



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 116964074 A

(43) 申请公布日 2023. 10. 27

(21) 申请号 202180094870.8

(22) 申请日 2021.12.29

(30) 优先权数据

20383169.8 2020.12.29 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.08.29

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2021/087804 2021.12.29

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/144401 EN 2022.07.07

(71) 申请人 IDP研发制药有限公司

地址 西班牙巴塞罗那

(72) 发明人 圣地亚哥·埃斯特班·马丁

劳拉·内沃拉

米格尔·雷蒙·莫雷诺·拉哈

玛利亚·费尔南达·蒙特纳哥·阿

尔塞

宙斯·尼普诺·罗德里格斯·洛佩

兹

(74) 专利代理机构 华进联合专利商标代理有限

公司 44224

专利代理师 郑元博

(51) Int. Cl.

C07K 7/08 (2006.01)

A61K 38/10 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 27/02 (2006.01)

A61P 27/06 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

A61P 17/06 (2006.01)

A61P 11/00 (2006.01)

权利要求书5页 说明书42页

序列表24页 附图1页

(54) 发明名称

调节VEGF的肽

(57) 摘要

本发明提供了肽或其药用盐,其长度为14至50并且包含相对于SEQ ID NO:1具有至少85%序列同一性的序列,其中“m”、“n”、“p”和“q”表示整数并且选自0和1;C末端对应于-C(O)R₄;以及N末端对应于-NHR₅;该肽任选地包含式(I)的接头双自由基“L”,该接头双自由基“L”将肽序列SEQ ID NO:1中位于位置“i”的氨基酸的α碳原子与位于位置“i+4”或“i+7”的氨基酸的α碳原子连接。本发明还提供了包含本发明的肽的融合蛋白和药物组合物以及它们的治疗用途,特别是治疗由VEGF水平增加或降低引起的疾病的用途。

1. 一种肽或其药用盐,其长度为14至50并且包含SEQ ID NO:1:

(Leu)^m-(Asp)ⁿ-Lys-Ala-Ser-Val-Met-Arg-Leu-Thr-Ile-Ser-Tyr-Leu-Arg-Val-(Arg)^p-(Lys)^q

其中

-“m”、“n”、“p”和“q”表示整数并且选自0和1;

-C末端对应于-C(O)R₄;以及

-N末端对应于-NHR₅;

所述肽包含式(I)的接头双自由基“L”

-[(R₁)_a-(R₂)_b-(R₃)_c]- (I)

所述接头双自由基“L”将肽序列SEQ ID NO:1中位于位置“i”的氨基酸的α碳原子与位于位置“i+4”或“i+7”的氨基酸的α碳原子连接,

其中

“a”和“b”相同或不同,并且为0或1;

“c”由1至10组成;

R₁和R₃是独立地选自由以下组成的组中的双自由基:(C₁-C₁₀)烷基;被一个或多个选自由卤素、(C₁-C₁₀)烷基、-OR₆、-NR₇R₈、-SR₉、-SOR₁₀、-SO₂R₁₁和-CO₂R₁₂组成的组中的基团取代的(C₁-C₁₀)烷基;(C₂-C₁₀)烯基;被一个或多个选自由卤素、(C₁-C₁₀)烷基、-OR₆、-NR₇R₈、-SR₉、-SOR₁₀、-SO₂R₁₁和-CO₂R₁₂组成的组中的基团取代的(C₂-C₁₀)烯基;(C₂-C₁₀)炔基;和被一个或多个选自由卤素、(C₁-C₁₀)烷基、-OR₆、-NR₇R₈、-SR₉、-SOR₁₀、-SO₂R₁₁和-CO₂R₁₂组成的组中的基团取代的(C₂-C₁₀)炔基;

R₂是选自由以下组成的组中的双自由基:-O-、C(=O)、C(=O)NR₁₃、C(=O)O、S(=O)、S(=O)₂、NR₁₄、(C₁-C₁₀)烷基、(C₂-C₁₀)烯基、(C₂-C₁₀)炔基、-NR₁₅-NR₁₆、-N=N-、-S-S-和已知的包含3至14个成员的系统,所述系统包含1至3个环,其中:

所述环中的每一个是饱和的、部分不饱和的或芳香族的;

所述环是孤立的、部分或完全稠合的,

形成已知的所述环系统的每个成员选自由以下组成的组:-CH-、-CH₂-、-NH-、-N-、-SH-、-S-和-O-;以及

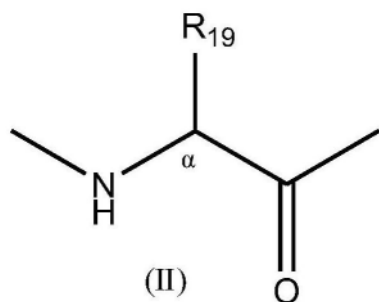
所述环系统任选地被一个或多个独立地选自由以下组成的组中的基团取代:卤素、-OH、-NO₂、(C₁-C₁₀)烷基、(C₁-C₁₀)卤代烷基和(C₁-C₁₀)烷基-O-;以及

R₄是选自由-OH和-NR₁₇R₁₈组成的组中的基团;

R₅是选自由-H和(C₁-C₂₀)烷基组成的组中的基团;

R₆、R₇、R₈、R₉、R₁₀、R₁₁、R₁₂、R₁₃、R₁₄、R₁₅、R₁₆、R₁₇和R₁₈是独立地选自由-H和(C₁-C₁₀)烷基组成的组中的基团;以及

其中SEQ ID NO:1中通过所述接头连接的氨基酸被式(II)的氨基酸取代



其中

R_{19} 是选自由以下组成的组中的单自由基： (C_1-C_{10}) 烷基，被一个或多个选自由卤素、 (C_1-C_{10}) 烷基、 $-OR_6$ 、 $-NR_7R_8$ 、 $-SR_9$ 、 $-SOR_{10}$ 、 $-SO_2R_{11}$ 和 $-CO_2R_{12}$ 组成的组中的基团取代的 (C_1-C_{10}) 烷基， (C_2-C_{10}) 烯基，被一个或多个选自由卤素、 (C_1-C_{10}) 烷基、 $-OR_6$ 、 $-NR_7R_8$ 、 $-SR_9$ 、 $-SOR_{10}$ 、 $-SO_2R_{11}$ 和 $-CO_2R_{12}$ 组成的组中的基团取代的 (C_2-C_{10}) 烯基， (C_2-C_{10}) 炔基，被一个或多个选自由卤素、 (C_1-C_{10}) 烷基、 $-OR_6$ 、 $-NR_7R_8$ 、 $-SR_9$ 、 $-SOR_{10}$ 、 $-SO_2R_{11}$ 和 $-CO_2R_{12}$ 组成的组中的基团取代的 (C_2-C_{10}) 炔基，以及已知的包含3至14个成员的环系统，所述系统包含1至3个环，其中：

所述环中的每一个是饱和的、部分不饱和的或芳香族的；

所述环是孤立的、部分或完全稠合的，

形成已知的所述环系统的每个成员选自由以下组成的组： $-CH-$ 、 $-CH_2-$ 、 $-NH-$ 、 $-N-$ 、 $-SH-$ 、 $-S-$ 和 $-O-$ 。

2. 根据权利要求1所述的肽，其中所述肽由权利要求1中定义的序列SEQ ID NO:1组成。

3. 根据前述权利要求中任一项所述的肽，其中所述肽包含的所述式(I)的接头双自由基“L”处于肽序列SEQ ID NO:1中位于位置“i”的氨基酸的 α 碳原子和位于位置“i+7”的氨基酸的 α 碳原子之间。

4. 根据前述权利要求中任一项所述的肽，其中所述肽选自由以下组成的组：

SEQ ID NO:2 (Leu)m- (Asp)n-Lys-Ala-Ser-Val-Met-Arg-Leu-Thr-Ile-Ser-Tyr-Leu-Arg-Val- (Arg)p- (Lys)q；

SEQ ID NO:3 (Leu)m- (Asp)n-Lys-Ala-Ser-Val-Met-Arg-Leu-Thr-Ile-Ser-Tyr-Leu-Arg-Val- (Arg)p- (Lys)q；

SEQ ID NO:4: (Leu)m- (Asp)n-Lys-Ala-Ser-Val-Met-Arg-Leu-Thr-Ile-Ser-Tyr-Leu-Arg-Val- (Arg)p- (Lys)q；

SEQ ID NO:5 (Leu)m- (Asp)n-Lys-Ala-Ser-Val-Met-Arg-Leu-Thr-Ile-Ser-Tyr-Leu-Arg-Val-Arg- (Lys)q；

SEQ ID NO:6: Lys-Ala-Ser-Val-Met-Arg-Leu-Thr-Ile-Ser-Tyr-Leu-Arg-Val-Arg；

SEQ ID NO:7: Lys-Ala-Ser-Val-Met-Arg-Leu-Thr-Ile-Ser-Tyr-Leu-Arg-Val-Arg；

SEQ ID NO:8: Lys-Ala-Ser-Val-Met-Arg-Leu-Thr-Ile-Ser-Tyr-Leu-Arg-Val-Arg；

SEQ ID NO:9: Lys-Ala-Ser-Val-Met-Arg-Leu-Thr-Ile-Ser-Tyr-Leu-Arg-Val-Arg；

SEQ ID NO:10: Leu-Asp-Lys-Ala-Ser-Val-Met-Arg-Leu-Thr-Ile-Ser-Tyr-Leu-Arg-Val-Arg-Lys；

SEQ ID NO:11: Leu-Asp-Lys-Ala-Ser-Val-Met-Arg-Leu-Thr-Ile-Ser-Tyr-Leu-Arg-Val-Arg-Lys；和

SEQ ID NO:12:Leu-Asp-Lys-Ala-Ser-Val-Met-Arg-Leu-Thr-Ile-Ser-Tyr-Leu-Arg-Val-Arg-Lys;

其中以粗体和下划线标出的氨基酸指出了所述接头双自由基“L”的位置,C末端对应于-C(O)R₄,且N末端对应于-NHR₅。

5.根据前述权利要求中任一项所述的肽,其中“a”、“b”和“c”为1。

6.根据前述权利要求中任一项所述的肽,其中R₁和R₃是独立地选自由以下组成的组中的双自由基:(C₁-C₁₀)烷基;(C₂-C₁₀)烯基;和(C₂-C₁₀)炔基。

7.根据前述权利要求中任一项所述的肽,其中R₂是选自由以下组成的组中的双自由基:(C₁-C₁₀)烷基、(C₂-C₁₀)烯基和(C₂-C₁₀)炔基。

8.根据前述权利要求中任一项所述的肽,其中R₁₉是选自由以下组成的组中的单自由基:(C₁-C₁₀)烷基、(C₁-C₁₀)卤代烷基、(C₂-C₁₀)烯基和(C₂-C₁₀)炔基。

9.根据前述权利要求中任一项所述的肽,其中

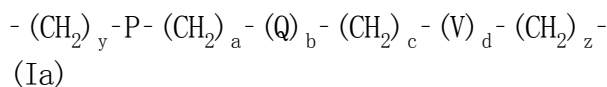
-R₁、R₃和R₁₉为(C₁-C₁₀)烷基;R₂为(C₂-C₁₀)烯基;“m”和“n”相同;并且“p”和“q”相同;或者可替换地,

-R₁、R₃和R₁₉为(C₁-C₁₀)烷基;R₂为(C₂-C₁₀)烯基;“m”和“n”相同;并且“p”和“q”不同;或者可替换地,

-R₁、R₃和R₁₉为(C₁-C₁₀)烷基;R₂为(C₂-C₁₀)烯基;“m”、“n”、“p”和“q”相同;或者可替换地,

-R₁、R₃和R₁₉为(C₁-C₁₀)烷基;R₂为(C₂-C₁₀)烯基;“m”、“n”、“q”相同并且“p”不同。

10.根据权利要求1至5中任一项所述的肽,其中L具有式(Ia):



其中

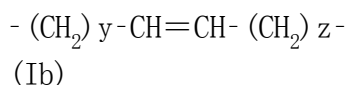
P、Q和V各自独立地选自包括以下的组:O、S、NH、CONH、C(O)O、C₁-C₆亚烷基、例如亚苯基的亚芳基、和例如三唑烯的杂亚芳基,任选地被卤素取代;

y和z是各自独立地选自1至10的整数值;

a和c是各自独立地选自0至10的整数值;以及

b和d是各自独立地选自0至3的整数值。

11.根据前述权利要求中任一项所述的肽,其中L具有式(Ib):



其中,y和z相同或不同,并且是选自1至10的整数值,优选独立地选自3至6,更优选独立地选自3和6。

12.根据前述权利要求中任一项所述的肽,其中R₁₉是甲基或卤代甲基,例如氟甲基。

13.根据前述权利要求中任一项所述的肽,其中所述C末端对应于-C(O)OH或-C(O)NH₂,且所述N末端对应于-NH₂。

14.根据前述权利要求中任一项所述的肽,其中所述肽包含选自由序列SEQ ID NO:14至21组成的组中的序列或者由选自由序列SEQ ID NO:14至21组成的组中的序列组成,优选地所述肽包含SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:17或由SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:17组成。

15.根据前述权利要求中任一项所述的肽,其中所述肽与标记物、药物、细胞穿透肽或

聚乙二醇缀合。

16. 一种融合蛋白, 包含前述权利要求中任一项所定义的肽。

17. 一种药物组合物, 包含治疗有效量的权利要求1至15中任一项所定义的肽或其药用盐或权利要求16所定义的融合蛋白, 以及可接受的药物赋形剂和/或载体。

18. 用于治疗或预防由VEGF水平增加引起的疾病的肽、其药用盐、其融合蛋白、或包含其任一种与可接受的药物赋形剂和/或载体的药物组合物,

所述肽或其药用盐的长度为14至50并且包含SEQ ID NO:1的序列:

(Leu)^m-(Asp)ⁿ-Lys-Ala-Ser-Val-Met-Arg-Leu-Thr-Ile-Ser-Tyr-Leu-Arg-Val-(Arg)^p-(Lys)^q

其中

-“m”、“n”、“p”和“q”表示整数并且选自0和1;

-C末端对应于-C(O)R₄; 以及

-N末端对应于-NHR₅;

-R₄是选自由-OH和-NR₁₇R₁₈组成的组中的基团;

-R₅是选自由-H和(C₁-C₂₀)烷基组成的组中的基团;

-R₁₇和R₁₈是独立地选自由-H和(C₁-C₁₀)烷基组成的组中的基团;

所述肽包含式(Ib)的接头双自由基“L”:

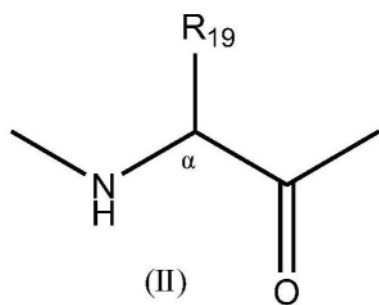
-(CH₂)_y-CH=CH-(CH₂)_z-

(Ib)

其中,y和z相同或不同, 并且是选自1至10的整数值, 优选独立地选自3至6, 更优选独立地选自3和6;

其中, 所述接头双自由基“L”将肽序列SEQ ID NO:1中位于位置“i”的氨基酸的α碳原子与位于位置“i+4”或“i+7”的氨基酸的α碳原子连接; 以及

其中, SEQ ID NO:1中通过所述接头连接的氨基酸被式(II)的氨基酸取代



其中,R₁₉是选自由以下组成的组中的单自由基:(C₁-C₁₀)烷基、(C₁-C₁₀)卤代烷基、(C₂-C₁₀)烯基和(C₂-C₁₀)炔基。

19. 用于治疗或预防由VEGF水平增加引起的疾病的肽、其药用盐、其融合蛋白、或包含其任一种的药物组合物, 所述肽是根据权利要求18定义的。

20. 根据权利要求19所定义的用途的肽、其药用盐、其融合蛋白、或包含其任一种的药物组合物, 其中所述疾病选自由以下组成的组: 失明病症, 例如糖尿病视网膜病变、年龄相关性黄斑变性(AMD)或青光眼; 银屑病; 慢性阻塞性肺病和癌症。

21. 根据权利要求18至20中任一项所定义的用途的肽、其药用盐、融合蛋白或药物组合

物,其中所述肽、其药用盐、融合蛋白或药物组合物与一种或多种其他治疗剂或与可以提高其生物利用度、减少和/或改变其代谢、抑制其排泄和/或改变其在体内的分布的药剂组合。

22. 根据权利要求18至21中任一项所定义的用途的肽、其药用盐、融合蛋白或药物组合物,其中所述肽选自自由以下组成的组:

SEQ ID NO:2 (Leu)_m- (Asp)_n-Lys-Ala-Ser-Val-Met-Arg-Leu-Thr-Ile-Ser-Tyr-Leu-Arg-Val- (Arg)_p- (Lys)_q;

SEQ ID NO:3 (Leu)_m- (Asp)_n-Lys-Ala-Ser-Val-Met-Arg-Leu-Thr-Ile-Ser-Tyr-Leu-Arg-Val- (Arg)_p- (Lys)_q;

SEQ ID NO:4: (Leu)_m- (Asp)_n-Lys-Ala-Ser-Val-Met-Arg-Leu-Thr-Ile-Ser-Tyr-Leu-Arg-Val- (Arg)_p- (Lys)_q;

SEQ ID NO:5 (Leu)_m- (Asp)_n-Lys-Ala-Ser-Val-Met-Arg-Leu-Thr-Ile-Ser-Tyr-Leu-Arg-Val-Arg- (Lys)_q;

SEQ ID NO:6: Lys-Ala-Ser-Val-Met-Arg-Leu-Thr-Ile-Ser-Tyr-Leu-Arg-Val-Arg;

SEQ ID NO:7: Lys-Ala-Ser-Val-Met-Arg-Leu-Thr-Ile-Ser-Tyr-Leu-Arg-Val-Arg;

SEQ ID NO:8: Lys-Ala-Ser-Val-Met-Arg-Leu-Thr-Ile-Ser-Tyr-Leu-Arg-Val-Arg;

SEQ ID NO:9: Lys-Ala-Ser-Val-Met-Arg-Leu-Thr-Ile-Ser-Tyr-Leu-Arg-Val-Arg;

SEQ ID NO:10: Leu-Asp-Lys-Ala-Ser-Val-Met-Arg-Leu-Thr-Ile-Ser-Tyr-Leu-Arg-Val-Arg-Lys;

SEQ ID NO:11: Leu-Asp-Lys-Ala-Ser-Val-Met-Arg-Leu-Thr-Ile-Ser-Tyr-Leu-Arg-Val-Arg-Lys; 和

SEQ ID NO:12: Leu-Asp-Lys-Ala-Ser-Val-Met-Arg-Leu-Thr-Ile-Ser-Tyr-Leu-Arg-Val-Arg-Lys;

其中以粗体和下划线标出的氨基酸指出了所述接头双自由基“L”的位置, C末端对应于-C(O)R₄, 且N末端对应于-NHR₅。

23. 根据权利要求18至22中任一项所定义的用途的肽、其药用盐、融合蛋白或药物组合物,其中所述C末端对应于-C(O)OH或-C(O)NH₂, 且所述N末端对应于-NH₂。

24. 根据权利要求18至23中任一项所定义的用途的肽、其药用盐、融合蛋白或药物组合物,其中所述肽选自包含序列SEQ ID NO:14至21或由序列SEQ ID NO:14至21组成的组, 优选地所述肽包含SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:17或由SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:17组成。

调节VEGF的肽

技术领域

[0001] 本发明涉及肽和疗法的领域。具体地,本发明提供了具有调节VEGF蛋白质的能力的肽。这使得这些肽可用于VEGF发挥重要作用的过程(例如血管生成)的调节。本发明还提供了包含本发明的肽的融合蛋白和药物组合物。

背景技术

[0002] 血管生成在正常个体的包括胚胎形成、体细胞生长和神经系统分化在内的多种基本生理过程中发挥着关键作用。在女性生殖系统中,血管生成发生在卵泡发育过程的卵泡中、排卵后的黄体中以及胎盘中以建立并维持妊娠。血管生成也是身体修复过程例如伤口和骨折的愈合中的一部分。因此,促进血管生成可以对需要建立或延伸血管形成的情况有用。然而,血管生成也是许多病理过程中的关键因素,可能最显著的是肿瘤生长和转移,因为肿瘤需要持续刺激新的毛细血管以供生长。受血管生成影响的其他病理过程包括与特别是在毛细血管中的血管增殖相关的病症,例如糖尿病视网膜病变、黄斑变性、关节病、银屑病、类风湿性关节炎、肺动脉高压、慢性阻塞性肺病、肝病、肾病等(Carmeliet P.,2003)。

[0003] 目前的研究表明,内皮细胞特异性生长因子家族(即,血管内皮生长因子,VEGF)与其同源受体一起,主要负责刺激内皮细胞生长和分化。这些因子是PDGF家族的成员并且似乎主要通过内皮受体酪氨酸激酶(RTK)发挥作用。

[0004] 萌发型血管生成是胚胎发育和成年期间血管形成的重要模式,其通过现有血管的内皮细胞的生长来形成新的血管。由于内皮细胞通常处于静止状态,因此需要刺激性细胞因子(例如VEGF)来开始血管生成。VEGF本身被认为是血管生成的主要调节因子,它导致内皮细胞从主干血管分离并迁移到邻近的间质中。缺氧是VEGF表达的主要调节因子,因为VEGF是HIF-1 α 和HIF-2 α 的直接转录靶标。Arnt突变血管缺陷伴随着VEGF表达减少,而VEGF表达减少是观察到的许多血管异常的原因,因为外源性VEGF可以挽救这些缺陷。

[0005] 闭塞性血管疾病仍然是工业化社会中死亡和发病的最主要原因。例如心肌梗死、外周动脉疾病(PAD)和中风的终末期的治疗通常仅限于姑息性干预措施,例如血管成形术以及在严重PAD病例中的截肢。以定向方式诱导和调节血管生成和血管重塑的能力将代表在缺血性血管疾病治疗方面的重大进展。

[0006] 另一方面,不受控制的血管生成对健康产生巨大影响的另一个实例是不受控制的血管生长,其已成为包括糖尿病视网膜病变、年龄相关性黄斑变性(AMD)、青光眼和早产儿视网膜病变(ROP)在内的许多人类失明疾病的核心病理组成部分。在这些疾病中观察到的神经元细胞死亡和视力丧失是由异常的渗漏性血管引起的,这通常与病理性新生血管形成有关。总的来说,这些疾病是视力丧失的最常见原因,这表明非常有效的抗血管生成疗法将在工业化世界对失明患病率产生巨大作用。事实上,新生血管性眼病是以阻断血管生成起治疗效用的最明显例子,因为VEGF抑制剂已成功应用于临床并在治疗湿性(新生血管性)AMD方面显示出疗效。

[0007] 鉴于以上,许多努力已经集中在寻找具有调节血管生成的能力的分子,无论是以

正向方式(即,刺激VEGF)或以负向方式(即,抑制VEGF)。

[0008] 缺氧诱导因子(HIF)是参与多种基因转录活化的转录因子,这些基因包括血管生成因子(例如VEGF和FLT1)、葡萄糖转运蛋白(Glut-1和Glut-3)以及参与在缺乏氧气下产生ATP的糖酵解酶(概述参见Semenza GL.2003;Nat.Rev.Cancer 3:721-732;Paul SA,Simons JW,MabjeeshNJ.2004;J.Cell Physiol.200:20-30;Wang Guang 1等人1995,PNAS,92(12):5510-5514)。HIF转录因子异二聚体由两个亚基HIF- α 和HIF- β 组成。HIF- β 是组成型表达的,而HIF- α 的表达受氧水平调节。因此,在存在正常氧张力(即常氧)的情况下,HIF-1 α 在两个关键的脯氨酸残基(GenBank登录号NP_001521的402和564)处被脯氨酸羟化酶蛋白(PHD)家族的成员(PHD-1、-2和-3)羟基化。然后,羟基化的HIF-1 α 可以结合von Hippel-Lindau (VHL)肿瘤抑制蛋白,其招募E3泛素连接酶复合物以靶向HIF- α 蛋白来进行蛋白酶体降解。然而,由于氧是PHD酶的限速辅助因子,在低氧张力(即缺氧条件)下,脯氨酸羟化酶无法使HIF- α 羟基化。因此,不会发生VHL相互作用,并且E3泛素连接酶复合物无法靶向HIF-1 α 以进行蛋白酶体降解,从而导致HIF稳定。然后,稳定的HIF-1 α 可以与HIF-1 β 形成异二聚体,该异二聚体与靶基因中缺氧反应元件(FIRE)的基本螺旋-环-螺旋结构域相互作用。此外,HIF- α C末端反式活化结构域(TAD)中的天冬酰胺残基(在位置803)被抑制HIF-1的因子(FIH-1)羟基化,这种羟基化通过阻止HIF与p300和CBP反式活化子的相互作用来负向调节HIF的转录活性。WO2006038208 (A2)公开了HIF- α 衍生的肽,包括对应于本公开的SEQ ID NO:36的15个氨基酸的线性肽,并且表明该肽将具有VEGF还原活性和抗癌特性,然而,该文件不包括任何支持这些声称特性的实验数据。另一方面,WO2010034028 (A1)和US2019225650 (A1)描述了声称调节HIF与p300和CBP反式活化因子之间相互作用的环肽。

[0009] 遗憾的是,基于VEGF的疗法在适当调节血管生成方面不够有效。因此,仍然需要高效调节血管生成的抗VEGF疗法。

发明内容

[0010] 本发明人已经发现了在缺氧条件下高效调节VEGF表达的肽。

[0011] 因此,在第一方面,本发明提供了肽或其药用盐,其长度为14至50个氨基酸并且包含相对于SEQ ID NO:1具有至少85%序列同一性的序列:

[0012] (Leu)^m-(Asp)ⁿ-Lys-Ala-Ser-Val-Met-Arg-Leu-Thr-Ile-Ser-Tyr-Leu-Arg-Val-(Arg)^p-(Lys)^q

[0013] 其中

[0014] -“m”、“n”、“p”和“q”表示整数并且选自0和1;

[0015] -C末端对应于-C(O)R₄;以及

[0016] -N末端对应于-NHR₅;

[0017] 该肽任选地包含式(I)的接头双自由基“L”

[0018] $-[(R_1)_a - (R_2) - (R_3)_b]_c - (I)$

[0019] 该接头双自由基“L”将肽序列SEQ ID NO:1中位于位置“i”的氨基酸的 α 碳原子与位于位置“i+4”或“i+7”的氨基酸的 α 碳原子连接,

[0020] 其中

[0021] “a”和“b”相同或不同,并且为0或1;

[0022] “c”由1至10组成；

[0023] R_1 和 R_3 是独立地选自由以下组成的组中的双自由基： (C_1-C_{10}) 烷基；被一个或多个选自由卤素、 (C_1-C_{10}) 烷基、 $-OR_6$ 、 $-NR_7R_8$ 、 $-SR_9$ 、 $-SOR_{10}$ 、 $-SO_2R_{11}$ 和 $-CO_2R_{12}$ 组成的组中的基团取代的 (C_1-C_{10}) 烷基； (C_2-C_{10}) 烯基；被一个或多个选自由卤素、 (C_1-C_{10}) 烷基、 $-OR_6$ 、 $-NR_7R_8$ 、 $-SR_9$ 、 $-SOR_{10}$ 、 $-SO_2R_{11}$ 和 $-CO_2R_{12}$ 组成的组中的基团取代的 (C_2-C_{10}) 烯基； (C_2-C_{10}) 炔基；和被一个或多个选自由卤素、 (C_1-C_{10}) 烷基、 $-OR_6$ 、 $-NR_7R_8$ 、 $-SR_9$ 、 $-SOR_{10}$ 、 $-SO_2R_{11}$ 和 $-CO_2R_{12}$ 组成的组中的基团取代的 (C_2-C_{10}) 炔基；

[0024] R_2 是选自由以下组成的组中的双自由基： $-O-$ 、 $C(=O)$ 、 $C(=O)NR_{13}$ 、 $C(=O)O$ 、 $S(=O)$ 、 $S(=O)_2$ 、 NR_{14} 、 (C_1-C_{10}) 烷基、 (C_2-C_{10}) 烯基、 (C_2-C_{10}) 炔基、 $-NR_{15}-NR_{16}-$ 、 $-N=N-$ 、 $-S-S-$ 和已知的包含3至14个成员的环系统，该系统包含1至3个环，其中：

[0025] 每个环是饱和的、部分不饱和的或芳香族的；

[0026] 环是孤立的、部分或完全稠合的，

[0027] 形成已知环系统的每个成员选自由以下组成的组： $-CH-$ 、 $-CH_2-$ 、 $-NH-$ 、 $-N-$ 、 $-SH-$ 、 $-S-$ 和 $-O-$ ；以及

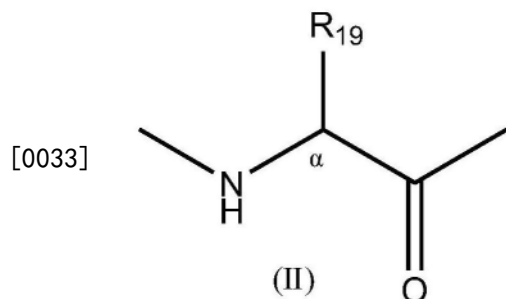
[0028] 该环系统任选地被一个或多个独立地选自由以下组成的组中的基团取代：卤素、 $-OH$ 、 $-NO_2$ 、 (C_1-C_{10}) 烷基、 (C_1-C_{10}) 卤代烷基和 (C_1-C_{10}) 烷基- $O-$ ；以及

[0029] R_4 是选自由 $-OH$ 和 $-NR_{17}R_{18}$ 组成的组中的基团；

[0030] R_5 是选自由 $-H$ 和 (C_1-C_{20}) 烷基组成的组中的基团；

[0031] R_6 、 R_7 、 R_8 、 R_9 、 R_{10} 、 R_{11} 、 R_{12} 、 R_{13} 、 R_{14} 、 R_{15} 、 R_{16} 、 R_{17} 和 R_{18} 是独立地选自由 $-H$ 和 (C_1-C_{10}) 烷基组成的组中的基团；以及

[0032] 通过接头连接的氨基酸具有式(II)



[0034] 其中

[0035] R_{19} 是选自由以下组成的组中的单自由基： (C_1-C_{10}) 烷基，被一个或多个选自由卤素、 (C_1-C_{10}) 烷基、 $-OR_6$ 、 $-NR_7R_8$ 、 $-SR_9$ 、 $-SOR_{10}$ 、 $-SO_2R_{11}$ 和 $-CO_2R_{12}$ 组成的组中的基团取代的 (C_1-C_{10}) 烷基， (C_2-C_{10}) 烯基，被一个或多个选自由卤素、 (C_1-C_{10}) 烷基、 $-OR_6$ 、 $-NR_7R_8$ 、 $-SR_9$ 、 $-SOR_{10}$ 、 $-SO_2R_{11}$ 和 $-CO_2R_{12}$ 组成的组中的基团取代的 (C_2-C_{10}) 烯基， (C_2-C_{10}) 炔基，被一个或多个选自由卤素、 (C_1-C_{10}) 烷基、 $-OR_6$ 、 $-NR_7R_8$ 、 $-SR_9$ 、 $-SOR_{10}$ 、 $-SO_2R_{11}$ 和 $-CO_2R_{12}$ 组成的组中的基团取代的 (C_2-C_{10}) 炔基，以及已知的包含3至14个成员的环系统，该系统包含1至3个环，其中：

[0036] 每个环是饱和的、部分不饱和的或芳香族的；

[0037] 环是孤立的、部分或完全稠合的，

[0038] 形成已知环系统的每个成员选自由以下组成的组： $-CH-$ 、 $-CH_2-$ 、 $-NH-$ 、 $-N-$ 、 $-SH-$ 、 $-S-$ 和 $-O-$ 。

[0039] 如下所示,与常氧条件相比,本发明的第一方面的肽在缺氧条件下高效调节VEGF的表达。特别地,显示的是当本发明的第一方面的肽是线性的(即,不包含接头双自由基“L”)时,获得增加的VEGF值。更具体地,如实施例1所示,SEQ ID NO:13(18个氨基酸)显示在缺氧条件下增加VEGF表达(表2)。发明人进一步研究了其较短版本的特性,例如SEQ ID NO:36(15个氨基酸)和SEQ ID NO:37(14个氨基酸),发现减小大小可以使线性肽失活或保持VEGF表达上调(表3)。因此,与W02006038208(A2)中的建议相反,发明人显示SEQ ID NO:36对VEGF表达的调节不起作用。

[0040] 令人惊讶的是,本发明人发现,当包含接头双自由基时,本发明的第一方面的肽的表现显著改变,导致VEGF表达显著降低,在一些情况下降低约50%。具体地,如实施例1所示,本发明的第一方面的交联肽,例如SEQ ID NO:14至SEQ ID NO:21,在缺氧诱导条件下在体外人视网膜色素上皮细胞(即ARPE-19)中诱导VEGF表达相对于未处理细胞的降低,参见表2。此外,进一步显示SEQ ID NO:16在另外两种细胞系(即乳腺癌细胞系和永生化角质形成细胞系)中也获得了这样的效果,参见表4。

[0041] 此外,发明人进一步证明,VEGF降低的效果导致体内血管生成减少,如实施例2的乳腺癌异种移植小鼠模型中所示。事实上,如通过免疫组织化学(ICH)测定,与对照相比,SEQ ID NO:17的肽导致处理后的肿瘤中CD31(血管中内皮细胞的标志物)表达在统计学上显著减少。

[0042] 因此,本发明人已经发现,通过在序列SEQ ID NO:1中包含或不包含接头双自由基“L”,包含序列SEQ ID NO:1的肽可以调节VEGF表达,进而调节血管生成。缺少接头提供了可以增强VEGF表达的肽,从而“增强”血管生成,而存在接头则提供了降低VEGF表达的肽,从而“减少”血管生成。

[0043] 这是首次报道了通过肽中接头双自由基的存在来调整该肽对VEGF表达的调节作用的可能性。

[0044] 在第二方面,本发明提供了肽或其药用盐,其长度为15至50个氨基酸并且包含相对于SEQ ID NO:22具有至少85%序列同一性的序列。

[0045] (Arg)_r-(Ser)_s-Arg-Arg-Ser-Lys-Glu-Ser-Glu-Val-Phe-Tyr-Glu-Leu-Ala-His-Gln-(Leu)_t-(Pro)_v

[0046] 其中

[0047] -“r”、“s”、“t”和“v”表示整数并且选自0和1;

[0048] -C末端对应于-C(O)R₄;以及

[0049] -N末端对应于-NHR₅;

[0050] 该肽包含式(I)的接头双自由基“L”

[0051] $-(R_1)_a-(R_2)-(R_3)_b]_c-(I)$

[0052] 该接头双自由基“L”将肽序列SEQ ID NO:22中式(I)的肽序列中位于位置“i”的氨基酸的α碳原子与位于位置“i+4”或“i+7”的氨基酸的α碳原子连接,

[0053] 其中

[0054] “a”和“b”相同或不同,并且为0或1;

[0055] “c”由1至10组成;

[0056] R₁和R₃是独立地选自以下组成的组中的双自由基:(C₁-C₁₀)烷基;被一个或多个

选自自由卤素、 (C_1-C_{10}) 烷基、 $-OR_6$ 、 $-NR_7R_8$ 、 $-SR_9$ 、 $-SOR_{10}$ 、 $-SO_2R_{11}$ 和 $-CO_2R_{12}$ 组成的组中的基团取代的 (C_1-C_{10}) 烷基； (C_2-C_{10}) 烯基；被一个或多个选自自由卤素、 (C_1-C_{10}) 烷基、 $-OR_6$ 、 $-NR_7R_8$ 、 $-SR_9$ 、 $-SOR_{10}$ 、 $-SO_2R_{11}$ 和 $-CO_2R_{12}$ 组成的组中的基团取代的 (C_2-C_{10}) 烯基； (C_2-C_{10}) 炔基；和被一个或多个选自自由卤素、 (C_1-C_{10}) 烷基、 $-OR_6$ 、 $-NR_7R_8$ 、 $-SR_9$ 、 $-SOR_{10}$ 、 $-SO_2R_{11}$ 和 $-CO_2R_{12}$ 组成的组中的基团取代的 (C_2-C_{10}) 炔基；

[0057] R_2 是选自自由以下组成的组中的双自由基： $-O-$ 、 $C(=O)$ 、 $C(=O)NR_{13}$ 、 $C(=O)O$ 、 $S(=O)$ 、 $S(=O)_2$ 、 NR_{14} 、 (C_1-C_{10}) 烷基、 (C_2-C_{10}) 烯基、 (C_2-C_{10}) 炔基、 $-NR_{15}$ 、 $-NR_{16}$ 、 $-N=N-$ 、 $-S-S-$ 和已知的包含3至14个成员的环系统，该系统包含1至3个环，其中：

[0058] 每个环是饱和的、部分不饱和的或芳香族的；

[0059] 环是孤立的、部分或完全稠合的，

[0060] 形成已知环系统的每个成员选自自由以下组成的组： $-CH-$ 、 $-CH_2-$ 、 $-NH-$ 、 $-N-$ 、 $-SH-$ 、 $-S-$ 和 $-O-$ ；以及

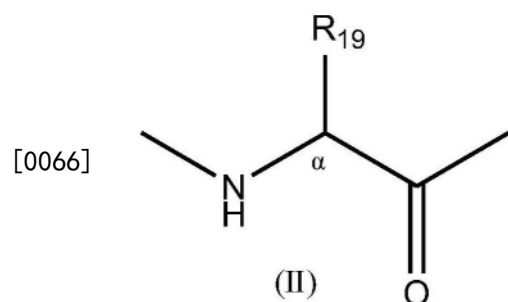
[0061] 该环系统任选地被一个或多个独立地选自自由以下组成的组中的基团取代：卤素、 $-OH$ 、 $-NO_2$ 、 (C_1-C_{10}) 烷基、 (C_1-C_{10}) 卤代烷基和 (C_1-C_{10}) 烷基- $O-$ ；以及

[0062] R_4 是选自自由 $-OH$ 和 $-NR_{17}R_{18}$ 组成的组中的基团；

[0063] R_5 是选自自由 $-H$ 和 (C_1-C_{20}) 烷基组成的组中的基团；

[0064] R_6 、 R_7 、 R_8 、 R_9 、 R_{10} 、 R_{11} 、 R_{12} 、 R_{13} 、 R_{14} 、 R_{15} 、 R_{16} 、 R_{17} 和 R_{18} 是独立地选自自由 $-H$ 和 (C_1-C_{10}) 烷基组成的组中的基团；以及

[0065] 通过接头连接的氨基酸具有式 (II)



[0067] 其中

[0068] R_{19} 是选自自由以下组成的组中的单自由基： (C_1-C_{10}) 烷基，被一个或多个选自自由卤素、 (C_1-C_{10}) 烷基、 $-OR_6$ 、 $-NR_7R_8$ 、 $-SR_9$ 、 $-SOR_{10}$ 、 $-SO_2R_{11}$ 和 $-CO_2R_{12}$ 组成的组中的基团取代的 (C_1-C_{10}) 烷基， (C_2-C_{10}) 烯基，被一个或多个选自自由卤素、 (C_1-C_{10}) 烷基、 $-OR_6$ 、 $-NR_7R_8$ 、 $-SR_9$ 、 $-SOR_{10}$ 、 $-SO_2R_{11}$ 和 $-CO_2R_{12}$ 组成的组中的基团取代的 (C_2-C_{10}) 烯基， (C_2-C_{10}) 炔基，被一个或多个选自自由卤素、 (C_1-C_{10}) 烷基、 $-OR_6$ 、 $-NR_7R_8$ 、 $-SR_9$ 、 $-SOR_{10}$ 、 $-SO_2R_{11}$ 和 $-CO_2R_{12}$ 组成的组中的基团取代的 (C_2-C_{10}) 炔基，以及已知的包含3至14个成员的环系统，该系统包含1至3个环，其中：

[0069] 每个环是饱和的、部分不饱和的或芳香族的；

[0070] 环是孤立的、部分或完全稠合的，

[0071] 形成已知环系统的每个成员选自自由以下组成的组： $-CH-$ 、 $-CH_2-$ 、 $-NH-$ 、 $-N-$ 、 $-SH-$ 、 $-S-$ 和 $-O-$ 。

[0072] 如下所示，本发明的第二方面的肽掺入了接头双自由基，也能够调节血管生成。具体地，已发现相对于常氧条件下获得的水平，本发明的第二方面的肽能够在缺氧条件下增

加VEGF的表达。

[0073] 因此,本发明的第二方面的肽可用于在生长因子已发生减少的情况下恢复VEGF水平。因此,本发明的第二方面的这些肽可以应用于预防或治疗由VEGF水平的降低导致的血管生成失调引起的疾病。

[0074] 在第三方面,本发明提供了融合蛋白,该融合蛋白包含如本发明的第一或第二方面中定义的肽和任选的细胞穿透肽。

[0075] 在第四方面,本发明提供了药物组合物,该药物组合物包含治疗有效量的如本发明的第一或第二方面定义的肽或其药用盐、或如本发明的第三方面定义的融合蛋白,以及可接受的药物赋形剂和/或载体。

[0076] 如上已经说明,本发明的肽能够调节VEGF的表达。这表明本发明的肽在治疗与VEGF失调相关的疾病中的可用性。VEGF已被广泛报道为在血管生成过程中发挥核心作用。因此,本发明的肽作为VEGF表达的调节剂,也能够调节血管生成过程:增加VEGF表达则刺激血管生成,而如果减少VEGF表达,则下调血管生成过程。

[0077] 因此,在第五方面,本发明提供了用于治疗用途的本发明第一或第二方面定义的肽或其药用盐、或本发明第三方面定义的融合蛋白或本发明第四方面定义的药物组合物。

[0078] 在第六方面,本发明提供了用于治疗或预防由VEGF表达水平失调引起的疾病的用途的本发明第一或第二方面定义的肽或其药用盐、或本发明第三方面定义的融合蛋白、或本发明第四方面定义的药物组合物。该方面可以可替换地被制定为用于预防或治疗由VEGF表达水平失调引起的疾病的方法,该方法包括向有此需要的对象施用治疗有效量的本发明第一或第二方面定义的肽或其药用盐、或本发明第三方面定义的融合蛋白或本发明第四方面定义的药物组合物的步骤。该方面可以可替换地被制定为本发明第一或第二方面定义的肽或其药用盐、或本发明第三方面定义的融合蛋白或本发明第四方面定义的药物组合物在制备用于治疗或预防由VEGF表达水平失调引起的疾病的药物中的用途。

[0079] 在第七方面,本发明提供了用于治疗或预防由血管生成失调引起的疾病(特别是通过调节VEGF表达水平进行)的用途的本发明第一或第二方面定义的肽或其药用盐、或本发明第三方面定义的融合蛋白或本发明第四方面定义的药物组合物。该方面可以可替换地被改写为用于治疗或预防由血管生成失调引起的疾病(特别是通过调节VEGF表达水平进行)的方法,该方法包括向有此需要的对象施用治疗有效量的本发明第一或第二方面定义的肽或其药用盐、或本发明第三方面定义的融合蛋白或本发明第四方面定义的药物组合物的步骤。该方面可以可替换地被制定为本发明第一或第二方面定义的肽或其药用盐、或本发明第三方面定义的融合蛋白或本发明第四方面定义的药物组合物在制备用于治疗或预防由血管生成失调引起的疾病(特别是通过调节VEGF表达水平进行)的药物中的用途。

附图说明

[0080] 图1:未经处理小鼠(溶媒)和通过皮下(SC)施用SEQ:17处理后小鼠的乳腺肿瘤组织用抗CD31抗体进行的免疫组织化学(IHC)染色。

[0081] 图2:未经处理小鼠(溶媒)和通过皮下(SC)施用SEQ:17处理后小鼠的乳腺肿瘤组织的经计算的相对CD31染色强度。

具体实施方式

[0082] 除非另有说明,本申请中使用的所有术语应该以其在本领域已知的普通含义来理解。本申请中使用的某些术语的其他更具体的定义如下所述,并且旨在统一地适用于整个说明书和权利要求书,除非另外明确阐述的定义提供了更广泛的定义。

[0083] 为了本发明的目的,给出的任何范围包括该范围的下端点和上端点。

[0084] 如以上已经说明,本发明提供了包含与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:22具有至少85%同一性的序列的肽。

[0085] 在本发明中,术语“同一性”是指当序列进行最佳对齐时,两个序列中相同残基的百分比。如果在最佳对齐中,第一个序列中的位置被与第二个序列中相应位置的相同氨基酸残基占据,则序列表现出关于该位置的同一性。将两个序列之间的同一性水平(或“序列同一性百分比”)测量为这两个序列共有的相同位置的数量相对于序列大小的比率(即,序列同一性百分比=(相同位置的数量)/位置总数)×100)。

[0086] 许多用于快速获得最佳对齐并计算两个或更多个序列之间的同一性的数学算法是已知的并且被合并至许多可获得的软件程序中。此类程序的实例包括用于氨基酸序列分析的MATCH-BOX、MULTAIN、GCG、FASTA和ROBUST程序等。优选的软件分析程序包括ALIGN、CLUSTAL W和BLAST程序(例如BLAST 2.1、BL2SEQ及其更高版本)。

[0087] 对于氨基酸序列分析,将权重矩阵,例如BLOSUM矩阵(例如BLOSUM45、BLOSUM50、BLOSUM62和BLOSUM80矩阵)、Gonnet矩阵或PAM矩阵(例如PAM30、PAM70、PAM120、PAM160、PAM250、和PAM350矩阵)用于确定同一性。

[0088] BLAST程序提供至少两个氨基酸序列的分析,其通过将选定的序列与数据库(例如GenSeq)中的多个序列比对或者使用BL2SEQ在两个选定的序列之间比对来进行。BLAST程序优选地由例如DUST或SEG程序的低复杂度过滤程序(优选地集成到BLAST程序操作中)加以修改。如果使用空位存在罚分(gap existence costs)(或空位评分),则将空位存在罚分优选地设置在约-5至-15之间。类似的空位参数可以在适当时用在其他程序中。BLAST程序及其背后的原理在例如Altschul等人,“基本局部比对搜索工具”,1990,J.Mol.Biol,第215卷,第403-410页中进一步描述。

[0089] 对于多序列分析,可以使用CLUSTAL W程序。理想地使用“动态”(相对于“快速”)设置来运行CLUSTAL W程序。根据序列之间的同一性水平,使用一组可变的BLOSUM矩阵来评估氨基酸序列。CLUSTAL W程序和背后的操作原理在例如Higgins等人,“CLUSTAL V:用于多序列比对的改进软件”,1992,CABIOS,8(2),第189-191页中进一步描述。

[0090] 在本发明的第一方面的另一个实施方式中,任选地与上文或下文提供的任何实施方式组合,肽或其盐是相对于SEQ ID NO:1具有85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的肽。在本发明的第一方面的另一个实施方式中,任选地与上文或下文提供的任何实施方式组合,肽或其盐是与任何序列SEQ ID NO:1具有100%同一性的肽。在一个实施方式中,任选地与上文或下文提供的任何实施方式组合,在进行比对以确定相同位置以确认同一性程度时,不将通过接头连接的两个氨基酸残基考虑在内。在本发明的第一方面的一个实施方式中,肽或其盐是由如上定义的序列SEQ ID NO:1组成的肽或其盐,任选地包含式(I)的“L”双自由基。

[0091] 在本发明的第一方面的另一个实施方式中,任选地与上文或下文提供的任何实施

方式组合,肽或其盐是相对于SEQ ID NO:22具有85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的肽。在本发明的第一方面的另一个实施方式中,任选地与上文或下文提供的任何实施方式组合,肽或其盐是与任何序列SEQ ID NO:22具有100%同一性的肽。在一个实施方式中,任选地与上文或下文提供的任何实施方式组合,在进行比对以确定相同位置以确认同一性程度时,不将通过接头连接的两个氨基酸残基考虑在内。

[0092] 如本文所用的,术语“药学上可接受的盐”是指在合理的医学判断范围内适合用于与人类和更低等的动物的组织接触而没有过度毒性、刺激、过敏反应等,并与合理的收益/风险比相称的那些盐。药学上可接受的盐是本领域熟知的。药学上可接受的无毒的酸加成盐的实例是氨基与无机酸(如盐酸、氢溴酸、磷酸、硫酸和高氯酸)或与有机酸(如乙酸、三氟乙酸、草酸、马来酸、酒石酸、柠檬酸、琥珀酸或丙二酸)形成的盐,或通过使用本领域使用的其他方法(例如离子交换)形成的盐。其他药学上可接受的盐包括己二酸盐、海藻酸盐、抗坏血酸盐、天冬氨酸盐、苯磺酸盐、苯甲酸盐、硫酸氢盐、硼酸盐、丁酸盐、樟脑酸盐、樟脑磺酸盐、柠檬酸盐、环戊烷丙酸盐、二葡萄糖酸盐、十二烷基硫酸盐、乙磺酸盐、甲酸盐、富马酸盐、葡庚糖酸盐、甘油磷酸盐、葡萄糖酸盐、半硫酸盐、庚酸盐、己酸盐、氢碘酸盐、2-羟基乙磺酸盐、乳糖醛酸盐、乳酸盐、月桂酸盐、十二烷基硫酸盐、苹果酸盐、马来酸盐、丙二酸盐、甲磺酸盐、2-萘磺酸盐、烟酸盐、硝酸盐、油酸盐、草酸盐、棕榈酸盐、双羟萘酸盐、果胶酸盐、过硫酸盐、3-苯基丙酸盐、磷酸盐、苦味酸盐、新戊酸盐、丙酸盐、硬脂酸盐、琥珀酸盐、硫酸盐、酒石酸盐、硫氰酸盐、对甲苯磺酸盐、十一烷酸盐、戊酸盐等。衍生自适当的碱的盐包括碱金属、碱土金属和铵。代表性的碱金属盐或碱土金属盐包括钠、锂、钾、钙、镁等。当合适时,其他药学上可接受的盐包括无毒铵、季铵和使用抗衡离子形成的胺阳离子,抗衡离子是例如卤化物、氢氧根、羧酸根、硫酸根、磷酸根、硝酸根、低级烷基磺酸根和芳基磺酸根。

[0093] 术语(C_1 - C_{10})烷基是指具有1至10个碳原子的饱和的直链或支链烷基链。说明性的非限制性实例是:甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基、正戊基、新戊基和正己基。

[0094] 术语(C_1 - C_{20})烷基是指具有1至20个碳原子的饱和的直链或支链烷基链。

[0095] 术语(C_2 - C_{10})烯基是指含有2至10个碳原子并且还含有一个或多个双键的饱和的直链或支链烷基链。说明性的非限制性实例是乙烯基、丙烯基、丁烯基、1-甲基-2-丁烯-1-基等。

[0096] 术语(C_2 - C_{10})炔基是指含有2至20个碳原子并且还含有一个或多个三键的饱和的直链或支链烷基链。实例尤其包括乙炔基、1-丙炔基、2-丁炔基、1,3-丁二炔基、4-戊炔基和1-己炔基。

[0097] 术语“卤素”是指元素周期表中由五种化学相关元素组成的族:氟(F)、氯(Cl)、溴(Br)、碘(I)和砹(At)。

[0098] 术语(C_1 - C_{10})卤代烷基是指(C_1 - C_{10})烷基中的一个或多个氢原子被一个或多个、优选1至6个可以相同或不同的卤素原子取代而产生的基团。实例尤其包括三氟甲基、氟甲基、1-氯乙基、2-氯乙基、1-氟乙基、2-氟乙基、2-溴乙基、2-碘乙基、2,2,2-三氟乙基、五氟乙基、3-氟丙基、3-氯丙基、2,2,3,3-四氟丙基、2,2,3,3,3-五氟丙基、七氟丙基、4-氟丁基和九氟丁基。

[0099] 如本文所用的,术语“已知的”环系统是指化学上可行且本领域已知的环系统,因此旨在排除那些化学上不可能的环系统。

[0100] 根据本发明,当环系统由“孤立的”环形成时,其是指环系统由两个、三个或四个环形成并且所述环经由键从一个环的原子与另一个环的原子键合。术语“分离的”还包括其中环系统仅具有一个环的实施方式。由一个环组成的已知环系统的说明性非限制性实例是衍生自以下的环系统:环丙基、环丁基、环戊基、环己基、环庚基、环丙烯基、环丁烯基、环戊烯基、苯基和环庚烯基。

[0101] 根据本发明,当环系统具有“完全稠合”的环时,其是指环系统由两个、三个或四个环形成,其中两个或更多个原子为两个相邻环所共有。说明性的非限制性实例是1,2,3,4-四氢萘基、1-萘基、2-萘基、蒽基或菲基。

[0102] 根据本发明,当环系统是“部分稠合”时,其是指环系统由三个或四个环形成,所述环中的至少两个环完全稠合(即,两个或更多个原子为两个相邻环所共有)且其余环经由键从一个环的原子与稠合环之一的原子键合。

[0103] 除非另有说明,形成本发明的肽的一种或多种氨基酸可以具有L-或D-构型。在本发明的第一或第二方面的一个实施方式中,任选地与上文或下文提供的任何实施方式组合,形成肽的至少一个氨基酸是D-氨基酸。在本发明的第一或第二方面的另一个实施方式中,任选地与上文或下文提供的任何实施方式组合,形成肽的一个氨基酸是D-氨基酸。在本发明的第一或第二方面的另一个实施方式中,任选地与上文或下文提供的任何实施方式组合,由接头连接的至少一个氨基酸是D-氨基酸。在本发明的第一或第二方面的另一个实施方式中,任选地与上文或下文提供的任何实施方式组合,通过接头连接的一个氨基酸是D-氨基酸,而另一个氨基酸是L-氨基酸。在本发明的第一或第二方面的另一个实施方式中,任选地与上文或下文提供的任何实施方式组合,通过接头连接的氨基酸使得最靠近N末端的氨基酸是D-氨基酸,而最靠近C末端的氨基酸是L-氨基酸。

[0104] 用于构建本发明的肽的氨基酸可以通过有机合成来制备,或通过其他途径获得,例如天然来源的降解或从天然来源分离。

[0105] 在本发明的第一方面的一个实施方式中,任选地与上文或下文提供的任何实施方式组合,该肽是其中m和n相同(优选是1)的肽。在可替换性实施方式中,该肽是其中m和n不同(即,m是0并且n是1)的肽。在本发明的第一方面的另一个实施方式中,任选地与上文或下文提供的任何实施方式组合,该肽是其中p和q相同(优选是1)的肽。在可替换性实施方式中,肽是其中p和q不同(即,p是1并且q是0)的肽。在本发明的第一方面的另一个实施方式中,任选地与上文或下文提供的任何实施方式组合,m、n、p和q相同,特别是1。在本发明的第一方面的另一个实施方式中,任选地与上文或下文提供的任何实施方式组合,m、n和q相同。在本发明的第一方面的另一个实施方式中,任选地与上文或下文提供的任何实施方式组合,m、n和q表示0,并且p表示1。在本发明的第一方面的另一个实施方式中,任选地与上文或下文提供的任何实施方式组合,m、n和p相同。在本发明的第一方面的另一个实施方式中,任选地与上文或下文提供的任何实施方式组合,m、n和p表示1,并且q表示0。

[0106] 在本发明的第一方面的另一个实施方式中,任选地与上文或下文提供的任何实施方式组合,该肽是线性肽。在本发明中,术语“线性肽”是指该肽不包含“L”双自由基。在另一个实施方式中,任选地与上文或下文提供的任何实施方式组合,线性肽是其中m、n、p和q相

同的肽。在另一个实施方式中,任选地与上文或下文提供的任何实施方式组合,线性肽是其中m、n、p和q相同且表示1的肽。

[0107] 在本发明的第二方面的一个实施方式中,任选地与上文或下文提供的任何实施方式组合,该肽是其中r和s相同的肽。在本发明的第二方面的另一个实施方式中,任选地与上文或下文提供的任何实施方式组合,该肽是其中t和v相同的肽。在本发明的第二方面的另一个实施方式中,任选地与上文或下文提供的任何实施方式组合,r和s表示1,并且t和v表示0。在本发明的第二方面的另一个实施方式中,任选地与上文或下文提供的任何实施例组合,r和s表示0,并且t和v表示1。

[0108] 在本发明的第一方面的另一个实施方式中,任选地与上文或下文提供的任何实施方式组合,式(I)的接头双自由基处于肽序列SEQ ID NO:1中位于位置“i”的氨基酸的 α 碳原子和位于位置“i+7”的氨基酸的 α 碳原子之间。

[0109] 在本发明的第一方面的另一个实施方式中,任选地与上文或下文提供的任何实施方式组合,该肽选自自由以下组成的组:

[0110] SEQ ID NO:2 (Leu)m-(Asp)n-Lys-Ala-Ser-Val-Met-Arg-Leu-Thr-Ile-Ser-Tyr-Leu-Arg-Val-(Arg)p-(Lys)q;

[0111] SEQ ID NO:3 (Leu)m-(Asp)n-Lys-Ala-Ser-Val-Met-Arg-Leu-Thr-Ile-Ser-Tyr-Leu-Arg-Val-(Arg)p-(Lys)q;

[0112] SEQ ID NO:4: (Leu)m-(Asp)n-Lys-Ala-Ser-Val-Met-Arg-Leu-Thr-Ile-Ser-Tyr-Leu-Arg-Val-(Arg)p-(Lys)q;

[0113] SEQ ID NO:5 (Leu)m-(Asp)n-Lys-Ala-Ser-Val-Met-Arg-Leu-Thr-Ile-Ser-Tyr-Leu-Arg-Val-Arg-(Lys)q;

[0114] SEQ ID NO:6: Lys-Ala-Ser-Val-Met-Arg-Leu-Thr-Ile-Ser-Tyr-Leu-Arg-Val-Arg;

[0115] SEQ ID NO:7: Lys-Ala-Ser-Val-Met-Arg-Leu-Thr-Ile-Ser-Tyr-Leu-Arg-Val-Arg;

[0116] SEQ ID NO:8: Lys-Ala-Ser-Val-Met-Arg-Leu-Thr-Ile-Ser-Tyr-Leu-Arg-Val-Arg;

[0117] SEQ ID NO:9: Lys-Ala-Ser-Val-Met-Arg-Leu-Thr-Ile-Ser-Tyr-Leu-Arg-Val-Arg;

[0118] SEQ ID NO:10: Leu-Asp-Lys-Ala-Ser-Val-Met-Arg-Leu-Thr-Ile-Ser-Tyr-Leu-Arg-Val-Arg-Lys;

[0119] SEQ ID NO:11: Leu-Asp-Lys-Ala-Ser-Val-Met-Arg-Leu-Thr-Ile-Ser-Tyr-Leu-Arg-Val-Arg-Lys;和

[0120] SEQ ID NO:12: Leu-Asp-Lys-Ala-Ser-Val-Met-Arg-Leu-Thr-Ile-Ser-Tyr-Leu-Arg-Val-Arg-Lys;

[0121] 其中下划线的粗体氨基酸具有相同构型(二者都是L-氨基酸或D-氨基酸)或不同构型,指出了接头双自由基“L”的位置(i,i+7),C末端对应于-C(O)R₄,且N末端对应于-NHR₅。

[0122] 在本发明的第二方面的另一个实施方式中,任选地与上文或下文提供的任何实施方式组合,式(I)的接头双自由基是处于肽序列SEQ ID NO:22中位于位置“i”的氨基酸的 α 碳原子和位于位置“i+7”的氨基酸的 α 碳原子之间。

[0123] 在本发明的第二方面的另一个实施方式中,任选地与上文或下文提供的任何实施方式组合,该肽选自由以下组成的组:

[0124] SEQ ID NO:23 (Arg)r-(Ser)s-Arg-Arg-Ser-Lys-Glu-**Ser**-Glu-Val-Phe-Tyr-Glu-Leu-**Ala**-His-Gln-(Leu)t-(Pro)v;

[0125] SEQ ID NO:24 (Arg)r-(Ser)s-Arg-Arg-Ser-Lys-Glu-Ser-Glu-**Val**-Phe-Tyr-Glu-Leu-Ala-His-**Gln**-(Leu)-(Pro)v;

[0126] SEQ ID NO:25: (Arg)r-(Ser)s-Arg-Arg-**Ser**-Lys-Glu-Ser-Glu-Val-Phe-**Tyr**-Glu-Leu-Ala-His-Gln-(Leu)t-(Pro)v;

[0127] SEQ ID NO:26: Arg-Ser-Arg-Arg-Ser-Lys-Glu-**Ser**-Glu-Val-Phe-Tyr-Glu-Leu-**Ala**-His-Gln;

[0128] SEQ ID NO:27: Arg-Ser-Arg-Arg-Ser-Lys-Glu-Ser-Glu-**Val**-Phe-Tyr-Glu-Leu-Ala-His-**Gln**;
和

[0129] SEQ ID NO:28: Arg-Arg-**Ser**-Lys-Glu-Ser-Glu-Val-Phe-**Tyr**-Glu-Leu-Ala-His-Gln-Leu-Pro,

[0130] 其中下划线的粗体氨基酸具有相同构型(二者都是L-氨基酸或D-氨基酸)或不同构型,指出了接头双自由基“L”的位置(i,i+7),C末端对应于-C(O)R₄,N末端对应于-NHR₅。

[0131] 在本发明的第一或第二方面的另一个实施方式中,任选地与上文或下文提供的任何实施方式组合,肽或其盐是包含其中a=1的“L”接头的肽或其盐。在本发明的第一或第二方面的另一个实施方式中,任选地与上文或下文提供的任何实施方式组合,肽或其盐是包含其中b=1的“L”接头的肽或其盐。在本发明的第一方面的另一个实施方式中,任选地与上文或下文提供的任何实施例组合,肽或其盐是包含其中c=1的“L”接头的肽或其盐。在本发明的第一方面的另一个实施方式中,任选地与上文或下文提供的任何实施例组合,肽或其盐是包含其中a=b=c=1的“L”接头的肽或其盐。

[0132] 在本发明的第一方面的另一个实施方式中,任选地与上文或下文提供的任何实施方式组合,肽或其盐是包含“L”接头的肽或其盐,其中R₁和R₃是独立地选自由以下组成的组中的双自由基:(C₁-C₁₀)烷基;(C₂-C₁₀)烯基;和(C₂-C₁₀)炔基。在本发明的第一方面的另一个实施方式中,任选地与上文或下文提供的任何实施方式组合,肽或其盐是包含“L”接头的肽或其盐,其中R₁和R₃相同或不同并且表示(C₁-C₁₀)烷基。

[0133] 在本发明的第一或第二方面的另一个实施方式中,任选地与上文或下文提供的任何实施方式组合,肽或其盐是包含“L”接头的肽或盐,其中R₂是选自由以下组成的组中的双自由基:-O-、C(=O)、C(=O)NR₁₃、C(=O)O、S(=O)、S(=O)₂、NR₁₄、(C₁-C₁₀)烷基、(C₂-C₁₀)烯基、(C₂-C₁₀)炔基、-NR₁₅-NR₁₆-、-N=N-、-S-S-和已知的由3至6个成员组成的环系统,该环:

[0134] 是饱和的、部分不饱和的或芳香族的;

[0135] 形成已知环系统的每个成员选自由以下组成的组:-CH-、-CH₂-、-NH-、-N-、-SH-、-S-和-O-;以及

[0136] 该环系统任选地被一个或多个独立地选自由以下组成的组中的基团取代:卤素、-OH、-NO₂、(C₁-C₁₀)烷基、(C₁-C₁₀)卤代烷基和(C₁-C₁₀)烷基-O-。

[0137] 在本发明的第一或第二方面的另一个实施方式中,任选地与上文或下文提供的任何实施方式组合,肽或其盐是包含“L”接头的肽或其盐,其中R₂是选自由以下组成的组中的双自由基:(C₁-C₁₀)烷基、(C₂-C₁₀)烯基和(C₂-C₁₀)炔基。在本发明的第一方面的另一个实施

方式中,任选地与上文或下文提供的任何实施方式组合,肽或其盐是包含其中 R_2 是 (C_2-C_{10}) 烯基的“L”接头的肽或其盐。

[0138] 在本发明的第一或第二方面的另一个实施方式中,任选地与上文或下文提供的任何实施方式组合,肽或其盐是包含“L”接头的肽或其盐,其中 R_1 和 R_3 相同或不同并且表示 (C_1-C_{10}) 烷基;并且 R_2 为 (C_2-C_{10}) 烯基。

[0139] 在本发明的第一或第二方面的另一个实施方式中,任选地与上文或下文提供的任何实施方式组合,肽或其盐是包含“L”接头的肽或其盐,其中 R_1 和 R_3 相同或不同并且表示 (C_1-C_{10}) 烷基; R_2 为 (C_2-C_{10}) 烯基;并且 $a=b=c=1$ 。

[0140] 在本发明的第一或第二方面的另一个实施方式中,任选地与上文或下文提供的任何实施方式组合,肽或其盐是其中 R_{19} 选自由以下组成的组中的肽或其盐: (C_1-C_{10}) 烷基、 (C_1-C_{10}) 卤代烷基、 (C_2-C_{10}) 烯基和 (C_2-C_{10}) 炔基。在本发明的第一或第二方面的另一个实施方式中,任选地与上文或下文提供的任何实施方式组合,肽或其盐是其中 R_{19} 是 (C_1-C_{10}) 烷基单自由基、优选 (C_1-C_4) 烷基单自由基,例如甲基、乙基、丙基、异丙基或丁基,或 (C_1-C_{10}) 卤代烷基,优选 (C_1-C_4) 卤代烷基单自由基,例如卤代甲基,例如氟甲基的肽或其盐。在优选的实施方式中, R_{19} 是甲基。在本发明的第一或第二方面的另一个实施方式中,任选地与上文或下文提供的任何实施方式组合,肽或其盐是其中 R_1 、 R_3 和 R_{19} 相同或不同并且表示 (C_1-C_{10}) 烷基; R_2 为 (C_2-C_{10}) 烯基的肽或其盐。

[0141] 在本发明的第一或第二方面的另一个实施方式中,任选地与上文或下文提供的任何实施方式组合,L是具有直链或支链 $C3-C30$ 烃的双自由基,该L可以被一个或多个独立地选自以下的基团中断一次或多于一次: $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-SO-$ 、 $-NH-$ 、 $-CO-$ 、 $-NMe-$ 、 $-NHCO-$ 、 $-CONH-$ 、亚芳基、杂亚芳基、直链或支链 $C1-C6$ -亚烷基和环状亚烷基以及具有至多4个选自N、O和S的杂原子的5至10元杂环基团;该L任选地被一个或多个选自自由卤素、 $-OH$ 、 $-COOH$ 、 $-NH_2$ 、 $-NO_2$ 、 C_1-C_6 烷基和 C_1-C_6 烯基组成的组中的取代基取代。

[0142] 在具体的实施方式中,L具有式(Ia):

[0143] $-(CH_2)_y-P-(CH_2)_a-(Q)_b-(CH_2)_c-(V)_d-(CH_2)_z-$

[0144] (Ia)

[0145] 其中

[0146] P、Q和V各自独立地选自包括以下的组: O 、 S 、 NH 、 $CONH$ 、 $C(O)O$ 、 C_1-C_6 亚烷基、例如亚苯基的亚芳基、和例如三唑烯的杂亚芳基,任选地被卤素取代;

[0147] y和z是各自独立地选自1至10的整数值;

[0148] a和c是各自独立地选自0至10的整数值;以及

[0149] b和d是各自独立地选自0至3的整数值。

[0150] 在优选的实施方式中,这种配体接头(L)选自由以下组成的组:

[0151] $-(CH_2)_y-CH=CH-(CH_2)_z-$ (Ib),

[0152] 优选地其中,y和z相同或不同,并且是选自1至10的整数值,包括1、2、3、4、5、6、7、8、9和10。优选地,y和z是独立地选自3至6的整数值,更优选是独立地选自3和6的整数值;

[0153] $-(CH_2)_y-P-(CH_2)_a-\left(\text{C}_6\text{H}_4\right)_b-(CH_2)_c-V-(CH_2)_z-$ (Ic)

[0154] 优选地其中,P和V各自独立地选自由O和S组成的组;还优选地y和z为1;优选地a选

自1至10或6至10;优选地b为0或1;优选地c为0或1;

[0155] 式(Ic)的一些具体实施方式是:

[0156] $-(\text{CH}_2)_y-\text{P}-(\text{CH}_2)_a-\text{V}-(\text{CH}_2)_z-$ (Id1),

[0157] 优选地其中,P和V各自独立地选自由0和S组成的组;还优选地,y和z为1,a选自6至10,优选a为8。在一些优选的实施方式中,式(Id1)的配体选自(Id1.1)和(Id1.2):

[0158] $-(\text{CH}_2)_n-\text{O}-(\text{CH}_2)_n-\text{O}-(\text{CH}_2)_n-$ (Id1.1);

[0159] $-(\text{CH}_2)_n-\text{S}-(\text{CH}_2)_n-\text{S}-(\text{CH}_2)_n-$ (Id1.2);

[0160] $-(\text{CH}_2)_y-\text{P}-(\text{CH}_2)_a-$   $-(\text{CH}_2)_c-\text{V}-(\text{CH}_2)_z-$ (Id2)

[0161] 优选地其中,P和V各自独立地选自由0和S组成的组;还优选地,y、a、c和z为1。在一些优选的实施方式中,式(I11d2)的配体选自(Id2.1)和(Id2.2):

$-(\text{CH}_2)_n-\text{O}-(\text{CH}_2)_n-$   $-(\text{CH}_2)_n-\text{O}-(\text{CH}_2)_n-$ (Id2.1)

$-(\text{CH}_2)_n-\text{S}-(\text{CH}_2)_n-$   $-(\text{CH}_2)_n-\text{S}-(\text{CH}_2)_n-$ (Id2.2)

[0162] $-(\text{CH}_2)_n-$  $-(\text{CH}_2)_n-$ (Ie)

, 和

$-(\text{CH}_2)_n-\text{C(O)NH}-(\text{CH}_2)_n-$ (If)

[0163] 其中在式(Id1.1)、(Id1.2)、(Id2.1)、(Id2.2)、(Ie)和(If)中,每个n是独立地选自1至10的整数值,包括1、2、3、4、5、6、7、8、9和10。在一些优选的实施方式中,每个n是独立地选自3至6的整数值。优选地,对于式(Ie)或(If)的配体,每个n是独立地选自3至6的整数值。在其他优选的实施方式中,每个n独立地选自1或2。优选地,对于式(Id)的配体,每个n是1。在优选的实施方式中,接头(L)具有式

[0164] $-(\text{CH}_2)_y-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_z-$ (Ib)

[0165] 该式如以上定义;

[0166] 并且R₁₉为如以上定义的(C₁-C₁₀)烷基单自由基,优选地R₁₉是甲基。

[0167] 在本发明的第一方面的一个实施方式中,任选地与上文或下文提供的任何实施方式组合,该肽是其中如下所述的肽:

[0168] -R₁、R₃和R₁₉为(C₁-C₁₀)烷基;R₂为(C₂-C₁₀)烯基;“m”和“n”相同;并且“p”和“q”相同;或者可替换地,

[0169] -R₁、R₃和R₁₉为(C₁-C₁₀)烷基;R₂为(C₂-C₁₀)烯基;“m”和“n”相同;并且“p”和“q”不同;或者可替换地,

[0170] -R₁、R₃和R₁₉为(C₁-C₁₀)烷基;R₂为(C₂-C₁₀)烯基;“m”、“n”、“p”和“q”相同,特别是相同且表示1;或者可替换地,

[0171] $-R_1$ 、 R_3 和 R_{19} 为 (C_1-C_{10}) 烷基； R_2 为 (C_2-C_{10}) 烯基；“m”、“n”、“q”相同并且“q”不同；特别是， $m=n=q=0$ 且 $q=1$ 。

[0172] 在本发明的第二方面的一个实施方式中，任选地与上文或下文提供的任何实施方式组合，该肽是其中如下所述的肽：

[0173] $-R_1$ 、 R_3 和 R_{19} 为 (C_1-C_{10}) 烷基； R_2 为 (C_2-C_{10}) 烯基；“r”和“s”相同；“t”和“v”相同；或者可替换地，

[0174] $-R_1$ 、 R_3 和 R_{19} 为 (C_1-C_{10}) 烷基； R_2 为 (C_2-C_{10}) 烯基；“r”和“s”相同并且表示1；“t”和“v”相同并且表示0；或者可替换地，

[0175] $-R_1$ 、 R_3 和 R_{19} 为 (C_1-C_{10}) 烷基； R_2 为 (C_2-C_{10}) 烯基；“r”和“s”相同并且表示0；“t”和“v”相同并且表示1。

[0176] 在本发明的第一或第二方面的另一个实施方式中，任选地与上文或下文提供的任何实施方式组合，肽或其盐是其中 R_4 是-OH（即，C末端是-C(O)OH）的肽或其盐。在本发明的第一或第二方面的另一个实施方式中，任选地与上文或下文提供的任何实施方式组合，肽或其盐是其中 R_4 是-NR₁₇R₁₈（R₁₇和R₁₈含义相同）的肽或其盐。在本发明的第一或第二方面的另一个实施方式中，任选地与上文或下文提供的任何实施方式组合，N末端对应于-NH₂。在本发明的第一或第二方面的另一个实施方式中，任选地与上文或下文提供的任何实施方式组合，本发明的肽的C末端和N末端分别是-C(O)OH和-NH₂。在本发明的第一或第二方面的另一个实施方式中，任选地与上文或下文提供的任何实施方式组合，本发明的肽的C末端和N末端分别是-C(O)NH₂和-NH₂。

[0177] 在本发明的第一或第二方面的另一个实施方式中，任选地与上文或下文提供的任何实施方式组合，本发明的肽的C末端和N末端分别是-C(O)R₄和-NH₂，其中R₄表示-NHR₁₈，并且R₁₈是选自由以下组成的组中的基团： (C_1-C_{10}) 烷基和被一个或多个选自由卤素、 (C_1-C_{10}) 烷基、-OR₆、-NR₇R₈、-SR₉、-SOR₁₀、-SO₂R₁₁和-CO₂R₁₂组成的组中的基团取代的 (C_1-C_{10}) 烷基。

[0178] 在本发明的第一或第二方面的另一个实施方式中，任选地与上文或下文提供的任何实施方式组合，本发明的肽的C末端和N末端分别是-C(O)R₄和-NH₂，其中R₄表示-NR₁₇R₁₈，并且R₁₇和R₁₈是独立地选自由以下组成的组中的基团： (C_1-C_{10}) 烷基和被一个或多个选自由卤素、 (C_1-C_{10}) 烷基、-OR₆、-NR₇R₈、-SR₉、-SOR₁₀、-SO₂R₁₁和-CO₂R₁₂组成的组中的基团取代的 (C_1-C_{10}) 烷基。

[0179] 在本发明的第一或第二方面的另一个实施方式中，任选地与上文或下文提供的任何实施方式组合，本发明的肽的C末端和N末端分别是-C(O)OH和-NHR₅，其中R₅选自： (C_1-C_{20}) 烷基和被一个或多个选自由卤素、 (C_1-C_{10}) 烷基、-OR₆、-NR₇R₈、-SR₉、-SOR₁₀、-SO₂R₁₁和-CO₂R₁₂组成的组中的基团取代的 (C_1-C_{10}) 烷基。

[0180] 在本发明的第一方面和第二方面的另一个实施方式中，任选地与上文或下文提供的任何实施方式组合，肽或其盐是其中 R_1 、 R_3 和 R_{19} 相同或不同并且表示 (C_1-C_{10}) 烷基； R_2 为 (C_2-C_{10}) 烯基的肽或其盐。在本发明的第一方面和第二方面的另一个实施方式中，任选地与上文或下文提供的任何实施方式组合，肽或其盐是其中 R_1 、 R_3 和 R_{19} 相同或不同并且表示 (C_1-C_{10}) 烷基； R_2 为 (C_2-C_{10}) 烯基；C末端选自-C(O)OH和-CONH₂且N末端为-NH₂的肽或其盐。

[0181] 在本发明的第一方面的另一个实施方式中，该肽是相对于选自由序列SEQ ID NO：13至21组成的组中任一种的序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、

93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的肽：

[0182] SEQ ID NO:13

[0183] Leu-Asp-Lys-Ala-Ser-Val-Met-Arg-Leu-Thr-Ile-Ser-Tyr-Leu-Arg-Val-Arg-Lys

[0184] 其中N末端对应于-NH₂,C末端对应于-C(O)NH₂。

[0185] 衍生自SEQ ID NO:1的其他线性肽序列是SEQ ID NO:36和SEQ ID NO:37,如下所示：

[0186] SEQ ID NO:36:

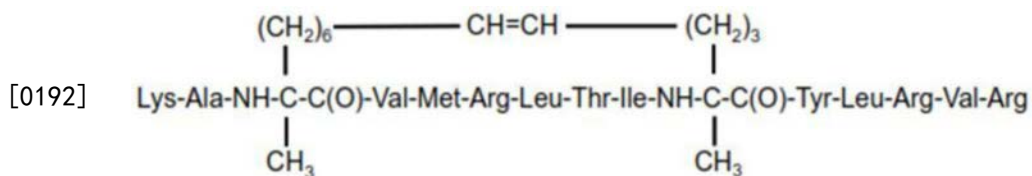
[0187] Lys-Ala-Ser-Val-Met-Arg-Leu-Thr-Ile-Ser-Tyr-Leu-Arg-Val-Arg

[0188] SEQ ID NO:37:

[0189] Lys-Ala-Ser-Val-Met-Arg-Leu-Thr-Ile-Ser-Tyr-Leu-Arg-Val

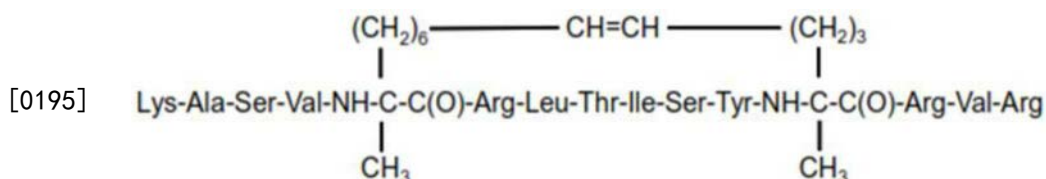
[0190] 值得注意的是,SEQ ID NO:37不同于SEQ ID NO:36之处在于它缺少末端精氨酸。

[0191] SEQ ID NO:14



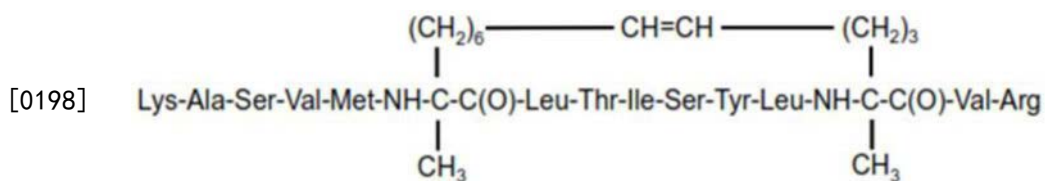
[0193] 其中N末端对应于-NH₂,C末端对应于-C(O)NH₂,第3位的氨基酸为D-氨基酸,其余氨基酸为L-氨基酸。

[0194] SEQ ID NO:15



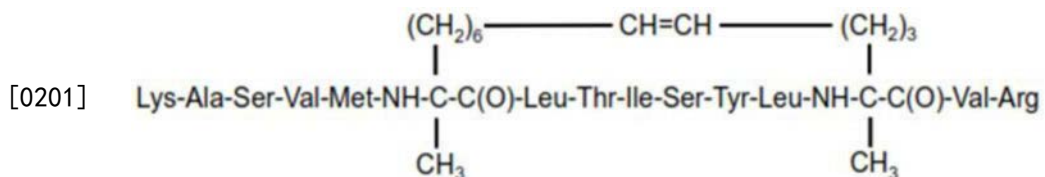
[0196] 其中N末端对应于-NH₂,C末端对应于-C(O)NH₂,第5位的氨基酸为D-氨基酸,其余氨基酸为L-氨基酸。

[0197] SEQ ID NO:16



[0199] 其中N末端对应于-NH₂,C末端对应于-C(O)NH₂,第6位的氨基酸为D-氨基酸,其余氨基酸为L-氨基酸。

[0200] SEQ ID NO:17

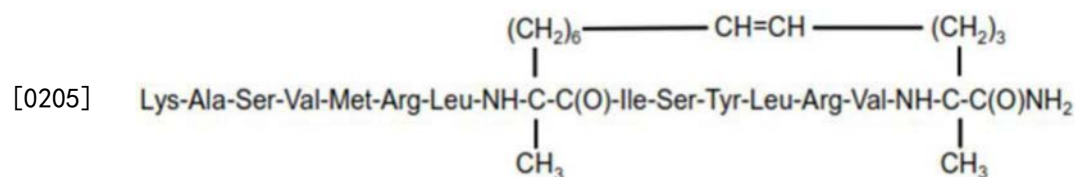


[0202] 其中N末端对应于-NH₂,C末端对应于-C(O)OH,第6位的氨基酸为D-氨基酸,其余氨基酸为L-氨基酸。

基酸为L-氨基酸。

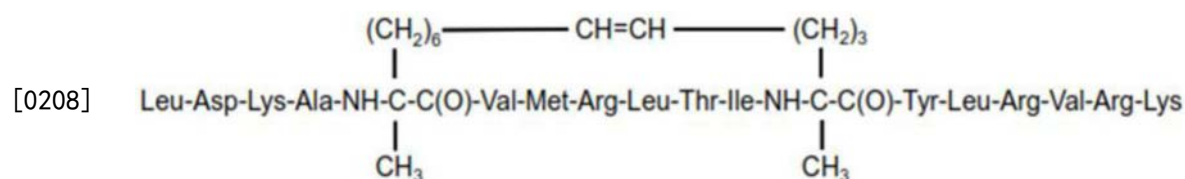
[0203] 值得注意的是,SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:17仅在C末端的官能团上不同,SEQ ID NO:16的C末端对应于 $-C(O)NH_2$,SEQ ID NO:17的C末端对应于 $-C(O)OH$ 。

[0204] SEQ ID NO:18



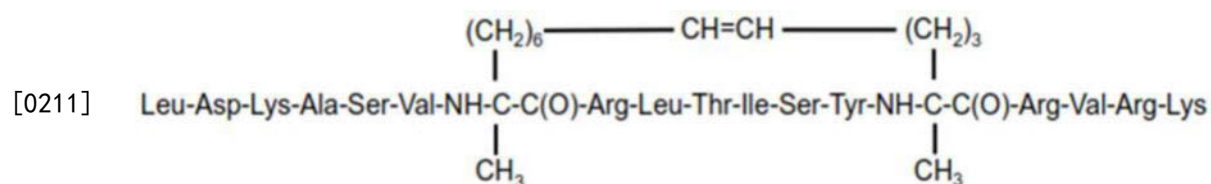
[0206] 其中N末端对应于 $-NH_2$,C末端对应于 $-C(O)NH_2$,第8位的氨基酸为D-氨基酸,其余氨基酸为L-氨基酸。

[0207] SEQ ID NO:19



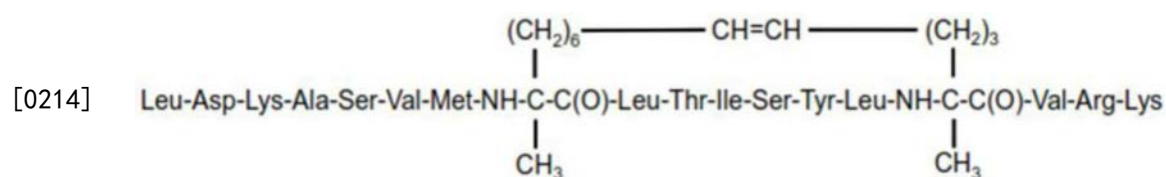
[0209] 其中,N末端对应于 $-NH_2$,C末端对应于 $-C(O)NH_2$,第5位的氨基酸为D-氨基酸,其余氨基酸为L-氨基酸。

[0210] SEQ ID NO:20



[0212] 其中,N末端对应于 $-NH_2$,C末端对应于 $-C(O)NH_2$,第7位的氨基酸为D-氨基酸,其余氨基酸为L-氨基酸。

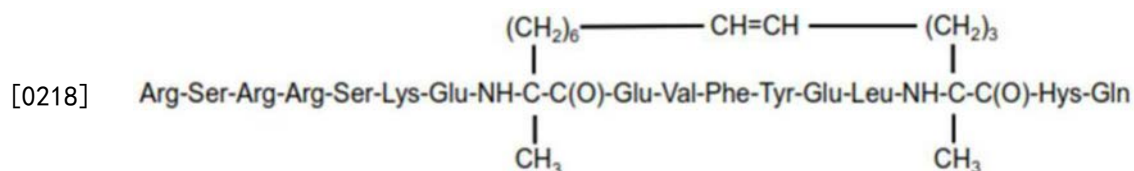
[0213] SEQ ID NO:21



[0215] 其中,N末端对应于 $-NH_2$,C末端对应于 $-C(O)NH_2$,第8位的氨基酸为D-氨基酸,其余氨基酸为L-氨基酸。

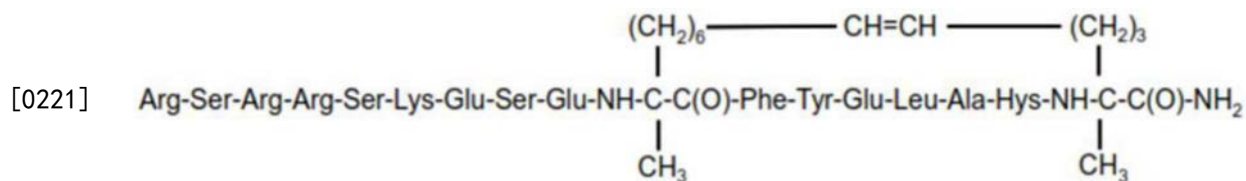
[0216] 在本发明的第一方面的另一个实施方式中,该肽是选自包括以下的组或由以下组成的组中的肽:序列SEQ ID NO:13至21(例如SEQ ID NO:14至21)中的任一个,优选地是选自包括以下的组或由以下组成的组中的肽:SEQ ID NO:14、16-17和19-21中的任一个。在本发明的第二方面的另一个实施方式中,该肽是相对于选自由SEQ ID NO:29至31组成的组中的任一个的序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的肽:

[0217] SEQ ID NO:29



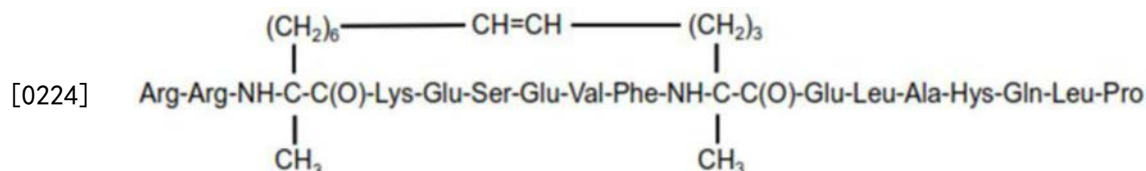
[0219] 其中N末端对应于-NH₂,C末端对应于-C(O)NH₂,第8位的氨基酸为D-氨基酸,其余氨基酸为L-氨基酸。

[0220] SEQ ID NO:30



[0222] 其中N末端对应于-NH₂,C末端对应于-C(O)NH₂,第10位的氨基酸为D-氨基酸,其余氨基酸为L-氨基酸。

[0223] SEQ ID NO:31

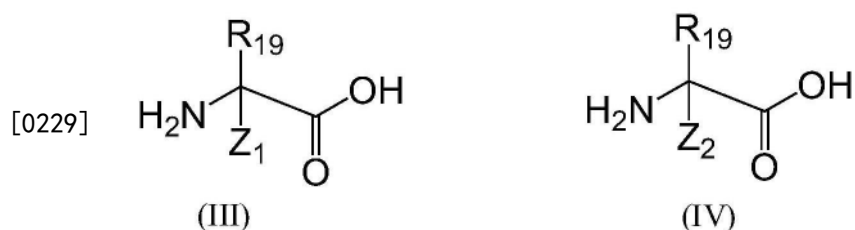


[0225] 其中N末端对应于-NH₂,C末端对应于-C(O)NH₂,第3位的氨基酸为D-氨基酸,其余氨基酸为L-氨基酸。

[0226] 在本发明的第二方面的另一个实施方式中,任选地与上文提供的任何实施方式组合,该肽选自由SEQ ID NO:29至31组成的组。

[0227] 用于制备根据本发明的第一方面的肽的方法包括:

[0228] (1.a) 通过缩合将肽的相应氨基酸与式(III)化合物和式(IV)化合物偶联,该式(III)化合物和式(IV)化合物对应于称为“i”和“i+4”或“i+7”的氨基酸。化合物(III)和(IV)将是进行后续环化步骤以生成“L”双自由基的化合物:

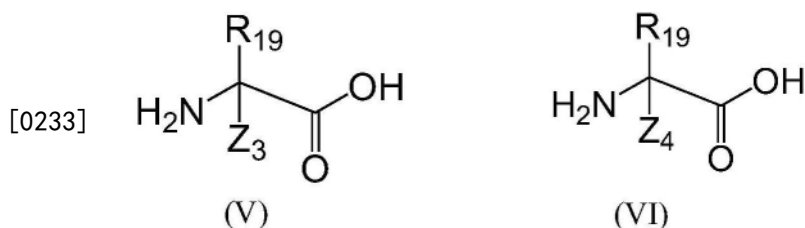


[0230] 其中R₁₉如上文定义,Z₁和Z₂相同或不同并且表示(C₂-C₁₀)烯基;以及

[0231] (1.b) 环化步骤,包括在溶液中用格拉布(I代或II代)催化剂进行Z₁和Z₂的关环复分解(查阅Kim Young-Woo等人,“Synthesis of all-hydrocarbon stapled α-helical peptides by ring-closing olefin metathesis”,Nature Protocols,2011,6(6),第761-771页;Scott J.M.等人,“Application of Ring-Closing Metathesis to the Synthesis of Rigidified Amino Acids and Peptides”,J.Am.Chem.Soc.,1996,v.118(40),第9606-9614页);或者可替换地,

[0232] (2a) 通过缩合将包括式(V)化合物和式(VI)化合物的所需氨基酸偶联,该式(V)化

合物和式(VI)化合物对应于称为“i”和“i+4”或“i+7”的氨基酸。化合物(V)和化合物(VI)将是进行后续环化步骤以生成“L”双自由基的化合物:



[0234] 其中 R_{19} 如上文定义, Z_3 和 Z_4 相同或不同,选自由以下组成的组:卤素-SH、- NHR_{20} 、-OH、(C_2 - C_{10})烷基-SH、(C_1 - C_{10})烷基-OH、(C_1 - C_{10})烷基- NHR_{21} 、 $\text{C}(=\text{O})\text{OH}$ 、(C_1 - C_{10}) $\text{C}(=\text{O})\text{OH}$ 、 $\text{C}(=\text{O})\text{NHR}_{22}$ 、(C_1 - C_{10})烷基- $\text{C}(=\text{O})\text{NHR}_{23}$ 、 OR_{24} 、 $\text{C}(=\text{O})$ -卤素、 $\text{C}(=\text{O})$ - OR_{25} 、 $\text{S}(=\text{O})$ -卤素、 $\text{S}(=\text{O})$ - OR_{26} 、 $\text{S}(=\text{O})_2\text{R}_{27}$,其中 R_{20} 、 R_{21} 、 R_{22} 、 R_{23} 、 R_{24} 、 R_{25} 、 R_{26} 和 R_{27} 是选自由以下组成的组中的单自由基:氢、(C_1 - C_{10})烷基、(C_2 - C_{10})烯基和(C_2 - C_{10})炔基;已知的包含3至14个碳原子的环系统,该系统包含1至3个环,其中:

[0235] 每个环是饱和的、部分不饱和的或芳香族的;

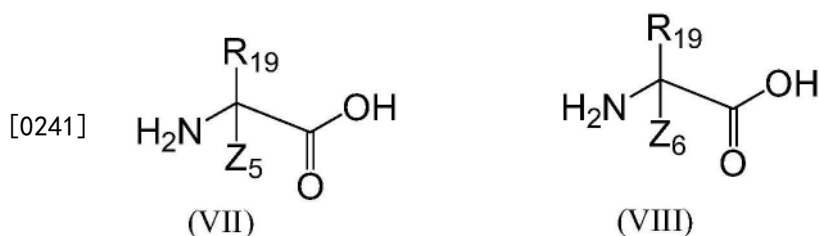
[0236] 环是孤立的、部分或完全稠合的,

[0237] 形成已知环系统的每个成员选自由以下组成的组:-CH-、- CH_2 -、-NH-、-N-、-SH-、-S-和-O-;以及

[0238] 该环系统任选地被一个或多个独立地选自由以下组成的组中的基团取代:卤素、-OH、- NH_2 、-SH、 $\text{C}(=\text{O})$ -卤素、(C_1 - C_{10})卤代烷基、和(C_1 - C_{10})烷基-O-;以及

[0239] (2b)环化步骤,包括 Z_3 和 Z_4 基团之间的偶联反应;或者可替换地,

[0240] (3a)通过缩合将肽的相应氨基酸与式(VII)化合物和式(VIII)化合物偶联,该式(VII)化合物和式(VIII)化合物对应于称为“i”和“i+4”或“i+7”的氨基酸。化合物(VII)和(VIII)将是进行后续环化步骤以生成“L”双自由基的化合物:



[0242] 其中 R_{19} 如上文定义, Z_5 和 Z_6 中的一个为(C_2 - C_{10})炔基,另一个为(C_2 - C_{10})烷基 N_3 ;以及

[0243] (3.b)环化步骤,包括通过熟知的方案(例如Cu(I)介导的Huisgen 1,3-偶极环加成反应(又名“点击”反应))将 Z_5 和 Z_6 基团缩合以生成1,4-取代的1,2,3-三唑桥(查阅Kolb H.C.等人,“The growing impact of click chemistry on drug discovery”,2003,Drug Discov Today,8(24):1128-1137)。

[0244] 用于制备根据本发明的第二方面的肽的方法包括通过缩合将一个氨基酸的羧基或C末端与另一个氨基酸的氨基或N末端偶联,该偶联反应重复所需的次数,直至获得所需的肽。

[0245] 式(III)、(IV)、(V)、(VI)、(VII)和(VIII)的化合物可以商购获得,并通过缩合偶联至肽序列的已形成部分。这些化合物可以携带用于肽的适当固相合成的珠子,以及羧基、

氨基或侧链的保护基团。化合物的示例性非限制性实例是：2-(2'-丙烯基)丙氨酸、2-(3'-丁烯基)甘氨酸、2-(4'-戊烯基)丙氨酸、2-(6'-庚烯基)丙氨酸、2-(7'-辛烯基)丙氨酸、烯丙基-甘氨酸、5-叠氮基-戊氨酸和 α -炔丙基-丙氨酸等。

[0246] “偶联”步骤可以在固相中，遵循“脱保护-洗涤-偶联-洗涤”方案，使用以上定义的氨基酸以及式(III)至(VIII)的 α - α 二取代氨基酸，通过将氨基酸的羧基与另一个氨基酸残基的氨基缩合来进行。

[0247] 固相肽合成的一般原理是重复脱保护-洗涤-偶联-洗涤的循环。固相连接的肽的游离N末端胺与单个N-保护的氨基酸单元偶联。然后该单元被脱保护，露出可以在其上连接另外氨基酸的新的N末端胺。氨基酸的N末端和C末端具有反应性部分，这有利于合成期间氨基酸偶联。许多氨基酸还具有反应性侧链官能团，这些反应性侧链官能团可以在合成和肽延伸期间与游离端基团或其他侧链基团相互作用，并对产量和纯度产生负面影响。为了促进侧链反应性最小的正确氨基酸的合成，已经开发了化学基团来与特定的氨基酸官能团结合并阻断或保护官能团免受非特异性反应。这些保护基团虽然实际上数量庞大，但可以分类为如下三组：N末端保护基团、C末端保护基团（主要用于液相合成）和侧链保护基团。

[0248] 为了偶联肽，羧基通常被活化。这对于加速反应很重要。活化基团主要有两种类型：碳二亚胺和三唑醇。然而，五氟苯酯(FDPP、PFPOH)和BOP-Cl的使用可用于环化肽。

[0249] 在合成之前将纯化的单个氨基酸与这些保护基团反应，然后在肽合成的特定步骤期间选择性去除保护基团。

[0250] 本发明可以采用的示例性树脂包括但不限于：(1) 烯基树脂（例如，REM树脂、聚合物键合型乙烯基砜树脂、乙烯基-聚苯乙烯树脂）；(2) 胺官能化树脂（例如，脒树脂、聚合物键合型N-(4-苄氧基苄基)羟胺、(氨基甲基)聚苯乙烯、聚合物键合型(R)-(+)- α -甲基苄胺、2-氯三苯甲基克诺尔树脂、聚合物键合型2-N-Fmoc-氨基-二苯并环庚-1,4-二烯树脂、4-[4-(1-Fmoc-氨基乙基)-2-甲氧基-5-硝基苯氧基]丁酰胺基甲基-聚苯乙烯树脂、聚合物键合型4-苄氧基苄胺、聚合物键合型4-羧基苯磺酰胺、聚合物键合型双(叔丁氧羰基)异硫脲、二甲基氨基甲基-聚苯乙烯、聚合物键合型Fmoc-3-氨基-3-(2-硝基苯基)丙酸、N-甲基氨基甲基化聚苯乙烯、PAL树脂、Sieber酰胺树脂、聚合物键合型N-(2-巯基乙基)氨基甲酸叔丁酯、聚合物键合型三苯基氯甲烷-4-甲酰胺）；(3) 二苯甲基胺(BHA)树脂（例如，聚合物键合型2-氯二苯甲基氯、聚合物键合型HMPB-二苯甲基胺、聚合物键合型4-甲基二苯甲醇、聚合物键合型二苯甲基氯、聚合物键合型二苯甲基胺）；(4) Br-官能化树脂（例如，聚合物键合型4-(苄氧基)苄基溴，4-溴聚苯乙烯、溴化PPOA树脂、溴化Wang树脂、聚合物键合型溴缩醛、溴聚苯乙烯、HypoGel®200BR、用于肽合成的聚苯乙烯A-Br、聚合物键合型溴化硒、TentaGel HL-Br、TentaGel MB-Br、TentaGel S-Br）；(5) 氯甲基树脂（例如，聚合物键合型5-[4-(氯甲基)苯基]戊基]苯乙烯、聚合物键合型4-(苄氧基)苄基氯、聚合物键合型4-甲氧基二苯甲基氯）；(6) CHO-官能化树脂（例如，(4-甲酰基-3-甲氧基苯氧基甲基)聚苯乙烯、(4-甲酰基-3-甲氧基苯氧基甲基)聚苯乙烯、聚合物键合型3-苄氧基苯甲醛、聚合物键合型4-苄氧基-2,6-二甲氧基苯甲醛、甲酰基聚苯乙烯、HypoGel®200CHO、吡啶树脂、聚苯乙烯A-CH(OEt)2、TentaGel HL-CH(OEt)2）；(7) Cl-官能化树脂（例如，聚合物键合型苯甲酰氯、(氯甲基)聚苯乙烯、Merrifield树脂）；(8) CO2H官能化树脂（例如，羧乙基聚苯乙烯、HypoGel®200COOH、

聚苯乙烯AM-COOH、TentaGel HL-COOH、TentaGel MB-COOH、TentaGel S-COOH) ; (9) HypoGel树脂(例如, HypoGel® 200FMP、HypoGel® 200PHB、HypoGel® 200Trt-OH、HypoGel® 200HMB) ; (10) 碘-官能化树脂(例如, 聚合物键合型4-碘苯酚、碘聚苯乙烯) ; Janda-Jels™ (JandaJel<ä>-Rink酰胺、JandaJel-NH₂、JandaJel-Cl、JandaJel-4-巯基苯酚、JandaJel-OH、JandaJel-1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺、JandaJel-1,3,4,6,7,8-六氢-2H-嘧啶基-[1,2-a]嘧啶、JandaJel-吗啉、JandaJel-聚吡啶、JandaJel-三苯基膦、JandaJel-Wang) ; (11) MBHA树脂(3[4'-(羟甲基)苯氧基]丙酸-4-甲基二苯甲基胺树脂、4-(羟甲基)苯氧基乙酸聚合物结合至MBHA树脂、聚合物键合型HMBA-4-甲基二苯甲基胺、聚合物键合型4-甲基二苯甲基胺盐酸盐容量(胺)) ; (12) NH₂官能化树脂((氨基甲基)聚苯乙烯、(氨基甲基)聚苯乙烯、HypoGel® 200NH₂、聚苯乙烯AM-NH₂、2-氨基乙基化聚苯乙烯微球、2-溴乙基化聚苯乙烯微球、2-羟乙基化聚苯乙烯微球、TentaGel HL-NH₂、Tentagel M Br、Tentagel M NH₂、Tentagel M OH、TentaGel MB-NH₂、TentaGel S-NH₂、TentaGel S-NH₂) ; (13) OH-官能化树脂(例如, 聚合物键合型4-羟甲基苯甲酸、羟甲基树脂、OH-官能化Wang树脂) ; (14) 脒树脂(例如, 聚合物键合型4-氯二苯甲酮脒、聚合物键合型二苯甲酮脒、聚合物键合型4-甲氧基二苯甲酮脒) ; (15) PEG树脂(例如, 聚合物键合型乙二醇) ; (16) Boc-/Bzl肽合成树脂(例如, Boc-Lys(Boc)-Lys[Boc-Lys(Boc)]-Cys(Acm)-b-Ala-O-PAM树脂、Boc-Lys(Fmoc)-Lys[Boc-Lys(Fmoc)]-b-Ala-O-Pam树脂、Boc-Lys(Boc)-Lys[Boc-Lys(Boc)]-Lys{Boc-Lys(Boc)-Lys[Boc-Lys(Boc)]}-b-Ala-O-PAM树脂、Boc-Lys(Fmoc)-Lys[Boc-Lys(Fmoc)]-Lys[Boc-Lys(Fmoc)-Lys{Boc-Lys(Fmoc)}]-b-Ala-O-PAM树脂、Boc-Lys(Boc)-Lys[Boc-Lys(Boc)]-Lys{Boc-Lys(Boc)-Lys[Boc-Lys(Boc)]}-Cys(Acm)-b-Ala-O-PAM树脂, 预加载PAM树脂) ; (17) Fmoc-/t-Bu肽合成树脂(例如, Fmoc-Lys(Fmoc)-Lys[Fmoc-Lys(Fmoc)]-b-Ala-O-Wang树脂、Fmoc-Lys(Fmoc)-Lys[Fmoc-Lys(Fmoc)]-Lys{Fmoc-Lys(Fmoc)-Lys[Fmoc-Lys(Fmoc)]}-b-Ala-O-Wang树脂, 预加载TentaGel® S三苯甲基树脂, 预加载TentaGel®树脂, 预加载三苯甲基树脂、预加载Wang树脂、预加载氨基醇的三苯甲基树脂) ; (19) 硫醇官能化树脂(例如HypoGel® 200S-Trt、AM-S-三苯甲基聚苯乙烯、TentaGel HL-S-三苯甲基、TentaGel MB-S-三苯甲基、TentaGel S-S-三苯甲基) ; (20) Wang树脂(例如, Fmoc-Ala-Wang树脂、Fmoc-Arg(Pbf)-Wang树脂、Fmoc-Arg(Pmc)-Wang树脂、Fmoc-Asn(Trt)-Wang树脂、Fmoc-Asp(OtBu)-Wang树脂、Fmoc-Cys(Acm)-Wang树脂、Fmoc-Cys(StBu)-Wang树脂、Fmoc-Cys(Trt)Wang树脂、Fmoc-Gln(Trt)-Wang树脂、Fmoc-Glu(OtBu)-Wang树脂、Fmoc-Gly-Wang树脂、Fmoc-His(Trt)-Wang树脂、Fmoc-Ile-Wang树脂、Fmoc-Leu-Wang树脂、Fmoc-Lys(Boc)-Wang树脂、Fmoc-Met-Wang树脂、Fmoc-D-Met-Wang树脂、Fmoc-Phe-Wang树脂、Fmoc-Pro-Wang树脂、Fmoc-Ser(tBu)-Wang树脂、Fmoc-Ser(Trt)-Wang树脂、Fmoc-Thr(tBu)-Wang树脂、Fmoc-Trp(BoC)Wang树脂、Fmoc-Trp-Wang树脂、Fmoc-Tyr(tBu)-Wang树脂、Fmoc-Val-Wang树脂)。

[0251] “保护基团”(PG)是指当连接至分子中的反应性基团时,掩盖、减少或防止反应性的原子团。

[0252] 合适的氨基保护基团包括氨基甲酸甲酯、氨基甲酸乙酯、9-苄基甲基氨基甲酸酯(Fmoc)、9-(2-磺基)苄基甲基氨基甲酸酯、9-(2,7-二溴)苄基甲基氨基甲酸酯、2,7-二-叔-

丁基-[9-(10,10-二氧代-10,10,10,10-四氢噻吨基)]甲基氨基甲酸酯(DBD-Tmoc)、4-甲氧基苯甲酰甲基氨基甲酸酯(Phenoc)、2,2,2-三氯乙基氨基甲酸酯(Troc)、2-三甲基甲硅烷基乙基氨基甲酸酯(Teoc)、2-苄乙基氨基甲酸酯(hZ)、1-(1-金刚烷基)-1-甲基乙基氨基甲酸酯(Adpoc)、1,1-二甲基-2-卤乙基氨基甲酸酯、1,1-二甲基-2,2-二溴乙基氨基甲酸酯(DB-t-BOC)、1,1-二甲基-2,2,2-三氯乙基氨基甲酸酯(TCBOC)、1-甲基-1-(4-联苯基)乙基氨基甲酸酯(Bpoc)、1-(3,5-二-叔-丁基苯基)-1-甲基乙基氨基甲酸酯(t-Bumeoc)、2-(2'-和4'-吡啶基)乙基氨基甲酸酯(Pyoc)、2-(N,N-二环己基甲酰胺基)乙基氨基甲酸酯、叔丁基氨基甲酸酯(BOC)、1-金刚烷基氨基甲酸酯(Adoc)、乙烯基氨基甲酸酯(Voc)、烯丙基氨基甲酸酯(Alloc)、1-异丙基烯丙基氨基甲酸酯(Ipaoc)、肉桂基氨基甲酸酯(Coc)、4-硝基肉桂基氨基甲酸酯(Noc)、8-喹啉基氨基甲酸酯、N-羟基哌啶基氨基甲酸酯、烷基二硫代氨基甲酸酯、氨基甲酸苄酯(Cbz)、对甲氧基苄基氨基甲酸酯(Moz)、对硝基苄基氨基甲酸酯、对溴苄基氨基甲酸酯、对氯苄基氨基甲酸酯、2,4-二氯苄基氨基甲酸酯、4-甲基亚磺酰基苄基氨基甲酸酯(Msz)、9-蒎基甲基氨基甲酸酯、二苯基甲基氨基甲酸酯、2-甲硫基乙基氨基甲酸酯、2-甲基磺酰基乙基氨基甲酸酯、2-(对甲苯磺酰基)乙基氨基甲酸酯、[2-(1,3-二噻烷基)]甲基氨基甲酸酯(Dmoc)、4-甲硫基苯基氨基甲酸酯(Mtpc)、2,4-二甲基苯硫基氨基甲酸酯(Bmpc)、2-磷鎓基乙基氨基甲酸酯(Peoc)、2-三苯基磷鎓基异丙基氨基甲酸酯(Ppoc)、1,1-二甲基-2-氰基乙基氨基甲酸酯、间-氯-对-酰氧基苄基氨基甲酸酯、对-(二羟基氧硼基)苄基氨基甲酸酯、5-苯并异噁唑基甲基氨基甲酸酯、2-(三氟甲基)-6-色酮基甲基氨基甲酸酯(Tcroc)、间硝基苯基氨基甲酸酯、3,5-二甲氧基苄基氨基甲酸酯、邻硝基苄基氨基甲酸酯、3,4-二甲氧基-6-硝基苄基氨基甲酸酯、苯基(邻硝基苯基)甲基氨基甲酸酯、吩噻嗪基-(10)-羰基衍生物、N'-对甲苯磺酰胺基羰基衍生物、N'-苯基氨基硫代羰基衍生物、叔戊基氨基甲酸酯、S-苄基硫代氨基甲酸酯、对氰基苄基氨基甲酸酯、氨基甲酸环丁酯、氨基甲酸环己酯、氨基甲酸环戊酯、环丙基甲基氨基甲酸酯、对癸氧基苄基氨基甲酸酯、2,2-二甲氧基羰基乙烯基氨基甲酸酯、邻-(N,N-二甲基甲酰胺基)苄基氨基甲酸酯、1,1-二甲基-3-(N,N-二甲基甲酰胺基)丙基氨基甲酸酯、1,1-二甲基丙炔基氨基甲酸酯、二(2-吡啶基)甲基氨基甲酸酯、2-呋喃基甲基氨基甲酸酯、2-碘乙基氨基甲酸酯、氨基甲酸异冰片酯、氨基甲酸异丁酯、异烟基氨基甲酸酯、对-(对'-甲氧基苯基偶氮)苄基氨基甲酸酯、1-甲基环丁基氨基甲酸酯、1-甲基环己基氨基甲酸酯、1-甲基-1-环丙基甲基氨基甲酸酯、1-甲基-1-(3,5-二甲氧基苯基)乙基氨基甲酸酯、1-甲基-1-(对苯基偶氮苯基)乙基氨基甲酸酯、1-甲基-1-苯基乙基氨基甲酸酯、1-甲基-1-(4-吡啶基)乙基氨基甲酸酯、氨基甲酸苯酯、对(苯基偶氮)苄基氨基甲酸酯、2,4,6-三叔丁基苯基氨基甲酸酯、4-(三甲基铵)苄基氨基甲酸酯、2,4,6-三甲基苄基氨基甲酸酯、甲酰胺、乙酰胺、氯乙酰胺、三氯乙酰胺、三氟乙酰胺、苯基乙酰胺、3-苯基丙酰胺、吡啶甲酰胺、3-吡啶甲酰胺、N-苯甲酰基苯基丙氨酰衍生物、苯甲酰胺、对苯基苯甲酰胺、邻硝基苯基乙酰胺、邻硝基苯氧基乙酰胺、乙酰乙酰胺、(N'-二硫代苄氧基羰基氨基)乙酰胺、3-(对羟基苯基)丙酰胺、3-(邻硝基苯基)丙酰胺、2-甲基-2-(邻硝基苯氧基)丙酰胺、2-甲基-2-(邻苯基偶氮苯氧基)丙酰胺、4-氯丁酰胺、3-甲基-3-硝基丁酰胺、邻硝基肉桂酰胺、N-乙酰基甲硫氨酸衍生物、邻硝基苯甲酰胺、邻(苯甲酰氧基甲基)苯甲酰胺、4,5-二苯基-3-噁唑啉-2-酮、N-邻苯二甲酰亚胺、N-二硫代琥珀酰亚胺(Dts)、N-2,3-二苯基马来酰亚胺、N-2,5-二甲基吡咯、N-1,1,4,4-四甲基二甲硅烷基氮杂

环戊烷加合物(STABASE)、5-取代的1,3-二甲基-1,3,5-三氮杂环己-2-酮、5-取代的1,3-二苄基-1,3,5-三氮杂环己-2-酮、1-取代的3,5-二硝基-4-吡啶酮、N-甲胺、N-烯丙胺、N-[2-三甲基甲硅烷基]乙氧基]甲胺(SEM)、N-3-乙酰氧基丙胺、N-(1-异丙基-4-硝基-2-氧代-3-吡咯啉-3-基)胺、季铵盐、N-苄胺、N-二(4-甲氧基苯基)甲胺、N-5-二苯并环庚胺、N-三苯基甲胺(Tr)、N-[(4-甲氧基苯基)二苯基甲基]胺(MMTr)、N-9-苯基苄基胺(PhF)、N-2,7-二氯-9-苄基亚甲基胺、N-二茂铁基甲基氨基(Fcm)、N-2-甲基吡啶氨基N'-氧化物、N-1,1-二甲基硫代亚甲基胺、N-亚苄基胺、N-对-甲氧基亚苄基胺、N-二苯基亚甲基胺、N-[(2-吡啶基)均三甲基苯基]亚甲基胺、N-(N',N'-二甲基氨基亚甲基)胺、N,N'-异亚丙基二胺、N-对硝基亚苄基胺、N-亚水杨基胺、N-5-氯亚水杨基胺、N-(5-氯-2-羟基苯基)苯基亚甲基胺、N-亚环己基胺、N-(5,5-二甲基-3-氧代-1-环己烯基)胺、N-硼烷衍生物、N-二苯基硼酸衍生物、N-[苯基(五烷基铬-或钨)羰基]胺、N-铜螯合物、N-锌螯合物、N-硝基胺、N-亚硝基胺、胺N-氧化物、二苯基膦酰胺(Dpp)、二甲基硫代膦酰胺(Mpt)、二苯基硫代膦酰胺(Ppt)、氨基磷酸二烷酯、氨基磷酸二苄酯、氨基磷酸二苯酯、苯亚磺酰胺、邻硝基苯亚磺酰胺(Nps)、2,4-二硝基苯亚磺酰胺、五氯苯亚磺酰胺、2-硝基-4-甲氧基苯亚磺酰胺、三苯基甲基亚磺酰胺、3-硝基吡啶亚磺酰胺(Npys)、对甲苯磺酰胺(Ts)、苯磺酰胺、2,3,6,-三甲基-4-甲氧基苯磺酰胺(Mtr)、2,4,6-三甲氧基苯磺酰胺(Mtb)、2,6-二甲基-4-甲氧基苯磺酰胺(Pme)、2,3,5,6-四甲基-4-甲氧基苯磺酰胺(Mte)、4-甲氧基苯磺酰胺(Mbs)、2,4,6-三甲基苯磺酰胺(Mts)、2,6-二甲氧基-4-甲基苯磺酰胺(iMds)、2,2,5,7,8-五甲基色满-6-磺酰胺(Pmc)、甲基磺酰胺(Ms)、 β -三甲基甲硅烷基乙基磺酰胺(SES)、9-蒽磺酰胺、4-(4',8'-二甲氧基萘基甲基)苯磺酰胺(DNMBS)、苄基磺酰胺、三氟甲基磺酰胺和苯甲酰甲基磺酰胺。

[0253] 适当保护的羧酸的实例包括但不限于甲硅烷基-、烷基-、烯基-、芳基-和芳烷基-保护的羧酸。合适的甲硅烷基的实例包括三甲基甲硅烷基、三乙基甲硅烷基、叔丁基二甲基甲硅烷基、叔丁基二苯基甲硅烷基、三异丙基甲硅烷基等。合适的烷基的实例包括甲基、苄基、对甲氧基苄基、3,4-二甲氧基苄基、三苯甲基、叔丁基、四氢吡喃-2-基。合适的烯基的实例包括烯丙基。合适的芳基的实例包括任选取代的苯基、联苯基或萘基。合适的芳烷基的实例包括任选取代的苄基(例如,对甲氧基苄基(MPM)、3,4-二甲氧基苄基、邻硝基苄基、对硝基苄基、对卤代苄基、2,6-二氯苄基、对氰基苄基)和2-和4-吡啶甲基。

[0254] 在第三方面,本发明提供了包含本发明的第一或第二方面中定义的肽的融合蛋白。

[0255] 在本发明中,术语“融合蛋白”是指将本发明的肽与本来属于其他单独蛋白质的一种或多种肽连接的蛋白质。

[0256] 在本发明的第一、第二或第三方面的一个实施方式中,任选地与上文或下文提供的任何实施方式组合,该肽或融合蛋白与例如标记物、药物、细胞渗透剂或聚乙二醇(PEG)的部分缀合。存在用于将该部分缀合至本发明的肽或融合蛋白的熟知的常规合成方案。

[0257] 在本发明的第一、第二或第三方面的另一个实施方式中,任选地与上文或下文提供的任何实施方式组合,该肽或融合蛋白与标记物缀合。在本发明的第一、第二或第三方面的另一个实施方式中,任选地与上文或下文提供的任何实施方式组合,该标记物缀合至肽或融合蛋白的N末端或C末端。

[0258] 如本文使用的,“标记物”是可以通过包括荧光、电导率、放射性、大小等的多种方

法检测的分子或化合物。标记物可能固有地能够发射信号,例如荧光标记物,其在被另一个较低特征波长的光激发后发射特定波长的光。可替换地,标记物可能不能固有地发射信号,但它可能能够被另一种发射信号的化合物结合。后一种情况的实例是例如生物素的标记物,生物素本身不发射信号,但当生物素与被标记的亲合素或链霉亲和素分子结合时可以被检测到。后一种标记物的其他实例是与特定受体特异性结合的配体。具有可检测标记物的受体允许与配体标记的单位特异性标志物结合,以便将这些标志物可视化。

[0259] 根据本发明可以使用的标记物包括但不限于电子自旋共振分子、荧光分子、化学发光分子、放射性同位素、酶底物、酶、生物素分子、亲和素分子、电荷转移分子、半导体纳米晶体、半导体纳米粒子、胶体金纳米晶体、配体、微珠、磁珠、顺磁分子、量子点、发色底物、亲和分子、蛋白质、肽、核酸、碳水化合物、半抗原、抗原、抗体、抗体片段和脂质。

[0260] 放射性同位素可以用胶片或电荷耦合装置(CCD)来检测,配体可以通过具有荧光、化学发光或酶标签的受体的结合来检测,并且微珠可以使用电子显微镜或原子力显微镜来检测。

[0261] 标记物与肽的缀合可以按照本领域技术人员熟知的常规方案来进行。

[0262] 在另一个实施方式中,任选地与上文或下文提供的任何实施方式组合,本发明的第一或第二方面的肽或本发明的第三方面的融合蛋白与药物缀合。在一个实施方式中,药物缀合至肽或蛋白质的N末端。

[0263] 在另一个实施方式中,任选地与上文或下文提供的任何实施方式组合,本发明的第一或第二方面的肽或本发明的第三方面的融合蛋白与PEG缀合。在一个实施方式中,PEG缀合至肽或蛋白质的N末端。

[0264] 本文中术语“PEG”与聚乙二醇和衍生物同义使用,该衍生物例如是具有一个甲氧基化末端的衍生物,例如甲氧基-聚乙二醇/聚乙二醇单甲醚。本领域技术人员已知这些化合物均可以用于药物的修饰并且在PEG链一端具有不同的端基,其中羟基可以用甲氧基修饰。此外,本领域技术人员已知,PEG的另一端需要用特定的“活化基团”修饰,以便将PEG特异性地偶联至肽。关于此类活化基团的概述记载在Zalipsky, Bioconjugate Chem. 1995, 6, 150-165中。用于缀合的PEG的分子量可以根据所得PEG缀合肽所需的持续功效程度进行适当改变。一种PEG分子的分子量为5至40kDa,例如10至30kDa或20至30kDa。用于缀合的PEG分子可以具有线性、支化或星形的形式。

[0265] 在本发明的第一或第二方面的另一个实施方式中,任选地与上文或下文提供的任何实施方式组合,该肽与细胞穿透肽缀合。

[0266] 在本发明中,术语“细胞穿透肽”(“CPP”)是指促进各种分子货物(从纳米大小的颗粒到小化学分子和大DNA片段)的细胞摄取的短肽。“货物(cargo)”通过共价键的化学键合或者通过非共价相互作用由C(t)端或N(t)端与肽缔合。CPP的功能是将货物递送到细胞中,这一过程通常通过内吞作用发生。目前的使用受限于CPP介导的货物递送缺乏细胞特异性以及对其摄取模式认识不足。CPP的氨基酸组成通常要么包含相对高丰度的带正电氨基酸(例如赖氨酸或精氨酸),要么具有包含极性/带电氨基酸和非极性疏水氨基酸的交替模式的序列。这两种类型的结构分别被称为聚阳离子型或两亲型。第三类CPP是疏水性肽,仅含有非极性残基,具有低净电荷或具有对细胞摄取关键的疏水氨基酸基团。CPP与本发明提供的肽的缀合可以按照熟知的常规方案进行,例如固相合成或溶液选择性封端(查阅

Copolovici D.M等人,“细胞穿透肽:设计、合成和应用(Cell-Penetrating Peptides: Design, Synthesis, and Applications)”,2014,ACS Nano,2014,8(3),第1972-1994页)。在本发明的第一方面的另一个实施方式中,任选地与上文或下文提供的任何实施方式组合,细胞穿透肽是聚阳离子CPP、聚Arg、或可替换地是细胞穿膜肽(penetratine)。

[0267] 在第四方面,本发明提供了药物组合物。

[0268] 如本文所用的,表述“治疗有效量”是指当施用该化合物传递至血流并且足以预防待解决疾病的一种或多种症状的发展或在一定程度上加以减轻的化合物(即肽或其药学上可接受的盐)的量。根据本发明施用的肽的具体剂量当然将由围绕该病例的具体情况确定,这些情况包括施用的化合物、施用途、所治疗的具体病症和类似的考虑因素。

[0269] 术语“药学上可接受的”是指适用于制备具有医学用途的组合物的制药技术中的赋形剂或载体。

[0270] 表述“赋形剂和/或载体”是指可接受的材料、组成或溶媒。每种组分在与组合物的其他成分相容的意义上必须是药学上可接受的。它还必须适合于与人和非人动物的组织或器官接触,而不会产生过度毒性、刺激性、过敏反应、免疫原性或其他问题或并发症,并具有合理的效益/风险比。合适的可接受的赋形剂的实例是溶剂、分散介质、稀释剂或其他液体溶媒、分散助剂或悬浮助剂、表面活性剂、等渗剂、增稠剂或乳化剂、防腐剂、固体粘合剂、润滑剂等。除非任何常规的赋形剂介质与物质或其衍生物不相容,例如通过产生任何不期望的生物学效应或以有害方式与药物组合物的任何其他组分相互作用而不相容,否则其使用预期是在本发明的范围内。

[0271] 本文所述的药物组合物的制剂可以通过药理学领域已知的或以后开发的任何方法来制备。一般而言,此类制备方法包括将活性成分(肽)与赋形剂和/或一种或多种其他辅助成分结合的步骤,然后如果需要和/或期望的话,将产品成型和/或包装成所需的单剂量单位或多剂量单位。

[0272] 本发明的药物组合物可以作为单一单位剂量和/或作为多个单一单位剂量以批量进行制备、包装和/或销售。如本文所用,“单位剂量”是包含预定量的活性成分的药物组合物的离散量。

[0273] 本发明的组合物中的活性成分(即,如任一前述方面和实施方式中定义的肽)、可接受的赋形剂和/或任何附加成分的相对量将根据所治疗的对象的身份、体重和/或病况并进一步根据组合物的施用途进行改变。

[0274] 用于制造这些组合物的可接受的赋形剂包括但不限于惰性稀释剂、分散剂和/或造粒剂、表面活性剂和/或乳化剂、崩解剂、粘合剂、防腐剂、缓冲剂、润滑剂和/或油。此类赋形剂可以任选地包含在本发明的制剂中。根据配制者的判断,组合物中可以存在例如可可脂和栓剂蜡、着色剂、包衣剂、甜味剂、调味剂和芳香剂的赋形剂。

[0275] 示例性稀释剂包括但不限于碳酸钙、碳酸钠、磷酸钙、磷酸二钙、硫酸钙、磷酸氢钙、磷酸钠、乳糖、蔗糖、纤维素、微晶纤维素、高岭土、甘露醇、山梨醇、肌醇、氯化钠、干淀粉、玉米淀粉、糖粉及其组合。

[0276] 示例性的造粒剂和/或分散剂包括但不限于马铃薯淀粉、玉米淀粉、木薯淀粉、羟甲基淀粉钠、粘土、海藻酸、瓜尔胶、柑橘渣、琼脂、膨润土、纤维素和木制品、天然海绵、阳离子交换树脂、碳酸钙、硅酸盐、碳酸钠、交联聚乙烯吡咯烷酮(交联聚维酮)、羧甲基淀粉钠

(羟基乙酸淀粉钠)、羧甲基纤维素、交联羧甲基纤维素钠(交联羧甲基纤维素)、甲基纤维素、预胶化淀粉(淀粉1500)、微晶淀粉、水不溶性淀粉、羧甲基纤维素钙、硅酸镁铝(Veegum)、十二烷基硫酸钠、季铵化合物及其组合。

[0277] 示例性表面活性剂和/或乳化剂包括但不限于天然乳化剂(例如,阿拉伯胶、琼脂、海藻酸、海藻酸钠、黄芪胶、角叉菜(chondrux)、胆固醇、黄原胶、果胶、明胶、蛋黄、酪蛋白、羊毛脂、胆固醇、蜡和卵磷脂)、胶质粘土(例如,膨润土[硅酸铝]和Veegum[硅酸镁铝])、长链氨基酸衍生物、高分子量醇(例如,硬脂醇、十六醇、油醇、单硬脂酸三醋精、乙二醇二硬脂酸酯、单硬脂酸甘油酯以及丙二醇单硬脂酸酯、聚乙烯醇)、卡波姆(例如,聚羧乙烯、聚丙烯酸、丙烯酸聚合物和羧基乙烯基聚合物)、角叉菜胶、纤维素衍生物(例如,羧甲基纤维素钠、粉状纤维素、羟甲基纤维素、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、甲基纤维素)、山梨醇酐脂肪酸酯{例如,聚氧乙烯山梨醇酐单月桂酸酯[Tween 20]、聚氧乙烯山梨醇酐[Tween 60]、聚氧乙烯山梨醇酐单油酸酯[Tween 80]、山梨醇酐单棕榈酸酯[Span40]、山梨醇酐单硬脂酸酯[Span 60]、山梨醇酐三硬脂酸酯[Span 65]、甘油单油酸酯、山梨醇酐单油酸酯[Span 80]}、聚氧乙烯酯(例如,聚氧乙烯单硬脂酸酯[Myrj 45]、聚氧乙烯氢化蓖麻油、聚乙氧基蓖麻油、聚甲醛硬脂酸酯和Solutol)、蔗糖脂肪酸酯、聚乙二醇脂肪酸酯(例如, Cremophor)、聚氧乙烯醚(例如,聚氧乙烯月桂基醚[Brij 30])、聚(乙烯基-吡咯烷酮)、二甘醇单月桂酸酯、三乙醇胺油酸酯、油酸钠、油酸钾、油酸乙酯、油酸、月桂酸乙酯、月桂基硫酸钠、Pluronic F 68、Poloxamer 188、西曲溴铵、西吡氯铵、苯扎氯铵、多库酯钠等和/或其组合。

[0278] 示例性粘合剂包括但不限于淀粉(例如,玉米淀粉和淀粉糊);明胶;糖(例如,蔗糖、葡萄糖、右旋糖、糊精、糖蜜、乳糖、乳糖醇、甘露醇);天然和合成树胶(例如,阿拉伯树胶、海藻酸钠、爱尔兰苔藓提取物、panwar树胶、印度树胶(ghatti gum)、isapol壳的粘液、羧甲基纤维素、甲基纤维素、乙基纤维素、羟乙基纤维素、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、微晶纤维素、醋酸纤维素、聚乙烯吡咯烷酮)、硅酸铝镁(Veegum)和落叶松阿拉伯半乳聚糖);海藻酸盐;聚氧化乙烯;聚乙二醇;无机钙盐;硅酸;聚甲基丙烯酸酯;蜡;水;醇;及其组合。

[0279] 示例性防腐剂可以包括抗氧化剂、螯合剂、抗微生物防腐剂、抗真菌防腐剂、醇防腐剂、酸性防腐剂和其他防腐剂。示例性抗氧化剂包括但不限于 α 生育酚、抗坏血酸、抗坏血酸棕榈酸酯、丁基化羟基茴香醚、丁基化羟基甲苯、单硫代甘油、焦亚硫酸钾、丙酸、没食子酸丙酯、抗坏血酸钠、亚硫酸氢钠、焦亚硫酸钠和亚硫酸钠。示例性螯合剂包括乙二胺四乙酸(EDTA)、柠檬酸一水合物、乙二胺四乙酸二钠、乙二胺四乙酸二钾、乙二胺四乙酸、富马酸、苹果酸、磷酸、乙二胺四乙酸钠、酒石酸和乙二胺四乙酸三钠。示例性抗微生物防腐剂包括但不限于苯扎氯铵、苄索氯铵、苯甲醇、溴硝醇、西曲溴铵、西吡氯铵、氯己定、氯丁醇、氯甲酚、氯二甲苯酚、甲酚、乙醇、甘油、海克替啶、咪脲、苯酚、苯氧乙醇、苯乙醇、硝酸苯汞、丙二醇和硫柳汞。示例性抗真菌防腐剂包括但不限于对羟基苯甲酸丁酯、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸乙酯、对羟基苯甲酸丙酯、苯甲酸、羟基苯甲酸、苯甲酸钾、山梨酸钾、苯甲酸钠、丙酸钠和山梨酸。示例性醇防腐剂包括但不限于乙醇、聚乙二醇、苯酚、酚类化合物、双酚、氯代丁醇、羟基苯甲酸酯和苯乙醇。示例性酸性防腐剂包括但不限于维生素A、维生素C、维生素E、 β -胡萝卜素、柠檬酸、乙酸、脱氢乙酸、抗坏血酸、山梨酸和植酸。其他防腐剂包括

但不限于生育酚、生育酚乙酸酯、去氧肟甲磺酸盐(deteroxime mesylate)、西曲溴铵、丁基化羟基茴香醚(BHA)、丁基化羟基甲苯(BHT)、乙二胺、十二烷基硫酸钠(SLS)、十二烷基醚硫酸钠(SLES)、亚硫酸氢钠、焦亚硫酸钠、亚硫酸钾、焦亚硫酸钾、Glydant Plus、Phenonip、对羟基苯甲酸甲酯、Germall 115、Germaben II、尼奥龙(Neolone)、凯松(Kathon)和Euxyl。在某些实施方式中,防腐剂是抗氧化剂。在其他实施方式中,防腐剂是螯合剂。

[0280] 示例性缓冲剂包括但不限于柠檬酸盐缓冲溶液、乙酸盐缓冲溶液、磷酸盐缓冲溶液、氯化铵、碳酸钙、氯化钙、柠檬酸钙、葡乳醛酸钙、葡庚糖酸钙、葡萄糖酸钙、D-葡萄糖酸、甘油磷酸钙、乳酸钙、丙酸、乙酰丙酸钙、戊酸、磷酸氢钙、磷酸、磷酸三钙、羟基磷灰石、乙酸钾、氯化钾、葡萄糖酸钾、钾混合物、磷酸氢二钾、磷酸二氢钾、磷酸钾混合物、乙酸钠、碳酸氢钠、氯化钠、柠檬酸钠、乳酸钠、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、磷酸钠混合物、氨丁三醇、氢氧化镁、氢氧化铝、海藻酸、无热原水、等渗盐水、林格氏溶液、乙醇及其组合。

[0281] 示例性润滑剂包括但不限于硬脂酸镁、硬脂酸钙、硬脂酸、二氧化硅、滑石、麦芽、山嵛酸甘油酯、氢化植物油、聚乙二醇、苯甲酸钠、乙酸钠、氯化钠、亮氨酸、十二烷基硫酸镁、十二烷基硫酸钠及其组合。

[0282] 示例性油包括但不限于扁桃仁油、杏仁油、鳄梨油、巴巴苏油、香柠檬(bergamot)油、黑加仑籽油、琉璃苣油、杜松油、甘菊油、芥花籽(Canola)油、葛缕子油、巴西棕榈油、蓖麻油、肉桂油、可可脂、椰子油、鳕鱼肝油、咖啡油、玉米油、棉籽油、鹌鹑油、桉树油、月见草油、鱼油、亚麻籽油、香叶醇、葫芦油、葡萄籽油、榛子油、牛膝草油、肉豆蔻酸异丙酯、荷荷巴油、库奎果(kukui nut)油、杂薰衣草(lavandin)油、薰衣草(lavender)油、柠檬油、山苍子油、澳洲坚果(macademia nut)油、锦葵油、芒果籽油、白芒花籽(meadowfoam seed)油、貂油、肉豆蔻油、橄榄油、橙子油、橙连鳍鲑(Orange Roughy)油、棕榈油、棕榈仁油、桃仁油、花生油、罂粟籽油、南瓜籽油、油菜籽油、米糠油、迷迭香油、红花油、檀香油、茶花油(sasquana)、香薄荷油、沙棘油、芝麻油、乳木果油、硅树脂油、大豆油、向日葵油、茶树油、蓟油、山茶花油、香根草油、核桃油和麦胚油。示例性油包括但不限于硬脂酸丁酯、辛酸甘油三酯、癸酸甘油三酯、环聚二甲基硅氧烷、癸二酸二乙酯、聚二甲基硅氧烷360、肉豆蔻酸异丙酯、矿物油、辛基十二烷醇、油醇、硅油及其组合。

[0283] 用于肠胃外施用的液体剂型包括但不限于药学上可接受的脂质体乳液、微乳液、溶液、悬浮液、糖浆剂和酞剂。除了活性成分之外,所述液体剂型可以包含本领域常用的惰性稀释剂,例如像,水或其他溶剂、增溶剂以及乳化剂,例如乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苯甲醇、苯甲酸苄酯、丙二醇、1,3-丁二醇、二甲基甲酰胺、油(具体地,棉籽油、花生油、玉米油、胚芽油、橄榄油、蓖麻油以及芝麻油)、甘油、四氢糠醇、聚乙二醇以及脱水山梨醇的脂肪酸酯及其混合物。在肠胃外施用的某些实施方式中,本发明的缀合物与增溶剂(例如,聚乙氧基蓖麻油(例如CREMOPHORTM)、醇类、油类、改性油类、二醇类、聚山梨醇酯、环糊精、聚合物及其组合)混合。

[0284] 可注射制剂(例如,水性或油性无菌可注射悬浮液)可以根据已知技术使用合适的分散剂或湿润剂和悬浮剂来配制。无菌可注射制剂可以是在非毒性的、肠胃外可接受的稀释剂或溶剂中的无菌可注射的溶液、悬浮液或乳液,例如作为在1,3-丁二醇中的溶液。可以采用的可接受的溶媒和溶剂是水、林格氏溶液、U.S.P.以及等渗氯化钠溶液。此外,常规地采用无菌的固定油作为溶剂或悬浮介质。为此目的,可以采用任何温和的固定油,包括合成

的甘油单酯或甘油二酯。此外,将脂肪酸(例如,油酸)用于制备注射剂。可替代地,制剂可以是脂质体的形式。

[0285] 可以将可注射配制品灭菌,例如,通过细菌截留过滤器过滤,或通过掺入无菌固体组合物形式的灭菌剂,该灭菌剂在使用前可以溶解或分散在无菌水或其他无菌可注射介质中。

[0286] 为了延长药物的作用,经常希望减缓皮下注射或肌肉内注射的药物的吸收。这可以通过使用水溶性差的结晶或无定形材料的液体悬浮液来实现。药物的吸收速率则取决于其溶解速率,而溶解速率又可以取决于晶体大小和晶形。可替换地,通过将药物溶解或悬浮于油溶媒中来完成肠胃外施用的药物形式的延迟吸收。

[0287] 如上所述,本发明的肽可以是具有一种或多种赋形剂的微囊密封形式。在一个实施方式中,本发明的肽配制在脂质体中。

[0288] 应理解,本发明的肽和药物组合物可以用于组合疗法。在组合方案中使用的疗法(治疗方法或程序)的特定组合将考虑所需治疗方法和/或程序的兼容性以及要实现的所需治疗效果。应理解,所采用的疗法可以实现对相同目的的所需效果,或者它们可以实现不同的效果(例如,控制任何副作用)。

[0289] 本发明的药物组合物可以单独施用或者与一种或多种其他治疗剂组合施用。“与……组合”并不旨在暗示该药剂必须同时施用和/或一起配制用于递送,但是这些递送方法在本发明的范围内。该组合物可以与一种或多种其他所需的疗法或医疗程序同时施用、在其之前施用、或在其之后施用。通常,每种药剂将以针对该药剂确定的剂量和/或时间表来施用。另外,本发明包括肽或药物组合物与可以提高其生物利用度、减少和/或改变其代谢、抑制其排泄和/或改变其在体内分布的药剂组合的递送。

[0290] 在组合方案中采用的疗法特定组合将考虑所需治疗方法和/或程序的兼容性以及要实现的所需治疗效果。应理解,所采用的疗法可以实现对相同病症的所需效果(例如,本发明的肽可以与用于治疗相同病症的另一种生物活性剂同时施用),和/或它们可以实现不同的效果(例如,控制任何副作用)。将进一步理解的是,用于这种组合的生物活性剂可以在单一组合物中一起施用,或者在不同组合物中分别施用。

[0291] 表述“与……组合”还包括(通过化学-物理相互作用)将本发明的肽与上文和下文提到的任何其他药剂缀合的可能性,该药剂可以是治疗剂或用于改善肽特性(例如,生物利用度)的药剂等。

[0292] 在第六方面和第七方面,本发明提供了用于预防或治疗分别由VEGF表达失调和血管生成失调引起的疾病的本发明的第一方面和第二方面的肽、第三方面的融合蛋白或本发明的第四方面的药物组合物。该方面可以可替换地制定为预防或治疗由VEGF表达失调或血管生成失调引起的疾病的方法,该方法包括向有此需要的对象施用治疗有效量的本发明第一方面或第二方面定义的肽或其药用盐、或本发明第三方面定义的融合蛋白或本发明第四方面定义的药物组合物的步骤。该方面可以可替换地制定为本发明第一方面或第二方面定义的肽或其药用盐、或本发明第三方面定义的融合蛋白或本发明第四方面定义的的药物组合物在制备用于治疗或预防由VEGF表达失调或血管生成失调引起的疾病的药物中的用途。术语“VEGF表达水平”是指VEGF蛋白或mRNA的水平。在本发明的一个实施方式中,本发明的肽促进VEGF mRNA的调节。在本发明的另一个实施方式中,本发明的肽促进VEGF蛋白的调节。

存在用于在蛋白质或mRNA水平上测定VEGF的量的商业试剂盒。

[0293] 在本发明的上下文中,血管生成失调是由于VEGF表达水平的改变。因此,存在血管生成失调是由于VEGF表达增加所导致的疾病。在这种情况下,本发明的第一方面的包含双自由基“L”的肽可以是有用的,因为该肽能够减少VEGF表达(参见下面提供的数据)。因此,在本发明的第六方面和第七方面的一个实施方式中,该肽是根据第一方面的肽并包含如上文提供的任何实施方式中定义的接头双自由基“L”,并且该肽用于治疗或预防由VEGF水平增加引起的疾病。由VEGF水平增加引起的疾病的说明性非限制性实例是失明病症,例如糖尿病视网膜病变、年龄相关性黄斑变性(AMD)、青光眼、银屑病、慢性阻塞性肺病和癌症等(Cameli et P.2003)。

[0294] 本发明的第六方面和第七方面的优选实施方式涉及用于预防或治疗癌症的本发明的第一方面和第二方面的肽、第三方面的融合蛋白或本发明的第四方面的药物组合物,其中该肽是根据第一方面的肽并包含如上文提供的任何实施方式中定义的接头双自由基“L”。本发明的第六方面和第七方面的相关实施方式涉及治疗或预防癌症的方法,该方法包括向有此需要的对象施用治疗有效量的本发明的第一方面和第二方面的肽、第三方面的融合蛋白或本发明的第四方面的药物组合物,其中该肽是根据第一方面的肽并包含如上文提供的任何实施方式中定义的接头双自由基“L”。本发明的第六方面和第七方面的进一步相关实施方式涉及本发明的第一方面和第二方面的肽、第三方面的融合蛋白或本发明的第四方面的药物组合物在制备用于预防或治疗癌症的药物中的用途,其中该肽是根据第一方面的肽并包含如上文提供的任何实施方式中定义的接头双自由基“L”。

[0295] 如本文使用的术语“癌症”包括癌、淋巴瘤、母细胞瘤、肉瘤、骨髓瘤(例如,多发性骨髓瘤)和白血病(例如,急性髓性白血病)。此类癌症的更具体实例包括乳腺癌、鳞状细胞癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺腺癌、肺鳞状细胞癌、腹膜癌、肝细胞癌、胃肠道癌、胰腺癌、胶质母细胞瘤、宫颈癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、肝细胞癌、结肠癌、结肠直肠癌、子宫内膜癌或子宫癌、唾液腺癌、肾脏癌症、肝脏癌症、前列腺癌、肾癌、外阴癌、甲状腺癌、肝癌、胃癌、黑色素瘤和各种类型的头颈癌。

[0296] 在更具体的实施方式中,本发明的第一方面和第二方面的肽、第三方面的融合蛋白或本发明的第四方面的药物组合物与一种或多种抗癌剂组合用于治疗或预防癌症,其中该肽是根据第一方面的肽并包含如上文提供的任何实施方式中定义的接头双自由基“L”。

[0297] 术语抗癌剂可以包括但不限于化疗剂、生长抑制剂、细胞毒性剂、抗激素剂、用于放射疗法的药剂、抗血管生成剂、细胞凋亡剂、抗微管蛋白剂等,以及它们的任何组合。所述抗癌剂可以在施用本文所述的环肽、融合蛋白或药物组合物之前、同时或之后施用。两种或更多种药物可以形成同一组合物的一部分或者提供为分开的组合物以在同时或不同时间施用。

[0298] 在其他具体实施方式中,本发明的第一方面和第二方面的肽、第三方面的融合蛋白或本发明的第四方面的药物组合物与例如抗VEGF治疗或光动力疗法(PDT)的一种或多种标准护理药剂组合用于治疗或预防失明病症,例如糖尿病视网膜病变、年龄相关性黄斑变性(AMD)或青光眼,其中该肽是根据第一方面的肽并包含如上文提供的任何实施方式中定义的接头双自由基“L”。

[0299] 在又一些具体实施方式中,本发明的第一方面和第二方面的肽、第三方面的融合

蛋白或本发明的第四方面的药物组合物与一种或多种标准护理药剂(例如,皮质类固醇或其他免疫系统调节剂)组合用于治疗或预防银屑病,其中该肽是根据第一方面的肽并包含如上文提供的任何实施方式中定义的接头双自由基“L”。

[0300] 在又一些具体实施方式中,本发明的第一方面和第二方面的肽、第三方面的融合蛋白或本发明的第四方面的药物组合物与一种或多种标准护理药剂(例如,支气管扩张剂或皮质类固醇)组合用于治疗或预防慢性阻塞性肺病,其中该肽是根据第一方面的肽并包含如上文提供的任何实施方式中定义的接头双自由基“L”。

[0301] 在其他情况下,血管生成失调是由于VEGF表达减少导致的。因此,在本发明的第六方面和第七方面的可替换性实施方式中,该肽是本发明的第一方面提供的线性肽或本发明的第二方面提供的任何肽,并且用于治疗或预防由VEGF水平降低引起的疾病。在本发明的第六方面和第七方面的另一个实施方式中,本发明提供了用于治疗或预防由VEGF水平降低引起的疾病的方法,该方法包括向有此需要的对象施用治疗有效量的本发明的第一方面和第二方面的肽、第三方面的融合蛋白或本发明的第四方面的药物组合物,其中该肽是本发明的第一方面提供的线性肽或本发明的第二方面提供的任何肽。在另一个相关的实施方式中,本发明涉及至有此需要的对象的本发明的第一方面和第二方面的肽、第三方面的融合蛋白或本发明的第四方面的药物组合物在制备用于治疗或预防由VEGF水平降低引起的疾病的药物中的用途,其中该肽是本发明的第一方面提供的线性肽或本发明的第二方面提供的任何肽。

[0302] 本发明的第一方面提供的线性肽或本发明的第二方面提供的任何肽将使低VEGF水平增加,刺激VEGF产生(数据也在下文提供)。与降低的血管生成和VEGF表达水平相关的疾病的说明性非限制性实例是肺纤维化、缺血性组织损伤、胃溃疡、肾病、骨质流失、运动神经元变性、慢性伤口、皮肤血管脆性等(Manish B.等人,2010)。

[0303] 在整个说明书和权利要求书中,词语“包括”以及该词语的变体并不旨在排除其他技术特征、添加剂、组分或步骤。此外,词语“包括”涵盖“由……组成”的情况。本领域技术人员在阅读说明书后将清楚本发明的其他目的、优点和特征,或者可以通过本发明的实践来了解本发明的其他目的、优点和特征。通过举例说明的方式提供了以下实施例,并且这些实施例不旨在限制本发明。此外,本发明涵盖本文描述的特定和优选实施方式的所有可能的组合。

[0304] 实施例

[0305] 实施例1:在缺氧诱导条件下本发明的肽对人视网膜色素上皮(RPE)细胞系、人角质形成细胞系和人乳腺癌细胞系中的VEGF的调节。

[0306] 1. 材料和方法

[0307] 合成的一般程序

[0308] 购买如下材料:Fmoc保护的 α -氨基酸(---);Rinkamide MBHA树脂(天津南开和成科技有限公司);HBTU((2-(1H-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脒鎓六氟磷酸盐),GLBiochem);N-甲基吗啉(国药集团化学试剂有限公司);琥珀酸酐(Aladdin);乙腈(兴科化工);茚三酮(国药集团化学试剂有限公司);哌啶(Vertellus);二甲基甲酰胺、DMF(浙江江山化工有限公司);三氟乙酸,TFA(三氟乙酸,Solvay),TIS(茴香硫醚,Solvay)。

[0309] 简而言之,线性多肽是以Rink酰胺MBHA树脂为载体,使用基于Fmoc的SPPS(固相肽

合成)人工合成的。

[0310] 使用了以下方案:

[0311] 1.用20%哌啶的DMF溶液去除Fmoc保护基团。

[0312] 2.用DMF洗涤树脂五次。

[0313] 3.随后使用Fmoc-AA(3当量)、HBTU(3当量)和N-甲基吗啉(6当量)将Fmoc保护的氨基酸偶联45min。

[0314] 4.用DMF洗涤树脂五次。通过茚三酮测试检查偶联。

[0315] 5.从步骤1开始重复。

[0316] 6.通过与琥珀酸酐(10当量)和N-甲基吗啉(10当量)反应将N末端封端。

[0317] 通过暴露于溶液F(95%TFA,2.5%水,2.5%TIS)将肽从树脂上切割下来并去保护,并且冻干。

[0318] 使用C18柱通过反相HPLC纯化冻干肽(详情参见化合物表征)。通过LC-MS-ESI对肽进行鉴定。所有化合物的所有质谱数据在下表1中示出。

[0319] 购买如下的材料:Fmoc保护的 α -氨基酸(包括烯属氨基酸Fmoc-[(S)-2-(4戊烯基)丙氨酸]OH、Fmoc-[(R)-2-(4戊烯基)丙氨酸]OH、Fmoc-[(S)-2-(7辛烯基)丙氨酸]OH、Fmoc-[(R)-2-(4戊烯基)丙氨酸]OH、2-(6-氯-1-H-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基铵六氟磷酸盐(TBTU)、树脂、二甲基甲酰胺(DMF)、N,N-二异丙基乙胺(DIEA)、三氟乙酸(TFA)、1,2-二氯乙烷(DCE)、格拉布Ru(IV)催化剂和哌啶购自不同供应商。

[0320] 简而言之,线性多肽是使用Fmoc固相肽化学用自动合成器合成的。仅在从反应器容器中取出树脂后人工进行与烯属氨基酸的偶联,如前一节所公开。

[0321] 在从树脂上切割线性肽后,在含有第一代格拉布催化剂的溶液中进行关环复分解反应,如Scott J.M.及其同事所公开(Scott J.M.等人,“Application of Ring-Closing Metathesis to the Synthesis of Rigidified Amino Acids and Peptides”,1996, J. Am. Chem. Soc., 1996, 118(40), 第9606-9614页)。

[0322] 将去保护的肽用甲基叔丁基醚在4℃下沉淀并冻干。

[0323] 使用Agilent ZORBAX 300SB-C18 5 μ m柱通过反相HPLC纯化冻干肽(详情参见化合物表征)。通过LC-MS-ESI对肽进行鉴定。所有化合物的所有质谱数据在下表1中示出。

[0324] HPLC条件:

[0325] SEQ ID NO:13.通过HPLC-RP(C-18柱;泵A:含0.1%TFA的100%H₂O;泵B:含0.1%TFA的80%乙腈),使用29%-39%B的线性梯度,在20分钟内纯化化合物(R.T.=10.2)。通过HPLC测定的纯度级别为95.16%;

[0326] SEQ ID NO:14.通过HPLC-RP(C-18柱;泵A:含0.1%TFA的100%H₂O;泵B:含0.1%TFA的80%乙腈),使用40%-50%B的线性梯度,在20分钟内纯化化合物(R.T.=6.5-7.8)。通过HPLC测定的纯度级别>95%;

[0327] SEQ ID NO:15.通过HPLC-RP(C-18柱;泵A:含0.1%TFA的100%H₂O;泵B:含0.1%TFA的80%乙腈),使用36%-46%B的线性梯度,在20分钟内纯化化合物(R.T.=9.2-10.3)。通过HPLC测定的纯度级别>95%;

[0328] SEQ ID NO:16.通过HPLC-RP(C-18柱;泵A:含0.1%TFA的100%H₂O;泵B:含0.1%TFA的80%乙腈),使用50%-60%B的线性梯度,在20分钟内纯化化合物(R.T.=10.3-

10.9)。通过HPLC测定的纯度级别>95%；

[0329] SEQ ID NO:17.通过HPLC-RP(C-18柱；泵A:含0.1%TFA的100%H₂O；泵B:含0.1%TFA的80%乙腈)，使用35%-55%B的线性梯度，在20分钟内纯化化合物(R.T.=12.5-13.1)。通过HPLC测定的纯度级别>95%；

[0330] SEQ ID NO:18.通过HPLC-RP(C-18柱；泵A:含0.1%TFA的100%H₂O；泵B:含0.1%TFA的80%乙腈)，使用55%-75%B的线性梯度，在20分钟内纯化化合物(R.T.=8.5-9.3)。通过HPLC测定的纯度级别>95%；

[0331] SEQ ID NO:19.通过HPLC-RP(C-18柱；泵A:含0.1%TFA的100%H₂O；泵B:含0.1%TFA的80%乙腈)，使用36%-46%B的线性梯度，在20分钟内纯化化合物(R.T.=9.9-10.4)。通过HPLC测定的纯度级别>95%；

[0332] SEQ ID NO:20.通过HPLC-RP(-18柱；泵A:含0.1%TFA的100%H₂O；泵B:含0.1%TFA的80%乙腈)，使用35%-45%B的线性梯度，在20分钟内纯化化合物(R.T.=9.8-10.4)。通过HPLC测定的纯度级别>95%；

[0333] SEQ ID NO:21.通过HPLC-RP(-18柱；泵A:含0.1%TFA的100%H₂O；泵B:含0.1%TFA的80%乙腈)，使用45%-55%B的线性梯度，在20分钟内纯化化合物(R.T.=13.2-14.4)。通过HPLC测定的纯度级别为95.7%；

[0334] SEQ ID NO:29.通过HPLC-RP(C-18柱；泵A:含0.1%TFA的100%H₂O；泵B:含0.1%TFA的80%乙腈)，使用38%-48%B的线性梯度，在20分钟内纯化化合物(R.T.=8.9-9.3)。通过HPLC测定的纯度级别为95.13%；

[0335] SEQ ID NO:30.通过HPLC-RP(C-18柱；泵A:含0.1%TFA的100%H₂O；泵B:含0.1%TFA的80%乙腈)，使用36%-46%B的线性梯度，在20分钟内纯化化合物(R.T.=12.4)。通过HPLC测定的纯度级别为95.13%；

[0336] SEQ ID NO:31.通过HPLC-RP(C-18柱；泵A:含0.1%TFA的100%H₂O；泵B:含0.1%TFA的80%乙腈)，使用28%-48%B的线性梯度，在20分钟内纯化化合物(R.T.=9.9-10.2)。通过HPLC测定的纯度级别为95.13%；

[0337] SEQ ID NO:36.通过HPLC-RP(C-18柱；泵B:含0.1%TFA的100%H₂O；泵A:含0.1%TFA的100%乙腈)，使用23%-48%A的线性梯度，在25分钟内纯化化合物(R.T.=11.2)。通过HPLC测定的纯度级别为96.65%；

[0338] SEQ ID NO:37.通过HPLC-RP(C-18柱；泵B:含0.1%TFA的100%H₂O；泵A:含0.1%TFA的100%乙腈)，使用24%-49%A的线性梯度，在25分钟内纯化化合物(R.T.=9.54)。通过HPLC测定的纯度级别为96.42%。

[0339] 表1:质量表征

[0340]	SEQ ID NO:		MW (1H)	质量(2H)
	13	计算值	2148.7	1075.3

[0341]

	实测值		1075.3
14	计算值	1910.5	956.2
	实测值		956.1
15	计算值	1840.3	921.1
	实测值		921.0
16	计算值	1772.2	887.1
	实测值		887.0
17	计算值	1773.81	887.9
	实测值		887.7
18	计算值	1827.3	914.7
	实测值		914.6
19	计算值	2266.9	1134.4
	实测值		1134.3
20	计算值	2196.7	1099.3
	实测值		1099.3
21	计算值	2128.7	1065.3
	实测值		1065.2
29	计算值	2255.3	1128.7
	实测值		1128.8
30	计算值	2186,47	1094.2
	实测值		1094.3
31	计算值	2130,49	1066.2
	实测值		1066.2
36	计算值	1792.24	897.1
	实测值		896.9
37	计算值	1636.05	819.02
	实测值		819.2

[0342] 细胞系、细胞培养和缺氧诱导条件

[0343] MDA-MB-231人乳腺癌细胞系、HaCat永生化人角质形成细胞系和ARPE-19人视网膜色素上皮(RPE)细胞系购自美国典型培养物保藏中心(ATCC,马纳萨斯,弗吉尼亚州,美国)。根据ATCC指南,使用基因型分析对人细胞进行常规验证。使ARPE-19细胞在含有HEPES并补充有10%胎牛血清和抗生素的DMEM/F12培养基中维持。使MDA-MB-231和HaCaT在含有4.5g/L葡萄糖、谷氨酰胺和丙酮酸2mM并补充有10%胎牛血清和抗生素的DMEM培养基中维持。

[0344] 在用CoCl₂处理的测定细胞中有效地诱导了缺氧。在水中制备了新鲜储备液(0.4M CoCl₂)并将其添加到培养基中以获得用于MDA-MB-231细胞的浓度50μM、用于HaCaT细胞的浓度200μM和用于ARPE-19细胞的浓度300μM。将细胞与相应CoCl₂浓度一起孵育24小时以模拟缺氧条件。

[0345] VEGF测定

[0346] 按照制造商的说明,通过VEGF-ELISA(Abcam;ab100662;剑桥,英国)测量培养细胞上清液中的VEGF含量。ELISA的检测范围在8.23pg/ml至6,000pg/ml之间。ELISA可检测人

VEGF-A的所有同种型。在常氧和缺氧条件下对未处理细胞进行测定,以确定并计算24小时时缺氧下VEGF量与常氧下VEGF量的比率,结果是对于每种测试的细胞系 >1 。在存在本发明的肽下使用相同的程序。

[0347] 实时定量RT-PCR

[0348] 使用Nzy总RNA分离试剂盒(Nzytech,里斯本,葡萄牙)提取指定细胞的RNA,并使用Nzy第一链cDNA合成试剂盒(Nzytech)制备cDNA。引物使用Primer Blast软件(NCBI)设计并从Thermo-Fisher获得。使用SYBR Green Master Mix(Applied Biosystems)通过qRT-PCR(QuantStudio 5实时PCR系统,Applied Biosystems,福斯特城,加州,美国)来评估mRNA表达水平,并相对于 β -肌动蛋白归一化。本研究中使用以下引物: β -肌动蛋白(正向:5'-AGA AAA TCT GGC ACC ACA CC-3'(SEQ ID NO:32);反向:5'-GGG GTG TTG AAG GTC TCA AA-3'(SEQ ID NO:33));VGFA(正向:5'-TAC TGC CAT CCA ATC GAG AC-3'(SEQ ID NO:34);反向:5'-GCA TGG TGA TGT TGG ACT-3'(SEQ ID NO:35))。

[0349] 统计学分析

[0350] 将RT-PCR实验重复至少两次。对于VEGF测定,计算以一式三份进行的三次测定的平均值 $\pm$ 标准差。统计学显著性是在Microsoft Windows 6.0版SPSS统计软件(Professional Statistic,芝加哥,伊利诺伊州,美国)中使用曼-惠特尼检验对平均值进行比较来确定的。使用双侧非配对的学生t检验进行个体比较。所有比较的显著性标准为 $P < 0.05$ 。

[0351] 2. 结果

[0352] 本研究的目的是确定在缺氧诱导条件下肽对ARPE-19细胞系中的VEGF的调节作用。计算缺氧下与常氧下未处理细胞中的VEGF蛋白(使用ELISA试剂盒),并设置活性阈值。然后,用溶解在细胞培养基中的20 μ M的本发明相应肽的溶液单独地(常氧条件)或在 CoCl_2 存在下(缺氧条件)处理细胞,并计算VEGF蛋白量的比率。将显示出 $\text{VEGF}_{\text{缺氧}}/\text{VEGF}_{\text{常氧}}$ 比率高于未处理细胞中的比率的肽认为是VEGF蛋白的诱导剂,而提供 $\text{VEGF}_{\text{缺氧}}/\text{VEGF}_{\text{常氧}}$ 比率低于未处理细胞中的比率的肽被认为是VEGF蛋白的降低剂,如表2所示。

[0353] 表2. 未处理的ARPE-19细胞和用20 μ M肽处理的ARPE-19细胞中的 $\text{VEGF}_{\text{缺氧}}/\text{VEGF}_{\text{常氧}}$ 比率

[0354]

ARPE-19 细胞中的 VEGF 调节(20 μ M)	
化合物	相对 VEGF (缺氧/常氧)
未经处理	2.02
SEQ ID NO: 13	2.59
SEQ ID NO: 29	2.60
SEQ ID NO: 30	2.70
SEQ ID NO: 31	2.64
SEQ ID NO: 14	1.41
SEQ ID NO: 16	1.01
SEQ ID NO: 17	1.02
SEQ ID NO: 19	1.39
SEQ ID NO: 20	0.99
SEQ ID NO: 21	1.36

[0355] 表3. 未处理的ARPE-19细胞和用20 μ M肽处理的ARPE-19细胞中的VEGF_{缺氧}/VEGF_{常氧}比率

[0356]

ARPE-19 细胞中的 VEGF 调节(20 μ M)	
化合物	相对 VEGF (缺氧/常氧)
未经处理	1.87
SEQ ID NO: 36	1.89
SEQ ID NO: 37	2.02

[0357] 结果显示本发明的肽能够显著地调节VEGF水平。

[0358] 具体地,本发明的第一方面的线性肽在缺氧条件下使VEGF值增加。令人惊奇的是,当本发明的第一方面的肽包含稳定化修饰(staple)时,其针对VEGF的表现显著改变,导致VEGF显著减少,减少约50%。因此,本发明人已经发现,包含序列SEQ ID NO:1的肽可以通过在序列SEQ ID NO:1中包含或不包含接头双自由基“L”来调节VEGF,并因此调节血管生成。不存在接头提供了增强VEGF的肽,从而“增强”血管生成,而存在接头提供了降低VEGF的肽,从而“降低”血管生成。

[0359] 在本发明的第二方面的肽的情况下,发现了相对于在常氧条件下获得的水平,该肽能够在缺氧条件下增加VEGF表达。因此,本发明的第二方面的肽还可以用于在生长因子已发生减少的情况下恢复VEGF水平。

[0360] 为了证实该结果,在人角膜细胞系以及MDA-MB-231细胞系中测试了肽SEQ ID NO: 16,与常氧相比,这些细胞系在诱导的缺氧条件下诱导了VEGF蛋白表达的增加。用10 μ M的本发明肽溶解在细胞培养基中的溶液单独地(常氧条件)或在CoCl₂存在下(缺氧条件)处理细胞,并计算VEGF量的比率。表4中报告了结果。

[0361] 表4.

[0362]

HaCat 细胞中的 VEGF 调节(10 μ M)

[0363]

肽	相对 VEGF (缺氧/常氧)
未经处理	1.15
SEQ ID NO: 16	0.88
MDA-MB-231 细胞中的 VEGF 调节(10 μ M)	
未经处理	1.72
SEQ ID NO: 16	1.30

[0364] 结果显示本发明的肽降低了VEGF比率,其与ARPE-19细胞提供的结果一致。

[0365] 通过RP-PCR还测定在常氧和缺氧条件下用10 μ M的肽SEQ ID NO:17处理24小时的ARPE-19细胞中VEGF表达的调节。表5中报告了结果。

[0366] 表5. 未经处理和用10 μ M肽处理的ARPE-19细胞中的VEGF mRNA

[0367]

	VEGF mRNA 拷贝/百万肌动蛋白拷贝	相对于对照的相对拷贝
未经处理 常氧	33918	1
未经处理 缺氧	152782	4.50
SEQ ID NO: 17 常氧	31454	0.93
SEQ ID NO: 17 缺氧	25873	0.76

[0368] 当细胞处于缺氧条件下时,检测到VEGF mRNA水平明显增加。结果显示,与缺氧中未经处理的细胞相比,用肽SEQ ID NO:17处理显著降低了mRNA水平,而在常氧中仅检测到降低。

[0369] 实施例2:体内血管生成降低

[0370] 1. 材料和方法

[0371] 将100 μ l DMEM中的MDA-MB-231细胞(2.5×10^6 个细胞/动物)接种到无胸腺小鼠的乳腺脂肪垫中。当肿瘤体积达到100mm³时,将动物分组并每周通过皮下施用溶媒(2% Tween-20的0.9%NaCl无菌溶液,对照组)两次以及每周通过皮下施用SEQ ID NO:17(处理组)来进行处理。处死时,收集肿瘤、称重并用福尔马林固定(24小时)。将福尔马林固定的肿瘤加工成石蜡包埋的组织块,然后将其送往穆尔西亚大学(Universidad de Murcia)兽医学院的生物化学与分子生物学A系进行分析。

[0372] 组织学和免疫组织化学

[0373] 苏木精、伊红、二氨基联苯胺四盐酸盐和过氧化氢来自默克公司(马德里,西班牙)。鼠抗CD31单克隆抗体来自Novus。在免疫组织化学中,CD31主要用于显示组织学组织切片中内皮细胞的存在,以评估肿瘤中血管生成的程度。

[0374] 肿瘤用PBS清洗,用10%福尔马林固定并包埋在石蜡中。

[0375] 对石蜡包埋组织的连续切片进行苏木精和伊红(H&E)染色。对于免疫组织化学,将石蜡切片脱蜡并在柠檬酸钠缓冲液(pH 6.0)中进行抗原修复。用5%过氧化氢将组织内源性过氧化物酶失活。封闭载玻片,并在4℃下与一抗孵育过夜。接下来,将载玻片与用过氧化物酶缀合的二抗一起孵育,并用0.2%二氨基联苯胺四盐酸盐和过氧化氢将特异性反应显色。使用SCN400F莱卡扫描仪扫描染色的载玻片,并使用ImageJ软件分析图像。

[0376] 2. 结果

[0377] CD31染色图像(图1)和计算的CD31相对强度(图2)表明,与对照相比,经处理肿瘤

中的血管(血管生成)显著降低。

[0378] 引用列表

[0379] Altschul等人,“Basic local alignment search tool”,1990,J.Mol.Biol, v.215,pages 403-410.

[0380] Carmeliet P.,“Angiogenesis in health and disease”,Nature Medicine, 2003,9,653-660.

[0381] Copolovici D.M.等人,“Cell-Penetrating Peptides:Design,Synthesis,and Applications”,2014,ACS Nano,2014,8(3),pp 1972-1994.

[0382] Higgins等人,“CLUSTAL V:improved software for multiple sequence alignment”,1992,CABIOS,8(2),pages 189-191.

[0383] Kim Young-Woo等人,“Synthesis of all-hydrocarbon stapled α -helical peptides by ring-closing olefin metathesis”,Nature Protocols,2011,6(6),p.761-771.

[0384] Kolb H.C.等人,“The growing impact of click chemistry on drug discovery”,2003,Drug Discov Today,8(24):1128-1137.

[0385] Manisha B.等人,“Angiogenesis:Future of pharmacological modulation”,Indian J.Pharmacol.,2010,42(1),pages 2-8.

[0386] Scott J.M.等人,“Application of Ring-Closing Metathesis to the Synthesis of Rigidified Amino Acids and Peptides”,J.Am.Chem.Soc.,1996,v.118 (40),pp 9606-9614.

[0387] Zalipsky S.,“Functionalized Poly(ethylene glycols)for Preparation of Biologically Relevant Conjugates”,Bioconjugate Chemistry,1995,6(2),150-165.

[0388] 条款

[0389] 出于完整性的原因,本发明的各个方面在以下编号的条款中列出:

[0390] 条款1:肽或其药用盐,其长度为14至50并且包含相对于SEQ ID NO:1具有至少85%序列同一性的序列:

[0391] (Leu)_m-(Asp)_n-Lys-Ala-Ser-Val-Met-Arg-Leu-Thr-Ile-Ser-Tyr-Leu-Arg-Val-(Arg)_p-(Lys)_q

[0392] 其中

[0393] -“m”、“n”、“p”和“q”表示整数并且选自0和1;

[0394] -C末端对应于-C(O)R₄;以及

[0395] -N末端对应于-NHR₅;

[0396] 该肽任选地包含式(I)的接头双自由基“L”

[0397] $-[(R_1)_a - (R_2) - (R_3)_b]_c - (I)$

[0398] 该接头双自由基“L”将肽序列SEQ ID NO:1中位于位置“i”的氨基酸的 α 碳原子与位于位置“i+4”或“i+7”的氨基酸的 α 碳原子连接,

[0399] 其中

[0400] “a”和“b”相同或不同,并且为0或1;

[0401] “c”由1至10组成;

[0402] R_1 和 R_3 是独立地选自由以下组成的组中的双自由基： (C_1-C_{10}) 烷基；被一个或多个选自由卤素、 (C_1-C_{10}) 烷基、 $-OR_6$ 、 $-NR_7R_8$ 、 $-SR_9$ 、 $-SOR_{10}$ 、 $-SO_2R_{11}$ 和 $-CO_2R_{12}$ 组成的组中的基团取代的 (C_1-C_{10}) 烷基； (C_2-C_{10}) 烯基；被一个或多个选自由卤素、 (C_1-C_{10}) 烷基、 $-OR_6$ 、 $-NR_7R_8$ 、 $-SR_9$ 、 $-SOR_{10}$ 、 $-SO_2R_{11}$ 和 $-CO_2R_{12}$ 组成的组中的基团取代的 (C_2-C_{10}) 烯基； (C_2-C_{10}) 炔基；和被一个或多个选自由卤素、 (C_1-C_{10}) 烷基、 $-OR_6$ 、 $-NR_7R_8$ 、 $-SR_9$ 、 $-SOR_{10}$ 、 $-SO_2R_{11}$ 和 $-CO_2R_{12}$ 组成的组中的基团取代的 (C_2-C_{10}) 炔基；

[0403] R_2 是选自由以下组成的组中的双自由基： $-O-$ 、 $C(=O)$ 、 $C(=O)NR_{13}$ 、 $C(=O)O$ 、 $S(=O)$ 、 $S(=O)_2$ 、 NR_{14} 、 (C_1-C_{10}) 烷基、 (C_2-C_{10}) 烯基、 (C_2-C_{10}) 炔基、 $-NR_{15}-NR_{16}-$ 、 $-N=N-$ 、 $-S-S-$ 和已知的包含3至14个成员的环系统，该系统包含1至3个环，其中：

[0404] 每个环是饱和的、部分不饱和的或芳香族的；

[0405] 环是孤立的、部分或完全稠合的，

[0406] 形成已知环系统的每个成员选自由以下组成的组： $-CH-$ 、 $-CH_2-$ 、 $-NH-$ 、 $-N-$ 、 $-SH-$ 、 $-S-$ 和 $-O-$ ；以及

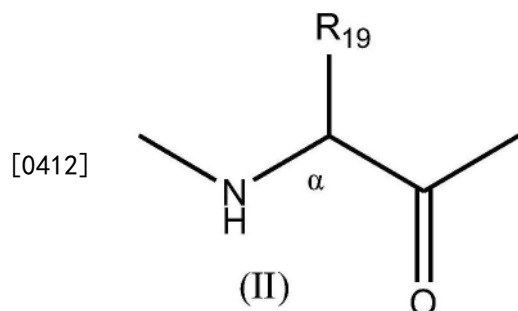
[0407] 该环系统任选地被一个或多个独立地选自由以下组成的组中的基团取代：卤素、 $-OH$ 、 $-NO_2$ 、 (C_1-C_{10}) 烷基、 (C_1-C_{10}) 卤代烷基和 (C_1-C_{10}) 烷基 $-O-$ ；以及

[0408] R_4 是选自由 $-OH$ 和 $-NR_{17}R_{18}$ 组成的组中的基团；

[0409] R_5 是选自由 $-H$ 和 (C_1-C_{20}) 烷基组成的组中的基团；

[0410] R_6 、 R_7 、 R_8 、 R_9 、 R_{10} 、 R_{11} 、 R_{12} 、 R_{13} 、 R_{14} 、 R_{15} 、 R_{16} 、 R_{17} 和 R_{18} 是独立地选自由 $-H$ 和 (C_1-C_{10}) 烷基组成的组中的基团；以及

[0411] 通过接头连接的氨基酸具有式(II)



[0413] 其中

[0414] R_{19} 是选自由以下组成的组中的单自由基： (C_1-C_{10}) 烷基， (C_2-C_{10}) 烯基， (C_2-C_{10}) 炔基，以及已知的包含3至14个成员的环系统，该系统包含1至3个环，其中：

[0415] 每个环是饱和的、部分不饱和的或芳香族的；

[0416] 环是孤立的、部分或完全稠合的，

[0417] 形成已知环系统的每个成员选自由以下组成的组： $-CH-$ 、 $-CH_2-$ 、 $-NH-$ 、 $-N-$ 、 $-SH-$ 、 $-S-$ 和 $-O-$ 。

[0418] 条款2.根据条款1所述的肽，其中该肽由序列SEQ ID NO:1组成，任选地包含条款1所定义的式(I)的接头双自由基“L”。

[0419] 条款3.根据前述条款中任一项所述的肽，其中该肽包含的所述式(I)的接头双自由基“L”处于肽序列SEQ ID NO:1中位于位置“i”的氨基酸的 α 碳原子和位于位置“i+7”的氨基酸的 α 碳原子之间。

[0420] 条款4.根据前述条款中任一项所述的肽,其中所述肽选自由以下组成的组:

[0421] SEQ ID NO:2 (Leu)m-(Asp)n-Lys-Ala-Ser-Val-Met-Arg-Leu-Thr-Ile-Ser-Tyr-Leu-Arg-Val-(Arg)p-(Lys)q;

[0422] SEQ ID NO:3 (Leu)m-(Asp)n-Lys-Ala-Ser-Val-Met-Arg-Leu-Thr-Ile-Ser-Tyr-Leu-Arg-Val-(Arg)p-(Lys)q;

[0423] SEQ ID NO:4: (Leu)m-(Asp)n-Lys-Ala-Ser-Val-Met-Arg-Leu-Thr-Ile-Ser-Tyr-Leu-Arg-Val-(Arg)p-(Lys)q;

[0424] SEQ ID NO:5 (Leu)m-(Asp)n-Lys-Ala-Ser-Val-Met-Arg-Leu-Thr-Ile-Ser-Tyr-Leu-Arg-Val-Arg-(Lys)q;

[0425] SEQ ID NO:6: Lys-Ala-Ser-Val-Met-Arg-Leu-Thr-Ile-Ser-Tyr-Leu-Arg-Val-Arg;

[0426] SEQ ID NO:7: Lys-Ala-Ser-Val-Met-Arg-Leu-Thr-Ile-Ser-Tyr-Leu-Arg-Val-Arg;

[0427] SEQ ID NO:8: Lys-Ala-Ser-Val-Met-Arg-Leu-Thr-Ile-Ser-Tyr-Leu-Arg-Val-Arg;

[0428] SEQ ID NO:9: Lys-Ala-Ser-Val-Met-Arg-Leu-Thr-Ile-Ser-Tyr-Leu-Arg-Val-Arg;

[0429] SEQ ID NO:10: Leu-Asp-Lys-Ala-Ser-Val-Met-Arg-Leu-Thr-Ile-Ser-Tyr-Leu-Arg-Val-Arg-Lys;

[0430] SEQ ID NO:11: Leu-Asp-Lys-Ala-Ser-Val-Met-Arg-Leu-Thr-Ile-Ser-Tyr-Leu-Arg-Val-Arg-Lys;和

[0431] SEQ ID NO:12: Leu-Asp-Lys-Ala-Ser-Val-Met-Arg-Leu-Thr-Ile-Ser-Tyr-Leu-Arg-Val-Arg-Lys;

[0432] 其中以下划线和粗体标出的氨基酸具有相同构型(二者都是L-氨基酸或D-氨基酸)或不同构型,指出了所述接头双自由基“L”的位置,C末端对应于-C(O)R₄,且N末端对应于-NHR₅。

[0433] 条款5.根据前述条款中任一项所述的肽,其中“a”、“b”和“c”为1。

[0434] 条款6.根据前述条款中任一项所述的肽,其中R₁和R₃是独立地选自由以下组成的组中的双自由基:(C₁-C₁₀)烷基;(C₂-C₁₀)烯基;和(C₂-C₁₀)炔基。

[0435] 条款7.根据前述条款中任一项所述的肽,其中R₂是选自由以下组成的组中的双自由基:(C₁-C₁₀)烷基、(C₂-C₁₀)烯基和(C₂-C₁₀)炔基。

[0436] 条款8.根据前述条款中任一项所述的肽,其中R₁₉是选自由以下组成的组中的单自由基:(C₁-C₁₀)烷基、(C₂-C₁₀)烯基和(C₂-C₁₀)炔基。

[0437] 条款9.根据前述条款中任一项所述的肽,其中

[0438] -R₁、R₃和R₁₉为(C₁-C₁₀)烷基;R₂为(C₂-C₁₀)烯基;“m”和“n”相同;并且“p”和“q”相同;或者可替换地,

[0439] -R₁、R₃和R₁₉为(C₁-C₁₀)烷基;R₂为(C₂-C₁₀)烯基;“m”和“n”相同;并且“p”和“q”不同;或者可替换地,

[0440] -R₁、R₃和R₁₉为(C₁-C₁₀)烷基;R₂为(C₂-C₁₀)烯基;“m”、“n”、“p”和“q”相同,特别是1;或者可替换地,

[0441] $-R_1$ 、 R_3 和 R_{19} 为 (C_1-C_{10}) 烷基; R_2 为 (C_2-C_{10}) 烯基;“m”、“n”、“q”相同并且“p”不同;特别是 $m=n=q=0$ 且 $p=1$ 。

[0442] 条款10.根据前述条款中任一项所述的肽,其中C末端对应于 $-C(O)OH$ 或 $-C(O)NH_2$,并且N末端对应于 $-NH_2$ 。

[0443] 条款11.根据前述条款中任一项所述的肽,其中所述肽相对于选自由序列SEQ ID NO:13至21组成的组中的肽具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列同一性。

[0444] 条款12.根据前述条款中任一项所述的肽,其中所述肽与标记物、药物、细胞穿透肽或聚乙二醇(PEG)缀合。

[0445] 条款13.融合蛋白,包含前述条款中任一项所定义的肽。

[0446] 条款14.药物组合物,包含治疗有效量的条款1至12中任一项所定义的肽或其药用盐、或条款13所定义的融合蛋白,以及可接受的药物赋形剂和/或载体。

[0447] 条款15.用于治疗的条款1至12中任一项所定义的肽或其药用盐、或条款13所定义的融合蛋白、或条款14所定义的药物组合物。

[0448] 条款16.用于治疗或预防由VEGF表达失调引起的疾病、特别是由VEGF表达增加或降低引起的疾病的条款1至12中任一项所定义的肽或其药用盐、或条款13所定义的融合蛋白、或条款14所定义的药物组合物。

[0449] 条款17.用于治疗或预防基于VEGF的表达而与血管生成失调相关的疾病的条款1至12中任一项所定义的肽或其药用盐、或条款13所定义的融合蛋白、或条款14所定义的药物组合物。

[0450] 条款18.肽或其药用盐,其长度为15至50并且包含相对于SEQ ID NO:22具有至少85%序列同一性的序列:

[0451] (Arg)r-(Ser)s-Arg-Arg-Ser-Lys-Glu-Ser-Glu-Val-Phe-Tyr-Glu-Leu-Ala-His-Gln-(Leu)t-(Pro)v

[0452] 其中

[0453] “r”、“s”、“t”和“v”表示整数并且选自0和1;

[0454] -C末端对应于 $-C(O)R_4$;以及

[0455] -N末端对应于 $-NHR_5$;

[0456] 该肽任选地包含式(I)的接头双自由基“L”

[0457] $-[(R_1)_a-(R_2)-(R_3)_b]_c-(I)$

[0458] 该接头双自由基“L”将肽序列SEQ ID NO:21中位于位置“i”的氨基酸的 α 碳原子与位于位置“i+4”或“i+7”的氨基酸的 α 碳原子连接,

[0459] 其中

[0460] “a”和“b”相同或不同,并且为0或1;

[0461] “c”由1至10组成;

[0462] R_1 和 R_3 是独立地选自由以下组成的组中的双自由基: (C_1-C_{10}) 烷基;被一个或多个选自由卤素、 (C_1-C_{10}) 烷基、 $-OR_6$ 、 $-NR_7R_8$ 、 $-SR_9$ 、 $-SOR_{10}$ 、 $-SO_2R_{11}$ 和 $-CO_2R_{12}$ 组成的组中的基团取代的 (C_1-C_{10}) 烷基; (C_2-C_{10}) 烯基;被一个或多个选自由卤素、 (C_1-C_{10}) 烷基、 $-OR_6$ 、 $-NR_7R_8$ 、 $-SR_9$ 、 $-SOR_{10}$ 、 $-SO_2R_{11}$ 和 $-CO_2R_{12}$ 组成的组中的基团取代的 (C_2-C_{10}) 烯基; (C_2-C_{10}) 炔基;和被一

个或多个选自自由卤素、 (C_1-C_{10}) 烷基、 $-OR_6$ 、 $-NR_7R_8$ 、 $-SR_9$ 、 $-SOR_{10}$ 、 $-SO_2R_{11}$ 和 $-CO_2R_{12}$ 组成的组中的基团取代的 (C_2-C_{10}) 炔基；

[0463] R_2 是选自自由以下组成的组中的双自由基： $-O-$ 、 $C(=O)$ 、 $C(=O)NR_{13}$ 、 $C(=O)O$ 、 $S(=O)$ 、 $S(=O)_2$ 、 NR_{14} 、 (C_1-C_{10}) 烷基、 (C_2-C_{10}) 烯基、 (C_2-C_{10}) 炔基、 $-NR_{15}-NR_{16}-$ 、 $-N=N-$ 、 $-S-S-$ 和已知的包含3至14个成员的环系统，该系统包含1至3个环，其中：

[0464] 每个环是饱和的、部分不饱和的或芳香族的；

[0465] 环是孤立的、部分或完全稠合的，

[0466] 形成已知环系统的每个成员选自自由以下组成的组： $-CH-$ 、 $-CH_2-$ 、 $-NH-$ 、 $-N-$ 、 $-SH-$ 、 $-S-$ 和 $-O-$ ；以及

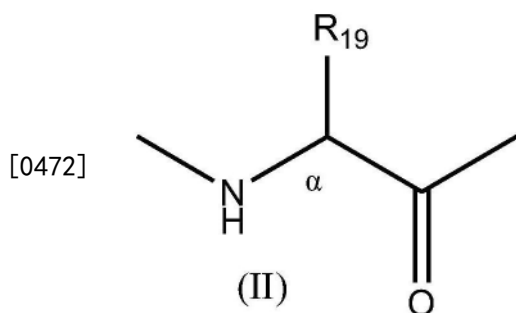
[0467] 该环系统任选地被一个或多个独立地选自自由以下组成的组中的基团取代：卤素、 $-OH$ 、 $-NO_2$ 、 (C_1-C_{10}) 烷基、 (C_1-C_{10}) 卤代烷基和 (C_1-C_{10}) 烷基- $O-$ ；以及

[0468] R_4 是选自自由 $-OH$ 和 $-NR_{17}R_{18}$ 组成的组中的基团；

[0469] R_5 是选自自由 $-H$ 和 (C_1-C_{20}) 烷基组成的组中的基团；

[0470] R_6 、 R_7 、 R_8 、 R_9 、 R_{10} 、 R_{11} 、 R_{12} 、 R_{13} 、 R_{14} 、 R_{15} 、 R_{16} 、 R_{17} 和 R_{18} 是独立地选自自由 $-H$ 和 (C_1-C_{10}) 烷基组成的组中的基团；以及

[0471] 通过接头连接的氨基酸具有式 (II)



[0473] 其中

[0474] R_{19} 是选自自由以下组成的组中的单自由基： (C_1-C_{10}) 烷基、 (C_2-C_{10}) 烯基、 (C_2-C_{10}) 炔基和已知的包含3至14个成员的环系统，该系统包含1至3个环，其中：

[0475] 每个环是饱和的、部分不饱和的或芳香族的；

[0476] 环是孤立的、部分或完全稠合的，

[0477] 形成已知环系统的每个成员选自自由以下组成的组： $-CH-$ 、 $-CH_2-$ 、 $-NH-$ 、 $-N-$ 、 $-SH-$ 、 $-S-$ 和 $-O-$ 。

[0478] 条款19. 根据条款18所述的肽，其中该肽由序列SEQ ID NO:21组成，任选地包含条款18所定义的式(I)的接头双自由基“L”。

[0479] 条款20. 根据前述条款18至19中任一项所述的肽，其中该肽包含的所述式(I)的接头双自由基“L”处于肽序列SEQ ID NO:21中位于位置“i”的氨基酸的 α 碳原子和位于位置“i+7”的氨基酸的 α 碳原子之间。

[0480] 条款21. 根据前述条款18至20中任一项所述的肽，其中所述肽选自自由以下组成的组：

[0481] SEQ ID NO:23 (Arg)r-(Ser)s-Arg-Arg-Ser-Lys-Glu-Ser-Glu-Val-Phe-Tyr-Glu-Leu-Ala-His-Gln-(Leu)t-(Pro)v；

[0482] SEQ ID NO:24 (Arg)r-(Ser)s-Arg-Arg-Ser-Lys-Glu-Ser-Glu-**Val**-Phe-Tyr-Glu-Leu-Ala-His-**Gln**-(Leu)-(Pro)v;

[0483] SEQ ID NO:25: (Arg)r-(Ser)s-Arg-Arg-**Ser**-Lys-Glu-Ser-Glu-Val-Phe-**Tyr**-Glu-Leu-Ala-His-Gln-(Leu)t-(Pro)v;

[0484] SEQ ID NO:26: Arg-Ser-Arg-Arg-Ser-Lys-Glu-**Ser**-Glu-Val-Phe-Tyr-Glu-Leu-**Ala**-His-Gln;

[0485] SEQ ID NO:27: Arg-Ser-Arg-Arg-Ser-Lys-Glu-Ser-Glu-**Val**-Phe-Tyr-Glu-Leu-Ala-His-**Gln**;
和

[0486] SEQ ID NO:28: Arg-Arg-**Ser**-Lys-Glu-Ser-Glu-Val-Phe-**Tyr**-Glu-Leu-Ala-His-Gln-Leu-Pro,

[0487] 其中以下划线和粗体标出的氨基酸具有相同构型(二者都是L-氨基酸或D-氨基酸)或不同构型,指出了所述接头双自由基“L”的位置,C末端对应于-C(O)R₄,且N末端对应于-NHR₅。

[0488] 条款22.根据前述条款18至21中任一项所述的肽,其中“a”、“b”和“c”为1。

[0489] 条款23.根据前述条款18至22中任一项所述的肽,其中R₁和R₃是独立地选自由以下组成的组中的双自由基:(C₁-C₁₀)烷基;(C₂-C₁₀)烯基;和(C₂-C₁₀)炔基。

[0490] 条款24.根据前述条款18至23中任一项所述的肽,其中R₂是选自由以下组成的组中的双自由基:(C₁-C₁₀)烷基、(C₂-C₁₀)烯基和(C₂-C₁₀)炔基。

[0491] 条款25.根据前述条款18至24中任一项所述的肽,其中R₁₉是选自由以下组成的组中的单自由基:(C₁-C₁₀)烷基、(C₂-C₁₀)烯基和(C₂-C₁₀)炔基。

[0492] 条款26.根据前述条款18至25中任一项所述的肽,其中

[0493] -R₁、R₃和R₁₉为(C₁-C₁₀)烷基;R₂为(C₂-C₁₀)烯基;“r”和“s”相同;“t”和“v”相同;或者可替换地,

[0494] -R₁、R₃和R₁₉为(C₁-C₁₀)烷基;R₂为(C₂-C₁₀)烯基;“r”和“s”相同并且表示1;“t”和“v”相同并且表示0;或者可替换地,

[0495] -R₁、R₃和R₁₉为(C₁-C₁₀)烷基;R₂为(C₂-C₁₀)烯基;“r”和“s”相同并且表示0;“t”和“v”相同并且表示1。

[0496] 条款27.根据前述条款18至26中任一项所述的肽,其中C末端对应于-C(O)OH或-C(O)NH₂、特别是-C(O)NH₂,并且N末端对应于-NH₂。

[0497] 条款28.根据前述条款18至27中任一项所述的肽,其中所述肽相对于选自由序列SEQ ID NO:29至31组成的组中的肽具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列同一性。

[0498] 条款29.根据前述条款18至28中任一项所述的肽,其中所述肽与标记物、药物、细胞穿透肽或PEG缀合。

[0499] 条款30.融合蛋白,包含前述条款18至29中任一项所定义的肽。

[0500] 条款31.药物组合物,包含治疗有效量的条款18至29中任一项所定义的肽或其药用盐、或条款30所定义的融合蛋白,以及可接受的药物赋形剂和/或载体。

[0501] 条款32.用于治疗的条款18至29中任一项所定义的肽或其药用盐、或条款30所定义的融合蛋白、或条款31所定义的药物组合物。

[0502] 条款33.用于治疗或预防由VEGF表达失调引起的疾病的权利要求18至29中任一项

所定义的肽或其药用盐、或权利要求30所定义的融合蛋白、或权利要求31所定义的药物组合物。

[0503] 条款34. 用于治疗或预防基于VEGF的表达而与血管生成失调相关的疾病的条款18至29中任一项所定义的肽或其药用盐、或条款30所定义的融合蛋白、或条款31所定义的药物组合物。

序列表

- <110> IDP研发制药有限公司
- <120> 调节VEGF的肽
- <130> 906 772
- <150> EP 20383169.8
- <151> 2020-12-29
- <160> 37
- <170> BiSSAP 1.3.6
- <210> 1
- <211> 18
- <212> PRT
- <213> 人工序列
- <220>
- <223> 肽
- <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> 1..1
- <223> X代表(Leu)_m,其中m为0或1
- <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> 1..1
- <223> N末端对应于-NHR5,其中R5选自由-H和(C1-C20)烷基组成的组
- <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> 2..2
- <223> X代表(Asp)_n,其中n为0或1
- <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> 17..17
- <223> X代表(Arg)_p,其中p为0或1
- <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> 18..18
- <223> X代表(Lys)_q,其中q为0或1
- <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> 18..18
- <223> C末端对应于-C(O)R4,其中R4是选自由-OH和-NR17R18组成的组中的基团;

<400> 1

Xaa Xaa Lys Ala Ser Val Met Arg Leu Thr Ile Ser Tyr Leu Arg Val

1

5

10

15

Xaa Xaa

<210> 2

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> 1..1

<223> X代表 (Leu)_m, 其中m为0或1

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> 1..1

<223> N末端对应于-NHR₅, 其中R₅选自由-H和(C₁-C₂₀)烷基组成的组

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> 2..2

<223> X代表 (Asp)_n, 其中n为0或1

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> 5..5

<223> 氨基酸具有式(I), 通过接头“L”将该氨基酸的α碳与第12位的氨基酸的α碳连接

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> 12..12

<223> 氨基酸具有式(I), 通过接头“L”将该氨基酸的α碳与第5位的氨基酸的α碳连接

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> 17..17

<223> X代表 (Arg)_p, 其中p为0或1

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> 18..18

<223> X代表 (Lys)_q, 其中q为0或1

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> 18..18

<223> C末端对应于-C(=O)R₄,其中R₄是选自由-OH和-NR₁₇R₁₈组成的组中的基团;

<400> 2

Xaa Xaa Lys Ala Ser Val Met Arg Leu Thr Ile Ser Tyr Leu Arg Val

1

5

10

15

Xaa Xaa

<210> 3

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> 1..1

<223> X代表(Leu)_m,其中m为0或1

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> 1..1

<223> N末端对应于-NHR₅,其中R₅选自由-H和(C₁-C₂₀)烷基组成的组

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> 2..2

<223> X代表(Asp)_n,其中n为0或1

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> 7..7

<223> 氨基酸具有式(I),通过接头“L”将该氨基酸的α碳与第14位的氨基酸的α碳连接

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> 14..14

<223> 氨基酸具有式(I),通过接头“L”将该氨基酸的α碳与第7位的氨基酸的α碳连接

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> 17..17

<223> X代表(Arg)_p,其中p为0或1

<220>

<221> MISC_FEATURE

- <222> 18..18
<223> X代表(Lys)_q,其中q为0或1
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> 18..18
<223> C末端对应于-C(O)R₄,其中R₄是选自由-OH和-NR₁₇R₁₈组成的组中的基团
<400> 3
Xaa Xaa Lys Ala Ser Val Met Arg Leu Thr Ile Ser Tyr Leu Arg Val
1 5 10 15
Xaa Xaa
<210> 4
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 肽
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> 1..1
<223> X代表(Leu)_m,其中m为0或1
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> 1..1
<223> N末端对应于-NHR₅,其中R₅选自由-H和(C₁-C₂₀)烷基组成的组
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> 2..2
<223> X代表(Asp)_n,其中n为0或1
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> 8..8
<223> 氨基酸具有式(I),通过接头“L”将该氨基酸的α碳与第15位的氨基酸的α碳连接
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> 15..15
<223> 氨基酸具有式(I),通过接头“L”将该氨基酸的α碳与第8位的氨基酸的α碳连接
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> 17..17

<223> X代表(Arg)_p,其中p为0或1

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> 18..18

<223> X代表(Lys)_q,其中q为0或1

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> 18..18

<223> C末端对应于-C(O)R₄,其中R₄是选自由-OH和-NR₁₇R₁₈组成的组中的基团

<400> 4

Xaa Xaa Lys Ala Ser Val Met Arg Leu Thr Ile Ser Tyr Leu Arg Val

1

5

10

15

Xaa Xaa

<210> 5

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> 1..1

<223> X代表(Leu)_m,其中m为0或1

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> 1..1

<223> N末端对应于-NHR₅,其中R₅选自由-H和(C₁-C₂₀)烷基组成的组

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> 2..2

<223> X代表(Asp)_n,其中n为0或1

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> 10..10

<223> 氨基酸具有式(I),通过接头“L”将该氨基酸的α碳与第17位的氨基酸的α碳连接

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> 17..17

<223> 氨基酸具有式(I),通过接头“L”将该氨基酸的α碳与第10位的氨基酸的α碳连接

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> 18..18
 <223> X代表(Lys)_q,其中q为0或1
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> 18..18
 <223> C末端对应于-C(O)R₄,其中R₄是选自由-OH和-NR₁₇R₁₈组成的组中的基团
 <400> 5
 Xaa Xaa Lys Ala Ser Val Met Arg Leu Thr Ile Ser Tyr Leu Arg Val
 1 5 10 15
 Arg Xaa
 <210> 6
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 肽
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> 1..1
 <223> N末端对应于-NHR₅,其中R₅选自由-H和(C₁-C₂₀)烷基组成的组
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> 3..3
 <223> 氨基酸具有式(I),通过接头“L”将该氨基酸的α碳与第10位的氨基酸的α碳连接
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> 10..10
 <223> 氨基酸具有式(I),通过接头“L”将该氨基酸的α碳与第3位的氨基酸的α碳连接
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> 15..15
 <223> C末端对应于-C(O)R₄,其中R₄是选自由-OH和-NR₁₇R₁₈组成的组中的基团
 <400> 6
 Lys Ala Ser Val Met Arg Leu Thr Ile Ser Tyr Leu Arg Val Arg
 1 5 10 15
 <210> 7
 <211> 15

<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 肽
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> 1..1
<223> N末端对应于-NHR5,其中R5选自由-H和(C1-C20)烷基组成的组
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> 5..5
<223> 氨基酸具有式(I),通过接头“L”将该氨基酸的 α 碳与第12位的氨基酸的 α 碳连接
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> 12..12
<223> 氨基酸具有式(I),通过接头“L”将该氨基酸的 α 碳与第5位的氨基酸的 α 碳连接
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> 15..15
<223> C末端对应于-C(O)R4,其中R4是选自由-OH和-NR17R18组成的组中的基团
<400> 7
Lys Ala Ser Val Met Arg Leu Thr Ile Ser Tyr Leu Arg Val Arg
1 5 10 15
<210> 8
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 肽
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> 1..1
<223> N末端对应于-NHR5,其中R5选自由-H和(C1-C20)烷基组成的组
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> 6..6
<223> 氨基酸具有式(I),通过接头“L”将该氨基酸的 α 碳与第13位的氨基酸的 α 碳连接
<220>
<221> MISC_FEATURE

13..13

〈223〉 氨基酸具有式(I),通过接头“L”将该氨基酸的 α 碳与第6位的氨基酸的 α 碳连接

 $\langle 220 \rangle$

<221> MISC FEATURE

⟨222⟩ 15.,15

<223> C末端对应于-C(O)R₄,其中R₄是选自由-OH和-NR₁₇R₁₈组成的组中的基团

<400> 8

Lys Ala Ser Val Met Arg Leu Thr Ile Ser Tyr Leu Arg Val Arg

1 5 10 15

<210> 9

<211> 15

<212> PRT

〈213〉 人工序列

 $\langle 220 \rangle$

〈223〉 肽

 $\langle 220 \rangle$

<221> MISC FEATURE

 $\langle 222 \rangle$ 1..1

〈223〉 N末端对应于-NHR5,其中R5选自由-H和(C1-C20)烷基组成的组

 $\langle 220 \rangle$

<221> MISC FEATURE

8.8.8.222

<223> 氨基酸具有式(I),通过接头“L”将该氨基酸的 α 碳与第15位的氨基酸的 α 碳连接

 $\langle 220 \rangle$

<221> MISC FEATURE

⟨222⟩ 15.,15

〈223〉 氨基酸具有式(I),通过接头“L”将该氨基酸的 α 碳与第8位的氨基酸的 α 碳连接

<400> 9

Lys Ala Ser Val Met Arg Leu Thr Ile Ser Tyr Leu Arg Val Arg

1 5 10 15

 $\langle 210 \rangle$ 10

<211> 18

<212> PRT

〈213〉 人工序列

 $\langle 220 \rangle$

〈223〉 肽

 $\langle 220 \rangle$

<221> MISC FEATURE

 $\langle 222 \rangle$ 1..1

〈223〉 N末端对应于-NHR5,其中R5选自由-H和(C1-C20)烷基组成的组

 $\langle 220 \rangle$

<221> MISC FEATURE

 $\langle 222 \rangle$ 5.,.5

<223> 氨基酸具有式(I),通过接头“L”将该氨基酸的 α 碳与第12位的氨基酸的 α 碳连接

 $\langle 220 \rangle$

<221> MISC FEATURE

 $\langle 222 \rangle$ 12..12

〈223〉 氨基酸具有式(I),通过接头“L”将该氨基酸的 α 碳与第5位的氨基酸的 α 碳连接

 $\langle 220 \rangle$

<221> MISC FEATURE

⟨222⟩ 18..18

〈223〉 C末端对应于-C(O)R₄,其中R₄是选自由-OH和-NR₁₇R₁₈组成的组中的基团

 $\langle 400 \rangle$ 10

Leu Asp Lys Ala Ser Val Met Arg Leu Thr Ile Ser Tyr Leu Arg Val

1

5

10

15

Arg Lys

⟨210⟩ 11

<211> 18

<212> PRT

〈213〉 人工序列

 $\langle 220 \rangle$

〈223〉 肽

 $\langle 220 \rangle$

<221> MISC FEATURE

 $\langle 222 \rangle$ 1..1

〈223〉 N末端对应于-NHR5,其中R5选自由-H和(C1-C20)烷基组成的组

 $\langle 220 \rangle$

<221> MISC FEATURE

7.7

〈223〉 氨基酸具有式(I),通过接头“L”将该氨基酸的 α 碳与第12位的氨基酸的 α 碳连接

 $\langle 220 \rangle$

<221> MISC FEATURE

⟨222⟩ 14..14

〈223〉 氨基酸具有式(I),通过接头“L”将该氨基酸的 α 碳与第7位的氨基酸的 α 碳连接

 $\langle 220 \rangle$

<221> MISC FEATURE

⟨222⟩ 18., 18

<223> C末端对应于-C(O)R₄,其中R₄是选自由-OH和-NR₁₇R₁₈组成的组中的基团

<400> 11

Leu Asp Lys Ala Ser Val Met Arg Leu Thr Ile Ser Tyr Leu Arg Val

1

5

10

15

Arg Lys

<210> 12

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> 1..1

<223> N末端对应于-NHR5,其中R5选自由-H和(C1-C20)烷基组成的组

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> 8..8

<223> 氨基酸具有式(I),通过接头“L”将该氨基酸的 α 碳与第15位的氨基酸的 α 碳连接

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> 15..15

<223> 氨基酸具有式(I),通过接头“L”将该氨基酸的 α 碳与第8位的氨基酸的 α 碳连接

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> 18..18

<223> C末端对应于-C(O)R4,其中R4是选自由-OH和-NR17R18组成的组中的基团

<400> 12

Leu Asp Lys Ala Ser Val Met Arg Leu Thr Ile Ser Tyr Leu Arg Val

1

5

10

15

Arg Lys

<210> 13

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽

<400> 13

Leu Asp Lys Ala Ser Val Met Arg Leu Thr Ile Ser Tyr Leu Arg Val

1

5

10

15

Arg Lys
<210> 14
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 肽
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> 3..3
<223> 氨基酸具有式(I),R19是-CH₃基团;通过接头-(CH₂)₆-CH=CH-(CH₂)₃-将该氨基酸的α碳与第10位的氨基酸的α碳连接
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> 10..10
<223> 氨基酸具有式(I),R19是-CH₃基团;通过接头-(CH₂)₆-CH=CH-(CH₂)₃-将该氨基酸的α碳与第3位的氨基酸的α碳连接
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> 15..15
<223> C末端对应于-C(=O)NH₂
<400> 14
Lys Ala Ser Val Met Arg Leu Thr Ile Ser Tyr Leu Arg Val Arg
1 5 10 15
<210> 15
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 肽
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> 5..5
<223> 氨基酸具有式(I),R19是-CH₃基团;通过接头-(CH₂)₆-CH=CH-(CH₂)₃-将该氨基酸的α碳与第12位的氨基酸的α碳连接
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> 12..12
<223> 氨基酸具有式(I),R19是-CH₃基团;通过接头-(CH₂)₆-CH=CH-(CH₂)₃-将该氨基

<221> MISC FEATURE

<222> 6..6

<223> 氨基酸具有式(I), R19是-CH₃基团;通过接头-(CH₂)₆-CH=CH-(CH₂)₃-将该氨基酸的α碳与第13位的氨基酸的α碳连接

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> 13..13

<223> 氨基酸具有式(I), R19是-CH₃基团;通过接头-(CH₂)₆-CH=CH-(CH₂)₃-将该氨基酸的α碳与第6位的氨基酸的α碳连接

<400> 17

Lys Ala Ser Val Met Arg Leu Thr Ile Ser Tyr Leu Arg Val Arg

1 5 10 15

<210> 18

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> 8..8

<223> 氨基酸具有式(I), R19是-CH₃基团;通过接头-(CH₂)₆-CH=CH-(CH₂)₃-将该氨基酸的α碳与第15位的氨基酸的α碳连接

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> 15..15

<223> 氨基酸具有式(I), R19是-CH₃基团;通过接头-(CH₂)₆-CH=CH-(CH₂)₃-将该氨基酸的α碳与第8位的氨基酸的α碳连接

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> 15..15

<223> C末端对应于-C(O)NH₂

<400> 18

Lys Ala Ser Val Met Arg Leu Thr Ile Ser Tyr Leu Arg Val Arg

1 5 10 15

<210> 19

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> 5..5
<223> 氨基酸具有式(I), R19是-CH₃基团;通过接头-(CH₂)₆-CH=CH-(CH₂)₃-将该氨基酸的α碳与第12位的氨基酸的α碳连接
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> 12..12
<223> 氨基酸具有式(I), R19是-CH₃基团;通过接头-(CH₂)₆-CH=CH-(CH₂)₃-将该氨基酸的α碳与第5位的氨基酸的α碳连接
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> 18..18
<223> C末端对应于-C(=O)NH₂
<400> 19
Leu Asp Lys Ala Ser Val Met Arg Leu Thr Ile Ser Tyr Leu Arg Val
1 5 10 15
Arg Lys
<210> 20
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 肽
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> 7..7
<223> 氨基酸具有式(I), R19是-CH₃基团;通过接头-(CH₂)₆-CH=CH-(CH₂)₃-将该氨基酸的α碳与第14位的氨基酸的α碳连接
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> 14..14
<223> 氨基酸具有式(I), R19是-CH₃基团;通过接头-(CH₂)₆-CH=CH-(CH₂)₃-将该氨基酸的α碳与第7位的氨基酸的α碳连接
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> 18..18
<223> C末端对应于-C(=O)NH₂

<400> 20

Leu Asp Lys Ala Ser Val Met Arg Leu Thr Ile Ser Tyr Leu Arg Val

1

5

10

15

Arg Lys

<210> 21

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> 8..8

<223> 氨基酸具有式(I), R19是-CH₃基团;通过接头-(CH₂)₆-CH=CH-(CH₂)₃-将该氨基酸的α碳与第15位的氨基酸的α碳连接

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> 15..15

<223> 氨基酸具有式(I), R19是-CH₃基团;通过接头-(CH₂)₆-CH=CH-(CH₂)₃-将该氨基酸的α碳与第8位的氨基酸的α碳连接

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> 18..18

<223> C末端对应于-C(=O)NH₂

<400> 21

Leu Asp Lys Ala Ser Val Met Arg Leu Thr Ile Ser Tyr Leu Arg Val

1

5

10

15

Arg Lys

<210> 22

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> 1..1

<223> X代表(Arg)_r,其中r为0或1

<220>

<221> MISC_FEATURE
<222> 1..1
<223> N末端对应于-NHR5,其中R5选自由-H和(C1-C20)烷基组成的组
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> 2..2
<223> X代表(Ser) s,其中s为0或1
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> 18..18
<223> X代表(Leu) t,其中t为0或1
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> 19..19
<223> X代表(Pro) v,其中v为0或1
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> 19..19
<223> C末端对应于-C(O)R4,其中R4是选自由-OH和-NR17R18组成的组中的基团
<400> 22
Xaa Xaa Arg Arg Ser Lys Glu Ser Glu Val Phe Tyr Glu Leu Ala His
1 5 10 15
Gln Xaa Xaa
<210> 23
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 肽
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> 1..1
<223> X代表(Arg) r,其中r为0或1
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> 1..1
<223> N末端对应于-NHR5,其中R5选自由-H和(C1-C20)烷基组成的组
<220>
<221> MISC_FEATURE

- <222> 2..2
 <223> X代表(Ser)s,其中s为0或1
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> 8..8
 <223> 氨基酸具有式(I),通过接头“L”将该氨基酸的 α 碳与第15位的氨基酸的 α 碳连接
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> 15..15
 <223> 氨基酸具有式(I),通过接头“L”将该氨基酸的 α 碳与第8位的氨基酸的 α 碳连接
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> 18..18
 <223> X代表(Leu)t,其中t为0或1
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> 19..19
 <223> X代表(Pro)v,其中v为0或1
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> 19..19
 <223> C末端对应于-C(O)R₄,其中R₄是选自由-OH和-NR₁₇R₁₈组成的组中的基团
 <400> 23
 Xaa Xaa Arg Arg Ser Lys Glu Ser Glu Val Phe Tyr Glu Leu Ala His
 1 5 10 15
 Gln Xaa Xaa
 <210> 24
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 肽
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> 1..1
 <223> X代表(Arg)r,其中r为0或1
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> 1..1

- <223> N末端对应于-NHR5,其中R5选自自由-H和(C1-C20)烷基组成的组
- <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> 2..2
- <223> X代表(Ser)s,其中s为0或1
- <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> 10..10
- <223> 氨基酸具有式(I),通过接头“L”将该氨基酸的 α 碳与第17位的氨基酸的 α 碳连接
- <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> 17..17
- <223> 氨基酸具有式(I),通过接头“L”将该氨基酸的 α 碳与第10位的氨基酸的 α 碳连接
- <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> 18..18
- <223> X代表(Leu)t,其中t为0或1
- <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> 19..19
- <223> X代表(Pro)v,其中v为0或1
- <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> 19..19
- <223> C末端对应于-C(O)R4,其中R4是选自自由-OH和-NR17R18组成的组中的基团
- <400> 24
- | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Xaa | Xaa | Arg | Arg | Ser | Lys | Glu | Ser | Glu | Val | Phe | Tyr | Glu | Leu | Ala | His |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | 15 | | |
| Gln | Xaa | Xaa | | | | | | | | | | | | | |
- <210> 25
- <211> 19
- <212> PRT
- <213> 人工序列
- <220>
- <223> 肽
- <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> 1..1
- <223> X代表(Arg)r,其中r为0或1

- <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> 1..1
<223> N末端对应于-NHR₅,其中R₅选自由-H和(C₁-C₂₀)烷基组成的组
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> 2..2
<223> X代表(Ser)_s,其中s为0或1
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> 5..5
<223> 氨基酸具有式(I),通过接头“L”将该氨基酸的α碳与第12位的氨基酸的α碳连接
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> 12..12
<223> 氨基酸具有式(I),通过接头“L”将该氨基酸的α碳与第5位的氨基酸的α碳连接
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> 18..18
<223> X代表(Leu)_t,其中t为0或1
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> 19..19
<223> X代表(Pro)_v,其中v为0或1
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> 19..19
<223> C末端对应于-C(O)R₄,其中R₄是选自由-OH和-NR₁₇R₁₈组成的组中的基团
<400> 25
Xaa Xaa Arg Arg Ser Lys Glu Ser Glu Val Phe Tyr Glu Leu Ala His
1 5 10 15
Gln Xaa Xaa
<210> 26
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 肽
<220>

<221> MISC_FEATURE
<222> 1..1
<223> N末端对应于-NHR5,其中R5选自由-H和(C1-C20)烷基组成的组
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> 8..8
<223> 氨基酸具有式(I),通过接头“L”将该氨基酸的 α 碳与第15位的氨基酸的 α 碳连接
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> 15..15
<223> 氨基酸具有式(I),通过接头“L”将该氨基酸的 α 碳与第8位的氨基酸的 α 碳连接
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> 17..17
<223> C末端对应于-C(O)R4,其中R4是选自由-OH和-NR17R18组成的组中的基团
<400> 26
Arg Ser Arg Arg Ser Lys Glu Ser Glu Val Phe Tyr Glu Leu Ala His
1 5 10 15
Gln
<210> 27
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 肽
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> 1..1
<223> N末端对应于-NHR5,其中R5选自由-H和(C1-C20)烷基组成的组
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> 10..10
<223> 氨基酸具有式(I),通过接头“L”将该氨基酸的 α 碳与第17位的氨基酸的 α 碳连接
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> 17..17
<223> 氨基酸具有式(I),通过接头“L”将该氨基酸的 α 碳与第10位的氨基酸的 α 碳连接
<220>
<221> MISC_FEATURE

<222> 17..17

<223> C末端对应于-C(O)R₄,其中R₄是选自由-OH和-NR₁₇R₁₈组成的组中的基团

<400> 27

Arg Ser Arg Arg Ser Lys Glu Ser Glu Val Phe Tyr Glu Leu Ala His

1 5 10 15

Gln

<210> 28

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> 1..1

<223> N末端对应于-NHR₅,其中R₅选自由-H和(C₁-C₂₀)烷基组成的组

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> 3..3

<223> 氨基酸具有式(I),通过接头“L”将该氨基酸的α碳与第10位的氨基酸的α碳连接

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> 10..10

<223> 氨基酸具有式(I),通过接头“L”将该氨基酸的α碳与第3位的氨基酸的α碳连接

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> 19..19

<223> C末端对应于-C(O)R₄,其中R₄是选自由-OH和-NR₁₇R₁₈组成的组中的基团

<400> 28

Arg Ser Arg Arg Ser Lys Glu Ser Glu Val Phe Tyr Glu Leu Ala His

1 5 10 15

Gln Leu Pro

<210> 29

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽

<220>

<221> MISC_FEATURE
<222> 8..8
<223> 该氨基酸具有式(I),R19是-CH₃基团;通过接头-(CH₂)₆-CH=CH-(CH₂)₃-将该氨基酸的α碳与第15位的氨基酸的α碳连接
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> 15..15
<223> 该氨基酸具有式(I),R19是-CH₃基团;通过接头-(CH₂)₆-CH=CH-(CH₂)₃-将该氨基酸的α碳与第8位的氨基酸的α碳连接
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> 17..17
<223> C末端对应于-C(=O)NH₂
<400> 29
Arg Ser Arg Arg Ser Lys Glu Ser Glu Val Phe Tyr Glu Leu Ala His
1 5 10 15
Gln
<210> 30
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 肽
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> 10..10
<223> 该氨基酸具有式(I),R19是-CH₃基团;通过接头-(CH₂)₆-CH=CH-(CH₂)₃-将该氨基酸的α碳与第17位的氨基酸的α碳连接
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> 17..17
<223> 该氨基酸具有式(I),R19是-CH₃基团;通过接头-(CH₂)₆-CH=CH-(CH₂)₃-将该氨基酸的α碳与第10位的氨基酸的α碳连接
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> 17..17
<223> C末端对应于-C(=O)NH₂
<400> 30
Arg Ser Arg Arg Ser Lys Glu Ser Glu Val Phe Tyr Glu Leu Ala His

1	5	10	15
Gln			
<210> 31			
<211> 19			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 肽			
<220>			
<221> MISC_FEATURE			
<222> 3..3			
<223> 该氨基酸具有式(I), R19是-CH ₃ 基团;通过接头-(CH ₂) ₆ -CH=CH-(CH ₂) ₃ -将该氨基酸的α碳与第10位的氨基酸的α碳连接			
<220>			
<221> MISC_FEATURE			
<222> 10..10			
<223> 该氨基酸具有式(I), R19是-CH ₃ 基团;通过接头-(CH ₂) ₆ -CH=CH-(CH ₂) ₃ -将该氨基酸的α碳与第3位的氨基酸的α碳连接			
<220>			
<221> MISC_FEATURE			
<222> 19..19			
<223> C末端对应于-C(=O)NH ₂			
<400> 31			
Arg Ser Arg Arg Ser Lys Glu Ser Glu Val Phe Tyr Glu Leu Ala His			
1	5	10	15
Gln Leu Pro			
<210> 32			
<211> 20			
<212> DNA			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 引物			
<400> 32			
agaaaatctg gcaccacacc			20
<210> 33			
<211> 20			
<212> DNA			
<213> 人工序列			
<220>			

72

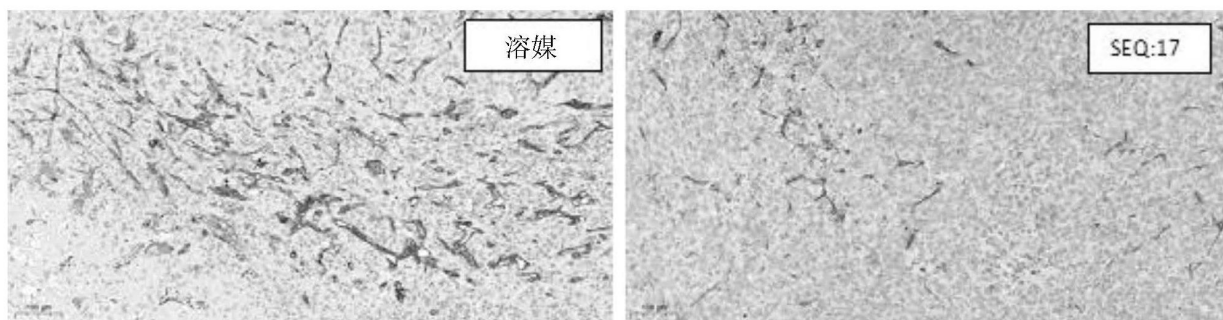


图1

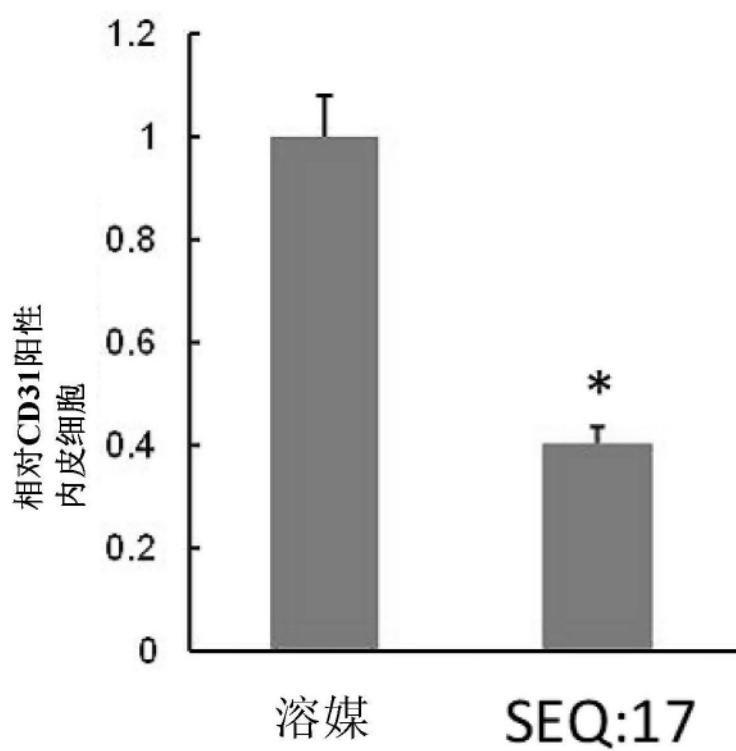


图2