



(10) 授权公告号 CN 112689513 B

(45) 授权公告日 2024.08.02

(21) 申请号 201980060040.6

(22) 申请日 2019.09.13

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 112689513 A

(43) 申请公布日 2021.04.20

(30) 优先权数据
18194531.2 2018.09.14 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2021.03.12

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2019/074547 2019.09.13

(87) PCT国际申请的公布数据
W02020/053417 EN 2020.03.19

(73) 专利权人 艾德万斯科尔有限责任公司
地址 德国马丁雷德

(72) 发明人 J·法斯宾德 H·P·霍尔特霍夫
李忠民 M·昂格雷尔

(74) 专利代理机构 隆天知识产权代理有限公司
72003
专利代理师 付文川 吴小瑛

(51) Int.Cl.
A61K 38/00 (2006.01)
C07K 14/72 (2006.01)

(56) 对比文件
Julia Fassbender et al..Therapeutic effects of short cyclic and combined epitope peptides in a long-term model of Graves' disease and orbitopathy.《Thyroid》.2019,第1-29页.

审查员 叶金金

权利要求书1页 说明书13页
序列表4页 附图7页

(54) 发明名称

用于治疗格雷夫斯病的短环肽

(57) 摘要

本发明涉及短环肽,其在治疗、改善或预防由靶向甲状腺中促甲状腺素-TSH受体(TSHR)的抗体引起的疾病(尤其是格雷夫斯病和眼眶病)中的用途,并且涉及包含所述短环肽的药物组合物。

1. 环肽,其序列为SEQ ID No.11或SEQ ID No.12所示的序列。
2. 一种药物组合物,其包含权利要求1所述的环肽,并任选地包含药学上可接受的载体。
3. 权利要求1所述的环肽或权利要求2所述的药物组合物在制备用于治疗、改善或预防格雷夫斯病、格雷夫斯眼眶病、桥本病和/或甲状腺功能亢进的药物中的用途。

用于治疗格雷夫斯病的短环肽

发明领域

[0001] 本发明涉及短环肽,其在治疗、改善或预防由靶向甲状腺中促甲状腺素-TSH受体(TSHR)的抗体引起的疾病(尤其是格雷夫斯病和眼眶病(Graves' disease and orbitopathy)中的用途,并且涉及包含所述短环肽的药物组合物。

[0002] 发明背景

[0003] 格雷夫斯病是靶向甲状腺中促甲状腺素-TSH受体(TSHR)的抗体介导的一种常见的自身免疫病况,其导致甲状腺功能亢进(hyperthyroidism) (1),全球年发病率为每100,000人中15至80人患病。所有的现有治疗选择均具有相对高的复发率和显著的副作用(2)。如果不加以治疗,格雷夫斯病会导致发病率和死亡率显著增加(3)。

[0004] 难治性疾病病例和伴随的眼病(ophthalmopathy)/眼眶病(orbitopathy)的治疗尤其具有挑战性。眼病发生在几乎一半的格雷夫斯病患者中——在普通人群中,每年每100,000名女性中多达16例(4)。这些患者必须频繁接受数周高剂量的静脉内皮质激素类治疗,这甚至会产生更多副作用(5)。一类有前景的选择是已经建立超过100年的用于治疗过敏性自身免疫病况的特异性免疫疗法(例如6、7中的综述)。通常,用广谱的免疫抑制药物治疗可引起严重的副作用,因此,人们认为此类过敏原特异性疗法可在多种相关条件下诱导耐受性。模拟免疫原的环肽作为一种新的选择,已经被开发用于治疗抗TSHR抗体介导的格雷夫斯病(8)。通过用表达TSHR的胞外A亚基的重组腺病毒进行9次免疫接种以永久性提高小鼠中抗体的产生,成功建立了人类格雷夫斯病的长期疾病模型(9,10)。每月静脉内施用衍生自TSHR A亚基的三级结构的环肽能强效地在经TSHR免疫的患病小鼠中诱导耐受性,并明显减少眼眶后纤维化(8)。

[0005] EP 3369743 A1公开了环肽,所述环肽适用于治疗、改善或预防由靶向甲状腺中促甲状腺素-TSH受体(TSHR)的抗体引起的疾病,尤其是格雷夫斯病和眼眶病。等于或大于24个氨基酸的环肽长度(一级结构)对于获得所报道的作用被认为是必需的。但是,生产适量的至少24个氨基酸这么长的长肽困难且昂贵。

[0006] 发明概述

[0007] 根据以上所述,本发明的问题是提供另外的多肽,其适用于治疗、改善或预防由靶向甲状腺中促甲状腺素-TSH受体(TSHR)的抗体引起的疾病,尤其是格雷夫斯病和眼眶病,所述多肽不具有以上缺点,尤其是适量生产更容易且更便宜。

[0008] 令人惊讶地的是发现,衍生自TSHR的亮氨酸富集重复结构域的第1或第8圆柱环的缩短的环肽也在动物体内诱导耐受性并成功地治疗甲状腺疾病,仅从肽治疗开始后8周起即导致甲状腺尺寸减小,甲状腺甲状腺素(T4)水平正常化。还发现眼眶后纤维化得到缓解,表明其对格雷夫斯眼眶病有积极作用。新疗法还持续减少心动过速(Tachycardia)和心肌肥大(cardiac hypertrophy)。

[0009] 本发明提供了环肽。这些环肽可用于治疗或预防由靶向甲状腺中促甲状腺素-TSH受体(TSHR)的抗体引起的疾病,尤其是格雷夫斯病和眼眶病。

[0010] 本发明提供了环肽,其由9个至最多15个氨基酸组成,并且包含SEQ ID No.1或8之

一中存在的至少9个氨基酸的氨基酸序列,或其衍生物,其中一个或两个氨基酸已被另一(another)氨基酸取代或已被除去。优选地,所述肽由10个至最多13个氨基酸组成,更优选地由11个或13个氨基酸组成。

[0011] 作为优选的实施方案,所述环肽包含

[0012] a) 氨基酸序列CHQEEDFRVTC,或其衍生物,其中一个或两个氨基酸已被另一氨基酸取代或已被除去,或

[0013] b) 氨基酸序列TKLDAVYLNKNKG,或其衍生物,其中1至3个氨基酸已被另一氨基酸取代或已被除去。

[0014] 作为更优选的实施方案,所述肽具有式(I)或(II)

[0015] 环($x_{(i)}$ CHQEEDFRVTC $z_{(j)}$) (I),

[0016] 环($x_{(k)}$ TKLDAVYLNKNKG) (II),

[0017] 其中 x 和 z 在每次出现时独立地选自一种氨基酸; i 是0至4之间的整数, j 是0至4之间的整数, $i+j \leq 4$,且 k 是0至2之间的整数,及其衍生物,其中1至3个氨基酸已被另一氨基酸取代或已被除去。

[0018] 此外,本发明提供了一种药物组合物,其包含所述环肽以及任选的药学上可接受的载体。所述环肽和所述药物组合物用于治疗、改善或预防由靶向甲状腺中促甲状腺素-TSH受体(TSHR)的抗体引起的疾病,尤其是用于治疗、改善或预防格雷夫斯病(Graves' disease)、格雷夫斯眼眶病(Graves' orbitopathy)、桥本病(Hashimoto's disease)和/或甲状腺功能亢进,以及与之相关的心血管症状。

[0019] 附图简要说明

[0020] 在本申请和附图中,本发明的肽分别表示为“P19”或“肽19”,以及“P83613mer”。

[0021] 图1A显示了包括免疫接种和治疗的研究的时间表;图1B显示了促甲状腺素(thyroid stimulating hormone, TSH)受体的示意性结构。

[0022] 图2显示了本发明的肽对甲状腺尺寸的影响。

[0023] 图3显示了本发明的肽对血清甲状腺素(T4)水平的影响。

[0024] 图4显示了在组织学制备眼眶切片后,本发明的肽对眼眶后纤维化体积的数字化分析的影响。

[0025] 图5显示了本发明的肽对心率的影响。

[0026] 图6显示了本发明的肽对抗TSHR滴度的时程的影响。

[0027] 图7显示了本发明的肽对表达TSHR的测试细胞中的cAMP刺激的影响。

[0028] 图8显示了本发明的肽19对经Ad-TSHR免疫的小鼠血清样品中的抗TSHR抗体滴度的影响。

[0029] 图9显示了本发明的肽对抗TSHR抗体滴度的离体影响,其由改进的第三代测定法中的双重方法(double approach)所测定。

[0030] 优选实施方案的描述

[0031] 本发明提供了环肽,其由9个至最多15个氨基酸组成,并且包含SEQ ID No.1或8之一中存在的至少9个氨基酸的氨基酸序列,或其衍生物,其中一个或两个氨基酸已被另一氨基酸取代或已被除去。优选地,所述肽由10个至最多13个氨基酸组成,更优选地由11个或13个氨基酸组成。作为优选的实施方案,所述环肽包含以下氨基酸序列:a)CHQEEDFRVTC,或b)

TKLDAVYLNKNKG,或其衍生物,其中1至3个氨基酸已被另一氨基酸取代或已被除去。

[0032] 作为更优选的实施方案,所述肽具有式(I)或(II)

[0033] 环($x_{(i)}$ CHQEEDFRVTC $z_{(j)}$) (I),

[0034] 环($x_{(k)}$ TKLDAVYLNKNKG) (II),

[0035] 其中 x 和 z 在每次出现时独立地选自一种氨基酸; i 是0至4之间的整数, j 是0至4之间的整数, $i+j \leq 4$,优选 $i=j=0$,且 k 是0至2之间的整数,优选 $k=0$,及其衍生物,其中一个或两个氨基酸已被另一氨基酸取代或已被除去。

[0036] 所述肽是环肽。环肽可以通过线性肽的环化获得,所述线性肽可以通过本领域已知的肽合成方法,例如固相肽合成来获得。环化可以通过共价结合的键而发生,所述键选自包含以下的组:S-S键、肽键、碳键如C-C或C=C、酯键、醚键、偶氮键、C-S-C键、C-N-C键和C=N-C键。在一个实施方案中,S-S键通过肽的两个Cys残基而形成。后者是式(I)的肽所优选的,其中优选 $i=0$ 且 $j=0$ 。如果式(I)的肽中的环化是通过肽的两个Cys残基的S-S键而发生的,则 $x_{(i)}$ 和 $y_{(j)}$ 代表了通过肽键连接至肽主链的环状肽的侧链。

[0037] 在另一个优选的实施方案中,环化通过肽键而发生。后者是式(II)的肽所优选的,其中优选 $k=0$ 。优选地,肽键通过N-末端氨基酸的NH₂基团和C-末端氨基酸的COOH基团而形成。用于此类环化的方法是本领域公知的。

[0038] 在另一个实施方案中,通过组成性氨基酸的NH₂基团和COOH基团的侧链而形成额外的键。

[0039] 以下不希望受到任何理论的束缚,本发明人出乎意料地发现,许多短环肽适用于治疗、缓解或预防由靶向甲状腺中促甲状腺素-TSH受体(TSHR)的抗体引起的疾病,尤其适用于治疗、改善或预防格雷夫斯病、格雷夫斯眼眶病和/或甲状腺功能亢进。特别地,已经发现,重复进行每4周一次的静脉内施用0.1mg/kg bw的环肽19,一种源自TSHR的亮氨酸富集结构域(LRD)的第一个圆柱环的缩短的衍生物,减少了格雷夫斯病的长期小鼠模型中的甲状腺增生。另外,从肽治疗开始后8周起,升高的甲状腺素(T₄)水平和窦性心动过速也得以降低。施用0.3mg/kg bw的环肽836 13mer(源自第8TSHR LRD的缩短的衍生物)导致这些参数的未达到统计学显著性的改善趋势,但显著改善了眼眶后纤维化。在幼稚(naive)小鼠中施用所述肽再次证实了较短的环肽本身不是免疫原性的。

[0040] 与我们之前的研究(8)相比,这些数据显示,可以设计显著缩短的衍生自TSHR表位的环肽,其仍在小鼠格雷夫斯病模型中产生相关的治疗活性。本发明背后的假设是,通过潜在活性环肽的设计使10个TSHR LRD环的3维构型足够保守(13),这最终产生24-mer至25-mer肽(8)。由于这些肽的生产是一个重大挑战,并且在长期治疗时还可能招致免疫原性的风险,因此有必要进行进一步开发。现已发现,将肽的长度减少至11-mer或13-mer的变体实际上是可行的。出乎意料的是,这些较短的变体在较小剂量下保留了活性,从而有两个变体的静脉内肽负荷可以降低十倍。

[0041] 肽19是在先前研究(8)中已研究过的衍生自第一环的环肽829的缩短版本。已经发现,肽829仅导致小的、不显著的疾病参数改善趋势。相比之下,肽19的序列衍生自相同的TSHR LRD区域,但呈现出通过二硫键(而不是通过肽主链)环化的11-mer变体,其比24-mer肽829更有效。因此,肽的环结构(例如通过C-C键合)也似乎是重要的,而不仅仅是其所衍生的氨基酸序列。

[0042] 在测试中使用了经Ad-TSHR免疫的小鼠的血清样品,离体测定了其多克隆抗TSHR抗体与TSHR-Fc的组的结合。离体添加环肽19导致了这些抗TSHR抗体滴度(titer)的高亲和力抑制,但环肽836 13-mer并不如此。相比之下,使用单克隆抗TSHR抗体M22在稍作改进的第三代测定法中测定的抗TSHR抗体滴度在体内不受肽治疗的影响。另外,在离体“类第三代”测定中研究了所述肽是否能抑制人类患者血清样品对M22的结合抑制,并且也未发现任何所研究的肽的显著影响。在这些基于M22的“类第三代”测定中,未观察到这样的影响还可能是取决于TSHR结合底物,因为这个底物并未被制造商完全公开,且其似乎衍生自猪TSHR变体。

[0043] 还研究了新型肽对格雷夫斯病的心脏表现和并发症的影响。心动过速是甲状腺功能亢进患者的疾病严重程度的可靠标志(15,16)。定期ECG登记用以检测对心率的影响。用肽19进行治疗显著降低了心动过速,而在未经处理的经TSHR免疫的小鼠中会持续发展心动过速3至9个月。

[0044] 总而言之,本文的结果显示,通过缩短的模拟TSHR LRD环的环肽来治疗格雷夫斯病小鼠模型中的临床疾病表现,显著改善了数个疾病参数。

[0045] 本发明的环肽由9个至最多15个氨基酸组成,并且包含SEQ ID No.1或8之一中存在的至少9个氨基酸的肽。氨基酸数目以及由此的一级结构长度对于本发明各种肽的生物学作用似乎是至关重要的。9个至15个氨基酸(一级结构)的环肽长度被认为是必要的,并且足以获得所报道的结果。

[0046] 据此,本发明涉及如以上描述所反映的整体肽结构。本领域技术人员还将理解,单独的氨基酸可以被另一天然存在的或合成的氨基酸取代,优选当两个氨基酸均属于同一类别的氨基酸。据此,例如,酸性氨基酸可以被另一酸性氨基酸取代,碱性氨基酸可以被另一碱性氨基酸取代,依此类推。本领域技术人员还将认识到,可以对形成本发明的肽的一个或几个氨基酸进行修饰。据此,本文所用的任何氨基酸优选还代表其修饰形式。例如,本文所用的丙氨酸残基还包含修饰的丙氨酸。此类修饰尤其可以是甲基化或酰化等,由此此类修饰或修饰的氨基酸优选包含在本发明中,只要修饰的氨基酸,更尤其是含有所述修饰的氨基酸的肽仍然具有如本文所定义的功能活性,更尤其具有本发明的功能活性。用于确定这样的肽,即包含一个或数个修饰的氨基酸的肽,是否满足这一要求的各个测定法是本领域技术人员已知的,且尤其是在本文中,特别是在实施例中也已有描述。

[0047] 本发明还包含所述肽的衍生物,例如含有以下生理性有机和无机酸的盐类:如HCl、H₂SO₄、H₃PO₄、苹果酸、富马酸、柠檬酸、酒石酸、乙酸和三氟乙酸。

[0048] 根据本领域的实践,肽的序列显示为从N端至C端,其中N端在各个描绘的氨基酸序列的左侧,C端在右侧。本文所述的肽是环肽,其不具有末端,因为它们共价连接的。

[0049] 在一个优选的实施方案中,氨基酸,例如x和z的氨基酸,选自酸性、碱性、中性和/或脂肪族氨基酸。优选地,酸性氨基酸是选自包含Asp、Asn、Glu和Gln的组的氨基酸;优选地,碱性氨基酸是选自包含Arg和Lys的组的氨基酸;优选地,中性氨基酸是选自包含Gly、Ala、Ser、Thr、Val、Leu、He的组的氨基酸;优选地,脂肪族氨基酸是选自包含Gly、Ala、Ser、Thr、Val、Leu、He、Asp、Asn、Glu、Gln、Arg、Lys、Cys和Met的组的氨基酸。

[0050] 如本文所用,一个特定氨基酸,例如碱性氨基酸,被一个不同的氨基酸取代,所述不同的氨基酸选自各自的特定氨基酸组,例如包含碱性氨基酸的组,这个表达优选意指所

述特定氨基酸被另一个即不同的氨基酸所取代,前提是这个不同的氨基酸是所述各自的特定氨基酸组的一部分。

[0051] 可以将本发明的环肽(本文也称为“活性化合物”)加入适合于施用的药物组合物中。此类组合物通常包含环肽和药学上可接受的载体。如本文所用,用语“药学上可接受的载体”包括与药物施用相容的溶剂、分散介质、包衣、抗细菌和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂。可以将其他活性化合物掺入组合物中。

[0052] 将本发明的药物组合物配制成与其希望的施用途径相容。优选的施用途径包括胃肠道外施用,例如静脉内或动脉内施用。用于胃肠道外的溶液或悬浮液:无菌稀释剂,例如注射用水、盐溶液、不挥发油、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其他合成溶剂;抗细菌剂,例如苯甲醇或对羟基苯甲酸甲酯;抗氧化剂,例如抗坏血酸或亚硫酸氢钠;螯合剂,例如乙二胺四乙酸;缓冲液,例如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐,以及用于调节张力的试剂,例如氯化钠或右旋糖。可以用酸或碱,例如盐酸或氢氧化钠来调节pH。可以将胃肠道外制剂封入安瓿瓶、一次性注射器或由玻璃或塑料制成的多个剂量小瓶中。

[0053] 适用于注射用途的药物组合物包括无菌水溶液或分散液,以及用于临时制备无菌注射溶液或分散液的无菌粉末。对于静脉内施用,合适的载体包括生理盐水、Cremophor EL (BASF; Parsippany, N. J.) 或磷酸盐缓冲液(PBS)。在所有情况下,所述组合物必须是无菌的,并且流动性应达到易于注射的程度。它在生产和储存条件下必须是稳定的,并且必须加以保存以防止微生物例如细菌和真菌的污染。

[0054] 载体可以是溶剂或分散介质,其包含例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇和液态聚乙二醇)及其混合物。例如,可以通过使用诸如卵磷脂的包衣,通过维持所需的粒径(在分散液的情况下),以及通过使用表面活性剂,来维持适当的流动性。可以通过各种抗细菌和抗真菌剂,例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、抗坏血酸、硫柳汞等,来抑制微生物的作用。在许多情况下,优选在组合物中包含等渗剂,例如糖类,多元醇如甘露醇、山梨糖醇,氯化钠。

[0055] 可以根据需要通过将所需量的活性化合物与上述一种成分或多种成分的组合一起加入合适的溶剂中,然后进行过滤灭菌,以制备无菌注射溶液。通常,通过将活性化合物加入含有基本分散介质和上述所需其他成分的无菌媒介物中,来制备分散液。对于用于制备无菌注射溶液的无菌粉末而言,优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥,其从其先前的无菌过滤溶液中产生活性成分和任何其他所需成分的粉末。

[0056] 以剂量单位形式配制口服或胃肠道外组合物以使施用方便且剂量均匀,这尤其有益。本文所用的剂量单位形式是指适合作为单位剂量用于待治疗受试者的物理上离散的单位。每个单位含有预定量的活性化合物,其经计算可与所需的药物载体一起产生期望的治疗效果。

[0057] 活性成分可以以下范围存在于药物组合物中: $1\mu\text{g}/\text{kg}$ 至 $100\text{mg}/\text{kg}$, 优选 $10\mu\text{g}/\text{kg}$ 至 $1000\mu\text{g}/\text{kg}$, 例如约 $100\mu\text{g}/\text{kg}$, 这取决于施用形式, 优选 s. c. 或 i. v. 施用。合适的给药间隔是一周到三个月, 例如每两到四周。

[0058] 在本发明中,所述肽和所述药物组合物用于治疗如上定义的任何疾病和患者组,包括使用上述化合物治疗、改善或预防这些患者中由靶向甲状腺中促甲状腺素-TSH受体(TSHR)的抗体引起的疾病。另外,本发明的肽可以用于制备用于治疗 and/或预防如上定义的

与药物组合物有关的任何疾病和患者组的药物。

[0059] 最后,本发明涉及如上定义的用于治疗患者的方法,其中患者需要这样的治疗,并且其中所述方法包括向所述患者施用药学有效量的本发明的肽,或本文所公开的药物组合物或药物。

[0060] 优选地,治疗有效剂量是指减轻受试者症状的活性成分的量,这可以由本领域技术人员进行常规测试来确定。用于本发明目的的“患者”,即本发明的化合物或本发明的药物组合物的施用对象,包括人以及其他动物和生物。因此,所述化合物、药物组合物和方法适用于人类治疗和兽医应用或与其相关,在最优选的实施方案中,患者是人。

[0061] 参考文献

[0062] 1. Weetman AP. Graves' disease. *N Engl J Med* 2000;34:1236-1248.

[0063] 2. Sundaresh V, Brito JP, Wang Z, Prokop LJ, Stan MN, Murad MH, Bahn RS. Comparative effectiveness of therapies for Graves' hyperthyroidism: a systematic review and network meta analysis. *J Clin Endocrinol Metab* 2013;98:3671-3677.

[0064] 3. Abraham-Nordling M, Törring O, Hamberger B, Lundell G, Tallstedt L, Calissendorf J, Wallin G. Graves' disease: a long-term quality of life follow up of patients randomized to treatment with antithyroid drugs, radioiodine or surgery. *Thyroid* 2005;15:1279-1285.

[0065] 4. Bahn RS. Graves' ophthalmopathy. *N Engl J Med* 2010;362:726-738.

[0066] 5. Stan MN, Garrity JA, Carranza Leon BG, Prabin T, Bradley EA, Bahn RS. Randomized Controlled Trial of Rituximab in Patients With Graves' Orbitopathy. *J Clin Endocrinol Metab* 2015;100:432-441.

[0067] 6. Larche M, Wraith DC. Peptide-based therapeutic vaccines for allergic and autoimmune diseases. *Nature Med* 2005;11(4):S69-S76.

[0068] 7. Soyka M, van de Veen W, Holzmann D, Akdis M, Akdis CA. Scientific foundations of allergen-specific immunotherapy for allergic diseases. *Chest* 2014;146:1347-1357.

[0069] 8. Holthoff HP, Li Z, Fassbender J, Reimann A, Adler K, Münch G, Ungerer M. Cyclic peptides for effective treatment in a long-term model of Graves' disease and orbitopathy. *Endocrinology* 2017;158(7):2376-2390.

[0070] 9. Holthoff HP, Göbel S, Li ZM, Fassbender J, Reimann A, Zeibig S, Lohse MJ, Münch G, Ungerer M. Prolonged TSH receptor A subunit immunization of female mice leads to a long-term model of Graves' disease, tachycardia and cardiomyopathy. *Endocrinology* 2015;156:1577-1589.

[0071] 10. Ungerer M, Fassbender J, Li Z, Münch G, Holthoff HP. Review of mouse models of Graves' disease and orbitopathy - novel treatment by induction of tolerance. *Clin Rev Allerg Immunol* 2017;52(2):182-193.

[0072] 11. Parmentier M, Libert F, Maenhaut C, Lefort Gerard C, Peret J, Van Sande J, Dumont JE, Vassart G. Molecular cloning of the thyrotropin

receptor. *Science* 1989; 246: 1620-1622.

[0073] 12. Nagayama Y, Kaufman KD, Seto P, Rapoport B. Molecular cloning, sequence and functional expression of the cDNA for the human thyrotropin receptor: *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 165: 1184-1190.

[0074] 13. Nunez Miguel R, Sanders J, Chirgadze DY, Furmaniak J, Rees Smith B. Thyroid stimulation autoantibody M22 mimics TSH binding to the TSH receptor leucine rich domain: a comparative structural study of protein-protein interactions. *J Mol Endocrin* 2009; 42: 381-395.

[0075] 14. Neumann S, Place RF, Krieger CC, Gershengorn MC. Future prospects for the treatment of Graves' hyperthyroidism and eye disease. *Horm Metab Res* 2015; 47: 789-796.

[0076] 15. Klein I, Ojamaa K. Thyroid hormone and the cardiovascular system. *New Engl J Med* 2001; 344: 501-509.

[0077] 16. von Olshausen K, Bischoff S, Kahaly G, Mohr-Kahaly S, Erbel R, Beyer J, Meyer J. Cardiac arrhythmias and heart rate in hyperthyroidism. *Am J Cardiol* 1989; 63: 930-933.

[0078] 17. Blank M, Shoenfeld Y. B cell targeted therapy in autoimmunity. *J Autoimmunity* 2007; 28: 62-68.

[0079] 现在将通过以下附图和实施例进一步说明本发明。

[0080] 图1A显示了免疫接种、施用治疗性肽和测量的时程。在第0周开始免疫接种,在第11周开始治疗。“-▶”(实心箭头)表示i.m.免疫接种/ECG以测量心率;“→”(空心箭头)表示i.v.施用肽/媒介物(NaCl);*表示抽血;°表示测定血清样品中的T4和/或抗TSHR抗体;#表示最终的ECG记录/甲状腺和眼眶组织病理学。

[0081] 图1B显示了促甲状腺素(TSH)受体的结构图。本发明的环肽衍生自TSHR的细胞外A亚基的亮氨酸富集重复结构域的第八环结构,如深色所标记的。

[0082] 图2显示了宏观测量的肽治疗对甲状腺尺寸的影响。在实验结束时测量甲状腺尺寸。测量在Ad-TSHR免疫的小鼠中进行,这些小鼠每4周一次注射媒介物(0.9%NaCl,“格雷夫斯氏无治疗(Graves' no therapy)”,n=10只小鼠),或施用0.3mg/kg体重的肽836 13-mer(11只小鼠)或0.1mg/kg体重的肽19(“P19”,10只小鼠)。此外,研究了年龄相匹配的免疫学幼稚的未免疫小鼠(“健康的”,10只动物)。甲状腺平均尺寸显示为mm³和SEM。

[0083] 通过AVOVA以及随后的事后LSD检验(post hoc LSD testing)来检测各组之间的差异。与仅用NaCl处理的经TSHR免疫的组(“格雷夫斯氏无治疗”)相比,*p<0.05,**p<0.001。

[0084] 图3显示了肽治疗对血清甲状腺素(T4)水平的影响。测量在Ad-TSHR免疫的小鼠中进行,这些小鼠每4周一次注射媒介物(0.9%NaCl,“格雷夫斯无治疗”,n=10只小鼠),或施用0.3mg/kg体重的肽836 13-mer(11只小鼠)或0.1mg/kg体重的肽19(“P19”,10只小鼠)。此外,研究了年龄相匹配的免疫学幼稚的未免疫小鼠(“健康的”,10只动物)。数据显示为平均值±SEM。随时间的显著性通过给定时间点各组的方差分析(ANOVA)来检测,且受一个组内重复测量值的ANOVA控制,然后进行事后LSD检验。与仅用NaCl处理的经TSHR免疫的组(“格

雷夫斯氏无治疗”)相比,* $p < 0.05$,** $p < 0.01$ 。

[0085] 图4显示了在组织学制备眼眶切片后,肽治疗对眼眶后纤维化体积(mm^3 胶原蛋白)的数字化分析的影响。在所有可得动物的组织学切片中评估了肽治疗对眼眶后纤维化严重程度的影响。测量在对Ad-TSHR免疫的小鼠中进行,这些小鼠经过每4周一次注射媒介物(0.9%NaCl,“格雷夫斯氏无治疗”, $n=10$ 只小鼠),或施用0.3mg/kg体重的肽836 13-mer(11只小鼠),或0.1mg/kg体重的肽19(“P19”,10只小鼠)。此外,研究了年龄相匹配的免疫学幼稚的未免疫小鼠(“健康的”,10只动物)。通过对所有切片的数字化图像分析以及连续整合(consecutive integration)所评估的,每个全眼眶(左和右)的平均总纤维化体积以SEM显示。通过ANOVA检测了各组之间的差异,与仅用NaCl处理的经TSHR免疫的组(“格雷夫斯氏无治疗”)相比,* $p < 0.01$,** $p < 0.001$ 。

[0086] 图5显示了肽治疗在不同时间对心率的影响。对所有动物的心率进行评估。测量在Ad-TSHR免疫的小鼠中进行,这些小鼠每4周一次注射媒介物(0.9%NaCl,“格雷夫斯氏无治疗”, $n=10$ 只小鼠),或施用0.3mg/kg体重的肽83613-mer(11只小鼠),或0.1mg/kg体重的19(“P19”,10只小鼠)。此外,研究了年龄相匹配的免疫学上幼稚的未免疫小鼠(“健康的”,10只动物)。数据表示为平均值 \pm SEM。随时间的显著性通过给定时间点各组的方差分析(ANOVA)来检测,且受一个组内重复测量值ANOVA,然后进行事后LSD检验。与仅用NaCl处理的经TSHR免疫的组(“格雷夫斯氏无治疗”)相比,* $p < 0.05$,** $p < 0.005$ 。

[0087] 图6显示了所述肽对抗TSHR滴度的时程的影响,其通过第三代ELISA来测量,其中使用血清样品来测定对M22结合包被板的抑制。测量在Ad-TSHR免疫的小鼠中进行,这些小鼠每4周一次注射媒介物(0.9%NaCl,“格雷夫斯氏无治疗”, $n=10$ 只小鼠),或施用0.3mg/kg体重的肽83613-mer(11只小鼠),或0.1mg/kg体重的肽19(“P19”,10只小鼠)。此外,研究了年龄相匹配的免疫学幼稚的未免疫小鼠(“健康的”,10只动物)。数据表示为平均值 \pm SEM。随时间的显著性通过在给定时间点各组的方差分析(ANOVA)来检测,且受一个组内重复测量值的ANOVA控制,然后进行事后LSD检验。与仅用NaCl处理的经TSHR免疫的组(“格雷夫斯氏无治疗”)相比,* $p < 0.001$ 。

[0088] 图7显示了肽治疗对表达TSHR的测试细胞中的cAMP刺激的影响,这在实验期间取自小鼠的血清中测定。在表达人TSHR的CHO细胞中评估了肽治疗对抗TSHR抗体刺激cAMP产生的能力的影响。测量在Ad-TSHR免疫的小鼠中进行,这些小鼠每4周一次注射媒介物(0.9%NaCl,“格雷夫斯氏无治疗”, $n=10$ 只小鼠),或施用0.3mg/kg体重的肽836 13-mer(11只小鼠)或0.1mg/kg体重的肽19(10只小鼠)。此外,研究了年龄相匹配的免疫学幼稚的未免疫小鼠(“健康的”,10只动物)。数据表示为平均值 \pm SEM。通过ANOVA以及随后的事后LSD来检测各组之间的差异。与仅用NaCl处理的经TSHR免疫的组(“格雷夫斯氏无治疗”)相比,* $p < 0.01$ 。

[0089] 图8显示了本发明的肽19对经Ad-TSHR免疫的小鼠的抗TSHR抗体滴度的离体影响。每次测量均在4个样品中进行。结果显示为光密度(OD)450值和平均值标准误差(SEM)。

[0090] 图9显示了本发明的肽对抗TSHR抗体滴度的离体影响,其在改进的第三代测定中以双重方法测定(通过与单克隆抗TSHR抗体M22竞争来检测)。每个测量均在4个样品中进行。结果显示为未经处理的对照的百分比和平均值标准误差(SEM)。通过在各组之间进行方差分析(ANOVA)以及随后的事后LSD检验来检测显著性。各组之间没有统计学上相关的差

异。相对于经TSHR免疫的无治疗, **p<0.01。

实施例

[0091] 材料与amp;方法

[0092] 重组腺病毒

[0093] 如前所述(9), 将编码人TSH受体的前289个氨基酸的DNA序列(11, 12) 克隆到Microbix Admax™腺病毒表达系统中。使用HEK293A细胞进行增殖, 直到首次病毒斑可见。这个系统产生了重组的复制缺陷型E1和E3缺陷型腺病毒5。将仅含报告基因GFP的对照腺病毒(Ad-GFP)以相同的方式进行扩增和纯化。

[0094] 环肽的合成

[0095] 本发明的环肽衍生自与TSHR亮氨酸富集结构域的10个圆柱环(如表1所概述)中的第一个和第八个环具有结构同源性的肽。

[0096] 表1: TSHR亮氨酸富集结构域的圆柱环区域的TSHR-肽序列

肽 # (衍生自 TSHR

序列 aa):

	829	26-49	SPPCECHQEEDFRVTCKDIQRIPS	(SEQ ID No.1)
	830	50-73	LPPSTQTLKLI ETHLRTIPSHAFS	(SEQ ID No.2)
	831	73-89	SNLPNISRIYVSIDVTL	(SEQ ID No.3)
[0097]	832	98-121	YNLSKVTHIEIRNTRNLTYIDPDA	(SEQ ID No.4)
	833	122-145	LKELPLLKFLGIFNTGLKMFDPDLT	(SEQ ID No.5)
	834	146-163	KVYSTDIFFILEITDNP	(SEQ ID No.6)
	835	170-193	NAFQGLCNETLTLKLYNNGFTSVQ	(SEQ ID No.7)
	836	194-217	GYAFNGTKLDAVYLNKNKYLTVID	(SEQ ID No.8)
	837	218-237	KDAFGGVYSGPSLLDVSQTS	(SEQ ID No.9)
	838	242-265:	PSKGLEHLKELIARNTWTLKKLPL	(SEQ ID No.10)

[0098] 具体地, 13-mer的肽836, 在本文中也称为“P836 13-mer”(本发明的肽)复制了第八个圆柱环的一部分。“肽19”或“P19”(本发明的肽)是肽829(其设计为类似于TSHR LRR的第一个环)的缩短版本。

[0099] 所述蛋白是由Biosyntan Berlin根据基于苄氧羰基(Fmoc)树脂的氨基酸链延伸以及随后的头到尾环化的所述方法合成的。使Fmoc氨基酸或Fmoc二肽结合到2-氯三苯甲基氯树脂(RAPP Polymere GmbH, 德国)上, 产生0.30mmol/g的树脂负载量。通过用30%哌啶/N,N-二甲基甲酰胺(DMF, 5+12分钟)进行解封并与DMF中的3当量的Fmoc-氨基酸/0-(7-氮杂苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲-六氟磷酸盐(HATU)(Fmoc-amino acid/0-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium-hexafluorophosphate)/6当量的N-甲基吗啉(N-methylmorpholine, NMM)进行偶联(双偶联, 2x30分钟)的标准循环, 来完成肽合成。在用20%六氟异丙醇(HFIP)/DCM(2x 20分钟)从树脂上裂解后, 将分离出的粗肽

用DMF中的1.5当量的7-氮杂苯并三唑-1-基氧基)三吡咯烷基六氟磷酸盐(PyAOP)(7-Azabenzotriazol-1-yloxy) tripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate)/3当量的二异丙基乙胺(DIEA)进行环化过夜,蒸发溶剂,并用三氟乙酸(TFA)/水/硫代苯甲醚(TIS)(95:5:3)将粗肽解封2小时。然后,肽通过HPLC方法纯化至95%,并通过MALDI-TOF质谱进行分析。这个质量控制再次确认了氨基酸已正确地包含在肽中,并且从分子量的实验测定值与理论预测值可明显看出其环化作用:例如,对于肽836 13-mer,分子量观测值与预测分子量为1446.2和1445.7,而对于肽19,则为1364.6和1363.5。

[0100] 免疫小鼠的研究

[0101] 雌性BALB/c小鼠来自德国苏兹菲尔德的查尔斯河(Charles River, Sulzfeld, Germany),并适应至少一周的时间,以在6周龄开始实验。将每组十只动物在标准的饲养条件($23 \pm 2^\circ\text{C}$, $55 \pm 10\% \text{RH}$)下饲养在GR1800DD笼中(Tecniplast[®])。所有动物实验均由德国慕尼黑上巴伐利亚行政区(Regierung von Oberbayern)的当地动物福利局和伦理委员会批准(编号55.2-1-54-2531-25-12),并按照世界医学协会的指南(赫尔辛基宣言)和欧盟委员会的指南(2010/63/EU指令)进行实验。遵守了所有动物护理准则。

[0102] 小鼠接受了 10^{10} 个噬斑形成单位(pfu)的携带TSHR基因的A-亚基的腺病毒。此外,研究了年龄相匹配的免疫学幼稚的小鼠(10只动物)用于比较。为进行免疫接种,将小鼠用异氟烷麻醉(导入为5%,维持在1.5-2%),并置于加热垫上。对左右股骨肌肉分别注射 $25\mu\text{l}$ 腺病毒。

[0103] 将小鼠移至约束器以进行抽血。用27G针头从左或右尾静脉中抽出 $100\mu\text{l}$ 血液。在室温下将血液以 2400g 离心15分钟,并将血清储存在 -20°C 。在研究结束时(安乐死之前),用1ml注射器和24G针头在深麻醉($170\text{mg}/\text{kg}$ 氯胺酮+ $17\text{mg}/\text{kg}$ 甲苯噻嗪)下进行心内抽血,并如上所述进行处理。

[0104] 研究方案使用了3次每3周一次的免疫接种(“起始”),然后是进一步常规每4周一次加强免疫直到第9次免疫接种为止的“维持”阶段,如前所述(9)。在开始研究之前,规定了严格的纳入和排除标准:如果经Ad-TSHR免疫的小鼠的T4甲状腺素值在第11周比第0周的基础测量值高至少25%,则将小鼠纳入进一步研究。因此,在随机分组之前,25%的免疫小鼠被排除在外,因为它们没有达到这个阈值。并且,所有组的平均T4值和基础心率必须一致地改变。将小鼠随机分配到治疗组,隐瞒分配情况,并且兽医和所有其他处理动物或分析结果的人员对治疗组完全不知情。在第4次免疫接种后1周,通过IV注射到尾静脉中给予治疗(肽或0.9%NaCl媒介物),然后以每4周一次的间隔持续治疗,如前所述(8)。详细的免疫接种时间如图1A所示。结果中报告了所有在随机分组后被排除的动物。在将小鼠麻醉以进行免疫接种时,用心电图(ECG放大器模块,Harvard Apparatus,Hugo Sachs electronics)监测其心脏功能,并用可以通过ECG读数确定心率的特殊软件(Haemodyn,Hugo Sachs electronics)记录下来。还在研究结束时,在对动物实施安乐死以进行组织学检查之前,在麻醉下进行ECG。用免疫测定试剂盒(#T4044T-100,Calbiotech Inc,Austin,CA)以双重测定来测定总甲状腺素(T4)。

[0105] 组织学分析

[0106] 安乐死后,在立体显微镜下解剖甲状腺,如前所述(8)。眼眶切片在4x物镜(Axioscope,Zeiss)下观察,用Axiovision数码cam系统捕获,并以 2560×1920 像素分辨率

记录。对于每个新视野都调整焦距,但光照条件保持不变。所有切片均以盲法进行评估。

[0107] 眼眶外脂肪组织和眼眶外肌肉 (EOM) 区域中的纤维化区域以绿色来指示。使用基于像素区域扩展的Adobe Photoshop软件CS5版本的发光工具,对绿色像素进行数字化图像分析。为了校正染色之间的可能偏差,将每个切片中各眼眶骨的绿色染色强度作为每个测量的内部标准。因此,对整个眼眶切片中的所有纤维化组织进行定量,并最终将所有切片的结果相加,以得出每个所研究的眼眶的总纤维化体积(mm^3) (考虑切片之间的间隔厚度为0.63mm)。

[0108] 小鼠血清的测量

[0109] 在免疫接种开始前(基础值),初次免疫接种后56天,初次免疫接种后133天,初次免疫接种后189天以及在实验结束时,测定测试细胞中抗TSHR自身抗体滴度和抗体刺激TSHR依赖性cAMP水平的效力。为此,使用了以下2种不同的测定法:

[0110] 1) “第三代测定”:通过市售的第三代酶免疫测定法(由RSR Limited, Avenue Park, Pentwyn, Cardiff, U.K. 提供)来检测针对TSHR的抗体,其中衍生自人格雷夫斯病患者的M22单克隆抗体和血清抗体竞争所固定的TSHR上的结合位点。所述测定法还在用于ECLIA的Roche的Cobas^R测定法(04388790)中使用,但稍作改动。根据制造商的说明,使用30 μl 1:10 (PBS) 稀释的血清以至少双重测定进行测定。

[0111] 2) 通过测量表达人TSHR的中国仓鼠卵巢(CHO)细胞JP2626(由比利时布鲁塞尔的Gilbert Vassart博士慷慨提供)中的环单磷酸腺苷(cAMP)的产生,来分析甲状腺功能亢进小鼠血清中的促甲状腺抗体。将CHO细胞接种到96孔板中(每孔30000个细胞),并在含有2%胎牛血清的Dulbecco改良的Eagle培养基(DMEM, Invitrogen Ltd)中孵育24小时。然后,移除DMEM,并将小鼠血清以1:8稀释在40 μl 补充1.5% BSA和0.5mM异丁基-1-甲基黄嘌呤(Sigma-Aldrich, Pole, UK)的HBSS缓冲液(20mM Hepes, 1.26mM CaCl_2 , 5.33mM KCl, 0.44mM KH_2PO_4 , 0.5mM MgCl_2 , 0.4mM MgSO_4 , 4.2mM NaHCO_3 , 5.6mM葡萄糖和222mM蔗糖, pH7.2)中,并添加到每个孔中。在37 $^\circ\text{C}$ 下孵育2.5小时后,通过竞争性免疫测定ELISA(#EMSCAMPL, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)一式两份测定培养基中的cAMP释放。

[0112] 体外研究

[0113] 为了研究所述肽在体外与抗TSHR抗体的直接结合,将ELISA板用含0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ TSHR-Fc的包被溶液包被1小时。所有后续步骤均在室温(RT)下进行,并在微量滴定板振荡器上进行孵育。将包被的板用PBST洗涤3次,用100 μl /孔的封闭溶液(含0.1% Tween, 3%奶粉的PBS)封闭1小时,然后再次洗涤。然后将封闭的ELISA板和与稀释于PBST中的不同浓度的肽19预孵育(30分钟)的多克隆小鼠抗TSHR抗体一起孵育1小时。用PBST洗涤后,将ELISA板与100 μl /孔的标记有POD的抗小鼠IgG检测抗体孵育1小时。洗涤后,通过与100 μl /孔的TMB底物一起孵育直至达到约1到2的最大光学密度(OD),来检测POD。最后,用100 μl /孔的终止溶液终止比色反应,并用Tecan Infinite F 200酶标仪在450nm波长下以595nm为参考波长来测定OD。

[0114] 还在稍作改动的第三代测定法中研究了所述肽:将30 μl 稀释的单克隆M22-Bio抗体与30 μl 稀释的肽(在PBS中终浓度为100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)混合,并添加到预包被有TSHR的微量滴定板中。在室温下孵育2小时后,按照制造商的说明继续操作。

[0115] 幼稚小鼠中的研究

[0116] 使BALB/c小鼠适应至少一周,以在12周龄时开始实验。如前所述地饲养动物。这项研究由德国慕尼黑上巴伐利亚行政区(Regierung von Oberbayern)的当地动物福利局和伦理委员会批准(编号55.2-1-54-2532.0-32-15),并按照欧盟委员会指南进行实验。

[0117] 通过IV注射到这些幼稚小鼠(每组n=6)的尾静脉来给予所述肽(1mg/kg体重)或NaCl媒介物对照,并然后按4周一次的间隔连续给予6个月,如前所述用于免疫小鼠中的治疗研究。以相同间隔采集血清样品。

[0118] 统计学

[0119] 使用SPSS软件(版本19),通过ANOVA、随后是事后LSD(最小显著差)检验或学生t检验(合适情况下),分析各组之间的差异以对各组进行比较。为比较一组内的不同时间的值,在合适情况下使用用于重复测量的ANOVA(RM-ANOVA)。

[0120] 结果

[0121] 环肽的选择

[0122] 合成了氨基酸序列和三级结构衍生自TSHR的亮氨酸富集结构域(LRD)的环肽-(参见上述表1)。

[0123] 短肽836是具有基于第八TSHR LRD环的序列TKLDAVYLNKNGK(SEQ ID No.11)的13mer环肽,且肽19(11-mer)具有基于TSHR LRD的第一个环的序列CHQEEDFRVTC(SEQ ID No.12)。

[0124] 在一些初步研究中,通过研究这些肽对主要结果参数的影响来评估它们的最佳剂量。因此,确定了0.3mg/kg体重的肽836 13-mer以及0.1mg/kg体重的肽19产生最佳结果。因此,选择这些剂量进行随机、盲化的主要研究-这些结果如下所示。在随机分组后不将动物过早地从研究中拿除,并且对所有动物均完成预先规定的方案。结果反映了所有随机动物的所有值的各平均值。

[0125] 甲状腺尺寸,由一系列切片测定

[0126] 甲状腺体积(mm³)由整个切割区域(5至10张玻片,取决于甲状腺的相应大小)的每个切片的面积之和乘以0.5mm的切片厚度得出。这个宏观研究显示,与健康小鼠组相比,已接受9次Ad-TSHR免疫接种的小鼠的甲状腺尺寸明显增加(参见图2)。相比之下,经肽19处理的动物显示出甲状腺尺寸的显著减少,而用836 13-mer处理则导致尺寸减小的趋势但没有达到统计学显著性。

[0127] 甲状腺素血清水平的测定

[0128] 在研究开始时各组之间的甲状腺素(T4)水平没有差异,而在第11周时(治疗开始,图3),经Ad-TSHR免疫的组中的符合条件的动物的平均T4水平显著高于对照组。治疗开始后,经肽19处理的动物显示出逐渐降低的T4水平。在经肽19处理的组中,这些值甚至恢复为正常值。相比之下,经肽836 13-mer处理的小鼠表现出未达到统计学显著性的趋势。

[0129] 眼眶的病理组织学变化

[0130] 在眼眶连续切片后进行眼眶后纤维化的组织学研究。在经9次AdTSHR处理的小鼠中,在数字化图像分析下观察到眼眶后纤维化的显著增加,其在经836 13-mer处理的小鼠中显著减少,而在经肽19处理的小鼠中观察到未达到统计学显著性的趋势(图4)。

[0131] 用ECG测定心率

[0132] 从第三次免疫接种开始,在甲状腺功能亢进的经Ad-TSHR免疫的组中观察到心率

的显著增加(图5)。相比之下,幼稚的健康组的心率仅在年纪较大时略有增加,但没有显著变化。

[0133] 连续进行Ad-TSHR免疫时,在甲状腺功能亢进的媒介物处理组中观察到心率的进一步强烈上升。相比之下,经肽19处理的动物表现出一些较大的变化,但在之后的时间点静息心率显著降低。相比之下,经肽836 13-mer处理的小鼠显示出心率降低的趋势,但未达到统计学显著性。

[0134] 抗TSHR抗体的滴度和在测试细胞中刺激cAMP的能力

[0135] 通过研究各小鼠血清抑制格雷夫斯病患者单克隆抗体M22结合TSHR的能力,从血清样品中确定了抗TSHR抗体(“第三代ELISA”)。在所有经Ad-TSHR免疫的动物中均检测到高度显著的滴度(图6)。与之前的研究一样,各组之间的体内抗TSHR滴度没有统计学上的显著差异。

[0136] 此外,将这些抗体的刺激活性测定为小鼠血清样品诱导受试细胞中TSHR依赖性cAMP水平增加的能力(图7)。几乎所有经TSHR免疫的小鼠中的抗TSHR抗体均显示在表达TSHR的测试细胞中刺激cAMP的能力。最大的可诱导的cAMP水平显示出相当大的变化。肽治疗不会影响这些TSHR依赖性cAMP的平均形成。

[0137] 体外研究:ELISA

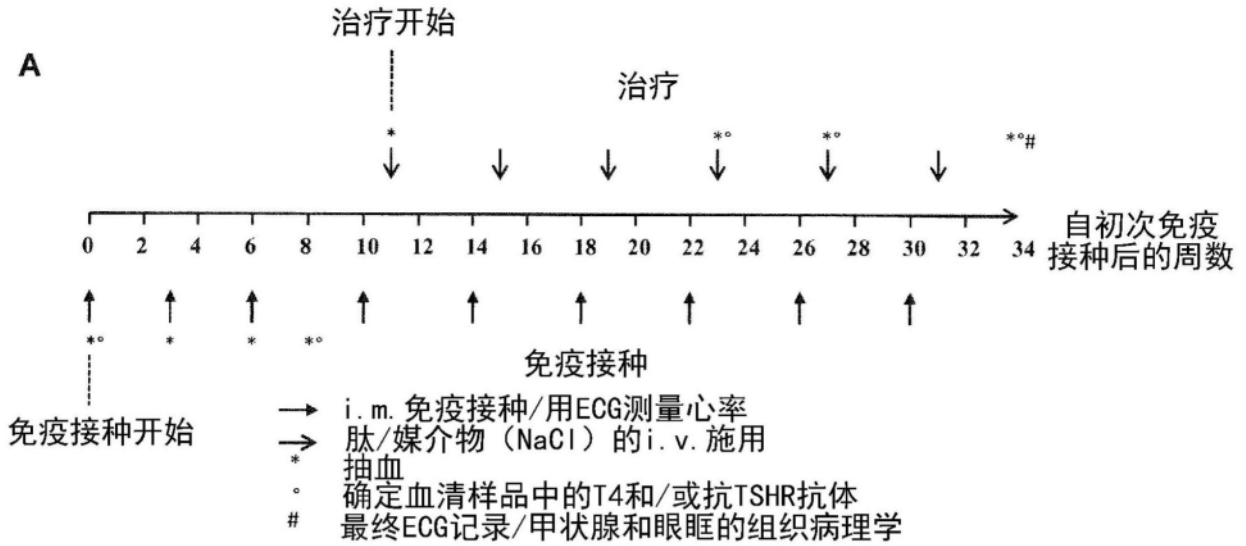
[0138] 为了表征所述环肽的离体/体外作用,我们进行了2次ELISA测定。与在典型的第3代体内测定中观察到的所有肽均缺乏抑制作用相反(图6),我们在体外测定中发现了肽19的明显抑制作用:当将其添加到经Ad-TSHR免疫的小鼠的血清中时,肽19以约20nmol/L的低IC50值有效地抑制了其中所含的多克隆抗TSHR抗体与包被的TSHR-Fc的结合(图8)。然而,对于肽83613-mer,未观察到这些离体作用。

[0139] 进一步在离体“类第三代”测定中研究了所述肽是否能够抑制人类患者血清样品对M22的结合抑制。结果如图9所示:肽组(终浓度:100µg/mL)与对照组之间的抗TSHR抗体滴度没有差异。

[0140] 免疫学幼稚的小鼠的研究

[0141] 所有免疫学幼稚的小鼠均良好地耐受了1mg/kg bw的环肽836 13-mer、肽19或媒介物(NaCl)的6次每月施用—未观察到病理学临床发现。任何经肽处理的动物在6个月均未观察到抗TSHR抗体的产生—所有测得的滴度均低于背景,因此没有记录任何对任一个肽的免疫应答。在经肽处理的组和媒介物处理组之间没有统计学上的显著差异(通过t-检验或ANOVA评估)。

- [0039] <210> 4
- [0040] <211> 24
- [0041] <212> PRT
- [0042] <213> 人工
- [0043] <220>
- [0044] <223> 衍生自促甲状腺素-TSH受体(TSHR)的氨基酸序列
- [0045] <400> 4
- [0046] Tyr Asn Leu Ser Lys Val Thr His Ile Glu Ile Arg Asn Thr Arg Asn
- [0047] 1 5 10 15
- [0048] Leu Thr Tyr Ile Asp Pro Asp Ala
- [0049] 20
- [0050] <210> 5
- [0051] <211> 24
- [0052] <212> PRT
- [0053] <213> 人工
- [0054] <220>
- [0055] <223> 衍生自促甲状腺素-TSH受体(TSHR)的氨基酸序列
- [0056] <400> 5
- [0057] Leu Lys Glu Leu Pro Leu Leu Lys Phe Leu Gly Ile Phe Asn Thr Gly
- [0058] 1 5 10 15
- [0059] Leu Lys Met Phe Pro Asp Leu Thr
- [0060] 20
- [0061] <210> 6
- [0062] <211> 17
- [0063] <212> PRT
- [0064] <213> 人工
- [0065] <220>
- [0066] <223> 衍生自促甲状腺素-TSH受体(TSHR)的氨基酸序列
- [0067] <400> 6
- [0068] Lys Val Tyr Ser Thr Asp Ile Phe Phe Ile Leu Glu Ile Thr Asp Asn
- [0069] 1 5 10 15
- [0070] Pro
- [0071] <210> 7
- [0072] <211> 24
- [0073] <212> PRT
- [0074] <213> 人工
- [0075] <220>
- [0076] <223> 衍生自促甲状腺素-TSH受体(TSHR)的氨基酸序列
- [0077] <400> 7



B

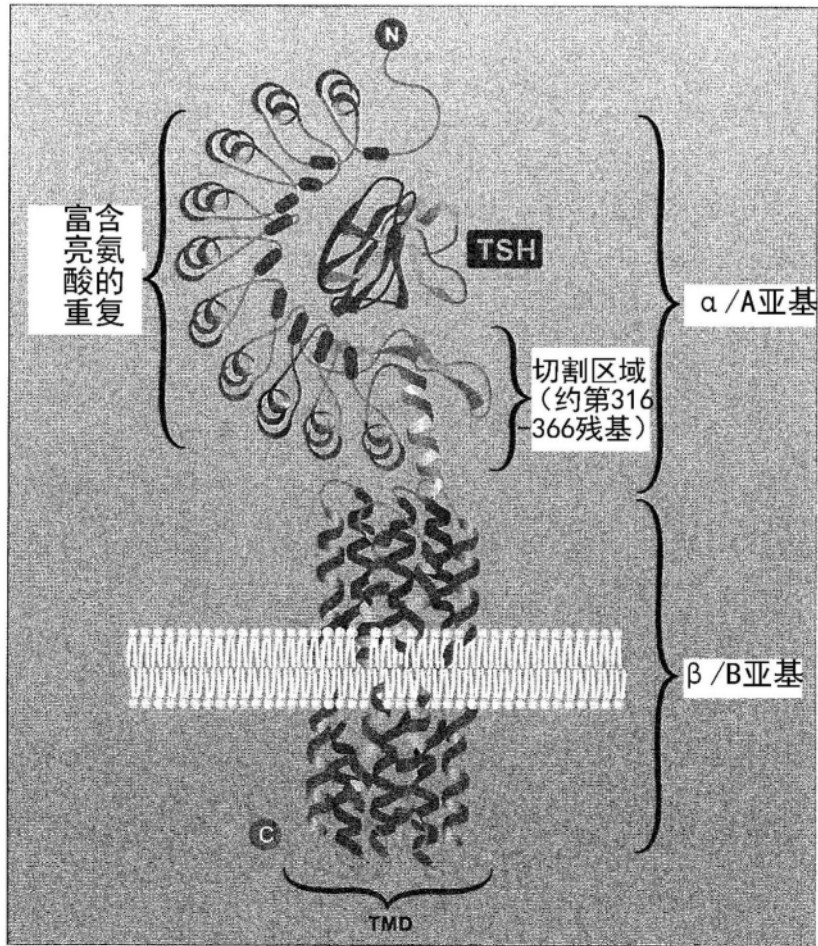


图1

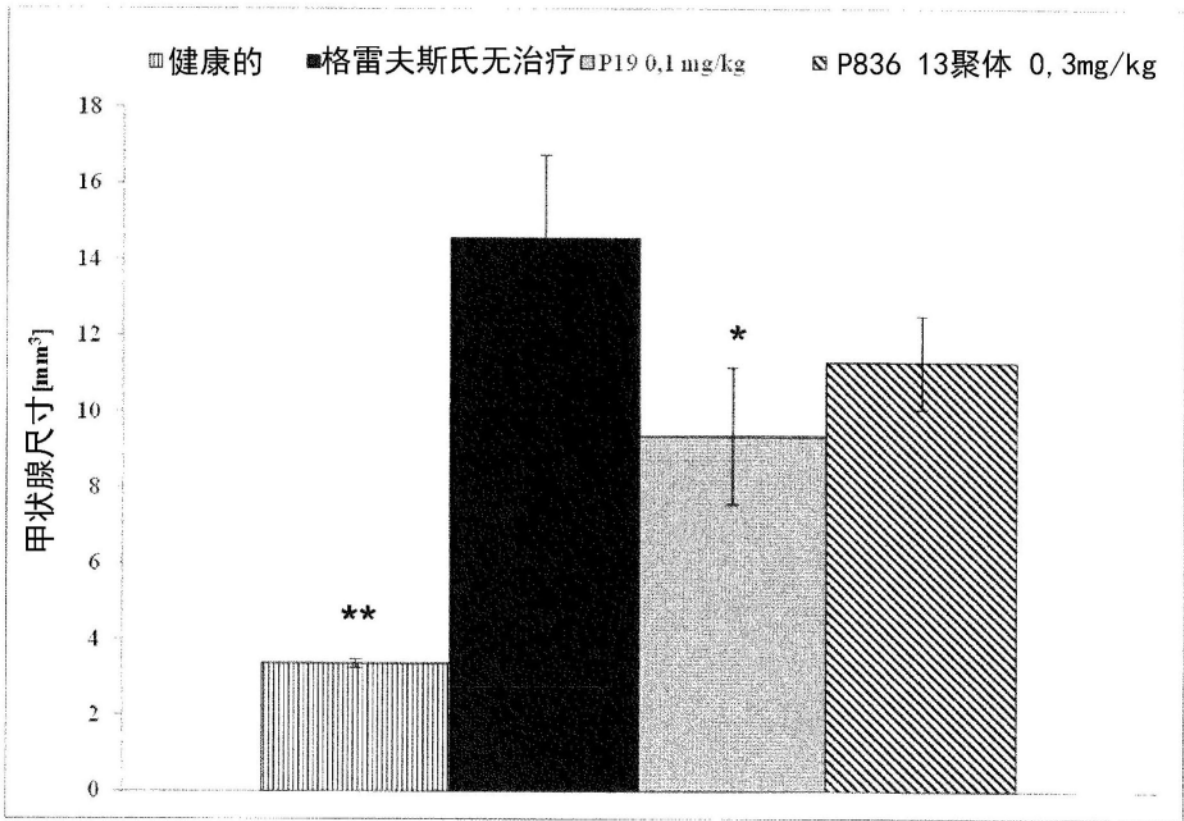


图2

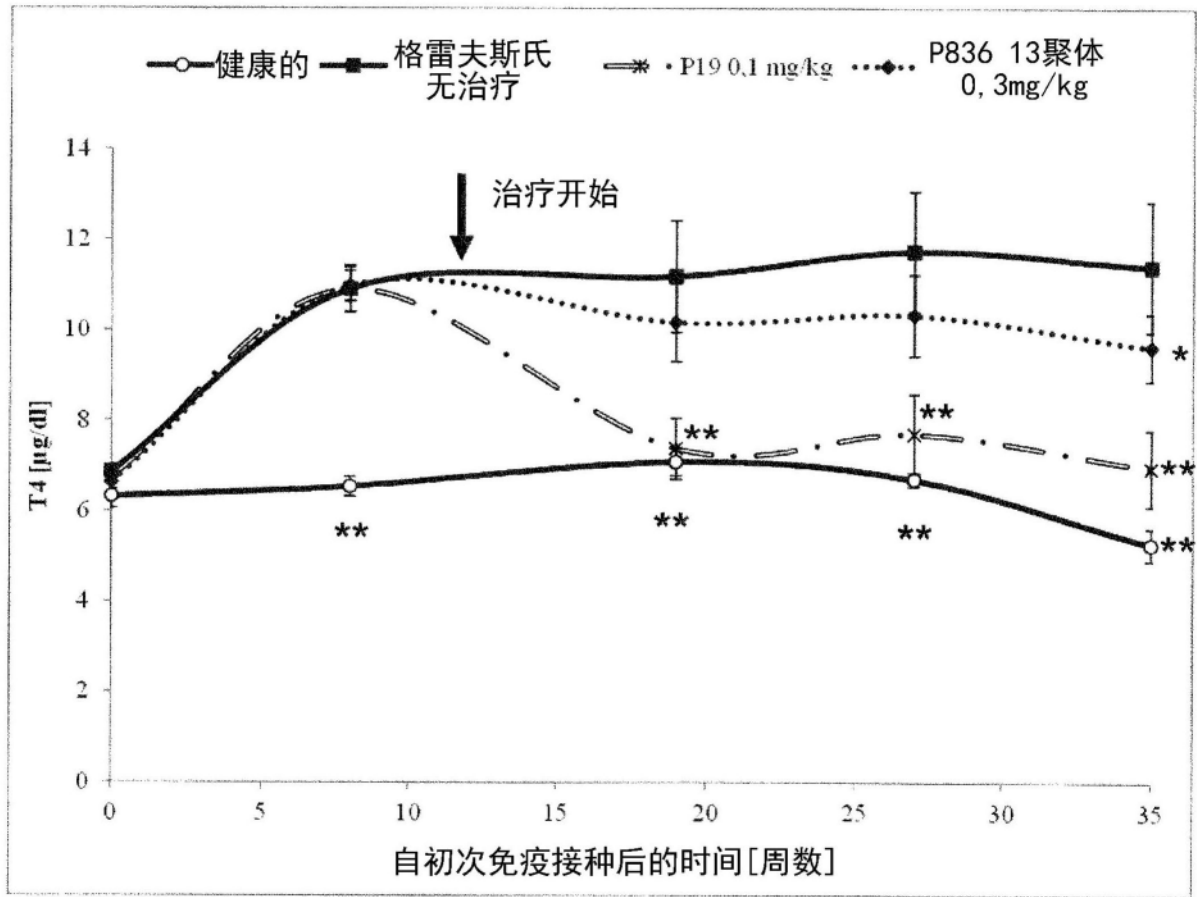


图3

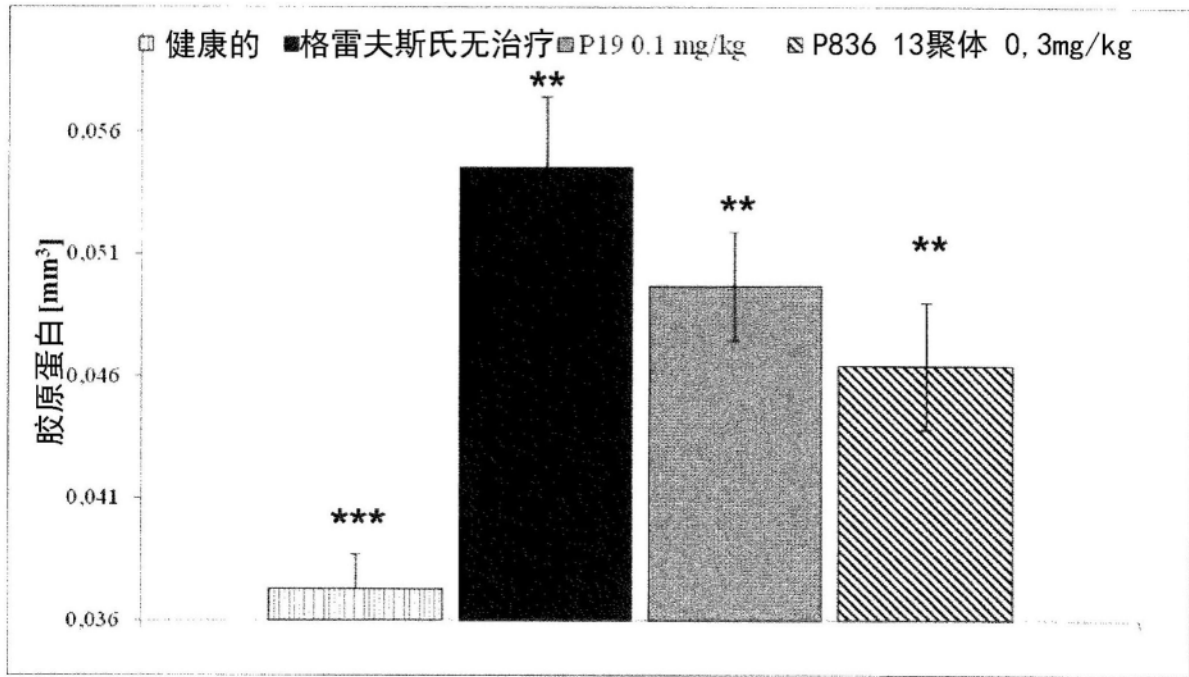


图4

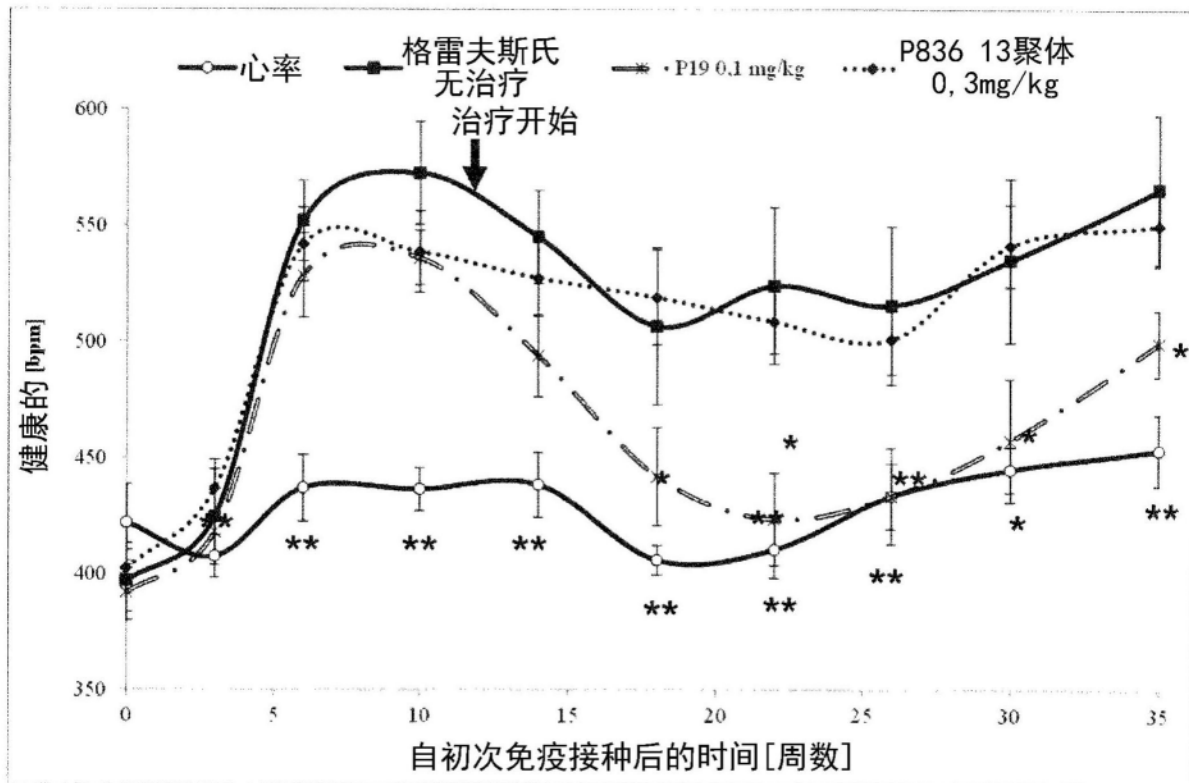


图5

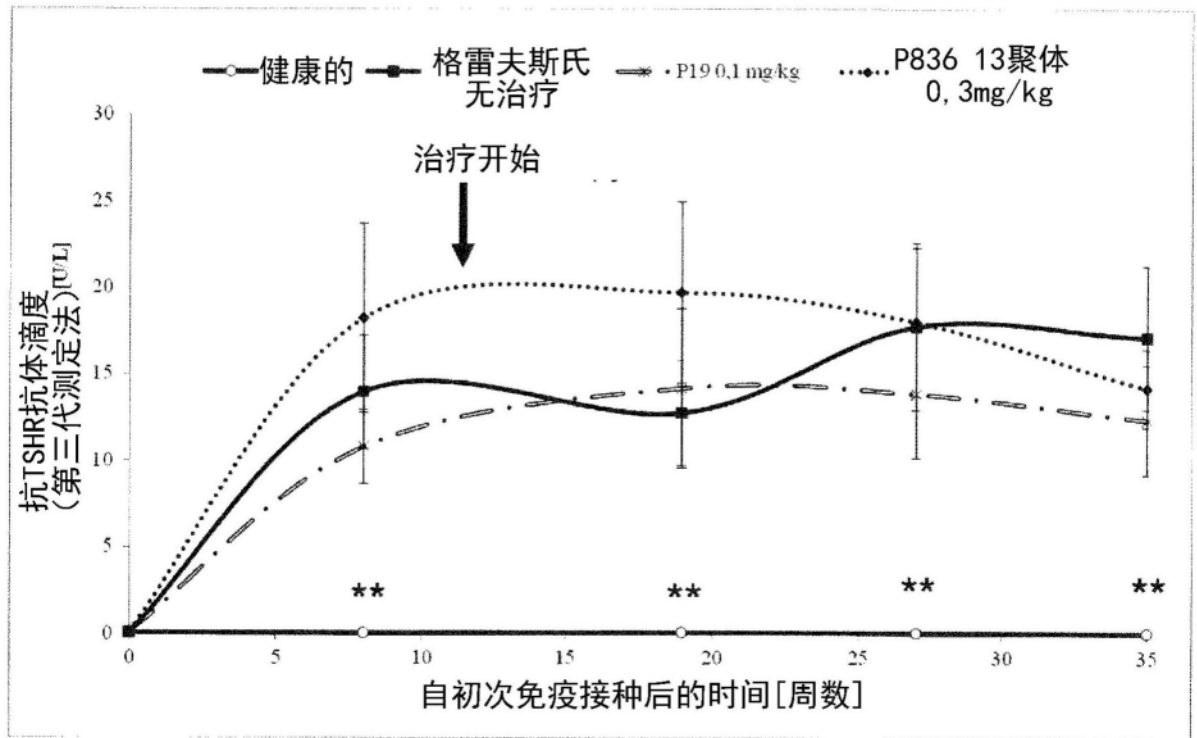


图6

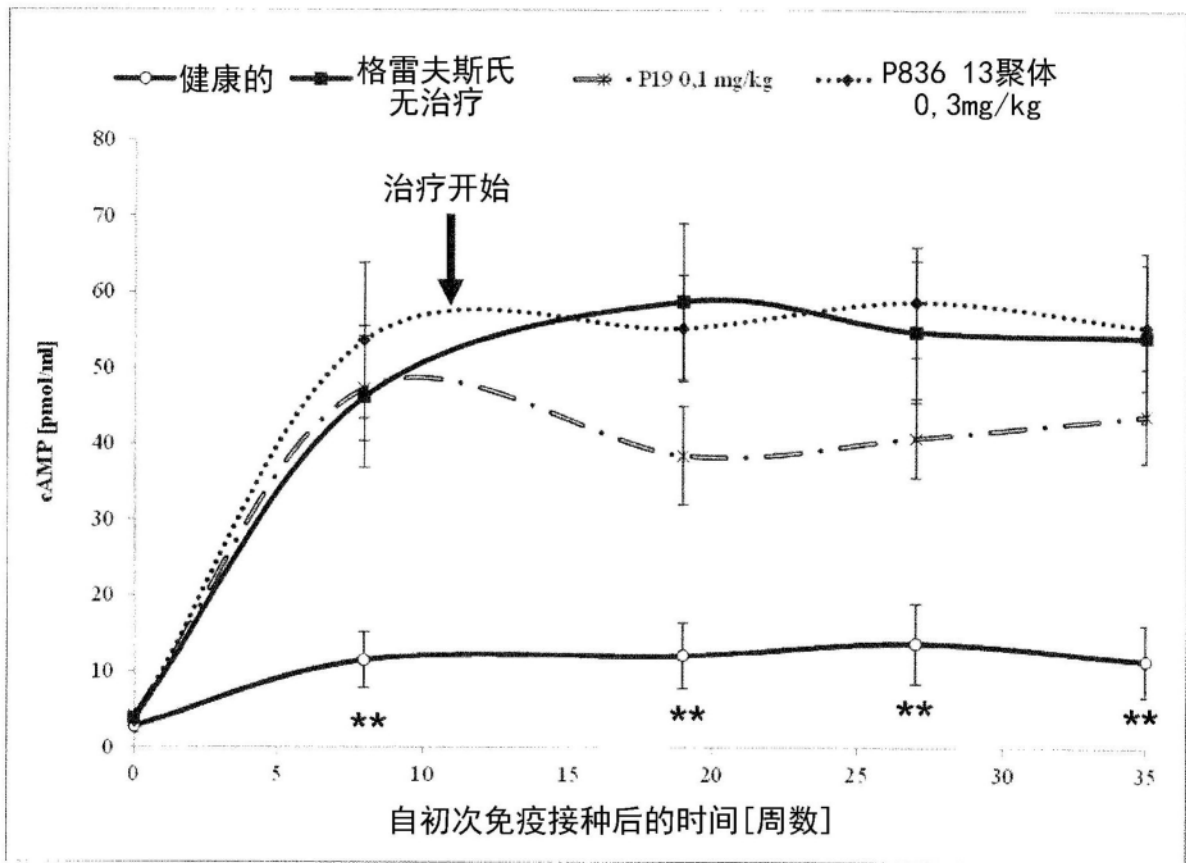


图7

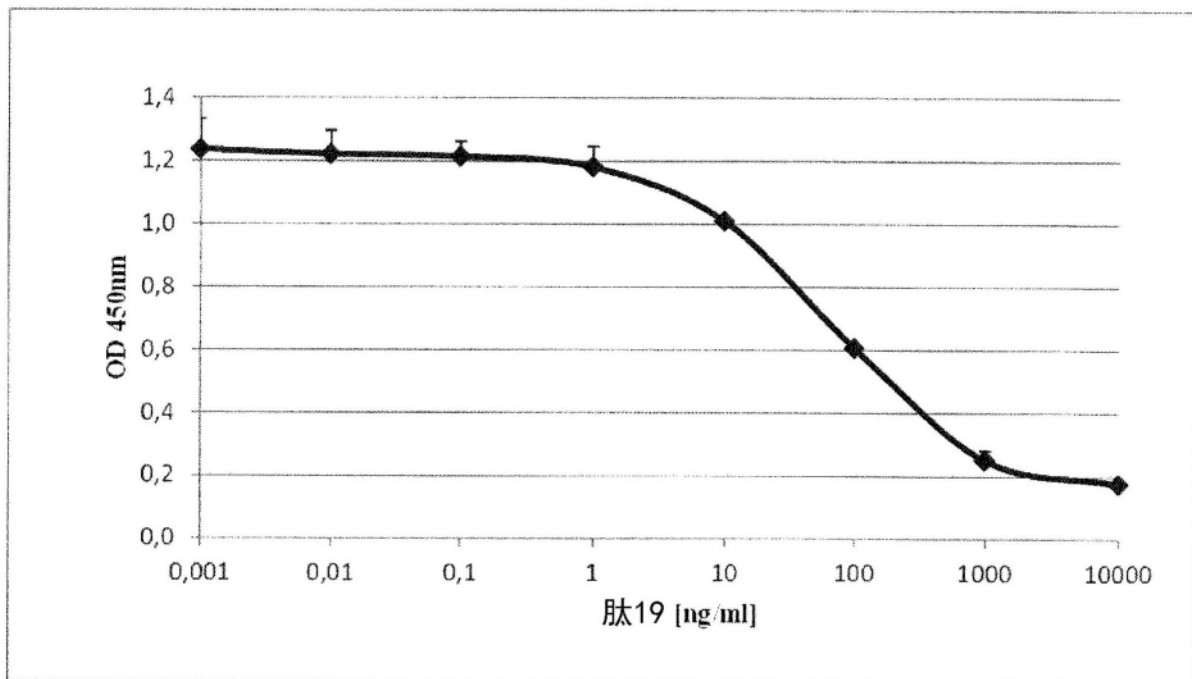


图8

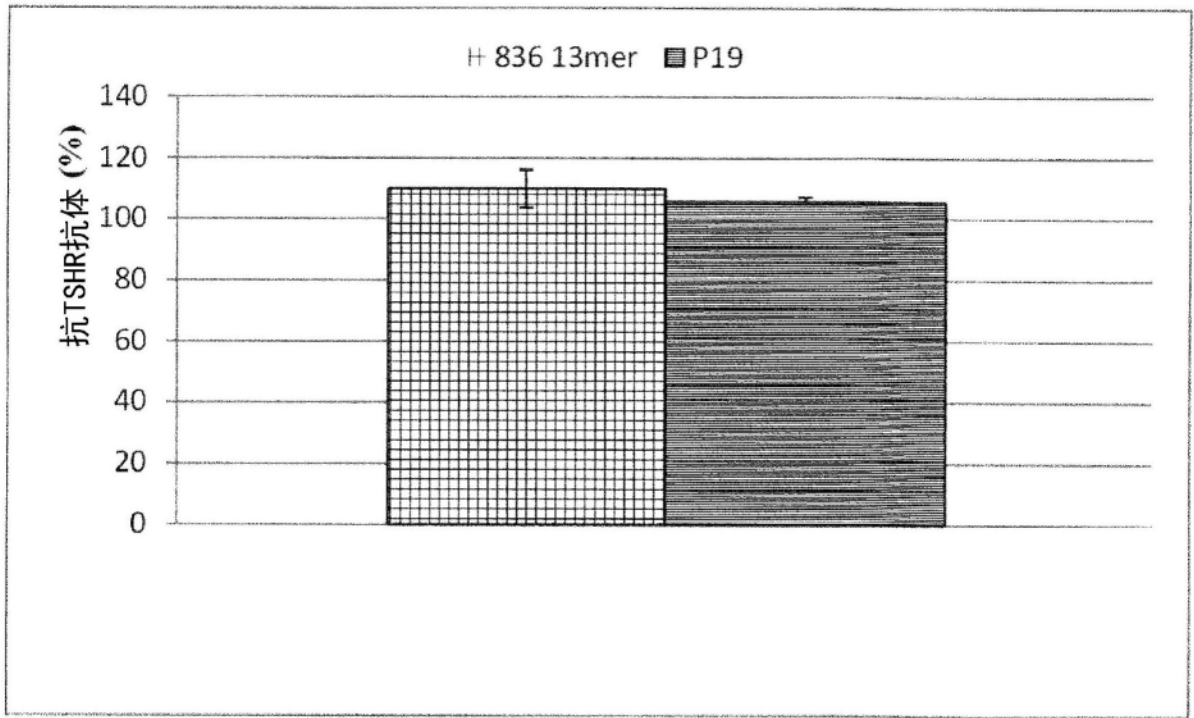


图9