



1. 一种单离的肽,其特征在於:所述单离的肽仅由SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:18或SEQ ID NO:21所表示的一氨基酸序列所组成。
2. 一种单离的肽,其特征在於:所述单离的肽仅由SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:20所表示的一氨基酸序列所组成。
3. 一种药物组合物,其特征在於:所述药物组合物包含:如权利要求1至2任一项所述的肽以及一生理上可接受的载体,所述肽作为一活性剂。

## 肽化合物及其治疗用途

[0001] 相关申请案

[0002] 本申请要求于2018年7月11日提交的以色列专利申请第260555号的优先权,其全部内容通过引用合并于此。

[0003] 序列列表声明:

[0004] ASCII档案,命名77809Sequence Listing.txt,2019年7月7日创建,包含8,069,120个字节,在与本申请提交同时通过引用并入本文。

[0005] 技术领域及背景技术

[0006] 本发明在一些实施例中,涉及组合物及使用所述组合物治疗发炎性和自身免疫性疾病的方法。

[0007] 对于可用于减弱正常组织中细胞和免疫应激反应的新型组合物存在未满足的需求,以一种特定、安全且有效的方式,从而降低与压力相关的退化性疾病和压力引起的发炎的严重程度。

[0008] 肽LPPLPYP (SEQ ID NO:2,也称为Stressin-1和IPL344)是一种短的7个氨基酸的肽,其保护各种类型的细胞免受促凋亡压力并激活Akt信号系统。PL344的结构类似于衔接蛋白的结合位点。已经提出一种作用机制,所述机制包含模仿这类蛋白质并通过Akt和其他可能的途径激活细胞保护过程。

[0009] 国际专利申请公开号W0 2006/021954和W02012/160563公开LPPLPYP (SEQ ID NO:2) 肽用于治疗疾病如ALS的用途。

### 发明内容

[0010] 根据本发明的一个观点,提供一种单离的肽,不超过10个氨基酸,其中所述单离的肽包含以公式 $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6$  (SEQ ID NO:17) 表示的一氨基酸序列,

[0011] (i) 其中 $X_1$ 是脯氨酸,或者脯氨酸的一类似物或衍生物;

[0012] (ii) 其中 $X_2$ 是脯氨酸,或者脯氨酸的一类似物或;

[0013] (iii) 其中 $X_3$ 选自由丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、半胱氨酸、异亮氨酸、蛋氨酸以及它们的一衍生物或类似物所组成的一族群;

[0014] (iv) 其中 $X_4$ 选自由丙氨酸、缬氨酸、丝氨酸以及它们的一衍生物或类似物所组成的一族群;

[0015] (v) 其中 $X_5$ 是任一氨基酸;

[0016] (vi) 其中 $X_6$ 是脯氨酸,或者脯氨酸的一类似物或衍生物;以及

[0017] (vii) 其中所述肽用以减少一小鼠中由地塞米松引发的脾脏及/或胸腺的重量减轻的量。

[0018] 根据本发明的一个观点,提供一种单离的肽,不超过6个氨基酸,其中所述单离的肽包含以公式 $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5$  (SEQ ID NO:1) 表示的一氨基酸序列,

[0019] (i) 其中 $X_1$ 是脯氨酸,或者脯氨酸的一类似物或衍生物;

[0020] (ii) 其中 $X_2$ 是脯氨酸,或者脯氨酸的一类似物或衍生物;

[0021] (iii) 其中 $X_3$ 选自由丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、半胱氨酸、异亮氨酸、蛋氨酸以及它们的一衍生物或类似物所组成的一族群；

[0022] (iv) 其中 $X_4$ 选自由丙氨酸、缬氨酸、丝氨酸、脯氨酸以及它们的一衍生物或类似物所组成的一族群；

[0023] (v) 其中 $X_5$ 是任一氨基酸；以及

[0024] (vi) 其中所述肽用以减少一小鼠中由地塞米松引发的脾脏及/或胸腺的重量减轻的量。

[0025] 根据本发明的一个观点,提供一种单离的肽,有5个氨基酸,其中所述单离的肽由公式 $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5$  (SEQ ID NO:5) 表示的一氨基酸序列组成,其中

[0026] (i)  $X_1$ 和 $X_3$ 是任一氨基酸；

[0027] (ii)  $X_2$ 是脯氨酸,或脯氨酸的一类似物或衍生物；

[0028] (iii)  $X_4$ 不是脯氨酸；以及

[0029] (iv) 所述肽用以减少一小鼠中由地塞米松引发的脾脏及/或胸腺的重量减轻的量。

[0030] 根据本发明的一个观点,提供一种单离的肽,有7个氨基酸,所述单离的肽由公式 $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7$  (SEQ ID NO:6) 表示的一氨基酸序列所组成,其中

[0031] (i)  $X_1$ 、 $X_5$ 以及 $X_6$ 是任一氨基酸；

[0032] (ii)  $X_2$ 、 $X_3$ 以及 $X_7$ 是脯氨酸,或者脯氨酸的一类似物或衍生物；

[0033] (iii)  $X_4$ 不是脯氨酸；以及

[0034] (iv) 所述肽用以减少一小鼠中由地塞米松引发的脾脏及/或胸腺的重量减轻的量。

[0035] 根据本发明的一个观点,提供一种药物组合物,其中所述药物组合物包含:如权利要求1至27任一项所述的肽以及一生理上可接受的载体,所述肽作为一活性剂。

[0036] 根据本发明的实施例,脯氨酸的所述衍生物或类似物选自由N-甲基脯氨酸、 $\alpha$ -甲基脯氨酸以及 $\alpha$ -氨基丁酸所组成的一族群。

[0037] 根据本发明的实施例,所述肽为6个氨基酸长度。

[0038] 根据本发明的实施例,所述肽包含一氨基酸,附接至 $X_1$ 的N端点,所述氨基酸选自由丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、半胱氨酸、异亮氨酸、蛋氨酸以及它们的一衍生物或类似物所组成的一族群。

[0039] 根据本发明的实施例,附接至 $X_1$ 的所述N端点的所述氨基酸是亮氨酸,或者亮氨酸的一衍生物或类似物。

[0040] 根据本发明的实施例,附接至 $X_1$ 的所述N端点的所述氨基酸是D-氨基酸。

[0041] 根据本发明的实施例,所述肽为7个氨基酸长度。

[0042] 根据本发明的实施例,所述 $X_4$ 是丙氨酸,或丙氨酸的一类似物或衍生物。

[0043] 根据本发明的实施例,所述 $X_5$ 选自由酪氨酸、苯基丙氨酸、色氨酸以及它们的一衍生物或类似物所组成的一族群。

[0044] 根据本发明的实施例,所述 $X_5$ 是酪氨酸。

[0045] 根据本发明的实施例,所述单离的肽包含SEQ ID NO:4所表示的一氨基酸序列。

[0046] 根据本发明的实施例,所述单离的肽由SEQ ID NO:4所表示的一氨基酸序列所组

成。

[0047] 根据本发明的实施例,所述肽包含SEQ ID NO:18所表示的一氨基酸序列。

[0048] 根据本发明的实施例,所述肽由SEQ ID NO:18所表示的一氨基酸序列所组成。

[0049] 根据本发明的实施例,所述单离的肽为5个氨基酸。

[0050] 根据本发明的实施例,所述X<sub>4</sub>选自由丙氨酸、脯氨酸、丙氨酸的一衍生物或类似物以及脯氨酸的一衍生物或类似物所组成的一族群。

[0051] 根据本发明的实施例,脯氨酸的所述衍生物或类似物选自由N-甲基脯氨酸、 $\alpha$ -甲基脯氨酸以及 $\alpha$ -氨基丁酸所组成的一族群。

[0052] 根据本发明的实施例,所述氨基酸序列包含SEQ ID NO:3所表示的一氨基酸序列。

[0053] 根据本发明的实施例,所述单离的肽由SEQ ID NO:3所表示的一氨基酸序列所组成、由SEQ ID NO:7所表示的一氨基酸序列所组成,或由SEQ ID NO:18所表示的一氨基酸序列所组成。

[0054] 根据本发明的实施例,所述X<sub>3</sub>是亮氨酸。

[0055] 根据本发明的实施例,所述X<sub>1</sub>及/或X<sub>3</sub>是D-氨基酸。

[0056] 根据本发明的实施例,所述肽是一钉接肽。

[0057] 根据本发明的实施例,所述肽是一环肽。

[0058] 根据本发明的实施例,所述序列的顺序颠倒,且所有氨基酸均为D型。

[0059] 根据本发明的实施例,所述肽附接至一细胞穿透部分。

[0060] 根据本发明的实施例,所述细胞穿透部分附接至所述肽的一N端点。

[0061] 根据本发明的实施例,所述肽应用于处理一发炎性或退化性的疾病。

[0062] 根据本发明的实施例,所述疾病与凋亡关联且是一发炎性的或退化性的疾病。

[0063] 根据本发明的实施例,所述发炎性的疾病是一自身免疫性疾病。

[0064] 根据本发明的实施例,所述退化性的疾病是一神经退化性疾病。

[0065] 根据本发明的实施例,所述疾病与凋亡关联且选自由年龄相关性黄斑变性(AMD)、色素性视网膜炎、中风以及心肌梗塞所组成的一族群。

[0066] 除非另有定义,否则本文使用的所有技术及/或科学术语具有与普通技术人员对本发明有关的技术领域中所通常理解的不同含义。虽然类似或等同于本文描述的那些方法与材料可以用在本发明实施例的实践或测试中,示例性方法及/或材料仍进行说明如下。在冲突的情况下,专利说明书,包括定义,将控制。此外,材料、方法和举例仅是说明性的,非意指其必要限制。

## 附图说明

[0067] 在此描述本发明的一些实施例,仅通过举例的方式,参照随附的图式以及图像。现以具体参照附图详细说明,强调所示细节是通过举例的方式以及为了发明实施例的说明性讨论的目的。在这点上,结合附图所做的描述会使得本领域的技术人员明显可知本发明的实施例可以如何实施。

[0068] 在附图中:

[0069] 图1是一图表绘示示例的肽对脾脏重量、脾脏细胞数、胸腺重量以及胸腺细胞数的效果。

[0070] 筛检中使用的肽如下:

[0071] PPLPY-SEQ ID NO:3

[0072] LPPLAYP-SEQ ID NO:4

[0073] PLPYP-SEQ ID NO:9

[0074] PPL-SEQ ID NO:10

[0075] PLP-SEQ ID NO:11

[0076] PYP-SEQ ID NO:12

[0077] LPGLPYP-SEQ ID NO:13

[0078] LPPLGYP-SEQ ID NO:14

[0079] LAPLPYP-SEQ ID NO:15

[0080] LPALPYP-SEQ ID NO:16

[0081] 图2是一图表绘示示例的肽对脾脏重量、脾脏细胞数、胸腺重量以及胸腺细胞数的效果。

[0082] 筛检中使用的肽如下:

[0083] LPPLPYP-SEQ ID NO:2 (对照)

[0084] PPLAYP-SEQ ID NO:18

[0085] LPPLPY-SEQ ID NO:7

[0086] LPPLAYP-SEQ ID NO:4

[0087] PPLPY-NH<sub>2</sub>-SEQ ID NO:19

[0088] PPLPY-SEQ ID NO:3

### 具体实施方式

[0089] 本发明,在一些实施例中,涉及组合物及使用所述组合物治疗一发炎性及自身免疫性疾病的方法。

[0090] 在详细解释本发明的至少一个实施例之前,应该理解,本发明的应用并不一定限于下面所描述及/或绘示于附图中及/或范例中的组件的构造和布置及/或方法的细节。或在附图和/或实施例中说明。本发明能够以其他方式实施或以各种方式实践或执行。

[0091] 肽键几乎仅在一反式构象被发现,其具有一扭转角 $\omega$  (torsion angle  $\omega$ ) 接近180度,而仅有一非常有限的部份在顺式构象中被发现,具有一 $\omega$ 角约0度。反式/顺式构造之间的能障(energetic barrier)趋近于20[kcal/mol],且所述反式异构体是约2.5[kcal/mol]在能量上偏好的。在20个经典氨基酸中,脯氨酸扮演一个特殊的角色。所述脯氨酸肽键带有前面的氨基酸残基(Xaa-Pro, Xaa表示任何氨基酸)且缺乏酰胺氢,因此这个肽键不能作为氢键供体,且能障及能隙显著降低至分别约13及约0.5[kcal/mol][2],所述反式/顺式的平衡向顺式构造偏移。与所述脯氨酸的反式/顺式异构化过程关联(0至180)的 $\omega$ 角的大变化受到分子内和分子间相互作用的调节,且对多肽链的结构活性关系有一戏剧性的影响。这样的脯氨酸异构化正在成为控制许多生物过程活动的关键组成部分。这与短肽特别相关,短肽中顺式构型可占据构象种群的30%以上,取决于前面的残基。

[0092] 多重构象效应更已知体现于位在从所述肽(倒数第二脯氨酸)的N端点第二个残基的脯氨酸残基。在含有倒数第二脯氨酸的肽中的第一N端残基的截断通常造成肽构象改变。

在In a data set of 58个肽的数据组中,发现到近80%的肽显示这个效应[Glover, M.S., et al., 2014 J Am Soc Mass Spectrom. 26(3):p.444-5]。

[0093] 多重脯氨酸肽LPPLPYP (SEQ ID NO:2), 也已知为IPL344和Stressin-1, 是一个短的7个氨基酸肽, 保护各种类型的细胞免受促凋亡压力并激活Akt信息系统。它是用于治疗发炎性和自身免疫性疾病的候选。

[0094] 考虑到脯氨酸的微妙的构象性质, 本发明人着手确定反式脯氨酸构型是否支配了LPPLPYP (SEQ ID NO:2) 肽的所有四个脯氨酸残基的功能。本发明人惊奇地发现, 用倒数第二脯氨酸代替丙氨酸可产生一肽 (SEQ ID NO:4), 所述肽显着减少了一小鼠中地塞米松引发的脾脏及/或胸腺的重量减轻的量 (图1)。与此形成鲜明对比的是, 用倒数第二脯氨酸代替甘氨酸会导致缺乏这种活性的肽。

[0095] 在进一步简化本发明的实践的同时, 本发明人发现去除SEQ ID NO:2的第一个和最后一个氨基酸, 也导致一肽 (具有SEQ ID NO:3所示的序列) 显着地减少一小鼠中由地塞米松引发的脾脏及/或胸腺的重量减轻的量。

[0096] 本发明人得出结论, 基于SEQ ID NO:3和4的短肽有望用于治疗发炎性的和自身免疫性疾病。

[0097] 在进一步简化本发明的实践的同时, 本发明人发现符合SEQ ID NO:17所示的公式的一另外的肽 (SEQ ID NO:18) 在减少小鼠中由地塞米松引发的脾脏及/或胸腺的重量减轻的量方面显示一显著的改善 (见图2)。

[0098] 本发明人进一步呈现, 与基础肽 (SEQ ID NO:2) 相比, 属于所公开的通式中的任一种示例性肽在减少小鼠中由地塞米松引发的脾脏及/或胸腺重量减轻的量上均显示出显著改善。

[0099] 本文所用的术语“肽”是指天然或合成氨基酸的聚合物, 包括天然肽 (降解产物, 合成的合成多肽或重组多肽) 和拟肽 (通常是合成的合成肽), 以及聚肽类似物的类肽和半类肽, 它们可能具有例如修饰, 可以使肽在体内或进入细胞时更加稳定。

[0100] 本发明也涵盖衍生物 (具有修饰及/或在氨基酸侧链增加一化学官能, 肽骨架无化学变化) 以及类似物 (具有修饰及/或在肽骨架中增加一化学官能, 例如, 一N端点或C端点修饰, 一肽键修饰, 一氨基酸修饰不界定为“衍生物”), 与其他物种如一金属离子 (例如铜、锌、锰、镁及其他) 的复合物。

[0101] 此修饰包括, 但不限于N端点修饰、C端点修饰、多肽键修饰, 包括但不限于CH<sub>2</sub>-NH、CH<sub>2</sub>-S、CH<sub>2</sub>-S=O、O=C-NH、CH<sub>2</sub>-O、CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>、S=C-NH、CH=CH或CF=CH、骨架修饰以及残基修饰。制备拟肽化合物的方法在本领域中是众所周知的, 并且已经指明, 例如, 在Quantitative Drug Design, C.A.Ramsden Gd., Chapter 17.2, F.Choplin Pergamon Press (1992), 通过引用将其并入本文, 如同在此完整阐述。这方面的进一步细节在下文提供。

[0102] 多肽中的多肽键 (-CO-NH-) 可被取代, 例如, 被N-甲基化键 (-N(CH<sub>3</sub>)-CO-); 酯键 (-C(R)H-C-O-O-C(R)-N-); 酮亚甲基键 (-CO-CH<sub>2</sub>-)、 $\alpha$ -氮杂键 (-NH-N(R)-CO-), 其中R是任一烷基, 例如甲基; 呋 (carba) 键 (-CH<sub>2</sub>-NH-); 羟乙烯键 (-CH(OH)-CH<sub>2</sub>-); 硫代酰胺键 (-CS-NH-); 烯炔双键 (-CH=CH-); 逆向酰胺键 (-NH-CO-); 多肽衍生物 (-N(R)-CH<sub>2</sub>-CO-), 其中R是“正常”侧链, 天然存在于碳原子上。

[0103] 这些修饰可以发生在沿着所述多肽链的任何所述键,且甚至同时在多个(2-3)键。

[0104] 天然芳香氨基酸,Trp、Tyr以及Phe,可以取代合成的非天然酸,如类似物苯基甘氨酸、TIC、萘基丙氨酸(naphthylelanine,No1)、Phe的环甲基化衍生物、Phe的卤化衍生物或邻-甲基-Tyr。

[0105] 脯氨酸可以替代合成的、非天然酸,如衍生物N-甲基脯氨酸、 $\alpha$ -甲基脯氨酸以及类似物 $\alpha$ -氨基丁酸。

[0106] 其他非天然氨基酸概述于下面表2。

[0107] 除了上面所述,本发明的所述多肽也可以包含一或多个修饰的氨基酸或者一或多个非氨基酸单体(例如,脂肪酸、复合碳水化合物等)。

[0108] 如在本文的说明书和权利要求书中所使用的,下面的术语“氨基酸”或“多个氨基酸”应理解为包括20个天然存在的氨基酸;那些氨基酸经常在体内翻译后修饰,包括例如羟基脯氨酸、磷酸丝氨酸(phosphoserine)以及磷酸苏氨酸(phosphothreonine);以及其他不寻常氨基酸,包括但不限于2-氨基己二酸(2-aminoadipic acid)、羟赖氨酸(hydroxylysine)、异锁链素(isodesmosine)、正缬氨酸(nor-valine)、正亮氨酸(nor-leucine)以及鸟氨酸(ornithine)。再者,术语“氨基酸”包括D-和L-氨基酸(立体异构体)。

[0109] 下面的表1和表2列出天然存在的氨基酸(表1)和非传统或修饰的氨基酸(表2),可以与本发明一起使用。

[0110] 表1

[0111]

氨基酸	三字母缩写	一字母符号
丙氨酸	Ala	A
精氨酸	Arg	R
天冬酰胺	Asn	N
天门冬氨酸	Asp	D
半胱氨酸	Cys	C
谷氨酰胺	Gln	Q
谷氨酸	Glu	E
甘氨酸	Gly	G
组氨酸	His	H
异亮氨酸	Ile	I
亮氨酸	Leu	L
赖氨酸	Lys	K
蛋氨酸	Met	M
苯基丙氨酸	Phe	F
脯氨酸	Pro	P
丝氨酸	Ser	S
苏氨酸	Thr	T
色氨酸	Trp	W
酪氨酸	Tyr	Y
缬氨酸	Val	V

上述任一氨基酸	Xaa	X
---------	-----	---

[0112] 表2

非传统氨基酸	代码	非传统氨基酸	代码
鸟氨酸	Orn	羟基脯氨酸	Hyp
$\alpha$ -氨基丁酸	Abu	氨基降冰片基羧酸盐 (aminonorbornyl- carboxylate)	Norb
D-丙氨酸	Dala	氨基环丙烷羧酸盐	Cpro

[0114]

		(aminocyclopropane-carboxylate)	
D-精氨酸	Darg	N-(3-胍基丙基)甘氨酸	Narg
D-天冬酰胺	Dasn	N-(氨基甲酰甲基)甘氨酸	Nasn
D-天门冬氨酸	Dasp	N-(羧甲基)甘氨酸	Nasp
D-半胱氨酸	Dcys	N-(硫代甲基)甘氨酸	Ncys
D-谷氨酰胺	Dgln	N-(2-氨基甲酰乙基)甘氨酸	Ngln
D-谷氨酸	Dglu	N-(2-羧乙基)甘氨酸	Nglu
D-组氨酸	Dhis	N-(咪唑基乙基)甘氨酸	Nhis
D-异亮氨酸	Dile	N-(1-甲基丙基)甘氨酸	Nile
D-亮氨酸	Dleu	N-(2-甲基丙基)甘氨酸	Nleu
D-赖氨酸	Dlys	N-(4-氨基丁基)甘氨酸	Nlys
D-蛋氨酸	Dmet	N-(2-甲基硫代乙基)甘氨酸	Nmet
D-鸟氨酸	Dorn	N-(3-氨基丙基)甘氨酸	Norn
D-苯基丙氨酸	Dphe	N-苄基甘氨酸	Nphe
D-脯氨酸	Dpro	N-(羟基甲基)甘氨酸	Nser
D-丝氨酸	Dser	N-(1-羟乙基)甘氨酸	Nthr
D-苏氨酸	Dthr	N-(3-吡啶基乙基)甘氨酸	Nhtrp
D-色氨酸	Dtrp	N-(p-羟基苯基)甘氨酸	Ntyr
D-酪氨酸	Dtyr	N-(1-甲基乙基)甘氨酸	Nval
D-缬氨酸	Dval	N-甲基甘氨酸	Nmgly
D-N-甲基丙氨酸	Dnmala	L-N-甲基丙氨酸	Nmala
D-N-甲基精氨酸	Dnmarg	L-N-甲基精氨酸	Nmarg
D-N-甲基天冬酰胺	Dnmasn	L-N-甲基天冬酰胺	Nmasn
D-N-天门冬氨酸甲酯	Dnmasp	L-N-甲基天门冬氨酸	Nmasp
D-N-甲基半胱氨酸	Dnmcys	L-N-甲基半胱氨酸	Nmcys
D-N-甲基谷氨酰胺	Dnmgln	L-N-甲基谷氨酰胺	Nmgln
D-N-谷氨酸甲酯	Dnmglu	L-N-甲基谷氨酸	Nmglu
D-N-甲基组氨酸	Dnmhis	L-N-甲基组氨酸	Nmhis
D-N-甲基异亮氨酸	Dnmile	L-N-甲基异亮氨酸	Nmile
D-N-甲基亮氨酸	Dnmleu	L-N-甲基亮氨酸	Nmleu
D-N-甲基赖氨酸	Dnmlys	L-N-甲基赖氨酸	Nmlys
D-N-甲基蛋氨酸	Dnmmet	L-N-甲基蛋氨酸	Nmmet

[0115]

D-N-甲基鸟氨酸	Dnmorn	L-N-甲基鸟氨酸	Nmorn
D-N-甲基苯基丙氨酸	Dnmphe	L-N-甲基苯基丙氨酸	Nmphe
D-N-甲基脯氨酸	Dnmpro	L-N-甲基脯氨酸	Nmpro
D-N-甲基丝氨酸	Dnmser	L-N-甲基丝氨酸	Nmser
D-N-甲基苏氨酸	Dnmthr	L-N-甲基苏氨酸	Nmthr
D-N-甲基色氨酸	Dnmtrp	L-N-甲基色氨酸	Nmtrp
D-N-甲基酪氨酸	Dnmtyr	L-N-甲基酪氨酸	Nmtyr
D-N-甲基缬氨酸	Dnmval	L-N-甲基缬氨酸	Nmval
L-正亮氨酸	Nle	L-N-甲基正亮氨酸	Nmnle
L-正缬氨酸	Nva	L-N-甲基正缬氨酸	Nmnva
L-乙基甘氨酸	Etg	L-N-甲基-乙基甘氨酸	Nmetg
L-t-丁基甘氨酸	Tbug	L-N-甲基-t-丁基甘氨酸	Nmtbug
L-高苯丙氨酸	Hphe	L-N-甲基-高苯丙氨酸	Nmhphe
$\alpha$ -萘基丙氨酸	Anap	N-甲基- $\alpha$ -萘基丙氨酸	Nmanap
青霉素胺	Pen	N-甲基青霉素胺	Nmpen
$\gamma$ -氨基丁酸	Gabu	N-甲基- $\gamma$ -氨基丁酸酯	Nmgabu
环己基丙氨酸	Chexa	N-甲基-环己基丙氨酸	Nmchexa
环戊基丙氨酸	Cpen	N-甲基-环戊基丙氨酸	Nmcpen
$\alpha$ -氨基- $\alpha$ -丁酸甲酯	Aabu	N-甲基- $\alpha$ -氨基- $\alpha$ -丁酸甲酯	Nmaabu
$\alpha$ -氨基异丁酸	Aib	N-甲基- $\alpha$ -氨基异丁酸酯	Nmaib
D- $\alpha$ -甲基精氨酸	Dmarg	L- $\alpha$ -甲基精氨酸	Marg
D- $\alpha$ -甲基天冬酰胺	Dmasn	L- $\alpha$ -甲基天冬酰胺	Masn
D- $\alpha$ -天门冬氨酸甲酯	Dmasp	L- $\alpha$ -天门冬氨酸甲酯	Masp
D- $\alpha$ -甲基半胱氨酸	Dmcys	L- $\alpha$ -甲基半胱氨酸	Mcys
D- $\alpha$ -甲基谷氨酰胺	Dmgln	L- $\alpha$ -甲基谷氨酰胺	Mgln
D- $\alpha$ -甲基谷氨酸	Dmglu	L- $\alpha$ -谷氨酸甲酯	Mglu
D- $\alpha$ -甲基组氨酸	Dmhis	L- $\alpha$ -甲基组氨酸	Mhis
D- $\alpha$ -甲基异亮氨酸	Dmile	L- $\alpha$ -甲基异亮氨酸	Mile
D- $\alpha$ -甲基亮氨酸	Dmleu	L- $\alpha$ -甲基亮氨酸	Mleu
D- $\alpha$ -甲基赖氨酸	Dmlys	L- $\alpha$ -甲基赖氨酸	Mlys
D- $\alpha$ -甲基蛋氨酸	Dmmet	L- $\alpha$ -甲基蛋氨酸	Mmet
D- $\alpha$ -甲基鸟氨酸	Dmorn	L- $\alpha$ -甲基鸟氨酸	Morn
D- $\alpha$ -甲基苯基丙氨酸	Dmphe	L- $\alpha$ -甲基苯基丙氨酸	Mphe
D- $\alpha$ -甲基脯氨酸	Dmpro	L- $\alpha$ -甲基脯氨酸	Mpro

	D- $\alpha$ -甲基丝氨酸	Dmser	L- $\alpha$ -甲基丝氨酸	Mser
	D- $\alpha$ -甲基苏氨酸	Dmthr	L- $\alpha$ -甲基苏氨酸	Mthr
	D- $\alpha$ -甲基色氨酸	Dmtrp	L- $\alpha$ -甲基色氨酸	Mtrp
	D- $\alpha$ -甲基酪氨酸	Dmtyr	L- $\alpha$ -甲基酪氨酸	Mtyr
	D- $\alpha$ -甲基缬氨酸	Dmval	L- $\alpha$ -甲基缬氨酸	Mval
	N-环丁基甘氨酸	Ncbut	L- $\alpha$ -甲基正缬氨酸	Mnva
	N-环庚基甘氨酸	Nchep	L- $\alpha$ -甲基乙基甘氨酸	Metg
	N-环己基甘氨酸	Nchex	L- $\alpha$ -甲基-t-丁基甘氨酸	Mtbug
	N-环癸基甘氨酸	Ncdec	L- $\alpha$ -甲基-高苯丙氨酸	Mhphe
	N-环十二烷基甘氨酸	Ncdod	$\alpha$ -甲基- $\alpha$ -萘基丙氨酸	Manap
[0116]	N-环辛基甘氨酸	Ncoct	$\alpha$ -甲基青霉素胺	Mpen
	N-环丙基甘氨酸	Ncpro	$\alpha$ -甲基- $\gamma$ -氨基丁酸酯	Mgabv
	N-环十一烷基甘氨酸	Ncund	$\alpha$ -甲基-环己基丙氨酸	Mchexa
	N-(2-氨基乙基)甘氨酸	Naeg	$\alpha$ -甲基-环戊基丙氨酸	Mcpen
	N-(2,2-二苯乙基)甘氨酸	Nbhm	N-(N-(2,2-二苯乙基)氨基甲酰甲基-甘氨酸	Nnbhm
	N-(3,3-二苯丙基)甘氨酸	Nbhe	N-(N-(3,3-二苯丙基)氨基甲酰甲基-甘氨酸	Nnbhe
	1-羧基-1-(2,2-二苯乙基氨基)环丙烷	Nmbc	1,2,3,4-四氢异喹啉-3-羧酸	Tic
	磷酸丝氨酸	pSer	磷酸苏氨酸	pThr
	磷酸酪氨酸	pTyr	O-甲基-酪氨酸	
	2-氨基己二酸		羟基赖氨酸	

[0117] 续表2

[0118] 本发明所述肽的所述氨基酸可被保守地或非保守地取代。

[0119] 如本文所用,术语“保守取代”是指用天然或非天然存在的氨基或具有类似空间特性的拟肽替换肽中天然序列中存在的氨基酸。其中待取代的所述天然氨基酸的侧链是极性或疏水的,所述保守取代需要使用亦为极性或疏水的一天然存在的氨基酸、一非天然存在的氨基酸或一拟肽部份(moiety) (除了具有与被替换的氨基酸的侧链相同的空间特性之外)。

[0120] 由于天然存在的氨基酸通常根据它们自身特性被分组,在牢记根据本发明用立体相似的非带电氨基酸代替带电氨基酸被认为是保守取代的事实上,可以容易确认被天然存在的氨基酸保守取代。

[0121] 为了制造通过非天然存在的氨基酸的保守取代,也可能使用本领域熟知的氨基酸类似物(合成的氨基酸)。在熟练技术人员已知的文献中已有充分记载所述天然存在的氨基酸的一拟肽。

[0122] 当影响保守取代时,所述取代的氨基酸需具有与原始氨基酸相同或一相似的官能基在侧链上。

[0123] 本文所用的短语“非保守取代”是指用另一种天然或非天然存在的氨基酸取代母体序列中存在的氨基酸,所述氨基酸具有不同的电化学和/或空间特性。因此,所述取代的氨基酸的所述侧链可显著大于(或小于)被取代的所述天然氨基酸的所述侧链及/或可以具有与被取代的所述天然氨基酸明显不同的电子特性的官能基。此类型非保守取代的范例包括以苯基丙氨酸或环己基甲基甘氨酸取代丙氨酸,异亮氨酸取代甘氨酸,或-NH-CH[(-CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-COOH]-CO-取代天门冬氨酸。落入本发明的范围内的那些非保守取代是仍构成具有抗菌特性的肽的那些。

[0124] 如上所述,本发明的所述肽的N和C端可以通过官能基来保护。适合的官能基描述于Green and Wuts,“Protecting Groups in Organic Synthesis”,John Wiley and Sons,Chapters 5 and 7,1991,其教导通过引用并入本文。优选保护基是促进附接的化合物转运进入一细胞的那些,例如,通过减少化合物的亲水性并增加亲脂性。

[0125] 这些部份可以在体内裂解,或通过细胞内水解或酶促水解。羟基保护基包括酯类、碳酸盐以及氨基甲酸酯保护基。胺保护基包括烷氧基和芳氧羰基,如上文关于N端保护基所述。羧酸保护基包括脂族、苄基和芳基酯,如上文对于C端保护基所述。在一实施例中,在本发明的一肽中的一或多个谷氨酸或天门冬氨酸残基的侧链的羧酸基被保护,优选使用一甲基、乙基、苄基或被取代的苄基酯。

[0126] N端保护基的范例包括酰基(-CO-R1)和烷氧基羰或芳氧基羰基(-CO-O-R1),其中R1是一脂族、被取代的脂族、苄基、被取代的苄基、芳香或一被取代的芳香基。酰基的特定范例包括乙酰基、(乙基)-CO-、n-丙基-CO-、异丙基-CO-、n-丁基-CO-、仲丁基-CO-、t-丁基-CO-、己基、月桂酰(lauroyl)、棕榈酰(palmitoyl)、肉豆蔻酰基(myristoyl)、硬脂基、油酰苯基-CO-、被取代的苯基-CO-、苄基-CO-以及(被取代的苄基)-CO-。烷氧基羰和芳氧基羰基的范例包括CH<sub>3</sub>-O-CO-、(乙基)-O-CO-、n-丙基-O-CO-、异丙基-O-CO-、n-丁基-O-CO-、仲丁基-O-CO-、t-丁基-O-CO-、苯基-O-CO-、被取代的苯基-O-CO-以及苄基-O-CO-、(被取代的苄基)-O-CO-。金刚烷(Adamantan)、萘酐(naphtalen)、肉豆蔻(myristoleyl)、甲苯(tuluen)、联苯、肉桂酰(cinnamoyl)、硝基苯甲酰基(nitrobenzoy)、甲苯甲酰(toluoyl)、糠酰(furoyl)、苯甲酰基(benzoyl)、环己烷、降冰片烷(norbornane)、Z-己酸。为了促进所述N-酰化,一至四个甘氨酸残基可以存在于分子的N端点。

[0127] 化合物的C端点处的羧基可被保护,例如,通过一酰胺(即,所述羟基在所述C端点被-NH<sub>2</sub>、-NHR<sub>2</sub>以及-NR<sub>2</sub>R<sub>3</sub>替换)或酯(即,所述羟基在所述C端点被-OR<sub>2</sub>替换)。R<sub>2</sub>和R<sub>3</sub>独立为一脂族、被取代的脂族、苄基、被取代的苄基、芳香或一被取代的芳香基。此外,与氮原子一起,R<sub>2</sub>和R<sub>3</sub>可以形成一C<sub>4</sub>至C<sub>8</sub>杂环,具有大约0至2个额外的杂原子如氮、氧或硫。适合的杂环的范例包括哌啶基(piperidinyl)、吡咯烷基(pyrrolidinyl)、吗啉代(morpholino)、硫吗啉代(thiomorpholino)或哌嗪基(piperazinyl)。C端保护基的范例包括-NH<sub>2</sub>、-NHCH<sub>3</sub>、-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>、-NH(乙基)、-N(乙基)<sub>2</sub>、-N(甲基)(乙基)、-NH(苄基)、-N(C<sub>1</sub>至C<sub>4</sub>烷基)(苄基)、-NH(苯基)、-N(C<sub>1</sub>至C<sub>4</sub>烷基)(苯基)、-OCH<sub>3</sub>、-O(乙基)、-O(n-丙基)、-O(n-丁基)、-O(异丙基)、-O(仲丁基)、-O(t-丁基)、-O苄基以及-O苯基。

[0128] 本发明的所述肽也可以包含非氨基酸部份,例如,疏水部份(各种直链、支链、环

状、多环或杂环烃和烃衍生物) 附接至所述肽; 非肽渗透剂; 各种保护基, 特别其中所述化合物是直链的, 其附接至所述化合物的末端, 以减少降解。存在于所述化合物的化学的(非氨基酸) 基团可被包括, 为了改善各种生理特性, 例如降低降解或清除率; 减少各种蜂窝泵的排斥, 改善免疫原活性, 改善各种施用模式(如各种序列的附接允许渗透通过各种屏障, 通过肠道等); 增加特异性, 增加亲和力, 减少毒性及类似的特性。

[0129] 可以通过共价, 或通过非共价络合物离子化将本发明的肽的氨基酸序列成分附接到其他非氨基酸试剂上, 例如, 通过络合物离子化连接至一疏水聚合物, 它们可以降级或裂解以产生能够持续释放的化合物; 通过将肽的氨基酸部分捕捉在脂质体或胶束中以制造本发明的最终肽。这种结合可能是由于氨基酸序列被包裹在其他组分(脂质体, 胶束) 内所致, 或者在聚合物中浸入所述氨基酸序列以制造本发明的最终肽。

[0130] 根据一个特定的实施例, 所述肽被附接至一细胞穿透部分。

[0131] 如本文所用的术语“细胞穿透部分”是指一部分(例如脂质, 如棕榈酸), 其增强一附着的肽在一细胞膜上的转运。在一特定的实施例中, 所述细胞穿透部分不是一肽部分。所述部份可以附接到N或C端点。

[0132] 本发明的所述肽可以是直链或环状(环化可以提高稳定性)。环化可以通过本领域已知的任何方式进行。如果所述化合物主要由氨基酸组成, 环化可以是通过N端至C端, N端至侧链以及N端至主链, C端至侧链, C端至主链, 侧链至主链以及侧链至侧链, 以及主链至主链环化。所述肽的环化也可以通过所述肽中的非氨基酸有机部份进行。

[0133] 本发明人还构思了钉接肽。

[0134] 本文所用的术语“钉接肽(stapled peptide)”是指具有一选定数量的标准或非标准氨基酸, 并且还至少具有两个部份能够进行反应以促进碳-碳键形成的一种肽, 其已经与一试剂接触以在所述至少两个部分之间产生至少一个交联剂, 所述交联剂调节例如肽的稳定性。

[0135] 如本文所用, 术语“钉接(stapling)”将至少两个部分引入肽中, 所述至少两个部分能够进行反应以促进碳-碳键形成, 所述碳-碳键形成可与一试剂接触以在至少两个部分之间产生至少一个交联剂。钉接对一二级结构提供一约束, 如一 $\alpha$ -螺旋结构(.alpha.-helix structure)。可以优化所述交联剂的长度和几何形状, 以提高所需二级结构含量的产率。提供的约束可以例如, 防止所述二级结构展开及/或可以强化所述二级结构的形状。被防止展开的一个二级结构例如是更稳定的。

[0136] 本发明的所述肽可以是生化合成的如使用标准固相技术。这些方法包括独家固相合成(exclusive solid phase synthesis)、部分固相合成方法、片段缩合(fragment condensation)、经典溶液合成。固相多肽合成步骤在本领域中是众所周知的且进一步由 John Morrow Stewart 和 Janis Dillaha Young 描述于 Solid Phase Polypeptide Syntheses (2nd Ed., Pierce Chemical Company, 1984)。

[0137] 大规模肽合成被叙述于 Andersson Biopolymers 2000; 55(3): 227-50。

[0138] 合成的肽可以通过制备型高效液相色谱纯化 [Creighton T. (1983) Proteins, structures and molecular principles. WH Freeman and Co. N.Y.] 以及可以通过氨基酸测序确定其组成。

[0139] 重组技术也可以使用来产生本发明的所述肽。为了使用重组技术制造本发明的一

肽,编码本发明的所述肽的一多核苷酸被连接到一核酸表达载体中,其包含所述多核苷酸序列在适合于引导宿主细胞中本发明的所述多肽的构造、组织特异性或诱导性转录的顺式调控序列(cis-regulatory sequence)的转录控制下(例如,启动子序列)。

[0140] 除了在宿主细胞内可合成,本发明的所述肽也可以使用体外表达系统合成。这些方法在本领域是众所周知的,且所述系统的组件都是可以购得的。

[0141] 本文所描述的肽可以减少一小鼠中由地塞米松引发的脾脏及/或胸腺的重量减轻的量-例如(IP)注射100 $\mu$ g地塞米松之后。

[0142] 在另一实施例中,本文所描述的肽可以响应先天激活剂,如脂多糖(LPS)和CpG寡核苷酸,通过巨噬细胞干扰和阻断TNF- $\alpha$ 和IL-6的分泌。

[0143] 附加地或替代地,本文所描述的肽可以或减少、预防或抑制在真核细胞中的凋亡。不论机制如何,通过所述机制本发明的所述肽调解压力反应,并且不希望受到任何理论或作用机制的束缚,假定所述肽可能可以结合p53,从而防止p53与受损DNA结合。所述肽可通过分析它们抑制L12细胞系对过高热的反应的能力来测试(其缺乏内源性p53活性,且已被p53基因或对照载体稳定转染)。在这些细胞内,p53活性诱导生长停滞和细胞存活,而不是针对过高热做出凋亡的反应(如W02012/160563所述,其内容通过引用并入本文)。

[0144] 测量凋亡的方法:凋亡是一种细胞的主动、基因导向的自我破坏过程,且与特征形态和生化变化相关联。垂死细胞的细胞核和细胞质的浓缩以及碎片化进入膜结合的凋亡体是凋亡的典型特征。凋亡细胞死亡的另一特征是特定核酸酶激活后,染色体DNA降解为寡核小体片段。

[0145] 通过“抑制凋亡”或“抑制凋亡活性”表示相对于未经处理的对照(即未暴露于本发明的所述肽的细胞),经历凋亡的细胞数的任何减少。优选地,所述减少为至少25%,更优选地所述减少为至少50%,以及最优选地所述减少为至少一倍。

[0146] 流式细胞仪提供了多种测量凋亡的可能性。建立和实施了不同的方法,有些在细胞表面染色,有些在细胞内染色。

[0147] 最早的方法之一是,除了观察凋亡细胞收缩且具有较高的细胞内的粒度之外,再用DNA特定的荧光染料(例如,碘化丙锭[PI],溴化乙锭[EtBr])进行染色。一旦引入一个致命的打击,所述DNA开始改变其样貌。凋亡的DNA不仅由片段的DNA组成(在琼脂糖凝胶中可视为较短的条带,即所谓的DNA阶梯),也被部分消化成单核苷酸,从而有更少的DNA被PI或EtBr等荧光染料染色(Nicoletti et al.,1991)。在FACScan<sup>TM</sup>(来自Becton Dickinson, USA)中的特定荧光染料检测通道上通常观察到一个向左边的位移,称为sub-G1峰。

[0148] 另一方法是末端脱氧核苷酸转移酶(TdT)-介导的DNA链断裂的末端标记(TUNEL)。所述TUNEL方法探测经历凋亡的细胞中的DNA链断裂。TdT是一种酵素,其催化脱氧核糖核苷酸三磷酸加成到双链或单链DNA的3'-OH末端。不像正常细胞,凋亡细胞核在TdT存在下合并外源核苷酸(dUTP)-DIG。带有一共轭荧光染料的一抗DIG抗体片段可令凋亡细胞可视化。凋亡细胞的增加造成一个更高的数量的DNA片段且因此荧光更亮。这个方法的一个优点在于有非常高的特异性(Gavrieli et al.,1992)。这个方法的一个缺点在于,昂贵且仅可以用于一小组的样本,因为它是时间密集的。因此,不适用于大型筛查程序。

[0149] 在凋亡的早期阶段期间,细胞膜极性的丧失以及在外面的细胞膜上出现磷脂酰丝氨酸(PS)增加的量已经导致了一种新的方法。膜联蛋白V是一种钙依赖性磷脂结合蛋白,对

PS具有高亲和力。在早期和中期阶段的凋亡中保持住所述细胞膜完整性。早期和中期的凋亡细胞呈现膜联蛋白-FITC的结合提高且主要PI染色阴性。凋亡后期和坏死细胞变为双阳性,因为表面上的PS存在和由于膜的分解引起的细胞内核酸的PI染色。这个方法也是昂贵且劳动密集的。

[0150] 在美国专利第6,726,895号和第6,723,567号公开了测量体内和体外凋亡的其他方法。

[0151] 如此,根据本发明的一第一观点,提供一种单离的肽,不超过6个氨基酸,其中所述单离的肽包含以公式 $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5$  (SEQ ID NO:1) 表示的一氨基酸序列,

[0152] (i) 其中 $X_1$ 是脯氨酸,或者脯氨酸的一类似物或衍生物;

[0153] (ii) 其中 $X_2$ 是脯氨酸,或者脯氨酸的一类似物或衍生物;

[0154] (iii) 其中 $X_3$ 选自由丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、半胱氨酸、异亮氨酸、蛋氨酸以及它们的一衍生物或类似物所组成的一族群;

[0155] (iv) 其中 $X_4$ 选自由丙氨酸、缬氨酸、丝氨酸、脯氨酸以及它们的一衍生物或类似物所组成的一族群;

[0156] (v) 其中 $X_5$ 是任一氨基酸;以及

[0157] (vi) 其中所述肽可以减少一小鼠中由地塞米松引发的脾脏及/或胸腺的重量减轻的量。

[0158] 根据本发明的此观点,所述肽可以是5或6个氨基酸长度。

[0159] 优选地,所述氨基酸被选定因此 $X_1$ 和 $X_2$ 之间的所述肽键(至少50%时间;至少60%时间;至少70%时间;至少80%时间或甚至90%时间)是顺式配置-即平衡向一顺式配置偏移;且 $X_3$ 和 $X_4$ 之间的所述肽键(至少50%时间;至少60%时间;至少70%时间;至少80%时间或甚至90%时间)是反式配置-即平衡向一反式配置偏移。

[0160] 测试一肽键的顺\反式配置在本领域中是已知的且包括例如NMR。

[0161] 在一实施例中, $X_4$ 选自由丙氨酸、脯氨酸、丙氨酸的一衍生物或类似物,以及脯氨酸的一衍生物或类似物所组成的一族群。

[0162] 根据一个特定的实施例,脯氨酸的所述衍生物或类似物是N-甲基脯氨酸、 $\alpha$ -甲基脯氨酸或 $\alpha$ -氨基丁酸。

[0163] 在一实施例中,所述肽包含SEQ ID NO:3 (PPLPY) 所表示的一氨基酸序列。

[0164] 在另一实施例中,所述肽由SEQ ID NO:3 (PPLPY) 所表示的一氨基酸序列所组成。

[0165] 在另一实施例中,所述肽由SEQ ID NO:7 (LPPLPY) 所表示的一氨基酸序列所组成。

[0166] 在一特定的实施例中, $X_1$ 及/或 $X_3$ 可以是D-氨基酸,如由SEQ ID NO:20 (d-LPPLPY) 所表示的所述肽。

[0167] 根据本发明的另一观点,提供一种单离的肽,不超过10个氨基酸,其中所述单离的肽包含以公式 $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6$  (SEQ ID NO:17) 表示的一氨基酸序列,

[0168] (i) 其中 $X_1$ 是脯氨酸,或者脯氨酸的一类似物或衍生物;

[0169] (ii) 其中 $X_2$ 是脯氨酸,或者脯氨酸的一类似物或;

[0170] (iii) 其中 $X_3$ 选自由丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、半胱氨酸、异亮氨酸、蛋氨酸以及它们的一衍生物或类似物所组成的一族群;

[0171] (iv) 其中 $X_4$ 选自由丙氨酸、缬氨酸、丝氨酸以及它们的一衍生物或类似物所组成

的一族群；

[0172] (v) 其中 $X_5$ 是任一氨基酸；

[0173] (vi) 其中 $X_6$ 是脯氨酸,或者脯氨酸的一类似物或衍生物;以及

[0174] (vii) 其中所述肽可以减少一小鼠中由地塞米松引发的脾脏及/或胸腺的重量减轻的量。

[0175] 优选地,所述氨基酸被选定因此 $X_1$ 和 $X_2$ 之间的所述肽键(至少50%时间;至少60%时间;至少70%时间;至少80%时间或甚至90%时间)是顺式配置-即平衡向一顺式配置偏移;且 $X_3$ 和 $X_4$ 之间的所述肽键(至少50%时间;至少60%时间;至少70%时间;至少80%时间或甚至90%时间)是反式配置-即平衡向一反式配置偏移;以及 $X_5$ 和 $X_6$ 之间的肽键(至少50%时间;至少60%时间;至少70%时间;至少80%时间或甚至90%时间)是顺式配置-即平衡向一顺式配置偏移。

[0176] 在一实施例中,本观点的所述肽是6个氨基酸长度。

[0177] 此一肽的一范例是SEQ ID NO:18(PPLAYP)所表示的一个。

[0178] 可以用来替代脯氨酸的优选的非天然存在的氨基酸包括但不限于N-甲基脯氨酸、 $\alpha$ -甲基脯氨酸以及 $\alpha$ -氨基丁酸。

[0179] 本发明人预想一额外的氨基酸附接在SEQ ID NO:17的 $X_1$ 的所述N端点处。

[0180] 所述额外的氨基酸优选地选定,从而其与 $X_1$ 之间的所述肽键(至少50%时间;至少60%时间;至少70%时间;至少80%时间或甚至90%时间)是顺式配置-即平衡向一顺式配置偏移。

[0181] 候选的氨基酸包括,但不限于,丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、半胱氨酸、异亮氨酸、蛋氨酸以及它们的一衍生物或类似物。

[0182] 在一特定的实施例中,附接至 $X_1$ 的所述N端点的所述额外的氨基酸是亮氨酸或亮氨酸的一衍生物或类似物。

[0183] 在一进一步的实施例中,附接至 $X_1$ 的所述N端点的所述额外的氨基酸是一D-氨基酸。

[0184] 如此,本发明人构想了具有7个氨基酸的肽,且所述肽包含SEQ ID NO:17所表示的公式。

[0185] 根据一个特定的实施例, $X_4$ 是丙氨酸或丙氨酸的一类似物或衍生物。

[0186] 根据再另一个实施例, $X_5$ 选自酪氨酸、苯基丙氨酸、色氨酸以及它们的一衍生物或类似物所组成的一族群。

[0187] 预期 $X_5$ 的一个氨基酸范例是酪氨酸。

[0188] 预期 $X_3$ 的一个氨基酸范例是亮氨酸。

[0189] 本发明的此观点,所述肽可以包含SEQ ID NO:4(LPPLAYP)所表示的一氨基酸序列。这样的肽可以是7、8、9或10个氨基酸。

[0190] 本发明的此观点的肽可以由SEQ ID NO:4所表示的一氨基酸序列所组成。

[0191] 对于本发明此观点的肽, $X_1$ 及/或 $X_3$ 及/或 $X_5$ 可以是D-氨基酸,如例如d-LPPLAYP (SEQ ID NO:21)。

[0192] 对于任何本文所描述的肽,本发明也考虑到反逆肽(retro-inverso peptides)。此类肽对蛋白酶具有抗性,且由相反顺序的D-氨基酸组成,导致肽主链发生了改变,但侧链

的取向不变。

[0193] 根据本发明的再另一观点,提供另一个单离的肽,有5个氨基酸,其特征在于:所述单离的肽由公式 $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5$  (SEQ ID NO:5) 表示的一氨基酸序列组成,其中

[0194] (i)  $X_1$ 和 $X_3$ 是任一氨基酸;

[0195] (ii)  $X_2$ 是脯氨酸,或脯氨酸的一类似物或衍生物;

[0196] (iii)  $X_4$ 不是脯氨酸;以及

[0197] (iv) 所述肽用以减少一小鼠中由地塞米松引发的脾脏及/或胸腺的重量减轻的量。

[0198] 优选地,所述氨基酸被选定因此 $X_1$ 和 $X_2$ 之间的所述肽键(至少50%时间;至少60%时间;至少70%时间;至少80%时间或甚至90%时间)是顺式配置-即平衡向一顺式配置偏移;且 $X_3$ 和 $X_4$ 之间的所述肽键(至少50%时间;至少60%时间;至少70%时间;至少80%时间或甚至90%时间)是反式配置-即平衡向一反式配置偏移。

[0199] 根据本发明的再另一观点,提供一种单离的肽,有7个氨基酸,所述单离的肽由公式 $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7$  (SEQ ID NO:6) 表示的一氨基酸序列所组成,其中

[0200] (i)  $X_1$ 、 $X_5$ 以及 $X_6$ 是任一氨基酸;

[0201] (ii)  $X_2$ 、 $X_3$ 以及 $X_7$ 是脯氨酸,或者脯氨酸的一类似物或衍生物;

[0202] (iii)  $X_4$ 不是脯氨酸;以及

[0203] (iv) 所述肽用以减少一小鼠中由地塞米松引发的脾脏及/或胸腺的重量减轻的量。

[0204] 优选地,所述氨基酸被选定因此 $X_1$ 和 $X_2$ 之间的所述肽键(至少50%时间;至少60%时间;至少70%时间;至少80%时间或甚至90%时间)是顺式配置-即平衡向一顺式配置偏移; $X_2$ 和 $X_3$ 之间的所述肽键(至少50%时间;至少60%时间;至少70%时间;至少80%时间或甚至90%时间)是顺式配置-即平衡向一顺式配置偏移; $X_6$ 和 $X_7$ 之间的所述肽键(至少50%时间;至少60%时间;至少70%时间;至少80%时间或甚至90%时间)是顺式配置-即平衡向一顺式配置偏移;以及 $X_4$ 和 $X_5$ 之间的所述肽键(至少50%时间;至少60%时间;至少70%时间;至少80%时间或甚至90%时间)是反式配置-即平衡向一反式配置偏移。

[0205] 本文所描述的肽可以用来治疗无数疾病,包括那些与压力相关反应关联的疾病。这些疾病包括病理状况如神经退化性疾病(例如中风、帕金森氏症以及阿尔茨海默氏症)、心肌梗塞、暴露于放射线或化学治疗剂、发炎、受伤(例如,烧伤和中枢神经系统伤害)、细胞老化、过高热、癫痫发作、缺氧(例如,缺血和中风),以及移植前在移植组织和器官中。

[0206] 这些状态也包括自身免疫性疾病,其特征是一个体针对至少一个体的正常成分的一种免疫状态。这些现象特别是在病理中被观察到,所述病理包括但不限于与SLE (Systemic Lupus Erythematosus disease) 相关的感染,古-斯二氏综合征 (Gougerot-Sjogren syndrome) [或舍格伦氏病 (Sjogren's disease)] 以及类风湿性关节炎,以及如结节病和骨质减少,脊椎关节炎,硬皮病,多发性硬化症,肌萎缩性侧索硬化 (ALS), 甲状腺功能亢进症,阿狄森氏病 (Addison's disease), 自身免疫性溶血性贫血,克罗恩病 (Crohn's disease), 古巴斯彻氏综合征 (Goodpasture's syndrome), 格雷夫斯病 (Graves' disease), 桥本氏甲状腺炎 (Hashimoto's thyroiditis), 特发性紫癜出血,胰岛素依赖型糖尿病,重症肌无力,寻常型天疱疮,恶性贫血,链球菌后肾小球肾炎,银屑病以及自发性不育,以及在

移植排斥和移植物抗宿主病期间观察到的立即或延迟的现象。在一特定的实施例中,本发明的所述肽对治疗多发性硬化症是有用的。在另一实施例中,本发明的所述肽对治疗缺血或心肌梗塞是有用的。

[0207] 本发明设想的其他疾病,包括但不限于,阿尔茨海默氏症,帕金森氏症,外伤后继发变性,中风,中枢神经系统中毒(CNS intoxication),青光眼,黄斑变性,1型糖尿病,多发性硬化症,系统性红斑狼疮,自身免疫性葡萄膜炎,移植物抗宿主病,移植排斥,关节炎,全身性炎症反应综合征(SIRS),炎症性肠病(IBD),成人呼吸窘迫综合征(ARDS),银屑病,动脉粥样硬化,心肌梗塞,放射病,过高热,缺氧,暴发性毒性肝,肾功能衰竭,不孕症以及很多其他的。

[0208] 移植排斥的现象是个人对抗故意植入患者体内的外来成分(体液如血液、脑脊液等,细胞、组织、器官、抗体等)的一种免疫状态。

[0209] 如本文所用,术语“退化性失调”,“退化性疾病”和“退化状态”针对任何失调、疾病或状态,特征在于不当的细胞增殖或不当的细胞死亡或在某些情况下两者皆是,或者异常或失调的凋亡。这些状况也包括,其中尽管在单个细胞的级别上合适并受调节,过度凋亡与器官功能障碍或衰竭相关联。

[0210] 在一实施例中,所述肽对预防具有一肿瘤性疾病的一受试者在非恶性组织或细胞中的细胞死亡是有用的,所述受试者为了癌症的治疗正接受化学疗法及/或放射治疗。

[0211] 本文所使用的术语“发炎性的疾病”和“发炎性的状态”意指任一疾病或状态,其中一过多或不受管制的发炎性反应导致过多发炎性的症状、宿主组织损伤,或组织功能丧失。

[0212] 在一实施例中,所述发炎性的疾病或状态是一自身免疫性疾病。

[0213] 在另一实施例中,所述发炎性的疾病或状态具有与至少一亲发炎性的细胞因子的制造关联的一病因学,所述细胞因子选自IL-6和TNF- $\alpha$ 。

[0214] 在另一实施例中,所述疾病或状态选自自由阿尔茨海默氏症、帕金森氏症、外伤后继发变性、中风、中枢神经系统中毒、青光眼、黄斑变性、心肌梗塞、放射病、过高热、缺氧、暴发性毒性肝、肾功能衰竭以及不孕症所组成的一族群。

[0215] 在再另一实施例中,所述疾病包括色素性视网膜炎以及黄斑变性。

[0216] 在另一实施例中,所述疾病包括中风或心肌梗塞。

[0217] 所述肽可与合适的载体或赋形剂混合且将其本身或作为药物组合物的一部分提供。

[0218] 如本文所用,一“药物组合物”是指本文所述的一种或多种活性成分与其他化学组分如生理上合适的载体和赋形剂的制剂。一药物组合物的目的是促进对一生物体施用一化合物。

[0219] 在本文中,术语“活性成分”是指负责生物学效果的所述肽。

[0220] 在下文中,可以互换使用的短语“生理上可接受的载体”和“药学上可接受的载体”是指不会对一生物体造成明显刺激并且不会消除所述被施用的化合物的生物活性和特性的一载体或一稀释剂。一佐剂包含在这些短语中。

[0221] 含有作为活性成分的肽或多肽的药物组合物的制剂在本领域中是众所周知的。通常,将这类组合物制备成可指示的液体溶液或悬浮液,然而,也可以制备在注射之前可以被悬浮或溶解的固体形态。所述制剂也可以被乳化。混合活性治疗成分与无机及/或有机载

体,它们是药学上可接受的并且与活性成分相容的。载体是药学上可接受的赋形剂(媒介物),包含或多或少的惰性物质,当添加到一药物组合物中以赋予所述组合物适当的稠度或形态时。合适的载体为,例如,水、盐水、葡萄糖、甘油、乙醇等或其组合。此外,如果想要,所述组合物可以含有少量辅助物质,如润湿剂或乳化剂以及pH缓冲剂,增强活性成分的功效。

[0222] 可以通过细胞培养或实验动物中的标准药学方法确定本文所述肽的毒性和治疗功效,例如,通过确定一主体化合物的 $IC_{50}$ (提供50%抑制作用的浓度)以及 $LD_{50}$ (导致50%的测试动物死亡的致死剂量)。从这些细胞培养测定法和动物研究获得的数据可被使用在制定人类使用的一剂量范围。所述剂量可以变化,取决于所采用的剂型和所利用的给药途径。个别医生可以鉴于患者的病情选择确切的配方、给药途径以及剂量。(参见例如Finglet al.,1975)。

[0223] 用于本发明的一给药组合物中的活性剂的量是有效达到所述特定活性剂用于目标指示目的的量。所述组合物中的活性剂的量通常是一药理上、生物学上、治疗上或化学上有效的量。然而,所述量可以小于所述组合物以一剂量单位形式被使用,因为所述剂量单位形式可能含有多个化合物或活性剂在一单一组合物中,或可以含有一药理上、生物学上、治疗上或者化学上分开的有效量。然后可以用一累积单位施用总有效量,所述累积单位总共包含有效量的所述活性剂。

[0224] 本发明的一治疗上有效量的一肽是当施用于一患者的量可以发挥一抗凋亡活性及/或一抗发炎性的活性。检测本发明的所述肽抗凋亡活性的方法包括但不限于,以特定荧光染料(如碘化丙锭和溴化乙锭)染色DNA、膜联蛋白V分析、TUNEL分析等;这些分析的某些非限制性示例在下面的范例中呈现。检测所述肽的抗发炎性的活性的分析在本领域也是众所周知的。

[0225] 虽然本发明的肽的一合适剂量会根据给药途径、年龄、体重、性别或患者的状况而变化,并且应最终由医师确定,但是适合成人的剂量通常可以在约0.2至2000mg/kg体重,优选地在约2至200mg/kg之间。

[0226] 本发明的药物组合物包含本发明的一或更多化合物,以及一或更多赋形剂或稀释剂。在一实施例中,一或更多化合物或溶剂化物,或这些化合物的盐类。

[0227] 如本文所用,术语“药学上可接受的盐”是指对生物体基本无毒的盐。典型的药学上可接受的盐包括由本发明的化合物与一药学上可接受的矿物质或有机酸反应所制备的那些盐类。这些盐类也已知为酸加成盐。

[0228] 与施用无递送剂的活性剂相比,包含所述化合物和活性剂的所述组合物具有将活性剂递送至选定的生物系统以及增加或改善所述活性剂的生物利用度的实用性。可通过一段时间的递送更多活性剂改善递送,或者在一特定时间周期内递送活性剂(如加快速度或延迟递送)或经过一段时间(如持续递送)。

[0229] 根据本发明使用药物组合物因此可以传统方法制定使用一或更多生理上可接受的载体包含赋形剂和辅助物,其促进所述活性化合物加工成为可药学上使用的制剂。适当的配方取决于所选择的给药途径。

[0230] 所述药物组合物可以通过任何常规且适当的途径局部或全身地施用,包括但不限于,口服,腹膜内,肠胃外,静脉内,肌肉内,皮下,经皮,鞘内,局部,直肠,颊,吸入或鼻内。

[0231] 为了注射,可以将本发明的所述化合物配制成水溶液,优选地在生理上相容的缓

冲剂如汉克氏溶液 (Hank's solution), 林格氏溶液 (Ringer's solution) 或生理盐水中配制。为了透粘膜给药, 在制剂中使用适合于要渗透的屏障的渗透剂。这类渗透剂例如DMSO或聚乙二醇在本领域中通常是已知的。

[0232] 可以口服使用的药物组合物包括由明胶制成的推入配合胶囊, 以及由明胶和增塑剂, 如甘油或山梨糖醇, 制成的密封软胶囊。推入配合胶囊可以包含与填充剂如乳糖, 与粘合剂如淀粉, 与润滑剂如滑石或硬脂酸镁, 以及可选地, 稳定剂混合的活性成分。

[0233] 在软胶囊中, 活性化合物可以溶解或悬浮在合适的液体中, 如脂肪油、液体石蜡或液态聚乙二醇。此外, 可以加入稳定剂。所有用于口服的制剂的剂量应适合所选的给药途径。

[0234] 或者, 本发明的所述化合物可被并入口服液体制剂, 如水性或油性悬浮液、溶液、乳化液、糖浆或酏剂。再者, 含有这些化合物的配方可以呈现为一干品, 使用前用水或其他合适的媒介配制。此类液体制剂可以包含传统添加物, 如悬浮剂, 如山梨糖浆、甲基纤维素、葡萄糖/糖浆、明胶、羟甲基纤维素、羧甲基纤维素、硬脂酸铝凝胶以及氢化食用脂肪; 乳化剂, 如卵磷脂、脱水山梨糖醇单油酸酯或金合欢; 非水性溶媒 (其中可以包括食用油) 如杏仁油、分馏椰子油、油性酯、丙二醇以及乙醇; 以及防腐剂, 如甲基或丙基p-羟基苯甲酸酯和山梨酸。

[0235] 为了通过吸入给药, 根据本发明使用的所述肽以一气溶胶喷雾形式呈现且从一加压包装或一雾化器配合使用一合适的推进剂, 例如二氯二氟甲烷、三氯氟甲烷、二氯四氟乙烷或二氧化碳, 被方便地递送。如果是一加压气溶胶, 所述剂量单位可通过提供一阀递送一计量数量来确定。胶囊和药筒如明胶使用于一吸入器或吹入器可被配制成包含一粉末混合所述肽和一合适的粉末基质, 如乳糖或淀粉。

[0236] 本发明的所述药物组合物也对局部和病灶内的应用有用。如本文所使用的术语“局部”是指“具有特定的表面积”, 例如皮肤和粘膜, 以及所述局部用药施加到所述表面的一特定区域将仅影响其所施加的区域。所述肽/肽类似物的制剂可以局部施用如一凝胶、软膏、乳膏、乳液、缓释制剂包括一透皮贴剂, 以及可包含脂质体和适合局部用药的任何其他药学上可接受的载体。本文所述药物组合物也可以包含凝胶相载体或赋形剂的合适固体。这类载体或赋形剂的范例包括但不限于碳酸钙、磷酸钙、各种糖、淀粉、纤维素衍生物、明胶和聚合物如聚乙二醇。

[0237] 本发明的组合物可以, 如果想要, 放在一包装或分配器装置中, 如一FDA批准的套件, 可包含有所述活性成分的一或更多单位剂量形式。所述包装可以, 例如, 包含金属或塑料箔, 如一起泡包装。所述包装或分配器装置可能附有给药指示。所述包装或分配器也可以由一通告容纳, 所述通告与以一政府机构规定的规范制造的形式的容器相关联, 使用或贩卖药品, 所述通告反映了代理机构对所述组合物形式或人类或兽医给药的认可。此通知, 例如, 可以是经美国食品药品监督管理局批准用于处方药的标签, 也可以是经批准的产品插页。还可以制备包含在一相容的药物载体中配制的本发明的一制剂的组合物, 将其放置在适当的容器中, 并贴上标签以治疗指定的病症, 如上所述。

[0238] 如本文中所使用, 术语“大约” (about) 为...的 $\pm 10\%$ 之内。

[0239] 术语“包含” (comprises)、“包含” (comprising)、“包括” (includes)、“包括” (including)、“具有” (having) 和其词形变化是指“包括但不限于”。

[0240] 术语“由...组成”(consisting of)意指“包括并且限于”。

[0241] 术语“基本上由.....组成”(essentially consisting of)是指组合物、方法或结构可包括额外的成分、步骤和/或部件,但只有当额外的成分、步骤和/或部件实质上不改变所要求保护的组合物、方法或结构的基本特征和新特征。

[0242] 如本文所使用的,单数形式的一(a, an, the)包含复数形式,除非上下文另有明确说明。例如,术语一化合物(a compound)或至少一化合物(at least one compound)可以包括多种化合物,包括其混合物。

[0243] 在整个申请中,本发明在一范围形式中的可呈现各种实施例。但应当理解是,范围形式的描述仅仅是为了方便和简化,不应被解释为对本发明的范围的强行限制。因此,范围的描述应当被认为已经具体公开了所有可能的子范围以及范围内的单个数值。例如,范围的描述,从1至6应考虑到具有具体公开的子范围,如从1至3,从1至4,从1至5,从2至4,从2至6,从3至6等,以及在所述范围内的个数,例如1,2,3,4,5及6,不论范围的宽度皆适用。

[0244] 每当本文指出一数值范围,其意在包括任何数字(分数或整数)在指示的范围限制内,包括范围限制,除非上下文另有明确规定。短语在第一指示数字和第二指示数字的“范围内(ranging)/范围之间(ranges between)”,并且“范围内(ranging)/范围从(ranged from)”一第一指示数字“到(to)”一第二指示数字,在本文中可互换地使用,并且意在包括所述第一和第二指示数字,以及其间的所有分数和整数。

[0245] 如本文所使用的术语“方法”是指用于完成一给定任务的方式、手段、技术和程序,包括但不限于化学、药理学、生物学、生物化学和医学领域的从业者已知或很容易从已知方式、手段、技术和程序开发的那些方式、手段、技术和程序。

[0246] 如本文所使用,术语“治疗(treating)”包括消除、基本上抑制、减慢或逆转一病症的进展,基本上改善一病症的临床或美学上的症状或基本上预防一病症的临床或美学症状的出现。

[0247] 可以理解的是,本发明的某些特征,为了清楚起见在分开的实施例的上下文中描述,也可以在单个实施例中被组合提供。相反地,本发明的各种特征,为了简洁起见,在单个实施例的上下文中描述,也可以单独地或以任何合适的子组合,或如适用于本发明的任何其他描述的实施例提供。在各种实施例的上下文中描述的某些特征不应被认为是所述实施例的必要特征,除非所述实施例在没有所述元件的情况下是无作用的。

[0248] 如上文界定的以及下面权利要求书所请求保护的本发明的各种实施例和观点在以下范例中找到实验支持。

[0249] 范例:

[0250] 现参照下面范例,其与以上描述一起以非限制性方式示出了本发明的一些实施例。

[0251] 通常,本文所使用的专门术语及本发明中使用的实验室程序包括分子,生化,微生物和重组DNA技术。这些技术在文献中有详尽的解释。参见例如,“Molecular Cloning: A laboratory Manual”Sambrook et al., (1989);“Current Protocols in Molecular Biology”Volumes I-III Ausubel, R.M., ed. (1994); Ausubel et al., “Current Protocols in Molecular Biology”, John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, “A Practical Guide to Molecular Cloning”, John Wiley & Sons, New York

(1988); Watson et al., "Recombinant DNA", Scientific American Books, New York; Birren et al. (eds) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998); 如美国专利第4,666,828号、第4,683,202号、第4,801,531号、第5,192,659以及第5,272,057号所述的方法论; "Cell Biology: A Laboratory Handbook", Volumes I-III Cellis, J.E., ed. (1994); "Culture of Animal Cells-A Manual of Basic Technique" by Freshney, Wiley-Liss, N.Y. (1994), Third Edition; "Current Protocols in Immunology" Volumes I-III Coligan J.E., ed. (1994); Stites et al. (eds), "Basic and Clinical Immunology" (8th Edition), Appleton&Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell and Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", W.H. Freeman and Co., New York (1980); 专利和科学文献中广泛描述了可用的免疫测定, 参见例如美国专利第3,791,932号、第3,839,153号、第3,850,752号、第3,850,578号、第3,853,987号、第3,867,517号、第3,879,262号、第3,901,654号、第3,935,074号、第3,984,533号、第3,996,345号、第4,034,074号、第4,098,876号、第4,879,219号、第5,011,771号以及第5,281,521号; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M.J., ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B.D., and Higgins S.J., eds. (1985); "Transcription and Translation" Hames, B.D., and Higgins S.J., eds. (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R.I., ed. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) and "Methods in Enzymology" Vol. 1-317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak et al., "Strategies for Protein Purification and Characterization-A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996); 通过引用将其全部内容并入本文, 如同在此完整阐述一样。本文档中提供了其他一般参考。相信其中的过程在本领域中是众所周知的, 并且为了读者的方便而提供。其中包含的所有信息均通过引用并入本文。

[0252] 范例1:

[0253] 地塞米松是一种皮质类固醇药物, 可诱导免疫细胞和淋巴样组织的凋亡。使用 BALB/c 小鼠检测候选肽挽救淋巴细胞的凋亡的能力。给小鼠腹膜内 (IP) 注射 100 $\mu$ g 的地塞米松。地塞米松处理后以及处理 24 小时之后的小鼠立即接受静脉 (IV) 注射候选肽 (250 或 400 $\mu$ g 肽/小鼠)。第一次治疗之后 48 小时牺牲小鼠。称重脾脏和胸腺, 并对两个器官进行全细胞计数。

[0254] 在筛检中使用的肽如下:

[0255] PPLPY-SEQ ID NO:3

[0256] LPPLAYP-SEQ ID NO:4

[0257] PLPYP-SEQ ID NO:9

[0258] PPL-SEQ ID NO:10

[0259] PLP-SEQ ID NO:11

[0260] PYP-SEQ ID NO:12

[0261] LPGLPYP-SEQ ID NO:13

[0262] LPPLGYP-SEQ ID NO:14

[0263] LAPLPYP-SEQ ID NO:15

[0264] LPALPYP-SEQ ID NO:16

[0265] 结果:

[0266] 地塞米松引发的脾脏及胸腺的重量减轻,以及脾脏细胞数减少约50%。与正常小鼠相比,胸腺细胞数减少近80%。所述肽中的两个(SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4)在减少脾脏及胸腺重量减轻的数量以及降低细胞数损失中具有显著效果(见图1)。两种治疗剂量(250或400 $\mu\text{g}$ /小鼠)之间没有差异。

[0267] 范例2:

[0268] 使用BALB/c小鼠检测候选肽挽救淋巴细胞的凋亡的能力。给小鼠腹膜内(IP)注射100 $\mu\text{g}$ 的地塞米松。地塞米松处理后以及处理24小时之后的小鼠立即接受静脉(IV)注射候选肽(200 $\mu\text{g}$ 肽/小鼠)。第一次治疗之后48小时牺牲小鼠。称重脾脏和胸腺,并对两个器官进行全细胞计数。

[0269] 在筛检中使用的肽如下:

[0270] LPPLPYP-SEQ ID NO:2(对照)

[0271] PPLAYP-SEQ ID NO:18

[0272] LPPLPY-SEQ ID NO:7

[0273] LPPLAYP-SEQ ID NO:4

[0274] PPLPY-SEQ ID NO:3

[0275] PPLPY-NH<sub>2</sub>-SEQ ID NO:19

[0276] 结果:

[0277] 图2中提供了结果。每个所述测试的肽均显示出优于对照肽(SEQ ID NO:2)的改善。

[0278] 尽管本发明已经结合具体实施方案进行了描述,但显然的,许多替换、修改和变化对于本领域的技术人员将是清楚明白的。因此,本发明意在涵盖落入所附权利要求的精神和范围内的所有替换、修改和变化。

[0279] 所有在此说明书中所述的公开刊物、专利以及专利申请案在此并入它们的全文于本说明书中,以供参照至每一个单一公开文件、专利或专利申请案所特定且单一指示于此并入参照的相同范围。此外,任何参照资料的援引文献或定义在此申请中不应被解释为承认这个参照资料可作为本发明的已知技术。关于其章节标题被使用的情况下,不应被解释为必要的限制。此外,本申请的任何优先权文件在此全文以引用方式并入本文。

- [0001] SEQUENCE LISTING
- [0002] <110> 免疫制药有限公司
- [0003] 欧瓦迪亚, 艾伦
- [0004] 班席蒙, 艾维
- [0005] <120> 肽化合物及其治疗用途
- [0006] <130> 77809
- [0007] <150> IL 260555
- [0008] <151> 2018-07-11
- [0009] <160> 21
- [0010] <170> SIPOSequenceListing 1.0
- [0011] <210> 1
- [0012] <211> 5
- [0013] <212> PRT
- [0014] <213> Artificial sequence
- [0015] <220>
- [0016] <223> 肽
- [0017] <220>
- [0018] <221> MISC\_FEATURE
- [0019] <222> (1) .. (2)
- [0020] <223> X是脯氨酸或脯氨酸的一类似物或衍生物
- [0021] <220>
- [0022] <221> MISC\_FEATURE
- [0023] <222> (3) .. (3)
- [0024] <223> X是丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、半胱氨酸、异亮氨酸、蛋氨酸或它们的一衍生物或类似物
- [0025] <220>
- [0026] <221> MISC\_FEATURE
- [0027] <222> (4) .. (4)
- [0028] <223> X是丙氨酸、缬氨酸、丝氨酸、脯氨酸或它们的一衍生物或类似物
- [0029] <220>
- [0030] <221> MISC\_FEATURE
- [0031] <222> (5) .. (5)
- [0032] <223> X是任一氨基酸
- [0033] <400> 1
- [0034] Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
- [0035] 1 5
- [0036] <210> 2
- [0037] <211> 7

- [0038] <212> PRT
- [0039] <213> Artificial sequence
- [0040] <220>
- [0041] <223> Stressin-1氨基酸序列
- [0042] <400> 2
- [0043] Leu Pro Pro Leu Pro Tyr Pro
- [0044] 1 5
- [0045] <210> 3
- [0046] <211> 5
- [0047] <212> PRT
- [0048] <213> Artificial sequence
- [0049] <220>
- [0050] <223> 合成的肽
- [0051] <400> 3
- [0052] Pro Pro Leu Pro Tyr
- [0053] 1 5
- [0054] <210> 4
- [0055] <211> 7
- [0056] <212> PRT
- [0057] <213> Artificial sequence
- [0058] <220>
- [0059] <223> 合成的肽
- [0060] <400> 4
- [0061] Leu Pro Pro Leu Ala Tyr Pro
- [0062] 1 5
- [0063] <210> 5
- [0064] <211> 5
- [0065] <212> PRT
- [0066] <213> Artificial sequence
- [0067] <220>
- [0068] <223> 合成的肽
- [0069] <220>
- [0070] <221> misc\_feature
- [0071] <222> (1) .. (1)
- [0072] <223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸
- [0073] <220>
- [0074] <221> MISC\_FEATURE
- [0075] <222> (2) .. (2)
- [0076] <223> X2是脯氨酸或脯氨酸的一类似物或衍生物

---

[0077]	<220>
[0078]	<221> misc_feature
[0079]	<222> (3) .. (3)
[0080]	<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸
[0081]	<220>
[0082]	<221> MISC_FEATURE
[0083]	<222> (4) .. (4)
[0084]	<223> X不是脯氨酸
[0085]	<220>
[0086]	<221> misc_feature
[0087]	<222> (5) .. (5)
[0088]	<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸
[0089]	<400> 5
[0090]	Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
[0091]	1                      5
[0092]	<210> 6
[0093]	<211> 7
[0094]	<212> PRT
[0095]	<213> Artificial sequence
[0096]	<220>
[0097]	<223> 合成的肽
[0098]	<220>
[0099]	<221> misc_feature
[0100]	<222> (1) .. (1)
[0101]	<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸
[0102]	<220>
[0103]	<221> MISC_FEATURE
[0104]	<222> (2) .. (3)
[0105]	<223> X是脯氨酸或脯氨酸的一类似物或衍生物
[0106]	<220>
[0107]	<221> MISC_FEATURE
[0108]	<222> (4) .. (4)
[0109]	<223> X不是脯氨酸
[0110]	<220>
[0111]	<221> misc_feature
[0112]	<222> (5) .. (6)
[0113]	<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸
[0114]	<220>
[0115]	<221> MISC_FEATURE

- [0116] <222> (7) .. (7)
- [0117] <223> X是脯氨酸或脯氨酸的一类似物或衍生物
- [0118] <400> 6
- [0119] Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
- [0120] 1 5
- [0121] <210> 7
- [0122] <211> 6
- [0123] <212> PRT
- [0124] <213> Artificial sequence
- [0125] <220>
- [0126] <223> 合成的肽
- [0127] <400> 7
- [0128] Leu Pro Pro Leu Pro Tyr
- [0129] 1 5
- [0130] <210> 8
- [0131] <211> 6
- [0132] <212> PRT
- [0133] <213> Artificial sequence
- [0134] <220>
- [0135] <223> 合成的肽
- [0136] <400> 8
- [0137] Pro Pro Leu Pro Tyr Pro
- [0138] 1 5
- [0139] <210> 9
- [0140] <211> 5
- [0141] <212> PRT
- [0142] <213> Artificial sequence
- [0143] <220>
- [0144] <223> 合成的肽
- [0145] <400> 9
- [0146] Pro Leu Pro Tyr Pro
- [0147] 1 5
- [0148] <210> 10
- [0149] <211> 3
- [0150] <212> PRT
- [0151] <213> Artificial sequence
- [0152] <220>
- [0153] <223> 合成的肽
- [0154] <400> 10

- [0155] Pro Pro Leu  
[0156] 1  
[0157] <210> 11  
[0158] <211> 3  
[0159] <212> PRT  
[0160] <213> Artificial sequence  
[0161] <220>  
[0162] <223> 合成的肽  
[0163] <400> 11  
[0164] Pro Leu Pro  
[0165] 1  
[0166] <210> 12  
[0167] <211> 3  
[0168] <212> PRT  
[0169] <213> Artificial sequence  
[0170] <220>  
[0171] <223> 合成的肽  
[0172] <400> 12  
[0173] Pro Tyr Pro  
[0174] 1  
[0175] <210> 13  
[0176] <211> 7  
[0177] <212> PRT  
[0178] <213> Artificial sequence  
[0179] <220>  
[0180] <223> 合成的肽  
[0181] <400> 13  
[0182] Leu Pro Gly Leu Pro Tyr Pro  
[0183] 1 5  
[0184] <210> 14  
[0185] <211> 7  
[0186] <212> PRT  
[0187] <213> Artificial sequence  
[0188] <220>  
[0189] <223> 合成的肽  
[0190] <400> 14  
[0191] Leu Pro Pro Leu Gly Tyr Pro  
[0192] 1 5  
[0193] <210> 15

- [0194] <211> 7  
[0195] <212> PRT  
[0196] <213> Artificial sequence  
[0197] <220>  
[0198] <223> 合成的肽  
[0199] <400> 15  
[0200] Leu Ala Pro Leu Pro Tyr Pro  
[0201] 1 5  
[0202] <210> 16  
[0203] <211> 7  
[0204] <212> PRT  
[0205] <213> Artificial sequence  
[0206] <220>  
[0207] <223> 合成的肽  
[0208] <400> 16  
[0209] Leu Pro Ala Leu Pro Tyr Pro  
[0210] 1 5  
[0211] <210> 17  
[0212] <211> 6  
[0213] <212> PRT  
[0214] <213> Artificial Sequence  
[0215] <220>  
[0216] <223> 合成的肽  
[0217] <220>  
[0218] <221> MISC\_FEATURE  
[0219] <222> (1) .. (1)  
[0220] <223> X是脯氨酸,或者脯氨酸的一类似物或衍生物  
[0221] <220>  
[0222] <221> MISC\_FEATURE  
[0223] <222> (2) .. (2)  
[0224] <223> X是脯氨酸,或者脯氨酸的一类似物或  
[0225] <220>  
[0226] <221> MISC\_FEATURE  
[0227] <222> (3) .. (3)  
[0228] <223> X是丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、半胱氨酸、异亮氨酸、蛋氨酸及它们的衍生物  
或类似物  
[0229] <220>  
[0230] <221> MISC\_FEATURE  
[0231] <222> (4) .. (4)

- [0232] <223> X是丙氨酸、缬氨酸、丝氨酸及它们的衍生物或类似物
- [0233] <220>
- [0234] <221> misc\_feature
- [0235] <222> (5) .. (5)
- [0236] <223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸
- [0237] <220>
- [0238] <221> MISC\_FEATURE
- [0239] <222> (6) .. (6)
- [0240] <223> X是脯氨酸或脯氨酸的一类似物或衍生物
- [0241] <400> 17
- [0242] Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
- [0243] 1 5
- [0244] <210> 18
- [0245] <211> 6
- [0246] <212> PRT
- [0247] <213> Artificial Sequence
- [0248] <220>
- [0249] <223> 合成的肽
- [0250] <400> 18
- [0251] Pro Pro Leu Ala Tyr Pro
- [0252] 1 5
- [0253] <210> 19
- [0254] <211> 5
- [0255] <212> PRT
- [0256] <213> Artificial Sequence
- [0257] <220>
- [0258] <223> 合成的肽
- [0259] <220>
- [0260] <221> MOD\_RES
- [0261] <222> (5) .. (5)
- [0262] <223> 酰胺化
- [0263] <400> 19
- [0264] Pro Pro Leu Pro Tyr
- [0265] 1 5
- [0266] <210> 20
- [0267] <211> 6
- [0268] <212> PRT
- [0269] <213> Artificial Sequence
- [0270] <220>

[0271] <223> 合成的肽  
[0272] <220>  
[0273] <221> MISC\_FEATURE  
[0274] <222> (1) .. (1)  
[0275] <223> 可以是D-氨基酸  
[0276] <220>  
[0277] <221> MISC\_FEATURE  
[0278] <222> (3) .. (3)  
[0279] <223> 可以是D-氨基酸  
[0280] <400> 20  
[0281] Leu Pro Pro Leu Pro Tyr  
[0282] 1 5  
[0283] <210> 21  
[0284] <211> 7  
[0285] <212> PRT  
[0286] <213> Artificial Sequence  
[0287] <220>  
[0288] <223> 合成的肽  
[0289] <220>  
[0290] <221> MISC\_FEATURE  
[0291] <222> (1) .. (1)  
[0292] <223> may be D amino acid  
[0293] <220>  
[0294] <221> MISC\_FEATURE  
[0295] <222> (3) .. (3)  
[0296] <223> 可以是D-氨基酸  
[0297] <220>  
[0298] <221> MISC\_FEATURE  
[0299] <222> (5) .. (5)  
[0300] <223> 可以是D-氨基酸  
[0301] <400> 21  
[0302] Leu Pro Pro Leu Ala Tyr Pro  
[0303] 1 5

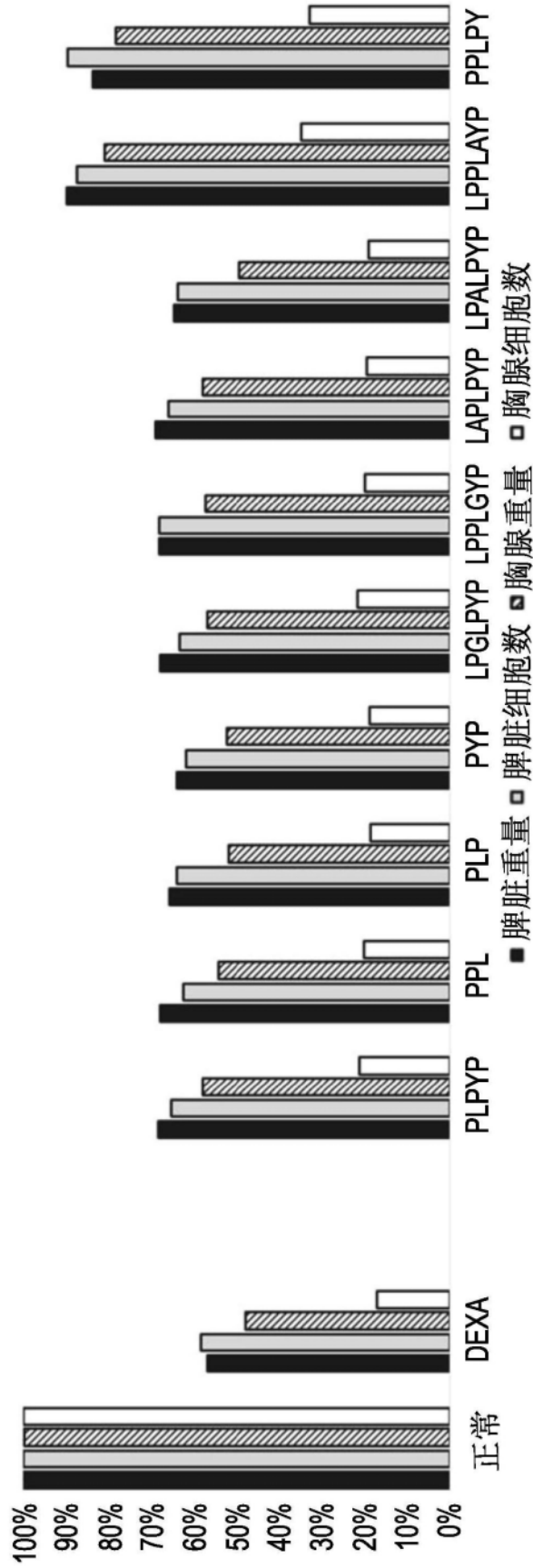


图1

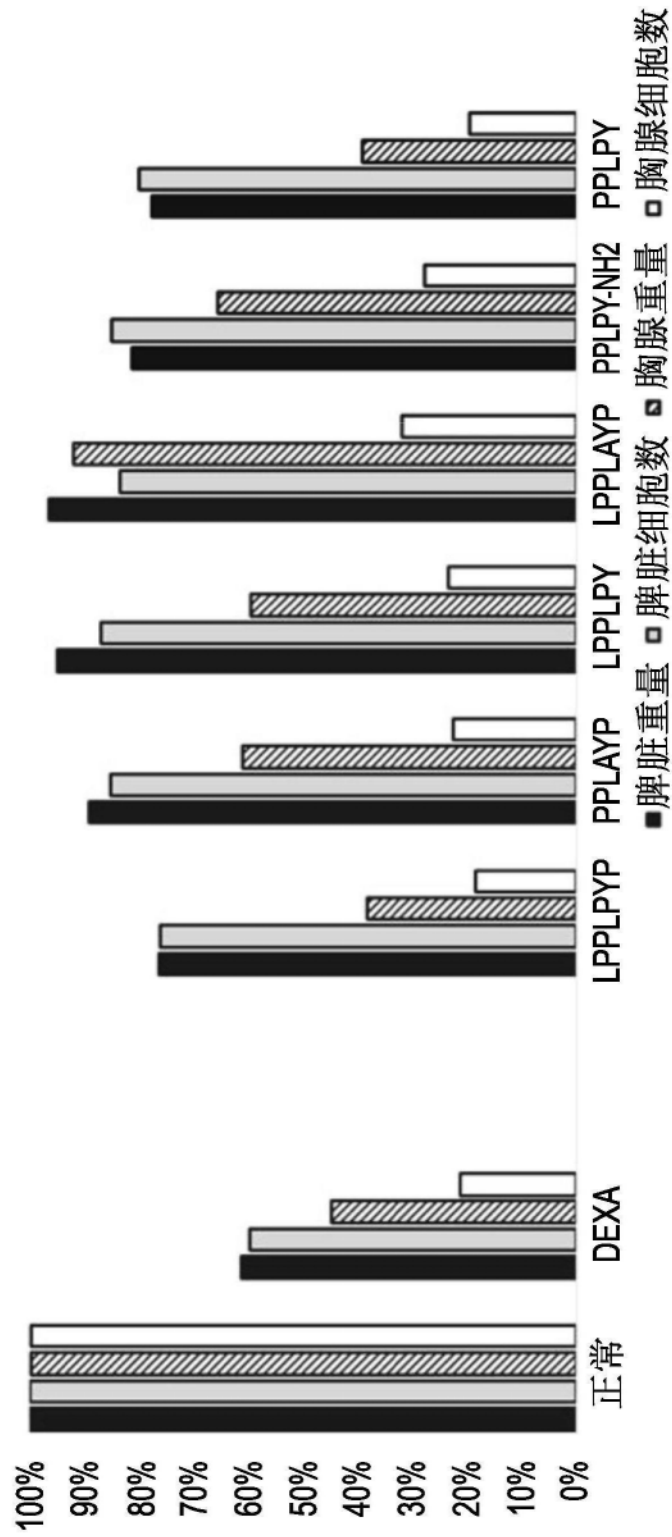


图2