



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104507489 B

(45)授权公告日 2016.07.13

(21)申请号 201380036874.6

(22)申请日 2013.05.10

(30)优先权数据

10-2012-0050529 2012.05.11 KR

10-2012-0050533 2012.05.11 KR

10-2012-0071989 2012.07.02 KR

10-2012-0104207 2012.09.19 KR

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2015.01.09

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/KR2013/004156 2013.05.10

(87)PCT国际申请的公布数据

W02013/169067 KO 2013.11.14

(73)专利权人 杰姆维克斯&凯尔有限公司

地址 韩国大田广域市

专利权人 金商在

(72)发明人 金商在

(74)专利代理机构 北京三友知识产权代理有限公司

公司 11127

代理人 庞东成 武触

(51)Int.Cl.

A61K 38/17(2006.01)

A61K 38/16(2006.01)

A61P 19/02(2006.01)

A61P 19/00(2006.01)

(56)对比文件

CN 1291231A ,2001.04.11,

CN 1313773A ,2001.09.19,

Stevenson CL.advanced in peptide pharmaceutical.《current pharmaceutical biotechnology》.2009,第10卷(第1期),第122-137页.

(续)

审查员 程婷

权利要求书1页 说明书13页

序列表6页 附图7页

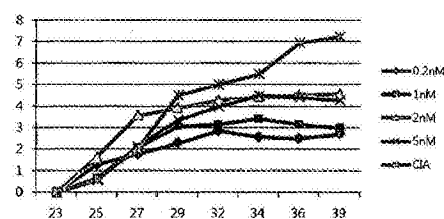
(54)发明名称

用于预防和治疗类风湿性关节炎的组合物

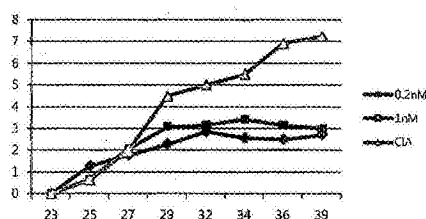
(57)摘要

本说明书涉及一种用于预防或治疗类风湿性关节炎的组合物,更具体而言,涉及包含以下肽的用于预防或治疗类风湿性关节炎的组合物:包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的肽、与所述肽的氨基酸序列具有80%以上的序列同一性的肽、或者作为其片段的肽。根据本发明,提供了用于预防或治疗类风湿性关节炎的组合物,所述组合物对类风湿性关节炎具有优异效果,但具有最小的副作用。

关节炎评分



关节炎评分:低浓度



[转续页]

[接上页]

(56)对比文件

Brunsvig PF et al. Telomerase peptide vaccination in NSCLC: a phase II trial in stage III patients vaccinated after chemoradiotherapy and an 8-year update on a phase I/II trial..《clinical cancer

research》.2011,第17卷(第21期),第6847-6857页.

John Amund Kyte. cancer vaccination with telomerase peptide GV001.《expert opinion on investigational drugs》.2009,第18卷(第5期),第687-694页.

1. 肽在制备用于预防或治疗类风湿性关节炎的组合物中的应用,所述肽由SEQ ID NO: 1的氨基酸序列组成。
2. 如权利要求1所述的应用,其中,所述肽源自人端粒酶。
3. 如权利要求1所述的应用,其中,所述组合物用于消除与类风湿性关节炎有关的症状或预防和治疗类风湿性关节炎。
4. 如权利要求1所述的应用,其中,所述肽以0.001ng/kg~1ng/kg的单剂量施用。
5. 如权利要求1所述的应用,其中,所述肽以0.01ng/kg~0.4ng/kg的单剂量施用。
6. 如权利要求1所述的应用,其中,所述肽每1天~5天施用1次。
7. 如权利要求1所述的应用,其中,所述肽每1.5天~2.5天施用1次。
8. 如权利要求1所述的应用,其中,所述组合物包含0.05nM~5nM浓度的肽。
9. 如权利要求1所述的应用,其中,所述组合物被配制用于注射。
10. 如权利要求1所述的应用,其中,所述组合物是用于预防或治疗类风湿性关节炎的药物组合物。
11. 如权利要求1所述的应用,其中,所述组合物是用于预防或治疗类风湿性关节炎的食品组合物。
12. 肽在制备用于预防或治疗类风湿性关节炎的试剂盒中的应用,所述试剂盒包含所述肽和使用说明书,其中,所述肽由SEQ ID NO:1的氨基酸序列组成;所述使用说明书包括所述肽的施用剂量、施用途径、施用频率和的适应证中的至少一种。
13. 如权利要求12所述的应用,其中,所述肽以0.001ng/kg~1ng/kg的单剂量施用。
14. 如权利要求12所述的应用,其中,所述肽以0.01ng/kg~0.4ng/kg的单剂量施用。
15. 如权利要求12所述的应用,其中,所述肽每1天~5天施用1次。
16. 如权利要求12所述的应用,其中,所述肽每1.5天~2.5天施用1次。
17. 如权利要求12所述的应用,其中,所述组合物包含0.05nM~5nM浓度的肽。
18. 如权利要求12所述的应用,其中,所述肽被配制用于注射。

用于预防和治疗类风湿性关节炎的组合物

技术领域

[0001] 本发明涉及一种用于预防和治疗类风湿性关节炎的组合物,所述组合物包括:包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的肽,与所述肽序列具有至少80%的同源性的肽,或者作为其片段的肽。

背景技术

[0002] 类风湿性关节炎是以多发性关节炎为特征的慢性炎性疾病。在最初阶段,炎症发生在覆盖关节的滑膜中,但其会扩散穿过周围的软骨和骨从而破坏和改变关节。除了关节之外,关节外的其他症状包括贫血、干燥综合征、皮下结节、肺纤维化、脉管炎、皮肤溃疡以及能够进行系统性入侵的疾病。

[0003] 类风湿性关节炎的确切成因尚未发现,但已知自身免疫性是其主要的机制。自身免疫性是指攻击自己而不是抵御外界攻击的免疫系统紊乱。通常一直认为遗传因素和细菌或病毒感染是类风湿性关节炎的成因。通常已知类风湿性关节炎是在受物理或生理应激之后容易出现的疾病。换言之,类风湿性关节炎是涉及关节的肿胀、炎症、僵硬和疼痛并在全身显示出系统性多发性关节炎症状的根深蒂固的自身免疫病。换言之,其是指身体将自身认为是非自身、基于自身-非自身的识别缺陷而攻击自己、并且产生异常的免疫应答以形成结缔组织炎症的系统性疾病。

[0004] 退化性关节炎,即骨关节炎,意味着疾病。当在构成软骨的软骨细胞中发生老化和退化时,II型胶原和蛋白聚糖的合成受到抑制,同时诱导产生了炎性细胞因子,包括白细胞介素1 β 和肿瘤坏死因子 α ,然后,降解关节基质的基质金属蛋白酶(MMP)的合成和活性增加,从而使受破坏的软骨组织引起疾病。

[0005] 此外,当一氧化氮的产生引起自扩增炎性细胞因子的合成并由此诱导多得多的MMP合成时,关节基质降解的加速使得类风湿性关节炎恶化。同时,炎性细胞因子通过增加前列腺素E2(一种脂代谢物)的产量而在关节炎处诱导炎症。

[0006] 作为慢性关节风湿病的疗法,使用抗炎类固醇(例如泼尼松龙)、非类固醇抗炎药(例如吲哚美辛、阿司匹林)、免疫抑制剂(例如环孢菌素A、他克莫司(FK506)、甲氨蝶呤、环磷酰胺、咪唑硫嘌呤)、疾病调节性抗风湿病药(例如,金盐试剂)。抗炎药控制炎症并减少疼痛和肿胀,但难以抑制疾病的进展。因此,大多数药物只是单纯地缓解症状或延迟疾病的进展,还有可能在长期施用时表现出副作用,因此没有药物能声称足以让人满意。

[0007] 另一方面,用于治疗类风湿性关节炎的药物可以根据炎症的减少、疾病进展的延迟和尿酸浓度的下降的主要机制而分类,并且用于治疗神经性关节炎的许多药物可减少炎症。炎症是引起疼痛、浮肿、发热、癫痫和僵硬的疾病进程,快速舒缓炎症的药物包括非类固醇抗炎药(包括阿司匹林)和类固醇抗炎药(包括可的松)。

[0008] 非类固醇抗炎药具有通过减少疼痛来缓解炎症和舒缓神经性关节炎的效果,但是对于具有活性胃溃疡和胃区域出血病史的人而言,这种药是禁用的,因为这种药物可能引起胃肠问题和胃痛。类固醇抗炎药不常使用,因为该药与其功效相比具有严重的副作用,包

括体重增加和高血压。具体而言,类固醇抗炎药与根治疗法不相关,并且由于能暂时减少疼痛,该药物可能导致过度使用,因此需要小心地使用该药物,该药物可能引起神经性关节炎破坏和疾病恶化。

[0009] 因此,由于用于治疗关节炎的现有疗法的治疗功效有限并且还包括副作用,现有疗法具有不能长期使用的问题。因此,需要能够解决现有疗法的问题的新疗法。

[0010] 【现有技术文献】

[0011] 【专利文献】

[0012] KR 2012-0121196A

[0013] KR 2004-0015087A

[0014] 【非专利文献】

[0015] Kim等,“Experimental Animal Models for Rheumatoid Arthritis:Methods and Applications”,Journal of Rheumatic Disease,19卷,4期,2012年8月;

[0016] Myers等,“Collagen-Induced Arthritis,an Animal Model of Autoimmunity”,Life Sciences,61卷,19期,1861-1878,1997

发明内容

[0017] 【技术问题】

[0018] 本发明的发明人努力开发出了能有效治疗类风湿性关节炎且没有有害的副作用的组合物,并且完成了本发明。

[0019] 本发明涉及提供能有效治疗类风湿性关节炎的组合物,所述组合物包含源自端粒酶的肽。

[0020] 【技术方案】

[0021] 根据本发明的一个实施方式,提供了一种用于预防和治疗类风湿性关节炎的组合物,所述组合物包括:包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的肽,包含与所述氨基酸序列具有80%以上的序列同一性的氨基酸序列的肽,或者上述肽的肽片段。

[0022] 在本发明实施方式的用于预防和治疗类风湿性关节炎的组合物中,所述肽片段包含三个以上氨基酸。

[0023] 在本发明实施方式的用于预防和治疗类风湿性关节炎的组合物中,所述肽可以源自人端粒酶。

[0024] 在本发明实施方式的用于预防和治疗类风湿性关节炎的组合物中,所述组合物可以基本上消除、预防或治疗与类风湿性关节炎相关的症状。

[0025] 在本发明实施方式的用于预防和治疗类风湿性关节炎的组合物中,所述组合物可以以5nM/kg以下、更优选以0.15nM/kg~5nM/kg的溶液浓度提供。

[0026] 在本发明实施方式的用于预防和治疗类风湿性关节炎的组合物中,所述组合物可以是外用皮肤组合物。

[0027] 在本发明实施方式的用于预防和治疗类风湿性关节炎的组合物中,所述组合物可以是药物组合物。

[0028] 在本发明实施方式的用于预防和治疗类风湿性关节炎的组合物中,所述组合物可以是食品组合物。

[0029] 根据本发明的实施方式,提供了一种预防和治疗类风湿性关节炎的方法,所述方法包括向有需要的受试对象施用有效量的用于预防和治疗类风湿性关节炎的上述组合物的步骤。

[0030] 在本发明实施方式的预防和治疗类风湿性关节炎的方法中,所述组合物可以以低于5nM/Kg/天、更优选以0.15nM/Kg/天~5nM/Kg/天施用。

[0031] 根据本发明的实施方式,提供了所述组合物在预防和治疗类风湿性关节炎中的应用。

[0032] 在一个实施方式中,提供了一种用于预防和治疗类风湿性关节炎的试剂盒,所述试剂盒包括:包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的肽,包含与所述氨基酸序列具有80%以上的序列同一性的氨基酸序列的肽,或者上述肽的肽片段;以及包括所述肽或组合物的施用剂量、施用途径、施用频率和适应证中的至少一种的使用说明书。

[0033] 【有益效果】

[0034] 根据本发明,可以提供一种具有以最小的副作用预防或治疗类风湿性关节炎的良好功效的组合物。

附图说明

[0035] 图1和图2分别显示了使用CIA动物模型诱导类风湿性关节炎并用肽进行处理的第二和第一实验的按时间的计划方案。

[0036] 图3通过照片显示了关于类风湿性关节炎指数的分数的各个状况。

[0037] 图4显示了用于确认类风湿性关节炎的治疗效果的组织病理学图。

[0038] 图5通过图表显示了第一实验的结果,其呈现了对照组、1nM预防组和1nM治疗组的类风湿性关节炎指数。

[0039] 图6通过图表显示了第一实验的结果,其呈现了对照组、10nM预防组和10nM治疗组的类风湿性关节炎指数。

[0040] 图7显示了对照组和治疗组的体重变化,其中Y轴的值表示体重变化(以克为单位)。X轴的值表示治疗经历的时间。

[0041] 图8显示了第二实验的结果,其呈现了对照组和0.2nM、1nM、2nM及5nM治疗组的类风湿性关节炎指数(上图),并单独绘出了低浓度(0.2nM,1nM)的肽治疗的更有效展示的结果(下图)。

[0042] 图9显示了第二实验的结果,其呈现了对照组和0.2nM、1nM、2nM及5nM治疗组的体重变化(上图),并单独绘出了低浓度(0.2nM,1nM)的肽治疗的更有效展示的结果(下图)。

[0043] 图10显示了HeLa细胞内的毒性测试的结果。

具体实施方式

[0044] 本发明可以以各种方式修改和实施。下文中,将通过示例性实施方式更详细地描述本发明。但是,以下实施例不意图限制本发明。反而本发明可以基于所附权利要求进行各种改变。应该理解的是,本发明包括落入本发明的技术思想和范围内的任何改变、等价物或替代物。在本说明书中,可能省略了公知的特征和技术的细节,以避免不必要地模糊了所呈现的实施方式。

[0045] 已知端粒为染色体末端的遗传物质重复序列,其防止染色体受损或与其它染色体融合。端粒的长度会在每次细胞分裂时缩短,在细胞分裂一定次数后,端粒的长度会缩得非常短以使细胞停止分裂并死亡。另一方面,已知端粒的延长可延长细胞的寿命。举例而言,癌细胞分泌一种称为端粒酶的酶,其防止端粒缩短,因而导致癌细胞增殖。

[0046] 在本发明的一个实施方式中,提供了编码肽的多核苷酸,其中,所述肽包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列,所述肽与SEQ ID NO:1的同源性超过80%,或者所述肽是上述肽的片段。上述多核苷酸允许大量生产所述肽。例如,培养包括编码肽的多核苷酸的载体允许大量生产肽。

[0047] 本发明公开的肽可以包括:包含与肽SEQ ID NO:1具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%的序列同源性的氨基酸序列的肽或其片段。另外,本发明公开的肽可以包括:与SEQ ID NO:1或其片段有差别的肽,所述差别在于至少1个氨基酸、至少2个氨基酸、至少3个氨基酸、至少4个氨基酸、至少5个经转变(transformed)的氨基酸、至少6个经转变的个氨基酸、或至少7个氨基酸。

[0048] 在本发明的一个实施方式中,氨基酸的改变包括对肽的物理和化学特性的修饰。例如,可以进行氨基酸修饰以改善肽的热稳定性、改变底物特异性和改变最佳pH。

[0049] 在本发明的示例性实施方式中,SEQ ID NO:1的肽、SEQ ID NO:1的肽的片段肽或与所述肽具有80%以上的序列同一性的肽是源自端粒酶、特别是人(智人(Homo sapiens))端粒酶的肽。

[0050] 本文中术语“氨基酸”不仅包括天然整合成肽的22种标准氨基酸,还包括D-异构体和经修饰的氨基酸。因此,在本发明的特定实施方式中,本文的肽包括具有D-氨基酸的肽。另一方面,肽可以包括非标准氨基酸,例如,具有翻译后修饰的那些。翻译后修饰的实例包括磷酸化、糖基化、酰化(包括乙酰化、肉豆蔻酰化、棕榈酰化)、烷基化、羧基化、羟基化、糖化、生物素化、泛素化、化学性质的修饰(例如、 β -消除脱酰亚胺化和脱酰胺化)以及结构修饰(例如形成二硫键)。另外,氨基酸的改变包括与用于形成肽缀合物的交联剂的结合过程中的化学反应所导致的氨基酸的改变,例如氨基、羧基或侧链的改变。

[0051] 本文公开的肽可以是天然来源鉴定和分离出的野生型肽。另一方面,当与SEQ ID NO:1或其片段比较时,本文公开的肽可以是包含一个或多个替换、缺失和/或插入的氨基酸的人工突变肽。不仅在人工突变肽中,在野生型肽中的氨基酸改变也包括不显著影响蛋白质折叠和/或活性的保守性氨基酸替换。保守性替换的实例可以在下述组内:碱性氨基酸(精氨酸、赖氨酸和组氨酸)、酸性氨基酸(谷氨酸和天冬氨酸)、极性氨基酸(谷氨酰胺和天冬酰胺)、疏水性氨基酸(亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸和甲硫氨酸)、芳香族氨基酸(苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸)以及小氨基酸(甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸和苏氨酸)。通常不影响特定活性的氨基酸替换是本领域已知的。最常发生的改变是Ala/Ser、Val/Ile、Asp/Glu、Thr/Ser、Ala/Gly、Ala/Thr、Ser/Asn、Ala/Val、Ser/Gly、Tyr/Phe、Ala/Pro、Lys/Arg、Asp/Asn、Leu/Ile、Leu/Val、Ala/Glu、Asp/Gly以及其相反的改变。保守性替换的其他实例示于以下表1中。

[0052] 【表1】

[0053]

最初的氨基酸	残基替换的实例	优选的残基替换
--------	---------	---------

Ala(A)	val;leu;ile	Val
Arg(R)	lys;gln;asn	Lys
Asn(N)	gln;his;asp;lys;arg	Gln
Asp(D)	glu;asn	Glu
Cys(C)	ser;ala	Ser
Gln(Q)	asn;glu	Asn
Glu(E)	asp;gln	Asp
Gly(G)	ala	Ala
His(H)	asn;gln;lys;arg	Arg
Ile(I)	leu;val;met;ala;phe;正亮氨酸	Leu
Leu(L)	正亮氨酸;ile;val;met;ala;phe	Ile
Lys(K)	arg;gln;asn	Arg
Met(M)	leu;phe;ile	Leu
Phe(F)	leu;val;ile;ala;tyr	Tyr
Pro(P)	ala	Ala
Ser(S)	thr	Thr
Thr(T)	ser	Ser
Trp(W)	tyr;phe	Tyr
Tyr(Y)	trp;phe;thr;ser	Phe
Val(V)	ile;leu;met;phe;ala;正亮氨酸	Leu

[0054] 通过选择在下列效果方面显著不同的替换来实现肽的生物性质的实质性转变：
(a)在替换区域内保持多肽骨架的结构(例如折叠或螺旋三维结构)的效果；(b)保持目标区域中的分子的电荷或疏水性的效果，或(c)保持侧链的体积的效果。将天然残基按照侧链总体性质分成下述组：

[0055] (1)疏水性：正亮氨酸、met、ala、val、leu、ile；

[0056] (2)中性亲水性：cys、ser、thr；

[0057] (3)酸性：asp、glu；

[0058] (4)碱性：asn、gln、his、lys、arg；

[0059] (5)影响链取向的残基：gly、pro；和

[0060] (6)芳香性：Trp、tyr、phe。

[0061] 非保守性替换可以通过将以上类别中的成员更换为不同类别中的成员来进行。通常可以将不涉及维持肽的正确三维结构的任何半胱氨酸残基替换为丝氨酸，由此增加分子的氧化稳定性并防止错误的交联。反之，可以通过在肽中添加一个或多个半胱氨酸键来改善稳定性。

[0062] 肽的氨基酸变异的其他类型是抗体糖基化模式的改变。此处术语“改变”是指见于肽中的碳水化合物残基的缺失和/或肽中不存在的至少一个糖基化残基的增加。

[0063] 肽中的糖基化通常为N-连接型或O-连接型糖基化。本文的术语「N-连接型」是指碳水化合物残基接附至天冬酰胺残基的侧链上。作为三肽序列，天冬酰胺-X-丝氨酸及天冬酰胺-X-苏氨酸(其中X为除了脯氨酸之外的任何氨基酸)为碳水化合物残基经由酶作用而附

接至天冬酰胺侧链的识别序列。因此,使一条这种三肽序列存在于多肽中,便产生了潜在的糖基化位置。「O-连接型糖基化」意指将糖N-乙酰半乳糖胺、半乳糖或木糖中的一种附接至羟基氨基酸上。最常见的羟基氨基酸为丝氨酸或苏氨酸,但也可使用5-羟基脯氨酸或5-羟基赖氨酸。

[0064] 通过改变氨基酸序列以含有上述三肽序列来将糖基化位点方便地加入肽中(以获得N-连接型糖基化位点)。这些改变可以通过将至少一个丝氨酸或苏氨酸残基加入第一肽序列中或通过用这些残基进行替换来完成(以获得O-连接型糖基化位点)。

[0065] 在本发明的一个实施方式中,多核苷酸为核酸分子,其可为单链或双链的、天然的或人工的DNA或RNA分子。核酸分子可为相同类型的一个或多个核酸(例如,具有相同的核苷酸序列),或为不同类型的核酸。核酸分子包含一种或多种DNA、cDNA、诱骗(decoy)DNA、RNA、siRNA、miRNA、shRNA、stRNA、snoRNA、snRNA、PNA、反义寡聚物、质粒及其它经修饰的核酸,但不限于此。

[0066] 本文所使用的SEQ ID No:1(下文中称为'PEP 1')是由16个氨基酸组成的源自端粒酶的肽。

[0067] SEQ ID NO:1EARPALLTSRLRFIPK

[0068] 另外,在一方面,本发明是包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的肽、与上述序列具有高于80%的同源性的肽、或者上述肽的片段,其优点在于:由于在细胞内的毒性低,其具有高度可行性。

[0069] 在一方面,本发明是用于预防和治疗类风湿性关节炎的组合物,所述组合物包括作为活性成分的包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的肽、与上述序列具有高于80%的同源性的肽、或者上述肽的片段。

[0070] 在一方面,本发明是预防和治疗类风湿性关节炎的方法,所述方法包括:向有需要的受试对象施用有效量的包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的肽、与上述序列具有高于80%的同源性的肽、或者上述肽的片段。

[0071] 在一方面,本发明是肽在预防和治疗类风湿性关节炎中的应用,所述应用包括:向有需要的受试对象施用有效量的包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的肽、与上述序列具有高于80%的同源性的肽、或者上述肽的片段。

[0072] 在一方面,本发明是试剂盒,所述试剂盒包括:包含氨基酸序列SEQ ID NO:1的肽、与上述序列具有高于80%的同源性的肽、或者上述肽的片段;以及包括所述肽或组合物的施用剂量、施用途径、施用频率和适应证中的至少一种的使用说明书。

[0073] 在一方面,所述片段可以由至少3个氨基酸组成。在其他方面,所述片段可以由至少4个氨基酸、至少5个氨基酸、至少6个氨基酸、至少7个氨基酸、至少8个氨基酸、至少9个氨基酸、至少10个氨基酸、至少11个氨基酸、至少12个氨基酸、至少13个氨基酸、至少14个氨基酸或至少15个氨基酸组成。

[0074] 在一方面,所述肽可以源自人端粒酶。具体而言,SEQ ID NO:1的肽是指整个人端粒酶序列(1132个氨基酸,SEQ ID NO:2)的611~626位的肽。

[0075] 在一方面,所述肽可用于消除与类风湿性关节炎相关的症状或预防和治疗类风湿性关节炎。

[0076] 在一方面,所述肽可以以0.001ng/kg~1ng/kg或0.01ng/kg~0.4ng/kg的单剂量

施用。在其他方面,施用剂量可以是至少0.001ng/kg、至少0.005ng/kg、至少0.01ng/kg、至少0.02ng/kg或至少0.03ng/kg。在其他方面,施用剂量可以小于1ng/kg、小于0.9ng/kg、小于0.8ng/kg、小于0.7ng/kg、小于0.6ng/kg、小于0.5ng/kg、小于0.4ng/kg、小于0.3ng/kg、小于0.2ng/kg。

[0077] 在一方面,所述肽可以1天~5天施用1次或1.5天~2.5天施用1次。

[0078] 在一方面,所述组合物可以含有0.05nM~5nM浓度的肽。

[0079] 在一方面,所述组合物可以配制成用于注射。

[0080] 根据本发明的一个实施方式,提供了一种用于预防和治疗类风湿性关节炎的组合物,所述组合物包括:包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的肽,包含与所述氨基酸序列具有80%以上序列同一性的氨基酸序列的肽,或者上述肽的肽片段。

[0081] 根据本发明的一个实施方式,提供了肽在预防和治疗类风湿性关节炎中的应用,所述肽包括:包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的肽、与所述肽序列具有80%以上的序列同一性的肽、或者作为其片段的肽。

[0082] 根据本发明的一个实施方式,提供了一种治疗类风湿性关节炎的方法,所述方法包括:向有需要的受试对象施用包括包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的肽、与所述肽序列具有80%以上的序列同一性的肽、或者作为其片段的肽和药物的组合物。

[0083] 根据本发明的一个实施方式,提供了一种预防和治疗类风湿性关节炎效果优异的药学、皮肤外用剂或者食品组合物,所述组合物包括:包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的肽、包含与所述肽序列具有80%以上序列同一性的氨基酸序列的肽、或者作为其片段的肽。

[0084] 根据本发明的实施方式,所述组合物可以含有0.1μg/mg~1mg/mg、特别是1μg/mg~0.5mg/mg、更特别是10μg/mg~0.1mg/mg的包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的肽、包含与所述氨基酸序列具有80%以上的序列同一性的氨基酸序列的肽、或者其肽片段。当含有上述范围内的肽时,该组合物的所有安全性及稳定性均可得到满足,并且可以实现良好的经济效益。

[0085] 根据本发明的实施方式,所述组合物可以应用于所有动物,包括人、犬、鸡、猪、牛、羊、豚鼠和猴。

[0086] 根据本发明的实施方式,药物组合物可以通过口服、直肠、透皮、静脉内、肌肉内、腹膜内、骨髓内、硬膜外或皮下方式来施用。

[0087] 口服施用的形式可以是(但不限于)片剂、丸剂、软胶囊或硬胶囊、颗粒剂、粉末、溶液或乳液。非口服施用的形式可以是(但不限于)注射剂、滴剂、洗剂、软膏、凝胶剂、乳膏、悬浮液、乳液、栓剂、贴剂或喷雾剂。

[0088] 根据本发明的实施方式,必要时所述药物组合物可以含有添加剂,例如稀释剂、赋形剂、润滑剂、粘合剂、崩解剂、缓冲剂、分散剂、表面活性剂、着色剂、芳香剂或甜味剂。根据本发明的实施方式,所述药物组合物可以通过本领域的常规工业方法来制造。

[0089] 根据本发明的实施方式,所述药物组合物的活性成分可以根据患者的年龄、性别、体重、疾病状态和严重性、施用途径或处方医师的判断而不同。本领域普通技术人员可以基于上述因素决定剂量,并且每日剂量可以是(但不限于)约0.0000001ng/kg/天~约10000ng/kg/天或约0.00001ng/kg/天~约100ng/kg/天,特别是约0.0001ng/kg/天~约10ng/kg/天,更特别是约0.01ng/kg/天~约0.4ng/kg/天。根据本发明的实施方式,所述药

物组合物可以每1~5天施用1次~3次,但不限于此。

[0090] 作为载剂,使用一种或多种固体、半固体或液化的稀释剂、成丸剂和用于处方的其他材料。期望的是,药物组合物以单个单位剂型施用。本发明的药物组合物可以通过口服或非口服形式(例如注射、经直肠)施用。

[0091] 本发明的实施方式的药物组合物可以每日施用1次~3次,但不限于此。

[0092] 本发明实施方式的外用组合物可以以所有适于局部应用的形式提供。例如,提供形式可以为溶液、通过将油相分散到水中获得的乳液、通过将水分散到油相中获得的乳液、悬浮液、固体、凝胶、粉末、糊剂、泡沫或气溶胶。这些形式可以根据本领域的常规工业方法制造。

[0093] 本发明实施方式的外用组合物在不损害主效果的范围内可以包括能够增加主效果的其他成分。在本发明的一个实施方式中,化妆品组合物可以另外包括保湿剂、润肤剂、表面活性剂、紫外吸收剂、防腐剂、杀真菌剂、抗氧化剂、pH调节剂、有机或无机颜料、芳香剂、冷感剂或止汗剂。上述成分的配制比可以由本领域技术人员在不损害本发明的目的和效果的程度内决定,并且基于所述化妆品组合物的总重的配制比可以为0.01重量%~5重量%,特别是0.01重量%~3重量%。

[0094] 在本发明的一个实施方式中,食品组合物的形式不受限制,而可以是例如颗粒、粉末、液体和固体形式。除了活性成分之外,每种形式都可以用本领域技术人员合理选择的工业常用成分来形成,并且可以与其他成分一起增加效果。

[0095] 本领域技术人员可决定上述活性成分的剂量,并且每日剂量可以为例如约1 μ g/kg/天~10mg/kg/天,更特别是约10 μ g/kg/天~1mg/kg/天,更特别是约50 μ g/kg/天~100 μ g/kg/天,但不限于这些数值,并且可以根据年龄、健康状态、并发症和其他各种因素而变化。

[0096] 口服施用的形式可以是(但不限于)片剂、丸剂、软胶囊或硬胶囊、颗粒剂、粉末、溶液或乳液。

[0097] 口服施用的形式可以是(但不限于)固体或液体剂量单元,例如粉末、消散剂、片剂、糖衣丸剂、胶囊、颗粒剂、悬浮液、溶液、糖浆剂、滴剂、舌下片剂和其他制剂。

[0098] 粉末形式通过将本发明的化合物粉碎至合适的粒径而制备。消散剂形式也通过将本发明的化合物粉碎并与粉碎至合适粒径的药物载剂(例如碳水化合物,如淀粉和甘露醇)混合而制备。必要时,粉末形式可以含有添加剂,例如赋形剂、防腐剂、分散剂、着色剂、芳香剂等。

[0099] 上述颗粒剂形式通过将粉末形式、消散剂形式或片剂形式填充到诸如明胶胶囊等胶囊壳中而制备。在将润滑剂或流动化剂(例如胶体二氧化硅、滑石、硬脂酸镁、硬脂酸钙和固体聚乙二醇)的形式混合成粉末形式之后,可以进行填充操作。当采用胶囊剂形式时,添加崩解剂或增溶剂(例如羧甲基纤维素、羧甲基纤维素钙、低取代羟丙基纤维素、交联羧甲基纤维素钠、羧甲基淀粉钠、碳酸钙、碳酸钠)可以增加药物的功效。

[0100] 另外,本发明的微粉形式可以通过在植物油、聚乙二醇、甘油和表面活性剂中分散并用明胶片包覆而制备的软胶囊。

[0101] 片剂形式可以通过添加赋形剂以产生粉末混合物、使之颗粒化或块化、并在添加润滑剂后压片而制备。

[0102] 必要时,用于口服施用的剂量处方药可以是微胶囊。该处方药还可以通过用鞘涂布或浸入聚合物或蜡中等手段来实现延迟释放或持续释放。

[0103] 非口服施用形式可以使用注射剂和栓剂等。对于皮下、肌肉或静脉注射而言,可以使用采用溶液或悬浮液形式的单剂量单位。它们可以通过将部分化合物溶解在适于注射的无毒液体载体中并将该溶液或悬浮液灭菌来制备。为了制备等渗注射液,可以添加无毒的盐或盐溶液。另外,可以组合使用稳定剂、防腐剂、乳化剂。

[0104] 直肠施用可以使用以下述方法制备的栓剂:将本发明的化合物溶解在包含可溶于水或不溶于水的低熔点固体(例如聚乙二醇、可可脂、半合成脂质、聚酯(例如棕榈酸肉豆蔻酯))的混合物中。

[0105] 本发明的用于预防和治疗风湿性关节炎的组合物可以与其他药物(例如抗炎类固醇、非类固醇抗炎药、免疫抑制剂、疾病调节性抗风湿病药)混合或组合使用。

[0106] 本文使用的术语“基本上(实质上)消除与类风湿性关节炎有关的症状”是指所述症状减少了至少96%。

[0107] 本文使用的术语“治疗”包括例如:障碍的抑制、消退或延迟,或减少、遏制、抑制、衰减、消除或改善障碍。

[0108] 本文使用的术语“与类风湿性关节炎有关的症状”包括任何临床和测试体征,且并不限于受试对象的感受或观察。炎症是类风湿性关节炎的症状。

[0109] 本文使用的术语意在用于描述实施方式,而不是限制本发明。前面没有数值的术语并不限制数量,而是表示所用术语所指的事物可以多于1个。术语“包含”、“具有”、“包括”和“含有”应解释为开放式(即,“包括但不限于”)。

[0110] 提及数值范围是用来代替陈述该范围内的单独的数字,因此,除非另外指出,该范围应该解释为等同于该范围内的所有数值都在本文中单独描述。所有范围的端值都包括在该范围内,并且可以独立地组合。

[0111] 除非另外指出或与上下文明显矛盾,本文提到的所有方法都可以以合适的顺序进行。除非包括在权利要求中,任何一个实施方式和所有实施方式或示例性语言(例如“例如”、“等”)的使用是为了更清楚地描述本发明,而不是限制本发明的范围。本文中,权利要求之外的任何语言不应该解释为本发明的必需要素。除非另外定义,本文使用的科技术语具有本发明所属领域技术人员所通常理解的含义。

[0112] 本发明的优选实施方式是本发明人已知的用于实施本发明的最佳模式。在阅读之前的描述后,优选实施方式的变化形式对本领域技术人员而言将是清楚的。本发明人希望本领域技术人员可充分使用这些变化形式,且本发明可以以本文所列方式以外的其它方式来实施。因此,在专利法允许下,本发明包括所附权利要求中所述的发明的关键点的等价形式、修改及其变化形式。此外,除非另有明确陈述或与上下文矛盾,否则上述组成部分的任何组合情况中的所有可能的变化形式皆包括在本发明中。尽管通过示例性实施方式说明并示出了本发明,但本领域技术人员将充分理解,在不背离权利要求所限定的本发明的精神及范围的情况下,在形式和细节上可以有多种变化。

[0113] 本发明的方式

[0114] 下文中,将通过实施例和测试例详细地描述本发明。但是,以下实施例和测试例仅仅出于说明目的;对本领域技术人员显而易见的是,本发明的范围不受实施例和测试例限

制。

[0115] 实施例1:肽的合成

[0116] 根据固相肽合成的常规已知方法合成SEQ ID NO:1的肽。更具体而言,利用ASP48S (Peptron, Inc., Daejeon, Republic of Korea),通过Fmoc固相肽合成(SPSS)从C端偶联各氨基酸而合成所述肽。使用了以下肽(其C端的首个氨基酸附接到树脂上):

[0117] $\text{NH}_2\text{-Lys(Boc)-2-氯-三苯甲基树脂}$

[0118] $\text{NH}_2\text{-Ala-2-氯-三苯甲基树脂}$

[0119] $\text{NH}_2\text{-Arg(Pbf)-2-氯-三苯甲基树脂}$

[0120] 用于合成肽的所有氨基酸材料在N-端都受到Fmoc保护,且氨基酸残基受到可溶于酸中的Trt、Boc、t-Bu(叔丁酯)、Pbf(2,2,4,6,7-五甲基二氢-苯并呋喃-5-磺酰基)的保护。

例如:

[0121] Fmoc-Ala-OH、Fmoc-Arg(Pbf)-OH、Fmoc-Glu(OtBu)-OH、Fmoc-Pro-OH、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-Ile-OH、Fmoc-Phe-OH、Fmoc-Ser(tBu)-OH、Fmoc-Thr(tBu)-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-Gln(Trt)-OH、Fmoc-Trp(Boc)-OH、Fmoc-Met-OH、Fmoc-Asn(Trt)-OH、Fmoc-Tyr(tBu)-OH、Fmoc-Ahx-OH、Trt-巯基乙酸。

[0122] 使用HBTU[六氟磷酸2-(1H-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基铵]/HOBt[N-羟基苯并三唑]/NMM[4-甲基吗啉]作为偶联剂。使用20%DMF中的哌啶来除去Fmoc。为了从残基除去保护或为了将合成的肽与树脂分离,使用切割混合剂[TFA(三氟乙酸)/TIS(三异丙基硅烷)/EDT(乙二硫醇)/H₂O=92.5/2.5/2.5/2.5]。

[0123] 通过使用固相支持体并重复以下过程来合成每种肽:氨基酸从氨基酸保护开始,使对应的氨基酸单独反应,用溶剂洗涤,并脱去保护。从树脂释放后,用HPLC进行纯化,并用MS验证合成状况,随后冷冻干燥。

[0124] 通过高效液相色谱发现所制备的肽的纯度为95%以上。

[0125] 基于SEQ ID:NO.1的PEP 1的合成过程如下描述具体的肽合成过程。

[0126] 1)偶联

[0127] 将受 $\text{NH}_2\text{-Lys(Boc)-2-氯-三苯甲基树脂}$ 保护的氨基酸(8当量)与溶于DMF中的偶联剂HBTU(8当量)/HOBt(8当量)/NMM(16当量)混合在一起,在室温(RT)下温育2小时。温育后,用DMF、MeOH和DMF依次洗涤反应混合物。

[0128] 2)Fmoc脱保护

[0129] 添加在20%DMF中的哌啶,并在室温下温育5分钟两次,然后依次用DMF、MeOH和DMF进行洗涤。

[0130] 3)通过重复上述反应1)和2)制造肽的基本框架 $\text{NH}_2\text{-E(OtBu)-A-R(Pbf)-P-A-L-L-T(tBu)-S(tBu)-R(Pbf)L-R(Pbf)-F-I-P-K(Boc)-2-氯-三苯甲基树脂}$ 。

[0131] 4)切割:向完全合成的肽中添加切割混合剂,然后将所合成的肽与树脂分离。

[0132] 5)向获得的混合物中添加预冷的乙醚,然后使用离心来沉淀出所收集的肽。

[0133] 6)用制备型HPLC纯化后,通过LC/MS确认分子量,并冻干来产生粉末形式。

[0134] 使用通过实施例1所述的方法制备的PEP 1来进行预防和治疗类风湿性关节炎的有效性的实验。

[0135] 实施例2:使用CIA动物模型来诱导类风湿性关节炎并用肽进行治疗

[0136] 建立CIA(胶原诱导型关节炎)动物模型

[0137] 为了发现本发明的肽对类风湿性关节炎(RA)的有效性,使用CIA(胶原诱导型关节炎)小鼠来进行确认。

[0138] 本发明提及的非专利文献描述了有关CIA动物模型的细节。参考该文献,本实施方式如下建立了CIA动物模型。

[0139] 在下述第一和第二实验中,将实施例1的冻干形成的粉末PEP1溶解于0.9%盐水溶液中并使用。在对PEP1进行纯度校正(纯度:97.3%,含量:85.3%)后,在即将施用前用0.9%盐水溶液作为添加剂制备各浓度的注射用溶液。每种剂量通过100 μ L的量的溶液来施用。

[0140] 第一实验

[0141] 在第1天使用5周龄雄性DBA/1J小鼠(Orient Bio Inc.,Korea)对38只小鼠进行第一次诱导,将小鼠分成预防组、治疗组和PBS处理组,预防组由在CIA诱导前被施用了肽组合物的16只小鼠组成(即,8只小鼠接受1nM,100 μ l(约0.2ng剂量),8只小鼠接受10nM,100 μ l(约2ng剂量)),治疗组由在CIA诱导后被施用了肽组合物的16只小鼠组成(即,8只小鼠接受1nM,100 μ l,8只小鼠接受10nM,100 μ l),PBS处理组由6只小鼠组成。

[0142] 对于预防组,治疗如下进行:在第2、4、6、21、23、25、35、37和39天以各合适的浓度进行皮内注射。在第19天,对38只小鼠进行第二次诱导;对于治疗组,治疗如下进行:从第21天开始在第21、23、25、35、37和39天以各合适的浓度进行皮内注射(见图1)。

[0143] 从第二次诱导之日起至第42天,每2天进行对类风湿性关节炎指数的评估,在第42天处死所有小鼠,之后收集关节和血清。

[0144] 在施用PEP1期间所有小鼠都存活。

[0145] 第二实验

[0146] 与第一实验相似,使用5周龄小鼠在第1天对38只小鼠进行第一次诱导,将小鼠分为以下组:由在CIA诱导前被施用了肽组合物的32只小鼠(8只小鼠接受0.2nM,100 μ l(即约0.04ng);8只小鼠接受1nM,100 μ l(约0.2ng剂量);8只小鼠接受2nM,100 μ l(即约0.4ng);8只小鼠接受5nM,100 μ l(即约1ng))组成的组,和由6只小鼠组成的PBS处理组。

[0147] 在第21天进行第二次诱导,治疗如下进行:在第23、25和27天以各合适的浓度对各组进行皮内注射(图2)。

[0148] 从第二次诱导之日起至第42天,每2天进行对类风湿性关节炎指数的评估,在第42天处死所有小鼠,之后收集关节和血清。

[0149] 在施用PEP1期间所有小鼠都存活。

[0150] 实施例3:确认对类风湿性关节炎的功效

[0151] 用0~4分来区分类风湿性关节炎指数,对一只小鼠给出的分数可以从0到最大16(参见表2)。

[0152] [表2]

[0153] 类风湿性关节炎的评价标准

[0154]

0分	没有出现类风湿性关节炎迹象
1分	5个脚趾中的1个脚趾肿胀

2分	踝肿胀,但5个脚趾都不肿胀
3分	5个脚趾中小于4个脚趾肿胀,且踝肿胀
4分	所有5个脚趾和踝都肿胀

[0155] 图3中,通过照片显示了表2中描述的每个分数的类风湿性关节炎状况。

[0156] 为了评估类风湿性关节炎,测量了每只小鼠的0~16分的指数,并且将其平均值显示为分数。

[0157] 图4中,显示了用于确认对类风湿性关节炎的治疗功效的组织病理学图。通过正常对照组(NL)、CIA对照组(CIA载质)以及10nM肽和1nM肽治疗组(Tx)确认了以下结果:与正常对照组相比,CIA对照组的细胞中显示出由更显著的浮肿和炎症导致的侵蚀和渗透,而在肽治疗组中此类细胞损伤减少。

[0158] 第一实验的结果

[0159] 直到第36天,预防组(预防-1nM和预防-10nM)对于降低类风湿性关节炎而言看上去是有效的,但是之后该有效性消失。治疗组(治疗-1nM和治疗-10nM)在整个期间都显示出减少关节炎的效果,但是10nM组比1nM组更有效。另外,与CIA对照组相比,预防组和治疗组显示出增加的体重(参见图5~图7)。

[0160] 第二实验的结果

[0161] 当将各浓度的肽治疗组与CIA对照组相比时,肽治疗组看上去在整个期间都减少关节炎指数。特别是在低浓度时显示出了优异的效果(参见图8)。另外,当测量体重时,与CIA对照组相比,在低水平的肽治疗组中确认了体重增加(参见图9)。

[0162] 从上述第一和第二实验的结果可总结出,比起施用10nM的肽,施用更低浓度的1nM肽时更有效,并且在第二次诱导后处理的治疗组比预防组更有效地抑制了类风湿性关节炎。另外,在测量各组的体重变化的结果中,用1nM肽处理的治疗组中的体重减少低于任何其他组,这也是抑制关节炎的效果。

[0163] 实施例5:毒性测试

[0164] (1)细胞培养

[0165] HeLa细胞系购自ATCC。将HeLa细胞系保持在补充有10%胎牛血清(Invitrogen, USA)、Earle's盐、非必需氨基酸、丙酮酸钠、100μg/ml青霉素和100单位/ml链霉素的MEM中,然后在37℃、5%CO₂下温育。

[0166] (2)细胞存活力和毒性分析

[0167] 将细胞接种至96孔板中,向各孔中添加补充有10%胎牛血清(Invitrogen, USA)、100μg/ml青霉素和100单位/ml链霉素的培养基。将细胞培养在37℃、5%CO₂的温育器中培养12小时。温育后,用PBS洗涤板,添加MEM(最低基础培养基)进行1小时的饥饿。向各孔中添加20μM PEP 1的100μl水溶液,然后将细胞在37℃下温育24小时。温育后,使用MTT测定来评价细胞存活力和毒性。结果示于图10中。

[0168] 【序列】

[0169] SEQ ID NO:1(PEP 1)EARPALLTSRLRFIPK

[0170] SEQ ID NO:2(人端粒酶)

[0171]

MPRAPRCRAVRSLLRSHYREVLPLATFVRRLGPQGWRVLVQRGDPAAFRALVAQCLVCVPWDARPPPAAPSFRQVSCL

KELVARVLQRLCERGAKNVLAFGFALLDGARGGPPEAFTTSVRSYLPNTVTDALRGSGAWGLLLRRVGDDVLVHLLA
RCALFVLVAPSCAYQVCGPPLYQLGAATQARPPPHASGPRRRRLGCERAWNHSVREAGVPLGLPAPGARRRGGSASRS
LPLPKRPRRGAAPEPERTPVGQGSWAHPGRTRGPSDRGFCVVSAPARPAEEATSLEGALSGTRHSHPSVGRQHHAGPP
STSRPPRPWDTPCPPVYAETKHFLYSSGDKEQLRPSFLLSSLRPSLTGARRLVETIFLGSRPWMPGTPRRLPRLPQR
YWQMRPLFLELLGNHAQCPYGVLLKTHCPLRAAVTPAAGVCAREKPQGSVAAPEEEDTDPRRLVQLLRQHSSPWQVY
GFVRACLRLVPPGLWGSRHNERFLRNTKKFISLGKHAKLSLQELTWKMSVRDCAWLRRSPGVGCVPAAEHRLREE
ILAKFLHWLMSVYVVELLRSFFYVTETTFQKNRLFFYRKS VWSKLQSIGIRQHLKRVQLRELSEAEVRQHREARPAL
LTSRLRFIPKPDGLRPIVNMDYVVGARTFRREKRAERLTSRVKALFSVLNYERARRPGLLGASVLGLDDIHRAWRTF
VLRVRAQDPPPELYFVKVDVTGAYDTIPQDRLTEVIASIIKPQNTYCVRRYAVVQKAAHGHVRKAFKSHVSTLTDLQ
PYMRQFVAHLQETSPLRDAVVIEQSSSLNEASSGLFDVFLRFMCHHAVRIRGKSYVQCQGI PQGSILSTLLCSLCYG
DMENKLFAGIRRDGLLLRLVDDFLLVTPHLTHAKTFLRTLVRGVPEYGCVVNLRKTVVNFVVEDEALGGTAFVQMPA
HGLFPWCGLLLDTRTLEVQSDYSSYARTSIRASLTFNRGFKAGRNMRRKLFGLRLKCHSLFLDLQVNSLQTVCTNI
YKILLQAYRFHACVLQLPFHQVWKNPTFFLRVISDTASLCYSILKAKNAGMSLGAKGAAGPLPSEAVQWLCHQAF
LLKLTRHRVTYVPLLGSLRTAQTQLSRKLP GTTLTALEAAANPALPSDFKTILD

- <110> 凯尔杰姆维克斯有限公司
金商在
- <120> 用于预防和治疗类风湿性关节炎的组合物
- <130> 0F13P124/CN
- <150> KR1020120050529
<151> 2012-05-11
- <150> KR1020120050533
<151> 2012-05-11
- <150> KR1020120071989
<151> 2012-07-02
- <150> KR1020120104207
<151> 2012-09-19
- [0001] <160> 2
- <170> PatentIn version 3.2
- <210> 1
<211> 16
<212> PRT
<213> 智人
- <400> 1
Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile Pro Lys
1 5 10 15
- <210> 2
<211> 1132
<212> PRT
<213> 智人
- <400> 180
Met Pro Arg Ala Pro Arg Cys Arg Ala Val Arg Ser Leu Leu Arg Ser
1 5 10 15

His Tyr Arg Glu Val Leu Pro Leu Ala Thr Phe Val Arg Arg Leu Gly	
20	25 30
Pro Gln Gly Trp Arg Leu Val Gln Arg Gly Asp Pro Ala Ala Phe Arg	
35	40 45
Ala Leu Val Ala Gln Cys Leu Val Cys Val Pro Trp Asp Ala Arg Pro	
50	55 60
Pro Pro Ala Ala Pro Ser Phe Arg Gln Val Ser Cys Leu Lys Glu Leu	
65	70 75 80
Val Ala Arg Val Leu Gln Arg Leu Cys Glu Arg Gly Ala Lys Asn Val	
85	90 95
Leu Ala Phe Gly Phe Ala Leu Leu Asp Gly Ala Arg Gly Gly Pro Pro	
100	105 110
Glu Ala Phe Thr Thr Ser Val Arg Ser Tyr Leu Pro Asn Thr Val Thr	
115	120 125
[0002] Asp Ala Leu Arg Gly Ser Gly Ala Trp Gly Leu Leu Leu Arg Arg Val	
130	135 140
Gly Asp Asp Val Leu Val His Leu Leu Ala Arg Cys Ala Leu Phe Val	
145	150 155 160
Leu Val Ala Pro Ser Cys Ala Tyr Gln Val Cys Gly Pro Pro Leu Tyr	
165	170 175
Gln Leu Gly Ala Ala Thr Gln Ala Arg Pro Pro Pro His Ala Ser Gly	
180	185 190
Pro Arg Arg Arg Leu Gly Cys Glu Arg Ala Trp Asn His Ser Val Arg	
195	200 205
Glu Ala Gly Val Pro Leu Gly Leu Pro Ala Pro Gly Ala Arg Arg Arg	
210	215 220
Gly Gly Ser Ala Ser Arg Ser Leu Pro Leu Pro Lys Arg Pro Arg Arg	
225	230 235 240
Gly Ala Ala Pro Glu Pro Glu Arg Thr Pro Val Gly Gln Gly Ser Trp	

		245						250						255			
		Ala	His	Pro	Gly	Arg	Thr	Arg	Gly	Pro	Ser	Asp	Arg	Gly	Phe	Cys	Val
					260					265					270		
		Val	Ser	Pro	Ala	Arg	Pro	Ala	Glu	Glu	Ala	Thr	Ser	Leu	Glu	Gly	Ala
					275					280					285		
		Leu	Ser	Gly	Thr	Arg	His	Ser	His	Pro	Ser	Val	Gly	Arg	Gln	His	His
					290					295					300		
		Ala	Gly	Pro	Pro	Ser	Thr	Ser	Arg	Pro	Pro	Arg	Pro	Trp	Asp	Thr	Pro
		305							310					315			320
		Cys	Pro	Pro	Val	Tyr	Ala	Glu	Thr	Lys	His	Phe	Leu	Tyr	Ser	Ser	Gly
					325						330						335
		Asp	Lys	Glu	Gln	Leu	Arg	Pro	Ser	Phe	Leu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Pro
					340						345						350
[0003]		Ser	Leu	Thr	Gly	Ala	Arg	Arg	Leu	Val	Glu	Thr	Ile	Phe	Leu	Gly	Ser
					355					360							365
		Arg	Pro	Trp	Met	Pro	Gly	Thr	Pro	Arg	Arg	Leu	Pro	Arg	Leu	Pro	Gln
					370												380
		Arg	Tyr	Trp	Gln	Met	Arg	Pro	Leu	Phe	Leu	Glu	Leu	Leu	Gly	Asn	His
					385												400
		Ala	Gln	Cys	Pro	Tyr	Gly	Val	Leu	Leu	Lys	Thr	His	Cys	Pro	Leu	Arg
					405												415
		Ala	Ala	Val	Thr	Pro	Ala	Ala	Gly	Val	Cys	Ala	Arg	Glu	Lys	Pro	Gln
					420												430
		Gly	Ser	Val	Ala	Ala	Pro	Glu	Glu	Glu	Asp	Thr	Asp	Pro	Arg	Arg	Leu
					435												445
		Val	Gln	Leu	Leu	Arg	Gln	His	Ser	Ser	Pro	Trp	Gln	Val	Tyr	Gly	Phe
					450												460
		Val	Arg	Ala	Cys	Leu	Arg	Arg	Leu	Val	Pro	Pro	Gly	Leu	Trp	Gly	Ser
					465												480

	Arg	His	Asn	Glu	Arg	Arg	Phe	Leu	Arg	Asn	Thr	Lys	Lys	Phe	Ile	Ser	
					485					490					495		
	Leu	Gly	Lys	His	Ala	Lys	Leu	Ser	Leu	Gln	Glu	Leu	Thr	Trp	Lys	Met	
				500					505					510			
	Ser	Val	Arg	Asp	Cys	Ala	Trp	Leu	Arg	Arg	Ser	Pro	Gly	Val	Gly	Cys	
			515					520					525				
	Val	Pro	Ala	Ala	Glu	His	Arg	Leu	Arg	Glu	Glu	Ile	Leu	Ala	Lys	Phe	
		530					535					540					
	Leu	His	Trp	Leu	Met	Ser	Val	Tyr	Val	Val	Glu	Leu	Leu	Arg	Ser	Phe	
	545					550					555					560	
	Phe	Tyr	Val	Thr	Glu	Thr	Thr	Phe	Gln	Lys	Asn	Arg	Leu	Phe	Phe	Tyr	
				565					570						575		
	Arg	Lys	Ser	Val	Trp	Ser	Lys	Leu	Gln	Ser	Ile	Gly	Ile	Arg	Gln	His	
				580					585					590			
[0004]	Leu	Lys	Arg	Val	Gln	Leu	Arg	Glu	Leu	Ser	Glu	Ala	Glu	Val	Arg	Gln	
			595					600					605				
	His	Arg	Glu	Ala	Arg	Pro	Ala	Leu	Leu	Thr	Ser	Arg	Leu	Arg	Phe	Ile	
		610					615					620					
	Pro	Lys	Pro	Asp	Gly	Leu	Arg	Pro	Ile	Val	Asn	Met	Asp	Tyr	Val	Val	
	625					630					635				640		
	Gly	Ala	Arg	Thr	Phe	Arg	Arg	Glu	Lys	Arg	Ala	Glu	Arg	Leu	Thr	Ser	
				645					650					655			
	Arg	Val	Lys	Ala	Leu	Phe	Ser	Val	Leu	Asn	Tyr	Glu	Arg	Ala	Arg	Arg	
				660					665					670			
	Pro	Gly	Leu	Leu	Gly	Ala	Ser	Val	Leu	Gly	Leu	Asp	Asp	Ile	His	Arg	
			675					680					685				
	Ala	Trp	Arg	Thr	Phe	Val	Leu	Arg	Val	Arg	Ala	Gln	Asp	Pro	Pro	Pro	
		690					695					700					
	Glu	Leu	Tyr	Phe	Val	Lys	Val	Asp	Val	Thr	Gly	Ala	Tyr	Asp	Thr	Ile	
	705					710					715				720		

	Pro	Gln	Asp	Arg	Leu	Thr	Glu	Val	Ile	Ala	Ser	Ile	Ile	Lys	Pro	Gln	
					725					730					735		
	Asn	Thr	Tyr	Cys	Val	Arg	Arg	Tyr	Ala	Val	Val	Gln	Lys	Ala	Ala	His	
				740					745					750			
	Gly	His	Val	Arg	Lys	Ala	Phe	Lys	Ser	His	Val	Ser	Thr	Leu	Thr	Asp	
			755					760					765				
	Leu	Gln	Pro	Tyr	Met	Arg	Gln	Phe	Val	Ala	His	Leu	Gln	Glu	Thr	Ser	
		770					775					780					
	Pro	Leu	Arg	Asp	Ala	Val	Val	Ile	Glu	Gln	Ser	Ser	Ser	Leu	Asn	Glu	
	785				790						795					800	
	Ala	Ser	Ser	Gly	Leu	Phe	Asp	Val	Phe	Leu	Arg	Phe	Met	Cys	His	His	
				805					810					815			
	Ala	Val	Arg	Ile	Arg	Gly	Lys	Ser	Tyr	Val	Gln	Cys	Gln	Gly	Ile	Pro	
				820					825					830			
[0005]	Gln	Gly	Ser	Ile	Leu	Ser	Thr	Leu	Leu	Cys	Ser	Leu	Cys	Tyr	Gly	Asp	
			835					840					845				
	Met	Glu	Asn	Lys	Leu	Phe	Ala	Gly	Ile	Arg	Arg	Asp	Gly	Leu	Leu	Leu	
		850					855					860					
	Arg	Leu	Val	Asp	Asp	Phe	Leu	Leu	Val	Thr	Pro	His	Leu	Thr	His	Ala	
	865				870					875					880		
	Lys	Thr	Phe	Leu	Arg	Thr	Leu	Val	Arg	Gly	Val	Pro	Glu	Tyr	Gly	Cys	
				885					890						895		
	Val	Val	Asn	Leu	Arg	Lys	Thr	Val	Val	Asn	Phe	Pro	Val	Glu	Asp	Glu	
			900						905					910			
	Ala	Leu	Gly	Gly	Thr	Ala	Phe	Val	Gln	Met	Pro	Ala	His	Gly	Leu	Phe	
		915					920					925					
	Pro	Trp	Cys	Gly	Leu	Leu	Leu	Asp	Thr	Arg	Thr	Leu	Glu	Val	Gln	Ser	
		930					935					940					
	Asp	Tyr	Ser	Ser	Tyr	Ala	Arg	Thr	Ser	Ile	Arg	Ala	Ser	Leu	Thr	Phe	

945	950	955	960
Asn Arg Gly Phe Lys Ala Gly Arg Asn Met Arg Arg Lys Leu Phe Gly			
965	970	975	
Val Leu Arg Leu Lys Cys His Ser Leu Phe Leu Asp Leu Gln Val Asn			
980	985	990	
Ser Leu Gln Thr Val Cys Thr Asn Ile Tyr Lys Ile Leu Leu Leu Gln			
995	1000	1005	
Ala Tyr Arg Phe His Ala Cys Val Leu Gln Leu Pro Phe His Gln Gln			
1010	1015	1020	
Val Trp Lys Asn Pro Thr Phe Phe Leu Arg Val Ile Ser Asp Thr Ala			
1025	1030	1035	1040
[0006] Ser Leu Cys Tyr Ser Ile Leu Lys Ala Lys Asn Ala Gly Met Ser Leu			
1045	1050	1055	
Gly Ala Lys Gly Ala Ala Gly Pro Leu Pro Ser Glu Ala Val Gln Trp			
1060	1065	1070	
Leu Cys His Gln Ala Phe Leu Leu Lys Leu Thr Arg His Arg Val Thr			
1075	1080	1085	
Tyr Val Pro Leu Leu Gly Ser Leu Arg Thr Ala Gln Thr Gln Leu Ser			
1090	1095	1100	
Arg Lys Leu Pro Gly Thr Thr Leu Thr Ala Leu Glu Ala Ala Ala Asn			
1105	1110	1115	1120
Pro Ala Leu Pro Ser Asp Phe Lys Thr Ile Leu Asp			
1125	1130		

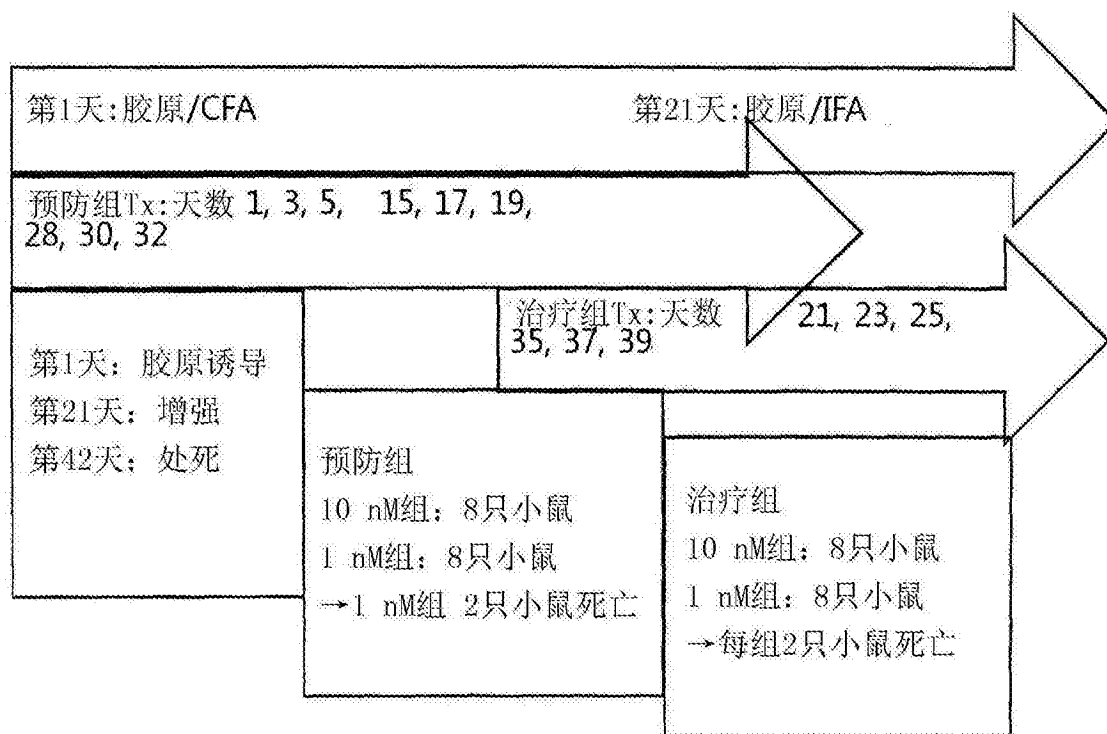


图1

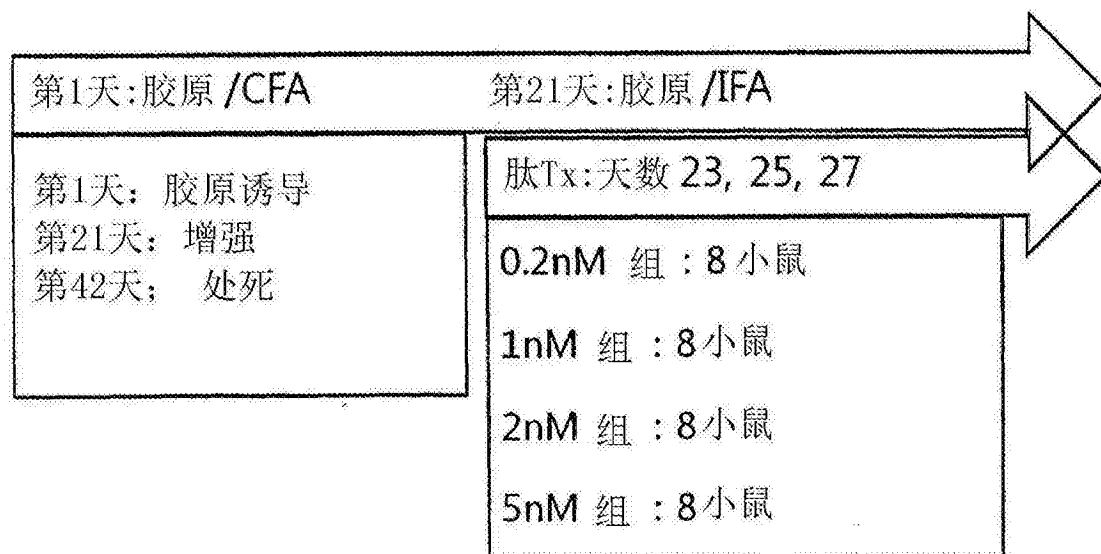


图2

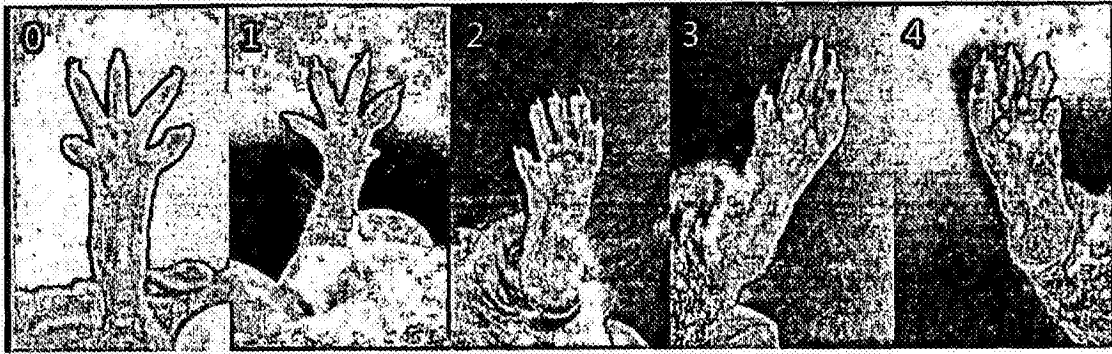


图3

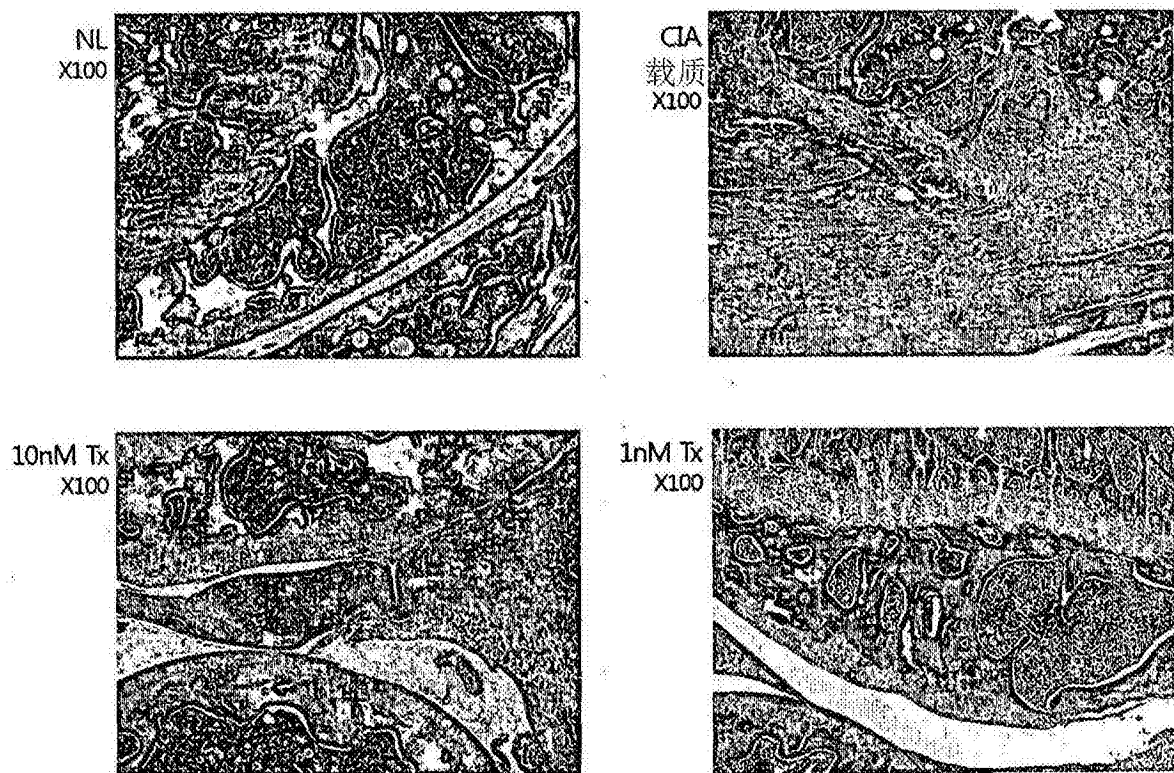


图4

关节炎评分; 1nM

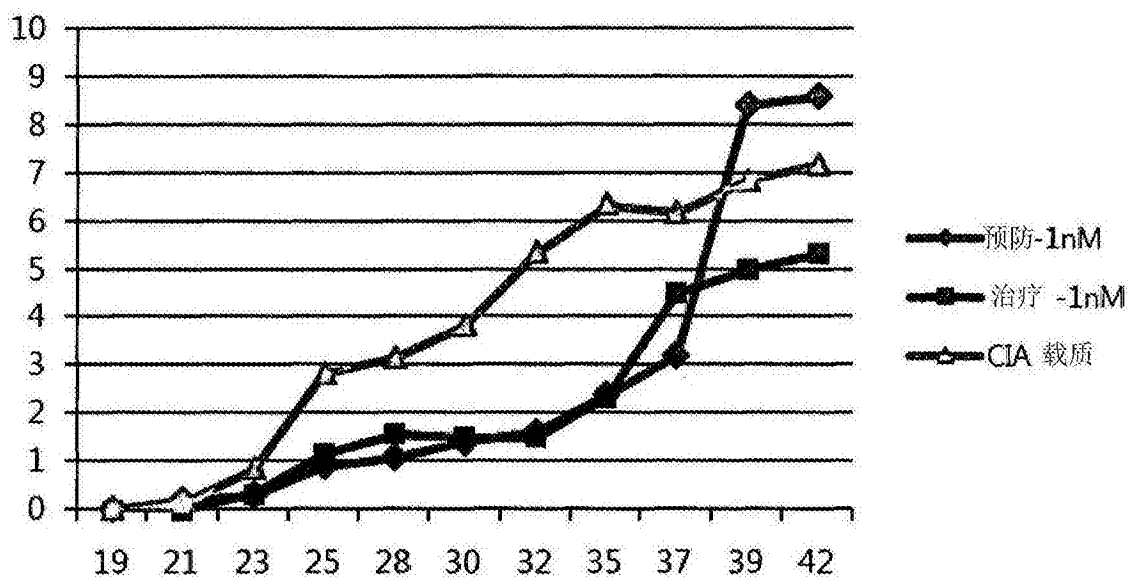


图5

关节炎评分; 10nM

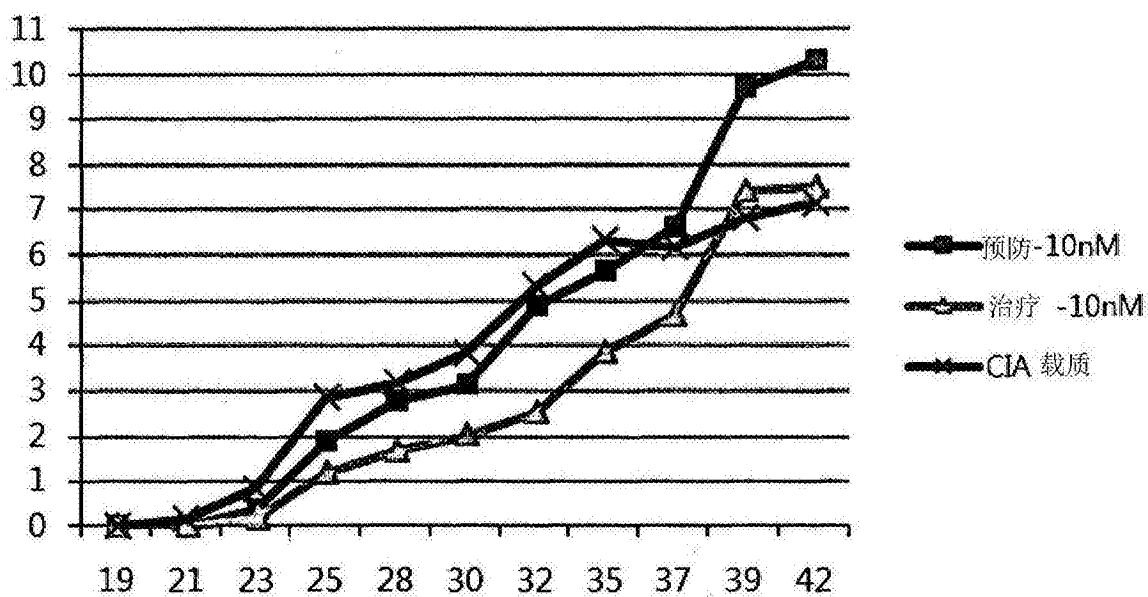
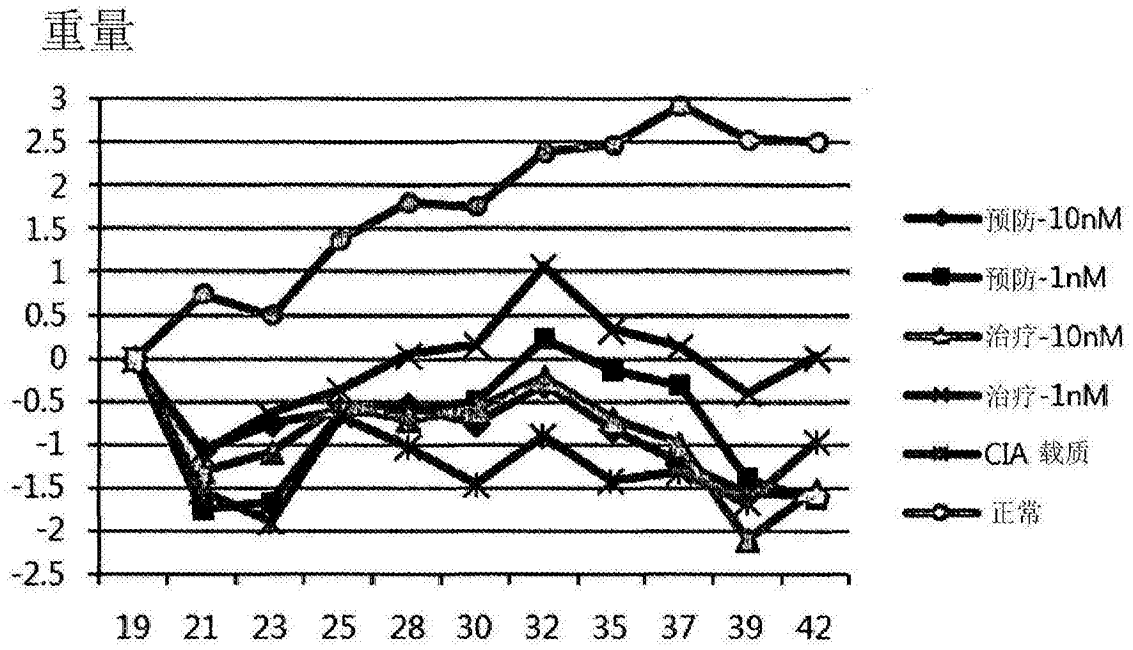
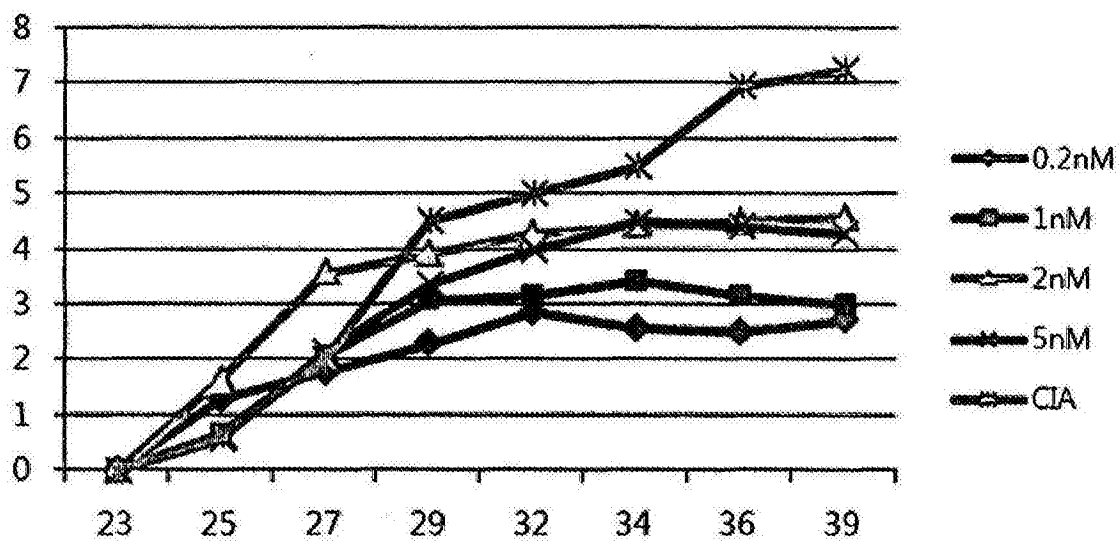


图6



关节炎评分



关节炎评分;低浓度

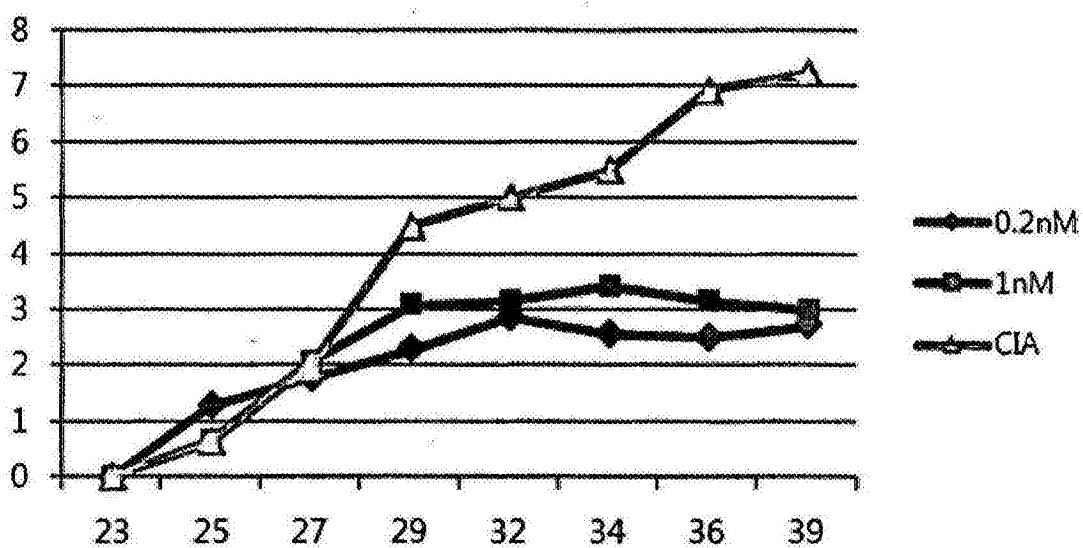
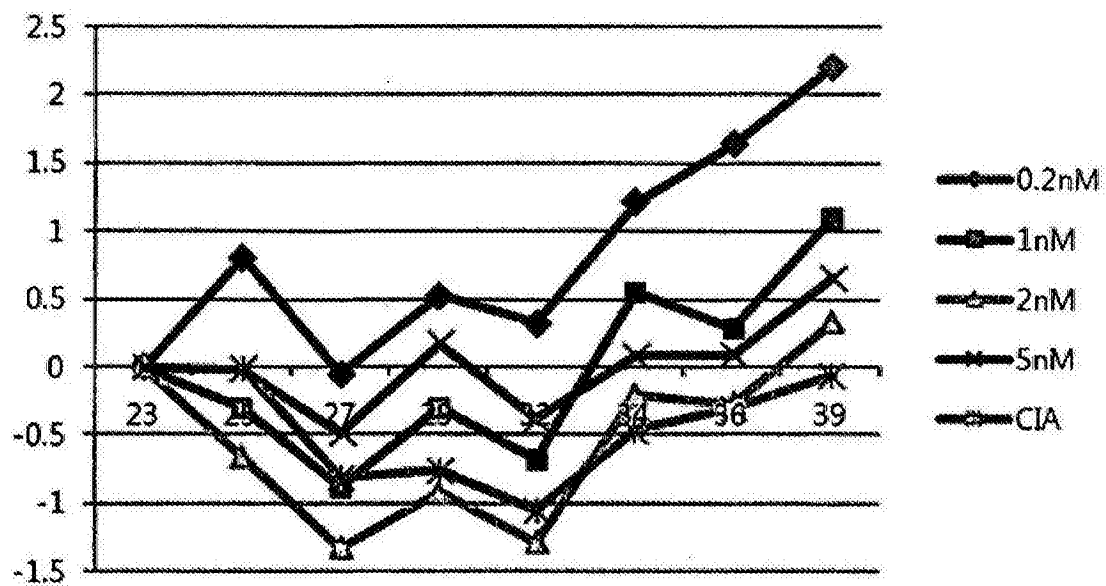


图8

重量



重量;低浓度

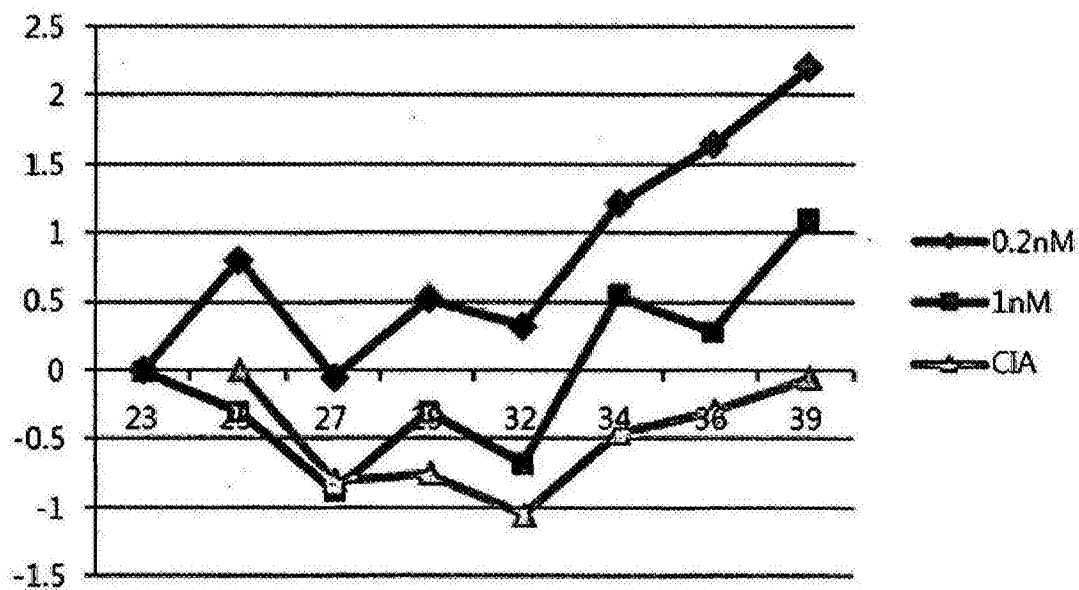


图9

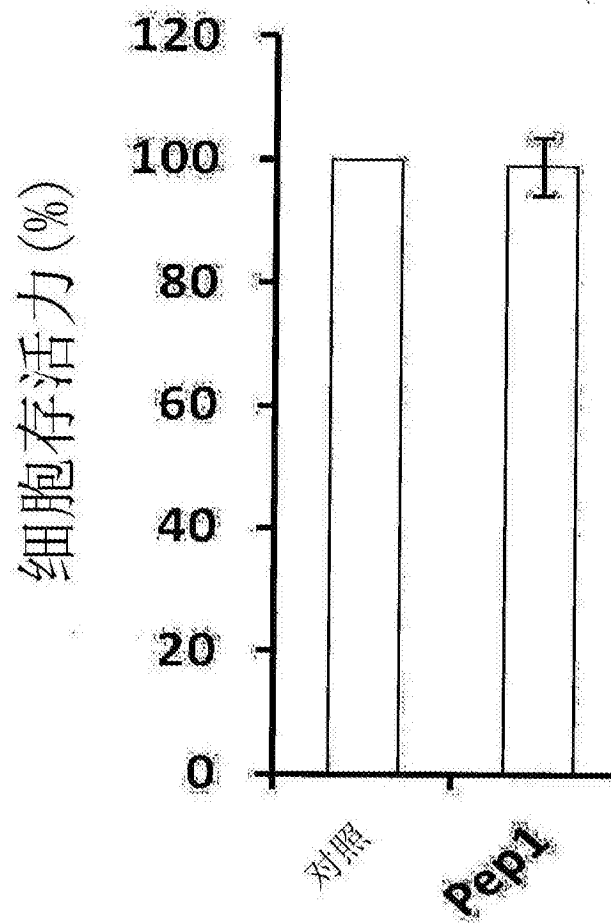


图10