



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103796665 A

(43) 申请公布日 2014. 05. 14

(21) 申请号 201280025044. 9

(74) 专利代理机构 北京同达信恒知识产权代理有限公司 11291

(22) 申请日 2012. 03. 22

代理人 杨黎峰 石磊

(30) 优先权数据

61/467, 288 2011. 03. 24 US

61/474, 189 2011. 04. 11 US

61/480, 267 2011. 04. 28 US

(51) Int. Cl.

A61K 38/08 (2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2013. 11. 22

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2012/030167 2012. 03. 22

(87) PCT国际申请的公布数据

W02012/129427 EN 2012. 09. 27

(71) 申请人 康奈尔大学

地址 美国纽约

申请人 康肽德生物医药技术有限公司

(72) 发明人 黑兹尔·H·司徒

亚历山大·V·比尔克

D·特拉维斯·威尔逊

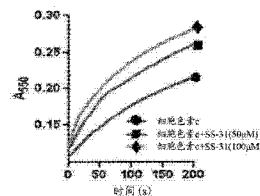
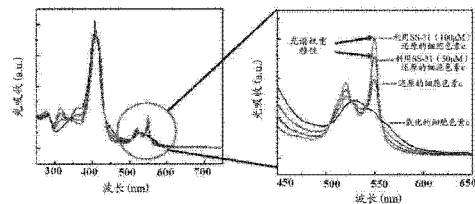
权利要求书3页 说明书55页 附图15页

(54) 发明名称

芳香族阳离子肽及其用途

(57) 摘要

本发明提供了芳香族阳离子肽组合物以及使用该组合物的方法。该方法包括在电子传输和电传导中使用所述芳香族阳离子肽。



1. 一种增加包含细胞色素 c 的样品中的细胞色素 c 还原的方法,所述方法包括使所述样品与有效量的肽 D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ 接触。

2. 一种增强包含细胞色素 c 的样品中的穿过细胞色素 c 的电子扩散的方法,所述方法包括使所述样品与有效量的肽 D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ 接触。

3. 一种诱导在包含细胞色素 c 的样品中的细胞色素 c 周围的 $\pi-\pi$ 相互作用的方法,所述方法包括使所述样品与有效量的肽 D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ 接触。

4. 一种传感器,包括:掺杂有一含量的肽 D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ 的细胞色素 c;和计量仪,所述计量仪用以测量由所述肽 D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ 的所述含量的变化引起的细胞色素 c 的特性的变化。

5. 根据权利要求 4 所述的传感器,其中,所述肽 D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ 的含量响应于细胞色素 c 的温度的变化和 / 或细胞色素 c 的 pH 的变化而改变。

6. 根据权利要求 4 所述的传感器,其中,所述特性为导电性,且所述计量仪包括与细胞色素 c 电连通的阳极和阴极。

7. 根据权利要求 4 所述的传感器,其中,所述特性为光致发光性,且所述计量仪包括光检测器,所述光检测器用以测量细胞色素 c 发出的光的强度的变化和 / 或细胞色素 c 发出的光的波长的变化。

8. 一种感测方法,包括测量掺杂有一含量的肽 D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ 的细胞色素 c 的特性的变化,该变化由所述肽 D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ 的所述含量的变化引起。

9. 根据权利要求 8 所述的方法,其中,所述肽 D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ 的含量响应于细胞色素 c 的温度的变化和 / 或细胞色素 c 的 pH 的变化而改变。

11. 根据权利要求 8 所述的方法,其中,所述特性为导电性、光致发光强度和光致发光波长中的至少一个。

12. 一种开关,包括:细胞色素 c;与上述细胞色素 c 连通的肽 D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ 的源;和致动器,所述致动器用以控制与上述细胞色素 c 连通的肽 D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ 的量。

13. 根据权利要求 11 所述的开关,其中,所述致动器控制细胞色素 c 的温度和 / 或细胞色素 c 的 pH。

14. 一种开关方法,包括改变与细胞色素 c 连通的肽 D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ 的含量。

15. 根据权利要求 13 所述的方法,其中,改变肽 D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ 的含量包括改变细胞色素 c 的温度和 / 或细胞色素 c 的 pH。

16. 一种发光元件,包括:掺杂有效量的肽 D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ 的细胞色素 c;和用以激励上述细胞色素 c 发光的源。

17. 一种发光方法,所述方法包括激励掺杂有有效量的肽 D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ 的细胞色素 c。

18. 根据权利要求 1-3 中的任一项所述的方法,其中,所述样品包括传感器部件、导体部件、开关部件或发光元件部件。

19. 一种生物传感器,包括掺杂有肽 D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ 的细胞色素 c。

20. 根据权利要求 19 所述的生物传感器,其中,掺杂有肽的细胞色素 c 包括电子流动至电极的中介物。

21. 根据权利要求 19 所述的生物传感器,其中,掺杂有肽的细胞色素 c 直接固定在所述电极上。

22. 根据权利要求 19 所述的生物传感器,其中,所述肽 D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ 和 / 或细胞色素 c 被固定在所述生物传感器内的表面上。

23. 根据权利要求 19 所述的生物传感器,其中,所述肽 D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ 和 / 或细胞色素 c 在所述生物传感器内是能够自由扩散的。

24. 一种检测样品中的基底的方法,包括:

a) 使所述样品与生物传感器接触,所述生物传感器包括:

i) 对所述基底特异性的氧化还原活性酶;

ii) 掺杂有肽 D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ 的细胞色素 c ;和

iii) 电极 ;和

b) 检测所述生物传感器内的电子流动。

25. 根据权利要求 24 所述的方法,其中,掺杂有肽的细胞色素 c 包括电子流动至电极的中介物。

26. 根据权利要求 24 所述的方法,其中,掺杂有肽的细胞色素 c 直接固定在所述电极上。

27. 根据权利要求 24 所述的方法,其中,所述肽 D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ 和 / 或细胞色素 c 被固定在所述生物传感器内的表面上。

28. 根据权利要求 24 所述的方法,其中,所述肽 D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ 和 / 或细胞色素 c 在所述生物传感器内是能够自由扩散的。

29. 一种用在环境污染物的生物修复中的组合物,包括表达一种或多种芳香族阳离子肽的重组细菌。

30. 根据权利要求 29 所述的组合物,其中,所述重组细菌包括编码所述一种或多种芳香族阳离子肽的核酸序列。

31. 根据权利要求 30 所述的组合物,其中,所述核酸序列在诱导型启动子的控制下进行表达。

32. 根据权利要求 30 所述的组合物,其中,所述核酸序列在组成型启动子的控制下进行表达。

33. 根据权利要求 30 所述的组合物,其中,所述核酸序列包括质粒 DNA。

34. 根据权利要求 30 所述的组合物,其中,所述核酸序列包括基因组插入物。

35. 根据权利要求 29 所述的组合物,其中,所述重组细菌源自表 7 中列出的细菌物种。

36. 一种用于环境污染物的生物修复的方法,包括:使包含环境污染物的材料与生物修复组合物接触,所述生物修复组合物包括表达一种或多种芳香族阳离子肽的重组细菌。

37. 根据权利要求 36 所述的方法,其中,所述环境污染物包括金属。

38. 根据权利要求 37 所述的方法,其中,所述金属包括 Sc、Ti、V、Cr、Mn、Fe、Co、Ni、Cu、

Zn、Y、Zr、Nb、Mo、Tc、Ru、Pd、Ag、Cd、Hf、Ta、W、Re、Os、Ir、Pt、Au、Hg、Rf、Db、Sg、Bh、Hs、Cn、Al、Ga、In、Sn、Ti、Pb 或 Bi。

39. 根据权利要求 36 所述的方法,其中,所述环境污染物包括非金属。

40. 根据权利要求 39 所述的方法,其中,所述非金属包括硫酸盐。

41. 根据权利要求 36 所述的方法,其中,所述环境污染物包括高氯酸盐。

42. 根据权利要求 41 所述的方法,其中,所述高氯酸盐包括 NH_4ClO_4 、 CsClO_4 、 LiClO_4 、 $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ 、 HClO_4 、 KClO_4 、 RbClO_4 、 AgClO_4 或 NaClO_4 。

43. 根据权利要求 36 所述的方法,其中,所述环境污染物包括硝酸盐。

44. 根据权利要求 43 所述的方法,其中,所述硝酸盐包括 HNO_3 、 LiNO_3 、 NaNO_3 、 KNO_3 、 RbNO_3 、 CsNO_3 、 $\text{Be}(\text{NO}_3)_2$ 、 $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ 、 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 、 $\text{Sr}(\text{NO}_3)_2$ 、 $\text{Ba}(\text{NO}_3)_2$ 、 $\text{Sc}(\text{NO}_3)_3$ 、 $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3$ 、 $\text{Mn}(\text{NO}_3)_2$ 、 $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ 、 $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ 、 $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$ 、 $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ 、 $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ 、 $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$ 、 $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ 、 $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ 、 $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 或者 $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 。

45. 根据权利要求 36 所述的方法,其中,所述环境污染物包括放射性核素。

46. 根据权利要求 45 所述的方法,其中,所述放射性核素包括铜系元素。

47. 根据权利要求 45 所述的方法,其中,所述放射性核素包括铀。

48. 根据权利要求 36 所述的方法,其中,所述环境污染物包括甲基叔丁基醚 MTBE、氯乙烯或者二氯乙烯。

49. 根据权利要求 36 所述的方法,其中,原位进行生物修复。

50. 根据权利要求 36 所述的方法,其中,异位进行生物修复。

51. 根据权利要求 36 所述的方法,其中,所述细菌包括编码所述一种或多种芳香族阳离子肽的核酸序列。

52. 根据权利要求 51 所述的方法,其中,所述核酸序列在诱导型启动子的控制下进行表达。

53. 根据权利要求 51 所述的方法,其中,所述核酸序列在组成型启动子的控制下进行表达。

54. 根据权利要求 51 所述的方法,其中,所述核酸序列包括质粒 DNA。

55. 根据权利要求 51 所述的方法,其中,所述核酸序列包括基因组插入物。

56. 根据权利要求 36 所述的方法,其中,所述重组细菌源自在表 7 中列出的细菌物种。

57. 根据权利要求 36-56 中任一项所述的方法,其中,所述芳香族阳离子肽包括 $\text{D-Arg-2}'$, $6'$ -Dmt-Lys-Phe-NH₂。

芳香族阳离子肽及其用途

技术领域

[0001] 本发明总体涉及芳香族阳离子肽组合物及其用在电子传递和导电中的方法。

发明内容

[0002] 在一个方面,本发明提供了一种芳香族阳离子肽或其药学上可接受的盐,例如醋酸盐或三氟醋酸盐。在一些实施方式中,该肽包括:

[0003] 1. 至少一个净正电荷;

[0004] 2. 最少三个氨基酸;

[0005] 3. 最多约 20 个氨基酸;

[0006] 4. 净正电荷的最小数目(p_m)和氨基酸残基的总数目(r)之间的关系,其中 $3p_m$ 为小于或等于 $r+1$ 的最大数;以及

[0007] 5. 芳香族基团的最小数目(a)和净正电荷的总数目(p_t)之间的关系,其中

[0008] 除了当 a 为 1 时, p_t 也可 1 外, $2a$ 为小于或等于 p_t+1 的最大数。

[0009] 在一些实施方式中,所述肽包括氨基酸序列 Tyr-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ (SS-01)、2',6'-Dmt-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ (SS-02)、Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ (SS-20) 或者 D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ (SS-31)。在一些实施方式中,所述肽包括下面氨基酸序列中的一个或多个氨基酸序列:

[0010] D-Arg-Dmt-Lys-Trp-NH₂;

[0011] D-Arg-Trp-Lys-Trp-NH₂;

[0012] D-Arg-Dmt-Lys-Phe-Met-NH₂;

[0013] H-D-Arg-Dmt-Lys(N^qMe)-Phe-NH₂;

[0014] H-D-Arg-Dmt-Lys-Phe(NMe)-NH₂;

[0015] H-D-Arg-Dmt-Lys(N^qMe)-Phe(NMe)-NH₂;

[0016] H-D-Arg(N^qMe)-Dmt(NMe)-Lys(N^qMe)-Phe(NMe)-NH₂;

[0017] D-Arg-Dmt-Lys-Phe-Lys-Trp-NH₂;

[0018] D-Arg-Dmt-Lys-Dmt-Lys-Trp-NH₂;

[0019] D-Arg-Dmt-Lys-Phe-Lys-Met-NH₂;

[0020] D-Arg-Dmt-Lys-Dmt-Lys-Met-NH₂;

[0021] H-D-Arg-Dmt-Lys-Phe-Sar-Gly-Cys-NH₂;

[0022] H-D-Arg-Ψ[CH₂-NH]-Dmt-Lys-Phe-NH₂;

[0023] H-D-Arg-Dmt-Ψ[CH₂-NH]Lys-Phe-NH₂;

[0024] H-D-Arg-Dmt-LysΨ[CH₂-NH]Phe-NH₂;和

[0025] H-D-Arg-Dmt-Ψ[CH₂-NH]Lys-Ψ[CH₂-NH]Phe-NH₂;

[0026] Lys-D-Arg-Tyr-NH₂,

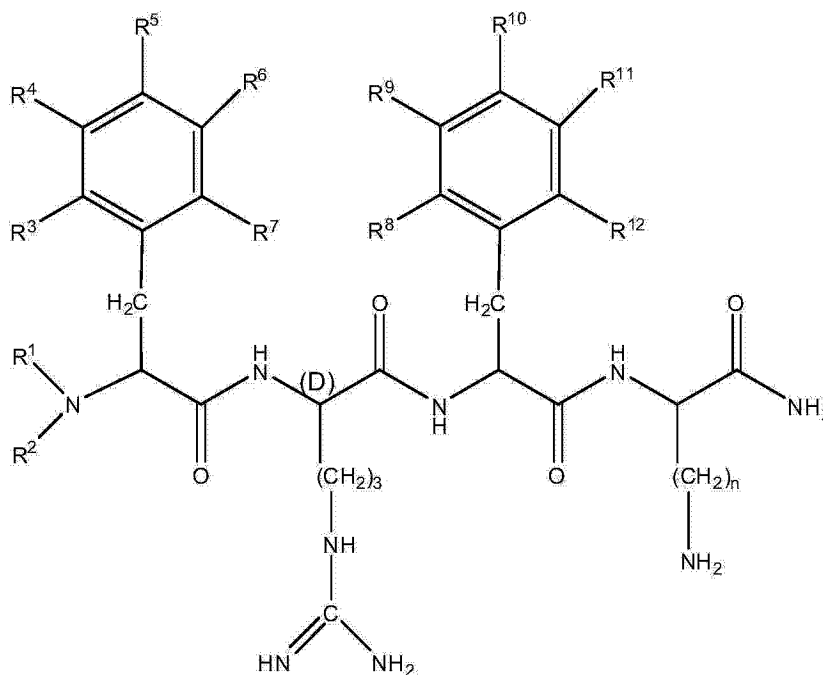
[0027] Tyr-D-Arg-Phe-Lys-NH₂

[0028] 2',6'-Dmt-D-Arg-Phe-Lys-NH₂

- [0029] Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂
- [0030] Phe-D-Arg-Dmt-Lys-NH₂
- [0031] D-Arg-2' 6' Dmt-Lys-Phe-NH₂
- [0032] H-Phe-D-Arg-Phe-Lys-Cys-NH₂
- [0033] Lys-D-Arg-Tyr-NH₂
- [0034] D-Tyr-Trp-Lys-NH₂,
- [0035] Trp-D-Lys-Tyr-Arg-NH₂,
- [0036] Tyr-His-D-Gly-Met,
- [0037] Tyr-D-Arg-Phe-Lys-Glu-NH₂,
- [0038] Met-Tyr-D-Lys-Phe-Arg,
- [0039] D-His-Glu-Lys-Tyr-D-Phe-Arg,
- [0040] Lys-D-Gln-Tyr-Arg-D-Phe-Trp-NH₂,
- [0041] Phe-D-Arg-Lys-Trp-Tyr-D-Arg-His,
- [0042] Gly-D-Phe-Lys-Tyr-His-D-Arg-Tyr-NH₂,
- [0043] Val-D-Lys-His-Tyr-D-Phe-Ser-Tyr-Arg-NH₂,
- [0044] Trp-Lys-Phe-D-Asp-Arg-Tyr-D-His-Lys,
- [0045] Lys-Trp-D-Tyr-Arg-Asn-Phe-Tyr-D-His-NH₂,
- [0046] Thr-Gly-Tyr-Arg-D-His-Phe-Trp-D-His-Lys,
- [0047] Asp-D-Trp-Lys-Tyr-D-His-Phe-Arg-D-Gly-Lys-NH₂,
- [0048] D-His-Lys-Tyr-D-Phe-Glu-D-Asp-D-His-D-Lys-Arg-Trp-NH₂,
- [0049] Ala-D-Phe-D-Arg-Tyr-Lys-D-Trp-His-D-Tyr-Gly-Phe,
- [0050] Tyr-D-His-Phe-D-Arg-Asp-Lys-D-Arg-His-Trp-D-His-Phe,
- [0051] Phe-Phe-D-Tyr-Arg-Glu-Asp-D-Lys-Arg-D-Arg-His-Phe-NH₂,
- [0052] Phe-Tyr-Lys-D-Arg-Trp-His-D-Lys-D-Lys-Glu-Arg-D-Tyr-Thr,
- [0053] Tyr-Asp-D-Lys-Tyr-Phe-D-Lys-D-Arg-Phe-Pro-D-Tyr-His-Lys,
- [0054] Glu-Arg-D-Lys-Tyr-D-Val-Phe-D-His-Trp-Arg-D-Gly-Tyr-Arg-D-Met-NH₂,
- [0055] Arg-D-Leu-D-Tyr-Phe-Lys-Glu-D-Lys-Arg-D-Trp-Lys-D-Phe-Tyr-D-Arg-Gly,
- [0056] D-Glu-Asp-Lys-D-Arg-D-His-Phe-Phe-D-Val-Tyr-Arg-Tyr-D-Tyr-Arg-His-Phe-NH₂,
- [0057] Asp-Arg-D-Phe-Cys-Phe-D-Arg-D-Lys-Tyr-Arg-D-Tyr-Trp-D-His-Tyr-D-Phe-Lys-Phe,
- [0058] His-Tyr-D-Arg-Trp-Lys-Phe-D-Asp-Ala-Arg-Cys-D-Tyr-His-Phe-D-Lys-Tyr-His-Ser-NH₂,
- [0059] Gly-Ala-Lys-Phe-D-Lys-Glu-Arg-Tyr-His-D-Arg-D-Arg-Asp-Tyr-Trp-D-His-Trp-His-D-Lys-Asp, 和
- [0060] Thr-Tyr-Arg-D-Lys-Trp-Tyr-Glu-Asp-D-Lys-D-Arg-His-Phe-D-Tyr-Gly-Val-Ile-D-His-Arg-Tyr-Lys-NH₂。
- [0061] 在一些实施方式中,“Dmt”指 2', 6' - 二甲基酪氨酸(2' 6' -Dmt)。在一些实施方式中,“Dmt”指 3', 5' - 二甲基酪氨酸(3' 5' -Dmt)。

[0062] 在一个实施方式中,该肽由式 I 定义:

[0063]

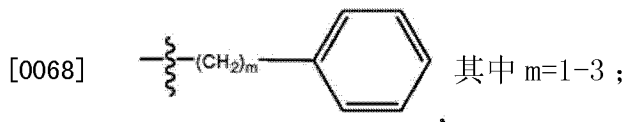


[0064] 其中, R¹ 和 R² 各独立地选自:

[0065] (i) 氢;

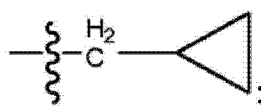
[0066] (ii) 直链的或支链的 C₁-C₆ 的烷基;

[0067] (iii)



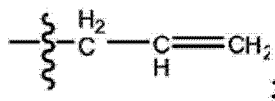
[0069] (iv)

[0070]



[0071] (v)

[0072]



[0073] R³, R⁴, R⁵, R⁶, R⁷, R⁸, R⁹, R¹⁰, R¹¹ 和 R¹² 各独立地选自:

[0074] (i) 氢;

[0075] (ii) 直链的或支链的 C₁-C₆ 的烷基;

[0076] (iii) C₁-C₆ 的烷氧基;

[0077] (iv) 氨基;

[0078] (v) C₁-C₄ 的烷基氨基;

[0079] (vi) C₁-C₄ 的二烷基氨基;

[0080] (vii) 硝基；

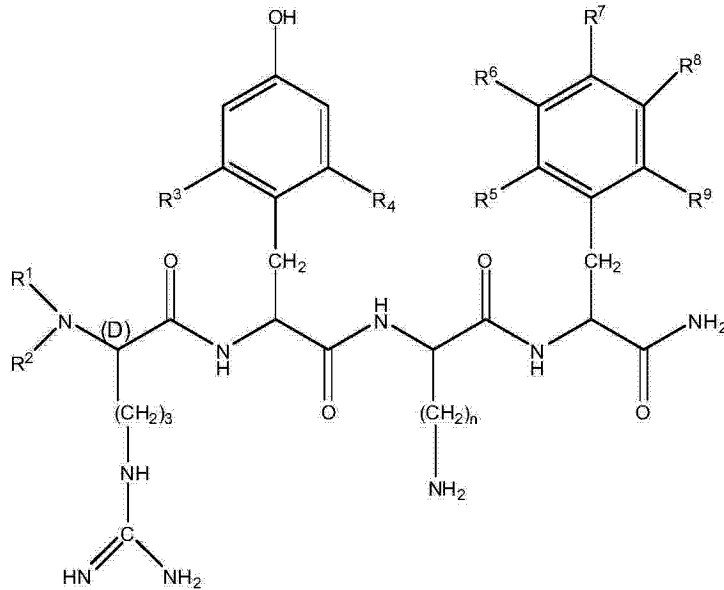
[0081] (viii) 羟基；

[0082] (ix) 卤素，其中“卤素”包括氯、氟、溴和碘；且 n 为 1 到 5 的整数。

[0083] 在特定的实施方式中， R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 、 R^{10} 、 R^{11} 和 R^{12} 全为氢；且 n 为 4。在另一实施方式中， R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 和 R^{11} 全为氢； R^8 和 R^{12} 为甲基； R^{10} 为羟基；且 n 为 4。

[0084] 在一个实施方式中，该肽由式 II 定义：

[0085]

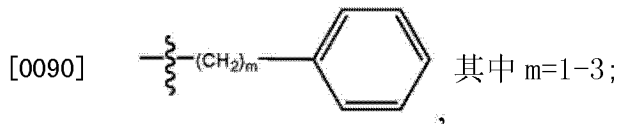


[0086] 其中， R^1 和 R^2 各独立地选自：

[0087] (i) 氢；

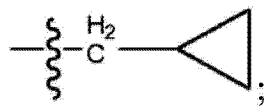
[0088] (ii) 直链的或支链的 C_1 - C_6 的烷基；

[0089] (iii)



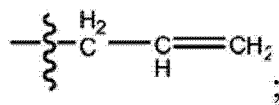
[0091] (iv)

[0092]



[0093] (v)

[0094]



[0095] R^3 和 R^4 各独立地选自：

[0096] (i) 氢；

- [0097] (ii) 直链的或支链的 C_1-C_6 的烷基；
- [0098] (iii) C_1-C_6 的烷氧基；
- [0099] (iv) 氨基；
- [0100] (v) C_1-C_4 的烷基氨基；
- [0101] (vi) C_1-C_4 的二烷基氨基；
- [0102] (vii) 硝基；
- [0103] (viii) 羟基；
- [0104] (ix) 卤素，其中“卤素”包括氯、氟、溴和碘；
- [0105] R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 和 R^9 各独立地选自：
- [0106] (i) 氢；
- [0107] (ii) 直链的或支链的 C_1-C_6 的烷基；
- [0108] (iii) C_1-C_6 的烷氧基；
- [0109] (iv) 氨基；
- [0110] (v) C_1-C_4 的烷基氨基；
- [0111] (vi) C_1-C_4 的二烷基氨基；
- [0112] (vii) 硝基；
- [0113] (viii) 羟基；
- [0114] (ix) 卤素，其中“卤素”包括氯、氟、溴和碘；以及 n 为 1 到 5 的整数。
- [0115] 在特定的实施方式中， R^1 和 R^2 为氢； R^3 和 R^4 为甲基； R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 和 R^9 全是氢；且 n 为 4。
- [0116] 在一个实施方式中，芳香族阳离子肽具有交替的芳香族氨基酸和阳离子氨基酸的核心结构基元。例如，所述肽可为由下列给出的式 III 至式 VI 中的任一式所定义的四肽：
- [0117] 芳香族的 - 阳离子的 - 芳香族的 - 阳离子的 (式 III)
- [0118] 阳离子的 - 芳香族的 - 阳离子的 - 芳香族的 (式 IV)
- [0119] 芳香族的 - 芳香族的 - 阳离子的 - 阳离子的 (式 V)
- [0120] 阳离子的 - 阳离子的 - 芳香族的 - 芳香族的 (式 VI)
- [0121] 其中，芳香族的氨基酸为选自以下物质的残基：Phe (F)、Tyr (Y)、Trp (W) 和环己基丙氨酸 (Cha)；而阳离子的氨基酸为选自 Arg (R)、Lys (K)、正亮氨酸 (Nle) 和 2-氨基 - 庚酸 (Ahe) 的残基。
- [0122] 在一些实施方式中，在文中描述的芳香族阳离子肽包括的氨基酸都为左旋 (L) 氨基酸。
- [0123] 在一些方面，本公开提供了涉及细胞色素 c 的方法。在一些实施方式中，该方法涉及增强包含细胞色素 c 的样品中的细胞色素 c 还原，包括使所述样品与有效量的芳香族阳离子肽或其盐 (例如醋酸盐或三氟醋酸盐) 接触。另外地或可替代地，在一些实施方式中，该方法涉及增强在包含细胞色素 c 的样品中的经由细胞色素 c 的电子扩散，包括使样品与有效量的芳香族阳离子肽接触。另外地或可替代地，在一些实施方式中，该方法涉及增强在包含细胞色素 c 的样品中的细胞色素 c 的电子产生能力，包括使样品与有效量的芳香族阳离子肽接触。另外地或可替代地，在一些实施方式中，该方法涉及诱导在包含细胞色素 c 的样品中围绕细胞色素 c 的新型 $\pi - \pi$ 相互作用，包括使样品与有效量的芳香族阳离子肽接触。

在一些实施方式中,该芳香族阳离子肽包括 D-Arg-2', 6' -Dmt-Lys-Phe-NH₂。另外地或可替代地,在一些实施方式中,芳香族阳离子肽包括 Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂。

[0124] 在一些实施方式中,包含掺杂有本发明的芳香族阳离子肽的细胞色素 c 的样品包括:传感器部件,例如光电池传感器或发光传感器;导体;开关,例如晶体管;发光元件,例如发光二极管;电荷存储或累积装置,例如光伏器件;二极管;集成电路;固态装置;或任何其它的有机电子装置。在一些实施方式中,芳香族阳离子肽包括 D-Arg-2', 6' -Dmt-Lys-Phe-NH₂。另外地或可替代地,在一些实施方式中,芳香族阳离子肽包括 Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂。

[0125] 在一些实施方式中,细胞色素 c 以纯化的、分离的和 / 或浓缩的形式存在于样品中。在一些实施方式中,细胞色素 c 以天然形式存在于样品中。例如,在一些实施方式中,细胞色素 c 存在于一个或多个线粒体中。在一些实施方式中,线粒体被分离。在其它实施方式中,线粒体存在于细胞或细胞制剂中。在一些实施方式中,细胞色素 c 掺杂有芳香族阳离子肽或其盐,例如醋酸盐或三氟醋酸盐。在一些实施方式中,芳香族阳离子肽包括 D-Arg-2', 6' -Dmt-Lys-Phe-NH₂。另外地或可替代地,在一些实施方式中,芳香族阳离子肽包括 Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂。

[0126] 在一些方面,本公开提供一种关于线粒体呼吸的方法。在一些实施方式中,所述方法涉及增大线粒体的 O₂ 消耗、增加样品中的三磷酸腺苷 ATP 合成、和 / 或增强细胞色素 c 减少的线粒体内膜(mitoplasts)的呼吸。在一些实施方式中,含有线粒体和 / 或细胞色素 c 减少的线粒体内膜的样品与有效量的芳香族阳离子肽或其盐接触。在一些实施方式中,线粒体以纯化的、分离的和 / 或浓缩的形式存在于样品中。在一些实施方式中,线粒体以天然形式存在于样品中。例如,在一些实施方式中,线粒体存在于细胞中或细胞制剂中。在一些实施方式中,芳香族阳离子肽包括 D-Arg-2', 6' -Dmt-Lys-Phe-NH₂。另外地或可替代地,在一些实施方式中,芳香族阳离子肽包括 Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂。

[0127] 在一些方面,提供了传感器。在一些实施方式中,传感器包括掺杂有一定含量的在文中公开的芳香族阳离子肽或其盐(如醋酸盐或三氟醋酸盐)的细胞色素 c。在一些实施方式中,传感器包括用于测量由芳香族阳离子肽的含量变化而引起的细胞色素 c 的性质的变化的计量仪。在一些实施方式中,芳香族阳离子肽的含量响应于细胞色素 c 的温度和 / 或细胞色素 c 的 pH 的变化而变化。在一些实施方式中,所述性质为导电性,该计量仪包括与细胞色素 c 电连通的阳极和阴极。在一些实施方式中,细胞色素 c 的性质为光致发光性,且该计量仪包括用以测量掺杂有一定含量的本发明的芳香族阳离子肽的细胞色素 c 发出的光的强度和 / 或掺杂有本发明的芳香族阳离子肽的细胞色素 c 发出的光的波长的变化的光检测器。在一些实施方式中,芳香族阳离子肽包括 D-Arg-2', 6' -Dmt-Lys-Phe-NH₂。另外地或可替代地,在一些实施方式中,芳香族阳离子肽包括 Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂。

[0128] 在一些方面中,提供了感测方法。在一些实施方式中,该方法包括测量掺杂有一定含量的芳香族阳离子肽或其盐(例如醋酸盐或三氟醋酸盐)的细胞色素 c 的性质的变化。在一些实施方式中,所测量的变化由芳香族阳离子肽的含量的变化引起。在一些实施方式中,芳香族阳离子肽的含量响应于细胞色素 c 的温度和 / 或细胞色素 c 的 pH 的变化而变化。在一些实施方式中,性质为导电性、光致发光强度和光致发光波长中的至少一个。在一些实施方式中,芳香族阳离子肽包括 D-Arg-2', 6' -Dmt-Lys-Phe-NH₂。另外地或可替代地,在

一些实施方式中,芳香族阳离子肽包括 Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂。

[0129] 在一些方面,提供了开关。在一些实施方式中,所述开关包括细胞色素 c 和芳香族阳离子肽的源。在一些实施方式中,芳香族阳离子肽或其盐(例如醋酸盐或三氟醋酸盐)与细胞色素 c 连通。在一些实施方式中,提供致动器以控制与细胞色素 c 连通的芳香族阳离子肽的量。在一些实施方式中,该致动器控制细胞色素 c 的温度和 / 或细胞色素 c 的 pH。在一些实施方式中,芳香族阳离子肽包括 D-Arg-2', 6' -Dmt-Lys-Phe-NH₂。另外地或可替换地,在一些实施方式中,芳香族阳离子肽包括 Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂。

[0130] 在一些方面,提供了开关方法。在一些实施方式中,所述方法包括改变与细胞色素 c 连通的芳香族阳离子肽或其盐(例如醋酸盐或三氟醋酸盐)的含量。在一些实施方式中,改变芳香族阳离子肽的含量包括改变细胞色素 c 的温度和 / 或细胞色素 c 的 pH。在一些实施方式中,芳香族阳离子肽包括 D-Arg-2', 6' -Dmt-Lys-Phe-NH₂。另外地或可替换地,在一些实施方式中,芳香族阳离子肽包括 Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂。

[0131] 在一些方面,提供了发光元件。在一些实施方式中,发光元件包括掺杂有效量的芳香族阳离子肽(例如 D-Arg-2', 6' -Dmt-Lys-Phe-NH₂ 和 / 或 Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂)或其盐(例如醋酸盐或三氟醋酸盐)的细胞色素 c 以及刺激细胞色素 c 的发光的源。

[0132] 在一些方面,提供了一种发光的方法。在一些实施方式中,所述发光方法包括刺激掺杂有效量的芳香族阳离子肽(例如 D-Arg-2', 6' -Dmt-Lys-Phe-NH₂ 和 / 或 Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂)或其盐(例如醋酸盐或三氟醋酸盐)的细胞色素 c。

[0133] 在一些方面,本公开提出了用于细胞色素 c 生物传感器的方法和组合物。在一些实施方式中,细胞色素 c 生物传感器包括一种或多种在文中公开的芳香族阳离子肽或其盐(例如醋酸盐或三氟醋酸盐)。在一些实施方式中,掺杂有肽的细胞色素 c 用作生物传感器内的氧化还原活性酶和电极之间的中介物。在一些实施方式中,掺杂有肽的细胞色素 c 直接固定在生物传感器的电极上。在一些实施方式中,肽与生物传感器内的细胞色素 c 连接。在一些实施方式中,肽不与细胞色素 c 连接。在一些实施方式中,肽和 / 或细胞色素 c 固定在生物传感器内的表面上。在一些实施方式中,肽和 / 或细胞色素 c 在生物传感器内可自由扩散。在一些实施方式中,生物传感器包括肽 D-Arg-2', 6' -Dmt-Lys-Phe-NH₂。另外地或可替换地,在一些实施方式中,生物传感器包括芳香族阳离子肽 Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂。

[0134] 在一些方面,本公开提出了用于环境污染物的生物修复的组合物。在一些实施方式中,该组合物包括表达一种或多种芳香族阳离子肽或其盐(例如醋酸盐或三氟醋酸盐)的重组细菌。在一些实施方式中,该重组细菌包括编码一种或多种芳香族阳离子肽的核酸。在一些实施方式中,核酸在诱导型启动子的控制下进行表达。在一些实施方式中,核酸在组成型启动子的控制下进行表达。在一些实施方式中,核酸包括质粒 DNA。在一些实施方式中,核酸包括染色体插入物。在一些实施方式中,重组细菌源自在表 7 中列出的细菌物种。

[0135] 在一些方面,本公开提供了用于环境污染物的生物修复的方法。在一些实施方式中,该方法包括使包含环境污染物的材料与包含表达一种或多种芳香族阳离子肽的重组细菌的生物修复组合物相接触。在一些实施方式中,在文中公开的方法包括用于异化型金属还原的方法。在一些实施方式中,金属包括 Sc、Ti、V、Cr、Mn、Fe、Co、Ni、Cu、Zn、Y、Zr、Nb、Mo、Tc、Ru、Pd、Ag、Cd、Hf、Ta、W、Re、Os、Ir、Pt、Au、Hg、Rf、Db、Sg、Bh、Hs、Cn、Al、Ga、In、Sn、Ti、Pb 或 Bi。在一些实施方式中,在文中公开的方法包括用于非金属的异化还原的方

法。在一些实施方式中,非金属包括硫酸盐。在一些实施方式中,在文中公开的方法包括用于高氯酸盐的异化还原的方法。在一些实施方式中,高氯酸盐包括 NH_4ClO_4 、 CsClO_4 、 LiClO_4 、 $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ 、 HClO_4 、 KClO_4 、 RbClO_4 、 AgClO_4 、或 NaClO_4 。在一些实施方式中,在文中公开的方法包括用于异化型硝酸盐还原的方法。在一些实施方式中,硝酸盐包括 HNO_3 、 LiNO_3 、 NaNO_3 、 KNO_3 、 RbNO_3 、 CsNO_3 、 $\text{Be}(\text{NO}_3)_2$ 、 $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ 、 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 、 $\text{Sr}(\text{NO}_3)_2$ 、 $\text{Ba}(\text{NO}_3)_2$ 、 $\text{Sc}(\text{NO}_3)_3$ 、 $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3$ 、 $\text{Mn}(\text{NO}_3)_2$ 、 $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ 、 $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ 、 $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$ 、 $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ 、 $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ 、 $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$ 、 $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ 、 $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ 、 $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 或 $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 。在一些实施方式中,在文中公开的方法包括用于放射性核素的异化还原的方法。在一些实施方式中,放射性核素包括锕系元素。在一些实施方式中,放射性核素包括铀。在一些实施方式中,在文中公开的方法包括用于甲基叔丁基醚(MTBE)、氯乙烯或二氯乙烯的异化还原的方法。

[0136] 在一些实施方式中,在文中描述的生物修复方法在原位进行。在一些实施方式中,在文中描述的生物修复方法非原位进行。

[0137] 在一些实施方式中,在文中描述的生物修复方法包括使污染物与包含编码一种或多种芳香族阳离子肽的核酸的重组细菌相接触。在一些实施方式中,核酸在诱导型启动子的控制下进行表达。在一些实施方式中,核酸在组成型启动子的控制下进行表达。在一些实施方式中,核酸包括质粒 DNA。在一些实施方式中,核酸包括染色体插入物。在一些实施方式中,重组细菌源自表 7 中列出的细菌物种。

[0138] 在一些在文中公开的生物修复方法和组合物的实施方式中,芳香族阳离子肽包括 $\text{D-Arg-2}'$, $6'$ - Dmt-Lys-Phe-NH_2 。

附图说明

[0139] 图 1A 和图 1B 为示出肽 $\text{D-Arg-2}'$, $6'$ - Dmt-Lys-Phe-NH_2 (SS-31) 增大细胞色素 c 还原速率的图;

[0140] 图 2A 为示出肽 $\text{D-Arg-2}'$, $6'$ - Dmt-Lys-Phe-NH_2 (SS-31) 增强通过细胞色素 c 的电子扩散的图表。图 2B 为示出在 100mV/s 下具有增加的 SS-31 用量的溶液(20mM 氨基丁三醇-硼酸-乙二胺四乙酸(TBE)缓冲液, pH7)中的细胞色素 c 的循环伏安图的图表;

[0141] 图 3A 和图 3B 为示出肽 $\text{D-Arg-2}'$, $6'$ - Dmt-Lys-Phe-NH_2 (SS-31) 增强细胞色素 c 的电子产生能力的图;

[0142] 图 4 为示出肽 $\text{D-Arg-2}'$, $6'$ - Dmt-Lys-Phe-NH_2 (SS-31) 诱导围绕细胞色素 c 血红素的新型 $\pi-\pi$ 相互作用的图;

[0143] 图 5A 和图 5B 为示出肽 $\text{D-Arg-2}'$, $6'$ - Dmt-Lys-Phe-NH_2 (SS-31) 增大分离的线粒体中的 O_2 消耗的图;

[0144] 图 6 为示出肽 $\text{D-Arg-2}'$, $6'$ - Dmt-Lys-Phe-NH_2 (SS-31) 增加分离的线粒体中的 ATP 合成的图;

[0145] 图 7 为示出肽 $\text{D-Arg-2}'$, $6'$ - Dmt-Lys-Phe-NH_2 (SS-31) 增强细胞色素 c 减少的线粒体内膜的呼吸作用的图;

[0146] 图 8 为掺杂有肽的细胞色素 c 传感器的图;

[0147] 图 9 为可替代的掺杂有肽的细胞色素 c 传感器的图;

[0148] 图 10 为掺杂有肽的细胞色素 c 开关的图;

[0149] 图 11 为生物传感器中的电子流动的图,其中,掺杂有肽的细胞色素 c 用作电子流至电极的中介物;

[0150] 图 12 为生物传感器中的电子流动的图,其中,掺杂有肽的细胞色素 c 固定在电极上;

[0151] 图 13 为示出肽 D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ (SS-31) 和肽 Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ (SS-20) 促进细胞色素 c 还原的图;

[0152] 图 14 为示出肽 D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ (SS-31) 和肽 Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ (SS-20) 提高电子通量的图,该电子通量由在分离的大鼠肾线粒体中的 O₂ 消耗来测量;

[0153] 图 15 为示出肽 D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ (SS-31) 和肽 Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ (SS-20) 增大分离的线粒体中的 ATP 生成的速率的图;

[0154] 图 16 为有机发光晶体管的框图;

[0155] 图 17 为有机发光二极管的框图;

[0156] 图 18 为分散的异质结有机光伏电池的框图;

[0157] 图 19A 示出利用高度折叠的异质结有机光伏电池的电子空穴对形成;图 19B 示出利用受控生长异质结有机光伏电池的电子空穴对形成;

[0158] 图 20A 和图 20B 示出用于在制造有机电子装置期间沉积有机材料的薄膜的技术,有机电子装置包括但不限于有机发光晶体管、有机发光二极管和有机光伏电池。

具体实施方式

[0159] 应当明白,下文以不同的详细程度描述了本发明的某些方面、模式、实施方式、变型和特征,以提供对本发明的实质性理解。下文提供了本说明书中使用的一些术语的定义。除非另有说明,本文中使用的所有技术和科学用语通常具有和本发明所属领域的普通技术人员通常理解的意思相同的意思。

[0160] 在实践本发明中,使用细胞生物学、分子生物学、蛋白质生物化学、免疫学、细菌学的许多常规技术。这些技术在本领域中是公知的且提供在许多可用的出版物中,包括 Current Protocols in Molecular Biology (Vols. I-III, Ausubel, Ed. (1997)); Sambrook 等的 Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第二版, (冷泉港实验室出版社,冷泉港,纽约,1989)。

[0161] 除非内容清楚指明,否则本说明和所附的权利要求中使用的单数形式“一”和“该”包括复数的引用对象。例如,所提及的“一细胞”包括两个细胞或更多细胞的组合等。

[0162] 本文中使用的将制剂、药物或肽“给药”至对象包括将化合物引入到或给送到对象以执行其预期功能的任何途径。可以通过任何合适的途径来执行“给药”,包括口服、鼻内、肠胃外(通过静脉、肌内、腹腔内或皮下)或者局部给药。“给药”包括自身给药和由其他人给药。

[0163] 本文中使用的术语“氨基酸”包括天然存在的氨基酸和合成的氨基酸以及氨基酸类似物和以类似于天然存在的氨基酸的形式作用的氨基酸模拟物。天然存在的氨基酸是通过遗传密码编码的氨基酸以及后来被改性的那些氨基酸,比如羟(基)脯氨酸、 γ -羧基谷氨酸和 O-磷酸丝氨酸。氨基酸类似物指的是具有和天然存在的氨基酸相同的基本化学结

构的化合物,所述的基本化学结构即结合至氢的 α -碳、羧基、氨基和 R 基,所述氨基酸类似物比如为高丝氨酸、正亮氨酸、蛋氨酸亚砷、甲硫基蛋氨酸。这样的类似物具有改性的 R 基(例如正亮氨酸)或改性的肽主链,但保持与天然存在的氨基酸相同的基本化学结构。氨基酸模拟物指的是具有与氨基酸的通用化学结构不同的结构、但以类似于天然存在的氨基酸的方式作用的化学化合物。本文可按照 IUPAC-IUB 生化命名委员会建议的通常已知的三字母符号或者一字母符号指代氨基酸。

[0164] 本文中使用的术语“有效量”指的是足以获得所需的治疗和 / 或预防效果的量。在治疗或预防性应用的背景下,给药至对象的组合物的量将取决于疾病的类型和严重性以及例如平常健康情况、年龄、性别、体重和对药物的耐受性的个体特性。所述量还取决于疾病的程度、严重性和类型。专业的技术人员将能够根据这些因素和其他因素来确定合适的剂量。所述组合物还可结合一种或多种其他的治疗化合物来给药。在一些实施方式中,术语“有效量”指足以实现所需的电子效应或导电效应(例如促进或增强电子转移)的量。

[0165] 在文中使用的“外源核酸”指的是,不是寄主细胞内天然存在的、而是从外源引入的核酸(例如 DNA、RNA)。在文中使用的外源核酸指的是未整合到寄主细胞的基因组、而保持独立的核酸,例如细菌质粒核酸。在文中使用的“细菌质粒”指的是细菌来源的用作所关注的序列的载体以及用于在细菌寄主细胞内表达该序列的工具的环状 DNA。

[0166] “分离的”或“纯化的”多肽或肽基本上不具有源自细胞或组织的源(试剂来自于该源)的细胞材料或其它受污染的多肽,或者当化学合成时基本上不具有化学前体或其它的化学物质。例如,分离的芳香族阳离子肽或所分离的细胞色素 c 蛋白将不具有会干扰试剂的诊断用途或治疗用途、或者干扰肽的导电性或电性能的材料。这样的干扰材料可以包括酶、激素和其他蛋白质类的和非蛋白质类的溶解物。

[0167] 在文中使用的“诱导型启动子”指的是受一定条件(例如温度或者特定分子的存在)影响、且仅在满足这些条件时促进所关注的操作性连接的核酸序列的表达的启动子。

[0168] 文中使用的“组成型启动子”指的是在所有或大多数环境条件下促进所关注的操作性连接的核酸序列的表达的启动子。

[0169] 本文中使用的术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”在本文中是可互换的,以表示包括通过肽键或改性的肽键而互相连接的两个或更多个氨基酸的聚合物,即,肽电子等排体。多肽既指短链(通常称为肽、糖肽或低聚物)也指较长的链(通常称为蛋白质)。多肽可以包括与 20 个基因编码的氨基酸不同的氨基酸。多肽包括通过诸如翻译后加工的天然过程或本领域中熟知的化学改性技术改性的氨基酸序列。

[0170] 文中使用的“重组细菌”指已被设计成携带和 / 或表达一种或多种外源核酸(例如 DNA) 序列的细菌。

[0171] 本文中使用的术语“治疗”或“减轻”指的是治疗处理措施和预防或防止措施,其中,目的是防止或减缓(减轻)目标病症或失调。还应当理解,本文描述的治疗或预防医学病症的各种模式旨在表示“显著”,其包括完全治疗或者预防以及小于完全治疗或者预防,其中实现了某种生物学相关或医学相关的结果。

[0172] 本文中使用的“防止”失调或病症指的是相对于未治疗的对照样本,化合物降低治疗的样本的失调或病症的发生率,或者相对于未治疗的对照样本延迟失调或病症的发病或者减轻失调或病症的一种或多种症状的严重程度。

[0173] 芳香族阳离子肽

[0174] 本发明涉及芳香族阳离子肽的用途。在一些实施方式中,所述肽用在与导电性有关的方面中。

[0175] 所述芳香族阳离子肽可溶于水并且强极性。尽管所述肽具有这些特性,然而所述肽能够容易地穿过细胞膜。芳香族阳离子肽通常最少包括通过肽键而共价键连接的三个氨基酸或最少包括通过肽键而共价键连接的四个氨基酸。芳香族阳离子肽中存在的氨基酸的最大数目为通过肽键而共价键连接的大约二十个氨基酸。适当地,氨基酸的最大数目为大约 12 个、大约 9 个或大约 6 个。

[0176] 芳香族阳离子肽的氨基酸可以是任何氨基酸。本文中使用的术语“氨基酸”用来指包括至少一个氨基和至少一个羧基的任何有机分子。通常,至少一个氨基是相对于羧基在 α 位。所述氨基酸可以是天然存在的。例如,天然存在的氨基酸包括通常在哺乳动物蛋白中发现的二十种最常见的左旋(L)氨基酸,即丙氨酸(Ala),精氨酸(Arg),天门冬酰胺(Asn),天门冬氨酸(Asp),半胱氨酸(Cys),谷氨酰胺(Gln),谷氨酸(Glu),甘氨酸(Gly),组氨酸(His),异亮氨酸(Ile),亮氨酸(Leu),赖氨酸(Lys),蛋氨酸(Met),苯丙氨酸(Phe),脯氨酸(Pro),丝氨酸(Ser),苏氨酸(Thr),色氨酸(Trp),酪氨酸(Tyr),和缬氨酸(Val)。其它天然存在的氨基酸包括诸如与蛋白质合成无关的代谢过程中合成的氨基酸。例如,氨基酸—鸟氨酸和瓜氨酸是在哺乳动物新陈代谢的产生尿素期间合成的。天然存在的氨基酸的另一示例包括羟(基)脯氨酸(Hyp)。

[0177] 所述肽可选地包括一种或多种非天然存在的氨基酸。最佳地,所述肽不具有天然存在的氨基酸。所述非天然存在的氨基酸可以是左旋(L-)氨基酸、右旋(D-)氨基酸或其混合物。非天然存在的氨基酸是这样的氨基酸:通常不是在生物体的天然代谢过程中合成的,且非天然地出现在蛋白质中。此外,非天然存在的氨基酸合适地也不会由普通的蛋白酶识别。非天然存在的氨基酸可以存在于肽的任何位置中。例如,非天然存在的氨基酸可以在 N 末端、C 末端或者在 N 末端和 C 末端之间的任何位置。

[0178] 例如,非天然的氨基酸可以包括天然氨基酸中不存在的烷基、芳基或烷基芳基。非天然烷基氨基酸的一些示例包括 α -氨基丁酸、 β -氨基丁酸、 γ -氨基丁酸、 δ -氨基戊酸和 ϵ -氨基己酸。非天然的芳基氨基酸的一些示例包括邻氨基苯甲酸、间氨基苯甲酸和对氨基苯甲酸。非天然的烷基芳基氨基酸的一些示例包括邻氨基苯乙酸、间氨基苯乙酸和对氨基苯乙酸、以及 γ -苯基- β -氨基丁酸。非天然存在的氨基酸包括天然存在的氨基酸的衍生物。所述天然存在的氨基酸的衍生物可以包括诸如对天然存在的氨基酸添加一种或多种化学基团。

[0179] 例如,可以将一种或多种化学基团添加至苯基丙氨酸残基或酪氨酸残基的芳香环的 2'、3'、4'、5' 或 6' 位置或者至色氨酸残基的苯并环的 4'、5'、6' 或 7' 位置。所述基团可以是添加到芳香环的任何化学基团。这样的基团的一些示例包括:支链的或者无支链的 C_1 - C_4 的烷基,比如甲基、乙基、正丙基、异丙基、丁基、异丁基、或叔丁基; C_1 - C_4 的烷氧基(即烷氧基);氨基; C_1 - C_4 的烷基氨基和 C_1 - C_4 的二烷基氨基(例如,甲氨基、二甲氨基);硝基;羟基;卤素(即氟、氯、溴或碘)。天然存在的氨基酸的非天然存在的衍生物的一些特定示例包括正缬氨酸(Nva)和正亮氨酸(Nle)。

[0180] 肽中氨基酸的改性的另一示例是将肽中的天冬氨酸或谷氨酸残基的羧基衍生化。

衍生化的一个示例是与氨或伯胺或仲胺(例如甲胺、乙胺、二甲胺或二乙胺)的酰胺化。衍生化的另一示例包括与诸如甲醇或乙醇进行酯化。另一种这样的改性包括赖氨酸、精氨酸或组氨酸残基的氨基的衍生化。例如,这些氨基可以被酰化。例如,一些合适的酰基包括苯甲酰基或者包括以上提及的 C_1 - C_4 的烷基中的任一烷基的烷酰基,比如乙酰基或丙酰基。

[0181] 非天然存在的氨基酸对常见的蛋白酶适当地为抵抗性的或不敏感。对蛋白酶抵抗性的或者不敏感的非天然存在的氨基酸的示例包括以上提及的任一种天然存在的左旋(L-)氨基酸的右旋(D-)形式以及左旋和/或右旋的非天然存在的氨基酸。尽管右旋氨基酸存在于通过与细胞的常规的核糖体蛋白合成方法不同的方法而合成的某些肽抗生素中,但右旋氨基酸通常不存在于蛋白质中。本文中使用的右旋氨基酸被认为是非天然存在的氨基酸。

[0182] 为了使蛋白酶灵敏度最小,肽应当具有小于5个、小于4个、小于3个、或小于2个的由普通蛋白酶识别的连续左旋氨基酸,而与氨基酸是否为天然存在无关。在一个实施方式中,肽仅具有右旋氨基酸,而不具有左旋氨基酸。如果肽具有蛋白酶敏感的氨基酸序列,则所述氨基酸中的至少一个氨基酸优选地为非天然存在的右旋氨基酸,由此提供蛋白酶抗性。蛋白酶敏感序列的示例包括可以由常见的蛋白酶(比如肽链内切酶和胰蛋白酶)容易地切割的两个或更多个连续的碱性氨基酸。碱性氨基酸的示例包括精氨酸、赖氨酸和组氨酸。

[0183] 与肽中的氨基酸残基的总数目相比,在生理 pH,芳香族阳离子肽应当具有最小数目的净正电荷。生理 pH 的净正电荷的最小数目将在下文称为(p_m)。肽中的氨基酸残基的总数目将在下文称为(r)。下文讨论的净正电荷的最小数目都是在生理 pH。本文中使用的术语“生理 pH”指的是哺乳动物体的组织和器官的细胞中的正常 pH。例如,人的生理 pH 通常为约 7.4,而哺乳动物中的正常生理 pH 可以为从约 7.0 至约 7.8 的任一 pH。

[0184] 本文中使用的“净电荷”指的是存在于肽中的氨基酸所携带的正电荷的数目和负电荷的数目之间的平衡。在本说明书中,应当理解,净电荷是在生理 pH 下测定的。在生理 pH 带正电的天然存在的氨基酸包括左旋赖氨酸、左旋精氨酸和左旋组氨酸。在生理 pH 带负电的天然存在的氨基酸包括左旋天冬氨酸和左旋谷氨酸。

[0185] 通常地,肽具有带正电的 N-末端氨基和带负电的 C-末端羧基。所述电荷在生理 pH 相互抵消。作为计算净电荷的示例,肽 Tyr-Arg-Phe-Lys-Glu-His-Trp-D-Arg 具有一个带负电的氨基酸(即 Glu)和四个带正电的氨基酸(即,两个 Arg 残基、一个 Lys 和一个 His)。因此,以上的肽具有 3 个净正电荷。

[0186] 在一个实施方式中,芳香族阳离子肽的生理 pH 的净正电荷的最小数目(p_m)和氨基酸残基的总数目(r)之间具有某种关系,其中, $3p_m$ 是小于或等于 $r+1$ 的最大数。在该实施方式中,净正电荷的最小数目(p_m)和氨基酸残基的总数目(r)之间的关系如下:

[0187] 表 1. 氨基酸数目和净正电荷 ($3p_m \leq r+1$)

[0188]

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

[0189] 在另一实施方式中,芳香族阳离子肽的净正电荷的最小数目(p_m)和氨基酸残基的总数目(r)之间具有某种关系,其中, $2p_m$ 是小于或等于 $r+1$ 的最大数。在该实施方式中,净

正电荷的最小数目(p_m)和氨基酸残基的总数目(r)之间的关系如下:

[0190] 表 2. 氨基酸数目和净正电荷($2p_m \leq p+1$)

[0191]

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

[0192] 在一个实施方式中,净正电荷的最小数目(p_m)和氨基酸残基的总数目(r)相等。在另一实施方式中,肽具有三个或四个氨基酸残基,其净正电荷的最小数目为 1、适当地净正电荷的最小数目为 2 且更优选地净正电荷的最小数目为 3。

[0193] 还重要的是,芳香族阳离子肽相比于净正电荷的总数目(p_t)具有最小数目的芳香基团。芳香基团的最小数目在下文将称为(a)。具有芳香基团的天然存在的氨基酸包括氨基酸—组氨酸、色氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸。例如,六肽 Lys-Gln-Tyr-D-Arg-Phe-Trp 具有 2 个净正电荷(由赖氨酸残基和精氨酸残基提供)以及三个芳香基团(由酪氨酸残基、苯丙氨酸残基和色氨酸残基提供)。

[0194] 芳香族阳离子肽还应当在芳香基团的最小数目(a)和生理 pH 的净正电荷的总数目(p_t)之间具有某种关系,其中,除了当 p_t 为 1 时 a 也可 为 1 之外, $3a$ 是小于或等于 p_t+1 的最大数。在该实施方式中,芳香基团的最小数目(a)和净正电荷的总数目(p_t)之间的关系如下:

[0195] 表 3. 芳香基团和净正电荷($3a \leq p_t+1$ 或 $a=p_t=1$)

[0196]

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

[0197] 在另一实施方式中,芳香族阳离子肽在芳香基团的最小数目(a)和净正电荷的总数目(p_t)之间具有某种关系,其中, $2a$ 是小于或者等于 p_t+1 的最大数。在该实施方式中,芳香氨基酸残基的最小数目(a)和净正电荷的总数目(p_t)之间的关系如下:

[0198] 表 4. 芳香基团和净正电荷($2a \leq p_t+1$ 或 $a=p_t=1$)

[0199]

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

[0200] 在另一实施方式中,芳香基团的数目(a)和净正电荷的总数目(p_t)相等。

[0201] 羧基且尤其是 C- 末端氨基酸的末端羧基适当地与诸如氨进行酰胺化,以形成 C- 端酰胺。可替代地, C- 端氨基酸的末端羧基可以与任一伯胺或仲胺进行酰胺化。所述伯胺或仲胺可以是诸如烷基、尤其是支链的或无支链的 C_1 - C_4 的烷基或者芳香胺。因此,在肽的 C 末端的氨基酸可以转化为酰胺基、N- 甲基酰胺基、N- 乙基酰胺基、N, N- 二甲基酰胺基、N, N- 二乙基酰胺基、N- 甲基 -N- 乙基酰胺基、N- 苯基酰胺基或 N- 苯基 -N- 乙基酰胺基。未出现在芳香族阳离子肽的 C 末端的天冬酰胺残基、谷氨酰胺残基、天冬氨酸残基和谷

氨基酸残基的游离的羧酸基也可被酰胺化,不论它们是否存在于肽内。这些内部位置的酰胺化可以与氨或以上所述伯胺或仲胺中的任何一者进行。

[0202] 在一个实施方式中,芳香族阳离子肽是具有两个净正电荷以及至少一个芳香族氨基酸的三肽。在特定的实施方式中,所述芳香族阳离子肽是具有两个净正电荷和两个芳香族氨基酸的三肽。

[0203] 在一个实施方式中,芳香族阳离子肽具有

[0204] 1. 至少一个净正电荷;

[0205] 2. 最少三个氨基酸;

[0206] 3. 最多约 20 个氨基酸;

[0207] 4. 净正电荷的最小数目(p_m)和氨基酸残基的总数目(r)之间的联系,其中 $3p_m$ 为小于或等于 $r+1$ 的最大数;以及

[0208] 5. 芳香族基团的最小数目(a)和净正电荷的总数目(p_t)之间的联系,其中除了当 a 为 1 时, p_t 也可 为 1 外, $2a$ 为小于或等于 p_t+1 的最大数。

[0209] 在另一实施方式中,本发明提供了一种用于减少哺乳动物的离体器官中进行线粒体通透性转变(MPT)的线粒体的数目、或者用于防止哺乳动物的离体器官中的线粒体通透性转变的方法。该方法包括对离体器官施用有效量的芳香族阳离子肽,所述芳香族阳离子肽具有:

[0210] 至少一个净正电荷;

[0211] 最少三个氨基酸;

[0212] 最多约 20 个氨基酸;

[0213] 净正电荷的最小数目(p_m)和氨基酸残基的总数目(r)之间的联系,其中 $3p_m$ 为小于或等于 $r+1$ 的最大数;以及

[0214] 芳香族基团的最小数目(a)和净正电荷的总数目(p_t)之间的联系,其中除了当 a 为 1 时, p_t 也可 为 1 外, $2a$ 为小于或等于 p_t+1 的最大数。

[0215] 在又一实施方式中,本发明提供了一种在有需要的哺乳动物中减少进行线粒体通透性转变(MPT)的线粒体的数目、或者在有需要的动物中防止线粒体通透性转变的方法。所述方法包括对该哺乳动物施用有效量的芳香族阳离子肽,所述芳香族阳离子肽具有:

[0216] 至少一个净正电荷;

[0217] 最少三个氨基酸;

[0218] 最多约 20 个氨基酸;

[0219] 净正电荷的最小数目(p_m)和氨基酸残基的总数目(r)之间的联系,其中 $3p_m$ 为小于或等于 $r+1$ 的最大数;以及

[0220] 芳香族基团的最小数目(a)和净正电荷的总数目(p_t)之间的联系,其中除了当 a 为 1 时, p_t 也可 为 1 外, $3a$ 为小于或等于 p_t+1 的最大数。

[0221] 芳香族阳离子肽包括但不限于下列给出的肽:

[0222] H-Phe-D-Arg Phe-Lys-Cys-NH₂

[0223] D-Arg-Dmt-Lys-Trp-NH₂;

[0224] D-Arg-Trp-Lys-Trp-NH₂;

[0225] D-Arg-Dmt-Lys-Phe-Met-NH₂;

- [0226] H-D-Arg-Dmt-Lys(N^αMe)-Phe-NH₂ ;
[0227] H-D-Arg-Dmt-Lys-Phe(NMe)-NH₂ ;
[0228] H-D-Arg-Dmt-Lys(N^αMe)-Phe(NMe)-NH₂ ;
[0229] H-D-A r g (N ^α M e) - D m t - (N M e) - L y s (N ^α M e) - P h e (N M e) - N H ₂ ;
D-Arg-Dmt-Lys-Phe-Lys-Trp-NH₂ ;
[0230] D-Arg-Dmt-Lys-Dmt-Lys-Trp-NH₂ ;
[0231] D-Arg-Dmt-Lys-Phe-Lys-Met-NH₂ ;
[0232] D-Arg-Dmt-Lys-Dmt-Lys-Met-NH₂ ;
[0233] H-D-Arg-Dmt-Lys-Phe-Sar-Gly-Cys-NH₂ ;
[0234] H-D-Arg-Ψ [CH₂-NH]Dmt-Lys-Phe-NH₂ ;
[0235] H-D-Arg-Dmt-Ψ [CH₂-NH]Lys-Phe-NH₂ ;
[0236] H-D-Arg-Dmt-Lys Ψ [CH₂-NH]Phe-NH₂ ;和
[0237] H-D-Arg-Dmt-Ψ [CH₂-NH]Lys-Ψ [CH₂-NH]Phe-NH₂ ,
[0238] Tyr-D-Arg-Phe-Lys-NH₂
[0239] 2' , 6' -Dmt-D-Arg-Phe-Lys-NH₂
[0240] Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂
[0241] Phe-D-Arg-Dmt-Lys-NH₂
[0242] D-Arg-2' , 6' -Dmt-Lys-Phe-NH₂
[0243] H-Phe-D-Arg-Phe-Lys-Cys-NH₂
[0244] Lys-D-Arg-Tyr-NH₂ ,
[0245] D-Tyr-Trp-Lys-NH₂ ,
[0246] Trp-D-Lys-Tyr-Arg-NH₂ ,
[0247] Tyr-His-D-Gly-Met ,
[0248] Tyr-D-Arg-Phe-Lys-Glu-NH₂ ,
[0249] Met-Tyr-D-Lys-Phe-Arg ,
[0250] D-His-Glu-Lys-Tyr-D-Phe-Arg ,
[0251] Lys-D-Gln-Tyr-Arg-D-Phe-Trp-NH₂ ,
[0252] Phe-D-Arg-Lys-Trp-Tyr-D-Arg-His ,
[0253] Gly-D-Phe-Lys-Tyr-His-D-Arg-Tyr-NH₂ ,
[0254] Val-D-Lys-His-Tyr-D-Phe-Ser-Tyr-Arg-NH₂ ,
[0255] Trp-Lys-Phe-D-Asp-Arg-Tyr-D-His-Lys ,
[0256] Lys-Trp-D-Tyr-Arg-Asn-Phe-Tyr-D-His-NH₂ ,
[0257] Thr-Gly-Tyr-Arg-D-His-Phe-Trp-D-His-Lys ,
[0258] Asp-D-Trp-Lys-Tyr-D-His-Phe-Arg-D-Gly-Lys-NH₂ ,
[0259] D-His-Lys-Tyr-D-Phe-Glu-D-Asp-D-His-D-Lys-Arg-Trp-NH₂ ,
[0260] Ala-D-Phe-D-Arg-Tyr-Lys-D-Trp-His-D-Tyr-Gly-Phe ,
[0261] Tyr-D-His-Phe-D-Arg-Asp-Lys-D-Arg-His-Trp-D-His-Phe ,
[0262] Phe-Phe-D-Tyr-Arg-Glu-Asp-D-Lys-Arg-D-Arg-His-Phe-NH₂ ,
[0263] Phe-Tyr-Lys-D-Arg-Trp-His-D-Lys-D-Lys-Glu-Arg-D-Tyr-Thr ,

- [0264] Tyr-Asp-D-Lys-Tyr-Phe-D-Lys-D-Arg-Phe-Pro-D-Tyr-His-Lys,
 [0265] Glu-Arg-D-Lys-Tyr-D-Val-Phe-D-His-Trp-Arg-D-Gly-Tyr-Arg-D-Met-NH₂,
 [0266] Arg-D-Leu-D-Tyr-Phe-Lys-Glu-D-Lys-Arg-D-Trp-Lys-D-Phe-Tyr-D-Arg-Gly,
 [0267] D-Glu-Asp-Lys-D-Arg-D-His-Phe-Phe-D-Val-Tyr-Arg-Tyr-D-Tyr-Arg-His-Phe-NH₂,
 [0268] Asp-Arg-D-Phe-Cys-Phe-D-Arg-D-Lys-Tyr-Arg-D-Tyr-Trp-D-His-Tyr-D-Phe-Lys-Phe,
 [0269] His-Tyr-D-Arg-Trp-Lys-Phe-D-Asp-Ala-Arg-Cys-D-Tyr-His-Phe-D-Lys-Tyr-His-Ser-NH₂,
 [0270] Gly-Ala-Lys-Phe-D-Lys-Glu-Arg-Tyr-His-D-Arg-D-Arg-Asp-Tyr-Trp-D-His-Trp-His-D-Lys-Asp, 和
 [0271] Thr-Tyr-Arg-D-Lys-Trp-Tyr-Glu-Asp-D-Lys-D-Arg-His-Phe-D-Tyr-Gly-Val-Ile-D-His-Arg-Tyr-Lys-NH₂。

[0272] 在一些实施方式中,可用在本发明的方法中的肽为具有酪氨酸残基或具有酪氨酸衍生物的肽。在一些实施方式中,酪氨酸的衍生物包括 2'-甲基酪氨酸(Mmt)、2',6'-二甲基酪氨酸(2',6'-Dmt)、3',5'-二甲基酪氨酸(3',5'-Dmt)、N,2',6'-三甲基酪氨酸(Tmt)和 2'-羟基-6'-甲基酪氨酸(Hmt)。

[0273] 在一个实施方式中,肽具有式 Tyr-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ (文中称为 SS-01)。SS-01 具有氨基酸—酪氨酸、精氨酸和赖氨酸所贡献的三个净正电荷和氨基酸—苯丙氨酸和酪氨酸所贡献的两个芳香基。SS-01 的酪氨酸可以为酪氨酸的改性衍生物,例如 2',6'-二甲基酪氨酸,以制备具有式 2',6'-Dmt-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ (文中称为 SS-02) 的化合物。

[0274] 在一个适宜的实施方式中,在 N-末端的氨基酸残基为精氨酸。这样的肽的示例为 D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ (文中称为 SS-31)。

[0275] 在另一实施方式中,在 N-末端的氨基酸为苯丙氨酸或苯丙氨酸的衍生物。在一些实施方式中,苯丙氨酸的衍生物包括 2'-甲基苯丙氨酸(Mmp)、2',6'-二甲基苯丙氨酸(Dmp)、N,2',6'-三甲基苯丙氨酸(Tmp)和 2'-羟基-6'-甲基苯丙氨酸(Hmp)。这样的肽的示例为 Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ (文中称为 SS-20)。在一个实施方式中,SS-02 的氨基酸序列进行重排使得 2',6'-Dmt 不位于 N-末端。这样的芳香族阳离子肽的示例具有式 D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ (SS-31)。

[0276] 在另一实施方式中,芳香族阳离子肽具有式 Phe-D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-NH₂ (文中称为 SS-30)。可替代地,N-末端的苯丙氨酸可为苯丙氨酸的衍生物,例如 2',6'-二甲基苯丙氨酸(2',6'-Dmp)。在一些实施方式中,肽具有包含位于氨基酸位置 1 处的 2',6'-二甲基苯丙氨酸的式,且具有式 2',6'-Dmp-D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-NH₂。在一些实施方式中,肽具有式 2',6'-Dmp-D-Arg-Phe-Lys-NH₂。

[0277] 本文提到的肽和它们的衍生物还可包括功能类似物。如果类似物具有与所列举的肽相同的功能,则肽被认为功能类似物。例如,该类似物可以为肽的取代变型,其中一个或多个氨基酸被另一氨基酸所取代。该肽合适的取代变型包括保守的氨基酸取代物。氨基酸可以根据其物理化学性质而进行如下分组:

- [0278] (a) 非极性氨基酸:Ala(A) Ser(S) Thr(T) Pro(P) Gly(G) Cys(C);

[0279] (b) 酸性氨基酸 :Asn (N) Asp (D) Glu (E) Gln (Q) ;

[0280] (c) 碱性氨基酸 :His (H) Arg (R) Lys (K) ;

[0281] (d) 疏水性氨基酸 :Met (M) Leu (L) Ile (I) Val (V) ;以及

[0282] (e) 芳香族氨基酸 :Phe (F) Tyr (Y) Trp (W) His (H) 。

[0283] 肽中的氨基酸被同一组中的另一种氨基酸取代称为保守取代,且可以保留原始肽的物理化学性质。相反,肽中的氨基酸被不同组中的另一种氨基酸取代通常更有可能改变原始肽的物理化学性质。可用在本发明的实践中的类似物的非限定性示例包括但不限于在表 5 中示出的芳香族阳离子肽。

[0284] 表 5. 肽类似物的示例

[0285]

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

[0286]

Lys	D-Arg	Phe	Dmt				NH ₂
Lys	D-Arg	Dmt	Phe				NH ₂
D-Arg	Dmt	D-Arg	Phe				NH ₂
D-Arg	Dmt	D-Arg	Dmt				NH ₂
D-Arg	Dmt	D-Arg	Tyr				NH ₂
D-Arg	Dmt	D-Arg	Trp				NH ₂
Trp	D-Arg	Phe	Lys				NH ₂
Trp	D-Arg	Tyr	Lys				NH ₂
Trp	D-Arg	Trp	Lys				NH ₂
Trp	D-Arg	Dmt	Lys				NH ₂
D-Arg	Trp	Lys	Phe				NH ₂
D-Arg	Trp	Phe	Lys				NH ₂
D-Arg	Trp	Lys	Dmt				NH ₂
D-Arg	Trp	Dmt	Lys				NH ₂
D-Arg	Lys	Trp	Phe				NH ₂
D-Arg	Lys	Trp	Dmt				NH ₂
Cha	D-Arg	Phe	Lys				NH ₂
Ala	D-Arg	Phe	Lys				NH ₂

[0287] Cha= 环己基

[0288] 在某些情况下,使用也具有阿片受体激动剂活性的肽可是有利的。可用在本发明的实践中的类似物的示例包括但不限于表 6 示出的示出的芳香族阳离子肽。

[0289] 表 6. 具有阿片受体激动剂活性的肽类似物

氨基酸位 置 1	氨基酸位 置 2	氨基酸位 置 3	氨基酸位置 4	氨基酸位置 5 (如果存在)	C-末端改性
Tyr	D-Arg	Phe	Lys		NH ₂
Tyr	D-Arg	Phe	Orn		NH ₂
Tyr	D-Arg	Phe	Dab		NH ₂
Tyr	D-Arg	Phe	Dap		NH ₂
Tyr	D-Arg	Phe	Lys	Cys	NH ₂
2',6'-Dmt	D-Arg	Phe	Lys		NH ₂
2',6'-Dmt	D-Arg	Phe	Lys	Cys	NH ₂
2',6'-Dmt	D-Arg	Phe	Lys-NH(CH ₂) ₂ -N H-dns		NH ₂

[0291]

2',6'-Dmt	D-Arg	Phe	Lys-NH(CH ₂) ₂ -N H-atn		NH ₂
2',6'-Dmt	D-Arg	Phe	dnsLys		NH ₂
2',6'-Dmt	D-Cit	Phe	Lys		NH ₂
2',6'-Dmt	D-Cit	Phe	Lys	Cys	NH ₂
2',6'-Dmt	D-Cit	Phe	Ahp		NH ₂
2',6'-Dmt	D-Arg	Phe	Orn		NH ₂
2',6'-Dmt	D-Arg	Phe	Dab		NH ₂
2',6'-Dmt	D-Arg	Phe	Dap		NH ₂
2',6'-Dmt	D-Arg	Phe	Ahp(2-氨基庚酸)		NH ₂
Bio-2',6'-Dmt	D-Arg	Phe	Lys		NH ₂
3',5'-Dmt	D-Arg	Phe	Lys		NH ₂
3',5'-Dmt	D-Arg	Phe	Orn		NH ₂
3',5'-Dmt	D-Arg	Phe	Dab		NH ₂
3',5'-Dmt	D-Arg	Phe	Dap		NH ₂
Tyr	D-Arg	Tyr	Lys		NH ₂
Tyr	D-Arg	Tyr	Orn		NH ₂
Tyr	D-Arg	Tyr	Dab		NH ₂
Tyr	D-Arg	Tyr	Dap		NH ₂
2',6'-Dmt	D-Arg	Tyr	Lys		NH ₂
2',6'-Dmt	D-Arg	Tyr	Orn		NH ₂
2',6'-Dmt	D-Arg	Tyr	Dab		NH ₂
2',6'-Dmt	D-Arg	Tyr	Dap		NH ₂
2',6'-Dmt	D-Arg	2',6'-Dmt	Lys		NH ₂
2',6'-Dmt	D-Arg	2',6'-Dmt	Orn		NH ₂
2',6'-Dmt	D-Arg	2',6'-Dmt	Dab		NH ₂
2',6'-Dmt	D-Arg	2',6'-Dmt	Dap		NH ₂
3',5'-Dmt	D-Arg	3',5'-Dmt	Arg		NH ₂
3',5'-Dmt	D-Arg	3',5'-Dmt	Lys		NH ₂
3',5'-Dmt	D-Arg	3',5'-Dmt	Orn		NH ₂
3',5'-Dmt	D-Arg	3',5'-Dmt	Dab		NH ₂
2',6'-Dmt	D-Arg	2',6'-Dmt	Lys	Cys	NH ₂
Tyr	D-Lys	Phe	Dap		NH ₂
Tyr	D-Lys	Phe	Arg		NH ₂
Tyr	D-Lys	Phe	Arg	Cys	NH ₂

[0292]

Tyr	D-Lys	Phe	Lys		NH ₂
Tyr	D-Lys	Phe	Orn		NH ₂
2',6'-Dmt	D-Lys	Phe	Dab		NH ₂
2',6'-Dmt	D-Lys	Phe	Dap		NH ₂
2',6'-Dmt	D-Lys	Phe	Arg		NH ₂
2',6'-Dmt	D-Lys	Phe	Lys		NH ₂
3',5'-Dmt	D-Lys	Phe	Orn		NH ₂
3',5'-Dmt	D-Lys	Phe	Dab		NH ₂
3',5'-Dmt	D-Lys	Phe	Dap		NH ₂
3',5'-Dmt	D-Lys	Phe	Arg		NH ₂
3',5'-Dmt	D-Lys	Phe	Arg	Cys	NH ₂
Tyr	D-Lys	Tyr	Lys		NH ₂
Tyr	D-Lys	Tyr	Orn		NH ₂
Tyr	D-Lys	Tyr	Dab		NH ₂
Tyr	D-Lys	Tyr	Dap		NH ₂
2',6'-Dmt	D-Lys	Tyr	Lys		NH ₂
2',6'-Dmt	D-Lys	Tyr	Orn		NH ₂
2',6'-Dmt	D-Lys	Tyr	Dab		NH ₂
2',6'-Dmt	D-Lys	Tyr	Dap		NH ₂
2',6'-Dmt	D-Lys	2',6'-Dmt	Lys		NH ₂
2',6'-Dmt	D-Lys	2',6'-Dmt	Orn		NH ₂
2',6'-Dmt	D-Lys	2',6'-Dmt	Dab		NH ₂
2',6'-Dmt	D-Lys	2',6'-Dmt	Dap		NH ₂
2',6'-Dmt	D-Arg	Phe	dnsDap		NH ₂
2',6'-Dmt	D-Arg	Phe	atnDap		NH ₂
3',5'-Dmt	D-Lys	3',5'-Dmt	Lys		NH ₂
3',5'-Dmt	D-Lys	3',5'-Dmt	Orn		NH ₂
3',5'-Dmt	D-Lys	3',5'-Dmt	Dab		NH ₂
3',5'-Dmt	D-Lys	3',5'-Dmt	Dap		NH ₂
Tyr	D-Lys	Phe	Arg		NH ₂
Tyr	D-Orn	Phe	Arg		NH ₂
Tyr	D-Dab	Phe	Arg		NH ₂
Tyr	D-Dap	Phe	Arg		NH ₂
2',6'-Dmt	D-Arg	Phe	Arg		NH ₂
2',6'-Dmt	D-Lys	Phe	Arg		NH ₂
2',6'-Dmt	D-Orn	Phe	Arg		NH ₂
2',6'-Dmt	D-Dab	Phe	Arg		NH ₂
3',5'-Dmt	D-Dap	Phe	Arg		NH ₂
3',5'-Dmt	D-Arg	Phe	Arg		NH ₂

[0293]

3',5'-Dmt	D-Lys	Phe	Arg		NH ₂
3',5'-Dmt	D-Orn	Phe	Arg		NH ₂
Tyr	D-Lys	Tyr	Arg		NH ₂
Tyr	D-Orn	Tyr	Arg		NH ₂
Tyr	D-Dab	Tyr	Arg		NH ₂
Tyr	D-Dap	Tyr	Arg		NH ₂
2',6'-Dmt	D-Arg	2',6'-Dmt	Arg		NH ₂
2',6'-Dmt	D-Lys	2',6'-Dmt	Arg		NH ₂
2',6'-Dmt	D-Orn	2',6'-Dmt	Arg		NH ₂
2',6'-Dmt	D-Dab	2',6'-Dmt	Arg		NH ₂
3',5'-Dmt	D-Dap	3',5'-Dmt	Arg		NH ₂
3',5'-Dmt	D-Arg	3',5'-Dmt	Arg		NH ₂
3',5'-Dmt	D-Lys	3',5'-Dmt	Arg		NH ₂
3',5'-Dmt	D-Orn	3',5'-Dmt	Arg		NH ₂
Mmt	D-Arg	Phe	Lys		NH ₂
Mmt	D-Arg	Phe	Orn		NH ₂
Mmt	D-Arg	Phe	Dab		NH ₂
Mmt	D-Arg	Phe	Dap		NH ₂
Tmt	D-Arg	Phe	Lys		NH ₂
Tmt	D-Arg	Phe	Orn		NH ₂
Tmt	D-Arg	Phe	Dab		NH ₂
Tmt	D-Arg	Phe	Dap		NH ₂
Hmt	D-Arg	Phe	Lys		NH ₂
Hmt	D-Arg	Phe	Orn		NH ₂
Hmt	D-Arg	Phe	Dab		NH ₂
Hmt	D-Arg	Phe	Dap		NH ₂
Mmt	D-Lys	Phe	Lys		NH ₂
Mmt	D-Lys	Phe	Orn		NH ₂
Mmt	D-Lys	Phe	Dab		NH ₂
Mmt	D-Lys	Phe	Dap		NH ₂
Mmt	D-Lys	Phe	Arg		NH ₂
Tmt	D-Lys	Phe	Lys		NH ₂
Tmt	D-Lys	Phe	Orn		NH ₂
Tmt	D-Lys	Phe	Dab		NH ₂
Tmt	D-Lys	Phe	Dap		NH ₂
Tmt	D-Lys	Phe	Arg		NH ₂
Hmt	D-Lys	Phe	Lys		NH ₂
Hmt	D-Lys	Phe	Orn		NH ₂
Hmt	D-Lys	Phe	Dab		NH ₂

	Hmt	D-Lys	Phe	Dap		NH ₂
	Hmt	D-Lys	Phe	Arg		NH ₂
	Mmt	D-Lys	Phe	Arg		NH ₂
	Mmt	D-Orn	Phe	Arg		NH ₂
	Mmt	D-Dab	Phe	Arg		NH ₂
	Mmt	D-Dap	Phe	Arg		NH ₂
	Mmt	D-Arg	Phe	Arg		NH ₂
	Tmt	D-Lys	Phe	Arg		NH ₂
[0294]	Tmt	D-Orn	Phe	Arg		NH ₂
	Tmt	D-Dab	Phe	Arg		NH ₂
	Tmt	D-Dap	Phe	Arg		NH ₂
	Tmt	D-Arg	Phe	Arg		NH ₂
	Hmt	D-Lys	Phe	Arg		NH ₂
	Hmt	D-Orn	Phe	Arg		NH ₂
	Hmt	D-Dab	Phe	Arg		NH ₂
	Hmt	D-Dap	Phe	Arg		NH ₂
	Hmt	D-Arg	Phe	Arg		NH ₂

[0295] Dab= 二氨丁基

[0296] Dap= 二氨基丙酸

[0297] Dmt= 二甲基酪氨酸

[0298] Mmt=2' - 甲基酪氨酸

[0299] Tmt=N, 2', 6' - 三甲基酪氨酸

[0300] Hmt=2' - 羟基 -6' - 甲基酪氨酸

[0301] dnsDap=β - 丹磺酰 -L-α, β - 二氨基丙酸

[0302] atnDap=β - 邻氨基苯甲酰 -L-α, β - 二氨基丙酸

[0303] Bio= 生物素

[0304] 具有 μ 型阿片受体激动剂活性的肽通常是那些在 N 末端(即, 第一氨基酸位置)上具有酪氨酸残基或酪氨酸衍生物的肽。适合的酪氨酸衍生物包括 2' - 甲基酪氨酸(Mmt)、2', 6' - 二甲基酪氨酸(2', 6' -Dmt)、3', 5' - 二甲基酪氨酸(3', 5' -Dmt)、N, 2', 6' - 三甲基酪氨酸(Tmt) 和 2' - 羟基 -6' - 甲基酪氨酸(Hmt)。

[0305] 不具有 μ 型阿片受体激动剂活性的肽通常在 N 末端(即, 氨基酸位置 1) 上不具有酪氨酸残基或酪氨酸衍生物。N 末端上的氨基酸可以是与酪氨酸不同的任何天然存在的氨基酸或非天然存在的氨基酸。在一个实施方式中, N 末端上的氨基酸是苯丙氨酸或其衍生物。苯丙氨酸的示例性衍生物包括 2' - 甲基苯丙氨酸(Mmp)、2', 6' - 二甲基苯丙氨酸(2', 6' -Dmp)、N, 2', 6' - 三甲基苯丙氨酸(Tmp) 和 2' - 羟基 -6' - 甲基苯丙氨酸(Hmp)。

[0306] 表 5 和表 6 中显示的肽的氨基酸可以是左旋结构或右旋结构。

[0307] 在一些实施方式中, 芳香族阳离子肽包括至少一个精氨酸残基和 / 或至少一个赖氨酸残基。在一些实施方式中, 精氨酸残基和 / 或赖氨酸残基作为电子受体且参与质

子耦合电子转移。另外地或可替代地,在一些实施方式中,芳香族阳离子肽包括形成“电荷-环-电荷-环”构型的序列,例如存在于 SS-31 中的序列。另外地或可替代地,在一些实施方式中,芳香族阳离子肽包括包含硫醇的残基,例如半胱氨酸和蛋氨酸。在一些实施方式中,包括包含硫醇的残基的肽直接提供电子且还原细胞色素 c。在一些实施方式中,芳香族阳离子肽包括在肽的 N- 末端和 / 或 C- 末端的半胱氨酸。

[0308] 在一些实施方式中,提供了肽多聚体。例如,在一些实施方式中,提供二聚体,例如 SS-20 二聚体 :Phe-D-Arg-Phe-Lys-Phe-D-Arg-Phe-Lys。在一些实施方式中,二聚体为 SS-31 二聚体 :D-Arg-2',6' -Dmt-Lys-Phe-D-Arg-2',6' -Dmt-Lys-Phe-NH₂。在一些实施方式中,多聚体为三聚体、四聚体和 / 或五聚体。在一些实施方式中,多聚体包括不同单体肽的组合(例如与 SS-31 肽连接的 SS-20 肽)。在一些实施方式中,这些较长的类似物可用作治疗分子和 / 或用在文中所公开的传感器、开关和导体中。

[0309] 在一些实施方式中,文中描述的芳香族阳离子肽包括全部左旋(L) 氨基酸。

[0310] 肽合成

[0311] 可以通过本领域熟知的任何方法来合成肽。例如,用于以化学方式合成肽的合适方法包括 Stuart 和 Young 在以下文献中描述的方法 :Solid Phase Peptide Synthesis, 第二版, Pierce 化学公司(Pierce Chemical Company) (1984 年); 以及 Methods Enzymol., 289, 学术出版社公司, 纽约(1997 年)。

[0312] 使肽稳定以防止酶降解的一种方式是在经受断裂的肽键处用 D- 氨基酸替代 L- 氨基酸。制备除了已存在的 D-Arg 残基外还包含一个或多个 D- 氨基酸残基的芳香族阳离子肽类似物。防止酶降解的另一方式为在肽的一个或多个氨基酸残基处的 α - 氨基的 N- 甲基化作用。这会防止通过任何肽酶而肽键断裂。示例包括 :H-D-Arg-2',6' -Dmt-Lys(N^qMe)-Phe-NH₂; H-D-Arg-2',6' -Dmt-Lys-Phe(NMe)-NH₂; H-D-Arg-2',6' -Dmt-Lys(N^qMe)-Phe(NMe)-NH₂; 和 H-D-Arg(N^qMe)-2',6' -Dmt(NMe)-Lys(N^qMe)-Phe(NMe)-NH₂。N^q- 甲基化的类似物具有较低的氢结合能力且可预计具有提高的肠道通透性。

[0313] 使肽酰胺键(-CO-NH-) 稳定从而防止酶降解的可替代方式为利用还原的酰胺键(Ψ [CH₂-NH]) 替换所述肽酰胺键。这可通过 Boc- 氨基酸- 醛和在固相肽合成中的生长肽链的 N- 末端氨基酸残基的氨基之间的还原烷基化反应来实现。由于降低的氢结合能力, 还原的肽键预计导致提高的细胞通透性。示例包括 :H-D-Arg- Ψ [CH₂-NH]2',6' -Dmt-Lys-Phe-NH₂、H-D-Arg-2',6' -Dmt- Ψ [CH₂-NH]Lys-Phe-NH₂、H-D-Arg-2',6' -Dmt-Lys- Ψ [CH₂-NH]Phe-NH₂、H-D-Arg-2',6' -Dmt- Ψ [CH₂-NH]Lys- Ψ [CH₂-NH]Phe-NH₂ 等。

[0314] 芳香族阳离子肽的预防用途和治疗用途

[0315] 本文中描述的芳香族阳离子肽有利于预防或治疗疾病。具体地, 本发明提供了通过给药本文描述的芳香族阳离子肽来治疗处于疾病的危险中(或易受疾病影响) 的对象的预防和治疗方案。因此, 本方法提供了通过将有效量的芳香族阳离子肽给药至有需要的对象来预防和 / 或治疗对象中的疾病。

[0316] 在一个方面, 本公开提供了一种减少有需要的哺乳动物中经受线粒体通透性转变(MPT) 的线粒体的数目、或者预防有需要的哺乳动物中线粒体通透性转变的方法, 所述方法包括对哺乳动物给药有效量的文中所描述的一种或多种芳香族阳离子肽。在另一方面, 本

公开提供了一种用于提高有需要的哺乳动物中的 ATP 合成速率的方法,所述方法包括对哺乳动物给药有效量的文中所描述的一种或多种芳香族阳离子肽。在另一方面,本公开提供了一种用于减少有需要的哺乳动物中的氧化损伤的方法,所述方法包括对哺乳动物给药有效量的文中所描述的一种或多种芳香族阳离子肽。

[0317] 氧化损伤。上文描述的肽用于减少有需要的哺乳动物中的氧化损伤。需要减少氧化损伤的哺乳动物为那些经受与氧化损伤关联的疾病、病症或治疗的哺乳动物。通常,通过例如活性氧簇(ROS)和/或活性氮簇(RNS)的自由基导致氧化损伤。ROS 和 RNS 的示例包括羟基自由基、超氧阴离子自由基、一氧化氮、氢、次氯酸(HOCl)和过氧亚硝酸盐阴离子。如果在给药有效量的上述芳香族阳离子肽之后,哺乳动物、离体器官或细胞中的氧化损伤的量降低,则氧化损伤被视为“减少”。通常,与未使用该肽治疗的对照对象相比,如果氧化损伤降低了至少约 10%、至少约 25%、至少约 50%、至少约 75% 或至少约 90%,则氧化损伤被视为减少。

[0318] 在一些实施方式中,待治疗的哺乳动物可以为患有与氧化损伤关联的疾病或症状的哺乳动物。氧化损伤可出现在哺乳动物的任何细胞、组织或器官中。在人类中,许多疾病涉及氧化应激。示例包括动脉粥样硬化、帕金森氏病、心力衰竭、心肌梗塞、老年痴呆症、精神分裂症、躁郁症、X 染色体易损综合征和慢性疲劳综合征。

[0319] 在一个实施方式中,哺乳动物可以经受与氧化损伤关联的治疗。例如,该哺乳动物可以经受再灌注。再灌注是指对其中血流减少或阻塞的任何器官或组织进行血流恢复。在再灌注期间的血流的恢复导致呼吸爆发和形成自由基。

[0320] 在一个实施方式中,由于缺氧或局部缺血,哺乳动物的血流会减少或被阻塞。在缺氧或局部缺血期间的血液供给的减少或严重减缩可由例如血栓栓塞性中风、冠状动脉粥样硬化或周围性血管疾病引起。大量的器官和组织经受局部缺血或缺氧。这样的器官的示例包括脑、心脏、肾脏、肠和前列腺。受影响的组织通常为肌肉,例如心肌、骨骼肌或平滑肌。例如,心肌局部缺血或缺氧通常由动脉粥样硬化的阻塞或血栓性的阻塞引起,动脉粥样硬化的阻塞或血栓性的阻塞导致借助心脏动脉供血和毛细血管供血而输送到心脏组织的氧收缩或减少。这样的心肌缺血或缺氧可导致受影响的心肌疼痛和坏死,并且最终可导致心力衰竭。

[0321] 所述方法还可以用于减少与任何神经退行性疾病或病症关联的氧化损伤。神经退行性疾病可以影响中枢神经系统和周围神经系统的任何细胞、组织或器官。这样的细胞、组织和器官的示例包括脑、脊髓、神经元、神经节、雪旺细胞(Schwann cell)、星形胶质细胞、少突细胞和小神经胶质细胞。神经退行性病症可以为例如中风或脑创伤或脊髓损伤的急性病症。在另一实施方式中,神经退行性疾病或病症可以为慢性神经退行性病症。在慢性神经退行性病症中,自由基例如可以导致对蛋白质造成损伤。这样的蛋白质的示例为 β 淀粉样蛋白。与由自由基造成的损伤关联的慢性神经退行性疾病的示例包括帕金森氏症、老年痴呆症、亨廷顿症(Huntington's disease)和肌萎缩侧索硬化症(也称为葛雷克氏症)。

[0322] 可以被治疗的其他病症包括子痫前期、糖尿病和老化综合征以及与老化相关的病症(比如黄斑变性、皱纹)。

[0323] 线粒体通透性转变。上文描述的肽有利于治疗与线粒体通透性转变(MPT)关联的任何疾病或病症。这样的疾病和病症包括但不限于组织或器官的局部缺血和/或再灌注、

缺氧和大量神经退行性疾病中的任一种神经退行性疾病。需要抑制或预防 MPT 的哺乳动物是那些患有这些疾病或病症的哺乳动物。

[0324] 确定基于芳香族阳离子肽的治疗药物的生物效果。在各个实施方式中,进行合适的体外测定或体内测定来确定特定的基于芳香族阳离子肽的治疗药物的效果以及其给药是否适于治疗。在各个实施方式中,可以对典型的动物模型进行体外测定,以确定给定的基于芳香族阳离子肽的治疗药物是否在预防或治疗疾病方面发挥期望的效果。在对人类对象测试之前,可以在合适的动物模型系统中测试治疗中所用的化合物,所述动物模型系统包括但不限于大鼠、小鼠、鸡、猪、牛、猴、兔等。类似地,对于体内测试,在给药至人类对象之前,可以使用本领域已知的任一动物模型系统。

[0325] 预防方法。在一方面中,本发明提供了一种通过将预防病症的发病或进展的芳香族阳离子肽给药至对象来预防该对象中的疾病的方法。在预防应用中,将芳香族阳离子肽的药物组合物或药剂以足够的量给药至易遭受疾病或病症或者处于疾病或病症的风险中的对象以消除或降低疾病的风险、减轻疾病的严重性或延迟疾病的发作,包括疾病的生物化学的、组织学的和 / 或行为的症状、该疾病的并发症和该疾病发展期间的中间病理表型呈现。预防性的芳香族阳离子肽的给药可在反常的症状特点显现之前进行,使得疾病或失调得到预防或可替代地使其进展得到延迟。可以基于上文描述的筛选试验确定合适的化合物。

[0326] 治疗性方法。本发明的另一方面包括出于治疗目的来治疗疾病的方法。在治疗性应用中,将一定量的组合物或药物给药至疑似患上这样的疾病的对象或者已患有这样的疾病的对象,来充分消除或者至少部分地抑制所述疾病的病症,包括其并发症和该疾病发展中的中间病理表现型。

[0327] 给药模式和有效剂量

[0328] 可以使用本领域的技术人员所知的用于将细胞、器官或组织与肽接触的任何方法。适当的方法包括体外法、间接体内法或体内法。体内法通常包括将芳香族阳离子肽(比如上文描述的芳香族阳离子肽)给药至哺乳动物、合适地给药至人。当用在体内以治疗时,芳香族阳离子肽可以以有效的量(即具有期望的治疗效果的量)给药至对象。剂量和给药方案将取决于对象中的损伤的程度、所使用的特定的芳香族阳离子肽的性质(例如其治疗指数)、该对象以及该对象的病史。

[0329] 可以在临床前试验和临床试验期间利用内科医生和临床医生熟悉的方法来测定有效量。在所述方法中有用的肽的有效量可以通过用于给药药物组合物的多种已知方法中的任一方法来给药至需要该肽的哺乳动物。肽可以以全身给药或局部给药。

[0330] 所述肽可以配制成药学上可接受的盐。术语“药学上可接受的盐”表示由适于给药至比如为哺乳动物的患者的碱或酸制备成的盐(例如,对于给定的给药方案,具有可接受的哺乳动物安全度的盐)。然而,应当理解,所述盐不一定是药学上可接受的盐,例如那些不用来给药至患者的中间化合物的盐。药学上可接受的盐可以由药学上可接受的无机碱或有机碱以及药学上可接受的无机酸和有机酸衍生出。此外,当肽同时包含碱性部分(例如胺、吡啶或咪唑)和酸性部分(例如羧酸或四唑)时,可以形成两性离子,且所述两性离子包括在本文中使用的术语“盐”中。由药学上可接受的无机碱衍生出的盐包括铵盐、钙盐、铜盐、铁盐、亚铁盐、锂盐、镁盐、三价锰盐、二价锰盐、钾盐、钠盐和锌盐等。由药学上可接受的有机碱衍

生出的盐包括伯胺盐、仲胺盐和叔胺盐,包括取代胺盐、环胺盐、天然存在的胺盐等,比如精氨酸、甜菜碱、咖啡因、胆碱、N,N'-二苄基乙二胺、二乙胺、2-二乙胺基乙醇、2-二甲胺基乙醇、乙醇胺、乙二胺、N-乙基吗啉、N-乙基哌啶、还原葡萄糖胺、葡萄糖胺、组氨酸、海巴明青霉素(hydrabamine)、异丙胺、赖氨酸、葡甲胺、吗啉、哌嗪、哌啶、多胺树脂、普鲁卡因、嘌呤、可可碱、三乙胺、三甲胺、三丙胺、氨丁三醇等。由药学上可接受的无机酸衍生出的盐包括硼酸盐、碳酸盐、卤化氢(氢溴酸、盐酸、氢氟酸或氢碘酸)的盐、硝酸盐、磷酸盐、氨基磺酸盐和硫酸盐。由药学上可接受的有机酸衍生出的盐包括脂肪族羧酸(例如,柠檬酸、葡糖酸、乙醇酸、乳酸、乳糖酸、苹果酸和酒石酸)的盐、脂肪族单羧酸(例如,醋酸、丁酸、甲酸、丙酸和三氟乙酸)的盐、氨基酸(例如,天冬氨酸、谷氨酸)的盐、芳香羧酸(例如,苯甲酸、对氯苯甲酸、二苯乙酸、龙胆酸、马尿酸和三苯基乙酸)的盐、芳香羧酸(例如,邻羟基苯甲酸、对羟基苯甲酸、1-羟基萘-2-羧酸和3-羟基萘-2-羧酸)的盐、抗坏血酸盐、二羧酸(例如,富马酸、马来酸、草酸和琥珀酸)盐、葡萄糖醛酸盐、扁桃酸盐、黏液酸盐、烟酸盐、乳清酸盐、双羟萘酸盐、泛酸盐、磺酸(例如,苯磺酸、樟脑磺酸、乙二磺酸(edisylic)、乙磺酸、羟乙磺酸、甲磺酸、萘磺酸、萘-1,5-二磺酸、萘-2,6-二磺酸和对甲苯磺酸)的盐、羟萘甲酸(xinafoic acid)的盐等。在一些实施方式中,盐为醋酸盐。另外地或可替代地,在其他实施方式中,盐为三氟醋酸盐。

[0331] 本文描述的芳香族阳离子肽可以加入到药物组合物以单独给药或联合给药至对象来治疗或预防本文中描述的疾病。所述组合物通常包括活性剂和药学上可接受的载体。本文中使用的术语“药学上可接受的载体”包括与给药药物可配伍的生理盐水、溶剂、分散介质、涂层、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延缓剂等。辅助性的活性化合物也可以加入到所述组合物中。

[0332] 通常将药物组合物制备成与其计划给药途径相符。给药途径的示例包括肠胃外(例如,静脉内、皮内、腹腔或皮下)、口服、吸入、经皮肤(局部)、眼内、离子渗入和经粘膜透过给药。用于肠胃外、皮内或皮下应用的溶液或悬浮液可以包括以下成分:无菌稀释剂,诸如注射用水、生理盐水、不挥发油、聚乙二醇、丙三醇、丙二醇或其它合成溶剂;抗菌剂,比如苯甲醇或对羟基苯甲酸甲酯;抗氧化剂,比如抗坏血酸或亚硫酸氢钠;络合剂,比如乙二胺四乙酸;缓冲液,比如醋酸盐、柠檬酸盐和磷酸盐;以及用于调节渗透压的试剂,比如氯化钠或右旋糖。可以用酸或碱来调节pH,比如盐酸或氢氧化钠。肠胃外制剂可以装在玻璃或塑料制的安瓿瓶、一次性注射器或多剂量瓶中。为了患者或治疗医师的方便,可以以包括治疗过程(例如治疗7天)所需的所有用具(例如,药瓶、稀释液瓶、注射器和针头)的试剂盒的形式提供剂量制剂。

[0333] 适于注射用途的药物组合物可以包括无菌水溶液(在水溶性的情况下)或者用于临时制备无菌注射液或分散液的分散剂或无菌粉末。为了静脉注射,合适的载体包括生理盐水、抑菌水、Cremophor EL™(BASF, 帕西波尼, N. J.) 或磷酸盐缓冲盐水(PBS)。在所有情况下,用于肠胃外给药的组合物必须无菌且应当是达到易于注射的程度的液体。用于肠胃外给药的组合物在制造和存储条件下应当稳定且必须被保存同时防止微生物(例如细菌和真菌)的污染行为。

[0334] 所述芳香族阳离子肽组合物可以包括载体,该载体可以是包括诸如水、乙醇、多元醇(例如,丙三醇、丙二醇以及液态聚乙二醇等)及其合适的混合物的溶剂或分散介质。可以

通过例如以下的方式来保持适当的流动性：利用比如卵磷脂的涂层；在分散质的情况下，通过保持所需的颗粒尺寸；和通过利用表面活性剂。可以通过各种抗菌剂和抗真菌剂来实现预防微生物的行为，例如尼泊金、氯丁醇、苯酚、抗坏血酸、硫柳汞等。可以包括谷胱甘肽和其他的抗氧化剂以防止氧化。在很多情况下，将优选地是，在该组合中包括等渗剂，比如糖、多元醇（比如甘露醇、山梨醇）或氯化钠。可以通过在该组合中包括延迟吸收的制剂来引起可注射组合物的延长吸收，所述延迟吸收的制剂例如为单硬脂酸铝或药用胶。

[0335] 可以通过将所需量的活性化合物加入具有以上列出的一种成分或多种成分的组合的适当的溶剂中、根据需要然后进行过滤灭菌来制备注射用无菌溶液。通常，通过将活性化合物加入到包括基本分散介质以及以上列出的所需的其它成分的无菌媒介物中来制备分散质。在用于制备注射用无菌溶液的无菌粉末的情况下，典型的制备方法包括真空干燥和冷冻干燥，这可以产出活性成分以及来自于先前灭菌过滤的溶液中的任何其他所需成分的粉末。

[0336] 口服组合物通常包括惰性稀释剂或可食用的载体。为了口服治疗给药，活性化合物可以与赋形剂混合并以片剂、锭剂或胶囊（例如明胶胶囊）的形式使用。还可利用液态载体来制备口服组合物以用作洗口药。药学上相容的粘合剂和 / 或辅助材料可以被包括为该组合物的一部分。所述片剂、丸剂、胶囊剂、锭剂等可以包括具有相似性质的以下成分或化合物中的任一种：粘合剂，比如微晶纤维素、黄耆胶或明胶；赋形剂，比如淀粉或乳糖；分裂剂，比如褐藻酸、羧甲淀粉钠、或玉米淀粉；润滑剂，比如硬脂酸镁或 Sterotes；助流剂，比如胶态二氧化硅；甜味剂，比如蔗糖或糖精；或者增味剂，比如薄荷、水杨酸甲酯或桔子调味品。

[0337] 关于通过吸入法给药，所述化合物可以以喷雾剂的形式从包括合适的推进物（例如，比如二氧化碳的气体）的加压容器或分配器或者喷雾器喷洒而递送。这样的方法包括第 6468798 号美国专利中描述的方法。

[0338] 本文中描述的治疗化合物的全身给药还可以通过经粘膜方法或经皮肤方法进行。对于经粘膜给药或经皮肤给药，适合于待渗透的屏障的渗透剂用在该配方中。这样的渗透剂通常是本技术领域已知的，例如，对于经粘膜给药而言，这样的渗透剂包括清洗剂、胆汁盐类或梭链孢酸衍生物。可以通过使用鼻喷入法来完成经粘膜给药。对于经皮肤给药而言，活性化合物配制成本领域普遍知道的药膏、软膏、凝胶或乳液。在一个实施方式中，经皮肤给药可以通过电离子渗透法来进行。

[0339] 治疗性蛋白质或肽可以在载体体系中配制而成。该载体可以是胶态体系。该胶态体系可以是脂质体、磷脂双分子层媒介物。在一个实施方式中，在脂质体中该治疗肽被胶囊化，同时保持肽完整性。本领域技术人员理解，有各种方法来制备脂质体。（参见：Lichtenberg 等的 *Methods Biochem. Anal.*, 33:337-462(1988)；Anselem 等的 *Liposome Technology*, CRC Press(1993)）。脂质体制剂可以延迟排出并增强细胞摄取（参见 Reddy, *Ann. Pharmacother.*, 34(7-8):915-923(2000)）。活性剂还可以载入到由药学上可接受的成分制备成的颗粒中，所述药学上可接受的成分包括但不限于可溶解的、不可溶解的、可渗透的、不可渗透的、可生物降解的或胃内滞留的聚合物或脂质体。这样的颗粒包括但不限于纳米颗粒、可生物降解的纳米颗粒、微颗粒、可生物降解的微颗粒、纳米球、可生物降解的纳米球、微球、可生物降解的微球、胶囊剂、乳剂、脂质体、胶粒以及病毒载体体系。

[0340] 该载体还可以是聚合物,比如可生物降解的、可生物相容的聚合物基质。在一个实施方式中,治疗性肽可以嵌入到聚合物基质中,同时保持蛋白质完整性。所述聚合物可以是天然的,比如多肽、蛋白质或多糖;或者可以是合成的,比如聚 α -羟酸。示例包括由例如以下物质制成的载体:胶原蛋白、纤连蛋白、弹性蛋白、乙酸纤维素、硝酸纤维素、多糖、纤维蛋白、明胶及其组合。在一个实施方式中,所述聚合物是聚乳酸(PLA)或乳酸羟基乙酸共聚物(PGLA)。可以以各种形式和尺寸来制备并分离聚合物基体,包括微球和纳米球。聚合物制剂可以引起治疗作用的期间的延长(参见:Reddy, *Ann. Pharmacother.*, 34(7-8):915-923(2000))。用于人类生长激素(hGH)的聚合物制剂已用在临床试验中(参见:Kozarich 和 Rich, *Chemical Biology*, 2:548-552(1998))。

[0341] 高分子微球持续释放剂的示例在 PCT 公布 W099/15154 (Tracy 等)、第 5674534 号美国专利以及第 5716644 号美国专利(都属于 Zale 等)、PCT 公布 W096/40073 (Zale 等)以及 PCT 公布 W000/38651 (Shah 等)中予以描述。第 5674534 号美国专利以及第 5716644 号美国专利以及 PCT 公布 W096/40073 描述了包括含红细胞生成素的颗粒的聚合物基体,所述红细胞生成素的颗粒用盐来防止凝聚而稳定。

[0342] 在一些实施方式中,治疗性化合物与将保护所述治疗化合物以防止其从身体中快速排出的载体一起制备,所述载体比如控释剂,包括植入体和微胶囊化的输送体系。可以使用可生物降解的、生物相容的聚合物,比如乙烯醋酸乙烯酯、聚酞、聚乙醇酸、胶原质、聚原酸酯和聚乳酸。可以利用已知的技术来制备这样的制剂。还可以在在市场上获得所述材料,例如从 Alza Corporation 和 Nova Pharmaceuticals, Inc 买到。脂质体悬浮液(包括针对具有细胞特异性抗原的单细胞克隆抗体的特定细胞的脂质体)也可用作医学上可以接受的载体。所述胶体悬浮液可以利用本领域技术人员知道的方法来制备,比如,第 4522811 号美国专利中描述的方法。

[0343] 还可以配制所述治疗性化合物以增强细胞内传递。例如,本领域已知脂质体传递系统,例如,参见:Chonn 和 Cullis 的“Recent Advances in Liposome Drug Delivery Systems”, *Current Opinion in Biotechnology* 6:698-708(1995);Weiner 的“Liposomes for Protein Delivery:Selecting Manufacture and Development Processes”, *Immunomethods* 4(3)201-9(1994);和 Gregoriadis 的“Engineering Liposomes for Drug Delivery:Progress and Problems”*Trends Biotechnol.* 13(12):527-37(1995)。以下文献描述了利用融合脂质体在体内和在体外将蛋白质传递至细胞:Mizguchi 等的 *Cancer Lett.* 100:63-69(1996)。

[0344] 可以通过细胞培养或试验动物中的标准药理学过程来确定治疗性药物的用量、毒性和治疗效率,例如,用于确定 LD50 (总数 50% 的致命剂量)和 ED50 (总数 50% 中有效治疗的剂量)。毒性和治疗效果之间的剂量比是治疗指数,且其可以表示为比率 LD50/ED50。表现出高治疗指数的化合物是优选的。尽管具有毒性副作用的化合物可以使用,但应当考虑设计传递系统,该传递系统将这样的化合物靶向组织的受影响的位置,以将对未感染的细胞的可能损伤最小化,且由此降低副作用。

[0345] 从细胞培养试验和动物研究获取的数据可以用在配制人类中使用的剂量范围中。这样的化合物的剂量优选地位于包括毒性很小或无毒的 ED50 的循环浓度的范围中。根据使用的剂量类型和利用的给药途径,剂量可以在该范围内变化。对于该方法中使用的任何

化合物而言,可以最初根据细胞培养试验来计算出治疗有效的剂量。可以在动物模型中制定一剂量来获得包括细胞培养中确定的 IC50 (即,测试化合物的获得最大抑制病症的一半的浓度)的循环血药浓度范围。这样的制剂可以用来更准确地确定人类中的有用剂量。可以例如通过高效液相色谱法测定血药浓度。

[0346] 通常,芳香族阳离子肽的足以获得治疗效果或预防效果的有效量的范围为约 0.000001 毫克/千克体重/天到约 10000 毫克/千克体重/天。合适地,剂量范围从约 0.0001 毫克/千克体重/天到约 100 毫克/千克体重/天。例如,剂量可以是每天、每两天或每三天 1 毫克/千克体重或者 10 毫克/千克体重,或者在每周、每两周或每三周的 1 毫克/千克体重到 10 毫克/千克体重的范围中。在一个实施方式中,肽的单剂量的范围从 0.1 毫克/千克体重到 10000 毫克/千克体重。在一个实施方式中,芳香族阳离子肽在载体中的浓度的范围从 0.2 毫克/递送的每毫升到 2000 毫克/递送的每毫升。示例性的治疗方法每天或每周提供一次给药。在治疗应用中,在相对短的时间间隔中有相对高的剂量有时是需要的,直到疾病的进程减缓或终止为止,且优选地直到对象显示出部分或完全地改善了疾病的病症。其后,可以对患者实行预防性的给药方式。

[0347] 在一些实施方式中,芳香族阳离子肽的治疗有效的量可以限定为目标组织中的肽的浓度为 10^{-12} 摩尔到 10^{-6} 摩尔,例如约 10^{-7} 摩尔。可以以 0.01 毫克/千克到 100 毫克/千克的全身剂量或身体表面面积的等效剂量来给予该浓度。优化剂量的时间表,以保持目标组织的治疗浓度,最优选地通过每天或每周给药,但也包括连续给药(例如,输液或经皮肤施药)来进行。

[0348] 在一些实施方式中,芳香族阳离子肽的剂量提供为从约 0.001mg/kg/h 到约 0.5mg/kg/h、合适地从约 0.01mg/kg/h 到约 0.1mg/kg/h。在一个实施方式中,剂量提供为从约 0.1mg/kg/h 到约 1.0mg/kg/h,合适地从约 0.1mg/kg/h 到约 0.5mg/kg/h。在一个实施方式中,剂量提供为从约 0.5mg/kg/h 到约 10mg/kg/h,合适地从约 0.5mg/kg/h 到约 2mg/kg/h。

[0349] 本领域技术人员将认识到,某些因素可以影响有效地治疗一对象的剂量和时间,包括但不局限于疾病或失调的严重程度、先前的治疗、健康情况和/或对象的年龄以及存在的其它疾病。而且,利用本文描述的治疗有效量的治疗组合物来治疗一对象可以包括单次治疗或一系列治疗。

[0350] 根据本发明的方法治疗的哺乳动物可以是任何动物,这些动物例如包括农场动物,如羊、猪、牛和马;宠物动物,如狗和猫;实验室里的动物,如小鼠、大鼠和兔。在优选的实施方式中,所述哺乳动物是人。

[0351] 电子传递中的芳香族阳离子肽

[0352] 通过电子流经线粒体内膜(IMM)的电子传递链(ETC)来驱动线粒体 ATP 合成。电子流经该电子传递链可被描述为一系列的氧化/还原过程。电子从电子供体(NADH 或 QH₂)经过一系列的电子受体(复合物 I-IV),最终到达最终的电子受体:分子氧。与 IMM 松散结合的细胞色素 c 在复合物 III 和复合物 IV 之间传递电子。

[0353] 经过 ETC 的电子快速分流对于防止发生短路是重要的,短路会导致电子逸出和产生自由基中间体。在电子供体和电子受体之间的电子传递(ET)的速率随着两者之间的距离呈指数下降,且超交换 ET 限制为 20\AA 。长范围的 ET 可在多步电子跳跃过程中实现,其中,

供体和受体之间的总距离被分成一系列的较短、且因此较快的 ET 步骤。在 ETC 中,长距离的有效 ET 通过沿着 IMM 战略地定位的辅助因子辅助,辅助因子包括 FMN、FeS 簇和血红素。芳香族氨基酸(例如 Phe、Tyr 和 Trp)也可促进电子经过重叠 π 云传递到血红素,这以细胞色素 c 为例被特别示出(参见实验例)。具有合适的氧化电势的氨基酸(Tyr、Trp、Cys、Met)可通过充当中间电子载体来作为跳板(stepping stone)作用。另外,当 Tyr 的羟基传递电子时,其可失去质子,附近的碱基(例如 Lys)的存在可导致甚至更为有效的质子耦合 ET。

[0354] 已表明了,靶向线粒体的过氧化氢酶(mCAT)的过度表达改善小鼠老化(例如减少症状)并且延长小鼠的寿命。这些实施例识别可以减少线粒体氧化应激并且保护线粒体功能的“可作为药物的”化学化合物。由于线粒体为细胞内的活性氧簇(ROS)的主要源,因此,抗氧化剂必须被输送到线粒体以便限制对线粒体 DNA、电子传递链(ETC)的蛋白质和线粒体脂质膜的氧化损伤。我们发现了一系列的选择性地靶向线粒体内膜(IMM)并聚集在线粒体内膜中的合成的芳香族阳离子四肽。这些肽中的一些肽含有氧化还原活性的氨基酸,这些氨基酸可以经受单电子氧化并且表现为靶向线粒体的抗氧化剂。在细胞和动物研究中,文中所公开的肽(例如肽 D-Arg-2' 6' -Dmt-Tyr-Lys-Phe-NH₂)减少了线粒体 ROS 并且保护线粒体功能。近来的研究表明,该肽起到的抵抗线粒体氧化应激的保护作用可比得上利用线粒体过氧化氢酶的过度表达所观察到的抵抗线粒体氧化应激的保护作用。尽管清除自由基为减少氧化应激的最常用的方法,但存在可以使用的其他潜在机理,包括促进电子转移以减少电子泄露和提高线粒体还原电位。

[0355] 充足的间接证据表明,氧化应激造成了正常老化和一些重大疾病的很多后果,重大疾病包括心血管疾病、糖尿病、神经退行性疾病和癌症。氧化应激通常被定义成促氧化剂和抗氧化剂之间的失衡。然而,尽管大量的科学证据支持组织的氧化损伤越来越多,但对抗氧化剂的大量的临床研究并没有显示出对这些疾病有显著的健康益处。其中一个原因可能是由于可用的抗氧化剂不能到达促抗氧化剂的产生部位。

[0356] 线粒体电子传递链(ETC)为 ROS 的主要的细胞内生产者,以及线粒体本身最易于受到氧化应激的损害。因此,保护线粒体功能将是防止由线粒体氧化应激导致的细胞死亡的先决条件。靶向线粒体的过氧化氢酶(mCAT)(而不是靶向线粒体的过氧化物酶体(pCAT))的过度表达的益处提供了以下概念验证,即靶向线粒体的抗氧化剂将是克服老化的损害效应所必需的。然而,将化学抗氧化剂充分输送到 IMM 仍然是挑战。

[0357] 一种肽类似物 D-Arg-2' 6' -Dmt-Tyr-Lys-Phe-NH₂ 具有内在的抗氧化剂性能,这是因为改性的酪氨酸残基为氧化还原活性的并且可以经受单电子氧化。我们已经示出,该肽可以中和 H₂O₂、羟自由基和过氧亚硝基,并且抑制脂质过氧化。该肽在缺血再灌注损伤、神经退行性疾病和新陈代谢综合症的动物模型中已经显示出显著的功效。

[0358] 靶向线粒体的肽的设计包含并且增强了以下作用模式中的一种或多种:(i)清除过量的 ROS,(ii)通过促进电子传递来减少 ROS 生成,或(iii)提高线粒体还原能力。肽分子的优点在于,其可以包括可充当氧化还原中心、促进电子传递或增加巯基的天然或非天然的氨基酸,同时保留线粒体靶向所需的芳香族阳离子基序。

[0359] 用于电子感测和光学感测的芳香族阳离子肽

[0360] 如实施例所示,改变样品中的文中所公开的芳香族阳离子肽的浓度改变了细胞色素 c 的电性质和光致发光性质,该芳香族阳离子肽包括包含氨基酸序

列 Tyr-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ (SS-01)、2',6'-Dmt-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ (SS-02)、Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ (SS-20) 或 D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ (SS-31) 的肽。具体地,增大芳香族阳离子肽相对于细胞色素 c 的浓度引起细胞色素 c 的导电性和光致发光效率增大。芳香族阳离子肽浓度的合适范围包括但不限于 0-500mM、0-100mM、0-500 μ M、0-250 μ M 和 0-100 μ M。

[0361] 在导电性和光致发光效率上的这些变化可被用于如下所述的导电、感测、开关、和 / 或增强细胞色素 c 的发光。例如,细胞色素 c、芳香族阳离子肽、和 / 或掺杂有肽的细胞色素 c 可用于制造和 / 或增强传感器、压力 / 温度 / pH 至电流的变换器、场效应晶体管(包括发光晶体管)、发光装置(例如二极管和显示器)、电池、和太阳能电池。芳香族阳离子肽浓度水平(例如在细胞色素 c 中)也可在空间上不同以形成具有不同带隙的区域;带隙的这些变化可用于形成异质结、量子阱、梯度带隙区等,其可被整合到上述的传感器、晶体管、二极管以及太阳能电池中以提高它们的性能。

[0362] 掺杂有芳香族阳离子肽的细胞色素 c 传感器

[0363] 图 8 示出示例性传感器 100,其通过测量掺杂有本文所公开的任一种肽(例如 Tyr-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ (SS-01)、2',6'-Dmt-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ (SS-02)、Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ (SS-20) 或 D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ (SS-31))的细胞色素 c 层 110 的导电性(电阻)的变化来检测测试基底 130 的 pH 和 / 或温度的变化。当基底 130 的温度和 / 或 pH 变化时,芳香族阳离子肽扩散到掺杂有肽的细胞色素 c 层 110 中或者从该层中扩散出去,这进而导致掺杂有肽的细胞色素 c 层 110 的导电性变化。计量仪 120 通过借助阳极 122 和阴极 124 向细胞色素 c 层 110 施加电势(电压)来测量导电性的变化。当导电性升高时,在阳极 122 和阴极 124 之间流动的电流增大。当导电性下降时,在阳极 122 和阴极 124 之间流动的电流减小。替选的传感器可包括用于更灵敏的电阻测量的另外的电端子(即阳极和阴极)。例如,替选的传感器可包括用于电阻的开尔文感测测量的四个电力端子。

[0364] 图 9 示出替选的传感器 101,其通过测量掺杂有肽的细胞色素 c 层 110 的光致发光性的变化来检测测试基底 130 的 pH 和 / 或温度的变化。光源 140,例如激光器或发光二极管(LED),以激发波长(例如 532.8nm)照射掺杂有肽的细胞色素 c 层 110。如图 3A 所示,在激发波长下照射掺杂有肽的细胞色素 c 层 110 将电子从价带激发到受激态。(如本领域技术人员所理解的,在价带和受激态之间的带隙与激发波长成比例)。在短的弛豫时间后,电子从受激态衰减至导带。当电子从导带弛豫至价带时,掺杂有肽的细胞色素 c 层 110 以发光波长(例如 650nm)发射光子,该发光波长由价带和导带之间的带隙所固定。

[0365] 如图 3B 所示,对于(来自源 140)的恒定激发强度,细胞色素 c 发出的光的强度随着芳香族阳离子肽浓度进行非线性变化:芳香族阳离子肽浓度从 0 μ M 增至 50 μ M 使在发光波长下的发光强度从约 4200CPS 增至约 4900CPS,然而芳香族阳离子肽浓度从 50 μ M 倍增至 100 μ M 使在发光波长下的发光强度从约 4900CPS 增至约 7000CPS。因此,当掺杂有肽的细胞色素 c 层 110 中的芳香族阳离子肽浓度由于测试基底 130 的 pH 和 / 或温度的变化而改变时,发光波长的强度也发生变化。利用光检测器 150 检测该强度变化产生测试基底 130 的 pH 和 / 或温度的指示。

[0366] 在一些情况下,芳香族阳离子肽浓度的变化可引起光发射波长的变化,而光发射

强度不变化,或者可引起除了光发射强度变化外,光发射波长也变化。发射波长的这些变化可通过设置在掺杂有肽的层 110 和检测器 150 之间的滤波器 152 对所发出的光进行滤波来检测。滤波器 152 使通带内的光透射并反射和 / 或吸收在通带外的光。如果发射波长由于 pH 和 / 或温度引起的肽浓度变化而落在通带外,则检测器 150 检测不到任何光,这种效应可被利用以确定肽浓度的变化。可替代地,芳香族阳离子肽引起的发光波长的变化可通过分析未经滤波的发射光谱来测量,例如利用光谱分析仪(未示出)来代替光检测器 150。

[0367] 本领域技术人员将易于理解到,本文所公开的芳香族阳离子肽,例如肽 Tyr-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ (SS-01)、2',6'-Dmt-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ (SS-02)、Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ (SS-20)或 D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ (SS-31),也可用于提高和 / 或调整光刺激的和 / 或电刺激的细胞色素 c 发出的光的波长。例如,以 100 μM 的肽浓度掺杂细胞色素 c 几乎使 650nm 下发射的光的强度增倍,如图 3B 所示。因此,图 9 的传感器 101 也可被用作增强型发光元件。与半导体 LED 和半导体显示器不同,基于掺杂有肽的细胞色素 c 的增强型发光元件可以制成任意形状且可在柔性基底上制作。另外,肽浓度可被设定以提供所需的照射水平和 / 或照射波长。

[0368] 使用细胞色素 c、芳香族阳离子肽、和 / 或掺杂有肽的细胞色素 c 制作的传感器可用于检测压力、温度、pH、外加场、和 / 或影响导电性的其他性质的变化。例如,传感器 100 和传感器 101 可用于检测影响细胞色素 c 中的芳香族阳离子肽的浓度的压力变化;当压力变化引起芳香族阳离子肽扩散到细胞色素 c 中时,导电性和 / 或发光强度增大,反之亦然。影响细胞色素 c 中的肽浓度的温度和 pH 的变化产生相似的结果。改变细胞色素 c 中的肽浓度的外加场(例如电磁场)也引起所测量的导电性、发射强度和发射波长变化。

[0369] 掺杂有芳香族阳离子肽的细胞色素 c 传感器也可用于感测本文中所公开的生物活性和 / 或化学活性。例如,示例性的传感器可用于识别其他分子和 / 或原子,所述其他分子和 / 或原子连接至芳香族阳离子肽和 / 或细胞色素 c 且改变掺杂有肽的细胞色素 c 的电气特性和发光特性。在一些情况下,掺杂有单个肽分子(例如 Tyr-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ (SS-01)、2',6'-Dmt-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ (SS-02)、Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ (SS-20)或者 D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ (SS-31)的分子)的细胞色素 c 的单个分子能够检测由芳香族阳离子肽分子自身结合至细胞色素 c 分子或者芳香族阳离子肽分子自身从细胞色素 c 分子释放而引起的压力、温度、pH、外加场等的微小变化。单分子传感器(和 / 或多分子传感器)可以以有规律的(例如周期性的)或无规律的阵列进行布置以检测应用中的任一上述性质,该应用包括但不限于酶分析(例如葡萄糖测定和乳酸盐测定)、DNA 分析(例如,聚合酶链反应和高通量测序)和蛋白质组学。

[0370] 微流体中掺杂有芳香族阳离子肽的细胞色素 c

[0371] 另外,掺杂有肽的细胞色素 c 传感器可用在微流控设备和光流控设备中,例如以将压力、温度、pH、外加场等的变化转换成电流和 / 或电压以用在混合式生物 / 化学 / 电子处理器中。该传感器也可用于微流控设备和光流控设备,例如在美国专利申请公布 No. 2009/0201497、美国专利申请公布 No. 2010/0060875 和美国专利申请公布 No. 2011/0039730 所描述的那些设备,这些专利分别通过引用全部并入文中。

[0372] 光流控学指的是在微米规模到纳米规模上使用流体来控制光,反之亦可。通过利用微流控制,流体的光学特性可被精确地且灵活地控制以实现可重构的光学元件,该光学

元件利用固态技术难以或者不能够实现。另外,在微米 / 纳米规模的流体的独特行为引起可以使用光控制流体。基于掺杂有芳香族阳离子肽的细胞色素 c 的光流控设备的应用包括但不限于:自适应光学元件;使用微共振器进行检测;流控波导管;荧光微流控光源;集成纳米光子学和微流控学;微光谱学;微流控量子点条形码;用于非线性光学应用的微流控学;光流控显微镜;用于可重构的光子学的光流控量子级联激光器和芯片上分子检测器;使用纳米颗粒混合物的光存储器;以及用于集成的光-流控应用的测试管微腔激光器。

[0373] 包括掺杂有芳香族阳离子肽的细胞色素 c 的传感器可用在微流控处理器中以将流体流动的变化引起的压力变化转换成电信号和 / 或光信号的变化,该电信号和 / 或光信号的变化可使用常规的电检测器和如上所述的光检测器容易地检测到。掺杂有肽的细胞色素 c 转换器可被用于控制微流泵、处理器和其他装置,包括可调的微型透镜阵列。

[0374] 用于开关和晶体管的掺杂有芳香族阳离子肽的细胞色素 c

[0375] 掺杂有芳香族阳离子肽的细胞色素 c 也可用作电学开关或光学开关或者可用在电学开关或光学开关中,例如在图 10 中所示的开关 201。开关 201 包括储存器 220,其容纳芳香族阳离子肽 200,例如 Tyr-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ (SS-01)、2',6'-Dmt-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ (SS-02)、Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ (SS-20)或 D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ (SS-31)),所述芳香族阳离子肽通过导管 221 和通道 210 与细胞色素 c 或掺杂有肽的细胞色素 c110 流体连通。在操作中,导管 221 开放以允许肽 200 沿着方向 212 流入通道 210。通过跨通道 210 和细胞色素 c130 之间的边界形成温度和 / 或 pH 梯度来驱动开关 201。根据梯度的方向,肽 200 扩散到细胞色素 c130 内或者从细胞色素 c 扩散出去,这导致导电性和光致发光性质发生如上所述的变化。由于肽浓度的波动引起的导电性的变化可用于调节阳极 222 和阴极 224 之间的电流。

[0376] 在图 10 中示出的开关 201 作为有机场效应晶体管 (OFET) 作用:其响应于与跨通道 210 和细胞色素 c130 之间的边界的温度和 / 或 pH 梯度相对应的“场”的变化来调节电流。每一晶体管包括细胞色素 c 沟道层或掺杂有芳香族阳离子肽的细胞色素 c 沟道层、栅级、源级和漏极。沟道层设置在下部基底的上方。源极和漏极设置在沟道层的上方且分别与沟道层的相对的两侧接触。栅极设置在沟道层的上方且定位在源极和漏极之间。以上的有机电致发光器件与用于通过沟道层接收从源极输出的电流且根据电流的大小进行发光的漏极电连接。

[0377] 与常规的晶体管相比较,本发明的晶体管(例如掺杂有肽的细胞色素 cOFET)可制造起来简单。常规的无机晶体管需要高温(例如 500°C -1,000°C),而 OFET 可在室温和 200°C 之间进行制造。OFET 甚至可在易于受热损害的塑料基底上形成。OFET 可用于实现轻质的、薄的且柔性的装置元件,这允许它们用在各种独特装置中,例如柔性显示器和传感器。

[0378] OFET 可用于实现数字信号处理所需的基本逻辑运算。例如,晶体管可用于形成(非线性的)逻辑门,例如非门和或非门,逻辑门可连接在一起以处理数字信号。掺杂有肽的细胞色素 c 晶体管可用在下列应用中,所述应用包括但不限于:射极跟随器(例如,用于电压调节)、电流源、计数器、模数转换器等;以及用在通用计算和专用处理中,例如计算机联网处理、无线通信(例如软件定义无线电)等。对于晶体管的更多应用,参见 P. Horowitz 和 W. Hill 的“The Art of Electronics”,其全部内容通过引用并入文中。

[0379] 晶体管也可用于通过将一种性质(例如 pH)的小的变化变换成另一性质(例如导电

性)的大变化来放大信号;众所周知,放大作用可用于多种应用,包括无线(无线电)传输、声重发、以及(模拟)信号处理。掺杂有肽的细胞色素 c 晶体管也可用于制造运算放大器(op amps),其用在反相放大器、同相放大器、反馈回路、振荡器等中。对于有机晶体管的更多信息,参见美国专利 No. 7, 795, 611、美国专利 No. 7, 768, 001、美国专利 No. 7, 126, 153 和美国专利 No. 7, 816, 674, 其全部内容分别通过引用并入文中。

[0380] 用于随机存取存储器的掺杂有芳香族阳离子肽的细胞色素 c

[0381] 基于细胞色素 c 和 / 或掺杂有如文中所公开的芳香族阳离子肽(例如 Tyr-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ (SS-01)、2',6'-Dmt-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ (SS-02)、Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ (SS-20) 或 D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ (SS-31)) 的细胞色素 c 的晶体管,也可用于实现存储器,例如静态的或者动态的随机存取存储器(RAM),其存数用于数字计算的信息。众所周知,六个晶体管可连接在一起以形成静态 RAM (SRAM) 单元,其存储一位信息而不需周期性的刷新。基于细胞色素 c 和 / 或掺杂有芳香族阳离子肽的细胞色素 c 的晶体管也可用于实现其他类型的存储器,包括用于数字计算的动态随机存取存储器(DRAM)。众所周知, RAM 可用于执行用于诸如如上所述的应用的数字计算。

[0382] 掺杂有肽的细胞色素 c 晶体管可形成在可编程的或预先编程的生物阵列中,很像常规的晶体管形成在集成电路中。如果由于肽活性引起细胞色素 c 的导电性(电阻率)变化足够高,则示例性的晶体管(开关)可由掺杂有单个肽分子的单个细胞色素 c 分子制成。单分子细胞色素 c 晶体管的排列可形成以建立非常小的且密集的逻辑电路。

[0383] 用于发光晶体管的掺杂有本发明的芳香族阳离子肽的细胞色素 c

[0384] 细胞色素 c 和 / 或掺杂有如文中所公开的芳香族阳离子肽(例如 Tyr-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ (SS-01)、2',6'-Dmt-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ (SS-02)、Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ (SS-20) 或者 D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ (SS-31)) 的细胞色素 c 也可用于制造有机发光晶体管(OLET),其可引起计算机芯片上更廉价的数码显示器以及快速切换光源。基于 OLET 的光源比二极管切换得快得多,由于其平面设计,基于 OLET 的光源可更易于整合到计算机芯片中,提供了比铜线更快的芯片间数据传输。较高效率的关键是三层结构,其中薄膜相互叠置。电流水平流经顶层和底层(一层携带电子且另一层携带空穴),而漂移进中央层的载流子重新组合并发射光子。由于结合区在沟道内的位置取决于栅极电压和漏极电压,故发射区域可被调节。

[0385] 示例性的 OLET,例如在图 16 中示出的 OLET,可被构造在透明的(例如玻璃)基底上,该基底涂覆有铟锡氧化物层,该铟锡氧化物层作为晶体管的栅极且涂覆有聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)层,PMMA 为一种常见的介电材料。多层有机结构,其可包括电子传输材料(例如,掺杂有肽的细胞色素 c) 薄膜、发射材料薄膜、以及空穴传输材料,可被沉积在 PMMA 上。最后,金属触点被沉积在有机结构上面以提供源极和漏极。在 OLET 中的光发射成沿着发光层的带条,而不是如在 OLED 中那样向上穿过触点。发光层的形状可进行变化以使其更易于将发射的光耦合到光纤、波导和其他结构中。

[0386] 由 Hepp 等在 2003 年开发的有机发光晶体管(OLET)以单极 p- 型模式进行操作且产生接近于金漏电极(电子注入)的绿色电致发光。然而,由于单极操作模式,Hepp 装置的发射区域不能被调整。平衡的双极型传输对于提高 OLET 的量子效率而言是极其需要的,且对于单组分晶体管和异质结构晶体管二者而言是重要的。

[0387] 双极型 OLET 可基于空穴传输材料和电子传输材料(例如,掺杂有肽的细胞色素 c)的异质结构。双极型 OLET 的光强度可通过漏极-源极电压以及栅极电压二者进行控制。基于相同材料(例如,掺杂有肽的细胞色素 c)的 OLET 的载流子迁移率和电致发光性质可通过改变两种组分的比率而进行调节。空穴传输材料的较高浓度可导致不发光的双极型 FET,而较高的掺杂有肽的细胞色素 c 的浓度(或者细胞色素 c 中的肽浓度)可导致发光单极型 n- 沟道 FET。

[0388] 基于两组分的分层结构的 OLET 可通过相继地沉积空穴传输材料和电子传输材料而实现。形态分析表明在两个有机薄膜之间有连续的界面,这对于控制 OLET 的界面质量和产生的光电性质是关键。在连续的沉积工艺期间,通过改变基底的倾角,可使叠置的 p-n 异质结构限定在晶体管沟道内部。发射区域(即重叠区域)远离空穴源电极和电子源电极,这避免了在金属电极处的激子和光子猝灭。还可以以替选的异质结构实现 OLET,包括静态感应晶体管与 OLED 的竖向组合、与顶栅型静态感应晶体管或顶栅型静态感应三极管类似的顶栅型 OLET、以及具有横向布置的异质结结构和二极管/FET 混合体的 OLET。有机发光晶体管的更多细节可在 Meng 等的美国专利 No. 7, 791, 068 以及 Kido 等的美国 No. 7, 633, 084 中发现,其分别通过全文引用的方式并入文中。

[0389] 可替选地,或者另外,芳香族阳离子肽浓度可被用于调节细胞色素 c110 发出的光的强度和/或波长。芳香族阳离子肽浓度的合适范围包括但不限于 0-500mM、0-100mM、0-500 μ M、0-250 μ M 和 0-100 μ M。事实上,在图 3B 中示出的发光强度的非线性变化表明掺杂有肽的细胞色素 c110 非常适合于二进制(数字)开关:当肽浓度低于预定阈值(例如 50 μ M)时,发光强度低于给定的水平,例如 5000CPS。在高于阈值的芳香族阳离子肽浓度(例如 100 μ M)下,发光强度跃至例如大约 7000CPS。可利用该非线性行为以检测或者响应于细胞色素 c110 和/或与细胞色素 c110 热连通和/或流体连通的任何层或物质的 pH 变化或温度变化。

[0390] 用于发光二极管和电致发光显示器的掺杂有芳香族阳离子肽的细胞色素 c

[0391] 细胞色素 c 和/或掺杂有文中所公开的芳香族阳离子肽(例如 Tyr-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ (SS-01)、2',6'-Dmt-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ (SS-02)、Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ (SS-20) 或者 D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ (SS-31))的细胞色素 c 可用在有机发光二极管(OLED)和电致发光显示器中。OLED 可用于各种消费品,例如手表、电话、膝上电脑、寻呼机、蜂窝式电话、数码摄像机、DVD 播放器和计算器。包含 OLED 的显示器具有多个优于传统的液晶显示器(LCD)的优势。由于基于 OLED 的显示器不需要背光,故它们可显示深暗水平且可实现相对高的对比率,即使是在广视角下。它们还可比 LCD 更薄、更有效、和更亮,LCD 需要大量的、功耗大的背光。由于这些组合特征,OLED 显示器比 LCD 显示器在重量上更轻且占用更少的空间。

[0392] OLED 通常包括置于两个电极—阳极和阴极之间的发光元件,如图 17 所示。发光元件通常包括薄有机层的叠置体,其包括空穴传输层、发光层、和电子传输层。OLED 还可包含另外的层,例如空穴注入层和电子注入层。用芳香族阳离子肽(以及可能的其它掺杂剂)掺杂细胞色素 c 发射层可增强 OLED 的电致发光效率和控制颜色输出。掺杂有肽的细胞色素还可用作电子传输层。

[0393] 在 OLED 中,掺杂有芳香族阳离子肽(例如 Tyr-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ (SS-01)、

2', 6' -Dmt-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ (SS-02)、Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ (SS-20) 或者 D-Arg-2', 6' -Dmt-Lys-Phe-NH₂ (SS-31)) 的细胞色素 c 的层涂覆(例如旋涂)或者设置在两个电极之间,其中至少一个电极是透明的。例如,基于 OLED 的显示器可丝网印刷到任意合适的基底上、利用喷墨打印机印刷到任意合适的基底上、或者使用滚动式-气相沉积沉积到任意合适的基底上,基底包括刚性的和柔性的基底。典型基底在电磁谱的可见区中是至少部分地可透射的。例如,对于电磁谱的可见区(400nm 至 700nm)中的光,透明基底(和电极层)可具有至少 30%、可替代地至少 60%、可替代地至少 80% 的透光百分率。基底的示例包括但不限于:半导体材料,例如硅、具有二氧化硅表面层的硅、和砷化镓;石英;熔融石英;氧化铝;陶瓷;玻璃;金属箔;聚烯烃,例如聚乙烯、聚丙烯、聚苯乙烯和聚对苯二甲酸乙二醇酯;氟碳聚合物,例如聚四氟乙烯和聚氟乙烯;聚酰胺,例如尼龙;聚酰亚胺;聚酯,例如聚甲基丙烯酸甲酯和聚(乙烯 2,6-萘二羧酸酯);环氧树脂;聚醚;聚碳酸酯;聚砜;和聚醚砜。

[0394] 通常,基底的至少一个表面涂覆有第一电极,该第一电极可以是透明材料,例如铟锡氧化物(ITO)或者任何其他合适的材料。该第一电极层在 OLED 中可用作阳极或阴极。阳极通常选自高逸出功(>4eV)的金属、合金或金属氧化物,例如氧化铟、锡氧化物、锌氧化物、铟锡氧化物(ITO)、铟锌氧化物、掺铝锌氧化物、镍和金。阴极可为:低逸出功(<4eV)的金属,例如 Ca、Mg 和 Al;如上所述的高逸出功(>4eV)的金属、合金或金属氧化物;或者,低逸出功金属和至少一种具有高逸出功或低逸出功的其他金属的合金,例如 Mg-Al、Ag-Mg、Al-Li、In-Mg 和 Al-Ca。在 OLED 的制造中沉积阳极层和阴极层的方法在本领域中是公知的,例如蒸发、共蒸发、DC 磁控溅射或者 RF 溅射。

[0395] 活性层,包括细胞色素 c 层和/或掺杂有芳香族阳离子肽的细胞色素 c 层,被涂覆到透明电极上以形成发光元件。该发光元件包括空穴传输层和发射层/电子传输层,其中空穴传输层和发射层/电子传输层直接彼此叠置,空穴传输层包括如下所述的固化的聚硅氧烷。发光元件的取向取决于阳极和阴极在 OLED 中的相对位置。空穴传输层位于阳极和发射层/电子传输层之间,发射层/电子传输层位于空穴传输层和阴极之间。空穴传输层的厚度可为 2nm 至 100nm,可替代地 30nm 至 50nm。发射层/电子传输层的厚度可为 20nm 至 100nm,可替代地 30nm 至 70nm。

[0396] OLED 显示器可利用无源矩阵寻址方案或有源矩阵寻址方案进行驱动,无源矩阵寻址方案和有源矩阵寻址方案都是公知的。例如,OLED 显示面板可包括有源矩阵像素阵列和数个薄膜晶体管(TFT),每一薄膜晶体管可作为掺杂有肽的细胞色素 c 晶体管(如上所述)实现。有源矩阵像素阵列设置在包含活性层的基底之间。有源矩阵像素阵列包括若干个像素。每一像素由第一扫描线和其相邻的第二扫描线以及第一数据线和其相邻的第二数据线所限定,第一数据线和第二数据线被设置在较下的基底上。在像素的非显示区内设置的 TFT 与相应的扫描线和数据线电连接。利用扫描线和数据线切换像素中的 TFT 导致相应的像素开启(即发光)。

[0397] 此外,活性层(例如细胞色素 c 和/或掺杂有肽的细胞色素 c)可布置成几乎任意的形状和尺寸,且可被图案化成任意的形状。活性层还可进一步被掺杂以产生特定波长的光。有机发光二极管和有机发光显示器的其它细节可以查看美国专利 No. 7, 358, 663、美国专利 No. 7, 843, 125、美国专利 No. 7, 550, 917、美国专利 No. 7, 714, 817、和美国专利

No. 7, 535, 172, 这些专利分别通过全文引用的方式并入文中。

[0398] 用于异质结的掺杂有芳香族阳离子肽的细胞色素 c

[0399] 细胞色素 c 活性层中的芳香族阳离子肽的浓度水平也可随着空间和 / 或时间进行变化以形成异质结, 该异质结为具有不同能隙的两种半导体材料之间的界面, 如在美国专利 No. 7, 897, 429 中所述(该专利的全部内容通过引用并入文中), 且在图 18 和图 19 的光伏电池中示出。芳香族阳离子肽的浓度的合适范围包括但不限于 0mM-500mM、0mM-100mM、0mM-500 μ M、0mM-250 μ M 和 0mM-100 μ M。例如, 异质结可用于形成多个量子阱结构以用于在 OLED 和其他器件中的增强发射。在利用 p- 型和 n- 型晶体薄膜的活性层构造的有机异质结晶体管中发现高的导电性后, 有机异质结引起了更多关注。与在无机异质结中形成的耗尽层相反, 电子累积层和空穴累积层可在有机异质结界面的两侧上观察到。具有高导电性的异质结薄膜可被用作电荷注入缓冲层和串联二极管的连接单元。双极晶体管和发光晶体管(上述的)可以使用作为活性层的有机异质结膜来实现。

[0400] 有机异质结构可用在 OLED (如上所述)、OFET (如上所述) 和有机光伏(OPV) 电池(如下所述)中以改善装置性能。在典型的双层 OLED 结构中, 有机异质结降低起始电压且提高了照明效率。有机异质结还可用于使 OPV 电池的能量转换效率比单层电池 - 双极性 OFET (如上所述) 提高一个数量级, 这需要电子和空穴都根据施加电压而在装置沟道中累积和传输, 能够通过引入有机异质结构(包括掺杂有肽的细胞色素 c) 作为活性层来实现。有机异质结构在有机电子器件的持续发展中具有重要的作用。

[0401] 有机异质结构还可被用作 OFET 中的缓冲层以改善电极和有机层之间的接触。例如, 细胞色素 c 和 / 或掺杂有肽的细胞色素 c 的薄层可被插入于电极和半导体层之间, 引起较好的载流子注入和提高的迁移率。具有高导电性的有机异质结(例如由于使用掺杂有芳香族阳离子肽的细胞色素 c) 也可被用作 OFET 中的缓冲层以改善金属和有机半导体之间的接触, 从而提高电子场效应迁移率。其他基于掺杂有肽的细胞色素 c 的异质结构可用于改善 OFET 中的电接触、OPV 电池中的电接触以及在叠置的 OPV 电池和 OLED 中作为连接单元。

[0402] 有机异质结构的引入具有显著改善的装置性能且在许多应用方面提供了新的功能。例如, 在有机异质结的两侧上观察到电子累积层和空穴累积层表明, 异质结界面处的相互作用会导致载流子重分配和能带弯曲。有机异质结的这种双极性传输行为提供了可以制造具有高量子效率的 OLED FET。还论述了有机异质结构(包括由掺杂有肽的细胞色素 c 构成的异质结构) 作为缓冲层的应用改善了有机层和金属电极之间的接触。在有机半导体中的电荷传输受许多因素影响—本论述强调了有意掺杂的 n- 型和 p- 型有机半导体的使用, 且主要考虑由显示能带传输行为的有机晶体膜构成的有机异质结。

[0403] 通常, OFET 以累积模式进行操作。在 OFET 的空穴累积模式中, 例如当相对于源电极(其接地) 向栅极施加负电压时, 在靠近绝缘层的有机层中引发正电荷(空穴) 的形成。当所施加的栅极电压超过阈值电压(V_T) 时, 引发的空穴形成导电沟道, 且在相对于源电极向漏电极施加的偏置电压(V_{DS}) 下, 允许电流从漏极流向源极。OFET 中的沟道包含可移动的自由空穴, 且阈值电压是引发导电沟道形成而所需的最小栅极电压。因此, OFET 以累积模式运行, 或者作为“常关型”装置运作。然而, 在某情况下, 在零栅极电压下, OFET 可具有开放的沟道, 这意味着关闭装置需要相反的栅极电压。因此, 这些装置被称作“常开型”晶体管或者“耗尽型”晶体管。

[0404] 用于常开型 CuPc/F₁₆CuPc 异质结晶体管的导电沟道中的电荷-载流子类型取决于底层半导体(绝缘体附近的有机层)。电荷累积可导致 p- 型材料中的从主体到界面的向上的能带弯曲和 n- 型材料中从主体到界面的向下的能带弯曲,这与对于常规的无机 p-n 结的情况不同。由于自由的电子和空穴可共同存在于有机异质结薄膜中,故有机异质结薄膜可根据栅电压来传输电子或空穴。事实上,在优化薄膜厚度和装置构造后,已经观测到双极性传输行为。

[0405] 在平面型异质结中的载流子传输与异质结界面平行,这类似于 OFET 的情况且直接反应了异质结薄膜的导电性。具有双层结构的二极管的导电性可比单层装置的导电性高大约 1 个数量级,且可通过改变用于形成异质结的细胞色素 c 中的芳香族阳离子肽的浓度来进一步增强。芳香族阳离子肽浓度的合适范围包括但不限于 0-500mM、0-100mM、0-500 μ M、0-250 μ M、和 0-100 μ M。对于常开型 OFET,引发的电子和空穴在薄膜中形成导电沟道,产生高的导电性。由于界面的较高的粗糙度而引起的导电性的下降可通过改变如上所述的肽掺杂浓度来补偿。

[0406] 在 n- 型和 p- 型半导体中被感应的电子和空穴在异质结界面处形成空间电荷区,其可导致从 p- 型半导体到 n- 型半导体的内建电场。在具有垂直结构的二极管的电子性质中显示了这样的建构。垂直异质结二极管在正偏压下产生小的电流而在负偏压下产生大的电流。与无机 p-n 型二极管相对,有机异质结二极管可显示反向整流特性。正偏压加强了能带弯曲且限制了载流子流动,然而在负偏压下,所施加的电场与内建电场反向,导致了势垒的下降。因此,在负偏压下减弱了能带弯曲,从而有助于电流流过结。

[0407] 在有机异质结界面的两侧上的电荷载流子累积形成内建电场,该内建电场可用于改变 OFET 中的阈值电压。在 n- 沟道有机异质结晶体管中,例如,阈值电压与 n- 型层中的陷阱密度相关。被引发的电子可填充这些陷阱;因此,在恒定的 n- 型层厚度的情况下,阈值电压随着电子密度的增大而降低。在中性条件下,在 p- 型层中被引发的空穴的数目等于在 n- 型层中被引发的空穴的数目,并且随着 p- 型层厚度而增加并趋向饱和。因此,有机异质结晶体管的阈值电压可通过增大 p- 型层的厚度而减小。可根据阈值电压不再随着 p- 型层厚度增大而变化时,估计电荷累积厚度。

[0408] 构成异质结的两个半导体的逸出功之间的差异导致在空间电荷区中的各种电子状态。半导体异质结还通过形成异质结的两个半导体的导电类型进行分类。如果两个半导体具有相同类型的导电性,则该结被称作同型异质结;相反,其被称作异型异质结。由于两个部件的费米能级的差异,电子和空穴可同时在异型异质结的两侧累积和耗尽。如果 p- 型半导体的逸出功大于 n- 型半导体的逸出功 ($\Phi_p > \Phi_n$),则电子和空穴的耗尽层出现在异质结的任一侧上,并且空间电荷区由不能移动的负离子和正离子组成。该类型的异质结被称为耗尽异质结,且大多数无机异质结属于这类的异质结,包括常规的 p-n 同质结。

[0409] 用于电池的掺杂有芳香族阳离子肽的细胞色素 c

[0410] 细胞色素 c 和 / 或掺杂有芳香族阳离子肽(例如, Tyr-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ (SS-01)、2', 6' -Dmt-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ (SS-02)、Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ (SS-20) 或者 D-Arg-2', 6' -Dmt-Lys-Phe-NH₂ (SS-31))的细胞色素 c,还可用于减小电池组的内电阻,这可在放电期间使电池维持在接近恒定的电压。如在本领域中所理解的,电池是将化学能直接转化成电能的装置。该电池包括多个伏打电池,每一伏打电池又包括两个通过包含

阴离子和阳离子的导电电解质而串联连接的半电池。一个半电池包括电解质和阴离子(带负电的离子)迁移至的电极,即阳电极或负电极;另一半电池包括电解质和阳离子(带正电的离子)迁移至的电极,即阴极或正电极。在为电池供电的氧化还原反应中,阳离子在阴极被还原(添加电子),而阴离子在阳极被氧化(移除电子)。电极彼此不接触但是通过电解质而电连接。一些电池使用两个具有不同电解质的半电池。在半电池之间的分隔器允许离子流动,但防止电解质的混合。

[0411] 每一半电池具有电动势(或者 emf),由其用于将电流从电池的内部驱动到该电池的外部的能力确定。电池的净 emf 为其半电池的电动势之间的差值,因此,如果电极具有电动势,则该净 emf 为在半反应的还原电势之间的差值。掺杂有肽的细胞色素 c 可用于将电流从具有可变的或预设的导电性的电池的内部传输至其外部,以根据应用增大(或减小) emf 和 / 或充电时间。

[0412] 跨电池的端子的电动势被称为端电压(差值)且以伏特进行测量。既不充电也不放电的电池的端电压被称作开路电压,且等于电池的 emf。由于内电阻,正在放电的电池的端电压在幅度上小于开路电压,而正在充电的电池的端电压超过开路电压。理想的电池具有可以忽略的内电阻,因此其在耗尽之前会维持恒定的端电压,然后降为零。在实际电池中,内电阻在放电情况下增大,且开路电压也在放电情况下降低。如果绘制电压和电阻相对于时间的图表,则所得到的图通常为曲线;该曲线的形状根据所采用的化学性质和内部布局而变化。细胞色素 c 和 / 或掺杂有芳香族阳离子肽的细胞色素 c 可用于减小电池的内电阻以提供更好的性能。关于有机电池的更多细节,参见例如美国专利 No. 4, 585, 717, 其全部内容通过引用并入文中。

[0413] 单分子的掺杂有肽的细胞色素 c 电池

[0414] 细胞色素 c 的单分子也可用作分子电池,其充电时间和 / 或放电时间可通过一种或多种芳香族阳离子肽(例如, Tyr-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ (SS-01)、2',6'-Dmt-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ (SS-02)、Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ (SS-20) 或者 D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ (SS-31)) 来调节。如文中所述,细胞色素 c 为膜蛋白,其中,碳和硫位于膜的与带电的氧原子和氮原子相对的侧上。覆有带电的氧和氮的区域(该区域偏好含水环境),在膜的相对面上突出。该布置对于由细胞色素 c 进行的工作而言是完美的,细胞色素 c 使用氧对水做出的反应来为分子泵提供能量。当氧被消耗时,通过将氢离子从膜的一侧泵送到膜的另一侧来存储能量。然后,该能量可用于建立 ATP 或者通过将氢离子穿过膜回渗来为发动机提供能量。

[0415] 用于光伏(太阳能)电池的掺杂有芳香族阳离子肽的细胞色素 c

[0416] 有机光伏(OPV)提供了显著打破定价和美学方面的常规情况、以及弱光条件下有骄人的效率的前景。OPV 材料也是柔性的且形状配合的。OPV 材料可潜在地卷绕或者甚至涂覆到各种材料上。目前的 OPV 效率在 5% 和 6.25% 之间。尽管这些效率可能不足以替代常规的发电形式,但是 OPV 适合不需要较大效率的应用,尤其是考虑到半导体太阳能电池的高成本。例如,OPV 电池可用于在弱光条件下基于连续涓流充电设置为手机提供能量,如在办公室、家、或者会议室设置中的那些 OPV 电池。

[0417] OPV 电池,例如在图 18 和图 19 中示出的那些 OPV 电池,比无机电池也便宜且更易于制造,这是由于其在低得多的温度(20°C -200°C)下加工较简单。例如,使用二氧化钛以

及有机染料和液体电解质的电化学太阳能电池已超过 6% 的能量转化效率,且由于它们相对低的生产成本,将进入商业市场。还可使用简单且因此较廉价的沉积方法(例如旋涂或刮涂)在室温下将溶液沉积在柔性基底上而加工成 OPV 材料。可行的应用可从小型一次性太阳能电池到电力智能塑料卡(信用卡、借记卡、电话卡或者其他卡)(例如其可显示余额)、大区域扫描仪或医学成像中的光检测器、和粗糙表面上的太阳能应用。

[0418] OPV 电池(OPVC)是使用有机电子学的光伏电池,诸如,用于光吸收和电荷传输的细胞色素 c 和 / 或掺杂有芳香族阳离子肽(例如 Tyr-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ (SS-01)、2',6'-Dmt-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ (SS-02)、Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ (SS-20) 或者 D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂(SS-31))的细胞色素 c。OPVC 将可见光转化成直流(DC)电。一些光伏电池还可将红外(IR)辐射或紫外(UV)辐射转化成 DC。活性层(例如掺杂有肽的细胞色素 c)的带隙确定 OPVC 的吸收带。

[0419] 当这些有机带隙材料吸收光子时,受激态形成且被限定于吸收光子的分子或者该分子的区域。受激态可被认为通过静电相互作用而结合在一起电子空穴对。在光伏电池中,激子通过有效场而被分解成自由的电子空穴对。有效场通过在两个不同的材料之间形成异质结来建立。有效场通过使电子从吸收料的导带落至受体分子的导带来分解激子。必需的是,受体材料的导电边缘低于吸收材料的导带边缘。

[0420] 单层 OPVC 可通过将有机电子材料(例如,细胞色素 c 和 / 或掺杂有芳香族阳离子肽的细胞色素 c)的层夹在两个金属导体之间来制造,该两个金属导体通常为具有高逸出功的铟锡氧化物(ITO)层和低逸出功金属(例如 Al、Mg 或 Ca)的层。两个导体之间的逸出功的差值在有机层中建立了电场。当有机层吸收光时,电子将受激发到导带且使空穴留在价带中,形成激子。通过不同的逸出功形成的电势有助于分离激子对,从而将电子拉至阴极,将空穴拉至阳极。由该过程产生的电流和电压可用于做功。

[0421] 实际上,单层 OPVC 具有低的量子效率(<1%)和低的能量转换效率(<0.1%)。它们存在的主要问题为:由两个导电电极之间的差异产生的电场几乎不足以分解光生激子。电子常常与空穴重新组合,而不是到达电极。

[0422] 有机异质结可用于形成内建电场来增强 OPVC 性能。通过将两个以上的不同的层包括在导电电极之间来实现异质结。这些两个以上的材料层在电子亲合性和电离能方面存在差异,例如由于肽浓度引起,该差异引发在两个层之间的界面处有静电力。适当地选择材料以使该差异足够大,使得这些局部电场较强,其可比单层光伏电池更为有效地分解激子。具有较高的电子亲合性(例如,较高的肽掺杂浓度)和电离电位的层为电子受体,另一层为电子供体。该结构也被称为平面型供体-受体异质结。

[0423] 电子供体和电子受体可混合在一起以形成本体异质结 OPVC。如果混合的供体和受体的长度尺度与激子扩散长度相似,则在任一材料中产生的激子的大多数可达到界面,在该界面处,激子有效地分解。电子移动至受体域,然后被携带穿过装置且由一个电极收集,而空穴则被沿相反方向拖曳,在另一侧收集。

[0424] 与无机光伏器件比较,与有机光伏电池相关的难题包括很大程度由于有机材料的大带隙引起的低量子效率(~3%)。抗氧化和还原的不稳定性、再结晶和温度变化也可导致随着时间而发生器件退化和性能下降。对于具有不同组成的器件而言,不同的程度地发生这一点,且正对这一点进行主动研究。其他重要的因素包括激子扩散长度、电荷分离和电荷

收集、和电荷传输和迁移性,这些因素受到杂质存在的影响。关于有机光伏的更多细节,参见例如美国专利 No. 6, 657, 378、美国专利 No. 7, 601, 910 和美国专利 No. 7, 781, 670, 这些专利的全部内容分别通过引用并入文中。

[0425] 掺杂有示例性的芳香族阳离子肽的细胞色素 c 的薄膜应用

[0426] 如电子领域的技术人员公知的是,任何上述器件可通过沉积、生长、或者提供材料的薄层以形成合适结构来制造而成。例如,用于晶体管、二极管和光伏电池的异质结可通过彼此相邻地或以分层方式沉积具有不同带隙能的材料层来形成。除了形成分层的薄膜结构外,通过沉积材料的非均匀混合物,具有不同带隙的有机材料可混合来形成具有不同的空间布局的异质结,如在图 19 (a) 和图 19 (b) 中所示。这样的不均匀的混合物可包括但不限于细胞色素 c、芳香族阳离子肽和掺杂有不同浓度的芳香族阳离子肽的细胞色素 c 的混合物,该芳香族阳离子肽包括但不限于 Tyr-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ (SS-01)、2',6'-Dmt-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ (SS-02)、Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ (SS-20) 或者 D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ (SS-31)。示例性的芳香族阳离子肽浓度可包括但不限于 0-500mM、0-100mM、0-500 μ M、0-250 μ M 和 0-100 μ M。这些薄膜还可用于增强常规的电子器件的性能,例如通过增大电极的导电性和 / 或减少电极的散热而实现。

[0427] 如上所述,与平面型异质结相比,供体-受体有机材料的分散的异质结具有高量子效率,这是因为激子更可能在其扩散长度内发现界面。膜形态也可对器件的量子效率产生巨大的影响。粗糙表面和孔的存在可增大串联电阻且还增大发生短路的几率。膜形态和量子效率可通过在利用厚度约 1000Å 的金属阴极覆盖器件之后使器件退火来改善。在有机膜上面的金属膜对有机膜施加应力,这有助于防止有机膜的形态松弛。这产生更密集的膜,同时允许在有机薄膜的主体内形成相分离的互相贯穿的供体-受体界面。

[0428] 异质结的受控生长对供体-受体材料的位置提供更好的控制,这比平面型的和高度混乱定向的异质结产生大得多的功率效率(输出功率与输入功率的比值)。这是因为在供体受体界面发生电荷分离:当电荷移动至电极,电荷可被捕获和 / 或重新组合在无序的互相贯穿的有机材料中,导致降低的器件效率。选择合适的工艺参数以更好地控制结构和膜形态,减轻了不期望的过早捕获和 / 或重新组合。

[0429] 沉积掺杂有芳香族阳离子肽的细胞色素 c

[0430] 对于光伏应用和其他应用,包括细胞色素 c、芳香族阳离子肽、或者掺杂有芳香族阳离子肽(诸如, Tyr-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ (SS-01)、2',6'-Dmt-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ (SS-02)、Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ (SS-20) 或者 D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ (SS-31)) 的细胞色素 c 的有机膜,可通过旋涂、气相沉积、以及在美国专利 No. 6, 734, 038、美国专利 No. 7, 662, 427 和美国专利 No. 7, 799, 377 中描述的方法进行沉积,这些专利分别通过引入全部并入文中。旋涂技术可用于以高速来涂覆较大的表面区域,但是使用用于一个层的溶剂可降解任何已经存在的聚合物层。旋涂材料必须在独立的图案化步骤中进行图案化。

[0431] 如在图 20 (a) 中示出的真空热蒸发(VTE)为涉及在真空下加热有机材料的沉积技术。基板被设置成远离源几厘米,使得被蒸发的材料可直接沉积在基板上。VTE 可用于沉积许多层不同材料,而在不同层之间没有化学相互作用。

[0432] 相比于真空热蒸发,如在图 20 (b) 中所示的有机气相沉积(OPVD)对膜的结构和形态产生更好的控制。OPVD 涉及在惰性载气的存在下蒸发基板上的有机材料。所得到的膜

的形态可通过改变气流速率和源温度而变化。通过降低载气压力,这增大气体的速率和平均自由行程,进而导致边界层厚度的减小,可生长均匀的膜。由于腔室的壁是温热的且不允许分子粘附至壁且在壁上形成膜,故由 OVPD 制造的电池不具有与源自腔室的壁的薄片的污染相关的问题。根据生长参数(例如,源温度、基准压力和载体的流量等),所沉积的膜在本质上可是结晶的或者无定形的。使用 OVPD 制造的器件比使用 VTE 制造的器件显示出较高的短路电流密度。在电池顶部的供体-受体异质结的额外层可阻断激子,但允许传导电子,从而得到改善的电池效率。

[0433] 用于增大效率的掺杂有示例性的芳香族阳离子肽的细胞色素 c

[0434] 如上所述,示例性芳香族阳离子肽,如 Tyr-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ (SS-01)、2',6'-Dmt-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ (SS-02)、Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ (SS-20) 或者 D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ (SS-31),可用于增大导电性。因此,示例性的芳香族阳离子肽可用于以较低的通过产生(废弃的)热能而产生的损耗,来传导电流。该效应可被利用以延长电池供电装置(例如消费性电子产品)的工作寿命以及该效应可用在大型电力系统中,例如用在电力传输应用中。降低废热产生还降低冷却需求,进一步增大了效率,且延长了由导电材料(例如,掺杂有本发明的芳香族阳离子肽的细胞色素 c)提供能量的电子器件的使用寿命。

[0435] 用于细胞色素 c 生物传感器应用的芳香族阳离子肽

[0436] 文中所公开的芳香族阳离子肽可用于增强细胞色素 c 生物传感器中的电子流动并且提高细胞色素 c 生物传感器的灵敏度水平。如实施例所示,文中所公开的肽,例如肽 D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂,促进细胞色素 c 的还原(图 1)且增大穿过细胞色素 c 的电子流动(图 2)。

[0437] 从电化学观点看,细胞色素 c 为有前途的生物传感器候选者。然而,在血红素和裸电极之间的电子传递通常是缓慢的。可替代地,小的中介物可用于间接地促进氧化还原活性中心和电极之间的电子传递。另外地或可替代地,可使用直接电子传递方法,由此,氧化还原活性酶被直接固定在电极表面上。例如,在 pH7 时带正电的且包含大量的围绕血红素边缘的 Lys 残基的细胞色素 c 吸附在带负电的表面上,例如该带负的表面通过自组装羧基封端的烷硫醇而形成。在一些实施方式中,在 +150mV 的恒定电势下,细胞色素 c 电极对在 nM 浓度范围内的超氧化物灵敏。

[0438] 在一些方面,本公开提供了用于增大细胞色素 c 生物传感器的灵敏度的方法和组合物。在一些实施方式中,细胞色素 c 生物传感器包括文中所公开的一种或多种芳香族阳离子肽。在一些实施方式中,掺杂有肽的细胞色素 c 用作在生物传感器内的氧化还原活性酶和电极之间的中介物。在一些实施方式中,掺杂有肽的细胞色素 c 直接固定在生物传感器的电极上。在一些实施方式中,在生物传感器内,肽与细胞色素 c 连接。在其他实施方式中,肽不与细胞色素 c 连接。在一些实施方式中,肽和/或细胞色素 c 固定在生物传感器内的表面上。在其他实施方式中,肽和/或细胞色素 c 在生物传感器内是可自由扩散的。在一些实施方式中,生物传感器包括肽 D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ 和/或 Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂。

[0439] 图 11 示出了生物传感器内的电子流动,在生物传感器中,芳香族阳离子肽和细胞色素 c 用作电子从氧化还原活性酶流动到电极的中介物。在连续的氧化还原反应中,电子

从基底 300 传递至氧化还原活性酶 310,从酶 310 传递至掺杂有肽的细胞色素 c320,从掺杂有肽的细胞色素 c320 传递至电极 330。

[0440] 图 12 示出在生物传感器内的电子流动,在该生物传感器内,芳香族阳离子肽和细胞色素 c 被直接固定在电极上。在连续的氧化还原反应中,电子从基底 340 传递至氧化还原活性酶 350,从氧化还原活性酶 350 传递至电极 360,掺杂有肽的细胞色素 c 固定在电极 360 上。

[0441] 在环境污染物的生物修复中的芳香族阳离子肽

[0442] 文中所公开的芳香族阳离子肽可用于环境污染物的生物修复。尤其,该肽可用于增大生物修复反应的速率和 / 或效率,在该生物修复反应中,细菌的细胞色素 c 介导电子到环境污染物的传递,从而改变物质的化合价且减小其相对毒性。在文中所公开的方法中,芳香族阳离子肽与细菌的细胞色素 c 相互作用,促进电子传输。在一个方面,芳香族阳离子肽促进细菌细胞色素 c 的还原。在另一方面,肽增强穿过细菌细胞色素 c 的电子扩散。在另一方面,肽增大细菌细胞色素 c 中的电子容量。在另一方面,肽引发了围绕细菌细胞色素的血红素基团的新的 $\pi-\pi$ 相互作用,该 $\pi-\pi$ 相互作用有利于电子扩散。最终,芳香族阳离子肽与细菌细胞色素 c 的相互作用促进和 / 或增强环境污染物的异化还原。

[0443] 在一个方面,本公开提供了用于环境污染物的生物修复的方法和组合物。一般来讲,该方法包括:使包含环境污染物的样品在有助于在样品中出现的特定污染物的异化还原的条件下,与生物修复组合物接触。一般来讲,该生物修复组合物包括表达文中所公开的一种或多种芳香族阳离子肽的重组细菌。

[0444] 在一些实施方式中,文中描述的生物修复组合物包括自外源核酸表达文中所公开的一种或多种芳香族阳离子肽的重组细菌。在一些实施方式中,核酸编码该肽。在一些实施方式中,编码该肽的核酸携带在质粒 DNA 上,该质粒 DNA 通过细菌转化被细菌吸收。可用在本文所描述的方法中的细菌表达质粒的示例包括但不限于 Co1E1、pACYC184、pACYC177、pBR325、pBR322、pUC118、pUC119、RSF1010、R1162、R300B、RK2、pDSK509、pDSK519 和 pRK415。

[0445] 在一些实施方式中,生物修复组合物包括由稳定的基因组插入而表达文中所公开的芳香族阳离子肽的重组细菌。在一些实施方式中,基因组插入包括编码该肽的核酸序列。在一些实施方式中,核酸序列被细菌转座子所携带,该细菌转座子并入到细菌基因组中。可用在本文所描述的方法中的细菌转座子的示例包括但不限于 Tn1、Tn2、Tn3、Tn21、 $\gamma-\delta$ (Tn1000)、Tn501、Tn551、Tn801、Tn917、Tn1721、Tn1722、Tn2301。

[0446] 在一些实施方式中,编码芳香族阳离子肽的核酸序列受细菌启动子的控制。在一些实施方式中,启动子包括诱导型启动子。可用于文中描述的方法中的诱导型启动子的示例包括但不限于热激启动子,异丙基 β -D-1- 硫代半乳糖苷 (IPTG)- 诱导型启动子、和四环素 (Tet) - 诱导型启动子。

[0447] 在一些实施方式中,启动子包括组成型启动子。可用在本文所描述的方法中的组成型启动子的示例包括但不限于 spc 核糖体蛋白操纵子启动子 (Pspc)、 β -内酰胺酶基因启动子 (Pbla)、 λ -噬菌体的 PL 启动子、复制控制启动子 PRNAI 和 PRNAII、以及 rrnB 核糖体 RNA 操纵子的 P1 启动子和 P2 启动子。

[0448] 在一些实施方式中,重组细菌包括希瓦氏菌属 (Shewanella) 的细菌。在一些实施方式中,细菌包括深渊希瓦氏菌 (S. abyssi)、海藻希瓦氏菌

(*S. algae*)、*S. algidipiscicola*、亚马逊希瓦氏菌(*S. amazonensis*)、海水希瓦氏菌(*S. aquimarina*)、波罗的海希瓦氏菌(*S. baltica*)、海底希瓦氏菌(*S. benthica*)、考氏希瓦氏菌(*S. colwelliana*)、脱色希瓦氏菌(*S. decolorationis*)、反硝化希瓦氏菌(*S. Denitrificans*)、东海希瓦氏菌(*S. donghaensis*)、真实希瓦氏菌(*S. fidelis*)、冷海希瓦氏菌(*S. frigidimarina*)、潮汐希瓦氏菌(*S. gaetbuli*)、冰海希瓦氏菌(*S. gelidimarina*)、*S. glacialipiscicola*、哈夫尼希瓦氏菌(*S. hafniensis*)、哈里法克斯希瓦氏菌(*S. halifaxensis*)、羽田希瓦氏菌(*S. hanedai*)、*S. irciniae*、刺参希瓦氏菌(*S. japonica*)、*S. kaireitica*、利文斯顿岛希瓦氏菌(*S. livingstonensis*)、光伏希瓦氏菌(*S. loihica*)、海动物肠希瓦氏菌(*S. marinintestina*)、黄海希瓦氏菌(*S. marisflavi*)、鳕鱼希瓦氏菌(*S. morhuae*)、*S. olleyana*、奥奈达湖希瓦氏菌(*S. oneidensis*)、太平洋希瓦氏菌(*S. pacifica*)、皮氏希瓦氏菌(*S. pealeana*)、耐压希瓦氏菌(*S. piezotolerans*)、肺鲑希瓦氏菌(*S. pneumatophori*)、深海希瓦氏菌(*S. profunda*)、嗜冷希瓦氏菌(*S. psychrophila*)、腐败希瓦氏菌(*S. putrefaciens*)、竹刀鱼希瓦氏菌(*S. sairae*)、*S. schegeliana*、沉积物希瓦氏菌(*S. sediminis*)、海绵希瓦氏菌(*S. spongiae*)、*S. surugensis*、紫色希瓦氏菌(*S. violacea*)、瓦克希瓦氏菌(*S. waksmanii*)、或者武氏希瓦氏菌(*S. woodyi*)。

[0449] 在一些实施方式中,重组细菌包括地杆菌属(*Geobacter*)的细菌。在一些实施方式中,细菌包括铁还原地杆菌(*G. Ferrireducens*)、*G. Chappellei*、腐殖质还原地杆菌(*G. Humireducens*)、*G. arculus*、硫还原地杆菌(*G. Sulfurreducens*)、嗜氢地杆菌(*G. Hydrogenophilus*)、金属还原地杆菌(*G. Metallireducens*)、泥质地杆菌(*G. argillaceus*)、*G. bemidjiensis*、不来梅地杆菌(*G. bremensis*)、*G. grbiciae*、口誉夕尼地杆菌(*G. pelophilus*)、*G. pickeringii*、*G. thiogenes* 或 *G. uraniiireducens*。

[0450] 在一些实施方式中,重组细菌包括脱硫单胞菌属(*Desulfuromonas*)细菌。在一些实施方式中,细菌包括棕榈油酸脱硫单胞菌(*D. Palmitatis*)、*D. Chloroethenica*、需乙酸脱硫单胞菌(*D. Acetexigens*)、乙酸氧化脱硫单胞菌(*D. Acetoxidans*)、密执安脱硫单胞菌(*D. Michiganensis*) 或者嗜硫脱硫单胞菌(*D. Thiophila*)、脱硫单胞菌(*D. Sp.*)。

[0451] 在一些实施方式中,重组细菌包括脱硫弧菌属(*Desulfovibrio*)细菌。在一些实施方式中,细菌包括非洲脱硫弧菌(*Desulfovibrio africanus*)、杆状脱硫弧菌(*Desulfovibrio baculatus*)、脱硫脱硫弧菌(*Desulfovibrio desulfuricans*)、巨大脱硫弧菌(*Desulfovibrio gigas*)、嗜盐脱硫弧菌(*Desulfovibrio halophilus*)、趋磁脱硫弧菌(*Desulfovibrio magneticus*)、*Desulfovibrio multispirans*、*Desulfovibriopigra*、需盐脱硫弧菌(*Desulfovibrio salixigens*)、脱硫弧菌(*Desulfovibrio sp.*)、或者普通脱硫弧菌(*Desulfovibrio vulgaris*)。

[0452] 在一些实施方式中,重组细菌包括硫还原弯形菌属(*Desulfuromusa*)细菌。在一些实施方式中,细菌包括巴氏硫还原弯形菌(*D. bakii*)、科瑟硫还原弯形菌(*D. kysingii*) 或者琥珀酸氧化硫还原弯形菌(*D. succinoxidans*)。

[0453] 在一些实施方式中,重组细菌包括暗杆菌属(*Pelobacter*)细菌。在一些实施方式中,细菌包括产丙酸暗杆菌(*P. propionisus*)、*P. acetylinicus*、威尼斯暗杆菌(*P. venetianus*)、*P. carbinolicus*、没食子酸暗杆菌(*P. cidigallici*)、暗杆菌 A3b3 (*P. sp.*)。

A3b3)、玛斯里暗杆菌(*P. masseliensis*) 或者 *P. seleniigenes*。

[0454] 在一些实施方式中, 重组细菌包括海栖热袍菌(*Thermotoga maritima*)、*Thermoterrubacterium ferrireducens*、嗜热脱铁杆菌(*Deferribacter thermophilus*)、铁还原地弧菌(*Geovibrio ferrireducens*)、丙酸脱硫杆菌(*Desulfobacter propionicus*)、*Geospirillum barnseii*、*Ferribacterium limneticum*、发酵地发菌(*Geothrix fermentans*)、土下芽孢杆菌(*Bacillus infernus*)、*Thermas* sp. SA-01, 大肠杆菌(*Escherichia coli*)、奇异变形菌(*Proteus mirabilis*)、荚膜红细菌(*Rhodobacter capsulatus*)、类球红细菌(*Rhodobacter sphaeroides*)、脱氮硫杆菌(*Thiobacillus denitrificans*)、脱氮微球菌(*Micrococcus denitrificans*)、脱氮副球菌(*Paraoccus denitrificans*) 或者假单胞菌(*Pseudomonas* sp)。

[0455] 在一些实施方式中, 文中所公开的方法涉及金属的异化还原。在一些实施方式中, 金属包括 Sc、Ti、V、Cr、Mn、Fe、Co、Ni、Cu、Zn、Y、Zr、Nb、Mo、Tc、Ru、Pd、Ag、Cd、Hf、Ta、W、Re、Os、Ir、Pt、Au、Hg、Rf、Db、Sg、Bh、Hs、Cn、Al、Ga、In、Sn、Ti、Pb 或者 Bi。在一些实施方式中, 该方法导致形成不溶的氧化物。在一些实施方式中, 该方法导致 Cr (VI) 还原为 Cr (III) 以及形成不溶的沉淀物。在一些实施方式中, 用于金属生物修复的方法包括使金属与包含在表 7 中列出的细菌的生物修复组合物接触, 该细菌被工程设计成表达文中所公开的一种或多种芳香族阳离子肽。

[0456] 在一些实施方式中, 本文所公开的方法涉及非金属的异化还原。在一些实施方式中, 非金属包括硫酸盐。在一些实施方式中, 方法导致硫酸盐的还原和硫化氢的形成。在一些实施方式中, 硫酸盐生物修复方法包括使硫酸盐与包含在表 7 中列出的细菌的生物修复组合物相接触, 该细菌被工程设计成表达文中所公开的一种或多种芳香族阳离子肽。

[0457] 在一些实施方式中, 文中所公开的方法涉及高氯酸盐的异化还原。在一些实施方式中, 高氯酸盐包括 NH_4ClO_4 、 CsClO_4 、 LiClO_4 、 $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ 、 HClO_4 、 KClO_4 、 RbClO_4 、 AgClO_4 或者 NaClO_4 。在一些实施方式中, 方法导致高氯酸盐还原成亚氯酸盐。在一些实施方式中, 高氯酸盐生物修复方法包括使高氯酸盐与生物修复组合物接触, 该生物修复组合物包含大肠杆菌(*E. coli*)、奇异变形杆菌(*Proteus mirabilis*)、荚膜红细菌(*Rhodobacter capsulatus*) 或者类球红细菌(*Rhodobacter sphaeroides*), 这些细菌被工程设计成表达文中所公开的一种或多种芳香族阳离子肽。在一些实施方式中, 高氯酸盐生物修复方法包括使高氯酸盐与包含表 7 中列出的细菌的生物修复组合物接触, 该细菌被工程设计成表达文中所公开的一种或多种芳香族阳离子肽。

[0458] 在一些实施方式中, 在文中所公开的方法涉及硝酸盐的异化还原。在一些实施方式中, 硝酸盐包括 HNO_3 、 LiNO_3 、 NaNO_3 、 KNO_3 、 RbNO_3 、 CsNO_3 、 $\text{Be}(\text{NO}_3)_2$ 、 $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ 、 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 、 $\text{Sr}(\text{NO}_3)_2$ 、 $\text{Ba}(\text{NO}_3)_2$ 、 $\text{Sc}(\text{NO}_3)_3$ 、 $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3$ 、 $\text{Mn}(\text{NO}_3)_2$ 、 $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ 、 $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ 、 $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$ 、 $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ 、 $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ 、 $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$ 、 $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ 、 $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ 、 $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 或者 $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 。在一些实施方式中, 该方法导致硝酸盐还原成亚硝酸盐。在一些实施方式中, 硝酸盐生物修复方法包括使硝酸盐与生物修复组合物相接触, 该生物修复组合物包括脱氮硫杆菌(*Thiobacillus denitrificans*)、脱氮小球菌(*Micrococcus denitrificans*)、脱氮副球菌(*Paraoccus denitrificans*)、假单胞菌(*Pseudomonas* sp.)、或者大肠杆菌(*E. coli*), 这些细菌被工程设计成表达文中所公开的一种或多种芳香族阳离子肽。在一些实施方式中, 硝酸盐生物修复方法包括使硝酸盐

与包含表 7 中列出的细菌的生物修复组合物接触,该细菌被工程设计成表达文中所公开的一种或多种芳香族阳离子肽。

[0459]

表 7. 示例性生物修复细菌种

深渊希瓦氏菌 (<i>Shewenella abyssi</i>)	竹刀鱼希瓦氏菌 (<i>Shewenella</i>	<i>Desulfuromonas chloroethenica</i>
海藻希瓦氏菌 (<i>Shewenella algae</i>)	<i>sairae</i>)	需乙酸脱硫单胞菌
<i>Shewenella algidipiscicola</i>	<i>Shewenella schegeliana</i>	(<i>Desulfuromonas acetexigens</i>)
亚马逊希瓦氏菌 (<i>Shewenella</i>	沉积物希氏瓦菌 (<i>Shewenella</i>	乙酸氧化脱硫单胞菌
<i>amazonensis</i>)	<i>sediminis</i>)	(<i>Desulfuromonas acetoxidans</i>)
海水希瓦氏菌 (<i>Shewenella</i>	海绵希瓦氏菌 (<i>Shewenella</i>	密执安脱硫单胞菌
<i>aquimarina</i>)	<i>spongiae</i>)	(<i>Desulfuromonas michiganensis</i>)
波罗的海希瓦氏菌 (<i>Shewenella</i>	<i>Shewenella surugensis</i>	嗜硫脱硫单胞菌 (<i>Desulfuromonas</i>
<i>baltica</i>)	紫色希瓦氏菌 (<i>Shewenella</i>	<i>thiophila</i>)
海底希瓦氏菌 (<i>Shewenella</i>	<i>violacea</i>)	脱硫单胞菌 (<i>Desulfuromonas sp.</i>)
<i>benthica</i>)	瓦克希瓦氏菌 (<i>Shewenella</i>	巴氏硫还原弯形菌 (<i>Desulfuromusa</i>
考氏希瓦氏菌 (<i>Shewenella</i>	<i>waksmanii</i>)	<i>bakii</i>)
<i>colwelliana</i>)	武氏希瓦氏菌 (<i>Shewenella woodyi</i>)	科瑟硫还原弯形菌 (<i>Desulfuromusa</i>
脱色希瓦氏菌 (<i>Shewenella</i>	非洲脱硫弧菌 (<i>Desulfovibrio</i>	<i>kysingii</i>)
<i>decolorationis</i>)	<i>africanus</i>)	

[0460]

反硝化希瓦氏菌 (<i>Shewenella denitrificans</i>)	杆状脱硫弧菌 (<i>Desulfovibrio baculatus</i>)	琥珀酸氧化硫还原弯形菌 (<i>Desulfiromusa succinoxidans</i>)
东海希氏瓦菌 (<i>Shewenella donghaensis</i>)	脱硫脱硫弧菌 (<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>)	产丙酸暗杆菌 (<i>Pelobacter propionisus</i>)
真实希瓦氏菌 (<i>Shewenella fidelis</i>)	巨大脱硫弧菌 (<i>Desulfovibrio gigas</i>)	<i>Pelobacter acetylinicus</i>
冷海希瓦氏菌 (<i>Shewenella frigidimarina</i>)	嗜盐脱硫弧菌 (<i>Desulfovibrio halophilus</i>)	威尼斯暗杆菌 (<i>Pelobacter venetianus</i>)
潮汐希瓦氏菌 (<i>Shewenella gaetbuli</i>)	趋磁脱硫弧菌 (<i>Desulfovibrio magneticus</i>)	<i>Pelobacter arbinolicus</i>
冰海希瓦氏菌 (<i>Shewenella gelidimarina</i>)	<i>Desulfovibrio multispirans</i>	没食子酸暗杆菌 (<i>Pelobacter acidigallici</i>)
<i>Shewenella glacialis</i>	<i>Desulfovibrio pigra</i>	暗杆菌 A3b3 (<i>Pelobacter sp. A3b3</i>)
<i>Shewenella glacialis piscicola</i>	需盐脱硫弧菌 (<i>Desulfovibrio salixigens</i>)	玛斯里暗杆菌 (<i>Pelobacter masseliensis</i>)
哈夫尼希瓦氏菌 (<i>Shewenella hafniensis</i>)	脱硫弧菌 (<i>Desulfovibrio sp.</i>)	<i>Pelobacter selenigenes</i>
哈里法克斯希瓦氏菌 (<i>Shewenella halifaxensis</i>)	普通脱硫弧菌 (<i>Desulfovibrio vulgaris</i>)	海栖热袍菌 (<i>Thermotoga maritime</i>)
羽田希瓦氏菌 (<i>Shewenella hanedai</i>)	铁还原地杆菌 (<i>Geobacter ferrireducens</i>)	<i>Thermoterrubacterium ferrireducens</i>
<i>Shewenella ircinia</i>	<i>Geobacter chapellei</i>	嗜热脱铁杆菌 (<i>Deferribacter thermophilus</i>)
刺参希瓦氏菌 (<i>Shewenella japonica</i>)	腐殖质还原地杆菌 (<i>Geobacter humireducens</i>)	铁还原地弧菌 (<i>Geovibrio ferrireducens</i>)
<i>Shewenella kaireitica</i>	<i>Geobacter arculus</i>	丙酸脱硫杆菌 (<i>Desulfobacter propionicus</i>)
利文斯顿岛希瓦氏菌 (<i>Shewenella livingstonensis</i>)	硫还原地杆菌 (<i>Geobacter sulfurireducens</i>)	<i>Geospirillum barnseii</i>
光伏希瓦氏菌 (<i>Shewenella loihica</i>)	嗜氢地杆菌 (<i>Geobacter hydrogenophilus</i>)	<i>Ferribacterium limneticum</i>
海动物肠希瓦氏菌 (<i>Shewenella marinintestina</i>)	金属还原地杆菌 (<i>Geobacter metallireducens</i>)	发酵地发菌 (<i>Geothrix fermentens</i>)
黄海希瓦氏菌 (<i>Shewenella marisflavi</i>)		土下芽孢杆菌 (<i>Bacillus infernus</i>)
		<i>Thermas sp. SA-01</i>
		大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)

[0461]

鳕鱼希瓦氏菌 (<i>Shewenella morhuae</i>)	泥质地杆菌 (<i>Geobacter argillaceus</i>)	奇异变形菌 (<i>Proteus mirabilis</i>)
<i>Shewenella olleyana</i>	<i>Geobacter bemidjensis</i>	荚膜红细菌 (<i>Rhodobacter capsulatus</i>)
奥奈达湖希瓦氏菌 (<i>Shewenella oneidensis</i>)	不来梅地杆菌 (<i>Geobacter bremensis</i>)	类球红细菌 (<i>Rhodobacter sphaeroides</i>)
太平洋希瓦氏菌 (<i>Shewenella pacifica</i>)	<i>Geobacter grbciciae</i>	脱氮硫杆菌 (<i>Thiobacillus denitrificans</i>)
皮氏希瓦氏菌 (<i>Shewenella pealeana</i>)	口誉夕尼地杆菌 (<i>Geobacter pelophilus</i>)	脱氮微球菌 (<i>Micrococcus denitrificans</i>)
耐压希瓦氏菌 (<i>Shewenella piezotolerans</i>)	<i>Geobacter pickeringii</i>	脱氮副球菌 (<i>Paraoccus denitrificans</i>)
肺鲈希瓦氏菌 (<i>Shewenella pneumatophori</i>)	<i>Geobacter thiogenes</i>	
深海希瓦氏菌 (<i>Shewenella profunda</i>)	<i>Geobacter uranireducens</i>	假单胞菌 (<i>Pseudomonas sp.</i>)
嗜冷希瓦氏菌 (<i>Shewenella psychrophila</i>)	棕榈油酸脱硫单胞菌 (<i>Desulfuromonas palmitatis</i>)	
腐败希瓦氏菌 (<i>Shewenella putrefaciens</i>)		

[0462] 在一些实施方式中,在文中所公开的方法涉及放射性核素的异化还原。在一些实施方式中,放射性核素包括锕系元素。在一些实施方式中,放射性核素包括铀(U)。在一些实施方式中,该方法导致U(VI)还原为U(IV),且形成不溶的沉淀物。在一些实施方式中,该方法涉及甲基叔丁基醚(MTBE)、氯乙烯或者二氯乙烯的异化还原。在一些实施方式中,生物修复方法包括使这些污染物与包含表7中列出的细菌的生物修复组合物接触,该细菌被工程设计成表达文中所公开的一种或多种芳香族阳离子肽。

[0463] 在一些实施方式中,文中所公开的方法包括原位生物修复,其中,文中描述的生物修复组合物在环境污染的位置进行施用。在一些实施方式中,该方法包括异位生物修复,其中,被污染的材料从其原始位置移走且在另外的地方进行处理。

[0464] 在一些实施方式中,异位生物修复包括土地耕作,其中,被污染的土壤从其原始位置被挖出、与文中所公开的生物修复组合物进行组合、铺展在准备好的地基上、然后进行有规律地耕作,直到污染物去除或者污染物减少至可接受的水平。在一些实施方式中,异位生物修复包括堆肥化,其中,被污染的土壤从其原始位置挖出、与文中所公开的生物修复组合物以及无害的有机材料进行组合、然后维持在堆肥容器中,直到污染物去除或者污染物减

少至可接受的水平。在一些实施方式中,异位生物修复包括在生物反应器中去污染,其中,被污染的土壤或水被放置在设计的密封系统中,与文中所描述的生物修复组合物混合、以及维持到污染物被去除或者污染物减少至可接受的水平。

[0465] 在本领域中公知本文描述的用于形成重组细菌的方法。本领域技术人员将理解到,许多常规的分子生物学技术可用于产生编码一种或多种芳香族阳离子肽的细菌质粒。例如,使用限制性内切酶和连接酶,编码肽的核酸序列可被合成且被克隆到所选择的质粒中。连接产物可被转到大肠杆菌中以产生大量的产物,该产物可接着被转到所选择的生物修复细菌中。类似的策略可用来产生携带编码一种或多种芳香族阳离子肽的核酸序列的细菌转座子,且将该转座子转到所选择的生物修复细菌中。

[0466] 本领域技术人员还会理解到,细菌学的常规方法可用于产生大量的文中所描述的重组细菌以用于大规模的生物修复操作。本领域技术人员应理解到,精确的培养条件将根据使用的具体细菌物种而不同,且对于各种生物修复细菌的培养条件在本领域中是可容易得到的。

[0467] 在以下的参考文献中提供了用于生物修复和其它有关应用的一般文献,这些文献通过引用方式全部并入文中:美国专利 No. 6,913,854;Reimers, C. E. 等的“Harvesting Energy from Marine Sediment-Water Interface”, *Environ. Sci. Technol.* 2001, 35, 192-195, 第 16 卷, 2000; Bond D. R. 等的“Electrode Reducing Microorganisms that Harvest Energy from Marine Sediments”, *Science*, 第 295 卷, 483-485, 2002 年 1 月 18 日; Tender, L. M. 等的“Harnessing Microbially Generated Power on the Seafloor”, *Nature Biology*, 第 20 卷, 第 821- 第 825 页, 2002 年 8 月; DeLong, E. F. 等的“Power From the Deep”, *Nature Biology*, vol. 20, 第 788- 第 789 页, 2002 年 8 月; Bilal 的“Thermo-Electrochemical Reduction of Sulfate to Sulfide Using a Graphite Cathode”, *J. Appl. Electrochem.*, 28, 1073, 1998; Habermann 等的“Biological Fuel Cells With Sulphide Storage Capacity”, *Applied Microbiology Biotechnology*, 35, 128, 1991, ; 和 Zhang 等“Modelling of a Microbial Fuel Cell Process”, *Biotechnology Letters*, 第 17 (8) 卷, 第 809- 第 814 页, 1995 年 8 月。

[0468] 纳米线应用中的芳香族阳离子肽和细胞色素 c

[0469] 文中所公开的芳香族阳离子肽、细胞色素 c 和 / 或掺杂有肽的细胞色素 c 可用于纳米线应用。通常,纳米线为直径大约为纳米(10^{-9} 米)的纳米结构。可替代地,纳米线可被限定为厚度或直径限制为几十纳米或更小且长度不受限的结构。在这些尺度下,量子机械效应开始起作用。存在许多不同类型的纳米线,包括金属的(例如, Ni、Pt、Au)、半导体的(例如, Si、InP、GaN 等)、和绝缘的(例如, SiO_2 、 TiO_2) 纳米线。分子纳米线由重复的有机的(例如, DNA、文中所公开的芳香族阳离子肽、细胞色素 c、和 / 或掺杂有肽的细胞色素 c 等)或无机的(例如, $\text{Mo}_6\text{S}_9-x\text{I}_x$) 分子单元组成。例如,文中所公开的纳米线可用于将组件连接成极其小的电路。使用纳米技术,组件由化学化合物构成。

[0470] 纳米线合成

[0471] 存在两种合成纳米线的基本方法:自上而下方法和自下而上方法。在自上而下方法中,大块的材料通过不同方法(例如光刻法和电泳法)被切割成小块。然而,自下而上方法中,纳米线通过成分吸附原子的组合来合成。大多数的合成技术基于自下而上方法。

[0472] 通过数个常见的实验室技术(包括悬浮、沉积(电化学沉积或其它沉积)和 VLS 生长)使纳米线结构生长。

[0473] 悬浮的纳米线是在纵向末端固定的高真空腔室内制造的线。悬浮的纳米线可通过以下步骤制造:化学蚀刻或者轰击(通常利用高能离子)较大的线;使 STM 的尖端凹进接近其熔点的金属的表面中;然后收回 STM 的尖端。

[0474] 用于形成纳米线的另一常见技术为气-液-固(VLS)合成方法。该技术使用激光烧蚀的颗粒或者原料气(例如硅烷)作为源材料。然后使源材料暴露于催化剂。对于纳米线,最佳催化剂为液态金属(例如金)纳米簇,其可以以胶体形式被购买且沉积在基底上或者通过去湿从薄膜中自组装。在半导体材料的情况下,该方法经常可制造结晶的纳米线。源材料进入这些纳米簇中并开始充盈其中。一旦达到超饱和,源材料固化且从纳米簇向外生长。最终产品的长度可简单地通过切断源材料供应而调节。具有交替材料的超晶格的化合物纳米线可通过仍在生长阶段期间切换源材料来实现。在一些实施方式中,可使用诸如芳香族阳离子肽、细胞色素 c 和 / 或掺杂有肽的细胞色素 c 的源材料。无机纳米线(诸如 $\text{Mo}_6\text{S}_9-x\text{I}_x$, 其可替代地被视为簇聚合物)在高温下在单步气相反应中来合成。

[0475] 此外,许多类型的材料(诸如芳香族阳离子肽、细胞色素 c 和 / 或掺杂有肽的细胞色素 c)的纳米线,可在溶液中生长。溶液相合成具有以下优点:与在表面上制造纳米线的方法相比,其可大规模生产非常大量的纳米线。已证实多元醇合成尤其通用于制造 Pb、Pt 和银的纳米线,在多元醇合成中,乙二醇既是溶剂又是还原剂。

[0476] 一般方法

[0477] 细胞色素 c 还原:将增大量的芳香族阳离子肽添加到被氧化的细胞色素 c 的溶液中。通过在 500nm 的吸光率来监测还原的细胞色素 c 的形成。通过非线性分析(Prizm 软件)来确定细胞色素 c 还原的速率。

[0478] 时间分辨的紫外-可见光吸收光谱用于研究在肽存在下的细胞色素 c 的电子传输过程。还原的细胞色素 c 通过在宽带光谱范围(200nm-1100nm)的吸光率进行监控。利用紫外/可见分光光度计(Ultrospec3300pro, GE),在 1mm 或 2mm 的路径长度的石英槽中记录吸收率变化。N-乙酰半胱氨酸(NAC)和谷胱甘肽被作为电子供体以还原被氧化的细胞色素 c。通过添加各种浓度的肽来估计细胞色素 c 还原的速率常数。肽的剂量依赖性与细胞色素 c 还原动力学相关。

[0479] 线粒体 O_2 消耗和 ATP 产生:如先前所述,从大鼠肾中分离新鲜的线粒体。如先前所述,使用用于 C1(谷氨酸盐/苹果酸盐)、C2(琥珀酸盐)、和 C3(TMPD/抗坏血酸盐)的不同底物,通过耗氧量(Oxygraph 克拉克氏电极)来测量电子通量。在低底物条件下进行测定以避免使酶反应饱和。使用荧光素酶方法(Biotherma),在 96-孔发光板读取仪(96-well luminescence plate reader, Molecular Devices 公司)中动力学确定离体的线粒体中的 ATP 产生。在第一分钟内确定起始的 ATP 合成的最大速率。

[0480] 循环伏安法:使用生物分析系统 CV-50W 伏安分析仪,使用具有相对于标准氢电极 NHE 的电势 +0.237V 的 Ag/AgCl/1M KCl 参比电极(Biometra, 哥廷根, 德国)和铂反电极,来执行循环伏安法。在建立的方案后,清洗金线电极。使用巯基丙醇改良的电极(在 20mM 的巯基丙醇中培养 24h)进行溶液中的细胞色素 c 的电化学研究。利用 1M KCl 和 10mM 磷酸钠缓冲液(pH7.4/7.8)中的 20 μM 细胞色素 c 记录循环伏安图。按照 Randles-Sevcik 方

程,由不同扫描速率下的峰值电流,将表观电位计算为在不同的扫描速率(100mV/s-400mV/s)和扩散系数下的阳极峰值电位和阴极峰值电位之间的中点。

[0481] 实施例

[0482] 通过下面实施例进一步说明本发明,以下实施例应不以任何方式认为限制本发明。

[0483] 实施例 1. 芳香族阳离子肽的合成

[0484] 使用固相肽合成且所有的氨基酸衍生物可从市场购买。在完成肽组装后,以常规方式使肽与树脂分离。通过制备型反相色谱提纯粗肽。在三个不同的系统中,肽的结构同一性通过 FAB 质谱法进行确认,且肽的纯度通过分析反相 HPLC 和薄层色谱法进行评估。将实现 >98% 的纯度。通常,使用 5g 树脂的合成试验产生约 2.0g-2.3g 的纯肽。

[0485] 实施例 2. 肽 D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ (SS-31) 有利于细胞色素 c 还原

[0486] 吸收光谱法(UltroSpec3300Pro ;220nm-1100nm)用于确定 SS-31 是否调节细胞色素 c 还原(图 1)。利用谷胱甘肽还原细胞色素 c 与 Q 带(450nm-650nm)中的多个移动有关,其中,显著的移动在 550nm 处。添加 SS-31 在 550nm 处产生显著的光谱权重移动(图 1A)。与时间相关的光谱学示出 SS-31 增大了细胞色素 c 还原的速率(图 1B)。这些数据示出 SS-31 改变了细胞色素 c 的电子结构且增强了 Fe³⁺ 血红素到 Fe²⁺ 血红素的还原。

[0487] 实施例 3. 肽 D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ (SS-31) 增强穿过细胞色素 c 的电子扩散

[0488] 执行循环伏安法(CV)以确定 SS-31 是否改变细胞色素 c 的电子流动和 / 或还原 / 氧化电势(图 2,上面板)。使用 Au 工作电极、Ag/AgCl 参比电极和 Pt 辅助电极来进行 CV。对于细胞色素 c 的还原过程和氧化过程二者,SS-31 都增大了电流(图 2,上面板)。SS-31 未改变还原 / 氧化电势(图 2,上面板),但增强穿过细胞色素 c 的电子流动,这表明 SS-31 减小了复合物 III 到复合物 IV 之间的电阻。对于图 2(下面板),使用与 BASi C3Cell Stand 连接的 BASi-50W 伏安分析仪来执行全部的伏安测量。Ag/AgCl 电极被用作参比电极,而玻璃碳和铂电极被用于标准测量。在每次测量之前,利用氮气使溶液充分脱气以避免电极污染。针对氨基丁三醇 - 硼酸 - 乙二胺四乙酸(TBE)缓冲液、缓冲液加细胞色素 c、以及缓冲液加胞色素 c 加两个不同的 SS-31 剂量,作出循环伏安图(如在图 2 中所示,下面板)。当 SS-31 用量为相对于细胞色素 c 的两倍时(细胞色素 c:SS-31=1:2),电流(电子扩散速率)增大至几乎 200%。该结果表明 SS-31 促进细胞色素 c 中的电子扩散,这使肽可用于设计更灵敏的生物检测器。

[0489] 实施例 4. 肽 D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ (SS-31) 增强细胞色素 c 中的电子产生能力

[0490] 进行光致发光(PL)以检查 SS-31 对细胞色素 c 的血红素的导带的电子结构、负责电子传输的能态的影响(图 3)。使用 Nd:YD04 激光器(532.8nm)以激发细胞色素 c 中的电子(图 2A)。细胞色素 c 中的强 PL 发光态可在 650nm 清晰地识别(图 2B)。随着添加 SS-31,PL 强度呈现剂量依赖性增大,这说明在细胞色素 c 中的导带中的可利用的电子态增加(图 2B)。这表明,SS-31 增大细胞色素 c 的导带的电子产生能力,其与 SS-31 调控穿过细胞色素 c 的电流增大相一致。

[0491] 实施例 5. 肽 D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ (SS-31) 引发围绕细胞色素 c 血

红素的新的 $\pi-\pi$ 相互作用

[0492] 执行圆二色性(Olis 分光偏振计, DSM20)以监控俗特谱带(反峰,在 415nm 处),作为用于细胞色素 c 中的 $\pi-\pi^*$ 血红素环境的探针(图 4)。SS-31 促进该峰“红”移至 440nm,表明 SS-31 引发细胞色素 c 内的新的血红素-酪氨酸 $\pi-\pi^*$ 过渡,而没有发生变性(图 4)。这些结果表明,通过向血红素提供用于电子隧道效应的额外的酪氨酸 Tyr、或者通过减小外源 Tyr 残基和血红素之间的距离,SS-31 改变了血红素的直接环境。围绕血红素的 $\pi-\pi^*$ 相互作用的增大将增强电子隧道效应,其有利于电子扩散。

[0493] 实施例 6. 肽 D-Arg-2', 6' -Dmt-Lys-Phe-NH₂ (SS-31) 增大线粒体 O₂ 消耗

[0494] 使用氧描记器(Oxygraph)来确定离体的大鼠肾的线粒体的耗氧量(图 5)。在状态 2 (仅 400 μ M ADP)、状态 3 (400 μ M ADP 和 500 μ M 底物) 和状态 4 (仅底物) 下,在不同的 SS-31 浓度的存在下,测量呼吸速率。所有试验多次重复进行,其中 n=4-7。结果表明 SS-31 促进电子传递到氧,而不解联线粒体(图 5)。实施例 7. 肽 D-Arg-2', 6' -Dmt-Lys-Phe-NH₂ (SS-31) 增加离体线粒体中的 ATP 合成

[0495] 通过测量从离体线粒体收集的呼吸缓冲液在添加 400mM ADP 之后 1 分钟时的 ATP 而确定线粒体 ATP 合成的速率(图 6)。使用 HPLC 分析 ATP。全部试验多次重复进行,其中 n=3。将 SS-31 添加到离体的线粒体中剂量依赖性地增大了 ATP 合成的速率(图 6)。这些结果表明,由 SS-31 引起的电子传递的增强与 ATP 合成有关。

[0496] 实施例 8. 肽 D-Arg-2', 6' -Dmt-Lys-Phe-NH₂ (SS-31) 增强细胞色素 c 减少的线粒体内膜的呼吸

[0497] 为了证实细胞色素 c 在 SS-31 对线粒体呼吸的作用中所起到的作用,在细胞色素 c 减少的线粒体内膜中确定 SS-31 对线粒体耗氧量的影响,该线粒体内膜从经冷冻的大鼠肾的线粒体得到(图 7)。在具有 100 μ M SS-31 或不具有 100 μ M SS-31 的 500 μ M 琥珀酸盐存在下,测量呼吸速率。重复进行该实验,其中 n=3。这些数据表明:1) SS-31 借助 IMM- 紧密结合的细胞色素 c 而起作用;2) SS-31 可补救细胞色素 c 的功能下降。

[0498] 实施例 9. 肽 D-Arg-2', 6' -Dmt-Lys-Phe-NH₂ (SS-31) 和 Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ (SS-20) 促进细胞色素 c 还原

[0499] SS-31 和 SS-20 可加速作为还原剂的谷胱甘肽(GSH)引发的细胞色素 c 还原的动力学(图 13)。通过在 550nm 处的吸光度的增加来监控细胞色素 c 的还原。添加 GSH 导致 550nm 处的吸光度的时间依赖性增加(图 13)。使用作为还原剂的 N-乙酰半胱氨酸(NAC)得到类似的结果(未示出)。单独添加 100 μ M 浓度的 SS-31 未还原细胞色素 c,但是 SS-31 剂量依赖性地增大 NAC 引发的细胞色素 c 还原的速率,这说明 SS-31 并不提供电子,但可加速电子传递。

[0500] 实施例 10. 肽 D-Arg-2', 6' -Dmt-Lys-Phe-NH₂ (SS-31) 和 Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ (SS-20) 增加线粒体电子通量和 ATP 合成

[0501] SS-20 和 SS-31 都能够提升电子通量,如在离体的大鼠肾线粒体中的耗氧量测量的(图 14)。以 100 μ M 的浓度将 SS-20 或者 SS-31 添加到包含 0.5mM 琥珀酸盐(复合物 II 底物)和 400 μ M ADP 的呼吸缓冲液中的离体的线粒体中。当使用低浓度的复合物 I 底物(谷氨酸盐/苹果酸盐)时,观测到类似的耗氧量的增加(数据未示出)。电子通量的增大与离体线粒体中的 ATP 产生的速率的显著增大有关,该离体线粒体利用低浓度的琥珀酸盐提

供能量(图 15)。这些数据示出,使 SS-20 和 SS-31 靶向 IMM 可提升电子传输链中的电子通量以及提高 ATP 合成,尤其在减少的底物供给的条件下。

[0502] 实施例 11. 细胞色素 c 分离和纯化

[0503] 在本领域中已知分离和纯化细胞色素 c 的方法。提供了一种示例性的且非限制性的方法。细胞色素 c 具有一些带正电的基团,从而使其具有大约 10 的 pI。因此,通过离子吸引至线粒体的膜上的磷脂的负电荷,细胞色素 c 通常与线粒体的膜结合。在低 pH 下,在混合器中,在硫酸铝溶液中,通过均质化首先破碎组织和线粒体。带正电荷的铝离子通过与带负电荷的磷脂结合可从线粒体膜置换出细胞色素 c,并且使蛋白质游离在溶液中。通过将 pH 升高至 8.0 除去过量的硫酸铝,其中,铝以氢氧化铝的形式沉淀。

[0504] 在过滤以去除沉淀的氢氧化铝之后,使用离子交换色层分析来根据蛋白质的电荷而分离蛋白质。细胞色素 c 具有几个带正电的基团;通常,柱由 Amberlite CG-50 制成,其作为一种带负电的树脂或者阳离子交换树脂。

[0505] 一旦已收集洗脱液,硫酸铵沉淀法用于选择性地使在细胞色素 c 制备中残留的污染蛋白质沉淀。大多数蛋白质以在硫酸铵中 80% 的饱和度沉淀,而细胞色素 c 保持可溶。存在于溶液中的过量盐随后通过凝胶过滤色谱法被去除,该凝胶过滤色谱法基于蛋白质的尺寸来分离蛋白质。

[0506] 为了评估纯化,在纯化的每一步,收集制备的样品。随后使用 Bradford 方法针对总蛋白含量分析这些样品,且通过分光光度测定法测量这些样品的细胞色素 c 浓度。

[0507] 实施例 12: 通过脱硫脱硫弧菌(*Desulfovibrio desulfuricans*)的可溶硫酸盐的异化还原

[0508] 通过下面的实施例将进一步说明文中所描述的生物修复组合物和方法。该实例仅出于说明的目的给出且不用于限制。按照常规给出化学组分和其它组分。在文中所描述的方法和组合物的范围内,可以鉴于上述内容进行改动。

[0509] 表达载体构建: 编码芳香族阳离子肽的寡核苷酸将进行化学合成。寡核苷酸将被设计成在任一端包括独特的限制位点,其将允许定向克隆至在多克隆位点的上游携带组成型启动子的细菌质粒中。将利用与在寡核苷酸末端上的限制位点对应的酶,通过限制酶切消化来制备质粒。将使用分子生物学的常规技术,使寡核苷酸退火且连接到已制备的质粒。连接产物将被转至在选择性培养基上生长的大肠杆菌中。使用本领域中已知的方法,通过 DNA 测序,将筛选一些阳性克隆体来用于 cDNA 插入物。阳性克隆体将被扩增且制备了一批表达构建物。

[0510] 脱硫脱硫弧菌的转化: 100ml 的脱硫脱硫弧菌的过夜培养物($OD_{600}=0.6$)将进行离心分离且用无菌水冲洗团块三次,然后再悬浮在最终体积 200 μ l 的无菌水中。将 30 μ l 的一小份与 4 μ l 的质粒制剂(1 μ g)混合,通过电脉动器设备进行 5,000V/cn 电脉冲处理 6ms。将基于重组质粒赋予的抗生素抗性来挑选重组细菌。

[0511] 确定重组脱硫脱硫弧菌的硫酸盐还原酶活性: 将针对还原可溶硫酸盐的能力,测试野生型脱硫脱硫弧菌和重组脱硫脱硫弧菌。在厌氧条件下,在 30°C 下,在由 Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (德国微生物和细胞培养物保藏中心)推荐的培养基中培养细菌。将使 1280ppm 的硫酸盐水溶液接种有野生型脱硫脱硫弧菌和重组脱硫脱硫弧菌,然后培养 12 小时。

[0512] 硫酸盐测量 :将使用浊度技术(Icgen 等,2006)测量硫酸盐浓度。硫酸盐将沉淀在具有氯化钡的盐酸介质中以形成不溶的硫酸钡晶体。将新鲜制备包含甘油(104.16mL)、浓盐酸(60.25mL)和95%的异丙醇(208.33mL)的改进的调节混合物。对于每一反应,将2mL的不含细胞的上清液以1:50稀释在250mL锥形瓶中的Millipore水中,添加5mL的调节混合物。将通过搅拌充分混合全部的悬浮液。将添加大约1mg的氯化钡晶体,同时搅拌持续1分钟。在利用分光光度法在420nm测量浊度之前,在静止状态下静置该混合物2分钟。将从使用0-40ppm的 Na_2SO_4 的标准制定的曲线,来确定硫酸根离子的浓度。

[0513] 结果 :预测到在这些条件下,表达芳香族阳离子肽的重组细菌会显示提高的异化硫酸盐还原速率。

[0514] 等同物

[0515] 本发明不限于在本申请中描述的特定实施方式,用作本发明的单个方面的单独例证。本领域技术人员可以理解,可以不脱离本申请的精神和范围的情况下进行各种修改和改动。根据以上描述,除了本文中列举的以外,本公开的范围内的功能上等同的方法和装置对于本领域的技术人员而言是明显的。这样的改动和修改旨在落在所附权利要求书的范围内。本公开仅受所附权利要求书以及与这样的权利要求书的的范围所等同的全部范围限制。应当理解,本公开不限于特定的方法、试剂、组合物和生物系统,当然,所述方法、试剂、组合物和生物系统可以变化。还可理解,本文中使用的术语仅用于描述特定的实施方式而不旨在限制

[0516] 此外,在以马库什组的方式描述本公开的特征或方面的情况下,本领域的技术人员可以理解,本公开也是以马库什组中的任一单个成员或亚组成员的方式所描述的

[0517] 本领域的技术人员可以理解,为了任何或所有目的,尤其是提供说明书支持方面,本文中描述的所有范围还可涵盖任何且所有的可能子范围及其子范围的组合。任何列出的范围可以容易地看作充分公开并使其能够同一范围分成至少二分之一、三分之一、四分之一、五分之一、十分之一等的子范围。作为非限制性实施例,本文中描述的每一范围可以容易地分成下三分之一、中三分之一和上三分之一等。本领域技术人员还可以理解,所有的语言比如“上至”“至少”、“大于”、“小于”等包括本数且适用于可以随后被分成以上上述所提及子范围的范围。最后,本领域技术人员可以理解,范围包括每一单个成员。因此,例如,具有1到3个单元的组指的是具有1个单元、2个单元或3个单元的组。类似地,具有1到5个单元的组指的是具有1个单元、2个单元、3个单元、4个单元或5个单元的组,诸如此类

[0518] 本文所参考的或引用的所有专利、专利申请、在先申请和出版物通过引用以包括所有的附图和表格的全文并入本文,使得它们不与本说明书的明确教导相矛盾

[0519] 在所附的权利要求书中提出了其他实施方式。

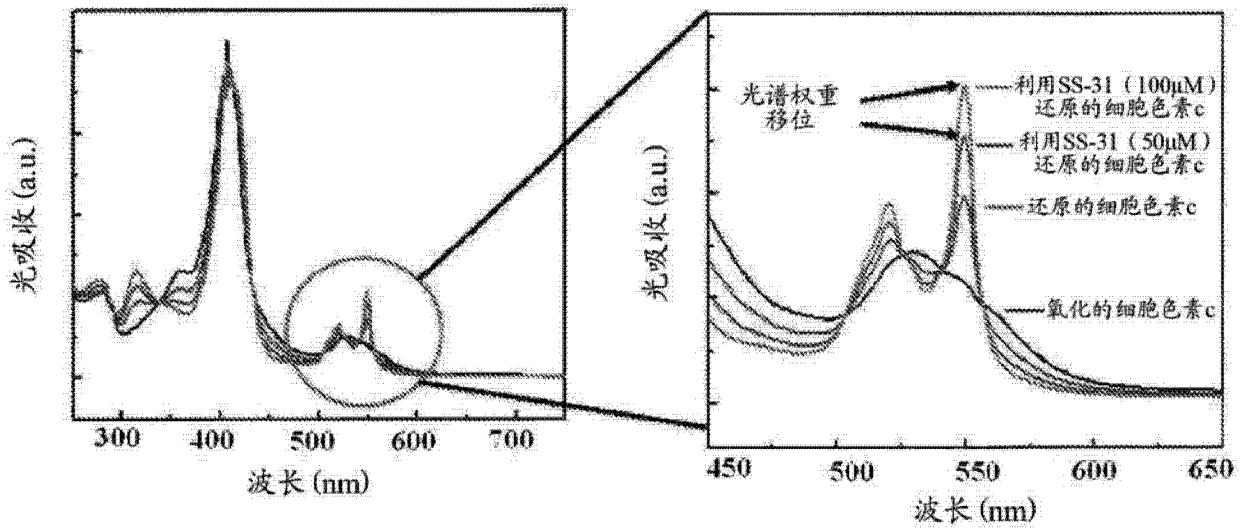


图 1A

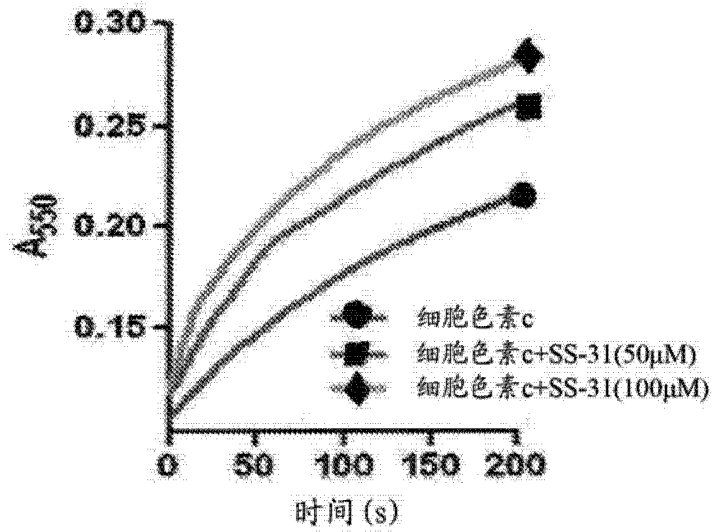
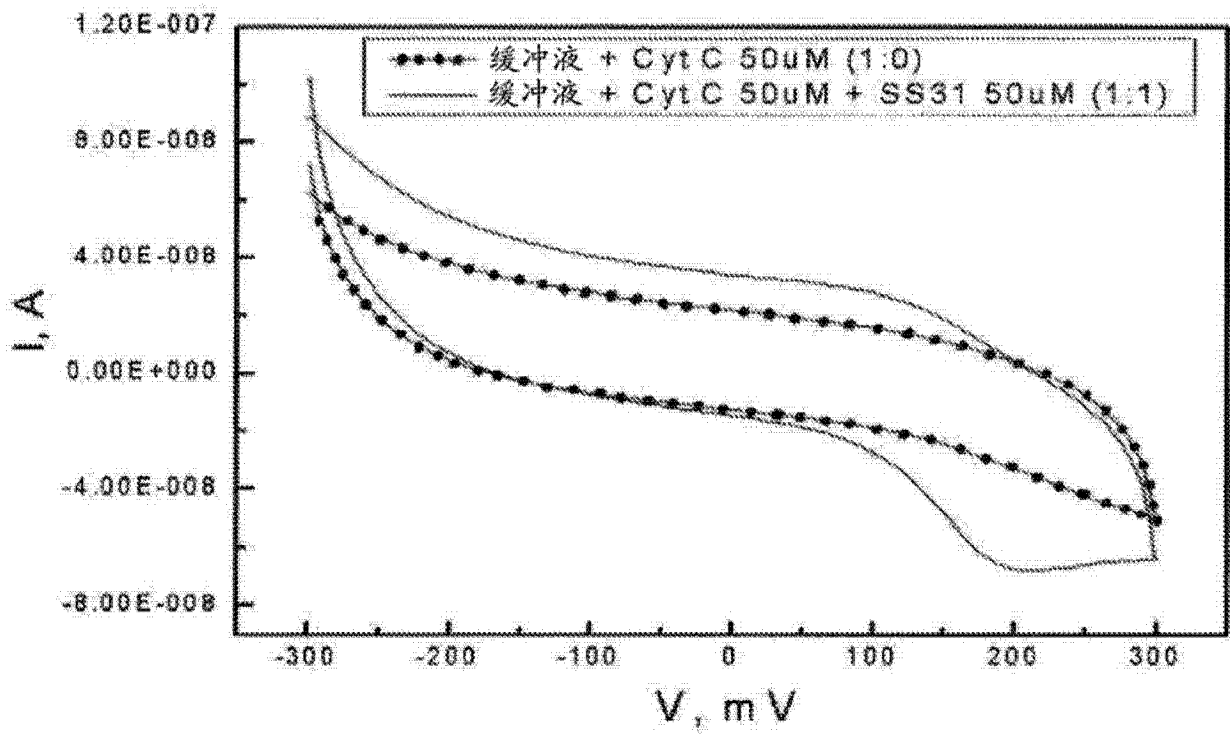


图 1B



	没有SS31(1:0)	具有SS31(1:1)
I_{ox}	17 nA	25 nA
V_{ox}	100 mV	100 mV
I_{red}	-33 nA	-67 nA
V_{red}	200 mV	200 mV

图 2A

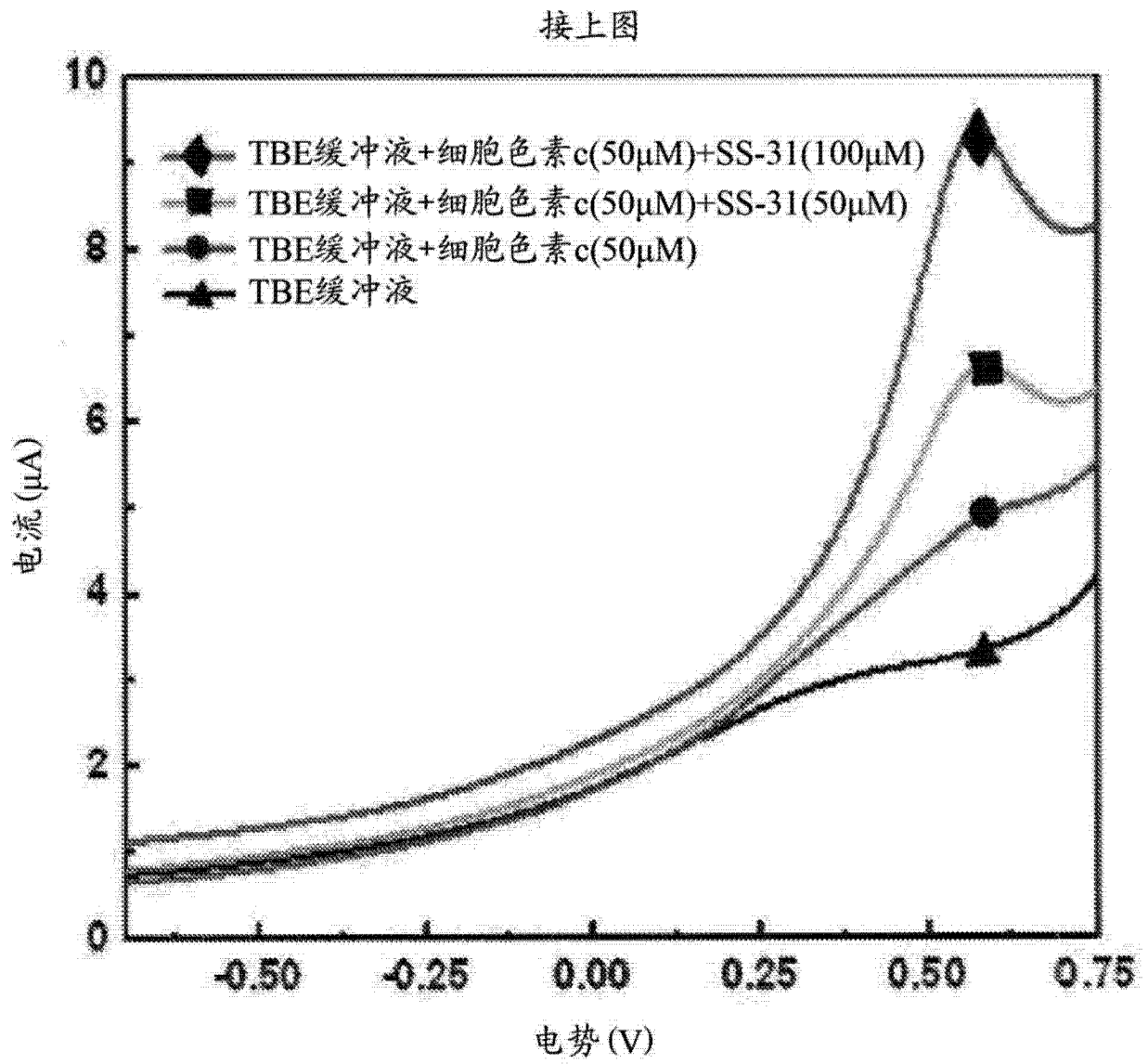


图 2B

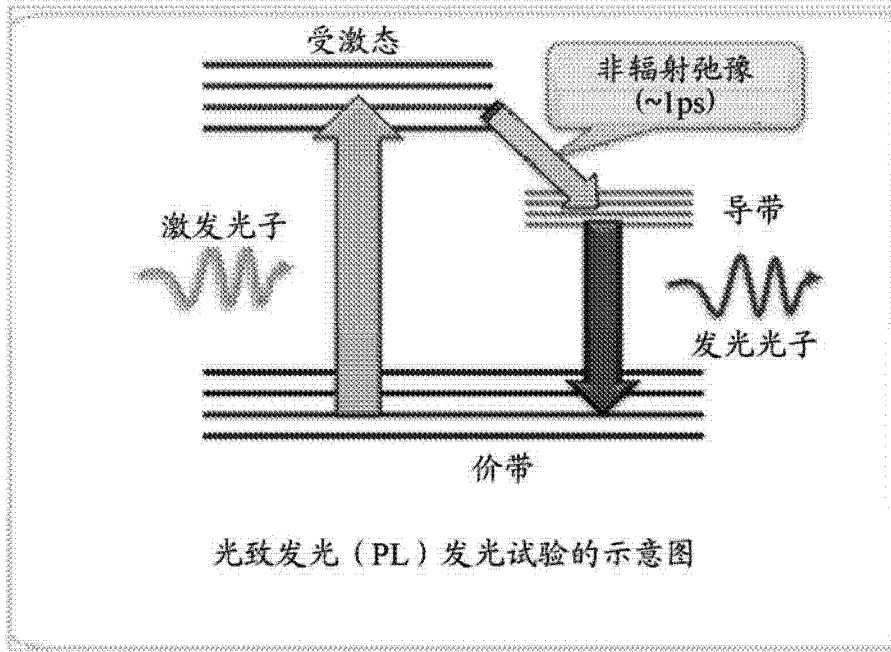


图 3A

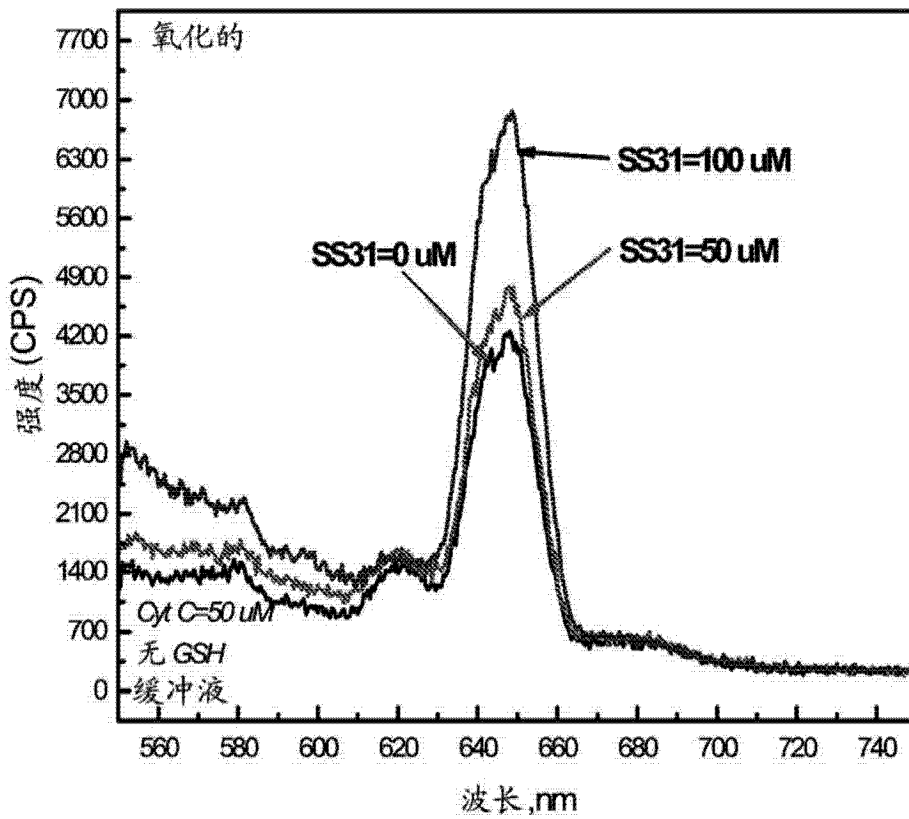


图 3B

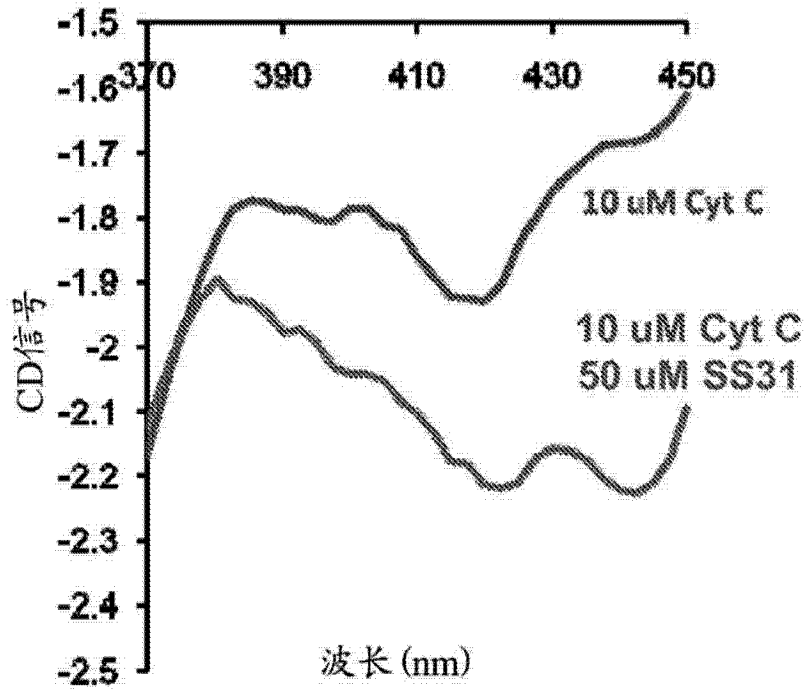


图 4

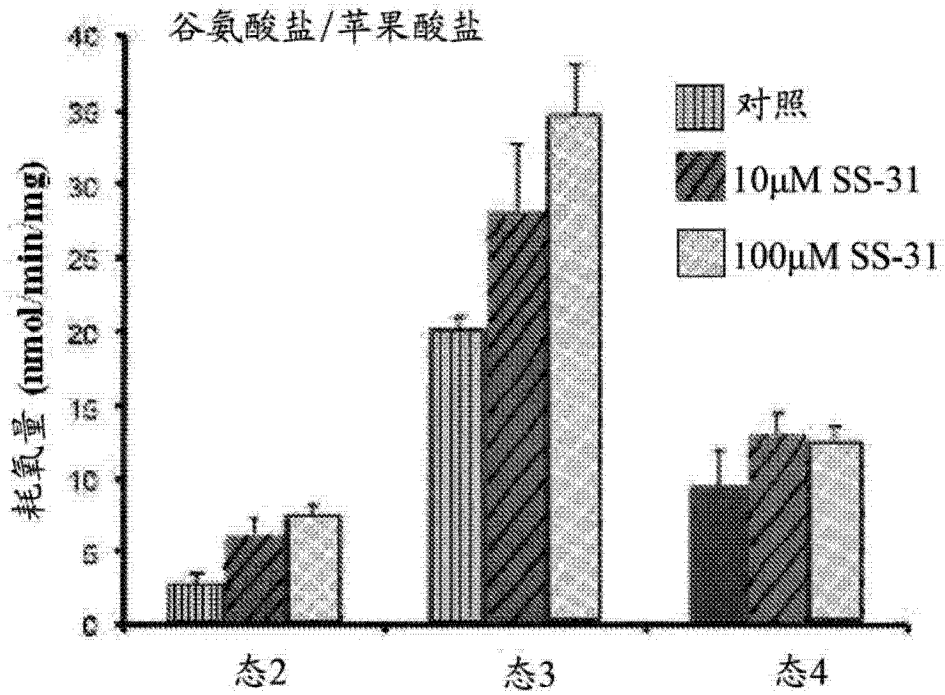


图 5A

接上图

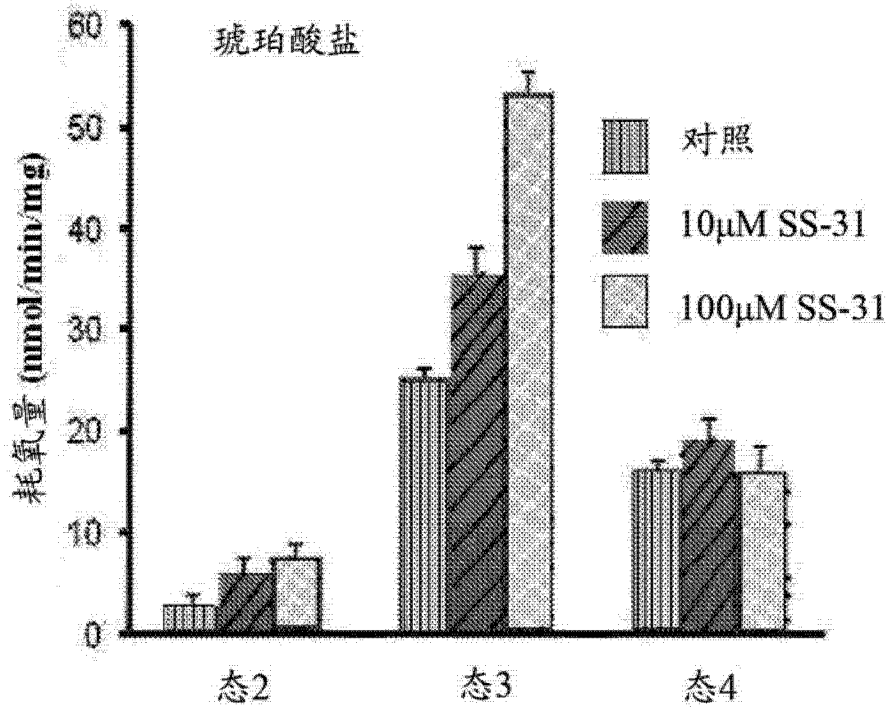


图 5B

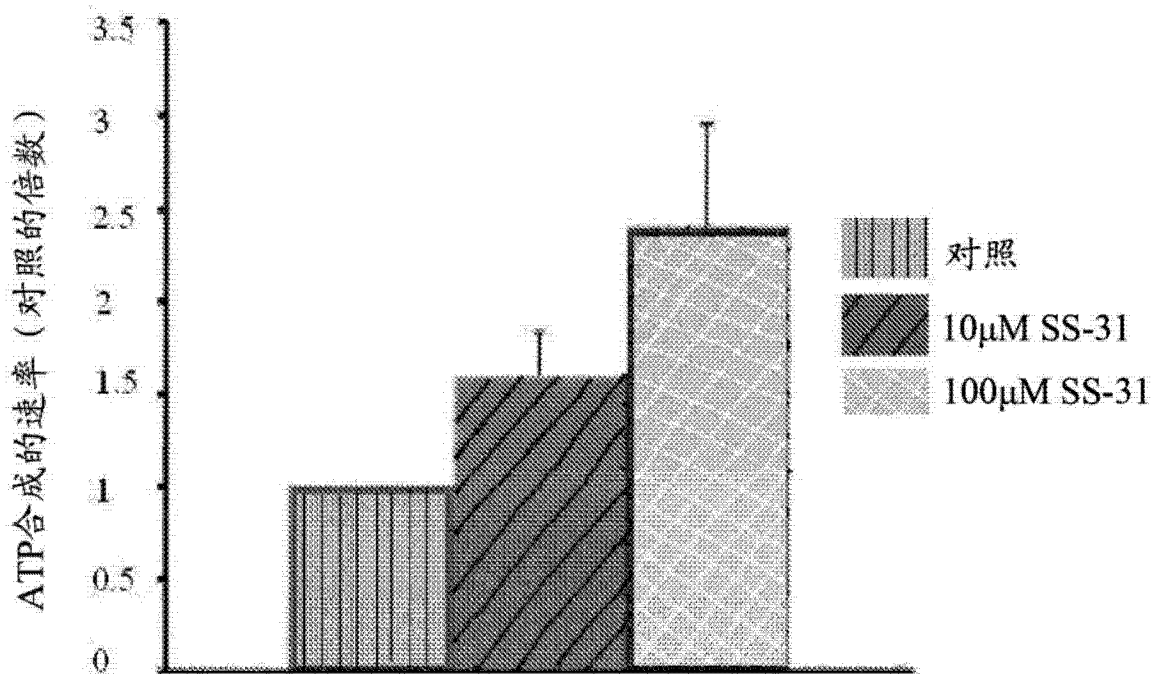


图 6

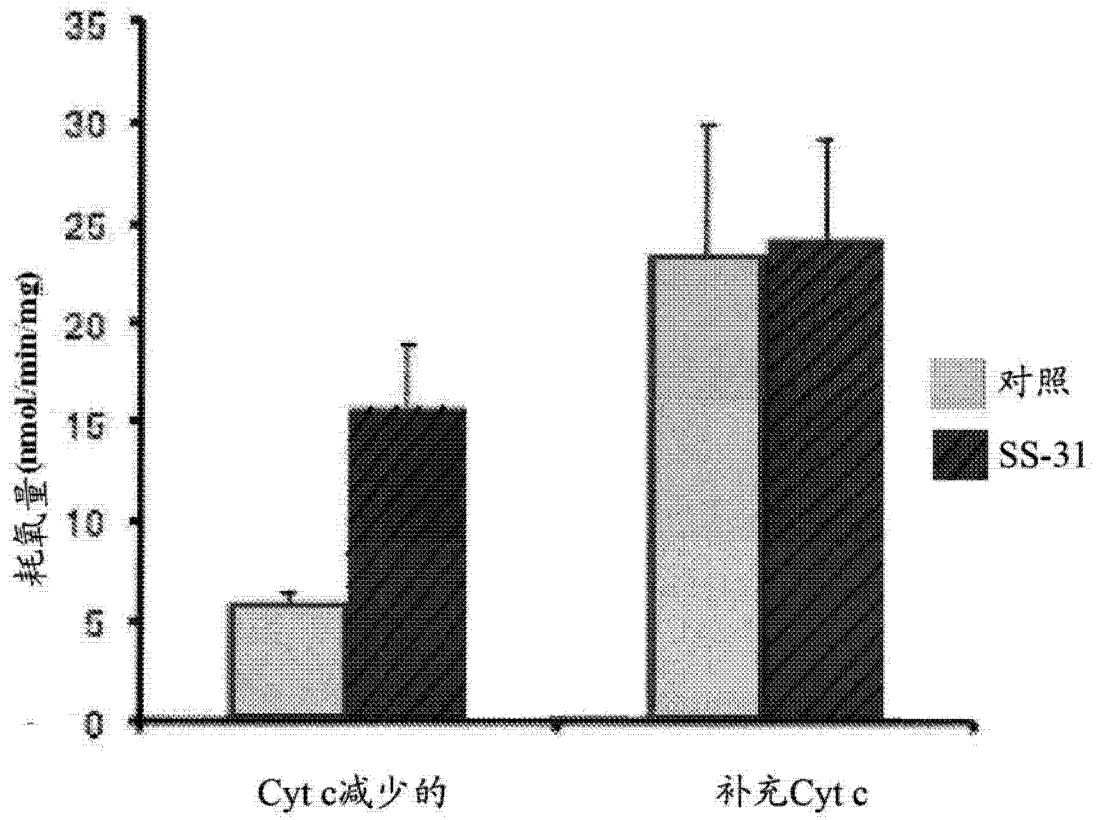


图 7

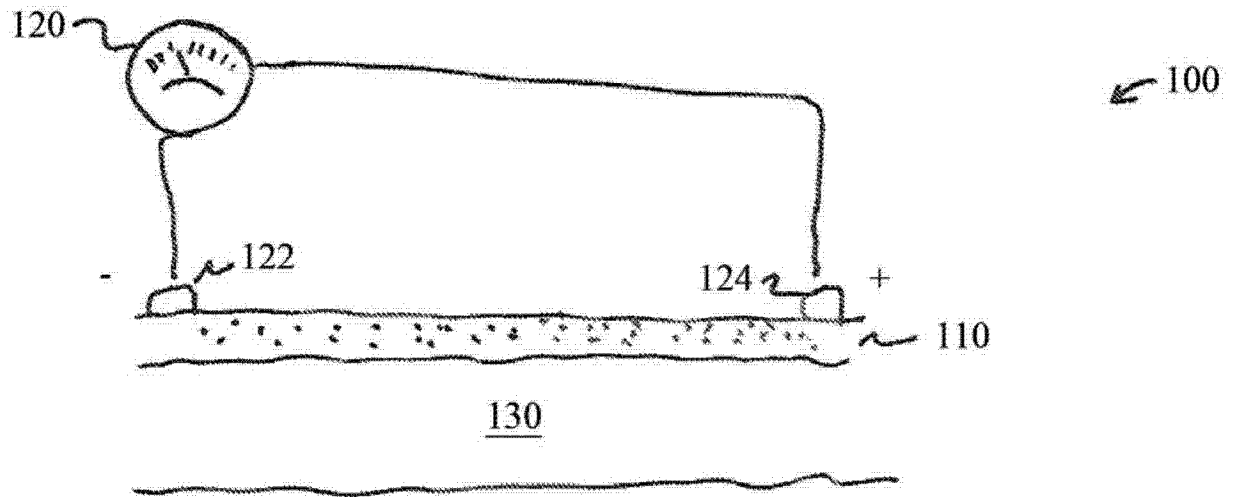


图 8

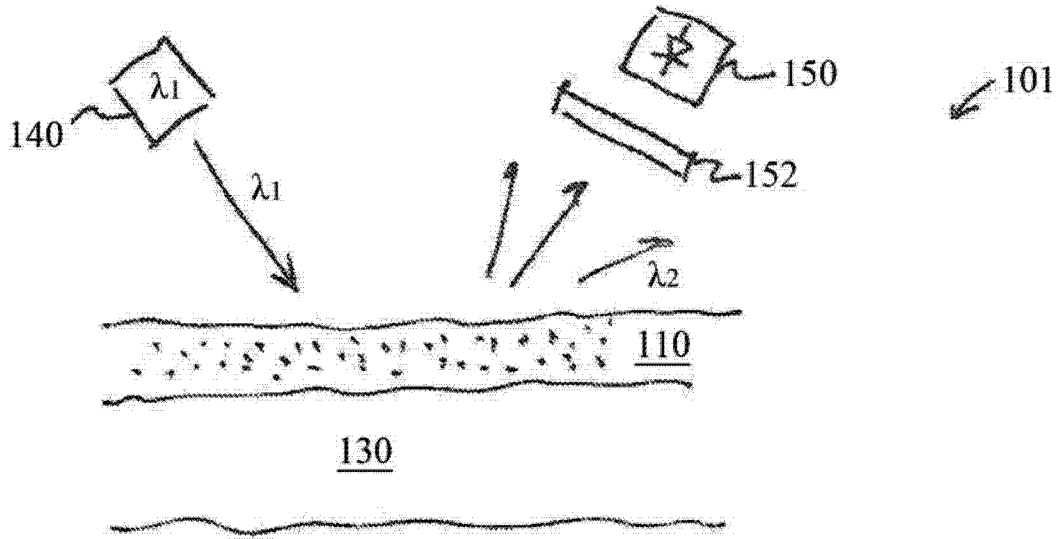


图 9

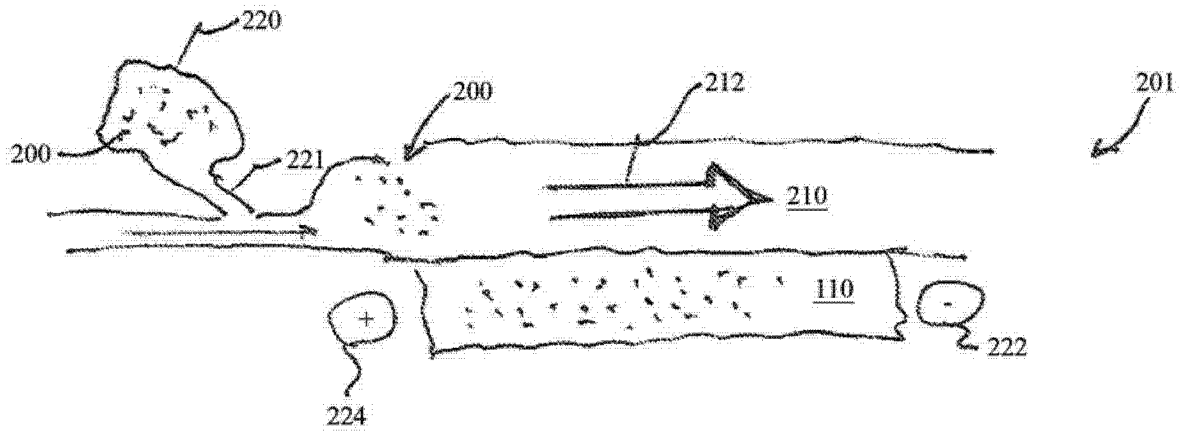


图 10

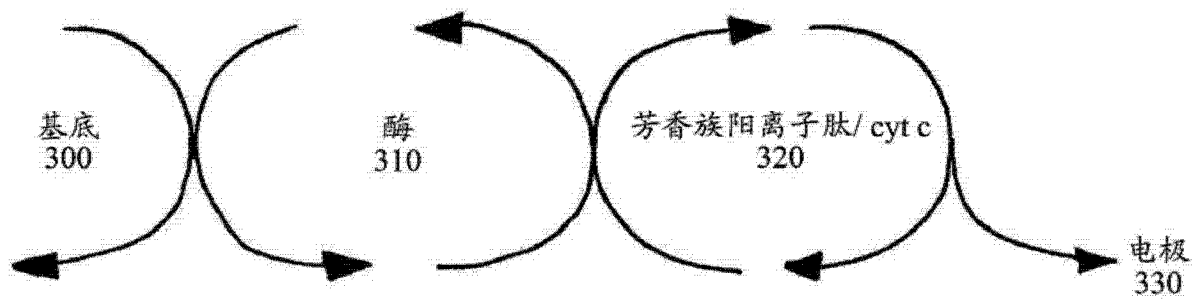


图 11

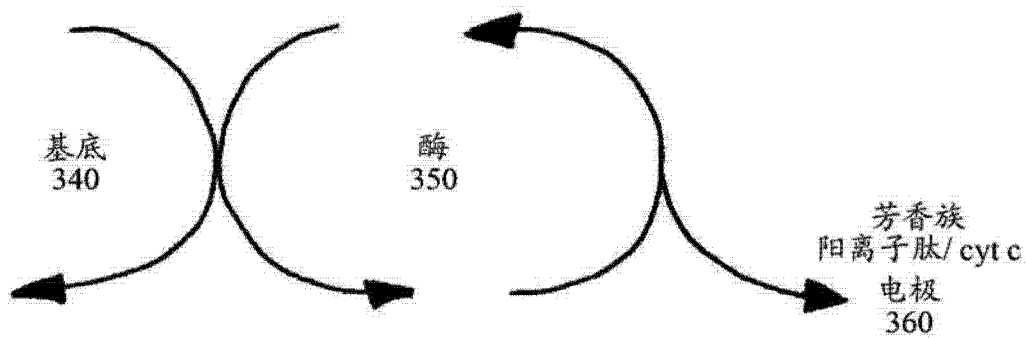


图 12

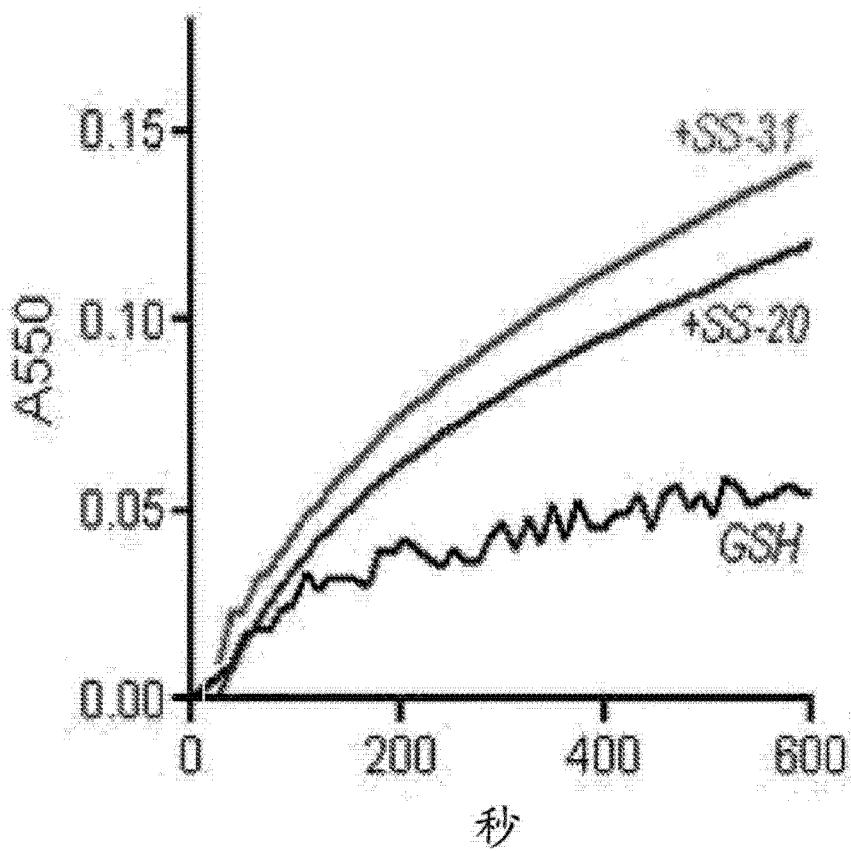


图 13

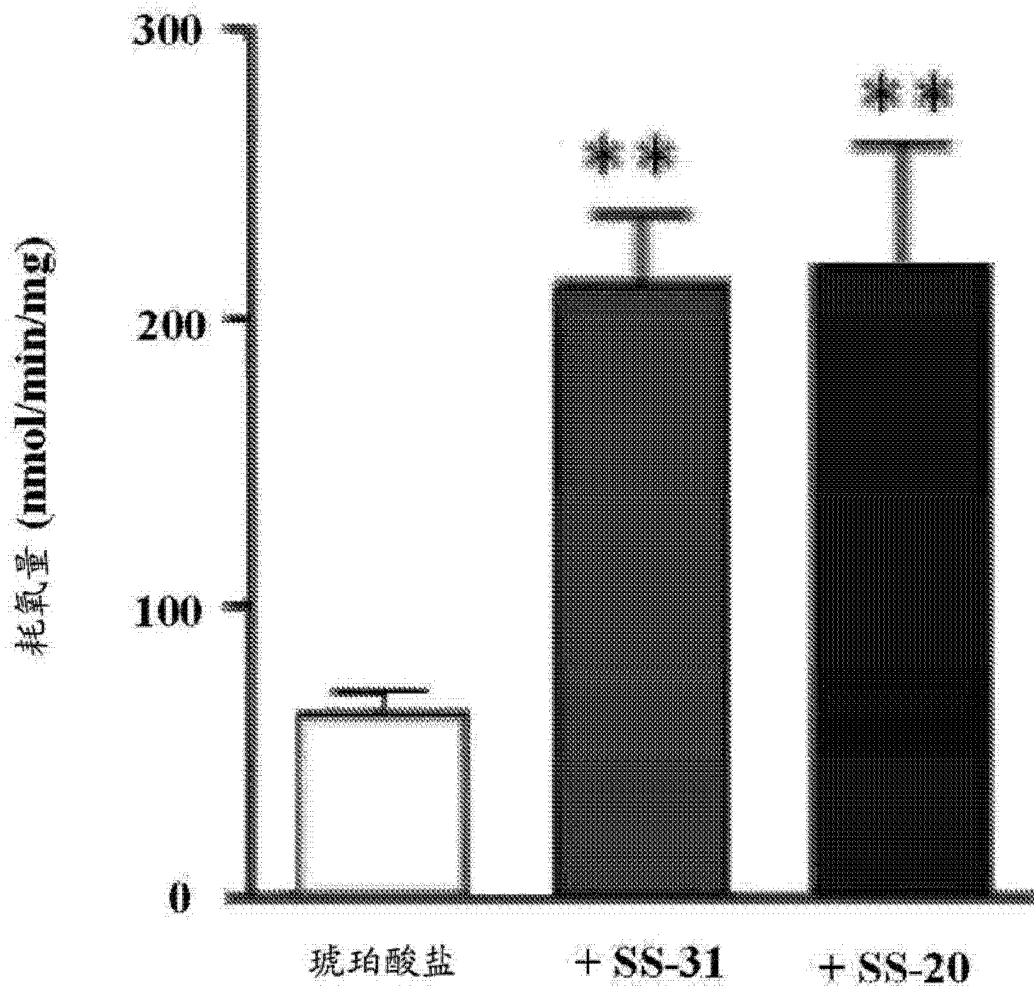


图 14

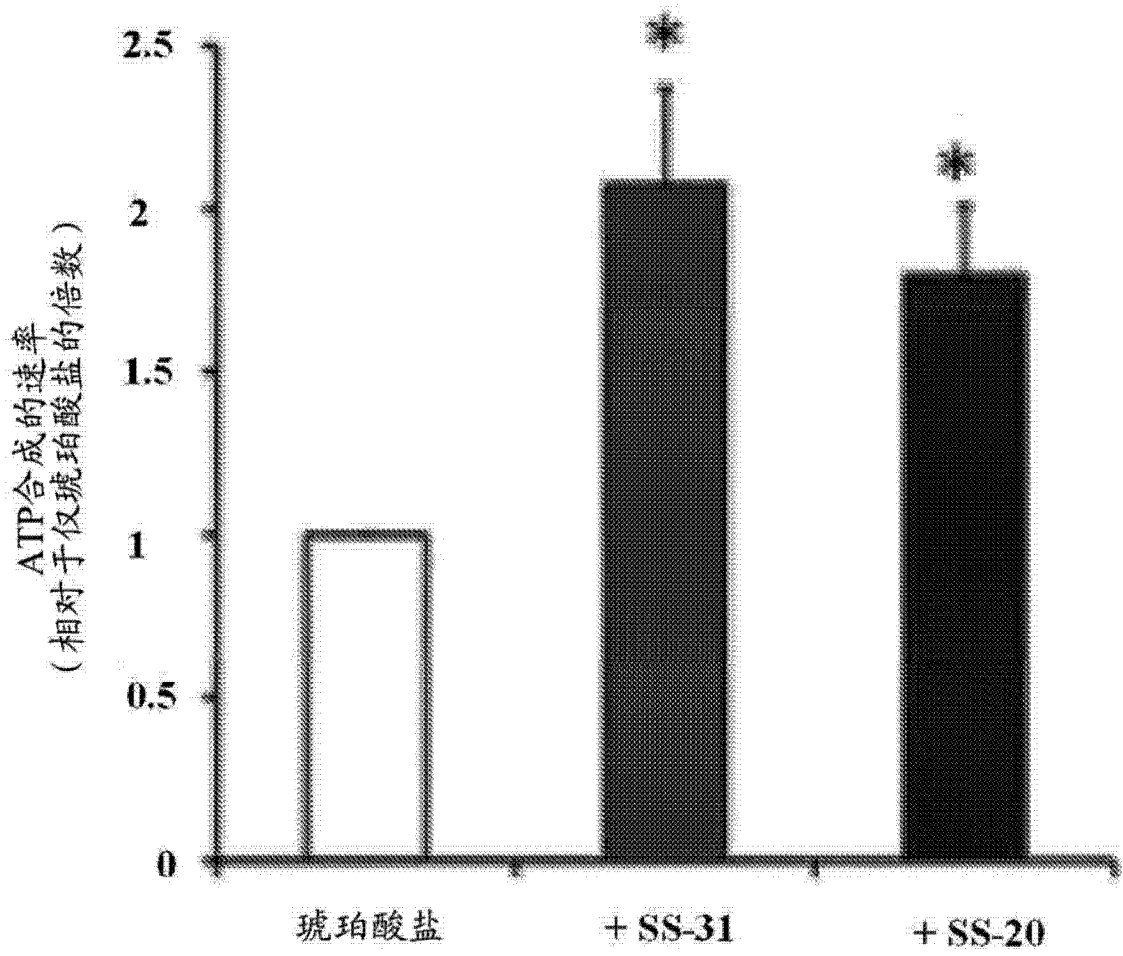


图 15

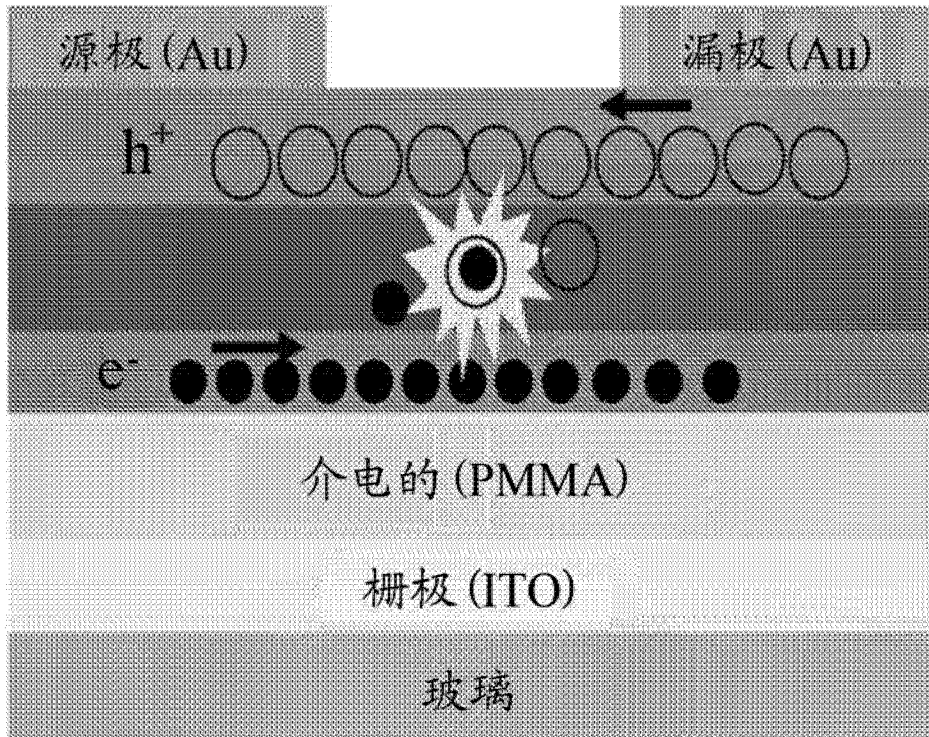
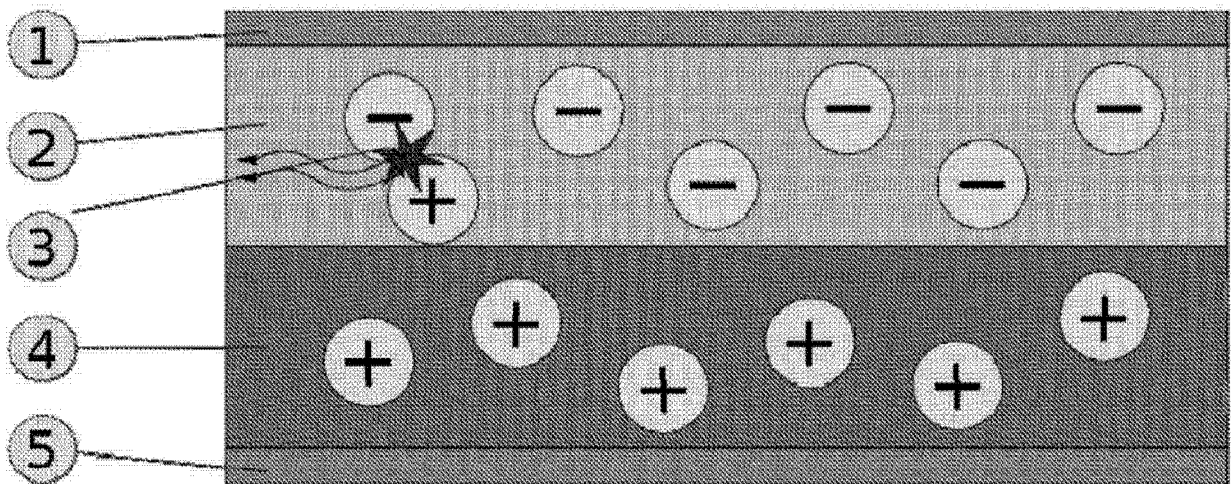


图 16



OLED示意图: 1.阴极 (-); 2.发光层; 3.辐射发光; 4.导电层; 5.阳极 (+)

图 17

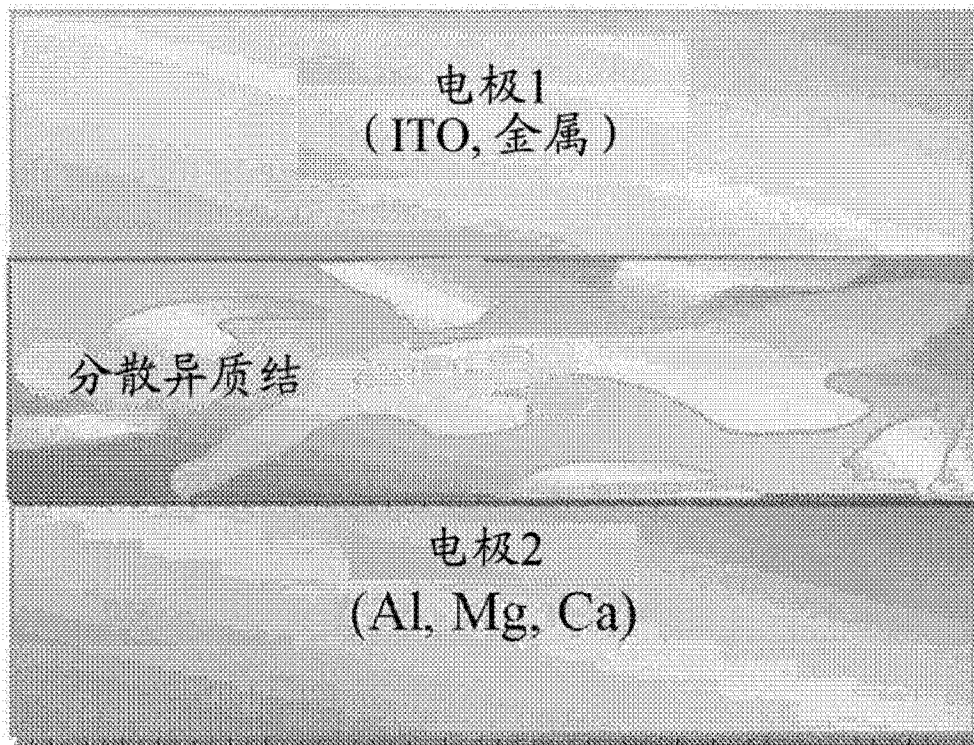


图 18

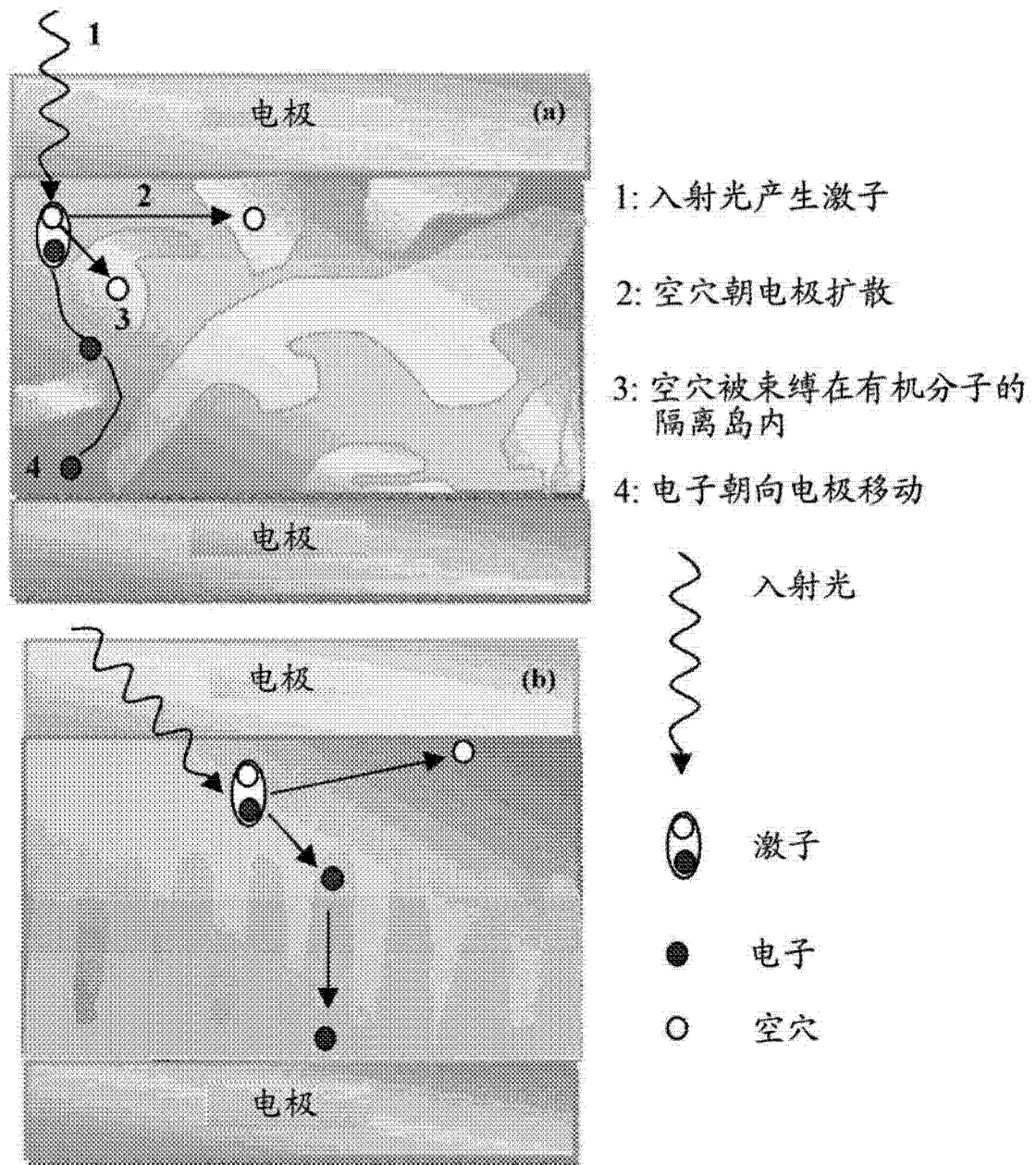


图 19

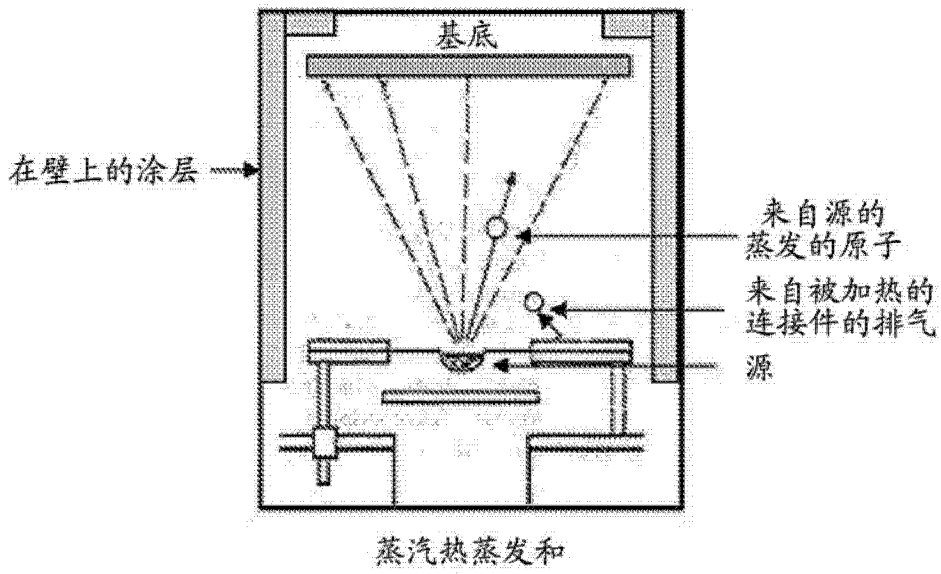


图 20A

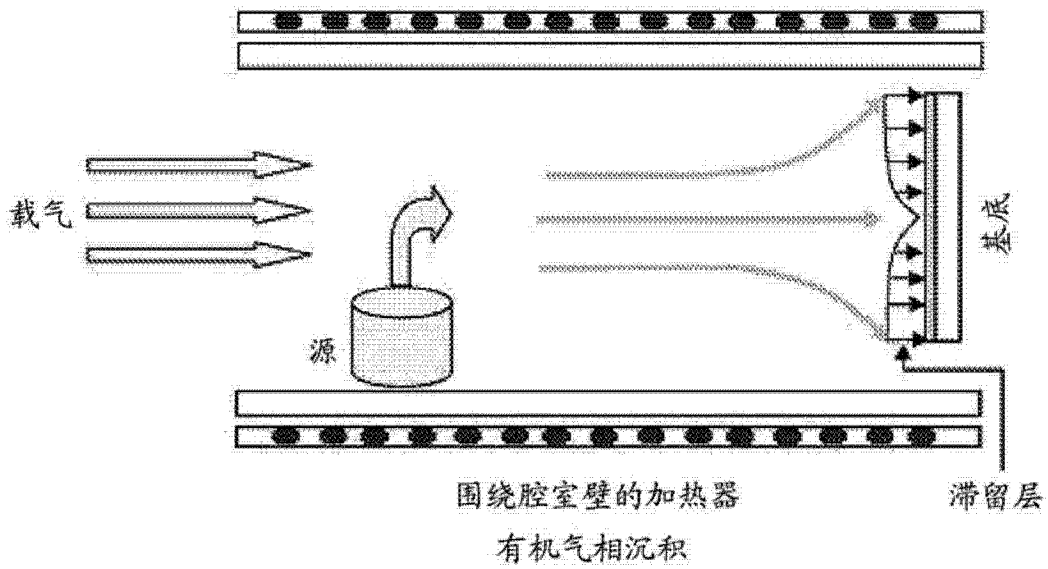


图 20B