



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104311653 B

(45)授权公告日 2017.12.05

(21)申请号 201410334833.1

(22)申请日 2005.07.21

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 104311653 A

(43)申请公布日 2015.01.28

(30)优先权数据

60/653,928 2005.02.18 US

(62)分案原申请数据

200580049237.8 2005.07.21

(73)专利权人 安吉奥开米公司

地址 加拿大魁北克

(72)发明人 R·贝利沃 M·德穆勒 C·谢

A·雷吉纳

(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 袁泉

(51)Int.Cl.

C07K 14/47(2006.01)

A61K 47/62(2017.01)

A61P 35/00(2006.01)

A61P 35/04(2006.01)

A61P 25/18(2006.01)

A61P 25/08(2006.01)

A61P 25/28(2006.01)

A61P 25/16(2006.01)

A61P 25/14(2006.01)

A61P 9/10(2006.01)

(56)对比文件

WO 2004060403 A2, 2004.07.22, 参见 第33
页第5行, 权利要求1, 15, 20, SEQ ID NO:4.

审查员 杨光

权利要求书1页 说明书30页

序列表27页 附图5页

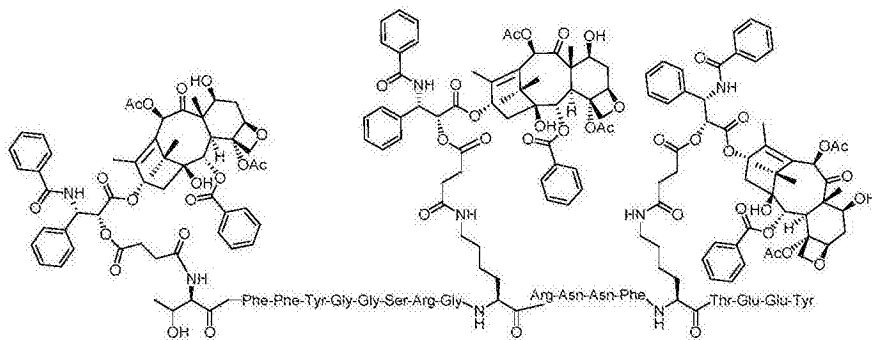
(54)发明名称

转运化合物穿过血脑屏障的分子

(57)摘要

本发明涉及药物递送领域中的改进。更具体地, 本发明涉及源自牛胰蛋白酶抑制剂和牛胰蛋白酶抑制剂类似物的多肽以及缀合物和含有这些多肽或缀合物的药物组合物。本发明还涉及这些多肽在转运化合物或药物穿过哺乳动物血脑屏障中和在神经系统疾病的治疗和诊断中的用途。

1. 一种缀合物或其药学上可接受的盐,所述缀合物具有如下结构:



2. 组合物,包含权利要求1的缀合物。

3. 药物组合物,包含权利要求1的缀合物及药物上可接受的载体。

4. 权利要求1的缀合物、或者权利要求2或3的组合物在制备用于治疗癌症的药物中的用途。

5. 权利要求4的用途,其中所述癌症是脑瘤或脑转移瘤。

6. 权利要求5的用途,其中所述脑瘤是神经胶质瘤或成神经胶质细胞瘤。

转运化合物穿过血脑屏障的分子

[0001] 本申请是申请日为2005年7月21日、申请号为200580049237.8、发明名称为“转运化合物穿过血脑屏障的分子”的发明专利申请的分案申请。

发明领域

[0002] 本发明涉及药物递送领域中的改进。更具体地,本发明涉及多肽、缀合物以及含有本发明多肽或缀合物的药物组合物。本发明还涉及这些多肽和缀合物在转运化合物或药物穿过哺乳动物血脑屏障中和在神经系统疾病的治疗和诊断中的用途。

[0003] 发明背景

[0004] 在大脑病变新疗法的发展中,认为血脑屏障(BBB)是治疗中枢神经系统(CNS)疾病的药物可能用途的主要障碍。CNS药物的全球市场在1998年为\$330亿,这大约是心血管药物全球市场的一半,即使是在美国,患有CNS疾病的人群接近心血管疾病患者的两倍。这种不平衡性的原因是超过98%的所有潜在CNS药物不能穿过血脑屏障。此外,超过99%的全球CNS药物研发只是致力于CNS药物发现,不到1%是针对CNS药物递送。该比率可解释为什么目前对于主要的神经系统疾病如脑瘤、阿尔茨海默氏病和中风没有有效的疗法可用。

[0005] 大脑因两个屏障系统的存在得到保护来对抗潜在的毒性物质:血脑屏障(BBB)和血-脑脊液屏障(BCSFB)。认为BBB是血清配体吸收的主要途径,因为其表面积大约大于BCSFB表面积的5000倍。构成BBB的大脑内皮代表了对抗许多CNS障碍的潜在药物用途的主要障碍。

[0006] 通常,只有小于约500道尔顿的亲脂性分子可以穿过BBB,即,从血液进入大脑中。然而,许多在动物研究中显示出具有治疗CNS失调前景的药物的大小明显比较大。因此,由于大脑毛细血管内皮壁对这些药物可忽略的渗透性,肽和蛋白质治疗剂通常从血液至大脑的转运中排除。与其他器官的毛细血管相比较,大脑毛细血管内皮细胞(BCEC)通过紧密连接得到密闭,具有很少的孔和很少的内吞小泡。BCEC由胞外基质、星形细胞、周皮细胞和小神经胶质细胞包围。内皮细胞与星形细胞足突的和毛细血管的基底膜的紧密关联对于允许血脑交换严密控制的BBB特性的发展和维持是重要的。

[0007] 国际公开WO 2004/060403公开了本发明人进行的发明,涉及转运药物穿过血脑屏障的分子。另外,迄今为止,对于大脑不存在有效的药物递送方法可用。调查研究中的用于将肽和蛋白质药物递送至大脑的方法可以分成三种主要策略。第一,侵入性方法包括通过外科手术药物的直接心室内给药,和通过高渗溶液颈动脉内输注BBB的暂时性破坏。第二,基于药物的策略在于通过提高肽或蛋白质的脂溶性促进通过BBB。第三,基于生理的策略充分利用针对BBB的各种载体机理,在近些年其已经得到了表征。在该方法中,使药物附着于蛋白质载体上,该蛋白质载体如同靶向受体的递送媒介物一样对BBB执行功能。该方法是高度特异性的并呈现出高效能,对于具有无限靶标的临床适应症具有极大的灵活性。本发明人已经并且仍然在研究后一种方法,他们提出了上述公开中所述的分子和本发明的分子。

[0008] 美国专利US5,807,980描述了牛胰蛋白酶抑制剂衍生的抑制剂及其制备方法和治疗用途。将这些肽用于治疗特征在于组织因子和/或VIIIa因子异常出现或数量的病症如异

常的血栓形成。

[0009] 美国专利US5,780,265描述了能够抑制血浆激肽释放酶的丝氨酸蛋白酶抑制剂。

[0010] 美国专利US5,118,668描述了牛胰蛋白酶抑制剂变体。

[0011] 拥有可以作为用于转运化合物或药物穿过个体BBB的载体或媒介物的改进分子是非常希望的。

[0012] 发明概述

[0013] 本发明的一个目的是提供药物递送领域中的改进。

[0014] 本发明的另一个目的是提供用于转运化合物或药物穿过个体血脑屏障的非侵入性且灵活的方法和载体。

[0015] 本申请公开了新的分子,其能够,例如转运所需的化合物穿过血脑屏障。

[0016] 在第一个方面中,本发明提供了能够穿过(即,通过)体外测定中模仿(模拟)哺乳动物血脑屏障的细胞层的生物活性多肽,该多肽可以选自,例如:

[0017] -牛胰蛋白酶抑制剂(SEQ ID NO.:98),

[0018] -牛胰蛋白酶抑制剂类似物

[0019] -可以包括(或基本上由)SEQ ID NO.:1中限定的氨基酸序列(构成)的牛胰蛋白酶抑制剂片段,

[0020] -SEQ ID NO.:1的生物活性类似物,

[0021] -SEQ ID NO.:1的生物活性片段,和;

[0022] -SEQ ID NO.:1类似物的生物活性片段。

[0023] 第二个方面中,本发明提供了能够穿过(即,通过)模仿(模拟)体外测定中哺乳动物血脑屏障的细胞层的生物活性多肽,该多肽可以选自,例如:

[0024] -可以包括SEQ ID NO.:1中限定的氨基酸序列的牛胰蛋白酶抑制剂片段,

[0025] -SEQ ID NO.:1的生物活性类似物,

[0026] -SEQ ID NO.:1的生物活性片段和;

[0027] -SEQ ID NO.:1类似物的生物活性片段。

[0028] 根据本发明,牛胰蛋白酶抑制剂片段可以由SEQ ID NO.:1中限定的序列构成。此外根据本发明,牛胰蛋白酶抑制剂片段可以包括SEQ ID NO.1并可以具有约19个氨基酸至约54个氨基酸的长度,例如,10至50个氨基酸长,10至30个氨基酸长等。

[0029] 根据本发明,SEQ ID NO.:1的生物活性类似物可以具有约19个氨基酸至约54个氨基酸的长度(例如,包括例如21至23、25至34、36至50和52至54个),或约19个氨基酸至约50个氨基酸的长度,或约19个氨基酸至约34个氨基酸的长度(例如,19、20、21、22、23、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34个),或约19个氨基酸至约23个氨基酸的长度或约19、20、21、22、23、24、35、51个氨基酸的长度。

[0030] 在此所述的(例如,19个氨基酸的)多肽的生物活性片段可以包括例如约7、8、9或10至18个氨基酸的多肽。因此,根据本发明,SEQ ID NO.:1或SEQ ID NO.:1类似物的生物活性片段可以具有约7至约18个氨基酸或约10至约18个氨基酸的长度。

[0031] 美国专利US5,807,980描述了在此标识为SEQ ID NO.:102的多肽。

[0032] 美国专利US5,780,265描述了在此标识为SEQ ID NO.:103的多肽。

[0033] 例如,可以在2004年7月22日以国际公开号WO 2004/060403公开的国际申请PCT/

CA2004/000011中找到牛胰蛋白酶抑制剂氨基酸序列(SEQ ID NO.:98)、血管肽(Angiopep)-1氨基酸序列,以及一些生物活性类似物的序列。此外,国际公开WO 04/060403描述了在此标识为SEQ ID NO.:104的多肽。

[0034] 美国专利US5,118,668描述了具有SEQ ID NO.:105中所示序列的多肽。

[0035] 可以通过进行国际申请PCT/CA2004/000011中公开的合成牛胰蛋白酶抑制剂序列(或其部分)的蛋白质清除(Genebank:www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)找到牛胰蛋白酶抑制剂类似物的实例。例如,根据登录号CAA37967(GI:58005)、1405218C(GI:3604747)等可以找到示例性牛胰蛋白酶抑制剂类似物。

[0036] 另一方面中,本发明提供了能够穿过(即,通过)模仿(模拟)体外测定中哺乳动物血脑屏障的细胞层的生物活性多肽,该多肽可以选自,例如:

[0037] -19至54(例如,19-50)个氨基酸长的牛胰蛋白酶抑制剂片段,其可以包括SEQ ID NO.:1,

[0038] -由SEQ ID NO.:1构成的牛胰蛋白酶抑制剂片段,

[0039] -约19至50个氨基酸长的SEQ ID NO.:1的生物活性类似物,和;

[0040] -(10至18个氨基酸的)SEQ ID NO.:1的生物活性片段或(约10至18个氨基酸的)SEQ ID NO.:1类似物的生物活性片段。

[0041] 根据本发明,提供了SEQ ID NO.:1的生物活性类似物,其可以选自,例如:

[0042] -包括与SEQ ID NO.:1氨基酸序列至少35%同一性的SEQ ID NO.:1类似物,

[0043] -包括与SEQ ID NO.:1氨基酸序列至少40%同一性的SEQ ID NO.:1类似物,

[0044] -包括与SEQ ID NO.:1氨基酸序列至少50%同一性的SEQ ID NO.:1类似物,

[0045] -包括与SEQ ID NO.:1氨基酸序列至少60%同一性的SEQ ID NO.:1类似物,

[0046] -包括与SEQ ID NO.:1氨基酸序列至少70%同一性的SEQ ID NO.:1类似物,

[0047] -包括与SEQ ID NO.:1氨基酸序列至少80%同一性的SEQ ID NO.:1类似物,

[0048] -包括与SEQ ID NO.:1氨基酸序列至少90%同一性的SEQ ID NO.:1类似物,

[0049] -包括与SEQ ID NO.:1氨基酸序列至少95%(即,96%、97%、98%、99%和100%)同一性的SEQ ID NO.:1类似物。

[0050] 例如,SEQ ID NO.:1的生物活性片段可以包括选自SEQ ID NO.:2至SEQ ID NO.:62、SEQ ID NO.:68至SEQ ID NO.:93和SEQ ID NO.:97以及99、100和101的任一个中限定的氨基酸序列的氨基酸序列。当本发明的多肽包括,例如,SEQ ID NO.:99、100或101时,该多肽具有约10至50个氨基酸,例如,10至30个氨基酸长的氨基酸序列。

[0051] 此外,根据本发明,SEQ ID NO.:1的生物活性类似物可以包括SEQ ID NO.:67中限定的氨基酸序列(即,其是SEQ ID NO.:67(血管肽-1)的酰胺化形式的67号多肽)。

[0052] 本发明的多肽可以是酰胺化的,即,可以具有酰胺化的氨基酸序列。例如,SEQ ID NO.:67的多肽可以是酰胺化的(67号多肽)。

[0053] 本发明的一部分可以涉及除了SEQ ID NO.:102、103、104和105中限定的多肽之外的在此限定的多肽,而本发明的另一部分可以包括这些肽。例如并且不受限制,本发明包括含有这些肽的缀合物及其用于治疗神经系统疾病(例如,脑瘤)的用途、治疗神经系统疾病(例如,脑瘤)的方法、治疗神经系统疾病的药物组合物等。

[0054] 再一方面中,本发明提供了生物活性多肽,其能够穿过(即,通过)模仿(模拟)体外

测定中哺乳动物血脑屏障的细胞层,该多肽可以选自,例如:

[0055] -19至54个(例如,19-50个)氨基酸长的牛胰蛋白酶抑制剂片段,其可以包括SEQ ID NO.:1,

[0056] -由SEQ ID NO.:1构成的牛胰蛋白酶抑制剂片段,

[0057] -约19至50个氨基酸长的SEQ ID NO.:1的生物活性类似物,只要所述类似物不包括SEQ ID NO.:102、103、104或105并且只要当所述类似物由SEQ ID NO.:67构成时,所述类似物是酰胺化的,

[0058] -10至18个氨基酸的SEQ ID NO.:1的生物活性片段,和;

[0059] -约10至18个氨基酸的SEQ ID NO.:1类似物的生物活性片段。

[0060] 此外,根据本发明,SEQ ID NO.:1的生物活性片段或SEQ ID NO.:1类似物的生物活性片段可以包括SEQ ID NO.:1或SEQ ID NO.:1类似物的至少9个或至少10个(连续或邻接的)氨基酸。

[0061] 本发明的多肽可以具有可以包括1至12个氨基酸置换的氨基酸序列(即,SEQ ID NO.:91)。例如,氨基酸置换可以为1至10个氨基酸置换,或1至5个氨基酸置换。根据本发明,氨基酸置换可以是非保守氨基酸置换或保守氨基酸置换。

[0062] 例如,当本发明的多肽包括与SEQ ID NO.:1的氨基酸完全相同的氨基酸和不同的(非相同的)其他氨基酸时,不同的那些可以是保守氨基酸置换。可以通过查看相应位置来进行相同和不同氨基酸的比较。

[0063] 可以具有至少35%同一性的SEQ ID NO.:1类似物的实例包括,例如,包括(由)SEQ ID NO.:91中限定的氨基酸序列(构成)的多肽(约36.8%同一性,即,SEQ ID NO.:91的19个氨基酸中有7个氨基酸与SEQ ID NO.:1的相同),包括(由)SEQ ID NO.:98中限定的氨基酸序列(构成)的多肽(约68.4%同一性,即,19个氨基酸中有13个氨基酸与SEQ ID NO.:1的相同),包括(由)SEQ ID NO.:67中限定的氨基酸序列(构成)的多肽(约73.7%同一性,即,19个氨基酸中有14个氨基酸与SEQ ID NO.:1的相同),包括(由)SEQ ID NO.:76中限定的氨基酸序列(构成)的多肽(约73.7%同一性,即,19个氨基酸中有14个氨基酸与SEQ ID NO.:1的相同)和包括(由)SEQ ID NO.:5中限定的氨基酸序列(构成)的多肽(约79%同一性,即,19个氨基酸中有15个氨基酸与SEQ ID NO.:1的相同)。

[0064] 可以具有至少60%同一性的SEQ ID NO.:1类似物的实例包括,例如,包括(由)SEQ ID NO.:98中限定的氨基酸序列(构成)的多肽(约68.4%同一性,即,19个氨基酸中的13个氨基酸与SEQ ID NO.:1的相同),包括(由)SEQ ID NO.:67中限定的氨基酸序列(构成)的多肽(约73.7%同一性,即,19个氨基酸中的14个氨基酸与SEQ ID NO.:1的相同),包括(由)SEQ ID NO.:76中限定的氨基酸序列(构成)的多肽(约73.7%同一性,即,19个氨基酸中的14个氨基酸与SEQ ID NO.:1的相同)和包括(由)SEQ ID NO.:5中限定的氨基酸序列(构成)的多肽(约79%同一性,即,19个氨基酸中的15个氨基酸与SEQ ID NO.:1的相同)。

[0065] 可以具有至少70%同一性的SEQ ID NO.:1类似物的实例包括,例如,包括(由)SEQ ID NO.:67(约73.7%同一性,即,19个氨基酸中的14个氨基酸与SEQ ID NO.:1的相同)、SEQ ID NO.:76(约73.7%同一性,即,19个氨基酸中的14个氨基酸与SEQ ID NO.:1的相同)和SEQ ID NO.:5(约79%同一性,即,19个氨基酸中的15个氨基酸与SEQ ID NO.:1的相同)中限定的氨基酸序列(构成)的多肽。

[0066] 根据本发明,载体可以更具具体地选自5、67、76、91和97号肽(即,SEQ ID NO.:5、67、76、91和97(血管肽-2))。可以使用载体,例如,用于转运连于其上的物质穿过血脑屏障。根据本发明,所述载体物质连接后能够穿过血脑屏障并因此能够将该物质转运穿过血脑屏障。

[0067] 根据本发明,多肽可以是分离的形式或是基本上纯化的形式。

[0068] 更具具体地,本发明提供了用于转运连于其上的物质穿过血脑屏障的载体,其中所述载体与物质连接后能够穿过血脑屏障并因此将该物质转运穿过血脑屏障。该载体可以包括至少一种本发明的多肽(只要当所述多肽或载体由SEQ ID NO.:67构成时,所述多肽被基团所修饰,例如,被酰胺化)。例如,该载体可以选自一类与牛胰蛋白酶抑制剂相关的分子。

[0069] 通过载体实现的转运活性不影响血脑屏障完整性。物质的转运可以导致,例如,该物质递送至个体的中枢神经系统(CNS)。

[0070] 在此应该理解可以化学合成(例如,固相合成)或可以通过DNA重组技术产生本发明的多肽。编码特定氨基酸的密码子是本领域公知的并在,例如,Biochemistry(第三版;1988,Lubert Stryer,Stanford University,W.H.Freeman and Company,New-York)中论述。因此在此包括编码本发明载体的核苷酸序列。更具具体地,本发明包括编码选自SEQ ID NO.:1至97中任一个的多肽的核苷酸序列(脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸或其衍生物)。编码牛胰蛋白酶抑制剂类似物的示例核苷酸序列示于SEQ ID NO.:106中并可以在Gene Bank中根据登录号X04666找到。该序列编码在位置16上具有替代见于SEQ ID NO.:98中的缬氨酸的赖氨酸的牛胰蛋白酶抑制剂类似物(参照SEQ ID NO.:106编码的氨基酸序列)。可以通过本领域已知的方法引入SEQ ID NO.:106的核苷酸序列中的突变以改变在位置16上具有缬氨酸的SEQ ID NO.:98的肽。可以使用本领域已知的技术将另外的突变引入该核苷酸序列中以编码本发明的类似物。可以通过酶消化或聚合酶链反应等从该核苷酸序列获得片段。另外,可以通过本领域已知的方法来化学合成所需的核苷酸序列。

[0071] 另一方面中,本发明涉及缀合物,其可以包括选自本发明多肽中的任一种的载体,和选自例如药物(例如,小分子药物,例如,抗生素)、药品、可检测标记、蛋白质(例如,酶)、基于蛋白质的化合物(例如,包括一条多肽链的蛋白质复合物)和多肽(肽)的物质。更具具体地,该物质可以是在中枢神经系统水平上具有活性的分子。该物质可以是用于治疗或检测神经系统疾病的任何物质。

[0072] 根据本发明,是缀合物一部分的载体可以选自,例如:

[0073] -10至54个(例如,19-50个)氨基酸长的牛胰蛋白酶抑制剂片段,其可以包括SEQ ID NO.:1,

[0074] -由SEQ ID NO.:1构成的牛胰蛋白酶抑制剂片段,

[0075] -(例如,约19至50个氨基酸长的)SEQ ID NO.:1的生物活性片段,只要当所述类似物由SEQ ID NO.:67构成时,所述类似物是酰胺化的,

[0076] -10至18个氨基酸的SEQ ID NO.:1的生物活性片段,和;

[0077] -约10至18个氨基酸的SEQ ID NO.:1类似物的生物活性片段。

[0078] 根据本发明,该物质可以具有约160,000道尔顿的最大分子量。

[0079] 此外,根据本发明,可以通过受体介导的转胞吞作用或吸附介导的转胞吞作用实现转运活性。该物质可以是能够通过这样的机制转运的物质。

[0080] 此外,根据本发明,缀合物可以是融合蛋白的形式,其可以具有基本上由本发明的载体构成的第一个部分和基本上由蛋白质或基于蛋白质的物质构成的第二个部分。

[0081] 可以通过载体和/或缀合物治疗或检测的示例神经系统疾病是选自例如脑瘤、脑转移瘤、精神分裂症、癫痫、阿尔茨海默氏病、帕金森病、亨廷顿病、中风和血脑屏障相关机能失常(例如,肥胖)的疾病。

[0082] 根据本发明,血脑屏障相关的机能失常是肥胖。此外,根据本发明,可以与本发明载体缀合的物质可以是瘦蛋白。包括瘦蛋白和载体的缀合物可以用于,例如,肥胖的治疗中。

[0083] 根据本发明,可检测标记可以是放射性成像剂。可以与本发明的载体缀合的并在此包括的标记的实例包括,例如并且不受限制,同位素、荧光标记(例如,若丹明)、受体分子(例如,生物素)等。可检测标记的其他实例包括,例如,绿色荧光蛋白、生物素、组胺酸标记蛋白和 β -半乳糖苷酶。

[0084] 可以与本发明的载体缀合的并在此包括的蛋白质或基于蛋白质的化合物的实例包括,且不受限制,抗体、抗体片段(例如,抗体结合片段如Fv片段、F(ab)2、F(ab)2'和Fab等)、基于肽或蛋白质的药物(例如,正向药理学调节剂(激动剂)或药理学抑制剂(拮抗剂))等。在此包括的物质的其他实例包括细胞毒素(例如,单甲基auristatin E(MMAE)、选自细菌内毒素和外毒素的毒素;白喉毒素、肉毒毒素、破伤风毒素、百日咳毒素、葡萄球菌肠毒素、中毒性休克综合征毒素TSST-1、腺苷酸环化酶毒素、shiga毒素、霍乱肠毒素等)和抗血管生成化合物(内皮抑制素、儿茶素、营养药、趋化因子IP-10、基质金属蛋白酶的抑制剂(MMPI)、anastellin、玻连蛋白、抗凝血酶、酪氨酸激酶抑制剂、VEGF抑制剂、针对受体的抗体、赫赛汀、阿瓦斯丁(avastin)和panitumumab等)。

[0085] 此外,根据本发明,物质可以是小分子药物,如抗癌药物(例如,用于治疗脑瘤)。本发明包括的抗癌药物可以包括,例如,具有允许其与本发明载体缀合的基团的药物。抗癌药物的实例包括,例如,且不受限制,可以选自紫杉醇(红豆杉醇)、长春花碱、长春新碱、依托泊苷、阿霉素、环磷酰胺、泰索帝、苯丙氨酸氮芥、苯丁酸氮芥和任意组合的药物。

[0086] 更具体地,本发明的缀合物可以包括式R-L-M或其药物学上可接受的盐,其中R是一类与牛胰蛋白酶抑制剂相关的分子(例如,牛胰蛋白酶抑制剂、牛胰蛋白酶抑制剂片段、血管肽-1、血管肽-2、类似物、衍生物或片段)。例如,R可以是选自一类与牛胰蛋白酶抑制剂相关的分子的载体,与牛胰蛋白酶抑制剂相关的分子与L-M连接后能够穿过血脑屏障,并因此转运M穿过血脑屏障。L可以是连接物或键(化学键)。M可以是选自药物(例如,小分子药物,例如,抗生素)、药品、(可检测)标记、蛋白质或基于蛋白质的化合物(例如,抗体、抗体片段)、抗生素、抗癌药、抗血管生成化合物和多肽或任何在中枢神经系统水平上具有活性的分子的物质。在此应当理解没有打算将式R-L-M局限于特定的次序或特定的比率。如在此例示的,可以发现M超过R几个比率。

[0087] 例如,式R-L-M的缀合物或其药物学上可接受盐,可以用于转运M穿过血脑屏障,其中R可以是,例如,选自如在此所述的5、67、76、91和97号肽的载体。该载体在与L-M连接后能够穿过血脑屏障并可以转运M穿过血脑屏障。

[0088] 根据本发明,M可以是用于治疗或诊断神经系统疾病的物质。

[0089] 在此应当理解当超过一个的载体缀合位点可用或存在时,可以将超过一个的药物

或药物分子缀合于本发明的载体上。因此,缀合物可以包括一个或多个药物分子。缀合物自身可以是活性的,即,即使与载体相连时药物仍可以是活性的。此外,根据本发明,化合物可以从载体中释放出来或不释放出来,即,通常在转运穿过血脑屏障之后。因此,化合物可以是能从缀合物中(或从载体中)释放出来的并且此后可以变成活性的。更具体地,物质转运穿过血脑屏障后可以从载体中释放出来。

[0090] 根据本发明的另一个实施方案,提供了用于转运物质穿过血脑屏障的缀合物,该缀合物可以包括:(a)载体;和(b)连于载体上的物质,其中该缀合物能够穿过血脑屏障并因此转运该物质穿过血脑屏障。

[0091] 另一方面中,本发明涉及本发明的载体或缀合物用于转运物质穿过有此需要的哺乳动物的血脑屏障的用途。

[0092] 再一方面中,本发明涉及一类与牛胰蛋白酶抑制剂相关的分子用于转运与其连接的化合物穿过患者的血脑屏障的用途。

[0093] 另一方面中,本发明涉及在此所述的载体或缀合物用于诊断神经系统疾病或中枢神经系统疾病的用途。例如,可以将载体或缀合物用于神经系统疾病的体内检测。

[0094] 载体可以选自,例如,(生物活性)的组:

[0095] -牛胰蛋白酶抑制剂(SEQ ID NO.:98),

[0096] -可以包括SEQ ID NO.:1中限定的氨基酸序列的牛胰蛋白酶抑制剂片段,

[0097] -由SEQ ID NO.:1构成的牛胰蛋白酶抑制剂片段,

[0098] -SEQ ID NO.:1的生物活性类似物,和;

[0099] -SEQ ID NO.:1的生物活性片段或SEQ ID NO.:1类似物的生物活性片段。

[0100] 更具体地,载体可以选自,例如,(生物活性)组:

[0101] -可以包括SEQ ID NO.:1中限定的氨基酸序列的牛胰蛋白酶抑制剂片段,

[0102] -由SEQ ID NO.:1构成的牛胰蛋白酶抑制剂片段,

[0103] -SEQ ID NO.:1的生物活性类似物,和;

[0104] -SEQ ID NO.:1的生物活性片段或SEQ ID NO.:1类似物的生物活性片段。

[0105] 根据本发明,当该类似物由SEQ ID NO:67构成时,所述类似物是酰胺化的。

[0106] 更具体地,载体可以选自,例如:

[0107] -10至54个(例如,19-50个)氨基酸长的牛胰蛋白酶抑制剂片段,其可以包括SEQ ID NO.:1,

[0108] -由SEQ ID NO.:1构成的牛胰蛋白酶抑制剂片段,

[0109] -(例如,约19至50个氨基酸长的)SEQ ID NO.:1的生物活性类似物,只要当所述类似物由SEQ ID NO.:67构成时,所述类似物是酰胺化的,

[0110] -10至18个氨基酸的SEQ ID NO.:1的生物活性片段,和;

[0111] -约10至18个氨基酸的SEQ ID NO.:1类似物的生物活性片段。

[0112] 另一方面中,本发明涉及一类与牛胰蛋白酶抑制剂相关的分子在制造药物中的用途。

[0113] 根据本发明,提供了一类与牛胰蛋白酶抑制剂相关的分子在制造用于治疗神经系统疾病或用于治疗中枢神经系统障碍的药物中的用途。

[0114] 再一方面中,本发明涉及在此所述的载体或缀合物在制造用于治疗脑病(脑相关

疾病)或神经系统疾病,用于诊断脑病或神经系统疾病或用于转运物质穿过血脑屏障的药物中的用途。

[0115] 另一方面中,本发明涉及本发明的载体或缀合物用于治疗具有例如神经系统疾病的哺乳动物或用于诊断有此需要的哺乳动物的神经系统疾病的用途。

[0116] 根据本发明,本发明所包括的神经系统疾病包括,例如并且不受限制,脑瘤、脑转移瘤、神经分裂症、癫痫、阿尔茨海默氏病、帕金森病、亨廷顿病、中风和血脑屏障相关的机能失常。

[0117] 另一方面中,本发明涉及转运物质穿过哺乳动物(人、动物)的血脑屏障的方法,其可以包括将化合物给药于哺乳动物的步骤,该化合物包括与一类与牛胰蛋白酶抑制剂相关的分子连接的物质。

[0118] 再一方面中,本发明提供了治疗患者的神经系统疾病的方法,包括将药物给药于患者,该药物包括一类与牛胰蛋白酶抑制剂相关的分子和适于治疗该疾病的化合物,该化合物与一类与牛胰蛋白酶抑制剂相关的分子连接。

[0119] 另一方面中,提供了治疗患者的中枢神经系统障碍的方法,包括将药物给药于患者,该药物包括一类与牛胰蛋白酶抑制剂相关的分子和适于治疗该疾病的化合物,该化合物与牛胰蛋白酶抑制剂连接。

[0120] 再一方面中,提供了转运物质穿过血脑屏障的方法,其包括将本发明的药物组合物给药于个体的步骤。

[0121] 另一方面中,本发明还涉及治疗有此需要的哺乳动物(例如,患者)(例如,具有神经系统疾病的患者)的方法。该方法可以包括将本发明的载体、缀合物和/或药物组合物给药于哺乳动物。

[0122] 本发明另外涉及诊断有此需要的哺乳动物(例如,患者)的神经系统疾病的方法(即诊断方法)。该方法可以包括将本发明的载体、缀合物和/或药物组合物给药于哺乳动物(人个体、患者、动物)。

[0123] 根据本发明,可以动脉内、鼻内、腹膜内、静脉内、肌内、皮下、经皮或口服来进行给药。

[0124] 根据本发明,可以将治疗有效量的药物组合物给药于哺乳动物。

[0125] 需要的哺乳动物(需要的个体)可以是,例如,具有神经系统疾病、中枢神经系统疾病、脑癌、脑转移瘤等或处于具有神经系统疾病、中枢神经系统疾病、脑癌、脑转移瘤等风险中的哺乳动物。

[0126] 另一方面中,本发明涉及药物组合物,其可以包括,例如:

[0127] -本发明的载体(其可以选自在此所述的任一种多肽)或缀合物;和

[0128] -药学上可接受的载体,例如,药学上可接受的赋形剂。

[0129] 根据本发明,药物组合物可以用于例如治疗神经系统疾病。

[0130] 根据本发明,药物组合物可以用于例如诊断神经系统疾病。

[0131] 此外,根据本发明,药物组合物可以用于例如转运物质穿过血脑屏障。

[0132] 此外,根据本发明,药物组合物可以用于例如将物质递送至个体的CNS。

[0133] 此外,根据本发明,药物组合物可以用于例如治疗有此需要的哺乳动物的中枢神经系统障碍。

[0134] 根据本发明,药物组合物可以用于将物质递送至个体的CNS。

[0135] 在此应当理解本发明包括载体(多肽)或缀合物的药物学上可接受的盐。

[0136] 组合物(药物组合物)因而可以包括如在此所限定的制造的药物以及药物学上可接受的赋形剂。

[0137] 对本发明来说,以下对下列术语进行定义。

[0138] 术语“载体”或“媒介物”意指能够转运化合物的化合物或分子如多肽。例如,转运可以穿过血脑屏障而发生。可以将载体连接(共价或非共价)或缀合到另一种化合物或物质上并因此能够转运其他化合物或物质穿过血脑屏障。例如,载体可以与脑内皮细胞上存在的受体结合并因此通过转胞吞作用被转运穿过血脑屏障。载体可以是为此可以获得高水平的经内皮转运的分子。载体可以是,但不限于,蛋白质、肽或肽模拟物并可以是天然存在的或通过化学合成或遗传重组技术(遗传工程)来生产。

[0139] 术语“缀合物”意指载体和另一种化合物或物质的组合。缀合物性质上可以是化学的,如通过连接物,或本质上是遗传的,例如通过遗传重组技术,如在例如与受体分子(例如,绿色荧光蛋白、 β -半乳糖苷酶、组胺酸标记等)的融合蛋白中。

[0140] 表述“小分子药物”意指具有1000g/mol或更低分子量的药物。

[0141] 术语“治疗”意指获得所需的药理性和/或生理性效果,例如,癌细胞生长的抑制、癌细胞的死亡或神经系统疾病或病症的缓解。就完全或部分预防疾病或其症状而言,该效果可以是预防性的和/或就部分或完全治愈疾病和/或由疾病引起的副作用而言,该效果可以是治疗性的。如在此所用的“治疗”涵盖哺乳动物(特别是人)疾病的任何治疗,并包括:(a)预防可以易患该疾病但还没有诊断为患有该疾病的个体中发生的疾病或病症(例如,预防癌症)的发生;(b)抑制疾病,(例如,阻止其发展);或(c)缓解疾病(例如,减轻与疾病相关的症状)。如在此所用的“治疗”涵盖药剂或化合物对个体的任何给药来治疗、治愈、缓解、改善、减轻或抑制该个体的病症,包括,并且不受限制,将载体-物质缀合物给药于个体。

[0142] 术语“癌症”意指任何细胞恶性肿瘤,其独特的性状是失去正常控制,其导致无节制生长、缺乏分化和入侵局部组织和转移的能力。癌症可以在任何器官的任何组织中发展。更具体地,癌症包括但不限于,脑癌。

[0143] 术语“给药”意指递送方式,包括但不限于,动脉内、鼻内、腹膜内、静脉内、肌内、皮下、经皮或口服。可以将日剂量分成一个、两个或多个适合于在整个时间段内给药一次、两次或多次形式的剂量。

[0144] 术语“治疗有效”或“有效量”意指足以基本上改善一些与疾病或医学病症相关症状的化合物的量。例如,在癌症或精神病症或神经系统或CNS疾病的治疗中,减轻、预防、延迟、抑制或阻止疾病或病症的任何症状的物质或化合物将是在治疗上有效的。治疗有效量的物质或化合物不需要治愈疾病或病症,但将提供疾病或病症的治疗,使得该疾病或病症的发作得到延迟、阻碍或预防,或该疾病或病症的症状得到缓解,或该疾病或病症的期限得到改变,或例如,降低疾病的严重程度或加速个体的恢复。

[0145] 本发明的载体和缀合物可以与常规治疗方法和/或疗法联合使用或可以与常规治疗方法和/或疗法分开使用。

[0146] 当本发明的缀合物与使用其它物质的疗法联合给药时,可以将它们按次序或同时给药于个体。另外,根据本发明的药物组合物可以由与药物学上可接受赋形剂结合的本发

明的载体-物质缀合物,如在此所述的,和本领域已知的另一种治疗剂或预防剂的组合构成。

[0147] 药物学上可接受的酸加成盐可以通过本领域已知和常用的方法来制备并包括于本发明中。

[0148] 本发明的生物活性多肽包括功能衍生物。术语“功能衍生物”意指本发明的载体或物质或缀合物及其盐的“化学衍生物”、“片段”或“变体”生物活性序列或部分。载体功能衍生物能够连接或缀合到另一种化合物或物质上并穿过血脑屏障且因此能够转运另一种化合物或物质穿过血脑屏障。

[0149] 术语“化学衍生物”意指本发明的载体、物质或缀合物,其含有不是该载体、物质或载体-物质缀合物的一部分的附加化学部分。共价修饰包括在本发明的范围内。可以使用本领域公知的方法,通过直接化学合成来方便地制备化学衍生物。例如,可以将这样的修饰引入蛋白质或肽载体、物质或载体-物质缀合物中,其通过将靶向氨基酸残基与能够与选定的侧链或末端残基反应的有机衍生剂反应来进行。载体化学衍生物能够穿过血脑屏障并连接或缀合到另一种化合物或物质上且因此能够转运另一种化合物或物质穿过血脑屏障。在优选的实施方案中,获得非常高水平的经内皮转运穿过血脑屏障,而对血脑屏障的完整性没有任何影响。

[0150] 术语“物质”无差别地意指抗体、药物(如医疗药物)或化合物如治疗剂或化合物、标记、示踪剂或成像化合物。

[0151] 术语“治疗剂”或“药剂”意指用于治疗疾病的症状、身体或精神病症、损伤或感染的药剂和/或药品和/或药物,并包括但不限于,抗生素、抗癌剂、抗血管生成剂和在中枢神经系统水平上具有活性的分子。例如,可以静脉内给药紫杉醇来治疗脑癌。

[0152] 术语“病症”意指任何引起个体疼痛、不适、恶心、疾病或伤残(精神或身体)的情况,包括神经系统疾病、损伤、感染或慢性或急性疼痛。可以用本发明治疗的神经系统疾病包括,但不限于,脑瘤、脑转移瘤、精神分裂症、癫痫、阿尔茨海默氏病、帕金森病、亨廷顿病和中风。

[0153] 如在此所用的,“药物组合物”意指治疗有效量的物质以及药物学上可接受的稀释剂、防腐剂、增溶剂、乳化剂、辅助剂和/或载体。如在此所用的“治疗有效量”指的是对于特定的病症和给药方案提供治疗效果的量。这样的组合物是液体或冻干的或以另外的方式干燥的制剂并包括各种缓冲内容物(例如,Tris-HCl、醋酸盐、磷酸盐)、pH和离子强度的稀释剂、添加剂如白蛋白或明胶来防止被表面吸收、去污剂(例如,吐温20、吐温80、Pluronic F68、胆汁酸盐)、增溶剂(例如,甘油、聚乙二醇)、抗氧化剂(例如,抗坏血酸、偏亚硫酸氢钠)、防腐剂(例如,硫柳汞、苯甲醇、对羟基苯甲酸酯)、增量物质或张力调节剂(例如,乳糖、甘露醇)、聚合物如聚乙二醇与蛋白质的共价连接,与金属离子配合或将该物质掺加到聚合物如聚乳酸、聚乙醇酸、水凝胶等的颗粒制剂之中或之上,或掺加到脂质体、微乳液、胶束、单层或多层脂质体、红细胞影或原生质球上。这样的组合物将影响物理状态、溶解度、稳定性、体内释放率和体内清除率。受控或持续释放组合物包括亲脂性储库(例如,脂肪酸、蜡、油)中的制剂。本发明还包括用聚合物(例如,泊洛沙姆或poloxamine)包被的颗粒组合物。本发明组合物的其它实施方案掺入颗粒形式的保护性涂层、蛋白酶抑制剂或渗透增强剂,用于各种给药途径,包括非肠道、肺、鼻、口、阴道、直肠途径。一个实施方案中,药物组合物

非肠道、癌附近 (paracancerally)、经粘膜、经皮、肌内、静脉内、皮内、皮下、腹膜内、心室内、头颅内和肿瘤内给药。

[0154] 此外,如在此所用的“药物可接受载体”或“药物载体”是本领域已知的并包括,但不限于,0.01-0.1M或0.05M磷酸盐缓冲液或0.8%盐水。此外,这样的药物学上可接受载体可以是水性或非水性溶液、悬浮液和乳液。非水性溶剂的实例是丙二醇、聚乙二醇、植物油如橄榄油和可注射的有机酯类如油酸乙酯。水性载体包括水、醇/水溶液、乳液或悬浮液,包括盐水和缓冲媒介物。非肠道媒介物包括氯化钠溶液、林格氏葡萄糖、葡萄糖和氯化钠、乳酸化林格氏或固定油。静脉内媒介物包括流体和营养补充剂、电解质补充剂,如基于林格氏葡萄糖的那些等。还可以存在防腐剂和/或其它添加剂,如,例如,抗微生物剂、抗氧化剂、整理剂(collating agents)、惰性气体等。

[0155] “类似物”在此应被理解为源自原始序列或一部分原始序列的多肽并且其可以包括一个或多个修饰;例如,一个或多个氨基酸序列中的修饰(例如,氨基酸添加、缺失、插入、置换等),一个或多个氨基酸的主链或侧链中的修饰,或将基团或另一个分子添加至一个或多个氨基酸(侧链或主链)。因此,“类似物”在此应被理解为具有与在此所述的多肽相似的生物活性和化学结构(或其结构的一部分)的分子。类似物包括在多肽的一个或两个末端上和/或在多肽氨基酸序列的内部可以具有,例如,一个或多个氨基酸插入的多肽。

[0156] “类似物”可以具有与原始序列或一部分原始序列的序列相似性和/或序列同一性并且还可以具有如在此所讨论的其结构修饰。两个序列之间相似性的程度是基于同一性(相同的氨基酸)和保守性置换的百分比。

[0157] 例如,可以在2、3、4、5、10、19、20个氨基酸或更多(和其之间的任何数量)的区域内比较相似性或同一性。同一性在此可以包括与原始肽相同的和与原始多肽相比较时可以占据相同或相似位置的氨基酸。例如,具有与原始多肽50%同一性的类似物可以包括例如,包含50%原始多肽的氨基酸序列和具有其它百分比的相似性的类似物。在此应当理解在与原始肽的氨基酸相同或相似的类似物的氨基酸之间可以发现缺口。该缺口可以没有氨基酸、包括一个或多个与原始肽不相同或相似的氨基酸。在此包括本发明载体(多肽)的生物活性类似物。

[0158] 例如,可以使用Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0中的算法GAP、BESTFIT或FASTA确定同一性百分比,使用默认缺口重量。

[0159] 例如,类似物可以包含或具有与原始氨基酸序列的50%同一性并且一部分占据相似位置的剩余的氨基酸可以是例如非保守性或保守性氨基酸置换。

[0160] 因此,本发明的类似物包括与原始序列或一部分原始序列具有至少90%序列相似性的那些类似物。“类似物”可以具有,例如,至少35%、50%、60%、70%、80%、90%或95%(96%、97%、98%、99%和100%)与原始序列或一部分原始序列的序列相似性。此外,“类似物”还可以具有,例如,至少35%、50%、60%、70%、80%、90%或95%(96%、97%、98%、99%和100%)与原始序列的序列相似性并且在氨基酸主链或侧链中具有一个或多个置换的组合或添加基团或另一个分子等。用来与其它的氨基酸相似的示例性氨基酸(保守性氨基酸)是本领域已知的并包括,例如,表1中所示的那些。

[0161] 本发明的类似物还包括与原始序列或一部分原始序列可以具有至少35%、50%、60%、70%、80%、90%或95%(96%、97%、98%、99%和100%)序列同一性的那些类似物。

此外,“类似物”可以具有,例如,35%、50%、60%、70%、80%、90%或95%氨基酸的主链或侧链中具有一个或多个置换的组合或添加基团或另一个分子等与原始序列的(序列)同一性(即,与原始肽至少35%、50%、60%、70%、80%、90%或95%相同的类似物)并且在氨基酸的主链或侧链中具有一个或多个置换的组合或添加基团或另一个分子等。

[0162] “片段”在此应被理解为源自原始或亲本序列的一部分或源自所述亲本序列的类似物的多肽。片段包括具有一个或多个氨基酸截断的多肽,其中所述截断可以源自氨基端(N-末端)、羧基端(C-末端),或源自蛋白质的内部。片段可以包含与原始序列的相应部分相同的序列。本发明包括在此所述的载体(多肽)的生物活性片段。

[0163] 因此,本发明包括在此所述载体的原始多肽、片段(修饰或未修饰的)、类似物(修饰或未修饰的)、衍生物(修饰或未修饰的)、同系物(修饰或未修饰的)形式的生物活性多肽。

[0164] 因此,在此包括与原始多肽相比较具有不显著破坏所需生物活性的修饰的任何多肽。本领域公知,可以对本发明的多肽进行各种修饰而不会有害地影响它们的生物活性。另一方面,这些修饰可以保持或提高原始多肽的生物活性或可以最佳化本发明多肽的一个或多个在某些情况下可能是需要的或理想的特性(例如,稳定性、生物利用率等)。本发明的多肽包括,例如,含有通过自然过程如翻译后加工或通过本领域已知的化学修饰技术修饰的氨基酸序列的那些多肽。修饰可以发生在多肽的任何位置,包括多肽主链、氨基酸侧链和氨基-或羧基-末端。可以理解在指定多肽中的几个位点上可以存在相同或不同程度的相同类型的修饰。此外,指定的多肽可以含有许多类型的修饰。多肽作为泛素化的结果可以是分支的,并且它们可以是环状的,具有或不具有分支。环状、分支和分支环状多肽可以由翻译后自然过程产生或可以由合成方法制得。修饰包括,例如,并且不受限制,聚乙二醇化、乙酰化、酰化、乙酰亚氨基甲基(Acm)基团的添加、ADP-核糖基化、烷基化、酰胺化、生物素化、甲氨酰化、羧乙基化、酯化、共价连接黄素、共价连接血红素部分、共价连接核苷酸或核苷酸衍生物、共价连接药物、共价连接标记(例如,荧光性的、放射活性的,等)、共价连接脂质或脂质衍生物、共价连接磷脂酰肌醇、交联、环化、二硫键形成、脱甲基、共价交联的形成、胱氨酸的形成、焦谷氨酸的形成、甲酰化、 γ -羧基化、糖基化、GPI锚形成、羟基化、碘化、甲基化、肉豆蔻酰化、氧化、蛋白水解加工、磷酸化、异戊二烯基化、外消旋化、硒酰化、硫酸盐化、转移-RNA介导的氨基酸添加至蛋白质如精氨酰化和泛素化等。在此应当理解本发明包括对在此所述的多肽多于一个的修饰达到生物活性与原始(亲本)多肽相似的程度。

[0165] 如上所述,肽修饰可以包括,例如,多肽序列中的氨基酸插入(即,添加)、缺失和置换(即,替换),保守性或非保守性的(例如,D-氨基酸、脱氨基酸),其中这样的改变基本上没有改变该多肽的整体生物活性。

[0166] 置换的实例可以是保守性置换(即,其中一个残基由另一个相同大类或组的残基替换)或当需要时,是非保守性置换(即,其中一个残基由另一种类型的氨基酸替换)。此外,非天然存在的氨基酸可以替代天然存在的氨基酸(即,非天然存在的保守性氨基酸置换或非天然存在的非保守性氨基酸置换)。

[0167] 如所理解的,天然存在的氨基酸可以被细分类为酸性、碱性、中性和极性,或中性和非极性。此外,编码氨基酸中有三个是芳香族的。不同于本发明的确定多肽的编码多肽含有氨基酸的置换密码子可能是有用的,其来自与所替代的氨基酸相同的类型或组。因此,在

某些情况下,碱性氨基酸Lys、Arg和His是可互换的;酸性氨基酸Asp和Glu是可互换的;中性极性氨基酸Ser、Thr、Cys、Gln和Asn是可互换的;非极性脂族氨基酸Gly、Ala、Val、Ile和Leu是可互换的,但由于大小Gly和Ala的更密切相关而Val、Ile和Leu彼此更密切相关,且芳香族氨基酸Phe、Trp和Tyr是可互换的。

[0168] 应当进一步注意如果多肽是合成的,还可以用不是由DNA天然编码的氨基酸(非天然存在的或非天然的氨基酸)进行置换。

[0169] 非天然存在的氨基酸在此应被理解为不是在哺乳动物中自然产生的或发现的氨基酸。非天然存在的氨基酸包括D-氨基酸、具有连接到半胱氨酸的硫原子上的乙酰氨基甲基的氨基酸、聚乙二醇化的氨基酸等。因此限定的多肽序列中包含非天然存在的氨基酸将产生原始多肽的衍生物。非天然存在的氨基酸(残基)还包括式 $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$ 的 ω 氨基酸,其中n是2-6,中性非极性氨基酸,如肌氨酸、叔丁基丙氨酸、叔丁基甘氨酸、N-甲基异亮氨酸、正亮氨酸等。苯基甘氨酸可以替代Trp、Tyr或Phe;瓜氨酸和甲硫氨酸亚砷是中性非极性的,半胱磺酸是酸性的,鸟氨酸是碱性的。脯氨酸可以被羟基脯氨酸置换并保留构象赋予特性。

[0170] 本领域已知类似物可以通过置换诱变来产生并保持本发明多肽的生物活性。这些类似物使该蛋白质分子中的至少一个氨基酸残基被除去并在其位置上插入不同的残基。被确认为“保守性置换”的置换实例显示于表1中。如果这样的置换导致不理想的改变,那么引入其他类型的置换,表1中称为“示例性置换”,或关于氨基酸类别在此进一步所述的,并筛选产物。

[0171] 有时,可能所关心的是通过氨基酸置换、插入或缺失来改变多肽的生物活性。例如,多肽的修饰可以导致多肽生物活性的增加,可以调节其毒性,可以导致生物利用率或稳定性的改变,或可以调节其免疫活性或免疫特性。通过选择置换来实现功能或免疫特性的实质性修饰,这些置换对维持(a)置换区域内多肽主链的结构,例如,作为片层或螺旋构象,(b)靶向位点上分子的电荷或疏水性,或(c)侧链的大小的效果显著不同。基于常见的侧链特性将天然存在的残基分成几组:

[0172] (1) 疏水性:正亮氨酸、甲硫氨酸(Met)、丙氨酸(Ala)、缬氨酸(Val)、亮氨酸(Leu)、异亮氨酸(Ile)、组氨酸(His)、色氨酸(Trp)、酪氨酸(Tyr)、苯丙氨酸(Phe),

[0173] (2) 中性亲水性:半胱氨酸(Cys)、丝氨酸(Ser)、苏氨酸(Thr)

[0174] (3) 酸性/带负电荷的:天冬氨酸(Asp)、谷氨酸(Glu)

[0175] (4) 碱性:天冬酰胺(Asn)、谷氨酰胺(Gln)、组氨酸(His)、赖氨酸(Lys)、精氨酸(Arg)

[0176] (5) 影响链取向的残基:甘氨酸(Gly)、脯氨酸(Pro);

[0177] (6) 芳香族:色氨酸(Trp)、酪氨酸(Tyr)、苯丙氨酸(Phe)、组氨酸(His)

[0178] (7) 极性:Ser、Thr、Asn、Gln

[0179] (8) 碱性带正电荷的:Arg、Lys、His,和;

[0180] (9) 带电荷的:Asp、Glu、Arg、Lys、His

[0181] 非保守性置换需要将这些类别之一的一个成员换成另一个成员。保守性置换需要将这些组之一的一个成员换成这些组中的另一个成员。表1中列出了可替换的其他保守性氨基酸置换。

[0182] 表1氨基酸置换

[0183]

原始残基	示例性置换	保守性置换
Ala (A)	Val、Leu、Ile	Val
Arg (R)	Lys、Gln、Asn	Lys
Asn (N)	Gln、His、Lys、Arg	Gln
Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	Ser	Ser
Gln (Q)	Asn	Asn
Glu (E)	Asp	Asp
Gly (G)	Pro	Pro
His (H)	Asn、Gln、Lys、Arg	Arg
Ile (I)	Leu、Val、Met、Ala、Phe、 正亮氨酸	Leu
Leu (L)	正亮氨酸、Ile、Val、Met、 Ala、Phe	Ile
Lys (K)	Arg、Gln、Asn	Arg
Met (M)	Leu、Phe、Ile	Leu
Phe (F)	Leu、Val、Ile、Ala	Leu
Pro (P)	Gly	Gly
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr	Tyr
Tyr (Y)	Trp、Phe、Thr、Ser	Phe
Val (V)	Ile、Leu、Met、Phe、Ala、 正亮氨酸	Leu

[0184] 生物活性类似物可以是,例如,原始序列中具有至少一个(即,非保守性或保守性)氨基酸置换的类似物。生物活性类似物还可以是例如,具有一个或多个氨基酸插入的类似物。

[0185] 其他示例性类似物包括,例如:

[0186] -具有式I: X_1 -SEQ ID NO.1- X_2 的SEQ ID NO.1类似物

[0187] -具有式II: X_1 -血管肽-1- X_2 的血管肽-1类似物和

[0188] -具有式III: X_1 -血管肽-2- X_2 的血管肽-2类似物

[0189] X_1 和 X_2 可以独立地是0至约100个(例如,0至约30至50个)氨基酸的氨基酸序列。 X_1 和 X_2 可以源自牛胰蛋白酶抑制剂或牛胰蛋白酶抑制剂类似物的保守性氨基酸(同源氨基酸序列)或可以是任何其他氨基酸序列(异源氨基酸序列)。式I、II或III的化合物还可以包含血管肽-1、血管肽-2或SEQ ID NO.1的氨基酸序列内的氨基酸置换、缺失或插入。然而,该类类似物优选是生物活性的,如通过在此所述的测定之一或通过任何相似或等价测定所确定的。

[0190] 可以使用在此所述的测定或方法之一来鉴定生物活性多肽(例如,载体)。例如,候选载体可以通过常规肽合成生产,与在此所述的红豆杉醇缀合并在在此所述的体内模型中

测试。例如,可以基于与没有用缀合物治疗的对照相比较提高已经注射了肿瘤细胞并用缀合物治疗的动物的存活率的功效来鉴定生物活性载体。此外,可以基于原位脑灌注测定中其在实质中的位置来鉴定生物活性载体。

[0191] 在此应当理解,如果对于本发明的特定特征(例如,温度、浓度、时间等)提及“范围”或“一组物质”,则本发明涉及并在此明确地引入每个具体的成员和其中任何亚范围或亚组的组合。因此,应将任何指定的范围或组理解为单独提及某个范围或组的每个成员以及其中所包括的每个可能的亚范围或亚组的简化方式;并且对于其中的任何亚范围或亚组同样如此。因此,例如,

[0192] -对于10至18个氨基酸的长度,应当理解为在此具体引入每个个别的长度,例如,18、17、15、10的长度,和其之间的任何数目等;因此,除非特别指出,应将在此提及的每个范围理解为包括两个端点。例如,5至10个氨基酸长的表述应被理解为包括5和10;

[0193] -关于其他参数如序列、长度、浓度、元件等...同样如此

[0194] 在此特别应当理解在此限定的序列、区域、部分各自包括所述的每个个别的序列、区域、部分以及每个可能的亚序列、亚区域、亚部分,不管将这样的亚序列、亚区域、亚部分定义为肯定包括特定的可能性、排除特定的可能性还是其组合;例如对于区域的排除性定义应当如下:“只要所述多肽不短于4、5、6、7、8或9个氨基酸。另外否定性限制的另一实例如下:包含SEQ ID NO.:X的序列,排除SEQ ID NO.:Y的多肽;等。否定性限制的再一实例如下:只要所述多肽不是(不包含或不由其构成)SEQ ID NO.:Z。

[0195] 附图简述

[0196] 附图中说明了本发明的典型实施方案,其中

[0197] 图1说明了使用Tricine凝胶分析的实例;

[0198] 图2说明了本发明的载体或媒介物与紫杉醇连接的方法;

[0199] 图3说明了使用与牛胰蛋白酶抑制剂缀合的紫杉醇对Lewis大鼠的成胶质细胞瘤模型的治疗效果;

[0200] 图4说明了使用与血管肽-1缀合的紫杉醇对裸鼠的成胶质细胞瘤模型的治疗效果;

[0201] 图5说明了使用交联剂BS³使牛胰蛋白酶抑制剂与IgG缀合的方案;

[0202] 图6说明了使用交联剂硫代-EMCS使牛胰蛋白酶抑制剂与IgG缀合的方案;

[0203] 图7说明了IgG-牛胰蛋白酶抑制剂缀合物的脑渗透;

[0204] 图8说明了红豆杉醇-血管肽-2缀合物对植入成胶质细胞瘤小鼠(无胸腺、裸鼠)存活的治疗效果;

[0205] 图9说明了本发明的典型多肽的结构。

[0206] 发明详述

[0207] 本发明涉及可以作为将物质、药物或其他分子转运至脑和/或中枢神经系统(CNS)中的载体的新分子。自身不能或无法穿过血脑屏障的物质、药物或其他分子当与载体连接或偶联(缀合)时将被转运穿过血脑屏障。另外,还可以观察到自身能够穿过血脑屏障的物质当与本发明的载体缀合时转运得到了提高。这样的缀合物可以为组合物,如药物组合物的形式,用于治疗病症或疾病。

[0208] 对作为载体的候选分子的设计

[0209] 在国际公开WO 2004/060403中,发明人公开了血管肽-1 (SEQ ID NO.:67) 和牛胰蛋白酶抑制剂 (SEQ ID NO.:98) 是有效的载体,用于转运所需的分子穿过血脑屏障。在此发明人证明了其他分子也可以用作载体,用于转运物质穿过血脑屏障。因此,将具有和牛胰蛋白酶抑制剂和血管肽-1相似结构域的肽和血管肽-1的修饰形式(酰胺化的,67号肽)设想为潜在的载体。这些衍生的肽类似牛胰蛋白酶抑制剂和血管肽-1,但是包含不同的氨基酸插入并带有不同的电荷。迄今,测试了表2中列出的96种肽以及序列表中列出的其他肽作为载体的可能性。

[0210] 在此应当理解以下的实验中,已经基于与其他的肽相比较较高的活性选择了肽。没有选择用于进一步实验的那些肽决不是要放弃而是旨在将其视为非功能性的。这些肽显示出显著的活性并具有作为(生物活性)载体的用途并且也包括于本发明中。

[0211] 表2. 来自与牛胰蛋白酶抑制剂和血管肽-1相似结构域的具有不同电荷和氨基酸插入的96种肽的设计

[0212] (此处插入表2)

在 SYNPEP 排好的 96 种肽 (美国, 加利福尼亚)

蛋白特征 淀粉质 肽 电荷 (+6) 电荷 (+5) 电荷 (+4)

电荷 (+3) 电荷 (+2) 电荷 (+1) 电荷 (+0)

人 人 人 人 人 人 人 人 人 人 人 人

人 人 人 人 人 人 人 人 人 人 人 人

人 人 人 人 人 人 人 人 人 人 人 人

人 人 人 人 人 人 人 人 人 人 人 人

[0213]

人 人 人 人 人 人 人 人 人 人 人 人

人 人 人 人 人 人 人 人 人 人 人 人

牛胰蛋白酶抑制剂 螺旋 折叠 血管肽 赖氨酸 N末端的

N末端的 C末端的 C末端的 电荷 电荷 电荷

电荷 电荷 电荷 电荷 电荷 电荷

Q替代F TFPI (相似结构域) 电荷+5 (人) 电荷+5 (人)

C-末端的 C-末端的 基础肽

[0214] 使用体外模型的选择

[0215] 将体外模型用于筛选测定并用于药物转运至脑的机制研究。由CELLIALTM Technologies公司研发出该有效的血脑屏障体外模型。为了得到可重复的结果,使用体外模型来评价不同载体到达脑的能力。该模型由牛脑毛细血管内皮细胞和大鼠胶质细胞的共培养物构成。它呈现出脑内皮所特有的超结构特征,包括紧密连接、缺乏穿孔、缺乏经内皮的通道、亲水性分子的低渗透性和高电阻。此外,该模型显示出多种测试分子的体外和体内分析之间良好的相关系数。迄今,获得的所有数据显示出该BBB模型通过重现一些

体内存在的细胞环境的复杂性严格地模拟了体内状况,同时保留了与组织培养相关的实验优势。许多研究已经证实了该细胞共培养物是最可重复的BBB体外模型之一。

[0216] 使用BBCEC和星形细胞的共培养物建立了BBB的体外模型。在细胞培养之前,用大鼠尾胶原蛋白覆盖在平板插入物(Millicell-PC3.0 μ M;30-mm直径)的上表面。然后将它们置于含有涂布于2mL共培养基中的滤器上表面的星形细胞和BBCEC的六孔微量平板中。将该BBCEC培养基一周更换三次。在这些条件下,7天后分化的BBCEC形成汇合单层。在达到汇合后5至7天进行实验。测量蔗糖的渗透系数来证实内皮渗透性。

[0217] 由新生大鼠的大脑皮层制备混合星形细胞的初级培养物(Dehouck M.P.,Meresse S.,Delorme P.,Fruchart J.C.,Cecchelli,R.An Easier,Reproductible,and Mass-Production Method to Study the Blood-Brain Barrier In Vitro.J.Neurochem,54,1798-1801,1990)。简而言之,除去脑膜后,将脑组织轻柔地压过82 μ m尼龙筛。将星形细胞在2mL补充了10%热灭活的胎牛血清的最佳培养基(DMEM)中以 1.2×10^5 细胞/mL的浓度涂布于六孔微量平板上。将培养基每周更换两次。

[0218] 从Cellial Technologies获得牛大脑毛细血管内皮细胞(BBCEC)。在补充了10%(v/v)马血清和10%热灭活的小牛血清、2mM谷氨酰胺、50 μ g/mL庆大霉素和1ng/mL基础成纤维细胞生长因子(每隔一天加入)的DMEM培养基存在下培养细胞。

[0219] 最初,进行一级选择,使用BBB的体外模型测试表2中所述的96种肽作为载体。将每种肽加到用内皮细胞覆盖或没有覆盖的插入物的上表面,在37 $^{\circ}$ C保持90分钟。孵育后,通过电泳解析位于室下表面的肽。用考马斯蓝将电泳凝胶染色来显现所述肽,如图1中所示的一些肽(不限于此)。在此通常将血管肽-1(SEQ ID NO.:67或67号肽(酰胺化形式))用作参照或用于比较目的。图1中,将每种涂布于滤器上表面的初始肽加载于电泳凝胶(ini)上作为对照。转胞吞作用90分钟后,将覆盖了(+)或没有覆盖(-)内皮细胞的滤器基底外侧面的50 μ l体积也加载于Tricine凝胶上。为了显现,用考马斯蓝将肽凝胶染色。

[0220] 在一级筛选后,选择通过考马斯蓝染色在室下表面检测到的肽(5、8、45、67、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、81、82、90和91)用于进一步研究,使用碘化肽。简而言之,使用来自Sigma的碘-珠用标准程序将选定的肽碘化。每种蛋白质使用两个碘-珠。在3ml WhatmanTM滤器上用磷酸盐缓冲液(PB)将这些珠粒洗涤两次并重悬浮于60 μ l的PB中。在室温下将来自Amersham-Pharmacia biotech的 125 I(1mCi)加入到珠粒悬浮液中保持5分钟。通过加入100 μ g(80-100 μ l)珠粒悬浮液来开始每种肽的碘化。在室温下孵育10分钟后,将上清液施加到预先填充了5ml来自Pierce的交联葡聚糖TM的脱盐柱上并用10ml PBS洗脱 125 I-蛋白质。收集0.5ml的级分并测量5 μ l的各级分中的放射性。汇集对应于 125 I-蛋白质的级分并对pH7.4的Ringer/Hepes缓冲液渗析。放射性标记的效率为 $0.6-1.0 \times 10^8$ cpm/100 μ g蛋白质。

[0221] 还使用BBB的体外模型研究了碘化肽。在37 $^{\circ}$ C将每种肽加到覆盖了或没有覆盖内皮细胞的插入物的上表面,保持90分钟。孵育后,对位于室下表面的肽进行TCA沉淀。将结果表示为cpm比率。对于每种 125 I-肽,将底部室中的cpm数目除以加入覆盖了内皮细胞(+细胞/初始)或未覆盖(-细胞/初始)的滤器的cpm总数。还计算了存在于用内皮细胞覆盖或没有覆盖的滤器的底部室中的 125 I-肽数目之间的比率(+细胞/-细胞)。非常低的-细胞/初始比率表示滤器可能干扰肽(肽5和8)。高的+细胞/初始和+细胞/-细胞比率表示肽较好地穿过了脑内皮细胞。之前选定的18种肽的结果显示于表3中。

[0222] 表3

[0223] 在二级筛选后肽的筛选结果

[0224]

#肽	比率		
	-细胞/初始	+细胞/初始	+细胞/-细胞
5	0.111	0.051	0.46
8	0.086	0.039	0.46
45	0.163	0.049	0.30
67	0.403	0.158	0.39
70	0.143	0.032	0.23
71	0.072	0.027	0.37
72	0.209	0.029	0.014
73	0.056	0.017	0.30
74	0.146	0.036	0.24
75	0.207	0.087	0.42
76	0.222	0.084	0.38
77	0.224	0.063	0.28
78	0.125	0.075	0.60
79	0.194	0.078	0.40
81	0.203	0.088	0.43
82	0.120	0.043	0.36
90	0.284	0.134	0.47
91	0.406	0.158	0.30
牛胰蛋白酶抑制剂	0.260	0.022	0.08

[0225] 从这些结果中,选择+细胞/-细胞比率一般高于0.35的12种肽,即,5、8、67、75、76、77、78、79、81、82、90和91。由于它们的+细胞/-细胞比率(>0.2),还选择了#91和#77肽用于进一步研究。

[0226] 然后通过使用体外BBB模型估算它们的渗透性系数来研究12种选定的肽。在星形细胞存在下生长于滤器上的BBCEC单层上的BBB模型中通过测量 $[^{14}\text{C}]$ 蔗糖渗透性来确定250nM每种选定的肽对BBB完整性的影响。为了完成该测试,将生长于插入物上的脑内皮细胞单层转移至每孔(基底外侧区室)含有2mL Ringer-Hepes的6-孔平板中,在37℃下保持两

小时。Ringer-Hepes溶液由150mM NaCl、5.2mM KCl、2.2mM CaCl₂、0.2mM MgCl₂、6mM NaHCO₃、5mM Hepes、2.8mM Hepes构成、pH7.4。在每个顶端室中,将培养基更换为1mL含有标记的[¹⁴C]-蔗糖的Ringer-Hepes。在不同时间,将插入物置于另一个孔中。在没有细胞的滤器或覆盖了BBCEC细胞的滤器上,在37℃测量[¹⁴C]蔗糖通过。在时间为零时的实验开始时加入肽。将结果以蔗糖清除(μl)作为时间(分钟)的函数来作曲线。

[0227]

$$\text{清除}(\mu\text{l}) = \frac{[\text{C}]\text{A} \times \text{VA}}{[\text{C}]\text{L}}$$

[C]A=腔外(Abluminal)痕量浓度

VA=腔外室的体积

[C]L=腔内(Luminal)痕量浓度

[0228] 线性变化的斜率(μl/分钟)是在肽存在下没有细胞的滤器(PSf)和覆盖了BBCEC细胞的滤器(PS_t)的蔗糖渗透系数。

[0229] 按照以下计算渗透系数(Pe):

$$[0230] \quad 1/\text{Pe} = (1/\text{PS}_t - 1/\text{PS}_f) / \text{滤器面积}(4.2\text{cm}^2)$$

[0231] 选择具有最高Pe的肽:67、76、90、91、5、79、8和78。

[0232] 将原位脑灌注(小鼠中)用作第四级选择来选择最佳的肽。该程序还将脑血管区室中剩余的化合物与已经穿过腔外内皮膜进入脑实质的化合物区分开来。实际上,灌注后毛细血管减液的技术可用于测量分子是否真正穿过内皮进入了脑实质。使用该技术,在此证明了特异性肽趋于在脑实质部分中累积(参见表4)。

[0233] 表4

[0234]

#肽	分布的体积(灌注5分钟)				
	匀浆	毛细血管		实质	
	(ml/100g)	(ml/100g)	%	(ml/100g)	%
5	312	217	73	95	27
8	250	204	82	46	18
25	1141	1082	95	60	5
67	38	13	34	25	65
76	40	16	40	24	60
78	198	181	90	16	10
79	70	52	74	18	26
90	87	76	88	11	12
91	47	24	59	23	41

[0235] 四种肽,即5、67、76和91,显示出在实质中最高水平的分布,体积高于20ml/100g并且其代表见于整个大脑(匀浆)体积的至少25%,因此显示出作为用作转运载体的最高潜能。排除了肽79,因为其在脑实质中的体积分布较低(18ml/100g)。肽67代表发明人递交的

在先申请中所述的血管肽-1的酰胺化形式。肽的酰胺化影响了肽的总电荷。如在表2和3中明显可见的,具有不同电荷的两种肽不一定具有相同的活性。

[0236] 因此本发明的载体可以用于转运物质穿过血脑屏障的方法中,该方法包括将含有连接到载体如牛胰蛋白酶抑制剂或其功能衍生物(即,牛胰蛋白酶抑制剂类似物、牛胰蛋白酶抑制剂片段、牛胰蛋白酶抑制剂衍生物、牛胰蛋白酶抑制剂片段的类似物)上的活性成分或药剂给药于个体。

[0237] 可以动脉内、鼻内、腹膜内、静脉内、肌内、皮下、经皮或口服将载体和缀合物给药于患者。药剂可以是,例如,抗血管生成化合物。该药剂可以具有160,000道尔顿的最大分子量。如在此所讨论的,该药剂可以是标记或药物,如小分子药物、蛋白质、肽或酶。药物可以适于治疗,例如,患者的神经系统疾病或中枢神经系统障碍。药物可以是细胞毒性药物并且标记可以是可检测标记如放射活性标记、绿色荧光蛋白、组胺酸标记蛋白或 β -半乳糖苷酶。可以将药剂递送到,例如,患者的中枢神经系统中。

[0238] 根据另一个实施方案,其中所提及的用途、方法、化合物、物质、药物或药品可以不改变患者血脑屏障的完整性。

[0239] 根据本发明另外的实施方案,肽可以选自牛胰蛋白酶抑制剂、牛胰蛋白酶抑制剂片段(SEQ ID NO:1)和SEQ ID NO:1至97、99、100或101中限定的任一种肽。

[0240] 例如,肽5、76、91、97和97以及肽67可以用于本发明中,通过使它们与物质或化合物连接,用于转运所述物质或化合物穿过患者的血脑屏障。所述物质或化合物可以适于治疗神经系统疾病或治疗中枢神经系统障碍。

[0241] 本发明的载体,如例如,肽5、76、91和97以及肽67可以与可检测标记连接或用可检测标记来标记,可检测标记如放射性成像剂,如发射射线的那些,例如使用放射性成像剂-抗体-载体缀合物用于检测疾病或病症,其中抗体与疾病或病症特异性抗原结合。除抗体以外的并且本领域已知并常用的其他结合分子也包括于本发明中。另外,本发明的载体或其功能衍生物或其混合物可以与治疗剂连接,来治疗疾病或病症,或可以与其混合物连接或用其混合物标记。可以通过在允许物质转运穿过血脑屏障的条件下将本发明的载体-物质缀合物给药于个体来实现治疗。

[0242] 在此使用的治疗剂可以是药物、药品、发射射线的物质、细胞毒素(例如,化疗剂)和/或其生物活性片段,和/或其混合物以允许细胞杀伤,或可以是用于治疗、治愈、缓解、改善、减轻或抑制所治疗个体的疾病或病症的物质。治疗剂可以是合成产物或真菌、细菌或其它微生物如支原体、病毒等、动物如爬行动物或植物来源的产物。治疗剂和/或其生物活性片段可以是酶促活性剂和/或其片段,或可以通过抑制或阻断重要和/或必要细胞途径或通过与重要和/或必要天然存在的细胞成分竞争来起作用。

[0243] 合适的发射射线的放射性成像剂(可检测放射标记)的实例通过铟-111、镓-67或低剂量碘-131来举例说明。

[0244] 用于本发明中可检测标记或标志可以是放射性标记、荧光标记、核磁共振活性标记、发光标记、发色团标记、PET扫描仪的正电子发射同位素、化学发光标记或酶标记。荧光标记包括但不限于,绿色荧光蛋白(GFP)、荧光素和若丹明。化学发光标记包括但不限于,萤光素酶和 β -半乳糖苷酶。酶标记包括但不限于过氧化物酶和磷酸酶。组胺酸标记也可以是可检测标记。

[0245] 预期物质可以在转运穿过血脑屏障后从载体中释放出来,例如通过酶切割或载体和物质之间化学键的断裂。然后释放剂可以在载体不存在下以其预计能力来起作用。

[0246] 通过参照以下实施例将更容易理解本发明,给出这些实施例来说明本发明而不是限制其范围。用牛胰蛋白酶抑制剂给出了以下实施例。然而,关于它们作为转运物质穿过血脑屏障的载体的潜能,在此已经证明了本发明的分子具有与牛胰蛋白酶抑制剂共同的特性。因此这些实施例适用于本发明的分子。

[0247] 实施例I

[0248] 药物缀合的策略(紫杉醇)

[0249] 对于缀合,紫杉醇(TAXOL™,红豆杉醇)具有2个策略位置(位置C2'和C7)。图2说明了本发明的载体与紫杉醇连接的方法。简而言之,将紫杉醇与琥珀酸酐嘧啶在室温反应3小时以在位置2'上连接琥珀酰基团。这样的2'-琥珀酰紫杉醇在位置2'上具有可断裂的酯键,在断裂时其可以简单地释放琥珀酸。如果需要,该可断裂的酯键可以进一步用于使用连接物的各种修饰。然后将所得到的2'-O-琥珀酰-紫杉醇与DMSO中的EDC/NHS在室温反应9小时,接着加入Ringer/DMSO中的载体,在室温持续另外的4小时反应时间。通过HPLC监控图2中所示的缀合反应。将每个中间产物,如紫杉醇、2'-O-琥珀酰-紫杉醇和2'-O-NHS-琥珀酰-紫杉醇纯化,并使用不同方法如HPLC、薄层色谱、NMR(¹³C或¹H交换)、熔点、质谱来证实。通过质谱和SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳来分析最终的缀合物。这允许确定每个载体上缀合的紫杉醇分子的数量。

[0250] 确定牛胰蛋白酶抑制剂-紫杉醇缀合物的转吞胞能力并呈现于以下的表5中。

[0251] 表5

[0252] 牛胰蛋白酶抑制剂-红豆杉醇缀合物穿过BBB的转吞胞能力的确定

[0253]

	转吞胞作用 (Pe 10 ⁻³ cm/分钟)	蔗糖完整性 (Pe 10 ⁻³ cm/分钟)
对照		
牛胰蛋白酶抑制剂	0.2	0.28
牛胰蛋白酶抑制剂-紫杉醇	0.21	0.24
红豆杉醇		0.22

[0254] • 缀合物没有影响牛胰蛋白酶抑制剂穿过该屏障的能力

[0255] • 还维持了该屏障的完整性

[0256] 如表5中所看到的,紫杉醇与牛胰蛋白酶抑制剂的缀合仍然能过穿过血脑屏障的体外模型而没有影响蔗糖完整性,因此证明了本发明的分子(在此也称为载体)与大的化学个体如紫杉醇缀合时仍然保持了它们的活性。

[0257] 然后进行了大鼠脑肿瘤模型的存活研究来证实缀合的紫杉醇在体内是否仍然是有活性的。对于大鼠脑肿瘤模型,大鼠接受脑内植入50000个CNS-1成胶质瘤细胞。三(3)天后,动物通过静脉内注射接受媒介物(牛胰蛋白酶抑制剂)、紫杉醇(5mg/kg)或紫杉醇-牛胰蛋白酶抑制剂(5mg/kg)的治疗。然后每周给予治疗直至将动物处死(参见图3)。每天监控大

鼠的临床症状和体重减轻。根据优质动物规范 (good animal practice) 的实验方案, 当观察到体重减轻持续了连续3天时或在体重减轻超过动物最初体重的20%之前将动物处死。

[0258] 使用相同的实验方案, 以最大耐受剂量 (54mg/kg) 单独注射紫杉醇时, 不能提高鼠的存活率 (Laccabue等, 2001Cancer, 92 (12) : 3085-92)。

[0259] 还在植入人脑肿瘤异种移植物的鼠中进行了存活研究。对于小鼠脑肿瘤模型, 小鼠接受脑内植入500000个人U87成胶质瘤细胞。植入3天后, 动物通过静脉内注射接受紫杉醇-血管肽1 (5mg/kg) 或媒介物的治疗。然后每周给予治疗直至将动物处死。每天监控小鼠的临床症状和体重减轻。根据优质动物规范的实验方案, 当观察到体重减轻持续了连续3天时或在体重减轻超过动物最初体重的20%之前将动物处死。此刻观察到对照组的中值存活是 19 ± 2 天。对于统计学分析, 认为20%的存活增加是显著性的。如图4中所看到的, 缀合物紫杉醇-血管肽-1保持了其活性, 具有统计学上显著的效果。与对照组相比较时, 紫杉醇-血管肽1治疗的动物的存活时间显著延长 ($p < 0.05, n = 8$)。

[0260] 在这两项存活研究中获得的结果表明紫杉醇与本发明载体的缀合提高了动物存活率。

[0261] 实施例II

[0262] 抗体缀合的策略

[0263] 由于蛋白质通常具有几个氨基可用于缀合, 所以将使用硫代-NHS/EDC激活的胺偶联用于交联治疗性抗体与本发明的载体。选择该方法是因为它是一种快速、简单和可重复的偶联技术, 因为所得到的缀合物是稳定的, 同时仍然保留抗体的生物活性并且其在偶联过程中具有容易受控的高缀合能力和低的非特异性相互作用。

[0264] 已经将抗体或抗体片段 (Fab和Fab' ₂) 与本发明的载体缀合以提高它们向大脑的递送。各种缀合方法已经用于首先使IgG和牛胰蛋白酶抑制剂缀合, 已经证明本发明的载体确切地相当于牛胰蛋白酶抑制剂。

[0265] 对于IgG的缀合, 已经测试了不同的交联剂, 如BS³ [双 (磺基琥珀酰亚胺基) 辛二酸酯]、NHS/EDC (N-羟基琥珀酰亚胺和N-乙基-N' (二甲基氨基丙基) 碳化二亚胺或硫代-EMCS ([N-ε-马来酰亚胺己酸] 酰肼)。BS³ 是靶向可及伯胺的同双功能N-羟基琥珀酰亚胺酯。NHS/EDC引起伯胺基团与羰基的缀合。硫代-EMCS是反应朝向: 巯基和氨基的异双功能反应性基团 (马来酰亚胺和NHS-酯)。

[0266] 首先评价了使用交联剂BS³ (图5) 或硫代-EMCS (图6) 的IgG与牛胰蛋白酶抑制剂的缀合。

[0267] 然后测试了IgG或IgG-缀合物穿过BBB的转运。使用本发明人实验室改进的原位脑灌注方法测量了 [¹²⁵I]-IgG至鼠脑毛细血管腔内侧的吸收以用于研究鼠脑中的药物吸收 (Dagenais等, 2000, J.Cereb.Blood Flow Metab. 20 (2) : 381-386)。通过Smith以前所述的确定BBB转运常数 (1996, Pharm.Biotechnol. 8: 285-307)。将IgG吸收表示为来自以下等式的分布体积 (Vd) :

$$[0268] \quad Vd = Q^*_{br} / C^*_{pf}$$

[0269] 其中Q^{*}_{br}是计算的每克右脑半球 [¹²⁵I]-IgG或 [¹²⁵I]-IgG-牛胰蛋白酶抑制剂缀合物的量且C^{*}_{pf}是在灌注液中测量的标记的痕量浓度。

[0270] 该实验的结果表明 [¹²⁵I]-IgG-牛胰蛋白酶抑制剂缀合物的脑吸收高于未缀合

[¹²⁵I]-IgG的脑吸收(参见图7)。

[0271] IgG与牛胰蛋白酶抑制剂的缀合提高了它们在体内脑实质中的累积。

[0272] 实施例III

[0273] 红豆杉醇-血管肽-2缀合物对小鼠存活的影响

[0274] 使用红豆杉醇-血管肽-2(在此称为97号肽(血管肽2是未酰胺化的))进行了该研究以确定红豆杉醇与血管肽-2的缀合是否能够提高小鼠存活率。SEQ ID NO.:97中显示了血管肽-2的结构。对于该实验,小鼠接受脑内移植500000个人U87成胶质瘤细胞。植入后3天,用媒介物(DMSO/Ringer-Hepes80:20v/v(即,对照))或红豆杉醇-血管肽-2缀合物(3:1,即,每种肽3个红豆杉醇分子的比率;Tx1An2(5mg/kg))通过尾静脉注射来治疗动物(图8)。每天监控小鼠的临床症状和体重减轻。给予治疗直至将动物处死。如表6中所示的,我们观察到对照组的中值存活为18天而接受红豆杉醇-血管肽-2缀合物的小鼠的中值存活为21天(图8)。对于用红豆杉醇-血管肽-2缀合物治疗的小鼠所获得的存活曲线(红色)表示中值存活显著提高了17%(图8)。也在表6中呈现的统计学分析表明红豆杉醇-血管肽-2缀合物的给药将存活显著提高了17%(p值=0.048)。

[0275] 表6.存活研究的结果小结

[0276]

a. 中值存活	天数	提高了(%)	小鼠(n)
对照	18.0	-	7
Tx1An2 缀合物	21.0	+17	7
b. 统计学分析	(p 值)	统计学差异	
对照与 Tx1an2 缀合物	p=0.048	是	

[0277] 本申请中提及的每篇出版物、专利和专利申请的内容在此引入作为参考。

[0278] 尽管在此已经详细描述并在附图中说明了本发明,但应当理解本发明不限于在此所述的实施方案并且可以进行各种改变和改进而不脱离本发明的范围或精神。

[0279] 尽管已经结合具体的实施方案描述了本发明,但应当理解能够进一步改进且该申请意欲涵盖通常按照本发明原理的本发明任何变化、用途或改进且包括在本发明所属领域已知或常规实践内的与本发明公开内容的偏离,并且可以将这样的偏离应用于此前所述的必要特征并且落入所附权利要求的范围中。

[0280] 序列表

[0281] SEQ ID NO.:

```

1 T F V Y G G C R A K R N N F K S A E D
2 T F Q Y G G C M G N G N N F V T E K E
3 P F F Y G G C G G N R N N F D T E E Y
4 S F Y Y G G C L G N K N N Y L R E E E
5 T F F Y G G C R A K R N N F K R A K Y

```

[0283] 5号肽包括SEQ ID NO.:5中限定的氨基酸序列并在其C-末端是酰胺化的(参见例如图9)

[0284]

```
6 T F F Y G G C R G K R N N F K R A K Y
7 T F F Y G G C R A K K N N Y K R A K Y
8 T F F Y G G C R G K K N N F K R A K Y
9 T F Q Y G G C R A K R N N F K R A K Y
10 T F Q Y G G C R G K K N N F K R A K Y
11 T F F Y G G C L G K R N N F K R A K Y
12 T F F Y G G S L G K R N N F K R A K Y
13 P F F Y G G C G G K K N N F K R A K Y
14 T F F Y G G C R G K G N N Y K R A K Y
15 P F F Y G G C R G K R N N F L R A K Y
16 T F F Y G G C R G K R N N F K R E K Y
17 P F F Y G G C R A K K N N F K R A K E
18 T F F Y G G C R G K R N N F K R A K D
19 T F F Y G G C R A K R N N F D R A K Y
20 T F F Y G G C R G K K N N F K R A E Y
21 P F F Y G G C G A N R N N F K R A K Y
22 T F F Y G G C G G K K N N F K T A K Y
23 T F F Y G G C R G N R N N F L R A K Y
24 T F F Y G G C R G N R N N F K T A K Y
25 T F F Y G G S R G N R N N F K T A K Y
26 T F F Y G G C L G N G N N F K R A K Y
27 T F F Y G G C L G N R N N F L R A K Y
```

28 T F F Y G G C L G N R N N F K T A K Y
 29 T F F Y G G C R G N G N N F K S A K Y
 30 T F F Y G G C R G K K N N F D R E K Y
 31 T F F Y G G C R G K R N N F L R E K E
 32 T F F Y G G C R G K G N N F D R A K Y
 33 T F F Y G G S R G K G N N F D R A K Y
 34 T F F Y G G C R G N G N N F V T A K Y
 35 P F F Y G G C G G K G N N Y V T A K Y
 36 T F F Y G G C L G K G N N F L T A K Y
 37 S F F Y G G C L G N K N N F L T A K Y
 38 T F F Y G G C G G N K N N F V R E K Y
 39 T F F Y G G C M G N K N N F V R E K Y
 40 T F F Y G G S M G N K N N F V R E K Y
 41 P F F Y G G C L G N R N N Y V R E K Y
 42 T F F Y G G C L G N R N N F V R E K Y
 43 T F F Y G G C L G N K N N Y V R E K Y

[0285]

44 T F F Y G G C G G N G N N F L T A K Y
 45 T F F Y G G C R G N R N N F L T A E Y
 46 T F F Y G G C R G N G N N F K S A E Y
 47 P F F Y G G C L G N K N N F K T A E Y
 48 T F F Y G G C R G N R N N F K T E E Y
 49 T F F Y G G C R G K R N N F K T E E D
 50 P F F Y G G C G G N G N N F V R E K Y
 51 S F F Y G G C M G N G N N F V R E K Y
 52 P F F Y G G C G G N G N N F L R E K Y
 53 T F F Y G G C L G N G N N F V R E K Y
 54 S F F Y G G C L G N G N N Y L R E K Y
 55 T F F Y G G S L G N G N N F V R E K Y
 56 T F F Y G G C R G N G N N F V T A E Y
 57 T F F Y G G C L G K G N N F V S A E Y
 58 T F F Y G G C L G N R N N F D R A E Y
 59 T F F Y G G C L G N R N N F L R E E Y
 60 T F F Y G G C L G N K N N Y L R E E Y
 61 P F F Y G G C G G N R N N Y L R E E Y
 62 P F F Y G G S G G N R N N Y L R E E Y

[0286]

63 M R P D F C L E P P Y T G P C V A R I
 64 A R I I R Y F Y N A K A G L C Q T F V Y G
 65 Y G G C R A K R N N Y K S A E D C M R T C G
 66 P D F C L E P P Y T G P C V A R I I R Y F Y
 67 T F F Y G G C R G K R N N F K T E E Y

[0287]

67号肽包括SEQ ID NO.:67中限定的氨基酸序列并且在其C-末端是酰胺化的(参

见例如图9)

68 K F F Y G G C R G K R N N F K T E E Y
69 T F Y Y G G C R G K R N N Y K T E E Y
70 T F F Y G G S R G K R N N F K T E E Y
71 C T F F Y G C C R G K R N N F K T E E Y
[0288] 72 T F F Y G G C R G K R N N F K T E E Y C
73 C T F F Y G S C R G K R N N F K T E E Y
74 T F F Y G G S R G K R N N F K T E E Y C
75 P F F Y G G C R G K R N N F K T E E Y
76 T F F Y G G C R G K R N N F K T K E Y

[0289] 76号肽包括SEQ ID NO.:76中限定的氨基酸序列并且在其C-末端是酰胺化的(参见例如图9)

77 T F F Y G G K R G K R N N F K T E E Y
78 T F F Y G G C R G K R N N F K T K R Y
79 T F F Y G G K R G K R N N F K T A E Y
80 T F F Y G G K R G K R N N F K T A G Y
81 T F F Y G G K R G K R N N F K R E K Y
[0290] 82 T F F Y G G K R G K R N N F K R A K Y
83 T F F Y G G C L G N R N N F K T E E Y
84 T F F Y G C G R G K R N N F K T E E Y
85 T F F Y G G R C G K R N N F K T E E Y
86 T F F Y G G C L G N G N N F D T E E E
87 T F Q Y G G C R G K R N N F K T E E Y
88 Y N K E F G T F N T K G C E R G Y R F
89 R F K Y G G C L G N M N N F E T L E E
[0291] 90 R F K Y G G C L G N K N N F L R L K Y
91 R F K Y G G C L G N K N N Y L R L K Y

[0292] 91号肽包括SEQ ID NO.:91中限定的氨基酸序列并且在其C-末端是酰胺化的(参见例如图9)

92 K T K R K R K K Q R V K I A Y E E I F K N Y
93 K T K R K R K K Q R V K I A Y
94 R G G R L S Y S R R F S T S T G R
95 R R L S Y S R R R F
96 R Q I K I W F Q N R R M K W K K
97 T F F Y G G S R G K R N N F K T E E Y
98 M R P D F C L E P P Y T G P C V A R I
I R Y F Y N A K A G L C Q T F V Y G G
C R A K R N N F K S A E D C M R T C G G A

[0293] 99 T F F Y G G C R G K R N N F K T K E Y
100 R F K Y G G C L G N K N N Y L R L K Y
101 T F F Y G G C R A K R N N F K R A K Y
102 N A K A G L C Q T F V Y G G C L A K R N N F
E S A E D C M R T C G G A
103 Y G G C R A K R N N F K S A E D C M R T C G
G A

104 G L C Q T F V Y G G C R A K R N N F K S A E
105 L C Q T F V Y G G C E A K R N N F K S A

[0294] SEQ ID NO.:106

[0295] atgagaccag atttctgcct cgagccgccc tacactgggc cctgcaaago tcgtatcatc
cgttacttct acaatgcaaa ggcaggcctg tgtcagacct tcgtatacgg cggctgcaga
gctaagcgta acaactcaa atccgcggaa gactgcatgc gtacttgccg tgggtgcttag

[0296] 优选的实施方式

[0297] 1.能够穿过体外测定中模仿哺乳动物血脑屏障的细胞层的生物活性多肽,所述多肽选自:

[0298] a) 包括SEQ ID NO.:1中限定的氨基酸序列的牛胰蛋白酶抑制剂片段,

[0299] b) 由SEQ ID NO.:1构成的牛胰蛋白酶抑制剂片段,

[0300] c) SEQ ID NO.:1的生物活性类似物,

[0301] d) SEQ ID NO.:1的生物活性片段,和;

[0302] e) SEQ ID NO.:1类似物的生物活性片段。

[0303] 2.能够穿过体外测定中模仿哺乳动物血脑屏障的细胞层的生物活性多肽,所述多肽选自:

[0304] -19至50个氨基酸长的牛胰蛋白酶抑制剂片段,其可以包括SEQ ID NO.:1,

[0305] -由SEQ ID NO.:1构成的牛胰蛋白酶抑制剂片段,

[0306] -19至50个氨基酸长的SEQ ID NO.:1的生物活性类似物,只要所述类似物不包括SEQ ID NO.:102、103、104或105并且只要当所述类似物由SEQ ID NO.:67构成时,所述类似物是酰胺化的,

[0307] -10至18个氨基酸的SEQ ID NO.:1的生物活性片段,和;

- [0308] -约10至18个氨基酸的SEQ ID NO.:1的生物活性片段。
- [0309] 3.项目1或2的多肽,其中所述SEQ ID NO.:1的生物活性类似物选自:
- [0310] a) 包括与SEQ ID NO.:1的氨基酸序列至少35%同一性的SEQ ID NO.:1类似物,
- [0311] b) 包括与SEQ ID NO.:1的氨基酸序列至少40%同一性的SEQ ID NO.:1类似物,
- [0312] c) 包括与SEQ ID NO.:1的氨基酸序列至少50%同一性的SEQ ID NO.:1类似物,
- [0313] d) 包括与SEQ ID NO.:1的氨基酸序列至少60%同一性的SEQ ID NO.:1类似物,
- [0314] e) 包括至少70%SEQ ID NO.:1的氨基酸序列同一性的SEQ ID NO.:1类似物,
- [0315] f) 包括至少80%SEQ ID NO.:1的氨基酸序列同一性的SEQ ID NO.:1类似物,
- [0316] g) 包括至少90%SEQ ID NO.:1的氨基酸序列同一性的SEQ ID NO.:1类似物,
- [0317] h) 包括至少95%SEQ ID NO.:1的氨基酸序列同一性的SEQ ID NO.:1类似物。
- [0318] 4.项目1的多肽,其中所述的SEQ ID NO.:1的生物活性类似物包括选自SEQ ID NO.:2至SEQ ID NO.:62、SEQ ID NO.:68至SEQ ID NO.:93和SEQ ID NO.:97中限定的氨基酸序列的氨基酸序列。
- [0319] 5.项目1的多肽,其中所述SEQ ID NO.:1的生物活性类似物包括SEQ ID NO.:67中限定的氨基酸序列。
- [0320] 6.项目5的多肽,其中所述多肽是酰胺化的。
- [0321] 7.项目1的多肽,其中所述SEQ ID NO.:1的生物活性类似物包括SEQ ID NO.:99、100或101中限定的氨基酸序列。
- [0322] 8.项目1至4或7任一项的多肽,其中所述氨基酸序列是酰胺化的。
- [0323] 9.项目1的多肽,其中所述牛胰蛋白酶抑制剂片段是10至50个氨基酸长。
- [0324] 10.项目10的多肽,其中所述牛胰蛋白酶抑制剂片段是10至50个氨基酸长。
- [0325] 11.项目4至7任一项的多肽,其中所述氨基酸序列包括1至12个氨基酸置换。
- [0326] 12.项目4至7任一项的多肽,其中所述氨基酸序列包括1至10个氨基酸置换。
- [0327] 13.项目4至7任一项的多肽,其中所述氨基酸序列包括1至5个氨基酸置换。
- [0328] 14.项目11的多肽,其中所述氨基酸置换是非保守性的。
- [0329] 15.项目11的多肽,其中所述氨基酸置换是保守性的氨基酸置换。
- [0330] 16.项目3的多肽,其中所述类似物与SEQ ID NO.:1相应位置氨基酸不同的至少一个氨基酸是保守性氨基酸置换。
- [0331] 17.项目1的多肽,其中所述SEQ ID NO.:1的生物活性片段是10至18个氨基酸长。
- [0332] 18.项目1的多肽,其中所述SEQ ID NO.:1类似物的生物活性片段是10至18个氨基酸长。
- [0333] 19.项目17的多肽,其中所述SEQ ID NO.:1的生物活性片段包括SEQ ID NO.:1的至少10个氨基酸。
- [0334] 20.项目17的多肽,其中所述SEQ ID NO.:1类似物的生物活性片段包括所述SEQ ID NO.:1类似物的至少10个氨基酸。
- [0335] 21.一种缀合物,包括:
- [0336] a) 选自项目1至20任一项多肽的载体;和
- [0337] b) 选自药物、可检测标记、蛋白质、基于蛋白质的化合物和多肽的物质。
- [0338] 22.一种缀合物,包括:

- [0339] a) 选自项目1至20任一项多肽的载体,只要当所述载体由SEQ ID NO:67构成时,所述载体是酰胺化的,和;
- [0340] b) 选自药物、可检测标记、蛋白质、基于蛋白质的化合物和多肽的物质。
- [0341] 23. 项目21或22的缀合物,其中所述可检测标记是放射性成像剂。
- [0342] 24. 项目21或22的缀合物,其中所述基于蛋白质的化合物是抗体或其抗体片段。
- [0343] 25. 项目21或22的缀合物,其中所述物质是小分子药物。
- [0344] 26. 项目25的缀合物,其中所述小分子药物是抗癌药物。
- [0345] 27. 项目26的缀合物,其中所述抗癌药物选自紫杉醇、长春花碱、长春新碱、依托泊苷、阿霉素、环磷酰胺、泰索帝、苯丙氨酸氮芥、苯丁酸氮芥及其组合。
- [0346] 28. 选自项目1至20任一项多肽的载体或项目21至27任一项缀合物的用途,用于转运物质穿过需要该物质的哺乳动物的血脑屏障。
- [0347] 29. 选自项目1至20任一项多肽的载体或项目21至27任一项缀合物的用途,用于转运物质穿过需要该物质的哺乳动物的血脑屏障,只要当所述载体由SEQ ID NO:67构成时,所述载体是酰胺化的。
- [0348] 30. 项目28或29的用途,其中所述物质是可检测标记。
- [0349] 31. 项目28或29的用途,其中所述可检测标记是放射性成像剂。
- [0350] 32. 项目28或29的用途,其中所述物质是基于蛋白质的化合物。
- [0351] 33. 项目32的用途,其中所述基于蛋白质的化合物是抗体或其抗体片段。
- [0352] 34. 项目28或29的用途,其中所述物质是小分子药物。
- [0353] 35. 项目34的用途,其中所述小分子药物是抗癌药物。
- [0354] 36. 项目35的用途,其中所述抗癌药物选自紫杉醇、长春花碱、长春新碱、依托泊苷、阿霉素、环磷酰胺、泰索帝、苯丙氨酸氮芥、苯丁酸氮芥及其组合。
- [0355] 37. 选自项目1至20任一项多肽的载体或项目21至27任一项的缀合物在制造用于治疗脑或神经系统疾病或用于诊断脑或神经系统疾病药物中的用途。
- [0356] 38. 选自项目1至20任一项多肽的载体或项目21至27任一项的缀合物在制造用于治疗脑或神经系统疾病或用于诊断脑或神经系统疾病药物中的用途,只要当所述载体由SEQ ID NO:67构成时,所述载体是酰胺化的。
- [0357] 39. 项目37或38的用途,其中所述神经系统疾病选自脑瘤、脑转移瘤、精神分裂症、癫痫、阿尔茨海默氏病、帕金森病、亨廷顿病、中风和血脑屏障相关的机能失常。
- [0358] 40. 项目39的用途,其中所述血脑屏障相关的机能失常疾病是肥胖。
- [0359] 41. 治疗患有神经系统疾病患者的方法,包括施用选自项目1至20任一项多肽的载体或项目21至27任一项的缀合物。
- [0360] 42. 治疗患有神经系统疾病患者的方法,包括施用选自项目1至20任一项多肽的载体或项目21至27任一项的缀合物,只要当所述载体由SEQ ID NO:67构成时,所述载体是酰胺化的。
- [0361] 43. 诊断有此需要的患者中神经系统疾病的方法,包括施用选自项目1至20任一项多肽的载体或项目21至27任一项的缀合物。
- [0362] 44. 诊断有此需要的患者中神经系统疾病的方法,包括施用选自项目1至20任一项多肽的载体或项目21至27任一项的缀合物,只要当所述载体由SEQ ID NO:67构成时,所

述载体是酰胺化的。

[0363] 45. 选自项目1至20任一项多肽的载体或项目21至27任一项的缀合物用于治疗患有神经系统疾病的哺乳动物或用于诊断有此需要的哺乳动物中神经系统疾病的用途。

[0364] 46. 选自项目1至20任一项多肽的载体或项目21至27任一项的缀合物用于治疗患有神经系统疾病的哺乳动物或用于诊断有此需要的哺乳动物中神经系统疾病的用途, 只要当所述载体由SEQ ID NO:67构成时, 所述载体是酰胺化的。

[0365] 47. 项目45或46的用途, 其中所述神经系统疾病选自脑瘤、脑转移瘤、精神分裂症、癫痫、阿尔茨海默氏病、帕金森病、亨廷顿病、中风和血脑屏障相关的机能失常。

[0366] 48. 项目47的用途, 其中所述血脑屏障相关的机能失常疾病是肥胖。

[0367] 49. 一种药物组合物, 包括

[0368] a) 选自项目1至20任一项多肽的载体或项目21至27任一项的缀合物, 和;

[0369] b) 药物学上可接受的载体。

[0370] 50. 一种药物组合物, 包括

[0371] a) 选自项目1至20任一项多肽的载体或项目21至27任一项的缀合物, 只要当所述载体由SEQ ID NO:67构成时, 所述载体是酰胺化的, 和;

[0372] b) 药物学上可接受的载体。

[0373] 51. 项目49或50的药物组合物, 其中所述药物组合物用于治疗神经系统疾病。

[0374] 52. 项目49或50的药物组合物, 其中所述药物组合物用于诊断神经系统疾病。

[0375] 53. 编码项目1至4或7任一项多肽的核苷酸序列。

[0376] 54. 项目43的核苷酸序列, 其中所述序列由选自核糖核苷酸、脱氧核糖核苷酸及其核苷酸类似物的核苷酸构成。

序列表

<110> ANGIOCHEM INC.

<120> 转运化合物穿过血脑屏障的分子

<130> 11217-013

<140> PCT/CA2005/00158

<141> 2005-07-21

<150> US 60/653,928

<151> 2005-02-18

<160> 106

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 多肽

<400> 1

Thr Phe Val Tyr Gly Gly Cys Arg Ala Lys Arg Asn Asn Phe Lys Ser
1 5 10 15

Ala Glu Asp

[0001]

<210> 2

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 多肽

<400> 2

Thr Phe Gln Tyr Gly Gly Cys Met Gly Asn Gly Asn Asn Phe Val Thr
1 5 10 15

Glu Lys Glu

<210> 3

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 多肽

<400> 3

Pro Phe Phe Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Arg Asn Asn Phe Asp Thr
1 5 10 15

Glu Glu Tyr

<210> 4

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工

<220>
<223> 多肽
<400> 4

Ser Phe Tyr Tyr Gly Gly Cys Leu Gly Asn Lys Asn Asn Tyr Leu Arg
1 5 10 15

Glu Glu Glu

<210> 5
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 多肽

<220>
<221> MISC FEATURE
<223> 可以是酰胺化的

<400> 5

Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Cys Arg Ala Lys Arg Asn Asn Phe Lys Arg
1 5 10 15

Ala Lys Tyr

[0002] <210> 6
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 多肽

<400> 6

Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Cys Arg Gly Lys Arg Asn Asn Phe Lys Arg
1 5 10 15

Ala Lys Tyr

<210> 7
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 多肽

<400> 7

Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Cys Arg Ala Lys Lys Asn Asn Tyr Lys Arg
1 5 10 15

Ala Lys Tyr

<210> 8
<211> 19
<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 多肽

<400> 8

Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Cys Arg Gly Lys Lys Asn Asn Phe Lys Arg
1 5 10 15

Ala Lys Tyr

<210> 9

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 多肽

<400> 9

Thr Phe Gln Tyr Gly Gly Cys Arg Ala Lys Arg Asn Asn Phe Lys Arg
1 5 10 15

Ala Lys Tyr

<210> 10

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工

[0003]

<220>

<223> 多肽

<400> 10

Thr Phe Gln Tyr Gly Gly Cys Arg Gly Lys Lys Asn Asn Phe Lys Arg
1 5 10 15

Ala Lys Tyr

<210> 11

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 多肽

<400> 11

Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Cys Leu Gly Lys Arg Asn Asn Phe Lys Arg
1 5 10 15

Ala Lys Tyr

<210> 12

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 多肽

<400> 12

Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Ser Leu Gly Lys Arg Asn Asn Phe Lys Arg
1 5 10 15

Ala Lys Tyr

<210> 13

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 多肽

<400> 13

Pro Phe Phe Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Lys Lys Asn Asn Phe Lys Arg
1 5 10 15

Ala Lys Tyr

<210> 14

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 多肽

[0004]

<400> 14

Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Cys Arg Gly Lys Gly Asn Asn Tyr Lys Arg
1 5 10 15

Ala Lys Tyr

<210> 15

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 多肽

<400> 15

Pro Phe Phe Tyr Gly Gly Cys Arg Gly Lys Arg Asn Asn Phe Leu Arg
1 5 10 15

Ala Lys Tyr

<210> 16

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 多肽

<400> 16

Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Cys Arg Gly Lys Arg Asn Asn Phe Lys Arg

1	5	10	15
---	---	----	----

Glu Lys Tyr

<210> 17
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 多肽

<400> 17

Pro Phe Phe Tyr Gly Gly Cys Arg Ala Lys Lys Asn Asn Phe Lys Arg
1 5 10 15

Ala Lys Glu

<210> 18
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 多肽

<400> 18

Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Cys Arg Gly Lys Arg Asn Asn Phe Lys Arg
1 5 10 15

[0005]

Ala Lys Asp

<210> 19
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 多肽

<400> 19

Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Cys Arg Ala Lys Arg Asn Asn Phe Asp Arg
1 5 10 15

Ala Lys Tyr

<210> 20
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 多肽

<400> 20

Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Cys Arg Gly Lys Lys Asn Asn Phe Lys Arg
1 5 10 15

Ala Glu Tyr

<210> 21
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 多肽

<400> 21

Pro Phe Phe Tyr Gly Gly Cys Gly Ala Asn Arg Asn Asn Phe Lys Arg
1 5 10 15

Ala Lys Tyr

<210> 22
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 多肽

<400> 22

Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Lys Lys Asn Asn Phe Lys Thr
1 5 10 15

Ala Lys Tyr

[0006]

<210> 23
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 多肽

<400> 23

Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Cys Arg Gly Asn Arg Asn Asn Phe Leu Arg
1 5 10 15

Ala Lys Tyr

<210> 24
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 多肽

<400> 24

Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Cys Arg Gly Asn Arg Asn Asn Phe Lys Thr
1 5 10 15

Ala Lys Tyr

<210> 25

<211> 19
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 多肽

<400> 25

Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Ser Arg Gly Asn Arg Asn Asn Phe Lys Thr
1 5 10 15

Ala Lys Tyr

<210> 26
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 多肽

<400> 26

Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Cys Leu Gly Asn Gly Asn Asn Phe Lys Arg
1 5 10 15

Ala Lys Tyr

[0007]

<210> 27
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 多肽

<400> 27

Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Cys Leu Gly Asn Arg Asn Asn Phe Leu Arg
1 5 10 15

Ala Lys Tyr

<210> 28
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 多肽

<400> 28

Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Cys Leu Gly Asn Arg Asn Asn Phe Lys Thr
1 5 10 15

Ala Lys Tyr

<210> 29
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工

<220>

<223> 多肽

<400> 29

Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Cys Arg Gly Asn Gly Asn Asn Phe Lys Ser
1 5 10 15

Ala Lys Tyr

<210> 30

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 多肽

<400> 30

Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Cys Arg Gly Lys Lys Asn Asn Phe Asp Arg
1 5 10 15

Glu Lys Tyr

<210> 31

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工

[0008]

<220>

<223> 多肽

<400> 31

Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Cys Arg Gly Lys Arg Asn Asn Phe Leu Arg
1 5 10 15

Glu Lys Glu

<210> 32

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 多肽

<400> 32

Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Cys Arg Gly Lys Gly Asn Asn Phe Asp Arg
1 5 10 15

Ala Lys Tyr

<210> 33

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 多肽

<400> 33

Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Ser Arg Gly Lys Gly Asn Asn Phe Asp Arg
1 5 10 15

Ala Lys Tyr

<210> 34
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 多肽

<400> 34

Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Cys Arg Gly Asn Gly Asn Asn Phe Val Thr
1 5 10 15

Ala Lys Tyr

<210> 35
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 多肽

<400> 35

[0009] Pro Phe Phe Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Lys Gly Asn Asn Tyr Val Thr
1 5 10 15

Ala Lys Tyr

<210> 36
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 多肽

<400> 36

Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Cys Leu Gly Lys Gly Asn Asn Phe Leu Thr
1 5 10 15

Ala Lys Tyr

<210> 37
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 多肽

<400> 37

Ser Phe Phe Tyr Gly Gly Cys Leu Gly Asn Lys Asn Asn Phe Leu Thr
1 5 10 15

Ala Lys Tyr

<210> 38
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 多肽

<400> 38

Thr	Phe	Phe	Tyr	Gly	Gly	Cys	Gly	Gly	Asn	Lys	Asn	Asn	Phe	Val	Arg
1				5					10					15	

Glu Lys Tyr

<210> 39
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 多肽

<400> 39

Thr	Phe	Phe	Tyr	Gly	Gly	Cys	Met	Gly	Asn	Lys	Asn	Asn	Phe	Val	Arg
1				5					10					15	

[0010] Glu Lys Tyr

<210> 40
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 多肽

<400> 40

Thr	Phe	Phe	Tyr	Gly	Gly	Ser	Met	Gly	Asn	Lys	Asn	Asn	Phe	Val	Arg
1				5					10					15	

Glu Lys Tyr

<210> 41
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 多肽

<400> 41

Pro	Phe	Phe	Tyr	Gly	Gly	Cys	Leu	Gly	Asn	Arg	Asn	Asn	Tyr	Val	Arg
1				5					10					15	

Glu Lys Tyr

<210> 42
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 多肽

<400> 42

Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Cys Leu Gly Asn Arg Asn Asn Phe Val Arg
1 5 10 15

Glu Lys Tyr

<210> 43
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 多肽

<400> 43

Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Cys Leu Gly Asn Lys Asn Asn Tyr Val Arg
1 5 10 15

Glu Lys Tyr

[0011]

<210> 44
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 多肽

<400> 44

Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gly Asn Asn Phe Leu Thr
1 5 10 15

Ala Lys Tyr

<210> 45
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 多肽

<400> 45

Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Cys Arg Gly Asn Arg Asn Asn Phe Leu Thr
1 5 10 15

Ala Glu Tyr

<210> 46
<211> 19
<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 多肽

<400> 46

Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Cys Arg Gly Asn Gly Asn Asn Phe Lys Ser
1 5 10 15

Ala Glu Tyr

<210> 47

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 多肽

<400> 47

Pro Phe Phe Tyr Gly Gly Cys Leu Gly Asn Lys Asn Asn Phe Lys Thr
1 5 10 15

Ala Glu Tyr

<210> 48

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工

[0012]

<220>

<223> 多肽

<400> 48

Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Cys Arg Gly Asn Arg Asn Asn Phe Lys Thr
1 5 10 15

Glu Glu Tyr

<210> 49

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 多肽

<400> 49

Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Cys Arg Gly Lys Arg Asn Asn Phe Lys Thr
1 5 10 15

Glu Glu Asp

<210> 50

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 多肽

<400> 50

Pro Phe Phe Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gly Asn Asn Phe Val Arg
1 5 10 15

Glu Lys Tyr

<210> 51

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 多肽

<400> 51

Ser Phe Phe Tyr Gly Gly Cys Met Gly Asn Gly Asn Asn Phe Val Arg
1 5 10 15

Glu Lys Tyr

<210> 52

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 多肽

<400> 52

[0013]

Pro Phe Phe Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gly Asn Asn Phe Leu Arg
1 5 10 15

Glu Lys Tyr

<210> 53

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 多肽

<400> 53

Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Cys Leu Gly Asn Gly Asn Asn Phe Val Arg
1 5 10 15

Glu Lys Tyr

<210> 54

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 多肽

<400> 54

Ser Phe Phe Tyr Gly Gly Cys Leu Gly Asn Gly Asn Asn Tyr Leu Arg

1 5 10 15

Glu Lys Tyr

<210> 55
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 多肽

<400> 55

Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Ser Leu Gly Asn Gly Asn Asn Phe Val Arg
1 5 10 15

Glu Lys Tyr

<210> 56
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 多肽

<400> 56

Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Cys Arg Gly Asn Gly Asn Asn Phe Val Thr
1 5 10 15

[0014]

Ala Glu Tyr

<210> 57
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 多肽

<400> 57

Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Cys Leu Gly Lys Gly Asn Asn Phe Val Ser
1 5 10 15

Ala Glu Tyr

<210> 58
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 多肽

<400> 58

Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Cys Leu Gly Asn Arg Asn Asn Phe Asp Arg
1 5 10 15

Ala Glu Tyr

<210> 59
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 多肽

<400> 59

Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Cys Leu Gly Asn Arg Asn Asn Phe Leu Arg
1 5 10 15

Glu Glu Tyr

<210> 60
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 多肽

<400> 60

Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Cys Leu Gly Asn Lys Asn Asn Tyr Leu Arg
1 5 10 15

Glu Glu Tyr

[0015]

<210> 61
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 多肽

<400> 61

Pro Phe Phe Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Arg Asn Asn Tyr Leu Arg
1 5 10 15

Glu Glu Tyr

<210> 62
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 多肽

<400> 62

Pro Phe Phe Tyr Gly Gly Ser Gly Gly Asn Arg Asn Asn Tyr Leu Arg
1 5 10 15

Glu Glu Tyr

<210> 63

<211> 19
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 多肽

<400> 63

Met Arg Pro Asp Phe Cys Leu Glu Pro Pro Tyr Thr Gly Pro Cys Val
1 5 10 15

Ala Arg Ile

<210> 64
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 多肽

<400> 64

Ala Arg Ile Ile Arg Tyr Phe Tyr Asn Ala Lys Ala Gly Leu Cys Gln
1 5 10 15

Thr Phe Val Tyr Gly
20

[0016]

<210> 65
<211> 22
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 多肽

<400> 65

Tyr Gly Gly Cys Arg Ala Lys Arg Asn Asn Tyr Lys Ser Ala Glu Asp
1 5 10 15

Cys Met Arg Thr Cys Gly
20

<210> 66
<211> 22
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 多肽

<400> 66

Pro Asp Phe Cys Leu Glu Pro Pro Tyr Thr Gly Pro Cys Val Ala Arg
1 5 10 15

Ile Ile Arg Tyr Phe Tyr
20

<210> 67
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 多肽

<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> 可以是酰胺化的

<400> 67

Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Cys Arg Gly Lys Arg Asn Asn Phe Lys Thr
1 5 10 15

Glu Glu Tyr

<210> 68
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 多肽

<400> 68

Lys Phe Phe Tyr Gly Gly Cys Arg Gly Lys Arg Asn Asn Phe Lys Thr
1 5 10 15

Glu Glu Tyr

[0017]

<210> 69
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 多肽

<400> 69

Thr Phe Tyr Tyr Gly Gly Cys Arg Gly Lys Arg Asn Asn Tyr Lys Thr
1 5 10 15

Glu Glu Tyr

<210> 70
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 多肽

<400> 70

Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Ser Arg Gly Lys Arg Asn Asn Phe Lys Thr
1 5 10 15

Glu Glu Tyr

<210> 71
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工

<312> 1992-06-02

<400> 105

Leu Cys Gln Thr Phe Val Tyr Gly Gly Cys Glu Ala Lys Arg Asn Asn
1 5 10 15

Phe Lys Ser Ala
20

<210> 106

<211> 180

<212> DNA

[0018] <213> 人工

<220>

<223> 合成构建体

<300>

<308> X04666

<309> 1993-09-13

<313> (217)..(396)

<400> 106

atgagaccag atttctgcct cgagccgccg tacactgggc cctgcaaagc tcgtatcatc 60

cgttacttct acaatgcaaa ggcaggcctg tgtcagacct tcgtatacgg cggtgcaga 120

gctaagcgta acaacttcaa atccgcggaa gactgcatgc gtacttgcgg tggtgcttag 180

<220>

<223> 多肽

<400> 71

Cys Thr Phe Phe Tyr Gly Cys Cys Arg Gly Lys Arg Asn Asn Phe Lys
1 5 10 15

Thr Glu Glu Tyr
20

<210> 72

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 多肽

<400> 72

Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Cys Arg Gly Lys Arg Asn Asn Phe Lys Thr
1 5 10 15

Glu Glu Tyr Cys
20

<210> 73

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工

[0019]

<220>

<223> 多肽

<400> 73

Cys Thr Phe Phe Tyr Gly Ser Cys Arg Gly Lys Arg Asn Asn Phe Lys
1 5 10 15

Thr Glu Glu Tyr
20

<210> 74

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 多肽

<400> 74

Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Ser Arg Gly Lys Arg Asn Asn Phe Lys Thr
1 5 10 15

Glu Glu Tyr Cys
20

<210> 75

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 多肽

<400> 75

Pro Phe Phe Tyr Gly Gly Cys Arg Gly Lys Arg Asn Asn Phe Lys Thr
1 5 10 15

Glu Glu Tyr

<210> 76

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 多肽

<220>

<221> MISC FEATURE

<223> 可以是酰胺化的

<400> 76

Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Cys Arg Gly Lys Arg Asn Asn Phe Lys Thr
1 5 10 15

Lys Glu Tyr

<210> 77

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工

[0020]

<220>

<223> 多肽

<400> 77

Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Lys Arg Gly Lys Arg Asn Asn Phe Lys Thr
1 5 10 15

Glu Glu Tyr

<210> 78

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 多肽

<400> 78

Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Cys Arg Gly Lys Arg Asn Asn Phe Lys Thr
1 5 10 15

Lys Arg Tyr

<210> 79

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 多肽

<400> 79

Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Lys Arg Gly Lys Arg Asn Asn Phe Lys Thr
1 5 10 15

Ala Glu Tyr

<210> 80

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 多肽

<400> 80

Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Lys Arg Gly Lys Arg Asn Asn Phe Lys Thr
1 5 10 15

Ala Gly Tyr

<210> 81

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 多肽

<400> 81

[0021]

Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Lys Arg Gly Lys Arg Asn Asn Phe Lys Arg
1 5 10 15

Glu Lys Tyr

<210> 82

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 多肽

<400> 82

Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Lys Arg Gly Lys Arg Asn Asn Phe Lys Arg
1 5 10 15

Ala Lys Tyr

<210> 83

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 多肽

<400> 83

Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Cys Leu Gly Asn Arg Asn Asn Phe Lys Thr

1 5 10 15

Glu Glu Tyr

<210> 84
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 多肽

<400> 84

Thr Phe Phe Tyr Gly Cys Gly Arg Gly Lys Arg Asn Asn Phe Lys Thr
1 5 10 15

Glu Glu Tyr

<210> 85
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 多肽

<400> 85

Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Arg Cys Gly Lys Arg Asn Asn Phe Lys Thr
1 5 10 15

[0022]

Glu Glu Tyr

<210> 86
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 多肽

<400> 86

Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Cys Leu Gly Asn Gly Asn Asn Phe Asp Thr
1 5 10 15

Glu Glu Glu

<210> 87
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 多肽

<400> 87

Thr Phe Gln Tyr Gly Gly Cys Arg Gly Lys Arg Asn Asn Phe Lys Thr
1 5 10 15

Glu Glu Tyr

<210> 88
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 多肽

<400> 88

Tyr Asn Lys Glu Phe Gly Thr Phe Asn Thr Lys Gly Cys Glu Arg Gly
1 5 10 15

Tyr Arg Phe

<210> 89
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 多肽

<400> 89

Arg Phe Lys Tyr Gly Gly Cys Leu Gly Asn Met Asn Asn Phe Glu Thr
1 5 10 15

Leu Glu Glu

[0023]

<210> 90
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 多肽

<400> 90

Arg Phe Lys Tyr Gly Gly Cys Leu Gly Asn Lys Asn Asn Phe Leu Arg
1 5 10 15

Leu Lys Tyr

<210> 91
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 多肽

<220>
<221> MISC FEATURE
<223> 可以是酰胺化的

<400> 91

Arg Phe Lys Tyr Gly Gly Cys Leu Gly Asn Lys Asn Asn Tyr Leu Arg
1 5 10 15

Leu Lys Tyr

<210> 92
<211> 22
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 多肽

<400> 92

Lys Thr Lys Arg Lys Arg Lys Lys Gln Arg Val Lys Ile Ala Tyr Glu
1 5 10 15

Glu Ile Phe Lys Asn Tyr
20

<210> 93
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 多肽

<400> 93

Lys Thr Lys Arg Lys Arg Lys Lys Gln Arg Val Lys Ile Ala Tyr
1 5 10 15

[0024]

<210> 94
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 多肽

<400> 94

Arg Gly Gly Arg Leu Ser Tyr Ser Arg Arg Phe Ser Thr Ser Thr Gly
1 5 10 15

Arg

<210> 95
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 多肽

<400> 95

Arg Arg Leu Ser Tyr Ser Arg Arg Arg Phe
1 5 10

<210> 96
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 多肽

<400> 96

Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys
1 5 10 15

<210> 97

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 多肽

<400> 97

Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Ser Arg Gly Lys Arg Asn Asn Phe Lys Thr
1 5 10 15

Glu Glu Tyr

<210> 98

<211> 59

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 多肽

<400> 98

Met Arg Pro Asp Phe Cys Leu Glu Pro Pro Tyr Thr Gly Pro Cys Val
1 5 10 15

[0025]

Ala Arg Ile Ile Arg Tyr Phe Tyr Asn Ala Lys Ala Gly Leu Cys Gln
20 25 30

Thr Phe Val Tyr Gly Gly Cys Arg Ala Lys Arg Asn Asn Phe Lys Ser
35 40 45

Ala Glu Asp Cys Met Arg Thr Cys Gly Gly Ala
50 55

<210> 99

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 多肽

<400> 99

Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Cys Arg Gly Lys Arg Asn Asn Phe Lys Thr
1 5 10 15

Lys Glu Tyr

<210> 100

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 多肽

<400> 100

Arg Phe Lys Tyr Gly Gly Cys Leu Gly Asn Lys Asn Asn Tyr Leu Arg
1 5 10 15

Leu Lys Tyr

<210> 101

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 多肽

<400> 101

Thr Phe Phe Tyr Gly Gly Cys Arg Ala Lys Arg Asn Asn Phe Lys Arg
1 5 10 15

Ala Lys Tyr

<210> 102

<211> 35

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 多肽

[0026]

<300>

<310> US 5,807,980

<311> 1993-07-01

<312> 1998-09-15

<400> 102

Asn Ala Lys Ala Gly Leu Cys Gln Thr Phe Val Tyr Gly Gly Cys Leu
1 5 10 15

Ala Lys Arg Asn Asn Phe Glu Ser Ala Glu Asp Cys Met Arg Thr Cys
20 25 30

Gly Gly Ala
35

<210> 103

<211> 24

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 多肽

<300>

<310> US 5,780,265

<311> 1995-07-05

<312> 1998-07-14

<400> 103

Tyr Gly Gly Cys Arg Ala Lys Arg Asn Asn Phe Lys Ser Ala Glu Asp
1 5 10 15

Cys Met Arg Thr Cys Gly Gly Ala
20

<210> 104
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 多肽

<300>
 <310> W004/060403
 <311> 2004-01-05
 <312> 2004-06-22

<400> 104

Gly Leu Cys Gln Thr Phe Val Tyr Gly Gly Cys Arg Ala Lys Arg Asn
 1 5 10 15

Asn Phe Lys Ser Ala Glu
 20

<210> 105
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 多肽

[0027] <300>
 <310> US 5, 118, 668
 <311> 1988-07-20
 <312> 1992-06-02

<400> 105

Leu Cys Gln Thr Phe Val Tyr Gly Gly Cys Glu Ala Lys Arg Asn Asn
 1 5 10 15

Phe Lys Ser Ala
 20

<210> 106
 <211> 180
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>
 <223> 合成构建体

<300>
 <308> X04666
 <309> 1993-09-13
 <313> (217).. (396)

<400> 106
 atgagaccag atttctgcct cgagccgccg tacactgggc cctgcaaagc tcgtatcatc 60
 cggttacttct acaatgcaaa ggcaggcctg tgtcagacct tcgtatacgg cggctgcaga 120
 gctaagcgta acaacttcaa atccgcggaa gactgcatgc gtacttgctg tggtgcttag 180

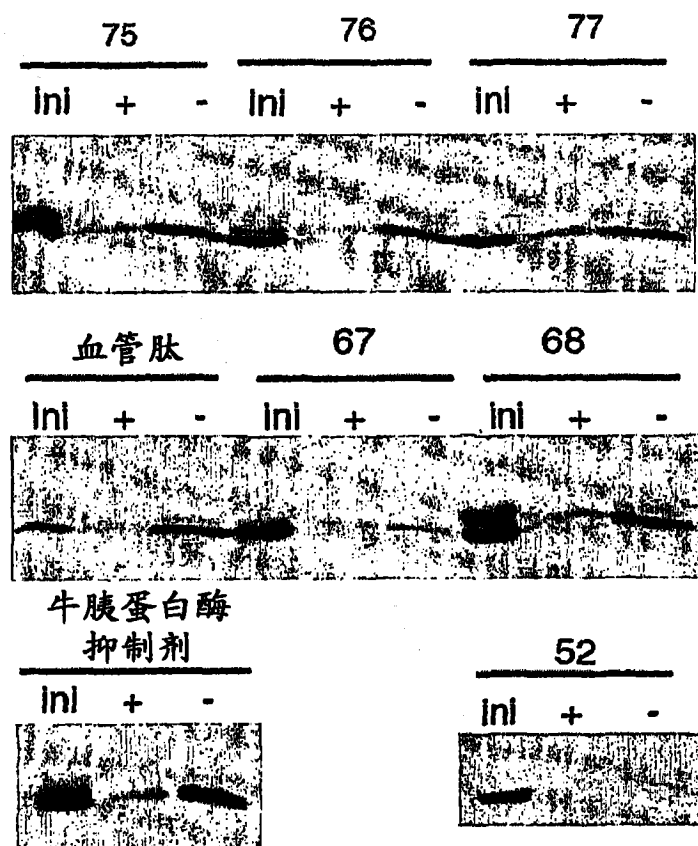


图1

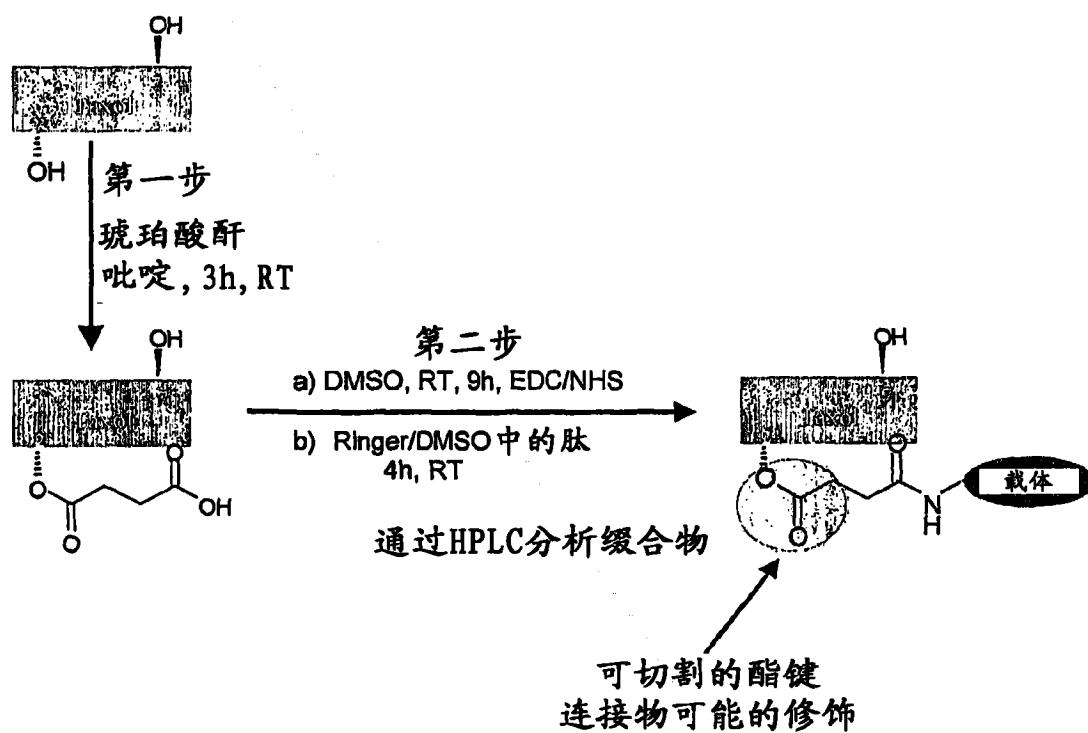


图2

存活研究1: Lewis大鼠中CNS-1成胶质细胞瘤模型
红豆杉醇和红豆杉醇-牛胰蛋白酶抑制剂治疗 (IV注射) 的效果
(04年4月)

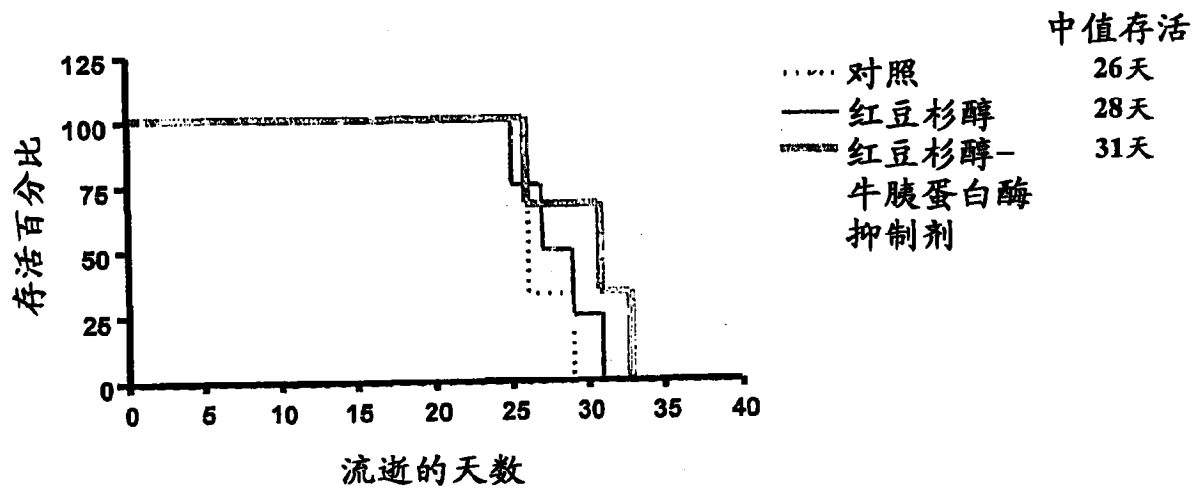


图3

存活研究2: 裸鼠中人U87成胶质细胞瘤模型。
红豆杉醇-血管肽1治疗 (IV注射) 的效果
(04年5月)

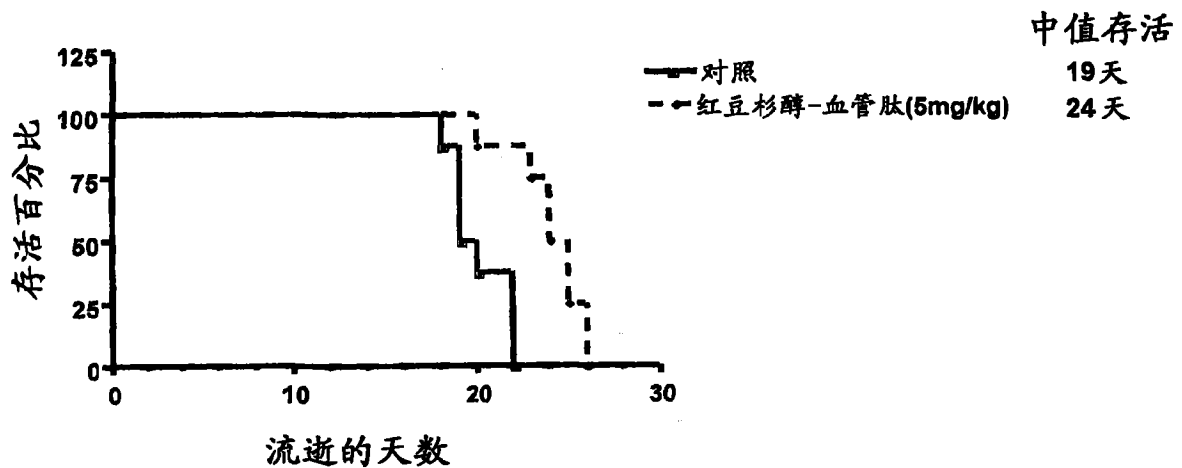


图4

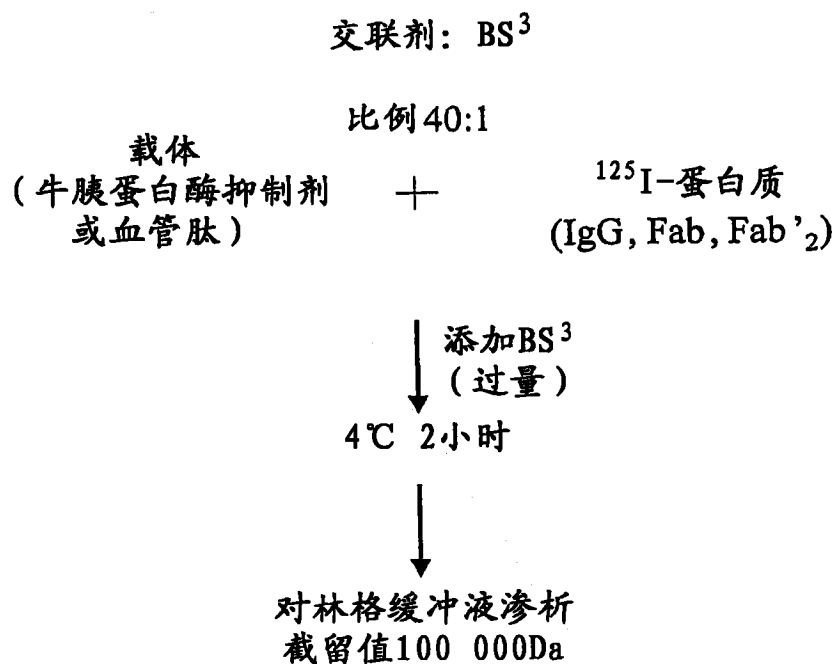


图5

交联剂: 硫代-EMCS

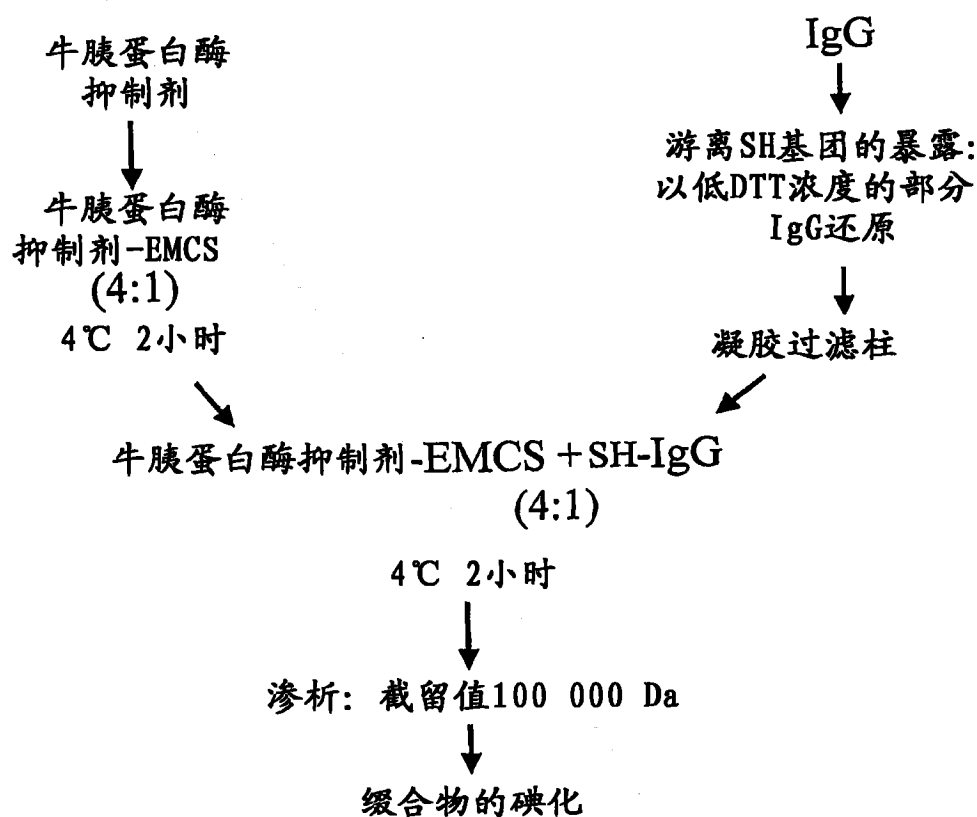
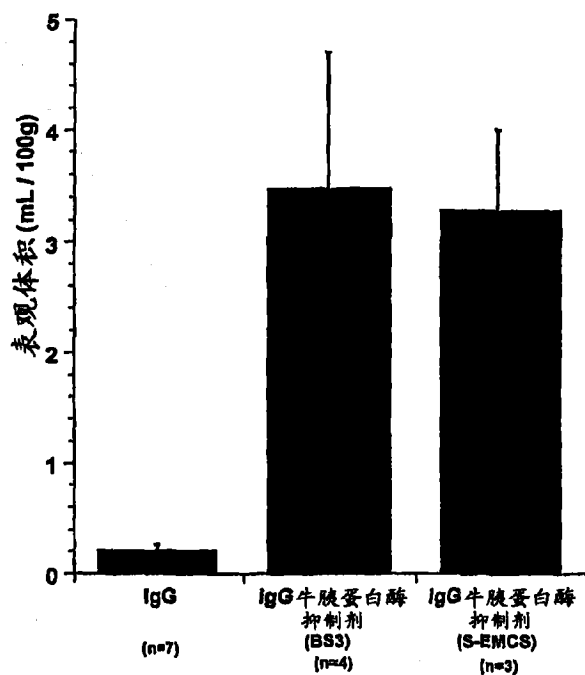


图6

对于IgG-牛胰蛋白酶抑制剂缀合物的较高脑渗透



比率: IgG / IgG牛胰蛋白酶抑制剂(BS3) = 17.4
IgG / IgG牛胰蛋白酶抑制剂(S-EMCS) = 16

图7

存活研究4: 红豆杉醇-血管肽-2缀合物 (5 mg/kg) 的效果

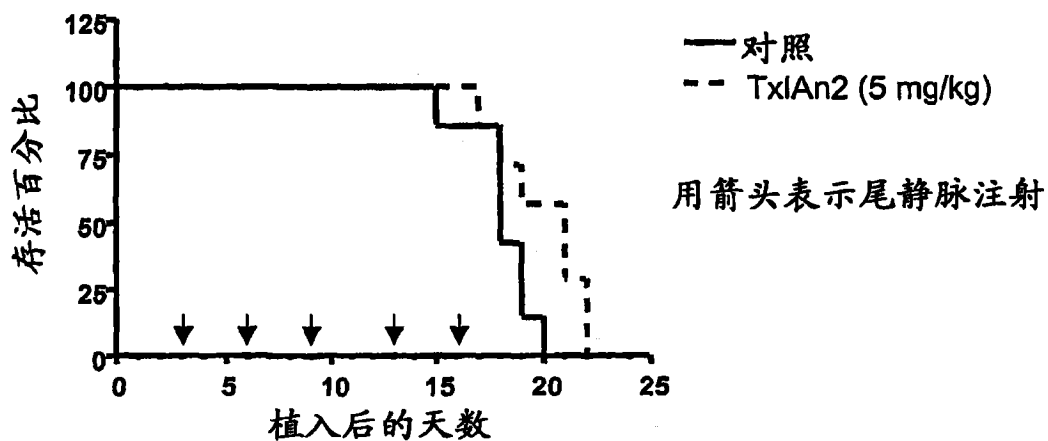


图8

肽	氨基酸序列	电荷
血管肽	TFFYGGCRGKRNNFKTEEY	+2
# 67	TFFYGGCRGKRNNFKTEEY-酰胺	+2
# 76	TFFYGGCRGKRNNFKTKEY-酰胺	+3
# 91	RFKYGGCLGNKNNYLRLKY-酰胺	+5
# 5	TFFYGGCRAKRNNFKRAKY-酰胺	+6

电荷+: 赖氨酸 (K), 精氨酸 (R)
电荷 -: 谷氨酸 (E), 天冬氨酸 (D)

图9