

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁶

C07K 14/475

[12] 发明专利申请公开说明书

C07K 16/24 A61K 38/18

A61K 39/395

[21] 申请号 97199744.6

[43]公开日 1999 年 12 月 8 日

[11]公开号 CN 1237982A

[22]申请日 97.11.18 [21]申请号 97199744.6

[30]优先权

[32]96.11.18 [33]JP [31]306056/96

[86]国际申请 PCT/JP97/04195 97.11.18

[87]国际公布 WO98/22505 日 98.5.28

[85]进入国家阶段日期 99.5.14

[71]申请人 住友电气工业株式会社

地址 日本大阪

[72]发明人 越田将悟

[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

代理人 陶永良

权利要求书 2 页 说明书 22 页 附图页数 11 页

[54]发明名称 可溶性多肽

[57]摘要

本发明提供作为对上皮细胞具有形态发生促进作用和细胞增殖作用的多肽、是由人的上皮形态促成因子的 N 末端的第 1 个氨基酸到第 103 个氨基酸所特定的多肽、以及由小鼠的上皮形态促成因子的 N 末端的第 1 个氨基酸到第 104 个氨基酸所特定的多肽、和以该多肽为有效成分的医药。所述多肽是可溶于水的多肽,可以用作伴随形态发生异常引起的疾病、例如炎症性疾病、烧伤、创伤等病症的治疗或预防的医药和用作用于促进毛发生长的医药等医药的有效成分。



ISSN 1008-4274

权利要求书

1. 具有序列 1 记载的氨基酸序列的多肽。
2. 由权利要求 1 记载的氨基酸序列中缺失、置换、和/或付加 1 个或 2 个氨基酸后的氨基酸序列构成的、且对上皮细胞具有形态发生促进作用的多肽。
3. 权利要求 2 记载的多肽，上述对上皮细胞的形态发生促进作用是象天然型上皮形态促成因子那样的作用。
4. 权利要求 2 或 3 任一项记载的多肽，是还具有细胞增殖作用的多肽。
5. 权利要求 1~4 任一项记载的多肽，是上述氨基酸序列中的氨基酸残基被从糖类、脂类、磷酸基组成的组中至少选出的一个基团修饰的多肽。
6. 以权利要求 1~5 任一项记载的多肽为有效成分的医药。
7. 以权利要求 1~5 任一项记载的多肽为有效成分的、能够治疗和/或预防起因于形态因子表达过少的疾病的医药。
8. 权利要求 7 记载的医药，上述形态发生因子为上皮形态促成因子。
9. 以权利要求 1~5 任一项记载的多肽为有效成分的、能够治疗和/或预防伴随组织或器官破坏的疾病的医药。
10. 权利要求 9 记载的医药，上述疾病为肾病。
11. 以权利要求 1~5 任一项记载的多肽为有效成分的毛发生长促进剂。
12. 具有序列 2 记载的氨基酸序列的多肽。
13. 由权利要求 12 记载的氨基酸序列中缺失、置换、和/或付加 1 个或 2 个以上氨基酸后的氨基酸序列构成的、且对上皮细胞具有形态发生促进作用的多肽。
14. 权利要求 13 记载的多肽，上述对上皮细胞的形态发生促进作用是象天然型上皮形态促成因子那样的作用。
15. 权利要求 13 或 14 任一项记载的多肽，还具有细胞增殖作用。
16. 权利要求 12~15 任一项记载的多肽，是上述氨基酸序列中的氨基酸残基与从糖类、脂类、磷酸基组成的组中至少选择出的一个基团结合的多肽。

17. 以权利要求 12~16 任一项记载的多肽为有效成分的医药。
18. 以权利要求 12~16 任一项记载的多肽为有效成分的、能够治疗和/或预防起因于形态因子表达过少的疾病的医药。
19. 权利要求 18 记载的医药，上述形态发生因子为上皮形态促成因子。
20. 以权利要求 12~16 任一项记载的多肽为有效成分的、能够治疗和/或预防伴随组织或器官破坏的疾病的医药。
21. 权利要求 20 记载的医药，上述疾病为肾病。
22. 以权利要求 12~16 任一项记载的多肽为有效成分的毛发生长促进剂。
23. 含有权利要求 4 或 15 任一项记载的多肽的细胞培养基。
24. 对权利要求 1~5、或 12~16 任一项记载的多肽的抗体。
25. 权利要求 24 记载的抗体、是抑制上述多肽的形态发生促进作用或细胞增殖作用的抗体。
26. 权利要求 24 记载的抗体、是能特异结合于具有卷曲螺旋区域(1)的上皮形态促成因子类的、抑制上述多肽对上皮细胞的形态发生促进作用或细胞增殖作用的抗体。
27. 以权利要求 24 或 26 任一项记载的抗体为有效成分的医药。
28. 权利要求 27 记载的医药，能够治疗或预防上皮形态促成因子表达过多引起的疾病。
29. 以权利要求 24 或 26 任一项记载的抗体为有效成分的毛发生长促进剂。

说明书

可溶性多肽

本发明涉及对上皮细胞具有形态发生促进作用和细胞增殖作用的新的可溶性多肽。

上皮组织的正常的形态发生受到来自于存在于上皮组织周围的间充质细胞产生的因子的控制。而人们认为起因于上皮组织形态发生异常的许多疾病的病因都是由于间充质细胞的异常引起的。根据有关的知识阐明间充质细胞对上皮组织形态发生的控制机制引起了人们的兴趣。然而，参与上皮组织形态发生的控制的物质群在复杂的体系中受到时间上以及空间上的调控而表现的，由于分离这些物质解析它们的功能是非常困难的，同时建立使上皮组织形态发生简单化的模型实验体系也很困难等理由，所以该领域的研究到现在为止也没有看到很大的进展。因此、为了阐明起因于上皮组织形态发生的疾病的发病机制以及确立这些疾病的治疗方法等，上皮组织中形态发生的调控机制的解析是人们所急切盼望的。

在这样的状况下，与上皮组织形态发生的调控有关的上皮形态促成因子（epimorphin）被分离纯化出来（特开平 6-25295 号公报）。已经弄清楚了该物质是以由 277 至 289 个氨基酸组成的蛋白质为核心蛋白质的生理活性物质，主要是由间充质细胞生物合成的。同时也已弄清楚了上皮形态促成因子作用于上皮细胞具有促进上皮组织形态发生的作用、同时人们也已清楚如果在上皮形态促成因子没有发挥其功能的条件下正常的组织形成不能进行。

关于上皮形态促成因子的结构特征、已经发现上皮形态促成因子分子在结构上大致可以分为 4 个片段（欧洲专利公开第 0698666 号）。即、构成上皮形态促成因子全长的多肽从 N 末端一侧开始可以分为卷曲螺旋区（1）、功能域（2）、卷曲螺旋区（3）、以及 C 末端的疏水区。这些片段中，就功能域来说该区域参与细胞粘着，可能与上皮形态促成因子的生理活性的表现有着密切的关系（上述欧洲专利公开第 0698666 号）。

由于上皮形态促成因子具有促进正常的形态发生的作用，所以人们期待着该物质用作 预防和治疗起因于形态发生异常的疾病的医药、或用作生发剂等医药的有效成分。然而、从哺乳动物得到天然型上皮形态促成因子难溶于生理盐水等水溶性的溶剂中，实际用作医药是困难的。因此、人们正尝试创造能实质上继续保持天然型上皮形态促成因子的形态发生促进作用、溶解性优良的上皮形态促成因子的衍生物。例如、已知有除去 C 末端的疏水区域的突变体（片段 123）等衍生物（特开平 6-25295 号公报）。

有关作为上皮形态促成因子部分结构的卷曲螺旋区（1）、以前人们清楚该区域具有使上皮形态促成因子可溶化的作用。然而、同时人们也清楚如果从上皮形态促成因子的 N 末端除去氨基酸，如除去卷曲螺旋区（1）的一部分，得到的突变体的细胞粘着活性降低（欧洲专利公开第 0698666 号）。就是说、关于该区域的作用，就可溶性方面来说，通过使片段（23）的高级结构变化等作用起着正作用，而就细胞粘着活性来说、通过使功能域（2）屏蔽等作用起着负作用，这暗示着作为医药的可适用性被否定。而有关上皮形态促成因子的上述各区域（卷曲螺旋区（1）、功能域（2）、或卷曲螺旋区（3））的各种生理作用虽然也有关于细胞粘着活性的报告，但有关上皮形态促成因子中类似的促进形态发生的作用到目前为止还不知道。

本发明的课题目的在于提供对上皮细胞具有形态发生促进作用的可溶性多肽。更具体讲、提供作用于上皮细胞，促进上皮组织形态发生、而且可溶解于生理盐水等水性溶剂的多肽是本发明的课题。

而本发明的另一个课题是提供含有具有上述特征的多肽为有效成分的、在预防和/或治疗起因于形态发生因子、例如上皮形态促成因子产生的量过少、或伴随着组织或器官的破坏的疾病中有用的医药。本发明的另一个课题还可提供含有上述可溶性多肽为有效成分的促进毛发生长剂。

本发明人为解决上述课题锐意努力的结果，发现由构成上皮形态促成因子的卷曲螺旋区（1）构成的多肽是可溶于水性溶剂的、且作用于上皮

细胞具有促进上皮组织形态发生、以及对上皮细胞具有显著的促进细胞增殖作用。本发明正是以上述发现为基础完成的。这里、所谓的“促进细胞增殖作用”意味着细胞在无血清培养基中培养数日后可使其活细胞数目增加。就是说、本发明提供的是具有形态发生促进作用的多肽、是通过下面的氨基酸序列(1)(序列表中的序列1):

Met Arg Asp Arg Leu Pro Asp Leu Thr Ala Cys Arg
Lys Asn Asp Asp Gly Asp Thr Val Val Val Val Glu
Lys Asp His Phe Met Asp Asp Phe Phe His Gln Val
Glu Glu Ile Arg Asn Ser Ile Asp Lys Ile Thr Gln
Tyr Val Glu Glu Val Lys Lys Asn His Ser Ile Ile
Leu Ser Ala Pro Asn Pro Glu Gly Lys Ile Lys Glu
Glu Leu Glu Asp Leu Asn Lys Glu Ile Lys Lys Thr
Ala Asn Lys Ile Arg Ala Lys Leu Lys Ala Ile Glu
Gln Ser Phe Asp Gln Asp Glu

特定的多肽(本发明说明书中、该多肽有时也称之为“多肽(I)”)。

还有、通过本发明提供的多肽是具有形态发生促进作用的多肽、是通过下面的氨基酸序列(II)(序列表中的序列2):

Met Arg Asp Arg Leu Pro Asp Leu Thr Ala Cys Arg
Thr Asn Asp Asp Gly Asp Thr Ala Val Val Ile Val
Glu Lys Asp His Phe Met Asp Gly Phe Phe His Gln
Val Glu Glu Ile Arg Ser Ser Ile Ala Arg Ile Ala
Gln His Val Glu Asp Val Lys Lys Asn His Ser Ile
Ile Leu Ser Ala Pro Asn Pro Glu Gly Lys Ile Lys
Glu Glu Leu Glu Asp Leu Asn Lys Glu Ile Lys Lys
Thr Ala Asn Arg Ile Arg Gly Lys Leu Lys Ser Ile
Glu Gln Ser Cys Asp Gln Asp Glu

特定的多肽(本发明说明书中、该多肽有时也称之为“多肽(II)”)。

附图的简单说明

图 1 是显微镜下拍摄的作为例 2 的对照只用 DH-medium 培养的 MDCKII 细胞（来自肾脏的细胞株）的形态的照片。

图 2 是显微镜下拍摄的在有本发明的多肽（ $15\mu\text{g/ml}$ ）存在下培养的 MDCKII 细胞（来自肾脏的细胞株）以及该细胞形成的组织形态的照片。

图 3 是显示用比图 1 和图 2 更高倍数显微镜拍摄的在有本发明的多肽（ $15\mu\text{g/ml}$ ）存在下培养的 MDCKII 细胞（来自肾脏的细胞株）以及该细胞形成的组织形态的结果的照片。

图 4 是显示显微镜下拍摄的作为例 4 的对照只用 DH-medium 培养的 MDCKII 细胞（来自肾脏的细胞株）的形态的结果的照片。

图 5 是显示作为例 4 的阳性对照在凝胶中添加了本发明的多肽（H1, $3\mu\text{g/ml}$ ）培养的 MDCKII 细胞（来自肾脏的细胞株）以及该细胞形成的组织形态的照片。

图 6 是显示在凝胶中添加了本发明的多肽（H1, $3\mu\text{g/ml}$ ）以及抗 H1 抗体（ $5.2\mu\text{g/ml}$ ）培养的 MDCKII 细胞（来自肾脏的细胞株）以及由该细胞形成的组织形态的照片。

图 7 是显示在凝胶中添加了本发明的多肽（H1, $3\mu\text{g/ml}$ ）以及抗 H1 抗体（ $26\mu\text{g/ml}$ ）培养的 MDCKII 细胞（来自肾脏的细胞株）以及由该细胞形成的组织形态的照片。

图 8 是显示在凝胶中添加了本发明的多肽（H1, $3\mu\text{g/ml}$ ）以及抗 H1 抗体（ $130\mu\text{g/ml}$ ）培养的 MDCKII 细胞（来自肾脏的细胞株）形态的照片。

图 9 是显示在凝胶中添加了本发明的多肽（H1, $3\mu\text{g/ml}$ ）以及抗 H3 抗体（ $5.2\mu\text{g/ml}$ ）培养的 MDCKII 细胞（来自肾脏的细胞株）以及由该细胞形成的组织形态的照片。

图 10 是显示在凝胶中添加了本发明的多肽（H1, $3\mu\text{g/ml}$ ）以及抗 H3 抗体（ $26\mu\text{g/ml}$ ）培养的 MDCKII 细胞（来自肾脏的细胞株）以及由该细胞形成的组织形态的照片。

图 11 是显示在凝胶中添加了本发明的多肽（H1, $3\mu\text{g/ml}$ ）以及抗 H3 抗

体 (130 μ g/ml) 培养的 MDCKII 细胞 (来自肾脏的细胞株) 以及由该细胞形成的组织形态的照片。

通过本发明提供的上述的多肽 (I) 相当于由人的上皮形态促成因子的 N 末端的第 1 号氨基酸到第 103 号氨基酸所特定的卷曲螺旋区 (1) (欧洲专利公开第 0698666 号)。而上述多肽 (II) 相当于由小鼠的上皮形态促成因子的 N 末端的第 1 号氨基酸到第 104 号氨基酸所特定的卷曲螺旋区 (1) (上述欧洲专利公开第 0698666 号)。这些多肽与天然型上皮形态促成因子相比在水溶性方面更优越、其特征是可溶于蒸馏水、生理盐水、磷酸盐缓冲生理盐水等水性溶剂。例如、将该多肽溶解于水性溶剂后、即使通过 100,000 $\times$ g 进行 1~2 小时的离心处理, 只要是 0.2mg/ml 以下的浓度实质上也看不到有沉淀的生成。不过、并不是将本发明书中使用的“可溶”限定于上述的特定的溶解性来解释。

而上述多肽 (I) 或多肽 (II) 的特征是实质上具有与天然型上皮形态促成因子对上皮细胞的形态发生促进作用同样的作用。所谓天然型上皮形态促成因子意味着例如通过哺乳类等动物的间充质细胞生物合成的上皮形态促成因子。作为天然型上皮形态促成因子例如有来自人、猴、牛、马、羊、狗、猫、兔、大鼠、小鼠等的上皮形态促成因子, 优选的是来自人的上皮形态促成因子等。

天然型上皮形态促成因子中存在着通过基因剪接形成的多个同等型。例如、就人的上皮形态促成因子来说, 就象特开平 6-25295 号公报所给出的那样存在着由 288 个氨基酸构成的人的上皮形态促成因子、以及分别由 287 个和 277 个氨基酸构成的人的上皮形态促成因子的同等型 A 和 B。就小鼠的上皮形态促成因子来说, 存在着由 289 个氨基酸构成的小鼠的上皮形态促成因子、以及分别由 288 个和 279 个氨基酸构成的小鼠的上皮形态促成因子的同等型 A 和 B。在本说明书中说到天然型上皮形态促成因子时、是作为包括了所有的同等型的概念使用的。

本发明的多肽中除了包括上述多肽 (I) 和多肽 (II) 以外、还包括多肽 (I) 和多肽 (II) 的组成氨基酸中的 1 个或 2 个氨基酸被其它的氨

氨基酸置换、缺失、和/或在上述多肽链中附加 1 个或 2 个以上的任意的氨基酸的上述多肽 (I) 和多肽 (II) 的氨基酸的变异体、实质上对上皮细胞具有形态发生促进作用和细胞增殖作用的多肽。虽然对置换和/或附加 1 个或 2 个以上的氨基酸的种类没有特别的限定、但最好是 L-氨基酸。

本发明的多肽中、包含上述多肽 (I) 或多肽 (II)、或以它们的氨基酸变异体作为多肽中的部分序列、实质上具有形态发生促进作用或细胞增殖作用的多肽。例如、即便在上述多肽 (I) 或多肽 (II) 的 N 末端和/或 C 末端结合 1 个或 2 个以上的氨基酸也可以、最好是结合由 2 个以上的任意的氨基酸构成的任意的寡肽。虽然这样的氨基酸的种类没有特别的限定、但最好是从 L-氨基酸中选择。例如、在上述多肽 (I) 和多肽 (II) 的 N 末端作为末端序列结合 1~10 个左右、优选的是结合 5~7 个、特别优选的是结合 6 个 L-组氨酸的多肽作为标记序列、该多肽由于可以利用特异结合于附加的标记序列的抗体和镍等物质可以简便地纯化、检测、所以从生产效率的观点看是优选的多肽。以提高亲水性或体内的稳定性等的功能性的改善和提高形态发生促进作用等为目的将特定的末端序列附加在多肽也是可能的。此外、通过附加可结合于特定分子的末端序列、也可制造出改善了对特定的组织或器官的药物释放效率的融合蛋白质等。

上述多肽即使是游离形态也是可以的、即便作为盐酸盐、醋酸盐、或对甲苯基磺酸等酸加成盐、或铵盐或有机胺盐等碱加成盐提供也可以。因此、本说明书中说到多肽时、是应当解释为包含上述那样的盐的形态的多肽。另外、除了上述各个多肽上结合了任意的糖类 (单糖、二糖、寡糖、或多糖) 的多肽和结合了脂类等物质的多肽以外、磷酸化的多肽也包含在本发明的多肽的范围。

在本说明书的实施例中就作为上述可溶性多肽的优选样式的多肽 (I) 具体地说明了对来自肾脏的 MDCKII 细胞的形态发生促进作用的试验方法。因此、本领域技术人员参照这些试验例子、或对这些方法进行适当的改变和修饰是可以很容易地证实上述定义的各个多肽具有所期望的形态发生促进作用的事实。而、上皮形态促成因子对上皮组织形态发生促

进作用因为在例如特开平 6-25295 号公报的实施例中已有详细记载、所以即使应用这样的试验体系确认形态发生促进作用也是可能的。

虽然并不拘泥于任何特定的理论、但天然型人的上皮形态促成因子通过存在于中央片段（功能域：通过由 N 末端第 104 到第 187 的氨基酸残基特定的片段）细胞粘着区结合于存在于上皮细胞外表面的上皮形态促成因子的受体在被固定于上皮细胞表面的基础上、含有多肽（I）的区域（天然型人的上皮形态促成因子的卷曲螺旋区：从上皮形态促成因子的 N 末端到第 103 号氨基酸残基的部分）结合乃至作用于参与形态发生的受体后表现出形态发生作用的可能性是存在的。

另外、本发明的上述多肽虽然对上皮组织与天然型上皮形态促成因子具有实质上的同样的形态发生促进作用、但其作用的强弱并没有特别限定。例如、在于天然型人的上皮形态促成因子同等程度或在其以下的浓度能够发挥形态发生促进作用就很优选了。而、本说明书的实施例中虽然具体地记载了有代表性的形态发生促进作用的试验方法（对来自肾脏细胞的管结构形成作用的试验方法）、但上述多肽的形态发生促进作用并不限定于该作用。而本发明的多肽对上皮细胞具有很强的促进细胞增殖作用。因此、通过本发明的多肽达成的形态发生是以伴随细胞增殖的形态发生为特征的。本说明书的实施例中虽然给出了本发明的多肽的细胞增殖促进活性的试验例子、但本发明的多肽的促进细胞增殖作用并不限定于通过该试验例子所表明的特定的作用。

虽然有关天然型上皮形态促成因子的数种形态发生促进作用已有报道、应当理解为这些作用可能是作为天然型上皮形态促成因子表现的各种各样的形态发生促进作用的部分作用。因此、所谓形态发生促进作用的用语不限于以往报道或已被确认的形态发生促进作用、有必要以最广义地解释。例如、形态发生诱导活性、器官·形态发生支持作用等概念也是包含在形态发生促进作用内的概念。而所谓的实质上同样的用语也不应当限定解释。本发明的多肽除了具有天然型上皮形态促成因子的形态发生促进作用、具有与该作用不同的其它形态发生作用的情形也包含在本发明的范围内。

上述多肽可以通过肽合成中通常使用的固相法和液相等化学上的手法合成。作为肽合成中氨基等的保护基以及缩合反应的缩合剂可以使用例如：铃木弘一编《蛋白质工程-基础和应用》（1992年，丸善株式会社）；ボンダンスキ-等人著《肽的合成》（1976, John Wiley & Sons, N. Y.）；以及スチュワート等人著《固相肽合成》（1969年, W.H. Freeman and Co., San Francisco）等记载的试剂。若用固相法可以利用市售的各种肽合成装置。而按照通常的基因表达操作等生物学上的手法在制造含有编码上述多肽的DNA序列的重组载体后、培养通过该载体转化的微生物（转化体）、从培养该转化体的培养物中可以分离纯化所期望的上述可溶性多肽。而上述多肽的制造方法并不限于这些化学的方法和生物学的方法。

作为通过基因表达的制造方法可利用的DNA可以举出下列的碱基序列：

```

ATG CGG GAC CGG CTG CCA GAC CTG ACG GCG TGT AGG
AAG AAT GAT GAT GGA GAC ACA GTT GTT GTG GTT GAG
AAA GAT CAT TTC ATG GAT GAT TTC TTC CAT CAG GTG
GAG GAG ATT AGA AAC AGT ATT GAT AAA ATA ACT CAA
TAT GTT GAA GAA GTA AAG AAA AAC CAC AGC ATC ATT
CTT TCT GCA CCA AAC CCG GAA GGA AAA ATA AAA GAA
GAG CTT GAA GAT CTG AAC AAA GAA ATC AAG AAA ACT
GCG AAT AAA ATT CGA GCC AAG TTA AAG GCT ATT GAA
CAA AGT TTT GAT CAG GAT GAG
    
```

（省略了互补的碱基序列，只给出了有意义链、序列中、起点是5'末端、终点是3'末端）。

该DNA相当于编码天然型人的上皮形态促成因子的全长的DNA（特开平6-25295号公报给出的式（6）所表示的核酸序列）当中、从第1个到第309个的核苷酸序列、是编码上述多肽（I）的DNA。上述多肽（II）的制造中、例如可以利用编码天然型小鼠的上皮形态促成因子的全长的DNA（特开平6-25295号公报给出的式（12）所表示的核酸序列）当中、

由从第 1 到第 312 的核苷酸序列所特定的 DNA。

另外、利用上述来自人的 DNA 或来自小鼠的 DNA 通过常规方法制造氨基酸突变体可能是很容易的。作为这样的方法可以利用例如《PCR 实验手册》(1991 年, HJB 出版局) 第 155~160 页记载的重组 PCR 法或《实验医学增刊 Vol. 8, No. 9》(1990 年, 羊土社) 第 63~67 页记载的 PCR 的制备变异基因的方法等。为了制造所期望的多肽作为可能利用的基因表达方法可以利用例如欧洲专利公开第 0698666 号说明书的实施例中详细记载的方法、但并不限于这些方法。

本发明的上述多肽作用于上皮细胞具有促进上皮性组织或器官等形态发生。因此、本发明的多肽作为伴随着起因于内因性的形态发生因子表达过少等的组织和器官的形态发生的异常的疾病、或伴随组织或器官的破坏引起的疾病的治疗和/或预防的医药的有效成分或作为用于上述疾病的诊断的医药的有效成分是很有用的。而上述多肽作为用于毛发生长促进剂的医药的有效成分也是很有用的。本说明书中说到的医药用语除了用于在包含人在内的哺乳动物的病的预防、治疗以及诊断外、通常从广义上讲还用作包含作为分类为外用药的毛发生长促进剂和毛发生长抑制剂等。

作为形态发生因子已知包含天然型上皮形态促成因子在内的各种各样的因子。本发明的医药在伴随起因于上述的形态发生因子、特别是上皮形态促成因子的表达过少的组织和器官的形态发生异常的疾病的预防和/或治疗中是很有用的。对于炎性疾病、癌、烧伤、手术、或创伤、以及它们的治疗过程等、伴随着上皮性的组织或器官的破坏的疾病(可以用作包含伤害在内的概念)、以促进上皮组织和器官的再生为目的使用本发明的医药是可能的。

更具体地说, 例如、慢性肾炎等肾脏疾病; 肺炎、肺气肿、肺结核、慢性闭塞性肺病、尘肺、吞噬性肺炎等慢性和急性肺病; 慢性支气管炎等气管和支气管病; 急性肝炎; 慢性肝炎; 肝硬变、重症肝炎等肝病; 癌; 良性前列腺肥大; 消化性溃疡; 创伤; 皮肤溃疡等疾病通过其它的具有形态发生促进作用的生理活性物质(例如 HGF 和 EGF 等)治疗是可

能的，可期望本发明的医药对这些疾病也有效。

在将本发明的医药用于起因于上皮形态促成因子的表达过少的疾病的患者时、一般都可看出该疾病症状的减轻、所以可以对该疾病进行确诊。就象本发明的实施例所具体给出的那样、本发明的多肽特别对肾细胞具有强有力的细胞增殖作用和形态发生促进作用。因此、在治疗时，例如对肾小管上皮细胞需要再生和需要保证的肾病患者、本发明的医药特别适用。例如、本发明的医药可能适用于急性肾小球肾炎、急速进行性肾炎、慢性肾小球肾炎等慢性肾炎、肾变病综合症、慢性肾衰竭、肾癌等肾病患者。

本发明的医药适用的对象并不限定于上述例子中给出的患者、应该理解为对认为与 1 种或 2 种以上的形态发生因子的表达过少、特别是上皮形态促成因子的表达过少有关的疾病、以及伴随组织或器官的实质性破坏的患者都有可能适用。而含有本发明的多肽作为有效成分的毛发生长促进剂的用途应该从最广义上解释为包含促进毛发发育和促进生发等用途。

作为本发明的医药可以直接从上述多肽中选择出 1 种或 2 种以上的物质使用也可以，通常、优选的是使用制剂学上容许的 1 或 2 种以上的制剂用添加剂制造成含有 1 种或 2 种以上的上述物质作为有效成分的医药组合物、用于上述患者的治疗和/或预防。从溶解度、吸收以及排泄等体内动态、和/或的制造方法等观点看、上述多肽即使是生理学上容许的盐的形态也可以。作为上述医药组合物的给药途径、例如有从静脉给药、直肠内给药、口服给药等全身给药以外、也可外用、点眼、点鼻、点耳、局部注射等局部给药。

例如静脉内给药用针剂或点滴剂等全身给药剂、或软膏、乳膏剂、贴剂、或局部注射剂等局部给药剂都是本发明的医药组合物的优选形态。通过使用将有效成分封入了脂质体等的医药组合物和结合了抗体等的医药组合物、有时可以改善对靶器官的亲亲和性和选择性。再者、给药途径可根据适用对象的患者的种类、治疗或预防的目的、患部的种类、患者的状态等适当选择、不用说可以适当选择最适于给药途径的各种各样的

制剂形态。用作诊断药的形态也没有特别的限定、但诊断方法中除了包含将本发明的医药给予患者外，也包含使用从患者分离和采集的生物体样品进行分析的情况。

含有 1 种或 2 种上述多肽作为有效成分的毛发生长促进剂最好是提供乳膏剂、喷雾剂、涂布用的溶液制剂、或贴剂等、作为非常适合于作为毛发生长促进剂使用目的形态的制剂。上述可溶性多肽即使是生理学上容许的盐的形式也可以、为了使透过皮肤的胶原层作为有效成分的上述多肽有效地经皮肤吸收、将适当的表面活性剂和脂溶性物质等掺入到乳膏剂等制剂中也是合适的。而本发明的多肽的用途并不限定于上述的医药上、例如、作为对细胞培养用的培养基的添加剂使用也是可能的。

按照本发明的第二种实施方案能够提供特异识别本发明多肽的抗体、优选的是特异识别上述多肽 (I) 或 (II) 的抗体、最好是单克隆抗体。本发明的抗体能够对本发明的多肽 (优选的是识别上述多肽 (I) 或 (II))、或者具有卷曲螺旋区 (1) 的上皮形态促成因子类 (最好是来自人或小鼠的天然型上皮形态促成因子) 特异结合、对上述物质的促进上皮细胞形态发生作用具有抑制作用。本说明书中上皮形态促成因子类用语是以包含天然型上皮形态促成因子以及具有与天然型上皮形态促成因子实质上同样生理作用的天然型上皮形态促成因子变化体 (上皮形态促成因子变化体)、以及具有与天然型上皮形态促成因子实质上同样的生理作用的它们的氨基酸的突变体的概念使用的。

本说明书中所谓的上皮形态促成因子变化体是指具有与天然型上皮形态促成因子实质上同样生理作用的 (例如对上皮细胞的细胞粘着作用和对上皮细胞的形态发生促进作用) 多肽、来自上述天然型上皮形态促成因子的多肽序列 (通常是由 277 乃至 289 个氨基酸组成的多肽) 的部分多肽序列、或是含有来自天然型上皮形态促成因子的多肽序列的上述部分多肽序列作为其部分序列的多肽。例如除去天然型上皮形态促成因子 C 末端的多肽 (特开平 6-25295 号公报) 就是上皮形态促成因子变化体的代表化合物。而在本说明书中所谓的天然型上皮形态促成因子或上皮形态促成因子的变化体的氨基酸突变体是指实质上具有与天然型上皮形态

促成因子同样的上述生理作用的多肽、构成上述天然型上皮形态促成因子或上皮形态促成因子变化体的多肽链的氨基酸中的 1 个或 2 个以上的氨基酸被别的氨基酸置换后、它们的构成氨基酸的 1 个或 2 个以上的氨基酸缺失后、和/或在上述多肽链中插入 1 个或 2 个以上的任意的氨基酸后形成的多肽。

除了上述公报等公布的上皮形态促成因子变化体之外、按照公布的方法、或在公布的多肽变化体中通过改变以至修饰的方法可能制造的上皮形态促成因子变化体只要是满足任一种上述的定义都应理解为包含在本说明书中的上皮形态促成因子变化体。而有关天然型上皮形态促成因子或上皮形态促成因子的变化体的氨基酸突变体的制造方法虽然在特愿平 7-175539 号说明书以及特愿平 8-99684 号说明书中具体地说明了、但并不限于这些方法、无论通过哪种方法制造的氨基酸突变体都可以。而通过这些上皮形态促成因子变化体或它的氨基酸突变体的生理活性的检测方法可以按照特开平 6-25295 号公报或国际公开 W097/40158 中详细说明的天然型上皮形态促成因子的生理活性检测方法进行。例如、如果能确认特愿平 8-102553 号说明书实施例记载的胎小鼠肺的支气管的形态发生促进作用和、胎小鼠上颌皮肤的形态发生促进作用等就可以。作为结合于上皮形态促成因子类抑制它们的作用的抗体、以前已知有 MC-1 (特开平 6-25295 号公报;《细胞》CELL, 69, pp. 471-481, 1992)。本发明的抗体与上述的 MC-1 同样在为阐明上皮形态促成因子类引起的上皮组织的正常的形态发生的机制方面是有用的、同时可以用于阐明起因于天然型上皮形态促成因子的表达异常(表达过多)的疾病的发病机制、以及也可用作这些疾病的预防和/或治疗的医药的有效成分。而本发明的抗体也用作毛发生长抑制剂的医药的有效成分。

作为本发明的抗体的制造方法的一个例子实施例中详细地记载了利用上述多肽(II)的多克隆抗体制造方法。因此、本发明的多肽在适宜的条件下作为抗原可作用于哺乳动物、按照通常的方法免疫哺乳动物、以及按照众所周知的或惯用的方法很容易地制造特异识别包含本发明的多肽在内的任意多肽的多克隆抗体或单克隆抗体, 这些过程容易为本领域

技术人员所理解的。

作为起因于 1 种或 2 种以上的形态发生因子表达过多的疾病、例如有慢性类风湿性关节炎、肾细胞癌和皮肤癌等癌症、动脉硬化、胶原病、造血器官疾病、肾病、肌营养障碍、骨质疏松、神经纤维瘤、Sturge-Weber 综合症、结节性硬化症、神经管闭塞性障碍、节性异常、迷走障碍、胼胝体发生、脑孔症、以及脑积水等疾病、以本发明的抗体为有效成分的医药有希望作于上述疾病的治疗和/预防、以及诊断。

还有、本发明的医药的适用对象并不限定于这些疾病、与 1 种或 2 种以上的形态发生因子表达过多、特别是与天然型上皮形态促成因子的表达过多有关的疾病都可理解为适用的对象。还有、上述抗体作为有效成分的毛发生长抑制剂的用途也应当最广义地理解为包含脱毛、抑制毛发发育、以及抑制生发等用途。而、含有本发明的抗体作为有效成分的医药通常使用制剂学上容许的 1 种或 2 种以上的制剂用的添加剂制备成医药组合物、医药的形态、制备方法、以及医药组合物的给药途径等可利用上述给出的说明。

以下、通过实施例更具体地说明本发明、但本发明的范围并不限定于以下的实施例。

实施例 1: 本发明的多肽的制造

通过 PCR 制备在位于由小鼠的天然型上皮形态促成因子的 N 末端氨基酸开始的 1~104 号氨基酸的 DNA 序列(特开平 6-25295 号公报给出的式(12)给出的核酸序列中、由第 1 个到第 312 个核苷酸所特定的 DNA) 5' 侧添加编码蛋氨酸以及 6 个组氨酸的 ATGCATCATCATCATCAT (编码合计 111 个氨基酸)、3' 末端添加终止子密码的 cDNA。将该 cDNA 重组到缺失了 2 个 EcoRV 位点间的区域的 pET3C 载体的 NdeI, NheII 位点、制备表达用的载体。

利用 Hanahan 法(《实验室手册遗传工程》、丸善株式会社发行)将得到的表达载体导入感受态细胞大肠杆菌 BL21 菌株。作为导入方法如下、在冰上溶解感受态细胞、向 100 μ l 感受态细胞溶液中添加适量的表达载

体（加入 $1\mu\text{l}$ 的 1mg/ml 的 DNA 溶液）、于冰上放置 10 分钟后进行。然后、于 42°C 的培养箱中放置 2 分钟、最后再于冰上放置 30 分钟完成导入。

接下来、将上述的转化体涂布于含有氨苄青霉素（ $50\mu\text{g/ml}$ ）的 LB 平板上（ 1% Bacto-tryptone, 0.5% Bacto-yeast extract, 1% NaCl, 1.5% Bacto-agar）、选择生长下来的菌落进行一次转化体的筛选。而作为最终确认含有表达载体的转化体、通过 PCR 确认编码目的多肽的 DNA 的有无（此时 10 个克隆中有 9 个克隆保持着 DNA）、得到含有表达载体的转化体。将得到的转化体用含有氨苄青霉素（ $50\mu\text{g/ml}$ ）的液体 LB 培养基（ 1% Bacto-tryptone, 0.5% Bacto-yeast extract, 1% NaCl）、通过 37°C 的振荡培养大量增殖后、在培养基中添加诱导表达的物质 IPTG, 使其最终浓度为 1mM 。然后继续于 37°C 的振荡 2 小时、使目的多肽在大肠杆菌中表达。表达的多肽的纯化按照使用了 QIAGEN 公司的 Ni^{2+} - NTA - Agarose (Cat. No. 30230) 的程序进行。纯化的多肽通过 SDS - PAGE (CBB 染色) 确认具有 95% 以上的纯度。纯化后的多肽对磷酸缓冲生理盐水 (PBS) 的溶解度是 0.15mg/ml 。

实施例 2: 本发明的多肽对 MDCKII 细胞（来自肾脏细胞株）的形态发生促进作用

象以下那样评价实施例 1 中制备的多肽对器官的形态发生促进作用。

将灭菌的トレフ试管立在冰中、加入 $1/10$ 容积的 $10\times\text{DH-medium}$ (Dulbecco 改进的 MEM 培养基和ハム F12 培养基等量混合培养基)、 $1/10$ 容量的再构成缓冲液 (260mM NaHCO_3 , 200mM HEPES, 50mM NaOH)。再向该试管中加入 $8/10$ 容量的新田明胶制的胶原溶液 I - P、利用移液管反复吸放混合。将实施例 1 制备的多肽对 DH-medium 透析后、加到トレフ试管, 终浓度为 $15\mu\text{g/ml}$ 。作为对照加入等量的 DH-medium 。然后、向试管中加入取自肾脏的细胞株 MDCKII (104cells/well)、通过移液管反复吸放混合。

按照每个孔为 $200\mu\text{l/well}$ 那样将上述混合物添加到 48 孔的多孔盘中、于 37°C 的培养箱中保温 1 小时使混合物凝胶化。然后按 $800\mu\text{l/well}$

添加无血清的 DH-medium 于 37℃ 使其平衡 1 小时、除去培养基、但注意不要弄坏凝胶。继续按 500 μ l/well 添加无血清的 DH-medium、于 37℃ 的 5% 二氧化碳培养箱中培养 1-2 周、观察形态。

图 1 至图 3 为在显微镜下拍摄的进行了 2 周培养后的细胞以及由该细胞形成的组织的照片。图给出的是对照的结果（只加 DH-medium）、图 2 给出的是添加了本发明的多肽（15 μ g/ml）后培养的结果。图 1 和图 2 的照片都是用相同倍数（40 倍）拍摄的结果、图 3 给出的是用高倍数（100 倍）拍摄的在凝胶中添加了本发明的多肽（15 μ g/ml）后培养的结果。在将本发明的多肽添加到胶原凝胶中时细胞（MDCKII）形成三维的管结构。这一结果表明本发明的多肽具有形态发生促进作用（器官的形态发生支持作用）

实施例 3: 本发明多肽的制备

用编码来自人的天然型上皮形态促成因子的从 N 末端开始的 1-103 的氨基酸的 DNA 序列（特开平 6-25295 号公报给出的式（6）代表的核酸序列中、由第 1 个到第 309 个核苷酸所特定的 DNA）取代编码来自小鼠的天然型上皮形态促成因子的从 N 末端开始的 1-104 的氨基酸的 DNA 序列、与实施例 1 一样制备本发明的多肽。将该多肽进行与实施例 2 同样的试验时确认该多肽对取子肾脏细胞株 MDCKII 细胞具有与实施例 1 同样的器官的形态发生支持作用。

实施例 4: 特异结合于本发明多肽的抗体的制备以及通过该抗体对形态发生的抑制

分别使用在实施例 1 得到的多肽（以下称 H1）、以及作为对照在没有形态发生促进作用的自小鼠的天然型上皮形态促成因子的部分多肽（由 N 末端的 189 至 263 的氨基酸序列特定的多肽）的 N 末端添加了蛋氨酸和 6 个组氨酸的多肽（以下称 H3）、按照通常的方法（讲谈社 Scientific《单克隆抗体实验手册》pp. 184-188）免疫大鼠、得到相应的各个多肽的抗血清。使用 Pharmacia 制造的 HiTrap Protein G (code No. 17-0404-01)

进行 IgG 级分的分离得到多克隆抗体。纯化操作按照附加的程序进行。将得到的多克隆抗体进行免疫印记、检测各个抗体的特异性、调配效价以备以下实验用。

使用通过本发明多肽使来自肾脏细胞株 MDCKII 细胞形成管结构的实施例 2 的实验条件、在最终培养前分别将多克隆抗体加入到无血清的 DH-medium ($500 \mu\text{l}/\text{well}$) 研究上述抗体对本发明的形态发生促进作用的影响。表 1 和图 4 至图 11 给出了研究的结果。表中 (++) 表示形态发生、(+) 表示形态发生被抑制了 80%、(-) 表示形态发生被 100% 抑制。图 4 至图 11 是表示显微镜下拍摄的培养了 11 天的细胞以及由该细胞形成的组织的照片。图 4 给出的是对照的结果 (只加 DH-medium)、图 5 给出的是凝胶中添加了本发明的多肽 (H1, $3 \mu\text{g}/\text{ml}$) 培养的结果。图 6、图 7、和图 8 给出的是分别添加了本发明的多肽 H1 抗体 $5.2 \mu\text{g}/\text{ml}$, $26 \mu\text{g}/\text{ml}$, 以及 $130 \mu\text{g}/\text{ml}$ 的结果。无论那一个照片都是用相同的倍数 (40 倍) 拍摄的。

表 1

抗体	$5.2 \mu\text{g}/\text{ml}$	$26 \mu\text{g}/\text{ml}$	$130 \mu\text{g}/\text{ml}$
抗 H1 抗体	++	+	-
抗 H3 抗体	++	+	++

就象这些结果所表明的那样抗 H1 抗体抑制本发明的多肽 (H1) 对 MDCKII 细胞的形态发生诱导活性抑制具有浓度依赖性、但抗 H3 抗体对上述形态发生诱导活性没有抑制作用。从这一事实可以证明在实施例 2 的实验中观察到的形态发生促进作用并不是例如由大肠杆菌等的杂质引起的、而是源于本发明的多肽 (H1) 自身的作用。另外从本发明的抗 H1 抗体有效地抑制多肽 H1 的上皮形态促成因子形式的形态发生促进作用也可证明该抗体作为治疗和/或预防起因于上皮形态促成因子的表达过剩导致的疾病的医药也是有用的。

实施例 5: 本发明多肽对细胞增殖的作用

象以下那样评价实施例 1 中制备的本发明多肽对细胞增殖的效果。作为培养基使用无血清的 DH-medium 或使用溶解 0.003~0.15mg/ml 的本发明多肽的无血清的 DH-medium、按 12,000cell/ml 将 MDCKII 细胞加到组织培养用的 24 孔盘中。在 37℃ 的 5% 二氧化碳培养箱中培养 5 天后、除去培养基、用 PBS (-) 洗 2 次。用胰蛋白酶-EDTA 将细胞从孔中剥离下来后、用台盼蓝染色后计算活的细胞数目。就象表 2 所给出的那样、MDCKII 细胞在无血清培养基中进行单层培养时如果培养液中不添加本发明的多肽、5 天后活细胞大约减少 1/10 (对照)。另外、培养液中添加本发明的多肽时、尽管是无血清培养、MDCKII 细胞的增殖的诱导依赖于本发明的多肽的浓度。当培养液中添加本发明的多肽 0.075mg/ml、培养 5 天后可以看出活细胞数目是培养开始时的 10 倍以上、这一结果可以与添加了 10% 胎牛血清的效果相接近、很清楚本发明的多肽具有极强的细胞增殖活性。

表 2

多肽浓度 (mg/ml)	培养后的细胞数目
0.15	140000
0.075	140000
0.05	90000
0.0375	83000
0.03	54000
0.015	14000
0.0075	9800
0.003	5300
0 (DH-medium)	1800

培养开始时细胞数 12000

本发明的多肽是可溶于生理盐水等水性溶剂的多肽、由于具有对上

皮组织形态发生促进作用、可以用作起因于形态发生异常引发的疾病的预防和/或治疗药物的有效成分等。

序列表

序列号: 1

序列长度: 103

序列类型: 氨基酸

拓扑型: 直链

序列种类: 肽

序列

```

Met Arg Asp Arg Leu Pro Asp Leu Thr Ala Cys Arg Lys Asn Asp
 1           5           10           15
Asp Gly Asp Thr Val Val Val Val Glu Lys Asp His Phe Met Asp
16           20           25           30
Asp Phe Phe His Gln Val Glu Glu Ile Arg Asn Ser Ile Asp Lys
31           35           40           45
Ile Thr Gln Tyr Val Glu Glu Val Lys Lys Asn His Ser Ile Ile
46           50           55           60
Leu Ser Ala Pro Asn Pro Glu Gly Lys Ile Lys Glu Glu Leu Glu
61           65           70           75
Asp Leu Asn Lys Glu Ile Lys Lys Thr Ala Asn Lys Ile Arg Ala
76           80           85           90
Lys Leu Lys Ala Ile Glu Gln Ser Phe Asp Gln Asp Glu
91           95           100

```

序列号: 2

序列长度: 104

序列类型: 氨基酸

拓扑型: 直链

序列种类: 肽

序列

Met	Arg	Asp	Arg	Leu	Pro	Asp	Leu	Thr	Ala	Cys	Arg	Thr	Asn	Asp
1				5					10					15
Asp	Gly	Asp	Thr	Ala	Val	Val	Ile	Val	Glu	Lys	Asp	His	Phe	Met
16				20					25					30
Asp	Gly	Phe	Phe	His	Gln	Val	Glu	Glu	Ile	Arg	Ser	Ser	Ile	Ala
31				35					40					45
Arg	Ile	Ala	Gln	His	Val	Glu	Asp	Val	Lys	Lys	Asn	His	Ser	Ile
46				50					55					60
Ile	Leu	Ser	Ala	Pro	Asn	Pro	Glu	Gly	Lys	Ile	Lys	Glu	Glu	Leu
61				65					70					75
Glu	Asp	Leu	Asn	Lys	Glu	Ile	Lys	Lys	Thr	Ala	Asn	Arg	Ile	Arg
76				80					85					90
Gly	Lys	Leu	Lys	Ser	Ile	Glu	Gln	Ser	Cys	Asp	Gln	Asp	Glu	
91				95					100					

序列号: 3

序列长度: 309

序列类型: 核酸

拓扑型: 直链

序列种类: cDNA to mRNA

序列

ATG	CGG	GAC	CGG	CTG	CCA	GAC	CTG	ACG	GCG	TGT	AGG	AAG	AAT	GAT	45
GAT	GGA	GAC	ACA	GTT	GTT	GTG	GTT	GAG	AAA	GAT	CAT	TTC	ATG	GAT	90
GAT	TTC	TTC	CAT	CAG	GTG	GAG	GAG	ATT	AGA	AAC	AGT	ATT	GAT	AAA	135

ATA ACT CAA TAT GTT GAA GAA GTA AAG AAA AAC CAC AGC ATC ATT 180
 CTT TCT GCA CCA AAC CCG GAA GGA AAA ATA AAA GAA GAG CTT GAA 225
 GAT CTG AAC AAA GAA ATC AAG AAA ACT GCG AAT AAA ATT CGA GCC 270
 AAG TTA AAG GCT ATT GAA CAA AGT TTT GAT CAG GAT GAG 309

说明书附图

图 1

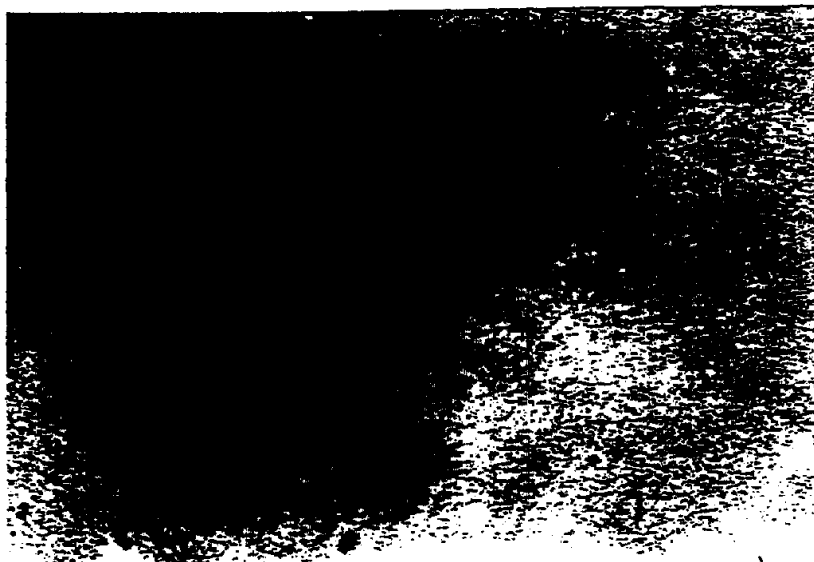




图 2



图 3

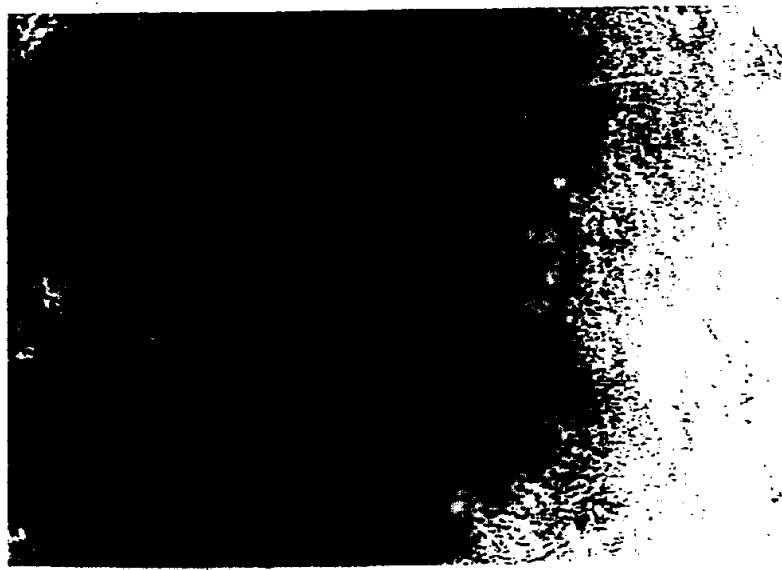


图 4



图 5

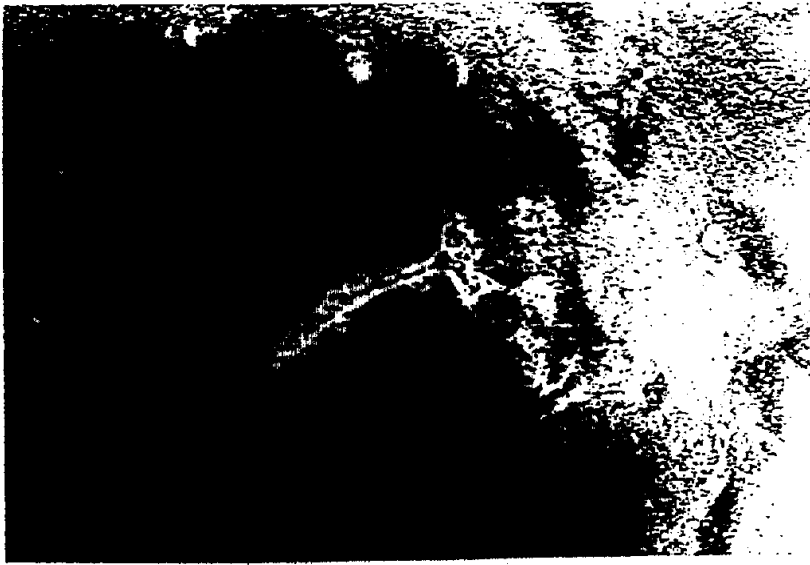


图 6



图 7

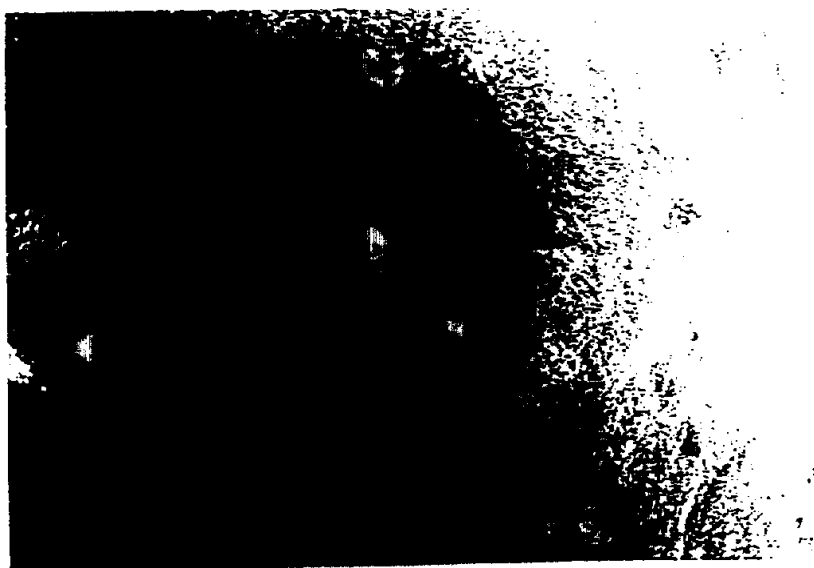


图 8



图 9



图 10



图 11