

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
A61K 38/02 (2006.01)



[12] 发 明 专 利 说 明 书

专利号 ZL 02810095.6

[45] 授权公告日 2006 年 2 月 15 日

[11] 授权公告号 CN 1241636C

[22] 申请日 2002.5.16 [21] 申请号 02810095.6

[30] 优先权

[32] 2001.5.17 [33] US [31] 60/291,326

[86] 国际申请 PCT/US2002/015394 2002.5.16

[87] 国际公布 WO2002/091969 英 2002.11.21

[85] 进入国家阶段日期 2003.11.17

[71] 专利权人 雷金纳克斯生物制药公司

地址 美国马里兰州

[72] 发明人 阿兰·L·戈尔茨坦

小杰克·芬克尔斯坦

审查员 陈晓亮

[74] 专利代理机构 隆天国际知识产权代理有限公司

代理人 郑特强 杨淑媛

权利要求书 2 页 说明书 7 页

[54] 发明名称

用胸腺素 $\beta 4$ 治疗大疱性表皮松解症

[57] 摘要

通过给予一种螯合肌动蛋白的多肽，例如胸腺素 $\beta 4$ 、胸腺素 $\beta 4$ 的同种异型体或氧化的胸腺素 $\beta 4$ ，治疗和预防与大疱性表皮松解症相关的水泡、疮伤或皮肤恶变。

1. 一种组合物，其用于促进愈合或预防与 EB 相关的水泡、疮伤或皮肤恶变，该组合物含有有效量的包括 EB 抑制性多肽的组合物，该多肽含有氨基酸序列 LKKTET 或其具有 EB 抑制活性的保守突变体。
- 5 2. 权利要求 1 所述的组合物，其中所述的组合物包含 LKKTET 的 N 末端或 C 末端突变体。
3. 权利要求 1 所述的组合物，其中所述的组合物包含 KLKKTET 或 LKKTETQ。
4. 权利要求 1 所述的组合物，其中所述的多肽包含 T β 4、T β 4 的同种
10 异型体、氧化的 T β 4 或 T β 4 亚砷。
5. 权利要求 1 所述的组合物，其包含凝胶剂、霜剂、贴剂、洗剂、喷雾剂、混悬剂、分散制剂、软膏、水凝胶剂或油膏剂。
6. 权利要求 1 所述的组合物在制备促进愈合或预防与 EB 相关的水泡、疮伤或皮肤恶变的药物中的应用。
- 15 7. 权利要求 6 所述的应用，其中，所述的多肽能促进皮肤症状的改善，包括增加所述患者皮肤的弹性。
8. 权利要求 6 所述的应用，其中，所述的多肽包括胸腺素 β 4(T β 4)、T β 4 的 N 末端突变体、T β 4 的 C 末端突变体、T β 4 的同种异型体、氧化的 T β 4 或 T β 4 亚砷。
- 20 9. 权利要求 6 所述的应用，其中，所述组合物的形式是凝胶剂、霜剂、贴剂、洗剂、喷雾剂、混悬剂、分散制剂、软膏、水凝胶剂或油膏剂。
10. 权利要求 9 所述的应用，其中，进一步包括至少一种能使 T β 4 缓释的试剂，或者促进 T β 4 渗透到治疗区域的试剂。
11. 权利要求 6 所述的应用，其中，所述的多肽是重组的或合成的。
- 25 12. 权利要求 6 所述的应用，其中，所述的多肽是一种抗体。
13. 权利要求 12 所述的应用，其中，所述的抗体是多克隆抗体或单克隆抗体。
14. 包含一种能够刺激 EB 抑制性多肽产生的试剂，所述多肽含有氨基酸序列 LKKTET 或其具有 EB 抑制活性的保守突变体的组合物在制备促进
30 愈合或预防与 EB 相关的水泡、疮伤或皮肤恶变的药物中的应用。

-
15. 权利要求 14 所述的应用，其中，所述的多肽是胸腺素 β 4。
 16. 权利要求 14 所述的应用，其中，所述的试剂是胸腺素 β 4 的拮抗剂。

用胸腺素 β 4治疗大疱性表皮松解症**背景技术**

- 5 本发明要求 2001 年 5 月 17 日递交的美国临时申请 No. 60/291, 326 作为优先权。

1. 技术领域

- 10 本发明涉及治愈或预防由大疱性表皮松解症及其所有亚型引起的皮肤和周围组织的退化性、免疫性炎症和其它紊乱症状。

2. 背景技术详述

- 15 大疱性表皮松解症 (EB) 是一种罕见的基因紊乱疾病, 它发生在所有的人种中。EB 作为一类疾病, 表现为皮肤表面的一个很小的创伤就会引起水泡, 导致开放性疮伤、溃疡和结疤。这类疾病的严重程度不同, 从轻微性到严重性的残废、毁伤以及有生命危险的皮肤疾病。与烧伤不同, 这些痛苦有些时候永远不会消失。最严重的情况下, 需要很大程度的调整生活方式。受这类疾病折磨的小孩永远都不能骑自行车, 也不能滑雪和参加运动, 因为小孩的正常运动会导致慢性疼痛。这类疼痛的覆盖范围是小孩身体的 75%。水泡和结疤也会发生在嘴和食道处。因此, 只能经常吃一些流质和软的食物。结疤也会引起手指和脚趾的融合, 导致畸形, 严重影响机体功能。病人的大部分生活都是在医院中接受治疗, 输血、活组织切片检查 and 手术治疗。病人的眼睛也经常起水泡, 几天看不见光。慢性贫血使得机体能量缺失, 发育迟缓。患有 EB 后, 患者存活一般不超过 30 年。

- 25 EB 有三种主要类型: 单纯型 EB、营养失调型 EB (显形的或隐性的) 和接合型 EB。各类型表现不同严重程度的症状。一般来说, EB 引起的水泡可限制在特定的部位, 例如手或脚, 或者在身体更大的部位。较轻微的水泡会正常治愈, 在皮肤上不会留下永久的损伤。非轻微型水泡治愈时会留下疤痕, 导致皮肤永久性的变化, 例如手指融合和手缩短, 运动功能减弱。一些接合型 EB 在幼年时会有生命危险。
- 30

EB 是由皮肤的生理、生化和免疫特性的有害变化所致。所有类型的 EB 都是遗传性的，并且现在已经知道几种导致疾病的不同亚型基因。基因缺陷使得皮肤层彼此不能有效粘附，产生了结构脆弱的区域。脆弱的皮肤尤其易受轻微摩擦的损伤，所引起的症状的特点就是产生了水泡。皮肤是感染的一个重要屏障，它是免疫系统的第一道防线。那些受 EB 侵害的脆弱的皮肤则失去了这一重要的防御机能。脉管系统的这些变化降低了修复损伤的能力，增加了皮肤癌发生的可能，例如扁平细胞癌，并且增加了受感染的几率。此外，口腔和消化腔的开放性疮伤会导致脱水和营养不良。

有许多治疗 EB 的尝试，但是没有一种方法对预防和治疗 EB 有实质性的效果。各种生长因子，合成皮肤，抗生素和其它治疗都不能有效、充分地治疗 EB。尽管 EB 是一种遗传疾病，然而能使伤口快速和更好治愈的治疗方法将是极其重要的。而且，预防性治疗也能明显给患者带来实质性的好处，并且还可能提高寿命。

各种药品、营养品或化妆品的配方已被提议用来减轻或逆转 EB 或其导致的困扰。

在该领域，一直希望找到一种更好的方法和物质来治疗或预防与 EB 相关的水泡和伤口。

发明概述

本发明提供了一种促进愈合或预防与 EB 相关的水泡、疮伤或皮肤恶变的治疗方法，包括：给予需要这种治疗的患者施用有效量的组合物，该组合物包含一种能抑制 EB 的多肽，其中该多肽包含有序列 LKKTET 或者具有 EB 抑制能力的该序列的保守突变体。

发明详述

本发明是基于发现了整合肌动蛋白的肽，例如胸腺素 $\beta 4$ (T $\beta 4$) 和其它整合肌动蛋白的肽，或含有氨基酸序列 LKKTET 或其保守突变体序列的肽片段，这些肽能够促进与 EB 相关的水泡、疮伤和皮肤恶变的治愈和预防。本发明的肽可以是 N-或 C-末端突变体，例如 KLKKTET 和 LKKTETQ。尽管 EB 是一种遗传缺陷性疾病，不限于任何特定的理论，这

些肽可能具有促进修复、愈合和预防的能力，它们具有诱导末端脱氧核苷酸转移酶(一种非模板控制的 DNA 聚合酶)、降低一个或多个炎症细胞因子或化学因子的水平、作为一种内皮细胞的趋化因子和/或血管生成因子的能力，从而治愈和预防 EB 患者的皮肤恶变。

5 最初，胸腺素 β 4 被认为是内皮细胞在体外迁移和分化中的正向调节蛋白。胸腺素 β 4 最早是在胸腺中被分离的，它具有 43 个氨基酸，分子量 4.9KDa，并且普遍存在于各种组织中。已经发现了该蛋白的几种作用，包括在内皮细胞分化和迁移、T 细胞分化、肌动蛋白整合以及在血管形成中的作用。

10 根据本发明的一个实施方案，本发明是一种促进愈合和预防与 EB 相关的水泡、疮伤和皮肤恶变的治疗方法，包括：给予需要这种治疗的患者施用有效量的组合物，该组合物包含一种能抑制 EB 的多肽，其中该多肽包含有序列 LKKTET 或者具有 EB 抑制能力的该序列的保守突变体。该多肽优选为胸腺素 β 4、胸腺素 β 4 的同种异型体(isoform)、氧化的胸腺素 β 4、胸腺素 β 4 亚砷 (T β 4 sulfoxide)或胸腺素 β 4 的拮抗剂。

15 本发明的组合物包含胸腺素 β 4(T β 4)、T β 4 的同种异型体、氧化的 T β 4、T β 4 亚砷、多肽或任何其它具有肌动蛋白结合域的整合或结合肌动蛋白的蛋白质、或包含或基本包含氨基酸序列 LKKTET 或具有 EB 抑制性的该序列保守突变体的多肽片段。国际申请 No. PCT/US99/17282，公开了 T β 4 的同种异型体，根据本发明它可能是有用的，并且还公开了氨基酸序列 LKKTET 以及具有 EB 抑制能力的该序列的保守突变体，它们可能是本发明可以利用的，在此作为参考引用。国际申请 No. PCT/GB99/00833 (WO 99/49883)，公开了氧化的胸腺素 β 4，它可能是本发明可以利用的，也在此作为参考引用。尽管本发明下文所述的内容主要是针对 T β 4 和 T β 4 的同种异型体，但是需要提及的是下文的描述同样适用于氨基酸序列 LKKTET、包含 LKKTET 或者基本上由 LKKTET 或具有 EB 抑制能力的该序列的保守突变体组成的肽片段以及氧化的 T β 4。

25 在一个实施方案中，本发明提供了一种愈合和预防皮肤水泡及疮伤的方法，该方法是使有效量的 EB 抑制性的组合物接触皮肤，其中该组合物
30 包含 T β 4 或 T β 4 的同种异型体。这种接触可以是局部性的或全身性的。

局部给药的例子包括,例如,用洗剂、油膏剂、凝胶剂、霜剂、贴剂、喷雾剂、混悬剂、分散制剂、水凝胶剂、软膏剂或油剂接触皮肤,所述制剂仅含有 T β 4、或者是 T β 4 与至少一种促进 T β 4 渗透或延迟或缓慢释放 T β 4 肽进入治疗区域的试剂的混合物。全身性给药包括,例如,静脉内、
5 腹膜内、肌内或皮下注射,或吸入、透皮或口服给药,所施用的药物组合
物含有 T β 4 或 T β 4 的同种异型体等。给药对象可以是哺乳动物,优选为人类。

T β 4 或其类似物、同种异型体或衍生物以适宜的抑制 EB 的剂量给药。例如, T β 4 可以在 0.1—50 微克的 T β 4 剂量范围内给药,优选剂量范围
10 是 1—25 微克。

本发明的药物组合物可以每日,隔天等方式给药,一天给药一次或一天给药多次,例如,一天给药 2、3、4 次或更多次。

T β 4 同种异型体是已知的,且其与已知氨基酸序列 T β 4 的同源性达到 70%、75%、80% 或更高。这些同种异型体包括,例如, T β 4^{ala}、T β 9、
15 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,同种异型体 T β 10 和 T β 15 也能整合肌动蛋白。T β 4、T β 10 和 T β 15 以及其它的同种异型体具有共同的氨基酸序列 LKKTET,该序列与介导肌动蛋白的整合或结合相关。尽管不受任何特定理论的约束,但是 T β 4 同种异型体的活性可能部分是由于具有调节肌动蛋白聚合的能力。例如, T β 4 能调
20 节皮肤的肌动蛋白的聚合(例如, β -胸腺素似乎能通过整合游离的 G-肌动蛋白来使 F-肌动蛋白解聚)。T β 4 调节肌动蛋白聚合的能力全部或部分地由于它能够通过 LKKTET 序列结合或整合肌动蛋白。因而,和 T β 4 一样,其它整合或结合肌动蛋白、或调节肌动蛋白聚合的蛋白质,包括含有氨基酸序列 LKKTET 的 T β 4 同种异型体,也能够减轻 EB,或与 T β 4 联合使
25 用减轻 EB。

因而,可以预见 T β 4 的同种异型体,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,以及尚未得到鉴定的 T β 4 同种异型体,均可用来实现本发明的目的。这些 T β 4 的同种异型体能用于本发明的方法中,包括施用于受试体。本发明因此进一步提供了一种药物组
30 合物,该药物组合物含有 T β 4、以及 T β 4 的同种异型体 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。

此外，经过合适的整合、结合、移动或聚合实验证明的或者通过鉴定表明存在有介导肌动蛋白结合的氨基酸序列如 LKKTET 的其它具有肌动蛋白整合或结合能力的蛋白质，或能移动肌动蛋白或调节肌动蛋白聚合的蛋白质，同样也能用在本发明的方法中。这些蛋白包括：例如凝溶胶蛋白 (gelsolin)、维生素 D 结合蛋白 (DBP)、肌动结合蛋白 (profilin), cofilin, adsevertin, propomyosin, fincilin, depactin, DNA 酶 I, vilin, 达肝素 (fragmin), severin, 外壳蛋白 (capping protein), β -辅肌动蛋白和 acumentin。这些方法包括应用于受试体的方法，本发明进一步提供了一种药物组合物，该药物组合物含有所述的凝溶胶蛋白、维生素 D 结合蛋白 (DBP)、profilin, cofilin, depactin, DNA 酶 I, vilin, fragmin, severin, 外壳蛋白, β -辅肌动蛋白和 acumentin。因此，本发明包括使用一种 EB 抑制性多肽，该多肽含有氨基酸序列 LKKTET(该序列可能存在于它的一级序列中)及其保守突变体。

此处所提及的术语“保守突变体”是指氨基酸残基被其它生物功能类似的残基替换。保守突变体的例子包括用其它残基来替换疏水残基，如异亮氨酸、缬氨酸、亮氨酸或甲硫氨酸，用其它残基来替换极性残基，例如用赖氨酸替换精氨酸、天冬氨酸替换谷氨酸，或天冬氨酰胺替换谷酰胺，及其它类似替换。

T β 4 分布在许多组织和细胞类型中，因而能刺激 T β 4 产生的试剂可添加到组合物中来促进组织和/或细胞产生 T β 4。这类试剂包括生长因子家族的成员，如胰岛素样生长因子 (IGF-1)、血小板来源的生长因子 (PDGF)、表皮生长因子 (EGF)、转化生长因子 β (TGF- β)、基本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)。尤其优选的是，试剂为转化生长因子 β (TGF- β) 或 TGF- β 超家族的其它成员。本发明的 T β 4 组合物可通过皮肤的细胞外基质的沉积、细胞迁移和血管形成来实现结缔组织的生长，从而减轻 EB 的症状。

根据一个实施方式，给受试体施用了一种在受试体内刺激产生如上所述的 EB 抑制性肽的试剂。

此外，可协助和刺激减轻 EB 的试剂也可与 T β 4 或 T β 4 同种异型体一起添加到组合物中。这些试剂包括皮肤内的血管生成剂、生长因子、控制细胞分化的试剂、促进细胞迁移的试剂和刺激细胞外基质物质供给的试剂。例如，以非限定的方式，T β 4 或 T β 4 同种异型体可单独添加或与下列任意一种或几种试剂混合添加，所述试剂为：有效剂量的 VEGF、KGF、FGF、PDGF、TGF β 、IGF-1、IGF-2、IL-1、前胸腺素 α 和胸腺素 α 1。

本发明还包括一种药物组合物，该组合物是在药学上可接收的载体中含有治疗有效量的 T β 4 或 T β 4 同种异型体。这种载体包括上面所列举的非肠道给药的载体。

10 愈合或预防与 EB 相关的水泡、疮伤和皮肤恶变的实际剂量、试剂、制剂或组合物与许多因素有关，包括受试体的体重和健康状况。但是，本领域的普通技术人员可以采用 PCT/US99/17282 所公开的确定临床剂量的方法和技术以及本发明引用文献的方法来确定适用剂量。

合适的局部给药制剂包含 T β 4 或 T β 4 同种异型体的浓度范围(重量百分比)为约 0.001—10%，更优选约 0.01—0.1%，最优选约 0.05%。

本发明描述的治疗方法涉及含有 T β 4 或其它本发明化合物的试剂或组合物的多种给药途径或传输途径，包括任何传统的给药技术(例如，但不限于，局部给药、局部注射、吸入或全身给药)。治疗方法和所用组合物还包括通过混合药学上可接受的无毒赋形剂或载体，将含有 T β 4 或其它本发明化合物的组合物制成的药物组合物。

20 本发明包括使用与 T β 4 肽或其功能片段相作用的抗体。抗体主要由具有不同表位特异性的混合单克隆抗体组成，并且提供了清楚的单抗制备。单抗是由含有蛋白片段的抗原通过本领域公知的技术制备的，参见 PCT/US99/17282 公开的内容。本发明所用的术语“抗体”包括单克隆和多克隆抗体。

在另一个实施方案中，本发明提供了一种通过给予有效量的一种调节 T β 4 基因表达的制剂进行治疗的方法。术语“调节”是指当 T β 4 过度表达时，抑制 T β 4 基因的表达；当 T β 4 表达不足时诱导 T β 4 基因的表达。术语“有效量”是 T β 4 制剂的剂量，该剂量能有效调节 T β 4 基因的表达，导致与 T β 4 相关的 EB 症状的减弱。调节 T β 4 或 T β 4 同种异型体基因

表达的试剂可以是，例如，多核苷酸。多核苷酸可以是反义的，三联试剂（triplex agent）或核酶。例如，可以使用结构基因区域的反义核苷酸，或是 T β 4 的启动子区域的反义核苷酸。

5 在另一个实施方式中，本发明提供了一种使用介导 T β 4 活性的化合物的方法。影响 T β 4 活性的化合物(例如，拮抗剂和激动剂)包括肽、肽类似物、多肽、化学化合物、矿物质如锌，和生物制剂。

10 由于不受限于任何特定的理论，本发明可通过诱导末端脱氧核苷酸转移酶(一种非模板控制的 DNA 聚合酶)、降低一个或多个炎症细胞因子或化学因子的水平、并且作为一种内皮细胞的化学趋向因子来促进与 EB 相关的水泡、伤口和皮肤恶变的治愈和预防，因而，可以促进由 EB 或其它退化性因素或环境因素引起的皮肤恶变的治愈和预防。