

發明專利說明書

200700434

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號： 94121890

※ 申請日期： 94.6.29

※IPC 分類：

一、發明名稱：(中文/英文)

一種拮抗介白素-6的寡胜肽/

iC07K 7/04 (2006.01)

iC12N 7/01, i15/63, i15/11

iA61K 38/00

iA61P 35/00

二、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

國立台灣大學 / National Taiwan University

代表人：(中文/英文)

李 嗣 涔 / Lee, Si-Chen

住居所或營業所地址：(中文/英文)

台北市 106 大安區羅斯福路四段一號 /

No.1, Sec. 4, Roosevelt Rd., Da-an District, Taipei City 106, Taiwan

國 籍：(中文/英文)

中華民國 / R.O.C.

三、發明人：(共 3 人)

姓 名：(中文/英文)

1. 魏 凌 鴻 / Wei, Lin-Hung

2. 蘇 振 良 / Su, Jen-Liang

3. 郭 明 良 / Kuo, Min-Liang

國 籍：(中文/英文)

1-3. 中華民國 / R.O.C.

四、聲明事項：

主張專利法第二十二條第二項 第一款或 第二款規定之事實，其事實發生日期為：94年04月30日與94年06月01日。

申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

主張專利法第三十條生物材料：

須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

五、中文發明摘要：

一種拮抗介白素-6 的胜肽，包含一胺基酸序列，其中該胺基酸序列係選自 SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6 與 SEQ ID NO:7 所表示之胺基酸序列所組成之族群。本發明胜肽能專一性結合至介白素-6 受體，藉以競爭抑制該介白素-6 與該介白素-6 受體的結合，以阻斷該介白素-6 所調節之訊號傳遞，因此可有效地抑制由該介白素-6 所調節之抗細胞凋亡作用與血管新生，進而抑制由介白素-6 所調節之腫瘤的生長。

六、英文發明摘要：

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第(無)圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

無

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係有關於一種能拮抗介白素-6 (Interleukin-6, 以下簡稱 IL-6)的胜肽，其能專一性地競爭抑制介白素-6 與介白素-6 受體的結合，藉以抑制由介白素-6 所調節之腫瘤的生長。

【先前技術】

IL-6 是一種多效性的分泌型細胞激素，其分子量介於 22-27 kDa 之間。習知，IL-6 的生理活性係藉由結合至目標細胞上之膜結合型醣蛋白介白素-6 受體(membrane-bound glycoprotein IL-6 receptor, IL-6R)的 α 鏈(gp80)來進行調節。IL-6 與 IL-6R 結合後所形成的 IL-6/IL-6R 複合體會活化結合的 IL-6R 上之 β -鏈(以下簡稱 gp130)，藉以表現出多種生物功能。IL-6/IL-6R 複合體會使得 gp130 從單體變成雙體，因而活化了目標細胞的細胞質中接在 gp130 上的酪氨酸激酶(tyrosine kinase)，進而啟動三條主要訊息傳遞路徑，包含傑納斯活化激酶/訊號轉導與轉錄啟動因數 (Janus-activated kinase/signal transducers and activators of transcription, Jak/STAT)路徑、Ras/有絲分裂原啟動蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)路徑，以及磷脂纖維醇三激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3-K)/Akt 路徑。

另外，根據先前的研究報告指出 gp80 可藉由穿膜金屬

蛋白酶(transmembrane metalloproteinase)自細胞膜分子上切開，或自可變剪接的 mRNA (alternatively spliced mRNA) 轉譯，而形成可溶性受體(soluble receptor, sIL-6R)。此可溶性受體與 IL-6 結合時，具有與位於細胞膜上受體相似的親合力，而且更重要的是，此 sIL-6R/IL-6 複合體可經由與膜結合型 gp-130 交互作用而活化細胞，啟動前述之訊號傳遞。對目標細胞來說，此一獨特的特性會使得 sIL-6R/IL-6 複合體成為一促效物(agonist)而非拮抗物(antagonist)。此外，在許多臨床的狀況中皆已被證明出 sIL-6R 的值會上升，此即表示在部份的疾病過程中會產生 sIL-6R。

IL-6 藉由 gp130 而引起的訊息傳遞多樣化，造成它具有許多不同的生物功能，例如調控發炎反應、免疫反應、肝臟急性期(acute-phase)蛋白的合成及其他重要的生理機能。特別重要的是，IL-6 經由 gp130 的訊號調控(signaling mediated)已被證實能影響許多細胞的功能，例如細胞凋亡(apoptosis)、細胞分化、細胞移動與腫瘤血管新生(angiogenesis)等，且其尚與多種人類癌症的病因有重要的關聯性，例如促進多發性骨髓瘤(multiple myeloma)、卡波西氏肉瘤(Kaposi's sarcoma)、前列腺癌(prostate cancer)、及子宮頸癌(cervical cancer)等的生長。

如前所述，由於 IL-6 在許多疾病的過程中扮演著關鍵性的角色，因此隨著分子生物學的進步，以及對 IL-6 與 IL-6R，及其訊息傳遞路徑的了解，均顯示出將 IL-6R 做為臨床治療的分子標的(Molecular Target)是相當具潛力的。

為此，Tripathi M. 等人，於臨床癌症研究期刊(Clin. Cancer Res. 2003; 9: 4653-4665)中，提出一種以 IL-6 為分子標的之臨床治療方式，其係利用 IL-6 單株抗體抑制 IL-6 之功能。惟熟習本領域之技藝者均了解，單株抗體的製備上較為複雜且製造成本高，並不利於產業上的應用。

【發明內容】

為解決前述習知技術之問題，本發明之目的即在於提供一種能與 IL-6R 專一性結合的寡胜肽，藉以抑制 IL-6 與 IL-6R 的結合，進而抑制由 IL-6 所調節之血管新生與腫瘤細胞的生長。

為達成本發明之目的，根據本發明所指出之一種能與 IL-6R 專一性結合的寡胜肽，其係包含一由 7 個胺基酸所組成之胜肽，且該胜肽係選自如 SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 6 與 SEQ ID NO: 7 所示之胺基酸序列所組成之族群。根據本發明所指出之胜肽能專一性的競爭抑制 IL-6 與 IL-6R 的結合，並干擾 IL-6 所調節之訊號的傳遞。前述之 IL-6R 可以為位於目標細胞上之膜型(membrane-type) IL-6R，或可溶性 IL-6R (sIL-6R)。

根據本發明所指出之寡胜肽(SEQ ID NO: 5~7)可藉由習知胜肽合成技術或儀器來加以合成，或藉由在噬菌體或載體(vector)中插入一段可轉譯成該寡胜肽之核酸，並使該噬菌體或該載體表現出本發明寡胜肽，但並不僅限於此。

根據本發明所指出之寡胜肽(SEQ ID NO: 5~7)，由於

可易於藉由習知合成胜肽技術與設備來合成，或藉由前述之噬菌體或載體來表現，故可較習知的單株抗體更可較易於被應用於商業上。

本發明寡胜肽(SEQ ID NO: 5~7)能專一性地競爭抑制 IL-6 與 IL-6R 中 α 鏈蛋白的結合，進而抑制 IL-6 所調節之訊號傳遞。本發明寡胜肽能抑制 IL-6 所誘導之 Mcl-1 蛋白質的上升調節(up-regulation)，進而干擾 IL-6 保護癌細胞免於細胞凋亡之作用。本發明寡胜肽亦能抑制 IL-6 經由上升調節血管內皮細胞生長因子 A (Vascular endothelial growth factor-A, VEGF-A) 的表現所造成之血管新生。此外，本發明寡胜肽可於活體中(*in vivo*)有效地抑制由 IL-6 所調節之腫瘤的生長，因此本發明寡胜肽非常適合被應用於由 IL-6 所誘發之腫瘤生長的控制上。

本發明將藉由參考下列的實施方式做進一步的說明，在此所述之實施方式並不限制本發明前面所揭示之內容。熟習本發明之技藝者，可做些許之改良與修飾，但仍不脫離本發明之範疇。

【實施方式】

於本發明中係藉由習知的噬菌體顯現技術自噬菌體胜肽庫(New England BioLabs, Inc. Beverly, MA)中篩選具有 7 個胺基酸序列長度，可與 IL-6R 的 α 鏈蛋白專一性結合的胜肽片段。

本發明係將 2×10^9 個插入有可表現出 7 個隨機胺基酸

序列之核酸的噬菌體殖株(phage clones)，以預先結合有介白素-6 受體 α 鏈蛋白(簡稱 IL-6R α ，購自 R&D Systems, Minneapolis, MN)之細胞培養盤進行篩選。於進行篩選時，係將前述噬菌體殖株加入前述預先結合有 IL-6R α 之細胞培養盤中，使其與 IL-6R α 進行吸附反應，之後再以甘胺酸緩衝液(glycine buffer, pH 2.2)進行沖提，再以 Tri 緩衝液(pH 9.1)中和，以將培養盤中未與 IL-6R α 結合的噬菌體殖株去除。重複上述動作 3 次後，約有 10.3% (300 個中有 31 個)的噬菌體殖株被分析出具有可與 IL-6R α 結合的活性(資料未顯示)。接著，再以習知核酸定序法，將此 31 個噬菌體殖株中所插入之 DNA 分離並定序出，結果顯示該些插入的 DNA 可轉譯成七種不同的寡胜肽，分別為 SEQ ID NO : 1、SEQ ID NO : 2、SEQ ID NO : 3、SEQ ID NO : 4、SEQ ID NO : 5、SEQ ID NO : 6 與 SEQ ID NO : 7 所示之胺基酸序列(表一)。

為進一步確認此七種不同寡胜肽對 IL-6R α 的結合能力，在此另將插入有可轉譯成此七種不同胺基酸序列之 DNA 的噬菌體殖株(在分別標示為噬菌體 S1、噬菌體 S2、噬菌體 S3、噬菌體 S4、噬菌體 S5、噬菌體 S6 與噬菌體 S7)，分別加入預先結合有 IL-6R α 的細胞培養盤中(10^{11} pfu/mL)。結果顯示，其中噬菌體 S5、S6 與 S7 均可顯著的抑制 IL-6 結合至 IL-6R α 上，而噬菌體 S1、S2、S3 與 S4 則否。

於活體外(*in vitro*)測試噬菌體 S7 對不同細胞株(cell

lines)之結合親合力的結果顯示，噬菌體 S7 於所有膜型(membrane-type) IL-6R α 表現細胞株中均顯示出較噬菌體 S1 為高的結合親合力。另外，免疫螢光染色分析(Immunofluorescence staining)的結果亦顯示噬菌體 S7 確實能結合至 C33A 子宮頸癌細胞的細胞膜(plasma membrane)上(結果未顯示)。這些結果均顯示出，噬菌體 S7 可專一性的結合至 IL-6R α ，且能阻斷(block) IL-6 與 IL-6R α 之間的交互作用。

另外，以習知的胜肽合成法合成出插入噬菌體 S7 中之 DNA 所編碼(encode)的胺基酸序列(於本發明中將其標示為 S7 胜肽，SEQ ID NO: 7)。本發明 S7 胜肽於活體外的競爭性抑制分析結果顯示，S7 胜肽可拮抗(antagonize) IL-6 與不同種類細胞株之 IL-6R α 的結合。

習知 IL-6 在多種人類惡性疾病中係為一抗細胞凋亡因子(antiapoptotic factor)，其係藉由通過 PI3K/Akt 與 MAPK 訊號傳遞路徑(signaling pathways)上升調節(up-regulation) Mcl-1 蛋白質來達成抗細胞凋亡的目的。而根據本發明所指出之 S7 胜肽則能抑制 IL-6 對 Akt 激酶與 MAPK 激酶的活化(磷酸化)，亦即 S7 胜肽抑制 IL-6 所調控的 PI3K/Akt 與 MAPK 訊號傳遞路徑，且能進一步抑制 IL-6 所誘導之 Mcl-1 蛋白質的上升調節，藉以抑制 IL-6 所調控之癌細胞的抗細胞凋亡作用。藉此由化學治療所誘發癌細胞的細胞凋亡，將由於無 IL-6 所調節的抗細胞凋亡作用，因此可提昇化學治療藥劑的治療效果。

另外，由於習知於子宮頸癌中 IL-6 會經由上升調節血管內皮細胞生長因子 A (VEGF-A) 的表現而引發血管新生，而本發明 S7 胜肽則可抑制於癌細胞中由 IL-6 所誘發之 VEGF-A 的蛋白與 mRNA 的表現。作為癌細胞的例子，例如子宮頸癌(cervical carcinoma)、多發性骨髓瘤(multiple myeloma)、卡波西氏肉瘤(Kaposi's sarcoma)、前列腺癌(prostate cancer)與基底細胞癌(Basal Cell Carcinoma, BCC)，但並不僅限於此。另外，根據血管新生分析的測試結果進一步可證實，本發明 S7 胜肽確實可有效減少由 IL-6 所誘發之人類臍帶靜脈內皮細胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)與其所形成之類微血管小管(capillary-like tubule)的增生。由此顯見，本發明 S7 胜肽確實可顯著地阻斷 IL-6 所調節之血管新生。

熟習本技術領域之技藝者可藉由閱讀本說明書前述之說明而可輕易了解到，根據本發明所指出之寡胜肽，亦可藉由習知技術將一可轉譯成本發明寡胜肽之核酸序列插入於一表現載體(vector)中，之後藉由該表現載體表現出該寡胜肽。另外，熟習技藝者亦可根據本說明書之說明得知，本發明寡胜肽或可表現出該胜肽的噬菌體亦可藉由習知技術結合一藥理上可接受之載物(carrier)製成醫藥組合物，用以抑制由 IL-6 所調節之腫瘤的生長。

此外，根據於活體中測試的結果進一步顯示，由 IL-6 所調節之腫瘤生長，亦可顯著地為本發明 S7 胜肽所抑制。顯見本發明 S7 胜肽於 IL-6 所誘發的腫瘤生長抑制上，具

有極佳的抗腫瘤效果。

實施例一

噬菌體殖株對 IL-6R α 的結合能力測試

為確認前述藉由噬菌體勝肽庫所篩選出對 IL-6R α 有結合活性之七種不同勝肽序列(參見表一)對 IL-6R α 的結合能力,在此將插入有可轉譯成此七種不同勝肽序列之 DNA 的噬菌體殖株(噬菌體 S1~S7),分別加入結合有 IL-6R α 的 96 孔細胞培養盤中(10^{12} pfu/mL),使其與 IL-6R α 進行吸附反應。於 1 小時後,於孔中再加入 IL-6 蛋白(50 ng/mL, 100 μ L)於室溫下培養 2 小時。之後,以 0.1%牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)/磷酸鹽緩衝溶液(以下簡稱 PBS)的緩衝溶液(BSA/PBS buffer, pH 8.5)清洗培養盤。最後,使用生物素標記抗介白素-6 抗體(biotin-conjugated anti-IL-6 mAb)、辣根標記鏈親合素(horseradish peroxidase (HRP)-conjugated streptavidin),及四甲基聯苯胺(Tetramethyl benzidine, TMB)基質,藉由習知的噬菌體酵素連結免疫吸附分析法(phage ELISA)分析細胞培養盤中所結合之 IL-6 蛋白的量。吸光值係以 650nm 作為參考波長於 450nm 下進行測定,所得結果請參閱第一圖。

由第一圖所得結果顯示,噬菌體 S5、S6 與 S7 均可顯著的干擾 IL-6 與 IL-6R α 的結合,而噬菌體 S1~4 則否,其中又以噬菌體 S7 的抑制效果最佳。

實施例二

噬菌體殖株於活體外(*in vitro*)對不同細胞株(cell lines)的結合性分析

取 C33A、HeLa 與 Siha 子宮頸癌(cervical carcinoma)細胞株、基底細胞癌(BCC)細胞株、HEK293 纖維母細胞株(HEK293 fibroblast cells)培養於含有 10%胎牛血清(FBS)之 DMEM 培養基中(上述細胞株均取自 Invitrogen, Carlsbad, CA)。人類臍帶靜脈內皮細胞株(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)則是藉由將人類臍帶以 0.1%膠原蛋白酶消化後，再以含有 10%胎牛血清之 M199 培養基將其收集並培養於該培養基中。

於進行噬菌體酵素連結免疫吸附分析時，先將前述細胞株以 90%密度(confluence)植入 96 孔培養盤中。於培養隔夜後，將細胞株以冰冷的戊二醛(0.125%)於室溫下固定 10 分鐘，之後再以 PBS 清洗。以含有 3%牛血清白蛋白(BSA)的 PBS 於 4°C 下隔夜阻隔(block)該培養盤。於阻隔後於該培養盤中加入 5×10^{12} pfu/mL 的噬菌體 S7，並於室溫下培養 2 小時。之後再以含有 0.1% Tween 20 的 TBS 緩衝液(Tris-buffered saline, pH 7.5)沖洗。最後使用辣椒根過氧化酶(horseradish peroxidase, HRP)標記的抗 M13 單株抗體藉由酵素連結免疫吸附分析法分析結合的噬菌體，所結果如第二圖所示。

從第二圖所得之結果可以看出，噬菌體 S7 於所有膜型(membrane-type) IL-6R α 表現細胞株中均顯示出較噬菌體

S1 (負控制組)為高的結合親合力，但對 IL-6R α 無表現的人類臍帶靜脈內皮細胞株則無呈現高的結合親合力。

實施例三

合成胜肽活體外的競爭性抑制分析

以習知的胜肽合成法合成出插入噬菌體 S7 與 S1 中之 DNA 所編碼(encode)的寡胜肽(S7 胜肽(SEQ ID NO: 7)與 S1 胜肽(SEQ ID NO: 1))。之後利用實施例一中所述之方法，但將實施例一中所述的噬菌體殖株以 S7 胜肽或 S1 胜肽(負控制組)替代，並將培養盤上結合的 IL-6R α 替換為實施例二中所使用的細胞株，以進行競爭性抑制分析，所得結果如第三圖所示。

由第三圖的結果顯示，合成的 S7 胜肽確實可拮抗(antagonize)介白素-6 與不同細胞株上之 IL-6R α 的連結。

實施例四

S7 胜肽抑制 IL-6 所調節之抗細胞凋亡(antiapoptotic)的訊號傳遞

取 80%密度(confluence)的 C33A 子宮頸癌細胞株，使其飢餓(starved) 24 小時，之後以人類 IL-6 蛋白(50 ng/mL)，於存在或不存在 S1 胜肽(50 μ mol/L)或 S7 胜肽(50 μ mol/L)的情況下分別進行處理。於處理後將細胞株溶解(lysate)，並以 SDS-PAGE 進行分離，之後再以西方墨漬法(Western blot)以不同抗體進行免疫轉漬(Immunoblotting)，

這些抗體包含抗磷酸化 ERK1/2 抗體 (anti-phospho-ERK1/2)、抗磷酸化 Akt 抗體 (anti-phospho-Akt)、抗 ERK1/2 抗體 (anti-ERK1/2)，以及抗 Akt 抗體 (anti-Akt)。測試所得結果請參閱第四圖(A)。

由第四圖(A)中西方墨漬分析法所得之結果可看出，於 IL-6 處理 C33A 子宮頸癌細胞株後，會增加其磷酸化的 (phosphorylated) Akt 激酶與 ERK1/2 MAPK 激酶的數值，而藉由 S7 胜肽的處理，則可顯著地抑制此活性，而以 S1 胜肽(負控制組)處理則無抑制的效果。

同上述之步驟，將 75 μ g 的細胞溶解物 (cell lysates) 以 SDS-PAGE 分離，再轉移至聚二氟乙烯膜 (polyvinylidene difluoride membrane) 上，之後以專一性的抗 Mcl-1 抗體進行探測 (probed)。在此另以 β 肌動蛋白 (β -actin) 做為內載 (internal loading) 控制組。所得結果請參閱第四圖(B)。

由第四圖(B)中可以看出，IL-6 所誘導之 Mcl-1 蛋白的上升調節 (up-regulation) 亦受 S7 胜肽所拮抗。

實施例五

S7 胜肽抑制由 IL-6 所誘導的血管內皮細胞生長因子 A (VEGF-A) 的表現與血管新生 (angiogenesis)

將 C33A 子宮頸癌細胞株、RPMI 8226 多發性骨髓瘤細胞株與基底細胞癌細胞株與載體(負控制組)與人類 IL-6 蛋白，於含有 10% 胎牛血清、盤尼西林 (100 units/mL) 與鏈黴素 (100 μ g/mL) 的 DMEM 培養基中進行培養。至 90% 密

度(confluence)時，將培養基置換成無血清的培養基。之後，將前述與人類 IL-6 蛋白一同培養的細胞株與 S1 胜肽或 S7 胜肽再進一步培養 24 小時。最後，經離心去除雜物後，即可收集到條件化培養液(conditioned medium, CM)。

將前述收集的條件化培養液(conditioned medium, CM)藉由 Amicon 超離心過濾裝置(Millipore)加以濃縮。位於培養液懸浮物中的 VEGF-A，則使用定量的三明治酵素連結免疫吸附分析(sandwich ELISA assay, R&D Systems)，依製造商的說明書指示進行分析。簡單的來說，將細胞懸浮液(50 μ L)與 50 μ L 的分析流析液置於已預先披覆(coated)抗 VEGF-A 單株抗體的 96 孔組織培養盤中，於室溫下培養 2 小時。於連續清洗五次後，於培養盤中加入由多株 VEGF-A 抗體與辣椒根過氧化酶(HRP)所組成之接合物，並將其混合後於室溫下培養 2 小時。接著，依序加入呈色劑，使用微量盤光譜測量儀(Thermo-Max microplate reader, Molecular Devices Co., Menlo Park, CA)於 450 nm 的波長下測定其吸光值。所得結果如第五圖所示。

由第五圖所得結果可以看出，由 IL-6 刺激所提高的 VEGF-A 分泌值類似於 VEGF-A 蛋白表現增加的結果(結果未顯示)，其表示成熟且具功能性活化的 VEGF-A 蛋白已於 IL-6 處理的細胞中產生。而 S7 胜肽則會顯著地於所測試的三細胞株中，減少由 IL-6 所調節的 VEGF-A 分泌。

S7 胜肽對 IL-6 所調節之血管新生活性的抑制，在此係藉由以前述由經處理的細胞所收集之條件化培養液(CM)

來執行血管新生的分析，例如藉由於活體外測試由人類臍帶靜脈內皮細胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs) (Clonetics, San Diego, CA)形成之類微血管小管與其增生。

於進行 HUVECs 增生測試時，係將 HUVECs 置於裝載有含 10%胎牛血清的 M199 培養基之 6 孔培養盤(Falcon, Becton Dickinson)中，每孔 2.5×10^5 個細胞。於細胞植入 1 天後，將 HUVECs 以來自藉由不同方式處理過之細胞的條件化培養液刺激，此條件化培養液已預先與 M199 培養基混合。24 小時後，使用錐藍排除法(trypsin blue exclusion method)計數細胞。

於進行錐藍排除法分析時，細胞先以 PBS 洗滌、之後進行胰蛋白酶化(trypsinized)，最後懸浮於 1 mL PBS 中。經錐藍染色的細胞使用改良的紐鮑爾(Neubauer)血球計(hemocytometer)及相位差光學顯微鏡(phase-contrast light microscope)計數。所得數據經統計分析後之結果示於第六圖。

由第六圖中可以看出，獲自 IL-6 過度表現之細胞的條件化培養液(IL-6-CM)顯著地抑制 HUVECs 的增生，且 IL-6-CM 所誘發的 HUVECs 增生可顯著地為 S7 胜肽所拮抗，但並不為 S1 胜肽所拮抗。

在此另使用生長因子降低型(growth factor-reduced)基底膜基質膠基質(basement membrane Matrigel matrix)於活體外評估類微血管小管的生成。將基質膠(Matrigel)於 4°C

下融化(thawed)並使其混合均勻。於 96 孔培養盤的底部披覆一層薄的基質膠(40 μL)後，於 37°C 下使其聚合 30 分鐘。將 HUVECs 懸浮於含 1%血清的 M199 培養基中(2.5×10^4 細胞/ μL)，在將其與 100 μL 含 1%血清的 M199 培養基，及 100 μL 獲自以不同方式處理的 C33A/neo 或 C33A/IL-6 細胞之條件化培養液(CM)混合，之後將其置於披覆有基質膠的培養盤表面。於 6 小時後，細胞以 4%三聚甲醛(paraformaldehyde)固定，並以 0.1%結晶紫染色。最後，隨機選擇 3 個顯微鏡視野並照相，以及計算每個視野中的類管狀(tube-like)結構，計算所得結果如第七圖所示。

從第七圖所得結果顯示出，C33A/IL-6-CM 會誘導類管狀結構的增生(控制組的 5.1 倍)，而此效應會幾乎完全為 S7 胜肽所抑制。

另外，本發明另使用基質膠栓分析法(Matrigel plug assay)分析 S7 胜肽於活體中對 IL-6 所誘導的血管新生之抑制效果。將含有條件化培養液(CM)的基質膠栓(500 μL)以靜脈注射方式植入 4-8 週齡的雌性 BALB/c 裸鼠的腹腔中線的側邊。前述條件化培養液係獲自載體控制組細胞或 IL-6 過度表現的 C33A 細胞結合或不結合 S7 胜肽。於植入 7 日後取出此基質膠栓，將其溶解於 PBS 中，並於 4°C 下靜置過夜。之後，使用 Drabkin's 溶液(Sigma Chemical)並依製造商說明書測定基質膠栓中的血紅素量，所得結果如第八圖所示。

由第八圖所得的結果可清楚地看出，含有

C33A/IL-6-CM 之基質膠栓的血紅素值明顯的高於含有 C33A/neo-CM 之基質膠栓的血紅素，且其所誘發血紅素增生幾乎為 S7 胜肽所完全抑制。

因此，根據上述所有血管新生分析的測試結果均顯示，本發明 S7 胜肽確實可有效減少由 IL-6 所誘發之所誘導的 VEGF-A 的表現與血管新生。

實施例六

腫瘤抑制分析

取 6-8 週齡的嚴重免疫缺乏症 (severe combined immunodeficiency, SCID) 老鼠以靜脈注射 1×10^6 介白素-6 過度表現的 C33A 子宮頸癌細胞 (C33A/IL-6) 或載體控制細胞 (C33A/neo)。於三天後，每兩天腹腔注射預先以磷酸鹽緩衝溶液溶解的 S1 胜肽與 S7 胜肽 (50 mg/kg)。之後測定腫瘤的長度 (L) 與寬度 (W)，腫瘤的體積則以公式 $L^2W/2$ 計算之。所得結果示於第九圖。

由第九圖所得結果可以看出，投與 S7 胜肽可顯著地降低 IL-6 所誘發之腫瘤的生長，且至實驗終了時 S7 胜肽可抑制 76% 的腫瘤生長。

由上述實驗結果顯見本發明 S7 胜肽於 IL-6 所誘發的腫瘤生長抑制上，具有極佳的抗腫瘤效果。

表一 藉由結合至介白素-6 受體所篩選出之胜肽的序列

噬菌體殖株	插入序列的編碼	序列編碼
S1	Leu-Ser-Leu-Met-Pro-Arg-Leu	SEQ ID NO : 1
S2	Asn-Pro-Met-Met-Arg-Pro-Leu	SEQ ID NO : 2
S3	Gln-Met-Arg-Thr-Thr-Ile-Arg	SEQ ID NO : 3
S4	Arg-Leu-Met-Met-Leu-Gln-Gln	SEQ ID NO : 4
S5	Met-Leu-Leu-Gln-Asn-Arg-Gln	SEQ ID NO : 5
S6	Thr-Leu-Gln-Ala-Ser-Ile-Leu	SEQ ID NO : 6
S7	Leu-Ser-Leu-Ile-Thr-Arg-Leu	SEQ ID NO : 7

【圖式簡單說明】

第一圖 為不同噬菌體殖株與介白素-6蛋白對介白素-6受體的競爭性抑制能力分析圖；

第二圖 為噬菌體殖株對不同細胞株上之介白素-6受體的結合能力分析圖；

□：噬菌體 S1； ■：噬菌體 S7

1：C33A 子宮頸癌細胞株；

2：HeLa 子宮頸癌細胞株；

3：Siha 子宮頸癌細胞株；

4：基底細胞癌細胞株；

5：HEK293 纖維母細胞株；

6：人類臍帶靜脈內皮細胞株

第三圖 為合成的 S7 胜肽對不同細胞株上之介白素-6受體的結合能力分析圖；

□：噬菌體 S1； ■：噬菌體 S7

C33A：C33A 子宮頸癌細胞株；

HeLa：HeLa 子宮頸癌細胞株；

Siha：Siha 子宮頸癌細胞株；

BCC：基底細胞癌細胞株；

HEK293：HEK293 纖維母細胞株；

HUVEC：人類臍帶靜脈內皮細胞株

第四圖 為本發明合成胜肽以西方墨漬法分析其抑制介白素-6所調節之抗細胞凋亡的訊號傳遞之電泳膠片照相圖；

(A) Akt 與 ERK1/2 表現；

(B) Mcl-1 蛋白的表現。

第五圖 為 S7 胜肽對不同細胞株中由介白素-6 所調節之血管內皮細胞生長因子 A 的表現抑制結果分析圖；

1：載體處理組(負控制組)

2：介白素-6 處理組

3：介白素-6 + S1 胜肽處理組；

4：介白素-6 + S7 胜肽處理組。

第六圖 為 S7 胜肽拮抗介白素-6 所調節之人類臍帶靜脈內皮細胞增生的結果分析圖；

1：載體處理組(負控制組)

2：介白素-6 處理組

3：介白素-6 + S1 胜肽處理組；

4：介白素-6 + S7 胜肽處理組。

第七圖 為 S7 胜肽抑制介白素-6 所誘發之類管狀結構增生的結果分析圖；

第八圖 為 S7 胜肽抑制介白素-6 所誘發之血管新生的結果分析圖；以及

第九圖 為活體中 S7 胜肽抑制介白素-6 所誘發之腫瘤生長的結果分析圖。

【主要元件符號說明】

無

序列表

- <110> 國立台灣大學
- <120> 一種拮抗介白素-6的寡胜肽
- <160> 7
- <210> 1
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
- <300>
<301> Jen-Liang Su, Kuo-Pao Lai, Chi-An Chen, Ching-Yao Yang, Pei-Sheng Chen, Chiao-Chia Chang, Chia-Hung Chou, Chi-Lun Hu, Min-Liang Kuo, Chang-Yao Hsieh, and Lin-Hung Wei
<302> A Novel Peptide Specifically Binding to Interleukin-6 Receptor (gp80) Inhibits Angiogenesis and Tumor Growth
<303> Cancer Research
<304> 65
<305> 11
<306> 4827-4835
<307> 2005-06-01
- <400> 1
Leu Ser Leu Met Pro Arg Leu
1 5
- <210> 2
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
- <300>
<301> Jen-Liang Su, Kuo-Pao Lai, Chi-An Chen, Ching-Yao Yang, Pei-Sheng Chen, Chiao-Chia Chang, Chia-Hung Chou, Chi-Lun Hu, Min-Liang Kuo, Chang-Yao Hsieh, and Lin-Hung Wei
<302> A Novel Peptide Specifically Binding to Interleukin-6 Receptor (gp80) Inhibits Angiogenesis and Tumor Growth
<303> Cancer Research
<304> 65
<305> 11
<306> 4827-4835
<307> 2005-06-01
- <400> 2
Asn Pro Met Met Arg Pro Leu
1 5
- <210> 3
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
- <300>
<301> Jen-Liang Su, Kuo-Pao Lai, Chi-An Chen, Ching-Yao Yang, Pei-Sheng Chen, Chiao-Chia Chang, Chia-Hung Chou, Chi-Lun Hu, Min-Liang Kuo, Chang-Yao Hsieh, and Lin-Hung Wei
<302> A Novel Peptide Specifically Binding to Interleukin-6 Receptor (gp80) Inhibits Angiogenesis and Tumor Growth
<303> Cancer Research
<304> 65
<305> 11
<306> 4827-4835
<307> 2005-06-01
- <400> 3
Gln Met Arg Thr Thr Ile Arg
1 5
- <210> 4
<211> 7
<212> PRT

<213> 人工序列

<300>

<301> Jen-Liang Su, Kuo-Pao Lai, Chi-An Chen, Ching-Yao Yang,
Pei-Sheng Chen, Chiao-Chia Chang, Chia-Hung Chou, Chi-Lun Hu,
Min-Liang Kuo, Chang-Yao Hsieh, and Lin-Hung Wei

<302> A Novel Peptide Specifically Binding to Interleukin-6 Receptor
(gp80) Inhibits Angiogenesis and Tumor Growth

<303> Cancer Research

<304> 65

<305> 11

<306> 4827-4835

<307> 2005-06-01

<400> 4

Arg Leu Met Met Leu Gln Gln

1

5

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<300>

<301> Jen-Liang Su, Kuo-Pao Lai, Chi-An Chen, Ching-Yao Yang,
Pei-Sheng Chen, Chiao-Chia Chang, Chia-Hung Chou, Chi-Lun Hu,
Min-Liang Kuo, Chang-Yao Hsieh, and Lin-Hung Wei

<302> A Novel Peptide Specifically Binding to Interleukin-6 Receptor
(gp80) Inhibits Angiogenesis and Tumor Growth

<303> Cancer Research

<304> 65

<305> 11

<306> 4827-4835

<307> 2005-06-01

<400> 5

Met Leu Leu Gln Asn Arg Gln

1

5

<210> 6

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<300>

<301> Jen-Liang Su, Kuo-Pao Lai, Chi-An Chen, Ching-Yao Yang,
Pei-Sheng Chen, Chiao-Chia Chang, Chia-Hung Chou, Chi-Lun Hu,
Min-Liang Kuo, Chang-Yao Hsieh, and Lin-Hung Wei

<302> A Novel Peptide Specifically Binding to Interleukin-6 Receptor
(gp80) Inhibits Angiogenesis and Tumor Growth

<303> Cancer Research

<304> 65

<305> 11

<306> 4827-4835

<307> 2005-06-01

<400> 6

Thr Leu Gln Ala Ser Ile Leu

1

5

<210> 7

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<300>

<301> Jen-Liang Su, Kuo-Pao Lai, Chi-An Chen, Ching-Yao Yang,
Pei-Sheng Chen, Chiao-Chia Chang, Chia-Hung Chou, Chi-Lun Hu,
Min-Liang Kuo, Chang-Yao Hsieh, and Lin-Hung Wei

<302> A Novel Peptide Specifically Binding to Interleukin-6 Receptor
(gp80) Inhibits Angiogenesis and Tumor Growth

<303> Cancer Research

<304> 65

<305> 11

200700434

<306> 4827-4835
<307> 2005-06-01

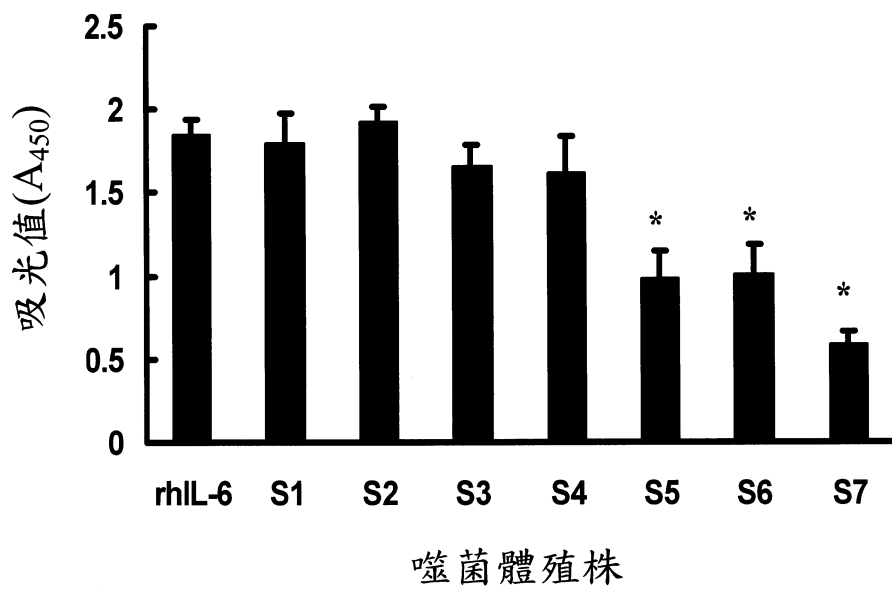
<400> 7
Leu Ser Leu Ile Thr Arg Leu
1 5

十、申請專利範圍：

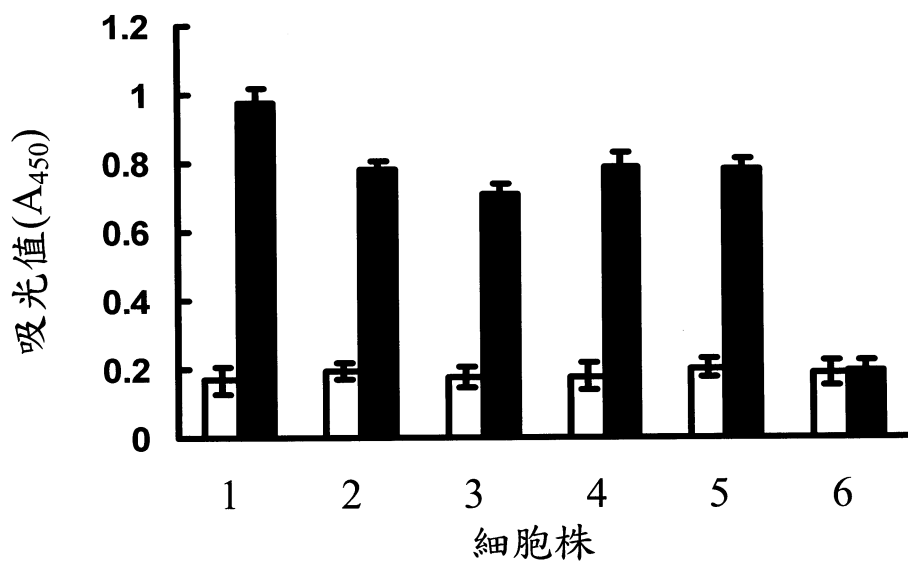
1. 一種拮抗介白素-6 的胜肽，其能專一性的結合至介白素-6 受體，藉以競爭抑制該介白素-6 與該介白素-6 受體的結合，且其包含一胺基酸序列，其中該胺基酸序列係選自 SEQ ID NO：5、SEQ ID NO：6 與 SEQ ID NO：7 所表示之胺基酸序列所組成之族群。
2. 如申請專利範圍第 1 項所述之拮抗介白素-6 的胜肽，其中該介白素-6 受體係為可溶性介白素-6 受體或位於目標細胞上之膜型(membrane-type)介白素-6 受體。
3. 如申請專利範圍第 2 項所述之拮抗介白素-6 的胜肽，其中該目標細胞為癌細胞。
4. 如申請專利範圍第 3 項所述之拮抗介白素-6 的胜肽，其中該癌細胞係為多發性骨髓瘤(multiple myeloma)、卡波西氏肉瘤(Kaposi's sarcoma)、基底細胞癌(Basal Cell Carcinoma, BCC)、前列腺癌(prostate cancer)或子宮頸癌(cervical cancer)。
5. 如申請專利範圍第 1 項所述之拮抗介白素-6 的胜肽，其中該胜肽係專一性結合至介白素-6 受體中的 α 鏈蛋白上。
6. 如申請專利範圍第 1 項所述之拮抗介白素-6 的胜肽，其中該胜肽能抑制由介白素-6 所調節之抗細胞凋亡作用。
7. 如申請專利範圍第 1 項所述之拮抗介白素-6 的胜肽，其中該胜肽能抑制由介白素-6 所調節之血管新生。
8. 如申請專利範圍第 1 項所述之拮抗介白素-6 的胜肽，其中該胜肽能抑制由介白素-6 所調節之腫瘤生長。

9. 一種噬菌體，其包含一可轉譯成一胺基酸序列的核酸序列，其中該胺基酸序列能專一性的結合至位於目標細胞上的介白素-6 受體，藉以競爭抑制介白素-6 與該介白素-6 受體的結合，且該胺基酸序列係選自 SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 6 與 SEQ ID NO: 7 所表示之胺基酸序列所組成之族群。
10. 一種表現載體(vector)，其包含一可轉譯成一胺基酸序列的核酸序列，其中該胺基酸序列能專一性的結合至位於目標細胞上的介白素-6 受體，藉以競爭抑制介白素-6 與該介白素-6 受體的結合，且該胺基酸序列係選自 SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 6 與 SEQ ID NO: 7 所表示之胺基酸序列所組成之族群。
11. 一種核酸序列，其可轉譯成一胺基酸序列，其中該胺基酸序列能專一性的結合至位於目標細胞上的介白素-6 受體，藉以競爭抑制介白素-6 與該介白素-6 受體的結合，且該胺基酸序列係選自 SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 6 與 SEQ ID NO: 7 所表示之胺基酸序列所組成之族群。
12. 一種抑制腫瘤細胞生長的醫藥組合物，包含一有效劑量如申請專利範圍第 1 項所述的胜肽，及一藥理上可接受之載物(carrier)。
13. 一種抑制腫瘤細胞生長的醫藥組合物，包含一有效劑量如申請專利範圍第 8 項所述的噬菌體，及一藥理上可接受之載物。

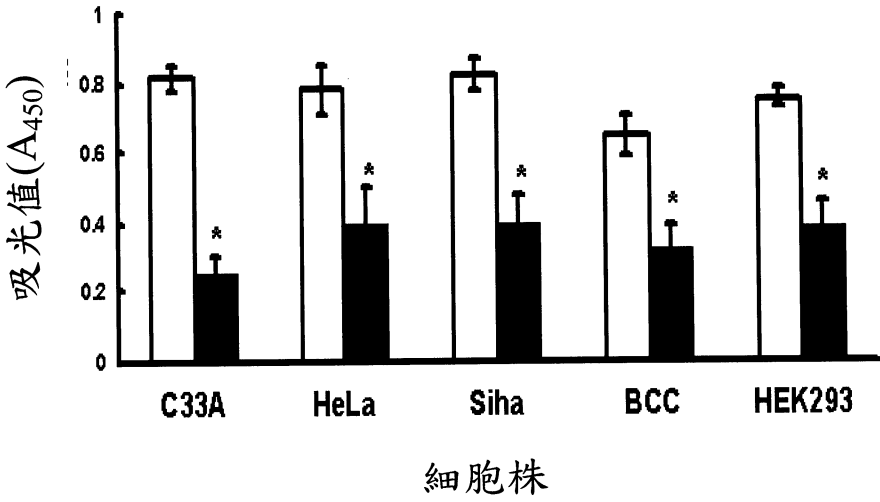
十一、圖式：



第一圖



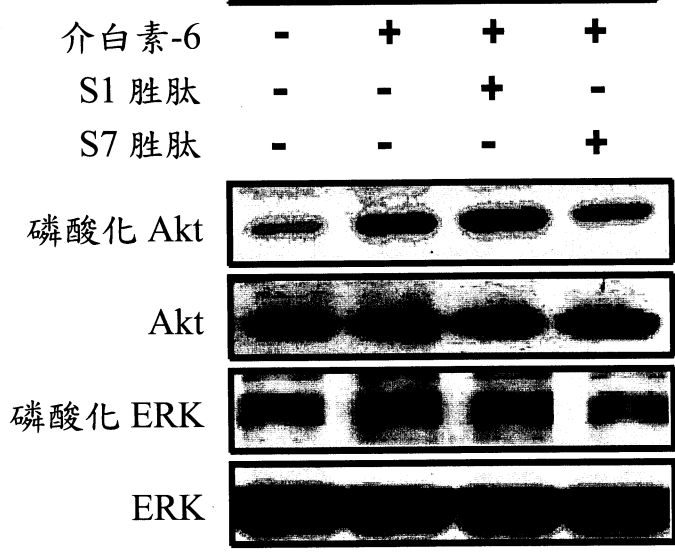
第二圖



第三圖

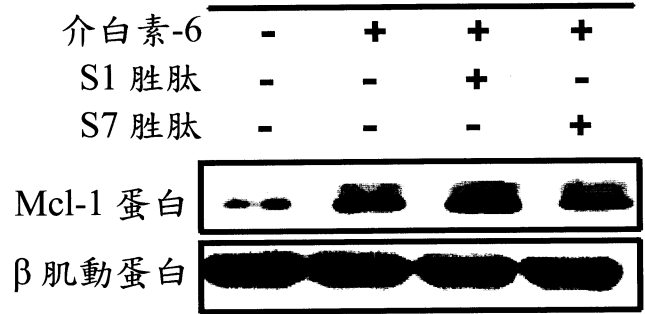
(A)

C33A 子宮頸癌細胞株

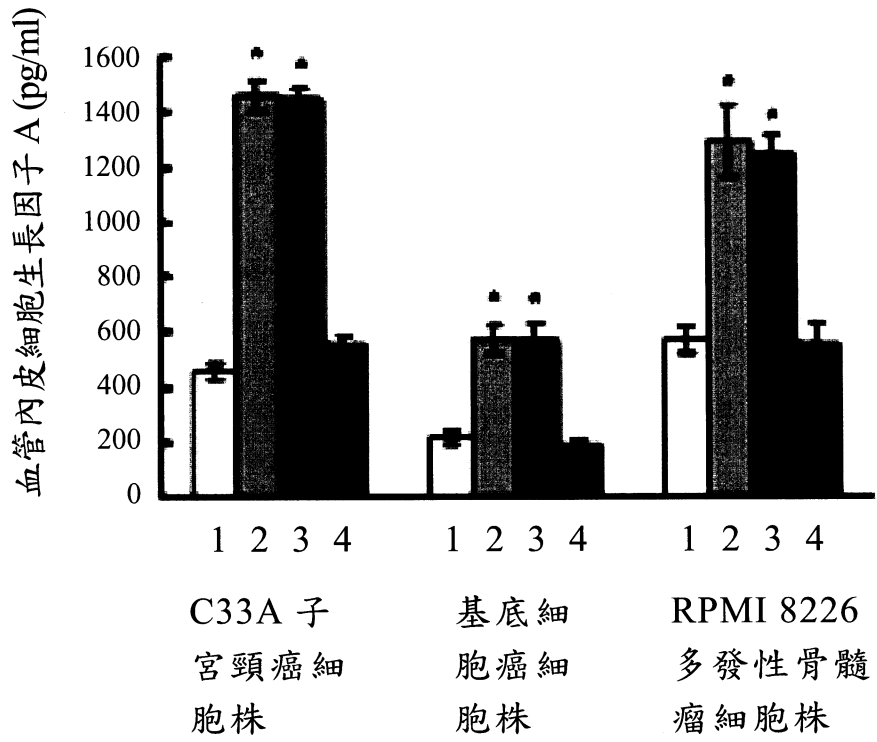


(B)

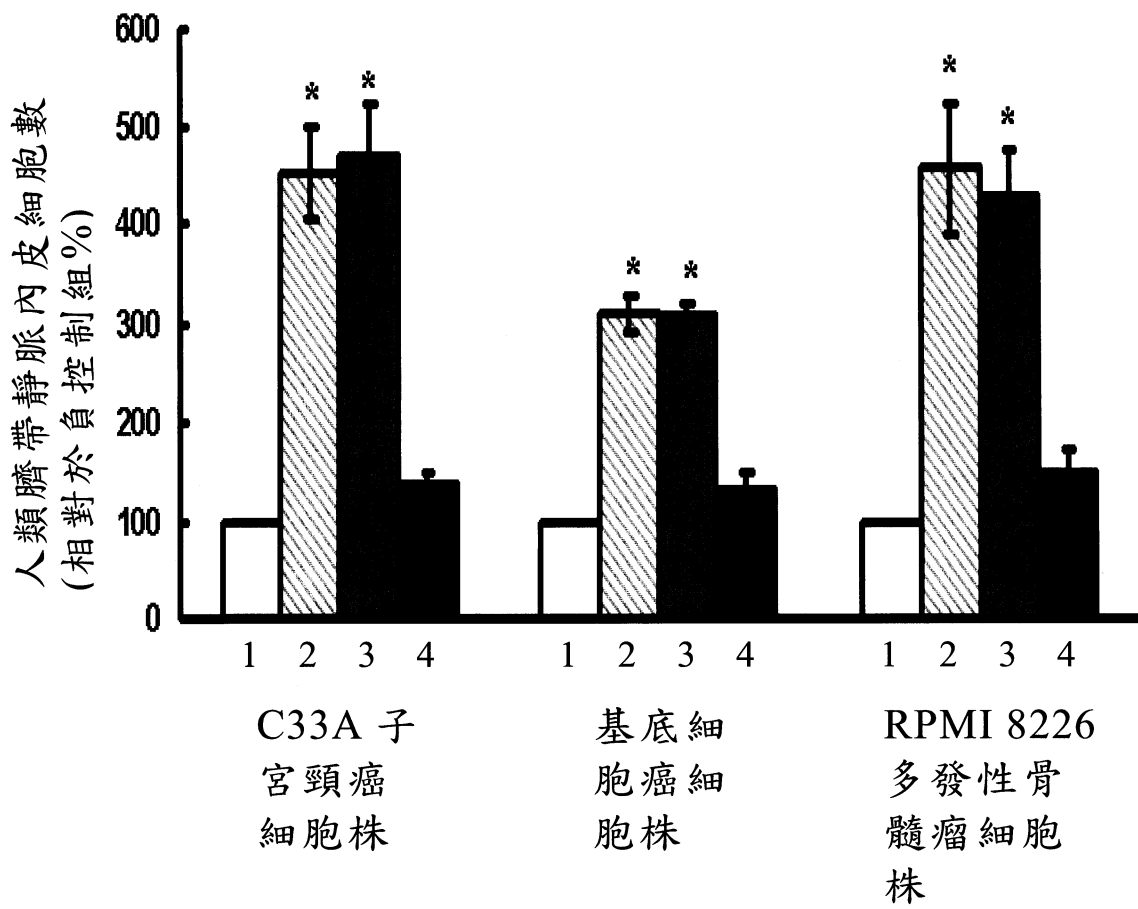
C33A 子宮頸癌細胞株



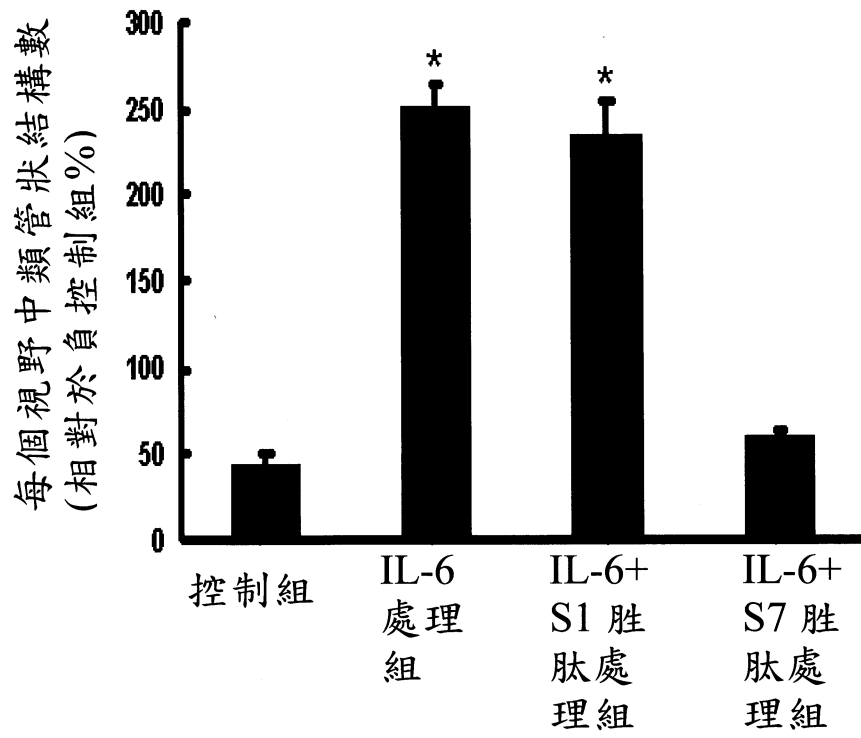
第四圖



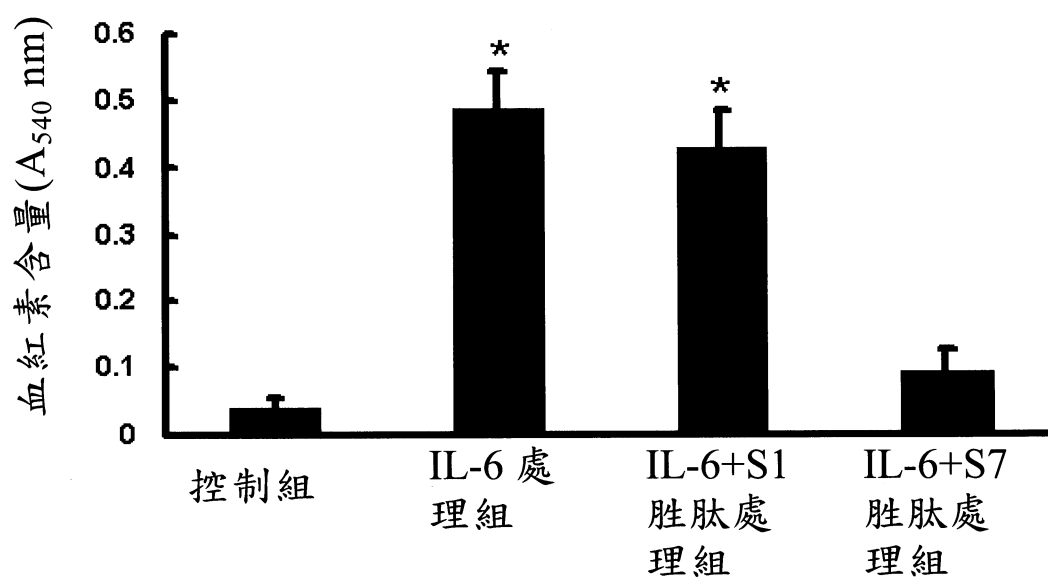
第五圖



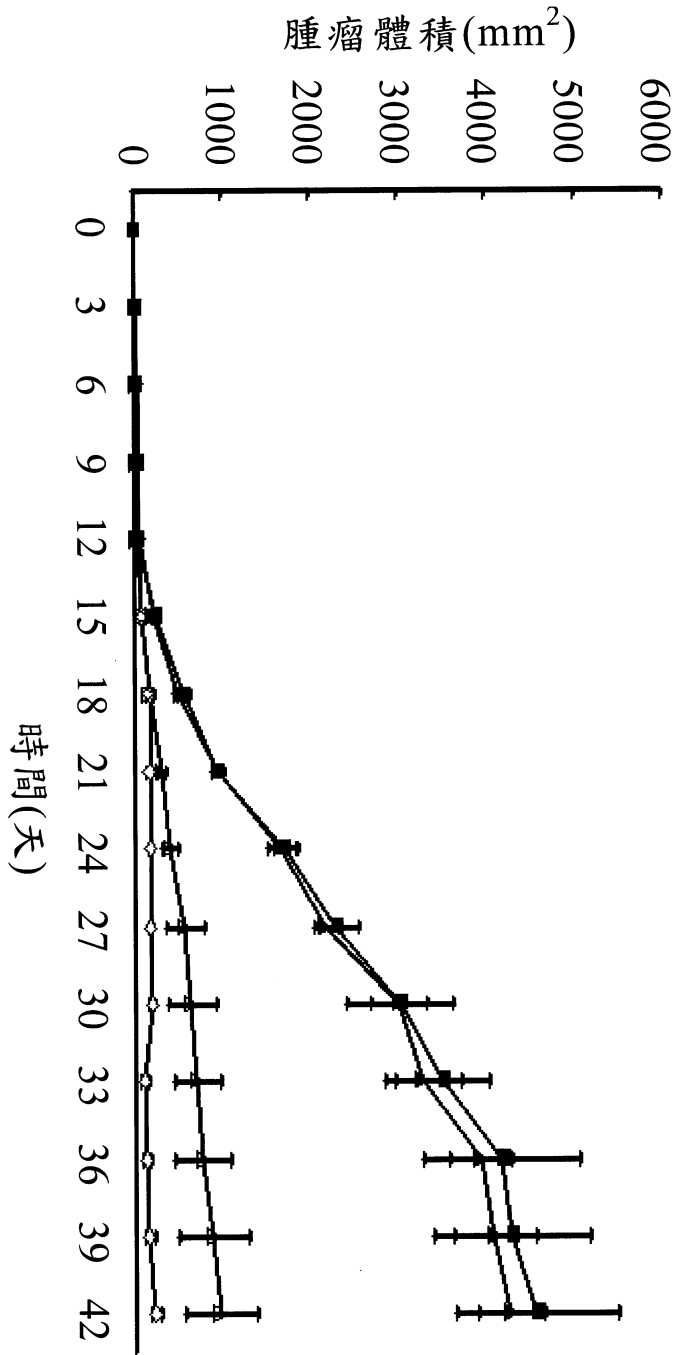
第六圖



第七圖



第八圖



第九圖