



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104725472 A

(43) 申请公布日 2015.06.24

(21) 申请号 201510081030.4

(22) 申请日 2011.01.24

(30) 优先权数据

61/298,062 2010.01.25 US

(62) 分案原申请数据

201180007135.5 2011.01.24

(71) 申请人 康奈尔大学

地址 美国纽约

申请人 蒙特利尔临床研究所

(72) 发明人 黑兹尔·H·司徒 彼得·W·席勒

(74) 专利代理机构 北京同达信恒知识产权代理

有限公司 11291

代理人 黄志华 石磊

(51) Int. Cl.

C07K 5/117(2006.01)

A61K 38/07(2006.01)

A61P 39/06(2006.01)

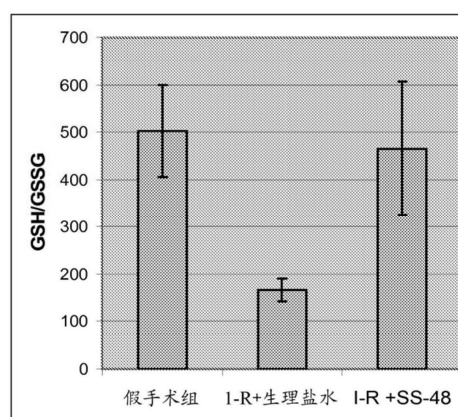
权利要求书1页 说明书18页 附图2页

(54) 发明名称

芳香族阳离子肽及其用途

(57) 摘要

本发明公开了芳香族阳离子肽及其用途。本发明提供了芳香族阳离子肽组合物和使用该芳香族阳离子肽组合物预防或治疗疾病的方法。该方法包括将有效量的芳香族阳离子肽给药至有需要的所述对象。



1. 一种芳香族阳离子肽,所述芳香族阳离子肽为 D-Arg-2' 6' -Dmt-Lys-Trp-NH₂。
2. 一种药物组合物,所述药物组合物包括权利要求 1 所述的芳香族阳离子肽及其药学上可接受的盐。
3. 根据权利要求 2 所述的药物组合物,其中,所述药物组合物还包括药学上可接受的载体。
4. 治疗有效量的根据权利要求 1 所述的芳香族阳离子肽在制备用于减少有需要的哺乳动物中的氧化损伤的药剂中的用途。
5. 治疗有效量的根据权利要求 1 所述的芳香族阳离子肽在制备用于减少有需要的哺乳动物中的经受线粒体通透性转变 (MPT) 的线粒体的数量或者预防有需要的哺乳动物中的线粒体通透性转变的药剂中的用途。

芳香族阳离子肽及其用途

[0001] 本申请是申请日为 2011 年 01 月 24 日、申请号为“201180007135.5”、发明名称为“芳香族阳离子肽及其用途”的发明专利申请的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求 2010 年 1 月 25 日提交的第 61/298,062 号美国临时申请的优先权,该申请的全部内容通过引用由此并入本文。

技术领域

[0004] 本发明总体涉及芳香族阳离子肽组合物和使用该芳香族阳离子肽组合物预防或治疗疾病的方法。

发明内容

[0005] 在一方面,本发明提供了芳香族阳离子肽或其药学上可接受的盐。在一些实施方式中,所述肽选自以下物质:

[0006] D-Arg-Dmt-Lys-Trp-NH₂;

[0007] D-Arg-Trp-Lys-Trp-NH₂;

[0008] D-Arg-Dmt-Lys-Phe-Met-NH₂;

[0009] H-D-Arg-Dmt-Lys(N^αMe)-Phe-NH₂;

[0010] H-D-Arg-Dmt-Lys-Phe(NMe)-NH₂;

[0011] H-D-Arg-Dmt-Lys(N^αMe)-Phe(NMe)-NH₂;

[0012] H-D-Arg(N^αMe)-Dmt(NMe)-Lys(N^αMe)-Phe(NMe)-NH₂;

[0013] D-Arg-Dmt-Lys-Phe-Lys-Trp-NH₂;

[0014] D-Arg-Dmt-Lys-Dmt-Lys-Trp-NH₂;

[0015] D-Arg-Dmt-Lys-Phe-Lys-Met-NH₂;

[0016] D-Arg-Dmt-Lys-Dmt-Lys-Met-NH₂;

[0017] H-D-Arg-Dmt-Lys-Phe-Sar-Gly-Cys-NH₂;

[0018] H-D-Arg-Ψ[CH₂-NH]Dmt-Lys-Phe-NH₂;

[0019] H-D-Arg-Dmt-Ψ[CH₂-NH]Lys-Phe-NH₂;

[0020] H-D-Arg-Dmt-LysΨ[CH₂-NH]Phe-NH₂;以及

[0021] H-D-Arg-Dmt-Ψ[CH₂-NH]Lys-Ψ[CH₂-NH]Phe-NH₂。

[0022] 在一些实施方式中,“Dmt”是指 2',6'-二甲基酪氨酸(2',6'-Dmt)或 3',5'-二甲基酪氨酸(3',5'-Dmt)。

[0023] 在另一方面中,本发明提供了包括芳香族阳离子肽和药学上可接受的载体的药物组合物。

[0024] 在另一方面中,本发明提供了用于对有需要的哺乳动物减少氧化损伤的方法,该方法包括将有效量的一种或多种芳香族阳离子肽给药至所述哺乳动物。

[0025] 在另一方面中,本发明提供了用于减少有需要的哺乳动物中的经受线粒体通透性

转变 (MPT) 的线粒体的数量或者预防有需要的哺乳动物中的线粒体通透性转变的方法, 该方法包括将有效量的一种或多种芳香族阳离子肽给药至所述哺乳动物。

附图说明

[0026] 图 1 为示出肽 D-Arg-Dmt-Lys-Phe-NH₂ 增大细胞色素 c (cyt c) 还原的速率的图表。通过在 550nm 处的吸收测量还原的 cyt c。该肽剂量相关地增大由 40 μM 的 NAC 诱发的 cyt c 还原的速率。单独的 100 μM 的该肽没有效果。

[0027] 图 2 为示出用 D-Arg-Dmt-Lys-Phe-NH₂ 治疗增强了经 20 分钟的 IR 损伤之后的分离的肾线粒体中的 3 态呼吸的图表 (p<0.01)。

[0028] 图 3 为示出用 D-Arg-Dmt-Lys-Phe-NH₂ 治疗提高了 IR 损伤之后 1 小时的时候的大鼠肾脏中的 ATP 含量的图表 (p<0.05)。

[0029] 图 4 为示出 H-Phe-D-Arg-Phe-Lys-Cys-NH₂ 保持缺血再灌注 (IR) 之后的大鼠肾脏中的氧化还原状态的图表。

具体实施方式

[0030] 应当明白, 下文以不同的详细程度描述了本发明的某些方面、模式、实施方式、变型和特征, 以提供对本发明的实质性理解。下文提供了本说明书中使用的一些术语的定义。除非另有说明, 本文中使用的所有技术和科学用语通常具有和本发明所属领域的普通技术人员通常理解的意思相同的意思。

[0031] 除非内容清楚指明, 否则本说明和所附的权利要求中使用的单数形式“一”和“该”包括复数的引用对象。例如, 所提及的“一细胞”包括两个细胞或更多细胞的组合等。

[0032] 本文中使用的将制剂、药物或肽“给药”至对象包括将化合物引入到或给送到对象以执行其预期功能的任何途径。可以通过任何合适的途径来执行“给药”, 包括口服、鼻内、肠胃外 (通过静脉、肌内、腹腔内或皮下) 或者局部给药。“给药”包括自身给药和由其他人给药。

[0033] 本文中使用的术语“氨基酸”包括天然存在的氨基酸和合成的氨基酸以及氨基酸类似物和以类似于天然存在的氨基酸的形式作用的氨基酸模拟物。天然存在的氨基酸是通过遗传密码编码的氨基酸以及后来被改性的那些氨基酸, 比如羟 (基) 脯氨酸、γ-羧基谷氨酸和 O-磷酸丝氨酸。氨基酸类似物指的是具有和天然存在的氨基酸相同的基本化学结构的化合物, 所述的基本化学结构即结合至氢的 α-碳、羧基、氨基和 R 基, 所述氨基酸类似物比如为高丝氨酸、正亮氨酸、蛋氨酸亚砷、甲硫基蛋氨酸。这样的类似物具有改性的 R 基 (例如正亮氨酸) 或改性的肽主链, 但保持与天然存在的氨基酸相同的基本化学结构。氨基酸模拟物指的是具有与氨基酸的通用化学结构不同的结构、但以类似于天然存在的氨基酸的方式作用的化学化合物。本文可按照 IUPAC-IUB 生化命名委员会建议的通常已知的三字母符号或者一字母符号指代氨基酸。

[0034] 本文中使用的术语“有效量”指的是足以获得所需的治疗和 / 或预防效果的量。在治疗或预防性应用的背景下, 给药至对象的组合物的量将取决于疾病的类型和严重性以及例如平常健康情况、年龄、性别、体重和对药物的耐受性的个体特性。所述量还取决于疾病的程度、严重性和类型。专业的技术人员将能够根据这些因素和其他因素来确定合适的剂

量。所述组合物还可结合一种或多种其他的治疗化合物来给药。

[0035] “分离的”或“纯化的”多肽或肽基本上不具有源自细胞或组织的源（试剂来自于该源）的细胞材料或其它受污染的多肽，或者当化学合成时基本上不具有化学前体或其它的化学物质。例如，分离的芳香族阳离子肽将不具有会干扰试剂的诊断用途或治疗用途的材料。这样的干扰材料可以包括酶、激素和其他蛋白质类的和非蛋白质类的溶解物。

[0036] 本文中使用的术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”在本文中是可互换的，以表示包括通过肽键或改性的肽键而互相连接的两个或更多个氨基酸的聚合物，即，肽电子等排体。多肽既指短链（通常称为肽、糖肽或低聚物）也指较长的链（通常称为蛋白质）。多肽可以包括与 20 个基因编码的氨基酸不同的氨基酸。多肽包括通过诸如翻译后加工的天然进程或本领域中熟知的化学改性技术改性的氨基酸序列。

[0037] 本文中使用的术语“治疗”或“减轻”指的是治疗处理措施和预防或防止措施，其中，目的是防止或减缓（减轻）目标病症或失调。还应当理解，本文描述的治疗或预防医学病症的各种模式旨在表示“显著”，其包括完全治疗或者预防以及小于完全治疗或者预防，其中实现了某种生物学相关或医学相关的结果。

[0038] 本文中使用的“防止”失调或病症指的是相对于未治疗的对照样本，化合物降低治疗的样本的失调或病症的发生率，或者相对于未治疗的对照样本延迟失调或病症的发病或者减轻失调或病症的一种或多种症状的严重程度。

[0039] 本发明涉及通过给药一些芳香族阳离子肽来治疗或防止疾病。

[0040] 所述芳香族阳离子肽可溶于水并且强极性。尽管所述肽具有这些特性，然而所述肽能够容易地穿过细胞膜。芳香族阳离子肽通常最少包括通过肽键而共价键连接的三个氨基酸或最少包括通过肽键而共价键连接的四个氨基酸。芳香族阳离子肽中存在的氨基酸的最大数目为通过肽键而共价键连接的大约二十个氨基酸。适当地，氨基酸的最大数目为大约 12 个、大约 9 个或大约 6 个。

[0041] 芳香族阳离子肽的氨基酸可以是任何氨基酸。本文中使用的术语“氨基酸”用来指包括至少一个氨基和至少一个羧基的任何有机分子。通常，至少一个氨基是相对于羧基在 α 位。所述氨基酸可以是天然存在的。例如，天然存在的氨基酸包括通常在哺乳动物蛋白中发现的二十种最常见的左旋 (L) 氨基酸，即丙氨酸 (Ala)，精氨酸 (Arg)，天门冬酰胺 (Asn)，天门冬氨酸 (Asp)，半胱氨酸 (Cys)，谷氨酰胺 (Gln)，谷氨酸 (Glu)，甘氨酸 (Gly)，组氨酸 (His)，异亮氨酸 (Ile)，亮氨酸 (Leu)，赖氨酸 (Lys)，蛋氨酸 (Met)，苯丙氨酸 (Phe)，脯氨酸 (Pro)，丝氨酸 (Ser)，苏氨酸 (Thr)，色氨酸 (Trp)，酪氨酸 (Tyr)，和缬氨酸 (Val)。其它天然存在的氨基酸包括诸如与蛋白质合成无关的代谢过程中合成的氨基酸。例如，氨基酸—鸟氨酸和瓜氨酸是在哺乳动物新陈代谢的产生尿素期间合成的。天然存在的氨基酸的另一示例包括羟（基）脯氨酸 (Hyp)。

[0042] 所述肽可选地包括一种或多种非天然存在的氨基酸。最佳地，所述肽不具有天然存在的氨基酸。所述非天然存在的氨基酸可以是左旋 (L-) 氨基酸、右旋 (D-) 氨基酸或其混合物。非天然存在的氨基酸是这样的氨基酸：通常不是在生物体的天然代谢过程中合成的，且非天然地出现在蛋白质中。此外，非天然存在的氨基酸合适地也不会由普通的蛋白酶识别。非天然存在的氨基酸可以存在于肽的任何位置中。例如，非天然存在的氨基酸可以在 N 末端、C 末端或者在 N 末端和 C 末端之间的任何位置。

[0043] 例如,非天然的氨基酸可以包括天然氨基酸中不存在的烷基、芳基或烷基芳基。非天然烷基氨基酸的一些示例包括 α -氨基丁酸、 β -氨基丁酸、 γ -氨基丁酸、 δ -氨基戊酸和 ϵ -氨基己酸。非天然的芳基氨基酸的一些示例包括邻氨基苯甲酸、间氨基苯甲酸和对氨基苯甲酸。非天然的烷基芳基氨基酸的一些示例包括邻氨基苯乙酸、间氨基苯乙酸和对氨基苯乙酸、以及 γ -苯基- β -氨基丁酸。非天然存在的氨基酸包括天然存在的氨基酸的衍生物。所述天然存在的氨基酸的衍生物可以包括诸如对天然存在的氨基酸添加一种或多种化学基团。

[0044] 例如,可以将一种或多种化学基团添加至苯基丙氨酸残基或酪氨酸残基的芳香环的 2'、3'、4'、5' 或 6' 位置或者至色氨酸残基的苯并环的 4'、5'、6' 或 7' 位置。所述基团可以是添加到芳香环的任何化学基团。这样的基团的一些示例包括:支链的或者无支链的 C_1 - C_4 的烷基,比如甲基、乙基、正丙基、异丙基、丁基、异丁基、或叔丁基; C_1 - C_4 的烷氧基(即烷氧基);氨基; C_1 - C_4 的烷基氨基和 C_1 - C_4 的二烷基氨基(例如,甲氨基、二甲氨基);硝基;羟基;卤素(即氟、氯、溴或碘)。天然存在的氨基酸的非天然存在的衍生物的一些特定示例包括正缬氨酸(Nva)和正亮氨酸(Nle)。

[0045] 肽中氨基酸的改性的另一示例是将肽中的天冬氨酸或谷氨酸残基的羧基衍生化。衍生化的一个示例是与氨或伯胺或仲胺(例如甲胺、乙胺、二甲胺或二乙胺)的酰胺化。衍生化的另一示例包括与诸如甲醇或乙醇进行酯化。另一种这样的改性包括赖氨酸、精氨酸或组氨酸残基的氨基的衍生化。例如,这些氨基可以被酰化。例如,一些合适的酰基包括苯甲酰基或者包括以上提及的 C_1 - C_4 的烷基中的任一烷基的烷酰基,比如乙酰基或丙酰基。

[0046] 非天然存在的氨基酸对常见的蛋白酶适当地为抵抗性的且不敏感。对蛋白酶抵抗性的或者不敏感的非天然存在的氨基酸的示例包括以上提及的任一种天然存在的左旋(L-)氨基酸的右旋(D-)形式以及左旋和/或右旋的非天然存在的氨基酸。尽管右旋氨基酸存在于通过与细胞的常规的核糖体蛋白合成方法不同的方法而合成的某些肽抗生素中,但右旋氨基酸通常不存在于蛋白质中。本文中使用的右旋氨基酸被认为是非天然存在的氨基酸。

[0047] 为了使蛋白酶灵敏度最小,肽应当具有小于 5 个、小于 4 个、小于 3 个、或小于 2 个的由普通蛋白酶识别的连续左旋氨基酸,而与氨基酸是否为天然存在无关。在一个实施方式中,肽仅具有右旋氨基酸,而不具有左旋氨基酸。如果肽具有蛋白酶敏感的氨基酸序列,则所述氨基酸中的至少一个氨基酸优选地为非天然存在的右旋氨基酸,由此提供蛋白酶抗性。蛋白酶敏感序列的示例包括可以由常见的蛋白酶(比如肽链内切酶和胰蛋白酶)容易地切割的两个或更多个连续的碱性氨基酸。碱性氨基酸的示例包括精氨酸、赖氨酸和组氨酸。

[0048] 与肽中的氨基酸残基的总数目相比,在生理 pH,芳香族阳离子肽应当具有最小数目的净正电荷。生理 pH 的净正电荷的最小数目将在下文称为 (p_m)。肽中的氨基酸残基的总数目将在下文称为 (r)。下文讨论的净正电荷的最小数目都是在生理 pH。本文中使用的术语“生理 pH”指的是哺乳动物体的组织和器官的细胞中的正常 pH。例如,人的生理 pH 通常为约 7.4,而哺乳动物中的正常生理 pH 可以为从约 7.0 至约 7.8 的任一 pH。

[0049] 本文中使用的“净电荷”指的是存在于肽中的氨基酸所携带的正电荷的数目和负电荷的数目的之间的平衡。在本说明书中,应当理解,净电荷是在生理 pH 下测定的。在生

理 pH 带正电的天然存在的氨基酸包括左旋赖氨酸、左旋精氨酸和左旋组氨酸。在生理 pH 带负电的天然存在的氨基酸包括左旋天冬氨酸和左旋谷氨酸。

[0050] 通常地,肽具有带正电的N-末端氨基和带负电的C-末端羧基。所述电荷在生理 pH 相互抵消。作为计算净电荷的示例,肽 Tyr-Arg-Phe-Lys-Glu-His-Trp-D-Arg 具有一个带负电的氨基酸(即 Glu)和四个带正电的氨基酸(即,两个 Arg 残基、一个 Lys 和一个 His)。因此,以上的肽具有 3 个净正电荷。

[0051] 在一个实施方式中,芳香族阳离子肽的生理 pH 的净正电荷的最小数目(p_m)和氨基酸残基的总数目(r)之间具有某种关系,其中, $3p_m$ 是小于或等于 $r+1$ 的最大数。在该实施方式中,净正电荷的最小数目(p_m)和氨基酸残基的总数目(r)之间的关系如下:

[0052] 表 1. 氨基酸数目和净正电荷 ($3p_m \leq r+1$)

[0053]

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

[0054] 在另一实施方式中,芳香族阳离子肽的净正电荷的最小数目(p_m)和氨基酸残基的总数目(r)之间具有某种关系,其中, $2p_m$ 是小于或等于 $r+1$ 的最大数。在该实施方式中,净正电荷的最小数目(p_m)和氨基酸残基的总数目(r)之间的关系如下:

[0055] 表 2. 氨基酸数目和净正电荷 ($2p_m \leq r+1$)

[0056]

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

[0057] 在一个实施方式中,净正电荷的最小数目(p_m)和氨基酸残基的总数目(r)相等。在另一实施方式中,肽具有三个或四个氨基酸残基,其净正电荷的最小数目为 1、适当地净正电荷的最小数目为 2 且更优选地净正电荷的最小数目为 3。

[0058] 还重要的是,芳香族阳离子肽相比于净正电荷的总数目(p_t)具有最小数目的芳香基团。芳香基团的最小数目在下文将称为(a)。具有芳香基团的天然存在的氨基酸包括氨基酸—组氨酸、色氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸。例如,六肽 Lys-Gln-Tyr-D-Arg-Phe-Trp 具有 2 个净正电荷(由赖氨酸残基和精氨酸残基提供)以及三个芳香基团(由酪氨酸残基、苯丙氨酸残基和色氨酸残基提供)。

[0059] 芳香族阳离子肽还应当在芳香基团的最小数目(a)和生理 pH 的净正电荷的总数目(p_t)之间具有某种关系,其中,除了当 p_t 为 1 时 a 也可 1 之外, $3a$ 是小于或等于 p_t+1 的最大数。在该实施方式中,芳香基团的最小数目(a)和净正电荷的总数目(p_t)之间的关系如下:

[0060] 表 3. 芳香基团和净正电荷 ($3a \leq p_t+1$ 或 $a = p_t = 1$)

[0061]

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

(a)	1	1	1	1	2	2	2	3	3	3	4	4	4	5	5	5	6	6	6	7
-----	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

[0062] 在另一实施方式中,芳香族阳离子肽在芳香基团的最小数目(a)和净正电荷的总数目(p_t)之间具有某种关系,其中, $2a$ 是小于或者等于 p_t+1 的最大数。在该实施方式中,芳香氨基酸残基的最小数目(a)和净正电荷的总数目(p_t)之间的关系如下:

[0063] 表 4. 芳香基团和净正电荷 ($2a \leq p_t+1$ 或 $a = p_t = 1$)

[0064]

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

[0065] 在另一实施方式中,芳香基团的数目(a)和净正电荷的总数目(p_t)相等。

[0066] 羧基且尤其是 C- 末端氨基酸的末端羧基适当地与诸如氨进行酰胺化,以形成 C- 端酰胺。可替代地, C- 端氨基酸的末端羧基可以与任一伯胺或仲胺进行酰胺化。所述伯胺或仲胺可以是诸如烷基、尤其是支链的或无支链的 C_1 - C_4 的烷基或者芳香胺。因此,在肽的 C 末端的氨基酸可以转化为酰胺基、N- 甲基酰胺基、N- 乙基酰胺基、N, N- 二甲基酰胺基、N, N- 二乙基酰胺基、N- 甲基 -N- 乙基酰胺基、N- 苯基酰胺基或 N- 苯基 -N- 乙基酰胺基。未出现在芳香族阳离子肽的 C 末端的天冬酰胺残基、谷氨酰胺残基、天冬氨酸残基和谷氨酸残基的游离的羧酸基也可被酰胺化,不论它们是否存在于肽内。这些内部位置的酰胺化可以与氨或以上所述伯胺或仲胺中的任何一者进行。

[0067] 在一个实施方式中,芳香族阳离子肽是具有两个净正电荷以及至少一个芳香族氨基酸的三肽。在特定的实施方式中,所述芳香族阳离子肽是具有两个净正电荷和两个芳香族氨基酸的三肽。

[0068] 芳香族阳离子肽包括但不限于以下肽的示例:

[0069] D-Arg-Dmt-Lys-Trp-NH₂;

[0070] D-Arg-Trp-Lys-Trp-NH₂;

[0071] D-Arg-Dmt-Lys-Phe-Met-NH₂;

[0072] H-D-Arg-Dmt-Lys(N^aMe)-Phe-NH₂;

[0073] H-D-Arg-Dmt-Lys-Phe(NMe)-NH₂;

[0074] H-D-Arg-Dmt-Lys(N^aMe)-Phe(NMe)-NH₂;

[0075] H-D-Arg(N^aMe)-Dmt(NMe)-Lys(N^aMe)-Phe(NMe)-NH₂;

[0076] D-Arg-Dmt-Lys-Phe-Lys-Trp-NH₂;

[0077] D-Arg-Dmt-Lys-Dmt-Lys-Trp-NH₂;

[0078] D-Arg-Dmt-Lys-Phe-Lys-Met-NH₂;

[0079] D-Arg-Dmt-Lys-Dmt-Lys-Met-NH₂;

[0080] H-D-Arg-Dmt-Lys-Phe-Sar-Gly-Cys-NH₂;

[0081] H-D-Arg-Ψ[CH₂-NH]Dmt-Lys-Phe-NH₂;

[0082] H-D-Arg-Dmt-Ψ[CH₂-NH]Lys-Phe-NH₂;

[0083] H-D-Arg-Dmt-Lys Ψ[CH₂-NH]Phe-NH₂;以及

[0084] H-D-Arg-Dmt-Ψ[CH₂-NH]Lys-Ψ[CH₂-NH]Phe-NH₂。

[0085] 在一个实施方式中,肽具有 μ 型阿片 (mu-opioid) 受体激动剂活性 (即,它们活化 μ 型阿片受体)。通过放射性配体结合到克隆的 μ 型阿片受体或通过利用豚鼠回肠的生物测定可以评估 μ 型阿片的活性 (Schiller 等, Eur J Med Chem, 35:895-901, 2000 ;Zhao 等, J Pharmacol Exp Ther, 307 :947-954, 2003)。 μ 型阿片受体的活化通常引起止痛作用。在一些情况下,具有 μ 型阿片受体激动剂活性的芳香族阳离子肽为优选的。例如,在短期治疗期间,比如在急性病或急性病症中,使用活化 μ 型阿片受体的芳香族阳离子肽是有利的。这样的急性病或急性病症通常与中等疼痛或严重疼痛有关。在这些情况中,芳香族阳离子肽的止痛作用可有利于病人或其他哺乳动物的治疗方案。然而,不活化 μ 型阿片受体的芳香族阳离子肽也可以根据临床需要与止痛药一起使用或不与止痛药一起使用。

[0086] 可替代地,在其他情况中,不具有 μ 型阿片受体激动剂活性的芳香族阳离子肽为优选的。例如,在长期治疗期间,例如慢性疾病状态或病症中,可能禁忌使用活化 μ 型阿片受体的芳香族阳离子肽。在这些情况中,芳香族阳离子肽的潜在的副作用或上瘾作用可排除在病人或其他哺乳动物的治疗方案中使用活化 μ 型阿片受体的芳香族阳离子肽。潜在的副作用可包括镇静、便秘和呼吸抑制。在这样的情况中,不活化 μ 型阿片受体的芳香族阳离子肽可以是适当的治疗。

[0087] 具有 μ 型阿片受体激动剂活性的肽通常是那些在 N 末端 (即,第一氨基酸位置) 上具有酪氨酸残基或酪氨酸衍生物的肽。适合的酪氨酸衍生物包括 2'-甲基酪氨酸 (Mmt)、2',6'-二甲基酪氨酸 (2',6'-Dmt)、3',5'-二甲基酪氨酸 (3',5'-Dmt)、N,2',6'-三甲基酪氨酸 (Tmt) 和 2'-羟基-6'-甲基酪氨酸 (Hmt)。

[0088] 不具有 μ 型阿片受体激动剂活性的肽通常在 N 末端 (即,氨基酸位置 1) 上不具有酪氨酸残基或酪氨酸衍生物。N 末端上的氨基酸可以是与酪氨酸不同的任何天然存在的氨基酸或非天然存在的氨基酸。在一个实施方式中, N 末端上的氨基酸是苯丙氨酸或其衍生物。苯丙氨酸的示例性衍生物包括 2'-甲基苯丙氨酸 (Mmp)、2',6'-二甲基苯丙氨酸 (2',6'-Dmp)、N,2',6'-三甲基苯丙氨酸 (Tmp) 和 2'-羟基-6'-甲基苯丙氨酸 (Hmp)。

[0089] 本文提到的肽和它们的衍生物还可包括功能类似物。如果一肽具有和所描述的肽相同的功能,则其可以被看作是功能类似物。例如,该类似物可以是肽的取代变型,其中,一个或多个氨基酸被另一氨基酸取代。肽的合适的取代变型包括保守氨基酸取代物。根据氨基酸的物理化学性质,氨基酸可以进行如下分组:

[0090] (a) 非极性氨基酸 :Ala(A) Ser(S) Thr(T) Pro(P) Gly(G) Cys(C) ;

[0091] (b) 酸性氨基酸 :Asn(N) Asp(D) Glu(E) Gln(Q) ;

[0092] (c) 碱性氨基酸 :His(H) Arg(R) Lys(K) ;

[0093] (d) 疏水性氨基酸 :Met(M) Leu(L) Ile(I) Val(V) ;以及

[0094] (e) 芳香族氨基酸 :Phe(F) Tyr(Y) Trp(W) His(H)。

[0095] 肽中的氨基酸被同一组中的另一种氨基酸取代称为保守取代,且可以保留原始肽的物理化学性质。相反,肽中的氨基酸被不同组中的另一种氨基酸取代通常更有可能改变原始肽的物理化学性质。

[0096] 可以通过本领域熟知的任何方法来合成肽。例如,用于以化学方式合成肽的合适方法包括 Stuart 和 Young 在以下文献中描述的方法 :Solid Phase Peptide Synthesis, 第二版, Pierce 化学公司 (Pierce Chemical Company) (1984 年) ; 以及 Methods

Enzymol., 289, 学术出版社公司, 纽约 (1997 年)。

[0097] 芳香族阳离子肽的预防用途和治疗用途

[0098] 本文中描述的芳香族阳离子肽有利于预防或治疗疾病。具体地, 本发明提供了通过给药本文描述的芳香族阳离子肽来治疗处于疾病的危险中 (或易受疾病影响) 的对象的预防和治疗方案。因此, 本方法提供了通过将有效量的芳香族阳离子肽给药至需要该芳香族阳离子肽的对象来预防和 / 或治疗对象中的疾病。

[0099] 氧化损伤。上文描述的肽有利于减少有需要的哺乳动物中的氧化损伤。需要减少氧化损伤的哺乳动物为那些经受与氧化损伤关联的疾病、病症或治疗的哺乳动物。通常, 通过例如活性氧簇 (ROS) 和 / 或活性氮簇 (RNS) 的自由基导致氧化损伤。ROS 和 RNS 的示例包括羟基自由基、超氧阴离子自由基、一氧化氮、氢、次氯酸 (HOCl) 和过氧亚硝酸盐阴离子。如果在给药有效量的上述芳香族阳离子肽之后, 哺乳动物、离体器官或细胞中的氧化损伤的量降低, 则氧化损伤被视为“减少”。通常, 与未使用该肽治疗的对照对象相比, 如果氧化损伤降低了至少约 10%、至少约 25%、至少约 50%、至少约 75% 或至少约 90%, 则氧化损伤被视为减少。

[0100] 在一些实施方式中, 待治疗的哺乳动物可以为患有与氧化损伤关联的疾病或症状的哺乳动物。氧化损伤可出现在哺乳动物的任何细胞、组织或器官中。在人类中, 许多疾病涉及氧化应激。示例包括动脉粥样硬化、帕金森氏病、心力衰竭、心肌梗塞、老年痴呆症、精神分裂症、躁郁症、X 染色体易损综合征和慢性疲劳综合征。

[0101] 在一个实施方式中, 哺乳动物可以经受与氧化损伤关联的治疗。例如, 该哺乳动物可以经受再灌注。再灌注是指对其中血流减少或阻塞的任何器官或组织进行血流恢复。在再灌注期间的血流的恢复导致呼吸爆发和形成自由基。

[0102] 在一个实施方式中, 由于缺氧或局部缺血, 哺乳动物的血流会减少或被阻塞。在缺氧或局部缺血期间的血液供给的减少或严重减缩可由例如血栓栓塞性中风、冠状动脉粥样硬化或周围性血管疾病引起。大量的器官和组织经受局部缺血或缺氧。这样的器官的示例包括脑、心脏、肾脏、肠和前列腺。受影响的组织通常为肌肉, 例如心肌、骨骼肌或平滑肌。例如, 心肌局部缺血或缺氧通常由动脉粥样硬化的阻塞或血栓性的阻塞引起, 动脉粥样硬化的阻塞或血栓性的阻塞导致借助心脏动脉供血和毛细血管供血而输送到心脏组织的氧减缩或减少。这样的心肌缺血或缺氧可导致受影响的心肌疼痛和坏死, 并且最终可导致心力衰竭。

[0103] 所述方法还可以用于减少与任何神经退行性疾病或病症关联的氧化损伤。神经退行性疾病可以影响中枢神经系统和周围神经系统的任何细胞、组织或器官。这样的细胞、组织和器官的示例包括脑、脊髓、神经元、神经节、雪旺细胞 (Schwann cell)、星形胶质细胞、少突细胞和小神经胶质细胞。神经退行性病症可以为例如中风或脑创伤或脊髓损伤的急性病症。在另一实施方式中, 神经退行性疾病或病症可以为慢性神经退行性病症。在慢性神经退行性病症中, 自由基例如可以导致对蛋白质造成损伤。这样的蛋白质的示例为 β 淀粉样蛋白。与由自由基造成的损伤关联的慢性神经退行性疾病的示例包括帕金森氏症、老年痴呆症、亨廷顿症 (Huntington's disease) 和肌萎缩侧索硬化症 (也称为葛雷克氏症)。

[0104] 可以被治疗的其他病症包括子痫前期、糖尿病和老化综合征以及与老化相关的病症 (比如黄斑变性、皱纹)。

[0105] 线粒体通透性转变。上文描述的肽有利于治疗与线粒体通透性转变 (MPT) 关联的任何疾病或病症。这样的疾病和病症包括但不限于组织或器官的局部缺血和 / 或再灌注、缺氧和大量神经退行性疾病中的任一种神经退行性疾病。需要抑制或预防 MPT 的哺乳动物是那些患有这些疾病或病症的哺乳动物。

[0106] 确定基于芳香族阳离子肽的治疗药物的生物效果。在各个实施方式中, 进行合适的体外测定或体内测定来确定特定的基于芳香族阳离子肽的治疗药物的效果以及其给药是否适于治疗。在各个实施方式中, 可以对典型的动物模型进行体外测定, 以确定给定的基于芳香族阳离子肽的治疗药物是否在预防或治疗疾病方面发挥期望的效果。在对人类对象测试之前, 可以在合适的动物模型系统中测试治疗中所用的化合物, 所述动物模型系统包括但不限于大鼠、小鼠、鸡、猪、牛、猴、兔等。类似地, 对于体内测试, 在给药至人类对象之前, 可以使用本领域已知的任一动物模型系统。

[0107] 预防方法。在一方面中, 本发明提供了一种通过将预防病症的发病或进展的芳香族阳离子肽给药至对象来预防该对象中的疾病的方法。在预防应用中, 将芳香族阳离子肽的药物组合物或药剂以足够的量给药至易遭受疾病或病症或者处于疾病或病症的风险中的对象以消除或降低疾病的风险、减轻疾病的严重性或延迟疾病的发作, 包括疾病的生物化学的、组织学的和 / 或行为的症状、该疾病的并发症和该疾病发展期间的中间病理表型呈现。预防性的芳香族阳离子肽的给药可在反常的症状特点显现之前进行, 使得疾病或失调得到预防或可替代地使其进展得到延迟。可以基于上文描述的筛选试验确定合适的化合物。

[0108] 治疗性方法。本发明的另一方面包括出于治疗目的来治疗疾病的方法。在治疗性应用中, 将一定量的组合物或药物给药至疑似患上这样的疾病的对象或者已患有这样的疾病的对象, 来充分消除或者至少部分地抑制所述疾病的病症, 包括其并发症和该疾病发展中的中间病理表现型。

[0109] 给药模式和有效剂量

[0110] 可以使用本领域的技术人员所知的用于将细胞、器官或组织与肽接触的任何方法。适当的方法包括体外法、间接体内法或体内法。体内法通常包括将芳香族阳离子肽 (比如上文描述的芳香族阳离子肽) 给药至哺乳动物、合适地给药至人。当用在体内以治疗时, 芳香族阳离子肽可以以有效的量 (即具有期望的治疗效果的量) 给药至对象。剂量和给药方案将取决于对象中的损伤的程度、所使用的特定的芳香族阳离子肽的性质 (例如其治疗指数)、该对象以及该对象的病史。

[0111] 可以在临床前试验和临床试验期间利用内科医生和临床医生熟悉的方法来测定有效量。在所述方法中有用的肽的有效量可以通过用于给药药物组合物的多种已知方法中的任一方法来给药至需要该肽的哺乳动物。肽可以以全身给药或局部给药。

[0112] 所述肽可以配制成药学上可接受的盐。术语“药学上可接受的盐”表示由适于给药至比如为哺乳动物的患者的碱或酸制备成的盐 (例如, 对于给定的给药方案, 具有可接受的哺乳动物安全度的盐)。然而, 应当理解, 所述盐不一定是药学上可接受的盐, 例如那些不用来给药至患者的中间化合物的盐。药学上可接受的盐可以由药学上可接受的无机碱或有机碱以及药学上可接受的无机酸和有机酸衍生出。此外, 当肽同时包含碱性部分 (例如胺、吡啶或咪唑) 和酸性部分 (例如羧酸或四唑) 时, 可以形成两性离子, 且所述两性离子包括

在本文中所用的术语“盐”中。由药学上可接受的无机碱衍生出的盐包括铵盐、钙盐、铜盐、铁盐、亚铁盐、锂盐、镁盐、三价锰盐、二价锰盐、钾盐、钠盐和锌盐等。由药学上可接受的有机碱衍生出的盐包括伯胺盐、仲胺盐和叔胺盐,包括取代胺盐、环胺盐、天然存在的胺盐等,比如精氨酸、甜菜碱、咖啡因、胆碱、N, N'-二苄基乙二胺、二乙胺、2-二乙胺基乙醇、2-二甲胺基乙醇、乙醇胺、乙二胺、N-乙基吗啉、N-乙基哌啶、还原葡萄糖胺、葡萄糖胺、组氨酸、海巴明青霉素 (hydrabamine)、异丙胺、赖氨酸、葡甲胺、吗啉、哌嗪、哌啶、多胺树脂、普鲁卡因、嘌呤、可可碱、三乙胺、三甲胺、三丙胺、氨丁三醇等。由药学上可接受的无机酸衍生出的盐包括硼酸盐、碳酸盐、卤化氢 (氢溴酸、盐酸、氢氟酸或氢碘酸) 的盐、硝酸盐、磷酸盐、氨基磺酸盐和硫酸盐。由药学上可接受的有机酸衍生出的盐包括脂肪族羧酸 (例如,柠檬酸、葡萄糖酸、乙醇酸、乳酸、乳糖酸、苹果酸和酒石酸) 的盐、脂肪族单羧酸 (例如,醋酸、丁酸、甲酸、丙酸和三氟乙酸) 的盐、氨基酸 (例如,天冬氨酸、谷氨酸) 的盐、芳香羧酸 (例如,苯甲酸、对氯苯甲酸、二苯乙酸、龙胆酸、马尿酸和三苯基乙酸) 的盐、芳香羧酸 (例如,邻羟基苯甲酸、对羟基苯甲酸、1-羟基萘-2-羧酸和 3-羟基萘-2-羧酸) 的盐、抗坏血酸盐、二羧酸 (例如,富马酸、马来酸、草酸和琥珀酸) 盐、葡萄糖醛酸盐、扁桃酸盐、黏液酸盐、烟酸盐、乳清酸盐、双羟基萘酸盐、泛酸盐、磺酸 (例如,苯磺酸、樟脑磺酸、乙二磺酸 (edislyic)、乙磺酸、羟乙磺酸、甲磺酸、萘磺酸、萘-1, 5-二磺酸、萘-2, 6-二磺酸和对甲苯磺酸) 的盐、羟基萘甲酸 (xinafoic acid) 的盐等。

[0113] 本文描述的芳香族阳离子肽可以加入到药物组合物以单独给药或联合给药至对象来治疗或预防本文中描述的疾病。所述组合物通常包括活性剂和药学上可接受的载体。本文中使用的术语“药学上可接受的载体”包括与给药药物可配伍的生理盐水、溶剂、分散介质、涂层、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延缓剂等。辅助性的活性化合物也可以加入到所述组合物中。

[0114] 通常将药物组合物制备成与其计划给药途径相符。给药途径的示例包括肠胃外 (例如,静脉内、皮内、腹腔或皮下)、口服、吸入、经皮肤 (局部)、眼内、离子渗入和经粘膜透过给药。用于肠胃外、皮内或皮下应用的溶液或悬浮液可以包括以下成分: 无菌稀释剂, 诸如注射用水、生理盐水、不挥发油、聚乙二醇、丙三醇、丙二醇或其它合成溶剂; 抗菌剂, 比如苯甲醇或对羟基苯甲酸甲酯; 抗氧化剂, 比如抗坏血酸或亚硫酸氢钠; 络合剂, 比如乙二胺四乙酸; 缓冲液, 比如醋酸盐、柠檬酸盐和磷酸盐; 以及用于调节渗透压的试剂, 比如氯化钠或右旋糖。可以用酸或碱来调节 pH, 比如盐酸或氢氧化钠。肠胃外制剂可以装在玻璃或塑料制的安瓿瓶、一次性注射器或多剂量瓶中。为了患者或治疗医师的方便, 可以以包括治疗过程 (例如治疗 7 天) 所需的所有用具 (例如, 药瓶、稀释液瓶、注射器和针头) 的试剂盒的形式提供剂量制剂。

[0115] 适于注射用途的药物组合物可以包括无菌水溶液 (在水溶性的情况下) 或者用于临时制备无菌注射液或分散液的分散剂或无菌粉末。为了静脉注射, 合适的载体包括生理盐水、抑菌水、Cremophor EL™ (BASF, 帕西波尼, N. J.) 或磷酸盐缓冲盐水 (PBS)。在所有情况下, 用于肠胃外给药的组合物必须无菌且应当是达到易于注射的程度的液体。用于肠胃外给药的组合物在制造和存储条件下应当稳定且必须被保存同时防止微生物 (例如细菌和真菌) 的污染行为。

[0116] 所述芳香族阳离子肽组合物可以包括载体, 该载体可以是包括诸如水、乙醇、多元

醇（例如，丙三醇、丙二醇以及液态聚乙二醇等）及其合适的组合物的溶剂或分散介质。可以通过例如以下的方式来保持适当的流动性：利用比如卵磷脂的涂层；在分散质的情况下，通过保持所需的颗粒尺寸；和通过利用表面活性剂。可以通过各种抗菌剂和抗真菌剂来实现预防微生物的行为，例如尼泊金、氯丁醇、苯酚、抗坏血酸、硫柳汞等。可以包括谷胱甘肽和其他的抗氧化剂以防止氧化。在很多情况下，将优选地是，在该组合物中包括等渗剂，比如糖、多元醇（比如甘露醇、山梨醇）或氯化钠。可以通过在该组合物中包括延迟吸收的制剂来引起可注射组合物的延长吸收，所述延迟吸收的制剂例如为单硬脂酸铝或药用胶。

[0117] 可以通过将所需量的活性化合物加入具有以上列出的一种成分或多种成分的组合的适当的溶剂中、根据需要然后进行过滤灭菌来制备注射用无菌溶液。通常，通过将活性化合物加入到包括基本分散介质以及以上列出的所需的其它成分的无菌媒介物中来制备分散质。在用于制备注射用无菌溶液的无菌粉末的情况中，典型的制备方法包括真空干燥和冷冻干燥，这可以产出活性成分以及来自于先前灭菌过滤的溶液中的任何其他所需成分的粉末。

[0118] 口服组合物通常包括惰性稀释剂或可食用的载体。为了口服治疗给药，活性化合物可以与赋形剂混合并以片剂、锭剂或胶囊（例如明胶胶囊）的形式使用。还可利用液态载体来制备口服组合物以用作洗口药。药学上相容的粘合剂和/或辅助材料可以被包括为该组合物的一部分。所述片剂、丸剂、胶囊剂、锭剂等可以包括具有相似性质的以下成分或化合物中的任一种：粘合剂，比如微晶纤维素、黄蓍胶或明胶；赋形剂，比如淀粉或乳糖；分裂剂，比如褐藻酸、羧甲淀粉钠、或玉米淀粉；润滑剂，比如硬脂酸镁或 Sterotes；助流剂，比如胶态二氧化硅；甜味剂，比如蔗糖或糖精；或者增味剂，比如薄荷、水杨酸甲酯或桔子调味品。

[0119] 关于通过吸入法给药，所述化合物可以以喷雾剂的形式从包括合适的推进物（例如，比如二氧化碳的气体）的加压容器或分配器或者喷雾器喷洒而递送。这样的方法包括第 6468798 号美国专利中描述的方法。

[0120] 本文中描述的治疗化合物的全身给药还可以通过经粘膜方法或经皮肤方法来进行。对于经粘膜给药或经皮肤给药，适合于待渗透的屏障的渗透剂用在该配方中。这样的渗透剂通常是本技术领域已知的，例如，对于经粘膜给药而言，这样的渗透剂包括清洗剂、胆汁盐类或梭链孢酸衍生物。可以通过使用鼻喷入法来完成经粘膜给药。对于经皮肤给药而言，活性化合物配制成本领域普遍知道的药膏、软膏、凝胶或乳液。在一个实施方式中，经皮肤给药可以通过电离子渗透法来进行。

[0121] 治疗性蛋白质或肽可以在载体体系中配制而成。该载体可以是胶态体系。该胶态体系可以是脂质体、磷脂双分子层媒介物。在一个实施方式中，在脂质体中该治疗肽被胶囊化，同时保持肽完整性。本领域技术人员理解，有各种方法来制备脂质体。（参见：Lichtenberg 等的 *Methods Biochem. Anal.*, 33:337-462(1988)；Anselem 等的 *Liposome Technology*, CRC Press(1993)）。脂质体制剂可以延迟排出并增强细胞摄取（参见 Reddy, *Ann. Pharmacother.*, 34(7-8):915-923(2000)）。活性剂还可以载入到由药学上可接受的成分制备成的颗粒中，所述药学上可接受的成分包括但不限于可溶解的、不可溶解的、可渗透的、不可渗透的、可生物降解的或胃内滞留的聚合物或脂质体。这样的颗粒包括但不限于纳米颗粒、可生物降解的纳米颗粒、微颗粒、可生物降解的微颗粒、纳米球、可生物降解

的纳米球、微球、可生物降解的微球、胶囊剂、乳剂、脂质体、胶粒以及病毒载体体系。

[0122] 该载体还可以是聚合物,比如可生物降解的、可生物相容的聚合物基质。在一个实施方式中,治疗性肽可以嵌入到聚合物基质中,同时保持蛋白质完整性。所述聚合物可以是天然的,比如多肽、蛋白质或多糖;或者可以是合成的,比如聚 α -羟酸。示例包括由例如以下物质制成的载体:胶原蛋白、纤连蛋白、弹性蛋白、乙酸钠纤维素、硝酸纤维素、多糖、纤维蛋白、明胶及其组合。在一个实施方式中,所述聚合物是聚乳酸(PLA)或乳酸羟基乙酸共聚物(PGLA)。可以以各种形式和尺寸来制备并分离聚合物基体,包括微球和纳米球。聚合物制剂可以引起治疗作用的期间的延长(参见:Reddy, Ann. Pharmacother., 34(7-8):915-923(2000))。用于人类生长激素(hGH)的聚合物制剂已用在临床试验中(参见:Kozarich 和 Rich, Chemical Biology, 2:548-552(1998))。

[0123] 高分子微球持续释放剂的示例在PCT公布W0 99/15154(Tracy等)、第5674534号美国专利以及第5716644号美国专利(都属于Zale等)、PCT公布W0 96/40073(Zale等)以及PCT公布W0 00/38651(Shah等)中予以描述。第5674534号美国专利以及第5716644号美国专利以及PCT公布W0 96/40073描述了包括含红细胞生成素的颗粒的聚合物基体,所述红细胞生成素的颗粒用盐来防止凝聚而稳定。

[0124] 在一些实施方式中,治疗性化合物与将保护所述治疗化合物以防止其从身体中快速排出的载体一起制备,所述载体比如控释剂,包括植入体和微胶囊化的输送体系。可以使用可生物降解的、生物相容的聚合物,比如乙烯醋酸乙烯酯、聚酐、聚乙醇酸、胶原质、聚原酸酯和聚乳酸。可以利用已知的技术来制备这样的制剂。还可以在在市场上获得所述材料,例如从Alza Corporation和Nova Pharmaceuticals, Inc买到。脂质体悬浮液(包括针对具有细胞特异性抗原的单细胞克隆抗体的特定细胞的脂质体)也可用作医学上可以接受的载体。所述脂质体悬浮液可以利用本领域技术人员知道的方法来制备,比如,第4522811号美国专利中描述的方法。

[0125] 还可以配制所述治疗性化合物以增强细胞内传递。例如,本领域已知脂质体传递系统,例如,参见:Chonn和Cullis的“Recent Advances in Liposome Drug Delivery Systems”, Current Opinion in Biotechnology 6:698-708(1995);Weiner的“Liposomes for Protein Delivery:Selecting Manufacture and Development Processes”, Immunomethods 4(3)201-9(1994);和Gregoriadis的“Engineering Liposomes for Drug Delivery:Progress and Problems” Trends Biotechnol. 13(12):527-37(1995)。以下文献描述了利用融合脂质体在体内和在体外将蛋白质传递至细胞:Mizguchi等的Cancer Lett. 100:63-69(1996)。

[0126] 可以通过细胞培养或试验动物中的标准药理学过程来确定治疗性药物的用量、毒性和治疗效率,例如,用于确定LD50(总数50%的致命剂量)和ED50(总数50%中有效治疗的剂量)。毒性和治疗效果之间的剂量比是治疗指数,且其可以表示为比率LD50/ED₅₀。表现出高治疗指数的化合物是优选的。尽管具有毒性副作用的化合物可以使用,但应当考虑设计传递系统,该传递系统将这样的化合物靶向组织的受影响的位置,以将对未感染的细胞的可能损伤最小化,且由此降低副作用。

[0127] 从细胞培养试验和动物研究获取的数据可以用在配制人类中使用的剂量范围中。这样的化合物的剂量优选地位于包括毒性很小或无毒的ED50的循环浓度的范围中。根据

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

[0128] 通常,芳香族阳离子肽的足以获得治疗效果或预防效果的有效量的范围为约 0.000001 毫克/千克体重/天到约 10000 毫克/千克体重/天。合适地,剂量范围从约 0.0001 毫克/千克体重/天到约 100 毫克/千克体重/天。例如,剂量可以是每天、每两天或每三天 1 毫克/千克体重或者 10 毫克/千克体重,或者在每周、每两周或每三周的 1 毫克/千克体重到 10 毫克/千克体重的范围中。在一个实施方式中,肽的单剂量的范围从 0.1 毫克/千克体重到 10000 毫克/千克体重。在一个实施方式中,芳香族阳离子肽在载体中的浓度的范围从 0.2 毫克/每毫升到 2000 毫克/每毫升。示例性的治疗方法每天或每周提供一次给药。在治疗应用中,在相对短的时间间隔中有相对高的剂量有时是需要的,直到疾病的进程减缓或终止为止,且优选地直到对象显示出部分或完全地改善了疾病的病症。其后,可以对患者实行预防性的给药方式。

[0129] 在一些实施方式中,芳香族阳离子肽的治疗有效的量可以限定为目标组织中的肽的浓度为 10^{-12} 摩尔到 10^{-6} 摩尔,例如约 10^{-7} 摩尔。可以以 0.01 毫克/千克到 100 毫克/千克的全身剂量或身体表面面积的等效剂量来给予前述浓度。优化剂量的时间表,以保持目标组织的治疗浓度,最优选地通过每天或每周给药,但也包括连续给药(例如,输液或经皮肤施药)来进行。

[0130] 在一些实施方式中,芳香族阳离子肽的剂量提供为从约 0.001mg/kg/h 到约 0.5mg/kg/h、合适地从约 0.01mg/kg/h 到约 0.1mg/kg/h。在一个实施方式中,剂量提供为从约 0.1mg/kg/h 到约 1.0mg/kg/h,合适地从约 0.1mg/kg/h 到约 0.5mg/kg/h。在一个实施方式中,剂量提供为从约 0.5mg/kg/h 到约 10mg/kg/h,合适地从约 0.5mg/kg/h 到约 2mg/kg/h。

[0131] 本领域技术人员将认识到,某些因素可以影响有效地治疗一对象的剂量和时间,包括但不限于疾病或失调的严重程度、先前的治疗、健康情况和/或对象的年龄以及存在的其它疾病。而且,利用本文描述的治疗有效量的治疗组合物来治疗一对象可以包括单次治疗或一系列治疗。

[0132] 根据本发明的方法治疗的哺乳动物可以是任何动物,这些动物例如包括农场动物,如羊、猪、牛和马;宠物动物,如狗和猫;实验室里的动物,如小鼠、大鼠和兔。在优选的实施方式中,所述哺乳动物是人。

[0133] 实施例

[0134] 通过以下实施例进一步例证了本发明,所述实施例不应当被理解成以任何方式限制本发明。

[0135] 已表明了,靶向线粒体的过氧化氢酶(mCAT)的过度表达改善小鼠老化并且延长小鼠的寿命。这些实施例识别可以减少线粒体氧化应激并且保护线粒体功能的“可作为药物的”化学化合物。由于线粒体为细胞内的活性氧簇(ROS)的主要源,因此,抗氧化剂必须被输送到线粒体以便限制对线粒体 DNA、电子传递链(ETC)的蛋白质和线粒体脂质膜的氧

化损伤。我们发现了一系列的选择性地靶向线粒体内膜 (IMM) 并聚集在线粒体内膜中的合成的芳香族阳离子四肽。这些肽中的一些肽含有氧化还原活性的氨基酸, 这些氨基酸可以经受单电子氧化并且表现为靶向线粒体的抗氧化剂。具体而言, 在细胞和动物研究中, 肽 D-Arg-2' 6' -Dmt-Tyr-Lys-Phe-NH₂ 减少了线粒体 ROS 并且保护线粒体功能。近来的研究表明, 该肽起到的抵抗线粒体氧化应激的保护作用可比得上利用线粒体过氧化氢酶的过度表达所观察到的抵抗线粒体氧化应激的保护作用。尽管清除自由基为减少氧化应激的最常用的方法, 但存在可以使用的其他潜在机理, 包括促进电子转移以减少电子泄露和提高线粒体还原电位。

[0136] 充足的间接证据表明, 氧化应激造成了正常老化和一些重大疾病的很多后果, 重大疾病包括心血管疾病、糖尿病、神经退行性疾病和癌症。氧化应激通常被定义成促氧化剂和抗氧化剂之间的失衡。然而, 尽管大量的科学证据支持组织的氧化损伤越来越多, 但对抗氧化剂的大量的临床研究并没有显示出对这些疾病有显著的健康益处。其中一个原因可能是由于可用的抗氧化剂不能到达促抗氧剂的产生部位。

[0137] 线粒体电子传递链 (ETC) 为 ROS 的主要的细胞内生产者, 以及线粒体本身最易于受到氧化应激的损害。因此, 保护线粒体功能将是防止由线粒体氧化应激导致的细胞死亡的先决条件。靶向线粒体的过氧化氢酶 (mCAT) (而不是靶向线粒体的过氧化物酶体 (pCAT)) 的过度表达的益处提供了以下概念验证, 即靶向线粒体的抗氧化剂将是克服老化的损害效应所必需的。然而, 将化学抗氧化剂充分输送到 IMM 仍然是挑战。

[0138] 一种肽类似物 D-Arg-2' 6' -Dmt-Tyr-Lys-Phe-NH₂ 具有内在的抗氧化剂性能, 这是因为改性的酪氨酸残基为氧化还原活性的并且可以经受单电子氧化。我们已经示出, 该肽可以中和 H₂O₂、羟自由基和过氧亚硝基, 并且抑制脂质过氧化。该肽在缺血再灌注损伤、神经退行性疾病和新陈代谢综合症的动物模型中已经显示出显著的功效。

[0139] 靶向线粒体的肽的设计包含并且增强了以下作用模式中的一种或多种: (i) 清除过量的 ROS, (ii) 通过促进电子传递来减少 ROS 生成, 或 (iii) 提高线粒体还原能力。肽分子的优点在于, 其可以包括可充当氧化还原中心、促进电子传递或增加巯基的天然或非天然的氨基酸, 同时保留线粒体靶向所需的芳香族阳离子基序。提出的设计策略由已知的电子化学支持并且将通过化学、生物化学、细胞培养和动物研究确认。现有技术的物理、化学和分子生物方法将用来针对线粒体 ROS 生成和氧化还原调节、测试与验证假设分子的作用模式来筛选新类似物。最有前景的类似物将被提供到各个项目以在线粒体模型、细胞模型和组织模型中评估。提出的研究表示了用以设计线粒体靶向的抗氧化剂的新型综合方法, 其明显不同于本领域中的其他方法。

[0140] 实施例 1. 芳香族阳离子肽的合成

[0141] 使用固相肽合成并且所有的氨基酸衍生物可在市场上买到。在肽组装完成之后, 以常用的方式将肽从树脂上切下。通过制备型的反相色谱法净化粗肽。通过快原子轰击 (FAB) 质谱分析法确认肽的结构的一致性, 以及通过分析型的反相高效液相色谱法 (HPLC) 和通过薄层色谱法在三个不同的体系中评估其纯度。可以获得大于 98% 的纯度。通常, 使用 5g 的树脂进行的合成产出约 2.0g 到 2.3g 的纯肽。

[0142] 实施例 2. 确定剂量方案

[0143] 所述肽可溶于水, 并且可以对其进行肠胃外 (静脉内、皮下、腹腔内) 给药。药代

动力学研究已经表明,在皮下给药之后吸收非常快且吸收完全,以及对于大多数适应症而言,体内疗效研究支持一天一次的剂量。我们还确定了,这些肽在 37℃ 下在溶液中为稳定的且稳定时间超过 3 个月。这使得可以借助可植入的 Alzet 微渗透压泵输送这些肽达 4 周或 6 周以避免每天注射。已证实了这种给药途径的可行性。我们在对大鼠和小鼠进行芳香族阳离子肽的长期给药中的经验表明,有效剂量的范围根据疾病模型从 0.00mg/kg/d 到 3mg/kg/d。毒理学研究已经显示,一些芳香族阳离子肽的安全边界非常宽,并且在大鼠中利用高达 300mg/kg/d 的剂量给药 28 天没有观察到副作用,例如,参见:Stuart 和 Young 的 Solid Phase Peptide Synthesis,第二版,Pierce 化学公司 (1984);和 Methods Enzymol.,289,学术出版社公司,纽约 (1997 年)。

[0144] 实施例 3. 口服活性的肽类似物

[0145] 通过水溶度、在肠胃液中的稳定度和穿过肠上皮屏障的吸收性确定任一化合物的口服生物利用度。肽 D-Arg-2' 6' -Dmt-Tyr-Lys-Phe-NH₂可溶于水、耐酸且耐胃酶,并且可以穿过上皮屏障容易地被吸收。然而,该肽的口服生物利用度受到该肽在肠液中降解的限制。该实施例提供了可以耐胰酶活性的新型类似物。

[0146] 使肽稳定以防止酶促降解的一种方式是用右旋氨基酸取代在经受裂解反应的肽键处的左旋氨基酸。制备除了已经存在的 D-Arg 残基之外还包括一个或多个右旋氨基酸残基的芳香族阳离子肽类似物。防止酶促降解的另一个方法是使肽的一个或多个氨基酸残基处的 α 氨基基团发生 N-甲基化。这将防止肽键被任一肽酶裂解。示例包括: H-D-Arg-Dmt-Lys(N^aMe)-Phe-NH₂; H-D-Arg-Dmt-Lys-Phe(NMe)-NH₂; H-D-Arg-Dmt-Lys(N^aMe)-Phe(NMe)-NH₂; 以及 H-D-Arg(N^aMe)-Dmt(NMe)-Lys(N^aMe)-Phe(NMe)-NH₂。N^a-甲基化的类似物具有较低的氢键结合能力并且预期可以改善肠道通透性。

[0147] 使肽酰胺键(-CO-NH-)稳定以防止酶促降解的可替代方式为用还原的酰胺键(Ψ [CH₂-NH])替代该肽酰胺键。这可以通过在固相肽合成中在 Boc-氨基酸-乙醛和生长的肽链的 N 末端氨基酸残基的氨基基团之间发生还原性烷基化反应来实现。预计还原后的肽键因氢键结合能力下降而引起细胞通透性提高。示例包括: H-D-Arg- Ψ [CH₂-NH]Dmt-Lys-Phe-NH₂, H-D-Arg-Dmt- Ψ [CH₂-NH]Lys-Phe-NH₂, H-D-Arg-Dmt-Lys- Ψ [CH₂-NH]Phe-NH₂, H-D-Arg-Dmt- Ψ [CH₂-NH]Lys- Ψ [CH₂-NH]Phe-NH₂等。

[0148] 针对在血浆、人造胃液 (SGF) 和人造肠液 (SIF) 中的稳定性筛选这些新型类似物。将一定量的肽加入到 10ml 的具有胃蛋白酶的 SGF 中 (Cole-Palmer) 或具有胰酶的 SIF 中 (Cole-Palmer),混合并且培养 0 分钟、30 分钟、60 分钟、90 分钟和 120 分钟。在固相提取后,通过 HPLC 分析样品。接着,评估在 SGF 和 SIF 中都稳定的新型类似物在 Caco-2 单层细胞中的分布。表观渗透系数确定大于 10⁻⁶cm/s 的(可预知良好的肠道吸收)的类似物则具有减少细胞培养液中所确定的线粒体氧化应激的活性。使用用于超氧化物的 MitoSox 和 HyPer-mito(用于感测 H₂O₂的靶向线粒体的基因编码的荧光指示剂)通过 FACS(流式细胞术)量化线粒体 ROS。线粒体氧化应激源可以包括过氧叔丁醇、抗霉素和血管收缩素。可以满足所有这些条件的新型类似物随后可以进行大规模的合成。

[0149] 可以预知,提出的策略将产生具有口服生物利用度的类似物。Caco-2 模型被制药产业视为肠道吸收性的良好预测器。

[0150] 实施例 5. 具有改善的电子清除能力的新型肽类似物

[0151] 一些天然的氨基酸为氧化还原活性的并且能够进行单电子氧化,这样的氨基酸包括 Tyr、Trp、Cys 和 Met,最通用的为 Tyr。Tyr 可以通过包括被 H_2O_2 和羟基自由基氧化的机理经受单电子氧化。酪氨酰自由基与 O_2 反应不佳,但可以结合以形成二酪氨酸二聚物。可以通过 GSH 清除酪氨酰自由基以产生含硫自由基 (GS•) 和超氧化物。超氧化物和苯氧基自由基的反应可以引起母体苯酚的修复或加成以形成氢过氧化物。一些条件有利于产生 Tyr 氢过氧化物,尤其是如果 Tyr 为 N 末端或者游离胺在附近。在现有的肽中,已通过 Tyr 或被取代的 Tyr (包括 2', 6'-Dmt) 提供电子清除。用 Phe 替代 Tyr 完全破坏了清除活性。

[0152] 我们预计,可以通过增大氧化还原活性的氨基酸的数目来增强肽的电子清除能力。我们还发现,与 Tyr 相比,在 Tyr 上加入甲基基团进一步提高了清除能力。此外,代替 Tyr, Trp 或 Met 可以取代到用于线粒体靶向的芳香族阳离子肽的设计中。超氧化物可以与色氨酸反应以形成大量的不同的反应产物,并且可以与蛋氨酸反应以形成蛋氨酸亚砷。新型肽类似物的示例包括: D-Arg-Dmt-Lys-Dmt-NH₂; D-Arg-Dmt-Lys-Trp-NH₂; D-Arg-Trp-Lys-Trp-NH₂; D-Arg-Dmt-Lys-Phe-Met-NH₂。这些新型类似物清除 H_2O_2 、羟基自由基、超氧化物和过氧亚硝基的能力在体外被确定,并且随后在细胞培养中得到确认。

[0153] 我们预料,肽类似物的清除能力将随着氧化还原活性的氨基酸的数量增大而线性增强。重要的是,我们保持芳香族阳离子基序以便保持线粒体靶向电位。可以将肽的长度增大到 6 个残基并且获得 3 倍的清除能力且同时仍然保持细胞通透性。

[0154] 实施例 6. 促进电子传递的新型肽类似物

[0155] ETC 中的 ATP 合成是由通过 ETC 的蛋白质络合物的电子流驱动的,这可以描述为一系列氧化 / 还原过程。穿过 ETC 的电子的快速分流对于防止短路是重要的,短路可导致电子逃逸和生成自由基中间物。在电子给体和电子受体之间的电子传递 (ET) 的速率随着电子给体和电子受体之间的距离而呈指数减小,超交换 ET 限于 20Å。长范围 ET 可以在多步电子跳跃过程中实现,其中给体和受体之间的总距离被分成一系列的较短并且因此较快的 ET 步骤。在 ETC 中,长距离的有效 ET 由沿着 IMM 战略性地定位的辅因子辅助,辅因子包括 FMN、FeS 簇和亚铁血红素。例如 Phe、Tyr 和 Trp 的芳香氨基酸也可以促进电子通过重叠 π 电子云传递到亚铁血红素,这对于 cyt c 而言尤其如此。具有适合的氧化电位的氨基酸 (Tyr、Trp、Cys、Met) 可以通过充当中间电子载体而作为跳板 (stepping stone) 作用。此外,当 Tyr 的羟基传输电子时其可以失去质子,并且附近的碱性基团 (例如 Lys) 的存在可以导致甚至更有效的质子耦合 ET。

[0156] 我们假设,芳香族阳离子肽在 IMM 中的蛋白质络合物中的分布可使其充当附加的中继站以便于 ET。为了支持该假设,我们采用 cyt c 还原的动力学 (通过吸收光谱法监控) 作为简单的模型系统以确定肽 D-Arg-2' 6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ 是否可促进 ET。添加作为还原剂的 N-乙酰半胱氨酸 (NAC) 导致 550nm (A_{550}) 处的吸收随时间增多 (图 1)。单独添加 100 μ M 浓度的肽不还原 cyt c, 但剂量相关地增大 NAC 诱发的 cyt c 还原的速率,这表明,该肽不放出电子但是可以加速电子传递。对作为还原剂的 GSH 和肽 H-Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ 获得类似的结果。

[0157] 初步研究进一步支持我们的假设,即, D-Arg-2' 6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ 可以促进 ET 并且提高体内的 ATP 合成。我们已经研究了,在大鼠受到缺血 - 再灌注 (IR) 损伤之后,该肽对线粒体呼吸和 ATP 合成的恢复的作用。大鼠经受达 45 分钟的肾动脉双侧结扎,随后进

行 20 分钟或 1 小时的再灌注。在局部缺血前 30 分钟时,以及在再灌注时,大鼠接受生理盐水或肽 (2.0mg/kg 皮下注射) (在每个组中 $n = 4$ 至 5)。图 2 和图 3 示出了结果,并且,所述结果证实了肽改善了氧消耗和 ATP 合成。

[0158] 制备了六肽类似物,其包括:D-Arg-Dmt-Lys-Phe-Lys-Trp-NH₂、D-Arg-Dmt-Lys-Dmt-Lys-Trp-NH₂、D-Arg-Dmt-Lys-Phe-Lys-Met-NH₂和 D-Arg-Dmt-Lys-Dmt-Lys-Met-NH₂等。这些类似物在 cyt c 还原试验中被评估,以及由对通透化的肌纤维和完好肌肉进行的电子通量测试确认。可以预计,与对照相比,这些肽将改善氧消耗和 ATP 合成。

[0159] 实施例 7. 可以提高线粒体的还原电位的新型肽类似物

[0160] 细胞的氧化还原环境取决于其还原电位和还原能力。氧化还原电位在细胞内被高度分区化,线粒体区室中的氧化还原对与其它细胞区室更具有还原性,并且更易于受到氧化的影响。谷胱甘肽 (GSH) 在线粒体中以 mM 的浓度存在并且被视为主要的氧化还原对。还原的硫醇基 -SH 可以还原蛋白质中的二硫化物 S-S 基并且恢复功能。GSH/GSSG 对的氧化还原电位取决于两个因素:GSH 和 GSSG 的量,以及 GSH 和 GSSG 之间的比率。由于 GSH 在细胞中被分区化以及 GSH/GSSG 的比率在各个区室中被独立调节,因此线粒体的 GSH (mGSH) 为抵抗线粒体氧化应激的主要防御。线粒体的 GSH 氧化还原电位随着老化而氧化性更强,这主要是由于 GSSG 含量增大以及 GSH 含量降低。

[0161] 芳香族阳离子肽用作载体以导引 Cys 输送至线粒体中。预计一些芳香族阳离子肽中的 Cys 的 -SH 基团参与与 GSSG 进行硫醇-二硫化物交换反应以恢复线粒体的 GSH/GSSG 浓度。在肾脏缺血再灌注 (IR) 损伤的大鼠模型中,用 SS-48 (H-Phe-D-Arg-Phe-Lys-Cys-NH₂) 获得初步结果。大鼠经受 45 分钟的肾动脉双侧结扎,随后进行 1 小时的再灌注。在大鼠局部缺血前 30 分钟时以及在再灌注时,大鼠接受生理盐水或 SS-48 (0.5mg/kg 皮下注射) (在每个组中 $n = 4$)。如图 4 所示,SS-48 能够保持 IR 肾脏中的 [GSH]/[GSSG]。这些结果表明,SS-48 可以用来提高 Cys 的细胞摄取。除了在 C 末端直接添加 Cys 之外,我们还将借助间隔基 (spacer) — 肌氨酸 (Sar)、Sar-Gly 或 7-氨基庚酸引入 Cys。这将在 C 末端提供结构灵活性以进行更有效的硫醇/二硫化物交换。含有 Cys 的类似物的一些示例如下:H-Phe-D-Arg-Phe-Lys-Gly-Cys-NH₂, H-D-Arg-Dmt-Lys-Phe-Gly-Cys-NH₂, H-Phe-D-Arg-Phe-Lys-Sar-Cys-NH₂和 H-D-Arg-Dmt-Lys-Phe-Sar-Gly-Cys-NH₂。随后将针对它们改善在 H₂O₂ 或 tBHP 诱发的氧化应激下的细胞培养基中的 GSH:GSSG 的比率的能力来筛选这些新型的含 Cys 的类似物。将使用谷胱甘肽还原酶回收方法确定细胞溶质的和线粒体的 [GSH] 和 [GSSG]。将在心肌和骨骼肌中证实结果好的类似物。

[0162] 等同物

[0163] 本发明不限于在本申请中描述的特定实施方式,用作本发明的单个方面的单独例证。本领域技术人员可以理解,可以不脱离本申请的精神和范围的情况下进行各种修改和改动。根据以上描述,除了本文中列举的以外,本公开的范围内的功能上等同的方法和装置对于本领域的技术人员而言是明显的。这样的改动和修改旨在落在所附权利要求书的范围内。本公开仅受所附权利要求书以及与此权利要求书的范围所等同的全部范围限制。应当理解,本公开不限于特定的方法、试剂、组合物和生物系统,当然,所述方法、试剂、组合物和生物系统可以变化。还可理解,本文中使用的术语仅用于描述特定的实施方式而

不旨在限制。

[0164] 此外,在以马库什组的方式描述本公开的特征或方面的情况下,本领域的技术人员可以理解,本公开也是以马库什组中的任一单个成员或亚组成员的方式所描述的。

[0165] 本领域的技术人员可以理解,为了任何或所有目的,尤其是提供说明书支持方面,本文中描述的所有范围还可涵盖任何且所有的可能子范围及其子范围的组合。任何列出的范围可以容易地看作充分公开并使其能够同一范围分成至少二分之一、三分之一、四分之一、五分之一、十分之一等的子范围。作为非限制性实施例,本文中描述的每一范围可以容易地分成下三分之一、中三分之一和上三分之一等。本领域技术人员还可以理解,所有的语言比如“上至”“至少”、“大于”、“小于”等包括本数且适用于可以随后被分成以上上述所提及子范围的范围。最后,本领域技术人员可以理解,范围包括每一单个成员。因此,例如,具有 1 到 3 个单元的组指的是具有 1 个单元、2 个单元或 3 个单元的组。类似地,具有 1 到 5 个单元的组指的是具有 1 个单元、2 个单元、3 个单元、4 个单元或 5 个单元的组,诸如此类。

[0166] 本文所参考的或引用的所有专利、专利申请、在先申请和出版物通过引用以包括所有的附图和表格的全文并入本文,使得它们不与本说明书的明确教导相矛盾。

[0167] 在所附的权利要求书中提出了其他实施方式。

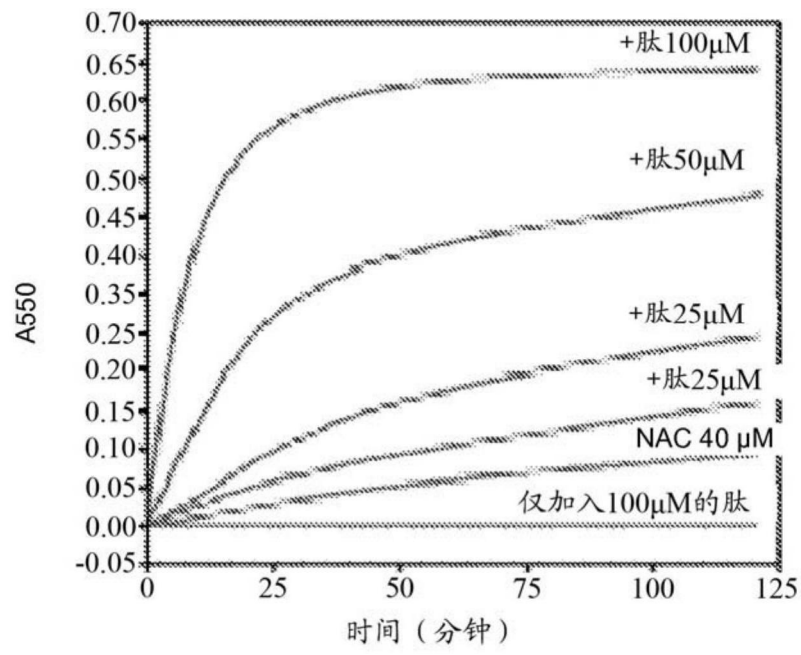


图 1

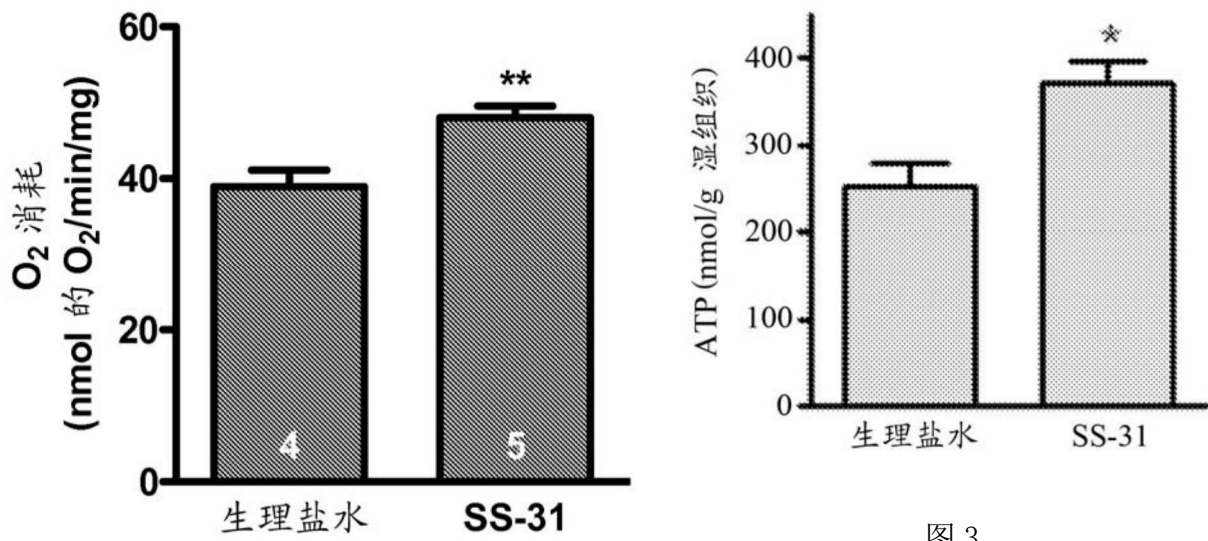


图 3

图 2

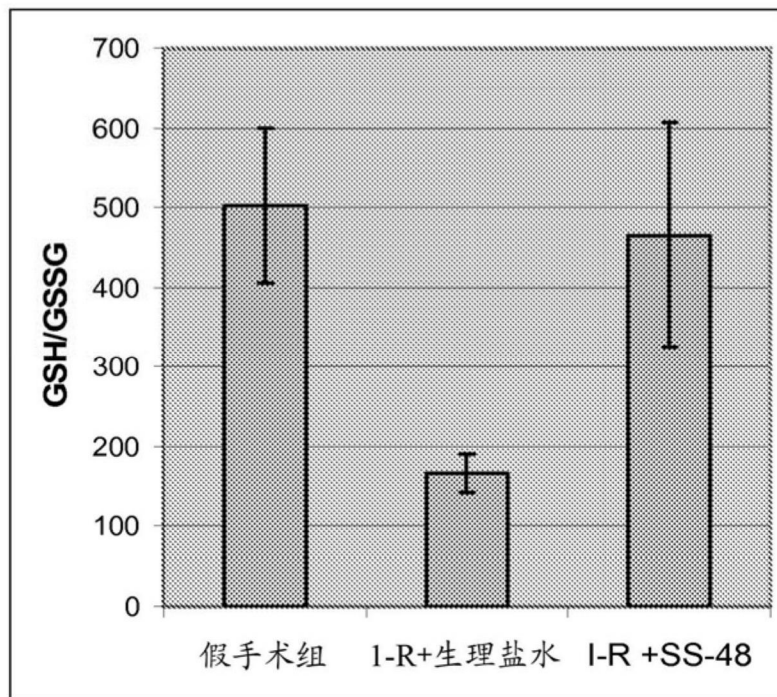


图 4

Abstract

The disclosure provides aromatic-cationic peptide compositions and methods of preventing or treating disease using the same. The methods comprise administering to the subject an effective amount of an aromatic-cationic peptide to subjects in need thereof.