

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发 明 专 利 说 明 书

专利号 ZL 200380104091.3

[51] Int. Cl.

C07K 5/06 (2006.01)

A61K 38/06 (2006.01)

A61P 9/06 (2006.01)

[45] 授权公告日 2009 年 11 月 11 日

[11] 授权公告号 CN 100558742C

[22] 申请日 2003.11.25

[21] 申请号 200380104091.3

[30] 优先权

[32] 2002.11.25 [33] US [31] 60/428,973

[86] 国际申请 PCT/DK2003/000805 2003.11.25

[87] 国际公布 WO2004/048400 英 2004.6.10

[85] 进入国家阶段日期 2005.5.25

[73] 专利权人 西兰制药公司

地址 丹麦格洛斯楚普

[72] 发明人 B·D·拉森 C·B·克努森

J·S·彼得森

[56] 参考文献

WO 02077017A2 2002.10.3

Delta - acetyl - L - omithyl - Beta - alanine
Methy EsterHydrochooride, an Intermolecule Type
Sweetener. Takashi Seki et aa. Agric. Biol.
Chem., Vol. 54 No. 1. 1990

审查员 唐 慧

[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

代理人 郭建新

权利要求书 7 页 说明书 50 页 附图 3 页

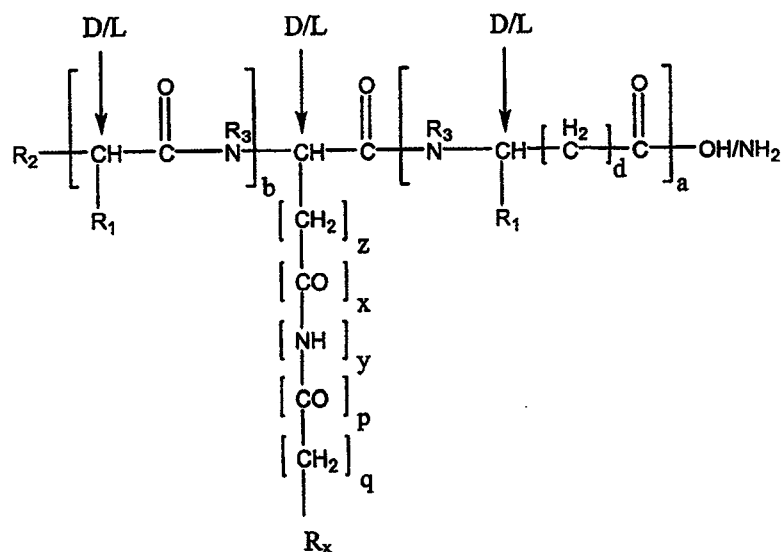
[54] 发明名称

肽间隙连接调节剂

[57] 摘要

公开了促进由间隙连接介导的细胞间通讯的二肽。本发明具有广谱的有用的应用,包括在治疗与受损伤的间隙连接细胞内通讯(GJIC)有关的疾病中的用途。

1. 通式 I 代表的肽或其药学上可接受的盐:



其中:

a 是 0 或 1;

b 是 0 或 1;

d 是 0-8;

p 是 0 或 1;

q 是 0 或 1;

x 是 0 或 1;

y 是 0 或 1; 并且

z 是 1-7,

其中如果 a 是 1 则 b 是 0;

其中如果 a 是 0 则 b 是 1;

其中如果 x 是 1 则 y 和 q 是 1 且 p 是 0;

其中如果 p 是 1 则 x 和 q 是 0 且 y 是 1;

其中如果 R₁ 是 H 则 d 是 0-8;

其中如果 R₁ 不是 H 则 d 是 0;

其中 R_1 是选自由下列氨基酸组成的组的氨基酸的侧链：丙氨酸、精氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、甘氨酸、组氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、丝氨酸、苏氨酸、色氨酸、酪氨酸和缬氨酸；

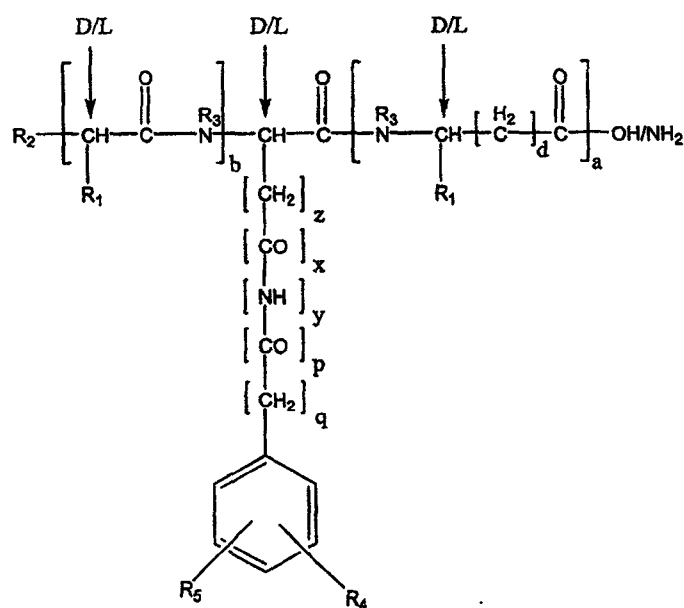
其中 R_2 选自由 NH_2 、 NHR 、 NR_2 、 NR_3^+H 、 OH 、 SH 、 RO 、 RS 、 RSO 、 RSO_2 、 COR 、 CSR 、 $COOH$ 、 $COOR$ 、 $CONH_2$ 、 $CONHR$ 、 $CONR_2$ 、 $OCOR$ 和 $SCOR$ 组成的组，

其中 R = 烷基、链烯基、芳基、芳烷基或环烷基；

其中 $R_3 = H$ 或 CH_3 ；并且

其中 R_x 是包含 4-位取代基的 6-元芳香碳环。

2. 通式 II 代表的肽或其药学上可接受的盐：



其中：

a 是 0 或 1；

b 是 0 或 1；

d 是 0-8；

p 是 0 或 1；

q 是 0 或 1；

x 是 0 或 1;

y 是 0 或 1; 并且

z 是 1-7,

其中如果 a 是 1 则 b 是 0;

其中如果 a 是 0 则 b 是 1;

其中如果 x 是 1 则 y 和 q 是 1 且 p 是 0;

其中如果 p 是 1 则 x 和 q 是 0 且 y 是 1;

其中如果 R_1 是 H 则 d 是 0-8;

其中如果 R_1 不是 H 则 d 是 0;

其中 R_1 是选自由下列氨基酸组成的组的氨基酸的侧链: 丙氨酸、精氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、甘氨酸、组氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、丝氨酸、苏氨酸、色氨酸、酪氨酸和缬氨酸;

其中 R_2 选自由 NH_2 、 NHR 、 NR_2 、 NR_3^+H 、 OH 、 SH 、 RO 、 RS 、 RSO 、 RSO_2 、 COR 、 CSR 、 $COOH$ 、 $COOR$ 、 $CONH_2$ 、 $CONHR$ 、 $CONR_2$ 、 $OCOR$ 和 $SCOR$ 组成的组, 其中 R=烷基、链烯基、芳基、芳烷基或环烷基;

其中 $R_3=H$ 或 CH_3 ;

其中 R_4 和 R_5 独立地选自由 H、烷基、链烯基、芳基、芳烷基、卤素、 CN 、 NO_2 、烷氧基、芳氧基、芳烷氧基、硫烷氧基、硫芳氧基、硫芳烷氧基、 $+S(CH_3)_2$ 、 SO_3H 、 SO_2R 、 NH_2 、 NHR 、 NR_2 、 $+NR_3$ 、 OH 、 SH 、 $COOH$ 、 $COOR$ 、 $CONH_2$ 、 $CONHR$ 、 $CONR_2$ 、 CH_2OH 、 NCO 、 $NCOR$ 、 $NHOH$ 、 $NHNH_2$ 、 $NHNHR$ 、 CH_2OCOR 、 CH_2OCSR 、 COR 、 CSR 、 $CSOR$ 、 CF_3 和 CCl_3 组成的组, 且其中 R 是烷基、链烯基、芳基、芳烷基或环烷基; 并且

其中 R_4 或 R_5 是所述 6-元芳香碳环 4 位上的取代基。

3. 根据权利要求 1 或 2 的肽, 其中 d 是 0; 并且 R_1 是氨基酸的侧链, 所述氨基酸选自由下列氨基酸组成的组: 丙氨酸、精氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、甘氨酸、组氨酸、

异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、丝氨酸、苏氨酸、色氨酸、酪氨酸和缬氨酸。

4. 根据权利要求1或2的肽,其中所述肽含有至少一种D氨基酸。

5. 根据权利要求1或2的肽,其中 z 是1、2、4、5、6或7。

6. 根据权利要求1或2的肽,其中所述芳香碳环被下列基团的至少一个取代:低级烷基、烷氧基、羧基、硫醇、酰肼、酰胺、卤化物、羟基、醚、胺、腈、亚胺、硝基、硫化物、亚砷、砷、醛、酮基、酯基团、硒基和硫基。

7. 根据权利要求1或2的肽,其中所述肽包括游离的N-末端,游离的C-末端或游离的N-和C-末端两者。

8. 根据权利要求1或2的肽,其中所述药学上可接受的盐是酸加成盐、金属盐、铵盐或氨基酸加成盐。

9. 根据权利要求8的肽,其中所述药学上可接受的盐是盐酸盐、硫酸盐、磷酸盐、乙酸盐、马来酸盐、富马酸盐、酒石酸盐、柠檬酸盐、钠盐、钾盐、镁盐、钙盐、铵或四甲基铵盐、赖氨酸盐、甘氨酸盐或苯丙氨酸盐。

10. 根据权利要求1或2的肽,其中所述肽进一步包括氢键基团,并且所述氢键基团的质量中心与 R_x 或6-元芳香碳环之间的距离包括4埃至12埃。

11. 根据权利要求1或2的肽,其中所述肽进一步包括氢键基团,并且所述氢键基团的质量中心与 R_x 或6-元芳香碳环之间的距离包括5埃至10埃。

12. 根据权利要求11的肽,其中所述氢键基团具有3至11埃的半径。

13. 根据权利要求1或2的肽,其中所述取代基选自由甲基、乙基、叔丁基、环己基、苯基、正丁基、正己基、正辛基、乙氧基、叔丁氧基、苯氧基、丁氧基、苄氧基、正己氧基和正辛氧基组成的组。

14. 根据权利要求1或2的肽,其中所述肽起抗心律失常药物的

作用。

15. 根据权利要求1或2的肽,其中所述肽是口服适用的肽。

16. 根据权利要求1或2的肽,其中所述肽与 hPepT1 运载蛋白或其生物学活性片段结合。

17. 根据权利要求1或2的肽,其中所述肽在体外血浆稳定性试验中具有大于30分钟的半衰期。

18. 根据权利要求1或2的肽,其中所述肽在体外血浆稳定性试验中具有大于48小时的半衰期。

19. 根据权利要求1或2的肽,其中所述肽包含被修饰以使肽针对酶促降解稳定的肽键。

20. 根据权利要求1或2的肽,其中所述肽与作为抗心律失常肽的作用位点的组织、细胞或细胞部分结合。

21. 根据权利要求20的肽,其中所述抗心律失常肽选自由 AAP, AAP10 和 HP5 组成的组。

22. 根据权利要求20的肽,其中所述肽是组织、细胞或细胞部分的功能的调节剂。

23. 根据权利要求22的肽,其中所述肽拮抗抗心律失常肽的功能。

24. 根据权利要求22的肽,其中所述肽激动抗心律失常剂的功能。

25. 根据权利要求20的肽,其中所述肽是抗心律失常肽的受体的调节剂。

26. 根据权利要求2的肽,其中所述肽是表1中显示的肽,其选自由化合物1-102组成的组。

27. 根据权利要求2的肽,其中所述肽是:

H-Gly-Lys(4-硝基苯甲酰基)-OH;

H-Gly-Lys(4-甲氧基苯甲酰基)-OH;

H-D-Lys(4-甲氧基苯甲酰基)-Gly-OH;

H-D-Lys(4-硝基苯甲酰基)Gly-OH;

H-D-Lys(4-叔丁基苯甲酰基)-Gly-OH;

H-D-Asn(NH(4-硝基苄基)Ala-OH;

H-D-Lys (苯甲酰基) Gly-OH 或

H-D-Asn (NH (4-甲氧基苄基) Ala-OH.

28. 根据权利要求 1 的肽, 其中所述肽是表 1 中显示的肽, 其选自化合物 1-5、7、8、11-16、18-22、24-35、37-66、68-81 和 83-102 组成的组。

29. 根据权利要求 1 的肽, 其中所述肽是:

H-Gly-Lys(4-硝基苯甲酰基)-OH;

H-Gly-Lys(4-甲氧基苯甲酰基)-OH;

H-D-Lys(4-甲氧基苯甲酰基)-Gly-OH;

H-D-Lys(4-硝基苯甲酰基)Gly-OH;

H-D-Lys(4-叔丁基苯甲酰基)-Gly-OH;

H-D-Asn(NH(4-硝基苄基)Ala-OH; 或

H-D-Asn (NH (4-甲氧基苄基) Ala-OH.

30. 根据权利要求 1 或 2 的肽在制备用于治疗涉及受损伤的间隙连接通讯的病理学状况的药物中的用途, 所述治疗包括给予患者治疗有效量的所述肽。

31. 根据权利要求 30 的用途, 其中所述药物用于预防和治疗心律失常。

32. 根据权利要求 31 的用途, 其中所述心律失常是缓慢心律失常或快速心律失常。

33. 根据权利要求 31 的用途, 其中所述心律失常是房性心律失常。

34. 根据权利要求 31 的用途, 其中所述心律失常是室性心律失常。

35. 根据权利要求 30 的用途, 其中所述药物用于口服。

36. 根据权利要求 30 的用途, 其中所述药物用于对人类患者施用。

37. 根据权利要求 1 或 2 的肽在制备用于治疗骨质疏松或其它影响骨形成、生长或维持的病理学的药物中的用途。

38. 根据权利要求 37 的用途, 其中所述药物用于口服。

39. 根据权利要求 37 的用途, 其中所述药物用于对人类患者施用。

40. 用于调节间隙连接通讯的药物组合物, 它包含权利要求 1 至

29 任意一项的肽和药物载体。

41. 根据权利要求 40 的药物组合物，其中所述组合物是可口服给药的。

肽间隙连接调节剂

发明领域

本发明涉及口服适宜的能调节细胞内间隙连接通讯的二肽。本发明也涉及使用所述肽来调节这样的通讯的方法，涉及所述肽在制备用于预防和/或治疗与所述通讯有关的状况的药物中的用途，和涉及包括所述二肽的药物组合物。

背景

人们日益认识到，细胞间的通讯对细胞的内环境平衡、繁殖和分化是必不可少的。认为这种通讯被间隙连接促进。这些结构被认为是偶联细胞，并允许“交谈”的一种途径。通常参见，Sperelakis, N., (1989) Cell Interactions and Gap Junctions by N. Sperelakis, William C. Cole (Editor)。

人们努力去了解间隙连接的结构和功能。例如，已有报道这类连接是一类在相邻细胞之间形成的复合物。认为大多数的间隙连接由直接连接邻近细胞内部(细胞质)的集合通道组成。在成年哺乳动物中，除循环的血液要素之外，在大多数细胞型中发现了间隙连接。

更具体地说，人们承认间隙连接是具有数百至数千密集包裹的间隙连接通道(包括两个半通道或连接蛋白)的细胞膜的特殊化区域。许多被认为直接连接两个邻近细胞的胞质腔隙。间隙连接通道可以在打开和关闭状态之间转换。在打开状态，认为离子和小分子可以通过孔隙。电脉冲传导和细胞间信号分子的扩射通过间隙连接发生。

在间隙连接之间的“交谈”被称为间隙连接的细胞内通讯(GJIC)，认为其在细胞代谢、繁殖、细胞至细胞间信号传导和组织完整性的调节中起重要作用。

例如，认为 GJIC 允许营养素、离子和细胞间流体的快速平衡。还

认为间隙连接在电可兴奋细胞中起电突触的作用。在许多组织中，认为电偶联允许比化学突触更快速的细胞至细胞间动作电位的传递。在心肌细胞和平滑肌细胞中，例如，认为这协助同步收缩。

已有通过 GJIC 介导的其它功能的报告。例如，认为 GJIC 增强组织对外界刺激的响应性。通常认为第二信使足够小以致于通过连接通道从激素活化的细胞穿过至休眠细胞，并将后者活化。

另外，已有报道间隙连接可以提供化学和/或电发育信号的细胞间路径，并协助界定发育腔隙的界限。已公开了 GJIC 在胚细胞中的具体模式中存在，并且 GJIC 的损害与发育异常和许多化学物致畸效应有关。进一步地，认为 GJIC 协助细胞活性的协调。

一些报告已证实，GJIC 中的异常与一系列疾病状态之间的联系在体外和体内已得到确定。例如，已认为在连接蛋白中的异常与心脏病之间有联系。Cx43 在心脏中的表达和分布的若干研究，描述了 Cx43 表达的降低程度和该间隙连接蛋白分布的改变的模式。参见 Kaprielian, R. R., 等人(1998) *Circulation* 97: 651-660; 和 Saffitz, J. E., 等人, (1999) *Cardiovasc Res.* 42: 309-317。

因此，在功能失常或间隙连接缺乏与增加的心律失常危险之间的关系领域存在认可。认为在改变的连接蛋白表达/分布与慢性心脏病之间有进一步的关系。

人们已进行了分析影响 GJIC 的肽的尝试。例如，已经公开了具有增加心脏中间隙连接传导性能力的一组肽（抗心律失常肽）。特别地，报道了从牛心房中已经分离出分子量 470D 的六肽。在新生大鼠心肌细胞中，据报道所述肽可将由乌本苷、钙或钾引起的纤维性颤动转变至正常节律。另外，报道所述肽将由钾和乙酰胆碱的结合引起的分离的大鼠心房的心律失常运动转变至正常节律。这种肽常常被称为抗心律失常（antiarrhythmic）肽（AAP）。参见例如，Aonuma, S., 等人(1980) *Chem Pharm Bull* (Tokyo) 28: 3332-3339。

人们日益了解到，AAP 是具有调节心脏中 GJIC 能力的重要肽。

例如，在细胞培养物中，显示 AAP 增加搏动中心的数目、传播细

胞的相对含量和蛋白质合成。参见 Aonuma, S., 等人(1980) Chem Pharm Bull (Tokyo) 28: 3340-3346。在其它研究中, 已经证实了体外观察到的 AAP 的抗心律失常的效果。据报道, 在小鼠中 AAP 对抗 CaCl_2 -、哇巴因-和 acotinine-导致的心律失常是有效的。参见 Ronsberg, M. A., 等人(1986) Med. Sci. 14: 350-351。

已经公开了 AAP 序列。参见例如, Aonuma, S., 等人(1982) J Pharmacobiodyn. 5: 40-48。

人们已经努力制备各种 AAP 衍生物。见例如, Dikshit, M., 等人(1988), Indian J. Exp. Biol. 26: 874-876; Kohama, Y., 等人(1987), Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) 35: 3928-3930; 和 Kohama, Y., 等人(1988), Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) 36: 4597-4599)。

例如, 一种这样的衍生物, AAP10, 被认为影响 GJIC。见 Dhein, S., 等人(1994), Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol. 350: 174-184; 和 Muller, A., 等人(1997) Eur. J. Pharmacol. 327: 65-72。据报道 AAP 提高了 GJIC, 降低了动作电位的分散并改进了传导性。

人们日益了解到, 许多抗心律失常肽确实影响 GJIC、常常不影响动作电位持续时间或形态。进一步, 认为许多这类肽没有不良的前心律失常的副作用。据认为这类作用限制了许多现行适用的抗心律失常药的用途。另外, AAP 以及某些 AAP 衍生物, 被认为具有一些不希望有的特征, 例如低稳定性和达到治疗功效之前需要高剂量。

许多潜在重要的肽缺少可接受的口服利用度。即, 所述肽在胃肠道、肠道细胞或在两者中被降解。在此情况下, 常常通过更疼痛且更不方便的静脉内途径将肽给予受试者。

人们已尝试通过增加与被称为 PepT1 的肠肽运载蛋白的接触, 来改进某些化合物的口服利用度。关于 PepT1 运载系统已有许多了解。参见 Bailey, P. D., 等人(2000) Angew. Chem. Int. Ed. 39: 506; 和其中引用的参考文献。

希望具有更有效的 GJIC 的肽调节剂。特别希望具有口服适用的肽调节剂。

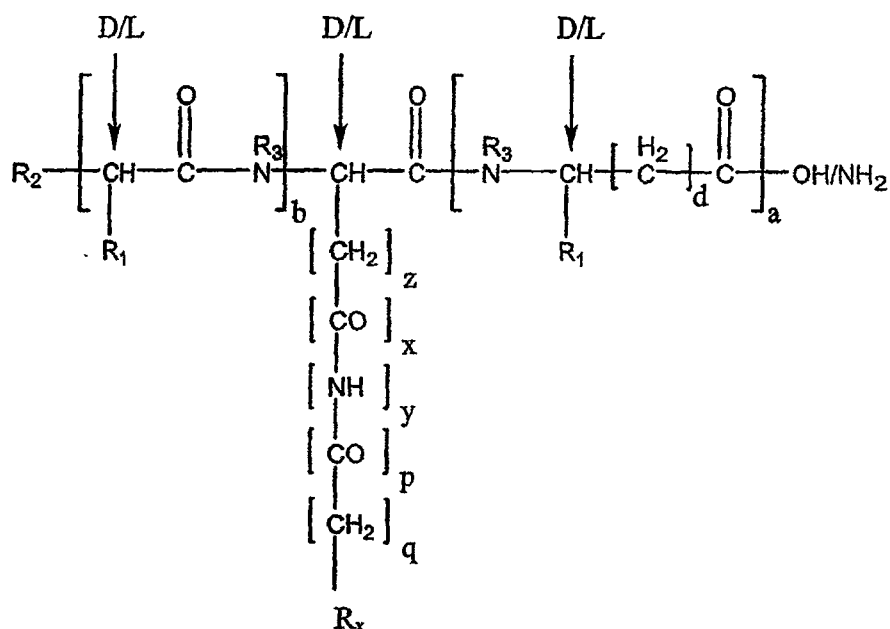
发明概述

本发明一般地涉及调节间隙连接细胞间通讯(GJIC)的肽。优选的肽是口服适用的。本发明具有广谱有用的应用,包括在治疗或预防与受损伤的GJIC有关的病理学中的用途。

以下列通式 I 表示按照本发明优选的肽：

其中，如果 $a = 1$ 則 $b = 0$;

如果 $a = 0$ 則 $b = 1$;


$$z = 1-7;$$

如果 $x = 1$ 則 y 和 $q = 1$ 和 $p = 0$;

如果 $p = 1$ 则 x 和 $q = 0$ 和 $y = 1$; 且进一步, 其中,

如果 $R_1 = H$ 則 $d = 0-8$;

如果 $R_1 \neq H$ 则 $d = 0$;

其中 R_1 = 下列任一氨基酸的側鏈：例如，丙氨酸，精氨酸，天冬酰胺，天冬氨酸，半胱氨酸，谷氨酸，谷氨酰胺，甘氨酸，組氨酸，異

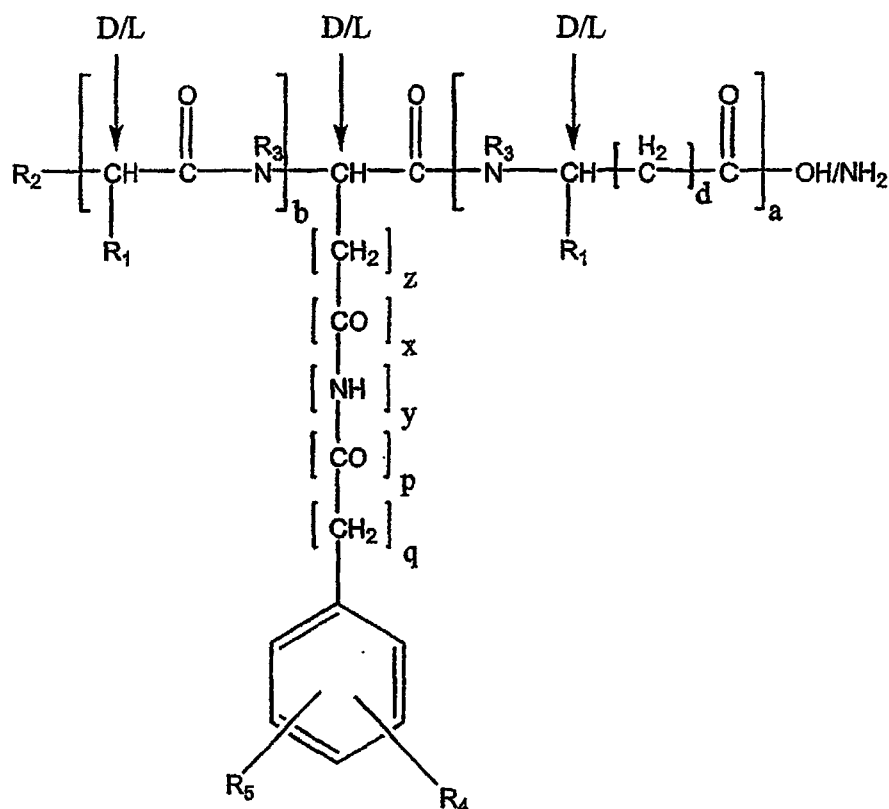
亮氨酸, 亮氨酸, 赖氨酸, 甲硫氨酸, 苯丙氨酸, 脯氨酸, 丝氨酸, 苏氨酸, 色氨酸, 酪氨酸, 和缬氨酸;

$R_2 = \text{NH}_2, \text{NHR}, \text{NR}_2, \text{NR}^{3+}\text{H}, \text{OH}, \text{SH}, \text{RO}, \text{RS}, \text{RSO}, \text{RSO}_2, \text{CO}_R, \text{CSR}, \text{COOH}, \text{COOR}, \text{CONH}_2, \text{CONHR}, \text{CONR}^2, \text{OCOR}, \text{SCOR}, (\text{R} = \text{烷基}, \text{链烯基}, \text{芳基}, \text{芳烷基}, \text{环烷基}, \text{等等});$

$R_3 = \text{H}, \text{CH}_3$; 和

其中 R_1 是疏水基, 并且优选地, 包含芳香碳环, 更优选地, 包含 6 或 12 元芳香碳环。一方面, 所述芳香环被下列基团的至少一种取代: 低级烷基, 烷氧基, 羟基, 羧基, 胺, 硫醇, 酰肼, 酰胺, 卤化物, 羟基, 醚, 胺, 腈, 亚胺, 硝基, 硫化物, 亚砷, 砷, 硫醇, 醛, 酮基, 羧基, 酯, 酰胺基; 包括它们的硒基和硫基衍生物。任选被取代的环也包括有或没有硒基的硫化物, 亚砷, 砷, 和硫醇衍生物。在其中芳香碳环被取代的实施方案中, 这类取代将典型地有小于约 10 个取代, 更优选, 取代将有约 1 至 5, 或 1 至 2 个取代。

进一步地, 本发明涉及一种由通式 II 表示的肽:



其中如果 a 是 1 则 b 是 0;

如果 a 是 0 则 b 是 1;

z 是 1-7;

如果 x 是 1 则 y 和 q 是 1 和 p 是 0;

如果 p 是 1 则 x 和 q 是 0 和 y 是 1; 且进一步地, 其中,

如果 R_1 是 H 则 d 是 0-8;

如果 R_1 不是 H 则 d 是 0;

其中 R_1 是选自由下列氨基酸组成的组的氨基酸的侧链: 丙氨酸, 精氨酸, 天冬酰胺, 天冬氨酸, 半胱氨酸, 谷氨酸, 谷氨酰胺, 甘氨酸, 组氨酸, 异亮氨酸, 亮氨酸, 赖氨酸, 甲硫氨酸, 苯丙氨酸, 脯氨酸, 丝氨酸, 苏氨酸, 色氨酸, 酪氨酸, 和缬氨酸;

其中 R_2 选自由 NH_2 , NHR , NR_2 , NR_3^+H , OH , SH , RO , RS , RSO , RSO_2 , CO_R , CSR , $COOH$, $COOR$, $CONH_2$, $CONHR$, $CONR_2$, $OCOR$, 和 $SCOR$ 组成的组, 其中 R = 烷基, 链烯基, 芳基, 芳烷基, 或环烷基;

其中 $R_3 = H$ 或 CH_3 ;

其中 R_4 和 R_5 独立地选自由 H, 烷基, 链烯基, 芳基, 芳烷基, 卤素, CN , NO_2 , 烷氧基, 芳氧基, 芳烷氧基, 硫烷氧基, 硫芳氧基, 硫芳烷氧基, $+S(CH_3)_2$, SO_3H , SO_2R , NH_2 , NHR , NR_2 , $+NR_3$, OH , SH , $COOH$, $COOR$, $CONH_2$, $CONHR$, $CONR_2$, CH_2OH , NCO , $NCOR$, $NHOH$, $NHNH_2$, $NHNRH$, CH_2OCOR , CH_2OCSR , COR , CSR , $CSOR$, CF_3 , 和 CCl_3 组成的组, 且其中 R 是烷基, 链烯基, 芳基, 芳烷基, 或环烷基。

这样的肽也可以包括被烷基化或其它修饰以使肽对酶促降解稳定的肽键和/或可以包括 D-氨基酸。

如由式 I 和 II 表示的更优选的肽是对哺乳动物, 具体地说, 对人类受试者口服适用的。各种确定口服利用度的试验在该领域是已知的, 包括但不限于下列具体的试验。

口服利用度试验

一种试验 (“Bailey 试验”) 是预测性试验, 且通常按照本发明接

着进行其它经验性试验，进一步描述如下。在 Bailey 试验中，候选肽实际上与底物模板匹配，底物模板被做成代表与 PepT1 结合的化合物模型，以鉴别在体外和体内可能与 PepT1 结合的肽。使用 Bailey 试验促进本发明口服适用肽的检测。

在一个实施方案中，按照式 I 和 II 的肽实质上与这种底物模板模型一致(例如，肽显示了与先前鉴别的以高亲合性与 hPepT1 结合的底物实质上相同的三维构象)，因此是口服适用肽的良好候选者。因此，这样的肽典型地是二肽。

更优选的二肽是那些显示归因于 PepT1 的高亲合性底物的至少下列四种性质的二肽；即从肽的 N-末端至 C-末端，肽包括：1) N-末端 NH_3^+ 基团的强结合位点；2) 与第一个肽键的羰基键合的氢键；3) 优选具有强定向载体特征的疏水袋和 4) 羧化物结合位点。优选地，根据该模型第一个羧化物结合位点后面是第二个羧化物结合位点。参见例如，Bailey, P. D., 等人, (2000), 上文。

一种证实如上所述预测性 Bailey 试验的经验性试验，是“标准体内口服利用度试验”。在该试验中，将肽口服给予哺乳动物，且随时间采集血样。使用本领域已知的常规方法，使用标准定量测定例如 LC/MS/MS，由血浆蛋白质浓度对时间的图计算曲线下面积(AUC)，以不同时间间隔测定肽浓度。优选，以平行的方式给予许多动物不同剂量的肽以确定那些显示最大血浆浓度和 AUC 值成剂量-比例增加的肽。作为对照物，可以静脉内给予相同浓度的肽，并且可以将口服得到的 AUC 下面积与静脉内给予得到的 AUC 下面积相比较。参见，例如，Milo Gibal (1991) Biopharmaceutics and Pharmacology, 第 4 版 (Lea and Sediger)。在一个优选实施方案中，具有良好口服利用度的肽是那些：其中口服后剂量标准化的 AUC 代表至少 20% 的静脉内给予后剂量标准化的 AUC。

按照如上所述标准的体内口服利用度试验显示良好口服利用度的肽，可能或可能不与 Bailey 试验实质一致。

进行第二次经验性试验以进一步证实如式 I 或 II 所表示的口服适

用的肽，将常常是有用的。在一个这样的试验中，测定了肽与 hPepT1 运载蛋白或其功能活性片段结合的能力。优选，按照本发明的肽对 hPepT1 运载蛋白或其生物学活性片段具有良好的亲合性。优选，这样的肽的 K_i 小于约 20 mM，更优选，小于约 10 mM，并且还更加优选地，小于约 5 mM，或小于约 1 mM。

可以进行 hPepT1 结合试验作为肽的初始筛选，然后在标准体内口服利用度试验中筛选所述肽，和/或可以进行 hPepT1 结合试验以确认标准体内口服利用度的结果；然而，标准体内口服利用度提供了肽口服利用度最有意义的试验。

另外优选的由上面式 I 代表的肽，按照本文被称为“体外血浆稳定性试验”或相关措词的试验显示出良好的半衰期。这样的肽可以与上述 PepT1 底物模板模型 (Bailey 试验) 实质一致。然而，对于一些肽，可能与该模型一致性很小或不一致。在试验中显示良好稳定性的肽，在一个实施方案中具有大于约 48 小时，例如大于 24 小时，例如大于 12 小时，例如大于 6 小时，例如大于 3 小时，例如大于 1 小时，例如大于 30 分钟的半衰期。在该实施方案中，本发明的肽在血流中显示了增加的稳定性。

本发明范围内的肽在一个实施方案中本文用游离的 N-末端和/或 C-末端基团表示。对于一些发明用途，这些基团可以保持游离状态。然而，在另一个实施方案中，所述肽以封闭的 C-末端基团和游离的 N-基团为特征。或者，这样的肽可以有封闭的 N-基团和游离的 C-末端基团，或封闭的 N-和 C-末端基团。在分子两边的端基的性质不是关键的，只要肽能够与具有令人满意的亲合性与 hPepT1 结合，以致所述肽和/或是口服适用的。正如所讨论的，通过测定主题肽是否与结合 hPepT1 载体的底物模板模型实质一致，可以提前预测对 hPepT1 运载蛋白的“令人满意的亲合性”。参见 Bailey, P. D., 等人, (2000), 上文。

另外，在二肽内的氨基酸残基可以是 D-或 L-氨基酸。在某些方面，为了增加化合物的稳定性，D-氨基酸是优选的。

按照本发明的肽具有许多重要的用途和优点。

例如, 这样的肽可被用于预防和/或治疗与受损伤的间隙连接功能有关的状况, 该受损伤的间隙连接功能导致减少的细胞间的通讯, 或细胞间的通讯过偶联, 或失调的细胞通讯, 和可被用于制备用于预防和/或治疗与受损的间隙连接功能有关的状况的药物。在一方面, 本发明提供一种给予患有或处在发生这种状况的危险中的患者治疗有效量的任何如上所述的肽。优选, 给予是口服。在一个优选的方面, 患者是人类。

可被治疗的状况的例子包括但不限于: 心血管疾病, 气道上皮组织的炎症, 肺泡组织障碍, 膀胱失禁, 由于耳蜗、内皮损伤、糖尿病性视网膜病和糖尿病性神经病疾病导致受损伤的听力, 中枢神经系统和脊髓的局部缺血, 牙组织障碍包括牙周病, 肾脏疾病, 骨髓移植失败, 创伤, 勃起机能障碍, 泌尿膀胱失禁, 神经病性疼痛, 亚慢性和慢性炎症, 癌症和骨髓与干细胞移植的失败, 在细胞和组织移植期间或在医学操作例如手术期间产生的状况; 以及由过量的反应性氧类和/或自由基和/或一氧化氮所引起的状况。

本发明另外提供了适合用于如上所述方法的药物组合物, 该组合物包含任何如上所述的肽和药物上可接受的载体。优选, 载体是无菌、无热原和无病毒的。还更优选, 所述组合物是可口服给予的。

附图的简要说明

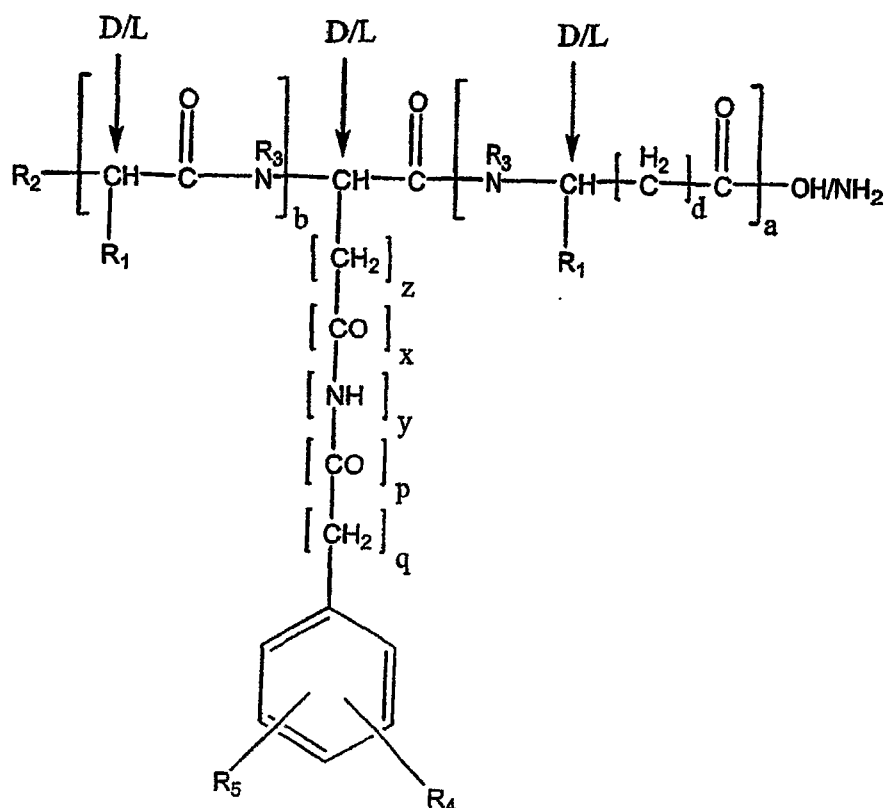
图 1A 和 1B 表示生成按照本发明某些方面的肽的示范性合成反应路线。

图 2 显示了化合物 4、化合物 22、化合物 23 和化合物 95 对人类成骨细胞中 ALP (碱性磷酸酶) 的效果。

发明的详细说明

正如所讨论的, 本发明涉及调节间隙连接细胞间通讯 (GJIC) 的口服适用的肽。本发明具有广谱有用的应用, 该应用包括在治疗或预防与受损伤的 GJIC 有关的病理学中的用途。具体的发明肽由上面式 I 表示。

按照本发明更具体的肽由下列通式 II 表示:



其中, 如果 $a = 1$ 则 $b = 0$;

如果 $a = 0$ 则 $b = 1$;

$z = 1-7$;

如果 $x = 1$ 则 y 和 $q = 1$ 和 $p = 0$;

如果 $p = 1$ 则 x 和 $q = 0$ 和 $y = 1$; 且进一步地, 其中,

如果 $\text{R}_1 = \text{H}$ 则 $d = 0-8$;

如果 $\text{R}_1 \neq \text{H}$ 则 $d = 0$;

其中 R_1 = 下列任一氨基酸的侧链: 例如, 丙氨酸, 精氨酸, 天冬酰胺, 天冬氨酸, 半胱氨酸, 谷氨酸, 谷氨酰胺, 甘氨酸, 组氨酸, 异亮氨酸, 亮氨酸, 赖氨酸, 甲硫氨酸, 苯丙氨酸, 脯氨酸, 丝氨酸, 苏氨酸, 色氨酸, 酪氨酸, 和缬氨酸;

$\text{R}_2 = \text{NH}_2, \text{NHR}, \text{NR}_2, \text{NR}^3\text{H}, \text{OH}, \text{SH}, \text{RO}, \text{RS}, \text{RSO}, \text{RSO}_2, \text{CO}_R, \text{CSR}, \text{COOH}, \text{COOR}, \text{CONH}_2, \text{CONHR}, \text{CONR}^2, \text{OCOR}, \text{SCOR}, (\text{R} = \text{烷基}, \text{链烯基}, \text{芳基}, \text{芳烷基}, \text{环烷基}, \text{等等});$

$R_3 = H, CH_3$;

R_4 和 R_5 独立地选自由 H, 烷基, 链烯基, 芳基, 芳烷基, 卤素, CN, NO_2 , 烷氧基, 芳氧基, 芳烷氧基, 硫烷氧基, 硫芳氧基, 硫芳烷氧基, $+S(CH_3)_2$, SO_3H , SO_2R , NH_2 , NHR , NR_2 , $+NR_3$, OH, SH, COOH, COOR, $CONH_2$, $CONHR$, $CONR_2$, CH_2OH , NCO , $NCOR$, $NHOH$, $NHNH_2$, $NHNRH$, CH_2OCOR , CH_2OCSR , COR , CSR , $CSOR$, CF_3 , 和 CCl_3 组成的组, (R=烷基, 链烯基, 芳基, 芳烷基, 环烷基, 等等)。

正如所讨论的, 所述肽可以包括游离的 N-末端, 或游离的 C-末端, 或两者都包括。

优选, 所述肽包括至少一个疏水基和至少一个氢键基团。在本发明的一方面肽的三维结构中, 至少一个疏水基与至少一个氢键基团之间的距离为约 4 埃至约 12 埃, 优选 5 至约 10 埃。更优选, 疏水基是芳香基, 包括但不限于, 苯甲酰基或苄基, 或其被取代的或被修饰的形式。取代的苯甲酰基或苄基优选包含在 4-位的取代基。更优选, 取代基在被取代基所占据的球面中具有 3-11 埃的半径。合适的取代基包括, 但不局限于: 甲基, 乙基, 叔丁基, 环己基, 苯基, 正丁基, 正己基, 正辛基, 乙氧基, 叔丁氧基, 苯氧基, 丁氧基, 苄氧基, 正己氧基, 正辛氧基。

在本发明范围内且具有此通式的更具体的肽显示在表 1 中。

表 1

化合物编号	化合物名称
1	H-Gly-Lys (4-硝基苯甲酰基)-OH
2	H-Gly-Lys (4-氟苯甲酰基)-OH
3	H-Gly-Lys (4-氯苯甲酰基)-OH
4	H-Gly-Lys (4-甲氧基苯甲酰基)-OH
5	H-Gly-Lys (4-氯苯甲酰基)-OH
6	H-Gly-Lys (苯甲酰基)-OH
7	H-Lys (4-硝基苯甲酰基)-Gly-OH
8	H-Lys (4-硝基苯甲酰基)-Sar-OH

-
- | | |
|----|---|
| 9 | H-Lys (苯甲酰基)-Sar-OH |
| 10 | H-Lys (苯甲酰基)-Gly-OH |
| 11 | H-Lys (4-甲氧基苯甲酰)-Gly-OH |
| 12 | H-Gly-D-Lys (4-甲氧基苯甲酰)-OH |
| 13 | H-Gly-D-Lys (4-硝基苯甲酰基)-OH |
| 14 | H-Gly-D-Lys (4-氟苯甲酰基)-OH |
| 15 | H-Gly-D-Lys (4-氟基苯甲酰基)-OH |
| 16 | H-Gly-D-Lys (4-硝基苯甲酰基)-OH |
| 17 | H-Gly-D-Lys (苯甲酰基)-OH |
| 18 | H-Lys (4-氟苯甲酰基)-Gly-OH |
| 19 | H-Lys (4-氟基苯甲酰基)-Gly-OH |
| 20 | H-Lys (4-氯苯甲酰基)-Gly-OH |
| 21 | H-D-Lys (4-甲氧基苯甲酰)-Gly-OH |
| 22 | H-D-Lys (4-硝基苯甲酰基)-Gly-OH |
| 23 | H-D-Lys (苯甲酰基)-Gly-OH |
| 24 | H-D-Lys (4-氟苯甲酰基 (fuorobenzoyl))-Gly-OH |
| 25 | H-D-Lys (4-氟基苯甲酰基)-Gly-OH |
| 26 | H-D-Lys (4-氯苯甲酰基)-Gly-OH |
| 27 | H-Lys (4-氟基苯甲酰基)-Sar-OH |
| 28 | H-Lys (4-甲氧基苯甲酰)-Sar-OH |
| 29 | H-Lys (4-氟苯甲酰基 (fuorobenzoyl))-Sar-OH |
| 30 | H-Lys (4-氯苯甲酰基)-Sar-OH |
| 31 | H-D-Lys (4-氟基苯甲酰基)-Sar-OH |
| 32 | H-D-Lys (4-甲氧基苯甲酰)-Sar-OH |
| 33 | H-D-Lys (4-氟苯甲酰基 (fuorobenzoyl))-Sar-OH |
| 34 | H-D-Lys (4-氯苯甲酰基)-Sar-OH |
| 35 | H-D-Lys (4-硝基苯甲酰基)-Sar-OH |
| 36 | H-D-Lys (苯甲酰基)-Sar-OH |
| 37 | H-Ala-D-Lys (4-甲氧基苯甲酰)-OH |

-
- | | |
|----|--|
| 38 | H-Val-D-Lys (4-甲氧基苯甲酰)-OH |
| 39 | H-Ile-D-Lys (4-甲氧基苯甲酰)-OH |
| 40 | H-Leu-D-Lys (4-甲氧基苯甲酰)-OH |
| 41 | H-Phe-D-Lys (4-甲氧基苯甲酰)-OH |
| 42 | H-Trp-D-Lys (4-甲氧基苯甲酰)-OH |
| 43 | H-His-D-Lys (4-甲氧基苯甲酰)-OH |
| 44 | H-Tyr-D-Lys (4-甲氧基苯甲酰)-OH |
| 45 | H-D-Lys (4-甲氧基苯甲酰)-Ala-OH |
| 46 | H-D-Lys (4-甲氧基苯甲酰)-Phe-OH |
| 47 | H-D-Lys (4-甲氧基苯甲酰)-Ile-OH |
| 48 | H-D-Lys (4-甲氧基苯甲酰)-Leu-OH |
| 49 | H-D-Lys (4-甲氧基苯甲酰)-Val-OH |
| 50 | H-D-Lys (4-甲氧基苯甲酰)-His-OH |
| 51 | H-D-Lys (4-甲氧基苯甲酰)-Trp-OH |
| 52 | H-D-Lys (4-甲氧基苯甲酰)-Tyr-OH |
| 53 | H-D-Lys (4-苯氧基苯甲酰基)-Gly-OH |
| 54 | H-D-Lys (4-叔丁基苯甲酰基)-Gly-OH |
| 55 | H-D-Lys (4-正丁氧基苯甲酰基)-Gly-OH |
| 56 | H-D-Lys (4-甲基苯甲酰基)-Gly-OH |
| 57 | H-D-Lys (4-乙基苯甲酰基)-Gly-OH |
| 58 | H-D-Lys (4-正丁基苯甲酰基)-Gly-OH |
| 59 | H-D-Lys (4-正己基苯甲酰基)-Gly-OH |
| 60 | H-D-Lys (4-正辛基苯甲酰基)-Gly-OH |
| 61 | H-D-Lys (4-苯基苯甲酰基 (phey1benzoy1))-Gly-OH |
| 62 | H-D-Lys (4-苄氧基苯甲酰基)-Gly-OH |
| 63 | H-D-Lys (4-乙氧基苯甲酰基)-Gly-OH |
| 64 | H-Asn (NH (4-三氟甲基苄基))-Ala-OH |
| 65 | H-Asn (NH (4-甲氧苄基))-Ala-OH |
| 66 | H-Asn (NH (4-硝基苄基))-Ala-OH |

- 67 H-Asn(NH(苄基))-Ala-OH
68 H-Asn(NH(4-氟苄基))-Ala-OH
69 H-Asn(NH(4-氯苄基))-Ala-OH
70 H-Asn(NH(4-氟苄基))-Ala-OH
71 H-Asn(NH(4-甲基苄基))-Ala-OH
72 H-Asn(NH(4-正丁基苄基))-Ala-OH
73 H-Asn(NH(4-叔丁基苄基))-Ala-OH
74 H-Asn(NH(4-正己基苄基))-Ala-OH
75 H-Asn(NH(4-正辛基苄基))-Ala-OH
76 H-Asn(NH(4-苯基苄基))-Ala-OH
77 H-Asn(NH(4-苯氧基苄基))-Ala-OH
78 H-Asn(NH(4-正丁氧基苄基))-Ala-OH
79 H-Asn(NH(4-三氟甲基苄基))-D-Ala-OH
80 H-Asn(NH(4-甲氧基苄基))-D-Ala-OH
81 H-Asn(NH(4-硝基苄基))-D-Ala-OH
82 H-Asn(NH(苄基))-D-Ala-OH
83 H-Asn(NH(4-氟苄基))-D-Ala-OH
84 H-Asn(NH(4-氯苄基))-D-Ala-OH
85 H-Asn(NH(4-氟苄基))-D-Ala-OH
86 H-Asn(NH(4-甲基苄基))-D-Ala-OH
87 H-Asn(NH(4-正丁基苄基))-D-Ala-OH
88 H-Asn(NH(4-叔丁基苄基))-D-Ala-OH
89 H-Asn(NH(4-正己基苄基))-D-Ala-OH
90 H-Asn(NH(4-正辛基苄基))-D-Ala-OH
91 H-Asn(NH(4-苯基苄基))-D-Ala-OH
92 H-Asn(NH(4-苯氧基苄基))-D-Ala-OH
93 H-Asn(NH(4-正丁氧基苄基))-D-Ala-OH
94 H-D-Asn(NH(4-三氟甲基苄基))-Ala-OH
95 H-D-Asn(NH(4-甲氧基苄基))-Ala-OH

96	H-D-Asn (NH (4-硝基苄基)) -Ala-OH
97	H-Asn (NH (4-甲氧苄基)) -Sar-OH
98	H-Asn (NH (4-甲氧苄基)) -Leu-OH
99	H-Asn (NH (4-甲氧苄基)) -Phe-OH
100	H-Gln (NH (4-甲氧苄基)) -Ala-OH
101	H-Orn (4-甲氧苄基) -Gly-OH
102	H-Gly-Asn (NH (4-甲氧苄基)) -OH
103	H-D-Lys (2, 4-二硝基苄基) -Gly-OH
104	H-D-Lys (2, 4-二甲基苄基) -Gly-OH
105	H-D-Lys (2, 5-二甲基苄基) -Gly-OH
106	H-D-Lys (3, 5-二甲基苄基) -Gly-OH
107	H-D-Lys (2, 4-二氯苄基) -Gly-OH
108	H-D-Lys (2, 5-二氯苄基) -Gly-OH
109	H-D-Lys (4-氟-3-硝基苄基) -Gly-OH
110	H-D-Lys (3-氟-4-甲基苄基) -Gly-OH

按照本发明更具体的肽在一方面促进和/或保持或抑制由间隙连接介导的细胞间通讯。在一个实施方案中，所述肽可以是抗心律失常的肽，其以被 AAP、AAP10、HP5 和/或其功能类似物作为靶位的相同细胞作为靶位，即，通过激动或拮抗 AAP、AAP10、HP5 和/或其功能类似物的功能，所述肽能够调节这些细胞的功能。本发明也涉及用于治疗与受损的细胞间间隙连接通讯有关的病理学的药物组合物的制备和用途，和使用这些组合物的方法。

根据本发明进一步优选的肽在下列试验的一种或多种中显示了良好的活性。尽管不必鉴别由上面式 I 和 II 表示的口服适用的肽，但可利用它们进一步确认且任选定量一种或一类 (a pool of) 肽的活性。

在本发明的一个实施方案中，肽选自由 H-Gly-Lys (4-硝基苄基) -OH (化合物 1)；H-Gly-Lys (4-甲氧苄基) -OH (化合物 4)；H-D-Lys (4-甲氧苄基) -Gly-OH (化合物 21)；H-D-Lys (4-硝基苄

甲酰基)Gly-OH(化合物 22); H-D-Lys(4-叔丁基苯甲酰基)-Gly-OH(化合物 54); 和 H-D-Asn(NH(4-硝基苄基))Ala-OH(化合物 96)组成的组。

在另一个实施方案中, 本发明的肽选自由 H-D-Lys(苯甲酰基)Gly-OH(化合物 23)和 H-D-Asn(NH(4-甲氧苄基))Ala-OH(化合物 95)组成的组。

在本发明的又一个实施方案中, 肽是 H-Gly-Lys(4-硝基苯甲酰基)-OH(化合物 1)。

按照本发明, 在一方面肽是 H-Gly-Lys(4-甲氧基苯甲酰基)-OH(化合物 4)。

进一步地, 在又一个实施方案中, 肽是 H-D-Lys(4-甲氧基苯甲酰基)-Gly-OH(化合物 21)。

在又一个方面, 肽是 H-D-Lys(4-硝基苯甲酰基)Gly-OH(化合物 22)。

在另一方面, 肽是 H-D-Lys(4-叔丁基苯甲酰基)-Gly-OH(化合物 54)。

在又另一个方面, 肽是 H-D-Asn(NH(4-硝基苄基))Ala-OH(化合物 96)。

进一步地, 在又一个实施方案中, 肽是 H-D-Lys(苯甲酰基)-Gly-OH(化合物 23)。

在又另一个实施方案中, 肽是 H-D-Asn(NH(4-甲氧苄基))Ala-OH(化合物 95)。

按照上面式 I 和 II 优选的肽显示了良好的作为间隙连接通讯调节剂(例如, 作为激动剂或拮抗剂)的功能。在一方面, 所述肽具有作为抗心律失常药的功能。

在一个实施方案中, 本发明的优选激动剂肽提供了细胞内传导性(Gj), 在本文被称为“标准心肌细胞试验”的试验中该传导性实质上与 AAP 的 Gj 相同或大于 AAP 的 Gj。

在另一个实施方案中, 优选的拮抗剂肽提供了小于 AAP 的 Gj 的 Gj, 和/或阻碍 AAP 使缺血性细胞的 Gj 正常化的能力, 即, 使 Gj 回复至在

非缺血性细胞中发现的实质上相同的值。在本发明的一方面，本发明的拮抗剂提供了比 AAP 的 G_j 小至少约 40%，例如至少小约 50%，例如至少小约 60%，例如至少小约 70%，例如至少小约 80%，例如至少小约 90%，例如至少小 100% 的 G_j。

本发明拮抗剂的抑制性能，不局限于如上所述相对的 G_j。在进一步的实施方案和试验类型中，拮抗剂可以显示不同的相对 G_j。这可以进一步取决于比较的肽/化合物。

心脏

在本文中被称为“标准钙导致的心律失常 (arrhythmia) 试验”的试验中，输注 CaCl₂ 后，按照本发明另外优选的肽增加了至 AV 阻滞的时间。优选，肽提供了至少约 40% 的 AAP 活性，例如至少约 50% 的 AAP 活性，例如约 60% 的 AAP 活性，例如至少约 70% 的 AAP 活性，例如至少约 80% 的 AAP 活性，例如至少约 90% 的 AAP 活性，例如至少约实质上相同的 AAP 活性，例如约 110% 的 AAP 活性，例如至少约 120% 的 AAP 活性，例如至少约 130% 的 AAP 活性，例如至少约 140% 的 AAP 活性，例如约 150% 的 AAP 活性，例如至少约 160% 的 AAP 活性，例如至少约 170% 的 AAP 活性，例如至少约 180% 的 AAP 活性，优选至少约 190% 的 AAP 活性，更优选至少约 200% 或更大的 AAP 活性 (即，显示了大致相同持续时间的时间延后)。

肽可以另外显示在本文中被称为“标准心室折返试验”的试验中观察到的折返心律失常的发病率降低或梗塞区域的大小的降低。优选，肽提供了至少约 40% 的 AAP 活性，例如至少约 50% 的 AAP 活性，例如约 60% 的 AAP 活性，例如至少约 70% 的 AAP 活性，例如至少约 80% 的 AAP 活性，例如至少约 90% 的 AAP 活性，例如至少约实质上相同的 AAP 活性，例如约 110% 的 AAP 活性，例如至少约 120% 的 AAP 活性，例如至少约 130% 的 AAP 活性，例如至少约 140% 的 AAP 活性，例如约 150% 的 AAP 活性，例如至少约 160% 的 AAP 活性，例如至少约 170% 的 AAP 活性，例如至少约 180% 的 AAP 活性，优选至少约 190% 的 AAP 活性，更优选至少约 200% 或更大的 AAP 活性 (即，提供了发病率的相似的降低或相似或更小尺寸

的梗塞区域)。

骨质疏松症

人们已了解 GJIC 在骨形成中是重要的。另外优选的肽，额外地或者可替代地增加了用于测定肽存在下的钙波形成和/或成骨细胞的碱性磷酸酶活性的在本文中被称为“标准成骨细胞活性试验”的试验中的成骨细胞活性。优选，这种肽增加钙波活性，表现为波涉及细胞数目的增加(如通过使用钙敏感的荧光染料，例如 fura-2 并计算发荧光细胞的数目，通过测定细胞内 Ca^{2+} 的水平来确定)。也可利用碱性磷酸酶活性，使用标准比色试验提供成骨细胞活性的量度。按照本发明的激动剂肽在这种试验中，提供至少约 10% 的 AAP 活性，例如至少约 20% 活性，例如至少约 30% 活性，例如至少约 40% 活性，例如至少约 50% 的 AAP 活性，优选，至少约 70% 活性，且更优选，100% 或更大的 AAP 活性。

癌症

在本文中被称为“标准肿瘤启动剂试验”的试验中，按照本发明优选的肽，可替代地或额外地，降低了由肿瘤促进剂例如 DTT 介导的 GJIC 抑制作用。优选，肽显示出 GJIC 抑制作用降低，比对 AAP 观察到的降低，该降低为至少 50%，优选 70%，且更优选 100% 或更大。

正如所讨论的，本发明的目的之一是提供调节间隙连接细胞间通讯(GJIC)的肽。因此，依照本发明的许多肽可以包括下列特征的一个或多个：降低细胞解偶联、使动作电位持续时间的分散正常化和使传导速度正常的能力，控制使连接蛋白表达正常化(根据需要上调或下调)的间隙连接的细胞量的能力；使间隙连接的降解正常化(抑制或增强)，使连接蛋白至质膜的细胞运输正常化(增加或降低)；促进连接蛋白组装进入功能性间隙连接；使存在的间隙连接的开放正常化，例如当间隙连接被抑制剂封闭或关门时，诱导或增加开放(例如，通过介导或增强一种或多种连接蛋白(例如 Cx43)的胞质羧基末端区域的过磷酸化作用)，或当间隙连接异常开放时(例如在进行性神经病性肌萎缩疾病中)；等等。

适用于鉴别和任选地定量优选的发明肽的活性的具体试验描述如下。所述试验是非限制性的且仅仅用作举例说明各种试验的目的，其中

可以测定本发明肽它们的间隙连接调节能力。应当了解测定不是互相排斥的，即按照本发明的一种肽可以在一种具体的试验中显示活性，但在另一个具体的试验中显示不同的活性或显示无活性。这可能是个体肽和测试所述肽的试验类型的多样性的反映。

A. 标准口服利用度试验

本发明的优选方面是提供具有增加的体内利用度的肽。口服后肽的吸收常常受到限制，因为它们被胃肠(GI)道中的酶或被肠道细胞的胞内腔中的酶降解。进一步，肽的理化性质，特别是它们的大的氢键合可能性，使得这些分子难以通过穿过细胞的被动扩散渗透至肠道细胞中。然而，幸免于胃肠液酶的二和三肽可以利用肽运载蛋白 hPepT1 进入细胞内腔，hPepT1 是一种位于小肠的肠道细胞顶膜中的膜蛋白。

因此按照本发明的优选肽对 hPepT1 运载蛋白或其类似物具有亲合性。结合 PepT1 运载蛋白的肽化合物的三维构象和关键结合位点，由 Bailey, P. D., 等人, 2000, 上文, 进行了描述, 并且可以将期望的肽在电脑中 (in silico) 做成模型, 以最佳地适合在如上所述的结合位点之内 (参见例如, Bailey, P. D., 等人 (2000), 上文; Vinter, J. G., (1996) J. Comput Aided Des. 10: 417)。

可以评估包括如式 I、式 II、表 1 所示结构, 或更通常使用 Bailey 试验鉴别的肽的口服利用度, 代表它与 PepT1 运载蛋白, 优选 hPepT1 运载蛋白的结合能力。例如, PepT1 cDNA, 优选, hPepT1 cDNA (参见例如 Covitz, K. M., 等人, (1996) Pharm. Res. 13(11): 1631-34) 可以在爪蟾卵母细胞表达系统中表达, 并且可以监测标记肽进入卵细胞的摄取至接近 K_i 值, 如在 Temple, C. S. 等人, (1996) J. Physiol. (London) 494: 795; Meredith, D. 等人, (1998) J. Physiol. (London) 512: 629 中所述。

在本发明的一方面, 进行标准体内口服利用度试验以确定肽的口服利用度, 这种肽被模拟成最佳与 Bailey 底物模板适合, 如以上的讨论。在此试验中, 口服给予哺乳动物例如大鼠肽, 以可口服的形式 (例如, 作为食物小丸的一部分或在水中), 同时, i. v. 给予相同浓度的肽 (例

如通过插入股静脉和动脉中的导管)。可以以大体积注射的方式给予肽，对于口服和 i.v. 给药，以 1 ml/kg 体积中 10^{-5} - 10^{-10} 的浓度范围。采集第一份血样之前 5 分钟，i.v. 给予动物 500 I.U. 的肝素。对照血样，即“剂量之前”或 B.D. 样品，在给予肽之前约 5 分钟收集。保留给药溶液的样品(例如 100ul 包含 10^{-5} - 10^{-10} M 肽的水)用于浓度测定。在 $t =$ B.D. , 5, 15, 30, 60, 90, 120, 180 和 240 分钟收集血样。

将血液收集在标记的用冰冷却的 EDTA 稳定化的血样小瓶中，并在冰上存储，直到在 4℃ 下将其快速离心 5 分钟(10,000 x g)。收获血浆(100 μ l)，将其转入一个标记的聚丙烯微量离心小瓶中(例如，0.5 ml eppendorf 瓶)，在冰上冷冻并在 -20℃ 保存直到进一步分析。将大约 40 μ l 滤液注到 HPLC 柱(XterraMS C18, 3 X 50 mm, 3.5 μ m 微粒)上，使用 4.0 分钟内从 0 至 100% B 的线性梯度洗脱。将柱在缓冲液 B(0.1% 甲酸的乙腈溶液，或另一种合适的缓冲液)中洗涤 2.9 分钟，在注射下一个样品之前，在缓冲液 A(0.1% 甲酸的水溶液或另一种合适的缓冲液)中平衡 5 分钟。使用本领域常规的方法和如进一步在下面实施例 1 和 2 中所描述的进行质谱法。

血浆样品中化合物的浓度由覆盖范围为 1.00 至 1000 nM 的外标曲线来计算。使用非房室分析，使用血浆浓度对时间数据在 WinNonLin 3.5(Pharsight, Mountain view, CA)中进行药物动力学建模，并如本领域已知的测定 AUC 值。优选，在约 30 分钟或更少时间之内以显著血浆水平观察按照本发明口服适用的肽。将在接受 i.v. 给予肽的动物中观测到的 AUC 值用来评估这类效果如清除率和半衰期，在两个系统中它们应该是相同的。

B. 标准血浆稳定性试验

本发明也提供了具有体外或体内增加的稳定性的肽。在一方面，所述肽包括被烷基化或者其它修饰，以使肽针对酶促降解稳定的肽键。在另一个方面，肽包含一种或多种 D-氨基酸。在进一步的方面，肽在标准稳定性试验中具有增加的稳定性。

在一方面，如在 2002 年 2 月 22 日申请的 PCT/US02/05773 中所述，

进行体外血浆稳定性试验。

如在 PCT/US02/05773 申请中公开的, 可以在血浆或血清中培育, 并定期间隔采集样品进行 HPLC 或 LC/MS/MS 分析, 以定量未降解肽的量。评估这类分析的合适条件(柱, 溶剂, 梯度和温度), 以保证肽峰和血浆峰不具有相同的保留时间。通过肽、血浆的接着注射和肽与血浆共注射, 随后进行 LC 方法参数的优化, 直到得到令人满意的分离, 完成这一工作。以同样方式处理的不含肽的对照物血浆样品, 也可以进行取样和评估。样品可以包括但不限于: 空白, 合适浓度的肽(例如, 0.1 mg/mL), 不含肽的血浆, $t = 0$ 的一种或多种样品, 和在每个定期间隔的一种或多种样品。优选, 平行采集多个样品。可以将样品浓度(mAU 中的峰高或离子计数)对时间作图, 并拟合描述单指数式衰减的特征函数(例如使用标准 Excel 包)。优选, 按照本发明的肽具有大于约 48 小时的半衰期, 例如大于 24 小时, 例如大于 12 小时, 例如大于 6 小时, 例如大于 3 小时, 例如大于 1 小时, 例如大于 30 分钟, 如使用此试验所确定的。

血浆稳定性可以使用标准试验进行体内检验。例如, 可将肽给予哺乳动物例如大鼠, 以约 1ml/kg 体积的大体积注射进行 i.v. 和 p.o. 给药。优选, 以平行于对照样品, 例如缓冲液或具有已知稳定性的抗心律失常(antiarrhythmic)肽, 来测试肽。在不同的时间周期(例如, 在 B.D., 5, 15, 30, 60, 90, 120, 180 和 240 分钟, 其中 B.D. 是指给药之前)收集血样。可以使用本领域常规方法例如 LC/MS/MS 定量样品中肽的量。例如, 血浆样品中肽的浓度可由覆盖范围为 1.00 至 1000 nM 的外标曲线来计算。使用非房室分析, 使用血浆浓度对时间数据在 WinNonLin 3.5 (Pharsight, Mountain view, CA) 中进行药物动力学建模, 如在本领域已知的可测定 AUC、Fpo、Clb、 $t_{1/2}$ 、Cmax 和 tmax 的结果参数。

C. 标准心肌细胞试验

在一方面, 给予心脏细胞按照本发明的肽, 并评估间隙连接功能。可以在标准心肌细胞(cardiomyocyte)试验中鉴别对于这种方法最适宜的肽。在一方面, 按照 Langendorff 方法, 通过用胶原酶灌注, 从哺乳

动物例如豚鼠心脏中分离出心脏细胞。将该细胞暴露给肽，并使用本领域已知的方法，通过膜片钳评估 GJIC。利用下式的细胞间传导性 (Gj)：

$$G_j = \frac{\Delta I_p}{\Delta U_j} = \frac{I_{p,pulse} - I_{p,rest}}{U_p - U_a}$$

(方程式 1)

其中 $I_{p, pulse}$ 和 $I_{p, rest}$ 分别表示：脉冲期间和脉冲之前被动细胞中的电流，且 U_p 和 U_a 表示被动和主动细胞的电压。通过比较 Gj 的相对变化分析肽给予后的 Gj 值变化，例如，可以测定相对 Gj，作为用肽（例如，大约 10^{-8} M）刺激之前和期间的时间函数。

在一个实施方案中，肽提供了 Gj，该 Gj 与抗心律失常肽例如 AAP、AAP10、HP5 和其功能类似物的 Gj 实质上相同 ($\pm 10\%$)。在一方面，细胞是缺血性细胞，肽提供了 Gj，该 Gj 与非缺血性细胞的 Gj 相同 ($\pm 20\%$ ，优选， $\pm 10\%$)。

在另一个实施方案中，本发明的肽提供了 Gj，该 Gj 与抗心律失常肽例如 AAP、AAP10、HP5 和其功能类似物的 Gj 不同 ($\pm 40\%$)。

涉及进行心肌细胞试验的细节被提供于 PCT/US02/05773，2002 年 2 月 22 日申请。

D. 标准的钙诱导的心律失常试验

按照 Lynch 等人 (1981) J Cardiovasc. Pharmacol. 3: 49-60 的模型，可以在钙诱导心律失常的体内模型中鉴别适合于给予心脏细胞的肽。用精神安定麻醉剂组合将小鼠 (25-30 g) 麻醉，并将 i.v. 套管插入到尾部静脉中。通过将不锈钢 ECG 电极定位在右前肢和左后肢上，连续记录导联 II ECG 信号。将接地电极置于右后肢。通过 Hugo Sachs Electronic model 689 ECG 模块将信号放大 ($\times 5.000-10.000$)，并过滤 (0.1-150 Hz)。通过 12 位数据收集板 (Data Translation model DT321) 将模拟信号数字化，并使用适用于 Windows NT Notocord HEM 3.1 软件在 1000 Hz 处变为脉冲信号。10 分钟平衡期后，将肽的测试样品注

入到尾部静脉中。测试用缓冲液预处理的小鼠，作为未经处理的动物中对照水平的度量。在所有的实验中，注射容量是 $100\ \mu\text{l}$ 。

i. v. 给予药剂或赋形剂后 3 分钟，开始输注 CaCl_2 (30 mg/ml, 0.1ml/min $\approx$ 100 mg/kg/min (氯化钙-2-水合物, Riedel-de Haen, Germany))。将至第二级 (2nd degree) AV 阻断起始的时滞，确定为从 CaCl_2 输注开始直到首次心律失常事件出现的时间。将第二级 AV 阻断的事件定义为 AV 传导的间歇失败，其特征在于没有伴随 QRS 综合波的 P 波。

相对于时间表示响应，直到第二级 AV 阻断在赋形剂处理的小鼠中出现。测定了化合物 (例如，肽，AAP，AAP10 或对照物) 的最大效果。优选，按照本发明的肽，具有与化合物 AAP、AAP10、HP5 或其功能类似物相似的抗心律失常的活性，即，输注 CaCl_2 后，所述肽增加了小鼠中至 AV 阻断的时间。优选，肽提供了至少约 40% 的 AAP 的活性，例如至少约 50% 的 AAP 活性，例如约 60% 的 AAP 活性，例如至少约 70% 的 AAP 活性，例如至少约 80% 的 AAP 活性，例如至少约 90% 的 AAP 活性，例如至少约实质上相同的 AAP 活性，例如约 110% 的 AAP 活性，例如至少约 120% 的 AAP 活性，例如至少约 130% 的 AAP 活性，例如至少约 140% 的 AAP 活性，例如约 150% 的 AAP 活性，例如至少约 160% 的 AAP 活性，例如至少约 170% 的 AAP 活性，例如至少约 180% 的 AAP 活性，优选至少约 190% 的 AAP 活性，更优选至少约 200 % 或更大的 AAP 活性 (即，所述肽显示了与 AAP 引起的大约相同持续时间的时滞)。

E. 标准成骨细胞活性试验

细胞间通讯的调节表示一种机理，通过该机理促骨因子调节骨形成细胞的活性。因此，在一方面，使用按照本发明的肽，通过增加骨细胞之间的间隙连接的通讯，增加了成骨细胞活性，由此增加了体内骨形成。

按照本发明肽的功效可以初步地在人类成骨细胞 (hOB) (osteoblast cells) 中测定，例如通过测定钙波活性和/或碱性磷酸酶活性。

在一方面,从人类骨髓中分离细胞,骨髓是通过健康志愿者(年龄20-36)的后髂脊柱的穿刺得到的:将10-15 ml 髓物质收集在带有100U/ml 肝素(Sigma, Cat. No. H-3149)的15 ml PBS+Ca, Mg(Life Technologies, Cat. No. 14040)中。髓的单核部分在Lymphoprep梯度仪(Nycomed Pharma, Cat. No. 1001967)上通过在2200 rpm下离心30分钟而分离出来。采收后,用培养基洗涤单核部分一次,并在1800 rpm下离心10分钟。随后统计细胞数量,并以 5×10^6 cells/100 mm皿将细胞铺板在培养基中。hOB培养基(所有的试剂从Life Technologies获得):MEM w/o Phenol Red w/Glutamax(Cat. No. 041-93013),补充以10%热失活的胎牛血清(Cat. No. 10106)和0.1%的青霉素/链霉素(Cat. No. 15140)。第二天改变培养基,并将细胞在37℃下5% CO₂中培养,每7天改变培养基。培养4-6周后,细胞将达到70%汇合。然后用100 nM地塞米松(Sigma, Cat. No. D-4902)补充培养基7天。然后将细胞铺析用于视频图像实验:将一块25 mm #1玻璃盖玻片放置在一个35 mm板(或6孔多孔皿的每个孔)中,以 2.5×10^5 细胞/盖玻片铺板细胞,并在使用之前培养2-3天。

将ROS 17/2.8细胞在100 mm皿中在37℃下用5% CO₂培养和每2-3天改变培养基。ROS培养基(所有试剂从Life Technologies获得):MEM(Cat. No. 31095),补充以10%热失活的小牛血清(Cat. No. 16170),1% NEAA(Cat. No. 11140),1%丙酮酸钠(Cat. No. 11360),1% L-谷氨酰胺(Cat. No. 25030)和0.1%青霉素/链霉素(Cat. No. 15140)。为了视频图像实验,将细胞以 $2-3 \times 10^5$ 细胞/盖玻片铺板在盖玻片上,并在使用之前培养2-3天。

在37℃下,将盖玻片上培养的细胞用5 μ M fura-2-AM(Molecular Probes, Cat. No. F-1221)装载30分钟,并在新鲜的培养基中培育20分钟。然后将盖玻片附着至PDMI-2培养室(Medical Systems Corp.),在37℃用倾注的CO₂保持,在Zeiss Axiovert显微镜上。使用附着在Eppendorf 5171显微操作器上的硼硅玻璃微吸管,通过单细胞的机械刺激引起细胞间的钙波。

使用 MetaMorph 成像系统(Universal imaging)进行成像。通过单色仪(T. I. L. L. Photonics GmbH)提供激发光(340 和 380 nm)。用加强的 CCD 照像机(Dage MTI)获得成像,并用 Matrox MVP 图像处理板将其数字化。在肽存在和不存在条件下,涉及钙波的细胞数目可被用于提供 GJIC 增加的度量。

在一方面,与暴露给对照物例如缓冲液的细胞相比,肽的给予增加了至少约两倍涉及波的细胞数目。在另一方面,肽的给予降低了至少约两倍涉及波的细胞数目。按照本发明的激动剂肽,在这样的试验中提供了至少约 10%的 AAP 活性,例如至少约 20%活性,例如至少约 30%活性,例如至少约 40%活性,例如至少约 50%的 AAP 活性,优选,至少约 70%活性,且还更优选,100%或更大的 AAP 活性。

也可以对细胞进行碱性磷酸酶活性的存在测定,以提供成骨细胞活性的总度量。在一方面,在 200 μ l 正常培养基中,将细胞以 8000 细胞/孔(hOB)或 3000 细胞/孔(ROS)的浓度铺板在 96 孔板中。在第 4 天(或对于 ROS 细胞在第 3 天),用 200 μ l MEM、0.1% BSA(Sigma, Cat. No. A-9418)洗涤细胞。将包含合适的含有各种浓度肽、对照物、AAP 或 AAP10 的培养基(例如,200 μ l MEM, 0.1% BSA)的样品加入到细胞中,并继续培养约 4 天(对于 ROS 细胞 2 天)。

在约第 8 天(对于 ROS 细胞优选在第 5 天),使用例如在本领域中已知的碱性磷酸酶(ALP)试验对细胞进行碱性磷酸酶测定。ALP 试验通常是用于测定酶活性的比色终点法,并可以使用碱性磷酸酶试剂盒(Sigma, Cat. No. 104-LL)进行。优选,用 200 μ l PBS+Ca, Mg 洗涤细胞一次,将 100 μ l 碱性缓冲液溶液加到每个孔中,并在 37 $^{\circ}$ C 下培育细胞 10 分钟。随后将 100 μ l 底物溶液加到每个孔中,并将板在 37 $^{\circ}$ C 下培育 30 分钟。将 100 μ l 2.0 N 的 NaOH 加到每个孔中以停止反应。使用平板读数器在 405 纳米处测定吸光度。

按照本发明的激动肽,相对于等渗盐水,提供碱性磷酸酶产生至少约 5%增加,优选,相对于等渗盐水至少增加了约 10%的碱性磷酸酶产生,且还更优选,相对于等渗盐水增加了 15%或更多的碱性磷酸酶产生。

碱性磷酸酶产生的增加是增加的成骨细胞活性的量度，因此是骨形成增加的度量。

F. 标准肿瘤促进剂试验

化合物 1,1-双(对-氯苯基)-2,2,2-三氯乙烷，也被称为杀虫剂 DDT，是间隙连接通讯的抑制剂，并具有肿瘤促进能力。通过降低间隙连接数目和大小，它抑制细胞至细胞间的通讯，以及对 DDT 的暴露与降低的间隙连接蛋白 Cx43 的磷酸化(活性的)形式的细胞水平有关。认为这些作用对于化合物的致癌性质是关键的 (X. Guan, 等人 (1996) *Carcinogenesis*, 17 1791-1798; R. J. Ruch, 等人 (1994) *Carcinogenesis*, 15 301-306); B. V. Madhukar, 等人 (1996) *Cancer Lett.* 106 117-123)。作为监测肽的治疗效能的方法，可以确定肽对 DDT 引起的人类成骨细胞解偶联的效果。因此，在一方面，使用按照本发明的肽抑制或预防肿瘤促进剂引起的 GJIC 的降低 (W. K. Hong, 等人 (1997) *Science*, 278 1073-1077)。

在一个示范性试验中，人类成骨细胞从人类骨髓中分离出来，骨髓是通过健康志愿者(年龄 20-36)的后髂脊柱的穿刺得到的。将大约 10-15 ml 骨髓物质收集在带有 100 U/ml 肝素 (Sigma, Cat. No. H-3149) 的 15 ml PBS + Ca, Mg (Life Technologies, Cat. No. 14040) 中。髓的单核部分在 Lymphoprep 梯度仪 (Nycomed Pharma, Cat. No. 1001967) 上，通过在 2200 rpm 下离心 30 分钟而分离出来。

收获后，用培养基洗涤单核部分一次，并在 1800 rpm 下离心 10 分钟。随后统计细胞数量，并以 8×10^6 细胞/100 mm 皿将细胞铺板在培养基中。在第二天改变培养基，并将细胞在 37°C 下 5% CO₂ 中培养，每 7 天变化培养基。培养 3-4 周后，细胞典型地达到 70% 汇合。然后用 100 nM 地塞米松 (Sigma, Cat. No. D-4902) 补充培养基 7 天。然后将细胞铺板用于视频图像实验。通常，将细胞以 2.5×10^5 细胞/盖玻片铺板，并在成像之前培养 2-3 天。

培养后，将细胞附着至 PDMI-2 培养室 (Medical Systems Corp.)，在 37°C 用倾注的 CO₂ 保持，在 Zeiss Axiovert 显微镜上。使用装载了

10 mM 荧光黄溶液(Sigma, Cat. No. L-0259)的微量吸液管进行显微注射。将单层中的细胞小心地用 LY 注射 30 秒钟;从细胞中取出微量吸液管,并且 30 秒钟后,统计显示染色转移的细胞数目。对于细胞培养物的亚型,将 DDT 以 13 μ M 的最终浓度加到培养基中,并放置 60 分钟。用加强的 CCD 照像机(Dage MTI)获得细胞的图像,并用 Matrox MVP 图像处理板,使用 MetaMorph 成像软件(Universal Imaging)将其数字化。

在对照条件下(不用 DDT 处理),染色通常扩展到 14.5 细胞的中值($n = 12$)。DDT 暴露的细胞典型地显示降低的细胞偶联,中值 7 ($n = 13$)。

将肽以 10^{-8} mol/l 的最终浓度加到槽液中,10 分钟后,进行另一次显微注射。优选,按照本发明的激动剂肽显示了细胞至细胞间的染色转移增加。更优选,如使用常规统计检验例如 Wilcoxon 非参数统计检验($p < 0.05$)所测定的,这种增加显著地不同于对照样品(没有肽)。优选,肽显示出 GJIC 抑制的降低,比对 AAP 观察到的降低,该降低为至少约 50%,优选约 70%,且更优选约 100%或更多。

可使用这种试验鉴别在逆转降低的与肿瘤促进有关的细胞间中具有最高治疗效能的候选肽,并且在一方面,对形成或具有癌症危险的患者给予这样的肽。可以单独使用肽,或其它肽联用和/或其它抗癌剂治疗联合。

还可以进行其它试验,以鉴别诱导出实质上与抗心律失常肽 AAP、AAP10、HP 和它们的功能类似物相同生理学反应的肽(例如,鉴别激动剂),或抑制或压制这些生理学反应的肽(例如,鉴别拮抗剂)。合适的试验包括但不限于:测定细胞(例如,CHO 细胞)中 cAMP 形成的试验;cAMP 功效(例如,测定 CHO 细胞中 APP 类化合物的毛喉素刺激的 cAMP 形成的抑制);心肌细胞中磷酸肌醇的更新(Meier 等人)(E. Meier, 等人(1997) Drug Development Research, 40: 1-16);和对于缺葡萄糖和氧的反应。

上面详细说明了大量的标准试验。另外的试验描述于 PCT/US02/05773, 2002 年 2 月 22 日申请,将其全部引入本文中作为参考。这些试验只是示范性的,并且其它可被开发并变成标准化的合适的

试验被包括在本发明的范围内。

药物组合物

本发明也涉及包含一个或多个任何如上所述肽与药物可接受的载体和/或稀释剂结合的药物组合物。这类组合物优选呈适合于口服的形式。

口服给药的制剂可以以本领域技术人员熟知的方式来制备，例如，通常在“Remington's Pharmaceutical Sciences”，17. Ed. Alfonso R. Gennaro (Ed.)，Mark Publishing Company，Easton，PA，U.S.A.，1985 和更近的版本中所描述的，和在“Drugs and the Pharmaceutical Sciences”丛书，Marcel Dekker 中的专题论文中所描述的。在一个优选的方面，组合物呈片剂、胶囊、粒剂、小丸、锭剂、糖锭等等的形式。例如在美国专利 No. 5,350,741 中描述了合适的肠溶制剂。

所用的药物载体或稀释剂可以是常规的固体或液体载体。固体载体的例子是乳糖，石膏粉，蔗糖，环糊精，滑石粉，明胶，琼脂，果胶，阿拉伯胶，硬脂酸镁，硬脂酸或纤维素的低级烷基醚。液体载体的例子是糖浆，花生油，橄榄油，磷脂，脂肪酸，脂肪酸胺，聚氧乙烯和水。

类似地，载体或稀释剂可以包括任何本领域已知的持续释放物质，例如单硬脂酸甘油酯或二硬脂酸甘油酯，单独或与蜡混合。

如果将固体载体用于口服给药，制剂可以被制成片剂，以粉末或小丸的形式放入硬明胶胶囊中，或它可以呈锭剂或糖锭的形式。固体载体的量将宽范围地改变，但通常将从约 25 mg 至约 1 g。

如果使用液体载体，制剂可以呈糖浆或适合于口服摄取的液体形式。

应当理解，用于特定治疗中的活性化合物的实际优选量将按照例如被使用的具体化合物、配制的具体组合物、给予的方式和受治疗者特征例如受治疗者的物种、性别、重量、一般健康和年龄而变化。对于特定给予方案的最佳给予量可以使用关于上述指南所进行的常规剂量测定试验，由本领域技术人员很容易地确定。合适的剂量范围可以包括从约 1mg/千克至约 100mg/千克体重每天。

本发明的治疗化合物合适地呈质子化和水溶性形式给予，例如，作为药学上可接受的盐，典型地为酸加成盐例如无机酸加成盐，例如，盐酸盐，硫酸盐，或磷酸盐，或作为有机酸加成盐例如乙酸盐，马来酸盐，富马酸盐，酒石酸盐，或柠檬酸盐。本发明治疗化合物的药学上可接受的盐也可以包括金属盐，特别是碱金属盐例如钠盐或钾盐；碱土金属盐例如镁或钙盐；铵盐例如铵或四甲基铵盐；或氨基酸加成盐例如赖氨酸，甘氨酸，或苯丙氨酸盐。

也可以局部给予本发明的化合物，以治疗周围血管疾病，照此可被配制成乳膏或软膏。

还可以将所本发明的肽配制在组合物中，例如用于非口服给药的无菌溶液或悬浮液。本发明的肽可以胃肠外，即通过静脉内，肌肉内，皮下，鼻内，直肠内，阴道内或腹膜内（intraperitoneal）给予。

现在将通过下列工作实施例进一步描述本发明，这些实施例举例说明本发明的优选实施方案。

治疗方法

在一方面，本发明提供一种方法，该方法给予患有或处在发育与受损伤的 GJIC 有关的状况危险中的患者治疗有效量的任何如上所述的肽。优选，给予是口服。可以使用按照本发明的肽治疗的患者包括但不限于：动物，优选哺乳动物，例如，啮齿类（包括小鼠，大鼠，仓鼠，和兔形目，例如兔），狗，猪，山羊（通常任何家养动物），和灵长类。在一个优选的方面，患者是人类。

在另一方面，本发明涉及按照本发明的肽在制备用于治疗涉及受损伤的间隙连接通讯的病理状况的药物中的用途，包括给予患者治疗有效量的所述肽。

可以治疗的状况的例子包括但不限于：心血管疾病，气道上皮组织炎症，肺泡组织障碍，膀胱失禁，由于耳蜗、内皮损伤，糖尿病性视网膜病和糖尿病性神经病的疾病导致受损伤的听力，中枢神经系统和脊髓的局部缺血，牙组织障碍包括牙周病，肾脏疾病，骨髓移植失败，创伤，勃起功能障碍，泌尿性膀胱失禁，神经病性疼痛，亚慢性和慢性

炎症，癌症和骨髓与干细胞移植的失败，在细胞和组织移植期间或在医学操作例如手术期间产生的状况；以及由过量的活性氧种类和/或自由基和/或一氧化氮所引起的状况。

心律失常 (arrhythmia)

在一个优选的方面，本发明提供了药理学上活性的抗心律失常肽，和其用途，用于治疗在心血管障碍，例如急性缺血性心脏病(例如，稳定型心绞痛，不稳定型心绞痛，急性心肌梗塞)，充血性心力衰竭(例如，心脏收缩，心脏舒张，高-输出，低-输出，右或左侧心力衰竭)，先天性心脏病，肺原性心脏病，心肌病，心肌炎，高血压性心脏病期间，在冠状换血管术期间，等等出现的心律失常和血栓性并发症。

在具体实施方案中，按照本发明的抗心律失常肽被用来治疗和/或预防缓慢性心律失常(例如，由于在窦房结，AV结，希斯氏束，右或左束支的疾病而导致的)，和与折返有关的快速性心律失常(例如，前房早期复合波，AV连接复合波，室性早期复合波，前房纤维性颤动，前房扑动，阵发性室上心动过速，窦房节折返性心动过速，AV结折返性心动过速，和非持续的室性心动过速)，或单独或与其它抗心律失常的化合物，例如I类药物(例如，利多卡因)，II类药物(例如，美托洛尔或心得安)，III类药物(例如，乙胺碘呋酮或甲磺胺心定)或IV类药物(例如，维拉帕米)结合。

另外，或可替代地，按照本发明的肽也可被用来治疗下列疾病的一种或多种：折返性心律失常；室性折返(例如，在急性心肌梗塞，慢性心肌梗塞，稳定型心绞痛和不稳定型心绞痛期间发生的)；感染性或自主的心肌病；前房纤维性颤动；再极化交替；单形室性心动过速；T-波交替；缓慢性心律失常；和通常地，心脏组织降低的收缩性，血栓等等。

骨质疏松症

在一个进一步的方面，按照本发明的肽被用来预防和/或治疗骨质疏松症或影响骨形成、生长或保持的其它病理学。能够在低氧期间使人类成骨细胞之间减少的GJIC正常化的肽，特别适合于治疗相对于骨吸

收而言受损伤的骨形成的骨疾病。用于这类方法的最佳肽，可以在增加的成骨细胞中碱性磷酸酶 (ALP) 活性的试验中选择，其提供了一种监测作为适当保持 GJIC 结果的细胞存活和生长的方法。在一方面，用从 1×10^{-13} 至 1×10^{-6} 不同浓度的肽刺激人类成骨细胞，并与未经处理的对照物相比。在正常培养条件下，肽优选增加 ALP 活性。甚至更优选，在低氧条件期间，在浓度范围 10^{-11} 至 10^{-8} mol/l 下肽刺激 ALP 活性。该试验因此可被用来使用于治疗和/或预防与骨组织中血管形成差、低氧和局部缺血有关的骨疾病的肽组合物最佳化。

在另一方面，使用按照本发明的肽预防和/或治疗涉及受损伤的细胞至细胞间偶联的关节疾病。例如，使用肽预防和/或治疗涉及代谢性应激的关节疾病。这些将包括任何形式的与降低的血管形成或折断软骨组织的治愈有关的关节炎。

癌症

在又另一个方面，使用按照本发明的肽治疗癌症。致癌作用以其中涉及生长因子、癌基因和肿瘤抑制基因的的生长控制机制的进展性损伤为特征。致癌作用中和致瘤作用的常规主题是下调 GJIC。使用染色转移试验的肿瘤细胞中间隙连接的渗透性典型地比周围组织中的 GJIC 低。进一步地，间隙连接的关门受降低 GJIC 的肿瘤促进剂的影响是已知的。因此，在一方面，按照本发明的肽被用作治疗癌症的药物，单独或与传统抗癌疗法联合。

创伤

在进一步的方面，使用按照本发明的肽治疗创伤，特别是加速创伤愈合。创伤愈合涉及许多细胞型的相互作用，并且认为间隙连接介导的细胞间的细胞间的通讯，在参与组织修复和再生的细胞的生长和发育期间细胞代谢的协调中起重要作用 (K. M. Abdullah, 等人 (1999) Endocrine, 10 35-41; M. Saitoh, 等人 (1997) Carcinogenesis, 18: 1319-1328; J. A. Goliger, 等人 (1995) Mol. Biol. Cell, 6 1491-1501)。通过使用本领域熟知的载体 (例如，软膏，乳膏，等等) 局部给予，可将肽给予至创伤的部位，或可以全身给予，例如，用于治疗

内部组织的创伤，例如在慢性胃溃疡损伤的治疗中。

其中涉及内皮间隙连接的细胞间通讯的附加功能是损伤后内皮细胞的迁移行为、血管形成、内皮的生长和衰老和血管舒缩反应的协调(G. J. Christ, 等人(2000) *Braz. J Med Biol. Res.*, 33: 423-429)。因此，在一方面，使用按照本发明的肽增加进行的血管反应，和有增加的在代谢性要求的状况(例如，身体锻炼，心动过速)期间及局部缺血期间提高血液供给。

还认为间隙连接提供神经胶质腔隙个体成员之间的，协调的长范围信号传导的分子连接。同样地，由于星形细胞的一端接触血管床而另一极接近神经元的实质细胞而被功能性极化，它们可理想地适合用于神经元的代谢性支持体(R. Dermietzel(1998) *Brain Res. Brain Res. Rev.*, 26: 176-183)。因此，在一个优选实施方案中，给予需要的患者按照本发明的肽，通过增加胶质细胞和神经元之间的代谢性支持体来预防脑中的缺血性损伤。这类患者可以包括具有器质性精神病的患者，这样的患者可以表现出迹象，例如压抑、焦虑、学习和记忆欠缺、恐怖症和幻觉，或者遭受外伤性的脑损伤的患者。优选，选择或配制这种，以便适用于中枢神经系统(即，与促进穿过血脑屏障转运的载体一起提供或结合)。

还可以使用按照本发明的肽加快神经损伤后、或未成熟细胞(祖细胞)植入脑组织期间的修复，例如，在患有神经外伤、脑局部缺血和慢性神经变性疾病例如帕金森氏病或亨廷顿舞蹈病的患者中(H. Aldskogius, 等人(1998) *Prog. Neurobiol.*, 55: 1-26)。

在具体实施方案中，由于对细胞间间隙连接通道的影响，可以使用按照本发明的肽治疗和/或预防白内障(D. Mackay, 等人(1999) *Am J Hum. Genet.*, 64 1357-1364)、治疗和/或预防在具有角膜营养不良的疾病状态中角膜的血管形成并提高角膜损伤的治愈(S. G. Spanakis, 等人(1998) *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.*, 39: 1320-1328)和/或预防高血压症。

对于本领域技术人员应该明显的是，可使用按照本发明的肽和药

物组合物治疗与受损伤的(异常降低或提高)间隙连接的通讯有关的任何状况或病理学。优选,以治疗有效量给予其需要的患者一种或多种肽或包括一种或多种肽的药物组合物。如本文中使用的“治疗有效量”,是减少特定状况或病理学的症状的量,优选是使患有所述状况或病理学的患者生理反应正常化的量。症状减少或生理反应正常化,可以使用本领域常规方法来测定,并可以随特定状况或病理学而变化。在一方面,一种或多种肽或包括一种或多种肽的药物组合物的治疗有效量,是恢复可测量的生理参数至没有 DMF 的患者中参数的实质上相同值(优选至值的 $\pm 30\%$ 之内、更优选至值的 $\pm 20\%$ 之内、且还更优选至值的 10% 之内)的用量。

实施例

现在将参照下面实施例进一步举例说明本发明。应理解下列的内容是通过举例的方式,而且可以对于内容加以改进,而这些改进仍落入本发明的范围。

实施例 1. 肽合成

优选的一般方法描述如下。然而,可在 W098/11125 中找到固相肽合成的更详细说明,在此以其全部引入。

a. 一般肽合成

装置和合成策略

在装备有用于过滤的聚丙烯过滤器的聚乙烯容器中使用 9-芴甲氧羰基(Fmoc)作为 N- α -氨基保护基和合适的用于侧-链官能度的通用保护基分批合成肽。

溶剂

通过穿过填装了强阳离子交换树脂(Lewatit S 100 MB/H 强酸, Bayer AG Leverkusen, Germany)的柱对溶剂 DMF (N,N-二甲基甲酰胺, Riedel de-Haen, Germany)加以纯化,并在使用之前通过加入 3,4-二氢-3-羟基-4-氧代-1,2,3-苯并三嗪(Dhbt-OH)对游离胺加以分析,如果

游离胺存在的话将产生黄色(Dhbt- O^- 阴离子)。溶剂 DCM(二氯甲烷, 分析级, Riedel de-Haen, Germany)直接使用没有纯化。乙腈(HPLC-级, Lab-Scan, Dublin Ireland)直接使用没有纯化。

氨基酸

呈适当侧-链保护的形式 Fmoc-保护的氨基酸从 Advanced ChemTech(ACT) 购买的。其他保护的氨基酸(Boc-Asp(OFm)-OH, Boc-D-Asp(OFm)-OH, Fmoc-Lys(Aloc)-OH, Fmoc-D-Lys(Aloc)-OH, Boc-Lys(Fmoc)-OH, Boc-D-Lys(Fmoc)-OH, Boc-Orn(Fmoc)-OH 从 Bachem(Switzerland); Fmoc-Lys(ivDde)-OH, Fmoc-Sar-OH 从 NovaBiochem(Switzerland) 获得。

苯甲酸和苄胺衍生物

苯甲酸和苄胺衍生物从 Aldrich 购买, 没有进一步纯化而使用。

偶联试剂

偶联试剂二异丙基碳酰亚胺(DIC)从(Riedel de-Haen, 德国)购买, PyBop 从 Advanced ChemTech 购买。

连接体

(4-羟甲基苯氧基)乙酸(HMPA), 是从 Novabiochem, 瑞士购买; 且与通过 DIC 的方式生成以预形成的 1-羟基苯并三唑(HOBt)酯形式的树脂偶合。

固体支持体

按照 Fmoc-策略在 TentaGel S 树脂 0,22-0,31 mmol/g(TentaGel-S-NH₂; TentaGel S-Ram, Rapp polymere, 德国)上合成肽。

催化剂及其它试剂

二异丙基乙胺(DIEA)从 Aldrich, 德国购买, 1,2-乙二胺从 Fluka 购买, 哌啶和吡啶从 Riedel-de Haen, Frankfurt, 德国购买。4-(N,N-二甲基氨基)吡啶(DMAP)从 Fluka, 瑞士购买, 并在涉及对称酸酐的偶合反应中用作催化剂。乙二硫醇从 Riedel-de Haen, Frankfurt, 德国购买。3,4-二氢-3-羟基-4-氧代-1,2,3-苯并三嗪(Dhbt-OH), 1-羟基苯

并三唑(HOBt)(HOAt)从Fluka、瑞士获得。

偶联方法

可在DMF中将第一个氨基酸偶联为由合适的 n - α -保护的氨基酸生成的对称的酸酐,并可用DMF中的DIC将随后的氨基酸偶联为由合适的 n - α -保护的氨基酸和HOBt或HOAt制造的原位生成的HOBt或HOAt酯。通过在80℃(80 oc)下进行的茚三酮试验来检测酰基化以防止在试验期间Fmoc脱保护(B. D. Larsen, A. Holm, Int. J Pept. Protein Res. 1994, 43 1-9)。

N- α -氨基保护基(Fmoc)的脱保护

通过用DMF中的20%哌啶处理,进行Fmoc基团的脱保护(1x5和1x10分钟),随后用DMF洗涤(5 x 15ml,每次5分钟),直到向所排出的DMF中加入Dhbt-OH后检测不到黄颜色。

烯丙基/Aloc的脱保护

将溶于15-20 ml CHCl_3 、AcOH、NMM(37: 2: 1)的3当量Pd(PPh₃)₄溶液加到肽树脂中。在室温下继续处理三个小时,并伴有鼓入N₂通过混合物。

Hobt 酯的偶联

将3当量N- α -氨基保护的氨基酸与3当量HOBt和3当量DIC一起溶于DMF中,然后加到树脂中。

预先形成的对称酸酐

将6当量N- α -氨基保护的氨基酸溶于DCM中,并冷却到0℃。加入DIC(3当量)并使反应继续10分钟。将溶剂在真空中除去,并将剩余物溶于DMF中。将溶液立刻加到树脂中,随后加入0.1当量的DMAP。

用酸使肽从树脂上裂解

通过用95%三氟乙酸(TFA, Riedel-de Haen, Frankfurt, 德国)-水v/v或用95%TFA和5%乙二硫醇v/v在室温下处理2小时,使肽从树脂上裂解。将过滤的树脂用95%TFA-水洗涤,并将滤液和洗液在减压下蒸发。将残余物用乙醚洗涤并从乙酸-水中冷冻干燥。将粗冷冻干燥产品通过高效液相色谱(HPLC)分析,并通过电喷雾电离质谱鉴别。

在 TentaGel 树脂 (PEG-PS) 上分批的肽合成

将 TentaGel 树脂 (1g, 0.22-0.31mmol/g) 放置在装有益于过滤的聚丙烯过滤器的聚乙烯容器中。将树脂溶胀在 DMF (15ml) 中, 并用 20%DMF 中的哌啶处理, 以保证在树脂上的非质子化氨基的存在。将树脂排出, 用 DMF 洗涤, 直到向排出的 DMF 中加入 Dhbt-OH 后检测不出黄颜色。以预先形成的如上所述 HOBt-酯的形式偶联 HMPA (3 当量), 并持续偶联 24 小时。排出树脂, 用 DMF (5 X 5 毫升, 每次 5 分钟) 洗涤, 并通过茚三酮试验检测酰化作用。以预先形成的如上所述对称酸酐的形式偶联第一个氨基酸。以预先形成的如上所述 Fmoc 保护的 HOBt 酯 (3 当量) 的形式偶联接下来的氨基酸。偶联持续 2 小时, 除非另作说明。排出树脂, 用 DMF (5 X 15ml, 每次 5 分钟) 洗涤, 以除去过量的试剂。通过在 80℃ 下进行的茚三酮试验检测所有的酰化作用。完全合成后, 用 DMF (3x15 毫升, 每次 5 分钟)、DCM (3x15 毫升, 每次 1 分钟) 和最后用乙醚 (3x15ml, 每次 1 分钟) 洗涤肽树脂, 并在真空中干燥。

制备型 HPLC 条件

使用装有 AFC2000 自动级分收集器 / 自动加样器的 VISION Workstation (PerSeptive Biosystem) 实施了制备型色谱法。使用 VISION-3 软件进行仪器控制和数据收集。

柱

Kromasil (EKA Chemicals) KR100-10-C8 100□, C-8, 10□; CER 2230, 250 x 50, 8 mm 或 VYDAC 218TP101550, 300□, C-18, 10-15□, 250 x 50 mm。使用的缓冲系统包括 A: 0.1% 在 MQV 中的 TFA; B: 0.085% TFA, 10% MQV, 90% MeCN。流速是 35-40ml/分钟, 柱温是 25℃。UV 检测于 215 纳米和 280 纳米处进行。对于个别的肽优化适合的梯度。

分析型 HPLC 条件:

梯度 HPLC 分析是使用 Hewlett Packard HP 1100 HPLC 系统进行的, 该系统由 HP 1100 四联泵, HP1100 自动加样器, HP1100 柱恒温器和 HP1100 多波长检测器组成。使用适用于 LC 软件 (rev. A.06.01) 的 Hewlett Packard Chemstation 用于仪器控制和数据收集。

对于分析型 HPLC, 视需要使用不同的柱, 例如 VYDAC 238TP5415, C-18, 5 μ m, 300Å, 或 a Jupiter, Phenomenex 00F-4053-E0 ; 5 μ m C-18, 300 Å 150 x 4,6 mm 及其它。缓冲系统包括 A: 在 MQV 中的 0.1% TFA; B: 0,085% TFA, 10% MQV, 90% MeCN。流速是 1mL/min。优选的柱温为 40℃。UV 检测于 215 纳米处进行。如同上述, 对于个别的肽优化适合的梯度。

质谱法

将肽溶于超梯度甲醇 (Labscan, Dublin, 爱尔兰), Milli-Q 水 (Millipore, Bedford, MA) 和甲酸 (Merck, Darmstadt, 德国) (50: 50: 0.1 V/V/V) 以产生在 1 和 10 μ g/ml 之间的浓度。使用 LCT 质谱仪 (Micromass, Manchester, UK) 以正极性模式通过 ESI-TOF-MS 对肽溶液 (20 μ l) 进行分析, 精度为 ± 0.1 m/z。

一般合成方法

在所有合成中, 将干燥的 TentaGel-S-NH₂ (0.23 mmol/g, 1 g) 放置在装备有用于过滤的聚丙烯过滤器的聚乙烯容器中, 如在 “在 TentaGel 树脂上分批的肽合成” 下所描述的处理。当位于 C-末端时将赖氨酸和其类似物 (例如鸟氨酸, 2,4-二氨基丁酸, 1,3-二氨基丙酸等等) 以 N- α -Fmoc 保护的衍生物形式与 ivDde 或 Alloc 保护的侧链官能度 (例如 Fmoc-Lys (Alloc)-OH) 偶联。当位于 N-末端时将赖氨酸和其类似物以 N- α -Boc 保护的衍生物形式与 Fmoc 保护的侧链官能度 (例如 Boc-Lys (Fmoc)-OH) 偶联。当位于 C-末端时将天冬氨酸, 谷氨酸和其类似物以 N- α -Fmoc 保护的衍生物形式与烯丙基保护的侧链官能度 (例如 Fmoc-Asp (Oallyl)-OH) 偶联。当位于 N-末端时将天冬氨酸, 谷氨酸和其类似物以 N- α -Boc 保护的衍生物形式与 Fm 保护的侧链官能度 (例如 Boc-Asp (OFm)-OH) 偶联。当位于 C-末端时将上面提到的以外的其它氨基酸以 N- α -Fmoc 保护的衍生物形式与适合的保护的侧链官能度偶联, 或当位于 N-末端时以 N- α -Boc 保护的衍生物形式与适合的保护的侧链官能度偶联。

在所有情况下, 将二肽组装, 随后将赖氨酸, 天冬氨酸或谷氨酸

或其类似物的侧链保护基脱保护。

在赖氨酸或其类似物的情况下，将被官能化为羧酸的疏水基用在 THF 中的 DIC 以原位生成的 HOBt 酯的形式偶联。

在天冬氨酸-和谷氨酸或其类似物的情况下，将被官能化为胺的疏水基用在 DMF 中的 DIC 通过三乙胺催化偶联成侧链羧酸的预生成的 HOBt 酯。

所有偶联持续至少 2 小时。如较早描述的、通过在 80℃ 下进行的茚三酮试验检测所有的酰化作用。完全合成后，用 DMF (3x1 毫升，每次 1 分钟)、DCM (3x15 毫升，每次 1 分钟) 和最后用乙醚 (3x15ml，每次 1 分钟) 洗涤肽-树脂，并在真空中干燥。然后如上所述使肽从树脂裂解下来，将其冷冻干燥。

使用如上所述的制备型 HPLC 纯化后，收集肽产物，并通过 ES-MS 确认肽的同一性。

使用上述方法合成所有进一步在下面举例说明的肽和在说明书的表 1 中显示的肽。示范性的合成反应路线见图 1A 和 1B。

b. 个体肽的合成

H-Gly-Lys (4-硝基苯甲酰基)-OH (化合物 1) 的合成

将赖氨酸偶联为 Fmoc-Lys (ivDde)-OH，N-末端甘氨酸偶联为 Boc 衍生物。如上所述除去 ivDde 保护基。首先将赖氨酸和甘氨酸装配在固体支持体上。然后除去 ivDdde 基团，随后用在 THF 中的 DIC 将 4-硝基苯甲酸偶联为原位生成的 HOBt 酯。使用如上所述的制备型 HPLC 纯化后，收集到 35 mg 纯度大于 99 % 的肽产物。通过 ES-MS 确认肽的同一性 (测定值: MH^+ 352.28, 计算值: MH^+ 352.21)。

H-Gly-Lys (4-氟基苯甲酰基)-OH (化合物 3) 的合成

将赖氨酸偶联为 Fmoc-Lys (ivDde)-OH，N-末端甘氨酸偶联为 Boc 衍生物。如上所述除去 ivDde 保护基。首先将赖氨酸和甘氨酸装配在固体支持体上。然后除去 ivDdde 基团，随后用在 DMF 中的 DIC 将 4-氟基苯甲酸偶联为原位生成的 HOBt 酯。使用如上所述的制备型 HPLC 纯化后，收集到 6 mg 纯度大于 90 % 的肽产物。通过 ES-MS 确认肽的同一性 (测

定值: MH^+ 332.25, 计算值: MH^+ 332.21)。

H-Gly-Lys (4-甲氧基苯甲酰基)-OH (化合物 4) 的合成

将赖氨酸偶联为 Fmoc-Lys(ivDde)-OH, N-末端甘氨酸偶联为 Boc 衍生物。如上所述除去 ivDde 保护基。首先将赖氨酸和甘氨酸装配在固体支持体上。然后除去 ivDde 基团, 随后用在 DMF 中的 DIC 将 4-甲氧基苯甲酸偶联为原位生成的 HOBt 酯。使用如上所述的制备 HPLC 纯化后, 收集到 7 mg 纯度大于 95 % 的肽产物。通过 ES-MS 确认肽的同一性(测定值: MH^+ 337.28, 计算值: MH^+ 337.21)。

H-Lys (4-硝基苯甲酰基)-Gly-OH (化合物 7) 的合成

将赖氨酸偶联为 Fmoc-甘氨酸, N-末端赖氨酸偶联为 Boc-Lys(Fmoc)-OH。首先将甘氨酸和赖氨酸装配在固体支持体上。然后除去赖氨酸侧链上的 Fmoc, 随后用在 THF 中的 DIC 将 4-硝基苯甲酸偶联为原位生成的 HOBt 酯。使用如上所述的制备型 HPLC 纯化后, 收集到 64 mg 纯度大于 98 % 的肽产物。通过 ES-MS 确认肽的同一性(测定值: MH^+ 352.19, 计算值: MH^+ 352.24)。

H-D-Lys (4-甲氧基苯甲酰基)-Gly-OH (化合物 21) 的合成

将赖氨酸偶联为 Fmoc-甘氨酸, N-末端赖氨酸偶联为 Boc-D-Lys(Fmoc)-OH。首先将甘氨酸和赖氨酸装配在固体支持体上。然后除去赖氨酸侧链上的 Fmoc, 随后用在 DMF 中的 DIC 将 4-甲氧基苯甲酸偶联为原位生成的 HOBt 酯。使用如上所述的制备型 HPLC 纯化后, 收集到 31 mg 纯度大于 97 % 的肽产物。通过 ES-MS 确认肽的同一性(测定值: MH^+ 337.24, 计算值: MH^+ 337.21)。

H-D-Lys (4-硝基苯甲酰基)-Gly-OH (化合物 22) 的合成

将赖氨酸偶联为 Fmoc-甘氨酸, N-末端赖氨酸偶联为 Boc-D-Lys(Fmoc)-OH。首先将甘氨酸和赖氨酸装配在固体支持体上。然后除去赖氨酸侧链上的 Fmoc, 随后用在 THF 中的 DIC 将 4-硝基苯甲酸偶联为原位生成的 HOBt 酯。使用如上所述的制备型 HPLC 纯化后, 收集到 65 mg 纯度大于 98 % 的肽产物。通过 ES-MS 确认肽的同一性(测定值: MH^+ 352.27, 计算值: MH^+ 352.24)。

H-D-Lys(苯甲酰基)-Gly-OH(化合物 23)的合成

将赖氨酸偶联为 Fmoc-甘氨酸, N-末端赖氨酸偶联为 Boc-D-Lys(Fmoc)-OH。首先将甘氨酸和赖氨酸装配在固体支持体上。然后除去赖氨酸侧链上的 Fmoc,随后用在 DMF 中的 DIC 将苯甲酸偶联为原位生成的 HOBt 酯。使用如上所述的制备型 HPLC 纯化后,收集到 31 mg 纯度大于 96 %的肽产物。通过 ES-MS 确认肽的同一性(测定值: MH^+ 307.22, 计算值: MH^+ 307.24)。

H-D-Lys(4-叔丁基苯甲酰基)-Gly-OH(化合物 54)的合成

将赖氨酸偶联为 Fmoc-甘氨酸, N-末端赖氨酸偶联为 Boc-D-Lys(Fmoc)-OH。首先将甘氨酸和赖氨酸装配在固体支持体上。然后除去赖氨酸侧链上的 Fmoc,随后用在 DMF 中的 DIC 将 4-叔丁基苯甲酸偶联为原位生成的 HOBt 酯。使用如上所述的制备型 HPLC 纯化后,收集到 34 mg 纯度大于 97 %的肽产物。通过 ES-MS 确认肽的同一性(测定值: MH^+ 363.27, 计算值: MH^+ 363.22)。

H-Asn(NH(4-甲氧苄基))-D-丙氨酸-OH(化合物 80)的合成。

将丙氨酸偶联为 Fmoc-D-丙氨酸, N-末端天冬酰胺偶联为 Boc-Asp(OFm)-OH。首先将丙氨酸和天冬氨酸装配在固体支持体上。然后除去天冬氨酸侧链上的 Fm,随后用在 DMF 中的 DIC 通过三乙胺催化将 4-甲氧基苄胺偶联成预生成的侧链羧酸的 HOBt 酯。使用如上所述的制备型 HPLC 纯化后,收集到 17 mg 纯度大于 98 %的肽产物。通过 ES-MS 确认肽的同一性(测定值: MH^+ 323.17, 计算值: MH^+ 323.15)。

H-D-Asn(NH(4-甲氧苄基))-丙氨酸-OH(化合物 95)的合成。

将丙氨酸偶联为 Fmoc-丙氨酸, N-末端天冬酰胺偶联为 Boc-D-Asp(OFm)-OH。首先将丙氨酸和天冬氨酸装配在固体支持体上。然后除去天冬氨酸侧链上的 Fm,随后用在 DMF 中的 DIC 通过三乙胺催化将 4-甲氧基苄胺偶联成预生成的侧链羧酸的 HOBt 酯。使用如上所述的制备型 HPLC 纯化后,收集到 25 mg 纯度大于 98 %的肽产物。通过 ES-MS 确认肽的同一性(测定值: MH^+ 323.12, 计算值: MH^+ 323.15)。

H-D-Asn(NH(4-硝基苄基))-丙氨酸-OH(化合物 96)的合成。

将丙氨酸偶联为 Fmoc-丙氨酸, N-末端天冬酰胺偶联为 Boc-D-Asp(OFm)-OH。首先将丙氨酸和天冬氨酸装配在固体支持体上。然后除去天冬氨酸侧链上的 Fm,随后用在 DMF 中的 DIC 通过三乙胺催化将 4-硝基苄胺偶联成预生成的侧链羧酸的 HOBt 酯。使用如上所述的制备型 HPLC 纯化后,收集到 102 mg 纯度大于 99 %的肽产物。通过 ES-MS 确认肽的同一性(测定值: MH^+ 338.14, 计算值: MH^+ 338.12)。

实施例 2 生物利用度

材料和方法

药物动力学筛选和食物相互作用研究

化学试剂和材料

用于这些实验的水是从与 Milli-Q 水二级处理系统 (Millipore, Bedford, MA 美国) 联用的反渗透主系统获得的最高质量的水。甲醇是从 Labscan Ltd. (Dublin, 爱尔兰) 获得的超梯度质量的甲醇。甲酸 p. a. (98-100%) 从 Merck (Darmstadt, 德国) 获得。HPLC 级的七氟丁酸从 Pierce (Rockford, III, 美国) 获得。EDTA 稳定的大鼠 (Sprague-Dawley) 血浆从 Harlan Sera Lab Ltd. (Loughborough, 英国) 获得。将血样收集在得自于 BD Vacutainer Systems (Plymouth, 英国) 的 EDTA 钾涂渍的微容器 (microtainers) 中。使用从 Millipore (Bedford, MA, 美国) 获得的带有 3000 分子量切割值 (cut off) Microcon 离心滤器装置, 进行通过超滤的样品制备。

仪器

在来自 Micromass (Manchester, 英国) 结合了 Quattro Ultima 质谱仪的 Waters Alliance 2790 HPLC 仪器上进行 LC/MS/MS 分析。通过 MassLynx 3.5 程序控制 LC 和 MS。在 MS/MS 检测之前, 在 XTerra MS C_{18} (2.0 x 50 mm), 3.5 μm 微粒, (Waters, Milford, MA, 美国) 上进行 LC 分离。

动物

从 M & B (丹麦) 获得十二只雄性 Sprague-Dawley 大鼠 (大约 350 克), 并在 Hypnorm[®]-Dormicum[®] 麻醉期间, 将导管插到股静脉和动脉中。

手术后, 在开始药物给予之前, 使大鼠恢复五天。

药物和剂量水平

二肽(化合物 22, 化合物 21, 化合物 23, 化合物 96, 化合物 95 和化合物 54)是以 TFA 盐的形式得到的, 并溶于 PBS (2.6 mM KCl, 137mM NaCl, 1.5 mM KH_2PO_4 和 8.2 mM Na_2HPO_4 , 调节至 pH= 7.4) 中, 得到 500 μM 的浓度。分别地, 对应于 500 nmol/kg 的剂量给药体积是 1 mL/kg。每个实验后, 将给药溶液在 0.5% 的甲酸水溶液中稀释, 并通过 LC/MS/MS 分析它们的药物物质的含量。给药溶液中药物物质的浓度由标准样品在 1 至 1000 nM 范围的响应值来计算。

研究设计

在交叉研究设计中, 将药物物质以 i.v. 和 p.o. 大体积形式给予两个动物。将 p.o. 剂量给予在药物给予之前禁食 17 小时的大鼠。在药物给予之间, 使动物休息 48 小时。第一次实验后, 使大鼠接受用肝素处理的血液的输血。

在药物给予之前(5 分钟), 大鼠以 i.v. 大体积形式接受 500 IU 肝素, 并收集对照血样。药物给予后, 在下列时间点从股动脉收集大约 250 μL 的血样: 剂量之前(B.D.), i.v. 给药后 5, 15, 30, 60, 120, 180 和 240 分钟, 和在 B.D., p.o. 给药后 10, 30, 50, 80, 120, 180, 240 和 300 分钟。将血样存储在冰上, 直至在 $10.000 \times g$ (4°C) 下离心 5 分钟, 并将血浆(100 μL)转入 1.5 mL 聚丙烯管中, 并在 -20°C 下存储, 直到样品制备和 LC/MS/MS 分析。

样品制备和 LC/MS/MS 分析

将血浆样品在冰上解冻, 并将 100 μL 血浆与 100 μL 1 % (v/v) 甲酸混合, 转入到微型 (Microcon) YM-3 过滤单元中。然后将样品在室温下以 $8.300 \times g$ 离心 1 小时。将滤液收集在 300 μL 自动加样器小瓶中, 并在 4°C 下存储, 直到注射(40 μL)到 LC 柱上。在 50°C 下, 使用在 4 分钟内从 100 % 缓冲液 A (0.1% 甲酸水溶液) 至 100% 缓冲液 B (0.1% 甲酸的乙腈溶液) 的线性梯度, 进行色谱法, 随后使用缓冲液 B 洗涤 3 分钟, 最后使用缓冲液 A 的 7 分钟再平衡期。使用氩气作为碰撞气体 (1.3×10^{-3}

mbar), 通过 MS/MS 进行药物物质的检测。在表 2 中给出了对于每种测试化合物的具体 MS/MS 设定。

化合物	锥形电压	碰撞能量	亲代离子	子代离子
22	40 V	24 eV	353.15 m/z	150.00 m/z
21	60 V	28 eV	338.15 m/z	135.00 m/z
23	30 V	18 eV	308.10 m/z	187.9 m/z 104.9 m/z
96	45 V	15 eV	339.15 m/z	220.00 m/z 169.80 m/z 123.90 m/z
95	60 V	20 eV	324.10 m/z	120.90 m/z
54	60 V	26 eV	364.20 m/z	160.90 m/z

表 2：在生物利用度研究中用于化合物 x-y 检测的 MS/MS 设定。

数据分析

药物物质的血浆浓度是由与外部标准曲线有关的面积来计算的，该曲线由如上所述处理的被掺入的 (spiked) 血浆样品得到。标准曲线是通过 $\log$ (峰面积) 对 $\log$ (浓度) 的线性回归得到的。标准曲线覆盖从 0.1 至 100 nM 浓度范围。

使用非房室分析，将得自于每个动物的血浆浓度对时间数据在 WinNonLin 3.5 (Pharsight, Mountain View, CA, USA) 中进行药物动力学建模，并且报告血浆浓度曲线下的面积值 (AUC)。以 iv 和 po 给药后剂量 (D) 标准化 AUC 之间的 % 比例来计算口服生物利用度 F_{po} : $AUC_{po} * D_{iv} / AUC_{iv} * D_{po}$ 。

结果

试验了 6 个化合物的口服生物利用度，并且口服后，检测所有的化合物。计算的生物利用度概括在下面的表 3 中。化合物 22、23、96 和 95 的生物利用度中等 (在 10-31% 之内)，化合物 54 和 21 的生物利用度低 (在 2-8% 之内)。

化合物编号	F (%)	
	平均值	SEM
22	31	5.3
21	2.6	0.78
23	10	5.7
96	15	3.0
95	29	10
54	7.2	0.40

表 3：6 个试验化合物的平均生物利用度 ± 平均值的浓度范围的标准误差 (SEM)。

结论

本发明的肽在 Sprague-Dawley 大鼠中显示了具有 2 和 31 % 之间的口服利用度。

实施例 3 成骨细胞活性 (ALP 试验)

材料和方法

人类原代成骨细胞是从来自志愿者后髂脊柱的骨髓活检获得的。培养 6 周时使用细胞。在 8 天处理中，将细胞在 24 孔板中培养，对于实验最后 4 天，用从 1×10^{-13} 至 1×10^{-6} 浓度的试验化合物刺激。收集细胞溶解产物用于 ALP 活性的测定。将来自 10-15 个供体的 hOB 细胞用于实验。对于 ALP 测定，使用可商业获得的试剂盒 (碱性磷酸酶试剂盒，Sigma-Aldrich Denmark A/S)。所有的测定按照制造商的建议进行。

分析

在实验终止时，对收集的细胞溶解产物测定 ALP。将测定结果与赋形剂处理的对照培养物相比较。

数据分析

视需要将数据表示为平均值和标准偏差或中间值和百分位数供。使用 0.05 显著水平、利用均值间两两 (post-hoc) 比较的 Fisher's LSD

检验进行双因素 ANOVA。

结果

化合物	N	平均值	SD	0.05 int
22	4	1,12	0,05	0,05
1	4	1,08	0,07	0,06
23	5	1,08	0,07	0,06
95	5	1,14	0,09	0,08

表 4

在图 2 中举例说明并在上述表 4 中概括了化合物 1、22、23 和 95 的活性。

结论

如通过碱性磷酸酶产生的增加测定的，本发明的肽增加了原代培养物中人成骨细胞的活性。

实施例 4 标准钙诱导的心律失常试验

按照 Lynch 等人[6]的模型，在钙诱导的心律失常模型中测定了本发明二肽的抗心律失常的效果。将雄性 NMRI 小鼠(25-30 克；Bomholdtgaard, L1. Skendsved, 丹麦)用精神安定麻醉剂组合(Hypnorm[®](枸橼酸芬太尼 0.315 毫克/毫升和 fuanisone 10 毫克/毫升)+咪达唑仑(5 毫克/毫升))麻醉。将 Hypnorm[®]和咪达唑仑的商品溶液在蒸馏水中 1:1 稀释，并将一部分稀释的 Hypnorm[®]与一部分稀释的咪达唑仑混合。以 50-75 μ l/10 克小鼠的剂量，通过 s.c. 给予这种溶液，引起麻醉。

将 i.v. 套管插入尾部静脉中。通过将不锈钢 ECG 电极定位在右前肢和左后肢上，连续记录导联 II ECG 信号。将接地电极置于右后肢上。将信号放大(x 5.000-10.000)，并通过 Hugo Sachs Electronic model 689 ECG 模块过滤(0.1-150 Hz)。通过 12 位数据收集板(Data Translation model DT321)将模拟信号数字化，并使用适用于 Windows NT Notocord HEM 3.1 软件在 1000 Hz 处变为脉冲信号。10 分钟平衡

期后, 将药物的测试样品注到尾部静脉中, 并且 3 分钟后, 开始 i.v. 输注 CaCl_2 (30mg/ml, 0.1ml/min $\approx$ 100 mg/kg/min), (氯化钙-2-水合物, Riedel-de Haen, 德国)。

将用赋形剂 (含有 0.1% 牛白蛋白的磷酸盐缓冲盐水) 预处理的小鼠在所有天测试, 作为未经处理的动物中对照水平的测量。在所有的实验中, 注射容量是 100 μ l。将至心律失常起始的时滞 (t_{arr}) 确定为从开始输注 CaCl_2 直到首次第二级 AV 阻断 (定义为 AV 传导的间歇失败, 其特征在于没有伴随的 QRS 综合波的 P-波) 的时间。

结果

试验化合物的%响应在表 5 中给出。按照 $(t_{arr}(\text{试验化合物}) - t_{arr}(\text{赋形剂})) \times 100 / t_{arr}(\text{赋形剂})$ 评估给出的响应。

表 5

化合物	% 响应	SEM
1	52.0	8.0
3	37.0	9.0
4	69.0	11.0
7	40	7
21	55.0	4.0
22	52.0	12.0
23	-8.0	7.0
54	61.3	12.3
80	33	6
95	0.3	9.4
96	54	6
AAP	18.9	6.4

结论

本发明的肽显示既抗心律失常的效果又不抗心律失常的效果。

定义

除非具体说明，对于在下列书面描述中所使用的具体术语提供下面的定义。

在整个说明书和权利要求书中，使用天然氨基酸的 3 字母代码，以及用于其它 α -氨基酸被普遍接受的 3 字母代码，例如肌氨酸(Sar)。L 或 D 型没有具体说明的，应将其理解为：所讨论的氨基酸可以是 L 或 D 型。

术语“卤素”是指 F、Cl、Br、和 I，其中 F 和 I 是优选的。

术语“烷基”是指通过从任何碳原子上除去一个氢原子而从烷烃衍生的单价基团： $C_nH_{2n+1}-$ 。通过从无支链烷烃的末端碳原子上除去一个氢原子而衍生的基团形成了正常烷基(正烷基)基团的亚基团(subclass)： $H[CH_2]_n-$ 。基团 RCH_2- 、 R_2CH- (R 不等于 H)和 R_3C- (R 不等于 H)分别是伯、仲和叔烷基。C(1-22)烷基是指具有从 1 至 22 个碳原子的任何烷基，并包括 C(1-6)烷基，例如甲基，乙基，丙基，异丙基，丁基，戊基和己基，和其所有可能的异构体。

短语“低级烷基”是指具有小于约 6 个碳原子的直链或支链烷基，优选甲基，乙基，丙基，或丁基。

术语“链烯基”是指含有一个或多个碳-碳双键的直链或支链或环烃基团。C(2-22)链烯基是指具有从 1 至 22 个碳原子的任何链烯基，并包括 C(2-6)链烯基，乙烯基，烯丙基，1-丁烯基，等等。

术语“芳烷基”是指芳基 C(1-22)烷基，整个说明书中的术语“芳基”是指苯基或萘基。

短语“疏水基”是指任选被取代的芳香碳环，优选 6 或 12 元芳香碳环。短语“任选取代的”是指用下列基团的至少一个取代 6 或 12 元芳香碳环：低级烷基，烷氧基，羟基，羧基，胺，硫醇，酰肼，酰胺，卤化物，羰基，醚，胺，腈，亚胺，硝基，硫化物，亚砷，砷，硫醇，醛，酮基，羧基，酯，酰胺基；包括它们的硒基和硫基衍生物。还包括在“任选取代的”定义中的有或者没有硒基的硫化物、亚砷、砷和硫醇衍生物。在其中芳香碳环是被取代的实施方案中，这类取代将典型地有小于约 10 个取代，更优选约 1 至 5 所述取代，约 1 或 2 个取代优选

于许多本发明应用。优选的烷氧基包括甲氧基，乙氧基，和丙氧基。例证性的疏水基包括未取代苄基，苯基，和萘基。

短语“氢键基团”是指（非共价）氢键的供体或受体。在其中氢键基团是供体的实施方案中，它将典型地包括至少一个与氢原子键合的电负原子。这类电负原子的例子包括但不局限于，氮，氧，卤化物（例如，Cl，F，Br，等等），和硫。例证性的氢键供体包括羟基，胺，硫醇，酰肼和酰胺。在其中第一个氢键基团是受体的实施方案中，它将优选包括至少一个电负原子，例如，如上面提到的那些，其中所述原子包括非成键电子对。这样的对常常被称为“孤对”。优选的氢键受体的例子包括但不局限于，卤化物，羟基，醚，胺，腈，亚胺，硝基，醛，酮基，羧基，酯，酰胺基；和它们的衍生物。还可预见的是合适的硫化物，亚砷，砷，和硫醇氢键受体，包括它们的衍生物。

术语“细胞间的通讯调节剂”，“间隙连接促进剂”，“促进间隙连接通讯的化合物”和“间隙连接开启剂”，等等，全部是指促进 GJIC、或保持 GJIC、或使 GJIC 正常化（例如通过抑制或增加）的化合物，不考虑此作用后面的具体机理。更具体地说，术语“间隙连接开启剂”可以涉及使分子交换正常化（即增加）的物质，所述分子能够通过细胞外和胞内空间之间的间隙连接，和/或可以使增加 GJIC 正常化的物质。

术语“激动剂”是指一种肽，其可以与组织、细胞或细胞部分相互作用，该组织、细胞或细胞部分例如，但不局限于 AAP、AAP10、HP5 肽或它们的功能类似物的靶，以在组织、细胞或细胞部分中引起与 AAP、AAP10、HP5 肽或它们的功能类似物实质上、或至少实质上相同的生理学反应。在一方面，生理反应是下述反应的一个或多个：收缩，松弛，分泌和酶激活。优选，肽与组织、细胞或细胞部分相结合。在一方面，肽与组织、细胞或细胞部分上的受体结合，其与 AP、AAP10、HP5 或其功能类似物结合。然而，本发明的“激动剂”可以与作为任何特定肽的靶的组织、细胞或细胞部分相互作用，导致相同、或至少实质上相同的生理学反应。

如本文中使用的“抗心律失常肽激动剂”是一种肽，其包括抗心

律失常活性，该活性实质上等于或大于 AAP、AAP10、HP5 肽或其功能类似物的抗心律失常活性。“大于”是指与 AAP、AAP10、HP5 肽或其功能类似物的抗心律失常活性相比，以更低浓度的肽、或在更短时间周期内观察到抗心律失常活性。

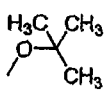
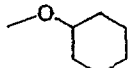
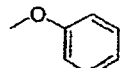
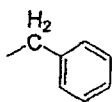
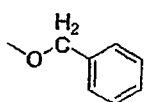
术语“拮抗剂”是指一种肽，在使组织、细胞或细胞部分与任何特定肽例如 AAP、AAP10、HP5 肽或其功能类似物接触后，该肽抑制或拮抗在组织、细胞或细胞部分中观测到的一个或多个生理学反应。在一方面，生理反应是下述反应的一个或多个：收缩，松弛，分泌和酶激活。优选，肽与组织、细胞或细胞部分相结合。在一方面，肽与组织、细胞或细胞部分上的受体结合，其与 AAP、AAP10、HP5 或其功能类似物结合，和/或抑制 AAP、AAP10、HP5 或其功能类似物的一种或多种与所述受体的结合。

本文中使用的“使正常化”是指生理学反应的改变，以致该反应与在正常患者中观测到的反应无显著地不同。因此，正常化取决于所涉及的病理学可以涉及反应的增加或减少。

小于约 10^{-6} M 的 EC50，并优选，小于约 10^{-8} M。

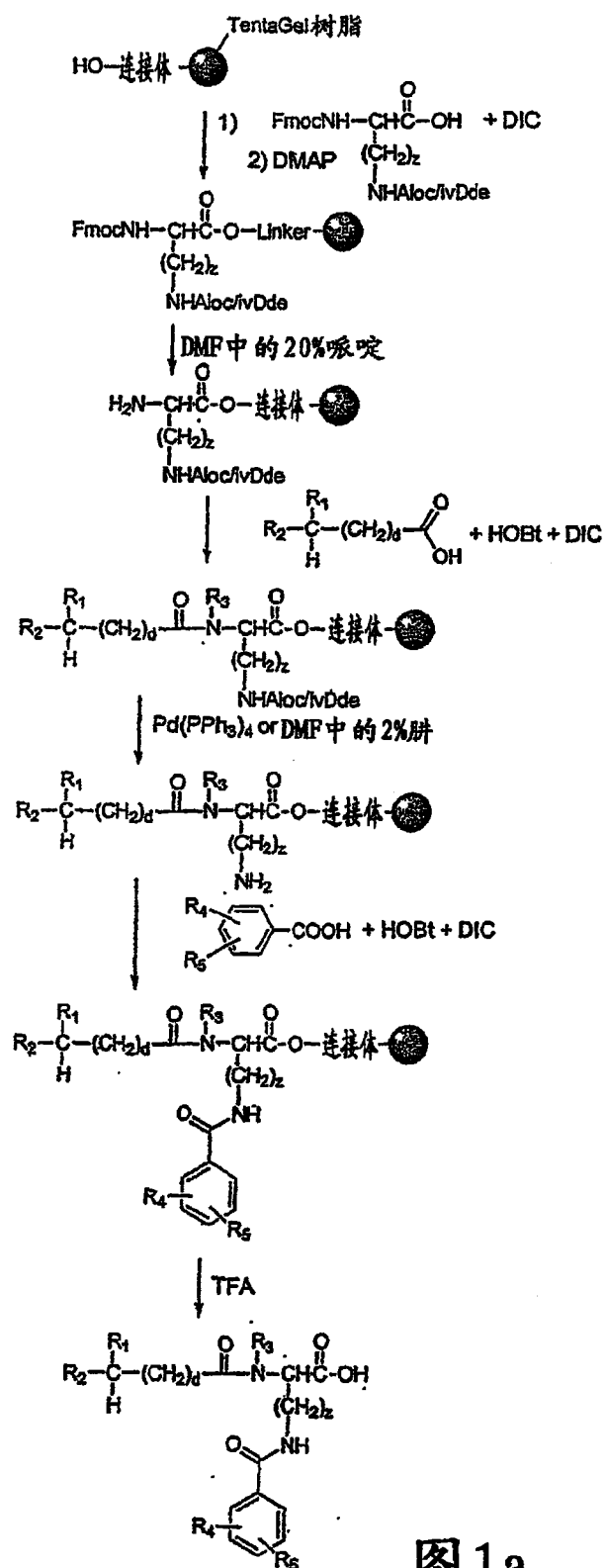
本文中使用的“口服利用度”是指口服给予药物进入血液中的吸收的速度和程度。

下面进一步定义本申请中使用的缩写。

甲基 (Me)	$-\text{CH}_3$	甲氧基 (MeO)	$-\text{OCH}_3$
乙基 (Et)	$-\text{CH}_2\text{CH}_3$	乙氧基 (EtO)	$-\text{OCH}_2\text{CH}_3$
正丁基 (n-Bu)	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$	正丁氧基 (n-BuO)	$-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$
正己基 (n-Hex)	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$	正己氧基 (n-HexO)	$-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$
正辛基 (n-Oct)	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$	正辛氧基 (n-OctO)	$-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$
叔丁基 (t-Bu)		叔丁氧基 (t-BuO)	
环己基 (c-Hex)		环己氧基 (c-HexO)	
苯基 (Ph)		苯氧基 (PhO)	
苄基 (Bzl)		苄氧基 (BzlO)	

在本文中引用的所有参考文献以其全部引入本文中作为参考。

对本领域普通技术人员来说在不背离本发明和权利要求的精神和范围的情况下，本文中描述的内容的改变、修饰和其它实施将存在。



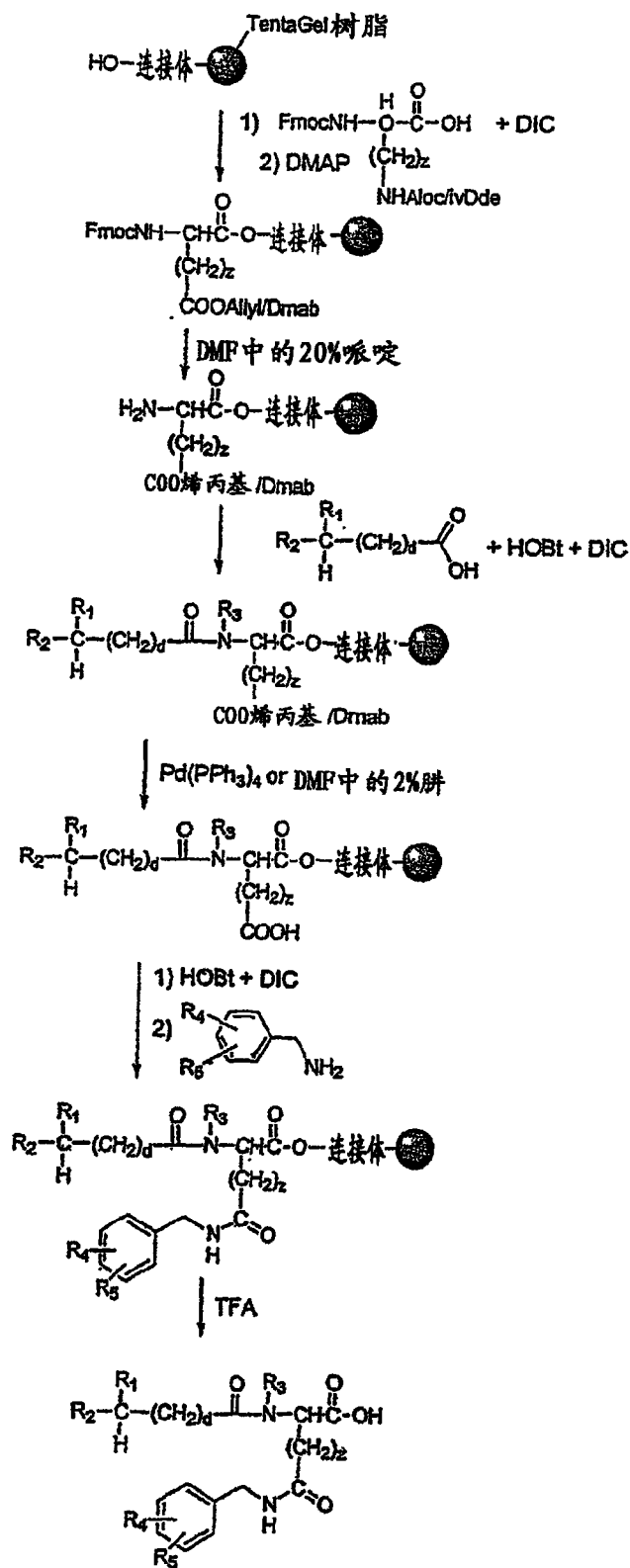


图1b

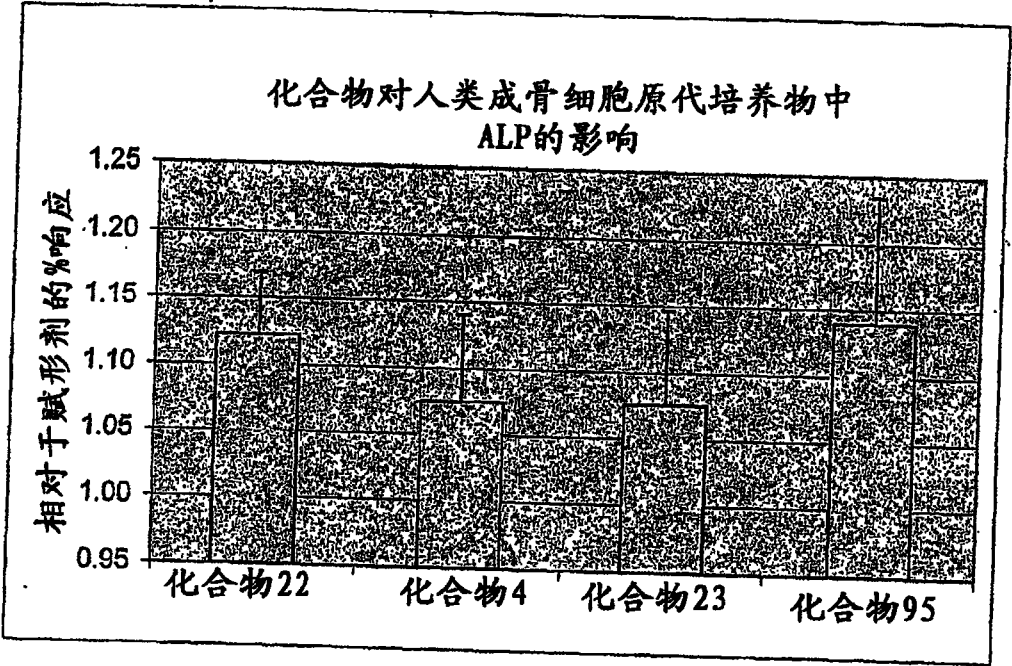


图2