



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101678068 B

(45) 授权公告日 2015. 05. 13

(21) 申请号 200880014311. 6

A61K 38/04(2006. 01)

(22) 申请日 2008. 02. 29

C07K 14/435(2006. 01)

A61K 38/10(2006. 01)

(30) 优先权数据

60/904, 507 2007. 03. 02 US

(56) 对比文件

WO 03/076561 A2, 2003. 09. 18, 权利要求

1-11, SEQ ID NO:8, 41.

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2009. 10. 30

审查员 樊颖

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2008/002754 2008. 02. 29

(87) PCT国际申请的公布数据

W02008/109010 EN 2008. 09. 12

(73) 专利权人 诺诺公司

地址 加拿大安大略

(72) 发明人 M·P·贝尔马里斯 J·D·加曼

P·S·卢 M·W·萨尔特

M·蒂米安斯基

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 黄革生 凌立

(51) Int. Cl.

A61K 38/00(2006. 01)

权利要求书1页 说明书30页

A61K 38/16(2006. 01)

序列表51页 附图9页

(54) 发明名称

不抑制 N 型钙通道而治疗中风和其他疾病

(57) 摘要

本发明提供了用于治疗中风的方法和用于治疗中风的组合物。该方法使用活性肽和内化肽的嵌合肽。内化肽是促进其自身和相连的活性肽吸收进入细胞而不与 N- 型钙通道大量结合的 tat 变体。Tat 变体的使用允许治疗中风而不具有与结合 N- 型钙通道相关的某些副作用。Tat 变体肽也可以与其他活性剂连接用于治疗其他疾病。

1. 经分离的嵌合肽,其中所述嵌合肽包含下述活性肽和内化肽,所述活性肽的氨基酸序列为 SEQ ID NO :12 所示的 KL SSIESDV 或 SEQ ID NO :13 所示的 KLSSIETDV,所述内化肽的氨基酸序列为 SEQ ID NO :135 所示的 FGRKKRRQRRR。
2. 药物组合物,其包含权利要求 1 的经分离的嵌合肽,以及可药用的载体。
3. 有效剂量的权利要求 1 的经分离的嵌合肽在制备药物中的用途,所述药物用于通过静脉施用,在患有中风或创伤性脑损伤的患者中治疗中风或创伤性脑损伤的损伤作用。
4. 权利要求 3 的用途,其中有效剂量是 0.05 到 500mg 所述嵌合肽的单一剂量。
5. 权利要求 4 的用途,其中有效剂量是 0.1 到 100mg 所述嵌合肽的单一剂量。
6. 权利要求 4 的用途,其中有效剂量是 0.5 到 50mg 所述嵌合肽的单一剂量。
7. 权利要求 4 的用途,其中有效剂量是 1-20 mg 所述肽的单一剂量。
8. 权利要求 3 的用途,其中所述患者患有缺血性中风。
9. 权利要求 3 的用途,其中所述患者患有出血性中风。
10. 权利要求 3 的用途,其中所述患者对 N- 型钙通道介导的副作用具有高于正常的易感性。
11. 权利要求 3 的用途,其中所述患者具有正常或低于正常的血压。
12. 经分离的嵌合剂,所述嵌合剂包含活性剂和促进嵌合剂吸收进入细胞的内化肽,其中所述内化肽氨基酸序列为 SEQ ID NO :135 所示的 FGRKKRRQRRR,其中所述活性剂是表 5 中所示的活性剂。
13. 权利要求 12 的经分离的嵌合剂,其中所述嵌合剂对 N- 型钙通道具有大于 10nM 的 kD。
14. 经分离的内化肽,其氨基酸序列为 SEQ ID NO :135 所示的 FGRKKRRQRRR。
15. 包含与活性剂连接的内化肽的嵌合剂,其中内化肽的氨基酸序列为 SEQ ID NO :135 所示的 FGRKKRRQRRR。

不抑制 N 型钙通道而治疗中风和其他疾病

[0001] 相关申请的交互参考

[0002] 本申请是非临时的,并且要求 2007 年 3 月 2 日提交的 USSN 60/904,507 的权益,该 USSN 60/904,507 通过完整引入本文用于所有的目的。

背景技术

[0003] 中风被预言为在美国每年影响多于 600,000 人。在 1999 年的报告中,超过 167,000 人死于中风,总死亡率为 278,000。在 1998 年,仅对从短期护理医院 (short-stay hospital) 出院的医疗保险受益人就赔付了 36 亿,不包括 > 1,000,000 人的长期护理,据报道他们由于中风而在日常生活活动中具有功能限制和困难 (Heart and Stroke Statistical update, American Heart Association, 2002)。没有一种疗法被证实通过直接保护神经元免于死亡而减轻由中风引起的脑损伤。

[0004] 中风的特征是局部缺血区域、脑出血区域和 / 或创伤区域的神经元细胞死亡。细胞死亡由谷氨酸对神经元的过度激发 (over-excitation) 引发,导致提高的细胞内 Ca^{2+} 和由 nNOS (神经元氧化氮合酶) 活性的提高而引起的增加的氧化氮。

[0005] 谷氨酸是中枢神经系统 (CNS) 中主要的兴奋性神经递质,并且介导跨过大部分兴奋性突触的神经传递。三类谷氨酸门控的离子通道受体 (N-甲基-D-天冬氨酸 (NMDA)、 α -氨基-3-羟基-5-甲基异噁唑-4-丙酸 (AMPA) 和红藻氨酸 (Kainate)) 转导突触后信号。其中, NMDA 受体 (NMDAR) 负责谷氨酸兴奋性神经毒性的主要部分。NMDA 受体是具有 NR1 亚基和一个或多个 NR2 亚基 (2A、2B、2C 或 2D) 的复合体 (见例如 McDain, C. 和 Caner, M. (1994) *Physiol. Rev.* 74 :723-760), 并且较不常见地具有 NR3 亚基 (Chatterton 等 (2002) *Nature* 415 :793-798)。NR1 亚基已显示结合甘氨酸,而 NR2 亚基则结合谷氨酸。甘氨酸和谷氨酸结合均是打开离子通道并允许钙进入细胞所需要的。四个 NR2 受体亚基似乎决定了 NMDA 受体的药理学和特性,其他的贡献来自于 NR1 亚基的替代性剪接 (Kornau 等 (1995) *Science* 269 :1737-40)。尽管 NR1 和 NR2A 亚基在脑中遍在表达,但是 NR2B 被限制于前脑中, NR2C 被限制于小脑中, NR2D 与其他类型相比是稀少的。

[0006] 因为兴奋性神经毒性应答中 NMDA 受体具有关键作用,所以它们被认为是治疗的靶标。已经开发出了靶向以下的化合物:离子通道 (氯胺酮、苯环利定、PCP、MK801、金刚烷胺)、外通道 (镁)、NR1 亚基上甘氨酸结合位点、NR2 亚基上谷氨酸结合位点和 NR2 亚基上特异性位点 (锌-NR2A; 艾芬地尔、曲索罗地 (Traxoprodil)-NR2B)。其中, NMDA 受体的非选择性拮抗剂在中风的动物模型中是最具神经保护性的药剂。然而,在中风和创伤性脑损伤中用这些药物进行临床试验迄今为止是失败的,通常归因于严重的副作用例如幻觉和甚至昏迷。

[0007] 根据报道,突触后密度-95 蛋白质 (PSD-95) 在介导兴奋性神经毒性和缺血性脑损害的通路中偶联 NMDAR (Aarts 等, *Science* 298, 846-850 (2002))。该偶联被转导神经元 (transducing neuron) 阻断,所述转导神经元具有来自 NMDAR 2B C-端的肽,所述肽结合与标准 tat 内化肽 (standard tat internalization peptide) 融合的 PSD-95。该处理减弱了

下游 NMDAR 信号传导而不抑制 NMDAR 活性,保护经培养的皮质神经元免受兴奋性神经毒性损伤 (excitotoxic insults),并在经历了暂时性局部脑缺血 (transientfocal cerebral ischemia) 的大鼠中减小了脑梗死体积。

[0008] 发明概述

[0009] 本发明提供了经分离的嵌合肽或其拟肽 (peptidomimetic),其中所述嵌合肽包含下述活性肽和内化肽,所述活性肽抑制 PSD-95 与 NMDA 受体的结合,所述内化肽促进嵌合肽吸收进入细胞,并且相对于 tat 肽 YGRKKRRQRRR (SEQ ID NO :1) 而言具有降低的与 N- 型钙通道结合的能力。任选地,内化肽是 tat 肽的变体。任选地,活性肽具有下述氨基酸序列,所述氨基酸序列由来自 NMDA 受体 C- 端的 3-25 个氨基酸或来自 PSD-95 受体的 PDZ 结构域 1 和 / 或 2 组成。任选地,活性肽具有包含 T/SXV/L (SEQ ID NO :14) 的氨基酸序列,内化肽具有包含 XGRKKRRQRRR (SEQ ID NO :2) 的氨基酸序列,其中 X 是除 Y 以外的氨基酸或者为空。任选地,X 是 F (SEQ ID NO :135)。任选地,X 为空 (SEQ ID NO :136)。任选地,内化肽由 GRKKRRQRRRP (SEQ ID NO :3) 组成。任选地,嵌合肽具有由 GRKKRRQRRRKLSSIESDV (SEQ ID NO :4) 组成的氨基酸序列。

[0010] 任选地,活性肽具有包含 [E/D/N/Q]-[S/T]-[D/E/Q/N]-[V/L] (SEQ ID NO :5) 的氨基酸序列。任选地,活性肽包含选自以下的氨基酸序列:ESDV (SEQ ID NO :6)、ESEV (SEQ ID NO :7)、ETDV (SEQ ID NO :8)、ETEV (SEQ ID NO :9)、DTDV (SEQ ID NO :10)、DTEV (SEQ ID NO :11)。任选地,活性肽具有包含 KLSSIESDV (SEQ ID NO :12) 的氨基酸序列。任选地,活性肽具有包含 KLSSIETDV (SEQ ID NO :13) 的氨基酸序列。任选地,嵌合肽具有包含 FGRKKRRQRRRKLSSIESDV (SEQ ID NO :19) 或 FGRKKRRQRRRKLSSIETDV (SEQ ID NO :16) 的氨基酸序列。任选地,嵌合肽具有由 FGRKKRRQRRRKLSSIESDV (SEQ ID NO :19) 或 FGRKKRRQRRRKLSSIETDV (SEQ ID NO :16) 组成的氨基酸序列。任选地,嵌合肽具有对 N- 型钙通道而言大于 10nM 的 K_d。

[0011] 本发明还提供了药物组合物,其包含上文所述经分离的嵌合肽或其拟肽和可药用的载体。

[0012] 本发明还提供了在患有中风或其他 CNS 损伤,或处于中风或其他 CNS 损伤风险下的患者中治疗中风的损伤作用的方法,其包括对患者施用有效量的嵌合肽或其拟肽。嵌合肽包含活性肽和内化肽,所述活性肽具有包含 T/SXV/L (SEQ ID NO :14) 的氨基酸序列,所述内化肽具有包含 XGRKKRRQRRR (SEQ ID NO :2) 的氨基酸序列,其中 X 是除 Y 以外的氨基酸。任选地,X 为 F (SEQ ID NO :135)。任选地,X 为空 (SEQ ID NO :136)。任选地,内化肽由 GRKKRRQRRRPQ (SEQ ID NO :15) 组成。任选地,嵌合肽具有包含 GRKKRRQRRRKLSSIESDV (SEQ ID NO :4) 的氨基酸序列。任选地,活性肽具有包含 [E/D/N/Q]-[S/T]-[D/E/Q/N]-[V/L] (SEQ ID NO :5) 的氨基酸序列。任选地,活性肽包含选自以下的氨基酸序列:ESDV (SEQ ID NO :6)、ESEV (SEQ ID NO :7)、ETDV (SEQ ID NO :8)、ETEV (SEQ ID NO :9)、DTDV (SEQ ID NO :10)、DTEV (SEQ ID NO :11)。任选地,活性肽具有包含 KLSSIESDV (SEQ ID NO :12) 的氨基酸序列。任选地,活性肽具有包含 KLSSIETDV (SEQ ID NO :13) 的氨基酸序列。任选地,嵌合肽具有包含 FGRKKRRQRRRKLSSIESDV (SEQ ID NO :19) 或 FGRKKRRQRRRKLSSIETDV (SEQ ID NO :16) 的氨基酸序列。任选地,嵌合肽具有由 FGRKKRRQRRRKLSSIESDV (SEQ ID NO :19) 或 FGRKKRRQRRRKLSSIETDV (SEQ ID NO :16) 组成的氨基酸序列。任选地,有效剂量是 0.05 到

500mg、任选地 0.1 到 100mg、0.5 到 50mg、或 1-20mg 肽或拟肽的单一剂量。任选地，患者患有缺血性中风。任选地，患者患有出血性中风。

[0013] 任选地，患者对 N- 型钙通道介导的副作用具有上述正常易感性。任选地，患者具有正常或低于正常的血压。本发明还提供了评价内化肽可能的副作用的方法。所述方法涉及提供促进下述活性肽吸收进入细胞的内化肽，所述活性肽抑制 PDS-95 与 NMDA 受体的结合；以及测定内化肽与 N- 型钙通道的结合。结合程度是内化肽在临床使用中可能的副作用的指标。任选地，如下提供内化肽：筛选测试肽，以测定测试肽是否促进活性肽的吸收。

[0014] 本发明还提供了经分离的嵌合剂 (chimeric agent)，所述嵌合剂包含活性剂和促进嵌合剂吸收进入细胞的内化肽。该内化肽是 tat 肽 YGRKKRRQRRR (SEQ ID NO:1) 的变体，其具有相对于 tat 肽降低的与 N- 型钙通道结合的能力。任选地，活性剂是表 5 中所示的活性剂。任选地，内化肽具有包含 XGRKKRRQRRR (SEQ ID NO:2) 的氨基酸序列，其中 X 是除 Y 以外的氨基酸或为空。任选地，X 为 F (SEQ ID NO:135)。任选地，X 为空 (SEQ ID NO:136)。任选地，内化肽由 GRKKRRQRRRP (SEQ ID NO:3) 组成。任选地，嵌合剂对 N- 型钙通道而言具有大于 10nM 的 Kd。

[0015] 本发明还提供了药物组合物，其包含上文所述经分离的嵌合剂和可药用的载体。

[0016] 本发明还提供了具有下述氨基酸序列的内化肽，所述氨基酸序列包含 XGRKKRRQRRR (SEQ ID NO:2)，其中 X 是除 Y 以外的氨基酸或为空。任选地，X 是 F (SEQ ID NO:135)。任选地，X 为空 (SEQ ID NO:136)。任选地，内化肽由 GRKKRRQRRRP (SEQ ID NO:3) 组成。任选地，内化肽具有对 N- 型钙通道阻断剂而言大于 10nM 的 Kd。

[0017] 本发明还在促进活性剂吸收进入细胞的方法中提供了下述改进，所述方法包括将细胞与和内化肽连接的活性剂接触，所述改进中筛选内化肽以测定其与 N- 型钙通道结合的能力。

[0018] 本发明还在包含与活性剂连接的内化肽的嵌合剂中提供了下述改进，其中内化肽具有包含 XGRKKRRQRRR (SEQ ID NO:2) 的氨基酸序列，其中 X 是除 Y 以外的氨基酸或为空。

[0019] 本发明还在治疗神经学疾病的方法中提供了下述改进，所述方法包括对患有或易患疾病的患者施用有效量的具有针对所述疾病的药物活性的活性剂，所述改进中活性剂与具有包含 XGRKKRRQRRR (SEQ ID NO:2) 的氨基酸序列的 tat 变体肽连接，其中 X 是除 Y 以外的氨基酸或为空。

[0020] 本发明还在用活性剂治疗疾病的方法中提供下述改进，所述活性剂具有治疗疾病的细胞内活性，所述方法包括对患有或易患疾病的患者施用有效量的活性剂，所述改进中活性剂与具有包含 XGRKKRRQRRR (SEQ ID NO:2) 的氨基酸序列的 tat 变体肽连接，其中 X 是除 Y 以外的氨基酸或为空。

[0021] 附图概述

[0022] 图 1A、B、C：受体结合 / 抑制研究的结果，所述研究评价肽 YGRKKRRQRRRKLSSIESDV (SEQ ID NO:17) 抑制多种放射性标记的配体与细胞受体结合的能力。

[0023] 图 2：应用多种肽对 DRG 神经元中 N- 型钙电流 (上方) 或全细胞电流 (下方) 振幅的影响。

[0024] 图 3A 和 3B 显示 (A) 使用脑膜血管阻塞模型 (pial vessel occlusion model) 开

始持久性缺血后 1 小时处理的大鼠中, Tat-NR2B9c 和 F-Tat-NR2B9c 对脑梗死体积的影响 (10 只大鼠/组); 和 (B) 来自各组的代表性大鼠的连续脑切片, 用氯化三苯基四氮唑 (TTC) 染色。

[0025] 图 4: DRG 神经元中, 针对 N- 型钙电流的某些肽的 IC_{50} 测定。

[0026] 图 5A 和 5B: DRG 神经元中 L- 型电流期间, Tat-NR2B9c 对 N- 型钙电流的选择性。图 5A 显示培养的 DRG 神经元中 Tat-NR2B9c (100 μ M) 和 ω - 食鱼螺毒素 (1 μ M) 对钙电流的影响。图 5B 显示存在 Tat-NR2B9c (细胞内 100 μ M) 时 DRG 钙电流的硝苯吡啶抑制。

[0027] 图 6: Tat-NR2B9c 对 N- 型钙电流抑制缺乏使用 - 依赖性。通过不同的频率 (0.07、10、20、50Hz) 在一个代表性 DRG 神经元中记录电流。如所指示应用 Tat-NR2B9c (100 μ M)。电流显示强频率依赖性的减少, 并且频率的增加未提高 Tat-NR2B9c 的抑制作用。

[0028] 图 7: Tat-NR2B9c 对 N- 型钙电流的抑制缺乏电压依赖性。在培养的 DRG 神经元中 Ca^{2+} 电流的 I-V 关系。在存在或不存在 10 μ M 硝苯吡啶时应用 Tat-NR2B9c (10, 100 μ M)。从 -60mV 的保持电位 (holding potential) 起, 使用从 -40 到 +50mV 的 50ms 电压钳步段 (voltage-clamp steps) 引发电流。

[0029] 图 8: 在大鼠中持久缺血的脑膜阻塞模型中, 评价使用替代性 C- 端序列观察到的神经元保护。

[0030] 发明详述

[0031] I. 定义

[0032] “嵌合肽”表示具有两个天然不彼此结合的组件肽的肽, 所述两个组件肽作为融合蛋白或通过化学键彼此结合。

[0033] “融合多肽”是指复合的多肽, 即由两个 (或更多) 不同的、异源的多肽形成的单个连续的氨基酸序列, 所述不同的异源多肽通常不在一条氨基酸序列中融合在一起。

[0034] 术语“PDZ 结构域”是指约 90 个氨基酸的模块蛋白质结构域, 其特征是对脑突触蛋白 PSD-95、果蝇 (*Drosophila*) 分隔连接蛋白 Discs-Large (DLG) 和上皮紧密连接蛋白 ZO1 (ZO1) 具有显著 (例如至少 60%) 的序列同一性。PDZ 结构域也称作 Discs-Large 同源性重复 (“DHRs”) 和 GLGF 重复。PDZ 结构域通常显示保留核心共有序列 (Doyle, D. A., 1996, Cell 85:1067-76)。示例性的含 PDZ 结构域的蛋白质和 PDZ 结构域序列在美国申请 No. 10/714, 537 中公开, 所述美国申请完整引入本文作为参考。

[0035] 术语“PL 蛋白质”或“PDZ 配体蛋白质”是指与 PDZ- 结构域形成分子复合体的天然存在的蛋白质, 或者表示其羧基端独立于全长蛋白质表达时 (例如作为 3-25 个残基, 例如 3、4、5、8、9、10、12、14 或 16 个残基的肽片段) 形成这类分子复合体的蛋白质。可体外观察该分子复合体, 或者使用例如美国申请 No. 10/714, 537 中所述的“A 实验”或“G 实验”体内观察该分子复合体。

[0036] 术语“NMDA 受体”或“NMDAR”是指已知与 NMDA 相互作用的膜关联蛋白。因此该术语包括背景章节中描述的多种亚基形式。这些受体可以是人或非人的 (例如小鼠、大鼠、兔子、猴子)。

[0037] “PL 基序”是指 PL 蛋白质 C- 端的氨基酸序列 (例如 C- 端 3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、20 或 25 个连续残基) (C- 端 PL 序列) 或已知结合 PDZ 结构域的内部序列 (“内部 PL 序列”)。

[0038] “PL 肽”是包含 PL 基序或由 PL 基序组成或以其他方式基于 PL 基序的肽,所述 PL 基序与 PDZ 结构域特异性结合。

[0039] 术语“分离的”或“纯化的”表示目标物类 (species) (例如肽) 已从样品中存在的污染物中纯化,所述样品例如从含有目标物类的天然来源获得的样品。如果目标物类是分离或纯化的,则其是样品中存在的主要的大分子 (例如多肽) 物类 (即在摩尔基础上其比组合物中任何其他个体物类都更加丰富), 并且优选地, 目标物类构成存在的所有大分子物类的至少约 50% (以摩尔为基础)。通常, 分离的、纯化的或基本纯化的组合物构成组合物中存在的所有大分子物类的多于 80% 到 90%。最优选地, 目标物类被纯化为基本同质 (即通过常规检测方法不能在组合物中检测到污染物物类), 其中组合物基本由单一的大分子物类组成。术语分离的或纯化的不必须排除其他组分的存在, 所述其他组分旨在与分离的物类组合发挥作用。例如, 尽管内化肽与活性肽连接, 但是其仍然可以被描述为分离的。

[0040] “拟肽”是指合成的化合物, 其具有与天然氨基酸组成的肽的基本相同的结构和 / 或功能性特征。拟肽可含有完全合成的、非天然的氨基酸类似物, 或可以是部分为天然肽氨基酸、部分为非天然氨基酸类似物的嵌合分子。拟肽也可以掺入任何量的天然氨基酸保守替换, 只要这类替换也基本上不改变拟肽的结构和 / 或抑制活性或结合活性即可。多肽模拟组合物可含有非天然结构组件的任何组合, 所述非天然结构组件通常来自三种结构组: a) 除天然酰胺键 (“肽键”) 连接外的其他残基连接组; b) 代替天然存在的氨基酸残基的非天然残基; 或 c) 引起二级结构模拟的残基, 即引起或稳定二级结构 (例如 β -转角、 γ -转角、 β -片层、 α -螺旋构象等等) 的残基。在包含活性肽和内化肽的嵌合肽的拟肽中, 活性部分或内化部分或二者均可以是拟肽。

[0041] 术语“特异性结合”是指两个分子 (例如配体和受体) 之间的结合, 其特征是甚至在存在许多其他不同分子时一种分子 (配体) 与另一种特异分子 (受体) 结合的能力, 即在分子的异质混合物中显示一种分子对另一分子的优先结合的能力。配体与受体的特异性结合也如下被证明: 存在过量未标记的配体时, 经可检测标记的配体与受体的结合降低 (即结合竞争实验)。

[0042] 兴奋性神经毒性是兴奋性神经递质谷氨酸的受体 (例如 NMDA 受体如 NMDAR 2B) 过度活化损害和杀死神经元的病理过程。

[0043] 标准 tat 内化肽包含氨基酸序列 YGRKKRRQRRR (SEQ ID NO :1)。

[0044] 变体 tat 内化肽相对于标准 tat 肽而言, 至少缺失、替换或内部插入了一个氨基酸。

[0045] 活性剂用于描述具有或可具有药理活性的化合物。药剂包括: 属于已知药物的化合物, 已鉴定了药理学活性但未进行进一步治疗评价的化合物, 和属于要针对药理学活性进行筛选的集合和文库成员的化合物。活性肽是属于肽的活性剂。活性嵌合剂包含与内化肽连接的活性剂。

[0046] “药理学”活性表示活性剂在下述筛选体系中显示活性, 所述筛选体系表明活性剂在疾病的预防或治疗中 useful 或者可能有用。筛选体系可以是体外、细胞、动物或人的。尽管可能需要进一步测试来确定在疾病治疗中的真实预防或治疗功用, 但是药剂仍然可以被描述为具有药理学活性。

[0047] 统计学显著的是指 p -值 < 0.05 , 优选地 < 0.01 , 最优选地 < 0.001 。

[0048] II. 概述

[0049] 本发明提供了适用于降低中风和至少部分由 NMDAR 兴奋性神经毒性介导的其他神经学病症的损伤效应的嵌合肽及其拟肽。嵌合肽至少具有两个组件。第一个组件是具有下述氨基酸序列的活性肽,所述氨基酸序列包含或基于 NMDA 受体 2 亚基的 PL 基序(例如对 NMDA NR2B 而言 GenBank 登录号为 4099612)(即 PL 肽)。尽管实践本发明不需要了解机制,但是相信这类肽至少部分通过抑制 NMDAR 与突触后密度 95 蛋白之间的相互作用来发挥作用(即 PSD-95 抑制剂)。

[0050] 活性肽也可以抑制 PSD-95 与 nNOS 和其他谷氨酸受体(例如钾盐镁矾受体或 AMPA 受体)之间的相互作用。与先前在临床试验中失败的谷氨酸拮抗剂不同,这类肽能够阻断缺血期间的神经中毒信号传导而不导致 NMDARs 其他功能丧失的不利后果。嵌合肽的第二组件是内化肽,在先前的工作中所述内化肽代表与 NMDAR 2B 肽融合的标准 tat 肽的变体。

[0051] 变体 tat 肽的用途部分依赖于本申请中所述的下述结果:标准 tat 肽,尤其是与 NMDAR 肽 KLSSIESDV(SEQ ID NO:12)接合时,结合 N-型钙通道并抑制其活性。位于突触前神经末梢的 N-型钙通道调节神经递质释放,包括来自初级传入伤害性感受器(nociceptors)的脊末端(spinal terminations)的神经递质释放。关于药物齐考诺肽(Ziconotide)(或 Prialt,锥形蜗牛肽 Ω -食鱼螺毒素 M-VII-A(cone snail peptide omega-conotoxin M-VII-A)前体的一种合成形式)结合 N-型通道的药理学作用已经良好的表征。结合 N-型钙通道与大量活动相关联,其中一些或所有在中风患者中可能是不想要的。这些活动包括比吗啡诱导的强得多的痛觉缺失,低血压,降低的意识水平,抑郁,认知缺损,幻觉,肌酸激酶水平提高,和尿潴留(见例如 Brose 等, Clin J Pain 13:256-259, (1997); Mathur 等, Semin Anesthesia Perioperative Med Pain 19:67-75, 2000, Staats 等, JAMA 291:63-70, 2004, McGuire 等, J Cardiovasc Pharmacol 30:400-403, 1997)。Mayo 诊所列出了用 Prialt 治疗后观察到的以下副作用,所述 Prialt 对 N-型钙通道是高度选择性的。

[0052] 表 1

[0053]

严重性	发病率	表型
严重的	常见	看到、听到或感觉到不存在的东西；自杀的念头。
	较不常见	胸痛；寒战；意识错乱；癫狂(convulsions)；咳嗽；深色尿；眩晕(dizziness)；困倦；晕厥；心跳过快；发热；全身性疾病感觉；头晕(lightheadedness)；肌肉痉挛或四肢抽搐；肌肉强直；快速浅呼吸；呼吸急促；喷嚏；咽喉痛；颈或背强直；胸部紧缩感；呼吸困难；集中注意力困难；入睡困难；异常的疲劳或虚弱；喘鸣。
	过量	降低的知觉或应答性；严重的睡意；颤抖和行走不稳；发抖或肌肉控制或协调的其他问题；不受控制的眼运动；不稳
中等	常见	烧灼；行走和平衡的改变；笨拙或不稳；意识错乱；蠕动感；腹泻；眩晕；过度的肌肉紧张、肌肉张力或紧缩；恐惧；自身或环境持续移动的感觉；发热；头痛；搔痒；力量的缺乏或损失；头晕；食欲不振；恶心；神经质；麻木；演讲或讲话的问题；感觉到转动；发抖或肌肉控制或协调的其他问题；不受控制的眼运动；尿潴留；呕吐；体重减轻。

[0054]

的	较不常见	酸或酸臭的胃；背痛；不好的、异常的或令人不悦的（后）味觉；嗝气；膀胱痛；有血或混浊的尿；擦伤(bruising)；异常的脑脊液；味觉改变；淤血；便秘；耳中持续鸣震或蜂鸣或其他无法解释的噪音；哭泣；降低的知觉或应答性；脱水；人格解体；抑郁；排尿困难、烧灼或疼痛；移动困难；夜视困难；复视；口干燥；皮肤干燥；咽喉干燥或疼痛；病理性心境恶劣(dysphoria)；欣快；昏晕(fainting)；心跳快速或不规则；感觉到其他人能够听到自己的想法、注视自己或者能够控制自己的行为；频繁的排尿冲动；听觉丧失；胃灼热(heartburn)；声嘶；敌意；眼睛对阳光灵敏度的提高；提高的对疼痛或触摸的灵敏度；消化不良；丧失膀胱控制；丧失记忆或记忆有问题；肺病症；颈痛；神经痛；关节痛；苍白的皮肤；耳中重击声；情绪上快速反应或过度反应；快速改变的心境；红色、鳞屑、肿胀或脱屑的皮肤区域；在导管位点处发红或者疼痛；鼻漏(runny nose)；严重的肌肉强直；失眠；慢或快的心跳；胃部不适、紊乱或疼痛；出汗；关节出汗或发红；颈中触痛、肿胀的腺体；吞咽困难；异常的出血或擦伤；异常的疲劳或虚弱；声音改变；皮肤温暖；腿虚弱或沉重。
---	------	---

[0055] 本发明的嵌合肽和拟肽与 Tat-NR2B9c 相比降低或消除了与 N- 型钙通道的结合和

对 N- 型钙通道的抑制, 并因此避免了使用 N- 型钙通道的高度特异的抑制剂所观察到的大量副作用, 包括严重的精神病学副作用。相对于 Tat-NR2B9c, 用本发明的嵌合肽及其拟肽治疗人时, 副作用的减少导致治疗指数的提高。

[0056] 本发明人还发现, 可通过使用标准 tat 序列的变体避免与 N- 型钙通道的结合。Tat 变体与基于或包含 NMDAR 2B C- 端或其他亚型的活性肽的组合允许以减少的副作用治疗中风, 这归因于 N- 型钙通道的抑制。

[0057] III. 活性肽

[0058] 适用于本发明中的活性肽抑制突触后密度 -95 蛋白质 (PSD-95) (由 Stathakism, Genomics 44(1):71-82(1997) 提供的人氨基酸序列) 的 PDZ 结构域 1 和 2 与一个或多个 NMDA 受体 2 亚基的 C- 端 PL 序列之间的相互作用, 所述 NMDA 受体 2 亚基包括神经元 N- 甲基 -D- 天冬氨酸受体的 NR2B 亚基 (Mandich 等, Genomics 22,216-8(1994))。NMDAR2B 具有 GenBankID 4099612, C- 端 20 个氨基酸 FNGSSNGHVYEKLSIESDV (SEQ ID NO:24) 和 PL 基序 ESDV (SEQ ID NO:6)。活性肽优选地抑制 PSD-95 的人形式和人 NMDAR 受体。然而, 抑制也可以由蛋白质的种类变体显示。可使用的 NMDA 和谷氨酸受体的列表见下文:

[0059] 表 2: 带有 PL 序列的 NMDA 受体

[0060]

名称	GI 或 Acc#	C-端 20 元序列	C-端 4 元序列	PL?	内部 PL ID
NMDAR1	307302	HPTDITGPLNLSDPSVST VV (SEQ ID NO:25)	STVV (SEQ ID NO:39)	X	AA216
NMDAR1-1	292282	HPTDITGPLNLSDPSVST VV (SEQ ID NO:25)	STVV (SEQ ID NO:39)	X	AA216
NMDAR1-4	472845	HPTDITGPLNLSDPSVST VV (SEQ ID NO:25)	STVV (SEQ ID NO:39)	X	AA216
NMDAR1-3b	2343286	HPTDITGPLNLSDPSVST VV (SEQ ID NO:25)	STVV (SEQ ID NO:39)	X	AA216
NMDAR1-4b	2343288	HPTDITGPLNLSDPSVST VV (SEQ ID NO:25)	STVV (SEQ ID NO:39)	X	AA216
NMDAR1-2	11038634	RRAIEREEGQLQLCSRH RES (SEQ ID NO:26)	HRES (SEQ ID NO:40)		

[0061]

名称	GI 或 Acc#	C-端 20 元序列	C-端 4 元序列	PL?	内部 PL ID
NMDAR1-3	11038636	RRAIEREEGQLQLCSRH RES (SEQ ID NO:26)	HRES (SEQ ID NO:40)		
NMDAR2C	6006004	TQGFGPCTWRRISSLES EV (SEQ ID NO:27)	ESEV (SEQ ID NO:7)	X	AA180
NMDAR3	560546	FNGSSNGHVYEKLSSIES DV (SEQ ID NO:24)	ESDV (SEQ ID NO:6)	X	AA34.1
NMDAR3A	17530176	AVSRKTELEEYQRTSRT CES (SEQ ID NO:28)	TCES (SEQ ID NO:41)		
NMDAR2B	4099612	FNGSSNGHVYEKLSSIES DV (SEQ ID NO:24)	ESDV (SEQ ID NO:6)	X	
NMDAR2A	558748	LNSCSNRRVYKKMPSIE SDV (SEQ ID NO:29)	ESDV (SEQ ID NO:6)	X	AA34.2
NMDAR2D	4504130	GGDLGTRRGSAHFSSLE SEV (SEQ ID NO:30)	ESEV (SEQ ID NO:7)	X	
谷氨酸受体 82	AF009014	QPTPTLGLNLGNDPDRGTSI (SEQ ID NO:31)	GTSI (SEQ ID NO:42)	X	
谷氨酸受体 1	I28953	MQSIPCMSSHSSGMPLGATGL (SEQ ID NO:32)	ATGL (SEQ ID NO:43)	X	
谷氨酸受体 2	L20814	QNFATYKEGYNVYGIESVKI (SEQ ID NO:33)	SVKI (SEQ ID NO:44)	X	
谷氨酸受体 3	AF167332	QNYATYREGYNVYGTESVKI (SEQ ID NO:34)	SVKI (SEQ ID NO:44)	X	
谷氨酸受体 4	U16129	HTGTAIRQSSGLAVIASDLP (SEQ ID NO:35)	SDLP (SEQ ID NO:45)		
谷氨酸受体 5	U16125	SFTSILTCHQRRRTQRKETVA (SEQ ID NO:36)	ETVA (SEQ ID NO:46)	X	
谷氨酸受体 6	U16126	EVINMHTFNDRLPGKETMA (SEQ ID NO:37)	ETMA (SEQ ID NO:47)	X	
谷氨酸受体 7	U16127	RRLPGKDSMACSTSLAPVFP (SEQ ID NO:38)	PVFP (SEQ ID NO:48)		

[0062] 不同 NMDAR 亚型在兴奋性神经毒性中作用的证明由例如 Lynch, J. Pharm. Exp. Therapeutics 300,717-723(2002); Kemp, Nature Neurosci. 增刊, 第 5 卷 (2002) 提供。一些活性肽抑制 PSD-95 和多个 NMDAR 亚基之间的相互作用。在这类情况下肽的使用不必须需要理解不同 NMDAR 各自对兴奋性神经毒性的贡献。其他活性肽是对单一 NMDAR 特异性

的。

[0063] 活性肽包含或基于来自任何上述亚基 C-端的 PL 基序,并且具有包含 [S/T]-X-[V/L] (SEQ ID NO:14) 的氨基酸序列。该序列优选地存在于本发明的肽的 C-端。优选的肽具有在其 C-端包含 [E/D/N/Q]-[S/T]-[D/E/Q/N]-[V/L] (SEQ ID NO:5) 的氨基酸序列。示例性的肽包含:ESDV (SEQ ID NO:6)、ESEV (SEQ ID NO:7)、ETDV (SEQ ID NO:8)、ETEV (SEQ ID NO:9)、DTDV (SEQ ID NO:10) 和 DTEV (SEQ ID NO:11) 作为 C-端氨基酸。两种尤其优选的肽是 KLSSIESDV (SEQ ID NO:12) 和 KLSSIETDV (SEQ ID NO:13)。不含有内化肽的本发明肽通常具有 3-25 个氨基酸,并且优选 5-10 个氨基酸、尤其是 9 个氨基酸的肽长度(也不含有内化肽)。在一些这类活性肽中,所有的氨基酸来自于 NMDA 受体的 C-端。

[0064] 其他活性肽包括 PSD-95 的 PDZ 结构域 1 和 / 或 2,或抑制 PSD-95 与 NMDA 受体(例如 NMDA2B)之间相互作用的任何这些结构域的亚片段。这类活性肽包含至少 50、60、70、80 或 90 个来自 PSD-95 的 PDZ 结构域 1 和 / 或 PDZ 结构域 2 的氨基酸,其存在于 Stathakis, Genomics 44(1):71-82(1997)(人序列)或 NP_031890.1, GI:6681195(小鼠序列)提供的 PSD-95 的约第 65-248 个氨基酸或其他物种变体的相应区域内。

[0065] III. 内化肽

[0066] 任何本发明的活性肽可以与内化肽连接,优选地在其 N-端与内化肽连接,所述内化肽促进通过细胞质膜的转运。内化肽包含标准 tat 序列 YGRKKRRQRRR (SEQ ID NO:1) 的变体。尽管本发明的实践不依赖于对机制的理解,但是相信跨膜和结合 N-型钙通道的两种能力均由肽中通常较多存在带正电的残基 Y、R 和 K 造成。用于本发明的变体肽应当保留促进吸收进入细胞的能力,但是具有降低的与 N-型钙通道结合的能力。一些合适的内化肽包含氨基酸序列 XGRKKRRQRRR (SEQ ID NO:2) 或由其组成,其中 X 是除 Y 以外的其他氨基酸(例如任何其他 19 种天然氨基酸),或者为空(在这种情况下 G 为游离的 N-端残基)。一种优选的 tat 变体具有用 F 替换的 N-端 Y 残基。因此,包含 FGRKKRRQRRR (SEQ ID NO:49) 或由其组成的 tat 变体是优选的。另一种优选的变体 tat 内化肽由 GRKKRRQRRR (SEQ ID NO:50) 组成。如果 XGRKKRRQRRR (SEQ ID NO:2) 侧翼存在额外的残基(除了活性肽以外),则残基可以例如是来自 tat 蛋白质的该区段侧翼的天然氨基酸、通常用于接合两个肽结构域的间隔区或连接体氨基酸,例如 Gly (Ser) 4 (SEQ ID NO:134)、TGEKP (SEQ ID NO:51)、GGRRGGGS (SEQ ID NO:52) 或 LRQRDGERP (SEQ ID NO:53)(见例如 Tang 等 (1996), J. Biol. Chem. 271, 15682-15686; Hennecke 等 (1998), Protein Eng. 11, 405-410),或可以是任何其他下述氨基酸,所述氨基酸不可检测地降低赋予吸收无侧翼残基的变体的能力,并且相对于无侧翼残基的变体而言不显著提高 N-型钙通道的抑制。优选地, XGRKKRRQRRR (SEQ ID NO:2) 任一侧除了活性肽以外的侧翼氨基酸的数量不超过十。优选不存在侧翼氨基酸,并且内化肽在其 C-端直接与活性肽连接。

[0067] 可用于允许吸收任何本发明的活性肽从而抑制 PSD-95 相互作用而不抑制 N-型钙通道的本发明的其他内化肽包括下表 3 中所示的内化肽。推荐筛选这些内化肽以证实期望的吸收和 N-型钙通道抑制的缺乏,如实施例所述。

[0068] 实施例中展示的数据证明 Tat-NR2B9c 的 N-端酪氨酸残基 (Y) 成为苯丙氨酸 (F) 的突变足以取消对 N-型钙通道的抑制而不降低肽的剩余部分的下述能力:定位至该药物在脑中的作用位点并降低在持久缺血的动物模型中诱导中风后的损伤。另外,实验证实

证明单独的 Tat (YGRKKRRQRRR (SEQ ID NO :1)) 足以诱导所观察到的对 N- 型钙通道的抑制, 并且与 Tat 结合时在 C- 端添加的不同肽仅对抑制具有温和的影响。因此, Tat 序列 N- 端酪氨酸的改变或去除很可能对于降低结合是重要的。接近该酪氨酸的碱性氨基酸的突变也可以导致对 N- 型钙通道的结合和抑制的降低。下表中的示例序列在本文中被预测为维持转运能力而不抑制 N- 型钙通道, 并因此对中风或神经外伤的治疗而言允许更大的治疗指数。

[0069] 表 3

[0070]

X-FGRKKRRQRRRKLSSIESDV (F-TatNR2B9c)	SEQ ID NOS :19, 77, 78, 79
X-GKKKKKQKKKLSSIESDV	SEQ ID NO :54, 80, 81, 82
X-RKKRRQRRRKLSSIESDV	SEQ ID NO :55, 83, 84, 85
X-GAKRRQRRRKLSSIESDV	SEQ ID NO :56, 86, 87, 88
X-AKKRRQRRRKLSSIESDV	SEQ ID NO :57, 89, 90, 91
X-GRKARRQRRRKLSSIESDV	SEQ ID NO :58, 92, 93, 94
X-RKARRQRRRKLSSIESDV	SEQ ID NO :59, 95, 96, 97
X-GRKKARQRRRKLSSIESDV	SEQ ID NO :60, 98, 99, 100
X-RKKARQRRRKLSSIESDV	SEQ ID NO :61, 101, 102, 103
X-GRKKRRQARRKLSSIESDV	SEQ ID NO :62, 104, 105, 106
X-RKKRRQARRKLSSIESDV	SEQ ID NO :63, 107, 108, 109
X-GRKKRRQARKLSSIESDV	SEQ ID NO :64, 110, 111, 112
X-RKKRRQARKLSSIESDV	SEQ ID NO :65, 113, 114, 115
X-RRPRRPRRKLSSIESDV	SEQ ID NO :66, 116, 117, 118
X-RRARRARRRKLSSIESDV	SEQ ID NO :67, 119, 120, 121
X-RRRARRRARRKLSSIESDV	SEQ ID NO :68, 122, 123, 124
X-RRRPRRPRRKLSSIESDV	SEQ ID NO :69, 125, 126, 127
X-RRPRRPRRKLSSIESDV	SEQ ID NO :70, 128, 129, 130
X-RRARRARRKLSSIESDV	SEQ ID NO :71, 131, 132, 133

[0071] X 可以表示游离的氨基端、生物素分子或其他帽化部分,包括但不限于 H、乙酰基、苯甲酰基、烷基(脂肪族的)、焦谷氨酸、末端带有环烷基的烷基、带有烷基间隔区的生物素、(5,6)-FAM。帽化基团与 N-端肽的化学偶联可以通过酰胺化学、硫酰胺化学、砷化学、烷基化化学实现。另外, X 也可以是除酪氨酸以外的其他氨基酸。

[0072] 内化肽通常与活性肽连接而作为融合肽,但是也可以通过化学键接合。两种组分的偶联可以通过偶联剂或缀合剂实现。大量这类试剂是可商业获得的,并由 S. S. Wong, Chemistry of Protein Conjugation and Cross-Linking, CRC Press (1991) 综述。交联试剂的一些例子包括 J-琥珀酰亚胺-3-(2-吡啶二硫代)丙酸盐(SPDP)或 N,N'-(1,3-亚苯基)双马来酰亚胺; N,N'-亚乙基-双-(碘乙酰胺)或具有 6 到 11 个碳亚甲基桥的其他这类试剂(其对巯基相对特异);和 1,5-二氟-2,4-二硝基苯(其与氨基和酪氨酸基形成不可逆的连接)。其他交联试剂包括 p,p'-二氟-m,m'-二硝基二苯砷(其与氨基和酚基形成不可逆的交联);二乙胺代己酸二甲酯(dimethyladipimide)(其对氨基是特异的);苯酚-1,4-二磺酰氯(其主要与氨基反应);1,6-己二异氰酸酯或二异硫氰酸酯,或苯基偶氮-对-二异氰酸酯(其主要与氨基反应);戊二醛(其与若干不同的侧链反应)和双重氨基联苯胺(其主要与酪氨酸和组氨酸反应)。

[0073] 肽,例如前文所述的肽能够任选地被衍生化(例如乙酰化、磷酸化和/或糖基化)以促进与抑制剂的亲和力,促进抑制剂跨越细胞膜被转运的能力,或促进稳定性。作为一个特定的例子,对其中来自 C-端的第三个残基为 S 或 T 的抑制剂而言,可在使用肽之前将该残基磷酸化。

[0074] 可通过固相合成或重组方法合成本发明的肽,其任选地与内化结构域融合。可使用科学文献和专利文献中所述的多种方案和方法合成拟肽,所述科学文献和专利文献例如为 Organic Syntheses Collective Volumes, Gilman 等(编) John Wiley & Sons, Inc., NY, al-Obeidi (1998) Mol. Biotechnol. 9:205-223; Hruby (1997) Curr. Opin. Chem. Biol. 1:114-119; Ostergaard (1997) Mol. Divers. 3:17-27; Ostresh (1996) Methods Enzymol. 267:220-234。

[0075] V. N-型钙通道

[0076] N-型钙通道是由 α_{1B} -(Cav2.2)、 β -和 $\alpha_2\delta$ -亚基和有时为 γ 亚基组成的杂寡聚复合物。 α_{1B} -亚基形成主要的通道并由单个基因编码。存在四种 $\alpha_2\delta$ -亚基基因($\alpha_2\delta$ -1- $\alpha_2\delta$ -4) (Snutch 等, Molecular properties of voltage-gated calcium channels. In: Voltage-gated calcium (Zamponi G 编), 第 61-94 页。New York: Landes Bioscience, 2005. Catterall, Biochemical studies of Ca^{2+} channels. In: Voltage-Gated Calcium (Zamponi G 编), 第 48-60 页。New York: Landes Bioscience, 2005)。物种间存在高度 N-型钙通道保守性。因此,可以使用来自人或其他物种(例如大鼠)的 N-型钙通道,针对结合的缺乏筛选 tat 变体。

[0077] 优选筛选 Williams 等, 1992 (Science 257 (5068), 389-395 (1992), Genbank 登录号 Q00975, 物种: 人类 (Homo Sapiens)) 和 Coppola 等, 1994 (FEBS Lett. 338 (1), 1-5 (1994), Genbank 登录号 055017, 物种: 小鼠 (Mus Musculus)) 和 Dubel 等, 1992 (Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 89 (11), 5058-5062 (1992) Genbank 登录号 Q02294, 物种: 褐鼠 (Rattus norvegicus)) 描述的 α_{1B} -亚基 N-型钙通道, 包括具有相似钙通道活性的剪接变体

及其片段至完整的蛋白质。也可以使用与任何上述序列至少具有 90% 序列同一性的等位基因变体和物种变体。任选地, α_{1B} 亚基可与 $\alpha_2(a-e)/\delta$ 、B1-4 和 / 或 γ 亚基组合使用。

[0078] VI. 筛选方法

[0079] 1. 测量对 N- 型钙通道的结合

[0080] 可使用已知结合 N- 型钙通道的经标记的肽 (例如齐考诺肽 (Ziconotide)), 通过竞争结合实验, 针对与 N- 型钙通道的结合而筛选内化肽。N- 型钙通道可以以纯化的形式提供, 或从细胞中天然表达或重组表达。如果以纯化的形式提供, 则可以将 N- 型钙通道固定在珠子上或微量滴定孔中。与经标记的肽和所测试的内化肽孵育后, 和钙通道结合的标签的量与所测试的内化肽结合钙通道的能力成反比。可在微量滴定板的孔中, 在高通量基础上进行该实验。也可以包括阴性对照和阳性对照。阴性对照可以是运载体。阳性对照可以是已知结合 N- 型钙通道的肽的未标记的形式。优选地, 内化肽对 N- 型钙通道的 K_d 大于 10nM, 优选大于 100nM。

[0081] 2. 测量 N- 型钙通道的抑制

[0082] 可以针对其抑制 N- 型钙通道介导的离子电流的能力, 筛选内化肽和包含与活性剂 (例如活性肽) 连接的内化肽的嵌合剂。抑制表示 N- 型钙通道载有的所测量的离子电流的统计学显著降低。所测量的电流的这类降低应当大于 20% 降低, 更优选大于 30% 降低, 更优选大于 40% 降低。可以通过在表达 N- 型钙电流的背根神经节神经元中进行全细胞膜片钳记录来测量抑制。背根神经节 (DRG) 的培养物从妊娠 13-14 天的 Swiss 小鼠制备。简言之, 将 DRG 切片并在 37°C 下进行 20 分钟胰蛋白酶消化, 将其机械解离并接种在用多聚-D-赖氨酸涂覆的盖玻片上。将它们在无血清的 MEM (Neurobasal MEM, B-27-Gibco Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) 中培养。3-5 天后, 添加 10 μ M FUDR 溶液来抑制神经胶质增殖。在潮湿的 5% CO₂ 大气中于 37°C 下维持培养物, 并且一周喂养两次。接种 10-14 天后在室温下进行全细胞记录。电生理学记录: 以电压钳模式, 用 Axopatch-1B 放大器 (Axon Instruments, Foster City, CA) 进行全细胞记录。使用两阶段拔出器 (two-stage puller; PP83; Narishige, Tokyo, 日本), 从薄壁的硼硅玻璃 (直径 1.5mm; World Precision Instruments, Sarasota, FL) 构建电阻为 3-5M Ω 的记录电极。使用 pClamp 9 (Axon Instruments) 程序将数据数字化、过滤 (2kHz) 并在线获得。向移液管中填充含有 CsCl 110、MgCl₂ 3、EGTA 10、HEPES 10、MgATP 3、GTP 0.6 (mM) 的溶液。用 CsOH 将 pH 调节至 7.2。浸浴溶液 (bath solution) 在 pH (NaOH) 7.4 下含有 CaCl₂ 1、BaCl₂ 10、HEPES 10、TEA-Cl 160、葡萄糖 10、TTX 0.0002 (mM)。使用 40ms 去极化脉冲, 将全细胞电流从 -60mV 的保持电位激发至 +20mV, 每 15s 应用一次。为了测试使用依赖型的抑制, 使用 10ms 去极化脉冲, 将电流从 -60mV 的保持电位激发至 +20mV, 分别每 0.02s (50Hz)、0.05s (20Hz)、0.1s (10Hz) 或 15s (0.07Hz) 应用一次。

[0083] 3. 测量内化活性

[0084] 可在动物中针对转运活性测试 tat 内化肽的变体。可单独测试内化肽, 或与活性剂如活性肽例如 KLSSIESDV (SEQ ID NO: 12) 连接时测试。标记内化肽, 优选使用荧光标签例如丹磺酰氯标记内化肽, 所述内化肽任选地与活性剂例如肽连接。然后将内化肽外周注射进动物例如小鼠中。例如, 腹膜内或静脉注射是合适的。注射后约 1 小时, 处死小鼠, 用固定液 (盐水中 3% 多聚甲醛、0.25% 戊二醛、10% 蔗糖、10U/mL 肝素) 灌注。然后取出脑, 冷

冻并切片。使用共聚焦显微镜分析切片的荧光。从荧光测定内化活性,任选地相对于阳性对照和阴性对照测定。合适的阳性对照是下述标准 tat 肽,其与所测试的内化肽相同的活性肽(如果存在的化)连接。合适的阴性对照是经荧光标记的、不与内化肽连接的活性肽。也可以使用未标记的运载体作为阴性对照。

[0085] 可在细胞培养物中进行相似的实验,以测试 tat 变体(见 US20030050243)。对皮层神经元培养物应用任选地与活性肽连接的、经荧光标记的变体 tat 肽。应用后使用荧光显微术在数分钟间测定吸收。可如针对动物中吸收实验所述,相对于阳性和阴性对照确定提高的吸收。

[0086] 4. 测量治疗中风的活性

[0087] 可以在中风的多种动物模型中测试嵌合肽(或这类嵌合肽的拟肽)的活性,所述嵌合肽(或这类嵌合肽的拟肽)包含与活性肽连接的内化肽。在一个这样的模型中,通过管腔内缝合方法(36,37),对成年雄性斯普拉-道来氏(Sprague-Dawley)大鼠进行 90 分钟的暂时性大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)。使动物禁食过夜并注射硫酸阿托品(0.5mg/kg IP)。10 分钟后诱导麻醉。对大鼠经口插管,机械通气,并用泮库溴铵(pancuronium bromide, 0.6mg/kg IV)使其麻痹。用热灯将体温维持在 36.5–37.5℃。股动脉和静脉中的聚乙烯导管被用于持续记录血压,并用于取出血样进行气体和 pH 测量。通过将多聚-L-赖氨酸包裹的 3-0 单丝尼龙缝线(Harvard Apparatus)经过颈内动脉引入大脑动脉环(circle of Willis)中,有效地堵塞大脑中动脉,实现 90 分钟的暂时性 MCAO。这产生了包括大脑皮层和基底神经节的广泛梗死。用所测试的嵌合肽或阴性对照或阳性对照处理动物。可在诱导缺血之前或之后至多 1 小时进行处理。阴性对照可以是运载体。阳性对照可以是先前显示有效的 Tat-NR2B9c 肽, YGRKKRRQRRRLSSIESDV (SEQ ID NO:17)。嵌合肽通过 MCAO 之前 45 分钟的单次静脉浓注(3nmol/g)递送。对动物施用化合物后,测定梗死体积和/或残疾指数。通常在处理后 24 小时测定梗死体积,但是也可以在较晚的时间例如第 3、7、14 或 60 天测定。可随时监测残疾指数,例如在处理后 2 小时,处理后 24 小时、处理后一周和一个月时监测。相对于未用化合物处理的对照动物而言显示统计学显著的梗死体积和/或残疾指数降低的嵌合肽被鉴定为具有适用于实践本发明方法的活性。

[0088] 可在进行了持久性缺血的动物中进行相似的实验。可以如 Forder 等, Am J Physiol Heart Circ Physiol 288:H1989–H1996(2005)所述实现大脑中动脉脑膜血管的持久性缺血。简言之,用 PE 10 聚乙烯管对右侧 ECA 进行插管。通过正中切口暴露头盖骨,并在右侧躯体感觉皮层(在前囟后 2mm 和侧面 5mm)上制造 6mm 到 8mm 的颅窗。通过向 ECA 中注射小团(10–20 μ L)正常盐水中的活体染料精制蓝紫(patent blue violet, 10mMol/L; Sigma)使脑膜动脉显影。对三个相同的脑膜微动脉 MCA 分支进行电烧灼,并重复进行染料注射以确保阻断了通过被烧灼的微动脉的流通。然后闭合切口,使动物返回笼中并允许其自由获得食物和水。该持久性缺血模型产生高度可再现的小梗死,所述梗死被限制在凝结的终端脑膜动脉下的皮层中。

[0089] 可通过 Longa, Stroke 20,84–91(1989)所述的管腔内缝合方法闭塞左中脑动脉。简言之,通过颈正中切口暴露左侧颈总动脉(CCA),并从其分叉到头盖骨基座将其从周围的神经和筋膜剥离。然后分离颈外动脉(ECA)的枕动脉分支,并将这些分支剥离和凝结。将 ECA 与末端舌动脉分支和上颌动脉分支一起从更远侧剥离和凝结,然后将其分开。将颈

内动脉 (ICA) 与邻近的迷走神经分离并分隔, 并且翼腭动脉与其起点密切连接。通过烧灼将 4cm 长的 3-0 单丝尼龙缝线 (Harvard Apparatus) 的顶端变圆, 达到 0.33-0.36mm 的顶端直径和 0.5-0.6mm 的顶端长度, 并用多聚-L-赖氨酸包裹 (Belayev 等, 1996)。通过 CCA 引入缝线, 进一步引入 ICA 中, 并因此引入大脑动脉环 (距离颈动脉杈约 18-20mm) 中, 有效地堵塞大脑中动脉。将 CCA 周围的丝线沿管腔内尼龙线收紧使其紧闭, 并持久性地堵塞大脑中动脉。

[0090] 5. 基于细胞的活性肽筛选

[0091] 任选地, 也可以使用例如 US 20050059597 中所述的实验, 针对抑制 PSD-95 和 NMDAR 2B 之间相互作用的能力来筛选活性肽或其拟肽。有用的肽在这样的实验中通常具有少于 50 μ M、25 μ M、10 μ M、0.1 μ M 或 0.01 μ M 的 IC50 值。优选的肽通常具有 0.001-1 μ M 之间的 IC50 值, 更优选具有 0.05-0.5 或 0.05 到 0.1 μ M 的 IC50 值。

[0092] VI. 中风和相关病症

[0093] 中风是由 CNS 中受损的血流导致的病症, 与原因无关。可能的原因包括栓塞、出血和血栓形成。一些神经元细胞由于受损的血流而立即死亡。这些细胞释放其组分分子 (包括谷氨酸), 所述组分分子随后活化 NMDA 受体, 所述 NMDA 受体提高细胞内钙水平和胞内酶水平, 导致更多的神经元细胞死亡 (兴奋性神经毒性级联放大)。CNS 组织的死亡被称作梗死。梗死体积 (即脑中由中风导致的死亡的神经元细胞的体积) 可以被用作中风导致的病理学损伤程度的指标。症状性效果既取决于梗死体积, 也取决于梗死在脑中位于何处。残疾指数可被用作症状性损伤的度量, 例如 Rankin 中风输出标度 (Rankin Stroke Outcome Scale, Rankin, Scott Med J ;2 :200-15(1957)) 和 Barthel 指数 (Barthel Index)。Rankin 标度以如下直接评价患者的全局病症为基础:

[0094] 表 4

[0095] 0 完全没有症状

[0096] 1 尽管有症状但是没有显著的残疾;能够进行所有日常工作和活动。

[0097] 2 轻微残疾;不能进行所有先前的活性, 但是能够照顾自己的事务而
[0098] 不需要帮助。

[0099] 3 需要一些帮助的中度残疾, 但是能够行走而不需要帮助。

[0100] 4 中度到严重的残疾, 不受帮助时不能行走, 并且不受帮助时不能照
[0101] 顾自身的身体需要。

[0102] 5 严重残疾;卧床不起, 失禁, 并需要持久的护理和关注。

[0103] Barthel 指数以关于患者进行 10 种基本日常生活活动的能力的一系列问题为基础, 所述问题得到 0 和 100 之间的分数, 较低的分数表示较多的残疾 (Mahoney 等, Maryland State Medical Journal 14 :56-61(1965))。

[0104] 或者可使用 NIH 中风标度测量中风严重性/输出, 所述 NIH 中风标度可在万维网 ninds.nih.gov/doctors/NIH_Stroke_Scale_Booklet.pdf 上获得。该标度以患者实行 11 组功能的能力为基础, 所述功能包括评价患者的意识、运动、感受和语言功能水平。

[0105] 缺血性中风更明确地表示由于通向大脑的血流被堵塞而引起的一类中风。这类堵塞的潜在病症最常见地是沿血管壁的脂肪沉着物的发生。该病症被称作动脉粥样硬化。这些脂肪沉着物能够引起两种梗阻。脑血栓形成是指在血管的阻塞部分产生的血栓 (血块)。

“脑栓塞”通常是指在循环系统中另一位点,通常在心和上胸大动脉和颈大动脉处形成的血块。然后血块的一部分破裂松开,进入血流并通过脑血管,直至达到太小而不能使其通过的血管。栓塞的第二个重要原因是不规则的心博,称作动脉肌纤维震颤。其引起下述病症,其中血块可在心中形成,移动并转移至脑。缺血性中风的其他潜在原因是出血、血栓形成、动脉或静脉的切割、心脏停搏、任何原因(包括出血)引起的休克,和医源性原因,如对脑血管或导向脑的血管的直接手术损伤或心脏手术。缺血性中风构成所有中风病例的约 83%。

[0106] 暂时性缺血性发作(TIAs)是较小的或警告性中风。在TIA中,存在指示缺血性中风的病症,并且发生典型的中风警告预兆。然而,梗阻(血块)发生时间短并且趋向于通过正常机制使自身溶解。

[0107] 出血性中风构成约 17%的中风病例。其由脆弱的血管导致,所述血管破裂并出血至周围的脑中。血累积并压迫周围的脑组织。两种常见的出血性中风是大脑内出血和蛛网膜下腔出血。出血性中风由脆弱的血管破裂引起。脆弱的血管破裂的可能原因包括高血压出血,其中高血压引起血管的破裂,或者脆弱的血管的另一潜在原因为例如破裂的脑血管畸形,包括脑动脉瘤、动静脉畸形(AVM)或海绵状畸形。出血性中风也可以由脆弱梗死处血管的缺血性中风的出血性转化引起,或由CNS中含有异常脆弱的血管的原发性或转移性肿瘤的出血引起。出血性中风也可以由医源性原因例如对脑血管的直接手术损伤引起。动脉瘤是血管被脆弱区域的膨胀。如果不治疗的话,动脉瘤会继续脆弱直至破裂并出血进入脑中。动静脉畸形(AVM)是一簇形状异常的血管。海绵状畸形是能够从脆弱的静脉结构引起出血的一种静脉异常。这些血管中任何一种能够破裂,并引起进入脑的血液。出血性中风也可以由物理创伤引起。一部分脑中的出血性中风能够通过出血性中风中失血引起的缺血而在另一部分脑中导致缺血性中风。

[0108] 若干种其他神经病学病症也可以通过NDMAR-介导的兴奋性神经毒性导致神经死亡。这些病症包括癫痫、缺氧、与中风无关的对CNS的创伤如创伤性脑损伤和脊髓损伤、阿尔茨海默病和帕金森氏症。

[0109] VII. 治疗方法

[0110] 上述嵌合肽或其拟肽被用于治疗患有中风的患者。通常在中风开始后尽可能早地开始治疗。偶尔在已知处于高风险下的患者中,可以在中风发作时或之前开始治疗。风险因素包括高血压、糖尿病、家族史、抽烟、先前中风和手术进行中。通常,在中风开始后1到24小时内首次进行治疗。单一剂量的本发明的嵌合肽通常是足够的。然而,也可以以6-24小时或更大的间隔施用多个剂量。

[0111] 在对由于与这些通道结合而导致的副作用的易感性高于正常的患者中,使用具有降低的结合和抑制N-型钙通道能力的tat肽是尤其适用的。这些患者包括具有正常(收缩压120-129mm Hg,舒张压80-84mm Hg)或低于正常的血压的患者。伴随着CNS损伤的失血能够引起低常血压(例如在车祸中经历挫伤的患者中,或在由于中风后摔倒而导致血液损失的患者中)。

[0112] 可以通过在治疗前和治疗后不同的时间测量梗死体积,监测患者对施用本发明的嵌合肽或其拟肽的应答。可以使用MRI弥散成像检测早期缺血。MRI方案(包括灌注成像)的组合可被用于确定处于风险下的组织并预测梗死体积。相对于未接受本发明方法治疗的可比较的患者人群中的平均梗死体积,该方法优选达到了梗死体积至少10%、15%、20%、

25%、30%、35%、40 或 50% 的减少。也可以根据开始治疗后一天到一周测定的残疾指数来测量患者的应答。相对于未接受本发明方法治疗的可比较的患者人群中的平均残疾指数,患者优选显示至少 4%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40 或 50% 的残疾指数改进(即更少的残疾)。患者优选在 Rankin 中风指数中评分为 0 或 1,或在 Barthel 指数中评分高于 75。

[0113] VIII. 药物组合物、剂量和施用途径

[0114] 本发明的嵌合肽或拟肽可以以药物组合物的形式被施用。药物组合物在 GMP 条件下制造。药物组合物可以以含有任何上述剂量的单位剂量(即单次施用的剂量)提供。药物组合物可以通过常规的混合、溶解、制粒、制锭、研磨、乳化、包封、捕获或冻干方法制造。具体地,下文所述的配制物和组合物中可以使用冻干的本发明的嵌合肽或拟肽。

[0115] 可以使用一种或多种生理学可接受的便于将嵌合肽或拟肽加工成可药用制剂的载体、稀释剂、赋形剂或辅料,以常规方式配制药物组合物。适当的配制依赖于选择的施用途径。

[0116] 施用可以是肠胃外、静脉内、经口、皮下、动脉内、颅内、鞘内、腹膜内、局部、鼻内或肌内的。优选静脉内施用。

[0117] 用于肠胃外施用的药物组合物优选地是无菌和基本等渗的。对注射而言,可以将嵌合肽配制进水溶液中,优选地配制进生理学兼容的缓冲液例如 Hank's 溶液、Ringer's 溶液,或生理盐水或乙酸缓冲液中(以减轻注射位点处的不适)。溶液可以含有配制剂例如悬浮剂、稳定剂和/或分散剂。

[0118] 或者,嵌合肽或拟肽可以是用于在使用前用合适运载体(例如无菌无热源水)构建的粉末形式。

[0119] 对跨粘膜施用而言,在配制物中使用适合要穿透的屏障的穿透剂。该施用途径可以被用于将化合物递送至鼻腔或用于舌下施用。

[0120] 对经口施用而言,可以将嵌合肽或拟肽与可药用的载体一起配制为片剂、丸剂、锭剂、胶囊、液体、凝胶、糖浆、浆体、悬浮液等等,用于由被治疗的患者经口摄入。对口服固体配制物例如粉末、胶囊和片剂而言,合适的赋形剂包括填充剂例如糖,如乳糖、蔗糖、甘露醇和山梨糖醇;纤维素制剂例如玉米淀粉、小麦淀粉、稻淀粉、马铃薯淀粉、明胶、西黄蓍胶、甲基纤维素、羧甲基甲基纤维素、羧甲基纤维素钠,和/或聚维酮(PVP);制粒剂;和粘合剂。需要时可以添加崩解剂,例如交联的聚乙烯吡咯烷酮、琼脂,或海藻酸或其盐,例如海藻酸钠。需要时可以使用标准技术对固体剂型进行糖包裹或肠溶衣包裹。对口服液体制剂例如悬浮液、酏剂和溶液而言,合适的载体、赋形剂或稀释剂包括水、甘油、油、醇。另外,可以添加调味剂、防腐剂、着色剂等等。

[0121] 除了先前所述的配制物以外,也可以将嵌合肽或拟肽配制成储存制剂。可以通过植入(例如皮下或肌内)或通过肌内注射来施用这类长效配制物。因此,例如化合物可与合适的多聚体材料或疏水材料(例如配制为可接受的油中的乳剂)或离子交换树脂配制在一起,或配制为略溶的衍生物,例如配制为略溶的盐。

[0122] 或者,可以使用其他药物递送系统。可使用脂质体和乳剂递送嵌合肽。也可以使用某些有机溶剂例如二甲基亚砜,尽管通常付出更大毒性的代价。另外,可以使用持续释放的系统(例如含有治疗剂的固体聚合物的半渗透性基质)递送化合物。

[0123] 根据其化学性质,持续释放胶囊可释放嵌合肽数周直至超过 100 天。根据治疗试剂的化学性质和生物稳定性,可以使用用于蛋白质稳定的其他策略。

[0124] 因为本发明的嵌合肽或拟肽可含有带电的侧链或末端,所以它们可以作为游离酸或碱或作为可药用的盐包含在任何上述配制物中。可药用的盐是基本保留游离碱的生物活性并通过与无机酸反应而制备的盐。药物盐倾向于比相应的游离碱形式更易溶于水和其他质子溶剂。

[0125] 嵌合肽或拟肽以有效达到预期目的(例如减轻损伤性中风和相关病症的损伤效果)的量使用。治疗有效量表示:相对于未用本发明嵌合肽或拟肽治疗的中风患者(或动物模型)对照群体中的损伤而言,在用本发明的嵌合肽或拟肽治疗的患者(或动物模型)群体中,足以显著降低中风引起的损伤的嵌合肽或拟肽的量。如果与未通过本发明方法治疗的可比较的患者对照群体中的平均输出(通过梗死体积或残疾指数测定)相比,个体经治疗的患者达到更良好的输出,则该量也被认为是治疗上有效的。如果个体被治疗的患者在 Rankin 标度中显示 2 或更少的残疾,和在 Barthel 标度中显示 75 或更多,则所述量也被认为是治疗上有效的。如果与可比较的未治疗群体相比,被治疗的患者群体在残疾标度上显示显著改进(即更少残疾)的分值分布,则剂量也被认为是治疗上有效的,见 Lees 等, N Engl J Med 2006 ;354 :588-600。治疗上有效的方案表示治疗上有效的剂量和达到上述预期目的所需的施用频率的组合。通常单一施用就足够了。

[0126] 优选的剂量范围包括中风后 6 小时内每 kg 患者体重 0.001 到 20 μmol 嵌合肽或拟肽,任选地每 kg 患者体重 0.03 到 3 μmol 嵌合肽,到每 kg 患者体重 μmol 嵌合肽。在一些方法中,在 6 小时内施用每 kg 患者体重 0.1-20 μmol 嵌合肽或拟肽。在一些方法中,在 6 小时内施用每 kg 患者体重 0.1-10 μmol 嵌合肽或拟肽,更优选在 6 小时内施用每 kg 患者体重约 0.3 μmol 嵌合肽。在其他情况下,剂量范围是每 kg 患者体重 0.005 到 0.5 μmol 嵌合肽或拟肽。可以通过除以 6.2 来补偿不同的表面积:质量比,将每 kg 体重的剂量从大鼠转化为人。可以通过乘以嵌合肽或拟肽的摩尔重量,将剂量从摩尔单位转化为克。用于人的嵌合肽或拟肽的合适剂量可包括 0.001 到 5mg/kg 患者体重,或更优选 0.005 到 1mg/kg 患者体重或 0.05 到 1mg/kg,或 0.09 到 0.9mg/kg。对 75kg 患者的绝对重量而言,这些剂量被转化为 0.075-375mg,0.375 到 75mg 或 3.75mg 到 75mg 或 6.7 到 67mg。据包括例如患者体重变化在内的估计,剂量通常在 0.05 到 500mg,优选 0.1 到 100mg,0.5 到 50mg,或 1-20mg 内。

[0127] 施用的嵌合肽或拟肽的量取决于被治疗的受试者、受试者的体重、痛苦的严重性、施用方式和开处方的医师的调节。在症状可检测时或甚至不可检测时可重复治疗。治疗可单独提供或者与其他药物组合提供。

[0128] 本发明嵌合肽或拟肽的治疗上有效的剂量能够提供治疗益处而不引起重大的毒性。可以通过标准药物步骤在细胞培养物或实验动物中测定嵌合肽的毒性,例如通过测定 LD_{50} (使 50% 群体致死的剂量)或 LD_{100} (使 100% 群体致死的剂量)来实现。毒效应和治疗效应间的剂量比例是治疗指数。优选显示高治疗指数的嵌合肽或拟肽(见例如 Fingl 等, 1975, In :The Pharmacological Basis of Therapeutics, 第 1 章, 第 1 页)。

[0129] IX. 筛选方法

[0130] 本发明还提供了筛选其他内化肽以确定这类肽是否结合和 / 或抑制 N- 型钙

通道的方法。可针对这类结合或抑制评价单独的或与活性剂尤其如活性肽（有时称作负荷肽 (cargo peptide)）连接的测试肽。可以测试的其他内化肽包括触角足内化肽 (Bonfanti, Cancer Res. 57, 1442-6 (1997))（及其变体），Tat 变体, Penetratin, SynB1 和 3, Transportan, Amphipathic, gp41NLS, 多聚精氨酸, 和以下参考文献中所述的其他内化肽 (Temsamani, Drug Discovery Today, 9(23) :1012-1019, 2004 ;De Coupade, Biochem J., 390 :407-418, 2005 ;Saalik Bioconjugate Chem. 15 :1246-1253, 2004 ;Zhao, Medicinal Research Reviews 24(1) :1-12, 2004 ;Deshayes, Cellular and Molecular Life Sciences 62 :1839-49, 2005)（均引入本文作为参考）。

[0131] X. Tat 变体与其他活性剂的连接

[0132] 上述 tat 变体可以与任何其他活性剂连接, 以促进试剂穿过细胞膜和 / 或血脑屏障的吸收。在治疗方法中使用包含 tat 变体和活性剂或由它们组成的嵌合剂相对于单独使用活性剂而言促进预期位点处的生物利用度, 并且通过与 N- 型钙通道结合, 相对于使用与标准 tat 肽连接的活性剂而言减轻副作用。tat 变体尤其适用于具有细胞内靶标的活性剂和 / 或需要穿过血脑屏障展示活性的神经活性药物。一些但非所有能够结合 tat 变体的活性剂是肽。tat 变体的使用尤其适合于具有差生物利用度、高剂量或短半衰期的现存药物。

[0133] 选择活性剂、结合方法及其使用的一些指导由涉及先前的 tat 肽的科学文献和专利文献提供（见例如 US 6, 316, 003 和 US 5, 804, 604）。上文关于包含与 tat 变体连接的活性肽的嵌合肽用于治疗中风和相关疾病的所有描述经过必要的修改 (mutatis mutandis) 后也适用于包含与活性剂连接的 tat 变体的嵌合剂。

[0134] 下表列出了活性剂的名称（其中一些是经批准的药物）、它们可治疗的病症（无论疾病是急性或慢性）、施用药物（至确定的程度）的途径和对现存药物问题的注解, 所述问题可通过 tat 变体肽赋予的改进的跨膜转运而被部分克服。

[0135] 包含与活性剂连接的 tat 变体肽的嵌合剂可以以等于或低于单独的活性剂的剂量（以摩尔为基础）使用, 或者可以通过与单独的活性剂相同的途径施用, 并用于治疗与单独的活性剂相同的疾病。施用本公开中肽 : 活性缀合物的优选的方法是静脉内、动脉内、鼻内 / 吸入、肌内、腹膜内、舌下、经直肠和局部（对于真皮或接近上皮细胞的病症而言）。

[0136] 表 5

[0137]

活性剂	疾病	急性 / 慢性	施用途径	注解	参考文献
苯巴比妥 (苯巴比妥钠)	癫痫		IV/ 口	依赖性,耐受 问题,相互作用, 副作用,出生缺陷	Motamedi & Meador (2006)Curr Neurol Neurosci Rep,6(4) : 341-6. Drugs. com
扑米酮 (Primidone) (myidone、麦苏 林 (mysoline))	癫痫		口	副作用,相互作用	Koristkova 等人 (2006) Int J Clin Pharmacol Ther, 44(9) :438-42. Drugs. com
地西泮 (Diazepam) (安定 (valium))	焦虑		IP/ 口	依赖性,副作用, 相互作用	Beard 等人 (2003) Health Technol Assess. 7(40) :iii, ix-x, 1-111. Drugs. com
多巴胺	帕金森氏症			不能通过 BBB, 副作用	Ahlskog(2001)Neurol Clin, 19(3) :579-605. Drugs. com
左旋多巴	帕金森氏症			在 BBB 之前降 解,副作用,半 衰期 = 1.5 小时	Nyholm(2006)Clin Pharmacokinet, 45(2) : 109-36. USPTO. gov (专利号 7160913)

阿扑吗啡 (Apomorphine)				IP	半衰期短	Nyholm (2006) Clin Pharmacokinet, 45 (2) : 109-36. Drugs. com
替拉扎特甲磺酸酯 (Tirilazad mesylate) (Freedox)	中风			IP	低有效性, 在第三期相终止	Hickenbottom & Grotta (1998) Semin Neurol 18 (4) : 485-92. Strokecenter. org
环孢菌素 A (Cyclosporine) (Gengraf)	免疫抑制			IP	肽, 5-18 小时半衰期	Kees 等人 (2006) Ther Drug Monit, 28 (3) : 312-20. Drugs. com
Vacomycin	抗生素			IP	肽, 低吸收, 4-6 小时半衰期	de Hoog 等人 (2004) Clin Pharmacokinet. 43 (7) : 417-40. Drugs. com
赖诺普利 (Lisinopril) (Prinivil)	高血压			IP/ 口	肽, 差 BBB 透过性, 12 小时半衰期	Tan 等人 (2005) Am J Hypertens, 18 (2) : 158-64. Drugs. com

叠氮胸苷 (AZT, 齐多夫定 (zidovudine), 双汰 芝 (combivir))	抗病毒			口	差 BBB 穿过性, 05-3 小时半衰 期, 血液毒性	Spitzenberger 等人 (2006) J Cereb Blood Flow Metab, 10 月 25 日, Epub ahead of print. Drugs. com
吡拉西坦 (Piracetam)	疼痛 / 癫痫				不能穿过 BBB	Loscher & Potschka (2002) J Pharmacol Exp Ther, 301 (1) :7-14. US7, 157, 421
Natrecor (BNP 肽)	心 - 肾代调失常 综合征			IV	未知有效性	Feldman & Sun (2004) Heart Fail Rev, 9 (3) : 203-8.

[0138]

活性剂	疾病	急性 / 慢性	施用途径	注解	参考文献
					Clinicaltrials.gov
AVR-118(肽)	癌症姑息剂		皮下	未知有效性,未知剂量	Clinicaltrials.gov
催产素(肽)	心境障碍		IV/ IM	相互作用,未知剂量	Swaab 等人 (2005) Ageing Res Rev,4(2): 141-94. Drugs.com
普伐他汀(普拉固)	MS		口	未知有效性,低生物利用度	Hatanaka(2000)Clin Pharmacokinet,39(6): 397-412. Clinicaltrials.gov
瑞芬太尼 (Remifentanyl)	疼痛,烧伤		IV	3.5 分钟半衰期,通过未知的酯酶代谢	Scott & Perry(2005) Drugs,65(13): 1793-1823. Clinicaltrials.gov
神经降压素 (Neurotensin)	Schizophrenia, 帕金森氏症,成瘾症			13AA 肽,容易降解,不能穿过 BBB	Boules 等人, (2006) Peptides,27(10): 2523-33.

GDNF(神经胶质 衍生的神经营养因 子)	帕金森氏症	慢性	实质 细胞 内	肽,不能穿过 BBB	Grondin 等人 (2003) Prog Drug Res,61 : 101-23.
蛋白酶抑制剂 -洛匹那韦 (lopinavir) -利托那韦 (ritonavir) -沙奎那韦 (saquinavir) -darunavir -atazanavir -安泼那韦 (amprenavir)	HIV		口	遭受 HIV 突变的急性能力的所 有 HIV 蛋白酶抑制剂,产生药物抗性的 HIV 菌株	-Oldfield & Plosker (2006) Drugs 66 (9) : 1275-99. -Porter & Charman (2001) Adv Drug Deliv Rev, 10 月 1 日 ;50 增 刊 1 :S127-47. -Piacenti (2006) Pharmacotherapy 26 (8) :1111-33.
氢化麦角胺	偏头痛		IV, IM, sub-Q	相互作用引起外 周缺血,9 小时 半衰期	Modi & Lowder (2006) Am Fam Physician 73 (1) :72-8.
斯皮仁诺 (Sporamax) (itraconazole)	抗真菌剂		口	最终产生药物抗性,在一些人群中发生充血性心力衰竭	Wang & Remold (2006) Cardiol Rev 14 (5) :223-6.

蛋白激酶 C 抑制剂	急性心肌梗死、 中风、缺血、再 灌注损伤				美国专利公开 20050267030, 20060148702, 20060293237, 20050215483, 20040204364, 20040009922
ATI-7	癌症,乳腺癌	慢性		封闭 ErbB2 胞内 域并提高毒素灵 敏度的拟肽	Kunz 等人, Mol Cancer Res 2006 ;4(12) :983-98
CRAMP 肽	沙门氏菌 (Salmonella) 感 染			细胞内抗微生物 肽,其降低沙门 氏菌复制	Rosenberger, CM. PNAS 2004 年 2 月 24 日 第 101 卷 第 8 期

[0139]

活性剂	疾病	急性 / 慢性	施用 途径	注解	参考文献
					2422-2427

钠通道肽	可能减轻肌痉挛（癫痫，腿不安静，帕金森氏症等等）			对应于钠通道 α 亚基同源跨膜结构域 III 和 IV 之间短细胞内区段的肽，慢代谢型	Vassilev, Science (1988) 241 :1658-6
适体 KDI1	阻断 EGF 信号传导 - 可能抗癌				Buerger, J. Biol. Chem., 第 278 卷, 第 39 期, 37610-37621, 2003 年 9 月 23 日
RNA/ 基因疗法				可使用转运肽引入 RNA 或 siRNA/RNAi 用于治疗	Turner 等人 (2007) Blood Cells Mol Dis. 38(1) :1-7.

[0140] 实施例 1 : 针对 Tat-NR2B9c 的副作用进行筛选

[0141] Tat-NR2B9c 是先前显示在大鼠中风模型中有效的 KLSSIESDV (SEQ ID NO :12) 和标准 tat 肽的嵌合肽。本实施例针对抑制已知配体与约 70 种受体蛋白质结合的能力筛选肽 Tat-NR2B9c。所筛选的受体的例子包括谷氨酸、组胺 H1、钾通道、多巴胺 D1、钙通道 (L- 型、N- 型)。

[0142] 发现 Tat-NR2B9c 抑制与两种这类受体 :N- 型钙通道和趋化因子 CXCR2 (IL-8Rb) 的结合。筛选作为竞争性结合实验进行, 其中在存在提高灵敏度的未经标记的配体时, 10 μ M 浓度的未经标记的 Tat-NR2B9c 与 I125 标记的配体竞争结合其受体。在 10 μ M 下, Tat-NR2B9c 显示 100% 抑制放射性标记的 ω -Conotoxin GVIA 与 N- 型钙通道的结合。相同浓度下 Tat-NR2B9c 还显示对 IL-8/IL-8RB 的 80% 的抑制。结果显示于图 1A、B、C 中。

[0143] 实施例 2 : 诱变标准 Tat 肽

[0144] 与已知的 N- 型钙通道抑制剂齐考诺肽类似, Tat-NR2B9c 含有大量正电荷。正电荷据推测既促进穿过血脑屏障的能力, 而且也可以促进 N- 型钙通道结合。直接的序列比较显示在正 (R = 精氨酸, K = 赖氨酸) 电荷以及这些电荷沿肽主链分布方面的一些相似性 (见下文的比对)。这大致将 Tat-NR2B9c 的 N- 型钙通道结合表位定位在 Tat 区域 (以斜体显示) 和 NMDAR2B 结构域的一个氨基酸中。

[0145] YGRKKRRQRRRK~~KLSSIESDV~~ (Tat-NR2B9c) (SEQ ID NO :17)

[0146] CKKGAKCSRLMYDCCTGSCRS~~GKCG~~ (齐考诺肽) (SEQ ID NO :72)

[0147] 本发明人推测, Tat-NR2B9c 的第 1 位上 Y 残基成为 F 的突变可能降低与 N- 型钙通道的结合而不损伤药物的细胞吸收。本发明人还推测标准 tat 肽中一串碱性残基的修饰会达到类似的结果。每种肽以 100 μ M 应用。测试了以下的肽 (Ca^{2+} 电流被显示为每种肽后面的百分比) : 1990 TAT : YGRKKRRQRRR (SEQ ID NO :1) (57+/-1.6% (n = 5)) ; 1991 2B9c : KLSSIESDV (SEQ ID NO :12) (94+/-1.7% (n = 5)) ; 1992 Tat-NR2B9c-AA : YGRKKRRQRRRK~~KLSSIE~~ADA (SEQ ID NO :18) (74+/-2.4% (n = 6)) ; 1993 F-Tat-NR2B9c : FGRKKRRQRRRK~~KLSSIESDV~~ (SEQ ID NO :19) (91+/-1.6% (n = 5)) ; 1994 Tat-NR2B9c K 到 A : YGRKKRRQRRRK~~ALSSIESDV~~ (SEQ ID NO :20) (77+/-1.8% (n = 7)) ; 1995 F-Tat-NR2B9c K 到 A : FGRKKRRQRRRK~~ALSSIESDV~~ (SEQ ID NO :21) (97+/-0.2% (n = 6)) ; 1976 : YGRKKRRQRRRK~~KLSSIESDX~~ (SEQ ID NO :22) 其中 X = 正缬氨酸 (66+/-3.4% (n = 6)) ; 1977 :

YGRKKRRQRRRKLSSIESDX (SEQ ID NO :23) 其中 X = L- 叔丁基 - 甘氨酸 (65+/-5.1% (n = 5)) ;1987 :Tat-NR2B9c 的 D- 异构体 (82+/-2.2% (n = 6))。Tat-NR2B9c (68+/-1.7% (n = 7))。数据被表示为均值 +/- 标准误差。

[0148] 还在以下的膜片钳实验中测试了肽。针对其抑制 N- 型钙通道介导的离子电流的能力,筛选内化肽和嵌合肽。这通过在表达 N- 型钙电流的背根神经节神经元中进行全细胞膜片钳记录来进行。背根神经节 (DRG) 的培养物从妊娠 13-14 天的 Swiss 小鼠制备。简言之,将 DRG 切片并在 37℃ 下进行 20 分钟胰蛋白酶消化,将其机械解离并接种在用多聚 -D- 赖氨酸涂覆的盖玻片上。将它们在无血清的 MEM (Neurobasal MEM, B-27-GibcoInvitrogen Corporation, Carlsbad, CA) 中培养。3-5 天后,添加 10 μ M FUDR 溶液来抑制神经胶质增殖。在潮湿的 5% CO₂ 大气中于 37℃ 下维持培养物,并且一周喂养两次。接种 10-14 天后在室温下进行全细胞记录。电生理学记录:以电压钳模式,用 Axopatch-1B 放大器 (Axon Instruments, FosterCity, CA) 进行全细胞记录。使用两阶段拔出器 (PP83 ;Narishige, Tokyo, 日本),从薄壁的硼硅玻璃 (直径 1.5mm ;World Precision Instruments, Sarasota, FL) 构建电阻为 3-5M Ω 的记录电极。使用 pClamp 9 (AxonInstruments) 程序将数据数字化、过滤 (2kHz) 并在线获得。向移液管中填充含有 CsCl 110、MgCl₂ 3、EGTA 10、HEPES 10、MgATP 3、GTP 0.6 (mM) 的溶液。用 CsOH 将 pH 调节至 7.2。浸浴溶液在 pH (NaOH) 7.4 下含有 CaCl₂ 1、BaCl₂ 10、HEPES 10、TEA-Cl 160、葡萄糖 10、TTX 0.0002 (mM)。使用 40ms 去极化脉冲,将全细胞电流从 -60mV 的保持电位激发至 +20mV,每 15s 应用一次。为了测试使用依赖型的抑制,使用 10ms 去极化脉冲,将电流从 -60mV 的保持电位激发至 +20mV,分别每 0.02s (50Hz)、0.05s (20Hz)、0.1s (10Hz) 或 15s (0.07Hz) 应用一次。

[0149] 结果:结果展示于图 2 中。上部分显示存在所示肽时全细胞钙电流的均值 +/- 标准误差,其被标准化为应用所述肽之前相同细胞中的全细胞钙电流。图 2 的下部分显示代表性的全细胞迹线,上部分中的均值来自于所述代表性全细胞迹线。简言之,数据显示嵌合肽的 TAT 转运蛋白部分主要负责 N- 型钙通道的抑制。Tat-NR2B9c 的 N- 端酪氨酸的突变几乎完全废除了该嵌合肽抑制 N- 型钙通道的能力。Tat-NR2B9c 的 C- 端部分 (KLSSIESDV (SEQ ID NO :12))、F-Tat-NR2B9c 或 1994Tat-NR2B9c K 到 A 显示对 N- 型钙通道活性无显著抑制。肽 1992、1994 和 1987 与单独的 TAT 相比显示通道活性的显著提高,尽管仍然显示 N- 型钙通道活性量的一些降低。所有这些肽与单独的标准 Tat 相比提供了降低的对 N- 型钙通道的结合,这指出包含这些 Tat 变体序列之一的药物提高的治疗指数。

[0150] 实施例 3 :进一步分析 Tat-NR2B9c 对 N- 型 Ca²⁺ 通道介导的离子电流的抑制

[0151] 其他实验如图 4-7 中所示进行。它们的目的是进一步表征 Tat-NR2B9c 对 N- 型 Ca²⁺ 通道介导的离子电流的抑制。另外,图 4 表征了 Tat-NR2B9c (YGRKKRRQRRRKLSSIESDV, SEQ ID NO :17) 对 Ca²⁺ 电流抑制的程度,并与其他变体:1990 TAT (YGRKKRRQRRR, SEQ ID NO :1);1992Tat-NR2B9c AA (YGRKKRRQRRRKLSSIEADA, SEQ ID NO :18);1994Tat-NR2B9c KtoA (YGRKKRRQRRRALSSIESDV, SEQ ID NO :20);1987D-Tat-NR2B9c (YGRKKRRQRRRKLSSIESDV (均为 D- 氨基酸) SEQ ID);1976 (YGRKKRRQRRRKLSSIESDX, 其中 X = 正缬氨酸, SEQ ID NO :22);1977 (YGRKKRRQRRRKLSSIESDX, 其中 X = L- 叔丁基甘氨酸, SEQ ID NO :23) 进行比较。

[0152] 组织培养:背根神经节 (DRG) 的培养物从妊娠 13-14 天的 Swiss 小鼠制备。简言之,将 DRG 切片并在 37℃ 下进行 20 分钟胰蛋白酶消化,将其机械解离并接种在用多

聚-D-赖氨酸涂覆的盖玻片上。将它们在无血清的 MEM (Neurobasal MEM, B-27-Gibco InVitrogen Corporation, Carlsbad, CA) 中培养。3-5 天后,添加 $10 \mu\text{M}$ FUDR 溶液来抑制神经胶质增殖。在潮湿的 $5\% \text{CO}_2$ 大气中于 37°C 下维持培养物,并且一周喂养两次。接种 10-14 天后在室温下进行全细胞记录。

[0153] 电生理学记录:以电压钳模式,用 Axopatch-1B 放大器 (Axon Instruments, Foster City, CA) 进行全细胞记录。使用两阶段拔出器 (PP83; Narishige, Tokyo, 日本),从薄壁的硼硅玻璃 (直径 1.5mm ; World Precision Instruments, Sarasota, FL) 构建电阻为 $3\text{--}5\text{M}\Omega$ 的记录电极。使用 pClamp9 (Axon Instruments) 程序将数据数字化、过滤 (2kHz) 并在线获得。向移液管中填充含有 $\text{CsCl } 110$ 、 $\text{MgCl}_2 \text{ } 3$ 、 $\text{EGTA } 10$ 、 $\text{HEPES } 10$ 、 $\text{MgATP } 3$ 、 $\text{GTP } 0.6 (\text{mM})$ 的溶液。用 CsOH 将 pH 调节至 7.2 。浸浴溶液在 pH (NaOH) 7.4 下含有 $\text{CaCl}_2 \text{ } 1$ 、 $\text{BaCl}_2 \text{ } 10$ 、 $\text{HEPES } 10$ 、 $\text{TEA-Cl } 160$ 、葡萄糖 10 、 $\text{TTX } 0.0002 (\text{mM})$ 。使用 40ms 去极化脉冲,将全细胞电流从 -60mV 的保持电位激发至 $+20\text{mV}$,每 15s 应用一次。为了测试使用依赖型的抑制,使用 10ms 去极化脉冲,将电流从 -60mV 的保持电位激发至 $+20\text{mV}$,分别每 0.02s (50Hz)、 0.05s (20Hz)、 0.1s (10Hz) 或 15s (0.07Hz) 应用一次。

[0154] 数据分析:数据被表示为均值 $\pm$ 标准误差。

[0155] 图 4 证明了在背根神经节神经元 (其主要表达 N-型 Ca^{2+} 通道) 中,递增浓度的含完整 Tat 序列 (YGRKKRRQRRR (SEQ ID NO:1)) 的所有肽显著地抑制 Ca^{2+} 电流。这表明 Tat 序列中抑制 N-型 Ca^{2+} 通道电流的残基的特性。

[0156] 图 5A 和 B 证明了 Tat-NR2B9c 对 Ca^{2+} 电流的抑制对 N-型 Ca^{2+} 通道是特异的。一种选择性 N-型 Ca^{2+} 通道阻断剂—— ω -食鱼螺毒素 ($1 \mu\text{M}$) 抑制 Ca^{2+} 电流,并且 N-通道被阻断时 Tat-NR2B9c ($100 \mu\text{M}$) 不能提供额外的抑制 (图 5A, 左侧)。类似地,在 Tat-NR2B9c 抑制离子电流后添加食鱼螺毒素时,未观察到额外的电流抑制 (图 5A, 右侧)。另外,选择性 L-型 Ca^{2+} 通道阻断剂硝苯吡啶显著地影响了存在 ($100 \mu\text{M}$ 细胞内) 或不存在的 Tat-NR2B9c 时记录的 Ca^{2+} 电流的大小,如图 5B 中所示。图 5B 的左侧部分显示钙电流的均值 $\pm$ 标准误差,而右侧是来自单一实验的代表性全细胞电流迹线。

[0157] 图 6 证明 Tat-NR2B9c 对 Ca^{2+} 电流的阻断不是频率依赖性的。使用 $100 \mu\text{M}$ Tat-NR2B9c 测试其使用依赖效应。 $+20\text{mV}$ 去极化脉冲激发的电流显示强的频率依赖性衰减。然而,频率 ($0.07, 10, 20, 50\text{Hz}$) 的提高未提高 Tat-NR2B9c 对该电流的抑制作用。该图显示在不同频率下一个代表性 DRG 神经元中记录的 Ca^{2+} 电流。这些电流具有在数分钟后衰减的自然趋势,并且频率的提高未影响 Tat-NR2B9c 对电流的抑制 (代表 $n = 4$)。

[0158] 图 7 证明在 DRG 神经元中 Tat-NR2B9c 以不依赖于电压的方式抑制 Ca^{2+} 电流,并且该抑制对 N-型 Ca^{2+} 通道是特异的,因为其不受 L-型 Ca^{2+} 通道阻断剂硝苯吡啶的影响。从 -60mV 的保持电位起,使用从 -40 到 $+50\text{mV}$ 的 50ms 电压钳步段引发电流。

[0159] 总而言之,图 4-7 显示 Tat-NR2B92 对 Ca^{2+} 电流的抑制对 N-型 Ca^{2+} 通道是特异性的,并且是带有 Tat 部分的其他肽的类似特性。数据还显示该抑制对 N-型 Ca^{2+} 通道是特异性的,并且与频率和电压无关。

[0160] 实施例 3:在中风模型中 F-Tat-NR2B9c 同样有效

[0161] 在上文描述和实施例 4 中进一步描述的持久缺血的大鼠脑膜阻塞模型中,以 3h mol/g 重量的单一剂量将 F-Tat-NR2B9c 与 Tat-NR2B9c 比较。在两种情况下,开始缺血后

一小时施用嵌合肽。如图 3 中所示, F-Tat-NR2B9c 和 Tat-NR2B9c 在诱导梗塞大小方面同样有效。

[0162] 实施例 4

[0163] 目的:

[0164] 1. 为了测试使用中风的体内脑膜 3 血管阻塞 (P3V0) 模型时, Tat-NR2B9c 肽在雄性和雌性大鼠中的神经保护功效。

[0165] 2. 为了通过在雄性大鼠中测试 Tat-NR2B9c 肽的 6 种变异来阐述作用机制。

[0166] 背景:

[0167] 已开发了称作 Tat-NR2B9c 的肽, 并且先前在大鼠的 MCAO 中风模型中测试。降低的梗塞大小显示该肽具有神经保护性。然而, 中风的 MCAO 模型导致巨大的梗死, 具有广泛的神经缺陷和缩短的生命期。中风的 P3V0 模型导致小得多的皮层梗死, 具有最小的神经缺陷和正常的生命期。

[0168] 测试了六种其他的肽, 其含有除了末端 3 个氨基酸以外与 Tat-NR2B9c 相同的氨基酸序列。通过改变这些氨基酸然后在中风的 P3V0 模型中测试肽的神经保护有效性, 可进一步阐述作用机制。

[0169] Tat-NR2B9c 和 6 种肽的氨基酸结构如下:

[0170] 序列: 名称:

[0171] YGRKKRRQRRRLSSIESDV Tat-NR2B9c (SEQ ID NO :17)

[0172] YGRKKRRQRRRLSSIESDX X = 3- 氟 -DL- 缬氨酸 1974 (SEQ ID NO :73)

[0173] YGRKKRRQRRRLSSIETDX X = 正缬氨酸 1975 (SEQ ID NO :74)

[0174] YGRKKRRQRRRLSSIESDX X = 正缬氨酸 1976 (SEQ ID NO :22)

[0175] YGRKKRRQRRRLSSIESDX X = L- 叔丁基 - 甘氨酸 1977 (SEQ ID NO :23)

[0176] YGRKKRRQRRRLSSIEXDV X = L-2- 氨基 -3- 脲基丙酸 1978 (SEQ ID NO :75)

[0177] YGRKKRRQRRRLSSIETAL 1980 (SEQ ID NO :76)

[0178] 方法:

[0179] 动物:

[0180] 使成年 Sprague Dawley 大鼠 (10-12 周龄) (雄性 ~ 300g, 雌性 ~ 250g) (图 8) 禁食 12-18 个小时, 然后对大脑中动脉在 Whisker Barrel 皮层 (P3V0) 上的 3 个末端分支进行持久性脑膜血管阻塞。在雄性大鼠中测试 7 种肽中的每一种再加上盐水对照组 (每组中 n = 8)。在雌性大鼠中测试 Tat-NR2B9c 肽和盐水对照组 (每组中 n = 8)。在手术时间直至梗塞大小的分析期间, 研究者对处理组是不知情的。

[0181] 一般步骤

[0182] 通过 0.5ml/kg 肌肉注射根据需要补充了 1/3 初始剂量的氯胺酮 (100mg/kg)、乙酰丙嗪 (2mg/kg) 和赛拉嗪 (5mg/kg), 将大鼠麻醉。插入肛门温度探针并将动物置于维持在 37°C 的加热垫上。用 PE 10 聚乙烯管对右颈外动脉 (ECA) 插管, 用于染料注射。通过正中切口暴露头盖骨, 刮去组织, 并在右侧将颞肌与头盖骨分离。使用解剖显微镜和充气的牙钻, 通过在颅骨上钻出矩形并掀开这片颅骨同时保持硬脑膜完整, 在右侧躯体感觉皮层 (在前囟后 2mm 和侧面 5mm) 上制造 6x4mm 的颅窗。用人工脑脊液冲洗后, 向右颈外动脉中注射小团 (10 到 20 μ L) 正常盐水中的活体染料精制蓝紫 (10mMol/L ;Sigma), 以证实穿过皮层表

面血管的转运。选择 barrel 皮层附近 MCA 的三个关键微动脉分支并通过硬脑膜进行电烧灼。烧灼后重复进行小团注射和染料转运,以确保阻断了通过被烧灼的小动脉的转运。将矩形头盖骨重置于颅窗上,并将头皮缝合。从 ECA 中拔出导管,连接 ECA,并缝合前部颈。开始病灶阻塞后 1 小时,通过尾部静脉以 0.06ml/ 分钟的速率灌注 0.3ml 药物 (3nmol/g 体重) 或盐水对照。将每只大鼠送回置于热灯下的各个笼中以保持体温,直至大鼠完全康复。无限制地供应食物和水。

[0183] 收获脑组织

[0184] 手术后 24 小时,用 1mL 戊巴比妥将动物再次麻醉,并迅速收获脑。在梗死区取出一片冠须切片,并于 37℃ 下在 2% 氯化三苯基四氮唑 (TTC) 中温育 15 分钟。扫描图像并将切片储存于 -80℃ 下。

[0185] 分析

[0186] 针对该研究中的每一只大鼠,将梗塞大小测量为半球体的百分比。获得梗塞大小度量后,将动物分离进各自的组。在作为均值 $\pm$ SE 的处理组之间进行比较。

[0187] 结果:

[0188] 在所测试的 6 种新颖的肽中,Tat-NR2B9c、1976 和 1977 导致显著降低的梗塞大小,1975 和 1978 展示梗塞大小的一些减小 (图 8)。

[0189] 本说明书中引用的所有出版物和专利文献引入本文作为参考,就好像每个出版物或专利被明确和个别地指明引入本文作为参考一样。通过 Genbank 标识 (GID) 或登录号引用的 Genbank 记录,尤其是任何多肽序列、多核苷酸序列或其注解引入本文作为参考。如果在不同时间下多于一个版本的序列与相同的登录号相关,则表示保藏号应当解释为适用于在申请的有效提交日存在的版本,如果在优先权申请中也参考了所述保藏物则所述有效提交日回溯至优先权申请。可进行多种改变和用等同物替换,而不偏离本发明的真实思想和范围。除非上下文中另有说明,任何特征、步骤或实施方案可以与任何其他特征、步骤或实施方案组合使用。

[0001]

序 列 表

<110> 阿尔伯维塔公司 (ARBOR VITA CORPORATION)
诺诺公司 (NONO INC.)

<120> 不抑制 N 型钙通道而治疗中风和其他疾病

<130> 026373-000510US

<140> US 00/000000

<141> 2008-02-29

<150> US 60/904, 507

<151> 2007-03-02

<160> 136

<170> PatentIn 版本 3.4

<210> 1

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的 tat 肽

<400> 1

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
1 5 10

<210> 2

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的内化肽

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> Xaa 是除 Tyr 外的任何氨基酸或缺失

<400> 2

Xaa Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg

[0002]

1 5 10

<210> 3
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的内化肽

<400> 3

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro
1 5 10

<210> 4
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的嵌合肽

<400> 4

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile Glu
1 5 10 15

Ser Asp Val

<210> 5
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的活性肽

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> Xaa = Glu, Asp, Asn 或 Gln

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> Xaa = Ser 或 Thr

[0003]

<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(3)
<223> Xaa = Asp, Glu, Gln 或 Asn

<220>
<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> Xaa = Val 或 Leu

<400> 5

Xaa Xaa Xaa Xaa
1

<210> 6
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的活性肽

<400> 6

Glu Ser Asp Val
1

<210> 7
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的活性肽

<400> 7

Glu Ser Glu Val
1

<210> 8
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的活性肽

[0004]

<400> 8

Glu Thr Asp Val
1

<210> 9

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的活性肽

<400> 9

Glu Thr Glu Val
1

<210> 10

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的活性肽

<400> 10

Asp Thr Asp Val
1

<210> 11

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的活性肽

<400> 11

Asp Thr Glu Val
1

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工的

[0005]

<220>

<223> 合成的活性肽 - 1991 2B9c

<400> 12

Lys Leu Ser Ser Ile Glu Ser Asp Val
1 5

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的活性肽

<400> 13

Lys Leu Ser Ser Ile Glu Thr Asp Val
1 5

<210> 14

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的活性肽

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> Xaa 是 Thr 或 Ser

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Xaa 是任何氨基酸

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3)..(3)

<223> Xaa 是 Val 或 Leu

<400> 14

Xaa Xaa Xaa
1

[0006]

<210> 15
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的内化肽

<400> 15

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Gln
1 5 10

<210> 16
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的嵌合肽

<400> 16

Phe Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile
1 5 10 15

Glu Thr Asp Val
20

<210> 17
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的肽

<400> 17

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile
1 5 10 15

Glu Ser Asp Val
20

<210> 18
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工的

[0007]

<220>

<223> 合成的肽 - 1992 Tat-NR2B9c-AA

<400> 18

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile
1 5 10 15

Glu Ala Asp Ala
20

<210> 19

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的肽 - 1993 F-Tat-NR2B9c

<400> 19

Phe Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile
1 5 10 15

Glu Ser Asp Val
20

<210> 20

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的肽 - 1994 Tat-NR2B9c K 至 A

<400> 20

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Ala Leu Ser Ser Ile
1 5 10 15

Glu Ser Asp Val
20

<210> 21

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工的

[0008]

<220>

<223> 合成的肽 - 1995 F-Tat-NR2B9c K 至 A

<400> 21

Phe Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Ala Leu Ser Ser Ile
1 5 10 15

Glu Ser Asp Val
20

<210> 22

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的肽变体- 1976

<220>

<221> MOD_RES

<222> (20).. (20)

<223> Xaa 是 Nva

<400> 22

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile
1 5 10 15

Glu Ser Asp Xaa
20

<210> 23

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的肽 - 1977

<220>

<221> MOD_RES

<222> (20).. (20)

<223> Xaa 是 L-叔丁基-甘氨酸

<400> 23

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile
1 5 10 15

[0009]

Glu Ser Asp Xaa
20

<210> 24

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的肽

<400> 24

Phe Asn Gly Ser Ser Asn Gly His Val Tyr Glu Lys Leu Ser Ser Ile
1 5 10 15

Glu Ser Asp Val
20

<210> 25

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的肽 - C 端 20 元序列

<400> 25

His Pro Thr Asp Ile Thr Gly Pro Leu Asn Leu Ser Asp Pro Ser Val
1 5 10 15

Ser Thr Val Val
20

<210> 26

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的肽 - C 端 20 元序列

<400> 26

Arg Arg Ala Ile Glu Arg Glu Glu Gly Gln Leu Gln Leu Cys Ser Arg
1 5 10 15

His Arg Glu Ser

[0010]

20

<210> 27

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的肽 - C 端 20 元序列

<400> 27

Thr Gln Gly Phe Pro Gly Pro Cys Thr Trp Arg Arg Ile Ser Ser Leu
1 5 10 15

Glu Ser Glu Val
20

<210> 28

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的肽 - C 端 20 元序列

<400> 28

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

Thr Cys Glu Ser
20

<210> 29

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的肽 - C 端 20 元序列

<400> 29

Leu Asn Ser Cys Ser Asn Arg Arg Val Tyr Lys Lys Met Pro Ser Ile
1 5 10 15

Glu Ser Asp Val
20

[0011]

<210> 30
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的肽 - C 端 20 元序列

<400> 30

Gly Gly Asp Leu Gly Thr Arg Arg Gly Ser Ala His Phe Ser Ser Leu
1 5 10 15

Glu Ser Glu Val
20

<210> 31
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的肽 - C 端 20 元序列

<400> 31

Gln Pro Thr Pro Thr Leu Gly Leu Asn Leu Gly Asn Asp Pro Asp Arg
1 5 10 15

Gly Thr Ser Ile
20

<210> 32
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的肽 - C 端 20 元序列

<400> 32

Met Gln Ser Ile Pro Cys Met Ser His Ser Ser Gly Met Pro Leu Gly
1 5 10 15

Ala Thr Gly Leu
20

[0012]

<210> 33
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的肽 - C 端 20 元序列

<400> 33

Gln Asn Phe Ala Thr Tyr Lys Glu Gly Tyr Asn Val Tyr Gly Ile Glu
1 5 10 15

Ser Val Lys Ile
20

<210> 34
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的肽 - C 端 20 元序列

<400> 34

Gln Asn Tyr Ala Thr Tyr Arg Glu Gly Tyr Asn Val Tyr Gly Thr Glu
1 5 10 15

Ser Val Lys Ile
20

<210> 35
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的肽 - C 端 20 元序列

<400> 35

His Thr Gly Thr Ala Ile Arg Gln Ser Ser Gly Leu Ala Val Ile Ala
1 5 10 15

Ser Asp Leu Pro
20

<210> 36

[0013]

<211> 20
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的肽 - C 端 20 元序列

<400> 36

Ser Phe Thr Ser Ile Leu Thr Cys His Gln Arg Arg Thr Gln Arg Lys
1 5 10 15

Glu Thr Val Ala
20

<210> 37
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的肽 - C 端 20 元序列

<400> 37

Glu Val Ile Asn Met His Thr Phe Asn Asp Arg Arg Leu Pro Gly Lys
1 5 10 15

Glu Thr Met Ala
20

<210> 38
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的肽 - C 端 20 元序列

<400> 38

Arg Arg Leu Pro Gly Lys Asp Ser Met Ala Cys Ser Thr Ser Leu Ala
1 5 10 15

Pro Val Phe Pro
20

<210> 39
<211> 4

[0014]

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的肽 - C 端 4 元序列

<400> 39

Ser Thr Val Val

1

<210> 40

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的肽 - C 端 4 元序列

<400> 40

His Arg Glu Ser

1

<210> 41

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的肽 - C 端 4 元序列

<400> 41

Thr Cys Glu Ser

1

<210> 42

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的肽 - C 端 4 元序列

<400> 42

Gly Thr Ser Ile

1

[0015]

<210> 43
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的肽 - C 端 4 元序列

<400> 43

Ala Thr Gly Leu
1

<210> 44
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的肽 - C 端 4 元序列

<400> 44

Ser Val Lys Ile
1

<210> 45
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的肽 - C 端 4 元序列

<400> 45

Ser Asp Leu Pro
1

<210> 46
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的肽 - C 端 4 元序列

<400> 46

[0016]

Glu Thr Val Ala

1

<210> 47

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的肽 - C 端 4 元序列

<400> 47

Glu Thr Met Ala

1

<210> 48

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的肽 - C 端 4 元序列

<400> 48

Pro Val Phe Pro

1

<210> 49

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的 tat 变体内化肽

<400> 49

Phe Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg

1

5

10

<210> 50

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

[0017]

<223> 合成的 tat 变体内化肽

<400> 50

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
1 5 10

<210> 51

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的肽

<400> 51

Thr Gly Glu Lys Pro
1 5

<210> 52

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的肽

<400> 52

Gly Gly Arg Arg Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 53

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的肽

<400> 53

Leu Arg Gln Arg Asp Gly Glu Arg Pro
1 5

<210> 54

<211> 19

<212> PRT

[0018]

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的肽

<400> 54

Gly Lys Lys Lys Lys Lys Gln Lys Lys Lys Lys Leu Ser Ser Ile Glu
1 5 10 15

Ser Asp Val

<210> 55

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的肽

<400> 55

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile Glu Ser
1 5 10 15

Asp Val

<210> 56

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的肽

<400> 56

Gly Ala Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile Glu
1 5 10 15

Ser Asp Val

<210> 57

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工的

[0019]

<220>

<223> 合成的肽

<400> 57

Ala	Lys	Lys	Arg	Arg	Gln	Arg	Arg	Arg	Lys	Leu	Ser	Ser	Ile	Glu	Ser
1				5					10					15	

Asp Val

<210> 58

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的肽

<400> 58

Gly	Arg	Lys	Ala	Arg	Arg	Gln	Arg	Arg	Arg	Lys	Leu	Ser	Ser	Ile	Glu
1				5						10					15

Ser Asp Val

<210> 59

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的肽

<400> 59

Arg	Lys	Ala	Arg	Arg	Gln	Arg	Arg	Arg	Lys	Leu	Ser	Ser	Ile	Glu	Ser
1				5						10				15	

Asp Val

<210> 60

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工的

[0020]

<220>

<223> 合成的肽

<400> 60

Gly	Arg	Lys	Lys	Ala	Arg	Gln	Arg	Arg	Arg	Lys	Leu	Ser	Ser	Ile	Glu
1				5					10					15	

Ser Asp Val

<210> 61

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的肽

<400> 61

Arg	Lys	Lys	Ala	Arg	Gln	Arg	Arg	Arg	Lys	Leu	Ser	Ser	Ile	Glu	Ser
1				5					10					15	

Asp Val

<210> 62

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的肽

<400> 62

Gly	Arg	Lys	Lys	Arg	Arg	Gln	Ala	Arg	Arg	Lys	Leu	Ser	Ser	Ile	Glu
1				5					10					15	

Ser Asp Val

<210> 63

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

[0021]

<223> 合成的肽

<400> 63

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Ala Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile Glu Ser
1 5 10 15

Asp Val

<210> 64

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的肽

<400> 64

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Ala Arg Lys Leu Ser Ser Ile Glu
1 5 10 15

Ser Asp Val

<210> 65

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的肽

<400> 65

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Ala Arg Lys Leu Ser Ser Ile Glu Ser
1 5 10 15

Asp Val

<210> 66

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的肽

[0022]

<400> 66

Arg Arg Pro Arg Arg Pro Arg Arg Pro Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile
1 5 10 15

Glu Ser Asp Val
20

<210> 67

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的肽

<400> 67

Arg Arg Ala Arg Arg Ala Arg Arg Ala Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile
1 5 10 15

Glu Ser Asp Val
20

<210> 68

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的肽

<400> 68

Arg Arg Arg Ala Arg Arg Arg Ala Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile Glu
1 5 10 15

Ser Asp Val

<210> 69

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的肽

[0023]

<400> 69

Arg Arg Arg Pro Arg Arg Arg Pro Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile Glu
1 5 10 15

Ser Asp Val

<210> 70

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的肽

<400> 70

Arg Arg Pro Arg Arg Pro Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile Glu Ser Asp
1 5 10 15

Val

<210> 71

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的肽

<400> 71

Arg Arg Ala Arg Arg Ala Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile Glu Ser Asp
1 5 10 15

Val

<210> 72

<211> 26

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的 N-型钙通道抑制剂- 齐考诺肽

<400> 72

[0024]

Cys Lys Gly Lys Gly Ala Lys Cys Ser Arg Leu Met Tyr Asp Cys Cys
1 5 10 15

Thr Gly Ser Cys Arg Ser Gly Lys Cys Gly
20 25

<210> 73

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的肽变体 1974

<220>

<221> MOD_RES

<222> (20).. (20)

<223> Xaa 是 3-氟-L-缬氨酸

<400> 73

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile
1 5 10 15

Glu Ser Asp Xaa
20

<210> 74

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的肽变体 1975

<220>

<221> MOD_RES

<222> (20).. (20)

<223> Xaa 是 Nva

<400> 74

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile
1 5 10 15

Glu Thr Asp Xaa
20

[0025]

<210> 75
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的肽变体 1978

<220>
<221> MOD_RES
<222> (18).. (18)
<223> Xaa 是 L-2-氨基-3-脲基丙酸

<400> 75

Tyr	Gly	Arg	Lys	Lys	Arg	Arg	Gln	Arg	Arg	Arg	Lys	Leu	Ser	Ser	Ile
1				5				10					15		

Glu	Xaa	Asp	Val
			20

<210> 76
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的肽变体 1980

<400> 76

Tyr	Gly	Arg	Lys	Lys	Arg	Arg	Gln	Arg	Arg	Arg	Lys	Leu	Ser	Ser	Ile
1				5				10					15		

Glu	Thr	Ala	Leu
			20

<210> 77
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的肽

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1).. (1)

[0026]

<223> Xaa 是生物素分子或其他帽化部分修饰的 Phe，所述其他帽化部分包括但不限于 H、乙酰基、苯甲酰基、烷基（脂肪族的）、末端带有环烷基的烷基、带有烷基间隔区的生物素、(5,6)-FAM。

<400> 77

Xaa Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile
1 5 10 15

Glu Ser Asp Val
20

<210> 78

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Xaa 是焦谷氨酸

<400> 78

Xaa Phe Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Lys Leu Ser Ser
1 5 10 15

Ile Glu Ser Asp Val
20

<210> 79

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Xaa 是除 Tyr 外的氨基酸

<400> 79

Xaa Phe Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Lys Leu Ser Ser
1 5 10 15

[0027]

Ile Glu Ser Asp Val
20

<210> 80

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Xaa 是生物素分子或其他帽化部分修饰的 Gly，所述其他帽化部分包括但不限于 H、乙酰基、苯甲酰基、烷基（脂肪族的）、末端带有环烷基的烷基、带有烷基间隔区的生物素、(5,6)-FAM。

<400> 80

Xaa Lys Lys Lys Lys Lys Gln Lys Lys Lys Lys Leu Ser Ser Ile Glu
1 5 10 15

Ser Asp Val

<210> 81

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Xaa 是焦谷氨酸

<400> 81

Xaa Gly Lys Lys Lys Lys Lys Gln Lys Lys Lys Lys Leu Ser Ser Ile
1 5 10 15

Glu Ser Asp Val
20

<210> 82

<211> 20

<212> PRT

[0028]

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Xaa 是除 Tyr 外的氨基酸

<400> 82

Xaa Gly Lys Lys Lys Lys Lys Gln Lys Lys Lys Lys Leu Ser Ser Ile
1 5 10 15

Glu Ser Asp Val
20

<210> 83

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Xaa 是生物素分子或其他帽化部分修饰的 Arg, 所述其他帽化部分包括但不限于 H、乙酰基、苯甲酰基、烷基(脂肪族的)、末端带有环烷基的烷基、带有烷基间隔区的生物素、(5,6)-FAM。

<400> 83

Xaa Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile Glu Ser
1 5 10 15

Asp Val

<210> 84

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的肽

<220>

[0029]

<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> Xaa 是焦谷氨酸

<400> 84

Xaa Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile Glu
1 5 10 15

Ser Asp Val

<210> 85
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的肽

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> Xaa 是除 Tyr 外的氨基酸

<400> 85

Xaa Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile Glu
1 5 10 15

Ser Asp Val

<210> 86
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的肽

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> Xaa 是生物素分子或其他帽化部分修饰的 Gly, 所述其他帽化部分包括但不限于 H、乙酰基、苯甲酰基、烷基(脂肪族的)、末端带有环烷基的烷基、带有烷基间隔区的生物素、(5,6)-FAM。
<400> 86

Xaa Ala Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile Glu
[0030]

1	5	10	15
Ser Asp Val			
<210> 87			
<211> 20			
<212> PRT			
<213> 人工的			
<220>			
<223> 合成的肽			
<220>			
<221> MISC_FEATURE			
<222> (1)..(1)			
<223> Xaa 是焦谷氨酸			
<400> 87			
Xaa Gly Ala Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile			
1	5	10	15
Glu Ser Asp Val			
	20		
<210> 88			
<211> 20			
<212> PRT			
<213> 人工的			
<220>			
<223> 合成的肽			
<220>			
<221> MISC_FEATURE			
<222> (1)..(1)			
<223> Xaa 是除酪氨酸外的氨基酸			
<220>			
<221> MISC_FEATURE			
<222> (1)..(1)			
<223> Xaa 是除 Tyr 外的氨基酸			
<400> 88			
Xaa Gly Ala Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile			
1	5	10	15

[0031]

Glu Ser Asp Val
20

<210> 89
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的肽

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)

<223> Xaa 是生物素分子或其他帽化部分修饰的 Ala, 所述其他帽化部分包括但不限于 H、乙酰基、苯甲酰基、烷基 (脂肪族的)、末端带有环烷基的烷基、带有烷基间隔区的生物素、(5,6)-FAM。

<400> 89

Xaa Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile Glu Ser
1 5 10 15

Asp Val

<210> 90
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的肽

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> Xaa 是焦谷氨酸

<400> 90

Xaa Ala Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile Glu
1 5 10 15

Ser Asp Val

<210> 91
<211> 19
<212> PRT

[0032]

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Xaa 是除 Tyr 外的氨基酸

<400> 91

Xaa Ala Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile Glu
1 5 10 15

Ser Asp Val

<210> 92

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Xaa 是生物素分子或其他帽化部分修饰的 Gly, 所述其他帽化部分包括但不限于 H、乙酰基、苯甲酰基、烷基(脂肪族的)、末端带有环烷基的烷基、带有烷基间隔区的生物素、(5,6)-FAM。

<400> 92

Xaa Arg Lys Ala Arg Arg Gln Arg Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile Glu
1 5 10 15

Ser Asp Val

<210> 93

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的肽

<220>

[0033]

<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> Xaa 是焦谷氨酸

<400> 93

Xaa Gly Arg Lys Ala Arg Arg Gln Arg Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile
1 5 10 15

Glu Ser Asp Val
20

<210> 94
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的肽

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> Xaa 是除 Tyr 外的氨基酸

<400> 94

Xaa Gly Arg Lys Ala Arg Arg Gln Arg Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile
1 5 10 15

Glu Ser Asp Val
20

<210> 95
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的肽

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> Xaa 是生物素分子或其他帽化部分修饰的 Arg, 所述其他帽化部分包括但不限于 H、乙酰基、苯甲酰基、烷基(脂肪族的)、末端带有环烷基的烷基、带有烷基间隔区的生物素、(5,6)-FAM。

<400> 95

[0034]

Xaa Lys Ala Arg Arg Gln Arg Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile Glu Ser
1 5 10 15

Asp Val

<210> 96

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Xaa 是焦谷氨酸

<400> 96

Xaa Arg Lys Ala Arg Arg Gln Arg Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile Glu
1 5 10 15

Ser Asp Val

<210> 97

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Xaa 是除 Tyr 外的氨基酸

<400> 97

Xaa Arg Lys Ala Arg Arg Gln Arg Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile Glu
1 5 10 15

Ser Asp Val

<210> 98

[0035]

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Xaa 是生物素分子或其他帽化部分修饰的 Gly, 所述其他帽化部分包括但不限于 H、乙酰基、苯甲酰基、烷基(脂肪族的)、末端带有环烷基的烷基、带有烷基间隔区的生物素、(5,6)-FAM。

<400> 98

Xaa Arg Lys Lys Ala Arg Gln Arg Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile Glu
1 5 10 15

Ser Asp Val

<210> 99

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Xaa 是焦谷氨酸

<400> 99

Xaa Gly Arg Lys Lys Ala Arg Gln Arg Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile
1 5 10 15

Glu Ser Asp Val
20

<210> 100

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的肽

[0036]

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Xaa 是除 Tyr 外的氨基酸

<400> 100

Xaa Gly Arg Lys Lys Ala Arg Gln Arg Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile

1

5

10

15

Glu Ser Asp Val

20

<210> 101

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Xaa 是生物素分子或其他帽化部分修饰的 Arg, 所述其他帽化部分包括但不限于 H、乙酰基、苯甲酰基、烷基(脂肪族的)、末端带有环烷基的烷基、带有烷基间隔区的生物素、(5,6)-FAM。

<400> 101

Xaa Lys Lys Ala Arg Gln Arg Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile Glu Ser

1

5

10

15

Asp Val

<210> 102

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Xaa 是焦谷氨酸

[0037]

<400> 102

Xaa Arg Lys Lys Ala Arg Gln Arg Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile Glu
1 5 10 15

Ser Asp Val

<210> 103

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Xaa 是除 Tyr 外的氨基酸

<400> 103

Xaa Arg Lys Lys Ala Arg Gln Arg Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile Glu
1 5 10 15

Ser Asp Val

<210> 104

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Xaa 是生物素分子或其他帽化部分修饰的 Gly, 所述其他帽化部分包括但不限于 H、乙酰基、苯甲酰基、烷基 (脂肪族的)、末端带有环烷基的烷基、带有烷基间隔区的生物素、(5,6)-FAM。

<400> 104

Xaa Arg Lys Lys Arg Arg Gln Ala Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile Glu
1 5 10 15

Ser Asp Val

[0038]

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

<220>
<223> 合成的肽

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> Xaa 是焦谷氨酸

<400> 105

Xaa	Gly	Arg	Lys	Lys	Arg	Arg	Gln	Ala	Arg	Arg	Lys	Leu	Ser	Ser	Ile
1				5					10				15		

Glu	Ser	Asp	Val
			20

<210> 106
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的肽

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> Xaa 是除 Tyr 外的氨基酸

<400> 106

Xaa	Gly	Arg	Lys	Lys	Arg	Arg	Gln	Ala	Arg	Arg	Lys	Leu	Ser	Ser	Ile
1				5					10				15		

Glu	Ser	Asp	Val
			20

<210> 107
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工的

[0039]

<220>

<223> 合成的肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Xaa 是生物素分子或其他帽化部分修饰的 Arg，所述其他帽化部分包括但不限于 H、乙酰基、苯甲酰基、烷基（脂肪族的）、末端带有环烷基的烷基、带有烷基间隔区的生物素、(5,6)-FAM。

<400> 107

Xaa	Lys	Lys	Arg	Arg	Gln	Ala	Arg	Arg	Lys	Leu	Ser	Ser	Ile	Glu	Ser
1			5						10					15	

Asp Val

<210> 108

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Xaa 是焦谷氨酸

<400> 108

Xaa	Arg	Lys	Lys	Arg	Arg	Gln	Ala	Arg	Arg	Lys	Leu	Ser	Ser	Ile	Glu
1			5							10				15	

Ser Asp Val

<210> 109

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

[0040]

<222> (1)..(1)

<223> Xaa 是除 Tyr 外的氨基酸

<400> 109

Xaa Arg Lys Lys Arg Arg Gln Ala Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile Glu
1 5 10 15

Ser Asp Val

<210> 110

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Xaa 是生物素分子或其他帽化部分修饰的 Gly, 所述其他帽化部分包括但不限于 H、乙酰基、苯甲酰基、烷基(脂肪族的)、末端带有环烷基的烷基、带有烷基间隔区的生物素、(5,6)-FAM。

<400> 110

Xaa Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Ala Arg Lys Leu Ser Ser Ile Glu
1 5 10 15

Ser Asp Val

<210> 111

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Xaa 是焦谷氨酸

<400> 111

Xaa Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Ala Arg Lys Leu Ser Ser Ile
[0041]

1 5 10 15

Glu Ser Asp Val
20

<210> 112

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Xaa 是除 Tyr 外的氨基酸

<400> 112

Xaa Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Ala Arg Lys Leu Ser Ser Ile

1 5 10 15

Glu Ser Asp Val
20

<210> 113

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Xaa 是生物素分子或其他帽化部分修饰的 Arg, 所述其他帽化部分包括但不限于 H、乙酰基、苯甲酰基、烷基(脂肪族的)、末端带有环烷基的烷基、带有烷基间隔区的生物素、(5,6)-FAM。

<400> 113

Xaa Lys Lys Arg Arg Gln Arg Ala Arg Lys Leu Ser Ser Ile Glu Ser

1 5 10 15

Asp Val

<210> 114

[0042]

<211> 19
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的肽

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> Xaa 是焦谷氨酸

<400> 114

Xaa Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Ala Arg Lys Leu Ser Ser Ile Glu
1 5 10 15

Ser Asp Val

<210> 115
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的肽

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> Xaa 是除 Tyr 外的氨基酸

<400> 115

Xaa Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Ala Arg Lys Leu Ser Ser Ile Glu
1 5 10 15

Ser Asp Val

<210> 116
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的肽

[0043]

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Xaa 是生物素分子或其他帽化部分修饰的 Arg，所述其他帽化部分包括但不限于 H、乙酰基、苯甲酰基、烷基（脂肪族的）、末端带有环烷基的烷基、带有烷基间隔区的生物素、(5,6)-FAM。

<400> 116

Xaa Arg Pro Arg Arg Pro Arg Arg Pro Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile
1 5 10 15

Glu Ser Asp Val
20

<210> 117

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Xaa 是焦谷氨酸

<400> 117

Xaa Arg Arg Pro Arg Arg Pro Arg Arg Pro Arg Arg Lys Leu Ser Ser
1 5 10 15

Ile Glu Ser Asp Val
20

<210> 118

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Xaa 是除 Tyr 外的氨基酸

<400> 118

[0044]

Xaa Arg Arg Pro Arg Arg Pro Arg Arg Pro Arg Arg Lys Leu Ser Ser
1 5 10 15

Ile Glu Ser Asp Val
20

<210> 119

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Xaa 是生物素分子或其他帽化部分修饰的 Arg，所述其他帽化部分包括但不限于 H、乙酰基、苯甲酰基、烷基（脂肪族的）、末端带有环烷基的烷基、带有烷基间隔区的生物素、(5,6)-FAM。

<400> 119

Xaa Arg Ala Arg Arg Ala Arg Arg Ala Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile
1 5 10 15

Glu Ser Asp Val
20

<210> 120

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Xaa 是焦谷氨酸

<400> 120

Xaa Arg Arg Ala Arg Arg Ala Arg Arg Ala Arg Arg Lys Leu Ser Ser
1 5 10 15

Ile Glu Ser Asp Val
20

[0045]

<210> 121
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的肽

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> Xaa 是除 Tyr 外的氨基酸

<400> 121

Xaa Arg Arg Ala Arg Arg Ala Arg Arg Ala Arg Arg Lys Leu Ser Ser
1 5 10 15

Ile Glu Ser Asp Val
20

<210> 122
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成的肽

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> Xaa 是生物素分子或其他帽化部分修饰的 Arg，所述其他帽化部分包括但不限于 H、乙酰基、苯甲酰基、烷基（脂肪族的）、末端带有环烷基的烷基、带有烷基间隔区的生物素、(5,6)-FAM。

<400> 122

Xaa Arg Arg Ala Arg Arg Arg Ala Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile Glu
1 5 10 15

Ser Asp Val

<210> 123
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
[0046]

<223> 合成的肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Xaa 是焦谷氨酸

<400> 123

Xaa Arg Arg Arg Ala Arg Arg Arg Ala Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile
1 5 10 15

Glu Ser Asp Val
20

<210> 124

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Xaa 是除 Tyr 外的氨基酸

<400> 124

Xaa Arg Arg Arg Ala Arg Arg Arg Ala Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile
1 5 10 15

Glu Ser Asp Val
20

<210> 125

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Xaa 是生物素分子或其他帽化部分修饰的 Arg, 所述其他帽化部分包括但不限于 H、乙酰基、苯甲酰基、烷基(脂肪族的)、末端带有环烷基的烷基、带有烷基间隔区的生物素、(5,6)-FAM。

[0047]

<400> 125

Xaa Arg Arg Pro Arg Arg Arg Pro Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile Glu
1 5 10 15

Ser Asp Val

<210> 126

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Xaa 是焦谷氨酸

<400> 126

Xaa Arg Arg Arg Pro Arg Arg Arg Pro Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile
1 5 10 15

Glu Ser Asp Val
20

<210> 127

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Xaa 是除 Tyr 外的氨基酸

<400> 127

Xaa Arg Arg Arg Pro Arg Arg Arg Pro Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile
1 5 10 15

Glu Ser Asp Val

[0048]

20

<210> 128

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Xaa 是生物素分子或其他帽化部分修饰的 Arg，所述其他帽化部分包括但不限于 H、乙酰基、苯甲酰基、烷基（脂肪族的）、末端带有环烷基的烷基、带有烷基间隔区的生物素、(5,6)-FAM。

<400> 128

Xaa Arg Pro Arg Arg Pro Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile Glu Ser Asp

1

5

10

15

Val

<210> 129

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Xaa 是焦谷氨酸

<400> 129

Xaa Arg Arg Pro Arg Arg Pro Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile Glu Ser

1

5

10

15

Asp Val

<210> 130

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工的

[0049]

<220>

<223> 合成的肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Xaa 是除 Tyr 外的氨基酸

<400> 130

Xaa Arg Arg Pro Arg Arg Pro Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile Glu Ser
1 5 10 15

Asp Val

<210> 131

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Xaa 是生物素分子或其他帽化部分修饰的 Arg, 所述其他帽化部分包括但不限于 H、乙酰基、苯甲酰基、烷基(脂肪族的)、末端带有环烷基的烷基、带有烷基间隔区的生物素、(5,6)-FAM。

<400> 131

Xaa Arg Ala Arg Arg Ala Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile Glu Ser Asp
1 5 10 15

Val

<210> 132

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

[0050]

<222> (1)..(1)

<223> Xaa 是焦谷氨酸

<400> 132

Xaa Arg Arg Ala Arg Arg Ala Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile Glu Ser
1 5 10 15

Asp Val

<210> 133

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Xaa 是除 Tyr 外的氨基酸

<400> 133

Xaa Arg Arg Ala Arg Arg Ala Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile Glu Ser
1 5 10 15

Asp Val

<210> 134

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的肽

<400> 134

Gly Ser Ser Ser Ser
1 5

<210> 135

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工的

[0051]

<220>

<223> 合成的内化肽

<400> 135

Phe	Gly	Arg	Lys	Lys	Arg	Arg	Gln	Arg	Arg	Arg
1				5					10	

<210> 136

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的内化肽

<400> 136

Gly	Arg	Lys	Lys	Arg	Arg	Gln	Arg	Arg	Arg
1				5					10

目录号	靶标	批次 ^a	物种	n=	浓度	抑制%					
						%	-100 ↓	-50 ↓	0 ↓	50 ↓	100 ↓
200510	腺苷 A ₁	151494	人	2	10 μM	-8			■		
200610	腺苷 A _{2A}	151495	人	2	10 μM	0					
200720	腺苷 A ₃	151503	人	2	10 μM	-22			■		
203500	肾上腺素能 α ₁ , 非选择性	151722	大鼠	2	10 μM	-19			■		
203900	肾上腺素能 α ₂ , 非选择性	151551	大鼠	2	10 μM	-5			■		
204010	肾上腺素能 β ₁	151527	人	2	10 μM	8				■	
205000	过敏毒素 C5a	151609	人	2	10 μM	15				■	
210110	血管紧张素 AT ₂	151781	人	2	10 μM	12				■	
226700	苯二氮杂, 外周	151814	大鼠	2	10 μM	-17			■		
212610	缓激肽 B ₂	151530	人	2	10 μM	-7			■		
214510	L-型钙通道, 苯二氮杂	151496	大鼠	2	10 μM	6				■	
214600	L-型钙通道, 二氢吡啶	151497	大鼠	2	10 μM	5				■	
215000	L-型钙通道, 苯烷基胺	151498	大鼠	2	10 μM	4				■	
◆ 216000	N-型钙通道	151744	大鼠	2	10 μM	108					■
217500	趋化因子 CCR1	151506	人	2	10 μM	-15			■		
◆ 244500	趋化因子 CXCR2 (IL-8R _α)	152328	人	2	10 μM	77					■
218010	缩胆囊素 CCK ₁ (CCK _α)	152108	人	2	10 μM	-11			■		
219100	秋水仙素	151615	大鼠	2	10 μM	-10			■		
219500	多巴胺 D ₁	151531	人	2	10 μM	2				■	
219700	多巴胺 D ₂₅	151533	人	2	10 μM	1				■	
224010	内皮缩血管肽 ET _A	151508	人	2	10 μM	1				■	
226500	GABA _A , 激动剂位点	151572	大鼠	2	10 μM	2				■	
226600	GABA _A , 苯二氮杂, 中枢的	152561	大鼠	2	10 μM	12				■	
226810	GABA _A , 氯化物通道, TBOB	151537	大鼠	2	10 μM	4				■	
228510	GABA _B , 非选择性	151952	大鼠	2	10 μM	0					
228600	GABA _{B1A}	151853	人	2	10 μM	-11			■		
228700	GABA _{B1B}	151575	人	2	10 μM	27				■	
231600	甘丙肽 GAL2	152193	人	2	10 μM	-22			■		
232600	谷氨酸盐, AMPA	151576	大鼠	2	10 μM	-2				■	

图 1A

目录号	靶标	批次*	物种	n=	浓度	抑制%					
						%	-100 ↓	-50 ↓	0 ↓	50 ↓	100 ↓
232700	谷氨酸盐, 红藻氨酸盐	151577	大鼠	2	10 μ M	-12			■		
232810	谷氨酸盐, NMDA, Agonism	151578	大鼠	2	10 μ M	6				■	
232910	谷氨酸盐, NMDA, 甘氨酸	151579	大鼠	2	10 μ M	10				■	
233000	谷氨酸盐, NMDA, 苯环利定	151580	大鼠	2	10 μ M	-21		■			
234000	谷氨酸盐, NMDA, 多胺	151619	大鼠	2	10 μ M	28				■	
235010	谷氨酸盐, 非选择性	152191	大鼠	2	10 μ M	22				■	
239000	甘氨酸, 士的宁-敏感的	151620	大鼠	2	10 μ M	18				■	
239610	组胺 H ₁	151538	人	2	10 μ M	2				■	
239710	组胺 H ₂	151539	人	2	10 μ M	0					
239810	组胺 H ₃	151540	人	2	10 μ M	-28		■			
239900	组胺 H ₄	151541	人	2	10 μ M	-11			■		
241000	咪唑啉 I ₁ , 中枢	151581	大鼠	2	10 μ M	-17		■			
241100	咪唑啉 I ₂ , 外周	152162	大鼠	2	10 μ M	5				■	
243510	白介素 IL-1	151547	小鼠	2	10 μ M	3				■	
243700	白介素 IL-2	151710	小鼠	2	10 μ M	6				■	
244100	白介素 IL-6	151711	人	2	10 μ M	-10			■		
252610	毒蕈碱 M ₁	151513	人	2	10 μ M	8				■	
252710	毒蕈碱 M ₂	151514	人	2	10 μ M	4				■	
252810	毒蕈碱 M ₃	151515	人	2	10 μ M	-25		■			
257010	神经肽 Y Y ₁	151516	人	2	10 μ M	0					
257110	神经肽 Y Y ₂	151517	人	2	10 μ M	6				■	
258010	神经紧张肽 NT ₁	152160	人	2	10 μ M	28				■	
260110	阿片剂 δ (OP1, DOP)	151542	人	2	10 μ M	-4			■		
260210	阿片剂 κ (OP2, KOP)	151543	人	2	10 μ M	5				■	
260410	阿片剂 μ (OP3, MOP)	151544	人	2	10 μ M	4				■	
260600	孤啡肽 (Orphanin) ORL ₁	152161	人	2	10 μ M	43				■	
265800	钾通道 [SK _{Ca}]	151632	大鼠	2	10 μ M	17				■	
265900	钾通道 HERG	151518	人	2	10 μ M	7				■	
271110	血清素 (5-羟色胺) 5-HT _{1A}	151594	人	2	10 μ M	-12			■		
271650	血清素 (5-羟色胺) 5-HT _{2A}	151502	人	2	10 μ M	1				■	

图 1B

目录号	靶标	批次 [*]	物种	n=	浓度	抑制%					
						%	-100 ↓	-50 ↓	0 ↓	50 ↓	100 ↓
271910	血清素 (5-羟色胺) 5-HT ₃	151598	人	2	10 μM	-4					
272100	血清素 (5-羟色胺) 5-HT _{5A}	151601	人	2	10 μM	-12			■		
272200	血清素 (5-羟色胺) 5-HT ₆	151602	人	2	10 μM	-3					
279510	钠通道, 位点 2	151606	大鼠	2	10 μM	-2					
226400	转运蛋白, GABA	151536	大鼠	2	10 μM	6				■	
239100	转运蛋白, 甘氨酸	152079	大鼠	2	10 μM	-8			■		
287010	血管活性肠肽 VIP ₁	151520	人	2	10 μM	-1					
287520	血管升压素 V _{1A}	151649	人	2	10 μM	3				■	

图 1C

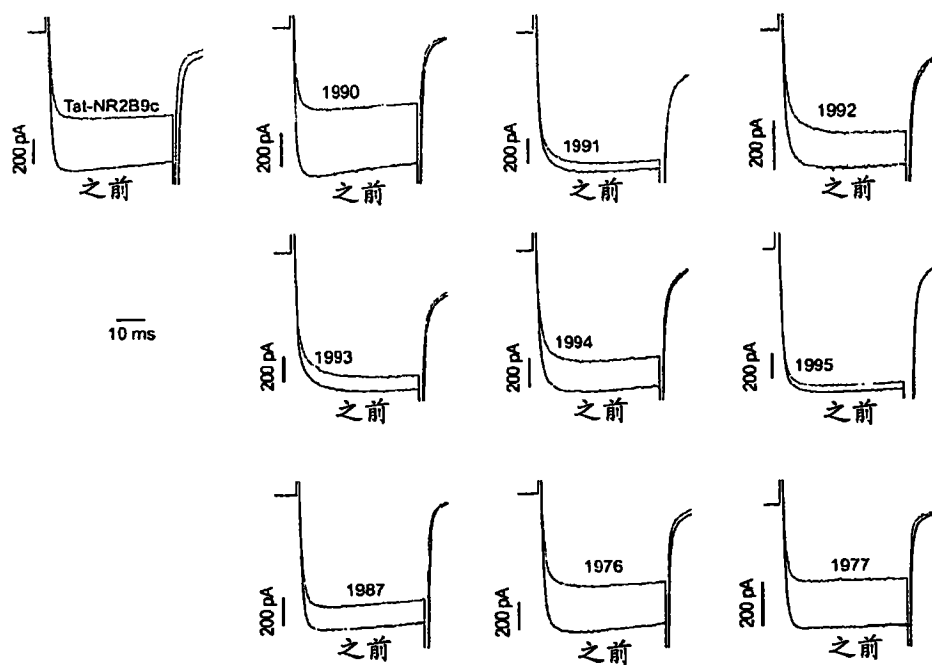
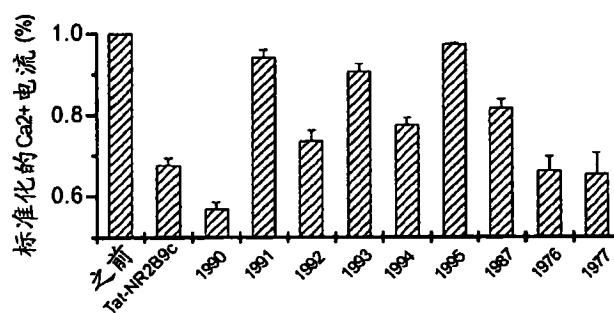


图 2

3PVO 手术灌注后1小时

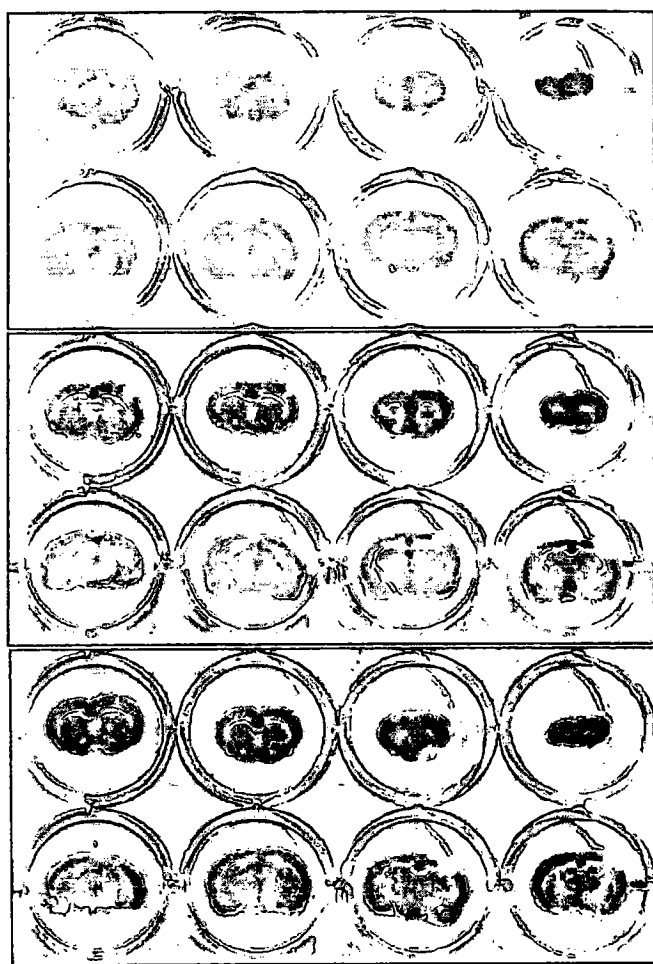
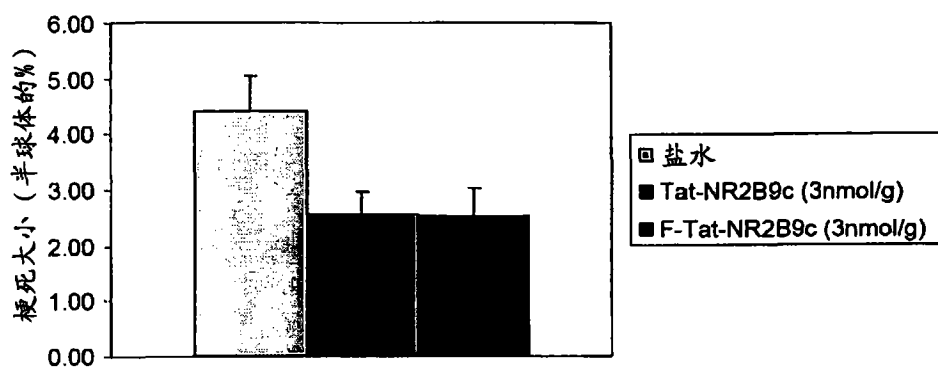


图 3B

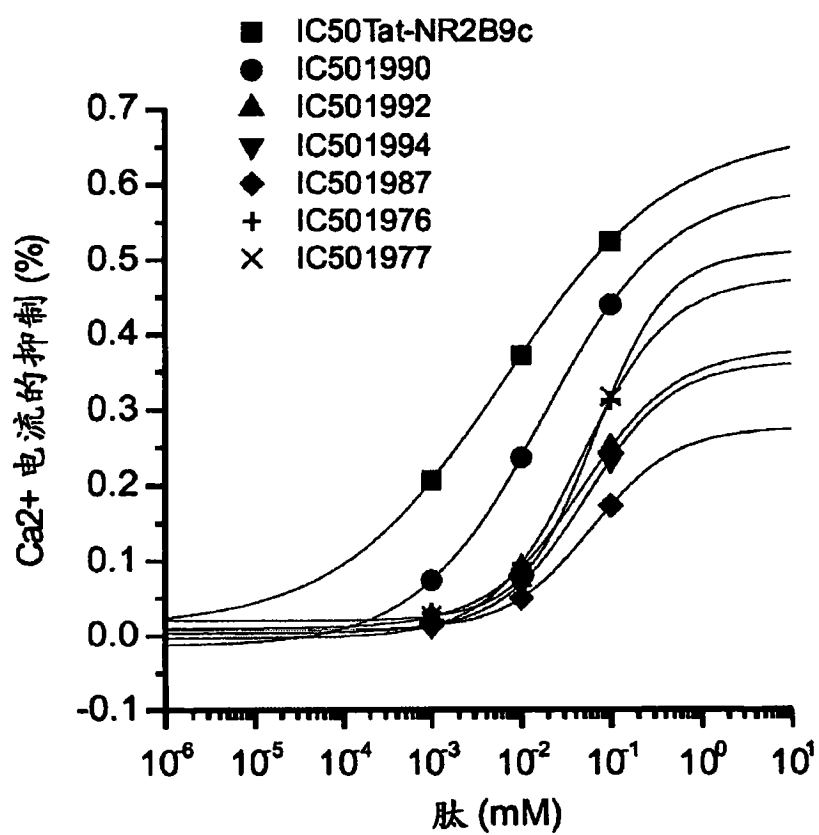
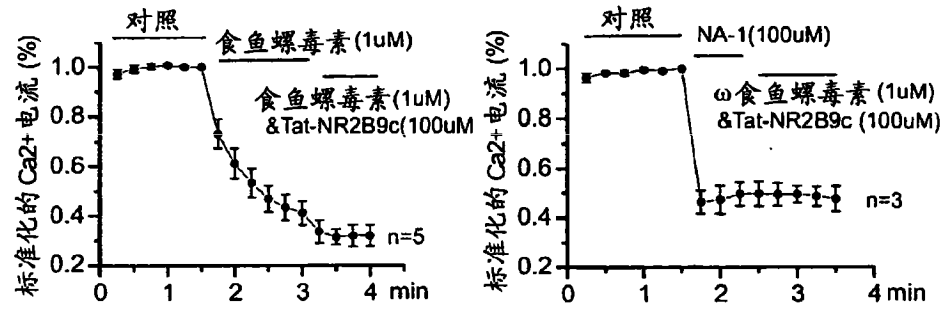


图 4

A



B

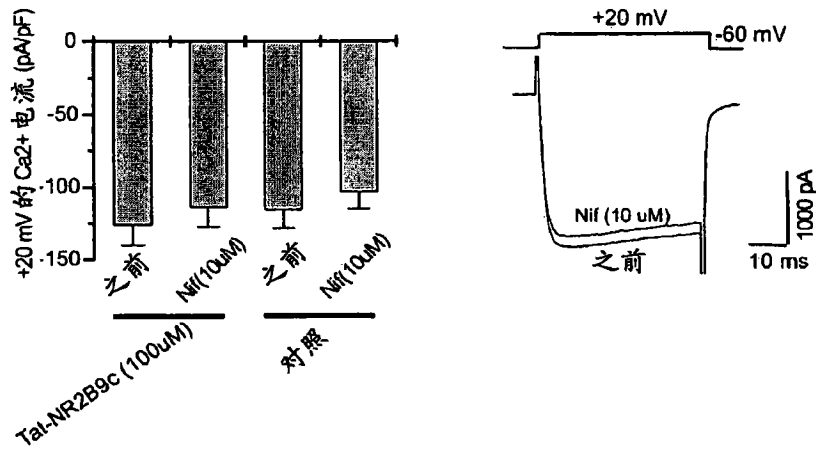


图 5

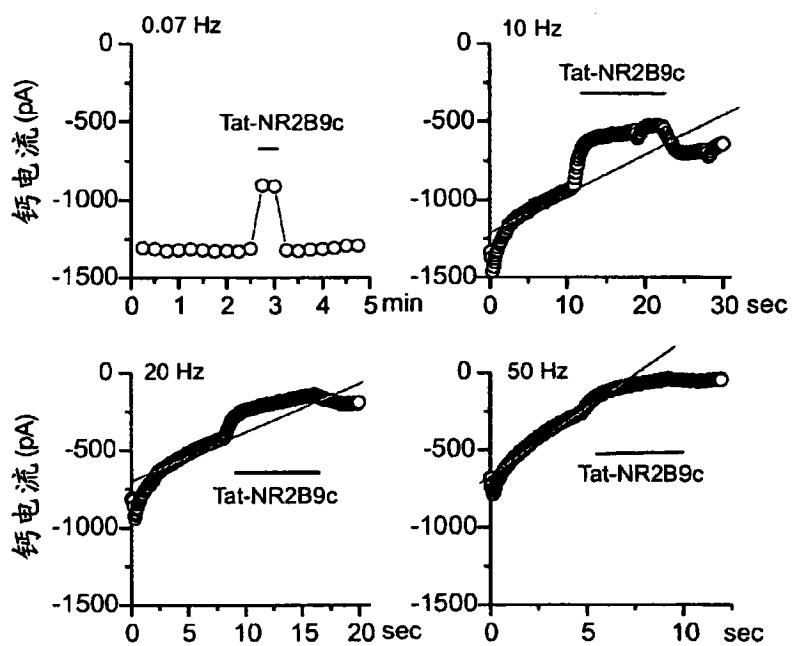


图 6

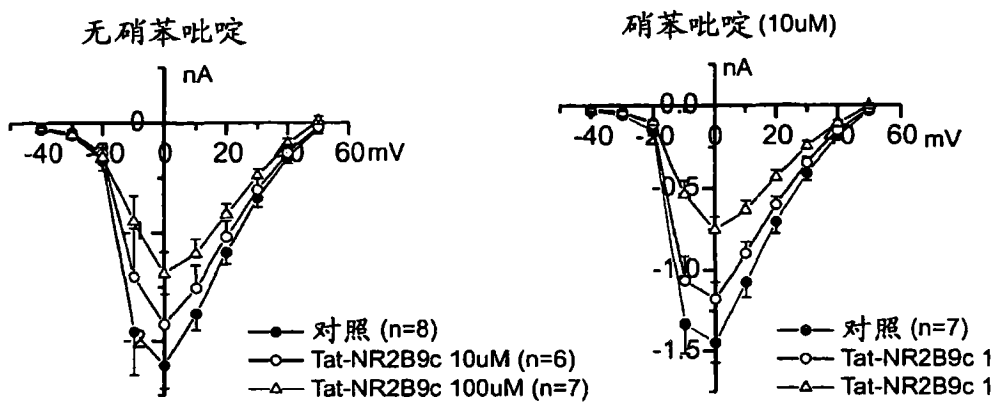


图 7

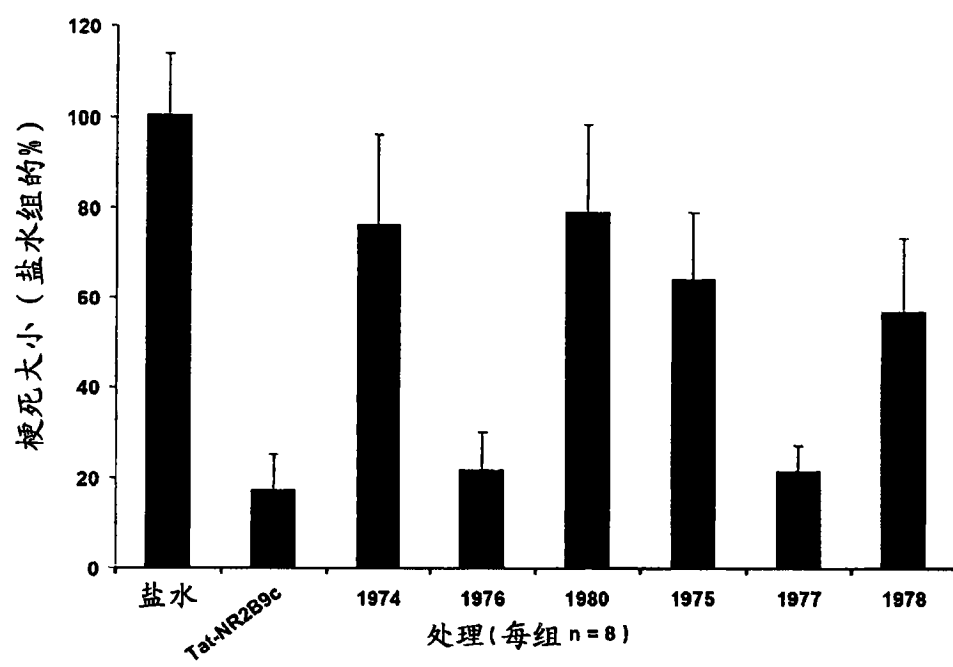


图 8