

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

A61K 38/36 (2006.01)

A61P 7/04 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200680048650.7

[43] 公开日 2009 年 2 月 11 日

[11] 公开号 CN 101365477A

[22] 申请日 2006.11.10

[21] 申请号 200680048650.7

[30] 优先权

[32] 2005.12.23 [33] AT [31] A2067/2005

[86] 国际申请 PCT/AT2006/000465 2006.11.10

[87] 国际公布 WO2007/070899 德 2007.6.28

[85] 进入国家阶段日期 2008.6.23

[71] 申请人 菲布雷克斯医疗研究及开发有限责任公司
公司

地址 奥地利维也纳

[72] 发明人 P·佩特泽尔鲍尔 R·亨宁

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 刘维升 付磊

权利要求书 1 页 说明书 9 页

[54] 发明名称

治疗出血性休克的药物制剂及其缓释胶囊剂
或缓释片剂(SEQUELS)

[57] 摘要

本发明是关于含有以下 N-末端序列的肽 Gly - His - Arg - Pro - Leu - Asp - Lys - Lys - Arg - Glu - Glu - Ala - Pro - Ser - Leu - Arg - Pro - Ala - Pro - Pro - Pro - Ile - Ser - Gly - Gly - Gly - Tyr - Arg 或者该肽的任何等位基因变异体或衍生物在制备治疗休克、更特别是出血性休克的药物组合物中的用途,所述肽或该肽的任何等位基因变异体或衍生物具有匹配人纤维蛋白的 B β -链(即, B β ₁₅₋₄₂)上的可诱导 VE-钙粘蛋白结合基序的生物学特性。

1、含有如下 N-末端序列的肽

Gly-His-Arg-Pro-Leu-Asp-Lys-Lys-Arg-Glu-Glu-Ala-Pro-Ser-Leu-Arg-Pro-Ala-Pro--Pro-Pro-Ile-Ser-Gly-Gly-Gly-Tyr-Arg

或者该肽的任何等位基因变异体或衍生物在制备治疗出血性休克及其后遗症的药物组合物中的用途，所述肽或该肽的任何等位基因变异体或衍生物具有匹配人纤维蛋白的 B β -链(即，B β 15-42)上的可诱导的 VE-钙粘蛋白结合基序的生物学特性。

2、根据权利要求 1 的用途，特征在于该肽是

Gly-His-Arg-Pro-Leu-Asp-Lys-Lys-Arg-Glu-Glu-Ala-Pro-Ser-Leu-Arg-Pro-Ala-Pro--Pro-Pro-Ile-Ser-Gly-Gly-Gly-Tyr-Arg。

3、一种测定肽的抗炎效应的方法，该方法在用纤维蛋白 E 片段作用之后，通过测量从内皮细胞释放白细胞介素-6(IL-6)的抑制进行。

4、权利要求 1 或 2 的用途，其中休克是与导致保持足够组织灌注的能力的主要出血事件相关并由此导致，其减少或消除此症状的有害后果该症状包括但不限于全身炎症反应综合征(SIRS)、急性呼吸窘迫综合征(ARDS)、肝衰竭、肾衰竭和多器官衰竭。

治疗出血性休克的药物制剂 及其缓释胶囊剂或缓释片剂(SEQUELS)

发明背景

本发明是涉及治疗出血性休克及其后遗症的药物组合物。

休克是很多不同病理学症状的一种急性并发症，特征在于心血管系统无能力维持足够的灌注压。更特别地，在出血性休克中，血液损耗超过了身体补偿并提供足够的组织灌注和氧合作用的能力。这常常是因为创伤，但是其可能由于自发性出血(例如，胃肠出血、分娩)、手术及其他原因造成的。

更常见地，临床上的出血性休克是由于个别突如其来的事件的急性出血发作造成的。较少常见地，出血性休克可能在关于亚急性失血的临床症状中看到。此病症是 1-44 岁年龄组死亡的主要原因。

出血的生理学上的代偿机制包括早期的外周和肠系膜的血管收缩以分流血液至中央循环。然后这由于进行性心动过速增强。侵入性监测可以显示增加的心排血量指数、增加的氧输送(即， DO_2)以及组织增加的氧耗量(即， VO_2)。乳酸盐水平、酸-碱状态及其他生物标志也可以提供生理学状态的有用指标。年龄、给药法及 Comorbid 因素全部可能影响患者对于出血性休克的反应。

出血性休克中代偿机制的失效可以导致死亡。没有介入，典型的三种模式的死亡分布是严重的出血性休克中发现。最初的死亡率峰值是在由于直接放血的出血的几分钟内出现。另一个峰值是在一至数小时之后出现，因为进行性的代偿失调。第三个峰值是在此后的数天至数周出现，因为败血症和器官衰竭，其是对于器官再穿孔损伤的常见结果。

对由于大量失血引起的休克的治疗是一个巨大的挑战，因为涉及炎症性反应和凝血系统的改变的继发效应可能已经变得不受约束而且不考虑疑问导致患者的死亡，不管足够的液体和血液补充是否有可能。由于事故或其他创伤的大量出血以及出血性休克的专门治疗是由采用类晶体或胶体的液体复苏组成，以便恢复器官灌注。此外，当前操作的目的在于缓解症状，其包括机械换气、补液、使用作用于心脏的药物、严格控制氧饱和度、血红蛋白、葡萄糖和肾功能。仅仅控制炎症反应，例

如采用高剂量的类固醇类或采用抗凝血酶抑制血凝固，不能提高存活率。

作为失血后遗症的休克及出血性休克是与伴随形成纤维蛋白和增加纤维蛋白片段的血浆血纤蛋白原的明显或不明显地改变有关。凝固和溶解纤维蛋白途径的激活可能导致明显或不明显的弥漫性血管内凝血(DIC)，产生血管阻塞和终末器官损伤，消耗凝血因子导致出血。重要地，血纤蛋白原、纤维蛋白及纤维蛋白片段不仅在凝血中起作用，而且具有细胞和基质蛋白的多个结合位点，其使它们与白细胞、血小板、内皮细胞及基质结构相互反应。这导致细胞激活、细胞迁移、细胞因子释放并最终导致炎症反应。炎症中血纤蛋白原或纤维蛋白的作用是充分证明(Altieri Thromb Haemost 82:781-786 的综述，Herrick 等人.Int J Biochem Cell Biol 31:741-46)。分子的 D-区含有用于基质分子、内皮细胞、血小板和炎性细胞的多个结合位点。纤维蛋白的 E-区结合 CD11c (Loike 等人, Proc Nati Acad Sci USA 88:1044-48)。

近来已经描述了纤维蛋白的 B β ₁₅₋₄₂ 序列在炎症中的新作用(WO 02/48180)。此序列也是位于纤维蛋白的 E-区，只有当纤维蛋白肽裂开时才激活。在其 β 链的游离的 N-末端含有此序列的纤维蛋白片段结合内皮并引起炎症，匹配纤维蛋白的 B β 链的氨基酸类 15-42 的肽阻断纤维蛋白片段结合内皮表面并阻止体外的炎症(WO 02/48180)。在体内，这种肽预防心肌炎症并减少缺血/再灌注情形下的心肌梗塞面积(WO 02/48180)。

纤维蛋白片段是在受损的纤维蛋白形成及受损的纤维蛋白溶解的任何情形下出现。特别地在休克的情形下，此改变的纤维蛋白形成及纤维蛋白溶解是大问题。对于很多疾病而言，结果和受损的纤维蛋白形成/纤维蛋白溶解之间的直接关联已经得到证明。E.g. Dengue (van Gorp 等人.J Med Virol 2002, 67:549-54, Mairuhu 等人, Lancet InfDis 2003; 3:33-41)。成人型呼吸窘迫综合征(ARDS)是急性肺损伤的一种形式，其特征在于鲜红色的细胞外纤维蛋白沉积(Idell Am J Respir Med. 2002; 1:383-91)。肺血管系统中的血栓形成及弥漫性血管内凝血已经在 ARDS 有关的情形下观察到。

发明概述

本发明是有关含有以下 N-末端序列的肽

Gly-His-Arg-Pro-Leu-Asp-Lys-Lys-Arg-Glu-Glu-Ala-Pro-Ser-Leu-Arg-Pro-Ala-Pro--Pro-Pro-Ile-Ser-Gly-Gly-Gly-Tyr-Arg

或者该肽的任何等位基因变异体或衍生物在制备治疗休克的药物组合物中的用途，所述肽具有匹配人纤维蛋白的 B β -链(即，B β ₁₅₋₄₂)上的可诱导的 VE-钙粘蛋白结合基序的生物学特性。

在优选的实施方案中，该肽是

Gly-His-Arg-Pro-Leu-Asp-Lys-Lys-Arg-Glu-Glu-Ala-Pro-Ser-Leu-Arg-Pro-Ala-Pro-Pro-Pro-Ile-Ser-Gly-Gly-Gly-Tyr-Arg。

已经令人吃惊地发现，这些肽在防止温血动物大出血事件后的再灌注和出血性休克的后果和并发症中具有非常有益作用。我们能够证明，其能够阻止由出血性休克和再灌注引起的急性炎症反应产生的器官损伤和器官衰竭。此肽能够阻止这样的疾病，如全身炎症响应症状(SIRS)、急性呼吸窘迫综合征(ARDS)、肾衰竭、肝衰竭及多器官衰竭。

发明详述

肽和蛋白质

肽是由固相肽合成产生，并采用Nucleosil 100-10C18柱的反相HPLC纯化(PiChem, Graz, Austria)。应当注意，当允许保守氨基酸取代时，在物种中 β 15-42区域是100 %类似的。由氨基酸A α 1-51、B β 1-118和 γ 1-78构成的血纤蛋白原的N-末端二硫化物结(NDSK)是根据先前所述制得(WO 02/48180)。由氨基酸A α 1-51、B β 15-118和 γ 1-78构成的纤维蛋白的N-末端二硫化物结(NDSK-II，其缺乏血纤肽A和B)是通过用凝血酶(20 U/1mg的NDSK)在37°C下处理NDSK3小时制得的。残留的凝血酶是在37°C下使用10 mM氟磷酸二异丙酯(Fluka, Milwaukee, WI)2小时中和。所有产品然后透析进入磷酸盐缓冲盐水(PBS)。

ELISA

肽B β ₁₅₋₄₂结合VE-钙粘蛋白

纤维蛋白的 B β 链(B β ₁₅₋₄₂)与内皮细胞的相互作用引起形态学改变(Bunce 等人. J Clin Invest 89:842-50; Bach 等人. Exp Cell Res 238:324-34; Chalupowicz 等人. J Cell Biol 130:207-15; Hamaguchi 等人. Blood

81:2348-56; Francis 等人. Blood cells 19:291-306)、增殖(Sporn 等人. Blood 86:1802-10)、von Willebrand 因子的释放(Ribes 等人. J Clin Invest 79:117-23, Ribes 等人. J Clin Invest 84: 435-42; Erban 和 Wagner, J Biol Chem 267, 2451-58;)及可能 IL-8(Qi 等人. Blood 90:3593-3602)以及 CD54 的膜表达(Harley 等人. Art Thromb Vase Biol 20:652-658)。VE-钙粘蛋白已经鉴定为序列 B β ₁₅₋₄₂ 的结合配体, 已经开发 ELISAs 以证明内皮细胞和/或 VE-钙粘蛋白与纤维蛋白或纤维蛋白片段的相互作用。Martinez 等人已经使用抗-Pan 钙粘蛋白抗体以从内皮细胞中捕获钙粘蛋白, 接着使用纤维蛋白孵育(Martinez 等人, Ann NY Acad Sci 936:386-405), HUVEC 单层(其表达 VE-钙粘蛋白)已经用放射标记的纤维蛋白片段或肽 B β ₁₅₋₄₂ 覆盖(Bach 等人. J Biol Chem 273:30719-28; Harley 等人. Art Thromb Vase Biol 20:652-658), 重组体 VE-钙粘蛋白是由 Gorlatov 和 Medved 使用(Biochemistry 41:4107-16)。其他人已经使用 ELISA 检测血液中的纤维蛋白片段, 主要是针对血纤蛋白原分子中的各种序列使用抗体, 包括抗 B β ₁₅₋₄₂ 基序的抗体(在 Fareed 等人. Clin Chem 8:1845-53 中综述)。

我们已经开发了采用其他人所述的相同原理操作的修饰的 ELISA, 但是在此所述 ELISA 的目的不是定量纤维蛋白降解产物, 而是寻找干扰 B β ₁₅₋₄₂ 序列和 VE-钙粘蛋白结合的蛋白质、肽类或化合物。原理是, VE-钙粘蛋白, 作为截短蛋白、全蛋白或结合其他不干扰 B β ₁₅₋₄₂-结合位点的蛋白, 可以与纤维蛋白的 B β ₁₅₋₄₂ 序列相互作用。任何另外的附加物质可以引入该系统并测定, 如果这种物质抑制 VE-钙粘蛋白/B β ₁₅₋₄₂ 结合的话。

详细地, 96 孔蛋白质固定板(Exiqon, Vedbaek, DK)是涂敷含重组体人 VE-钙粘蛋白 FC 融合蛋白(8 nM/ml; R&D 系统, Minneapolis)的 PBS, 并在 4°C 下留置整夜。然后清洗板, 用采用 FLAG-序列(DYKDDDDK)在肽的 C-末端标记的肽 B β ₁₅₋₄₂(GHRPLDKKREEAPSLRPAPPPISGGGYR)孵育或者采用更具体 0-80 μ Mol/ml 浓度的 FLAG-标记的随机肽(DRGAPAHRRPPRGPISGRSTPEKEKLLPG)孵育。洗涤之后, 结合的 FLAG-标记的肽是通过过氧化物酶-标记的抗-FLAG 抗体(Sigma, St. Louis, USA)及生色物质孵育而检测到。光密度是用在 450 nm 波长下设定的 ELISA 板读书器测定。数据表示三个独立实验的平均值, 其中各自进行三次。下表显示了以浓度依赖方式结合 VE-钙粘蛋白肽的 B β ₁₅₋₄₂。与此相反, 随机肽仅仅证明不显著的结合。

肽 B β_{15-42} 剂量依赖地结合 VE-钙粘蛋白

$\mu\text{M/ml}$		0	0.23	0.7	2.3	7	14	21	35	46	70
15-42 FLAG	平均值	0	0.01	0.02	0.08	0.33	0.92	1.3	1.5	1.93	2.1
	标准偏差	0	0.01	0.01	0.03	0.17	0.19	0.2	0	0	0
随机 FLAG	平均值	0	0.01	0	0.01	0.03	0.12	0.2		0.35	0.5
	标准偏差	0	0.01	0	0.01	0.02	0.04	0.1		0	0

肽 B β_{15-42} 和纤维蛋白片段竞争结合 VE-钙粘蛋白

在下一步, 我们分析这种 ELISA 是否可以筛分用于竞争 B β_{15-42} 序列结合至 VE-钙粘蛋白的其他肽/化合物。如期望的, 肽 B β_{15-42} 完全抑制 flag 标记的肽 B β_{15-42} 的结合, 并用作正性对照, 随机肽或溶剂不具有作用并用作负性对照。较短的肽部分地抑制 B β_{15-42} 结合 VE-钙粘蛋白。以浓度依赖方式, NDSK-II 抑制 B β_{15-42} 结合。B β_{15-42} 和 NDSK-II(50% 抑制) 之间的平衡在摩尔比 24:1 时达到。NDSK 具有很少或没有作用。

VE-钙粘蛋白是涂敷在塑料表面, 浓度为 8 nM/ml。然后标明的肽以浓度 200 $\mu\text{M/ml}$ 加入, NDSK 或 NDSK-II 是以标明的浓度加入。FLAG-标记的 B β_{15-42} (12 $\mu\text{M/ml}$) 的结合的检测是如上进行。

此外, 我们已经鉴定用于测定肽的要求的活性的专门分析法, 其在于测量抑制白细胞介素-6 从内皮细胞中的释放。白细胞介素-6 已经显示为休克情形下的结果和死亡率的强的预报因子, 并因此是确定肽的有益作用的有价值的参数。这种分析法因此也是本发明的部分。

(该页剩下的部分故意留下空白)

阻断试剂	15-42FLAG-结合至 VE-钙粘蛋白的抑制的百分率 平均值 $\pm$ 标准偏差
肽 15-42 (28mer)	100 $\pm$ 10
随机肽 (4mer)	3 $\pm$ 3
随机肽 (28mer)	10 $\pm$ 3
溶剂	0 + 0
肽 15-18 (4mer) 200 μ M/ml	65 $\pm$ 12
肽 15-26 (12mer) 200 μ M/ml	64 $\pm$ 10
肽 15-30 (16mer) 200 μ M/ml	61 $\pm$ 13
肽 15-34 (20mer) 200 μ M/ml	67 $\pm$ 17
肽 15-37 (24mer) 200 μ M/ml	17 $\pm$ 19
肽 16-42 (27mer) 200 μ M/ml	55 $\pm$ 13
肽 15-18 (4mer) 12 μ M/ml	7 $\pm$ 2
肽 15-26 (12mer) 12 μ M/ml	6 $\pm$ 1
肽 15-30 (16mer) 12 μ M/ml	6 $\pm$ 3
肽 15-34 (20mer) 12 μ M/ml	7 $\pm$ 1
肽 15-37 (24mer) 12 μ M/ml	7 $\pm$ 2
肽 16-42 (27mer) 12 μ M/ml	5 $\pm$ 2
NDSK-II 0.06 μ M/ml	1 + 0
NDSK-II 0.12 μ M/ml	39 + 18
NDSK-II 0.20 μ M/ml	42 + 14
NDSK-II 0.60 μ M/ml	52 + 16
NDSK-II 1.2 μ M/ml	63 + 13
NDSK-II 2.4 μ M/ml	79 + 9
NDSK-II 4.0 μ M/ml	82 + 12
NDSK 0.06 μ M/ml	0 + 0
NDSK 0.12 μ M/ml	2 + 1
NDSK 0.20 μ M/ml	1 + 1
NDSK 0.60 μ M/ml	7 + 6
NDSK 1.2 μ M/ml	15 + 13
NDSK 2.4 μ M/ml	16 + 9
NDSK 4.0 μ M/ml	20 + 10
抗-VE-钙粘蛋白 Ab(TEA1/31,1 mg/ml)	2 + 1

抑制从内皮细胞释放白细胞介素-6

96-孔细胞培养板涂敷 1 % 明胶。在各个孔中，用滴管加入含大约 23,000 人脐带静脉内皮细胞(HUVEC)的 200 μ l 的培养基中。HUVECs 是取自四种不同供体的混合液的第 4 传代。稀释所用培养基是标准培养基，在 Iscove 's 改性的 Dulbecco 培养基含有 10 % FCS、ECGS(Petzelbauer 等人, J Immunol. 151:5062-5072, 1993 年)。融合细胞单层是在 37℃ 培养箱内约 18 小时形成。除去上清液，用含单独的 NDSK-II 或加上肽 B β ₁₅₋₄₂(GHRPLDKKREEAPSLRPAPPPIISGGGYR)的 NDSK-II 的培养基代替。

总的最终量是 200 μ l。在 37℃ 和 5 % 的 CO₂ 下孵育 4 小时之后，再除去细胞培养物上清液并在 4℃ 下以 3000 U/分离心 10 分钟。白细胞介素-6(IL-6)的浓度是使用商业分析法(IL-6 Quantikine Immonuassay (R&D Sytems; Catalog#: D6050; Lot; 231361)测量。根据分析法制作商提供的标准实验设计进行校正，不同稀释度的重组体 IL-6 及培养基。在 450 nm 的波长下读数光密度，参考波长 550 nm。

结果

	IL-6 浓度，以 pg/ml 计算
培养基	12 $\pm$ 1
0.3 μ g/ml NDSK-II	19 $\pm$ 2
0.3 μ g/ml NDSK-II + 10 μ g/ml 肽	15 $\pm$ 2
3 μ g/ml NDSK-II	25 $\pm$ 3
3 μ g/ml NDSK-II + 10 μ g/ml 肽	12 $\pm$ 3(p<0.05，与仅含有 NDSK-II 的对比)
30 μ g/ml NDSK-II	21 $\pm$ 2
30 μ g/ml NDSK-II + 10 μ g/ml 肽	13 $\pm$ 1(p<0.05，与仅含有 NDSK-II 的对比)

饲养猪的出血性休克

称重 20-35kg 的驯养的雄性长白猪喂养标准食物，并自由饮水。所有操作是根据 AAALAC 指南和 Guide for the Care of Laboratory Animals (Department of Health and Human Services, National Institutes of Health,

Publication Nr. 86-23)执行。猪以药阿扎哌隆(4 mg/kg)预处理。导管插入耳静脉,使用麻醉的异丙酚。动物是充分用仪器装备并平衡 1 小时,以便接收到稳定的基线。随后,动物(n=16)驱血直至获得 40 mm Hg 的平均动脉压。其保持在构成出血性休克水平 1 小时。在此时间之后,损失的血量是用流血和盐溶液(类晶体)再替代。此外,动物接受推注剂量的肽 B β ₁₅₋₄₂(n=8)或 2.4 mh/kg 剂量的随机序列肽(n=8),各自为单一静脉推注。在接着发生的 5 小时内的再灌注期间,Horowitz 指数(测量血液氧饱和度(Sauerstoffsättigung))、PEEP(mm Hg 计的正性内呼吸压)及心脏射血量是在不同时间点测量。在下表中,使用以下时间点:

时间点 1: 出血性休克前 1 小时

时间点 2: 出血性休克期间

时间点 3: 再灌注开始后 1 小时

时间点 4: 再灌注开始后 3 小时

时间点 5: 再灌注开始后 5 小时

EV(ml)

	对照组	治疗组	
1	38+/-1	44+/-2	
2	6+/-1	6+/-1	
3	25+/-3	31+/-4	p<0.05
4	25+/-4	32+/-3	p<0.05
5	22+/-2	37+/-4	p<0.05

Horowitz 指数

	对照组	治疗组	
1	460+/-20	465+/-20	
2	395+/-60	450+/-20	
3	425+/-30	420+/-10	
4	360+/-50	410+/-20	
5	220+/-20	420+/-30	p<0.05

PEEP (mmHg)			
	对照组	治疗组	
1	4+/-0.2	4+/-0.1	
2	4.3+/-0.3	4+/-0.1	
3	5+/-0.3	4.1+/-0.2	p<0.05
4	5.4+/-0.4	4.2+/-0.3	p<0.05
5	6.6+/-0.4	4.3+/-0.2	p<0.05