



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101511861 B

(45) 授权公告日 2013.04.24

(21) 申请号 200780031898.7

(22) 申请日 2007.07.19

(30) 优先权数据

PI0602885-3 2006.07.21 BR

PI0703175-0 2007.07.04 BR

(85) PCT申请进入国家阶段日

2009.02.26

(86) PCT申请的申请数据

PCT/BR2007/000186 2007.07.19

(87) PCT申请的公布数据

W02008/009085 EN 2008.01.24

(73) 专利权人 克里斯泰利亚化学药物产品有限公司

地址 巴西伊塔皮拉

专利权人 圣保罗国情研究援助基金会
莫尼卡·费雷拉

(72) 发明人 莫尼卡·费雷拉 卡拉·希尔瓦

丹尼尔·皮曼塔

费尔南达·普尔塔罗

卡迪亚·康塞西奥

马利利恩·德马斯

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所 11038

代理人 李璜

(51) Int. Cl.

C07K 7/64 (2006.01)

(56) 对比文件

CA 2487351 A1, 2003.12.04,

W0 0216409 A2, 2002.02.28,

G.S.Magalhães et al. Natterins, a new class of proteins with kininogenase activity characterized from Thalassophryne nattereri fish venom. 《Biochimie》. 2005, 第 87 卷第 687-699 页.

审查员 冯晓亮

权利要求书1页 说明书10页

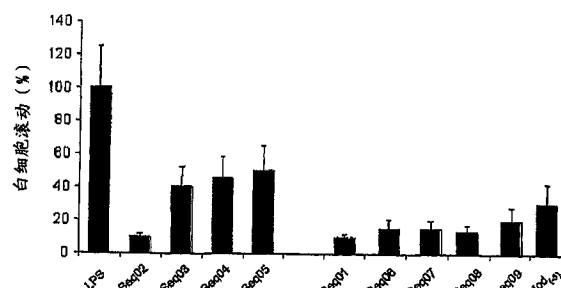
序列表4页 附图5页

(54) 发明名称

抗炎和抗过敏的环肽

(57) 摘要

本发明涉及合成的环肽,其一级结构含有 13 个 L-氨基酸的序列,呈现出抗炎和抗过敏的活性,可用于治疗急性或慢性炎症和 / 或过敏症,尤其是可用于治疗急性或慢性过敏性哮喘。本发明还描述了含有所述肽的药物组合物、其用途和治疗或预防急性和 / 或慢性炎症和 / 或过敏性病症的方法。



1. 由 13 个氨基酸组成的肽, 呈现在肽链的第 4 位和第 13 位的氨基酸半胱氨酸和第 11 位的氨基酸赖氨酸以及限定环状结构的半胱氨酸残基 4 和 13 之间的二硫键, 其中所述肽具有抗炎和 / 或抗过敏的活性, 所述肽具有选自下组的氨基酸序列:

Ile₁-Pro₂-Arg₃-Cys₄-Arg₅-Lys₆-Met₇-Pro₈-Gly₉-Val₁₀-Lys₁₁-Met₁₂-Cys₁₃
Val₁-Glu₂-Gln₃-Cys₄-Thr₅-Ile₆-Ile₇-Gly₈-Asp₉-Glu₁₀-Lys₁₁-Asp₁₂-Cys₁₃
Val₁-Glu₂-Gln₃-Cys₄-Thr₅-Ile₆-Ile₇-Gly₈-Asp₉-Ala₁₀-Lys₁₁-Asp₁₂-Cys₁₃
Val₁-Gln₂-Gln₃-Cys₄-Ser₅-Glu₆-Ile₇-Ala₈-Gly₉-Ala₁₀-Lys₁₁-Pro₁₂-Cys₁₃
Leu₁-His₂-Arg₃-Cys₄-Asp₅-Lys₆-Ile₇-Ala₈-Asp₉-Ala₁₀-Lys₁₁-Pro₁₂-Cys₁₃
Ile₁-Pro₂-Arg₃-Cys₄-Arg₅-Ala₆-Met₇-Pro₈-Gly₉-Val₁₀-Lys₁₁-Met₁₂-Cys₁₃
Ile₁-Pro₂-Arg₃-Cys₄-Arg₅-Lys₆-Met₇-Pro₈-Gly₉-Val₁₀-Lys₁₁-Met₁₂-Cys₁₃-NH₂
Ac-Ile₁-Pro₂-Arg₃-Cys₄-Arg₅-Lys₆-Met₇-Pro₈-Gly₉-Val₁₀-Lys₁₁-Met₁₂-Cys₁₃
Ac-Ile₁-Pro₂-Arg₃-Cys₄-Arg₅-Lys₆-Met₇-Pro₈-Gly₉-Val₁₀-Lys₁₁-Met₁₂-Cys₁₃-NH₂。

2. 根据权利要求 1 的肽, 其中脯氨酸残基被羟脯氨酸残基取代。

3. 根据权利要求 1 的肽, 其中甲硫氨酸残基被氧化甲硫氨酸残基取代。

4. 根据权利要求 1 的肽, 其中一个或多个 L- 氨基酸被 D- 氨基酸取代。

5. 根据权利要求 1 的肽, 该肽是抗哮喘的。

6. 根据权利要求 1 的肽, 该肽是胰蛋白酶抑制剂。

7. 药物组合物, 含有单独或组合的权利要求 1 的肽, 或它们的药物可接受盐, 和一种或多种药物可接受的赋形剂。

8. 根据权利要求 7 的药物组合物, 其被配制成经口、鼻内、肌内或静脉内给药的剂型。

9. 权利要求 1-6 任一项的肽在制备用于治疗或预防急性和 / 或慢性炎症和 / 或过敏性病症的药物中的用途。

抗炎和抗过敏的环肽

发明领域

[0001] 本发明涉及合成的环肽,其一级结构含有 13 个 L-氨基酸的序列,呈现出抗炎和抗过敏的活性,可用于治疗急性或慢性炎症和 / 或过敏症,尤其是可用于治疗急性或慢性过敏性哮喘。本发明还描述了含有所述肽的药物组合物、其用途和治疗或预防急性和 / 或慢性炎症和 / 或过敏性病症的方法。

[0002] 缩写

[0003] 贯穿本说明性报道使用下列缩写:

[0004] “seq01”是指 Sequence ID No. 1;

[0005] “seq02”是指 Sequence ID No. 2;

[0006] “Seq03”是指 Sequence ID No. 3;

[0007] “Seq04”是指 Sequence ID No. 4;

[0008] “Seq05”是指 Sequence ID No. 5;

[0009] “Seq06”是指 Sequence ID No. 6;

[0010] “Seq07”是指 Sequence ID No. 7;

[0011] “Seq08”是指 Sequence ID No. 8;

[0012] “Seq09”是指 Sequence ID No. 9。

[0013] 发明基础

[0014] 炎症是动态的和保护性的内稳态反应,其作为宿主遭受多样攻击的结果而发生。炎症急性期的特征为血管系统改变,它引起微循环血流增加和结构变化,允许血浆蛋白和白细胞从循环中流出,其伴有旨在恢复内稳态的细胞和组织上的一系列事件。

[0015] 在组织中的事件方面,在这个时期,白细胞募集至损伤部位。最初,主要流入是嗜中性白细胞,随后是单核细胞。流入引起炎症过程消退、除去攻击物质和恢复组织内稳态。

[0016] 嗜中性白细胞是到达损害部位的初级细胞,在组织损伤急性期,数量上占有优势。它们通过吞噬作用和破坏致病物质而在生物体防御中起重要作用。此外,嗜中性白细胞可被内皮细胞和组织中固有的巨噬细胞所产生的细胞因子活化。

[0017] 一旦血液单核细胞离开循环系统并进入损伤部位,它们就分化为巨噬细胞,巨噬细胞是炎症反应中最终的效应细胞。巨噬细胞负责吞噬外来颗粒并通过合成反应性氧种类例如一氧化氮来破坏它们。随后,活化巨噬细胞通过除去细胞碎片,诱发消除抗原和消除炎症反应,以及启动适应性免疫反应。

[0018] 考虑到另一种方式的细胞事件,募集至损伤部位的白细胞启动促炎或“报警”细胞因子 (IL-1、TNF α 和 IL-6) 的分泌过程,它们启动炎症部位以及远处的一连串体液和细胞反应。

[0019] 细胞因子对基质细胞的活化驱使对嗜中性白细胞和单核细胞起作用的趋化性趋化因子的分泌。在炎症部位,毛细血管后微静脉的舒张开始发生以及血流改变 (减少),引起白细胞沿着血管内皮边缘化,这是碳水化合物中富含的选择蛋白及其配体介导的过程。

[0020] 活化后,白细胞停止滚动并稳固附着于内皮上。这个事件是白细胞中表达的整联

蛋白 $\beta 1$ 和 $\beta 2$ 与内皮中表达的免疫球蛋白超家族的各种成员 (ICAM-1、ICAM-2 和 VCAM-1) 结合的结果。最后,白细胞在朝向基底外侧表面的顶部区的内皮细胞之间向血管外空间的方向迁移(血细胞渗出)。随后通过血管外组织向内皮下迁移依赖于趋化因子的梯度、趋化细胞因子和与胞外基质的粘附相互作用。最后,在炎症灶,白细胞增强它们的细胞毒性作用,释放氧化剂、蛋白酶和其他产物,诸如生长因子和细胞因子。与嗜中性白细胞相反,嗜酸性粒细胞可以在组织中长期存活,时常存活数周,这取决于微环境中存在的细胞因子。

[0021] 关于参与这个过程的细胞因子,由单核细胞、巨噬细胞、活化 NK 细胞和 T 淋巴细胞产生的促炎细胞因子 $\text{TNF } \alpha$ 增强内皮细胞的粘附分子表达;活化嗜中性白细胞;刺激巨噬细胞产生 IL-1、IL-6 和 IL-8;增加 I 型 MHC 表达;增加下丘脑细胞合成前列腺素;作用于肝细胞,产生血清淀粉样蛋白;抑制髓质中细胞的分裂;减少组织灌流(通过降低心肌收缩力);缓和血管平滑肌紧张和促进血管内血栓形成。

[0022] 巨噬细胞、内皮和上皮细胞产生的细胞因子 IL-1 促进 T 淋巴细胞合成 IL-2 和 B 淋巴细胞的分化;促进前列腺素合成;增加 T 和 B 淋巴细胞增生;作用于巨噬细胞,诱导 IL-1、IL-6、 $\text{TNF-}\alpha$ 和 IL-8 合成;促进蛋白急性期合成;恶病质和增加髓质中细胞的分裂。

[0023] 巨噬细胞、内皮和 T 淋巴细胞产生的细胞因子 IL-6 作用于肝细胞,产生纤维蛋白原;活化 B 淋巴细胞的生长因子;增加髓质中细胞的分裂。

[0024] 这些细胞和组织事件产生影响,其特征是疼痛、体温升高、红斑、水肿和炎症持续过程中损害部位附近的功能丧失。炎症过程控制的调节失败并可以引起上皮、内皮或肌细胞破坏以及引起细胞水平或所波及器官的功能障碍。

[0025] 例如哮喘是慢性肺炎性疾病,其特征在于支气管收缩急性发作和嗜酸性粒细胞肺炎。在急性期,支气管收缩由肥大细胞释放的药理学介质驱使,由过敏原与其表面上过敏原特异性 IgE 分子结合活化,和晚期支气管反应与严重的嗜酸性粒细胞肺炎有关。T 淋巴细胞,主要是 Th2 亚型,通过产生基因控制的细胞因子,例如 IL-4、IL-5、IL-9 和 IL-13 而安排这些反应。

[0026] 成熟肺树突细胞呈递抗原是 Th2 致敏过程的基础,其在接触空传过敏原的过敏患者或动物中发生。

[0027] 哮喘中炎症的证据最初来源于这一发现:它表现出 CD4^+ T 淋巴细胞、Th2 型、肥大细胞和巨噬细胞在致命哮喘患者的肺中优先蓄积。晚期反应 LPR 期间,哮喘患者的支气管肺泡灌洗法分析也揭示存在 CD4^+ T 淋巴细胞和嗜酸性粒细胞数量升高。

[0028] 活化 CD4^+ T 细胞是细胞因子 (IL-4、IL-5、IL-9 和 IL-13) 的主要来源,其造成过敏性肺炎反应,典型地 Th2,嗜酸性粒细胞优先渗出和 IgE 产生。由于多种多样的因子的作用,例如促进趋化性的细胞因子和趋化因子的作用,嗜酸性粒细胞被吸引到肺,增加粘附分子在血管内皮和细胞表面表达、活化和细胞迁移。

[0029] 一旦活化,嗜酸性粒细胞就释放它们的颗粒状内容物(主要是碱性蛋白、来源于嗜酸性粒细胞的神经毒素、来自嗜酸性粒细胞的阳离子蛋白和嗜酸性粒细胞产生的过氧化物酶),除了对蠕虫和细菌有毒性之外,还直接刺激支气管平滑肌,引起收缩和促进胆碱能介质反应增加。

[0030] 在先前确立的肺炎中,由于局部产生促炎细胞因子,嗜酸性粒细胞能够扩增反应、募集新细胞。慢性嗜酸性粒细胞炎症和 IgE 抗体直接与哮喘严重性有关。

[0031] 哮喘中的慢性炎症伴有肺反应过度（支气管应答非特异性刺激而收缩增强）和气道结构变化。

[0032] 很多因素可以促成哮喘发作，包括过敏原、细菌或病毒感染、锻炼、气象突然变化或接触空传刺激，例如烟草烟雾。5 岁以下儿童哮喘的主要原因是副流感病毒（PIV）、呼吸道合胞病毒（VSR）、鼻病毒和肠道病毒引起的病毒感染。

[0033] 当过敏性哮喘个体接触烟雾形式的过敏原时，当 5 至 10 分钟内开始表现出症状。在哮喘急性期期间，观察到下列症状：支气管平滑肌收缩、局限性水肿、支气管上皮腺体粘液分泌增加和轻度细胞浸润。介质的作用可以解释这些特征，所述介质诸如组胺、前列腺素 D2 (PGD2)、白细胞三烯 C4 (LTC4)、血小板活化因子 (PAF) 和 IgE 过敏原 - 特异性抗体活化的肥大细胞所释放的细胞因子 TNF- α 和 IL-1。

[0034] 根据国立卫生统计中心疾病预防控制中心 (NCHS-CDC, 2005, Hyattsville, MD) 的估计，在美国大约 2220 万人罹患哮喘，其中 650 万人小于 18 岁。单就在美国，每天接近 11 人死于哮喘。在巴西，估计表明 10% 的人群表现出哮喘症状，每年 2500 人死亡，是进入通用健康管理系统 (Universal Health Care System, SUS) 的第四大原因。在哮喘患者中，60% 的病例难以控制。

[0035] 目前，炎症和哮喘的治疗利用两类药物：1) 改善急性症状（60% 的哮喘）的药物试剂，主要以具有速效作用的 β_2 -激动剂为代表，季铵抗胆碱能试剂异丙托溴铵，和黄嘌呤衍生物氨茶碱，引起小支气管平滑肌松弛；和 2) 维持药物，用于预防哮喘症状，主要以吸入性和全身性皮质醇为代表。

[0036] 尽管如此，使用这些药物，特别是重复或长期使用，具有局限性，因为它们作用非特异性和随之发生的对患者的不受欢迎的副作用。此外，目前使用的抗炎药物不能显著预防哮喘伴发的肺功能丧失。

[0037] 设法治疗炎症的药物具有副作用风险最小的潜力和正在不断地研究更特异的药物。可以援引几个实例。

[0038] 专利申请 WO 03/070194 介绍了用 α -氨基酸酯化皮质醇的提议，由此能够作为前体药物起作用，用于治疗鼻炎和哮喘，尤其是通过吸入，和用于炎症的治疗，尤其是通过局部或局限性给药。然而，该提议的前体药物呈现的优点不明确，因为提出的治疗仍依赖于皮质醇的作用。

[0039] 专利申请 WO 2004/068928 涉及从蟾蜍 *Bombina maxima* 皮肤防御性分泌而分离的肽，它们是 B₂ 缓激肽受体激动剂，能够用于治疗 and / 或预防与缓激肽有关的病症，包括心血管病症、炎症、哮喘、过敏性鼻炎、疼痛、血管生成等。

[0040] 在又一个专利申请 US 2003/0152564 中，提供了一个肽，相当于人 C 反应蛋白序列第 62-71 位，能够体外抑制人白细胞弹性蛋白酶和 / 或人组织蛋白酶 G 的酶活性，能够治疗慢性炎症状态例如类风湿性关节炎、肺气肿、囊性纤维化、支气管炎、哮喘和一些急性综合征，包括呼吸障碍。

[0041] 专利申请 US 2007/0123455 提出一种方法和组合物，其包含人蛋白 S100A8 和 / 或 S100A9，称其能够用于治疗炎性疾病，例如过敏症、哮喘、动脉粥样硬化、自身免疫疾病、感染等等。

[0042] 美国专利 5, 290, 762 描述了一种预防或治疗患者炎症疾病的方法，包括将大量至

少一种丝氨酸蛋白酶抑制剂施用于受伤部位。该专利文献要求保护一组丝氨酸蛋白酶抑制剂,分泌白细胞蛋白酶、C 反应蛋白、血清淀粉样蛋白 A、 α -2-巨球蛋白或 α -2-抗纤维蛋白溶酶的任何抑制剂。

[0043] 已经广泛研究了包括抑制丝氨酸蛋白酶治疗炎症的方案。例如,人类胰蛋白酶是丝氨酸蛋白酶,在肥大细胞中发现,类似于胰蛋白酶。类胰蛋白酶是一系列过敏性和炎症病理过程的介质,包括鼻炎、结膜炎和哮喘。因而,这个丝氨酸蛋白酶抑制剂可以用于成功治疗过敏性和呼吸系统疾病。

[0044] 在丝氨酸蛋白酶抑制剂当中,研究最好的是 Bowman [Proc. Soc. Exptl. Med. 194663 : 547] 和 Birk 等 [Bull. Res. Council Israel, SecA 196211 : 48 ; Biochem. Biophys. Acta 196367 : 326] 描述的肽 (它们是命名为 BBI-Bowman Birk 抑制剂-起源的来源)。双子叶和单子叶植物中富含 BBI's。这些当中,指出名为 SFTI-1 (向日葵胰蛋白酶抑制剂-1),它是由 14 个氨基酸组成的二环肽,到目前内止,是最小和最有效的天然 Bowman-Birk 型抑制剂。SFTI-1 已经用于抗病原体和昆虫的转基因植物,但是也可以用于预防癌症、登革热及其他炎症和过敏性疾病。

[0045] 除了植物可以产生的药理学活性肽之外,动物产生的物质,例如毒液也已经是研究的目标。动物毒素可以认为是自然产生的分子,能够实现特异性和选择性目标,抑制或刺激生理反应。

[0046] 尤其应该指出该蛋白命名为 natterines,它们是从巴西发现的鱼 *Thalassophryne nattereri* 毒液中分离的。这些蛋白形成分子量大约 38kDa 的毒素家族,它们之间序列呈现高度同源性并能够诱导无数生物活性,例如水肿和伤害感受。

[0047] 使用 natterines 作为起点,可以观察到本身不是通过天然毒液纯化获得的氨基酸的序列,尽管它们与 Bowman-Birk 肽的结构相似性显著。从 natterines 分离所述氨基酸序列的尝试挫败了,因为它需要长期和艰辛的过程,产生很少量的不纯肽片段,不完全对应于本发明感兴趣的肽。这是工业生产这些肽的显著障碍。

[0048] 发明概述

[0049] 本发明提供了通过人工肽合成获得的环肽,在它们的一级结构中包含 13 个 L-氨基酸的序列,具体地说在该肽链的第 4 和 13 位存在氨基酸半胱氨酸而在该肽链的第 11 位存在氨基酸赖氨酸,它们的特征在于含有在第 4 和 13 位的半胱氨酸残基的硫醇基之间的二硫键,形成环肽。所述合成环肽呈现抗炎和抗过敏活性,尤其是在治疗急性和 / 或慢性哮喘中的应用前景。

[0050] 附图描述

[0051] 图 1 :胰蛋白酶水解底物 Abz-FRSSRQ-EDDnp 的催化活性获得的米-曼氏动力学。

[0052] 图 2 :不同类型序列对 LPS (脂多糖) 所诱发的微循环中的白细胞滚动的影响。* 和 LPS 组相比 $p < 0.05$ 。

[0053] 图 3 :Seq07 和 Mod_{Lys/Ala} 序列的必需氨基酸改变对 LPS (脂多糖) 所诱发的微循环中白细胞滚动的影响。* 和 LPS 组相比 $p < 0.05$ 。

[0054] 图 4 :Seq07 预防 LPS (脂多糖) 诱导腹膜炎。LPS (10 μ g/mL) 注射的小鼠在用 Seq07 (4 或 40nM) 处理之前先腹膜内处理 30 分钟。该图表示了 24 小时后洗涤腹膜,细胞 (A)、嗜中性白细胞 (B) 和巨噬细胞 (C) 总数。结果用平均值 $\pm$ SEM 来表示。* 和 LPS 组相

比 $p < 0.05$ 。

[0055] 图 5 : 中 Seq07 (4 或 40nmol) 对急性哮喘支气管肺泡灌洗得到的白细胞和嗜酸性粒细胞募集的影响。进行小鼠支气管肺泡灌洗以计算细胞 (A) 和嗜酸性粒细胞 (B) 总数。结果用 6 只动物 / 组的平均值 $\pm$ SEM 来表示。* 和哮喘组相比 $p < 0.001$ 。

[0056] 图 6 : Seq07 对慢性哮喘时支气管肺泡灌洗法得到的白细胞和嗜酸性粒细胞募集的影响。进行支气管肺泡灌洗以计算细胞 (A) 和嗜酸性粒细胞 (B) 总数。结果用 6 只动物 / 组的平均值 $\pm$ SEM 来表示。* 和哮喘组相比 $p < 0.001$ 。

[0057] 发明详述

[0058] 本发明涉及环状合成肽, 它们的一级结构中包含 13 个 L-氨基酸的序列, 优选在该肽的一个或两个末端存在化学保护基, 所述肽呈现出抗炎和抗过敏活性。

[0059] 本发明的肽在肽链的第 4 和 13 位具有氨基酸半胱氨酸而在肽链的第 11 位具有氨基酸赖氨酸。

[0060] 另外, 本发明中包括的肽优选在它们的基础序列第 1 位具有氨基酸缬氨酸、亮氨酸或异亮氨酸或另外的疏水和中性氨基酸。

[0061] 另外, 本发明中包括的肽优选在它们的基础序列第 3 位具有氨基酸精氨酸、谷氨酰胺或另外的亲水和极性氨基酸, 能具有正电荷。

[0062] 另外, 本发明中包括的肽优选在它们的基础序列第 5 位具有氨基酸精氨酸、苏氨酸、丝氨酸、天冬氨酸或另外的亲水和极性氨基酸, 能具有正电荷。

[0063] 另外, 本发明中包括的肽优选在它们的基础序列第 7 位具有氨基酸甲硫氨酸、异亮氨酸、亮氨酸或另外的亲水和中性氨基酸。

[0064] 另外, 本发明中包括的肽优选在它们的基础序列第 9 位具有氨基酸甘氨酸或天冬氨酸。

[0065] 特别是, 本发明的肽特征在于它们含有第 4 和 13 位半胱氨酸残基的硫醇基之间形成二硫键, 形成环肽的事实。

[0066] 肽分子的化学保护可以通过向肽羧基末端或肽氨基末端添加化学保护基, 或仍通过分子两个末端的保护来实现。优选, 分子的保护通过本发明肽第 13 位氨基酸半胱氨酸羧基的酰胺化而发生, 或通过肽链第 1 位氨基酸残基乙酰化而发生, 或仍通过羧基末端和氨基末端二者的保护而发生。

[0067] 在本发明的主要实施方案中, 这些肽以本文中鉴定的氨基酸序列表征, 缩写是 Seq01、Seq02、Seq03、Seq04、Seq05、Seq06、Seq07、Seq08 和 Seq09, 它们的衍生物、同系物、类似物和 / 或模拟物也包括在本发明范围内。

[0068] 这些肽的氨基酸序列的置换、缺失或修饰形式也包括在本发明范围内, 从本文教导的肽出发, 其对于本发明技术人员是显而易见的。这些修饰的实例包括但不限于脯氨酸残基被羟基化脯氨酸 (羟脯氨酸) 单独、间隔或组合置换; 甲硫氨酸残基被氧化形式甲硫氨酸单独、间隔或组合置换; 和 L-氨基酸被 D-氨基酸单独、间隔或组合置换。

[0069] 在它们的基础序列中含有本文描述的氨基酸序列的更大的肽也包括在本发明范围内。类似地, 如本文所述, 第 1、2 和 3 位已经缺失的肽, 同时仍保持第 4 和 13 位氨基酸之间存在的不变的环状结构, 也包括在本发明范围内。

[0070] 包括在本发明中的环肽单独或至少两个肽组合呈现抑制实验室中检测的哺乳动

物中白细胞的粘附和滚动的能力。当用本发明的代表性肽处理时,在炎性试剂 LPS(脂多糖)注射的实验室哺乳动物腹腔中,除抑制白细胞的粘附和滚动之外,还观察到白细胞募集减少和阻止,尤其是嗜中性白细胞和巨噬细胞。

[0071] 在用卵清蛋白(OVA)攻击引起急性鼠哮喘表现的免疫哺乳动物中,肌肉注射、鼻内和经口给予本发明的环肽单独或含有至少两个肽的组合时,也显示出能够抑制向肺泡腔募集的白细胞总数,这个降低的特征尤其是在支气管肺泡灌洗中嗜酸性粒细胞不存在。

[0072] 在发生动物慢性哮喘的常规实验动物模型中,本发明的环肽单独或含有至少两个肽的组合也能够减少向肺泡腔募集的白细胞总数,伴嗜酸性粒细胞降低。

[0073] 根据在此以前相关的特征,已经注意到本发明的环肽单独或含有至少两个肽的组合能够抑制哺乳动物中观察到嗜酸性粒细胞渗出的炎症表现、病理过敏表现,例如哮喘、支气管炎、鼻炎和皮炎,以及相关病理表现,例如关节炎、免疫系统失调、免疫反应过程中淋巴细胞功能障碍、肿瘤、细胞粘附和/或寄生虫病。向哮喘提供的结果可以与使用地塞米松的哮喘常规治疗相媲美,其中本发明肽被证明同样有效。

[0074] 另外,已经观察到本发明的环肽对抗胰蛋白酶消化,由此能够经口给药。本发明肽可以采用的其他给药方式包括但不限于鼻内、肌肉和静脉内给药。

[0075] 除抗胰蛋白酶的作用之外,本发明的肽也能抑制胰蛋白酶的水解作用,呈现 20 至 63.6nM 范围内的 K_i 。本发明肽的这个性能提示这种肽可以被分为丝氨酸蛋白酶抑制剂,从前胰蛋白酶是丝氨酸蛋白酶家族代表性的重要酶。也已知人类胰蛋白酶是肥大细胞中发现的丝氨酸蛋白酶,与胰蛋白酶非常相似,而且它的抑制被证明可成功治疗呼吸和过敏性疾病,这可以提示证实的本发明肽的活性与抑制丝氨酸蛋白酶有关。

[0076] 本发明肽对巨噬细胞不具有任何细胞毒性作用,而且也证明对实验动物提睾肌的肌纤维或微循环不具有任何杀伤作用。

[0077] 此外,尚未证明本发明的肽单独或组合具有免疫原性,因为它们不诱导特异性抗体的合成,最重要的是尚未证明有致命性。

[0078] 在本发明的一个实施方案中,环肽 Seq01、seq02、seq03、seq04、seq05、seq06、seq07、seq08 和 seq09 可以采用已知的合成肽技术获得,例如经典的在溶液中或固相化学合成;酶催化合成;使用重组 DNA 的技术。

[0079] 本发明的环肽的化学合成优选可以在固相中完成,和更优选使用 FMOC(9-芴甲氧羰基)策略以保护存在于反应中的 α -氨基。

[0080] 合成肽的纯化可以采用本领域熟知的色谱技术完成。优选,采用液相色谱,质谱法验证肽的纯度和同一性。

[0081] 根据上述说明合成肽的纯化后,接着必须将二硫键引入各个肽。该二硫键在空气中通过还原方法在同一肽链第 4 和 13 位半胱氨酸残基之间形成,例如,通过将肽以的 0.05 至 15mg/mL 的比例搅拌溶于 0.01 至 0.5M 碳酸氢铵溶液中,直到二硫键完全形成。肽可以通过冻干分离和通过制备型液相层析来纯化。

[0082] 本发明的另外实施方案中涉及药物组合物,含有肽 Seq01、seq02、Seq03、Seq04、Seq05、Seq06、Seq07、Seq08 或 Seq09、它们的衍生物、同系物、类似物和/或模拟物,其可以是它的药物可接受盐形式,单独或含有至少两种肽的组合在选自稀释剂、赋形剂或药物可接受溶剂的一种或多种载体中。

[0083] 本发明的另一个实施方案是治疗或预防急性或慢性炎症和 / 或过敏性病症的方法,例如但不限于支气管哮喘、鼻炎、关节炎、异位性皮炎、免疫系统失调、免疫反应过程中淋巴细胞功能障碍、肿瘤、细胞粘附和 / 或寄生虫病表现,通过将环肽 Seq01、Seq02、Seq03、Seq04、Seq05、Seq06、Seq07、Seq08 或 Seq09 单独或组合给予哺乳动物,或将含有至少一种本发明肽的药物组合物给予哺乳动物。

[0084] 本发明的又一实施方案是环肽 Seq01、Seq02、Seq03、Seq04、Seq05、Seq06、Seq07、Seq08 或 Seq09 单独或组合在制备用于预防或治疗急性或慢性炎症和 / 或过敏性病症的药物中的应用,例如但不限于支气管哮喘、鼻炎、关节炎、异位性皮炎、免疫系统失调、免疫反应过程中淋巴细胞功能障碍、肿瘤、细胞粘附和 / 或寄生虫病表现。依据这方面,本发明的合成环肽单独或组合可以用来获得抑制哺乳动物炎症和 / 或过敏症发展的前体药物或药物。

[0085] 本发明的环肽或含有它的药物组合物的给药可以通过不限于肌内、鼻内、静脉内和经口给药的方式完成,优选给药方法是经口。

[0086] 引用下列实施例来说明本发明的实施方案并且应当仅仅为了更好地理解本发明包含的研发内容而采用,而不应解释为限制本发明的范围或精神。

[0087] 实施例 1A :胰蛋白酶的抑制

[0088] 肽 Seq01 抑制胰蛋白酶的研究揭示了图 1 所示的简单竞争性抑制 (用 X 轴简单截取) 和得到范围 $10 \mu\text{M}$ – 0.1nM 的 K_i 值。

[0089] 利用的底物是缓激肽荧光类似物 Abz-Phe-Arg-Ser-Ser-Arg-Gln-EDDnp,用纯化,(HPLC) 直到纯度达到 95% 以上 (单峰)。

[0090] 实施例 1B :测试

[0091] a) 确定 K_m 和 k_{cat} 的酶促反应

[0092] 通过荧光分析胰蛋白酶完全水解后形成的产物 Abz 来确定底物溶液的浓度。

[0093] 使用 Hitachi F-2000 荧光分光计实施水解反应,激发和发射缝隙分别定在 10 和 20nm,和激发和发射波长分别在 320 和 420nm。反应杯温度维持在恒温控制的隔室中 37°C 。

[0094] 在 50mM Tris-HCl 缓冲液 pH 8.0 中 37°C 测定胰蛋白酶 (0.5–5nM) 的酶促活性,所述缓冲液含有 20mM NaCl,并添加大约 0.1 – $6.0 \mu\text{M}$ 荧光底物。荧光的增加以荧光分光计连续监测 5 分钟。必要时,使用 Araújo 等人, Biochemistry 25 ;8519,2000 描述的经验式进行荧光读数的校正。测定最初的水解 (消耗底物小于 10%) 的动力学数据并使用 GRAFIT 为 Windows 3.0 程序提供的米 – 曼氏方程式进行包括动力学参数 (K_m , V_{max} 和 k_{cat}) 的计算。

[0095] b) 测定抑制常数 (K_i)

[0096] 为测定本发明肽抑制胰蛋白酶的动力学,使用三种底物浓度 :a) 相当于 K_m 值的一半 ($0.8 \mu\text{M}$) ;b) 相当于 K_m 全部值 ($1.6 \mu\text{M}$) ;c) 相当于稍高于 K_m 值的二倍 ($3.5 \mu\text{M}$)。酶采用 3.0nM 的浓度和抑制剂 (Seq01 至 Seq09) 采用三种浓度 (10nM 、 100nM 和 $1 \mu\text{M}$) ,除每个底物浓度的对照外,底物消耗小于起始浓度的 10%。在含 20mM NaCl 的 Tris-HCl 缓冲液 pH8.0 中, 37°C 进行孵育。对于酶抑制的表征,采用 Lineweaver-Burk 图 ($1/V$ 对 $1/S$) ,和由表观抑制常数 ($K_{i(app)}$) 和底物 K_m 值之间的关系测定 K_i 值 : $K_{i(app)} = [I]/[(v_0/v_i)-1]$ 和 $K_i = K_{i(app)}/[(K_m/[S])+1]$, 其中 $[I]$ = 抑制浓度 ; (v_0/v_i) = 分别在不存在和存在抑制剂下水解速度的比值 ; $K_m/[S]$ = 底物 K_m 和底物浓度之间的比值。

[0097] 以下表 1 中总结了得到的结果：

[0098] 表 1

[0099]

鉴定序列	Ki (nM)
Seq01	22.5
Seq02	24.0
Seq03	63.6
Seq04	42.0
Seq05	44.0
Seq06	24.2
Seq07	20.0
Seq08	24.8
Seq09	21.8

[0100] 实施例 2：抑制白细胞体内粘附和滚动

[0101] a) 本发明的肽对白细胞的滚动：

[0102] 在小鼠 ($n = 3$ 只 / 组) 中进行证实抑制白细胞粘附和滚动的测试, 小鼠用戊巴比妥钠 (**Hypnol[®]**, 50mg/Kg) 麻醉并保持在温度控制板中 (37°C)。实施阴囊手术操作以暴露提睾肌, 固定在板透明区周围。这定位于光学显微镜托架上以允许体内显象局部微循环。制剂保持湿润和用 0.15M PBS (磷酸盐缓冲液) 灌注而温暖。1 $\mu\text{g/mL}$ 浓度的炎性试剂 LPS (脂多糖) 稀释至 20 μL 局部应用于提睾肌。应用 LPS (脂多糖) 前后记录次毛细血管小静脉的状况。应用 LPS 后, 局部应用肽 Seq01 至 Seq09 (1 μM) 15 分钟。观察前和次毛细血管小静脉、小动脉和肌纤维事件 30 分钟。记录在直径 20–40 μM 之间的次毛细血管处小静脉白细胞滚动、坚固粘附和渗出并以 1 分钟间隔定量 10 分钟的时间。迁移定义为延伸 100 μM 一段的血管外组织中白细胞的数量。用外照明技术使用活体内荧光显微镜分析提睾肌微循环 (Axio Imager A1, Carl Zeiss, Germany), 如 Sperandio 等 (J. Exp. Med., 19; 197(10):1355–1363, 2003) 所述。

[0103] 检测的肽诱导小鼠提睾肌次毛细血管小静脉中白细胞滚动减少大约 50 到 90%, 如图 2 所看到的。

[0104] b) 修饰肽：第 1、2 和 3 位缺失氨基酸对白细胞的滚动。

[0105] 用修饰肽 (Mod₍₋₃₎) 重复上面的检测, 其中第 1、2 和 3 位氨基酸被去掉, 如下表示：

[0106]

Seq01	Ile ₁ -Pro ₂ -Arg ₃ -Cys ₄ -Arg ₅ -Lys ₆ -Met ₇ -Pro ₈ -Gly ₉ -Val ₁₀ -Lys ₁₁ -Met ₁₂ -Cys ₁₃
Mod ₍₋₃₎	Cys ₄ -Arg ₅ -Lys ₆ -Met ₇ -Pro ₈ -Gly ₉ -Val ₁₀ -Lys ₁₁ -Met ₁₂ -Cys ₁₃

[0107] 这种修饰的目的是证实由存在于第 4 和 13 位的半胱氨酸残基的硫醇基之间的二硫键产生的环状结构对于本发明肽抗炎活性的必要性。已经除去氨基酸的肽与本发明描述的肽相比,对白细胞滚动保持抑制活性,如图 2 所见。

[0108] c) 第 11 位 Lys 的置换对本发明的肽活性的影响

[0109] 重复修饰肽 ($\text{Mod}_{\text{Lys/Ala}}$) 对于白细胞滚动的检测,如实施例 2 所述,其中本发明一个肽的第 11 位赖氨酸被丙氨酸(与赖氨酸具有相反性能的氨基酸)置换,以测定 Lys_{11} 残基对于本发明肽活性的必要性,如下表所示:

[0110]

Seq01	Ile ₁ -Pro ₂ -Arg ₃ -Cys ₄ -Arg ₅ -Lys ₆ -Met ₇ -Pro ₈ -Gly ₉ -Val ₁₀ -Lys ₁₁ -Met ₁₂ -Cys ₁₃
$\text{Mod}_{\text{Lys/Ala}}$	Ile ₁ -Pro ₂ -Arg ₃ -Cys ₄ -Arg ₅ -Lys ₆ -Met ₇ -Pro ₈ -Gly ₉ -Val ₁₀ -Ala ₁₁ -Met ₁₂ -Cys ₁₃

[0111] 修饰肽 ($\text{Mod}_{\text{Lys/Ala}}$) 与肽 Seq07 相比不能有效抑制白细胞滚动,如图 3 所见,证明 Lys_{11} 的存在对于保持药理活性的重要性。

[0112] 实施例 3:预防 LPS 诱导的腹膜炎

[0113] 在腹膜内注射稀释于 500 μL 无菌盐水溶液的 LPS (055 :BR20 $\mu\text{g/mL}$, Sigma) 前 30 分钟,给小鼠腹膜内注射溶于 500 μL 无菌盐水溶液的 4nmol 或 40nmol Seq07 鉴定的肽。仅注射无菌盐水的动物考虑作为对照。LPS 注射后 24 小时,用高剂量水合氯醛杀死动物,以洗涤腹腔,计算细胞 (A)、嗜中性白细胞 (B) 和巨噬细胞 (C) 数目。从腹膜去掉的物质以 1500rpm 4℃ 离心 10 分钟,分离上清并冷冻于 -20℃ 用于进一步分析,同时含有细胞的残留物质重悬于含 0.1% BSA 的 PBS 中。计算 Neubauer 室中的总数。对于白细胞分类计数,将等份细胞悬浮液置于玻片上并离心 (Citospin),用 Hema 3 染色和在光学显微镜下研究,计数总共 300 个细胞。用样品柱中发现的细胞总数乘以百分比获得每个细胞群的绝对数量。

[0114] 在测试的肽的两个浓度 (4nmol 和 40nmol) 阻止 LPS 注射的小鼠腹腔中接近于 50% 的白细胞募集 (与对照相比)。研究图 4 还可以证实肽阻止嗜中性白细胞和巨噬细胞募集。

[0115] 实施例 4:抑制急性和慢性肺过敏性和炎症反应

[0116] 在第 0 和 7 天,用吸附于 1.6mg 氢氧化铝上的 1% 卵清蛋白 (OVA V 级, 10 μg , sigma) 免疫 7 周龄雄性 BALB/c 小鼠,观察到诱发了急性哮喘。第 14 天后,动物接受 1% OVA 烟雾剂攻击,每周三次。免疫且仅仅用 PBS (磷酸盐缓冲盐水) 攻击的动物认为是对照。为诱导慢性哮喘,连续三周每周三次攻击动物。

[0117] 对于烟雾剂攻击,动物处于配备有超声喷雾器 (US-800, ICEL) 的密闭塑料箱内并暴露着吸入 2mL 含 1% 卵清蛋白溶液 (V 级, Sigma) 的盐水 20 分钟。最后一次烟雾剂攻击后 24 小时,用高剂量水合氯醛杀死动物获得外周血,支气管肺泡灌洗 (BAL) 和肺组织以计算白细胞和嗜酸性粒细胞总数。

[0118] 每次攻击之前,用 Seq07 鉴定的 4nmol 或 40nmol 肽处理动物组,鼻内和腹膜内处理 30 分钟,和每次攻击前经口处理 1 小时。每次攻击之前,仅仅用 Seq07 鉴定的 4nmol 或 40nmol 肽腹膜内处理慢性哮喘动物组 30 分钟。

[0119] 为达到 BAL,用 10% 水合氯醛杀死两组 (OVA 处理或对照) 动物,除去血液,和将

套管放入气管。用 1mL 等分 HBSS (Hanks 平衡盐溶液)+EDTA (乙二胺四乙酸) 洗涤气道三次。收集后, BAL 立即在 800rpm 离心 10 分钟, 丢弃上清液, 和细胞块重悬于 1mL HBSS+0.1% BSA (牛血清清蛋白) 以计算细胞。计算 Neubauer 室中来自 BAL 的全部细胞。在载玻片上离心含 5×10^5 个细胞的等分, 使用冷冻离心, 以 600rpm 5 分钟。为测定不同细胞群的百分比, 用 Hema 3 对玻片进行染色和计算随机选择区域中的 300 个细胞。用样品柱中发现的细胞总数乘以百分比获得 BAL 中每个细胞群的绝对数量。

[0120] 用 4nmol 或 40nmol 检验肽以全部给药途径治疗表现出急性哮喘的动物引起向肺泡腔募集的白细胞总数减少。这个降低的特征为嗜酸性粒细胞不存在, 如图 5 可以证实。检验肽对细胞募集至肺的影响类似于口服 0.3mg/Kg 剂量地塞米松诱发的作用。

[0121] 用 4nmol 或 40nmol 检验肽腹膜内治疗表现出慢性哮喘的动物引起向肺泡腔募集的白细胞总数减少, 嗜酸性粒细胞减少, 如图 6 可以证实。检验肽对细胞募集至肺的影响类似于口服 0.3mg/Kg 剂量地塞米松诱发的作用。

序列表

<110>CRISTALIA PRODUTOS QUIMICOS FARMACEUTICOS LTDA
FUNDACAO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SAO PAULO-FAPESP
FERREIRA, MONICA VALDYRCE DOS ANJOS LOPES

<120> 抗炎和抗过敏的环肽

<130>PI0602885-3

<140>PCT/BR2007/

<141>2007-07-19

<150>PI0602885-3

<151>2006-07-21

<150>20070090499

<151>2007-07-04

<160>9

<170>PatentIn version 3.3

<210>Sequence ID No.1 : (Seq01)

<211>13

<212>PRT

<213> 人工

<220>

<223> 人工序列 : 抗炎和抗过敏的肽

<400>1

Ile Pro Arg Cys Arg Lys Met Pro Gly Val Lys Met Cys

1

5

10

<210>Sequence ID No.2 : (Seq02)

<211>13

<212>PRT

<213> 人工

<220>

<223> 人工序列 :抗炎和抗过敏的肽

<400>2

Val Glu Gln Cys Thr Ile Ile Gly Asp Glu Lys Asp Cys
1 5 10

<210>Sequence ID No. 3 : (Seq03)

<211>13

<212>PRT

<213> 人工

<220>

<223> 人工序列 :抗炎和抗过敏的肽

<400>3

Val Glu Gln Cys Thr Ile Ile Gly Asp Ala Lys Asp Cys
1 5 10

<210>Sequence ID No. 4 : (Seq04)

<211>13

<212>PRT

<213> 人工

<220>

<223> 人工序列 :抗炎和抗过敏的肽

<400>4

Val Gln Gln Cys Ser Glu Ile Ala Gly Ala Lys Pro Cys
1 5 10

<210>Sequence ID No. 5 : (Seq05)

<211>13

<212>PRT

<213> 人工

<220>

<223> 人工序列 :抗炎和抗过敏的肽

<400>5

Leu His Arg Cys Asp Lys Ile Ala Asp Ala Lys Pro Cys

1 5 10

<210>Sequence ID No. 6 : (Seq06)

<211>13

<212>PRT

<213> 人工

<220>

<223> 人工序列 : 抗炎和抗过敏的肽

<400>6

Ile Pro Arg Cys Arg Ala Met Pro Gly Val Lys Met Cys

1 5 10

<210>Sequence ID No. 7 : (Seq07)

<211>13

<212>PRT

<213> 人工

<220>

<223> 人工序列 : 抗炎和抗过敏的肽。NH₂ 是氨基化合物羧基末端保护基。

<400>7

Ile Pro Arg Cys Arg Lys Met Pro Gly Val Lys Met Cys NH₂

1 5 10

<210>Sequence ID No. 8 : (Seq08)

<211>13

<212>PRT

<213> 人工

<220>

<223> 人工序列 : 抗炎和抗过敏的肽。Ac 是乙酰基, 氨基末端保护基。

<400>8

Ac Ile Pro Arg Cys Arg Lys Met Pro Gly Val Lys Met Cys

1 5 10

<210>Sequence ID No. 9 : (Seq09)

<211>13

<212>PRT

<213> 人工

<220>

<223> 人工序列 : 抗炎和抗过敏的肽。Ac 是乙酰基, 氨基末端保护基。NH₂ 是氨基化合物羧基末端保护基。

<400>9

Ac Ile Pro Arg Cys Arg Lys Met Pro Gly Val Lys Met Cys NH₂

1

5

10

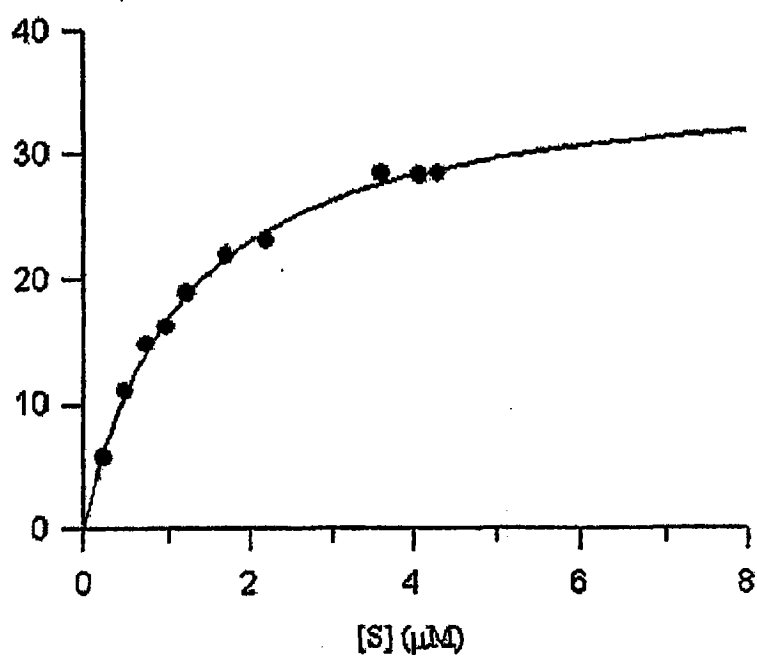


图 1

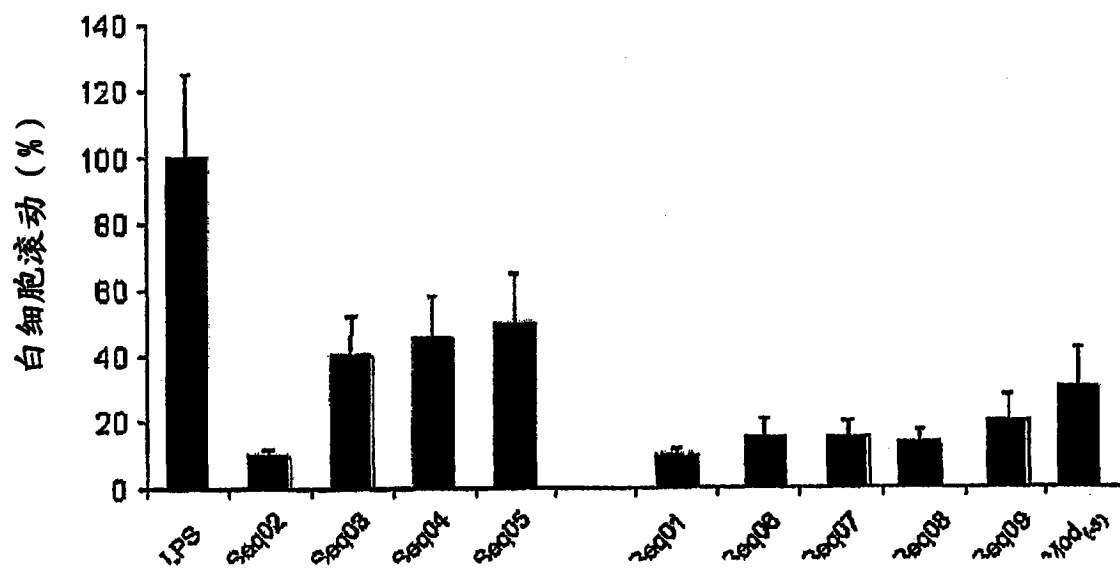


图 2

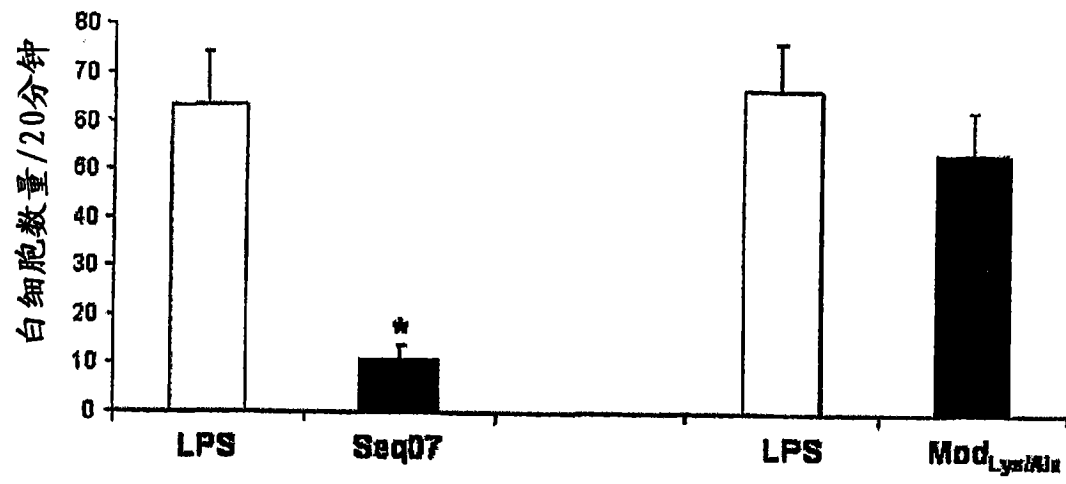


图 3

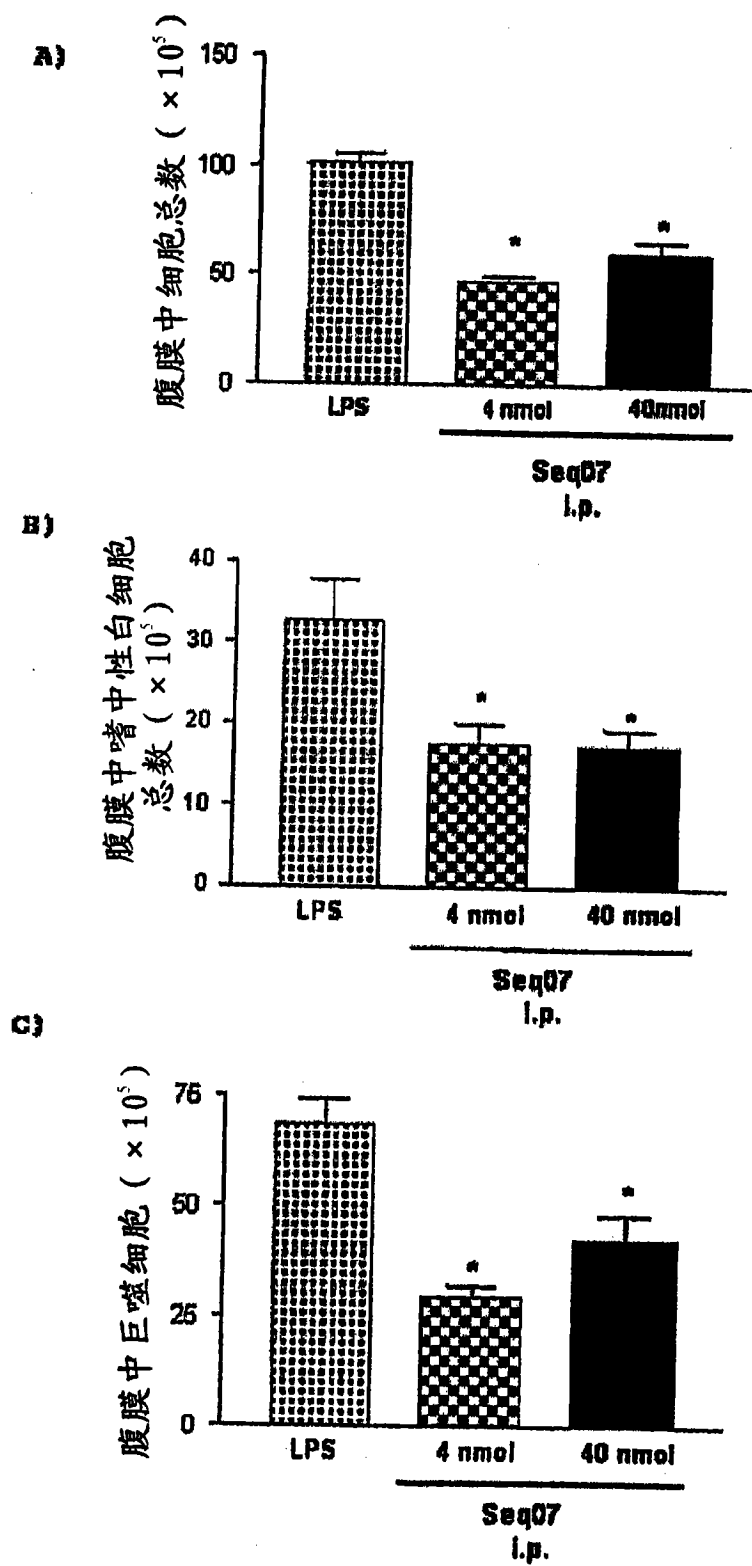


图 4

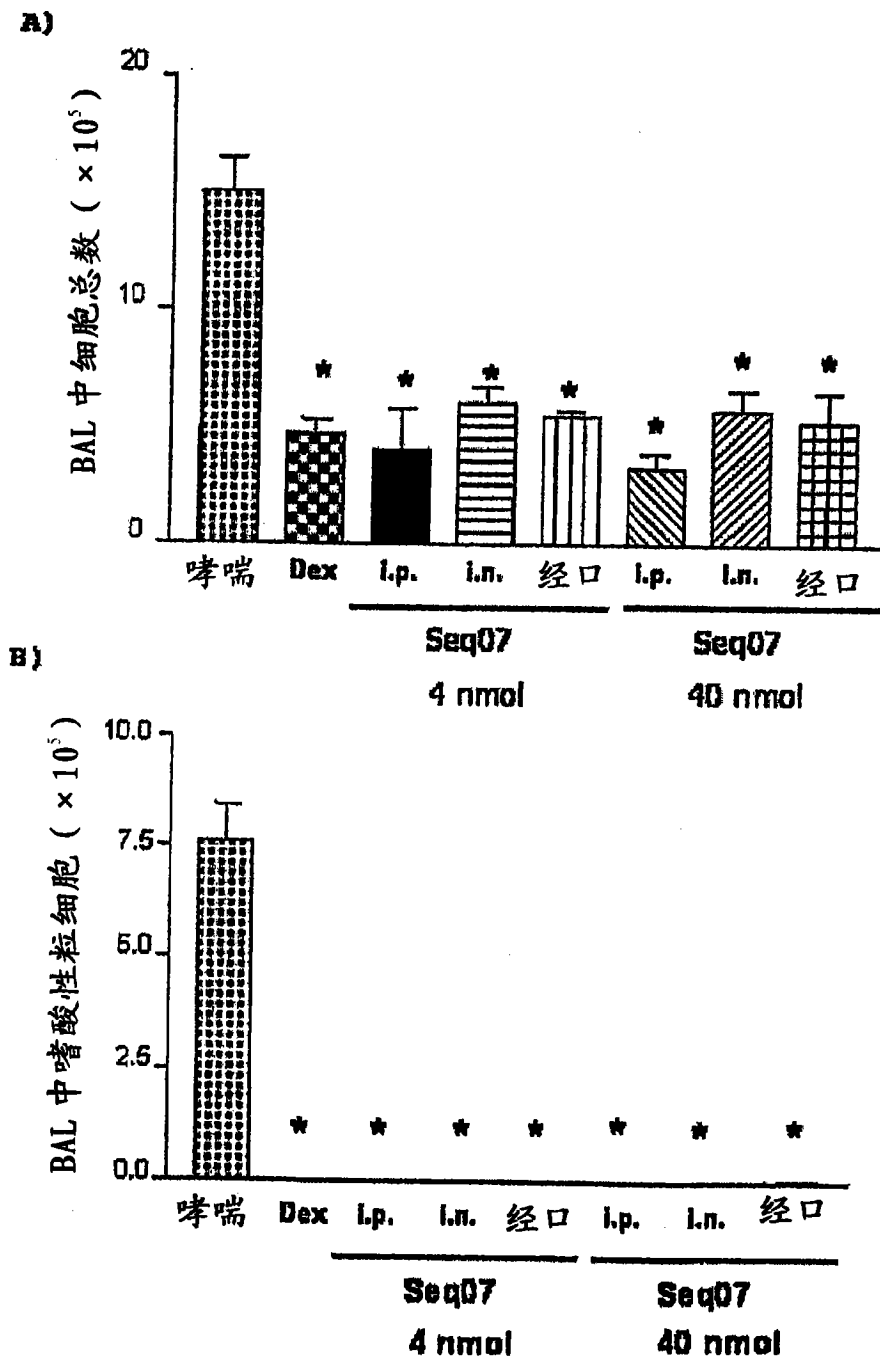


图 5

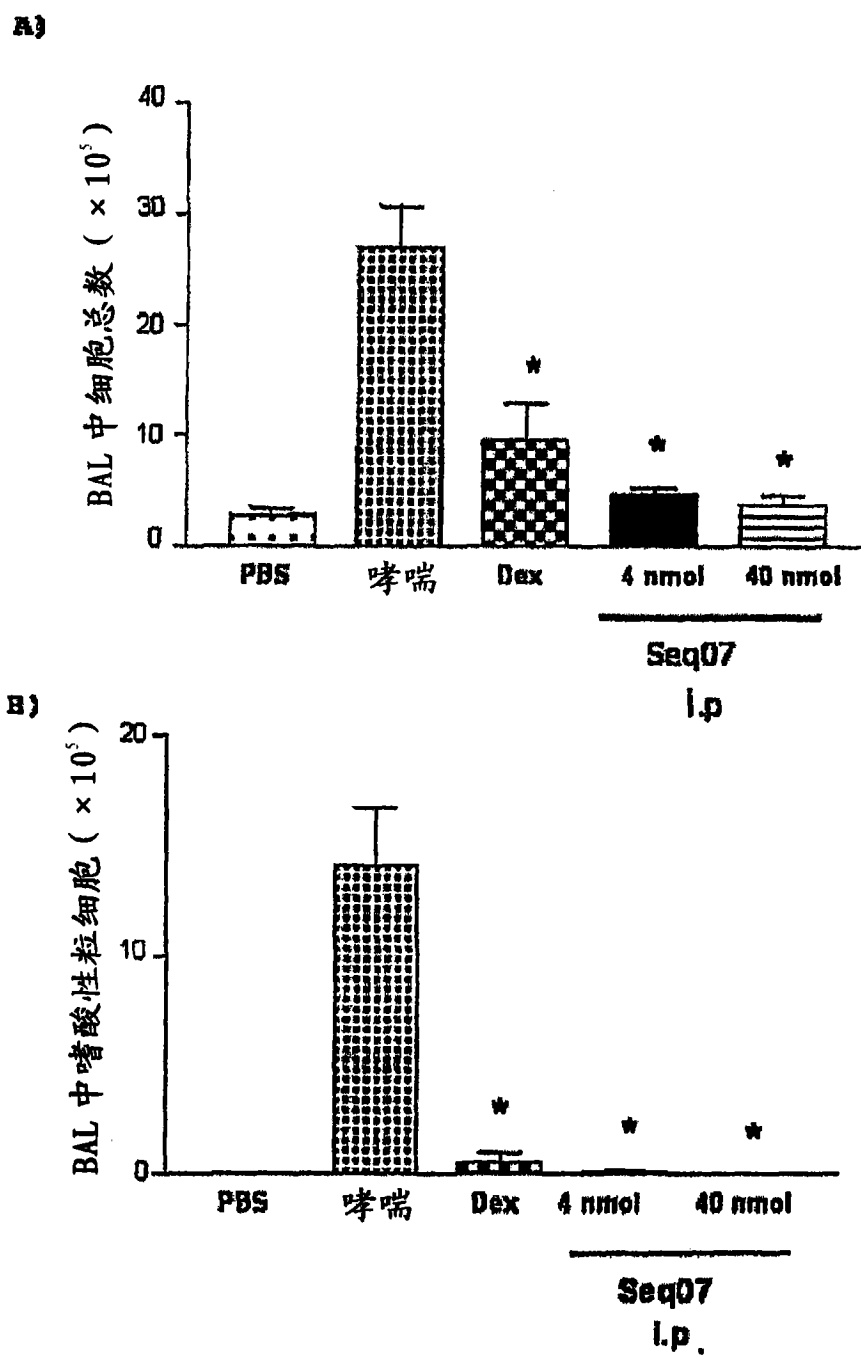


图 6