

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

A61K 38/02

A61K 38/03 A61K 38/08

A61P 9/04 A61P 9/06

A61P 9/10



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02812056.6

[43] 公开日 2004 年 7 月 28 日

[11] 公开号 CN 1516596A

[22] 申请日 2002.5.17 [21] 申请号 02812056.6

[30] 优先权

[32] 2001.5.17 [33] AU [31] PR 5066

[86] 国际申请 PCT/AU2002/000608 2002.5.17

[87] 国际公布 WO2002/092119 英 2002.11.21

[85] 进入国家阶段日期 2003.12.16

[71] 申请人 澳大利亚国立大学

地址 澳大利亚堪培拉

[72] 发明人 A·F·杜尔汉提

M·G·卡萨罗托

[74] 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

代理人 黄革生 林柏楠

权利要求书 8 页 说明书 35 页 序列表 5 页
附图 8 页

[54] 发明名称 调节心脏细胞中钙通道活性的方法及其试剂

[57] 摘要

本发明总体上涉及可调节心脏细胞中钙通道活性的新肽。更具体地，本发明提供了调节心脏钙通道活性的方法，该方法包括：将心脏理阿诺碱受体(RyR2)接触一定量的足以调节所述 RyR2 活性的二氢吡啶受体(DHPR)多肽片段，并测定所述钙通道活性。本发明方法用于与心脏功能异常有关的一系列失调和疾病的治疗，特别是涉及心脏细胞中减少的心输出量和/或异常的兴奋-收缩偶联、钙超载或钙渗漏的疾病和失调的治疗。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1、一种用于调节心脏理阿诺碱受体钙通道活性的方法，该方法包括将心脏理阿诺碱通道接触一定量的足以调节所述理阿诺碱通道活性的二氢吡啶受体（DHPR）多肽片段或其衍生物、同系物或类似物。

2、根据权利要求1的方法，其中所述方法包括测定所述心脏理阿诺碱钙通道活性的额外步骤。

3、根据权利要求1或2的方法，其中所述调节是正调节。

4、根据权利要求3的方法，其中以约1nm至约10 μ M的浓度范围应用所述片段。

5、根据权利要求1或2的方法，其中所述调节是负调节。

6、根据权利要求5的方法，其中以大于约10 μ M的浓度应用所述片段。

7、根据权利要求1至6中任意一项所述的方法，其中所述片段包含下列肽序列的至少5个邻接的氨基酸残基：

Thr Ser Ala Gln Lys Xaa Xaa Xaa Xaa Glu Glu Xaa Xaa Arg Ser Lys
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa (SEQ ID NO: 1)

8、根据权利要求7的方法，其中所述肽序列对应于下列肽序列的任一：

- (i) Thr Ser Ala Gln Lys Ala Lys Ala Glu Glu Arg Lys Arg Arg Lys Met Ser
Lys Gly Leu (SEQ ID NO: 3)
- (ii) Thr Ser Ala Gln Lys Ala Lys Ala Glu Glu Arg Lys Arg Arg Lys Met Ser
Arg Gly Leu (SEQ ID NO: 4)
- (iii) Thr Ser Ala Gln Lys Glu Glu Glu Glu Lys Glu Arg Lys Lys Leu Ala
Arg Thr Ala (SEQ ID NO: 5)
- (iv) Thr Ser Ala Gln Lys Glu Glu Glu Glu Lys Glu Arg Lys Lys Leu Ala
Arg Thr Ala (SEQ ID NO: 6)
- (v) Thr Ser Ala Gln Lys Ala Lys Ala Glu Glu Arg Lys Arg Lys Lys Leu Ala
Arg Ala Asn (SEQ ID NO: 7)

9、根据权利要求7的方法，其中所述肽序列包含基序：**RKRRK**。

10、根据权利要求9的方法，其中所述肽序列对应于下列肽序列的任一或其衍生物、同系物或类似物：

(i) Thr Ser Ala Gln Lys Ala Lys Ala Glu Glu Arg Lys Arg Arg Lys Met Ser
Lys Gly Leu (SEQ ID NO: 2)

(ii) Thr Ser Ala Gln Lys Ala Lys Ala Glu Glu Arg Lys Arg Arg Lys Met Ala
Arg Gly Leu (SEQ ID NO: 8)

(iii) Thr Ser Ala Gln Lys Ala Lys Ala Glu Glu Arg Lys Arg Arg Lys Met Ser
Xaa Gly Leu (SEQ ID NO: 9)

(iv) Thr Ser Ala Gln Lys Ala Lys Ala Glu Glu Arg Lys Arg Arg Lys Met Ala
Xaa Gly Leu (SEQ ID NO: 10)

11、根据权利要求1-10中任意一项所述的方法，其中所述肽包含至少10个邻接氨基酸残基，且更优选地包含至少15-20个邻接氨基酸残基。

12、根据权利要求11的方法，其中所述片段为碱性电荷片段。

13、一种鉴定心脏理阿诺碱钙通道肽或非肽调节剂的方法，包括：

(i) 在适于调节钙通道活性的条件下，于存在功能性心脏理阿诺碱钙通道时，温育一定量的调节心脏理阿诺碱通道活性的二氢吡啶受体多肽或其同系物、类似物或衍生物，并测定通道活性；

(ii) 在适于通过所述二氢吡啶受体多肽或其同系物、类似物或衍生物调节钙通道活性的条件下，于存在所述功能性心脏理阿诺碱钙通道时，温育候选肽或非肽化合物，并测定通道活性；

(iii) 比较在(i)和(ii)时的活性。

14、根据权利要求13的方法，其中所述调节是正调节。

15、根据权利要求14的方法，其中以约1nM至约10 μ M的浓度范围应用所述的片段。

16、根据权利要求 15 的方法，其中所述调节是负调节。

17、根据权利要求 16 的方法，其中以大于约 10 μ M 的浓度应用所述片段。

18、根据权利要求 13-17 中任意一项所述的方法，其中所述片段包含下列肽序列：

Thr Ser Ala Gln Lys Xaa Xaa Xaa Xaa Glu Glu Xaa Xaa Arg Ser Lys
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa (SEQ ID NO: 1)

19、根据权利要求 18 的方法，其中所述肽序列对应于下列肽序列的任一：

(i) Thr Ser Ala Gln Lys Ala Lys Ala Glu Glu Arg Lys Arg Arg Lys Met Ser
Lys Gly Leu (SEQ ID NO: 3)

(ii) Thr Ser Ala Gln Lys Ala Lys Ala Glu Glu Arg Lys Arg Arg Lys Met Ser
Arg Gly Leu (SEQ ID NO: 4)

(iii) Thr Ser Ala Gln Lys Glu Glu Glu Glu Glu Lys Glu Arg Lys Lys Leu Ala
Arg Thr Ala (SEQ ID NO: 5)

(iv) Thr Ser Ala Gln Lys Glu Glu Glu Glu Glu Lys Glu Arg Lys Lys Leu Ala
Arg Thr Ala (SEQ ID NO: 6)

(v) Thr Ser Ala Gln Lys Ala Lys Ala Glu Glu Arg Lys Arg Lys Lys Leu Ala
Arg Ala Asn (SEQ ID NO: 7)

20、根据权利要求 18 的方法，其中所述肽序列包含基序：**RKRRK**。

21、根据权利要求 20 的方法，其中所述肽序列对应于下列肽序列的任何之一或其衍生物、同系物或类似物：

(i) Thr Ser Ala Gln Lys Ala Lys Ala Glu Glu Arg Lys Arg Arg Lys Met Ser
Lys Gly Leu (SEQ ID NO: 2)

- (ii) Thr Ser Ala Gln Lys Ala Lys Ala Glu Glu Arg Lys Arg Arg Lys Met Ala Arg Gly Leu (SEQ ID NO: 8)
- (iii) Thr Ser Ala Gln Lys Ala Lys Ala Glu Glu Arg Lys Arg Arg Lys Met Ser Xaa Gly Leu (SEQ ID NO: 9)
- (iv) Thr Ser Ala Gln Lys Ala Lys Ala Glu Glu Arg Lys Arg Arg Lys Met Ala Xaa Gly Leu (SEQ ID NO: 10)

22、根据权利要求 13-21 中任意一项所述的方法，其中所述肽包含至少 10 个邻接氨基酸残基，且更优选地包含至少 15 - 20 个邻接氨基酸残基。

23、根据权利要求 22 的方法，其中所述片段为碱性电荷片段。

24、包括下列步骤的一种方法：

(i) 鉴定心脏理阿诺碱钙通道的候选激动剂和拮抗剂；

(ii) 确定 (i) 中实际上激活或抑制心脏理阿诺碱通道活性的那些化合物；

(iii) 确定 (ii) 中对所述心脏理阿诺碱钙通道较 SEQ ID NOs: 1-10 中任何之一具有更高结合亲和性的化合物；和

(iv) 任选地，确定 (iii) 中那些化合物和所述心脏理阿诺碱钙通道间相互作用的位点。

25、一种确定心脏理阿诺碱通道是否打开或有高的通道打开概率的方法，所述方法包括将心脏理阿诺碱通道接触一定量的二氢吡啶受体多肽片段一段时间，在足以产生与理阿诺碱结合的条件下进行，并测定所述肽与理阿诺碱的结合，其中所述肽与理阿诺碱的结合表示高的通道打开概率，且其中肽与通道孔的非特异性结合表示低的通道打开概率。

26、根据权利要求 25 的方法，其中所述片段包含下列肽序列的至少 5 个邻接氨基酸残基：

Thr Ser Ala Gln Lys Xaa Xaa Xaa Xaa Glu Glu Xaa Xaa Arg Ser Lys
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa (SEQ ID NO: 1)

27、根据权利要求 26 的方法，其中所述肽序列对应于下列肽序列的任何之一：

- (i) Thr Ser Ala Gln Lys Ala Lys Ala Glu Glu Arg Lys Arg Arg Lys Met Ser Lys Gly Leu (SEQ ID NO: 3)
- (ii) Thr Ser Ala Gln Lys Ala Lys Ala Glu Glu Arg Lys Arg Arg Lys Met Ser Arg Gly Leu (SEQ ID NO: 4)
- (iii) Thr Ser Ala Gln Lys Glu Glu Glu Glu Glu Lys Glu Arg Lys Lys Leu Ala Arg Thr Ala (SEQ ID NO: 5)
- (iv) Thr Ser Ala Gln Lys Glu Glu Glu Glu Glu Lys Glu Arg Lys Lys Leu Ala Arg Thr Ala (SEQ ID NO: 6)
- (v) Thr Ser Ala Gln Lys Ala Lys Ala Glu Glu Arg Lys Arg Lys Lys Leu Ala Arg Ala Asn (SEQ ID NO: 7)

28、根据权利要求 26 的方法，其中所述肽序列包含基序：RKRRK。

29、根据权利要求 28 的方法，其中所述肽序列对应于下列肽序列的任何之一或其衍生物、同系物或类似物：

- (i) Thr Ser Ala Gln Lys Ala Lys Ala Glu Glu Arg Lys Arg Arg Lys Met Ser Lys Gly Leu (SEQ ID NO: 2)
- (ii) Thr Ser Ala Gln Lys Ala Lys Ala Glu Glu Arg Lys Arg Arg Lys Met Ala Arg Gly Leu (SEQ ID NO: 8)
- (iii) Thr Ser Ala Gln Lys Ala Lys Ala Glu Glu Arg Lys Arg Arg Lys Met Ser Xaa Gly Leu (SEQ ID NO: 9)
- (iv) Thr Ser Ala Gln Lys Ala Lys Ala Glu Glu Arg Lys Arg Arg Lys Met Ala Xaa Gly Leu (SEQ ID NO: 10)

30、根据权利要求 25-29 中任意一项所述的方法，其中所述肽包含至少 10 个邻接氨基酸残基，且更优选地包含至少 15 - 20 个邻接氨基酸残基。

31、根据权利要求 30 的方法，其中所述片段为碱性电荷片段。

32、一种对人或动物受试者心脏功能障碍的治疗方法，该方法包括施用有效量的二氢吡啶受体多肽片段一段时间并在足以出现增强的心脏收缩的条件下施用，由此矫正所述的心脏功能障碍。

33、根据权利要求 30 的方法，其中所述心脏功能障碍为心肌收缩衰竭、局部缺血性心脏病、系统炎性状态如脓毒病、心脏肥大（钙超载）、心肌病如致心律失常性右心室发育异常类型-2（ARVD2）以及药物（例如可卡因）诱导的心肌病、梗塞、节律障碍、充血性心力衰竭或心脏病。

34、根据权利要求 32 或 33 的方法，其中所述片段包含下列肽序列的至少 5 个邻接氨基酸残基：

Thr Ser Ala Gln Lys Xaa Xaa Xaa Xaa Glu Glu Xaa Xaa Arg Ser Lys
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa (SEQ ID NO: 1)

35、根据权利要求 34 所述的方法，其中所述肽序列对应于下列肽序列的任何之一：

- (i) Thr Ser Ala Gln Lys Ala Lys Ala Glu Glu Arg Lys Arg Arg Lys Met Ser Lys Gly Leu (SEQ ID NO: 3)
- (ii) Thr Ser Ala Gln Lys Ala Lys Ala Glu Glu Arg Lys Arg Arg Lys Met Ser Arg Gly Leu (SEQ ID NO: 4)
- (iii) Thr Ser Ala Gln Lys Glu Glu Glu Glu Glu Lys Glu Arg Lys Lys Leu Ala Arg Thr Ala (SEQ ID NO: 5)
- (iv) Thr Ser Ala Gln Lys Glu Glu Glu Glu Glu Lys Glu Arg Lys Lys Leu Ala Arg Thr Ala (SEQ ID NO: 6)
- (v) Thr Ser Ala Gln Lys Ala Lys Ala Glu Glu Arg Lys Arg Lys Lys Leu Ala Arg Ala Asn (SEQ ID NO: 7)

36、根据权利要求 32 或 33 的方法，其中所述肽序列包含基序：
RKRRK。

37、根据权利要求 36 的方法，其中所述肽序列对应于下列肽序列的
任何之一或其衍生物、同系物或类似物：

- (i) Thr Ser Ala Gln Lys Ala Lys Ala Glu Glu Arg Lys Arg Arg Lys Met Ser
Lys Gly Leu (SEQ ID NO: 2)
- (ii) Thr Ser Ala Gln Lys Ala Lys Ala Glu Glu Arg Lys Arg Arg Lys Met Ala
Arg Gly Leu (SEQ ID NO: 8)
- (iii) Thr Ser Ala Gln Lys Ala Lys Ala Glu Glu Arg Lys Arg Arg Lys Met Ser
Xaa Gly Leu (SEQ ID NO: 9)
- (iv) Thr Ser Ala Gln Lys Ala Lys Ala Glu Glu Arg Lys Arg Arg Lys Met Ala
Xaa Gly Leu (SEQ ID NO: 10)

38、根据权利要求 32-37 中任意一项所述的方法，其中所述肽包含至
少 10 个邻接氨基酸残基，更优选地包含至少 15 - 20 个邻接氨基酸残基。

39、根据权利要求 38 的方法，其中所述片段为碱性电荷片段。

40、二氢吡啶受体肽片段或其同系物、类似物或衍生物用途，用于
修饰心脏理阿诺碱钙通道活性，因此修饰缺陷性钙信号传导，其中所述二
氢吡啶受体肽片段包含 SEQ ID NOs: 1-10 所示的任一肽的至少约 5 个邻
接氨基酸残基。

41、根据权利要求 40 的用途，其中所述肽包含至少 10 个邻接氨基酸
残基，更优选地包含至少 15 - 20 个邻接氨基酸残基。

42、根据权利要求 40 或 41 的用途，其中所述缺陷性钙信号传导诱发
慢性肥大、扩张的心肌病或心脏衰竭。

43、根据权利要求 40 或 41 的用途，其中所述肽或其同系物、类似物
或衍生物以增强收缩力，并进一步增强心缩期细胞内钙浓度（即 $[Ca^{2+}]_i$ ）
和进一步降低心舒期 $[Ca^{2+}]_i$ 的剂量施用。

44、根据权利要求 43 的用途，其中所述肽或其同系物、类似物或衍生物与心缩期 $[Ca^{2+}]_i$ 比较，诱导至少约 3% 或 5% 的心缩期 $[Ca^{2+}]_i$ 的增加。

45、根据权利要求 43 的用途，其中所述肽或其同系物、类似物或衍生物与心舒期 $[Ca^{2+}]_i$ 比较，诱导至少约 3% 或 5% 的心舒期 $[Ca^{2+}]_i$ 的降低。

46、根据权利要求 44 或 45 的用途，其中分别相对于心缩期 $[Ca^{2+}]_i$ 或心舒期 $[Ca^{2+}]_i$ ，所述心缩期 $[Ca^{2+}]_i$ 增加或心舒期 $[Ca^{2+}]_i$ 降低了至少约 10% 或 15%，且更优选地至少约 20%，25%，30%，40% 或 50%。

47、根据权利要求 40-46 中任意一项所述的用途，其中所述施用的肽诱导心脏收缩效力的改进。

48、根据权利要求 47 的用途，其中在施用后 0.5-1.0 小时内，通过诱导前负荷-补充搏功增加至少约 5% 或 10% 而增强所述心脏收缩。

49、根据权利要求 48 的用途，其中所述心脏收缩增强了约 15%，20%，30%，40%，50%，55%，60% 或 70%。

50、二氢吡啶受体多肽片段或其同系物、类似物或衍生物用于制备治疗人或动物受试者心脏功能障碍的药物的用途，该二氢吡啶受体多肽片段包含 SEQ ID NOs: 1-10 所示的任一肽的至少约 5 个邻接氨基酸残基。

51、根据权利要求 51 的用途，其中所述心脏功能障碍为心肌收缩衰竭、局部缺血性心脏病、系统炎性状态如脓毒病、心脏肥大（钙超载）、心肌病如致心律失常性右心室发育异常类型-2（ARVD2）以及药物（例如可卡因）诱导的心肌病、梗塞、节律障碍、充血性心力衰竭或心脏病。

52、根据权利要求 50 或 51 的用途，其中所述肽包含至少 10 个邻接氨基酸残基，且更优选地包含至少 15-20 个邻接氨基酸残基。

53、一种药物组合物，其包含二氢吡啶受体多肽片段或其同系物、类似物或衍生物以及包含一种或多种可药用载体和/或稀释剂，其中所述肽段包含 SEQ ID NOs: 1-10 所示的任一肽的至少约 5 个邻接氨基酸残基。

54、根据权利要求 53 的药物组合物，其中所述肽包含至少 10 个邻接氨基酸残基，且更优选地包含至少 15-20 个邻接氨基酸残基。

55、当根据权利要求 32-39 中任意一项所述方法使用时的权利要求 53 或 54 的药物组合物。

调节心脏细胞中钙通道活性的方法及其试剂

发明领域

本发明总体上涉及可调节心脏细胞中钙通道活性的新肽。更具体地，本发明提供了调节心脏钙通道活性的方法，该方法包括：将心脏理阿诺碱受体（RyR2）接触一定量的足以调节所述 RyR2 活性的二氢吡啶受体（DHPR）多肽片段，并测定所述钙通道活性。本发明方法用于与心脏功能异常有关的一系列失调和疾病的治疗，特别是涉及心脏细胞中减少的心输出量和/或异常的兴奋-收缩偶联、钙超载或钙渗漏的疾病和失调的治疗。

发明背景

在本说明书末尾收集了本申请文件中参考的出版物目录细节。不应该将这里谈及的现有技术，包括任意一种或多种现有技术文献的参考文献视为所述现有技术是澳大利亚的常识或形成了澳大利亚常识的一部分的公知或暗示。

兴奋-收缩偶联对于横纹肌如心肌和骨骼肌发挥作用连结电兴奋和机械活性是必要的。兴奋-收缩偶联的关键成分是二氢吡啶受体（DHPR）——一种横小管（TT）的电压依赖性 Ca^{2+} 通道以及肌浆网（SR）膜的 Ca^{2+} 释放通道或理阿诺碱受体（RyR），其打开以从 SR 释放钙到细胞质中。

在心肌细胞和骨骼肌细胞中存在 RyRs 和 DHPRs 的不同同工型。特别地，在骨骼肌中 RyR1 和 DHPR-同工型 3 占优势，在心脏细胞中 RyR2 和 DHPR-同工型 1 占优势。在 RyR1 和 RyR2 氨基酸序列间仅有约 70% 的同源性。

在骨骼肌中，已知 DHPR α -1 亚基的重复 II 和 III 间 138 个氨基酸胞质环的蛋白质-蛋白质间相互作用激活了理阿诺碱受体（RyR1）（Tanabe 等，1990, *Nature* 346: 567-568）。已经确定足以激活骨骼肌 RyR1 介导的钙释放的骨骼 DHPR 胞质环区域存在于 Thr⁶⁷¹ 到 Leu⁶⁹⁰ 的 20 个氨基酸内

(E1 Hayek 等, 1995, *J. Biol. Chem.* 270: 22116-22118; Dulhunty 等, 1999, *Biophys. J.* 77: 189-203; 和 Gurrola 等, 1999, *J. Biol. Chem.* 274 : 7879-7886)。在骨骼肌, 有 4 个 DHPR 分子位于 DHPRs 四联体构型中, 在严格的几何匹配中, 与每隔开一个的 RyR1 多肽相对应, 认为这对于正常的兴奋-收缩偶联是重要的。在 DHPR 兴奋期间, 如通过电刺激兴奋期间, 该蛋白质-蛋白质相互作用可能引起导致通道打开的 RyR1 多肽构型转换, 因此引起了从 SR 的钙流出。因此, 骨骼肌中兴奋-收缩偶联实质上是不依赖于钙的过程。

相反, 心肌中兴奋-收缩偶联涉及钙诱导的钙释放(CICR)机理(Niggli, 1999, *Annu Rev Physiol* 61: 311-335)。心脏 DHPR 钙通道兴奋后的打开, 通过每个动作电位期间激活的依赖于电压的 L-型钙通道(即心脏 DHPRs)引起了少量细胞外钙流入到心肌细胞中。这个最初信号作为随后贮存在 SR 中细胞内钙的 CICR 的触发。通过心脏 RyR2 钙释放通道产生从 SR 的次级钙释放。在大多数哺乳动物中, CICR 放大了最初信号触发若干倍, 放大倍数与约 16: 1 的心脏 RyR2 分子比心脏 DHPR 的化学计算法一致。

尽管心脏 CICR 需要胞质 Ca^{2+} 的最初升高以触发从 SR 的钙释放, 但是它似乎没有变成自动维持。这是因为 CICR 可能仅在超载钙的心肌细胞间传导, 而钙在单个细胞中是正常定位的。此外, 在约 $3 \times 10^{-7} M [Ca^{2+}]_i$ 和约 $10^{-6} M [Ca^{2+}]_i$ 之间, 心肌收缩力随着 $[Ca^{2+}]_i$ 的增加成比例地增强表明 CICR 不是全或无应答。

与骨骼肌细胞中兴奋-收缩偶联相比, 尽管在体内心脏 DHPR 和心脏 RyR2 间是否存在任何直接的蛋白质-蛋白质相互作用是未知的, 但是在双杂交测定中骨骼 DHPR α -1 亚基的胞质环确实结合心脏 RyR2 (Osterland 等, 1999, *Biophys. J.* 76: A467- (摘要)), 并且在表面胞质共振研究中骨骼 DHPR α -1 亚基胞质环的 20-mer 肽(即 Thr⁶⁷¹ 到 Leu⁶⁹⁰) 结合 RyR2 (O'Reilly 和 Ronjat, 1999, *Biophys. J.* 76: A466- (摘要))。

有力的使人信服的数据表明骨骼和心脏 DHPRs 和 RyRs 通道间的关系是不同的。例如, 在缺乏骨骼 RyR1 但含有骨骼 DHPR α -1 亚基的 dyspedic 肌细胞中表达的心脏 RyR2 不能支持骨骼类型的兴奋-收缩偶联。此外, 心脏或骨骼 DHPR α -1 亚基的重复 II 和 III 间全部的 138 个氨基酸胞质环没

有激活分离的 RyR2 通道 (Lu 等, 1994, *J. Biol. Chem.* 269 : 6511-6516)。并且, 尽管骨骼 DHPR α -1 亚基胞质环的 20-mer 肽 (即 Thr⁶⁷¹ 到 Leu⁶⁹⁰) 是骨骼肌 RyR1 通道高亲和性激活剂的事实, 但是已经表明其不诱导从心脏 SR 的 Ca²⁺ 释放, 或不增强结合心脏 RyR2 通道的 [³H] 理阿诺碱 (E1 Hayek 等, 1995, 上文)。而且, 这些可用的数据表明骨骼 DHPR α -1 亚基胞质环的 20-mer 肽 (即 Thr⁶⁷¹ 到 Leu⁶⁹⁰) 不能激活心脏 RyR2 通道, 例如延长它们的开放时间或开放频率。

Stern (1992, *FASEB J.* 6: 3092-3100) 提出了心脏组织中 Ca²⁺ 突触 (即定位于进入和释放 Ca²⁺ 位点附近非常高的 Ca²⁺ 结构域) 功能性地连结 DHPRs 和 RyRs 活性。借助于高的局部 Ca²⁺ 浓度, 每个 Ca²⁺ 突触允许 RyR2 的局部控制以产生可观察的高信号放大, 而在整个细胞和细胞间没有 Ca²⁺ 释放信号的传播。结果, 可以用触发钙释放定量分级每个信号期间收集的释放单元数。这个建议与心肌细胞刺激期间短期 (约 50ms) 钙的激发和有限的空间传播 (约 1.5 μ m) 观察结果相符 (Cheng 等, 1993, *Science* 262: 740-744)。

心肌收缩衰竭是患缺血性心脏病、充血性心力衰竭和系统炎性状态如脓毒病患者中发病和死亡的常见病因。累积的证据表明收缩衰竭与肌质钙流动的调节障碍有关。肌丝降低的 Ca²⁺ 敏感性或例如由于钙突触的退化或破坏、RyR2 退化或 DHPR 退化的钙信号传导的退化可以引起心脏收缩力的衰退。在心脏衰竭或心脏肥大期间不利地影响了几种 Ca²⁺ 信号途径 (具有在心脏衰竭末期观察到的钙超载)。已经观察到衰竭或肥大心脏组织中 SR 中升高的静止 Ca²⁺ 浓度、降低的 Ca²⁺ 瞬变幅度、减缓的张弛和改变的 Ca²⁺ 泵。

更具体地, 与正常心脏比较, 肥大和衰竭的心脏显示了降低的兴奋-收缩偶联效力 (Gomez 等, 1997, *Science* 276: 755-756)。然而, 衰竭或肥大心脏中单独的 DHPRs 和 RyRs 看似正常的, 表明这两种钙信号蛋白质间的连结可能是缺陷的。通过应用 β -肾上腺素能激动剂以延长心脏 DHPRs 开放时间, 恢复肥大细胞或随后的充血性心力衰竭中正常的兴奋-收缩偶联支持了该观点。

此外, 衰竭的人心脏中 RyR2 的超磷酸化引起了缺陷的通道功能。

此外，在急性情况下如心脏病发作后，通过增强兴奋-收缩偶联的“心肌变力剂”可以增加心输出量。在缺血性发病期间损害了心肌的离散区域，引起了降低的心输出量。通过要求保持健康的心肌以更有力的收缩可以维持主要器官如大脑的血液供应。目前这是通过模拟 β -肾上腺素能刺激和增加 cAMP 水平以刺激 DHPR 活性和兴奋-收缩偶联的药物完成的。从长远的观点看，增加的 cAMP 水平可能变成有毒的，并且引起钙超载。

发明概述

本申请文件包含用程序 PatentIn 版本 3.1 做成的核苷酸和氨基酸序列信息，这里在参考书目后示出了该信息。通过数字标记<210>，随后通过序列标志符（例如，<210>1，<210>2 等）确定了列表中的每种核苷酸或氨基酸序列。分别通过数字标记字段<211>、<212>和<213>中提供的信息表示序列（DNA，蛋白质（PRT）等）的长度、类型和每种核苷酸或氨基酸序列的来源组织。用后面带有数字标记的描述符“SEQ ID NO”定义本申请文件中参照的核苷酸和氨基酸序列。例如，SEQ ID NO:1 指标明为<400>1 的数字标记字段中提供的信息等。

应该理解这里 SEQ ID NO:1 中所述共有序列的参考文献为包括 SEQ ID Nos:2 - 7 中所述任何一种或多种氨基酸序列的参考文献，其中所述 SEQ ID Nos:2 - 7 用于编辑共有序列。

在整个该申请文件中，除非上下文另外要求，将文字“包括”理解为意指包括规定的步骤或要素或整体，或者一组步骤或要素或整体，但不排除任何其它步骤或要素或整体，或者一组要素或整体。

应该理解这里所用术语“来源于”为表示可以从特定来源获得的特定整体，虽然该特定整体不必直接来自于该来源。

在进行本发明的工作中，发明人试图鉴定调节心脏组织中 CICR 的新方法，以提供心脏衰竭和/或心脏肥大的改进治疗方案。意外地，尽管确定了心脏 DHPRs 和心脏 RyRs 间没有物理关系，但是本发明提供了小片段的骨骼或心脏 DHPR 多肽，例如小的碱性电荷肽，其能激活心脏 RyR2 通道。

更具体地，本发明人已经证明骨骼 DHPR α -1 亚基的胞质环 20-mer 肽（即 Thr⁶⁷¹ 到 Leu⁶⁹⁰）在-40mV（负电势诱导从 SR 的钙释放）产生了

RyR2 通道的显著激活，在+40mV 产生了强抑制。在显著低于激活骨骼肌 RyR1 所需肽浓度的 1nM 低的肽浓度观察到了心脏 RyR2 的激活。此外，在 3×10^{-7} M 胞质 Ca^{2+} 时，心脏 RyR2 通道的抑制显著大于观察到的骨骼 RyR1 通道的抑制。

因此，本发明的一个方面提供了调节心脏理阿诺碱受体 (RyR2) 钙通道活性的方法，该方法包括用适量的足以调节所述 RyR2 活性的二氢吡啶受体 (DHPR) 多肽片段，例如碱性电荷片段接触心脏 RyR2。

更优选地，本发明提供了调节心脏理阿诺碱受体 (RyR2) 钙通道活性的方法，该方法包括用适量的足以调节所述 RyR2 活性的二氢吡啶受体 (DHPR) 多肽片段，例如碱性电荷片段接触心脏 RyR2，测定所述心脏 RyR2 钙通道的活性。

从前面讨论显而易见本发明的一种实施方案涉及增加心脏 RyR2 钙通道活性的方法，该方法包括用适量的足以增加所述 RyR2 活性的二氢吡啶受体 (DHPR) 多肽片段接触心脏 RyR2，以及测定所述心脏 RyR2 钙通道的活性。如这里所示例的，并且本发明不限于任何理论或作用方式或有效的肽浓度，本发明人已经证明对于脂质双层中分离的心脏 RyR2，通过应用达到约 1nM 肽到约 10 μ M 肽增加了通道打开的频率和每个通道打开的期间。在高的肽浓度时，最初打开的通道活性稍微下降，然而其它通道的活性更显著，可能反应了对肽敏感的 RyR2 通道中微不均一性。

从前面讨论显而易见本发明的另一种实施方案涉及抑制心脏 RyR2 钙通道活性的方法，该方法包括用适量的足以抑制所述 RyR2 活性的二氢吡啶受体 (DHPR) 多肽片段接触心脏 RyR2，测定所述心脏 RyR2 钙通道缺少活性。如这里所示例的，并且本发明不限于任何理论或作用方式或有效的肽浓度，本发明人已经证明对于脂质双层中分离的心脏 RyR2，通过高于约 10 μ M 肽的浓度降低了钙打开的频率，特别是在+40mV 时钙打开的频率，这可能是在不同于通道激活期间肽结合位点的位点结合 RyR2 通道小孔内的肽的结果。

本发明第二方面提供了鉴定心脏 RyR2 钙通道肽调节剂的方法，该方法包括：

- (i) 在适于调节钙通道活性的条件下，于存在功能性心脏 RyR2 钙

通道时，温育适量的调节心脏 RyR2 通道活性的二氢吡啶受体多肽或其同系物、类似物或衍生物，并测定通道活性；

(ii) 在适于通过所述二氢吡啶受体多肽或其同系物、类似物或衍生物调节钙通道活性的条件下，于存在所述功能性心脏 RyR2 钙通道时，温育候选肽，并测定通道活性；

(iii) 比较在 (i) 和 (ii) 时的活性；和

(iv) 优选 (ii) 中相对于 (i) 具有可比较或增加的调节通道活性的肽。

在可替代的实施方案中，本发明的该方面提供了鉴定心脏 RyR2 钙通道肽调节剂的方法，该方法包括：

(i) 在适于调节钙通道活性的条件下，于存在功能性心脏 RyR2 钙通道时，温育适量的调节心脏 RyR2 通道活性的二氢吡啶受体多肽或其同系物、类似物或衍生物，并测定通道活性；

(ii) 在适于通过所述二氢吡啶受体多肽或其同系物、类似物或衍生物调节钙通道活性的条件下，于功能性心脏 RyR2 钙通道存在时，温育候选肽和适量的调节心脏 RyR2 通道活性的所述二氢吡啶受体多肽或其同系物、类似物或衍生物，并测定通道活性；

(iii) 比较在 (i) 和 (ii) 的活性；和

(iv) 优选 (ii) 中相对于 (i) 具有可比较或增加的通道活性调节的肽。

本发明的第三个方面提供了测定心脏 RyR2 通道是否打开或具有高的通道打开概率的方法，所述方法包括用适量的二氢吡啶受体 (DHPR) 多肽片段或其同系物、类似物或衍生物接触心脏 RyR2 通道一段时间，并且在足以出现结合所述通道条件下进行，并测定所述肽与所述通道的结合，其中所述肽与所述通道的结合表示高的通道打开概率，并且其中非特异性肽的结合表示低的通道打开概率。

本发明的第四方面提供了人或动物受试者心脏功能障碍的治疗方法，该方法包括施用有效量的二氢吡啶受体 (DHPR) 多肽片段或其同系物、类似物或衍生物一段时间并且在足以出现增加的心脏收缩的条件下，因此矫正所述的心脏功能障碍。

本发明的第五个方面提供了包含二氢吡啶受体多肽片段或其同系物、类似物或衍生物，并包含一种或多种可药用稀释剂的药物组合物，其中所述肽包含在 SEQ ID NOs: 1-10 中所示的任一肽的至少约 5 个邻接氨基酸残基。

表 1 中定义了整个申请文件中所用的单个和三个字母缩写。

表 1 单个和三个字母的氨基酸缩写

氨基酸	三个字母的缩写	一个字母的符号
丙氨酸	Ala	A
精氨酸	Arg	R
天冬酰胺	Asn	N
天冬氨酸	Asp	D
半胱氨酸	Cys	C
谷氨酰胺	Gln	Q
谷氨酸	Glu	E
甘氨酸	Gly	G
组氨酸	His	H
异亮氨酸	Ile	I
亮氨酸	Leu	L
赖氨酸	Lys	K
甲硫氨酸	Met	M
苯丙氨酸	Phe	F
脯氨酸	Pro	P
丝氨酸	Ser	S
苏氨酸	Thr	T
色氨酸	Trp	W
酪氨酸	Tyr	Y
缬氨酸	Val	V
任何残基或另外所定义的	Xaa	X

附图简述

图 1 是表示如下几种心脏和骨骼 DHPR 多肽胞质环对齐氨基酸序列的示意图：人骨骼肌 DHPR-3 (SEQ ID NO: 2; Drouet 等, 1993); 鼠骨骼肌 DHPR-3 (SEQ ID NO: 3; Chaudhari, 1992); 兔骨骼肌 DHPR-3 (SEQ ID NO: 4; Tanabe 等, 1987); 兔心脏 DHPR-1 (SEQ ID NO: 5); 大鼠心脏 DHPR-1 (SEQ ID NO: 6); 和牛蛙骨骼肌 DHPR-3 (SEQ ID NO: 7; Zhou 等, 1998)。根据所得序列的比较, 以粗体形式表示共有序列 (SEQ ID NO: 1)。也表示了称为 NB (SEQ ID NO: 8) 和 A1S (SEQ ID NO: 9) 的非特异性肽的氨基酸序列。

图 2 是表示当在 -40mV 测量时, 于胞质 (*cis*) 10^{-7}M Ca^{2+} 存在的情况下, 加到脂质双层中分离的心脏 RyR2 胞质 (*cis*) 面的骨骼 DHPR 胞质环的 20-mer 肽 (SEQ ID NO: 2) 增加了心脏 RyR2 的活性的示图。在添加的肽缺乏的情况下 (小组 A) 或者在 65nM 肽 (小组 B) 或 $6.5\ \mu\text{M}$ 肽 (小组 C) 存在的情况下, 于 -40mV 测定了单通道活性。

在每个小组的左手侧, 表示在 -40mV 的下降的通道打开, 其中通过点线 “C” 表示零电流 (封闭的) 水平, 通过连续线 “O” 表示最大的单通道电导。在肽添加后, 双层中两个通道在 -40mV 是活性的。

在每个小组的右手侧是在 30s 记录期间的所有点的图示。X 轴的数字表示通道打开的幅度, 横坐标表示在每个幅度总的打开比例。负数表示在 -40mV 的负 (内部的) 电流。

图 3 是表示在 $+40\text{mV}$ 时, 于 *cis* 10^{-7}M Ca^{2+} 存在的情况下, 加到胞质 (*cis*) 溶液的骨骼 DHPR 胞质环的 20-mer 肽 (SEQ ID NO: 2) 增加和然后接着降低了心脏 RyR2 活性的示图。在添加的肽缺乏的情况下 (小组 A) 或者在 65nM 肽 (小组 B) 或 $32.5\ \mu\text{M}$ 肽 (小组 C) 存在的情况下, 于 $+40\text{mV}$ 时测定了单通道活性。

在每个小组的左手侧, 表示在 $+40\text{mV}$ 的上升的通道打开, 其中通过点线 “C” 表示零电流 (封闭的) 水平, 通过连续线 “O” 表示最大的单通道电导。在 65nM 浓度时, 通道大多数是处于打开的构型。相反, 在缺乏肽

或在 32.5 μM 肽时，通道大多数是处于关闭的构型。

在每个小组的右手侧是在 30s 记录期间的所有点的图示。X 轴的数字表示通道打开的幅度，横坐标表示在每个幅度总的打开比例。数值表示在 +40mV 的通道打开。

图 4 是表示在 -40mV (小组 A) 和在 +40mV (小组 B) 时，胞质溶液中肽浓度 (即, $\log_{10}[\text{肽 nM}]$) 与平均标准化平均电流 (横坐标) 的函数示图。标准化平均电流 (I'_{p}/I'_{c}) 是肽存在情况下的平均电流 (即 I'_{p}) 与对照条件下肽缺乏情况的平均电流 (即 I'_{c}) 的比率。数据表示平均的平均电流 \pm SEM。样品含有 SEQ ID NO: 2 所述的骨骼 DHPR 胞质环的 20-mer 肽 ($n=8$, ●), 或者 SEQ ID NO: 8 所述的非特异性肽 NB ($n=2$, ▲), 或者 SEQ ID NO: 9 所述的非特异性肽 AIS ($n=3$, ■)。大于 1.0 的标准化平均电流表示肽激活心脏 RyR2 通道。因此, 数据表示在 +40mV 时, 10 μM 肽 (SEQ ID NO: 2), 或者在 -40mV 时更高的浓度, 显著活化心脏 RyR2 通道。

图 5 是增加 Ca^{2+} 和咖啡因激活的 Ca^{2+} 从心脏 SR 囊泡释放的的题述肽的图示。显示了在对照条件下或随后 20 μM Ca^{2+} 或 2mM 咖啡因添加至囊泡外溶液 (在零肽浓度时), 和单独肽添加到囊泡溶液后 (小符号), 或在横坐标所述浓度时, 20 μM Ca^{2+} 或 2mM 咖啡因加肽添加到囊泡溶液后 (大符号), 最初的 Ca^{2+} 释放的速率。给出 Ca^{2+} 释放的速率为每分钟 SR 囊泡中每毫克蛋白质的微摩尔 Ca^{2+} 。数据表示 SEQ ID NO: 2 (填充的圆形), SEQ ID NO: 8 (填充的方形), SEQ ID NO: 9 (空心的圆形) 和 SEQ ID NO: 10 (空心的方形)。结果表示为平均值 \pm sem, 每个浓度至少有 5 个观测值。

图 6 是用 100 μM *cis* (胞质) Ca^{2+} 浓度, SEQ ID NO: 9 对流过掺入脂质双层的 RyR 通道平均电流影响的示图。数据获自在 -40mV (上图) 和 +40mV (下图) 双层电势的 60s 记录。数据点表示来自于 6 个试验的平均相对平均电流 (有肽的平均电流除以对照条件下的平均电流), 并且垂直条表示 \pm sem。肽以浓度依赖的方式明显地抑制通道活性, 在 100nM 肽时

有最大的影响。100nM 肽在+40mV（星号）时抑制显著高于在-40mV 时的抑制。

图 7 是用 100nM *cis*（胞质）Ca²⁺浓度，SEQ ID NO: 9 对流过结合进入脂质双层的 RyR 通道平均电流影响的示图。数据获自在-40mV（上图）和+40mV（下图）双层电势的 60s 记录。数据点表示来自于 7 个试验的平均相对平均电流（有肽的平均电流除以对照条件下的平均电流），并且垂直条表示 ± sem。肽以浓度依赖的方式明显地增加通道活性，在 100nM 肽时有最大的影响。在+40mV 观察到了>100nM 肽时的抑制，该抑制表示一些小孔闭合。

图 8 是 SEQ ID NO: 9 的肽浓度对单通道参数影响的函数关系示图。显示了在-40mV（左侧小组）和+40mV（右侧小组）时的数据。上图表示通道打开的概率，第二图表示平均打开时间，接着是平均关闭时间，最后是通道打开的频率。数据点表示七个试验的平均参数值，垂直条表示 ± 1sem。通道关闭时间的减少和随后频率的增加极大地有助于打开概率的增加。

优选实施方案的详细描述

本发明的一个方面提供了调节心脏理阿诺碱受体（RyR2）钙通道活性的方法，该方法包括用适量的足以调节所述 RyR2 活性的二氢吡啶受体（DHPR）多肽片段接触心脏 RyR2 通道。

更具体地，本发明提供了调节心脏理阿诺碱受体（RyR2）钙通道活性的方法，该方法包括用适量的足以调节所述 RyR2 活性的二氢吡啶受体（DHPR）多肽片段接触心脏 RyR2 通道，并测定所述心脏 RyR2 钙通道的活性。

这里所用术语“理阿诺碱受体-2 通道”或“RyR2 通道”或“心脏 RyR 通道”应该理解为意指包含 RyR2 多肽亚基的钙通道。本领域技术人员知道这里提到的“RyR2 通道”或“心脏 RyR 通道”的物理结构。

这里所用术语“调节”应该理解为意指增强或抑制 RyR2 钙通道的活

性。因此，通过“修饰 RyR2 钙通道活性”或类似术语一般意指修饰 CICR（即增强或降低），例如通过修饰心脏 RyR2 的钙突触或钙敏感性、每个动作电位期间心脏 RyR2 通道打开的频率或者单独的心脏 RyRs 的打开时间。

如上文所述，本发明清楚地包括增强心脏 RyR2 钙通道活性的方法和抑制心脏 RyR2 钙通道活性的方法。

心脏 RyR2 通道可以原位存在于心脏细胞或在体内心肌，然而它也可以是例如插入在脂质双层中分离的 RyR2 通道，或者备选地，是例如在转染细胞（例如 CHO 细胞或 dyspedic 肌细胞）膜中表达的重组或重建的 RyR2 通道。可以用例如 Bhat 等(1997, *Biophys. J* 73: 1329-1336)所述的标准方法在转染细胞中表达 RyR2 通道，这里并入该篇文献为参考文献。优选地，心脏 RyR2 通道在原位心脏细胞或在体内心脏组织。

这里所用术语“片段”意指肽在生理 pH 值时由于相对高比例的碱性氨基酸残基例如精氨酸或赖氨酸或半碱性氨基酸残基组氨酸的存在而具有总体上的正电荷。优选地，片段将有至少约 25% 的碱性氨基酸残基，更优选地至少约 50% 的碱性氨基酸残基。

用在进行这里所述本发明中的肽具有来源于心脏或骨骼二氢吡啶受体（DHPR）多肽片段的至少约 5 个氨基酸长度，所述多肽片段包含氨基酸序列 TSAQKXXXEE (R/K) XR (R/K) K (M/L) (A/S) (R/K) XX (SEQ ID NO: 1)，其中 X 是任何氨基酸残基。本发明清楚地延伸至使用任何来源的与 SEQ ID NO: 1 有相似序列的肽，例如合成或天然存在的肽或任何来源于 DHPR 序列的肽。

为了进一步描述本发明的目的，SEQ ID NO: 1 中所述氨基酸序列对应于几种动物物种骨骼肌和心肌 DHPRs 胞质 II-III 环的 20-mer 肽共有序列，如图 1 所示。如这里所示例的，本发明人证明了人骨骼肌 DHPR-3 的一部分胞质 II-III 环调节绵羊 RyR2 通道活性。图 1 中列出的各种 DHPRs 间密切的序列关系表示具有 SEQ ID NO: 1 序列或基本上与 SEQ ID NO: 1 相同序列的肽将调节 RyR2 通道活性。

因此，本发明清楚地延伸至使用 SEQ ID NO: 1 中所述氨基酸序列的任何或所有同系物、类似物和衍生物用途。优选地，此类同系物、类似物或衍生物将是碱性电荷的肽，更优选地其保留有 SEQ ID NO: 1 的保守碱性残基。

甚至更优选地，题述序列包含在 SEQ ID NO: 1 氨基酸位置 11 直到 15 的基序 RKRRK。

在本发明上下文中，SEQ ID NOs: 1-7 任何之一的“同系物”指直接来源于骨骼或心脏 DHPR 氨基酸序列或来自其它来源如其它物种相似序列的天然或合成的碱性电荷肽，或者备选地，通过筛选 RyR2 通道调节活性的模拟肽获得的天然或合成的碱性电荷肽，并且其包含基本对应于 SEQ ID NO: 1 或 SEQ ID NOs: 2-7 中列出的任何特定氨基酸序列之一的序列。

例如，只要保持肽的总体特性（例如碱性电荷或构象），就可以用具有类似特性，例如疏水性、亲水性、疏水力矩、抗原性、电荷或形成 α 螺旋结构倾向的其它氨基酸置换 SEQ ID NOs: 1-7 任何之一的氨基酸。

置换包含氨基酸的改变，其中用不同的天然存在或非常规的氨基酸残基置换氨基酸。用另一种类似特性的天然存在的氨基酸置换氨基酸残基情况的这种置换可以归类为“保守性的”，例如 Gly \leftrightarrow Ala, Val \leftrightarrow Ile \leftrightarrow Leu \leftrightarrow Met, Asp \leftrightarrow Glu, Lys \leftrightarrow Arg 或者 Asn \leftrightarrow Gln。通常地，氨基酸置换是单个残基的置换，但是也可以是成簇或分散的多个残基的置换。

本发明特别考虑了通过本领域已知的任何方法，例如利用在自动肽合成仪中的 Fmoc 氨基酸的固相方法生产合成肽的同系物。可以通过常规方法进行环化和/或部分纯化这种肽，这样它们基本上不含同种的肽。

SEQ ID NOs: 1-7 任何之一的“类似物”包含与所述序列或其同系物基本相同的氨基酸序列，尽管其中存在一种或多种非天然存在的氨基酸类似物。特别优选的类似物包含 SEQ ID NOs: 1-7 任何之一的任何肽或非肽模拟物，该肽或非肽模拟物保留所述序列特性，例如电荷分布或构象或其它结构特性。本发明特别考虑了 Gurrola 等(1999, *J. Biol. Chem.* 274: 7879-7886)描述的欧前胡素肽和任何合成的非肽模拟物。

与 SEQ ID NOs: 1-7 任何之一相关的术语“衍生物”应该理解为意指所述序列或其同系物或类似物的任何部分、片段或多肽融合物。衍生物包含修饰的氨基酸序列或肽，其中配体与其中含有的一个或多个氨基酸残基连接，所述配体例如脂质、脂糖、脂多糖（LPS）、碳水化合物、酶、肽、放射性核素、荧光化合物、可光活化残基（例如，对苯甲酰-苯丙氨酸）或葡萄糖基部分。衍生肽的方法是本领域熟知的。

例如，优选的衍生物可以包含 SEQ ID NOs: 1-7 任何之一的片段或 SEQ ID NOs: 1-7 任何之一的同系物或类似物的片段。氨基酸缺失通常具有约 1-15 个氨基酸残基长度。优选地，对 SEQ ID NO: 1 的 N-末端或 C-末端制造缺失。

备选地，SEQ ID NOs: 1-7 任何之一的衍生物可以有加到肽或其同系物或类似物 N-末端或 C-末端的附加氨基酸残基。一般地，插入要足够小，如，例如 1-4 氨基酸残基的插入以不阻碍进入 RyR2 通道。

优选的 SEQ ID NOs: 1-7 任何之一的同系物、类似物和衍生物将包含 SEQ ID NOs: 1-7 任何之一的至少约 5 个邻接氨基酸，更优选地至少约 10 个邻接氨基酸残基或更优选地至少约 15-20 个邻接氨基酸残基。因此，与 SEQ ID NOs: 2-7 任何之一比较，这种同系物、类似物和衍生物可以是全长或小于全长的序列。

关于 RyR2 通道调节活性，除了与 SEQ ID NO: 1 具有功能性等效外，优选的同系物、类似物或衍生物将包含与 SEQ ID NO: 1 有至少约 70% 同一性的氨基酸序列。优选地，与 SEQ ID NO: 1 的百分比同一性将是至少约 80%，更优选地至少约 90%，并且甚至更优选地至少约 95% 或至少约 98% 或 99%。在确定是否两个氨基酸序列属于定义的百分比同一性或相似性限制方面，本领域技术人员知道进行氨基酸序列的并排比较。在这种比较或对齐中，根据用于进行该对齐的算法，在不相同氨基酸残基的定位中将出现不同。在本上下文中，涉及两个或多个氨基酸序列间百分比同一性或相似性应该分别理解为意指利用任何本领域已知标准算法所测定的所述序列间相同和相似残基数。特别地，利用 Computer Genetics Group, Inc.,

University Research Park, Madison, Wisconsin, United States of America (Devereaux 等, 1984, *Nucl. Acids Res.* 12: 387-395)的 GAP 程序计算氨基酸同一性和相似性, 该程序利用了 Needleman 和 Wunsch 的算法(1970, *J. Mol Biol.* 48: 443-453), 或者可替代地, 利用 Thompson 等(1994, *Nucl Acids Res.* 22: 4673-4680)用于多重对齐的 CLUSTAL W 算法以最大化相同/相似氨基酸数并以最小化对齐中的序列空位数和/或长度。

特别优选的 SEQ ID NO: 1 的同系物、类似物或衍生物将成功地与 SEQ ID NOs: 2-7 任何之一竞争对心脏 RyR2 通道活性的调节。在标准竞争研究中, 在 SEQ ID NO: 2 浓缩物存在的情况下, 测定被试验肽的不同浓度的 RyR2 通道调节活性, 例如, 增强或抑制心脏 RyR2 通道活性的 RyR2 通道调节活性。例如, 可以通过在约 10^{-7} M 到约 10^{-5} M 范围的胞质钙浓度时, 心脏 RyR2 通道的高亲和激活物可通过其成功地增强脂质双层中的通道活性并竞争已知激活物肽(例如, 约 1nM SEQ ID NO: 2 到约 100nM SEQ ID NO: 2)诱导的通道活性增加的能力来确定。类似地, 可以通过在约 10^{-7} M 到约 10^{-5} M 范围的胞质钙浓度时, 心脏 RyR2 通道的高亲和抑制剂可通过其成功地抑制脂质双层中的通道活性并在胞质 Ca^{2+} 浓度达到 10^{-4} M 竞争已知抑制剂肽(例如, 32.5 μ M SEQ ID NO: 2)诱导的通道活性抑制的能力来确定。

不以任何方式限制本发明, 本发明人产生了如这里所述的对应于 SEQ ID NO: 2 中所述人骨骼 DHPR 20-mer 肽序列类似物和衍生物的三种肽。详述这些肽如下:

(i) SEQ ID NO: 8 对应于 SEQ ID NO: 2 的 20-mer 肽, 但是其中用丙氨酸残基置换丝氨酸⁶⁸⁷ (SEQ ID NO: 2 的残基 17), 如下:

TSAQKAKAEERKRRKMARGL (SEQ ID NO: 8)

(ii) SEQ ID NO: 9 对应于 SEQ ID NO: 2 的 20-mer 肽, 但是其中用精氨酸的 D-异构体置换精氨酸⁶⁸⁸ (SEQ ID NO: 2 的残基 18), 如下:

TSAQKAKAEERKRRKMSR_DGL (SEQ ID NO: 9)

(iii) SEQ ID NO: 10 对应于 SEQ ID NO: 2 的 20-mer 肽, 但是其

中用丙氨酸残基置换丝氨酸⁶⁸⁷ (SEQ ID NO: 2 的残基 17)，用精氨酸的 D-异构体置换精氨酸⁶⁸⁸ (SEQ ID NO: 2 的残基 18)，如下：

TSAQKAKAEERKRRKMAR_DGL (SEQ ID NO: 10)

在本上下文中，例如，术语“接触”可以意指将具有 DHPR 多肽的碱性肽片段与心脏 RyR2 通道接触，使该肽与通道有密切的物理连接，而不必需要肽与通道的实际结合。尽管在实施本发明中 DHPR 肽可以结合 RyR2 通道，但是这种结合不是本发明的必要特征，因为所需要的只是修饰通道活性。在这方面，本发明的目的不是实现与心脏 RyR2 多肽的结合，而是调节 RyR2 通道的活性。本领域技术人员知道结合和活性不必是等价的，因为 DHPR 肽可以结合 RyR2 多肽上任何大量不同位点之一，而不必修饰 RyR2 通道的活性。

优选地，该肽与 RyR2 通道的胞质面接触。

优选地，在实施本发明方法期间，SEQ ID NOs: 1-7 任何之一或 SEQ ID NOs: 1-7 任何之一的同系物、类似物或衍生物，如 SEQ ID NOs: 8-10 任何之一结合 RyR2 通道中 RyR2 多肽的一部分。不受任何理论或作用方式限制，在实施本发明中所用的肽（或其同系物、类似物或衍生物）可通过结合通道中 RyR2 多肽的一个或多个负电荷残基，例如氨基酸序列：FRAEKTYAVKAGRWYFEFEAVTSGDMRVGWSRPGCQP (SEQ ID NO: 13) 中的酸性残基，可以呈现获得进入 RyR2 通道的构象。

在前述讨论之后是测定心脏 RyR2 钙通道的活性，仅仅测定肽或理阿诺碱与通道或 RyR2 多肽的结合是不充分的，尽管其一定可以形成用于确定修饰通道活性的附属物。确定通道活性的优选方法选自：

(i) 利用本领域公知的方法，例如 Ahern 等 (1994, *FEBS Lett.* 352:369-374)，Lu 等 (1994, *J. Biol. Chem.* 269: 6511-6516)，Laver 等 (1995, *J. Membr. Biol.* 147: 7-22) 或 Dulhunty 等 (1999) 于上文中所述的方法，记录脂质双层中单个或多个 RyR2 通道打开；

(ii) 利用本领域公知的方法，例如 El-Hayek 等 (1995, 上文)，Gurrola 等 (1999, 上文) 或 Dulhunty 等 (1999, 见上文) 所述的方法，测定从 SR 囊泡

的钙释放;

(iii) 例如根据 Zaloga 等 (1997), 通过测定心脏的收缩性来测定心脏功能; 以及

(iv) 利用本领域公知的任一测定血管紧张度的方法, 在肽施用后, 测定分离的胸主动脉环的血管紧张度。

本领域技术人员知道可通过测定肽施用对一个或多个参数的浓度相关性易于测定心脏的功能, 所述一个或多个参数选自: 通过 dP/dt_{max} 或 dP/dt_{max} 值、左心室收缩压和心率估测的收缩率。也可以测定心室颤动和其它的心脏心率失常以定量肽的无益副作用。

在测定增强的心脏 RyR2 通道活性中, 检测增加的通道打开概率(P_o)。较高的通道打开概率引起了增加的钙流出或从 SR 包括从 SR 囊泡的释放, 以及增加的心脏收缩性和减少的张弛。也可以增加血管紧张度。

相反, 心脏 RyR2 通道活性的抑制剂将减少通道打开概率, 降低从 SR 的钙释放和减少心脏的收缩性。也可以降低血管紧张度。

不排除测定修饰心脏 RyR2 通道活性的其它方法。

SEQ ID NOs: 1-7 任何之一或其同系物、类似物或衍生物 (如 SEQ ID NOs: 8-10), 特别是 SEQ ID NO: 2 在调节心脏 RYR 通道活性的效力证实了这种序列作为用于筛选具有结构和功能相似性化合物的试剂的用途。这种试剂能进行高通量的筛选测定, 其中可以快速筛选数千种化合物。在脂质双层或在另一合适的分析体系中用分离的心脏 RyR2 受体可以测定这里所述的潜在地具有调节活性的肽模拟物调节心脏 RyR2 通道活性的能力。

因此, 本发明第二方面提供了鉴定心脏 RyR2 钙通道的肽或非肽调节剂的方法, 该方法包括:

(i) 在适于调节钙通道活性的条件下, 于存在功能性心脏 RyR2 钙通道时, 温育适量的调节心脏 RyR2 通道活性的二氢吡啶受体多肽或其同系物、类似物或衍生物, 并测定通道活性;

(ii) 在适于通过所述二氢吡啶受体多肽或其同系物、类似物或衍生

物调节钙通道活性的条件下，于存在功能性心脏 RyR2 钙通道时，温育候选的肽或非肽化合物，并测定通道活性；

(iii) 比较在 (i) 和 (ii) 时的活性。

优选地，所述片段包含 SEQ ID NO: 1 肽序列的至少 5 个邻接氨基酸。

优选地，选择对 SEQ ID NO: 1 或 SEQ ID NO: 1 同系物、类似物或衍生物具有可比较或增强的通道活性调节的肽。通过上文 (ii) 中相对于 (i) 检测到的可比较或增加的通道活性调节，这种肽是可检测的。

例如，可以向功能性受体添加调节心脏 RyR2 通道活性的固定量的 SEQ ID NO: 1 或其同系物类似物或衍生物。然后在适于待调节活性的条件下温育反应混合物，并测定通道的活性。在平行试验中，在 SEQ ID NO: 1 存在时，于允许活性调节的条件下温育候选肽或非肽化合物与心脏通道，并且测定该试验样品相对于 SEQ ID NO: 1 或其同系物、类似物或衍生物活性的通道活性。可以选择与 SEQ ID NO: 1 或其同系物、类似物或衍生物比较，具有可比较或增强的调节活性的肽或非肽化合物。

在备选实施方案中，本发明的该方面提供了鉴定心脏 RyR2 钙通道肽或非肽调节剂的方法，包括：

(i) 在适于调节钙通道活性的条件下，于存在功能性心脏 RyR2 钙通道时，温育适量的调节心脏 RyR2 通道活性的二氢吡啶受体多肽或其同系物、类似物或衍生物，并测定通道活性；

(ii) 在适于通过所述二氢吡啶受体多肽或其同系物、类似物或衍生物调节钙通道活性的条件下，于存在功能性心脏 RyR2 钙通道时，温育候选的肽或非肽化合物和适量的调节心脏 RyR2 通道活性的所述二氢吡啶受体多肽或其同系物、类似物或衍生物，并测定通道活性；

(iii) 比较在 (i) 和 (ii) 时的活性。

优选地，所述片段包含 SEQ ID NO: 1 肽序列的至少 5 个邻接氨基酸。

在本发明这些方面的最优选实施方案中，所述 SEQ ID NO: 1 肽或其同系物或衍生物选自 SEQ ID NOs: 2-10 的任何一种或多种。

优选地，选择对 SEQ ID NO: 1 或 SEQ ID NO: 1 同系物、类似物或

衍生物具有可比较或增强的通道活性调节的肽或非肽模拟物等。通过上文在 (ii) 和 (i) 比较时检测到的可比较或增加的通道活性调节, 这些肽或非肽化合物是可检测的。

例如, 在允许出现调节的条件下, 可以向功能性受体添加固定量的调节心脏 RyR2 通道活性的 SEQ ID NO: 1 或 SEQ ID NO: 1 同系物、类似物或衍生物。在候选肽存在或缺乏的情况下, 测定通道的活性, 并比较样品的通道活性。可以选择调节 SEQ ID NO: 1 或其同系物、类似物或衍生物作用的肽或非肽化合物。

任何依赖于调节心脏 RyR2 通道活性的常规测定方法适于该目的。在一个优选的测定方法中, 待测样品是在平面脂质双层中的重建 RyR2 通道或具有功能性心脏 RyR2 钙通道的 SR 囊泡或 dyspedic 肌细胞。仅仅利用常规的实验法, 本领域技术人员可以测定是否特定的候选肽、或非肽化合物调节心脏钙通道的活性。

本发明清楚地考虑了利用具有一些耐受非特异性的快速, 高通量筛选的方法, 和/或具有较高特异性的较小规模功能性筛选, 和/或定量的动力学研究以阐述心脏 RyR2 通道的化学结构/功能关系, 例如心脏 RyR2 钙通道功能激动剂或拮抗剂的肽或非肽化合物的确定, 或者阐释通道中所述化合物锚定位点。

优选地, 本发明考虑了一种方法, 其包括:

- (i) 鉴定心脏 RyR2 钙通道候选激动剂和拮抗剂;
- (ii) 鉴定 (i) 中实际上激活或抑制心脏 RyR2 通道活性的那些化合物;
- (iii) 确定 (ii) 中对所述心脏 RyR2 钙通道比 SEQ ID NOs: 1-10 任何之一具有更高结合亲和性的化合物; 和
- (iv) 任选地, 确定 (iii) 中那些化合物和所述心脏 RyR2 钙通道间相互作用的位点。

优选地利用心肌微粒体制备物中, 或者可替代地, 利用在 CHO 细胞中或其它适合的细胞测定系统中表达的心脏 RyR2 钙通道进行鉴定心脏

RyR2 钙通道候选激动剂和拮抗剂的快速、高通量的筛选。这种高通量的筛选有利于与微粒体制备物温育的，或注射入表达 RyR2 通道的转染细胞中或与表达 RyR2 通道的转染细胞温育的大量化合物的筛选。高通量的筛选也有利于文库中表达的大量肽的筛选，其中所述文库已经转染入表达 RyR2 通道的细胞。

可替代地，或者此外，通过将心脏 RyR2 蛋白质与载体如大量聚合物针结合鉴定候选激动剂和拮抗剂分子，并且使得大量针上的多肽与候选激动剂和/或拮抗剂分子接触用于筛选。可以同位素标记被筛选分子使得结合的简便迅速检测。可替代地，用于筛选的化合物可以与固相载体，如大量的针结合，所述用于筛选的化合物与 RyR2 多肽反应。例如，通过同位素标记或通过抗体检测或另一种报道试剂的应用可以再一次检测结合。

可以通过本领域已知的用于测定蛋白质-配体相互作用的动力学参数的任何本领域技术人员公知的测定方法测定特定化学化合物对心脏 RyR2 钙通道的结合亲和性。优选地，利用例如表面胞质共振的结合测定法。例如，利用 Biacore™ 分析仪可以测定蛋白质的表面胞质共振。如本领域技术人员所知的，该方法提供了配体与目的蛋白质结合的开和关的速率测定的数据。

为了筛选多个候选化合物，化合物可以与大量聚合针或载体连接。

为了测定候选化合物和心脏 RyR2 钙通道间相互作用的位点，可以测定候选化合物与多种突变体 RyR2 多肽的结合，其中所述突变体 RyR2 多肽的一个或多个位点是对天然蛋白质用不同的氨基酸序列缺失或置换，并且比较所述化合物与野生型或非突变体 RyR2 蛋白质的结合。而且，可以用表面胞质共振促进结合亲和性的比较。利用提供更强激活剂/拮抗剂活性的相互作用位点的数据有利于与此类位点结合的药物合理设计，但是药物具有增强的结合亲和性。

利用这种筛选方法检测的化合物最终可以用于例如心脏功能障碍的治疗中。

在可替代实施方案中，通过鉴定与心脏 RyR2 钙通道立体结构结合或

连接的化合物，利用合理的药物设计来确定激动剂和/或拮抗剂化合物。本发明清楚地考虑了来源于心脏 RyR2 钙通道立体结构的任何化合物，该化合物结合所述通道，并且激活或抑制心脏 RyR2 钙通道活性。

通过与 SEQ ID NO: 1 或其同系物、类似物或衍生物温育来观察对心脏 RyR2 通道打开概率的调节证实此类序列在确定或测定体外和体内心脏 RyR2 通道的小孔结构和调节机制的用途。更具体地，一方面肽与 RyR2 结合间的相关性和通道高的打开概率，以及在通道小孔内负电荷残基的肽间非特异性结合的相关性和低的打开概率使得根据肽结合研究的打开概率预测成为可能。

因此，本发明的第三方面提供了测定心脏 RyR2 通道是否打开或有高的通道打开概率的方法，所述方法包括用适量的二氢吡啶受体 (DHPR) 多肽片段或其同系物、类似物或衍生物接触心脏 RyR2 通道一段时间，并且在足以出现对 RyR2 结合的条件下进行，并测定所述肽与 RyR2 的结合，其中所述肽与 RyR2 的结合表示高的通道打开概率，并且其中非特异性肽与通道小孔的结合表示低的通道打开概率。

优选地，所述片段基本上是 SEQ ID NOs: 1-10 的任何一种或多种所定义的肽。

可以通过本领域技术人员已知的任何方法，例如，通过利用放射性标记或荧光标记的肽或用报道分子标记的肽，并且测定在任何特定肽浓度下与通道结合的标记物或报道分子的量来测定肽结合。用于该目的的优选的报道分子是不妨碍肽结合通道能力的小分子，例如可光活化化合物。

可替代地，可以通过测定经通道释放钙测定该通道活性从而间接地确定肽结合。如这里所示例的，在约 1nM 和约 10 μ M 间的肽浓度时肽产生了高的通道开放概率，而在更高浓度的肽时产生了低的通道打开概率，特别是对脂质双层中的通道产生低的通道打开概率。

本发明的第四方面提供了人或动物受试者心脏功能障碍的治疗方法，该方法包括施与有效量的二氢吡啶受体 (DHPR) 多肽片段或其衍生物、同系物或类似物一段时间，并在足以出现增加的收缩的条件下进行，

因此矫正所述的心脏功能障碍。

优选地，所述片段包含基本上如 SEQ ID NOs: 1-10 任何一种或多种所定义肽的至少 5 个邻接氨基酸。

“心脏功能障碍”是指涉及损害的心肌收缩的情况，例如其中的肌丝 Ca^{2+} 敏感性降低或存在钙信号传导的退化，例如由于钙突触的退化或破坏，RyR2 的退化或 DHPR 的退化。这里考虑的根据本发明可以治疗的心脏功能障碍疾病包括但不限于心肌收缩衰竭、局部缺血性心脏病、系统炎性状态如脓毒症、心脏肥大（钙超载）、心肌病如致心律失常性右心室发育异常类型-2（ARVD2）以及药物（例如，可卡因）诱导的心肌病、梗塞、节律障碍、充血性心力衰竭或心脏病。

“有效量”指足以减轻或逆转功能障碍发展的肽量。

对于本发明该方面的目的，有益或期望的临床结果包括但不限于可检测到的或不可检测到的症状的缓解、疾病程度的减轻、疾病状态的稳定、疾病发展的延迟或减缓、疾病状态的好转或减轻和症状缓解（无论部分还是全部）。“治疗”也包括与不接受治疗受试者的期望存活比较时存活的延长。这里所用的术语“治疗”包括预防。

“减轻”疾病指减少了疾病状态的程度和/或不期望的临床表现和/或通过治疗减缓或延长了进展的时间过程。

在预防的上下文中，“受试者”包括但不限于约 40 岁或以上普通人群中的个体；并且特别是具有进行性心脏肥大、心肌病、心脏病、高血压、肾衰竭、血管高血压、呼吸疾病如肺气肿或囊性纤维化、慢性哮喘和肺结核的历史和体质的个体。适合的个体也包括器官移植患者。

本发明的第五个方面提供了二氢吡啶受体多肽片段或其同系物、类似物或衍生物修饰心脏理阿诺碱钙通道活性的用途，因此修饰缺陷性钙信号传导，其中所述二氢吡啶受体多肽片段包含任一个 SEQ ID NOs: 1-10 所述肽的至少约 5 个邻接氨基酸残基。

优选地，所述缺陷的钙信号传导诱导慢性肥大、扩张的心肌病或心脏衰竭。

本发明的第六方面提供了二氢吡啶受体多肽片段或其同系物、类似物或衍生物在制造用于人或动物受试者心脏功能障碍治疗的药物的用途，该二氢吡啶受体多肽片段包含任一个 SEQ ID NOs: 1-10 所述肽的至少约 5 个邻接氨基酸残基。

本发明涉及任一个 SEQ ID NOs: 1-10 或其同系物、类似物或衍生物所述肽修饰心脏 RyR2 钙通道活性的用途，因此修饰慢性未接受治疗的动物或人受试者中诱导慢性肥大或扩张心肌病或者甚至心脏衰竭的缺陷性钙信号传导。

优选地，以可以增强收缩力，并进一步可以增加心缩期细胞内钙浓度（即 $[Ca^{2+}]_i$ ），进一步可以降低心舒期 $[Ca^{2+}]_i$ 的剂量施用肽或其同系物、类似物或衍生物。优选地，根据标准的体外钙敏化测定，与肽缺乏情况下测定的心缩期 $[Ca^{2+}]_i$ 比较，肽或其同系物、类似物或衍生物诱导至少约 3 % 或 5 % 心缩期 $[Ca^{2+}]_i$ 的增加。优选地，根据标准的体外钙敏化测定，与肽缺乏情况下测定的心舒期 $[Ca^{2+}]_i$ 比较，肽或其同系物、类似物或衍生物诱导至少约 3 % 或 5 % 心舒期 $[Ca^{2+}]_i$ 的降低。更优选地，在这种标准的体外钙敏化测定中，与肽缺乏情况下分别测定的心缩期 $[Ca^{2+}]_i$ 或心舒期 $[Ca^{2+}]_i$ 比较，增加心缩期 $[Ca^{2+}]_i$ 或降低心舒期 $[Ca^{2+}]_i$ 至少约 10 % 或 15 %，并且甚至更优选地至少约 20 %，25 %，30 %，40 % 或 50 %。

甚至更优选地，施用的肽或其同系物、类似物或衍生物改进了心脏收缩的效力。优选地，通过在给药后 0.5-1.0 小时内诱导至少约 5 % 或 10 % 前负荷-补充搏功（PRSW）的增加而增强心脏的收缩。更优选地，与健康个体比较，心脏衰竭患者中通过所测定的 PRSW 增加而使心脏收缩增强了约 15 %，20 %，30 %，40 %，50 %，55 %，60 % 或 70 %。

例如，可以立即施与（例如 i.p 或 i.v）已经患有或正在患有充血性心力衰竭或心源性休克的患者肽或其同系物、类似物或衍生物。优选地，这种立即施用将需要施用合适剂量肽，以在患者已经患有心力衰竭如充血性心力衰竭或心源性休克后约 1，2，4，8，12 或 24 小时内，或一天以上到约 2 或 3 周之间增加 RyR2 钙通道活性。

患者已经患有慢性心力衰竭后，以适于活化 RyR2 钙通道活性的剂量的肽，或其同系物、类似物或衍生物的相对长期给药对于提供增加的运动耐力和功能性能力也是有益的。例如，在已经患有心力衰竭后，可以有规律地给患者施用肽至少 2, 4, 6, 8, 12, 16, 18, 20 或 24 周或者更长，例如 6 个月，1 年，2 年，3 年或更多年以促进增加的功能性能力。对于这种长期给药，将优选口服剂量的剂型。

不排除以抑制人或动物患者中心脏 RyR2 钙通道活性的剂量施用肽或其同系物、类似物或衍生物，并且可以适于如需要心脏组织瞬时张弛的情况下。

可以通过细胞培养或实验动物中标准的药物方法测定肽、同系物、类似物或衍生物的毒性和治疗效力，例如测定 LD₅₀(群体中 50% 的致死剂量)和 ED₅₀(群体中 50% 治疗有效的剂量)。毒性和治疗效果间的剂量比率是治疗指数，并且该指数可以表达为比率 LD₅₀/ED₅₀。优选 SEQ ID NOs: 1-7 中任何之一或其同系物、类似物或衍生物中具有高治疗指数的氨基酸序列。

虽然显示毒副作用或有高 LD₅₀ 值的肽、同系物、类似物或衍生物是不太期望的，但这种肽可以与将化合物靶向到受侵袭组织位点的递送系统一起使用，因此最小化对健康组织的潜在损害。

可以利用获自细胞测定和动物研究的数据来计算用于人类的目标肽的剂量范围。Grant 等(USSN 6,201,165, 于 2001 年 3 月 13 日出版)所述的心脏肥大动物模型对于该目的特别有用。肽、同系物、类似物或衍生物的剂量优选位于这样的浓度范围内，即通过特定途径给药后，产生了与 ED₅₀ 一致的循环浓度并且几乎没有或没有毒性。剂量范围可以根据剂型和给药途径在该范围内变化。剂量也可以根据如个体的疾病，疾病的严重性，年龄，性别和体重因素而变化。

对于任何用在本发明方法中的肽、同系物、类似物或衍生物，可以从基于细胞的测定和动物模型中最初估测治疗有效的剂量。例如，可以通过动物模型中计算的有效的剂量获得循环血浆浓度范围，包括从基于细胞的测定和/或整体动物测定的 IC₅₀ (即，达到对症状的半数最大抑制的肽或非

肽化合物的浓度)。这种信息可以用于更精确地测定人的有用剂量。

也可以通过诱导动物模型中的心力衰竭来测定肽或其同系物、类似物或衍生物的适合剂量,方法为长期的快速心室起搏,然后以约 3.3mL/min 的速率灌注不同浓度的肽进入右心房,然后记录压力-面积的关系以及对肽应答的动脉压力。也可以利用已知的钙敏化剂,如 Marban 等(USSN 6, 191, 136, 2001 年 2 月 20 日出版)所述敏化剂进行对照试验。也可以测定心脏养气消耗。

本发明的另一方面涉及药物组合物,其包含二氢吡啶受体多肽片段,其肽包含任一个 SEQ ID NOs: 1-10 或其同系物、类似物或衍生物的至少约 5 个邻接氨基酸残基和一种或多种药学上可接受的载体和/或稀释剂。

本领域技术人员可利用诊断和治疗的已知原理获得本发明方法检测到的物质在心脏功能障碍治疗方面的治疗效力。

治疗组合物在制造和贮藏条件下必需是无菌和稳定的。肽可以制成溶液、微乳状液、脂质体或其它适于高药物浓度的有序结构。载体可以是包含例如水、乙醇、多元醇(例如,甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)的溶剂或分散介质和其合适混合物。例如,通过包衣如卵磷脂的应用,在分散情况下通过所需颗粒大小的维持和通过表面活性剂的应用可以维持适当的流动性。在许多情况下,优选组合物中包含等渗剂,例如糖、多元醇如甘露醇、山梨醇或氯化钠。

通过将肽或其同系物、类似物或衍生物与脂质或脂糖部分的连接可以实现吸附增强。

通过在组合物中包含延缓吸收的试剂例如单硬脂酸盐或明胶可以引起可注射组合物的吸收延长。而且,可以通过时间释放制剂的形式施用化合物,例如在包含缓释或控释聚合体的组合物中优选包含疏水和/或两亲化合物。可以用保护化合物免遭快速释放的载体制备肽,如可控的释放剂型,包括植入和微囊化的递送系统。可以使用可生物降解的、可生物相容的聚合物如乙烯乙酸乙烯酯、聚酞、聚乙醇酸、胶原、聚原酸酯、聚乳酸和聚乳、聚乙二醇共聚体(PLG)。一般地,此类剂型的制备方法是本领域技

术人员已知的。

例如，如果在有玻璃转变稳定的玻璃状基质相中分散肽或蛋白质药物，其中所述玻璃转变温度高于聚(ϵ -己内酯)聚合物的熔点温度，例如如Wang等(USSN6, 187, 330)所述，通过冷冻干燥肽的水溶液和适合的热防护剂(例如，海藻糖，松三糖，乳糖，麦芽糖，纤维二糖，蜜二糖或棉子糖)产生玻璃状的基质相时，在融化阶段通过在可生物侵蚀、可生物降解的聚(ϵ -己内酯)聚合物基质中分散肽、同系物、类似物或衍生物以制备适合的控释递送安瓿。

可以通过在适合溶剂中混合所需量的肽、同系物、类似物或衍生物和所需的上述列举的一种组分或组分组合，随后通过无菌过滤制备无菌注射溶液。一般地，通过在含有碱性分散介质和所需的上述列举的其它组分的无菌媒介物中掺入活性肽或非肽化合物来制备分散体。在制备无菌注射溶液的无菌粉末时，优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥，该干燥方法产生了来源于其前面无菌过滤溶液的活性组分及任何额外的所需组分的粉末。

优选地，本发明的肽、或其同系物、类似物或衍生物制剂为在施用后延长其半衰期的剂型，特别是将其制成用于慢性疾病治疗的剂型。延长活性肽化合物半衰期的方法包括直接修饰以降低其蛋白水解作用，例如通过交联或氨基酸置换以除去已知的蛋白酶位点。备选地，通过将活性成分封装入合适的剂型，例如缓释剂型可以延长任何活性组分的半衰期。根据给药途径，可以用保护肽、同系物、类似物或衍生物免受导致其失活的酶、酸和其它自然条件作用的材料包被肽、同系物、类似物或衍生物。

例如，肽，同系物、类似物或衍生物可以在合适载体或稀释剂中与酶抑制剂，或合适的载体如脂质体共施用而施与受试者。可药用稀释剂包括盐水和缓冲溶液。酶抑制剂包括胰腺胰蛋白酶抑制剂、二异丙基氟磷酸(DEP)和抑肽酶(trasyolol)。脂质体包括水包油包水乳剂及常规的脂质体。

也可以在甘油、液体聚乙二醇和其混合物以及在油中制备分散体。在

贮藏和使用的普通条件下,这些制品可以含有防腐剂以防止微生物的生长。
也参考下面非限制性实施例描述本发明。

实施例 1

调节心脏 RYR2 钙通道活性的 20-mer 肽

材料和方法

材料

化学试剂和生物试剂购自 Sigma-Aldrich (Castle Hill, 澳大利亚)。利用 Applied Biosystems 430A 肽合成仪合成 DHPR II-III 环肽(SEQ ID Nos:1-7), 利用 HPLC 和质谱法和 NMR 纯化, 其纯度 $\geq 98\%$ 。在水中以 $\sim 2\text{mM}$ 母液制备肽, 以 $20\ \mu\text{l}$ 等份冷冻。利用酸水解, 随后通过标准 PTC (苯基硫代甲酰氨基) 方法, 通过 Auspep Pty Ltd 测定精确的母液浓度, 并且通过反相 HPLC 分析。

肽

用于研究的特定肽是:

1. DHPR II-II 胞质环的 20-mer 肽 (SEQ ID NO: 2) :

Thr Ser Ala Gln Lys Ala Lys Ala Glu Glu Arg Lys Arg Arg Lys Met Ser Lys Gly Leu

2. 肽 NB(II-III 环 B 片段的 N-末端部分; Hamilton 和 Ianuzzo, 1991; SEQ ID NO: 11) :

Gly Leu Pro Asp Lys Thr Glu Glu Glu Lys Ser Val Met Ala Lys Lys Leu Glu Gln Lys

3. 肽 A1S(混杂的 20-mer 肽; SEQ ID NO: 12):

Thr Arg Lys Ser Arg Leu Ala Arg Gly Gln Lys Ala Lys Ala Lys Ser Glu Met Arg Glu

SR 囊泡制备

如 Laver 等(1995, *J. Membr. Biol.* 147: 7-22)所述从绵羊心脏分离 SR 囊泡。

脂质双层

基本上根据 Ahern 等(1994, *FEBS Lett.* 352: 369-374)和 Laver 等(1995, *J. Membr. Biol.* 147: 7-22) 在 20°C 到 25°C 进行试验。通过 1.0ml Delrin 杯壁具有约 100 μm 直径的孔径(Cadillac Plastics, 澳大利亚), 由磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸和磷脂酰胆碱 (5:3:2 w/w/w) 形成双层(Avanti Polar Lipids, Alabaster, Alabama)。向胞质 (即 *cis*) 室添加终池 (TC) 囊泡 (终浓度, 10 $\mu\text{g/ml}$) 和药物。利用 Axopatch 200A 放大器(Axon Instruments, Foster City, CA)控制双层电势, 并记录单通道活性。为了试验目的, *cis* 室保持在底面上, 并控制腔 (即, *trans*) 的电压。双层电势以常规的方式表达为 $V_{cis}-V_{trans}$ (即 $V_{胞质}-V_{腔}$)。

双层溶液

如上所述形成双层, 利用含有 230mM Cs 甲烷磺酸盐 (MS), 20 mM CsCl, 1mM CaCl_2 和 10 mM N-tris (羟甲基) 甲基-2-氨基乙烷磺酸 (TES, pH7.4, 有 CsOH) 的 *cis* 溶液和含有 30 mM Cs MS, 20 mM CsCl, 1mM CaCl_2 和 10 mM TES (pH7.4) 的 *trans* 溶液, 将囊泡掺进双层中。为了防止多通道掺进双层, 当观察通道活性时, 通过 *cis* 室的灌注置换 *cis* 溶液。除了用 1mM BAPTA 缓冲的 $[\text{Ca}^{2+}]$ 是 $3 \times 10^{-7}\text{M}$ 外, *cis* 灌注溶液与最初的 *cis* 溶液是相同的。在通道掺入后向 *trans* 室添加 CsMS (200mM), 以产生对称的溶液。

记录单通道活性和数据分析

向 *cis* 室每次添加肽后每 30s 改变双层电势, 进行 2 分钟以上, 向 *trans* 室添加 200mM CsMS 后, 记录对照活性 2 分钟。每等份肽 (每个通道中检测 6 种不同的肽浓度) 的 *cis* 添加后, 记录活性 2 分钟。将肽灌注出 *cis* 室, 记录恢复。最后将通道暴露于 30 μM 钌红。

在 1kHz 过滤电流 (8-电极低通 Bessel, -3dB), 并且在 5kHz 数字化。

对单通道记录的分析(利用 PW Gage 和 M Smith 研究的通道 2)产生了通道打开概率 (P_0), 事件频率 (F_0), 打开时间, 关闭时间和平均打开或关闭时间 (T_0 或 T_C) 及平均电流 (I')。在约 20% 最大电流, 而不是通常的 50% 时, 事件鉴频器设定在基线噪音以上, 这样在分析中包括这种对次级传导和最大传导水平的打开。分析在 +40mV 和 -40mV 时的通道活性, 分析连续活性的多于两个 30s 期间。

统计分析

平均数据表示为平均值 \pm SEM。根据需要对单独或成对的数据, 用单边或两边学生 T 试验 (one sided or two sided Students T-test) 测定对照和试验数值间差异的显著性。

实施例 2

调节心脏 RyR2 钙通道活性的 20-mer 肽

结果

当浓度为 10^{-7} M *cis* Ca^{2+} , 向通道的胞质 (*cis*) 侧添加 20-mer 肽 (SEQ ID NO: 2) 观察心肌 RyRs 活性的增加。在 +40mV 或 -40mV 双层电势时约 450pS 的 Cs^+ 传导和在试验最后 30 μ M 钿红阻断通道的能力确定单通道为 RyRs。

图 2 所示是在 -40mV 和图 3 所述是在 +40mV 时心脏 RyRs 强烈地被 20-mer 肽 (SEQ ID NO: 2) 激活的一个试验的记录。肽添加前, 通道活性由短暂的间歇性打开组成 (图 2, 小组 A; 图 3, 小组 A)。在添加 65nM 肽 (SEQ ID NO: 2) 的 10s 内, 在 -40mV 时, 通道打开增加。

双层中第二通道的打开伴随着事件频率的增加, 非常长打开的出现 (图 2, 小组 B)。当肽浓度增加到 6.5 μ M SEQ ID NO: 2, 在 -40mV 时, RyR2 通道活性稍微下降, 尽管第二通道活性更显著。如图 2 小组 C 所示, 通道特别是在 65nM 肽时显示了高的打开概率 (P_0) (如果通道充分打开, 所期望的主要的电流水平, O)。

记录表明单通道活性的增加与单通道传导中任何变化无关。

当双层电势是 +40mV 时, 在 65nM 20-mer 肽 (SEQ ID NO: 2) 时通

道活性也增加了（图 3，小组 B）。然而，通道活性的增加小于-40mV 时观察到的相同通道活性的增加（图 2，小组 B）。

虽然在-40mV 双层电势的通道活性在较高肽浓度时增加，但是在+40mV 时由于低的传导水平，在约 100nM 肽浓度以上时通道打开开始下降，并且在 10 μ M 肽时观察到仅仅几个短暂的通道打开（图 3，小组 C）。不以任何一种理论或作用方式限制本发明，认为其中通道打开大多数由于次最大传导的 40mV 时活性的降低是由于肽（SEQ ID NO: 2）与低亲和性位点的结合，所述低亲和性位点不同于通道激活期间肽结合的位点。这些低亲和性位点可能在通道孔内。

在 8 个双层样品的 8 个中获得了脂质双层中心心脏 RyR2 通道的相似激活和抑制。没有进行单通道分析，因为大多数双层含有一个以上通道。肽（SEQ ID NO: 2）添加到 *cis* 室后，所有样品在+40mV 和在-40mV 有较高的打开频率。此外，与在 10^{-7} M *cis* Ca^{2+} 时肽缺乏的情况下检测到的相比，在肽存在的情况下，在-40mV 电势时出现了延长的通道打开。

平均电流（即，在每个电势和每个肽浓度时，将两个 30s 期间的所有数据的平均值除以记录中观察到的通道数）提供了通道活性的测定。图 4 中平均标准化平均电流表示为肽浓度的函数。整数 $I'p/I'c$ 是肽存在情况下的平均电流与向室添加肽之前平均电流的比率。在-40mV 或+40mV 的双层电势时，在 10nM 肽（SEQ ID NO: 2）中检测到了平均电流的显著增加（约 2 倍）。在-40mV 时，50 μ M 肽（SEQ ID NO: 2）中平均电流的增加进一步达到 4 倍。相反，+40mV 时 10nM 肽（SEQ ID NO: 2）加倍的标准化平均电流保持升高一直到约 10 μ M 肽，然后在更高肽浓度（即，约 10 μ M 肽和 50 μ M 肽之间）时急剧下降。

也测定了 20-mer 肽（SEQ ID NO: 2）的心脏 RyR2 通道活化的特异性。在 1 μ M *cis* 肽 NB（SEQ ID NO: 8）或 10 μ M *cis* 肽 NB 时，在+40mV 或-40mV 双层电势时没有观察到修饰的通道活性（ $n=3$ ；图 4）。在其它 2 个双层的 2 个中（图 4），为非同源序列、与试验的 20-mer 肽具有相同等电点的混杂序列（即，肽 AIS；SEQ ID NO: 9）以较高浓度（即，1 μ M *cis*

肽或 $10 \mu\text{M}$ *cis* 肽) 存在时降低了心脏 RyR2 通道活性。

数据提供了 20-mer 肽 (SEQ ID NO: 2) 的活化反映了对心脏 RyR2 通道的结合的强有力的支持。

不以任何方式限制本发明, 并非意料之外的是, 在 $+40\text{mV}$ 时, 较高浓度的 20-mer 肽 (SEQ ID NO: 2) 和肽 AIS 抑制心脏 RyR 活性的能力表明心脏和骨骼 RyRs 中的孔和其孔隙含有大量的可以与肽中正电荷残基相互作用的负电荷位点。在缺乏激活的情况下, 肽 AIS 持续抑制的事实进一步提供了激活和抑制取决于结合 RyR2 通道上两个分离位点的 20-mer 肽 (SEQ ID NO: 2) 的证据。

实施例 3

DHPR 20-MER 片段衍生物和类似物的功能分析

材料和方法

肽

在该系列试验中检测了 4 种肽, 它们是:

- (i) 天然 DHPR 20-mer 肽 (SEQ ID NO: 2);
- (ii) SEQ ID NO: 2 肽中将 Ser⁶⁸⁷ (残基 17) 置换为丙氨酸残基以产生 SEQ ID NO: 8;
- (iii) SEQ ID NO: 2 肽中将 Arg⁶⁸⁸ (残基 18) 置换为 D 异构体以产生 SEQ ID NO: 9; 和
- (iv) SEQ ID NO: 2 肽中 Ser⁶⁸⁷ 突变为丙氨酸, Arg⁶⁸⁸ 置换为 D 异构体以产生 SEQ ID NO: 10。

从心脏 SR Ca^{2+} 释放的测定

向比色杯加入心脏 SR 囊泡 ($50 \mu\text{g}$ 蛋白质), 至 2ml 溶液的终体积, 含有 (以 mM 为单位): 100, KH_2PO_4 (pH = 7); 4, MgCl_2 ; 1, Na_2ATP ; 0.5, antipyrylazo III。利用 Cray50 或者 Cray100 分光光度计在 710nm 监测囊泡外 $[\text{Ca}^{2+}]$ 。在 790nm 的相同试验表明不依赖于 $[\text{Ca}^{2+}]$ 改变的 OD 没有改变, 该 $[\text{Ca}^{2+}]$ 改变将改变 710nm 测定的 Ca^{2+} 释放速率。用 4 个 $3 \mu\text{l}$ 等份的 5mM CaCl_2 将 Ca^{2+} 加载囊泡, 到 $7.5 \mu\text{M}$ Ca^{2+} 的最终浓

度。然后添加毒胡萝卜素（200nM）以阻断 SR Ca^{2+} ATPase。最后单独添加肽，或者添加肽和 20 μM Ca^{2+} 或 2mM 咖啡因。在毒胡萝卜素存在的情况下，在激活剂添加前立即测定 Ca^{2+} 释放速率，在激活剂添加后立即测定 Ca^{2+} 最初速率。然后添加特异的 RyR 活性阻断剂 5 μM 钌红以证实 Ca^{2+} 释放是通过 RyR 通道进行的。在试验最后添加 Ca^{2+} 离子载体 A23187(3 $\mu\text{g/ml}$) 以测定保留在 SR 囊泡中 Ca^{2+} 的量。当完成 Ca^{2+} 释放时，离子载体添加后 Ca^{2+} 的瞬态表明含有不能通过 RyR 通道释放的钙的囊泡部分（推定囊泡来源于缺乏 RyR 通道的纵向 SR）。结果表明仅仅 10-20% 的心脏 SR 制备物含有 RyR 的可调型贮藏。在从 3 个不同绵羊心脏制备物分离的囊泡上重复试验。

单通道试验

在缺乏 BAPTA 的情况下，*cis* 溶液中 Ca^{2+} 的浓度通过向 *cis* 溶液添加 CaCl_2 至 100nM 缓冲，或者调整 Ca^{2+} 的浓度至 100 μM 。

实施例 4

DHPR 20-MER 肽片段衍生物和类似物的功能分析

结果

概述

实施例 4 的试验包括测定所有化合物对心脏 SR 囊泡 Ca^{2+} 释放。此外，单心脏 RyR 通道暴露于肽 SEQ ID NO:9。所有的肽均显著地增加了 Ca^{2+} 激活的 Ca^{2+} 释放速率或咖啡因激活的 Ca^{2+} 释放速率。在缺乏激活的 Ca^{2+} 或咖啡因的情况下，肽 SEQ ID NO:9 和 10 在 >30 μM 的高浓度时勉强增加了 Ca^{2+} 释放速率，并且也增强了 Ca^{2+} 激活的 Ca^{2+} 释放和咖啡因激活的 Ca^{2+} 释放。在脂质双层试验中，肽 SEQ ID NO:9 在低浓度（1-10nM）时增加了心脏 RyR 的活性，但是在高浓度时，于 +40mV 下以电压-和 Ca^{2+} - 依赖的方式阻断了通道孔。因此，在适合的生理条件下，二氢吡啶受体片段肽能结合并激活心脏 Ca^{2+} 释放通道和心脏 SR 的 Ca^{2+} 释放。

肽对心脏 SR Ca^{2+} 释放的作用

在其它激活因子缺乏的情况下，测定 SEQ ID Nos:2, 8, 9 和 10 从心

脏 SR 释放 Ca^{2+} 的能力。向囊泡外溶液添加肽，并且在肽添加后立即测定最初的 Ca^{2+} 释放速率。在图 5 中所示的是 4 种肽的平均数据（小符号）。在 $30\ \mu\text{M}$ 和 $50\ \mu\text{M}$ 浓度时观察到所有肽释放速率的少量增加。

检测了肽对 Ca^{2+} 激活的 Ca^{2+} 释放和咖啡因激活的 Ca^{2+} 释放的作用。 Ca^{2+} 激活是心脏收缩期间 RyR 激活的主要体内机理。 Ca^{2+} 激活机理与从 SR 囊泡的 Ca^{2+} 激活和咖啡因激活的 Ca^{2+} 释放有关，因为咖啡因的主要作用是转换 Ca^{2+} 激活曲线至更低的 Ca^{2+} 浓度。在咖啡因存在的情况下，约 100nM 的静息 Ca^{2+} 浓度激活 Ca^{2+} 释放。 $20\ \mu\text{M}$ Ca^{2+} 和 2mM 咖啡因诱导的 Ca^{2+} 释放的最初速率是相似的，在这些试验中每毫克 SR 蛋白质每分钟约释放 $10\ \mu\text{moles}$ 的 Ca^{2+} 。肽对 Ca^{2+} 诱导的 Ca^{2+} 释放和咖啡因诱导的 Ca^{2+} 释放作用也是相似的，在图 5 中示出了两种激活方法获得的数据以平均数据一起进行的分组。清楚地，当将 4 种肽的每一种肽加入到囊泡外溶液中时，它们都能增加从心脏 SR 囊泡的 Ca^{2+} /咖啡因激活的 Ca^{2+} 释放。在所有试验中，通过添加钿红终止 Ca^{2+} 释放，表示释放是通过 RyR 通道进行的。具有 4 种肽的每一种肽的 Ca^{2+} 释放的最大速率比对照大 2 到 2.5 倍，在 $20\text{-}30\ \mu\text{M}$ 肽时达到 Ca^{2+} 释放的最大速率。四种肽存在双阶段作用，因为在较高肽浓度时， Ca^{2+} 释放的速率倾向于下降。

在从心脏 SR 释放 Ca^{2+} 和增加 Ca^{2+} /咖啡因激活的 Ca^{2+} 释放方面所有的肽都显示了相似的效力。可能是从非 Ca^{2+} /咖啡因激活通道的释放太小了而不能获得肽间的差异。不以任何方式限制本发明，肽对 Ca^{2+} /咖啡因激活的 Ca^{2+} 释放作用间的这种相似性已经反映了在单独具有激活剂的情况下，RyR 通道接近最大打开的事实，因此限制了肽进一步激活它们的能力。

肽 SEQ ID NO:9 对单心脏 RyR 通道活性的作用

检测了脂质双层中 SEQ ID NO:9 对单心脏 RyR 通道活性的作用。最初向具有 $100\ \mu\text{M}$ *cis* Ca^{2+} 的心脏 RyR 通道胞质 (*cis*) 侧添加肽。肽不能激活通道 (图 6)。

当向双层溶液添加肽 SEQ ID NO:9 时诱导的心脏 RyR 活性的降低在

+40mV时比-40mV时要大,因此其与通过肽 SEQ ID NO:2 进行的骨骼 RyR 通道依赖电压(即,依赖电流方向)的阻断是相似的。活性的降低与进入离子通道并与孔内负电荷相作用的正电荷 SEQ ID NO:9 肽相符。当电流从 *cis* 到 *trans* 并且携带肽进入孔时,阻断增加,但是当电流从 *trans* 到 *cis* 并且倾向于从孔中带走肽时,阻断部分反转。

利用 2mM BAPTA 缓冲的 100nM 肽的 *cis* Ca^{2+} 浓度。肽 SEQ ID NO:9 对心脏通道的强烈激活均引起了正和负电势时,相对平均电流的 10-20 倍的增加(图 7)。仅仅用 10nM 肽就使活性显著增加,用 100nM 肽观察到了最大的激活。在+40mV、较高肽浓度(1 和 10 μM)时相对平均电流的下降表明肽的残余阻断作用。

测定了该肽对心脏 RyRs 的平均单通道参数的作用,图 8 所示是平均数据。在-40mV 时肽诱导了约 50 倍增加的打开概率,在+40mV 时肽诱导了约 10 倍增加的打开概率。该活性的增加是由于在两个电势时平均打开时间增加了 8 倍以及在+40mV 和-40mV 时,平均关闭时间分别降低 80 或 170 倍和事件频率的相应增加。因此肽对通道门的主要作用是对平均关闭次数的作用。

因此, DHPR II-III 环 SEQ ID NO:2 肽可以激活心脏 RyR 通道并从心脏 SR 囊泡释放 Ca^{2+} 。不仅天然肽释放 Ca^{2+} , 具有增加的螺旋结构, 并且优选含有 RKR RK 序列的几种其它肽显示了对 Ca^{2+} 释放的相同作用。

本领域技术人员将理解除了特别说明以外,这里描述的本发明是易于变化和修改的。也要理解本发明包括所有的此类变化和修改。本发明也包括本申请文件中单独或一起引用的或标明的所有步骤、特征、组合物和化合物,和所述步骤或特征的所有联合或任何两个或多个联合。

本发明不限于这里描述的特定实施方案的范围,实施方案仅仅用于示例性目的。功能性等同的产品、组合物和方法清楚地在这里所述本发明范围内。

参考文献

- Ahern, G. P., P. R. Junankar 和 A. F. Dulhunty. 1994. *FEBS Lett.* 352: 369-374.
- Bhat, M. B., J. Zhao, H. Takeshima,和 J. Ma. 1997. *Biophys. J* : 73: 1329-1336.
- Chaudhari, N. 1992. *J Biol Chem* 1992 年 12 月 25 日 ; 267(36):25636-9
267 : 25636-25639.
- Cheng, H., W. J. Lederer,和 M. B. Cannell. 1993. *Science* 262: 740-744.
- Devereux, J., Haeberli, P.和 Smithies, O. 1984. *Nucl. Acids Res.* 12: 387-395.
- Drouet, B., L. Garcia, D. Simon-Chazottes, M. Mattei, J. Guenet, A. Schwarz, G. Varadi,和 M. Pincon-Raymond. 1993. *Mamm Genome* 4: 499-503.
- Dulhunty, A. F., D. R. Laver, E. M. Gallant, M. G. Casarotto, S. M. Pace, 和 S. Curtis. 1999. *Biophys. J* : 77: 189-203.
- El-Hayek, R., B. Antoniu, J. Wang, S. L. Hamilton, 和 N. Ikemoto. 1995. *J Biol. Chem.* 270: 22116-22118.
- Gomez, A., H. Valdivia, H. Cheng, M. Lederer, L. Santana, M. Cannell, S. McCune, R. Altschuld,和 W. Lederer. 1997. *Science* 276: 755-756.
- Gurrola, G. B., C. Arevalo, R. Sreekumar, A. J. Lokuta, J. W. Walker, 和 H. H. Valdivia. 1999. *J. Biol Chem.* 274: 7879-7886.
- Laver, D. R., L. D. Roden, G. P. Ahern, K. R. Eager, P. R. Junankar,和 A. F. Dulhunty. 1995. *J. Membr. Biol.* 147: 7-22.
- Lu, X., L. Xu,和 G. Meissner. 1994. *J. Biol. Chem.* 269: 6511-6516.
- McCall, E., L. V. Hryshko, V. M. Stiffel, D. M. Christensen,和 D. M. Bers. 1996. *J. Mol. Cell Cardiol.* 28: 79-93.
- Needleman 和 Wunsch. 1970 *J. Mol. Biol.* 48 : 443-453.
- Niggli, E. 1999. *Annu Rev Physiol* 61 : 311-335.

- O'Reilly, F. M.和 M. Ronjat. 1999. *Biophys. J.* 76: A466-(摘要).
- Osterland, J. C., S. M. Hayek, X. Xu, M. B. Bhat,和 J. Ma. 1999. *Biophys. J.* 76: A467- (摘要).
- Stern, M. D.和 E. G. Lakatta. 1992. *FASEB J.* 6: 3092-3100.
- Tanabe, T., H. Takeshima, A. Mikami, V. Flockerzi, H. Takahashi, K. Kangawa, M. Kojima, H. Matsuo, T. Hirose,和 S. Numa. 1987. *Nature* 328: 313-318.
- Tanabe, T., K. G. Beam, B. A. Adams, T. Niidome,和 S. Numa. 1990. *Nature* 346 : 567-568.
- Thompson,等 1994. *Nucl. Acids Res.* 22: 4673-4680
- Zaloga, G. P., P. R. Roberts, K. W. Black, M. Lin, G. Zapata-Sudo, R. T. Sudo,和 T.E. Nelson. 1997. *Am. J. Physiol.* 272: H462-H468.
- Zhou, J., L. Cribbs, J. Yi, R. Shirokov, E. Perez-Reyes,和 E. Rios. 1998. *J. Biol. Chem.* 273: 25503-25509.

<110> 澳大利亚国立大学

<120> 调节心脏细胞中钙通道活性的方法及其试剂

<130> 2533538/TDO

<160> 12

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 21

<212> PRT

<213> 合成的DHPR 20-mer 肽共有序列

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(21)

<223> 在第6位和第8位的Xaa为任一氨基酸,优选地为Ala或Glu;在第7位的Xaa为任一氨基酸,优选地为Glu或Lys;在第11、14和18位的Xaa为Arg或Lys;在第12位的Xaa为任一氨基酸,优选地为Arg或Glu;在第16位的Xaa为Met,Leu,Ile或Val;在第17位的Xaa为Ala或Ser;在第18位的Xaa为Lys或Arg;在第18位的Xaa为任一氨基酸,优选地为Gly,Thr,Ala;在第19位的Xaa为任一氨基酸,优选地为Leu,Ala或Asn。

<400> 1

```

Thr Ser Ala Gln Lys Xaa Xaa Xaa Xaa Glu Glu Xaa Xaa Arg Ser Lys
1           5           10           15
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
                20

```

<210> 2

<211> 20

<212> PRT

<213> 合成的鼠骨髓DHPR 20-mer 肽

<400> 2

```

Thr Ser Ala Gln Lys Ala Lys Ala Glu Glu Arg Lys Arg Arg Lys Met
1           5           10           15
Ser Lys Gly Leu
                20

```

<210> 3

<211> 20

<212> PRT

<213> 合成的鼠骨骼 DHPR 20-mer 肽

<400> 3

Thr Ser Ala Gln Lys Ala Lys Ala Glu Glu Arg Lys Arg Arg Lys Met

1 5 10 15

Ser Lys Gly Leu

20

<210> 4

<211> 20

<212> PRT

<213> 合成的兔骨骼 DHPR 20-mer 肽

<400> 4

Thr Ser Ala Gln Lys Ala Lys Ala Glu Glu Arg Lys Arg Arg Lys Met

1 5 10 15

Ser Arg Gly Leu

20

<210> 5

<211> 20

<212> PRT

<213> 合成的兔心脏 DHPR 20-mer 肽

<400> 5

Thr Ser Ala Gln Lys Glu Glu Glu Glu Glu Lys Glu Arg Lys Lys Leu

1 5 10 15

Ala Arg Thr Ala

20

<210> 6

<211> 20

<212> PRT

<213> 合成的大鼠心脏 DHPR 20-mer 肽

<400> 6

Thr Ser Ala Gln Lys Glu Glu Glu Glu Glu Lys Glu Arg Lys Lys Leu

1 5 10 15

Ala Arg Thr Ala

20

<210> 7
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> 合成的牛蛙骨骼 DHPR 20-mer 肽

<400> 7

Thr Ser Ala Gln Lys Ala Lys Ala Glu Glu Arg Lys Arg Lys Lys Leu
 1 5 10 15
 Ala Arg Ala Asn
 20

<210> 8
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> 合成的人骨骼 DHPR 20-mer 肽衍生物

<400> 8

Thr Ser Ala Gln Lys Ala Lys Ala Glu Glu Arg Lys Arg Arg Lys Met
 1 5 10 15
 Ala Arg Gly Leu
 20

<210> 9
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> 人骨骼 DHPR 20-mer 肽类似物

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(20)

<223> X 为 Arg 的 D 异构体

<400> 9

Thr Ser Ala Gln Lys Ala Lys Ala Glu Glu Arg Lys Arg Arg Lys Met
 1 5 10 15
 Ser Xaa Gly Leu
 20

<210> 10
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> 人骨骼 DHPR 20-mer 肽类似物

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(20)

<223> X 为 Arg 的 D 异构体

<400> 10

Thr Ser Ala Gln Lys Ala Lys Ala Glu Glu Arg Lys Arg Arg Lys Met
 1 5 10 15
 Ala Xaa Gly Leu
 20

<210> 11

<211> 20

<212> PRT

<213> 合成肽 NB

<400> 11

Gly Leu Pro Asp Lys Thr Glu Glu Glu Lys Ser Val Met Ala Lys Lys
 1 5 10 15
 Leu Glu Gln Lys
 20

<210> 12

<211> 20

<212> PRT

<213> 合成肽 A1S

<400> 12

Thr Arg Lys Ser Arg Leu Ala Arg Gly Gln Lys Ala Lys Ala Lys Ser
 1 5 10 15
 Glu Met Arg Glu
 20

<210> 13

<211> 37

<212> PRT

<213> 合成的 RyR2 肽

<400> 13

Phe Arg Ala Glu Lys Thr Tyr Ala Val Lys Ala Gly Arg Trp Tyr Phe
 1 5 10 15
 Glu Phe Glu Ala Val Thr Ser Gly Asp Met Arg Val Gly Trp Ser Arg
 20 25 30

Pro Gly Cys Gln Pro

35

SEQ ID NO: 2	人骨骼:	T S A Q K A K A K A E E R K R R K M S R G L
SEQ ID NO: 3	鼠骨骼:	T S A Q K A K A K A E E R K R R K M S R G L
SEQ ID NO: 4	兔骨骼:	T S A Q K A K A K A E E R K R R K M S R G L
SEQ ID NO: 5	兔心脏:	T S A Q K E E E E E E R K R R K L A R T A
SEQ ID NO: 6	大鼠心脏:	T S A Q K E E E E E E R K R R K L A R T A
SEQ ID NO: 7	牛蛙骨骼:	T S A Q K A K A K A E E R K R R K L A R A N
SEQ ID NO: 1	共有序列:	T S A Q K X X X E E R X R R K M A R X X
		K K K L S K
SEQ ID NO: 11	肤NB	G L P D K K T E E E K S V M A K K L E Q K
SEQ ID NO: 12	肤AS	T R K S R L A R G Q K A K A K S E M R E

图1

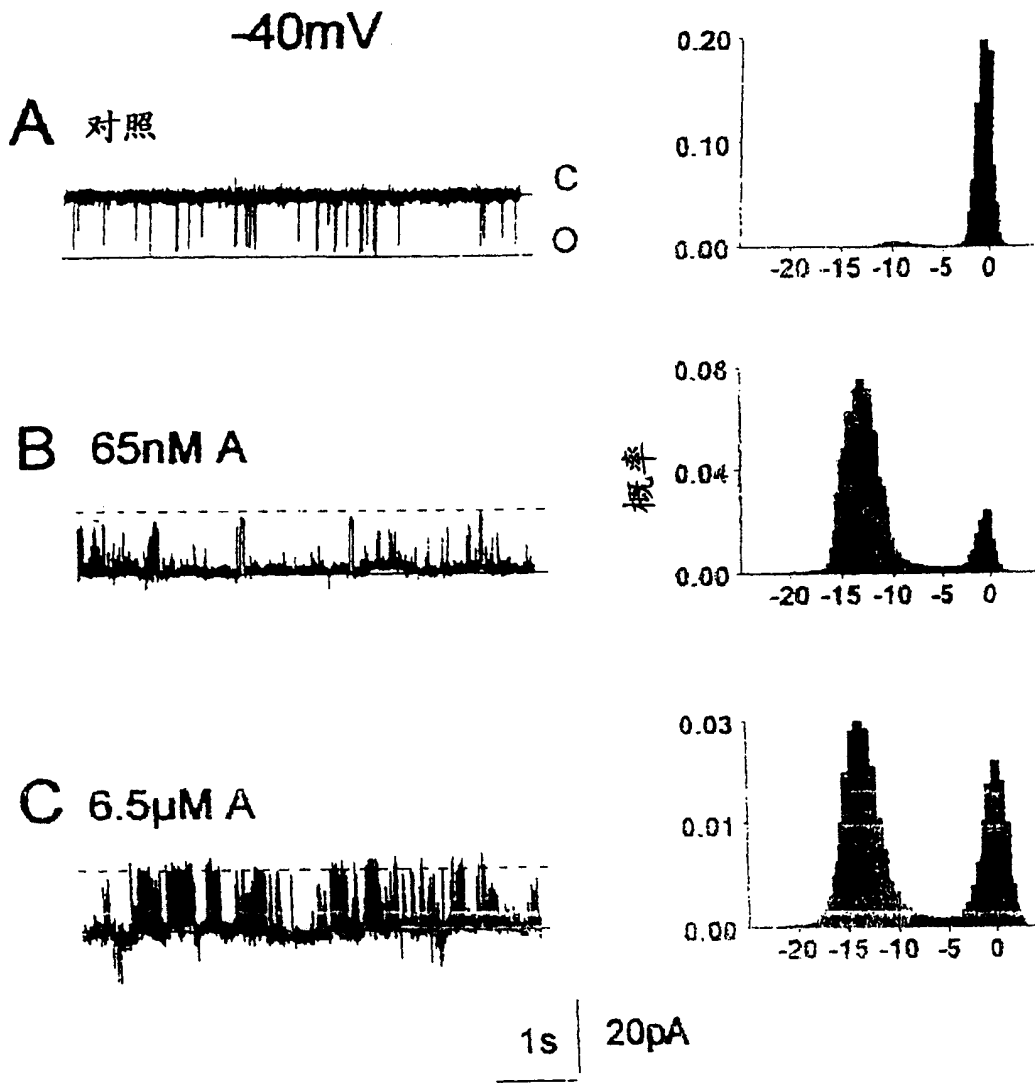


图2

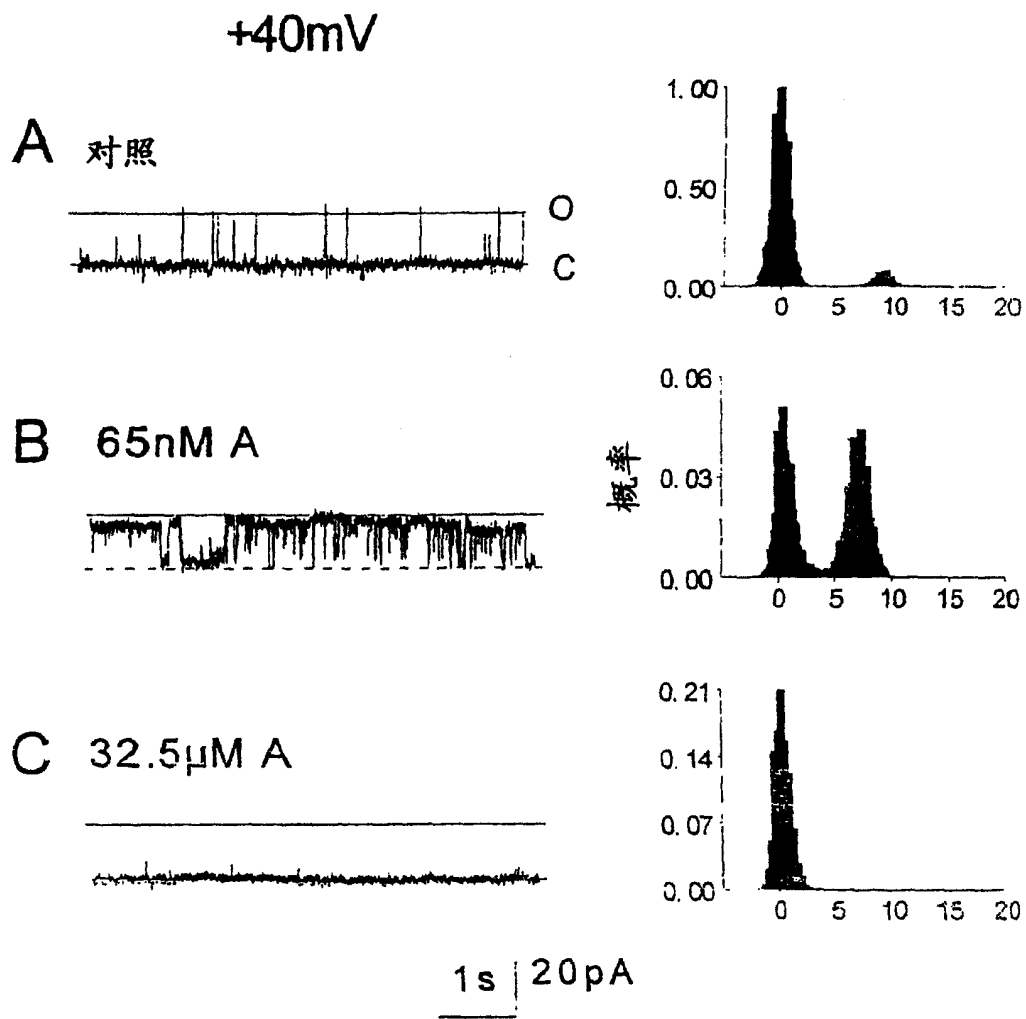


图3

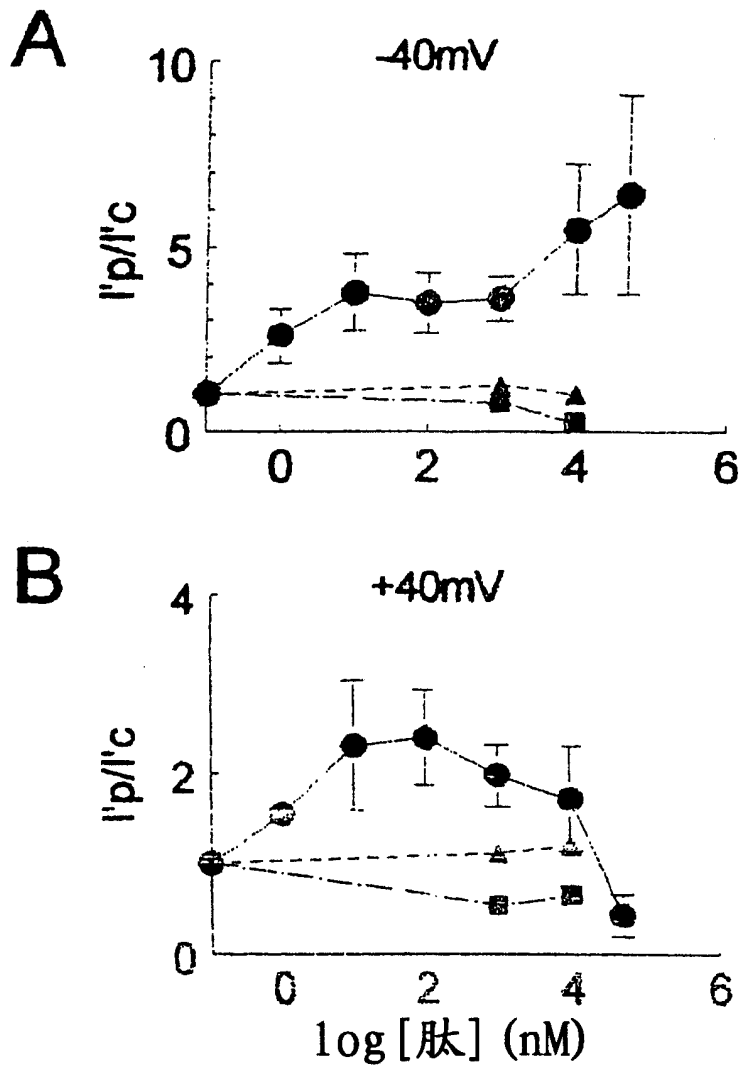


图4

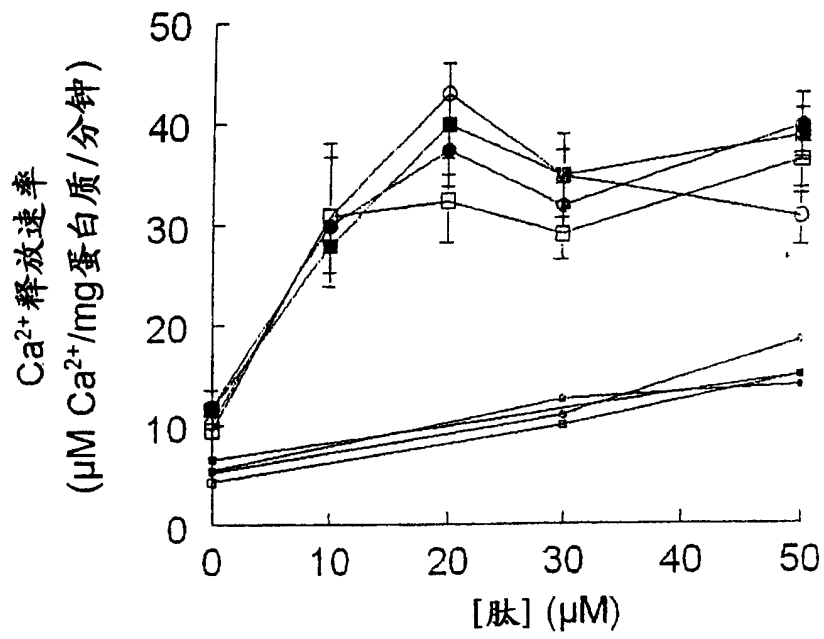


图5

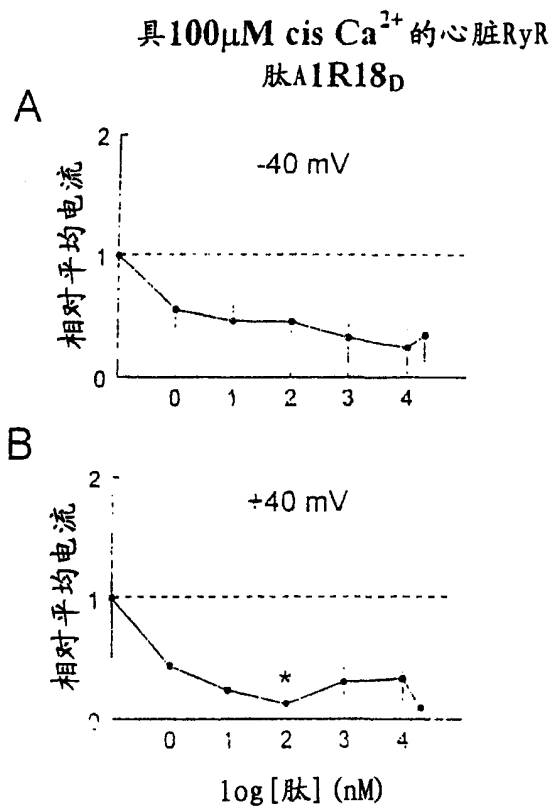


图6

具100nM cis Ca²⁺的心脏RyR
肽 SEQ ID NO: 9

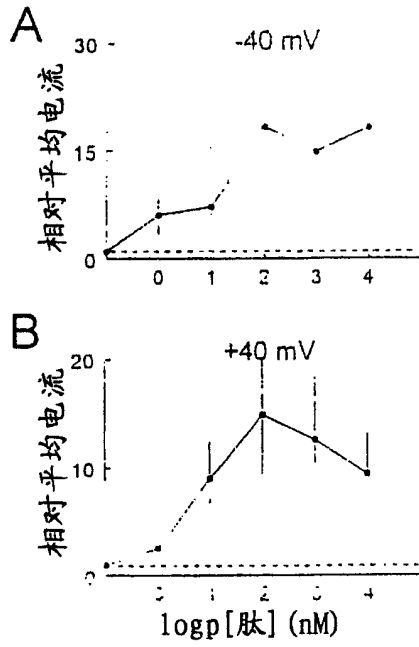


图7

具肽 SEQ ID NO: 9 的心脏 RyR2

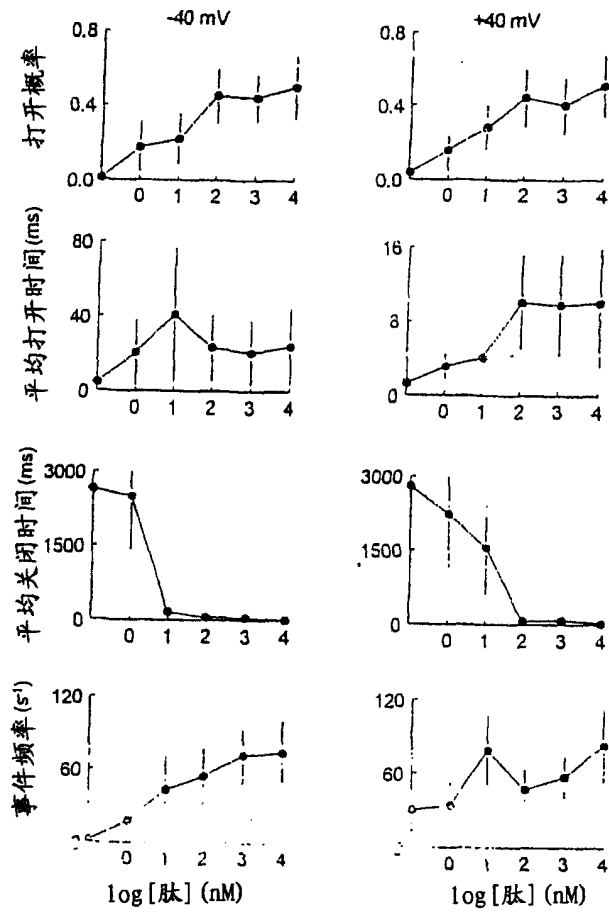


图8