



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106163537 A

(43)申请公布日 2016. 11. 23

(21)申请号 201480063400.5

玛格丽塔·任

(22)申请日 2014.09.29

(74)专利代理机构 北京同达信恒知识产权代理有限公司 11291

(30)优先权数据

61/884,722 2013.09.30 US

代理人 黄志华 石磊

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2016.05.19

(51)Int.Cl.

A61K 38/00(2006.01)

A61K 38/04(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2014/058049 2014.09.29

(87)PCT国际申请的公布数据

W02015/048647 EN 2015.04.02

(71)申请人 康奈尔大学

地址 美国纽约

(72)发明人 黑兹尔·H·司徒

亚历山大·V·比尔克

保罗·萨博 布莱恩·尹格·赵

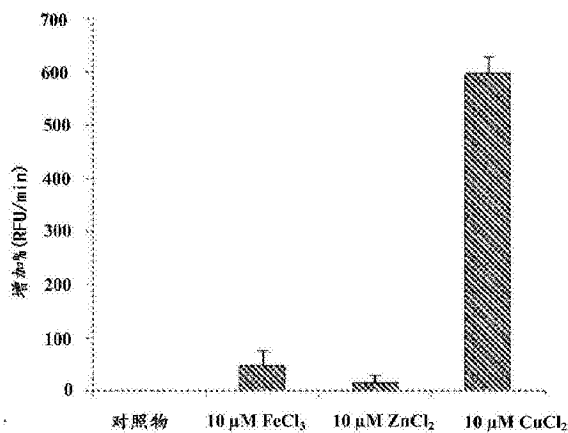
权利要求书2页 说明书45页 附图13页

(54)发明名称

心磷脂靶向肽抑制 β -淀粉样蛋白寡聚物毒性

(57)摘要

本公开内容提供芳香族阳离子肽组合物及其使用方法。所述方法包括所述芳香族阳离子肽用于降低毒性 β -淀粉样蛋白(A β)肽的作用的用途,其包括阻断细胞外A β 寡聚物的积聚、抑制A β 介导的氧合酶活性、降低线粒体功能障碍和/或预防A β 诱发的神经元细胞凋亡。



1. 一种降低在患有与 A β 毒性关联的疾病的受试者中的 β -淀粉样蛋白(A β)诱发的氧化酶活性的方法,其包括向所述受试者施用治疗有效量的芳香族阳离子肽或其医药上可接受的盐。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述芳香族阳离子肽包括选自 2',6'-Dmt-D-Arg-Phe-Lys-NH₂(SS-02)、Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂(SS-20)、D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂(SS-31)和D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Ala-NH₂([ald]SS-31)的一种或多种肽。

3. 根据权利要求1所述的方法,其中所述盐为乙酸盐、酒石酸盐或三氟乙酸盐。

4. 根据权利要求1所述的方法,其中所述芳香族阳离子肽经口、肠胃外、静脉内、皮下、经皮、局部或通过吸入施用。

5. 根据权利要求1所述的方法,其中所述疾病选自阿尔茨海默氏病、路易体痴呆、包涵体肌炎和淀粉样脑血管病。

6. 根据权利要求5所述的方法,其中治疗包括降低或缓解选自记忆丧失、精神激动、情绪摇摆、判断力减弱、痴呆、抽象思维困难、无法胜任原本熟悉的事务、认知困难、定向障碍、沟通技巧减少、重复言语或行动、视觉和空间关系困难、戒除、抑郁、识别丧失、运动技能和触觉丧失、错觉、偏狂症、口头或人身攻击和睡眠障碍的一种或多种阿尔茨海默氏病症状。

7. 一种减少在患有与 A β 毒性关联的疾病的受试者中的细胞外 β -淀粉样蛋白(A β)寡聚物的方法,其包括向所述受试者施用治疗有效量的芳香族阳离子肽或其医药上可接受的盐。

8. 根据权利要求7所述的方法,其中所述芳香族阳离子肽包括选自 2',6'-Dmt-D-Arg-Phe-Lys-NH₂(SS-02)、Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂(SS-20)和D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Ala-NH₂([ald]SS-31)的一种或多种肽。

9. 根据权利要求7所述的方法,其中所述盐为乙酸盐、酒石酸盐或三氟乙酸盐。

10. 根据权利要求7所述的方法,其中所述芳香族阳离子肽经口、肠胃外、静脉内、皮下、经皮、局部或通过吸入施用。

11. 根据权利要求7所述的方法,其中所述疾病选自阿尔茨海默氏病、路易体痴呆、包涵体肌炎和淀粉样脑血管病。

12. 根据权利要求11所述的方法,其中治疗包括降低或缓解选自记忆丧失、精神激动、情绪摇摆、判断力减弱、痴呆、抽象思维困难、无法胜任原本熟悉的事务、认知困难、定向障碍、沟通技巧减少、重复言语或行动、视觉和空间关系困难、戒除、抑郁、识别丧失、运动技能和触觉丧失、错觉、偏狂症、口头或人身攻击和睡眠障碍的一种或多种阿尔茨海默氏病症状。

13. 一种治疗在需要其的受试者中的阿尔茨海默氏病的方法,其包括向需要其的受试者施用治疗有效量的D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Ala-NH₂([ald]SS-31)或其医药上可接受的盐。

14. 根据权利要求13所述的方法,其中治疗包括降低或缓解选自记忆丧失、精神激动、情绪摇摆、判断力减弱、痴呆、抽象思维困难、无法胜任原本熟悉的事务、认知困难、定向障碍、沟通技巧减少、重复言语或行动、视觉和空间关系困难、戒除、抑郁、识别丧失、运动技能和触觉丧失、错觉、偏狂症、口头或人身攻击和睡眠障碍的一种或多种阿尔茨海默氏病症状。

15. 根据权利要求13所述的方法, 其中D-Arg-2', 6'-Dmt-Lys-Ala-NH₂ ([ald]SS-31) 经口、肠胃外、静脉内、皮下、经皮、经局部或通过吸入施用。

16. 根据权利要求13所述的方法, 其中所述盐为乙酸盐、酒石酸盐或三氟乙酸盐。

心磷脂靶向肽抑制 β -淀粉样蛋白寡聚物毒性

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2013年9月30日提交的美国申请号61/884,722的权益和优先权,其通过引用整体结合到本文中来。

技术领域

[0003] 本发明通常涉及芳香族阳离子肽组合物及用于治疗、预防或缓解 β -淀粉样蛋白肽(A β)寡聚物毒性的效应的方法。

背景技术

[0004] 提供以下描述以帮助读者理解。所提到的信息或引用的参考文献中一个也不被承认是现有技术。

[0005] A β 衍生自淀粉样前体蛋白(APP)。APP为在例如神经可塑性和神经突触形成的许多重要神经元功能中涉及的完整糖蛋白。APP的加工通过两种路径执行: α 路径和 β 路径。通常,APP经由 α 路径廓清,其不生成A β 。

[0006] β 路径为淀粉样蛋白路径。进入 β 路径的APP用 β -分泌酶和 γ -分泌酶切割以生成A β 。所生成的A β 可在36-43个氨基酸的大小范围内。最常见的A β 同种型为A β_{1-40} 和A β_{1-42} 。在这两者之中,与A β_{1-40} 相比,A β_{1-42} 更疏水,更趋于聚集且毒性更大。A β_{1-42} 也是在淀粉样斑块中最常见的形式。

发明内容

[0007] 一方面,本发明提供一种治疗或预防与 β -淀粉样蛋白肽(A β)毒性关联的病状或疾病的症状的方法,其包括向需要其的受试者施用治疗有效量的芳香族阳离子肽或其医药上可接受的盐。

[0008] 在所述方法的一些实施方案中,所述芳香族阳离子肽包括选自2',6'-Dmt-D-Arg-Phe-Lys-NH₂(SS-02)、Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂(SS-20)、D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂(SS-31)和D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Ald-NH₂([ald]SS-31)的一种或多种肽。

[0009] 在所述方法的一些实施方案中,所述盐为乙酸盐、酒石酸盐或三氟乙酸盐。

[0010] 在所述方法的一些实施方案中,所述疾病选自阿尔茨海默氏病(Alzheimer's Disease)、路易体痴呆(Dementia with Lewy Bodies)、包涵体肌炎和淀粉样脑血管病。

[0011] 在所述方法的一些实施方案中,治疗包括降低或缓解选自记忆丧失、精神激动、情绪摇摆、判断力减弱、痴呆、抽象思维困难、无法胜任原本熟悉的事务、认知困难、定向障碍、沟通技巧减少、重复言语或行动、视觉和空间关系困难、戒除、抑郁、识别丧失、运动技能和触觉丧失、错觉、偏狂症、口头或人身攻击和睡眠障碍的一种或多种阿尔茨海默氏病症状。

[0012] 在所述方法的一些实施方案中,所述芳香族阳离子肽经口、肠胃外、静脉内、皮下、经皮、经局部或通过吸入施用。

[0013] 另一方面,本发明提供一种降低在患有与A β 毒性关联的疾病的受试者中的 β -淀

粉样蛋白(A β)-诱发的氧合酶活性的方法,其包括向所述受试者施用治疗有效量的芳香族阳离子肽或其医药上可接受的盐。

[0014] 在所述方法的一些实施方案中,所述芳香族阳离子肽包括选自2',6'-Dmt-D-Arg-Phe-Lys-NH₂(SS-02)、Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂(SS-20)、D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂(SS-31)和D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Ala-NH₂([ald]SS-31)的一种或多种肽。

[0015] 在所述方法的一些实施方案中,所述盐为乙酸盐、酒石酸盐或三氟乙酸盐。

[0016] 在所述方法的一些实施方案中,所述疾病选自阿尔茨海默氏病、路易体痴呆、包涵体肌炎和淀粉样脑血管病。

[0017] 在所述方法的一些实施方案中,治疗包括降低或缓解选自记忆丧失、精神激动、情绪摇摆、判断力减弱、痴呆、抽象思维困难、无法胜任原本熟悉的事务、认知困难、定向障碍、沟通技巧减少、重复言语或行动、视觉和空间关系困难、戒除、抑郁、识别丧失、运动技能和触觉丧失、错觉、偏狂症、口头或人身攻击和睡眠障碍的一种或多种阿尔茨海默氏病症状。

[0018] 在所述方法的一些实施方案中,所述芳香族阳离子肽经口、肠胃外、静脉内、皮下、经皮、经局部或通过吸入施用。

[0019] 另一方面,本发明提供一种减少在患有与A β 毒性关联的疾病的受试者中的细胞外 β -淀粉样蛋白(A β)寡聚物的方法,其包括向所述受试者施用治疗有效量的芳香族阳离子肽或其医药上可接受的盐。

[0020] 在所述方法的一些实施方案中,所述芳香族阳离子肽包括选自2',6'-Dmt-D-Arg-Phe-Lys-NH₂(SS-02)、Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂(SS-20)和D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Ala-NH₂([ald]SS-31)的一种或多种肽。

[0021] 在所述方法的一些实施方案中,所述盐为乙酸盐、酒石酸盐或三氟乙酸盐。

[0022] 在所述方法的一些实施方案中,所述芳香族阳离子肽经口、肠胃外、静脉内、皮下、经皮、经局部或通过吸入施用。

[0023] 在所述方法的一些实施方案中,所述疾病选自阿尔茨海默氏病、路易体痴呆、包涵体肌炎和淀粉样脑血管病。

[0024] 在所述方法的一些实施方案中,治疗包括降低或缓解选自记忆丧失、精神激动、情绪摇摆、判断力减弱、痴呆、抽象思维困难、无法胜任原本熟悉的事务、认知困难、定向障碍、沟通技巧减少、重复言语或行动、视觉和空间关系困难、戒除、抑郁、识别丧失、运动技能和触觉丧失、错觉、偏狂症、口头或人身攻击和睡眠障碍的一种或多种阿尔茨海默氏病症状。

[0025] 一方面,本发明提供一种治疗在需要其的受试者中的阿尔茨海默氏病的方法,其包括向需要其的受试者施用治疗有效量的D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Ala-NH₂([ald]SS-31)或其医药上可接受的盐。在所述方法的一些实施方案中,所述盐为乙酸盐、酒石酸盐或三氟乙酸盐。

[0026] 在所述方法的一些实施方案中,治疗包括降低或缓解选自记忆丧失、精神激动、情绪摇摆、判断力减弱、痴呆、抽象思维困难、无法胜任原本熟悉的事务、认知困难、定向障碍、沟通技巧减少、重复言语或行动、视觉和空间关系困难、戒除、抑郁、识别丧失、运动技能和触觉丧失、错觉、偏狂症、口头或人身攻击和睡眠障碍的一种或多种阿尔茨海默氏病症状。

[0027] 在所述方法的一些实施方案中,D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Ala-NH₂([ald]SS-31)经口、肠胃外、静脉内、皮下、经皮、经局部或通过吸入施用。

附图说明

[0028] 图1证实在 Cu^{2+} 离子存在下培育心磷脂和 $\text{A}\beta_{1-42}$ 寡聚物促进 $\text{A}\beta_{1-42}$ 介导的氧合酶活性。各样品含有200 μL 1x PBS pH7.4、50 μM Amplex Red、800nM $\text{A}\beta$ 寡聚物和30 μM 1,1',2,2'-四亚油酰基心磷脂(TLCL)。表示为相对荧光单位(RFU)/分钟的氧合酶活性通过监测在缺乏 H_2O_2 的情况下50 μM Amplex Red试剂的荧光来测定。显示出对于各实验运转而言氧合酶活性相对于对照组的增加%以及连续时程数据。图1A证实 CuCl_2 主动刺激 $\text{A}\beta_{1-42}$ 介导的氧合酶活性。图1B证实 Cu^{2+} 离子(如由 $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ 和 CuCl_2 例示)是刺激 $\text{A}\beta_{1-42}$ 介导的氧合酶活性所必需的。图1C证实 Cu^{2+} 离子剂量依赖性增加 $\text{A}\beta_{1-42}$ 介导的氧合酶活性。

[0029] 图2证实心磷脂同种型1,1',2,2'-四亚油酰基心磷脂(TLCL)是 Cu^{2+} 依赖性刺激 $\text{A}\beta_{1-42}$ 介导的氧合酶活性所需要的。图2A显示不同心磷脂(CL)同种型的结构。心磷脂同种型在其脂肪酸尾处表现出不同的饱和度:1,1',2,2'-四肉豆蔻酰基心磷脂(TMCL)含有饱和脂肪酸尾,1,1',2,2'-四油酰基心磷脂(TOCL)含有在各个尾中具有一个双键的不饱和脂肪酸尾且1,1',2,2'-四亚油酰基心磷脂(TLCL)含有在各个尾中具有两个双键的不饱和脂肪酸尾。在图2B和图2C中,各样品含有200 μL 1x PBS pH7.4、50 μM Amplex Red、800nM $\text{A}\beta$ 寡聚物和30 μM CuCl_2 。表示为相对荧光单位(RFU)/分钟的氧合酶活性通过监测在缺乏 H_2O_2 的情况下50 μM Amplex Red试剂的荧光来测定。显示出对于各实验运转而言氧合酶活性相对于对照组的增加%以及连续时程数据。图2B证实除TLCL以外的磷脂在 Cu^{2+} 离子存在下不能刺激 $\text{A}\beta_{1-42}$ 介导的氧合酶活性。图2C证实TLCL为能够在 Cu^{2+} 离子存在下刺激 $\text{A}\beta_{1-42}$ 介导的氧合酶活性的唯一心磷脂同种型。

[0030] 图3证实TLCL和 $\text{A}\beta$ 寡聚物以剂量依赖方式增加 $\text{A}\beta_{1-42}$ 介导的氧合酶活性。表示为相对荧光单位(RFU)/分钟的氧合酶活性通过监测在缺乏 H_2O_2 的情况下50 μM Amplex Red试剂的荧光来测定。显示出对于各实验运转而言氧合酶活性相对于对照组的增加%以及连续时程数据。在图3A中,各样品含有200 μL 1x PBS pH7.4、50 μM Amplex Red、800nM $\text{A}\beta$ 寡聚物和30 μM CuCl_2 。在图3B中,各样品含有200 μL 1x PBS pH7.4、50 μM Amplex Red、30 μM TLCL和30 μM CuCl_2 。TLCL和 $\text{A}\beta$ 寡聚物的剂量依赖性反应分别示于图3A和图3B中。

[0031] 图4A示出D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂(SS-31)和D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Ald-NH₂([ald]SS-31)的化学结构。图4B证实D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂(SS-31)(由虚线条表示)和D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Ald-NH₂([ald]SS-31)(由实线条表示)抑制 $\text{A}\beta_{1-42}$ 介导的氧合酶活性以剂量依赖性方式的 Cu^{2+} 依赖性刺激。表示为相对荧光单位(RFU)/分钟的氧合酶活性通过监测在缺乏 H_2O_2 的情况下50 μM Amplex Red试剂的荧光来测定。显示出对于涉及D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Ald-NH₂([ald]SS-31)的各实验运转而言氧合酶活性相对于对照组的增加%以及连续时程数据。各样品含有200 μL 1x PBS pH7.4、50 μM Amplex Red、800nM $\text{A}\beta$ 寡聚物、30 μM TLCL和30 μM CuCl_2 。

[0032] 图5示出在存在或缺乏1 μM $\text{A}\beta$ 的情况下aladan和D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Ald-NH₂([ald]SS-31)(1 μM , $\lambda_{\text{ex}}=360\text{nm}$)的荧光发射光谱。图5示出在将 $\text{A}\beta$ 加到D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Ald-NH₂([ald]SS-31)中时的发射最大值(λ_{max})的位移和荧光强度的增加。

[0033] 图6示出在40 μM $\text{A}\beta$ 存在下aladan、D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂(SS-31)和D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Ald-NH₂([ald]SS-31)的混浊度数据。将仅含有 $\text{A}\beta$ 寡聚物的样品用作

参考。图6示出在将A β 加到D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Ald-NH₂([ald]SS-31)中时散射光强度增加,这指示混浊度较高。

[0034] 图7A为A β 寡聚物的电子显微照片。图7B示出在使A β 寡聚物与D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Ald-NH₂([ald]SS-31)接触时A β 原纤维形成的不同阶段。图7C为在A β 寡聚物与D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Ald-NH₂([ald]SS-31)接触时生成的A β 原纤维的电子显微照片。图7D为天然形成的A β 原纤维的电子显微照片。

具体实施方式

[0035] 应当了解本发明的某些方面、模式、实施方案、变化和特点在下文以不同的详细水平描述以提供本发明的基本理解。如本说明书中使用的某些数据的定义在下文中提供。除非另外定义,否则本文使用的所有技术术语和科学术语一般具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解相同的含义。

[0036] 在实践本公开内容中,使用细胞生物学、分子生物学、蛋白质生物化学、免疫学和细菌学的许多常规技术。这些技术是本领域众所周知的,并且在许多可得到的出版物中提供,包括Current Protocols in molecular Biology,第I-III卷,Ausubel编(1997); Sambrook等,Molecular Cloning: A Laboratory Manual,第二版(Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989)。

[0037] 如本说明书和所附权利要求中所使用,单数形式“一个/种”和“所述/该”包括复数个所指对象,除非内容另有明确说明。例如,提及“单元”包括两种或多种单元的组合等。

[0038] 本文使用的试剂、药物或肽向受试者的“施用”包括将化合物引入或递送至受试者以执行其预定功能的任何途径。施用可通过任何合适途径进行,包括经口、经鼻、肠胃外(静脉内、肌内、腹膜内或皮下)、局部、经表皮、经直肠、皮内、经皮、吸入、动脉内、大脑内、骨内、鞘内、离子电渗、经眼、阴道内等。施用包括自施用和通过另一者的施用。

[0039] 如本文使用的术语“氨基酸”包括天然存在的氨基酸和合成氨基酸,以及氨基酸类似物和氨基酸模拟物,其以类似于天然存在的氨基酸的方式起作用。天然存在的氨基酸为由遗传密码编码的氨基酸,以及后来修饰的氨基酸,例如羟脯氨酸、 γ -羧基谷氨酸盐和O-磷酸丝氨酸。氨基酸类似物是指如下化合物,其具有与天然存在的氨基酸相同的基本化学结构,即与氢、羧基、氨基和R基结合的 α -碳,例如高丝氨酸、正亮氨酸、甲硫氨酸亚砷、甲硫氨酸甲基砷。这类类似物具有经修饰的R基(例如,正亮氨酸)或经修饰的肽主链,但保留与天然存在的氨基酸相同的基本化学结构。氨基酸模拟物是指如下化学化合物,其具有不同于氨基酸的一般化学结构的结构,但以类似于天然存在的氨基酸的方式起作用。氨基酸在本文中可由其通常已知的三字母符号或由IUPAC-IUB生物化学命名委员会推荐的单字母符号提及。

[0040] 本文使用的术语“有效量”是指足以实现所需治疗和/或预防效果的量。在治疗或预防应用的背景下,对受试者施用的组合物量将取决于疾病的类型和严重性,以及个体的特征,例如一般健康、年龄、性别、体重和对药物的耐受性。它还将取决于疾病的程度、严重性和类型。根据这些及其他因素,技术人员将能够确定适当剂量。组合物还可与一种或多种另外的治疗性化合物组合施用。

[0041] “分离的”或“纯化的”多肽或肽基本上不含来自试剂源自其的细胞或组织来源的

细胞材料或其他污染多肽,或当化学合成时,基本上不含化学前体或其他化学品。例如,分离的芳香族阳离子肽或分离的细胞色素C蛋白质将不含将干扰试剂的诊断或治疗用途或将干扰肽的电导或电子性质的材料。所述干扰材料可包括酶、激素及其他蛋白质性和非蛋白质性溶质。

[0042] 本文使用的术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”在本文中可互换使用以指包含通过肽键或经修饰的肽键彼此连接的两个或多个氨基酸的聚合物,即肽等排物。多肽是指通常称为肽、糖肽或寡聚物的短链和一般称为蛋白质的更长链两者。多肽可含有除20种基因编码的氨基酸以外的氨基酸。多肽包括通过例如翻译后加工的天然过程或通过本领域众所周知的化学修饰技术进行修饰的氨基酸序列。

[0043] 本文使用的术语“单独”治疗使用是指在同一时间或基本相同的时间通过不同的途径施用至少两种活性成分。

[0044] 本文使用的术语“顺序”治疗使用是指在不同的时间施用至少两种活性成分,施用途径相同或不同。更特定地讲,顺序使用是指在一种或多种其他活性成分的施用开始之前,完全施用所述活性成分中的一种。因此,可以在施用一种或多种其他活性成分之前的若干分钟、若干小时或若干天施用所述活性成分中的一种。在这种情况下没有同时治疗。

[0045] 本文使用的术语“同时”治疗使用是指通过相同的途径且在同一时间或基本相同的时间施用至少两种活性成分。

[0046] 本文使用的术语“受试者”、“个体”或“患者”可为个体生物、脊椎动物、哺乳动物或人类。

[0047] 本文使用的“增效治疗效果”是指由至少两种治疗剂的组合生成且超过另外将由所述至少两种治疗剂的唯一施用产生的效果的大于相加的治疗效果。一种优势可包括但不限于一种或多种治疗剂在治疗医学疾病或病状中的剂量减低,产生增加的治疗功效和减小的副作用。

[0048] 本文使用的“治疗有效量”的化合物是指至少缓解疾病或病症的生理作用的化合物水平。治疗有效量可在一次或多次施用中给出。构成治疗有效量的化合物的量将根据所述化合物、病症及其严重性和待治疗的受试者的一般健康、年龄、性别、体重和对药物的耐受性而变,但可由本领域的普通技术人员常规地确定。

[0049] 本文使用的术语“治疗”或“缓解”涵盖对在例如人类的受试者中的本文所述的疾病或病症的治疗,且包括:(i)抑制疾病或病症,即中止其发展;(ii)减轻疾病或病症,即引起病症消退;(iii)减缓病症进展;和/或(iv)抑制、减轻或减缓疾病或病症的一种或多种症状。

[0050] 本文使用的“预防”病症或病状是指相对于未治疗的对照样品降低治疗过的样品中的病症或病状的出现,或者相对于未治疗的对照样品,延迟病症或病状的一种或多种症状的发作。

[0051] 还应该了解如所述的治疗或预防医学病状的各种模式意图是指“显著”,其包括完全治疗或预防以及小于完全治疗或预防,且其中实现了一些生物学或医学相关的结果。

[0052] 芳香族阳离子肽

[0053] 本发明涉及芳香族阳离子肽的用途。在一些实施方案中,至少一种芳香族阳离子肽可用于与治疗或缓解以 β 淀粉样蛋白肽(A β)的过度表达为特征的症状、病状或疾病有关

的方面。另外或供选地,在一些实施方案中,至少一种芳香族阳离子肽可用于与治疗或缓解以 A β 和/或 A β 斑块在脑中积聚或过度表达为特征的症状、病状或疾病有关的方面。另外或供选地,在一些实施方案中,至少一种芳香族阳离子肽可用于与治疗或缓解以 A β 寡聚物的积聚或过度表达为特征的症状、病状或疾病有关的方面。

[0054] 所述芳香族阳离子肽为水溶性的且高极性的。尽管有这些性质,所述肽可容易地穿透细胞膜。所述芳香族阳离子肽通常包括由肽键共价连接的最少三个氨基酸或最少四个氨基酸。在所述芳香族阳离子肽中存在的氨基酸的最大数目为由肽键共价连接的约二十个氨基酸。合适地,氨基酸的最大数目为约十二个、约九个或约六个。

[0055] 所述芳香族阳离子肽的氨基酸可为任何氨基酸。本文使用的术语“氨基酸”用以指含有至少一个氨基和至少一个羧基的任何有机分子。通常,至少一个氨基在相对于羧基的位置处。所述氨基酸可为天然存在的。天然存在的氨基酸包括例如在哺乳动物蛋白质中通常发现的二十种最常见的左旋(L)氨基酸,即丙氨酸(Ala)、精氨酸(Arg)、天冬酰胺(Asn)、天冬氨酸(Asp)、半胱氨酸(Cys)、谷氨酰胺(Gln)、谷氨酸(Glu)、甘氨酸(Gly)、组氨酸(His)、异亮氨酸(Ile)、亮氨酸(Leu)、赖氨酸(Lys)、甲硫氨酸(Met)、苯丙氨酸(Phe)、脯氨酸(Pro)、丝氨酸(Ser)、苏氨酸(Thr)、色氨酸(Trp)、酪氨酸(Tyr)和缬氨酸(Val)。其他天然存在的氨基酸包括例如在与蛋白质合成不相关的代谢过程中合成的氨基酸。例如,氨基酸鸟氨酸和瓜氨酸在尿素生产期间的哺乳动物代谢中合成。天然存在的氨基酸的另一实例包括羟脯氨酸(Hyp)。

[0056] 所述肽任选含有一种或多种非天然存在的氨基酸。最佳地,所述肽没有天然存在的氨基酸。所述天然存在的氨基酸可为左旋的(L-)、右旋的(D-)或其混合物。非天然存在的氨基酸为通常在活生物体中的正常代谢过程中未合成并且在蛋白质中未天然存在的那些氨基酸。此外,所述非天然存在的氨基酸合适地也不由常见蛋白酶识别。所述天然存在的氨基酸可存在于肽中的任何位置处。例如,非天然存在的氨基酸可在N-末端、C-末端或在N-末端和C-末端之间的任何位置处。

[0057] 所述非天然氨基酸可例如包含在天然氨基酸中未发现的烷基、芳基或烷基芳基。非天然烷基氨基酸的一些实例包括 α -氨基丁酸、 β -氨基丁酸、 γ -氨基丁酸、 δ -氨基戊酸和 ϵ -氨基己酸。非天然芳基氨基酸的一些实例包括邻氨基苯甲酸、间氨基苯甲酸和对氨基苯甲酸。非天然烷基芳基氨基酸的一些实例包括邻-、间-和对-氨基苯基乙酸和 γ -苯基- β -氨基丁酸。非天然存在的氨基酸包括天然存在的氨基酸的衍生物。天然存在的氨基酸的衍生物可例如包括一个或多个化学基团加成到天然存在的氨基酸。

[0058] 例如,一个或多个化学基团可加到苯丙氨酸或酪氨酸残基的芳香族环的2'、3'、4'、5'或6'位置或者色氨酸残基的苯并环的4'、5'、6'或7'位置中的一个或多个。所述基团可为可加到芳香族环的任何化学基团。所述基团的一些实例包括包括分支或未分支的C₁-C₄烷基,例如甲基、乙基、正丙基、异丙基、丁基、异丁基或叔丁基;C₁-C₄烷氧基(即,烷氧基)、氨基、C₁-C₄烷基氨基和C₁-C₄二烷基氨基(例如,甲基氨基、二甲氨基)、硝基、羟基、卤素(即,氟、氯、溴或碘)。天然存在的氨基酸的非天然存在的衍生物的一些具体实例包括正缬氨酸(Nva)和正亮氨酸(Nle)。

[0059] 在肽中的氨基酸修饰的另一实例为肽的天冬氨酸或谷氨酸残基的羧基的衍生化。一个衍生化实例为用氨或伯胺或仲胺酰胺化,所述伯胺或仲胺例如为甲胺、乙胺、二甲胺或

二乙胺。另一衍生化实例包括用例如甲醇或乙醇酯化。另一种这样的修饰包括赖氨酸、精氨酸或组氨酸残基的氨基的衍生化。例如,所述氨基可为酰化的。一些合适的酰基包括例如苯甲酰基或包含上文提及的C₁-C₄烷基中的任一个的烷酰基,例如乙酰基或丙酰基。

[0060] 非天然存在的氨基酸合适地对常见蛋白酶是抗性或不敏感的。对蛋白酶为抗性或不敏感的非天然存在的氨基酸的实例包括右旋(D-)形式的上述天然存在的L-氨基酸中的任一种,以及L-和/或D-非天然存在的氨基酸。D-氨基酸通常不存在于蛋白质中,尽管它们在某些肽抗生素中发现,所述肽抗生素由除细胞的正常核糖体蛋白合成机制以外的方法合成。本文使用的D-氨基酸被视为非天然存在的氨基酸。

[0061] 为了使蛋白酶敏感性减至最低,所述肽应具有由常见蛋白酶识别的小于五个、小于四个、小于三个或小于两个邻接L-氨基酸,与氨基酸是天然存在的还是非天然存在的无关。在一个实施方案中,所述肽仅具有D-氨基酸,而没有L-氨基酸。如果所述肽含有蛋白酶敏感的氨基酸序列,则所述氨基酸中的至少一个优选为非天然存在的D-氨基酸,由此赋予蛋白酶抗性。蛋白酶敏感序列的实例包括由例如内肽酶和胰蛋白酶的常见蛋白酶容易切割的两个或多个邻接的碱性氨基酸。碱性氨基酸的实例包括精氨酸、赖氨酸和组氨酸。

[0062] 与在肽中的氨基酸残基总数目相比较,芳香族阳离子肽在生理学pH下应具有最小数目的净正电荷。在生理学pH下的净正电荷的最小数目在下文中将称为(p_m)。在肽中的氨基酸残基总数目在下文中将称为(r)。下文论述的净正电荷的最小数目均在生理学pH下。本文使用的术语“生理学pH”是指在哺乳动物身体的组织和器官的细胞中的正常pH。例如,人类的生理学pH通常为大约7.4,但在哺乳动物中的正常生理学pH可为约7.0-约7.8的任何pH。

[0063] 本文使用的“净电荷”是指由在肽中存在的氨基酸携带的正电荷数目和负电荷数目的平衡。在本说明书中,应当理解净电荷在生理学pH下测量。在生理学pH下带正电的天然存在的氨基酸包括L-赖氨酸、L-精氨酸和L-组氨酸。在生理学pH下带负电的天然存在的氨基酸包括L-天冬氨酸和L-谷氨酸。

[0064] 通常,肽具有带正电的N-末端氨基和带负电的C-末端羧基。电荷在生理学pH下彼此抵消。作为计算净电荷的实例,肽Tyr-Arg-Phe-Lys-Glu-His-Trp-D-Arg具有一个带负电的氨基酸(即,Glu)和四个带正电的氨基酸(即,两个Arg残基、一个Lys和一个His)。因此,上述肽具有3个净正电荷。

[0065] 在一个实施方案中,所述芳香族阳离子肽具有在生理学pH下的净正电荷的最小数目(p_m)和氨基酸残基的总数目(r)之间的关系为:其中 $3p_m$ 为小于或等于 $r+1$ 的最大数。在该实施方案中,净正电荷的最小数目(p_m)和氨基酸残基总数目(r)之间的关系如下:

[0066] 表1. 氨基酸数目和净正电荷($3p_m < p+1$)

[0067]

(r)	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
(p_m)	1	1	2	2	2	3	3	3	4	4	4	5	5	5	6	6	6	7

[0068] 在另一实施方案中,所述芳香族阳离子肽具有净正电荷的最小数目(p_m)和氨基酸残基的总数目(r)之间的关系为:其中 $2p_m$ 为小于或等于 $r+1$ 的最大数。在该实施方案中,净

正电荷的最小数目(p_m)和氨基酸残基总数目(r)之间的关系如下:

[0069] 表2. 氨基酸数目和净正电荷($2p_m < p+1$)

[0070]

(r)	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
(p_m)	2	2	3	3	4	4	5	5	6	6	7	7	8	8	9	9	10	10

[0071] 在一个实施方案中,净正电荷的最小数目(p_m)和氨基酸残基的总数目(r)相等。在另一实施方案中,所述肽具有三个或四个氨基酸残基和最少一个净正电荷,合适地最少两个净正电荷且更优选最少三个净正电荷。

[0072] 同样重要的是,所述芳香族阳离子肽具有与净正电荷的总数目(p_t)相比较最小数目的芳香族基团。芳香族基团的最小数目在下文将称为(a)。具有芳香族基团的天然存在的氨基酸包括氨基酸组氨酸、色氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸。例如,六肽具有2个净正电荷(由赖氨酸残基和精氨酸残基贡献)以及3个芳香族基团(由酪氨酸、苯丙氨酸和色氨酸残基贡献)。

[0073] 所述芳香族阳离子肽还应具有在芳香族基团的最小数目(a)和在生理学pH下的净正电荷的总数目(p_t)之间的关系为:其中 $3a$ 为小于或等于 p_t+1 的最大数,除了当 p_t 是1时, a 也可1之外。在该实施方案中,在芳香族基团的最小数目(a)和净正电荷的总数目(p_t)之间的关系如下:

[0074] 表3. 芳香族基团和净正电荷($3a < p_t+1$ 或 $a = p_t = 1$)

[0075]

(p_t)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
(a)	1	1	1	1	2	2	2	3	3	3	4	4	4	5	5	5	6	6	6	7

[0076] 在另一实施方案中,所述芳香族阳离子肽具有在芳香族基团的最小数目(a)和净正电荷的总数目(p_t)之间的关系为:其中 $2a$ 为小于或等于 p_t+1 的最大数。在该实施方案中,在芳香族氨基酸残基的最小数目(a)和净正电荷的总数目(p_t)之间的关系如下:

[0077] 表4. 芳香族基团和净正电荷($2a < p_t+1$ 或 $a = p_t = 1$)

[0078]

(p_t)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
(a)	1	1	2	2	3	3	4	4	5	5	6	6	7	7	8	8	9	9	10	10

[0079] 在另一实施方案中,芳香族基团的数目(a)和净正电荷的总数目(p_t)相等。

[0080] 特别是C-末端氨基酸的末端羧基的羧基合适地用例如氨酰胺化,以形成C-末端酰胺。或者,C-末端氨基酸的末端羧基可用任一伯胺或仲胺酰胺化。所述伯胺或仲胺可例如为烷基,特别是分支或无分支的 C_1 - C_4 烷基或芳基胺。

[0081] 相应地,在肽的C-末端处的氨基酸可转化成酰胺基、N-甲基酰胺基、N-乙基酰胺基、N,N-二甲基酰胺基、N,N-二乙基酰胺基、N-甲基-N-乙基酰胺基、N-苯基酰胺基或N-苯基-N-乙基酰胺基。未存在于芳香族阳离子肽的C-末端处的天冬酰胺、谷氨酰胺、天冬氨酸和谷氨酸残基的游离羧酸酯基团也可被酰胺化,不论它们是否存在于所述肽内。在这些内部位置处的酰胺化可为用氨或上述伯胺或仲胺中的任一种。

[0082] 在一个实施方案中,所述芳香族阳离子肽为具有两个净正电荷和至少一个芳香族氨基酸的三肽。在一个特定的实施方案中,所述芳香族阳离子肽为具有2个净正电荷和2个芳香族氨基酸的三肽。

[0083] 又一方面,本发明提供芳香族阳离子肽或例如乙酸盐、酒石酸盐或三氟乙酸盐的其医药上可接受的盐。在一些实施方案中,所述肽包括

[0084] 1.至少一个净正电荷;

[0085] 2.最少3个氨基酸;

[0086] 3.最多约20个氨基酸;

[0087] 4.净正电荷的最小数目(p_m)和氨基酸残基的总数目(r)之间的关系为:其中 $3p_m$ 为小于或等于 $r+1$ 的最大数;和

[0088] 5.在芳香族基团的最小数目(a)和净正电荷的总数目(p_t)之间的关系为:其中 $2a$ 为小于或等于 p_t+1 的最大数,除了当 a 为1时, p_t 也可1之外。

[0089] 在一些实施方案中,所述肽包含氨基酸序列。Tyr-D-Arg-Phe-Lys-NH₂(SS-01)、2',6'-Dmt-D-Arg-Phe-Lys-NH₂(SS-02)、Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂(SS-20)或D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂(SS-31)。在一些实施方案中,所述肽包含下述中的一种或多种:

[0090] D-Arg-Dmt-Lys-Trp-NH₂;

[0091] D-Arg-Trp-Lys-Trp-NH₂;

[0092] D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-Met-NH₂;

[0093] H-D-Arg-Dmt-Lys(N^qMe)-Phe-NH₂;

[0094] H-D-Arg-Dmt-Lys-Phe(NMe)-NH₂;

[0095] H-D-Arg-Dmt-Lys(N^qMe)-Phe(NMe)-NH₂;

[0096] H-D-Arg(N^qMe)-Dmt(NMe)-Lys(N^qMe)-Phe(NMe)-NH₂;

[0097] D-Arg-Dmt-Lys-Phe-Lys-Trp-NH₂;

[0098] D-Arg-Dmt-Lys-Dmt-Lys-Trp-NH₂;

[0099] D-Arg-Dmt-Lys-Phe-Lys-Met-NH₂;

[0100] D-Arg-Dmt-Lys-Dmt-Lys-Met-NH₂;

[0101] H-D-Arg-Dmt-Lys-Phe-Sar-Gly-Cys-NH₂;

[0102] H-D-Arg-Ψ[CH₂-NH]Dmt-Lys-Phe-NH₂;

[0103] H-D-Arg-Dmt-Ψ[CH₂-NH]Lys-Phe-NH₂;

[0104] H-D-Arg-Dmt-Lys-Ψ[CH₂-H]Phe-NH₂;

[0105] H-D-Arg-Dmt-Ψ[CH₂-NH]Lys-Ψ[CH₂-NH]Phe-NH₂;

[0106] Lys-D-Arg-Tyr-NH₂;

[0107] Tyr-D-Arg-Phe-Lys-NH₂;

[0108] 2',6'-Dmt-D-Arg-Phe-Lys-NH₂;

[0109] Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂;

[0110] Phe-D-Arg-Dmt-Lys-NH₂;

[0111] D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂;

[0112] H-Phe-D-Arg-Phe-Lys-Cys-NH₂;

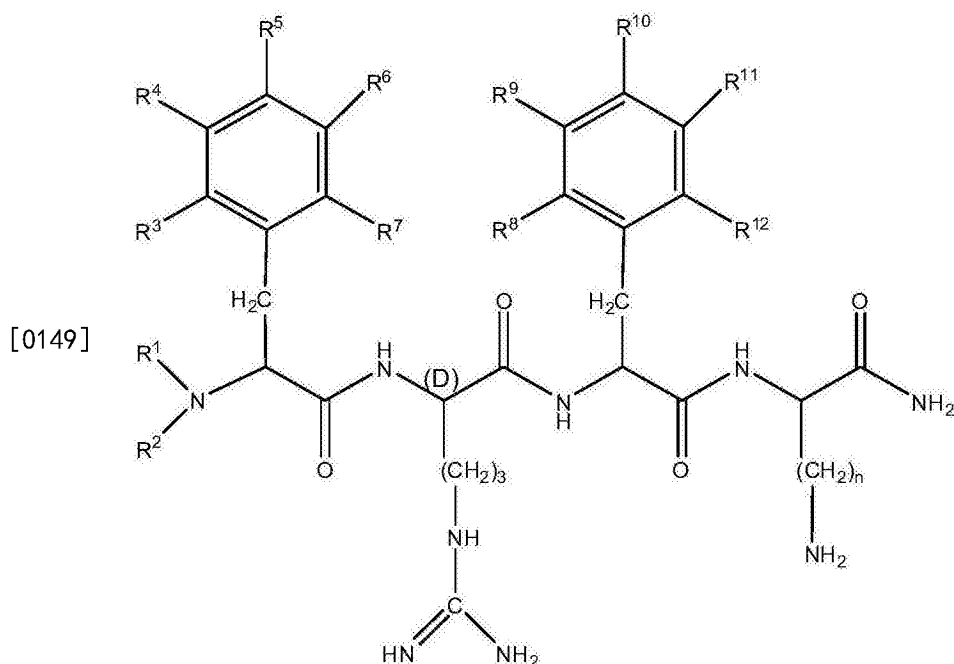
[0113] Lys-D-Arg-Tyr-NH₂;

[0114] D-Tyr-Trp-Lys-NH₂;

[0115] Trp-D-Lys-Tyr-Arg-NH₂;

[0116] Tyr-His-D-Gly-Met;

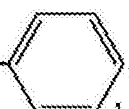
- [0117] Tyr-D-Arg-Phe-Lys-Glu-NH₂;
- [0118] Met-Tyr-D-Lys-Phe-Arg;
- [0119] D-His-Glu-Lys-Tyr-D-Phe-Arg;
- [0120] Lys-D-Gln-Tyr-Arg-D-Phe-Trp-NH₂;
- [0121] Phe-D-Arg-Lys-Trp-Tyr-D-Arg-His;
- [0122] Gly-D-Phe-Lys-Tyr-His-D-Arg-Tyr-NH₂;
- [0123] Val-D-Lys-His-Tyr-D-Phe-Ser-Tyr-Arg-NH₂;
- [0124] Trp-Lys-Phe-D-Asp-Arg-Tyr-D-His-Lys;
- [0125] Lys-Trp-D-Tyr-Arg-Asn-Phe-Tyr-D-His-NH₂;
- [0126] Thr-Gly-Tyr-Arg-D-His-Phe-Trp-D-His-Lys;
- [0127] Asp-D-Trp-Lys-Tyr-D-His-Phe-Arg-D-Gly-Lys-NH₂;
- [0128] D-His-Lys-Tyr-D-Phe-Glu-D-Asp-D-His-D-Lys-Arg-Trp-NH₂;
- [0129] Ala-D-Phe-D-Arg-Tyr-Lys-D-Trp-His-D-Tyr-Gly-Phe;
- [0130] Tyr-D-His-Phe-D-Arg-Asp-Lys-D-Arg-His-Trp-D-His-Phe;
- [0131] Phe-Phe-D-Tyr-Arg-Glu-Asp-D-Lys-Arg-D-Arg-His-Phe-NH₂;
- [0132] Phe-Tyr-Lys-D-Arg-Trp-His-D-Lys-D-Lys-Glu-Arg-D-Tyr-Thr;
- [0133] Tyr-Asp-D-Lys-Tyr-Phe-D-Lys-D-Arg-Phe-Pro-D-Tyr-His-Lys;
- [0134] Glu-Arg-D-Lys-Tyr-D-Val-Phe-D-His-Trp-Arg-D-Gly-Tyr-Arg-D-Met-NH₂;
- [0135] Arg-D-Leu-D-Tyr-Phe-Lys-Glu-D-Lys-Arg-D-Trp-Lys-D-Phe-Tyr-D-Arg-Gly;
- [0136] D-Glu-Asp-Lys-D-Arg-D-His-Phe-Phe-D-Val-Tyr-Arg-Tyr-D-Tyr-Arg-His-Phe-NH₂;
- [0137] Asp-Arg-D-Phe-Cys-Phe-D-Arg-D-Lys-Tyr-Arg-D-Tyr-Trp-D-His-Tyr-D-Phe-Lys-Phe;
- [0138] His-Tyr-D-Arg-Trp-Lys-Phe-D-Asp-Ala-Arg-Cys-D-Tyr-His-Phe-D-Lys-Tyr-His-Ser-NH₂;
- [0139] Gly-Ala-Lys-Phe-D-Lys-Glu-Arg-Tyr-His-D-Arg-D-Arg-Asp-Tyr-Trp-D-His-Trp-His-D-Lys-Asp;
- [0140] Thr-Tyr-Arg-D-Lys-Trp-Tyr-Glu-Asp-D-Lys-D-Arg-His-Phe-D-Tyr-Gly-Val-Ile-D-His-Arg-Tyr-Lys-NH₂;
- [0141] Dmt-D-Arg-Phe-(atn)Dap-NH₂, 其中(atn)Dap为β-邻氨基苯甲酰-L-α,β-二氨基丙酸;
- [0142] Dmt-D-Arg-Ald-Lys-NH₂, 其中Ald为β-(6'-二甲氨基-2'-萘甲酰基)丙氨酸;
- [0143] Dmt-D-Arg-Phe-Lys-Ald-NH₂, 其中Ald为β-(6'-二甲氨基-2'-萘甲酰基)丙氨酸;
- [0144] Dmt-D-Arg-Phe-(dns)Dap-NH₂, 其中(dns)Dap为β-丹磺酰-L-α,β-二氨基丙酸;
- [0145] D-Arg-Tyr-Lys-Phe-NH₂; 和
- [0146] D-Arg-Tyr-Lys-Phe-NH₂。
- [0147] 在一些实施方案中,“Dmt”是指2',6'-二甲基酪氨酸(2',6'-Dmt)或3',5'-二甲基酪氨酸(3',5'-Dmt)。
- [0148] 在一些实施方案中,所述肽由式I定义:



[0150] 其中 R^1 和 R^2 各自独立地选自

[0151] (i)氢；

[0152] (ii)线性或分支的 C_1 - C_6 烷基；

[0153] (iii) $\text{---}(\text{CH}_2)_m\text{---}$  其中 $m=1-3$ ；

[0154] (iv) $\text{---}\text{C}(\text{H}_2)\text{---}$ ；

[0155] (v) $\text{---}\text{C}(\text{H}_2)\text{---}\text{C}(\text{H})=\text{CH}_2$ ；

[0156] R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 、 R^{10} 、 R^{11} 和 R^{12} 各自独立地选自

[0157] (i)氢；

[0158] (ii)线性或分支的 C_1 - C_6 烷基；

[0159] (iii) C_1 - C_6 烷氧基；

[0160] (iv)氨基；

[0161] (v) C_1 - C_4 烷基氨基；

[0162] (vi) C_1 - C_4 二烷基氨基；

[0163] (vii)硝基；

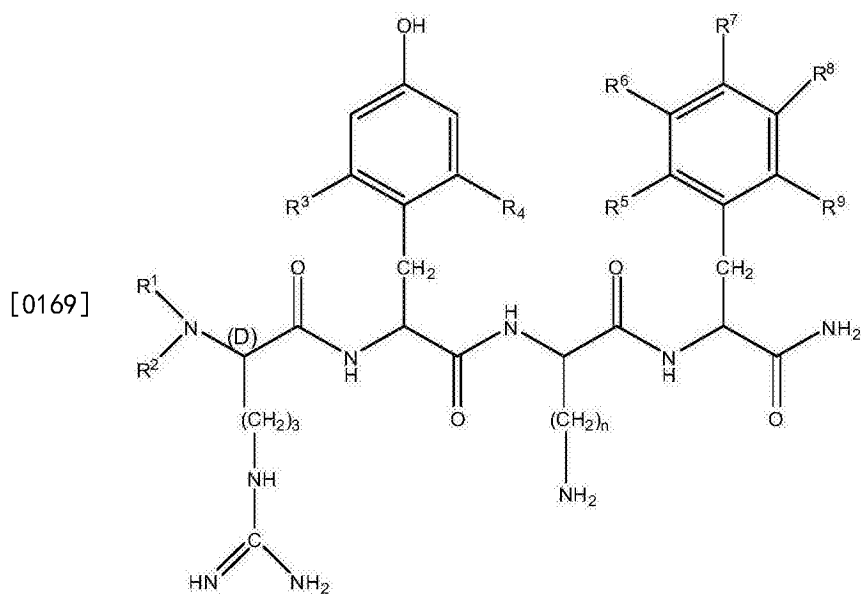
[0164] (viii)羟基；

[0165] (ix)卤素，其中“卤素”包括氯、氟、溴和碘；且

[0166] n 为1-5的整数。

[0167] 在一些实施方案中， R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 、 R^{10} 、 R^{11} 和 R^{12} 全部为氢；且 n 为4。在另一实施方案中， R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 和 R^{11} 全部为氢； R^8 和 R^{12} 为甲基； R^{10} 为羟基；且 n 为4。

[0168] 在一些实施方案中，所述肽由式II限定：



[0170] 其中 R^1 和 R^2 各自独立地选自

[0171] (i)氢；

[0172] (ii)线性或分支的 C_1 - C_6 烷基；

[0173] (iii) $\text{---}(\text{CH}_2)_m\text{---}$ 其中 $m=1-3$ ；

[0174] (iv) $\text{---}(\text{CH}_2)_m\text{---}$ 其中 $m=1-3$ ；

[0175] (v) $\text{---}(\text{CH}_2)_m\text{---}$ 其中 $m=1-3$ ；

[0176] R^3 和 R^4 各自独立地选自

[0177] (i)氢；

[0178] (ii)线性或分支的 C_1 - C_6 烷基；

[0179] (iii) C_1 - C_6 烷氧基；

[0180] (iv)氨基；

[0181] (v) C_1 - C_4 烷基氨基；

[0182] (vi) C_1 - C_4 二烷基氨基；

[0183] (vii)硝基；

[0184] (viii)羟基；

[0185] (ix)卤素，其中“卤素”包括氯、氟、溴和碘；

[0186] R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 和 R^9 各自独立地选自

[0187] (i)氢；

[0188] (ii)线性或分支的 C_1 - C_6 烷基；

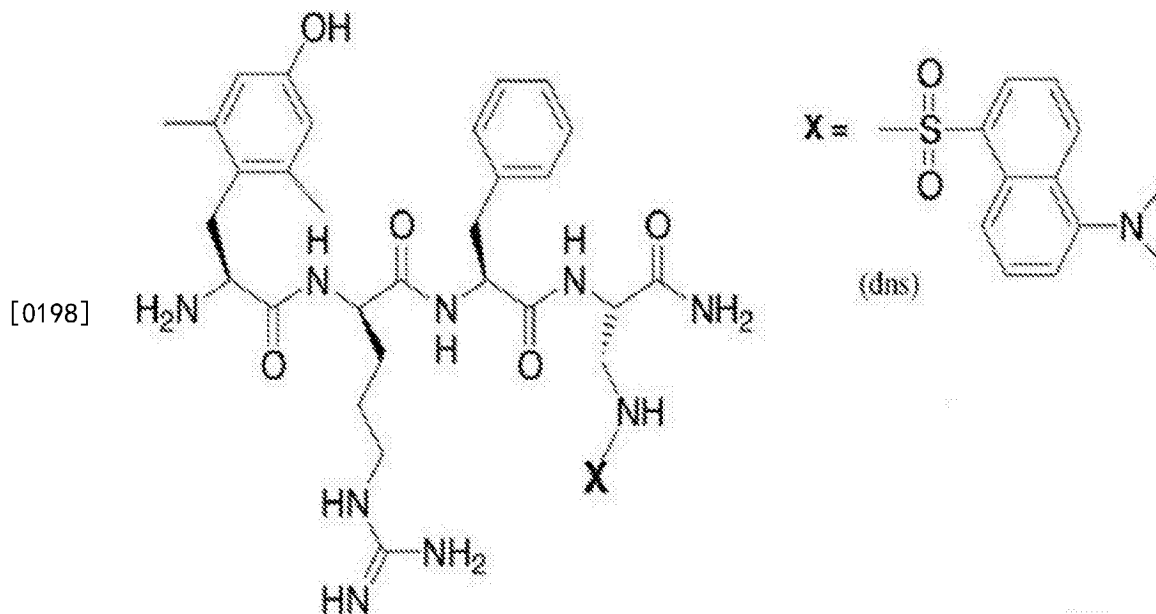
[0189] (iii) C_1 - C_6 烷氧基；

[0190] (iv)氨基；

[0191] (v) C_1 - C_4 烷基氨基；

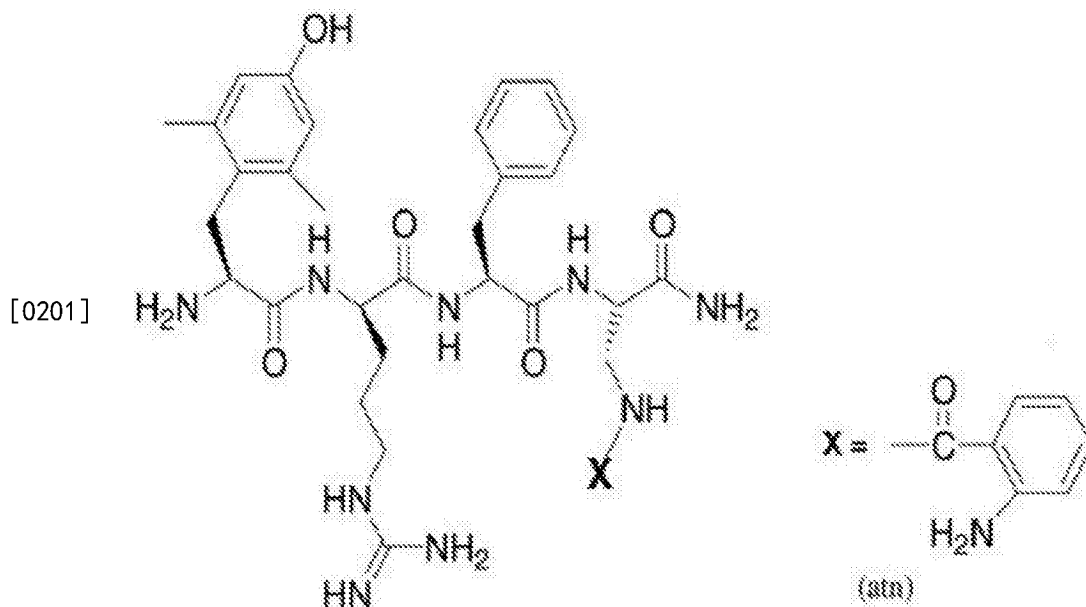
[0192] (vi) C_1 - C_4 二烷基氨基；

- [0193] (vii)硝基；
 [0194] (viii)羟基；
 [0195] (ix)卤素，其中“卤素”包括氯、氟、溴和碘；且
 [0196] n为1-5的整数。
 [0197] 在一些实施方案中，所述肽由下式限定：



[0199] 还表示为2',6'-Dmt-D-Arg-Phe-(dns)Dap-NH₂，其中(dns)Dap为β-丹磺酰-L-α,β-二氨基丙酸(SS-17)。

[0200] 在一些实施方案中，所述肽由下式限定：



[0202] 还表示为2',6'-Dmt-D-Arg-Phe-(atn)Dap-NH₂，其中(atn)Dap为β-邻氨基苯甲酰-L-α,β-二氨基丙酸(SS-19)。SS-19也称作[atn]SS-02。

[0203] 在一个特定的实施方案中，R¹和R²为氢；R³和R⁴为甲基；R⁵、R⁶、R⁷、R⁸和R⁹全部为氢；且n为4。

[0204] 在一个实施方案中，所述芳香族阳离子肽具有交替的芳香族和阳离子氨基酸的核

心结构基元。例如,所述肽可为由下文所阐述的式III-VI中的任一个限定的四肽:

[0205] 芳香族-阳离子-芳香族-阳离子(式III)

[0206] 阳离子-芳香族-阳离子-芳香族(式IV)

[0207] 芳香族-芳香族-阳离子-阳离子(式V)

[0208] 阳离子-阳离子-芳香族-芳香族(式VI)

[0209] 其中芳香族为选自:Phe(F)、Tyr(Y)、Trp(W)和环己基丙氨酸(Cha)的残基;且阳离子为选自Arg(R)、Lys(K)、正亮氨酸(Nle)和2-氨基庚酸(Ahe)的残基。

[0210] 在一些实施方案中,本文所述的芳香族阳离子肽包括所有左旋(L)氨基酸。

[0211] 在一个实施方案中,所述芳香族阳离子肽具有

[0212] 1.至少一个净正电荷;

[0213] 2.最少3个氨基酸;

[0214] 3.最多约20个氨基酸;

[0215] 4.净正电荷的最小数目(p_m)和氨基酸残基的总数目(r)之间的关系为:其中 $3p_m$ 为小于或等于 $r+1$ 的最大数;和

[0216] 5.在芳香族基团的最小数目(a)和净正电荷的总数目(p_t)之间的关系为:其中 $2a$ 为小于或等于 p_t+1 的最大数,除了当 a 为1时, p_t 也可不为1之外。

[0217] 在另一实施方案中,本发明提供降低经历线粒体通透性转换(MPT)的线粒体数目或预防在哺乳动物的移除器官中的线粒体通透性转换或者治疗或缓解以 $A\beta$ 诱发的线粒体功能障碍为特征的症状、病状或疾病的方法。所述方法包括向所述移除器官施用有效量的具有以下特性的芳香族阳离子肽:

[0218] 至少一个净正电荷;

[0219] 最少3个氨基酸;

[0220] 最多约20个氨基酸;

[0221] 净正电荷的最小数目(p_m)和氨基酸残基的总数目(r)之间的关系为:其中 $3p_m$ 为小于或等于 $r+1$ 的最大数;和

[0222] 在芳香族基团的最小数目(a)和净正电荷的总数目(p_t)之间的关系为:其中 $2a$ 为小于或等于 p_t+1 的最大数,除了当 a 为1时, p_t 也可不为1之外。

[0223] 在另一实施方案中,本发明提供降低经历线粒体通透性转换(MPT)的线粒体数目或预防在需要其的哺乳动物中的线粒体通透性转换或者治疗或缓解以 $A\beta$ 诱发的线粒体功能障碍为特征的症状、病状或疾病的方法。所述方法包括向所述哺乳动物施用有效量的具有以下特性的芳香族阳离子肽:

[0224] 至少一个净正电荷;

[0225] 最少3个氨基酸;

[0226] 最多约20个氨基酸;

[0227] 净正电荷的最小数目(p_m)和氨基酸残基的总数目(r)之间的关系为:其中 $3p_m$ 为小于或等于 $r+1$ 的最大数;和

[0228] 在芳香族基团的最小数目(a)和净正电荷的总数目(p_t)之间的关系为:其中 $3a$ 为小于或等于 p_t+1 的最大数,除了当 a 为1时, p_t 也可不为1之外。

[0229] 芳香族阳离子肽包括但不限于以下说明性肽:

- [0230] H-Phe-D-Arg Phe-Lys-Cys-NH₂;
- [0231] D-Arg-Dmt-Lys-Trp-NH₂;
- [0232] D-Arg-Trp-Lys-Trp-NH₂;
- [0233] D-Arg-Dmt-Lys-Phe-Met-NH₂;
- [0234] H-D-Arg-Dmt-Lys(N^αMe)-Phe-NH₂;
- [0235] H-D-Arg-Dmt-Lys-Phe(NMe)-NH₂;
- [0236] H-D-Arg-Dmt-Lys(N^αMe)-Phe(NMe)-NH₂;
- [0237] H-D-Arg(N^αMe)-Dmt(NMe)-Lys(N^αMe)-Phe(NMe)-NH₂;
- [0238] D-Arg-Dmt-Lys-Phe-Lys-Trp-NH₂;
- [0239] D-Arg-Dmt-Lys-Dmt-Lys-Trp-NH₂;
- [0240] D-Arg-Dmt-Lys-Phe-Lys-Met-NH₂;
- [0241] D-Arg-Dmt-Lys-Dmt-Lys-Met-NH₂;
- [0242] H-D-Arg-Dmt-Lys-Phe-Sar-Gly-Cys-NH₂;
- [0243] H-D-Arg-Ψ[CH₂-NH]Dmt-Lys-Phe-NH₂;
- [0244] H-D-Arg-Dmt-Ψ[CH₂-NH]Lys-Phe-NH₂;
- [0245] H-D-Arg-Dmt-Lys-Ψ[CH₂-NH]Phe-NH₂; 和
- [0246] H-D-Arg-Dmt-Ψ[CH₂-NH]Lys-Ψ[CH₂-NH]Phe-NH₂;
- [0247] Tyr-D-Arg-Phe-Lys-NH₂;
- [0248] 2',6'-Dmt-D-Arg-Phe-Lys-NH₂;
- [0249] Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂;
- [0250] Phe-D-Arg-Dmt-Lys-NH₂;
- [0251] D-Arg-2'6'Dmt-Lys-Phe-NH₂;
- [0252] H-Phe-D-Arg-Phe-Lys-Cys-NH₂;
- [0253] Lys-D-Arg-Tyr-NH₂;
- [0254] D-Tyr-Trp-Lys-NH₂;
- [0255] Trp-D-Lys-Tyr-Arg-NH₂;
- [0256] Tyr-His-D-Gly-Met;
- [0257] Tyr-D-Arg-Phe-Lys-Glu-NH₂;
- [0258] Met-Tyr-D-Lys-Phe-Arg;
- [0259] D-His-Glu-Lys-Tyr-D-Phe-Arg;
- [0260] Lys-D-Gln-Tyr-Arg-D-Phe-Trp-NH₂;
- [0261] Phe-D-Arg-Lys-Trp-Tyr-D-Arg-His;
- [0262] Gly-D-Phe-Lys-Tyr-His-D-Arg-Tyr-NH₂;
- [0263] Val-D-Lys-His-Tyr-D-Phe-Ser-Tyr-Arg-NH₂;
- [0264] Trp-Lys-Phe-D-Asp-Arg-Tyr-D-His-Lys;
- [0265] Lys-Trp-D-Tyr-Arg-Asn-Phe-Tyr-D-His-NH₂;
- [0266] Thr-Gly-Tyr-Arg-D-His-Phe-Trp-D-His-Lys;
- [0267] Asp-D-Trp-Lys-Tyr-D-His-Phe-Arg-D-Gly-Lys-NH₂;
- [0268] D-His-Lys-Tyr-D-Phe-Glu-D-Asp-D-His-D-Lys-Arg-Trp-NH₂;

- [0269] Ala-D-Phe-D-Arg-Tyr-Lys-D-Trp-His-D-Tyr-Gly-Phe;
- [0270] Tyr-D-His-Phe-D-Arg-Asp-Lys-D-Arg-His-Trp-D-His-Phe;
- [0271] Phe-Phe-D-Tyr-Arg-Glu-Asp-D-Lys-Arg-D-Arg-His-Phe-NH₂;
- [0272] Phe-Tyr-Lys-D-Arg-Trp-His-D-Lys-D-Lys-Glu-Arg-D-Tyr-Thr;
- [0273] Tyr-Asp-D-Lys-Tyr-Phe-D-Lys-D-Arg-Phe-Pro-D-Tyr-His-Lys;
- [0274] Glu-Arg-D-Lys-Tyr-D-Val-Phe-D-His-Trp-Arg-D-Gly-Tyr-Arg-D-Met-NH₂;
- [0275] Arg-D-Leu-D-Tyr-Phe-Lys-Glu-D-Lys-Arg-D-Trp-Lys-D-Phe-Tyr-D-Arg-Gly;
- [0276] D-Glu-Asp-Lys-D-Arg-D-His-Phe-Phe-D-Val-Tyr-Arg-Tyr-D-Tyr-Arg-His-Phe-NH₂;
- [0277] Asp-Arg-D-Phe-Cys-Phe-D-Arg-D-Lys-Tyr-Arg-D-Tyr-Trp-D-His-Tyr-D-Phe-Lys-Phe;
- [0278] His-Tyr-D-Arg-Trp-Lys-Phe-D-Asp-Ala-Arg-Cys-D-Tyr-His-Phe-D-Lys-Tyr-His-Ser-NH₂;
- [0279] Gly-Ala-Lys-Phe-D-Lys-Glu-Arg-Tyr-His-D-Arg-D-Arg-Asp-Tyr-Trp-D-His-Trp-His-D-Lys-Asp; 和
- [0280] Thr-Tyr-Arg-D-Lys-Trp-Tyr-Glu-Asp-D-Lys-D-Arg-His-Phe-D-Tyr-Gly-Val-Ile-D-His-Arg-Tyr-Lys-NH₂;
- [0281] Dmt-D-Arg-Phe-(atn)Dap-NH₂, 其中(atn)Dap为β-邻氨基苯甲酰-L-α,β-二氨基丙酸;
- [0282] Dmt-D-Arg-Phe-(dns)Dap-NH₂, 其中(dns)Dap为β-丹磺酰-L-α,β-二氨基丙酸;
- [0283] Dmt-D-Arg-Ald-Lys-NH₂, 其中Ald为β-(6'-二甲氨基-2'-萘甲酰基)丙氨酸;
- [0284] Dmt-D-Arg-Phe-Lys-Ald-NH₂, 其中Ald为β-(6'-二甲氨基-2'-萘甲酰基)丙氨酸和D-Arg-Tyr-Lys-Phe-NH₂; 和
- [0285] D-Arg-Tyr-Lys-Phe-NH₂。
- [0286] 在一些实施方案中,可在本发明的方法中使用的肽为具有酪氨酸残基或酪氨酸衍生物的那些肽。在一些实施方案中,酪氨酸的衍生物包括2'-甲基酪氨酸(Mmt); 2',6'-二甲基酪氨酸(2',6'-Dmt); 3',5'-二甲基酪氨酸(3',5'-Dmt); N,2',6'-三甲基酪氨酸(Tmt); 和2'-羟基-6'-甲基酪氨酸(Hmt)。
- [0287] 在一个实施方案中,所述肽具有式Tyr-D-Arg-Phe-Lys-NH₂(在本文中称为SS-01)。SS-01具有由氨基酸酪氨酸、精氨酸和赖氨酸贡献的3个净正电荷且具有由氨基酸苯丙氨酸和酪氨酸贡献的2个芳香族基团。SS-01的酪氨酸可为酪氨酸的改性衍生物,例如,2',6'-二甲基酪氨酸,以生成具有式2',6'-Dmt-D-Arg-Phe-Lys-NH₂的化合物(在本文中称为SS-02)。
- [0288] 在一个合适的实施方案中,在N-末端的氨基酸残基为精氨酸。这样的肽的一个实例为D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂(在本文中称为SS-31)。
- [0289] 在另一实施方案中,在N-末端的氨基酸为苯丙氨酸或其衍生物。在一些实施方案中,苯丙氨酸的衍生物包括2'-甲基苯丙氨酸(Mmp)、2',6'-二甲基苯丙氨酸(Dmp)、N,2',6'-三甲基苯丙氨酸(Tmp)和2'-羟基-6'-甲基苯丙氨酸(Hmp)。这样的肽的一个实例为Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂(在本文中称为SS-20)。在一个实施方案中,SS-02的氨基酸序列进行重

排使得Dmt不位于N-末端。这样的芳香族阳离子肽的一个实例具有式D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂(SS-31)。

[0290] 在另一实施方案中,所述芳香族阳离子肽具有式Phe-D-Arg-Dmt-Lys-NH₂(在本文中称为SS-30)。或者,N-末端苯丙氨酸可为苯丙氨酸的衍生物,例如2',6'-二甲基苯丙氨酸(2',6'-Dmp)。在氨基酸位置1处含有2',6'-二甲基苯丙氨酸的SS-01具有式2',6'-Dmp-D-Arg-Dmt-Lys-NH₂。

[0291] 在一些实施方案中,所述芳香族阳离子肽包括2',6'-Dmt-D-Arg-Phe-(atn)Dap-NH₂(SS-19),其中(atn)Dap为β-邻氨基苯甲酰-L-α,β-二氨基丙酸;2',6'-Dmt-D-Arg-Ald-Lys-NH₂(SS-36),其中Ald为β-(6'-二甲基氨基-2'-萘甲酰基)丙氨酸;2',6'-Dmt-D-Arg-Phe-Lys-Ald-NH₂(SS-37),其中Ald为β-(6'-二甲基氨基-2'-萘甲酰基)丙氨酸;D-Arg-Tyr-Lys-Phe-NH₂(SPI-231);和2',6'-Dmt-D-Arg-Phe-(dns)Dap-NH₂,其中(dns)Dap为β-丹磺酰-L-α,β-二氨基丙酸(SS-17)。

[0292] 本文提到的肽及其衍生物还可包括功能类似物。如果类似物具有与所陈述的肽相同的功能,则肽被视为功能类似物。所述类似物可例如为肽的取代变体,其中一个或多个氨基酸被另一氨基酸取代。所述肽的合适取代变体包括保守氨基酸取代。氨基酸可根据其物理化学性质而进行如下分组:

[0293] (a)非极性氨基酸:Ala(A)Ser(S)Thr(T)Pro(P)Gly(G)Cys(C);

[0294] (b)酸性氨基酸:Asn(N)Asp(D)Glu(E)Gln(Q);

[0295] (c)碱性氨基酸:His(H)Arg(R)Lys(K);

[0296] (d)疏水氨基酸:Met(M)Leu(L)Ile(I)Val(V);和

[0297] (e)芳香族氨基酸:Phe(F)Tyr(Y)Trp(W)His(H)。

[0298] 在肽中的氨基酸被同一组中的另一氨基酸取代称为保守取代,且可以保留原始肽的物理化学性质。相比之下,在肽中的氨基酸被不同组中的另一氨基酸取代通常更可能改变原始肽的特性。可用于实施本发明的类似物的非限制性实例包括但不限于在表5中示出的芳香族阳离子肽。

[0299] 表5.肽类似物的实例

[0300]

氨基酸 位置 1	氨基酸 位置 2	氨基酸 位置 3	氨基酸 位置 4	氨基酸 位置 5	氨基酸 位置 6	氨基酸 位置 7	C-末端 修饰
D-Arg	Dmt	Lys	Phe				NH ₂
D-Arg	Dmt	Phe	Lys				NH ₂
D-Arg	Phe	Lys	Dmt				NH ₂
D-Arg	Phe	Dmt	Lys				NH ₂
D-Arg	Lys	Dmt	Phe				NH ₂
D-Arg	Lys	Phe	Dmt				NH ₂
D-Arg	Dmt	Lys	Phe	Cys			NH ₂
D-Arg	Dmt	Lys	Phe	Glu	Cys	Gly	NH ₂
D-Arg	Dmt	Lys	Phe	Ser	Cys		NH ₂
D-Arg	Dmt	Lys	Phe	Gly	Cys		NH ₂
Phe	Lys	Dmt	D-Arg				NH ₂
Phe	Lys	D-Arg	Dmt				NH ₂
Phe	D-Arg	Phe	Lys				NH ₂
Phe	D-Arg	Phe	Lys	Cys			NH ₂
Phe	D-Arg	Phe	Lys	Glu	Cys	Gly	NH ₂
Phe	D-Arg	Phe	Lys	Ser	Cys		NH ₂
Phe	D-Arg	Phe	Lys	Gly	Cys		NH ₂
Phe	D-Arg	Dmt	Lys				NH ₂
Phe	D-Arg	Dmt	Lys	Cys			NH ₂
Phe	D-Arg	Dmt	Lys	Glu	Cys	Gly	NH ₂
Phe	D-Arg	Dmt	Lys	Ser	Cys		NH ₂
Phe	D-Arg	Dmt	Lys	Gly	Cys		NH ₂
Phe	D-Arg	Lys	Dmt				NH ₂
Phe	Dmt	D-Arg	Lys				NH ₂
Phe	Dmt	Lys	D-Arg				NH ₂

[0301]

氨基酸 位置 1	氨基酸 位置 2	氨基酸 位置 3	氨基酸 位置 4	氨基酸 位置 5	氨基酸 位置 6	氨基酸 位置 7	C-末端 修饰
Lys	Phe	D-Arg	Dmt				NH ₂
Lys	Phe	Dmt	D-Arg				NH ₂
Lys	Dmt	D-Arg	Phe				NH ₂
Lys	Dmt	Phe	D-Arg				NH ₂
Lys	D-Arg	Phe	Dmt				NH ₂
Lys	D-Arg	Dmt	Phe				NH ₂
D-Arg	Dmt	D-Arg	Phe				NH ₂
D-Arg	Dmt	D-Arg	Dmt				NH ₂
D-Arg	Dmt	D-Arg	Tyr				NH ₂
D-Arg	Dmt	D-Arg	Trp				NH ₂
Trp	D-Arg	Phe	Lys				NH ₂
Trp	D-Arg	Tyr	Lys				NH ₂
Trp	D-Arg	Trp	Lys				NH ₂
Trp	D-Arg	Dmt	Lys				NH ₂
D-Arg	Trp	Lys	Phe				NH ₂
D-Arg	Trp	Phe	Lys				NH ₂
D-Arg	Trp	Lys	Dmt				NH ₂
D-Arg	Trp	Dmt	Lys				NH ₂
D-Arg	Lys	Trp	Phe				NH ₂
D-Arg	Lys	Trp	Dmt				NH ₂
Cha	D-Arg	Phe	Lys				NH ₂
Ala	D-Arg	Phe	Lys				NH ₂

[0302] Cha=环己基丙氨酸

[0303] 在某些情况下,使用还具有阿片受体激动剂活性的肽可为有利的。可用于实施本发明的类似物的实例包括但不限于在表6中示出的芳香族阳离子肽。

[0304] 表6.具有阿片受体激动剂活性的肽类似物

[0305]

氨基酸 位置 1	氨基酸 位置 2	氨基酸 位置 3	氨基酸位置 4	氨基酸位 置 5(如果 存在的话)	C-末端修 饰
Tyr	D-Arg	Phe	Lys		NH ₂
Tyr	D-Arg	Phe	Orn		NH ₂
Tyr	D-Arg	Phe	Dab		NH ₂
Tyr	D-Arg	Phe	Dap		NH ₂
Tyr	D-Arg	Phe	Lys	Cys	NH ₂
2'6'Dmt	D-Arg	Phe	Lys		NH ₂
2'6'Dmt	D-Arg	Phe	Lys	Cys	NH ₂
2'6'Dmt	D-Arg	Phe	Lys-NH(CH ₂) ₂ -NH-dns		NH ₂
2'6'Dmt	D-Arg	Phe	Lys-NH(CH ₂) ₂ -NH-atn		NH ₂
2'6'Dmt	D-Arg	Phe	dnsLys		NH ₂
2'6'Dmt	D-Cit	Phe	Lys		NH ₂
2'6'Dmt	D-Cit	Phe	Lys	Cys	NH ₂
2'6'Dmt	D-Cit	Phe	Ahp		NH ₂
2'6'Dmt	D-Arg	Phe	Orn		NH ₂
2'6'Dmt	D-Arg	Phe	Dab		NH ₂
2'6'Dmt	D-Arg	Phe	Dap		NH ₂
2'6'Dmt	D-Arg	Phe	Ahp(2-氨基 庚酸)		NH ₂

[0306]

氨基酸 位置 1	氨基酸 位置 2	氨基酸 位置 3	氨基酸位置 4	氨基酸位 置 5(如果 存在的话)	C-末端修 饰
Bio-2'6' Dmt	D-Arg	Phe	Lys		NH ₂
3'5'Dmt	D-Arg	Phe	Lys		NH ₂
3'5'Dmt	D-Arg	Phe	Orn		NH ₂
3'5'Dmt	D-Arg	Phe	Dab		NH ₂
3'5'Dmt	D-Arg	Phe	Dap		NH ₂
Tyr	D-Arg	Tyr	Lys		NH ₂
Tyr	D-Arg	Tyr	Orn		NH ₂
Tyr	D-Arg	Tyr	Dab		NH ₂
Tyr	D-Arg	Tyr	Dap		NH ₂
2'6'Dmt	D-Arg	Tyr	Lys		NH ₂
2'6'Dmt	D-Arg	Tyr	Orn		NH ₂
2'6'Dmt	D-Arg	Tyr	Dab		NH ₂
2'6'Dmt	D-Arg	Tyr	Dap		NH ₂
2'6'Dmt	D-Arg	2'6'Dmt	Lys		NH ₂
2'6'Dmt	D-Arg	2'6'Dmt	Orn		NH ₂
2'6'Dmt	D-Arg	2'6'Dmt	Dab		NH ₂
2'6'Dmt	D-Arg	2'6'Dmt	Dap		NH ₂
3'5'Dmt	D-Arg	3'5'Dmt	Arg		NH ₂
3'5'Dmt	D-Arg	3'5'Dmt	Lys		NH ₂
3'5'Dmt	D-Arg	3'5'Dmt	Orn		NH ₂
3'5'Dmt	D-Arg	3'5'Dmt	Dab		NH ₂
2'6'Dmt	D-Arg	2'6'Dmt	Lys	Cys	NH ₂
Tyr	D-Lys	Phe	Dap		NH ₂
Tyr	D-Lys	Phe	Arg		NH ₂
Tyr	D-Lys	Phe	Arg	Cys	NH ₂
Tyr	D-Lys	Phe	Lys		NH ₂

[0307]

氨基酸 位置 1	氨基酸 位置 2	氨基酸 位置 3	氨基酸位置 4	氨基酸位 置 5(如果 存在的话)	C-末端修 饰
Tyr	D-Lys	Phe	Orn		NH ₂
2'6'Dmt	D-Lys	Phe	Dab		NH ₂
2'6'Dmt	D-Lys	Phe	Dap		NH ₂
2'6'Dmt	D-Lys	Phe	Arg		NH ₂
2'6'Dmt	D-Lys	Phe	Lys		NH ₂
3'5'Dmt	D-Lys	Phe	Orn		NH ₂
3'5'Dmt	D-Lys	Phe	Dab		NH ₂
3'5'Dmt	D-Lys	Phe	Dap		NH ₂
3'5'Dmt	D-Lys	Phe	Arg		NH ₂
3'5'Dmt	D-Lys	Phe	Arg	Cys	NH ₂
Tyr	D-Lys	Tyr	Lys		NH ₂
Tyr	D-Lys	Tyr	Orn		NH ₂
Tyr	D-Lys	Tyr	Dab		NH ₂
Tyr	D-Lys	Tyr	Dap		NH ₂
2'6'Dmt	D-Lys	Tyr	Lys		NH ₂
2'6'Dmt	D-Lys	Tyr	Orn		NH ₂
2'6'Dmt	D-Lys	Tyr	Dab		NH ₂
2'6'Dmt	D-Lys	Tyr	Dap		NH ₂
2'6'Dmt	D-Lys	2'6'Dmt	Lys		NH ₂
2'6'Dmt	D-Lys	2'6'Dmt	Orn		NH ₂
2'6'Dmt	D-Lys	2'6'Dmt	Dab		NH ₂
2'6'Dmt	D-Lys	2'6'Dmt	Dap		NH ₂
2'6'Dmt	D-Arg	Phe	dnsDap		NH ₂
2'6'Dmt	D-Arg	Phe	atnDap		NH ₂
3'5'Dmt	D-Lys	3'5'Dmt	Lys		NH ₂
3'5'Dmt	D-Lys	3'5'Dmt	Orn		NH ₂

[0308]

氨基酸 位置 1	氨基酸 位置 2	氨基酸 位置 3	氨基酸位置 4	氨基酸位 置 5(如果 存在的话)	C-末端修 饰
3'5'Dmt	D-Lys	3'5'Dmt	Dab		NH ₂
3'5'Dmt	D-Lys	3'5'Dmt	Dap		NH ₂
Tyr	D-Lys	Phe	Arg		NH ₂
Tyr	D-Orn	Phe	Arg		NH ₂
Tyr	D-Dab	Phe	Arg		NH ₂
Tyr	D-Dap	Phe	Arg		NH ₂
2'6'Dmt	D-Arg	Phe	Arg		NH ₂
2'6'Dmt	D-Lys	Phe	Arg		NH ₂
2'6'Dmt	D-Orn	Phe	Arg		NH ₂
2'6'Dmt	D-Dab	Phe	Arg		NH ₂
3'5'Dmt	D-Dap	Phe	Arg		NH ₂
3'5'Dmt	D-Arg	Phe	Arg		NH ₂
3'5'Dmt	D-Lys	Phe	Arg		NH ₂
3'5'Dmt	D-Orn	Phe	Arg		NH ₂
Tyr	D-Lys	Tyr	Arg		NH ₂
Tyr	D-Orn	Tyr	Arg		NH ₂
Tyr	D-Dab	Tyr	Arg		NH ₂
Tyr	D-Dap	Tyr	Arg		NH ₂
2'6'Dmt	D-Arg	2'6'Dmt	Arg		NH ₂
2'6'Dmt	D-Lys	2'6'Dmt	Arg		NH ₂
2'6'Dmt	D-Orn	2'6'Dmt	Arg		NH ₂
2'6'Dmt	D-Dab	2'6'Dmt	Arg		NH ₂
3'5'Dmt	D-Dap	3'5'Dmt	Arg		NH ₂
3'5'Dmt	D-Arg	3'5'Dmt	Arg		NH ₂
3'5'Dmt	D-Lys	3'5'Dmt	Arg		NH ₂
3'5'Dmt	D-Orn	3'5'Dmt	Arg		NH ₂

[0309]

氨基酸 位置 1	氨基酸 位置 2	氨基酸 位置 3	氨基酸位置 4	氨基酸位 置 5(如果 存在的话)	C-末端修 饰
Mmt	D-Arg	Phe	Lys		NH ₂
Mmt	D-Arg	Phe	Orn		NH ₂
Mmt	D-Arg	Phe	Dab		NH ₂
Mmt	D-Arg	Phe	Dap		NH ₂
Tmt	D-Arg	Phe	Lys		NH ₂
Tmt	D-Arg	Phe	Orn		NH ₂
Tmt	D-Arg	Phe	Dab		NH ₂
Tmt	D-Arg	Phe	Dap		NH ₂
Hmt	D-Arg	Phe	Lys		NH ₂
Hmt	D-Arg	Phe	Orn		NH ₂
Hmt	D-Arg	Phe	Dab		NH ₂
Hmt	D-Arg	Phe	Dap		NH ₂
Mmt	D-Lys	Phe	Lys		NH ₂
Mmt	D-Lys	Phe	Orn		NH ₂
Mmt	D-Lys	Phe	Dab		NH ₂
Mmt	D-Lys	Phe	Dap		NH ₂
Mmt	D-Lys	Phe	Arg		NH ₂
Tmt	D-Lys	Phe	Lys		NH ₂
Tmt	D-Lys	Phe	Orn		NH ₂
Tmt	D-Lys	Phe	Dab		NH ₂
Tmt	D-Lys	Phe	Dap		NH ₂
Tmt	D-Lys	Phe	Arg		NH ₂
Hmt	D-Lys	Phe	Lys		NH ₂
Hmt	D-Lys	Phe	Orn		NH ₂
Hmt	D-Lys	Phe	Dab		NH ₂
Hmt	D-Lys	Phe	Dap		NH ₂

[0310]

氨基酸 位置 1	氨基酸 位置 2	氨基酸 位置 3	氨基酸位置 4	氨基酸位 置 5(如果 存在的话)	C-末端修 饰
Hmt	D-Lys	Phe	Arg		NH ₂
Mmt	D-Lys	Phe	Arg		NH ₂
Mmt	D-Orn	Phe	Arg		NH ₂
Mmt	D-Dab	Phe	Arg		NH ₂
Mmt	D-Dap	Phe	Arg		NH ₂
Mmt	D-Arg	Phe	Arg		NH ₂
Tmt	D-Lys	Phe	Arg		NH ₂
Tmt	D-Orn	Phe	Arg		NH ₂
Tmt	D-Dab	Phe	Arg		NH ₂
Tmt	D-Dap	Phe	Arg		NH ₂
Tmt	D-Arg	Phe	Arg		NH ₂
Hmt	D-Lys	Phe	Arg		NH ₂
Hmt	D-Orn	Phe	Arg		NH ₂
Hmt	D-Dab	Phe	Arg		NH ₂
Hmt	D-Dap	Phe	Arg		NH ₂
Hmt	D-Arg	Phe	Arg		NH ₂

[0311] Dab=二氨基丁酸

[0312] Dap=二氨基丙酸

[0313] Dmt=二甲基酪氨酸

[0314] Mmt=2'-甲基酪氨酸

[0315] Tmt=N,2',6'-三甲基酪氨酸

[0316] Hmt=2'-羟基,6'-甲基酪氨酸

[0317] dnsDap=β-丹磺酰-L-α,β-二氨基丙酸;

[0318] atnDap=β-邻氨基苯甲酰-L-α,β-二氨基丙酸;.

[0319] Bio=生物素

[0320] 具有阿片受体激动剂活性的其他肽包括2',6'-Dmt-D-Arg-Ald-Lys-NH₂(SS-36), 其中Ald为β-(6'-二甲氨基-2'-萘甲酰基)丙氨酸,和2',6'-Dmt-D-Arg-Phe-Lys-Ald-NH₂(SS-37),其中Ald为β-(6'-二甲氨基-2'-萘甲酰基)丙氨酸。

[0321] 具有μ-阿片受体激动剂活性的肽通常为在N-末端(即,第一氨基酸位置)上具有酪氨酸残基或酪氨酸衍生物的那些肽。酪氨酸的合适衍生物包括2'-甲基酪氨酸(Mmt);2',6'-二甲基酪氨酸(2'6'-Dmt);3',5'-二甲基酪氨酸(3'5'Dmt);N,2',6'-三甲基酪氨酸

(Tmt);和2'-羟基-6'-甲基酪氨酸(Hmt)。

[0322] 不具有 μ -阿片受体激动剂活性的肽通常在N-末端(即,氨基酸位置1)不具有酪氨酸残基或酪氨酸衍生物。在N-末端的氨基酸可为与酪氨酸不同的任何天然存在的氨基酸或非天然存在的氨基酸。在一个实施方案中,在N-末端的氨基酸为苯丙氨酸或其衍生物。苯丙氨酸的例示性衍生物包括2'-甲基苯丙氨酸(Mmp)、2',6'-二甲基苯丙氨酸(2',6'-Dmp)、N,2',6'-三甲基苯丙氨酸(Tmp)和2'-羟基-6'-甲基苯丙氨酸(Hmp)。

[0323] 在表5和表6中示出的肽的氨基酸可为L-构型或D-构型。

[0324] 在一些实施方案中,所述芳香族阳离子肽包含至少一个精氨酸残基和/或至少一个赖氨酸残基。在一些实施方案中,精氨酸残基和/或赖氨酸残基作为电子受体且参与质子耦合电子转移。另外或供选地,在一些实施方案中,所述芳香族阳离子肽包含产生“电荷-环-电荷-环”构型的序列,例如存在于SS-31中的序列。另外或供选地,在一些实施方案中,所述芳香族阳离子肽包含含硫醇的残基,例如半胱氨酸和蛋氨酸。在一些实施方案中,包含含有硫醇的残基的肽直接提供电子且还原细胞色素c。在一些实施方案中,所述芳香族阳离子肽包含在肽的N-末端和/或C-末端的半胱氨酸。

[0325] 在一些实施方案中,提供肽多聚体。例如,在一些实施方案中,提供二聚体,例如SS-20二聚体:Phe-D-Arg-Phe-Lys-Phe-D-Arg-Phe-Lys。在一些实施方案中,所述二聚体为SS-31二聚体:D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂。在一些实施方案中,所述多聚体为三聚体、四聚体和/或五聚体。在一些实施方案中,所述多聚体包含不同单体肽的组合(例如,与SS-31肽连接的SS-20肽)。在一些实施方案中,这些较长的类似物可用作治疗分子。

[0326] 在一些实施方案中,本文所述的芳香族阳离子肽包括所有左旋(L)氨基酸。

[0327] 肽合成

[0328] 所述肽可通过本领域中众所周知的方法中的任一种合成。化学合成蛋白质的合成方法包括例如由Stuart和Young在Solid Phase Peptide Synthesis,第二版,Pierce Chemical Company(1984)中和在Methods Enzymol.,289,Academic Press,Inc,New York(1997)中描述的那些。

[0329] 使肽稳定以防止酶降解的一种方式是在经历断裂的肽键处用D-氨基酸替代L-氨基酸。制备除了已存在的D-Arg残基外还含有一个或多个D-氨基酸残基的芳香族阳离子肽类似物。防止酶降解的另一方式为在肽的一个或多个氨基酸残基处的 α -氨基的N-甲基化作用。这将防止通过任何肽酶而肽键断裂。实例包括:H-D-Arg-Dmt-Lys(N^qMe)-Phe-NH₂;H-D-Arg-Dmt-Lys-Phe(NMe)-NH₂;H-D-Arg-Dmt-Lys(N^qMe)-Phe(NMe)-NH₂;和H-D-Arg(N^qMe)-Dmt(NMe)-Lys(N^qMe)-Phe(NMe)-NH₂。N^q-甲基化类似物具有较低的氢结合能力且可预计具有改进的肠道通透性。

[0330] 使肽酰胺键(-CO-NH-)稳定从而防止酶降解的供选方式为用还原的酰胺键(Ψ [CH₂-NH])置换所述肽酰胺键。这可通过在Boc-氨基酸-醛和在固相肽合成中的生长肽链的N-末端氨基酸残基的氨基之间的还原烷基化反应来实现。由于降低的氢结合能力,还原的肽键预计产生改进的细胞通透性。实例包括:H-D-Arg- Ψ [CH₂-NH]Dmt-Lys-Phe-NH₂、H-D-Arg-Dmt- Ψ [CH₂-NH]Lys-Phe-NH₂、H-D-Arg-Dmt-Lys- Ψ [CH₂-NH]Phe-NH₂、H-D-Arg-Dmt- Ψ [CH₂-NH]Lys- Ψ [CH₂-NH]Phe-NH₂等。

[0331] β -淀粉样蛋白肽(A β)

[0332] β -淀粉样蛋白肽(A β)衍生自淀粉样前体蛋白(APP)。APP为在例如神经可塑性和神经突触形成的许多重要神经元功能中涉及的完整糖蛋白。APP的加工通过两种路径执行： α 路径和 β 路径。通常，APP经由 α 路径廓清，其不生成A β 。

[0333] β 路径为淀粉样蛋白路径。进入 β 路径的APP用 β -分泌酶和 γ -分泌酶切割以生成A β 。所生成的A β 可在36-43个氨基酸的大小范围内。最常见的A β 同种型为A β_{1-40} 和A β_{1-42} 。在这两者之中，与A β_{1-40} 相比，A β_{1-42} 更疏水，更趋于聚集且毒性更大。A β_{1-42} 也是在淀粉样斑块中最常见的形式。

[0334] 存在与A β 有关的三种核心结构：单体、寡聚物和原纤维。A β 单体细胞外释放。高浓度的细胞外A β 单体引起A β 单体寡聚以形成各种A β 寡聚物，例如二聚体、三聚体等。当存在大量聚集在一起的A β 寡聚物时，形成A β 原纤维。A β 原纤维为淀粉样蛋白斑块的主要组分。

[0335] 一些研究指示阿尔茨海默氏病部分地由A β 在脑中积聚造成。A β 的积聚归因于A β 肽平衡的改变。通常，随着A β 生成，各种分子酶自脑廓清。当廓清速率无法匹配生成速率时，产生过量的A β 。过量的A β 允许造成与A β 斑块关联的疾病状态的扩增的淀粉样蛋白级联。

[0336] 尽管淀粉样蛋白斑块与晚期阿尔茨海默氏病关联，但有证据说明A β 寡聚物为主要的毒性物质。在细胞培养物中，A β_{1-42} 的毒性为相同组成的A β 原纤维的毒性的10倍。在不希望超出理论的情况下，与A β 原纤维相比，A β 寡聚物的更大毒性效应可归因于与大的细胞外A β 原纤维相比较小的细胞外A β 寡聚物可能更易于穿透细胞膜。

[0337] 研究已经示出A β 与线粒体的相互作用引起ATP损失，电子转移链(特别是在含有Cu²⁺的复合物IV处)破坏和引起神经元细胞死亡的细胞凋亡因子激活。已经发现A β 积聚在线粒体中，其中其局限化到线粒体内膜。

[0338] A β 还具有毒性氧化性质，例如过氧化物酶活性(使用过氧化氢来催化氧化反应的酶活性)。在线粒体中，过氧化物酶活性破坏电子转移链并驱动反应性氧物质(ROS)的形成。

[0339] 脂质

[0340] 心磷脂(阳离子磷脂)为线粒体内膜的重要组分，其中其构成约20%的总脂质组合物。在哺乳动物细胞中，心磷脂几乎排他地在线粒体内膜中发现，其中其是在线粒体新陈代谢中涉及的酶的最佳功能所必需的。

[0341] 心磷脂为包含两个磷脂酰甘油的双磷脂酰甘油脂质种类，这两个磷脂酰甘油由甘油主链连接以形成二聚结构。其具有四个烷基且潜在地携带两个负电荷。因为在心磷脂中存在四条不同的烷基链，所以所述分子具有极大复杂性的潜力。然而，在大多数动物组织中，心磷脂含有在其各自上具有2个不饱和键的18-碳脂肪烷基链。已经提出(18:2)₄酰基链构型是心磷脂对在哺乳动物线粒体中的内部膜蛋白的高亲和性的重要结构需求。然而，用分离的酶制剂的研究指示其重要性可根据所检查的蛋白质而变。

[0342] 在分子中的两个磷酸盐各自可捕集一个质子。尽管其具有对称结构，但一个磷酸盐的电离在与电离两者不同的酸度水平下发生，其中pK₁=3且pK₂>7.5。因此，在正常生理学条件(pH为大约7.0)下，分子可仅携带一个负电荷。在磷酸盐上的羟基(-OH和-O-)形成稳定的分子内氢键，形成二环共振结构。该结构捕获一个质子，其有助于氧化磷酸化。

[0343] 在由复合物IV催化的氧化磷酸化过程期间,大量的质子从膜的一侧转移到另一侧,引起大pH改变。在不希望受理论束缚的情况下,已经提出心磷脂充当在线粒体膜内的质子阱,从而严格地局限化质子池并使线粒体膜间隙中的pH减至最低。该功能被认为是由于心磷脂的独特结构,如上所述,其可捕获在双环结构内的质子,同时携带负电荷。因此,心磷脂可充当电子缓冲池以释放或吸收质子以维持在线粒体膜附近的pH。

[0344] 另外,已经显示心磷脂在细胞凋亡中起作用。在细胞凋亡级联中的早期事件涉及心磷脂。心磷脂特异性氧合酶生成心磷脂-氢过氧化物,其促使脂质经历构象改变。氧化的心磷脂随后从线粒体内膜易位到线粒体外膜,其中认为其形成细胞色素c通过其释放到细胞溶质中的孔。细胞色素c可与刺激钙释放的IP3受体结合,其还促进细胞色素c的释放。当细胞质钙浓度达到毒性水平时,细胞死亡。另外,线粒体外的细胞色素c与细胞凋亡活化因子相互作用,引起凋亡体复合物的形成和蛋白酶解半胱天冬酶级联的活化。

[0345] 另一后果为细胞色素c以高亲和性与在线粒体内膜上的心磷脂相互作用且与心磷脂形成复合物,所述复合物在转移电子中为非生产性的,但充当心磷脂特异性氧合酶/过氧化物酶。实际上,心磷脂与细胞色素c的相互作用产生其正常氧化还原电位比完整细胞色素c的氧化还原电位更负约负(-)400mV的复合物。结果,细胞色素c/心磷脂复合物不能接受来自线粒体复合物III的电子,导致歧化产生H₂O₂的超氧化物的产生增强。细胞色素c/心磷脂复合物也不能接受来自超氧化物的电子。另外,心磷脂与细胞色素c的高亲和相互作用导致细胞色素c激活成具有针对多不饱和分子心磷脂的过氧化的选择性催化活性的心磷脂特异性过氧化物酶。细胞色素c/心磷脂复合物的过氧化物酶反应由作为氧化等效物源的H₂O₂驱动。最终,该活性导致主要是心磷脂-OOH及其还原产物(心磷脂-OH)的心磷脂氧化产物的积聚。如上所述,已经显示氧合的心磷脂物质在线粒体膜透化和促细胞凋亡因子(包括细胞色素c自身)释放到细胞溶质中起作用。参见,例如Kagan等,Advanced Drug Delivery Reviews,61(2009)1375-1385;Kagan等,Mol.Nutr.Food Res.2009January;53(1):104-114,其中两者都通过引用结合到本文中来。

[0346] 细胞色素c为球状蛋白质,其主要功能是充当在线粒体电子转移链中的从复合物III(细胞色素c还原酶)到复合物IV(细胞色素c氧化酶)的电子载体。血红素辅基在Cys14和Cys17处附着至细胞色素c,并且另外由两个配位轴向配体His18和Met80结合。与Met80的第6配位结合防止Fe与例如O₂、H₂O₂、NO等其他配体的相互作用。

[0347] 细胞色素c池分布在膜间隙中,而剩余部分经由静电相互作用和疏水性相互作用两者与IMM关联。细胞色素c为高阳离子蛋白质(在中性pH下的8+净电荷),其可经由静电相互作用与在IMM上的阴离子磷脂心磷脂松散地结合。并且,如上所述,细胞色素c还可经由疏水性相互作用与心磷脂紧密地结合。细胞色素c与心磷脂的该紧密结合起因于心磷脂的酰基链离开脂质膜的延伸且延伸到在细胞色素c内部中的疏水通道中(Tuominen等,2001;Kalanxhi和Wallace,2007;Sinibaldi等,2010)。这导致在细胞色素c血红素袋中的Fe-Met80键的破裂且导致在血红素环境中的改变,如由索雷带(Soret band)区中的负科顿(Cotton)峰的丧失所示(Sinibaldi等,2008)。其还导致血红素Fe对H₂O₂和NO的暴露。

[0348] 天然细胞色素c具有由于其第6配位的弱过氧化物酶活性。然而,在与心磷脂的疏水性结合后,细胞色素c经历破坏Fe-Met80配位且增加血红素Fe对H₂O₂的暴露的结构改变,并且细胞色素c从电子载体转换成过氧化物酶,其中心磷脂为主要底物(Vladimirov等,

2006;Basova等,2007)。如上所述,心磷脂过氧化导致改变的线粒体膜结构,和来自IMM的细胞色素c释放,以起始半胱天冬酶介导的细胞死亡。

[0349] 芳香族阳离子肽的预防和治疗用途

[0350] 本发明涉及芳香族阳离子肽的用途。在一些实施方案中,至少一种芳香族阳离子肽可用于与治疗或缓解由 β 淀粉样蛋白肽(A β)(至少部分地)造成的症状、病状或疾病有关的方面。在一些实施方案中,与A β 有关的病状或疾病以A β 的过度表达、A β 斑块或A β 诱发的线粒体功能障碍为特征。

[0351] 另外或供选地,在一些实施方案中,至少一种芳香族阳离子肽可用于与治疗或缓解以A β 和/或A β 斑块在脑中积聚或过度表达为特征的症状、病状或疾病有关的方面中。

[0352] 另外或供选地,在一些实施方案中,至少一种芳香族阳离子肽可用于与治疗或缓解以A β 单体(例如,A β_{1-40} 和A β_{1-42})和/或A β 寡聚物的过度表达或积聚为特征的症状、病状或疾病有关的方面。在一些实施方案中,所述A β 寡聚物包括一种或多种A β 亚种。例如,而并不限制,在一些实施方案中,所述A β 寡聚物包括A β_{1-40} 、A β_{1-42} 或其组合。在一些实施方案中,所述A β 寡聚物仅包括单一A β 亚种,例如A β_{1-42} 。

[0353] 另一方面,本发明涉及芳香族阳离子肽减少细胞外A β 寡聚物的用途。另外或供选地,在一些实施方案中,芳香族阳离子肽用以降低A β 毒性(例如,线粒体毒性)。在不希望受理论约束的情况下,人们认为芳香族阳离子肽与A β 寡聚物的相互作用导致A β 原纤维的形成,因此降低可用以易位到细胞中的A β 寡聚物的量并防止A β 易位到细胞中。

[0354] 确定基于芳香族阳离子肽的治疗剂的生物作用。在各种实施方案中,执行合适的体外或体内测定以确定基于特异性芳香族阳离子肽的治疗剂的作用及指示其施用是否用于治疗。在各种实施方案中,体外测定可用代表性动物模型执行以确定给定的基于芳香族阳离子肽的治疗剂是否施加预防或治疗疾病的所要效果。

[0355] 在治疗中使用的化合物可在人类受试者中试验之前在包括但不限于大鼠、小鼠、小鸡、猪、奶牛、猴、兔等合适动物模型系统中试验。类似地,对于活体试验,可在施用到人类受试者之前使用本领域已知的任何动物模型系统。

[0356] 预防方法。一方面,本发明提供一种通过向受试者施用预防A β 诱发的疾病或病状的启动或进展的芳香族阳离子肽来预防在所述受试者中的所述疾病或病状的方法。在预防应用中,向对疾病或病状敏感或另外处于疾病或病状的危险之中的受试者以足以消除或降低所述危险或延迟所述疾病的起始的量施用芳香族阳离子肽的医药组合物或药物,所述疾病包括疾病的生物化学、组织和/或行为症状、其并发症和在疾病发展期间表现的中间病理表型。预防性芳香族阳离子的施用可在表现以反常为特征的症状之前发生,从而预防疾病或病症或供选地延迟其进展。适当的化合物可基于上述筛选测定确定。

[0357] 治疗方法。本发明的另一方面包括出于治疗目的治疗在受试者中的疾病的方法。在治疗应用中,对怀疑患有或已经患有所述疾病的受试者中以足以治愈所述疾病的症状、降低其严重性或至少部分地中止所述疾病的症状的量施用组合物或药物,所述疾病的症状包括其并发症和在疾病发展中的中间病理表型。

[0358] 一方面,本公开内容提供一种降低经历A β 诱发的线粒体通透性转换(MPT)的线粒体数目或预防在需要其的哺乳动物中的A β 诱发的线粒体通透性转换的方法,所述方法包括向所述哺乳动物施用有效量的一种或多种本文所述的芳香族阳离子肽。

[0359] 又一方面,本公开内容提供一种降低在需要其的受试者中的A β 诱发的氧化损伤的方法,所述方法包括向所述哺乳动物施用有效量的一种或多种本文所述的芳香族阳离子肽。在一些实施方案中,本发明的芳香族阳离子肽可用于降低在需要其的受试者中的A β 诱发的ROS生产的方法中。

[0360] 一方面,本公开内容一种提供治疗、预防或缓解在需要其的受试者中的A β 诱发的线粒体功能障碍的方法,所述方法包括向所述哺乳动物施用有效量的一种或多种本文所述的芳香族阳离子肽。

[0361] 在一些实施方案中,本发明的芳香族阳离子肽可用于抑制在需要其的受试者中的A β 诱发的膜电位损耗的方法中。

[0362] 在一些实施方案中,本发明的芳香族阳离子肽可用于抑制在需要其的受试者中的在A β 肽和线粒体之间的相互作用的方法中。

[0363] 在一些实施方案中,本发明的芳香族阳离子肽可用于抑制在需要其的受试者中的A β 诱发的细胞呼吸减少的方法中。

[0364] 在一些实施方案中,本发明的芳香族阳离子肽可用于抑制在需要其的受试者中的A β 诱发的ATP合成速率减小的方法中。

[0365] 在一些实施方案中,本发明的芳香族阳离子肽可用于治疗、缓解或逆转在需要其的受试者中的例如嵴形成损失的A β 诱发的线粒体损伤的方法中。

[0366] 在一些实施方案中,本发明的芳香族阳离子肽可用于抑制在需要其的受试者中的A β 诱发的细胞色素c过氧化物酶活性的方法中。

[0367] 在一些实施方案中,本发明的芳香族阳离子肽可用于抑制或逆转在需要其的受试者中的A β 诱发的细胞色素c损伤的方法中。

[0368] 在一些实施方案中,本发明的芳香族阳离子肽可用于抑制在需要其的受试者中的A β 诱发的心磷脂过氧化的方法中。

[0369] 因此,在一些实施方案中,将如本文公开的芳香族阳离子肽(例如D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂、Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂、D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Ala-NH₂([ald]SS-31)或其医药上可接受的盐,例如乙酸盐、酒石酸盐或三氟乙酸盐)施用到需要其的受试者。在不希望受理论约束的情况下,认为芳香族阳离子肽接触(例如,靶向)细胞色素c、心磷脂或两者,阻碍A β 诱发的心磷脂-细胞色素c相互作用,抑制心磷脂/细胞色素c复合物的A β 诱发的氧合酶/过氧化物酶活性,抑制A β 诱发的心磷脂-氢过氧化物形成,抑制A β 诱发的心磷脂向外膜易位和/或抑制A β 诱发的细胞色素c从IMM中释放。另外或供选地,在一些实施方案中,本文公开的芳香族阳离子肽包括以下特征或功能中的一种或多种:(1)为细胞可透过的且靶向线粒体内膜;(2)经由静电相互作用选择性地结合心磷脂,其促进肽与细胞色素c的相互作用;(3)与游离或松散地结合或紧密地结合心磷脂的细胞色素c相互作用;(4)保护细胞色素c的疏水性血红素袋和/或抑制心磷脂破坏Fe-Met80键;(5)促进与血红素卟啉的 π - π^* 相互作用;(6)抑制细胞色素c过氧化物酶活性;(7)促进细胞色素c还原的动力学;(8)防止抑制由心磷脂引起的细胞色素c还原;(9)促进在线粒体电子转移链和ATP合成中的电子通量。在一些实施方案中,肽促进电子转移的能力与肽抑制细胞色素c/心磷脂复合物的A β 诱发的过氧化物酶活性的能力不相关。因此,在一些实施方案中,所施用的肽抑制、延迟或降低在心磷脂和细胞色素c之间的A β 诱发的相互作用。另外或供选地,在一些实施方

案中,所施用的肽抑制、延迟或降低 A β 诱发的细胞色素c/心磷脂复合物的形成。另外或供选地,在一些实施方案中,所施用的肽抑制、延迟或降低细胞色素c/心磷脂复合物的 A β 诱发的氧合酶/过氧化物酶活性。另外或供选地,在一些实施方案中,所施用的肽抑制、延迟或降低 A β 诱发的心磷脂过氧化增加。另外或供选地,在一些实施方案中,所施用的肽抑制、延迟或降低 A β 诱发的细胞凋亡增加。

[0370] 本文所述的芳香族阳离子肽可用于预防或治疗疾病。具体地讲,本公开内容提供通过施用本文所述的芳香族阳离子肽治疗处于以 A β 诱发的线粒体功能障碍、A β 过度表达或 A β 斑块为特征的疾病的危险之中(或对其敏感)的受试者的预防方法和治疗方法。相应地,本发明方法提供通过在需要其的受试者中施用有效量的芳香族阳离子肽预防或治疗以 A β 诱发的线粒体功能障碍、A β 过度表达或 A β 斑块为特征的疾病。

[0371] 氧化损伤。本文公开的肽可用于降低在需要其的哺乳动物中的氧化损伤。需要降低氧化损伤的哺乳动物为患有与氧化损伤相关的疾病、病状或治疗的那些哺乳动物。通常,所述氧化损伤由例如反应性氧物质(ROS)和/或反应性氮物质(RNS)的自由基造成。ROS和 RNS的实例包括羟基自由基、超氧化物阴离子自由基、一氧化氮、氢、次氯酸(HOCl)和过氧亚硝酸盐阴离子。如果在施用有效量的上述芳香族阳离子肽之后,受试者、移除器官或细胞中的氧化损伤的量减少,则氧化损伤被视为“降低的”。通常,与未使用所述肽治疗的对照受试者相比较,如果氧化损伤减少至少约10%、至少约25%、至少约50%、至少约75%或至少约90%,则氧化损伤被视为降低的。

[0372] 在一些实施例中,待治疗的受试者可为患有与氧化损伤相关的疾病或病症的哺乳动物。所述氧化损伤可出现在哺乳动物的任何细胞、组织或器官中。在人类中,例如阿尔茨海默氏病等许多疾病涉及氧化应激。

[0373] 所述方法还可用于降低与任何神经变性疾病或病症相关的氧化损伤。所述神经变性疾病可影响中枢神经系统和周围神经系统的任何细胞、组织或器官。这样的细胞、组织和器官的实例包括脑、脊髓、神经元、神经节、雪旺细胞(Schwann cell)、星形胶质细胞、少突胶质细胞和小神经胶质细胞。神经变性病症可为例如中风或脑创伤或脊髓损伤的急性病状。在另一实施方案中,所述神经变性疾病或病状可为慢性神经变性病状。在慢性神经变性病状中,自由基例如可导致对蛋白质造成损伤。与由自由基引起的损伤关联慢性神经变性疾病的实例包括阿尔茨海默氏病。

[0374] 线粒体通透性转换。本文公开的肽可用于治疗与线粒体通透性转换(MPT)关联的任何疾病或病状。所述疾病和病状包括但不限于组织或器官的局部缺血和/或再灌注、缺氧和大量神经变性疾病中的任一种。需要抑制或预防MPT的哺乳动物为患有这些疾病或病症的那些哺乳动物。

[0375] 心磷脂氧化。本文公开的肽可用于预防、抑制或减少心磷脂氧化。心磷脂为几乎排他地在线粒体内膜上以及在连接外膜和内膜的接触部位处发现的独特磷脂。心磷脂结构域是适当的嵴形成所需要的,并且它们涉及呼吸复合物组构成更高级的超级复合物,以促进电子转移。心磷脂也是保持细胞色素c与呼吸复合物紧密接近所需要的,用于有效电子转移。带正电的细胞色素c经由静电相互作用与高度阴离子的心磷脂相互作用。

[0376] 该心磷脂-细胞色素c相互作用通过心磷脂过氧化减弱,并且该游离细胞色素c损失到细胞溶质内起始半胱天冬酶依赖性细胞凋亡(Shidoji等,1999,Biochem Biophys Res

Commun 264,343-347)。脂质膜的重塑在细胞凋亡期间发生,并且磷脂酰丝氨酸从质膜内部小叶移动到外部小叶。以类似的方式,心磷脂及其代谢物可从线粒体再定位至其他细胞内细胞器并至细胞表面(Sorice等人,2004,Cell Death Differ 11,1133-1145)。

[0377] 本文公开的芳香族阳离子肽(例如,但不限于2',6'-Dmt-D-Arg-Phe-Lys-NH₂(SS-02)、Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂(SS-20)和D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂(SS-31)、D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Ala-NH₂([ald]SS-31)或其医药上可接受的盐,例如乙酸盐、酒石酸盐和三氟乙酸盐)可用于预防心磷脂过氧化。心磷脂过氧化主要由细胞色素c的过氧化物酶活性介导。约15-20%的线粒体细胞色素c经由疏水性相互作用在复合物中与心磷脂紧密结合,由此心磷脂的一条或多条酰基链插入细胞色素c的疏水通道内。酰基链插入细胞色素c内破坏在Met80和血红素Fe之间的配位键,并且使血红素Fe的第六配位暴露于H₂O₂,因此使该酶转换成可选择性地催化心磷脂氧化的过氧化物酶。

[0378] 本文公开的芳香族阳离子肽(例如但不限于2',6'-Dmt-D-Arg-Phe-Lys-NH₂(SS-02)、Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂(SS-20)和D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂(SS-31)、D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Ala-NH₂([ald]SS-31)或其医药上可接受的盐,例如乙酸盐、酒石酸盐和三氟乙酸盐)为细胞可渗透的,并且可在线粒体内膜中选择性地靶向并浓缩。所述芳香族阳离子肽选择性地靶向阴离子磷脂,例如心磷脂、磷脂酰丝氨酸、磷脂酸和磷脂酰甘油,其中心磷脂与一些肽具有最高亲和性。在一些实施方案中,所述芳香族阳离子肽与细胞色素c相互作用且所述相互作用在心磷脂存在下增强。在一些实施方案中,所述肽可穿透到与血红素紧密结合的细胞色素c蛋白质内,并且该穿透在心磷脂的存在下增强。

[0379] 在不希望受理论约束的情况下,通过穿透到细胞色素c的血红素环境中,可能芳香族阳离子肽干扰在心磷脂和细胞色素c之间的结构相互作用,并且防止Met80-Fe配位的破裂并且防止细胞色素c变成过氧化物酶。这些芳香族阳离子肽还增加血红素区域中的 π - π *相互作用并促进细胞色素c还原。

[0380] 本文公开的芳香族阳离子肽还增强线粒体呼吸,增加氧化磷酸化能力,并降低线粒体反应性氧物质。结果,它们可保护线粒体功能,降低心磷脂过氧化和/或抑制细胞凋亡。

[0381] 阿尔茨海默氏病

[0382] 本文公开的肽可用于治疗以A β 诱发的线粒体功能障碍、A β 过度表达或A β 斑块的存在为特征的疾病或病状,所述疾病或病状例如但不限于阿尔茨海默氏病。

[0383] 心磷脂过氧化和氧化应激增加可为在阿尔茨海默氏病的病变中的重要过程。在一些实施方案中,在线粒体中的氧合酶活性通过在Cu²⁺存在下由A β (例如A β ₁₋₄₂或A β ₁₋₄₂寡聚物)氧化心磷脂(例如,1,1',2,2'-四油酰基心磷脂(TLCL))而增加。

[0384] 相应地,可使用本公开内容的芳香族阳离子肽(例如,2',6'-Dmt-D-Arg-Phe-Lys-NH₂(SS-02)、Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂(SS-20)和D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂(SS-31)、D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Ala-NH₂([ald]SS-31)或其医药上可接受的盐,例如乙酸盐、酒石酸盐和三氟乙酸盐)以通过预防在受试者中的A β 诱发的心磷脂氧化、A β 诱发的氧化应激、A β 诱发的氧合酶活性和细胞的细胞凋亡来治疗阿尔茨海默氏病。

[0385] 在另一实施方案中,可使用本公开内容的芳香族阳离子肽(例如,D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Ala-NH₂([ald]SS-31)或其医药上可接受的盐,例如乙酸盐、酒石酸盐和三氟乙酸盐)通过减少A β (例如,A β 或A β 寡聚物)进入细胞来治疗阿尔茨海默氏病。阿尔茨海默氏

病的症状包括记忆丧失、精神激动、情绪摇摆、判断力减弱、痴呆、抽象思维困难、无法胜任原本熟悉的事务、认知困难、定向障碍、沟通技巧减少、重复言语或行动、视觉和空间关系困难、戒除、抑郁、识别丧失、运动技能和触觉丧失、错觉、偏狂症、口头或人身攻击和睡眠障碍。

[0386] 路易体痴呆

[0387] 还包括路易体痴呆、弥漫性路易体病、皮质路易体病和路易型老年性痴呆的多种其他名字已知的路易体痴呆(DLB)为与帕金森氏症紧密关联的一类痴呆。DLB以在脑中称为路易体的异常蛋白质(α -突触核蛋白)胞浆包涵体的发展为特征。

[0388] 尸检系列揭示DLB的病变常与阿尔茨海默氏病的病变伴发。也就是说,当在皮层中发现路易体包涵体时,它们常与主要在塔兰氏筋膜中发现的阿尔茨海默氏病病变同时出现,所述病变包括老年斑(沉积的A β 肽)和粒状空泡变性(在海马神经元内的粒状沉积物和包围海马神经元的清亮区)。

[0389] DLB的核心症状为每天每小时具有重大注意力和警觉变化的波动认知、复发性视觉幻觉、复视觉、曳行步态、步行期间手臂摆动减少、面部表情范围减小、运动僵硬、棘齿样嵌齿轮运动、低音量、流涎和吞咽困难。提示性症状为在PET或SPECT扫描中检测到的快速眼运动(REM)-睡眠行为障碍和异常。DLB患者还常经历立位性低血压的问题,包括重复跌倒、昏倒(晕厥)和暂时性意识丧失。

[0390] 淀粉样脑血管病

[0391] 淀粉样脑血管病(CAA)(也称作刚果红血管病(congophilic angiopathy))为其中淀粉样蛋白沉积物在中枢神经系统的血管壁中形成的一种形式的血管病。使用术语刚果红,因为淀粉样蛋白异常聚集的存在可通过在应用称为刚果红的专用染色剂之后脑组织的显微镜检查证实。淀粉样蛋白材料仅在脑中发现,且因而该疾病与其他形式的淀粉样变性无关。

[0392] 间歇形式的CAA已经基于淀粉样蛋白 β -蛋白质(A β)在皮质毛细管中的沉积而进一步表征成两种类型。在所有情况下,其由A β 在软脑膜(leptomeningal)和脑血管壁中的沉积限定。淀粉样蛋白沉积容易诱发这些血管破损,增加出血性中风的危险。由CAA损伤而从血管中渗漏的血液可导致脑的周围区域突然停止适当地工作,产生症状如四肢衰弱或麻痹、语言困难、感觉或平衡损失或昏迷。如果血液渗漏到脑周围的敏感组织,其可导致急剧且剧烈的头痛。有时由周围脑的刺激引起的其他症状为痉挛(惊厥)或漫不经心讲话的暂时性神经症状如四肢或脸的麻刺感或衰弱。

[0393] 包涵体肌炎

[0394] 包涵体肌炎(IBM)为发炎性肌肉疾病,其以远端肌肉和近端肌肉两者的缓进型衰弱和损耗为特征,在胳膊和腿的肌肉中最为明显。存在两种类型:间歇性包涵体肌炎(sIBM)和遗传性包涵体肌病(hIBM)。

[0395] IBM的发病机理可涉及淀粉样蛋白 β -有关的变性过程。IBM的密谋特征为淀粉样蛋白 β (A β)和磷酸化tau蛋白质在sIBM肌纤维内积聚。 β 淀粉样蛋白质对IBM致病机理关键的假设已经在小鼠模型中使用发现在小鼠模型中有效抵抗IBM的A β 疫苗支持。

[0396] 常见的早期症状包括频繁绊倒和跌倒、上楼衰弱和手指控制困难。在一个脚或两个脚中的足下垂也是IBM和晚期多肌炎(PM)的症状。在疾病过程期间,患者的活动性变得逐

渐受限。许多患者可经历平衡问题。因为sIBM使腿肌肉衰弱且不稳定,所以患者非常容易受绊倒或跌倒的严重损伤。许多患者报道特别是在大腿中的严重肌肉疼痛。在存在时,吞咽困难为在具有IBM的患者中的渐进性病状且常导致因吸入性肺炎而死亡。吞咽困难存在于40–85%的IBM病例中。IBM可引起有氧代谢能力减小。该下降最可能是常与IBM的症状(即,渐进性肌肉衰弱、活动性减小和疲劳程度增加)关联的久坐生活方式的后果。

[0397] 在电子转移中的芳香族阳离子肽

[0398] 线粒体ATP合成通过电子流经IMM的电子转移链(ETC)来驱动。电子流经所述链可描述为一系列的氧化/还原过程。电子从电子供体(NADH或QH₂)经过一系列的电子受体(复合物I–IV),且最终到达最终的电子受体:分子氧。与IMM松散结合的细胞色素c在复合物III和复合物IV之间转移电子。

[0399] 经过ETC的电子快速分流对于防止发生短路是重要的,短路会导致电子逸出和自由基中间体产生。在电子供体和电子受体之间的电子转移(ET)的速率随着两者之间的距离指数减小,且超交换ET限于20Å。长范围的ET可在多步电子跳跃过程中实现,其中在供体和受体之间的总距离被分成一系列的较短且因此较快的ET步骤。在ETC中,长距离的有效ET通过沿着IMM战略定位的辅助因子辅助,辅助因子包括FMN、FeS簇和血红素。例如Phe、Tyr和Trp的芳香族氨基酸还可促进电子经重叠的 π 云转移到血红素。具有合适氧化电位的氨基酸(Tyr、Trp、Cys、Met)可通过充当中间电子载体而用作跳板(stepping stone)。另外,当Tyr的羟基递送电子时,其可失去质子,且附近的碱基(例如,Lys)的存在可导致甚至更为有效的质子耦合ET。

[0400] 已经显示靶向线粒体的催化酶(mCAT)的过度表达改进老化(例如,减少症状)并延长小鼠寿命。这些实例识别可以降低线粒体氧化应激并且保护线粒体功能的“可作为药物的”化学化合物。由于线粒体为细胞内反应性氧物质(ROS)的主要源,因此抗氧化剂必须被递送到线粒体以便限制对线粒体DNA、电子转移链(ETC)的蛋白质和线粒体脂质膜的氧化损伤。在一些实施方案中,芳香族阳离子肽在IMM中选择地靶向并浓缩。这些肽中的一些含有可经历单电子氧化且表现为线粒体靶向的抗氧化剂的氧化还原活性氨基酸。本文公开的肽,例如D-Arg-2',6'-Dmt-Tyr-Lys-Phe-NH₂,在细胞和动物研究中降低线粒体ROS且保护线粒体功能。近期研究显示该肽可赋予与用线粒体过氧化氢酶过度表达观察到的那种可比较的针对线粒体氧化应激的保护。尽管自由基清除为最常用的降低氧化应激的方法,但存在可使用的其他潜在机制,包括促进电子转移,以降低电子泄漏和改进的线粒体还原电位。

[0401] 充足的环境证据指示氧化应激促成正常老化和几种重大疾病的许多后果,所述重大疾病包括心血管疾病、糖尿病、神经变性疾病和癌症。氧化应激通常定义为促氧化剂和抗氧化剂的不平衡。然而,尽管大量科学证据支持增加的氧化组织损伤,但使用抗氧化剂的大规模临床研究仍未证实在这些疾病中的显著健康益处。原因之一可能是由于可用抗氧化剂无法到达促氧化剂产生的部位。

[0402] 线粒体电子转移链(ETC)为ROS的主要细胞内生产者,并且线粒体自身对氧化应激为最脆弱的。因此,保护线粒体功能将是防止由线粒体氧化应激引起的细胞死亡的必要条件。过度表达靶向线粒体的催化酶(mCAT)而不是过氧化物酶体(pCAT)的益处提供下述概念验证:靶向线粒体的抗氧化剂将是克服老化的有害作用所必需的。然而,化学抗氧化剂充分递送至IMM仍然是一项挑战。

[0403] 一种肽类似物D-Arg-2',6'-Dmt-Tyr-Lys-Phe-NH₂具有固有的抗氧化剂能力,因为经修饰的酪氨酸残基为氧化还原活性的,并且可经历单电子氧化。该肽可中和H₂O₂、羟基自由基和过氧亚硝酸盐且抑制脂质过氧化。所述肽在缺血再灌注损伤、神经变性疾病和新陈代谢综合症的动物模型中已证实显著的功效。

[0404] 靶向线粒体的肽的设计合并且增强下述作用模式中的一种或多种:(i)清除过量的ROS,(ii)通过促进电子转移来降低ROS产生,或(iii)增加线粒体还原能力。肽分子的优点在于它能够合并可充当氧化还原中心、促进电子转移或增加巯基的天然或非天然氨基酸,同时保留线粒体靶向所需要的芳香族阳离子基元。

[0405] 施用模式和有效配量

[0406] 可以采用本领域的技术人员所知的使细胞、器官或组织与芳香族阳离子肽接触的任何方法。合适的方法包括体外、离体或体内方法。体外方法通常包括培养样品。例如,可将细胞放置在贮存器(例如,组织培养板)中,并在适合获得所要结果的适当条件下用芳香族阳离子肽培育。合适的培育条件可由本领域的技术人员容易地确定。

[0407] 离体法通常包括从例如人类的哺乳动物除去的细胞、器官或组织。所述细胞、器官或组织可例如在适当条件下用芳香族阳离子肽培育。所接触的细胞、器官或组织通常回到供体中,放置在受者中或者储存以备将来使用。因此,所述芳香族阳离子肽通常在医药学上可接受的载剂中。

[0408] 体内法通常包括向合适地为人类的哺乳动物施用例如上文描述的那些芳香族阳离子肽的芳香族阳离子肽。当使用体内法治疗时,将有效量(即,具有所要治疗效果的量)的芳香族阳离子肽施用到受试者。剂量和给药方案将取决于在受试者中的损伤的程度、所使用的特定芳香族阳离子肽的特性(例如,其治疗指数)、受试者以及受试者的病史。有效量可在临床前试验和临床试验期间通过内科医生和临床医生熟悉的方法来确定。

[0409] 可用于所述方法中的芳香族阳离子肽的有效量可通过用于施用医药化合物的多种公知方法中的任一方法来施用到需要其的哺乳动物。所述芳香族阳离子肽可全身施用或局部施用。

[0410] 所述芳香族阳离子肽可配制成医药学上可接受的盐。术语“药学上可接受的盐”意谓由适于施用到例如哺乳动物的患者的碱或酸制备的盐(例如,对于给定的给药方案,具有可接受的哺乳动物安全度的盐)。然而,应当理解,所述盐不一定是医药学上可接受的盐,例如那些不用来施用至患者的中间化合物的盐。

[0411] 医药学上可接受的盐可衍生自医药学上可接受的无机或有机碱和衍生自医药学上可接受的无机或有机酸。另外,当肽含有例如胺、吡啶或咪唑的碱性部分和例如羧酸或四唑的酸性部分两者时,可形成两性离子,且所述两性离子包括在本文中所用的术语“盐”中。衍生自医药学上可接受的无机碱的盐包括铵盐、钙盐、铜盐、铁盐、亚铁盐、锂盐、镁盐、三价锰盐、二价锰盐、钾盐、钠盐和锌盐等。由医药学上可接受的有机碱衍生的盐包括伯胺盐、仲胺盐和叔胺盐,包括取代胺盐、环胺盐、天然存在的胺盐等,例如精氨酸、甜菜碱、咖啡因、胆碱、N,N'-二苄基乙二胺、二乙胺、2-二乙氨基乙醇、2-二甲氨基乙醇、乙醇胺、乙二胺、N-乙基吗啉、N-乙基哌啶、还原葡糖胺、葡萄糖胺、组氨酸、海巴明青霉素(hydrabamine)、异丙胺、赖氨酸、葡甲胺、吗啉、哌嗪、哌啶、多胺树脂、普鲁卡因、嘌呤、可可碱、三乙胺、三甲胺、三丙胺、氨丁三醇等。由医药学上可接受的无机酸衍生的盐包括硼酸盐、碳酸盐、卤化氢(氢

溴酸、盐酸、氢氟酸或氢碘酸)的盐、硝酸盐、磷酸盐、氨基磺酸盐和硫酸盐。由医药学上可接受的有机酸衍生的盐包括脂族羧酸(例如,柠檬酸、葡糖酸、乙醇酸、乳酸、乳糖酸、苹果酸和酒石酸)的盐、脂族单羧酸(例如,乙酸、丁酸、甲酸、丙酸和三氟乙酸)的盐、氨基酸(例如,天冬氨酸和谷氨酸)的盐、芳香族羧酸(例如,苯甲酸、对氯苯甲酸、二苯乙酸、龙胆酸、马尿酸和三苯基乙酸)的盐、芳香族羧酸(例如,邻羟基苯甲酸、对羟基苯甲酸、1-羟基萘-2-羧酸和3-羟基萘-2-羧酸)的盐、抗坏血酸盐、二羧酸(例如,富马酸、马来酸、草酸和琥珀酸)盐、葡萄糖醛酸盐、扁桃酸盐、黏液酸盐、烟酸盐、乳清酸盐、双羟萘酸盐、泛酸盐、磺酸(例如,苯磺酸、樟脑磺酸、乙二磺酸(edisylic)、乙磺酸、羟乙磺酸、甲磺酸、萘磺酸、萘-1,5-二磺酸、萘-2,6-二磺酸和对甲苯磺酸)的盐、羧基甲酸(xinafoic acid)的盐等。在一些实施方案中,所述盐为乙酸盐。在一些实施方案中,所述盐为酒石酸盐。另外或供选地,在其他实施方案中,所述盐为三氟乙酸盐。

[0412] 本文所述的芳香族阳离子肽可合并到医药组合物中以单独施用或组合施用到受试者来治疗或预防本文所述的病症。所述组合物通常包含活性剂和医药学上可接受的载剂。本文使用的术语“医药学上可接受的载剂”包括与医药施用相容的盐水、溶剂、分散介质、包衣料、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延缓剂等。补充活性化合物也可合并到所述组合物中。

[0413] 医药组合物通常配制成与其预定施用途径相容。施用途径的实例包括肠胃外(例如,静脉内、皮内、腹膜内或皮下)、经口、吸入、经皮(局部)、眼内、离子电渗和经粘膜施用。

[0414] 用于肠胃外、皮内或皮下应用的溶液或悬浮液可包含以下组分:无菌稀释剂,例如注射用水、盐水溶液、固定油类、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其他合成溶剂;抗菌剂,例如苯醇或对羟基苯甲酸甲酯;抗氧化剂,例如抗坏血酸或亚硫酸氢钠;螯合剂,例如乙二胺四乙酸;缓冲剂,例如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐;和用于调节张力的试剂,例如氯化钠或右旋糖。pH可用例如盐酸或氢氧化钠的酸或碱来调节。肠胃外制剂可装入由玻璃或塑料制成的安瓿、一次性注射器或多剂量小瓶中。为了患者或治疗医师的方便,剂量制剂可以包括治疗过程(例如,治疗7天)所需的所有设备(例如,药瓶、稀释液瓶、注射器和针头)的试剂盒的形式提供。

[0415] 适于可注射用途的医药组合物可包括无菌水溶液(其中,水溶性的)或分散体以及用于临时制备无菌可注射溶液或分散体的无菌粉末。对于静脉内施用,合适的载剂包括生理盐水、抑菌水、Cremophor EL™(BASF, Parsippany, N.J.)或磷酸盐缓冲盐水(PBS)。在所有情况下,用于肠胃外施用的组合物必须为无菌的且应为达到易于注射的程度的存在的流体。在生产和储存的条件下,其应该是稳定的且应当被保存同时防止例如细菌和真菌的微生物的污染作用。

[0416] 在一个实施方案中,本发明的芳香族阳离子肽静脉内施用。例如,芳香族阳离子肽可经由迅速静脉内大剂量注射施用。在一些实施方案中,所述芳香族阳离子肽作为恒定速率静脉内输注施用。

[0417] 所述芳香族阳离子肽也可经口、局部、鼻内、肌肉内、皮下或经皮施用。在一个实施方案中,经皮施用通过离子电渗进行,其中装入的组合物通过电流在皮肤上递送。

[0418] 其他施用途径包括侧脑室内或鞘内。侧脑室内是指施用到脑的脑室系统。鞘内是指施用到在脊髓的蛛网膜下的间隙中。因此,在一些实施方案中,对于影响中枢神经系统的

器官或组织的那些疾病和病状使用侧脑室内或鞘内施用。

[0419] 如本领域中已知,所述芳香族阳离子肽也可通过缓释施用到哺乳动物。缓释施用为递送药物以经过特定的时间达到一定的药物水平的方法。所述水平通常通过血清或血浆浓度测量。通过控制释放递送化合物的方法的描述可在国际PCT申请号WO 02/083106中见到,其通过引用整体结合到本文中来。

[0420] 在药学领域中已知的任何制剂适合施用芳香族阳离子肽。对于经口施用,可使用液体或固体制剂。制剂的实例包括片剂、明胶胶囊、丸剂、锭剂、酏剂、悬浮剂、糖浆剂、糯米纸囊剂、口香糖等。所述芳香族阳离子肽可与如本领域的开业医生了解的合适的医药载剂(媒剂)或赋形剂混合。载剂和赋形剂的实例包括淀粉;牛奶;糖;某些类型的粘土;明胶;乳酸;硬脂酸或其盐,包括硬脂酸镁或硬脂酸钙;滑石粉;植物脂肪或油;树胶和二醇。

[0421] 对于全身性、侧脑室内、鞘内、局部、鼻内、皮下或经皮施用,所述芳香族阳离子肽的制剂可利用常规稀释剂、载剂或赋形剂等,例如本领域已知的那些,以递送所述芳香族阳离子肽。例如,所述制剂可包含以下试剂中的一种或多种:稳定剂;表面活性剂,优选非离子表面活性剂;和任选盐和/或缓冲剂。所述芳香族阳离子肽可以水溶液或冻干形式递送。

[0422] 所述稳定剂可包括例如氨基酸,例如甘氨酸;寡糖,例如蔗糖、四糖、乳糖;或葡聚糖。供选地,所述稳定剂可包括糖醇,例如甘露糖醇。在一些实施方案中,所述稳定剂或稳定剂组合构成配制组合物重量的约0.1重量%-约10重量%。

[0423] 在一些实施方案中,所述表面活性剂为非离子表面活性剂,例如聚山梨酸酯。合适表面活性剂的实例包括吐温20、吐温80;聚乙二醇或聚氧乙烯聚丙二醇,例如Pluronic F-68,约0.001%(w/v)-约10%(w/v)。

[0424] 所述盐或缓冲剂可为任何盐或缓冲剂,例如分别为氯化钠或磷酸钠/磷酸钾。在一些实施方案中,所述缓冲剂维持医药组合物的pH在约5.5-约7.5范围内。所述盐和/或缓冲剂也可用于维持渗透压度在适合施用到人类或动物的水平下。在一些实施方案中,所述盐或缓冲剂以约150mM-约300mM的大致等渗浓度下存在。

[0425] 芳香族阳离子肽的制剂可另外含有一种或多种常规添加剂。这样的添加剂的实例包括增溶剂,例如甘油;抗氧化剂,例如苯扎氯铵(季铵化合物的混合物,称为“quats”)、苜醇、氯代丁醇(chloreton)或氯丁醇(chlorobutanol);麻醉剂,例如吗啡衍生物;和等渗剂等,例如如本文所述。作为防止氧化或其他损伤的另一预防措施,所述医药组合物可在用不可渗透的塞子密封的小瓶中在氮气下储存。

[0426] 根据本发明治疗的哺乳动物可为任何哺乳动物,包括例如农场动物,例如绵羊、猪、奶牛和马;宠物动物,例如狗和猫;和实验室动物,例如小鼠、大鼠和兔。在一个实施方案中,所述哺乳动物为人类。

[0427] 在一些实施方案中,芳香族阳离子肽以有效降低经历MPT或预防MPT的线粒体的数目的量施用到哺乳动物。有效量在临床前试验和临床试验期间通过内科医生和临床医生熟悉的方法来确定。

[0428] 所述芳香族阳离子肽可全身施用或局部施用。在一个实施方案中,所述芳香族阳离子肽静脉内施用。例如,芳香族阳离子肽可经由迅速静脉内大剂量注射施用。在一个实施方案中,所述芳香族阳离子肽作为恒定速率静脉内输注施用。

[0429] 所述芳香族阳离子肽可在例如血管成形术或冠状动脉旁路手术期间直接注射到

冠状动脉中或应用到冠状支架上。

[0430] 所述芳香族阳离子肽组合物可包含载剂,所述载剂可为溶剂或分散介质,其含有例如水、乙醇、多元醇(例如,甘油、丙二醇和液态聚乙二醇等)以及其合适的混合物。恰当的流动性可例如通过使用例如卵磷脂的包衣、在分散体的情况下通过维持所需粒度或通过使用表面活性剂来维持。防止微生物作用可通过例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、抗坏血酸、硫柳汞等的各种抗菌剂和防真菌剂来实现。可包括谷胱甘肽及其他抗氧化剂以防止氧化。在一些实施方案中,例如糖的等渗剂,例如甘露醇、山梨糖醇的多元醇或氯化钠包含在所述组合物中。可注射组合物的延长吸收可通过在组合物中包含例如单硬脂酸铝或明胶的延迟吸收的试剂来实现。

[0431] 无菌可注射溶液可通过将所需量的活性化合物和根据需要的上文所列成分中的一种或组合一起合并到适当溶剂中,然后经过过滤灭菌来制备。通常,分散体通过将活性化合物合并到含有基本分散介质和来自上文所列的其他所需成分的无菌媒剂中来制备。在用于制备无菌注射溶液的无菌粉末的情况下,典型制备方法包括真空干燥和冷冻干燥,其可产生活性成分加在其先前无菌过滤的溶液中的任何另外的所要成分的粉末。

[0432] 口服组合物通常包含惰性稀释剂或可食用的载剂。为了口服治疗施用,可将活性化合物与赋形剂合并并且以片剂、锭剂或例如明胶胶囊的胶囊剂的形式使用。口服组合物也可使用流体载剂制备,以作为漱口水使用。

[0433] 医药学上相容的粘合剂和/或助剂材料可作为组合物的一部分而包含。片剂、丸剂、胶囊剂、锭剂等可含有具有类似性质的以下成分或化合物中的任一种:粘合剂,例如微晶纤维素、黄耆胶或明胶;赋形剂,例如淀粉或乳糖;崩解剂,例如褐藻酸、Primogel或玉米淀粉;润滑剂,例如硬脂酸镁或Sterotes;助流剂,例如胶体二氧化硅;甜味剂,例如蔗糖或糖精;或增味剂,例如薄荷、水杨酸甲酯或桔子调味品。

[0434] 对于通过吸入施用,所述化合物可以从含有例如气体如二氧化碳的合适推进剂的加压容器或配药器或者雾化器中以气溶胶喷雾的形式递送。所述方法包括在美国专利号6,468,798中描述的那些。

[0435] 如本文所述的治疗化合物的全身性施用也可通过粘膜或经皮方法来进行。对于经粘膜或经皮施用,在制剂中使用适合穿透屏障的渗透剂。这类渗透剂通常为本领域所公知,且例如对于经粘膜施用包括清洁剂、胆汁盐和夫西地酸(fusidic acid)衍生物。经粘膜施用可通过使用鼻腔喷雾实现。对于经皮施用,将活性化合物配制成本领域通常已知的软膏、药膏、凝胶剂或乳膏。在一个实施方案中,经皮施用可通过离子电渗进行。

[0436] 治疗蛋白质或肽可在载剂系统中配制。所述载剂可为胶体系统。所述胶体系统可为脂质体、磷脂双层媒剂。在一个实施方案中,所述治疗肽封装在脂质体中,同时维持肽完整性。如本领域的技术人员应理解,存在多种制备脂质体的方法。(参见Lichtenberg等, *Methods Biochem. Anal.*, 33:337-462(1988); Anselem等, *Liposome Technology*, CRC Press(1993))。脂质体制剂可延迟清除并增加细胞摄取(参见Reddy, *Ann. Pharmacother.*, 34(7-8):915-923(2000))。活性剂还可装载到由医药学上可接受的成分制备的颗粒内,所述医药学上可接受的成分包括但不限于可溶、不可溶、可渗透、不可渗透、生物可降解或胃滞留的聚合物或脂质体。所述颗粒包括但不限于纳米颗粒、生物可降解的纳米颗粒、微粒、生物可降解的微粒、纳米球、生物可降解的纳米球、微球、生物可降解的微球、胶囊剂、乳剂、

脂质体、胶束以及病毒载体系统。

[0437] 所述载剂还可作为聚合物,例如生物可降解、生物相容的聚合物基质。在一个实施方案中,所述治疗性肽可嵌入聚合物基质中,同时维持蛋白质完整性。所述聚合物可为天然的,例如多肽、蛋白质或多糖;或合成的,例如聚 α -羟基酸。实例包括由例如下述物质制成的载剂:胶原蛋白、粘连蛋白、弹性蛋白、乙酸钠纤维素、硝酸纤维素、多糖、纤维蛋白、明胶及其组合。在一个实施方案中,所述聚合物为聚-乳酸(PLA)或乳酸/乙醇酸共聚物(PGLA)。所述聚合物基质可以多种形式和大小进行制备并分离,包括微球和纳米球。聚合物制剂可导致治疗效果持续时间延长。(参见,Reddy,Ann.Pharmacother.,34(7-8):915-923(2000))。用于人类生长激素(hGH)的聚合物制剂已用在临床试验中。(参见,Kozarich and Rich,Chemical Biology,2:548-552(1998))。

[0438] 聚合物微球持续释放制剂的实例描述在PCT公告W0 99/15154(Tracy等)、美国专利号5,674,534和5,716,644(两者都属于Zale等)、PCT公告W0 96/40073(Zale等)和PCT公告W0 00/38651(Shah等)。美国专利号5,674,534和5,716,644以及PCT公告W096/40073描述含有促红细胞生成素颗粒的聚合物基质,所述促红细胞生成素颗粒用盐针对聚集进行稳定化。

[0439] 在一些实施方案中,所述治疗化合物与将保护治疗化合物以防止其从身体中迅速清除的载剂一起制备,例如控制释放制剂,包括植入剂和微囊化递送系统。

[0440] 可使用可生物降解的生物相容性聚合物,例如乙烯乙酸乙烯酯、聚酐、聚乙醇酸、胶原蛋白、聚原酸酯和聚乙酸。这样的制剂可使用已知技术制备。这些材料也可例如自Alza Corporation和Nova Pharmaceuticals,Inc.购得。脂质体悬浮液(包括靶向具有针对细胞特异性抗原的单克隆抗体的特定细胞的脂质体)也可用作医药学上可接受的载剂。这些物质可使用本领域技术人员所公知的方法,例如如在美国专利4,522,811号中所述来制备。

[0441] 所述治疗性化合物还可配制为增强细胞内递送。例如,脂质体递送系统在本领域中已知,参见,例如Chonn和Cullis,“Recent Advances in Liposome Drug Delivery Systems,”Current Opinion in Biotechnology6:698-708(1995);Weiner,“Liposomes for Protein Delivery:Selecting Manufacture and Development Processes,”Immunomethods,4(3):201-9(1994);和Gregoriadis,“Engineering Liposomes for Drug Delivery:Progress and Problems,”Trends Biotechnol.,13(12):527-37(1995)。Mizguchi等,Cancer Lett.,100:63-69(1996)描述使用膜融合脂质体在体内和在体外将蛋白质递送至细胞。

[0442] 治疗剂的剂量、毒性和治疗效果可通过在细胞培养或实验动物中的标准医药程序来确定,例如,用于确定LD50(对50%群体致命的剂量)和ED50(在50%群体中治疗有效的剂量)。在毒性和治疗效果之间的剂量比为治疗指数,且其可表示为ED50/LD50比。优选显示出高治疗指数的化合物。尽管可使用显示出毒性副作用的化合物,但应当小心设计递送系统,所述递送系统将此类化合物靶向受影响组织的部位,以使对未受影响细胞的潜在损伤降到最低,且由此降低副作用。

[0443] 从细胞培养测定和动物研究中获得的数据可用于配制在人类中使用的剂量范围。这类化合物的剂量优选位于包括具有很少毒性或无毒性的ED50的循环浓度的范围内。剂量可根据所采用的剂型和所利用的施用途径而在该范围内变化。对于在该方法中使用的任何

化合物,可最初由细胞培养测定来估计治疗有效剂量。可在动物模型中配制剂量来实现循环血浆浓度范围,其包括如在细胞培养中确定的IC₅₀(即,实现症状的半数最大抑制的试验化合物浓度)。这类信息可用于更准确地确定在人类中的有用剂量。可例如通过高效液相色谱法测量血浆水平。

[0444] 通常,足以实现治疗或预防效果的芳香族阳离子肽的有效量为约0.000001mg/kg体重/天至约10,000mg/kg体重/天。合适地,剂量范围为约0.0001mg/kg体重/天至约100mg/kg体重/天。例如,剂量可为每天、每两天或每三天1mg/kg体重或10mg/kg体重,或者在每周、每两周或每三周1-10mg/kg的范围内。在一个实施方案中,肽的单次剂量范围为0.1-10,000微克/kg体重。在一个实施方案中,在载剂中的芳香族阳离子肽浓度为0.2-2000微克/每递送的毫升。例示性治疗方案需要每天施用一次或每周施用一次。在治疗应用中,在相对短的间隔中相对高的剂量有时是需要的,直到疾病的进展降低或终止,且优选直到受试者显示疾病症状的部分或完全缓解。此后,可对患者施用预防方案。

[0445] 在一些实施方案中,芳香族阳离子肽的治疗有效量可限定为在靶标组织处 10^{-12} 至 10^{-6} 摩尔、例如大约 10^{-7} 摩尔的肽浓度。该浓度可通过0.01-100mg/kg的全身剂量或体表面积等效剂量来递送。将最佳化剂量的时间表,以维持在靶标组织处的治疗浓度,最优选通过每天或每周单次施用,但也包括连续施用(例如,肠胃外输注或经皮应用)。

[0446] 在一些实施方案中,芳香族阳离子肽的剂量以约0.001-约0.5mg/kg/h、合适地约0.01-约0.1mg/kg/h提供。在一个实施方案中,芳香族阳离子肽的剂量以约0.1-约1.0mg/kg/h、合适地约0.1-约0.5mg/kg/h提供。在一个实施方案中,剂量以约0.5-约10mg/kg/h、合适地约0.5-约2mg/kg/h提供。

[0447] 本领域技术人员应当理解,某些因素可影响有效治疗受试者的剂量和时机,包括但不限于疾病或病症的严重性、先前治疗、受试者的一般健康和/或年龄以及存在的其他疾病。此外,使用本文所述的治疗有效量的治疗组合物治疗受试者可包括单次治疗或一系列治疗。

[0448] 根据本发明方法治疗的哺乳动物可为任何哺乳动物,包括例如农场动物,例如绵羊、猪、奶牛和马;宠物动物,例如狗和猫;和实验室动物,例如大鼠、小鼠和兔。在一个实施方案中,所述哺乳动物为人类。

[0449] 组合疗法

[0450] 在一些实施方案中,芳香族阳离子肽可与一种或多种另外的治疗剂组合以预防、缓解或治疗医学疾病或病状。例如,而并非限制,线粒体疾病或病症的治疗通常包括摄取维生素和辅助因子。另外,还可施用作为非限制性实例的抗生素、激素、抗癌剂、类固醇、免疫调节剂、皮肤病药物、抗血栓形成剂、抗贫血剂、 $\alpha\beta$ 特异性抗体和心血管剂(例如,斯达汀(statins))。

[0451] 在一个实施方案中,芳香族阳离子肽与一种或多种辅助因子、维生素、铁螯合剂、抗氧化剂、共济蛋白水平调节剂、ACE抑制剂和 β -阻断剂组合。例如,而非限制,这类化合物可包括以下各物中的一种或多种:CoQ10、左卡尼汀(Levocarnitine)、核黄素(riboflavin)、乙酰-L-卡尼汀(carnitine)、硫胺素(thiamine)、烟酰胺(nicotinamide)、维生素E、维生素C、硫辛酸(lipoic acid)、硒、 β -胡萝卜素、生物素、叶酸、钙、镁、磷、琥珀酸盐、硒、肌氨酸、尿苷、citrate、泼尼松、维生素K、去铁胺(deferoxamine)、去铁酮、艾地苯

醌(idebenone)、促红细胞生成素、17 β -雌二醇、亚甲蓝和组蛋白脱乙酰酶抑制剂如BML-210和化合物106。

[0452] 在一个实施方案中,芳香族阳离子肽与一种或多种胆碱酯酶抑制剂、NMDA拮抗剂、抗抑郁剂、抗焦虑剂、抗精神病药、三环抗抑郁剂、苯二氮卓和与睡眠障碍有关的药物组合。举例来说,而并非限制,这样的化合物可包括以下各物中的一种或多种:多奈哌齐(donepezil)(Aricept[®])、卡巴拉汀(rivastigmine)(Exelon[®])、加兰他敏(galantamine)(Razadyne[®])、他克林(Tacrine)(Cognex[®])、美金刚(memantine)(Namenda[®])、西酞普兰(citalopram)(Celexa[®])、氟西汀(flvoxetine)(Prozac[®])、帕罗西汀(paroxetine)(Paxil[®])、舍曲林(sertraline)(Zoloft[®])、曲唑酮(trazodone)(Desyrel[®])、劳拉西泮(lorazepam)(Ativan[®])、奥沙西泮(oxazepam)(Serax[®])、替马西泮(temazepam)、阿立哌唑(aripiprazole)(Abilify[®])、氯氮平(clozapine)(Clozaril[®])、氟哌啶醇(haloperidol)(Haldol[®])、奥氮平(olanzapine)(Zyprexa[®])、喹硫平(quetiapine)(Seroquel[®])、利培酮(risperidone)(Risperdal[®])、齐拉西酮(ziprasidone)(Geodon[®])、卡马西平(carbamazepine)(Tegretol[®])、去甲替林(nortriptyline)、曲唑酮(trazodone)、唑吡坦(Zolpidem)、扎来普隆(zaleplon)、水合氯醛(chloral hydrate)、利培酮(risperidone)、奥氮平(olanzapine)、喹硫平(quetiapine)和氟哌啶醇(haloperidol)。

[0453] 在一个实施方案中,另外的治疗剂与芳香族阳离子肽组合施用到受试者,从而生成增效的治疗效果。“增效治疗效果”是指由至少两种治疗剂的组合生成且超过另外将由所述至少两种治疗剂的唯一施用产生的效果的大于相加的治疗效果。一种优势可包括但不限于一种或多种治疗剂在治疗医学疾病或病状中的剂量降低,产生增加的治疗功效和减小的副作用。

[0454] 多种治疗剂(包括芳香族阳离子肽)可以任何顺序或甚至同时施用。如果同时施用,多种治疗剂可以单个、统一的形式或以多个形式提供(仅举例而言,作为单个的丸剂或两个单独的丸剂)。所述治疗剂中的一种可以多剂量给出,或者两者都可作为多剂量给出。如果不同时施用,则在多次剂量之间的时机可自大于零周至小于4周变化。另外,组合方法、组合物和制剂不限于仅使用两种药剂。

[0455] 实施例

[0456] 本发明通过以下实施例进一步说明,而不应该将其视为以任何方式限制。

[0457] 通用方法

[0458] 试剂:D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂(SS-31)由Stealth Peptides Inc., Newton Centre, MA供应。D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Ald-NH₂([ald]SS-31)使用标准固相肽合成(Dalton Pharma Services, Toronto, Ontario, Canada)来合成。制备D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂(SS-31)和D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Ald-NH₂([ald]SS-31)的水性储备溶液。1-棕榈酰基-2-油酰基-sn-甘油基-3-磷酸酯(POPA)、1-棕榈酰基-2-油酰基-sn-甘油基-3-胆碱磷酸(POPC)、1-棕榈酰基-2-油酰基-sn-甘油基-3-磷酸基-L-丝氨酸(POPS)、四肉豆蔻酰基心磷脂(TMCL)、四油酰基心磷脂(TOCL)和四油酰基心磷脂(TLCL)自Avanti Polar Lipids Inc.(Alabaster, AL)获得。主要由TLCL组成的牛心脏心磷脂自Sigma(St. Louis, MO)购买。

无水水合硝酸铜(II)、无水氯化铁(III)和无水氯化锌也自Sigma获得。无水氯化铜(II)自Avantor Performance Materials(Center Valley,PA)获得。对应于人类序列的A β ₁₋₄₂肽自Life Technologies,(Carlsbad,CA)获得。

[0459] A β ₁₋₄₂肽的寡聚:将A β ₁₋₄₂肽溶解于1.5mL的1:1水/乙腈溶液中。将500 μ L等分试样在甲醇/干冰冷却浴中冷冻且随后冻干。一旦冻干,则将各等分试样溶解于20 μ L DMSO中。随后将等分试样涡旋,离心并在冰浴中在室温下超声处理。接着加入200 μ L过滤的1x PBS和20 μ L的2% SDS。将A β ₁₋₄₂肽溶液在37 $^{\circ}$ C下培育6小时。接着将580 μ L水加到A β ₁₋₄₂肽溶液中,接着在37 $^{\circ}$ C下培育16小时,之后将其储存在4 $^{\circ}$ C下。

[0460] A β ₁₋₄₂-心磷脂-Cu²⁺复合物氧合酶活性的测量: A β ₁₋₄₂-心磷脂-Cu²⁺氧合酶活性使用Amplex Red试剂盒测量。Amplex Red为与H₂O₂以1:1化学计量比反应以生成称为试卤灵的高荧光衍生物($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}=570/585\text{nm}$)的染料。在缺乏H₂O₂的Amplex反应中过氧化物酶活性的存在为由在Amplex Red试剂和氧在溶液中的反应产生的氧合酶活性的指示。所有实验都在缺乏H₂O₂的情况下实施。测量在引入Amplex Red(加到反应中的最后试剂)之后立即进行。让反应另外进行10分钟。10分钟时间的连续时程数据使用微板分光荧光计(Molecular Devices,Sunnyvale,CA)获得。

[0461] 芳香族阳离子肽与A β ₁₋₄₂寡聚物的相互作用:D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Ald-NH₂([ald]SS-31)为含有D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂(SS-31)的衍生物的aladan(ald)。参见Birk等,J Am Soc Nephrol.24(8):1250-1261(2013)。Ald(极性敏感性荧光氨基酸)随着其环境的极性减小而表现出发射强度增加,且其发射最大值(λ_{max})经历蓝移。因此,在D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Ald-NH₂([ald]SS-31)和磷脂之间的相互作用引起肽的荧光光谱的可观察到的位移。参见Birk等,J Am Soc Nephrol.24(8):1250-1261(2013)。分析(Hitachi F-4500荧光分光光度计)D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Ald-NH₂([ald]SS-31)的荧光光谱以评定在肽和A β ₁₋₄₂寡聚物之间的相互作用。将荧光团aladan用作对照物。所有实验都在20mM Hepes(pH 7.4)中实施以复制具有生理学pH的环境。

[0462] 与A β ₁₋₄₂寡聚物复合的芳香族阳离子肽的混浊度测量:含有芳香族阳离子肽和/或A β ₁₋₄₂寡聚物的溶液的混浊度经由在 $\lambda=633\text{nm}$ 下的直角散射(Hitachi F-4500荧光分光光度计)测量。所有实验都在Hepes(pH 7.4)中实施并立即扫描。

[0463] 透射电子显微术(TEM):执行TEM以显现当A β ₁₋₄₂寡聚物与D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Ald-NH₂([ald]SS-31)接触时生成的结构。样品在染色之后约1小时制备。样品通过将A β ₁₋₄₂和D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Ald-NH₂([ald]SS-31)加到50 μ L Hepes(pH 7.4)达到30 μ M A β ₁₋₄₂和30 μ M D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Ald-NH₂([ald]SS-31)的最终浓度。随后将样品在10,000rpm下离心7分钟。接着除去上清液且将粒料再悬浮在20 μ L的Hepes(pH 7.4)中。在再悬浮之后,将样品在室温水超声处理10分钟。紧接着,将10 μ L的各样品溶液放置到用聚醋酸甲基乙烯脂(formvar)涂覆的400目铜网(Electron Microscopy Sciences,Hatfield,PA)上。样品用1.5%醋酸双氧铀(水性)染色。将醋酸双氧铀培育1分钟且随后由1号Whatman(定性)滤纸芯吸。将该染色程序重复两次,之后使用数字电子显微镜(JEOL USA JEM-1400)检查试样。

[0464] 实施例1: A β 寡聚物与心磷脂在Cu²⁺离子存在下相互作用以刺激A β ₁₋₄₂介导的氧合酶活性。

[0465] 用 A β_{1-42} 寡聚物、心磷脂和细胞色素c的Amplex Red测定没有表现出氧合酶活性。同样,涉及 A β_{1-42} 寡聚物、心磷脂、细胞色素c和氯化亚铜(CuCl_2)的Amplex Red测定未能显示出氧合酶活性。然而,如在图1中所示,心磷脂和 A β_{1-42} 寡聚物在 CuCl_2 存在下的培育促进 A β_{1-42} 介导的氧合酶活性。

[0466] 铜、锌和铁水平在老化人类的脑中升高。因此, FeCl_3 、 ZnCl_2 和 CuCl_2 用 A β_{1-42} 和心磷脂培育以确定这些金属中的哪种能够刺激 A β_{1-42} 介导的氧合酶活性。如由图1A证实, CuCl_2 强烈地刺激 A β_{1-42} 介导的氧合酶活性。例如,与非金属处理的对照物相比较,用 $10\mu\text{M}$ CuCl_2 培育心磷脂和 A β_{1-42} 寡聚物引起 A β_{1-42} 介导的氧合酶活性增加500%以上。参见图1A。

[0467] 用 $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ 观察到类似水平的 A β_{1-42} 介导的氧合酶活性。根据图1B,与非金属处理的对照物相比较,用 $10\mu\text{M}$ $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ 培育心磷脂和 A β_{1-42} 寡聚物也引起 A β_{1-42} 介导的氧合酶活性增加500%。这提出 Cu^{2+} 离子(如由 $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ 和 CuCl_2 例示)是刺激 A β_{1-42} 介导的氧合酶活性所必需的。另外,图1C证实 Cu^{2+} 离子以剂量依赖方式刺激 A β_{1-42} 介导的氧合酶活性。

[0468] 这些结果证实 A β 寡聚物在 Cu^{2+} 离子存在下与心磷脂相互作用以刺激 A β_{1-42} 介导的氧合酶活性。

[0469] 实施例2:心磷脂同种型1,1',2,2'-四油酰基心磷脂(TLCL)是 Cu^{2+} 依赖性刺激 A β_{1-42} 介导的氧合酶活性所需要的。

[0470] A β 寡聚物用Amplex Red、 $30\mu\text{M}$ CuCl_2 和四种不同类型的磷脂:POPA、POPC、POPS或TLCL中的一种培育。如在图2B中所示,除TLCL以外的磷脂在 Cu^{2+} 离子存在下不能刺激 A β_{1-42} 介导的氧合酶活性。该结果证实 A β_{1-42} 介导的氧合酶反应不仅仅由TLCL磷脂的阴离子电荷驱动。

[0471] 心磷脂以三种结构形式存在,其中TLCL是最不饱和的。参见图2A。将 A β 寡聚物用Amplex Red、 $30\mu\text{M}$ CuCl_2 和三种心磷脂同种型:TLCL、TOCL和TMCL中的一种培育。图2C证实TLCL为能够在 Cu^{2+} 离子存在下刺激 A β_{1-42} 介导的氧合酶活性的唯一心磷脂同种型。另外,图3A证实TLCL以剂量依赖方式增加 A β_{1-42} 介导的氧合酶活性。同样,图3B证实 A β 寡聚物的浓度与 A β_{1-42} 介导的氧合酶活性的水平直接相关。

[0472] 这些结果证实TLCL和 A β 寡聚物两者都是 Cu^{2+} 依赖性刺激 A β_{1-42} 介导的氧合酶活性所必需的。

[0473] 实施例3:芳香族阳离子肽以剂量依赖方式抑制 A β_{1-42} 介导的氧合酶活性。

[0474] 将用Amplex Red、 $30\mu\text{M}$ CuCl_2 和TLCL培育的 A β 寡聚物暴露于变化浓度的D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂(SS-31)和D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Ala-NH₂([ald]SS-31)。如在图4B中所示,芳香族阳离子肽以剂量依赖方式抑制 A β_{1-42} 介导的氧合酶活性。与未处理的对照物相比较,用 $10\mu\text{M}$ D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂(SS-31)或 $10\mu\text{M}$ D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Ala-NH₂([ald]SS-31)处理示出 A β_{1-42} 介导的氧合酶活性降低90%。另外,与未处理的对照物相比较,暴露于 $100\mu\text{M}$ D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂(SS-31)或 $100\mu\text{M}$ D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Ala-NH₂([ald]SS-31)引起 A β_{1-42} 介导的氧合酶活性的完全抑制。

[0475] 这些结果证实能够穿越血脑屏障的例如D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂(SS-31)和D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Ala-NH₂([ald]SS-31)的芳香族阳离子肽可抑制毒性 A β_{1-42} 介导的氧合酶活性。因而,这些结果证实本发明的芳香族阳离子肽可用于降低 A β_{1-42} 氧合酶活性并预防在患有与 β -淀粉样蛋白肽(A β)毒性关联的疾病的受试者中的神经元细胞凋亡或

线粒体功能障碍的方法中。

[0476] 实施例4:在芳香族阳离子肽和A β 寡聚物之间的相互作用。

[0477] 在芳香族阳离子肽D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Ald-NH₂([ald]SS-31)和A β 寡聚物之间的相互作用使用在Birk等,2013中描述的发射光谱技术研究。将Aladan(Ald)用作阴性对照。如在图5中所示,在遇到1 μ M A β 寡聚物时D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Ald-NH₂([ald]SS-31)表现出蓝移,即 $\lambda_{\max}$ 从535nm移到465nm。该蓝移和荧光强度增加提出肽的aladan部分嵌入A β 寡聚物的疏水环境中。相反,Ald在接触1 μ M A β 寡聚物时没有表现出蓝移,即 $\lambda_{\max}$ 保持在535nm下。

[0478] 这些结果证实D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Ald-NH₂([ald]SS-31)与A β 寡聚物特异性相互作用,而不是Ald残基的假象。

[0479] 实施例5:芳香族阳离子肽驱动A β 平衡朝向原纤维形成。

[0480] 为了进一步研究在实施例4中描述的相互作用的生物相关性,执行混浊度试验以确定D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Ald-NH₂([ald]SS-31)对A β 寡聚物的整体结构的作用。如在图6中所示,与在A β_{1-42} 寡聚物对照样品中所观察到的光散射相比较,将D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Ald-NH₂([ald]SS-31)加到A β_{1-42} 寡聚物中引起光散射增加6倍。该可观察到的混浊度增加预示着A β 寡聚物聚集的改变。然而,将D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂(SS-31)或Ald加到A β_{1-42} 寡聚物中没有引起混浊度改变且类似于在A β_{1-42} 寡聚物对照样品中观察到的光散射,即约180RFU。

[0481] A β 寡聚物的聚集图案使用电子显微镜术分析。将A β 寡聚物并A β 原纤维用作对照物。分别参见图7A和图7D。图7B示出D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Ald-NH₂([ald]SS-31)诱发的A β 原纤维化的进展。在图7B的顶部,在一个区域中存在增加密度的A β 寡聚物。这样的寡聚物聚集是原纤维形成的先决条件。另外,原纤维存在于图7B的下右部中。原纤维代表在A β 寡聚物和A β 原纤维之间的中间阶段。最后,更致密的原纤维斑存在于图7B的下左部,其预示着这些结构进行到在图7C中示出的原纤维阶段的能力。

[0482] 此外,用D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Ald-NH₂([ald]SS-31)培育A β 寡聚物改变原纤维化过程的动力学。具体地讲,A β 寡聚物经历天然原纤维化通常花费至少7天。用D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Ald-NH₂([ald]SS-31)培育A β 寡聚物25分钟引起与在原纤维对照样品中发现的那些相同的A β 原纤维的形成。分别参见图7C和图7D。因此,用D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Ald-NH₂([ald]SS-31)处理使原纤维形成的速率增加400倍。

[0483] 这些结果证实本发明的芳香族阳离子肽可通过刺激无毒A β 原纤维的形成降低毒性A β 寡聚物的细胞外浓度。因而,这些结果证实本发明的芳香族阳离子肽可用于预防毒性A β 寡聚物进入细胞中并降低在患有与 β -淀粉样蛋白肽(A β)毒性关联的疾病的受试者中的现有A β 寡聚物浓度的方法中。

[0484] 等效物

[0485] 本发明不限于在本申请中描述的特定实施方案,所述特定实施例预期作为本发明的单个方面单独说明。如本领域的技术人员显而易见,本发明的许多修改和变化可在不脱离其精神和范围的情况下进行。根据上述说明书,除本文中列举的那些之外,在本发明的范围内的功能上等价的方法和设备对于本领域的技术人员将是显而易见的。预期这类修改和变化落在所附权利要求的范围内。本发明仅受所附权利要求书连同这类权利要求书赋予权

力的等价物的全部范围限制。应当理解,本发明并不限于特定的方法、试剂、化合物、组合物和生物系统,当然,所述方法、试剂、组合物和生物系统可以变化。还应理解,本文使用的术语仅用于描述特定实施方案,并不预期是限制性的。

[0486] 另外,当本公开内容的特征或方面按照Markush组进行描述时,本领域的技术人员将认识到本公开内容由此也按照Markush组的任何个别成员或成员亚组进行描述。

[0487] 如本领域的技术人员应当理解,为了任何和所有目的,特别是在提供书面说明书方面,本文公开的所有范围还涵盖任何和所有可能的子范围及其子范围的组合。任何列出的范围可容易地视为充分描述并使相同范围能够分解成至少相等的二分之一、三分之一、四分之一、五分之一、十分之一等。作为非限制性实例,本文讨论的每个范围可容易地分解成下三分之一、中三分之一和上三分之一等。如本领域的技术人员还应理解,所有的语言如“上至”、“至少”、“大于”、“小于”等等包括所述数目,并且指随后可分解成如上文讨论的子范围的范围。最后,如本领域的技术人员应当理解,范围包括每一个别成员。因此,例如,具有1-3个单元的组指具有1、2或3个单元的组。类似地,具有1-5个单元的组是指具有1、2、3、4或5个单元的组等等。

[0488] 本文提及或引用的所有专利、专利申请、临时申请和出版物包括所有附图和表格全文以引用的方式结合,到它们不与本说明书的明确教导相矛盾的程度。

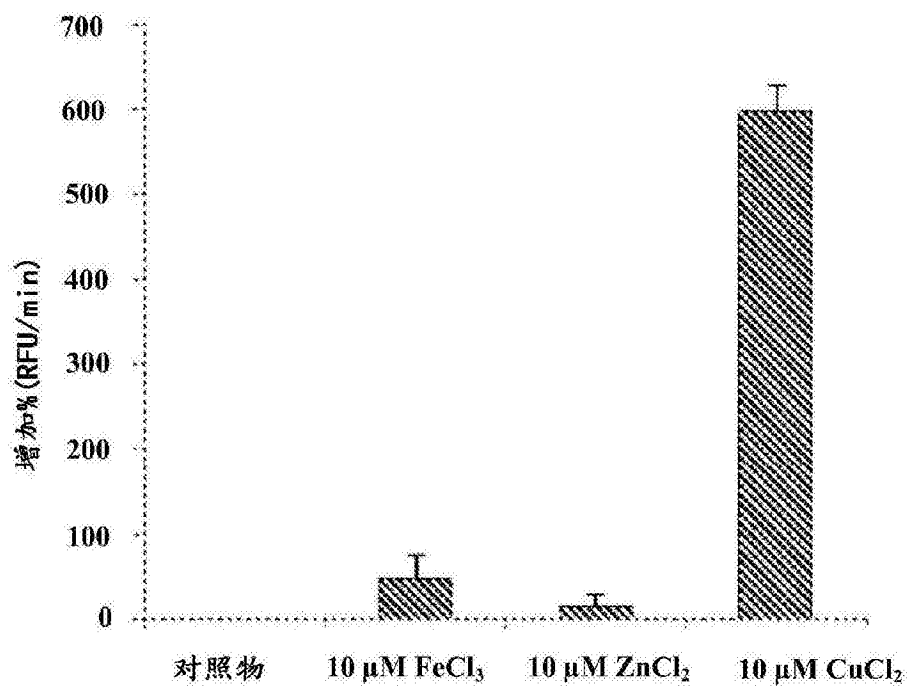


图1A

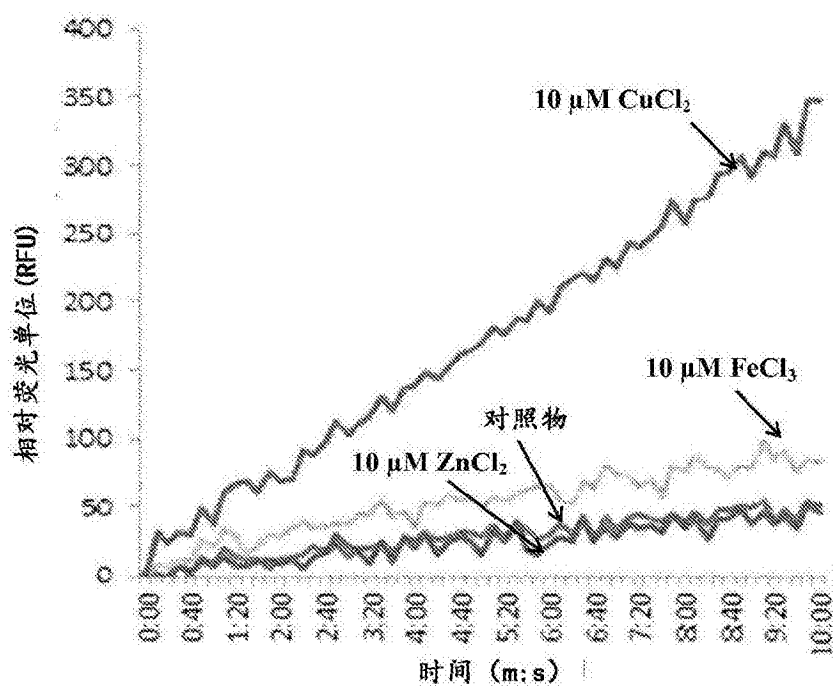


图1A(续)

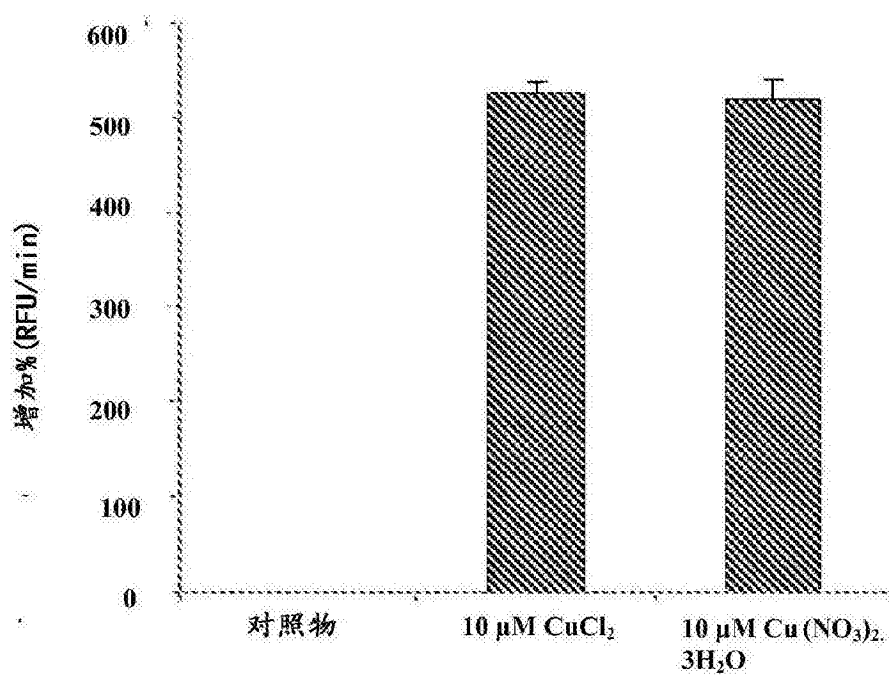


图1B

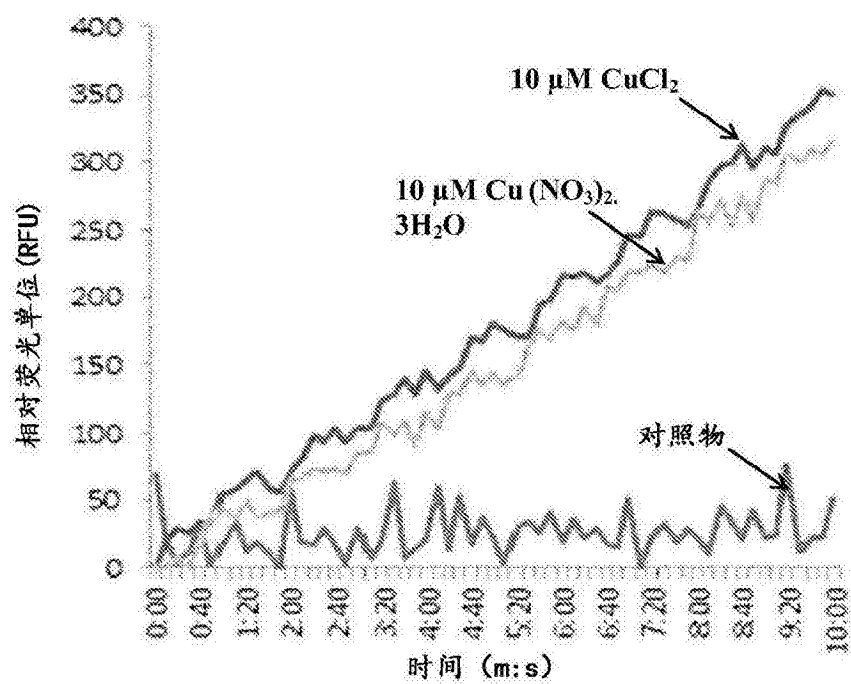


图1B(续)

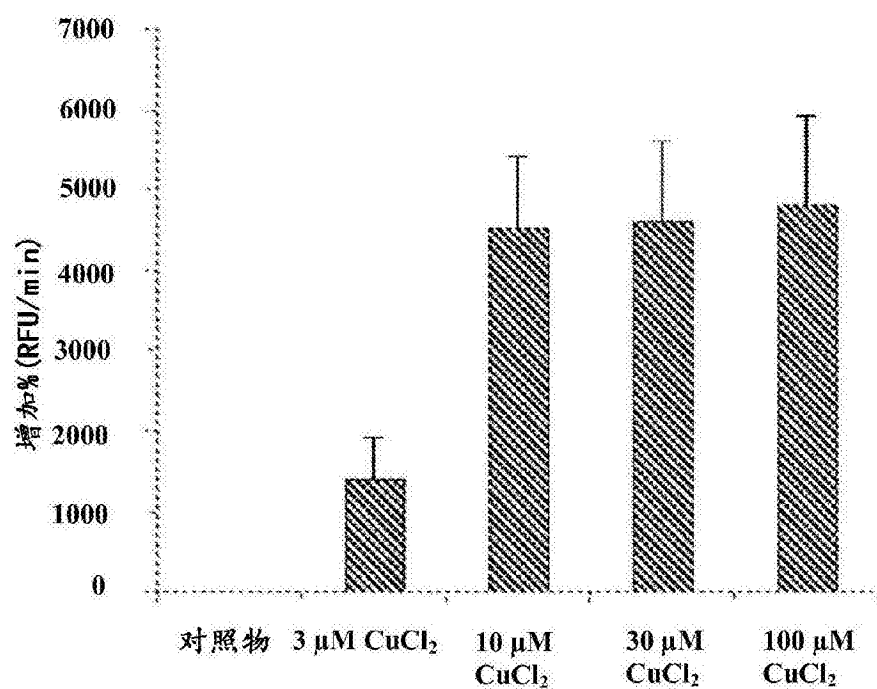


图1C

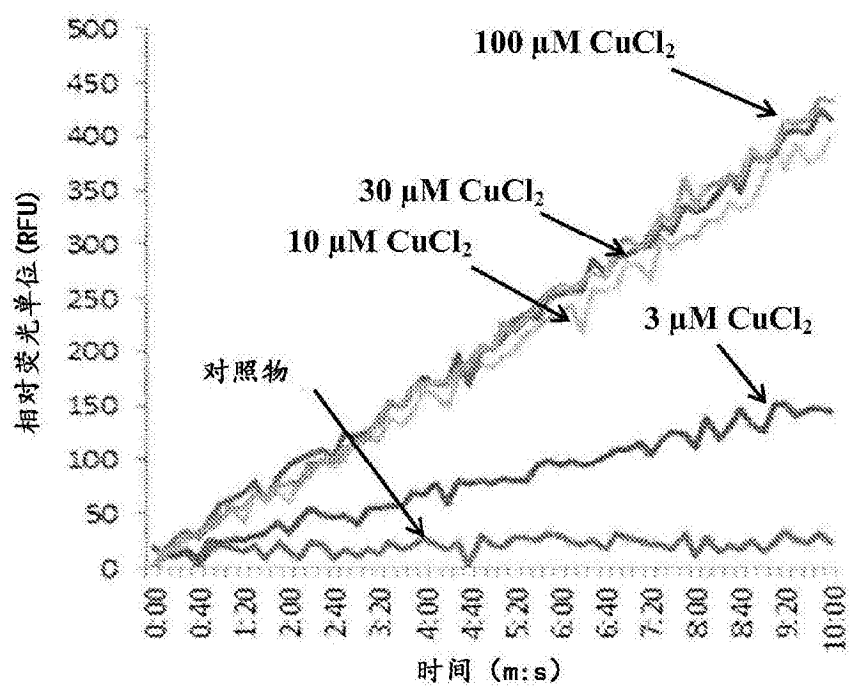


图1C(续)

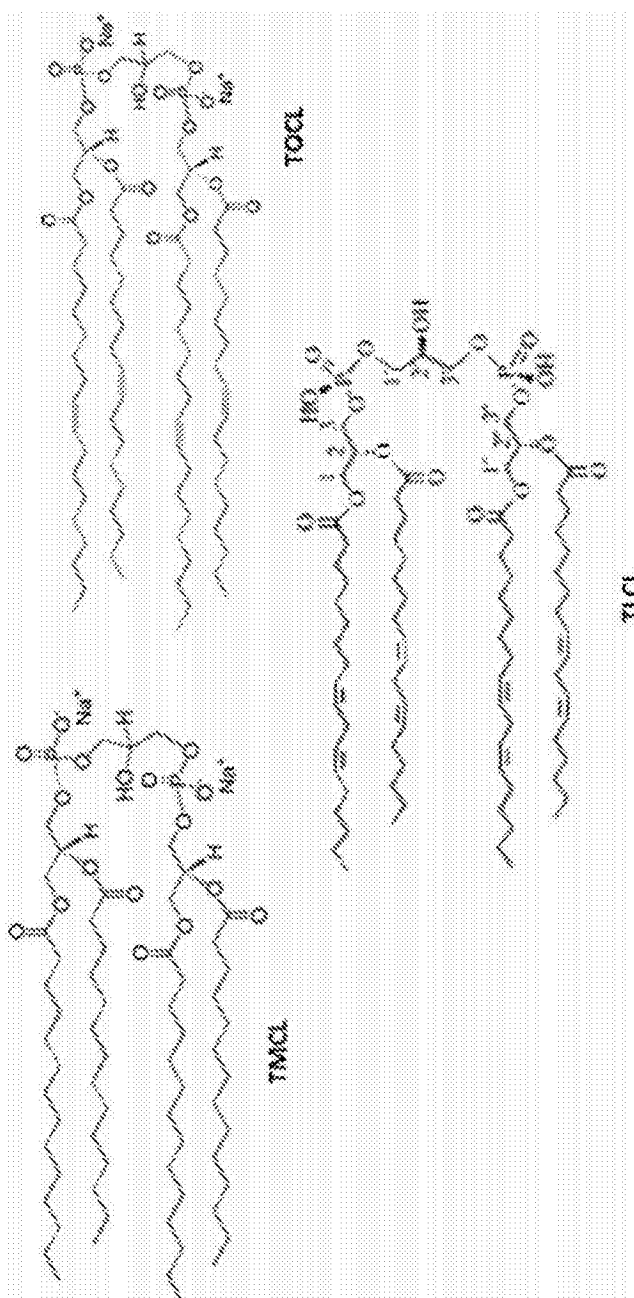


图2A

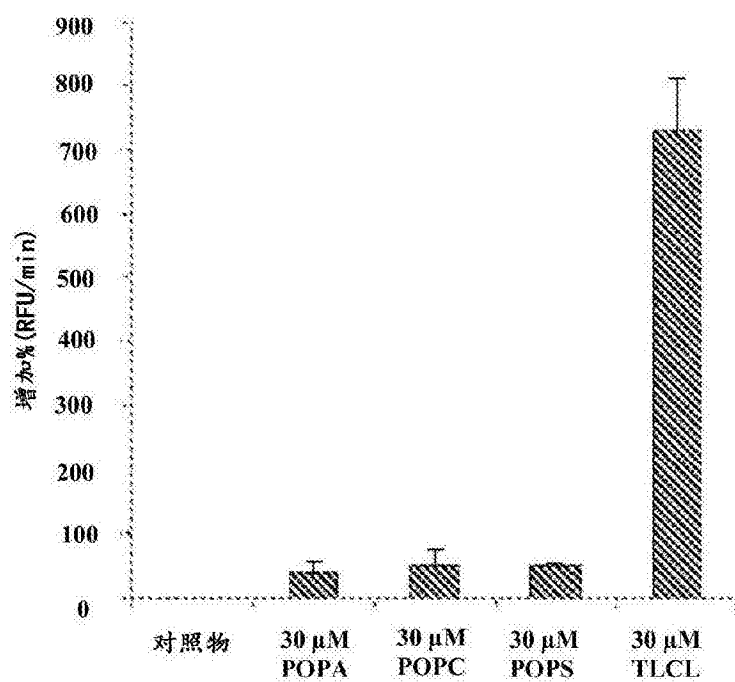


图2B

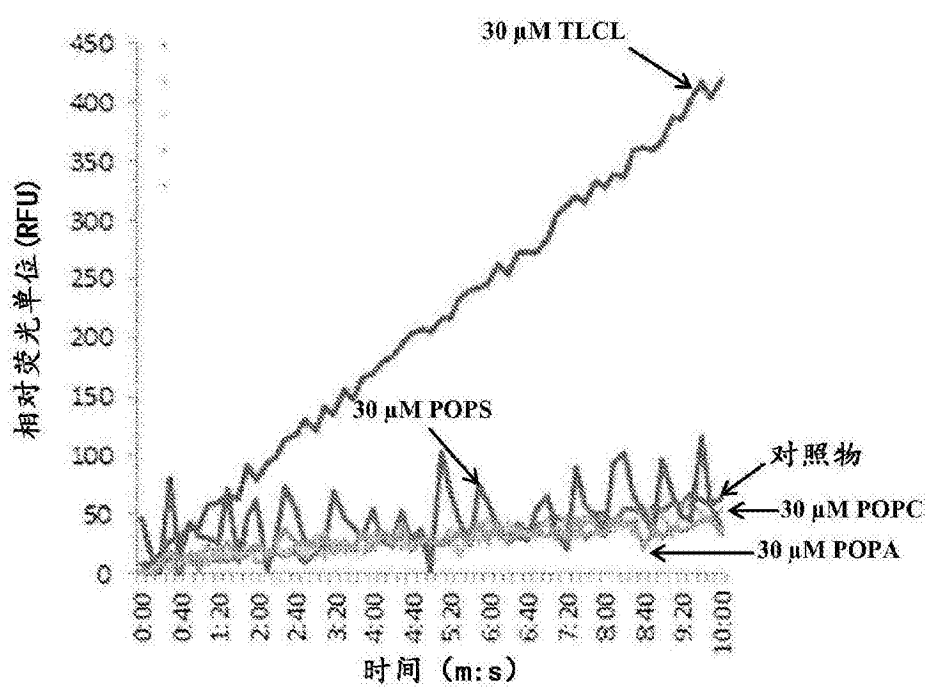


图2B(续)

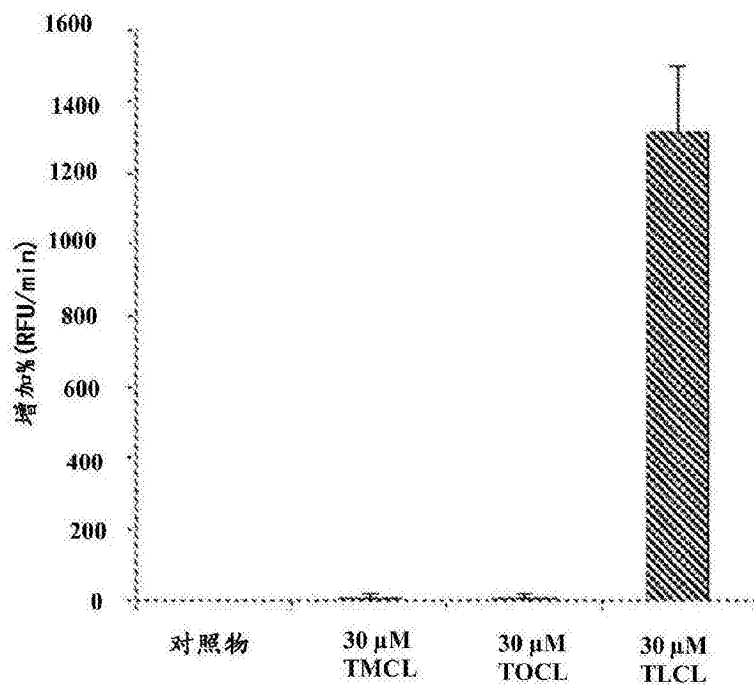


图2C

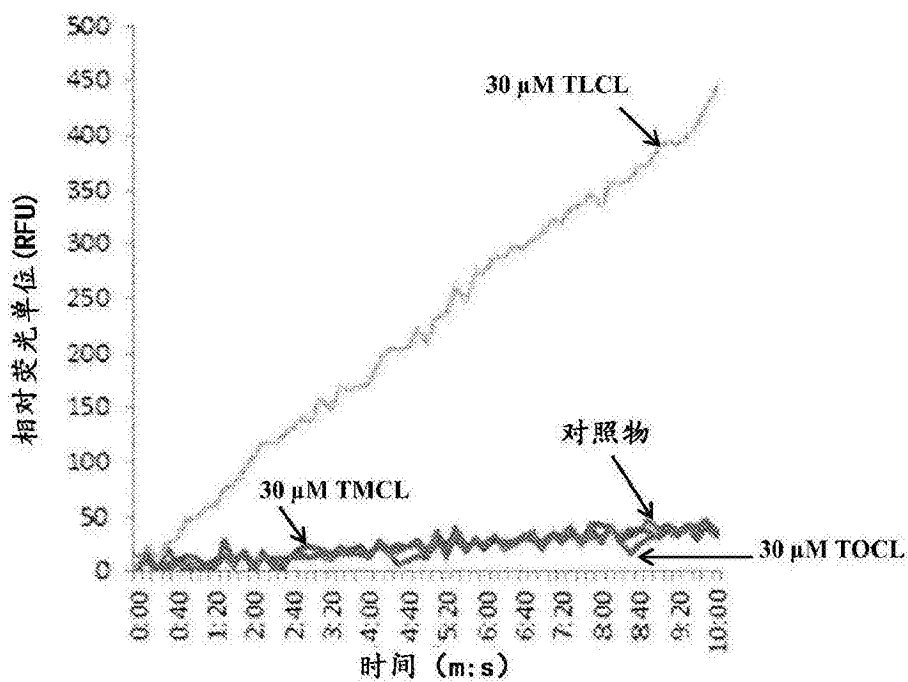


图2C(续)

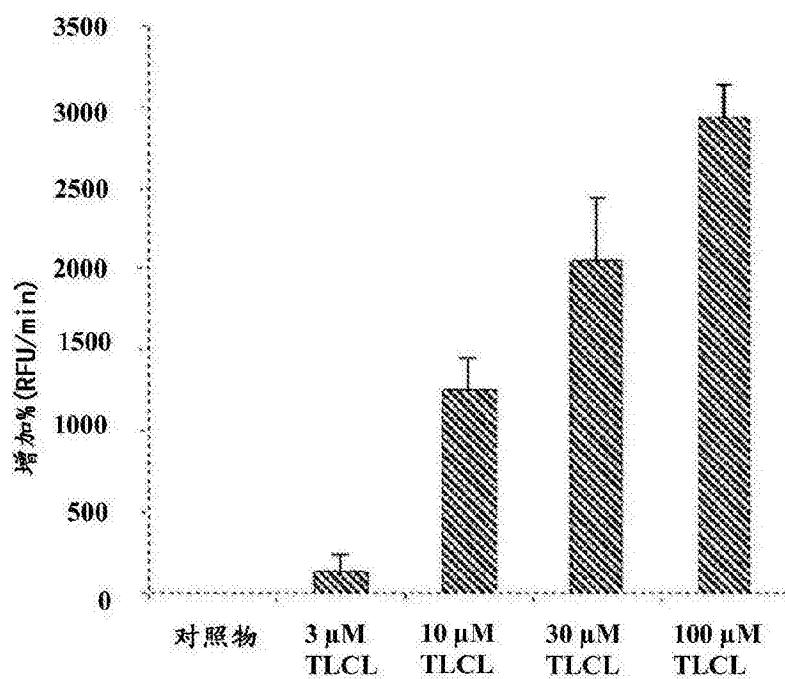


图3A

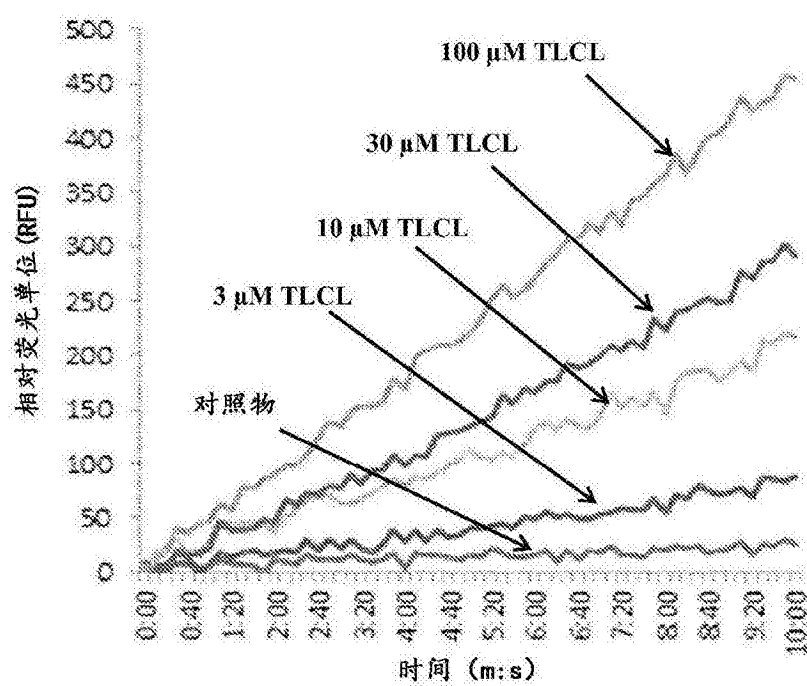


图3A(续)

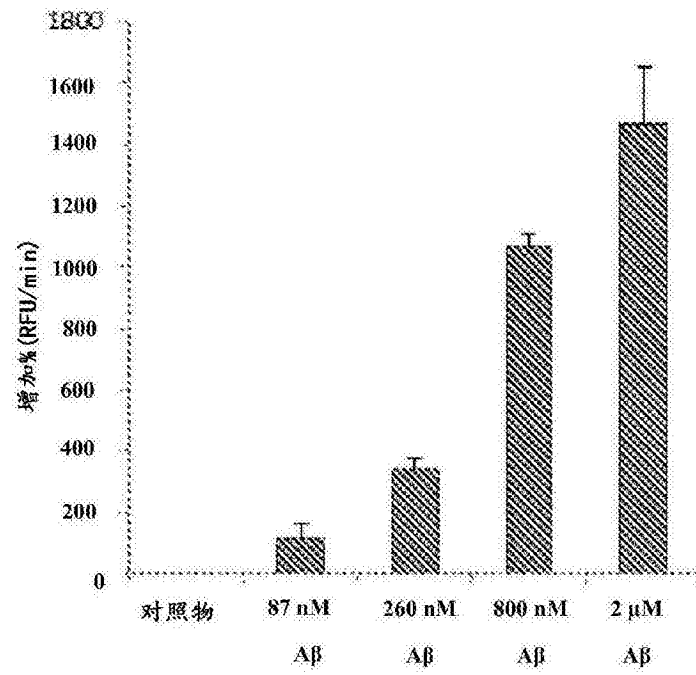


图3B

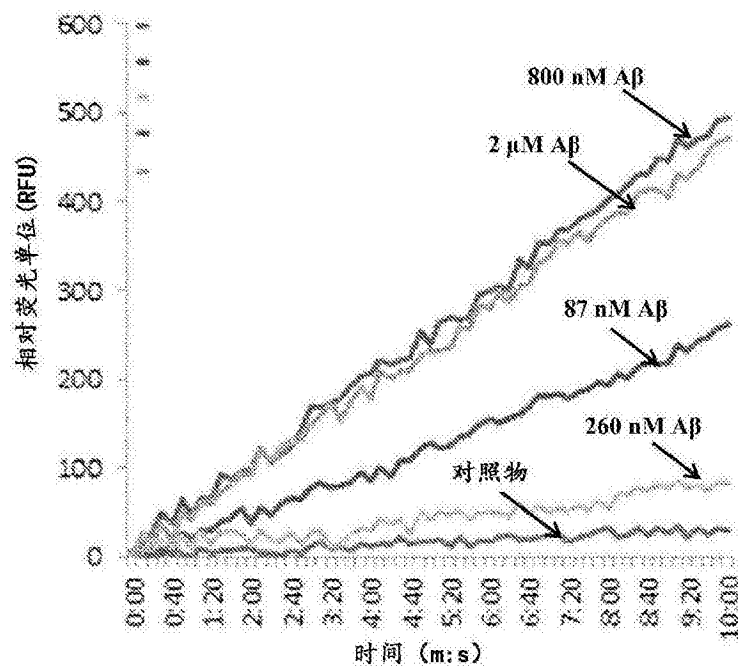


图3B(续)

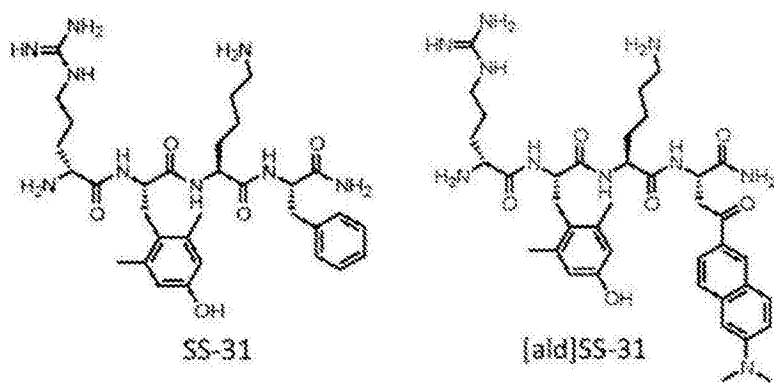


图4A

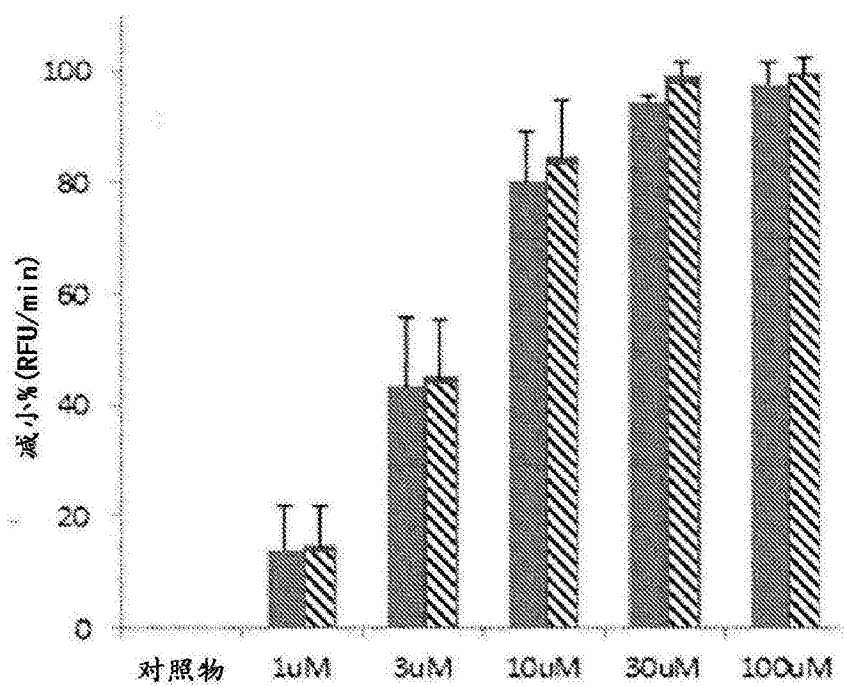


图4B

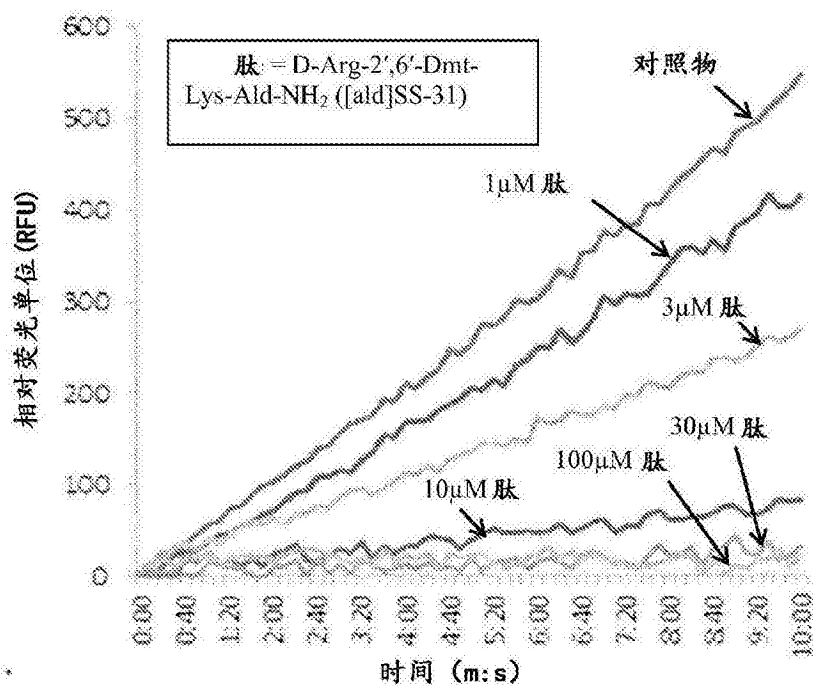


图4B(续)

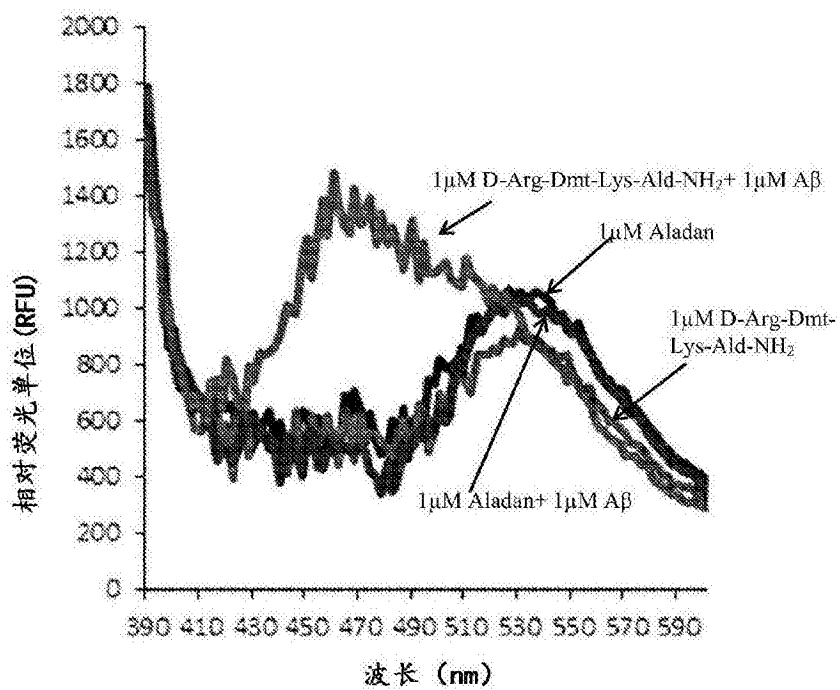


图5

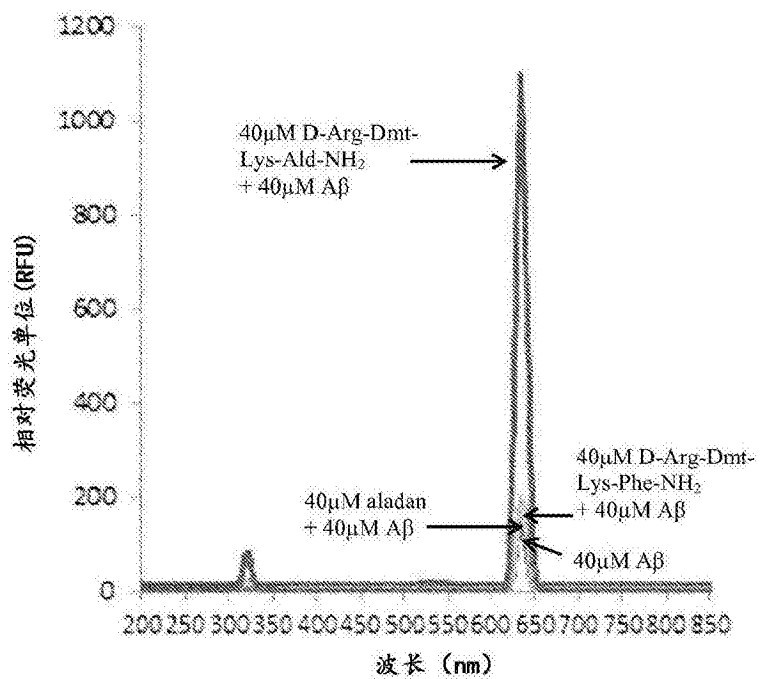


图6

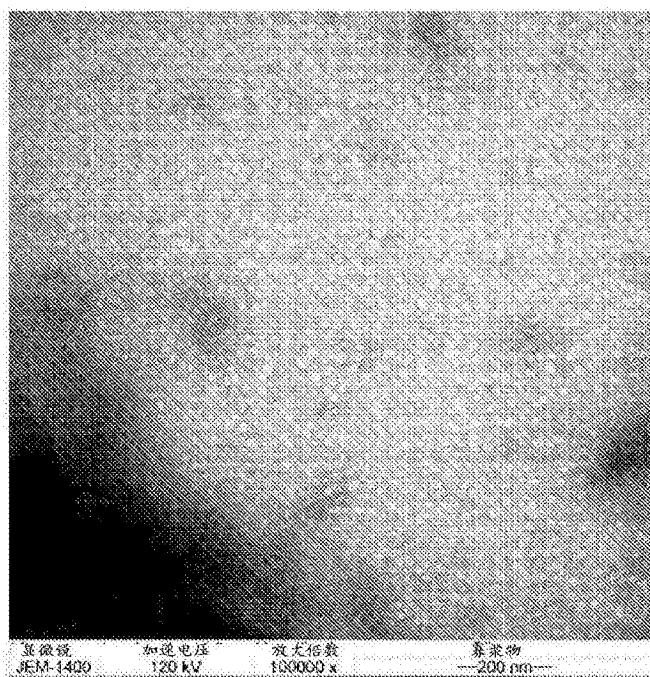


图7A

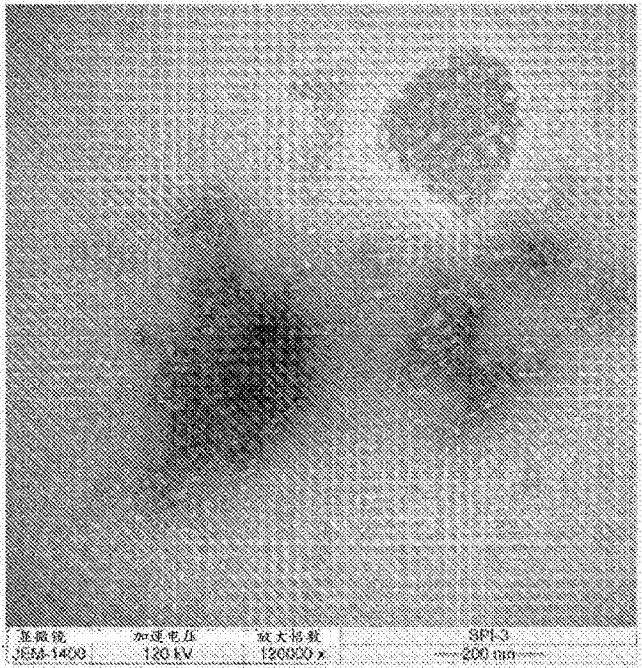


图7B

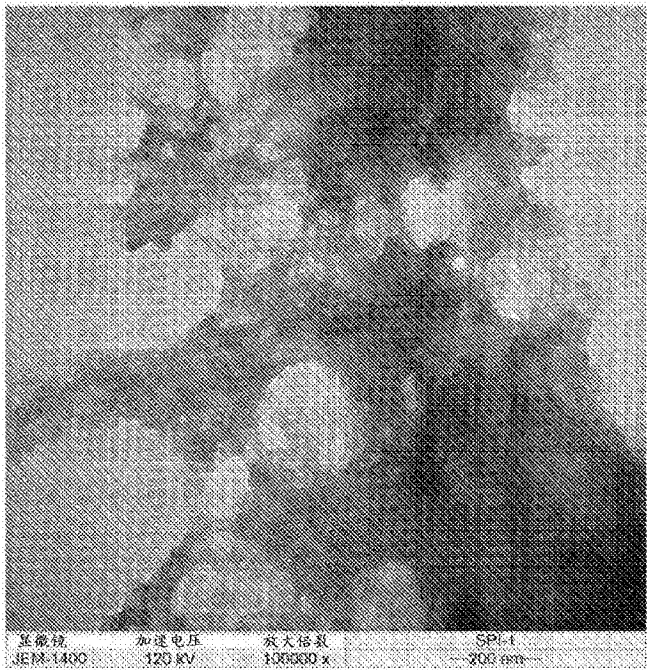


图7C

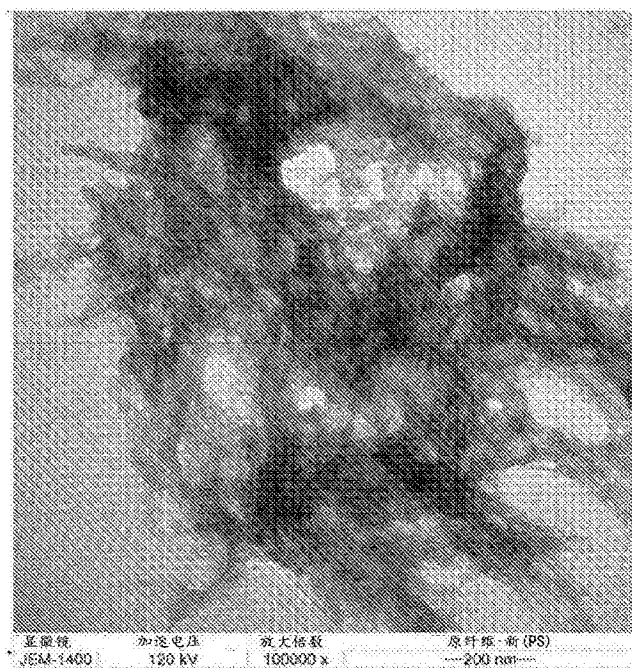


图7D