



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105050614 B

(45)授权公告日 2019.04.05

(21)申请号 201480012216.8

(22)申请日 2014.03.14

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 105050614 A

(43)申请公布日 2015.11.11

(30)优先权数据
61/798,191 2013.03.15 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2015.09.02

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2014/029232 2014.03.14

(87)PCT国际申请的公布数据
W02014/144708 EN 2014.09.18

(73)专利权人 加利福尼亚大学董事会
地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 约翰·K·比利奇 简·约翰逊
瓦利德·丹豪

(74)专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理
有限责任公司 11204
代理人 王达佐 洪欣

(51)Int.Cl.
A61K 38/00(2006.01)

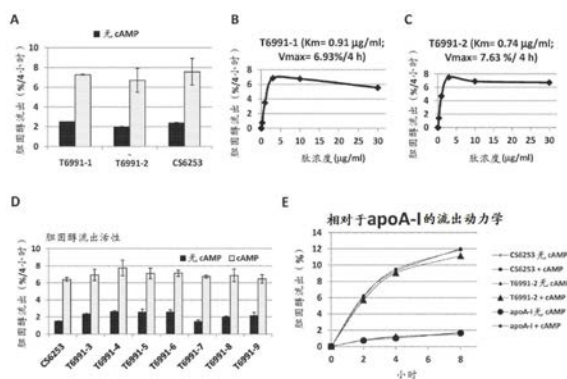
(56)对比文件
US 2011/0152112 A1, 2011.06.23,
CN 102123722 A, 2011.07.13,
CN 101675072 A, 2010.03.17,
审查员 李恩

(54)发明名称

刺激胆固醇流出的具有降低的毒性的肽

(57)摘要

本发明提供一个家族的与全长载脂蛋白(例如Apo AI和Apo E)具有类似胆固醇流出活性,并且与全长载脂蛋白具有类似对ABCA1的高选择性的非天然存在的多肽。此外,当在治疗剂量以及更高剂量下施用,本发明的肽具有少许毒性或不具有毒性。本发明也提供包含所述多肽的组合物,鉴定、筛选和合成所述多肽的方法,以及治疗、预防或诊断与血脂异常、高胆固醇血症或炎症相关的疾病和病症;或涉及异常葡萄糖代谢的疾病,例如糖尿病、代谢综合征;或阿尔茨海默氏病或额颞叶性痴呆的方法。



1. 一种具有胆固醇流出活性的长度为24个氨基酸的分离的多肽,其中所述氨基酸序列的每一位置处的氨基酸如下述:

位置3、14和23:

(a) (i) 在三个位置3、14和23中的至少一个位置处为瓜氨酸; (ii) 在位置3、14和23中的第二个位置处为L,Q,N或瓜氨酸;以及 (iii) 在位置3、14和23中的第三个位置处为瓜氨酸,R或K,或者

(b) 在位置3、14和23中两个位置处为Q或N;以及在位置3、14和23中的第三个位置处为R或K;

在位置1、7、8、15、18和19处的氨基酸独立地选自D或E;以及

在位置2、6、10、13、16、17、20、21、22和24处的氨基酸独立地选自L,I,V或A;。

在位置9处为W,L,A或V;

在位置4处为S;

在位置5处为K;以及

在位置11和12处为A。

2. 如权利要求1所述的分离的多肽,其中所述氨基酸序列在所述位置3、14或23中的两个位置处具有瓜氨酸。

3. 如权利要求1所述的分离的多肽,其中 (a) 的氨基酸序列在位置3、14或23中的第三个位置处具有R或K。

4. 如权利要求1所述的分离的多肽,其中所述氨基酸序列在所述位置3、14或23中的两个位置处具有瓜氨酸,且在第三位置处具有R或K。

5. 如权利要求4所述的分离的多肽,其中所述具有瓜氨酸的两个位置是位置3和14。

6. 如权利要求1所述的分离的多肽,其中 (a) 的氨基酸序列在位置3、14或23的第二位置处具有Q、N或L。

7. 如权利要求6所述的分离的多肽,其中在第三位置处的氨基酸残基是R或K。

8. 如权利要求1所述的分离的多肽,其中所述氨基酸序列在位置3、14或23中的两个位置处具有瓜氨酸;在第三个位置处具有R或K;以及在位置10、13、16和20处的残基是I,或在位置10、13、16和20处的残基是L。

9. 如权利要求1所述的分离的多肽,其中所述氨基酸序列为SEQ ID NO:1。

10. 如权利要求1所述的分离的多肽,其中所述氨基酸序列为SEQ ID NO:2。

11. 长度为26个氨基酸的分离的多肽,其中在位置1-24的每一位置处的残基如权利要求1所定义的,在位置25处的残基是K或N,以及在位置26处的残基是S。

12. 一种具有胆固醇流出活性的分离的多肽,其中所述多肽氨基酸序列为:

EVQSKLEEWLAAL (R8) ELAEEL (S5) AQLKS,在位置14和21处具有环钩[R8-S5];

EVQSKLEEWFAAF (S5) EFAEEF (R8) AQLKS,在位置14和21处具有环钩[S5-R8];或者

EVASKLEEWFAAF (S5) EFAEEF (R8) AALKS,在位置14和21处具有环钩[S5-R8]。

13. 根据前述权利要求中任一项所述的分离的多肽,其中所述多肽进一步包含保护基。

14. 根据权利要求13所述的分离的多肽,其中所述保护基是选自由以下组成的组的保护基:乙酰基(Ac)、酰胺、3至20个碳的烷基、Fmoc、叔丁氧基羰基(Tboc)、9-芴乙酰基、1-芴羧基、9-芴羧基、9-芴酮-1-羧基、苯甲氧基羰基、咕吨基(Xan)、三苯甲基(Trt)、4-甲基三苯

甲基 (Mtt)、4-甲氧基三苯甲基 (Mmt)、4-甲氧基-2,3,6-三甲基-苯磺酰基 (Mtr)、均三甲苯-2-磺酰基 (Mts)、4,4-二甲氧基二苯甲基 (Mbh)、甲苯磺酰基 (Tos)、2,2,5,7,8-五甲基色满-6-磺酰基 (Pmc)、4-甲基苯甲基 (MeBzl)、4-甲氧基苯甲基 (MeOBzl)、苯甲氧基 (BzlO)、苯甲基 (Bzl)、苯甲酰基 (Bz)、3-硝基-2-吡啶亚磺酰基 (Npys)、1-(4,4-二甲基-2,6-二氧代亚环己基)乙基 (Dde)、2,6-二氯苯甲基 (2,6-DiCl-Bzl)、2-氯苯甲氧基羰基 (2-Cl-Z)、2-溴苯甲氧基羰基 (2-Br-Z)、苯甲氧基甲基 (Bom)、环己基氧基 (cHxO)、叔丁氧基甲基 (Bum)、叔丁氧基 (tBuO)、叔丁基 (tBu) 和三氟乙酰基 (TFA)。

15. 根据权利要求13或14所述的分离的多肽,其中所述保护基被偶联于氨基或羧基末端。

16. 根据权利要求13或14所述的分离的多肽,其中所述多肽包含偶联于所述氨基末端的第一保护基和偶联于所述羧基末端的第二保护基。

17. 根据权利要求16所述的分离的多肽,其中所述第一保护基是选自由乙酰基、丙酰基和3至20个碳的烷基组成的组的保护基。

18. 根据权利要求17所述的分离的多肽,其中所述第一保护基是乙酰基。

19. 根据权利要求17或18所述的分离的多肽,其中所述第二保护基是酰胺。

20. 根据权利要求1至19中任一项所述的分离的多肽,其中对映异构氨基酸是“L”氨基酸和“D”氨基酸的混合物。

21. 一种如权利要求1至19中任一项所述的肽的类似物,其中所述类似物是逆反转类似物。

22. 一种药物组合物,其包含权利要求1至20中任一项所述的多肽或权利要求21所述的类似物以及药学上可接受的载体。

23. 根据权利要求22所述的组合物,其进一步包含用于治疗心血管疾病的治疗剂。

24. 根据权利要求23所述的组合物,其中所述治疗剂选自由他汀类药物、胆汁酸结合剂、血小板凝集抑制剂、烟碱酰胺、PPAR活化剂、维生素E及其组合组成的组。

25. 一种组合物,其包含与脂质复合的权利要求1至20中任一项所述的多肽或权利要求21所述的类似物。

26. 根据权利要求25所述的组合物,其中所述脂质是磷脂。

27. 根据权利要求26所述的组合物,其中所述磷脂是1-棕榈酰基-2-油酰基-sn-甘油-3-磷脂酰胆碱 (“POPC”)。

28. 根据权利要求25至27中任一项所述的组合物,其进一步包含药学上可接受的载体。

29. 权利要求1至20中任一项所述的多肽或权利要求21所述的类似物在制备用于介导哺乳动物的胆固醇流出的药物中的用途。

30. 根据权利要求29所述的用途,其中所述多肽使ABCA稳定。

31. 根据权利要求30所述的用途,其中所述ABCA是ABCA1。

32. 根据权利要求29所述的用途,其中所述多肽具有抗氧化活性。

33. 根据权利要求29所述的用途,其中所述多肽具有抗炎活性。

34. 根据权利要求29所述的用途,其中所述哺乳动物是人。

35. 根据权利要求34所述的用途,其中所述人具有ApoE4等位基因。

36. 根据权利要求29所述的用途,其中所述哺乳动物是非人哺乳动物。

37. 治疗有效量的权利要求1至20中任一项所述的多肽或权利要求21所述的类似物在制备用于治疗哺乳动物的动脉粥样硬化的症状的药物中的用途。

38. 根据权利要求37所述的用途, 其中所述哺乳动物是被诊断为具有动脉粥样硬化的一种或多种症状的哺乳动物。

39. 根据权利要求37所述的用途, 其中所述哺乳动物是被诊断为处于动脉粥样硬化的风险下的哺乳动物。

40. 根据权利要求37所述的用途, 其中所述哺乳动物是人。

41. 根据权利要求37所述的用途, 其中所述哺乳动物是非人哺乳动物。

42. 权利要求1至20中任一项所述的多肽或权利要求21所述的类似物在制备用于使哺乳动物的管腔壁中的脆弱斑块稳定的药物中的用途。

43. 根据权利要求42所述的用途, 其中所述哺乳动物是被诊断为具有一个或多个脆弱斑块的哺乳动物。

44. 根据权利要求42所述的用途, 其中所述哺乳动物是被诊断处于具有一个或多个脆弱斑块的风险下的哺乳动物。

45. 权利要求1至20中任一项所述的多肽或权利要求21所述的类似物在制备用于降低哺乳动物的葡萄糖水平的药物中的用途。

46. 如权利要求45所述的用途, 其中所述哺乳动物患有糖尿病、代谢综合征或糖尿病前期。

47. 如权利要求29所述的用途, 其中所述哺乳动物患有大血管或微血管疾病、慢性肾病或充血性心脏衰竭。

48. 如权利要求45、46或47中任一项所述的用途, 其中该哺乳动物为人类。

49. 权利要求1至20中任一项所述的多肽或权利要求21所述的类似物在制备用于治疗或预防阿尔茨海默氏病或额颞叶性痴呆的症状的药物中的用途。

50. 如权利要求49所述的用途, 其中所述患者已被诊断有阿尔茨海默氏病。

51. 如权利要求49或50所述的用途, 其中所述患者具有ApoE4等位基因。

52. 一种用于治疗动脉粥样硬化的症状的试剂盒, 所述试剂盒包括含有权利要求1至20中任一项所述的多肽或权利要求21所述的类似物的容器。

53. 根据权利要求52所述的试剂盒, 其进一步包括药学上可接受的载体。

54. 根据权利要求52所述的试剂盒, 其中所述多肽与药学上可接受的载体以单位剂量制剂形式组合。

刺激胆固醇流出的具有降低的毒性的肽

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2013年3月15日提交的美国临时申请号61/798,191的优先权权益,所述申请以引用的方式并入本文。

[0003] 关于联邦资助的研究和开发下做出的发明的权利的声明

[0004] 本发明是根据由美国能源部颁发的合同号DE-AC02-05CH11231和由国立卫生研究院颁发的拨款号HL085791在政府支持下进行。政府享有本发明中的某些权利。

[0005] 发明背景

[0006] 血浆HDL胆固醇的水平升高与动脉粥样硬化的风险降低相关(Gordon等,“High Density Lipoprotein As A Protective Factor Against Coronary Heart Disease,” Am.J.Med.,62:707-14(1977))。HDL的有益作用部分地与介导抗致动脉粥样硬化逆向胆固醇转运(RCT)路径的活性相关。RCT涉及自周边巨噬细胞向肝转运胆固醇以在粪便中排泄固醇(Lewis等,“New Insights Into The Regulation of HDL Metabolism and Reverse Cholesterol Transport,”Circ.Res.,96:1221-32(2005))。RCT的限速步骤涉及刺激胆固醇自巨噬细胞流出,所述流出由如ApoA-I和Apo E的天然载脂蛋白介导。这个胆固醇流出过程产生初生HDL,并且需要ATP结合盒转运体A1(ABCA1),否则显现动脉粥样硬化(Calpe-Berdiel等,“Direct Evidence In Vivo of Impaired Macrophage-Specific Reverse Cholesterol Transport in ATP-Binding Cassette Transporter A1-Deficient Mice,” Biochim.Biophys.Acta.,1738(1-3):6-9(2005))。ABCA1是特征在于血浆HDL重度缺乏和过早动脉粥样硬化的丹吉尔氏病(Tangiers disease)中的缺陷性分子(Attie等,“Pivotal Role of ABCA1 in Reverse Cholesterol Transport Influencing HDL Levels and Susceptibility to Atherosclerosis,”J Lipid Res.,42(11):1717-26(2001))。载脂蛋白A和E也通过防止细胞ABCA1蛋白降解来使它稳定,此确保高水平的细胞胆固醇排出和HDL装配。

[0007] HDL的临床重要性已激发对开发用以操纵RCT以达成治疗目的的策略的兴趣。已鉴定可在体内刺激胆固醇流出的肽(参见例如WO 2008/115303和WO 2009/155366)。这些肽的特征在于具有极性和非极性表面以及酸性氨基酸残基队列的 α 螺旋。然而,在一些情形下,这些肽在极高药理学剂量下施用已展现毒性。因此,对提供具有降低的毒性的改进的肽存在需要。本发明满足这个需要。

[0008] 发明概述

[0009] 本发明涉及具有胆固醇流出活性,并且在细胞毒性概况方面具有优越性质的肽。

[0010] 在一个方面,本发明提供一个家族的与全长载脂蛋白(例如Apo AI和Apo E)具有类似胆固醇流出活性;并且与全长载脂蛋白具有类似对ABCA1的高选择性的肽。此外,所述肽家族具有合乎需要的细胞毒性概况,因为它们在高药理学剂量下施用显示少许细胞毒性或不显示细胞毒性。本发明的多肽也在体内刺激胆固醇自巨噬细胞泡沫细胞流出,促进粪便固醇分泌持续增加,并且减轻载脂蛋白E缺乏性小鼠疾病模型中高胆固醇血症和高脂肪饮食伤害存在下建立的动脉粥样硬化的严重性。

[0011] 本发明的肽可在治疗上用于促进ABCA1稳定化以及ABCA1-脂质流出活性,并且可单独,或替代地,与其它已知药理学剂组合用于治疗心血管疾病以减轻动脉粥样硬化。此外,本发明的多肽可单独,或替代地,与其它已知药理学剂组合用于治疗急性冠脉综合征以降低斑块脂质含量,并且使脆弱斑块稳定。此外,本发明的肽可单独,或替代地,与其它已知药理学剂组合用于治疗血脂异常、高胆固醇血症和炎症以升高血浆HDL浓度和/或促进逆向胆固醇转运。此外,本发明的肽可在治疗上单独或与其它药理学剂一起用于降低患有葡萄糖代谢异常疾病的患者的葡萄糖。在一些实施方案中,本发明的肽可在治疗上用于治疗或预防阿尔茨海默氏病(Alzheimer's Disease)或额颞叶性痴呆的一种或多种症状。在各个方面,本发明包括但不限于以下实施方案。

[0012] 本发明的肽包含合起来限定所述肽的药物动力学和药理学性质的某些特征。在一些实施方案中,肽包含选择性结合血浆中的HDL,并且靶向细胞中的ABCA1转运体的24个氨基酸残基的核心序列。肽的特征包括两亲性 α 螺旋结构,其具有在极性表面的中心下方的酸性残基队列和在脂质-水界面处的荷正电氨基酸。此外,本发明的肽在脂质水界面的极性表面处,例如在含24个氨基酸的序列的如参照SEQ ID NO:1编号的位置3、14和/或23处具有一个或多个未荷电残基。在一些实施方案中,一个或多个未荷电残基是极性未荷电残基。在一些实施方案中,肽在极性表面处,例如在位置3、14和23中的一个或两个处包含一个或多个未荷电疏水性氨基酸。在一些实施方案中,肽在极性表面处,例如在位置3、14和23中的一个或两个处包含一个或多个未荷电脂族氨基酸。在典型实施方案中,本发明的肽具有净负电荷。在一些实施方案中,脂族氨基酸在非极性表面处是优选的。在一些实施方案中,丙氨酸可用于降低疏水性。

[0013] 肽也缺乏实质性立体特异性作用,例如包含L和D氨基酸的肽与反转形式同等良好起作用。

[0014] 在一个方面,本发明提供一种具有胆固醇流出活性,并且在高药理学剂量下具有少许毒性或不具有毒性的分离的肽,其中所述肽包含是具有非极性表面和极性表面的两亲性 α 螺旋的氨基酸序列,其中所述极性表面在脂质-水界面处包含荷电和未荷电氨基酸残基。在一些实施方案中,肽包含氨基酸序列EVcitSKLEEWLAALcitELAEELLARL (SEQ ID NO:1),其中“cit”代表瓜氨酸。在一些实施方案中,肽包含SEQ ID NO:1的与SEQ ID NO:1具有至少50%同一性、或至少60%同一性、或至少70%、至少80%、至少85%、至少90%同一性、或至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98或99%同一性的变体。在一些实施方案中,肽包含氨基酸序列EVcitSKLEEWIAAIcitEIAEEILARL (SEQ ID NO:2),其中“cit”代表瓜氨酸。在一些实施方案中,肽包含SEQ ID NO:2的与SEQ ID NO:2具有至少50%同一性、或至少60%同一性、或至少70%、至少80%、至少85%、至少90%同一性、或至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98或99%同一性的变体。此处所述的氨基酸位置是参照SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2确定。SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的肽变体通常在如参照SEQ ID NO:1编号的位置1、7、8、15、18和19处具有酸性氨基酸残基。在一些实施方案中,变体在极性表面处,例如在如参照SEQ ID NO:1编号的位置3、14或23中的至少一个处具有未荷电残基。在一些实施方案中,变体在如参照SEQ ID NO:1编号的位置3、14或23中的两个处具有瓜氨酸。在一些实施方案中,变体在位置3和14、位置3和23、或位置14和23处具有瓜氨酸。在一些实施方案中,变体具有在位置3和14处的瓜氨酸以及在位置23处的R或K;在位置3和23处的

瓜氨酸以及在位置14处的R或K;或在位置14和23处的瓜氨酸以及在位置3处的R或K。在一些实施方案中,变体具有至多两个R残基。举例来说,在一些实施方案中,变体可具有在位置5处的R和在位置23处的R。在一些实施方案中,氨基酸序列在位置3、14和23中的一个或两个处包含未荷电残基,其中所述残基是疏水性氨基酸,如Q、N、Y、W、A、I、L、V。在一些实施方案中,在位置3、14和23中的一个或两个处的未荷电残基是脂族氨基酸,如A、I、L或V。在当位置3、14和23中的一个或两个处存在疏水性或脂族氨基酸时的实施方案中,第三位置是R、K或瓜氨酸。在一些实施方案中,变体在如参照SEQ ID NO:1确定的位置2、6、9、10、13、16、17、20、21、22和24处包含疏水性氨基酸。在一些实施方案中,变体在位置2、6、10、13、16、17、20、21、22和24中的至少一个、或至少两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个或九个处包含脂族氨基酸。在一些实施方案中,变体在位置2、6、10、13、16、20、21和24中的各个处包含脂族残基。在一些实施方案中,脂族氨基酸是L、V或I。在某一实施方案中,在位置2、6、10、13、16、20和21处的脂族氨基酸残基是L。在某一实施方案中,在位置2、6、10、13、16、20和21处的脂族氨基酸残基是I。在一些实施方案中,在位置2处的脂族氨基酸残基是V。在一些实施方案中,在位置2处的脂族氨基酸残基是V,并且在位置6、10、13、16、20和21处的脂族氨基酸残基是L。在一些实施方案中,在位置10、13、16和20中的各个处的脂族氨基酸是相同氨基酸。在一些实施方案中,脂族氨基酸是支链氨基酸。在一些实施方案中,在位置10、13、16和20中的各个处的脂族氨基酸是选自由L、I或V组成的组的相同氨基酸。在一些实施方案中,在位置10、13、16和20中的各个处的脂族氨基酸是I。在一些实施方案中,在位置10、13、16和20中的各个处的脂族氨基酸是L。在一些实施方案中,在位置2处的脂族氨基酸是V,在位置6、21和24处的脂族氨基酸是L,并且在位置10、13、16和20处的脂族氨基酸残基是I或L。在一些实施方案中,变体在位置11和12处包含A。在一些实施方案中,本发明的肽具有葡萄糖降低活性和/或治疗或预防阿尔茨海默氏病或额颞叶性痴呆的一种或多种症状。在一些实施方案中,本发明的肽可使受试者对胰岛素敏感。举例来说,在一些实施方案中,肽在X₁₀、X₁₃、X₁₆和X₂₁处具有相同脂族残基,其中所述残基是支链脂族氨基酸残基。在一些实施方案中,X₁₀、X₁₃、X₁₆和X₂₁是L,或X₁₀、X₁₃、X₁₆和X₂₁是I。在一些实施方案中,多肽包含SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2。

[0015] 在一些实施方案中,本发明的肽,例如SEQ ID NO:1或如本文所述的变体,进一步在如参照SEQ ID NO:1编号的位置25和26处包含氨基酸。在一些实施方案中,在位置25处的氨基酸残基是K或N,并且在位置26处的氨基酸残基是S或Y。在一些实施方案中,在位置25处的氨基酸是K,并且在位置26处的氨基酸是S。在一些实施方案中,肽包含氨基酸序列 EVcitSKLEEWLAALcitELAEELLARLKS (SEQ ID NO:3)。在一些实施方案中,多肽包含 EVcitSKLEEWIAAIcitEIAEEILARLKS (SEQ ID NO:4)。

[0016] 在一些实施方案中,本发明提供一种具有胆固醇流出活性,并且具有少许细胞毒性或不具有细胞毒性的分离的多肽,其中所述多肽包含具有以下特征的氨基酸序列:两亲性 α 螺旋结构,所述结构具有在极性表面的中心下方的酸性残基队列和在脂质-水界面处的荷正电氨基酸。此外,本发明的肽在脂质水界面的极性表面处,例如在位置3、14或23处具有一个或多个未荷电残基。因此,在一些实施方案中,本发明提供一种包含以下24-氨基酸序列的肽:

[0017] X₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈X₉X₁₀X₁₁X₁₂X₁₃X₁₄X₁₅X₁₆X₁₇X₁₈X₁₉X₂₀X₂₁X₂₂X₂₃X₂₄ (序列1)

[0018] 其中X₁、X₇、X₈、X₁₅、X₁₈和X₁₉独立地选自由E和D组成的组；X₂、X₆、X₉、X₁₀、X₁₂、X₁₃、X₁₆、X₁₇、X₂₀、X₂₁和X₂₄是疏水性氨基酸残基；X₃、X₁₄和X₂₃是未荷电氨基酸；X₄、X₁₁和X₂₂是独立地选自由S、T、G、A和Y组成的组的氨基酸；并且X₅是R或K。在其中X₅是R的实施方案中，肽通常具有至多两个R残基。在一些实施方案中，X₂、X₆、X₁₀、X₁₂、X₁₃、X₁₆、X₁₇、X₂₀、X₂₁和X₂₄是脂族氨基酸。在一些实施方案中，位置X₃、X₁₄和X₂₃中的两个是瓜氨酸，并且第三位置是R或K。在一些实施方案中，24-氨基酸序列包含至多两个芳族氨基酸。在一些实施方案中，本发明的肽具有葡萄糖降低活性和/或治疗或预防阿尔茨海默氏病或额颞叶性痴呆的一种或多种症状。在一些实施方案中，本发明的肽可使受试者对胰岛素敏感。举例来说，在一些实施方案中，肽在X₁₀、X₁₃、X₁₆和X₂₁处具有相同脂族残基，其中所述残基是支链脂族氨基酸残基。在一些实施方案中，X₁₀、X₁₃、X₁₆和X₂₁是L，或X₁₀、X₁₃、X₁₆和X₂₁是I。

[0019] 本发明另外提供一种具有胆固醇流出活性的具有少许细胞毒性或不具有细胞毒性的分离的肽，其包含以下24-氨基酸序列：

[0020] X₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈X₉X₁₀X₁₁X₁₂X₁₃X₁₄X₁₅X₁₆X₁₇X₁₈X₁₉X₂₀X₂₁X₂₂X₂₃X₂₄ (序列2)

[0021] 其中X₁、X₇、X₈、X₁₅、X₁₈和X₁₉是酸性氨基酸；并且X₂、X₆、X₉、X₁₀、X₁₁、X₁₂、X₁₃、X₁₆、X₁₇、X₂₀、X₂₁、X₂₂和X₂₄是疏水性氨基酸，例如脂族氨基酸。在一些实施方案中，X₃、X₁₄和X₂₃是未荷电氨基酸。在一些实施方案中，位置X₃、X₁₄和X₂₃中的两个是瓜氨酸，并且第三位置是R或K。在一些实施方案中，X₁₁和X₂₂是A。在一些实施方案中，X₄是极性氨基酸，优选是极性未荷电氨基酸。在一些实施方案中，X₄是S、T、G或Y。在一些实施方案中，X₄是S。在一些实施方案中，X₅是荷正电氨基酸。在一些实施方案中，X₅是R或K。在一些实施方案中，X₅是R。在一些实施方案中，X₃和X₁₄是瓜氨酸。在一些实施方案中，X₁₀、X₁₃、X₁₆和X₂₀是I。在一些实施方案中，24-氨基酸序列包含至多两个芳族氨基酸。在一些实施方案中，当X₅是R时，肽具有至多两个R残基。在一些实施方案中，X₁、X₇、X₈、X₁₅、X₁₈和X₁₉独立地选自D和E；X₁₀、X₁₃、X₁₆和X₂₀是I；X₂、X₆、X₉、X₁₁、X₁₂、X₁₇、X₂₁、X₂₂和X₂₄是疏水性氨基酸；并且位置X₃、X₁₄和X₂₃中的两个是瓜氨酸，且第三位置是R或K。在一些实施方案中，X₁、X₇、X₈、X₁₅、X₁₈和X₁₉独立地选自D和E；X₁₀、X₁₃、X₁₆和X₂₀是L；X₂、X₆、X₁₁、X₁₂、X₁₇、X₂₁、X₂₂和X₂₄是脂族氨基酸；并且位置X₃、X₁₄和X₂₃中的两个是瓜氨酸，且第三位置是R或K。在一些实施方案中，X₁、X₇、X₈、X₁₅、X₁₈和X₁₉独立地选自D和E；X₁₀、X₁₃、X₁₆和X₂₀是I；X₂、X₆、X₉、X₁₁、X₁₂、X₁₇、X₂₁、X₂₂和X₂₄是疏水性氨基酸，例如脂族氨基酸；位置X₃和X₁₄是瓜氨酸，并且位置X₂₃是R或K。在一些实施方案中，X₁、X₇、X₈、X₁₅、X₁₈和X₁₉独立地选自D和E；X₁₀、X₁₃、X₁₆和X₂₀是L；X₂、X₆、X₁₁、X₁₂、X₁₇、X₂₁、X₂₂和X₂₄是脂族氨基酸；位置X₃和X₁₄是瓜氨酸，并且位置X₂₃是R或K。在一些实施方案中，本发明的肽具有葡萄糖降低活性和/或治疗或预防阿尔茨海默氏病或额颞叶性痴呆的一种或多种症状。在一些实施方案中，本发明的肽可使受试者对胰岛素敏感。

[0022] 在一些实施方案中，本发明提供一种具有胆固醇流出活性的具有少许细胞毒性或不具有细胞毒性，并且包含以下24-氨基酸序列的分离的肽：

[0023] X₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈X₉X₁₀X₁₁X₁₂X₁₃X₁₄X₁₅X₁₆X₁₇X₁₈X₁₉X₂₀X₂₁X₂₂X₂₃X₂₄ (序列3)

[0024] 其中X₁、X₇、X₈、X₁₅、X₁₈和X₁₉是独立地选自由E和D组成的组的氨基酸；X₂、X₆、X₁₀、X₁₂、X₁₃、X₁₆、X₁₇、X₂₀、X₂₁和X₂₄是独立地选自由A、V、L或I组成的组的氨基酸；X₉选自由A、V、L、I和W组成的组；X₃、X₁₄和X₂₃中的至少两个是瓜氨酸；X₅是K或R，并且X₄、X₁₁和X₂₂是独立地选自由S、T、G、A和Y组成的组的氨基酸。在一些实施方案中，X₃和X₁₄是瓜氨酸。在一些实施方案中，X₃

和X₁₄是瓜氨酸,并且X₂₃是R或K。在一些实施方案中,X₃和X₂₃是瓜氨酸,并且X₁₄是R或K。在一些实施方案中,X₁₄和X₂₃是瓜氨酸,并且X₃是R或K。在例如其中X₅是R的一些实施方案中,肽具有至多两个R残基。在一些实施方案中,24-氨基酸序列包含至多两个芳族氨基酸。在一些实施方案中,本发明的肽具有葡萄糖降低活性和/或治疗或预防阿尔茨海默氏病或额颞叶性痴呆的一种或多种症状。在一些实施方案中,本发明的肽可使受试者对胰岛素敏感。举例来说,在一些实施方案中,X₁₀、X₁₃、X₁₆和X₂₀是相同脂族氨基酸残基,例如I或L。

[0025] 在一些实施方案中,本发明提供一种具有胆固醇流出活性的具有少许细胞毒性或不具有细胞毒性,并且包含以下24-氨基酸序列的分离的肽:

[0026] X₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈X₉X₁₀X₁₁X₁₂X₁₃X₁₄X₁₅X₁₆X₁₇X₁₈X₁₉X₂₀X₂₁X₂₂X₂₃X₂₄ (序列4)

[0027] 其中X₁、X₇、X₈、X₁₅、X₁₈和X₁₉是D或E;X₂、X₆、X₁₀、X₁₂、X₁₃、X₁₆、X₁₇、X₂₀、X₂₁和X₂₄是独立地选自A、V、L或I组成的组的氨基酸;X₃、X₁₄和X₂₃中的至少两个是瓜氨酸;X₉是W;X₅是K,并且X₄、X₁₁和X₂₂独立地选自S和A组成的组。在一些实施方案中,X₃和X₁₄是瓜氨酸。在一些实施方案中,X₃和X₁₄是瓜氨酸,并且X₂₃是R或K。在一些实施方案中,24-氨基酸序列包含至多两个芳族氨基酸。在一些实施方案中,本发明的肽具有葡萄糖降低活性和/或治疗或预防阿尔茨海默氏病或额颞叶性痴呆的一种或多种症状。在一些实施方案中,本发明的肽可使受试者对胰岛素敏感。举例来说,在一些实施方案中,X₁₀、X₁₃、X₁₆和X₂₀是相同脂族氨基酸残基,例如I或L。

[0028] 在一些实施方案中,本发明提供一种具有胆固醇流出活性的具有少许细胞毒性或不具有细胞毒性,并且包含以下24-氨基酸序列的分离的肽:

[0029] X₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈X₉X₁₀X₁₁X₁₂X₁₃X₁₄X₁₅X₁₆X₁₇X₁₈X₁₉X₂₀X₂₁X₂₂X₂₃X₂₄ (序列5)

[0030] 其中X₁、X₇、X₈、X₁₅、X₁₈和X₁₉是E;X₂、X₆、X₁₀、X₁₂、X₁₃、X₁₆、X₁₇、X₂₀、X₂₁和X₂₄是独立地选自L和I组成的组的氨基酸;X₃、X₁₄和X₂₃中的至少两个是瓜氨酸;X₉是W;X₅是K,X₄是S;并且X₁₁和X₂₂是A。在一些实施方案中,X₃和X₁₄是瓜氨酸。在一些实施方案中,X₃和X₁₄是瓜氨酸,并且X₂₃是R或K。在一些实施方案中,本发明的肽具有葡萄糖降低活性和/或治疗或预防阿尔茨海默氏病或额颞叶性痴呆的一种或多种症状。在一些实施方案中,本发明的肽可使受试者对胰岛素敏感。举例来说,在一些实施方案中,X₁₀、X₁₃、X₁₆和X₂₀是相同脂族氨基酸残基,例如I或L。

[0031] 本发明进一步提供一种具有胆固醇流出活性的具有少许细胞毒性或不具有细胞毒性的分离的多肽,其中所述肽包含是具有非极性表面和极性表面的两亲性 α 螺旋的氨基酸序列,其中所述肽与SEQ ID NO:1具有至少60%同一性、或至少70%、至少80%、或至少90%同一性,或与SEQ ID NO:2具有至少60%同一性、或至少70%、至少80%、或至少90%同一性,其中所述肽在位置3、14或23处包含至少一个化学环钩(chemical staple)。此处所述的位置是参照SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2确定。因此,举例来说,肽可在位置14处包含与在位置21处的残基形成环钩的残基。优选地,肽在位置1、7、8、15、18和19处具有酸性氨基酸残基。在一些实施方案中,变体在如参照SEQ ID NO:1确定的位置2、6、9、10、13、16、17、20、21、22和24处包含疏水性残基。在一些实施方案中,变体在如参照SEQ ID NO:1确定的位置2、6、10、13、16、17、20、21、22和24中的至少一个、或至少两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个或九个处包含脂族氨基酸。在一些实施方案中,变体在位置2、6、10、13、16、20、21和24中的各个处包含脂族残基。在一些实施方案中,脂族氨基酸是L、V或I。在一些实施方案中,在位

置2、6、10、13、16、20和21处的脂族氨基酸残基是L。在一些实施方案中,在位置2、6、10、13、16、20和21处的脂族氨基酸残基是I。在一些实施方案中,在位置10、13、16和20中的各个处的脂族残基是I。在一些实施方案中,在位置10、13、16和20中的各个处的脂族残基是L。在一些实施方案中,在位置2处的脂族氨基酸残基是V。在一些实施方案中,在位置2处的脂族氨基酸残基是V,并且在位置10、13、16和20处的脂族氨基酸残基是L。在一些实施方案中,在位置2处的脂族氨基酸是V,在位置6、21和24处的脂族氨基酸是L,并且在位置10、13、16和20处的脂族氨基酸残基是I。在一些实施方案中,变体在位置11和12处包含A。在一些实施方案中,本发明的肽具有葡萄糖降低活性和/或治疗或预防阿尔茨海默氏病或额颞叶性痴呆的一种或多种症状。在一些实施方案中,本发明的肽可使受试者对胰岛素敏感。举例来说,在一些实施方案中,X₁₀、X₁₃、X₁₆和X₂₀是相同脂族氨基酸残基,例如I或L。

[0032] 如本领域中所了解,任何前述实施方案的变异肽可包含一个或多个非天然存在的氨基酸残基。在一些实施方案中,任一前述实施方案中的至少一个瓜氨酸被瓜氨酸氨基酸类似物替换。因此,在一些实施方案中,位置X₃、X₁₄和X₂₃中的一个或多个可为瓜氨酸的类似物。在一些实施方案中,一个或多个疏水性氨基酸被具有长脂族碳变化,例如长碳(C₅₋₈)烯基或烷基侧链的非天然存在的类似物氨基酸替换。

[0033] 在一个实施方案中,本发明的多肽进一步包含保护基。举例来说,多肽可被修饰以使组成氨基酸和/或末端氨基酸上的R基团被封阻,即由保护基保护。已发现封阻,特别是封阻氨基和/或羧基末端,可极大改进口服递送,并且显著增加血清半衰期。因此,在一个实施方案中,本发明的多肽进一步包含偶联于氨基或羧基末端的保护基。在一个实施方案中,多肽进一步包含偶联于氨基末端的第一保护基和偶联于羧基末端的第二保护基。

[0034] 适合保护基包括但不限于乙酰基(Ac)、酰胺、3至20个碳的烷基、Fmoc、叔丁氧基羰基(Tboc)、9-芴乙酰基、1-芴羧基、9-芴羧基、9-芴酮-1-羧基、苯甲氧基羰基、咕吨基(Xan)、三苯甲基(Trt)、4-甲基三苯甲基(Mtt)、4-甲氧基三苯甲基(Mmt)、4-甲氧基-2,3,6-三甲基-苯磺酰基(Mtr)、均三甲苯-2-磺酰基(Mts)、4,4-二甲氧基二苯甲基(Mbh)、甲苯磺酰基(Tos)、2,2,5,7,8-五甲基色满-6-磺酰基(Pmc)、4-甲基苯甲基(MeBzl)、4-甲氧基苯甲基(MeOBzl)、苯甲氧基(BzlO)、苯甲基(Bzl)、苯甲酰基(Bz)、3-硝基-2-吡啶亚磺酰基(Npys)、1-(4,4-二甲基-2,6-二氧代亚环己基)乙基(Dde)、2,6-二氯苯甲基(2,6-DiCl-Bzl)、2-氯苯甲氧基羰基(2-Cl-Z)、2-溴苯甲氧基羰基(2-Br-Z)、苯甲氧基甲基(Bom)、环己基氧基(cHxO)、叔丁氧基甲基(Bom)、叔丁氧基(tBuO)、叔丁基(tBu)和三氟乙酰基(TFA)。

[0035] 在一优选实施方案中,多肽包含偶联于氨基末端的第一保护基,所述第一保护基包括但不限于乙酰基、丙酰基以及3至20个碳的烷基。在一优选实施方案中,第一保护基是乙酰基。在另一优选实施方案中,多肽包含偶联于羧基末端的第二保护基,其中所述第二保护基是酰胺。

[0036] 本发明的多肽可包含所有“L”氨基酸、所有“D”氨基酸或“L”氨基酸和“D”氨基酸的混合物。

[0037] 本发明的多肽具有胆固醇流出活性和/或具有ABCA1稳定活性。在另一实施方案中,本发明的多肽保护磷脂免遭被氧化剂氧化(即多肽具有抗氧化活性)。在另一实施方案中,本发明的多肽具有抗炎活性,包括抑制粘着分子。在另一实施方案中,施用本发明的多肽会降低LDL,和/或对葡萄糖控制具有有利影响,即葡萄糖降低作用。在一些实施方案中,

本发明的肽治疗或预防阿尔茨海默氏病或额颞叶性痴呆的症状。在一些实施方案中,本发明的多肽包含这些活性中的各个。

[0038] 本发明的另一方面提供包含至少一种如本文所述的本发明的肽以及药学上可接受的载体或赋形剂的药物组合物。在一些实施方案中,药物组合物包含用于治疗与胆固醇流出相关的疾病或病症(例如心血管疾病)的其它治疗剂(例如他汀类药物(statin),如阿托伐他汀(atorvastatin)、洛伐他汀(lovastatin)、普伐他汀(pravastatin)、辛伐他汀(simvastatin)、氟伐他汀(fluvastatin)或罗苏伐他汀(rosuvastatin);胆汁酸结合剂,如消胆胺(cholestyramine)或考来替泊(colestipol);Nieman-Pick C1样1固醇转运体通道抑制剂,如依折麦布(Ezetimibe);血小板凝集抑制剂,如阿司匹林(aspirin)、噻氯匹定(ticlopidine)或氯吡格雷(clopidogrel)、烟酸(niacin)/烟碱酰胺(nicotinamide)、PPAR活化剂、维生素E或其组合)。

[0039] 在另一方面,本发明提供本文公开的多肽的肽模拟物,其中所述肽模拟物是类似物肽,例如逆反转类似物或逆对映类似物;或具有非酰胺骨架的替代物肽。在另一实施方案中,类似物是反式烯烃替代物肽或衍生物。在一些实施方案中,本发明的肽可包含其它骨架修饰。所述肽类似物或替代物可进一步包含如本文所述的保护基,并且优选是在氨基末端与羧基末端两者处的保护基。

[0040] 在另一方面,本发明提供一种包含与脂质复合的如本文所述的本发明的多肽,例如包含SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2或其变体的多肽或其肽模拟物的组合物。在一个实施方案中,脂质是磷脂。在另一实施方案中,磷脂是1-棕榈酰基-2-油酰基-sn-甘油-3-磷脂酰胆碱("POPC")。在另一实施方案中,组合物进一步包含药学上可接受的载体。

[0041] 本发明的另一方面提供通过向受试者施用至少一种本文所述的多肽或肽模拟物来介导哺乳动物受试者(例如人或黑猩猩的灵长类动物、或如大鼠或小鼠的啮齿动物)的胆固醇流出的方法。本领域技术人员将了解可替代施用多肽(或肽模拟物)来向受试者施用编码所述多肽(或肽模拟物)的核酸。本发明提供所述核酸。基于它们的胆固醇流出活性,本发明的多肽和肽模拟物可有利地用于治疗、改善或预防与血脂异常、高胆固醇血症、异常葡萄糖代谢、阿尔茨海默氏病、额颞叶性痴呆和炎症相关的疾病或病状。

[0042] 本发明的另一方面提供用于通过向受试者施用至少一种本文所述的多肽或肽模拟物来治疗或预防哺乳动物的动脉粥样硬化的症状的方法。再次,本领域技术人员将了解可替代施用多肽(或肽模拟物)来向受试者施用编码所述多肽(或肽模拟物)的核酸。所述核酸由本发明提供。在这个方法的一个实施方案中,哺乳动物是被诊断为具有动脉粥样硬化的一种或多种症状的哺乳动物。在另一实施方案中,哺乳动物被诊断为处于动脉粥样硬化的风险下。优选地,哺乳动物是人,但也可为非人动物。在一个实施方案中,多肽包含氨基酸序列SEQ ID NO:1或其如本文所述的变体。在一个实施方案中,多肽包含SEQ ID NO:2或其如本文所述的变体。

[0043] 在另一相关实施方案中,方法进一步包括施用至少一种其它治疗剂。所述治疗剂的实例包括但不限于治疗葡萄糖代谢异常的试剂(例如抗糖尿病剂)、治疗阿尔茨海默氏病和/或额颞叶性痴呆的试剂、抗体、酶抑制剂、抗菌剂、抗病毒剂、类固醇、非类固醇抗炎剂、抗代谢物、细胞因子或可溶性细胞因子受体。酶抑制剂可为蛋白酶抑制剂或环加氧酶抑制剂。其它试剂可作为药物组合物的一部分添加,或当其它试剂的生理作用与本发明的多

肽或肽模拟物的生理作用重叠时,可并行或在一定时期内施用。例如,更具体来说,可在施用多肽或肽模拟物之前1周、数天、24小时、8小时或即刻并行施用其它试剂。或者,可例如在施用多肽或肽模拟物之后1周、数天、24小时、8小时或即刻施用其它试剂。

[0044] 本发明的另一方面提供用于使脆弱斑块稳定的方法,所述方法包括向哺乳动物施用至少一种本文所述的多肽或肽模拟物。再次,本领域技术人员将了解可替代施用多肽来向受试者施用编码所述多肽的核酸。所述核酸由本发明提供。在这个方法的一个实施方案中,哺乳动物是被诊断为具有一个或多个脆弱斑块的哺乳动物。在另一实施方案中,哺乳动物被诊断为处于具有脆弱斑块的风险下。优选地,哺乳动物是人,但也可为非人动物。在一个实施方案中,多肽具有氨基酸序列SEQ ID NO:1或是如本文所述的变体。在一个实施方案中,多肽具有氨基酸序列SEQ ID NO:2,或是如本文所述的变体。

[0045] 在另一方面,本发明提供降低LDL的方法,所述方法包括向哺乳动物施用至少一种本文所述的多肽或肽模拟物。再次,本领域技术人员将了解可替代施用多肽来向受试者施用编码所述多肽的核酸。所述核酸由本发明提供。在这个方法的一个实施方案中,哺乳动物是被诊断为具有升高的LDL的哺乳动物。在另一实施方案中,哺乳动物被诊断为处于具有升高的LDL的风险下。优选地,哺乳动物是人,但也可为非人动物。在一个实施方案中,多肽具有氨基酸序列SEQ ID NO:1或是如本文所述的变体。在一个实施方案中,多肽具有氨基酸序列SEQ ID NO:2或是如本文所述的变体。

[0046] 在本发明的另一方面,提供降低具有异常葡萄糖代谢的患者,例如患有例如II型或I型糖尿病的糖尿病、或代谢综合征或糖尿病前期的患者的葡萄糖水平的方法,所述方法包括向哺乳动物施用至少一种本文所述的多肽或肽模拟物。再次,本领域技术人员将了解可替代施用多肽来向受试者施用编码所述多肽的核酸。所述核酸由本发明提供。在这个方法的一个实施方案中,哺乳动物是被诊断为具有异常葡萄糖代谢的哺乳动物。在另一实施方案中,哺乳动物被诊断为处于具有异常葡萄糖代谢的风险下。优选地,哺乳动物是人,但也可为非人动物。在一个实施方案中,多肽具有氨基酸序列SEQ ID NO:1或是如本文所述的变体。在一个实施方案中,多肽具有氨基酸序列SEQ ID NO:2或是如本文所述的变体。在一些实施方案中,被施用来降低葡萄糖的多肽是如本文所述的多肽,条件是所述多肽不包含氨基酸序列SEQ ID NO:2。在一些实施方案中,被施用来降低葡萄糖的多肽包含SEQ ID NO:2。

[0047] 在本发明的另一方面,提供预防或治疗额颞叶性痴呆、阿尔茨海默氏病或轻度认知损害的症状的方法,所述方法包括向受试者施用至少一种本文所述的多肽或肽模拟物。再次,本领域技术人员将了解可替代施用多肽来向受试者施用编码所述多肽的核酸。所述核酸由本发明提供。在这个方法的一个实施方案中,受试者被诊断为患有阿尔茨海默氏病。在另一实施方案中,受试者被诊断为患有轻度认知损害。在一些实施方案中,受试者具有ApoE4等位基因。在一个实施方案中,多肽具有氨基酸序列SEQ ID NO:1或是如本文所述的变体。在一个实施方案中,多肽具有氨基酸序列SEQ ID NO:2或是如本文所述的变体。

[0048] 本发明也提供用于治疗或预防与血脂异常、高胆固醇血症、异常葡萄糖代谢、炎症和/或阿尔茨海默氏病或额颞叶性痴呆相关的疾病或病状的试剂盒。在一个实施方案中,本发明提供用于治疗或预防动脉粥样硬化的症状的试剂盒,所述试剂盒包括含有本发明的多肽或肽模拟物的容器。在一个实施方案中,本发明提供用于治疗或预防与异常葡萄糖代谢

相关的疾病,例如糖尿病或代谢综合征的试剂盒,所述试剂盒包括含有本发明的多肽或肽模拟物的容器。在一个实施方案中,本发明提供用于治疗或预防阿尔茨海默氏病的症状的试剂盒,所述试剂盒包括含有本发明的多肽或肽模拟物的容器。试剂盒可进一步包括药学上可接受的载体。此外,试剂盒可进一步包括教导使用多肽或肽模拟物来治疗或预防疾病或病状的指导材料。本发明的试剂盒中提供的多肽和肽模拟物可包含呈天然顺序或(逆)反转顺序的所有L氨基酸、所有D氨基酸或L氨基酸和D氨基酸的混合物。

[0049] 关于以上试剂盒,指导材料可包括文件或记录介质,其包括关于使用药物组合物的书面或可听说明书。指导材料包括例如瓶上的标签、插入盒中的纸张、盒或纸板箱上的印刷品、由在这些位置中的任一个中给出的地址处的网站提供的说明书等。

[0050] 在另一方面,本发明提供至少一种本发明的多肽或肽模拟物制备用于介导例如人的哺乳动物的胆固醇流出的药物的用途。在一个实施方案中,多肽具有氨基酸序列SEQ ID NO:1或是如本文所述的变体。在一个实施方案中,多肽具有氨基酸序列SEQ ID NO:2或是如本文所述的变体。

[0051] 在另一方面,本发明提供至少一种本发明的多肽或肽模拟物制备用于治疗例如人的哺乳动物的动脉粥样硬化的症状的药物的用途。在一个实施方案中,多肽具有氨基酸SEQ ID NO:1或如本文所述的变体。在一个实施方案中,多肽具有氨基酸序列SEQ ID NO:2或是如本文所述的变体。

[0052] 在另一方面,本发明提供至少一种本发明的多肽或肽模拟物制备用于使例如人的哺乳动物的脆弱斑块稳定的药物的用途。在一个实施方案中,多肽具有氨基酸SEQ ID NO:1或如本文所述的变体。在一个实施方案中,多肽具有氨基酸序列SEQ ID NO:2或是如本文所述的变体。

[0053] 在另一方面,本发明提供至少一种本发明的多肽或肽模拟物制备用于治疗患者的血脂异常或高胆固醇血症的药物的用途。在一个实施方案中,多肽具有氨基酸SEQ ID NO:1或是如本文所述的变体。在一个实施方案中,多肽具有氨基酸序列SEQ ID NO:2或是如本文所述的变体。

[0054] 在另一方面,本发明提供至少一种本发明的多肽或肽模拟物制备用于降低例如人的哺乳动物的血糖水平的药物的用途。在一个实施方案中,多肽具有氨基酸SEQ ID NO:1或是如本文所述的变体。在一个实施方案中,多肽具有氨基酸序列SEQ ID NO:2或是如本文所述的变体。

[0055] 在另一方面,本发明提供至少一种本发明的多肽或肽模拟物制备用于预防或治疗人的额颞叶性痴呆、阿尔茨海默氏病或轻度认知损害的症状的药物的用途。在一个实施方案中,多肽具有氨基酸SEQ ID NO:1或是如本文所述的变体。在一个实施方案中,多肽具有氨基酸序列SEQ ID NO:2或是如本文所述的变体。

[0056] 本发明的另一方面提供一种编码本发明的多肽的分离的核酸、一种包含所述核酸的表达载体、以及一种包含所述表达载体的宿主细胞。

[0057] 本发明的多肽和肽模拟物也适用作研究工具和/或诊断工具。举例来说,所述肽可用于鉴定具有逆向胆固醇缺乏性血浆的受试者和作为对逆向胆固醇治疗的应答者的那些受试者。此外,本发明的多肽可用于评估其它化合物(包括例如肽模拟物)的抗动脉粥样硬化潜力。

[0058] 此外,本发明的多肽或肽模拟物可用于探究动物和动物模型中的脂蛋白-受体相互作用,特别是当本发明的多肽或肽模拟物被标记(例如放射性标记、荧光标记等)时。

[0059] 本发明的多肽或肽模拟物也可用于鉴定适用于阐明脂质代谢路径的动物模型。举例来说,多肽或肽模拟物可用于鉴定对逆向胆固醇转运具有影响的动物模型以及基因和/或药物相互作用。

[0060] 本发明以及它的优选实施方案的其它特征、目标和优势将由阅读随后的详细描述、实施例、权利要求和附图而变得显而易见。

[0061] 附图简述

[0062] 图1-高剂量施用HDL模拟肽ATI-5261在大鼠和兔中诱导细胞毒性应答。

[0063] 图2-高剂量施用HDL模拟物ATI-5261在大鼠和兔中增加血浆甘油三酯和胆固醇。

[0064] 图3-静脉内输注高剂量ATI-5261在猴中诱导细胞毒性应答。

[0065] 图4-ATI-5261的在大鼠、兔和食蟹猕猴中得到的细胞毒性应答在小鼠中得以重演。

[0066] 图5-与ATI-5261的非极性表面相关的芳族苯丙氨酸残基促成大部分肽毒性。

[0067] 图6-在施用ATI-5261的脂族类似物之后,C57Bl/6小鼠中的血浆脂质的浓度。

[0068] 图7-证明ATI-5261的缺乏苯丙氨酸残基的脂族类似物保留强力ABCA1选择性胆固醇流出活性。在图版A以及图中显示在cAMP以及不在cAMP下的胆固醇流出活性的所有类似双柱状图中,左侧棒条代表在无cAMP下的胆固醇流出,而右侧棒条代表在cAMP之后胆固醇流出(即ABCA依赖性流出)。

[0069] 图8-ATI-5261中的赖氨酸残基的毒性性质。

[0070] 图9-ATI-5261中的精氨酸残基的毒性性质。

[0071] 图10-可调节疏水性以降低ATI-5261类似物的残余毒性。

[0072] 图11-可调节疏水性以降低ATI-5261类似物的残余毒性的进一步证据。

[0073] 图12-另外用其它疏水性较小的氨基酸取代色氨酸可用于降低ATI-5261的毒性。

[0074] 图13-疏水性氨基酸可在位置R14处用于产生安全和有效的肽。

[0075] 图14-R14L取代可在其它ATI-5261类似物中用于产生安全和有效的HDL模拟肽。

[0076] 图15-瓜氨酸取代精氨酸可用于产生安全和有效的HDL模拟肽。

[0077] 图16-ATI-5261的瓜氨酸类似物保留功能性,并且以高效价刺激胆固醇流出。

[0078] 图17-ATI-5261的瓜氨酸类似物在产生安全和有效的肽方面可与其它氨基酸取代相容。

[0079] 图18-LeuATI-5261肽可支持瓜氨酸取代以产生安全和有效的HDL模拟肽。

[0080] 图19-ATI-5261的瓜氨酸类似物保留功能性,并且以高效价刺激胆固醇流出。

[0081] 图20-沿两亲性 α 螺旋的极性表面存在荷负电残基在调节HDL模拟肽的毒性性质方面起主要作用。

[0082] 图21-具有酸性残基取代的肽保留在介导细胞胆固醇流出方面的功能性。

[0083] 图22-Leu-ATI5261和它的瓜氨酸类似物的小24聚体形式安全和有效介导ABCA介导的胆固醇流出。

[0084] 图23-疏水性亮氨酸可用于在两亲性 α 螺旋的脂质-水界面处替换瓜氨酸以产生安全和有效的HDL模拟肽。

- [0085] 图24-LeuATI-5261的瓜氨酸形式支持其它氨基酸取代以产生安全和有效的肽。
- [0086] 图25-LeuATI-5261的具有各种亮氨酸取代的瓜氨酸形式保留胆固醇流出活性。
- [0087] 图26-异亮氨酸可用于替换ATI-5261中的苯丙氨酸以产生安全和有效的胆固醇流出肽。
- [0088] 图27-ATI-5261的异亮氨酸形式保留胆固醇流出活性。
- [0089] 图28-肽CS6253和T6991-2以高效价刺激细胞胆固醇通过ABCA1流出。
- [0090] 图29-Cit.ATI-5261的亮氨酸形式使巨噬细胞ABCA1稳定,并且以ABCA1依赖性方式刺激胆固醇流出。
- [0091] 图30-肽CS6253与天然ABCA1寡聚形式相互作用以介导细胞脂质流出和初生HDL装配。
- [0092] 图31-与磷脂一起配制的CS6253刺激胆固醇通过SRB1流出。
- [0093] 图32-与磷脂一起配制的CS6253刺激胆固醇通过ABCG1流出。
- [0094] 图33-CS6253诱导前 β -HDL的形成,并且增强人血浆的胆固醇流出活性。
- [0095] 图34-T6991-2诱导前 β -HDL的形成,并且增强人血浆的胆固醇流出活性。
- [0096] 图35-CS6253在仓鼠中体内诱导前 β HDL形成。
- [0097] 图36-CS6253在大鼠中的血浆半衰期。CS6253被设计成具有S26- $\rightarrow$ Y取代以有助于用 125 I标记(序列处于图的顶部)。
- [0098] 图37-CS6253在体内刺激巨噬细胞逆向胆固醇转运(RCT)至粪便。
- [0099] 图38-CS6253减轻apoE $^{-/-}$ 小鼠中的实质性动脉粥样硬化。
- [0100] 图39-低剂量施用CS6253减轻apoE $^{-/-}$ 小鼠中的实质性动脉粥样硬化。
- [0101] 图40-皮下(SC)施用的CS6253也减轻apoE $^{-/-}$ 小鼠中的实质性动脉粥样硬化。
- [0102] 图41-环钩化肽可被设计来介导ABCA1依赖性胆固醇流出。
- [0103] 图42-基于ATI-5261设计的环钩化肽以浓度依赖性方式介导ABCA1依赖性胆固醇流出。
- [0104] 图43-T6991-2在小鼠中的血糖降低性质。肽T6991-2:
- [0105] 图44-T6991-2降低在DIO小鼠中进行葡萄糖激发后的血糖浓度。
- [0106] 图45-T6991-2改进DIO小鼠中对胰岛素的敏感性。
- [0107] 图46-T6991-2降低在肥胖症的ob/ob遗传小鼠模型中进行葡萄糖激发后的血糖浓度。
- [0108] 图47-CitATI-5261的亮氨酸形式支持各种氨基酸取代以产生安全和有效的肽。
- [0109] 图48-CitATI-5261的具有亮氨酸或异亮氨酸取代的脂族形式在小鼠中保留胆固醇流出活性,并且降低血糖。
- [0110] 图49-CS6253的具有递增数目的异亮氨酸残基的类似物是安全和有效的。
- [0111] 图50-CS6253的具有递增异亮氨酸取代的脂族形式在小鼠中保留胆固醇流出活性,并且降低血糖。
- [0112] 图51-CS6253和T6991-2降低在C57B1/6小鼠中进行葡萄糖激发后的血糖浓度。
- [0113] 图52-CS6253和T6991-2在大鼠中的血浆清除。
- [0114] 图53-全身性施用肽T6991-2增加小鼠中的脑ABC转运体。
- [0115] 图54-全身性施用CS6253或T6991-2增加小鼠的脑中的apoE水平和脂质化。

- [0116] 图55-全身性施用CS6253或T6991-2降低小鼠的脑中的P- τ 蛋白和淀粉状蛋白 β 42。
- [0117] 图56-全身性施用CS6253和T6991-2关于被遏制的VGlut1和apoE受体2来逆转E4表型,并且增加神经元可塑性。
- [0118] 发明详述
- [0119] 定义
- [0120] 术语“ABC”或“ATP结合盒”是指负责控制转运物质(例如胆固醇)跨越细胞膜流出和流入的多结构域膜蛋白。ABC蛋白包含四个结构域,其中两个跨膜结构域(TMD)负责转运物质结合和转运,而两个核苷酸结合结构域(NBD)负责使ATP水解的能量偶联于TMD的构象变化。家族成员包括例如ABCA1和ABCA7(参见例如Dean等,J.Lipid Res.,42:1007-1017(2001))。ABCA1表征于Denis等,J Biol Chem.,279(40):41529-36(2004)中。ABCA1在胆固醇流出中起作用,并且在暴露于胆固醇富集条件的细胞中被上调,且在丹吉尔氏病中是缺陷性分子(Brooks-Wilson等,Nat.Gen.,22:336-344(1999);Bodzioch等,Nat.Gen.,22:347-351(1999);Rust等,Nat.Gen.,22:352-355(1999))。ABCA1快速转换,并且在不存在如载脂蛋白的适合稳定剂下具有约1小时的半衰期(参见例如Wang等,J.Clin.Invest.,111:99-107(2003))。ABCA1序列显示于Genbank登记号:AJ012376;NM_173076;NM_015657;NM_005502;NP_005493;095477中。ABCA家族成员综述于Broccardo等,Biochimica et Biophysica Acta,1461:395-404(1999)中。
- [0121] 术语“两亲性 α 螺旋(amphipathic alpha helix/amphipathic α helix)”是指可采用螺旋形二级结构的多肽序列,其中一个表面(即面)是极性且主要包含亲水性氨基酸(例如Asp、Glu、Lys、Arg、His、Gly、Ser、Thr、Cys、Tyr、Asn和Gln),并且另一表面是主要包含疏水性氨基酸(例如Leu、Ala、Val、Ile、Pro、Phe、Trp和Met)的非极性面(参见例如Kaiser和Keszdy,Ann.Rev.Biophys.Biophys.Chem.,16:561(1987)以及Science,223:249(1984))。
- [0122] 在一些情况下,两亲性 α 螺旋的极性面可显示“荷负电氨基酸的队列”或“酸性氨基酸的队列”,即一系列荷负电或酸性氨基酸(例如Asp和/或Glu)在多肽二级结构内近似均匀定位(例如在约每一个、两个或三个螺旋转角处)。两亲性 α 螺旋在分子内蛋白质-蛋白质相互作用与分子间蛋白质-蛋白质相互作用两者中起作用,并且已假定包含两亲性 α 螺旋的蛋白质和脂蛋白(例如包括载脂蛋白)在脂质(例如HDL)转运和代谢中起作用(参见例如Anantharamaiah等,Adv.Exp.Med.Biol.,285:131-40(1991))。两亲性 α 螺旋的结构和功能已综述于例如Segrest等,Proteins,8(2):103-17(1990)中。鉴定两亲性 α 螺旋的电子方法已由例如Jones等,J.Lipid Res.,33(2):141-66(1992)所述。鉴定多种包含两亲性 α 螺旋的蛋白质,包括例如载脂蛋白和血清淀粉样蛋白。
- [0123] 术语“胆固醇流出”和“胆固醇流出活性”是指胆固醇自任何细胞类型流出。举例来说,动脉壁中的巨噬细胞泡沫细胞释放(即排出)胆固醇至适当接受体,如载脂蛋白和/或HDL。介导胆固醇流出的化合物增强胆固醇释放(即移动)出细胞,并且进入细胞外介质或区室中。胆固醇流出常伴有磷脂自细胞流出或被磷脂自细胞流出居先,即在磷脂自细胞流出之后。胆固醇与磷脂两者的协调释放在适合脂质接受体,例如载脂蛋白或肽存在下产生HDL。因此,胆固醇流出过程和磷脂流出过程是彼此关联和同义的。相较于在不存在增强胆固醇自细胞释放的化合物下的胆固醇流出水平,所述化合物使出现在细胞外部的胆固醇和/或磷脂的量增加至少25%、50%、75%、100%或至少2倍、4倍、8倍、10倍或大于10倍。

[0124] 术语“ABCA稳定化活性”或“ABCA1稳定化”是指通过防止ABCA蛋白降解来增强和/或延长它的半衰期。具有ABCA1稳定化活性的化合物将显著延迟蛋白质降解。相较于在不存在化合物下检测的ABCA1蛋白,这将使细胞ABCA1蛋白水平产生至少25%、50%、75%、100%或至少2倍、4倍、8倍、10倍或高于10倍的增加。

[0125] 术语“抗炎活性”是指预防或减轻炎症。炎症将被认定为在动脉粥样硬化发展中起作用,并且与血脂异常、高胆固醇血症和/或脂蛋白脂质氧化以及其它疾病相关。炎症性应答可为局部的,如在动脉壁或脑或其它血管外组织中,和/或可为全身的。相较于不存在具有抗炎活性的肽,所述肽将降低炎症性应答,如通过炎症性介体(例如粘着分子、细胞因子和/或氧化脂质)的降低和/或斑块和组织中的巨噬细胞和/或巨噬细胞活化的降低所度量。

[0126] 术语“抗氧化活性”是指防止或降低由反应性氧物质(ROS)引起的氧化,所述物质包括例如过氧化氢(H_2O_2);次氯酸根离子($-OCl$);羟基自由基($-OH$);和超氧化物阴离子(O_2^-)。许多天然存在的物质具有抗氧化活性。举例来说,载脂蛋白可抑制脂质过氧化,由此保护磷脂表面免遭亲脂性以及水溶性自由基引发剂影响(参见例如Biochemistry, 41: 2089-2096 (2002))。在本发明的情形下,具有抗氧化活性的肽具有的抗氧化活性比在不存在所述肽下的抗氧化活性高至少25%、50%、75%、100%或至少2倍、4倍、8倍、10倍或大于10倍。

[0127] 如本文所用的“斑块稳定化”是指通过自富含脂质的斑块移除胆固醇,包括但不限于自泡沫细胞巨噬细胞移除胆固醇来使脆弱斑块稳定以免遭破裂或侵蚀的风险。斑块含有血栓形成性物质,即当暴露于血浆时在使血小板聚集方面极其强力,从而具有局部血栓形成和血管闭塞的风险的物质,如组织因子。通过使斑块与血管分离的纤维帽来防止斑块的破裂以及所述物质的暴露。移除脂质会赋予斑块稳定性。

[0128] 如本文所用的“逆向胆固醇转运(RCT)”是指以下过程:自巨噬细胞泡沫细胞移除胆固醇以及自动脉壁移除富含脂质的斑块,随后通过血浆转移至肝以进行摄取、处理以及以中性固醇(胆固醇)或酸性固醇(羟基化胆固醇/胆汁)形式于粪便中排泄。尽管胆固醇可移动至其它脆弱性较小的邻近细胞,但RCT益处本身要求胆固醇自巨噬细胞泡沫细胞流出。然而,通过以HDL样粒子形式转运至肝以达成排泄来进一步处置所述胆固醇是有利治疗方面。所述完全RCT通过实际净移除动脉中的胆固醇内含物来提供动脉树的总体复原。RCT和斑块稳定作用由所述肽直接赋予,或由所述肽与血浆和细胞中的磷脂天然形成的复合物赋予,或替代地,当所述肽结合内源性HDL粒子(由此改变它们的性质并使得它们更高效促进RCT)时,由apoA-I/HDL赋予。

[0129] 与“血脂异常”相关的疾病或病症是其中由于组织(即血液)脂质和脂蛋白浓度改变和/或对胆固醇流出的介导异常或ABCA稳定化异常而使脂质代谢调控异常的任何疾病或病症。所述疾病包括例如心脏病、动脉粥样硬化性病变、中风、阿尔茨海默氏病和贮积病症。

[0130] 术语“氨基酸”是指天然存在的氨基酸和合成氨基酸以及以与天然存在的氨基酸类似的方式起作用的氨基酸类似物和氨基酸模拟物。天然存在的氨基酸是由遗传密码编码的那些,以及随后修饰的那些氨基酸,例如羟基脯氨酸、 γ -羧基谷氨酸和O-磷酸丝氨酸。视侧链中的取代基而定,氨基酸可为中性的、正性的或负性的。“中性氨基酸”是指含有未荷电侧链取代基的氨基酸。中性氨基酸的实例包括丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、甲硫氨酸、甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸和半胱氨酸。“正性氨基酸”是指其中

侧链取代基在生理pH下荷正电的氨基酸。正性氨基酸的实例包括赖氨酸、精氨酸和组氨酸。“负性氨基酸”是指其中侧链取代基在生理pH下携带净负电荷的氨基酸。负性氨基酸的实例包括天冬氨酸和谷氨酸。氨基酸类似物是指与天然存在的氨基酸具有相同基本化学结构，即结合于氢的 α 碳、羧基、氨基和R基团的化合物，例如高丝氨酸、正亮氨酸、甲硫氨酸亚砷、甲硫氨酸甲基砷。所述类似物具有修饰的R基团(例如正亮氨酸)或修饰的多肽骨架，但保留与天然存在的氨基酸相同的基本化学结构。氨基酸模拟物是指结构不同于氨基酸的一般性化学结构，但以与天然存在的氨基酸类似的方式起作用的化合物。氨基酸也意图包括在 α 碳处具有L或D立体化学的氨基酸。对氨基酸以及保守性氨基酸取代的更详细描述以下于题为“多肽”的章节中提供。

[0131] “非天然氨基酸”包括在氨基酸的定义中，并且是指不是20种常见天然存在的氨基酸或稀有天然存在的氨基酸(例如硒代半胱氨酸或吡咯赖氨酸)中的一个的氨基酸。可与术语“非天然氨基酸(non-natural amino acid)”同义使用的其它术语是“非天然编码的氨基酸”、“非天然氨基酸(unnatural amino acid)”、“非天然存在的氨基酸”及其以连字符号连接和非以连字符号连接的形式。术语“非天然氨基酸”包括但不限于通过修饰天然编码的氨基酸(包括但不限于20种常见氨基酸或吡咯赖氨酸和硒代半胱氨酸)而天然存在，但本身不通过翻译复合物并入增长的多肽链中的氨基酸。不天然编码的天然存在的氨基酸的实例包括但不限于N-乙酰葡萄糖胺基-L-丝氨酸、N-乙酰葡萄糖胺基-L-苏氨酸和O-磷酸酪氨酸。另外，术语“非天然氨基酸”包括但不限于不天然存在，并且可合成获得或可通过修饰非天然氨基酸获得的氨基酸。

[0132] 氨基酸在本文中可通过它们的通常已知三字母符号或通过由IUPAC-IUB生物化学命名委员会推荐的单字母符号来提及。同样地，核苷酸可通过它们的通常接受的单字母代码来提及。

[0133] 如本文所用的术语“脂族”包括饱和和不饱和、非芳族、直链(即未分支)、支链、无环和环状(即碳环)烃，其任选被一个或多个官能团取代。如将由本领域普通技术人员所了解，“脂族”在本文中意图包括但不限于烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基和环炔基部分。因此，如本文所用，术语“烷基”包括直链、支链和环状烷基。类似惯例适用于其它通用术语，如“烯基”、“炔基”等。此外，如本文所用，术语“烷基”、“烯基”、“炔基”等涵盖取代的基团与未取代的基团两者。在某些实施方案中，如本文所用，“脂族”用于指示那些具有1-20个碳原子的脂族基团(环状、无环、取代的、未取代的、支链或未分支的)。脂族基团取代基包括但不限于本文所述的导致形成稳定部分的任何取代基(例如脂族、烷基、烯基、炔基、杂脂族、杂环、芳基、杂芳基、酰基、氧代基、亚氨基、硫代基、氰基、异氰基、氨基、叠氮基、硝基、羟基、硫醇、卤代基、脂族氨基、杂脂族氨基、烷基氨基、杂烷基氨基、芳基氨基、杂芳基氨基、烷基芳基、芳基烷基、脂族氧基、杂脂族氧基、烷基氧基、杂烷基氧基、芳基氧基、杂芳基氧基、脂族硫氧基、杂脂族硫氧基、烷基硫氧基、杂烷基硫氧基、芳基硫氧基、杂芳基硫氧基、酰基氧基等，其各自可或可不被进一步取代)。

[0134] 术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”在本文中可互换用于指代氨基酸残基的聚合物。所述术语适用于其中一个或多个氨基酸残基是相应天然存在的氨基酸的人工化学模拟物的氨基酸聚合物以及天然存在的氨基酸聚合物和非天然存在的氨基酸聚合物。氨基酸聚合物可包含完全L-氨基酸、完全D-氨基酸、或L氨基酸和D氨基酸的混合物。在本申请中使用术语

“肽或肽模拟物”仅强调涵盖包含天然存在的氨基酸以及修饰的氨基酸的肽。

[0135] 如本文所用的“环钩化(stapling)“或”炔环钩化”将至少两个能够经受用以促进碳-碳键形成的反应的部分引入肽中,所述部分可与试剂接触以在所述至少两个部分之间产生至少一个交叉接头。环钩化提供对如 α 螺旋结构的二级结构的约束。可优化交叉接头的长度和几何形状以改进所需二级结构内含物的产率。提供的约束可例如防止二级结构展开和/或可强化二级结构的形状。被防止展开的二级结构例如是更稳定的。

[0136] “环钩化”肽是包含所选数目的标准或非标准氨基酸的肽,其进一步包含至少两个能够经受用以促进碳-碳键形成的反应的部分,所述部分已与试剂接触以在所述至少两个部分之间产生至少一个调节例如肽稳定性的交叉接头。

[0137] 术语“分离的”、“纯化的”或“生物纯”是指物质大致上或基本上不含通常伴随它的如在它的天然状态下所见的组分。通常使用分析化学技术,如聚丙烯酰胺凝胶电泳或高效液相色谱法来测定纯度和均质性。作为制剂中存在的主要物质的蛋白质是大致上纯化的。术语“纯化的”表示核酸或蛋白质在电泳凝胶中产生基本上一个条带。具体来说,这意味着核酸或蛋白质的纯度是至少85%,更优选是至少95%,并且最优选是至少99%。

[0138] 术语“同一”或“同一性”百分比在两个或更多个多肽序列(或两个或更多个核酸)的情形下是指当在比较窗或示范区域内比较和比对以达成最大对应时,两个或更多个序列或子序列在指定区域(如SEQ ID 1的24个氨基酸或SEQ ID NO:2的24个氨基酸)内是相同的,或具有指定百分比的相同氨基酸残基或核苷酸,例如60%同一性,优选65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性,如使用以下一种序列比较算法或通过手动比对和目视检查所测量。所述序列接着被称为“大致上同一”。这个定义也涉及测试序列的互补序列。

[0139] 对于序列比较,通常一个序列充当测试序列与其进行比较的参照序列。当使用序列比较算法时,将测试序列和参照序列输入计算机中,必要时指定子序列坐标,并且指定序列算法程序参数。可使用缺省程序参数,或可指定替代性参数。序列比较算法接着基于程序参数计算测试序列相对于参照序列的序列同一性百分比。对于核酸和蛋白质的序列比较,使用BLAST和BLAST 2.0算法以及缺省参数。

[0140] 术语“参照…编号”或“对应于”或“参照…确定”在对给定氨基酸编号的情形下使用时是指当将所述给定氨基酸序列与参照序列进行比较时,所述指定参照序列的残基的编号。因此,当在SEQ ID NO:1与变异蛋白质比对中,多肽中的残基与SEQ ID NO:1中的某一位置处的氨基酸比对时,所述残基“对应于”所述氨基酸。与参照序列比对的多肽无需与参照序列具有相同长度。

[0141] 术语“核酸”和“多核苷酸”在本文中可互换用于指代呈单链或双链形式的脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸及其聚合物。所述术语涵盖含有已知核苷酸类似物或修饰的骨架残基或键联的核酸,其是合成的、天然存在的和非天然存在的,其与参照核酸具有类似结合性质,并且其以与参照核苷酸类似的方式被代谢。所述类似物的实例包括不限于硫代磷酸酯、氨基磷酸酯、甲基磷酸酯、手性甲基磷酸酯、2-O-甲基核糖核苷酸、多肽-核酸(PNA)。除非另外指示,否则特定核酸序列也涵盖其“保守修饰的变体”(例如简并密码子取代)和互补序列以及明确指示的序列。具体来说,简并密码子取代可通过产生其中一个或多个所选(或所有)密码子的第三位置被混合碱基和/或脱氧肌苷残基取代的序列来达成(Batzer等,

Nucleic Acid Res.19:5081 (1991); Ohtsuka等, J.Biol.Chem., 260:2605-2608 (1985); Rossolini等, Mol.Cell.Probes, 8:91-98 (1994))。术语核酸可与基因、cDNA、mRNA、寡核苷酸和多核苷酸互换使用。

[0142] “表达载体”是重组或合成产生的具有一系列允许特定核酸在宿主细胞中转录的指定核酸元件的核酸构建体。表达载体可为质粒、病毒或核酸片段的一部分。通常,表达载体包括可操作地连接于启动子的待转录核酸。

[0143] 就“宿主细胞”来说,其是指含有表达载体,并且支持所述表达载体的复制或表达的细胞。宿主细胞可为原核细胞,如大肠杆菌(E.coli);或真核细胞,如酵母、昆虫、两栖动物或哺乳动物细胞,如CHO、HeLa等,例如培养的细胞、外植体和体内细胞。

[0144] “标记”或“可检测标记”是可通过分光、光化学、生物化学、免疫化学或化学手段检测的组合物。举例来说,适用标记包括放射性同位素(例如³H、³⁵S、³²P、⁵¹Cr或¹²⁵I)、荧光染料、电子密集试剂、酶(例如碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶或通常用于ELISA中的其它酶)、生物素、地高辛或可获得其抗血清或单克隆抗体的半抗原和蛋白质(例如由SEQ ID NO:1、2或3编码的多肽可例如通过将放射性标记并入所述多肽中而使其可检测,并且用于检测与所述多肽具有特异性反应性的抗体)。

[0145] 如本文所用,“改善”是指减轻、减小或降低症状的程度,或降低疾病表现形式的发作的发生次数。

[0146] 术语“预防”是本领域公知的,并且当关于病状,如疾病(如高胆固醇血症或动脉粥样硬化)的复发或发作使用时在本领域中是被充分理解的,且包括施用相对于未接受组合物的受试者,降低受试者的医学病状的症状的频率,或延迟所述症状的发作的所述组合物。

[0147] 如本文所用,“治疗”是指减缓、终止或逆转病症或疾病的进展。在一优选实施方案中,“治疗”是指使进展逆转达到消除病症或疾病的程度。

[0148] 如本文所用,“抑制”是指相较于将在对照样品中出现的量,使量降低。在一优选实施方案中,抑制是指使量降低至少50%或大于50%,或甚至更优选降低大于75%或甚至100%。

[0149] 待通过本文公开的方法治疗的“受试者”、“患者”或“哺乳动物”可指人或非人动物。

[0150] 多肽

[0151] 本发明提供一个家族的非天然存在的多肽,其使用强力逆向胆固醇转运(RCT)路径来介导胆固醇流出。本发明的多肽通常包括具有氨基酸序列SEQ ID NO:1的肽或SEQ ID NO:1的非天然存在的肽变体;或包括具有氨基酸序列SEQ ID NO:2的肽或SEQ ID NO:2的非天然存在的变体。SEQ ID NO:1的变体的氨基酸位置是参照SEQ ID NO:1确定。类似地,SEQ ID NO:2的变体的氨基酸位置是参照SEQ ID NO:2确定。本发明的肽以与载脂蛋白(例如Apo A-I、Apo E等)的摩尔效价类似的摩尔效价刺激ABCA1依赖性胆固醇流出。除是ABCA1依赖性胆固醇流出的强力和选择性介体之外,多肽在高剂量下施用具有少许毒性或不具有毒性。本发明的多肽也具有ABCA1稳定化活性、LDL降低活性、抗氧化活性以及抗炎活性,可改进葡萄糖代谢,可治疗阿尔茨海默氏病的症状,或具有这些活性的任何组合,并且优选具有所有这些活性。

[0152] 如本文所用,术语“少许毒性或无毒性”可与“少许细胞毒性或无细胞毒性”互换用

于指代在高药理学剂量下施用的本发明的肽的细胞毒性水平通常基本上等于仅使用不含有所述肽的对照(即媒介物,如PBS)获得的细胞毒性水平。可在体外或体内测定中测量毒性。举例来说,在其中在300mg/kg的剂量下腹膜内(IP)施用肽的大鼠、小鼠或兔模型中,高于PBS 50%或大于50%,并且在一些实施方案中,高于PBS 40%、30%或20%的应答被视为有毒。

[0153] 如本文所用,“高药理学剂量”是指高于治疗剂量,例如高至少2倍至10倍的量。举例来说,使用大鼠、兔或小鼠模型,高药理学剂量可在30mg/kg至300mg/kg的范围内,或多达500mg/kg。在一些实施方案中,大鼠、小鼠或兔模型中用以评估毒性的高治疗剂量是300mg/kg。

[0154] 关于两亲性 α 螺旋肽,疏水性氨基酸被集中在螺旋的一侧上,通常在另一侧上具有极性或亲水性氨基酸。这个排列常见于载脂蛋白和球状蛋白质的 α 螺旋中,其中螺旋的一个面朝向疏水性核心定向,并且一个面朝向水暴露表面定向。不同氨基酸序列形成 α 螺旋结构的倾向不同。甲硫氨酸、丙氨酸、亮氨酸、谷氨酸和赖氨酸都具有尤其高的螺旋形成倾向,而脯氨酸、甘氨酸、酪氨酸和丝氨酸具有相对不良的螺旋形成倾向。脯氨酸倾向于破坏或扭结螺旋,因为它不能贡献酰胺氢键(不具有酰胺氢),并且因为它的侧链会在空间上起干扰。它的环结构也使它的骨架二面角限于接近 -70° ,此较不常见于 α 螺旋中。技术人员了解尽管脯氨酸可存在于本文所述的序列中的某些位置处,但在序列内存在大于三个脯氨酸将预期会破坏螺旋结构。因此,本发明的多肽不具有大于三个脯氨酸,并且通常不具有存在于 α 螺旋形成序列中的各位置处的大于两个脯氨酸。通常,当脯氨酸存在于本发明的肽,例如SEQ ID NO:1的肽变体的核心螺旋结构的序列中时,它仅存在于核心螺旋序列的一个位置中。

[0155] 具有胆固醇流出活性的本发明的多肽包含是具有非极性表面和极性表面的两亲性 α 螺旋的氨基酸序列,其中所述极性表面在脂质-水界面处包含荷电和未荷电氨基酸残基。在一些实施方案中,本发明的肽包含氨基酸序列SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2或其变体,其中所述变体包含与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2具有至少50%,通常至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%或大于95%同一性的氨基酸序列。在典型实施方案中,变体在如参照SEQ ID NO:1编号的位置3、14或23中的至少一个处具有未荷电残基。在一个实施方案中,本发明的肽包含氨基酸序列SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2。

[0156] 在一些实施方案中,肽具有存在于脂质-水界面处,例如在如参照SEQ ID NO:1编号的3、14或23处的瓜氨酸或瓜氨酸的类似物。在一些实施方案中,变体在位置3和14、位置3和23、或位置14和23处具有瓜氨酸。

[0157] SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的变体通常仅具有有限数目的R氨基酸残基,通常至多两个R残基。举例来说,在一些实施方案中,变体可具有在位置5处的R和在位置23处的R。在一些实施方案中,变体可具有在位置3和14处的瓜氨酸以及在位置23处的R;或在位置3和23处的瓜氨酸以及在位置14处的R;或在位置14和23处的瓜氨酸以及作为位置3的R。在一些实施方案中,在指示位置处的R可被K残基取代。因此,在一些实施方案中,变体可具有在位置5处的K和在位置23处的R,或在位置5处的R和在位置23处的K,或在位置5与23两者处的K。在一些实施方案中,变体可具有在位置3和14处的瓜氨酸以及在位置23处的K;或在位置3和23处的瓜氨酸以及在位置14处的K;或在位置14和23处的瓜氨酸以及在位置3处的K。

[0158] 在一些实施方案中,变体在如参照SEQ ID NO:1确定的位置2、6、9、10、13、16、17、20、21、22和24中的至少一个、或至少两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个或十个处包含疏水性氨基酸,通常是脂族氨基酸。在一些实施方案中,SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的变体包含至多三个或至多两个、或至多一个芳族氨基酸。在一些实施方案中,变体在位置2、6、10、13、16、20、21和24中的各个处包含脂族残基。在一些实施方案中,脂族氨基酸是L、V、A或I。在一些实施方案中,本发明的肽在位置10、13、16和20中的各个处包含相同脂族氨基酸。在一些实施方案中,在位置10、13、16和20中的各个处的相同脂族氨基酸是支链脂族氨基酸。在一些实施方案中,在位置10、13、16和20中的各个处的相同脂族氨基酸选自L、I或V组成的组。在一些实施方案中,在位置10、13、16和20处的氨基酸残基是I。在一些实施方案中,在位置10、13、16和20处的氨基酸残基是L。在一些实施方案中,在位置2处的脂族氨基酸残基是V或L。在一些实施方案中,在位置2处的脂族氨基酸残基是V,并且在位置10、13、16和20处的脂族氨基酸残基是I或L。在一些实施方案中,在位置2处的脂族氨基酸是V,在位置6、21和24处的脂族氨基酸是L,并且在位置10、13、16和20处的脂族氨基酸残基是I或L。在一些实施方案中,变体在位置11和12处包含A。

[0159] 在一些实施方案中,本发明的肽进一步在如参照SEQ ID NO:1编号的位置25和26处包含氨基酸。在典型实施方案中,在位置25处的氨基酸残基是K或N,并且在位置26处的氨基酸残基是S、Y或P。在一些实施方案中,在位置25处的氨基酸是K,并且在位置26处的氨基酸是S。在一些实施方案中,肽包含氨基酸序列SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:4。

[0160] 将由本领域技术人员易于了解的是前述多肽并不完全包括本发明的多肽的家族。实际上,使用本文提供的教义,可通过例如保守性或半保守性取代(例如D被E替换)、延伸、缺失等来常规产生其它适合多肽(例如其它保守性变体)。此外,使用本文提供的测定,可常规筛选具有所需生物活性的其它适合多肽。

[0161] 非同一氨基酸残基可为天然或非天然存在的。术语“同一百分比”是指两个氨基酸序列之间(或也由本发明提供的两个核苷酸序列之间)的序列同一性。同一性可各自通过比较可出于比较目的比对的各序列中的位置来确定。当比较的序列中的等效位置由相同氨基酸或碱基占据时,那么分子在那个位置是同一的;当等效位点由相同或类似氨基酸残基(例如在立体和/或电子性质方面类似)占据时,那么分子可称为在那个位置是同源的(类似的)。表述为同源性(即类似性)或同一性百分比是指在由比较的序列共有的位置处类似或同一的氨基酸的数目的函数。可使用各种比对算法和/或程序,包括例如FASTA、BLAST和ENTREZ。FASTA和BLAST可作为GCG序列分析包(University of Wisconsin, Madison, Wis.)的一部分获得,并且可在例如缺省设置下使用。ENTREZ可通过National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine, National Institutes of Health, Bethesda, MD获得。在一个实施方案中,两个序列的同一性百分比可通过GCG程序,以空位权重1(例如各氨基酸空位被加权就好像它是两个序列之间的单一氨基酸错配一样)来确定。

[0162] 在可与上述实施方案重叠的另一示例性实施方案中,SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的变体被保守性(或半保守性)氨基酸残基取代。术语“保守性氨基酸取代”是指来自一个所述组的氨基酸被来自同一组的不同氨基酸取代(在概念上或在其它方面)。一种用以确定个别氨基酸之间的共同性质的实用方式在于分析同源生物体的相应蛋白质之间的标准化氨

基酸变化频率(参见例如Schulz,G.E.和R.H.Schirmer,Principles of Protein Structure,Springer-Verlag)。根据所述分析,可确定各组氨基酸,其中组内的氨基酸优先彼此交换,并且因此在它们对总体蛋白质结构的影响方面彼此大多类似(参见例如Schulz,G.E.和R.H.Schirmer,Principles of Protein Structure,Springer-Verlag)。以这个方式确定的一组氨基酸组的一个实例包括:(i) 荷电组,由Glu和Asp、Lys、Arg和His组成;(ii) 荷正电组,由Lys、Arg和His组成;(iii) 荷负电组,由Glu和Asp组成;(iv) 芳族组,由Phe、Tyr和Trp组成;(v) 氮环组,由His和Trp组成;(vi) 大脂族非极性组,由Val、Leu和Ile组成;(vii) 略微极性组,由Met和Cys组成;(viii) 小残基组,由Ser、Thr、Asp、Asn、Gly、Ala、Glu、Gln和Pro组成;(ix) 脂族组,由Val、Leu、Ile、Met和Cys组成;以及(x) 小羟基组,由Ser和Thr组成。在本发明的情形下,提及氨基酸的电荷是指在生理pH下的电荷。

[0163] 在也可与上述实施方案重叠的另一示例性实施方案中,“保守性氨基酸取代”可指氨基酸被在分子量方面类似或在疏水性方面类似的另一氨基酸取代。就“类似分子量”和“类似疏水性”来说,其是指数值在相应数值的25%,更优选20%、15%、10%或小于10%内。氨基酸分子量和疏水性的数据显示于表1中。疏水性分级显示于表2中;保守性取代包括使指定为“=”的氨基酸交换成另一氨基酸(例如Tyr=Trp),以及使一个氨基酸交换成按照如由大于和小于符号描绘的分级顺序邻近于它的另一氨基酸。

[0164] 表1:

未修饰的生理L- α -氨基酸的参数				
氨基酸	3字母代码	1字母代码	分子量 [†]	疏水性 [‡]
丙氨酸	Ala	A	89.09	0.616
半胱氨酸	Cys	C	121.16	0.680
天冬氨酸	Asp	D	133.10	0.028
谷氨酸	Glu	E	147.13	0.043
苯丙氨酸	Phe	F	165.19	1.00
甘氨酸	Gly	G	75.07	0.501
组氨酸	His	H	155.16	0.165
异亮氨酸	Ile	I	131.18	0.943
[0165] 赖氨酸	Lys	K	146.19	0.283
亮氨酸	Leu	L	131.18	0.943
甲硫氨酸	Met	M	149.21	0.738
天冬酰胺	Asn	N	132.12	0.236
脯氨酸	Pro	P	115.13	0.711
谷氨酰胺	Gln	Q	146.15	0.251
精氨酸	Arg	R	174.20	0.000
丝氨酸	Ser	S	105.09	0.359
苏氨酸	The	T	119.12	0.450
缬氨酸	Val	V	117.15	0.825
色氨酸	Trp	W	204.23	0.878
[0166] 酪氨酸	Tyr	Y	181.19	0.880

[0167] †给出的分子量是中性游离氨基酸的分子量；残基重量可通过减去1当量水(18g/mol)来获得。

[0168] ‡给出的疏水性是通过“小片段方法”由计算log(P)确定值获得的“换算”值(参见“Development of Hydrophobicity Parameters to Analyze Proteins Which Bear Post-or Cotranslational Modifications”Black,S.D.和Mould,D.R.,Anal.Biochem., 193:72-82(1991))。用于将原始log(P)值换算成给出的换算值的等式如下:换算参数=(原始参数+2.061)/4.484。

[0169] 表2:

[0170]

生理L- α -氨基酸的疏水性参数的趋势
Phe>Leu=Ile>Tyr=Trp>Val>Met>Pro>Cys>Ala>Gly>
Thr>Ser>Lys>Gln>Asn>His>Glu>Asp>Arg

[0171] 对两个多肽是彼此的保守性变体的另一指示是两个多肽执行相同功能,并且在优选实施方案中,在相同或极其类似活性水平下执行相同功能。因此,在一个实施方案中,本发明的多肽的保守性变体将包含的活性是具有SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的多肽中所见的活性的至少80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%;并且当在高剂量下施用时将也不展现毒性。此外,在一些实施方案中,本发明的多肽将具有大于一种活性。举例来说,本发明的多肽可包含胆固醇流出介导活性、ABCA稳定化活性、LDL降低活性、抗炎活性以及抗氧化活性、这些活性的任何组合,或理想地,所有这些活性。保守性变体可具有一种或多种所述活性,并且理想地,所有所述活性。本文所述的筛选测定可由本领域技术人员容易地用于确定两种或更多种多肽是否具有类似活性。此外,本领域技术人员将了解可用于确定两种或更多种多肽是否具有类似生物性质或活性的其它筛选测定。

[0172] 技术人员了解氨基酸残基可被添加至本发明的多肽的C末端和/或N末端而不影响所述多肽的活性。因此,包含如本文所述的 α 螺旋序列(例如SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2)的本发明的多肽包括长度超过24个氨基酸的实施方案,例如长度是25、26、28、30、32、35或40个氨基酸的肽。技术人员也了解本发明的多肽也可例如通过脯氨酸或其它接头残基连接于可刺激胆固醇流出的另一两亲性 α 螺旋肽以形成例如长度是50、60、70、80、90或100个氨基酸的双螺旋或多聚体多肽。因此,如本文所述的任何肽的序列都可具有氨基酸添加,或可被接合。举例来说,可通过脯氨酸残基使本发明的多肽(例如SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2或其如本文所述的变体)的一个分子接合于所述多肽的另一分子以提供长度是49个残基的多肽。所述多肽具有的胆固醇流出活性可超过天然全长载脂蛋白(例如Apo AI和Apo E)或载脂蛋白的胆固醇流出介导结构域的胆固醇流出活性。使用本文所述的方法,技术人员可容易地添加其它氨基酸至C末端和/或N末端,接着筛选具有所需活性的所得多肽。

[0173] 在一些实施方案中,可使本发明的肽接合于具有短暂半衰期的另一肽以提供当在类似摩尔剂量下向受试者施用,半衰期长于后述肽的双重肽。在一些实施方案中,可使本发明的肽接合于另一生理活性肽以提供双功能杂交肽。在一些实施方案中,可使本发明的肽接合于来自细胞蛋白质的另一生理活性肽,或生理活性肽可靶向细胞蛋白质,如受体。举例来说,在一些实施方案中,可使SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2或其如本文所述的变体接合于具有短暂半衰期的A和B利钠肽(ANP、BNP及其变体);比伐卢定(bivalirudin)(和其它凝血酶和Xa抑制剂);或葡萄糖调控肽(GLP-1、升糖素和它们的变体)。

[0174] 在另一实施方案中,提供本发明的多肽的肽模拟物。“肽模拟物”包括对氨基酸链的任何修饰形式,包括但不限于磷酸化、加帽、脂肪酸修饰,并且包括非天然骨架和/或侧链结构。将为本领域技术人员易于显而易见的是肽模拟物在氨基酸链与非肽小分子之间包含结构连续体。肽模拟物通常保留可识别的多肽样聚合物单元结构。因此,肽模拟物通常保留与天然多肽所结合的任何靶标分子的结合功能。适合肽模拟物的实例公开于美国专利申请

公布号2006/0069030中,所述公布的教义出于所有目的以引用的方式并入本文。其它肽模拟物及其制备方法将为本领域技术人员所知。

[0175] 本发明的肽模拟物属于两个种类中的一个:(i) 替代物;和(ii) 类似物。已开发多肽的酰胺键的众多替代物。常开发的酰胺键替代物包括但不限于以下群组:(i) 反式烯烃,(ii) 氟代烯,(iii) 亚甲基氨基,(iv) 膦酰胺,和(v) 磺酰胺。所述替代物的实例公开于美国专利申请公布号2006/0069030中。另外,可使用基于对多肽的骨架的更实质性修饰的肽模拟物。属于这个种类的肽模拟物包括(i) 逆反转类似物,和(ii) N-烷基甘氨酸类似物(所谓类肽)。此外,所述类似物的实例公开于美国专利申请公布号2006/0069030中。

[0176] 在本发明的一个实施方案中,肽或肽模拟物是逆反转类似物。可根据本领域中已知的方法,以与合成基于L-氨基酸的多肽类似的方式制备逆反转类似物。更具体来说,适于制备所述逆反转类似物的方法的实例描述于授予Sisto等的美国专利号4,522,752中。最终产物或其中间体可通过HPLC或为本领域技术人员所知的任何其它适合色谱方法纯化。

[0177] 在另一实施方案中,肽或肽模拟物是逆对映类似物。逆对映类似物可使用标准固体或溶液相多肽合成技术自可商购获得的D-氨基酸(或其类似物)合成。

[0178] 在另一实施方案中,肽模拟物是反式烯烃替代物肽或衍生物。所述反式烯烃肽可根据Shue等,Tetrahedron Lett.,28:3225(1987)的方法容易地合成。此外,也可使用本领域中已知的其它方法。应了解视用于合成反式烯烃衍生物的试剂的性质而定,Sjue等的程序或其它可用程序的变化可为必需的。

[0179] 也有可能通过以上方法使合成的假二肽偶联于其它假二肽以制备具有若干烯属官能基而非酰胺官能基的假肽。举例来说,可制备对应于某些二肽序列的假二肽,接着通过标准技术偶联在一起以产生多肽的在残基之间具有交替烯键的类似物。

[0180] 另一类肽模拟物衍生物包括磷酸酯衍生物。所述磷酸酯衍生物的合成可由已知合成流程改适(参见例如Loots等,“Peptides:Chemistry and Biology,”(Escom Science Publishers,Leiden,第118页,1988);Petrillo等,“Peptides:Structure and Function (Proceedings of the 9th American Peptide Symposium),”(Pierce Chemical Co.Rockland,Ill.,1985))。

[0181] 在其它实施方案中,可修饰本发明的多肽。修饰的一个实例是引入碳水化合物或脂质部分。所述修饰可改变多肽在各种介质中的溶解度以使它们可有利地被制备为适合药物组合物。修饰性脂质基团包括但不限于法尼基(farnesyl)和肉豆蔻酰基。修饰性碳水化合物基团包括但不限于任何天然存在和/或合成糖和糖醇(包括例如葡萄糖、半乳糖、鼠李糖、甘露糖、阿拉伯糖和其它糖以及它们的相应醇)的单糖或寡糖。

[0182] 在某些实施方案中,本发明的多肽可进一步包含与翻译后修饰类似的修饰。所述修饰包括但不限于乙酰化、羧化、糖基化、磷酸化、脂质化和酰化。因此,修饰的肽模拟物可含有非氨基酸元件,如聚乙二醇、脂质、多糖或单糖和磷酸酯。可使用本文公开的测定方法测试所述非氨基酸元件对肽模拟物的功能性的影响。

[0183] 在特定实施方案中,肽模拟物包括至少一个不是氨基至羧基方向上的酰胺键联的骨架键联(如相对于天然存在的多肽的逆反转多肽)或至少一个不是酰胺键联的骨架键联。

[0184] 如先前所述,在本发明情形下提及“氨基酸”涉及天然存在的氨基酸与非天然存在的氨基酸两者。因此,本发明的肽可包含一个或多个氨基酸类似物。氨基酸类似物的实例包

括但不限于以下：

[0185] 烷基、芳基、酰基、叠氮基、氰基、卤代基、肼、酰肼、羟基、烯基、炔基、醚、硫醇、磺酰基、磺基、硒基、酯、硫代酸、硼酸酯基 (borate)、硼酸酯基 (boronate)、磷酸基、膦酰基、杂环、烯酮、亚胺、醛、烷氧基胺、羟胺、酮基或氨基取代的氨基酸或其任何组合；糖基化或碳水化合物化合物修饰的氨基酸；含酮基氨基酸；糖取代的氨基酸，例如糖取代的丝氨酸等；碳连接的含糖氨基酸；糖取代的半胱氨酸；氧化还原活性氨基酸；含 α -羟基酸；含氨基硫代酸氨基酸； α, α 双取代的氨基酸； β -氨基酸；磺基酪氨酸、4-二羟硼基-苯丙氨酸、氨基氧基氨基酸、氨基氧基赖氨酸、氨基氧基鸟氨酸、氨基氧基酪氨酸或除脯氨酸以外的环状氨基酸。其它非天然氨基酸包括但不限于包含以下官能团中的任何一个或多个的非天然氨基酸：醛部分、酮基部分、 β -二酮基部分、烷氧基胺部分、酰肼部分、脱氢丙氨酸部分、硫酯部分、酯部分、硼酸酯部分、叠氮化物部分、炔基部分、烯基部分、邻位硫醇胺部分等。非天然氨基酸包括呈L-构型或D-构型的以与天然存在的氨基酸类似的方式起作用的N-取代的甘氨酸、N-甲基氨基酸、苯丙氨酸类似物、以及赖氨酸 (Lys)、鸟氨酸 (Orn) 和 α, γ -二氨基丁酸 (Dbu) 的衍生物。

[0186] 非天然氨基酸的其它实例包括但不限于氮杂环丁烷甲酸、2-氨基己二酸、3-氨基己二酸、 β -丙氨酸、氨基丙酸、2-氨基丁酸、4-氨基丁酸、6-氨基己酸、2-氨基庚酸、2-氨基异丁酸、3-氨基异丁酸、2-氨基庚二酸、叔丁基甘氨酸、2,4-二氨基异丁酸、锁链素、2,2'-二氨基庚二酸、2,3-二氨基丙酸、N-乙基甘氨酸、N-乙基天冬酰胺、高脯氨酸、羟基赖氨酸、别羟基赖氨酸、3-羟基脯氨酸、4-羟基脯氨酸、异锁链素、别异亮氨酸、N-甲基丙氨酸、N-甲基甘氨酸、N-甲基异亮氨酸、N-甲基戊基甘氨酸、N-甲基缬氨酸、萘基丙氨酸、正缬氨酸、鸟氨酸、戊基甘氨酸、哌啶甲酸、硫代脯氨酸、氨基苯丙氨酸、羟基酪氨酸和氨基酪氨酸。在一些其它实施方案中，非天然氨基酸可为1-氨基环戊烷-1-甲酸 (Acp)、1-氨基环丁烷-1-甲酸 (Ac b)、1-氨基环丙烷-1-甲酸 (Acp c)、高瓜氨酸 (HoCit)、 α -氨基己二酸 (Aad)、3-(4-吡啶基) 丙氨酸 (4-Pal)、3-(3-吡啶基) 丙氨酸 (3-Pal)、炔丙基甘氨酸 (Pra)、 α -氨基异丁酸 (Aib)、 α -氨基丁酸 (Abu)、正缬氨酸 (Nva)、 α, β -二氨基丙酸 (Dpr)、 α, γ -二氨基丁酸 (Dbu)、 α -叔丁基甘氨酸 (Bug)、3,5-二硝基酪氨酸 Tyr (3,5-di NO₂)、正亮氨酸 (Nle)、3-(2-萘基) 丙氨酸 (Nal-2)、3-(1-萘基) 丙氨酸 (Nal-1)、环己基丙氨酸 (Cha)、二-正丙基甘氨酸 (Dpg)、环丙基丙氨酸 (Cpa)、高亮氨酸 (Hle)、高丝氨酸 (HoSer)、高精氨酸 (Har)、高半胱氨酸 (Hcy)、甲硫氨酸亚砷 (Met (O))、甲硫氨酸甲基砷 (Met (S-Me))、 α -环己基甘氨酸 (Chg)、3-苯并-噻吩基丙氨酸 (Bta)、牛磺酸 (Tau)、羟基脯氨酸 (Hyp)、O-苯甲基-羟基脯氨酸 (Hyp (Bzl))、高脯氨酸 (HoPro)、 β -高脯氨酸 (BHoPro)、噻唑烷-4-甲酸 (Thz)、3-哌啶甲酸 (Nip)、4-哌啶甲酸 (IsoNip)、3-羧甲基-1-苯基-1,3,8-三氮杂螺[4,5]癸-4-酮 (Cptd)、四氢-异喹啉-3-甲酸 (3-Tic)、5H-噻唑并[3,2-a]吡啶-3-甲酸 (Btd)、3-氨基苯甲酸 (3-Abz)、3-(2-噻吩基) 丙氨酸 (2-Thi)、3-(3-噻吩基) 丙氨酸 (3-Thi)、 α -氨基辛二酸 (Asu)、二乙基甘氨酸 (Deg)、4-氨基-4-羧基-1,1-二氧化-四氢噻喃 (Ac dt)、1-氨基-1-(4-羟基环己基) 甲酸 (Ahch)、1-氨基-1-(4-酮基环己基) 甲酸 (Akch)、4-氨基-4-羧基四氢吡喃 (Actp)、3-硝基酪氨酸 (Tyr (3-NO₂))、1-氨基-1-环己烷甲酸 (Ach)、1-氨基-1-(3-哌啶基) 甲酸 (3-Apc)、1-氨基-1-(4-哌啶基) 甲酸 (4-Apc)、2-氨基-3-(4-哌啶基) 丙酸 (4-App)、2-氨基茛满-2-甲酸 (Aic)、2-氨基-2-萘基乙酸 (Ana)、(2S,5R)-5-苯基吡咯烷-2-甲酸 (Ppca)、4-噻唑基丙氨酸 (Tha)、2-氨基辛酸 (Aoa)、2-氨基庚酸 (Aha)、鸟氨酸 (Orn)、氮杂环丁烷-2-甲酸 (Aca)、 α -氨基-3-氯-4,

5-二氢-5-异唑乙酸 (Acidi)、噻唑烷-2-甲酸 (Thz (2-COOH))、烯丙基甘氨酸 (Ag1)、4-氰基-2-氨基丁酸 (Cab)、2-吡啶基丙氨酸 (2-Pa1)、2-喹啉基丙氨酸 (2-Qa1)、环丁基丙氨酸 (Cba)、苯丙氨酸类似物、赖氨酸衍生物、鸟氨酸 (Orn) 衍生物、 α , γ -二氨基丁酸 Dbu 衍生物、其立体异构体及其组合 (参见 Liu 和 Lam, Anal. Biochem., 295:9-16 (2001))。因此, 非天然 α -氨基酸以非天然 L- α -氨基酸、非天然 D- α -氨基酸或其组合形式存在。其它适合氨基酸类似物包括但不限于 β -氨基酸和 γ -氨基酸。适于 β -氨基酸或 γ -氨基酸的 R 基团包括但不限于存在于天然存在的氨基酸和非天然氨基酸中的侧链。N-甲基氨基酸包括 N-甲基-Ala、N-甲基-Cys、N-甲基-Asp、N-甲基-Glu、N-甲基-Phe、N-甲基-Gly、N-甲基-His、N-甲基-Ile、N-甲基-Arg、N-甲基-Lys、N-甲基-Leu、N-甲基-Met、N-甲基-Asn、N-甲基-Gln、N-甲基-Ser、N-甲基-Thr、N-甲基-Val、N-甲基-Trp、N-甲基-Tyr、N-甲基-Acp、N-甲基-Acb、N-甲基-Acpc、N-甲基-Cit、N-甲基-HoCit、N-甲基-Aad、N-甲基-4-Pa1、N-甲基-3-Pa1、N-甲基-Pra、N-甲基-Aib、N-甲基-Abu、N-甲基-Nva、N-甲基-Dpr、N-甲基-Dbu、N-甲基-Nle、N-甲基-Nal-2、N-甲基-Nal-1、N-甲基-Cha、N-甲基-Cpa、N-甲基-Hle、N-甲基-HoSer、N-甲基-Har、N-甲基-Hcy、N-甲基-Chg、N-甲基-Bta、N-甲基-2-Thi、N-甲基-3-Thi、N-甲基-Asu、N-甲基-Acdt、N-甲基-Ahch、N-甲基-Akch、N-甲基-Actp、N-甲基-Tyr (3-NO₂)、N-甲基-Ach、N-甲基-3-Apc、N-甲基-4-Apc、N-甲基-4-App、N-甲基-Tha、N-甲基-Aoa、N-甲基-Aha、N-甲基-Orn、N-甲基-Aca、N-甲基-Ag1、N-甲基-Cab、N-甲基-2-Pa1、N-甲基-Cba、N-甲基-HoPhe、N-甲基-Phg、N-甲基-Phe (4-NH₂)、N-甲基-4-Phe (4-Me)、N-甲基-Phe (4-F)、N-甲基-Phe (4-Cl)、N-甲基-Phe (2-Br)、N-甲基-Phe (3-Br)、N-甲基-Phe (4-Br)、N-甲基-Phe (3-CF₃)、N-甲基-Phe (4-CF₃)、N-甲基-Phe (4-NO₂)、N-甲基-Phe (4-CN)、N-甲基-Bpa、N-甲基-Phg (4-Cl)、N-甲基-Phg (4-Br)、N-甲基-Tyr (Me)、N-甲基-Lys38、N-甲基-Lys27、N-甲基-Lys73、N-甲基-Lys55、N-甲基-Lys28、N-甲基-Lys72、N-甲基-Lys12、N-甲基-Lys123、N-甲基-Lys63、N-甲基-Lys124、N-甲基-Lys82、N-甲基-Lys31、N-甲基-Lys15、N-甲基-Lys125、N-甲基-Lys43、N-甲基-Lys24、N-甲基-Lys5、N-甲基-Lys4、N-甲基-Lys50、N-甲基-Lys81、N-甲基-Orn38、N-甲基-Orn27、N-甲基-Orn73、N-甲基-Orn55、N-甲基-Orn28、N-甲基-Orn72、N-甲基-Orn12、N-甲基-Orn123、N-甲基-Orn63、N-甲基-Orn124、N-甲基-Orn82、N-甲基-Orn31、N-甲基-Orn15、N-甲基-Orn125、N-甲基-Orn43、N-甲基-Orn24、N-甲基-Orn5、N-甲基-Orn4、N-甲基-Orn50、N-甲基-Orn81、N-甲基-Dbu38、N-甲基-Dbu27、N-甲基-Dbu73、N-甲基-Dbu55、N-甲基-Dbu28、N-甲基-Dbu72、N-甲基-Dbu12、N-甲基-Dbu123、N-甲基-Dbu63、N-甲基-Dbu124、N-甲基-Dbu82、N-甲基-Dbu31、N-甲基-Dbu15、N-甲基-Dbu125、N-甲基-Dbu43、N-甲基-Dbu24、N-甲基-Dbu5、N-甲基-Dbu4、N-甲基-Dbu50、N-甲基-Dbu81、其立体异构体及其组合。

[0187] 赖氨酸 (Lys)、鸟氨酸 (Orn) 和 α , γ -二氨基丁酸 (Dbu) 的类似物包括但不限于 Lys38、Lys27、Lys73、Lys55、Lys28、Lys72、Lys12、Lys123、Lys63、Lys124、Lys82、Lys31、Lys15、Lys125、Lys43、Lys24、Lys5、Lys4、Lys50、Lys81、Orn38、Orn27、Orn73、Orn55、Orn28、Orn72、Orn12、Orn123、Orn63、Orn124、Orn82、Orn31、Orn15、Orn125、Orn43、Orn24、Orn5、Orn4、Orn50、Orn81、Dbu38、Dbu27、Dbu73、Dbu55、Dbu28、Dbu72、Dbu12、Dbu123、Dbu63、Dbu124、Dbu82、Dbu31、Dbu15、Dbu125、Dbu43、Dbu24、Dbu5、Dbu4、Dbu50、Dbu81、其立体异构体及其组合。Orn 和 Dbu 的衍生物类似于赖氨酸衍生物, 其中相应羧酸分别连接于 Orn 和 Dbu 的侧链。亮氨酸、缬氨酸、异亮氨酸、甘氨酸、丙氨酸、甲硫氨酸的疏水性氨基酸类似物包括正缬氨酸

(Nva)、1-氨基环丙烷-1-甲酸(Acpc)、1-氨基环丁烷-1-甲酸(Acb)、 α -环己基甘氨酸(Chg)、 α -氨基异丁酸(Aib)、 α -氨基丁酸(Abu)、3-(2-噻吩基)丙氨酸(2-Thi)、3-(3-噻吩基)丙氨酸(3-Thi)、3-(3-吡啶基)丙氨酸(3-Pal)、3-(2-萘基)丙氨酸(Nal-2)、2-氨基-2-萘基乙酸(Ana)、3,5-二硝基酪氨酸(Tyr(3,5-di NO₂))、二乙基甘氨酸(Deg)、4-氨基-4-羧基-1,1-二氧化-四氢噻喃(Acdt)、1-氨基-1-(4-羟基环己基)甲酸(Ahch)、1-氨基-1-(4-酮基环己基)甲酸(Akch)、4-氨基-4-羧基四氢吡喃(Actp)、3-硝基酪氨酸(Tyr(3-NO₂))、1-氨基-1-环己烷甲酸(Ach)、2-氨基茚满-2-甲酸(Aic)、(2S,5R)-5-苯基吡咯烷-2-甲酸(Ppca)、4-噻唑基丙氨酸(Tha)、2-氨基辛酸(Aoa)、2-氨基庚酸(Aha)及其立体异构体。优选地,脯氨酸类似物是羟基脯氨酸。

[0188] 荷负电氨基酸的类似物包括 α -氨基己二酸、 α -氨基辛二酸、高天冬氨酸、 γ -羧基-谷氨酸、4-羧基苯丙氨酸及其立体异构体。在其它实施方案中,荷负电氨基酸选自Aad、Bec和Bmc。

[0189] 保护基

[0190] 本发明的多肽以及肽模拟物(包括例如逆反转肽模拟物)可被修饰以使组成氨基酸和/或末端氨基酸上的R基团被封阻,即由保护基保护。已发现封阻,特别是封阻氨基和/或羧基末端,会极大改进口服递送,并且显著增加血清半衰期。如本文所用,“保护基”是指保护潜在反应性官能团免遭非所需化学转化的暂时取代基。所述保护基的实例通常包括羧酸的酯、醇的硅烷基醚、以及醛和酮的分别缩醛和缩酮。已综述保护基化学领域(Greene, T.W.; Wuts, P.G.M. *Protective Groups in Organic Synthesis*, 第2版; Wiley: New York, 1991)。

[0191] 广大数目的保护基适于这个目的。所述基团包括但不限于乙酰基、CH₃-(CH₂)_n-CO-、酰胺、Fmoc、叔丁氧基羰基(t-BOC)、9-芴乙酰基、1-芴羧基、9-芴羧基、9-芴酮-1-羧基、苯甲氧基羰基、咕吨基(Xan)、三苯甲基(Trt)、4-甲基三苯甲基(Mtt)、4-甲氧基三苯甲基(Mmt)、4-甲氧基-2,3,6-三甲基-苯磺酰基(Mtr)、均三甲苯-2-磺酰基(Mts)、4,4-二甲氧基二苯甲基(Mbh)、甲苯磺酰基(Tos)、2,2,5,7,8-五甲基色满-6-磺酰基(Pmc)、4-甲基苯甲基(MeBzl)、4-甲氧基苯甲基(MeOBzl)、苯甲氧基(BzlO)、苯甲基(Bzl)、苯甲酰基(Bz)、3-硝基-2-吡啶亚磺酰基(Npys)、1-(4,4-二甲基-2,6-二氧化亚环己基)乙基(Dde)、2,6-二氯苯甲基(2,6-DiCl-Bzl)、2-氯苯甲氧基羰基(2-Cl-Z)、2-溴苯甲氧基羰基(2-Br-Z)、苯甲氧基甲基(Bom)、环己基氧基(cHxO)、叔丁氧基甲基(Bom)、叔丁氧基(tBuO)、叔丁基(tBu)和三氟乙酰基(TFA)。变量“n”是整数0至12,通常是0至6,如0至4。其它适合保护基公开于美国专利号6,933,279中,所述专利的教义以引用的方式并入本文。

[0192] 在一个实施方案中,优选保护基包括但不限于乙酰基、酰胺和烷基基团,其中乙酰基和烷基特别优选用于N末端保护,而酰胺基团特别优选用于羧基末端保护。在一个优选实施方案中,乙酰基用于保护氨基末端,而酰胺基团用于保护羧基末端。在这个实施方案中,可在合成期间当多肽在使用乙酸酐的树脂上时达成乙酰化。可通过选择适用于合成的树脂来达成酰胺保护。举例来说,可使用rink酰胺树脂。在合成完成之后,酸性双官能氨基酸(如Asp和Glu)和碱性氨基酸(如Lys)上的半永久性保护基以及Tyr的羟基全都同时被移除。使用酸处理自所述树脂释放的多肽显现出N末端被保护为乙酰基,以及C末端被保护为NH₂,同时移除所有其它保护基。

[0193] 在一特别优选实施方案中,本发明的多肽包含一个或多个如本文所述的D-氨基酸。在某些实施方案中,每个氨基酸(例如每个对映异构氨基酸)都是D-氨基酸。已发现包含完全D-氨基酸的多肽如同L-氨基酸多肽一样以高能力和高亲和力刺激胆固醇流出。仅通过在化学合成中使用D型衍生氨基酸残基就在多肽中的一个或多个位置处容易地并入D-氨基酸。用于固相多肽合成的D型残基可自许多供应商(参见例如Advanced Chem Tech, Louisville, KY; Nova Biochem, San Diego, CA; Sigma, St Louis, MO; Bachem California Inc., Torrance, CA等)商购获得。D型氨基酸可根据需要并入在多肽中的任何位置处。因此,举例来说,在一个实施方案中,多肽可包含单一D-氨基酸,而在其它实施方案中,多肽包含至少两个,通常至少三个,更通常至少四个,最通常至少五个,优选至少六个,更优选至少七个,并且最优选至少八个D氨基酸。在一个实施方案中,基本上每隔一个(对映异构)氨基酸是D型氨基酸。在某些实施方案中,至少80%,优选至少90%,更优选至少95%的对映异构氨基酸是D型氨基酸。在一个特别优选实施方案中,基本上每个对映异构氨基酸都是D型氨基酸。

[0194] 尽管在优选实施方案中,本发明的多肽利用天然存在的氨基酸或D型天然存在的氨基酸,但非天然存在的氨基酸取代物(例如甲硫氨酸亚砷、甲硫氨酸甲基砷、正亮氨酸、 ϵ -氨基己酸、4-氨基丁酸、四氢异喹啉-3-甲酸、8-氨基辛酸、4-氨基丁酸、Lys(N(ϵ))-三氟乙酰基)、 α -氨基异丁酸等)可用于本发明的多肽中。如同其它氨基酸取代一样,通常用非天然存在的氨基酸进行取代以使在取代后,它们保留它们所取代的残基的空间和离子或非离子特性。

[0195] 在一些实施方案中,瓜氨酸被瓜氨酸类似物氨基酸替换。所述类似物和它们的制备为本领域技术人员所知。举例来说, Sonke, 等, Stereoselective Biocatalysis (2000), 第23-58页以及Greene: Protective Groups in Organic Synthesis (Wiley, New York 1999)。瓜氨酸氨基酸类似物的实例可见于美国专利号7,888,133中。

[0196] 在一些实施方案中,在肽中的位置处采用非天然存在的氨基酸,其中非天然存在的氨基酸具有长(例如C₅₋₈)碳烯基或烷基侧链。

[0197] 在一些实施方案中,SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的变体可包含化学环钩。举例来说,在肽序列的(i)和(i+7)位置处引入含有具有不同长度的烯属侧链的 α -甲基化氨基酸,接着通过烯炔复分解来环化。如本文所用,(i)是指参照氨基酸残基,并且术语(i+x)是指离(i)氨基酸有x个残基的氨基酸。通过使得肽对降解具有更大抗性以及使得它们能够被细胞摄取,炔环钩克服肽治疗剂的一些典型缺点。环钩化肽保留它们的天然形状,对降解具有抗性,并且可进入细胞并在细胞中施加它们的预定功能。环钩化肽在本领域中是已知的。(参见例如Verdine和Helinski Methods Enzymol. 2012;503:3-3; Schafineister等J Am Chem Soc 122:5891-92 (2000))。也参见美国专利公布号US2005/0250680,其以引用的方式整体并入本文。在本发明中,应了解当化学环钩据称存在于特定残基处,例如SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2或其变体的位置3、14或23处时,在肽中例如在离所述位置有4或7个残基的位置处存在也是环钩化残基的相应残基以使形成环钩键联。

[0198] 在另一实施方案中,本发明提供一种降低具有胆固醇流出活性的肽的毒性的方法,所述多肽包含形成具有非极性和极性表面的两亲性 α 螺旋的氨基酸序列;其中所述极性表面在脂质-水界面处具有荷正电氨基酸以使极性表面包含荷正电和未荷电氨基酸。用未

荷电氨基酸替换阳离子残基会产生a) 在高药理学剂量下无毒, 并且b) 高效刺激细胞胆固醇流出的多肽。在典型实施方案中, 所述方法包括在脂质-水界面处利用瓜氨酸和/或它的类似物而非阳离子残基。在一些实施方案中, 如ATI-5261的肽可被修饰来在位置3、14和23中的至少一个, 通常两个处用未荷电氨基酸替换在脂质水界面处的阳离子残基。以引用的方式并入本文的WO 2008/115303另外描述ATI-5261的变体, 其可根据本发明来修饰, 即例如在位置3、14和23中的至少一个, 通常两个处用未荷电氨基酸替换在脂质水界面处的阳离子残基。

[0199] 肽的制备

[0200] 可使用已知技术制备本发明的多肽。举例来说, 可使用本领域中熟知的方法化学合成肽, 所述方法包括例如固相合成(参见例如Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85:2149-2154 (1963) 以及Abelson等, Methods in Enzymology, 第289卷: Solid-Phase Peptide Synthesis (第1版1997))。可进行多肽合成以产生全长肽。或者, 可分别化学合成多肽的各种片段, 接着使用化学方法组合以产生全长多肽。

[0201] 也可重组表达本文所述的多肽, 尤其当多肽不包含“D”氨基酸残基时。这个实施方案依赖于重组遗传学领域中的常规技术。通常, 本文所述的重组DNA技术中的命名和实验室程序是本领域中熟知并通常采用的那些。标准技术用于克隆、核酸分离、扩增和纯化。许多提供进行重组DNA操作的指导的手册是可用的, 例如Sambrook和Russell, Molecular Cloning, A Laboratory Manual (第3版, 2001); 以及Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel, 等, John Wiley and Sons, New York, 2009, 直至2013的补编)。技术人员可使用已知技术产生编码本发明的多肽的核酸, 并且获得高水平表达。

[0202] 为获得核酸序列, 如编码本发明的多肽的核酸序列的高水平表达, 通常将编码本发明的多肽序列的核酸序列亚克隆至表达载体中, 随后将所述表达载体转染至适于表达的宿主细胞中。包括启动子、编码可选择标记的序列等的表达载体组分在本领域中是熟知的。用于将遗传信息转运至细胞中的特定表达载体并不是特别关键的。可使用用于在真核或原核细胞中表达的任何常规载体。

[0203] 鉴定具有所需活性的多肽方法

[0204] 可使用为本领域技术人员所熟知的方法容易地评估本发明的多肽或肽模拟物介导胆固醇流出和/或使ABCA (例如ABCA1) 稳定的能力。可另外评估肽的毒性。

[0205] 许多不同筛选方案可用于鉴定介导胆固醇流出和/或使ABCA (例如ABCA1) 稳定的本发明的多肽或肽模拟物。在一个实施方案中, 筛选方法涉及筛选多种测试多肽以鉴定在例如哺乳动物细胞 (包括人细胞) 中介导胆固醇流出和/或使ABCA (例如ABCA1) 稳定的那些多肽。

[0206] 除针对它们介导胆固醇流出和/或使ABCA稳定的能力进行筛选之外, 也可针对其它活性 (例如抗氧化活性和抗炎活性) 筛选候选测试多肽。许多不同筛选方案可用于鉴定具有抗氧化活性和/或抗炎活性的本发明的多肽或肽模拟物。

[0207] 将为本领域技术人员易于显而易见的是除本文公开的筛选测定之外, 众多其它筛选测定也可用于筛选具有所需生物活性的本发明的多肽或肽模拟物。

[0208] 活性测定-胆固醇流出活性

[0209] 适合胆固醇流出测定描述于例如Bieliński, J. K和Oda, M. N., Biochemistry, 41:

2089-2096 (2002); Jia等, Biochem. Biophys. Res. Commun., 297:206-213 (2002) 中。在一些实施方案中, 已知介导胆固醇流出的多肽 (例如ApoA-I的螺旋9/10) 用于在基于细胞的测定中筛选其它胆固醇流出介体。举例来说, 其中胆固醇流出可使用上调ABCA1蛋白表达的cAMP类似物来增强的细胞系 (例如J774巨噬细胞) 可适宜地用于评估本发明的多肽介导胆固醇流出的能力。使细胞与标记的胆固醇 (例如 $[^3\text{H}]$ 胆固醇) 一起在适于由细胞摄取胆固醇的条件下孵育。因此, 在引发细胞胆固醇流出之前, 即在使细胞与测试多肽接触之前, 使cAMP或cAMP类似物 (例如CPT-cAMP) 与细胞一起孵育适合时间。出现在培养基中的标记的胆固醇的测量结果用于确定测试多肽的胆固醇流出介导活性。

[0210] 活性测定-ABCA稳定化活性

[0211] 本领域中已知的多个测定可用于测量本发明的多肽的ABCA稳定化活性。举例来说, 结合测定可用于测试测试多肽结合ABCA (例如ABCA1) 的能力。已发现具有ABCA稳定化活性的多肽也可能是胆固醇流出介体。因此, 在一优选实施方案中, 本发明的多肽或肽模拟物能够介导胆固醇流出以及使ABCA稳定。在一个筛选实施方案中, 结合测定可为竞争性测定。其它测定包括例如在与测试多肽接触之后直接测量ABCA (例如ABCA蛋白或核酸)。

[0212] 结合测定

[0213] 结合测定通常涉及使ABCA与一种或多种测试多肽接触, 以及允许ABCA和测试多肽有足够时间来形成结合复合物。可使用许多建立的分析技术中的任一个检测形成的任何结合复合物。蛋白结合测定包括但不限于免疫组织化学结合测定、流式细胞术或其它测定。在一些实施方案中, 竞争测定用于确定测试多肽是否具有ABCA稳定化活性。竞争测定在本领域中是熟知的。通常, 标记竞争化合物 (即已知结合ABCA的化合物) 以使可测量在结合ABCA方面的差异 (例如在存在递增量的可结合ABCA的本发明的测试多肽下)。用于测定中的特定标记或可检测基团并不是本发明的关键方面, 只要它不显著干扰测试化合物结合ABCA即可。如本文所述, 可检测基团 (或替代地, 可检测部分或标记) 可为具有可检测物理或化学性质的任何物质。已充分开发免疫测定领域中的所述可检测标记, 并且一般来说, 适用于所述方法中的差不多任何标记都可应用于本发明。因此, 标记是可通过分光、光化学、生物化学、免疫化学、电学、光学或化学手段检测的任何组合物。适用于本发明中的标记包括但不限于磁性珠粒 (例如DYNABEADSTM)、荧光染料 (例如异硫氰酸荧光素、得克萨斯红 (Texas red)、若丹明 (rhodamine) 等)、放射性标记 (例如 ^3H 、 ^{125}I 、 ^{35}S 、 ^{14}C 或 ^{32}P)、酶 (例如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶和通常用于ELISA中的其它酶)、以及比色标记, 如胶体金或有色玻璃或塑料珠粒 (例如聚苯乙烯、聚丙烯、乳胶等)。

[0214] 在一些实施方案中, ABCA表达性和非表达性细胞用于通过测量测试多肽和竞争化合物 (例如全长ApoA-I A或Apo A-I 9/10多肽) 对ABCA的相对ABCA结合亲和力来测量测试多肽的ABCA (例如ABCA1) 稳定化活性。在一些实施方案中, 将全长Apo A-IA对ABCA的结合亲和力与本发明的标记的多肽的结合亲和力进行比较, 如例如Remaley等, J. Lipid Res., 44: 828-836 (2003) 中所述。在存在和不存在竞争化合物下孵育表达ABCA的细胞, 接着使其暴露于一定浓度范围的个别标记的测试多肽 (例如本发明的放射性标记的多肽)。通常, 测试多肽的浓度将在约 $0.1\mu\text{g/ml}$ 至约 $200\mu\text{g/ml}$ 、约 $0.5\mu\text{g/ml}$ 至约 $100\mu\text{g/ml}$ 、约 $1\mu\text{g/ml}$ 至约 $40\mu\text{g/ml}$ 、或约 $5\mu\text{g/ml}$ 至约 $20\mu\text{g/ml}$ 的范围内。

[0215] 直接测量ABCA

[0216] 在一些实施方案中,通过使用基于细胞的测定直接测量ABCA (例如ABCA蛋白或核酸) 来测量ABCA稳定化。可以其中表达ABCA的任何细胞 (例如J774巨噬细胞) 进行基于细胞的测定,包括已用ABCA转染的细胞 (例如HeLa细胞)。可使用任何细胞类型。举例来说,J774巨噬细胞可用于评估在存在和不存在本发明的多肽下的相对ABCA1蛋白水平。首先使细胞与将诱导ABCA的化合物 (例如cAMP或cAMP类似物,如8-溴-cAMP) 接触以上调ABCA (例如ABCA1) 表达,接着在不存在cAMP刺激物下在存在和不存在本发明的多肽下使细胞暴露于各种水平的合成ABCA1蛋白以评估ABCA1蛋白被稳定或降解。可使用本领域中已知的任何手段评估ABCA1蛋白的相对水平,所述手段例如细胞膜的免疫印迹分析 (Oram等,J.Biol.Chem., 278:52379-52385 (2003)) 或核酸探针杂交于ABCA mRNA。

[0217] 毒性测定

[0218] 可使用已知测定评估本发明的肽或肽模拟物的毒性。所述测定的实例说明于实施例章节中。通常测定在大鼠、兔、小鼠、猴或狗模型中的毒性。在一说明性测定,如实施例1中所述的测定中,使用兔或大鼠模型在3、30和300mg/kg的剂量下静脉内施用肽,并且也施用单独媒介物,在48小时间隔下总计注射4次。可接着测定血液中的包括血浆丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、天冬氨酸氨基转移酶 (AST) 和肌酸激酶 (CK) 的各组安全性化学调查对象。血液中的这些酶的水平相较于对照正常值存在升高指示具有毒性。当在这个说明性测定中使用最高剂量300mg/kg的结果等于 (落在标准偏差内) 对接受单独媒介物的对照动物测量的值,或至多是用单独媒介物获得的本底的2或3倍时,本发明的肽通常被视为无毒或具有少许毒性。在一些实施方案中,进行毒性测定,其中将本发明的肽的毒性与ATI-5261的毒性进行比较。当在300mg/kg的剂量下向小鼠、大鼠或兔施用肽时,例如在注射之后4小时,不具有毒性或具有少许毒性的本发明的肽通常展现的毒性是用ATI-5261观察到的毒性的小于50%,优选小于20%,或更优选小于10%。例如猴的其它动物模型也可用于评估毒性。

[0219] 抗氧化活性

[0220] 可使用本领域中已知的方法评估本发明的肽或肽模拟物的抗氧化活性。举例来说,美国专利公布号2003/0087819描述可用于测定多肽的抗氧化活性的多个测定,包括例如胶束底物测定。包含磷脂的胶束底物 (例如1-棕榈酰基-2-亚油酰基磷脂酰胆碱) 用于测量由特定酶 (例如大豆脂肪加氧酶和/或黄嘌呤/黄嘌呤氧化酶) 催化的脂质过氧化速率。在向磷脂胶束添加本发明的重组多肽之后,酶引发脂质过氧化。通过紫外吸收光谱法 (234nm) 在25℃下监测共轭二烯 (脂质过氧化的产物) 的增加。使用共轭二烯的摩尔吸光系数 ($\epsilon = 29,500 \text{ Lcm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$) 计算磷脂氢过氧化物的质量。脂肪加氧酶介导的脂质过氧化的初始速率由氧化曲线的线性部分的斜率计算,并且结果可表示为每分钟形成的磷脂过氧化物的纳摩尔数。基于在不存在多肽下获得的最大脂质过氧化物累积水平 (即与氧化曲线相关的平稳状态),有可能推导关于本发明的多肽的效价的定量信息 (例如导致针对脂质过氧化的50%保护的多肽浓度)。其它方法涉及针对多肽防止ApoB脂蛋白氧化成LDL、VLDL和Lp (A) 的能力进行筛选。

[0221] 用于针对抗氧化活性进行筛选的其它测定公开于PCT公布号W0 02/15923中,所述公布的教义以引用的方式并入本文。

[0222] 抗炎活性

[0223] 可使用本领域中已知的任何手段评估本发明的多肽或肽模拟物的抗炎活性。举例

来说,用以评估对炎症性事件敏感的酶(例如卵磷脂:胆固醇乙酰基转移酶(LCAT)或对氧磷脂酶(PON))的活性的测定可用于评估本发明的多肽的抗炎活性。适合测定描述于例如以下中:Chen等,J.Lipid Res.,23:680-691(1982),其描述使用外源性蛋白脂质体底物定量LCAT活性;以及Forte等,J.Lipid Res.,43:477-485(2002),其描述定量PON活性。其它筛选可包括在各种刺激(例如粘着分子、TNF- α 、LPS或其组合)之后监测多肽抑制靶标细胞的mRNA表达和/或蛋白质产生的能力。

[0224] 进一步测试

[0225] 可进一步测试最初鉴定为介导胆固醇流出或与ABCA相互作用的多肽以验证它们介导胆固醇流出和/或使ABCA稳定的能力。所述方法的基本形式涉及向充当模型的动物施用在初始筛选期间鉴定的先导化合物。验证研究中利用的动物模型通常是任何种类的哺乳动物。适合动物的特定实例包括但不限于灵长类动物(例如黑猩猩、猴等)和啮齿动物(例如小鼠、大鼠、豚鼠、兔等)。在一优选实施方案中,使用Apo E-/-小鼠、Apo A-II-/-小鼠或Apo C-III-/-小鼠。其它动物模型描述于例如Marschang等,Sem.Cell Dev.Biol.,14:25-35(2003)中。

[0226] 可另外使用实施例章节(例如实施例31)中说明的方法筛选能够降低葡萄糖的肽。举例来说,可使用如小鼠或大鼠的动物模型评估降低葡萄糖的能力。喂以正常实验室普通饮食(chow diet)的小鼠(例如C57B1/6小鼠)用经受评估的肽例如在300mg/kg的剂量下腹膜内注射,并且在注射之后的某一时期,例如6小时测量血液中的葡萄糖水平,并且与接受PBS的对照动物中的血糖水平进行比较。或者,可如实施例36中所说明,筛选能够降低葡萄糖的肽。举例来说,将300mg/kg肽腹膜内注射至禁食动物中,并且此后3小时,通过注射2g/kg葡萄糖来进行葡萄糖耐受性测试,在所述测试期间持续120分钟追踪葡萄糖浓度。具有葡萄糖降低活性的肽相对于对照显示统计显著降低的葡萄糖。通常,相对于对照,肽使葡萄糖降低至少5%,常常至少10%或大于10%。也可评估肽在肥胖症动物模型(例如DIO小鼠)中的葡萄糖降低活性。此外,可评估肽改进对胰岛素的敏感性的能力,例如如实施例章节的实施例31中所述。

[0227] 另外,可使用已知方法(如实施例章节中说明的那些)筛选能够治疗阿尔茨海默氏病的症状,包括对apoE4和apoE3等位基因相关的阿尔茨海默氏病具有一般性或选择性作用的肽。所述测定的一实例提供于实施例40中。在这个实例中,测定表达人apoE3或apoE4的人apoE3或apoE4替换小鼠的脑中的P- τ 蛋白和/或淀粉状蛋白 β 42的水平。相对于对照,能够治疗阿尔茨海默氏病的症状的肽显示统计显著降低的P- τ 蛋白和/或淀粉状蛋白 β 42水平。

[0228] 可使用任何形式筛选具有活性的肽。举例来说,高通量筛选(HTS)方法可用于鉴定介导胆固醇流出和/或使ABCA稳定的本发明的多肽或肽模拟物。HTS方法涉及提供含有许多潜在治疗性化合物(即介导胆固醇流出或使ABCA稳定的多肽或肽模拟物)的组合多肽文库。接着如本文所述在一种或多种测定中筛选所述文库以鉴定显示所需特征活性的那些文库成员(即特定多肽或肽模拟物)。由此鉴定的化合物可充当常规“先导化合物”或可本身用作潜在或实际治疗剂。

[0229] 药物动力学和细胞靶向

[0230] 肽结合HDL,并且呈现在大鼠中估计是8小时(参见实施例章节、图36和52A中的大鼠PK实例),并且在人中估计是3-5天的长久HDL半衰期,由此允许以长久间隔进行施用。肽

在结合于其它肽、小分子或部分(货物分子)时可以类似方式增加这些分子的半衰期。肽在血浆中的HDL结合性质以及ABCA1细胞结合造成肽和它的货物的可用于诊断和治疗目的(包括但不限于心脏衰竭、血管疾病、糖尿病、癌症和神经疾病)的独特PK、组织和细胞分布性质。

[0231] 使用方法

[0232] 本发明的非天然存在的多肽使用强力逆向胆固醇转运(RCT)路径来介导胆固醇流出。除是ABCA1依赖性胆固醇流出的强力和选择性介体之外,本发明的多肽也具有ABCA1稳定化活性、抗糖尿病活性、抗氧化活性以及抗炎活性、这些活性的任何组合,并且优选具有所有这些活性。

[0233] 鉴于它们的生物活性以及具体来说它们介导胆固醇流出的能力,本发明的多肽(或其肽模拟物)可用于治疗哺乳动物的胆固醇水平升高,或防治性治疗处于显现胆固醇水平升高的风险下的哺乳动物。此外,多肽或肽模拟物也可用于改进哺乳动物的脂质参数。“脂质参数”改进包括例如以下中的一个或多个:脂蛋白粘着于血管的倾向降低、动脉粥样硬化性斑块的量降低(尽管血浆LDL和/或HDL浓度可能未显著变化)、HDL或LDL粒子的氧化潜力降低、动脉粥样硬化消退(例如如通过颈动脉血管造影术或超声所测量)以及心脏事件减少。因此,本发明的多肽或肽模拟物可用于治疗或预防(即防治性治疗)与血脂异常、高胆固醇血症和炎症相关的疾病和病状、糖尿病、或可通过改变脂质参数治疗的疾病和病状,如本文公开的那些疾病和病状。在一些实施方案中,肽可用于治疗患有如本文所述的疾病的并发症的患者。因此,在一些实施方案中,患者患有大血管或微血管疾病、慢性肾病或充血性心脏衰竭。

[0234] 除本文明确公开的疾病和病状之外,本领域技术人员将了解可使用本发明的多肽或肽模拟物治疗或预防的与血脂异常、高胆固醇血症和炎症相关的其它疾病和病状。

[0235] 治疗或预防动脉粥样硬化的症状

[0236] 在一个实施方案中,本发明提供用于治疗、改善和/或预防动脉粥样硬化的一种或多种症状的方法。所述方法优选涉及向生物体(优选哺乳动物,并且更优选人)施用一种或多种本发明的多肽(或所述多肽的肽模拟物)。可根据许多标准方法中的任一个,如本文所述来施用多肽,所述标准方法包括但不限于注射、栓剂、经鼻喷雾剂、定时释放植入物、经皮贴片、经口服等。在一个特别优选实施方案中,多肽是经口服(例如以糖浆、胶囊、片剂等形式)施用。

[0237] 本发明方法不限于治疗具有动脉粥样硬化的一种或多种症状(例如高血压、血管狭窄、斑块形成和破裂、心脏病发作、绞痛或中风、血浆胆固醇的水平较高、低密度脂蛋白的水平较高、极低密度脂蛋白的水平较高或炎症性蛋白质等)的人或非人动物,而是也极其适用于防治情形下。因此,本发明的多肽(或其肽模拟物)可向生物体(如人或非人动物)施用以预防动脉粥样硬化的一种或多种症状的发作,即显现。适于防治性治疗的候选受试者包括例如具有动脉粥样硬化的一个或多个风险因素(例如家族史、与动脉粥样硬化相关联的遗传标记、高血压、肥胖症、酒精消耗较高、抽烟、血液胆固醇较高、血液甘油三酯较高、血液LDL、VLDL、IDL升高或HDL较低、糖尿病、或糖尿病家族史、血液脂质较高、心脏病发作、绞痛或中风等)的那些受试者。

[0238] 治疗可补充或消除对侵袭性程序和血管手术的需要,从而使得抗动脉粥样硬化治

疗具有系统性和可持续性。因此,肽可在干预之前给与以在手术之前优化循环,在手术期间给与以在血管结构或它的附近中达成区域性施用,或在手术后给与以减轻由手术干预所致的机械性创伤引起的炎症和动脉粥样硬化。

[0239] 治疗或预防与急性炎症性应答相关的动脉粥样硬化的症状

[0240] 本发明的动脉粥样硬化抑制性多肽也适用于许多其它情形下。具体来说,已发现心血管并发症(例如动脉粥样硬化、中风等)常伴随或跟随急性期炎症性应答的发作。所述急性期炎症性应答常与复发性炎症性疾病(例如麻风、结核、全身性红斑狼疮、类风湿性关节炎等)、病毒性感染(例如流感、HIV等)、细菌性感染、真菌性感染、器官移植、伤口或其它创伤、植入假肢、生物薄膜等相关。

[0241] 鉴于它们的抗氧化活性,本文所述的多肽可用于降低或防止在急性期炎症性应答期间或之后形成氧化磷脂,由此缓和或消除与所述病状相关的心血管并发症。炎症性应答也可具有更慢性性质,如在酒精性和非酒精性肝病、慢性肾病和充血性心脏衰竭中。

[0242] 治疗或预防涉及异常葡萄糖代谢的病症

[0243] 在另一方面,本发明提供一种改变具有异常葡萄糖代谢的哺乳动物的方法。在某一实施方案中,哺乳动物患有II型糖尿病。在一些实施方案中,哺乳动物患有I型糖尿病。在某一实施方案中,哺乳动物患有糖尿病前期或代谢综合征。在一些实施方案中,哺乳动物是人。在一些实施方案中,哺乳动物是具有超过100mg/dL的空腹血糖水平的人。在一些实施方案中,哺乳动物患有糖尿病的并发症,如大血管或微血管疾病、肾病或充血性心脏衰竭。

[0244] 在一些实施方案中,向哺乳动物施用包含以下序列的肽: $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}X_{12}X_{13}X_{14}X_{15}X_{16}X_{17}X_{18}X_{19}X_{20}X_{21}X_{22}X_{23}X_{24}$, 其中 X_1 、 X_7 、 X_8 、 X_{15} 、 X_{18} 和 X_{19} 是酸性氨基酸; X_4 是极性氨基酸; X_5 是荷正电氨基酸; X_2 、 X_6 、 X_9 、 X_{11} 、 X_{12} 、 X_{17} 、 X_{21} 、 X_{22} 和 X_{24} 是疏水性氨基酸; X_{10} 、 X_{13} 、 X_{16} 和 X_{20} 是相同脂族氨基酸残基,例如相同支链脂族氨基酸残基;并且 X_3 、 X_{14} 和 X_{23} 是未荷电氨基酸。在一些实施方案中,位置 X_3 、 X_{14} 和 X_{23} 中的至少两个是瓜氨酸,并且第三位置是R或K。在一些实施方案中, X_4 是极性未荷电氨基酸;并且 X_2 、 X_6 、 X_{11} 、 X_{12} 、 X_{17} 、 X_{21} 、 X_{22} 和 X_{24} 中的两个或更多个是脂族氨基酸。在一些实施方案中, X_2 、 X_6 、 X_{11} 、 X_{12} 、 X_{17} 、 X_{21} 、 X_{22} 和 X_{24} 都是脂族氨基酸。在一些实施方案中, X_9 是W。在一些实施方案中, X_{10} 、 X_{13} 、 X_{16} 和 X_{20} 是I。在一些实施方案中, X_{10} 、 X_{13} 、 X_{16} 和 X_{20} 是L。在一些实施方案中, X_1 、 X_7 、 X_8 、 X_{15} 、 X_{18} 和 X_{19} 独立地选自D和E; X_{10} 、 X_{13} 、 X_{16} 和 X_{20} 是I或 X_{10} 、 X_{13} 、 X_{16} 和 X_{20} 是L; X_{11} 和 X_{22} 是脂族氨基酸, X_4 是S、T、G或Y; X_9 是W, X_5 是R或K;并且 X_3 、 X_{14} 和 X_{23} 选自以下: X_3 和 X_{14} 是瓜氨酸,并且 X_{23} 是R或K;瓜氨酸在位置3和23处,并且R或K在位置14处;以及瓜氨酸在位置14和23处,并且R或K在位置3处。

[0245] 治疗或预防阿尔茨海默氏病或轻度认知损害

[0246] 在另一方面,本发明提供一种治疗患有阿尔茨海默氏病或轻度认知损害、额颞叶性痴呆;或血管性痴呆的人患者的方法。

[0247] 如本文所用,“阿尔茨海默氏病”是指如使用本领域中通常接受的准则诊断的老年性痴呆,所述准则如由国立神经和交际病症与中风研究所(The National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke)和阿尔茨海默氏病与相关病症联合会(Alzheimer's disease and Related Disorders Association)阐述的准则和/或如由美国精神病学联合会(American Psychiatric Association)出版的精神病症的诊断和统计手册(DSM-IV-TR)中所列的准则。也称为DSM-IV-TR的精神病症的诊断和统计手册

(第4版, 2000年修订) 概述一组用于诊断阿尔茨海默氏病的详细准则。

[0248] 在一些实施方案中, 患者可患有可使用神经学测试和其它临床终点鉴定的轻度至中度痴呆或早期阶段阿尔茨海默氏病。举例来说, 可使用小型精神状态检查 (MMSE) 鉴定患有轻度至中度痴呆, 例如阿尔茨海默氏病的受试者。通常, 计分16至26 (包括两者) 指示轻度至中度阿尔茨海默氏病。也可基于临床参数鉴定患有晚期阿尔茨海默氏病的患者。患有这个形式的阿尔茨海默氏病的受试者可不再对用乙酰胆碱酯酶抑制剂进行的疗法应答, 并且可具有显著降低的乙酰胆碱水平。

[0249] 在一些实施方案中, 用本发明的肽治疗的患者可患有轻度认知损害。所述患者处于显现阿尔茨海默氏病的风险下。轻度认知损害可使用心理学或精神病学在领域中熟知和接受的许多客观测试或准则中的任一个来诊断和评估。

[0250] “额颞叶性痴呆”是一种主要涉及额叶和/或颞叶的特征在于渐进性神经元损失的神经变性疾病。所述病症由Kirk Wilhelmsen和同事于1994年首次鉴定, 他们基于它不显现有淀粉状蛋白斑块、神经纤维缠结或路易体 (Lewy body) 而将它与阿尔茨海默氏病和路易体痴呆区分。术语“额颞叶性变性”或“FTLD”用于描述导致额颞叶性痴呆综合征的特定病理性疾病。这些疾病是根据它们对额叶和颞叶脑结构的影响来联合。亚型确定是基于见于神经元包涵体内的特定蛋白质。大多数变性亚型是FTLD- τ 蛋白, 其包括都显示含 τ 蛋白包涵体的皮克氏病 (Pick's disease)、CBD和PSP; 或FTLD-TDP, 其包括其中可见含TDP-43包涵体的若干亚型。

[0251] 在一些实施方案中, 向患有阿尔茨海默氏病、额颞叶性痴呆或血管性痴呆; 或处于患有阿尔茨海默氏病的风险下的患者, 例如患有轻度认知损害的患者施用包含以下序列的肽: $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}X_{12}X_{13}X_{14}X_{15}X_{16}X_{17}X_{18}X_{19}X_{20}X_{21}X_{22}X_{23}X_{24}$, 其中 X_1 、 X_7 、 X_8 、 X_{15} 、 X_{18} 和 X_{19} 是酸性氨基酸; X_4 是极性氨基酸; X_5 是荷正电氨基酸; X_2 、 X_6 、 X_9 、 X_{11} 、 X_{12} 、 X_{17} 、 X_{21} 、 X_{22} 和 X_{24} 是疏水性氨基酸; X_{10} 、 X_{13} 、 X_{16} 和 X_{20} 是相同脂族氨基酸残基, 例如相同支链脂族氨基酸残基; 并且 X_3 、 X_{14} 和 X_{23} 是未荷电氨基酸。在一些实施方案中, 位置 X_3 、 X_{14} 和 X_{23} 中的至少两个是瓜氨酸, 并且第三位置是R或K。在一些实施方案中, X_4 是极性未荷电氨基酸; 并且 X_2 、 X_6 、 X_{11} 、 X_{12} 、 X_{17} 、 X_{21} 、 X_{22} 和 X_{24} 中的两个或更多个是脂族氨基酸。在一些实施方案中, X_2 、 X_6 、 X_{11} 、 X_{12} 、 X_{17} 、 X_{21} 、 X_{22} 和 X_{24} 都是脂族氨基酸。在一些实施方案中, X_9 是W。在一些实施方案中, X_{10} 、 X_{13} 、 X_{16} 和 X_{20} 是I。在一些实施方案中, X_{10} 、 X_{13} 、 X_{16} 和 X_{20} 是L。在一些实施方案中, X_1 、 X_7 、 X_8 、 X_{15} 、 X_{18} 和 X_{19} 独立地选自D和3; X_{10} 、 X_{13} 、 X_{16} 和 X_{20} 是I或 X_{10} 、 X_{13} 、 X_{16} 和 X_{20} 是L; X_{11} 和 X_{22} 是脂族氨基酸, X_4 是S、T、G或Y; X_9 是W, X_5 是R或K; 并且 X_3 、 X_{14} 和 X_{23} 选自以下: X_3 和 X_{14} 是瓜氨酸, 并且 X_{23} 是R或K; 瓜氨酸在位置3和23处, 并且R或K在位置14处; 以及瓜氨酸在位置14和23处, 并且R或K在位置3处。

[0252] 其它治疗用途

[0253] 在一些实施方案中, 本发明的肽可用于递送治疗剂。因此, 举例来说, 在一些实施方案中, 可使肽连接于如毒素或放射性标记的试剂以治疗癌症。可治疗任何类型的癌症。

[0254] 在其它实施方案中, 本发明的多肽用于降低或防止形成氧化磷脂。在所述方法中, 可向人或非人动物施用本发明的多肽以降低或防止形成氧化磷脂, 由此抑制或预防如风湿性多肌痛、多发性结节性动脉炎、硬皮病、特发性肺纤维化、慢性阻塞性肺病、AIDS、冠脉钙化、钙化主动脉瓣狭窄、骨质疏松等的疾病的症状。

[0255] 通常, 所有以上方法都涉及施用本发明的单一多肽, 或替代地, 施用本发明的两种

或更多种不同多肽。可单独或与其它治疗剂(如本文公开的那些)组合施用所述多肽。多肽可以单体形式或以二聚、寡聚或聚合形式提供。在某些实施方案中,多聚形式可包含缔合的单体(例如离子连接或疏水性连接);然而,在其它实施方案中,其它多聚形式包含共价连接的单体(直接连接或通过接头)。

[0256] 此外,尽管所有前述方法都是关于人在本文中加以描述,但将为技术人员易于显而易见的是所述方法也适用于其它动物,即适用于兽医医学使用。因此,优选生物体包括但不限于人、非人灵长类动物、犬科动物、马科动物、猫科动物、猪科动物、有蹄类动物、兔形目动物等。

[0257] 脆弱斑块的稳定化

[0258] 在一些实施方案中,本发明的多肽可例如通过逆向胆固醇转运降低斑块脂质含量来使倾向于破裂,从而潜在导致血栓性动脉阻塞的脆弱斑块稳定。因此,在另一实施方案中,本发明提供用于通过向哺乳动物(并且更优选是人)施用一种或多种本发明的多肽(或所述多肽的肽模拟物)来使所述哺乳动物的血管中的脆弱斑块稳定的方法。“脆弱”斑块通常定义为具有缺乏适当胶原蛋白和平滑肌细胞支持的减薄纤维帽的富含脂质的斑块。可使用已知方法将优选是人的哺乳动物诊断为具有一个或多个脆弱斑块,所述方法包括温度检测策略、标记策略、成像策略(例如利用磁共振、超声、红外、荧光、可见光、无线电波、x射线等的装置)、用于区别脆弱斑块与周围健康血管组织的一般性策略等(参见例如美国专利号6,245,026、6,475,159、6,475,210和7,118,567)。在另一实施方案中,优选是人的哺乳动物处于具有一个或多个脆弱斑块的风险下。在这个实施方案中,已显现临床症状和/或已发生临床事件,所述临床症状和/或所述临床事件导致本领域技术人员相信哺乳动物处于具有一个或多个脆弱斑块的风险下。

[0259] 组合疗法

[0260] 在一些实施方案中,与一种或多种用于治疗或预防与血脂异常、高胆固醇血症和炎症相关的疾病和病症,如心血管疾病(包括动脉粥样硬化)的其它治疗剂组合施用本发明的多肽或肽模拟物。举例来说,在一个实施方案中,连同用于动脉粥样硬化的标准治疗中的任一个一起施用本发明的多肽,所述治疗包括例如他汀类药物(例如阿托伐他汀、洛伐他汀、普伐他汀、辛伐他汀、氟伐他汀或罗苏伐他汀);Nieman-Pick C1样1固醇转运体通道抑制剂(例如依折麦布);胆汁酸结合剂(例如消胆胺或考来替泊);血小板凝集抑制剂(例如阿司匹林、噻氯匹定或氯吡格雷);烟酸/烟碱酰胺;PPAR活化剂;维生素E;手术干预(例如血管成形术、支架、支架或动脉内膜切除术);以及生活方式变化(例如低脂肪饮食、减轻重量和锻炼)。

[0261] 更具体来说,本发明的多肽或肽模拟物可与以下中的一个或多个组合成单独单位或固定组合来使用:结合非所要炎症性分子或细胞因子(如白介素-6、白介素-8、粒细胞巨噬细胞群落刺激因子和肿瘤坏死因子- α)的抗体;酶抑制剂,如蛋白酶抑制剂抑蛋白酶肽(aprotinin)或环加氧酶抑制剂;抗生素,如阿莫西林(amoxicillin)、利福平(rifampicin)、红霉素(erythromycin);抗病毒剂,如阿昔洛韦(acyclovir);类固醇抗炎剂,如糖皮质激素;非类固醇抗炎剂,如阿司匹林、布洛芬(ibuprofen)或乙酰胺酚(acetaminophen);或非炎症性细胞因子,如白介素-4或白介素-10。其它细胞因子和生长因子,如干扰素- β 、肿瘤坏死因子、抗血管生成因子、红血球生成素、血小板生成素、白介素、成

熟因子、趋化性蛋白质以及它们的保留类似生理活性的变体和衍生物,也可用作其它治疗剂。

[0262] 本发明的多肽或肽模拟物可与通常用于治疗例如糖尿病患者的脂质病症的药物组合使用。所述药物包括但不限于HMG-CoA还原酶抑制剂、烟酸、依折麦布、胆汁酸螯合剂、纤维酸衍生物、MTP抑制剂、ACAT抑制剂和CETP抑制剂。HMG-CoA还原酶抑制剂的实例包括洛伐他汀、普伐他汀、辛伐他汀、罗苏伐他汀、氟伐他汀和阿托伐他汀。胆汁酸螯合剂的实例包括消胆胺、考来替泊和考来维仑。纤维酸衍生物的实例包括吉非罗齐(gemfibrozil)和非诺贝特(fenofibrate)。

[0263] 本发明的多肽或肽模拟物也可与抗高血压药物,例如像利尿剂、 β -阻断剂、组织蛋白酶S抑制剂、甲基多巴(methyldopa)、 α 2-肾上腺素能激动剂、胍那决尔(guanadrel)、利血平(reserpine)、 β -肾上腺素能受体拮抗剂、 α 1-肾上腺素能受体拮抗剂、肼苯哒嗪(hydralazine)、米诺地尔(minoxidil)、钙通道拮抗剂、ACE抑制剂和血管紧张素II受体拮抗剂组合使用。 β -阻断剂的实例包括醋丁洛尔(acebutolol)、比索洛尔(bisoprolol)、艾司洛尔(esmolol)、普萘洛尔(propanolol)、阿替洛尔(atenolol)、拉贝洛尔(labetalol)、卡维洛尔(carvedilol)和美托洛尔(metoprolol)。ACE抑制剂的实例包括卡托普利(captopril)、依那普利(enalapril)、赖诺普利(lisinopril)、贝那普利(benazepril)、福辛普利(fosinopril)、雷米普利(ramipril)、喹那普利(quinapril)、培哚普利(perindopril)、群多普利(trandolapril)和莫西普利(moexipril)。

[0264] 本发明的多肽或肽模拟物也可与心血管药物,如钙通道拮抗剂、 β -肾上腺素能受体拮抗剂和激动剂、醛固酮拮抗剂、ACE抑制剂、血管紧张素II受体拮抗剂、硝基血管舒张剂和强心苷组合使用。本发明的多肽或肽模拟物也可与抗炎药物,如H1受体拮抗剂、H2受体介导的激动剂和拮抗剂、COX-2抑制剂、NSAID、水杨酸盐、乙酰胺酚、丙酸衍生物、烯醇酸、二芳基取代的呋喃酮、环加氧酶抑制剂、以及舒缓激肽激动剂和拮抗剂组合使用。

[0265] 适于与本发明的多肽或肽模拟物组合使用的其它治疗剂公开于2005年6月30日公布的美国专利申请公布号2005/0142180中,所述公布的教义以引用的方式并入本文。

[0266] 多肽(或其肽模拟物)和其它治疗剂可同时或依序施用。举例来说,可首先施用多肽,随后施用其它治疗剂。或者,可首先施用其它治疗剂,随后施用本发明的多肽。在一些情况下,以同一制剂形式施用本发明的多肽和其它治疗剂。在其它情况下,以不同制剂形式施用多肽和其它治疗剂。当以不同制剂形式施用多肽和其它治疗剂时,它们的施用可为同时的或依序的。

[0267] 药物制剂

[0268] 为执行本发明方法,向被诊断为患有与血脂异常、高胆固醇血症和炎症相关的疾病或病症或处于患有所述疾病或病症的风险下的个体(例如向被诊断为具有动脉粥样硬化的一种或多种症状或处于动脉粥样硬化的风险下的个体);或患有与异常葡萄糖代谢相关的疾病或处于患有所述疾病的风险下的个体;或向患有阿尔茨海默氏病或处于患有阿尔茨海默氏病的风险下的个体施用一种或多种本发明的多肽或其肽模拟物。多肽或其肽模拟物可以它们的“天然”形式,或必要时以例如盐、酯、酰胺、前药、衍生物等形式施用,条件是盐、酯、酰胺、前药或衍生物在本发明方法中是药理学上适合的,即有效的。

[0269] 在本文所述的方法的一个实施方案中,施用途径可为口服、腹膜内、经皮、皮下、通

过静脉内或肌肉内注射、通过吸入、表面、病变内、输注；脂质体介导的递送；表面、鞘内、龈袋、经直肠、支气管内、经鼻、经粘膜、经肠、经眼或经耳递送、或如本领域技术人员可易于感知的本领域中已知的任何其它方法。本发明的组合物的其它实施方案并有针对性针对各种施用途径（包括胃肠外、经肺、经鼻和口服）的颗粒形式、保护性包衣、蛋白酶抑制剂或渗透增强剂。视施用方法/模式而定，药物组合物可以多种单位剂型施用。适合单位剂型包括但不限于粉剂、片剂、丸剂、胶囊、糖锭、栓剂、贴片、鼻用喷雾剂、可注射剂、可植入持续释放制剂等。

[0270] 因此，在另一方面，本发明提供包含药学上有效量的本发明的多肽或肽模拟物以及可接受的载体和/或赋形剂的药物组合物。药学上可接受的载体包括在生理上可相容，并且优选不干扰或另外抑制多肽或肽模拟物的活性的任何溶剂、分散介质或包衣剂。优选地，载体适于静脉内、肌肉内、口服、腹膜内、经皮、表面或皮下施用。药学上可接受的载体可含有一种或多种例如起使组合物稳定或增加或降低活性剂的吸收的作用的生理可接受的化合物。生理可接受的化合物可包括例如碳水化合物（如葡萄糖、蔗糖或葡聚糖）、抗氧化剂（如抗坏血酸或谷胱甘肽）、螯合剂、低分子量蛋白质、降低活性剂的清除或水解的组合物、或赋形剂或其它稳定剂和/或缓冲剂。

[0271] 其它生理可接受的化合物包括但不限于湿润剂、乳化剂、分散剂或特别适用于防止微生物生长或作用的防腐剂。各种防腐剂是熟知的，并且包括例如苯酚和抗坏血酸。本领域技术人员将了解对药学上可接受的载体（包括生理可接受的化合物）的选择例如取决于多肽或肽模拟物的施用途径以及多肽或肽模拟物的特定物理化学特征。

[0272] 在一优选实施方案中，药学上可接受的载体是生理盐水。其它药学上可接受的载体和它们的制剂是熟知的，并且一般地描述于例如Remington's Pharmaceutical Science（第18版，Gennaro编，Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1990）中。各种药学上可接受的赋形剂在本领域中是熟知的，并且可见于例如Handbook of Pharmaceutical Excipients（第4版，Rowe等编，Pharmaceutical Press, Washington, D.C.）中。此外，药物组合物可被配制溶液、微乳液、脂质体、胶囊、片剂或其它适合形式。可以某一材料包覆活性组分以保护它在达到靶标作用部位之前免遭由环境失活。

[0273] 在某些实施方案中，可根据为本领域技术人员所熟知的标准方法经口服（例如通过片剂）或以可注射剂形式施用本发明的多肽或肽模拟物。在其它优选实施方案中，也可使用常规经皮药物递送系统，即经皮“贴片”来通过皮肤递送多肽或肽模拟物，其中多肽或肽模拟物通常含于充当待固定于皮肤的药物递送装置的层状结构内。在所述结构中，药物组合物通常含于下伏于上部背衬层的层或“储库”中。应了解术语“储库”在这个情形下是指最终可用于向皮肤表面递送的一定量的“活性成分”。因此，举例来说，“储库”可在贴片的背衬层上的粘着剂中，或在为本领域技术人员所知的多种不同基质制剂中的任一种中包括活性成分。贴片可含有单一储库，或它可含有多个储库。

[0274] 在一个实施方案中，储库包含用于在药物递送期间使系统固定于皮肤的药学上可接受的接触粘着材料的聚合基质。适合皮肤接触粘着材料的实例包括但不限于聚乙烯、聚硅氧烷、聚异丁烯、聚丙烯酸酯、聚氨基甲酸酯等。或者，含药物储库和皮肤接触粘着剂以单独和不同层形式存在，其中粘着剂下伏于储库，所述储库在这个情况下可为如上所述的聚合基质，或它可为液体或水凝胶储库，或可采用某一其它形式。在这些分层中充当装置的上表面的背衬层优选充当“贴片”的主要结构元件，并且向装置提供它的大部分柔韧性。选择

用于背衬层的材料优选大致上不可为活性剂和存在的任何其它材料所渗透。

[0275] 用于表面药物递送的其它制剂包括但不限于软膏剂和乳膏剂。软膏剂是通常基于矿脂或其它石油衍生物的半固体制剂。含有所选活性剂的乳膏剂通常是粘性液体或半固体乳液,常为水包油型或油包水型。乳膏基质通常是可水洗的,并且含有油相、乳化剂和水相。油相,有时也称为“内部”相,通常包含矿脂和脂肪醇,如十六醇或硬脂醇;尽管未必,但水相通常在体积方面超过油相,并且通常含有保湿剂。乳膏制剂中的乳化剂通常是非离子、阴离子、阳离子或两性表面活性剂。如将由本领域技术人员了解的待使用的特定软膏或乳膏基质是将提供最优药物递送的基质。如同其它载体或媒介物一样,软膏基质应为惰性、稳定、无刺激性和非致敏性的。

[0276] 在一些实施方案中,植入装置(例如动脉和静脉内支架(包括溶出支架)和导管)用于递送包含本发明的多肽和肽模拟物的制剂。举例来说,通过支架和导管直接施用包含本发明的多肽和肽模拟物的水溶液。在一些实施方案中,支架和导管可用包含本文所述的多肽和肽模拟物的制剂涂布。在一些实施方案中,多肽和肽模拟物将呈定时释放制剂形式,并且自支架溶出。适合支架描述于例如美国专利号6,827,735;6,827,735;6,827,732;6,824,561;6,821,549;6,821,296;6,821,291;6,818,247;6,818,016;6,818,014;6,818,013;6,814,749;6,811,566;6,805,709;6,805,707;6,805,705;6,805,704;6,802,859;6,802,857;6,802,856;和49 6,802,849中。适合导管描述于例如美国专利号6,829,497;6,827,798;6,827,730;6,827,703;6,824,554;6,824,553;6,824,551;6,824,532;和6,819,951中。

[0277] 本发明的包含L型或D型氨基酸的多肽可在不针对由胃酸进行的蛋白水解等加以保护的情况下施用。然而,在某些实施方案中,可通过使用如本领域中所知的保护性赋形剂来增强多肽递送(参见例如美国专利号5,391,377)。

[0278] 可通过使用持续释放多肽“包装”系统来维持血清半衰期升高。所述持续释放系统为本领域技术人员所熟知。在一个优选实施方案中,使用用于蛋白质和多肽的ProLease可生物降解微球体递送系统(Tracy,Biotechnol.Prog.,14:108(1998);Johnson等,Nature Med.,2:795(1996);Herbert等,Pharmaceut.Res.,15:357(1998)),此涉及使用由于聚合物基质中含有多肽的可生物降解聚合微球体组成的干燥粉末,其可与或不与其它试剂一起混配成干燥制剂。

[0279] 在另一实施方案中,溶液的一种或多种组分可以“浓缩物”形式提供,例如提供于备用稀释的储存容器中(例如以预测量体积),或于备用添加至一定体积的水中的可溶性胶囊中。

[0280] 在本发明的某些实施方案中,药物组合物是持续释放制剂。本发明的多肽或肽模拟物可与控制共聚物向紧邻环境中的释放速率的生物相容性聚合物或基质混合。控制释放或持续释放组合物包括于亲脂性储库(例如脂肪酸、蜡、油)中的制剂。本发明也涵盖用聚合物(例如泊洛沙姆(poloxamer)或泊洛沙胺(poloxamine))包覆的颗粒组合物。本发明的组合物的其它实施方案并有针对性各种施用途(包括胃肠外、经肺、经鼻和口服)的颗粒形式、保护性包衣、蛋白酶抑制剂或渗透增强剂。可接受的载体包括羧甲基纤维素(CMC)和改性CMC。

[0281] 本发明的药物组合物在递送时优选是无菌和无热原的,并且在制造和储存条件下

优选是稳定的。这些药物组合物可通过常规熟知灭菌技术来灭菌。

[0282] 在治疗应用中,以足以治愈或至少部分预防或遏止疾病、病状和/或其并发症的量向被诊断为患有与血脂异常、高胆固醇血症和炎症相关的疾病或病症或处于患有所述疾病或病症的风险下的个体(并且在优选实施方案中,向被诊断为具有动脉粥样硬化的一种或多种症状或处于动脉粥样硬化的风险下的个体);或患有与异常葡萄糖代谢相关的疾病或处于患有所述疾病的风险下的个体;或向患有阿尔茨海默氏病或处于患有阿尔茨海默氏病的风险下的个体施用本发明的组合物。足以达成这个作用的量定义为“治疗有效剂量”。有效用于这个用途的量将取决于疾病的严重性和患者的总体健康状态。视如由患者所需以及所耐受的剂量和频率而定,可施用单次或多次组合物施用。在任何情况下,组合物都应提供本发明的制剂的足以有效治疗(改善一种或多种症状)个体或患者的量的活性剂,即多肽或肽模拟物。

[0283] 多肽或肽模拟物的浓度可广泛变化,并且将主要基于流体体积、粘度、体重、多肽的循环血浆水平、多肽毒性、疾病(例如动脉粥样硬化)的进展、特异性结合多肽的抗体的产生等,根据所选特定施用模式和患者的需要加以选择。通常,多肽或肽模拟物的剂量当量是每千克体重约0.1至约50mg,优选是每千克体重约1至约25或30mg,或每千克体重约1至约20mg。应了解可改变所述剂量以优化在特定受试者或一组受试者中进行的治疗方案。

[0284] 对于施用,本发明的多肽可在根据多肽的LD50以及多肽在如根据患者的质量和总体健康状况应用的各种浓度下的副作用确定的速率下施用。施用可通过单次剂量或分次剂量,例如持续一段时期(例如2、3、4、5、6天或1-3周或大于3周)定期(例如每日)施用的剂量来达成。

[0285] 如本文所说明,可以许多不同方式修饰本发明的多肽或肽模拟物。举例来说,多肽可被修饰以使组成氨基酸和/或末端氨基酸上的R基团被封阻,即由保护基保护。已发现封阻,特别是封阻氨基和/或羧基末端,可极大改进口服递送,并且显著增加血清半衰期。此外,为增强体内递送和/或生物活性,可使用为合成有机化学领域技术人员所知以及例如由March(1992) *Advanced Organic Chemistry; Reactions, Mechanisms and Structure*, 第4版N.Y. Wiley-Interscience所述的标准程序制备本发明的多肽或肽模拟物的盐、酯、酰胺、前药和其它衍生物。

[0286] 举例来说,使用通常涉及与适合酸的反应的常规方法,自游离碱制备酸加成盐。通常,将药物的碱形式溶解于极性有机溶剂,如甲醇或乙醇中,并且向其中添加酸。所得盐沉淀,或可通过添加极性较小溶剂使所得盐析出溶液。适于制备酸加成盐的酸包括有机酸(例如乙酸、丙酸、乙醇酸、丙酮酸、草酸、苹果酸、丙二酸、丁二酸、顺丁烯二酸、反丁烯二酸、酒石酸、柠檬酸、苯甲酸、肉桂酸、杏仁酸、甲烷磺酸、乙烷磺酸、对甲苯磺酸、水杨酸等)以及无机酸(例如盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、磷酸等)两者。可通过用适合碱处理来使酸加成盐再转化成游离碱。本文所述的多肽的特别优选的酸加成盐是卤化物盐,如可使用盐酸或氢溴酸制备。相反,使用药学上可接受的碱,如氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化铵、氢氧化钙、三甲胺等,以类似方式制备本发明的多肽或肽模拟物的碱性盐的制剂。特别优选的碱性盐包括碱金属盐,例如钠盐和铜盐。

[0287] 制备酯通常涉及使可存在于本发明的多肽或肽模拟物内的羟基和/或羧基官能化。酯通常是游离醇基团的酰基取代的衍生物,即衍生自式RCOOH羧酸的部分,其中R是烷

基,并且优选是低级烷基。必要时,可通过使用常规氢解或水解程序使酯再转化成游离酸。

[0288] 也可使用为本领域技术人员所知或贴切文献中所述的技术制备酰胺和前药。举例来说,可使用适合胺反应物自酯制备酰胺,或它们可自酸酐或酸氯化物,通过与氨或低级烷基胺反应来制备。通常通过共价连接导致化合物在治疗上是非活性的直至由个体的代谢系统修饰的部分来制备前药。

[0289] 前述制剂和施用方法明确意图是说明性的,而非以任何方式进行限制。应了解,使用本文提供的教义,可易于设计其它适合制剂和施用模式。

[0290] 基于脂质的制剂

[0291] 在另一方面,优选连同一种或多种脂质一起施用本发明的多肽和肽模拟物。脂质可被配制成赋形剂以保护和/或增强多肽或肽模拟物的转运/摄取,或它们可分开施用。

[0292] 脂质可被配制成脂质体、纳米胶囊、微粒、微球体、脂质粒子、脂质囊泡等。所述脂质制剂可用于囊封本发明的多肽和肽模拟物和/或它们可与所述多肽和肽模拟物简单复合/混合。本领域技术人员将了解如何使用所述脂质制剂来囊封或复合本发明的多肽或肽模拟物。举例来说,脂质体的形成和使用通常为本领域技术人员所知。近来,开发了血清稳定性和循环半衰期改进的脂质体(参见美国专利号5,741,516)。此外,已综述作为潜在药物载体的脂质体和脂质体样制剂的各种方法(参见美国专利号5,567,434;5,552,157;5,565,213;5,738,868和5,795,587)。

[0293] 在一个实施方案中,以与美国专利申请公布号2005/0142180中公开的方式类似的方式使本发明的多肽或肽模拟物与脂质,如磷脂(例如1-棕榈酰基-2-油酰基-sn-甘油-磷脂酰胆碱(“POPC”))复合,所述公布于2005年6月30日公开,其教义以引用的方式并入本文。因此,本发明提供胆固醇自细胞流出的能力增加的多肽-脂质复合物(或替代地,肽模拟物-脂质复合物)。通常,在施用之前使脂质与多肽混合。本发明的多肽和脂质可以适当比率混合于水溶液中,并且可通过本领域中已知的方法复合,所述方法包括但不限于冷冻干燥、去污剂溶解继之以透析、微流化、超声处理和均质化。可例如通过改变压力、超声频率或去污剂浓度来优化复合效率。通常用于制备多肽-脂质复合物的去污剂的一实例是胆酸钠。

[0294] 在某些实施方案中,多肽-脂质(例如磷脂)复合物可与适当药物稀释剂或载体相溶解。在其它实施方案中,多肽-脂质复合物的冷冻干燥或冻干制剂可在施用之前用适当药物稀释剂水化或复原。在另一实施方案中,多肽-脂质复合物可为在向有需要的受试者施用之前解冻直至达成均质溶液的冷冻制剂。

[0295] 脂质可为为本领域技术人员所知的任何适合脂质。在一个实施方案中,可使用非含磷脂质,包括硬脂胺、十二胺、乙酰基棕榈酸酯、(1,3)-D-甘露糖基-(1,3)甘油二酯、氨基苯基糖苷、3-胆固醇基-6'-(糖基硫基)己醚糖脂、N-(2,3-二(9-(Z)-十八烯基氧基))-丙-1-基-N,N,N-三甲基氯化铵和脂肪酸酰胺。

[0296] 在另一实施方案中,使用磷脂或磷脂的混合物。适合磷脂包括但不限于(可为)小烷基链磷脂、磷脂酰胆碱、卵磷脂酰胆碱、大豆磷脂酰胆碱、二棕榈酰基磷脂酰胆碱、大豆磷脂酰甘油、卵磷脂酰甘油、二硬脂酰基磷脂酰甘油、二肉豆蔻酰基磷脂酰胆碱、二硬脂酰基磷脂酰胆碱、二月桂酰基磷脂酰胆碱、1-肉豆蔻酰基-2-棕榈酰基磷脂酰胆碱、1-棕榈酰基-2-肉豆蔻酰基磷脂酰胆碱、1-棕榈酰基-2-硬脂酰基磷脂酰胆碱、1-硬脂酰基-2-棕榈酰基磷脂酰胆碱、二油酰基磷脂酰胆碱、1-棕榈酰基-2-油酰基磷脂酰胆碱、1-油酰基-2-棕榈酰

基磷脂酰胆碱、二油酰基磷脂酰乙醇胺、二月桂酰基磷脂酰甘油、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰肌醇、磷脂酰甘油、二磷脂酰甘油、二肉豆蔻酰基磷脂酰甘油、二棕榈酰基磷脂酰甘油、二硬脂酰基磷脂酰甘油、二油酰基磷脂酰甘油、磷脂酸、二肉豆蔻酰基磷脂酸、二棕榈酰基磷脂酸、二肉豆蔻酰基磷脂酰乙醇胺、二棕榈酰基磷脂酰乙醇胺、二肉豆蔻酰基磷脂酰丝氨酸、二棕榈酰基磷脂酰丝氨酸、脑磷脂酰丝氨酸、神经鞘磷脂、鞘脂、脑神经鞘磷脂、二棕榈酰基神经鞘磷脂、二硬脂酰基神经鞘磷脂、半乳糖脑苷脂、神经节苷脂、脑苷脂、磷脂酰甘油、磷脂酸、溶血卵磷脂、溶血磷脂酰乙醇胺、脑磷脂、心磷脂、磷酸二-十六酯、二硬脂酰-磷脂酰乙醇胺以及胆固醇和它的衍生物。类似地，磷脂可为任何前述磷脂的衍生物或类似物，或此外，可为任何前述磷脂中的两个或更多个的混合物。所述磷脂可自商业来源、天然来源或通过为本领域技术人员所知的合成或半合成手段获得。

[0297] 在优选实施方案中，多肽-脂质复合物是多肽-磷脂复合物。在一更优选实施方案中，脂质是1-棕榈酰基-2-油酰基磷脂酰胆碱(“POPC”)或(“1-棕榈酰基-2-油酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱”)。

[0298] 将为本领域技术人员易于显而易见的是包含本发明的多肽和脂质，优选是磷脂的复合物可包含任何量的脂质和任何量的多肽，条件是复合物有效介导胆固醇流出，并且转而治疗疾病或与其相关的症状。如先前所提及，已惊人地发现当在约1:0.5至约1:5(多肽:POPC)的范围内的比率下使本发明的多肽与例如POPC复合时，形成具有在约5与约20nm之间的尺寸的不同脂质-多肽粒子，此导致胆固醇自细胞流出的能力(capacity/ability)显著增强。然而，本发明的多肽-脂质复合物可包括具有其它磷脂与多肽比率，如约100:1、约10:1、约5:1、约3:1、约2:1、约1:1、约1:2、约1:3、约1:5、约1:10和约1:100(多肽的重量/脂质的重量)的复合物。

[0299] 本发明的多肽-脂质复合物可通过为本领域技术人员所知的任何方法制备。在一些情况下，合乎需要的是在施用之前混合脂质和多肽。脂质可呈溶液形式，或呈使用如均质化、超声处理或挤出的标准技术形成的脂质体或乳液形式。超声处理通常用尖端超声波仪，如Branson尖端超声波仪，在冰浴中进行。通常，使混悬液经受若干超声处理循环。挤出可通过生物膜挤出机，如Lipex Biomembrane Extruder.TM. (Lipex Biomembrane Extruder, Inc. Vancouver, Canada) 来进行。挤出过滤器中确定的孔尺寸可产生具有特定尺寸的单层脂质体囊泡。脂质体也可通过不对称陶瓷过滤器(如可自Norton Company, Worcester, MA商购获得的Ceraflow Microfilter.TM.)或通过聚碳酸酯过滤器或为本领域技术人员所知的其它类型的聚合材料(即塑料)进行挤出来形成。

[0300] 如先前所提及，本发明的多肽-脂质复合物可以包括但不限于囊泡、脂质体或蛋白脂质体的多种形式制备。为本领域技术人员所熟知的多种方法可用于制备多肽-脂质复合物。可使用许多可用于制备脂质体或蛋白脂质体的技术。举例来说，可将本发明的多肽(例如具有SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2或其变体的多肽)与适当脂质一起共同超声处理(使用浴或探针超声发生器)以形成多肽-脂质复合物。在某些实施方案中，可使多肽与预先形成的脂质囊泡组合，从而导致自发性形成多肽-脂质复合物。在另一实施方案中，多肽-脂质复合物也可通过去污剂透析方法制备。在这个方法中，可透析多肽、脂质和如胆酸钠的去污剂的混合物以移除去污剂，并且复原以制备多肽-脂质复合物(参见例如Jonas等, Methods Enzymol., 128:553-82(1986))。

[0301] 在其它实施方案中,多肽-脂质复合物可通过如美国专利号6,287,590和6,455,088中所述的共同冻干来制备,所述专利两者的教义均据此以引用的方式整体并入本文。其它方法公开于例如美国专利号6,004,925、6,037,323和6,046,166中,所述专利全部的教义都以引用的方式整体并入本文。制备多肽-脂质复合物的其它方法将为本领域技术人员显而易见。

[0302] 在一个优选实施方案中,多肽-脂质复合物可通过均质化制备。

[0303] 核酸

[0304] 在另一实施方案中,本发明提供编码本文公开的多肽的分离的核酸、包含核酸的表达载体、以及包含表达载体的宿主细胞。更具体来说,本发明提供编码本发明的多肽的分离的核酸,所述多肽在每个分子基础上具有与全长载脂蛋白类似的胆固醇流出活性,并且以与全长载脂蛋白类似的方式对ABAC1具有高选择性,所述多肽包括但不限于具有氨基酸序列SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2或如本文所述的变体的多肽。

[0305] 在某些实施方案中,编码本发明的多肽的核酸用于在体外以及在体内转染细胞。这些核酸可如下所述插入用于转染靶标细胞和生物体的许多熟知载体中的任一个中。通过载体和靶标细胞的相互作用使核酸离体或在体内转染至细胞中。受控于启动子的核酸接着表达本发明的多肽,由此缓和与血脂异常、高胆固醇血症、炎症、异常葡萄糖代谢或阿尔茨海默氏病相关的疾病的影响。

[0306] 作为研究工具以及在诊断方法中的使用

[0307] 本发明的多肽和肽模拟物也适用作研究工具。举例来说,本发明的多肽或肽模拟物可用于探究动物和动物模型中的脂蛋白-受体相互作用。此外,本发明的多肽也可用于鉴定适用于阐明脂质代谢路径的动物模型。举例来说,多肽可用于鉴定其中脂质过氧化促进动脉粥样硬化的进展的动物模型。此外,本发明的多肽可用于评估其它化合物(包括例如多肽变体和其它肽模拟物)的抗动脉粥样硬化潜力。

[0308] 在一些情况下,本发明的多肽或肽模拟物用于使治疗剂靶向表达ABCA的细胞和组织。

[0309] 在其它实施方案中,本发明的多肽或肽模拟物可用于诊断与异常胆固醇流出或与ABCA相关的疾病和病症的方法中。举例来说,肽可用于用以诊断逆向胆固醇转运缺乏症以及用以鉴定预测是对肽治疗的应答者的个体的测定中。所述诊断测定包括体外测定。举例来说,可在测定中评估胆固醇流出,其中使本发明的多肽与来自受试者的血浆混合,并且暴露于细胞以指示受试者是否将对治疗应答(例如相较于在不存在肽下的血浆介导的流出,在存在肽下的流出大幅增加表明所述受试者将具有应答性)。类似地,可使本发明的多肽与来自受试者的血浆混合以检测HDL子类分布变化和/或以检测在存在肽下血浆的抗氧化性质变化。

[0310] 在一些实施方案中,多肽或肽模拟物用于体内成像方法。使多肽或肽模拟物缀合于可检测部分,并且向受试者(例如哺乳动物,如人)施用。对可检测部分检测允许使包括例如动脉粥样硬化性病变或淀粉状蛋白斑块的目标细胞、组织或器官成像。

[0311] 成像方法在本领域中是熟知的。成像模态的实例包括但不限于磁共振、核磁共振、放射性闪烁摄影法、正电子发射断层摄影术、计算机断层摄影术、近红外荧光、X射线、超声、紫外光或可见光(参见例如Dahnert,Radiology Review Manual(第4版1999);Brant等,

Fundamentals of Diagnostic Radiobiology (第2版1999); Weissleder等, Primer of Diagnostic Imaging (第2版1997); Buddinger等, Medical Magnetic Resonance A Primer, Society of Magnetic Resonance, Inc. (1988); 以及 Weissleder等, Nature Biotech., 17:375-378 (1999)。

[0312] 如本文所用的短语“可检测部分”是指可通过本文所述或为本领域技术人员所知的程序或模态来体内、离体或体外成像和/或检测的部分或标记。可使可检测部分直接或间接连接于本发明的多肽或肽模拟物。可通过共价或非共价手段, 使用通常涉及一个或多个位于可检测部分、接头和/或多肽上的官能团的相互作用的熟知方法来达成使可检测部分连接于本发明的多肽或肽模拟物。特定接头并不是本发明的关键方面。可使用本领域中已知的任何接头, 只要它使多肽或肽模拟物和可检测部分结合在一起持续足够时期(即足以使多肽靶向所需靶标并被检测的时期)即可。

[0313] 用于本发明方法中的可检测部分可为能够在本文所述或为本领域技术人员所知的成像程序中直接或间接检测的任何部分。这些部分可包括发射或可被导致发射可检测放射(例如通过放射性衰变、荧光激发、自旋共振激发等)的部分、影响局部电磁场的部分(例如顺磁性、超顺磁性、亚铁磁性或铁磁性物质)、吸收或散射辐射能量的部分(例如发色团、粒子(包括含气体或液体囊泡)、重元素及其化合物等)、以及产生可检测物质的部分(例如气体微泡产生剂)。参见例如美国专利号5,228,446; 4,647,447; 4,863,715; 4,770,183和5,387,080; PCT公布号W0 97/25073、W0 96/09840、W0 85/02772、W0 92/17212、W0 97/29783、W0 91/15243、W0 93/05818、W0 96/23524、W0 95/26205和W0 96/17628; EP-A-554213; 以及 GB9624918.0; W0 91/14460、W0 89/00557、W0 92/17215、W0 96/40287和W0 96/22914; 以及美国专利号4,647,447、5,367,080和5,364,613; Matsuoka, Topics in Applied Chemistry: Infrared absorbing dyes (1990); Waring等, Topics in Applied Chemistry: The Chemistry and Application of Dyes (1990); “Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals” Haugland, Molecular Probes Inc, 1996; DE-A-4445065; DE-A-4326466; JP-A-3/228046; Narayanan等, J. Org. Chem., 60:2391-2395 (1995); Lipowska等, Heterocyclic Comm., 1:427-430 (1995); Fabian等, Chem. Rev., 92:1197 (1992); PCT公布号W096/23525; Strekowska等, J. Org. Chem., 57:4578-4580 (1992); 以及PCT公布号W0 96/17628; 可见光染料, 如Waring和Hallas, The Chemistry and Application of Dyes, Topics in Applied Chemistry (1990)中所述; Haugland, Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals (第6版1996)。

[0314] 在某些情况下, 可合乎需要的是接头在施用之后生物降解。通过选择可适当生物降解的接头, 有可能改进多肽和/或可检测部分的生物分布和生物消除样式。

[0315] 试剂盒

[0316] 在另一方面, 本发明提供用于治疗, 即改善或预防与血脂异常、高胆固醇血症和炎症相关的疾病或病症, 即病状; 或与异常葡萄糖代谢相关的疾病或病状; 或阿尔茨海默氏病的试剂盒。在一优选实施方案中, 本发明提供用于治疗, 即改善疾病的一种或多种症状, 或用于防治性治疗处于所述疾病的风险下的受试者(例如人或动物)的试剂盒。试剂盒优选包括含有一种或多种本发明的多肽(或肽模拟物)的容器。多肽或肽模拟物可以单位剂量制剂(例如片剂、囊片、贴片、栓剂等)形式提供, 和/或可任选与一种或多种药学上可接受的赋形

剂组合。

[0317] 试剂盒可任选进一步包括一种或多种用于治疗与血脂异常、高胆固醇血症和炎症相关的疾病或病状(如心脏病和/或动脉粥样硬化);或与异常葡萄糖代谢相关的疾病或病状;或阿尔茨海默氏病的其它试剂。所述试剂包括但不限于在以上与以上章节和关于“组合法”的章节关联阐述的那些。举例来说,在某些实施方案中,试剂盒可包括 β 阻断剂、血管舒张剂、阿司匹林、他汀类药物、ace抑制剂或ace受体抑制物(ARB)等。

[0318] 此外,试剂盒可任选包括提供用于实施方法或使用本发明的“治疗剂”或“防治剂”的指导(即方案)的标签和/或指导材料。优选指导材料描述使用一种或多种本发明的多肽或肽模拟物例如缓和动脉粥样硬化的一种或多种症状,和/或预防处于动脉粥样硬化的风险下的个体的一种或多种所述症状的发作或增加,或缓和与异常葡萄糖代谢相关的疾病的一种或多种症状;或缓和阿尔茨海默氏病或轻度认知损害的一种或多种症状。指导材料也可任选教导优选剂量/治疗方案、对抗适应症等。

[0319] 尽管指导材料通常包括书面或印刷材料,但它们不限于此。能够储存所述说明书,并且将它们向终端用户传达的任何介质都由本发明涵盖。所述介质包括但不限于电子储存介质(例如磁盘、磁带、盒式磁带、芯片等)、光学介质(例如CD ROM)等。所述介质可包括提供所述指导材料的因特网站点的地址。

[0320] 本发明将通过特定实施例的方式更详细加以描述。下列实施例是出于说明性目的而提供,并且不意图以任何方式限制本发明。本领域技术人员将易于认识到多种非关键参数可被改变或修改以产生基本上相同结果。

实施例

[0321] 实施例1

[0322] 这个实施例显示当在高剂量下施用肽ATI-5261时,所述肽的毒性。

[0323] 评估HDL模拟肽ATI-5261在高剂量下于大鼠和兔中的细胞毒性(图1)。在3、30和300mg/kg的剂量下,向雄性普通饮食喂食的Wistar大鼠(图版A和B)静脉内(IV)施用肽ATI-5261(无脂质)或单独媒介物,在48小时间隔下总计注射4次。在指示时间收集血液以评估血浆丙氨酸氨基转移酶(ALT,图版A)和天冬氨酸氨基转移酶(AST,图版B)活性。向喂以标准普通饮食的雄性新西兰白兔(图版C和D)施用3、30或300mg/kg ATI-5261的单次静脉内弹丸注射,并且随后收集血液以评估ALT(图版C)和AST(图版D)。值是平均值 $\pm$ SD, n=每组5个动物,其中在0.2-24小时对大鼠进行一式两份测定。结果显示高剂量施用在大鼠和兔中诱导细胞毒性应答。

[0324] 高剂量施用也增加血浆甘油三酯和胆固醇(图2)。对于图2中的实验,如图1中所述在3、30和300mg/kg的剂量下向雄性普通饮食喂食的Wistar大鼠(图版A和B)施用ATI-5261。在指示的时间以酶法测定血浆甘油三酯(TG,图版A)和未酯化的胆固醇(图版B)浓度。向雄性新西兰白兔(图版C和D)施用3、30或300mg/kg的ATI-5261的单次弹丸注射,并且测定血浆TG(图版C)和未酯化的胆固醇(图版C)。值是平均值 $\pm$ SD, n=每组5个动物,其中在0.2-24小时对大鼠进行一式两份测定。

[0325] 静脉内输注高剂量ATI-5261另外在猴中诱导细胞毒性应答(图3)。在100mg/kg的固定剂量下,通过每96小时进行静脉内输注(60分钟),总计注射4次来向雄性(上部图版)和

雌性(下部图版)食蟹猕猴施用ATI-5261。在输注后24小时收集血液,并且测定血浆ALT、AST、肌酸激酶(CPK)以及总胆红素和间接胆红素的水平。值表示为增加倍数对给药前水平。在首次输注之后观察到血浆肌酸激酶显著增加(雄性和雌性猴),随后输注所致的增加相对适度,最终返回基线。

[0326] ATI-5261的在大鼠、兔和食蟹猕猴中观察的高剂量细胞毒性应答另外在小鼠中得以重演(图4)。用30或300mg/kg的无脂质ATI-5261腹膜内(IP)注射雄性普通饮食喂食的C57b1/6小鼠。在肽注射之后4小时通过眶后丛收集血液,并且随后获得血浆以测量CPK(图版A)以及ALT和AST活性(图版B,ALT左侧棒条,AST,右侧棒条)。值是平均值 $\pm$ SD,n=每组4只小鼠。在施用300mg/kg ATI-5261之后观察到高水平的细胞毒性标记。

[0327] 实施例2

[0328] 这个实施例说明与ATI-5261的非极性表面相关的芳族苯丙氨酸残基促成大部分肽毒性(图5)。产生ATI-5261的具有脂族亮氨酸(L)的类似物以评估毒性(图5)。将ATI-5261的具有系统地用于(图版A的序列表)替换苯丙氨酸(F)的脂族亮氨酸(L)的变体腹膜内注射至雄性普通饮食喂食的C57B1/6小鼠中。在注射之后4小时通过眶后丛收集血液以分离血浆。如图1中所述测定血浆CPK(图版A)、ALT(图版B)和AST(图版C)的水平。值是平均值 $\pm$ SD,n=每组4只小鼠。图版A中的插图显示与缺乏苯丙氨酸残基的完全脂族类似物(T5055-13,即零F或无F)相关的相对于单独媒介物(PBS对照)的残余毒性。

[0329] 也测定在施用ATI-5261的脂族类似物之后,C57B1/6小鼠中的血浆脂质的浓度。图6显示在300mg/kg下施用肽之后,图5中自小鼠收集的 plasma 中的脂质的浓度。所有值(mg/dl)都是平均值 $\pm$ SD,n=4,在用肽治疗后4和6小时测定。ATI-5261产生血浆TG、总胆固醇和未酯化的(游离)胆固醇(FC)显著增加,此在使用缺乏芳族苯丙氨酸残基的脂族类似物(即T5055-13)下被极大减弱。

[0330] ATI-5261的缺乏苯丙氨酸残基的脂族类似物保留强力ABCA1选择性胆固醇流出活性(图7)。J774巨噬细胞用 $[^3\text{H}]$ 胆固醇标记(48小时),并且用cAMP类似物处理(18小时)以诱导ABCA1蛋白表达;在不存在cAMP下孵育的细胞(左侧棒条)充当对照。图版A-ATI-5261的完全脂族类似物(LeuATI-5261,即T5055-13)以ABCA1依赖性方式刺激胆固醇流出。在最大限度促进胆固醇流出活性的30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度下使用肽。图版B-胆固醇流出取决于肽的浓度。在大致3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 肽下获得类似胆固醇流出饱和度,从而指示LeuATI-5261类似物与亲本ATI-5261肽类似,保留以高效率刺激胆固醇流出的能力。图版C显示具有各种亮氨酸取代的肽的ABCA1依赖性胆固醇流出活性的概述。结果表示为使用cAMP处理的J774细胞相对于非处理J774细胞所观察到的胆固醇流出差异(%/4小时)。值是平均值 $\pm$ SD,n=3。结果显示ATI-5261的缺乏苯丙氨酸残基的脂族类似物保留强力ABCA1选择性胆固醇流出活性。

[0331] 实施例3

[0332] 为测试ATI-5261的细胞毒性应答是否优先与精氨酸或赖氨酸残基相关联,产生ATI-5261的具有赖氨酸消除或R>K取代的肽类似物,并且在小鼠中评估(图8)。图版A-如图5中所述通过将肽(300mg/kg)(腹膜内)注射至雄性普通饮食喂食的C57B1/6小鼠中来评估安全性和TG升高作用。值是平均值SD,n=4。通过除去(T5766-5)或氨基酸取代(K25 $\rightarrow$ N,T5594-4)自ATI-5261的C末端移除赖氨酸25(K25)极大降低肌肉毒性,如通过血浆中的CPK活性降低(左侧图版)所判断,从而表明赖氨酸残基促进毒性。具有完全赖氨酸残基的肽(即

R>K取代,T5594-5)也显示细胞毒性和TG升高活性,这与赖氨酸或精氨酸具有介导肽的负性作用的作用一致。图版B-使用用 $[^3\text{H}]$ 胆固醇标记的J774巨噬细胞测定的肽的ABCA1依赖性胆固醇流出活性。结果表示为如图7中所述的ABCA1流出组分。所有肽都具有功能性,并且在 $3\mu\text{g}/\text{ml}$ 的饱和浓度下刺激高水平的胆固醇流出,此类似于使用亲本ATI-5261肽观察到的胆固醇流出。

[0333] 为进一步评估特定荷电残基在ATI-5261的毒性应答中的作用,用未荷电谷氨酰胺(Q)或天冬酰胺(N)替换精氨酸残基(图9)。图版A-如图5中所述通过将肽(300mg/kg)(腹膜内)注射至雄性普通饮食喂食的C57B1/6小鼠中来评估安全性和TG升高作用。值是平均值SD, $n=4$ 。在位置3和14处使用谷氨酰胺或天冬酰胺(即分别是R3,14>Q(T5766-3)或R3,14>N(T5766-4))极大降低ATI-5261的CPK和TG升高作用的增加,从而指示荷正电精氨酸部分地促进肽的毒性应答。图版B-使用用 $[^3\text{H}]$ 胆固醇标记的J774巨噬细胞测定的肽的ABCA1依赖性胆固醇流出活性。结果表示为如图7中所述的ABCA1流出组分。所有肽都具有功能性,并且在 $3\mu\text{g}/\text{ml}$ 的饱和浓度下刺激高水平的胆固醇流出,此类似于使用亲本ATI-5261肽观察到的胆固醇流出。

[0334] 实施例4

[0335] 这个实施例证明可调节疏水性以降低ATI-5261类似物的残余毒性。为鉴定除荷电残基之外也消除ATI-5261的毒性的因素,使用丙氨酸取代系统降低疏水性(图10)。图版A-如图5中所述通过将肽(300mg/kg)(腹膜内)注射至雄性普通饮食喂食的C57B1/6小鼠中来评估安全性和TG升高作用。值是平均值SD, $n=4$ 。在LeuATI-5261肽中使用单一亮氨酸至丙氨酸取代(L24A或L21A,即T4883-6或T4883-7)足以消除残余肌肉毒性(即CPK活性),并且进一步降低细胞毒性应答和TG升高作用。图版B-使用用 $[^3\text{H}]$ 胆固醇标记的J774巨噬细胞测定的肽的ABCA1依赖性胆固醇流出活性。结果表示为如图7中所述的ABCA1流出组分。具有单一L24A或L21A取代的肽具有功能性,并且在 $3\mu\text{g}/\text{ml}$ 的饱和浓度下刺激高水平的胆固醇流出,此类似于使用亲本ATI-5261肽观察到的胆固醇流出。图版C-验证肽的强力功能性的详细研究。使 $[^3\text{H}]$ 胆固醇标记的用cAMP处理的J774细胞与递增浓度的肽一起孵育,并且在4小时之后评估流出至培养基中的胆固醇。具有单一丙氨酸取代的肽证实高度强力流出活性,如通过低Km($3\mu\text{g}/\text{ml}$ 或小于 $3\mu\text{g}/\text{ml}$)和胆固醇流出饱和度所判断,从而指示降低总体疏水性的氨基酸取代可用于产生安全和有效的肽。

[0336] 可调节疏水性以降低ATI-5261类似物的残余毒性的其它证据提供于图11中提供的结果中。为鉴定可用于降低ATI-5261类似物的残余毒性的其它氨基酸取代,丙氨酸被系统地用于替换肽的不同区域内的缬氨酸(V)或亮氨酸(L)。图版A-如图5中所述通过将肽(300mg/kg)(腹膜内)注射至雄性普通饮食喂食的C57B1/6小鼠中来评估安全性和TG升高作用。值是平均值SD, $n=4$ 。与色氨酸(W)取代组合使用单一亮氨酸至丙氨酸取代(L24A)(T5505-9)显著降低血浆CPK和AST的增加以及TG升高活性。这个组合似乎最有利,因为涉及V2和L10的取代保留一定细胞毒性和TG升高作用,即使相较于ATI-5261处于极大降低水平下。图版B-使用用 $[^3\text{H}]$ 胆固醇标记的J774巨噬细胞测定的肽的ABCA1依赖性胆固醇流出活性。结果表示为如图7中所述的ABCA1流出组分。所有肽都具有功能性,并且在 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 的饱和浓度下刺激高水平的胆固醇流出。图版C-验证肽T5505-9(L24A;W9L取代)的如对于图11所述测定的强力功能性的详细研究。肽T5505-9以高效率刺激细胞胆固醇流出,如通过低Km

(0.58 μ g/ml)和在 $\sim$ 3 μ g/ml浓度下达成的胆固醇流出饱和度所判断。

[0337] 用其它疏水性较小的氨基酸取代色氨酸可用于降低ATI-5261的毒性(图12)。评估色氨酸(W)被丙氨酸(A)或缬氨酸(V)取代的肽的毒性应答、TG升高作用和介导细胞胆固醇流出方面的功能性。图版A-如图5中所述通过将肽(300mg/kg)(腹膜内)注射至雄性普通饮食喂食的C57B1/6小鼠中来评估安全性和TG升高作用。值是平均值SD, n=4。具有W $\rightarrow$ A或V取代的肽相较于ATI-5261产生低水平的血浆CPK、AST和TG升高作用。图版B-使用用 $[^3\text{H}]$ 胆固醇标记的J774巨噬细胞测定的肽的ABCA1依赖性胆固醇流出活性。显示胆固醇自用以及不用cAMP处理的细胞的流出。所有肽都具有功能性,并且以ABCA1依赖性方式刺激胆固醇流出。图版C-具有W9A或L24A;W9V取代的肽类似物以高效率刺激细胞胆固醇流出,如通过低 K_m 和在 $\sim$ 3 μ g/ml浓度下达成的胆固醇流出饱和度所判断。

[0338] 实施例5

[0339] 这个实施例证明可在位置R14处使用疏水性氨基酸来产生安全和有效的肽。沿着LeuATI-5261的长度使用多个丙氨酸取代产生低毒性,并且极大除去ATI-5261类似物的TG升高作用(图11,肽T5505-12)。然而,过度使用丙氨酸取代会产生介导细胞胆固醇流出的功能性损失。为挽救具有多个丙氨酸取代的肽的胆固醇流出活性,我们在T5505-12或ATI-5261内缺失R14或用疏水性亮氨酸替换R14(图13)。这些缺失/取代扩大疏水性表面,同时自肽的脂质-水界面移除有害荷正电残基。图版A-如图5中所述通过将肽(300mg/kg)(腹膜内)注射至雄性普通饮食喂食的C57B1/6小鼠中来评估安全性和TG升高作用。值是平均值SD, n=4。尽管在各个位置(V2、L6和L24 $\rightarrow$ A)处使用丙氨酸,但具有R14L取代的肽(T5211-2)显示少许毒性应答或不显示毒性应答,并且显示低血浆TG。图版B-使用用 $[^3\text{H}]$ 胆固醇标记的J774巨噬细胞测定的肽的ABCA1依赖性胆固醇流出活性。结果表示为如图7中所述的ABCA1流出组分。在饱和浓度(10 μ g/ml)下,T5055-12的具有R14L取代的肽类似物(即T5211-2)显示高水平的胆固醇流出活性,此类似于ATI-5261,并且相对于亲本T5055-12肽显著改进。因此,在两亲性 α 螺旋肽的脂质-水界面处使用疏水性亮氨酸残基可用于恢复通过使用丙氨酸取代而致使毒性较小的肽的胆固醇流出活性。

[0340] 实施例6

[0341] 这个实施例证明R14L取代可用于其它ATI-5261类似物中以产生安全和有效的HDL模拟肽。通过用缬氨酸(V)取代各个丙氨酸残基来产生含有R14L取代的T5211-2的肽类似物(图14)。图版A-如图5中所述通过将肽(300mg/kg)(腹膜内)注射至雄性普通饮食喂食的C57B1/6小鼠中来评估安全性和TG升高作用。值是平均值SD, n=4。T5211-2的含有单一或多个A $\rightarrow$ V取代以及缺乏C末端残基KS的肽类似物相较于ATI-5261阳性对照展现相对较低的细胞毒性应答。图版B-使用用 $[^3\text{H}]$ 胆固醇标记的J774巨噬细胞测定的肽的ABCA1依赖性胆固醇流出活性。T5211-2的肽类似物具有功能性,在浓度(10 μ g/ml)下以ABCA1依赖性方式介导高水平的胆固醇流出,此类似于ATI-5261。图版C-浓度依赖性研究证明具有以及不具有缬氨酸取代的R14L肽以高度高效方式刺激胆固醇流出,显示低 K_m 和在3 μ g/ml下达成的胆固醇流出饱和度。左侧图版显示R14L肽(批号T6023-3,即原始T5211-2)的流出活性,说明相较于亲本T5055-12肽的微弱活性,R14L取代赋予强力功能性(参见图11,图版C)。

[0342] 实施例7

[0343] 这个实施例证明瓜氨酸取代精氨酸可用于产生安全和有效的HDL模拟肽(图15)。

瓜氨酸是精氨酸的天然氨基酸类似物,其缺乏正电荷,但保留氢键结以保持盐桥构型。为测试缺乏正电荷本身是否消除ATI-5261的毒性和TG升高作用,产生一系列在位置3、14和23处具有R-→瓜氨酸取代的肽类似物(参见图15中的序列表)。图和表显示如图5中所述腹膜内注射(300mg/kg)至雄性普通饮食喂食的C57B1/6小鼠中的肽的安全性和TG升高作用。值是平均值SD,n=4。对于测试的肽,在位置3和14处使用瓜氨酸极大降低ATI-5261的肌肉毒性,而总体全身性毒性(AST)和血浆TG保持增加。

[0344] ATI-5261的瓜氨酸类似物保留功能性,并且以高效价刺激胆固醇流出。图16显示使用[3H]胆固醇标记的J774巨噬细胞测定的肽刺激胆固醇流出的活性。结果表示为如图7中所述的ABCA1流出组分。所有肽都类似于ATI-5261以饱和浓度(3μg/ml)获得高水平的ABCA1依赖性胆固醇流出。表征肽介导胆固醇流出的效价的 K_m 和 V_{max} 值显示于表中。除三重R3,14,23-→瓜氨酸取代(T5426-7)之外,测试的所有肽都被证明类似于亲本ATI-5261肽,高度高效介导胆固醇流出,如通过低 K_m (即对ABCA1的高亲和力)所判断。

[0345] 实施例8

[0346] 这个实施例证明ATI-5261的瓜氨酸类似物支持其它氨基酸取代。在ATI-5261的双重瓜氨酸形式(即R3,14-→瓜氨酸,T5426-4)中产生各种疏水性氨基酸(W-→L、V或A)取代以测试肽是否可支持其它氨基酸变化以进一步消除毒性应答和TG升高作用。这些实验的结果显示于图17中。图版A-如图5中所述通过将肽(300mg/kg)(腹膜内)注射至雄性普通饮食喂食的C57B1/6小鼠中来评估安全性和TG升高作用。值是平均值SD,n=4。ATI-5261的具有W9-→L、V或A取代的瓜氨酸形式在血浆中显示少许毒性应答和TG升高应答或不显示毒性应答和TG升高应答。图版B-使用J774巨噬细胞测定的肽的ABCA1依赖性胆固醇流出活性。结果表示为如图7中所述的ABCA1流出组分。具有瓜氨酸取代的肽类似物具有功能性,并且类似于ATI-5261,在饱和浓度(3μg/ml)下显示高水平的胆固醇流出活性。

[0347] 实施例9

[0348] 这个实施例证明LeuATI-5261肽可支持瓜氨酸取代以产生安全和有效的HDL模拟肽。为测试消除荷正电精氨酸与芳族苯丙氨酸(F)残基两者是否产生保留强力胆固醇流出活性的安全肽,在LeuATI-5261类似物中产生一系列瓜氨酸取代(参见图18中的序列表)。评估肽的结果提供于图18中。图和表显示如图5中所述腹膜内注射(300mg/kg)至雄性普通饮食喂食的C57B1/6小鼠中的肽的安全性和TG升高作用。值是平均值SD,n=4。对于测试的肽,在位置3和14处使用瓜氨酸极大降低ATI-5261的肌肉毒性(CPK活性)以及总体细胞毒性应答(ALT和AST)和TG升高作用。最值得注意的是,在位置3和14处具有两个瓜氨酸取代(即R3,14-→瓜氨酸)的肽相较于PBS对照不显示可检测肌肉或肝毒性。这不同于用ATI-5261的具有F残基的瓜氨酸形式(图15,即T5426肽)观察到的适度AST和TG增加,从而指示LeuATI-5261的瓜氨酸类似物在高剂量下施用是格外安全的。

[0349] ATI-5261的瓜氨酸类似物保留功能性,并且以高效价刺激胆固醇流出(图19)。柱状图显示肽刺激胆固醇自用[3H]胆固醇标记的J774巨噬细胞流出的活性。结果表示为如图7中所述的ABCA1流出组分。具有一个(R3-→瓜氨酸)或两个(R3,14-→瓜氨酸)取代的肽类似于ATI-5261以饱和浓度(3μg/ml)获得高水平的胆固醇流出。这通过表中所示的详细剂量-应答研究来验证,其中测试的肽具有以高效率刺激胆固醇流出的低 K_m 值。

[0350] 实施例10

[0351] 这个实施例显示沿两亲性 α 螺旋的极性表面存在荷负电残基在调节HDL模拟肽的毒性性质方面起主要作用(图20)。未荷电谷氨酰胺(Q)用于在遍及ATI-5261、LeuATI-5261和它的瓜氨酸类似物的各个位置处替换荷负电谷氨酸(E),如图20中的序列表中所示。对于所示序列,肽的净电荷在+1(T5554-1)至-1(T5554-5和T5554-6)的范围内。图和表显示如图5中所述腹膜内注射(300mg/kg)至雄性普通饮食喂食的C57B1/6小鼠中的肽的安全性和TG升高作用。值是平均值SD, n=4。相较于用亲本ATI-5261肽观察的毒性应答,自ATI-5261移除酸性残基(E7, 18→Q, 即T5554-1)产生毒性应答大幅增加。这在有利瓜氨酸取代存在下(即T5554-5和T5554-4)稍微减弱;然而,两者均保留强烈毒性(CPK、ALT和AST)应答和TG升高应答。这些结果指示HDL模拟肽ATI-5261的安全性概况部分地取决于荷负电氨基酸的存在性和位置。

[0352] 具有酸性残基取代的肽保留在介导细胞胆固醇流出方面的功能性。图21中描绘的柱状图显示肽刺激胆固醇自用[3H]胆固醇标记的J774巨噬细胞流出的活性。结果表示为如图7中所述的ABCA1流出组分。所有肽都以饱和浓度(3 μ g/ml)获得高水平的胆固醇流出,从而指示肽具有足以介导ABCA1依赖性胆固醇流出的酸性残基、结构和电荷特性。

[0353] 实施例11

[0354] 这个实施例证明Leu-ATI5261和它的瓜氨酸类似物的小24聚体形式是安全和有效的(图22)。移除C末端残基似乎降低ATI-5261的毒性应答而不改变肽活性(图8, T5766-5)。为测试这个作用是否在ATI-5261的其它更安全形式下重演,自LeuATI-5261和它的瓜氨酸类似物缺失氨基酸25和26(分别是KS)(图22)。图版A-如图5中所述通过将肽(300mg/kg)(腹膜内)注射至雄性普通饮食喂食的C57B1/6小鼠中来评估安全性和TG升高作用。值是平均值SD, n=4。缺乏C末端残基KS的肽展现相对较低的细胞毒性应答,但保留TG升高作用,如使用基于ATI-5261的24聚体所观察(图8)。图版B-使用用[3H]胆固醇标记的J774巨噬细胞测定的肽的胆固醇流出活性。肽具有功能性,在浓度(10 μ g/ml)下以ABCA1依赖性方式介导高水平的胆固醇流出,此类似于基于LeuATI-5261的瓜氨酸形式的亲本26聚体肽(CS6253, 即等效于批次T5237-4)。图版C-证明24聚体肽以高度高效方式刺激胆固醇流出,显示低Km和在3 μ g/ml下达成的胆固醇流出饱和度的剂量应答。

[0355] 实施例12

[0356] 这个实施例证明疏水性亮氨酸可用于在两亲性 α 螺旋的脂质-水界面处替换瓜氨酸以产生安全和有效的HDL模拟肽(图23)。为验证LeuATI-5261的双重瓜氨酸形式(T5237-4)可用作用以产生安全和有效的HDL模拟肽的平台,在位置3处或替代在位置2处的缬氨酸使用疏水性亮氨酸。图版A-如图5中所述通过将肽(300mg/kg)(腹膜内)注射至雄性普通饮食喂食的C57B1/6小鼠中来评估安全性和TG升高作用。值是平均值SD, n=4。具有亮氨酸取代的肽类似于具有R14L取代的类似物(图13)显示少许细胞毒性性质或不显示细胞毒性性质。这指示位置R3和14是高度稳固的,并且可由一系列广泛氨基酸取代所靶向以产生安全和有效的HDL模拟肽。图版B-使用用[3H]胆固醇标记的J774巨噬细胞测定的肽的胆固醇流出活性。肽具有功能性,在浓度(10 μ g/ml)下以ABCA1依赖性方式介导高水平的胆固醇流出,此类似于LeuATI-5261的亲本瓜氨酸形式(CS6253, 即T5237-4的等效批次)。图版C-证明具有亮氨酸取代的肽以高度高效方式刺激胆固醇流出,显示低Km和在3 μ g/ml下达成的胆固醇流出饱和度的剂量应答。

[0357] 实施例13

[0358] 这个实施例证明LeuATI-5261的瓜氨酸形式支持其它氨基酸取代以产生安全和有效的肽(图24)。产生LeuATI-5261的具有在位置3和14处的亮氨酸或瓜氨酸或在位置2处的亮氨酸的各种类似物。图版A-如图5中所述通过将代表性肽(300mg/kg)(腹膜内)注射至雄性普通饮食喂食的C57Bl/6小鼠中来评估安全性和TG升高作用。值是平均值SD, n=4。在位置14处具有亮氨酸(瓜氨酸14→L)的肽类似于具有R14L取代的类似物(图13)显示少许细胞毒性性质或不显示细胞毒性性质。

[0359] 实施例14

[0360] 这个实施例证明LeuATI-5261的具有各种亮氨酸取代的瓜氨酸形式保留胆固醇流出活性。使用用 $[^3\text{H}]$ 胆固醇标记,并且用(右侧棒条)以及不用(左侧棒条)cAMP处理以调节ABCA1表达的J774巨噬细胞测定肽的胆固醇流出活性(图25)。图版A-具有瓜氨酸和/或亮氨酸取代的肽类似物具有功能性,在10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度下以ABCA依赖性方式介导高水平的胆固醇流出。图版B-证明T6275-5肽(单一瓜氨酸14→L取代)以高度高效方式刺激胆固醇流出,显示低Km和在3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 下达成的胆固醇流出饱和度的剂量-应答。

[0361] 实施例15

[0362] 这个实施例证明异亮氨酸可用于替换ATI-5261中的苯丙氨酸以产生安全和有效的胆固醇流出肽(图26)。产生ATI-5261的肽类似物以鉴定可在非极性表面上用于产生安全肽的氨基酸取代。如图5中所述通过将肽(300mg/kg)(腹膜内)注射至雄性普通饮食喂食的C57Bl/6小鼠中来评估安全性和TG升高作用。柱状图(左下)显示ATI-5261的具有异亮氨酸取代(F10,13,16,20→I)的类似物(T6991-1)以及Cit.ATI-5261的具有异亮氨酸取代(F10,13,16,20→I)的类似物(T6991-2)关于CPK升高显示少许细胞毒性性质或不显示细胞毒性性质。相对于ATI-5261对照,异亮氨酸肽也使血清ALT和AST值显著降低(表)。相反,ATI-5261的在非极性表面上具有丝氨酸或酪氨酸替换的类似物诱导相对较高的CPK、ALT和AST应答,从而指示肽的脂质结合表面上的极性残基的位置不降低细胞毒性应答。这些结果提供ATI-5261的毒性性质与可通过策略性使用瓜氨酸和脂族氨基酸残基加以消除的芳族和荷正电残基相关的证据。值是平均值SD, n=4。

[0363] 实施例16

[0364] 这个实施例证明ATI-5261的异亮氨酸形式保留胆固醇流出活性(图27)。使用用 $[^3\text{H}]$ 胆固醇标记,并且用(右侧棒条)以及不用(左侧棒条)cAMP处理以调节ABCA1表达的J774巨噬细胞测定肽的胆固醇流出活性。图版A-ATI-5261的异亮氨酸形式(T6991-1)以及Cit.ATI-5261的异亮氨酸形式(T6991-2)具有功能性,在10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度下以ABCA依赖性方式介导高水平的胆固醇流出。图版B-证明ATI-5261的异亮氨酸形式以高度高效方式刺激ABCA1胆固醇流出。图版C-证明Cit.ATI-5261的异亮氨酸形式(T6991-2)以高度高效方式刺激ABCA1胆固醇流出。图版D-在非极性表面上具有丝氨酸或酪氨酸的肽(10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)保留以ABCA1依赖性方式,即在使用用以及不用cAMP处理的J774细胞下介导高水平的胆固醇流出的能力。图版E-显示肽T6991-2和CS6253与全长apoA-I以相同速率动力学刺激胆固醇自J774巨噬细胞流出的数据。在10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 浓度下以无脂质形式使用肽和apoAI。值是平均值SD, n=4。

[0365] 实施例17

[0366] 这个实施例证明肽CS6253和T6991-2以高效价刺激细胞胆固醇通过ABCA1流出。(图28)。使用用[3H]胆固醇标记,并且用(右侧棒条)以及不用(左侧棒条)cAMP处理以调节ABCA1表达的J774巨噬细胞测定肽的胆固醇流出活性。图版A-Cit.ATI-5261的亮氨酸(CS6253)和异亮氨酸(T6991-2)形式具有功能性,在10 μ g/ml的浓度下以ABCA1依赖性方式介导高水平的胆固醇流出。图版B-使用Michaelis-Menten等式(Graph-Pad Prism5软件)和由cAMP处理的J774细胞获得的流出数据计算的肽、apoA-I、apoE和apoE C末端(CT)结构域的胆固醇流出效价(K_m值)的概述。K_m值是基于质量(μ g/ml)或体积摩尔浓度(μ M)来表示。后者指示CS6253和T6991-2以接近的载脂蛋白体积摩尔浓度效价刺激胆固醇流出,特别是当与apoE的天然流出结构域(CT)进行比较时。图版C-证明T6991-2和CS6253以高度高效方式刺激胆固醇流出,显示低K_m和在3 μ g/ml下达成的胆固醇流出饱和度的剂量-应答。

[0367] 实施例18

[0368] 这个实施例证明Cit.ATI-5261的亮氨酸形式使巨噬细胞ABCA1稳定,并且以ABCA1依赖性方式刺激胆固醇流出。(图29)。J774巨噬细胞用于实验。图版A-细胞用3H胆固醇标记(48小时),并且用(右侧棒条)以及不用(左侧棒条)cAMP类似物处理以调节ABCA1表达。以无脂质形式添加(10 μ g/ml)载脂蛋白(apo)A-I、E、apoE的C末端(CT)结构域以及肽CS6253至细胞中以引发细胞胆固醇流出。在4小时之后,测定培养基中流出的[3H]胆固醇。值是平均值 $\pm$ SD, n=3。相对于在不存在cAMP下的低应答,使用利用cAMP使ABCA1应答上调的细胞,观察到所有载脂蛋白和肽都导致高水平的胆固醇流出。因此,肽CS6253类似于天然载脂蛋白刺激ABCA1依赖性胆固醇流出。图版B-全细胞溶解产物的蛋白质印迹,其显示在用cAMP处理J774细胞之后的ABCA1蛋白表达(泳道1, t=0)。在随后6小时追踪期间在持续存在肽CS6253(泳道4)或apoA-I(泳道5)下,ABCA1维持在高水平下;而在单独无血清培养基下,ABCA1蛋白被降解(泳道3)。这些数据指示Cit.ATI-5261的亮氨酸形式使细胞膜中的ABCA1蛋白稳定。图版C-CS6253:磷脂复合物的ABCA1依赖性胆固醇流出活性。通过胆酸盐透析来制备CS6253肽和POPC的7-8nm小复合物,并且与[3H]胆固醇标记的以及不用cAMP处理的J774细胞一起孵育。值是平均值 $\pm$ SD, n=3。POPC复合的新型安全肽CS6253的胆固醇流出活性与相应亲本ATI-5261肽相同,由此提供功能性保留的额外支持数据。

[0369] 实施例19

[0370] 这个实施例证明肽CS6253与天然ABCA1寡聚形式相互作用以介导细胞脂质流出和初生HDL装配(图30)。用ABCA1稳定转染的BHK细胞或模拟转染对照细胞如图5中所述用[3H]胆固醇标记。图版A-证明CS6253类似于ATI-5261和apoA-I与细胞膜中天然形式的ABCA1相互作用,如通过交联测定和蛋白质印迹分析,使用针对肽或apoA-I的抗体所确定。图版B-CS6253类似于apoA-I和ATI-5261以高效价刺激胆固醇通过ABCA1流出。图版C-相较于apoA-I,肽介导具有类似尺寸的初生HDL粒子的装配,如通过非变性PAGE所确定。数据指示如由CS6253例示的本发明的单一 α 螺旋肽足以以高效价介导ABCA1脂质流出,包括胆固醇和磷脂流出,并且支持初生HDL粒子的装配/结构。

[0371] 实施例20

[0372] 这个实施例证明与磷脂一起配制的肽CS6253刺激胆固醇通过SRB1流出(图31)。为进一步评估CS6253的潜在抗致动脉粥样化机理,主要表达用于介导细胞脂质流出的SR-B1的Fu5AH细胞用[3H]胆固醇标记,并且用于流出实验中。Cit.ATI-5261的用POPC脂质化的亮

氨酸形式 (CS6253) 在每毫升50 μ g肽浓度下用作培养基中的胆固醇接受体。图版A-SR-B1介导的胆固醇流出的时程。相对于无脂质肽的不良活性,CS6253:POPC的复合物刺激高水平的胆固醇流出,这与涉及需要脂质化接受体粒子作为底物的SR-B1一致。图版B-CS6253与ATI-5261之间在介导细胞胆固醇通过SR-B1流出方面的比较。使[3H]胆固醇标记的Fu5AH细胞与无脂质肽或与POPC一起配制的肽一起孵育。CS6253:POPC复合物达成相对高水平的胆固醇流出(4小时),超过以ATI-5261:POPC复合物获得的胆固醇流出。数据指示具有磷脂的肽制剂产生高度有效介导胆固醇通过SR-B1流出的HDL样粒子。

[0373] 实施例21

[0374] 这个实施例证明与磷脂一起配制的肽CS6253刺激胆固醇通过ABCG1流出(图32)。为进一步评估CS6253的潜在抗致动脉粥样化机理,用ABCG1稳定转染的BHK细胞和模拟转染对照细胞用[3H]胆固醇标记,并且用于流出实验中。Cit.ATI-5261的用POPC脂质化的亮氨酸形式(CS6253)以及用POPC脂质化的ATI-5261在每毫升无血清培养基50 μ g肽下用作胆固醇流出接受体。图版A-无脂质CS6253肽或CS6253:POPC复合物达成ABCG1介导的胆固醇自细胞流出的时程。相对于无脂质肽的不良活性,CS6253:POPC的复合物刺激高水平的胆固醇流出,这与涉及需要脂质化粒子作为底物的ABCG1一致。图版B-CS6253与ATI-5261之间在介导细胞胆固醇通过ABCG1流出方面的比较。使[3H]胆固醇标记的BHK细胞(ABCG1对模拟转染;左侧棒条,对照BHK,右侧棒条,G1-BHK)与无脂质肽或与POPC一起配制的肽一起孵育。惊人地,使用CS6253:POPC复合物观察到相对高水平的胆固醇流出(4小时);而ATI-5261(游离肽或POPC复合物)具有不良活性。因此,CS6253基于若干准则被证明是一种优越肽,所述准则包括安全性和介导胆固醇通过各种细胞表面受体流出的活性。

[0375] 实施例22

[0376] 这个实施例显示CS6253诱导前 β -HDL的形成,并且增强人血浆的胆固醇流出活性。(图33)。为测试CS6253是否在生物环境中施加抗致动脉粥样化作用,使人血浆暴露(5分钟)于无脂质肽。评估CS6253与血浆中的HDL的相互作用以及血浆刺激胆固醇流出的活性;后者使用用[3H]胆固醇标记的J774巨噬细胞。图版A-用无脂质肽处理的血浆的胆固醇流出活性。使人血浆与300 μ g/ml肽一起孵育5分钟(4 $^{\circ}$ C),于无血清RPMI-1640培养基中稀释至1%,并且立刻添加至[3H]胆固醇标记的J774细胞中。相对于用单独媒介物处理的对照血浆(左侧棒条),用肽(CS6253或ATI-5261)处理的血浆具有刺激胆固醇通过ABCA1自细胞(即自cAMP处理的细胞,右侧棒条)流出的更大能力。图版B-在用CS6253处理人血浆后对前 β HDL的诱导。使血浆暴露于相对于内源性apoA-I较少量的肽(分别是1:10摩尔比),并且通过2D非变性梯度凝胶电泳(NDGGE)和蛋白质印迹分析来评估前 β HDL的形成。左侧图版显示未用肽处理的血浆中的前 β HDL的量(总HDL的5-6%),如使用针对apoA-I的抗体所判断。右侧图版显示在肽处理下,前 β HDL增加,并且 α 迁移性HDL物质相应降低(apoA-I抗体)。中间图版说明CS6253与血浆中的 α -HDL缔合,如使用针对CS6253的抗体所判断。结果指示CS6253自 α -HDL的表面移置apoA-I以诱导前 β HDL形成以及胆固醇流出活性(图版A)。结果与产生完全由内源性apoA-I组成的确凿前 β HDL粒子一致。

[0377] 实施例23

[0378] 这个实施例证明肽T6991-2诱导前 β -HDL的形成,并且增强人血浆的胆固醇流出活性(图34)。为测试T6991-2是否在生物环境中施加抗致动脉粥样化作用,使人血浆暴露(5分

钟)于无脂质肽。使用用[3H]胆固醇标记的J774巨噬细胞评估T6991-2与血浆中的HDL的相互作用以及血浆刺激胆固醇流出的活性。图版A-用无脂质肽处理的血浆的胆固醇流出活性。使人血浆与300 μ g/ml肽一起孵育5分钟(4 $^{\circ}$ C),于无血清RPMI-1640培养基中稀释至1%,并且立刻添加至[3H]胆固醇标记的J774细胞中。相对于用单独媒介物处理的对照血浆(左侧棒条),用肽(T6991-2或CS6253)处理的血浆具有刺激胆固醇通过ABCA1自细胞(即自cAMP处理的细胞,右侧棒条)流出的更大能力。图版B-在用T6991-2处理人血浆后对前 β HDL的诱导。使血浆暴露于相对于内源性apoA-I较少量的肽(分别是1:10摩尔比),并且通过2D非变性梯度凝胶电泳(NDGGE)和蛋白质印迹分析来评估前 β HDL的形成。两个左侧图版(即一式两份操作)显示未用肽处理的血浆中的前 β HDL的量(总HDL的 $\sim$ 6%),如使用针对apoA-I的抗体所判断。右侧图版显示在肽处理下,前 β HDL增加,并且 α 迁移性HDL物质相应降低(apoA-I抗体)。结果指示T6991-2类似于肽CS6253诱导血浆中的在介导胆固醇通过ABCA1流出方面具有功能性的前 β HDL粒子。

[0379] 实施例24

[0380] 这个实施例证明CS6253在仓鼠中体内诱导前 β HDL形成(图35)。已知比小鼠具有更类人HDL代谢的金黄叙利亚仓鼠被喂以高脂肪西方饮食4周,用30mg/kg的无脂质CS6253肽皮下(SC)注射。在注射后1、2和4小时,收集血浆以通过非变性2D PAGE和蛋白质印迹,使用针对apoA-I的抗体分析前 β HDL水平。图版A-显示媒介物对照注射(4小时时间点)和肽(1、2和4小时)所达成的呈前 β 1HDL(左侧棒条)和主要 α -HDL迁移性物质(右侧棒条)形式的HDL物质的分布的柱状图。观察到相对于对照,在肽处理下,前 β 1HDL大幅增加($\sim$ 8倍),从而指示CS6253能够在体内与HDL相互作用,并且有利调节HDL。图版B-2D-PAGE1(非变性)的代表性蛋白质印迹(apoA-I抗体),其显示PBS对照和CS6253注射所达成的HDL子物质的分布(4小时数据)。图版C-肽处理在金黄叙利亚仓鼠中达成的小幅HDL增加和LDL降低的剂量-应答。用10、30和100mg/kg肽和PBS皮下注射仓鼠(n=每组3),并且随后4小时收集血浆。在通过离心移除白蛋白之后,注射血浆,并且用基于气相差异性电泳大分子迁移率的方法(离子迁移率或IM)(Caulfield等Clin Chem 2008 54:8 1307-16)分离脂蛋白。前 β HDL增加的剂量-应答与LDL粒子(特别是具有小尺寸的LDL粒子)的剂量-应答相关。

[0381] 实施例25

[0382] 这个实施例显示CS6253在大鼠中的半衰期(图36)。CS6253被设计成具有S26 $\rightarrow$ Y取代以有助于用 125 I标记(序列处于图的顶部)。通过各种施用途径将放射性标记的肽注射至雄性普通饮食喂食的Wistar大鼠中,并且定量它在血浆中的摄取。图版A-在注射 125 I-CS6253之后自血浆清除的动力学。表(右侧)显示CS6253的由清除曲线计算的半衰期以及它的呈注射剂量%形式的生物利用度。图版B-使用用[3H]胆固醇标记的J774巨噬细胞测定的CS6253的Y26形式的胆固醇流出活性。肽具有功能性,在浓度(10 μ g/ml)下以ABCA1依赖性方式介导高水平的胆固醇流出,此类似于亲本CS6253肽。图版C-证明肽以高效率刺激胆固醇流出,显示低Km和在3 μ g/ml下达成的胆固醇流出饱和度的剂量应答。

[0383] 实施例26

[0384] 这个实施例显示T6991-2和CS6253在体内刺激巨噬细胞逆向胆固醇转运(RCT)至粪便(图37)。将用乙酰化LDL(100 μ g/ml)装载,并且用[3H]胆固醇标记的J774巨噬细胞泡沫细胞连同单独媒介物(PBS)或指示的无脂质肽在10或30mg/kg的剂量下一起腹膜内注射至4

个月年龄的雄性动脉粥样硬化性apoE缺乏性 (apoE^{-/-}) 小鼠中。在24小时收集粪便以评估 [3H] 固醇。图版A和B-相较于PBS媒介物治疗组, 应答于T6991-2注射的 [3H] 固醇排出量。结果表示为每克粪便的dpm (图版A) 或注射的 [3H] 胆固醇% (B)。图版C-应答于CS6253的 [3H] 固醇排出量。平均来说, 肽使巨噬细胞特异性逆向胆固醇转运增加。值是平均值±SD, n=每组4只小鼠。

[0385] 实施例27

[0386] 这个实施例显示CS6253减轻apoE^{-/-}小鼠中的实质性动脉粥样硬化。(图38)。8周龄的雄性apoE^{-/-}小鼠被喂以高脂肪西方饮食14周。随后将小鼠随机分至对照组以接受腹腔内注射单独媒介物 (左侧棒条) 或无脂质肽 (30mg/kg), 在48小时间隔下持续6周。评估含亮氨酸ATI-5261肽的两种瓜氨酸形式: T5460-1 (中间棒条), 其等效于具有单一R3→瓜氨酸取代的T5237-1; 以及T5460-2 (右侧棒条), 其等效于具有R3, 14→瓜氨酸的CS6253 (即T5237-4), 参见图18。显示整个主动脉被脂肪病变覆盖的程度, 通过油红O染色所测定。值是平均值±SD, n=每组10只小鼠。

[0387] 实施例28

[0388] 这个实施例显示低剂量施用CS6253减轻apoE^{-/-}小鼠中的实质性动脉粥样硬化 (图39)。8周龄的雄性apoE^{-/-}小鼠被喂以高脂肪西方饮食14周。随后将小鼠随机分至对照组以接受腹腔内注射单独媒介物 (左侧棒条) 或无脂质CS6253 (10mg/kg, 右侧棒条), 在48小时间隔下持续10周。显示整个主动脉被脂肪病变覆盖的程度, 通过油红O染色所测定。值是平均值±SD, n=每组10只小鼠。

[0389] 实施例29

[0390] 这个实施例显示皮下 (SC) 施用的CS6253也减轻apoE^{-/-}小鼠中的实质性动脉粥样硬化。(图40)。8周龄的雄性apoE^{-/-}小鼠被喂以高脂肪西方饮食14周。在治疗开始之前使一组终止作为基线对照。随后将小鼠随机分至3个组别中的一个以隔天接受皮下 (SC) 注射6周; 单独媒介物、30mg/kg CS6253或60mg/kg CS6253。在前4周治疗期间, 小鼠保持高脂肪西方饮食, 而在最后两周期间, 将它们转换成普通饮食。显示整个主动脉被脂肪病变覆盖的程度, 通过油红O染色所测定。值是平均值±SD, n=每组10只小鼠。

[0391] 实施例30

[0392] 这个实施例显示环钩化肽可被设计来介导ABCA1依赖性胆固醇流出。

[0393] 设计在位置3和23处具有未荷电丙氨酸 (A) 的ATI-5261, 即肽CS6257, 以及ATI-5261的在位置3和23处具有谷氨酰胺 (Q) 的亮氨酸形式, 即肽CS6259。两者均具有如序列中所示的化学环钩 (图41)。评估肽刺激胆固醇自 [3H] 胆固醇标记的用 (右侧棒条) 以及不用 (左侧棒条) cAMP处理的J774巨噬细胞流出的能力。在10μg/ml的浓度下以无脂质形式使用肽。值是平均值±SD, n=3个孔。与刺激总体更大流出应答的ATI-5261类似, 两种肽 (即CS6257和CS6259) 达成的胆固醇流出均高度取决于ABCA1。

[0394] 基于ATI-5261设计的环钩化肽以浓度依赖性方式介导ABCA1依赖性胆固醇流出 (图42)。构建在位置3和23处具有未荷电丙氨酸 (A) 的ATI-5261肽, 即肽CS6257A (上文); 以及在位置3和23处具有谷氨酰胺 (Q) 的ATI-5261肽, 即肽CS6256A。两者也均具有如序列中所示的化学环钩。图版A显示使用 [3H] 胆固醇标记, 并且用 (右侧棒条) 以及不用 (左侧棒条) cAMP处理以调节ABCA1表达的J774巨噬细胞测定肽刺激胆固醇流出的能力。在10μg/ml的浓

度下以无脂质形式使用肽。值是平均值 $\pm$ SD, $n=3$ 个孔。与刺激更大流出应答的ATI-5261类似, 两种肽(即CS6257A和CS6256A)达成的胆固醇流出均高度取决于ABCA1。图版B是显示肽具有功能性, 以浓度依赖性方式刺激胆固醇流出的图。

[0395] 实施例31

[0396] 这个实施例说明本发明的说明性肽的血糖降低性质。

[0397] 评估T6991-2在小鼠中的血糖降低性质。肽T6991-2具有序列EVC*SKLEEWIAAIC*EIAEEILARLKS, 即在ATI-5261的异亮氨酸形式中具有R3, 14- $\rightarrow$ 瓜氨酸(C*)。显示在向喂以普通饮食的C57B1/6小鼠施用腹膜内注射的300mg/kg肽之后6小时的胆固醇和葡萄糖($n=3$) (图43)。相较于接受PBS注射的动物, T6991-2显示显著降低的总胆固醇(TC) 胆固醇酯(CE) 和葡萄糖(G) 值, $n=$ 每组3。图也显示在用作阳性对照的高剂量(300mg/kg) 下观察到的作为ATI-5261毒性应答的特征的甘油三酯(TG) 升高作用。

[0398] T6991-2也降低在DIO小鼠中进行葡萄糖激发后的血糖浓度(图44)。雄性C57B1/6小鼠被喂以60%高脂肪饮食6周(DIO模型); 接着用单独媒介物、10或30mg/kg无脂质T6991-2隔天腹膜内(IP) 注射6周。在治疗之后, 通过腹膜内注射1g/kg葡萄糖来进行葡萄糖耐受性测试。在指示时间通过尾部静脉收集血液, 并且使用血糖仪测量血糖。图版A和B-分别是表示为在 $t=0$ 时的对照值的百分比的血糖浓度以及相应曲线下面积图。图版C和D-分别是表示为在葡萄糖激发之后随时间的绝对值的血糖浓度以及相应曲线下面积。值是平均值 $\pm$ SD, $n=$ 每组4只小鼠。(图版B和D: 左侧棒条, PBS; 中间棒条, 10mg/kg T6991-2; 右侧棒条, T6991-2, 30mg/kg) 数据指示低剂量T6991-2减弱葡萄糖激发后的血糖应答, 并且作用具有剂量依赖性。

[0399] T6991-2也改进DIO小鼠中对胰岛素的敏感性(图45)。雄性C57B1/6小鼠被喂以60%高脂肪饮食6周(DIO模型); 接着用单独媒介物、10或30mg/kg无脂质T6991-2隔天腹膜内(IP) 注射6周, 如图44中所述。在治疗之后, 通过腹膜内注射0.75单位/kg来进行胰岛素耐受性测试(ITT)。在指示时间通过尾部静脉收集血液, 并且使用血糖仪测量血糖。图版A和B-分别是表示为在 $t=0$ 时的对照值的百分比的血糖浓度以及相应曲线下面积图。图版C和D-分别是表示为在葡萄糖激发之后随时间的绝对值的血糖浓度以及相应曲线下面积。值是平均值 $\pm$ SD, $n=$ 每组4只小鼠。(图的右侧-图版B和D: 左侧棒条, PBS; 中间棒条, 10mg/kg T6991-2; 右侧棒条, T6991-2, 30mg/kg) 数据指示低剂量T6991-2改进对胰岛素的敏感性, 并且作用具有剂量依赖性。

[0400] 此外, T6991-2降低在肥胖症的ob/ob遗传小鼠模型中进行葡萄糖激发后的血糖浓度(图46)。雄性ob/ob小鼠被喂以普通饮食6周(DIO模型); 接着用单独媒介物(柱状图的左侧棒条) 或10mg/kg无脂质T6991-2(柱状图的右侧棒条) 隔天腹膜内(IP) 注射6周。在治疗之后, 通过腹膜内注射1g/kg葡萄糖来进行葡萄糖耐受性测试。在指示时间通过尾部静脉收集血液, 并且使用血糖仪测量血糖。图版A和B-分别是表示为在 $t=0$ 时的对照值的百分比的血糖浓度以及相应曲线下面积图。图版C和D-治疗的小鼠中在6小时禁食之后且肽注射后2小时的C-肽和胰岛素浓度较低, 从而表明图版A和B中所示的改进的葡萄糖激发应答不是胰岛素介导的。值是平均值 $\pm$ SD, $n=$ 每组4只小鼠。数据指示低剂量T6991-2减弱在ob/ob小鼠中进行葡萄糖激发后的血糖应答。

[0401] 实施例32

[0402] 这个实施例说明CitATI-5261的亮氨酸形式支持各种氨基酸取代以产生安全和有效的肽(图47)。产生ATI-5261的具有在位置10、13、16、20处的异亮氨酸(I)和/或在位置3和14处的瓜氨酸的类似物,以及缺乏C末端KS残基的较短24聚体(序列-图47的顶部,即T7983系列肽)。图版A-如图5中所述通过将肽(300mg/kg)(腹膜内)注射至雄性普通饮食喂食的C57B1/6小鼠中来评估安全性和TG升高作用。值是平均值SD,n=4。在指定位置处具有呈各种组合形式的瓜氨酸、亮氨酸和异亮氨酸的所有肽都是安全的,并且显示少许TG升高作用或不显示TG升高作用。

[0403] 实施例33

[0404] 这个实施例说明CitATI-5261的具有亮氨酸或异亮氨酸取代的脂族形式在小鼠中保留胆固醇流出活性,并且降低血糖(图48)。测试的肽来自图47,即T7983系列。图版A-使用用[3H]胆固醇标记,并且用(右侧棒条)以及不用(左侧棒条)cAMP处理以调节ABCA1表达的J774巨噬细胞测定肽的胆固醇流出活性。具有亮氨酸、异亮氨酸和/或瓜氨酸取代的肽类似物具有功能性,在10 μ g/ml的浓度下以ABCA依赖性方式介导高水平的胆固醇流出。图版B-在单次腹膜内注射300mg/kg的T7983肽之后,用于图47中的C57B1/6小鼠(普通饮食喂食)的血液中的葡萄糖浓度。在单次注射之后,几乎测试的所有肽都降低血糖水平。

[0405] 实施例34

[0406] 这个实施例说明CS6253的具有递增数目的异亮氨酸残基的类似物是安全和有效的(图49)。将递增数目的异亮氨酸残基通过L $\rightarrow$ I取代在沿着肽的疏水性长度的不同位置处系统地引入CS6253中(序列-图49的顶部,即T8212系列肽)。图版A-如图5中所述通过将肽(300mg/kg)(腹膜内)注射至雄性普通饮食喂食的C57B1/6小鼠中来评估安全性和TG升高作用。值是平均值SD,n=4。在指定位置处具有亮氨酸和异亮氨酸的各种组合的所有肽都是安全的,并且显示少许TG升高作用或不显示TG升高作用。

[0407] 实施例35

[0408] 这个实施例说明CS6253的具有递增异亮氨酸取代的脂族形式在小鼠中保留胆固醇流出活性,并且降低血糖(图50)。测试的肽来自图49,即T8212系列。图版A-使用用[3H]胆固醇标记,并且用(右侧棒条)以及不用(左侧棒条)cAMP处理以调节ABCA1表达的J774巨噬细胞测定肽的胆固醇流出活性。具有递增异亮氨酸取代的肽类似物具有功能性,在10 μ g/ml的浓度下以ABCA依赖性方式介导高水平的胆固醇流出。图版B-具有一个或两个L $\rightarrow$ I取代的代表性CS6253肽以浓度依赖性方式,并且以高效价刺激ABCA1胆固醇流出。使用cAMP处理的J774巨噬细胞获得结果。图版C-在单次(腹膜内)注射300mg/kg的T8212肽之后,用于图49中的C57B1/6小鼠(普通饮食喂食)的血液中的葡萄糖浓度(左侧棒条,4H;右侧棒条,6H)。在单次注射之后,几乎测试的所有肽相较于PBS都降低血糖水平。

[0409] 实施例36

[0410] 这个实施例说明CS6253和T6991-2降低在C57B1/6小鼠中进行葡萄糖激发后的血糖浓度(图51)。采用普通饮食的空腹雄性C57B1/6小鼠接受单次腹膜内(IP)注射单独媒介物或300mg/kg无脂质肽,如对于图5中的安全性研究所述。在治疗之后,通过腹膜内注射2g/kg葡萄糖来进行葡萄糖耐受性测试。在指示时间自尾部静脉收集血液,并且使用血糖仪测量血糖。图版A和B-分别是表示为在葡萄糖激发之后随时间的质量值的血糖浓度以及相应曲线下面积。(柱状图,图版B,自左至右的棒条分别是PBS、CS6253、T699102、2、4、5、6和9)值

是平均值 $\pm$ SD, n =每组4只小鼠。ATI-5261的在位置10、13、16和20处具有完全亮氨酸(CS6253)或完全异亮氨酸(T6991-2)的双瓜氨酸形式降低在葡萄糖激发后的血糖浓度。相反,具有亮氨酸和异亮氨酸残基的各种组合的肽2、4、5、6和9(对应于图49中的序列T8212-2、T8212-4、T8212-5、T8212-6和T8212-9)在降低血糖应答方面具有不良活性。总之,这些数据指示沿着HDL模拟肽的长度在重要位置处均质使用亮氨酸或异亮氨酸是产生高度有效抗糖尿病化合物的要素。

[0411] 实施例37

[0412] 这个实施例说明CS6253和T6991-2在大鼠中的血浆清除(图52)。两种肽均被设计成具有S26 $\rightarrow$ Y取代以有助于用 125 I标记,如图36中所述。将放射性标记的肽腹膜内注射至雄性普通饮食喂食的Wistar大鼠中,并且定量它的出现以及随后自血浆的清除。图版A-在注射 125 I-CS6253或 125 I-T6991-2肽之后的血浆动力学,其指示两种肽的血浆半衰期均是约7.5小时。图版B- 125 I-肽在注射后6和24小时的组织分布(CS6253=左侧棒条,而T6991-2=右侧棒条)。应注意少量两种肽出现在脑中,此随时间而增加。图版C-使用用[3H]胆固醇标记的J774巨噬细胞测定的T6991-2和它的Y26类似物(T7983-11)的胆固醇流出活性(ABCA依赖性流出显示在右侧棒条上)。肽具有功能性,在浓度(10 μ g/ml)下以ABCA1依赖性方式介导高水平的胆固醇流出。图版D-证明T6991-2和它的Y26类似物(T7983-11)以高效率刺激胆固醇流出,显示低 K_m 和在3 μ g/ml下达成的胆固醇流出饱和度的剂量应答。

[0413] 实施例38

[0414] 这个实施例说明本发明的肽增加小鼠中的脑ABC转运体。显示全身性施用肽T6991-2增加小鼠中的脑ABC转运体的说明性数据提供于图53中。每日一次持续5周在30mg/kg/48h下向ApoE3小鼠腹膜内施用ATI-5261的(C*)异亮氨酸形式T6991-2:EVC*SKLEEWIAAIC*EIAEEILARLKS。在终止时,通过ELISA评估海马的ABCA1、ABCG1和apoE。T6991-2(右侧棒条)相较于PBS(左侧棒条)显著增加它们的浓度($p<0.05$)。

[0415] 实施例39

[0416] 这个实施例使用人apoE3和E4替换小鼠模型说明本发明的肽增加脑apoE水平和脂质化。显示全身性施用CS6253或T6991-2增加脑apoE水平和脂质化的说明性数据提供于图54中。在30mg/kg/48h下向人apoE3(huApoE3)和E4(huApoE4)替换小鼠腹膜内施用T5237-4(即CS6253):EVC*SKLEEWLAALC*ELAEELLARLKS(C*=瓜氨酸),即ATI-5261的亮氨酸形式;以及T6991-2:EVC*SKLEEWIAAIC*EIAEEILARLKS,即ATI-5261的(C*)异亮氨酸形式5周,并且与PBS进行比较(n =每组小鼠),即“AD研究”。在终止时,评估海马的apoE蛋白水平(SDS凝胶)和脂质化(非变性凝胶)。图版A-显示apoE蛋白在它们的相应小鼠模型中的相对水平的代表性印迹,即人E3蛋白对E4蛋白,以及就肽治疗来说。图版B和C-分别是E3(空心棒条)对E4(实心棒条)小鼠中脂质化apoE蛋白(非变性)和总apoE蛋白(SDS-PAGE)的水平。huApoE3小鼠中的脂质化apoE显著高于huApoE4的相应水平。相对于T6991-2治疗的小鼠的相应样品,肽(具体来说CS6253)增加脂质化apoE4的量。T6991-2增加huApoE3小鼠中的apoE水平。

[0417] 实施例40

[0418] 这个实施例提供说明全身性施用本发明的肽降低小鼠的脑中的P- τ 蛋白和淀粉状蛋白 β 42的数据(图55)。在终止实施例39和图54中所述的AD研究时,评估海马的CA3区域的P- τ 蛋白(AT-8抗体)和淀粉状蛋白 β 42。在huApoE4小鼠中,CS6253相较于PBS显著降低P- τ 蛋

白 ($p < 0.001$) 和淀粉状蛋白 $\beta 42$ ($p = 0.04$)。在huApoE3小鼠与huApoE4小鼠两者中,肽T6991-2也降低P- τ 蛋白和淀粉状蛋白 $\beta 42$ 。

[0419] 实施例41

[0420] 这个实施例提供说明全身性施用本发明的肽逆转E4表型的数据。显示全身性施用CS6253和T6991-2关于被遏制的VGluT1和apoE受体2来逆转病理性apoE4表型的说明性数据提供于图56中。在终止实施例39、图54中所述的AD研究时,评估海马的CA3区域的VGluT1(谷氨酰胺能神经元)和apoE受体2。两种肽相较于PBS均逆转huApoE4小鼠的VGluT1和apoER2的水平缺乏。

[0421] 以上提供的示例性数据证明本发明的多肽在小鼠中展现少许细胞毒性乃至不展现细胞毒性,并且显示它们的体内功效,具有葡萄糖降低作用,并且逆转阿尔茨海默氏病的表型指示物。在例如 $\leq 30\text{mg/kg}$ 的药理学剂量下得到抗糖尿病性、抗动脉粥样硬化性以及在大脑中的作用。

[0422] 应了解以上描述意图具有说明性而非限制性。许多实施方案将为本领域技术人员在阅读以上描述后显而易见。因此,本发明的范围应在不参考以上描述的情况下确定,而应代之以参考随附权利要求以及所述权利要求所授权的等效物的完全范围来确定。所有文章和参考文献(包括专利申请和公布和登记号)的公开内容出于所有目的以引用的方式并入本文。

序列表

<110> 加利福尼亚大学董事会

<120> 刺激胆固醇流出的具有降低的毒性的肽

<130> D15C81308CN

<140> PCT/US14/29232

<141> 2014-03-14

<150> US 61/798,191

<151> 2013-03-15

<160> 112

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 24

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的两亲性 α -螺旋胆固醇流出肽

[0001]

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3)... (14)

<223> Xaa = 瓜氨酸 (cit, Cit)

<400> 1

Glu Val Xaa Ser Lys Leu Glu Glu Trp Leu Ala Ala Leu Xaa Glu Leu

1

5

10

15

Ala Glu Glu Leu Leu Ala Arg Leu

20

<210> 2

<211> 24

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的两亲性 α -螺旋胆固醇流出肽

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3)... (14)

<223> Xaa = 瓜氨酸 (cit, Cit)

<400> 2

Glu Val Xaa Ser Lys Leu Glu Glu Trp Ile Ala Ala Ile Xaa Glu Ile

1

5

10

15

Ala Glu Glu Ile Leu Ala Arg Leu

20

<210> 3
<211> 26
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的两亲性 α -螺旋胆固醇流出肽

<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)... (14)
<223> Xaa = 瓜氨酸 (cit, Cit)

<400> 3
Glu Val Xaa Ser Lys Leu Glu Glu Trp Leu Ala Ala Leu Xaa Glu Leu
1 5 10 15
Ala Glu Glu Leu Leu Ala Arg Leu Lys Ser
20 25

<210> 4
<211> 26
<212> PRT
<213> 人工序列

[0002]

<220>
<223> 合成的两亲性 α -螺旋胆固醇流出肽

<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)... (14)
<223> Xaa = 瓜氨酸 (cit, Cit)

<400> 4
Glu Val Xaa Ser Lys Leu Glu Glu Trp Ile Ala Ala Ile Xaa Glu Ile
1 5 10 15
Ala Glu Glu Ile Leu Ala Arg Leu Lys Ser
20 25

<210> 5
<211> 26
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的两亲性 α -螺旋胆固醇流出肽T55055-13 (LeuATI-5261)

<400> 5
Glu Val Arg Ser Lys Leu Glu Glu Trp Leu Ala Ala Leu Arg Glu Leu
1 5 10 15
Ala Glu Glu Leu Leu Ala Arg Leu Lys Ser
20 25

<210> 6
<211> 26
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的两亲性 α -螺旋胆固醇流出肽T5055-14

<400> 6
Glu Val Arg Ser Lys Leu Glu Glu Trp Phe Ala Ala Leu Arg Glu Leu
1 5 10 15
Ala Glu Glu Leu Leu Ala Arg Leu Lys Ser
20 25

<210> 7
<211> 26
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的两亲性 α -螺旋胆固醇流出肽T5055-15

<400> 7
Glu Val Arg Ser Lys Leu Glu Glu Trp Phe Ala Ala Phe Arg Glu Leu
1 5 10 15
Ala Glu Glu Leu Leu Ala Arg Leu Lys Ser
20 25

[0003]

<210> 8
<211> 26
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的两亲性 α -螺旋胆固醇流出肽T5055-16

<400> 8
Glu Val Arg Ser Lys Leu Glu Glu Trp Phe Ala Ala Phe Arg Glu Phe
1 5 10 15
Ala Glu Glu Leu Leu Ala Arg Leu Lys Ser
20 25

<210> 9
<211> 26
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的两亲性 α -螺旋胆固醇流出肽T5055-17 (ATI-5261)

<400> 9
Glu Val Arg Ser Lys Leu Glu Glu Trp Phe Ala Ala Phe Arg Glu Phe
1 5 10 15

Ala Glu Glu Phe Leu Ala Arg Leu Lys Ser
20 25

<210> 10
<211> 24
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的两亲性 α -螺旋胆固醇流出肽T5766-5, ATI-5261类似物

<400> 10
Glu Val Arg Ser Lys Leu Glu Glu Trp Phe Ala Ala Phe Arg Glu Phe
1 5 10 15
Ala Glu Glu Phe Leu Ala Arg Leu
20

<210> 11
<211> 26
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的两亲性 α -螺旋胆固醇流出肽T5594-4, ATI-5261类似物

[0004] <400> 11
Glu Val Arg Ser Lys Leu Glu Glu Trp Phe Ala Ala Phe Arg Glu Phe
1 5 10 15
Ala Glu Glu Phe Leu Ala Arg Leu Asn Ser
20 25

<210> 12
<211> 26
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的两亲性 α -螺旋胆固醇流出肽T5594-5, ATI-5261类似物

<400> 12
Glu Val Lys Ser Lys Leu Glu Glu Trp Phe Ala Ala Phe Lys Glu Phe
1 5 10 15
Ala Glu Glu Phe Leu Ala Lys Leu Lys Ser
20 25

<210> 13
<211> 26
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的两亲性 α -螺旋胆固醇流出肽T5766-3, LeuATI-5261类似物

<400> 13

Glu	Val	Gln	Ser	Lys	Leu	Glu	Glu	Trp	Leu	Ala	Ala	Leu	Gln	Glu	Leu
1				5					10					15	
Ala	Glu	Glu	Leu	Leu	Ala	Arg	Leu	Lys	Ser						
			20					25							

<210> 14

<211> 26

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的两亲性 α -螺旋胆固醇流出肽T5766-4, LeuATI-5261类似物

<400> 14

Glu	Val	Asn	Ser	Lys	Leu	Glu	Glu	Trp	Leu	Ala	Ala	Leu	Asn	Glu	Leu
1				5					10					15	
Ala	Glu	Glu	Leu	Leu	Ala	Arg	Leu	Lys	Ser						
			20					25							

<210> 15

<211> 26

<212> PRT

<213> 人工序列

[0005]

<220>

<223> 合成的两亲性 α -螺旋胆固醇流出肽T4873-7 (LeuATI-5261)

<400> 15

Glu	Val	Arg	Ser	Lys	Leu	Glu	Glu	Trp	Leu	Ala	Ala	Leu	Arg	Glu	Leu
1				5					10					15	
Ala	Glu	Glu	Leu	Leu	Ala	Arg	Leu	Lys	Ser						
			20					25							

<210> 16

<211> 26

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的两亲性 α -螺旋胆固醇流出肽T4883-6, LeuATI-5261类似物

<400> 16

Glu	Val	Arg	Ser	Lys	Leu	Glu	Glu	Trp	Leu	Ala	Ala	Leu	Arg	Glu	Leu
1				5					10					15	
Ala	Glu	Glu	Leu	Leu	Ala	Arg	Ala	Lys	Ser						
			20					25							

<210> 17

<211> 26

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的两亲性 α -螺旋胆固醇流出肽T4883-7, LeuATI-5261类似物

<400> 17

Glu	Val	Arg	Ser	Lys	Leu	Glu	Glu	Trp	Leu	Ala	Ala	Leu	Arg	Glu	Leu
1				5					10					15	
Ala	Glu	Glu	Leu	Ala	Ala	Arg	Leu	Lys	Ser						
			20					25							

<210> 18

<211> 26

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的两亲性 α -螺旋胆固醇流出肽T4883-12, LeuATI-5261类似物

<400> 18

Glu	Val	Arg	Ser	Lys	Leu	Glu	Glu	Trp	Leu	Ala	Ala	Leu	Arg	Glu	Ala
1				5					10					15	
Ala	Glu	Glu	Leu	Ala	Ala	Arg	Ala	Lys	Ser						
			20					25							

<210> 19

<211> 26

<212> PRT

[0006] <213> 人工序列

<220>

<223> 合成的两亲性 α -螺旋胆固醇流出肽T5505-1, LeuATI-5261类似物

<400> 19

Glu	Ala	Arg	Ser	Lys	Leu	Glu	Glu	Trp	Leu	Ala	Ala	Leu	Arg	Glu	Leu
1				5					10					15	
Ala	Glu	Glu	Leu	Leu	Ala	Arg	Leu	Lys	Ser						
			20					25							

<210> 20

<211> 26

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的两亲性 α -螺旋胆固醇流出肽T5505-3, LeuATI-5261类似物

<400> 20

Glu	Val	Arg	Ser	Lys	Leu	Glu	Glu	Trp	Ala	Ala	Ala	Leu	Arg	Glu	Leu
1				5					10					15	
Ala	Glu	Glu	Leu	Leu	Ala	Arg	Leu	Lys	Ser						
			20					25							

<210> 21

<211> 26

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的两亲性 α -螺旋胆固醇流出肽T5505-9, LeuATI-5261类似物

<400> 21
Glu Val Arg Ser Lys Leu Glu Glu Leu Leu Ala Ala Leu Arg Glu Leu
1 5 10 15
Ala Glu Glu Leu Leu Ala Arg Ala Lys Ser
20 25

<210> 22
<211> 26
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的两亲性 α -螺旋胆固醇流出肽T5505-12, LeuATI-5261类似物

<400> 22
Glu Ala Arg Ser Lys Ala Glu Glu Trp Leu Ala Ala Leu Arg Glu Leu
1 5 10 15
Ala Glu Glu Leu Leu Ala Arg Ala Lys Ser
20 25

[0007]

<210> 23
<211> 26
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的两亲性 α -螺旋胆固醇流出肽T5325-4, LeuATI-5261类似物

<400> 23
Glu Val Arg Ser Lys Leu Glu Glu Ala Leu Ala Ala Leu Arg Glu Leu
1 5 10 15
Ala Glu Glu Leu Leu Ala Arg Leu Lys Ser
20 25

<210> 24
<211> 26
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的两亲性 α -螺旋胆固醇流出肽T5325-8, LeuATI-5261类似物

<400> 24
Glu Val Arg Ser Lys Leu Glu Glu Val Leu Ala Ala Leu Arg Glu Leu
1 5 10 15
Ala Glu Glu Leu Leu Ala Arg Ala Lys Ser
20 25

<210> 25
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的两亲性 α -螺旋胆固醇流出肽T5211-1, LeuATI-5261类似物

<400> 25
 Glu Ala Arg Ser Lys Ala Glu Glu Trp Leu Ala Ala Leu Glu Leu Ala
 1 5 10 15
 Glu Glu Leu Leu Ala Arg Ala Lys Ser
 20 25

<210> 26
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的两亲性 α -螺旋胆固醇流出肽T5211-2, LeuATI-5261类似物

<400> 26
 Glu Ala Arg Ser Lys Ala Glu Glu Trp Leu Ala Ala Leu Leu Glu Leu
 1 5 10 15
 Ala Glu Glu Leu Leu Ala Arg Ala Lys Ser
 20 25

[0008]

<210> 27
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的两亲性 α -螺旋胆固醇流出肽T5211-3, LeuATI-5261类似物

<400> 27
 Glu Val Arg Ser Lys Leu Glu Glu Trp Phe Ala Ala Phe Glu Phe Ala
 1 5 10 15
 Glu Glu Phe Leu Ala Arg Leu Lys Ser
 20 25

<210> 28
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的两亲性 α -螺旋胆固醇流出肽T5211-4, LeuATI-5261类似物

<400> 28
 Glu Val Arg Ser Lys Leu Glu Glu Trp Phe Ala Ala Phe Leu Glu Phe
 1 5 10 15

[0009]

Ala Glu Glu Phe Leu Ala Arg Leu Lys Ser
20 25

<210> 29

<211> 26

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的两亲性 α -螺旋胆固醇流出肽T5220, LeuATI-5261类似物

<400> 29

Glu Ala Arg Ser Lys Ala Glu Glu Trp Leu Ala Ala Leu Ala Glu Leu
1 5 10 15
Ala Glu Glu Leu Leu Ala Arg Ala Lys Ser
20 25

<210> 30

<211> 26

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的两亲性 α -螺旋胆固醇流出肽T6023-3, LeuATI-5261类似物, HDL模拟肽

<400> 30

Glu Ala Arg Ser Lys Ala Glu Glu Trp Leu Ala Ala Leu Leu Glu Leu
1 5 10 15
Ala Glu Glu Leu Leu Ala Arg Ala Lys Ser
20 25

<210> 31

<211> 24

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的两亲性 α -螺旋胆固醇流出肽T6023-4, LeuATI-5261类似物, HDL模拟肽

<400> 31

Glu Ala Arg Ser Lys Ala Glu Glu Trp Leu Ala Ala Leu Leu Glu Leu
1 5 10 15
Ala Glu Glu Leu Leu Ala Arg Ala
20

<210> 32

<211> 24

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的两亲性 α -螺旋胆固醇流出肽T6023-6, LeuATI-5261类似物, HDL模拟肽

[0010]

<400> 32

Glu Val Arg Ser Lys Ala Glu Glu Trp Leu Ala Ala Leu Leu Glu Leu
1 5 10 15
Ala Glu Glu Leu Leu Ala Arg Ala
20

<210> 33

<211> 24

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的两亲性 α -螺旋胆固醇流出肽T6023-8, LeuATI-5261类似物, HDL模拟肽

<400> 33

Glu Val Arg Ser Lys Val Glu Glu Trp Leu Ala Ala Leu Leu Glu Leu
1 5 10 15
Ala Glu Glu Leu Leu Ala Arg Ala
20

<210> 34

<211> 26

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的两亲性 α -螺旋胆固醇流出肽T5426-1, ATI-5261类似物, HDL模拟肽

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3)... (3)

<223> Xaa = 瓜氨酸 (cit, Cit)

<400> 34

Glu Val Xaa Ser Lys Leu Glu Glu Trp Phe Ala Ala Phe Arg Glu Phe
1 5 10 15
Ala Glu Glu Phe Leu Ala Arg Leu Lys Ser
20 25

<210> 35

<211> 26

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的两亲性 α -螺旋胆固醇流出肽T5426-2, ATI-5261类似物, HDL模拟肽

<220>

<221> MOD_RES

<222> (14)... (14)

<223> Xaa = 瓜氨酸 (cit, Cit)

<400> 35

Glu Val Arg Ser Lys Leu Glu Glu Trp Phe Ala Ala Phe Xaa Glu Phe

1 5 10 15
Ala Glu Glu Phe Leu Ala Arg Leu Lys Ser
20 25

<210>	36
<211>	26
<212>	PRT
<213>	人工序列

<223> 合成的两亲性 α -螺旋胆固醇流出肽T5426-3, ATI-5261类似物, HDL模拟肽

```

<220>
<221> MOD RES
<222> (23)...(23)
<223> Xaa = 瓜氨酸 (cit, Cit)

```

<400> 36
 Glu Val Arg Ser Lys Leu Glu Glu Trp Phe Ala Ala Phe Arg Glu Phe
 1 5 10 15
 Ala Glu Glu Phe Leu Ala Xaa Leu Lys Ser
 20 25

<210>	37
<211>	26
<212>	PRT
<213>	人工序列

合成的两亲性 α -螺旋胆固醇流出肽T5426-4, ATI-5261类似物, HDL模拟肽

```

<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)... (14)
<223> Xaa = 瓜氨酸 (cit, Cit)

```

<400> 37
 Glu Val Xaa Ser Lys Leu Glu Glu Trp Phe Ala Ala Phe Xaa Glu Phe
 1 5 10 15
 Ala Glu Glu Phe Leu Ala Arg Leu Lys Ser
 20 25

$\langle 210 \rangle$	38
$\langle 211 \rangle$	26
$\langle 212 \rangle$	PRT
$\langle 213 \rangle$	人工序列

<223> 合成的两亲性 α -螺旋胆固醇流出肽T5426-5, ATI-5261类似物, HDL模拟肽

$\langle 220 \rangle$
 $\langle 221 \rangle$ MOD RES
 $\langle 222 \rangle$ $(14)^- \dots (23)$
 $\langle 223 \rangle$ Xaa = 瓜氨酸 (cit, Cit)

[0012]

<400> 38

Glu	Val	Arg	Ser	Lys	Leu	Glu	Glu	Trp	Phe	Ala	Ala	Phe	Xaa	Glu	Phe
1				5					10					15	
Ala	Glu	Glu	Phe	Leu	Ala	Xaa	Leu	Lys	Ser						
			20					25							

<210> 39

<211> 26

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的两亲性 α -螺旋胆固醇流出肽T5426-6, ATI-5261类似物, HDL模拟肽

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3)... (23)

<223> Xaa = 瓜氨酸 (cit, Cit)

<400> 39

Glu	Val	Xaa	Ser	Lys	Leu	Glu	Glu	Trp	Phe	Ala	Ala	Phe	Arg	Glu	Phe
1				5					10					15	
Ala	Glu	Glu	Phe	Leu	Ala	Xaa	Leu	Lys	Ser						
			20					25							

<210> 40

<211> 26

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的两亲性 α -螺旋胆固醇流出肽T5426-7, ATI-5261类似物, HDL模拟肽

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3)... (23)

<223> Xaa = cirulline (cit, Cit)

<400> 40

Glu	Val	Xaa	Ser	Lys	Leu	Glu	Glu	Trp	Phe	Ala	Ala	Phe	Xaa	Glu	Phe
1				5					10					15	
Ala	Glu	Glu	Phe	Leu	Ala	Xaa	Leu	Lys	Ser						
			20					25							

<210> 41

<211> 26

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的两亲性 α -螺旋胆固醇流出肽T5594-1, ATI-5261类似物

<220>

<221> MOD_RES
<222> (3)... (14)
<223> Xaa = 瓜氨酸 (cit, Cit)

<400> 41
Glu Val Xaa Ser Lys Leu Glu Glu Leu Phe Ala Ala Phe Xaa Glu Phe
1 5 10 15
Ala Glu Glu Phe Leu Ala Arg Leu Lys Ser
20 25

<210> 42
<211> 26
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的两亲性 α -螺旋胆固醇流出肽T5594-2, ATI-5261类似物

<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)... (14)
<223> Xaa = 瓜氨酸 (cit, Cit)

<400> 42
Glu Val Xaa Ser Lys Leu Glu Glu Ala Phe Ala Ala Phe Xaa Glu Phe
1 5 10 15
Ala Glu Glu Phe Leu Ala Arg Leu Lys Ser
20 25

[0013]

<210> 43
<211> 26
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的两亲性 α -螺旋胆固醇流出肽T5594-3, ATI-5261类似物

<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)... (14)
<223> Xaa = 瓜氨酸 (cit, Cit)

<400> 43
Glu Val Xaa Ser Lys Leu Glu Glu Val Phe Ala Ala Phe Xaa Glu Phe
1 5 10 15
Ala Glu Glu Phe Leu Ala Arg Leu Lys Ser
20 25

<210> 44
<211> 26
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的两亲性 α -螺旋胆固醇流出肽T5237-1, LeuATI-5261类似物

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3)... (3)

<223> Xaa = 瓜氨酸 (cit, Cit)

<400> 44

Glu	Val	Xaa	Ser	Lys	Leu	Glu	Glu	Trp	Leu	Ala	Ala	Leu	Arg	Glu	Leu
1				5				10						15	
Ala	Glu	Glu	Leu	Leu	Ala	Arg	Leu	Lys	Ser						
			20					25							

<210> 45

<211> 26

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的两亲性 α -螺旋胆固醇流出肽T5237-2, LeuATI-5261类似物

<220>

<221> MOD_RES

<222> (14)... (14)

<223> Xaa = 瓜氨酸 (cit, Cit)

<400> 45

[0014]

Glu	Val	Arg	Ser	Lys	Leu	Glu	Glu	Trp	Leu	Ala	Ala	Leu	Xaa	Glu	Leu
1				5				10						15	
Ala	Glu	Glu	Leu	Leu	Ala	Arg	Leu	Lys	Ser						
			20					25							

<210> 46

<211> 26

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的两亲性 α -螺旋胆固醇流出肽T5237-3, LeuATI-5261类似物

<220>

<221> MOD_RES

<222> (23)... (23)

<223> Xaa = 瓜氨酸 (cit, Cit)

<400> 46

Glu	Val	Arg	Ser	Lys	Leu	Glu	Glu	Trp	Phe	Ala	Ala	Phe	Arg	Glu	Phe
1				5				10						15	
Ala	Glu	Glu	Phe	Leu	Ala	Xaa	Leu	Lys	Ser						
			20					25							

<210> 47

<211> 26

<212> PRT

[0015]

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的两亲性 α -螺旋胆固醇流出肽T5237-4 (CS6253), LeuATI-5261类似物

<220>

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3)... (14)

<223> Xaa = 瓜氨酸 (cit, Cit)

<400> 47

Glu	Val	Xaa	Ser	Lys	Leu	Glu	Glu	Trp	Leu	Ala	Ala	Leu	Xaa	Glu	Leu
1				5				10					15		
Ala	Glu	Glu	Leu	Leu	Ala	Arg	Leu	Lys	Ser						
			20				25								

<210> 48

<211> 26

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的两亲性 α -螺旋胆固醇流出肽T5237-5, LeuATI-5261类似物

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3)... (23)

<223> Xaa = 瓜氨酸 (cit, Cit)

<400> 48

Glu	Val	Xaa	Ser	Lys	Leu	Glu	Glu	Trp	Phe	Ala	Ala	Phe	Arg	Glu	Phe
1				5				10					15		
Ala	Glu	Glu	Phe	Leu	Ala	Xaa	Leu	Lys	Ser						
			20				25								

<210> 49

<211> 26

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的两亲性 α -螺旋胆固醇流出肽T5237-6, LeuATI-5261类似物

<220>

<221> MOD_RES

<222> (14)... (23)

<223> Xaa = 瓜氨酸 (cit, Cit)

<400> 49

Glu	Val	Arg	Ser	Lys	Leu	Glu	Glu	Trp	Phe	Ala	Ala	Phe	Xaa	Glu	Phe
1				5				10					15		
Ala	Glu	Glu	Phe	Leu	Ala	Xaa	Leu	Lys	Ser						
			20				25								

<210> 50
<211> 26
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的两亲性 α -螺旋胆固醇流出肽T5237-7, LeuATI-5261类似物

<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)... (23)
<223> Xaa = 瓜氨酸 (cit, Cit)

<400> 50
Glu Val Xaa Ser Lys Leu Glu Glu Trp Phe Ala Ala Phe Xaa Glu Phe
1 5 10 15
Ala Glu Glu Phe Leu Ala Xaa Leu Lys Ser
20 25

<210> 51
<211> 26
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的两亲性 α -螺旋胆固醇流出肽T5237-9, LeuATI-5261类似物

[0016]

<220>
<221> MOD_RES
<222> (14)... (14)
<223> Xaa = 瓜氨酸 (cit, Cit)

<400> 51
Glu Val Arg Ser Lys Leu Glu Glu Leu Leu Ala Ala Leu Xaa Glu Leu
1 5 10 15
Ala Glu Glu Leu Leu Ala Arg Ala Lys Ser
20 25

<210> 52
<211> 26
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的两亲性 α -螺旋胆固醇流出肽T5237-11, LeuATI-5261类似物

<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)... (14)
<223> Xaa = 瓜氨酸 (cit, Cit)

<400> 52
Glu Val Xaa Ser Lys Leu Glu Glu Leu Leu Ala Ala Leu Xaa Glu Leu
1 5 10 15

Ala Glu Glu Leu Leu Ala Arg Ala Lys Ser
20 25

<210> 53
<211> 26
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的两亲性 α -螺旋胆固醇流出肽T5554-1, HDL模拟肽

<400> 53
Glu Val Arg Ser Lys Leu Gln Glu Trp Phe Ala Ala Phe Arg Glu Phe
1 5 10 15
Ala Gln Glu Phe Leu Ala Arg Leu Lys Ser
20 25

<210> 54
<211> 26
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的两亲性 α -螺旋胆固醇流出肽T5554-2, HDL模拟肽

[0017] <400> 54
Glu Val Arg Ser Lys Leu Gln Glu Trp Phe Ala Ala Phe Arg Glu Phe
1 5 10 15
Ala Glu Glu Phe Leu Ala Arg Leu Lys Ser
20 25

<210> 55
<211> 26
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的两亲性 α -螺旋胆固醇流出肽T5554-3, HDL模拟肽

<400> 55
Glu Val Arg Ser Lys Leu Glu Glu Trp Phe Ala Ala Phe Arg Glu Phe
1 5 10 15
Ala Gln Glu Phe Leu Ala Arg Leu Lys Ser
20 25

<210> 56
<211> 26
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的两亲性 α -螺旋胆固醇流出肽T5554-4, HDL模拟肽

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)... (3)
 <223> Xaa = 瓜氨酸 (cit, Cit)

<400> 56
 Glu Val Xaa Ser Lys Leu Gln Glu Trp Phe Ala Ala Phe Arg Glu Phe
 1 5 10 15
 Ala Glu Glu Phe Leu Ala Arg Leu Lys Ser
 20 25

<210> 57
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的两亲性 α -螺旋胆固醇流出肽T5554-5, HDL模拟肽

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)... (14)
 <223> Xaa = 瓜氨酸 (cit, Cit)

<400> 57
 Glu Val Xaa Ser Lys Leu Gln Glu Trp Phe Ala Ala Phe Xaa Glu Phe
 1 5 10 15
 [0018] Ala Gln Glu Phe Leu Ala Arg Leu Lys Ser
 20 25

<210> 58
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的两亲性 α -螺旋胆固醇流出肽T5554-6, HDL模拟肽

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)... (23)
 <223> Xaa = 瓜氨酸 (cit, Cit)

<400> 58
 Glu Val Xaa Ser Lys Leu Gln Glu Trp Phe Ala Ala Phe Xaa Glu Phe
 1 5 10 15
 Ala Gln Gln Phe Leu Ala Xaa Leu Lys Ser
 20 25

<210> 59
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的两亲性 α -螺旋胆固醇流出肽T5554-7, HDL模拟肽

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)... (14)
 <223> Xaa = 瓜氨酸 (cit, Cit)

<400> 59
 Glu Val Xaa Ser Lys Leu Gln Glu Trp Phe Ala Ala Phe Xaa Glu Phe
 1 5 10 15
 Ala Glu Glu Phe Leu Ala Arg Leu Lys Ser
 20 25

<210> 60
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的两亲性 α -螺旋胆固醇流出肽T5554-8, HDL模拟肽

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)... (14)
 <223> Xaa = 瓜氨酸 (cit, Cit)

[0019] <400> 60
 Glu Val Xaa Ser Lys Leu Glu Glu Trp Phe Ala Ala Phe Xaa Glu Phe
 1 5 10 15
 Ala Gln Glu Phe Leu Ala Arg Leu Lys Ser
 20 25

<210> 61
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的两亲性 α -螺旋胆固醇流出肽T5554-9, HDL模拟肽

<400> 61
 Glu Val Arg Ser Lys Leu Gln Glu Trp Leu Ala Ala Leu Arg Glu Leu
 1 5 10 15
 Ala Glu Glu Leu Leu Ala Arg Leu Lys Ser
 20 25

<210> 62
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的两亲性 α -螺旋胆固醇流出肽T5554-10, HDL模拟肽

[0020]

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3)... (3)

<223> Xaa = 瓜氨酸 (cit, Cit)

<400> 62

Glu	Val	Xaa	Ser	Lys	Leu	Gln	Glu	Trp	Leu	Ala	Ala	Leu	Arg	Glu	Leu
1				5				10					15		
Ala	Glu	Glu	Leu	Leu	Ala	Arg	Leu	Lys	Ser						
			20				25								

<210> 63

<211> 26

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的两亲性 α -螺旋胆固醇流出肽T5766-6, LeuATI-5261类似物

<400> 63

Glu	Val	Arg	Ser	Lys	Leu	Glu	Glu	Trp	Leu	Ala	Ala	Leu	Arg	Glu	Leu
1				5				10					15		
Ala	Glu	Glu	Leu	Leu	Ala	Arg	Leu	Lys	Ser						
			20				25								

<210> 64

<211> 24

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的两亲性 α -螺旋胆固醇流出肽T6023-1, Cit. LeuATI-5261类似物

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3)... (14)

<223> Xaa = 瓜氨酸 (cit, Cit)

<400> 64

Glu	Val	Xaa	Ser	Lys	Leu	Glu	Glu	Trp	Leu	Ala	Ala	Leu	Xaa	Glu	Leu
1				5				10					15		
Ala	Glu	Glu	Leu	Leu	Ala	Arg	Leu								
			20												

<210> 65

<211> 26

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的两亲性 α -螺旋胆固醇流出肽T6623-2, Cit. LeuATI-5261类似物, HDL模拟肽

<220>

[0021]

<221> MOD_RES

<222> (14)... (14)

<223> Xaa = 瓜氨酸 (cit, Cit)

<400> 65

Glu	Val	Leu	Ser	Lys	Leu	Glu	Glu	Trp	Leu	Ala	Ala	Leu	Xaa	Glu	Leu
1				5				10					15		
Ala	Glu	Glu	Leu	Leu	Ala	Arg	Leu	Lys	Ser						
			20				25								

<210> 66

<211> 26

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的两亲性 α -螺旋胆固醇流出肽T6275-3, Cit.LeuATI-5261类似物, HDL模拟肽

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3)... (14)

<223> Xaa = 瓜氨酸 (cit, Cit)

<400> 66

Glu	Leu	Xaa	Ser	Lys	Leu	Glu	Glu	Trp	Leu	Ala	Ala	Leu	Xaa	Glu	Leu
1				5				10					15		
Ala	Glu	Glu	Leu	Leu	Ala	Arg	Leu	Lys	Ser						
			20				25								

<210> 67

<211> 26

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的两亲性 α -螺旋胆固醇流出肽T6275-5, Cit.LeuATI-5261类似物

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3)... (3)

<223> Xaa = 瓜氨酸 (cit, Cit)

<400> 67

Glu	Val	Xaa	Ser	Lys	Leu	Glu	Glu	Trp	Leu	Ala	Ala	Leu	Leu	Glu	Leu
1				5				10					15		
Ala	Glu	Glu	Leu	Leu	Ala	Arg	Leu	Lys	Ser						
			20				25								

<210> 68

<211> 26

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的两亲性 α -螺旋胆固醇流出肽T6623-1, Cit. LeuATI-5261类似物

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3)... (3)

<223> Xaa = 瓜氨酸 (cit, Cit)

<400> 68

Glu	Leu	Xaa	Ser	Lys	Leu	Glu	Glu	Trp	Leu	Ala	Ala	Leu	Leu	Glu	Leu
1				5					10					15	
Ala	Glu	Glu	Leu	Leu	Ala	Arg	Leu	Lys	Ser						
			20					25							

<210> 69

<211> 26

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的两亲性 α -螺旋胆固醇流出肽T6623-3, Cit. LeuATI-5261类似物

<220>

<221> MOD_RES

<222> (14)... (14)

<223> Xaa = 瓜氨酸 (cit, Cit)

[0022]

<400> 69

Glu	Leu	Leu	Ser	Lys	Leu	Glu	Glu	Trp	Leu	Ala	Ala	Leu	Xaa	Glu	Leu
1				5					10					15	
Ala	Glu	Glu	Leu	Leu	Ala	Arg	Leu	Lys	Ser						
			20					25							

<210> 70

<211> 26

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的两亲性 α -螺旋胆固醇流出肽T6623-4, Cit. LeuATI-5261类似物

<400> 70

Glu	Val	Leu	Ser	Lys	Leu	Glu	Glu	Trp	Leu	Ala	Ala	Leu	Leu	Glu	Leu
1				5					10					15	
Ala	Glu	Glu	Leu	Leu	Ala	Arg	Leu	Lys	Ser						
			20					25							

<210> 71

<211> 26

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的两亲性 α -螺旋胆固醇流出肽T6623-5, Cit. LeuATI-5261类似物

<400> 71
Glu Leu Leu Ser Lys Leu Glu Glu Trp Leu Ala Ala Leu Leu Glu Leu
1 5 10 15
Ala Glu Glu Leu Leu Ala Arg Leu Lys Ser
20 25

<210> 72
<211> 24
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的两亲性 α -螺旋胆固醇流出肽T6623-6, Cit.LeuATI-5261类似物

<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)... (3)
<223> Xaa = 瓜氨酸 (cit, Cit)

<400> 72
Glu Leu Xaa Ser Lys Leu Glu Glu Trp Leu Ala Ala Leu Leu Glu Leu
1 5 10 15
Ala Glu Glu Leu Leu Ala Arg Leu
20

[0023]

<210> 73
<211> 24
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的两亲性 α -螺旋胆固醇流出肽T6623-7, Cit.LeuATI-5261类似物

<220>
<221> MOD_RES
<222> (14)... (14)
<223> Xaa = 瓜氨酸 (cit, Cit)

<400> 73
Glu Val Leu Ser Lys Leu Glu Glu Trp Leu Ala Ala Leu Xaa Glu Leu
1 5 10 15
Ala Glu Glu Leu Leu Ala Arg Leu
20

<210> 74
<211> 24
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的两亲性 α -螺旋胆固醇流出肽T6623-8, Cit.LeuATI-5261类似物

<220>
<221> MOD_RES

<222> (14)...(14)

<223> Xaa = 瓜氨酸 (cit, Cit)

<400> 74

Glu Leu Leu Ser Lys Leu Glu Glu Trp Leu Ala Ala Leu Xaa Glu Leu
1 5 10 15
Ala Glu Glu Leu Leu Ala Arg Leu
20

<210> 75

<211> 24

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的两亲性 α -螺旋胆固醇流出肽T6623-9, Cit. LeuATI-5261类似物

<400> 75

Glu Val Leu Ser Lys Leu Glu Glu Trp Leu Ala Ala Leu Leu Glu Leu
1 5 10 15
Ala Glu Glu Leu Leu Ala Arg Leu
20

<210> 76

<211> 24

<212> PRT

[0024] <213> 人工序列

<220>

<223> 合成的两亲性 α -螺旋胆固醇流出肽T6623-10, Cit. LeuATI-5261类似物

<400> 76

Glu Leu Leu Ser Lys Leu Glu Glu Trp Leu Ala Ala Leu Leu Glu Leu
1 5 10 15
Ala Glu Glu Leu Leu Ala Arg Leu
20

<210> 77

<211> 24

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的两亲性 α -螺旋胆固醇流出肽T6623-11, Cit. LeuATI-5261类似物

<400> 77

Glu Leu Arg Ser Lys Leu Glu Glu Trp Leu Ala Ala Leu Leu Glu Leu
1 5 10 15
Ala Glu Glu Leu Leu Ala Arg Leu
20

<210> 78

<211> 24

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的两亲性 α -螺旋胆固醇流出肽T6623-12, Cit. LeuATI-5261类似物

<400> 78
Glu Leu Leu Ser Lys Leu Glu Glu Trp Leu Ala Ala Leu Arg Glu Leu
1 5 10 15
Ala Glu Glu Leu Leu Ala Arg Leu
20

<210> 79
<211> 26
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的两亲性 α -螺旋胆固醇流出肽T6991-1, ATI-5261类似物

<400> 79
Glu Val Arg Ser Lys Leu Glu Glu Trp Ile Ala Ala Ile Arg Glu Ile
1 5 10 15
Ala Glu Glu Ile Leu Ala Arg Leu Lys Ser
20 25

[0025] <210> 80
<211> 26
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的两亲性 α -螺旋胆固醇流出肽T6991-2, ATI-5261类似物

<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)... (14)
<223> Xaa = 瓜氨酸 (cit, Cit)

<400> 80
Glu Val Xaa Ser Lys Leu Glu Glu Trp Ile Ala Ala Ile Xaa Glu Ile
1 5 10 15
Ala Glu Glu Ile Leu Ala Arg Leu Lys Ser
20 25

<210> 81
<211> 26
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的两亲性 α -螺旋胆固醇流出肽T6991-3, ATI-5261类似物

<400> 81

Glu Val Arg Ala Lys Leu Glu Glu Trp Phe Ala Ala Phe Arg Glu Phe
1 5 10 15
Ser Glu Glu Phe Leu Ala Arg Leu Lys Ser
20 25

<210> 82
<211> 26
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的两亲性 α -螺旋胆固醇流出肽T6991-4, ATI-5261类似物

<400> 82
Glu Val Arg Ser Lys Leu Glu Glu Trp Phe Ala Ala Phe Arg Glu Phe
1 5 10 15
Ser Glu Glu Phe Leu Ala Arg Leu Lys Ala
20 25

<210> 83
<211> 26
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的两亲性 α -螺旋胆固醇流出肽T6991-5

[0026]

<400> 83
Glu Val Arg Ser Lys Leu Glu Glu Trp Phe Ala Ala Phe Arg Glu Phe
1 5 10 15
Ser Glu Glu Phe Leu Ala Arg Leu Lys Ser
20 25

<210> 84
<211> 26
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的两亲性 α -螺旋胆固醇流出肽T6991-6, ATI-5261类似物

<400> 84
Glu Val Arg Ser Lys Leu Glu Glu Trp Phe Ala Ala Phe Arg Glu Phe
1 5 10 15
Tyr Glu Glu Phe Leu Ala Arg Leu Lys Ser
20 25

<210> 85
<211> 26
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

[0027]

<223> 合成的两亲性 α -螺旋胆固醇流出肽T6991-7, ATI-5261类似物

<400> 85

Glu	Val	Arg	Ser	Lys	Leu	Glu	Glu	Tyr	Phe	Ala	Ala	Phe	Arg	Glu	Phe
1				5				10						15	
Ala	Glu	Glu	Phe	Leu	Ala	Arg	Leu	Lys	Ser						
			20					25							

<210> 86

<211> 26

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的两亲性 α -螺旋胆固醇流出肽T6991-8, ATI-5261类似物

<400> 86

Glu	Val	Arg	Ser	Lys	Leu	Glu	Glu	Trp	Phe	Ala	Ala	Phe	Arg	Glu	Phe
1				5				10						15	
Ala	Glu	Glu	Phe	Leu	Ala	Arg	Ser	Lys	Leu						
			20					25							

<210> 87

<211> 26

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的两亲性 α -螺旋胆固醇流出肽T6991-9, ATI-5261类似物

<400> 87

Glu	Val	Arg	Ser	Lys	Leu	Glu	Glu	Trp	Phe	Ala	Ala	Phe	Arg	Glu	Phe
1				5				10						15	
Tyr	Glu	Glu	Phe	Leu	Ala	Arg	Ser	Lys	Leu						
			20					25							

<210> 88

<211> 26

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的两亲性 α -螺旋胆固醇流出肽T6275-1, LeuATI-5261类似物, CS6253类似物

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3)... (14)

<223> Xaa = 瓜氨酸 (cit, Cit)

<400> 88

Glu	Val	Xaa	Ser	Lys	Leu	Glu	Glu	Trp	Leu	Ala	Ala	Leu	Xaa	Glu	Leu
1				5				10						15	
Ala	Glu	Glu	Leu	Leu	Ala	Arg	Leu	Lys	Tyr						
			20					25							

[0028]

<210> 89

<211> 26

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的两亲性 α -螺旋胆固醇流出肽CS6257 (CS6257A), ATI-5261类似物, i, i+7环钩肽

<220>

<221> MOD_RES

<222> (14)... (14)

<223> Xaa = S- α -甲基, α -n-戊烯基甘氨酸(S5), R-4, 11S(11)环化交联至R8(在位置21处)

<220>

<221> MOD_RES

<222> (21)... (21)

<223> Xaa = R- α -甲基, α -n-辛烯基甘氨酸(R8), R-4, 11S(11)环化交联至S5(在位置14处)

<400> 89

Glu	Val	Ala	Ser	Lys	Leu	Glu	Glu	Trp	Phe	Ala	Ala	Phe	Xaa	Glu	Phe
1				5					10					15	
Ala	Glu	Glu	Phe	Xaa	Ala	Ala	Leu	Lys	Ser						
			20					25							

<210> 90

<211> 26

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的两亲性 α -螺旋胆固醇流出肽CS6259, LeuATI-5261类似物, i, i+7环钩肽

<220>

<221> MOD_RES

<222> (14)... (14)

<223> Xaa = R- α -甲基, α -n-辛烯基甘氨酸(R8), R-4, 11S(11)环化交联至S5(在位置21处)

<220>

<221> MOD_RES

<222> (21)... (21)

<223> Xaa = S- α -甲基, α -n-戊烯基甘氨酸(S5), R-4, 11S(11)环化交联至R8(在位置14处)

<400> 90

Glu	Val	Gln	Ser	Lys	Leu	Glu	Glu	Trp	Leu	Ala	Ala	Leu	Xaa	Glu	Leu
1				5					10					15	
Ala	Glu	Glu	Leu	Xaa	Ala	Gln	Leu	Lys	Ser						
			20					25							

<210> 91

<211> 26

<212> PRT

<213> 人工序列

[0029]

<220>

<223> 合成的两亲性 α -螺旋胆固醇流出肽CS6256A, ATI-5261类似物, i, i+7环钩肽

<220>

<221> MOD_RES

<222> (14)... (14)

<223> Xaa = S- α -甲基, α -n-戊烯基甘氨酸(S5), R-4, 11S(11)环化交联至R8(在位置21处)

<220>

<221> MOD_RES

<222> (21)... (21)

<223> Xaa = R- α -甲基, α -n-戊烯基甘氨酸(R8), R-4, 11S(11)环化交联至S5(在位置14处)

<400> 91

Glu	Val	Gln	Ser	Lys	Leu	Glu	Glu	Trp	Phe	Ala	Ala	Phe	Xaa	Glu	Phe
1				5				10						15	
Ala	Glu	Glu	Phe	Xaa	Ala	Gln	Leu	Lys	Ser						
			20				25								

<210> 92

<211> 24

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的两亲性 α -螺旋胆固醇流出肽T7983-1, CitLeuATI-5261 (CS6253)类似物

<400> 92

Glu	Val	Arg	Ser	Lys	Leu	Glu	Glu	Trp	Ile	Ala	Ala	Ile	Arg	Glu	Ile
1				5				10						15	
Ala	Glu	Glu	Ile	Leu	Ala	Arg	Leu								
			20												

<210> 93

<211> 24

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的两亲性 α -螺旋胆固醇流出肽T7983-2, CitLeuATI-5261 (CS6253)类似物

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3)... (14)

<223> Xaa = 瓜氨酸 (cit, Cit)

<400> 93

Glu	Val	Xaa	Ser	Lys	Leu	Glu	Glu	Trp	Ile	Ala	Ala	Ile	Xaa	Glu	Ile
1				5				10						15	
Ala	Glu	Glu	Ile	Leu	Ala	Arg	Leu								
			20												

<210> 94

<211> 26

[0030]

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的两亲性 α -螺旋胆固醇流出肽T7983-3, CitLeuATI-5261 (CS6253)类似物

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3)... (14)

<223> Xaa = 瓜氨酸 (cit, Cit)

<400> 94

Glu	Val	Xaa	Ser	Lys	Leu	Glu	Glu	Trp	Leu	Ala	Ala	Leu	Xaa	Glu	Leu
1				5				10					15		
Ala	Glu	Glu	Ile	Leu	Ala	Arg	Leu	Lys	Ser						
			20				25								

<210> 95

<211> 26

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的两亲性 α -螺旋胆固醇流出肽T7983-4, CitLeuATI-5261 (CS6253)类似物

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3)... (14)

<223> Xaa = 瓜氨酸 (cit, Cit)

<400> 95

Glu	Val	Xaa	Ser	Lys	Leu	Glu	Glu	Trp	Ile	Ala	Ala	Leu	Xaa	Glu	Leu
1				5				10					15		
Ala	Glu	Glu	Ile	Leu	Ala	Arg	Leu	Lys	Ser						
			20				25								

<210> 96

<211> 26

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的两亲性 α -螺旋胆固醇流出肽T7983-5, CitLeuATI-5261 (CS6253)类似物

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3)... (14)

<223> Xaa = 瓜氨酸 (cit, Cit)

<400> 96

Glu	Val	Xaa	Ser	Lys	Leu	Glu	Glu	Trp	Leu	Ala	Ala	Ile	Xaa	Glu	Ile
1				5				10					15		
Ala	Glu	Glu	Leu	Leu	Ala	Arg	Leu	Lys	Ser						
			20				25								

[0031]

<210> 97
<211> 26
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的两亲性 α -螺旋胆固醇流出肽T7983-6, CitLeuATI-5261 (CS6253)类似物

<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)... (14)
<223> Xaa = 瓜氨酸 (cit, Cit)

<400> 97
Glu Val Xaa Ser Lys Leu Glu Glu Trp Ile Ala Ala Ile Xaa Glu Ile
1 5 10 15
Ala Glu Glu Leu Leu Ala Arg Leu Lys Ser
20 25

<210> 98
<211> 26
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的两亲性 α -螺旋胆固醇流出肽T7983-7, CitLeuATI-5261 (CS6253)类似物

<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)... (14)
<223> Xaa = 瓜氨酸 (cit, Cit)

<400> 98
Glu Val Xaa Ser Lys Leu Glu Glu Trp Leu Ala Ala Ile Xaa Glu Ile
1 5 10 15
Ala Glu Glu Ile Leu Ala Arg Leu Lys Ser
20 25

<210> 99
<211> 26
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的两亲性 α -螺旋胆固醇流出肽T7983-8, CitLeuATI-5261 (CS6253)类似物

<220>
<221> MOD_RES
<222> (14)... (14)
<223> Xaa = 瓜氨酸 (cit, Cit)

<400> 99
Glu Val Ile Ser Lys Leu Glu Glu Trp Leu Ala Ala Leu Xaa Glu Leu
1 5 10 15

[0032]

Ala Glu Glu Leu Leu Ala Arg Leu Lys Ser
 20 25

<210> 100

<211> 26

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的两亲性 α -螺旋胆固醇流出肽T7983-9, CitLeuATI-5261 (CS6253)类似物

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3)... (3)

<223> Xaa = 瓜氨酸 (cit, Cit)

<400> 100

Glu Val Xaa Ser Lys Leu Glu Glu Trp Leu Ala Ala Leu Ile Glu Leu
 1 5 10 15
 Ala Glu Glu Leu Leu Ala Arg Leu Lys Ser
 20 25

<210> 101

<211> 26

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的两亲性 α -螺旋胆固醇流出肽T7983-10, LeuATI-5261类似物

<400> 101

Glu Val Ile Ser Lys Leu Glu Glu Trp Leu Ala Ala Leu Ile Glu Leu
 1 5 10 15
 Ala Glu Glu Leu Leu Ala Arg Leu Lys Ser
 20 25

<210> 102

<211> 26

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的两亲性 α -螺旋胆固醇流出肽T8212-1, CitLeuATI-5261 (CS6253)类似物

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3)... (14)

<223> Xaa = 瓜氨酸 (cit, Cit)

<400> 102

Glu Val Xaa Ser Lys Leu Glu Glu Trp Ile Ala Ala Leu Xaa Glu Leu
 1 5 10 15
 Ala Glu Glu Leu Leu Ala Arg Leu Lys Ser
 20 25

[0033]

<210> 103
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的两亲性 α -螺旋胆固醇流出肽T8212-2, CitLeuATI-5261 (CS6253)类似物

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)... (14)
 <223> Xaa = 瓜氨酸 (cit, Cit)

<400> 103
 Glu Val Xaa Ser Lys Leu Glu Glu Trp Leu Ala Ala Ile Xaa Glu Leu
 1 5 10 15
 Ala Glu Glu Leu Leu Ala Arg Leu Lys Ser
 20 25

<210> 104
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的两亲性 α -螺旋胆固醇流出肽T8212-3, CitLeuATI-5261 (CS6253)类似物

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)... (14)
 <223> Xaa = 瓜氨酸 (cit, Cit)

<400> 104
 Glu Val Xaa Ser Lys Leu Glu Glu Trp Leu Ala Ala Leu Xaa Glu Ile
 1 5 10 15
 Ala Glu Glu Leu Leu Ala Arg Leu Lys Ser
 20 25

<210> 105
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的两亲性 α -螺旋胆固醇流出肽T8212-4, CitLeuATI-5261 (CS6253)类似物

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)... (14)
 <223> Xaa = 瓜氨酸 (cit, Cit)

<400> 105
 Glu Val Xaa Ser Lys Leu Glu Glu Trp Ile Ala Ala Leu Xaa Glu Leu

[0034]

1	5	10	15						
Ala	Glu	Glu	Ile	Leu	Ala	Arg	Leu	Lys	Ser
			20					25	

<210> 106

<211> 26

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的两亲性 α -螺旋胆固醇流出肽T8212-5, CitLeuATI-5261 (CS6253)类似物

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3)... (14)

<223> Xaa = 瓜氨酸 (cit, Cit)

<400> 106

Glu	Val	Xaa	Ser	Lys	Ile	Glu	Glu	Trp	Ile	Ala	Ala	Leu	Xaa	Glu	Leu
1				5				10						15	
Ala	Glu	Glu	Ile	Leu	Ala	Arg	Leu	Lys	Ser						
			20					25							

<210> 107

<211> 26

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的两亲性 α -螺旋胆固醇流出肽T8212-6, CitLeuATI-5261 (CS6253)类似物

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3)... (14)

<223> Xaa = 瓜氨酸 (cit, Cit)

<400> 107

Glu	Val	Xaa	Ser	Lys	Ile	Glu	Glu	Trp	Leu	Ala	Ala	Ile	Xaa	Glu	Ile
1				5				10						15	
Ala	Glu	Glu	Leu	Leu	Ala	Arg	Leu	Lys	Ser						
			20					25							

<210> 108

<211> 26

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的两亲性 α -螺旋胆固醇流出肽T8212-7, CitLeuATI-5261 (CS6253)类似物

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3)... (14)

<223> Xaa = 瓜氨酸 (cit, Ciit)

[0035]

<400> 108

Glu	Val	Xaa	Ser	Lys	Ile	Glu	Glu	Trp	Ile	Ala	Ala	Ile	Xaa	Glu	Ile
1				5					10					15	
Ala	Glu	Glu	Leu	Leu	Ala	Arg	Leu	Lys	Ser						
			20					25							

<210> 109

<211> 26

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的两亲性 α -螺旋胆固醇流出肽T8212-8, CitLeuATI-5261 (CS6253)类似物

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3)... (14)

<223> Xaa = 瓜氨酸 (cit, Cit)

<400> 109

Glu	Val	Xaa	Ser	Lys	Ile	Glu	Glu	Trp	Ile	Ala	Ala	Ile	Xaa	Glu	Ile
1				5					10					15	
Ala	Glu	Glu	Ile	Leu	Ala	Arg	Leu	Lys	Ser						
			20					25							

<210> 110

<211> 26

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的两亲性 α -螺旋胆固醇流出肽T8212-9, CitLeuATI-5261 (CS6253)类似物

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3)... (14)

<223> Xaa = 瓜氨酸 (cit, Cit)

<400> 110

Glu	Val	Xaa	Ser	Lys	Ile	Glu	Glu	Trp	Ile	Ala	Ala	Ile	Xaa	Glu	Ile
1				5					10					15	
Ala	Glu	Glu	Ile	Ile	Ala	Arg	Leu	Lys	Ser						
			20					25							

<210> 111

<211> 26

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的两亲性 α -螺旋胆固醇流出肽T8212-10, CitLeuATI-5261 (CS6253)类似物

<220>

<221> MOD_RES
<222> (3)... (14)
<223> Xaa = 瓜氨酸 (cit, Cit)

<400> 111
Glu Val Xaa Ser Lys Ile Glu Glu Trp Ile Ala Ala Ile Xaa Glu Ile
1 5 10 15
Ala Glu Glu Ile Ile Ala Arg Ile Lys Ser
20 25

<210> 112
<211> 26
<212> PRT
[0036] <213> 人工序列

<220>
<223> 合成的两亲性 α -螺旋胆固醇流出肽T7983-11, ATI-5261类似物

<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)... (14)
<223> Xaa = 瓜氨酸 (cit, Cit)

<400> 112
Glu Val Xaa Ser Lys Leu Glu Glu Trp Ile Ala Ala Ile Xaa Glu Ile
1 5 10 15
Ala Glu Glu Ile Leu Ala Arg Leu Lys Tyr
20 25

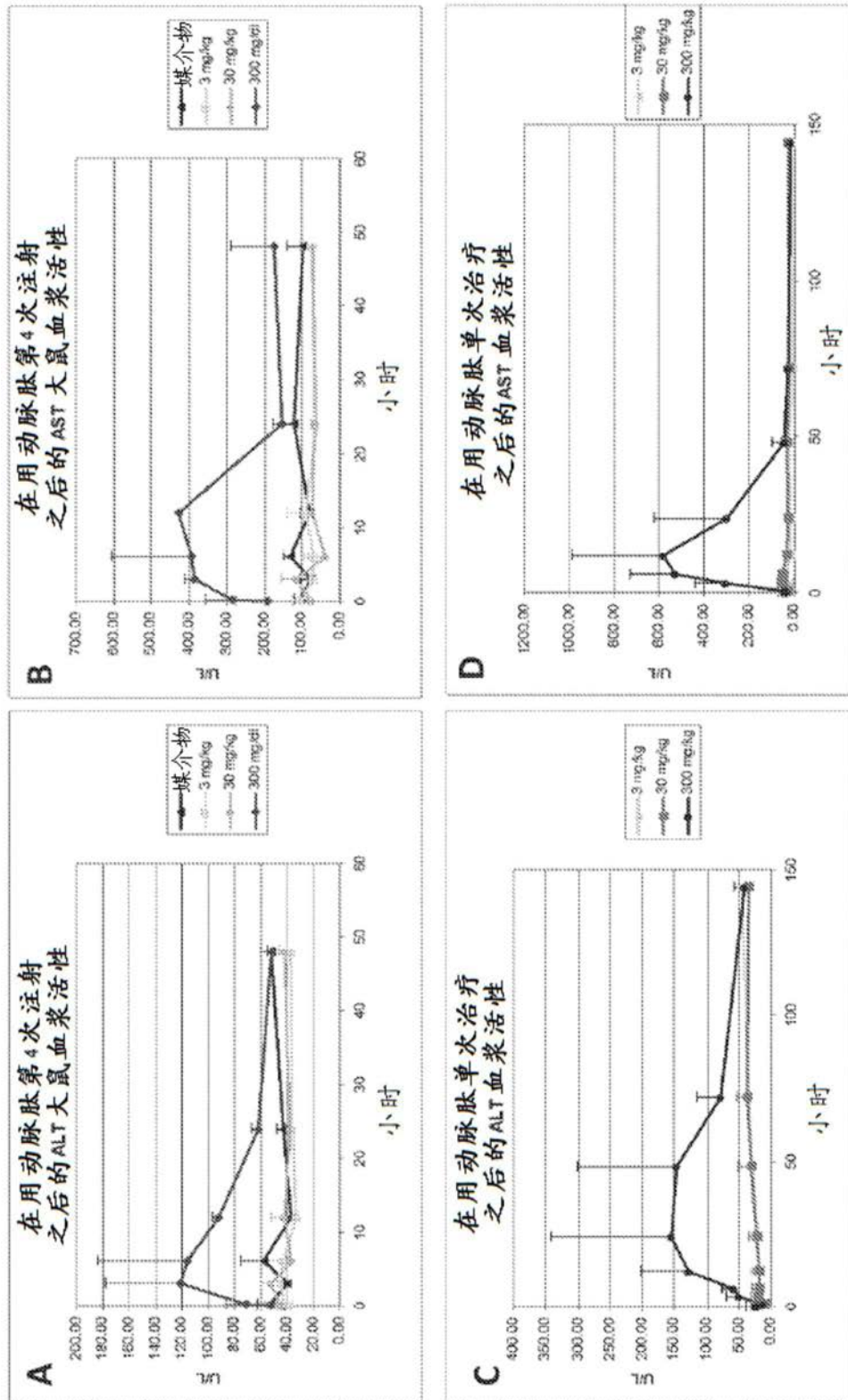


图1

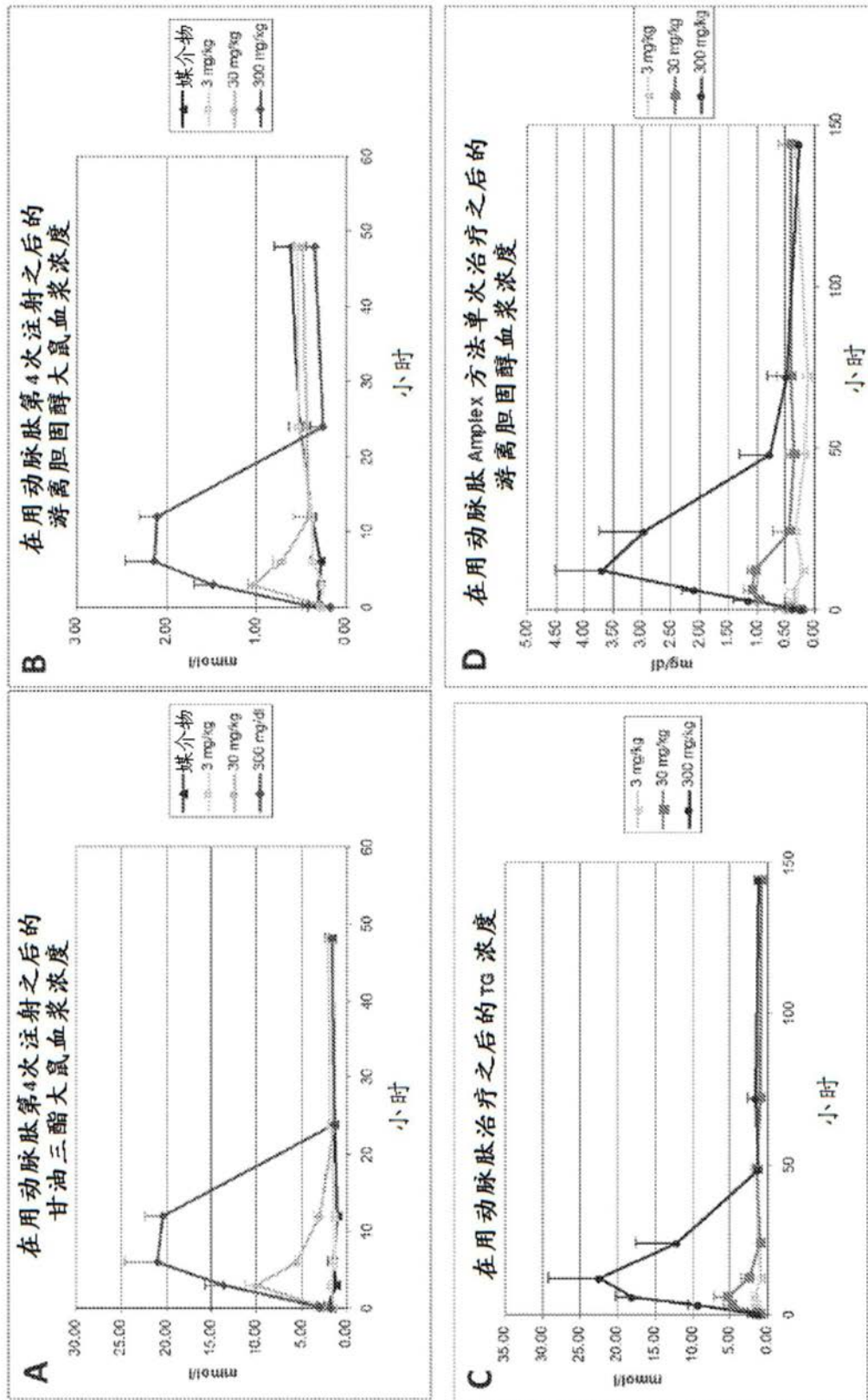


图2

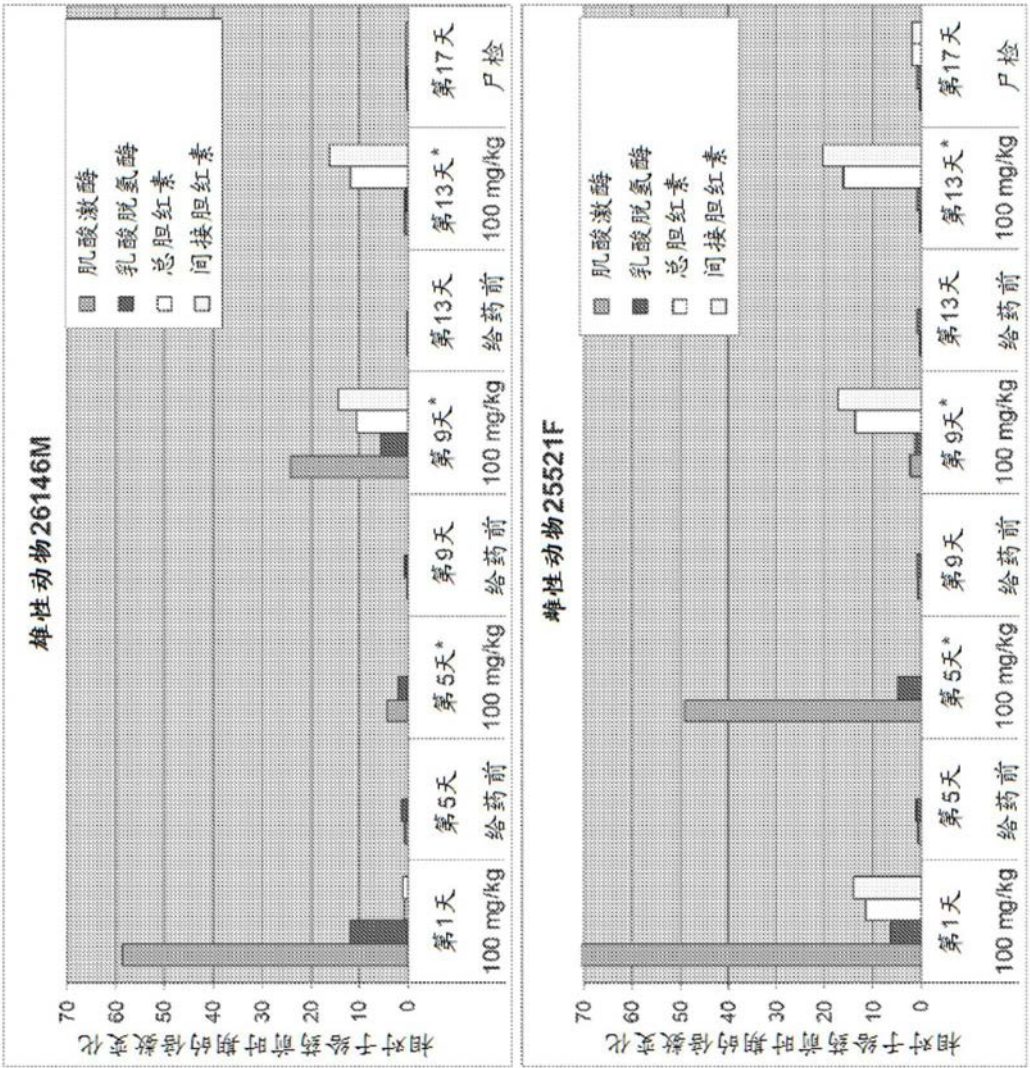


图3

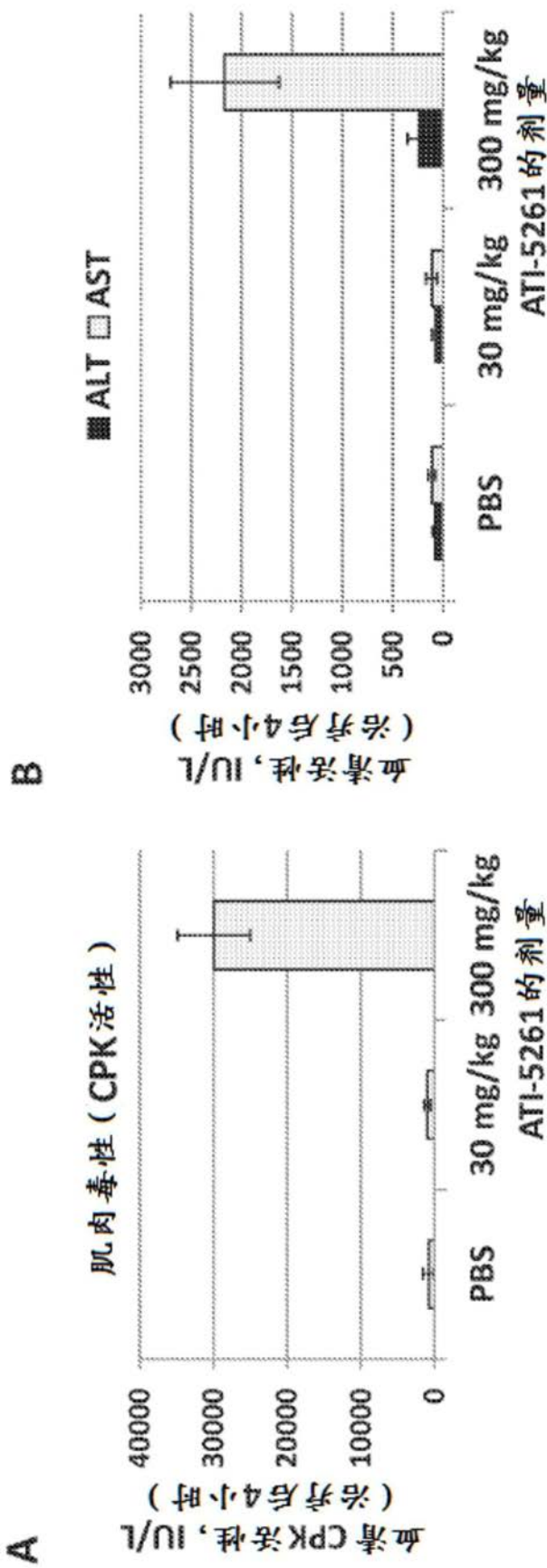


图4

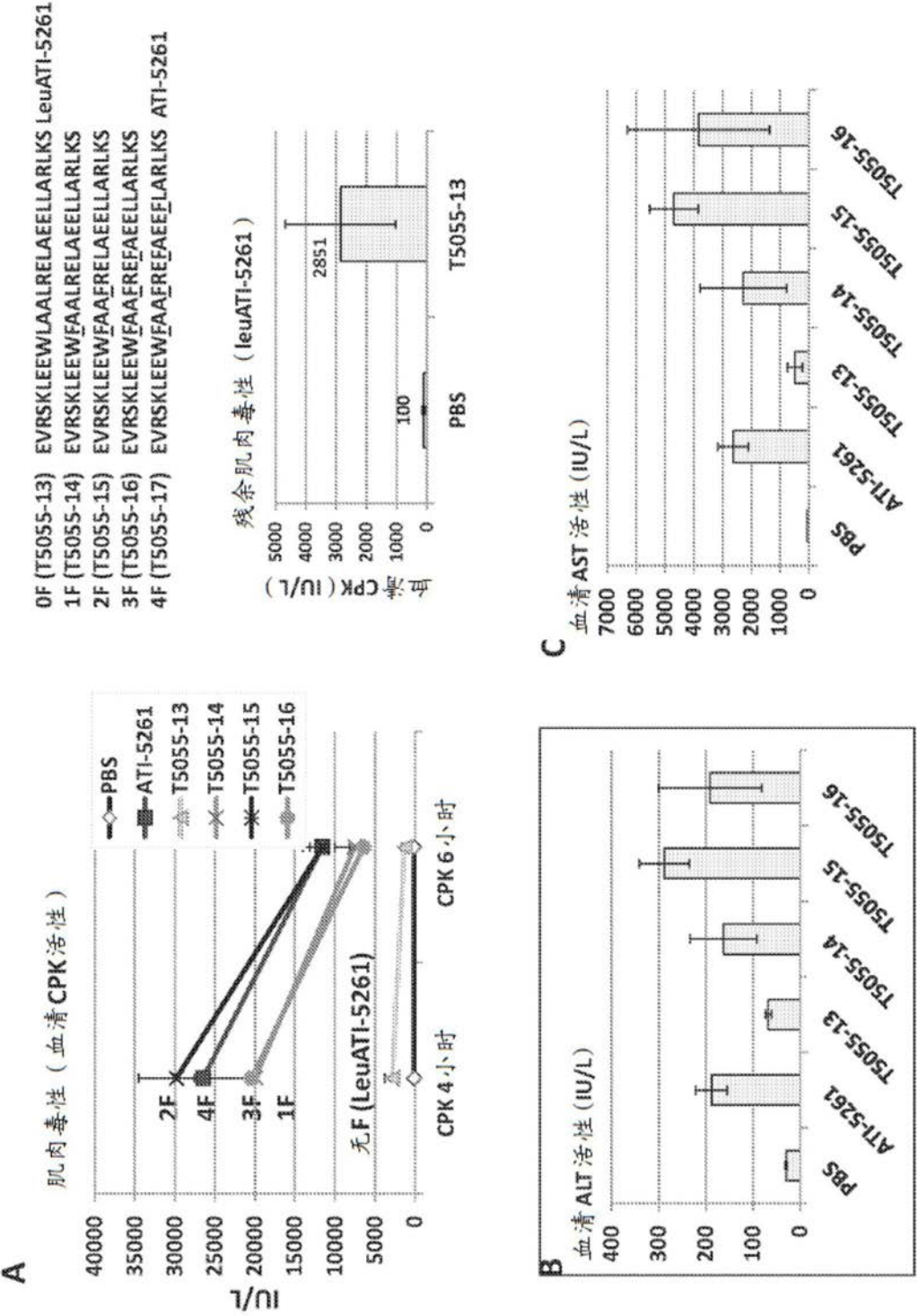


图5

在用肽治疗 (4小时对6小时)之后的血清脂质浓度 (mg/dl)									
甘油三酯			总胆固醇		游离胆固醇		胆固醇酯		
			4 h	6 h	4 h	6 h	4 h	6 h	6 h
PBS	37±7	29±6	71±21	66±4	11±2	12±4	60±21	54±5	
ATI-5261	1951±117	1358±161	172±25	174±18	43±15	44±8	128±36	130±15	
T5055-13	757±500	455±28	125±39	112±32	36±19	44±29	88±23	67±18	
T5055-14	1153±755	821±574	140±45	109±55	47±27	58±34	93±19	61±7	
T5055-15	1393±123	1009±64	129±24	131±11	56±16	80±6	74±25	51±14	
T5055-16	1390±453	1011±277	103±18	130±17	52±17	65±27	51±27	66±15	

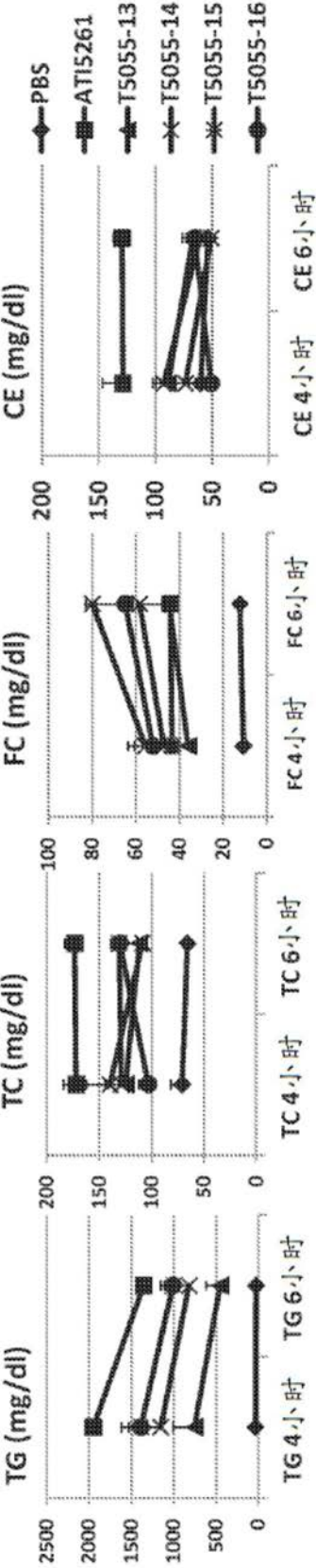


图6

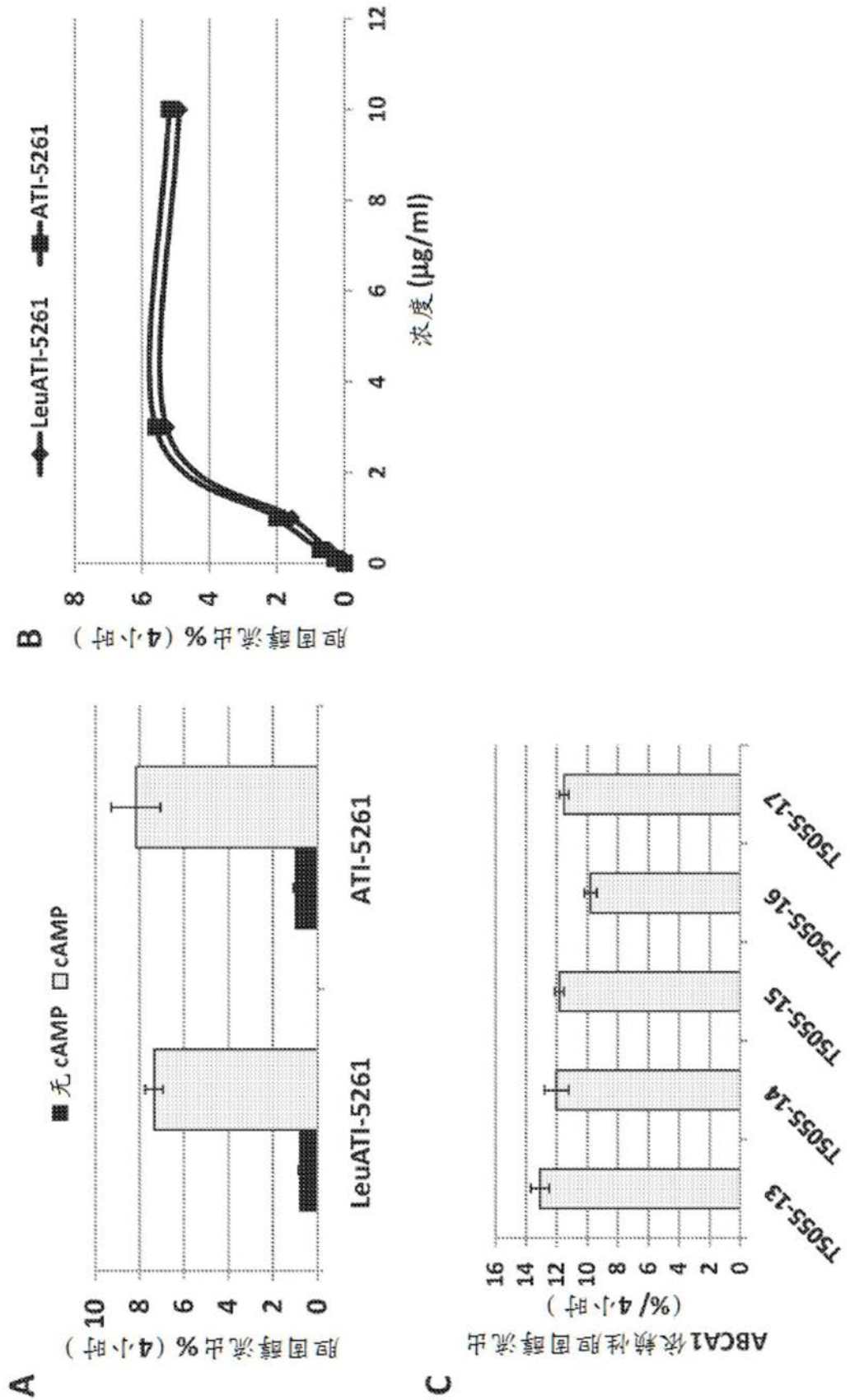


图7

ATI-5261类似物 (赖氨酸取代或缺失)

24聚体ATI-5261 (无KS)

T5766-5 EVRSKLEEWFAAFREFAEFFLARI K25→N

T5594-4 EVRSKLEEWFAAFREFAEFFLRLNS R3,14,23→K

T5594-5 EVSKLEEWFAAFKEFAEEFLAKLKS

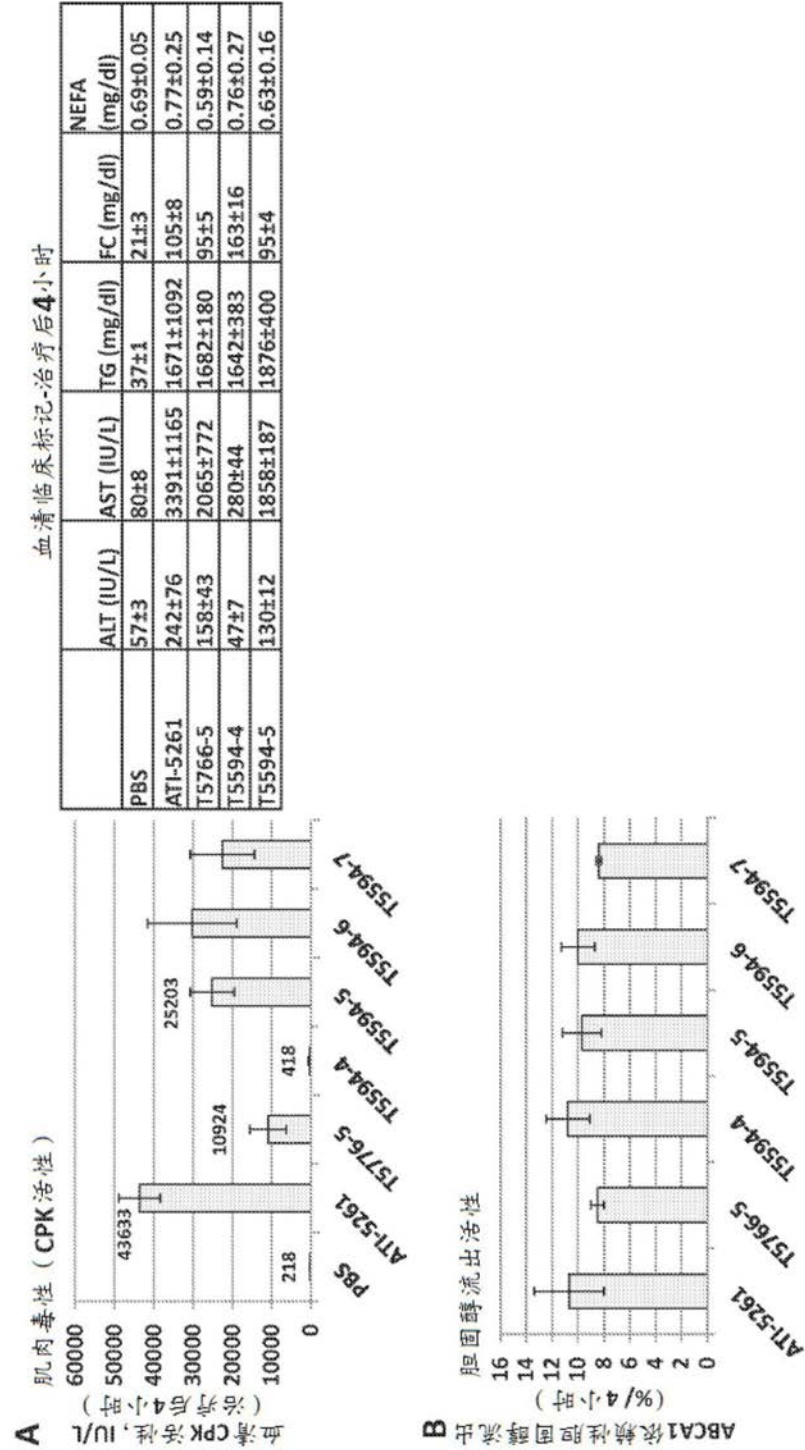


图8

LeuATI-5261类似物
T5766-3 EVQSKLEEWLAALQELAEELLARLKS (R3,14→Q)
T5766-4 EVNSKLEEWLAALNELAEELLARLKS (R3,14→N)

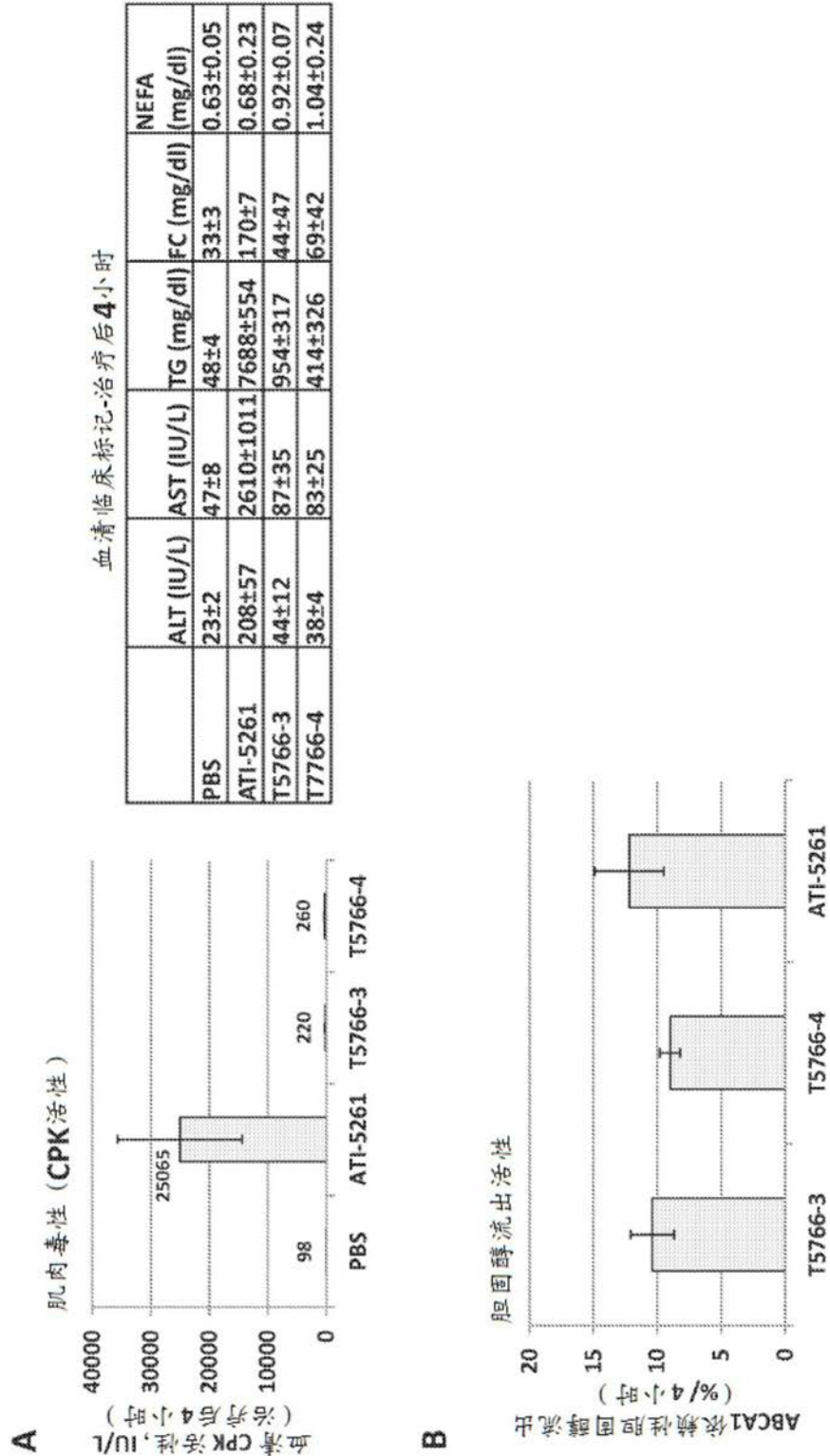


图9

Leu.ATI-5261--- 疏水性类似物
T4873-7 EVRSKLEEWLAALRELAELLARLKS LeuATI-5261
T4883-6 EVRSKLEEWLAALRELAELLARAKS L24A
T4883-7 EVRSKLEEWLAALRELAELLARLKS L21A
T4883-12 EVRSKLEEWLAALREAAEEELAAARAKS L24,21,16A

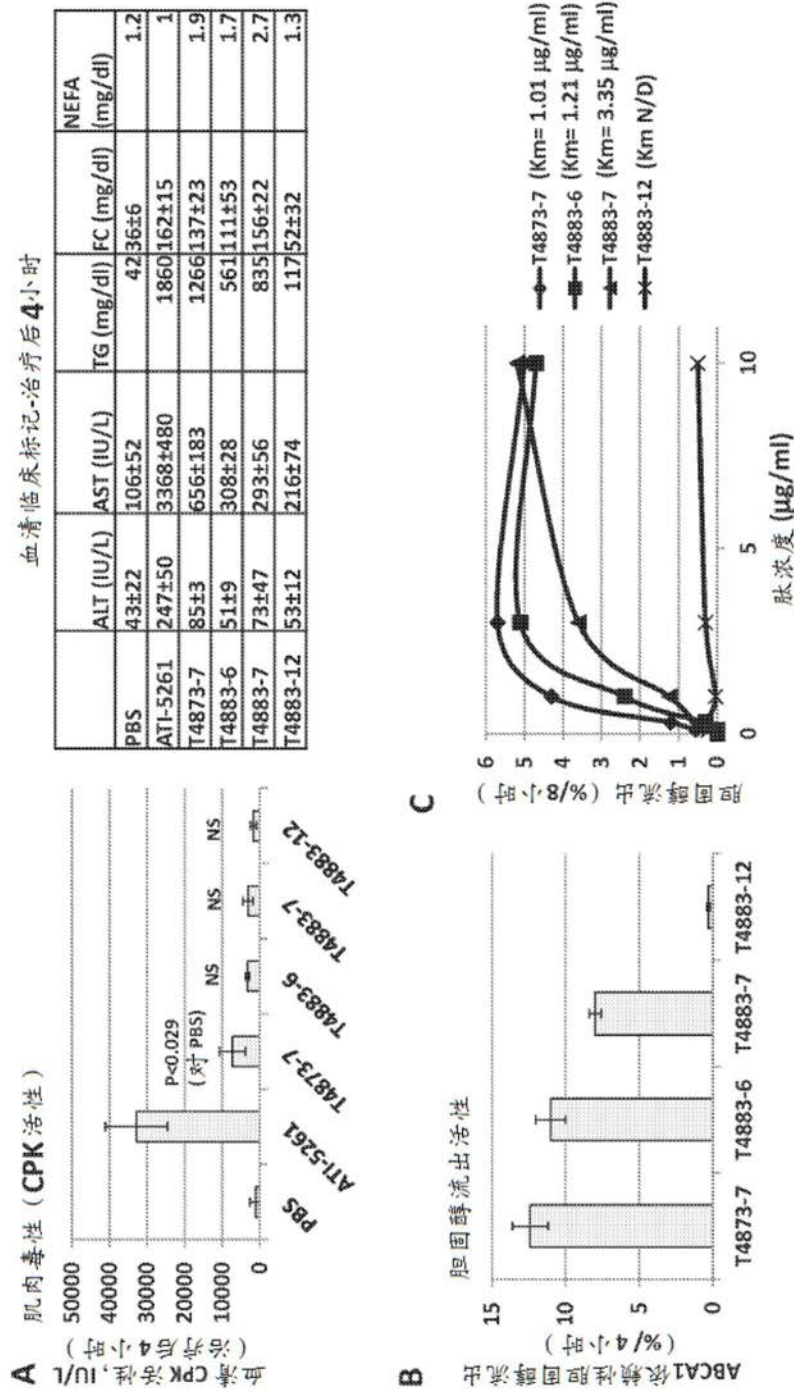


图10

Leu,ATI-5261----疏水性类似物接续
T5505-1 EARSKLEEWLAALRELAELLARLKS V2>A
T5505-3 EVRSKLEEWAAAALRELAELLARLKS L10>A
T5505-9 EVRSKLEELLAALRELAELLARAKS L24>A; W9>L
T5505-12 EARSKAEFWLAALRELAELLARAKS V2, L6, L24>A

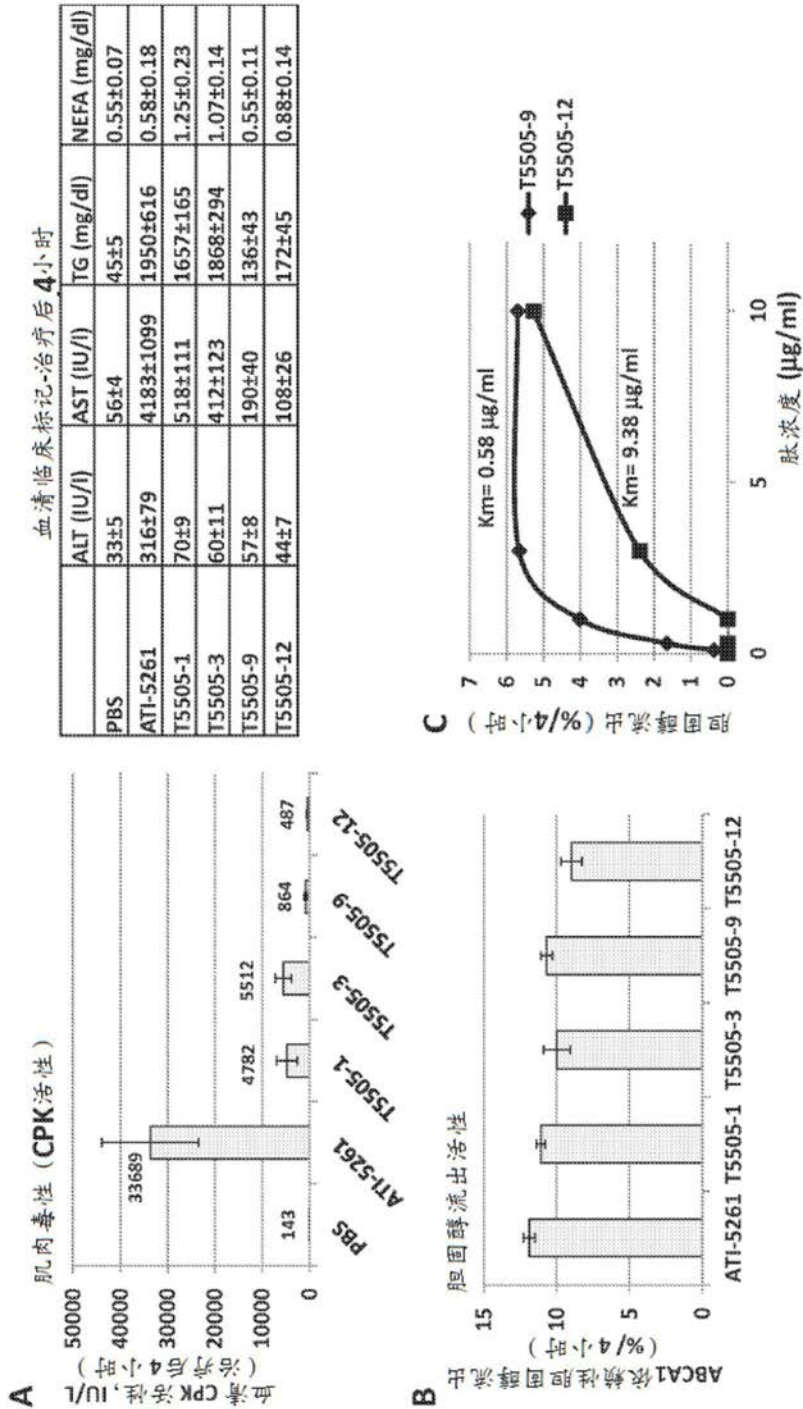


图11

Leu,ATI-5261----疏水性类似物接续
T5325-4 EVRSKLEEALAEAEELLARLKS W9>A
T5325-8 EVRSKLEEVLAALRELAEEELLARAKS L24>A; W9V

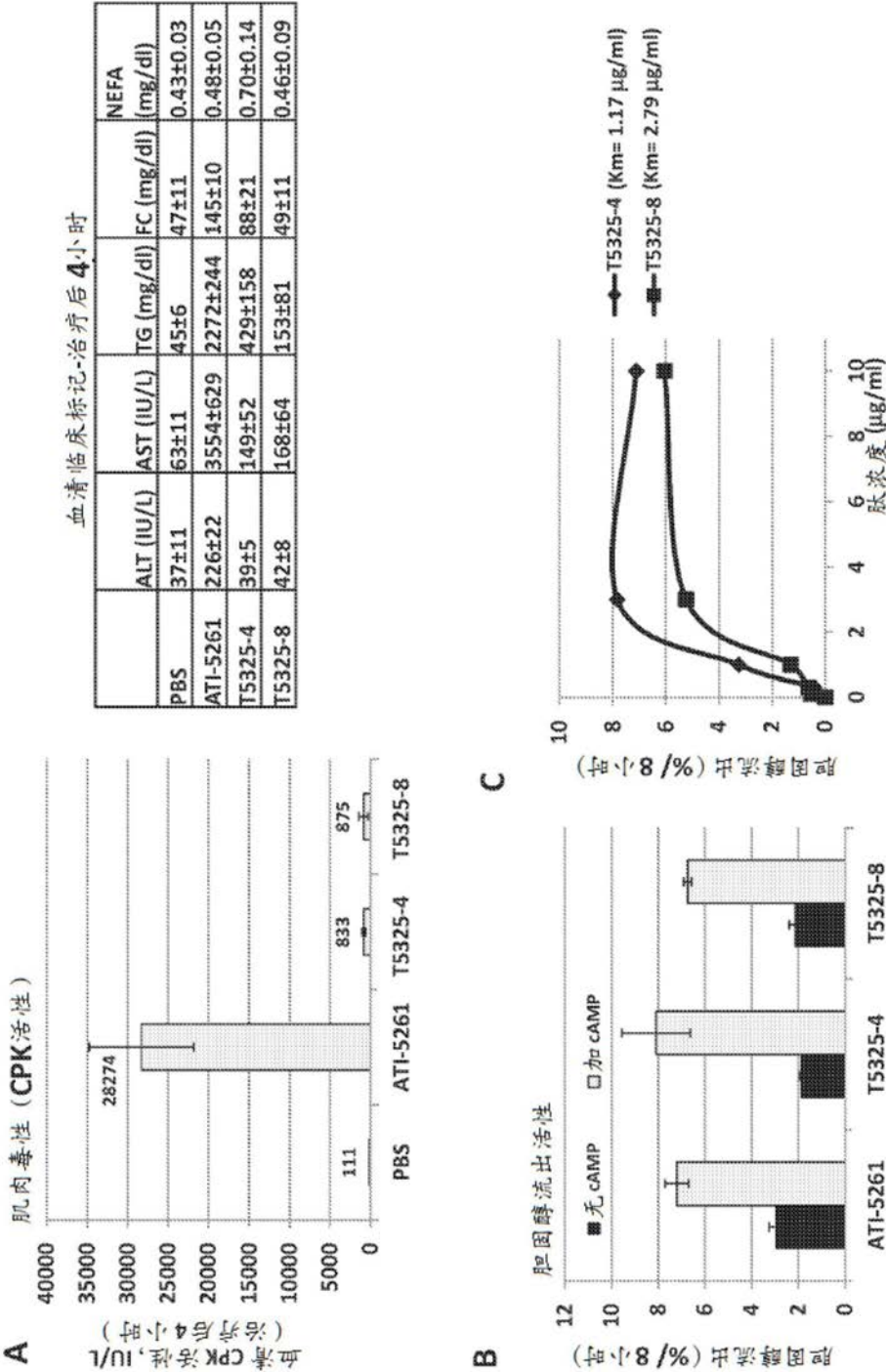


图12

LeuATI-5261 类似物，R14 del, R14L, 或 R14A, 于 T5505-12

T5211-1 EARSKAEWLAAL_ELAEEELLARAKS 具有R14缺失的T5505-12

T5211-2 EARSKAEWLAALLELAEEELLARAKS 具有R14L的T5505-12

T5211-3 EVRSKLEEWFAAF_EFAEEFLARLKS 具有R14缺失的ATI-5261

T5211-4 EVRSKLEEWFAAFLEFAEEFLARLKS 具有R14L的ATI-5261

T5220 EARSKAEWLAALAEELAEELLARAKS 具有R14A的T5505-12

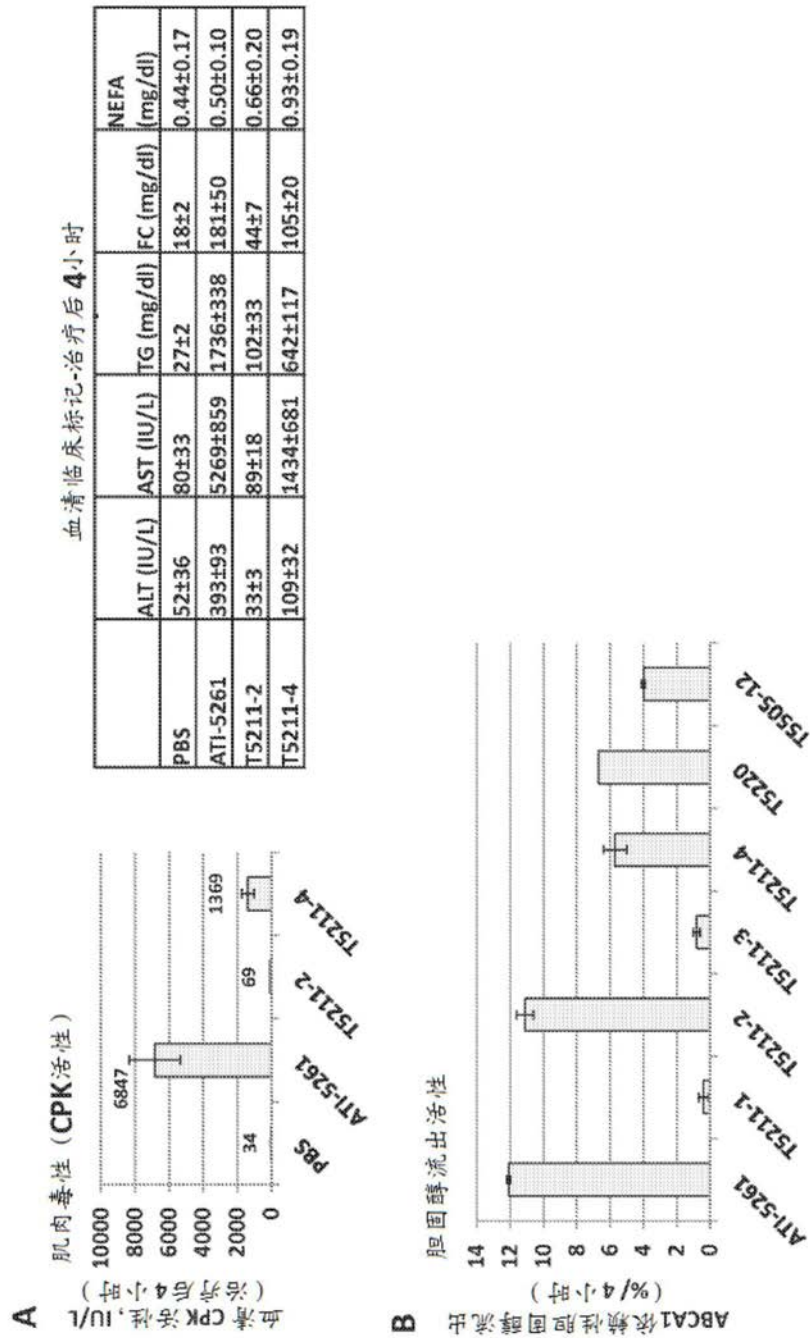


图13

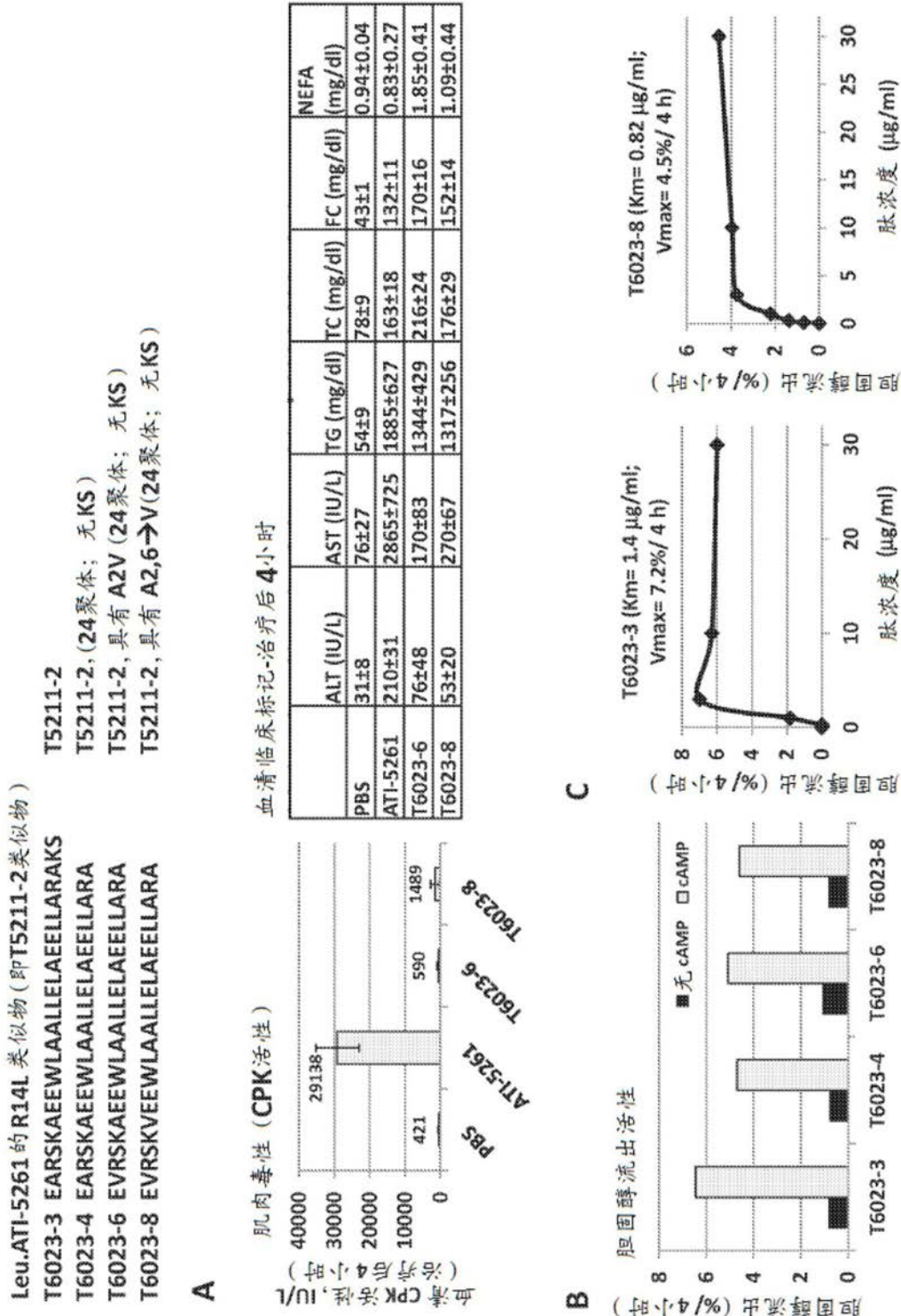


图14

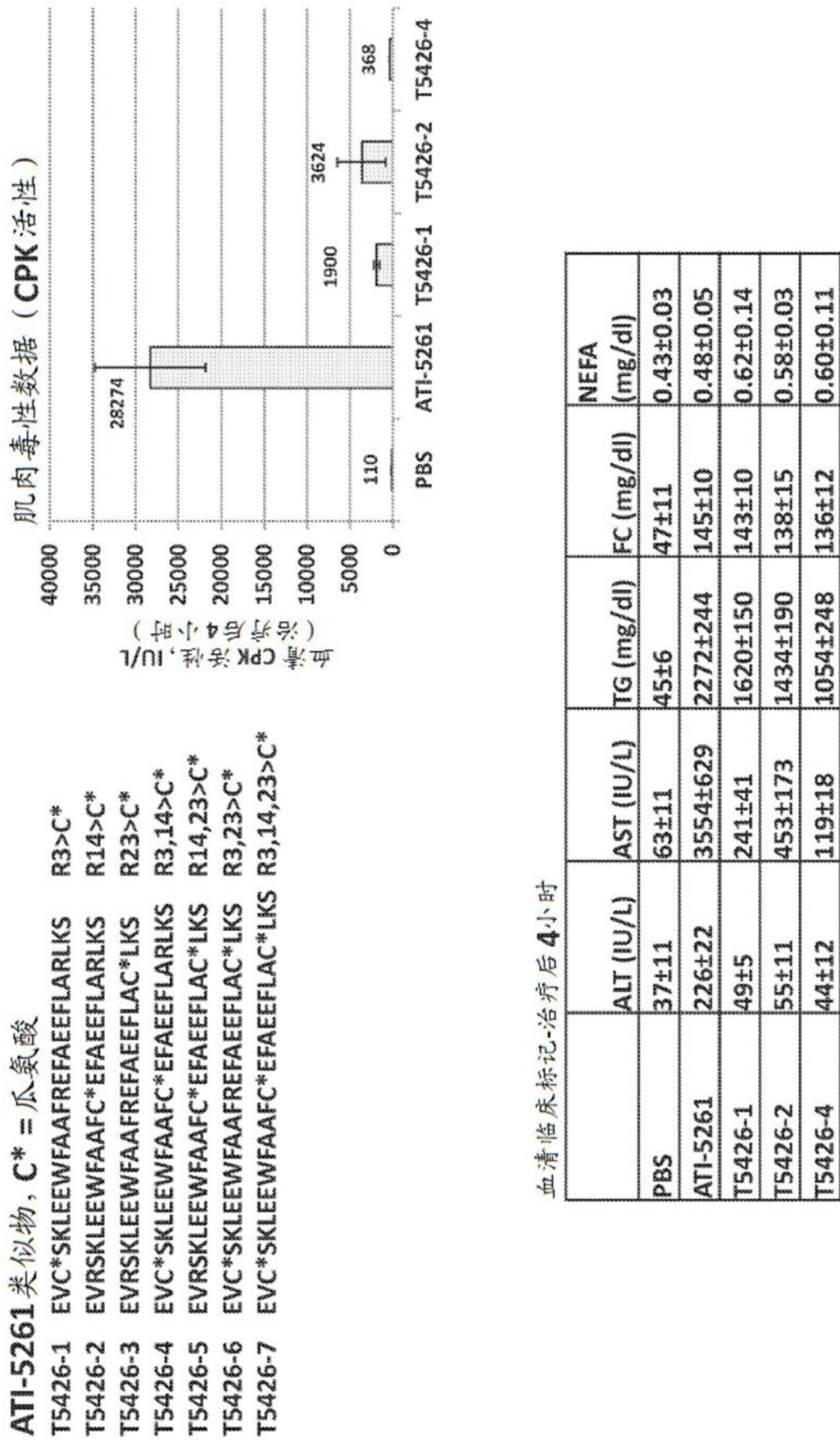


图15

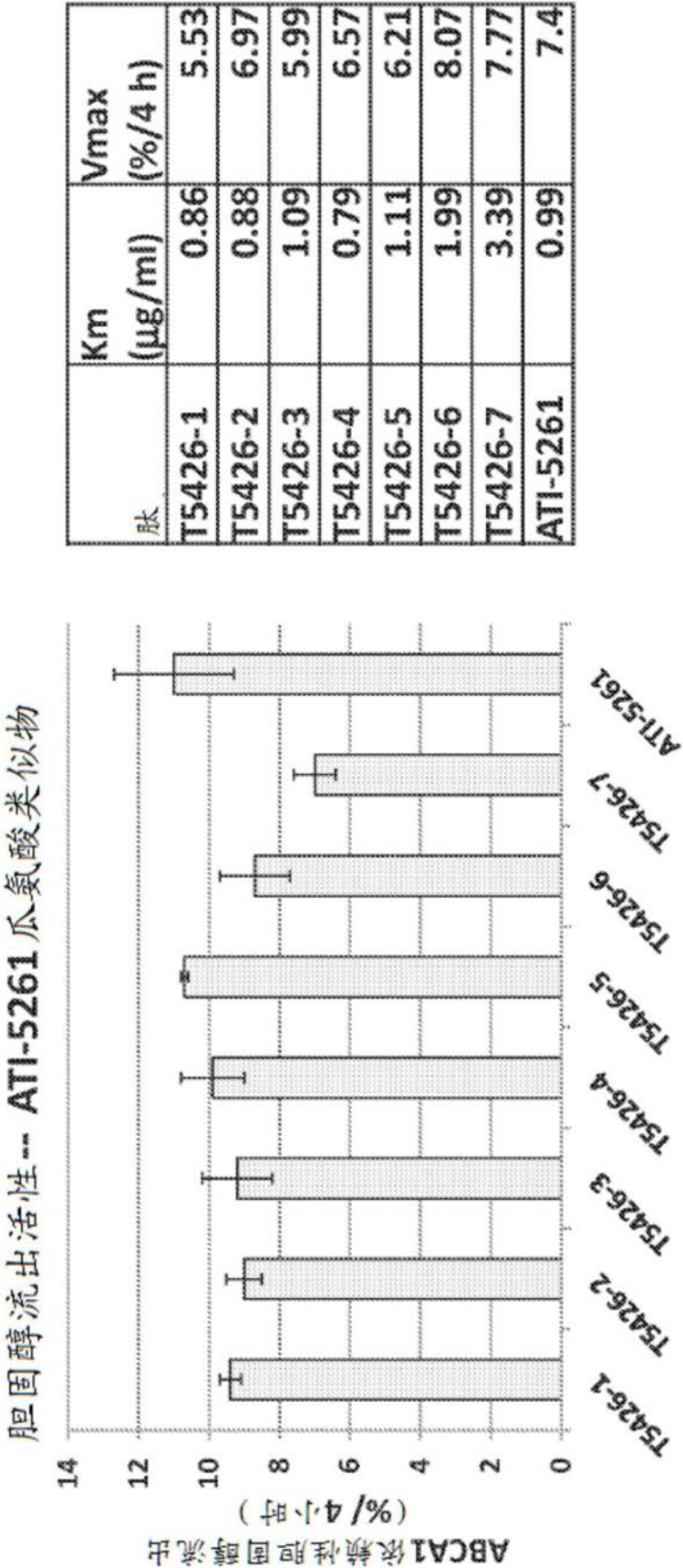


图16

ATI-5261的瓜氨酸类似物; W9→L、A或V(C* = 瓜氨酸)

T5594-1 EVC*SKLEELFAAFC*EFAEEFLARLKS W9L

T5594-2 EVC*SKLEEAFAAFC*EFAEEFLARLKS W9A

T5594-3 EVC*SKLEEVFAAFC*EFAEEFLARLKS W9V

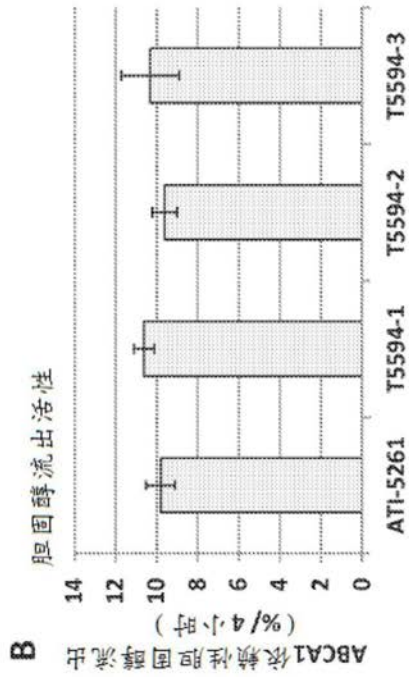
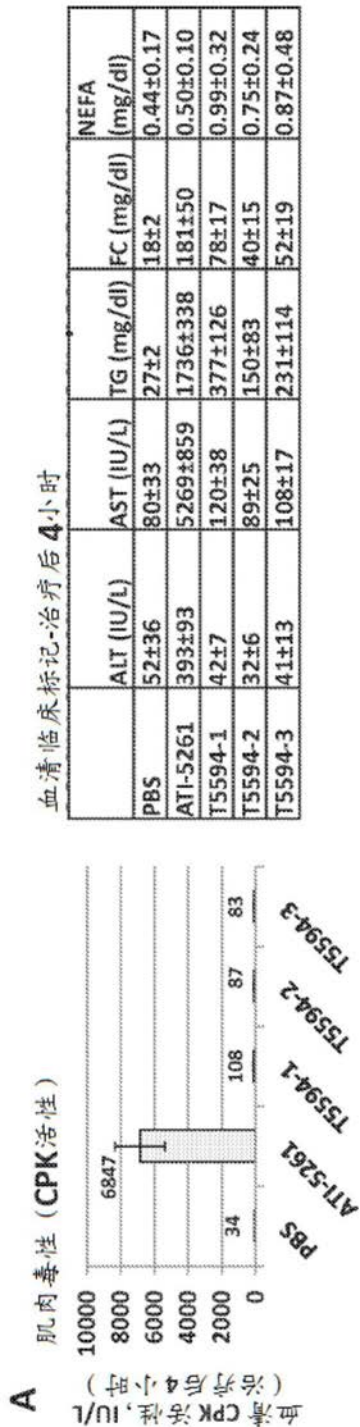
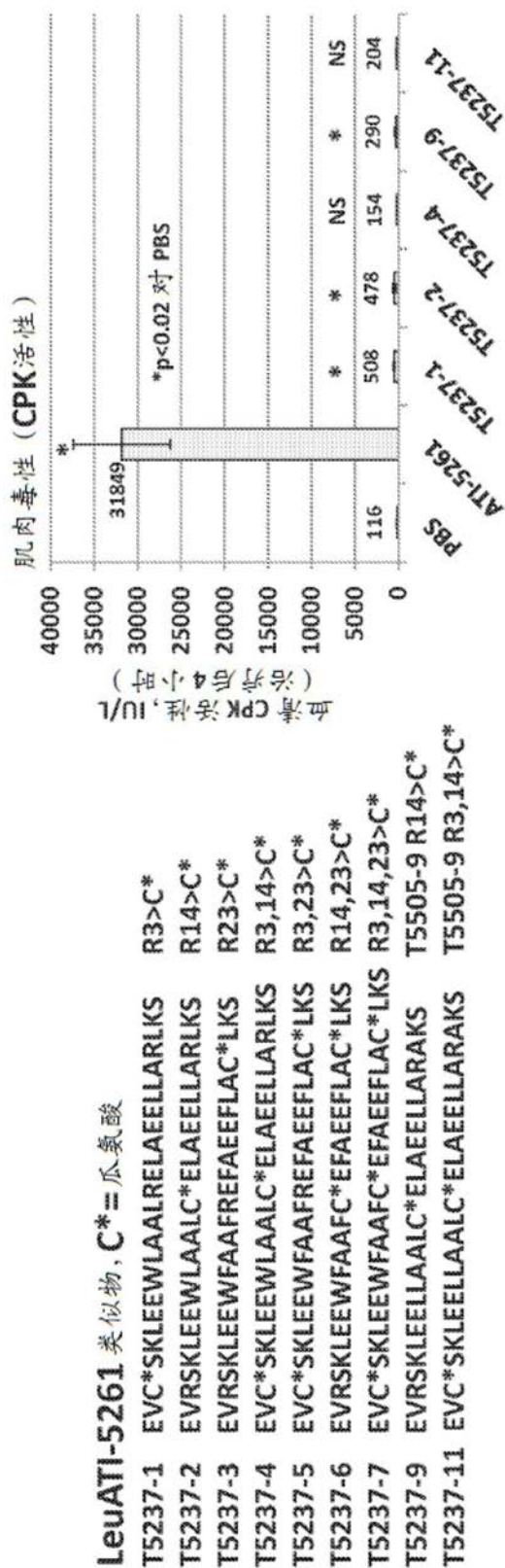


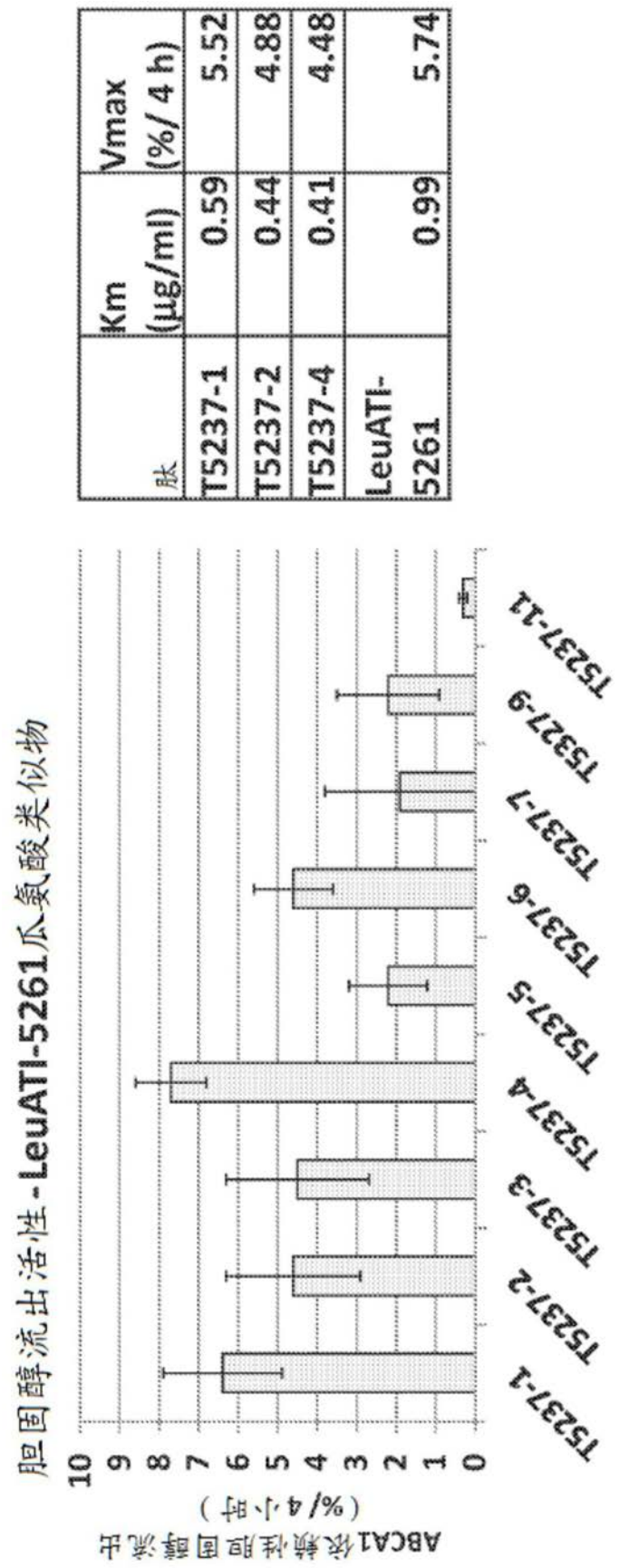
图17



血清临床标记-治疗后4小时

	ALT (IU/L)	AST (IU/L)	TG (mg/dl)	TC (mg/dl)	FC (mg/dl)	NEFA (mg/dl)
PBS	58±8	53±9	57±8	81±18	21±2	0.51±0.1
ATI-5261	240±54	3640±959	3202±168	212±22	87±26	0.80±0.14
T5237-1	38±3	100±20	1539±469	176±20	93±24	0.89±0.11
T5237-2	47±11	147±59	447±372	138±68	57±31	0.81±0.21
T5237-4	36±4	68±4	321±79	79±15	32±3	0.78±0.09
T5237-9	43±7	99±10	51±8	41±15	18±2	0.49±0.05
T5237-11	36±5	76±14	40±13	34±22	17±4	0.50±0.02

图18



肽	Km (μg/ml)	Vmax (%/4 h)
TS237-1	0.59	5.52
TS237-2	0.44	4.88
TS237-4	0.41	4.48
LeuATI-5261	0.99	5.74

图19

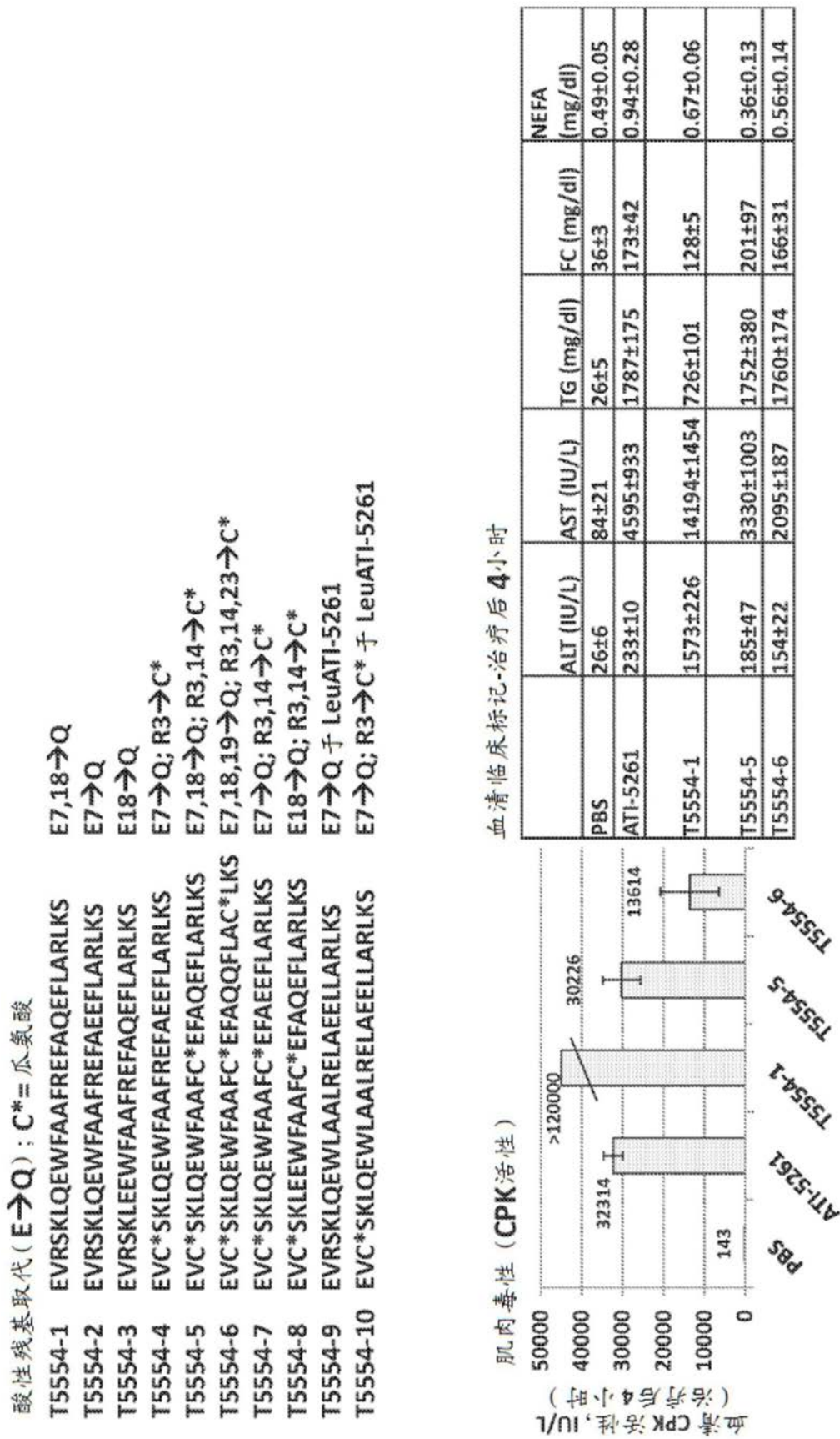


图20

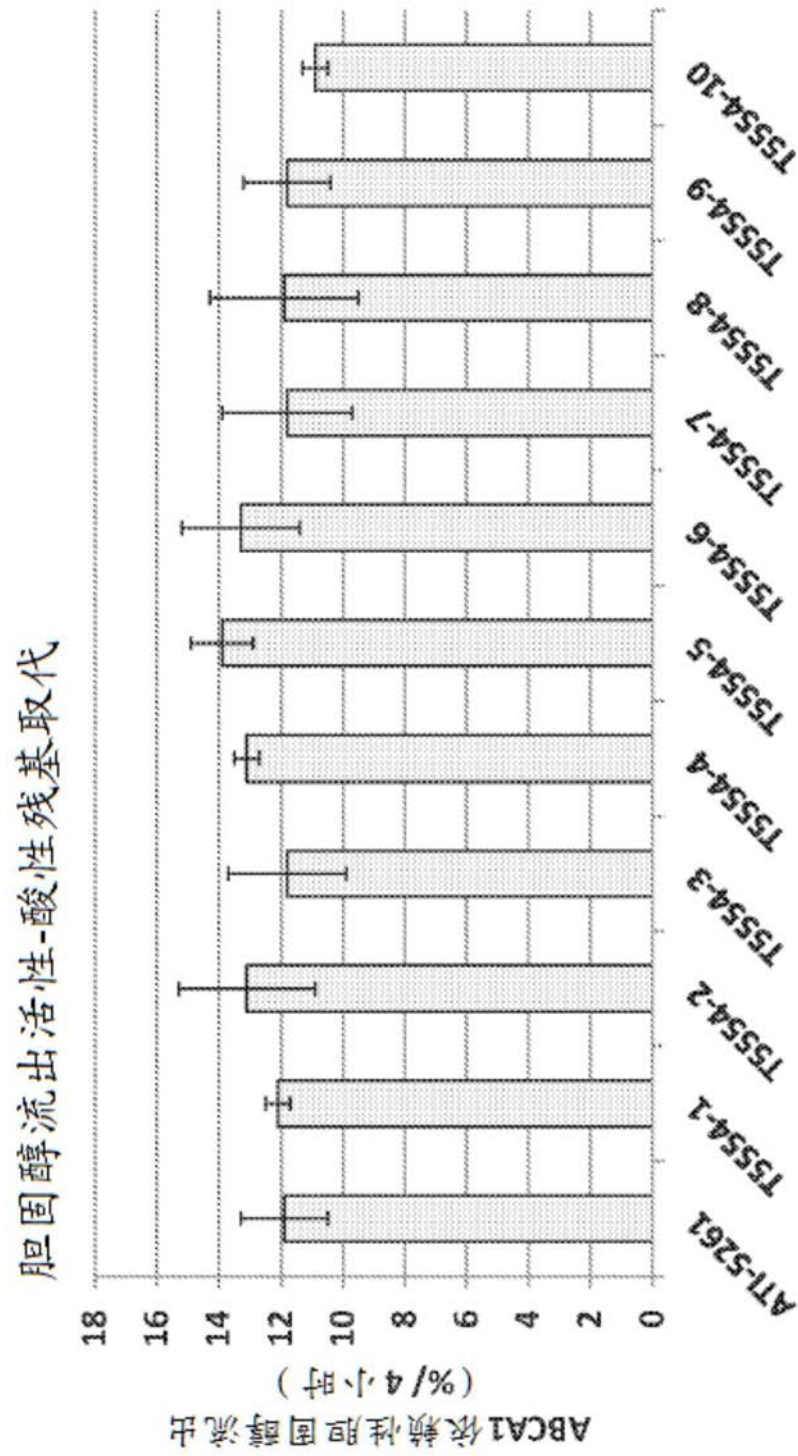


图21

Cit.LeuATI-5261 类似物, 24 聚体, C*=瓜氨酸
T5766-6 EVRSKLEEWLAALRELAELLARLKS Leu.ATI-5261 (无KS)
T6023-1 EVC*SKLEEWLAALC*ELAEELLARL Cit.LeuATI-5261 (无KS)

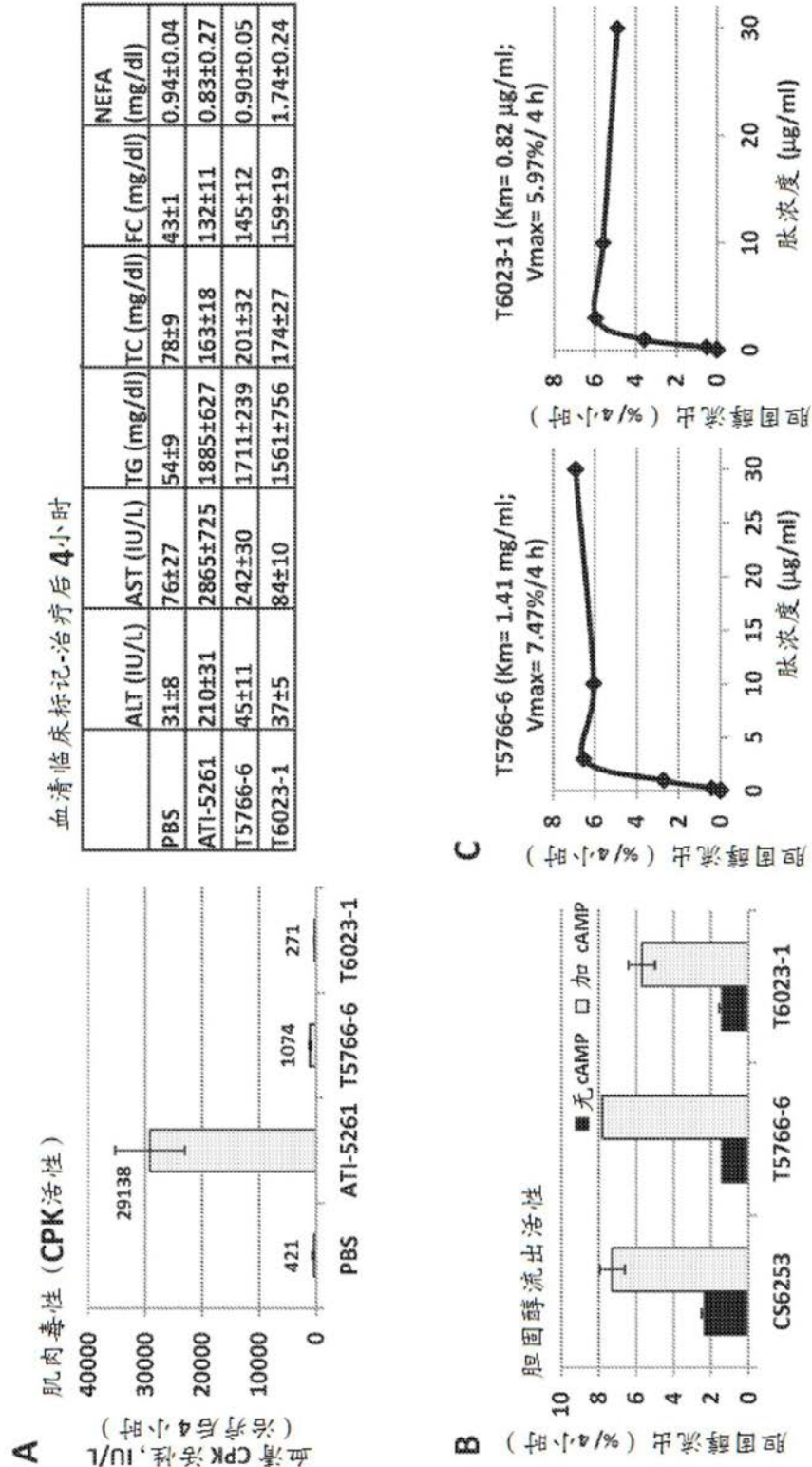


图22

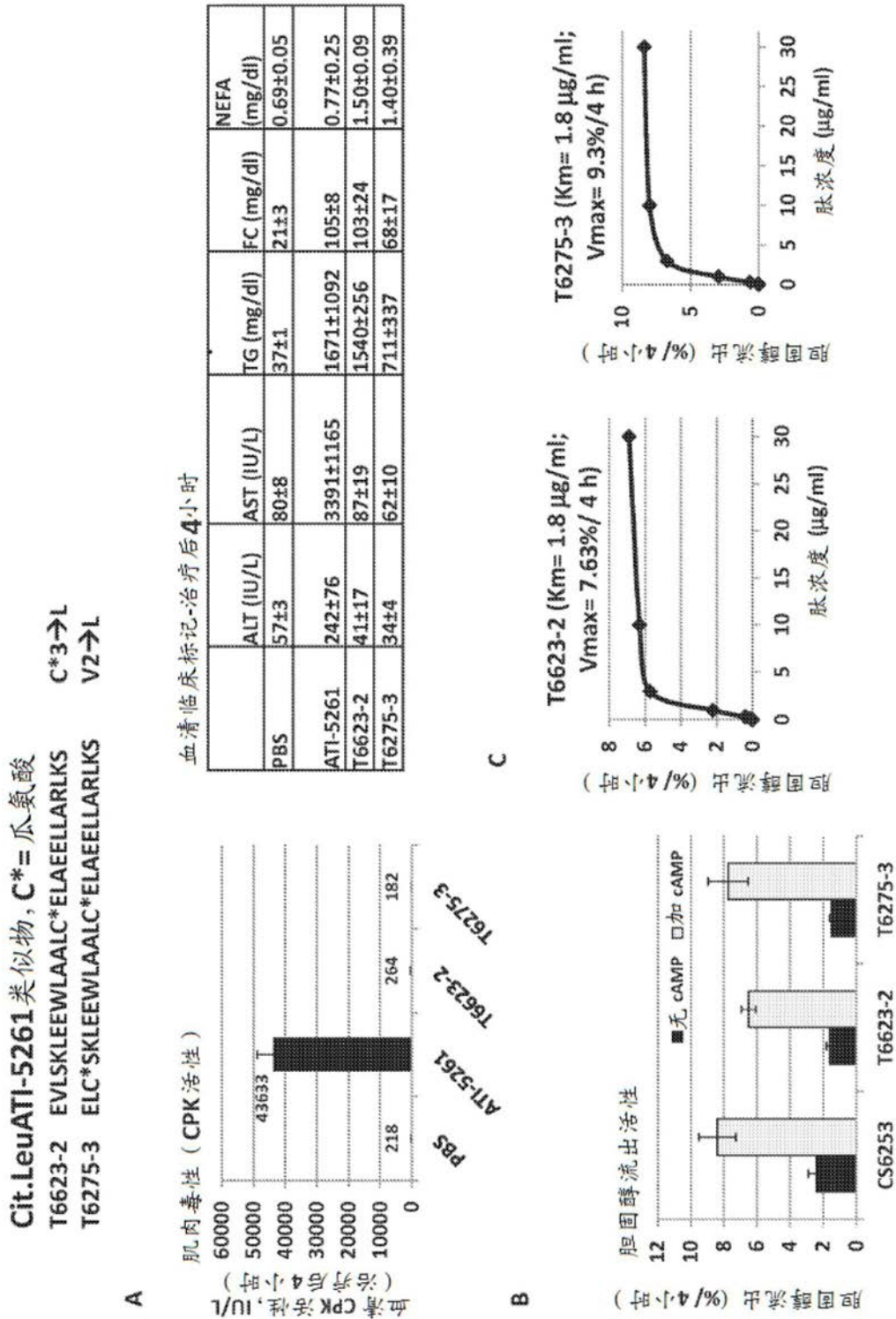


图23

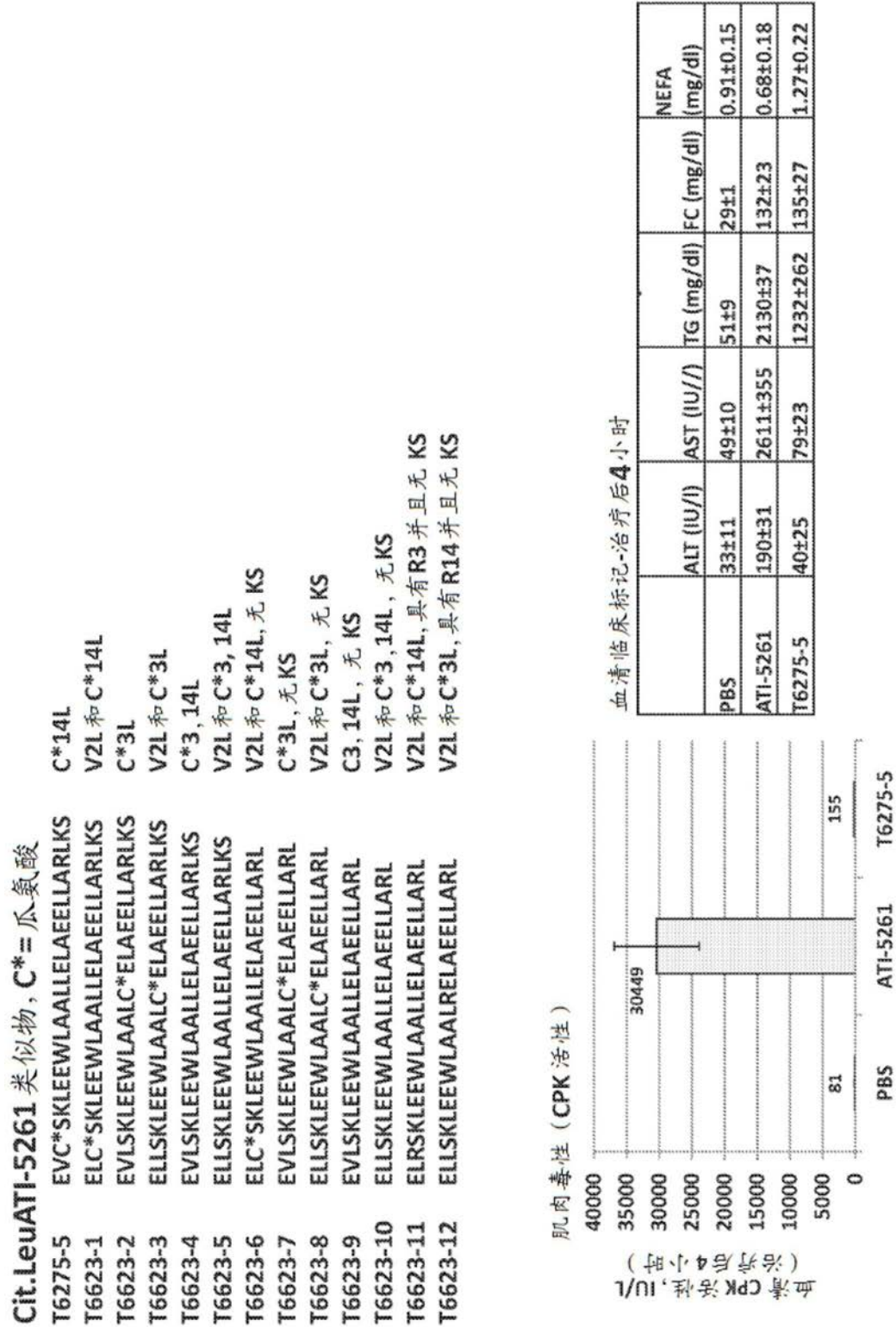


图24

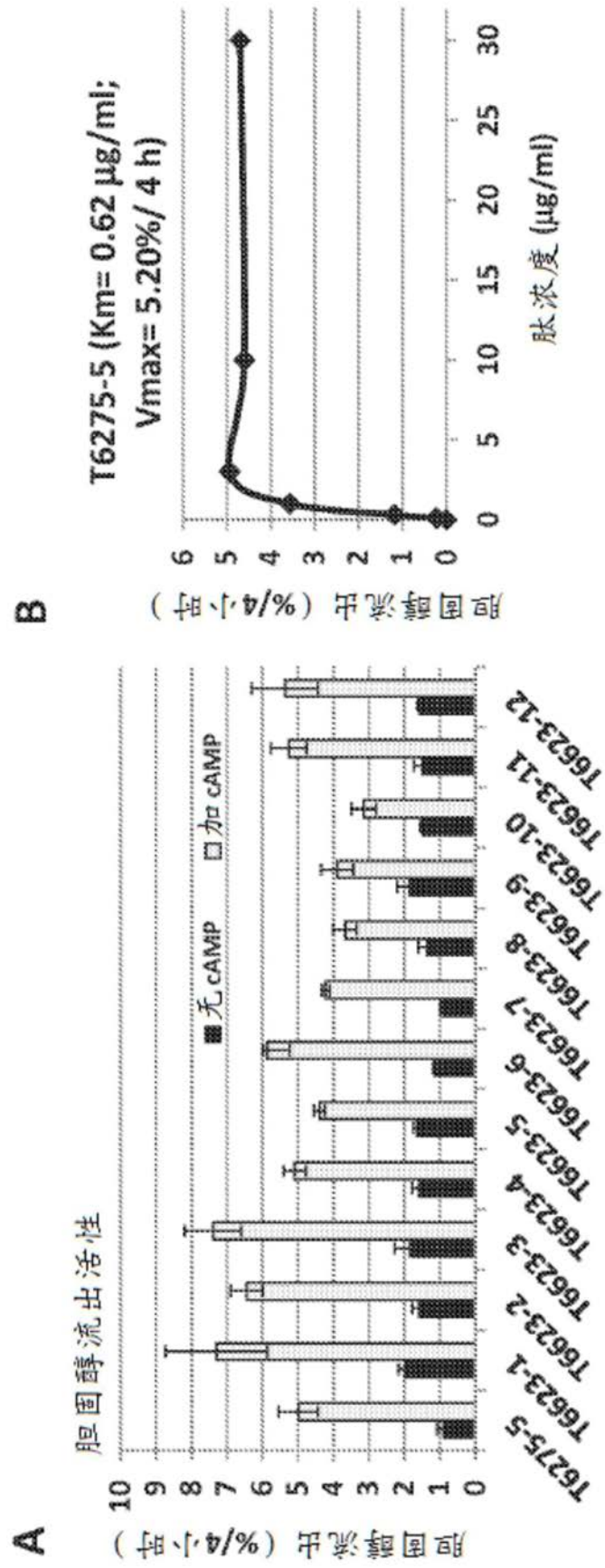


图25

具有瓜氨酸的ATI-5261类似物, C*=瓜氨酸

T6991-1	EVRSKLEEWIAAIREIAEEILARLKS	F10,13,16,20→I(F至异亮氨酸, 于ATI-5261中)
T6991-2	EVC*SKLEEWIAAIC*EIAEEILARLKS	R3, 14→C*, 于ATI-5261的异亮氨酸形式中
T6991-3	EVRAKLEEWFAAFREFSEEFARLKS	S4/A17调换
T6991-4	EVRSKLEEWFAAFREFSEEFARLKA	S26/A17调换
T6991-5	EVRSKLEEWFAAFREFSEEFARLKS	A17→S
T6991-6	EVRSKLEEWFAAFREFYEEFLARLKS	A17→Y
T6991-7	EVRSKLEEYFAAFREFAEFLARLKS	W9→Y
T6991-8	EVRSKLEEWFAAFREFAEFLARSKL	S26/L24调换
T6991-9	EVRSKLEEWFAAFREFYEEFLARSKL	S26/L24调换, 伴有A17→Y

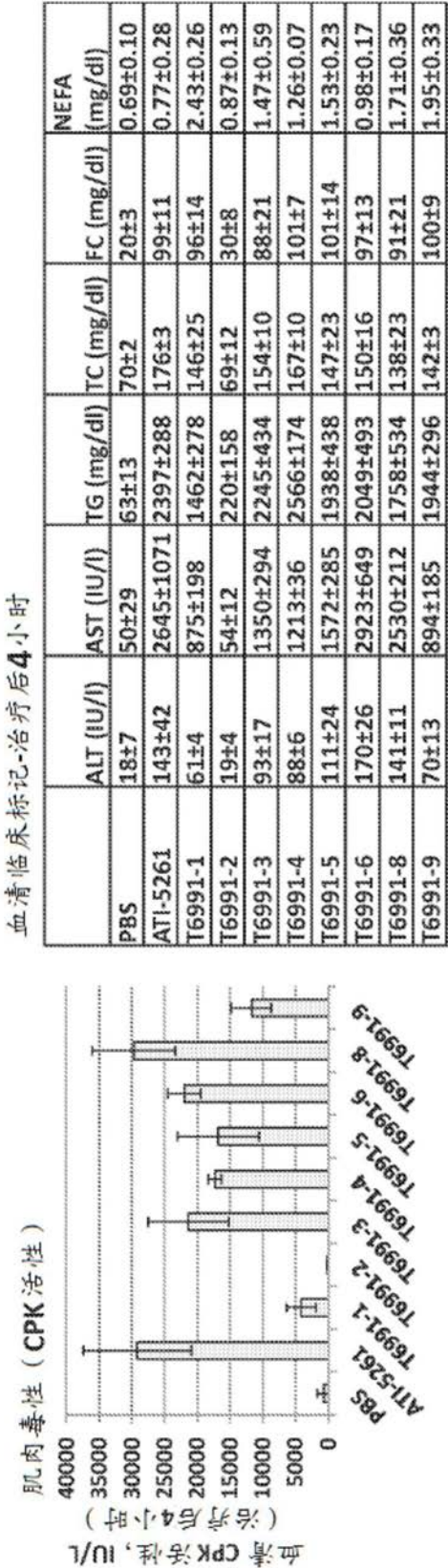


图26

123

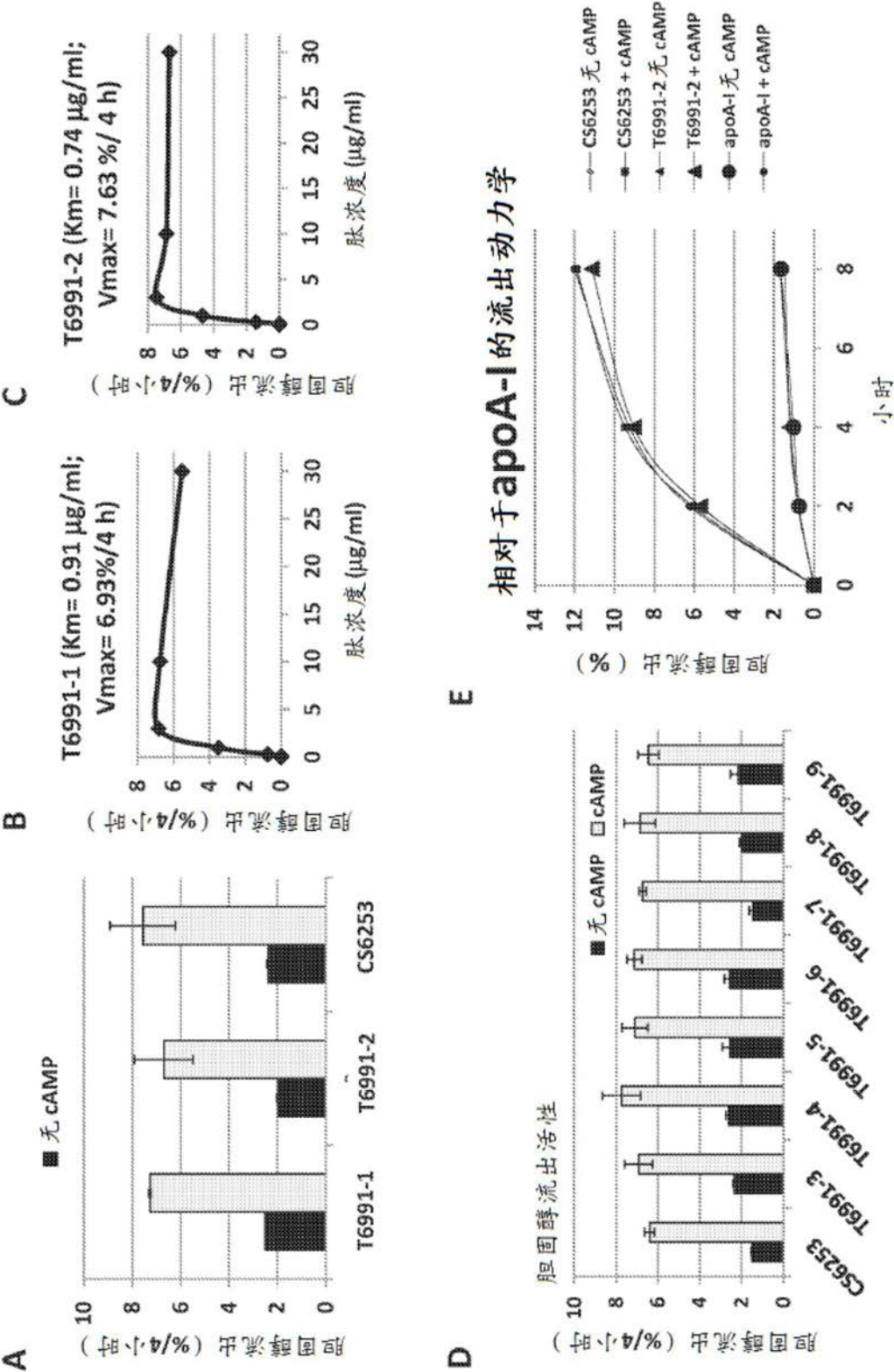


图27

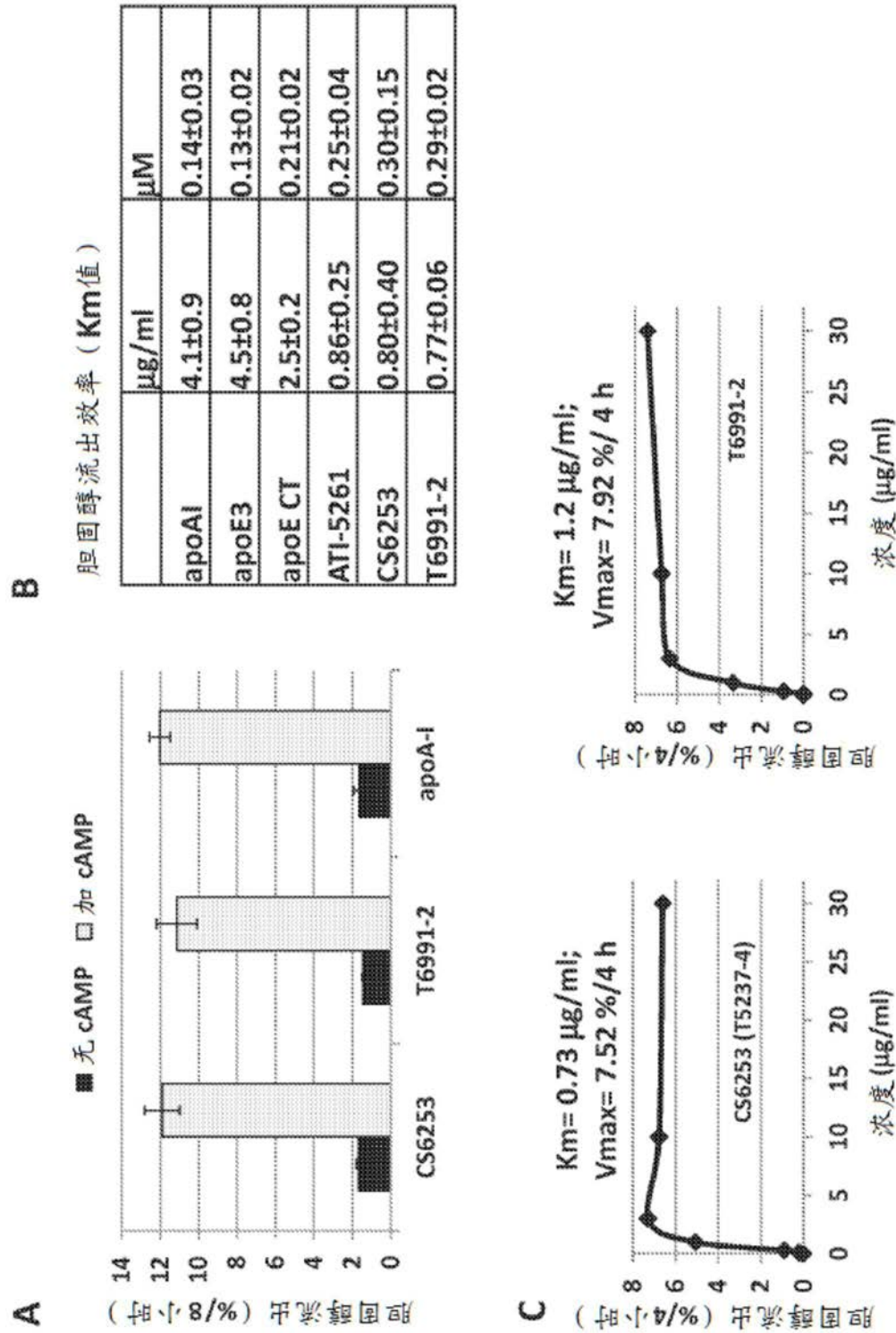


图28

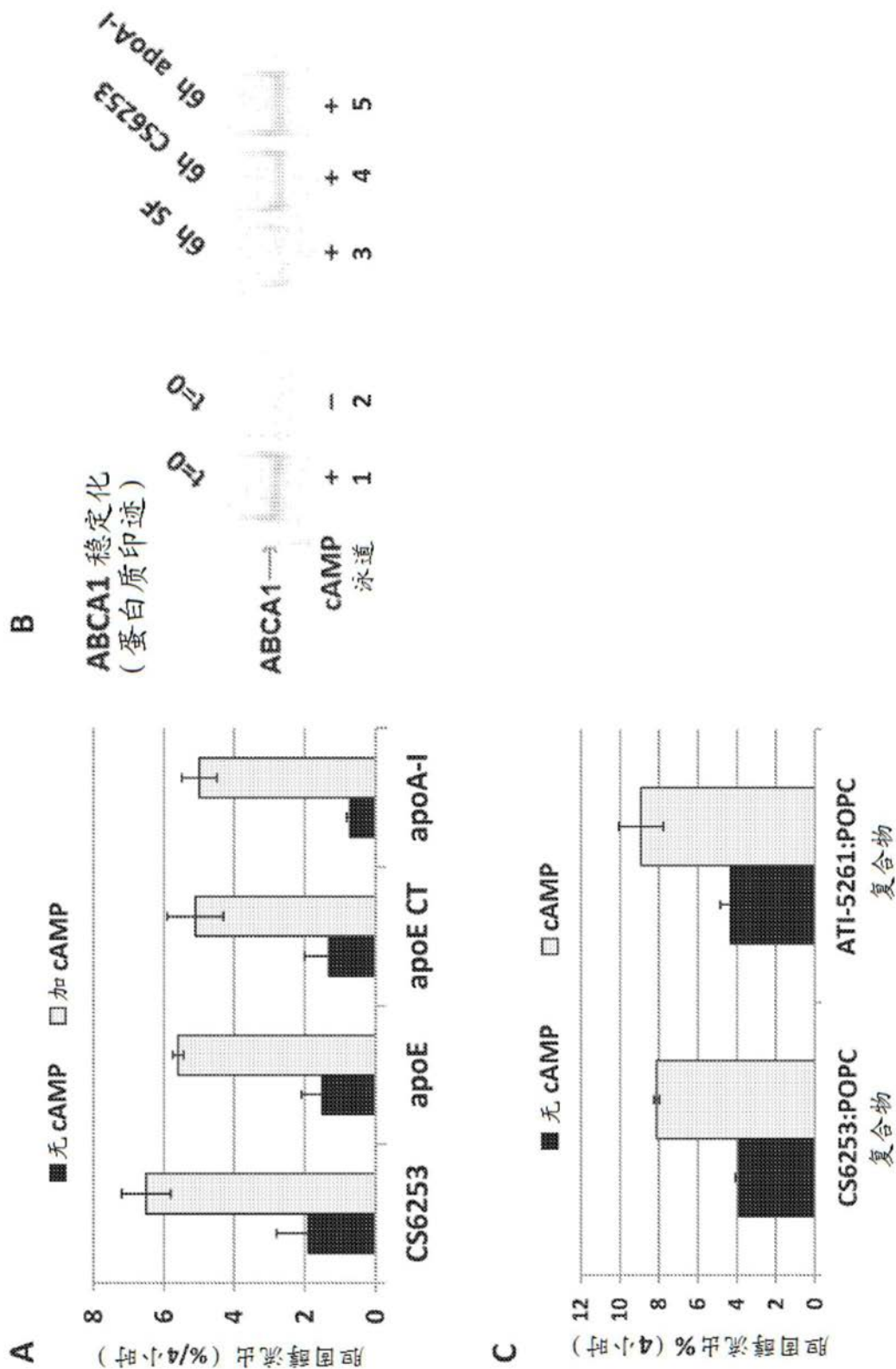
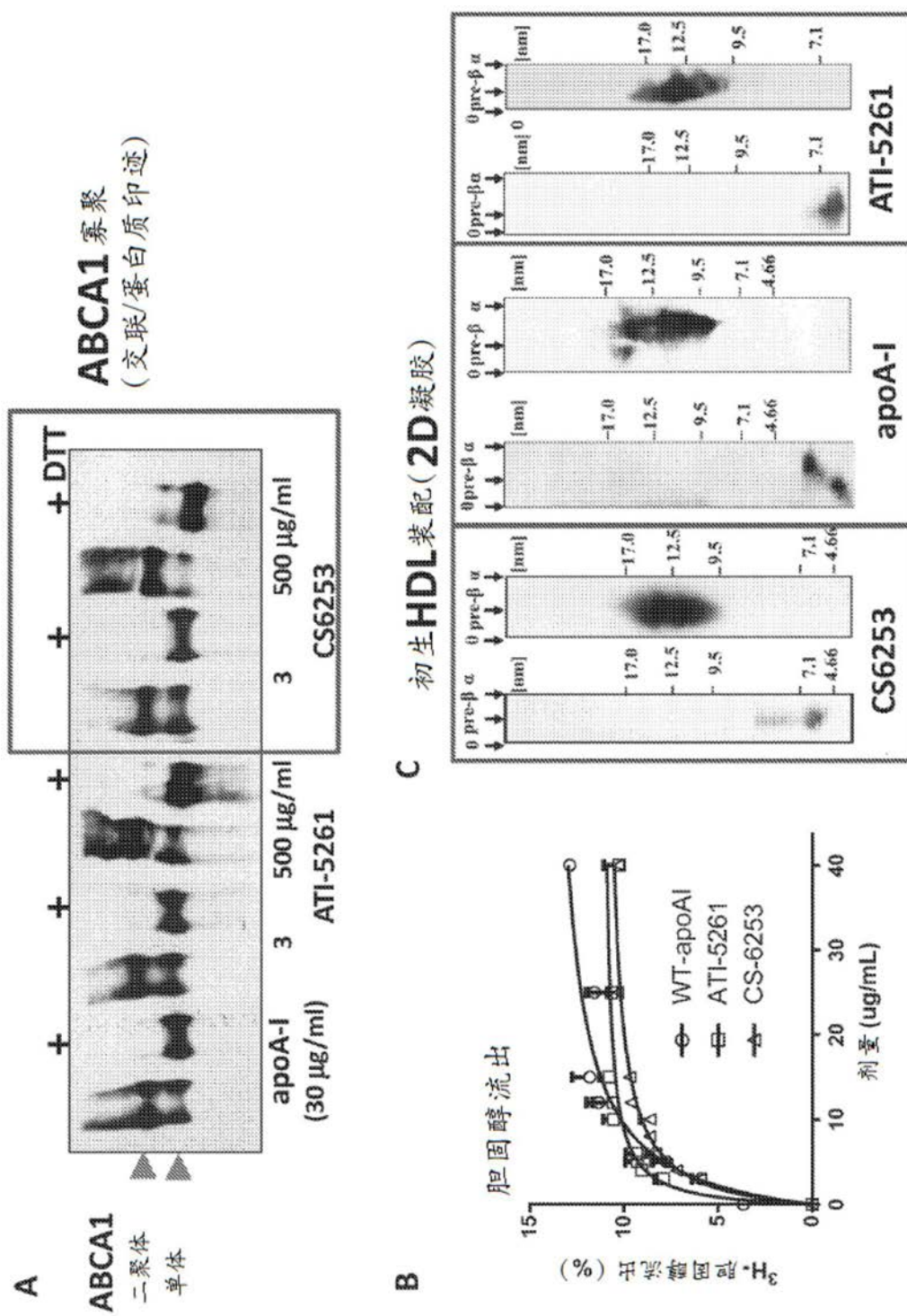


图29



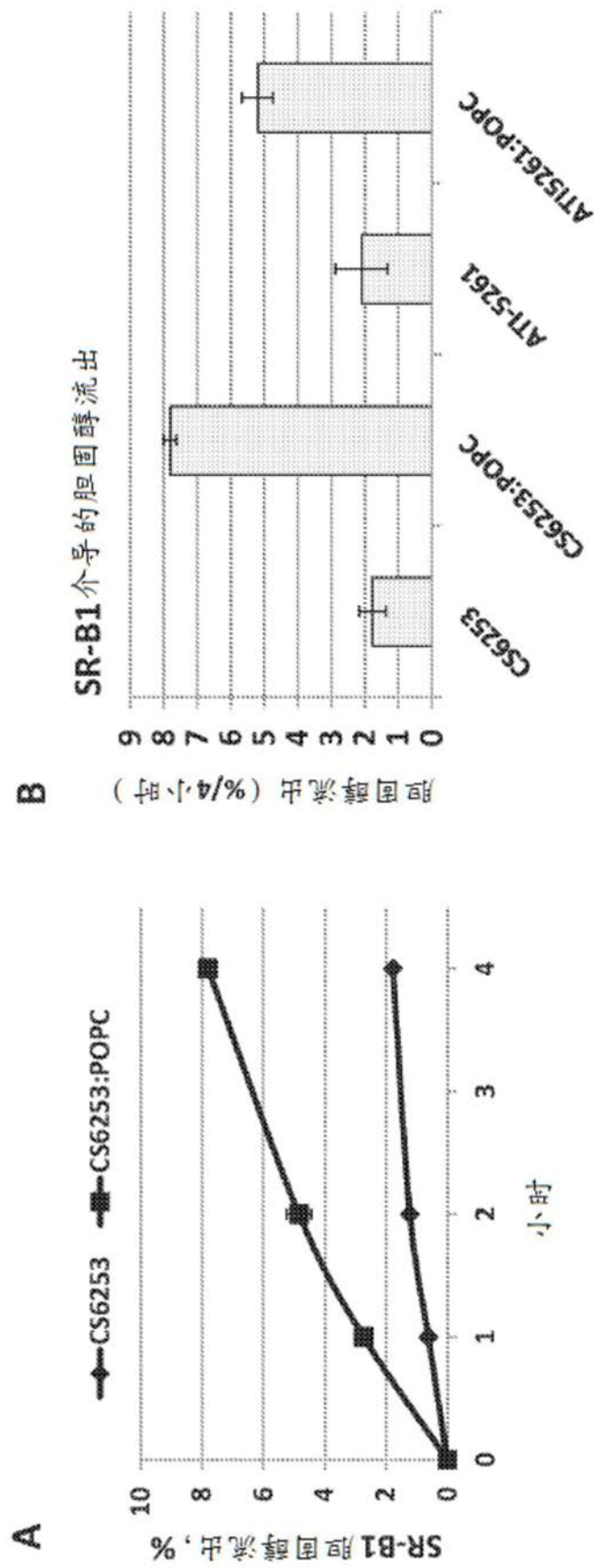


图31

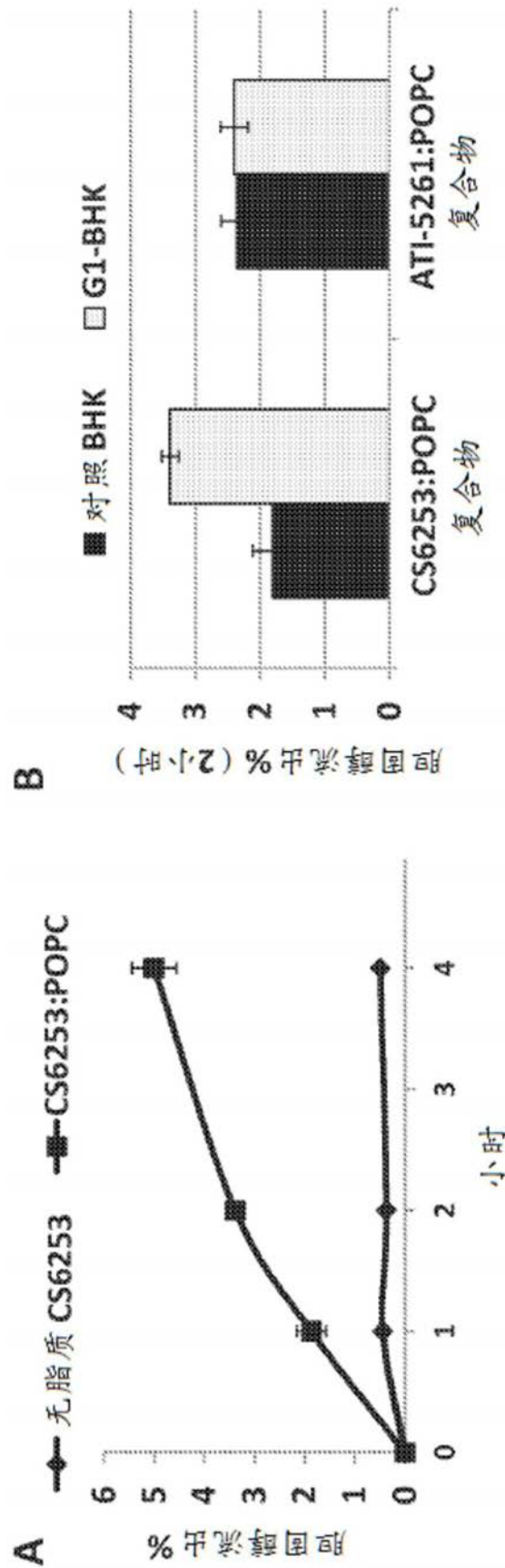


图32

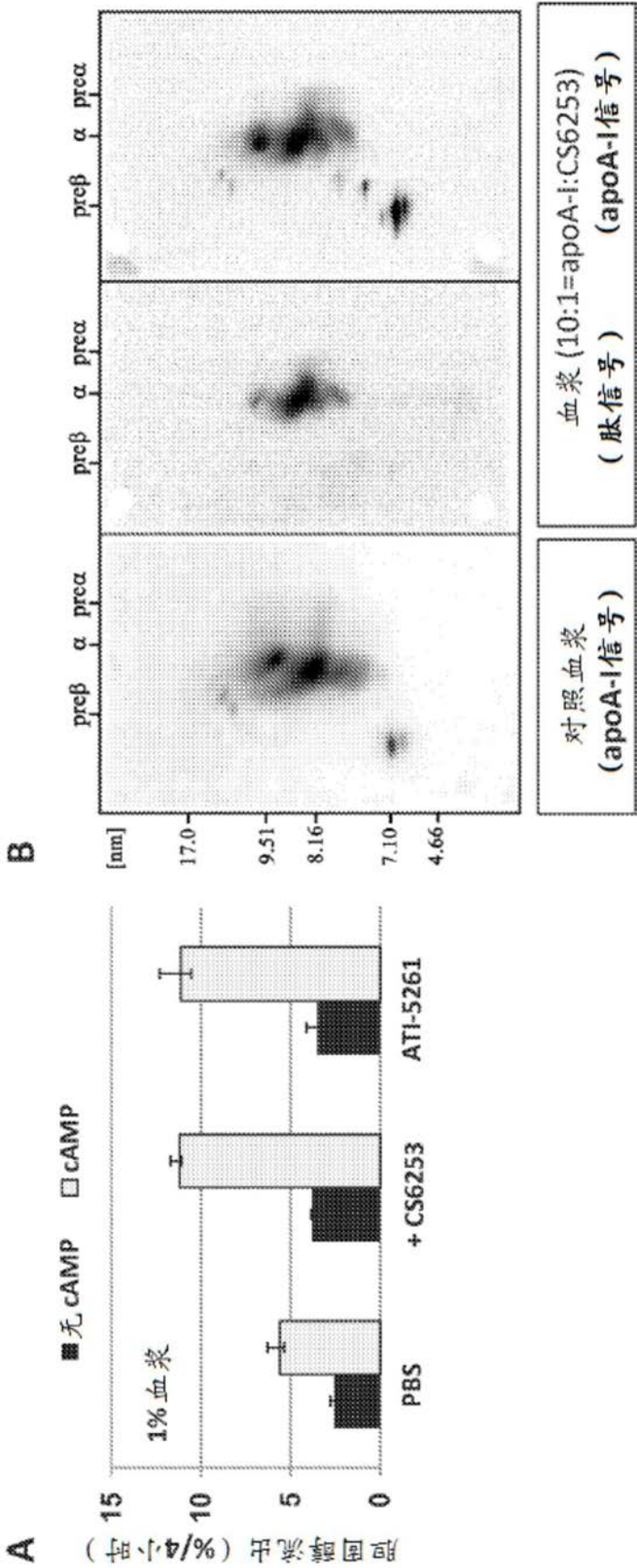


图33

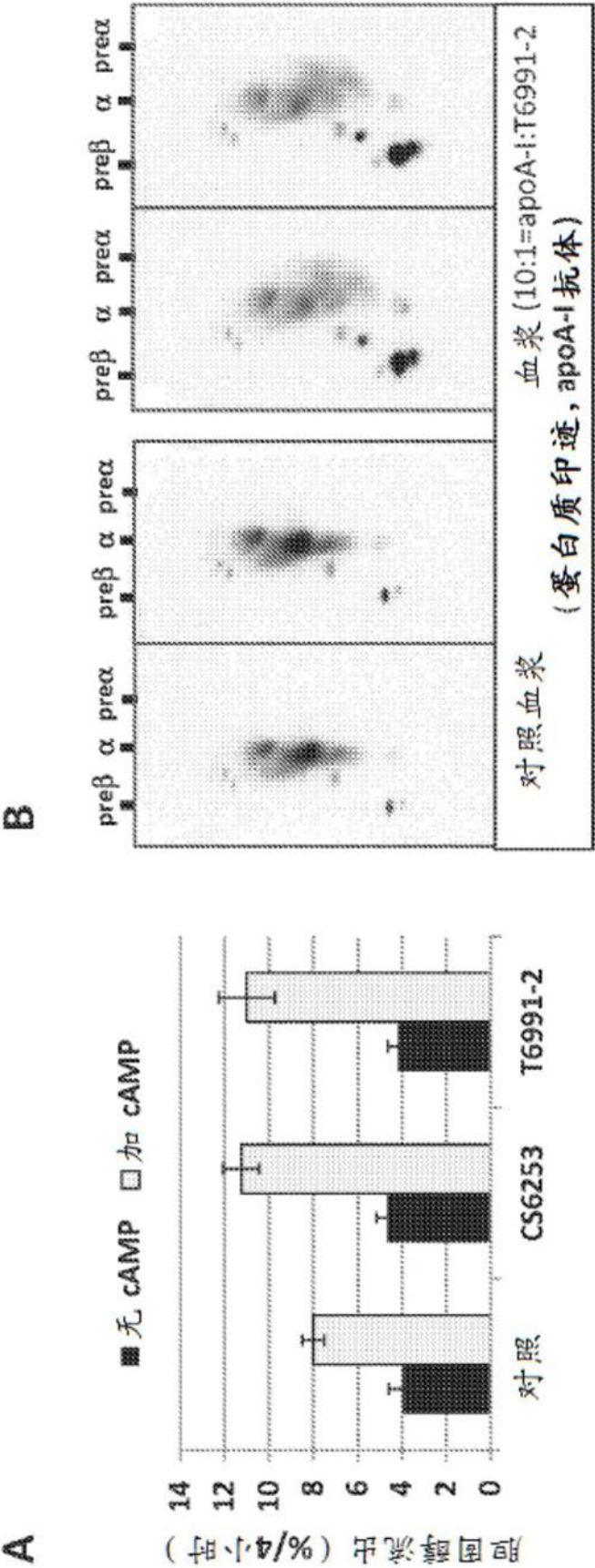


图34

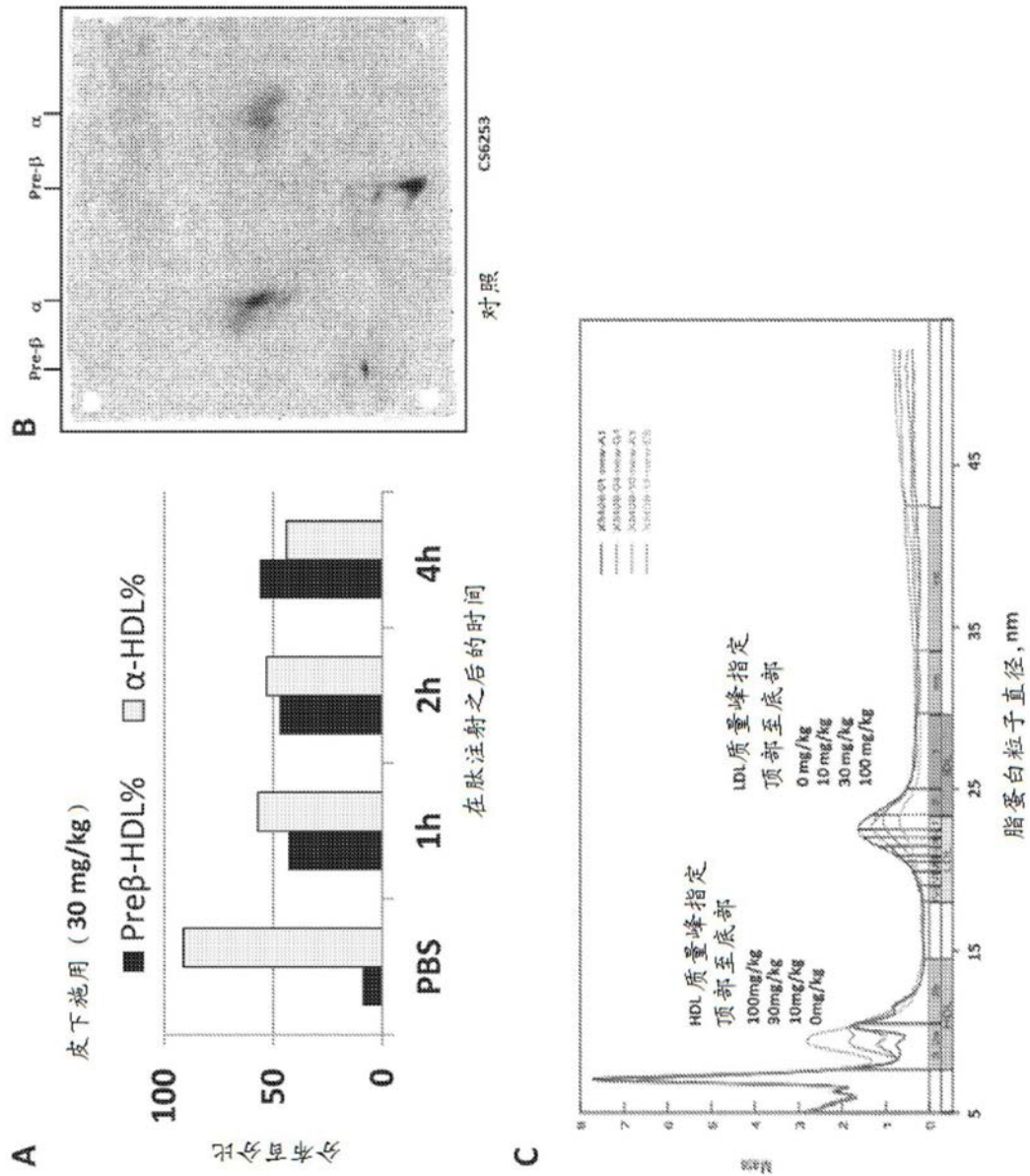


图35

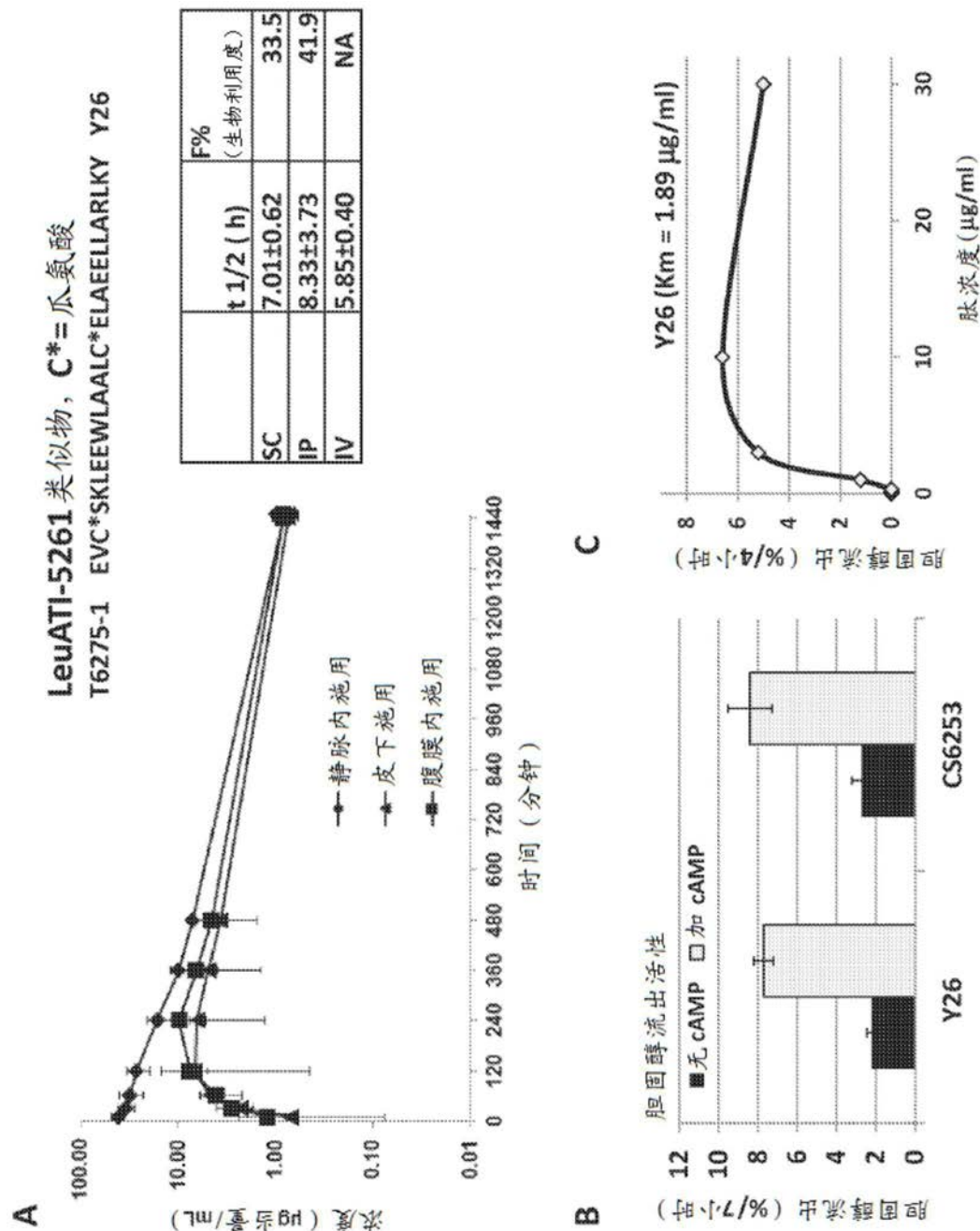


图36

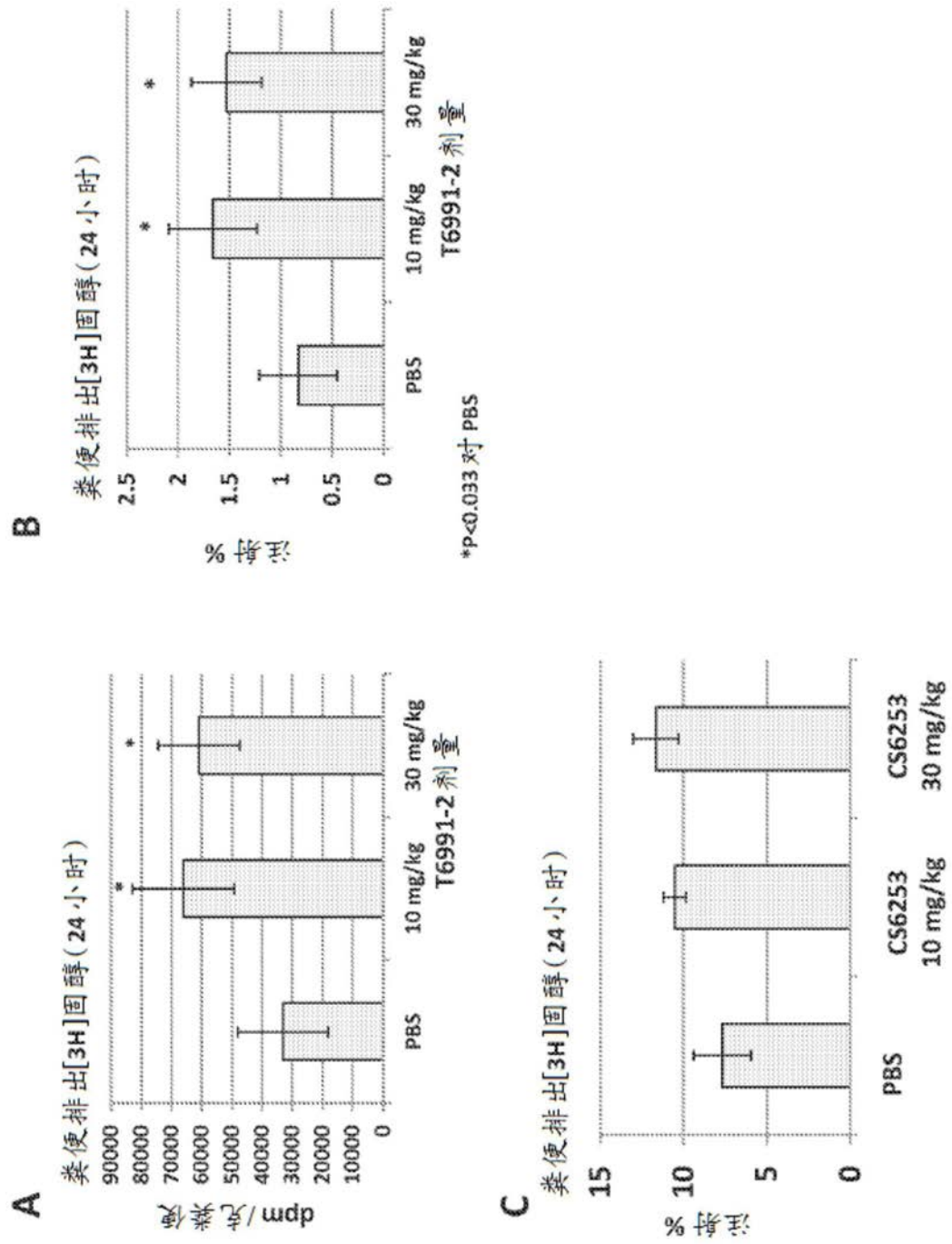


图37

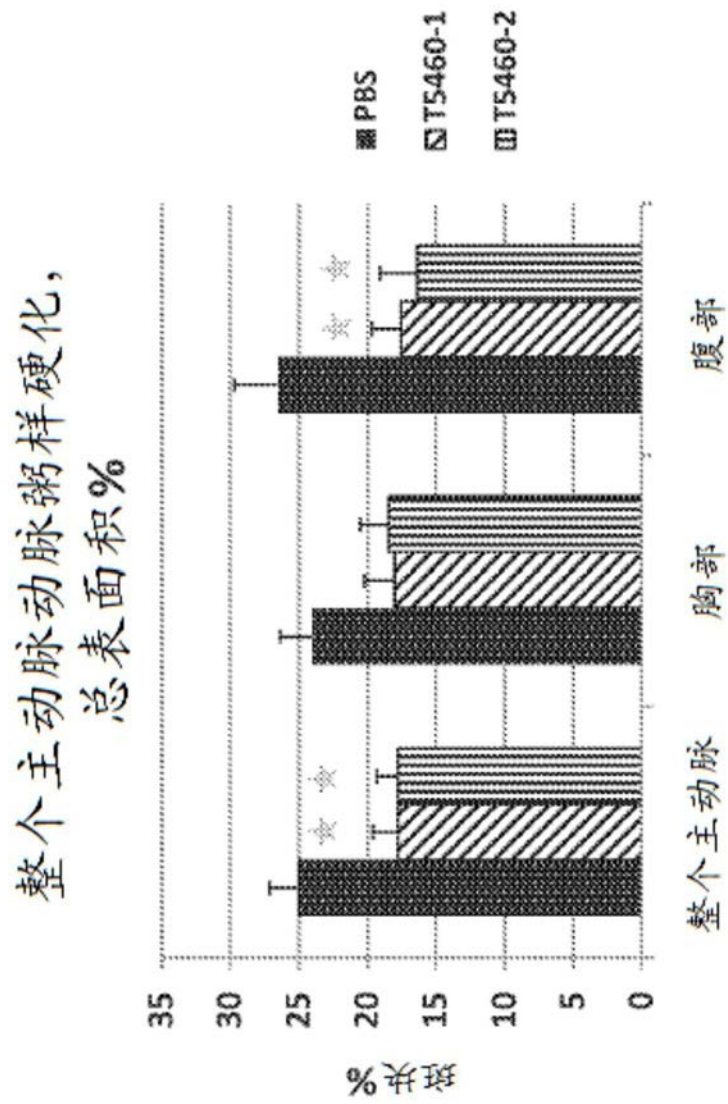


图38

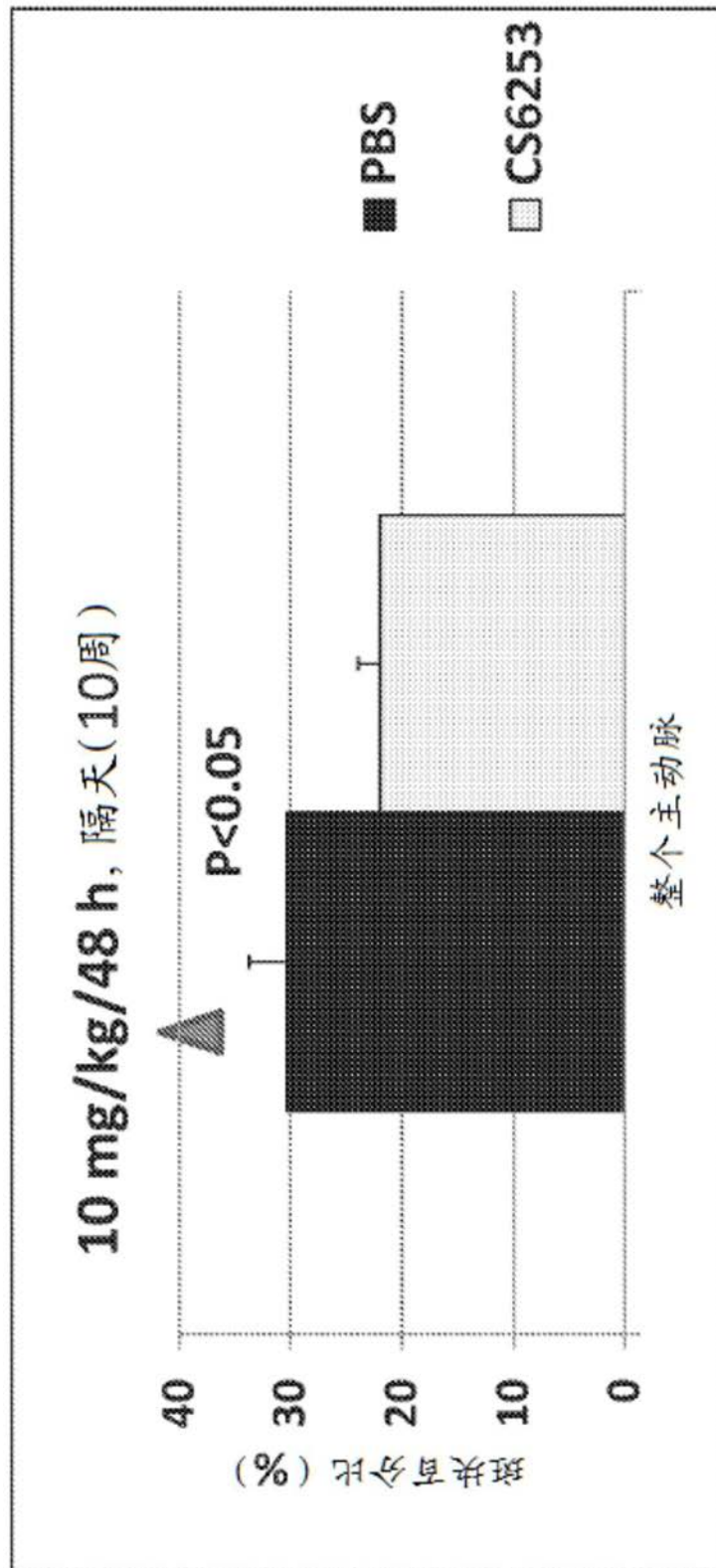


图39

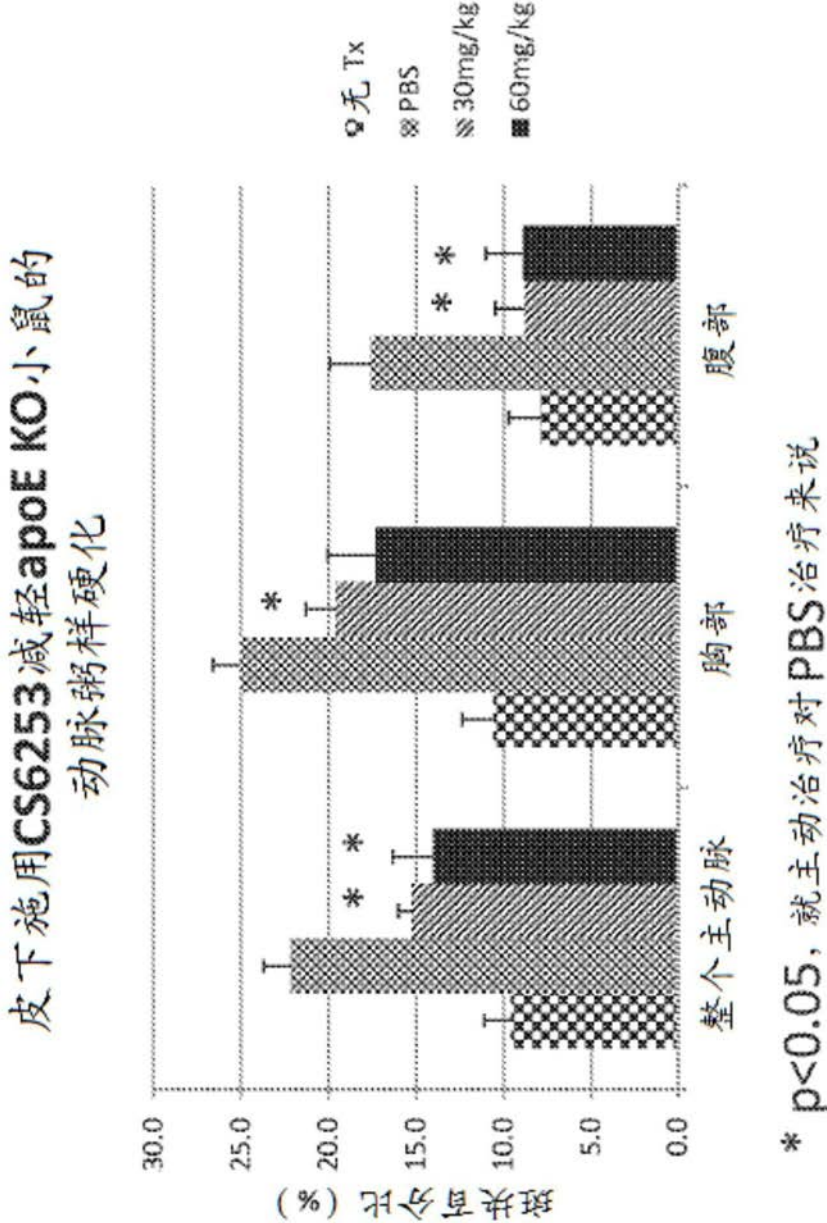


图40

环钩化肽可被设计来介导ABCA1介导的
胆固醇自J774细胞流出

CS6257 (ATI-5261, R3,23→A, 在位置14和21处具有环钩[S5-R8])
EVASKLEEWFAAF(S5)EFAEEF(R8)AALKS

CS6259 (LeuATI-5261, R3,23→Q, 在位置14和21处具有环钩[S5-R8])
EVQSKLEEWLAAL(R8)ELAEEL(S5)AQLKS

4 小时流出% (10 ug/ml 肽)		SD 值	
	CS6257	CS6259	ATI-5261
无 cAMP	0.45	0.67	1.4
加 cAMP	3.06	3.28	7.81
		CS6257	CS6259
		0.05	0.04
		0.84	0.73
			0.22
			0.91

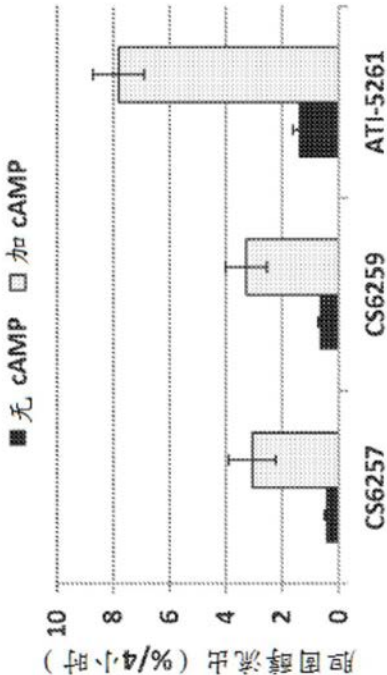


图41

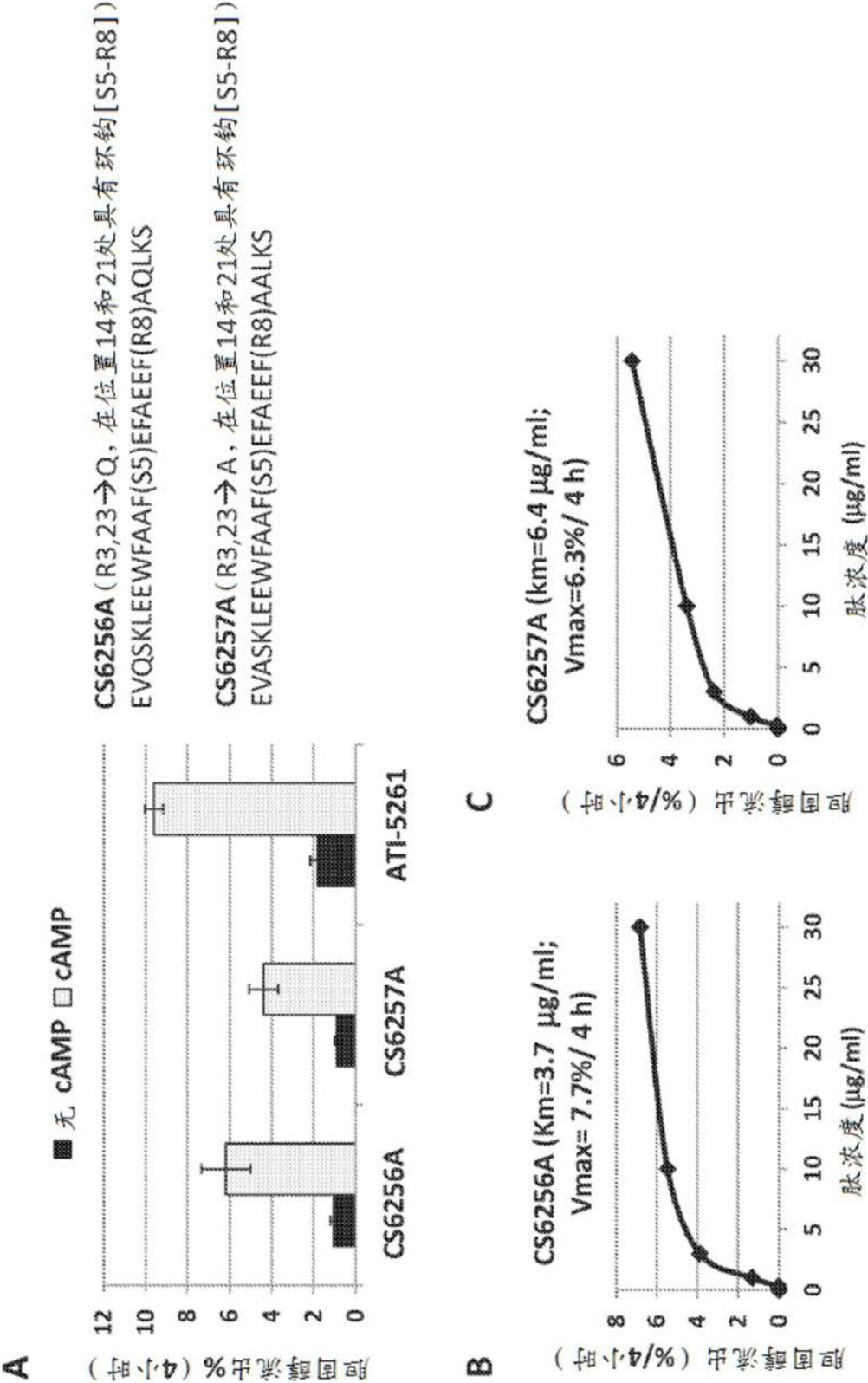


图42

ABCA1配体肽可被设计来具有胆固醇降低和葡萄糖降低性质

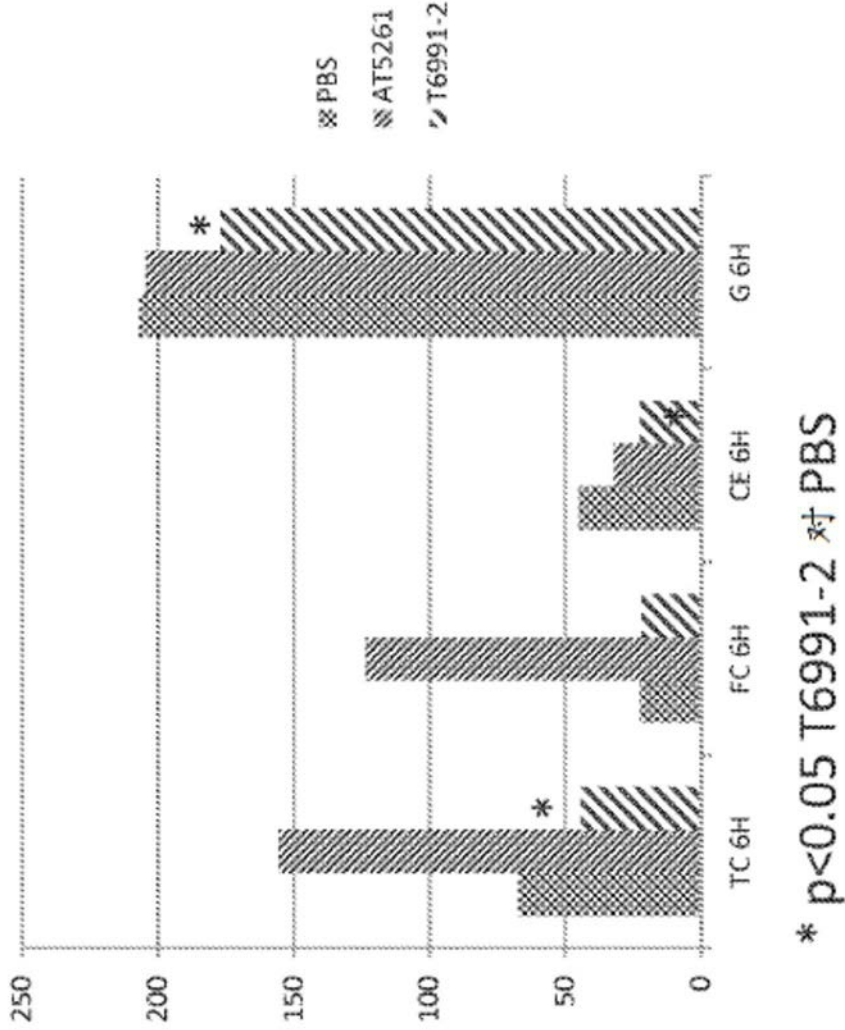


图43

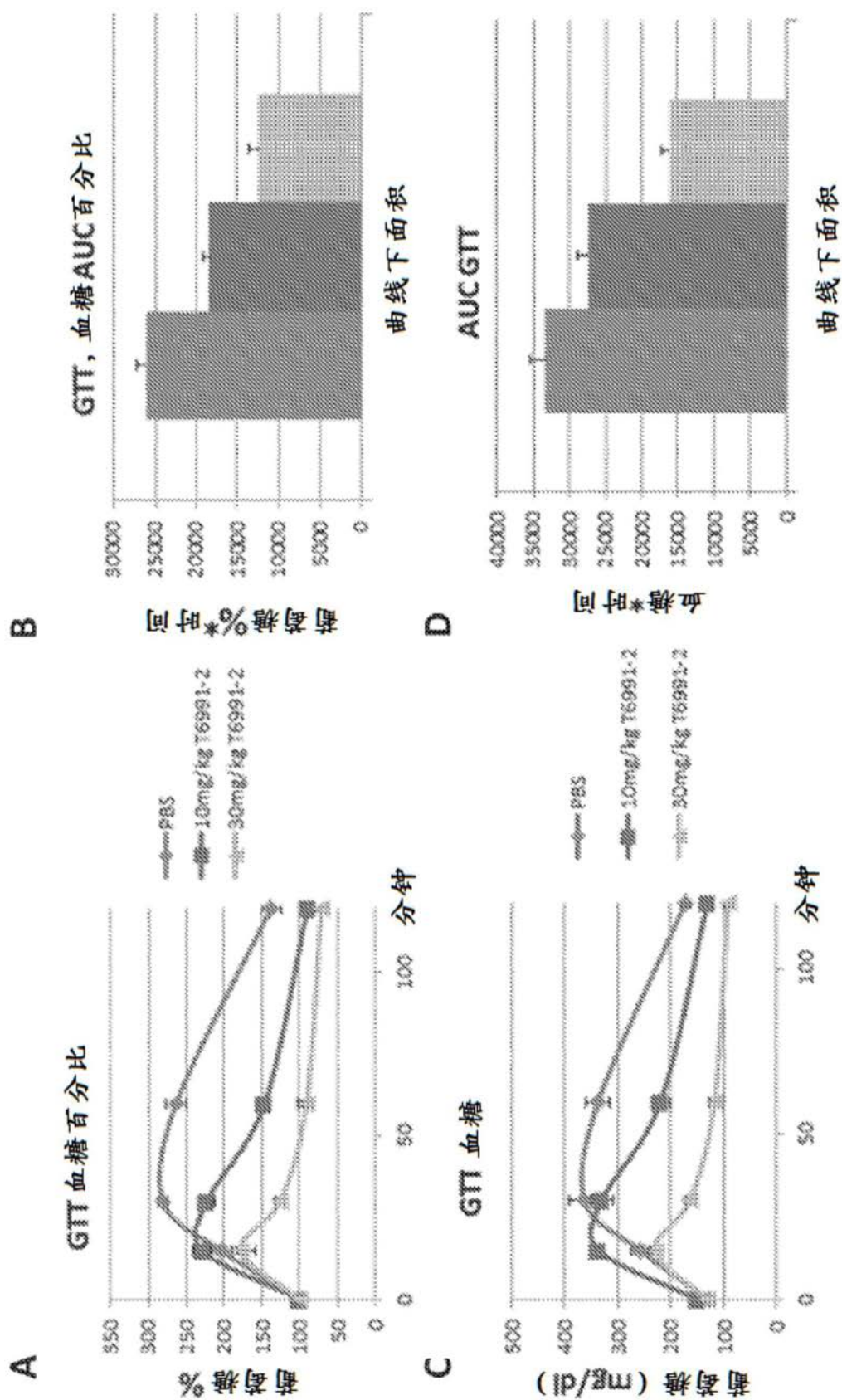


图44

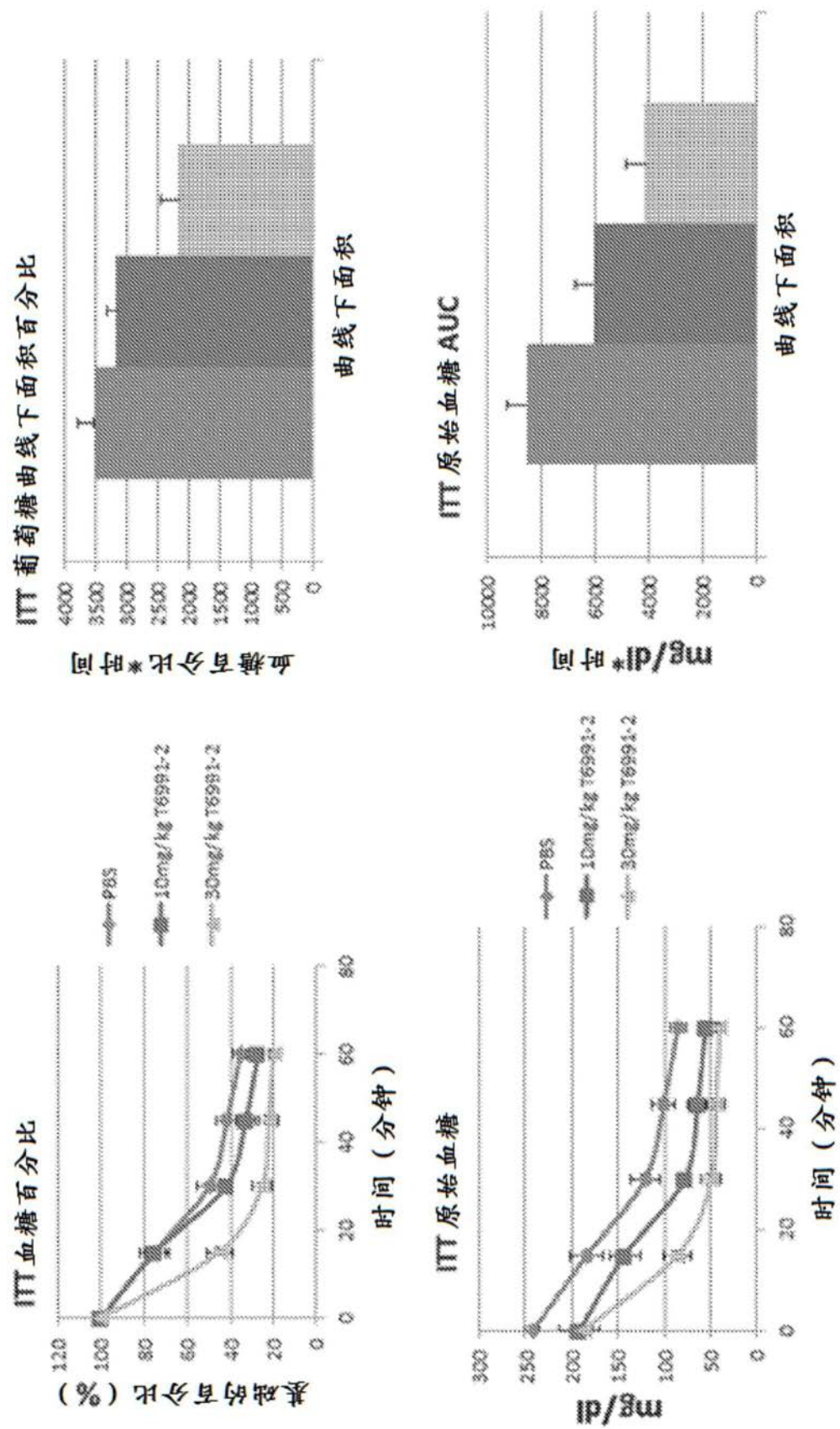


图45

GTT; Ob/Ob小鼠, 6周, 10mg/kg/48h

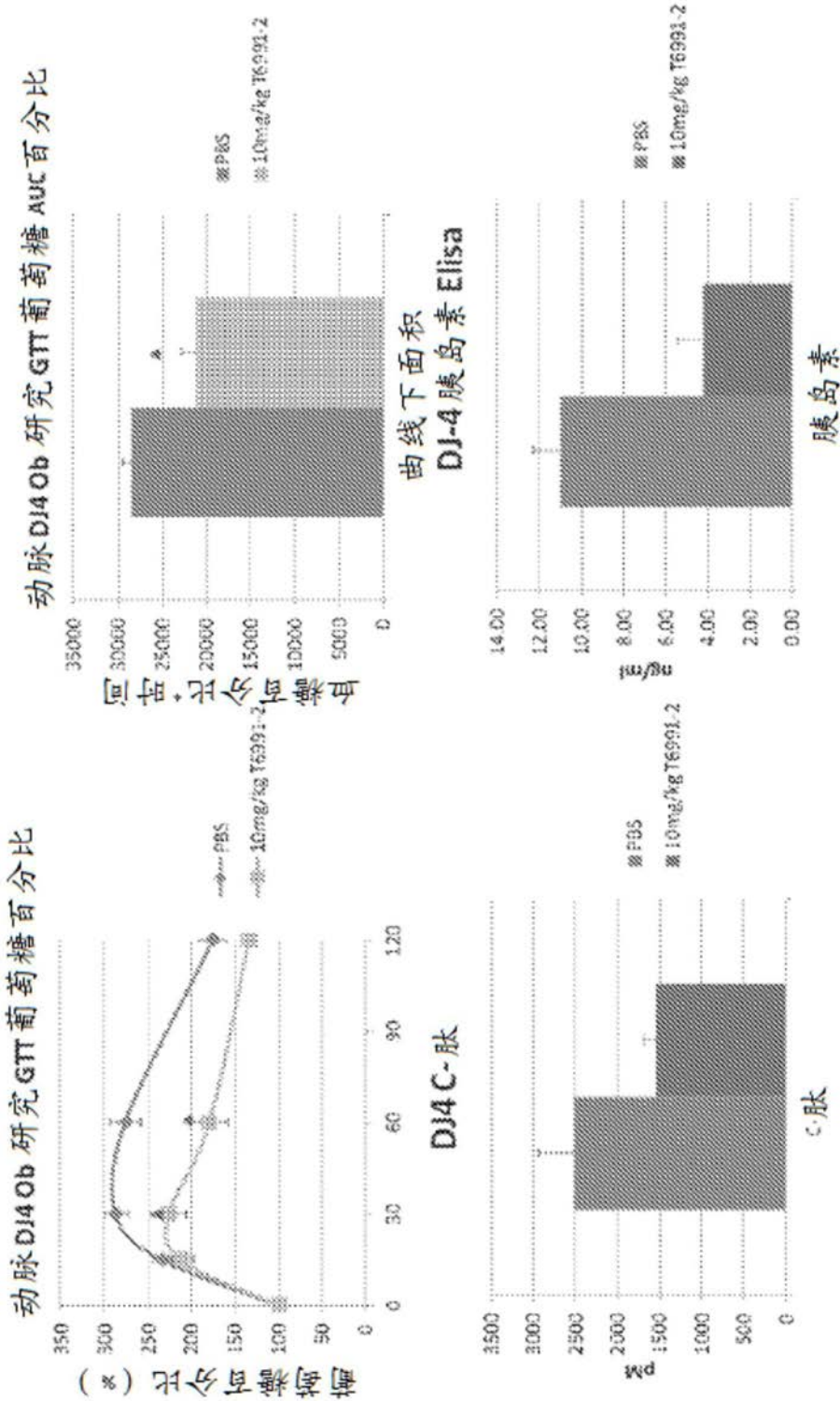


图46

具有异亮氨酸的CitLeuATI-5261(CS6253)类似物, C*=瓜氨酸	
T7983-1	EVRSKLEEWIAAIREIAEEILARL F10,13,16,20→I(所有F都变为异亮氨酸, 于ATI-5261的24聚体中)
T7983-2	EVC*SKLEEWIAAIC*EIAEEILARL R3, 14→ C*, 于24聚体ATI-5261的异亮氨酸形式中(24聚体T6991-2)
T7983-3	EVC*SKLEEWLAALC*ELAEELLARLKS L20→I, 于CitLeuATI-5261中
T7983-4	EVC*SKLEEWIAALC*ELAEELLARLKS L10, 20→I, 于CitLeuATI-5261中
T7983-5	EVC*SKLEEWLAALC*EIAEELLARLKS L13, 16→I, 于CitLeuATI-5261中
T7983-6	EVC*SKLEEWIAAIC*EIAEELLARLKS L10,13,16→I, 于CitLeuATI-5261中
T7983-7	EVC*SKLEEWLAALC*EIAEELLARLKS L13,16,20→I, 于CitLeuATI-5261中
T7983-8	EVISKLEEWLAALC*ELAEELLARLKS R3→I, 于Cit14_LeuATI-5261中
T7983-9	EVC*SKLEEWLAALIEIAEELLARLKS R14→I, 于 Cit3_LeuATI-5261中
T7983-10	EVISKLEEWLAALIEIAEELLARLKS R3,14→I, 于LeuATI-5261中(即无瓜氨酸)

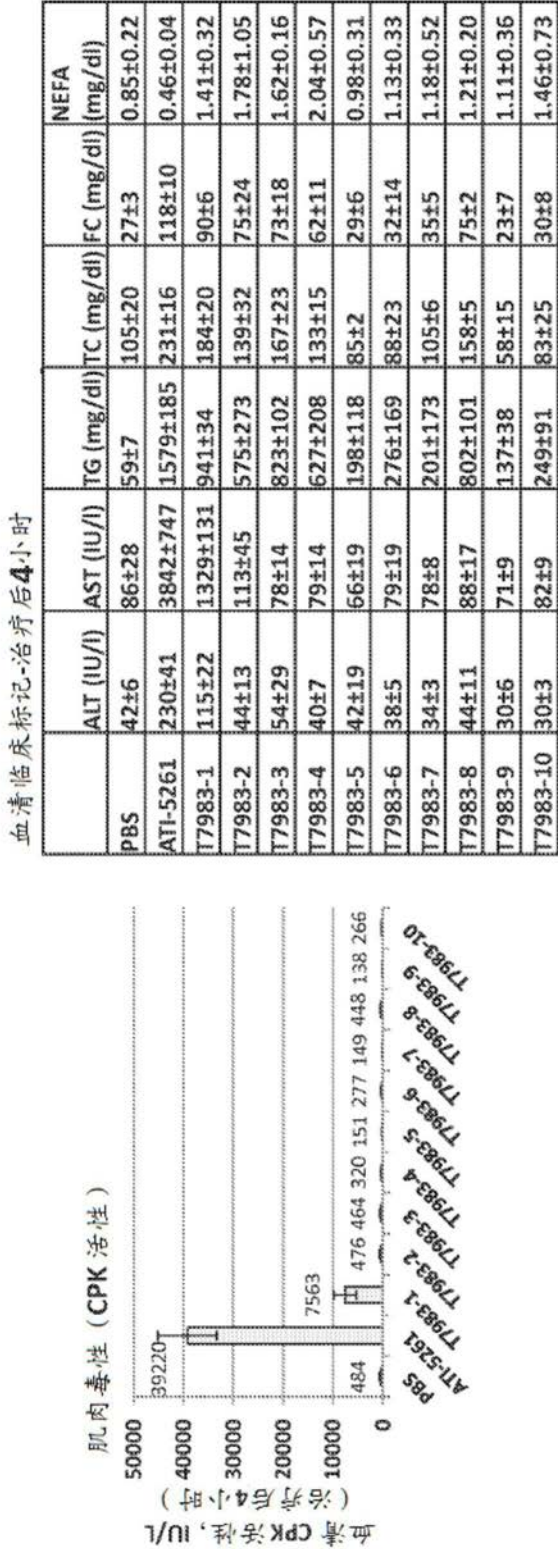


图47

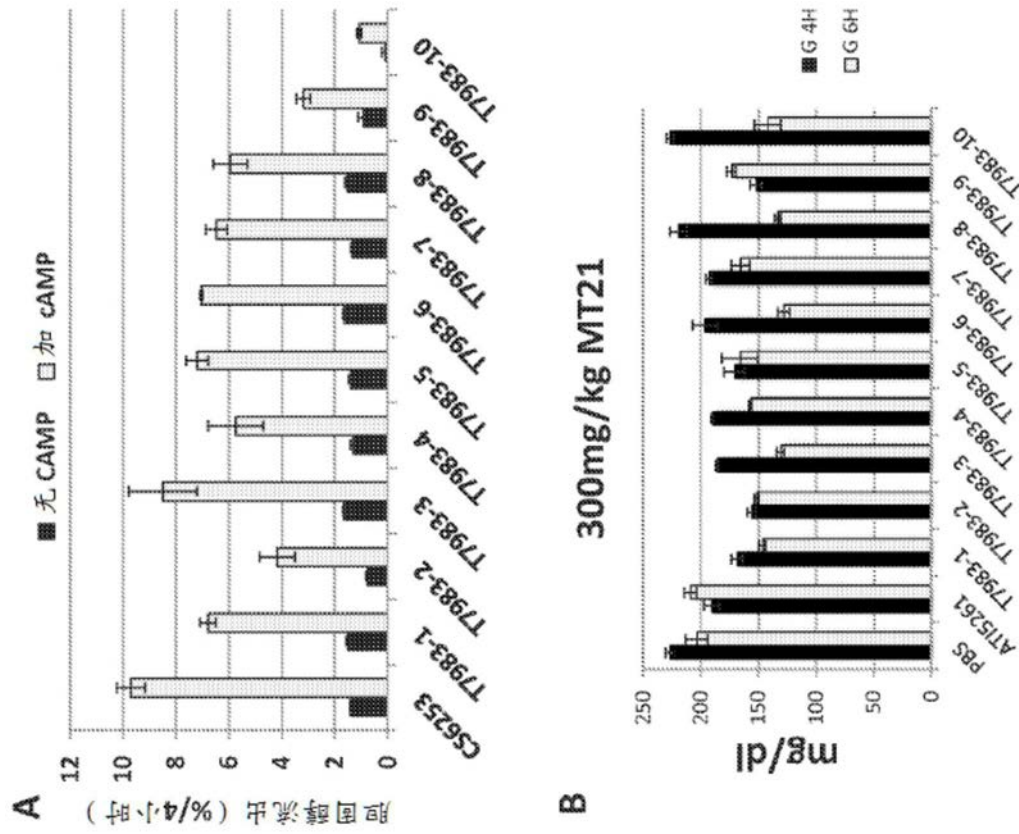
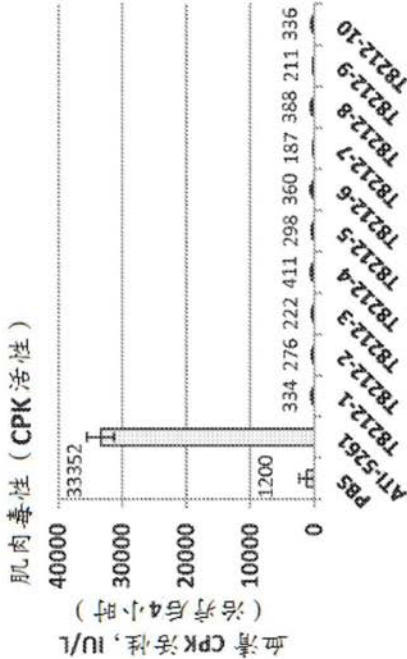


图48

具有异亮氨酸的CitLeuATI-5261(CS6253)类似物, C*=瓜氨酸

T8212-1	EVC*SKIEEWIAALC*ELAEELLARLKS	L10→I, 予CitLeuATI-5261中
T8212-2	EVC*SKIEEWLAALC*ELAEELLARLKS	L13→I, 予CitLeuATI-5261中
T8212-3	EVC*SKIEEWLAALC*EIAEELLARLKS	L16→I, 予CitLeuATI-5261中
T8212-4	EVC*SKIEEWIAALC*ELAEELLARLKS	L10, 20→I, 予CitLeuATI-5261中
T8212-5	EVC*SKIEEWIAALC*ELAEELLARLKS	L6, 10, 20→I, 予CitLeuATI-5261中
T8212-6	EVC*SKIEEWLAALC*EIAEELLARLKS	L6, 13, 16→I, 予CitLeuATI-5261中
T8212-7	EVC*SKIEEWIAALC*EIAEELLARLKS	L6, 10, 13, 16→I, 予CitLeuATI-5261中
T8212-8	EVC*SKIEEWIAALC*EIAEELLARLKS	L6, 10, 13, 16, 20→I, 予CitLeuATI-5261中
T8212-9	EVC*SKIEEWIAALC*EIAEELLARLKS	L6, 10, 13, 16, 20, 21→I, 予CitLeuATI-5261中
T8212-10	EVC*SKIEEWIAALC*EIAEELLARLKS	L6, 10, 13, 16, 20, 21, 24→I, 予CitLeuATI-5261中 (即完全异亮氨酸)

图49



血清临床标记-治疗后4小时

	ALT(IU/l)	AST(IU/l)	TG (mg/dl)	TC (mg/dl)	FC (mg/dl)	NEFA (mg/dl)
PBS	56±8	185±93	25±16	51±7	17±2	0.80±0.05
ATI-5261	247±26	3279±528	770±225	104±25	59±11	0.46±0.15
T8212-1	40±5	123±10	355±287	72±18	39±21	1.60±0.89
T8212-2	49±20	121±31	373±46	63±13	31±1	1.71±0.19
T8212-3	40±9	98±15	335±30	61±2	40±7	1.72±0.31
T8212-4	44±10	118±19	309±13	67±3	41±3	1.76±0.19
T8212-5	58±2	112±14	252±106	43±4	27±9	1.09±0.05
T8212-6	35±5	117±13	305±168	55±19	36±15	1.15±0.36
T8212-7	45±32	87±14	185±182	68±15	36±16	1.04±0.32
T8212-8	52±8	104±27	384±31	72±7	45±3	1.80±0.11
T8212-9	51±33	95±27	376±289	77±32	44±21	1.57±0.36
T8212-10	42±2	116±28	670±92	110±25	68±8	1.95±0.36

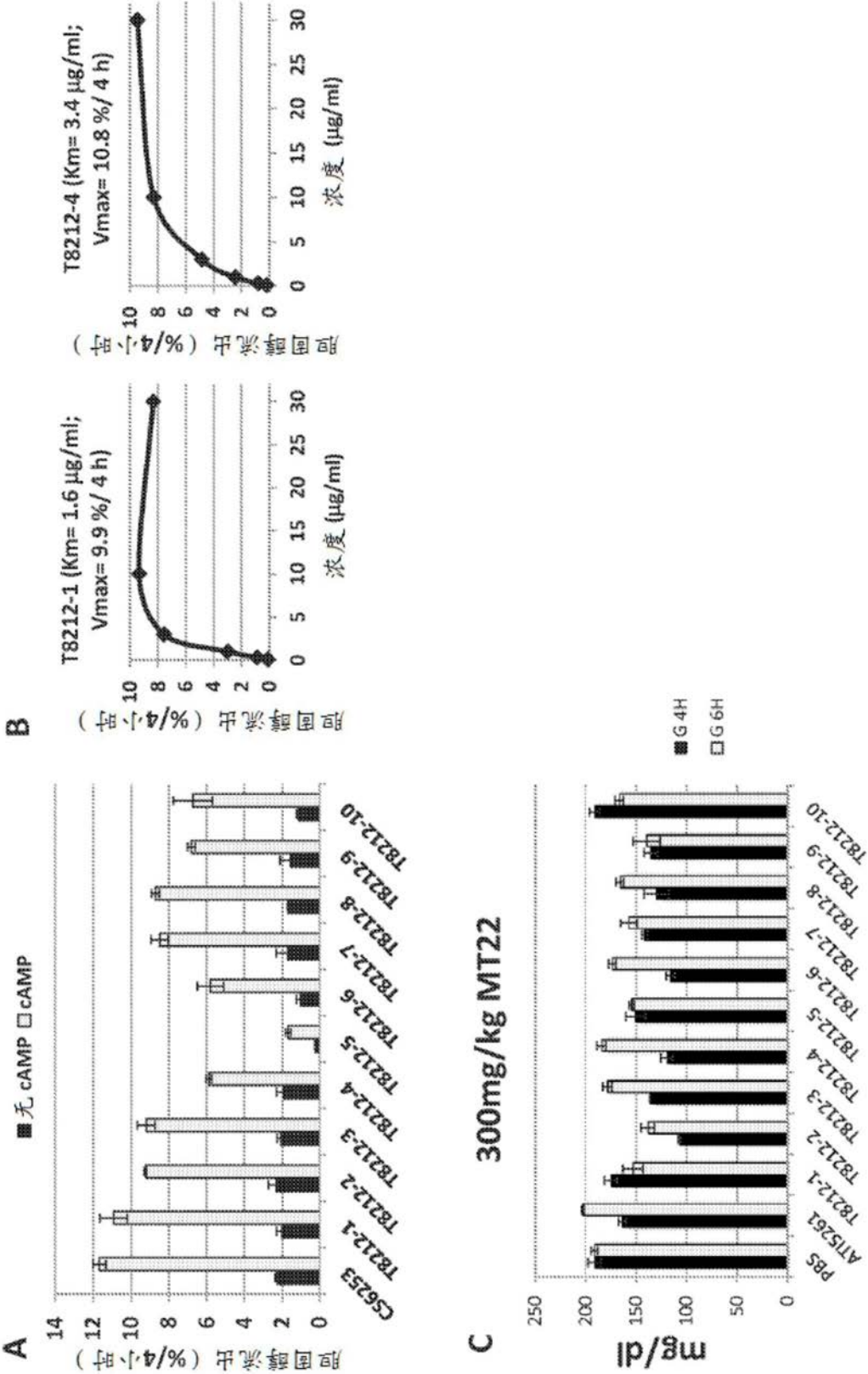


图50

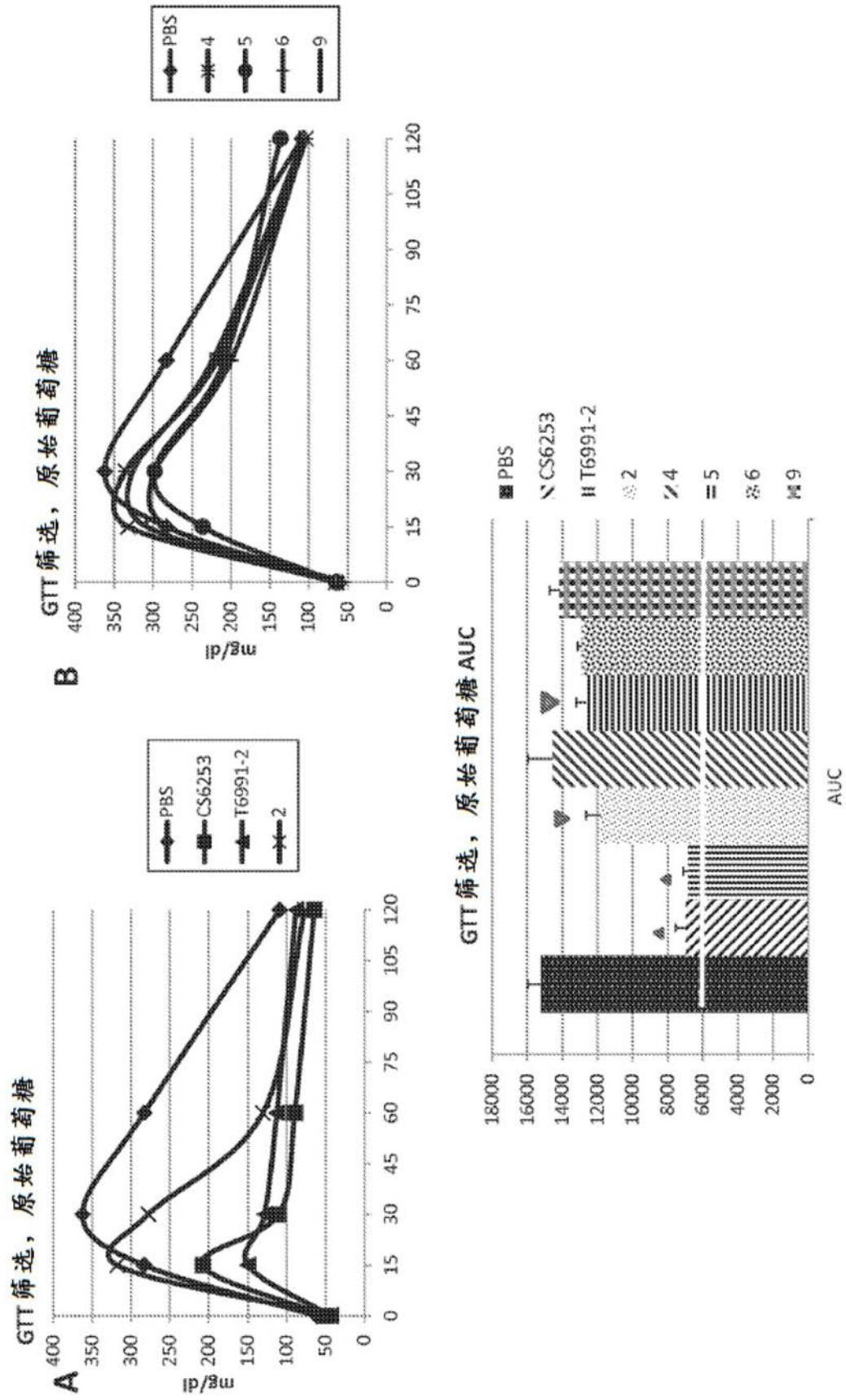


图51

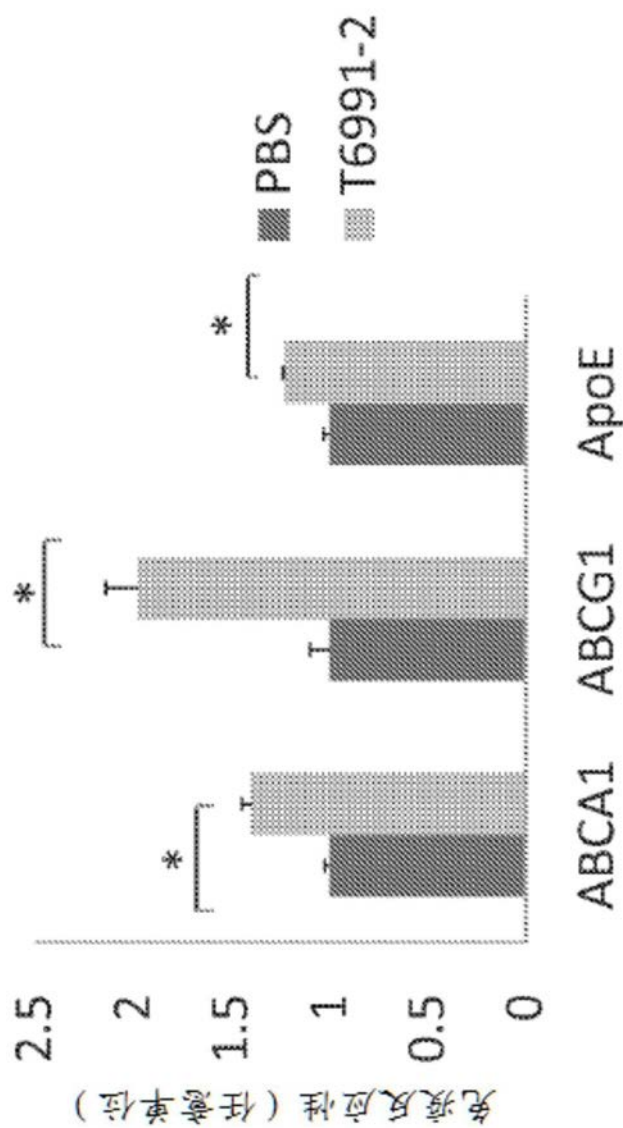


图53

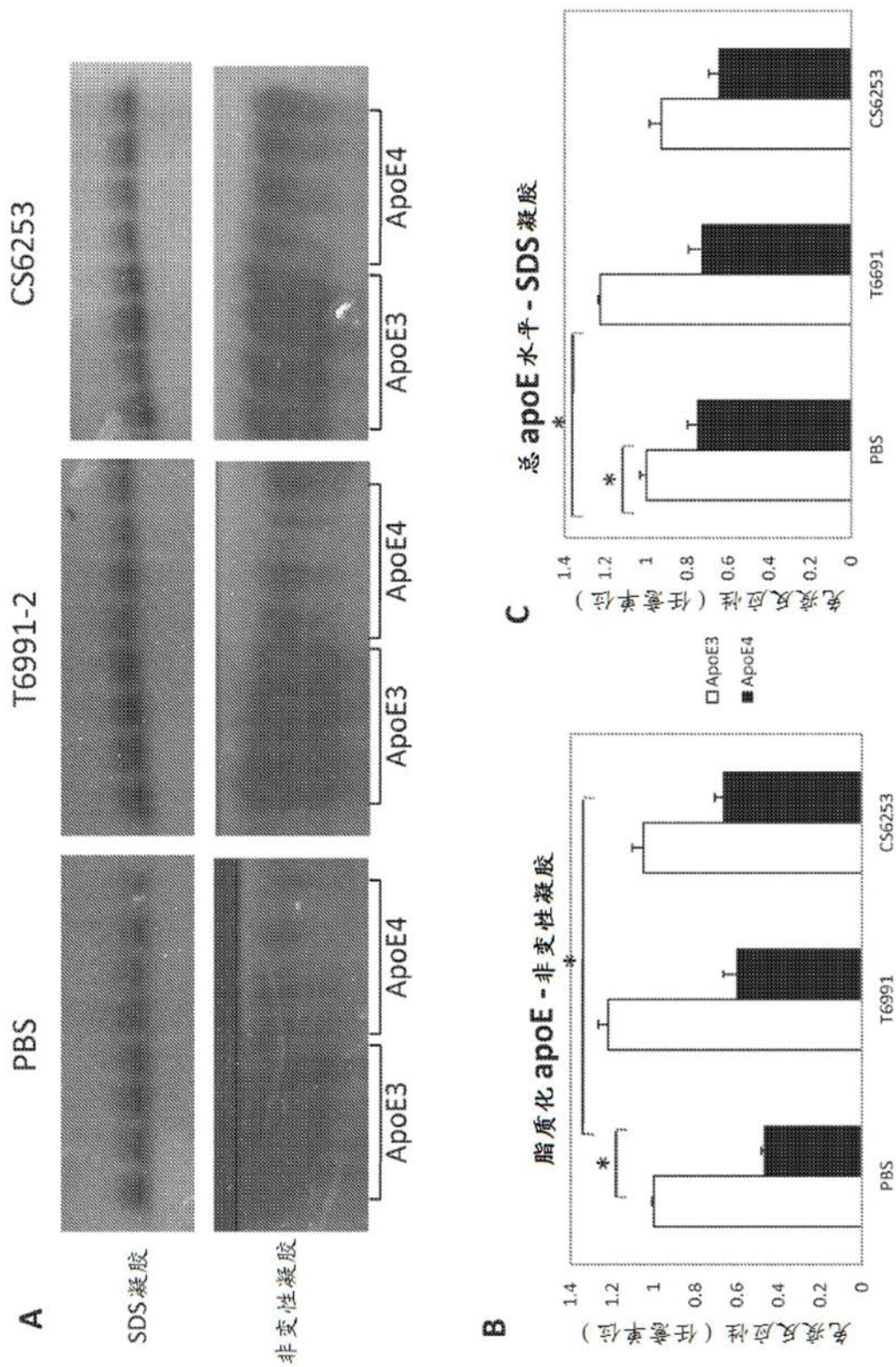


图54

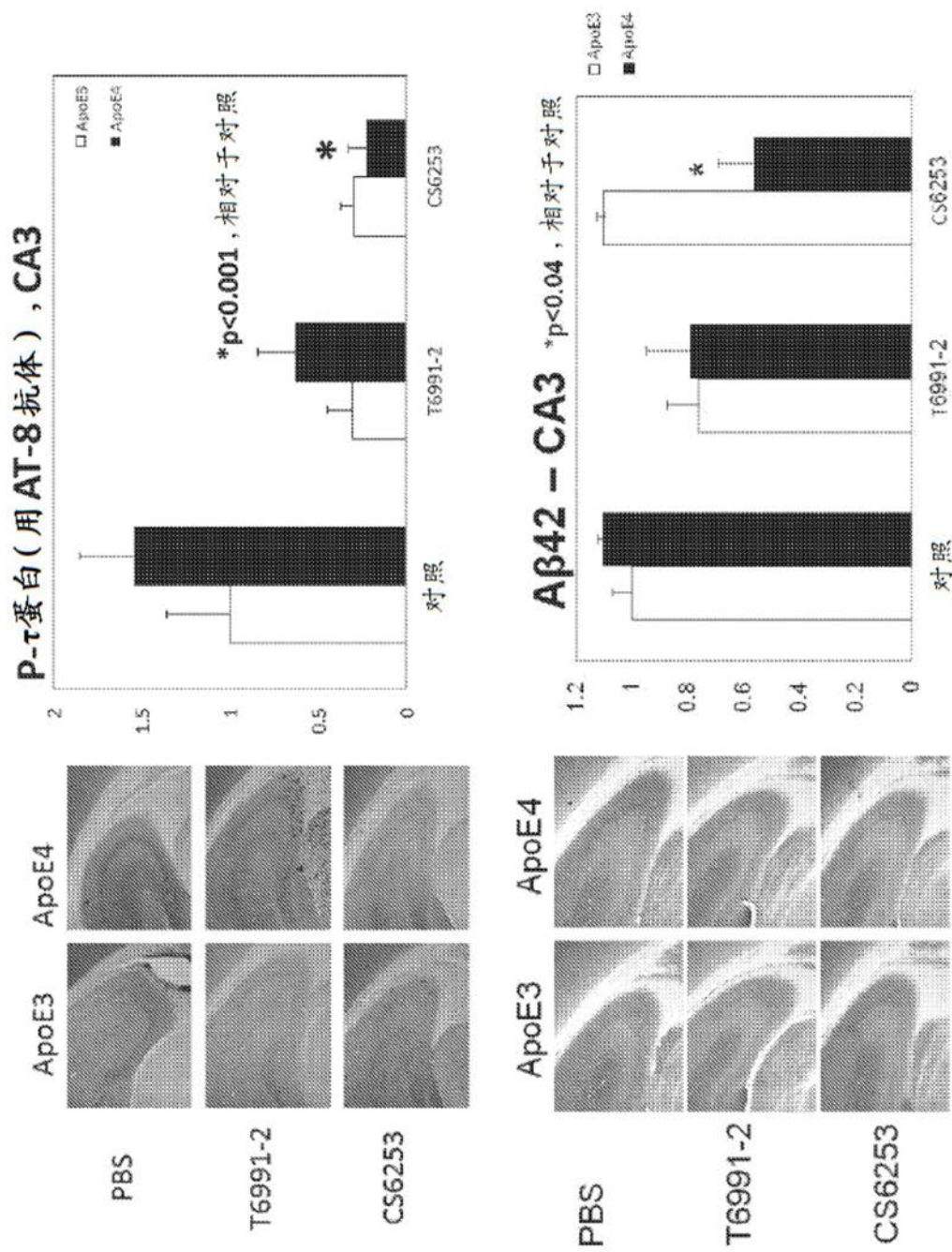


图55

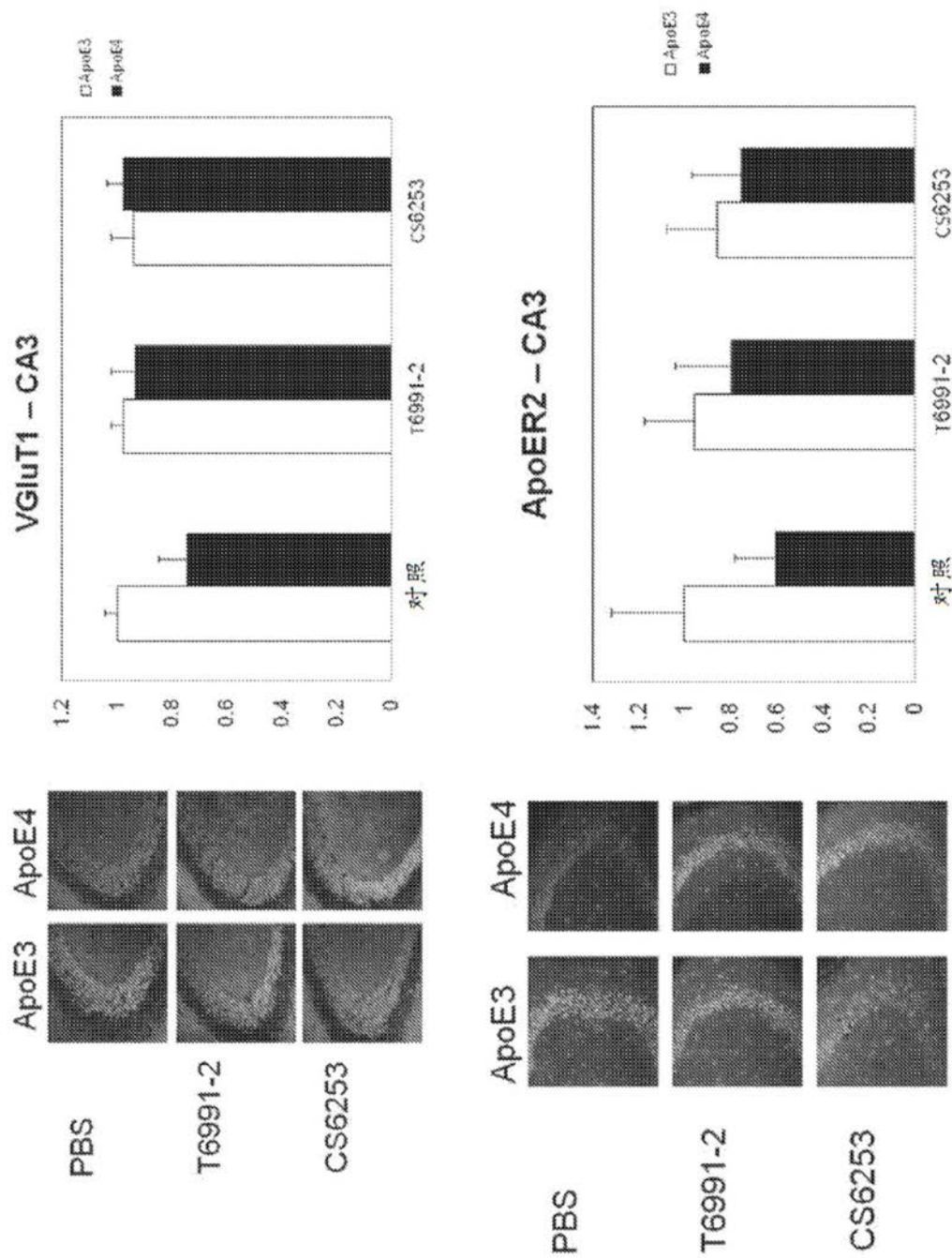


图56