



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101454341 B

(45) 授权公告日 2013. 11. 06

(21) 申请号 200780019270. 5

A61K 38/00 (2006. 01)

(22) 申请日 2007. 04. 27

A61P 35/00 (2006. 01)

(30) 优先权数据

0603813 2006. 04. 27 FR

(56) 对比文件

WO 95/29190 A1, 1995. 11. 02, 权利要求
1-23.

(85) PCT申请进入国家阶段日

2008. 11. 25

(86) PCT申请的申请数据

PCT/FR2007/000730 2007. 04. 22

B. Krust et al..The anti-HIV pentameric
pseudopeptide HB-19 is preferentially taken
up in vivo by lymphoid organs where it forms
a complex with nucleolin. 《PNAS》. 2001, 第 98
卷 (第 24 期), 14090-14095.

(87) PCT申请的公布数据

W02007/125210 FR 2007. 11. 08

Se´

(73) 专利权人 国家科学研究中心

地址 法国巴黎

bastien Nisole et al..The Anti-HIV
Pentameric Pseudopeptide HB-19 Binds the
C-terminal End of Nucleolin and Prevents
Anchorage of Virus Particles in the Plasma
Membrane of Target Cells. 《THE JOURNAL OF
BIOLOGICAL CHEMISTRY》. 2002, 第 277 卷 (第 23
期), 20877-20886.

(72) 发明人 J·库尔蒂 A·荷瓦耐森

J·P·白里安 G·吉夏尔 Y·哈马

(74) 专利代理机构 北京戈程知识产权代理有限
公司 11314

审查员 曹丙洲

代理人 程伟

(51) Int. Cl.

C07K 14/16 (2006. 01)

权利要求书2页 说明书29页

序列表20页 附图23页

(54) 发明名称

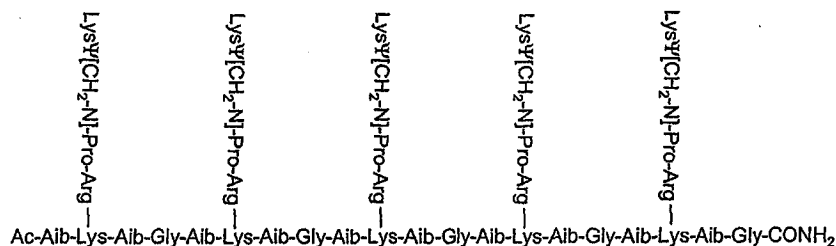
表面核仁素的多价合成配体在治疗癌症或发
炎中的用途

(57) 摘要

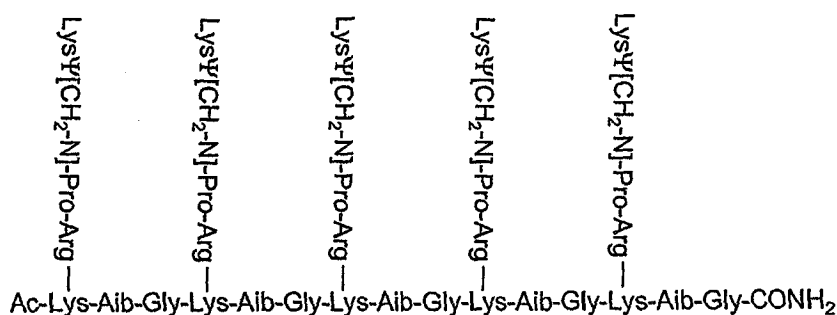
本发明涉及一种多价合成化合物在制备用于
治疗涉及细胞增殖和 / 或血管生成下调的疾病,
优选作为表面核仁素配体,或者治疗炎症疾病的
药物中的用途,该化合物包含一个载体,在所述载
体上至少三个假肽单元被接枝,该化合物符合通
式 (I), 其中每个 X 独立代表任何氨基酸 ;Y₁和 Y₂
独立选自具有碱性侧链的氨基酸 ;Z 选自脯氨酸,
可选地在≠、- 或 .. 被取代 ;天然的或非天然的
N- 烷基氨基酸 ;二烷基氨基酸 ;环二烷基氨基酸 ;
哌可酸或其衍生物 ;n 和 i 独立地为 0 或 1 ;m 是 0
至 3 的整数 ;k 是大于或等于 3 的整数 ;ψ 代表经
修饰的肽键,其相对于标准肽键来说,对至少一种
蛋白酶具有更显著抗性。

1. 一种多价合成化合物,其选自:

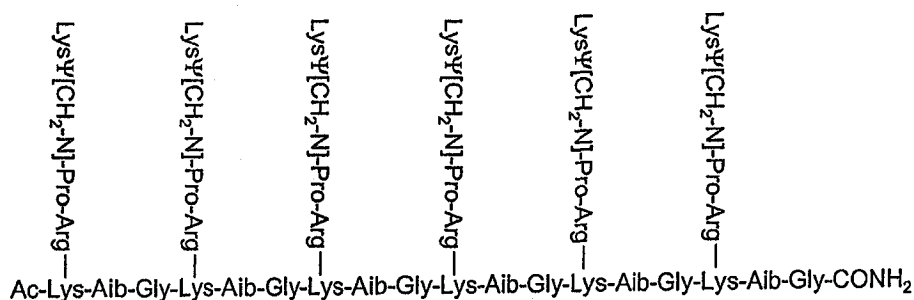
Nucant2 的通式



Nucant3 的通式

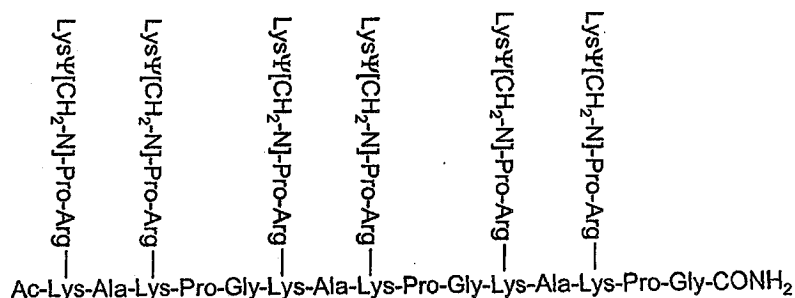


Nucant6 的通式



和

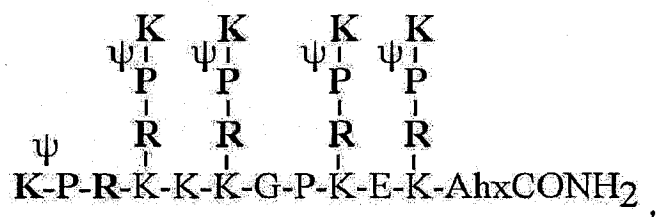
Nucant7 的通式



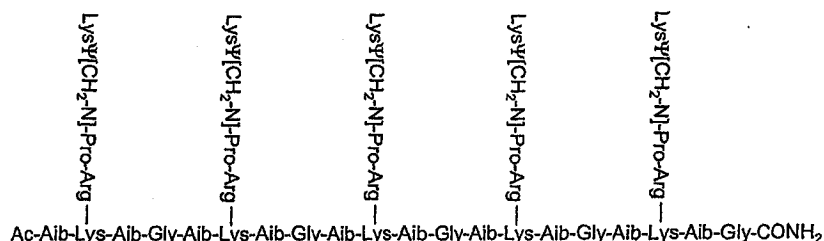
2. 包含如权利要求 1 所述的化合物的药物组合物。

3. 选自以下的化合物在制备用于治疗涉及细胞增殖下调和 / 或血管生成下调的疾病的药物中的用途,

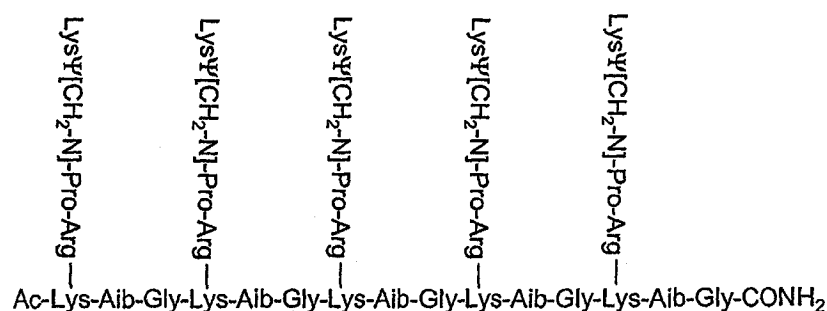
HB19 的通式:



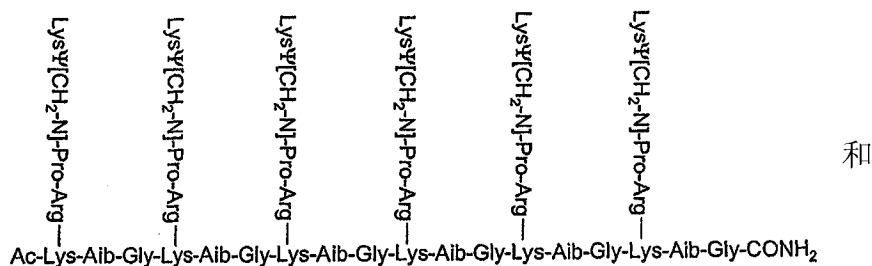
Nucant2 的通式



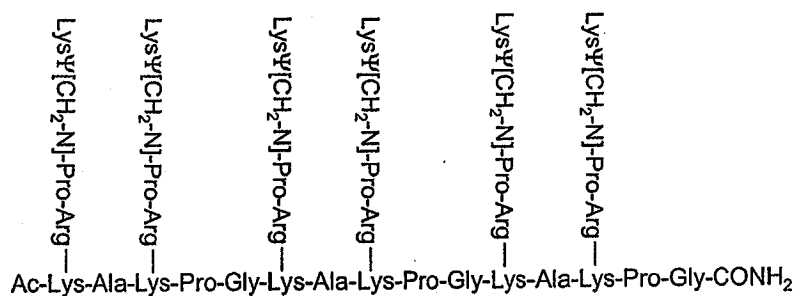
Nucant3 的通式



Nucant6 的通式



Nucant7 的通式

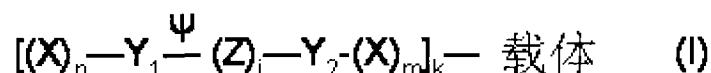


4. 根据权利要求 3 所述的用途,其特征为所述涉及细胞增殖下调和 / 或血管生成下调的疾病为癌症。

表面核仁素的多价合成配体在治疗癌症或发炎中的用途

[0001] 本发明涉及一种多价合成化合物在制备用于治疗涉及细胞增殖和 / 或血管生成下调的疾病以及优选地作为表面核仁素配体的药物中的用途, 该化合物包含或者由一个载体 (support) 组成, 在所述载体上至少三个假肽单元被接枝, 该化合物通式 (I) 为:

[0002]



[0003] 其中每个 X 独立代表任何氨基酸; Y_1 和 Y_2 独立选自具有碱性侧链的氨基酸; Z 选自脯氨酸, 可选地在 γ 、 β 或 δ 被取代; 天然的或非天然的 N-烷基氨基酸; 二烷基氨基酸; 环二烷基氨基酸; 哌可酸或其衍生物; n 和 i 独立地为 0 或 1; m 是 0 至 3 的整数; k 是大于或等于 3 的整数; Ψ 代表经修饰的肽键, 其相对于标准肽键来说, 对至少一种蛋白酶具有更显著抗性。

[0004] 细胞分裂或有丝分裂是使细胞繁殖从而修复或再生组织和替代死亡细胞的过程。在癌细胞中, 这个过程的调节是有缺陷的, 这就是为何这些细胞无限制地分裂从而导致肿瘤。因此, 一种有效预防癌症发展的治疗途径在于使用具有抗有丝分裂特性的分子来阻断癌细胞的分裂。

[0005] 但是, 目前的抗有丝分裂分子 (例如, 紫杉醇 (paclitaxel)、更公知为 taxol, 或秋水仙碱) 无细胞特异性地作用于所有的细胞, 而没有区别性, 因此带来很多不想要的副作用。因此必须发展低有害效应的抗有丝分裂分子。

[0006] 每种肿瘤都需要营养物和氧气以生长。这些元素由肿瘤内血管提供, 所述血管来自一种称为血管生成的机制。实际上, 如果这些血管不存在, 肿瘤细胞将进行细胞坏死过程, 肿瘤生长会慢下来然后停止。因此另外一种抗癌的治疗途径的例子在于通过阻断控制这个机制的分子来阻断血管生成过程。

[0007] 现有的抗有丝分裂分子多数为对一种血管生成因子特异。这种单特异性引起抗性现象。对一种血管生成因子的抑制会通过血管生成补偿机制产生另一种的表达。因此, 能得到针对所牵涉因子具有广谱活性的抗有丝分裂分子是有益的。

[0008] 但是, 抑制血管生成过程本身通常不足以有效阻断肿瘤生长。而且, 也不能阻断转移的形成。

[0009] 因此, 能得到新的能够同时抑制肿瘤细胞增殖和肿瘤中血管生成过程的抗癌分子是非常有用的。实际上, 近期一项研究显示, 两种治疗分子的组合 (一个抗有丝分裂的, 另一个抗血管生成的) 产生了协同效应, 与只使用一种这些分子的治疗相比, 显著增加了总治疗功效。

[0010] 没有报道过同时具有这两种效应 (抗有丝分裂和抗血管发生) 的分子。

[0011] 此外, 现有的抗癌试剂的大部分不是真正特异针对肿瘤细胞, 因此也靶向健康细胞, 从而导致很多的、有时很严重的副作用。这个问题在一些情况下通过发展靶向一些肿瘤的表面分子的抗体获得解决。但是, 使用抗体有其它严重的问题, 发展有效的治疗性无毒抗体是长期的、不确定的和昂贵的过程。此外, 在严格健康和安全条件下大规模生产抗体是特别困难的。因此, 基于特异性抗体的治疗仍很稀少而且及其昂贵。

[0012] 另外一个与常规抗癌药物例如紫杉醇相关的问题是,这些分子通常为高疏水性的,必须发展复杂的和昂贵的药学制剂以达到可接受的体内生物可利用率。在使用核酸的治疗中体内生物可利用率的问题更加严重,因为它们非常难以有效和特异的方式到达它们的靶细胞。

[0013] 因此,能得到具有以下特性的新的抗癌分子是非常有用的:

[0014] - 由于在肿瘤增殖和血管生成上的双抑制作用而具有很大改善的功效,因此它们是单独有效的,不需使用常规化疗或放疗,因此大大限制了与这些治疗相关的副作用;

[0015] - 针对血管生成因子的相当广谱的活性以防止治疗抗性;

[0016] - 由于针对肿瘤细胞的更高的特异性,从而副作用很小;

[0017] - 可容易地适合于工业水平的合成过程;

[0018] - 容易应用,特别是由于更好的生物可利用率和/或体内更长的半衰期,特别是由于直接针对肿瘤细胞的特异性,在水媒中的高溶解性和改进的针对体内分解过程的抗性。

[0019] 核仁素(结构见图 1A)最初被描述为存在于大多数真核细胞中的核蛋白。最近表明,虽然无跨膜结构域可使其附着到细胞膜,但这个蛋白的另一种分子形式也存在于细胞表面(1-4)。这个表面核仁素与细胞内肌动蛋白微丝紧密相连。这种相连最有可能是通过跨膜伴侣间接发生。

[0020] 在静止细胞中,核仁素主要被发现于细胞核,但在胞质和细胞表面也有一部分。在细胞增殖被激活后,胞质核仁素通过主动转运的方式(非常规机制,独立于内质网和高尔基体)向膜表面转运(1)。

[0021] 因此细胞激活后(特别是细胞增殖被激活后)表面核仁素表达度大大增加。因此表面核仁素构成增殖期激活细胞的标志。特别是在靶向于激活细胞的人类免疫缺陷病毒(HIV)的情况下,已经表明表面核仁素可能与 HIV 引起的细胞感染相关(2,5)。

[0022] 此外,也已经表明,表面核仁素在肿瘤细胞表面表达,例如源自肝癌的肿瘤细胞(6)、白血病 T 淋巴细胞(7 和 8)和子宫癌细胞(7)以及激活的内皮细胞表面(9),即在血管生成过程中相关的细胞。此外,表面核仁素构成与各种配体具有低亲和性的受体,即几种生长因子例如中期因子(midkine, MK)、肝素亲和调节蛋白(HARP,也称为 pleiotrophin, PTN)和乳铁蛋白(lactoferrin)(10-12)。

[0023] 最近,在专利申请 WO 2005/035579 中建议,可使用核仁素结合试剂(例如抗核仁素抗体、抗核仁素干扰 RNA 或反义抗核仁素寡聚核苷酸)来治疗癌症。所呈现的主要结果表明表面核仁素可被认为是癌细胞的标志,其本身不成为一个好的靶标。只有小鼠中的初步结果表明加入抗核仁素抗体可改善紫杉醇带来的肿瘤退化。但是,没有发表的结果证明这样的抗体本身的功效,也没给出与紫杉醇组合得到此种改善所需的剂量。此外,在人体体内使用抗体,如上所述,在使用上具有严重的问题。

[0024] 抗核仁素试剂可按不同的路径作用。特别是,这样的试剂可通过与核仁素蛋白结合或不结合来作用。对于干扰 RNA 类的试剂或反义抗核仁素寡聚核苷酸,这些试剂可能在细胞内核酸水平作用而不是结合至核仁素的水平。例如,在美国专利申请 US 2005/0026860 中描述,反义核仁素寡聚核苷酸在小鼠模型体内肿瘤退化中具有阳性效应。但是,虽然如此,在小鼠中观察到的效应是局部的,具有较小的肿瘤发展,并且未描述或建议其在血管生成上的效应。虽然这些结果建议核仁素可考虑作为癌症治疗的靶标,也建议平均功效不会

引起以抗核仁素试剂单独治疗的可能性,而只是简单地作为传统化疗之外的辅助治疗。此外,如上所述,体内使用寡聚核苷酸具有严重的生物可利用率问题。

[0025] 抗核仁素试剂也可直接结合至核仁素蛋白。各种核仁素配体已经在文献中有描述:

[0026] - 肽 F3(或肿瘤导向蛋白(tumour-homing protein))是对应于 HMG2N 蛋白(其结合至各种类型肿瘤的血管的激活的内皮细胞)的一个 34 个氨基酸的片段的肽。最近表明,肽 F3 与内皮细胞上表达的核仁素结合然后被内化并通过主动过程转运至细胞核。抗核仁素抗体可阻断与核仁素的结合和内化。有报道指出,肽 F3 结合至核仁素的 N-末端区域,该区域含有几个氨基酸富集区(9)。在本申请中,发明人表明肽 F3 不能抑制生长因子 HARP 引发的 NIH-3T3 细胞的细胞增殖(见实施例 1.1.1)。因此简单的与表面核仁素结合并内化不足以使这个肽具有抑制肿瘤细胞增殖的能力。

[0027] - 本发明人所合成和描述的多价化合物 HB19(见图 2A)也是一种表面核仁素配体(7,8,13,14),其与 RGG 结构域相互作用(见图 1B)。已经表明:这个化合物可能使抑制 HIV 激活的细胞感染(13)和其它天然配体与核仁素的结合(10-12)成为可能。但是,尚无报道的结果可以证明其可能的减少和/或抑制肿瘤生长或血管生成的能力。

[0028] - 专利申请 WO 00/61597 描述,富含鸟嘌呤的寡聚核苷酸(GRO)结合至可能是核仁素的蛋白,并在大于或等于 15 μ M 的剂量在体外抑制肿瘤细胞的增殖(15)。在体内,只提到了一定的伴随常规化疗的协同治疗的存在。没有描述或建议对血管生成的效应。此外,GRO 似乎主要与细胞内核仁素结合。

[0029] - 在注册了专利 WO 00/61597 的团队所发表的文章中,另一种混合的称为 MIX1 的寡聚核苷酸(在同义序列中包括碱基 G 和 T 例如 GRO,但也有碱基 A 和 C)被描述为以 GRO 相同的效力结合至核仁素但在细胞增殖上没有效应,这再次建议简单的与核仁素结合不足以具有抑制细胞增殖的能力(15)。

[0030] - 最近,一个团队表明可能通过一个含有抗-核仁素多克隆抗体的制备物来抑制由 VEGF 诱导的血管生成(16)。但是,虽然抗-核仁素多克隆抗体制备物阻断了内皮细胞形成小管,却不阻断内皮细胞的增殖。而且,只测试了由 VEGF 诱导的血管生成,而血管生成中涉及很多其它的因子;而且没有描述或建议抑制细胞增殖的结果。

[0031] 从以上描述中可清楚得知不是所有的核仁素配体表现出抗肿瘤活性,以上所列的文献没有一个建议这些配体中的任何一个可能同时在总体上抑制肿瘤细胞增殖和由各种因子引发的血管生成。

[0032] 此外,着重需注意的是,所列结果,不管是单一的看还是合起来看,都没有在任何方面建议这些配体可能具有足够的活性来单独使用而不与常规抗癌治疗(放疗或者尤其是,常规化疗例如紫杉醇)组合。

[0033] 但是,本发明人令人惊奇地表明,五价肽化合物 HB19,或其它化合物(具有接枝于载体上的至少三个相同类型的假肽单元),可能在总体上抑制肿瘤细胞增殖,不管是依赖性地或非依赖性地锚定(经转化细胞特点的增殖)或由各种因子引发的,以及抑制由各种因子引发的血管生成。此外更重要的是,本发明人表明在一个小鼠模型中,五价化合物 HB19 可在体内同时抑制肿瘤增殖和血管生成,而化合物 HB19 在肽的通常剂量(5mg/kg)下的抗肿瘤效应比紫杉醇(抗肿瘤治疗中的一种标准分子)在 10mg/kg 下要大。

[0034] 因此,以前所描述的其它表面核仁素的配体似乎只具有可引起辅助治疗的局部功效,而化合物 HB19 在小鼠体内表现出比紫杉醇(标准抗癌分子)更高的功效,这建议单独使用它而不与常规化疗分子组合的可能性。特别的,所使用的紫杉醇的剂量虽然确实能够引起肿瘤退化,但退化不是全部的,因为小鼠死亡后发现并称重了一个肿瘤。相反,使用低 2 倍剂量的多价配体 HB19,在小鼠死后未发现肿瘤,因此证明完全退化。

[0035] 因此多价化合物 HB19 似乎是强有力的抗癌试剂。这个效应可能与其双能力相关,所述双能力即本发明人所证明的同时抑制肿瘤细胞的增殖(不论是由几个不同的生长因子引发的或者甚至是锚定点非依赖性的)以及由 2 个不同的血管生成因子引发的血管生成过程。

[0036] 而且,本发明人没有发现毒性效应,不论是在化合物 HB19 存在下体外培养了几周的细胞中还是在以化合物 HB19 处理的小鼠体内。此外,体内使用后对结合至多价化合物 HB19 的蛋白的纯化可获得超过 90% 的表面核仁素,这表明多价化合物 HB19 和核仁素之间相互作用的高特异性。这极大地限制了副作用发生的可能性。本发明人同时表明虽然肽 HB19 可在结合至表面核仁素后被内化,但它不到达细胞核,这是解释对健康细胞无毒性的的重要因素。

[0037] 化合物 HB19 和其衍生物或类似物也可在容易的受控健康安全条件下容易地合成,甚至是在工业水平上。

[0038] 最后,它对核仁素以及肿瘤细胞和激活的内皮细胞的特异性,它的假肽本性和它在水媒中的高溶解性意味着它在体内具有非常好的生物可利用率。化合物 HB19 对表面核仁素的特异性不需要任何与靶分子的偶联。此外,在 HB19 的情况下,所呈现的每个 KPR 单元的赖氨酸和脯氨酸之间的经修饰的肽键(在化合物 19 的情况下为还原)使其在体内具有对蛋白酶很好的抗性和超过 24 小时的体内半衰期,这与体内半衰期不超过半小时的常规肽相反。而且,化合物 HB19 在水媒中完全可溶,这使其更易于使用,因为不需要特别的药物形式来进行体内的循环和靶向。

[0039] 因此五价化合物 HB19 呈现出提供新抗癌化合物所要解决的各种技术问题的所有必要特性:

[0040] - 由于在肿瘤增殖和血管生成中的双效应,能够具有单独的高抗肿瘤功效,所述功效使设想一种不需与常规化疗分子例如紫杉醇结合的单一治疗成为可能;

[0041] - 对一种特定类型的癌症不具有特异性,而是针对肿瘤细胞和激活的内皮细胞具有广谱活性;

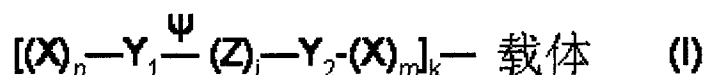
[0042] - 相对于健康细胞,对肿瘤细胞和激活的内皮细胞的特异性,因此在体内具有很小的副作用;

[0043] - 具有可容易地适合于工业水平的合成过程;和

[0044] - 在体内具有足够的生物可利用率从而不需要研制特别的药物形式。

[0045] 因此本发明涉及一种多价合成化合物在制备用于治疗涉及细胞增殖和/或血管生成下调的疾病的药物中的用途,该化合物包含或者由一个载体组成,在载体上至少三个假肽单元被接枝,该化合物通式(I)为:

[0046]



[0047] 其中每个 X 独立代表任何氨基酸；

[0048] Y_1 和 Y_2 独立选自具有碱性天然侧链的氨基酸；

[0049] Z 选自：

[0050] - 脯氨酸，可能在 γ 、 β 或 δ 被羟基、胺、 C_1 - C_{10} 烷基、 C_1 - C_{10} 烯基、 C_1 - C_{10} 炔基、 C_5 - C_{12} 芳基、 C_5 - C_{14} 芳烷基、 C_5 - C_{12} 杂芳基（优选地为 C_5 杂芳基）基团取代，这些基团本身可能被 1 至 6 个选自卤素原子、 NO_2 、OH、 C_1 - C_4 烷基、 NH_2 、CN、三卤甲基、 C_1 - C_4 烷氧基、 C_1 - C_4 二烷基氨基、胍基基团、硫醇基团的取代基取代；

[0051] - 天然的或非天然的 N- 烷基氨基酸；

[0052] - 二烷基氨基酸；

[0053] - 环二烷基氨基酸；或

[0054] - 哌可酸或其衍生物；

[0055] n 和 i 独立地为 0 或 1；

[0056] m 是 0 至 3 的整数；

[0057] k 是大于或等于 3 的整数；

[0058] Ψ 代表经修饰的肽键，其相对于标准肽键来说，对至少一种蛋白酶具有更显著抗性。

[0059] 优选地，这样的多价合成化合物作为表面核仁素的配体。

[0060] 在本申请的文本中，术语“载体”是指任何药学上可接受的分子，换一种说法即是无内在毒性，在其上面至少三个通式 (I) 的假肽单元可被接枝。因此，可接受的载体需具有足够的大小以允许至少三个通式 (I) 的假肽单元在其上面被接枝，优选为 3 至 8 个通式 (I) 的假肽单元。优选地这种可接受的载体也需要足够大，以允许至少 3 个，优选为 3 至 8 个通式 (I) 的假肽单元能够在一个或多个核仁素分子的 RGG 结构域中结合在一起从而相互作用。而且，该载体必须无免疫原性。

[0061] 这样的载体可选自直链肽或环肽、直链或环形拟肽 (peptoid) (N- 取代的甘氨酸低聚物)、折叠体 (foldamer) (具有强烈的采用紧密趋势的低聚物或多聚物，在溶液中具有非常确定和可预测的构象)、直链多聚物或球形树状聚体 (大分子，其由围绕一个多功能核心按照树形过程组合的多聚物组成)、糖或纳米颗粒。优选地，所述载体选自直链或环肽或者直链或环形拟肽。

[0062] 使用直链肽 (见图 2A 中 HB19 的结构) 使载体可以很容易地合成，本发明人以 HB19 获得的结果表明这样的载体确实有效解决了本申请中的技术问题。本申请中作为载体的直链肽可优选地含有超过 25% 比例的赖氨酸。更精确的，当在本发明中使用直链肽时，假肽单元优选为在赖氨酸的 ϵ 位置进行接枝。因此，当在本发明中使用直链肽时，优选为包括至少和待接枝的假肽单元同样数目的赖氨酸。

[0063] 例如，一个直链肽载体可具有选自 KKKGPKEKGC (SEQ ID NO :1)、KKKKGC (SEQ ID NO :2)、KKKKGPKKKKGA (SEQ ID NO :3) 或 KKKGPKEKAhxCONH₂ (SEQ ID NO :4) 的序列，Ahx 代表氨基己酸，CONH₂ 代表酸基团已被胺基团替代，AhxCONH₂ 代表 (2S)-2- 氨基己酰胺，或由 2-4 个单元 (KAKPG, SEQ ID NO :12) 所组成的直链序列，即 AcKAKPGKAKPGKAKPGCONH₂ (SEQ ID

NO:13, 其中 Ac 代表乙酰基基团 $\text{CH}_3\text{-CO-}$, CONH_2 意味着甘氨酸的酸基团 COOH 已被酰胺基团 CONH_2 所替代)。优选地, 直链肽载体可以是肽 $\text{KKKGPKKEKAhxCONH}_2$ (见例如图 2A 中的 HB19 例子, SEQ ID NO:5, 其以这个直链肽作为载体), 或者肽 $\text{AcKAKPGKAKPGKAKPGCONH}_2$ (SEQ ID NO:4, 其中 Ac 代表乙酰基基团 $\text{CH}_3\text{-CO-}$, CONH_2 意味着甘氨酸的酸基团 COOH 已被酰胺基团 CONH_2 所替代, 例如图 2F 中的 Nucant7, SEQ ID NO:17, 其以这个直链肽作为载体)。

[0064] 在直链肽中, 有一些为已知的采用螺旋面结构。这些直链肽也可被用于本发明中的载体。这种来自螺旋面结构的直链肽载体包含由大于或等于 3 的整数即 3-8 个重复肽单元序列组成的载体, 所述序列分别为 Aib-Lys-Aib-Gly (SEQ ID NO:6) 或 Lys-Aib-Gly (SEQ ID NO:7), 其中 Aib 代表 2-氨基-异丁酸。由于这些单元每个均由单一赖氨酸残基 (Lys) 组成, 因此需要与待接枝到通式 (I) 的假肽单元同样多的这些单元的重复。

[0065] 例如, 为了获得具有 5 个通式 (I) 的假肽单元的五价化合物, 该载体可以是直链肽, 该肽形成以下式的螺旋面结构:

[0066] Aib-Lys-Aib-Gly-Aib-Lys-Aib-Gly-Aib-Lys-Aib-Gly-Aib-Lys-Aib-Gly-Aib-Lys-Aib-Gly (SEQ ID NO:8) 或 Lys-Aib-Gly-Lys-Aib-Gly-Lys-Aib-Gly-Lys-Aib-Gly-Lys-Aib-Gly (SEQ ID NO:9)。优选地, 使用一种直链肽, 其形成源于 SEQ ID NO:8 和 9 的式的螺旋面结构。这个式选自 $\text{Ac-Aib-Lys-Aib-Gly-Aib-Lys-Aib-Gly-Aib-Lys-Aib-Gly-Aib-Lys-Aib-Gly-Aib-Lys-Aib-Gly-CONH}_2$ (SEQ ID NO:18, 其中 Ac 代表乙酰基基团 $\text{CH}_3\text{-CO-}$, CONH_2 意味着甘氨酸的酸基团 COOH 已被酰胺基团 CONH_2 所替代, 例如见图 2C 中的 Nucant 2, SEQ ID NO:20, 其以这个直链肽作为载体) 或 $\text{Ac-Lys-Aib-Gly-Lys-Aib-Gly-Lys-Aib-Gly-Lys-Aib-Gly-Lys-Aib-Gly-Lys-Aib-Gly-CONH}_2$ (SEQ ID NO:19, 其中 Ac 代表乙酰基基团 $\text{CH}_3\text{-CO-}$, CONH_2 意味着甘氨酸的酸基团 COOH 已被酰胺基团 CONH_2 所替代, 例如见图 2D 中的 Nucant 3, SEQ ID NO:21, 其以这个直链肽作为载体)。

[0067] 或者, 为了获得具有 6 个通式 (I) 的假肽单元的六价化合物, 所用的载体可以是直链肽, 该肽形成以下式的螺旋面结构: $\text{Ac-Aib-Lys-Aib-Gly-Aib-Lys-Aib-Gly-Aib-Lys-Aib-Gly-Aib-Lys-Aib-Gly-Aib-Lys-Aib-Gly-CONH}_2$ (SEQ ID NO:14, 其中 Ac 代表乙酰基基团 $\text{CH}_3\text{-CO-}$, CONH_2 意味着甘氨酸的酸基团 COOH 已被酰胺基团 CONH_2 所替代) 或 $\text{Ac-Lys-Aib-Gly-Lys-Aib-Gly-Lys-Aib-Gly-Lys-Aib-Gly-Lys-Aib-Gly-Lys-Aib-Gly-Lys-Aib-Gly-CONH}_2$ (SEQ ID NO:15, 其中 Ac 代表乙酰基基团 $\text{CH}_3\text{-CO-}$, CONH_2 意味着甘氨酸的酸基团 COOH 已被酰胺基团 CONH_2 所替代, 例如见图 2E 中的 Nucant 6, SEQ ID NO:17, 其以这个直链肽作为载体)。

[0068] 环形肽或拟肽也可被优选地用作载体。特别的, 这使得该结构的弹性被限制。环形肽或拟肽载体可主要选自六-, 八-, 十-, 或十二- 环形肽, 优选为由交替的 L (左旋的) 和 D (右旋的) 构型的氨基酸残基 (D, L- 环肽) 或由 N- 烷基甘氨酸残基链 (环形拟肽) 组成。具有这样的载体的化合物的例子为环形六肽, 其由交替的 D 构型的丙氨酸残基 (A) 和 L 构型的赖氨酸残基 (K) 组成, 具有 3 个 KPR 单元, 在 K 和 P 中间有一个 ψ 键 ($\psi = (\text{CH}_2\text{N-})$), 如图 2B (化合物 Nucant 01) 所示。

[0069] 优选地, 本发明所述的通式 (I) 的化合物的载体选自由交替的 D 构型的丙氨酸残基 (A) 和 L 构型的赖氨酸残基 (K) 组成的环形六肽, 或者具有 SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14,

SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:18 或 SEQ ID NO:19 序列的直链肽。

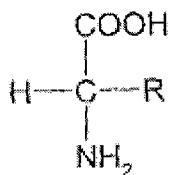
[0070] 在本发明的文本中,对于假肽单元的术语“接枝”意思是通过共价键的方式被结合至载体,不管是直接的还是通过假肽和载体之间的间隔化合物中间体。结果为,在一个特定实施方式中,在假肽单元和载体之间无间隔化合物,假肽单元直接接枝到载体。在另一个实施方式中,假肽单元通过间隔物中间体被接枝到载体。可接受的间隔物的例子包括乙二醇、哌嗪类化合物,或氨基己酸类或 β -丙氨酸类氨基酸。

[0071] 在载体为直链或环形肽和假肽单元直接接枝到该肽的情况下,肽和假肽单元之间的连接优选在肽载体的赖氨酸残基上进行,位于赖氨酸的 α 或 ϵ 位,优选为 ϵ 位(侧链上)的氨基基团。因此,将假肽单元直接接枝到肽载体优选为通过酰胺键进行,该酰胺键位于假肽单元的 C 末端的氨基酸的 COOH 酸基团和赖氨酸残基的氨基基团(优选为赖氨酸的 ϵ 位(侧链上)的氨基基团)之间。

[0072] 在本发明所述的化合物中,至少 3 个假肽单元被接枝到载体上。实际上,发明人的结果显示结合至核仁素的 RGG 结构域对于化合物 HB19 和其衍生物或类似物的不寻常抗肿瘤功效的重要性(见图 1)。结合至核仁素的 RGG 结构域可通过几个假肽单元的多价呈递来实现,例如那些合并通式(I)中的。对于载体为 KKKGPKEKGC, KKKKGC, KKKKGPKKKGA 或 KKKGPKEKA h_x CONH₂ 序列的直链肽来说,本发明人表明,少于 3 个单元($k < 3$),与核仁素结合的效力和抗肿瘤功效可能较低。因此本发明所述的化合物包括至少 3 个接枝到载体上的假肽单元, k 为大于或等于 3 的整数。因此本发明所述的化合物优选为呈现接枝到载体上的 3-8 个假肽单元($3 \leq k \leq 8$)。而且,本发明人表明,具有 5 或 6 个接枝到载体上的假肽单元时($k = 5$),活性最优,因为与核仁素的结合效力并不随着假肽单元数目的增多而升高。因此优选地,在通式(I)的化合物中, k 为介于 3 至 8 之间,优选为 4 至 7 之间,4 至 6 之间,4 至 5 之间或 5 至 6 之间。更优选地,在通式(I)的化合物中, k 等于 5 或更好为 6。

[0073] 在本发明的文本中,术语“任意氨基酸”意思是任何天然的或合成的氨基酸,可能经存在的一个或多个取代基所修饰。更确切地,术语氨基酸意思是具有以下一般结构的 α 氨基的氨基酸:

[0074]



[0075] 其中 R 代表氨基酸的侧链。因此在本发明的文本中, R 代表侧链或非侧链氨基酸的侧链。术语“天然氨基酸”意思是在活的生命体内天然发现的任何氨基酸。因此天然氨基酸包括在翻译中合并到蛋白质中的由 mRNA 编码的氨基酸,也包括体内天然发现的、代谢过程的产物或副产物的其它氨基酸,例如鸟氨酸,其通过精氨酸酶由 L-精氨酸经尿素生产过程产生。因此在本发明中所使用的氨基酸可以是天然的或非天然的。即,天然氨基酸通常具有 L 构型,但是根据本发明,氨基酸可以是 L 或 D 构型。而且, R 当然不限于天然氨基酸的侧链,而是可以自由选择。

[0076] 通式(I)的化合物的假肽单元中, Z 可不存在($i = 0$),或者存在($i = 1$)则选自:

[0077] 脯氨酸,可能在 γ 、 β 或 δ 被羟基基团、胺、 C_1 - C_{10} 烷基、 C_1 - C_{10} 烯基、 C_1 - C_{10} 炔基、 C_5 - C_{12} 芳基、 C_5 - C_{14} 芳烷基、 C_5 - C_{12} 杂芳基(优选地为 C_5 杂芳基)基团取代,这些基团本身可能被 1 至 6 个选自卤素原子、 NO_2 、 OH 、 C_1 - C_4 烷基、 NH_2 、 CN 、三卤甲基、 C_1 - C_4 烷氧基、 C_1 - C_4 二烷基氨基、胍基基团、硫醇基团的取代基取代;

[0078] - 天然的或非天然的 N- 烷基氨基酸;

[0079] - 二烷基氨基酸(例如氨基异丁酸);

[0080] - 环二烷基氨基酸;或

[0081] - 哌可酸或其衍生物。

[0082] 术语“ C_1 - C_i 烷基”意思是直链或支链的式 $-C_jH_{2j+1}$ 的饱和烃自由基,其中 $1 \leq j \leq i$ 。因此, C_1 - C_{10} 烷基包括 C_1 烷基(甲基)、 C_2 (乙基)、 C_3 (正丙基或异丙基)、 C_4 (正丁基、异丁基、仲丁基或叔丁基)、 C_5 (例如:正戊基、新戊基、异戊基、叔戊基)以及 C_6 至 C_{10} 烷基。术语“ C_1 - C_{10} 烯基”意思是由 1-10 个碳原子和至少一个 $C=C$ 双键组成的直链或支链的不饱和烃自由基。术语“ C_1 - C_{10} 炔基”意思是由 1-10 个碳原子和至少一个 $C \equiv C$ 三键组成的直链或支链的不饱和烃自由基。术语“ C_5 - C_{12} 芳基”意思是具有 5-12 个碳原子的芳香多环或单环烃自由基。术语“ C_5 - C_{14} 芳烷基”意思是总共具有 5-14 个碳原子的烷基和芳基的组合。术语“ C_5 - C_{12} 杂芳基”意思是一个芳基基团,在通常具有 5-12 个碳原子的烃链上至少一个碳原子被另一个选自 N、O 或 S 的原子取代。因此术语“ C_5 杂芳基”意思是一个芳基基团,其烃链上 5 个碳原子中至少一个被另一个选自 N、O 或 S 的原子取代。术语“ C_1 - C_4 烷氧基”意思是具有以下式的基团: $-O(O)C-(C_1-C_4 \text{ 烷基})$, $-O(O)C-(C_4-C_{12} \text{ 环烷基})$, $-O(O)C-(C_4-C_{12} \text{ 芳基})$, $-O(O)C-(C_4-C_{12} \text{ 芳烷基})$ 或 $-O(O)C-(C_4-C_{12} \text{ 杂芳基})$ 。优选地,通式 (I) 的化合物中,这样的“ C_1 - C_4 烷氧基”选自式 $-O(O)C-(C_1-C_4 \text{ 烷基})$, $-O(O)C-(C_4 \text{ 环烷基})$, $-O(O)C-(C_4 \text{ 芳基})$, $-O(O)C-(C_4 \text{ 芳烷基})$,或 $-O(O)C-(C_4 \text{ 杂芳基})$ 。术语“ C_1 - C_4 二烷基氨基”意思是式 $-N(C_1-C_4 \text{ 烷基})_2$ 的自由基,其中每个烷基相同或不同。

[0083] 术语“N- 烷基氨基酸”意思是任何氨基酸,其中胺基团中的一个氢原子被 C_1 - C_{10} 烷基链或 C_5 - C_{14} 芳烷基基团、优选为 C_5 - C_{10} ,即可能为 C_{10} 所取代。N- 烷基氨基酸的例子包括 N- 甲基甘氨酸或肌氨酸, N- 甲基异亮氨酸, N- 甲基缬氨酸等。术语“二烷基氨基酸”意思是任意氨基酸,其中 2 个氢原子(在中心碳原子或胺基团上)被 C_1 - C_{10} 烷基链或 C_5 - C_{14} 芳烷基基团、优选为 C_5 - C_{10} ,即可能为 C_{10} 所取代。二烷基氨基酸的例子包括 2- 氨基- 异丁酸(Aib),氨基环丙烷羧酸等。

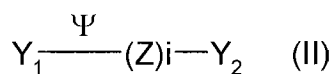
[0084] 优选地,Z 存在,因此 $i = 1$ 。同样优选地,当 Z 存在时($i = 1$)则 Z 为脯氨酸,可在 γ 、 β 或 ϵ 被取代,如上所述。

[0085] 在通式 (I) 的化合物的假肽单元中, Y_1 和 Y_2 选自具有碱性侧链的氨基酸。术语“具有碱性侧链的氨基酸”意思是任何天然或非天然氨基酸,其侧链 R 具有大于 7 的 pK_a 值($pK_a(R) > 7$)。因此,任何氨基酸可用于 Y_1 和 Y_2 ,只要其侧链具有大于 7 的 pK_a 值,优选为大于 7.5,大于 8,大于 8.5 或大于 9。特别地,在那些具有大于 7 的 pK_a 值的侧链的天然氨基酸中,包括赖氨酸(K, $pK_a(R) \approx 10.5$),精氨酸(R, $pK_a(R) \approx 12.5$),鸟氨酸(赖氨酸的下级同族体(inferior homologue), $pK_a(R) \approx 10.8$),通常被认为是天然的碱性氨基酸。因此,在一个优选的实施方式中, Y_1 和 Y_2 独立地选自精氨酸(R),赖氨酸(K)或鸟氨酸。更优选地, Y_1 是赖氨酸(K), Y_2 是精氨酸(R)。但是,也可使用其它的非天然氨基酸只要它们的

侧链的 pKa 值大于 7, 优选大于 7.5, 大于 8, 大于 8.5 或大于 9。

[0086] 在本发明的化合物中, 与核仁素的 RGG 结构域结合所必需的假肽单元是式 (II) 的亚单元:

[0087]



[0088] 其中, Y_1 和 Y_2 如上所定义。不过, 在此必需的亚单元的一端或另一端存在如上所定义的几个氨基酸不会防止与核仁素的结合。这就是为何此必需的式 (II) 的亚单元可以在一端和 / 或另一端包括 0 至 3 个任何氨基酸, 如在通式 (I) 中分别由 $(X)_n$ 和 $(X)_m$ 所代表, 其中 n 等于 0 或 1, m 是 0 至 3 的整数。优选地, 在此必需的式 (II) 的亚单元的一端和 / 或另一端存在的氨基酸的数目是低的, 换句话说, n 优选地为 0, m 优选地 0 至 2 的整数, 优选为 0 或 1, 优选为 0。因此, 在一个优选的实施方式中, n 和 m 等于 0。

[0089] 在本发明的化合物中, 式 (II) 的亚单元包括经修饰的肽键 Ψ , 其相对于标准肽键来说, 对至少一种蛋白酶具有更显著抗性。

[0090] 术语“标准肽键”意思是式 $(-\text{CONH}-)$ 的酰胺键, 其通常在天然蛋白质的两个氨基酸之间存在。这样的键对蛋白酶作用敏感。术语“经修饰的肽键 Ψ ”意思是与式 $(-\text{CONH}-)$ 的标准肽键不同的化学式的 2 个氨基酸之间的化学键。这样的经修饰的肽键 Ψ 相对于式 $(-\text{CONH}-)$ 标准肽键来说, 对至少一种蛋白酶具有更显著抗性。术语“蛋白酶”, 也称为“肽酶”或“蛋白水解酶”, 意思是可以切割蛋白质中的标准肽键的任何酶。这个过程被称为蛋白水解切割。这包括使用水分子, 其导致蛋白酶被归类为水解酶。即蛋白酶包括被称为 N- 肽酶的蛋白酶, 其对蛋白质的 N- 末端进行切割。在肽的体内稳定性方面, 没有经修饰的肽键, 这些蛋白酶是非常麻烦的。这就是为何通式 (I) 的化合物的假肽单元在 Y_1 和 Z 之间 (如果 $i = 1$) 或 Y_1 和 Y_2 之间 (如果 $i = 0$) 包括一个经修饰的键 Ψ , 以显著增加式 (II) 的亚单元对这些 N- 肽酶的抗性, 所述亚单元对与核仁素结合是必需的。因此 Ψ 键应该可能显著增加对至少一种 N- 肽酶的抗性。这可显著增加通式 (I) 的化合物的体内和体外半衰期。即, 具有经修饰的肽键 Ψ 的化合物 HB19 在血清或胎牛血清中在 37°C 下具有大于 24 小时的半衰期, 而具有标准肽键而不是 Ψ 键的相同化合物在同样条件下只有 1 个小时的半衰期。

[0091] 此外, 本发明人发现, 经修饰的肽键 Ψ 的存在也可显著增加与核仁素结合的效力。这种现象可能是由于可允许化合物 HB19 与核仁素形成不可逆的复合体。

[0092] 已知有各种化学键可显著增加对至少一种蛋白酶的抗性。因此, 在一个优选的实施方式中, Ψ 代表还原的键 $(-\text{CH}_2\text{NH}-)$ 或 $(-\text{CH}_2\text{N}-)$ (在结合发生于仲胺水平的情况下, 如脯氨酸的键的情况)、逆反键 $(-\text{NHCO}-)$ 、氧亚甲基键 $(-\text{CH}_2-\text{O}-)$ 、硫亚甲基键 $(-\text{CH}_2-\text{S}-)$ 、碳键 $(-\text{CH}_2-\text{CH}_2-)$ 、酮亚甲基键 $(-\text{CO}-\text{CH}_2-)$ 、羟乙烯基键 $(-\text{CHOH}-\text{CH}_2-)$ 、 $(-\text{N}-\text{N}-)$ 键、E- 烯键或 $(-\text{CH}=\text{CH}-)$ 键。即, 本发明人表明使用还原的 $(-\text{CH}_2-\text{NH}-)$ 可显著增加对至少一种蛋白酶的抗性。因此 Ψ 优选地代表还原的键 $(-\text{CH}_2\text{NH}-)$ 。

[0093] 虽然在通式 (I) 的化合物中只有 Ψ 在 Y_1 和 Z 之间 (如果 $i = 1$) 或 Y_1 和 Y_2 之间 (如果 $i = 0$) 之间系统地存在, 假肽单元的其他肽键也可能被修饰, 如上所述。特别地, 在本发明的文本中, 未说明的氨基酸之间的键完全可以标准肽键或经修饰的 Ψ 键, 如上所述。另外的 Ψ 键的存在使进一步增加通式 (I) 的化合物对蛋白酶的抗性成为可能。不过, 由于在 Y_1 和 Z 之间 (如果 $i = 1$) 或 Y_1 和 Y_2 之间 (如果 $i = 0$) 存在的第一个 Y 键而引起

的增加已经是非常显著的,其它 ψ 键的加入使假肽单元的合成复杂化并因此使通式 (I) 的化合物的合成复杂化。因此另外的 ψ 键的存在是可能的,但是是可选的。

[0094] 本发明中可使用的化合物的例子特别包括化合物(见图 2 和实施例 1, 2, 3 和 4):

[0095] -HB19(图 2A, SEQ ID NO:5, 以 SEQ ID NO:4 的直链肽作为载体的化合物, 其中 5 个假肽单元 $\kappa \psi PR(\psi = CH_2-N)$ 共价连接至 5 个赖氨酸残基 (K) 中的每个的 ϵ 氨基基团),

[0096] -Nucant 01(图 2B, 由交替的 D 构型的丙氨酸残基 (A) 和 L 构型的赖氨酸残基 (K) 组成的环形六肽作为载体的化合物, 其中 3 个假肽单元 $\kappa \psi PR(\psi = CH_2-N)$ 共价连接至 3 个赖氨酸残基 (K) 中的每个的 ϵ 氨基基团; 见图 2B),

[0097] -Nucant 2(图 2C, SEQ ID NO:20, 以具有 SEQ ID NO:18 的螺旋面结构的直链肽作为载体的化合物, 其中 5 个假肽单元 $\kappa \psi PR(\psi = CH_2-N)$ 共价连接至 5 个赖氨酸残基 (K) 中的每个的 ϵ 氨基基团),

[0098] -Nucant 3(图 2D, SEQ ID NO:21, 以具有 SEQ ID NO:19 的螺旋面结构的直链肽作为载体的化合物, 其中 5 个假肽单元 $\kappa \psi PR(\psi = CH_2-N)$ 共价连接至 5 个赖氨酸残基 (K) 中的每个的 ϵ 氨基基团),

[0099] -Nucant 6(图 2E, SEQ ID NO:16, 以具有 SEQ ID NO:15 的螺旋面结构的直链肽作为载体的化合物, 其中 6 个假肽单元 $\kappa \psi PR(\psi = CH_2-N)$ 共价连接至 6 个赖氨酸残基 (K) 中的每个的 ϵ 氨基基团),

[0100] -Nucant 7(图 2F, SEQ ID NO:17, 以 SEQ ID NO:13 的直链肽作为载体的化合物, 其中 6 个假肽单元 $\kappa \psi PR(\psi = CH_2-N)$ 共价连接至 6 个赖氨酸残基 (K) 中的每个的 ϵ 氨基基团)。

[0101] 以上所描述的化合物用于制备治疗涉及细胞增殖和 / 或血管生成下调的药物。术语“涉及细胞增殖和 / 或血管生成下调”在本申请的文本中意思是, 任何人类或动物疾病, 所述疾病影响一个或多个器官, 在所述器官中观察到一个或多个不正常细胞增殖现象, 以及细胞或组织的群体, 和 / 或不正常的新血管形成。特别的, 这些疾病包括所有类型的癌症, 例如腺瘤、肉瘤、癌、淋巴瘤以及特别是下列的癌症: 卵巢、乳、胰腺、淋巴结、皮肤、血、肺、脑、肾、肝、鼻咽腔、甲状腺、中枢神经系统、前列腺、结肠、直肠、子宫颈、睾丸或膀胱。它们也包括皮肤的非癌疾病, 例如表皮或真皮囊肿、牛皮癣、血管瘤, 以及眼病, 例如与年龄相关的黄斑退化 (ARMD)、糖尿病性视网膜病或新生血管性青光眼。神经变性疾病例如多发性硬化 (multiple sclerosis)、帕金森病 (Parkinson's) 和阿尔茨海默病 (Alzheimer's) 或自身免疫病, 例如狼疮或类风湿性关节炎, 以及与动脉硬化症相关的疾病。

[0102] 优选地, 所述涉及细胞增殖和 / 或血管生成下调的疾病是癌症, 特别是以上所列的其中一种。

[0103] 本发明还涉及一种同时抑制细胞增殖和血管生成的分子的筛选方法, 其包含:

[0104] (a) 将表达表面核仁素的细胞与测试分子接触; 和

[0105] (b) 确定所述测试分子与核仁素的 RGG 结构域的结合能力。

[0106] 可能通过化学合成或使用遗传工程通过核 DNA 序列的表达来合成核仁素的 60 个氨基酸的 RGG 结构域。然后通过本领域技术人员已知的各种技术来确定所述测试分子与核仁素的 RGG 结构域的结合能力。

[0107] 特别的,这可通过使用表面等离子共振技术,特别是使用 **Biacore® 3000** 仪器测定其与合成的 60 个氨基酸的 RGG 结构域的结合来进行。**BIACORE®** 系统使用表面等离子共振 (SPR) 的物理原理的生物感应器。其可对生物特异性表面上的两个分子之间的动力学相互作用常数 (K_a 和 K_d) 进行实时的和无特异标记的测定。为此,一个分子 (配体) 被固定在感应器表面,另一个 (被分析物) 被注入。SPR 检测的原理是对接近表面的折射率的变化进行定量,与生物感应器表面的质量变化 (由分子复合物的形成和拆分所引起) 联系。当单色的极化光到达具有不同折射率的两种介质的界面时,该界面以金属细层包被,反射光的强度对于一个特定的入射角明显降低。这是由于光的一个电磁成分,消逝波 (evanescent wave) 与界面垂直传播,达到 $1\ \mu\text{m}$ 。由于位于接近表面的分子重量的作用,共振角变化。因此,循时间而监测 SPR 角度可能实现对配体和被分析物的结合和拆分的实时观测。所获得的信号被记录下来 (sensogram)。以共振单位 (RU) 定量。1000RU 的变化对应于 0.1° 的角度上的偏移,并等于每 mm^2 上结合 1ng 的蛋白。因此这个技术不仅可建立测试分子与 RGG 结构域结合的能力,而且可建立所述分子与核仁素的 RGG 结构域的结合效力 (亲和常数)。

[0108] 也可以产生一个合成的 RGG 结构域,以生物素标记或者融合至肽或蛋白例如 GST (谷胱甘肽 S- 转移酶)。生物素或 GST 存在使得可以通过标记的亲和素 / 链霉亲和素配体 (荧光、发光、放射性等) 来检测,不论 RGG 结构域是生物素化的,和 / 或 RGG 结构域是以 GST 融合的,如果有抗 -GST 抗体。虽然精确度低,但这些技术可迅速且容易地筛选大量分子的与核仁素 RGG 结构域结合的能力,然后可使用以上所述的表面等离子共振技术对它们与 RGG 结构域结合的效力进行更精确的测定。

[0109] 因此,优选为首先对与核仁素 RGG 结构域结合的能力进行迅速且容易的筛选。然后,精进分析,即通过表面等离子共振技术确定能够与 RGG 结构域结合的候选者与 RGG 结构域结合的能力。但是,在只测定小数目化合物的情况下,可使用表面等离子共振技术直接测定它们与 RGG 结构域结合的效力。

[0110] 本发明进一步涉及如上所定义的化合物,但不包括下述载体为非环肽的化合物: 该非环肽包括选自 KPG, KGP, KGC 或 $\text{KX}_1\text{KX}_4\text{KX}_1\text{K}$ 的氨基酸序列,其中, X_1 是可选的,选自赖氨酸 (K)、缬氨酸 (V)、丙氨酸 (A)、谷氨酸 (E) 或异亮氨酸 (I), X_4 是可选的,选自缬氨酸 (V)、丙氨酸 (A)、谷氨酸 (E) 或异亮氨酸 (I)。

[0111] 特别的,载体 (除了上段所排除的以外)、假肽单元在载体上的接枝方式以及氨基酸 X 、 Y_1 和 Y_2 , n 和 m , 或 Y 可以是任何前述实施方式中的形式。

[0112] 本发明也涉及前述的化合物,载体为直链肽的化合物除外。特别的,载体 (除了直链肽以外)、假肽单元在载体上的接枝方式以及氨基酸 X 、 Y_1 和 Y_2 , n 和 m , 或 Y 可以是任何前述实施方式中的形式。

[0113] 特别的,载体可选自包含氨基酸序列的直链肽,所述氨基酸序列选自 Aib-K-Aib-G (SEQ ID NO :6) 或 K-Aib-G (SEQ ID NO :7), 环肽、直链或环形拟肽、折叠体、直链多聚物或球形树状聚体、糖或纳米颗粒。

[0114] 在一些优选的情况下,载体可以是由以下氨基酸序列组成的直链肽,所述氨基酸序列选自 SEQ ID NO :8、SEQ ID NO :9、SEQ ID NO :14、SEQ ID NO :15、SEQ ID NO :18 或 SEQ ID NO :19。

[0115] 根据本发明所述的化合物可特别地包括,载体为环肽例如 Nucant 01 (图 2B), 或

螺旋面结构例如 Nucant 2 (SEQ ID NO :20 和图 2C) 和 Nucant 3 (SEQ ID NO :21 和图 2D) 的化合物,如上所述。它们也可包括化合物 Nucant 6 (SEQ ID NO :16, 见实施例 4 和图 2E)。

[0116] 本发明也涉及化合物 Nucant 7 (SEQ ID NO :17 和图 2F) 作为化合物。

[0117] 本发明进一步涉及如上所定义的化合物作为药物的用途,但不包括下述载体为非环肽的化合物:该非环肽包括选自 KPG, KGP, KGC 或 $KX_1KX_4KX_1K$ 的氨基酸序列,其中, X_1 是可选的,选自赖氨酸 (K)、缬氨酸 (V)、丙氨酸 (A)、谷氨酸 (E) 或异亮氨酸 (I), X_4 是可选的,选自缬氨酸 (V)、丙氨酸 (A)、谷氨酸 (E) 或异亮氨酸 (I)。

[0118] 特别的,载体 (除了上段所排除的以外)、假肽单元在载体上的接枝方式以及氨基酸 X 、 Y_1 和 Y_2 , n 和 m , 或 Y 可以是任何前述实施方式中的形式。

[0119] 本发明也涉及前述的化合物,载体为直链肽的化合物除外。特别的,载体 (除了直链肽以外)、假肽单元在载体上的接枝方式以及氨基酸 X 、 Y_1 和 Y_2 , n 和 m , 或 Y 可以是任何前述实施方式中的形式。

[0120] 特别的,载体可选自包含氨基酸序列的直链肽、环肽、直链或环形拟肽、折叠体、直链多聚物或球形树状聚体、糖或纳米颗粒,所述直链肽包含选自 Aib-K-Aib-G (SEQ ID NO :6) 或 K-Aib-G (SEQ ID NO :7) 的氨基酸序列。

[0121] 在一些优选的情况下,载体可以是由以下氨基酸序列组成的直链肽,所述氨基酸序列选自 SEQ ID NO :8、SEQ ID NO :9、SEQ ID NO :14、SEQ ID NO :15、SEQ ID NO :18 或 SEQ ID NO :19。

[0122] 这些用作药物的化合物可特别地包括,载体为环肽例如 Nucant 01 (图 2B),或螺旋面结构例如 Nucant 2 (SEQ ID NO :20 和图 2C) 和 Nucant 3 (SEQ ID NO :21 和图 2D) 的化合物,如上所述。它们也可包括化合物 Nucant 6 (SEQ ID NO :16, 见实施例 4 和图 2E)。

[0123] 本发明也涉及化合物 Nucant 7 (SEQ ID NO :17 和图 2F) 作为药物的用途。

[0124] 本发明进一步涉及包含化合物的药物组合物,所述化合物如上所定义的化合物,但不包括下述载体为非环肽的化合物:该非环肽包括选自 KPG, KGP, KGC 或 $KX_1KX_4KX_1K$ 的氨基酸序列,其中, X_1 是可选的,选自赖氨酸 (K)、缬氨酸 (V)、丙氨酸 (A)、谷氨酸 (E) 或异亮氨酸 (I), X_4 是可选的,选自缬氨酸 (V)、丙氨酸 (A)、谷氨酸 (E) 或异亮氨酸 (I)。

[0125] 特别的,载体 (除了上段所排除的以外)、假肽单元在载体上的接枝方式以及氨基酸 X 、 Y_1 和 Y_2 , n 和 m , 或 Y 可以是任何前述实施方式中的形式。

[0126] 本发明也涉及前述的药物组合物,载体为直链肽的化合物除外。特别的,载体 (除了直链肽以外)、假肽单元在载体上的接枝方式以及氨基酸 X 、 Y_1 和 Y_2 , n 和 m , 或 Y 可以是任何前述实施方式中的形式。

[0127] 特别的,载体可选自包含氨基酸序列的直链肽,所述氨基酸序列选自 Aib-K-Aib-G (SEQ ID NO :6) 或 K-Aib-G (SEQ ID NO :7), 环肽、直链或环形拟肽、折叠体、直链多聚物或球形树状聚体、糖或纳米颗粒。

[0128] 在一些优选的情况下,载体可以是由以下氨基酸序列组成的直链肽,所述氨基酸序列选自 SEQ ID NO :8、SEQ ID NO :9、SEQ ID NO :14、SEQ ID NO :15、SEQ ID NO :18 或 SEQ ID NO :19。

[0129] 根据本发明所述的药物组合物可特别地包括,载体为环肽例如 Nucant 01 (图 2B),或具有螺旋面结构的直链肽例如 Nucant 2 (SEQ ID NO :20 和图 2C) 和 Nucant 3 (SEQ

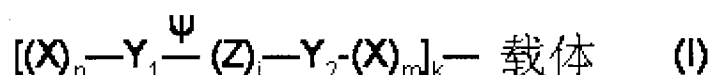
ID NO:21 和图 2D) 的化合物,如上所述。它们也可包括化合物 Nucant 6 (SEQ ID NO:16, 见实施例 4 和图 2E)。

[0130] 本发明也涉及含有化合物 Nucant 7 (SEQ ID NO:17 和图 2F) 的药物组合物。

[0131] 这样的药物组合物将本发明所述的化合物与药学上可接受的载体组合。

[0132] 本发明也涉及一种合成多价化合物在制备用于治疗炎性疾病的药物中的用途,所述化合物包含或者由一个载体组成,在载体上至少三个假肽单元被接枝,该化合物通式 (I) 为:

[0133]



[0134] 其中每个 X 独立代表任何氨基酸;Y₁ 和 Y₂ 独立选自具有碱性侧链的氨基酸;Z 选自脯氨酸,可选地在 γ、β 或 δ 被取代;天然的或非天然的 N-烷基氨基酸;二烷基氨基酸;环二烷基氨基酸;哌可酸或其衍生物;n 和 i 独立地为 0 或 1;m 是 0 至 3 的整数;k 是大于或等于 3 的整数;Ψ 代表经修饰的肽键,其相对于标准肽键来说,对至少一种蛋白酶具有更显著抗性。

[0135] 现在已经广泛确定,慢性炎性疾病,即细胞调节的自身免疫病,部分是由细胞因子引发的。由各种实验动物模型获得的结果已经解释出细胞因子在疾病发病机理中所扮演的角色 (17)。例如,促炎性细胞因子例如肿瘤坏死因子 α (TNF-α)、白介素 1 (IL-1)、IL-6、IL-15 和 IL-18 调节类风湿性关节炎病人的免疫和炎性反应。特别地,TNF-α 和 IL-1β 促进软骨和骨髓的破坏。

[0136] 此外,在发炎过程中,血管内皮表达不同的趋化因子 (chemokine) 和黏附分子,它们参与炎性中心的白细胞补充 (18)。

[0137] IL-8 是 C-X-C 趋化因子,其引发组织 (发炎位置) 中的白细胞的激活和选择性补充。当高量表达时,IL-8 可对机体具有致病性后果。脂多糖 (LPS) 和促炎性细胞因子例如 TNF-α 和 IL-1 引发许多类型的细胞分泌 IL-8,特别是内皮细胞 (19)。

[0138] 细胞间黏附分子-1 (ICAM-1) 是在几种类型的细胞 (包括内皮细胞和与免疫反应有关的细胞) 表面表达的免疫球蛋白类型的蛋白。它在白细胞黏附和向发炎位置移动上扮演重要角色 (20)。

[0139] 促炎性细胞因子也参与由细菌感染引发的普通炎性反应 (感染性休克 (Septicshock))。脂多糖 (LPS) 是革兰氏阴性菌的外膜上的组成成分。这个免疫刺激分子对引发普通炎性反应 (称为感染性休克,其经常伴随革兰氏阴性菌感染) 起极大作用。LPS 具有刺激淋巴网状内皮细胞产生细胞因子 (例如 TNF-α、IL-1 和 IL-6) 的生物学特性。这些细胞因子的诱导在败血症状的发展中扮演关键角色,因为单独使用 TNF-α 可导致败血症和死亡,因为 TNF-α 可引发体内 IL-1 和 IL-6 的产生。此外,在动物模型中,以抗-TNF-α 抗体和 IL-1 受体激动剂预处理可保护动物免于 LPS 的致命效应 (21)。

[0140] 严重败血病与攻击性炎性反应和器官衰败相关。它经常与高死亡率相联。它可以从细菌、真菌或病毒感染继续下去。这种反应的标志是相继的促炎性细胞因子然后是炎性细胞因子的分泌。TNF-α 和 IL-1β 是众多促炎性细胞因子中的。直至现在,尚未有关于抗-LPS 或抗-细胞因子试剂的临床试验获得成功 (22,23)。

[0141] 促炎性细胞因子似乎也在心脏炎或心脏发炎的病人中扮演病理生理学角色,所述

心脏发炎表现为心内膜（心内膜炎）或心包膜（心包炎）或心肌（心肌炎）的发炎。例如，在传染性心内膜炎（特别的，可由金黄色酿脓葡萄球菌（*Staphylococcus aureus*）感染所引起）的病人中，血清 IL-6 水平显著升高。同样，血清中高水平的 IL-6 可暗示传染性心包炎的存在并可作为这种疾病的诊断工具和追踪治疗（24, 25）。

[0142] 考虑到促炎性细胞因子例如 TNF- α 、IL-1 和 IL-6 在炎性疾病中的重要作用，已经发展了有关抗 -TNF- α ，抗 -IL-1 和抗 -IL-6 试剂的抗炎性细胞因子治疗，来治疗遭受炎性疾病的病人（26）。

[0143] 各种有关抗炎性细胞因子试剂的临床试验在治疗慢性炎性疾病例如类风湿性关节炎和腹部炎性疾病中已经取得一些成功：依那西普（Etanercept）（TNF 受体 -P75Fc 融合蛋白）、英夫利昔单抗（Infliximab）（嵌合人抗 -TNF- α 单克隆抗体）、阿达木单抗（Adalimumab）（重组人抗 -TNF- α 单克隆抗体）和阿那白滞素（Anakinra）（人 IL-1 β 受体拮抗剂的重组形式）（22）。

[0144] 然而，所有的目前可获得的抗炎性细胞因子试剂都是蛋白，因此具有与蛋白药物相联的缺点，特别是，生产的高成本和大规模生产中具有的问题。

[0145] 因此，非常需要能够特异性靶向促炎性细胞因子合成途径的低分子量的分子。

[0146] 令人惊奇的是，本发明人发现通式（I）的化合物，如上所述，具有抗炎性活性；特别的，他们抑制经 LPS 刺激的各种类型的细胞的 TNF- α 、IL-6 和 IL-8 的产生，以及 ICAM-1 的表达。这些化合物是极其有趣的，因为，如上所述的：

[0147] - 本发明人未发现这些化合物的毒性效应，不论在体外还是在体内；

[0148] - 这些化合物在容易控制的条件下可容易地合成，甚至是在工业规模上；

[0149] - 这些化合物本身具有足够的体内生物可利用率，无需发展特别的药物形式；

[0150] 因此本发明涉及通式（I）的合成多价化合物（如以上所述任何实施方式中所定义）在制备用于治疗炎性疾病的药物中的用途。

[0151] 特别的，在通式（I）中，载体、假肽单元 k 的数目、假肽单元在载体上的接枝方式氨基酸 X、Y₁ 和 Y₂，n 和 m，或 ψ 可以是以上描述的任何实施方式中的形式。

[0152] 术语“炎性疾病”意思是任何疾病，其中炎性反应对有机体具有致病性后果。特别的，本发明文本中的炎性疾病包括自身免疫病（例如狼疮或类风湿性关节炎）、败血病、感染性休克、心脏发炎疾病（心脏炎，特别是心内膜炎、心包炎、心肌炎，特别是有感染源的，例如由金黄色酿脓葡萄球菌所引起的）、移植排斥反应、外伤、关节的炎性疾病（特别的，关节炎的不同形式）、胃肠系统炎性疾病（特别的，大肠炎、肠炎、胃炎、肠胃炎和肠的慢性炎性疾病，例如克罗恩病（Crohn's disease）和出血性直肠结肠炎（HRC））、皮肤的炎性疾病（湿疹、过敏性接触皮炎、牛皮癣、皮肤病）、呼吸系统的炎性疾病，特别是慢性阻塞性肺病（COPD）和过敏症。

[0153] 在一个优选的实施方式中，炎性疾病为自身免疫病，特别是狼疮或类风湿性关节炎。在另一个优选实施方式中，炎性疾病为感染性休克。在另一个优选实施方式中，炎性疾病为心内膜炎，特别是有感染源的心内膜炎，例如由金黄色酿脓葡萄球菌所引起的。

[0154] 本发明的优点通过以下附图和实施例进行说明。

附图说明

[0155] 图 1. A. 核仁素蛋白的结构。人类核仁素由 707 个氨基酸组成。核仁素可被分解为两个主要部分 (3, 4) :N- 末端 (aa 1-308) 和 C- 末端 (309-706)。N- 末端结构域由 4 个长的酸性结构域 (由谷氨酸和天冬氨酸不间断的重复 (A1, A2, A3, A4) 组成) 组成。C- 末端结构域, 由交替的疏水和亲水区域 (形成 4 个称为 RBD (即 RNA 结合结构域 :I, II, III, IV) 的结合至 RNA 的区域) 组成, 其末端 (aa 644-707) 携带高度碱性的包含 Arg-Gly-Gly 重复的 RGG 结构域。B. 化合物 HB19 的与核仁素结合结构域 (RGG 结构域) 的鉴定。在一个使用兔网状细胞裂解液的系统中, 通过体外转录 / 翻译核仁素获得对应于 N- 和 C- 末端区域的核仁素构建体。因此, 产生了 [³⁵S]Met/Cys 标记的全核仁素和 N- 和 C- 末端部分 (分别含有氨基酸 1-707, 1-308 和 309-707)。然后以生物素化的 HB19 来温育标记的粗产物, 复合体在亲和素-琼脂糖柱上纯化。如所期望的, 全核仁素与 HB19 相互作用。另一方面, 富含酸性残基的核仁素的 N- 末端部分根本不与该化合物相互作用, 而核仁素的 C- 末端含有 HB19 的靶位 (14)。鉴定了含有 HB19 靶位的核仁素的 C- 末端后, 制造了这个区域的各种构建体 (N^o1-9)。第一个构建体对应于编码人核仁素 (包括 4 个 RBD 和 RGG 结构域) 的 C- 末端部分的 cDNA, 与 GST 蛋白 (谷胱甘肽 S- 转移酶) 融合以进行用抗 -GST 抗体的检测。其它的构建体, 也是与 GST 融合, 对应于同样的部分但一个或多个较短结构域。所有这些蛋白以 E. coli 产生。HB19 与每个构建体相互作用的能力这样测定: 将表达不同的核仁素构建体的细菌粗提物与生物素化的 HB19 温育, 然后固定于亲和素-琼脂糖以进行纯化。然后以聚丙烯酰胺凝胶和 GST 分析这些样品, 使用抗 -GST 抗体以免疫检测 (Western Blot) 显示。结果表明 RGG 结构域的存在对于 HB19 与核仁素的 C- 末端部分相互作用是必需的。而且, RGG 结构域自身对这种相互作用已足够。

[0156] 图 2. A. 化合物 HB19 的结构。B. 三价化合物 Nucant 01 的结构, 所述 Nucant01 具有环形六肽作为载体, 所述环形六肽由交替的 D 构型的丙氨酸残基 (A) 和 L 构型的赖氨酸残基 (K) 组成。3 个假肽单元 K Ψ PR ($\Psi = \text{CH}_2\text{-N}$) 共价连接至每个赖氨酸残基 (K) 的 ϵ 氨基基团; C. 五价化合物 Nucant 2 (SEQ ID NO:10) 的结构, 所述 Nucant2 具有直链肽作为载体, 所述直链肽具有 SEQ ID NO:8 序列的螺旋面结构, 其中 5 个假肽单元 K Ψ PR ($\Psi = \text{CH}_2\text{-N}$) 共价连接至 5 个赖氨酸残基中的每个的 ϵ 氨基基团, Ac 代表 $\text{CH}_3\text{-CO-}$ 基团; D. 五价化合物 Nucant 3 (SEQ ID NO:11) 的结构, 所述 Nucant 3 具有直链肽作为载体, 所述直链肽具有 SEQ ID NO:9 序列的螺旋面结构, 其中 5 个假肽单元 K Ψ PR ($\Psi = \text{CH}_2\text{-N}$) 共价连接至 5 个赖氨酸残基 (K) 中的每个的 ϵ 氨基基团, Ac 代表 $\text{CH}_3\text{-CO-}$ 基团。E. 六价化合物 Nucant 6 (SEQ ID NO:16) 的结构, 所述 Nucant 6 具有直链肽作为载体, 所述直链肽具有 SEQ ID NO:15 序列的螺旋面结构, 其中 5 个假肽单元 K Ψ PR ($\Psi = \text{CH}_2\text{-N}$) 共价连接至 6 个赖氨酸残基 (K) 中的每个的 ϵ 氨基基团, Ac 代表 $\text{CH}_3\text{-CO-}$ 基团。F. 六价化合物 Nucant 7 (SEQ ID NO:17) 的结构, 所述 Nucant 7 具有直链肽作为载体, 所述直链肽具有 SEQ ID NO:13 序列的螺旋面结构, 其中 6 个假肽单元 K Ψ PR ($\Psi = \text{CH}_2\text{-N}$) 共价连接至 6 个赖氨酸残基 (K) 中的每个的 ϵ 氨基基团, Ac 代表 $\text{CH}_3\text{-CO-}$ 基团。

[0157] 图 3. A. 抗-核仁素 (抗 Nu), B. 同位型 IgG, C. 肽 F3 和 D. HB-19 在经 HARP 刺激的 NIH-3T3 细胞增殖中的效应。在所示浓度的 HB19 存在或不存在的条件下, 不刺激或以 4nM HARP 刺激静止的 NIH-3T3 细胞。温育 24 小时后, 通过测定氟化胸苷的引入来确定细胞增殖。结果以相对于经 HARP 刺激的对照 (100%) 的百分率给出。MSD (起点), (**p<0.01,

*** $p < 0.001$)。

[0158] 图 4. 以 HB19 预处理 NIH-3T3 细胞 1 个小时在 HARP 诱导的增殖中的效应。NIH-3T3 细胞以 HB19 处理 1 个小时,然后洗涤,不刺激或以 3.6nM HARP 刺激。温育 24 小时后,通过测定氟化胸苷的引入来确定细胞增殖。结果以相对于经 HARP 刺激的对照 (100%) 的百分率给出。MSD(起点), (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)。

[0159] 图 5. HB-19 在经 0.2nM FGF-2 (A) 刺激或 5%胎牛血清 (B) 刺激的 NIH-3T3 细胞增殖中的效应。在所示浓度的 HB19 存在或不存在的条件下,以 FGF-2 或 5%血清刺激静止的 NIH-3T3 细胞。温育 24 小时后,通过测定氟化胸苷的引入来确定细胞增殖。结果以相对于经 HARP 刺激对照 (100%) 的百分率给出。MSD(起点), (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)。

[0160] 图 6. 抗-核仁素 (抗 Nu) (A), IgG 同位型 (B) 和 HB-19 (C) 对 MDA-MB231 在湿琼脂上生长的效应。MDA-MB231 细胞在培养基上培养,所述培养基在 0.6%琼脂基质上含有 0.35%琼脂。培养 10 天后,直径大于 50 μ M 的克隆被计数。每孔 5 个区域,每个点三次重复 (** $p < 0.01$)。

[0161] 图 7. 抗-核仁素 (抗 Nu) (A) 和 HB19 (B) 对 B16-BL6 在湿琼脂上生长的效应。B16-BL6 细胞在培养基上培养,所述培养基在 0.6%琼脂基质上含有 0.35%琼脂。培养 10 天后,直径大于 50 μ M 的克隆被计数。每孔 5 个区域,每个点三次重复 (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)。

[0162] 图 8. HB-19 在血管生成中的效应。A. HB-19 在 HUVEC 细胞体外增殖中的效应。20000 个 HUVEC 细胞在孔中培养,每天加入不同浓度的化合物 HB19。处理 6 天后对细胞计数。B. 也测定了 HB19 (1 μ M) 在 HUVEC 细胞分化中的效应,所述 HUVEC 细胞在 HARP 血管生成因子 (1nM);VEGF (1nM) 和 FGF-2 (3nM) 存在下以三维胶原凝胶培养。结果以任意单位表现。C. 体内血管生成模型 (matrigel 插入检测) (matrigel plug assay) 中,HB-19 在 HARP 或 FGF-2 引发的血管生成中的效应。将含有所示浓度的分子的 matrigel (300 μ l) 经皮下注射入小鼠。1 周后杀死小鼠,除去 matrigel。进行 8 μ m 厚的切片。染色后,通过图像分析估计内皮细胞的数目。对于每个 matrigel,每个实验点分析 5 个切片和 4 只小鼠。

[0163] 图 9. MDA-MB231 异种移植模型中,HB-19 在肿瘤生长中的效应。人乳腺癌 MDA-MB231 细胞经皮下注射入无胸腺小鼠 (裸)。当肿瘤达到 200mm³ 的体积时,以图 A 中所示的皮下途径处理小鼠。B. 在第 40 天杀死的小鼠中肿瘤的观测和测量。C. 在第 40 天杀死的小鼠的肿瘤重量。

[0164] 图 10. MDA-MB231 异种移植模型中,HB-19 在肿瘤生长中的效应。肿瘤生长的变化。腹腔内 (IP) 或皮下 (SC) 注射。

[0165] 图 11. MDA-MB231 异种移植模型中,HB-19 在转移的肿瘤细胞中的效应。使用抗 HLA-DR 抗体,以流式细胞仪 (FACS) 研究经 HB-19 处理或未处理的异种移植小鼠血液中的 MDA-MB231 细胞。HLA-DR⁺ 被环绕,标明了 HLA-DR⁺ 细胞在血细胞中的百分率。A. 没有 MDA-MB231 异种移植的小鼠的血液,未处理,HLA-DR⁺ 细胞在外周血细胞中的百分率: 0.36%。B. 没有 MDA-MB231 异种移植的小鼠的血液,未处理,HLA-DR⁺ 细胞在外周血细胞中的百分率: 22.2%。C. 具有 MDA-MB231 异种移植的小鼠的血液,以 HB19 经皮下途径处理,HLA-DR⁺ 细胞在外周血细胞中的百分率: 0.1%。D. 具有 MDA-MB231 异种移植的小鼠的血液,以 HB19 经皮下途径处理,HLA-DR⁺ 细胞在外周血细胞中的百分率: 0.31%。

[0166] 图 12. HB-19 和 Nucant01 在经 HARP 刺激的 NIH-3T3 细胞生长中的效应。在所示浓

度的 HB19 或 Nucant01 存在的情况下,不刺激或以 4nM HARP 刺激静止的 NIH-3T3 细胞。温育 24 小时后,通过测定氟化胸苷的引入来确定细胞增殖。结果(3 个点的平均值)以相对于对照的细胞增殖百分率给出,所述对照在无 HB19 和 Nucant 01 存在下经 HARP 刺激(100% 细胞增殖)。

[0167] 图 13. HB19、Nucant 2 和 Nucant 3 在经 HARP 刺激的 NIH-3T3 细胞生长中的效应。在所示浓度(0.1, 0.25 和 $0.5 \geq \mu\text{M}$) 的 HB19、Nucant 2 或 Nucant 3 存在的情况下,不刺激或以 4nM HARP 刺激静止的 NIH-3T3 细胞。温育 24 小时后,通过测定氟化胸苷的引入来确定细胞增殖。结果(3 个点的平均值)以相对于经 HARP 刺激的对照的百分率(100% 细胞增殖)给出。同时给出了 IC₅₀ 浓度(相对于经 HARP 刺激的对照,导致细胞增殖抑制 50% 的浓度)。

[0168] 图 14. NUCANT 3, 6 和 7 在经 5% FCS 刺激的 NIH-3T3 细胞增殖中的效应。在浓度范围为 0.125 至 $2 \mu\text{M}$ 的 NUCANT 3, 6 和 7 存在或不存在的条件下,以 5% FCS 刺激 NIH-3T3 细胞。所述 NIH-3T3 细胞经血清剥夺而成为静止的。温育 24 小时后,通过测定氟化胸苷的引入来确定细胞增殖。结果以相对于经 5% FCS 刺激的对照细胞的百分率给出。ID₅₀ 以点线表示。

[0169] 图 15. Nucant 6 和 Nucant 7 比 HB19 表现出更好的抗表面核仁素活性。ID₅₀: 抑制表面核仁素 50% 的浓度,以 μM 表示; ID₉₅: 抑制表面核仁素 95% 的浓度,以 μM 表示。

[0170] 图 16. HB-19、Nucant 3、Nucant 6 和 Nucant 7 对 MDA-MB231 细胞表达核仁素的抑制效应。MDA-MB231 细胞在含有 10% 胎牛血清的 DMEM 中在 75cm^2 培养。培养 2 天后,以 $10 \mu\text{M}$ 的 HB-19(线 1)、Nucant 3(线 2)、Nucant 6(线 3) 或 Nucant 7(线 4) 处理分汇合(subconfluent) 细胞(每瓶约 3×10^6 个细胞) 24 或 48 个小时。线 C 代表未经处理的细胞。处理 24 或 48 小时后,以 PBS 洗涤细胞,以 10ml 含有 1% 胎牛血清和生物素化的 HB-19($5 \mu\text{M}$) 的 DMEM 在室温下温育 45 分钟。以含有 1mMEDTA 的 PBS(PBS-EDTA) 彻底洗涤后,用含有 20mM Tris HCl, pH7.6, 150mMNaCl, 5mM MgCl_2 , 0.2mM 苯甲基磺酰氟化物, 5mM β -巯基乙醇, 抑肽酶(1000U/ml) 和 0.5% Triton X-100 的裂解缓冲液制备胞质提取物。使用 PBS-EDTA 中的亲和素-琼脂糖($100 \mu\text{l}$; ImmunoPure Immobilized Avidin, Pierce Chemical Company, USA) 从纯化提取物分离表面核仁素和生物素化的 HB-19 之间形成的复合物。在 4°C 温育 2 小时后,亲和素-琼脂糖样品以 PBS-EDTA 彻底洗涤。这些含有纯化的表面核仁素的样品(A; 对应于 2×10^6 个细胞的材料) 和细胞粗提物(B 和 C; 对应于 4×10^5 个细胞的材料) 在含有 SDS 的电泳缓冲液中变性,通过 SDS-PAGE 分析。表面核仁素的存在使用 D3 单克隆抗体(A 和 B) 以免疫杂交显示。C 中显示了考马斯蓝染色后的电泳分析。线 M 对应于分子重量标记物。

[0171] 图 17. 体外 CAM 模型中血管生成的抑制。含有或不含有(对照) HB-19($10 \mu\text{M}$; $0.6 \mu\text{g}$) 或 Nucant7($10 \mu\text{M}$; $0.8 \mu\text{g}$) 的 $20 \mu\text{l}$ 水沉淀至 CAM 表面。温育 48 小时后进行血管的观测。

[0172] 图 18. HB-19 对经各种 LPS 制备物刺激的人初级外周单核细胞(PBMC) 产生 $\text{TNF-}\alpha$ 的抑制。使用人全血 EDTA- 钾通过 Ficol1 密度梯度离心分离 PBMC 并重悬于含有 1% 人血清 AB(Invitrogen) 的 RPMI 1640。在 HB-19 不存在(0) 或存在(1 和 $5 \mu\text{M}$) 的情况下,以 100ng/ml 的来自大肠杆菌(*Escherichia coli*) 型 0111:B4 和 055:B5 的 LPS 以及来自肠

道沙门氏菌 (*Salmonella enterica*) 血清型 Re 595 的 LPS 刺激浓度为 10^6 个细胞 /0.5ml 的细胞。同样的 PBMC 以 20ng/ml :1 μ M 的 PMA :伊屋诺霉素 (Ionomycin) (佛波醇-12-豆蔻酸酯-13-乙酸酯 :伊屋诺霉素) 刺激。在 37°C 下 5% CO_2 的温育箱中温育 PBMC 培养物。温育 20 小时后收集培养物上清,以 ELISA 测定 TNF- α 的水平。

[0173] 图 19. HB-19 对经各种 LPS 制备物刺激的鼠腹膜初级巨噬细胞产生 TNF- α 和 IL-6 的抑制。在 4 μ M HB-19 不存在 (-) 或存在 (+) 的情况下,不刺激 (B40) 或以浓度为 100ng/ml (B4 100) 和 1000ng/ml (B4 1000) 的来自大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 型 0111 :B4 的 LPS 刺激鼠腹膜巨噬细胞。在 37°C 下 5% CO_2 的温育箱中温育细胞培养物 20 小时。以 ELISA 测定 TNF- α (A) 和 IL-6 (B) 的水平。

[0174] 图 20. Nucant 7 对经各种 LPS 刺激的鼠腹膜初级巨噬细胞产生 TNF- α 和 IL-6 的抑制。在 10 μ M Nucant 7 不存在 (-) 或存在 (+) 的情况下,不刺激 (-) 或以浓度为 10ng/ml, 100ng/ml 和 1000ng/ml 的来自大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 型 0111 :B4 的 LPS 刺激 (+) 鼠腹膜巨噬细胞。在 37°C 下 5% CO_2 的温育箱中温育细胞培养物 20 小时。以 ELISA 测定 TNF- α (A) 和 IL-6 (B) 的水平。

[0175] 图 21. HB-19 对经 LPS 刺激的人脐带血管内皮细胞 (HUVEC) 产生 IL-8 和表达 ICAM-1 的抑制。HUVEC 细胞以 10000 个细胞 / cm^2 在 96 孔板中以含有 2% 胎牛血清的 EBM-2 培养液进行培养。在 5 μ M HB-19 不存在或存在的情况下,以 100ng/ml 的大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 血清型 055 :B5 刺激细胞。在 37°C 下 5% CO_2 的温育箱中温育细胞培养物 20 小时。以 ELISA 测定 IL-8 和 ICAM-1 蛋白水平。在 5 μ M HB-19 存在或不存在的条件下, HUVEC 细胞用作对照,作为基础水平。

[0176] 图 22. HB-19 对经热灭活的金黄色酿脓葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) (HKSA, 热杀死的金黄色酿脓葡萄球菌) 刺激的人初级外周单核细胞 (PBMC) 产生 TNF- α 和 IL-6 的抑制。使用人全血 EDTA- 钾通过 Ficol1 密度梯度离心分离 PBMC 并重悬于含有 1% 人血清 AB (Invitrogen) 的 RPMI 1640。在 HB-19、Nucant 3、Nucant 6 或 Nucant 7 (10 μ M) 或地塞米松 (Dexamethasone) (Dex. 1 μ g/ml) 不存在 (对照) 或存在的条件下,以 10^8 个 HKSA/ml 的颗粒 (InvivoGen, San Diego, USA) 刺激浓度为 10^6 个细胞 /0.5ml 的细胞。在 37°C 下 5% CO_2 的温育箱中温育 PBMC 培养物。温育 20 小时后收集培养物上清,以 ELISA 测定 TNF- α (A) 和 IL-6 (B) 的水平。

[0177] 实施例

[0178] 实施例 1 五价化合物 HB19 的抗肿瘤活性

[0179] 1.1 五价化合物 HB19 对体外肿瘤生长的效应

[0180] 1.1.1 表面核仁素在锚定依赖性细胞增殖中的作用和 HB-19 对这种增殖的抑制效应

[0181] 在一系列实验中研究了核仁素在 HARP 分子的生物活性中的作用 :在特异性识别核仁素的单克隆抗体存在或不存在的条件下评估 HARP 的有丝分裂活性,所述有丝分裂活性通过测定 NIH 3T3 细胞的氟化胸苷的引入而进行测试。结果表明,这个抗体通过剂量依赖性方式在 NIH 3T3 细胞中抑制 HARP 的有丝分裂活性 (图 3A)。

[0182] 加入 50nM 的抗-核仁素抗体完全抑制了来自 4nM HARP 的有丝分裂活性,而针对相同同位型的核仁素的非特异性抗体对 HARP 诱导的增殖没有效应。无论所用的免疫球蛋白

白浓度如何,总是这样,因此证明了所观测到的抑制的特异性(图 3B)。

[0183] 肽 F3 和化合物 HB19 是核仁素的两个配体。肽 F3 结合至核仁素的 N-末端部分(包含酸性氨基酸区域(9)),相反,化合物 19 结合至位于核仁素的 C-末端部分的 RGG 结构域(见图 1)。也表明了化合物 HB19 特异性结合至细胞表面不受肽 F3 存在的影响(本发明人以 FACS 进行的实验)。

[0184] 本发明人研究了肽 F3 和五价化合物 HB19 是否能够抑制生长因子 HARP 引发的 NIH-3T3 细胞的细胞增殖。因此在相同系列实验中,测定了化合物 HB19 和肽 F3 的效应(特异性结合至表面核仁素)。

[0185] 肽 F3 的结果在图 3C 中给出,毫不含糊地表明:像 IgG 抗体一样,肽 F3 不引起对 HARP 引发的 NIH 3T3 增殖的抑制。

[0186] HB19 的结果在图 3D 中给出,表明:HB-19 引起对 HARP 引发的 NIH 3T3 增殖的剂量依赖性抑制。加入 $0.5 \mu\text{M}$ 的 HB-19 引起对 4nM 的 HARP 引发的效应的 81% 的抑制。这清楚地表明:一个能够内化而带来增殖抑制的核仁素配体是不够的;暗示了:为了有效,核仁素配体必须是多价的并可结合至一个或多个核仁素分子的 C-末端结构域的一个或多个 RGG 单元。

[0187] 此外,有趣的是,注意到当细胞以各种浓度的 HB-19 预处理 1 小时、洗涤然后以 HARP 刺激时,可观测到水平相当的抑制(图 4)。这个结果表明 HB-19 结合至 NIH 3T3 上存在的表面核仁素,因此在一个小时后抑制由 HARP 引发的细胞增殖。

[0188] 为了研究 HB-19 对抑制细胞增殖的效应是不是对给定的生长因子例如 HARP 是特异性的,进行了两个系列实验,其在于:研究 HB-19 对 NIH 3T3 细胞的效应,所述 NIH 3T3 细胞由以下刺激:

[0189] -FGF-2,另一个生长因子,或

[0190] -含有各种生长因子的混合物的 5% 胎牛血清。

[0191] 这些实验的结果表示在图 5 中,其表明:HB-19 在浓度为 $0.5 \mu\text{M}$ 时能够抑制 FGF-2(A) 或胎牛血清(B) 引发的细胞增殖。

[0192] 因此,结果表明,总的来说,HB-19 能够体外抑制肿瘤细胞的增殖。不管所用引发细胞增殖的试剂是什么,情况都是这样。

[0193] 1.1.2 核仁素在锚定依赖性细胞增殖中的作用和 HB-19 对这种增殖的抑制效应

[0194] 与细胞增殖的研究相平行,使用人类乳腺癌细胞系 MDA-MB231 和鼠黑素瘤细胞系 B16-BL6 在湿琼脂上以一个生长模型测定了核仁素在锚定非依赖性细胞生长中的作用,和转化细胞的表型特征。

[0195] 在这些实验中,在各种浓度的对照抗-核仁素抗体、对照免疫球蛋白或化合物 HB-19 存在或不存在的条件下,在琼脂凝胶上培养细胞。在 37°C 下温育 10 天后,对每个培养板上存在的克隆数目计数。如图 6 所示,以 $0.1 \mu\text{M}$ 抗-核仁素(A) 处理的培养物的克隆数目下降 60%,而以相同的同位型免疫球蛋白处理的培养物中未发现有效应(B)。

[0196] 更特别的,相对于对照,也发现了以 HB-19 处理的培养物中克隆数目的抑制,其为剂量依赖性方式。在以 $1 \mu\text{M}$ HB-19 处理的培养物中观测到克隆数目减少 59% (图 6C)。

[0197] 使用鼠黑素瘤例如 B16-BL6 作为靶细胞得到了类似的结果。结果显示于图 7。对结果的分析表明:抗-核仁素抗体(A) 和 HB-19 分子(B) 都以剂量依赖性方式抑制湿琼脂

上 B16-BL6 的生长。在 $1\mu\text{M}$ 的 HB-19 存在下,观测到超过 50% 的克隆数目的抑制。

[0198] 这套结果证明:化合物 HB-19 对锚定非依赖性细胞生长具有抑制效应。这对两个细胞模型,人乳腺癌和鼠黑素瘤都是正确的。

[0199] 1.2 五价化合物 HB19 对血管生成因子引发的血管生成的效应

[0200] 鉴于表面核仁素存在于激活的内皮细胞表面 (9),测定了 HB-19 对内皮细胞分化的效应。

[0201] 首先,在内皮细胞的体外增殖中测试了这种效应 (HUVEC:人脐带血管内皮细胞)。培养每孔 20000 个 HUVEC 细胞并在每天加入不同浓度的化合物 HB19。处理 6 天后对细胞计数。结果在图 8A 中给出,其表明:与 Huang 等人的文章 (16) 中所用的抗-核仁素多克隆抗体制备物相反,HB19 引起内皮细胞增殖的抑制。

[0202] 也测定了 HB19 ($1\mu\text{M}$) 的存在对 HUVEC 细胞分化的效应,所述 HUVEC 细胞在 HARP 血管新生因子 (angiogens) (1nM)、VEGF (1nM) 和 FGF-2 (3nM) 存在下在三维胶原凝胶培养。4 天后,对管网结构计数。结果以任意单位表示于图 8B,其表明,HB19 也抑制血管生成因子存在下在三维胶原凝胶培养的 HUVEC 细胞的分化。

[0203] 最后,在体内血管生成模型中测定了 HB-19 对内皮细胞分化的效应。这个测试模拟引起血管形成的过程的第一个时期。

[0204] 这个血管生成实验模型在于,以含有待分析其血管生成刺激或抑制特性物质的 matrigel 经皮下注射小鼠。1 周后除去 matrigel,进行组织切片,在免疫组化后以图像分析对内皮细胞 (CD31+, 因子 VIII+) 的数目进行定量。如图 8 中所示,HB-19 自身对 matrigel 中内皮细胞的补充无效应。另一方面,它抑制 HARP 或 FGF-2 引发的血管生成。

[0205] 对结果的分析表明:HB-19 能够抑制促血管生成因子例如 FGF-2 或 HARP 引发的血管生成。这显示了 HB-19 (特异性靶向血管生成中相关的内皮细胞) 的一般的血管生成效应。

[0206] 因此,化合物 HB19 彻底地抑制 HARP、VEGF 和 FGF-2 引发的 HUVEC 细胞的增殖和分化。因此它具有比黄等人的文章 (16) 所用的抗-核仁素单克隆抗体更加显著的效应。

[0207] 使用内皮细胞作为抗癌靶细胞具有几个优点。与肿瘤细胞所呈现的遗传不稳定相反,内皮细胞在遗传上是极其稳定的,因此限制了抗性机制。而且,由于分子靶标是表面核仁素,HB-19 主要靶向激活的内皮细胞从而靶向那些已进入新血管生成期的。应该注意,肿瘤内皮细胞比正常内皮细胞分裂快 70 倍,这就是为何肿瘤内皮细胞是主要的靶点,从而限制了潜在的副作用。

[0208] 1.3 五价化合物 HB19 的体内抗肿瘤效应

[0209] 在无胸腺小鼠的肿瘤生长模型中测试了五价化合物 HB-19 在体内对肿瘤生长的效应。在本实验中,靶细胞起源自人乳腺癌:MDA-MB231。

[0210] 以 2×10^6 个细胞在腰窝处注射每组 4 只无胸腺 (裸 / 裸) 小鼠。当肿瘤体体积达到至少 200mm^3 时,每两天以 $100\mu\text{l}$ 的 PBS 溶液 (对照组) 或 HB-19 溶液 (5mg/kg) 或一种广泛使用的临床试剂它莫西芬 (tamoxifen, 10mg/kg) 注射肿瘤 (癌周的或皮下途径) 来处理小鼠,或者不处理小鼠。在第 7、14、21、28、34 和 40 天以卡钳测量肿瘤体积。

[0211] 结果在图 8 中显示,其表明:相对于未处理的对照小鼠 (具有 7 倍大的肿瘤体积),以 5mg/kg 的剂量使用肽 HB-19 引起肿瘤生长的抑制。

[0212] 此外,尽管经它莫西芬处理的小鼠其肿瘤体积从处理开始没有显著性变化,但是以 HB-19 处理的小鼠的肿瘤在处理 21 天后已检测不到(图 9A)。虽然它莫西芬在 10mg/kg 只是引起肿瘤体积的稳定或部分退化,五价化合物 HB-19 在 5mg/kg 实际上引起明显的总肿瘤退化。

[0213] 为了对照这些结果,在处理 40 天后杀死小鼠,除去肿瘤并称重。未处理的小鼠的平均肿瘤重量为 0.22g(分布于 0.083-0.34g),经 10mg/kg 它莫西芬处理的为 0.06g(分布于 0.006-0.22g),以 HB-19 处理的小鼠中未发现肿瘤(图 9B 和 C),因此确定了经体外测量大小来估计的肿瘤体积。

[0214] 在另一个实验中,经腹腔内(IP)途径和癌周(SC)途径使用 HB19(5mg/kg)(图 10)。结果表明,通过腹腔内(IP)途径和癌周(SC)途径,HB-19 的抗癌作用是同样有效的,不仅证明了五价化合物 HB-19 的未预料到的功效,而且证明了其在体内肿瘤位置的生物可利用性,包括全身使用的情况。

[0215] 也应该注意,在 HB-19 处理的过程中,在经处理的小鼠中没有观测到不正常的生理或行为迹象。而且,在实验末尾对器官的解剖学检验没有揭示任何的组织毒性的可见迹象,或者任何的血管和血小板计数上的变化。

[0216] 此外,在经 HB-19 处理的异种移植小鼠的外周血细胞中,不可能检测 HLA-DR⁺ 人类细胞(从而检测 MDA-MB231 肿瘤细胞)(图 11)。事实上,与未处理小鼠(PBS)(其中 MDA-MB231 细胞(HLA-DR⁺)的比例代表外周血细胞的 22.2%)相反,在经皮下或腹腔内以 HB-19 处理的小鼠的情况下,这个比例只有 0.1%至 0.31%。这些结果暗示,HB-19 也能够防止肿瘤细胞循环,从而防止转移现象。

[0217] 1.4 结论

[0218] 实施例 2 中呈现的结果表明,因为其在肿瘤生长和血管生成上的双效应,五价化合物 HB-19 是细胞增殖有利的抑制剂。这些观测在体内模型(其表明,在无胸腺小鼠的 PC3 细胞异种移植模型中,癌周注射 HB-19 的处理能够诱导肿瘤的抑制甚至是退化)中经过了确认,并且没有组织毒性。

[0219] 与在癌症治疗中常规使用的处理例如紫杉醇相比,实验模型中所用的 HB-19 似乎更有效。与它莫西芬相比 HB-19 这种更强的功效可能来源于 HB-19 对肿瘤生长和肿瘤增殖所需的血管形成都具有抑制效应。不管是肿瘤细胞还是激活的内皮细胞的情况,HB-19 靶向并阻断这两种类型细胞的增殖。

[0220] 存在很多具有抑制肿瘤细胞增殖特性的细胞。这些分子通常具有效应,而没有细胞靶点。实际上,对于很多化疗试剂,肿瘤细胞中存在的分子靶点也在正常细胞中发现,这就解释了这种治疗的很多副作用。经靶向的生物试剂具有较少的副作用,因为它们阻断的目标不存在于正常细胞中或只是很少地存在于正常细胞中。激活细胞表面存在的核仁素响应这种特性,因此成为癌症治疗中理想的治疗靶点。应着重注意,我们不仅靶向癌细胞而且靶向激活的内皮细胞。而且,表面核仁素似乎不限于一种特定类型的癌症。

[0221] 双靶向(肿瘤细胞本身和激活的内皮细胞)的功效应该与 Genentech 所进行的一项研究(其表明,在一个随机试验中,抗增殖试剂(5-氟尿嘧啶)与抗血管生成试剂(阿瓦斯丁(Avastin))结合对人结肠直肠癌的情况有很高的功效)的结果相比较。在 III 期临床试验中,在以前未经处理的转移的结肠直肠癌个体中,阿瓦斯丁处理作为化疗(依列替

康 (irinotecan)/5- 氟尿嘧啶 / 亚叶酸 (leucovorin)) 的补充, 将生存率显著延长了平均 5 个月 (20.3 个月, 与 15.6 个月相比)。在这些病人中发现, 与只接受化疗的病人相比, 肿瘤不生长的时间长度, 从 6.2 个月增长到 10.6 个月 (29)。

[0222] 这种对肿瘤细胞和内皮细胞的双效应使 HB-19 成为癌症治疗中可选择的一种分子。

[0223] 实施例 2. 三价化合物 Nucant 01 的抗肿瘤活性

[0224] 2.1 三价化合物 Nucant 01 的合成

[0225] 三价化合物 Nucant 01 的化学结构在图 2B 中给出。这个化合物具有环形六肽作为载体, 所述环形六肽由交替的 D 构型的丙氨酸残基 (A) 和 L 构型的赖氨酸残基 (K) 组成。3 个 K Ψ PR 单元 ($\Psi = \text{CH}_2\text{-NH}$) 共价连接至 3 个赖氨酸残基 (K) 中的每个的 ϵ 氨基基团。

[0226] 化合物 Nucant 01 的合成包括将 K Ψ PR 单元共价连接至三元对称碳环核心分子。核心分子的合成如 S. Fournel 等人 (30) 所描述。在氯三苯甲基型树脂上使用根据 Fmoc 化学的标准固相合成技术组装经保护的 K Ψ PR 单元, 然后在弱酸性条件下从树脂上切割下来。然后, 以 1.1K Ψ PR/1 个环形分子的化学计量学标准将经保护的 K Ψ PR 单元连接至核心分子的每个赖氨酸残基 (K) 的 ϵ NH₂ 基团。根据 BOP/HoBt 激活程序进行连接, 持续 48 小时。在反应末尾, 在三氟乙酸中切割保护 K Ψ PR 单元的基团, 在醚中沉淀最终的化合物。通过 HPLC 纯化程序末尾所获得的 Nucant 01 分子, 并以质谱进行完全的描述。

[0227] 2.2 Nucant 01 在体外对肿瘤细胞增殖的抑制活性

[0228] 将 Nucant01 对经 HARP 刺激的 NIH-3T3 细胞增殖的效应与五价化合物 HB-19 进行了比较。在所示浓度 (0.1, 0.2, 0.4, 1, 2 和 4 μM) 的 HB19 或 Nucant 01 存在的情况下, 不刺激或以 4nM HARP 刺激静止的 NIH-3T3 细胞。温育 24 小时后, 通过测定氟化胸苷的引入来确定 NIH-3T3 细胞的增殖, 如前所述。

[0229] 与 HB 19 和 Nucant 01 不存在的情况下经 HARP 刺激的对照 (100% 细胞增殖) 相比较发现, 化合物 Nucant 01 (对于 KPR 单元只是三价的) 在 2 μM 的浓度下也引起对经 HARP 刺激的 NIH-3T3 细胞增殖的 50% 的抑制。因此这个结果证明, 具有至少 3 个接枝到环肽上的通式 (I) 的假肽单元的合成多价化合物可能和五价化合物 HB-19 (其载体是直链肽) 以同样的方式来抑制由 HARP 引发的肿瘤细胞的增殖。

[0230] 所需要的浓度比达到同样水平的抑制所需的 HB-19 的浓度 (0.2 μM 高 10 倍, 但是化合物 Nucant 01 只具有 3 个通式 (I) 的假肽单元而化合物 HB-19 具有 5 个。

[0231] 因此, 增加接枝到环肽上的通式 (I) 的假肽单元的数目 (如 Nucant 01 中所用) 至 4 或 5 可能进一步增加该化合物的功效, 可能至 100 倍。

[0232] 2.3 结论

[0233] 这些结果清晰地表明了通式 (I) 的假肽单元的多价态形式对本发明中所用化合物的活性的重要性, 可使用众多的载体, 可使用直链肽或环肽而不影响该化合物的功效。

[0234] 因此可同样使用其它可接受的载体, 只要它们允许至少 3 个, 优选 3 至 8 个, 优选 4 至 6 个, 优选 5 或 6 个通式 (I) 的假肽单元接枝到它们上面。

[0235] 实施例 3. 五价化合物 Nucant 2 和 Nucant 3 的抗肿瘤活性

[0236] 3.1 五价化合物 Nucant2 和 Nucant3 的合成

[0237] 通过固相合成来组装两个已知的采用螺旋面结构的肽载体 (其上锚定了 K Ψ PR 单

元)。这些载体由重复的序列单元组成,连接起来 5 次;对于 NUCANT2 为 Aib-Lys-Aib-Gly,对于 NUCANT 3 为 Lys-Aib-Gly。以 Boc 化学的方式进行组装。然后通过 DMF 中的哌啶处理(3 次,5 分钟)切割来除去侧链上的赖氨酸残基的保护性 Fmoc 基团。赖氨酸的 5 个 ϵ NH₂ 基团作为 K Ψ PR 单元($\Psi = \text{CH}_2\text{-N}$)的支撑点。以氢氟酸进行最后的切割。经过在醚中沉淀肽、在水性条件下分解和冷冻-干燥之后,通过 HPLC 纯化 NUCANT 2 和 NUCANT 3 类似物并以质谱分析,然后冻干。

[0238] 3.2 Nucant 2 和 Nucant 3 在体外对肿瘤细胞增殖的抑制活性

[0239] 将 Nucant 2 和 Nucant 3 对 HARP 引发的 NIH-3T3 细胞增殖的效应与五价化合物 HB-19 进行了比较。在所示浓度(0.1, 0.25 和 0.5 μM)的 HB19、Nucant 2 或 Nucant3 存在的情况下,不刺激或以 4nM HARP 刺激静止的 NIH-3T3 细胞。温育 24 小时后,通过测定氟化胸苷的引入来确定 NIH-3T3 细胞的增殖,如前所述。

[0240] 在本实验中,HB19 抑制的 IC₅₀ 为 0.1 μM 。Nucant 2 和 Nucant 3 以剂量依赖性方式抑制细胞增殖,其 IC₅₀ 为 1.5 μM 。

[0241] 因此五价化合物 Nucant 2 和 Nucant 3 能够以剂量依赖性方式抑制细胞增殖,其 IC₅₀(引起细胞增殖抑制 50% 的浓度)与化合物 HB19 非常类似。

[0242] 也将 Nucant 3 对 5% FCS 处理的 NIH-3T3 细胞增殖的效应与五价化合物 HB-19 进行了比较。在不同浓度(介于 0.125 至 2 μM)的 NUCANT 3,6 或 7 存在或不存在的条件下,以 5% FCS 刺激静止的 NIH-3T3 细胞(通过血清剥夺来使其静止)。温育 24 小时后,通过测定氟化胸苷的引入来确定细胞的增殖,如前所述。

[0243] 结果表示于图 14 中,以相对于经 5% FCS 刺激的对照细胞的百分率表示。结果表明 NUCANT 3 对细胞增殖具有抑制效应。对图表的分析表明 NUCANT 3 具有和 HB-19 分子相似但比其稍低的 ID₅₀ 值(抑制 50% 的剂量),因此其效应比 HB-19 稍低。没有观察到 NUCANT 3 对未经刺激的细胞的效应,表明这些分子无任何毒性。

[0244] 3.3 结论

[0245] 这些结果亦表明通式 (I) 的假肽单元的多价态形式对本发明中所用化合物活性的重要性,所用载体完全可以是含有或不含有结构元件(β 折叠, β 片层)的直链肽,具有螺旋面结构的直链肽甚至是环形化合物,而不影响该结构的功效。

[0246] 因此可互换地使用各种可接受的载体,只要它们允许至少 3 个,优选 3 至 8 个,优选 4 至 6 个,优选 5 或 6 个通式 (I) 的假肽单元接枝到它们上面。

[0247] 实施例 4. 六价化合物 Nucant 6 和 Nucant 7 的抗肿瘤活性

[0248] 4.1 六价化合物 Nucant 6 和 Nucant 7 的合成

[0249] 使用和五价化合物 Nucant 2 和 Nucant 3 相同的合成过程获得这些六价化合物。

[0250] 4.2 Nucant 6 和 Nucant 7 在体外对肿瘤细胞增殖的抑制活性

[0251] 将 Nucant 6 和 Nucant 7 对 5% FCS 处理的 NIH-3T3 细胞增殖的效应与五价化合物 HB-19 进行了比较。在不同浓度(介于 0.125 至 2 μM)的 NUCANT 3,6 或 7 存在的条件下,以 5% FCS 刺激静止的 NIH-3T3 细胞(通过血清剥夺来使其静止)。温育 24 小时后,通过测定氟化胸苷的引入来确定细胞的增殖,如前所述。

[0252] 结果表示于图 14 中,以相对于经 5% FCS 刺激的对照细胞的百分率表示。结果表明 NUCANT 6 和 7 对细胞增殖具有抑制效应。NUCANT 6 和 7 具有和 HB-19 分子相似但比其

稍低的 ID₅₀ 值（抑制 50% 的剂量），因此其效应比 HB-19 稍低。没有观察到 NUCANT 6 或 7 对未经刺激的细胞的效应，表明这些分子无任何毒性。

[0253] 4.3 结论

[0254] 这些结果进一步证明通式 (I) 的假肽单元的多价态形式对本发明中所用化合物的活性的重要性，所用载体完全可以含有或不含有结构元件（ β 折叠， β 片层）的直链肽，具有螺旋面结构的直链肽甚至是环形化合物，而不影响该结构的功效。

[0255] 特别地，具有 6 个假肽单元的形式似乎在获得所需要的抗增殖和抗血管生成方面更加有效。

[0256] 实施例 5 Nucant 6 和 Nucant 7 是比 HB-19 更强的表面核仁素抑制剂

[0257] 5.1 Nucant 6 和 Nucant 7 是比 HB-19 更强的抑制剂并且抑制表面核仁素的活性

[0258] 使用我们以前描述的技术 (13) 在 HeLa P4 细胞中测定了表面核仁素的活性。

[0259] 结果表示于图 15 中，其表明：Nucant 3 对表面核仁素活性的抑制与 HB-19 相当。另一方面，Nucant 6 和 Nucant 7 具有比 HB-19 更大的抗表面核仁素活性。HB-19 和 Nucant 3 的 ID₅₀ 值（抑制 50% 的剂量）为介于 0.1-0.2 μ M，而 Nucant 6 和 Nucant 7 的 ID₅₀ 值低于 0.1 μ M。此外，Nucant 6 和 Nucant 7 在 0.8 μ M 下引起对表面核仁素活性超过 95% 的抑制。

[0260] 5.2 HB-19, Nucant 3, 6 和 7 引起人乳癌细胞 MDA-MB231 中表面核仁素的抑制

[0261] 表面核仁素在增殖和肿瘤血管生成中扮演重要角色。HB-19 以及相关的分子 Nucant 3, Nucant 6 和 Nucant 7 特异性结合至表面核仁素，因此阻断肿瘤生长和血管生成。在这些假肽结合至表面核仁素之后，复合体 [假肽 - 核仁素] 通过主动过程被迅速内化。这些结果显示于图 16A 中，其表明，与未经处理的细胞相比，以 HB-19（线 1）、Nucant 3（线 2）、Nucant 6（线 3）或 Nucant 7（线 4）处理细胞导致表面核仁素存在的减少。在处理 24 小时后而且在处理 48 小时后观察到这个减少，在处理 48 小时后核仁素已检测不到。

[0262] 有趣的是，和以 HB-19 及 Nucant 3（线 1 和 2）处理的细胞相比，以假肽 Nucant 6 及 Nucant 7（线 3 和 4）处理 24 小时的细胞中表面核仁素的减少要大得多。在处理 48 小时后有同样的观测结果。应该着重注意，表面核仁素的减少不是表面核仁素细胞内数量减少的结果。事实上，在未经处理和经 HB-19 或各种类型的 Nucant 处理的细胞的提取物中发现了同样数量的核仁素（图 16B）。类似地，发现：从未经处理和经 HB-19 或各种类型的 Nucant 处理的细胞中提取的蛋白，其电泳图谱没有差异。这个结果表明：蛋白合成不受 HB-19 或不同类型 Nucant 研究的影响。此外，有趣的是，HB-19 和所研究的各种类型的 Nucant 没有细胞毒性效应（其可能解释所观测到的表面核仁素的减少）。

[0263] 5.3 结论

[0264] 这一套结果表明：

[0265] a) 核仁素在肿瘤细胞表面大量表达，例如在人乳癌细胞（MDA-MB231）中。

[0266] b) 以 HB-19、Nucant 3、Nucant 6 和 Nucant 7 处理引发细胞表面存在的核仁素“库”显著的减少。

[0267] c) 假肽 Nucant 6 和 Nucant 7 对于产生细胞表面存在的核仁素“库”的减少以及抑制表面核仁素活性方面更加有效。

[0268] 实施例 6. HB-19 和 Nucant 7 对血管生成的效应

[0269] 方法

[0270] 在体外血管生成模型（鸡胚绒毛尿囊膜，CAM）中测试了 HB-19 和 Nucant 7 对血管生成的效应。

[0271] 将含有或不含有（对照）HB-19（10 μ M ;0.6 μ g）或 Nucant 7（10 μ M ;0.8 μ g）的 20 μ l 水沉淀至 CAM 表面。温育 48 小时后进行血管的观测。

[0272] 结果

[0273] 结果显示于图 17 中，其表明：温育 48 小时后 HB-19 和 Nucant 7 清晰地引起血管生成的抑制。图像分析研究（不仅考虑毛细血管长度，而且考虑分支的数目）显示了在区域中相对于对照来说 50% 的抑制。

[0274] 实施例 7. 化合物 HB 19 和 Nucant 7 的抗炎症活性

[0275] 7.1 HB-19 对经 LPS 刺激的人初级 PBMC 产生 TNF- α 的抑制方法

[0276] 使用人全血 EDTA- 钾通过 Ficoll 密度梯度离心分离 PBMC 并重悬于含有 1% 人血清 AB (Invitrogen) 的 RPMI 1640。在 HB-19 不存在 (0) 或存在 (1 和 5 μ M) 的情况下，以 100ng/ml 的来自大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 型 0111:B4 和 055:B5 的 LPS 以及来自肠道沙门氏菌 (*Salmonella enterica*) 血清型 Re 595 的 LPS 刺激浓度为 10^6 个细胞 /0.5ml 的细胞。同样的 PBMC 以 20ng/ml :1 μ M 的 PMA :伊屋诺霉素 (Ionomycin) (佛波醇-12-豆蔻酸酯-13-乙酸酯 :伊屋诺霉素) 刺激。在 37°C 下 5% CO₂ 的温育箱中温育 PBMC 培养物。温育 20 小时后收集培养物上清，以 ELISA 测定 TNF- α 的水平。

[0277] 结果

[0278] 结果（见图 18）表明，新鲜分离的 PBMC 产生 TNF- α ，这种 TNF- α 的组成型产生不受 HB-19 的影响。另一方面，HB-19 以剂量依赖性方式抑制 PBMC 针对各种来自大肠杆菌或肠道沙门氏菌 LPS 制备物刺激而产生 TNF- α 。这种效应是特异性的，因为 HB-19 对于 PBMC 针对 PMA-伊屋诺霉素刺激而产生 TNF- α 没有效应。

[0279] 在 5 μ M 的 HB-19 存在下，人 PBMC 针对各种 LPS 制备物刺激而产生 TNF- α 被抑制达到与未经 LPS 刺激而观察到的基本水平类似的程度。

[0280] 7.2 HB-19 和 Nucant 7 对经 LPS 刺激的鼠腹膜初级巨噬细胞产生 TNF- α 和 IL-6 的抑制

[0281] 方法

[0282] 为了获得经刺激的巨噬细胞，在实验前 4 天，以 1.5ml 巯基乙酸盐溶液（3% 盐溶液）通过腹腔内注射 balb/c 小鼠（7-8 周龄）。以 5ml 含有 1% 胎牛血清的 RPMI 培养液洗涤腹膜腔来收集巨噬细胞，然后将细胞以 RPMI 1640 培养液中 10^6 个细胞 /0.5ml 的浓度置于培养板，在 37°C 下 5% CO₂ 的温育箱中温育，2 小时后除去非吸附的细胞。

[0283] 在 4 μ M HB-19 或 10 μ M Nucant 7 不存在 (-) 或存在 (+) 的情况下，不刺激或以浓度为 10ng/ml, 100ng/ml 和 1000ng/ml 的来自大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 血清型 0111:B4 的 LPS 刺激巨噬细胞。在 37°C 下 5% CO₂ 的温育箱中温育细胞培养物 20 小时。以 ELISA 测定 TNF- α 和 IL-6 蛋白的水平。

[0284] 结果

[0285] 对于 HB-19 所获得的结果显示于图 19。在 4 μ M 的 HB-19 存在下，鼠腹膜巨噬细胞针对 LPS 刺激而产生的 TNF- α 和 IL-6 被显著性抑制。如果考虑到未经 LPS 刺激所观测到

的基本水平,对 TNF- α 的净抑制程度为 72-75%,对 IL-6 为 68-71%。

[0286] 对于 Nucant 7 所获得的结果显示于图 20。在 10 μ M 的 Nucant 7 存在下,鼠腹膜巨噬细胞针对 LPS 刺激而产生的 TNF- α 和 IL-6 几乎被完全抑制,因为在经 Nucant 7 处理的培养物观测到的针对 LPS 刺激所产生的细胞因子水平与没有 LPS 中所观测到的相类似。

[0287] 如果考虑到未经 LPS 刺激所观测到的基本水平,10 μ M 的 Nucant 7 对经 10,100 和 1000ng/ml LPS 刺激的培养物的抑制程度超过 95%。LPS 浓度为 100 倍大的情况下抑制程度没有变化,这一事实意味着 Nucant 7 的抑制机理主要是由于结合至表面核仁素。实际上,如果 Nucant 7 抑制的机理是与 LPS 相互作用,则 100ng/ml LPS 的情况会比 10ng/ml LPS 的情况抑制效应低。

[0288] 7. 3HB-19 对经 LPS 刺激的 HUVEC 细胞产生 IL-8 和表达 ICAM-1 的抑制方法

[0289] HUVEC 细胞以 10000 个细胞 /cm² 在 96 孔板中以含有 2% 胎牛血清的 EBM-2 培养液进行培养。在 5 μ M HB-19 不存在或存在的情况下,以 100ng/ml 的来自大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 血清型 055 :B5 的 LPS 刺激细胞。在 37°C 下 5% CO₂ 的温育箱中温育细胞培养物 20 小时。以 ELISA 测定 IL-8 和 ICAM-1 的水平。在 5 μ MHB-19 不存在或存在的情况下 HUVEC 细胞用作对照作为基础水平。

[0290] 结果

[0291] 如果考虑到未经 LPS 刺激所观测到的基本水平,5 μ M HB-19 对 IL-8 和 ICAM-1 产生的抑制程度为大约 50%。因此这些结果证明了 HB-19 和相关的 Nucant 类型的化合物作为 IL-8 和 ICAM-1 产生抑制剂的潜在的功效 (见图 21)。

[0292] 7. 4HB19 对经灭活的金黄色酿脓葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 刺激的人初级 PBMC 产生 TNF- α 的抑制

[0293] 金黄色酿脓葡萄球菌感染被证明是引起心内膜炎的主要因素之一 (24, 25)。

[0294] 因此本发明人测定了在 10 μ M 的化合物 HB-19、Nucant 3、Nucant 6 或 Nucant7 不存在 (对照) 或存在的情况下,人初级 PBMC 培养物针对热灭活的金黄色酿脓葡萄球菌 (HKSA, 热杀死的金黄色酿脓葡萄球菌) 而产生的 TNF- α 和 IL-6 的水平。作为阳性对照 (Dex.), 也使用地塞米松 (Dexamethasone, 已知的具有抗炎和免疫抑制活性的糖皮质激素) 处理 PBMC。

[0295] 方法

[0296] 使用人全血 EDTA- 钾通过 Ficoll 密度梯度离心分离 PBMC 并重悬于含有 1% 人血清 AB (Invitrogen) 的 RPMI 1640 培养液。在 HB-19、Nucant 3、Nucant 6 或 Nucant7 (10 μ M) 或地塞米松 (Dexamethasone) (1 μ g/ml) 不存在 (对照) 或存在的情况下,以 10⁸ 个 HKSA/ml 的颗粒 (InvivoGen, San Diego, USA) 刺激浓度为 10⁶ 个细胞 /0.5ml 的细胞。在 37°C 下 5% CO₂ 的温育箱中温育 PBMC 培养物。温育 20 小时后收集培养物上清,以 ELISA 测定 TNF- α 和 IL-6 蛋白的水平。

[0297] 结果

[0298] 结果显示于图 22,其表明:所有测试的假肽 (HB-19、Nucant 3、Nucant 6 和 Nucant 7) 都可能获得对经热杀死的金黄色酿脓葡萄球菌刺激而产生 TNF- α 和 IL-6 的显著性抑制。假肽与标准抗炎治疗例如地塞米松同样有效。

[0299] 因此通式 (I) 的假肽例如 HB-19、Nucant 3、Nucant 6 和 Nucant 7 也可用于治疗

心脏发炎,特别是用于治疗由感染起源的心内膜炎。

[0300] 7.5 结论

[0301] 因此本发明人获得的结果表明,化合物 HB-19 和 Nucant 7 能够抑制各种类型的细胞针对 LPS 刺激而产生促炎性细胞因子例如 TNF- α 和 IL-6,以及同时抑制各种类型的细胞针对 LPS 刺激而产生趋化因子 IL-8 和黏附分子 ICAM-1。

[0302] 此外,这些化合物也引起针对金黄色酿脓葡萄球菌(引起由感染起源的各种形式的心内膜炎的一种试剂)刺激而产生促炎性细胞因子例如 TNF- α 和 IL-6 的显著性抑制。

[0303] 因此,本发明所描述的这些化合物以及相关的通式(I)的化合物能够抑制促炎性细胞因子和发炎位置白细胞补充所涉及分子的产生。因此这些化合物可用于抗炎症用途,特别是用于治疗一般描述中提及的各种疾病。

[0304] 参考文献

[0305] 1. Hovanessian, A. G., Puvion-Dutilleul, F., Nisole, S., Svab, J., Perret, E., Deng, J. S., and Krust, B. The cell-surface-expressed nucleolin is associated with the actin cytoskeleton. (2000) *Exp. Cell Res.* 261, 312-328

[0306] 2. Nisole, S., Krust, B., Callebaut, C., Guichard, G., Muller, S., Briand, J. P., and Hovanessian, A. G. The anti-HIV composé HB-19 forms a complex with the cell-surface-expressed nucleolin independent of heparan sulfate proteoglycans. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 27875-27884

[0307] 3. Ginisty, H., Sicard, H., Roger, B., and Bouvet, P. Structure and functions of nucleolin. (1999) *J. Cell Science* 112, 761-772

[0308] 4. Srivastava, M., and Pollard, H. B. Molecular dissection of nucleolin's role in growth and cell proliferation: new insights. (1999) *FASEB J.* 13, 1911-1922

[0309] 5. Nisole, S., Krust, B., and Hovanessian, A. G. Anchorage of HIV on permissive cells leads to coaggregation of viral particles with surface nucleolin at membrane raft microdomains. (2002) *Exp. Cell Res.* 276, 155-173

[0310] 6. Semenkovich, C. F., Ostlund, R. E. J., Olson, M. O., and Yang, J. W. A protein partially expressed on the surface of HepG2 cells that binds lipoprotein specifically is nucleolin. (1990) *Biochemistry* 29, 9708-9713

[0311] 7. Callebaut, C., Jacotot, E., Krust, B., Guichard, G., Blanco, J., Svab, J., Muller, S., Briand, J. P., and Hovanessian, A. G. Composé TASP inhibitors of HIV entry bind specifically to a 95-kDa cell surface protein. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 7159-7166

[0312] 8. Callebaut, C., Blanco, J., Benkirane, N., Krust, B., Jacotot, E., Guichard, G., Seddiki, N., Svab, J., Dam, E., Muller, S., Briand, J. P., and Hovanessian, A. G. Identification of V3 loop-binding proteins as potential receptors implicated in the binding of HIV particles to CD4(+) cells. (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 21988-2199

[0313] 9. Christian, S., Pilch, J., Akerman, M. E., Porkka, K., Laakkonen, P., and Ruoslahti, E. Nucleolin expressed at the cell surface is a marker of

endothelial cells in angiogenic blood vessels. (2003) *J. Cell Biol.* 163, 871–878

[0314] 10. Said, A. E., Krust, B., Nisole, S., Briand, J. P., and Hovanessian, A. G. The anti-HIV cytokine midkine binds the cell surface-expressed nucleolin as a low affinity receptor. (2002) *J. Biol. Chem.* 277, 37492–37502

[0315] 11. Said, E. A., Courty, J., Svab, J., Delbé, J., Krust, B., and Hovanessian, A. G. Pleiotrophin inhibits HIV infection by binding the cell surface-expressed nucleolin. (2005) *FEBS J.* 272, 4646–4659

[0316] 12. Legrand, D., Vigie, K., Said, E. A., Ellass, E., Masson, M., Slomianny, M. C., Carpentier, M., Briand, J. P., Mazurier, J., and Hovanessian, A. G. Surface nucleolin participates in both the binding and endocytosis of lactoferrin in target cells. (2004) *Eur. J. Biochem.* 271, 303–317

[0317] 13. Nisole, S., Krust, B., Dam, E., Blanco, A., Seddiki, N., Loaec, S., Callebaut, C., Guichard, G., Muller, S., Briand, J. P., and Hovanessian, A. G. The HB-19 composed of 5 [Kpsi(CH₂N)PR]-TASP inhibits attachment of T lymphocyte- and macrophage-tropic HIV to permissive cells. (2000) *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 16, 237–249

[0318] 14. Nisole, S., Said, E. A., Mische, C., Prevost, M. C., Krust, B., Bouvet, P., Bianco, A., Briand, J. P., and Hovanessian, A. G. The anti-HIV pentameric composed HB-19 binds the C-terminal end of nucleolin and prevents anchorage of virus particles in the plasma membrane of target cells. (2002) *J. Biol. Chem.* 277, 20877–20886

[0319] 15. Bates, P. J., Kahlon, J. B., Thomas, S. D., Trent, J. O., and Miller, D. M. Antiproliferative activity of G-rich oligonucleotides correlates with protein binding. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 26369–26377

[0320] 16. Huang Y, Shi H, Zhou H, Song X, Yuan S, Luo Y. The angiogenesis function of nucleolin is mediated by vascular endothelial growth factor and nonmuscle myosin. (2006) *Blood* 107, 3564–3571.

[0321] 17. Seko Y, Cole S, Kasprzak W, Shapiro BA, Ragheb JA. The role of cytokine mRNA stability in the pathogenesis of autoimmune disease. *Autoimmun Rev* 2006 ;5 ;299–305.

[0322] 18. Rot A. Neutrophil attractant/activation protein-1 (interleukin-8) induces in vitro neutrophil migration by haptotactic mechanism. *Eur J Immunol* 1993 ;23 ;303–06.

[0323] 19. Ellass E, Masson M, Mazurier J, Legrand D. Lactoferrin inhibits the lipopolysaccharide-induced expression and proteoglycan-binding ability of IL-8 in human endothelial cells. *Infect Immun* 2002 ;70 ;1860–66.

[0324] 20. Kevil CG, Patel RP, Bullard DC. Essential role of ICAM-1 in mediating monocyte adhesion to aortic endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001 ;281 :C1442–47.

[0325] 21. Bucklin SE, Silverstein R, Morrison DC. An interleukin-6-induced acute-phase response does not confer protection against lipopolysaccharide

lethality. *Infect Immun* 1993 ;61 :3184-89.

[0326] 22. Karima R, Matsumoto S, Higashi H, Matsushima K. The molecular pathogenesis of endotoxic shock and organ failure. *Mol Med Today* 1999 ; 5 :123-32.

[0327] 23. Zanotti S, Kulmar A, Kumar A. Cytokine modulation in sepsis and septic shock. *Expert Opin Investig Drugs* 2002 ;11 :1061-75.

[0328] 24. Alter, P, Hoeschen, J., Ritter, M., Maisch, B. Usefulness of cytokines interleukin-6 and interleukin-2R concentrations in diagnosing active infective endocarditis involving native valves. (2002) *Am. J. Cardiol.* 89, 1400-1404

[0329] 25. Shun, C. T., Lu, S. Y., Yeh, C. Y., Chaing, C. P., Chia, J. S., Chen, J. Y. Glucosyltransferases of viridans streptococci are modulators of interleukin-6 induction in infective endocarditis. (2005) *Infect. Immun.* 73, 3261-3270.

[0330] 26. Kannan K, Ortmann RA, Kimpel D. Animal models of rheumatoid arthritis and their relevance to human disease. *Pathophysiology* 2005 ;12 :167-81.

[0331] 27. Peifer C, Wagner G, Laufer S. New approaches to the treatment of inflammatory disorders: small molecule inhibitors of p38 MAP kinase. *Curr Top Med Chem* 2006 ;6 (2) :113-49 2006 ;6 :113-49.

[0332] 28. Kabbinnavar, F., Hurwitz, H. I., Fehrenbacher, L., Meropol, N. J., Novotny, W. F., Lieberman, G., Griffing, S., and Bergsland, E. Phase II, randomized trial comparing bevacizumab plus fluorouracil (FU)/leucovorin (LV) with FU/LV alone in patients with metastatic colorectal cancer. (2003) *J Clin Oncol* 21, 60-65.

[0333] 29. Hurwitz, H. I. New agents in colon cancer. (2003) *Clin Adv Hematol Oncol* 1, 404-405

[0334] 30. Fournel, S. et al. C3-symmetric peptide scaffolds are functional mimetics of trimeric CD40L. (2005) *Nat Chem Biol* 1, 377-382.

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 国家科学研究中心 (CNRS)
- [0003] J • 库尔蒂
- [0004] A • 荷瓦耐森
- [0005] J • P • 白里安
- [0006] G • 吉夏尔
- [0007] Y • 哈马
- [0008] <120> 表面核仁素的多价合成配体在治疗癌症或发炎中的用途
- [0009] <130> 351183-D24262
- [0010] <150> FR0603813
- [0011] <151> 2006-04-27
- [0012] <160> 21
- [0013] <170> PatentIn version 3.3
- [0014] <210> 1
- [0015] <211> 10
- [0016] <212> PRT
- [0017] <213> 人工序列
- [0018] <220>
- [0019] <223> 合成肽
- [0020] <400> 1
- [0021] Lys Lys Lys Gly Pro Lys Glu Lys Gly Cys
- [0022] 1 5 10
- [0023] <210> 2
- [0024] <211> 6
- [0025] <212> PRT
- [0026] <213> 人工序列
- [0027] <220>
- [0028] <223> 合成肽
- [0029] <400> 2
- [0030] Lys Lys Lys Lys Gly Cys
- [0031] 1 5
- [0032] <210> 3
- [0033] <211> 12
- [0034] <212> PRT
- [0035] <213> 人工序列
- [0036] <220>
- [0037] <223> 合成肽
- [0038] <400> 3

[0039] Lys Lys Lys Lys Gly Pro Lys Lys Lys Lys Gly Ala
[0040] 1 5 10
[0041] <210>4
[0042] <211>9
[0043] <212>PRT
[0044] <213> 人工序列
[0045] <220>
[0046] <223> 合成肽
[0047] <220>
[0048] <221>MOD_RES
[0049] <222>(9)
[0050] <223>Xaa 是 (2S)-2- 氨基己酰胺
[0051] <400>4
[0052] Lys Lys Lys Gly Pro Lys Glu Lys Xaa
[0053] 1 5
[0054] <210>5
[0055] <211>11
[0056] <212>PRT
[0057] <213> 人工序列
[0058] <220>
[0059] <223> 合成肽
[0060] <220>
[0061] <221> 结合
[0062] <222>(1)
[0063] <223> 赖氨酰 脯氨酸
[0064] <220>
[0065] <221> 结合
[0066] <222>(3)
[0067] <223>N6-Arg-Pro- 赖氨酰
[0068] <220>
[0069] <221> 结合
[0070] <222>(5)
[0071] <223>N6-Arg-Pro- 赖氨酰
[0072] <220>
[0073] <221> 结合
[0074] <222>(8)
[0075] <223>N6-Arg-Pro- 赖氨酰
[0076] <220>
[0077] <221> 结合

[0078]	<222>(10)
[0079]	<223>N6-Arg-Pro- 赖氨酰
[0080]	<220>
[0081]	<221>MOD_RES
[0082]	<222>(11)
[0083]	<223>Xaa 是 (2S)-2- 氨基己酰胺
[0084]	<400>5
[0085]	Pro Arg Lys Lys Lys Gly Pro Lys Glu Lys Xaa
[0086]	1 5 10
[0087]	<210>6
[0088]	<211>4
[0089]	<212>PRT
[0090]	<213> 人工序列
[0091]	<220>
[0092]	<223> 合成肽
[0093]	<220>
[0094]	<221> 变体
[0095]	<222>(3)
[0096]	<223>2- 氨基 - 异丁酸
[0097]	<400>6
[0098]	Aib Lys Aib Gly
[0099]	1
[0100]	<210>7
[0101]	<211>3
[0102]	<212>PRT
[0103]	<213> 人工序列
[0104]	<220>
[0105]	<223> 合成肽
[0106]	<220>
[0107]	<221> 变体
[0108]	<222>(2)
[0109]	<223>2- 氨基 - 异丁酸
[0110]	<400>7
[0111]	Lys Aib Gly
[0112]	1
[0113]	<210>8
[0114]	<211>20
[0115]	<212>PRT
[0116]	<213> 人工序列

[0117]	<220>
[0118]	<223> 合成肽
[0119]	<220>
[0120]	<221> 变体
[0121]	<222> (3)
[0122]	<223> 2-氨基 - 异丁酸
[0123]	<220>
[0124]	<221> 变体
[0125]	<222> (5)
[0126]	<223> 2-氨基 - 异丁酸
[0127]	<220>
[0128]	<221> 变体
[0129]	<222> (7)
[0130]	<223> 2-氨基 - 异丁酸
[0131]	<220>
[0132]	<221> 变体
[0133]	<222> (9)
[0134]	<223> 2-氨基 - 异丁酸
[0135]	<220>
[0136]	<221> 变体
[0137]	<222> (11)
[0138]	<223> 2-氨基 - 异丁酸
[0139]	<220>
[0140]	<221> 变体
[0141]	<222> (13)
[0142]	<223> 2-氨基 - 异丁酸
[0143]	<220>
[0144]	<221> 变体
[0145]	<222> (15)
[0146]	<223> 2-氨基 - 异丁酸
[0147]	<220>
[0148]	<221> 变体
[0149]	<222> (17)
[0150]	<223> 2-氨基 - 异丁酸
[0151]	<220>
[0152]	<221> 变体
[0153]	<222> (19)
[0154]	<223> 2-氨基 - 异丁酸
[0155]	<400> 8

[0156]	Aib Lys Aib Gly Aib Lys Aib Gly Aib Lys Aib Gly Aib Lys Aib Gly Aib Lys Aib Gly
[0157]	1 5 10 15 20
[0158]	<210>9
[0159]	<211>15
[0160]	<212>PRT
[0161]	<213> 人工序列
[0162]	<220>
[0163]	<223> 合成肽
[0164]	<220>
[0165]	<221> 变体
[0166]	<222> (2)
[0167]	<223>2- 氨基 - 异丁酸
[0168]	<220>
[0169]	<221> 变体
[0170]	<222> (5)
[0171]	<223>2- 氨基 - 异丁酸
[0172]	<220>
[0173]	<221> 变体
[0174]	<222> (8)
[0175]	<223>2- 氨基 - 异丁酸
[0176]	<220>
[0177]	<221> 变体
[0178]	<222> (11)
[0179]	<223>2- 氨基 - 异丁酸
[0180]	<220>
[0181]	<221> 变体
[0182]	<222> (14)
[0183]	<223>2- 氨基 - 异丁酸
[0184]	<400>9
[0185]	Lys Aib Gly Lys Aib Gly Lys Aib Gly Lys Aib Gly Lys Aib Gly
[0186]	1 5 10 15
[0187]	<210>10
[0188]	<211>20
[0189]	<212>PRT
[0190]	<213> 人工序列
[0191]	<220>
[0192]	<223> 合成肽
[0193]	<220>
[0194]	<221> 变体

[0195]	<222>(1)
[0196]	<223>2- 氨基 - 异丁酸
[0197]	<220>
[0198]	<221> 变体
[0199]	<222>(3)
[0200]	<223>2- 氨基 - 异丁酸
[0201]	<220>
[0202]	<221> 变体
[0203]	<222>(5)
[0204]	<223>2- 氨基 - 异丁酸
[0205]	<220>
[0206]	<221> 变体
[0207]	<222>(7)
[0208]	<223>2- 氨基 - 异丁酸
[0209]	<220>
[0210]	<221> 变体
[0211]	<222>(9)
[0212]	<223>2- 氨基 - 异丁酸
[0213]	<220>
[0214]	<221> 变体
[0215]	<222>(11)
[0216]	<223>2- 氨基 - 异丁酸
[0217]	<220>
[0218]	<221> 变体
[0219]	<222>(13)
[0220]	<223>2- 氨基 - 异丁酸
[0221]	<220>
[0222]	<221> 变体
[0223]	<222>(15)
[0224]	<223>2- 氨基 - 异丁酸
[0225]	<220>
[0226]	<221> 变体
[0227]	<222>(17)
[0228]	<223>2- 氨基 - 异丁酸
[0229]	<220>
[0230]	<221> 变体
[0231]	<222>(19)
[0232]	<223>2- 氨基 - 异丁酸
[0233]	<220>

[0234]	<221> 结合
[0235]	<222> (2)
[0236]	<223>N6-Arg-Pro- 赖氨酰
[0237]	<220>
[0238]	<221> 结合
[0239]	<222> (6)
[0240]	<223>N6-Arg-Pro- 赖氨酰
[0241]	<220>
[0242]	<221> 结合
[0243]	<222> (10)
[0244]	<223>N6-Arg-Pro- 赖氨酰
[0245]	<220>
[0246]	<221> 结合
[0247]	<222> (14)
[0248]	<223>N6-Arg-Pro- 赖氨酰
[0249]	<220>
[0250]	<221> 结合
[0251]	<222> (18)
[0252]	<223>N6-Arg-Pro- 赖氨酰
[0253]	<400>10
[0254]	Aib Lys Aib Gly Aib Lys Aib Gly Aib Lys Aib Gly Aib Lys Aib Gly Aib Lys Aib Gly
[0255]	1 5 10 15 20
[0256]	<210>11
[0257]	<211>15
[0258]	<212>PRT
[0259]	<213> 人工序列
[0260]	<220>
[0261]	<223> 合成肽
[0262]	<220>
[0263]	<221> 变体
[0264]	<222> (2)
[0265]	<223>2- 氨基 - 异丁酸
[0266]	<220>
[0267]	<221> 变体
[0268]	<222> (5)
[0269]	<223>2- 氨基 - 异丁酸
[0270]	<220>
[0271]	<221> 变体
[0272]	<222> (8)

[0273]	<223>2- 氨基 - 异丁酸
[0274]	<220>
[0275]	<221> 变体
[0276]	<222>(11)
[0277]	<223>2- 氨基 - 异丁酸
[0278]	<220>
[0279]	<221> 变体
[0280]	<222>(14)
[0281]	<223>2- 氨基 - 异丁酸
[0282]	<220>
[0283]	<221> 结合
[0284]	<222>(1)
[0285]	<223>N6-Arg-Pro- 赖氨酰
[0286]	<220>
[0287]	<221> 结合
[0288]	<222>(4)
[0289]	<223>N6-Arg-Pro- 赖氨酰
[0290]	<220>
[0291]	<221> 结合
[0292]	<222>(7)
[0293]	<223>N6-Arg-Pro- 赖氨酰
[0294]	<220>
[0295]	<221> 结合
[0296]	<222>(10)
[0297]	<223>N6-Arg-Pro- 赖氨酰
[0298]	<220>
[0299]	<221> 结合
[0300]	<222>(13)
[0301]	<223>N6-Arg-Pro- 赖氨酰
[0302]	<400>11
[0303]	Lys Aib Gly Lys Aib Gly Lys Aib Gly Lys Aib Gly Lys Aib Gly
[0304]	1 5 10 15
[0305]	<210>12
[0306]	<211>5
[0307]	<212>PRT
[0308]	<213> 人工序列
[0309]	<220>
[0310]	<223> 合成肽
[0311]	<400>12

[0312]	Lys Ala Lys Pro Gly
[0313]	1 5
[0314]	<210>13
[0315]	<211>15
[0316]	<212>PRT
[0317]	<213> 人工序列
[0318]	<220>
[0319]	<223> 合成肽
[0320]	<220>
[0321]	<221>MOD_RES
[0322]	<222>(1)
[0323]	<223> 乙酰基赖氨酸
[0324]	<220>
[0325]	<221>MOD_RES
[0326]	<222>(15)
[0327]	<223> 甘氨酸
[0328]	<400>13
[0329]	Lys Ala Lys Pro Gly Lys Ala Lys Pro Gly Lys Ala Lys Pro Gly
[0330]	1 5 10 15
[0331]	<210>14
[0332]	<211>24
[0333]	<212>PRT
[0334]	<213> 人工序列
[0335]	<220>
[0336]	<223> 合成肽
[0337]	<220>
[0338]	<221> 变体
[0339]	<222>(1)
[0340]	<223>2- 氨基 - 异丁酸
[0341]	<220>
[0342]	<221> 变体
[0343]	<222>(3)
[0344]	<223>2- 氨基 - 异丁酸
[0345]	<220>
[0346]	<221> 变体
[0347]	<222>(5)
[0348]	<223>2- 氨基 - 异丁酸
[0349]	<220>
[0350]	<221> 变体

[0351]	<222>(7)
[0352]	<223>2- 氨基 - 异丁酸
[0353]	<220>
[0354]	<221> 变体
[0355]	<222>(9)
[0356]	<223>2- 氨基 - 异丁酸
[0357]	<220>
[0358]	<221> 变体
[0359]	<222>(11)
[0360]	<223>2- 氨基 - 异丁酸
[0361]	<220>
[0362]	<221> 变体
[0363]	<222>(13)
[0364]	<223>2- 氨基 - 异丁酸
[0365]	<220>
[0366]	<221> 变体
[0367]	<222>(15)
[0368]	<223>2- 氨基 - 异丁酸
[0369]	<220>
[0370]	<221> 变体
[0371]	<222>(16)
[0372]	<223>2- 氨基 - 异丁酸
[0373]	<220>
[0374]	<221> 变体
[0375]	<222>(17)
[0376]	<223>2- 氨基 - 异丁酸
[0377]	<220>
[0378]	<221> 变体
[0379]	<222>(21)
[0380]	<223>2- 氨基 - 异丁酸
[0381]	<220>
[0382]	<221> 变体
[0383]	<222>(23)
[0384]	<223>2- 氨基 - 异丁酸
[0385]	<220>
[0386]	<221>MOD_RES
[0387]	<222>(1)
[0388]	<223> 乙酰基赖氨酸
[0389]	<220>

[0390]	<221>MOD_RES
[0391]	<222>(24)
[0392]	<223> 甘氨酸
[0393]	<400>14
[0394]	Aib Lys Aib Gly Aib Lys Aib Gly Aib Lys Aib Gly Aib Lys Aib Gly
[0395]	1 5 10 15
[0396]	Aib Lys Aib Gly Aib Lys Aib Gly
[0397]	20
[0398]	<210>15
[0399]	<211>18
[0400]	<212>PRT
[0401]	<213> 人工序列
[0402]	<220>
[0403]	<223> 合成肽
[0404]	<220>
[0405]	<221> 变体
[0406]	<222>(2)
[0407]	<223>2- 氨基 - 异丁酸
[0408]	<220>
[0409]	<221> 变体
[0410]	<222>(5)
[0411]	<223>2- 氨基 - 异丁酸
[0412]	<220>
[0413]	<221> 变体
[0414]	<222>(8)
[0415]	<223>2- 氨基 - 异丁酸
[0416]	<220>
[0417]	<221> 变体
[0418]	<222>(11)
[0419]	<223>2- 氨基 - 异丁酸
[0420]	<220>
[0421]	<221> 变体
[0422]	<222>(14)
[0423]	<223>2- 氨基 - 异丁酸
[0424]	<220>
[0425]	<221> 变体
[0426]	<222>(17)
[0427]	<223>2- 氨基 - 异丁酸
[0428]	<220>

[0429]	<221>MOD_RES
[0430]	<222>(1)
[0431]	<223> 乙酰基赖氨酸
[0432]	<220>
[0433]	<221>MOD_RES
[0434]	<222>(18)
[0435]	<223> 甘氨酸
[0436]	<400>15
[0437]	Lys Aib Gly Lys Aib Gly Lys Aib Gly Lys Aib Gly Lys Aib Gly Lys
[0438]	1 5 10 15
[0439]	Aib Gly
[0440]	<210>16
[0441]	<211>18
[0442]	<212>PRT
[0443]	<213> 人工序列
[0444]	<220>
[0445]	<223> 合成肽
[0446]	<220>
[0447]	<221> 变体
[0448]	<222>(2)
[0449]	<223>2- 氨基 - 异丁酸
[0450]	<220>
[0451]	<221> 变体
[0452]	<222>(5)
[0453]	<223>2- 氨基 - 异丁酸
[0454]	<220>
[0455]	<221> 变体
[0456]	<222>(8)
[0457]	<223>2- 氨基 - 异丁酸
[0458]	<220>
[0459]	<221> 变体
[0460]	<222>(11)
[0461]	<223>2- 氨基 - 异丁酸
[0462]	<220>
[0463]	<221> 变体
[0464]	<222>(14)
[0465]	<223>2- 氨基 - 异丁酸
[0466]	<220>
[0467]	<221> 变体

[0468]	<222>(17)
[0469]	<223>2- 氨基 - 异丁酸
[0470]	<220>
[0471]	<221>MOD_RES
[0472]	<222>(1)
[0473]	<223> 乙酰基赖氨酸
[0474]	<220>
[0475]	<221> 结合
[0476]	<222>(1)
[0477]	<223>N6-Arg-Pro- 赖氨酰
[0478]	<220>
[0479]	<221> 结合
[0480]	<222>(4)
[0481]	<223>LYS-X-PRO-ARG-LYS. X 为键 (-CH2NH-)
[0482]	<220>
[0483]	<221> 结合
[0484]	<222>(7)
[0485]	<223>N6-Arg-Pro- 赖氨酰
[0486]	<220>
[0487]	<221> 结合
[0488]	<222>(10)
[0489]	<223>N6-Arg-Pro- 赖氨酰
[0490]	<220>
[0491]	<221> 结合
[0492]	<222>(13)
[0493]	<223>N6-Arg-Pro- 赖氨酰
[0494]	<220>
[0495]	<221> 结合
[0496]	<222>(16)
[0497]	<223>N6-Arg-Pro- 赖氨酰
[0498]	<220>
[0499]	<221>MOD_RES
[0500]	<222>(18)
[0501]	<223> 甘氨酸
[0502]	<400>16
[0503]	Lys Aib Gly Lys Aib Gly Lys Aib Gly Lys Aib Gly Lys Aib Gly Lys
[0504]	1 5 10 15
[0505]	Aib Gly
[0506]	<210>17

[0507]	<211>15
[0508]	<212>PRT
[0509]	<213> 人工序列
[0510]	<220>
[0511]	<223> 合成肽
[0512]	<220>
[0513]	<221>MOD_RES
[0514]	<222>(1)
[0515]	<223> 乙酰基赖氨酸
[0516]	<220>
[0517]	<221> 结合
[0518]	<222>(1)
[0519]	<223>N6-Arg-Pro- 赖氨酰
[0520]	<220>
[0521]	<221> 结合
[0522]	<222>(3)
[0523]	<223>N6-Arg-Pro- 赖氨酰
[0524]	<220>
[0525]	<221> 结合
[0526]	<222>(6)
[0527]	<223>N6-Arg-Pro- 赖氨酰
[0528]	<220>
[0529]	<221> 结合
[0530]	<222>(8)
[0531]	<223>N6-Arg-Pro- 赖氨酰
[0532]	<220>
[0533]	<221> 结合
[0534]	<222>(11)
[0535]	<223>N6-Arg-Pro- 赖氨酰
[0536]	<220>
[0537]	<221> 结合
[0538]	<222>(13)
[0539]	<223>N6-Arg-Pro- 赖氨酰
[0540]	<220>
[0541]	<221>MOD_RES
[0542]	<222>(15)
[0543]	<223> 甘氨酰胺
[0544]	<400>17
[0545]	Lys Ala Lys Pro Gly Lys Ala Lys Pro Gly Lys Ala Lys Pro Gly

[0546]	1	5	10	15
[0547]	<210>18			
[0548]	<211>20			
[0549]	<212>PRT			
[0550]	<213> 人工序列			
[0551]	<220>			
[0552]	<223> 合成肽			
[0553]	<220>			
[0554]	<221> 变体			
[0555]	<222>(1)			
[0556]	<223>2- 氨基 - 异丁酸			
[0557]	<220>			
[0558]	<221> 变体			
[0559]	<222>(3)			
[0560]	<223>2- 氨基 - 异丁酸			
[0561]	<220>			
[0562]	<221> 变体			
[0563]	<222>(5)			
[0564]	<223>2- 氨基 - 异丁酸			
[0565]	<220>			
[0566]	<221> 变体			
[0567]	<222>(7)			
[0568]	<223>2- 氨基 - 异丁酸			
[0569]	<220>			
[0570]	<221> 变体			
[0571]	<222>(9)			
[0572]	<223>2- 氨基 - 异丁酸			
[0573]	<220>			
[0574]	<221> 变体			
[0575]	<222>(11)			
[0576]	<223>2- 氨基 - 异丁酸			
[0577]	<220>			
[0578]	<221> 变体			
[0579]	<222>(13)			
[0580]	<223>2- 氨基 - 异丁酸			
[0581]	<220>			
[0582]	<221> 变体			
[0583]	<222>(15)			
[0584]	<223>2- 氨基 - 异丁酸			

[0585]	<220>
[0586]	<221> 变体
[0587]	<222> (17)
[0588]	<223> 2- 氨基 - 异丁酸
[0589]	<220>
[0590]	<221> 变体
[0591]	<222> (19)
[0592]	<223> 2- 氨基 - 异丁酸
[0593]	<220>
[0594]	<221> MOD_RES
[0595]	<222> (1)
[0596]	<223> 乙酰基赖氨酸
[0597]	<220>
[0598]	<221> MOD_RES
[0599]	<222> (20)
[0600]	<223> 甘氨酸
[0601]	<400> 18
[0602]	Aib Lys Aib Gly Aib Lys Aib Gly Aib Lys Aib Gly Aib Lys Aib Gly Aib Lys Aib Gly
[0603]	1 5 10 15 20
[0604]	<210> 19
[0605]	<211> 15
[0606]	<212> PRT
[0607]	<213> 人工序列
[0608]	<220>
[0609]	<223> 合成肽
[0610]	<220>
[0611]	<221> 变体
[0612]	<222> (2)
[0613]	<223> 2- 氨基 - 异丁酸
[0614]	<220>
[0615]	<221> 变体
[0616]	<222> (5)
[0617]	<223> 2- 氨基 - 异丁酸
[0618]	<220>
[0619]	<221> 变体
[0620]	<222> (8)
[0621]	<223> 2- 氨基 - 异丁酸
[0622]	<220>
[0623]	<221> 变体

[0624]	<222>(11)
[0625]	<223>2- 氨基 - 异丁酸
[0626]	<220>
[0627]	<221> 变体
[0628]	<222>(14)
[0629]	<223>2- 氨基 - 异丁酸
[0630]	<220>
[0631]	<221>MOD_RES
[0632]	<222>(1)
[0633]	<223> 乙酰基赖氨酸
[0634]	<220>
[0635]	<221>MOD_RES
[0636]	<222>(15)
[0637]	<223> 甘氨酸
[0638]	<400>19
[0639]	Lys Aib Gly Lys Aib Gly Lys Aib Gly Lys Aib Gly Lys Aib Gly
[0640]	1 5 10 15
[0641]	<210>20
[0642]	<211>20
[0643]	<212>PRT
[0644]	<213> 人工序列
[0645]	<220>
[0646]	<223> 合成肽
[0647]	<220>
[0648]	<221> 变体
[0649]	<222>(1)
[0650]	<223>2- 氨基 - 异丁酸
[0651]	<220>
[0652]	<221> 变体
[0653]	<222>(3)
[0654]	<223>2- 氨基 - 异丁酸
[0655]	<220>
[0656]	<221> 变体
[0657]	<222>(5)
[0658]	<223>2- 氨基 - 异丁酸
[0659]	<220>
[0660]	<221> 变体
[0661]	<222>(7)
[0662]	<223>2- 氨基 - 异丁酸

[0663]	<220>
[0664]	<221> 变体
[0665]	<222> (9)
[0666]	<223> 2- 氨基 - 异丁酸
[0667]	<220>
[0668]	<221> 变体
[0669]	<222> (11)
[0670]	<223> 2- 氨基 - 异丁酸
[0671]	<220>
[0672]	<221> 变体
[0673]	<222> (13)
[0674]	<223> 2- 氨基 - 异丁酸
[0675]	<220>
[0676]	<221> 变体
[0677]	<222> (15)
[0678]	<223> 2- 氨基 - 异丁酸
[0679]	<220>
[0680]	<221> 变体
[0681]	<222> (17)
[0682]	<223> 2- 氨基 - 异丁酸
[0683]	<220>
[0684]	<221> 变体
[0685]	<222> (19)
[0686]	<223> 2- 氨基 - 异丁酸
[0687]	<220>
[0688]	<221> MOD_RES
[0689]	<222> (1)
[0690]	<223> 乙酰基赖氨酸
[0691]	<220>
[0692]	<221> 结合
[0693]	<222> (2)
[0694]	<223> N6-Arg-Pro- 赖氨酰
[0695]	<220>
[0696]	<221> 结合
[0697]	<222> (6)
[0698]	<223> N6-Arg-Pro- 赖氨酰
[0699]	<220>
[0700]	<221> 结合
[0701]	<222> (10)

[0702]	<223>N6-Arg-Pro- 赖氨酰
[0703]	<220>
[0704]	<221> 结合
[0705]	<222>(14)
[0706]	<223>N6-Arg-Pro- 赖氨酰
[0707]	<220>
[0708]	<221> 结合
[0709]	<222>(18)
[0710]	<223>N6-Arg-Pro- 赖氨酰
[0711]	<220>
[0712]	<221>MOD_RES
[0713]	<222>(20)
[0714]	<223> 甘氨酸
[0715]	<400>20
[0716]	Aib Lys Aib Gly Aib Lys Aib Gly Aib Lys Aib Gly Aib Lys Aib Gly Aib Lys Aib Gly
[0717]	1 5 10 15 20
[0718]	<210>21
[0719]	<211>15
[0720]	<212>PRT
[0721]	<213> 人工序列
[0722]	<220>
[0723]	<223> 合成肽
[0724]	<220>
[0725]	<221> 变体
[0726]	<222>(2)
[0727]	<223>2- 氨基 - 异丁酸
[0728]	<220>
[0729]	<221> 变体
[0730]	<222>(5)
[0731]	<223>2- 氨基 - 异丁酸
[0732]	<220>
[0733]	<221> 变体
[0734]	<222>(8)
[0735]	<223>2- 氨基 - 异丁酸
[0736]	<220>
[0737]	<221> 变体
[0738]	<222>(11)
[0739]	<223>2- 氨基 - 异丁酸
[0740]	<220>

[0741]	<221> 变体
[0742]	<222> (14)
[0743]	<223> 2- 氨基 - 异丁酸
[0744]	<220>
[0745]	<221> MOD_RES
[0746]	<222> (1)
[0747]	<223> 乙酰基赖氨酸
[0748]	<220>
[0749]	<221> 结合
[0750]	<222> (1)
[0751]	<223> N6-Arg-Pro- 赖氨酰
[0752]	<220>
[0753]	<221> 结合
[0754]	<222> (4)
[0755]	<223> N6-Arg-Pro- 赖氨酰
[0756]	<220>
[0757]	<221> 结合
[0758]	<222> (7)
[0759]	<223> N6-Arg-Pro- 赖氨酰
[0760]	<220>
[0761]	<221> 结合
[0762]	<222> (10)
[0763]	<223> N6-Arg-Pro- 赖氨酰
[0764]	<220>
[0765]	<221> 结合
[0766]	<222> (13)
[0767]	<223> N6-Arg-Pro- 赖氨酰
[0768]	<220>
[0769]	<221> MOD_RES
[0770]	<222> (15)
[0771]	<223> 甘氨酰胺
[0772]	<400> 21
[0773]	Lys Aib Gly Lys Aib Gly Lys Aib Gly Lys Aib Gly Lys Aib Gly
[0774]	1 5 10 15

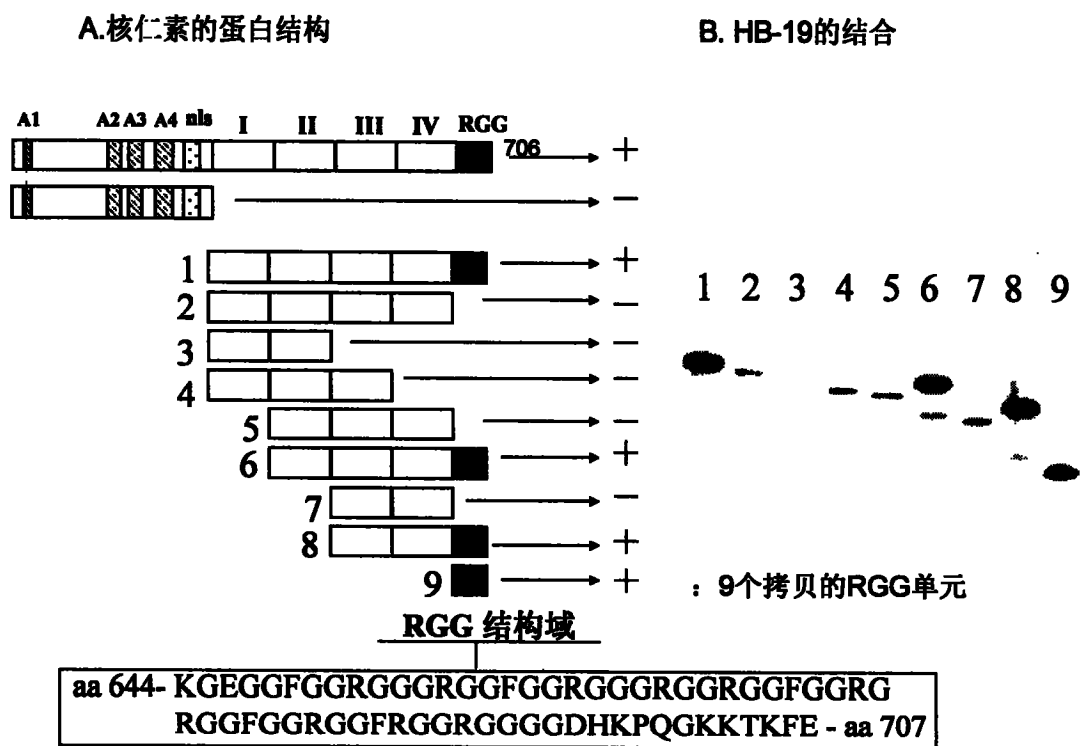


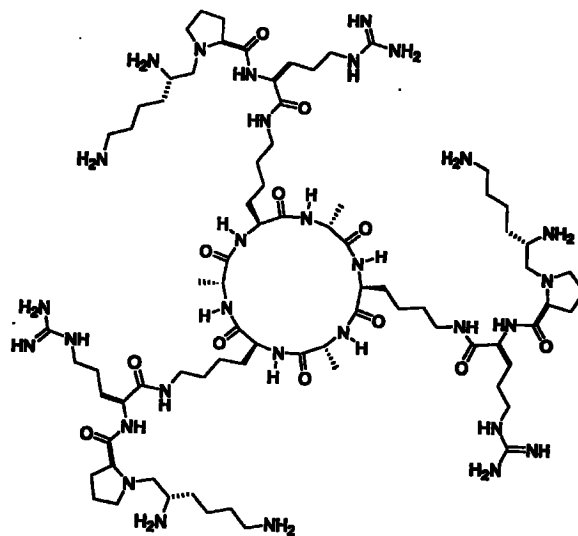
图 1

A



HB-19

B



Nucant 01

图 2

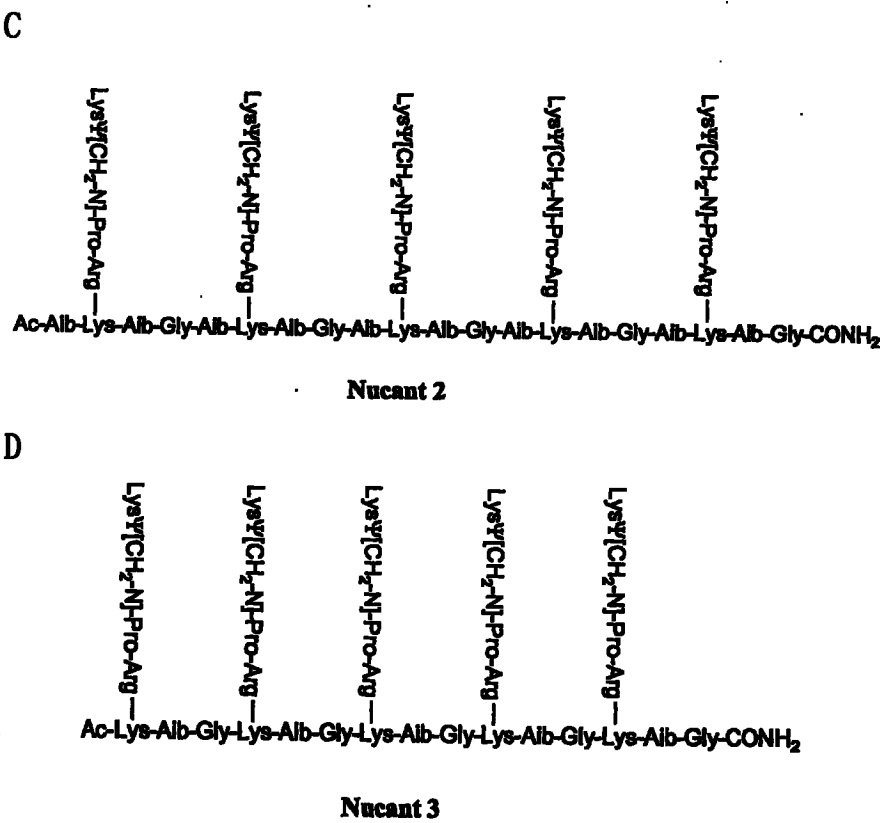


图 2(续)

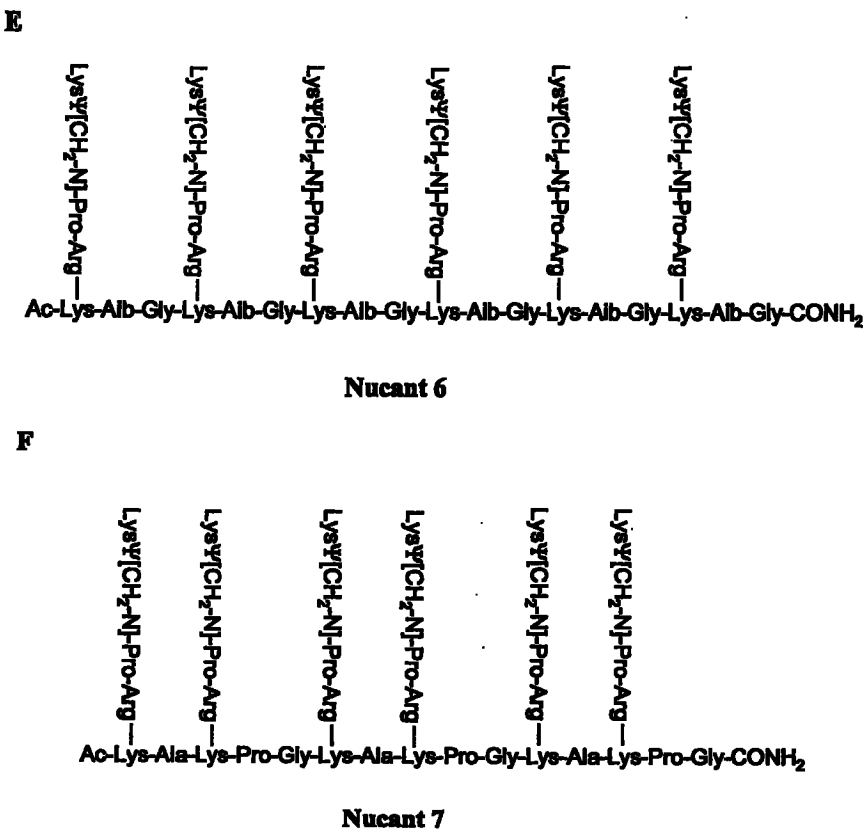


图 2(续)

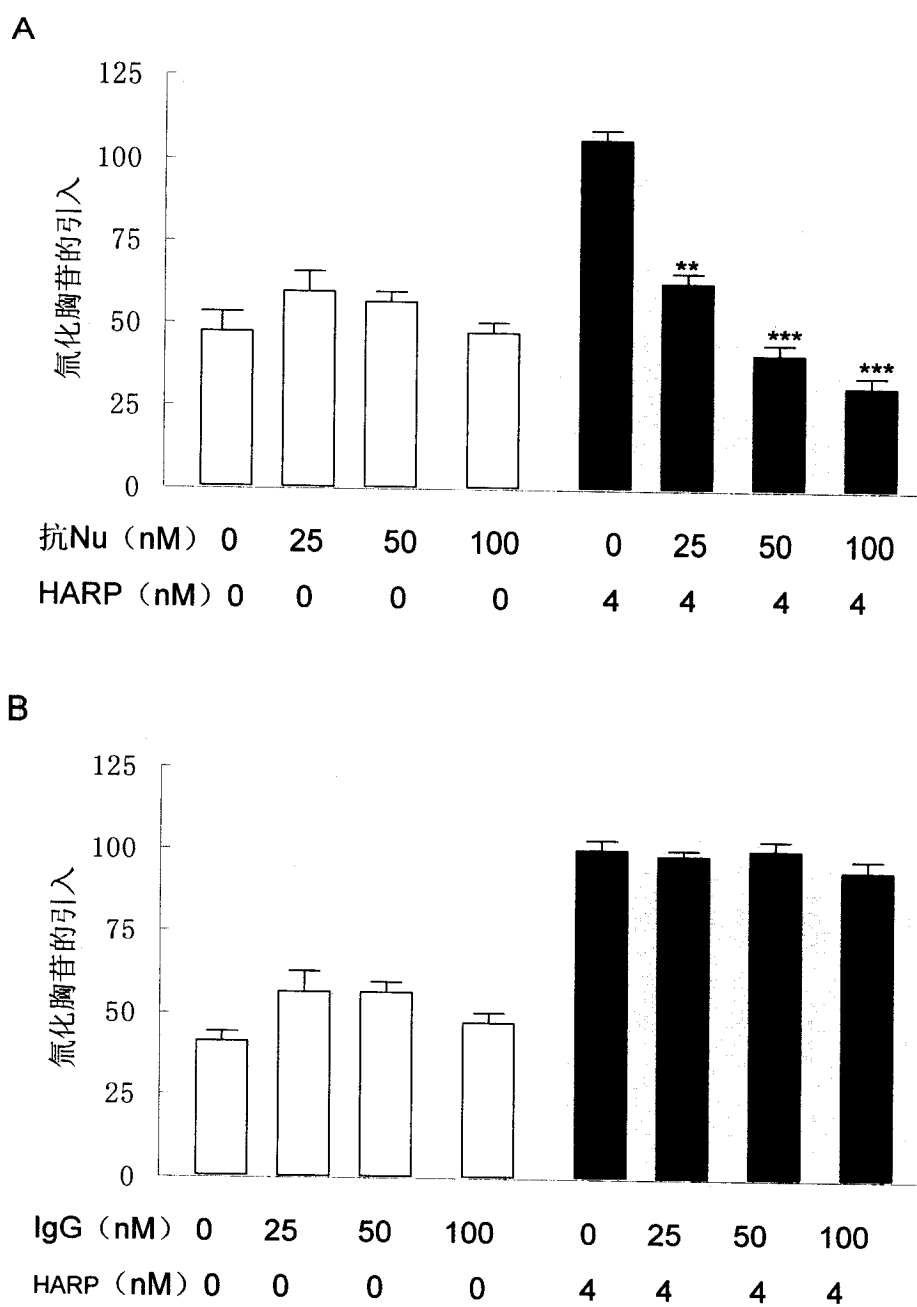


图 3

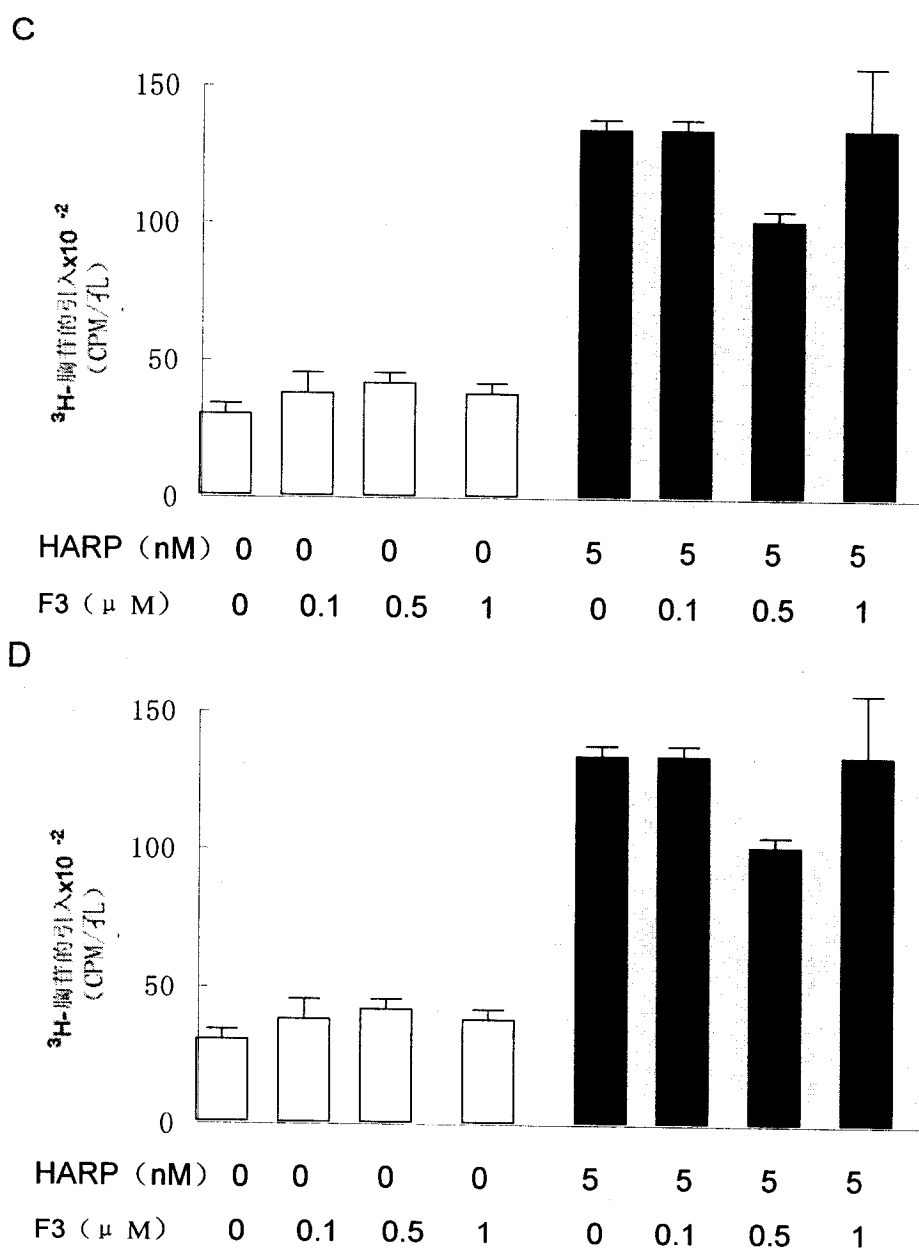


图3(续)

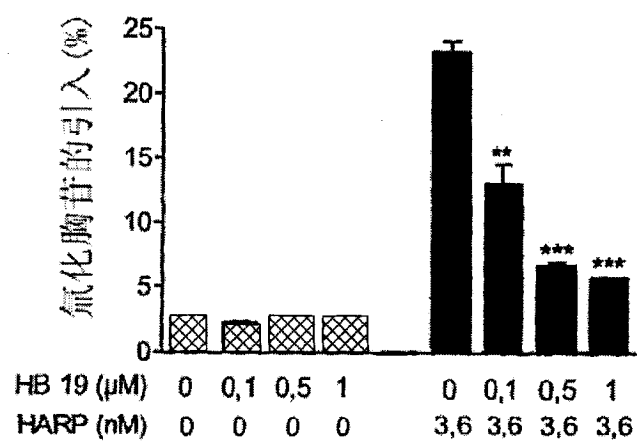


图 4

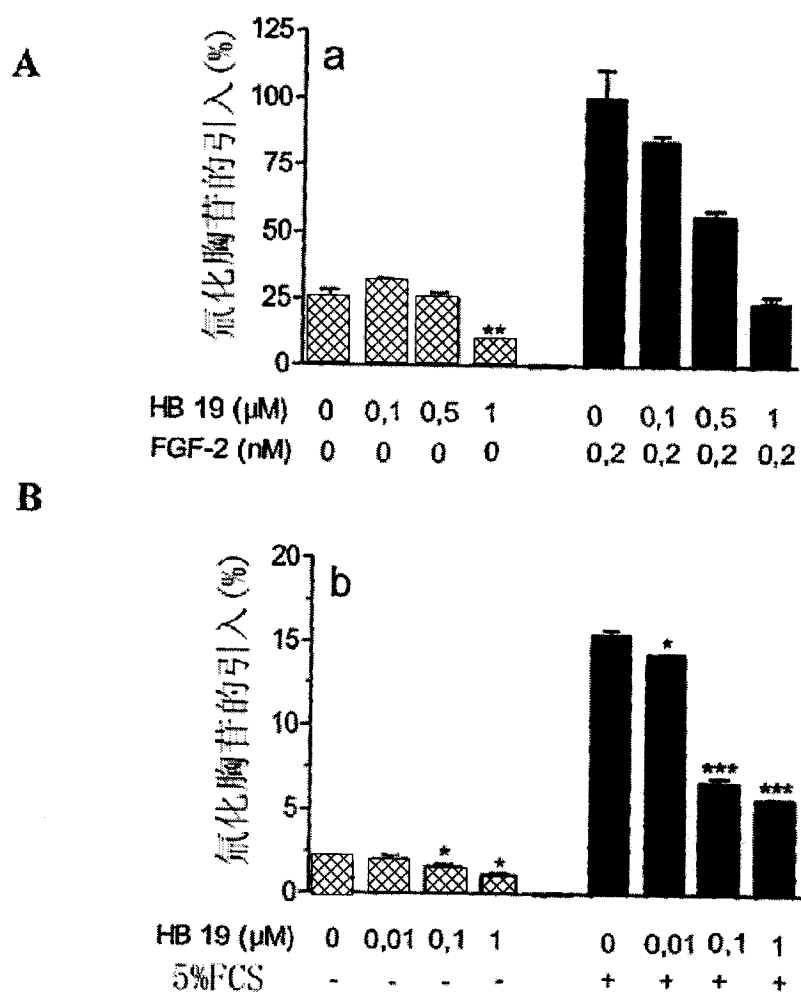
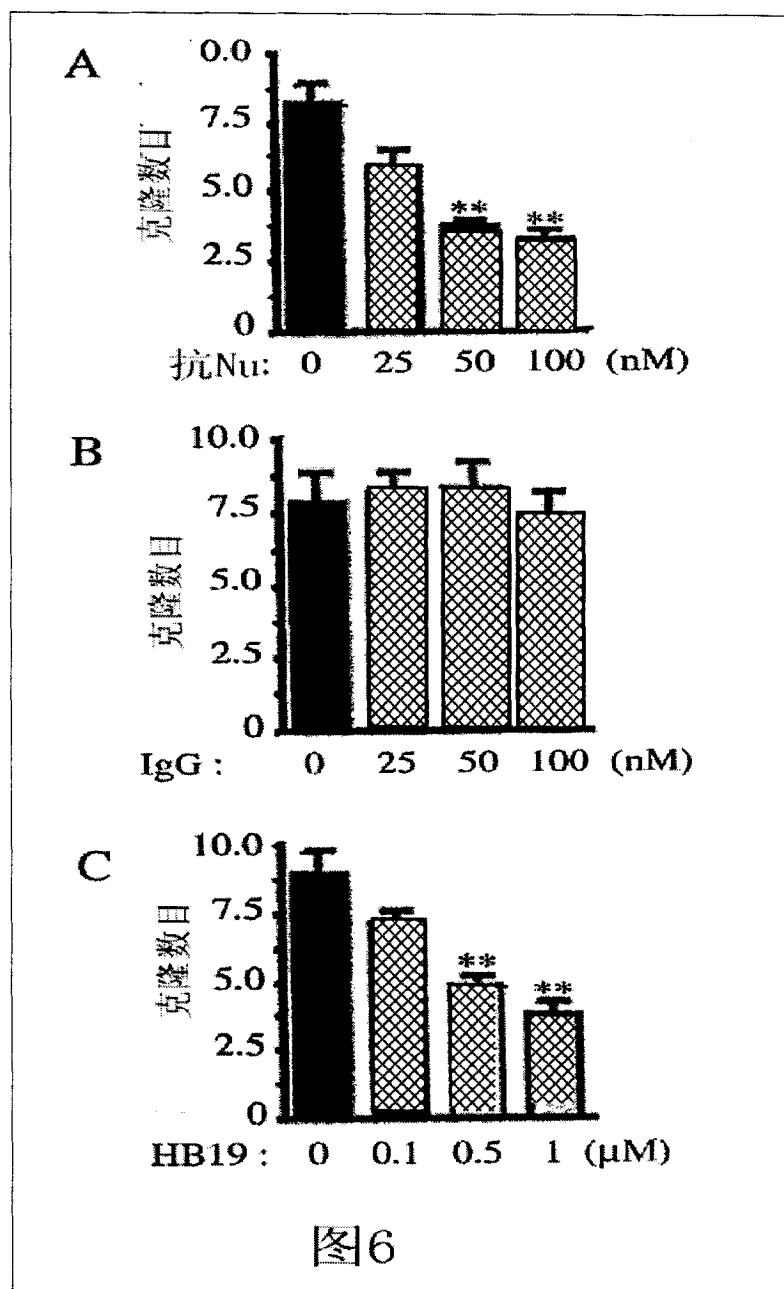


图 5



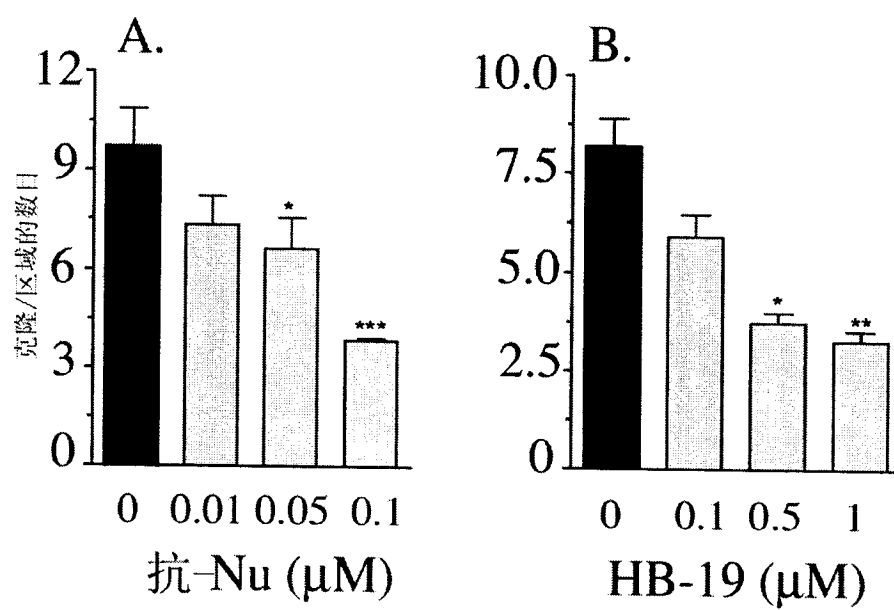


图 7

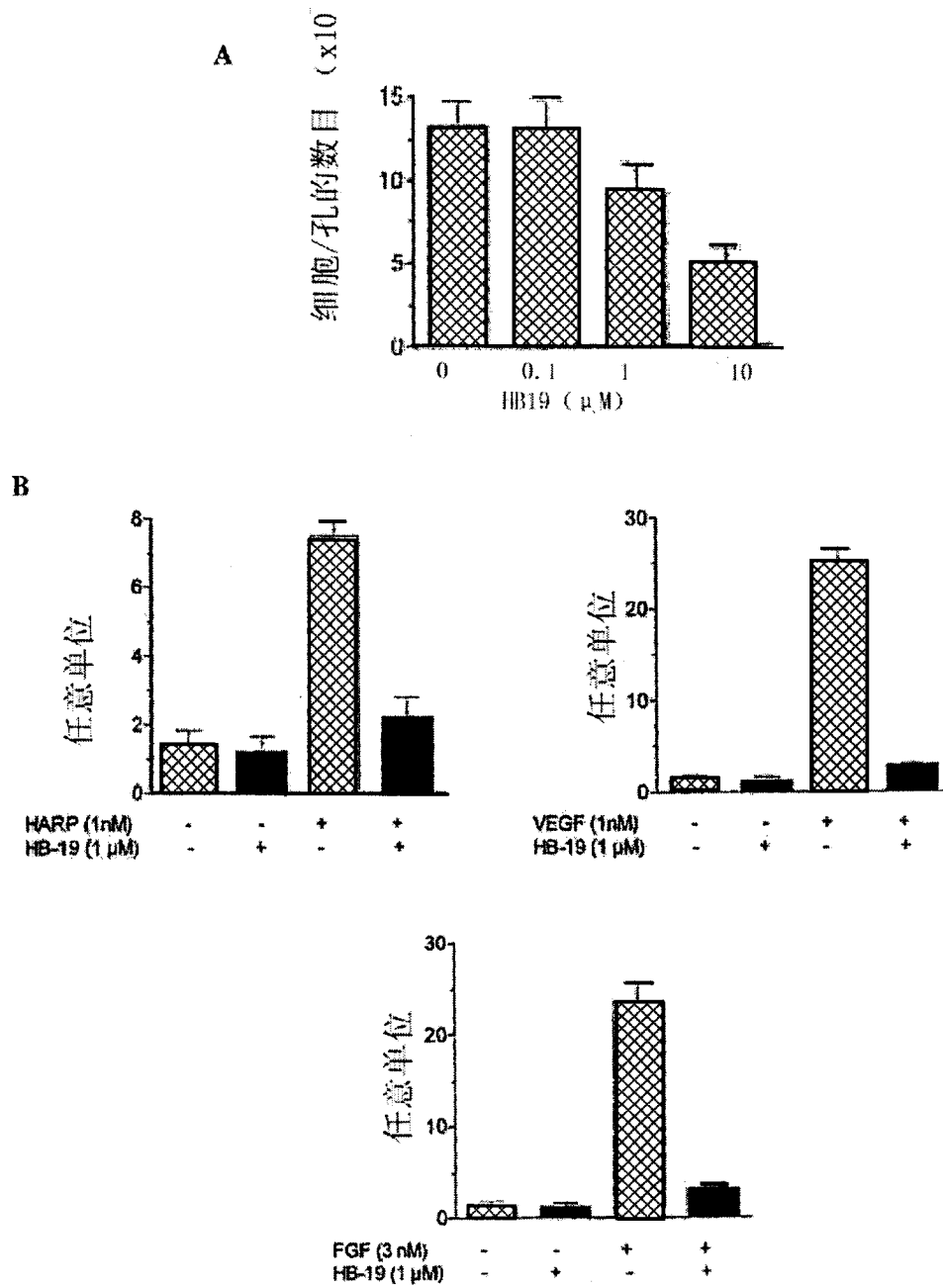


图 8

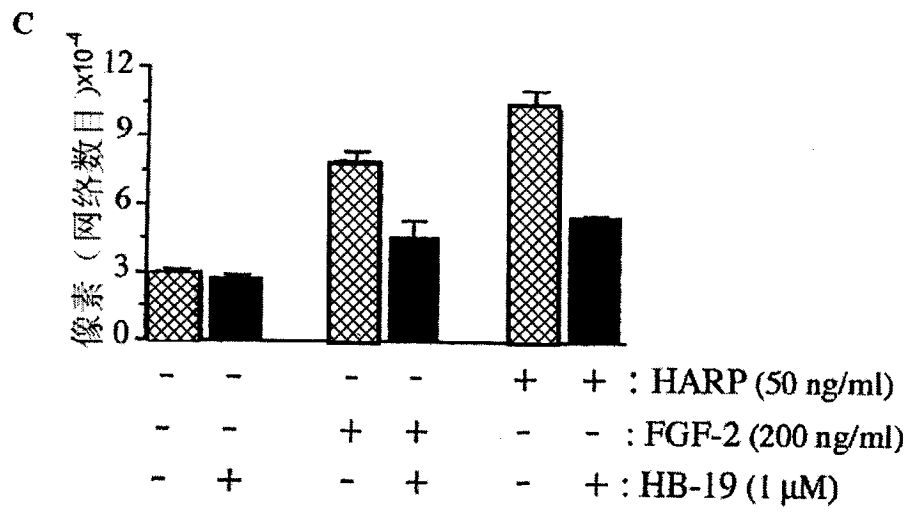


图 8(续)

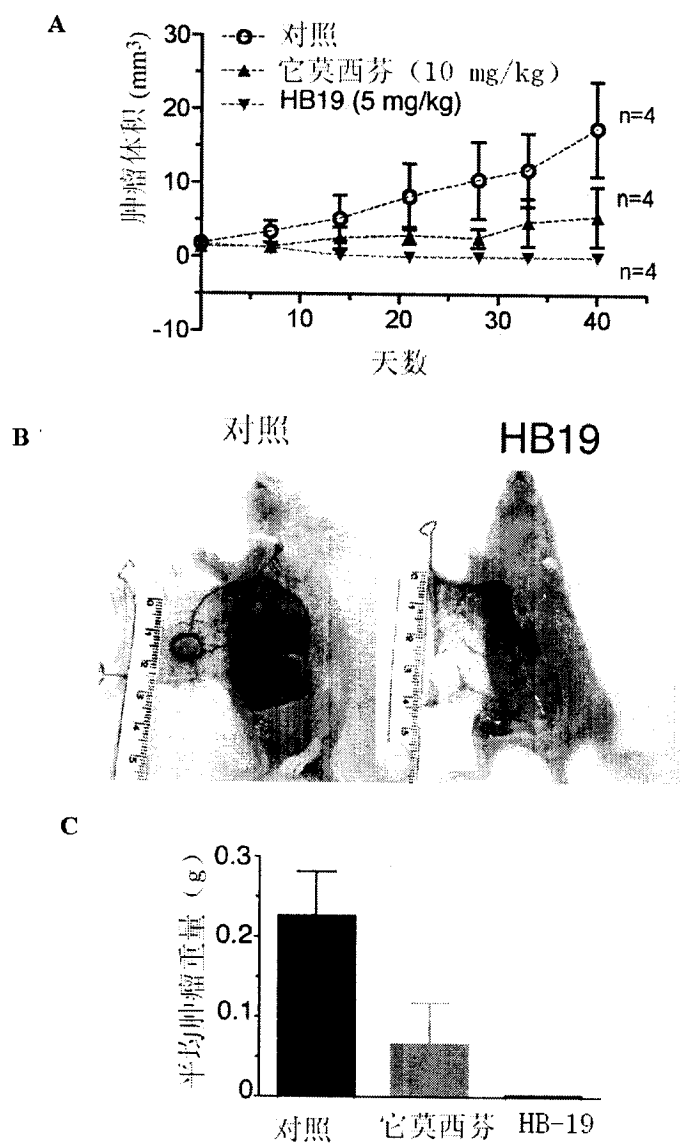


图 9

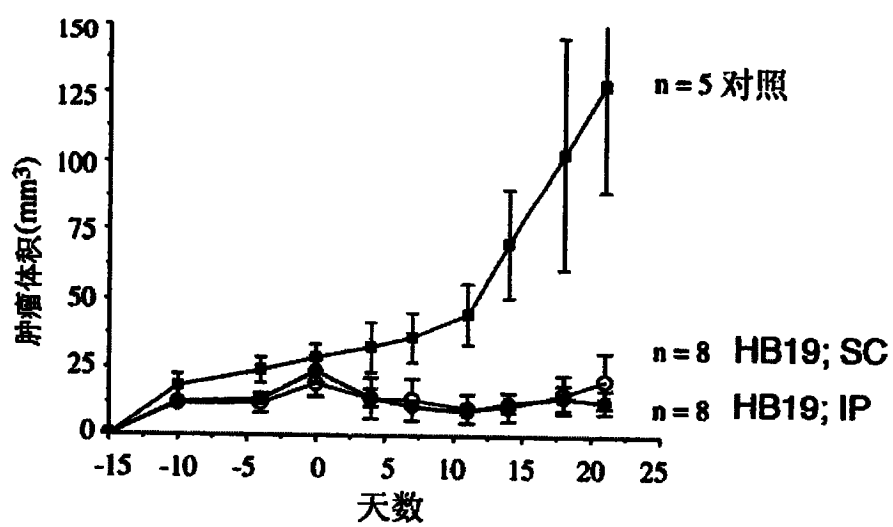


图 10

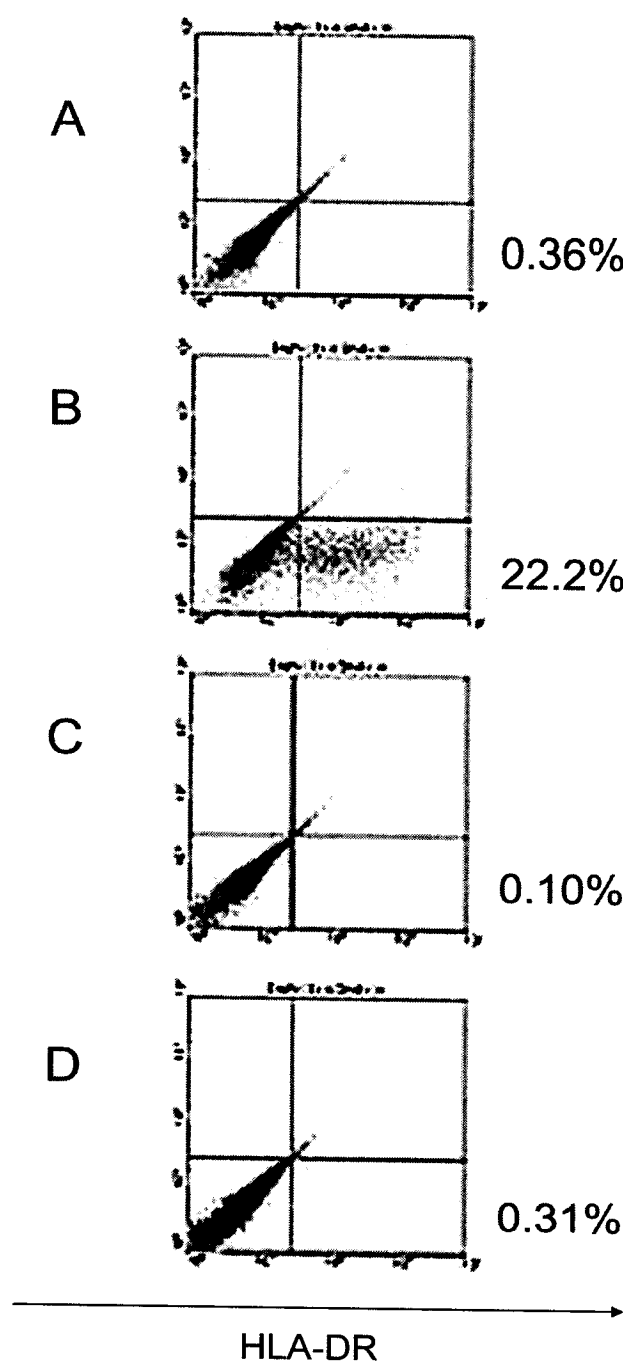


图 11

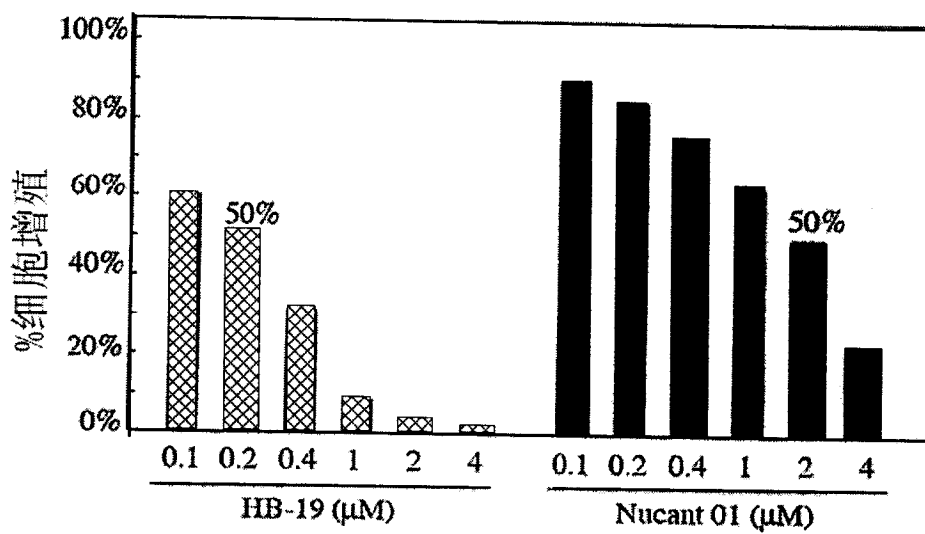


图 12

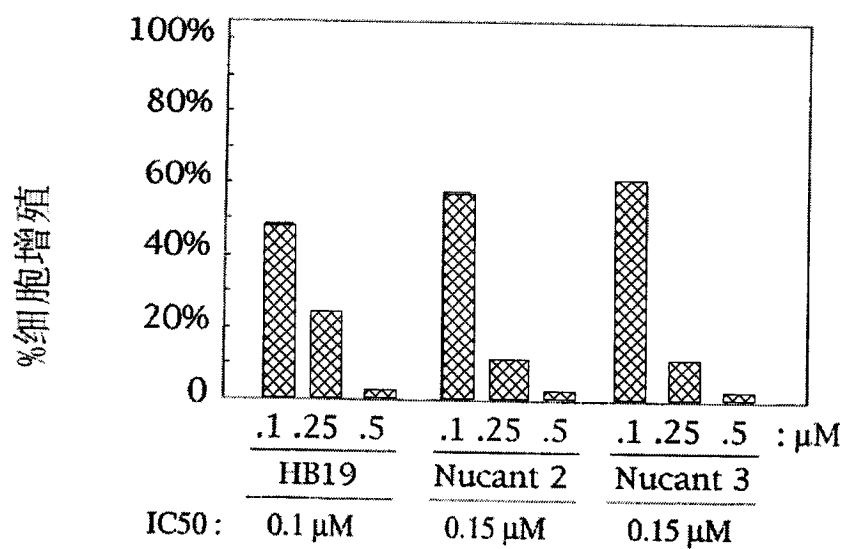
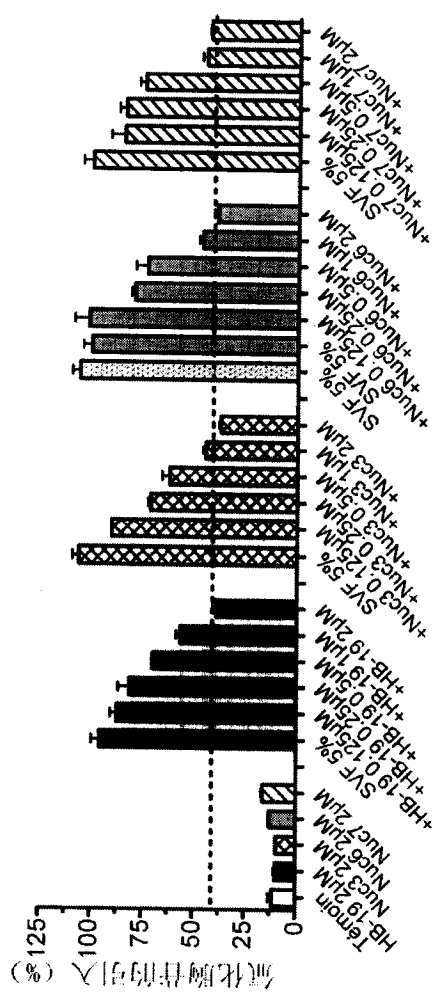


图 13



14

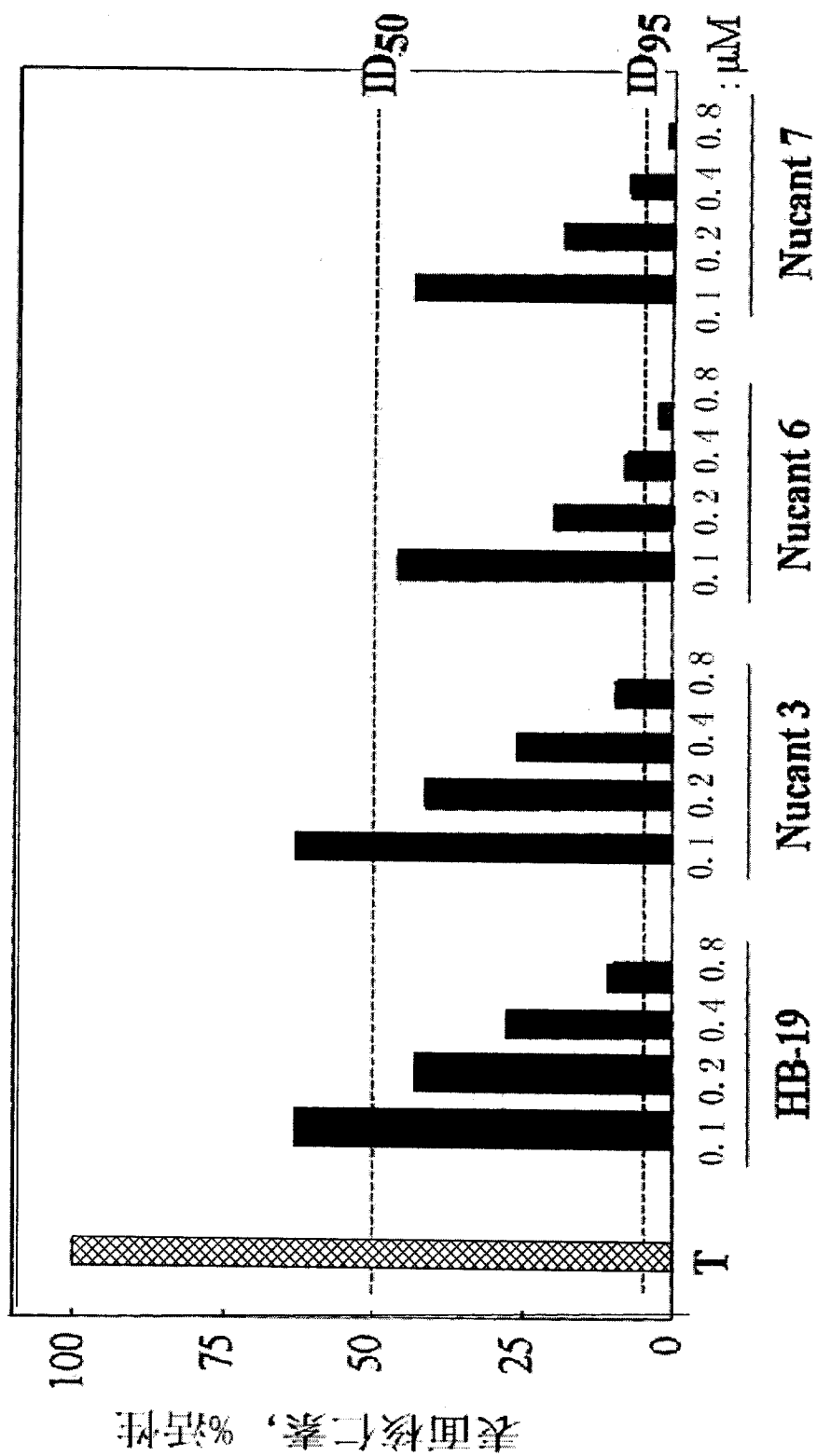


图15

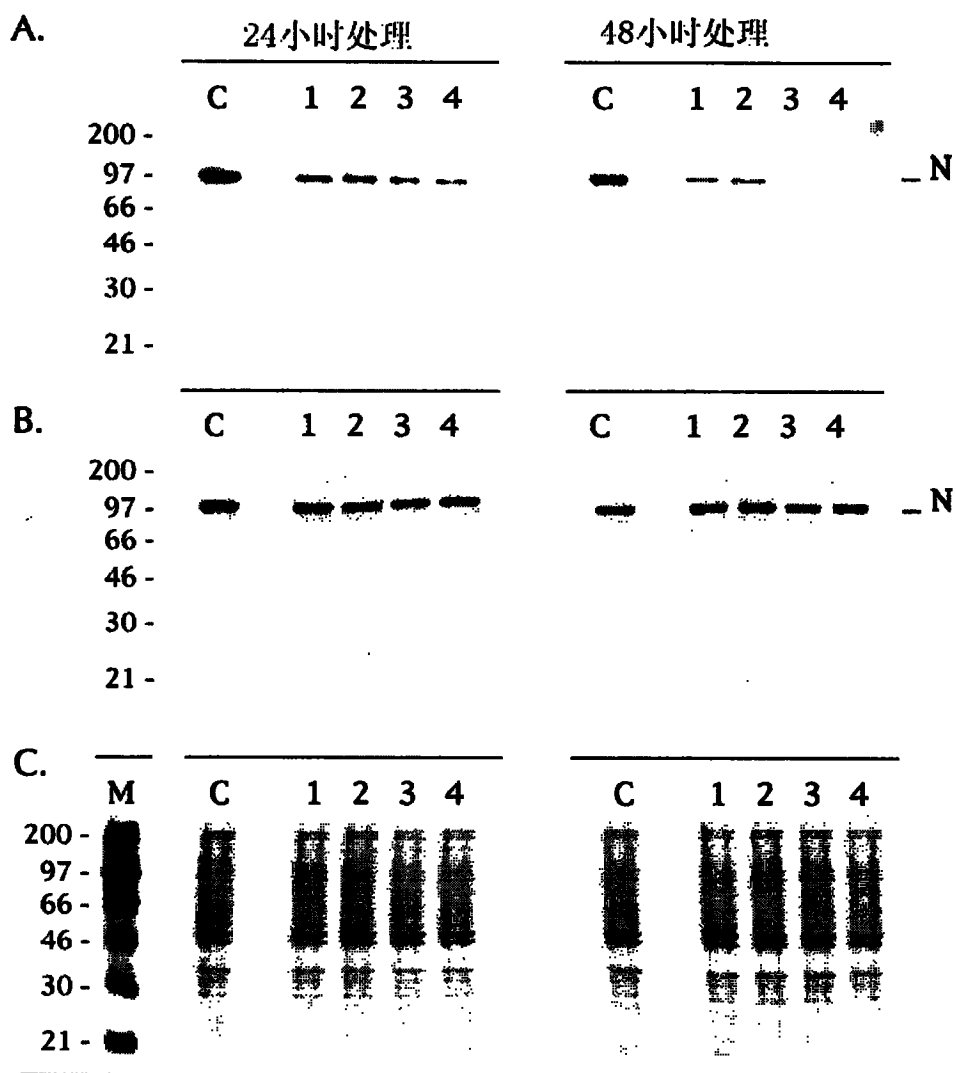
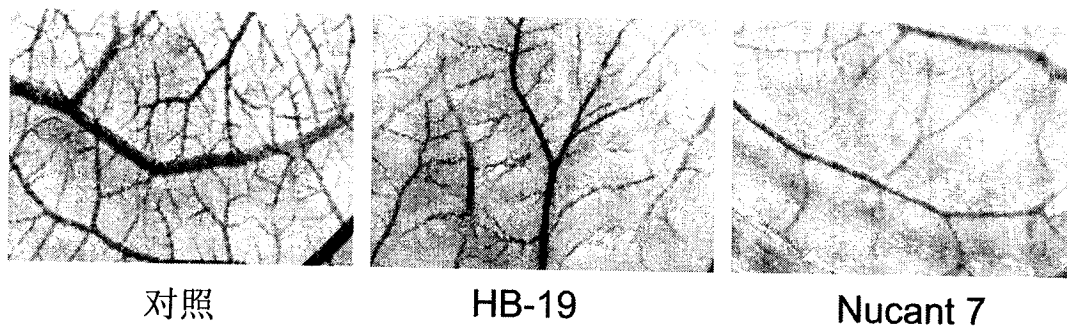


图 16



对照

HB-19

Nucant 7

图 17

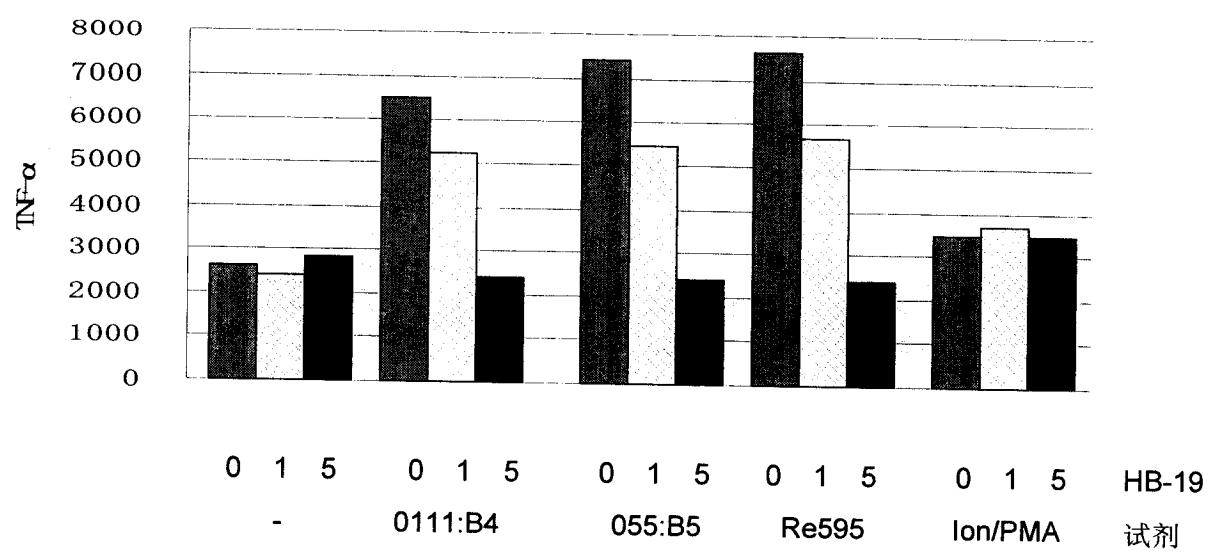


图 18

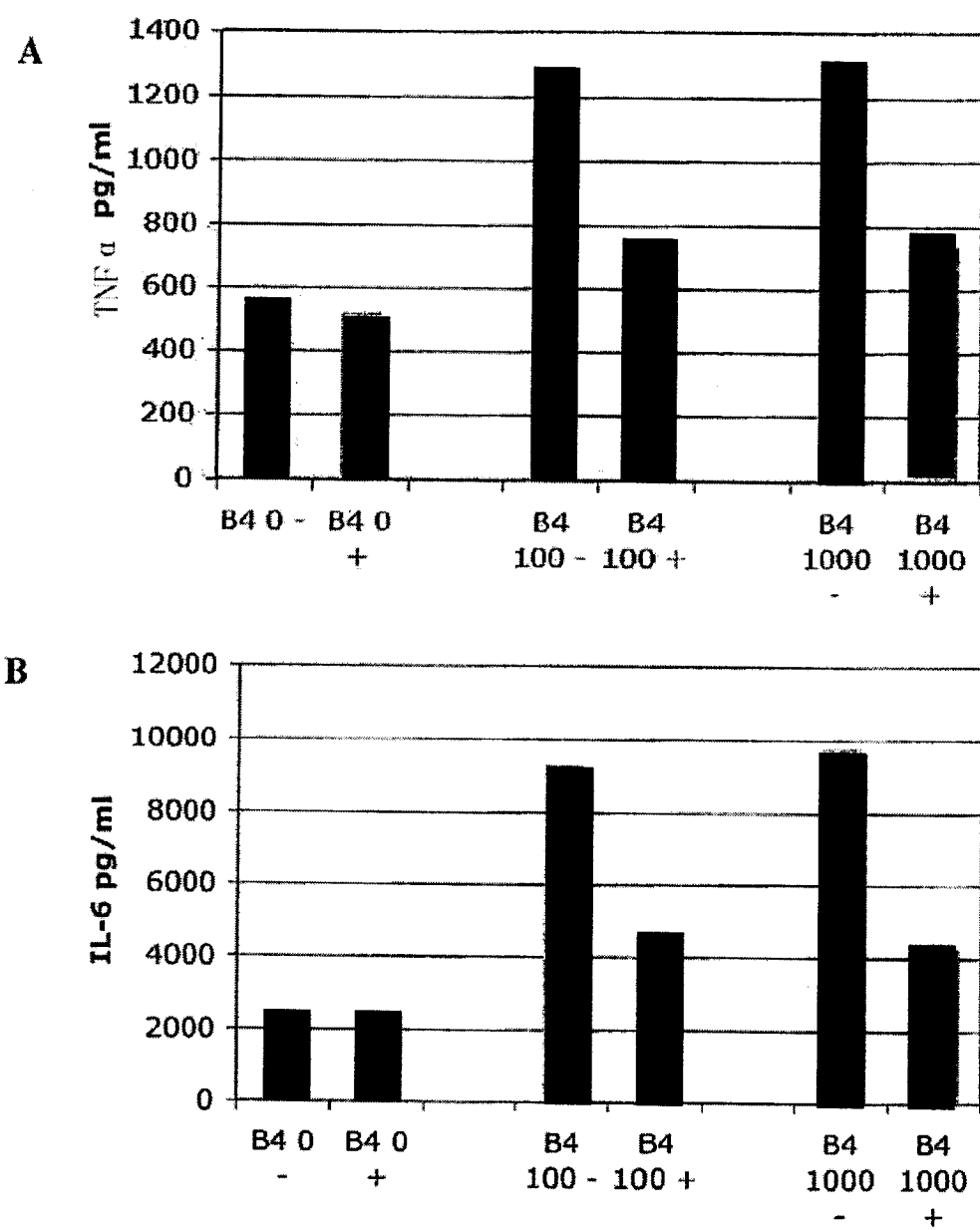


图 19

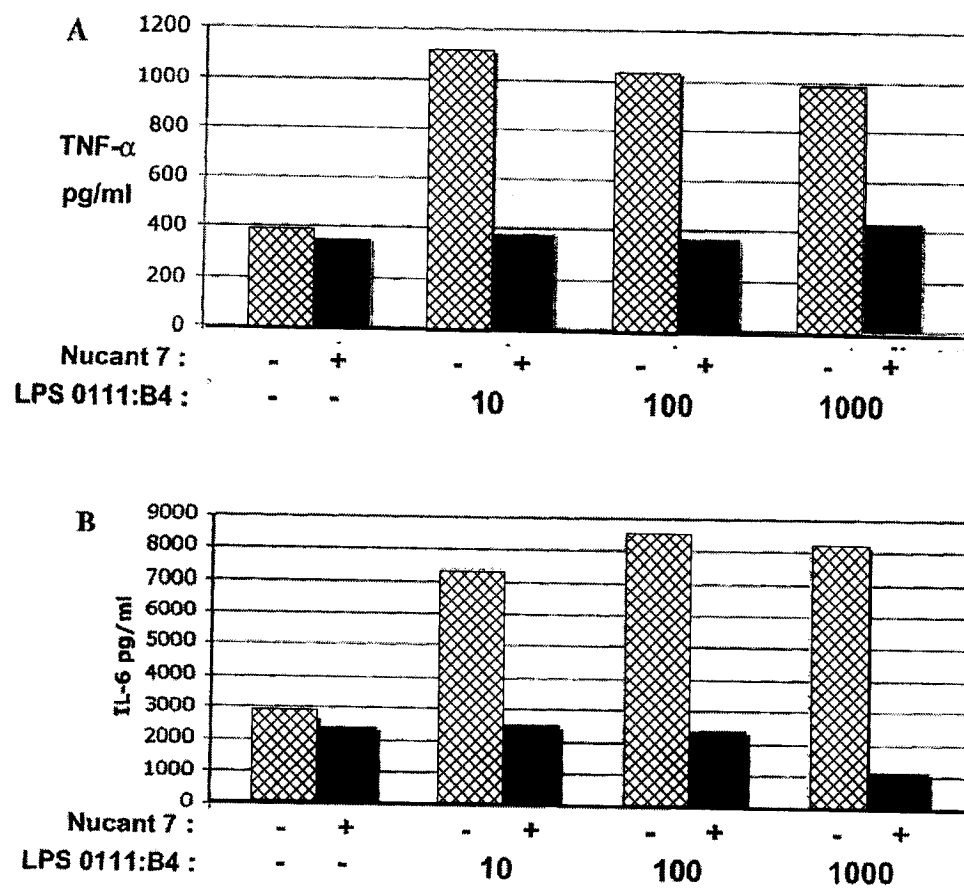


图 20

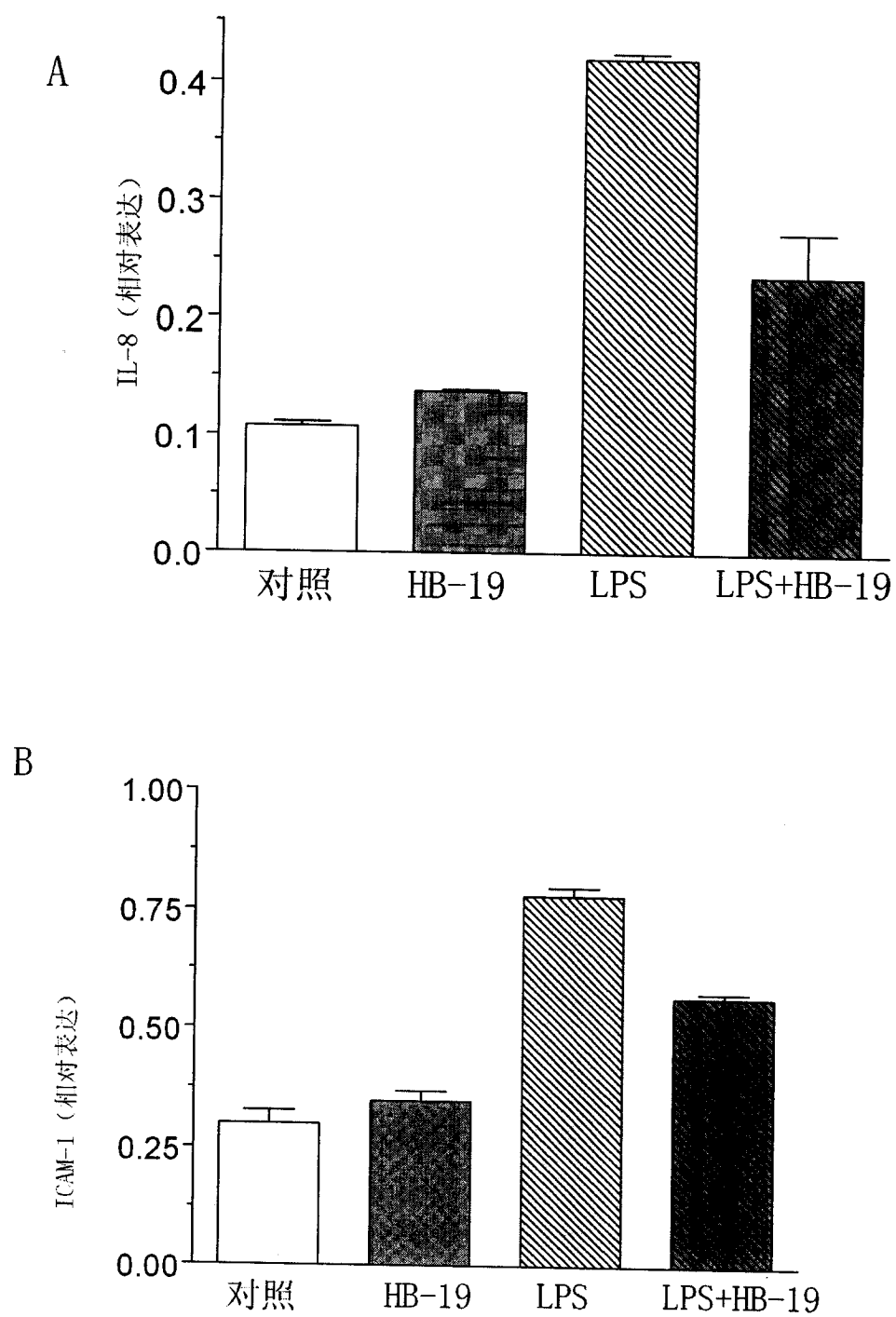


图 21

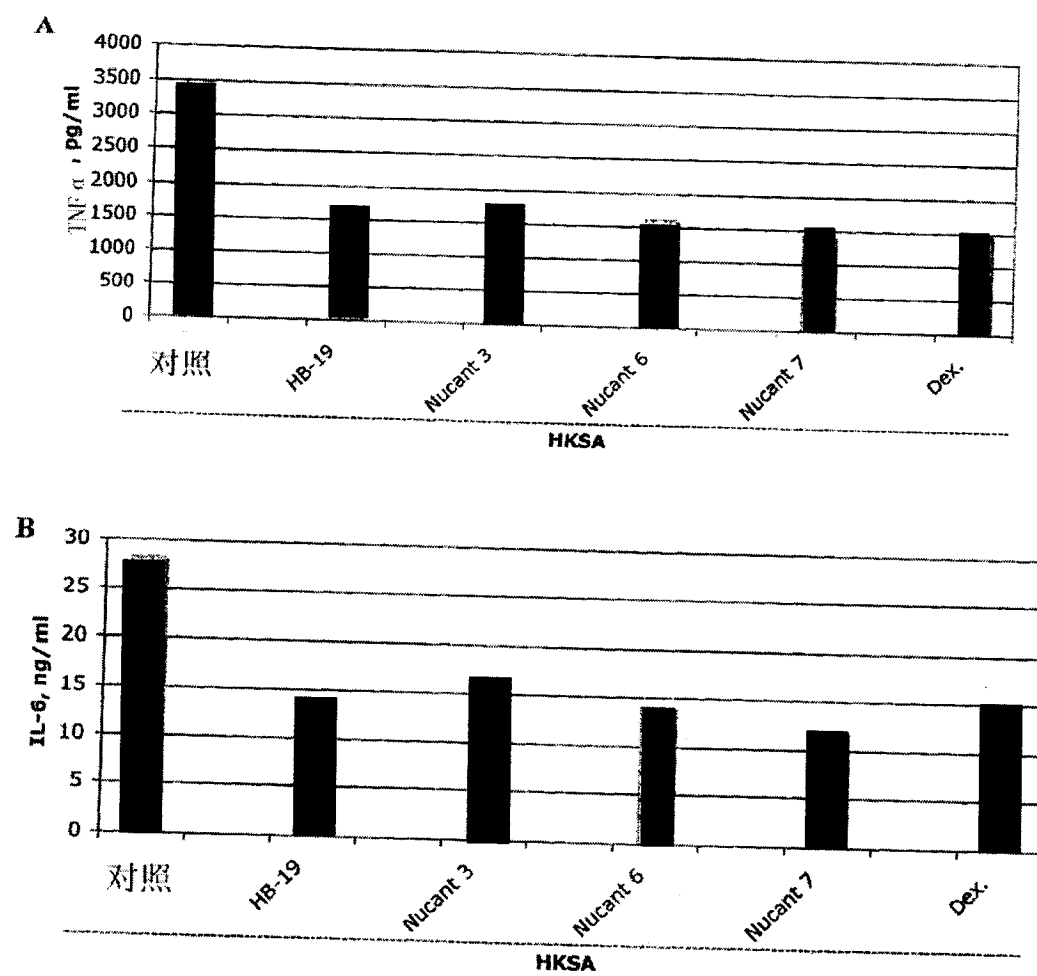


图 22