

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

C07K 14/00 (2006.01)

A61P 19/00 (2006.01)



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 01815793.9

[45] 授权公告日 2009 年 5 月 20 日

[11] 授权公告号 CN 100488980C

[22] 申请日 2001.8.14 [21] 申请号 01815793.9

[30] 优先权

[32] 2000. 8. 16 [33] US [31] 09/641,034

[32] 2001. 3. 19 [33] US [31] 09/812,485

[86] 国际申请 PCT/US2001/025542 2001.8.14

[87] 国际公布 WO2002/014360 英 2002.2.21

[85] 进入国家阶段日期 2003.3.17

[73] 专利权人 阿克勒斯股份有限公司

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 熊谷是成 R·W·布拉谢

米田俊之

[56] 参考文献

WO99489019A2 1999.9.30

WO9960017A2 1999.11.25

WO9943844A1 1999.9.2

审查员 丁慧萍

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司

代理人 徐 迅

权利要求书 2 页 说明书 38 页 附图 6 页

[54] 发明名称

含有整联蛋白结合基序的肽及其用途

[57] 摘要

公开了含有 10 - 50 个氨基酸的肽序列。这些序列的特征是含有整联蛋白结合基序如 RGD 序列、糖胺聚糖结合基序和钙结合基序中的至少一种，余下的氨基酸是邻近胞外基质磷糖蛋白的 RGD 序列的氨基酸。可以配制这些序列，以用于注射，或者将其分散在牙膏或漱剂或牙龈贴片中，并由此给予这些序列，以提高骨/牙齿生长和/或减少过量尿磷酸盐从体内丧失。

1. 一种肽，它含有 10-50 个氨基酸，其特征在于，该肽增加骨生长，其中各氨基酸可以是 D-或 L-构型，其中所述肽含有 RGD 序列和选自糖胺聚糖结合基序和钙结合基序的基序，且其中除所述 RGD 序列之外的其余氨基酸是与天然胞外基质磷糖蛋白中的 RGD 序列邻近的氨基酸。

2. 如权利要求 1 所述的肽，其特征在于，所述糖胺聚糖结合基序具有序列 SGD G。

3. 如权利要求 1 所述的肽，其特征在于，所述钙结合基序具有序列 DXDXSFXGXXQ，其中 X 是任何氨基酸。

4. 如权利要求 3 所述的肽，其特征在于，所述钙结合基序具有序列 DNDISPFSGDGQ。

5. 一种多聚体，其特征在于，该多聚体是权利要求 1 的肽的多聚体。

6. 一种制剂，其特征在于，该制剂含有：

载体；和

治疗有效量的权利要求 1 的肽。

7. 如权利要求 6 所述的制剂，其特征在于，所述载体是盐水溶液，所述制剂是可注射的。

8. 如权利要求 6 所述的制剂，其特征在于，所述载体是糊状物，所述制剂是牙膏。

9. 如权利要求 6 所述的制剂，其特征在于，所述载体是含水增香溶液，所述制剂是漱剂。

10. 一种用于口腔传送化合物的贴片，其特征在于，所述贴片含有权利要求 7 所述的制剂。

11. 权利要求 1 所述的肽在制备减少骨损失用的制剂中的用途。

12. 权利要求 1 所述的肽在制备减少个体的肾磷酸盐排泄的制剂中的用途。

13. 一种制剂，其特征在于，它含有：

载体；和

选自以下的治疗有效量的肽：

DFEGSGYTDLQ**ERGD**(SEQ ID NO:45)

YTDLQ**ERGD**NDISPF(SEQ ID NO:46)

ERGDNDISPFSGDGQ(SEQ ID NO:47)

TDLQ**ERGD**NDISPFSGDGQPFKD(SEQ ID NO:49)。

14. 如权利要求 13 所述的制剂，其特征在于，所述载体是盐水溶液，所述制剂是可注射的制剂。

15. 如权利要求 13 所述的制剂，其特征在于，所述载体是糊状物，所述制剂是牙膏。

16. 如权利要求 13 所述的制剂，其特征在于，所述载体是含水增香溶液，所述制剂是漱剂。

含有整联蛋白结合基序的肽及其用途

发明领域

本发明总的涉及肽的领域，更具体而言，本发明涉及用于治疗骨骼疾病的肽及其制剂。

发明背景

引起世界范围内的各种明显的健康问题的骨骼组织和矿物质代谢的疾病已在文献中有很好的记载。

在人类中，最大的骨量出现在 15-40 岁之间，这个时期被称为“峰值骨量”。过了这个峰值骨量年龄后，骨量开始逐渐减少，骨的机械强度也因此而减少。结果，当机械强度减少到某个水平时，个体处于较大危险的骨折。这种自发事件被称为骨质疏松，严重的话足以致病。

个体中出现骨损失的速度不同，尤其是与性别有关。在女性中，骨损失的速度在绝经期后立即增加(参见图 1)，因为她们所能得到的在维持健康的骨代谢方面起关键作用的激素——雌激素明显减少。绝经后的骨质疏松成为一个重要的临床问题，因为它使非常多的妇女深受其苦。值得注意的是，骨质疏松患者的男女比例为 1: 3。

大多数骨疾病的特征是骨矿物质的损失，使得骨变弱，结果增加了骨折的频率和严重性，这被称为“病理性骨折”。在老龄人群中，这还产生明显的社会问题，因为许多骨折患者移动困难，这常常导致其它精神和机体功能的退化，导致痴呆、肌无力和/或疲劳。此外，血栓形成明显地增加了发病率和疼痛，如由于髌部或骨盆骨折的结果可发生肺栓塞。

单单在美国，据说到 2000 年，将有 5 千 2 百万名年龄超过 45 岁的妇女患有骨质疏松。目前，在全世界范围内，患有骨质疏松的人群大约为 2 亿。单单在美国，病理性骨折的年发病率大约为 150 万。据估计，每年治疗这些骨质疏松患者的医药费，在美国和在全世界分别为 140 亿美元和 600 亿美元。

肾衰竭也是一个与矿物质代谢和骨骼形成相关的重要的健康问题，其患者的数量也在迅速增加。这些患者中，肾功能在几年到十年的时期内逐渐下降。当肾功能下降到健康水平的大约 1/4 时，患者被归类为慢性肾衰竭患者。当肾功能下降到大约 1/6 时，这些患者需要开始透析，并被称为晚期肾病(ESRD)。在患有慢性肾衰竭的患者中，重要矿物质如钙和磷酸盐的血清水平损失了他们正常的体内稳态，导致骨骼畸形。这种疾病被称为肾性骨营养不良(ROD)，这是由肾衰竭导致的一种继发性骨质疏松。ROD 还可能会引起病理性骨折，如骨质疏松。在美国，晚期肾病的流行迅速增加，在2000年达到了大约30万人。ROD影响着大多数ESRD患者。

还有其它几种骨骼组织和矿物质代谢疾病，如佩吉特病、佝偻病、骨硬化症、甲状旁腺功能亢进等等，并且有很多患者受到这些疾病的困扰。

从代谢角度看，骨是高度活跃的器官，它们连续地发生骨吸收和形成(重塑)。破骨细胞促进了骨吸收，这类细胞由单核/巨噬细胞谱系细胞分化而成。破骨细胞粘附于骨的表明，通过分泌酸和酶降解骨组织。破骨细胞通过粘附于降解的骨组织并分泌骨基质蛋白，从而促进了骨形成，这些破骨细胞大多数被钙和磷酸盐矿化。破骨细胞分化成骨细胞，并成为骨组织的一部分。

许多实验方法都试图加速骨形成或者消除骨吸收。例如，已知生长因子如BMP(骨形态生成蛋白)、TGF β (转化生长因子 β)、IGF(胰岛素样生长因子)和成纤维细胞生长因子(FGF)在骨形成中具有潜在的生物学活性。具体而言，BMP的少数几种亚类分子如BMP-2被认为是用于硬组织的最有潜力的生长因子之一。但是，这些因子并没有被开发用作全身性骨疾病的治疗剂。因为它们之中没有任何一种可被选择性地传送到骨中，并且其中的一些因子如BMP将软组织转化成硬组织。这被称为异位钙化，当它们全身使用时，有非常不利的影响。此外，骨形成和吸收的过程是如此的紧密相关，因而使得骨形成的选择性增加或骨吸收的选择性抑制变得极端地困难。

目前，需要对骨损失进行有效的治疗。诸如雌激素、降钙素、维生素D、氟化物、异丙氧黄酮、二磷酸酯以及少数其它治疗剂都未能提供令人满意的治疗方法〔Gennari等，*Drug Saf.*(1994)，11(3): 179-95〕。

常常给患有绝经后骨质疏松的患者使用雌激素及其类似物。雌激素替代治疗涉及恰好在绝经期开始之前或之后给予雌激素。但是，与使用类固醇激素治疗常

常出现的情况一样，长期使用雌激素也会产生明显的不利影响，如乳腺癌和其它妇科癌症〔Schneider 等, Int. J. Fertil. Menopausal Study(1995), 40(1): 40-53〕。

降钙素是甲状腺产生的一种内源性激素，通过其受体选择性结合于破骨细胞，并将这些细胞灭活。由于破骨细胞是仅有的可以将骨组织溶解的细胞，所以降钙素结合会阻断或放慢由破骨细胞引起的骨降解。但是，这种生物学机制是非常短暂的，因为破骨细胞相对快速地对这种药物产生耐受。因此，降钙素的使用不能提供有效的治疗选择。

当将氟化物给予人时，已显示出可增加骨量。但是，虽然骨量增加了，骨的机械强度却没有增加。因此，尽管在表观骨量上有增加，但是骨折的风险仍存在〔Fratzl 等, J. Bone Mineral Res.(1994), 9(10): 1541-1549〕。此外，给予氟化物有明显的健康风险。

在世界上的一些地区已使用异丙氧黄酮治疗骨质疏松。但是，这种化合物的实际疗效仍是个问题，因此它未被广泛接受用作治疗骨疾病的有用治疗剂。

二磷酸酯是从焦磷酸盐衍生得到的化合物。其合成涉及用碳取代位于两个磷原子之间的氧原子，然后用各种取代基修饰该碳。虽然已知二磷酸酯抑制骨吸收，但是它们对骨形成的影响小。此外，二磷酸酯粘附于骨表面，并在那里维持非常长的时间，导致骨组织更新的长时间减少。由于骨组织需要不断地更新，这种更新的减少最终导致骨退化〔Lufkin 等, Osteoporos. Int.(1994), 4(6): 320-322; Chapparel 等, J. Bone. Miner. Res.(1995), 10(1): 112-118〕。

与上述制剂相关的另一重要的问题是，除了氟化物和异丙氧黄酮之外的其它制剂不适合于口服给药，因而必须是经肠胃外给予。由于骨疾病常常是慢性的，而且需要长期的治疗，所以需要适合于口服给予的治疗剂。

总之，在可预防或治疗骨损失的治疗剂方面存在大量的需求。具体而言，非常需要可选择性增加骨形成和/或破骨细胞的数量而不影响骨吸收或软组织的新药物。

另一涉及骨骼和矿物质代谢的主要健康问题是牙齿。据估计，仅在美国就有六千七百万人受到牙周病的影响，2000 年的治疗费用大约 60 亿美元。据说整个人群中有 90% 的人在他们的生命中患有龋齿。仅在美国，每年为治疗龋齿而花的费用超过 500 亿美元。

龋齿是一种常见的疾病，常常影响小孩和成人。另一方面，牙周病主要影响

成人,更具体地说是年老者。在许多病例中,患者的牙龈发炎并被破坏,支持牙齿的牙槽骨损坏。组成根的核心牙骨质也受到损伤,结果导致牙齿脱落。治疗牙齿缺失的一种最常用的方法涉及使用牙齿植入物。将人工植入物(骨整合的牙齿植入物)放置在丢失了牙齿的地方。在严重的病例中,要用植入物代替整个义齿。但是,植入物常常松动,或者脱落,这是因为它们在牙槽骨上的固定并不总是成功的。由于这些患者的牙槽骨由于某种原因而受到损伤,所以植入物并不总是得到牙槽骨的很好支持。当牙槽骨严重受损时,要进行自体的骨移植。对于这种情况,从同一患者的另一骨组织获得的骨移植物被移植到该损坏的牙槽骨上,以使硬组织在该处再生,并使该处的窦升高。由于这些治疗需要昂贵的可生物相容的材料和/或非常熟练的技术,所以治疗成本一般都非常高。

据认为龋齿是由口腔中的酸性条件引起的。例如,糖被转化成酸,并在牙齿的表面上溶解。虽然许多病例中仅仅是釉质和部分牙质受到影响,但是在严重的病例中,这种损伤可到达牙髓腔,从而导致明显的疼痛。最典型的治疗是使用不可降解的材料如金属或金属氧化物填充龋齿病变。龋齿的治疗大多数依赖于那些材料以及牙医所采取的技术,这些通常是昂贵的。

虽然已开发出少量的治疗剂,并用于牙科领域,但是通常它们仅仅是抗炎症的药物、镇痛剂和抗生素。还没有开发出可直接改进牙周硬组织的一般有效的治疗剂。

与矿物质代谢相关的另一主要临床问题是磷酸盐(PO_4)的过量损失或浪费到体外。磷酸盐在所有的活生物中起到各种重要的作用。在脊椎动物中,磷酸盐是它们的骨骼的主要成分。在所有的动物中,磷酸盐是建立多核苷酸链以及细胞膜所必需的成分,糖和核苷酸的磷酸化和去磷酸化是能量产生和消耗的最基本的反应,蛋白质、糖和脂质的磷酸化和去磷酸化对于细胞中的信号传导是不可缺少的反应。因此,磷酸盐的短缺甚至可导致死亡。

在哺乳动物中,体液中磷酸盐的浓度被控制在使体内所有的生物学功能正常运行的范围之内。肾是控制体内磷酸盐水平的最重要的器官。肾中的肾小球使磷酸盐恒定渗透到尿中,近端的小管通常再吸收大约 80%的这种渗透的磷酸盐。如果这种再吸收功能受损的话,过量的磷酸盐将流失到尿中,导致各种临床问题。

例如,已知大多数的肾移植患者都会出现过量的肾磷酸盐泄漏,因为移植的肾或多或少地仅再吸收尿中的磷酸盐,使其重新回到循环中。肾移植患者的这种

再吸收活性差的原因已经弄清。这种再吸收性差常常导致患者产生营养不良和继发性骨质疏松。这种问题不能采用简单的外源补给磷酸盐的方法来治疗。在儿科医学中也常常观察到其病理特征未知的类似的肾磷酸盐泄漏，其结果导致营养不良或生长延缓。

与循环的磷酸盐短缺相关的健康问题并不限于人类。乳牛由于过量生产牛奶的缘故有时也患有低磷酸盐血症(血液中的磷酸盐太低)。这不仅使牛奶的营养质量变差，而且还常常使奶牛无法产奶。这是牛奶场中比较常见的问题。

明显地，非常需要一种治疗剂来促进牙槽骨和/或牙齿的再生、增加帮助形成牙组织的成牙本质细胞和/或成骨细胞的数量和活性，以及减少肾磷酸盐分泌。

发明概要

公开了一类化合物，这类化合物用于治疗或预防与骨骼损失或软弱相关的疾病，和/或减少肾磷酸盐排泄。这类化合物是肽或其类似物，含有 10-50 个单体(如氨基酸)单元。氨基酸序列含有一个或多个下述基序：整联蛋白结合基序序列；糖胺聚糖结合基序；和钙结合基序。这些氨基酸可以是 D 或 L 构型。化合物中剩余的单体单元(除了前述基序以外的序列)可以是氨基酸类似物。当基序是整联蛋白结合基序时，剩余的单体单元较佳是具有与天然蛋白质——胞外基质磷糖蛋白中的 RGD 序列邻近的氨基酸序列基本上相同的序列的天然氨基酸 [Rowe 等, 《基因组学》(Genomics)(2000), 67: 56-68]。

本发明的一个方面是一组肽和/或肽类似物。

本发明的一个特征是，本发明的化合物含有一个或多个下述基序：整联蛋白结合基序序列；糖胺聚糖结合基序；和钙结合基序。这些氨基酸可以是 D 或 L 构型。

本发明的一个优点是，本发明的化合物增强了骨骼生长。

本发明的另一个优点是，本发明的化合物在新骨骼或牙齿生长的表面上增加了成骨细胞的数量，并且可能也增加成牙本质细胞的数量。

本发明的另一优点是，本发明的化合物减少磷酸盐(Pi)从身体中流失，如通过减少尿中 Pi 的泄漏所表示。

本发明的另一方面是提供一种治疗用的制剂，该制剂含有足够浓度的本发明化合物，可将该制剂给予牙齿的牙髓、牙齿的牙根和牙龈之间的空间，或者牙槽

骨，以预防牙齿和/或牙槽骨上的损伤，或者使受损牙齿和/或牙槽骨中的硬组织再生。

本发明的另一方面是提供牙膏，该牙膏含有足够浓度的本发明的化合物，用于增强已退化区域上的牙齿和/或牙槽骨的生长，或者预防这种退化。

本发明的又一方面是一种漱剂，该漱剂含有足够浓度的本发明的化合物，用于增强已退化区域上的牙齿和/或牙槽骨的生长，或者预防这种退化。

本发明的又一方面为牙线，包涂于其上和/或埋植于其中的是本发明的化合物，这些化合物的量为反复施用于牙齿和/或牙槽骨增强已退化区域上的牙齿和/或牙槽骨的生长，或者预防这种退化的量。

本发明的又一方面为施用于个体的牙龈组织上的小粘贴片，该粘贴片含有治疗有效量的本发明的化合物。这种化合物被缓慢地从该粘贴片释放到牙龈上，这样所释放的化合物渗透到牙齿的牙根以及牙槽骨和/或颌骨中，以预防这些骨损失和/或使这些骨再生。

本发明的一个目的是提供一种治疗或预防骨骼或牙骨损失的方法，该方法包括给予/施用本发明的任何制剂/组合物。

在阅读下文关于本发明的更详细的描述之后，本领域熟练的技术人员将更容易地理解本发明的这些和其它目的、优点以及特征。

附图的简要说明

图 1 是显示人的骨量和年龄的关系图。

图 2 是胞外基质磷糖蛋白质的示意图，其中，称为“A”的区域包括与本发明的肽匹配的序列，称为“B”的区域是与骨-牙齿基质磷糖蛋白质如骨桥蛋白(OPN)、牙质唾液磷蛋白(DSPP)、牙质基质蛋白质 1(DMP1)和骨唾液蛋白 II(IBSP)高度同源的基序。

图 3A、3B、3C 和 3D 是骨(从 7 天的小鼠颅盖器官培养研究中得到)横截面的实际照片，分别显示对照(图 3A)、成纤维细胞生长因子-1(FGF-1)(图 3B)和本发明称为 D-00004 以及 D-00006(分别为图 3C 和 3D)的两条肽的效果。

图 4 是不同化合物对颅盖的影响的比较图。

图 5 是显示 D-00006 的体内作用的图。

图 6 是显示 D-00006 对尿磷酸盐泄漏的作用的图。

发明的详细描述

在描述本发明的肽、类似物、制剂和方法之前，应理解本发明并不受到所述的任何具体实施例的限制，当然这些都是可以改变的。还应理解，本文所用的术语仅仅是为了描述本发明的目的，而不是限定本发明的范围，本发明的范围应由附带的权利要求限定。

在给出一个范围的值时，应理解在该范围的上限和下限之间的各个居中值，除非文中另外清楚地说明该居中值为该下限单位的十分之一，否则这些居中值都被具体公开。任何指定的值或在指定范围中的居中值与任何其它指定的值或在指定范围中的居中值之间的各较小范围都包括在本发明之内。这些较小范围的上限和下限可独立包括在该范围之内或排除在该范围之外，任一极点、两个极点都或都不包括在此较小范围内的各范围也包括在本发明的范围内，从属于所述指定范围内的任何具体排除的限度。在所指定的范围包括一个或两个限度的情况下，不包括任一或两个这些包含的极点的范围也包括在本发明之中。

除非另有描述，否则本文所用所有技术和科学术语的含义与本领域普通的技术人员通常所理解的相同。虽然在实践或者测试本发明时，可采用与本文所述类似或等效的任何方法和材料，但是下文所述的是优选的方法和材料。通过公开和描述与本文所引用的出版物相关的方法和/或材料，将这些出版物纳入本文作为参考。

必须注意的是，在本文和附带的权利要求书中，除非另有说明，否则单数形式的“一个”、“和”以及“该”包括其复数形式。因此，例如，以“一条肽”为例，它包括许多的这类肽，而“该方法”则包括一种或多种方法以及本领域熟练的技术人员熟知的等效形式，等等。

本文所讨论的出版物都是本申请的申请日以前公开的。在此不能认为因这些出版物先于本发明公开而不能给本发明授权。此外，所提供的出版日期可能与实际的出版日期不同，这可能需要单独确认。

定义

术语“肽”和“肽化合物”在文中互换使用，指长约 10-50 个氨基酸的氨基酸多聚体形式，可包括编码的或非编码的氨基酸，化学修饰的或生物化学修饰或衍生的氨基酸，L-或 D-氨基酸，具有修饰的肽骨架的肽，以及含有氨基酸类似物

的肽。肽化合物可以是以下物质的聚合物：(a) 天然的氨基酸残基；(b) 非天然的氨基酸残基，如 N-取代的甘氨酸、氨基酸取代基等等；或者(c)天然的和非天然的氨基酸残基/取代基。换言之，本发明的肽化合物可以是肽或类肽(peptoid)。类肽化合物和它们的制备方法在 WO 91/19735 中公开，本文将此出版物的内容纳入作为参考。

术语“治疗”在本文中指获得所需的药理学上和/或生理学上的效果。该效果可以是预防性的，如完全或部分预防疾病或其症状，和/或可以是治疗性的，如部分或完全治愈一种疾病和/或由这种疾病引起的不利的影响，如增强维生素 D 的效果。“治疗”在本文中涵盖治疗脊椎动物尤其是哺乳动物、最特别是人的疾病，包括：

- (a) 预防易患上某种疾病但尚未诊断出已经患有该疾病的对象患上该疾病；
- (b) 抑制疾病，即阻止其发展；或者
- (c) 缓解疾病，即使该疾病消退。

本发明尤其涉及可治疗已患有骨损失或者被认为可能患有骨损失的患者的肽，因此，本发明具体涉及预防、抑制或缓解骨损失的作用。对象将被“治疗”，只要该对象存在治疗上可检测的和有利的效果，这种效果可在各种不同的标准上进行测量，包括增加的骨生长、增加的骨强度或本领域熟练的技术人员通常所理解的在治疗骨相关的疾病中所需的其它特征。

术语“抗体”指能结合抗原的免疫球蛋白。术语“抗体”在本文中包括能结合感兴趣的抗原或抗原片段的抗体片段〔如 F(ab')₂，Fab'和 Fab〕。

术语“特异性结合”指抗体对特异性肽——尤其是指本发明的肽的高亲合力和/或高亲和力结合。抗体与其特异性靶表位结合要强于该抗体与该肽上其它表位或者其它肽上的其它表位的结合。特异性与感兴趣的肽结合的抗体能与其它肽结合 1 周，而仍处于可检测的水平(如感兴趣的肽所显示的结合的 10%或以下)。这种微弱的结合或背景结合很容易与感兴趣的肽结合的特异性抗体相区分，如使用适当的对照。

术语“骨骼损失”指骨骼量、骨骼的物质或基质或任何成分(如钙和磷酸盐)减少，或者骨变弱(如在其抵抗折断的能力方面)。

术语“骨骼”包括骨和牙齿。同样的，术语“骨骼的”也包括骨和牙齿。

术语“骨质疏松”指涉及骨损失的任何病症，即涉及由任何原因引起的骨量

或物质的减少。该术语具体涉及由骨的去矿化、绝经后的或者围绝经期的雌激素减少或神经损伤而导致的骨损失。

术语“对象”、“个体”、“患者”或“宿主”在文中交替使用，指任何脊椎动物，尤其是任何哺乳动物，更具体是包括人、家畜以及哺乳动物类宠物。

肽化合物

本发明的肽化合物是含有 10-50 个氨基酸的肽。这些氨基酸优选自 20 个天然 L-氨基酸。但是，D-氨基酸也可作为氨基酸类似物存在。本发明的肽将含有一个或多个下述氨基酸序列基序：整联蛋白结合基序，如 RGD 序列；糖胺聚糖结合基序；和钙结合基序。单独的氨基酸在肽中可以 L-或 D-同种型存在，但较佳是 L 型。本发明的肽的 C 末端可以被酰胺化，或者未被酰胺化，或者在其 N 末端被羧化或者未被羧化。本发明的肽可含有或不含有呈 L-或 D-型的糖胺聚糖结合基序，如 SGD₂G(S₁SEQ ID NO:41)序列。还可利用生物学活性来进一步表征本发明的化合物，即本发明化合物增加骨骼生长，以及成骨细胞或成牙本质细胞在新的骨骼生长表面上的生长或募集。

当将有效量的本发明的肽化合物给予个体时，它们具有一个或多个以下特性：(1) 减少骨损失；(2) 增加骨量；(3) 增加骨强度；(4) 减少肾的磷酸盐排泄；和(5) 减少个体的磷酸盐损失。

本发明肽的特殊例子是，在胞外基质磷糖蛋白的天然序列的 RGD 序列的任一侧含有 7-47 个氨基酸。因此，本发明的肽的例子含有从下述序列获得的序列，并包含以黑体字显示的 RGD 序列：

DSQAQKSPVKSKSTHRIQHNDY¹LKHL²SKVKKIP³SD⁴FEGSGY⁵TDLQ⁶ERG⁷DNDISPFSG
DGQPFKDIPGKGEATGPDLEGKDIQTGFAGPSEAESTHL (SEQ ID NO:1)

含有 RGD 序列为其末端序列的本发明肽的特殊例子如下：

AQKSPVKSKSTHRIQHNDY¹LKHL²SKVKKIP³SD⁴FEGSGY⁵TDLQ⁶ERG⁷D (SEQ ID NO:2)
RGDAQKSPVKSKSTHRIQHNDY¹LKHL²SKVKKIP³SD⁴FEGSGY⁵TDLQ⁶E (SEQ ID NO:3)
DSQAQKSPVKSKSTHRIQHNDY¹LKHL²SKVKKIP³SD⁴FEGSGY⁵TDRG⁶D (SEQ ID NO:4)
RGDSPVKSKSTHRIQHNDY¹LKHL²SKVKKIP³SD⁴FEGSGY⁵TDLQ⁶E (SEQ ID NO:5)
DSQAQKSPVKSKSTHRIQHNDY¹LKHL²SKVKKIP³SD⁴FEGSGR⁵RG⁶D (SEQ ID NO:6)

RGDTHRIQHNIDYLKHL SKVKKIP SDFEGSGYTDLQE (SEQ ID NO:7)
DSQAQKSPVK SKSTHRIQHNIDYLKHL SKVKKIP SDFERGD (SEQ ID NO:8)
RGDLKHL SKVKKIP SDFEGSGYTDLQE (SEQ ID NO:9)
DSQAQKSPVK SKSTHRIQHNIDYLKHL SKVKKIP SRGD (SEQ ID NO:10)
RGDLSKVKKIP SDFEGSGYTDLQE (SEQ ID NO:11)
DSQAQKSPVK SKSTHRIQHNIDYLKHL SKRGD (SEQ ID NO:12)

RGDVKKIP SDFEGSGYTDLQE (SEQ ID NO:13)
DSQAQKSPVK SKSTHRIQHNIDYLKRGD (SEQ ID NO:14)
RGDIP SDFEGSGYTDLQE (SEQ ID NO:15)
DSQAQKSPVK SKSTHRIQHNIDRGD (SEQ ID NO:16)
RGDDFEGSGYTDLQE (SEQ ID NO:17)
DSQAQKSPVK SKSTHRRGD (SEQ ID NO:18)
RGDGSYTDLQE (SEQ ID NO:19)
DSQAQKSPVKRGD (SEQ ID NO:20)
RGDGYTDLQE (SEQ ID NO:21)
DSQAQKSRGD (SEQ ID NO:22)
RGDNDISPFSGDGQPFDIPGKGEATGPDLEGKDIQTGFA (SEQ ID NO:23)

其 RGD 在序列之中的本发明肽的特殊例子如下:

NDI RGDSPFSGDGQPFDIPGKGEATGPDLEGKDIQTGFA (SEQ ID NO:24)
NDISPF RGDSDGQPFKDIPGKGEATGPDLEGKDI (SEQ ID NO:25)
NDISPFSGD RGDGQPFDIPGKGEATGPD (SEQ ID NO:26)
FSGDGQPFDIPGKGEATGPDLEGKDIQTGFAGPSEAES RGDTHL (SEQ ID NO:27)
IPGKGEATGPDLEGKDIQTGFAGPSE RGD AESTHL (SEQ ID NO:28)
EATGPDLEGKDIQTGFAG RGD PSEAESTHL (SEQ ID NO:29)
NDISPFSGDGQPFD RGDIPGKGEATGPDLEGK (SEQ ID NO:30)
GKGEATGPDLEGKDI RGDQTGFAGPSEAESTHL (SEQ ID NO:31)
FSGDGQPFDIPGKGEATG RGD PLEGKDIQTGFAGPSEA (SEQ ID NO:32)
DGQPFDIPGKGEATG RGD PLEGKDIQTGF (SEQ ID NO:33)
PFDIPGKGEATG RGD PLEGKDIQ (SEQ ID NO:34)
DIPGKGEATG RGD PLEGKDIQTGFAGP (SEQ ID NO:35)
DGQPFDIPGKGEATG RGD PLEGKDIQTGF (SEQ ID NO:36)

GKGEATG RGDPLEGKDIQTGFAGPSEA (SEQ ID NO:37)

EATG RGDPLEGKDIQTGF (SEQ ID NO:38)

EATG RGDPLEGK (SEQ ID NO:39)

EATG RGDPL (SEQ ID NO:40)

在一些实施例中，本发明的肽含有糖胺聚糖结合基序。糖胺聚糖结合基序具有共有序列 SGXG(SEQ ID NO:50)，其中 X 是任何氨基酸。在一些实施例中，糖胺聚糖结合基序具有序列 SGD(GSEQ ID NO:41)。

在其它实施例中，本发明的肽含有钙结合基序。在一些实施例中，钙结合基序具有 DNDISPFSGDGQ 序列(SEQ ID NO:42)。“钙结合基序”这个术语还包括与 SEQ ID NO:42 有 1、2、3、4、5、6、7 或 8 个氨基酸不同的氨基酸序列。在许多实施例中特别感兴趣的是 SEQ ID NO:42 的保守氨基酸 1、3、5、7、9 和 12。因此，在一些实施例中，本发明的肽含有序列 DXDXSFXGXQXQ(SEQ ID NO:43)作为其钙结合基序，其中 X 是任何氨基酸或氨基酸类似物。

在其它一些实施例中，钙结合基序具有序列 $DX_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}X_{12}$ ，其中，

X_1 是任何氨基酸；

X_2 是 D、N 或 S；

X_3 是 I、L、V、F、Y 或 W；

X_4 是 D、E、N、S、T 或 G；

X_5 是 D、N、Q、G、H、R 或 K；

X_6 是 G 或 P；

X_7 是 L、I、V、M、C；

X_8 是 D、E、N、Q、S、T、A、G 或 C；

X_9 和 X_{10} 各自独立为任何氨基酸；

X_{11} 是 D 或 E；和

X_{12} 是 L、I、V、M、F、Y 或 W。

在其它一些实施例中，钙结合基序具有序列 $X_1X_2X_3X_4C(X_5)_nC(X_6)_mX_7X_8X_9X_{10}X_{11}X_{12}X_{13}X_{14}C$ ，其中

X_1 、 X_3 和 X_4 各自独立为 D、E、Q 或 N；

X_2 、 X_5 、 X_6 、 X_7 、 X_9 、 X_{10} 、 X_{11} 、 X_{12} 和 X_{14} 各自独立为任何氨基酸；

n 为 3-14；

m 为 3-7；

X_8 为 D 或 N； 和

X_{13} 为 F 或 Y。

在其它一些实施例中，钙结合基序具有序列 $X_1X_2X_3X_4X_5DX_6X_7X_8X_9X_{10}X_{12}X_{13}X_{14}X_{15}X_{16}X_{17}X_{18}X_{19}X_{20}X_{21}$ ，其中，

X_1 和 X_2 各自独立为 L、I、V、M、F、Y 或 W；

X_3 、 X_4 、 X_6 、 X_7 、 X_8 、 X_{10} 、 X_{11} 、 X_{12} 、 X_{15} 、 X_{18} 和 X_{19} 各自独立为任何氨基酸；

X_5 为 L 或 K；

X_9 为 D 或 N；

X_{13} 为 D、N、S 或 G；

X_{14} 为 F 或 Y；

X_{16} 为 E 或 S；

X_{17} 为 F、Y、V 或 C；

X_{20} 为 L、I、V、M、F 或 S；

和 X_{21} 为 L、I、V、M 或 F。

在其它一些实施例中，钙结合基序具有序列 $DX_1X_2X_3X_4X_5X_6GX_7DX_8X_9X_{10}GGX_{11}X_{12}X_{13}D$ ，其中， X_1 、 X_3 、 X_4 、 X_5 、 X_6 、 X_7 、 X_8 、 X_{10} 、 X_{11} 、 X_{12} 和 X_{13} 各自独立地为任何氨基酸； X_2 和 X_9 各自独立地为 L 或 I。

钙结合基序在本领域中是已知的，并已被详细描述。例如可参见 Springer 等，(2000) *Cell*, 102: 275-277; Kawasaki 和 Kretsinger(1995), *Protein Prof.*, 2: 305-490; Moncrief 等，(1990), *J. Mol. Evol.*, 30: 522-562; Chauvaux 等，(1990), *Biochem. J.*, 265: 261-265; Bairoch 和 Cox(1990), *FEBS Lett.*, 269: 454-456; Davis(1990), *New Biol.*, 2: 410-419; Schaefer 等(1995), *Genomics*, 25: 638-643; 和 Economou 等(1990), *EMBO J.*, 9: 349-354。任何已知的钙

结合基序都可包括在本发明的肽化合物中。

本发明的肽可含有一个或多个整联蛋白结合基序、糖胺聚糖结合基序和钙结合基序。这些基序相互之间可以任何相对顺序存在于肽中。这些基序可以被 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个或更多个氨基酸相互分离。此外，一个基序可用一个或多个其它基序重叠。作为一个非限制性例子，具有序列 TDLQERGDNDISPFSGDGQPFKD(SEQ ID NO:49)的肽含有所有三种基序，这些基序相互重叠。

上述序列中的所有或者任一氨基酸都可以是 D-或 L-构型，并且可以被等价的类似物取代。优选的实施例包含天然的 L-构型氨基酸。

所有或任一上述序列在其 C 末端可以被酰胺化、未酰胺化或者有其它修饰，或者在其 N 末端可以被羧化、未羧化或者其它修饰。

此外还提供了任一上述肽的多聚体形式。多聚体包括二聚体、三聚体、四聚体、五聚体、六聚体等等。因此，长度约为 10 到 50 个氨基酸的本发明的肽可以被多聚体化，任选地具有一个插入接头，这样主体肽以 2、3、4、5、6 或更多的拷贝的随机阵列存在。此外，本发明的两条或多条不同的肽可以相互之间多聚体化，形成“杂多聚体”。因此，例如，一个多聚体可包含一个第一肽和一个第二肽，它们由肽键连接在一起，任选地具有一个接头分子，如 1-10 个甘氨酸残基。

可采用任何已知方法获得本发明的肽化合物，包括例如固相肽合成技术，这些技术是本领域熟练的技术人员已知的。合成肽的方法在本领域中是周知的，并已在许多出版物中有详细的描述，例如《肽合成实践》(The Practice of Peptide Synthesis), M. Bodanszky 和 A. Bodanszky 编辑(1994), Springer-Verlag; 和 Jones, 《肽的化学合成》(The Chemical Synthesis of Peptides)(Clarendon 出版社, 牛津)(1994)。通常，在这些方法中，通过依次将激活的单体单元加到固相结合生长肽链上可制得肽。还感兴趣的是亚单体在固相合成中的使用，如 WO 94/06451 所述，本文将该文的公开内容纳入作为参考。

本发明的肽化合物不采用固相合成制得，而是通过含有编码该肽化合物的多核苷酸的表达系统的表达而获得。可采用任何方便的方法，这些可采用的方法通常包括含制备有编码本发明肽的核苷酸序列的核酸分子、将该编码区域导入表达载体、用该载体转化宿主细胞，以及表达和回收产物。实现上

述各步骤的规程在本领域中是已知的。参见 Sambrook, Fritsch & Maniatis, 《分子克隆, 实验室手册》(Molecular Cloning, A Laboratory Manual)(Cold Spring Harbor 出版社)(1989)。

从导致患者患骨软化的人肿瘤中克隆出胞外基质磷酸蛋白, 并将其表征。这种一种极少见的肿瘤, 称为致瘤的低磷酸盐血症骨软化 (Oncogenic Hypophosphatemic Osteomalacia, OHO) 肿瘤, 已知这种肿瘤引起肾的磷酸盐泄漏、低磷酸盐血症(低的血清磷酸盐水平)、低的血清骨化三醇(1,25-维生素 D3), 以及骨骼矿化中的异常(骨软化)。在 OHO 肿瘤患者中, 肿瘤的切除导致上述所有症状的减轻, 已提出从 OHO 肿瘤中分泌出来的一种循环的磷酸盐沉着因子在骨软化中起作用。胞外基质磷酸蛋白被认为是这种磷酸盐沉着因子的候选物 [Rowe 等, *Genomics*(2000), 67: 56-68)。

磷酸盐在许多基本过程中起主要的作用, 这些基本过程对于细胞和骨骼的矿化是必需的。具体而言, 骨骼矿化依赖于体内磷酸盐和钙的的调节, 磷酸盐-钙体内稳态的任何破坏都会对骨骼的完整产生严重的影响。在肾脏中, 磷酸盐被动流失到肾小球滤液中, 通过钠(Na^+)依赖性磷酸盐协同转动蛋白被主动地再吸收。在肠中, 磷酸盐从食物中吸收。已发现钠(Na^+)依赖性磷酸盐协同转动蛋白在肠中表达, 并且最近将其克隆了 [Hilfiker, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95(24), (1998), 14564-14569]。肝、皮肤和肾都涉及到维生素 D3 转化成其活性代谢物——骨化三醇, 这种代谢物在磷酸盐平衡的维持和骨骼矿化中起积极的作用。

维生素 D 不足引起儿童的佝偻病和成年人的骨软化。两种病症的特征都是类骨质(为骨骼的基质)的钙化失败。

因此, 由胞外基质磷酸蛋白产生的所有的体液功能, 即肾磷酸盐泄漏、低磷酸盐血症(低的血清磷酸盐水平)、低血清骨化三醇(1,25-维生素 D3), 都对健康的骨骼形成有害。

胞外基质磷酸蛋白是一个具有 525 个氨基酸的大多肽, 它有短的 N 末端信号序列。因此, 这种分子非常有可能从其生产细胞中分泌到体液中, 并进行循环。除了这 525 个氨基酸序列以外, 在其 C 末端上的 23 个氨基酸基序表现出与骨-牙齿矿物基质磷酸蛋白 [如骨桥蛋白(OPN)、牙质唾液磷蛋白(DSPP)、牙质基质蛋白质 1(DMP1)和骨唾液蛋白 II(IBSP)] 具有高的相似性。已提出, 这

些骨-牙齿矿物基质磷糖蛋白可能在骨骼矿化中起重要的作用。

尽管有了上面关于胞外基质磷糖蛋白的观察，但是，含有位于其氨基酸序列内但远离其 C 末端序列、与其它骨-牙齿矿物基质磷糖蛋白具有高度相似性的整联蛋白结合基序的较小的肽序列，也已证明具有非常潜在的骨骼形成活性，并且增加了这些骨骼形成表面上的成骨细胞的数量。这些活性的效力相对于成纤维细胞生长因子(FGF)。令人惊讶的是，已证明存在于在骨骼上具有破坏功能的较大的蛋白质中的小基序具有有效的骨骼形成活性，并且这些基序位于远离显示出与其它已知骨-牙齿基质蛋白同源的序列的位置上。

另一令人惊讶的事实是，本发明有效的骨骼形成基序含有整联蛋白结合基序，具体而言，RGD 序列。已报道含有该 RDG 序列的合成肽在胎儿大鼠骨骼的矿化器官培养系统中抑制骨骼形成和再吸收〔Gronowicz 等，《骨和矿物研究杂志》(Journal of Bone and Mineral Research)，(2): 193-201(1994)〕，这个实验方法与本发明采用的试验方法非常相似。

此外，由本发明的小肽提供的骨骼形成活性与完整的生长因子(如 FGF)一样有效力。

治疗方法

本发明提供减少骨骼损失的方法、减少肾磷酸盐泄漏的方法、增加骨量的方法、增加骨强度的方法以及减少 Pi 排泄的方法，这些方法包括给予本发明的肽化合物。通常，本发明的肽化合物与药学上可接受的赋形剂一起配制，用于给需要的个体传送。

本发明肽化合物的“有效量”在本文中指与合适的对照相比，减少骨损失、和/或增加骨强度、和/或增加骨量、和/或减少磷酸盐损失、和/或减少肾磷酸盐排泄至少约 10%、至少约 15%、至少约 20%、至少约 25%、至少约 30%、至少约 35%、至少约 40%、至少约 45%、至少约 50%、至少约 55% 或者至少约 60% 或更多的量。在实验动物的情况中，合适的对照是指未经所述肽处理的动物，如用载体处理，或者用不相关的肽处理；在人的情况中，用安慰剂处理人，或者经本发明的肽处理之前的人。

在一些实施例中，本发明肽化合物的有效量是与合适的对照相比，减少肾磷酸盐排泄，因此减少个体的磷酸盐损失至少约 10%、至少约 15%、至少

约 20 %、至少约 25 %、至少约 30 %、至少约 35 %、至少约 40 %、至少约 45 %、至少约 50 %、至少约 55 % 或者至少约 60 % 或更多的量。

可采用任何已知的试验测量与骨损失减少、骨强度增加、骨量增加、磷酸盐损失减少和肾磷酸盐排泄减少相关的任何已知参数，从而可以确定一种给定的肽是否减少个体的骨损失、和/或增加骨强度、和/或增加骨量、和/或减少磷酸盐损失、和/或减少肾磷酸盐排泄，这些试验包括但不限于：血清和尿中磷的水平(如采用比色测定)；血清和尿中的钙水平(如采用比色测定)；血清和尿中的肌酸酐水平；骨更新标记物水平〔如脱氧吡啶诺啉(deoxypyridinoline)和骨钙蛋白〕；骨密度(如采用体内骨密度测定法)；骨机械测试(如腰椎压迫测试；股骨骨体三点弯曲测试；等等)；等等。这些方法都是本领域中的标准方法。

适合采用本发明的方法进行治疗的个体是被认为存在骨损失、或由骨损失引起的疾病、或者其后遗症包括骨损失的疾病(包括但不限于龋齿、骨质疏松、佩吉特病、肾磷酸盐泄漏、肾性骨营养不良、骨软化、有其它原因引起的骨营养不良、由癌症介导的骨质溶解、骨折和甲状旁腺功能亢进)的风险的个体。这类个体包括老年个体、绝经期后妇女、肾移植受体和具有或存在任一种前述疾病风险的个体。

给药途径

采用适合用于药物传送的任何可采用的方法和途径给予本发明的肽，包括体内和离体的方法，以及全身性和局部给药。

常规的和药学上可接受的给药途径包括鼻内、肌肉内、气管内、皮下、皮内、局部应用、静脉内、直肠、鼻、口腔和其它肠胃外的给药途径。如果需要，可将给药的途径组合，或者根据免疫调节核酸分子和/或对免疫反应所需达到的效果而作出调整。本发明的肽可以单剂量或多剂量的方式给予。

可采用适合用于常规药物的传送的任何可采用的常规方法和途径给予本发明的肽，包括全身性的和局部的途径。通常，本发明考虑到的给药途径包括但不限于肠内、肠胃外或吸入给药。

除了吸入给药以外，肠胃外给药途径还包括但不限于局部、经皮、皮下、肌肉内、眼眶内、囊内、脊柱内、胸骨内和静脉内途径，即除了通过

消化道给药以外的其它任何给药途径。可实施肠胃外给药, 以实现本发明肽的全身性或局部性传送。当需要全身性传送时, 给药一般涉及药物制剂的侵入性或全身性吸收的局部或粘膜给药。

还可通过肠给药传送本发明的肽。肠给药途径包括但不一定限于口服和直肠(如使用栓剂)传送。

通过皮肤或粘膜给予本发明肽的方法包括但不一定限于: 局部使用合适的药物制剂、经皮传送、注射和表皮给药。还考虑到的传送本发明肽的方法是使用在其上含有本发明肽的贴片。贴片可应用于皮肤或其它组织上, 如牙龈组织。任何适用于口腔传送系统的已知的贴片系统都可以使用。例如可参见美国专利第 6146655 号。

还通过向个体给予含有编码本发明的肽的核苷酸序列的核酸分子, 从而将本发明的肽传送给个体。术语“多核苷酸”和“核酸分子”在文中交替使用, 指任何长度的核苷酸的多聚体形式。多核苷酸可含有脱氧核糖核苷酸、核糖核苷酸和/或它们的类似物。为了表达, 可使用表达盒。表达载体将提供转录起始区域和翻译起始区域, 这些区域可以是可诱导的或组成型的, 在这种情况下, 编码区域被可操作性地连接, 并处于该转录起始区域的转录控制以及转录和翻译中止区域的控制之下。这些控制区域对于编码本发明肽的基因来说是天然的, 或者可从外源衍生得到。

表达载体通常具有方便的限制性位点, 这些位点位于启动子序列附近, 用于向编码异源蛋白质的核酸序列提供插入位点。可存在于表达宿主中起作用的可选择标记物。表达载体可用于融合蛋白质的生产, 这种情况下, 外源的融合肽提供了额外的功能, 即蛋白质合成、稳定性、与指定抗血清、酶标记物(如 β -半乳糖苷酶, 等)的反应性增加。

可将表达盒制成含有转录起始区域、基因或其片段以及转录中止区域。载体包括但不限于质粒、粘粒、病毒载体、人工染色体(YAC、BAC 等)、微型染色体等等。载体已在许多出版物中有详细的描述, 并已被本领域熟练的技术人员所周知, 如《精编分子生物学实验指南》(Short Protocols in Molecular Biology), (1999), F. Ausubel 等编辑, Wiley & Sons。

可使用表达载体将编码本发明肽的核酸分子导入个体的细胞中。这些载体通常具有方便的限制性位点, 这些位点位于启动子序列的附近, 用于为核

苷酸序列提供插入位点。可制备转录盒，使其含有转录起始区域、靶基因或其片段以及转录中止区域。可将转录盒导入各种载体中，如：质粒；逆转录病毒，如慢病毒、腺病毒等等；在这种情况下，这些载体能短暂地或稳定地维持在细胞中，通常至少约1天，更通常至少约几天到几周。

可采用各种途径将含有编码本发明的肽的核苷酸序列的表达载体导入组织或宿主细胞中，包括病毒感染、微注射或小泡的融合。也可在肌肉内给药中使用喷射注射(jet injection)，如Furth等(1992)，*Anal Biochem*，205: 365-368所述。可将表达载体包涂在金微粒上，然后采用粒子轰击装置或者文献中所述的“基因枪”〔例如可参见Tang等，(1992)，*Nature*，356: 152-154〕经皮内传送，在这种情况下，金微粒被表达载体包涂，并被轰击到皮肤细胞中，

剂量

虽然所使用的剂量根据所要实现的临床目标而改变，但是合适的剂量范围是提供达到约1 μ g、约1000 μ g、约10000 μ g、约25000 μ g或者约50000 μ g的本发明肽的范围。本发明的肽可以单剂量给予，或者整个期间以若干较小剂量给予。或者，可将肽的目标剂量认定为：在给予宿主该肽后的第1个24-48小时之内抽取的血液样品中含有约0.1-1000 μ M，约1-500 μ M，或者约5-250 μ M的肽。

对骨损失、骨强度、磷酸盐排泄或者其它参数的影响可能是剂量依赖性的。因此，为了增加2个数量级的药效，各单剂量的浓度是双倍的。为了获得所需的治疗目标，可能需要增加剂量。因此，本发明考虑给予多剂量，以提供并维持对骨损失、骨强度、磷酸盐排泄或者其它参数的影响。当给予多剂量时，在约16周、约12周、约8周、约6周、约4周、约2周、约1周、约5天、约72小时、约48小时、约24小时、约12小时、约8小时、约4小时或者约2小时之内给予后来的剂量，或以前的剂量中的较小剂量。

根据本公开所提供的讲义，临床领域熟练的技术人员将熟悉或者能容易地判断给药本发明肽的合适参数。

制剂

通常，在药学上可接受的组合物中配制肽，用于传送给宿主。优选用于

本发明的肽的药学上可接受的载体可包括非水性溶液、悬浮液以及乳化液的无菌水溶液。非水性溶剂的例子是丙二醇、聚乙二醇、植物油如橄榄油，以及可注射的有机酯，如油酸乙酯。水性载体包括水、醇性/水溶液、乳化液或悬浮液，包括盐水和缓冲介质。肠胃外载体包括氯化钠溶液、林格氏葡萄糖、葡萄糖和氯化钠、乳酸盐的林格氏或不挥发的油。静脉内载体包括液体和营养补充剂、电解质补充剂(如以林格氏葡萄糖为基础的补充剂)等等。还可采用本领域已知的方法冻干含有本发明的肽的组合物，以用于本发明接下来的重新配制和使用。还感兴趣的是用于脂质体传送的制剂，以及含有微胶囊化的肽的制剂。

通常，可将药物组合物制备成各种形式，如粒剂、片剂、丸剂、栓剂、胶囊、悬浮液、药膏、洗剂等等。在一些实施例中，当将本发明的肽传送给口腔组织时，可将本发明的肽配制成牙膏、漱剂的形式，或者可使其包涂在或埋植于牙线中。可使用适用于口腔或局部使用的药用级有机或无机载体和/或稀释剂来配制含有治疗活性化合物的组合物。本领域已知的稀释剂包括水性介质、植物油和动物油和脂肪。可使用稳定剂、增湿剂和乳化剂、用于改变渗透压的盐、或者用于保证足够的 pH 值的缓冲液、以及皮肤渗透增强剂作为佐剂。也可存在防腐剂和其它添加剂，如抗病原体剂(如抗微生物剂、抗菌剂、抗病毒剂、抗真菌剂等)、抗氧化剂、螯合剂以及惰性气体等等。

本发明的肽化合物可与用于减少骨损失的其它任何已知制剂一起给予。因此，可以考虑进行组合治疗。可与本发明的肽一起给予的其它制剂包括但不限于雌激素、降钙素、维生素 D、氟化物、异丙氧黄酮和二膦酸酯。本发明的肽可以与减少骨损失的其它制剂同时给予(如与它们混合，或者分开)，或者可在给予减少骨损失的另一种制剂后约 15 分钟、约 30 分钟、约 60 分钟、约 2 小时、约 5 小时、约 10 小时、约 12 小时、约 24 小时、约 36 小时、约 4 天、约 7 天或更长的时间内给予。此外，本发明的两条或多条肽可同时给予，或者在给予其中 1 条肽后的约 15 分钟、约 30 分钟、约 60 分钟、约 2 小时、约 5 小时、约 10 小时、约 12 小时、约 24 小时、约 36 小时、约 4 天、约 7 天或更长的时间内给予。

实施例

给出下述实施例，以给本领域熟练的技术人员提供关于怎样制备和使用本发明的完整的公开和描述，但是，这些实施例并不限定本发明者所认为的范围，也不表示以下实施例是本发明者所进行的所有实施例，或者本发明者仅仅进行这些实施例。已作出努力以确保所使用的数据(如数量、温度等)准确，但是，应考虑到一些实验误差和偏差。除非另有说明，否则份为按重量份，分子量为重均分子量，温度为℃，压力为大气压或接近大气压。

实施例 1

D-00001 等的合成

采用 9-芴甲氧羰基(Fmoc)策略人工合成 6 条不同的肽，并制备成 C 末端酰胺形式。这 6 条肽如下：

D-00001: IPSDFEGSGYTDLQE(SEQ ID NO:44)

D-00002: DFEGSGYTDLQERGD(SEQ ID NO:45)

D-00003: YTDLQERGDNDISPF(SEQ ID NO:46)

D-00004: ERGDNDISPFSGDGQ(SEQ ID NO:47)

D-00005: NDISPFSGDGQPFKD(SEQ ID NO:48)

D-00006: TDLQERGDNDISPFSGDGQPFKD(SEQ ID NO:49)

(C 末端酰胺化)

从 Bachem, Inc., Torrance(加利福尼亚)和 Novabiochem, La Jolla(加利福尼亚)购得氨基酸衍生物和树脂。使用 4-(2',4'-二甲氧苯基-Fmoc-氮甲基)-苯氧基树脂，以逐步的方式人工将各氨基酸缩合。在合成过程中，使用 N-甲基吡咯烷酮作为溶剂。对于缩合，使用二异丙基碳二亚胺/N-羟基苯并三唑，对于 N^α-Fmoc 基团的去保护，使用 20% 哌啶在 N-甲基吡咯烷酮中的溶液。使用下述侧链保护基团：Asn 和 Gln，三苯甲基；Asp、Glu、Ser 和 Thr。叔丁基；Arg，2,2,5,7,8-五甲基苯并二氢吡喃-6-磺酰基；Lys，叔丁氧羰基。使用三氟乙酸-苯甲硫醚-m-甲酚-乙二醇-H₂O(80: 5: 5: 5: 5, v/v)，在 20℃ 处理所得肽树脂 2 小时，将经保护的肽树脂去保护，使肽从树脂上解离。使所得的粗肽沉淀，用乙醚洗涤，然后采用反相高效液相色谱法(使用 Vydac 5C18 柱和含有 0.1% 三氟乙酸的水/乙腈的梯度)进行纯化。所有的肽的得率为 5-20% (从起始树

脂起算)。采用分析高效液相色谱法确定肽的纯度。采用 Sciex API IIIIE 三极矩离子喷射质谱仪确认肽的同一性。

实施例 2

小鼠胎儿颅盖试验

试剂

从 Peprotech Inc.(Rocky Hill, NJ)购得 FGF-1。由 Nomizu 博士(北海道大学, 日本)提供 RGD-1、2、3、4、5 和 6(在此指 D-00001、D-00002、D-00003、D-00004、D-00005、D-00006)。

小鼠

从 SLC 日本公司(静冈, 日本)购得怀孕的 ICR 小鼠。

小鼠颅盖器官培养

如 Mundy G 等, *Science*, 286: 1946-1949, 1999 和 Traianedes K 等, *Endocrinology*, 139: 3178-3184, 1998 所述进行小鼠颅盖器官培养。切除 4 天龄小鼠的颅盖, 沿着矢状缝将其切成两半。将每一半颅盖放在不锈钢格栅上, 然后放到 12-孔培养皿(Asahi Glass Techno Corp., 船桥, 日本)中。各孔含有 1.5 毫升的 BGj 培养基(Sigma, St. Louis, MO), 该培养基补充了 0.1% 牛血清白蛋白(Sigma)和各化合物。如 Mundy 等所述将 FGF-1 用作阳性对照。在第 1 天和第 4 天更换该培养基, 该试验在第 7 天停止。

组织形态学分析

用 10% 中性缓冲的福尔马林固定颅盖, 用 4.13% EDTA 将颅盖脱钙, 然后埋植在石蜡中。制备 4 毫米厚的切片, 用苏木精和曙红染色。使用 Image-Pro Plus (Media Cybernetics, Silver Spring, MD)测量新骨的面积。

测试实施例 1 的 6 条肽在实施例 2 所进行的试验中增加骨生长的能力。不含有 RGD 序列的肽没有显示出阳性结果。其它四条肽显示出阳性结果, 其中获得最好结果的是以下序列:

D-00004: ERGDNDISPFSGDGQ(SEQ ID NO:47)和

D-00006: TDLQERGDNDISPFSGDGQPFDK(SEQ ID NO:49)。

最好的结果显示在图 3 中(分别为图 3C 和 3D)。将从这些结果得到的数据绘制成图 4。

实施例 3

体内骨形成研究

试剂

从 Peprotech Inc.(Rocky Hill, NJ)购得 FGF-1。在本发明者的指导下, 使用 CS Bio(San Carlos, 加利福尼亚)合成 RGD-6(在文中称为 D-00006)。

D-00006: TDLQERGDNDISPFSGDGQPFKD(SEQ ID NO:49)

小鼠

从 SLC 日本公司(静冈, 日本)购得四周龄小鼠, 将其随机分成 3 组(n=5)。

小鼠颅盖生长试验

将 D-00006(20 μ g/kg/天)、FGF-1(12.5 μ g/kg/天)或载体(盐水)皮下注射到试验动物的接近颅盖的软组织中。将样品每天的量分成两份, 每天注射 2 次, 共 5 天。在最后一次给药 15 天后, 切除颅盖并沿着矢状缝将其切成两半, 提供组织形态学分析。

组织形态学分析

用 10% 中性缓冲的福尔马林固定颅盖, 用 4.13% EDTA 将颅盖脱钙, 然后埋植在石蜡中。制备 4 毫米厚的切片, 用苏木精和曙红染色。使用 Image-Pro Plus (Media Cybernetics, Silver Spring, MD)测量新骨的面积。

结果

与载体处理组相比, 经 FGF-1 处理的动物的颅盖切片显示出明显的骨区域扩大。经 D-00006 处理的动物的切片与载体处理组的切片相比, 也显示出明显的骨面积扩大, 并且效果与 FGF-1 的相等。将从这些结果获得的数据绘制成图 5。

实施例 4

D-00006 对肾磷酸盐排泄的作用

试验设计和处理

在开始进行试验前, 先使 40 只 3 月龄未交配 Sprague-Dawley 雌性大鼠 (Harlan Sprague Dawley, Inc.)适应环境 1 周。在适应期后, 根据原始体重将这些动物随机分成处理组, 如表 1 所示。Ovx: 切除卵巢的; LD: 低剂量; HD: 高剂量; Est: 雌二醇; D-00006(TDLQERGDNDISPFSGDGQPFKD(SEQ ID

NO:49)。

表 1

组号	描述	处理	剂量水平	动物数量
1	伪装	载体	—	8
2	Ovx	载体	—	8
3	Ovx+LD	D-00006	20μg/kg/天	8
4	Ovx+HD	D-00006	200μg/kg/天	8
5	Ovx+Est	17β-雌二醇小丸植入物和载体	10μg/kg/天	8

在开始处理的前一天，用氯胺酮/甲苯噻嗪麻醉用混合物将这些动物麻醉，然后切除第 2-5 组动物的卵巢。在第 41 天收集代谢笼中的尿。在 41 天的处理期结束时，收集血液和尿液样品，用于化学性质和骨更新标记物检测。在收集尿和血液之前，先将动物放到代谢笼中，不给它们食物 1 个晚上，禁食 18 小时。收集尿液样品，并记录其体积。然后在离心机中以大约 3000g 离心尿样品 10 分钟。过滤该样品，除去污染的沉积物。

血清和尿化学性质

所有处理组的总血清钙水平和肌酸酐水平都相同，除了用雌二醇处理的 Ovx 动物其血清钙有轻微的增加。在 D-00006 处理组中，血清磷中存在剂量依赖性的增加。所有组在 18 小时内收集的总的尿体积都相同。图 6 显示所得的尿参数。

在 18 小时尿收集获得的磷的总量在 D-00006 处理组中显示出明显的下降。结果证明，D-00006 处理组具有较低的磷酸盐清除和较高百分数的磷的小管再吸收。D-00006 清楚地显示可以作为将磷保持在循环中的制剂。

虽然本发明已结合其具体的实施例进行了描述，但是本领域熟练的技术人员应理解，在不偏离本发明的实质精神和范围的情况下，可对本发明作出各种改变，可用各种等效形式取代。此外，可实施许多修改，以使具体的环境、材料、物质的组成、方法，或步骤适应本发明的目的、精神和范围。所有这些修改都包括在附带的权利要求书所限定的本发明的范围之内。

序列表

<110> 熊谷 足成(Kumagai, Yoshinari)
R.W. 布拉谢(Blacher, Russell Wayne)
米田 俊之(Yoneda, Toshiyuki)

<120> 含有整联蛋白结合基序的肽和治疗骨骼疾病的方法

<130> BEAR-006W02

<140> 09/812,485

<141> 2001-03-19

<150> 09/641,034

<151> 2000-08-16

<160> 50

<170> 用于 Windows 4.0 版的 FastSEQ

<210> 1
<211> 97
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽化合物

<400> 1
Asp Ser Gln Ala Gln Lys Ser Pro Val Lys Ser Lys Ser Thr His Arg
1 5 10 15
Ile Gln His Asn Ile Asp Tyr Leu Lys His Leu Ser Lys Val Lys Lys
20 25 30
Ile Pro Ser Asp Phe Glu Gly Ser Gly Tyr Thr Asp Leu Gln Glu Arg
35 40 45
Gly Asp Asn Asp Ile Ser Pro Phe Ser Gly Asp Gly Gln Pro Phe Lys
50 55 60
Asp Ile Pro Gly Lys Gly Glu Ala Thr Gly Pro Asp Leu Glu Gly Lys
65 70 75 80
Asp Ile Gln Thr Gly Phe Ala Gly Pro Ser Glu Ala Glu Ser Thr His
85 90 95
Leu

<210> 2
<211> 47
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽化合物

<400> 2
Ala Gln Lys Ser Pro Val Lys Ser Lys Ser Thr His Arg Ile Gln His
1 5 10 15

```

Asn Ile Asp Tyr Leu Lys His Leu Ser Lys Val Lys Lys Ile Pro Ser
  20                      25                      30
Asp Phe Glu Gly Ser Gly Tyr Thr Asp Leu Gln Glu Arg Gly Asp
  35                      40                      45

```

```

<210> 3
<211> 47
<212> PRT
<213> 人工序列

```

```

<220>
<223> 肽化合物

```

```

<400> 3
Arg Gly Asp Ala Gln Lys Ser Pro Val Lys Ser Lys Ser Thr His Arg
  1                      5                      10                      15
Ile Gln His Asn Ile Asp Tyr Leu Lys His Leu Ser Lys Val Lys Lys
  20                      25                      30
Ile Pro Ser Asp Phe Glu Gly Ser Gly Tyr Thr Asp Leu Gln Glu
  35                      40                      45

```

```

<210> 4
<211> 47
<212> PRT
<213> 人工序列

```

```

<220>
<223> 肽化合物

```

```

<400> 4
Asp Ser Gln Ala Gln Lys Ser Pro Val Lys Ser Lys Ser Thr His Arg
  1                      5                      10                      15
Ile Gln His Asn Ile Asp Tyr Leu Lys His Leu Ser Lys Val Lys Lys
  20                      25                      30
Ile Pro Ser Asp Phe Glu Gly Ser Gly Tyr Thr Asp Arg Gly Asp
  35                      40                      45

```

```

<210> 5
<211> 44
<212> PRT
<213> 人工序列

```

```

<220>
<223> 肽化合物

```

```

<400> 5
Arg Gly Asp Ser Pro Val Lys Ser Lys Ser Thr His Arg Ile Gln His
  1                      5                      10                      15
Asn Ile Asp Tyr Leu Lys His Leu Ser Lys Val Lys Lys Ile Pro Ser
  20                      25                      30
Asp Phe Glu Gly Ser Gly Tyr Thr Asp Leu Gln Glu
  35                      40

```

<210> 6
 <211> 44
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 肽化合物

<400> 6
 Asp Ser Gln Ala Gln Lys Ser Pro Val Lys Ser Lys Ser Thr His Arg
 1 5 10 15
 Ile Gln His Asn Ile Asp Tyr Leu Lys His Leu Ser Lys Val Lys Lys
 20 25 30
 Ile Pro Ser Asp Phe Glu Gly Ser Gly Arg Gly Asp
 35 40

<210> 7
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 肽化合物

<400> 7
 Arg Gly Asp Thr His Arg Ile Gln His Asn Ile Asp Tyr Leu Lys His
 1 5 10 15
 Leu Ser Lys Val Lys Lys Ile Pro Ser Asp Phe Glu Gly Ser Gly Tyr
 20 25 30
 Thr Asp Leu Gln Glu
 35

<210> 8
 <211> 41
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 肽化合物

<400> 8
 Asp Ser Gln Ala Gln Lys Ser Pro Val Lys Ser Lys Ser Thr His Arg
 1 5 10 15
 Ile Gln His Asn Ile Asp Tyr Leu Lys His Leu Ser Lys Val Lys Lys
 20 25 30
 Ile Pro Ser Asp Phe Glu Arg Gly Asp
 35 40

<210> 9
 <211> 27

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽化合物

<400> 9
Arg Gly Asp Leu Lys His Leu Ser Lys Val Lys Lys Ile Pro Ser Asp
1 5 10 15
Phe Glu Gly Ser Gly Tyr Thr Asp Leu Gln Glu
20 25

<210> 10
<211> 38
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽化合物

<400> 10
Asp Ser Gln Ala Gln Lys Ser Pro Val Lys Ser Lys Ser Thr His Arg
1 5 10 15
Ile Gln His Asn Ile Asp Tyr Leu Lys His Leu Ser Lys Val Lys Lys
20 25 30
Ile Pro Ser Arg Gly Asp
35

<210> 11
<211> 24
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽化合物

<400> 11
Arg Gly Asp Leu Ser Lys Val Lys Lys Ile Pro Ser Asp Phe Glu Gly
1 5 10 15
Ser Gly Tyr Thr Asp Leu Gln Glu
20

<210> 12
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽化合物

<400> 12
Asp Ser Gln Ala Gln Lys Ser Pro Val Lys Ser Lys Ser Thr His Arg

1	5	10	15
Ile Gln His Asn Ile Asp Tyr Leu Lys His Leu Ser Lys Arg Gly Asp			
20	25	30	

<210> 13
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 肽化合物

<400> 13
 Arg Gly Asp Val Lys Lys Ile Pro Ser Asp Phe Glu Gly Ser Gly Tyr
 1 5 10 15
 Thr Asp Leu Gln Glu
 20

<210> 14
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 肽化合物

<400> 14
 Asp Ser Gln Ala Gln Lys Ser Pro Val Lys Ser Lys Ser Thr His Arg
 1 5 10 15
 Ile Gln His Asn Ile Asp Tyr Leu Lys Arg Gly Asp
 20 25

<210> 15
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 肽化合物

<400> 15
 Arg Gly Asp Ile Pro Ser Asp Phe Glu Gly Ser Gly Tyr Thr Asp Leu
 1 5 10 15
 Gln Glu

<210> 16
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>

<223> 肽化合物

<400> 16

Asp Ser Gln Ala Gln Lys Ser Pro Val Lys Ser Lys Ser Thr His Arg

1 5 10 15

Ile Gln His Asn Ile Asp Arg Gly Asp

20 25

<210> 17

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽化合物

<400> 17

Arg Gly Asp Asp Phe Glu Gly Ser Gly Tyr Thr Asp Leu Gln Glu

1 5 10 15

<210> 18

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽化合物

<400> 18

Asp Ser Gln Ala Gln Lys Ser Pro Val Lys Ser Lys Ser Thr His Arg

1 5 10 15

Arg Gly Asp

<210> 19

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽化合物

<400> 19

Arg Gly Asp Gly Ser Gly Tyr Thr Asp Leu Gln Glu

1 5 10

<210> 20

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽化合物

<400> 20

Asp Ser Gln Ala Gln Lys Ser Pro Val Lys Arg Gly Asp

1 5 10

<210> 21

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽化合物

<400> 21

Arg Gly Asp Gly Tyr Thr Asp Leu Gln Glu

1 5 10

<210> 22

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽化合物

<400> 22

Asp Ser Gln Ala Gln Lys Ser Arg Gly Asp

1 5 10

<210> 23

<211> 40

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽化合物

<400> 23

Arg Gly Asp Asn Asp Ile Ser Pro Phe Ser Gly Asp Gly Gln Pro Phe

1 5 10 15

Lys Asp Ile Pro Gly Lys Gly Glu Ala Thr Gly Pro Asp Leu Glu Gly

20 25 30

Lys Asp Ile Gln Thr Gly Phe Ala

35 40

<210> 24

<211> 40

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽化合物

<400> 24

```

Asn Asp Ile Arg Gly Asp Ser Pro Phe Ser Gly Asp Gly Gln Pro Phe
 1           5           10           15
Lys Asp Ile Pro Gly Lys Gly Glu Ala Thr Gly Pro Asp Leu Glu Gly
           20           25           30
Lys Asp Ile Gln Thr Gly Phe Ala
           35           40

```

<210> 25

<211> 35

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽化合物

<400> 25

```

Asn Asp Ile Ser Pro Phe Arg Gly Asp Ser Gly Asp Gly Gln Pro Phe
 1           5           10           15
Lys Asp Ile Pro Gly Lys Gly Glu Ala Thr Gly Pro Asp Leu Glu Gly
           20           25           30
Lys Asp Ile
           35

```

<210> 26

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽化合物

<400> 26

```

Asn Asp Ile Ser Pro Phe Ser Gly Asp Arg Gly Asp Gly Gln Pro Phe
 1           5           10           15
Lys Asp Ile Pro Gly Lys Gly Glu Ala Thr Gly Pro Asp Leu
           20           25           30

```

<210> 27

<211> 45

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽化合物

<400> 27

Phe Ser Gly Asp Gly Gln Pro Phe Lys Asp Ile Pro Gly Lys Gly Glu
 1 5 10 15
 Ala Thr Gly Pro Asp Leu Glu Gly Lys Asp Ile Gln Thr Gly Phe Ala
 20 25 30
 Gly Pro Ser Glu Ala Glu Ser Arg Gly Asp Thr His Leu
 35 40 45

<210> 28
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 肽化合物

<400> 28
 Ile Pro Gly Lys Gly Glu Ala Thr Gly Pro Asp Leu Glu Gly Lys Asp
 1 5 10 15
 Ile Gln Thr Gly Phe Ala Gly Pro Ser Glu Arg Gly Asp Ala Glu Ser
 20 25 30
 Thr His Leu
 35

<210> 29
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 肽化合物

<400> 29
 Glu Ala Thr Gly Pro Asp Leu Glu Gly Lys Asp Ile Gln Thr Gly Phe
 1 5 10 15
 Ala Gly Arg Gly Asp Pro Ser Glu Ala Glu Ser Thr His Leu
 20 25 30

<210> 30
 <211> 33
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 肽化合物

<400> 30
 Asn Asp Ile Ser Pro Phe Ser Gly Asp Gly Gln Pro Phe Lys Asp Arg
 1 5 10 15
 Gly Asp Ile Pro Gly Lys Gly Glu Ala Thr Gly Pro Asp Leu Glu Gly
 20 25 30
 Lys

<210> 31
 <211> 33
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 肽化合物

<400> 31
 Gly Lys Gly Glu Ala Thr Gly Pro Asp Leu Glu Gly Lys Asp Ile Arg
 1 5 10 15
 Gly Asp Gln Thr Gly Phe Ala Gly Pro Ser Glu Ala Glu Ser Thr His
 20 25 30
 Leu

<210> 32
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 肽化合物

<400> 32
 Phe Ser Gly Asp Gly Gln Pro Phe Lys Asp Ile Pro Gly Lys Gly Glu
 1 5 10 15
 Ala Thr Gly Arg Gly Asp Pro Asp Leu Glu Gly Lys Asp Ile Gln Thr
 20 25 30
 Gly Phe Ala Gly Pro Ser Glu Ala
 35 40

<210> 33
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 肽化合物

<400> 33
 Asp Gly Gln Pro Phe Lys Asp Ile Pro Gly Lys Gly Glu Ala Thr Gly
 1 5 10 15
 Arg Gly Asp Pro Asp Leu Glu Gly Lys Asp Ile Gln Thr Gly Phe
 20 25 30

<210> 34
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>

<223> 肽化合物

<400> 34

```

Pro Phe Lys Asp Ile Pro Gly Lys Gly Glu Ala Thr Gly Arg Gly Asp
 1           5           10           15
Pro Asp Leu Glu Gly Lys Asp Ile Gln
          20           25

```

<210> 35

<211> 28

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽化合物

<400> 35

```

Asp Ile Pro Gly Lys Gly Glu Ala Thr Gly Arg Gly Asp Pro Asp Leu
 1           5           10           15
Glu Gly Lys Asp Ile Gln Thr Gly Phe Ala Gly Pro
          20           25

```

<210> 36

<211> 31

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽化合物

<400> 36

```

Asp Gly Gln Pro Phe Lys Asp Ile Pro Gly Lys Gly Glu Ala Thr Gly
 1           5           10           15
Arg Gly Asp Pro Asp Leu Glu Gly Lys Asp Ile Gln Thr Gly Phe
          20           25           30

```

<210> 37

<211> 28

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽化合物

<400> 37

```

Gly Lys Gly Glu Ala Thr Gly Arg Gly Asp Pro Asp Leu Glu Gly Lys
 1           5           10           15
Asp Ile Gln Thr Gly Phe Ala Gly Pro Ser Glu Ala
          20           25

```

<210> 38
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽化合物

<400> 38
Glu Ala Thr Gly Arg Gly Asp Pro Asp Leu Glu Gly Lys Asp Ile Gln
1 5 10 15
Thr Gly Phe

<210> 39
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽化合物

<400> 39
Glu Ala Thr Gly Arg Gly Asp Pro Asp Leu Glu Gly Lys
1 5 10

<210> 40
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽化合物

<400> 40
Glu Ala Thr Gly Arg Gly Asp Pro Asp Leu
1 5 10

<210> 41
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 糖胺聚糖结合基序

<400> 41
Ser Gly Asp Gly
1

<210> 42
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 钙结合基序

<400> 42
Asp Asn Asp Ile Ser Pro Phe Ser Gly Asp Gly Gln
1 5 10

<210> 43
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 钙结合基序

<221> 变体
<222> 2, 4, 6, 8, 10, 11
<223> Xaa = 任何氨基酸

<400> 43
Asp Xaa Asp Xaa Ser Xaa Phe Xaa Gly Xaa Xaa Gln
1 5 10

<210> 44
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> D-00001 肽

<221> 酰胺化
<222> 15

<400> 44
Ile Pro Ser Asp Phe Glu Gly Ser Gly Tyr Thr Asp Leu Gln Glu
1 5 10 15

<210> 45
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> D-00002 肽

<221> 酰胺化

<222> 15

<400> 45

Asp Phe Glu Gly Ser Gly Tyr Thr Asp Leu Gln Glu Arg Gly Asp
1 5 10 15

<210> 46

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> D-00003 肽

<221> 酰胺化

<222> 15

<400> 46

Tyr Thr Asp Leu Gln Glu Arg Gly Asp Asn Asp Ile Ser Pro Phe
1 5 10 15

<210> 47

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> D-00004 肽

<221> 酰胺化

<222> 15

<400> 47

Glu Arg Gly Asp Asn Asp Ile Ser Pro Phe Ser Gly Asp Gly Gln
1 5 10 15

<210> 48

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> D-00005 肽

<221> 酰胺化

<222> 15

<400> 48

Asn Asp Ile Ser Pro Phe Ser Gly Asp Gly Gln Pro Phe Lys Asp
1 5 10 15

<210> 49
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> D-00006 肽

<221> 酰胺化
<222> 15

<400> 49
Thr Asp Leu Gln Glu Arg Gly Asp Asn Asp Ile Ser Pro Phe Ser Gly
1 5 10 15
Asp Gly Gln Pro Phe Lys Asp
20

<210> 50
<211> 4
<212> PRT
<213> 肽

<220>
<223> 糖胺聚糖结合基序

<221> 变体
<222> 3
<223> Xaa = 任何氨基酸

<400> 50
Ser Gly Xaa Gly
1

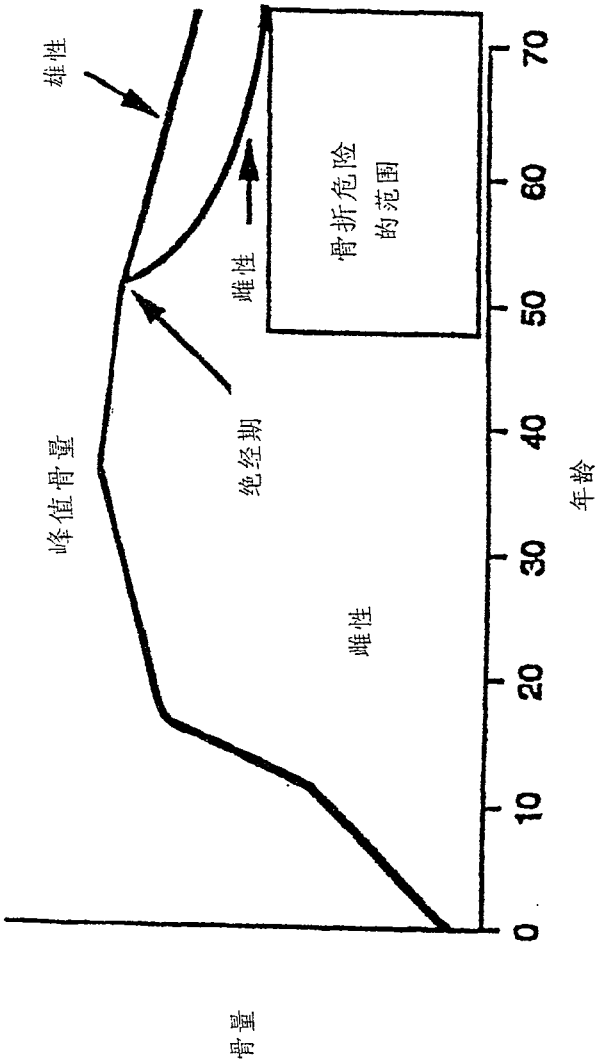


图 1

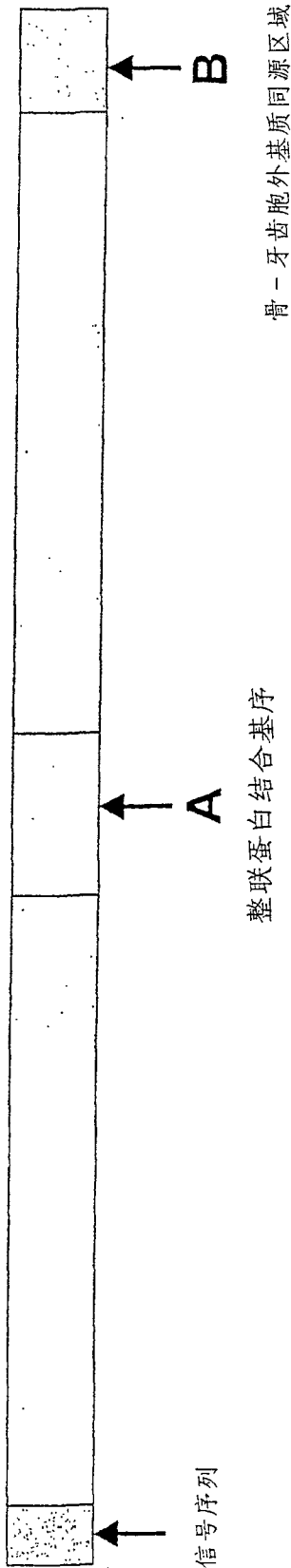


图 2
胞外基质磷糖蛋白质的结构

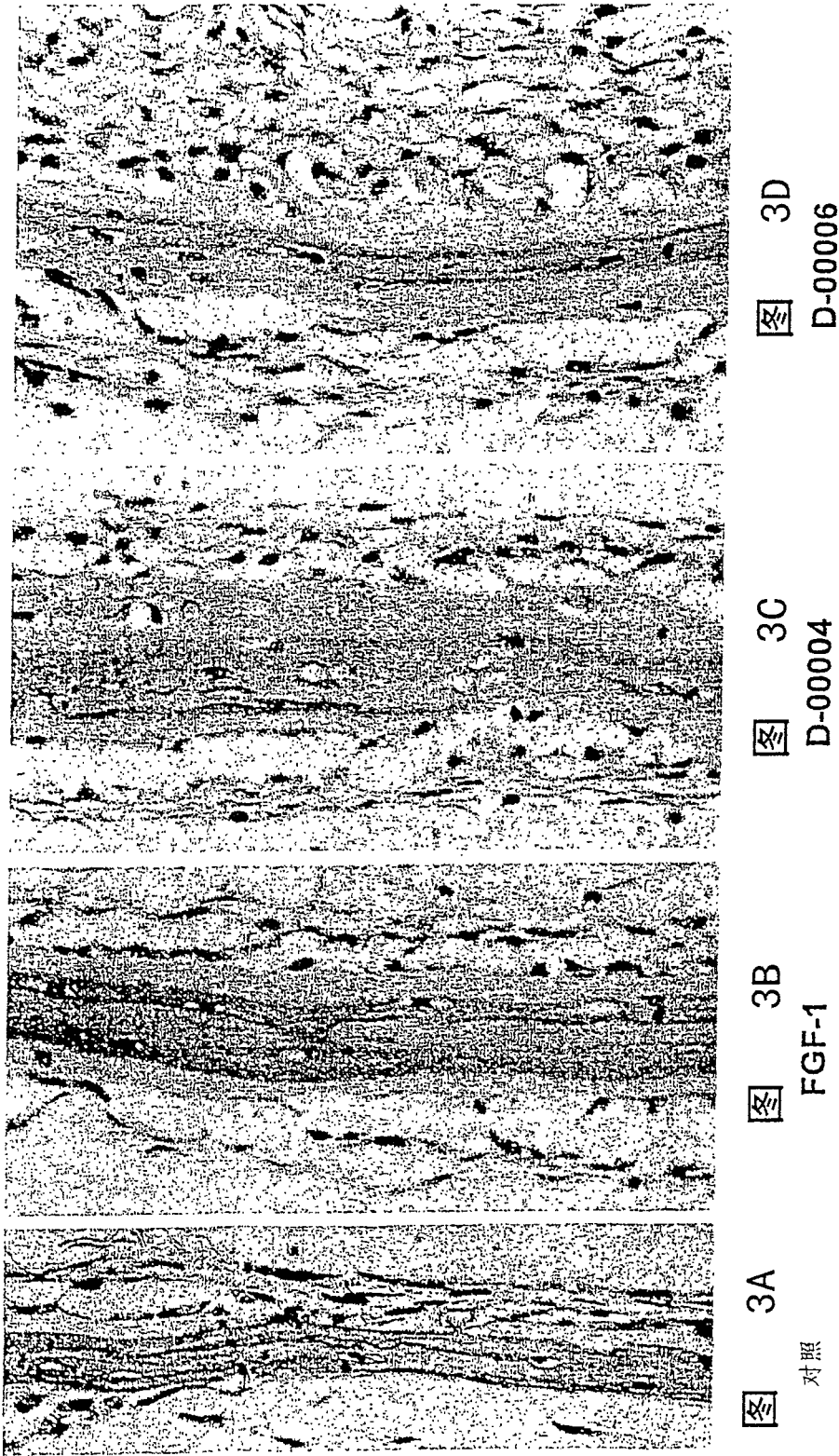


图 3
骨形成和成骨细胞增加

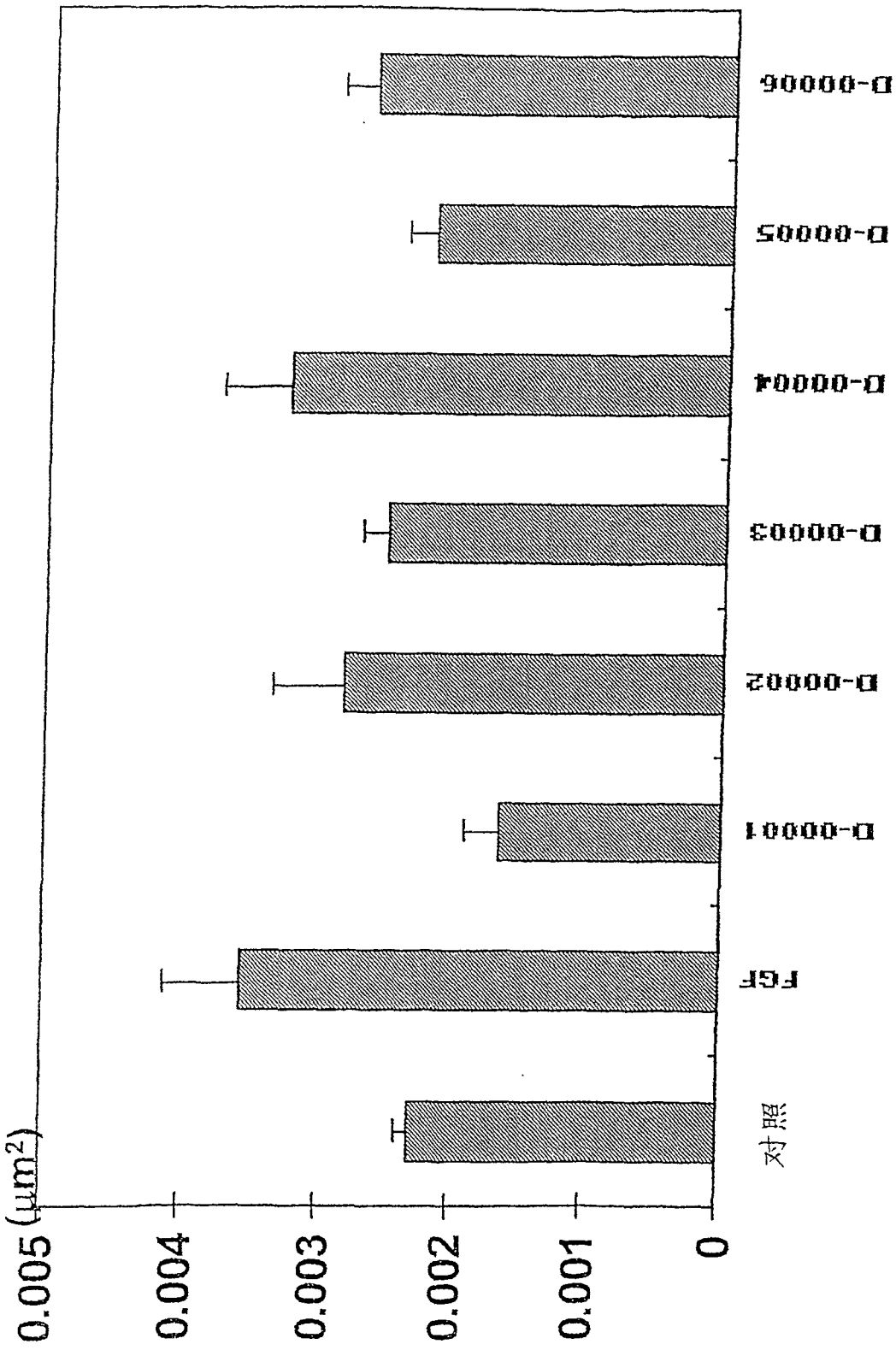
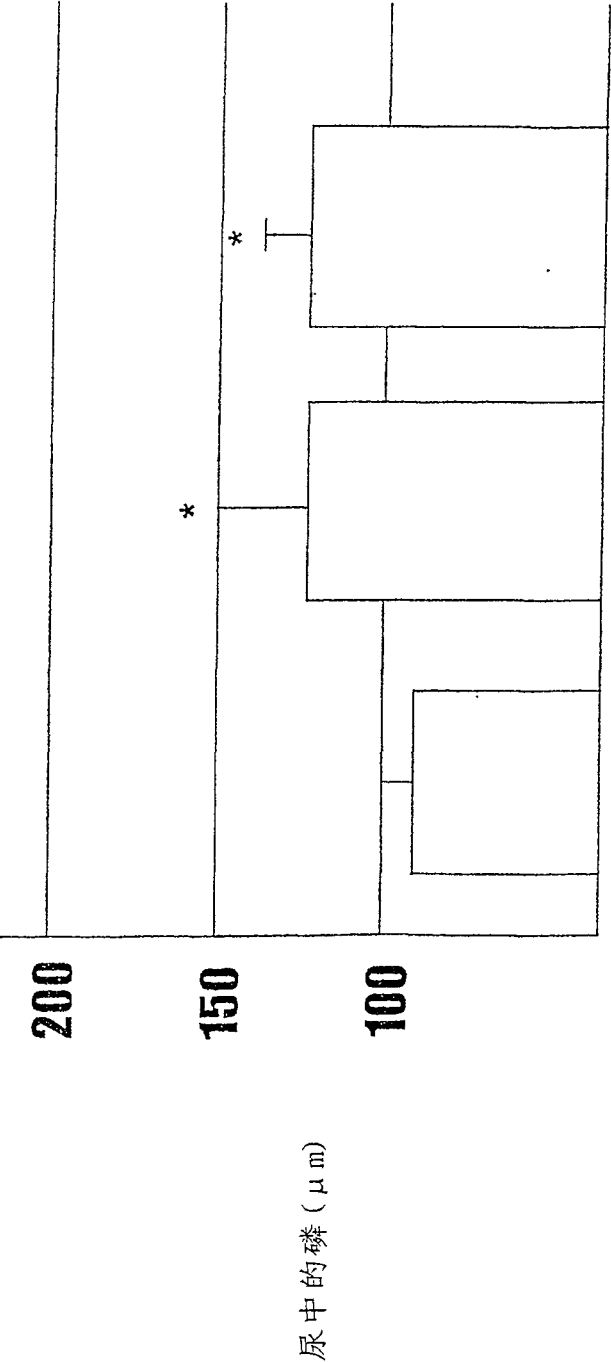


图 4
小鼠颅盖试验中的新骨的面积



对照 FGF (12.5) D-000006 (20)
测试样品 (μg/kg/天)

图 5

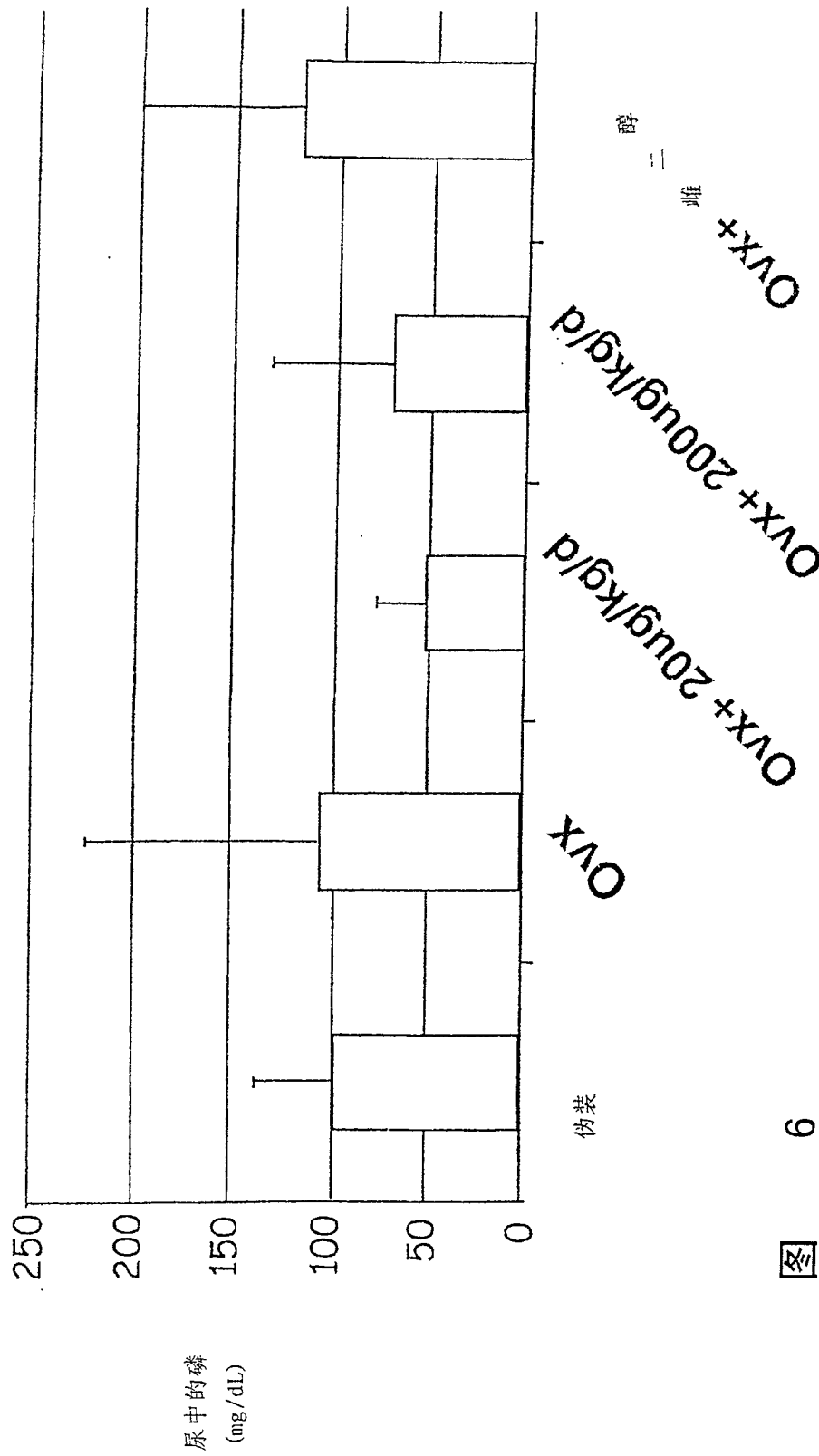


图 6