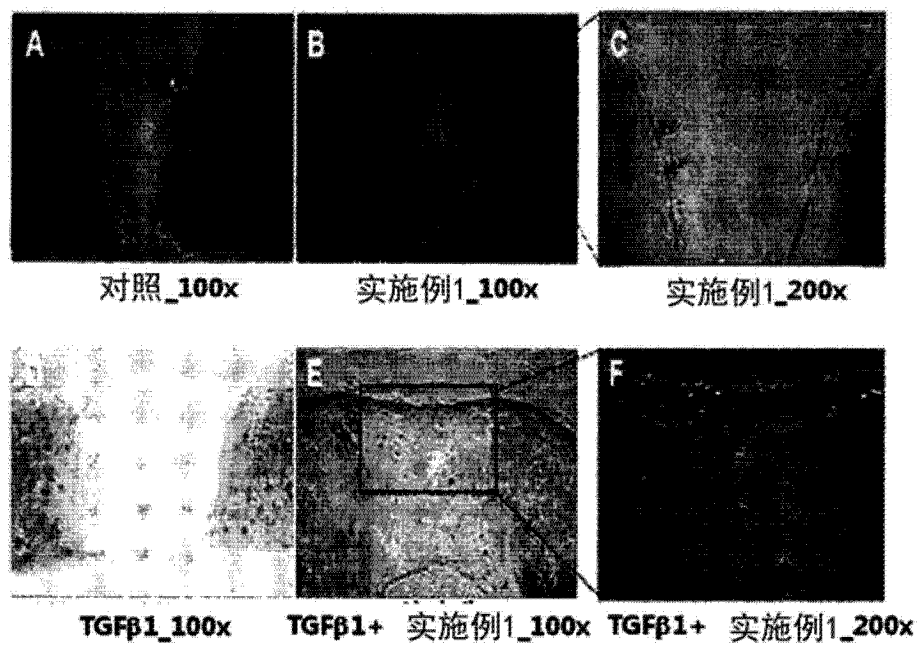


图 4

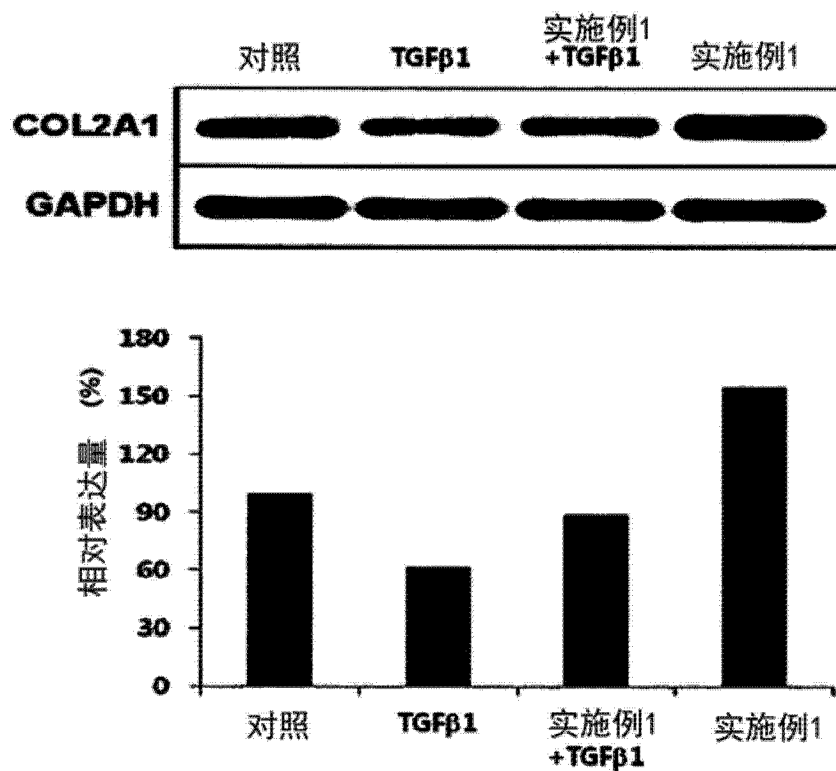


图 5

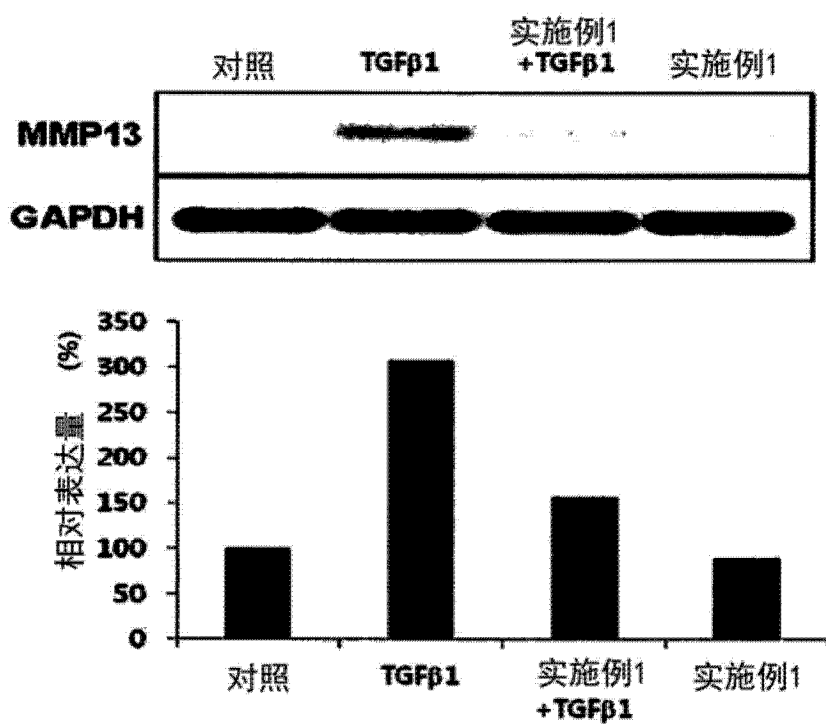


图 6

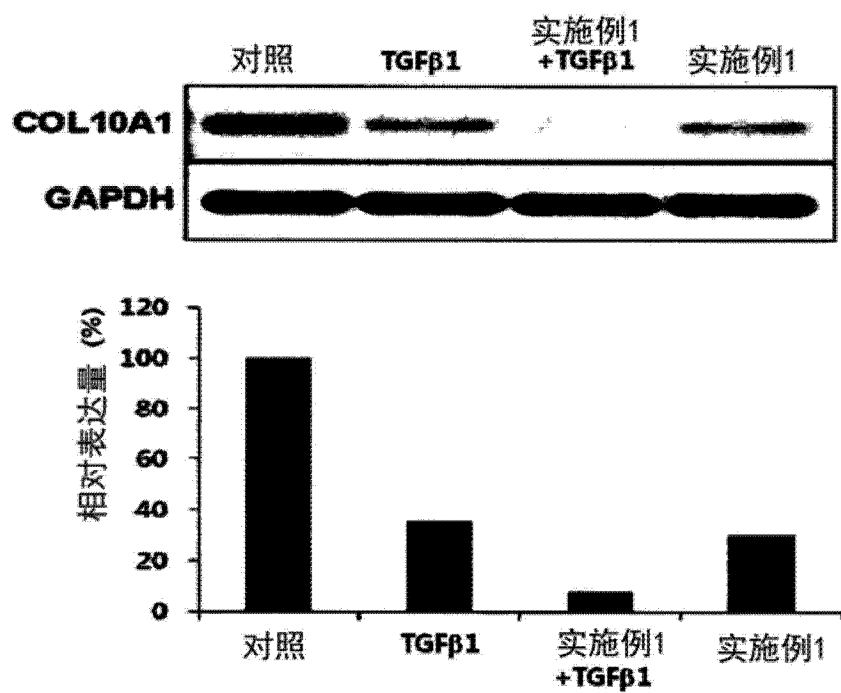


图 7

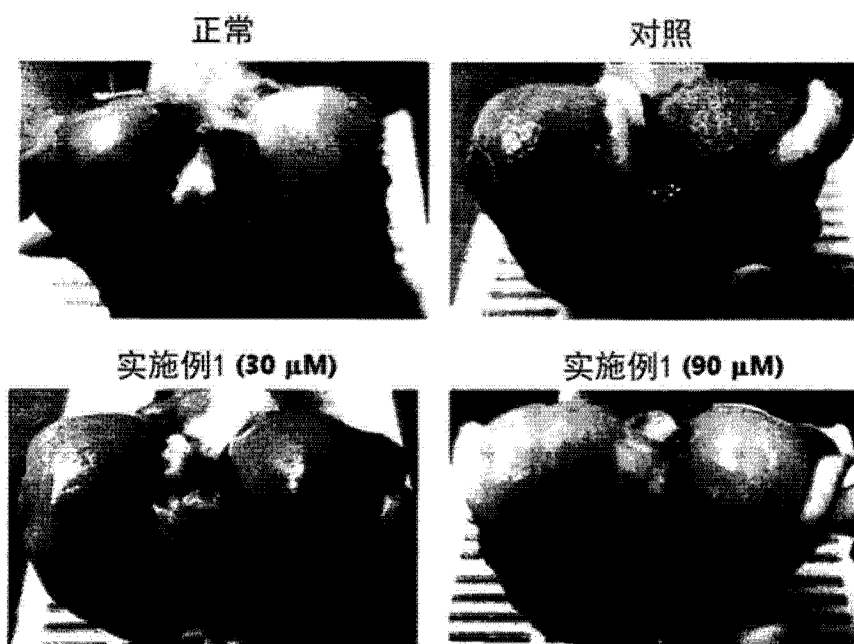


图 8

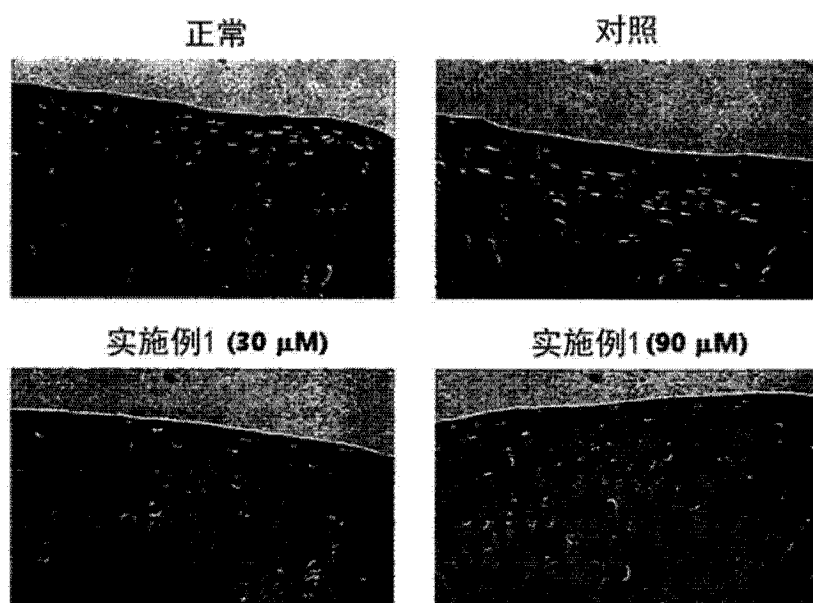


图 9

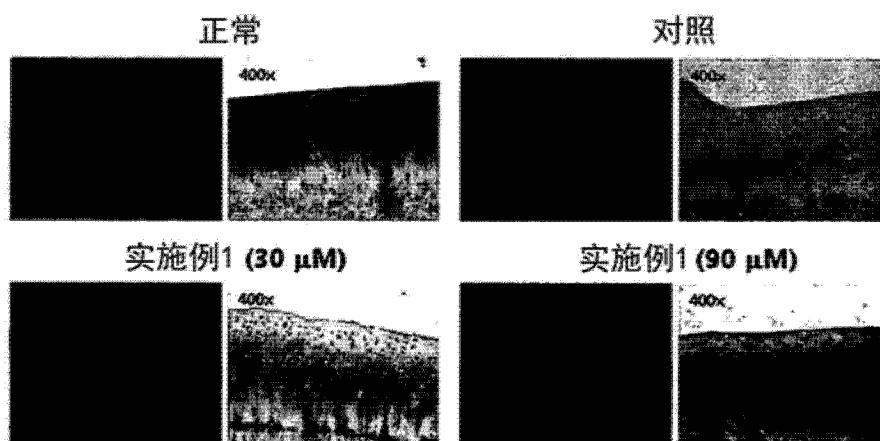


图 10

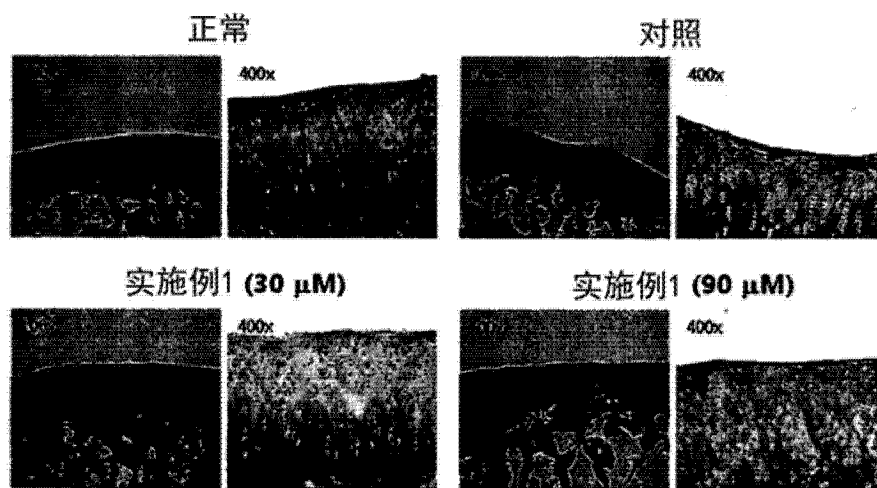


图 11