

發明專利說明書

※申請案號：094121890

※IPC分類：

一、發明名稱：

一種拮抗介白素-6的寡胜肽

二、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。

三、英文發明摘要：

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第()圖

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

[0001] 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】

[0002] 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上的酪胺酸激酶(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。

[0003] 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。

[0004] 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。

[0005] 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】

[0006] 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。

[0007] 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)。

[0008] 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。

[0009] 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。

[0010] 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。

[0011] 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】

[0012] 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。

[0013] 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)。

[0014] 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。

- [0015] 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。
- [0016] 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。
- [0017] 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。
- [0018] 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。
- [0019] 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。
- [0020] 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。
- [0021] 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胜肽庫所篩選出對IL-6R α 有結合活性之七種不同胜肽序列(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胜肽序列之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。
- [0022] 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。
- [0023] 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。

- [0024] 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。
- [0025] 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。
- [0026] 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))。之後利用實施例一所述之方法，但將實施例一所述的噬菌體植株以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。
- [0027] 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。
- [0028] 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)。
- [0029] 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。
- [0030] 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)。
- [0031] 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。
- [0032] 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)。
- [0033] 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。
- [0034] 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。
- [0035] 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。

- [0036] 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。
- [0037] 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(Newbauer)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。
- [0038] 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。
- [0039] 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($40 \mu\text{L}$)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。
- [0040] 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。
- [0041] 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($500 \mu\text{L}$)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。
- [0042] 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。
- [0043] 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。
- [0044] 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 $L^2 W/2$ 計算之。所得結果示於第九圖。
- [0045] 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。
- [0046] 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】

[0048] 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S71；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S7C33A；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。

[0049] 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。

[0050] 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。

[0051] 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】

【序列式】

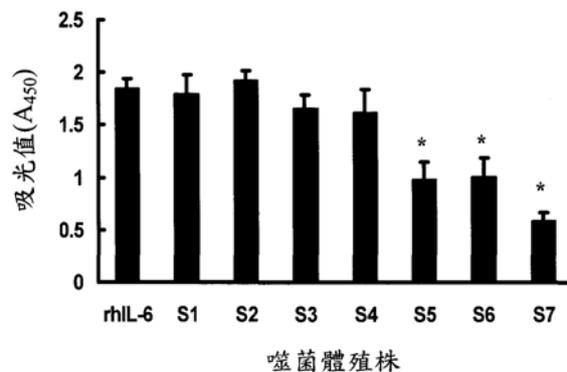
[0052]

七、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。

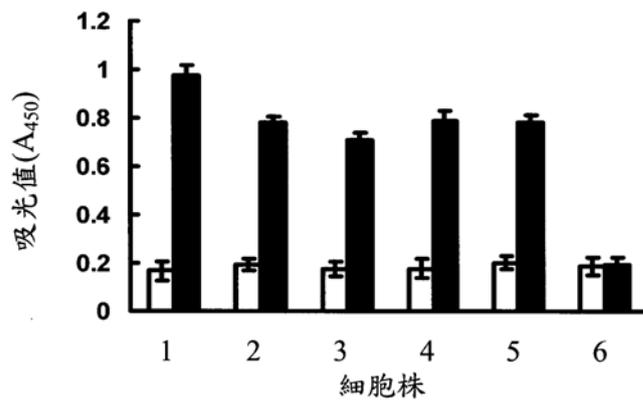
9. 一種噬菌體，其包含一可轉譯成一胺基酸序列的核酸序列，其中該胺基酸序列能專一性的結合至位於目標細胞上的介白素-6受體，藉以競爭抑制介白素-6與該介白素-6受體的結合，且該胺基酸序列係選自SEQ ID NO：5、SEQ ID NO：6與SEQ ID NO：7所表示之胺基酸序列所組成之族群。
10. 一種表現載體(vector)，其包含一可轉譯成一胺基酸序列的核酸序列，其中該胺基酸序列能專一性的結合至位於目標細胞上的介白素-6受體，藉以競爭抑制介白素-6與該介白素-6受體的結合，且該胺基酸序列係選自SEQ ID NO：5、SEQ ID NO：6與SEQ ID NO：7所表示之胺基酸序列所組成之族群。
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。

八、圖式：



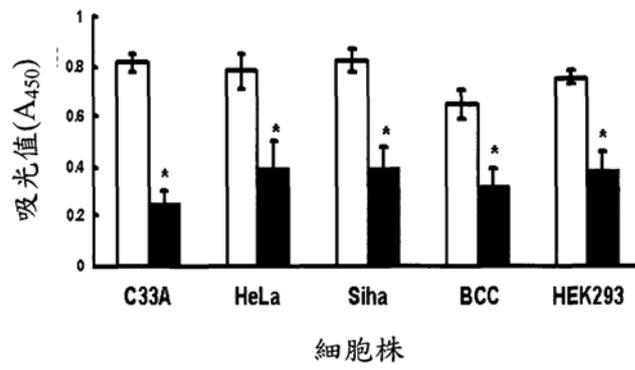
第一圖

第一圖



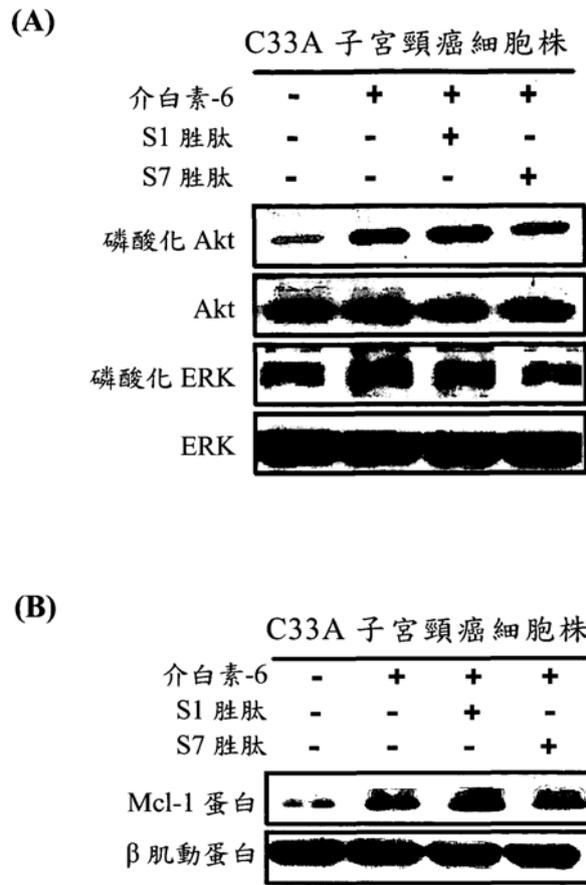
第二圖

第二圖



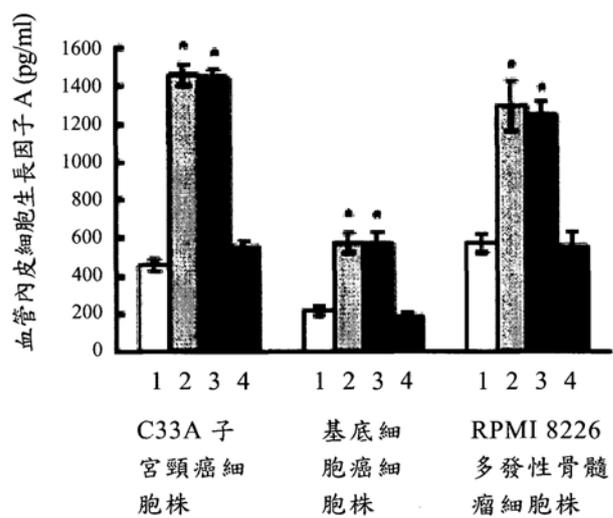
第三圖

第三圖



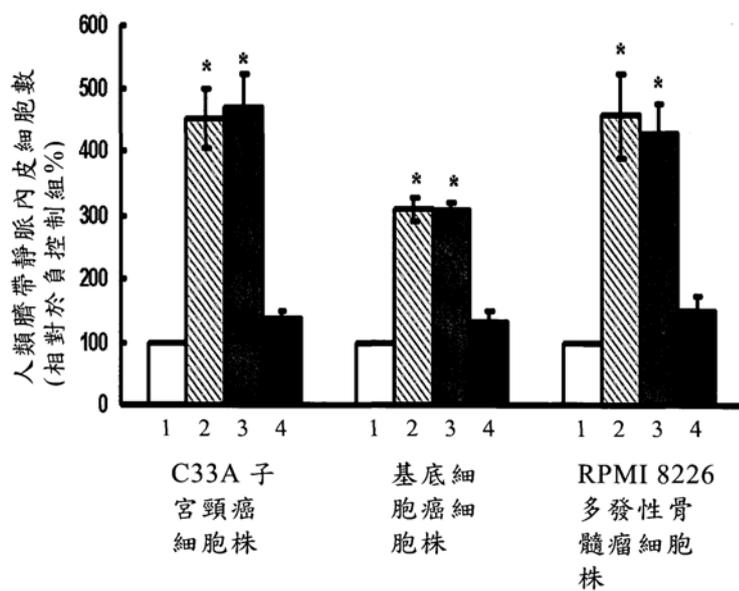
第四圖

第四圖



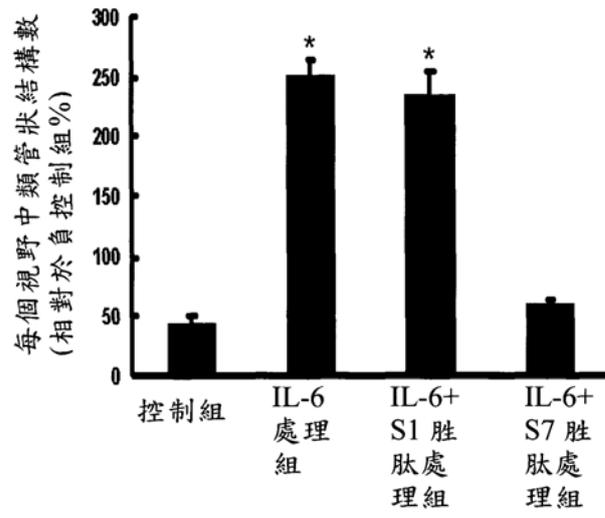
第五圖

第五圖



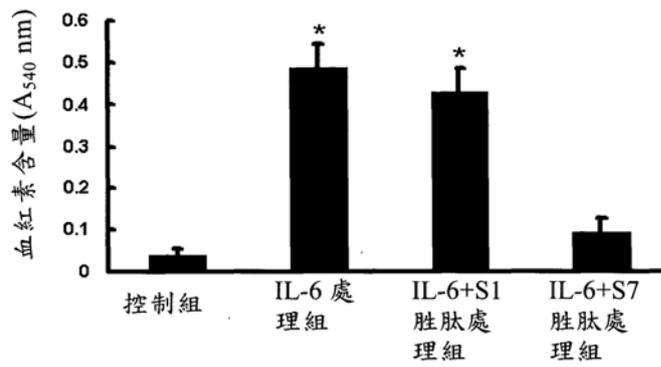
第六圖

第六圖



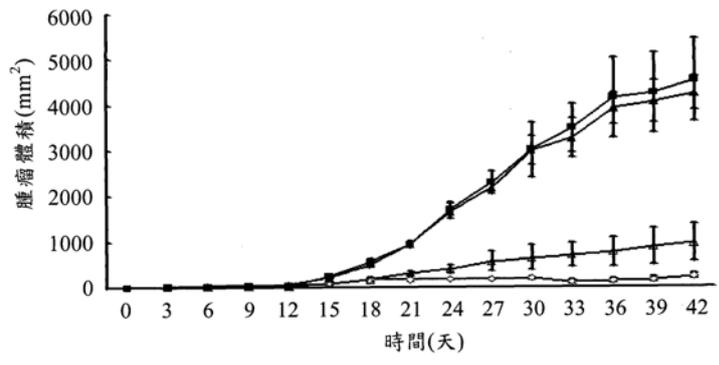
第七圖

第七圖



第八圖

第八圖



第九圖

第九圖