



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1943781 B

(45) 授权公告日 2011.01.12

(21) 申请号 200610100668.9

A61P 33/00 (2006.01)

(22) 申请日 2001.08.23

A61P 25/28 (2006.01)

(30) 优先权数据

A61P 19/10 (2006.01)

09/645,454 2000.08.24 US

A61P 19/02 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

(62) 分案原申请数据

(56) 对比文件

01817280.6 2001.08.23

US 6037323 A, 2000.03.14, 全文.

(73) 专利权人 加利福尼亚大学董事会

审查员 张艳霞

地址 美国加利福尼亚州

专利权人 UAB 研究基金会

(72) 发明人 艾伦·M·福格尔曼

加塔达哈里·M·阿南萨拉梅亚

默罕穆德·纳瓦布

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 巫肖南 封新琴

(51) Int. Cl.

A61K 38/10 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

A61P 31/10 (2006.01)

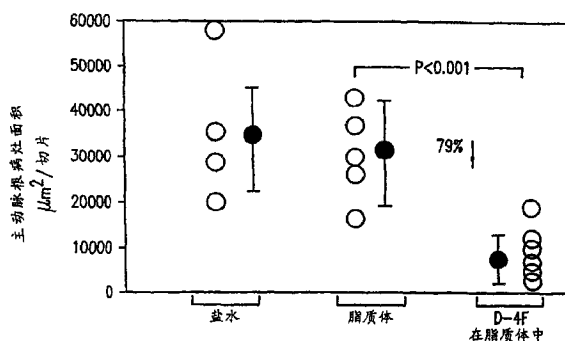
权利要求书 1 页 说明书 88 页 附图 18 页

(54) 发明名称

用于改善动脉粥样硬化的口服给药的肽

(57) 摘要

本发明提供了改善动脉粥样硬化的一种或多种症状的新型肽。该肽包含至少一个 A 型两亲性螺旋和至少一个 D-氨基酸。该肽是高度稳定的且容易通过口服途径给药。



1. 一种改善动脉粥样硬化症状的肽, 其中
所述肽的氨基酸序列由序列D-W-F-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F-(SEQ ID NO :5)组成;
所述的肽不包含“D”氨基酸残基;
所述的肽包含偶联到氨基末端的第一保护基团和偶联到羧基末端的第二保护基团;且
所述的肽保护磷脂, 使其不被氧化剂氧化。
2. 权利要求1的肽, 其中所述的第一保护基团和所述的第二保护基团独立的选自下组: 乙酰基, 酰胺, 3到20个碳原子的烷基, Fmoc, t-boc, 9-芴乙酰基, 1-芴羧基, 9-芴羧基, 9-芴酮-1-羧基, 苄氧基羰基, 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(Mtr), 1,3,5-三甲基苯-2-磺酰基(Mts), 4,4二甲氧基二苯甲基(Mbh), 甲苯磺酰基(Tos), 2,2,5,7,8-五甲基苯并二氢吡喃-6-磺酰基(Pmc), 4-甲苄基(MeBzl), 4-甲氧基苄基(MeOBzl), 苄氧基(BzlO), 苄基(Bzl), 苯甲酰基(Bz), 3-硝基-2-吡啶磺酰基(Npys), 1-(4,4-二甲基-2,6-二偶氮亚环己基)乙基(Dde), 2,6-二氯苄基(2,6-DiCl-Bzl), 2-氯苄氧基羰基(2-Cl-Z), 2-溴苄氧基羰基(2-Br-Z), 苄氧基甲基(Bom), t-丁氧基羰基(Boc), 环己氧基(cHxO), t-丁氧基甲基(Bum), t-丁氧基(tBuO), t-丁基(tBu), 乙酰基(Ac), 苯甲酰基, 苄酯基, 丙基, 丁基, 戊基, 己基和三氟乙酰基(TFA)。
3. 权利要求1的肽, 其中所述第一保护基团是选自下组的保护基团: 苯甲酰基, 乙酰基, 丙烯基, 苄酯基, 丙基, 丁基, 戊基, 己基, 和3到20个碳原子的烷基。
4. 权利要求3的肽, 其中所述第二保护基团是酰胺。
5. 权利要求3的肽, 其中所述第一保护基团是乙酰基且所述第二保护基团是酰胺。
6. 权利要求1的肽, 其中所述的氧化剂选自下组: 过氧化氢, 13(S)-HPODE, 15(S)-HPETE, HPODE, HPETE, HODE 和 HETE。
7. 权利要求1的肽, 其中所述的磷脂选自下组: 1-棕榈酰-2-花生四烯酰-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(PAPC), 1-硬脂酰-2-花生四烯酰-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(SAPC), 1-硬脂酰-2-花生四烯酰-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(SAPE)。
8. 药用组合物, 包含权利要求1-7任一项的肽, 其中所述的肽与可药用赋形剂混合。
9. 权利要求8的药用组合物, 其中所述的可药用赋形剂是适合于口服给药至哺乳动物的可药用赋形剂。
10. 依照权利要求1-7任一项的肽, 其是用于动脉粥样硬化的预防或治疗的肽。
11. 依照权利要求1-7任一项的肽, 其是用于与炎症的急性期反应相关的冠状动脉并发症的预防或治疗的肽。
12. 依照权利要求1-7任一项的肽用于制造预防或治疗动脉粥样硬化的药物的用途。
13. 依照权利要求1-7任一项的肽用于制造预防或治疗与炎症的急性期反应相关的冠状动脉并发症的药物的用途。
14. 权利要求12或13的用途, 其中所述的肽在可药用赋形剂中配制成单位剂量形式。
15. 权利要求12或13的用途, 其中所述的肽配制用于通过选自下组的路径给药: 口服给药, 鼻腔给药, 直肠给药, 腹膜内注射, 血管内注射, 皮下注射, 经皮给药和肌肉内注射。

用于改善动脉粥样硬化的口服给药的肽

[0001] 本申请是申请日为 2001 年 8 月 23 日、申请号为 200510103876.X、发明名称为“用于改善动脉粥样硬化的口服给药的肽”的专利申请的分案申请。

技术领域

[0002] 相关申请的交叉参考

[0003] 本申请是 2001 年 6 月 29 日申请的 USSN 09/896,841 的部分继续申请,而后者是 2000 年 8 月 24 日申请的 USSN 09/645,454 的部分继续申请,这两者以其整体作为参考文献在本文中引用用于所有目的。

[0004] 对于由联邦政府赞助的研究和开发所做出的发明的权利声明

[0005] 本工作由美国公共卫生部和国家心、肺和血液研究所拨款 HL30568 和 HL34343 资助。美国政府拥有明确的对本发明的权利。

[0006] 本发明涉及动脉粥样硬化领域。具体地说,本发明涉及可口服用药且改善动脉粥样硬化的一种或多种症状的一类肽的鉴定。

背景技术

[0007] 心血管疾病特别是在美国和西欧国家中是发病率和死亡率的主要原因。在心血管疾病的形成中涉及的一些病原性因素包括对该疾病的遗传诱因,性别,诸如吸烟和饮食的生活方式因素,年龄,高血压,和高脂血症,包括高胆固醇血症。其中一些因素,特别是高脂血症和高胆固醇血症(血液胆固醇浓度高)提供了与动脉粥样硬化相关的重要风险因素。

[0008] 胆固醇在血液中以游离状态和脂蛋白颗粒内的酯化胆固醇存在,通常称为乳糜微粒,极低密度脂蛋白(VLDL),低密度脂蛋白(LDL),和高密度脂蛋白(HDL)。血液中的总胆固醇浓度受下列因素影响:(1)从消化道吸收的胆固醇,(2)从诸如糖类,蛋白质,脂肪和乙醇的饮食成分合成的胆固醇,和(3)由组织,特别是肝脏从血液中除去胆固醇并随后将胆固醇转变成胆汁酸,类固醇激素,和胆汁胆固醇。

[0009] 血液胆固醇浓度的维持受遗传和环境因素影响。遗传因素包括胆固醇生物合成中的限速酶浓度,肝脏中低密度脂蛋白的受体浓度,胆固醇胆汁酸转化的限速酶浓度,脂蛋白的合成和分泌速率及人的性别。影响人类血液胆固醇浓度的环境因素包括饮食结构,吸烟影响,身体活动,和各种药物的使用。饮食变量包括脂肪的含量和类型(饱和的和多不饱和脂肪酸),胆固醇的含量,纤维的含量和类型,也许还有诸如维生素C和D的维生素和诸如钙的无机物的含量。

[0010] 流行病学研究表明高密度脂蛋白(HDL)和载脂蛋白(apo)A-I水平与动脉粥样硬化结果的发生反相关(Wilson等(1988)Arteriosclerosis 8:737-741)。给喂养致动脉粥样硬化食物的兔子注射 HDL 显示出抑制动脉粥样硬化病灶形成(Badimon等(1990)J Clin. Invest. 85:1234-1241)。

[0011] 人 apo A-I 由于其抗致动脉粥样化特性而成为了被深入研究的主题。包括 apo A-I 的可交换的载脂蛋白具有脂缔合结构域(Brouillette 和 Anantharamaiah(1995)Biochim.

Biophys. Acta 1256 :103-129 ;Segrest 等 (1974)FEBS Lett. 38 :247-253)。假定 Apo A-I 具有 8 个串联重复的 22mer 序列,其中大多数具有形成 A 型两亲性螺旋结构的潜力 (Segrest 等 (1974)FEBS Lett. 38 :247-253)。A 型两亲性螺旋的特征包括具有在极性 - 非极性界面的带正电荷的残基和在极性面中央带负电荷的残基 (Segrest 等 (1974)FEBS Lett. 38 :247-253 ;Segrest 等 (1990)Proteins :Structure, Function, and Genetics 8 :103-117)。已表明 Apo A-I 与磷脂强烈缔合形成复合物并启动富含胆固醇的细胞中的胆固醇流出。apo A-I 血清水平的传递和维持有效减轻动脉粥样硬化的一种或多种症状至今仍证明是难以捉摸的。

发明内容

[0012] 本发明提供了新的肽,其施用可减轻动脉粥样硬化的一种或多种症状。

[0013] 具体地说,本发明的发现是包含一种 A 型两亲性螺旋的肽当用“D”氨基酸残基制成和 / 或具有保护的氨基和羧基末端时可通过口服施用给生物体,容易被吸收并传递到血清,且有效减轻动脉粥样硬化的一种或多种症状。

[0014] 因此,在一个实施方案中,本发明提供了改善动脉粥样硬化症状的肽,其中该肽的长度范围从大约 10 个到大约 30 个氨基酸,包含至少一个 A 型两亲性螺旋,包含至少一个“D”氨基酸残基,防止磷脂被氧化剂氧化,且不是 D-18A 肽 (例如,具有全部 D 型氨基酸残基的 D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-A-F (SEQ ID NO :1))。在特别优选的实施方案中,该肽还包含偶联到氨基和 / 或羧基末端的保护基团。优选的保护基团包括,但不限于乙酰基,酰胺,3 到 20 个碳原子的烷基, Fmoc, t-boc, 9- 芴乙酰基,1- 芴羧基,9- 芴羧基,9- 芴酮-1- 羧基,苄氧基羰基,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 (Mtr),1,3,5- 三甲基苯-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- 五甲基苯并二氢吡喃-6- 磺酰基 (Pmc),4- 甲苄基 (MeBzl),4- 甲氧基苄基 (MeOBzl), 苄氧基 (BzlO), 苄基 (Bzl), 苯甲酰基 (Bz),3- 硝基-2- 吡啶磺酰基 (3-nitro-2-pyridinesulphenyl, Npys),1-(4,4- 二甲基 (dimentyl)-2,6- 二偶氮亚环己基) 乙基 (Dde),2,6- 二氯苄基 (2,6-DiCl-Bzl),2- 氯苄氧基羰基 (2-Cl-Z),2- 溴苄氧基羰基 (2-Br-Z), 苄氧基甲基 (Bom), t- 丁氧基羰基 (Boc), 环己氧基 (cHxO), t- 丁氧基甲基 (Bum), t- 丁氧基 (tBuO), t- 丁基 (tBu), 乙酰基 (Ac), 和三氟乙酰基 (TFA)。在某些特别优选的实施方案中,该肽还包含与氨基末端偶联的第一保护基团和与羧基末端偶联的第二保护基团。特别优选的肽密切模拟人或小鼠 apo A-I 的 A 型两亲性螺旋。在某些实施方案中,优选的肽包含与由编码人或小鼠 apo A-I 的 A 型两亲性螺旋的外显子编码的多肽有大于大约 50% 的氨基酸序列同一性。在某些优选的实施方案中,至少大约 10%, 优选至少 20%, 更优选至少大约 30%, 也更优选至少大约 50%, 甚至更优选至少大约 75%, 且最优选至少 90% 和甚至 100% 的对映体氨基酸是“D”氨基酸。该肽可与可药用赋形剂 (例如,适合于给哺乳动物口服用药的赋形剂) 结合。

[0015] 在某些特别优选的实施方案中,该肽包含一个或多个下列氨基酸序列:

[0016] D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-A-F- (SEQ ID NO :2),

[0017] D-W-F-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-A-F- (SEQ ID NO :3),

- [0018] D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F-(SEQ ID NO :4),
- [0019] D-W-F-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F-(SEQ ID NO :5),
- [0020] D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-F-E-K-F-K-E-F-F-(SEQ ID NO :6),
- [0021] D-W-L-K-A-F-Y-D-K-F-F-E-K-F-K-E-F-F-(SEQ ID NO :7),
- [0022] D-W-F-K-A-F-Y-D-K-F-F-E-K-F-K-E-F-F-(SEQ ID NO :8),
- [0023] D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-F-F-(SEQ ID NO :9),
- [0024] D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-F-E-K-F-K-E-A-F-(SEQ ID NO :10),
- [0025] D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-F-E-K-L-K-E-F-F-(SEQ ID NO :11),
- [0026] D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-F-F-(SEQ ID NO :12),
- [0027] D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-F-E-K-F-K-E-F-F-(SEQ ID NO :13),
- [0028] E-W-L-K-L-F-Y-E-K-V-L-E-K-F-K-E-A-F-(SEQ ID NO :14),
- [0029] E-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F-(SEQ ID NO :15),
- [0030] E-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-F-F-(SEQ ID NO :16),
- [0031] E-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-F-E-K-F-K-E-A-F-(SEQ ID NO :17),
- [0032] E-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-F-E-K-L-K-E-F-F-(SEQ ID NO :18),
- [0033] E-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-F-F-(SEQ ID NO :19),
- [0034] E-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-F-E-K-F-K-E-F-F-(SEQ ID NO :20),
- [0035] A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-A-F-(SEQ ID NO :21),
- [0036] A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F-(SEQ ID NO :22),
- [0037] A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F-(SEQ ID NO :23),
- [0038] A-F-Y-D-K-F-F-E-K-F-K-E-F-F-(SEQ ID NO :24),
- [0039] A-F-Y-D-K-F-F-E-K-F-K-E-F-F-(SEQ ID NO :25),
- [0040] A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F-(SEQ ID NO :26),
- [0041] A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-F-F-(SEQ ID NO :27),
- [0042] A-F-Y-D-K-V-F-E-K-F-K-E-A-F-(SEQ ID NO :28),
- [0043] A-F-Y-D-K-V-F-E-K-L-K-E-F-F-(SEQ ID NO :29),
- [0044] A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-F-F-(SEQ ID NO :30),
- [0045] K-A-F-Y-D-K-V-F-E-K-F-K-E-F-(SEQ ID NO :31),
- [0046] L-F-Y-E-K-V-L-E-K-F-K-E-A-F-(SEQ ID NO :32),
- [0047] A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F-(SEQ ID NO :33),
- [0048] A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-F-F-(SEQ ID NO :34),
- [0049] A-F-Y-D-K-V-F-E-K-F-K-E-A-F-(SEQ ID NO :35),
- [0050] A-F-Y-D-K-V-F-E-K-L-K-E-F-F-(SEQ ID NO :36),
- [0051] A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-F-F-(SEQ ID NO :37),
- [0052] A-F-Y-D-K-V-F-E-K-F-K-E-F-F-(SEQ ID NO :38),
- [0053] D-W-L-K-A-L-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-A-L-(SEQ ID NO :39),
- [0054] D-W-F-K-A-F-Y-E-K-V-A-E-K-L-K-E-F-F-(SEQ ID NO :40),
- [0055] D-W-F-K-A-F-Y-E-K-F-F-E-K-F-K-E-F-F-(SEQ ID NO :41),
- [0056] E-W-L-K-A-L-Y-E-K-V-A-E-K-L-K-E-A-L-(SEQ ID NO :42),

- [0057] E-W-L-K-A-F-Y-E-K-V-A-E-K-L-K-E-A-F-(SEQ ID NO :43),
- [0058] E-W-F-K-A-F-Y-E-K-V-A-E-K-L-K-E-F-F-(SEQ ID NO :44),
- [0059] E-W-L-K-A-F-Y-E-K-V-F-E-K-F-K-E-F-F-(SEQ ID NO :45),
- [0060] E-W-L-K-A-F-Y-E-K-F-F-E-K-F-K-E-F-F-(SEQ ID NO :46),
- [0061] E-W-F-K-A-F-Y-E-K-F-F-E-K-F-K-E-F-F-(SEQ ID NO :47),
- [0062] D-F-L-K-A-W-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-A-W-(SEQ ID NO :48),
- [0063] E-F-L-K-A-W-Y-E-K-V-A-E-K-L-K-E-A-W-(SEQ ID NO :49),
- [0064] D-F-W-K-A-W-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-W-W-(SEQ ID NO :50),
- [0065] E-F-W-K-A-W-Y-E-K-V-A-E-K-L-K-E-W-W-(SEQ ID NO :51),
- [0066] D-K-L-K-A-F-Y-D-K-V-F-E-W-A-K-E-A-F-(SEQ ID NO :52),
- [0067] D-K-W-K-A-V-V-D-K-F-A-E-A-F-K-E-F-L-(SEQ ID NO :53),
- [0068] E-K-L-K-A-F-Y-E-K-V-F-E-W-A-K-E-A-F-(SEQ ID NO :54),
- [0069] E-K-W-K-A-V-Y-E-K-F-A-E-A-F-K-E-F-L-(SEQ ID NO :55),
- [0070] D-W-L-K-A-F-V-D-K-F-A-E-K-F-K-E-A-Y-(SEQ ID NO :56),
- [0071] E-K-W-K-A-V-Y-E-K-F-A-E-A-F-K-E-F-L-(SEQ ID NO :57),
- [0072] D-W-L-K-A-F-V-Y-D-K-V-F-K-L-K-E-F-F-(SEQ ID NO :58),
- [0073] E-W-L-K-A-F-V-Y-E-K-V-F-K-L-K-E-F-F-(SEQ ID NO :59),
- [0074] D-W-L-R-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-A-F-(SEQ ID NO :60),
- [0075] E-W-L-R-A-F-Y-E-K-V-A-E-K-L-K-E-A-F-(SEQ ID NO :61),
- [0076] D-W-L-K-A-F-Y-D-R-V-A-E-K-L-K-E-A-F-(SEQ ID NO :62),
- [0077] E-W-L-K-A-F-Y-E-R-V-A-E-K-L-K-E-A-F-(SEQ ID NO :63),
- [0078] D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-R-L-K-E-A-F-(SEQ ID NO :64),
- [0079] E-W-L-K-A-F-Y-E-K-V-A-E-R-L-K-E-A-F-(SEQ ID NO :65),
- [0080] D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-R-E-A-F-(SEQ ID NO :66),
- [0081] E-W-L-K-A-F-Y-E-K-V-A-E-K-L-R-E-A-F-(SEQ ID NO :67),
- [0082] D-W-L-K-A-F-Y-D-R-V-A-E-R-L-K-E-A-F-(SEQ ID NO :68),
- [0083] E-W-L-K-A-F-Y-E-R-V-A-E-R-L-K-E-A-F-(SEQ ID NO :69),
- [0084] D-W-L-R-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-R-E-A-F-(SEQ ID NO :70),
- [0085] E-W-L-R-A-F-Y-E-K-V-A-E-K-L-R-E-A-F-(SEQ ID NO :71),
- [0086] D-W-L-R-A-F-Y-D-R-V-A-E-K-L-K-E-A-F-(SEQ ID NO :72),
- [0087] E-W-L-R-A-F-Y-E-R-V-A-E-K-L-K-E-A-F-(SEQ ID NO :73),
- [0088] D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-R-L-R-E-A-F-(SEQ ID NO :74),
- [0089] E-W-L-K-A-F-Y-E-K-V-A-E-R-L-R-E-A-F-(SEQ ID NO :75),
- [0090] D-W-L-R-A-F-Y-D-K-V-A-E-R-L-K-E-A-F-(SEQ ID NO :76),
- [0091] E-W-L-R-A-F-Y-E-K-V-A-E-R-L-K-E-A-F-(SEQ ID NO :77),
- [0092] D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-A-F-P-D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-A-F (SEQ ID NO :78),
- [0093] D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-F-F-P-D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-F-F (SEQ ID NO :79),

[0094] D-W-F-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-A-F-P-D-W-F-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-A-F (SEQ ID NO :80),

[0095] D-K-L-K-A-F-Y-D-K-V-F-E-W-A-K-E-A-F-P-D-K-L-K-A-F-Y-D-K-V-F-E-W-L-K-E-A-F (SEQ ID NO :81),

[0096] D-K-W-K-A-V-Y-D-K-F-A-E-A-F-K-E-F-L-P-D-K-W-K-A-V-Y-D-K-F-A-E-A-F-K-E-F-L (SEQ ID NO :82),

[0097] D-W-F-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F-P-D-W-F-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F (SEQ ID NO :83),

[0098] D-W-L-K-A-F-V-Y-D-K-V-F-K-L-K-E-F-F-P-D-W-L-K-A-F-V-Y-D-K-V-F-K-L-K-E-F-F (SEQ ID NO :84),

[0099] D-W-L-K-A-F-Y-D-K-F-A-E-K-F-K-E-F-F-P-D-W-L-K-A-F-Y-D-K-F-A-E-K-F-K-E-F-F (SEQ ID NO :85), 上述序列的截短形式, 上述序列的多聚体组合 (例如, 优选的范围从二聚体到三聚体, 四聚体, 5 聚体, 8 聚体或 10 聚体), 上述序列的保守取代, 和 / 或含有氨基酸类似物的上述序列。该序列的对映体氨基酸优选包含至少一个“D”氨基酸。在某些优选的实施方案中, 至少 50%, 更优选至少 75%, 且最优选至少 90% 和甚至 100% 的对映体氨基酸是本文所述的“D”氨基酸。该肽也可包括与氨基或羧基末端偶联的保护基团 (例如, 酰胺, 乙酰基, 丙烯基 (propeonyl), 和 3 到 20 个碳原子的烷基, 等)。在某些实施方案中, 与羧基末端偶联的保护基团是酰胺。在某些实施方案中, 与氨基末端偶联的保护基团是乙酰基, 丙烯基, 或 3 到 20 个碳的烷基。某些肽同时包含羧基和氨基末端的保护基团。在一个这种实施方案中, 氨基末端保护基团是选自乙酰基, 丙烯基和 3 到 20 个碳的烷基的保护基团; 羧基末端保护基团是酰胺。

[0100] 在某些实施方案中, 肽是防止磷脂被选自诸如过氧化氢, 13(S)-HPODE, 15(S)-HPETE, HPODE, HPETE, HODE, 或 HETE 的脂类的氧化剂氧化的肽。磷脂可以是选自 1-棕榈酰-2-花生四烯酰 (arachidonoyl)-sn-甘油基-3-磷酸胆碱 (PAPC), 1-硬脂酰-2-花生四烯酰-sn-甘油基-3-磷酸胆碱 (SAPC), 1-硬脂酰-2-花生四烯酰-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺 (SAPE) 的磷脂。因此该肽防止形成诸如氧化的 1-棕榈酰-2-花生四烯酰-sn-甘油基-3-磷酸胆碱 (Ox-PAPC), 1-棕榈酰-2-氧代戊酰基 (oxovaleroyl)-sn-甘油基-3-磷酸胆碱 (POVPC), 1-棕榈酰-2-戊二酰 (glutaroyl)-sn-甘油基-3-磷酸胆碱 (PGPC), 1-棕榈酰-2-环氧异前列腺烷 (epoxyisoprostane)-sn-甘油基-3-磷酸胆碱 (PEIPC), 氧化的 1-硬脂酰-2-花生四烯酰-sn-甘油基-3-磷酸胆碱 (Ox-SAPC), 1-硬脂酰-2-氧代戊酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱 (SOVPC), 1-硬脂酰-2-戊二酰-sn-甘油基-3-磷酸胆碱 (SGPC), 1-硬脂酰-2-环氧异前列腺烷-sn-甘油基-3-磷酸胆碱 (SEIPC), 氧化的 1-硬脂酰-2-花生四烯酰-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺 (Ox-SAPE), 1-硬脂酰-2-氧代戊酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺 (SOVPE), 1-硬脂酰-2-戊二酰-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺 (SGPE), 和 1-硬脂酰-2-环氧异前列腺烷-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺 (SEIPE) 等脂类。

[0101] 在另一实施方案中, 本发明提供了改善动脉粥样硬化症状的适合于口服给药的组合物。该组合物包含一种肽, 该肽是含有一个 A 型两亲性螺旋的人 apo A-I 肽或其片断, 或人 apo A-I 肽的类似物, 其中所述的肽具有连接在氨基末端的第一保护基团和连接在羧

基末端的第二保护基团且其中所述的肽还包含多个 D 氨基酸残基。保护基团包括,但不限于本文所述的保护基团。在某些实施方案中,肽中包含的超过半数,更优选超过 80%,且最优选超过 90%或甚至全部对映体氨基酸是 D 氨基酸。组合物可进一步包含可药用赋形剂(例如,适合于口服用药的赋形剂或适合于注射的赋形剂)。优选的肽能够防止磷脂[例如,1-棕榈酰-2-花生四烯酰-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(PAPC),1-硬脂酰-2-花生四烯酰-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(SAPC),1-硬脂酰-2-花生四烯酰-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(SAPE)]被氧化剂(例如,过氧化氢,13(S)-HPODE,15(S)-HPETE,HPODE,HPETE,HODE,和 HETE)氧化。因此该肽防止形成氧化的 1-棕榈酰-2-花生四烯酰-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(Ox-PAPC),1-棕榈酰-2-氧代戊酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(POVPC),1-棕榈酰-2-戊二酰-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(PGPC),1-棕榈酰-2-环氧异前列腺烷-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(PEIPC),氧化的 1-硬脂酰-2-花生四烯酰-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(Ox-SAPC),1-硬脂酰-2-氧代戊酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(SOVPC),1-硬脂酰-2-戊二酰-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(SGPC),1-硬脂酰-2-环氧异前列腺烷-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(SEIPC),氧化的 1-硬脂酰-2-花生四烯酰-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(Ox-SAPE),1-硬脂酰-2-氧代戊酰基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(SOVPE),1-硬脂酰-2-戊二酰-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(SGPE),和 1-硬脂酰-2-环氧异前列腺烷-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(SEIPE)。

[0102] 本发明还提供了改善动脉粥样硬化症状的方法。该方法包含给生物体(例如,人或非人哺乳动物)施用一种或多种本文所述的肽。在特别优选的实施方案中,该肽包含多个“D”氨基酸和/或按本文所述被保护。该肽优选给生物体口服用药且生物体优选是诊断为具有动脉粥样硬化的一种或多种症状或存在该风险的生物体。在某些实施方案中,该肽作为分离的肽或与本文所述的药物学赋形剂组合供应。优选以足以改善动脉粥样硬化的一种或多种症状和/或有效减少动脉粥样硬化的一种或多种症状发生的可能性的剂量用药。

[0103] 在另一实施方案中,本发明提供了改善动脉粥样硬化症状的试剂盒。优选的试剂盒包括含有一个或多个本文所述肽的容器。肽优选包含多个“D”氨基酸和/或按本文所述被保护。在某些实施方案中,该试剂盒可任选还包括可药用赋形剂和/或该肽与可药用赋形剂组合(例如,为单剂制剂形式)供应。以单剂制剂的形式供应肽的优选试剂盒用于口服给药。该试剂盒还任选包括教导将所述的肽用于改善动脉粥样硬化的一种或多种症状和/或减少动脉粥样硬化的一种或多种症状发生的可能性的说明材料。

[0104] 在某些实施方案中,本发明排除了在美国专利 4,643,988 和/或在 Garber 等(1992)Arteriosclerosis and Thrombosis,12:886-894 中公开的任何一种或多种肽。在某些实施方案中,本发明排除了在美国专利 4,643,988 和/或在 Garber 等(1992)中公开的任何一种或多种合成肽,其所有对映体氨基酸是 L 氨基酸或 D 氨基酸并且这些肽是封闭基团。在某些实施方案中,本发明排除了具有通式 $A_1-B_1-B_2-C_1-D-B_3-B_4-A_2-C_2-B_5-B_6-A_3-C_3-B_7-C_4-A_4-B_8-B_9$ (SEQ ID NO:87) 的肽,其中 A_1, A_2, A_3 和 A_4 是独立的天冬氨酸或谷氨酸,或其同系物或类似物; $B_1, B_2, B_3, B_4, B_5, B_6, B_7, B_8$ 和 B_9 是独立的色氨酸,苯丙氨酸,丙氨酸,亮氨酸,酪氨酸,异亮氨酸,缬氨酸或 α -萘基丙氨酸,或其同系物或类似物; C_1, C_2, C_3 和 C_4 是独立的赖氨酸或精氨酸,且 D 是丝氨酸,苏氨酸,丙氨酸,甘氨酸,组氨酸,或其同系物或类似物;前提是,当 A_1 和 A_2 是天冬氨酸, A_3 和 A_4 是谷氨酸, B_2 和 B_9 是亮氨酸, B_3 和 B_7 是苯丙氨酸, B_4 是

酪氨酸, B₅ 是缬氨酸, B₆, B₈, 和 D 是丙氨酸, 且 C₁, C₂, C₃ 和 C₄ 是赖氨酸时, B₁ 不是色氨酸。

[0105] 定义

[0106] 术语“多肽”, “肽”和“蛋白质”在本文中可互换使用, 是指氨基酸残基的多聚体。该术语适用于其中一个或多个氨基酸残基是相应于天然存在的氨基酸的人工化学类似物的氨基酸多聚体, 以及适用于天然存在的氨基酸的多聚体。

[0107] 术语“A 型两亲性螺旋”是指带正电荷的残基位于极性-非极性界面且带负电荷的残基位于极性面的中心形成产生极性和非极性面分离的 α -螺旋的蛋白质结构(参见, 例如, Segrest 等 (1990) Proteins: Structure, Function, and Genetics 8:103-117)。

[0108] 术语“改善”当用于“改善动脉粥样硬化的一种或多种症状”时是指减小, 预防, 或消除动脉粥样硬化和/或相关病变特征性的一种或多种症状。这种减小包括, 但不限于氧化磷脂的减少或消除, 动脉粥样硬化斑的形成和破裂的减少, 心脏发病、痉挛性疼痛(angina)、或中风(stroke)等的临床事件的减少, 高血压的缓解, 炎症性蛋白质生物合成的减少, 血浆胆固醇的减少等。

[0109] 术语“对映体氨基酸”是指能以至少两种形式存在的氨基酸, 所述两种形式互为不能重叠的镜像。大多数氨基酸(除甘氨酸外)是对映体且以所谓的 L-型(L 氨基酸)或 D-型(D 氨基酸)存在。大多数天然存在的氨基酸是“L”氨基酸。术语“D 氨基酸”和“L 氨基酸”用于指氨基酸的绝对构型, 而不是平面偏振光(plane-polarized light)的具体旋转方向。本文的用法与本领域的技术人员的标准用法一致。

[0110] 术语“保护基团”是指一种化学基团, 当连接到氨基酸的官能团(例如, 侧链, α 氨基, α 羧基, 等)上时封闭或屏蔽该官能团的特性。优选的氨基末端保护基团包括, 但不限于乙酰基, 或氨基基团。其它氨基末端保护基团包括, 但不限于在脂肪酸中的烷基链, 丙烯基, 甲酰基等。优选的羧基末端保护基团包括, 但不限于形成酰胺或酯的基团。

[0111] 短语“保护磷脂, 使其不被氧化剂氧化”是指化合物减小磷脂在与氧化剂(例如, 过氧化氢, 13-(S)-HPODE, 15-(S)-HPETE, HPODE, HPETE, HODE, HETE 等)接触时的氧化速率的能力(或产生的氧化磷脂的量)。

[0112] 术语“低密度脂蛋白”或“LDL”按照本领域技术人员的通常用法定义。一般来说, LDL 是指通过超速离心分离时在密度范围 $d = 1.019$ 到 $d = 1.063$ 发现的脂蛋白复合物。

[0113] 术语“高密度脂蛋白”或“HDL”按照本领域的技术人员的通常用法定义。一般来说, “HDL”是指通过超速离心分离时在密度范围 $d = 1.063$ 到 $d = 1.21$ 发现的脂蛋白复合物。

[0114] 术语“I 组 HDL”是指使氧化型脂类(例如, 在低密度脂蛋白中的氧化型脂类)还原或防止氧化型脂类被氧化剂氧化的高密度脂蛋白或其成分(例如, apo A-I, 对氧磷酶, 血小板活化因子乙酰水解酶(acetylhydrolase)等)。

[0115] 术语“II 组 HDL”是指保护脂类不被氧化或修复(例如, 还原)氧化型脂类的活性降低或无活性的 HDL。

[0116] 术语“HDL 成分”是指包含高密度脂蛋白(HDL)的成分(例如, 分子)。对能保护脂类不被氧化或被修复(例如, 使氧化型脂类还原)的 HDL 进行的分析也包括对表现所述活性的 HDL 成分(例如, apo A-I, 对氧磷酶, 血小板活化因子乙酰基水解酶等)进行的分析。

[0117] 术语“人 apo A-I 肽”是指全长人 apo A-I 肽或其含有 A 型两亲性螺旋的片断或

结构域。

[0118] 本文使用的“单核细胞反应”是指具有与动脉粥样硬化斑形成相关的“炎症性反应”特征的单核细胞活性。单核细胞反应的特征在于单核细胞附着到血管壁的细胞（例如，血管内皮的细胞）上，和 / 或趋化进入内皮下空间，和 / 或单核细胞分化成巨噬细胞。

[0119] 术语“无改变”当指氧化的磷脂的量时是指没有可检测到的改变，更优选没有统计学上显著的改变（例如，至少以 85%，优选至少 90%，更优选至少 95%，且最优选至少以 98% 或 99% 的可信度水平）。没有可检测的改变也可指这样的试验，其中氧化磷脂水平改变，但不比缺乏本文所述的蛋白质或参照其它阳性或阴性对照时更大。

[0120] 本文使用下列缩写：PAPC：L- α -1-棕榈酰-2-花生四烯酰-sn-甘油基-3-磷酸胆碱；POVPC：1-棕榈酰-2-(5-氧代戊酰基(oxovaleryl))-sn-甘油基-3-磷酸胆碱；PGPC：1-棕榈酰-2-戊二酰-sn-甘油基-3-磷酸胆碱；PEIPC：1-棕榈酰-2-(5,6-环氧异前列腺烷 E₂)-sn-甘油基-3-磷酸胆碱；ChC18:2：胆固醇亚油酸酯；ChC18:2-OOH：胆固醇亚油酸酯氢过氧化物；DMPC：1,2-双十四烷酰-rac-甘油基-3-磷酸胆碱；PON：对氧磷酶；HPF：标准化高能场(Standardized high powerfield)；PAPC：L- α -1-棕榈酰-2-花生四烯酰-sn-甘油基-3-磷酸胆碱；POVPC：1-棕榈酰-2-(5-氧代戊酰基)-sn-甘油基-3-磷酸胆碱；PGPC：1-棕榈酰-2-戊二酰-sn-甘油基-3-磷酸胆碱；PEIPC：1-棕榈酰-2-(5,6-环氧异前列腺烷 E₂)-sn-甘油基-3-磷酸胆碱；PON：对氧磷酶；BL/6：C57BL/6J；C3H：C3H/HeJ。

[0121] 术语“保守取代”用于蛋白质或肽时是指基本上不改变分子的活性（特异性（例如，对脂蛋白而言））或结合亲和力（例如，对脂类或脂蛋白而言）的氨基酸取代。典型的保守氨基酸取代涉及一个氨基酸被具有相似化学特性（例如，电荷或疏水性）的另一氨基酸取代。下面 6 组中每组所含氨基酸互为典型的保守取代：1) 丙氨酸 (A)，丝氨酸 (S)，苏氨酸 (T)；2) 天冬氨酸 (D)，谷氨酸 (E)；3) 天冬酰胺 (N)，谷氨酰胺 (Q)；4) 精氨酸 (R)，赖氨酸 (K)；5) 异亮氨酸 (I)，亮氨酸 (L)，甲硫氨酸 (M)，缬氨酸 (V)；和 6) 苯丙氨酸 (F)，酪氨酸 (Y)，色氨酸 (W)。

[0122] 涉及两个或多个核酸或多肽序列的术语“相同”或“同一性”百分数是指当使用下列一种序列比较算法或通过肉眼观察测量进行最大对应的比较和排列时，两个或多个序列或亚序列是相同的或具有指定百分数的氨基酸残基或核苷酸是相同的。对于本发明的肽，序列同一性在该肽的全长上测定。

[0123] 对于序列比较，一般以一个序列充当参照序列，待测序列与它进行比较。当使用序列比较算法时，将待测和参照序列输入计算机，如果需要，可指定亚序列坐标，并指定序列比较程序参数。然后序列比较算法按照指定的程序参数计算待测序列相对于参照序列的序列相同性百分数。

[0124] 通过，例如 Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482(1981) 的局部同源性算法，Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443(1970) 的同源性序列对比算法，Pearson & Lipman(1988)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444 的相似性检索方法，这些算法的计算机化操作 (GAP, BESTFIT, FASTA, 和 TFASTA, Wisconsin 遗传性软件包, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI)，或通过肉眼检查（一般参见 Ausubel 等，出处同上）可进行比较时的最佳序列排列。

[0125] 一个有用的算法的例子是 PILEUP。PILEUP 使用渐进的,逐对的序列对比实现一组相关序列的多序列对比以显示其亲缘关系和序列相同性百分数。它也绘制显示聚类亲缘的树或树状图用于实现序列对比。PILEUP 使用 Feng & Doolittle(1987) J. Mol. Evol. 35 : 351-360 的渐进式序列对比方法的简化形式。所用的方法相似于 Higgins & Sharp(1989) CABIOS 5 :151-153 所述的方法。该程序可对比多达 300 个序列,每个序列最大长度为 5,000 个核苷酸或氨基酸。多序列对比方法以逐对对比两个最相似的序列开始,产生两个对比序列的一簇。然后将该簇与下一个最相关的序列或对比序列簇进行对比。通过两个单序列的逐对对比的简单延伸对比两个序列簇。通过一系列渐进式逐对的对比实现最终的序列对比。通过指定具体序列和其序列比较区域的氨基酸或核苷酸坐标和通过指定程序参数运行该程序。例如,使用下列参数:默认空位加权 (default gap weight) (3.00),默认空位长度加权 (0.10),和加权的末端间隔可比较参照序列与其它待测序列以测定序列相同性百分数关系。

[0126] 适合于测定序列相同性和序列相似性百分数的算法的另一例子是 BLAST 算法,它在 Altschul 等 (1990) J. Mol. Biol. 215 :403-410 中描述。进行 BLAST 分析的软件可通过国家生物技术信息中心 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 公开获得。该算法包括通过鉴定查询序列中的短字串 (word) 长度 W 首先鉴定高记分序列对 (HSPs),当与数据库序列中相同长度的字串进行序列对比时它符合或满足一些正值的阈值得分 T。T 称为邻近字串得分阈值 (Altschul 等,出处同上)。这些起始的邻近字串命中充当起启动搜索发现包含它们的更长 HSP 的种子 (seed)。然后字串命中沿各序列的两个方向延伸到可增加累积的序列对比得分的尽可能远处。对于核苷酸序列,使用参数 M (匹配残基对的奖分;通常 > 0) 和 N (错配残基的罚分;通常 < 0) 计算累积得分。对于氨基酸序列,使用记分矩阵计算累积得分。当:累积序列对比得分从其最大达到值下降至定量 X;由于累积一个或多个记负分的残基对比导致累积记分趋于零或以下;或者到达任一序列的末端时停止在各个方向上的字串命中延伸。BLAST 算法参数 W, T, 和 X 决定了序列对比的灵敏度和速度。BLASTN 程序 (对于核苷酸序列) 使用的默认字串长度 (W) 为 11,期望值 (E) 为 10, M = 5, N = -4, 且比较两条链。对于氨基酸序列, BLASTP 程序使用的默认字串长度 (W) 为 3,期望值 (E) 为 10, 以及 BLOSUM62 记分矩阵 (参见 Henikoff & Henikoff(1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 :10915)。

[0127] 除了计算序列同一性百分数外, BLAST 算法也进行两个序列之间的相似性的统计学分析 (参见,例如, Karlin & Altschul(1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90 :5873-5787)。以 BLAST 算法进行的一种相似性测量法是最小总概率 (P(N)), 它提供了概率的指标,其中两个核苷酸或氨基酸序列之间的匹配随机出现。例如,在待测核酸与参照核酸的比较中如果最小总概率不超过大约 0.1,更优选不超过大约 0.01,且最优选不超过大约 0.001,那么认为该核酸与参照序列相似。

[0128] 术语“D-18A 肽”是指具有序列:

[0129] D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-A-F (SEQ ID NO :1) 的肽,其中全部对映体氨基酸是 D 型氨基酸。

[0130] 本发明包括:

[0131] 项 1. 一种改善动脉粥样硬化症状的肽,其中所述的肽包含如下所述的一种氨基酸序列:

- [0132] 长度范围从大约 10 个到大约 30 个氨基酸；
- [0133] 包含至少一个 A 型两亲性螺旋；
- [0134] 包含至少一个“D”氨基酸残基；
- [0135] 保护磷脂，使其不被氧化剂氧化；和
- [0136] 不是 D-18A 肽。
- [0137] 项 2. 项 1 的肽，其中所述的肽还包含保护基团。
- [0138] 项 3. 项 1 的肽，其中所述的肽还包含偶联到氨基或羧基末端的保护基团。
- [0139] 项 4. 项 2 的肽，其中所述的保护基团是选自：乙酰基，酰胺，3 到 20 个碳原子的烷基，Fmoc，t-boc，9- 芴乙酰基，1- 芴羧基，9- 芴羧基，9- 芴酮-1- 羧基，苄氧基羰基，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)，1, 3, 5- 三甲基苯-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- 五甲基苯并二氢吡喃-6- 磺酰基 (Pmc)，4- 甲苄基 (MeBzl)，4- 甲氧基苄基 (MeOBzl)，苄氧基 (BzlO)，苄基 (Bzl)，苯甲酰基 (Bz)，3- 硝基-2- 吡啶磺酰基 (Npys)，1-(4, 4- 二甲基-2, 6- 二偶氮亚环己基) 乙基 (Dde)，2, 6- 二氯苄基 (2, 6-DiCl-Bzl)，2- 氯苄氧基羰基 (2-Cl-Z)，2- 溴苄氧基羰基 (2-Br-Z)，苄氧基甲基 (Bom)，t- 丁氧基羰基 (Boc)，环己氧基 (cHxO)，t- 丁氧基甲基 (Bom)，t- 丁氧基 (tBuO)，t- 丁基 (tBu)，乙酰基 (Ac)，苯甲酰基，苄酯基，丙基，丁基，戊基，己基或三氟乙酰基 (TFA)。
- [0140] 项 5. 项 1 的肽，其中所述的肽还包含偶联到氨基末端的第一保护基团和偶联到羧基末端的第二保护基团。
- [0141] 项 6. 项 1 的肽，其中所有的对映体氨基酸是“D”氨基酸。
- [0142] 项 7. 项 1 的肽，其中所述的肽与人或小鼠 apo A-I 具有高于大约 50% 的氨基酸序列同一性。
- [0143] 项 8. 项 1 的肽，其中所述的肽与可药用赋形剂混合。
- [0144] 项 9. 项 1 的肽，其中所述的肽与适合于给哺乳动物口服给药的可药用赋形剂混合。
- [0145] 项 10. 项 1 的肽，其中所述的肽包含选自下列一组的序列：
- [0146] D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-A-F- (SEQ ID NO :2)，
- [0147] D-W-F-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-A-F- (SEQ ID NO :3)，
- [0148] D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F- (SEQ ID NO :4)，
- [0149] D-W-F-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F- (SEQ ID NO :5)，
- [0150] D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-F-E-K-F-K-E-F-F- (SEQ ID NO :6)，
- [0151] D-W-L-K-A-F-Y-D-K-F-F-E-K-F-K-E-F-F- (SEQ ID NO :7)，
- [0152] D-W-F-K-A-F-Y-D-K-F-F-E-K-F-K-E-F-F- (SEQ ID NO :8)，
- [0153] D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-F-F- (SEQ ID NO :9)，
- [0154] D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-F-E-K-F-K-E-A-F- (SEQ ID NO :10)，
- [0155] D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-F-E-K-L-K-E-F-F- (SEQ ID NO :11)，
- [0156] D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-F-F- (SEQ ID NO :12)，
- [0157] D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-F-E-K-F-K-E-F-F- (SEQ ID NO :13)，
- [0158] E-W-L-K-L-F-Y-E-K-V-L-E-K-F-K-E-A-F- (SEQ ID NO :14)，

- [0159] E-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F-(SEQ ID NO :15),
[0160] E-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-F-F-(SEQ ID NO :16),
[0161] E-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-F-E-K-F-K-E-A-F-(SEQ ID NO :17),
[0162] E-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-F-E-K-L-K-E-F-F-(SEQ ID NO :18),
[0163] E-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-F-F-(SEQ ID NO :19),
[0164] E-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-F-E-K-F-K-E-F-F-(SEQ ID NO :20),
[0165] A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-A-F-(SEQ ID NO :21),
[0166] A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F-(SEQ ID NO :22),
[0167] A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F-(SEQ ID NO :23),
[0168] A-F-Y-D-K-F-F-E-K-F-K-E-F-F-(SEQ ID NO :24),
[0169] A-F-Y-D-K-F-F-E-K-F-K-E-F-F-(SEQ ID NO :25),
[0170] A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F-(SEQ ID NO :26),
[0171] A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-F-F-(SEQ ID NO :27),
[0172] A-F-Y-D-K-V-F-E-K-F-K-E-A-F-(SEQ ID NO :28),
[0173] A-F-Y-D-K-V-F-E-K-L-K-E-F-F-(SEQ ID NO :29),
[0174] A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-F-F-(SEQ ID NO :30),
[0175] K-A-F-Y-D-K-V-F-E-K-F-K-E-F-(SEQ ID NO :31),
[0176] L-F-Y-E-K-V-L-E-K-F-K-E-A-F-(SEQ ID NO :32),
[0177] A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F-(SEQ ID NO :33),
[0178] A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-F-F-(SEQ ID NO :34),
[0179] A-F-Y-D-K-V-F-E-K-F-K-E-A-F-(SEQ ID NO :35),
[0180] A-F-Y-D-K-V-F-E-K-L-K-E-F-F-(SEQ ID NO :36),
[0181] A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-F-F-(SEQ ID NO :37),
[0182] A-F-Y-D-K-V-F-E-K-F-K-E-F-F-(SEQ ID NO :38),
[0183] D-W-L-K-A-L-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-A-L-(SEQ ID NO :39),
[0184] D-W-F-K-A-F-Y-E-K-V-A-E-K-L-K-E-F-F-(SEQ ID NO :40),
[0185] D-W-F-K-A-F-Y-E-K-F-F-E-K-F-K-E-F-F-(SEQ ID NO :41),
[0186] E-W-L-K-A-L-Y-E-K-V-A-E-K-L-K-E-A-L-(SEQ ID NO :42),
[0187] E-W-L-K-A-F-Y-E-K-V-A-E-K-L-K-E-A-F-(SEQ ID NO :43),
[0188] E-W-F-K-A-F-Y-E-K-V-A-E-K-L-K-E-F-F-(SEQ ID NO :44),
[0189] E-W-L-K-A-F-Y-E-K-V-F-E-K-F-K-E-F-F-(SEQ ID NO :45),
[0190] E-W-L-K-A-F-Y-E-K-F-F-E-K-F-K-E-F-F-(SEQ ID NO :46),
[0191] E-W-F-K-A-F-Y-E-K-F-F-E-K-F-K-E-F-F-(SEQ ID NO :47),
[0192] D-F-L-K-A-W-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-A-W-(SEQ ID NO :48),
[0193] E-F-L-K-A-W-Y-E-K-V-A-E-K-L-K-E-A-W-(SEQ ID NO :49),
[0194] D-F-W-K-A-W-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-W-W-(SEQ ID NO :50),
[0195] E-F-W-K-A-W-Y-E-K-V-A-E-K-L-K-E-W-W-(SEQ ID NO :51),
[0196] D-K-L-K-A-F-Y-D-K-V-F-E-W-A-K-E-A-F-(SEQ ID NO :52),
[0197] D-K-W-K-A-V-Y-D-K-F-A-E-A-F-K-E-F-L-(SEQ ID NO :53),

- [0198] E-K-L-K-A-F-Y-E-K-V-F-E-W-A-K-E-A-F-(SEQ ID NO :54),
- [0199] E-K-W-K-A-V-Y-E-K-F-A-E-A-F-K-E-F-L-(SEQ ID NO :55),
- [0200] D-W-L-K-A-F-V-D-K-F-A-E-K-F-K-E-A-Y-(SEQ ID NO :56),
- [0201] E-K-W-K-A-V-Y-E-K-F-A-E-A-F-K-E-F-L-(SEQ ID NO :57),
- [0202] D-W-L-K-A-F-V-Y-D-K-V-F-K-L-K-E-F-F-(SEQ ID NO :58),
- [0203] E-W-L-K-A-F-V-Y-E-K-V-F-K-L-K-E-F-F-(SEQ ID NO :59),
- [0204] D-W-L-R-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-A-F-(SEQ ID NO :60),
- [0205] E-W-L-R-A-F-Y-E-K-V-A-E-K-L-K-E-A-F-(SEQ ID NO :61),
- [0206] D-W-L-K-A-F-Y-D-R-V-A-E-K-L-K-E-A-F-(SEQ ID NO :62),
- [0207] E-W-L-K-A-F-Y-E-R-V-A-E-K-L-K-E-A-F-(SEQ ID NO :63),
- [0208] D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-R-L-K-E-A-F-(SEQ ID NO :64),
- [0209] E-W-L-K-A-F-Y-E-K-V-A-E-R-L-K-E-A-F-(SEQ ID NO :65),
- [0210] D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-R-E-A-F-(SEQ ID NO :66),
- [0211] E-W-L-K-A-F-Y-E-K-V-A-E-K-L-R-E-A-F-(SEQ ID NO :67),
- [0212] D-W-L-K-A-F-Y-D-R-V-A-E-R-L-K-E-A-F-(SEQ ID NO :68),
- [0213] E-W-L-K-A-F-Y-E-R-V-A-E-R-L-K-E-A-F-(SEQ ID NO :69),
- [0214] D-W-L-R-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-R-E-A-F-(SEQ ID NO :70),
- [0215] E-W-L-R-A-F-Y-E-K-V-A-E-K-L-R-E-A-F-(SEQ ID NO :71),
- [0216] D-W-L-R-A-F-Y-D-R-V-A-E-K-L-K-E-A-F-(SEQ ID NO :72),
- [0217] E-W-L-R-A-F-Y-E-R-V-A-E-K-L-K-E-A-F-(SEQ ID NO :73),
- [0218] D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-R-L-R-E-A-F-(SEQ ID NO :74),
- [0219] E-W-L-K-A-F-Y-E-K-V-A-E-R-L-R-E-A-F-(SEQ ID NO :75),
- [0220] D-W-L-R-A-F-Y-D-K-V-A-E-R-L-K-E-A-F-(SEQ ID NO :76),
- [0221] E-W-L-R-A-F-Y-E-K-V-A-E-R-L-K-E-A-F-(SEQ ID NO :77),
- [0222] D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-A-F-P-D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-A-F (SEQ ID NO :78),
- [0223] D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-F-F-P-D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-F-F (SEQ ID NO :79),
- [0224] D-W-F-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-A-F-P-D-W-F-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-A-F (SEQ ID NO :80),
- [0225] D-K-L-K-A-F-Y-D-K-V-F-E-W-A-K-E-A-F-P-D-K-L-K-A-F-Y-D-K-V-F-E-W-L-K-E-A-F (SEQ ID NO :81),
- [0226] D-K-W-K-A-V-Y-D-K-F-A-E-A-F-K-E-F-L-P-D-K-W-K-A-V-Y-D-K-F-A-E-A-F-K-E-F-L (SEQ ID NO :82),
- [0227] D-W-F-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F-P-D-W-F-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F (SEQ ID NO :83),
- [0228] D-W-L-K-A-F-V-Y-D-K-V-F-K-L-K-E-F-F-P-D-W-L-K-A-F-V-Y-D-K-V-F-K-L-K-E-F-F (SEQ ID NO :84),
- [0229] D-W-L-K-A-F-Y-D-K-F-A-E-K-F-K-E-F-F-P-D-W-L-K-A-F-Y-D-K-F-A-E-K-F-K-E

-F-F (SEQ ID NO :85)。

[0230] 项 11. 项 1 的肽,其中所述的肽包含 SEQ ID NO :5 (F4) 的氨基酸序列。

[0231] 项 12. 项 10 或 11 的肽,其中所有的对映体氨基酸是“D”氨基酸。

[0232] 项 13. 项 10 或 11 的肽,其中所述的肽还包含偶联到氨基或羧基末端的保护基团。

[0233] 项 14. 项 13 的肽,其中所述的肽包含偶联到氨基末端的保护基团且所述的氨基末端保护基团选自苯甲酰基,乙酰基,丙烯基,苄酯基,丙基,丁基,戊基,己基,或 3 到 20 个碳原子的烷基。

[0234] 项 15. 项 13 的肽,其中所述的肽包含偶联到羧基末端的保护基团且所述的羧基末端保护基团是酰胺。

[0235] 项 16. 项 10 的肽,其中所述的肽还包含偶联到氨基末端的第一保护基团和偶联到羧基末端的第二保护基团。

[0236] 项 17. 项 16 的肽,其中所述的肽还包含:

[0237] 偶联到氨基末端的第一保护基团,其中所述的保护基团选自苯甲酰基,乙酰基,丙烯基,苄酯基,丙基,丁基,戊基,己基,或 3 到 20 个碳的烷基;和

[0238] 偶联到羧基末端的第二保护基团且所述的羧基末端保护基团是酰胺。

[0239] 项 18. 项 16 的肽,其中所有的对映体氨基酸是“D”氨基酸。

[0240] 项 19. 项 1 的肽,其中所述的氧化剂选自过氧化氢,13(S)-HPODE,15(S)-HPETE,HPODE,HPETE,HODE,或 HETE。

[0241] 项 20. 项 1 的肽,其中所述的磷脂选自 1- 棕榈酰 -2- 花生四烯酰 -sn- 甘油基 -3- 磷酸胆碱 (PAPC),1- 硬脂酰 -2- 花生四烯酰 -sn- 甘油基 -3- 磷酸胆碱 (SAPC)),1- 硬脂酰 -2- 花生四烯酰 -sn- 甘油基 -3- 磷酸乙醇胺 (SAPE)。

[0242] 项 21. 一种适合于口服给药改善动脉粥样硬化的症状的组合物,其中所述组合物包含下述肽,它是人 apo A-I 肽或人 apo A-I 肽的类似物,其中所述的肽具有连接到氨基末端的第一保护基团和连接到羧基末端的第二保护基团,且其中所述的肽包含多个 D 氨基酸残基。

[0243] 项 22. 项 21 的组合物,其中所述的第一保护基团和所述的第二保护基团独立地选自乙酰基,酰胺,3 到 20 个碳原子的烷基,Fmoc,t-boc,9- 芴乙酰基,1- 芴羧基,9- 芴羧基,9- 芴酮-1- 羧基,苄氧基羰基,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),1,3,5- 三甲基苯-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- 五甲基苯并二氢吡喃-6- 磺酰基 (Pmc),4- 甲苄基 (MeBzl),4- 甲氧基苄基 (MeOBzl),苄氧基 (BzlO),苄基 (Bzl),苯甲酰基 (Bz),3- 硝基-2- 吡啶磺酰基 (Npys),1-(4,4- 二甲基-2,6- 二偶氮亚环己基) 乙基 (Dde),2,6- 二氯苄基 (2,6-DiCl-Bzl),2- 氯苄氧基羰基 (2-Cl-Z),2- 溴苄氧基羰基 (2-Br-Z),苄氧基甲基 (Bom),t- 丁氧基羰基 (Boc),环己氧基 (cHxO),t- 丁氧基甲基 (Bum),t- 丁氧基 (tBuO),t- 丁基 (tBu),乙酰基 (Ac),苯甲酰基,苄酯基,丙基,丁基,戊基,己基或三氟乙酰基 (TFA)。

[0244] 项 23. 项 21 的组合物,其中所述的第一保护基团是乙酰基。

[0245] 项 24. 项 21 的组合物,其中所述的第二保护基团是酰胺。

[0246] 项 25. 项 21 的组合物,其中所述的肽中包含的一半以上的对映体氨基酸是 D 氨基

酸。

[0247] 项 26. 项 21 的组合物,其中所述的肽中包含的所有对映体氨基酸是 D 氨基酸。

[0248] 项 27. 项 21 的组合物,其中所述的组合物还包含可药用赋形剂。

[0249] 项 28. 项 27 的组合物,其中所述的赋形剂是适合于口服给药的赋形剂。

[0250] 项 29. 项 27 的组合物,其中所述的赋形剂是适合于注射的赋形剂。

[0251] 项 30. 项 21 的组合物,其中所述的肽防止磷脂被氧化剂氧化。

[0252] 项 31. 项 30 的组合物,其中所述的氧化剂选自过氧化氢,13(S)-HPODE,15(S)-HPETE, HPODE, HPETE, HODE, 或 HETE。

[0253] 项 32. 项 30 的组合物,其中所述的磷脂选自 1- 棕榈酰 -2- 花生四烯酰 -sn- 甘油基 -3- 磷酸胆碱 (PAPC), 1- 硬脂酰 -2- 花生四烯酰 -sn- 甘油基 -3- 磷酸胆碱 (SAPC), 1- 硬脂酰 -2- 花生四烯酰 -sn- 甘油基 -3- 磷酸乙醇胺 (SAPE)。

[0254] 项 33. 如下肽或肽的多联体在制备改善哺乳动物中的动脉粥样硬化症状的药物中的用途:

[0255] 长度范围从大约 10 个到大约 30 个氨基酸;

[0256] 包含至少一个 A 型两亲性螺旋;

[0257] 包含至少一个“D”氨基酸残基;

[0258] 保护磷脂,使其不被氧化剂氧化;和

[0259] 不是 D-18A 肽。

[0260] 项 34. 项 33 的用途,其中所述的施用包含口服施用所述的肽。

[0261] 项 35. 项 33 的用途,其中所述的哺乳动物是诊断为具有动脉粥样硬化的一种或多种症状的哺乳动物。

[0262] 项 36. 项 33 的用途,其中所述的生物体是诊断为具有动脉粥样硬化风险的哺乳动物。

[0263] 项 37. 项 33 的用途,其中所述的哺乳动物是人类。

[0264] 项 38. 项 33 的用途,其中所述的哺乳动物是非人哺乳动物。

[0265] 项 39. 项 33 的用途,其中所述的肽还包含偶联到氨基或羧基末端的保护基团。

[0266] 项 40. 项 39 的用途,其中所述的保护基团选自乙酰基,酰胺,3 到 20 个碳原子的烷基, Fmoc, t-boc, 9- 芴乙酰基, 1- 芴羧基, 9- 芴羧基, 9- 芴酮 -1- 羧基, 苄氧基羰基, 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), 1,3,5- 三甲基苯 -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- 五甲基苯并二氢吡喃 -6- 磺酰基 (Pmc), 4- 甲苄基 (MeBzl), 4- 甲氧基苄基 (MeOBzl), 苄氧基 (BzlO), 苄基 (Bzl), 苯甲酰基 (Bz), 3- 硝基 -2- 吡啶磺酰基 (Npys), 1-(4,4- 二甲基 -2,6- 二偶氮亚环己基) 乙基 (Dde), 2,6- 二氯苄基 (2,6-DiCl-Bzl), 2- 氯苄氧基羰基 (2-Cl-Z), 2- 溴苄氧基羰基 (2-Br-Z), 苄氧基甲基 (Bom), t- 丁氧基羰基 (Boc), 环己氧基 (cHxO), t- 丁氧基甲基 (Bum), t- 丁氧基 (tBuO), t- 丁基 (tBu), 乙酰基 (Ac), 苯甲酰基, 苄酯基, 丙基, 丁基, 戊基, 己基或三氟乙酰基 (TFA)。

[0267] 项 41. 项 33 的用途,其中所述的肽还包含偶联到氨基末端的第一保护基团和偶联到羧基末端的第二保护基团。

[0268] 项 42. 项 33 的用途,其中所述的肽与人或小鼠 apo A-I 具有高于大约 50% 的氨基

酸序列相同性。

[0269] 项 43. 项 33 的用途,其中所述的肽与一种药理学赋形剂混合。

[0270] 项 44. 项 33 的用途,其中所述的肽与适合于给哺乳动物口服给药的药理学赋形剂混合。

[0271] 项 45. 项 33 的用途,其中所述的肽包含选自如下一组的氨基酸序列:

[0272] D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-A-F-(SEQ ID NO :2),

[0273] D-W-F-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-A-F-(SEQ ID NO :3),

[0274] D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F-(SEQ ID NO :4),

[0275] D-W-F-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F-(SEQ ID NO :5),

[0276] D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-F-E-K-F-K-E-F-F-(SEQ ID NO :6),

[0277] D-W-L-K-A-F-Y-D-K-F-F-E-K-F-K-E-F-F-(SEQ ID NO :7),

[0278] D-W-F-K-A-F-Y-D-K-F-F-E-K-F-K-E-F-F-(SEQ ID NO :8),

[0279] D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-F-F-(SEQ ID NO :9),

[0280] D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-F-E-K-F-K-E-A-F-(SEQ ID NO :10),

[0281] D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-F-E-K-L-K-E-F-F-(SEQ ID NO :11),

[0282] D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-F-F-(SEQ ID NO :12),

[0283] D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-F-E-K-F-K-E-F-F-(SEQ ID NO :13),

[0284] E-W-L-K-L-F-Y-E-K-V-L-E-K-F-K-E-A-F-(SEQ ID NO :14),

[0285] E-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F-(SEQ ID NO :15),

[0286] E-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-F-F-(SEQ ID NO :16),

[0287] E-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-F-E-K-F-K-E-A-F-(SEQ ID NO :17),

[0288] E-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-F-E-K-L-K-E-F-F-(SEQ ID NO :18),

[0289] E-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-F-F-(SEQ ID NO :19),

[0290] E-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-F-E-K-F-K-E-F-F-(SEQ ID NO :20),

[0291] A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-A-F-(SEQ ID NO :21),

[0292] A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F-(SEQ ID NO :22),

[0293] A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F-(SEQ ID NO :23),

[0294] A-F-Y-D-K-F-F-E-K-F-K-E-F-F-(SEQ ID NO :24),

[0295] A-F-Y-D-K-F-F-E-K-F-K-E-F-F-(SEQ ID NO :25),

[0296] A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F-(SEQ ID NO :26),

[0297] A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-F-F-(SEQ ID NO :27),

[0298] A-F-Y-D-K-V-F-E-K-F-K-E-A-F-(SEQ ID NO :28),

[0299] A-F-Y-D-K-V-F-E-K-L-K-E-F-F-(SEQ ID NO :29),

[0300] A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-F-F-(SEQ ID NO :30),

[0301] K-A-F-Y-D-K-V-F-E-K-F-K-E-F-(SEQ ID NO :31),

[0302] L-F-Y-E-K-V-L-E-K-F-K-E-A-F-(SEQ ID NO :32),

[0303] A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F-(SEQ ID NO :33),

[0304] A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-F-F-(SEQ ID NO :34),

[0305] A-F-Y-D-K-V-F-E-K-F-K-E-A-F-(SEQ ID NO :35),

- [0306] A-F-Y-D-K-V-F-E-K-L-K-E-F-F-(SEQ ID NO :36),
- [0307] A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-F-F-(SEQ ID NO :37),
- [0308] A-F-Y-D-K-V-F-E-K-F-K-E-F-F-(SEQ ID NO :38),
- [0309] D-W-L-K-A-L-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-A-L-(SEQ ID NO :39),
- [0310] D-W-F-K-A-F-Y-E-K-V-A-E-K-L-K-E-F-F-(SEQ ID NO :40),
- [0311] D-W-F-K-A-F-Y-E-K-F-F-E-K-F-K-E-F-F-(SEQ ID NO :41),
- [0312] E-W-L-K-A-L-Y-E-K-V-A-E-K-L-K-E-A-L-(SEQ ID NO :42),
- [0313] E-W-L-K-A-F-Y-E-K-V-A-E-K-L-K-E-A-F-(SEQ ID NO :43),
- [0314] E-W-F-K-A-F-Y-E-K-V-A-E-K-L-K-E-F-F-(SEQ ID NO :44),
- [0315] E-W-L-K-A-F-Y-E-K-V-F-E-K-F-K-E-F-F-(SEQ ID NO :45),
- [0316] E-W-L-K-A-F-Y-E-K-F-F-E-K-F-K-E-F-F-(SEQ ID NO :46),
- [0317] E-W-F-K-A-F-Y-E-K-F-F-E-K-F-K-E-F-F-(SEQ ID NO :47),
- [0318] D-F-L-K-A-W-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-A-W-(SEQ ID NO :48),
- [0319] E-F-L-K-A-W-Y-E-K-V-A-E-K-L-K-E-A-W-(SEQ ID NO :49),
- [0320] D-F-W-K-A-W-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-W-W-(SEQ ID NO :50),
- [0321] E-F-W-K-A-W-Y-E-K-V-A-E-K-L-K-E-W-W-(SEQ ID NO :51),
- [0322] D-K-L-K-A-F-Y-D-K-V-F-E-W-A-K-E-A-F-(SEQ ID NO :52),
- [0323] D-K-W-K-A-V-Y-D-K-F-A-E-A-F-K-E-F-L-(SEQ ID NO :53),
- [0324] E-K-L-K-A-F-Y-E-K-V-F-E-W-A-K-E-A-F-(SEQ ID NO :54),
- [0325] E-K-W-K-A-V-Y-E-K-F-A-E-A-F-K-E-F-L-(SEQ ID NO :55),
- [0326] D-W-L-K-A-F-V-D-K-F-A-E-K-F-K-E-A-Y-(SEQ ID NO :56),
- [0327] E-K-W-K-A-V-Y-E-K-F-A-E-A-F-K-E-F-L-(SEQ ID NO :57),
- [0328] D-W-L-K-A-F-V-Y-D-K-V-F-K-L-K-E-F-F-(SEQ ID NO :58),
- [0329] E-W-L-K-A-F-V-Y-E-K-V-F-K-L-K-E-F-F-(SEQ ID NO :59),
- [0330] D-W-L-R-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-A-F-(SEQ ID NO :60),
- [0331] E-W-L-R-A-F-Y-E-K-V-A-E-K-L-K-E-A-F-(SEQ ID NO :61),
- [0332] D-W-L-K-A-F-Y-D-R-V-A-E-K-L-K-E-A-F-(SEQ ID NO :62),
- [0333] E-W-L-K-A-F-Y-E-R-V-A-E-K-L-K-E-A-F-(SEQ ID NO :63),
- [0334] D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-R-L-K-E-A-F-(SEQ ID NO :64),
- [0335] E-W-L-K-A-F-Y-E-K-V-A-E-R-L-K-E-A-F-(SEQ ID NO :65),
- [0336] D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-R-E-A-F-(SEQ ID NO :66),
- [0337] E-W-L-K-A-F-Y-E-K-V-A-E-K-L-R-E-A-F-(SEQ ID NO :67),
- [0338] D-W-L-K-A-F-Y-D-R-V-A-E-R-L-K-E-A-F-(SEQ ID NO :68),
- [0339] E-W-L-K-A-F-Y-E-R-V-A-E-R-L-K-E-A-F-(SEQ ID NO :69),
- [0340] D-W-L-R-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-R-E-A-F-(SEQ ID NO :70),
- [0341] E-W-L-R-A-F-Y-E-K-V-A-E-K-L-R-E-A-F-(SEQ ID NO :71),
- [0342] D-W-L-R-A-F-Y-D-R-V-A-E-K-L-K-E-A-F-(SEQ ID NO :72),
- [0343] E-W-L-R-A-F-Y-E-R-V-A-E-K-L-K-E-A-F-(SEQ ID NO :73),
- [0344] D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-R-L-R-E-A-F-(SEQ ID NO :74),

- [0345] E-W-L-K-A-F-Y-E-K-V-A-E-R-L-R-E-A-F-(SEQ ID NO :75),
- [0346] D-W-L-R-A-F-Y-D-K-V-A-E-R-L-K-E-A-F-(SEQ ID NO :76),
- [0347] E-W-L-R-A-F-Y-E-K-V-A-E-R-L-K-E-A-F-(SEQ ID NO :77),
- [0348] D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-A-F-P-D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-A-F (SEQ ID NO :78),
- [0349] D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-F-F-P-D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-F-F (SEQ ID NO :79),
- [0350] D-W-F-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-A-F-P-D-W-F-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-A-F (SEQ ID NO :80),
- [0351] D-K-L-K-A-F-Y-D-K-V-F-E-W-A-K-E-A-F-P-D-K-L-K-A-F-Y-D-K-V-F-E-W-L-K-E-A-F (SEQ ID NO :81),
- [0352] D-K-W-K-A-V-Y-D-K-F-A-E-A-F-K-E-F-L-P-D-K-W-K-A-V-Y-D-K-F-A-E-A-F-K-E-F-L (SEQ ID NO :82),
- [0353] D-W-F-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F-P-D-W-F-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F (SEQ ID NO :83),
- [0354] D-W-L-K-A-F-V-Y-D-K-V-F-K-L-K-E-F-F-P-D-W-L-K-A-F-V-Y-D-K-V-F-K-L-K-E-F-F (SEQ ID NO :84),
- [0355] D-W-L-K-A-F-Y-D-K-F-A-E-K-F-K-E-F-F-P-D-W-L-K-A-F-Y-D-K-F-A-E-K-F-K-E-F-F (SEQ ID NO :85)。
- [0356] 项 46. 项 45 的用途,其中该肽包含的所有对映体氨基酸是 D 氨基酸。
- [0357] 项 47. 项 45 的用途,其中所述的肽还包含偶联到氨基或羧基末端的保护基团。
- [0358] 项 48. 项 47 的用途,其中所述的保护基团选自乙酰基, n 的范围从 1 到 20 的 $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_n-\text{CO}-$, 或酰胺。
- [0359] 项 49. 项 47 的用途,其中所述肽还包含偶联到氨基末端的第一保护基团和偶联到羧基末端的第二保护基团。
- [0360] 项 50. 项 33 的用途,其中所述的氧化剂选自过氧化氢, 13(S)-HPODE, 15(S)-HPETE, HPODE, HPETE, HODE, 或 HETE。
- [0361] 项 51. 项 33 的用途,其中所述的磷脂选自 1- 棕榈酰 -2- 花生四烯酰 -sn- 甘油基 -3- 磷酸胆碱 (PAPC), 1- 硬脂酰 -2- 花生四烯酰 -sn- 甘油基 -3- 磷酸胆碱 (SAPC), 1- 硬脂酰 -2- 花生四烯酰 -sn- 甘油基 -3- 磷酸乙醇胺 (SAPE)。
- [0362] 项 52. 一种组合物在制备给生物体口服施用的改善动脉粥样硬化症状的药物中的用途,该组合物包含下述肽,其是人 apo A-I 肽或人 apo A-I 肽的类似物,其中所述的肽具有连接到氨基末端的第一保护基团和连接到羧基末端的第二保护基团,且其中所述的肽包含多个 D 氨基酸残基。
- [0363] 项 53. 项 52 的用途,其中所述的第一保护基团和所述的第二保护基团独立地选自乙酰基, n 的范围从 3 到 20 的 $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_n-\text{CO}-$, 或酰胺。
- [0364] 项 54. 项 52 的用途,其中所述的第一保护基团是乙酰基。
- [0365] 项 55. 项 52 的用途,其中所述的第二保护基团是酰胺。
- [0366] 项 56. 项 52 的用途,其中所述的组合物还包含可药用赋形剂。

[0367] 项 57. 项 60 的用途,其中所述的赋形剂是适合于口服给药的赋形剂。

[0368] 项 58. 项 52 的用途,其中所述的肽防止磷脂被氧化剂氧化。

[0369] 项 59. 项 58 的用途,其中所述的氧化剂选自过氧化氢,13(S)-HPODE, 15(S)-HPETE, HPODE, HPETE, HODE, 或 HETE。

[0370] 项 60. 项 58 的用途,其中所述的磷脂选自 1-棕榈酰-2-花生四烯酰-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(PAPC), 1-硬脂酰-2-花生四烯酰-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(SAPC), 1-硬脂酰-2-花生四烯酰-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(SAPE)。

[0371] 项 61. 一种改善动脉粥样硬化症状的试剂盒,所述的试剂盒包括含有如下的一种肽的容器:

[0372] 长度范围从大约 10 个到大约 30 个氨基酸;

[0373] 包含至少一个 A 型两亲性螺旋;

[0374] 包含至少一个“D”氨基酸残基;

[0375] 保护磷脂,使其不被氧化剂氧化;和

[0376] 不是 D-18A 肽。

[0377] 项 62. 项 61 的试剂盒,其中所述的肽包含具有选自如下一组氨基酸序列的肽:

[0378] D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-A-F-(SEQ ID NO:2),

[0379] D-W-F-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-A-F-(SEQ ID NO:3),

[0380] D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F-(SEQ ID NO:4),

[0381] D-W-F-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F-(SEQ ID NO:5),

[0382] D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-F-E-K-F-K-E-F-F-(SEQ ID NO:6),

[0383] D-W-L-K-A-F-Y-D-K-F-F-E-K-F-K-E-F-F-(SEQ ID NO:7),

[0384] D-W-F-K-A-F-Y-D-K-F-F-E-K-F-K-E-F-F-(SEQ ID NO:8),

[0385] D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-F-F-(SEQ ID NO:9),

[0386] D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-F-E-K-F-K-E-A-F-(SEQ ID NO:10),

[0387] D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-F-E-K-L-K-E-F-F-(SEQ ID NO:11),

[0388] D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-F-F-(SEQ ID NO:12),

[0389] D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-F-E-K-F-K-E-F-F-(SEQ ID NO:13),

[0390] E-W-L-K-L-F-Y-E-K-V-L-E-K-F-K-E-A-F-(SEQ ID NO:14),

[0391] E-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F-(SEQ ID NO:15),

[0392] E-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-F-F-(SEQ ID NO:16),

[0393] E-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-F-E-K-F-K-E-A-F-(SEQ ID NO:17),

[0394] E-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-F-E-K-L-K-E-F-F-(SEQ ID NO:18),

[0395] E-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-F-F-(SEQ ID NO:19),

[0396] E-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-F-E-K-F-K-E-F-F-(SEQ ID NO:20),

[0397] A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-A-F-(SEQ ID NO:21),

[0398] A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F-(SEQ ID NO:22),

[0399] A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F-(SEQ ID NO:23),

[0400] A-F-Y-D-K-F-F-E-K-F-K-E-F-F-(SEQ ID NO:24),

[0401] A-F-Y-D-K-F-F-E-K-F-K-E-F-F-(SEQ ID NO:25),

- [0402] A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F-(SEQ ID NO :26),
[0403] A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-F-F-(SEQ ID NO :27),
[0404] A-F-Y-D-K-V-F-E-K-F-K-E-A-F-(SEQ ID NO :28),
[0405] A-F-Y-D-K-V-F-E-K-L-K-E-F-F-(SEQ ID NO :29),
[0406] A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-F-F-(SEQ ID NO :30),
[0407] K-A-F-Y-D-K-V-F-E-K-F-K-E-F-(SEQ ID NO :31),
[0408] L-F-Y-E-K-V-L-E-K-F-K-E-A-F-(SEQ ID NO :32),
[0409] A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F-(SEQ ID NO :33),
[0410] A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-F-F-(SEQ ID NO :34),
[0411] A-F-Y-D-K-V-F-E-K-F-K-E-A-F-(SEQ ID NO :35),
[0412] A-F-Y-D-K-V-F-E-K-L-K-E-F-F-(SEQ ID NO :36),
[0413] A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-F-F-(SEQ ID NO :37),
[0414] A-F-Y-D-K-V-F-E-K-F-K-E-F-F-(SEQ ID NO :38),
[0415] D-W-L-K-A-L-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-A-L-(SEQ ID NO :39),
[0416] D-W-F-K-A-F-Y-E-K-V-A-E-K-L-K-E-F-F-(SEQ ID NO :40),
[0417] D-W-F-K-A-F-Y-E-K-F-F-E-K-F-K-E-F-F-(SEQ ID NO :41),
[0418] E-W-L-K-A-L-Y-E-K-V-A-E-K-L-K-E-A-L-(SEQ ID NO :42),
[0419] E-W-L-K-A-F-Y-E-K-V-A-E-K-L-K-E-A-F-(SEQ ID NO :43),
[0420] E-W-F-K-A-F-Y-E-K-V-A-E-K-L-K-E-F-F-(SEQ ID NO :44),
[0421] E-W-L-K-A-F-Y-E-K-V-F-E-K-F-K-E-F-F-(SEQ ID NO :45),
[0422] E-W-L-K-A-F-Y-E-K-F-F-E-K-F-K-E-F-F-(SEQ ID NO :46),
[0423] E-W-F-K-A-F-Y-E-K-F-F-E-K-F-K-E-F-F-(SEQ ID NO :47),
[0424] D-F-L-K-A-W-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-A-W-(SEQ ID NO :48),
[0425] E-F-L-K-A-W-Y-E-K-V-A-E-K-L-K-E-A-W-(SEQ ID NO :49),
[0426] D-F-W-K-A-W-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-W-W-(SEQ ID NO :50),
[0427] E-F-W-K-A-W-Y-E-K-V-A-E-K-L-K-E-W-W-(SEQ ID NO :51),
[0428] D-K-L-K-A-F-Y-D-K-V-F-E-W-A-K-E-A-F-(SEQ ID NO :52),
[0429] D-K-W-K-A-V-Y-D-K-F-A-E-A-F-K-E-F-L-(SEQ ID NO :53),
[0430] E-K-L-K-A-F-Y-E-K-V-F-E-W-A-K-E-A-F-(SEQ ID NO :54),
[0431] E-K-W-K-A-V-Y-E-K-F-A-E-A-F-K-E-F-L-(SEQ ID NO :55),
[0432] D-W-L-K-A-F-V-D-K-F-A-E-K-F-K-E-A-Y-(SEQ ID NO :56),
[0433] E-K-W-K-A-V-Y-E-K-F-A-E-A-F-K-E-F-L-(SEQ ID NO :57),
[0434] D-W-L-K-A-F-V-Y-D-K-V-F-K-L-K-E-F-F-(SEQ ID NO :58),
[0435] E-W-L-K-A-F-V-Y-E-K-V-F-K-L-K-E-F-F-(SEQ ID NO :59),
[0436] D-W-L-R-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-A-F-(SEQ ID NO :60),
[0437] E-W-L-R-A-F-Y-E-K-V-A-E-K-L-K-E-A-F-(SEQ ID NO :61),
[0438] D-W-L-K-A-F-Y-D-R-V-A-E-K-L-K-E-A-F-(SEQ ID NO :62),
[0439] E-W-L-K-A-F-Y-E-R-V-A-E-K-L-K-E-A-F-(SEQ ID NO :63),
[0440] D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-R-L-K-E-A-F-(SEQ ID NO :64),

- [0441] E-W-L-K-A-F-Y-E-K-V-A-E-R-L-K-E-A-F-(SEQ ID NO :65),
- [0442] D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-R-E-A-F-(SEQ ID NO :66),
- [0443] E-W-L-K-A-F-Y-E-K-V-A-E-K-L-R-E-A-F-(SEQ ID NO :67),
- [0444] D-W-L-K-A-F-Y-D-R-V-A-E-R-L-K-E-A-F-(SEQ ID NO :68),
- [0445] E-W-L-K-A-F-Y-E-R-V-A-E-R-L-K-E-A-F-(SEQ ID NO :69),
- [0446] D-W-L-R-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-R-E-A-F-(SEQ ID NO :70),
- [0447] E-W-L-R-A-F-Y-E-K-V-A-E-K-L-R-E-A-F-(SEQ ID NO :71),
- [0448] D-W-L-R-A-F-Y-D-R-V-A-E-K-L-K-E-A-F-(SEQ ID NO :72),
- [0449] E-W-L-R-A-F-Y-E-R-V-A-E-K-L-K-E-A-F-(SEQ ID NO :73),
- [0450] D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-R-L-R-E-A-F-(SEQ ID NO :74),
- [0451] E-W-L-K-A-F-Y-E-K-V-A-E-R-L-R-E-A-F-(SEQ ID NO :75),
- [0452] D-W-L-R-A-F-Y-D-K-V-A-E-R-L-K-E-A-F-(SEQ ID NO :76),
- [0453] E-W-L-R-A-F-Y-E-K-V-A-E-R-L-K-E-A-F-(SEQ ID NO :77),
- [0454] D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-A-F-P-D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-A-F (SEQ ID NO :78),
- [0455] D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-F-F-P-D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-F-F (SEQ ID NO :79),
- [0456] D-W-F-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-A-F-P-D-W-F-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-A-F (SEQ ID NO :80),
- [0457] D-K-L-K-A-F-Y-D-K-V-F-E-W-A-K-E-A-F-P-D-K-L-K-A-F-Y-D-K-V-F-E-W-L-K-E-A-F (SEQ ID NO :81),
- [0458] D-K-W-K-A-V-Y-D-K-F-A-E-A-F-K-E-F-L-P-D-K-W-K-A-V-Y-D-K-F-A-E-A-F-K-E-F-L (SEQ ID NO :82),
- [0459] D-W-F-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F-P-D-W-F-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F (SEQ ID NO :83),
- [0460] D-W-L-K-A-F-V-Y-D-K-V-F-K-L-K-E-F-F-P-D-W-L-K-A-F-V-Y-D-K-V-F-K-L-K-E-F-F (SEQ ID NO :84),
- [0461] D-W-L-K-A-F-Y-D-K-F-A-E-K-F-K-E-F-F-P-D-W-L-K-A-F-Y-D-K-F-A-E-K-F-K-E-F-F (SEQ ID NO :85)。
- [0462] 项 63. 项 61 的试剂盒,其中所述的肽包含的所有对映体氨基酸是 D 氨基酸。
- [0463] 项 64. 项 61 的试剂盒,其中所述的肽在单剂制剂中与可药用赋形剂组合。
- [0464] 项 65. 项 64 的试剂盒,其中所述的单剂制剂用于口服给药。
- [0465] 项 66. 项 61 的试剂盒,还包含教导使用所述的肽改善动脉粥样硬化的一种或多种症状的教导性材料。
- [0466] 项 67. 一种改善动脉粥样硬化症状的试剂盒,所述的试剂盒包含一种容器,该容器中含有适用于口服给药改善动脉粥样硬化症状的组合物,其中所述的组合物包含下述肽,其是人 apo A-I 肽或人 apo A-I 肽的类似物,其中所述的肽具有连接到氨基末端的第一保护基团和连接到羧基末端的第二保护基团且其中所述的肽包含多个 D 氨基酸残基。
- [0467] 项 68. 项 67 的试剂盒,其中所述的肽在单剂制剂中与可药用赋形剂组合。

[0468] 项 69. 项 67 的试剂盒, 还包含教导使用所述的肽改善动脉粥样硬化的一种或多种症状的教导性材料。

[0469] 项 70. 项 1 到 20 任一项的多肽在制备在哺乳动物中减轻或防止与炎症的急性期反应相关的冠状动脉并发症的药物中的用途, 其中所述的冠状动脉并发症是一种动脉粥样硬化症状, 所述药物的使用方法中包含给具有所述急性期反应, 或者处于所述急性期反应风险中的哺乳动物施用权利要求 1 到 20 任一项的多肽的步骤。

[0470] 项 71. 项 70 的用途, 其中该药物的给药是通过选自下组的途径完成: 口服给药, 鼻腔给药, 直肠给药, 腹膜内注射, 和血管内注射, 皮下注射, 经皮给药和肌肉内注射。

[0471] 项 72. 项 70 的用途, 其中所述的多肽与相同多肽的全 L- 型组合给药。

[0472] 项 73. 项 70 的用途, 其中所述的多肽作为在可药用赋形剂中的单元制剂的形式来供应。

[0473] 项 74. 项 70 的用途, 其中所述的急性期反应是与复发性炎症疾病相关的炎症反应。

[0474] 项 75. 项 71 的用途, 其中所述的急性期反应与选自下组的疾病相关: 麻风病, 结核, 系统性红斑狼疮, 风湿性多肌痛, 结节性多动脉炎, 硬皮病, 自发性肺纤维变性, 慢性阻塞性肺疾病, 阿尔茨海默氏病和 AIDS, 风湿性多肌痛, 结节性多动脉炎, 硬皮病, 自发性肺纤维变性, 慢性阻塞性肺疾病, 阿尔茨海默氏病, AIDS, 冠状动脉钙化, 钙化性主动脉狭窄, 骨质疏松症, 和类风湿性关节炎。

[0475] 项 76. 项 70 的用途, 其中所述的急性期反应是与选自下组的病症相关的炎症反应: 细菌感染, 病毒感染, 真菌感染, 器官移植, 创伤, 植入修复术, 寄生虫感染, 脓毒症, 内毒素休克综合征和生物膜形成。

[0476] 项 77. 项 1 到 20 任一项的多肽在制备在哺乳动物中减轻或防止与炎症的急性期反应相关的冠状动脉并发症的药物中的用途, 其中所述的冠状动脉并发症是动脉粥样硬化症状, 其中该药物的使用方法中包含测定所述的哺乳动物中指示急性期反应或急性期反应重大风险的急性期蛋白 (APP) 水平; 和给显示出指示急性期反应的急性期蛋白 (APP) 水平的哺乳动物施用权利要求 1 到 20 任一项的多肽的步骤。

[0477] 项 78. 项 77 的用途, 其中所述的急性期蛋白 (APP) 是选自下组的阳性 APR: 血清淀粉样蛋白 A, C- 反应蛋白, 血清淀粉样蛋白 P 成分, C2 补体蛋白, C3 补体蛋白, C4 补体蛋白, C5 补体蛋白, C9 补体蛋白, B 补体蛋白, C1 抑制剂, C4 结合蛋白, 纤维蛋白原, von Willebrand 因子, α 1- 抗胰蛋白酶, α 1- 抗胰凝乳蛋白酶, α 2 抗纤溶酶, 肝素辅因子 II, 纤溶酶原激活物抑制剂 I, 肝珠蛋白, 血红素结合蛋白, 血浆铜蓝蛋白, 锰超氧化物歧化酶, α 1- 酸性糖蛋白, 血加氧酶, 甘露糖结合蛋白, 白细胞蛋白 I, 脂蛋白 (a), 和脂多糖结合蛋白。

[0478] 项 79. 项 77 的用途, 其中所述的急性期蛋白 (APP) 是选自下组的阴性 APR: 白蛋白, 前白蛋白, 运铁蛋白, apoAI, apoAII, α 2-HS 糖蛋白, 中间 - α - 胰蛋白酶抑制剂, 富含组氨酸的糖蛋白。

附图说明

[0479] 图 1 的 A, B, C, 和 D 图显示了 ^{14}C -D-5F 与 ApoE 无效 (null) 小鼠中的血液成分的

缔合。用 ^{14}C 氨基酸标记的 ApoA-I 模拟肽 D-5F 经口腔管饲法施用给 apo E 缺陷型小鼠 ($n = 5$) 或与其血浆体外温育。管饲法后 6 小时收集禁食血液 (fasting food) 并测定 ^{14}C 与血液, 血浆, 和脂蛋白的缔合。

[0480] 图 2A 和 2B 显示了口服施用的 D 肽是有效的。将 ApoA-I 模拟肽 D-5F 和 L-5F (每只动物施用 $100\ \mu\text{g}$) 通过口腔管饲法施用给 LDL 受体无效小鼠 ($n = 5$)。6 小时后收集血液, 通过凝胶过滤 (FPLC) 分离 LDL 和 HDL 并通过测定产生的单核细胞趋化性活性在动脉管壁模型系统中检查 HDL 的保护能力 (图 2A) 和 LDL 对氧化的抗性 (图 2B)。可见, D-5F 而不是 L-5F 给予 HDL 明显更大的保护性且在施用 D-5F 后 LDL 变得对氧化有高度抗性。

[0481] 图 3A 和 3B 显示了管饲法后 D 与 L 肽的血浆浓度。ApoA-I 模拟肽 D-4F (图 3B) 和 L-4F (图 3B) 用 ^{125}I 标记且通过口腔管饲法施用给 LDL 受体无效小鼠 ($n = 4$)。3 小时后收集血液, 通过 FPLC 分级分离血浆并在洗脱级分中测定放射性。低于 15% 的 L 肽作为完整的 18 体 (18mer) 洗脱而超过 70% 的 D-4F 是完整的。这些研究证实 D 肽与 L 肽相比对体内降解的抗性明显更强。

[0482] 图 4 显示了在处理的小鼠中没有抗 D-4F 的抗体。每天用 5mg 肽处理, 6 周后 (下图) 在 LDL 受体无效小鼠血浆中没有检测到抗 D-4F 的抗体 (白色沉淀线)。阳性对照 (上图) 表明在小鼠血浆中存在 apoA-I 的沉淀线。上图: 中央: 兔抗 ApoA-I, 周围: D4-F 小鼠的血浆。下图: 中央: 用 D-4F 处理的 LDL R-/- 小鼠的血浆, 周围: 0 至 $80\ \mu\text{g}$ 的纯 D-4F 肽。

[0483] 图 5 显示了, 接受西方人饮食的 LDL 受体无效小鼠的主动脉根中, 脂肪纹病灶的发生率。LDL 受体无效小鼠组按照西方人类型的饮食并口服给予载体 (对照) ($n = 9$) 或肽 D-4F ($n = 6$), 每天两次共 6 周。随后处死小鼠, 固定主动脉弓并切片, 定量脂肪纹病灶。接受 D-4F 的小鼠病灶面积减少 81% ($p < 0.01$)。

[0484] 图 6 的 A, B, 和 C 图显示了腹膜内注射后, 肽 5F 或 apo A-I 的血浆分布。人 apo A-I, 小鼠 apo A-I, 和肽 5F 用 ^{125}I 标记并经腹膜内途径注射进 C57BL/6 小鼠中, 所述小鼠已饲喂了致动脉粥样硬化饮食达至少 3 周。在表 3 所述的动力学研究期间取样。通过 CLiP 方法分析代表性样品, 并收集级分用于测定放射性。洗脱体积仅以柱泵速率为基础; 忽略由酶试剂泵产生的体积。所显示的数据是胆固醇 (以任意单位表示的 500nm 处的吸光度; 实线) 和放射性 (每分钟的计数; 虚线)。各图分别是 A: 人 apo A-I (注射后 1 小时); B: 小鼠 apo A-I (1 小时), C: 5F (1.5 小时)。

[0485] 图 7 的 A 和 B 图显示了小鼠脂蛋白与人动脉壁细胞的相互作用。从小鼠血浆通过 FPLC 分离 LDL 和 HDL, 所述小鼠饲喂了致动脉粥样硬化饮食, 并注射了载体 (PBS) 或肽 5F, $20\ \mu\text{g}/\text{只小鼠}/\text{天}$ 。所述共培养物不添加物质进行处理 (没加入), 或者添加以下物质进行处理: $200\ \mu\text{g}/\text{ml}$ LDL 蛋白的人 LDL (hLDL), 或 $200\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 小鼠 LDL (MoLDL), 或 $200\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 人 LDL+ $350\ \mu\text{g}/\text{ml}$ HDL 蛋白的人 HDL (hHDL) 或 $300\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 小鼠 HDL (MoHDL)。共培养物与上述添加物在 10% 的脂蛋白缺陷型血清 (LPDS) 存在下 37°C 温育 8 小时。收集上清并分析 Auerbach 脂类氢过氧化物等价物 (equivalents) (A 图)。然后洗涤共培养物并与无血清或 LPDS 的新鲜培养基再培养 8 小时。收集条件培养基并分析单核细胞趋化活性 (B 图)。两图均包含无细胞空白 (无细胞空白) 用于比较。

[0486] 图 8 显示了平均病灶横切面的面积。显示的数据代表各动物的平均病灶横切面面积 (○) 和平均值 $\pm$ 用误差条表示的各组中所有动物的 SEM (●)。缩写: PBS, 饲喂致

动脉粥样化饮食并每天注射 200 μ l 磷酸盐缓冲溶液的小鼠 ;5F, 饲喂致动脉粥样化饮食并每天注射在 200 μ l PBS 中的 20 μ g 5F 的小鼠 ;MoAI, 饲喂致动脉粥样化饮食并每天注射在 200 μ l PBS 中的 50 μ g 小鼠 apoA-I 的小鼠。* = 以双尾 (two-tailed) t- 检验测定的 $p < 0.002$ 。使用等级方差的单向分析也显示有显著差异 ($p < 0.001$)。

[0487] 图 9 显示了 apo A-I 肽模拟物的 D 和 L 型异构体都防止由体外适度氧化的 LDL 诱导的单核细胞趋化活性。单一培养基 (有 LDL, 无细胞或者有细胞, 无 LDL), 250 μ g/ml 来自正常受试者的对照 LDL (LDL), 和 LDL 加 350 μ g/ml 来自正常受试者的对照 HDL (+HDL)。用对照 LDL 与不同量 (在横坐标上表示的微克数) 的 D-2F, 或 L-2F (左侧的第三组, 2F) 或者 D-37-pA 或 L-37pA (右侧的最后一组, 37pA) 之一一起温育其它共培养物。数据代表从一式四份共培养物获得的平均值 $\pm$ SD 值。HDL 或加入肽的值都与单一 LDL (左侧第一组) 有以 $p < 0.01$ 水平的显著差异。

[0488] 图 10A 和 10B 显示了饲喂本发明的 ApoA-1 肽模拟物的小鼠导致红细胞对体外裂解有抗性。图 10A 和 10B 显示了在 18 小时 (图 10A) 和 48 小时 (图 10B) 时体外红细胞裂解试验的结果。星号表示接受载体的动物与接受肽的动物之间的红细胞裂解存在显著差异 ($p < 0.001$)。

[0489] 图 11 显示了饲喂本发明的 ApoA-1 模拟物 D 肽的小鼠导致循环的 LDL 抗氧化。LDL 受体缺陷型小鼠组 ($n = 3$) 通过管饲法施用 D- 肽或盐水载体。每只动物给予 100 μ l 盐水, 100 μ g/100 μ l 的肽 D-2F 或肽 D-37pA。17 小时后在中度麻醉下从眼眶后静脉窦收集血液。通过 FPLC 从血浆分离 LDL。动脉壁细胞的共培养物用单一培养基 (无添加), 来自正常受试者的对照 LDL (LDL), LDL 加来自正常受试者的对照 HDL (+HDL) 温育。其它共培养物用经过盐水 (盐水 LDL), D-2F (D-2F LDL) 或 D-37pA 肽 (D-37pA LDL) 管饲法后获得的鼠 LDL 温育。在 10% LPDS 存在下在 37°C 温育共培养物 4 小时。

[0490] 然后弃去上清, 洗涤共培养物并用无血清或 LPDS 的培养基再培养 4 小时。收集条件培养基并分析单核细胞趋化活性。值是一式四份共培养物的平均值 $\pm$ SD。星号指示 $p < 0.001$ 。

[0491] 图 12 显示了比较来自通过管饲法给予 D- 型和 L- 型肽的小鼠的脂蛋白的趋化性试验的结果。

[0492] 图 13A 显示了比较对照 HDL 和来自通过管饲法给予 D- 肽的小鼠的 HDL 的趋化性试验的结果。图 13B 显示了比较来自通过管饲法给予 D- 肽的小鼠的 LDL 和 VLDL/IDL 的趋化性试验的结果。

[0493] 图 14A 和 14B 显示了 2F 的电泳, 指示其自我缔合。图 14A : 2F 的 SDS-PAGE (18%)。泳道 1 显示了分子量标准, 泳道 2 显示了相应于 2F 的带 (分子量是 2242), 迁移略低于最低的分子量标准 (3.5-2.5 kDa)。图 14B : 非变性 PAGE (4-12%), 显示了指示溶液中自我缔合的 100 μ g/ml (泳道 2) 和 250 μ g/ml (泳道 1) 2F 的迁移率。泳道 3 显示了高分子量标准的迁移率。

[0494] 图 15 显示了肽的同源系列稳定 DiPoPE 双分子层的破坏性 (hex-phase) 转变。DiPoPE 的 T_H 转变是添加肽级分的摩尔数的函数。以 37° / 小时的热扫描率通过 DSC 测量。

● 2F ; ○ 3F³ ; ■ 4F ; □ 5F ; ▼ 6F ; ▲ 7F ; △ apo A-I。

[0495] 图 16 : 相对直角光散射监测的 EPC MLVs 被肽的同源系列的溶解是时间的

函数。显示了各同源肽的代表性的 EPC MLV 澄清曲线。使用等克分子浓度的肽和 EPC(105 μ M)。激发和发射波长均为 400nm。Triton X-100 在 1mM 的终浓度下达到完全溶解。-●-EPC;-○-2F;

[0496] -■-3F³, -□-3F¹⁴, -▲-4F;-△-5F;-▼-6F;-▽-7F;-◇-人 apo A-I;-◆-TritonX-100。

[0497] 图 17 显示了同源肽的 LCAT 激活能力。直方图表示 LCAT 被 F-肽的激活。使用 EPC-胆固醇的单层小泡测量 LCAT 的活性且该活性表示为与 apoA-I 活性相比的百分数,其中 apo A-I 的活性设定为 100%。每个值代表一式三份的平均值。使用的肽浓度是 20 μ g/ml。

[0498] 图 18 显示了 LDL-诱导的单核细胞趋化性被肽的同源系列抑制。向 10% LPDS 存在下 8 小时的人动脉壁细胞共培养物中加入单一的 LDL 或用人 HDL 或肽的同源系列培养的 LDL。弃去上清且用无血清或 LPDS 的培养基洗涤共培养物。然后收集条件培养基并分析单核细胞趋化活性。数据代表平均值 $\pm$ SEM 值(每种情况下 n = 9)。通过用 LDL 逐对比较,除 3F 肽外的所有肽明显更有效(至少 p < 0.001,用‘†’或‘*’表示)。通过单向(one-way)ANOVA 分析所有肽之间的比较。星号表示肽 4F,5F 和 6F 比同系物 2F 和 7F 明显更有效(以 Duckett 比较 p < 0.05)。方括号表示在这三个肽中抑制 LDL-诱导的趋化性的能力无显著差异。

[0499] 图 19 显示了流感 A 感染在感染两天后引起肝脏氧化的磷脂增加。按 Van Lenten 等(2001)Circulation,103:2283-2288 所述用一定剂量的流感 A 病毒经鼻内感染接受常规饮食的 C57BL/6 小鼠以便不使产生病毒血症。感染 0,2,3,5,7,和 9 天后取出肝脏并通过 ESI-MS 测定氧化的磷脂含量。

[0500] 图 20 显示了 D-4F 在流感 A 感染后防止对氧磷酶活性的下降。图 19 所述的一些小鼠每天用 20 μ g 的 D-4F 腹膜内注射,其它用磷酸盐缓冲液(PBS)注射。在感染后 0,2,7,和 9 天时的血浆中测量对氧磷酶活性(PON)。

[0501] 图 21 显示了 D-4F 在流感 A 病毒感染的小鼠主动脉中防止氧化磷脂的诱导。图 19 所述的一些小鼠每天用 20 μ g 的 D-4F 腹膜内注射,其它用磷酸盐缓冲液(PBS)注射。在感染后 0,2,7,和 9 天时收获小鼠主动脉并通过 ESI-MS 测量氧化的磷脂含量。

[0502] 图 22A 到 22C 显示口服用药后,D-4F 而不是 L-4F 在 LDL 受体无效小鼠循环中保持完整且增强 HDL 防止 LDL 被人动脉壁细胞氧化的能力且减少 LDL 诱导的单核细胞趋化活性。图 22A:肽 L-4F 和 D-4F 使用碘珠(Iodo-bead)试剂放射性标记并经过口腔管饲法施用给 LDL 受体无效小鼠(每只动物 100 μ l 盐水含 100 μ g 未标记的肽加上每 μ g 肽比活为 11×10^6 cpm 的 ¹²⁵I-标记的肽,n = 3)。4 小时后收集血液,分离血浆,去脂化并按参考文献 12 所述通过反相 HPLC 分析。B 和 C 组:肽 L-4F 和 D-4F(每只动物在 100 μ l 盐水中含 100 μ g)经口腔管饲法施用给 LDL 受体缺陷型小鼠(n = 5)。6 小时后收集血液,通过凝胶过滤(FPLC)分离血浆 HDL 和 LDL 并在共培养物中检查。

[0503] 图 22B:显示了小鼠和人 HDL 防止对照人 LDL(hLDL)被人动脉壁细胞氧化和抑制 LDL-诱导的单核细胞趋化活性的能力。将 200 μ g 蛋白质/ml 的人 LDL 与 350 μ g 蛋白质/ml 的人 HDL(hHDL)或来自接受盐水(盐水 Rx)或 L-4F(L-4FRx)或 D-4F(D-4F Rx)的小鼠

的 100 μ g 胆固醇 /ml 的小鼠 HDL(mHDL) 一起加入人动脉壁细胞共培养物中并按本文所述测定单核细胞趋化活性。图 22C :显示了小鼠 LDL 诱导单核细胞趋化活性的能力。B 组中左侧显示了试验对照。右侧,从接受盐水(盐水 Rx)或 L-4F(L-4F Rx)或 D-4F(D-4F Rx)的小鼠中分离小鼠 LDL(mLDL)并以 100 μ g 胆固醇 /ml 加入无 HDL 的动脉壁细胞共培养物中且测定单核细胞趋化活性。数值是在两个独立的实验中 4 个孔的平均值 $\pm$ SD。

[0504] 图 23 显示了口服施用 D-4F 显著减少接受西方人饮食的 LDL 受体无效小鼠中的病灶。LDL 受体无效小鼠组安置西方人饮食且通过口腔管饲法供应,100 μ l 单一盐水(盐水), $n = 4$ 只动物,或 100 μ l 无 D-4F 的脂质体(脂质体), $n = 5$ 只动物,或在 100 μ l 脂质体中的 2.5 mg D-4F 肽(脂质体中的 D-4F), $n = 6$ 只动物,每天两次共 6 周。小鼠放血并随后处死,固定主动脉根,切片并定量脂肪纹病灶中的油红 O 染色程度。

[0505] 图 24 显示了口腔施用 D-4F 显著减少接受常规饮食的 apo E 无效小鼠中的病灶。在 4 周龄时,将 D-4F 加入一些 apo E 无效小鼠的饮水中以产生 1mg/ml D-4F 的浓度($n = 4$ 只小鼠),D-4F 以 2mg/ml 的浓度加入另一组小鼠的饮水中($n = 4$ 只小鼠),第三组小鼠的饮水中不加肽($n = 5$ 只小鼠)。所有小鼠每天消耗大约 2.5ml 水使得一组不接受肽(水),第二组接受 2.5mg D-4F/ 只小鼠 / 天(2.5mg D-4F)及第三组接受 5.0mg D-4F/ 只小鼠 / 天(5.0mg D-4F)。所有小鼠继续接受常规饮食 5 周,此时给小鼠放血并随后处死,固定主动脉根,切片并定量脂肪纹病灶中的油红 O 染色程度。

具体实施方式

[0506] I. 动脉粥样硬化症状的减轻。

[0507] 本发明涉及的发现是设计成模拟 A 型两亲性螺旋基序 (Segrest 等 (1990) Proteins :Structure, Function, and Genetics 8 :103-117) 的合成肽能与磷脂缔合且表现出相似于人 apo-A-I 的许多生物学特性。具体地说,本发明的发现是当使用 D 氨基酸制备该肽时,肽表现出血清半寿期显著提高,且特别是当氨基和 / 或羧基末端被封闭时,甚至可口服给药。

[0508] 此外,本发明令人惊奇的发现是该 D- 型肽保留相应的 L- 型肽的生物学活性。使用该 D- 型肽的动物体内研究显示出有效的口服传递,血清半寿期提高,且具有减轻或预防 / 抑制动脉粥样硬化的一种或多种症状的能力。

[0509] 我们发现正常的 HDL 抑制在适度氧化的 LDL 形成中的 3 个步骤。在这些研究中(参见,申请日为 2000 年 3 月 31 日的共同未决申请 USSN09/541,468) 我们证实用 apo A-I 或 apo A-I 模拟肽 (37pA) 体外处理人 LDL 从包括 HPODE 和 HPETE 的 LDL 中去掉了种子 (seeding) 分子。这些种子分子对于人动脉壁细胞的共培养物能氧化 LDL 和对于 LDL 诱导动脉壁细胞产生单核细胞趋化性活性是必需的。我们也证实了将 apo A-I 注射进小鼠或输入人体后,从注射 / 输入 apo A-I 后的小鼠或人类志愿者分离的 LDL 对于人动脉壁细胞的氧化有抗性且在动脉壁细胞共培养物中不能诱导单核细胞趋化性活性。

[0510] 本发明的 D 肽的保护性功能在图 1 到 5 中说明。图 1, A, B, C, 和 D 组显示了 14C-D-5F 与 ApoE 无效小鼠的血液成分的缔合。本文还证实来自饲喂致动脉粥样化饮食并注射了 PBS 的小鼠的 HDL 不能抑制人 LDL 的氧化且不能抑制人动脉壁共培养物中 LDL- 诱导的单核细胞趋化性活性。相反,来自饲喂致动脉粥样化饮食并每天注射本文所述肽的小

鼠的 HDL 在抑制人 LDL 的氧化和防止共培养物中 LDL- 诱导的单核细胞趋化性活性中与正常人 HDL 一样有效 (图 2A 和 2B)。另外,从饲喂致动脉粥样化饮食并每天注射 PBS 的小鼠获取的 LDL 比从饲喂相同饮食但每天注射 20 μ g 肽 5F 的小鼠获取的 LDL 更容易被氧化且更容易诱导单核细胞趋化性活性。D 肽不会表现出免疫原性 (图 4)。

[0511] 人动脉壁细胞对来自饲喂致动脉粥样化饮食并注射根据本发明的肽的小鼠的 HDL 和 LDL 的体外反应与该肽在体内显示出的保护性作用一致。尽管总胆固醇, LDL- 胆固醇, IDL+VLDL- 胆固醇, 和较低 HDL 胆固醇与总胆固醇的百分数水平相似, 但饲喂致动脉粥样化饮食和注射肽的动物具有明显较低的病灶得分 (图 5)。因此本发明的肽防止在饲喂致动脉粥样化饮食的小鼠中动脉粥样硬化病灶的恶化。

[0512] 因此, 在一个实施方案中, 本发明提供了改善和 / 或预防动脉粥样硬化的一种或多种症状的方法。该方法优选包括给生物体, 优选哺乳动物, 更优选人施用一种或多种本发明的肽 (或该肽的模拟物)。该肽可按本文所述, 按照包括, 但不限于注射, 栓剂, 鼻喷雾, 定时释放移植物, 经皮贴剂 (transdermal pad) 等的许多标准方法中的任一种给药。在一个特别优选的实施方案中, 该肽经口服给药 (例如, 作为糖浆, 胶囊, 或片剂)。

[0513] 所述方法包含本发明的单个多肽的给药或两个或多个不同多肽的给药。多肽可作为单体或二聚体, 寡聚体或多聚体形式供应。在某些实施方案中, 多聚体形式可包括缔合的单体 (例如, 通过离子键或疏水键连接), 而某些其它多聚体形式包含共价连接的单体 (直接连接或通过接头连接)。

[0514] 尽管本发明用对于在人体中的用途进行了描述, 但是它也适用于动物, 例如兽医用途。因此优选的生物体包括, 但不限于人类, 非人灵长类, 犬, 马, 猫, 猪, 有蹄类, largomorphs, 等。

[0515] 本发明的方法不限于表现出动脉粥样硬化的一种或多种症状 (例如, 高血压, 蚀斑形成和破裂, 诸如心脏发病、痉挛性疼痛、或发作等临床事件的减少, 高水平的血浆胆固醇, 高水平的低密度脂蛋白, 高水平的极低密度脂蛋白, 或炎症性蛋白质等) 的人或非人动物, 而且可用于预防性情况。因此, 可将本发明的肽 (或其模拟物) 施用给生物体以预防动脉粥样硬化的一种或多种症状的发生 / 形成。在这种情况下特别优选的受试者是表现出动脉粥样硬化的一种或多种风险因素 (例如, 家族病史, 高血压, 肥胖, 高酒精消费, 吸烟, 高血液胆固醇, 高血液甘油三酯, 血液 LDL, VLDL, IDL 升高, 或低 HDL, 糖尿病, 或糖尿病的家族病史, 高血脂, 心脏发病, 痉挛性疼痛或发作, 等) 的受试者。

[0516] 除了本发明的抑制动脉粥样硬化的肽的使用方法外, 本发明还提供了肽本身, 配制成特别是用于口服传递的药物的肽, 和用于治疗 and / 或预防动脉粥样硬化的一种或多种症状的试剂盒。

[0517] II. 与急性炎症反应相关的动脉粥样硬化症状的减轻。

[0518] 本发明的抑制动脉粥样硬化的肽也用于许多其它情况。具体地说, 我们观察到心血管并发症 (例如, 动脉粥样硬化, 发作, 等) 经常与急性期的炎症反应的发作相伴或在其之后。该急性状态的炎症反应通常与复发性炎症疾病 (例如, 麻风病, 肺结核, 系统性红斑狼疮, 和类风湿性关节炎), 病毒感染 (例如, 流感), 细菌感染, 真菌感染, 器官移植, 伤口或其它外伤, 移植修复术, 生物膜等相关。

[0519] 本发明的令人惊奇的发现是施用本文所述的一种或多种肽可减少或防止在急性

期反应期间或之后形成氧化磷脂,从而减轻或消除与该状况相关的心血管并发症。

[0520] 因此,例如,我们证实了流感感染的后果是 HDL 中对氧磷酶和血小板活化的乙酰水解酶活性减少。不受具体理论的限制,我们相信,作为这些 HDL 酶活性损失的结果及作为急性期反应期间前体氧化剂 (prooxidant) 蛋白与 HDL 的缔合结果, HDL 不再能够防止 LDL 氧化且不再能够防止 LDL- 诱导产生内皮细胞的单核细胞趋化活性。

[0521] 我们观察到在用流感 A 病毒感染后每天注射极低剂量的本发明多肽 (例如,给小鼠 20 微克) 的受试者中,对氧磷酶水平不下降且不产生超过背景的有生物学活性的氧化磷脂。这表明可将 D-4F (和 / 或本发明的其它肽) 施用给 (例如,通过口服或注射) 在流感感染或可产生急性期炎症反应的其它事件 (例如,由于病毒感染,细菌感染,外伤,移植,各种自身免疫疾病状况等) 期间已知具有冠状动脉疾病的患者且因此我们可通过这种短期处理防止与产生该炎症状况的病变相关的心脏发病和发作的发病率增加。

[0522] 因此,在某些实施方案中,本发明包含将本发明的一种或多种肽施用给处于急性炎症反应风险中,或经受该反应和 / 或处于动脉粥样硬化症状风险中或经受该症状的受试者。

[0523] 因此,例如,可给具有冠状动脉疾病或处于该疾病风险中的人在流感季节预防性施用本发明的多肽。患有复发性炎症症状,例如,类风湿性关节炎,各种自身免疫疾病等的人 (或动物) 可用本发明的多肽治疗以减轻或防止动脉粥样硬化或发作的形成。患有外伤,例如,急性损伤,组织移植等的人 (或动物) 可用本发明的多肽治疗以减轻动脉粥样硬化或发作的形成。

[0524] 在某些情况下,该方法需要诊断急性炎症反应的发生或其风险。急性炎症反应一般涉及肝脏中代谢和基因调控的改变。它是一个动态的体内平衡过程,除了免疫,心血管和中枢神经系统外,它涉及身体的所有主要系统。正常情况下,急性期反应仅持续几天;然而,在慢性或复发性炎症的情况中,急性期反应的一些症状异常持续可引起与该疾病相伴的下面组织的损伤,且也可导致其它并发症,例如,心血管疾病或诸如淀粉样变性的蛋白质沉积疾病。

[0525] 急性期反应的一个重要方面是肝脏生物合成情况的根本性改变。在正常情况下,肝脏以稳定状态的浓度合成特征性范围的血浆蛋白。这些蛋白质中许多具有重要功能且在炎症刺激后在急性期反应期间需要更高血浆水平的这些急性期反应物 (APRs) 或急性期蛋白 (APPs)。尽管大多数 APRs 通过肝细胞合成,但是有些通过包括单核细胞,内皮细胞,成纤维细胞和脂肪细胞的其它细胞类型产生。大多数 APRs 被诱导到超过正常水平的 50% 和几倍之间。相反,主要 APRs 可增加到超过正常水平的 1000- 倍。这组蛋白包括血清淀粉样蛋白 A (SAA) 和任一种人体 C- 反应性蛋白 (CRP) 或其在小鼠中的同系物,血清淀粉样蛋白 P 成分 (SAP)。所谓的阴性 APRs 在急性期反应期间的血浆浓度减少以便允许肝脏合成诱导型 APRs 的能力增加。

[0526] 在某些实施方案中,急性期反应,或其风险通过测量一种或多种 APPs 来评估。测量该标志物是本领域的技术人员所熟知的,且存在提供该测量的商业公司 (例如,Cardiotech Services, Louisville, KY 可测量 AGP)。

[0527] III. 与冠状动脉钙化和骨质疏松症相关的症状或状况的减轻。

[0528] 我们还鉴定了氧化脂类是冠状动脉钙化和骨质疏松症的原因。而且,不受具体理

论的限制,我们相信在钙化性主动脉狭窄的发病机理中涉及相同的机制。

[0529] 因此,在某些实施方案中,本发明包含使用本文所述的肽以抑制或预防诸如风湿性多肌痛,结节性多动脉炎,硬皮病,自发性肺纤维变性,慢性阻塞性肺疾病,阿尔茨海默氏病,AIDS,冠状动脉钙化,钙化性主动脉狭窄,骨质疏松症等的疾病的症状。

[0530] IV. 优选的肽及其制备

[0531] 优选的肽

[0532] 本发明的发现是A型肽能够减轻动脉粥样硬化的一种或多种症状。A型肽的特征在于形成产生极性和非极性残基分离的 α -螺旋,从而形成带正电荷的残基位于极性-非极性界面和带负电荷的残基位于极性面中央的极性和非极性面(参见,例如,Anantharamaiah(1986)Meth. Enzymol,128:626-668)。注意到apo A-I的第4个外显子折叠成3.667个残基/转角时产生A型两亲性螺旋结构。

[0533] 一个特别优选的A型肽称为18A(参见,表1,也参见Anantharamaiah(1986)Meth. Enzymol,128:626-668),它按本文所述修饰以产生可口服用药且在抑制或预防动脉粥样硬化的一种或多种症状中非常有效的肽。不受具体理论的限制,相信本发明的肽可能通过获得减轻LDL氧化的种子分子在体内起作用。

[0534] 我们确定:增加18A疏水表面的Phe残基数目,理论上可增加脂类亲和力,如Palgunachari等(1996)Arteriosclerosis,Thrombosis,& Vascular Biology16:328-338所述的算法测定的那样。理论上,用Phe经系统性取代18A非极性表面的残基可产生6种肽。增加2,3,和4个Phe的肽理论上的脂亲和力(λ)值分别为13,14和15个单位。然而,如果Phe数目从4增加到5个,则数值1将激增4个单位(到19 λ 单位)。增加6或7个Phe会产生不太显著的增加(分别到20和21 λ 单位)。因此,我们选择增加5个Phe(且因此该肽命名为5F)。在一个特别优选的实施方案中,将氨基末端残基乙酰化且将羧基末端残基酰胺化封闭5F肽。

[0535] 该新型A型肽类似物5F抑制动脉粥样硬化易感性小鼠中的病灶形成。使用根据Levine等(Levine等(1993)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:12040-12044)的研究的肽剂量比较该新型肽类似物5F与小鼠apo A-I(MoA-I)在这些小鼠中抑制饮食诱导的动脉粥样硬化中的效力。

[0536] 也产生了许多其它A型肽且表现出变化的但程度显著的在减轻动脉粥样硬化的一种或多种症状中的效力。表1列出了许多这类肽。

[0537] 表1. 用于本发明的优选肽

[0538]

肽名称	氨基酸序列	SEQ ID NO.
-----	-------	------------

18A	D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-A-F	1
2F	Ac-D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-A-F-NH ₂	2
3F	Ac-D-W-F-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-A-F-NH ₂	3
3F14	Ac-D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F-NH ₂	4
4F	Ac-D-W-F-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F-NH ₂	5
5F	Ac-D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-F-E-K-F-K-E-F-F-NH ₂	6
6F	Ac-D-W-L-K-A-F-Y-D-K-F-F-E-K-F-K-E-F-F-NH ₂	7
7F	Ac-D-W-F-K-A-F-Y-D-K-F-F-E-K-F-K-E-F-F-NH ₂	8
	Ac-D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-F-F-NH ₂	9
	Ac-D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-F-E-K-F-K-E-A-F-NH ₂	10
	Ac-D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-F-E-K-L-K-E-F-F-NH ₂	11
	Ac-D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-F-F-NH ₂	12
	Ac-D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-F-E-K-F-K-E-F-F-NH ₂	13
	Ac-E-W-L-K-L-F-Y-E-K-V-L-E-K-F-K-E-A-F-NH ₂	14
	Ac-E-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F-NH ₂	15
[0539]	Ac-E-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-F-F-NH ₂	16
	Ac-E-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-F-E-K-F-K-E-A-F-NH ₂	17
	Ac-E-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-F-E-K-L-K-E-F-F-NH ₂	18
	Ac-E-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-F-F-NH ₂	19
	Ac-E-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-F-E-K-F-K-E-F-F-NH ₂	20
	Ac-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-A-F-NH ₂	21
	Ac-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F-NH ₂	22
	Ac-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F-NH ₂	23
	Ac-A-F-Y-D-K-F-F-E-K-F-K-E-F-F-NH ₂	24
	Ac-A-F-Y-D-F-F-F-E-K-F-K-E-F-F-NH ₂	25
	Ac-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F-NH ₂	26
	Ac-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-F-F-NH ₂	27
	Ac-A-F-Y-D-K-V-F-E-K-F-K-E-A-F-NH ₂	28
	Ac-A-F-Y-D-K-V-F-E-K-L-K-E-F-F-NH ₂	29
	Ac-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-F-F-NH ₂	30
	Ac-K-A-F-Y-D-K-V-F-E-K-F-K-E-F-NH ₂	31

	Ac-L-F-Y-E-K-V-L-E-K-F-K-E-A-F-NH ₂	32
	Ac-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F-NH ₂	33
	Ac-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-F-F-NH ₂	34
	Ac-A-Y-Y-D-K-V-F-E-K-F-K-E-A-F-NH ₂	35
	Ac-A-F-Y-D-K-V-F-E-K-L-K-E-F-F-NH ₂	36
	Ac-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-F-F-NH ₂	37
	Ac-A-F-Y-D-K-V-F-E-K-F-K-E-F-F-NH ₂	38
	Ac-D-W-L-K-A-L-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-A-L-NH ₂	39
	Ac-D-W-F-K-A-F-Y-E-K-V-A-E-K-L-K-E-F-F-NH ₂	40
	Ac-D-W-F-K-A-F-Y-E-K-F-F-E-K-F-K-E-F-F-NH ₂	41
	Ac-D-W-L-K-A-L-Y-E-K-V-A-E-K-L-K-E-A-L-NH ₂	42
	Ac-E-W-L-K-A-F-Y-E-K-V-A-E-K-L-K-E-A-F-NH ₂	43
	Ac-E-W-F-K-A-F-Y-E-K-V-A-E-K-L-K-E-F-F-NH ₂	44
	Ac-E-W-L-K-A-F-Y-E-K-V-F-E-K-F-K-E-F-F-NH ₂	45
	Ac-E-W-L-K-A-F-Y-E-K-F-F-E-K-F-K-E-F-F-NH ₂	46
[0540]	Ac-E-W-F-K-A-F-Y-E-K-F-F-E-K-F-K-E-F-F-NH ₂	47
	Ac-D-F-L-K-A-W-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-A-W-NH ₂	48
	Ac-E-F-L-K-A-W-Y-E-K-V-A-E-K-L-K-E-A-W-NH ₂	49
	Ac-D-F-W-K-A-W-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-W-W-NH ₂	50
	Ac-E-F-W-K-A-W-Y-E-K-V-A-E-K-L-K-E-W-W-NH ₂	51
	Ac-D-K-L-K-A-F-Y-D-K-V-F-E-W-A-K-E-A-F-NH ₂	52
	Ac-D-K-W-K-A-V-Y-D-K-F-A-E-A-F-K-E-F-L-NH ₂	53
	Ac-E-K-L-K-A-F-Y-E-K-V-F-E-W-A-K-E-A-F-NH ₂	54
	Ac-E-K-W-K-A-V-Y-E-K-F-A-E-A-F-K-E-F-L-NH ₂	55
	Ac-D-W-L-K-A-F-V-D-K-F-A-E-K-F-K-E-A-Y-NH ₂	56
	Ac-E-K-W-K-A-V-Y-E-K-F-A-E-A-F-K-E-F-L-NH ₂	57
	Ac-D-W-L-K-A-F-V-Y-D-K-V-F-K-L-K-E-F-F-NH ₂	58
	Ac-E-W-L-K-A-F-V-Y-E-K-V-F-K-L-K-E-F-F-NH ₂	59
	Ac-D-W-L-R-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-A-F-NH ₂	60
	Ac-E-W-L-R-A-F-Y-E-K-V-A-E-K-L-K-E-A-F-NH ₂	61
	Ac-D-W-L-K-A-F-Y-D-R-V-A-E-K-L-K-E-A-F-NH ₂	62

	Ac-E-W-L-K-A-F-Y-E-R-V-A-E-K-L-K-E-A-F-NH ₂	63
	Ac-D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-R-L-K-E-A-F-NH ₂	64
	Ac-E-W-L-K-A-F-Y-E-K-V-A-E-R-L-K-E-A-F-NH ₂	65
	Ac-D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-R-E-A-F-NH ₂	66
	Ac-E-W-L-K-A-F-Y-E-K-V-A-E-K-L-R-E-A-F-NH ₂	67
	Ac-D-W-L-K-A-F-Y-D-R-V-A-E-R-L-K-E-A-F-NH ₂	68
	Ac-E-W-L-K-A-F-Y-E-R-V-A-E-R-L-K-E-A-F-NH ₂	69
	Ac-D-W-L-R-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-R-E-A-F-NH ₂	70
	Ac-E-W-L-R-A-F-Y-E-K-V-A-E-K-L-R-E-A-F-NH ₂	71
	Ac-D-W-L-R-A-F-Y-D-R-V-A-E-K-L-K-E-A-F-NH ₂	72
	Ac-E-W-L-R-A-F-Y-E-R-V-A-E-K-L-K-E-A-F-NH ₂	73
	Ac-D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-R-L-R-E-A-F-NH ₂	74
	Ac-E-W-L-K-A-F-Y-E-K-V-A-E-R-L-R-E-A-F-NH ₂	75
	Ac-D-W-L-R-A-F-Y-D-K-V-A-E-R-L-K-E-A-F-NH ₂	76
	Ac-E-W-L-R-A-F-Y-E-K-V-A-E-R-L-K-E-A-F-NH ₂	77
[0541]	D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-A-F- <u>P</u> -D-W	78
	-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-A-F	
	D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-F-F- <u>P</u> -D-W	79
	-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-F-F	
	D-W-F-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-A-F- <u>P</u> -D-W	80
	-F-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-A-F	
	D-K-L-K-A-F-Y-D-K-V-F-E-W-A-K-E-A-F- <u>P</u> -D-K	81
	-L-K-A-F-Y-D-K-V-F-E-W-L-K-E-A-F	
	D-K-W-K-A-V-Y-D-K-F-A-E-A-F-K-E-F-L- <u>P</u> -D-K	82
	-W-K-A-V-Y-D-K-F-A-E-A-F-K-E-F-L	
	D-W-F-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F- <u>P</u> -D-W	83
	-F-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F	
	D-W-L-K-A-F-V-Y-D-K-V-F-K-L-K-E-F-F- <u>P</u> -D-W	84
	-L-K-A-F-V-Y-D-K-V-F-K-L-K-E-F-F	
	D-W-L-K-A-F-Y-D-K-F-A-E-K-F-K-E-F-F- <u>P</u> -D-W	85
	-L-K-A-F-Y-D-K-F-A-E-K-F-K-E-F-F	

[0542]

[0543] ¹ 接头用下画线标示。

[0544] 尽管表 1 的各个肽表示为乙酰基保护氨基末端且酰胺基保护羧基末端,但是这些保护基团的任一个或两个可以去掉和/或用本文所述的另一保护基团取代。在特别优选的实施方案中,该肽包含一个或多个本文所述的 D-型氨基酸。在某些实施方案中,表 1 的肽的每个氨基酸(例如,每个对映体氨基酸)是 D-型氨基酸。

[0545] 还应注意到表 1 并非完全包括的。使用本文提供的教导,可按常规产生其它合适的肽(例如,通过保守的或半保守的取代(例如 D 被 E 取代),延长,缺失等)。因此,例如,一个实施方案利用 SEQ ID Nos :2-20 和 39-85 鉴定的肽中的任意一个或多个的截短形式。因此,例如,SEQ ID NO :21 表示包含含有一个或多个 D 氨基酸的 18A C-末端的 14 个氨基酸的肽,而 SEQID NOS :22-38 表示其它的截短形式。更长的肽也是合适的。这种更长的肽可全部形成 A 型两亲性螺旋,或者 A 型两亲性螺旋(或多个螺旋)可形成肽的一个或多个结构域。另外,本发明包含肽的多聚体形式。因此,例如,表 1 中所示的肽可偶联在一起(用一个或多个插入的氨基酸直接或者通过接头(例如,碳接头,或一个或多个氨基酸)偶联)。举例性的多聚体肽包括 18A-Pro-18A 和优选包含一个或多个 D 氨基酸,更优选每个氨基酸是本文所述的 D 氨基酸和/或具有一个或两个保护末端的 SEQ ID NOs :79-85 的肽。

[0546] 本发明的令人惊奇的发现是,当 A 型肽(例如,如表 1 所示)掺入 D 氨基酸时,它们保留其活性,且能够口服给药。另外,这种口服给药导致相当有效的吸收和显著的血清半寿期,从而提供了减轻动脉粥样硬化的一种或多种症状的有效方法。

[0547] 使用本文提供的教导,技术人员可按常规修饰所示的 A 型肽以产生本发明的其它合适的 A 型肽。例如,可对已有的氨基酸做出常规保守的或半保守的取代(例如,E 取代 D)。使用 Palgunachari 等(1996)Arteriosclerosis, Thrombosis, & Vascular Biology 16 : 328-338 所述的计算方法可推测各种取代对所得肽的脂亲和力的影响。在保留 A 型 α -螺旋结构的前提下该肽可被加长或缩短。另外,可做出取代导致所得的肽更相似于受试者物种内源性产生的肽。

[0548] 在某些实施方案中,本发明的肽包含美国专利号 4,643,988 所述肽的“D”型形式,更优选具有一个或两个末端偶联到保护基团上的“D”型形式。该肽包括具有通式

[0549] $A_1-B_1-B_2-C_1-D-B_3-B_4-A_2-C_2-B_5-B_6-A_3-C_3-B_7-C_4-A_4-B_8-B_9$ (SEQ ID NO :86) 的肽,其中 A_1, A_2, A_3 和 A_4 独立地是天冬氨酸或谷氨酸,或其同系物或类似物; $B_1, B_2, B_3, B_4, B_5, B_6, B_7, B_8$ 和 B_9 独立地是色氨酸,苯丙氨酸,丙氨酸,亮氨酸,酪氨酸,异亮氨酸,缬氨酸或 α -萘基丙氨酸,或其同系物或类似物; C_1, C_2, C_3 和 C_4 独立地是赖氨酸或精氨酸,且 D 是丝氨酸,苏氨酸,丙氨酸,甘氨酸,组氨酸,或其同系物或类似物;前提是,当 A_1 和 A_2 是天冬氨酸, A_3 和 A_4 是谷氨酸, B_2 和 B_9 是亮氨酸, B_3 和 B_7 是苯丙氨酸, B_4 是酪氨酸, B_5 是缬氨酸, B_6, B_8 , 和 D 是丙氨酸,且 C_1, C_2, C_3 和 C_4 是赖氨酸时, B_1 不是色氨酸,其中至少一个对映体氨基酸是“D”型氨基酸。优选至少 50% 的对映体氨基酸是“D”型,更优选至少 80% 的对映体氨基酸是“D”型,且最优选至少 90% 或甚至全部的对映体氨基酸是“D”型氨基酸。

[0550] 尽管在优选的实施方案中,本发明的肽利用了天然存在的氨基酸或天然存在的氨基酸的 D 型形式,但是也包括用非天然存在的氨基酸(例如,甲硫氨酸亚砷,甲硫氨酸甲基硫,正亮氨酸, ϵ -氨基己酸,4-氨基丁酸(4-aminobutanoic acid),四氢异喹啉-3-羧酸,8-氨基辛酸,4-氨基丁酸, Lys(N(ϵ)-三氟乙酰), α -氨基异丁酸,等)取代。

[0551] 除了本文所述的 A 型肽外,本文还包含肽模拟物。肽类似物在制药工业中常用作

具有类似于模板肽的特性的非肽类药品。这些类型的非肽类化合物称为“肽模拟物”或“模拟肽”(Fauchere(1986)Adv. Drug Res. 15 :29 ;Veber 和 Freidinger(1985)TINS 第 392 页 ;和 Evans 等 (1987)J. Med. Chem. 30 :1229) 且通常借助于计算机化的分子模拟形成。可使用结构上相似于治疗上有用的肽的肽模拟物产生相当的治疗或预防效果。

[0552] 一般来说,肽模拟物在结构上相似于模板多肽(即,本文所述的 5F),但具有一个或多个肽键任选被选自: $-\text{CH}_2\text{NH}-$, $-\text{CH}_2\text{S}-$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}=\text{CH}-$ (顺式和反式), $-\text{COCH}_2-$, $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{SO}-$ 等的键按本领域已知的方法取代,该方法在下列参考文献中进一步描述:Spatola(1983)第 267 页,见 Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides, and Proteins, B. Weinstein, 编辑, Marcel Dekker, New York, ; Spatola(1983)Vega Data 1(3)Peptide Backbone Modifications. (综述);Morley(1980)Trends Pharm Sci 第 463-468 页(综述);Hudson 等(1979)Int JPept Prot Res 14 : 177-185($-\text{CH}_2\text{NH}-$, CH_2CH_2-);

[0553] Spatola 等(1986)Life Sci 38 :1243-1249($-\text{CH}_2-\text{S}-$);Hann, (1982)J Chem SocPerkin Trans I 307-314($-\text{CH}-\text{CH}-$, 顺式和反式);Almquist 等(1980)J Med Chem. 23 : 1392-1398($-\text{COCH}_2-$);Jennings-White 等(1982)Tetrahedron Lett. 23 :2533($-\text{COCH}_2-$); Szelke, M. 等, 欧洲申请 EP 45665(1982)CA :97 :39405(1982) ($-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$);Holladay 等(1983)Tetrahedron Lett 24 :4401-4404($-\text{C}(\text{OH})\text{CH}_2-$); 和 Hruby(1982)Life Sci., 31 : 189-199($-\text{CH}_2-\text{S}-$))。

[0554] 特别优选的非肽键是 $-\text{CH}_2\text{NH}-$ 。该肽模拟物相对于多肽的实施方案具有明显的优势,包括,例如:生产更经济,化学稳定性更高,药理学特性增强(半寿期,吸收,效力,功效,等),抗原性降低等。

[0555] 另外,通过本领域已知的方法(Rizo 和 Gierasch(1992)Ann. Rev. Biochem. 61 : 387);例如,通过添加能形成分子内二硫键以环化该肽的内部半胱氨酸残基可产生包含共有序列或基本上相同的共有序列变异的本文所述肽的循环取代或束缚肽(包括环化肽)。

[0556] 肽的制备

[0557] 本发明中所用的肽使用标准化学肽合成技术化学合成,或特别是如果肽不包含“D”氨基酸残基,则通过重组表达。如果多肽是重组表达的,可在给生物体以唯一 D 型形式提供一种或多种氨基酸的环境中培养宿主生物(例如,细菌,植物,真菌细胞,等)。然后重组表达的肽在该系统中掺入这些 D 氨基酸。

[0558] 在优选的实施方案中,以任意的本领域的技术人员已知的许多液相或固相肽合成技术化学合成该肽。固相合成是化学合成本发明的多肽的优选方法,其中序列的 C-端氨基酸附着到不溶性支持物上,随后在序列上依次添加剩下的氨基酸。固相合成技术是本领域的技术人员所熟知的且其描述参见,例如,Barany 和 Merrifield(1963)Solid-Phase Peptide Synthesis;第 3-284 页,见 The Peptides:Analysis, Synthesis, Biology. Vol. 2 : Special Methods in Peptide Synthesis, Part A.;Merrifield 等(1963)J. Am. Chem. Soc., 85 :2149-2156, 和 Stewart 等(1984)Solid Phase Peptide Synthesis, 第二版, PierceChem. Co., Rockford, III。

[0559] 在最优选的实施方案中,使用二苯甲基胺树脂(benzhydrylamineresin)(Beckman Bioproducts, 0.59mmol 的 NH_2 / 每克树脂)作为固相支持物通过固相肽合成程序

合成该肽。COOH 末端氨基酸（例如，t- 丁基羰基 -Phe）通过 4-（甲氧基）苯乙酰基附着到固相支持物上。它是比常规苯甲基酯键更稳定的键，但是仍然可通过氢化裂解完成的肽。使用甲酸作为氢供体的传递氢化可用于该目的。用于肽合成和合成肽的分析的详细方案在附上 Anantharamaiah 等 (1985) J. Biol. Chem., 260 (16) :10248-10255 的小型增刊中描述。

[0560] 应注意到在肽的化学合成中，特别是包含 D 氨基酸的肽，合成通常产生除了所需全长产物外的许多截短的肽。纯化过程（例如，HPLC）一般导致损失大量的全长产物。

[0561] 本发明的发现是，在 D 肽（例如，D-4）的合成中，为了防止在纯化最长形式中的损失，可以透析并使用混合物，从而排除了最后的 HPLC 纯化。该混合物损失大约 50% 效价的高纯度产物（例如，每份重量的蛋白质产物），但是该混合物含有大约 6 倍以上的肽且因此有更大的总活性。

[0562] D- 型氨基酸

[0563] 通过在化学合成中简单地使用 D- 型衍生氨基酸残基在肽的一个或多个位置掺入 D- 氨基酸。用于固相肽合成的 D- 型残基可从许多供应商（参见，例如，Advanced Chem Tech, Louisville ; Nova Biochem, San Diego ; Sigma, StLouis ; Bachem California Inc., Torrance, 等）以商业途径获得。D- 型氨基酸可在所需肽的任何位置掺入。因此，例如，在一个实施方案中，该肽可包含单个 D- 氨基酸，而在其它实施方案中，该肽包含至少两个，一般至少 3 个，更常见至少 4 个，最常见至少 5 个，优选至少 6 个，更优选至少 7 个且最优选至少 8 个 D 氨基酸。在特别优选的实施方案中，基本上每隔（对映体）一个氨基酸是 D- 型氨基酸。在某些实施方案中，至少 90%，优选至少 90%，更优选至少 95% 的对映体氨基酸是 D- 型氨基酸。在一个特别优选的实施方案中，基本上每个对映体氨基酸是 D- 型氨基酸。

[0564] 保护基团

[0565] 在某些实施方案中，组成型氨基酸和 / 或末端氨基酸上的一个或多个 R- 基团用保护基团封闭。不受具体理论的约束，本发明的发现是本发明的试验肽的封闭，特别是氨基和 / 或羧基末端的封闭极大地改进了口服传递且显著提高了血清半寿期。

[0566] 许多保护基团适用于该目的。该基团包括，但不限于乙酰基，酰胺基，和具有乙酰基的烷基且烷基特别优选用于 N- 末端保护，酰胺基优选用于羧基末端保护。在某些特别优选的实施方案中，保护基团包括，但不限于诸如在脂肪酸中的烷基链，丙烯基 (propeonyl)，甲酰基，及其它。特别优选的羧基保护基团包括形成酰胺，酯，和醚形成的保护基团。在一个优选的实施方案中，乙酰基用于保护氨基末端且酰胺基用于保护羧基末端。这些保护基团增强了肽形成螺旋的倾向。某些特别优选的保护基团包括各种长度的烷基基团，例如，具有通式： $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_n-\text{CO}-$ 的基团，其中 n 范围是从大约 1 到大约 20，优选从大约 1 到大约 16 或 18，更优选从大约 3 到大约 13，且最优选从大约 3 到大约 10。

[0567] 在某些特别优选的实施方案中，保护基团包括，但不限于诸如在脂肪酸中的烷基链，丙烯基，甲酰基，及其它。特别优选的羧基保护基团包括形成酰胺，酯，和醚形成的保护基团。在一个优选的实施方案中，乙酰基用于保护氨基末端且酰胺基用于保护羧基末端。这些保护基团增强了肽形成螺旋的倾向。某些特别优选的封闭基团包括各种长度的烷基基团，例如，具有通式： $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_n-\text{CO}-$ 的基团，其中 n 范围是从大约 3 到大约 20，优选从大约 3 到大约 16，更优选从大约 3 到大约 13，且最优选从大约 3 到大约 10。

[0568] 其它保护基团包括，但不限于 Fmoc，t- 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, 苄氧基羰基, 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), 1, 3, 5- 三甲基苯 -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- 五甲基苯并二氢吡喃 -6- 磺酰基 (Pmc), 4- 甲苄基 (MeBzl), 4- 甲氧基苄基 (MeOBzl), 苄氧基 (BzlO), 苄基 (Bzl), 苯甲酰基 (Bz), 3- 硝基 -2- 吡啶磺酰基 (Npys), 1-(4, 4- 二甲基 -2, 6- 二偶氮亚环己基) 乙基 (Dde), 2, 6- 二氯苄基 (2, 6-DiCl-Bzl), 2- 氯苄氧基羰基 (2-Cl-Z), 2- 溴苄氧基羰基 (2-Br-Z), 苄氧基甲基 (Bom), 环己氧基 (cHxO), t- 丁氧基甲基 (Bum), t- 丁氧基 (tBuO), t- 丁基 (tBu), 乙酰基 (Ac), 和三氟乙酰基 (TFA)。

[0569] 保护 / 封闭 (block) 基团是技术人员所熟知的, 类似于将该基团偶联到本发明的肽包含的合适残基上的方法 (参见, 例如 Greene 等, (1991) *Protective Groups in Organic Synthesis*, 第二版, John Wiley & Sons, Inc. Somerset, N. J.)。在一个优选的实施方案中, 例如, 合成期间当肽在树脂上时使用醋酸酐实现乙酰化。通过选择合适的合成树脂可实现酰胺保护。在该实施例中本文所述的肽合成期间, 使用 rink 酰胺树脂。合成完成后, 在诸如 Asp 和 Glu 的酸性双官能氨基酸和碱性氨基酸 Lys 上的半固定保护基团和 Tyr 的羟基都同时被去掉。使用酸处理从该树脂释放的肽表现出 n- 末端被乙酰基保护, 羧基被 NH_2 保护, 同时去掉了所有其它保护基团。

[0570] V. 增强肽吸收

[0571] 本发明令人惊奇的发现还有当所有 L 氨基酸肽 (例如, 具有本发明的肽的序列的不同形式) 与 D- 型 (即, 本发明的肽) 结合给药时, D- 型肽的吸收增加。因此, 在某些实施方案中, 本发明包含在本发明的方法中使用 D- 型和 L- 型肽的组合。D- 型肽和 L- 型肽可具有不同的氨基酸序列, 但是, 在优选的实施方案中, 它们都具有本文所述的肽的氨基酸序列, 在更优选的实施方案中, 它们具有相同的氨基酸序列。

[0572] 本发明的发现还有本发明的 A 型两亲性螺旋肽的多联体 (concatamer) 在减轻动脉粥样硬化的一种或多种症状中也是有效的。包含单体的多联体可直接偶联在一起或由接头连接。在某些实施方案中, 接头是氨基酸接头 (例如, 脯氨酸), 或肽接头 (例如, Gly_4Ser_3)。在某些实施方案中, 多联体是 2 聚体, 更优选 3 聚体, 甚至更优选 4 聚体, 且最优选 5 聚体, 8 聚体或 10 聚体。

[0573] VI. 药物制剂

[0574] 为了实现本发明的方法, 可将本发明的一种或多种肽或肽模拟物施用给, 例如, 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风险中的个体。肽或肽模拟物可以“天然”形式, 或者如果需要, 以盐, 酯, 酰胺, 前药, 衍生物等的形式给药, 前提是盐, 酯, 酰胺, 前药或衍生物是药理学上合适的, 即在该方法中有效。活性试剂的盐, 酯, 酰胺, 前药和其它衍生物可使用合成有机化学领域的技术人员已知的标准方法制备, 该方法由, 例如, March (1992) *Advanced Organic Chemistry ; Reactions, Mechanisms and Structure*, 第 4 版, N. Y. Wiley-Interscience 描述。

[0575] 例如, 使用一般涉及与合适的酸反应的常规方法从游离碱制备酸加成盐。一般来说, 该药品的碱性形式溶于诸如甲醇或乙醇的极性有机溶剂中并向其中加入酸。所得的盐可沉淀或者可通过加入极性较低的溶剂从溶液中制备出来。制备酸加成盐的合适的酸包括有机酸, 例如乙酸, 丙酸, 乙醇酸, 丙酮酸, 草酸, 苹果酸, 丙二酸, 琥珀酸, 马来酸, 延胡索酸,

酒石酸,柠檬酸,苯甲酸,肉桂酸,杏仁酸,甲磺酸,乙磺酸,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。通过用合适的碱处理可将酸加成盐转变成游离碱。特别优选的本文的活性试剂的酸加成盐是卤化盐,例如可使用盐酸或氢溴酸制备的卤化盐。相反,肽或模拟物的碱性盐的制备可使用诸如氢氧化钠,氢氧化钾,氢氧化铵,氢氧化钙,三甲胺等的药学上可接受的碱以相似的方式制备。特别优选的碱性盐包括诸如钠盐的碱金属盐,和铜盐。

[0576] 酯的制备一般涉及可能存在于药品分子结构内的羟基和/或羧基基团的功能发挥。酯一般是游离醇基团的酰基取代衍生物,即来自通式为 RCOOH 的羧酸的半分子,其中 R 是烷基,优选是低级烷基。如果需要,通过使用常规氢解或水解程序可将酯恢复成游离酸。

[0577] 使用本领域的技术人员已知的或在相关文献中所述的技术也可制备酰胺和前药。例如,使用合适的胺反应物可从酯制备酰胺,或者它们可通过与氨水或低级烷基胺反应从酸酐或盐酸制备。前药一般通过半分子的共价连接制备,该连接产生在被个体的代谢系统修饰前无治疗活性的化合物。

[0578] 本文鉴定的肽或模拟物可用于肠胃外,体表,口服,鼻腔(或者吸入),直肠,或局部给药,例如通过气溶胶或者经过皮肤给药,用于预防和/或治疗动脉粥样硬化和/或其症状。药用组合物可根据给药方法以各种单位剂量形式给药。合适的单位剂量形式包括,但不限于粉剂,片剂,丸剂,胶囊,锭剂,栓剂,贴剂,鼻腔喷雾剂,注射剂,植入的持久释放制剂,脂复合物等。

[0579] 本发明的肽和/或肽模拟物一般与可药用载体(赋形剂)组合以形成药理学组合物。可药用载体可含有用于例如,稳定该组合物或增加或减少活性试剂吸收的一种或多种生理学上可接受的化合物。生理学上可接受的化合物可包括,例如,诸如葡萄糖,蔗糖,或葡聚糖的糖类,诸如抗坏血酸或谷胱甘肽的抗氧化剂,螯合剂,低分子量蛋白,诸如脂类的保护和吸收增强剂,减少活性试剂清除或水解的成分,或赋形剂或其它稳定剂和/或缓冲液。

[0580] 其它生理学上可接受的化合物包括润湿剂,乳化剂,分散剂或对于防止微生物生长或作用特别有用的保护剂。各种保护剂是熟知的且包括,例如,苯酚和抗坏血酸。本领域的技术人员可预料到包括生理学上可接受的化合物的可药用载体的选择取决于,例如,活性试剂的给药途径和活性试剂的具体生理-化学特性。

[0581] 赋形剂优选是无菌的且一般不含不良物质。这些组合物可通过常规的熟知灭菌技术进行灭菌。

[0582] 在治疗性应用中,将本发明的组合物以足以治愈或至少部分防止或阻止该疾病和/或其并发症的量施用给患有动脉粥样硬化的一种或多种症状或有动脉粥样硬化风险的患者。足以实现该目的的量定义为“治疗有效量”。对该用途有效的量取决于该疾病的严重性和患者的总体健康状态。组合物的单次或多次给药可依赖于患者需要和耐受的剂量和频率进行给药。在任一情况中,组合物应提供足够量的本发明的制剂的活性剂以有效治疗患者(改善一种或多种症状)。

[0583] 肽或模拟物的浓度可大范围变化,且可以主要根据液体体积,粘度,体重等按照选定的和患者需要的具体给药方式做出选择。然而,选定的浓度一般提供范围从大约 0.1 或 1mg/kg/天到大约 50mg/kg/天且有时更高的剂量。典型的剂量范围从大约 3mg/kg/天到大约 3.5mg/kg/天,优选从大约 3.5mg/kg/天到大约 7.2mg/kg/天,更优选从大约 7.2mg/kg/

天到大约 11.0mg/kg/ 天,且最优选从大约 11.0mg/kg/ 天到大约 15.0mg/kg/ 天。在某些优选的实施方案中,剂量范围从大约 10mg/kg/ 天到大约 50mg/kg/ 天。可预料到该剂量可变化以优化对特定受试者和受试者群体的治疗方案。

[0584] 在某些优选的实施方案中,本发明的肽或肽模拟物可按照本领域的技术人员熟知的标准方法口服(例如,经过片剂)或者作为注射剂给药。在另一优选的实施方案中,该肽也可以使用常规经皮肤的药物传递系统,即经皮肤的“贴剂”通过皮肤传递,其中活性剂一般包含在用作药物传递装置以固定在皮肤上的层状结构内。在该结构中,药物组合物一般包含在上面衬背层下面的一层,或“储存库”中。可预料到本文中的术语“储存库”是指最终可传递到皮肤表面的“活性成分”的总量。因此,例如,“储存库”可包括粘连在贴剂衬背层上,或者在本领域的技术人员已知的任一种不同的基质制剂上的活性成分。贴剂可含有单个储存库,或者可含有多个储存库。

[0585] 在一个实施方案中,储存库包含用于在药物传递期间将系统粘贴到皮肤上的可药用接触粘连材料的聚合体基质。合适的皮肤接触粘连材料的例子包括,但不限于,聚乙烯,聚硅氧烷,聚异丁烯,聚丙烯酸酯,聚氨酯等。另外,包含药物的储存库与皮肤接触粘合剂作为分开的不同层存在,且粘合剂在储存库下面,在这种情况下,储存库可以是上述的聚合体基质,或者可以是液态或水凝胶储存库,或者可采用一些其它形式。用作该装置的上表面的这些层中的衬背层优选用作“贴剂”的主要结构元件且赋予该装置更大的弹性。选择用于衬背层的材料优选对于活性剂和存在的任意其它物质基本上不渗透。

[0586] 用于体表药物传递的其它优选的制剂包括,但不限于软膏和乳膏。软膏是半固态制品,一般以凡士林或其它石油衍生物为基础。含有选定活性剂的乳膏一般是粘性液体或半固态乳剂,通常是水包油或油包水型。乳膏基质一般是可水洗的且含有油相,乳化剂和水相。油相有时也称为“内部”相,一般由凡士林和诸如鲸蜡基或硬脂酰基醇的脂肪醇组成;尽管不是必然的,但水相通常在体积上超过油相,且一般含有润湿剂。乳膏制剂中的乳化剂一般是非离子的,阴离子的,阳离子的或两性表面活性剂。正如本领域的技术人员可预料到的,使用的特定软膏或乳膏基质是提供最佳药物传递的基质。与其它载体或媒介物一样,软膏基质应是惰性的,稳定的,无刺激的和不致敏的。

[0587] 不同于一般的肽制剂,含有 D- 型氨基酸的本发明的肽甚至可以通过口服给药,不需防止被胃酸等蛋白水解。尽管如此,在某些实施方案中,通过使用保护性赋形剂可增强肽传递。通过用导致其抗酸性和酶水解的成分络合该多肽或者通过在诸如脂质体的适当抗性载体中包装该多肽一般可实现这点。保护用于口服传递的多肽的方法是本领域熟知的(参见,例如,美国专利 5,391,377 描述的用于口服传递治疗剂的脂类组合物)。

[0588] 通过使用持续释放蛋白质的“包装”系统可维持血清半寿期的升高。这种持续释放系统是本领域的技术人员熟知的。在一个优选的实施方案中,用于蛋白质和肽的 ProLease 可生物降解的微球体传递系统 (Tracy (1998) Biotechnol. Prog. 14 :108 ;Johnson 等 (1996), Nature Med. 2 :795 ;Herbert (1998), Pharmaceut. Res. 15, 357), 是由在聚合体基质中含有蛋白质的可生物降解的聚合体微球体组成的干粉,它可作为含有或不含其它试剂的干燥制剂混合。

[0589] ProLease 微球体的构建方法被特别设计成达到较高的蛋白包装效率,同时维持蛋白质的完整性。该方法由下列步骤组成 (i) 通过喷雾冻干含稳定赋形剂的药品溶液从

大量蛋白质制备冻干的蛋白质颗粒, (ii) 制备药物聚合体悬液随后通过音波处理或匀浆减小药品颗粒大小, (iii) 通过雾化进液氮产生冷冻的药物聚合体微球体, (iv) 用乙醇提取聚合体溶剂, 和 (v) 过滤并真空干燥以产生最终的干粉产物。所得的粉末含有固体形式的蛋白质, 它是均匀的且稳固分散在多孔聚合体颗粒内。该方法中最常用的聚合体, 即 poly(lactide-co-glycolide) (PLG), 是生物相容性的和可生物降解的。

[0590] 包装可在低温(例如, -40°C)下完成。包装期间, 蛋白质维持不含水的固态, 从而最小化水诱导的蛋白质构象变化, 防止包含水作为反应物的蛋白质降解反应, 避免出现使蛋白质遭受变性的有机-水界面。一个优选的方法使用的溶剂对于大多数蛋白质是不溶的, 因此产生较高的包装效率(例如, 大于 95%)。

[0591] 在另一实施方案中, 溶液中的一种或多种成分作为“浓缩物”供应, 例如在易于稀释的贮存容器(例如, 以预定的(premeasured)容积)中, 或在易于加入一定体积水的可溶性胶囊中。

[0592] 上述制剂和给药方法是说明性的而不是限制性的。可预料到使用本文提供的教导可容易地设计其它合适的制剂和给药方式。

[0593] VII. 基于脂类的制剂

[0594] 在某些实施方案中, 本发明的肽与一种或多种脂类结合给药。脂类可作为防止和/或增强肽的运输/吸收的赋形剂进行配制或者它们可分开给药。

[0595] 不受具体理论的限制, 本发明的发现是施用(例如, 口服施用)某些磷脂可显著增加 HDL/LDL 比率。另外, 相信某些中等长度的磷脂通过不同于在一般脂类运输中涉及的方法进行运输。因此, 某些中等长度的磷脂与本发明的肽共同给药提供了许多优势: 它们防止磷脂消化或水解, 它们改进肽的吸收, 且它们改进 HDL/LDL 比率。

[0596] 脂类可形成包装本发明的多肽的脂质体和/或它们可与该多肽简单络合/混合。制备脂质体和包装试剂的方法是本领域的技术人员熟知的(参见, 例如, Martin 和 Papahadjopoulos(1982) J. Biol. Chem., 257:286-288; Papahadjopoulos 等(1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:11460-11464; Huang 等(1992) Cancer Res., 52:6774-6781; Lasic 等(1992) FEBS Lett., 312:255-258., 等)。

[0597] 用于这些方法的优选磷脂具有在 sn-1 和 sn-2 位置有从大约 4 个碳到大约 24 个碳范围的脂肪酸。在某些优选的实施方案中, 脂肪酸是饱和的。在其它优选的实施方案中, 脂肪酸可以是不饱和的。表 2 中列举了各种优选的脂肪酸。

[0598] 表 2 用于 D 肽给药的优选磷脂的 sn-1 和/或 sn-2 位置中优选的脂肪酸

[0599]

碳编号	俗名	IUPAC 名称
3: 0	丙酰基	Trianoic
4: 0	丁酰基	Tetranoic
5: 0	戊酰基	Pentanoic
6: 0	己酰基	Hexanoic
7: 0	庚酰基	Heptanoic
8: 0	辛酰基	Octanoic
9: 0	壬酰基	Nonanoic
10: 0	癸酰基	Decanoic
11: 0	十一烷酰基	Undecanoic
12: 0	月桂酰基	Dodecanoic
13: 0	十三烷酰基	Tridecanoic
14: 0	肉豆蔻酰基	Tetradecanoic
15: 0	十五烷酰基	Pentadecanoic
16: 0	棕榈酰基	Hexadecanoic
17: 0	十七烷酰基	Heptadecanoic
18: 0	硬脂酰基	Octadecanoic
19: 0	十九烷酰基	Nonadecanoic
20: 0	花生四烯酰	Eicosanoic
21: 0	Heniecosanoyl	Heniecosanoic
22: 0	二十二烷酰基	Docosanoic
23: 0	Trucisanoyl	Trocosanoic
24: 0	二十四烷酰基	Tetracosanoic
14: 1	肉豆蔻脑酰基(9-顺式)	
14: 1	Myristelaidoyl(9-反式)	
[0600] 16: 1	棕榈油酰基(9-顺式)	
16: 1	Palmitelaidoyl(9-反式)	

[0601] 在这些位置中的脂肪酸可以相同或不同。特别优选的磷脂在 sn-3 位置具有磷酸胆碱。

[0602] VIII. 其它药理学活性剂

[0603] 其它药理学活性剂可与主要活性剂,例如本发明的肽一起传递。在一个实施方案中,该试剂包括,但不限于减小动脉粥样硬化事件和/或其并发症的风险的试剂。该试剂包

括,但不限于 β 阻断剂, β 阻断剂与 thiazide 利尿剂的组合,抑制素,阿斯匹林,ace 抑制剂,ace 受体抑制剂 (ARBs),等。

[0604] 合适的 β 阻断剂包括,但不限于心脏选择性(选择性 β 1 阻断剂),例如,醋丁洛尔 (SectralTM),氨酰心安 (TenorminTM),倍他洛尔 (KerloneTM),比索洛尔 (bisoprolol) (ZebetaTM),美托洛尔 (LopressorTM),等。合适的非选择性阻断剂(同等阻断 β 1 和 β 2)包括,但不限于卡替洛尔 (CartrolTM),纳多洛尔 (CorgardTM),喷布洛尔 (LevatolTM),咪唑洛尔 (ViskenTM),普萘洛尔 (InderalTM),噻吗洛尔 (BlockadrenTM),拉贝洛尔 (NormodyneTM, TrandateTM),等。

[0605] 合适的 β 阻断剂 thiazide 利尿剂组合包括,但不限于 Lopressor HCT, ZIAC, Tenoretic, Corzide, Timolide, Inderal LA 40/25, Inderide, Normozide,等。

[0606] 合适的抑制素包括,但不限于 pravastatin (Pravachol/Bristol-Myers Squibb), simvastatin (Zocor/Merck), lovastatin (Mevacor/merck),等。

[0607] 合适的 ace 抑制剂包括,但不限于卡托普利(例如, Squibb 的 CapotenTM), benazepril(例如, Novartis 的 LotensinTM), enalapril(例如, Merck 的 VasotecTM), fosinopril(例如, Bristol-Myers 的 MonoprilTM), lisinopril(例如, Merck 的 PrinivilTM 或 Astra-Zeneca 的 ZestrilTM), quinapril(例如, Parke Davis 的 AccuprilTM), ramipril(例如, Hoechst Marion Roussel, King Pharmaceuticals 的 AltaceTM), imidapril, perindopril erbumine(例如, Rhone-Polenc Rorer 的 AceonTM), trandolapril(例如, Knoll Pharmaceutical 的 MavikTM),等。合适的 ARBS(Ace 受体阻断剂)包括但不限于 losartan(例如, Merck 的 CozaarTM), irbesartan(例如, Sanofi 的 AvaproTM), candesartan(例如, Astra Merck 的 AtacandTM), valsartan(例如, Novartis 的 DiovanTM),等。

[0608] IX. 改善动脉粥样硬化的一种或多种症状的试剂盒

[0609] 在另一实施方案中,本发明提供了用于改善动脉粥样硬化的一种或多种症状或用于预防性治疗具有动脉粥样硬化风险的受试者(人或动物)的试剂盒。该试剂盒优选包括包含本发明的一个或多个肽或肽模拟物的容器。肽或肽模拟物可以单剂制剂(例如,栓剂,片剂, caplet,贴剂,等)供应和/或任选与一种或多种可药用赋形剂组合。

[0610] 该试剂盒任选还包含用于治疗心脏病和/或动脉粥样硬化的一种或多种其它试剂。该试剂包括,但不限于, β 阻断剂,血管舒张剂,阿斯匹林,抑制素,ace 抑制剂或 ace 受体抑制剂 (ARBs) 等,例如如上所述。

[0611] 另外,该试剂盒任选包括为实施该方法或使用本发明的“治疗剂”或“预防剂”提供指导(即,方案)的标签和/或说明性材料。优选的说明性材料可描述本发明的一种或多种多肽减轻动脉粥样硬化的一种或多种症状和/或在有动脉粥样硬化风险的个体中防止一种或多种该症状的发作或增强的用途。说明性材料也可任选教导优选的剂量/治疗方案,计数器指示等。

[0612] 尽管说明性材料一般包含书面的或打印的材料,但是它们不限于这些。本发明还包含能储存这些说明并将它们传达给最终用户的任何介质。该介质包括,但不限于电子储存媒体(例如,磁盘,磁带,盒式磁带机,芯片),光学媒体(例如,CD ROM),等。该媒体可包括提供该说明性材料的因特网网址。

[0613] 实施例

[0614] 下面的实施例用于举例说明,但不是用于限制所要保护的发明。

[0615] 实施例 1

[0616] 一些合成的 A 型肽类似物已表现出模拟体外人 apo A-I 的许多特性。在该实施例中,一种两亲性增强的新型肽 (5F) 通过以 20 μ g/天,腹膜内注射共 16 周给予饲喂致动脉粥样化饮食的 C57BL/6J 小鼠。给其它小鼠提供小鼠 apo A-I (MoAI) (50 μ g/天) 或磷酸盐缓冲液 (PBS) 注射作为对照。除了接受 5F 或 MoAI 的小鼠以总胆固醇的百分数计算时具有较低的高密度脂蛋白 (HDL)-胆固醇处理组和对照组之间总血浆胆固醇水平和脂蛋白分布情况没有显著差异。观察到注射物没有毒性或产生其抗体。当 LDL 来自用 5F 注射的动物且提供给体外人动脉壁细胞时,比来自对照的 LDL 产生较少的脂类氢过氧化物和较少的 LDL-诱导的趋化活性。另外,当 HDL 来自用 5F 注射的小鼠且与人 LDL 一起提供给体外人动脉壁细胞时,形成明显更少的脂类氢过氧化物且具有明显更小的 LDL-诱导的单核细胞趋化活性。接受肽 5F 的小鼠与接受 PBS 的小鼠相比具有明显更小的主动脉动脉粥样硬化病灶面积。接受 MoAI 的小鼠中的病灶面积相似于 PBS-注射的动物。我们推断 5F 在动脉粥样硬化的预防和治疗中具有潜力。

[0617] 材料和方法**[0618] 肽**

[0619] 肽 5F (Ac-18A[Asp Trp Leu Lys Ala Phe Tyr Asp Lys Val Phe Glu Lys PheLys Glu Phe Phe]-NH₂) 通过固相肽合成法合成 (参见,例如,Anantharamaiah 和 Garber (1996) Meth. Enzymol. 263 :267-282 ;Palgunachari 等 (1996) Arteriosclerosis. Thrombosis, & Vascular Biology 16 :328-338)。通过分析 HPLC 和离子-喷射质谱法可确定众多的合成肽。该肽可用蒸馏水透析且用前冻干。

[0620] MoAI 从 C57BL/6J 小鼠的血浆中分离 (EDTA 血浆从 Harlan Bioproducts for Science, Indianapolis, IN 购买)。MoAI 使用大小-排阻结合反相柱层析分离。简单的说,通过加入 KBr 将血浆密度调到 1.21g/ml,4℃ 下以 50,000rpm 离心 24 小时 (Ti70 离心机;Beckman, Fullerton, CA)。收集上部级分,用水透析以去掉 KBr,冻干并脱脂 (delipidated)。沉淀溶于 Gn:DTT:Tris 溶液 (3M 盐酸胍,1mM 二硫苏糖醇,和 10mM Tris; pH = 8.0),然后使用截留值 12,000MW 的透析管用相同溶液透析以便从样品中去掉许多 apo A-II 和 C 载脂蛋白。然后用水透析该样品并冻干。沉淀溶于新鲜的 Gn:DTT:Tris 溶液中,通过大小排阻柱色谱法分离蛋白质,使用以 bulkphase Superose 12 (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) 填充并用 Gn:DTT:Tris 溶液平衡的 XK26/100 柱 (2.6×100cm)。流速为 0.5ml/分钟,且收集 2.5ml 级分。通过 SDS-PAGE 分析相应于 apo A-I 峰的级分,并通过制备型 C-18 反相 HPLC (Anantharamaiah 和 Garber (1996) Meth. Enzymol. 263 :267-282) 进一步纯化。

[0621] 小鼠

[0622] 使用雌性 C57BL/6J 小鼠 (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) 进行所有实验。购买 6 周龄小鼠,且用 8 周龄的小鼠开始饮食研究。在周转 (turnover) 研究中使用重 20 到 22 克的小鼠。所有动物研究经过预期评论并得到伯明翰的亚拉巴马州大学的动物保护和使用委员会组织的许可。

[0623] 动力学研究

[0624] 5F 肽, MoAI, 和人 apo A-I 通过 Bilheimer 等 (1972) Biochim. Biophys. Acta 260 : 212-221 的方法用 ^{125}I 标记。小鼠安置修改的 Thomas-Hartroft 致动脉粥样硬化饮食 (#TD88051; Teklad, Madison, WI) 共 4 周, 此时开始每天腹膜内注射溶于 $200\ \mu\text{l}$ 磷酸盐缓冲液 (PBS) 中的肽或蛋白质。用 MoAI 或人 apo A-I 注射的动物每只动物接受 $50\ \mu\text{g}$; 用 5F 注射的动物接受 $20\ \mu\text{g}$ 。动物不禁食以用于动力学研究且在注射 15, 30, 和 45 分钟, 及 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 和 24 小时后在甲苯噻嗪:氯胺酮麻醉下从眼眶后静脉窦获取血液样品。每只动物在不同的时间点提供 3 份血液样品 (均在眼眶后且轮换眼睛), 在每个时间点收集至少 3 个样品 (来自不同动物)。样品收集进肝素处理的毛细管中, 然后放入微量离心管中; 离心分离血浆。每个样品取两份 $10\ \mu\text{l}$ 等分试样用于放射性测定, 每个样品使用 γ 计数 (Cobra; Packard Instruments, Downers Grove, IL) 10 分钟。总血浆体积计算为体重的 4.2%。各样品以总血浆中注射的 CPM 的百分数表示。游离的 ^{125}I 通过三氯乙酸 (TCA) 沉淀法 (每 $10\ \mu\text{l}$ 血浆样品 1ml 的 10% TCA) 测定。使用所有数据点, 而不是在各时间点的平均值进行动力学模型适配 (PKAnalyst, MicroMath Scientific Software, Salt Lake City, UT)。

[0625] 用于病灶研究的注射方案和样品收集

[0626] 获取 6 周龄的小鼠, 除了不接受处理的阴性对照组为 10 只外, 随机分成 20 只的组, 并给予标准啮齿类食物。在 8 周龄时, 处理组安置修改的 Thomas-Hartroft 致动脉粥样硬化饮食 (#TD88051; Teklad, Madison, WI), 并开始注射。食物在 4°C 下贮存并在生产日后不超过 3 个月内使用以最小化脂类的氧化。每天腹膜内注射动物共 16 周, 包括周末和假日。每组 20 只小鼠每天接受 $200\ \mu\text{l}$ PBS (作为阳性对照), 或在 $200\ \mu\text{l}$ PBS 中的 $20\ \mu\text{g}$ 5F, 或在 $200\ \mu\text{l}$ PBS 中的 $50\ \mu\text{g}$ MoAI 的注射。

[0627] 制备冻干的 5F 肽装入小瓶中, 每瓶包含足够用于一天注射的肽。5F 肽在 PBS 中冻干, 并溶于在注射当天高压灭菌的 Milli-Q 水 (Millipore Corp., Bedford, MA) 中。所有组的注射体积维持在每天 $200\ \mu\text{l}$ /只小鼠。

[0628] 在研究开始 (给食前) 和在收获器官时在麻醉状态下通过眼眶后取血获取血液样品。在研究结束 (第 16 周) 时, 在最后一次取血时, 切除心脏和肝脏。心脏保持在 0.9% 的盐水溶液中大约 1 小时以清除血液并允许心肌舒张。然后将它们固定在磷酸盐缓冲的 4% 甲醛中至少 1 周直到切片。取出肝脏并称重。

[0629] 组织学评估

[0630] 按照有一些修改的 Paigen 等的方法 (Paigen 等 (1990) Arteriosclerosis 10 : 316-323) 进行组织学评估。简单的说, 将心脏固定在磷酸盐缓冲的甲醛溶液中至少一周。取出心脏的小于 $2/3$ 部分后, 剩余组织在 OCT 培养基 (Tissue-Tek, Miles Inc., Elkhart, IN) 中冷冻并在 -20°C 低温控制器中切片。交替的 $20\ \mu\text{m}$ 切片保存在玻片上, 并观察主动脉根的起始处。然后收集另外 $600\ \mu\text{m}$ 的切片, 或者直到主动脉横切面为圆形且瓣膜尖不再明显。玻片用油红 O 染色, 且用苏木精复染。通过图像分析 (SigmaScan Pro, SPSS Scientific, Chicago, IL) 在连续的 $80\ \mu\text{m}$ 部分玻片中测量染色病灶的横切面面积, 在超过 $400\ \mu\text{m}$ 长度 (5 张玻片) 的各主动脉窦上测定平均病灶面积以提供最大平均病灶面积。

[0631] 共培养物, 单核细胞的分离, 脂蛋白的分离, 脂类氢过氧化物的测定, 和单核细胞

趋化活性

[0632] 人动脉壁细胞的共培养物,单核细胞分离,从正常人供体的血浆通过超速离心,或者从小鼠血浆通过 FPLC 分离脂蛋白,和测定脂类氢过氧化物及单核细胞趋化活性均按照标准方法进行。所有人类受试者的参与都经过了由 UCLA 人类受试者保护委员会许可的告知同意。在共培养物中试验小鼠脂蛋白的方案也按如下进行:简单的说,从饲喂致动脉粥样化饮食并用载体 (PBS),或用肽 5F 以 $20 \mu\text{g}/\text{小鼠}/\text{天}$ 注射的小鼠的小鼠血浆通过 FPLC 分离 LDL 和 HDL。用人 LDL 以 $200 \mu\text{g}/\text{ml}$ LDL 蛋白质,或小鼠 LDL 以 $200 \mu\text{g}/\text{ml}$ 或用 $200 \mu\text{g}/\text{ml}$ 的人 LDL+ $350 \mu\text{g}/\text{ml}$ HDL 蛋白的人 HDL,或小鼠 HDL 以 $300 \mu\text{g}/\text{ml}$ 或用单独的小鼠 HDL 以 $300 \mu\text{g}/\text{ml}$ 处理共培养物。在 10%脂蛋白不足的血清 (LPDS) 存在下在 37°C 下使用或者不使用上述加入培养该共培养物 8 小时。收集上清并分析 Auerbach 脂类氢过氧化物等价物。然后洗涤共培养物并用无血清或 LPDS 的新鲜培养基再培养 8 小时。收集条件培养基并分析单核细胞趋化活性。

[0633] 化学和分析方法 – 柱上胆固醇脂蛋白的分布情况 (CLiP) –

[0634] 使用我们最近开发的 CLiP 方法 (Garber 等 (2000) J. Lipid Res. 41:1020–1026) 测量血浆胆固醇脂蛋白分布情况。简单的说,使用单一 Superose6 (Pharmacia, Piscataway NJ) 柱分析 5 到 $10 \mu\text{l}$ 血浆。在最靠近柱的下部,通过三通阀 (mixing tee) 导入胆固醇试剂,且洗脱液:试剂混合物进入柱后反应旋管中。洗脱液混合物的胆固醇含量在 500nm 处通过分光光度法检测,将数据点收集进计算机。所得的分布情况分解成组分峰并使用 PeakFit (SPSS Science, Chicago, IL) 分析相对面积;通过与对照样品的已知值比较测定总胆固醇和组分峰的绝对胆固醇值。在某些情况下,收集级分以测定放射性分布。CLiP 方法允许分析单个小鼠的样品,避免使用合并样品。

[0635] 抗体检测 –

[0636] 为了测定每天的肽注射是否在 小鼠中诱发任何免疫反应,可用收集器官时 (每天注射共 16 周后) 从小鼠获取的血浆进行间接 ELISA 滴定 (Engvall (1980) Meth. Enzymol. 70:419–439)。平板用注射肽或 MoAI ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$) 覆盖。将平板温育过夜。通过用含有 0.05% Tween 20 的硼酸盐缓冲液 (pH8.2) 彻底洗涤后,用缓冲液 (在硼酸盐缓冲液中的 0.1% 明胶和 0.1% BSA) 封闭 1 小时, $200 \mu\text{l}$ 稀释的小鼠血浆 (1:100 稀释) 样品用硼酸盐缓冲液按 1:1 系列稀释。然后向各孔中加入抗小鼠 IgG ($0.1 \text{g}/\text{ml}$) 的生物素标记的山羊抗体并用 SA-HRP (链霉抗生物素蛋白 – 辣根过氧化物酶) 处理平板 1 小时,用 ABTS 和过氧化物作为底物显色。每次加入抗原/抗体后在室温下温育平板过夜,用含有 0.05% Tween20 的硼酸盐缓冲液 (pH8.2) 彻底洗涤,并在下次加入前用缓冲液 (在硼酸盐缓冲液中的 0.1% 明胶和 0.1% BSA) 封闭 1 小时。

[0637] 统计学方法

[0638] 通过双尾 t- 检验或方差的单向分析 (其中数据正态分布),或者通过等级方差的单向分析 (SigmaStat; SPSS Science, Chicago, IL) 比较处理组。假定输入和输出速率不相等通过适配第一级单室动力学模型 (PKAnalyst; MicroMath Scientific Software, Salt Lake City, UT) 分析肽或蛋白质周转的动力学。

[0639] 结果

[0640] 动力学研究

[0641] 腹膜内注射后肽 5F 和人的及小鼠的 apo A-I 从小鼠血浆中清除的动力学在表 3 中概括。

[0642] 表 3. 动力学实验的适配 (fitted) 数据概括

[0643]

注射物质	T1/2 (h)	达到最大 CPM 的时间 (h)	血浆中的 Max. %	r ²
人 apo A-I (50 μ g/ 小鼠)	15. 6	3. 61	23. 7	0. 947
小鼠 apo A-I (50 μ g)	15. 7	1. 74	13. 5	0. 928
5F (20 μ g)	6. 22	2. 36	14. 29	0. 895

[0644] 所示的数据表示假定输入和输出速率不相等时第一级单室动力学模型 (PKAnalyst ;MicroMath Scientific Software,Salt Lake City,UT) 的适配数据结果。缩写 :T1/2 :从血浆中清除的时间的一半 ;血浆 Max. % :在峰值水平时总血浆中发现的注射剂量的百分数 ;r² :动力学模型的适配统计学合适度。

[0645] 人和小鼠 apo A-I 与 5F 肽相比具有更长的清除时间。人 apo A-I 和 5F 比小鼠 apo A-I 达到峰值血浆水平需要更长的时间,尽管达到的峰值水平一般相似 (人 apo A-I 比其它材料达到更高的峰值水平)。以柱层析法对血浆样品的分析证实肽 5F 和 apo A-I (人和小鼠的) 与血浆脂蛋白,特别是与在 HDL- 大小区域的颗粒缔合 (图 6)。注射 5F 1. 5 小时后肽放射性的 HDL : VLDL 比率为 4. 19±0. 58 (n = 3,p < 0. 05)。注射 5F 5 小时后发现相似的结果 (6. 44±1. 10, p < 0. 02)。开始注射的肽以 TCA 沉淀有不超 3% 的游离 ¹²⁵I。然而,注射 1. 5 小时后,作为总洗脱放射性百分数的血浆中游离的 ¹²⁵I 的放射性对于 5F 明显更高,为 26. 9±9. 4%,且在 5 小时时为 34. 4±4. 8%,反应了脂蛋白和缔合脂蛋白的肽的预期清除率。从 1. 5 到 5 小时游离碘的放射性的增加速率比从注射到 1. 5 小时之间小,可能表明肽在腹腔中大量开始降解。

[0646] 接受常规食物 (chow) 或致动脉粥样化饮食的存活率和总体形态

[0647] 只有三只小鼠在延续饮食研究过程期间死于未说明的原因。其中两只动物已经接受 MoAI,一只接受 5F 肽。收集器官时,在各组之间没有观察到总体形态的区别。在饲喂致动脉粥样化饮食的所有动物中肝脏增大,但各组之间肝脏重量或作为体重百分数的肝脏重量都没有差别 (表 4)。接受致动脉粥样化饮食的所有动物 (包括注射 PBS 的动物) 比饲喂常规食物的对照体重更低 (表 4)。

[0648] 表 4. 处理后的体重和肝脏重量

[0649]

饮食及亚组	体重(g)	肝脏重量(g)	肝脏:体重(百分数)
-------	-------	---------	------------

	常规食物	23.38±0.52	0.99±0.02	4.24±0.04%
	致动脉粥样硬化			
[0650]	PBS(n=14)	20.55±0.32*	1.60±0.04	7.84±0.26%
	5F(n=15)	21.60±0.28	1.61±0.04	7.46±0.23%
	MoAI(n=14)	21.16±0.34	1.72±0.04	8.15±0.23%*

[0651] 显示的数据是器官收获时（处理 16 周后）获取的重量平均值 ± SEM。饲喂常规食物的动物没有接受注射。其它小鼠按方法部分所述维持致动脉粥样硬化饮食。PBS 组每天接受 200 μl 磷酸盐缓冲液的腹腔内注射。5F 组每天接受在 200 μl PBS 中的 20 μg 5F 的腹腔内注射且 MoAI 组每天接受在 200 μl PBS 中的 50 μg MoAI。

[0652] * 与 5F 相比 $p < 0.05$; 双尾 t - 检验。

[0653] 抗原性

[0654] 在 16 周的注射期间结束时获取的血液样品中检测抗肽的抗体的存在。没有检测到抗肽 5F 或抗 MoAI 的抗体（数据未显示）。用未注射进动物组的肽或蛋白质覆盖的 ELISA 平板进行的交叉实验产生的结果基本上相同于在直接测定抗体的存在时的结果（数据未显示）。

[0655] 脂蛋白和载脂蛋白的特征鉴定

[0656] 通过 ClIP 方法测定的总的和脂蛋白胆固醇的值在表 3 中提供。总胆固醇值的精确度通过人工胆固醇试验（胆固醇 1000 ;Sigma, St. Louis, MO）证实（数据未显示）。可见在处理组之间在总的或脂蛋白 - 部分 (fraction) 的胆固醇水平上没有显著差异。然而, 当脂蛋白部分表示为总胆固醇的百分数时（表 5）, 5F 组和 MoAI 组与 PBS 组相比包含明显更低百分数的 HDL- 胆固醇。

[0657] 表 5 : 接受常规食物或致动脉粥样硬化饮食 16 周后总的和脂蛋白

[0658] 胆固醇的水平 (mg/dl 和总胆固醇百分数)。

[0659]

	VLDL	IDL+LDL	HDL	TC
常规食物	11.66±2.34	23.68±3.51	37.30±2.52	72.64±5.58
	(16.61±3.55%)	(31.66±3.61%)	(51.73±1.75%)	
致动脉粥样硬化饮食				
PBS	88.36±5.48	75.82±7.64	24.36±2.19	188.54±14.22
	(47.26±1.37%)	(39.83±1.34%)	(12.91±0.68%)	
5F	100.34±15.72	83.37±8.15	17.92±2.91	201.63±25.21
[0660]	(47.96±3.26%)	(42.80±2.51%)	(9.24±1.18%*)	
MoAI	100.08±9.73	87.86±8.34	19.50±3.07	207.45±16.94
	(48.23±2.75%)	(42.44±2.46%)	(9.34±1.19%*)	

[0661] 数据表示为平均值 mg/dl $\pm$ SEM 且在括号中表示为总胆固醇的百分数。缩写：VLDL, 极低密度脂蛋白；IDL, 中等密度脂蛋白；LDL, 低密度脂蛋白；HDL, 高密度脂蛋白；TC, 总胆固醇；MoAI, 小鼠 apo A-I；PBS, 磷酸盐缓冲液。饲喂常规食物的动物不接受注射。其它小鼠按方法部分所述维持致动脉粥样化饮食。PBS 组每天接受 200 μ l PBS 的腹膜内注射。5F 组每天接受在 200 μ l PBS 中的 20 μ g 5F 的腹膜内注射且 MoAI 组每天接受在 200 μ l PBS 中的 50 μ g MoA-I。动物数目如表 4 所示。

[0662] * 以双尾 t- 检验与 PBS 相比 $p < 0.05$ 或更低。

[0663] 小鼠脂蛋白与人动脉壁细胞的相互作用

[0664] 我们最近发现正常 HDL 抑制在适度氧化的 LDL 形成中的 3 个步骤。在这些研究中（参见，申请日为 2000 年 3 月 31 日的共同未决申请 USSN09/541,468），我们证实 apo A-I 或者 apo A-I 模拟肽（37pA）体外处理人 LDL 可从包括 HPODE 和 HPETE 的 LDL 中去掉种子分子。这些种子分子是人动脉壁细胞的共培养物能够氧化 LDL 和 LDL 诱导动脉壁细胞产生单核细胞趋化活性所必需的。我们还证实了将 apo A-I 注射进小鼠或者输注入人体后，从注射 / 输注 apo A-I 后的小鼠或人类志愿者分离的 LDL 对人动脉壁细胞的氧化有抗性且在动脉壁细胞共培养物中不诱导单核细胞趋化活性。图 7 证实了来自在本试验中饲喂致动脉粥样化饮食且注射 PBS 的小鼠的 HDL 不能抑制人 LDL 的氧化（图 7A）且在人动脉壁细胞共培养物中不能抑制 LDL- 诱导的单核细胞趋化活性（图 7B）。相反，来自饲喂致动脉粥样化饮食且每天注射肽 5F 的小鼠的 HDL 在抑制人 LDL 氧化和防止共培养物中 LDL- 诱导的单核细胞趋化活性上与正常人 HDL 一样有效。图 7 还显示了来自饲喂致动脉粥样化饮食且每天注射 PBS 的小鼠的 LDL 比来自饲喂相同饮食但每天注射 20 μ g 肽 5F 的小鼠的 LDL 更易于氧化且更易于诱导单核细胞趋化活性。在用任一脂蛋白处理的动脉壁细胞中未注意到有细胞毒性（数据未显示）。在三个独立实验的三个中均观察到相似的结果（数据未显示）。

[0665] 病灶形成

[0666] 图 8 中提供了平均的病灶横切面面积。正如预期，在接受正常小鼠食物的组中没有观察到病灶（数据未显示）。正如以前的报道（Paigen 等（1990）Arteriosclerosis 10: 316-323），在接受致动脉粥样化饮食的所有组中观察到病灶面积的显著变化。然而，注射 5F 的动物比注射 PBS 的动物具有明显更低的平均病灶面积，不论通过双尾 t- 检验分析（ $p < 0.002$ ）还是通过等级方差的单向分析（ $p < 0.001$ ；根据平均病灶面积的非正态分布测定）。注射 MoAI 与注射 PBS 相比没有产生病灶面积的差别，且病灶面积与注射 5F 的动物相比通过 t- 检验（ $p < 0.002$ ）和通过等级方差的单向分析（ $p < 0.001$ ）都明显更大。

[0667] 讨论

[0668] 我们以前证实设计成模拟 A 型两亲性螺旋基序的合成肽能够与磷脂缔合，且表现出相似于人 apoA-I（3, 8, 10, 14, 15, 20）的许多生物学特性。我们还显示了当这些肽在动物中通过静脉内给药时，发现它们与血浆脂蛋白（11）缔合。该试验设计成解释这样的一种假说，即理论上脂亲和力增强的新肽 5F 具有抗 - 致动脉粥样化特性。

[0669] 本文提供的研究证实了肽 5F 在腹膜内注射后进入血浆且达到大致比得上 MoAI，但小于人 apo A-I 的血浆水平（表 3 和图 6）。5F 的血浆清除半寿期比腹膜注射后的小鼠或人 apo A-I 更短。注射后，在 HDL 区发现大多数的 5F（图 6），尽管事实上接受致动脉粥样化饮食的多数循环胆固醇在 VLDL-，IDL-，和 LDL- 大小的区域。

[0670] 血浆胆固醇水平和分布在接受致动脉粥样化饮食的注射组中无显著差异(表5)。然而,当脂蛋白部分表示为总胆固醇的百分数时(表5),与PBS组相比5F和MoAI组中的HDL胆固醇包含显著更低的百分数。

[0671] 正常HDL抑制适度氧化的LDL形成中的3个步骤。我们证实用apo A-I或者apo A-I模拟肽体外处理人LDL可从包括HPODE和HPETE的LDL中去掉种子分子。这些种子分子是人动脉壁细胞的共培养物能够氧化LDL和LDL诱导动脉壁细胞产生单核细胞趋化活性所必需的(参见,申请日为2000年3月31日的共同未决申请USSN 09/541,468)。我们还证实了将apo A-I注射进小鼠或者输入人体后,从注射/输注apo A-I后的小鼠或人类志愿者分离的LDL对人动脉壁细胞的氧化有抗性且在动脉壁细胞共培养物中不诱导单核细胞趋化活性。在本试验中,来自饲喂致动脉粥样化饮食且注射PBS的小鼠的HDL不能抑制人LDL的氧化(图7A)且在人动脉壁细胞共培养物中不能抑制LDL-诱导的单核细胞趋化活性(图7B)。完全相反的是,发现来自饲喂相同致动脉粥样化饮食但注射肽5F的小鼠的HDL在抑制人LDL氧化和防止共培养物中LDL-诱导的单核细胞趋化活性上与正常人HDL一样有效(图7)。来自饲喂致动脉粥样化饮食且注射5F的小鼠的LDL比来自饲喂相同饮食但注射PBS的小鼠的LDL较少易于氧化且诱导较少的单核细胞趋化活性(图7)。可能5F与循环中的LDL相互作用(在与HDL缔合之前或者之后)并以与相关肽37pA体外所述(申请日为2000年3月31日的共同未决申请USSN 09/541,468)相似的方式去掉LDL氧化和LDL-诱导单核细胞趋化活性所必需的种子分子。

[0672] 人动脉壁细胞与来自饲喂致动脉粥样化饮食且注射肽5F的小鼠的HDL和LDL的体外反应与体内5F的保护作用一致。尽管作为总胆固醇百分数的总胆固醇,LDL胆固醇,IDL+VLDL-胆固醇,和较低HDL-胆固醇的水平相似,但是饲喂致动脉粥样化饮食且注射5F的动物具有明显更低的病灶得分(图8)。这些结果在某种程度上类似于Shah等(Shah等(1998)*Circulation* 97:780-785)的结果,他们发现尽管高胆固醇血症持续,但是apoA-I_{Milano}防止apo E-缺陷型小鼠中的动脉粥样硬化病灶恶化。

[0673] 人apo A-I已经成功用于防止/减轻动物中的动脉粥样硬化(Wilson等(1988)*Arteriosclerosis* 8:737-741;Rubin等(1991)*Nature* 353:265-267;Pasztty等(1994)*J. Clin. Invest.* 94:899-903;Plump等(1994)*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:9607-9611;Shah等(1998)*Circulation* 97:780-785)但是在这些试验中以每天50 μg的剂量注射MoAI却不能的原因还不清楚。已表明MoAI不能形成与人apoA-I一样稳定的蛋白质:脂类复合物(Gong等(1994)*Biochim. Biophys. Acta* 1213:335-342)。也表明小鼠HDL比人HDL更容易被盐酸胍变性(Gong等(1994)*Biochim. Biophys. Acta* 1213:335-342),这表明两性螺旋肽可能从小鼠HDL取代MoAI比从人HDL取代人apo A-I更容易。这些差别可以或者并不能解释为什么MoAI在该试验中不能显著减少病灶。也可能是在我们采用的条件下需要更高剂量的MoAI。无论如何,5F肽在这些条件下高度有效但MoAI没有。

[0674] 在注射操作结束时对血浆的ELISA分析表明对5F肽不形成抗体。这点并不意外,因为已经表明脂类缔合的肽不产生抗体,可能是因为这些肽以防止诱导免疫反应所必需的表位暴露的方式结合脂类(Muranishi(1997)*J. Pharm. Soc. Japan* 117:394-404;Fricker和Drewer(1996)*J. Peptide Sci.* 2:195-211)。

[0675] 我们以前的研究表明表达比本试验中使用的肽理论上具有较低脂亲和力的

A 型两亲性螺旋肽 (37pA) 的转基因小鼠对动脉粥样硬化具有抗性 (Garber 等 (1997) Circulation 96 :I-490)。当前的研究表明肽 5F 对于阐明动脉粥样化形成中涉及的机理具有更大的潜力且也具有治疗性潜力。

[0676] 实施例 2

[0677] D 肽的效力

[0678] 本实施例证实了本发明的 D 肽的效力。用单独的培养基 (有 LDL, 无细胞或有细胞, 无 LDL), 250 μ g/ml 来自正常受试者的对照 LDL (LDL) 和 LDL 加 350 μ g/ml 的来自正常受试者的对照 HDL (+HDL) 温育人主动脉壁共培养物。用对照 LDL 与各种量 (横坐标上所示的微克数) 的 D-2F, 或 L-2F (左侧第三组, 2F) 或者 D-37-pA 或 L-37pA (右侧最后一组, 37pA) 之一一起温育其它共培养物。该数据代表从一式四份共培养物中获得的值的平均值 $\pm$ SD。HDL 或加入肽的值与单独的 LDL (左侧第一组) 均有以 $p < 0.01$ 水平的显著差异。

[0679] 共培养物在 10% LPDS 存在下在 37°C 中温育 4 小时以产生适度氧化的 LDL。然后弃去上清, 洗涤共培养物并用无血清或 LPDS 的培养基再培养 4 小时。收集该条件培养基并分析单核细胞趋化活性。如图 9 所示, 用 D 肽体外处理 LDL 可防止它们被动脉壁细胞氧化。

[0680] 图 10 证实给小鼠提供 D 肽可导致其红血细胞对溶血有抗性 (由于氧化的一种表现, 因为它可用维生素 E 来防止, 数据未显示)。通常用作动脉粥样硬化病灶形成的动物模型的 LDL 受体缺陷型小鼠组 ($n = 3$) 通过管饲法施用 D- 肽或盐水载体。每只动物施用 100 μ l 盐水, 100 μ g/100 μ l 肽 D-2F 或肽 D-37pA。在轻度麻醉 17n 和 48 小时后从眼眶后静脉窦收集血液。离心分离红细胞, 用 PBS 稀释到 10% 血细胞比容并轻轻混合在 37°C 下温育。在时间点 $t = 0, 2, 6$ 和 18 小时时取出等分试样, 细胞沉淀离心下来并测定由释放的血红蛋白产生的光密度。

[0681] 图 11 证实通过管饲法给小鼠施用 D 肽并然后分离其 LDL 导致以单核细胞趋化性生物测定法测量时 LDL 对动脉壁细胞氧化有抗性。

[0682] 另一实验证实 D- 肽可从胃部吸收并导致 LDL 不能在我们的人动脉壁细胞共培养物模型中诱导单核细胞趋化活性而 2F 的 L- 肽不具有该特性。盐水或者从 D 氨基酸或从 L 氨基酸合成的 2F 之一通过管饲法滴注进小鼠胃中 (通过导管在胃部滴注)。管饲法后给小鼠抽血并分离其 LDL 且加入人动脉壁细胞共培养物中。D- 肽通过管饲法给药时保护 LDL, 其证据是从接受 D-2F 肽 (D2FLDL) (从 D 氨基酸合成) 的小鼠获取的 LDL 诱导的单核细胞趋化性减小, 而从接受 L-2F (从天然 L 氨基酸合成) (L2FLDL) 的小鼠获取的 LDL 容易诱导单核细胞趋化性 (见图 12)。

[0683] 从 L 氨基酸合成的 2F 体外呈递给 LDL 时与从 D 氨基酸合成的 2F 一样有效 (见图 9)。因此, 在通过管饲法体内给予该肽的实验中在该结果上的差异表明从 D 氨基酸合成的 2F 可能从胃部被完整吸收而从天然 L 氨基酸合成的 2F 肽可能在胃部在消化过程中和 / 或在血浆中被降解, 正如我们所假定的情况。在其它试验中我们未发现抗 D-2F 肽的抗体形成的证据。

[0684] 图 13A 和图 13B 是来自通过管饲法给 LDL 受体敲除的小鼠提供 50 微克 D-5F 的实验的两张图。在 1.5, 3 或 6 小时后给动物抽血并分离其 HDL, LDL, 和 VLDL/IDL。如图所示, 管饲法 1.5 小时后获取的 HDL 不能防止对照 (cont.) LDL 修饰, 但是管饲法 3 小时后和略少于 6 小时后获取的 HDL 在防止 LDL- 诱导的人动脉壁细胞产生的单核细胞趋化活性上与对

照 HDL 一样 (图 13A)。在另一图 (图 13B) 中,通过管饲法施用 50 微克 D-5F 1.5,3,或 6 小时后分离小鼠 LDL 和 VLDL/IDL。在左侧一组中,向不含或含有对照 HDL 的人动脉壁细胞中加入对照 LDL 并测量动脉壁细胞产生的单核细胞趋化活性。在中间一组中,将管饲法给予 50 微克 D-5F 1.5,3 或 6 小时后获取的小鼠 LDL 加入动脉壁细胞中。结果表明 3 小时和 6 小时后,LDL 诱导明显更小的单核细胞趋化活性。在图的右侧,加入脂蛋白的 VLDL/IDL 级分 (V/IDL) 且如图所示在 3 小时的时间点诱导明显更小的单核细胞趋化活性。

[0685] 实施例 3

[0686] 增加疏水性对 A 型两亲性螺旋肽的物理-化学和生物学特性的影响缩写目录

[0687] Ac₂O, 醋酸酐;apo A-I, 载脂蛋白 A-I;BSA, 牛血清白蛋白;CAD, 冠状动脉疾病;CD, 圆二色性;DMPC, 双肉豆蔻酰基 (dimyristoyl) 磷脂酰胆碱;DiPoPE, 双 (16 : 1) 棕榈油酰基磷脂酰乙醇胺;DSC, 示差扫描量热法;EDTA, 乙二胺四乙酸;EPC, 卵磷脂酰胆碱;FMOC, 氟代甲氧基羰基;Gdn HCl, 盐酸胍;HAEC, 人主动脉内皮细胞;HASMC, 人主动脉平滑肌细胞;HBTU, 2-(H-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脲六氟磷酸盐 (2-(H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate);HDL, 高密度脂蛋白;HPLC, 高效液相色谱法;LCAT, 卵磷脂胆固醇酰基转移酶;MCP-1, 单核细胞趋化蛋白-1;M-CSF, 巨噬细胞集落刺激因子;MLV, 多层泡囊;NMM, N-甲基吗啉;PBS, 磷酸盐缓冲液;PIPES, 哌嗪-N,N'-双[2-乙磺酸];RP-HPLC, 反相高效液相色谱法;TFA, 三氟乙酸。

[0688] 摘要

[0689] 我们最近表明两亲性增强的 A 型两亲性肽 5F 防止小鼠发生饮食诱导的动脉粥样硬化。我们现在通过用苯丙氨酸系统取代已有的非极性氨基酸检查了包括 5F 的一系列同源的 A 型两亲性肽的疏水性增加对与动脉粥样硬化抑制相关的物理和功能特性的影响。基于序列

[0690] Ac-D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-A-F-NH₂ (SEQ ID NO :1, Ac-18A-NH₂ 或 2F) 的肽是 :3F³(Ac-F³18A-NH₂), 3F¹⁴(Ac-F¹⁴ 18A-NH₂), 4F(Ac-F^{3,14}18A-NH₂), 5F(Ac-F^{11,14,17}18A-NH₂), 6F(Ac-F^{10,11,14,17}18A-NH₂) 和 7F(Ac-F^{3,10,11,14,17}18A-NH₂)。对水溶性, HPLC 滞留时间, 穿透进卵 PC 单分子层的排出压力和卵 PC 溶解速率的测量揭示肽 4F 和 5F 之间的疏水性突然增加;伴随着与磷脂缔合的能力增加。肽 6F 和 7F 效果较差, 表明在这些肽中启动脂类相互作用的疏水性增强受到限制。尽管脂亲和力和显著增加, 这些肽在激活血浆酶, 即卵磷脂:胆固醇酰基转移酶 (LCAT) 中比 apoA-I 效果更差, 其中 5F 激活 LCAT 最佳 (apoA-I 的 80%)。肽 4F, 5F 和 6F 在抑制 LDL- 诱导的单核细胞趋化活性中同样有潜力。这些研究表明肽-肽和肽-脂类相互作用之间的适当平衡是两亲性肽最佳生物学活性所必需的。这些研究提供了设计动脉粥样硬化抑制潜力增强的小 apoA-I- 模拟物的基本原理。

[0691] 引言

[0692] 高密度脂蛋白 (HDL) 和载脂蛋白 A-I (apo A-I), 即 HDL 的主要蛋白质成分的血浆水平与冠状动脉疾病 (CAD) 反相关 (Sprecher 等 (1993) Arterioscler. Thromb. 13 : 495-504; Philips 等 (1993) Circulation 88 : 2762-2770)。人 apo A-I 是一个 243 残基的蛋白质, 含有 8 个 22 残基的两亲性螺旋重复, 已表明其中大多数具有 A 型基序 (Segrest 等 (1990) Proteins 8 : 103-117; Anantharamaiah 等 (1993) 第 109-142 页, 见: The

Amphipathic Helix(Epand, R. M. 编辑), CRC Press, Boca Raton, FL)。A 型两亲性螺旋具有特征性电荷分布;它们在 α 螺旋的极性 / 非极性边界具有带正电荷的氨基酸簇且在极性面中央具有带负电荷的残基 (Segrest 等 (1990) *Proteins* 8:103-117;Anantharamaiah 等 (1993) 第 109-142, 见: *The Amphipathic Helix*(Epand, R. M., 编辑), CRC Press, Boca Raton, FL;Segrest 等 (1992) *J. Lipid Res.* 33:141-166)。这种特有的二级结构基序推定为负责 apo A-I 的脂类缔合特性 (Segrest 等 (1990) *Proteins* 8:103-117)。用 A 型两亲性螺旋的合成类似物进行的许多研究支持这一观点 (Segrest 等 (1994) *Adv. Prot. Chem.*, 45:303-369;Brouillette 和 Anantharamaiah(1995) *Biochim. Biophys. Acta* 1256:103-129)。最近,我们以单体和串联二聚体形式合成了在人 apo A-I 中存在的各个推断的 22 残基的螺旋且表明 N- 和 C- 末端两亲性螺旋具有最大脂类缔合能力 (Mishra 等 (1998) *Biochemistry* 37:10313-10324)。apo A-I 外显子 4(第 44-243 残基)的 X- 射线晶体结构和分子模型研究表明完整的 apo A-I 的自我缔合状态是脂类缔合所必需的 (Borhani 等 (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94:12291-12296;Segrest 等 (2000) *Current Opin. Lipidol.* 11:105-115)。在该模型中,apo A-I 的两个分子通过单体互相之间的相互作用以头尾相连的二聚体形式排列以稳定 apo A-I 的脂类缔合结构。

[0693] 实验证据表明 apo A-I 和 HDL 防止冠状动脉疾病的效果可能是由于其在“逆向胆固醇运输”中的作用 (Fielding 和 Fielding(1995) *J. Lipid Res.* 36:211-228; Glomset(1968) *J. Lipid Res.* 9:155-167)。逆向胆固醇运输是涉及 HDL/apo A-I 的三个步骤的总称, a) 胆固醇从 xx 细胞流出 (Johnson 等 (1991) *Biochim. Biophys. Acta.* 1085:273-298;Oram 和 Yokoyama(1996) *J. Lipid Res.* 37:2473-2491), b) HDL- 缔合的胆固醇被 LCAT 酯化 (Fielding 等 (1972) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 46:1493-1498;Jonas(1991) *Biochim. Biophys. Acta* 1084:205-220) 和 c) 胆固醇酯经受体介导的传递进入肝脏 (Kreiger(1999) *Ann Rev. Biochem.* 68:523-558)。体内研究表明人 apo A-I 和 A 型合成两亲性螺旋肽通过独立于逆向胆固醇运输的机制抑制动脉粥样硬化而不改变血浆胆固醇水平 (Shah 等 (1998) *Circulation* 97:780-785)。最近,我们建议抑制 LDL- 诱导的对动脉壁细胞的单核细胞趋化性已表明是 apo A-I 和 HDL 在预防动脉粥样硬化中所起的另一主要作用 (Navab 等 (2000) *J. Lipid Res.* 41:1481-1494;Navab 等 (2000) *J. Lipid Res.* 41:1495-1508)。

[0694] 已表明模拟人 apo A-I 特性的肽,即 18A 已经显示出具有 LCAT 激活 (Anantharamaiah 等 (1990) *Arteriosclerosis* 10:95-105;Epand 等 (1987) *J. Biol. Chem.* 262:9389-9396) 和胆固醇排出能力 (Davidson 等 (1994) *J. Biol. Chem.* 269:22975-22982;Yancey 等 (1995) *Biochemistry*, 34:7955-7965)。已表明中和 18A 的末端电荷形成的 Ac-18A-NH₂ 增强了其脂类亲和力和生物学活性 (Yancey 等 (1995) *Biochemistry*, 34:7955-7965;Venkatachalapathi 等 (1993) *Proteins: Structure, Function and Genetics.* 15:349-359)。对该“亲本”分子 18A 的氨基酸序列已做了一些修饰以尝试改进其 apo A-I 模拟特性 (Brouillette 和 Anantharamaiah(1995) *Biochim. Biophys. Acta* 1256:103-1291;Mishra 等 (1994) *J. Biol. Chem.* 269:7185-7191;Mishra 等 (1995) *J. Biol. Chem.* 270:1602-1611)。我们早期的研究 (Brouillette 和 Anantharamaiah(1995) *Biochim. Biophys. Acta* 1256:103-1291;Epand 等 (1987) *J. Biol. Chem.* 262:9389-9396) 表明该肽

疏水性的增大增强了其脂类亲和力和 apo A-I- 模拟特性。已表明一种合成肽 5F, 即两亲性增强的 Ac-18A-NH₂ 的类似物抑制小鼠中饮食诱导的动脉粥样硬化 (参见, 例如, 实施例 1 和 2)。然而, 肽 2F 在 C57 BL6 小鼠中不能显著抑制饮食诱导的病灶形成 (Garber 等 (1999) Circulation 100 :1538)。对 18A 二聚体肽的研究表明肽-肽缔合增强则减小肽:脂缔合 (Mishra 等 (1995) J. Biol. Chem. 270 :1602-1611)。为了测定对脂类缔合和 apo A-I- 模拟特性有正效果的增大 18A 肽脂亲和力的最大程度, 我们设计了一系列同源肽, 其中通过用 Phe 取代非极性面上的诸如 Leu 和 Ala 的疏水氨基酸而系统地增加 Phe 残基。按照 Wimley 和 White 的实验测定的疏水性等级 (Wimley 和 White (1996) Nature Struc. Biol. 3 :842-848), 某种意义上 Trp 和 Phe 是疏水性最大的氨基酸, 它们表现出最大分区的水相膜。我们选择使用 Phe 增强肽的疏水性, 因为它在膜活性肽中是最抗酸性的疏水氨基酸且包含 Phe 的肽比包含 Trp 的肽更容易合成。研究了疏水性增强对物理和脂类缔合特性, 及诸如 LCAT 激活和抑制 LDL- 诱导的趋化活性的影响。

[0695] 实验方法

[0696] 肽合成

[0697] 使用自动固相合成器 (PS3 Protein Technologies, Woburn, MA) 通过固相方法合成该肽。在 HBTU 和 NMM 存在下将 Fmoc 氨基酸偶联到 rink 酰胺树脂 [0.536mEq/g], (Peninsula Laboratories, Inc. Belmont, CA) 上, 并用醋酸酐在 N- 末端乙酰化。在苯甲醚 (1%), 巯基乙醇 (0.1%) 和色氨酸 (占肽树脂重量的 20%) 存在下使用在二氯甲烷中的 70% TFA 将肽从固相支持物上裂解下来并在 VYDAC C-4 (22mm×25cm, 颗粒大小 10 μm) 反相 HPLC (RP-HPLC) 柱上使用在 66 分钟内在含有 0.1% TFA 的水中从 25% 到 58% 乙腈的梯度以 4.8ml/ 分钟的流速纯化。使用 C₁₈ 柱 (VYDAC, 4.6mm×25cm, 5 μm) 和在 33 分钟内从 25% 到 58% 的线型乙腈-水 (在 0.1% TFA 存在下) 梯度通过分析 RP-HPLC 和通过质谱分析检验肽的纯度。

[0698] 圆二色性

[0699] 按 Mishra 等 (1994) J. Biol. Chem. 269 :7185-7191 所述在 AVIV 62DS 分光偏振计上记录 CD 光谱。简单的说, 使用 0.1cm 光程长度的比色皿获得光谱并在 25°C 下从 260nm 到 190nm 对每个 nm 进行测量。通过添加 4 次扫描, 基线校正和使平滑对所有的 CD 光谱进行信号平均。在 PBS, pH7.4 中的肽溶液以 11 μM 的浓度使用。肽-DMPC 复合物 (1 : 20mol : mol) 用于测定脂类结合对这些肽螺旋度的影响。通过将适当体积的肽溶液加入 DMPC 多层泡囊中制备这些复合物。DMPC 多层泡囊制备如下: 将已知量的脂类溶于乙醇中且在稀薄氮气流下通过缓慢蒸发去掉溶剂。通过将脂膜在真空中贮存过夜去掉残留溶剂。将适当体积的 PBS, pH7.4 加入稀薄脂膜中以产生所需最终浓度的 DMPC。通过加入所需体积的肽溶液以达到脂类与肽的摩尔比为 20 : 1 来制备脂类-肽复合物。由于这些肽的可溶性差, 使用 11 μM 的肽浓度。使用下面公式计算 222nm 下的平均剩余椭圆率 (mean residue ellipticity), $[\theta]_{\text{MRE}}$ (deg. cm². dmo⁻¹) :

$$[\theta]_{\text{MRE}} = \text{MRW}[\theta]/10c1$$

[0701] 其中, MRW 是肽的平均剩余重量, θ 是观察到的椭圆率度数, c 是以 g/ml 表示的肽浓度, l 是以厘米表示的比色皿光程长度。肽的螺旋度百分数按 Morrisett 等 (1973) Biochemistry, 12 :1290-1299 所述的下列公式估计 :

[0702] $\% \alpha$ 螺旋度 = $([\theta]_{222} + 3,000) / (36,000 + 3,000)$

[0703] 其中, $[\theta]_{222}$ 是 222nm 处的平均剩余椭圆率。

[0704] 示差扫描量热法

[0705] 使用 Microcal MC-2 扫描量热器 (MicroCal, Inc., Amherst, MA) 以对 DMPC 为 $20^{\circ}\text{C h}^{-1}$, DiPoPE 为 $37^{\circ}\text{C h}^{-1}$ 的扫描率, 使用 Mishra 等 (1994) J. Biol. Chem. 269 :7185-7191 所述的方法进行 DSC 研究。将已知量的磷脂溶于氯仿中。对于一组样品, 将肽溶于甲醇中并加入在氯仿 / 甲醇中的 DiPoPE 溶液 (2 : 1, v : v) 中。对于纯的脂类样品和脂类及肽的有机溶液两者, 在缓慢氮气流下去掉溶剂。在真空中去掉剩余溶剂。将单独的缓冲液 (对于 DMPC 为 PBS, pH7.4, 或者对于 DiPoPE 为 20mM PIPES, 1mM EDTA, 150mM NaCl 和 0.002% NaN_3 , pH7.4) 或者在缓冲液达到特定脂类 / 肽摩尔比的已知浓度的肽溶液加入干膜中并通过在室温下旋转 30 分钟进行水合。对于 DMPC, 在 60 分钟内连续扫描 4 次。获取扫描之间的平衡时间。使用 MicroCal Inc., Amherst, MA, and Origin, version 5.0 提供的软件分析 DSC 热分析图。

[0706] 表面压力测量

[0707] 单分子层排出压力测量提供了肽对脂-水界面的亲和力; 按照 Phillips 和 Krebs (Phillips 和 Krebs (1986) Methods Enzymol. 128 :387-403; Ibdah 等 (1989) Biochim. Biophys. Acta 1004 :300-308) 的方法。卵磷脂酰胆碱 (EPC) 的不溶性单分子层在 Teflon 盘中的气-水界面上室温下展开以产生 5-45 dyn/cm 范围的起始表面压力 (π_i)。将在含有 1.5M Gdn. HCl 的 PBS 中的肽溶液小心注射进下层相 (subphase) 中以产生 50 $\mu\text{g/dL}$ 的终浓度。在下层相中稀释 Gdn. HCl 以达到 $\leq 1\text{mM}$ 的终浓度以便允许肽复性。持续搅拌下层相并记录 EPC 单分子层表面压力的增加 ($\Delta \pi$) 直到获得稳定状态的值。通过外推 π_i 对 $\Delta \pi$ 的线型回归配合 $\Delta \pi = 0\text{dyn/cm}$ 计算肽不再穿透进 EYPC 单分子层的起始表面压力值 (π_i), 即排出压力 (π_e)。

[0708] 直角光散射测量

[0709] 在 EPC 多层囊泡 (MLV) 溶解后使用 SLM 8000C 光子计数荧光分光光度计按 (Mishra 等 (1994) J. Biol. Chem. 269 :7185-7191) 所述通过直角光散射测定这些肽与卵磷脂酰胆碱的缔合。通过在氮气中蒸发 EPC (Avanti Polar, AL) 溶液并用磷酸盐缓冲液 (pH7.4) 水合脂膜制备 EPC MLVs。含有 105 μM EPC 和等摩尔量肽的样品在 25°C 下维持并连续搅拌。监测浊度的澄清 30 分钟。通过加入 Triton X-100 达到 1mM 的终浓度实现 EPC 囊泡的完全溶解。

[0710] 卵磷脂:胆固醇酰基转移酶 (LCAT) 的纯化

[0711] 通过略有修改的 Albers 等 (1986) Methods Enzymol. 129 :763-783 的方法从新鲜的正常血脂 (normolipidemic) 的血浆分离 LCAT。将血浆密度调节到 1.21g/ml 且以 175,000g 离心 24 小时。对含有 LCAT 的级分进行 Affi-Gel Blue 层析, 随后进行 DE-52 层析。使用在 Tris 缓冲液 (10mM, pH7.6) 中的 75 到 200mM NaCl 梯度从 DE-52 柱洗脱 LCAT。SDS-PAGE 表明该酶的纯度超过 90% 且无人 apo A-I 污染。

[0712] LCAT 活性试验:

[0713] 通过在 Branson 250 超声波仪中超声处理含微量 7α - ^3H 胆固醇的卵 PC/ 胆固醇 (90 : 20mol/mol) 12 分钟以获得小单层囊泡来制备底物。底物 (50 μl) 与 5 μg 肽或人 apo

A-I 及 50 μ l 的 BSA(40 μ g/ml) 37°C 下温育 1 小时。使总体积达到 150 μ l。温育 1 小时后, 加入 100 μ l 的 LCAT 并在 37°C 下温育 1 小时, 通过在硅条上点样 10 μ l 结束反应。通过在己烷: 氯仿 (2 : 1v/v) 混合物中的硅条薄层层析法分离胆固醇和胆固醇酯。通过将 TLC 平板浸入 3% 醋酸铜, 8% 磷酸缓冲液中并加热可观察胆固醇和胆固醇油酸酯标准品。标准品的位置用于将硅条分割成两半且在 Packard Tri Carb 4530 中在闪烁液中计数两部分。所有反应以一式三份进行。肽对 LCAT 的激活表示为 apo A-I 总激活的百分数。

[0714] 电泳:

[0715] 使用 Laemmli(1970)Nature 227 :680-685 的方法进行非变性的和 SDS-PAGE。使用 Premade Novex 凝胶且用考马斯蓝染色凝胶以鉴定蛋白质带。

[0716] LDL- 诱导的单核细胞趋化活性:

[0717] 按 Navab 等 (Navab 等 (1991)J. Clin. Invest. 88 :2039-2046 ;Navab 等 (1977) J. Clin. Invest. 99 :2005-2019) 所述进行人动脉壁细胞的共培养, 单核细胞分离, 以超速离心从正常人供体血浆或通过 FPLC 从小鼠血浆分离脂蛋白, 并测定脂类氢氧化物和单核细胞趋化活性。简单的说, 用 Havel 等 (Havel 等 (1955)J. Clin. Invest. 43 :1345-1353) 的方法从人血浆分离 LDL 和 HDL。人主动脉内皮细胞 (HAEC) 和平滑肌细胞 (HASMC) 按 Navab 等 (1991)J. Clin. Invest. 88 :2039-2046 所述分离。用 0.1% 明胶在 37°C 下处理微量滴定板过夜。以 1×10^5 个细胞 /cm² 的汇合密度加入 HASMC。培养细胞 2 天, 此时它们覆盖孔的全部表面并产生大量细胞外基质。随后以 2×10^5 个细胞 /cm² 加入 HAEC 并使其生长, 在 2 天中形成汇合 HAEC 的全部单层。在所有实验中, 使用的 HAEC 和自体 HASMC(来自相同供体) 具有 4 到 6 代的传代水平。按 Fogelman 等 (1988)J. Lipid Res. 29 :1243-1247 所述从正常供体的血液分离单核细胞。共培养物用天然 LDL(250 μ g 蛋白质 /ml) 或存在 HDL(350 μ g 蛋白质 /ml) 或肽处理 8 小时。然后洗涤共培养物并用培养基 199 再培养 8 小时。按 Navab 等 (1997)J Clin Invest, 99 :2005-2019 所述测定所得共培养物上清的单核细胞趋化活性。

[0718] 结果

[0719] 肽的分析

[0720] 表 6 显示了合成的各种 18A 类似物的序列。在位置 6 和 18(靠近界面 Lys 残基) 具有两个 Phe 残基的肽 Ac-18A-NH₂ 称为 2F。合成两个 3F 肽, 3F³ 或 3F¹⁴, 其中在位置 3 和 14(均存在于非极性面的中央) 的 Leu 分别被 Phe 取代。肽 4F 在非极性面中央具有两个 Phe 残基, 它是取代两个中央 Leu 残基的结果。肽 (3F 到 7F) 上的取代在表 6 中显示。随着 Phe 残基数目的增加, 非极性面上每个残基的理论疏水性从 2F 肽的 2.05 增加到 7F 的 3.15。

[0721] 表 6 :修饰 Ac-18A-NH₂ 以增强疏水性

	肽	序列 ¹	疏水性 ²	理论脂亲和力(Δ) ³
[0722]	2F	Ac-18A-NH ₂	2.05	13.03
	3F ³	Ac-[F ³ 18A]-NH ₂	2.20	13.84
	3F ¹⁴	Ac-[F ¹⁴ 18A]-NH ₂	2.20	13.79
	4F	Ac-[F ^{3,14} 18A]-NH ₂	2.35	14.59
	5F	Ac-[F ^{11,14,17} 18A]-NH ₂	2.81	19.07
	6F	Ac-[F ^{10,11,14,17} 18A]-NH ₂	2.96	19.87
	7F	Ac-[F ^{3,10,11,14,17} 18A]-NH ₂	3.15	20.78

[0723] ¹ 基础序列 18A DWLKAIFYDKVAEKLKEAF (SEQ ID NO :2)

[0724] ² 疏水性表示为每个非极性面上的残基的疏水性。

[0725] ³ 理论脂亲和力按 (Palgunachari 等 (1996) Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 16 :328-338) 所示计算。

[0726] 使用水 (含有 0.1% 三氟乙酸) 和乙腈 (含有 0.1% 三氟乙酸) 通过反相 (RP)-HPLC 在制备型 Vydac C4 柱上纯化肽。使用在含有 0.1% TFA 的水中的 25% -58% 乙腈梯度在分析型 Vydac C₁₈ 柱上测定肽的纯度和滞留时间。还通过质谱法证实这些肽的纯度。质量与计算的分子量一致。肽的滞留时间在表 7 中列出。尽管 3F 肽和 4F 与 2F 相比 Phe 残基增加,但是这些肽在 C₁₈ 柱上的滞留时间没有很大区别 (~22 分钟)。5F, 6F 和 7F 明显在滞留时间上突然增加 (~26 分钟)。随着 Phe 残基数目的增加,这些肽在 PBS 中的可溶性下降。从表 7 可见,2F, 3F³, 3F¹⁴ 和 4F 的溶解度 (1.25 到 1.4mg/ml) 明显比 5F, 6F 和 7F (0.03 到 0.1mg/ml) 更高。

[0727] 表 7. F- 肽的物理特性

	肽	分子量 ¹	滞留时间 (分钟) ²	可溶性 (mg/ml) ³	单分子层 排出压力(π_c) ⁴
[0728]	apoA-I	28000	28.0	>2.0	34
	18A	2200	19.8	>2.0	30
	37pA	4580	26.0	>2.0	41
	2F	2242	22.5	>2.0	38
	3F ³	2276	21.0	1.25	38
	3F ¹⁴	2276	21.2	1.45	39
	4F	2310	22.0	1.30	40
	5F	2429	26.5	0.10	45
	6F	2462	27.0	0.03	46
	7F	2510	26.0	0.10	45

[0729] ¹ 以质谱法测定的质量与理论上计算的分子量非常接近。

[0730] ² 滞留时间是使用在 33 分钟内在含有 0.1% TFA 水中的 25% -58% 的乙腈梯度从 Vydac C18 柱获得洗脱肽的时间。

[0731] ³ 溶解度在 PBS 中测定。

[0732] ⁴ 这些测量值的重复性是 $\pm 1 \text{ dyn/cm}$

[0733] 通过非变性的聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 检测这些两亲性肽的自我缔合。图 14 显示了 2F 在变性 SDS (图 14A) 和非变性 (图 14B) 凝胶上的迁移率。2F 的分子量是 2242 且可见在 SDS 凝胶 (图 14A) 上作为单条带, 以略低于最低分子量标准 (3.5-2.5kDa) 迁移。然而, 在非变性条件下它以浓度依赖型方式形成聚集体, 如图 14B 所示。在较低浓度 (100 $\mu\text{g/ml}$) 时, 它形成 2 种大小的聚集体, 而在更高浓度 (250 $\mu\text{g/ml}$) 时, 仅观察到较大的聚集体 (图 14B)。试验的所有其它肽也表现出在非变性条件下聚集, 这表明该肽具有强烈的自我缔合倾向。

[0734] 圆二色性

[0735] 通过圆二色性分光术测定肽的二级结构。表 8 显示了在 PBS 中和在 DMPC 存在下肽的螺旋度百分数。在 PBS 中, 同源性 2F, 4F, 5F, 6F 和 7F 比 3F³ 和 3F¹⁴ 具有更高的螺旋度百分数 (表 8)。由于 5F, 6F 和 7F 在 PBS 中少量可溶, 因此使用 11 μM 的肽 (在该浓度下它们全部可溶) 进行 CD 研究。肽 2F 表现出 55% 的螺旋度, 比得上溶液中的 5F。6F 和 7F 螺旋度略高 (分别为 67% 和 58%), 而 4F 略低 (45%)。两个 3F 肽螺旋度低得多 ($\approx 20\%$)。然而, 与 DMPC 结合显著增加了除 6F 外的所有肽的螺旋度 (表 8)。在脂类环境中, 2F, 5F 和 7F 显示出高螺旋含量 (68% 到 76%)。尽管肽 3F³ 和 3F¹⁴ 在 PBS 中具有极小的螺旋含量, 但是在脂类环境中螺旋度显著增加, 3F³ 从大约 22% 增加到 42%, 3F¹⁴ 从 19% 增加到 55%。肽 6F 和 4F 的螺旋度在脂类存在下没有显著改变。

[0736] 然而, 这些肽比肽 2F 和 5F 具有更小的螺旋度。CD 结果表明随着 Phe 取代的增加, 肽的螺旋度没有系统改变; 肽 2F 和 5F 在溶液中且在磷脂存在下表现出最大螺旋度。

[0737] 表 8. F- 肽在水和脂环境中的螺旋度

肽	螺旋度百分数	
	PBS ¹	DMPC ¹
2F	55	72
3F ³	22	42
[0738] 3F ¹⁴	19	55
4F	45	44
5F	55	76
6F	67	50
7F	58	68

[0739] ¹ 使用 11 μM 的肽溶液。使用的肽: DMPC 比率为 1 : 20 (mol/mol)。进行 3 次测量且得到 $\pm 10\%$ 的误差。

[0740] 用 DMPC 和 DiPoPE 的 DSC 研究

[0741] 使用 100 : 1 脂类 / 肽摩尔比的肽 - 脂类混合物通过 DSC 试验这些 18A 类似物对 DMPC 多层囊泡的解链转变的影响。表 9 显示了在存在和没有肽的条件下 DMPC 解链转变的转变温度和焓。纯的脂类在 13℃ 经历预转变 (pretransition) 且在 23℃ 经历主链解链转变。向 DMPC 中加入肽导致凝胶向液 - 晶态转变增宽和转变焓降低 (表 9)。在任一肽存在下未见预转变。在试验的肽中, 2F, 3F³, 5F, 和 6F 将转变焓减少到最大程度 (表 9)。没有肽能将转变温度改变超过 0.2℃。

[0742] 表 9. F- 肽对 DMPC 解链转变参数的影响

	肽	T _{CM} (℃)	ΔH _{CM} (kcal/mol)	ΔT _{1/2} (℃)
	DMPC	23.1	6.4	0.2
	2F	23.2	4.5	0.5
	3F ³	23.2	4.9	0.4
[0743]	3F ¹⁴	23.2	5.5	0.3
	4F	23.2	5.3	0.4
	5F	23.2	4.9	0.5
	6F	23.1	4.0	0.5
	7F	23.2	4.5	0.5

[0744] 使用的 DMPC/ 肽比率是 100 : 1 (mol/mol)。使用的 DMPC 浓度是 1.5mM。T_{CM} 是发生解链转变时的温度。ΔH_{CM} 是转变焓, ΔT_{1/2} 是转变最大值一半的宽度。

[0745] 双分子层转变成六角形相的转变温度 (T_H) 用于评价肽对磷脂内部弯曲特性 (intrinsic curvature properties) 的影响 (Erand(1998) Biochim. Biophys. Acta, 1376 : 353-368)。以前显示 2F 升高 DiPoPE 的 T_H (Tytler 等 (1993) J. Biol. Chem. 268 : 22112-22118)。在当前的研究中, 我们以两种方式制备了肽 - 脂类混合物。一种通过将有机溶剂中的肽加入有机溶剂中的脂类中, 接着将该物质沉积为膜并随后与缓冲液水合。在另一方法中, 在各自分别水合后混合肽和脂类。如果混合物在 DSC 分析前达到平衡, 则最初如何混合肽和脂类都可以。然而, 当肽以高浓度掺入脂膜时可能在脂中有更多的肽, 膜系统可能平衡缓慢。一般来说, 来自两种样品制备方法的结果是相似的 (未表示), 但是对于将肽加入由脂类和肽组成的膜中的样品, T_H 的转变倾向于更大。显示了各种肽和 apo A-I 的 T_H 随肽级分 mol 数的变化 (图 15)。对于 2F 和 5F 观察到 T_H 的线型增加而 4F 表现更类似于 apo A-I, 其中观察到肽浓度越低, 增加越迅速。另一方面, 两个 3F 类似物以及 6F 和 7F 不明显影响 T_H。

[0746] 肽与磷脂单分子层的相互作用

[0747] 单分子层排出压力 π_e 是肽不再能够穿透 EPC 单分子层时的表面压力。π_e 值反映了肽的理论脂亲和力。F 肽的排出压力随 Phe 残基数目的增加而增大 (表 7)。这里研究的所有肽比 apo A-I 和亲本肽 18A 具有更高的排出压力。π_e 值从 2F 到 4F 逐渐增加 (38 到 40 dyn/cm)。它在对 37pA, 即一种被脯氨酸打断的 18A 的串联重复可见的范围内。5F, 6F

和 7F 的排出压力值显著增加 (40 到 45dyn/cm)。显然以排出压力测定时 5F, 6F 和 7F 同系物具有相似的与 EPC 单分子层相互作用的能力。令人感兴趣的是表 7 列出的 F- 肽的 HPLC 滞留时间和单分子层排出压力显示出平行的倾向, 在 4F 和 5F 之间突然增加。

[0748] 直角光散射

[0749] 如图 16 所见, 与不能澄清 EPC MLVs 的 apo A-I 不同, 所有的肽均能澄清 EPC MLVs。两个同源 3F 肽在澄清 EPC MLVs 中效力最小。同源性肽 2F, 5F, 6F 和 7F 都将 EPC MLVs 澄清到相似的程度。肽 4F 在澄清 EPC MLVs 中最有效, 具有相似于 Triton X-100 的活性。对于同系物 4F, EPC MLVs 的浊度清除 50% 的时间也最短。肽 7F 花费最长的时间完成 50% 的清除; 这是由于有 ~ 300 秒的起始延迟期 (图 16)。这很可能是由于需要自我缔合的 7F 分子在与 EPC MLVs 相互作用并溶解它们之前解离。同源性 2F, 5F 和 6F 表现出的清除速率较慢也可能是由于这些肽的自我缔合更高。

[0750] 血浆酶 LCAT 的激活

[0751] 通过测量 LCAT 与作为底物的卵 PC- 胆固醇囊泡反应的起始速率测定这些肽激活血浆酶 LCAT 的能力 (图 17)。LCAT 激活相对于认为是 100% 的 apo A-I 表示。20 μ g/ml 肽和 apo A-I 对 LCAT 的激活在图 4 中表示。在该浓度下, apo A-I 激活 LCAT 比任一肽都更好。然而, 在这里试验的肽中, 5F 是最好的激活剂 (为 apo A-I 的 80%)。对于涉及的 LCAT 激活, 3F³ 和 3F¹⁴ 具有相似的激活能力。因此, 它们以一条线段表示 (图 17)。

[0752] LDL- 诱导的单核细胞趋化活性

[0753] 当 LDL 与人动脉壁共培养物系统温育时, 它陷入内皮下空间并被氧化以产生有生物学活性的脂类。这些脂类诱导单核细胞趋化性。因此, 共培养物单核细胞趋化性是用于生物学活性脂类形成的一个完全确定的测定法。已经表明趋化性的抑制与负责单核细胞趋化蛋白 -1 (MCP-1) (Navab 等 (2000) J. Lipid Res. 41:1481-1494; Navab 等 (2000) J. Lipid Res. 41:1495-1508) 和分化因子巨噬细胞集落 - 刺激因子 (M-CSF) 分泌的“种子分子”的除去直接相关。图 18 显示了与肽温育后的 LDL 表现出不同的效果, 其中同系物 4F, 5F 和 6F 最能降低 LDL 的趋化特性。肽 3F 与 2F 和 7F 相比基本上无效, 而后者比 4F, 5F 和 6F 效力更低。

[0754] 讨论

[0755] A 型两亲性螺旋肽类似物的疏水性增强对其物理 - 化学和脂类结合特性的影响

[0756] 本文中研究的肽是亲本肽 18A 的同系物。在非极性面上的每个残基计算的疏水性 (按照修改的 GES 等级 (Palgunachari 等 (1996) Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 16: 328-338)) 随 Phe 残基数目的增加而增强。这种疏水性的增强 (表 6) 反映了理论脂亲和力, Δ (出处同上)。然而, Δ 值从 2F 到 4F 逐渐增大 (从 13.03 到 14.59), 且该值从 14.59 (对于 4F) 突然增大到 5F 的 19.07。5F 之后对于 6F 和 7F 的值又观察到 Δ 的逐渐增大 (表 6)。这是由于用 Phe 取代 Ac-18A-NH₂ 中位置 3 和 14 的 Leu 导致非极性面的疏水性略有增强, 因此两个 3F 类似物和 4F 的 Δ 值略有增加。然而, 在同源性 5F, 6F 和 7F 中, 除了 Leu 取代成 Phe 外, 11 和 17 位的 Ala 也被 Phe 取代, 导致 Δ 值显著增大 (表 6)。因为 Ala 疏水性比 Leu 更小且 Leu 疏水性比 Phe 更小。Ala 取代成 Phe 导致与 Leu 取代成 Phe 相比所得的肽的疏水性和理论脂亲和力改变更大。

[0757] 这些肽在 C₁₈ 反相 HPLC 柱上的滞留时间, 可溶性及其穿透 EPC 单分子层的能力均

表现出相似于在理论脂亲和数值中所见的倾向(表 7)。肽 2F, 3F³, 3F¹⁴ 和 4F 的滞留时间接近相同(21-22 分钟)且明显少于包含第二组的 5F, 6F 和 7F(26-27 分钟)。肽 2F 到 4F 的水溶性比少量可溶的同系物 5F 到 7F 明显更高(表 7)。从 2F 到 4F 观察到排出压力的逐渐增大, 之后有一个从 40dyn/cm 到 45dyn/cm 的突然增大。肽 5F, 6F 和 7F 的排出压力互相之间没有很大差别但明显高于 apo A-I(表 7)。亲本肽 18A(30 dyn/cm) 和甚至 18A 的二聚体, 37pA(40dyn/cm) 在穿透进铺展在气-水界面的卵 PC- 单分子层中也明显效力更小。根据上述物理特性, F 肽可分成两组: I 组是 2F, 3F³, 3F¹⁴, 4F; II 组是肽 5F, 6F 和 7F。

[0758] CD 数据(表 8)表示在 DMPC 存在下所有肽的螺旋度百分数值增大, 表明所有的肽均与脂类缔合。这些肽与 DMPC 的结合似乎相似于 DSC 所示(表 9)。然而, 这些肽对 DiPoPE 双分子层结构的稳定的影响不同。4F 和 5F 似乎与 DiPoPE 相互作用更好, 因为它们似乎是比较其它肽更好的稳定剂。

[0759] 尽管 apo A-I 不能澄清 EPC MLVs, 但是所有的肽类似物都能澄清, 只不过澄清到不同的程度。在易溶于水缓冲液且表现出单分子层排出压力值范围为 38-40 dyn/cm 的 I 组肽(2F, 3F 类似物和 4F) 中, 4F 表现出最有效且在试验的肽: 脂比率下表现出与 Triton X-100 相似的动力学(图 16)。尽管肽 2F 和 3F 的单分子层排出压力相似, 但是 3F 同系物在澄清 EPC MLVs 中最慢。3F 同系物降低 EPC 澄清能力的原因现在还不清楚。不易溶于水缓冲液且具有表面压力值 45dyn/cm 的 II 组肽(5F, 6F 和 7F) 溶解 EPC MLVs 相当缓慢。这些结果与肽聚合体必需解离然后与 EPC 相互作用一致。4F 的高反应性可用这样的事实解释, 即其疏水性最佳, 因此有利于自我缔合的疏水肽: 肽相互作用不能防止肽: 脂相互作用。

[0760] 疏水性增强对 LCAT 激活的影响:

[0761] LCAT 的激活是一个复杂的过程且不仅依赖于脂亲和力, 而且依赖于两亲性螺旋蛋白与酶 LCAT 的相互作用 (Jonas(2000) Biochim. Biophys. Acta 1529 :245-256)。与此一致, 发现同源性肽激活 LCAT 的能力有所不同。肽 5F 显示出最大 LCAT- 激活能力, 与表 7 中研究的物理特性一致, 其中可见包括在卵 PC- 水界面的排出压力值从 4F 到 5F 突然增加。肽 6F 和 7F 不如 5F 一样有效的事实可解释为肽: 肽相互作用增强(由这些肽的低水溶性反映出来)不允许肽: 脂或肽: LCAT 相互作用。这些结果与我们以前用 18A 二聚体肽的观察结果一致, 其中二聚体 18A-18A(36A) 肽的自我缔合增强与 18A-Pro-18A 肽相比降低了其与脂类相互作用的能力 (Jonas(2000) Biochim. Biophys. Acta 1529 :245-256)。尽管将肽对 LCAT 的激活与 apo A-I 进行了比较, 应注意 apo A-I 和肽与底物的相互作用不同, 因为它们与 EPC 都具有不同的反应性(图 16)。Chung 等获得了相似的观察结果, 他们显示了合成肽 18A-Pro-18A 和 apo A-I 与 EPC 的相互作用不同 (Chung 等 (1985) J. Biol. Chem. 260 : 10256-10262)。

[0762] 非极性面疏水性增强对 LDL- 诱导的单核细胞趋化性的影响

[0763] 根据我们的报道 (Navab 等 (2000) J. Lipid Res. 41 :1481-1494 ; Navab 等 (2000) J. Lipid Res. 41 :1495-1508), 由于去掉“种子分子”依赖于肽的两亲性, 我们检查了这些肽抑制 LDL- 诱导的单核细胞趋化性的能力。在该试验中, 根据方差的单向分析, 100 μ g/ml 水平的肽 4F, 5F 和 6F 表现出显著的和相似的对 LDL- 诱导的趋化性的抑制。尽管同源性 2F 由于尚不清楚的原因表现出一定的抑制活性, 但是肽类似物 3F 与单独的 LDL 相比显示出无抑制。这些结果与肽 3F 不能去掉脂类氢过氧化物(结果未显示)且澄清 EPC MLVs 的能力降

低的事实一致。肽 7F 比肽 4F, 5F 和 6F 效力显著更小 ($P < 0.001$)。7F 的能力降低又可解释为肽的自我缔合增强, 正如在 EPC MLV 澄清试验中所见, 它降低了其与脂类相互作用的能力。这些结果又证实了肽的疏水性贡献与自我缔合之间存在的微妙平衡可精密地影响 apo A-I- 模拟特性。

[0764] 体内施用具有增强的 LCAT 激活能力和增强的去掉“种子分子”的能力的肽 5F 可防止小鼠饮食-诱导的动脉粥样硬化。相反, 施用在 LCAT 激活能力方面相似于 4F, 但在从 LDL 去掉“种子分子”方面比 4F 和 5F 效力更低的 2F 在 C57 BL6 小鼠中不能显著抑制饮食诱导的病灶形成 (施用 PBS 的对照小鼠的平均病灶面积 $14.7 \pm 1.8 \mu\text{m}^2 \times 10^{-3}$ 与施用 2F 的小鼠的 $13.2 \pm 1.7 \mu\text{m}^2 \times 10^{-3}$ 相当, $n = 15$)。因此在该小鼠模型中, LDL- 诱导的单核细胞趋化性的抑制比 LCAT 激活更具有致动脉粥样硬化抗性。由于肽 2F 和 4F 在激活 LCAT 上相似, 且 4F 和 5F 在去掉 LDL 的“种子分子”上相似, 因此肽 4F 可用作在不同动脉粥样硬化敏感性小鼠模型中区别 LCAT 激活与 LDL- 诱导的单核细胞趋化性的抑制的重要性的试剂。如果 LDL- 诱导的趋化性的抑制比 LCAT- 激活能力更重要, 那么 4F 应当是用作动脉粥样硬化抑制剂的更好的肽, 因为该肽比肽 5F, 6F 和 7F 肽更可溶。

[0765] 实施例 4

[0766] 肽 D-4F 在急性炎症反应中维持对氧磷酶水平且抑制氧化的磷脂生产

[0767] 我们观察到在小鼠中鼻内滴注流感 A 病毒引起 HDL 的抗炎特性的时间依赖型丧失在接种 7 到 9 天后达到最大值。选择的剂量是不会引起病毒血症的剂量, 因此改变不是直接由病毒引起而是由于对病毒感染的宿主系统反应诱导的炎症状态引起。该反应是先天性免疫系统的一部分且称为急性期反应或急相反应。

[0768] 一个后果是流感感染后在小鼠的 HDL 中对氧磷酶和血小板激活的乙酰水解酶活性减小。由于这些 HDL 酶活性的损失且也由于急性期反应期间氧化剂前体蛋白与 HDL 的缔合, HDL 不再能够防止 LDL 氧化且不再能够防止 LDL- 诱导的由内皮细胞产生的单核细胞趋化活性。正常 HDL 能够防止 LDL- 诱导的由内皮细胞产生的单核细胞趋化活性, 因为正常 HDL 含有足够的对氧磷酶和血小板激活的乙酰水解酶活性以破坏有生物学活性的氧化磷脂。

[0769] 在本实施例中, 我们证实了在流感 A 感染后的早期 (2 天), 感染的小鼠肝脏产生这些氧化的磷脂 (图 19) 且后来 (感染后 7 到 9 天) 这些有生物学活性的氧化磷脂出现在小鼠主动脉中。然而, 如果用流感 A 病毒感染后小鼠每天注射 20 微克 D-4F, 则对氧磷酶水平不下降 (图 20) 且不产生超过背景的有生物学活性的氧化磷脂 (图 21)。

[0770] 这些数据表明 D-4F (和 / 或本发明的其它肽) 在流感感染或者可产生急性期炎症反应的其它事件 (例如, 由于病毒感染, 细菌感染, 外伤, 移植, 各种自体免疫状态等) 期间通过口服或者通过注射给予已知具有冠状动脉疾病的患者且因此我们可通过这种短期治疗防止与产生该炎症状态的病变相关的心脏病和发作的发生率增加。

[0771] 实施例 5

[0772] 口服施用 D- 氨基酸合成的 Apo A-I 模拟肽显著减少小鼠的动脉粥样硬化

[0773] 从 D 或 L 氨基酸合成的 Apo A-I 模拟肽在体外防止低密度脂蛋白 (LDL) 被动脉壁细胞氧化上均有效。然而, 当给 LDL 受体无效小鼠口服给予该肽, 并分离其 HDL 且检测其防止 LDL 体外氧化的能力时, 只有从 D- 氨基酸合成的肽有效。从 D- 氨基酸合成的肽在循环中稳定且在与高密度脂蛋白 (HDL) 缔合的级分中发现。从 L 氨基酸合成的肽迅速降解且在尿

中排出。当称为 D-4F 的从 D- 氨基酸合成的肽每天两次口服施用给接受西方饮食的 LDL 受体无效小鼠时,病灶减少 79%。当加入 apo E 无效小鼠的饮水中时,D-4F 将病灶减少 84% 以上。我们推定口服施用从 D- 氨基酸合成的 apo A-I 模拟肽对于预防和治疗动脉粥样硬化和由氧化脂类引起的其它慢性炎症性疾病有用。

[0774] 背景

[0775] HDL- 胆固醇浓度与动脉粥样硬化冠状动脉疾病的风险反相关 (Miller 和 Miller(1975)Lancet,1:16-19)。输注 (Badimon 等 (1990)J Clin Invest,85:1234-1241) 或转基因表达 (Plump 等 (1994)Proc. Natl. Acad. Sci., USA,91:9607-9611)apo A-I 时,已表明 HDL 的主要载脂蛋白防止动物模型中的动脉粥样硬化。apo A-I 防止动脉粥样硬化形成的机制假定为包括逆向胆固醇运输 (Shah 等 (2001)Circulation,103:3047-3050) 和氧化 LDL 所需的低水平的氧化脂类“种子分子”的除去 (Navab 等 (2000)J Lipid Res. 41:1481-1494;Navab 等 (2000)J Lipid Res,41:1495-1508;Navab 等 (2001)Arterioscler Thromb Vasc Biol. 21:481-488)。A 型两亲性螺旋肽类似物表现出模拟包括除去 LDL 氧化所需的“种子分子”的 apoA-I 的一些体外特性 (Navab 等 (2000)J Lipid Res. 41:1481-1494;Navab 等 (2000)J Lipid Res,41:1495-1508)。最近已表明 A 型两亲性螺旋肽的腹膜内给药可防止小鼠饮食诱导的动脉粥样硬化而不改变其血浆胆固醇水平 (Garber 等 (2001)J Lipid Res,42:545-552)。病灶的减少与 HDL 抑制体外 LDL 氧化的能力显著提高相关 (出处同上)。至今,apo A-I 或 apo A-I 模拟肽用作药物的主要限制是需要肠胃外途径给药。

[0776] 诸如蛋白酶的哺乳动物酶识别从 L- 氨基酸合成的肽和蛋白质,但很少识别从 D- 氨基酸合成的肽和蛋白质。这里我们证实了从 D- 氨基酸合成的 apoA-I 模拟肽的特定制剂可口服给药并显著抑制小鼠的动脉粥样硬化。

[0777] 方法

[0778] 小鼠

[0779] C57BL/6J 背景的雌性 LDL 受体失效或 apo E 无效小鼠从 JacksonLaboratory,Bar Harbor,ME 购买。LDL 受体无效小鼠在 Purina 食物 (RalstonPurina Co.) 上维持直到它们的年龄为 4 周,此时转换成西方饮食 (Teklad, Madison, WI, diet # 88137) 共 6 周。apo E 无效小鼠在整个研究过程中在 Purina 食物上维持。LDL 受体无效小鼠在附图说明所示的期间内通过胃管饲法每天两次接受试验肽或载体对照。在 4 周龄时,将试验肽以附图说明所示的浓度加入一些 apo E 无效小鼠的饮水中且 apo E 无效小鼠继续接受常规食物的饮食。

[0780] 按照 UCLA 动物研究委员会批准的方法在麻醉状态下从眼眶后静脉丛对小鼠抽血。按以前所述⁹测量动脉粥样硬化病灶。

[0781] 脂蛋白

[0782] 从人类志愿者得到告知同意后和从上述小鼠血液按 (Navab 等 (2000)JLipid Res. 41:1481-1494,和本文实施例)所述分离 LDL 和 HDL。

[0783] 共培养物, LDL 的细胞氧化,单核细胞分离,和单核细胞趋化性试验

[0784] 按以前所述 (出处同上)分离和培养人主动脉内皮和平滑肌细胞。按所述方法 (出处同上)测定在 HDL 存在和没有的条件下 LDL 的细胞氧化。人血液单核细胞在得到告知同意后分离且按以前所述⁵测定单核细胞趋化性。

[0785] apo A-I 模拟肽的合成和制备

[0786] Apo A-I 模拟肽按以前所述¹¹合成,除了在一些情况下肽中的各氨基酸是氨基酸的 D- 立体异构体。肽以序列

[0787] Ac-D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-A-F-NH₂ (SEQ ID NO :1) (Ac-18A-NH₂ 或 2F) 为基础。2F 或具有一级氨基酸序列

[0788] Ac-D-W-F-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F-NH₂ (SEQ ID NO :5, 也称为 4F) 的 2F 的类似物用于本文报道的研究。从 L- 氨基酸合成的肽用 L 命名 (例如 L-4F), 从 D- 氨基酸合成的肽用 D 命名 (例如, D-4F)。在某些情况下按照厂商的建议使用 IODO-BEAD 试剂 (Pierce, Rockford, IL) 对肽进行碘标记。由 L- α -1- 棕榈酰-2- 油酰基-sn- 甘油基-3- 磷酸胆碱 (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL) 与有和没有 D-4F 组成的脂质体按厂商建议制备。来自小鼠血浆的完整肽的提取和检测按 Garber 等 (1992) Arterioscler Thromb. 12 : 886-894 所述, 使用反相 HPLC 进行。

[0789] 其它方法

[0790] 脂蛋白的蛋白质 (Navab 等 (2000) J Lipid Res. 41 :1481-1494) 和胆固醇 (Van Lenten 等 (2001) Circulation, 103 :2283-2288) 含量和统计学分析按 VanLenten 等 (2001) Circulation, 103 :2283-2288 所述进行, 显著性定义为 $P < 0.05$ 。

[0791] 结果

[0792] 在体外, L-2F 和 D-2F 都能够同等地抑制 LDL 氧化和 LDL- 诱导的在人动脉壁细胞共培养物中的单核细胞趋化活性 (数据未显示)。然而, 在体内, 如图 22A 所示, 口服给药后, 只有 D-4F 在循环中保持完整且能够增强 HDL 的保护能力 (图 22B) 并降低 LDL- 诱导的单核细胞趋化活性 (图 22C)。口服施用 ¹²⁵I-L-4F 或 ¹²⁵I-D-4F 后 2 小时, 给予 L-4F 的小鼠尿的放射性比给予 D-4F 的小鼠尿大约高 15 倍 (数据未显示)。

[0793] 图 23 证实了通过管饲法每天两次施用 D-4F 在接受西方饮食的 LDL 受体无效小鼠中动脉粥样硬化病灶减少 79%。在接受 D-4F 和接受单独的脂质体或单独的盐水的 LDL 受体无效小鼠中总血浆胆固醇水平没有显著差异。D-4F 组的总胆固醇为 $761 \pm 69 \text{ mg/dl}$, 脂质体组为 $677 \pm 52 \text{ mg/dl}$, 盐水组为 699 ± 31 。平均 HDL- 胆固醇水平在 D-4F 组的 $73 \pm 8.7 \text{ mg/dl}$ 比脂质体组的 65.9 ± 9.2 和盐水组的 67.1 ± 3 略高, 但是这些差别没有达到统计学上显著的程度。

[0794] 图 24 证实了在其饮水中给予 D-4F 的 apo E 无效小鼠病灶减少 84% 以上且小鼠给予 2.5 mg/天/只小鼠 或者 5.0 mg/天/只小鼠 没有显著差异。不接受肽, 或者接受 $2.5 \text{ mg D-4F/只小鼠/天}$ 或者 $5.0 \text{ mg D-4F/只小鼠/天}$ 的 apo E 无效小鼠之间消耗的水量 (2.5 ml/天/只小鼠) 没有显著差异, 在三组中 apo E 无效小鼠在体重, 心脏重, 或者肝脏重方面没有显著差异 (数据未显示)。另外, 血浆总胆固醇浓度在接受 D-4F 的 apo E 无效小鼠中没有显著差异 (接受无肽的水的小鼠为 $478 \pm 149 \text{ mg/dl}$, 以 2.5 mg/只小鼠/天 接受 D-4F 的小鼠为 $534 \pm 12.3 \text{ mg/dl}$, 以 5.0 mg/只小鼠/天 接受 D-4F 的小鼠为 $579 \pm 4.6 \text{ mg/dl}$)。平均 HDL- 胆固醇在接受 D-4F 的小鼠中略有增加但是没有达到统计学上显著的差异 (接受无肽的水的小鼠为 $32.2 \pm 7 \text{ mg/dl}$, 以 2.5 mg/只小鼠/天 接受 D-4F 的小鼠为 38.7 ± 5 , 且以 5.0 mg/只小鼠/天 接受 D-4F 的小鼠为 $43.4 \pm 6 \text{ mg/dl}$)。

[0795] 讨论

[0796] 至今为止, apo A-I 和 apo A-I 模拟肽用作药品受到需要肠胃外给药的限制。在

本研究中发现动脉粥样硬化病灶显著减少,尽管总血浆胆固醇没有显著变化。尽管在接受 D-4F 的小鼠中 HDL-胆固醇水平倾向于略高,但是没有达到统计学上显著的程度。这里提供的试验表明口服施用从 D-氨基酸合成的 apo A-I 模拟肽可用于预防和治疗动脉粥样硬化和由氧化脂类引起的其它慢性炎症性疾病。

[0797] 应明白本文所述的实施例和实施方案仅用于举例说明的目的,在其教导下本领域的技术人员可提出各种修改或变化,它们应包含在本申请实质和范围以及所附权利要求书的范围内。本文引证的所有出版物,专利,和专利申请以其整体作为参考文献在此引用以便用于所有目的。

[0798] 序列表

[0799] <110>加利福尼亚大学董事会 (The Regents of the University of California)

[0800] <120>用于改善动脉粥样硬化的口服给药的肽

[0801] <130>407T-911220PC

[0802] <150>US 09/896,841

[0803] <151>2001-06-29

[0804] <150>US 09/645,454

[0805] <151>2000-08-24

[0806] <160>87

[0807] <170>PatentIn version 3.0

[0808] <210>1

[0809] <211>18

[0810] <212>PRT

[0811] <213>人工的

[0812] <220>

[0813] <223>合成或重组的 A 型肽

[0814] <400>1

[0815] Asp Trp Leu Lys Ala Phe Tyr Asp Lys Val Ala Glu Lys Leu Lys Glu

[0816] 1 5 10 15

[0817] Ala Phe

[0818] <210>2

[0819] <211>18

[0820] <212>PRT

[0821] <213>人工的

[0822] <220>

[0823] <223>合成或重组的 A 型肽

[0824] <400>2

[0825] Asp Trp Leu Lys Ala Phe Tyr Asp Lys Val Ala Glu Lys Leu Lys Glu

[0826] 1 5 10 15

[0827] Ala Phe

[0828] <210>3

- [0829] <211>18
[0830] <212>PRT
[0831] <213> 人工的
[0832] <220>
[0833] <223> 合成或重组的 A 型肽
[0834] <400>3
[0835] Asp Trp Phe Lys Ala Phe Tyr Asp Lys Val Ala Glu Lys Leu Lys Glu
[0836] 1 5 10 15
[0837] Ala Phe
[0838] <210>4
[0839] <211>18
[0840] <212>PRT
[0841] <213> 人工的
[0842] <220>
[0843] <223> 合成或重组的 A 型肽
[0844] <400>4
[0845] Asp Trp Leu Lys Ala Phe Tyr Asp Lys Val Ala Glu Lys Phe Lys Glu
[0846] 1 5 10 15
[0847] Ala Phe
[0848] <210>5
[0849] <211>18
[0850] <212>PRT
[0851] <213> 人工的
[0852] <220>
[0853] <223> 合成或重组的 A 型肽
[0854] <400>5
[0855] Asp Trp Phe Lys Ala Phe Tyr Asp Lys Val Ala Glu Lys Phe Lys Glu
[0856] 1 5 10 15
[0857] Ala Phe
[0858] <210>6
[0859] <211>18
[0860] <212>PRT
[0861] <213> 人工的
[0862] <220>
[0863] <223> 合成或重组的 A 型肽
[0864] <400>6
[0865] Asp Trp Leu Lys Ala Phe Tyr Asp Lys Val Phe Glu Lys Phe Lys Glu
[0866] 1 5 10 15
[0867] Phe Phe

- [0868] <210>7
[0869] <211>18
[0870] <212>PRT
[0871] <213> 人工的
[0872] <220>
[0873] <223> 合成或重组的 A 型肽
[0874] <400>7
[0875] Asp Trp Leu Lys Ala Phe Tyr Asp Lys Phe Phe Glu Lys Phe Lys Glu
[0876] 1 5 10 15
[0877] Phe Phe
[0878] <210>8
[0879] <211>18
[0880] <212>PRT
[0881] <213> 人工的
[0882] <220>
[0883] <223> 合成或重组的 A 型肽
[0884] <400>8
[0885] Asp Trp Phe Lys Ala Phe Tyr Asp Lys Phe Phe Glu Lys Phe Lys Glu
[0886] 1 5 10 15
[0887] Phe Phe
[0888] <210>9
[0889] <211>18
[0890] <212>PRT
[0891] <213> 人工的
[0892] <220>
[0893] <223> 合成或重组的 A 型肽
[0894] <400>9
[0895] Asp Trp Leu Lys Ala Phe Tyr Asp Lys Val Ala Glu Lys Leu Lys Glu
[0896] 1 5 10 15
[0897] Phe Phe
[0898] <210>10
[0899] <211>18
[0900] <212>PRT
[0901] <213> 人工的
[0902] <220>
[0903] <223> 合成或重组的 A 型肽
[0904] <400>10
[0905] Asp Trp Leu Lys Ala Phe Tyr Asp Lys Val Phe Glu Lys Phe Lys Glu
[0906] 1 5 10 15

- [0907] Ala Phe
[0908] <210>11
[0909] <211>18
[0910] <212>PRT
[0911] <213> 人工的
[0912] <220>
[0913] <223> 合成或重组的 A 型肽
[0914] <400>11
[0915] Asp Trp Leu Lys Ala Phe Tyr Asp Lys Val Phe Glu Lys Leu Lys Glu
[0916] 1 5 10 15
[0917] Phe Phe
[0918] <210>12
[0919] <211>18
[0920] <212>PRT
[0921] <213> 人工的
[0922] <220>
[0923] <223> 合成或重组的 A 型肽
[0924] <400>12
[0925] Asp Trp Leu Lys Ala Phe Tyr Asp Lys Val Ala Glu Lys Phe Lys Glu
[0926] 1 5 10 15
[0927] Phe Phe
[0928] <210>13
[0929] <211>18
[0930] <212>PRT
[0931] <213> 人工的
[0932] <220>
[0933] <223> 合成或重组的 A 型肽
[0934] <400>13
[0935] Asp Trp Leu Lys Ala Phe Tyr Asp Lys Val Phe Glu Lys Phe Lys Glu
[0936] 1 5 10 15
[0937] Phe Phe
[0938] <210>14
[0939] <211>18
[0940] <212>PRT
[0941] <213> 人工的
[0942] <220>
[0943] <223> 合成或重组的 A 型肽
[0944] <400>14
[0945] Glu Trp Leu Lys Leu Phe Tyr Glu Lys Val Leu Glu Lys Phe Lys Glu

[0946]	1	5	10	15
[0947]	Ala Phe			
[0948]	<210>15			
[0949]	<211>18			
[0950]	<212>PRT			
[0951]	<213> 人工的			
[0952]	<220>			
[0953]	<223> 合成或重组的 A 型肽			
[0954]	<400>15			
[0955]	Glu Trp Leu Lys Ala Phe Tyr Asp Lys Val Ala Glu Lys Phe Lys Glu			
[0956]	1	5	10	15
[0957]	Ala Phe			
[0958]	<210>16			
[0959]	<211>18			
[0960]	<212>PRT			
[0961]	<213> 人工的			
[0962]	<220>			
[0963]	<223> 合成或重组的 A 型肽			
[0964]	<400>16			
[0965]	Glu Trp Leu Lys Ala Phe Tyr Asp Lys Val Ala Glu Lys Leu Lys Glu			
[0966]	1	5	10	15
[0967]	Phe Phe			
[0968]	<210>17			
[0969]	<211>18			
[0970]	<212>PRT			
[0971]	<213> 人工的			
[0972]	<220>			
[0973]	<223> 合成或重组的 A 型肽			
[0974]	<400>17			
[0975]	Glu Trp Leu Lys Ala Phe Tyr Asp Lys Val Phe Glu Lys Phe Lys Glu			
[0976]	1	5	10	15
[0977]	Ala Phe			
[0978]	<210>18			
[0979]	<211>18			
[0980]	<212>PRT			
[0981]	<213> 人工的			
[0982]	<220>			
[0983]	<223> 合成或重组的 A 型肽			
[0984]	<400>18			

[0985]	Glu Trp Leu Lys Ala Phe Tyr Asp Lys Val Phe Glu Lys Leu Lys Glu														
[0986]	1			5					10					15	
[0987]	Phe Phe														
[0988]	<210>19														
[0989]	<211>18														
[0990]	<212>PRT														
[0991]	<213> 人工的														
[0992]	<220>														
[0993]	<223> 合成或重组的 A 型肽														
[0994]	<400>19														
[0995]	Glu Trp Leu Lys Ala Phe Tyr Asp Lys Val Ala Glu Lys Phe Lys Glu														
[0996]	1			5					10					15	
[0997]	Phe Phe														
[0998]	<210>20														
[0999]	<211>18														
[1000]	<212>PRT														
[1001]	<213> 人工的														
[1002]	<220>														
[1003]	<223> 合成或重组的 A 型肽														
[1004]	<400>20														
[1005]	Glu Trp Leu Lys Ala Phe Tyr Asp Lys Val Phe Glu Lys Phe Lys Glu														
[1006]	1			5					10					15	
[1007]	Phe Phe														
[1008]	<210>21														
[1009]	<211>14														
[1010]	<212>PRT														
[1011]	<213> 人工的														
[1012]	<220>														
[1013]	<223> 合成或重组的 A 型肽														
[1014]	<400>21														
[1015]	Ala Phe Tyr Asp Lys Val Ala Glu Lys Leu Lys Glu Ala Phe														
[1016]	1			5					10						
[1017]	<210>22														
[1018]	<211>14														
[1019]	<212>PRT														
[1020]	<213> 人工的														
[1021]	<220>														
[1022]	<223> 合成或重组的 A 型肽														
[1023]	<400>22														

- [1024] Ala Phe Tyr Asp Lys Val Ala Glu Lys Phe Lys Glu Ala Phe
[1025] 1 5 10
[1026] <210>23
[1027] <211>14
[1028] <212>PRT
[1029] <213> 人工的
[1030] <220>
[1031] <223> 合成或重组的 A 型肽
[1032] <400>23
[1033] Ala Phe Tyr Asp Lys Val Ala Glu Lys Phe Lys Glu Ala Phe
[1034] 1 5 10
[1035] <210>24
[1036] <211>14
[1037] <212>PRT
[1038] <213> 人工的
[1039] <220>
[1040] <223> 合成或重组的 A 型肽
[1041] <400>24
[1042] Ala Phe Tyr Asp Lys Phe Phe Glu Lys Phe Lys Glu Phe Phe
[1043] 1 5 10
[1044] <210>25
[1045] <211>14
[1046] <212>PRT
[1047] <213> 人工的
[1048] <220>
[1049] <223> 合成或重组的 A 型肽
[1050] <400>25
[1051] Ala Phe Tyr Asp Lys Phe Phe Glu Lys Phe Lys Glu Phe Phe
[1052] 1 5 10
[1053] <210>26
[1054] <211>14
[1055] <212>PRT
[1056] <213> 人工的
[1057] <220>
[1058] <223> 合成或重组的 A 型肽
[1059] <400>26
[1060] Ala Phe Tyr Asp Lys Val Ala Glu Lys Phe Lys Glu Ala Phe
[1061] 1 5 10
[1062] <210>27

- [1063] <211>14
[1064] <212>PRT
[1065] <213> 人工的
[1066] <220>
[1067] <223> 合成或重组的 A 型肽
[1068] <400>27
[1069] Ala Phe Tyr Asp Lys Val Ala Glu Lys Leu Lys Glu Phe Phe
[1070] 1 5 10
[1071] <210>28
[1072] <211>14
[1073] <212>PRT
[1074] <213> 人工的
[1075] <220>
[1076] <223> 合成或重组的 A 型肽
[1077] <400>28
[1078] Ala Phe Tyr Asp Lys Val Phe Glu Lys Phe Lys Glu Ala Phe
[1079] 1 5 10
[1080] <210>29
[1081] <211>14
[1082] <212>PRT
[1083] <213> 人工的
[1084] <220>
[1085] <223> 合成或重组的 A 型肽
[1086] <400>29
[1087] Ala Phe Tyr Asp Lys Val Phe Glu Lys Leu Lys Glu Phe Phe
[1088] 1 5 10
[1089] <210>30
[1090] <211>14
[1091] <212>PRT
[1092] <213> 人工的
[1093] <220>
[1094] <223> 合成或重组的 A 型肽
[1095] <400>30
[1096] Ala Phe Tyr Asp Lys Val Ala Glu Lys Phe Lys Glu Phe Phe
[1097] 1 5 10
[1098] <210>31
[1099] <211>14
[1100] <212>PRT
[1101] <213> 人工的

- [1102] <220>
- [1103] <223> 合成或重组的 A 型肽
- [1104] <400>31
- [1105] Lys Ala Phe Tyr Asp Lys Val Phe Glu Lys Phe Lys Glu Phe
- [1106] 1 5 10
- [1107] <210>32
- [1108] <211>14
- [1109] <212>PRT
- [1110] <213> 人工的
- [1111] <220>
- [1112] <223> 合成或重组的 A 型肽
- [1113] <400>32
- [1114] Leu Phe Tyr Glu Lys Val Leu Glu Lys Phe Lys Glu Ala Phe
- [1115] 1 5 10
- [1116] <210>33
- [1117] <211>14
- [1118] <212>PRT
- [1119] <213> 人工的
- [1120] <220>
- [1121] <223> 合成或重组的 A 型肽
- [1122] <400>33
- [1123] Ala Phe Tyr Asp Lys Val Ala Glu Lys Phe Lys Glu Ala Phe
- [1124] 1 5 10
- [1125] <210>34
- [1126] <211>14
- [1127] <212>PRT
- [1128] <213> 人工的
- [1129] <220>
- [1130] <223> 合成或重组的 A 型肽
- [1131] <400>34
- [1132] Ala Phe Tyr Asp Lys Val Ala Glu Lys Leu Lys Glu Phe Phe
- [1133] 1 5 10
- [1134] <210>35
- [1135] <211>14
- [1136] <212>PRT
- [1137] <213> 人工的
- [1138] <220>
- [1139] <223> 合成或重组的 A 型肽
- [1140] <400>35

- [1141] Ala Phe Tyr Asp Lys Val Phe Glu Lys Phe Lys Glu Ala Phe
 [1142] 1 5 10
 [1143] <210>36
 [1144] <211>14
 [1145] <212>PRT
 [1146] <213> 人工的
 [1147] <220>
 [1148] <223> 合成或重组的 A 型肽
 [1149] <400>36
 [1150] Ala Phe Tyr Asp Lys Val Phe Glu Lys Leu Lys Glu Phe Phe
 [1151] 1 5 10
 [1152] <210>37
 [1153] <211>14
 [1154] <212>PRT
 [1155] <213> 人工的
 [1156] <220>
 [1157] <223> 合成或重组的 A 型肽
 [1158] <400>37
 [1159] Ala Phe Tyr Asp Lys Val Ala Glu Lys Phe Lys Glu Phe Phe
 [1160] 1 5 10
 [1161] <210>38
 [1162] <211>14
 [1163] <212>PRT
 [1164] <213> 人工的
 [1165] <220>
 [1166] <223> 合成或重组的 A 型肽
 [1167] <400>38
 [1168] Ala Phe Tyr Asp Lys Val Phe Glu Lys Phe Lys Glu Phe Phe
 [1169] 1 5 10
 [1170] <210>39
 [1171] <211>18
 [1172] <212>PRT
 [1173] <213> 人工的
 [1174] <220>
 [1175] <223> 合成或重组的 A 型肽
 [1176] <400>39
 [1177] Asp Trp Leu Lys Ala Leu Tyr Asp Lys Val Ala Glu Lys Leu Lys Glu
 [1178] 1 5 10 15
 [1179] Ala Leu

- [1180] <210>40
[1181] <211>18
[1182] <212>PRT
[1183] <213> 人工的
[1184] <220>
[1185] <223> 合成或重组的 A 型肽
[1186] <400>40
[1187] Asp Trp Phe Lys Ala Phe Tyr Glu Lys Val Ala Glu Lys Leu Lys Glu
[1188] 1 5 10 15
[1189] Phe Phe
[1190] <210>41
[1191] <211>18
[1192] <212>PRT
[1193] <213> 人工的
[1194] <220>
[1195] <223> 合成或重组的 A 型肽
[1196] <400>41
[1197] Asp Trp Phe Lys Ala Phe Tyr Glu Lys Phe Phe Glu Lys Phe Lys Glu
[1198] 1 5 10 15
[1199] Phe Phe
[1200] <210>42
[1201] <211>18
[1202] <212>PRT
[1203] <213> 人工的
[1204] <220>
[1205] <223> 合成或重组的 A 型肽
[1206] <400>42
[1207] Glu Trp Leu Lys Ala Leu Tyr Glu Lys Val Ala Glu Lys Leu Lys Glu
[1208] 1 5 10 15
[1209] Ala Leu
[1210] <210>43
[1211] <211>18
[1212] <212>PRT
[1213] <213> 人工的
[1214] <220>
[1215] <223> 合成或重组的 A 型肽
[1216] <400>43
[1217] Glu Trp Leu Lys Ala Phe Tyr Glu Lys Val Ala Glu Lys Leu Lys Glu
[1218] 1 5 10 15

- [1219] Ala Phe
[1220] <210>44
[1221] <211>18
[1222] <212>PRT
[1223] <213> 人工的
[1224] <220>
[1225] <223> 合成或重组的 A 型肽
[1226] <400>44
[1227] Glu Trp Phe Lys Ala Phe Tyr Glu Lys Val Ala Glu Lys Leu Lys Glu
[1228] 1 5 10 15
[1229] Phe Phe
[1230] <210>45
[1231] <211>18
[1232] <212>PRT
[1233] <213> 人工的
[1234] <220>
[1235] <223> 合成或重组的 A 型肽
[1236] <400>45
[1237] Glu Trp Leu Lys Ala Phe Tyr Glu Lys Val Phe Glu Lys Phe Lys Glu
[1238] 1 5 10 15
[1239] Phe Phe
[1240] <210>46
[1241] <211>18
[1242] <212>PRT
[1243] <213> 人工的
[1244] <220>
[1245] <223> 合成或重组的 A 型肽
[1246] <400>46
[1247] Glu Trp Leu Lys Ala Phe Tyr Glu Lys Phe Phe Glu Lys Phe Lys Glu
[1248] 1 5 10 15
[1249] Phe Phe
[1250] <210>47
[1251] <211>18
[1252] <212>PRT
[1253] <213> 人工的
[1254] <220>
[1255] <223> 合成或重组的 A 型肽
[1256] <400>47
[1257] Glu Trp Phe Lys Ala Phe Tyr Glu Lys Phe Phe Glu Lys Phe Lys Glu

[1258]	1	5	10	15
[1259]	Phe Phe			
[1260]	<210>48			
[1261]	<211>18			
[1262]	<212>PRT			
[1263]	<213> 人工的			
[1264]	<220>			
[1265]	<223> 合成或重组的 A 型肽			
[1266]	<400>48			
[1267]	Asp Phe Leu Lys Ala Trp Tyr Asp Lys Val Ala Glu Lys Leu Lys Glu			
[1268]	1	5	10	15
[1269]	Ala Trp			
[1270]	<210>49			
[1271]	<211>18			
[1272]	<212>PRT			
[1273]	<213> 人工的			
[1274]	<220>			
[1275]	<223> 合成或重组的 A 型肽			
[1276]	<400>49			
[1277]	Glu Phe Leu Lys Ala Trp Tyr Glu Lys Val Ala Glu Lys Leu Lys Glu			
[1278]	1	5	10	15
[1279]	Ala Trp			
[1280]	<210>50			
[1281]	<211>18			
[1282]	<212>PRT			
[1283]	<213> 人工的			
[1284]	<220>			
[1285]	<223> 合成或重组的 A 型肽			
[1286]	<400>50			
[1287]	Asp Phe Trp Lys Ala Trp Tyr Asp Lys Val Ala Glu Lys Leu Lys Glu			
[1288]	1	5	10	15
[1289]	Trp Trp			
[1290]	<210> 51			
[1291]	<211>18			
[1292]	<212>PRT			
[1293]	<213> 人工的			
[1294]	<220>			
[1295]	<223> 合成或重组的 A 型肽			
[1296]	<400>51			

- [1297] Glu Phe Trp Lys Ala Trp Tyr Glu Lys Val Ala Glu Lys Leu Lys Glu
[1298] 1 5 10 15
[1299] Trp Trp
[1300] <210>52
[1301] <211>18
[1302] <212>PRT
[1303] <213> 人工的
[1304] <220>
[1305] <223> 合成或重组的 A 型肽
[1306] <400>52
[1307] Asp Lys Leu Lys Ala Phe Tyr Asp Lys Val Phe Glu Trp Ala Lys Glu
[1308] 1 5 10 15
[1309] Ala Phe
[1310] <210>53
[1311] <211>18
[1312] <212>PRT
[1313] <213> 人工的
[1314] <220>
[1315] <223> 合成或重组的 A 型肽
[1316] <400>53
[1317] Asp Lys Trp Lys Ala Val Tyr Asp Lys Phe Ala Glu Ala Phe Lys Glu
[1318] 1 5 10 15
[1319] Phe Leu
[1320] <210>54
[1321] <211>18
[1322] <212>PRT
[1323] <213> 人工的
[1324] <220>
[1325] <223> 合成或重组的 A 型肽
[1326] <400>54
[1327] Glu Lys Leu Lys Ala Phe Tyr Glu Lys Val Phe Glu Trp Ala Lys Glu
[1328] 1 5 10 15
[1329] Ala Phe
[1330] <210>55
[1331] <211>18
[1332] <212>PRT
[1333] <213> 人工的
[1334] <220>
[1335] <223> 合成或重组的 A 型肽

- [1336] <400>55
[1337] Glu Lys Trp Lys Ala Val Tyr Glu Lys Phe Ala Glu Ala Phe Lys Glu
[1338] 1 5 10 15
[1339] Phe Leu
[1340] <210>56
[1341] <211>18
[1342] <212>PRT
[1343] <213> 人工的
[1344] <220>
[1345] <223> 合成或重组的 A 型肽
[1346] <400>56
[1347] Asp Trp Leu Lys Ala Phe Val Asp Lys Phe Ala Glu Lys Phe Lys Glu
[1348] 1 5 10 15
[1349] Ala Tyr
[1350] <210>57
[1351] <211>18
[1352] <212>PRT
[1353] <213> 人工的
[1354] <220>
[1355] <223> 合成或重组的 A 型肽
[1356] <400>57
[1357] Glu Lys Trp Lys Ala Val Tyr Glu Lys Phe Ala Glu Ala Phe Lys Glu
[1358] 1 5 10 15
[1359] Phe Leu
[1360] <210>58
[1361] <211>18
[1362] <212>PRT
[1363] <213> 人工的
[1364] <220>
[1365] <223> 合成或重组的 A 型肽
[1366] <400>58
[1367] Asp Trp Leu Lys Ala Phe Val Tyr Asp Lys Val Phe Lys Leu Lys Glu
[1368] 1 5 10 15
[1369] Phe Phe
[1370] <210>59
[1371] <211>18
[1372] <212>PRT
[1373] <213> 人工的
[1374] <220>

- [1375] <223> 合成或重组的 A 型肽
- [1376] <400>59
- [1377] Glu Trp Leu Lys Ala Phe Val Tyr Glu Lys Val Phe Lys Leu Lys Glu
- [1378] 1 5 10 15
- [1379] Phe Phe
- [1380] <210>60
- [1381] <211>18
- [1382] <212>PRT
- [1383] <213> 人工的
- [1384] <220>
- [1385] <223> 合成或重组的 A 型肽
- [1386] <400>60
- [1387] Asp Trp Leu Arg Ala Phe Tyr Asp Lys Val Ala Glu Lys Leu Lys Glu
- [1388] 1 5 10 15
- [1389] Ala Phe
- [1390] <210>61
- [1391] <211>18
- [1392] <212>PRT
- [1393] <213> 人工的
- [1394] <220>
- [1395] <223> 合成或重组的 A 型肽
- [1396] <400>61
- [1397] Glu Trp Leu Arg Ala Phe Tyr Glu Lys Val Ala Glu Lys Leu Lys Glu
- [1398] 1 5 10 15
- [1399] Ala Phe
- [1400] <210>62
- [1401] <211>18
- [1402] <212>PRT
- [1403] <213> 人工的
- [1404] <220>
- [1405] <223> 合成或重组的 A 型肽
- [1406] <400>62
- [1407] Asp Trp Leu Lys Ala Phe Tyr Asp Arg Val Ala Glu Lys Leu Lys Glu
- [1408] 1 5 10 15
- [1409] Ala Phe
- [1410] <210>63
- [1411] <211>18
- [1412] <212>PRT
- [1413] <213> 人工的

- [1414] <220>
- [1415] <223> 合成或重组的 A 型肽
- [1416] <400>63
- [1417] Glu Trp Leu Lys Ala Phe Tyr Glu Arg Val Ala Glu Lys Leu Lys Glu
- [1418] 1 5 10 15
- [1419] Ala Phe
- [1420] <210>64
- [1421] <211>18
- [1422] <212>PRT
- [1423] <213> 人工的
- [1424] <220>
- [1425] <223> 合成或重组的 A 型肽
- [1426] <400>64
- [1427] Asp Trp Leu Lys Ala Phe Tyr Asp Lys Val Ala Glu Arg Leu Lys Glu
- [1428] 1 5 10 15
- [1429] Ala Phe
- [1430] <210>65
- [1431] <211>18
- [1432] <212>PRT
- [1433] <213> 人工的
- [1434] <220>
- [1435] <223> 合成或重组的 A 型肽
- [1436] <400>65
- [1437] Glu Trp Leu Lys Ala Phe Tyr Glu Lys Val Ala Glu Arg Leu Lys Glu
- [1438] 1 5 10 15
- [1439] Ala Phe
- [1440] <210>66
- [1441] <211>18
- [1442] <212>PRT
- [1443] <213> 人工的
- [1444] <220>
- [1445] <223> 合成或重组的 A 型肽
- [1446] <400>66
- [1447] Asp Trp Leu Lys Ala Phe Tyr Asp Lys Val Ala Glu Lys Leu Arg Glu
- [1448] 1 5 10 15
- [1449] Ala Phe
- [1450] <210>67
- [1451] <211>18
- [1452] <212>PRT

- [1453] <213> 人工的
[1454] <220>
[1455] <223> 合成或重组的 A 型肽
[1456] <400>67
[1457] Glu Trp Leu Lys Ala Phe Tyr Glu Lys Val Ala Glu Lys Leu Arg Glu
[1458] 1 5 10 15
[1459] Ala Phe
[1460] <210>68
[1461] <211>18
[1462] <212>PRT
[1463] <213> 人工的
[1464] <220>
[1465] <223> 合成或重组的 A 型肽
[1466] <400>68
[1467] Asp Trp Leu Lys Ala Phe Tyr Asp Arg Val Ala Glu Arg Leu Lys Glu
[1468] 1 5 10 15
[1469] Ala Phe
[1470] <210>69
[1471] <211>18
[1472] <212>PRT
[1473] <213> 人工的
[1474] <220>
[1475] <223> 合成或重组的 A 型肽
[1476] <400>69
[1477] Glu Trp Leu Lys Ala Phe Tyr Glu Arg Val Ala Glu Arg Leu Lys Glu
[1478] 1 5 10 15
[1479] Ala Phe
[1480] <210>70
[1481] <211>18
[1482] <212>PRT
[1483] <213> 人工的
[1484] <220>
[1485] <223> 合成或重组的 A 型肽
[1486] <400>70
[1487] Asp Trp Leu Arg Ala Phe Tyr Asp Lys Val Ala Glu Lys Leu Arg Glu
[1488] 1 5 10 15
[1489] Ala Phe
[1490] <210>71
[1491] <211>18

- [1492] <212>PRT
[1493] <213> 人工的
[1494] <220>
[1495] <223> 合成或重组的 A 型肽
[1496] <400>71
[1497] Glu Trp Leu Arg Ala Phe Tyr Glu Lys Val Ala Glu Lys Leu Arg Glu
[1498] 1 5 10 15
[1499] Ala Phe
[1500] <210>72
[1501] <211>18
[1502] <212>PRT
[1503] <213> 人工的
[1504] <220>
[1505] <223> 合成或重组的 A 型肽
[1506] <400>72
[1507] Asp Trp Leu Arg Ala Phe Tyr Asp Arg Val Ala Glu Lys Leu Lys Glu
[1508] 1 5 10 15
[1509] Ala Phe
[1510] <210>73
[1511] <211>18
[1512] <212>PRT
[1513] <213> 人工的
[1514] <220>
[1515] <223> 合成或重组的 A 型肽
[1516] <400>73
[1517] Glu Trp Leu Arg Ala Phe Tyr Glu Arg Val Ala Glu Lys Leu Lys Glu
[1518] 1 5 10 15
[1519] Ala Phe
[1520] <210>74
[1521] <211>18
[1522] <212>PRT
[1523] <213> 人工的
[1524] <220>
[1525] <223> 合成或重组的 A 型肽
[1526] <400>74
[1527] Asp Trp Leu Lys Ala Phe Tyr Asp Lys Val Ala Glu Arg Leu Arg Glu
[1528] 1 5 10 15
[1529] Ala Phe
[1530] <210>75

- [1531] <211>18
- [1532] <212>PRT
- [1533] <213> 人工的
- [1534] <220>
- [1535] <223> 合成或重组的 A 型肽
- [1536] <400>75
- [1537] Glu Trp Leu Lys Ala Phe Tyr Glu Lys Val Ala Glu Arg Leu Arg Glu
- [1538] 1 5 10 15
- [1539] Ala Phe
- [1540] <210>76
- [1541] <211>18
- [1542] <212>PRT
- [1543] <213> 人工的
- [1544] <220>
- [1545] <223> 合成或重组的 A 型肽
- [1546] <400>76
- [1547] Asp Trp Leu Arg Ala Phe Tyr Asp Lys Val Ala Glu Arg Leu Lys Glu
- [1548] 1 5 10 15
- [1549] Ala Phe
- [1550] <210>77
- [1551] <211>18
- [1552] <212>PRT
- [1553] <213> 人工的
- [1554] <220>
- [1555] <223> 合成或重组的 A 型肽
- [1556] <400>77
- [1557] Glu Trp Leu Arg Ala Phe Tyr Glu Lys Val Ala Glu Arg Leu Lys Glu
- [1558] 1 5 10 15
- [1559] Ala Phe
- [1560] <210>78
- [1561] <211>37
- [1562] <212>PRT
- [1563] <213> 人工的
- [1564] <220>
- [1565] <223> 合成或重组的 A 型肽
- [1566] <400>78
- [1567] Asp Trp Leu Lys Ala Phe Tyr Asp Lys Val Ala Glu Lys Leu Lys Glu
- [1568] 1 5 10 15
- [1569] Ala Phe Pro Asp Trp Leu Lys Ala Phe Tyr Asp Lys Val Ala Glu Lys

[1570]	20	25	30
[1571]	Leu Lys Glu Ala Phe		
[1572]	35		
[1573]	<210>79		
[1574]	<211>37		
[1575]	<212>PRT		
[1576]	<213> 人工的		
[1577]	<220>		
[1578]	<223> 合成或重组的 A 型肽		
[1579]	<400>79		
[1580]	Asp Trp Leu Lys Ala Phe Tyr Asp Lys Val Ala Glu Lys Leu Lys Glu		
[1581]	1	5	10
[1582]	Phe Phe Pro Asp Trp Leu Lys Ala Phe Tyr Asp Lys Val Ala Glu Lys		
[1583]	20	25	30
[1584]	Leu Lys Glu Phe Phe		
[1585]	35		
[1586]	<210>80		
[1587]	<211>37		
[1588]	<212>PRT		
[1589]	<213> 人工的		
[1590]	<220>		
[1591]	<223> 合成或重组的 A 型肽		
[1592]	<400>80		
[1593]	Asp Trp Phe Lys Ala Phe Tyr Asp Lys Val Ala Glu Lys Leu Lys Glu		
[1594]	1	5	10
[1595]	Ala Phe Pro Asp Trp Phe Lys Ala Phe Tyr Asp Lys Val Ala Glu Lys		
[1596]	20	25	30
[1597]	Leu Lys Glu Ala Phe		
[1598]	35		
[1599]	<210>81		
[1600]	<211>37		
[1601]	<212>PRT		
[1602]	<213> 人工的		
[1603]	<220>		
[1604]	<223> 合成或重组的 A 型肽		
[1605]	<400>81		
[1606]	Asp Lys Leu Lys Ala Phe Tyr Asp Lys Val Phe Glu Trp Ala Lys Glu		
[1607]	1	5	10
[1608]	Ala Phe Pro Asp Lys Leu Lys Ala Phe Tyr Asp Lys Val Phe Glu Trp		

[1609]	20	25	30
[1610]	Leu Lys Glu Ala Phe		
[1611]	35		
[1612]	<210>82		
[1613]	<211>37		
[1614]	<212>PRT		
[1615]	<213> 人工的		
[1616]	<220>		
[1617]	<223> 合成或重组的 A 型肽		
[1618]	<400>82		
[1619]	Asp Lys Trp Lys Ala Val Tyr Asp Lys Phe Ala Glu Ala Phe Lys Glu		
[1620]	1	5	10
[1621]	Phe Leu Pro Asp Lys Trp Lys Ala Val Tyr Asp Lys Phe Ala Glu Ala		
[1622]	20	25	30
[1623]	Phe Lys Glu Phe Leu		
[1624]	35		
[1625]	<210>83		
[1626]	<211>37		
[1627]	<212>PRT		
[1628]	<213> 人工的		
[1629]	<220>		
[1630]	<223> 合成或重组的 A 型肽		
[1631]	<400>83		
[1632]	Asp Trp Phe Lys Ala Phe Tyr Asp Lys Val Ala Glu Lys Phe Lys Glu		
[1633]	1	5	10
[1634]	Ala Phe Pro Asp Trp Phe Lys Ala Phe Tyr Asp Lys Val Ala Glu Lys		
[1635]	20	25	30
[1636]	Phe Lys Glu Ala Phe		
[1637]	35		
[1638]	<210>84		
[1639]	<211>37		
[1640]	<212>PRT		
[1641]	<213> 人工的		
[1642]	<220>		
[1643]	<223> 合成或重组的 A 型肽		
[1644]	<400>84		
[1645]	Asp Trp Leu Lys Ala Phe Val Tyr Asp Lys Val Phe Lys Leu Lys Glu		
[1646]	1	5	10
[1647]	Phe Phe Pro Asp Trp Leu Lys Ala Phe Val Tyr Asp Lys Val Phe Lys		

[1648]	20	25	30
[1649]	Leu Lys Glu Phe Phe		
[1650]	35		
[1651]	<210>85		
[1652]	<211>37		
[1653]	<212>PRT		
[1654]	<213> 人工的		
[1655]	<220>		
[1656]	<223> 合成或重组的 A 型肽		
[1657]	<400>85		
[1658]	Asp Trp Leu Lys Ala Phe Tyr Asp Lys Phe Ala Glu Lys Phe Lys Glu		
[1659]	1	5	10
[1660]	Phe Phe Pro Asp Trp Leu Lys Ala Phe Tyr Asp Lys Phe Ala Glu Lys		
[1661]	20	25	30
[1662]	Phe Lys Glu Phe Phe		
[1663]	35		
[1664]	<210>86		
[1665]	<211>18		
[1666]	<212>PRT		
[1667]	<213> 人工的		
[1668]	<220>		
[1669]	<223> 合成或重组的 A 型肽		
[1670]	<220>		
[1671]	<221>misc_feature		
[1672]	<222>(1).. (1)		
[1673]	<223>Xaa 是天冬氨酸或谷氨酸,或其同系物或类似物		
[1674]	<220>		
[1675]	<221>misc_feature		
[1676]	<222>(2).. (3)		
[1677]	<223>Xaa 是色氨酸,苯丙氨酸,丙氨酸,亮氨酸,酪氨酸,异亮氨酸,缬氨酸, α - 萘基丙氨酸,或其同系物或类似物		
[1678]	<220>		
[1679]	<221>misc_feature		
[1680]	<222>(4).. (4)		
[1681]	<223>Xaa 是赖氨酸或精氨酸		
[1682]	<220>		
[1683]	<221>misc_feature		
[1684]	<222>(5).. (5)		
[1685]	<223>Xaa 是丝氨酸,苏氨酸,丙氨酸,甘氨酸,组氨酸,或其同系物或类似物		

- [1686] <220>
- [1687] <221>misc_feature
- [1688] <222>(6)..(7)
- [1689] <223>Xaa 是色氨酸, 苯丙氨酸, 丙氨酸, 亮氨酸, 酪氨酸, 异亮氨酸, 缬氨酸, α - 萘基丙氨酸, 或其同系物或类似物
- [1690] <220>
- [1691] <221>misc_feature
- [1692] <222>(8)..(8)
- [1693] <223>Xaa 是天冬氨酸或谷氨酸, 或其同系物或类似物
- [1694] <220>
- [1695] <221>misc_feature
- [1696] <222>(9)..(9)
- [1697] <223>Xaa 是赖氨酸或精氨酸
- [1698] <220>
- [1699] <221>misc_feature
- [1700] <222>(10)..(11)
- [1701] <223>Xaa 是色氨酸, 苯丙氨酸, 丙氨酸, 亮氨酸, 酪氨酸, 异亮氨酸, 缬氨酸, α - 萘基丙氨酸, 或其同系物或类似物
- [1702] <220>
- [1703] <221>misc_feature
- [1704] <222>(12)..(12)
- [1705] <223>Xaa 是天冬氨酸或谷氨酸, 或其同系物或类似物
- [1706] <220>
- [1707] <221>misc_feature
- [1708] <222>(13)..(13)
- [1709] <223>Xaa 是丝氨酸, 苏氨酸, 丙氨酸, 甘氨酸, 组氨酸, 或其同系物或类似物
- [1710] <220>
- [1711] <221>misc_feature
- [1712] <222>(14)..(14)
- [1713] <223>Xaa 是色氨酸, 苯丙氨酸, 丙氨酸, 亮氨酸, 酪氨酸, 异亮氨酸, 缬氨酸, α - 萘基丙氨酸, 或其同系物或类似物
- [1714] <220>
- [1715] <221>misc_feature
- [1716] <222>(15)..(15)
- [1717] <223>Xaa 是丝氨酸, 苏氨酸, 丙氨酸, 甘氨酸, 组氨酸, 或其同系物或类似物
- [1718] <220>
- [1719] <221>misc_feature
- [1720] <222>(16)..(16)
- [1721] <223>Xaa 是天冬氨酸或谷氨酸, 或其同系物或类似物

- [1722] <220>
- [1723] <221>misc_feature
- [1724] <222>(17)..(18)
- [1725] <223>Xaa 是色氨酸, 苯丙氨酸, 丙氨酸, 亮氨酸, 酪氨酸, 异亮氨酸, 缬氨酸, α -萘基丙氨酸, 或其同系物或类似物
- [1726] <400>86
- [1727] Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
- [1728] 1 5 10 15
- [1729] Xaa Xaa
- [1730] <210>87
- [1731] <211>18
- [1732] <212>PRT
- [1733] <213> 人工的
- [1734] <220>
- [1735] <223> 合成或重组的 A 型肽
- [1736] <220>
- [1737] <221>misc_feature
- [1738] <222>(1)..(1)
- [1739] <223>Xaa 是天冬氨酸或谷氨酸, 或其同系物或类似物
- [1740] <220>
- [1741] <221>misc_feature
- [1742] <222>(8)..(8)
- [1743] <223>Xaa 是天冬氨酸或谷氨酸, 或其同系物或类似物
- [1744] <220>
- [1745] <221>misc_feature
- [1746] <222>(12)..(12)
- [1747] <223>Xaa 是天冬氨酸或谷氨酸, 或其同系物或类似物
- [1748] <220>
- [1749] <221>misc_feature
- [1750] <222>(16)..(16)
- [1751] <223>Xaa 是天冬氨酸或谷氨酸, 或其同系物或类似物
- [1752] <220>
- [1753] <221>misc_feature
- [1754] <222>(2)..(3)
- [1755] <223>Xaa 是色氨酸, 苯丙氨酸, 丙氨酸, 亮氨酸, 酪氨酸, 异亮氨酸, 缬氨酸, 或 α -萘基丙氨酸, 或其同系物或类似物
- [1756] <220>
- [1757] <221>misc_feature
- [1758] <222>(6)..(7)

- [1759] <223>Xaa 是色氨酸, 苯丙氨酸, 丙氨酸, 亮氨酸, 酪氨酸, 异亮氨酸, 缬氨酸, 或 α -萘基丙氨酸, 或其同系物或类似物
- [1760] <220>
- [1761] <221>misc_feature
- [1762] <222>(10).. (11)
- [1763] <223>Xaa 是色氨酸, 苯丙氨酸, 丙氨酸, 亮氨酸, 酪氨酸, 异亮氨酸, 缬氨酸, 或 α -萘基丙氨酸, 或其同系物或类似物
- [1764] <220>
- [1765] <221>misc_feature
- [1766] <222>(14).. (14)
- [1767] <223>Xaa 是色氨酸, 苯丙氨酸, 丙氨酸, 亮氨酸, 酪氨酸, 异亮氨酸, 缬氨酸, 或 α -萘基丙氨酸, 或其同系物或类似物
- [1768] <220>
- [1769] <221>misc_feature
- [1770] <222>(17).. (18)
- [1771] <223>Xaa 是色氨酸, 苯丙氨酸, 丙氨酸, 亮氨酸, 酪氨酸, 异亮氨酸, 缬氨酸, 或 α -萘基丙氨酸, 或其同系物或类似物
- [1772] <220>
- [1773] <221>misc_feature
- [1774] <222>(4).. (4)
- [1775] <223>Xaa 是赖氨酸或精氨酸
- [1776] <220>
- [1777] <221>misc_feature
- [1778] <222>(9).. (9)
- [1779] <223>Xaa 是赖氨酸或精氨酸
- [1780] <220>
- [1781] <221>misc_feature
- [1782] <222>(13).. (13)
- [1783] <223>Xaa 是赖氨酸或精氨酸
- [1784] <220>
- [1785] <221>misc_feature
- [1786] <222>(15).. (15)
- [1787] <223>Xaa 是赖氨酸或精氨酸
- [1788] <220>
- [1789] <221>misc_feature
- [1790] <222>(5).. (5)
- [1791] <223>Xaa 是丝氨酸, 苏氨酸, 丙氨酸, 甘氨酸, 组氨酸, 或其同系物或类似物
- [1792] <400>87
- [1793] Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

[1794]	1	5	10	15
[1795]	Xaa Xaa			

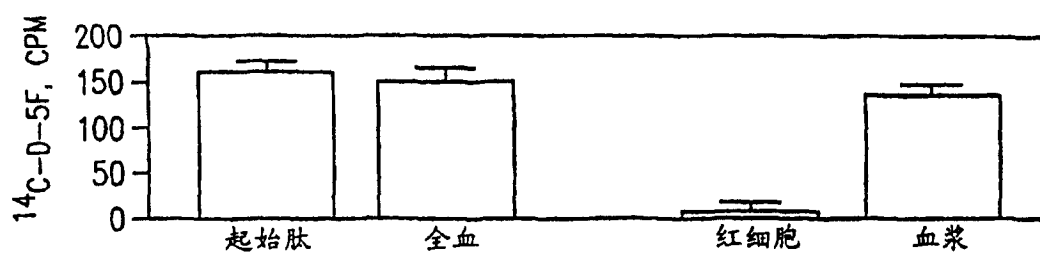


图 1A

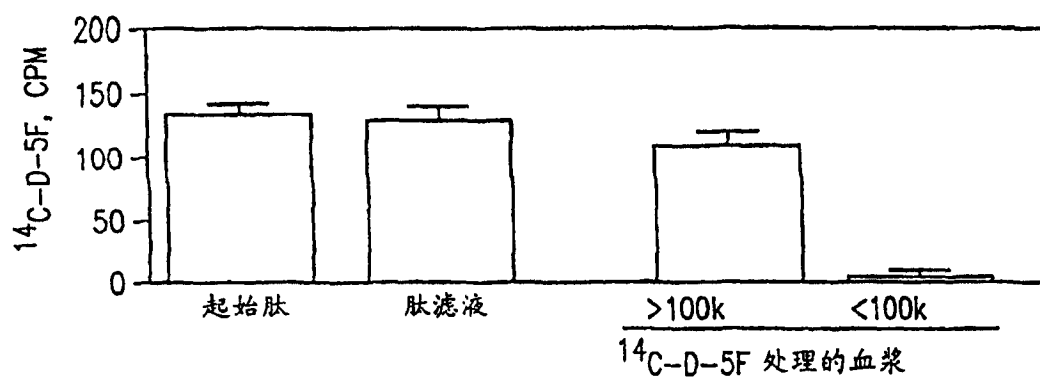


图 1B

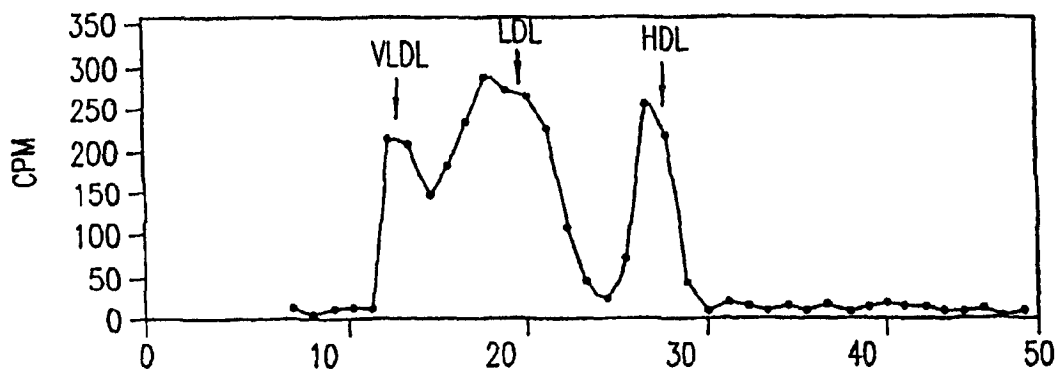


图 1C

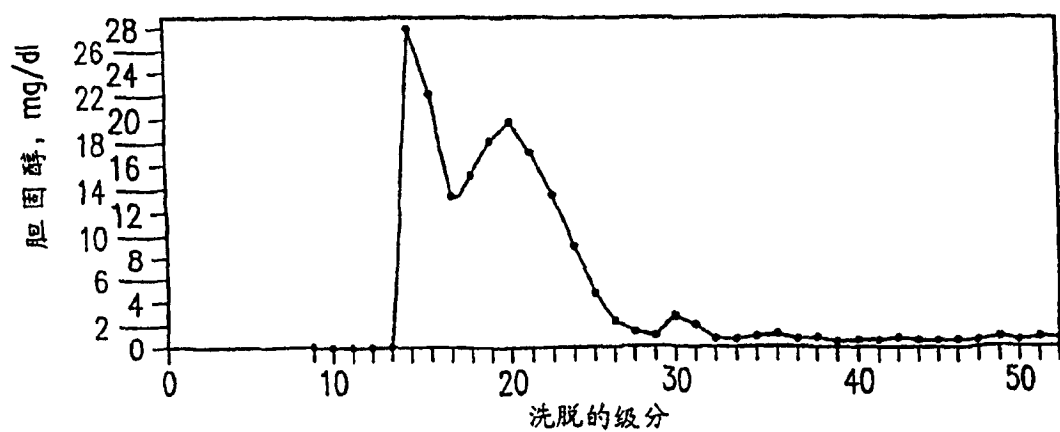


图 1D

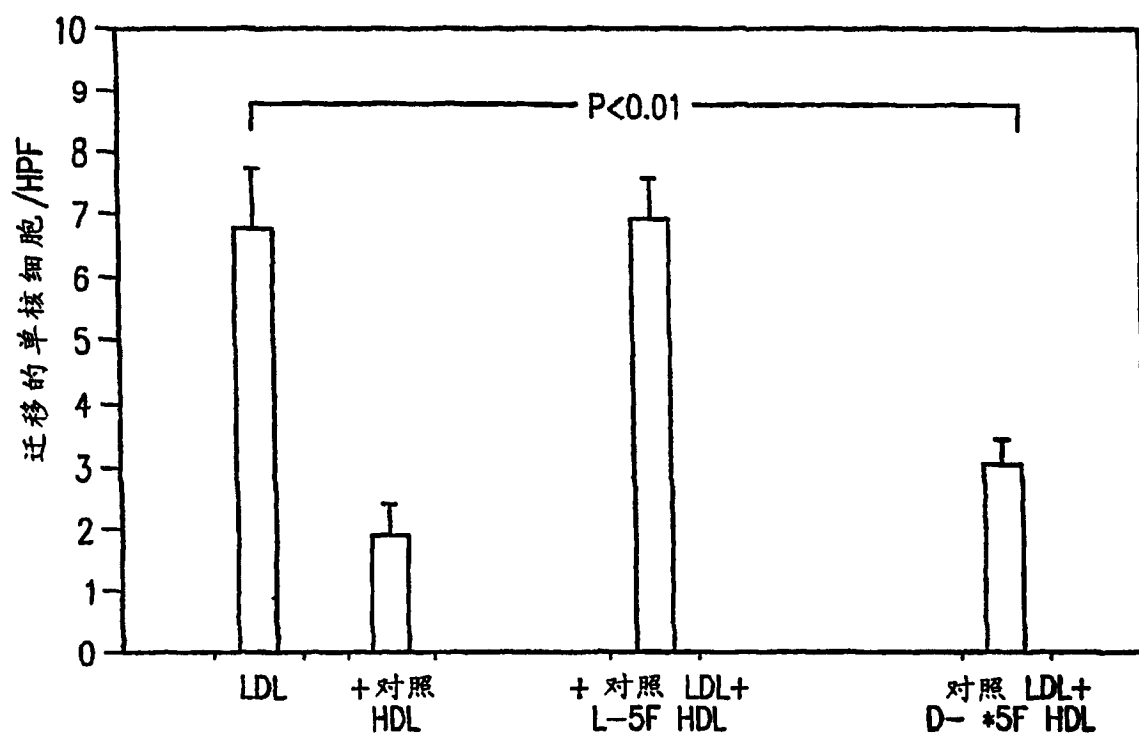


图 2A

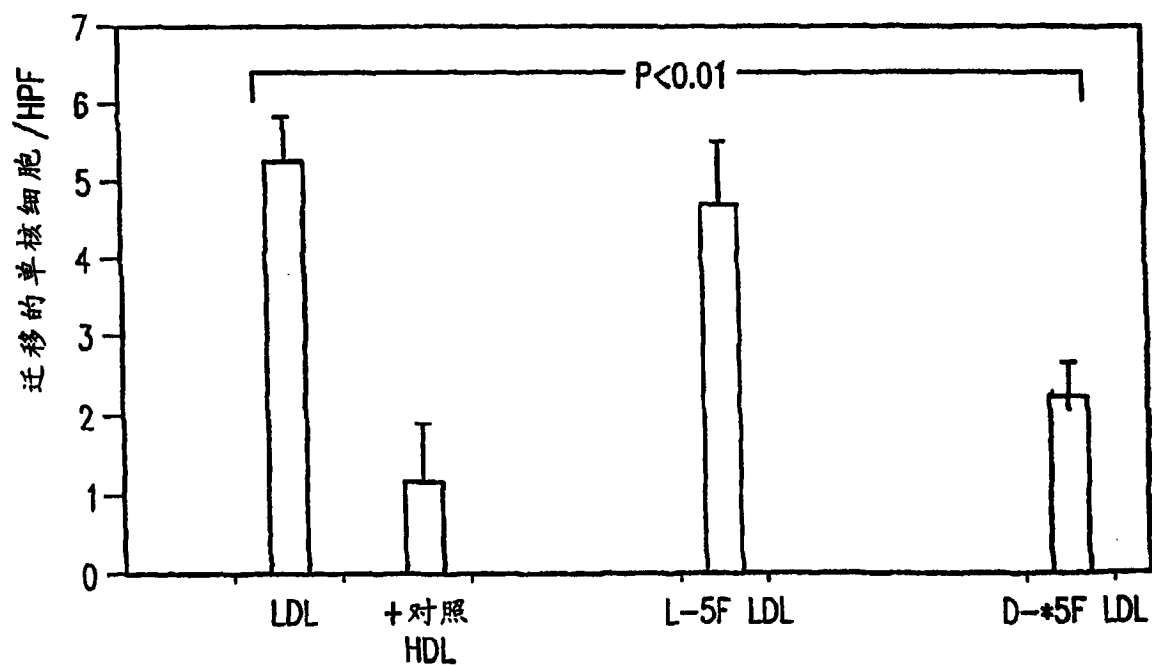


图 2B

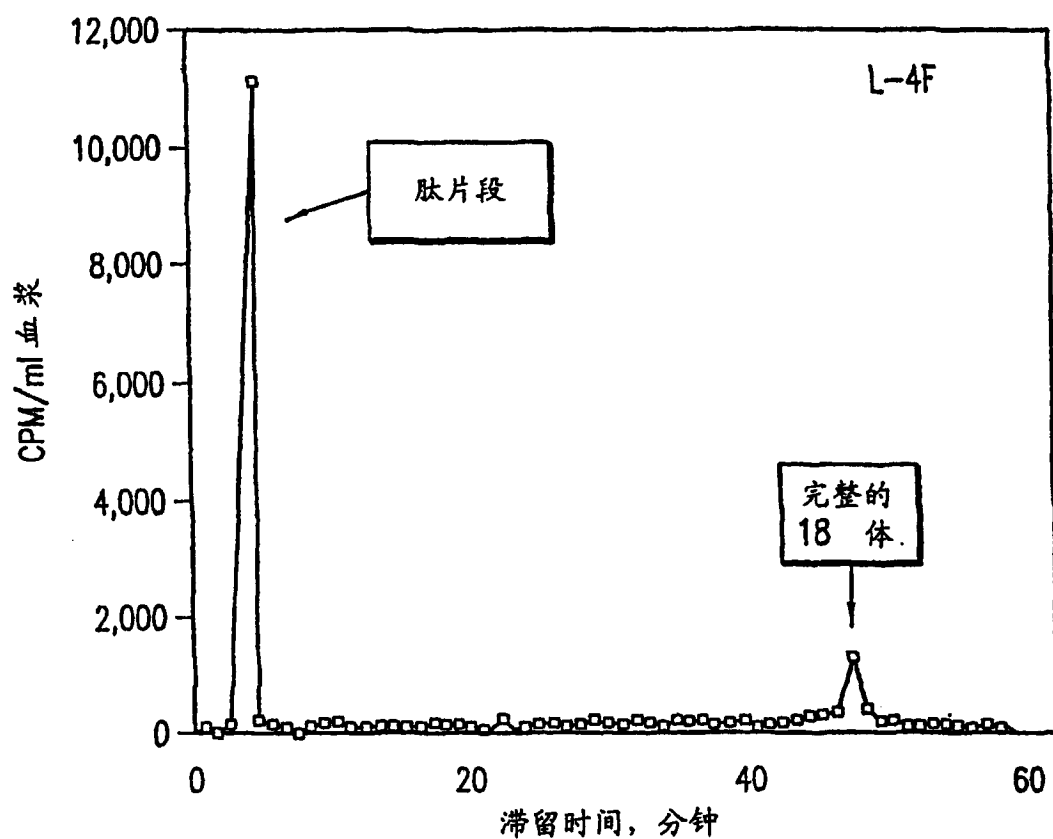


图 3A

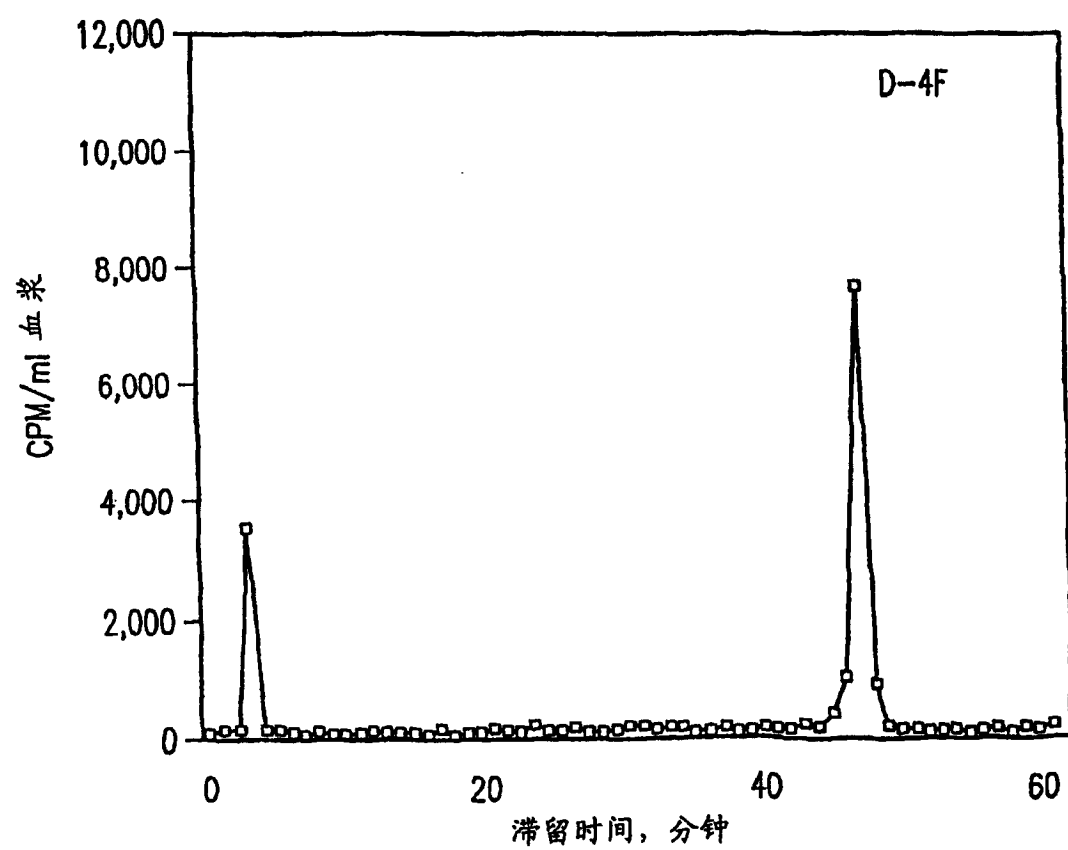


图 3B

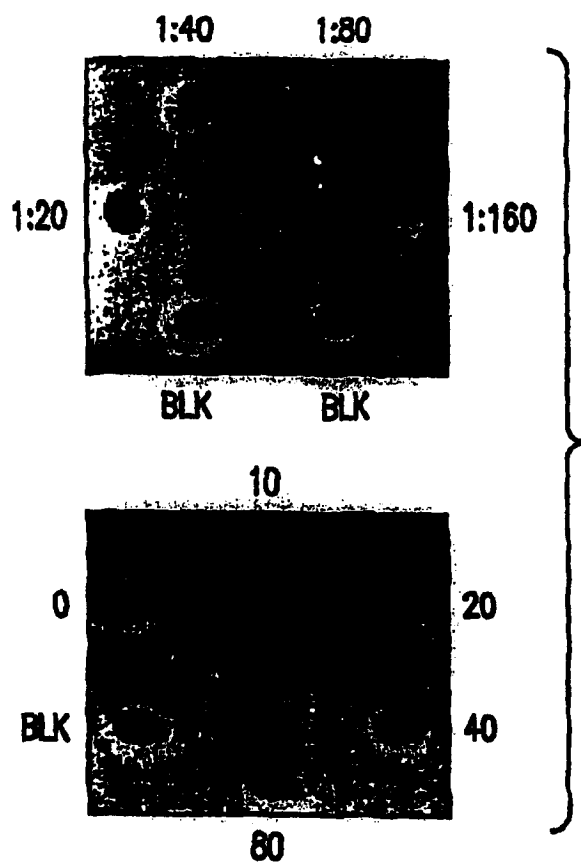


图 4

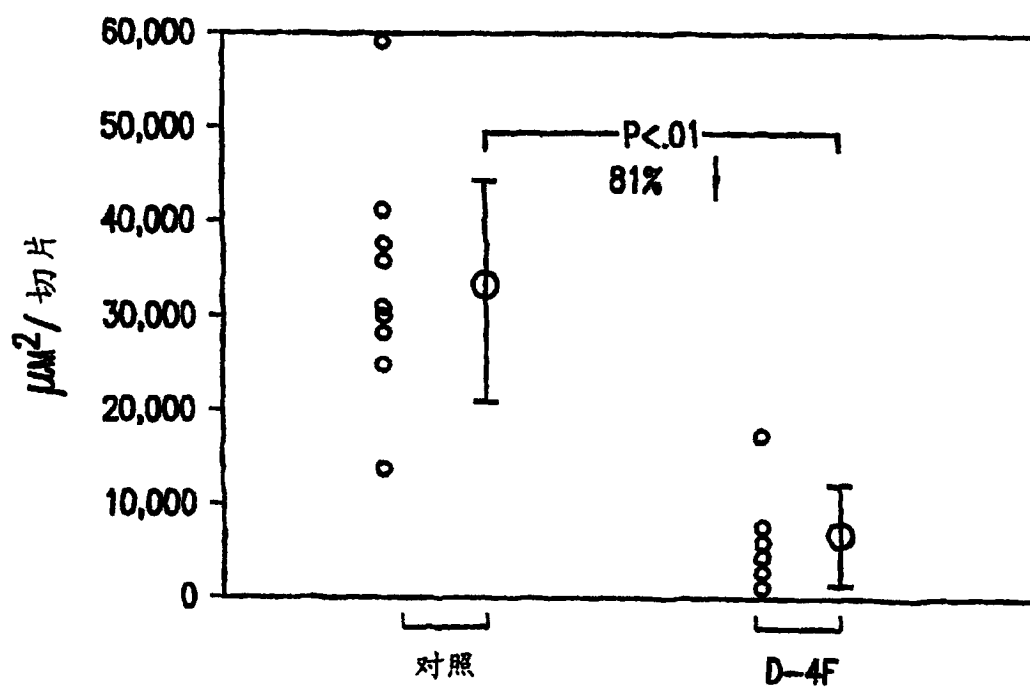


图 5

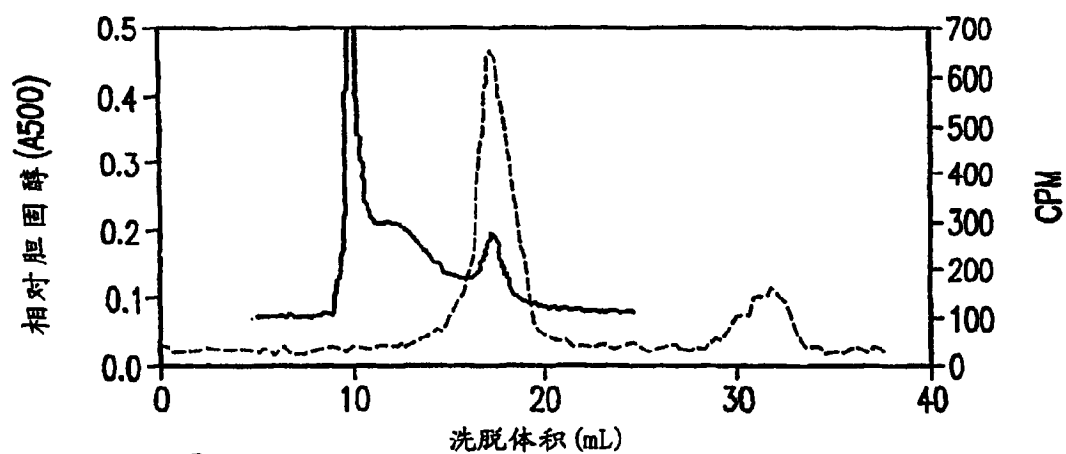


图 6A

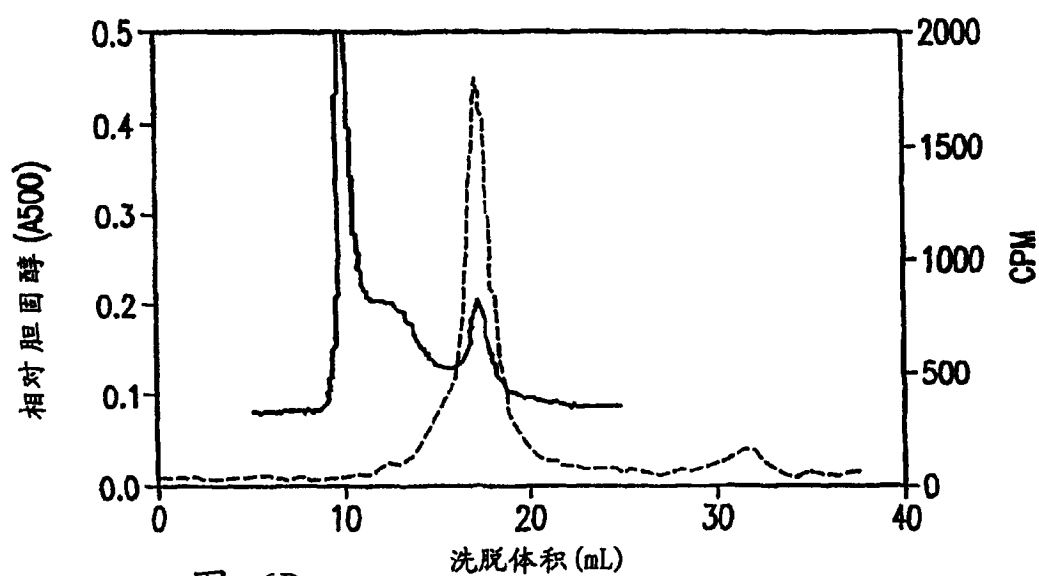


图 6B

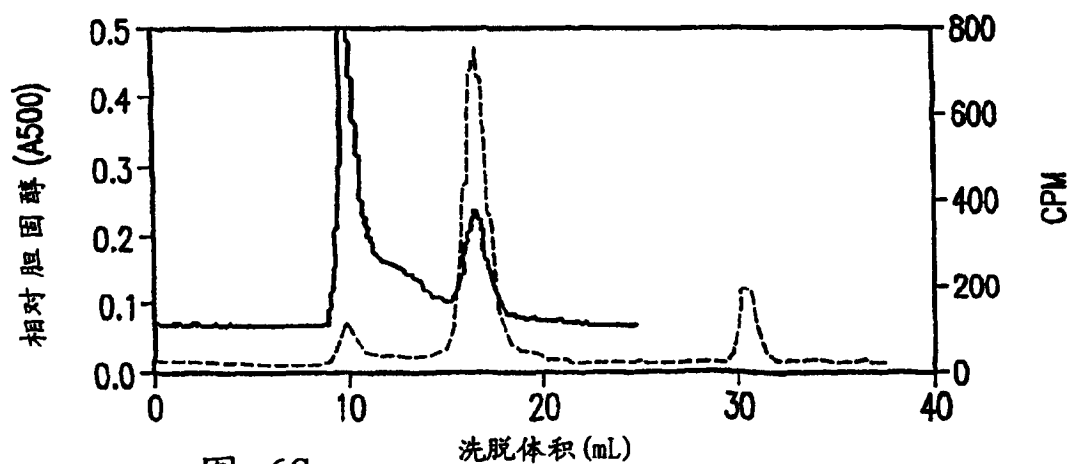


图 6C

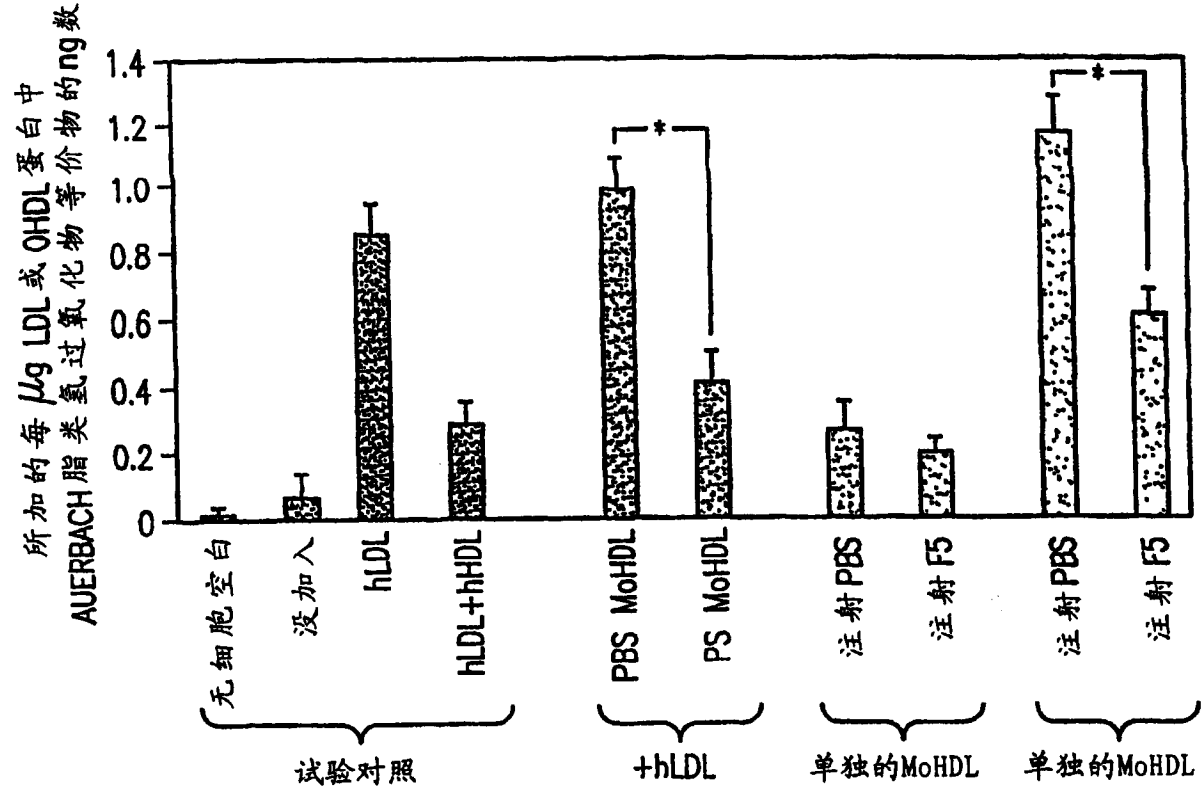


图 7A

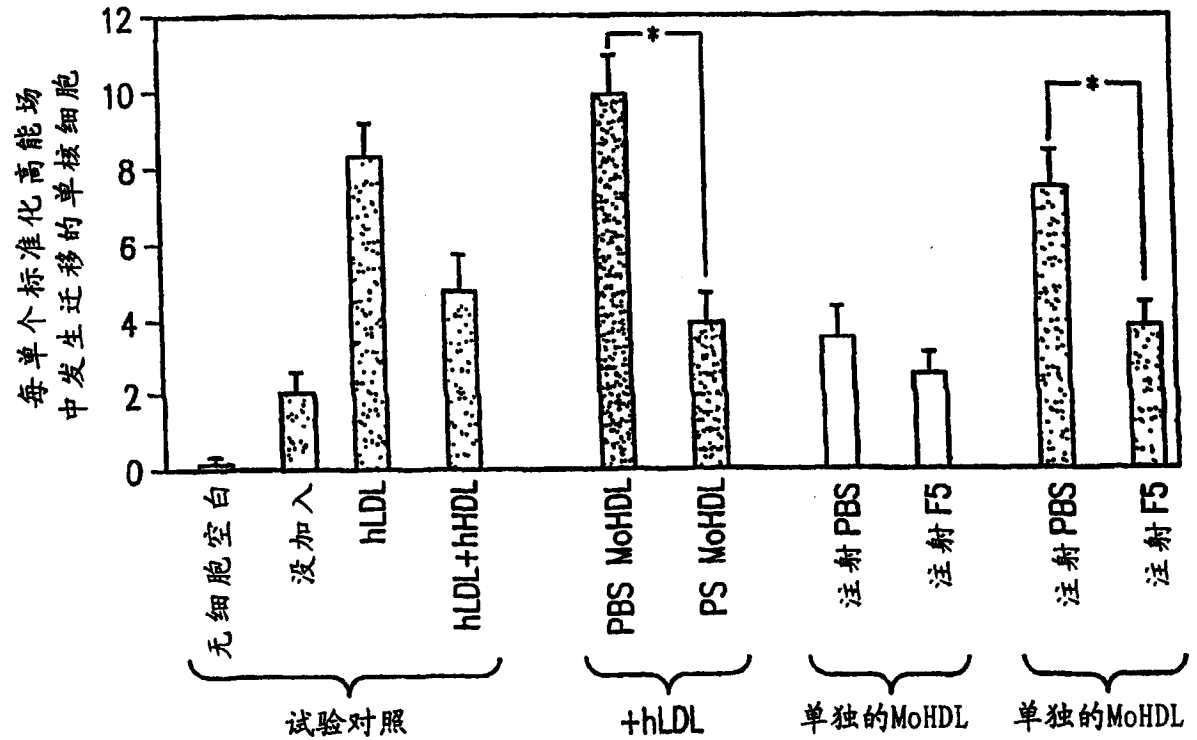


图 7B

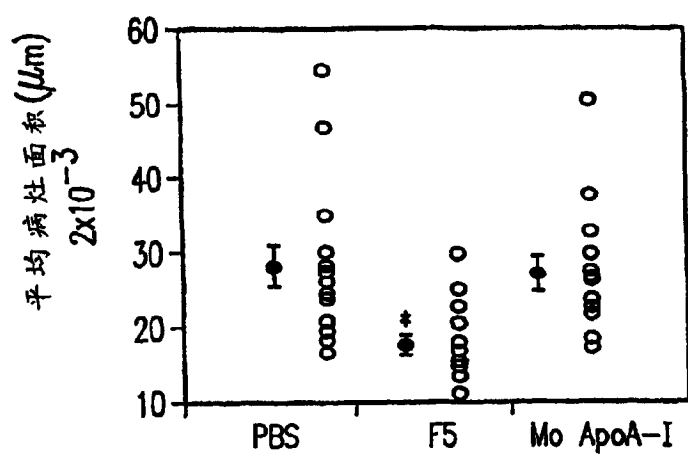


图 8

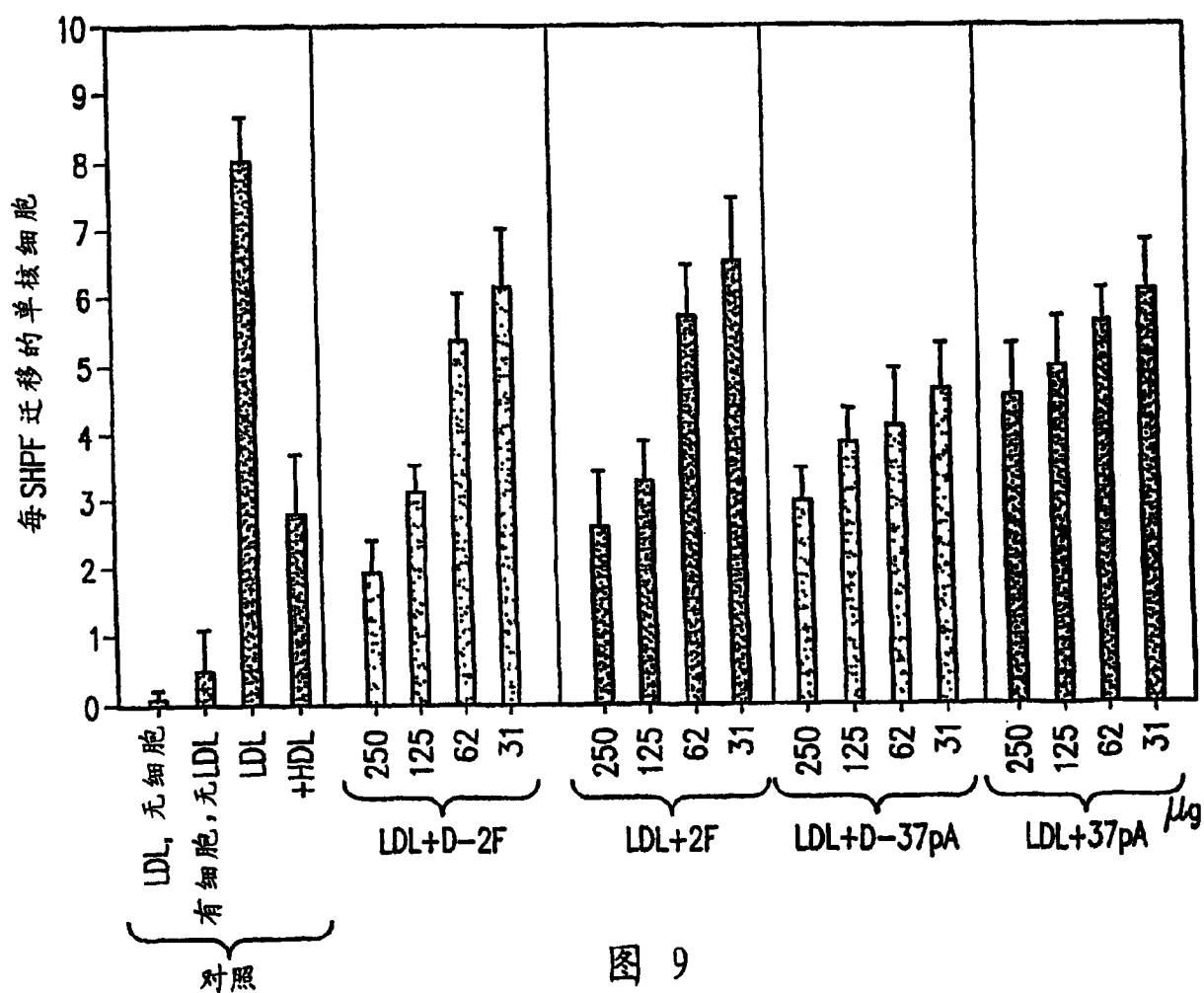


图 9

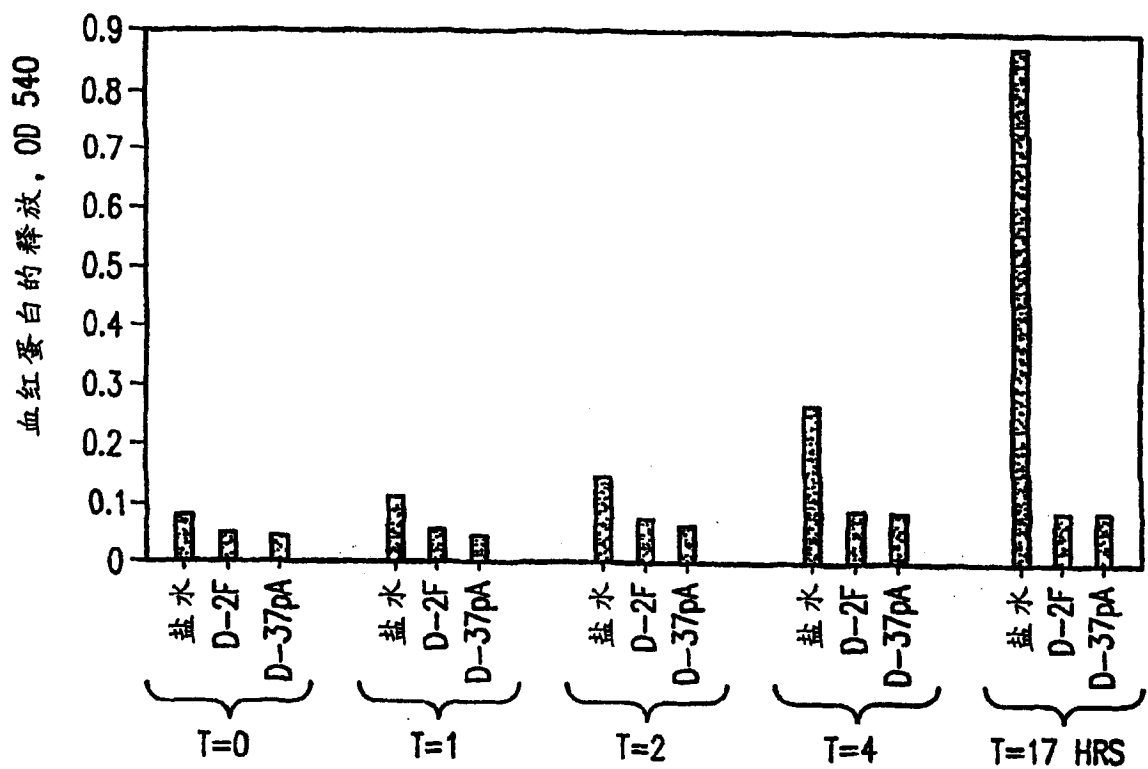


图 10A

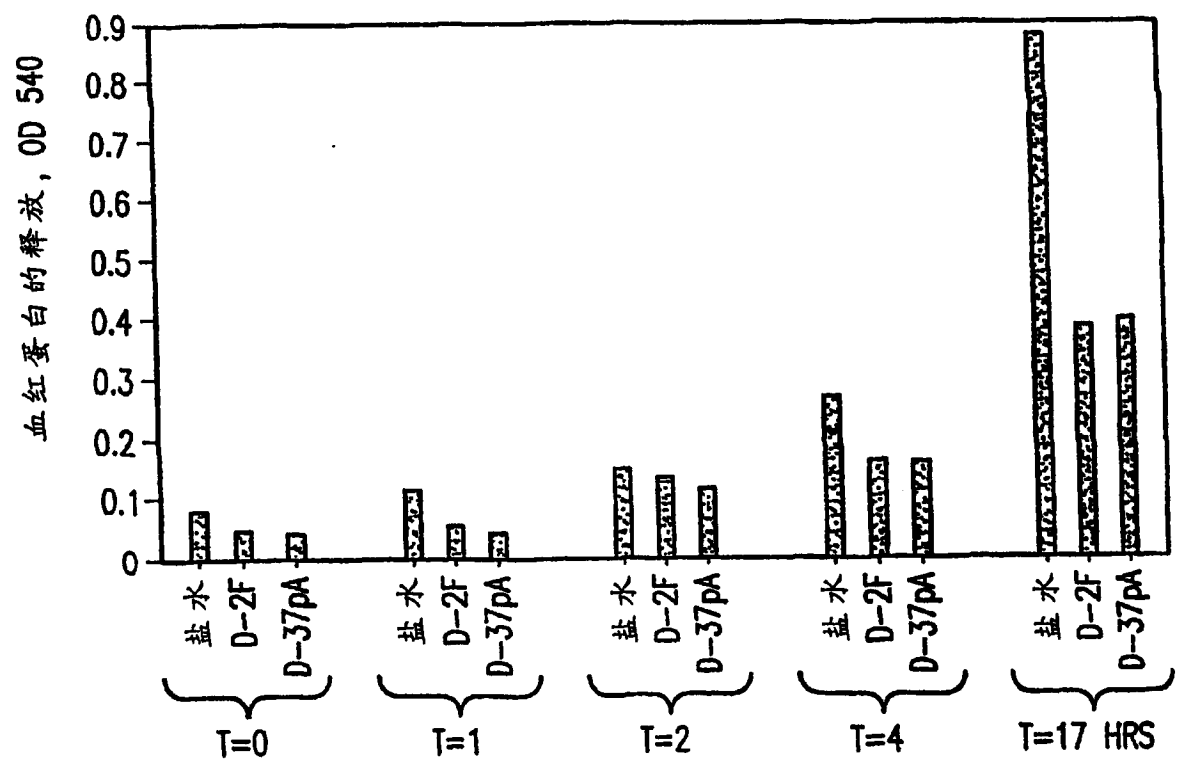


图 10B

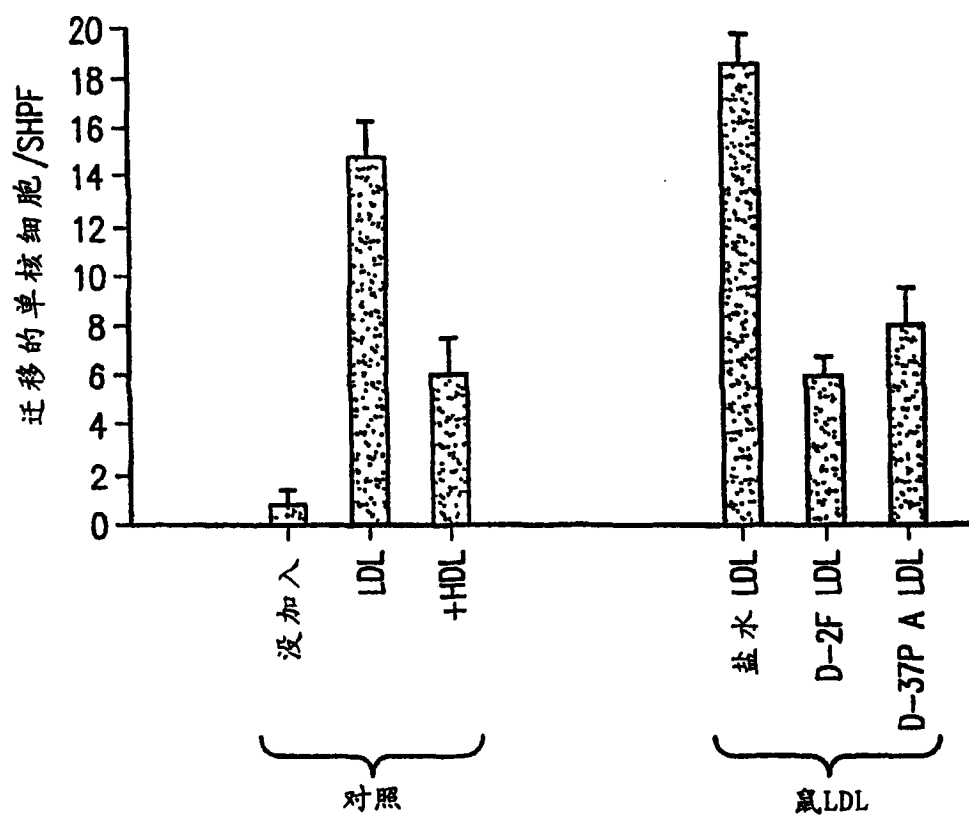


图 11

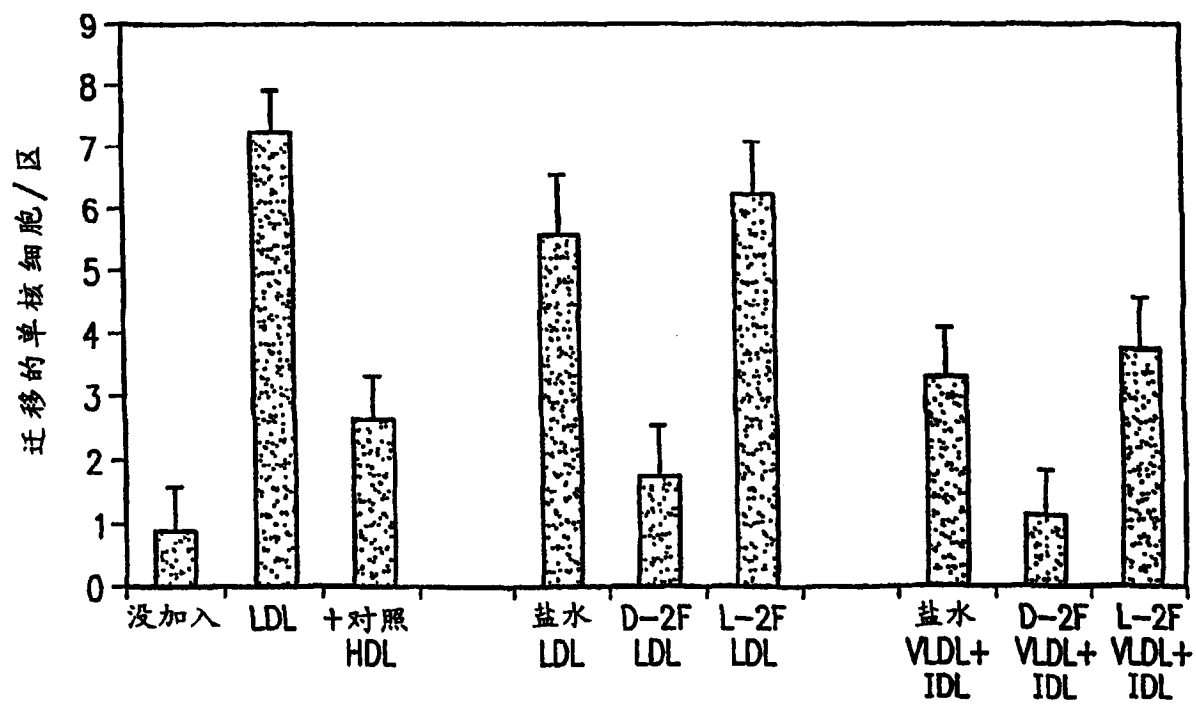


图 12

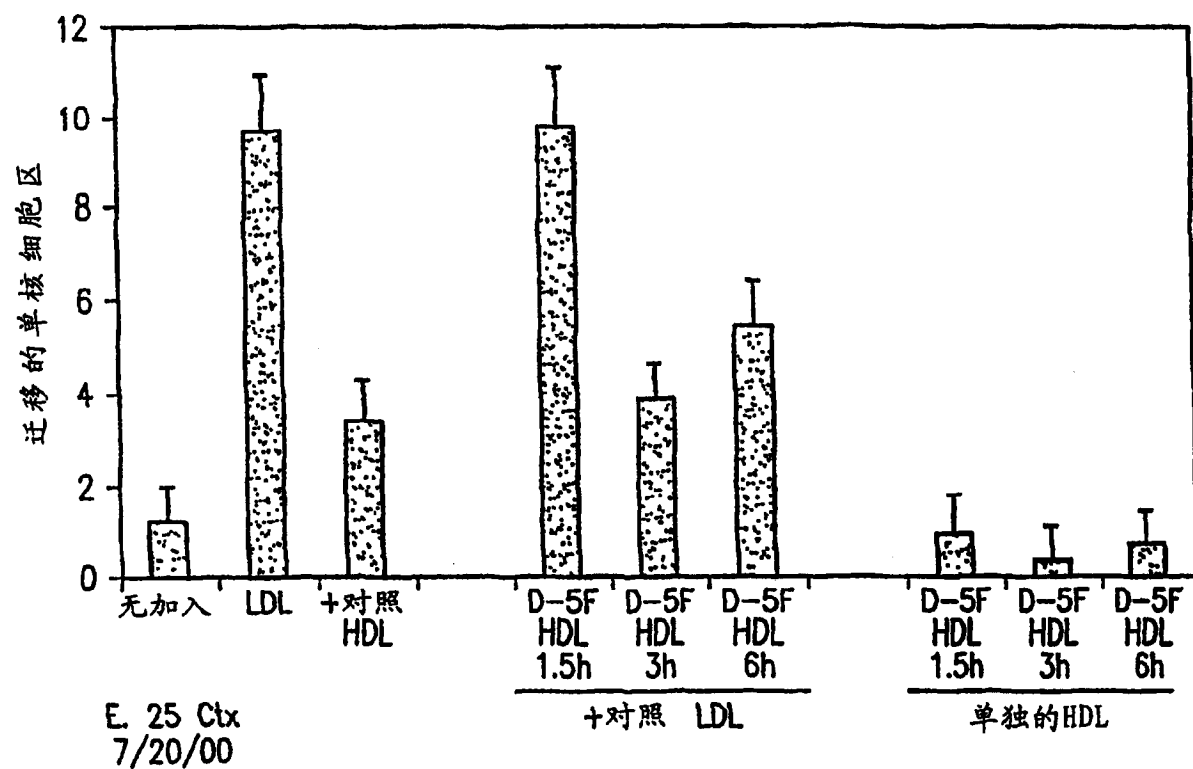


图 13A

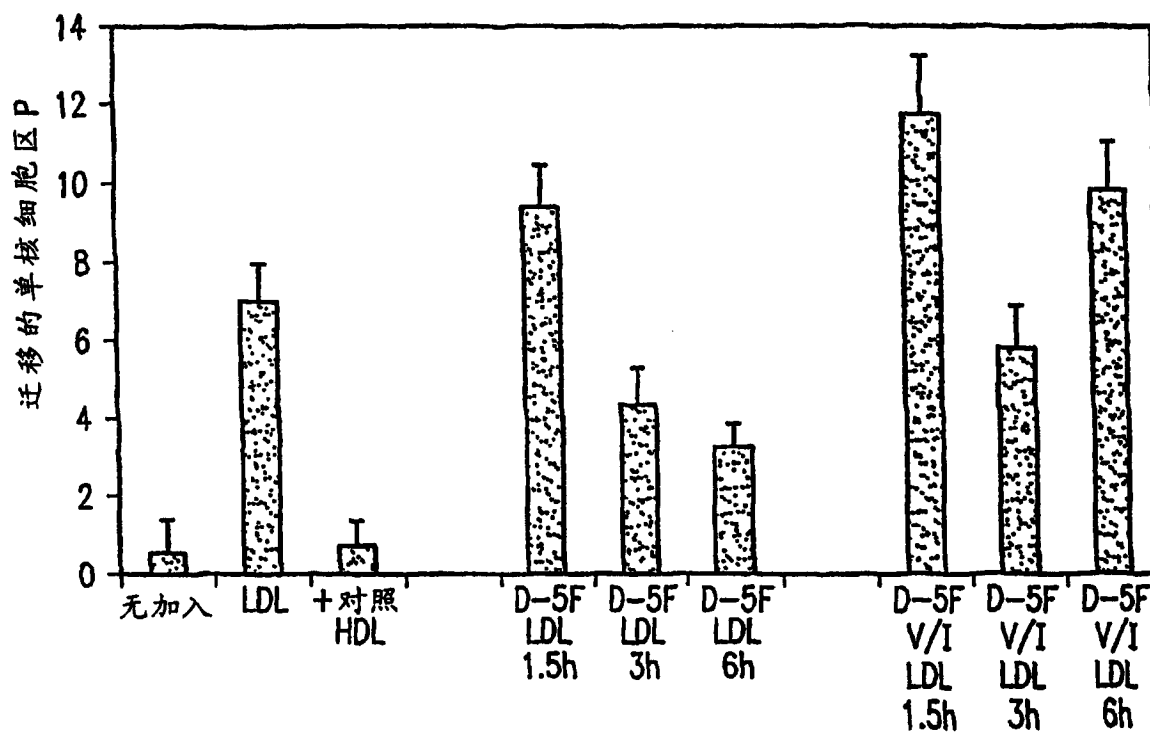


图 13B

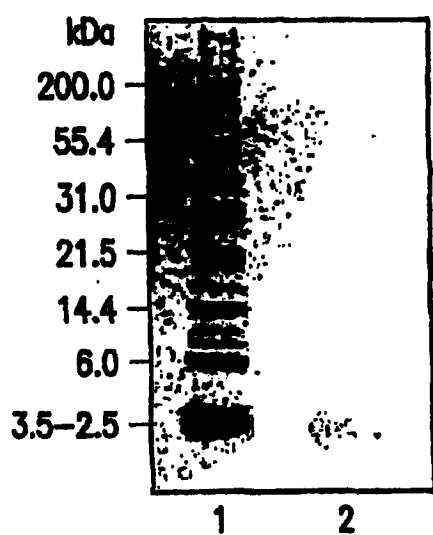


图 14A

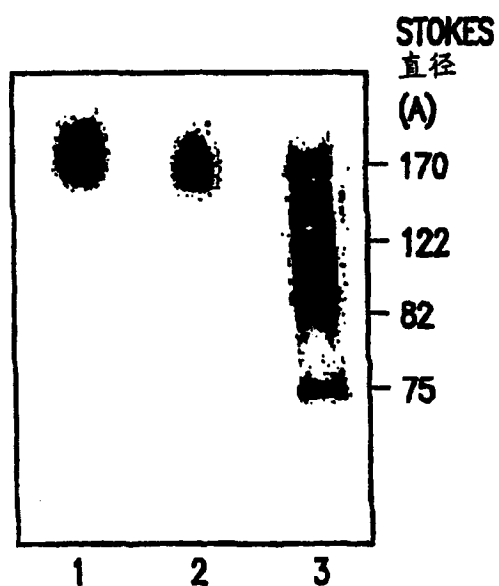


图 14B

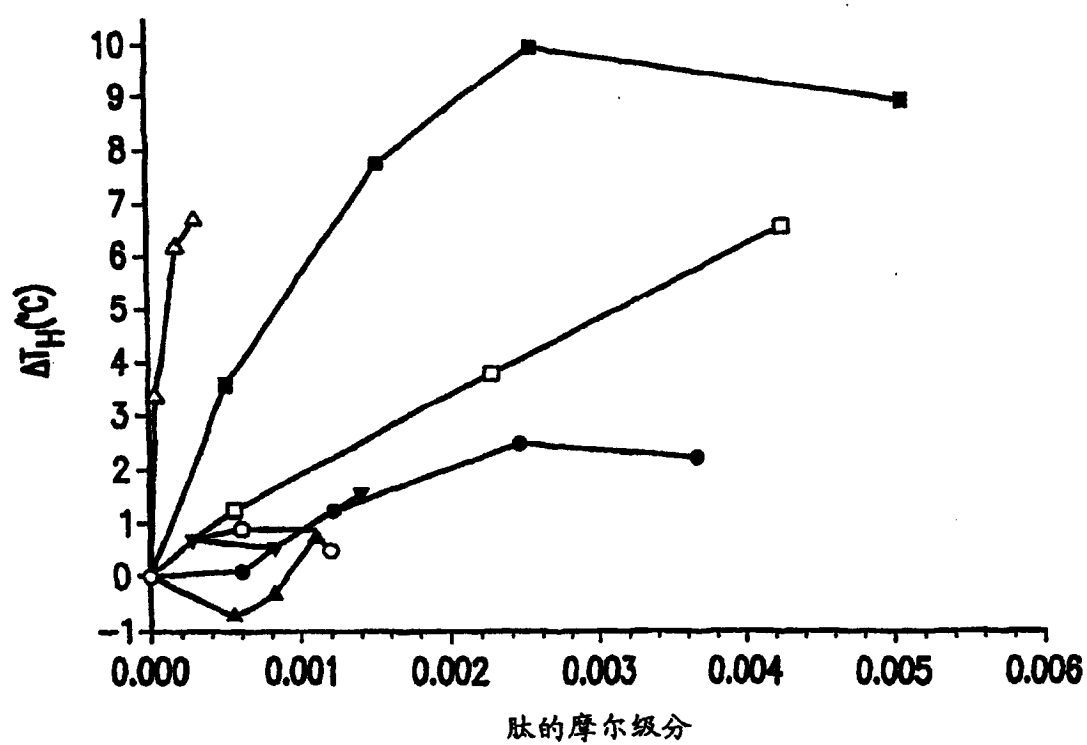


图 15

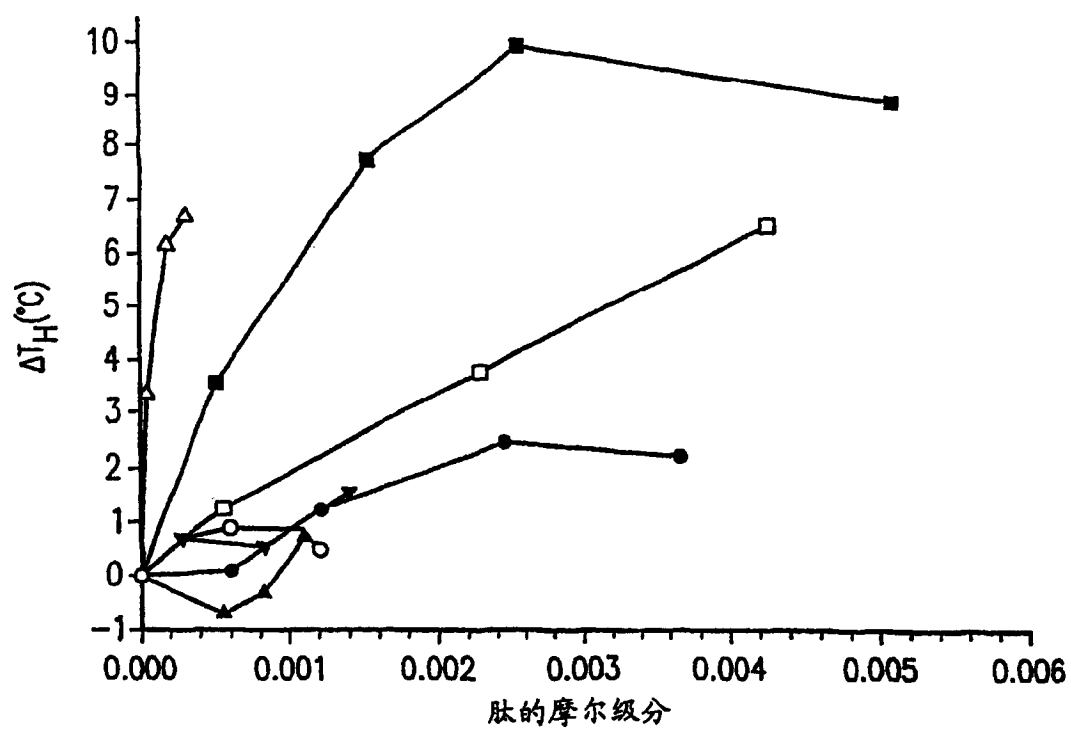


图 16

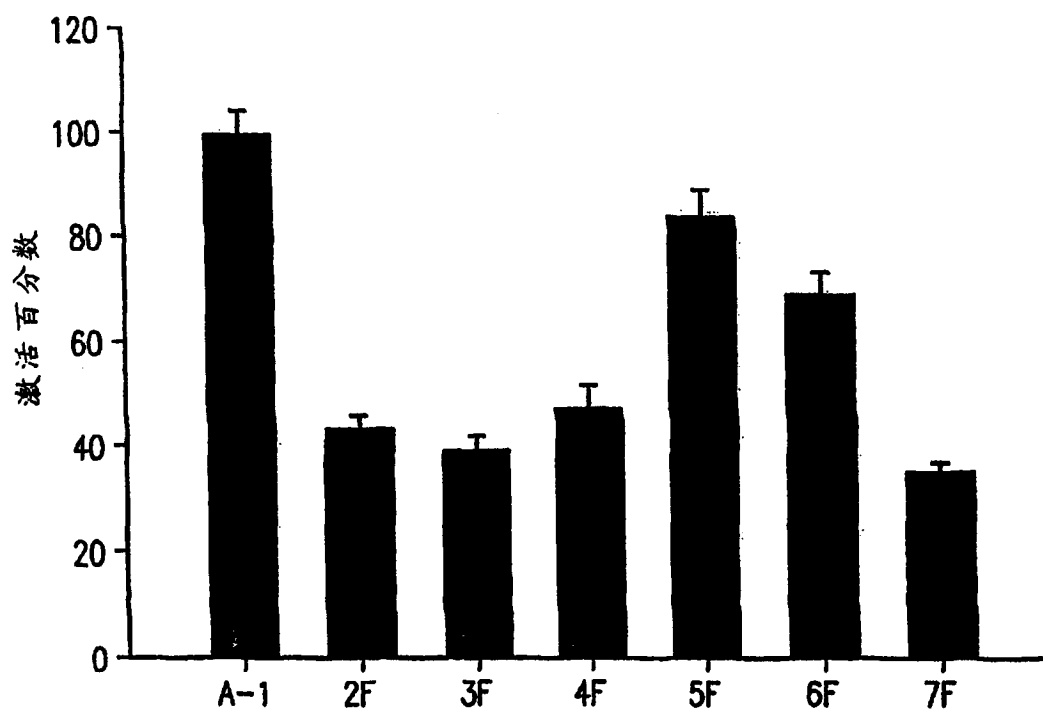


图 17

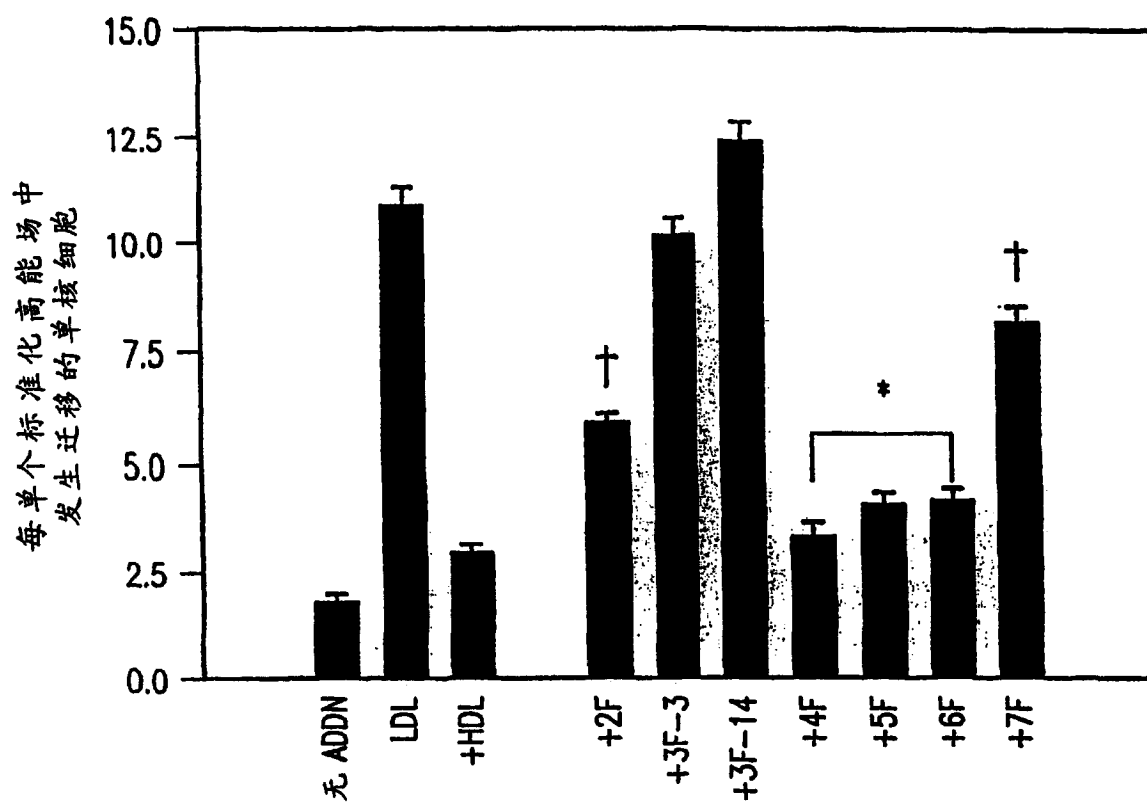


图 18

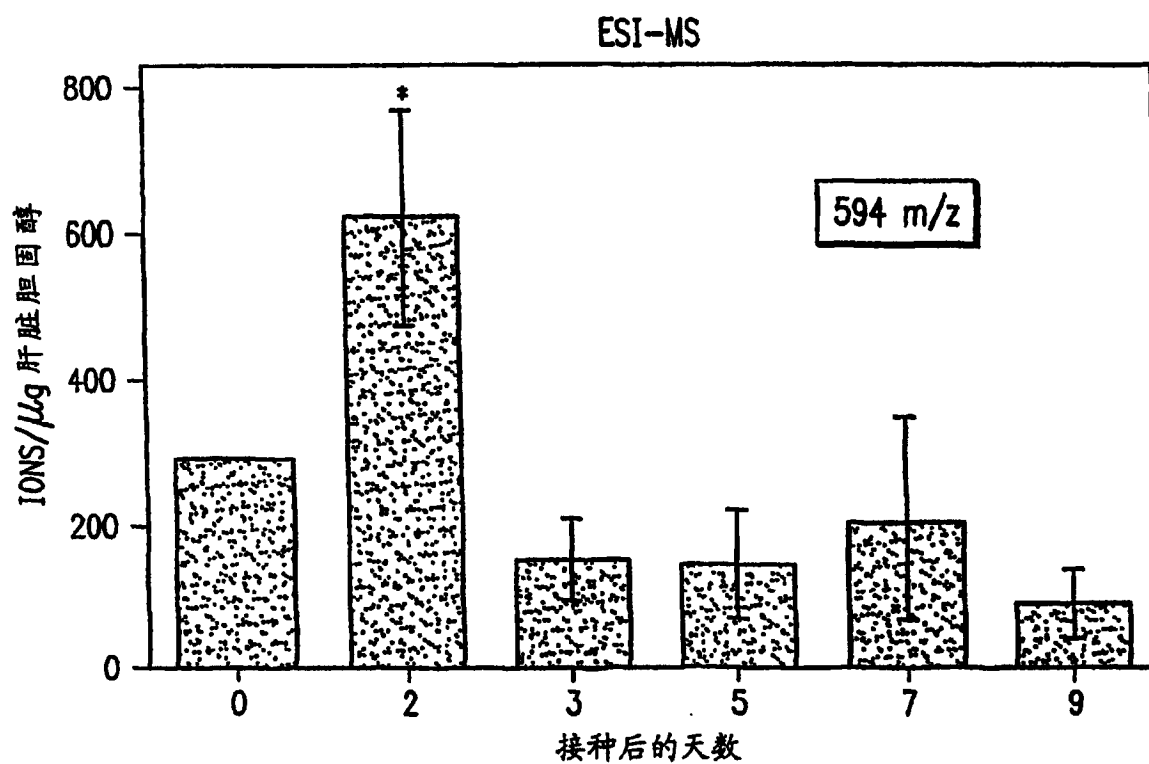


图 19

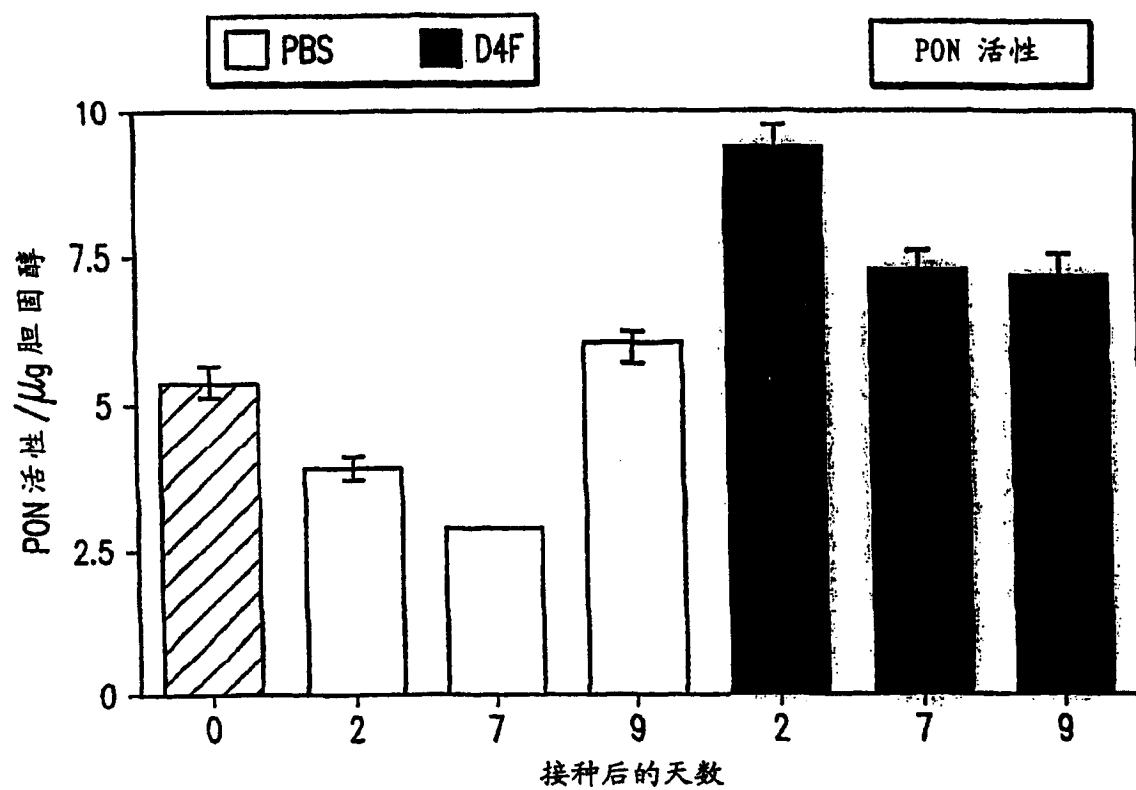


图 20

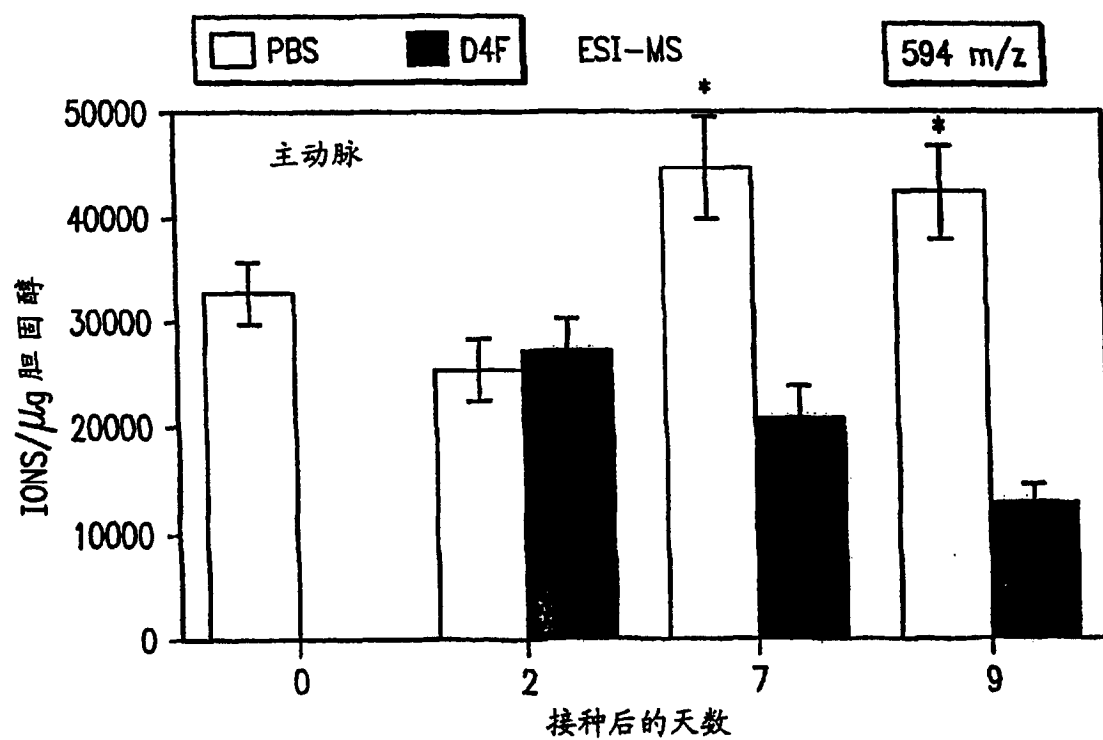


图 21

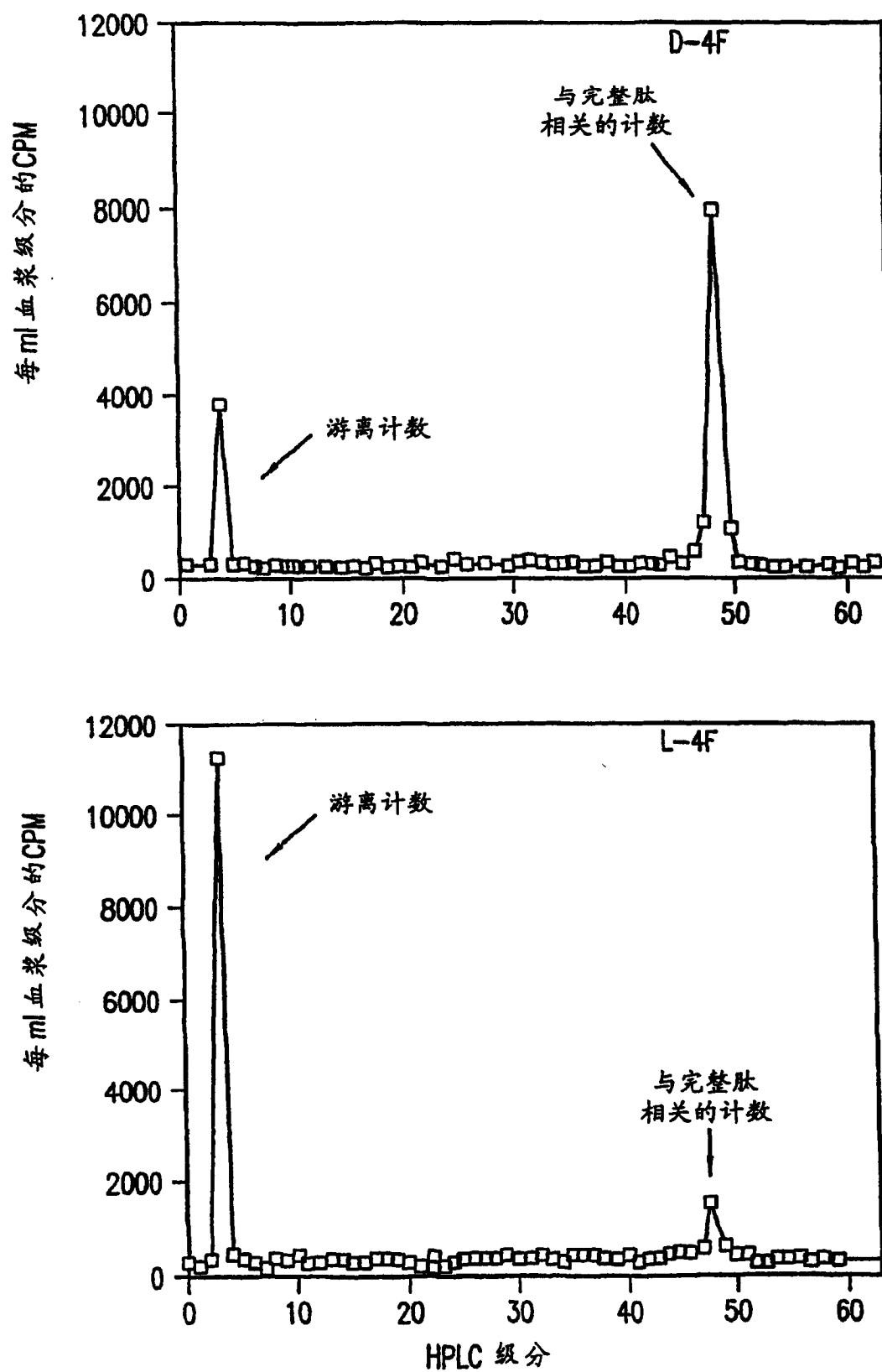
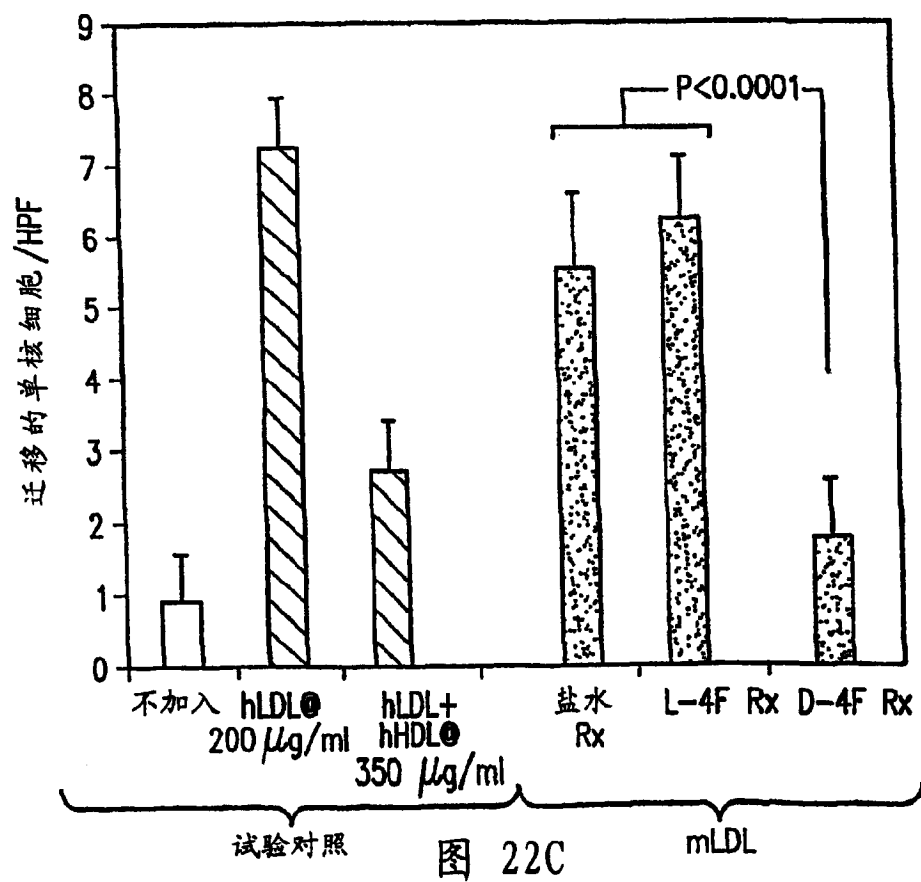
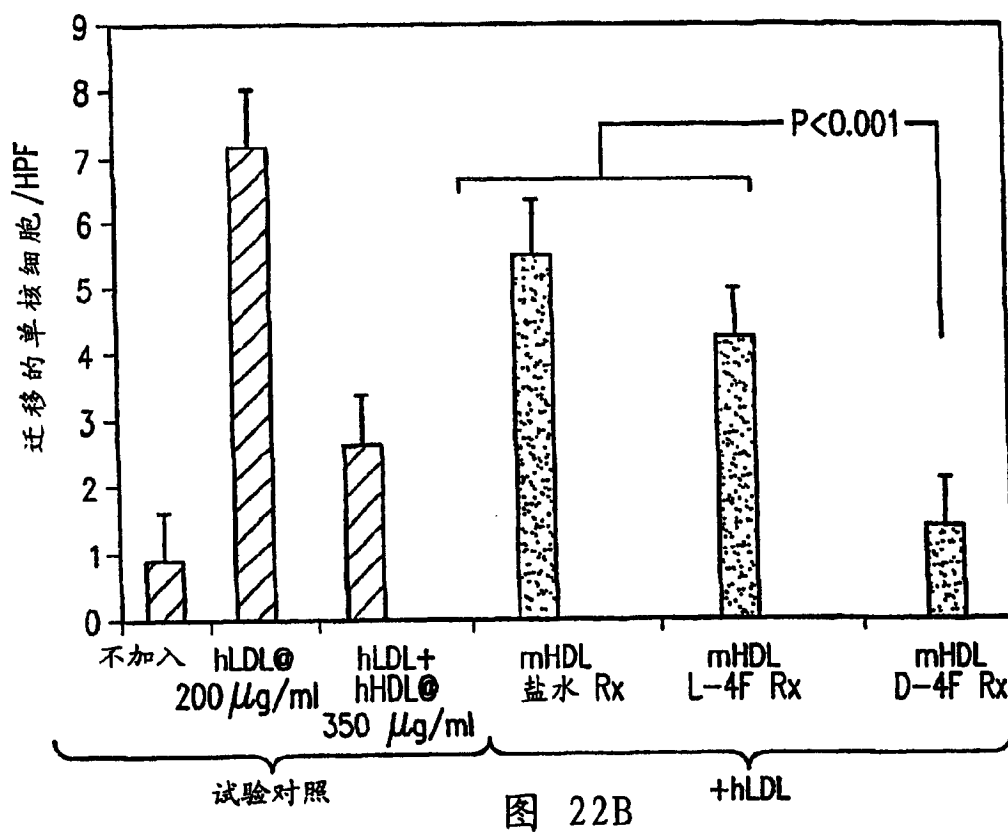


图 22A



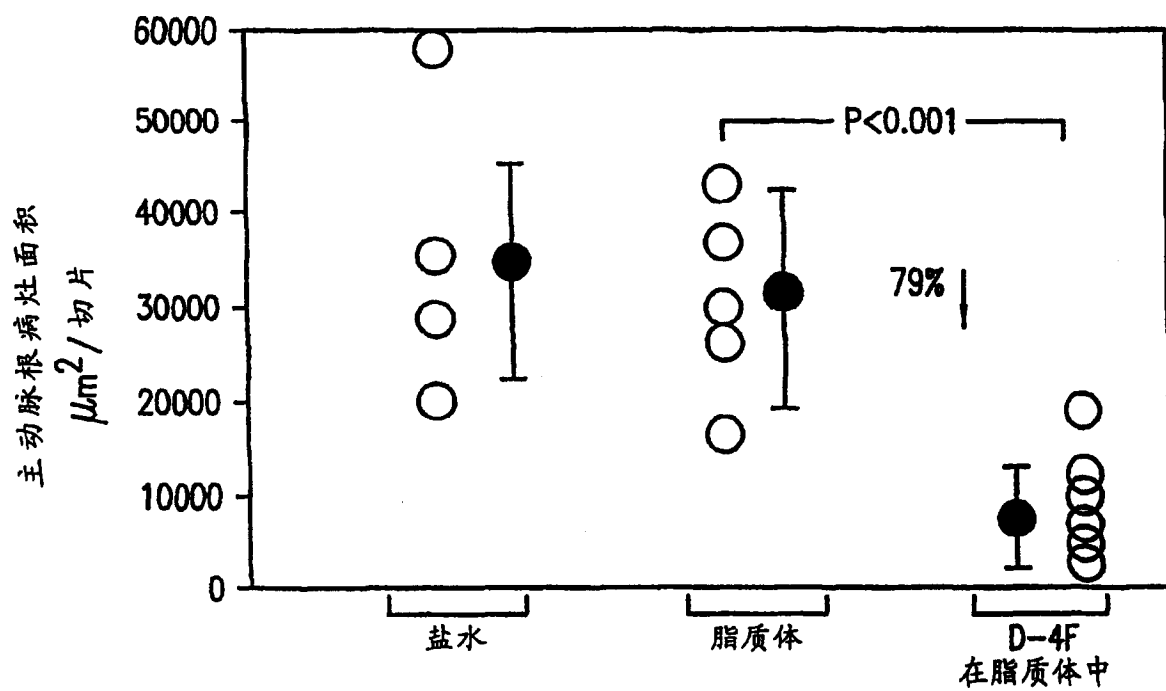


图 23

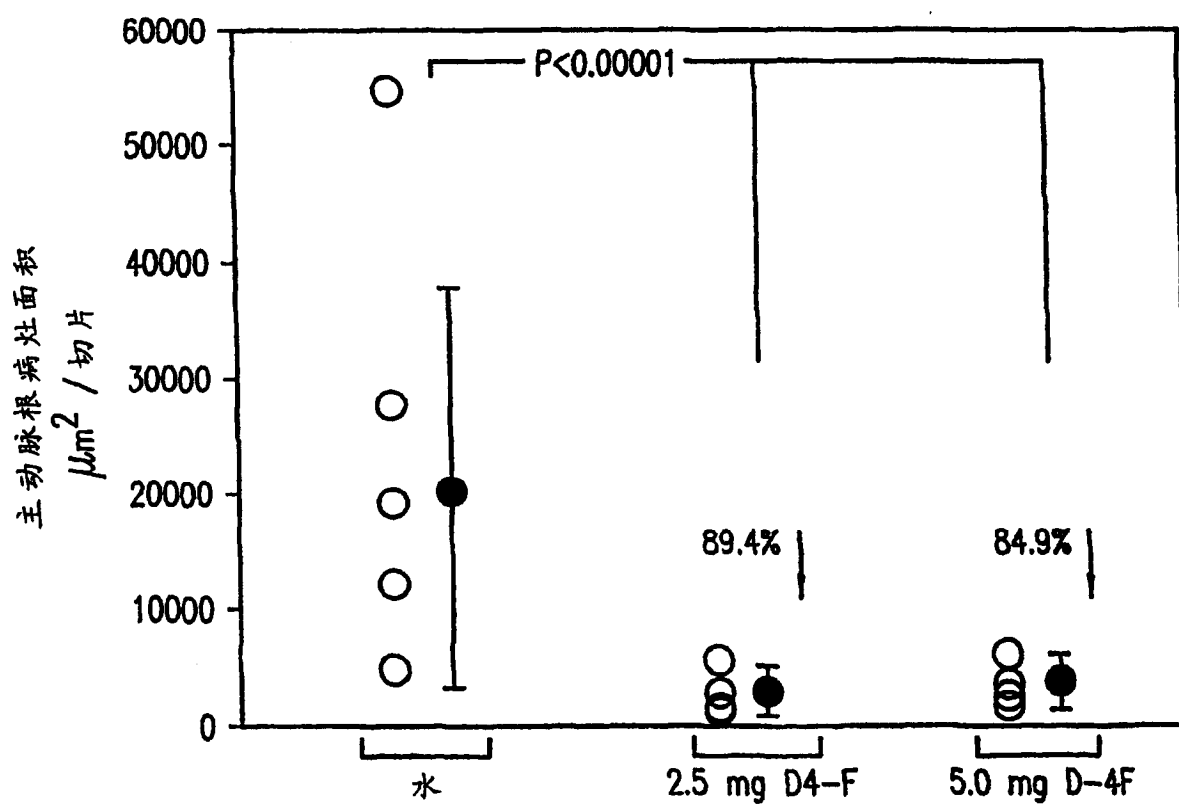


图 24