



## (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105828831 A

(43)申请公布日 2016.08.03

(21)申请号 201480066852.9

(74)专利代理机构 北京商专永信知识产权代理  
事务所(普通合伙) 11400

(22)申请日 2014.10.01

代理人 郭玥 葛强

(30)优先权数据

61/890,056 2013.10.11 US

61/940,095 2014.02.14 US

(51)Int.Cl.

A61K 38/08(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2016.06.07

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2014/058646 2014.10.01

(87)PCT国际申请的公布数据

W02015/054006 EN 2015.04.16

(71)申请人 塔瑞克斯制药有限公司

地址 美国马萨诸塞州

(72)发明人 R·弗兰克林

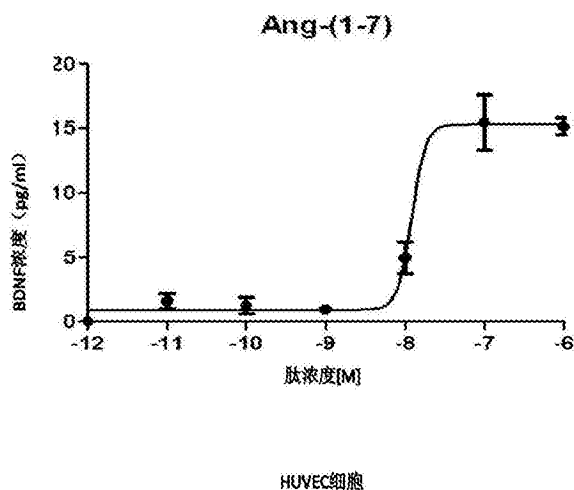
权利要求书2页 说明书27页 附图14页

(54)发明名称

新型肽组合物

(57)摘要

除了其他以外,本申请提供了包含所提供的肽的新型肽组合物,以及使用所提供的肽和组合物的方法。在一些实施方式中,所述环肽在氨基酸之间(例如在任意两个氨基酸之间)包含接头。在一些实施方式中,本发明提供了包含一种或多种如式I所示的肽的组合物。在一些实施方式中,所提供的组合物包含如式I所示的肽和药学上可接受的运载体。在一些实施方式中,所述药物组合物还包含一种或多种选自下述的药学上可接受的赋形剂:聚合物载体、崩解剂、润滑剂、溶剂或膨化剂。



1. 一种肽,所述肽包含如式I所示的氨基酸序列:  
Ala<sup>1</sup>-Xaa<sup>2</sup>-Xaa<sup>3</sup>-Ser<sup>4</sup>-Xaa<sup>5</sup>-Xaa<sup>6</sup>-Cys<sup>7</sup>(SEQ ID NO:1)  
其中  
Xaa<sup>2</sup>选自Arg、Lys、Ala、Cit(瓜氨酸)、Orn(鸟氨酸)、乙酰化的Ser、Sar、D-Arg和D-Lys;  
Xaa<sup>3</sup>选自Val、Ala、Leu、Nle、Ile、Gly、Lys、Pro、Aib(2-氨基异丁酸)、Acpc(1-氨基环戊烷基羧酸)和Tyr;  
Xaa<sup>5</sup>选自Ala、Leu、norLeu、Val和Gly;和  
Xaa<sup>6</sup>选自His、Arg和6-NH<sub>2</sub>-Phe(6-氨基苯丙氨酸)。
2. 权利要求1所述的肽,其中所述肽含有7至25个氨基酸,包括端点。
3. 权利要求1所述的肽,其中所述肽含有一个或多个化学修饰以增加蛋白酶抗性、血清稳定性和/或生物利用度。
4. 一种药物组合物,所述药物组合物包含如权利要求1所述的肽和药学上可接受的载体。
5. 权利要求4所述的药物组合物,其中将所述药物组合物制成用于口服、肌内、静脉内、皮下、局部、透皮、直肠、阴道、肺、鼻内、颊内或舌下施用。
6. 权利要求4所述的药物组合物,其中所述药物组合物还包含一种或多种选自下述的药学上可接受的赋形剂:聚合物载体、崩解剂、润滑剂、溶剂或膨胀剂。
7. 权利要求4-6中任意一项所述的药物组合物,其中将所述药物组合物制成片剂、丸剂、胶囊剂、颗粒剂、糖浆剂、喷雾剂、气溶胶、脂质体组合物、软膏、栓剂、植入剂、膏剂或缓释制剂。
8. 一种治疗疾病、状况或病症的方法,所述方法包括:  
向需要其的对象施用根据权利要求1-7中的任意一项所述的肽或组合物。
9. 一种肽,所述肽包含氨基酸序列Ala<sup>1</sup>-Arg<sup>2</sup>-Val<sup>3</sup>-Ser<sup>4</sup>-Ile<sup>5</sup>-His<sup>6</sup>-Cys<sup>7</sup>(SEQ ID NO:18)。
10. 权利要求9所述的肽,其中所述肽含有一个或多个化学修饰以增加蛋白酶抗性、血清稳定性和/或生物利用度。
11. 一种药物组合物,所述药物组合物包含如权利要求9所述的肽和药学上可接受的载体。
12. 权利要求11所述的药物组合物,其中将所述药物组合物制成用于口服、肌内、静脉内、皮下、局部、透皮、直肠、阴道、肺、鼻内、颊内或舌下施用。
13. 权利要求11所述的药物组合物,其中所述药物组合物还包含一种或多种选自下述的药学上可接受的赋形剂:聚合物载体、崩解剂、润滑剂、溶剂或膨胀剂。
14. 权利要求11-13中任意一项所述的药物组合物,其中将所述药物组合物制成片剂、丸剂、胶囊剂、颗粒剂、糖浆剂、喷雾剂、气溶胶、脂质体组合物、软膏、栓剂、植入剂、膏剂或缓释制剂。
15. 一种治疗疾病、状况或病症的方法,所述方法包括:  
向需要其的对象施用权利要求9-14中任意一项所述的肽或组合物。
16. 肽Ala<sup>1</sup>-Arg<sup>2</sup>-Val<sup>3</sup>-Ser<sup>4</sup>-Ile<sup>5</sup>-His<sup>6</sup>-Cys<sup>7</sup>(SEQ ID NO:18)在治疗人中的用途。
17. 权利要求15所述的方法,其中所述疾病、状况或病症是中风。

18. 权利要求17所述的方法, 其中所述肽或组合物包含具有氨基酸序列Ala<sup>1</sup>-Arg<sup>2</sup>-Val<sup>3</sup>-Ser<sup>4</sup>-Ile<sup>5</sup>-His<sup>6</sup>-Cys<sup>7</sup>(SEQ ID NO:18)的肽。

## 新型肽组合物

### 背景技术

[0001] 生物医药产品是疾病治疗市场越来越普遍的部分。生物制品包括特别是疫苗、基因疗法以及天然或重组蛋白和/或肽。生物制剂可以包括糖、蛋白、核酸或这些物质的复杂组合,并且已作为多种疾病、病症和状况的潜在治疗剂。

### [0002] 发明概述

[0003] 除了其他以外,本发明提供了包含所提供的肽的新型肽组合物,和使用所提供的肽和组合物的方法。

[0004] 在一些实施方式中,本发明提供了包含根据式I的氨基酸序列Ala<sup>1</sup>-Xaa<sup>2</sup>-Xaa<sup>3</sup>-Ser<sup>4</sup>-Xaa<sup>5</sup>-Xaa<sup>6</sup>-Cys<sup>7</sup>(SEQ ID NO:1)的肽。在一些实施方式中,Xaa<sup>2</sup>-Xaa<sup>6</sup>均可以是任意氨基酸或肽键。在一些实施方式中,Xaa<sup>2</sup>选自Arg、Lys、Ala、Cit(瓜氨酸)、Orn(鸟氨酸)、乙酰化的Ser、Sar、D-Arg和D-Lys。在一些实施方式中,Xaa<sup>3</sup>选自Val、Ala、Leu、Nle、Ile、Gly、Lys、Pro、Aib(2-氨基异丁酸)、Acpc(1-氨基环戊烷基羧酸)和Tyr。在一些实施方式中,Xaa<sup>5</sup>选自Ile、Ala、Leu、norLeu、Val和Gly。在一些实施方式中,Xaa<sup>6</sup>选自His、Arg和6-NH<sub>2</sub>-Phe(6-氨基苯基丙氨酸)。在一些实施方式中,所述肽具有氨基酸序列Ala<sup>1</sup>-Arg<sup>2</sup>-Val<sup>3</sup>-Ser<sup>4</sup>-Ile<sup>5</sup>-His<sup>6</sup>-Cys<sup>7</sup>(SEQ ID NO:18)。在一些实施方式中,所提供的肽是非环肽。

[0005] 在一些实施方式中,所提供的肽包含氨基酸序列

[0006] Ala<sup>1</sup>-Arg<sup>2</sup>-Val<sup>3</sup>-Tyr<sup>4</sup>-Ile<sup>5</sup>-His<sup>6</sup>-Pro<sup>7</sup>-Phe<sup>8</sup>-His<sup>9</sup>(SEQ ID NO:2)或

[0007] Ala<sup>1</sup>-Arg<sup>2</sup>-Val<sup>3</sup>-Ser<sup>4</sup>-Ile<sup>5</sup>-His<sup>6</sup>-Cys<sup>7</sup>-Phe<sup>8</sup>-His<sup>9</sup>(SEQ ID NO:3)。

[0008] 在一些实施方式中,所述肽是环肽。在一些实施方式中,所述环肽在氨基酸之间(例如在任意两个氨基酸之间)包含接头。在一些实施方式中,所述接头位于与SEQ ID NO:1的Ser<sup>4</sup>和Cys<sup>7</sup>位置对应的残基。在一些实施方式中,所述肽包含一个或多个化学修饰以增加蛋白酶抗性、血清稳定性和/或生物利用度。

[0009] 在一些实施方式中,本发明提供了包含根据式I的一种或多种肽的组合物。在一些实施方式中,所提供的组合物包含根据式I的肽和药学上可接受的载体。在一些实施方式中,所述药物组合物还包含一种或多种药学上可接受的赋形剂,所述赋形剂选自聚合物载体、崩解剂、润滑剂、溶剂或膨胀剂。在一些实施方式中,将所述药物组合物制成片剂、丸剂、胶囊剂、颗粒剂、糖浆剂、喷雾剂、气溶胶、脂质体组合物、软膏、栓剂、植入剂、膏剂或缓释制剂。

[0010] 在一些实施方式中,将所述药物组合物制成用于口服、肌内、静脉内、皮下、局部、透皮、直肠、阴道、肺、鼻内、颊内或舌下施用。

[0011] 在一些实施方式中,本发明提供了治疗疾病、状况或病症的方法,所述方法包括向需要其的对象施用一种或多种根据式I的肽,或者包含一种或多种根据式I的肽的组合物。

[0012] 如在本申请中所使用的,术语“约”和“近似”所表达的意义相同。本申请中带有或不带有约/近似的任意数字涵盖相关领域普通技术人员可以理解的任意正常波动。

[0013] 下文详细清楚地描述了本发明的其他特征、目的和优势。但应理解,说明本发明实施方式的详细描述仅具有说明性,并不具有限制性。本领域技术人员可根据详细描述清楚

地理解本发明范围内的各种变化和修饰。

[0014] 附图简述

[0015] 图1显示了在HUVEC中血管紧张素(1-7)(SEQ ID NO:4)与在各剂量刺激下的BDNF水平的剂量-响应曲线。

[0016] 图2描述了在HUVEC中Pancyte与在各剂量刺激下的BDNF水平的剂量-响应曲线。

[0017] 图3显示了在HUVEC中TXA301(SEQ ID NO:20)与在各剂量刺激下的BDNF水平的剂量-响应曲线。

[0018] 图4显示了与对照相比在HUVEC中血管紧张素(1-7)、Pancyte、TXA301(SEQ ID NO:20)、弗司扣林或异丙肾上腺素对BDNF的刺激图。

[0019] 图5显示了在HDMEC中血管紧张素(1-7)与在各剂量刺激下的BDNF水平的剂量-响应曲线。

[0020] 图6描述了在HDMEC中Pancyte与在各剂量刺激下的BDNF水平的剂量-响应曲线。

[0021] 图7显示了在HUVEC中TXA301(SEQ ID NO:20)与在各剂量刺激下的BDNF水平的剂量-响应曲线。

[0022] 图8显示了在HUVEC中若干血管紧张素(1-7)肽剂量-响应的复合图,包括血管紧张素(1-7)、Pancyte、TXA301(SEQ ID NO:20)、Ala<sup>1</sup>-Arg<sup>2</sup>-Val<sup>3</sup>-Tyr<sup>4</sup>-Ile<sup>5</sup>-His<sup>6</sup>-Pro<sup>7</sup>(SEQ ID NO:17)或Ala<sup>1</sup>-Arg<sup>2</sup>-Val<sup>3</sup>-Ser<sup>4</sup>-Ile<sup>5</sup>-His<sup>6</sup>-Cys<sup>7</sup>(SEQ ID NO:18,也称为TXA302)。

[0023] 图9显示了HUVEC产生的cAMP对不同剂量Ala<sup>1</sup>-Arg<sup>2</sup>-Val<sup>3</sup>-Ser<sup>4</sup>-Ile<sup>5</sup>-His<sup>6</sup>-Cys<sup>7</sup>(SEQ ID NO:18)的应答的示例性图。

[0024] 图10显示了暴露于下述之一的大鼠的前肢放置测试的示例性结果:多至7周每日一次皮下给予载剂、50μg/kg TXA301(SEQ ID NO:20)或50μg/kg TXA302(SEQ ID NO:18)。

[0025] 图11显示了暴露于下述之一的大鼠的踏步测试的示例性结果:多至7周每日一次皮下给予载剂、50μg/kg TXA301(SEQ ID NO:20)或50μg/kg TXA302(SEQ ID NO:18)。

[0026] 图12显示了暴露于下述之一的大鼠的身体摆动测试的示例性结果:多至7周每日一次皮下给予载剂、50μg/kg TXA301(SEQ ID NO:20)或50μg/kg TXA302(SEQ ID NO:18)。

[0027] 图13显示了暴露于下述之一的大鼠的神经评分测试的示例性结果:多至7周每日一次皮下给予载剂、50μg/kg TXA301(SEQ ID NO:20)或50μg/kg TXA302(SEQ ID NO:18)。

[0028] 图14显示了暴露于下述之一的大鼠血流比(左/右%)和血管直径的基于激光多普勒评估的示例性结果:多至7周每日一次皮下给予载剂、50μg/kg TXA301(SEQ ID NO:20)或50μg/kg TXA302(SEQ ID NO:18)。在中风发生后进行49天检测。

[0029] 定义

[0030] 为了使本发明更加易于理解,下文中首先对某些术语进行了定义。下列术语和其他术语的额外定义将在说明书中阐述。

[0031] **激动剂**:本文中使用的术语“激动剂”指对目标蛋白的功能具有正向影响的任意分子。在一些实施方式中,激动剂直接或间接地加强、增强、活化和/或增加目标蛋白的活性。在特定的实施方式中,激动剂直接与目标蛋白相互作用。此类激动剂可以是例如蛋白、化学化合物、小分子、核酸、抗体、药物、配体或其他试剂。

[0032] **动物**:本文中使用的术语“动物”是指动物界的任何成员。在一些实施方式中,“动物”指处于任何发育阶段的人。在一些实施方式中,“动物”指处于任何发育阶段的非人动

物。在某些实施方式中,非人动物为哺乳动物(如,啮齿类动物、小鼠、大鼠、兔、猴、犬、猫、绵羊、牛、灵长类动物和/或猪)。在一些实施方式中,动物包括但不限于哺乳动物、鸟类、爬行动物、两栖类、鱼、昆虫和/或蠕虫。在一些实施方式中,动物可以是转基因动物、基因工程改造的动物和/或克隆体。

[0033] 近似或约:本文中使用的术语“近似”或“约”当适用于一个或多个目标值时,是指与规定的参考值近似的数值。在某些实施方式中,除另有说明或上下文另有证据表明(除了当这些数字将超过可能数值的100%时),术语“近似”或“约”是指在所述参考值的任意方向(高于或低于)的25%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%或更小幅度以内的数值范围。

[0034] 生物活性:本文中的短语“生物活性”是指在生物系统中(特别是在生物体中)具有活性的任何试剂的特性。例如,给予生物体的一种试剂对此生物体具有生物作用,则认为此试剂具有生物活性。在特定的实施方式中,若一种肽具有生物活性,则具有所述肽至少一种生物活性的所述肽的部分一般称为“生物活性”部分。在某些实施方式中,若某种肽并不具有内在的生物活性,但抑制一种或多种天然存在的血管紧张素化合物的作用,则认为这种肽具有生物活性。

[0035] 运载体或稀释剂:本文中所用的术语“运载体”和“稀释剂”是指用于制备药物制剂的药学上可接受的(如给予人体时安全无毒)的运载体或稀释用的物质。示例性的稀释剂包括无菌水、抑菌性注射用水(BWFI)、pH缓冲液(如磷酸盐缓冲液)、无菌盐水溶液、林格氏溶液或葡萄糖溶液。

[0036] 剂型:本文中使用的术语“剂型”和“单位剂型”是指用于待治疗患者的治疗剂的物理上不连续单位。各单位含有经预先确定的活性物质的量,经计算此数量能够产生所需的治疗作用。但是应理解,组合物的总剂量应由主治医师在合理的医学判断范围内决定。

[0037] 给药方案:本文中使用的术语“给药方案”(或“治疗方案”)是分别给予对象的、通常间隔一定的时间段的一组单位剂量(通常超过一个)。在一些实施方式中,给定的治疗剂具有推荐使用的可以涉及一个或多个剂量的给药方案。在一些实施方式中,给药方案包含多次给药,各次给药彼此间隔相同长度的时间间隔;在一些实施方式中,给药方案包含多次给药,并且至少有两种不同长度的时间段间隔各次给药。在一些实施方式中,在预设定的时间段内连续给予治疗剂。在一些实施方式中,每日一次(QD)或每日两次(BID)给予治疗剂。

[0038] 功能性等价物或衍生物:本文使用的术语“功能性等价物”或“功能衍生物”指代保有与原始序列基本相似的生物活性(功能或结构)的分子。功能衍生物或等价物可能是天然衍生物或人工制备物。示例性的功能衍生物包括具有一个或多个氨基酸取代、缺失或增加的氨基酸序列,前提是仍保持所述蛋白的生物活性。用于取代的氨基酸与被取代的氨基酸理想地具有相似的理化性质。理想的相似理化性质包括在电荷、大小、疏水性、亲水性等上的相似性。

[0039] 改善、增加或减少:本文中使用的术语“改善”、“增加”或“减少”,或在语法上等同的术语,是指与基线测量结果相关的数值,所述基线测量如本申请所述的在开始治疗前相同个体的测量,或在未接受本申请所述的治疗的对照对象(或多个对照对象)中的测量。“对照对象”是指与接受治疗的对象患有相同形式的疾病、并与接受治疗的对象年龄相仿的对象(以确保在治疗个体和对照个体中的疾病阶段是可比的)。

[0040] 体外:本文使用的术语“体外”是指在人工环境(如在试管或反应器、在细胞培养物等)中发生的事件,而非在多细胞生物体中发生的事件。

[0041] 体内:本文使用的术语“体内”是指是多细胞生物体(例如人体和非人动物)中发生的事件。在基于细胞的系统的上下文中,此术语可用于表示在活细胞(相对于,例如体外系统)中发生的事件。

[0042] 分离的:本文中使用的术语“分离的”是指(1)从在最初生产时具有相关性(不论是在性质上还是和/或在实验环境上)的至少部分成分中分开的,和/或(2)人工生产、制备和/或制造的物质和/或实体。经分离的物质和/或实体可以从与其初始相关的其他成分的至少约10%、约20%、约30%、约40%、约50%、约60%、约70%、约80%、约90%、约95%、约98%、约99%、基本100%或100%中分开。在一些实施方式中,经分离的试剂的纯度超过约80%、约85%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%、基本100%或100%。如本申请中所使用的,若一种物质基本不含其他成分,则认为其是“纯的”。本文中使用的术语“分离的细胞”是指不包含在多细胞生物体中的细胞。

[0043] 预防:本文中使用的术语“预防”或“防止”,当与疾病、病症和/或状况的发生连用时是指发生疾病、病症和/或状况的风险下降。见对“风险”的定义。

[0044] 多肽:本文中使用的术语“多肽”是指通过肽键连接到一起的连续的氨基酸链。使用该术语指代任意长度的氨基酸链,但本领域的普通技术人员将理解此术语不限于指代长链,也可指代包含通过肽键相连的两个氨基酸的最短链。如本领域的技术人员所知,可对多肽进行加工和/或修饰。

[0045] 蛋白:本文中使用的术语“蛋白”是指作为独立单位发挥作用的一条或多条多肽。如果单一多肽是独立的功能单位,且无需通过与其他多肽形成永久或暂时的物理结合以形成独立的功能单位,则术语“多肽”和“蛋白”的用法可互换。若独立的功能单位包含相互物理结合的一条以上的多肽,则术语“蛋白”是指物理偶联并作为独立单位共同发挥作用的多个多肽。

[0046] 风险:通过上下文的理解可知,疾病、病症和/或状况的“风险”包含特定个体将发生疾病、病症和/或状况(如亨廷顿氏病、雷特综合征或中风)的可能性。在一些实施方式中,风险以百分比表示。在一些实施方式中,风险从0%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%直至100%。在一些实施方式中,风险表示为与参照样品或参照样品组相关的风险相对的风险。在一些实施方式中,参照样品或参照样品组具有疾病、病症、状况和/或结果(如亨廷顿氏病、雷特综合征或中风)的已知风险。在一些实施方式中,参照样品或参照样品组来自于与特定个体可比较的个体。在一些实施方式中,相对风险为0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多。

[0047] 稳定性:在本申请中使用的术语“稳定的”指治疗剂在较长一段时间内维持其治疗效果(例如全部或大部分其预期的生物活性和/或物理化学完整性)的能力。可以在较长的一段时间内(例如至少1、3、6、12、18、24、30、36个月或更长)评估治疗剂的稳定性和药物组合物维持此治疗剂稳定性的能力。在某些实施方式中,已将如本申请所述的药物组合物制剂以稳定制剂中的一种或多种治疗剂,或者延缓或阻止其降解。在与制剂相关的上下文中,稳定的制剂是在贮存和加工(如冻/融、机械混合和冻干)期间所述治疗剂在其中基本上保持其物理和/或化学完整性和生物活性。

[0048] 对象：本文中使用的术语“对象”是指人或任何非人动物(如小鼠、大鼠、兔、犬、猫、牛、猪、绵羊、马或灵长类动物)。人包括产前和产后的形态。在许多实施方式中，对象是人类。对象可为患者，即去往医师处诊断或治疗疾病的人。本文中使用的术语“对象”与“个体”或“患者”的用法可互换。对象可以患有或易患某种疾病或病症，但可能显示或可能未显示出所述疾病或病症的症状。

[0049] 基本：本文中使用的术语“基本”是指显示出目标特性或属性的完全或接近完全的范围或程度的定性情况。生物领域的普通技术人员将理解，生物和化学现象极少(若有)达到完全和/或向完全趋近，或者获得或避免绝对结果。因此，本文中使用的术语“基本”体现了许多生物和化学现象中固有的缺乏完全性的可能。

[0050] 患有：个体“患有”疾病、病症和/或状况是指所述个体已确诊或显示出所述疾病、病症和/或状况的一种或多种症状。

[0051] 易患：个体“易患”疾病、病症和/或状况是指所述个体尚未确诊此种疾病、病症和/或状况。在一些实施方式中，易患疾病、病症和/或状况的个体可能未显示出所述疾病、病症和/或状况的症状。在一些实施方式中，易患疾病、病症、状况或结果的个体可能具有下列一种或多种特征：(1)与所述疾病、病症和/或状况的发展相关的基因突变；(2)与所述疾病、病症和/或状况的发展相关的基因多态性；(3)与所述疾病、病症和/或状况的发展相关的增加和/或下降的蛋白表达和/或活性；(4)与所述疾病、病症、状况和/或结果的发展相关的习惯和/或生活方式；(5)已进行、计划进行或需要移植。在一些实施方式中，易患疾病、病症和/或状况的个体将发展为该疾病、病症和/或状况。在一些实施方式中，易患疾病、病症和/或状况的个体将不会发展为该疾病、病症和/或状况。

[0052] 治疗有效量：本文中使用的术语治疗剂的“治疗有效量”是指当给予患有或易患疾病、病症和/或状况的对象时，足以治疗、诊断、预防和/或延迟所述疾病、病症和/或状况的症状的发作的量。本领域的普通技术人员应理解治疗有效量通常是以包含至少一个剂量单位的给药方案来给药的。

[0053] 治疗：本文中使用的术语“治疗”“处理”或“医治”是指用于使特定疾病、病症和/或状况的一种或多种症状或特征部分或完全减轻、改善、缓解、抑制、预防、延迟发作、减轻严重程度和/或降低发生率的任何方法。可以向未显示出疾病体征和/或仅显示出疾病早期体征的对象给予治疗，以降低发生与疾病相关的病理的风险。

[0054] 某些实施方式的详细描述

[0055] 除了其他以外，本发明提供了新型的肽、包括一种或多种那些肽的组合物和用于治疗或降低一种或多种疾病、病症和/或状况风险的方法，所述方法包括施用所提供的肽和/或组合物。

[0056] 下列部分中详述了本发明的各个方面。各部分的使用并不意味着限制本发明。各部分可适用于本发明的任意方面。在本发明中，除另有说明，使用“或者”表示“和/或”。

[0057] 所提供的肽

[0058] 本申请中使用的术语“肽”和“多肽”是可互换使用的术语并且指由肽键键合在一起的两个或多个氨基酸。在本申请中使用的术语“肽”和“多肽”包括非环形(例如线形)和环肽。

[0059] 在一些实施方式中，本发明提供了多肽，所述多肽包含根据式I的氨基酸序列：

[0060] Ala<sup>1</sup>-Xaa<sup>2</sup>-Xaa<sup>3</sup>-Ser<sup>4</sup>-Xaa<sup>5</sup>-Xaa<sup>6</sup>-Cys<sup>7</sup>(SEQ ID NO:1)。

[0061] 在一些实施方式中,Xaa<sup>2</sup>-Xaa<sup>6</sup>均可以是任意氨基酸或肽键。在一些实施方式中,Xaa<sup>2</sup>选自Arg、Lys、Ala、Cit(瓜氨酸)、Orn(鸟氨酸)、乙酰化的Ser、Sar、D-Arg和D-Lys;Xaa<sup>3</sup>选自Val、Ala、Leu、Nle、Ile、Gly、Lys、Pro、Aib(2-氨基异丁酸)、Acpc(1-氨基环戊烷基羧酸)和Tyr;Xaa<sup>5</sup>选自Ile、Ala、Leu、norLeu、Val和Gly;和Xaa<sup>6</sup>选自His、Arg和6-NH<sub>2</sub>-Phe(6-氨基苯基丙氨酸)。

[0062] 在一些实施方式中,本发明提供了肽,所述肽包含氨基酸序列

[0063] Ala<sup>1</sup>-Arg<sup>2</sup>-Val<sup>3</sup>-Ser<sup>4</sup>-Ile<sup>5</sup>-His<sup>6</sup>-Cys<sup>7</sup>(SEQ ID NO:18)。

[0064] 在一些实施方式中,所提供的肽是Mas受体的配体。Mas受体是包含七个跨膜区的G蛋白偶联受体。本申请中使用的术语“血管紧张素(1-7)受体”包含G蛋白偶联的Mas受体。

[0065] 功能性等价物、类似物或衍生物

[0066] 在一些实施方式中,所提供的肽是根据式I的肽的功能性等价物。在本申请中使用的根据式I的肽的功能性等价物指与根据式I的肽具有相同氨基酸序列,并基本保留了与对照肽具有相同或相似的活性的任意肽。例如,在一些实施方式中,如本申请所述的根据式I的肽的功能性等价物具有使用本申请所述的或本领域公知的方法确定的对来源于脑的神经营养因子(BDNF)刺激活性。在一些实施方式中,如根据使用本申请中所述的或本领域公知的多种检测所测定的,本申请中所述的根据式I的肽的功能性等价物可连接至或活化血管紧张素(1-7)受体(如G蛋白偶联的Mas受体)。在一些实施方式中,所提供的肽是非环形肽。

[0067] 通常,根据式I的肽的功能性等价物包含包括对照肽中出现的氨基酸中的至少3个(如至少4个、至少5个、至少6个、至少7个)氨基酸的序列,其中所述至少3个(如至少4个、至少5个、至少6个或至少7个)氨基酸保持了他们出现在对照肽中的相对位置和/或间距。在一些实施方式中,所述对照肽是天然存在的Ang-(1-7),

[0068] Asp<sup>1</sup>-Arg<sup>2</sup>-Val<sup>3</sup>-Tyr<sup>4</sup>-Ile<sup>5</sup>-His<sup>6</sup>-Pro<sup>7</sup>(SEQ ID NO:4)。

[0069] 在一些实施方式中,根据式I的肽的功能性等价物也包含含有与对照肽的氨基酸序列具有至少约50%(如至少60%、70%、80%或90%)一致性的序列的任意肽。可通过氨基酸序列比对确定氨基酸序列一致性的百分比。可按照本领域的多种方式进行氨基酸序列比对,例如使用公众可获得的电脑软件如BLAST、ALIGN或Megalign(DNASTAR)软件。本领域的技术人员能够确定用于测定比对的适宜参数,包括获得相对于要对比序列全长的最大比对所需的任意算法。优选使用WU-BLAST-2软件来确定氨基酸序列一致性(Altschul等, Methods in Enzymology(酶学方法)266,460-480(1996);

[0070] <http://blast.wustl.edu/blast/README.html>)。WU-BLAST-2使用多种检索参数,其大部分设置为默认值。可调参数的数值设置如下:重叠跨距=1,重叠分数=0.125,代码阈值(word threshold)(T)=11。HSP评分(S)和HSP S2参数为动态的数值,由程序自身根据特定序列的组成来确定,然而最小值可以被调整并按上文所述来设置。

[0071] 在一些实施方式中,根据式I的肽的功能性等价物、类似物或衍生物是对照肽的片段。在一些实施方式中,与对照肽相比,根据式I的肽的功能性等价物、类似物或衍生物含有氨基酸的取代、缺失和/或插入。在一些实施方式中,功能性等价物、类似物或衍生物可通过取代、添加和/或缺失来改变氨基酸序列来获得。例如,Ala<sup>1</sup>-Arg<sup>2</sup>-Val<sup>3</sup>-Ser<sup>4</sup>-Ile<sup>5</sup>-His<sup>6</sup>-

Cys<sup>7</sup>(SEQ ID NO:18)的序列中的一个或多个氨基酸残基可被具有相似极性的另一个氨基酸取代,作为功能性等价物,产生沉默改变。序列内氨基酸的取代可选择此氨基酸所属类别的其他成员。例如正电荷(碱性)氨基酸包括精氨酸、赖氨酸和组氨酸。非极性(疏水性)氨基酸包括亮氨酸、异亮氨酸、丙氨酸、苯丙氨酸、缬氨酸、脯氨酸、色氨酸和甲硫氨酸。无电荷极性氨基酸包括丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、酪氨酸、天冬酰胺和谷氨酰胺。负电荷(酸性)氨基酸包括谷氨酸和天冬氨酸。氨基酸甘氨酸可包括在非极性氨基酸家族或无电荷(中性)极性氨基酸家族中。一个氨基酸家族内的取代一般称为保守性取代。例如,肽抑制剂的氨基酸序列可被修饰或取代。

[0072] 根据式I的肽的功能性等价物、类似物和衍生物示例在下文标题为“示例性肽”的章节中描述。

[0073] 根据不同的实施方式,所提供的肽可以是任意长度。在一些实施方式中,根据本发明的肽可以含有例如5-50或5-25个氨基酸残基,如5-20、5-15或5-10个氨基酸残基。在一些实施方式中,根据本发明的肽含有5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30、35、40、45或50个残基。

[0074] 在一些实施方式中,根据式I的肽含有一个或多个修饰以增加蛋白酶抗性、血清稳定性和/或生物利用度。在一些实施方式中,适宜的修饰选自聚乙二醇化、乙酰化、糖基化、生物素化、使用D-氨基酸和/或非天然氨基酸取代,以及/或肽环化。

[0075] 本申请中使用的术语“氨基酸”最为宽泛的含义是指可合并入一条多肽链的任何化合物和/或物质。在某些实施方式中,氨基酸具有 $\text{H}_2\text{N}-\text{C}(\text{H})(\text{R})-\text{COOH}$ 的通式结构。在某些实施方式中,氨基酸为天然存在的氨基酸。在某些实施方式中,氨基酸是合成或非天然的氨基酸(例如, $\alpha,\alpha$ -二取代氨基酸,N-烷基氨基酸);在一些实施方式中,氨基酸为D-氨基酸;在某些实施方式中,氨基酸为L-氨基酸。“标准氨基酸”是指在天然存在的肽中常见的二十种标准氨基酸的任意一种,包括经天然掺入肽中的L-氨基酸和D-氨基酸。“非标准”或“非常规氨基酸”是指除标准氨基酸以外的任何氨基酸,无论是通过合成制备的还是由天然来源获得的。本申请中使用的“合成或非天然氨基酸”包含经化学修饰的氨基酸,包括但不限于盐、氨基酸衍生物(例如酰胺)和/或取代物。在肽中包括羧基末端和/或氨基末端氨基酸的氨基酸,可进行甲基化、酰胺化、乙酰化修饰,和/或使用可改变肽的循环半衰期而对其活性没有不良影响的其他化学基团取代修饰。非常规或非天然氨基酸示例包括但不限于瓜氨酸、鸟氨酸、正亮氨酸、正缬氨酸、4-(E)-丁烯基-4(R)-甲基-N-甲基苏氨酸(MeBmt)、N-甲基-亮氨酸(MeLeu)、氨基异丁酸、抑胃酶氨酸和N-甲基-丙氨酸(MeAla)。氨基酸可参与二硫键。术语“氨基酸”可与“氨基酸残基”互换使用,可指游离氨基酸和/或肽上的氨基酸残基。从上下文使用该术语时可显而易见该术语是指代游离氨基酸还是肽的残基。

[0076] 在某些实施方式中,根据式I的肽包含一个或多个L-氨基酸、D-氨基酸和/或非天然氨基酸。

[0077] 除了仅仅包含天然存在的氨基酸的肽以外,本发明还包含模拟肽(peptidomimetic)或肽类似物。制药业常使用肽类似物作为与模板肽具有类似性质的非肽药物。这种非肽化合物被称为“肽模拟物”或模拟肽(Fauchere等, *Infect. Immun.* 54:283-287(1986); Evans等, *J. Med. Chem.* 30:1229-1239(1987))。与具有疗效的肽结构上有关的肽模拟物可用于生产等价物,或者用于增强疗效或预防效果。一般而言,模拟肽与模板多肽

(paradigm polypeptide)(即,具有生物或药理学活性的多肽)(例如天然存在的受体结合多肽)结构相似,但其中一个或多个肽接头被例如 $-\text{CH}_2\text{NH}-$ 、 $-\text{CH}_2\text{S}-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}=\text{CH}-$ (顺式和反式)、 $-\text{CH}_2\text{SO}-$ 、 $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$ 、 $-\text{COCH}_2-$ 等接头任选取代,取代的方法是本领域公知的(Spatola, Peptide Backbone Modifications(肽骨架修饰), Vega Data, 1(3):267(1983); Spatola等, Life Sci. 38:1243-1249(1986); Hudson等, Int. J. Pept. Res. 14:177-185(1979);和Weinstein.B., 1983, Chemistry and Biochemistry, of Amino Acids, Peptides and Proteins(氨基酸、肽和蛋白的化学和生物化学), Weinstein编, Marcel Dekker, New-York, )。这种肽模拟物与天然存在的多肽相比可以具有显著的优势,包括更加经济的生产、化学稳定性提高、药理性质(如半衰期、吸收、效能、有效性等)增强,抗原性降低等。

[0078] 所提供的肽也包含其他类型的肽衍生物,所述衍生物包含通常不是肽的组成部分的其他化学部分,但前提是所述衍生物保持了所需的肽的功能活性。此类衍生物的示例包括(1)氨基末端或另一个游离氨基的N酰基衍生物,其中所述酰基可以是链烷酰基(alkanoyl)(如,乙酰基、己酰基、辛酰基)、芳酰基(如苯甲酰基)或保护基团如F-moc(苄甲基- $\text{O}-\text{CO}-$ );(2)羧基末端或另一个游离羧基或羟基的酯;(3)羧基末端或另一个游离羧基的酰胺,所述酰胺由与氨或适当的胺反应而生成;(4)磷酸化的衍生物;(5)与抗体或其他生物配体偶联的衍生物及其他类型的衍生物;以及(6)与聚乙二醇(PEG)链偶联的衍生物。

[0079] 所提供的肽可通过本领域技术人员公知的任意肽合成方法来获得,包括合成(例如纯(exclusive)固相合成、部分固相合成、碎片缩合、经典溶液合成、自然化学连接)以及重组技术。例如,肽和肽的衍生物可以通过固相肽合成法来获得,简要而言,此法由将C末端氨基酸的羧基偶联至树脂(如二苯甲基胺树脂、氯甲基化树脂、羟甲基树脂)和连续添加N- $\alpha$ 保护的氨基酸来组成。保护基团可以为本领域公知的任意这种基团。在向不断增长的链中增加每个新的氨基酸之前,去除此前向链中添加的氨基酸的保护基团。此种固相合成已在下列文献中公开:Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85:2149(1964);Vale等, Science 213:1394-1397(1981), 美国专利号4,305,872和4,316,891, Bodonsky等 Chem. Ind. (伦敦), 38:1597(1966);以及Pietta和Marshall, Chem. Comm. 650(1970), 由Lubell等, 在“Peptides” Science of Synthesis(“肽”合成的科学)21.11, Chemistry of Amides(酰胺化学), Thieme, Stuttgart, 713-809(2005)中进行的技术综述。向适当的树脂上偶联氨基酸也是本领域公知的,并在美国专利号4,244,946(在Houwer-Weyl, Methods of Organic Chemistry(有机化学方法), 卷E22a. Synthesis of Peptides and Peptidomimetics(肽和模拟肽的合成), Murray Goodman主编, Thieme, Stuttgart. New York 2002中进行了综述)中公开。

[0080] 除另有定义以外,本文中使用的科学和技术术语以及命名法与本发明相关领域的普通技术人员通常理解的意义相同。总体而言,细胞培养、感染、分子生物学方法等过程是本领域中的常用方法。这种标准技术可在参考手册(如Ausubel等, Current Protocols in Molecular Biology(现在分子生物学指南), Wiley Interscience, New York 2001;以及 Sambrook等, Molecular Cloning: A Laboratory Manual(分子克隆:实验室手册), 第3版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (纽约冷泉港实验室出版社)N.Y., 2001)中找到。

[0081] 在制备所提供肽的任何过程中,可能需要保护任何相关分子的敏感性反应基团。可通过常规的保护基团来达到此种目的,例如在下列文献中所述的保护基团:T.W. Greene & P.G.M. Wuts的 Protective Groups In Organic Synthesis(有机合成中的保护基团),

1991, John Wiley and Sons, New-York; 以及Sewald和Jakubke的Peptides: chemistry and Biology(肽: 化学和生物学), 2002, Wiley-VCH, Weinheim, 第142页。例如,  $\alpha$ 氨基保护性基团包括酰基型保护性基团(如三氟乙酰基、甲酰基、乙酰基)、脂肪族氨基甲酸乙酯保护性基团(如t-丁氧羰基(BOC)、环己氧代羰基)、芳香族氨基甲酸乙酯型保护性基团(例如苄基-9-甲氧基-羰基(Fmoc)、苄氧羰基(Cbz)、Cbz衍生物)和烷基型保护性基团(如三苯基甲基、苄基)。氨基酸侧链保护性基团包括苄基(对Thr和Ser), Cbz(Tyr、Thr、Ser、Arg、Lys)、甲基乙基、环己基(Asp、His)、BOC(Arg、His、Cys)等。所述保护基团可使用本领域公知方法在方便的后续阶段中去除。

[0082] 此外, 所提供的肽可按照FMOC方案在有机相中使用保护性基团合成。理想的是, 所述肽使用高效液相色谱(HPLC)在C18色谱柱中以70%的产率纯化, 并使用10%~60%的乙腈梯度洗脱。肽的分子量可通过质谱法进行检测(在Fields的“Solid-Phase Peptide Synthesis”(固相肽合成)Methods in Enzymology(酶学方法). 卷289, 学术出版社(Academic Press), 1997中进行了综述)。

[0083] 或者, 所提供的肽可在重组系统中使用例如编码多肽的多核苷酸序列来制备。应理解, 在同一多肽中可以包含一种以上的上述修饰。

[0084] 虽然肽在体外可有效地引起生物学活性, 但所述肽的体内有效性可能因蛋白酶的存在而下降。血清蛋白酶具有特异性的底物要求。底物必须同时具有L氨基酸和以供断裂的肽键。此外, 代表了在血清中蛋白酶活性的最主要成分的肽链端解酶通常对肽的第一个肽键产生作用, 并且需要游离的N末端(Powell等, Pharm. Res. 10:1268-1273(1993))。鉴于此, 使用经修饰的肽常更有优势。经修饰的肽保留了原始L氨基酸肽产生根据式I的肽所需生物活性的结构特性, 但具有不易被蛋白酶和/或肽链端解酶断裂的优势。

[0085] 可使用相同类型的D氨基酸系统性取代参照序列中的一个或多个氨基酸(如D-赖氨酸取代L-赖氨酸)以生成更为稳定的肽。因此, 本发明中的肽衍生物或模拟肽可全部为L、全部为D或为由D和L混合的肽、具有正向序列或反向序列。N末端或C末端D氨基酸的存在能够增加肽的体内稳定性, 因为肽酶不能使用D氨基酸作为底物(Powell等, Pharm. Res. 10:1268-1273(1993))。反向D肽是指包含D氨基酸的肽, 所述肽以与包含L-氨基酸的肽相反的序列来排列。因此L-氨基酸肽的C末端残基变为D氨基酸肽的N末端, 以此类推。反向D肽保留了与L氨基酸肽相同的二级构象, 以及因此具有的相似活性, 但在体外和体内对酶降解的抗性更高, 因此比原始肽具有更强的疗效(Brady和Dodson, Nature 368:692-693(1994); Jameson等, Nature 368:744-746(1994))。类似地, 可使用标准方法来生成反向L肽, 其中母体肽的C末端取代反向L肽的N末端。可以预见的是, 不具有显著二级结构(如短肽)的L氨基酸肽的反向L肽保留了与L氨基酸肽相同的间距和侧链构象, 因此常与原始的L氨基酸肽具有相似的活性。此外, 反向肽可包含L氨基酸和D氨基酸的组合。氨基酸间的间距以及侧链的构象可以得到保留, 从而产生与原始的L氨基酸肽相似的活性。

[0086] 另一种通过作用于肽的N末端或C末端残基产生肽酶抗性的有效方法是在肽末端增加化学基团, 以使得经修饰的肽不再是肽酶的底物。一种此类化学修饰是在肽的一个或两个末端进行糖基化。某些化学修饰, 特别是N-末端糖基化, 已显示出增加了人血清中肽的稳定性(Powell等, Pharm. Res. 10:1268-1273(1993))。其他增强血清稳定性的化学修饰包括但不限于, 增加N-末端烷基, 所述烷基由从一到二十个碳的低级烷基组成, 例如乙酰基,

和/或增加C末端酰胺或经取代的酰胺基。特别地,本发明包括经修饰的肽,所述肽由带有N末端乙酰基和/或C末端酰胺基的肽组成。

[0087] 在肽的子序列中使用非天然存在的氨基酸取代天然氨基酸也可产生蛋白水解抗性。此种取代可以例如通过肽链端解酶作用于N末端而不影响生物活性产生蛋白水解抗性。非天然存在的氨基酸的例子包括 $\alpha,\alpha$ -二取代氨基酸、N-烷基氨基酸、C- $\alpha$ -甲基氨基酸、 $\beta$ -氨基酸和 $\beta$ -甲基氨基酸。在本发明中有用的氨基酸类似物可包括但不限于 $\beta$ -丙氨酸、正缬氨酸、正亮氨酸、4-氨基丁酸、鸟氨酸、羟脯氨酸、肌氨酸、瓜氨酸、磺基丙氨酸、环己基丙氨酸、2-氨基异丁酸、6-氨基己酸、叔丁基甘氨酸、苯基甘氨酸、o-磷酸丝氨酸、N-乙酰丝氨酸、N-甲酰甲硫氨酸、3-甲基组氨酸和其他非常规氨基酸。此外,使用非天然存在的氨基酸合成肽是本领域的常规技术。

[0088] 此外,可使用本领域公知的方法产生包含参照序列或基本相同的参照序列变体的限制性肽(constrained peptide)(Rizo和Gierasch,Ann.Rev.Biochem.61:387-418(1992))。例如,限制性肽可通过增加能够形成二硫桥的半胱氨酸残基而生成环肽来产生。可将环肽构建成没有游离N或C末端。因此尽管这种肽易于被不能断裂肽链末端的内肽酶水解,但是不易于被肽链端解酶水解。除了存在N末端或C末端的D氨基酸残基或其环状结构以外,具有N末端或C末端D氨基酸的肽的氨基酸序列以及环肽的氨基酸序列通常与其相应肽的序列相同。

[0089] 环肽

[0090] 在一些实施方式中,根据式I的肽的功能性等价物、类似物或衍生物是环肽。本申请中使用的环肽具有两个非相邻残基间的分子内共价键。此分子内的键可以为主链与主链、侧链与主链或侧链与侧链间的键(即线形肽的末端官能团和/或末端或内侧残基的侧链官能团可以连接形成环化)。典型的分子内键包括二硫键、酰胺键和硫醚键。多种环化多肽的方法以及可以对这种肽进行的多种其他修饰是本领域公知的。对于一般性的讨论,参见国际专利公开号W0 01/53331和W0 98/02452,其内容均通过引用并入本申请。此类环化键合和其他修饰也可用于本发明的环肽和衍生物。

[0091] 本文中所述的环肽包含L氨基酸残基、D氨基酸残基或其任意组合。氨基酸可来自天然或非天然来源,只要分子中存在至少一个氨基和至少一个羧基;一般优选 $\alpha$ 和 $\beta$ 氨基酸。环肽也可以含有一种或多种稀有氨基酸(例如4-羟脯氨酸或羟赖氨酸)、有机酸或酰胺和/或常见氨基酸的衍生物,例如具有C-末端羧酸盐酯化(如苄基、甲基或乙基酯)或酰胺化和/或具有N末端氨基修饰(如乙酰化或烷氧基羰基化)的氨基酸,带有或不带有任意多种侧链修饰和/或取代(如甲基化、苄基化、叔丁基化、甲苯磺酰化、烷氧基羰基化等)。适当的衍生物包括具有N-乙酰基(例如代表环化前的线形肽N末端的氨基被乙酰化)和/或C末端酰胺基(即环化前的线形肽的羧基末端被酰胺化)的氨基酸。环肽中可存在的普通氨基酸以外的残基包括但不限于青霉胺、 $\beta,\beta$ -四亚甲基半胱氨酸、 $\beta,\beta$ -环戊烷半胱氨酸、 $\beta$ -巯基丙酸、 $\beta,\beta$ -环戊烷- $\beta$ -巯基丙酸、2-巯基苯、2-巯基苯胺、2-巯基脯氨酸、鸟氨酸、二氨基丁酸、 $\alpha$ -氨基己二酸、m-氨基甲基苯甲酸以及 $\alpha,\beta$ -二氨基丙酸。

[0092] 在合成带有或不带有N-乙酰化和/或C-酰胺化的线形肽后,可采用本领域技术人员熟知的任意多种技术来进行环化。在一个实施方式中,在具有反应活性的氨基酸侧链间产生键合。例如,可通过任意多种方法使肽氧化使得包含两个含有巯基残基的线形肽形成

二硫桥。在一种这种方法中,可使用碱性或中性的水性介质,在数天时间内,通过巯基的空气氧化产生二硫键。对所用的肽进行高度稀释使得聚凝集和分子间副反应最小化。另一种方法是,使用强氧化剂如 $I_2$ 和 $K_3Fe(CN)_6$ 来形成二硫键。本领域的那些普通技术人员将理解必须谨慎操作以防止将Met、Tyr、Trp或His的敏感侧链氧化。在其他实施方式中,可通过形成酰胺键完成环化。例如,可在末端官能团(即环化前的线形肽的氨基末端和羧基末端)间形成肽键。在另一个此类的实施方式中,线形肽含有D-氨基酸。或者,可以通过连接一个末端和一个残基侧链或使用两个侧链(带有或不带有N末端乙酰基和/或C末端酰胺的)来实现环化。能够形成内酰胺键的残基包括赖氨酸、鸟氨酸(Orn)、 $\alpha$ -氨基己二酸、m-氨基甲基苯甲酸、 $\alpha,\beta$ -二氨基丙酸、谷氨酸或天冬氨酸。形成酰胺键的方法通常为本领域熟知。在一个这种方法中,可以通过羧酸与DCC、DIC、EDAC或DCCI的反应来完成碳二亚胺介导的内酰胺形成,从而形成了O-酰基脲,然后O-酰基脲能够立即与游离氨基反应来完成环化。或者,可使用叠氮化物的方法完成环化,其中具有反应活性的叠氮化物中间体可由烷基醚通过酰肼产生。或者,可以使用经活化的酯类来完成环化。酯类的烷氧基碳上存在吸电子取代基增加了对氨解的敏感性。p-硝基酚、N-羟基化合物以及多卤化苯酚的酯的高反应性使得这些“活性酯”可用于合成酰胺键。在其他实施方式中,在含巯基残基侧链和适当衍生化的 $\alpha$ -氨基酸之间可形成硫醚键。举例如下,赖氨酸侧链可通过碳二亚胺偶联的方法(DCC、EDAC)被偶联至溴乙酸,然后与上文所述的包含巯基残基的任何侧链反应来形成硫醚键。为了形成二硫醚(dithioether),任意两种含巯基侧链可与二溴乙烷和二异丙胺在DMF中反应。

[0093] 示例性的肽

[0094] 线形肽

[0095] 在某些方面,本发明提供了非环形(例如线形)肽。如上文所讨论的,在不同实施方式中,所提供的肽包含根据式I的氨基酸:

[0096]  $Ala^1-Xaa^2-Xaa^3-Ser^4-Xaa^5-Xaa^6-Cys^7$  (SEQ ID NO:1)

[0097] 其中Xaa可以是任意氨基酸,或其药学上可接受的盐。

[0098] 在一些实施方式中,Xaa<sup>2</sup>是Arg、Lys、Ala、Cit(瓜氨酸)、Orn(鸟氨酸)、乙酰化的Ser、Sar、D-Arg和D-Lys。在某些实施方式中,Xaa<sup>2</sup>是带正电的氨基酸如Arg或Lys,通常是Arg。

[0099] 在一些实施方式中,Xaa<sup>3</sup>是Val、Ala、Leu、Nle(正亮氨酸)、Ile、Gly、Lys、Pro、羟基Pro(羟脯氨酸)、Aib(2-氨基异丁酸)、Acpc或Tyr。在某些实施方式中,Xaa<sup>3</sup>是脂肪族氨基酸如Val、Leu、Ile或Nle,通常是Val或Nle。

[0100] 在一些实施方式中,Xaa<sup>5</sup>是Ile、Ala、Leu、norLeu、Val或Gly。在某些实施方式中,Xaa<sup>5</sup>是脂肪族氨基酸如Val、Leu、Ile或Nle,通常是Ile。

[0101] 在一些实施方式中,Xaa<sup>6</sup>是His、Arg或6-NH<sub>2</sub>-Phe(6-氨基苯丙氨酸)。在某些实施方式中,Xaa<sup>6</sup>是全部或部分带正电的氨基酸(如Arg或His)。

[0102] 在某些实施方式中,Xaa<sup>2</sup>-Xaa<sup>6</sup>的一个或多个与天然存在的Ang-(1-7)(即Asp<sup>1</sup>-Arg<sup>2</sup>-Val<sup>3</sup>-Tyr<sup>4</sup>-Ile<sup>5</sup>-His<sup>6</sup>-Pro<sup>7</sup>(SEQ ID NO:4))中的相应氨基酸相同。在某些此类实施方式中,除一个或两个以外其他Xaa<sup>2</sup>-Xaa<sup>6</sup>与天然存在的Ang-(1-7)中相应的氨基酸相同。在其他实施方式中,全部的Xaa<sup>2</sup>-Xaa<sup>6</sup>与天然存在的Ang-(1-7)中相应的氨基酸相同。

[0103] 在某些实施方式中,Xaa<sup>3</sup>是Nle。当Xaa<sup>3</sup>是Nle,Xaa<sup>2</sup>和Xaa<sup>5-6</sup>的一个或多个任选地与

天然存在的Ang-(1-7)中相应的氨基酸相同。在某些此类实施方式中,除一个或两个以外其他Xaa<sup>2</sup>和Xaa<sup>5-6</sup>与天然存在的Ang-(1-7)中相应的氨基酸相同。在其他实施方式中,每个Xaa<sup>2</sup>和Xaa<sup>5-6</sup>与天然存在的Ang-(1-7)中相应的氨基酸相同,得到氨基酸序列:Ala<sup>1</sup>-Arg<sup>2</sup>-Nle<sup>3</sup>-Ser<sup>4</sup>-Ile<sup>5</sup>-His<sup>6</sup>-Cys<sup>7</sup>(SEQ ID NO:5)。在一些实施方式中,所述的线形肽包含氨基酸序列Ala<sup>1</sup>-Arg<sup>2</sup>-Val<sup>3</sup>-Tyr<sup>4</sup>-Ile<sup>5</sup>-His<sup>6</sup>-Pro<sup>7</sup>(SEQ ID NO:17)。

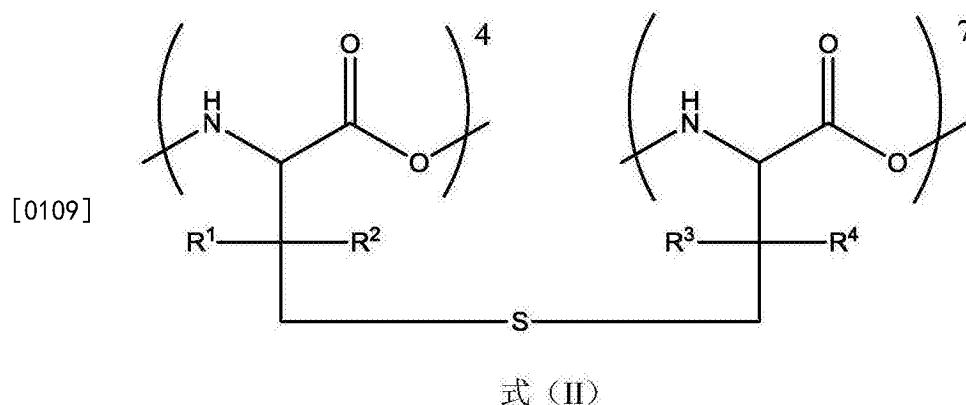
[0104] 在一些实施方式中,所述的线形血管紧张素肽包含Asp<sup>1</sup>-Arg<sup>2</sup>-Val<sup>3</sup>-Tyr<sup>4</sup>-Ile<sup>5</sup>-His<sup>6</sup>-Pro<sup>7</sup>-Phe<sup>8</sup>-His<sup>9</sup>(SEQ ID NO:19)(其与Ang-(1-9)的序列相同)的一个或多个氨基酸取代、缺失或增加。在某些实施方式中,所述肽具有氨基酸序列Ala<sup>1</sup>-Arg<sup>2</sup>-Val<sup>3</sup>-Ser<sup>4</sup>-Ile<sup>5</sup>-His<sup>6</sup>-Cys<sup>7</sup>-Phe<sup>8</sup>-His<sup>9</sup>(SEQ ID NO:3)。在一些实施方式中,所述肽具有氨基酸序列Ala<sup>1</sup>-Arg<sup>2</sup>-Val<sup>3</sup>-Tyr<sup>4</sup>-Ile<sup>5</sup>-His<sup>6</sup>-Pro<sup>7</sup>-Phe<sup>8</sup>-His<sup>9</sup>(SEQ ID NO:2)。

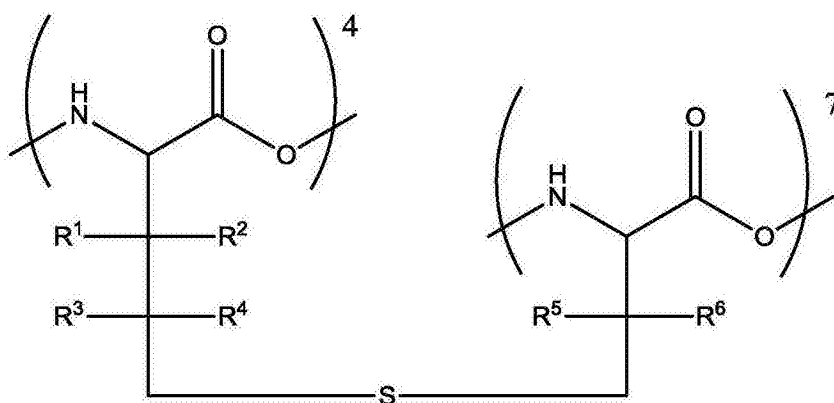
[0105] 在一些实施方式中,所提供的线形肽可以包含下文所述的任意环肽的氨基酸序列(即环肽未环化的线形版的氨基酸序列)。

[0106] 环肽

[0107] 在某些方面,本发明提供了包含接头的根据式I的环肽类似物,例如在式I中Ser<sup>4</sup>和Cys<sup>7</sup>位置的相应氨基酸侧链之间的接头。这些肽的类似物一般包含7个氨基酸残基,但也可包含可裂解序列。如下文的更加详细的描述,本发明包括片段和类似物,其中一个或多个氨基酸被另一个氨基酸(包含片段)取代,例如Ala<sup>1</sup>-Arg<sup>2</sup>-Val<sup>3</sup>-Ser<sup>4</sup>-Ile<sup>5</sup>-His<sup>6</sup>-Cys<sup>7</sup>(SEQ ID NO:18),其中Ser<sup>4</sup>与Cys<sup>7</sup>之间形成接头。

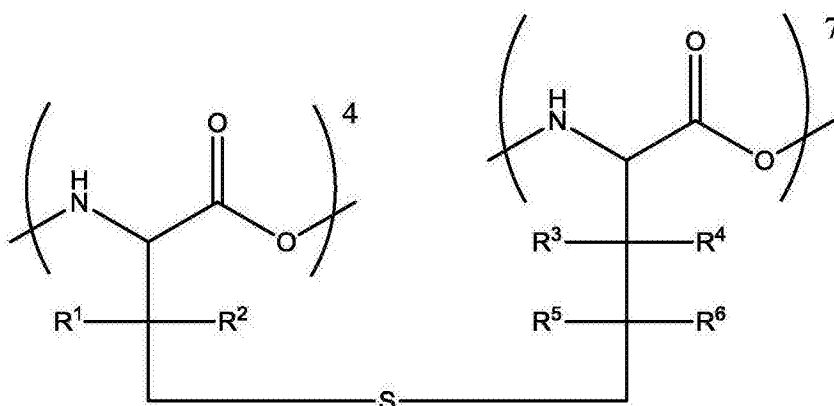
[0108] 虽然下面的章节描述了本发明在位置4和位置7连接残基的硫醚键的方面,应理解其他接头(如上文所述)可以替代硫醚桥且其他残基可以被环化。硫醚桥也可称为单硫桥,或者在Ala-S-Ala中,称为羊毛硫氨酸桥。包含硫醚桥的肽可由具有下式之一的两个氨基酸形成:





式 (III)

[0110]



式 (IV)

[0111] 在这些式中,  $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 和 $R^6$ 独立地为-H、烷基(如 $C_1$ - $C_6$ 烷基、 $C_1$ - $C_4$ 烷基)或芳烷基,其中所述烷基和芳烷基任选地被一个或多个卤素、-OH或-NRR'基团取代(其中R和R'独立地为-H或 $C_1$ - $C_4$ 烷基)。在某些实施方式中, $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 和 $R^6$ 分别独立地为-H或- $CH_3$ ,例如全部为-H。在一些实施方式中,所提供的环肽不包括硫醚桥。在一些实施方式中,所提供的环肽不包括4,7硫醚桥。

[0112] 在某些实施方式中,本发明提供了包含如式(II)的硫醚桥的根据式I所示的肽或其类似物或衍生物。通常, $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 和 $R^4$ 独立地选自-H和- $CH_3$ 。包含如式(II)的硫醚桥的肽可通过例如羊毛硫细菌素(lantibiotic)酶或通过二硫化物的硫的挤出来生产。在一个实施例中,挤出硫的二硫化物可通过位置4的D-半胱氨酸和位置7的L-半胱氨酸或通过位置4的D-半胱氨酸和位置7的L-青霉胺形成(参见如Galande, Trent和Spatola(2003)Biopolymers 71, 534-551)。

[0113] 在其他实施方式中,两个氨基酸间的接头可以为式(III)或式(IV)中所示的桥。包含如式(III)的硫醚桥的肽可以通过例如在位置4的D-高半胱氨酸和在位置7的L-半胱氨酸形成的二硫化物的硫脱出来制备。类似的,包含如式(IV)所示的硫醚桥的肽可以通过例如位置4的D-半胱氨酸和位置7的L-高半胱氨酸形成的二硫化物的硫脱出来制备。

[0114] 如上文所述,本发明的肽及其类似物和衍生物的长度和氨基酸组成可以改变。在一些实施例中,本发明的肽优选具有生物活性或者是可通过蛋白水解活化(例如通过裂解2个氨基酸将具有10个氨基酸的血管紧张素(I)转化为活性片段)的无活性前体分子。所提供

的肽或其类似物或衍生物的大小可以改变,但一般是约5至10个氨基酸,只要所述包含3-7个硫醚-环结构的“核心”五聚体片段包含在内即可。本发明的类似物或衍生物的氨基酸序列可以改变,通常前提是其具有生物活性或可通过蛋白水解来活化。可使用本领域公知的方法来确定类似物或衍生物的生物活性,所述方法包括放射配体结合研究、体外细胞激活检测和体内实验。例如可参见Godeny和Sayeski, (2006) *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 291: C1297-1307; Sarr等, *Cardiovasc. Res.* (2006) 71: 794-802; 以及Koziarz等, (1933) *Gen. Pharmacol.* 24: 705-713。

[0115] 当仅肽的长度改变时,所提供的肽或其类似物和衍生物包括下述:

[0116] 命名为[Cyc<sup>4-7</sup>](1-10)的4,7-环化类似物,具有包含Ala<sup>1</sup>-Arg<sup>2</sup>-Val<sup>3</sup>-Cyc<sup>4</sup>-Ile<sup>5</sup>-His<sup>6</sup>-Cyc<sup>7</sup>, SEQ ID NO:6的氨基酸序列。

[0117] 命名为[Nle<sup>3</sup>,Cyc<sup>4-7</sup>](1-10)的4,7-环化类似物,具有包含Ala<sup>1</sup>-Arg<sup>2</sup>-Nle<sup>3</sup>-Cyc<sup>4</sup>-Ile<sup>5</sup>-His<sup>6</sup>-Cyc<sup>7</sup>-Phe<sup>8</sup>-His<sup>9</sup>-Leu<sup>10</sup>, SEQ ID NO:7的氨基酸序列;

[0118] 命名为[Nle<sup>3</sup>,Cyc<sup>4-7</sup>](1-8)的4,7-环化类似物,具有包含Ala<sup>1</sup>-Arg<sup>2</sup>-Nle<sup>3</sup>-Cyc<sup>4</sup>-Ile<sup>5</sup>-His<sup>6</sup>-Cyc<sup>7</sup>-Phe<sup>8</sup>, SEQ ID NO:8的氨基酸序列;

[0119] 命名为[Nle<sup>3</sup>,Cyc<sup>4-7</sup>](2-8)的4,7-环化类似物,具有包含Arg<sup>2</sup>-Nle<sup>3</sup>-Cyc<sup>4</sup>-Ile<sup>5</sup>-His<sup>6</sup>-Cyc<sup>7</sup>-Phe<sup>8</sup>, SEQ ID NO:9的氨基酸序列;

[0120] 命名为[Nle<sup>3</sup>,Cyc<sup>4-7</sup>](3-8)的4,7-环化类似物,具有包含Nle<sup>3</sup>-Cyc<sup>4</sup>-Ile<sup>5</sup>-His<sup>6</sup>-Cyc<sup>7</sup>-Phe<sup>8</sup>, SEQ ID NO:10的氨基酸序列;

[0121] 命名为[Nle<sup>3</sup>,Cyc<sup>4-7</sup>](1-7)的4,7-环化类似物,具有包含Ala<sup>1</sup>-Arg<sup>2</sup>-Nle<sup>3</sup>-Cyc<sup>4</sup>-Ile<sup>5</sup>-His<sup>6</sup>-Cyc<sup>7</sup>, SEQ ID NO:11的氨基酸序列;和

[0122] 命名为[Nle<sup>3</sup>,Cyc<sup>4-7</sup>](1-9)的4,7-环化类似物,具有包含Ala<sup>1</sup>-Arg<sup>2</sup>-Nle<sup>3</sup>-Cyc<sup>4</sup>-Ile<sup>5</sup>-His<sup>6</sup>-Cyc<sup>7</sup>-Phe<sup>8</sup>-His<sup>9</sup>, SEQ ID NO:12的氨基酸序列。

[0123] 这些类似物可具有式(II)-(IV)中所示硫醚桥之一作为Cyc<sup>4-7</sup>部分,例如,其中Cyc<sup>4</sup>和Cyc<sup>7</sup>可由式(II)表示,例如其中R<sup>1</sup>-R<sup>4</sup>各自为-H或-CH<sub>3</sub>,通常为-H。

[0124] 在某些实施方式中,本发明的肽如式(V)所示:

[0125] Ala<sup>1</sup>-Xaa<sup>2</sup>-Xaa<sup>3</sup>-Cyc<sup>4</sup>-Xaa<sup>5</sup>-Xaa<sup>6</sup>-Cyc<sup>7</sup>(IV, SEQ ID NO:13)

[0126] Xaa<sup>2</sup>是带正电的氨基酸(如Arg或Lys),通常是Arg。

[0127] Xaa<sup>3</sup>是脂肪族氨基酸(如Leu、Ile或Val),通常是Val。

[0128] Cyc<sup>4</sup>与Cyc<sup>7</sup>结合形成硫醚桥。Cyc<sup>4</sup>可以为D-立体异构体和/或L-立体异构体,通常为D-立体异构体。Cyc<sup>4</sup>(与Cyc<sup>7</sup>一起)的示例如式(II)、(III)和(IV)所示。通常,式(II)、(III)和(IV)中的R基团为-H或-CH<sub>3</sub>,特别是-H。

[0129] Xaa<sup>5</sup>是脂肪族氨基酸(如Leu、Ile或Val),通常是Ile。

[0130] Xaa<sup>6</sup>是His。

[0131] Cyc<sup>7</sup>与Cyc<sup>4</sup>结合形成硫醚桥,如式(II)、(III)或(IV)中所示。Cyc<sup>7</sup>可为D-立体异构体和/或L-立体异构体,通常为L-立体异构体。Cyc<sup>7</sup>的示例(与Cyc<sup>4</sup>一起)如式(II)、(III)和(IV)所示。通常,式(II)、(III)和(IV)中的R基为-H或-CH<sub>3</sub>,特别是-H。

[0132] 在某些实施方式中,一个或多个Xaa<sup>2</sup>-Xaa<sup>6</sup>(Cyc<sup>4</sup>和Cyc<sup>7</sup>除外)与天然存在的Ang-(1-7)的相应氨基酸相同。在某些此类实施方式中,除了一个或两个以外,Xaa<sup>2</sup>-Xaa<sup>6</sup>中的全部均与天然存在的Ang-(1-7)的相应氨基酸相同。在其他实施方式中,Xaa<sup>2</sup>-Xaa<sup>6</sup>中的全部均

与天然存在的Ang-(1-7)中的相应氨基酸相同。

[0133] 在某些实施方式中,Cyc<sup>4</sup>和Cyc<sup>7</sup>独立地选自Abu(2-氨基丁酸)和Ala(丙氨酸),其中Ala在至少一个位置上存在。因此,环状类似物可具有由-Ala<sup>4</sup>-S-Ala<sup>7</sup>-(式(II),其中R<sup>1</sup>-R<sup>4</sup>各自为-H);-Ala<sup>4</sup>-S-Abu<sup>7</sup>-(式(II):R<sup>1</sup>-R<sup>3</sup>为-H且R<sup>4</sup>为-CH<sub>3</sub>)或-Abu<sup>4</sup>-S-Ala<sup>7</sup>-(式(II):R<sup>1</sup>,R<sup>3</sup>和R<sup>4</sup>为-H且R<sup>2</sup>为-CH<sub>3</sub>)形成的硫醚接头。环状类似物的特定示例包括-Abu<sup>4</sup>-S-Ala<sup>7</sup>-或-Ala<sup>4</sup>-S-Ala<sup>7</sup>-接头。

[0134] 在某些实施方式中,本发明的肽如式(VI)所示:

[0135] Ala<sup>1</sup>-Xaa<sup>2</sup>-Nle<sup>3</sup>-Cyc<sup>4</sup>-Xaa<sup>5</sup>-Xaa<sup>6</sup>-Cyc<sup>7</sup>-Xaa<sup>8</sup>-Xaa<sup>9</sup>-Xaa<sup>10</sup>(VI,SEQ ID NO:14)

[0136] 如上文所述,Xaa<sup>2</sup>、Xaa<sup>8</sup>、Xaa<sup>9</sup>和Xaa<sup>10</sup>中的一个或多个在某些实施方式中缺失。例如,(1)Xaa<sup>10</sup>缺失,(2)Xaa<sup>9</sup>和Xaa<sup>10</sup>缺失,(3)Xaa<sup>8</sup>、Xaa<sup>9</sup>和Xaa<sup>10</sup>缺失,(4)Xaa<sup>2</sup>缺失,(5)Xaa<sup>2</sup>和Xaa<sup>10</sup>缺失,(5)Xaa<sup>2</sup>、Xaa<sup>9</sup>和Xaa<sup>10</sup>缺失,或(6)Xaa<sup>2</sup>、Xaa<sup>8</sup>、Xaa<sup>9</sup>和Xaa<sup>10</sup>缺失。对于这些实施方式中的各个实施方式,剩余的氨基酸如下所述。

[0137] Xaa<sup>2</sup>当存在时是带正电的氨基酸(如Arg或Lys),通常是Arg。

[0138] Nle<sup>3</sup>是正亮氨酸。

[0139] Cyc<sup>4</sup>与Cyc<sup>7</sup>结合形成硫醚桥。Cyc<sup>4</sup>可以为D-立体异构体和/或L-立体异构体,通常为D-立体异构体。Cyc<sup>4</sup>(与Cyc<sup>7</sup>一起)的示例如式(II)、(III)和(IV)所示。通常,式(II)、(III)和(IV)中的R基团为-H或-CH<sub>3</sub>,特别是-H。

[0140] Xaa<sup>5</sup>是脂肪族氨基酸(如Leu、Nle、Ile或Val),通常是Ile。

[0141] Xaa<sup>6</sup>是His。

[0142] Cyc<sup>7</sup>与Cyc<sup>4</sup>结合形成硫醚键,例如式(II)、(III)或(IV)中所示。Cyc<sup>7</sup>可为D-立体异构体和/或L-立体异构体,通常为L-立体异构体。Cyc<sup>7</sup>(与Cyc<sup>4</sup>一起)的示例如式(II)、(III)和(IV)所示。通常,式(II)、(III)和(IV)中的R基为-H或-CH<sub>3</sub>,特别是-H。

[0143] Xaa<sup>8</sup>存在时为除Pro以外的氨基酸,通常为Phe或Ile。在某些实施方式中,Ile产生Ang(1-8)抑制剂。在某些实施方式中,Phe保持了Ang(1-8)或Ang(1-10)的生物活性。

[0144] Xaa<sup>9</sup>当存在时是His。

[0145] Xaa<sup>10</sup>当存在时是脂肪族残基,例如Ile、Val或Leu,通常是Leu。

[0146] 在某些实施方式中,Xaa<sup>2</sup>-Xaa<sup>10</sup>的一个或多个(Nle<sup>3</sup>、Cyc<sup>4</sup>和Cyc<sup>7</sup>除外)与天然存在的Ang(包含Ang-(1-7)、Ang(1-8)、Ang(1-9)、Ang(1-10)、Ang(2-7)、Ang(2-8)、Ang(2-9)、Ang(2-10)、Ang(3-8)、Ang(3-9)和Ang(3-10))中相应氨基酸相同。在某些此类实施方式中,除了一个或两个以外,Xaa<sup>2</sup>-Xaa<sup>10</sup>(对于存在的那些而言)中的全部均与天然存在的Ang的相应氨基酸相同。在其他实施方式中,Xaa<sup>2</sup>-Xaa<sup>10</sup>(对于存在的那些而言)中的全部均与天然存在的Ang中的相应氨基酸相同。

[0147] 在某些实施方式中,Cyc<sup>4</sup>和Cyc<sup>7</sup>独立地选自Abu(2-氨基丁酸)和Ala(丙氨酸),其中Ala在至少一个位置上存在。因此,所包括的为含有由-Ala<sup>4</sup>-S-Ala<sup>7</sup>-(式(II),其中R<sup>1</sup>-R<sup>4</sup>各自为-H);-Ala<sup>4</sup>-S-Abu<sup>7</sup>-(式(II):R<sup>1</sup>-R<sup>3</sup>为-H且R<sup>4</sup>为-CH<sub>3</sub>)或-Abu<sup>4</sup>-S-Ala<sup>7</sup>-(式(II):R<sup>1</sup>,R<sup>3</sup>和R<sup>4</sup>为-H且R<sup>2</sup>为-CH<sub>3</sub>)形成的硫醚接头的环状类似物。特定的环状类似物包括-Abu<sup>4</sup>-S-Ala<sup>7</sup>-或-Ala<sup>4</sup>-S-Ala<sup>7</sup>-接头。

[0148] 在一些实施方式中,本发明提供了在位置4和位置7之间具有硫醚桥且具有氨基酸序列Ala<sup>1</sup>-Arg<sup>2</sup>-Nle<sup>3</sup>-Abu<sup>4</sup>-Ile<sup>5</sup>-His<sup>6</sup>-Ala<sup>7</sup>(SEQ ID NO:15)或氨基酸序列Ala<sup>1</sup>-Arg<sup>2</sup>-Nle<sup>3</sup>-

Ala<sup>4</sup>-Ile<sup>5</sup>-His<sup>6</sup>-Ala<sup>7</sup>(SEQ ID NO:16)的肽或其类似物或衍生物。

[0149] 在一些实施方式中,所提供的环肽可以是上文所述任意线形肽的环化版。

[0150] 药物组合物

[0151] 根据本发明的方法,所提供的肽或其类似物或衍生物可以单独(例如以纯的肽或化合物),或者如本申请所述作为组合物或药物中的成分(例如在生产用于治疗疾病的药物中)向对象施用。所述组合物可以与生理学上可接受的运载体或赋形剂制剂以制备药物组合物。所述运载体和组合物可以是无菌的。所述制剂应适合于给药方式。将组合物制剂的方法是本领域公知的(参见例如Remington's Pharmaceuticals Sciences(雷明顿制药科学),第17版,Mack Publishing Co.,(Alfonso R.Gennaro编著)(1989))。

[0152] 适宜的药学上可接受的运载体包括但不限于水、盐溶液(例如NaCl)、生理盐水、缓冲盐、醇类、甘油、乙醇、阿拉伯胶、植物油、苾醇、聚乙二醇、明胶、碳水化合物(如乳糖、直链淀粉或淀粉)、糖类(如甘露醇、蔗糖或其他)、右旋糖、硬脂酸镁、滑石粉、硅酸、粘性石蜡、芳香油、脂肪酸酯、羟甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮等,及其组合。如有需要,所述药物配制品可以与助剂(例如润滑剂、防腐剂、稳定剂、润湿剂、乳化剂、影响渗透压的盐、缓冲剂、着色剂、调味剂和/或芳香物质等)混合,其不与活性化合物发生有害的反应或干扰其活性。在优选的实施方式中,使用适于静脉内施用的水溶性运载体。

[0153] 如有需要,所述组合物或药物还可以含有较少量的润湿或乳化剂,或pH缓冲剂。所述组合物可以是液态溶液、混悬剂、乳剂、片剂、丸剂、胶囊剂、持续释放制剂或粉剂。还可以将所述组合物与常规的粘合剂和运载体(如甘油三酯)制剂成栓剂。口服制剂可以包括标准的运载体(如药用级甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、聚乙烯吡咯烷酮、糖精钠、纤维素、碳酸镁等)。

[0154] 可以根据常规程序将所述组合物或药物制成适于向人施用的药物组合物。例如,在优选的实施方式中,静脉内施用的组合物通常是无菌等渗水性缓冲溶液。必要时,所述组合物还可以包括增溶剂和局部麻醉剂以缓解注射部位疼痛。在通常情况下,成分在单位剂型中单独地或混合在一起提供,例如作为在密封容器中的冻干粉末或无水浓缩物,如标明活性剂的量的安瓿或小袋中。当拟通过输注施用所述组合物时,可以将其配制在含有无菌药用级水、生理盐水或者右旋糖/水的输注瓶中。当通过注射施用所述组合物时,可以使用无菌注射用水或生理盐水的安瓿,这样可以在施用前将所述成分混合。

[0155] 在一些实施方式中,提供了组合物,包括作为药物制剂提供的那些,所述组合物包含液体运载体,例如但不限于水、生理盐水、磷酸盐缓冲液、林格氏溶液、右旋糖溶液、含有血清的溶液、Hank's溶液、其他水溶性生理平衡溶液、油、酯类和乙二醇。

[0156] 所提供的本申请所述的肽或其类似物或衍生物可以以中性或盐的形式制剂。药学上可接受的盐包括与游离的氨基基团形成的那些,如来源于盐酸、磷酸、乙酸、草酸、酒石酸等的那些,和与游离的羧基基团形成的那些,如来源于钠、钾、铵、钙、氢氧化铁、异丙胺、三乙胺、2-乙胺基乙醇、组氨酸、普鲁卡因等的那些。

[0157] 口服制剂

[0158] 在一些实施方式中,适宜的药物组合物是口服制剂。可以预期,在本发明的范围内可以使用任意医学上可接受的口服制剂。

[0159] 在一些实施方式中,提供了包括至少一种pH降低剂的组合物。可以预期,适用于本

发明一些实施方式的pH降低剂包括任意药学上可接受的pH降低剂或pH降低剂的组合物,其a)对胃肠道无毒性,b)能够递送氢离子或者能够从局部环境诱导较高的氢离子含量和/或c)能够以一定的量口服施用,所述量足以将局部肠道pH降低至低于在此处发现的蛋白酶的最适pH。可以使用不同检测以确定一种pH降低剂是否适于本发明及其适当的用量。例如,当将特定量的pH降低剂或pH降低剂的组合加入至10毫升0.1M碳酸氢钠溶液使得该溶液的pH降低至不高于5.5、4.7或3.5时,则该pH降低剂或pH降低剂的组合适于本发明。在一些实施方式中,可以将某一量的pH降低剂加入10毫升0.1M碳酸氢钠溶液中以降低pH,使其不高于3.4、3.2、3.0或2.8。

[0160] 在一些实施方式中,适宜的pH降低剂包括具有不高于4.2(例如不高于4.0、3.8、3.6、3.4、3.2、3.0或2.8)的pKa的至少一种pH降低剂。适于本发明的示例性pH降低剂包括但不限于羧酸,如乙酰水杨酸、乙酸、抗坏血酸、柠檬酸、富马酸、葡糖醛酸、戊二酸、甘油酸、乙醇酸、乙醛酸、异柠檬酸、异戊酸、乳酸、马来酸、草酰乙酸、草酰琥珀酸、丙酸、丙酮酸、琥珀酸、酒石酸和戊酸;氯化铝;氯化锌;氨基酸的盐(或其衍生物)包括乙酰谷氨酸、丙氨酸、精氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、甜菜碱、肉毒碱、肌肽、瓜氨酸、肌酸、谷氨酸、甘氨酸、组氨酸、羟甲基赖氨酸、羟脯氨酸、亚牛磺酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、甲基组氨酸、正亮氨酸、鸟氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、肌氨酸、丝氨酸、牛磺酸、苏氨酸、色氨酸、酪氨酸和缬氨酸的盐;某些磷酸酯(包括1,6二磷酸果糖和1,6二磷酸葡萄糖)在某些实施方式中也可以是适宜pH降低剂。在特定的实施方式中,将柠檬酸或酒石酸作为pH降低剂。

[0161] 任意特定pH降低剂或pH降低剂的组合所需的量是可以改变的。典型地,可以使用本领域公知的和本申请所述的多种检测确定适宜的量(例如,在上文所述的10毫升0.1M碳酸氢钠溶液中进行pH降低检测)。作为非限制性示例,在根据本发明的制剂中使用的pH降低剂的适宜的量可以是或高于约100mg、200mg、250mg、300mg、350mg、400mg、425mg、450mg、475mg、500mg、525mg、550mg、575mg、600mg、625mg、650mg、675mg、700mg、725mg、750mg、775mg、800mg、825mg、850mg、875mg、900mg、925mg、950mg、975mg或1,000mg的量。在其他实施方式中,所使用的柠檬酸的量可以超过1,000mg。

[0162] 在一些实施方式中,可以将所使用的pH降低剂(例如柠檬酸或酒石酸)的适宜的量测定为特定剂型总重量的百分率。作为非限制性示例,所使用的pH降低剂的适宜的量可以是或大于固体剂型总重量的约10%(例如是或大于15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%)。

[0163] 在不同的实施方式中,本发明的组合物包括一种或多种吸收增强剂。如在本申请中所使用的,吸收增强剂指增加其他成分在其释放的水性或亲脂性环境中的溶解度和/或增强活性肽(例如根据式I的线形肽或环肽)穿过肠壁的摄取的试剂。在一些实施方式中,吸收增强剂指作为溶解度增强剂和/或摄取增强剂。

[0164] 在一些实施方式中,吸收增强剂的混合物是可能的,其中一些提供增强的溶解度,一些提供增强的摄取,还有一些提供这两者。在给定的实施方式中具有不同数量的吸收增强剂是可能的,包括但不限于:1、2、3、4、5、6、7、8、9或10种吸收增强剂。

[0165] 表面活性剂是具有溶解度增强剂和摄取增强剂两种性质的有用的吸收增强剂的示例。在一些实施方式中,当将表面活性剂作为吸收增强剂时,其可以是便于在生产过程中混合和装载胶囊的自由流动的粉末。在其他实施方式中,当将表面活性剂用于增加所提供

的肽的生物利用度时,所述表面活性剂可以选自下组:(a)阴离子表面活性剂,如胆固醇衍生物(例如胆汁酸),(b)阳离子表面活性剂(例如酰基肉毒碱、磷脂等),(c)非离子表面活性剂,和(d)阴离子表面活性剂和负电荷中和剂(negative charge neutralizers)的混合物,及其组合。负电荷中和剂包括但不限于酰基肉毒碱、氯化十六烷基吡啶等。

[0166] 在一些实施方式中,酸性可溶性胆汁酸和阳离子表面活性剂可以共同用作吸收增强剂。在一些实施方式中,酰基肉毒碱(如月桂酰基肉毒碱)、磷脂和胆汁酸可能是特别有效的吸收增强剂。

[0167] 各种吸收增强剂适用于不同的实施方式中,下述示例性列出旨在说明本发明的一些实施方式。不具有限制性的,一些适宜的吸收增强剂包括:(a)水杨酸盐,如水杨酸钠、3-甲氧基水杨酸盐、5-甲氧基水杨酸盐和高香草酸盐;(b)胆汁酸,如牛磺胆酸、牛磺去氧胆酸、去氧胆酸、胆酸、glycholic、石胆酸、鹅去氧胆酸、熊去氧胆酸、熊胆酸、去氢胆酸、夫西地酸等;(c)非离子表面活性剂,如聚氧乙烯醚(例如Brij 36T、Brij 52、Brij 56、Brij 76、Brij 96、Texaphor A6、Texaphor A14、Texaphor A60等)、p-t-辛基酚聚氧乙烯(TritonX-45、Triton X-100、Triton X-114、Triton X-305)、壬基苯氧基聚氧乙烯(例如Igepal C0系列)、聚氧乙烯山梨醇酯(例如吐温-20、吐温-80等);(d)阴离子表面活性剂,如磺基丁二酸钠二辛酯;(e)溶血磷脂,如溶血卵磷脂和溶血磷脂酰乙醇胺;(f)酰基肉毒碱、酰基胆碱和酰基氨基酸,如月桂酰基肉毒碱、肉豆蔻酰基肉毒碱、棕榈酰基肉毒碱、月桂酰基胆碱、肉豆蔻酰基胆碱、棕榈酰基胆碱、十六烷基赖氨酸、N-酰基苯丙氨酸、N-酰基甘氨酸等;(g)水溶性磷脂,如二庚酰基磷脂酰胆碱、二辛基磷脂酰胆碱等;(h)中链甘油酯,其是含有中链长度的脂肪酸(辛酸、癸酸和月桂酸)的单、双和三甘油酯的混合物;(i)乙二胺四乙酸;(j)阳离子表面活性剂,如氯化十六烷基吡啶;(k)聚乙二醇的脂肪酸衍生物,如Labrasol、Labrafac等;和(l)烷基糖类,如月桂酰基麦芽糖苷、月桂酰基蔗糖、肉豆蔻酰基蔗糖、棕榈酰基蔗糖等。

[0168] 在一些实施方式中,所述吸收增强剂将以相对于药物组合物总重量(通常不计肠溶包衣)以重量计的百分率的测定定量形式存在。以附加的非限制性示例的方式,在实施方式中存在的吸收增强剂的量的范围可以是以重量计从0.1%至20%;以重量计从0.5%至20%;以重量计从1.0%至20%、以重量计从2.0%至20%、以重量计从3.0%至20%、以重量计从4.0%至20%、以重量计从5.0%至20%、以重量计从5.0%至15%、以重量计从5.0%至14%、以重量计从5.0%至13%、以重量计从5.0%至12%、以重量计从5.0%至12%、以重量计从5.0%至11%、以重量计从5.0%至10%、以重量计从6.0%至10%、以重量计从7.0%至10%、以重量计从8.0%至10%、以重量计从9.0%至10%、以重量计从5.0%至9.0%、以重量计从5.0%至8.0%、以重量计从5.0%至7.0%和以重量计从5.0%至6.0%。

[0169] 在一些实施方式中,pH降低剂与吸收增强剂的重量比可以是约3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1、15:1、16:1、17:1、18:1、19:1、20:1或者在任意两个前述示例性比例之间。在给定的药物组合物中的全部pH降低剂的总重量和全部吸收增强剂的总重量包括在前述示例性比例中。例如,如果药物组合物包括两种pH降低剂和三种吸收增强剂,则将以两种pH降低剂的总组合重量和全部三种吸收增强剂的总组合重量计算前述比例。

[0170] 在一些实施方式中,所述吸收增强剂在酸性pH下将是可溶的,如低于pH 5.5,和特

别地在pH 3.0和pH 5.0之间。

[0171] 在一些实施方式中,提供了包含一种或多种保护性载剂的组合物。如在本申请中所使用的,保护性载剂指任意保护性组分和/或结构,如运载体、层、包衣或其他载剂,其保护活性肽(例如根据式I的线形肽或环肽)免于受胃蛋白酶破坏。典型地,保护性载剂最终溶解,以使得在特定剂型中的活性和其他成分可以释放。保护性载剂的常见形式是肠溶包衣。在一些实施方式中,在以100转每分钟旋转所述组合物的溶出池中,适宜的肠溶性包衣可以持续至少2小时阻止本发明的药物组合物在0.1N HCl中被破坏,然后当pH增加至6.3后能够允许所述药物组合物在30分钟以内完全释放所有内容物。

[0172] 多种肠溶性包衣是本领域公知的并且在一个或多个实施方式中是有用的。肠溶性包衣的非限制性示例包括乙酸纤维素钛酸酯、羟丙基甲基乙基纤维素琥珀酸酯、羟丙基甲基纤维素钛酸酯、羧甲基乙基纤维素以及甲基丙烯酸-甲基丙烯酸甲酯共聚物。在一些实施方式中,吸收增强剂(如溶解度和/或摄取增强剂)以及pH降低剂包括在足够粘的保护性糖浆中,以使得所述实施方式的组分能够受保护地通过胃部。

[0173] 可以将适宜的肠溶性包衣应用于例如胶囊,在这之前所述胶囊中已装载了本发明的活性和其他成分。在其他实施方式中,将肠溶性包衣包覆在片剂外部或者包覆在活性成分颗粒的外表面,然后再将其压制成片剂,或者装入胶囊。

[0174] 在一些实施方式中,理想的可能是本发明的所有成分尽可能同时从运载体或载剂中释放并且溶解在肠道环境中。在一些实施方式中也可能优选的是载剂或运载体在小肠中释放活性成分,增加细胞间或细胞旁转运的摄取增强剂在此处释放较小可能引起不良副作用(与如果相同的摄取增强剂在结肠中更晚释放相比)。然而,应理解,本发明被认为在结肠中与在小肠中同样有效。除了上文中讨论的以外,多种载剂或运载体是本领域公知的。

[0175] 在一些实施方式中,理想的可能是保持较低的肠溶性包衣量(特别是在优化如何同时释放本发明的组分的情况下)。在一些实施方式中,肠溶性包衣增加不超过药物组合物(如固体剂型)其余重量的30% (“其余”是药物组合物不包括肠溶性包衣本身)。在其他实施方式中,肠溶性包衣增加低于20%、低于19%、低于18%、低于17%、低于16%、低于15%、低于14%、低于13%、低于12%、低于11%或低于10%的重量。在一些实施方式中,保护性载剂(如肠溶性包衣)构成或低于药物组合物(例如固体剂型)总重量的约25%、24%、23%、22%、21%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%的量。

[0176] 剂量

[0177] 在一些实施方式中,组合物以治疗有效量和/或根据与特定所需结果(例如治疗或减轻疾病的风险)相关的剂量方案施用。

[0178] 根据本申请所述式I的任意肽(或者含有根据本申请所述式I的肽的组合物或药物)可以以任意适宜的途径施用。在一些实施方式中,根据本申请所述式I的肽是皮下施用的。如在本申请中所使用的,术语“皮下组织”被定义为紧贴皮肤下方的疏松、无规则的结缔组织层。例如,所述皮下施用可以通过将组合物注射进入包括但不限于大腿区、腹部、臀部或肩胛区的区域进行。在一些实施方式中,根据本申请所述式I的肽静脉内施用。在其他实施方式中,根据本申请所述式I的肽通过直接向靶组织施用给药,如心脏或肌肉(例如肌肉)、肿瘤(瘤内)、神经系统(例如直接注射至脑;脑室内;鞘内)。或者,根据本申请所述式I

的肽(或者含有如本申请所述肽的组合物或药物)可以通过吸入、胃肠外、皮内、经皮或经粘膜(例如口服或鼻内)施用。如有需要,可以同时使用多于一种的途径。

[0179] 在一些实施方式中,根据本申请中式I的肽口服施用。在一些实施方式中,本发明提供了用于口服施用的根据本申请所述式I的肽的固体剂型,包括(a)根据式I的肽、(b)至少一种药学上可接受的pH降低剂、(c)至少一种有效促进根据式I的肽的生物利用度的吸收增强剂和(d)保护性载剂。在一些实施方式中,所述固体剂型是胶囊或片剂。用于制备口服制剂的不同方法和成分是本领域公知的并且预计本领域技术人员将能够确定这些方法和成分中的哪些与本说明书中和/或2013年9月17日申请的PCT专利申请号PCT/US13/60139(其公开的内容整体并入本申请)中描述的发明具有相容性。此类方法和成分也包括在本发明的范围内。

[0180] 在一些实施方式中,组合物以治疗有效量和/或根据与特定所需结果(例如治疗或减轻疾病的风险)相关的剂量方案施用。

[0181] 根据本发明施用的特定剂量或量可以改变,例如根据预期结果的性质和/或程度,特定的施用途径和/或时间,和/或一个或多个特征(例如体重、年龄、个人病史、遗传特征、生活方式参数、心脏缺陷的严重程度和/或心脏缺陷的风险水平等或其组合)。此类剂量或量可以由那些普通技术人员确定。在一些实施方式中,根据标准临床技术确定适宜的剂量或量。例如,在一些实施方式中,适宜的剂量或量是足以使一种或多种症状降低1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100%或更多的剂量或量。替代地或附加地,在一些实施方式中,通过使用一种或多种体外或体内测定来辅助鉴定待施用的理想的或最佳的剂量范围或量以确定适宜的剂量或量。

[0182] 在不同实施方式中,根据式I的肽以治疗有效量施用。如在本申请中所使用的,术语“治疗有效量”主要是根据在本发明的药物组合物中所含的治疗剂的总量确定的。在通常情况下,治疗有效量足以使对象获得有意义的益处(例如治疗、调节、治愈、预防和/或改善潜在疾病或状况)。在一些特定的实施方式中,待施用的适宜剂量或量可以由来自体外或动物模型检测系统的剂量应答曲线外推得到。

[0183] 根据式I的肽(包括衍生物、类似物和/或盐)的治疗有效剂量的量在不同实施方式中可以以变化的量存在。在一些实施方式中,治疗有效剂量可以是,例如约1-10,000 $\mu$ g/kg、约5-1,500 $\mu$ g/kg、约100-1,000 $\mu$ g/kg或50-500 $\mu$ g/kg。在一些实施方式中,所述治疗有效剂量可以是,例如约1 $\mu$ g/kg、2.5 $\mu$ g/kg、5 $\mu$ g/kg、10 $\mu$ g/kg、20 $\mu$ g/kg、30 $\mu$ g/kg、40 $\mu$ g/kg、50 $\mu$ g/kg、60 $\mu$ g/kg、70 $\mu$ g/kg、80 $\mu$ g/kg、90 $\mu$ g/kg、100 $\mu$ g/kg、150 $\mu$ g/kg、200 $\mu$ g/kg、250 $\mu$ g/kg、300 $\mu$ g/kg、400 $\mu$ g/kg、500 $\mu$ g/kg、600 $\mu$ g/kg、700 $\mu$ g/kg、800 $\mu$ g/kg、900 $\mu$ g/kg、1000 $\mu$ g/kg或1500 $\mu$ g/kg。特定个体的有效剂量可以随着时间而改变(例如增加或减少),其取决于所述个体的需求。在一些实施方式中,本申请所述的治疗有效量在一个剂量中提供。在一些实施方式中,本申请所述的治疗有效量在一天提供。

[0184] 在其他实施方式中,治疗有效剂量的量可以是,例如约0.001mg/kg体重至500mg/kg体重,例如从约0.001mg/kg体重至400mg/kg体重、从约0.001mg/kg体重至300mg/kg体重、从约0.001mg/kg体重至200mg/kg体重、从约0.001mg/kg体重至100mg/kg体重、从约0.001mg/kg体重至90mg/kg体重、从约0.001mg/kg体重至80mg/kg体重、从约0.001mg/kg体

重至70mg/kg体重、从约0.001mg/kg体重至60mg/kg体重、从约0.001mg/kg体重至50mg/kg体重、从约0.001mg/kg体重至40mg/kg体重、从约0.001mg/kg体重至30mg/kg体重、从约0.001mg/kg体重至25mg/kg体重、从约0.001mg/kg体重至20mg/kg体重、从约0.001mg/kg体重至15mg/kg体重、从约0.001mg/kg体重至10mg/kg体重。在一些实施方式中,本申请所述的治疗有效量在一个剂量中提供。在一些实施方式中,本申请所述的治疗有效量在一天提供。

[0185] 在又一个实施方式中,治疗有效剂量可以是,例如约0.001mg/kg体重至约1mg/kg体重,例如从约0.001mg/kg体重至约0.9mg/kg体重、从约0.001mg/kg体重至约0.8mg/kg体重、从约0.001mg/kg体重至约0.8mg/kg体重、从约0.001mg/kg体重至约0.7mg/kg体重、从约0.001mg/kg体重至约0.6mg/kg体重、从约0.001mg/kg体重至约0.5mg/kg体重、从约0.01mg/kg体重至约1mg/kg体重、从约0.01mg/kg体重至约0.9mg/kg体重、从约0.01mg/kg体重至约0.8mg/kg体重、从约0.01mg/kg体重至约0.7mg/kg体重、从约0.01mg/kg体重至约0.6mg/kg体重、从约0.01mg/kg体重至约0.5mg/kg体重、从约0.02mg/kg体重至约1mg/kg体重、从约0.02mg/kg体重至约0.9mg/kg体重、从约0.02mg/kg体重至约0.8mg/kg体重、从约0.02mg/kg体重至约0.7mg/kg体重、从约0.02mg/kg体重至约0.6mg/kg体重、从约0.02mg/kg体重至约0.5mg/kg体重、从约0.03mg/kg体重至约1mg/kg体重、从约0.03mg/kg体重至约0.9mg/kg体重、从约0.03mg/kg体重至约0.8mg/kg体重、从约0.03mg/kg体重至约0.7mg/kg体重、从约0.03mg/kg体重至约0.6mg/kg体重、从约0.03mg/kg体重至约0.5mg/kg体重、从约0.04mg/kg体重至约1mg/kg体重、从约0.04mg/kg体重至约0.9mg/kg体重、从约0.04mg/kg体重至约0.8mg/kg体重、从约0.04mg/kg体重至约0.7mg/kg体重、从约0.04mg/kg体重至约0.6mg/kg体重、从约0.04mg/kg体重至约0.5mg/kg体重、从约0.05mg/kg体重至约1mg/kg体重、从约0.05mg/kg体重至约0.9mg/kg体重、从约0.05mg/kg体重至约0.8mg/kg体重、从约0.05mg/kg体重至约0.7mg/kg体重、从约0.05mg/kg体重至约0.6mg/kg体重、从约0.05mg/kg体重至约0.5mg/kg体重。在一些实施方式中,本申请所述的治疗有效量在一个剂量中提供。在一些实施方式中,本申请所述的治疗有效量在一天提供。

[0186] 在又一个实施方式中,治疗有效剂量可以是,例如约0.0001mg/kg体重至0.1mg/kg体重,例如从约0.0001mg/kg体重至0.09mg/kg体重、从约0.0001mg/kg体重至0.08mg/kg体重、从约0.0001mg/kg体重至0.07mg/kg体重、从约0.0001mg/kg体重至0.06mg/kg体重、从约0.0001mg/kg体重至0.05mg/kg体重、从约0.0001mg/kg体重至约0.04mg/kg体重、从约0.0001mg/kg体重至0.03mg/kg体重、从约0.0001mg/kg体重至0.02mg/kg体重、从约0.0001mg/kg体重至0.019mg/kg体重、从约0.0001mg/kg体重至0.018mg/kg体重、从约0.0001mg/kg体重至0.017mg/kg体重、从约0.0001mg/kg体重至0.016mg/kg体重、从约0.0001mg/kg体重至0.015mg/kg体重、从约0.0001mg/kg体重至0.014mg/kg体重、从约0.0001mg/kg体重至0.013mg/kg体重、从约0.0001mg/kg体重至0.012mg/kg体重、从约0.0001mg/kg体重至0.011mg/kg体重、从约0.0001mg/kg体重至0.01mg/kg体重、从约0.0001mg/kg体重至0.009mg/kg体重、从约0.0001mg/kg体重至0.008mg/kg体重、从约0.0001mg/kg体重至0.007mg/kg体重、从约0.0001mg/kg体重至0.006mg/kg体重、从约0.0001mg/kg体重至0.005mg/kg体重、从约0.0001mg/kg体重至0.004mg/kg体重、从约0.0001mg/kg体重至0.003mg/kg体重、从约0.0001mg/kg体重至0.002mg/kg体重。在一些实施方式中,所述治疗有效剂量可以是0.0001mg/kg体重、0.0002mg/kg体重、0.0003mg/kg体

重、0.0004mg/kg体重、0.0005mg/kg体重、0.0006mg/kg体重、0.0007mg/kg体重、0.0008mg/kg体重、0.0009mg/kg体重、0.001mg/kg体重、0.002mg/kg体重、0.003mg/kg体重、0.004mg/kg体重、0.005mg/kg体重、0.006mg/kg体重、0.007mg/kg体重、0.008mg/kg体重、0.009mg/kg体重、0.01mg/kg体重、0.02mg/kg体重、0.03mg/kg体重、0.04mg/kg体重、0.05mg/kg体重、0.06mg/kg体重、0.07mg/kg体重、0.08mg/kg体重、0.09mg/kg体重或0.1mg/kg体重。特定个体的有效剂量可以随着时间而改变(例如增加或减少),其取决于所述个体的需求。在一些实施方式中,本申请所述的治疗有效量在一个剂量中提供。在一些实施方式中,本申请所述的治疗有效量在一天提供。

[0187] 在一些实施方式中,根据式I的肽以范围从约1-1,000 $\mu$ g/kg/天(例如范围从约1-900 $\mu$ g/kg/天、1-800 $\mu$ g/kg/天、1-700 $\mu$ g/kg/天、1-600 $\mu$ g/kg/天、1-500 $\mu$ g/kg/天、1-400 $\mu$ g/kg/天、1-300 $\mu$ g/kg/天、1-200 $\mu$ g/kg/天、1-100 $\mu$ g/kg/天、1-90 $\mu$ g/kg/天、1-80 $\mu$ g/kg/天、1-70 $\mu$ g/kg/天、1-60 $\mu$ g/kg/天、1-50 $\mu$ g/kg/天、1-40 $\mu$ g/kg/天、1-30 $\mu$ g/kg/天、1-20 $\mu$ g/kg/天、1-10 $\mu$ g/kg/天)的有效剂量施用。在一些实施方式中,根据式I的肽以范围从约1-500 $\mu$ g/kg/天的有效剂量施用。在一些实施方式中,根据式I的肽以范围从约50-500 $\mu$ g/kg/天的有效剂量施用。在一些实施方式中,根据式I的肽以范围从约1-100 $\mu$ g/kg/天的有效剂量施用。在一些实施方式中,根据式I的肽以范围从约1-60 $\mu$ g/kg/天的有效剂量施用。在一些实施方式中,根据式I的肽以选自下述的有效剂量施用:约1、2、4、6、8、10、15、20、25、30、35、40、45、50、75、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950或1,000 $\mu$ g/kg/天。特定个体的有效剂量可以随着时间而改变(例如增加或减少),其取决于所述个体的需求。在一些实施方式中,本申请所述的治疗有效量在一个剂量中提供。在一些实施方式中,本申请所述的治疗有效量在一天提供。

[0188] 在一些实施方式中,根据式I的肽以范围从约1-1,000pg/kg/天(例如范围从约1-900pg/kg/天、1-800pg/kg/天、1-700pg/kg/天、1-600pg/kg/天、1-500pg/kg/天、1-400pg/kg/天、1-300pg/kg/天、1-200pg/kg/天、1-100pg/kg/天、1-90pg/kg/天、1-80pg/kg/天、1-70pg/kg/天、1-60pg/kg/天、1-50pg/kg/天、1-40pg/kg/天、1-30pg/kg/天、1-20pg/kg/天、1-10pg/kg/天)的有效剂量施用。在一些实施方式中,血管紧张素(1-7)肽以范围从约1-60 $\mu$ g/kg/天的有效剂量施用。在一些实施方式中,血管紧张素(1-7)肽以选自下述的有效剂量施用:约1、2、4、6、8、10、15、20、25、30、35、40、45、50、75、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950或1,000pg/kg/天。特定个体的有效剂量可以随着时间而改变(例如增加或减少),其取决于所述个体的需求。在一些实施方式中,本申请所述的治疗有效量在一个剂量中提供。在一些实施方式中,本申请所述的治疗有效量在一天提供。

[0189] 在一些实施方式中,所提供的组合物以药物制剂的形式提供。在一些实施方式中,药物制剂是或包括用于根据与实现降低疾病的发生或风险相关的剂量方案施用的单位剂量的量。

[0190] 在一些实施方式中,包含根据本申请所述式I的肽的制剂以单剂量施用。在一些实施方式中,包含根据本申请所述式I的肽的制剂以规律间隔施用。如在本申请中所使用的,以“间隔”施用表示治疗有效量周期性地施用(区别于一次性剂量)。所述间隔可以通过标准临床技术确定。在一些实施方式中,包含根据本申请所述式I的肽的制剂每两个月、每个月、

每月两次、每三周、每两周、每周、每周两次、每周三次、每日、每日两次或每六小时施用。单一个体的施用间隔不需要是固定的间隔,而是可以随着时间而改变,其取决于所述个体的需求。

[0191] 如在本申请中所使用的,术语“每两个月”指每两个月施用一次(即每两个月一次);术语“每月”指每个月施用一次;术语“每三周”指每三周施用一次(即每三周一次);术语“每两周”指每两周施用一次(即每两周一次);术语“每周”指每周施用一次;和术语“每日”指每天施用一次。

[0192] 在一些实施方式中,包含根据本申请所述式I的肽的制剂以规律的间隔无限期施用。在一些实施方式中,包含根据本申请所述式I的肽的制剂以规律的间隔在限定的时间段施用。在一些实施方式中,包含根据本申请所述式I的肽的制剂以规律的间隔施用5年、4年、3年、2年、1年、11个月、10个月、9个月、8个月、7个月、6个月、5个月、4个月、3个月、2个月、1个月、3周、2周、1周、6天、5天、4天、3天、2天或1天。

[0193] 试剂盒

[0194] 本发明还提供了试剂盒或其他生产制品,其包含含有相同的根据式I的肽,并提供了将其重构(若为冻干的)和/或使用的说明书。试剂盒或其他生产制品可包括容器、注射器、小瓶和任意其他在给药(如皮下、口服、吸入)中使用的物品、装置或设备。适当的容器包括如瓶子、小瓶、注射器(如预装注射器)、安瓿、套筒、储液器或二室注射器。这些容器可以由多种材质(例如玻璃或塑料)形成。在一些实施方式中,容器是预装注射器。适当的预装注射器包括但不限于带有烤硅酮涂层的硼硅酸盐玻璃注射器、带有喷涂硅酮的硼硅酸盐玻璃注射器或不带有硅酮的塑料树脂注射器。

[0195] 通常,容器可以包含制剂和在容器上或与容器关联的标签,所述标签可以说明重构和/或使用的方法。例如,标签可说明将制剂重构成上述浓度。标签可以进一步说明制剂用作或旨在用作如皮下给药。在一些实施方式中,容器可以包括含有根据式I的肽的稳定制剂的单一剂量。在各种实施方式中,稳定制剂的单一剂量的体积少于约15ml、10ml、5.0ml、4.0ml、3.5ml、3.0ml、2.5ml、2.0ml、1.5ml、1.0ml或0.5ml。或者,包含制剂的容器可以为多次使用瓶,允许进行制剂的重复给药(如2至6次给药)。试剂盒或其他生产制品还可包括含有适当稀释剂(如BWF1、盐水、缓冲盐水)的第二容器。在混合稀释剂和制剂时,在重构制剂中的最终蛋白浓度一般为至少1mg/ml(如至少5mg/ml、至少10mg/ml、至少20mg/ml、至少30mg/ml、至少40mg/ml、至少50mg/ml、至少75mg/ml、至少100mg/ml)。试剂盒或其他生产制品还可包括从商业和用户角度出发所需要的其他材料,包括其他缓冲液、稀释剂、滤器、针头、注射器和带有使用说明的说明书。在一些实施方式中,试剂盒和其他生产制品可包括进行自行给药的说明。

[0196] 通过参考下述实施例将能够更加充分地理解本发明。但是,不应将其解释为限制本发明的范围。所有文献引文均通过引用并入。

[0197] 用途

[0198] 在一些实施方式中,所提供的肽可以用于治疗一种或多种疾病、病症或状况。在一些实施方式中,本发明提供了治疗疾病、状况或病症的方法,所述方法包括:向需要其的对象施用根据式I的肽或包含一种或多种此类肽的组合物。在一些实施方式中,根据式I的一种或多种肽以有效剂量并以一定的施用间隔周期性地施用,以使得疾病、病症或状况的至

少一种症状或特征的强度、严重程度、持续时间或频率降低或发病推迟。

## 实施例

[0199] 实施例1——体外BDNF生产的刺激

[0200] 本实施例显示了施用血管紧张素(1-7)肽使得在多种细胞类型中BDNF生产增加。

[0201] 细胞培养条件

[0202] 刺激前,使用无菌PBS洗涤细胞两次,然后给予相应的无血清细胞培养基。在无血清培养基中培育细胞1小时并且随后刺激24小时。对于剂量应答测定,使用范围为 $10^{-14}$ M至 $10^{-6}$ M的肽。对于所有其他实验,使用浓度为 $10^{-7}$ M的肽,使用浓度为 $10^{-6}$ M的异丙肾上腺素和弗司扣林。为了在24小时时间段内维持物质浓度,在12小时后将其再次加入培养基。刺激后,在细胞培养基中确定BDNF的浓度。直接使用样品或者将其保存在 $-80^{\circ}\text{C}$ 。

[0203] 测定条件

[0204] 为了确定BDNF的浓度,使用来自Promega的BDNF Emax<sup>®</sup>的免疫测定系统。首先,在 $4^{\circ}\text{C}$ 下使用抗BDNF将96孔板包被过夜。次日,使用TBST洗板并使用封闭缓冲液在室温下培育1小时。随后,使用TBST再次洗板并在各孔中加入 $100\mu\text{l}$ 样品。在室温下将板在摇床( $\sim 400\text{rpm}$ )上培育2小时并且随后使用TBST洗涤5次。向各孔中加入 $100\mu\text{l}$  pAb抗人BDNF,并且在连续振荡条件下在室温下再次培育该板2小时。随后,使用TBST洗板5次,每孔加入 $100\mu\text{l}$ 抗-IgY-HRP偶联物并在室温下振荡培育1小时。然后,使用TBST洗板5次并在室温下在摇床上使用TMB One溶液培育10min。使用1M盐酸终止反应并立即在450nm处测定吸光度。从标准曲线确定BDNF的浓度。

[0205] 所检测的每个血管紧张素(1-7)肽均能够刺激BDNF的显著表达。如图1和5所示,在剂量低至 $1 \times 10^{-8}$ M时给予Ang(1-7)能够在人脐静脉内皮细胞(HUVEC)和人真皮微血管内皮细胞(HDMEC)中刺激显著的BDNF表达。

[0206] 如图2中所示,在剂量低至 $1 \times 10^{-11}$ M时Pancyte能够在HUVEC中刺激显著的BDNF表达。有趣的是,BDNF表达的最大刺激出现在Pancyte的剂量为 $1 \times 10^{-11}$ M与 $1 \times 10^{-9}$ M之间。图6显示了在剂量低至 $1 \times 10^{-11}$ M时Pancyte能够在HDMEC中刺激BDNF表达并且表达的最强刺激出现在 $1 \times 10^{-11}$ M与 $1 \times 10^{-9}$ M之间。

[0207] TXA301也能够HUVEC和HDMEC中刺激显著的BDNF表达。图3和7显示了剂量低至 $1 \times 10^{-11}$ M的TXA301能够刺激显著水平的BDNF表达,并且有趣的是,高于 $1 \times 10^{-11}$  100,000倍的剂量能够在HUVEC和HDMEC中得到统计学上相似水平的表达。

[0208] 还考察了Ang(1-7)、Pancyte和TXA301对在完全(含有血清)培养基中的HUVEC的作用。此外,使用弗司扣林和异丙肾上腺素作为阳性对照。如图4所示,即使在含血清的培养基中,Pancyte仍能够刺激BDNF到对照水平之上。

[0209] 图8显示了图1、2、3、5和6中的数据以及在HUVEC中 $\text{Ala}^1\text{-Arg}^2\text{-Val}^3\text{-Tyr}^4\text{-Ile}^5\text{-His}^6\text{-Pro}^7$ (SEQ ID NO:17)和 $\text{Ala}^1\text{-Arg}^2\text{-Val}^3\text{-Ser}^4\text{-Ile}^5\text{-His}^6\text{-Cys}^7$ (SEQ ID NO:18)的剂量响应的复合图。如图8所示,与所有其他经测试的肽相比, $1 \times 10^{-11}$ M至 $1 \times 10^{-10}$ M剂量的 $\text{Ala}^1\text{-Arg}^2\text{-Val}^3\text{-Ser}^4\text{-Ile}^5\text{-His}^6\text{-Cys}^7$ (SEQ ID NO:18)以及 $1 \times 10^{-12}$ M至 $1 \times 10^{-11}$ M剂量的 $\text{Ala}^1\text{-Arg}^2\text{-Val}^3\text{-Tyr}^4\text{-Ile}^5\text{-His}^6\text{-Pro}^7$ (SEQ ID NO:17)能够刺激非常高的BDNF表达。

[0210] 实施例2——体外cAMP生产的刺激

[0211] 在使用Ala<sup>1</sup>-Arg<sup>2</sup>-Val<sup>3</sup>-Ser<sup>4</sup>-Ile<sup>5</sup>-His<sup>6</sup>-Cys<sup>7</sup>(SEQ ID NO:18)刺激前,使用PBS洗涤HUVEC细胞两次,然后在无血清培养基中培育1小时。在这个实施例中,为了产生剂量响应曲线,所述肽的浓度范围为 $1 \times 10^{-13}$ - $1 \times 10^{-6}$ M。刺激15分钟后,除去含有肽的培养基并裂解细胞(0.1M HCl,0.1%Triton X-100)。收集澄清的裂解物,使用25 $\mu$ l确定蛋白浓度(Pierce BCA蛋白测定试剂盒,Thermo Scientific,Rockford,USA)并将剩余部分保存在-80℃用于进行随后的分析。

[0212] 使用Sigma-Aldrich(St.Louis,MO,USA)的cAMP酶免疫测定试剂盒确定细胞裂解物中的cAMP浓度。简言之,使用50 $\mu$ l中和试剂中和96孔板(山羊抗家兔IgG预包被)的孔。接下来,加入100 $\mu$ l乙酰化的环AMP标准品或细胞裂解物,随后加入50 $\mu$ l蓝色cAMP碱性磷酸酶偶联物和50 $\mu$ l黄色EIA家兔抗cAMP抗体。然后在室温下将板在摇床( $\sim 500$ rpm)上培育2小时。接下来,对孔进行抽吸并使用洗涤缓冲液(1:10,在去离子水中的含有去垢剂和叠氮钠的Tris缓冲盐)洗涤3次。最后一次洗涤后,将板在干净的纸巾上拍打以除去任何残留的洗涤缓冲液。向各孔中加入200 $\mu$ l p-硝基苯磷酸盐底物溶液,并将板在室温下培育1小时。通过加入50 $\mu$ l终止溶液终止酶促反应,并立即在405nm处测定吸光度。使用GraphPad Prism 5.0软件从非线性标准曲线确定cAMP浓度。针对总蛋白浓度对最终的cAMP浓度进行校正。

[0213] 如图9所示,施用剂量低至 $1 \times 10^{-11}$ M的根据SEQ ID NO:18的肽引起了cAMP的显著增加,在该实施例中在约 $1 \times 10^{-9}$ M观察到了最大值。

[0214] 实施例3——中风后的感觉运动功能恢复

[0215] 在这个实施例中,使用公认的暂时性脑中动脉阻塞(tMCAO)中风大鼠模型评估某些所提供的肽在体内治疗和/或改善中风的一种或多种感觉运动功能症状的能力。在这个实施例中还评估了所提供的肽对血流和血管直径的作用。如下文所述,施用所提供的肽(包括TXA302(SEQ ID NO:18))在中风后的感觉运动功能和血管结构两方面产生了令人吃惊的显著改善。

[0216] 根据美国国立卫生研究院(NIH)和实验动物饲养评估认证协会(AAALAC)的指导原则进行动物处理。将动物饲养在尺寸为35 $\times$ 30 $\times$ 15cm的聚乙烯笼(5只/笼)中,其具有便于塑料瓶中的颗粒饲料和饮用水的不锈钢上栅格;使用蒸汽灭菌的洁净稻壳(Harlan,Sani-chip cat#:2018SC+F)作为垫料并且垫料与笼一起每周至少更换两次。在这个实施例中,共使用60只大鼠并且在研究开始时每只大鼠的体重为约300克。

[0217] 动物通过自由采食喂养市售啮齿动物饲料(Teklad Certified Global 18%蛋白饲料cat#:106S8216)。动物自由饮用来自按照PharmaSeed's SOP No.214(水系统)的市政供应的酸化饮用水(pH 2.5至3.5)。动物饲养在标准实验室条件中,装有空调并有足量的经过滤(HEPA F6/6)的新鲜空气供应(最少换气15次/小时)。将动物保持在气候受控的环境中。将动物保持在温度范围约20-24℃、相对湿度范围30-70%和12小时明暗交替循环。在动物抵达后对其进行检验并且每日检查发病和死亡的任何征兆。对在濒死状态下的动物和表现出严重疼痛和持久存在极度痛苦迹象(如呼吸困难、侧卧、抽搐、瘫痪或不能够到食物或水)的动物进行人道处置。

[0218] 对于本实施例的目的而言,将暂时性脑中动脉阻塞(tMCAO)程序日定义为在这项研究中的“第1天”。在手术当天,在70%N<sub>2</sub>O和30%O<sub>2</sub>的混合物中使用4%异氟烷诱导麻醉并使用1.5-2%的异氟烷维持。

[0219] 根据R.Schmid-Elsaesser等,A critical reevaluation of the intraluminal thread model of focal cerebral ischemia:evidence of inadvertent premature reperfusion and subarachnoid hemorrhage in rats by laser-doppler flowmetry(局灶性脑缺血栓线法模型关键的重新评估:通过激光多普勒血流仪确定的在大鼠中意外过早灌注和蛛网膜下腔出血的证据),Stroke,1998,29(10):2162-2170所述的方法进行tMCAO程序。简言之,通过中线颈部切口暴露右侧CCA(颈总动脉)并且仔细地将其与周围的神经和筋膜剥离——从其分叉处至颅底。然后分离ECA(颈外动脉)的枕动脉分支,并将这些分支切去并凝固。沿着舌末端和上颌动脉分支进一步远侧切去并凝固ECA,然后将其分离。分离ICA(颈内动脉)并将其与邻近的迷走神经仔细分离,并且在靠近其源头处使用5-0尼龙缝线(SMI,Belgium)结扎翼腭动脉。接下来,将4-0丝质缝线松散地绑绕在鼓起的ECA残端,并将4cm长的4-0单丝尼龙缝线(使用火焰将缝线尖端修平,并且在插入前使用聚赖氨酸涂覆缝线)通过近端ECA插入ICA并由此进入韦利斯氏环,以有效地阻塞MCA。闭合手术伤口并将动物送回笼中使其从麻醉中恢复。阻塞一个半小时以后将大鼠再次麻醉,将单丝抽出使其再灌注,闭合手术伤口并将大鼠送回笼中。

[0220] 再灌注24小时后利用经修订的神经评定量表(mNRS)对动物进行评分。在这项研究中仅包括总分 $\geq 10$ 的动物。根据第2天时的mNRS结果,将动物分配至检测组,以使得组间具有相似的大鼠行为分布。从第2天手术后24小时开始,通过皮下(SC)施用,给予每只动物50 $\mu$ g/kg TXA301(SEQ ID NO:20)或TXA302(SEQ ID NO:18)之一或者在PBS中为25mg/ml。组别分配见表1:

[0221] 表1—组别分配

[0222]

| 分组 | 治疗     | 剂量            | 施用 | 治疗持续时间(天) | 大鼠总计 |
|----|--------|---------------|----|-----------|------|
| 1  | 载体     | 0             | SC | 28        | 15   |
| 2  | TXA301 | 50 $\mu$ g/kg | SC | 28        | 15   |
| 3  | TXA302 | 50 $\mu$ g/kg | SC | 28        | 15   |

[0223] 前肢放置测试(在手术前和在第15、22、29、36、43和50天进行)

[0224] 肢体放置测试分为前肢和后肢测试。对于前肢放置测试而言,检查者抓住大鼠接近桌面并且将大鼠前肢置于桌面上以评估大鼠对胡须、视觉、触觉或本体感受刺激响应的能力。类似地,对于后肢放置测试而言,检查者将大鼠后肢置于桌面上以评估大鼠对触觉或本体感受刺激响应的能力。每个感觉输入模式获得单独的子分数并且相加以给出总分(对于前肢放置测试:0=正常、12=最大损伤;对于后肢放置测试:0=正常、6=最大损伤)。以0.5分为增量按照如下所示给出评分:胡须放置(0-2),视觉放置-前面(0-2)、-侧面(0-2);触觉放置-背面(0-2)、-侧面(0-2);本体感觉放置(0-2);总计0-12。

[0225] 图10显示与载体对照动物相比施用TXA302第15天(最早测定的时间点)得到显著行为改善。而施用TXA301在第15天时得到改善的趋势,但是该组直到第22天才取得具有统计学意义的显著效果。值得注意的是,与载体对照动物相比第50天时TXA302组的评分改善超过7点( $\sim 78\%$ )。通过比较,在相同时间段TXA301组的评分改善4点( $\sim 44\%$ )。

[0226] 踏步测试(在手术前和在第15、22、29、36、43和50天进行)

[0227] 在踏步测试中对动物前肢的运动失能情况进行测试。使用一只手固定住动物的后肢握住动物并且另一只手不监控前肢,同时使未束缚的前爪触及桌子。在两个前肢正手和反手方向上,计数经校正的步的数量,与此同时动物沿着桌子表面侧移(在约5秒内85cm)。

[0228] 如图11所示,与载剂对照动物相比,给予TXA301或TXA302的大鼠早在第15天时就显示具有统计学意义的显著效果。该具有统计学意义的显著效果保持了整个研究期间。

[0229] 身体摆动测试(在手术前和在第15、22、29、36、43和50天进行)

[0230] 在距离其尾根部约1英寸的位置握住大鼠。然后将其提升至桌子表面上1英寸的位置。将大鼠保持在垂直轴内,所述垂直轴的定义为左侧或右侧不超过10°。当大鼠将其头部移出任意一侧的垂直轴时记录为一次摆动。在尝试进行另一次摆动之前,大鼠必须返回垂直位置以便下次摆动可计数。共计数20次摆动。正常大鼠通常在两侧具有相同数量的摆动。在局灶性缺血以后,大鼠趋向于向健侧摆动(在本实施例中为左侧)。身体摆动评分以右侧占总摆动次数的百分率表示。

[0231] 图12显示了与载剂对照动物相比施用TXA302第15天(在本研究中评估的最早时间点)得到具有统计学意义的显著行为改善。在TXA302组中大鼠的这种行为改善保持了整个研究的其余时间。直至第22天开始,施用TXA301也得到了具有统计学意义的显著行为改善。

[0232] mNRS评估(在手术前和在第2、15、22、29、36、43和50天进行)

[0233] 由不知道所给予的药物/剂量的个体进行经修订的神经评定量表评分(mNRS)(盲测)。mNRS可以使用0至18可能的点作为尺度进行神经评分。与评分较低的大鼠相比,具有较高评分的动物显示出更加严重的症状和残疾。

[0234] 如图13所示,与载剂对照动物相比,给予TXA301或TXA302的大鼠早在第15天时在行为上就显示出显著的改善。这些改善保持了整个研究期间。

[0235] 脑血流和血管直径检测(第50天)

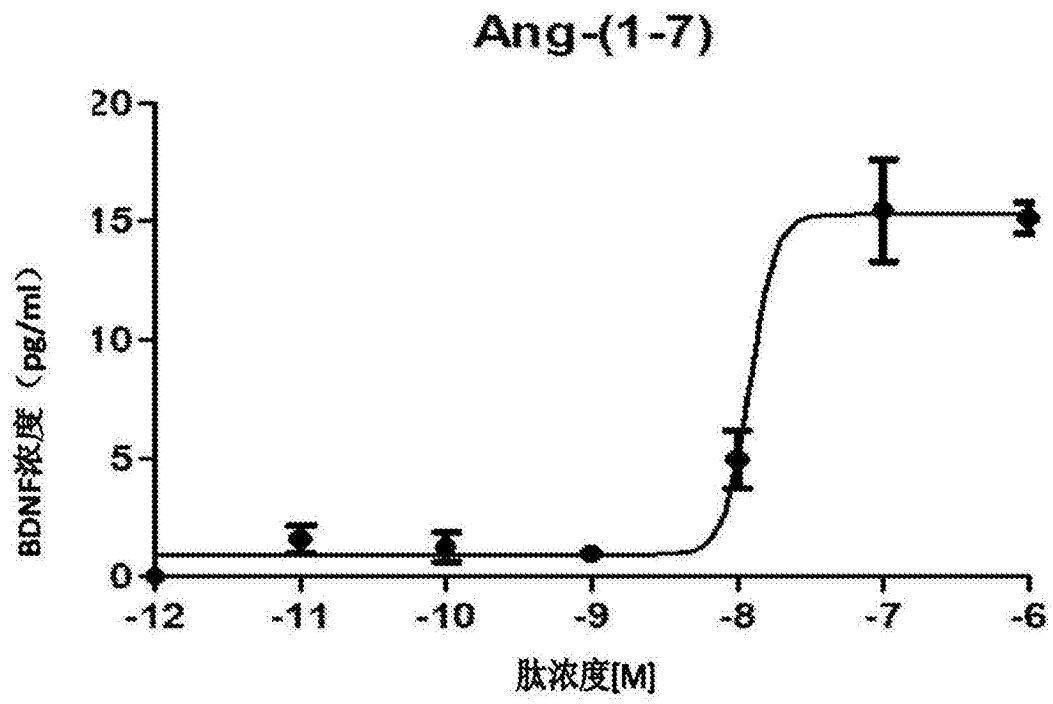
[0236] 使用Flow-R激光多普勒系统进行大脑皮层中的血流和血管收缩评估,其中对颅内血流和血管直径(收缩/舒张)进行监测。在中风后第50天进行多普勒程序并且在动物处于异氟烷麻醉下进行。

[0237] 图14显示了第50天时在给予50μg/kg TXA301或TXA302的大鼠中观察到了血流比和血管直径的具有统计学意义的显著改善。令人吃惊的是,不仅与载剂对照而且与给予TXA301的大鼠相比,给予TXA302的大鼠显示出显著改善的血流和增加的血管直径。

[0238] 除了其他以外,本实施例显示了根据若干公知的和可接受的感觉功能测试的检测以及血流和血管直径评估可知施用所提供的肽特别是TXA302(SEQ ID NO:18)使得中风的恢复改善。

[0239] 等同方式和范围

[0240] 本领域的技术人员将能够理解,或能够使用不超出常规实验的方法来确定,本申请所描述的特定实施方式的多种等同方式。本发明的范围并不旨在限于上述说明书,而是如所附的权利要求书中所示。



HUVEC细胞

图1

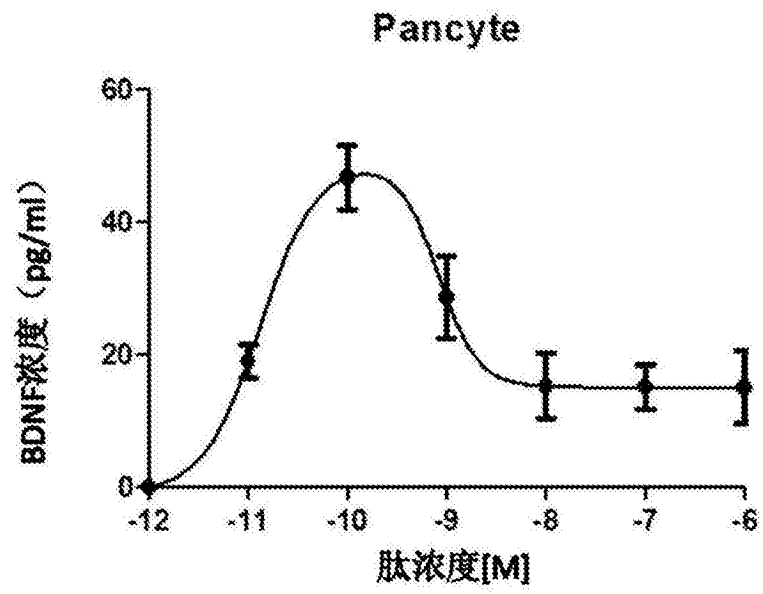
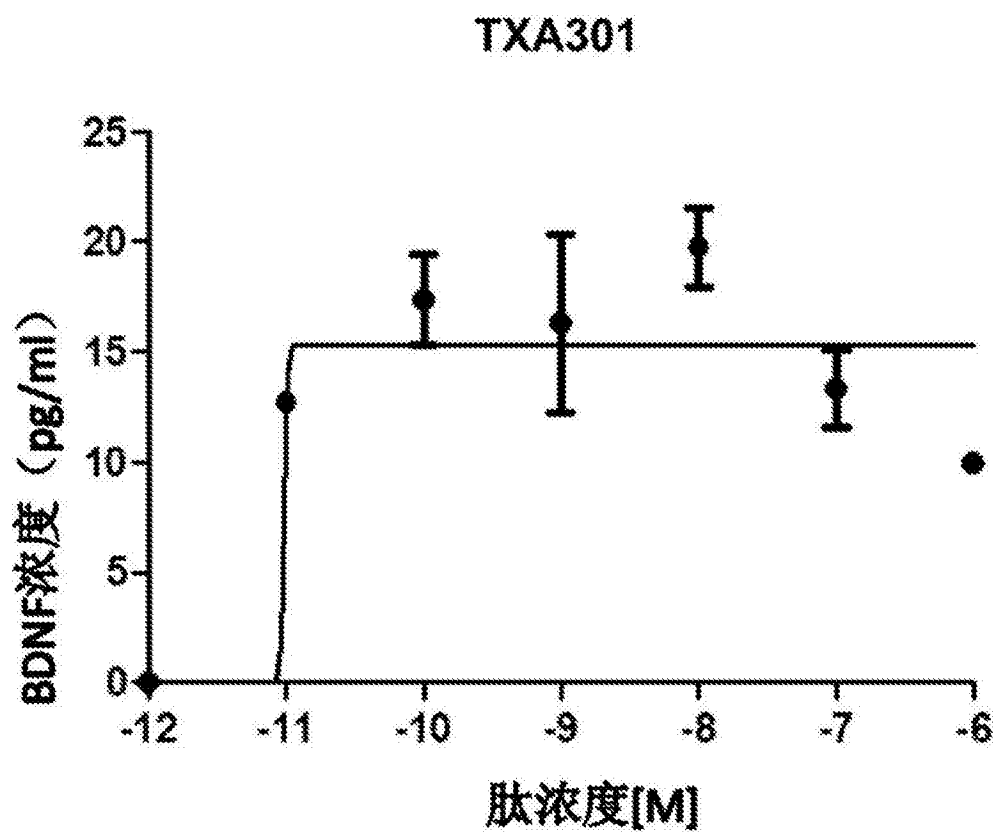


图2



**HUVEC细胞**

图3

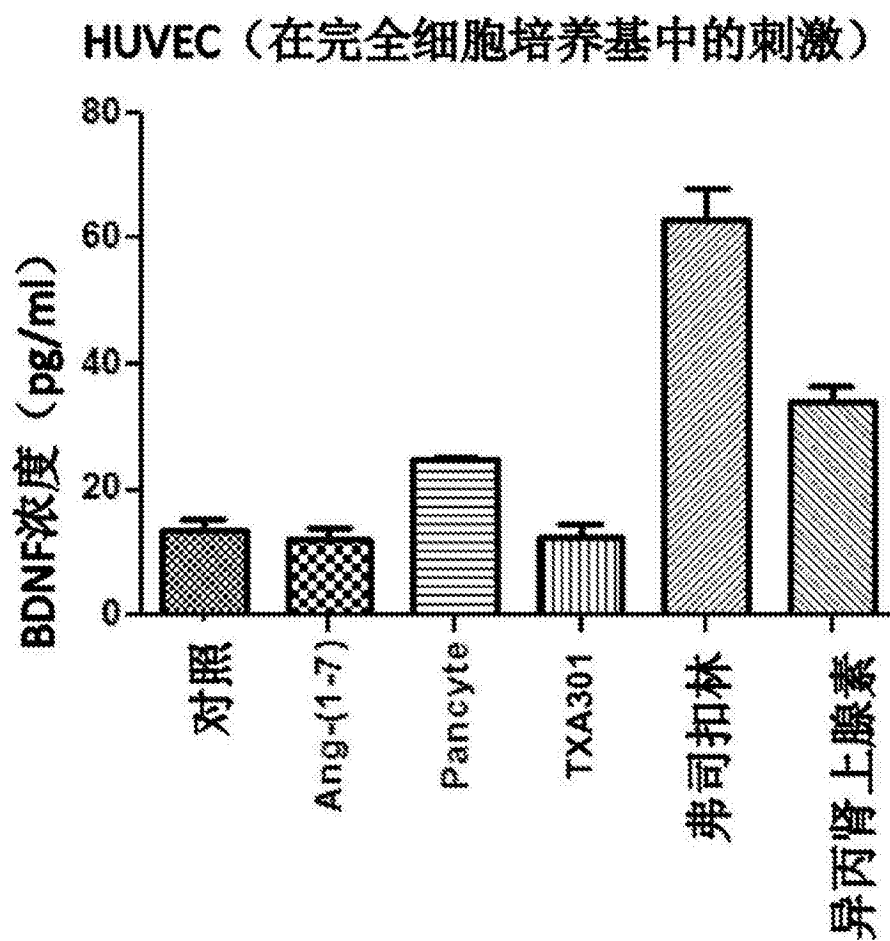


图4

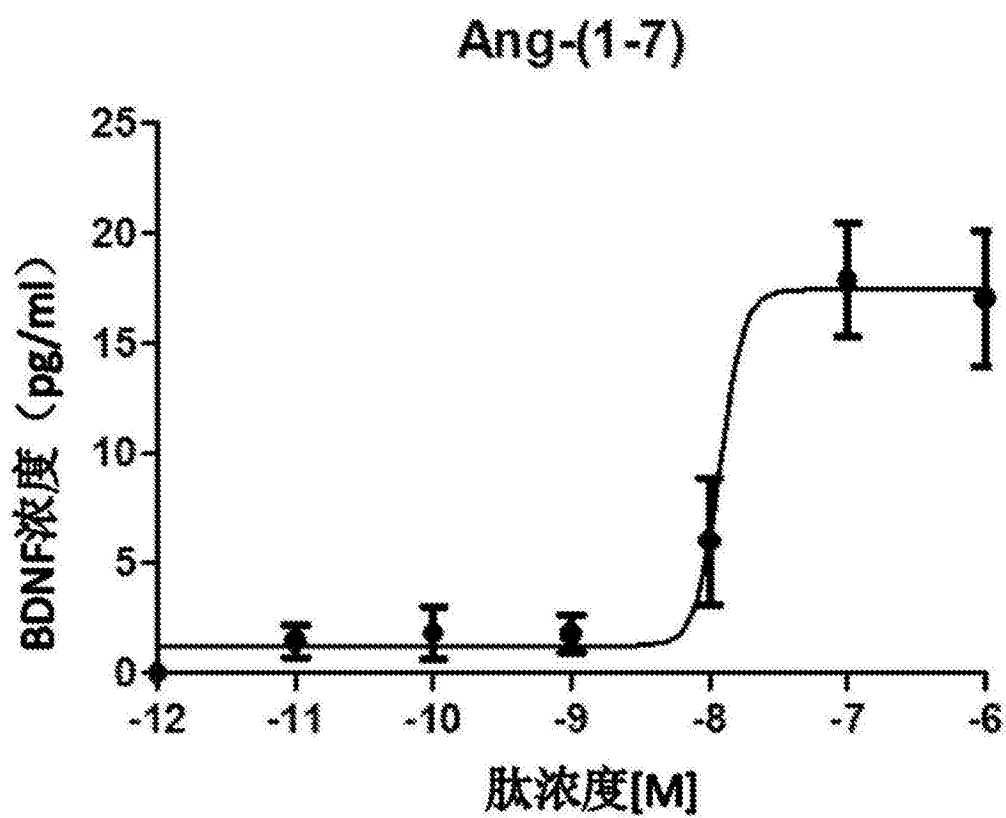
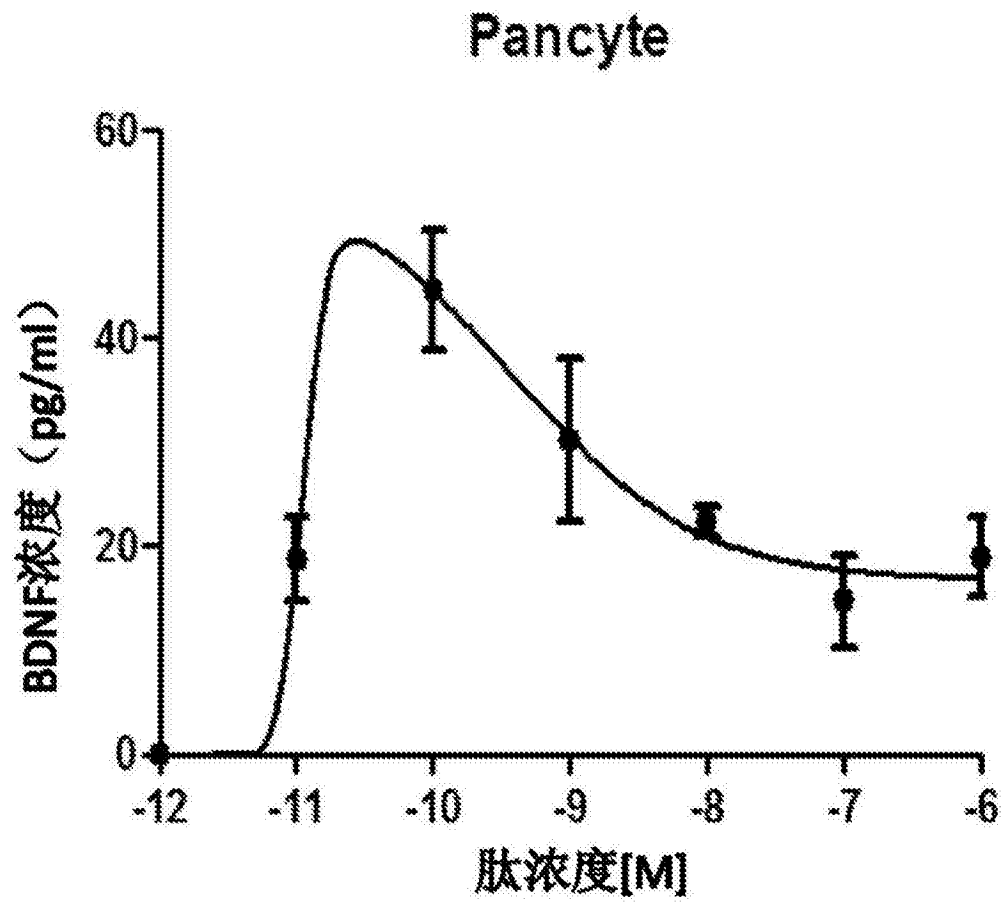
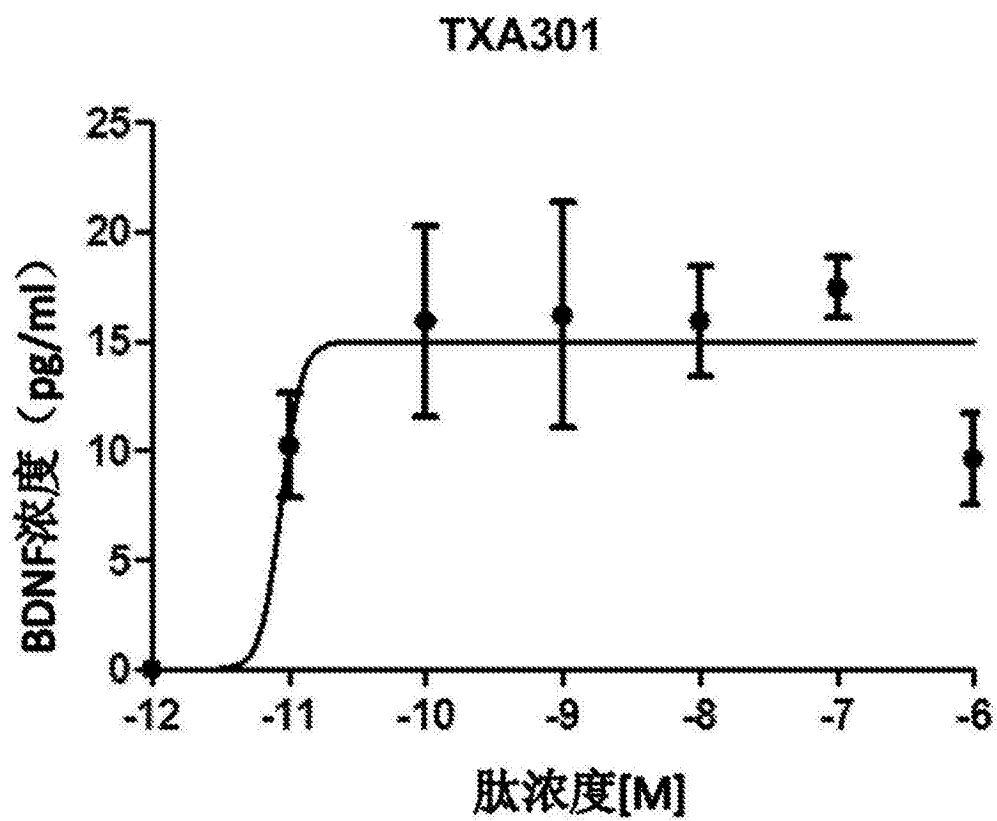


图5



**HDMEC细胞**

图6



**HDMEC细胞**

图7

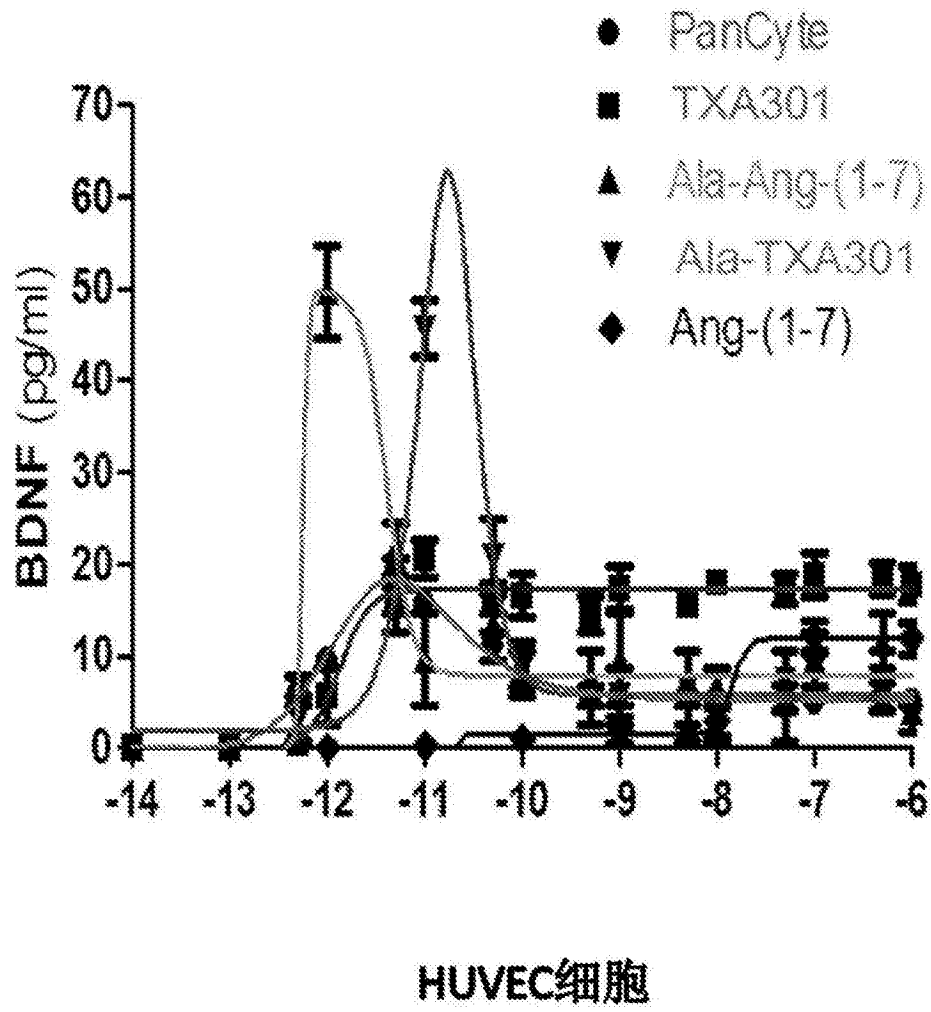


图8

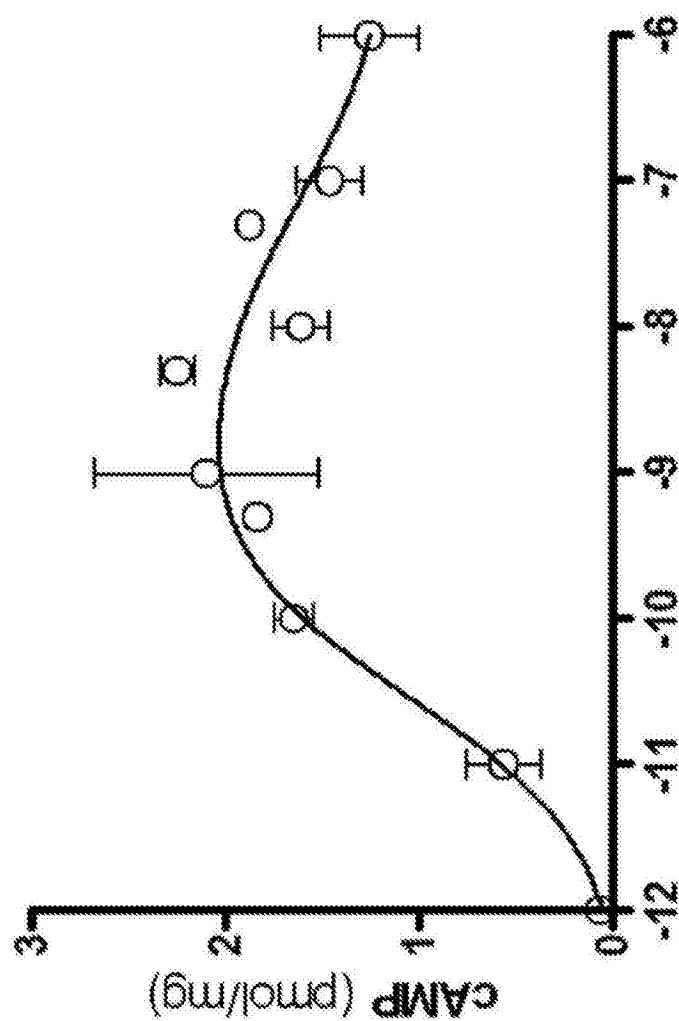


图9

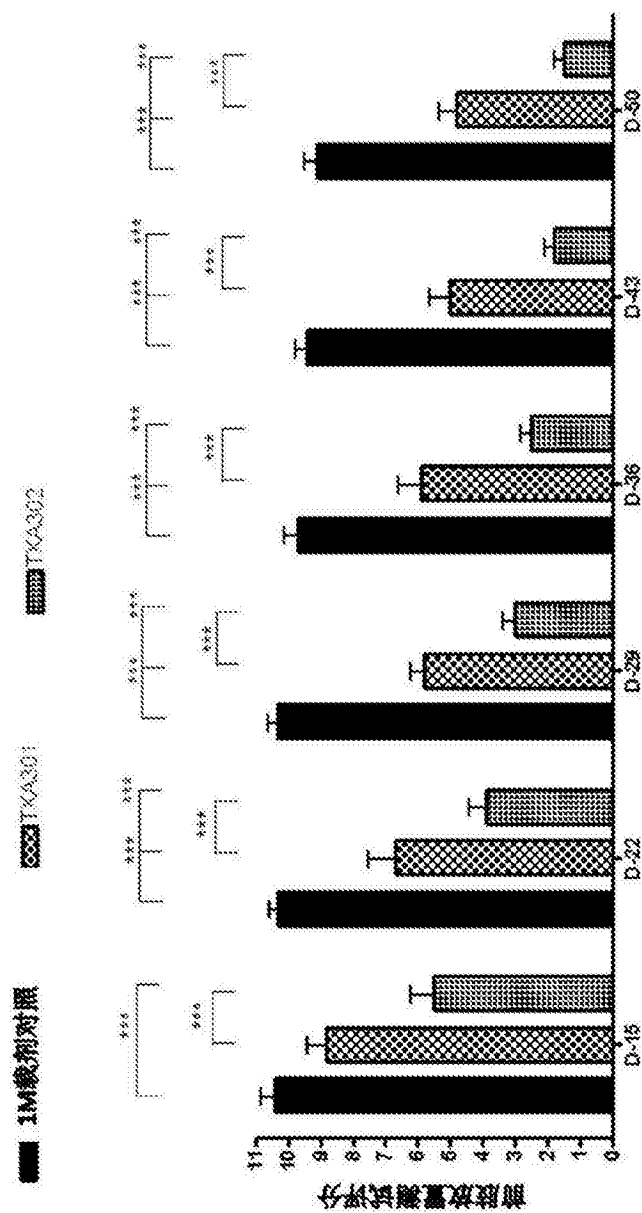


图10

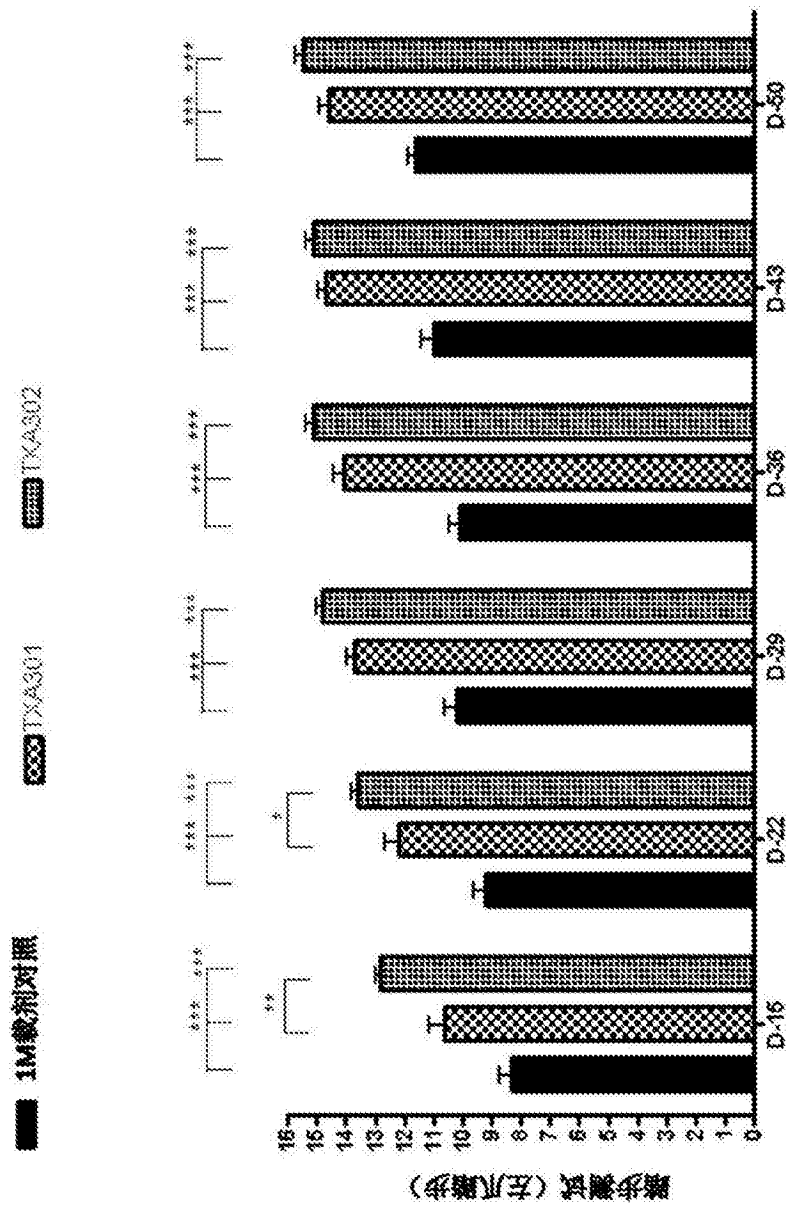


图11

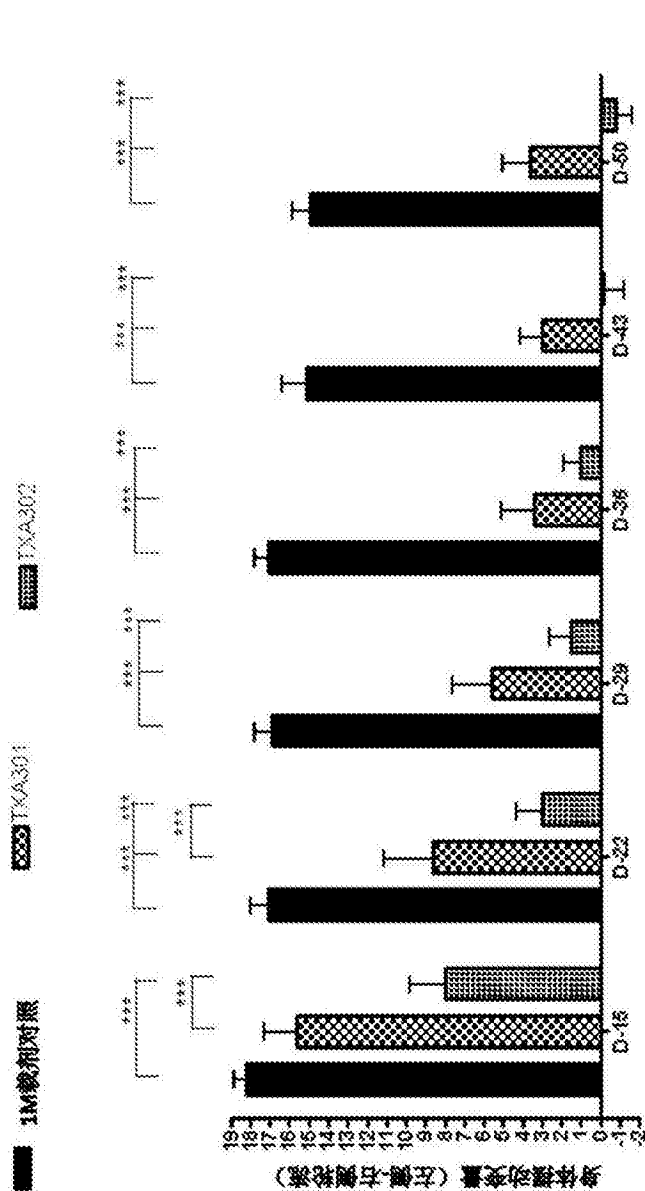


图12

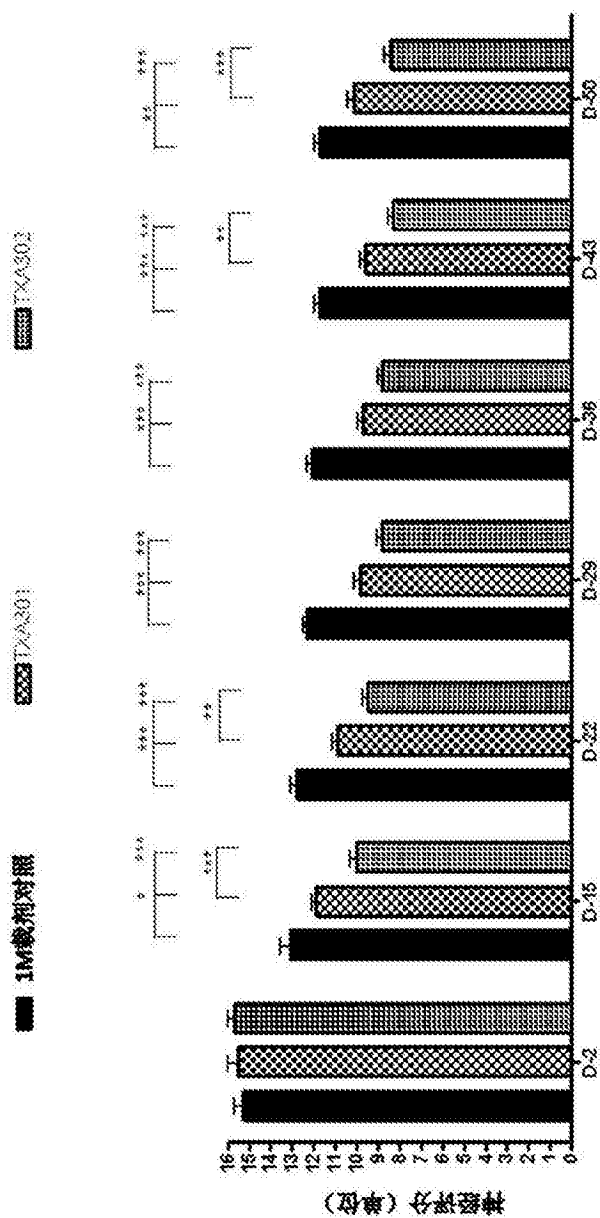


图13

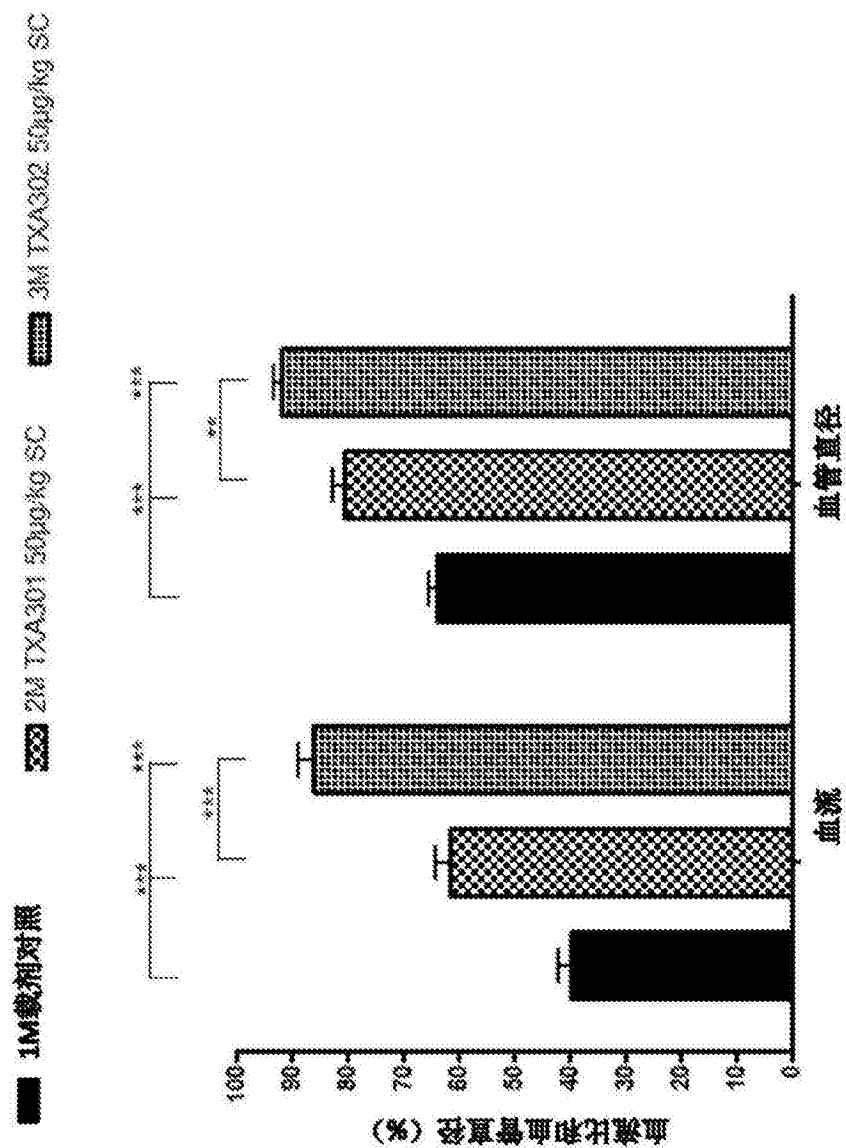


图14