



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103087153 B

(45) 授权公告日 2015. 05. 06

(21) 申请号 201110335251. 1

A61P 17/00(2006. 01)

(22) 申请日 2011. 10. 28

A61P 15/08(2006. 01)

(73) 专利权人 上海市第一人民医院
地址 200080 上海市虹口区海宁路 100 号

(56) 对比文件

WO 2006/128553 A1, 2006. 12. 07, 摘要及说明书第 7 页第 4-5 段.

(72) 发明人 许迅 郑颖

CN 1653177 A, 2005. 08. 10, 全文.

(74) 专利代理机构 上海一平知识产权代理有限公司 31266

US 2009/0068679 A1, 2009. 03. 12, 全文.

代理人 祝莲君 雷芳

审查员 夏文静

(51) Int. Cl.

C07K 14/00(2006. 01)

C12N 15/11(2006. 01)

A61K 38/16(2006. 01)

A61P 27/02(2006. 01)

A61P 35/00(2006. 01)

A61P 9/10(2006. 01)

A61P 9/00(2006. 01)

A61P 7/02(2006. 01)

A61P 1/00(2006. 01)

A61P 1/04(2006. 01)

A61P 29/00(2006. 01)

A61P 19/02(2006. 01)

A61P 17/06(2006. 01)

权利要求书1页 说明书13页
序列表1页 附图4页

(54) 发明名称

一类新的抑制新生血管的小肽及其应用

(57) 摘要

本发明涉及一类预防和抑制血管新生的多肽及其应用。本发明还涉及所述多肽的制法和应用以及含所述多肽的药物组合物。本发明多肽具有多种优点,例如分子量小,可透过各种眼组织屏障;水溶性好,能在中性泪液、房水和玻璃体液中保持较高的浓度等。

1. 一种多肽,或其药学上可接受的盐,所述多肽选自下组:
 - (a) SEQ ID NO:1 所示氨基酸序列的多肽;
 - (b) SEQ ID NO:1 所示氨基酸序列的衍生多肽,且所述的衍生多肽选自下组:
 - 衍生多肽 1:序列同 SEQ ID NO:1,其中第 4 位 Val 被 Ile 替换;
 - 衍生多肽 2:序列同 SEQ ID NO:1,其中第 12 位 Arg 被 Pro 替换;
 - 衍生多肽 3:序列同 SEQ ID NO:1,其中第 15 位 Asp 被 Glu 替换;
 - 衍生多肽 4:序列同 SEQ ID NO:1,其中第 23 位 Thr 被 Arg 替换;
 - 衍生多肽 5:序列同 SEQ ID NO:1,其中缺失第 8 位 Leu。
2. 一种分离的核酸分子,其特征在于,它编码权利要求 1 所述的多肽。
3. 一种药物组合物,其特征在于,它含有:
 - (a) 权利要求 1 所述多肽或其药学上可接受的盐;和
 - (b) 药学上可接受的载体或赋形剂。
4. 如权利要求 3 所述的药物组合物,其特征在于,所述组合物的剂型为针剂、眼药水、眼用凝胶或眼药膏。
5. 如权利要求 1 所述的多肽或药学上可接受的盐的用途,其特征在于,用于制备抑制血管新生或防治与血管新生相关疾病的药物;其中,所述的与血管新生相关疾病的选自下组:新生血管性眼病、肿瘤新生血管。
6. 如权利要求 5 所述的用途,其特征在于,所述的新生血管性眼病包括老年性黄斑变性、增生性糖尿病视网膜病变、视网膜血管阻断性疾病、早产儿视网膜病变、角膜感染、新生血管性青光眼。

一类新的抑制新生血管的小肽及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物医药领域,具体地,涉及一类新的抑制新生血管的小肽,所述的小肽是源于胎盘生长因子(Placenta Growth Factor,PlGF)的多肽。本发明还涉及所述多肽的制法和应用以及含所述多肽的药物组合物。

背景技术

[0002] 新生血管的形成是一个极其复杂的过程,它包括:现存血管的扩张、血管通透性的增加、血管周围基质的降解、内皮细胞的激活增殖、迁移以及新的毛细血管样管腔的形成。

[0003] 在眼部,约 2/3 的致盲性疾病均与病理性新生血管有关,例如:单纯疱疹性角膜基质炎引起的角膜新生血管,年龄相关性黄斑变性中的脉络膜新生血管,以及糖尿病视网膜病变或早产儿视网膜病变中的视网膜新生血管等。目前临床上,对于眼部病理性新生血管常规运用激光光凝、光动力学疗法(Photodynamic therapy,PDT)以及经瞳孔温热疗法(Thermal transpupillary therapy,TTT)等进行治疗。然而,这些治疗手段不仅对局部组织易造成破坏,其远期疗效也并不十分令人满意。因此,近年来人们不断尝试开发治疗眼部病理性新生血管更有效的方法。

[0004] 在开发有效的血管新生抑制剂时,应充分考虑到眼科用药的特殊性。

[0005] 第一,眼部存在多个解剖性和功能性的屏障。全身给药常常由于血-房水屏障和血-视网膜屏障而无法在眼组织局部达到足够的药物浓度;局部给药,如玻璃体腔注射,大于 76.5kDa 的大分子在理论上很难穿透视网膜作用于视网膜和脉络膜新生血管。对于眼表给药,药物必须要先后穿透亲脂性的角膜上皮细胞紧密连接和亲水性的角膜基质,因此只有具备适当脂溶性、低分子量或能与眼表组织内的转运体(如:氨基酸转运体、寡肽转运体等)结合的药物才能到达前房发挥作用。

[0006] 第二,药物在亲水的泪液、房水、玻璃体液中溶解的程度与其有效性呈正相关。

[0007] 第三,基于上述主要原因,眼科用药的生物利用度很低;要使之提高,可加大给药的浓度。用于治疗肿瘤新生血管的化合物毒副作用较为明显,全身和局部均无法高剂量给药。此外,分子量较大的外源性蛋白质也是敏感的异物源,可对眼部组织(如:葡萄膜)造成免疫损伤。

[0008] 第四,目前虽然已经有一系列相对安全的内源性血管新生抑制剂被先后证实,如血管抑素(angiotatin),它由纤溶酶原 Kringle 结构域 1-4(plasminogen Kringle 1-4)组成,可明显抑制血管依赖性肿瘤的生长,但由于其分子量较大且空间构象复杂,故在制备过程中存在重组表达纯化工艺繁琐和内毒素残留等不足。正是由于上述种种条件的限制,目前用于治疗眼部新生血管的药物十分有限,比如重组抗人 VEGF 单克隆抗体 bevacizumab(Avastin)、重组抗人 VEGF 单克隆抗体片段 ranibizumab(Lucentis)等,但它们价格高昂,并且需反复经玻璃体腔给药,甚至可引起血管栓塞等风险。

[0009] 由此可见,寻找具有特异生物学活性和生物相容性的小分子抑制剂,经无创或微创的给药途径透过各种眼组织屏障,提高眼局部的生物利用度,降低给药剂量,减少局部和

全身的副作用,对新生血管性眼病的临床防治具有十分重要的意义。因此,本领域迫切需要开发一种适于眼球组织的有效安全的小分子新生血管抑制剂。

发明内容

[0010] 本发明的目的是提供一类适于眼球组织的有效安全的可抑制血管新生的小分子多肽及其片段、类似物和衍生物。

[0011] 本发明的另一目的是提供含所述多肽的制法和应用。

[0012] 在本发明的第一方面,提供了在本发明的第一方面,提供了一种下式 I 表示的多肽,或其药学上可接受的盐

[0013] [Xaa0]-[Xaa1]-[Xaa2]-[Xaa3]-[Xaa4]-[Xaa5]-[Xaa6]-[Xaa7]-[Xaa8]-

[0014] [Xaa9]-[Xaa10]-[Xaa11]-[Xaa12]-[Xaa13]-[Xaa14]-[Xaa15]-[Xaa16]-

[0015] [Xaa17]-[Xaa18]-[Xaa19]-[Xaa20]-[Xaa21]-[Xaa22]-[Xaa23]-[Xaa24]

[0016] -[Xaa25]-[Xaa26]-[Xaa27]-[Xaa28] (I)

[0017] 式中,

[0018] Xaa0 是无,或 1-3 个氨基酸构成肽段;

[0019] Xaa1 是选自下组的氨基酸:Thr 或 Ser;

[0020] Xaa2 是选自下组的氨基酸:Ala、Val、Leu 或 Ile;

[0021] Xaa3 是选自下组的氨基酸:Asn、Gln、His、Lys 或 Arg;

[0022] Xaa4 是选自下组的氨基酸:Val、Ile、Leu、Met、Phe 或 Ala;

[0023] Xaa5 是选自下组的氨基酸:Thr 或 Ser;

[0024] Xaa6 是选自下组的氨基酸:Met、Leu、Phe、或 Ile;

[0025] Xaa7 是选自下组的氨基酸:Gln 或 Asn;

[0026] Xaa8 是选自下组的氨基酸:Leu、Ile、Val、Met、Ala 或 Phe;

[0027] Xaa9 是选自下组的氨基酸:Leu、Ile、Val、Met、Ala 或 Phe;

[0028] Xaa10 是选自下组的氨基酸:Lys、Arg、Gln 或 Asn;

[0029] Xaa11 是选自下组的氨基酸:Ile、Leu、Val、Met、Ala 或 Phe;

[0030] Xaa12 是选自下组的氨基酸:Arg、Pro、Lys、Gln 或 Asn;

[0031] Xaa13 是选自下组的氨基酸:Ser 或 Thr;

[0032] Xaa14 是选自下组的氨基酸:Gly、Pro、或 Ala;

[0033] Xaa15 是选自下组的氨基酸:Asp、Glu;

[0034] Xaa16 是选自下组的氨基酸:Arg、Lys、Gln 或 Asn;

[0035] Xaa17 是选自下组的氨基酸:Pro 或 Ala;

[0036] Xaa18 是选自下组的氨基酸:Ser 或 Thr;

[0037] Xaa19 是选自下组的氨基酸:Tyr、Trp、Phe、Thr 或 Ser;

[0038] Xaa20 是选自下组的氨基酸:Val、Ile、Leu、Met、Phe 或 Ala;

[0039] Xaa21 是选自下组的氨基酸:Glu 或 Arg;

[0040] Xaa22 是选自下组的氨基酸:Leu 或 Ser;

[0041] Xaa23 是选自下组的氨基酸:Thr 或 Arg;

[0042] Xaa24 是选自下组的氨基酸:Phe 或 Ser;

- [0043] Xaa25 是选自下组的氨基酸 :Ser 或 Arg ;
- [0044] Xaa26 是选自下组的氨基酸 :Gln 或 Ser ;
- [0045] Xaa27 是选自下组的氨基酸 :His 或 Arg ;
- [0046] Xaa28 是选自下组的氨基酸 :无,或 1-3 个氨基酸构成肽段 ;
- [0047] 并且所述的多肽具有抑制血管新生的活性,且所述多肽的长度为 27-33 个氨基酸。
- [0048] 在另一优选例中,所述多肽的长度为 28-31 个氨基酸。
- [0049] 在另一优选例中,Xaa28 是 3 个氨基酸构成的肽段。
- [0050] 在另一优选例中,Xaa0 为 Lys、Glu、Pro-Ile-Lys 或 Ile-Lys。
- [0051] 在另一优选例中,所述多肽选自下组 :
- [0052] (a) 具有 SEQ ID NO :1 所示氨基酸序列的多肽 ;
- [0053] (b) 将 SEQ ID NO :1 所示氨基酸序列经过 1-5 个 (较佳地 1-3,更佳地 1-2 个) 氨基酸残基的取代、缺失或添加而形成的,且具有抑制血管新生功能的由 (a) 衍生的多肽。
- [0054] 在另一优选例中,所述的衍生多肽保留了 $\geq 70\%$ 的 SEQ ID NO :1 的所示多肽的抑制血管新生活性。
- [0055] 在另一优选例中,所述的衍生多肽与 SEQ ID NO :1 的相同性 $\geq 80\%$,较佳地 $\geq 90\%$;更佳地 $\geq 95\%$ 。
- [0056] 本发明还提供了抑制血管新生功能的、式 I 化合物的二聚体和多聚体形式。
- [0057] 在本发明的第二方面,提供了一种分离的核酸分子,它编码本发明上述的多肽。
- [0058] 在本发明的第三方面,提供了一种药物组合物,它含有 :
- [0059] (a) 本发明上述的多肽或其药学上可接受的盐 ;和
- [0060] (b) 药学上可接受的载体或赋形剂。
- [0061] 在另一优选例中,所述组合物的剂型为眼药水、针剂 (如眼周和眼内注射液)、眼用凝胶或眼药膏。
- [0062] 在另一优选例中,所述的组合物为缓释剂型。
- [0063] 在本发明的第四方面,提供了一种本发明所述多肽或药学上可接受的盐的用途,它们被用于制备抑制血管新生或防治与血管新生相关疾病的药物。
- [0064] 在另一优选例中,所述的与血管新生相关疾病的选自下组 :新生血管性眼病、肿瘤、缺血性心脏病、非炎症性心肌病、冠状动脉硬化、闭塞性动脉硬化、动脉栓塞、动脉血栓、Berger's 病、慢性炎症、炎症性肠病、溃疡、风湿性关节炎、硬皮症、银屑病、不育症或肉瘤状病等。
- [0065] 在另一优选例中,所述的新生血管性眼病包括累及脉络膜、视网膜、角膜或虹膜,包括老年性黄斑变性、增生性糖尿病视网膜病变、视网膜血管阻断性疾病、早产儿视网膜病变、角膜感染、新生血管性青光眼等。
- [0066] 在本发明的第五方面,提供了一种抑制哺乳动物血管新生的方法,包括步骤 :给需要的对象施用本发明所述的多肽或其药学上可接受的盐。
- [0067] 在另一优选例中,所述的对象是人。
- [0068] 在另一优选例中,所述的血管新生是与新生血管性眼病相关的血管新生。
- [0069] 应理解,在本发明范围内中,本发明的上述各技术特征和在下文 (如实施例) 中具

体描述的各技术特征之间都可以互相组合,从而构成新的或优选的技术方案。限于篇幅,在此不再一一累述。

附图说明

[0070] 下列附图用于说明本发明的具体实施方案,而不用限定由权利要求书所界定的本发明范围。

[0071] 图 1 显示了小肽 ZY3 的高效液相色谱分析的纯度鉴定结果。

[0072] 图 2 显示了小肽 ZY3 对人脐静脉血管内皮细胞 HUVECs 增殖的影响,小肽 ZY3 明显具有抑制内皮细胞增殖的效应。相对于 VEGF 组,VEGF+ 小肽 ZY3 各组具有明显抑制 HUVECs 增殖的作用,*P < 0.05,**P < 0.01,差异具有统计学意义。

[0073] 图 3 显示小肽 ZY3 对人脐静脉血管内皮细胞 HUVECs 管腔形成的影响,可见小肽 ZY3 明显具有抑制内皮细胞管腔形成的效应。

[0074] 图 3a、3b、3c 显示小肽 ZY3 对 HUVECs 管腔形成的抑制作用。

[0075] 图 3a 为 VEGF 组;图 3b 为 VEGF+ZY3(160 μM) 组;图 3c 为相对于 VEGF 组,VEGF 和各个浓度的小肽 ZY3 组都具有明显抑制 HUVECs 管腔形成的作用,*P < 0.05,差异具有统计学意义。

[0076] 图 4 显示小肽 ZY3 对鸡胚尿囊膜上新生血管的影响:小肽 ZY3 明显具有抑制新生血管的效应。

[0077] 图 4a-4c 显示滤纸片周 2.5mm 范围内 3-5 级微血管计数结果。

[0078] 图 4a 为 PBS 组;图 4b 为 ZY3(10 μl/片) 组;图 4c 为 ZY3(50 μl/片) 组;图 4d 为相对于 VEGF 组,VEGF+ 各个浓度的小肽 ZY3 组均明显抑制鸡胚尿囊膜新生血管数,且抑制作用呈浓度依赖性,**P < 0.01,差异具有统计学意义。

[0079] 图 5 显示小肽 ZY3 对小鼠角膜病理性新生血管的影响,可见小肽 ZY3 明显具有抑制新生血管的效应。

[0080] 图 5a-5c 显示小鼠角膜新生血管面积,图 5a 为 VEGF 组;图 5b 为 ZY3(0.5 μl/粒) 组;图 5c 为 ZY3(2 μl/粒) 组;图 5d 为相对于 VEGF 组,VEGF+ 小肽 ZY3 不同浓度组,都具有明显抑制小鼠角膜病理性新生血管作用,**P < 0.01,差异具有统计学意义。

具体实施方式

[0081] 本发明人经过广泛而深入的研究,首次制备了一类源自胎盘生长因子的、具有抑制血管新生功能的,分子量小于 5kD(如仅约 3kD)的小分子多肽。具体而言,本发明人应用生物信息学的方法,基于同源性分析和生物学特性等分析,设计了数个候选序列,采用固相法将其合成,分离纯化获得高纯度的小肽 ZY3,并运用 HPLC 及 MS 对之进行鉴定,再经鸡胚尿囊膜血管模型、VEGF 诱导的人脐静脉内皮细胞增殖模型和人脐静脉内皮细胞管腔模型,以及小鼠角膜微囊袋模型筛选,获得了一类新型的、具有预防和治疗血管新生功能的小分子多肽。

[0082] 本发明的小肽的分子量小,可透过各种眼组织屏障;水溶性好,能在中性泪液、房水和玻璃体液中保持较高的浓度;安全性高,对生物组织毒副作用小;眼局部用药生物利用度高,可减少剂量,从而减小全身副作用。在此基础上完成了本发明。

[0083] 胎盘生长因子

[0084] 胎盘生长因子 (Placenta Growth Factor, PIGF) 是 VEGF 家族中的一员,最早于 1991 年由 Maglione 等人从人体胎盘 cDNA 文库中分离纯化而来。除了人体胎盘外,在心、肺、甲状腺、骨骼肌中也可检测到 PIGF 的存在。根据 PIGF 基因的选择性拼接,可以产生 4 种不同的异构体:PIGF-1 (PIGF131), PIGF-2 (PIGF152), PIGF-3 (PIGF203), PIGF-4 (PIGF224), 它们大小不同,分泌特性和受体亲和力也不一样。两个 PIGF 单体通过形成分泌性同源二聚体糖蛋白,再和其受体结合,从而介导之后的信号转导,发挥生物学效应。此外, PIGF 还能和 VEGF 结合形成异源二聚体,影响 VEGF 的信号转导通路。PIGF 能促进血管内皮细胞尤其是微血管内皮细胞增殖,并可作为内皮细胞生长因子的趋化因子来调节内皮细胞的生长,刺激血管生成。PIGF 还能促进单核细胞和内皮细胞的迁移,增加内皮细胞的通透性。尽管 VEGF 也能诱导新生血管形成,可由 PIGF 诱导产生的新生血管具有正常的生理特性而无其他异常改变,这些新生血管不会发生如 VEGF 诱导产生的新生血管所致的水肿、血管瘤、通透性增加等现象。

[0085] 活性多肽

[0086] 在本发明中,术语“本发明多肽”、“ZY3 多肽”、“ZY3 小肽”、“短肽 ZY3”或“肽 ZY3”可互换使用,都指具有血管新生抑制活性的肽 ZY3 氨基酸序列 (TANVTMQLLKIRSGDRPSYVELTFSQH,如 SEQ ID NO:1 所示) 的蛋白或多肽。此外,所述术语还包括具有抑制血管新生功能的、SEQ ID NO:1 序列的变异形式。这些变异形式包括(但并不限于):1-5 个(通常为 1-4 个,较佳地 1-3 个,更佳地 1-2 个,最佳地 1 个)氨基酸的缺失、插入和/或取代,以及在 C 末端和/或 N 末端添加或缺失一个或数个(通常为 5 个以内,较佳地为 3 个以内,更佳地为 2 个以内)氨基酸。例如,在本领域中,用性能相近或相似的氨基酸进行取代时,通常不会改变蛋白质的功能。又比如,在 C 末端和/或 N 末端添加或缺失一个或数个氨基酸通常也不会改变蛋白质的结构和功能。此外,所述术语还包括单体和多聚体形式本发明多肽。该术语还包括线性以及非线性的多肽(如环肽)。

[0087] 本发明还包括 ZY3 多肽的活性片段、衍生物和类似物。如本文所用,术语“片段”、“衍生物”和“类似物”是指基本上保持抑制血管新生功能或活性的多肽。本发明的多肽片段、衍生物或类似物可以是 (i) 有一个或多个保守或非保守性氨基酸残基(优选保守性氨基酸残基)被取代的多肽,或 (ii) 在一个或多个氨基酸残基中具有取代基团的多肽,或 (iii) ZY 多肽与另一个化合物(比如延长多肽半衰期的化合物,例如聚乙二醇)融合所形成的多肽,或 (iv) 附加的氨基酸序列融合于此多肽序列而形成的多肽(与前导序列、分泌序列或 6His 等标签序列融合而形成的然后蛋白)。根据本文的教导,这些片段、衍生物和类似物属于本领域熟练技术人员公知的范围。

[0088] 一类优选的活性衍生物指与式 I 的氨基酸序列相比,有至多 5 个,较佳地至多 3 个,更佳地至多 2 个,最佳地 1 个氨基酸被性质相似或相近的氨基酸所替换而形成多肽。这些保守性变异多肽最好根据表 1 进行氨基酸替换而产生。

[0089] 表 1

[0090]

最初的残基	代表性的取代	优选的取代

Ala(A)	Val ;Leu ;Ile	Val
Arg(R)	Lys ;Gln ;Asn	Lys
Asn (N)	Gln ;His ;Lys ;Arg	Gln
Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	Ser	Ser
Gln (Q)	Asn	Asn
Glu (E)	Asp	Asp
Gly (G)	Pro ;Ala	Ala
His(H)	Asn ;Gln ;Lys ;Arg	Arg
Ile(I)	Leu ;Val ;Met ;Ala ;Phe	Leu
Leu(L)	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	Leu
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	Leu

[0091] 发明还提供 ZY3 多肽的类似物。这些类似物与天然 ZY3 多肽的差别可以是氨基酸序列上的差异,也可以是不影响序列的修饰形式上的差异,或者兼而有之。类似物还包括具有不同于天然 L-氨基酸的残基(如 D-氨基酸)的类似物,以及具有非天然存在的或合成的氨基酸(如 β 、 γ -氨基酸)的类似物。应理解,本发明的多肽并不限于上述例举的代表性的多肽。

[0092] 修饰(通常不改变一级结构)形式包括:体内或体外的多肽的化学衍生形式如乙酰化或羧基化。修饰还包括糖基化,如那些在多肽的合成和加工中或进一步加工步骤中进

行糖基化修饰而产生的多肽。这种修饰可以通过将多肽暴露于进行糖基化的酶（如哺乳动物的糖基化酶或去糖基化酶）而完成。修饰形式还包括具有磷酸化氨基酸残基（如磷酸酪氨酸，磷酸丝氨酸，磷酸苏氨酸）的序列。还包括被修饰从而提高了其抗蛋白水解性能或优化了溶解性能的多肽。

[0093] 本发明多肽还可以以由药学上或生理学可接受的酸或碱衍生的盐形式使用。这些盐包括（但不限于）与如下酸形成的盐：氢氯酸、氢溴酸、硫酸、柠檬酸、酒石酸、磷酸、乳酸、丙酮酸、乙酸、琥珀酸、草酸、富马酸、马来酸、草酰乙酸、甲磺酸、乙磺酸、苯磺酸、或羟乙磺酸。其他盐包括：与碱金属或碱土金属（如钠、钾、钙或镁）形成的盐，以及以酯、氨基甲酸酯或其他常规的“前体药物”的形式。

[0094] 编码序列

[0095] 本发明还涉及编码 ZY3 多肽的多核苷酸。一种优选的编码序列是 (SEQ ID NO :2 : ACGGCCAATGTCACCATGCAGCTCCTAAAGATCCGTTCTGGGGACCGGCCCTCTACGTGGAGCTGACGTTCTCTCAGCAC), 它编码 SEQ ID NO :1 所示的短肽 ZY3。

[0096] 本发明的多核苷酸可以是 DNA 形式或 RNA 形式。DNA 可以是编码链或非编码链。编码成熟多肽的编码区序列可以与 SEQ ID NO :2 所示的编码区序列相同或者是简并的变异体。如本文所用，以 SEQ ID NO :2 为例，“简并的变异体”在本发明中是指编码具有 SEQ ID NO :1 序列的多肽，但与 SEQ ID NO :2 中相应编码区序列有差别的核酸序列。

[0097] 本发明的 ZY3 核苷酸全长序列或其片段通常可以用 PCR 扩增法、重组法或人工合成的方法获得。目前，已经可以完全通过化学合成来得到编码本发明多肽（或其片段，或其衍生物）的 DNA 序列。然后可将该 DNA 序列引入本领域中已知的各种现有的 DNA 分子（或如载体）和细胞中。

[0098] 本发明也涉及包含本发明的多核苷酸的载体，以及用本发明的载体或 ZY 多肽编码序列经基因工程产生的宿主细胞。

[0099] 另一方面，本发明还包括对 ZY3 多肽具有特异性的多克隆抗体和单克隆抗体，尤其是单克隆抗体。

[0100] 制备方法

[0101] 本发明多肽可以是重组多肽或合成多肽。本发明的多肽可以是化学合成的，或重组的。相应地，本发明多肽可用常规方法人工合成，也可用重组方法生产。

[0102] 一种优选的方法是使用液相合成技术或固相合成技术，如 Boc 固相法、Fmoc 固相法或是两种方法联合使用。固相合成可快速获得样品，可根据目的肽的序列特征选用适当的树脂载体及合成系统。例如，Fmoc 系统中优选的固相载体如连接有肽中 C 端氨基酸的 Wang 树脂，Wang 树脂结构为聚苯乙烯，与氨基酸间的手臂是 4- 烷氧基苄醇；用 25% 六氢吡啶 / 二甲基甲酰胺室温处理 20 分钟，以除去 Fmoc 保护基团，并按照给定的氨基酸序列由 C 端逐个向 N 端延伸。合成完成后，用含 4% 对甲基苯酚的三氟乙酸将合成的胰岛素原相关肽从树脂上切割下来并除去保护基，可过滤除树脂后乙醚沉淀分离得到粗肽。将所得产物的溶液冻干后，用凝胶过滤和反相高压液相层析法纯化所需的肽。当使用 Boc 系统进行固相合成时，优选树脂为连接有肽中 C 端氨基酸的 PAM 树脂，PAM 树脂结构为聚苯乙烯，与氨基酸间的手臂是 4- 羟甲基苯乙酰胺；在 Boc 合成系统中，在去保护、中和、偶联的循环中，用 TFA/ 二氯甲烷 (DCM) 除去保护基团 Boc 并用二异丙基乙胺 (DIEA/ 二氯甲烷中和。肽链缩

合完成后,用含对甲苯酚(5-10%)的氟化氢(HF),在0℃下处理1小时,将肽链从树脂上切下,同时除去保护基团。以50-80%乙酸(含少量巯基乙醇)抽提肽,溶液冻干后进一步用分子筛SephadexG10或Tsk-40f分离纯化,然后再经高压液相纯化得到所需的肽。可以使用肽化学领域内已知的各种偶联剂和偶联方法偶联各氨基酸残基,例如可使用二环己基碳二亚胺(DCC),羟基苯骈三氮唑(HOBt)或1,1,3,3-四脒六氟磷酸酯(HBTU)进行直接偶联。对于合成得到的短肽,其纯度与结构可用反相高效液相和质谱分析进行确证。

[0103] 在一优选例中,本发明多肽ZY3,按其序列,采用固相合成的方法制备,行高效液相色谱纯化,获得高纯度目的肽冻干粉,-20℃贮存。

[0104] 另一种方法是用重组技术产生本发明多肽。通过常规的重组DNA技术,可利用本发明的多核苷酸用来表达或生产重组的ZY3多肽。一般来说有以下步骤:

[0105] (1). 用本发明的编码ZY3多肽的多核苷酸(或变异体),或用含有该多核苷酸的重组表达载体转化或转导合适的宿主细胞;

[0106] (2). 在合适的培养基中培养的宿主细胞;

[0107] (3). 从培养基或细胞中分离、纯化蛋白质。

[0108] 重组多肽可在细胞内、或在细胞膜上表达、或分泌到细胞外。如果需要,可利用其物理的、化学的和其它特性通过各种分离方法分离和纯化重组的蛋白。这些方法是本领域技术人员所熟知的。这些方法的例子包括但并不限于:常规的复性处理、用蛋白沉淀剂处理(盐析方法)、离心、渗透破菌、超处理、超离心、分子筛层析(凝胶过滤)、吸附层析、离子交换层析、高效液相层析(HPLC)和其它各种液相层析技术及这些方法的结合。

[0109] 由于本发明多肽较短,因此可以考虑将多个多肽串联在一起,重组表达后获得多聚体形式的表达产物,然后通过酶切等方法形成所需的小肽。

[0110] 药物组合物和施用方法

[0111] 另一方面,本发明还提供了一种药物组合物,它含有(a)安全有效量的本发明多肽或其药学上可接受的盐;以及(b)药学上可接受的载体或赋形剂。本发明多肽的数量通常为10微克-100毫克/剂,较佳地为100-1000微克/剂。

[0112] 为了本发明的目的,有效的剂量为给予个体约0.01毫克/千克至50毫克/千克,较佳地0.05毫克/千克至10毫克/千克体重的本发明多肽。此外,本发明的多肽可以单用,也可与其他治疗剂一起使用(如配制在同一药物组合物中)。

[0113] 药物组合物还可含有药学上可接受的载体。术语“药学上可接受的载体”指用于治疗剂给药的载体。该术语指这样一些药剂载体:它们本身不诱导产生对接受该组合物的个体有害的抗体,且给药后没有过分的毒性。这些载体是本领域普通技术人员所熟知的。在Remington's Pharmaceutical Sciences(Mack Pub. Co., N. J. 1991)中可找到关于药学上可接受的赋形剂的充分讨论。这类载体包括(但并不限于):盐水、缓冲液、葡萄糖、水、甘油、乙醇、佐剂及其组合。

[0114] 治疗性组合物中药学上可接受的载体可含有液体,如水、盐水、甘油和乙醇。另外,这些载体中还可能存在辅助性的物质,如润湿剂或乳化剂、pH缓冲物质等。

[0115] 通常,可将治疗性组合物制成可注射剂,例如液体溶液或悬液;还可制成在注射前适合配入溶液或悬液中、液体载体的固体形式。

[0116] 一旦配成本发明的组合物,可将其通过常规途径进行给药,其中包括(但并不限

于) :眼表、眼周、眼内、肌内、静脉内、皮下、皮内或局部给药。待预防或治疗的对象可以是动物 ;尤其是人。

[0117] 当本发明的药物组合物被用于实际治疗时,可根据使用情况而采用各种不同剂型的药物组合物。较佳地,可以例举的有眼药水、针剂、眼用凝胶和眼药膏。

[0118] 这些药物组合物可根据常规方法通过混合、稀释或溶解而进行配制,并且偶尔添加合适的药物添加剂,如赋形剂、崩解剂、粘合剂、润滑剂、稀释剂、缓冲剂、等渗剂(isotonicities)、防腐剂、润湿剂、乳化剂、分散剂、稳定剂和助溶剂,而且该配制过程可根据剂型用惯常方式进行。

[0119] 例如,眼药水的配制可这样进行 :将短肽 ZY 或其药学上可接受的盐与基本物质一起溶解于无菌水(在无菌水中溶解有表面活性剂)中,调节渗透压和酸碱度至生理状态,并可任意地加入合适的药物添加剂如防腐剂、稳定剂、缓冲剂、等渗剂、抗氧化剂和增粘剂,然后使其完全溶解。

[0120] 本发明的药物组合物还可以缓释剂形式给药。例如,短肽 ZY 或其盐可被掺入以缓释聚合物为载体的药丸或微囊中,然后将该药丸或微囊通过手术植入待治疗的组织。此外,短肽 ZY3 或其盐还可通过插入预先涂有药物的眼内透镜而得以应用。作为缓释聚合物的例子,可例举的有乙烯-乙烯基乙酸酯共聚物、聚羟基甲基丙烯酸酯(polyhydrometaacrylate)、聚丙烯酰胺、聚乙烯吡咯烷酮、甲基纤维素、乳酸聚合物、乳酸-乙醇酸共聚物等,较佳地可例举的是可生物降解的聚合物如乳酸聚合物和乳酸-乙醇酸共聚物。

[0121] 当本发明的药物组合物被用于实际治疗时,作为活性成分的短肽 ZY3 或其药学上可接受的盐的剂量,可根据待治疗的每个病人的体重、年龄、性别、症状程度而合理地加以确定。例如,当局部滴眼时,通常其浓度约为 0.1-10wt%,较佳地 1-5wt%,每日可 2-6 次给药,每次 1-2 滴。

[0122] 工业应用性

[0123] 含有本发明肽或其药学上可接受盐作为活性成分的药物组合物,对血管新生有显著的抑制活性。经动物试验证实,本发明多肽不仅可以抑制鸡胚尿囊膜的血管新生,而且可以抑制人脐静脉血管内皮细胞的增殖、迁移、趋化及管腔形成,并且可抑制缺氧诱导的小鼠视网膜新生血管。

[0124] 本发明的主要优点包括 :

[0125] (a) 本发明多肽 ZY3 的分子量小,可透过眼组织屏障 ;

[0126] (b) 水溶性好,能在中性泪液、房水和玻璃体液中保持较高的浓度 ;

[0127] (c) 安全性高,对生物组织毒副作用小 ;并且眼局部用药生物利用度高,可减少剂量,从而减小全身副作用 ;

[0128] (d) 可通过固相合成的方法制备,纯度高,产量大,成本低 ;

[0129] (e) 本发明多肽的稳定性好。

[0130] 因此本发明多肽有望开发成药物,用于治疗新生血管性眼病及相关的新生血管性疾病,如肿瘤新生血管等。

[0131] 下面结合具体实施例,进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明而并不用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条

件如 Sambrook 等人,分子克隆:实验室手册(New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) 中所述的条件,或按照制造厂商所建议的条件。

[0132] 实施例 1

[0133] 小肽 ZY3 的合成及分离纯化

[0134] 采用市售的 SYMPHONY 型 12 通道多肽合成仪(美国 Protein Technologies 公司),合成序列分别为 SEQ ID NO:1 所示的 ZY3 多肽。具体方法如下:

[0135] 根据多肽合成仪的软件(Version. 201 版)计算配置试剂,将 2-Chlorotrietyl Chloride Resin 树脂(天津市南开合成科技有限公司)放入反应管中,加 DMF(15ml/g) (Dikma),振荡 30min。通过沙芯抽滤掉溶剂,分别加入 3 倍摩尔过量的 Fmoc-L-H-OH(小肽 ZY3)氨基酸(苏州天马医药集团精细化学品有限公司),再加入 10 倍摩尔过量的 DIEA(国药集团上海化学试剂公司),最后加入 DMF 溶解,振荡 30min。去掉 DMF,加 20%哌啶(国药集团上海化学试剂公司)DMF 溶液(15ml/g),5min,去掉 DMF,再加 20%哌啶 DMF 溶液(15ml/g),15min。抽掉哌啶溶液,取十几粒树脂,用乙醇洗三次,加入茚三酮, KCN, 苯酚溶液各一滴,105℃ -110℃ 加热 5min,变深蓝色为阳性反应。用 DMF(10ml/g)洗两次,甲醇(10ml/g)洗两次,DMF(10ml/g)洗两次。加入保护氨基酸(FOMC-Asp-OH)三倍过量, HBTU(苏州天马医药集团精细化学品有限公司)三倍过量,均用尽量少 DMF 溶解,加入反应管,立刻加入 NMM 十倍过量。反应 30min。用 DMF(10ml/g)洗一次,甲醇(10ml/g)洗两次,DMF(10ml/g)洗两次。重复上述操作步骤,从右到左依次连接小肽 ZY3 序列中的氨基酸。最后一个氨基酸连接后,脱保护,用 DMF(10ml/g)洗两次,甲醇(10ml/g)洗两次,DMF(10ml/g)洗两次,DCM(10ml/g)洗两次,以此洗去树脂,再抽干 10min。从树脂上切割多肽(切割液(10/g):TFA(J. T. Baker)94.5%,水 2.5%, EDT(ALDRICH)2.5%, TIS(ALDRICH)1%;切割时间:120min)。将裂解液用氮气(上海比欧气体工业公司)尽量吹干,用乙醚(上海试一化学试剂有限公司)洗六次,然后常温挥干。

[0136] 用 HPLC(SHIMADZU 高效液相色谱仪型号:制备型,分析型,软件:Class-VP. Sevia1 System,厂商:SHIMADZU)纯化多肽,将粗肽用纯水或者加少量乙腈(Fisher)溶解,按照下列条件分别纯化小肽 ZY3。

[0137] 泵 A:0.1%三氟乙酸+超纯水

[0138] 泵 B:0.1%三氟乙酸+乙腈

[0139] 流速:1.0ml/min

[0140] 检测体积:30ul

[0141] 波长:220nm

[0142] 检测柱:Column:Venusil MRC-ODS C18 柱(30x250mm)

[0143] 检测过程见表 2。

[0144] 表 2

	时间 (min)	A (%)	B (%)
[0145]	0.5	90	10
	30.0	20	80
	30.1	停止	

[0146] 最后将纯化后的溶液冻干,既得到高纯度 (> 95%) 的小肽 ZY3。

[0147] 实施例 2

[0148] 小肽 ZY3 的鉴定及保存

[0149] 取少量的成品小肽 ZY3,做 HPLC 分析的纯度鉴定,和 ESI-MS 的分子量鉴定。结果表明,小肽 ZY3 洗脱峰位于 12.800min,纯度大于 99% (结果见图 1)。

[0150] 小肽 ZY3 共有 27 个氨基酸,分子量为 3092.55。

[0151] 将白色粉末状的小肽,密封包装,置于 -20℃ 长期保存。

[0152] 实施例 3

[0153] 小肽 ZY3 对人脐静脉血管内皮细胞增殖活性的影响

[0154] 使用 MTS 方法,具体方法如下:

[0155] 将原代人脐静脉血管内皮细胞 HUVECs (购自 ScienCell 公司) 接种于 96 孔板中,接种浓度为 2×10^4 /ml;细胞贴壁后加入无血清培养剂 ECM 37℃ 培养 24 小时;之后在各孔中分别加入无血清培养剂 ECM 作为阴性对照、VEGF (100ng/ml) (购自 Sigma 公司) 作为阳性对照、VEGF (100ng/孔) + 不同浓度的小肽 ZY3 作为处理组;继续培养 24 小时后,在各孔中加入 20 μ l 的 MTS 溶液 (购自 Promega 公司);37℃ 孵育 4 小时后,利用酶标仪 (Bio-Rad 公司) 测定 490nm 各孔的吸光度,根据 OD490 判断细胞的增殖活性,最后运用 SPSS 11.0.1 进行统计分析。

[0156] 结果见图 2,可见小肽 ZY3 有明显抑制人脐静脉血管内皮细胞 HUVECs 增殖的效应,并呈浓度依赖性,相对于 VEGF 组,VEGF+ 小肽 ZY3 各组具有明显抑制 HUVECs 增殖的作用,*P < 0.05, **P < 0.01,差异具有统计学意义。

[0157] 实施例 4

[0158] 小肽 ZY3 对人脐静脉血管内皮细胞管腔形成活性的影响

[0159] 使用 Matrigel 基质胶方法,具体方法如下:

[0160] 在 96 孔板中加入 Matrigel 基质胶 (购自 BD 公司) 50 μ l/孔,37℃ 孵育 30 分钟。待其结成固体状后,将原代人脐静脉血管内皮细胞 HUVECs 接种于基质胶表面,接种浓度为 8×10^6 /ml;并在各孔中分别加入无血清培养剂 ECM 作为阴性对照、VEGF (100ng/ml) (购自 Sigma 公司) 作为阳性对照、VEGF (100ng/ml) + 不同浓度的小肽 ZY3 作为处理组,37℃ 继续培养。于处理后 6 小时在 200 倍镜下对孔板中细胞随机取 3 个视野进行拍照,并利用软件 Image-Pro Plus Program 5.1 (Media Cybernetics, Inc.) 计算其中形成的管腔最大直径的总和,最后运用 SPSS 11.0.1 进行统计分析。

[0161] 结果见图 3,小肽 ZY3 于 6 小时即有明显抑制人脐静脉血管内皮细胞 HUVECs 管腔形成的效应,并呈浓度依赖性。图 3a-3c 显示小肽 ZY3 对 HUVECs 管腔形成的抑制作用。图 3a 为 VEGF 组;图 3b 为 VEGF+ZY3 (160 μ M) 组;图 3c 为相对于 VEGF 组,VEGF 和各个浓度的

小肽 ZY3 组都具有明显抑制 HUVECs 管腔形成的作用, *P < 0.05, 差异具有统计学意义。

[0162] 实施例 5

[0163] 小肽 ZY3 抗鸡胚尿囊膜新生血管效应的测定

[0164] 使用鸡胚尿囊膜模型, 具体方法如下:

[0165] 将生后 1-2 天的种鸡蛋 (购于上海星火农场 36 连华青鸡场) 消毒后装入恒温恒湿箱 (上海博迅实业有限公司医疗设备厂, SPX-250C) (T = 37°C, 湿度 H = 60-70%) 孵育 5 天 (24 小时计一天), 每天早晚各翻蛋一次; 之后将含有醋酸可的松 (5 μg/μl, 5 μl/片) 的滤纸片 (Whatman quantitative filter papers, Sigma, ashless, Grade 42, Cat No 1442-042, 42.5mmΦ × 100circles) 分别滴加 PBS (5 μl/片) 或低浓度 (2 μg/μl)、高浓度 (10 μg/μl) 的小肽 ZY3 (5 μl/片), 滤纸片风干后置于种鸡蛋尿囊膜大血管之间并密封种鸡蛋; 继续将种鸡蛋置于恒温恒湿箱 (温度 T = 37°C, 湿度 H = 60-70%) 孵育 2 天 (24 小时计一天), 不翻蛋; 之后完全暴露鸡胚尿囊膜, 拍照 (范围为滤纸片周 5mm) 并对 3-5 级微血管计数 (范围为滤纸片周 2.5mm), 运用 SPSS11.0.1 进行统计分析。

[0166] 结果见图 4, 可见相较于 PBS 组, 小肽 ZY3 在低浓度 (10 μg/片) 及高浓度 (50 μg/片) 时均有明显抑制鸡胚尿囊膜新生血管的作用。图 4a-4c 示滤纸片周 2.5mm 范围内 3-5 级微血管计数。图 4a 为 PBS 组; 图 4b 为 ZY3 (10 μl/片) 组; 图 4c 为 ZY3 (50 μl/片) 组; 图 4d 为相对于 VEGF 组, VEGF+ 各个浓度的小肽 ZY3 组均明显抑制鸡胚尿囊膜新生血管数, 且抑制作用呈浓度依赖性, **P < 0.01, 差异具有统计学意义。

[0167] 实施例 6

[0168] 小肽 ZY3 抗小鼠角膜病理性新生血管效应的测定

[0169] 使用小鼠角膜微囊袋模型, 具体方法如下:

[0170] 于 C57BL/6 雄性小鼠 (周龄 4-5 周) 腹腔注射 2% 戊巴比妥 (约 0.1ml/只) 进行麻醉, 局部用 4% 盐酸奥布卡因眼液。在体式镜下, 在小鼠角膜上用 OT 针头及 2ml 针头在距角巩缘约 0.8-1mm 处的角膜基质层间进行钝性分离, 制成一大小约 0.6*0.8mm 的小袋, 分别将阴性对照组 (空白颗粒)、阳性对照组 (VEGF 组: 320ng/μl, 160ng/粒) 和处理组 (VEGF+ 低浓度 0.5 μg/粒、高浓度 2 μg/粒的小肽 ZY3) 的缓释颗粒 (12% POLYHAME : 蔗糖铝 1 : 1 体积混合) 植入微囊袋内, 术后第 5 天观察小鼠角膜上最长新生血管长度 (VL: 最长新生血管从角巩膜缘长入角膜的长度)、新生血管钟点数 (CN: 新生血管累及角膜的圆周钟点数), 计算新生血管面积 (Area), $Area(mm^2) = 0.5 * 3.14 * VL(mm) * CN * 0.4(mm)$, 运用 SPSS 11.0.1 进行统计分析。

[0171] 结果见图 5, 可见相对于 VEGF 组, 小肽 ZY3 在低浓度 (0.5 μg/粒) 及高浓度 (2 μg/粒) 时均有明显抑制小鼠角膜新生血管的作用 (具体见注释)。图 5 显示小肽 ZY3 对小鼠角膜病理性新生血管的影响, 可见小肽 ZY3 明显具有抑制新生血管的效应。图 5a-5c 显示小鼠角膜新生血管面积。图 5a 为 VEGF 组; 图 5b 为 ZY3 (0.5 μl/粒) 组; 图 5c 为 ZY3 (2 μl/粒) 组; 图 5d 为相对于 VEGF 组, VEGF+ 小肽 ZY3 不同浓度组, 都具有明显抑制小鼠角膜病理性新生血管作用, **P < 0.01, 差异具有统计学意义。

[0172] 实施例 7

[0173] 眼药水的制备

[0174] 利用常规技术, 混合以下组分, 制得 1% 眼药水, 其配方如下:

- [0175] ZY3 肽 (ZY3) 10mg
- [0176] 羟丙基甲基纤维素 0.03g
- [0177] 无菌水 加至 10ml
- [0178] 调节渗透压至 3000sm, 酸碱度 (pH) 至 6.8-7.1。
- [0179] 经 5 位志愿者试用一周, 每日 3 次, 每次 1 滴 / 眼。结果表明该眼药水可抑制眼部的血管新生。
- [0180] 实施例 8
- [0181] 衍生多肽的制备和活性
- [0182] 制备了以下数种衍生多肽, 并按实施例 3 所示的方法, 测定各 ZY3 衍生多肽对人脐静脉血管内皮细胞 HUVEC 的增殖的抑制作用。
- [0183] 衍生多肽 1 : 序列同 SEQ ID NO : 1, 其中第 4 位 Val 被 Ile 替换 ;
- [0184] 衍生多肽 2 : 序列同 SEQ ID NO : 1, 其中第 12 位 Arg Pro 替换 ;
- [0185] 衍生多肽 3 : 序列同 SEQ ID NO : 1, 其中第 15 位 Asp 被 Glu 替换 ;
- [0186] 衍生多肽 4 : 序列同 SEQ ID NO : 1, 其中第 23 位 Thr 被 Arg 替换 ;
- [0187] 衍生多肽 5 : 序列同 SEQ ID NO : 1, 其中缺失第 8 位 Leu。
- [0188] 结果表明, 上述衍生多肽 1-5 的处理组 (1ug/u1) 中, HUVEC 细胞增殖显著受到抑制。
- [0189] 在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考, 就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解, 在阅读了本发明的上述讲授内容之后, 本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改, 这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

[0001]

序列表

<110> 上海市第一人民医院

<120> 一类新的抑制新生血管的小肽及其应用

<130> P2011-0513

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 27

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 1

Thr Ala Asn Val Thr Met Gln Leu Leu Lys Ile Arg Ser Gly Asp Arg
 1 5 10 15

Pro Ser Tyr Val Glu Leu Thr Phe Ser Gln His
 20 25

<210> 2

<211> 81

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 2

acggccaatg tcaccatgca gctcctaaag atccgttctg gggaccggcc ctctactgtg 60

gagctgacgt tctctcagca c 81

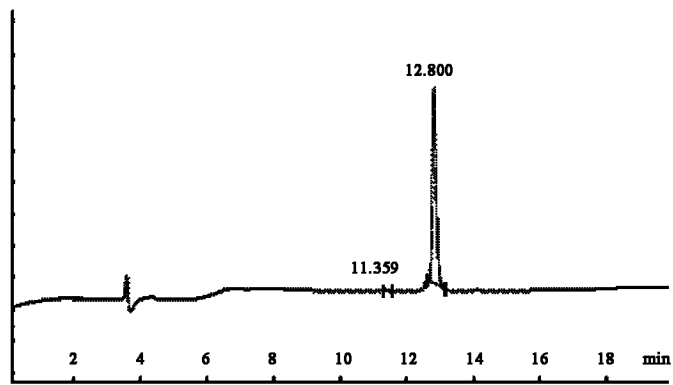


图 1

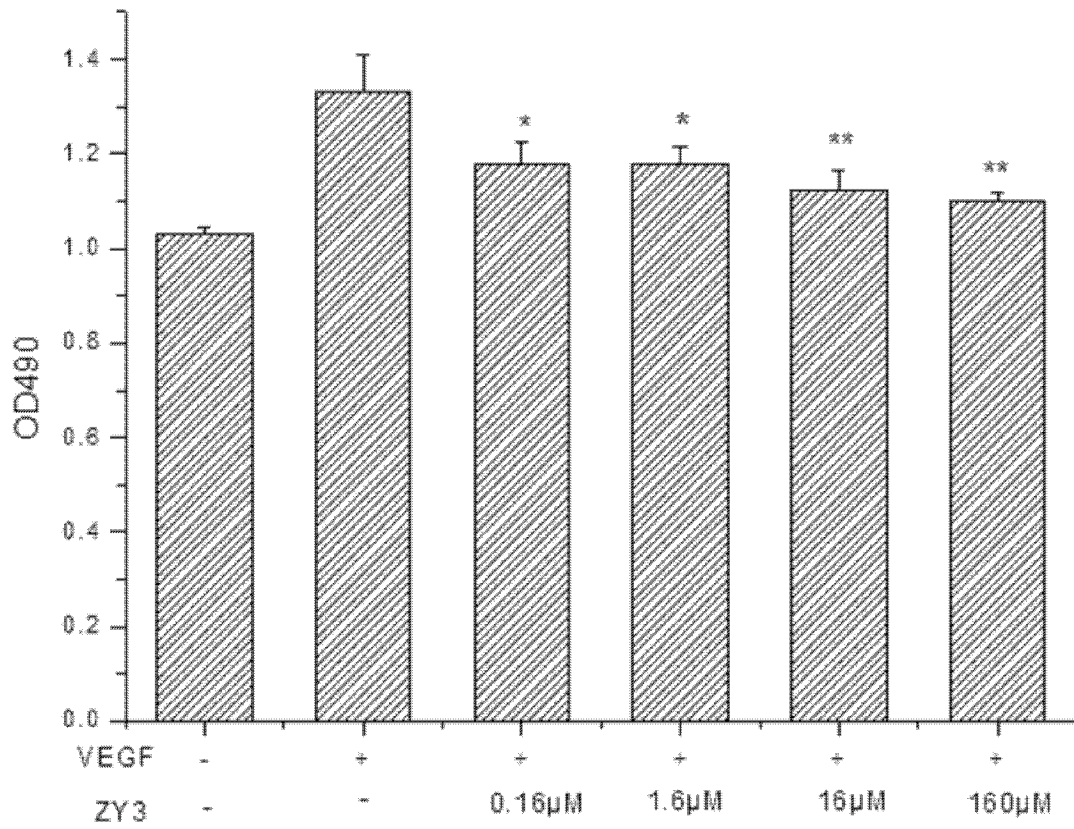


图 2

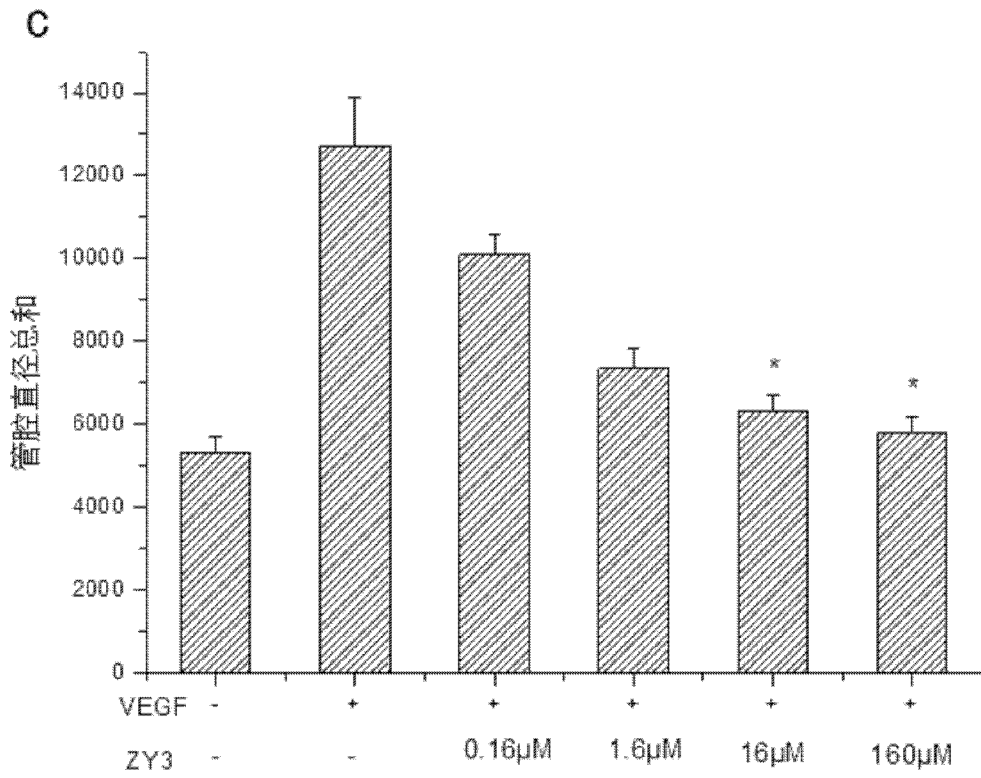
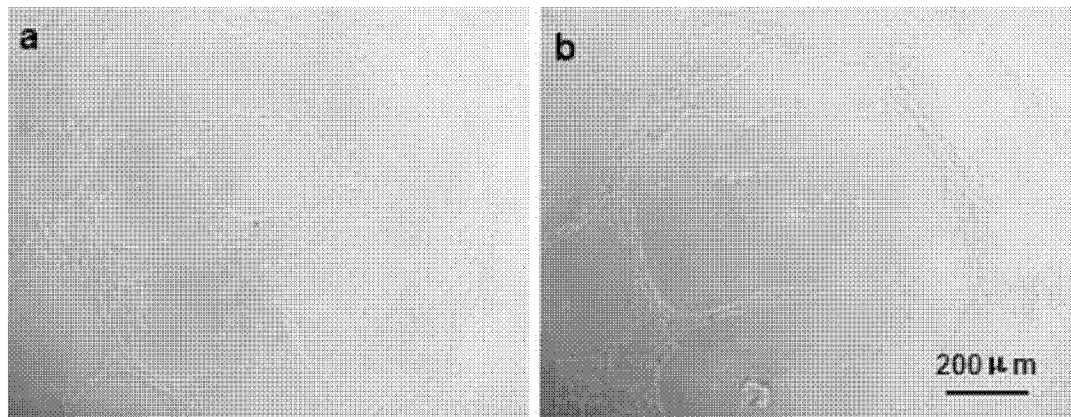


图 3

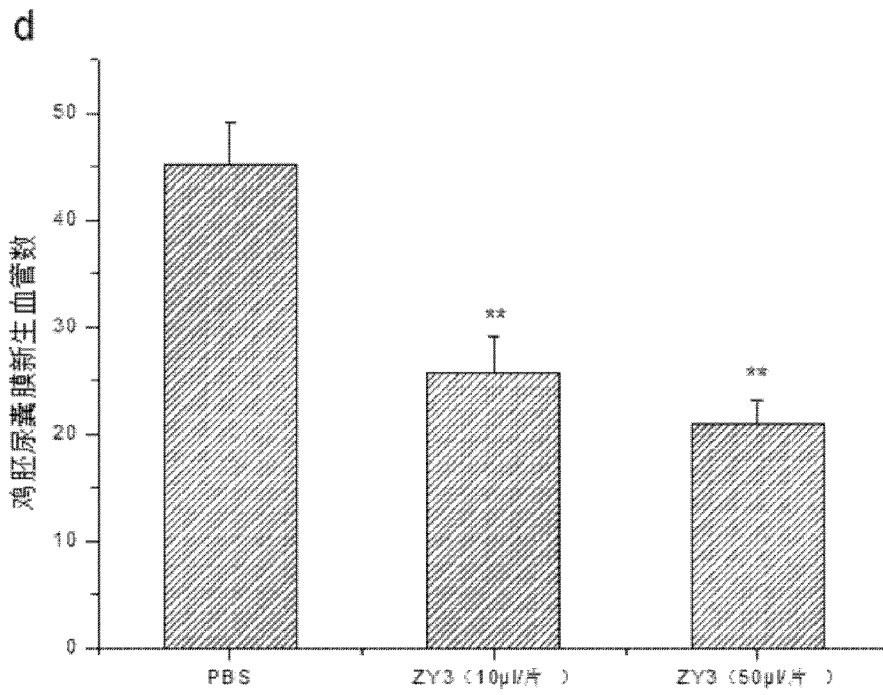
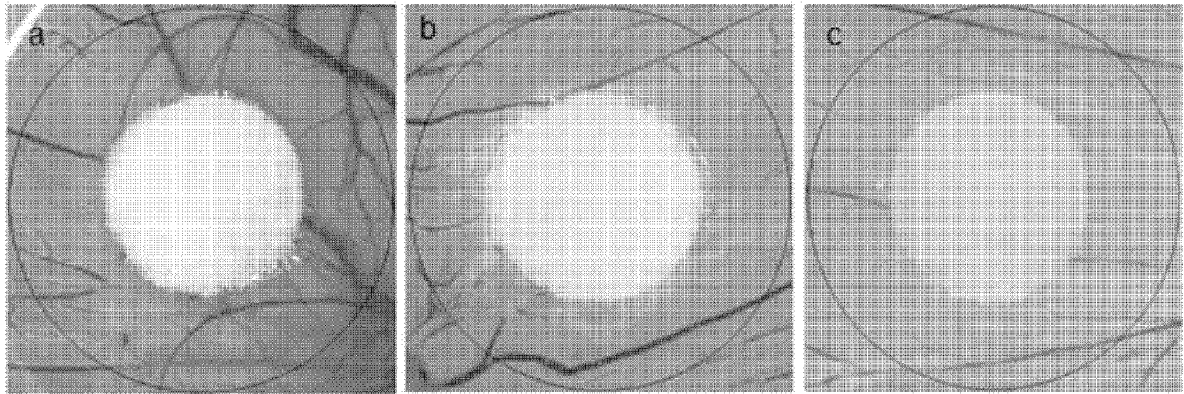


图 4

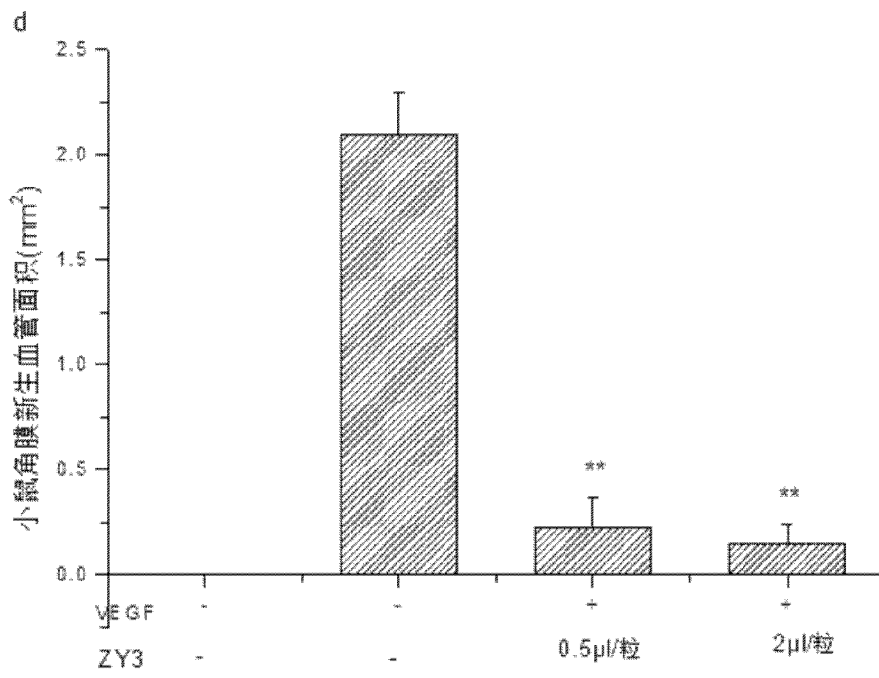
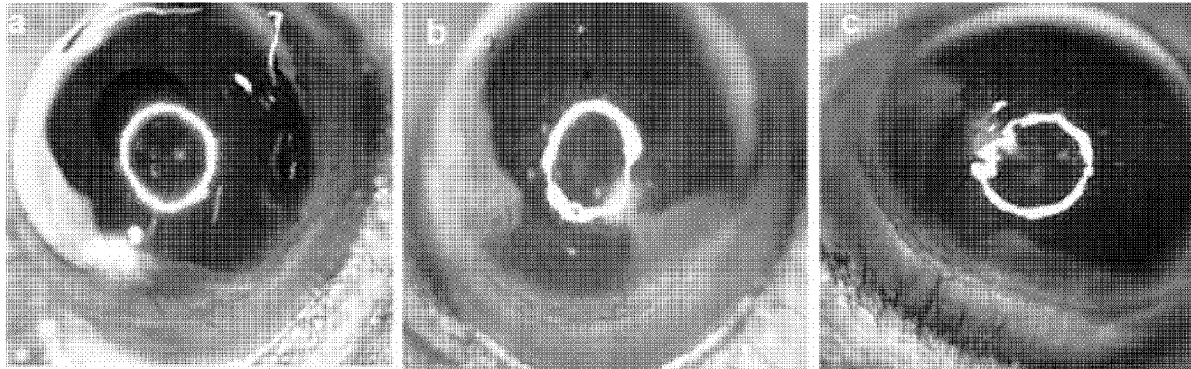


图 5