



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108350036 B

(45) 授权公告日 2022. 04. 08

(21) 申请号 201680040636.6	(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所 11256 代理人 陈文平 侯宝光
(22) 申请日 2016.07.08	
(65) 同一申请的已公布的文献号 申请公布号 CN 108350036 A	(51) Int.Cl. C07K 14/00 (2006.01) A61K 9/107 (2006.01) A61K 9/127 (2006.01) C12Q 1/48 (2006.01)
(43) 申请公布日 2018.07.31	
(30) 优先权数据 62/190,909 2015.07.10 US	
(85) PCT国际申请进入国家阶段日 2018.01.09	(56) 对比文件 WO 2009155366 A3,2010.04.22 WO 2012153620 A1,2012.11.15 CN 104558117 A,2015.04.29 CN 103393597 A,2013.11.20 CN 101855237 B,2014.10.22 US 2014024061 A1,2014.01.23
(86) PCT国际申请的申请数据 PCT/US2016/041544 2016.07.08	
(87) PCT国际申请的公布数据 W02017/011312 EN 2017.01.19	
(73) 专利权人 佩蒂诺沃生物制药有限责任公司 地址 美国密歇根州	审查员 王静
(72) 发明人 R·霍曼 W·L·埃利奥特	权利要求书1页 说明书28页 序列表45页 附图6页

(54) 发明名称
用于改善疏水性药物功效的制剂

(57) 摘要
新颖的两亲性肽,肽两亲物脂质胶束,用于制备包含两亲性肽和磷脂且任选地包含货物分子的肽两亲物脂质胶束的方法,以及使用方法。

1. 一种肽两亲物脂质胶束货物 (PALM-货物) 组合物, 其包含: a) 选自以下氨基酸序列组成的肽: SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 32 和 SEQ ID NO: 35, 其中所述肽在 N-末端酰化、在 C-末端酰胺化或在 N-末端酰化且在 C-末端酰胺化或者所述肽不在 N-末端酰化且不在 C-末端酰胺化;

包含鞘磷脂和一种或多种另外的磷脂的脂质组分; 和

货物分子, 其为具有式 (I) 的化合物缀合物:

A-R-L-X (式 I)

其中 A 是具有羟基或胺基的试剂; R 是所述试剂的羟基或胺基; L 是接头; 并且 X 是锚定部分; 其中所述试剂是抗癌药物。

2. 根据权利要求 1 所述的 PALM-货物组合物, 其中至少一种货物分子是具有式 (I) 的化合物缀合物:

A-R-L-X (式 I)

其中 X 选自由胆固醇、 α -生育三烯酚、 β -生育三烯酚、 γ -生育三烯酚和 δ -生育三烯酚组成的组。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的 PALM-货物组合物, 其中所述一种或多种另外的磷脂选自由以下项组成的组: 磷脂酰胆碱、聚乙二醇-磷脂酰乙醇胺 (PEG-PE)、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰甘油、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇、心磷脂或其任何组合。

4. 根据权利要求 1 或 2 所述的 PALM-货物组合物, 其中所述肽选自由 SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 32 和 SEQ ID NO: 35 组成的组。

5. 根据权利要求 1 或 2 所述的 PALM-货物组合物, 其中所述抗癌药物是羟基喜树碱、柔红霉素、紫杉醇或多西他赛。

6. 根据权利要求 1 或 2 所述的 PALM-货物组合物, 其中所述货物分子是紫杉醇 2'- δ -生育三烯酚碳酸酯、紫杉醇 2'-胆甾醇碳酸酯、多西他赛 2'-胆甾醇碳酸酯、柔红霉素 δ -生育三烯酚碳酸酯或吉西他滨的胆甾醇碳酸酯。

用于改善疏水性药物功效的制剂

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本PCT申请要求2015年7月10日提交的美国临时申请序列号62/190,909的权益。所述申请的公开内容据此以引用的方式整体并入。

[0003] 序列表

[0004] 本申请将2018年1月29日2:29pm创建 (29KB) 并且与本文一起以电子方式提交的标题为“236603-397087_Sequence_Listing_ST25.txt”的序列表以引用的方式整体并入。

[0005] 领域

[0006] 本发明涉及经由肠胃外施用将治疗分子转运并递送至其作用部位。更具体地,本发明涉及能够将药物掺入到可容易地肠胃外施用以用于将所掺入的药物安全并且有效地递送至其治疗靶标的纳米颗粒中的配制技术。

[0007] 背景

[0008] 在全身起作用的许多治疗物质不适合于口服给药的相对简单性,而是必须肠胃外施用。然而,使口服给药复杂化的相同因素常阻碍肠胃外给药过程。此类因素包括由疏水性或其他特性所致的水溶性差、消化道中的药物不稳定性、吸收不充分或吸收后清除增强,从而导致血浆浓度和/或暴露时间不足。

[0009] 处理需要肠胃外给药的疏水性药物的选项通常涉及添加各种赋形剂以获得适合于注射的稳定混悬液、分散液或溶液。所使用的赋形剂的类型包括洗涤剂、各种类型的聚合物、油乳剂、磷脂和白蛋白。在许多情况下,用于获得必需的药物增溶的赋形剂是洗涤剂样物质。这些包括:脱氧胆酸盐;蓖麻油的聚乙氧基化衍生物Cremophor EL®;和聚山梨醇酯80。后两者通常与乙醇联合使用。这些试剂解决了增溶问题,但它们具有引入超敏反应高风险的有害特性。通常要求注射含有Cremophore EL®或聚山梨醇酯80的溶液的患者用抗炎药物预处理以减轻制剂依赖性炎症。超敏反应的最严重后果是治疗耐受性降低和死亡风险增加。

[0010] 经批准的含有用于增溶的Cremophore EL®或聚山梨醇酯80的药物制剂的实例包括疏水性抗癌药物紫杉醇(Taxol®)、多西他赛(Taxotere®)、卡巴他赛(Jevtana®)和伊沙匹隆(Ixempra®)。免疫抑制剂环孢霉素(Sandimmune®)、他克莫司(Prograf®)和替西罗莫司(Torisel®)在配制时也依赖于这些试剂。在紫杉醇的情况下,已经通过以白蛋白取代Cremophore EL®和乙醇作为分散剂(即 Abraxane®)取得了一些进展。抗真菌剂两性霉素B也是相当疏水的,并且需要采取措施以获得用于输注的稳定混悬液。

[0011] 许多药物面临的其他给药障碍包括通过代谢途径的快速清除和失活。例如,抗癌剂吉西他滨必须以超过其通过胞苷脱氨酶的分解的高剂量进行输注,以便获得治疗水平。限制药物施用的另一问题是非靶组织非预期地暴露于这些药物的作用。这对于细胞毒性抗癌药物来说特别重要。

[0012] 对试图发现包括乳剂、胶束、脂质体制剂、聚合物和固体-脂质纳米颗粒的优质肠胃外制剂的描述很多,但是包封率低、药物不稳定性、有效负载泄漏和储存稳定性差的问题

已经阻碍了许多努力。已经用脂质体制剂获得了一些成功。实例包括降低清除率的阿糖胞苷脂质体(DepoCyt®)、降低心脏毒性的多柔比星脂质体(Doxil®、Myocet®)和改善增溶的两性霉素-B脂质体(例如 AmBisome®)。

[0013] 考虑到当前治疗的数量有限以及选项不足,显然需要提供具有改善的安全特性和治疗指数的肠胃外施用药物的制剂替代品;和/或至少为公众提供有用的选择的治疗方法。

[0014] 概述

[0015] 本公开通过提供脂质和肽的新颖的纳米颗粒制剂以及其形成方法来解决这种需求,所述纳米颗粒制剂允许掺入分子(例如,药物)并且在输注或注射溶液中稳定。本发明的制剂提供一种或多种改善,包括但不限于药代动力学参数改善、半衰期增加、靶向递送、毒性降低或肠胃外施用的药物特别是抗癌药物的治疗指数改善。

[0016] 本公开提供两亲性 α -螺旋肽,所述两亲性 α -螺旋肽包含氨基酸序列SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:36或SEQ ID NO:59的。

[0017] 此外,本公开提供肽两亲物脂质胶束(PALM),所述肽两亲物脂质胶束包含含有本公开的氨基酸序列的肽、鞘磷脂和一种或多种另外的磷脂。本公开的PALM任选地包含一种或多种货物分子,诸如显像剂和药物。

[0018] 本公开还提供用于制备用货物分子配制的PALM和PALM组合物的方法。

[0019] 另外,本公开提供化合物缀合物和制备适合与PALM一起使用的化合物缀合物的方法。

[0020] 此外,本公开提供通过施用PALM-药物缀合物来治疗病症的方法。

[0021] 附图简述

[0022] 图1A和1B分别是肽SEQ ID NO:3和25的德蒙逊(Edmundson)轮状描绘,示出其两亲性构象。图1A和1B进一步示出围绕 α -螺旋长轴的组成氨基酸(由标准单字母缩写识别)的轴向位置。字母“B”表示2-氨基-异丁酸。短划线指示形成肽的极性面的亲水性氨基酸(阴影)与形成非极性面的疏水性氨基酸之间的大致边界。图1C和1D分别是肽SEQ ID NO:3和25的螺旋网状描绘。

[0023] 图2.含有米铂的PALM(实线)与人HDL(短划线)相比的尺寸排阻色谱图。PALM由摩尔比为2.5:3:7:0.75的肽SEQ ID NO:25和POPC、SM以及米铂构成。

[0024] 图3.示出含有XC并且用肽SEQ ID NO:25以1:4:0.4的肽:磷脂:XC摩尔比制备的PALM的尺寸排阻色谱图。标记出各种斯托克斯直径的蛋白质标准物的洗脱位置。

[0025] 图4.含有XT3并且用肽SEQ ID NO:25(短划线)或用R4F肽(实线)制备的PALM的尺寸排阻色谱图的比较。两者的组成是摩尔当量比为1:2.8:1.2:0.4的肽:POPC:SM:XT3。

[0026] 图5.示出用肽SEQ ID NO:25制备并且含有芬维A胺的PALM的尺寸排阻色谱图。PALM组合物是摩尔当量比为2.5:3:7:2的肽:POPC:SM:芬维A胺。

[0027] 图6.与通过顺铂抑制相比的通过PALM(MP)抑制PC3前列腺癌细胞生长

[0028] 图7.SR-BI抗体对通过PALM(MP)进行的PC3前列腺癌细胞生长的抑制的作用。线指示数据与逻辑斯谛方程的拟合。

[0029] 图8.与通过紫杉醇(圆圈,短划线)进行的抑制相比的通过PALM/(XC)(正方形,点线)或PALM(XT3)(菱形,实线)进行的SKOV3卵巢癌细胞生长的抑制线指示数据与逻辑斯谛方程的拟合。

[0030] 图9.将用所指示的各种肽制备且含有DiI的PALM与用米非司酮诱导型人SR-BI基因稳定转染的BHK (SR-BI) 细胞一起孵育。用未诱导(对照)或诱导的细胞进行孵育。测试用DiI标记的人HDL以进行比较。通过荧光检测孵育4小时以上的细胞摄取的DiI的量。

[0031] 图10.用所指示浓度的PTX或PALM(XT3)将具有米非司酮诱导型人SR-BI基因(诱导的(SR-BI+)或未诱导的(对照))的BHK (SR-BI) 细胞孵育12小时在不存在测试剂的情况下将细胞再进一步孵育36小时,然后通过MTT测定来检测生长%。

[0032] 图11.SR-BI抗体阻断来自PALM(XT3)的XT3摄取(箭头)。

[0033] 发明详述

[0034] 定义

[0035] “纳米颗粒”意指尺寸不大于100nm的颗粒。

[0036] 除非上下文另外明确指示,否则如本文所用,单数形式“一个(种)(a/an)”和“所述(the)”包括复数指示物。

[0037] 应注意,在本公开中,诸如“包括(comprises/comprised/comprising)”、“含有(contains/containing)”等的术语具有美国专利法中所赋予的含义;它们是包括性的或开放式的,并且不排除另外的、未列举的元素或方法步骤。诸如“基本上由...组成(consisting essentially of/consists essentially of)”的术语具有美国专利法中所赋予的含义;它们允许包括不会实质上影响所要求保护发明的基本特征和新颖特征的另外的成分或步骤。术语“由...组成(consists of/consisting of)”具有美国专利法中赋予它们的含义;即这些术语是封闭式的。

[0038] 先行词“约”指示值是近似的。例如,“约1mg至约50mg”的范围指示值是近似值。“约1mg至约50mg”的范围包括近似值和特定值,例如,所述范围包括约1mg、1mg、约50mg和50mg。

[0039] 当描述范围时,所述范围包括范围的端值以及其间的所有数字。例如,“1mg与10mg之间”包括1mg、10mg和1mg与10mg之间的所有量。同样地,“1mg至10mg”包括1mg、10mg和1mg与10mg之间的所有量。

[0040] 如本文所用,“烷基”是指含有7-21个碳原子的饱和脂族烃基。如本文所用,术语(C₁-C_n)烷基是指含有1-n个碳原子的烷基。例如,(C₈-C₁₂)烷基是指含有8、9、10、11或12个碳原子的烷基。烷基可以是支链或非支链的。

[0041] 如本文所用,“烯基”是指含有7-21个碳原子和至少一个双键的脂族碳基。如本文所用,术语(C₁-C_n)烯基是指含有1-n个碳原子的烯基。烯基可以是支链或非支链的。

[0042] 当用于描述脂质组分时,“基本上由...组成”意味着脂质组分包括小于0.1mol%的除了所指定的那些之外的任何另外的脂质。

[0043] “XC”是紫杉醇2'-胆甾醇碳酸酯的缩写。

[0044] XT3是紫杉醇2'-δ-生育三烯酚碳酸酯的缩写。

[0045] “MP”是米铂的缩写。

[0046] “PTX”是紫杉醇的缩写

[0047] “POPC”是1-棕榈酰-2-油酰磷脂酰胆碱的缩写

[0048] “SM”是鞘磷脂的缩写

[0049] “HDL”是高密度脂蛋白的缩写。

[0050] “SR-BI”是清道夫受体B类1型的缩写。

[0051] “BHK”是幼仓鼠肾的缩写。

[0052] “DiI”是1,1'-双十八烷基-3,3,3',3'-四甲基吲哚羰化青的缩写

[0053] “PALM”是用于识别水性悬浮液中由两亲性肽与磷脂的组合和任选的其他疏水性分子形成的肽两亲物脂质胶束的首字母缩略词。

[0054] “两亲性”描述由于分子或聚合物中亲水性(亲水)取代基和疏水性(疏水)取代基在结构上彼此分离的构象而对脂质相和水相均具有亲和力的分子或聚合物(例如,肽)。

[0055] “亲脂性”描述优先分布到水性悬浮液中富含脂质的颗粒的脂质结构域的物质。富含脂质的颗粒包括脂质胶束、脂质体、脂蛋白、细胞膜和脂质乳剂。

[0056] “肽”是由通过聚合物中一个氨基酸的羧基与下一个氨基酸的 α -胺基之间形成的酰胺键连接在一起的 α -氨基酸单体产生的聚合物。“肽”还包括连接在一起的氨基酸单体的聚合物。可使用氨基酸的L-光学异构体和D-光学异构体。组成聚合物的氨基酸可以是天然存在的氨基酸(即天然氨基酸)或非天然氨基酸。术语“残基”或“氨基酸残基”包括提及掺入到肽、多肽或蛋白质中的氨基酸。

[0057] 根据惯例且如本文所用,肽序列从左至右从N-末端书写至C-末端。

[0058] “胶束”是在水相中通过非共价相互作用组织成的多分子结构。胶束由两亲性分子和疏水性分子构成,所述两种分子以这种方式聚集,使得分子的疏水性结构域与水隔离,并且亲水性组分在胶束-水界面处。

[0059] “货物分子”是具有药物、治疗或诊断特性的疏水性或两亲性分子,其稳定地掺入到PALM中并且不破坏PALM的稳定性。

[0060] “siRNA”是作为RNA诱导的基因沉默复合物的一部分生成以控制细胞基因表达的小干扰核糖核酸。

[0061] “Aib”是氨基酸 α -氨基异丁酸的三字母代码。

[0062] “Aba”是氨基酸 α -氨基丁酸的三字母代码。

[0063] “Amv”是非天然氨基酸 α -甲基缬氨酸的三字母代码。

[0064] “Orn”是氨基酸鸟氨酸的三字母代码。

[0065] “SEC”是尺寸排阻色谱法

[0066] “DLS”是动态光散射

[0067] 本公开的第一方面提供“两亲性肽”。两亲性肽能够采取 α 螺旋构象,在 α 螺旋构象中螺旋具有沿着螺旋的长轴取向的相对的极性面和非极性面。合成肽的技术是本领域熟知的。本公开的肽可通过本领域已知的任何技术来合成。

[0068] 表1显示本公开的特定两亲性肽与若干种现有技术序列相比的电荷分布。鉴于下文所示的现有技术,本发明的肽的电荷分布是新颖的。

[0069] 表1

在中性 pH 下载脂蛋白 A-I 模拟肽中残基的电荷																											
		氨基酸位置																									
肽	N-末端 电荷	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	C-末端 电荷	
[0070]	SEQ ID ^a	+	-	o	o	o	o	o	+	-	o	o	o	o	o	o	-	+	o	+	o	o					-
	SEQ ID ^b	+	-	o	o	o	+	o	o	-	o	o	o	o	o	o	-	+	o	+	o	o					-
	A-I _{con} ^c	+	o	o	o	-	-	o	+	-	+	o	o	-	o	o	-	o	o	+	o	+	o	+			-
	LAP642 ^d	+	o	o	o	-	o	o	+	-	o	o	o	-	o	o	-	o	o	+	o	+	o	+			-
	18A ^e	+	-	o	o	+	o	o	o	-	+	o	o	-	+	o	+	-	o	o							-
	2F ^f	o	-	o	o	+	o	o	o	-	+	o	o	-	+	o	+	-	o	o							o
	R4F ^g	o	o	o	-	+	o	+	-	o	o	+	-	o	o	o	+	o	o	-							o
FAMP ^h	+	o	o	-	o	o	o	o	o	o	-	+	o	o	+	o	o	-	-	o	o	+	+	o	o	-	
^a SEQ ID NO: 1-23																											
^b SEQ ID NO: 24-35																											
^c Anantharamaiah 等人. (1990) Arteriosclerosis 10:95-105																											
^d Homan 等人. (2013) Anal. Biochem. 441:80-86																											
^e Anantharamaiah 等人. (1985) J. Biol. Chem. 260:10248-10255																											
^f Datta 等人. (2001) J. Lipid Res. 42:1096-1104																											
^g Zhang 等人. (2009) Angew. Chem. Int. Ed. 48:9171-9175																											
^h Uehara 等人. (2013) J Am Heart Assoc. 2(3):e000048. doi: 10.1161/JAHA.113.000048																											
“o”指示在指示位置处为零电荷。																											
“+”指示在指示位置处为正电荷。																											
“-”指示在指示位置处为负电荷。																											
[0071]																											

[0072] 本公开的第一方面的一个实施方案提供一种包含以下氨基酸序列的肽： $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}-X_{11}-X_{12}-X_{13}-X_{14}-X_{15}-X_{16}-X_{17}-X_{18}-X_{19}-X_{20}$ ，其中： X_1 是氨基酸D； X_2 和 X_{20} 各自是氨基酸V； X_3 、 X_6 、 X_{10} 和 X_{13} 各自是独立地选自由L和F组成的组的氨基酸； X_4 、 X_{12} 和 X_{19} 各自是氨基酸Q； X_5 是氨基酸A或Aib； X_7 、 X_{16} 和 X_{18} 各自是氨基酸K； X_8 和 X_{15} 各自是氨基酸E； X_9 和 X_{14} 各自是独立地选自由A、L、F和Aib组成的组的氨基酸； X_{11} 是选自由A、Aib和N组成的组的氨基酸；并且 X_{17} 是选自由W、F和L组成的组的氨基酸，(SEQ ID NO:1)，其中所述肽的长度为20至24个氨基酸。

[0073] 第一方面的另一个实施方案提供一种基本上由以下氨基酸序列组成的肽： $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}-X_{11}-X_{12}-X_{13}-X_{14}-X_{15}-X_{16}-X_{17}-X_{18}-X_{19}-X_{20}$ ，其中： X_1 是氨基酸D； X_2 和 X_{20} 各自是氨基酸V； X_3 、 X_6 、 X_{10} 和 X_{13} 各自是独立地选自由L和F组成的组的氨基酸； X_4 、 X_{12} 和 X_{19} 各自是氨基酸Q； X_5 是氨基酸A或Aib； X_7 、 X_{16} 和 X_{18} 各自是氨基酸K； X_8 和 X_{15} 各自是氨基酸E； X_9 和 X_{14} 各自是独立地选自由A、L、F和Aib组成的组的氨基酸； X_{11} 是选自由A、Aib和N组成的组的氨基酸；并且 X_{17} 是选自由W、F和L组成的组的氨基酸，(SEQ ID NO:1)，其中所述肽的长度

为20至24个氨基酸。

[0074] 第一方面的再一个实施方案提供由以下氨基酸序列组成的肽： $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}-X_{11}-X_{12}-X_{13}-X_{14}-X_{15}-X_{16}-X_{17}-X_{18}-X_{19}-X_{20}$ ，其中： X_1 是氨基酸D； X_2 和 X_{20} 各自是氨基酸V； X_3 、 X_6 、 X_{10} 和 X_{13} 各自是独立地选自由L和F组成的组的氨基酸； X_4 、 X_{12} 和 X_{19} 各自是氨基酸Q； X_5 是氨基酸A或Aib； X_7 、 X_{16} 和 X_{18} 各自是氨基酸K； X_8 和 X_{15} 各自是氨基酸E； X_9 和 X_{14} 各自是独立地选自由A、L、F和Aib组成的组的氨基酸； X_{11} 是选自由A、Aib和N组成的组的氨基酸；并且 X_{17} 是选自由W、F和L组成的组的氨基酸。(SEQ ID NO:1)

[0075] 第一方面的又一个实施方案提供一种包含以下氨基酸序列的肽： $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}-X_{11}-X_{12}-X_{13}-X_{14}-X_{15}-X_{16}-X_{17}-X_{18}-X_{19}-X_{20}$ ，其中： X_1 是选自由D和E组成的组的氨基酸； X_2 和 X_{20} 各自是独立地选自由V、I和L组成的组的氨基酸； X_3 、 X_6 、 X_{10} 和 X_{13} 各自是独立地选自由L、I、V、W、Y、Aib、Amv和F组成的组的氨基酸； X_4 、 X_{12} 和 X_{19} 各自是独立地选自由Q和N组成的组的氨基酸； X_5 、 X_{16} 和 X_{18} 各自是独立地选自由K、R、H和Orn组成的组的氨基酸； X_7 选自由A、G、S、V、Aib和Amv组成的组； X_8 和 X_{15} 独立地选自由氨基酸E和D组成的组； X_9 和 X_{14} 是独立地选自由A、G、S、L、F、V、Amv和Aib组成的组的氨基酸； X_{11} 是选自由A、G、S、Aib、Amv、V和N组成的组的氨基酸； X_{17} 是选自由W、F、Y、I、V和L组成的组的氨基酸，(SEQ ID NO:24)，其中所述肽的长度为20至24个氨基酸。

[0076] 第一方面的另一个实施方案提供一种基本上由以下氨基酸序列组成的肽： $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}-X_{11}-X_{12}-X_{13}-X_{14}-X_{15}-X_{16}-X_{17}-X_{18}-X_{19}-X_{20}$ ，其中： X_1 是选自由D和E组成的组的氨基酸； X_2 和 X_{20} 各自是独立地选自由V、I和L组成的组的氨基酸； X_3 、 X_6 、 X_{10} 和 X_{13} 各自是独立地选自由L、I、V、W、Y、Aib、Amv和F组成的组的氨基酸； X_4 、 X_{12} 和 X_{19} 各自是独立地选自由Q和N组成的组的氨基酸； X_5 、 X_{16} 和 X_{18} 各自是独立地选自由K、R、H和Orn组成的组的氨基酸； X_7 选自由A、G、S、V、Aib和Amv组成的组； X_8 和 X_{15} 独立地选自由氨基酸E和D组成的组； X_9 和 X_{14} 是独立地选自由A、G、S、L、F、V、Amv和Aib组成的组的氨基酸； X_{11} 是选自由A、G、S、Aib、Amv、V和N组成的组的氨基酸；并且 X_{17} 是选自由W、F、Y、I、V和L组成的组的氨基酸，(SEQ ID NO:24)，并且所述肽的长度为20至24个氨基酸。

[0077] 第一方面的再一个实施方案提供一种由以下氨基酸序列组成的肽： $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}-X_{11}-X_{12}-X_{13}-X_{14}-X_{15}-X_{16}-X_{17}-X_{18}-X_{19}-X_{20}$ ，其中： X_1 是选自由D和E组成的组的氨基酸； X_2 和 X_{20} 各自是独立地选自由V、I和L组成的组的氨基酸； X_3 、 X_6 、 X_{10} 和 X_{13} 各自是独立地选自由L、I、V、W、Y、Aib、Amv和F组成的组的氨基酸； X_4 、 X_{12} 和 X_{19} 各自是独立地选自由Q和N组成的组的氨基酸； X_5 、 X_{16} 和 X_{18} 各自是独立地选自由K、R、H和Orn组成的组的氨基酸； X_7 选自由A、G、S、V、Aib和Amv组成的组； X_8 和 X_{15} 独立地选自由氨基酸E和D组成的组； X_9 和 X_{14} 是独立地选自由A、G、S、L、F、V、Amv和Aib组成的组的氨基酸； X_{11} 是选自由A、G、S、Aib、Amv、V和N组成的组的氨基酸；并且 X_{17} 是选自由W、F、Y、I、V和L组成的组的氨基酸。(SEQ ID NO:24)

[0078] 预期根据第一方面的肽的任何公开的实施方案任选地在肽的N-末端氨基酸的 α -胺酰化，任选地在肽的末端羧基酰胺化，或者任选地在N-末端氨基酸的 α -胺酰化并且在肽的末端羧基酰胺化。肽可通过本领域已知的方法酰化或酰胺化。

[0079] 下表2中提供本发明的具体肽。

[0080] 表2

[0081]

SEQ ID NO:	肽序列	平均疏水矩 ^a	平均疏水性 ^b
2	DVFQALKELFAQLLEKWKQV	0.846	-1.043

[0082]

SEQ ID NO:	肽序列	平均疏水矩 ^a	平均疏水性 ^b
3	DVFQ{AIB}LKELFNQLLEKWKQV	0.908	-1.135
4	DVFQ{AIB}LKELLAQLLEKFKQV	0.885	-0.995
5	DVFQ{AIB}LKELLNQLLEKFKQV	0.948	-1.092
6	DVFQ{AIB}LKELLNQL{AIB}EKFKQV	0.940	-1.120
7	DVFQ{AIB}LKELLNQL{AIB}EKWKQV	0.910	-1.151
8	DVFQALKELLAQLLEKFKQV	0.887	-1.000
9	DVFQALKELLNQLLEKFKQV	0.950	-1.097
10	DVFQ{AIB}LKELFAQLLEKWKQV	0.845	-1.038
11	DVFQ{AIB}LKELFNQLLEKWKQV	0.908	-1.135
12	DVFQ{AIB}LKELFNQLLEKFKQV	0.938	-1.104
13	DVFQALKELFAQL{AIB}EKWKQV	0.836	-1.071
14	DVFQALKELFNQL{AIB}EKWKQV	0.902	-1.168
15	DVFQALKELFNQL{AIB}EKFKQV	0.932	-1.137
16	DVFQAFKEAFAQLFEKWKQV	0.821	-1.099
17	DVFQAFKE{AIB}FAQLFEKWKQV	0.822	-1.094
18	DVFQ{AIB}FKE{AIB}FAQLFEKWKQV	0.820	-1.089
19	DVFQAFKEAF{AIB}QLFEKWKQV	0.818	-1.094
20	DVFQAFKE{AIB}F{AIB}QLFEKWKQV	0.819	-1.089
21	DVFQ{AIB}FKE{AIB}F{AIB}QLFEKWKQV	0.817	-1.084
22	DVFQALKELFNQLLEKWKQV	0.910	-1.140
23	DVFQ{AIB}LKELLNQLLEKWKQV	0.959	-1.081
25	DVFQKL{AIB}ELFNQLLEKWKQV	0.976	-1.135
26	DVFQKLVELFNQLLEKWKQV	0.979	-1.119
27	DV{AIB}QKLFELFNQLLEKWKQV	0.966	-1.135
28	DVFQKL{AIB}ELFNQLLEKFKQV	1.007	-1.104
29	DVFQKLVELFNQLLEKFKQV	1.010	-1.088
30	DV{AIB}QKLFELFNQLLEKFKQV	0.997	-1.104
31	DVLQKF{AIB}ELFNQLLEKWKQV	0.974	-1.135
32	DV{AIB}QKFLELFNQLLEKWKQV	0.958	-1.135
33	DVFQKLE{AIB}FNQLLEKWKQV	0.979	-1.135
34	DVFQKL{AIB}ELFNQ{AIB}LEKWKQV	0.955	-1.163
35	DVFQKL{AIB}ELFNQL{AIB}EKWKQV	0.961	-1.163

^a根据 Pownall 等人(FEBS Letters159:17-23 (1983))由氨基酸疏水性(Hessa 等人. Nature 433:377-381 (2005))计算。

^b计算为氨基酸疏水性的总和除以残基数(kcal/mol/残基)。

[0083] 本公开的第一方面的一个实施方案是包含氨基酸序列SEQ ID NO:1-23中的任一种的肽,其中所述肽的长度为20至24个氨基酸。又一个实施方案是基本上由氨基酸序列SEQ ID NO:1-23中的任一种组成的肽,其中所述肽的长度为20至24个氨基酸。又一个实施方案是由氨基酸序列SEQ ID NO:1-23中的任一种组成的肽。在所公开肽的任何上述实施方案中,任选地,肽的N-末端氨基酸的 α -胺被酰化;末端羧基被酰胺化;或者N-末端氨基酸的 α -胺被酰化并且肽的末端羧基被酰胺化。

[0084] 本公开的第一方面的一个实施方案是包含氨基酸序列SEQ ID NO:25-35中的任一种的肽,其中所述肽的长度为20至24个氨基酸。再一个实施方案是基本上由氨基酸序列SEQ

ID NO:25-35中的任一种组成的肽,其中所述肽的长度为20至24个氨基酸。另一个实施方案是由氨基酸序列SEQ ID NO:25-35中的任一种组成的肽。在肽的任何上述实施方案中,任选地,肽的N-末端氨基酸的 α -胺被酰化;末端羧基被酰胺化;或者N-末端氨基酸的 α -胺被酰化并且肽的末端羧基被酰胺化。

[0085] 本公开的实施方案还包括具有由SEQ ID NO:1和24一般定义的肽的反向序列的肽。

[0086] 本公开的第一方面的一个实施方案提供与SEQ ID NO:1反向的肽,并且所述肽包含氨基酸序列: $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}-X_{11}-X_{12}-X_{13}-X_{14}-X_{15}-X_{16}-X_{17}-X_{18}-X_{19}-X_{20}$,其中 X_1 和 X_{19} 各自是氨基酸V; X_2 、 X_9 和 X_{17} 各自是氨基酸Q; X_3 、 X_5 和 X_{14} 各自是氨基酸K; X_4 是选自W、F和L组成的组的氨基酸; X_6 和 X_{13} 各自是氨基酸E; X_7 和 X_{12} 各自是独立地选自A、L、F和Aib组成的组的氨基酸; X_8 、 X_{11} 、 X_{15} 和 X_{18} 各自是独立地选自L和F组成的组的氨基酸; X_{10} 是选自A、Aib和N组成的组的氨基酸; X_{16} 是选自A和Aib组成的组的氨基酸;并且 X_{20} 是氨基酸D,(SEQ ID NO:36)其中所述肽的长度为20至24个氨基酸。

[0087] 本公开的第一方面的另一个实施方案提供与SEQ ID NO:1反向的肽,并且所述肽包含氨基酸序列 $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}-X_{11}-X_{12}-X_{13}-X_{14}-X_{15}-X_{16}-X_{17}-X_{18}-X_{19}-X_{20}$,其中 X_1 和 X_{19} 各自是氨基酸V; X_2 、 X_9 和 X_{17} 各自是氨基酸Q; X_3 、 X_5 和 X_{14} 各自是氨基酸K; X_4 是选自W、F和L组成的组的氨基酸; X_6 和 X_{13} 各自是氨基酸E; X_7 和 X_{12} 各自是独立地选自A、L、F和Aib组成的组的氨基酸; X_8 、 X_{11} 、 X_{15} 和 X_{18} 各自是独立地选自L和F组成的组的氨基酸; X_{10} 是选自A、Aib和N组成的组的氨基酸; X_{16} 是选自A和Aib组成的组的氨基酸;并且 X_{20} 是氨基酸D,(SEQ ID NO:36)其中所述肽的长度为20至24个氨基酸。

[0088] 本公开的第一方面的一个实施方案提供与SEQ ID NO:1反向的肽,并且所述肽由以下氨基酸序列组成: $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}-X_{11}-X_{12}-X_{13}-X_{14}-X_{15}-X_{16}-X_{17}-X_{18}-X_{19}-X_{20}$,其中 X_1 和 X_{19} 各自是氨基酸V; X_2 、 X_9 和 X_{17} 各自是氨基酸Q; X_3 、 X_5 和 X_{14} 各自是氨基酸K; X_4 是选自W、F和L组成的组的氨基酸; X_6 和 X_{13} 各自是氨基酸E; X_7 和 X_{12} 各自是独立地选自A、L、F和Aib组成的组的氨基酸; X_8 、 X_{11} 、 X_{15} 和 X_{18} 各自是独立地选自L和F组成的组的氨基酸; X_{10} 是选自A、Aib和N组成的组的氨基酸; X_{16} 是选自A和Aib组成的组的氨基酸;并且 X_{20} 是氨基酸D。(SEQ ID NO:36)

[0089] 本公开的第一方面的另一个实施方案提供与SEQ ID NO:24反向的肽,并且所述反向肽包含以下氨基酸序列: $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}-X_{11}-X_{12}-X_{13}-X_{14}-X_{15}-X_{16}-X_{17}-X_{18}-X_{19}-X_{20}$,其中 X_1 和 X_{19} 各自是独立地选自V、I和L组成的组的氨基酸; X_2 、 X_9 和 X_{17} 各自是独立地选自Q和N组成的组的氨基酸; X_3 、 X_5 和 X_{16} 各自是独立地选自K、R、H和Orn组成的组的氨基酸; X_4 是选自W、F、Y、I、V和L组成的组的氨基酸; X_6 、 X_{13} 和 X_{20} 各自是独立地选自E和D组成的组的氨基酸; X_7 和 X_{12} 各自是独立地选自A、G、S、L、F、V、Amv和Aib组成的组的氨基酸; X_8 、 X_{11} 、 X_{15} 和 X_{18} 独立地选自氨基酸L、I、V、W、Aib、Amv和F组成的组; X_{10} 是选自A、G、S、Aib、Amv、V和N组成的组的氨基酸;并且 X_{14} 是选自A、G、S、V、Aib和Amv组成的组的氨基酸,(SEQ ID NO:59)其中所述肽的长度为20至24个氨基酸。

[0090] 本公开的第一方面的另一个实施方案提供与SEQ ID NO:24反向的肽,并且所述反向肽基本上由以下氨基酸序列组成: $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}-X_{11}-X_{12}-X_{13}-X_{14}-X_{15}-X_{16}-X_{17}-X_{18}-X_{19}-X_{20}$,其中 X_1 和 X_{19} 各自是独立地选自V、I和L组成的组的氨基酸; X_2 、 X_9 和 X_{17}

各自是独立地选自由Q和N组成的组的氨基酸;X₃、X₅和X₁₆各自是独立地选自由K、R、H和Orn组成的组的氨基酸;X₄是选自由W、F、Y、I、V和L组成的组的氨基酸;X₆、X₁₃和X₂₀各自是独立地选自由E和D组成的组的氨基酸;X₇和X₁₂各自是独立地选自由A、G、S、L、F、V、Amv和Aib组成的组的氨基酸;X₈、X₁₁、X₁₅和X₁₈独立地选自由氨基酸L、I、V、W、Aib、Amv和F组成的组;X₁₀是选自由A、G、S、Aib、Amv、V和N组成的组的氨基酸;并且X₁₄是选自由A、G、S、V、Aib和Amv组成的组的氨基酸,(SEQ ID NO:59)其中所述肽的长度为20至24个氨基酸。

[0091] 本公开的第一方面的另一个实施方案提供与SEQ ID NO:24反向的肽,并且所述反向肽由以下氨基酸序列组成:X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇-X₈-X₉-X₁₀-X₁₁-X₁₂-X₁₃-X₁₄-X₁₅-X₁₆-X₁₇-X₁₈-X₁₉-X₂₀,其中X₁和X₁₉各自是独立地选自由V、I和L组成的组的氨基酸;X₂、X₉和X₁₇各自是独立地选自由Q和N组成的组的氨基酸;X₃、X₅和X₁₆各自是独立地选自由K、R、H和Orn组成的组的氨基酸;X₄是选自由W、F、Y、I、V和L组成的组的氨基酸;X₆、X₁₃和X₂₀各自是独立地选自由E和D组成的组的氨基酸;X₇和X₁₂各自是独立地选自由A、G、S、L、F、V、Amv和Aib组成的组的氨基酸;X₈、X₁₁、X₁₅和X₁₈独立地选自由氨基酸L、I、V、W、Aib、Amv和F组成的组;X₁₀是选自由A、G、S、Aib、Amv、V和N组成的组的氨基酸;并且X₁₄是选自由A、G、S、V、Aib和Amv组成的组的氨基酸。(SEQ ID NO:59)

[0092] 表3中提供本发明的另外的肽。这些肽中的氨基酸序列与SEQ ID NO:2-23和25-35的氨基酸序列反向。

[0093] 表3

SEQ ID NO:	肽序列
37	VQKWKELLQAFLEKLAQFVD
38	VQKWKELLQNFLEKL{AIB}QFVD
39	VQKFKELLQALLEKL{AIB}QFVD
40	VQKFKELLQNLLEKL{AIB}QFVD
41	VQKFKE{AIB}LQNLLEKL{AIB}QFVD
42	VQKWKE{AIB}LQNLLEKL{AIB}QFVD
43	VQKFKELLQALLEKLAQFVD
44	VQKFKELLQNLLEKLAQFVD
45	VQKWKELLQAFLEKL{AIB}QFVD
46	VQKWKELLQNFLEKL{AIB}QFVD
47	VQKFKELLQNFLEKL{AIB}QFVD
48	VQKWKE{AIB}LQAFLEKLAQFVD
49	VQKWKE{AIB}LQNFLEKLAQFVD
50	VQKFKE{AIB}LQNFLEKLAQFVD
51	VQKWKEFLQAF{AIB}EKF{AIB}QFVD
52	VQKWKEFLQAF{AIB}EKF{AIB}QFVD
53	VQKWKEFLQ{AIB}FAEKFAQFVD
54	VQKWKEFLQ{AIB}F{AIB}EKF{AIB}QFVD
55	VQKWKEFLQ{AIB}F{AIB}EKF{AIB}QFVD
56	VQKWKEFLQ{AIB}F{AIB}EKF{AIB}QFVD
57	VQKWKELLQNFLEKLAQFVD
58	VQKLKELLQNLLEKL{AIB}QFVD
60	VQKWKELLQNFLE{AIB}LKQFVD
61	VQKWKELLQNFLEVLKQFVD
62	VQKWKELLQNFLEFLKQ{AIB}VD
63	VQKFKELLQNFLE{AIB}LKQFVD
64	VQKFKELLQNFLEVLKQFVD
65	VQKFKELLQNFLEFLKQ{AIB}VD
66	VQKWKELLQNFLE{AIB}FKQLVD
67	VQKWKELLQNFLELFKQ{AIB}VD
68	VQKWKELLQNF{AIB}ELLKQFVD
69	VQKWKE{AIB}QNFLE{AIB}LKQFVD
70	VQKWKE{AIB}LQNFLE{AIB}LKQFVD

[0094] 本公开的第一方面的一个实施方案是包含氨基酸序列SEQ ID NO:36-58中的任一种的肽,其中所述肽的长度为20至24个氨基酸。又一个实施方案是基本上由氨基酸序列SEQ ID NO:36-58中的任一种组成的肽。又一个实施方案是由氨基酸序列SEQ ID NO:36-58中的任一种组成的肽。在肽的任何上述实施方案中,任选地,肽的N-末端氨基酸的 α -胺被酰化;末端羧基被酰胺化;或者N-末端氨基酸的 α -胺被酰化并且肽的末端羧基被酰胺化。

[0095] 本公开的第一方面的一个实施方案是包含氨基酸序列SEQ ID NO:59-70中的任一种的肽,其中所述肽的长度为20至24个氨基酸。再一个实施方案是基本上由氨基酸序列SEQ ID NO:59-70中的任一种组成的肽。又一个实施方案是由氨基酸序列SEQ ID NO:59-70中的任一种组成的肽。在肽的任何上述实施方案中,任选地,肽的N-末端氨基酸的 α -胺被酰化;末端羧基被酰胺化;或者N-末端氨基酸的 α -胺被酰化并且肽的末端羧基被酰胺化。

[0097] 在本公开的肽包含氨基酸序列SEQ ID NO:1-70中的任一种和独立地添加到氨基酸序列的N-末端或C-末端的1-4个另外的氨基的情况下,选择另外的氨基酸以使得氨基酸的添加不会负面影响肽的两亲性。

[0098] 本公开的第二方面提供由两亲性肽与磷脂的组合形成的肽两亲物脂质胶束(PALM)。本公开的第二方面的PALM包含与脂质组分复合的本公开的第一方面的一种或多种肽,其中所述脂质组分包含鞘磷脂和一种或多种另外的磷脂。根据本公开的PALM可被动或主动地递送至靶细胞群。在本公开的第二方面的一个实施方案中,PALM包含本公开的一种或多种肽,其中所述脂质组分基本上由鞘磷脂和一种或多种另外的磷脂组成。在一个实施方案中,PALM包含本公开的肽以及脂质组分,其中所述脂质组分包含鞘磷脂和一种或多种另外的磷脂,其中所述另外的磷脂选自以下项组成的组:磷脂酰胆碱、聚乙二醇-磷脂酰乙醇胺(PEG-PE)、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰甘油、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇、心磷脂及其任何组合。在另一个实施方案中,PALM包含本公开的肽,并且所述脂质组分包含鞘磷脂和磷脂酰胆碱。在另一个实施方案中,PALM包含本公开的肽、鞘磷脂和1-棕榈酰-2-油酰磷脂酰胆碱(POPC)。在又一个实施方案中,PALM包含本公开的肽,并且所述脂质组分包含鞘磷脂和磷脂酰乙醇胺。在又一个实施方案中,PALM包含本公开的肽,并且所述脂质组分包含鞘磷脂和聚(乙二醇)磷脂酰乙醇胺。在再一个实施方案中,PALM包含本公开的肽,并且脂质组分包含鞘磷脂和磷脂酰丝氨酸。在另一个实施方案中,PALM包含本公开的肽,并且所述脂质组分包含鞘磷脂和心磷脂。

[0099] 在本公开的第二方面的再一个实施方案中,PALM包含本公开的肽,并且所述脂质组分基本上由鞘磷脂和一种或多种另外的磷脂组成,其中所述一种或多种另外的磷脂选自以下项组成的组:磷脂酰胆碱、聚乙二醇-磷脂酰乙醇胺(PEG-PE)、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰甘油、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇、心磷脂及其任何组合。在再一个实施方案中,PALM包含本公开的肽,并且所述脂质组分基本上由鞘磷脂和磷脂酰胆碱组成。在另一个实施方案中,PALM包含本公开的肽,并且所述脂质组分基本上由鞘磷脂和1-棕榈酰-2-油酰-磷脂酰胆碱(POPC)组成。

[0100] 在本公开的第二方面的一些实施方案中,PALM包含本公开的肽,并且所述脂质组分基本上由鞘磷脂和一种或多种另外的磷脂组成,其中所述一种或多种另外的磷脂选自以下项组成的组:磷脂酰胆碱、聚乙二醇-磷脂酰乙醇胺(PEG-PE)、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰甘油、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇、心磷脂及其任何组合,其中磷脂与鞘磷脂的摩尔比为约95:5至约10:90。在另一个实施方案中,磷脂与鞘磷脂的摩尔比为约90:10至约20:80。在再一个实施方案中,磷脂与鞘磷脂的摩尔比为约25:75至约35:65。在另一个实施方案中,磷脂与鞘磷脂的摩尔比为约30:70。在另一个实施方案中,磷脂与鞘磷脂的摩尔比为约80:20至约60:40。在又一个实施方案中,磷脂与鞘磷脂的摩尔比为约75:25至约65:35。在再一个实施方案中,磷脂与鞘磷脂的摩尔比为约70:30。

[0101] 磷脂的脂肪酸组分包括根据下式的脂肪酸: $R-COOH$,其中R是 (C_7-C_{21}) 烷基或 (C_7-C_{21}) 烯基,其中所述烯基可具有一至六个双键。合适的脂肪酸的实例包括但不限于植烷酸、亚麻酸、亚油酸、二十二碳四烯酸、油酸、辛酸、月桂酸、花生酸、肉豆蔻酸和棕榈酸。酯化成为具体磷脂的甘油主链的脂肪酸对可以是相同的,或者可各自是不同类型的脂肪酸。

[0102] 脂质组分与肽的摩尔比为约10:1至约2:1。在一个实施方案中,比率为约9:1至约

2:1。在一个实施方案中,脂质组分与肽的摩尔比为约8:1至约2:1。在再一个实施方案中,脂质组分与肽的摩尔比为约7:1至约3:1。在另一个实施方案中,脂质组分与肽的摩尔比为约6:1至约4:1。

[0103] 磷脂酰胆碱与两亲性肽的复合物是已知的。产生这些复合物的一种方法是通过由常见溶剂相进行初始共冻干,随后使干燥冻干物再水化以在水性悬浮液中形成复合物。

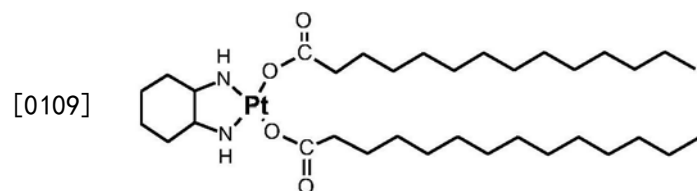
[0104] 颗粒尺寸通过DLS进行测量,并且表示为流体动力学平均直径(“平均直径”)。根据本公开的第二方面的PALM是平均直径为30nm或更小的纳米尺寸的颗粒。在一个实施方案中,平均颗粒直径为约5nm至约30nm。在又一个实施方案中,平均颗粒直径为约7.5nm至约30nm。在再一个实施方案中,平均颗粒直径为约10nm至约30nm。在另一个实施方案中,平均颗粒直径为约5nm至约25nm。在另一个实施方案中,平均颗粒直径为约7.5nm至约25nm。在又一个实施方案中,平均颗粒直径为约10nm至约25nm。在另一个实施方案中,平均颗粒直径为约5nm至约20nm。在另一个实施方案中,平均颗粒直径为约7.5nm至约20nm。在又一个实施方案中,平均颗粒直径为约10nm至约20nm。在再一个实施方案中,平均颗粒直径为约5nm至约15nm。在另一个实施方案中,平均颗粒直径为约7.5nm至约15nm。在又一个实施方案中,平均颗粒直径为约10nm至约15nm。在再一个实施方案中,平均颗粒直径为约7.5nm至约10nm。

[0105] 本公开的第三方面提供PALM-货物分子组合物,其包含本公开的第二方面的任一PALM实施方案以及货物分子。货物分子包括但不限于具有药物或治疗特性的分子。货物分子的非限制性实例共同或单独地包括:抗癌化合物,诸如全反式视黄酸、全反式视黄酸的醇酯(包括视黄酸的甲基、乙基和更长链脂肪烷基链醇酯)和视黄酸的胆甾醇酯;视黄酸酰胺,诸如芬维A胺;视黄醇和视黄醇的羧酸酯,包括视黄酸的甲基、乙基和更长链脂肪烷基链醇酯;亲脂性抗真菌剂,诸如两性霉素B或制霉菌素;类固醇,诸如黄体酮、睾酮、泼尼松龙、氢化可的松、地塞米松和雌二醇;止痛剂,诸如丙泊酚和氟哌啶醇;抗精神病药,诸如氟奋乃静癸酸酯和阿立哌唑;维生素D类似物胆钙化醇和麦角钙化醇;以及维生素E的异构体。

[0106] 货物分子还包括实现诊断或显像程序的分子(诸如荧光显像剂、放射性标记的显像剂)和用于MRI、PET、CT、SPECT/CT和x-射线研究的试剂。MRI显像剂包括但不限于造影剂,诸如具有与钆离子或类似的镧系离子或铟-111或镓-67或镱-177或钐-153螯合的二亚乙基三胺五乙酸部分的磷脂酰乙醇胺。

[0107] 货物分子也可以是通过已知方法连接至胆固醇或其他多环脂肪醇的各种类型和长度的RNA或DNA。

[0108] 在第三方面的一个实施方案中,货物分子是米铂,其化学名称为:顺-[(1R,2R)-1,2-环己二胺-N,N']双(肉豆蔻酰)]铂(II)。



[0110] 本公开的第三方面的又一个实施方案是PALM-货物分子复合物,其中货物分子是式I的化合物缀合物

[0111] A-R-L-X(式I)

[0112] 其中A是具有羟基或胺基的试剂;R是试剂的羟基或胺基;L是接头;并且X是锚定部

分。

[0113] 本公开的第三方面的另一个实施方案是PALM-货物分子复合物,其中货物分子是式I的化合物缀合物:

[0114] A-R-L-X (式I)

[0115] 其中A是具有羟基或胺基的试剂;R是试剂的羟基或胺基;L是碳酸、琥珀酸或二甘醇酸;并且X是胆固醇、 α -生育三烯酚、 β -生育三烯酚、 γ -生育三烯酚、 δ -生育三烯酚、胆固醇、粪醇、植物甾醇(β -谷甾醇、谷甾醇、豆甾醇、豆甾醇、菜油甾醇、菜子甾醇)、麦角固醇、视黄醇、胆钙化醇、麦角钙化醇、生育酚或生育三烯酚。

[0116] 本公开的第三方面的另一个实施方案是PALM-货物分子复合物,其中货物分子是式I的化合物缀合物:

[0117] 其中A是具有羟基或胺基的试剂;R是试剂的羟基或胺基;L选自由碳酸、琥珀酸或二甘醇酸组成的组;并且X选自由胆固醇、 α -生育三烯酚、 β -生育三烯酚、 γ -生育三烯酚、 δ -生育三烯酚、胆固醇、粪醇、植物甾醇(β -谷甾醇、谷甾醇、豆甾醇、豆甾醇、菜油甾醇、菜子甾醇)、麦角固醇、视黄醇、胆钙化醇、麦角钙化醇、 α -生育三烯酚、 β -生育三烯酚、 γ -生育三烯酚和 δ -生育三烯酚组成的组。

[0118] 本公开的第三方面的另一个实施方案是PALM-货物分子复合物,其中所述货物分子是式I的化合物缀合物:

[0119] 其中A是具有羟基或胺基的试剂;R是试剂的羟基或胺基;L是接头;并且X是锚定部分,其选自由胆固醇、胆钙化醇和 δ -生育三烯酚组成的组。

[0120] 在式(1)的化合物缀合物的一个实施方案中,R是试剂的羟基,并且锚定部分通过碳酸酯键共价结合至试剂。在式(1)的化合物缀合物的另一个实施方案中,R是试剂的胺基,并且锚定部分通过氨基甲酸酯键共价结合至试剂。

[0121] 在式(1)的化合物缀合物的另一个实施方案中,锚定部分是胆固醇。在式(1)的化合物缀合物的再一个实施方案中,锚定部分是胆固醇,前提条件是如果锚定部分是胆固醇,那么化合物不是紫杉醇。

[0122] 在式(1)的化合物缀合物的又一个实施方案中,锚定部分是 α -生育三烯酚。在式(1)的化合物缀合物的另一个实施方案中,锚定部分是 β -生育三烯酚。在式(1)的化合物缀合物的再一个实施方案中,锚定部分是 γ -生育三烯酚。在式(1)的化合物缀合物的又一个实施方案中,锚定部分是 δ -生育三烯酚。

[0123] 在式(1)的化合物缀合物的一些实施方案中,试剂是药物。

[0124] 在式(1)的化合物缀合物的一些实施方案中,试剂是抗癌药物。在式(1)的化合物缀合物的一个实施方案中,试剂是抗癌药物,并且抗癌药物通过碳酸酯键共价结合至锚。

[0125] 在式(1)的化合物缀合物的一个实施方案中,试剂是抗癌药物,并且抗癌药物通过氨基甲酸酯键共价结合至锚。

[0126] 具有可用于形成碳酸酯键的羟基的抗癌药物的非限制性实例包括AZD2811、羟基喜树碱、多柔比星、曲沙他滨、长春新碱、西罗莫司、微管溶素A、多西他赛或紫杉醇

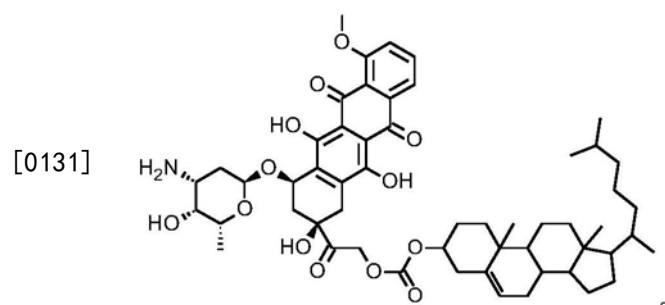
[0127] 具有可用于形成氨基甲酸酯键的胺的抗癌药物的非限制性实例包括多柔比星、柔红霉素、吉西他滨、阿糖胞苷和曲沙他滨。

[0128] 在本公开的第三方面的PALM-货物分子组合物的一些实施方案中,货物分子是紫

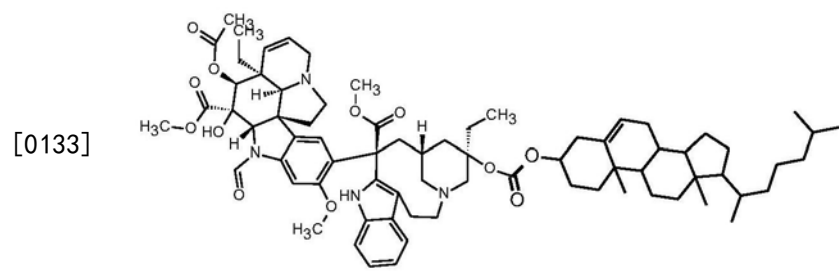
杉醇2'-胆甾醇碳酸酯。在另一个实施方案中,货物分子是紫杉醇2'- δ -生育三烯酚碳酸酯。

[0129] 在又其他实施方案中,货物分子是多西他赛2'-胆甾醇碳酸酯。在其他实施方案中,货物分子是10-羟基喜树碱的胆甾醇碳酸酯。在再其他实施方案中,货物分子是7-乙基-10-羟基喜树碱(其为伊立替康的活性代谢物)的胆甾醇碳酸酯。在另一个实施方案中,货物分子是西罗莫司的胆甾醇碳酸酯。在其他实施方案中,货物分子是吉西他滨的胆甾醇碳酸酯。在其他实施方案中,货物分子是微管溶素A的胆甾醇碳酸酯。在其他实施方案中,货物分子是吗啡的胆甾醇碳酸酯、氢吗啡酮的胆甾醇碳酸酯或可待因的胆甾醇碳酸酯。

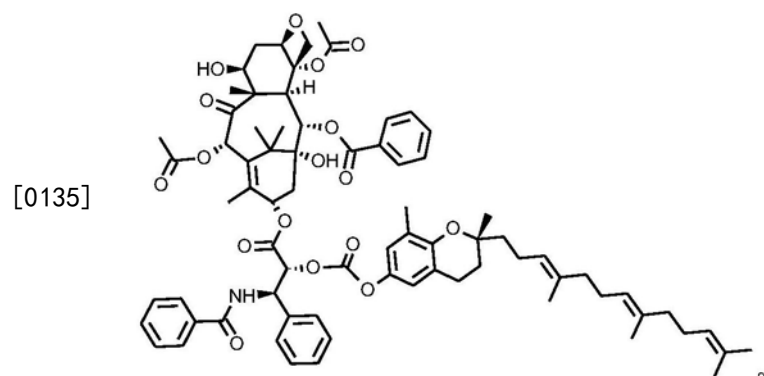
[0130] 在本公开的第三方面的PALM-货物分子组合物的其他实施方案中,货物分子是吉西他滨的胆甾醇氨基甲酸酯(胆甾醇(N^4)-吉西他滨氨基甲酸酯)。在又其他实施方案中,货物分子是腺苷的胆甾醇氨基甲酸酯。在又其他实施方案中,货物分子是多柔比星的胆甾醇碳酸酯,其结构是:



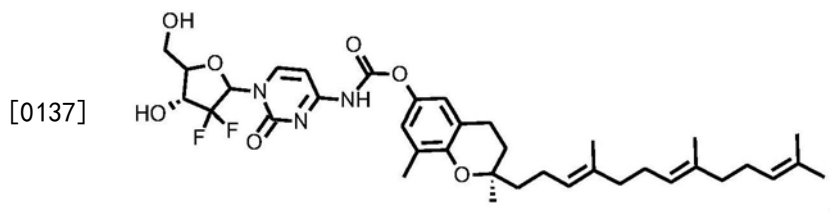
[0132] 在又一个实施方案中,货物分子是长春新碱的胆甾醇碳酸酯,其结构是:



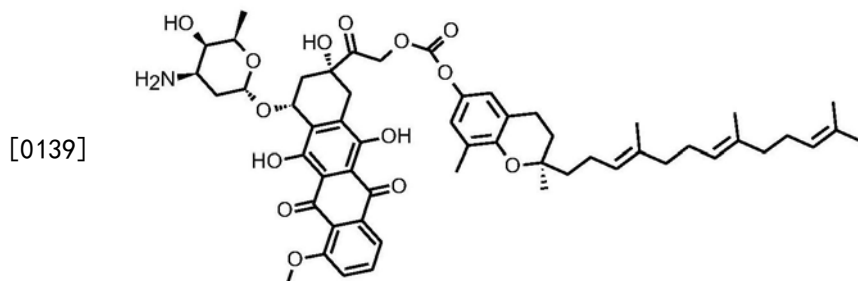
[0134] 在再一个实施方案中,货物分子是紫杉醇的 δ -生育三烯酚氨基甲酸酯,其结构是:



[0136] 在再一个实施方案中,货物分子是吉西他滨 δ -生育三烯酚碳酸酯,其结构是:

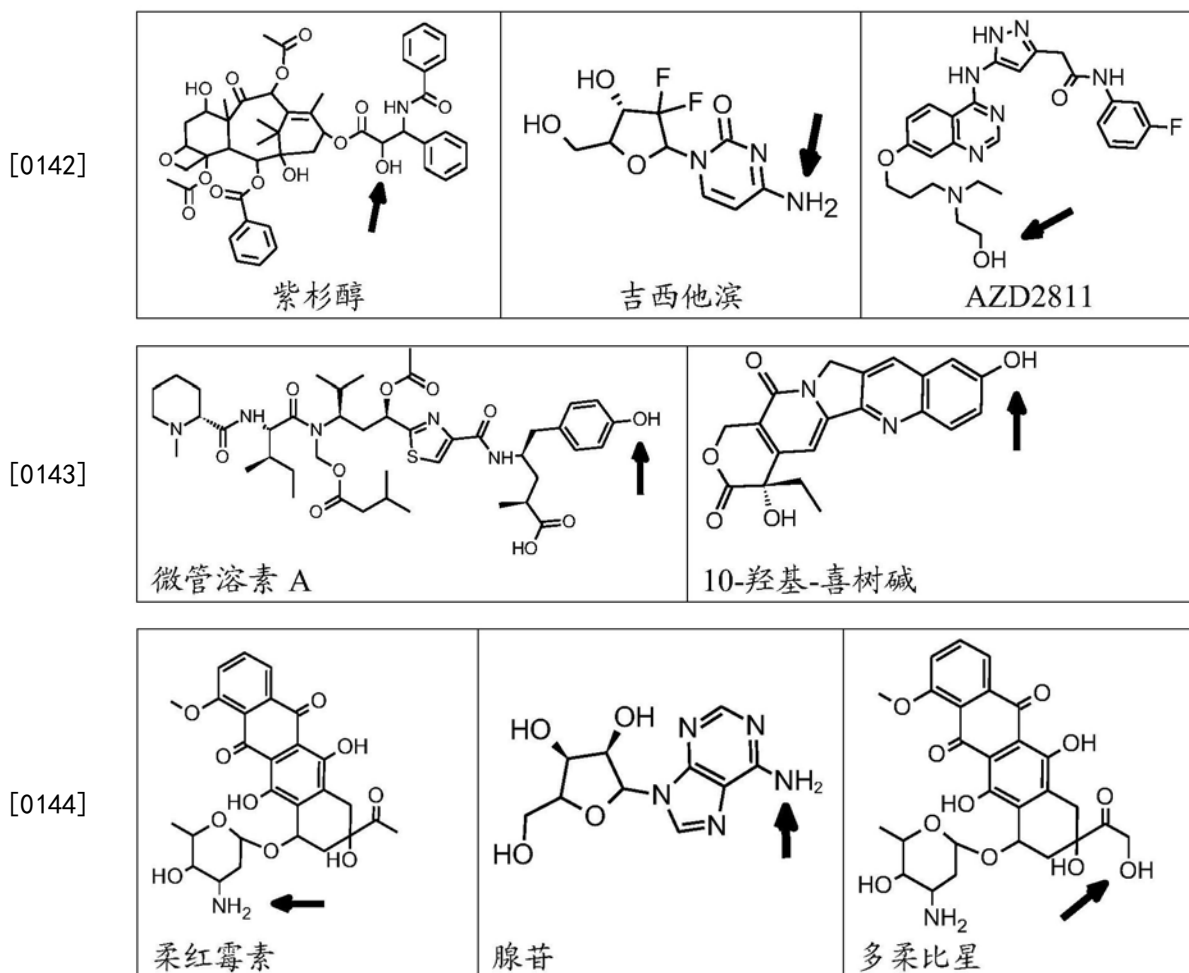


[0138] 在又一个实施方案中,货物分子是多柔比星 δ -生育三烯酚碳酸酯,其结构是:



[0140] 表4提供可用于本发明中的试剂(A)的非限制性实例的结构,箭头指示羟基或胺基(R)。

[0141] 表4



[0145] 表5提供式A-R-L-X的PALM-货物组合物的非限制性实例。

[0146] 表5

[0147]

化合物	A	R	L	X
1	紫杉醇	OH	碳酸	γ -生育三烯酚
2	紫杉醇	OH	碳酸	δ -生育三烯酚
3	紫杉醇	OH	碳酸	胆钙化醇
4	紫杉醇	OH	碳酸	麦角钙化醇
5	紫杉醇	OH	琥珀酸	胆固醇
6	紫杉醇	OH	琥珀酸	γ -生育三烯酚
7	紫杉醇	OH	琥珀酸	δ -生育三烯酚
8	紫杉醇	OH	琥珀酸	胆钙化醇
9	紫杉醇	OH	琥珀酸	麦角钙化醇

[0148]

化合物	A	R	L	X
10	紫杉醇	OH	二甘醇酸	胆固醇
11	紫杉醇	OH	二甘醇酸	γ -生育三烯酚
12	紫杉醇	OH	二甘醇酸	δ -生育三烯酚
13	紫杉醇	OH	二甘醇酸	胆钙化醇
14	紫杉醇	OH	二甘醇酸	麦角钙化醇
15	吉西他滨	NH ₂	碳酸	胆固醇
16	吉西他滨	NH ₂	碳酸	γ -生育三烯酚
17	吉西他滨	NH ₂	碳酸	δ -生育三烯酚
18	吉西他滨	NH ₂	碳酸	胆钙化醇
19	吉西他滨	NH ₂	碳酸	麦角钙化醇
20	吉西他滨	NH ₂	琥珀酸	胆固醇
21	吉西他滨	NH ₂	琥珀酸	γ -生育三烯酚
22	吉西他滨	NH ₂	琥珀酸	δ -生育三烯酚
23	吉西他滨	NH ₂	琥珀酸	胆钙化醇
24	吉西他滨	NH ₂	琥珀酸	麦角钙化醇
25	吉西他滨	NH ₂	二甘醇酸	胆固醇
26	吉西他滨	NH ₂	二甘醇酸	γ -生育三烯酚
27	吉西他滨	NH ₂	二甘醇酸	δ -生育三烯酚
28	吉西他滨	NH ₂	二甘醇酸	胆钙化醇
29	吉西他滨	NH ₂	二甘醇酸	麦角钙化醇
30	AZD2811	OH	碳酸	胆固醇
31	AZD2811	OH	碳酸	γ -生育三烯酚
32	AZD2811	OH	碳酸	δ -生育三烯酚
33	AZD2811	OH	碳酸	胆钙化醇
34	AZD2811	OH	碳酸	麦角钙化醇
35	AZD2811	OH	琥珀酸	胆固醇
36	AZD2811	OH	琥珀酸	γ -生育三烯酚
37	AZD2811	OH	琥珀酸	δ -生育三烯酚
38	AZD2811	OH	琥珀酸	胆钙化醇
39	AZD2811	OH	琥珀酸	麦角钙化醇
40	AZD2811	OH	二甘醇酸	胆固醇
41	AZD2811	OH	二甘醇酸	γ -生育三烯酚
42	AZD2811	OH	二甘醇酸	δ -生育三烯酚
43	AZD2811	OH	二甘醇酸	胆钙化醇
44	AZD2811	OH	二甘醇酸	麦角钙化醇
45	柔红霉素	NH ₂	碳酸	胆固醇
46	柔红霉素	NH ₂	琥珀酸	γ -生育三烯酚
47	柔红霉素	NH ₂	碳酸	δ -生育三烯酚
48	柔红霉素	NH ₂	碳酸	胆钙化醇
49	柔红霉素	NH ₂	碳酸	麦角钙化醇
50	柔红霉素	NH ₂	琥珀酸	胆固醇
51	柔红霉素	NH ₂	琥珀酸	γ -生育三烯酚

[0149]

化合物	A	R	L	X
52	柔红霉素	NH ₂	琥珀酸	δ-生育三烯酚
53	柔红霉素	NH ₂	琥珀酸	胆钙化醇
54	柔红霉素	NH ₂	琥珀酸	麦角钙化醇
55	柔红霉素	NH ₂	二甘醇酸	胆固醇
56	柔红霉素	NH ₂	二甘醇酸	γ-生育三烯酚
57	柔红霉素	NH ₂	二甘醇酸	δ-生育三烯酚
58	柔红霉素	NH ₂	二甘醇酸	胆钙化醇
59	柔红霉素	NH ₂	二甘醇酸	麦角钙化醇
60	10-羟基-喜树碱	OH	碳酸	胆固醇
61	10-羟基-喜树碱	OH	碳酸	γ-生育三烯酚
62	10-羟基-喜树碱	OH	碳酸	δ-生育三烯酚
63	10-羟基-喜树碱	OH	碳酸	胆钙化醇
64	10-羟基-喜树碱	OH	碳酸	麦角钙化醇
65	10-羟基-喜树碱	OH	琥珀酸	胆固醇
66	10-羟基-喜树碱	OH	琥珀酸	γ-生育三烯酚
67	10-羟基-喜树碱	OH	琥珀酸	δ-生育三烯酚
68	10-羟基-喜树碱	OH	琥珀酸	胆钙化醇
69	10-羟基-喜树碱	OH	琥珀酸	麦角钙化醇
70	10-羟基-喜树碱	OH	二甘醇酸	胆固醇
71	10-羟基-喜树碱	OH	二甘醇酸	γ-生育三烯酚
72	10-羟基-喜树碱	OH	二甘醇酸	δ-生育三烯酚
73	10-羟基-喜树碱	OH	二甘醇酸	胆钙化醇
74	10-羟基-喜树碱	OH	二甘醇酸	麦角钙化醇
75	腺苷	NH ₂	碳酸	胆固醇
76	腺苷	NH ₂	碳酸	γ-生育三烯酚
77	腺苷	NH ₂	碳酸	δ-生育三烯酚
78	腺苷	NH ₂	碳酸	胆钙化醇
79	腺苷	NH ₂	碳酸	麦角钙化醇
80	腺苷	NH ₂	琥珀酸	胆固醇
81	腺苷	NH ₂	琥珀酸	γ-生育三烯酚
82	腺苷	NH ₂	琥珀酸	δ-生育三烯酚
83	腺苷	NH ₂	琥珀酸	胆钙化醇
84	腺苷	NH ₂	琥珀酸	麦角钙化醇
85	腺苷	NH ₂	二甘醇酸	胆固醇
86	腺苷	NH ₂	二甘醇酸	γ-生育三烯酚
87	腺苷	NH ₂	二甘醇酸	δ-生育三烯酚
88	腺苷	NH ₂	二甘醇酸	胆钙化醇
89	腺苷	NH ₂	二甘醇酸	麦角钙化醇
90	微管溶素 A	OH	碳酸	胆固醇
91	微管溶素 A	OH	碳酸	γ-生育三烯酚
92	微管溶素 A	OH	碳酸	δ-生育三烯酚
93	微管溶素 A	OH	碳酸	胆钙化醇

[0150]

化合物	A	R	L	X
94	微管溶素 A	OH	碳酸	麦角钙化醇
95	微管溶素 A	OH	琥珀酸	胆固醇
96	微管溶素 A	OH	琥珀酸	γ -生育三烯酚
97	微管溶素 A	OH	琥珀酸	δ -生育三烯酚
98	微管溶素 A	OH	琥珀酸	胆钙化醇
99	微管溶素 A	OH	琥珀酸	麦角钙化醇
100	微管溶素 A	OH	二甘醇酸	胆固醇
101	微管溶素 A	OH	二甘醇酸	γ -生育三烯酚
102	微管溶素 A	OH	二甘醇酸	δ -生育三烯酚
103	微管溶素 A	OH	二甘醇酸	胆钙化醇
104	微管溶素 A	OH	二甘醇酸	麦角钙化醇
105	多柔比星	OH	碳酸	胆固醇
106	多柔比星	OH	碳酸	γ -生育三烯酚
107	多柔比星	OH	碳酸	δ -生育三烯酚
108	多柔比星	OH	碳酸	胆钙化醇
109	多柔比星	OH	碳酸	麦角钙化醇
110	多柔比星	OH	琥珀酸	胆固醇
111	多柔比星	OH	琥珀酸	γ -生育三烯酚
112	多柔比星	OH	琥珀酸	δ -生育三烯酚
113	多柔比星	OH	琥珀酸	胆钙化醇
114	多柔比星	OH	琥珀酸	麦角钙化醇
115	多柔比星	OH	二甘醇酸	胆固醇
116	多柔比星	OH	二甘醇酸	γ -生育三烯酚
117	多柔比星	OH	二甘醇酸	δ -生育三烯酚
118	多柔比星	OH	二甘醇酸	胆钙化醇
119	多柔比星	OH	二甘醇酸	麦角钙化醇

[0151] 本公开的第四方面提意外有效的共冻干技术,以从由叔丁醇和水构成的均匀溶剂相产生PALM或PALM-货物分子组合物。这种方法的优点是:1) 所有PALM组分包括肽、磷脂和任选的亲脂性货物(例如,紫杉醇-2'-胆甾醇碳酸酯)共溶解在单一溶剂相中;2) 溶剂组分可完全混溶,并且非常适合通过标准冻干程序去除;3) 因为叔丁醇是低毒性的3类溶剂,所以所述程序避免了潜在的有毒物质;以及4) 所得的干燥冻干物实现在储存期间的稳定性大于在水性制剂的情况下可能的稳定性的机会。

[0152] 用于制备PALM的溶剂混合物优选地是叔丁醇(TBA)和水的混合物。在一个实施方案中,TBA与水的百分比率在约70%:30%至约90%:10%之间。在另一个实施方案中,比率在约75%:25%与约85%:15%之间。在又一个实施方案中,比率为80%:20%。

[0153] 第四方面的一个实施方案提供一种用于制备PALM的方法,其包括以下步骤:

[0154] i) 将两亲性肽溶解在第一溶剂混合物中以提供肽溶液;

[0155] ii) 将鞘磷脂溶解在第二溶剂混合物中以提供鞘磷脂溶液

[0156] iii) 将另外的磷脂溶解在第三溶剂混合物中以提供磷脂溶液;

[0157] iv) 将肽溶液、鞘磷脂溶液和磷脂溶液组合以形成肽/鞘磷脂/磷脂溶液;以及

[0158] v) 将肽/鞘磷脂/磷脂溶液冻干,

[0159] 其中步骤i)、ii)和iii)以任何顺序进行;并且其中第一溶剂混合物、第二溶剂混

合物和第三溶剂混合物包含叔丁醇和水。

[0160] 本公开的第四方面的另一个实施方案提供一种用于制备PALM的方法,其包括以下步骤:

[0161] i) 将两亲性肽、鞘磷脂和另外的磷脂组合以形成肽/鞘磷脂/磷脂混合物;

[0162] ii) 将肽/鞘磷脂/磷脂混合物溶解在溶剂混合物中以形成肽/鞘磷脂/磷脂溶液;以及

[0163] iii) 将肽/鞘磷脂/磷脂溶液冻干,

[0164] 其中溶剂混合物包含叔丁醇和水。

[0165] 本公开的第四方面另外提供一种用于制备包含货物分子的PALM以形成PALM-货物分子复合物的方法。为了制备PALM-货物分子复合物,将肽、鞘磷脂、一种或多种另外的磷脂和货物分子各自单独地在溶剂混合物中制备,并根据期望制剂以特定的摩尔比组合。可替代地,可将肽、鞘磷脂、一种或多种另外的磷脂和货物分子在不预先增溶的情况下直接组合,然后用期望溶剂混合物制成溶液,之后进行冻干。

[0166] 本公开的第四方面的一个实施方案提供一种用于制备PALM-货物分子复合物的方法,其包括以下步骤:

[0167] i) 将两亲性肽溶解在第一溶剂混合物中以提供肽溶液;

[0168] ii) 将鞘磷脂溶解在第二溶剂混合物中以提供鞘磷脂溶液

[0169] iii) 将另外的磷脂溶解在第三溶剂混合物中以提供磷脂溶液;

[0170] iv) 将货物分子溶解在第四溶剂混合物中以提供货物分子溶液;

[0171] v) 将肽溶液、鞘磷脂溶液、磷脂溶液和货物分子溶液组合以形成肽/鞘磷脂/磷脂/货物分子溶液;以及

[0172] vi) 将肽/鞘磷脂/磷脂/货物分子溶液冻干,

[0173] 其中步骤i)、ii)、iii)和iv)以任何顺序进行;并且其中第一溶剂混合物、第二溶剂混合物、第三溶剂混合物和第四溶剂混合物包含叔丁醇和水。

[0174] 制备PALM-货物分子复合物的另一个实施方案包括以下步骤:

[0175] i) 将两亲性肽、鞘磷脂、另外的磷脂和货物分子组合以形成肽/鞘磷脂/磷脂/货物分子混合物;

[0176] ii) 将肽/鞘磷脂/磷脂/货物分子混合物溶解在溶剂混合物中以形成肽/磷脂溶液;以及

[0177] iii) 将肽/鞘磷脂/磷脂/货物分子溶液冻干,

[0178] 其中溶剂混合物包含叔丁醇和水

[0179] 所得的冻干饼可长时间储存并且将保持稳定。通过添加任何合适的水性溶液(例如,水或盐水)使冻干的产物再水化,随后轻轻涡旋内容物。PALM冻干物的重构可通过将PALM溶液在50°C下孵育5至30分钟来增强。然后将溶液过滤灭菌(0.2 μ m)并在4°C下储存。可替代地,将包含肽、磷脂和货物分子的溶剂混合物过滤灭菌,之后进行冻干。

[0180] 本公开的第五方面提供用于治疗病症的方法,其包括向有需要的受试者施用有效量的根据本公开的第三方面的任一实施方案的PALM-货物组合物。

[0181] 清道夫受体B-1 (SR-B1) 是结合载脂蛋白A-I (HDL的主要蛋白质组分) 以促进胆固醇的细胞转运的膜受体。胆固醇是增殖细胞(如在恶性肿瘤中发现的那些)的必需营养素。

SR-BI在许多肿瘤细胞中高度表达,所述肿瘤细胞包括但不限于乳癌、前列腺癌、结肠直肠癌、胰腺癌、肾上腺癌、皮肤癌、鼻咽癌和卵巢癌。一些两亲性肽也被SR-BI识别并结合。PALM由磷脂和两亲性肽的组合形成,所述两亲性肽被设计来结合至SR-BI,从而将货物分子选择性地递送至SR-BI阳性细胞。

[0182] 因此,本公开的第五方面的一个实施方案提供治疗与SR-BI受体过表达相关联的病症的方法,其包括向有需要的受试者施用PALM-药物。在一个实施方案中,所述方法是通过向有需要的受试者施用PALM-货物分子组合物来治疗癌症的方法。

[0183] 出于药物用途,冻干的PALM可以单剂量或多剂量容器提供,可在使用(例如医院或医生办公室)时使用标准稀释剂(诸如无菌注射用水、正常的无菌盐水或无菌的5%右旋糖溶液)便利地重构。然后将合适的容器无菌地填充无菌混合物,冻干,并适当密封以保持冻干物质的无菌性。合适的容器包括但不限于包括橡胶密封件的小瓶或等同物,其允许例如经由注射器引入用于重构的稀释剂。此类PALM制剂适合于肠胃外施用,包括静脉内、皮下、肌肉内、腹膜内注射。

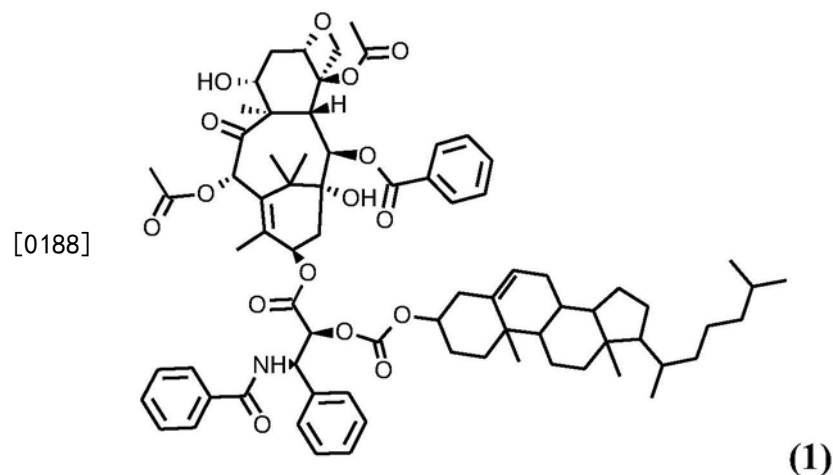
实施例

[0184] 实施例1肽合成和纯化

[0185] 肽是在GenScript USA, Inc. (Piscataway, NJ) 通过标准的Fmoc固相合成技术生产。按照标准程序通过N-末端的乙酰化和C-末端的酰胺化来在末端氨基酸处对某些肽进行修饰。通过标准高效液相色谱方法将肽以色谱法纯化至大于90%纯度以实现肽纯化。通过HPLC和质谱分析来确认纯度。

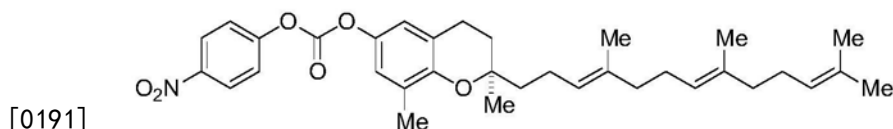
[0186] 实施例2紫杉醇2'-胆甾醇碳酸酯(XC)合成

[0187] 将50毫克紫杉醇溶解在2ml氯仿中,然后与1.5摩尔过量的胆固醇氯甲酸酯的2ml氯仿加4ml N,N-二异丙基乙胺和2ml乙腈溶液组合。将混合物在环境温度下搅拌过夜,然后在旋转蒸发器上干燥。然后将所得的灰白色沉淀物溶解在乙酸乙酯/己烷(3:1)中,并且用水萃取,干燥,然后再溶解在氯仿中。通过使用乙酸乙酯/己烷(3:1)作为流动相(紫杉醇的 R_f 为0.4, Tax-Chol的 R_f 为0.92)的薄层色谱法确认产物的形成。然后使用乙酸乙酯/己烷(3:1)作为流动相在硅胶柱上进行产物的进一步纯化,以产生标题化合物(1)。通过质谱法和NMR分析确认结构。



[0189] 实施例3紫杉醇2'- δ -生育三烯酚碳酸酯(XT3)合成

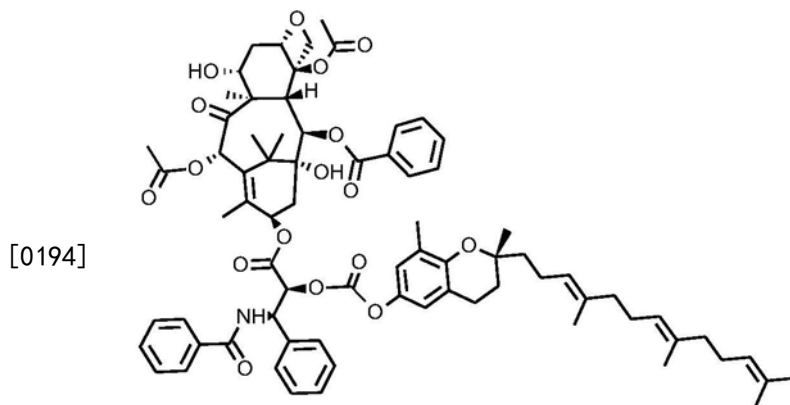
[0190] 步骤1. δ -生育三烯酚的对硝基苯基碳酸酯的合成



(2)

[0192] 在室温下,向 δ -生育三烯酚 (25Mg, 0.0629mmol) 的无水二氯甲烷 (1.5mL) 溶液中添加氯甲酸4-硝基苯酯 (51Mg, 0.25mmol) 和三乙胺 (35 μ L, 0.25mmol)。将反应混合物在室温下搅拌24小时,然后浓缩,然后使用制备型TLC、使用乙酸乙酯/庚烷 (10:90) 作为洗脱液来获得期望产物 (2)。获得呈黄色粉末 (18Mg) 的期望产物。¹H NMR (CDCl₃): δ 8.30 (d, 2H), 7.45 (d, 2H), 6.80 (dd, 2H), 5.05-5.20 (m, 3H), 2.72-2.78 (t, 2H), 2.18 (s, 4H), 1.95-2.15 (m, 4H), 1.72-1.85 (m, 4H), 1.68 (s, 3H), 1.55-1.62 (br s, 12H), 1.30 (br s, 5H)。

[0193] 步骤2. 紫杉醇的 δ -生育三烯酚碳酸酯 (3) 的合成



(3)

[0195] 将化合物 (2) (18mg, 步骤1产物) 的二氯甲烷 (2mL) 溶液、紫杉醇 (28mg) 和DMAP (10mg) 在室温下组合。将混合物在室温下搅拌24小时。将混合物浓缩,并通过使用制备型TLC、使用乙酸乙酯/庚烷 (50:50) 作为洗脱液进行纯化。获得呈无色固体的期望产物 (3) (17Mg)。TLC分析 (R_f为0.25, EA/己烷:1:1)。¹H NMR (CDCl₃): δ 8.20 (d, 2H), 7.75 (d, 2H), 7.60-7.62 (m, 1H), 7.30-7.52 (m, 9H), 6.90-6.95 (d, 1H), 6.60-6.75 (dd, 2H), 6.20-6.30 (m, 2H), 6.00-6.05 (m, 1H), 5.70-5.75 (d, 1H), 5.50 (s, 1H), 5.10-5.20 (br s, 2H), 4.95-5.00 (d, 1H), 4.30-4.35 (br s, 1H), 4.20-4.30 (dd, 2H), 3.75-3.80 (d, 1H), 2.70-2.75 (m, 2H), 2.30-2.60 (m, 7H), 2.23-2.27 (m, 11H), 1.50-2.20 (m, 26H), 1.25 (m, 9H), 1.15 (s, 3H)

[0196] 实施例4肽两亲物脂质胶束 (PALM) 制备

[0197] 在由80%叔丁醇 (TBA) 和20%水构成的溶剂混合物中制备肽和磷脂的单独储备溶液以获得10mM肽、20mM 1,2-二油酰-sn-甘油基-3-磷酸胆碱 (DOPC) 或20mM 1-棕榈酰-2-油酰-磷脂酰胆碱 (POPC) 和20mM卵SM的单独溶液。将等分试样的储备溶液组合,以获得含有10摩尔当量的肽、42摩尔当量的磷脂酰胆碱和18摩尔当量的SM的最终溶液。将溶液在1.5ml玻璃小瓶中组合,冷冻 (-70 $^{\circ}$ C),并在-5至-10 $^{\circ}$ C下冻干过夜。通过添加杜氏 (Dulbecco's) 磷酸盐缓冲盐水、随后轻轻涡旋内容物使所得的冻干饼再水化。通过将PALM溶液在50 $^{\circ}$ C下孵育

10分钟来完成PALM的形成。一些肽复合物在加热时保持混浊,并且还经受冷冻至-80℃、随后解冻至室温的一个循环,以试图获得澄清溶液。PALM制剂的品质在其外观上是明显的。视觉上澄清的制剂指示所形成的任何纳米颗粒的直径小于大约20nm。结果在表5中示出。

[0198] 表5

通过目视检查的肽/磷脂复合物的稳定性							
磷脂含量 ^a	摩尔比 PC/SM	摩尔比 C ₁₆ PTX/PL	肽				SEQ ID No. 32
			SEQ ID No. 25 ^b	SEQ ID No. 26	SEQ ID No. 27	SEQ ID No. 28	
[0199] POPC, SM	70/30	0	澄清	澄清	澄清	澄清	澄清
POPC, SM	70/30	0.1	澄清	混浊	混浊	混浊	混浊
DOPC, SM	70/30	0	澄清		混浊	混浊	混浊
DOPC, SM	70/30	0.1	澄清				混浊

[0200] ^a1-棕榈酰-2-油酰磷脂酰胆碱(POPC)、1,2-二油酰磷脂酰胆碱(DOPC)、卵

[0201] 鞘磷脂(SM)、磷脂酰胆碱(PC)、磷脂(PL)、紫杉醇2'-棕榈酸酯(C₁₆PTX)

[0202] ^b肽与磷脂的摩尔比为1/4。

[0203] 实施例5含有荧光染料DiI的PALM的制备

[0204] 将40μl等分试样的10mM肽与56μl 20mM POPC、24μl 20mM SM(卵)和16μl 2.5mM DiI在小玻璃瓶中组合。在80%TBA/20%水中制备肽溶液和脂质溶液。在92%TBA/8%水中制备DiI原液。将溶液冻干,并且通过添加0.2ml的杜氏磷酸盐缓冲盐水使所得的饼再水化。将溶液短暂涡旋,水浴超声处理(持续大约15秒),并在50℃加热块中放置20分钟。

[0205] 实施例6含有米铂的PALM的制备

[0206] 将50μl等分试样的10mM SEQ ID NO:25的80%TBA/20%水溶液(对应于2.5摩尔当量的肽)与分别来自40mM和20mM储备溶液(由相同溶剂混合物组成)的3摩尔当量的POPC和7摩尔当量的卵SM组合。向其中添加来自用100%TBA制备的1mM储备溶液的0.75摩尔当量的米铂(MedKoo Biosciences,Raleigh,NC)。将溶液冻干,并且通过添加0.4ml的5%右旋糖水溶液使所得的饼再水化。将溶液短暂涡旋,水浴超声处理(持续大约15秒),并在50℃加热块中放置20分钟。将所得的澄清溶液通过孔尺寸为0.2μm的聚醚砜灭菌过滤器并在4℃下储存。通过DLS进行的颗粒尺寸分析(实施例11)指示流体动力学平均直径为8nm。SEC确认尺寸与HDL相当的单一颗粒群体。SEC色谱图在图2中示出(米铂(实线),人HDL(短划线))。

[0207] 实施例7含有紫杉醇胆甾醇碳酸酯(XC)的PALM的制备

[0208] 含有XC的PALM的制备基本上如实施例6中所述,但有以下例外。将来自92%TBA/8%水中的10mM储备溶液的总计1.5摩尔当量的XC与其他PALM组分组合。将溶液冻干,并且用0.4ml的杜氏磷酸盐缓冲盐水使所得的饼再水化。通过DLS确定这种制剂的流体动力学平均直径为9nm(实施例11)。通过SEC进行的尺寸分析指示单一颗粒群体的直径主要为10nm(图3)。

[0209] 实施例8含有紫杉醇 δ -生育三烯酚碳酸酯(XT3)的PALM的制备

[0210] 将50 μ l等分试样的10mM肽SEQ ID NO:25的80%TBA/20%水溶液(对应于2.5摩尔当量的肽)与来自20mM储备溶液(由相同溶剂混合物组成)的7摩尔当量的POPC和3摩尔当量的卵SM组合。向其中添加来自92%TBA/8%水中的10mM储备溶液的1摩尔当量的XT3。用0.4ml的杜氏磷酸盐缓冲盐水使冻干饼再水化。

[0211] 实施例9R4F不适合于含有紫杉醇 δ -生育三烯酚碳酸酯(XT3)的PALM的制备

[0212] 用SEQ ID NO:25和用R4F(表1)如实施例9进行PALM制备。不同于用肽SEQ ID NO:25制成的PALM,其在室温和4℃下仍然是澄清溶液,含有R4F的PALM在室温下是澄清溶液,但在4℃下变成浑浊的凝胶。温热至室温后,凝胶返回至澄清液体。分析PALM制剂的尺寸(实施例11)。动态光散射指示,具有肽SEQ ID NO:25的PALM的平均流体动力学直径为8nm(体积强度)。具有R4F的PALM的相同分析显示,94%的颗粒群体的平均流体动力学直径为11nm,其余为32nm。SEC确认具有肽SEQ ID NO:25的PALM的均匀尺寸分布(图4)。相比之下,具有R4F的PALM显示出在大于SEQ ID NO:25PALM的尺寸至小于8nm的尺寸下洗脱的一系列峰。缺乏通过DLS进行的较小颗粒检测并不意外,因为对7nm以下的颗粒的灵敏度相当微弱。这些结果指示,R4F不是适合于PALM制备的肽。

[0213] 实施例10将芬维A胺装载到用肽SEQ ID NO:25制备的PALM中

[0214] 将35 μ l等分试样的10mM肽SEQ ID NO:25的80%TBA/20%水溶液(对应于2.5摩尔当量的肽)与分别来自40mM和20mM储备溶液(在相同溶剂混合物中制备而成)的3摩尔当量的POPC和7摩尔当量的卵SM组合。还添加两摩尔当量的20mM芬维A胺(在相同溶剂混合物中)。将溶液冻干,并且用0.325ml磷酸盐缓冲盐水使所得的饼再水化。在50℃下,溶液在20min内变得澄清。通过SEC进行的分析(实施例11)指示在8nm-10nm直径范围内洗脱为单一峰的所有组分(图5)。

[0215] 实施例11PALM尺寸的确定

[0216] 通过DLS和SEC确定PALM制剂的尺寸和尺寸均匀性。通过用Nicomp 370颗粒尺寸分析仪的DLS确定基于流体动力学平均直径的尺寸。分析仪用乳胶标准物进行校准。除非另外明确指示,否则本文和权利要求书中提及的颗粒尺寸是如上所述通过DLS计算的。

[0217] PALM颗粒的相对流体动力学尺寸也通过用连接至Beckman/Coulter 126型泵和128型二极管阵列检测器的GE Superose 6 Increase柱(10x300mm)的SEC确定。流动相(150mM NaCl,6mM NaPO₄(pH 7.4))流速为0.5ml/min。在215和280nm波长下监测洗脱液。通过注射蛋白质分子量标准物来确认系统性能(图3)。

[0218] 实施例12BHK(SR-BI)细胞中PALM的SR-BI选择性

[0219] 用从NIH获得的BHK(SR-BI)细胞进行SR-BI相互作用研究。借助于GeneSwitch™系统(Invitrogen)用诱导型人SR-BI基因稳定地转染细胞。将细胞接种(96孔板)(8000个细胞/孔)在含有博莱霉素和潮霉素各200 μ g/ml的生长培养基(含有10%胎牛血清的杜氏改良伊格尔(Eagle)培养基)中。孵育24小时后,将生长培养基去除,并用0.2%牛血清白蛋白的杜氏改良伊格尔培养基溶液代替。待诱导SR-BI表达的细胞的培养基还含有10nM米非司酮,其从DMSO储备溶液添加。将DMSO单独添加到未诱导的细胞的培养基。24小时后将诱导培养基去除,并且用含有DiI标记的PALM(32 μ g肽/ml)或DiI标记的HDL(19 μ g蛋白质/ml)(Kalen Biomedical, Montgomery Village, MD)的培养基代替。通过在0.2%牛血清白蛋白的杜氏改

良伊格尔培养基溶液中稀释等分试样的Di-I标记的PALM(实施例5)或DiI标记的HDL来制备测试培养基。在使用前,将溶液通过孔隙尺寸为0.2 μ m的聚醚砜灭菌过滤器。将细胞孵育4小时。接下来,将细胞用0.1%白蛋白的杜氏磷酸盐缓冲盐水(具有钙和镁)洗涤3次。最后一次的洗涤用200 μ l/孔的叔丁醇/水(95%/5%)代替。在偶尔振荡的情况下,将盖上的板在室温下静置30min。在Molecular Dynamics Gemini荧光板读取器(图9)上用550nm截止滤光片在520nm激发和580nm发射下检测每个孔的荧光。

[0220] 表6

[0221] BHK (SR-BI) 细胞从HDL和从用各种肽制备的PALM的DiI摄取取决于SR-BI表达

[0222]		未诱导的	诱导的	比未诱导 的增加
		DiI 摄取 ^a	DiI 摄取	
		(pmol/ μ g/ml)	(pmol/ μ g/ml)	
	HDL ^b	0.13 $\pm$ 0.02	0.86 $\pm$ 0.03	561%
	SEQ ID NO:3	0.16 $\pm$ 0.01	0.29 $\pm$ 0.03	88%
	SEQ ID NO:5	0.54 $\pm$ 0.03	0.93 $\pm$ 0.03	73%
[0223]	SEQ ID NO:25	0.24 $\pm$ 0.01	0.83 $\pm$ 0.02	245%
	SEQ ID NO:26	0.49 $\pm$ 0.04	0.81 $\pm$ 0.04	65%
	SEQ ID NO:27	0.34 $\pm$ 0.01	0.66 $\pm$ 0.02	90%
	SEQ ID NO:32	0.28 $\pm$ 0.02	0.90 $\pm$ 0.03	221%
	SEQ ID NO:35	0.35 $\pm$ 0.01	1.26 $\pm$ 0.06	264%

[0224] ^a细胞摄取的DiI相对于蛋白质(HDL)或肽(PALM)浓度的量。示出平均值(n=4)和平均值的标准误差。

[0225] ^b HDL DiI含量为21pmol/ μ g蛋白质。PALM DiI含量为40pmol/ μ g肽。HDL浓度为19 μ g/ml。PALM肽浓度为32 μ g/ml。

[0226] 实施例13紫杉醇的定量

[0227] 通过将1体积的水性样品与4体积的乙酸乙酯/丙酮/甲醇(70/30/5v/v)混合来从水性样品中萃取紫杉醇、XT3和XC。将振荡和离心后获得的上层有机层收集,通过溶剂蒸发和真空进行干燥,并重新溶解在HPLC流动相(甲醇/水(65/35v/v))中。将20 μ L等分试样的重构样品注射到HPLC上,以1.2ml/分钟的流速通过Macherey-Nagel柱(4 x 250mm,具有Nucleosil 10-5C18),并用UV检测器在230nm波长下进行检测。

[0228] 实施例14含有米铂的PALM以及顺铂抑制PC-3细胞生长

[0229] 将PC-3细胞(美国典型培养物保藏中心,CRL-1435)以每孔 5×10^3 个细胞(100 μ L)的密度接种在96孔板中,并在由F-12K培养基构成、补充有10%胎牛血清的生长培养基中生长,直至大约70%汇合度(24小时)。接下来,将生长培养基由100 μ L新鲜生长培养基(对照)或由补充有从100倍浓缩储备溶液(在5%右旋糖中制备)添加的各种浓度的顺铂(例如,在培养基中最终浓度为0 μ M和0.1至100 μ M)或补充由等效量的MP的PALM溶液(如实施例6制备)的生长培养基代替。各条件平行测试三次。将板孵育48小时。通过在杜氏磷酸盐缓冲盐水(具有钙和镁)中添加20 μ L的5mg/ml MTT并孵育3小时来用噻唑蓝四唑溴化物(MTT)测定法测定细胞活力。接下来,将培养基小心去除并由200 μ L二甲基亚砜(DMSO)代替。将板在定轨振荡器上轻轻搅拌15分钟。在570nm下读取每个孔的吸光度。通过数据与逻辑斯蒂方程的非线性回归拟合来确定产生50%生长抑制的浓度(IC₅₀)。对照孔的平均吸光度表示100%生长(图6)。

[0230] 实施例15SR-BI抗体削弱通过含有米铂的PALM进行的PC-3细胞生长抑制

[0231] 如实施例14生长PC-3细胞。将在SR-BI抗体(Novus Biologics,NB400-113)存在下待测试的细胞在含有抗体储备溶液的1/400稀释液的生长培养基中预孵育1hr。接下来,将所有培养基去除并用含有指示量的铂化合物的生长培养基(如实施例13制备)代替。用于抗体处理细胞的具有PALM(MP)的生长培养基含有抗体储备溶液的1/400稀释液的抗体。将细胞孵育5hr。接下来,将所有培养基去除;将细胞用培养基洗涤一次,然后在生长培养基中再孵育43小时。如实施例14,通过MTT测定法来确定细胞存活(图7)。

[0232] 实施例16XT3的PALM溶液在阻断SKOV-3细胞生长XC方面比XC的PALM溶液更有活性

[0233] 将SKOV-3卵巢癌细胞(美国典型培养物保藏中心,HTB-77)以每孔 5×10^3 个细胞(100 μ L)的密度接种在96孔板中,并在由McCoy氏培养基构成、补充有10%胎牛血清的生长培养基中生长,直至大约70%汇合度(24小时)。接下来,将生长培养基由100 μ L新鲜生长培养基(对照)或由补充有各种浓度的紫杉醇、PALM(XC)或PALM(XT3)的生长培养基代替。通过将5mM紫杉醇的DMSO储备溶液稀释到生长培养基中、随后过滤灭菌(0.2 μ m过滤器)来制备20 μ M紫杉醇的测试溶液。将等分试样的20 μ M溶液在生长培养基中稀释5倍以获得4 μ M紫杉醇。用4 μ M继续5倍稀释过程以获得800nM紫杉醇溶液。继续这一过程,直至获得生长培养基中0.051nM紫杉醇的浓度。将由此获得的9种溶液中每一种的四个100 μ L等分试样施加到含有细胞的单独孔。对于制备PALM(XC)和PALM(XT3)测试溶液使用了类似但修改的过程。所测试的最高浓度为50 μ M,其通过将PALM(XC)和PALM(XT3)的1mM制剂(实施例7、8)在生长培养基中稀释、随后过滤灭菌来制备。在重复8次将每种最新稀释液5倍稀释的过程中获得的最低浓度为0.13nM。将细胞用测试溶液孵育72小时。在这个周期结束时,如实施例14,通过MTT测定法来确定细胞活力。(图8)。

[0234] 实施例17 PALM(XT3)对BHK(SR-BI)细胞生长的抑制是SR-BI依赖性的

[0235] 将BHK(SR-BI)细胞接种(3000个细胞/孔)在具有生长培养基(含有10%胎牛血清以及博莱霉素和潮霉素各200 μ g/ml的杜氏改良伊格尔培养基)的96孔板中并孵育24小时。用含有从DMSO储备溶液添加的10nM米非司酮(诱导的)或等效量的仅DMSO(对照)的0.2%牛血清白蛋白的杜氏改良伊格尔培养基溶液代替生长培养基。将细胞孵育24小时。接下来,用指示浓度的PTX或PALM(XT3)的0.2%牛血清白蛋白(在杜氏改良伊格尔培养基中)溶液代替培养基,并将细胞孵育12小时。然后将这些培养基由正常生长培养基代替,并将细胞孵育

36hr以上。通过MTT测定法来确定相对于不具有测试剂的细胞的细胞生长百分比(图10)。

[0236] 实施例18裸鼠中的SKOV-3卵巢细胞异种移植抑制

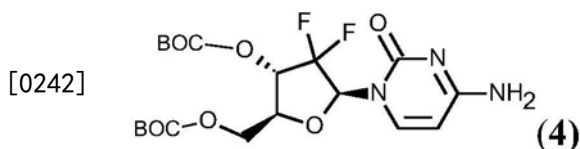
[0237] 在从商业供应商获得的雌性小鼠(Foxn1nu)中确定最大耐受剂量。将PALM(XT3)的
功效与Taxol®进行比较测试,Taxol®由用cremophor EL和乙醇配制的紫杉醇组成。每种
试剂在3个剂量水平进行测试,每个水平使用8只小鼠。待测试的Taxol®水平为9、15、25mg/
kg。将小鼠静脉内给药Q2Dx4。用适当体积的盐水或cremophor EL/乙醇媒介物处理单独的
媒介物对照组。所有小鼠每天称重并观察临床征象。所有小鼠在最后一次剂量后保持14天
以检测任何延迟的毒性

[0238] 对于功效研究,将小鼠皮下植入30至60mg从供体动物收集的肿瘤片段。对肿瘤超
过1g或肿瘤溃烂的小鼠实施安乐死,如在发现明显痛苦或处于垂死状态的那些。当实验中
所有组的平均估计肿瘤质量为100-150mg时开始给药(Q2Dx4)。有10个治疗组(每组8只小
鼠),包括:媒介物对照组,2种媒介物各一组;Taxol®的在0.6X、1X和1.67X最大耐受剂量下
的3个治疗组;以及PALM(XT3)的在0.3X、0.6X、1X、1.7X和2.8X最大耐受剂量下的5个组。所
有小鼠每天至少观察一次临床征象。每周记录身体重量和肿瘤测量值三次。小鼠在最后一
次剂量后继续评估60天以获得肿瘤生长延迟数据。

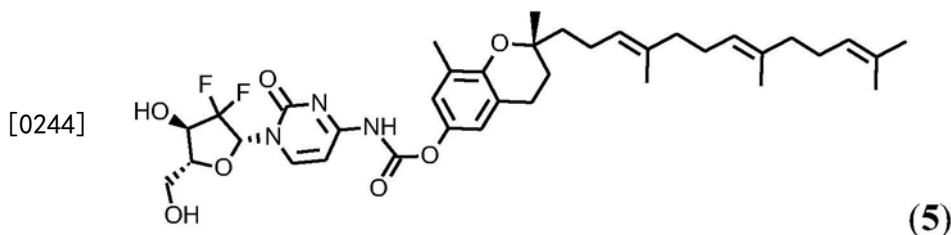
[0239] 肿瘤负荷(mg)通过假定单位密度的长椭圆体体积的式估计为:肿瘤负荷(mg) = (L
x W²)/2,其中L和W分别是用卡尺得到的正交的肿瘤长度和宽度测量值(mm)。用于评估功效
的主要终点是:1) T/C%,其定义为治疗组的中值肿瘤质量除以对照组的中值肿瘤质量x
100;2) 完全和部分肿瘤反应;3) 肿瘤生长延迟;以及4) 研究结束时的无肿瘤存活者数。通过
对数秩检验(Kaplan-Meier)分析所有研究组的评估尺寸的中值时间,以确定组间是否存在
任何显著差异。

[0240] 实施例19δ-生育三烯酚(N⁴)-吉西他滨氨基甲酸酯

[0241] 遵循Guo和Gallo(J.Org.Chem.1999,64,8319)的程序,通过用二碳酸二叔丁酯转
化成叔丁氧基羰基(BOC)酯来保护吉西他滨中的羟基,以产生(1)



[0243] 将化合物4溶解在无水二氯甲烷中至最终浓度为0.2M的化合物(4)。对于溶液中的
每摩尔化合物(4),将1.2摩尔当量的化合物(2)(0.5M浓度的二氯甲烷溶液)和3摩尔当量的
DMAP在室温下组合。将混合物在室温下搅拌24h。如所提及的,所得的产物用三氟乙酸去保
护。纯化合物通过使用二氯甲烷和甲醇洗脱液快速柱色谱获得,所述洗脱液从100%二氯
甲烷开始并逐渐将浓度增加至10%甲醇以产生标题化合物(5)。

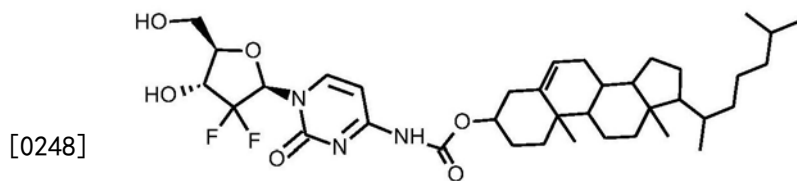


[0245] 实施例20与实施例19类似地进行(N⁴)-吉西他滨氨基甲酸酯与α、β或γ-生育三烯

酚异构体的合成。

[0246] 实施例21胆甾醇 (N^4) - 吉西他滨氨基甲酸酯

[0247] 以与实施例19所述相同的方式进行胆甾醇 (N^4) - 吉西他滨氨基甲酸酯 (6) 的合成, 除了将化合物 (4) 与胆固醇氯甲酸酯 (可商购获得) 反应并如实施例19去保护以产生标题化合物 (6)。



(6)

[0249] 实施例22经由琥珀酸和二甘醇酸连接至脂肪醇的紫杉醇

[0250] 通过将脂肪醇与4- (二甲基氨基) 吡啶和琥珀酸酐或二甘醇酸酐在无水吡啶中在室温下持续搅拌24h的情况下反应来实现经由琥珀酸酯或二甘醇酸酯二酯连接来连接至脂肪醇的紫杉醇的合成。用0.1N HCl的二氯甲烷溶液淬灭反应。通过用乙酸乙酯的石油醚溶液的制备型TLC或快速柱色谱获得产物。将醇-琥珀酸或-二甘醇酸缀合物与4- (二甲基氨基) 吡啶和N- (3-二甲基氨基丙基) -N'-乙基碳化二亚胺的干燥二氯甲烷溶液组合。将紫杉醇添加到反应混合物中。24h后, 将反应用水淬灭并用二氯甲烷萃取。通过使用乙酸乙酯/庚烷 (50:50) 作为洗脱剂的制备型TLC获得产物。

[0251] 实施例23SR-BI抗体对SKOV-3细胞中PALM (XT3) 细胞毒性的作用

[0252] 如实施例16, 将SKOV-3接种并孵育24小时。接下来, 用含有0.5%白蛋白和指示浓度的测试剂的无血清培养基 (具有或不具有抗-SRBI (1/250稀释液) (NB400-113, Novus Biologicals)) 代替生长培养基。将细胞孵育12hr。接下来, 将细胞用含有0.5%白蛋白的无血清培养基洗涤, 并在生长培养基中再生长60小时。通过MTT测定法来检测细胞生长 (图11)。

[0253] 虽然描述了本公开的多个实施方案, 但显而易见的是, 可改变基本实施例以提供使用或涵盖本发明的方法和过程的其他实施方案。这些实施方案和实施例是出于说明的目的并且不应解释为限制本公开, 而是所附权利要求书限定本发明的范围。

序列表

<110> Peptinovo Biopharma, LLC

<120> 用于改善疏水性药物功效的制剂

<130> 236603-397087

<150> PCT/US2016/041544

<151> 2016-07-08

<150> 62/190,909

<151> 2015-07-10

<160> 70

<170> PatentIn3.5 版

<210> 1

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

[0001]

<220>

<223> 合成

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> L 或 F

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> A 或 Aib

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> L 或 F

<220>

<221> MISC_FEATURE

	<222>	(9).. (9)
	<223>	A、L、F 或 Aib
	<220>	
	<221>	MISC_FEATURE
	<222>	(10).. (10)
	<223>	L 或 F
	<220>	
	<221>	MISC_FEATURE
	<222>	(11).. (11)
	<223>	A、Aib 或 N
	<220>	
	<221>	MISC_FEATURE
	<222>	(13).. (13)
	<223>	L 或 F
	<220>	
	<221>	MISC_FEATURE
	<222>	(14).. (14)
[0002]	<223>	A、L、F 或 Aib
	<220>	
	<221>	MISC_FEATURE
	<222>	(17).. (17)
	<223>	W、F 或 L
	<400>	1
	Asp Val Xaa Gln Xaa Xaa Lys Glu Xaa Xaa Xaa Gln Xaa Xaa Glu Lys	
	1	5 10 15
	Xaa Lys Gln Val	
	20	
	<210>	2
	<211>	20
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
	<220>	

<223> 合成肽

<400> 2

Asp Val Phe Gln Ala Leu Lys Glu Leu Phe Ala Gln Leu Leu Glu Lys
1 5 10 15

Trp Lys Gln Val
20

<210> 3

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

[0003] <220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> Aib

<400> 3

Asp Val Phe Gln Xaa Leu Lys Glu Leu Phe Asn Gln Leu Leu Glu Lys
1 5 10 15

Trp Lys Gln Val
20

<210> 4

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (5).. (5)

<223> Aib

<400> 4

Asp Val Phe Gln Xaa Leu Lys Glu Leu Leu Ala Gln Leu Leu Glu Lys

1 5 10 15

Phe Lys Gln Val

20

<210> 5

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

[0004] <223> 合成肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (5).. (5)

<223> Aib

<400> 5

Asp Val Phe Gln Xaa Leu Lys Glu Leu Leu Asn Gln Leu Leu Glu Lys

1 5 10 15

Phe Lys Gln Val

20

<210> 6

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (5).. (5)

<223> Aib

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (14).. (14)

<223> Aib

<400> 6

Asp Val Phe Gln Xaa Leu Lys Glu Leu Leu Asn Gln Leu Xaa Glu Lys

1

5

10

15

[0005]

Phe Lys Gln Val

20

<210> 7

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (5).. (5)

<223> Aib

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (14).. (14)

<223> Aib

<400> 7

Asp Val Phe Gln Xaa Leu Lys Glu Leu Leu Asn Gln Leu Xaa Glu Lys
1 5 10 15

Trp Lys Gln Val
20

<210> 8

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 8

[0006] Asp Val Phe Gln Ala Leu Lys Glu Leu Leu Ala Gln Leu Leu Glu Lys
1 5 10 15

Phe Lys Gln Val
20

<210> 9

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 9

Asp Val Phe Gln Ala Leu Lys Glu Leu Leu Asn Gln Leu Leu Glu Lys
1 5 10 15

Phe Lys Gln Val
20

<210> 10
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5).. (5)
<223> Aib

<400> 10

Asp Val Phe Gln Xaa Leu Lys Glu Leu Phe Ala Gln Leu Leu Glu Lys
1 5 10 15

[0007] Trp Lys Gln Val
20

<210> 11
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5).. (5)
<223> Aib

<400> 11

Asp Val Phe Gln Xaa Leu Lys Glu Leu Phe Asn Gln Leu Leu Glu Lys
1 5 10 15

Trp Lys Gln Val
20

<210> 12
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> Aib

<400> 12

[0008] Asp Val Phe Gln Xaa Leu Lys Glu Leu Phe Asn Gln Leu Leu Glu Lys
1 5 10 15

Phe Lys Gln Val
20

<210> 13
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (14)..(14)
<223> Aib

<400> 13

Asp Val Phe Gln Ala Leu Lys Glu Leu Phe Ala Gln Leu Xaa Glu Lys
1 5 10 15

Trp Lys Gln Val
20

<210> 14

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (14)..(14)

<223> Aib

[0009]

<400> 14

Asp Val Phe Gln Ala Leu Lys Glu Leu Phe Asn Gln Leu Xaa Glu Lys
1 5 10 15

Trp Lys Gln Val
20

<210> 15

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (14).. (14)

<223> Aib

<400> 15

Asp Val Phe Gln Ala Leu Lys Glu Leu Phe Asn Gln Leu Xaa Glu Lys

1 5 10 15

Phe Lys Gln Val

20

<210> 16

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

[0010]

<400> 16

Asp Val Phe Gln Ala Phe Lys Glu Ala Phe Ala Gln Leu Phe Glu Lys

1 5 10 15

Trp Lys Gln Val

20

<210> 17

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (9).. (9)

<223> Aib

<400> 17

Asp Val Phe Gln Ala Phe Lys Glu Xaa Phe Ala Gln Leu Phe Glu Lys
1 5 10 15

Trp Lys Gln Val
20

<210> 18

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

[0011]

<220>

<221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> Aib

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (9)..(9)

<223> Aib

<400> 18

Asp Val Phe Gln Xaa Phe Lys Glu Xaa Phe Ala Gln Leu Phe Glu Lys
1 5 10 15

Trp Lys Gln Val
20

<210> 19

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (11)..(11)

<223> Aib

<400> 19

Asp Val Phe Gln Ala Phe Lys Glu Ala Phe Xaa Gln Leu Phe Glu Lys
1 5 10 15

Trp Lys Gln Val
20

[0012]

<210> 20

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (9)..(9)

<223> Aib

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (11)..(11)

<223> Aib

<400> 20

Asp Val Phe Gln Ala Phe Lys Glu Xaa Phe Xaa Gln Leu Phe Glu Lys
1 5 10 15

Trp Lys Gln Val
20

<210> 21
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5).. (5)
<223> Aib

[0013]

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (9).. (9)
<223> Aib

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (11).. (11)
<223> Aib

<400> 21

Asp Val Phe Gln Xaa Phe Lys Glu Xaa Phe Xaa Gln Leu Phe Glu Lys
1 5 10 15

Trp Lys Gln Val
20

<210> 22
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 22

Asp Val Phe Gln Ala Leu Lys Glu Leu Phe Asn Gln Leu Leu Glu Lys
1 5 10 15

Trp Lys Gln Val
20

<210> 23

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

[0014]

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> Aib

<400> 23

Asp Val Phe Gln Xaa Leu Lys Glu Leu Leu Asn Gln Leu Leu Glu Lys
1 5 10 15

Leu Lys Gln Val
20

<210> 24

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

	<223> 合成肽
	<220>
	<221> MISC_FEATURE
	<222> (1).. (1)
	<223> D 或 E
	<220>
	<221> MISC_FEATURE
	<222> (2).. (2)
	<223> V、I 或 L
	<220>
	<221> MISC_FEATURE
	<222> (3).. (3)
	<223> L、I、V、W、Y、Aib、Amv、或 F
	<220>
[0015]	<221> MISC_FEATURE
	<222> (4).. (4)
	<223> Q 或 N
	<220>
	<221> MISC_FEATURE
	<222> (5).. (5)
	<223> K、R、H 或 Orn
	<220>
	<221> MISC_FEATURE
	<222> (6).. (6)
	<223> L、I、V、W、Y、Aib、Amv、或 F
	<220>
	<221> MISC_FEATURE
	<222> (7).. (7)
	<223> A、G、S、V、Aib 或 Amv
	<220>
	<221> MISC_FEATURE
	<222> (8).. (8)
	<223> E 或 D

[0016]

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (9).. (9)
<223> A、G、S、L、F、V、Amv 或 Aib

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (10).. (10)
<223> L、I、V、W、Y、Aib、Amv、或 F

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (11).. (11)
<223> A、G、S、Aib、Amv、V 或 N

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (12).. (12)
<223> Q 或 N

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (13).. (13)
<223> L、I、V、W、Y、Aib、Amv 或 F

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (14).. (14)
<223> A、G、S、L、F、V、Amv 或 Aib

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (15).. (15)
<223> E 或 D

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (16).. (16)
<223> K、R、H 或 Orn

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (17).. (17)
<223> W、F、Y、I、V、或 L

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (18).. (18)
<223> K、R、H 或 Orn

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (19).. (19)
<223> Q 或 N

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (20).. (20)
<223> V、I、或 L

<400> 24

Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
1				5				10						15	

[0017] Xaa Xaa Xaa Xaa
20

<210> 25
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7).. (7)
<223> Aib

<400> 25

Asp	Val	Phe	Gln	Lys	Leu	Xaa	Glu	Leu	Phe	Asn	Gln	Leu	Leu	Glu	Lys
1				5				10						15	

Trp Lys Gln Val
20

<210> 26
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 26

Asp Val Phe Gln Lys Leu Val Glu Leu Phe Asn Gln Leu Leu Glu Lys
1 5 10 15

Trp Lys Gln Val
20

[0018]

<210> 27
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3).. (3)
<223> Aib

<400> 27

Asp Val Xaa Gln Lys Leu Phe Glu Leu Phe Asn Gln Leu Leu Glu Lys
1 5 10 15

Trp Lys Gln Val
20

<210> 28
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> Aib

<400> 28

[0019] Asp Val Phe Gln Lys Leu Xaa Glu Leu Phe Asn Gln Leu Leu Glu Lys
1 5 10 15

Phe Lys Gln Val
20

<210> 29
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 29

Asp Val Phe Gln Lys Leu Val Glu Leu Phe Asn Gln Leu Leu Glu Lys
1 5 10 15

Phe Lys Gln Val
20

<210> 30
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> Aib

<400> 30

Asp	Val	Xaa	Gln	Lys	Leu	Phe	Glu	Leu	Phe	Asn	Gln	Leu	Leu	Glu	Lys
1				5					10					15	

[0020] Phe Lys Gln Val
20

<210> 31
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> Aib

<400> 31

Asp	Val	Leu	Gln	Lys	Phe	Xaa	Glu	Leu	Phe	Asn	Gln	Leu	Leu	Glu	Lys
1				5					10					15	

Trp Lys Gln Val
20

<210> 32
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> Aib

<400> 32

[0021] Asp Val Xaa Gln Lys Phe Leu Glu Leu Phe Asn Gln Leu Leu Glu Lys
1 5 10 15

Trp Lys Gln Val
20

<210> 33
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (9)..(9)
<223> Aib

<400> 33

Asp Val Phe Gln Lys Leu Leu Glu Xaa Phe Asn Gln Leu Leu Glu Lys
1 5 10 15

Trp Lys Gln Val
20

<210> 34

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

[0022] <222> (7)..(7)

<223> Aib

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (13)..(13)

<223> Aib

<400> 34

Asp Val Phe Gln Lys Leu Xaa Glu Leu Phe Asn Gln Xaa Leu Glu Lys
1 5 10 15

Trp Lys Gln Val
20

<210> 35

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (7).. (7)

<223> Aib

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (14).. (14)

<223> Aib

<400> 35

Asp Val Phe Gln Lys Leu Xaa Glu Leu Phe Asn Gln Leu Xaa Glu Lys

1

5

10

15

Trp Lys Gln Val

20

[0023]

<210> 36

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (4).. (4)

<223> W、F 或 L

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (7).. (7)

<223> A、L、F 或 Aib

<220>

	<221>	MISC_FEATURE
	<222>	(8).. (8)
	<223>	L 或 F
	<220>	
	<221>	MISC_FEATURE
	<222>	(10).. (10)
	<223>	A、Aib 或 N
	<220>	
	<221>	MISC_FEATURE
	<222>	(11).. (11)
	<223>	L 或 F
	<220>	
	<221>	MISC_FEATURE
	<222>	(12).. (12)
	<223>	A、L、F 或 Aib
[0024]	<220>	
	<221>	MISC_FEATURE
	<222>	(15).. (15)
	<223>	L 或 F
	<220>	
	<221>	MISC_FEATURE
	<222>	(16).. (16)
	<223>	A 或 Aib
	<220>	
	<221>	MISC_FEATURE
	<222>	(18).. (18)
	<223>	L 或 F
	<400>	36
	Val Gln Lys Xaa Lys Glu Xaa Xaa Gln Xaa Xaa Xaa Glu Lys Xaa Xaa	
	1 5 10 15	
	Gln Xaa Val Asp	
	20	

<210> 37
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 37

Val Gln Lys Trp Lys Glu Leu Leu Gln Ala Phe Leu Glu Lys Leu Ala
1 5 10 15

Gln Phe Val Asp
20

[0025]

<210> 38
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (16).. (16)
<223> Aib

<400> 38

Val Gln Lys Trp Lys Glu Leu Leu Gln Asn Phe Leu Glu Lys Leu Xaa
1 5 10 15

Gln Phe Val Asp
20

<210> 39
<211> 20

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (16).. (16)
<223> Aib

<400> 39

Val	Gln	Lys	Phe	Lys	Glu	Leu	Leu	Gln	Ala	Leu	Leu	Glu	Lys	Leu	Xaa
1				5					10					15	

Gln	Phe	Val	Asp
			20

[0026]

<210> 40
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (16).. (16)
<223> Aib

<400> 40

Val	Gln	Lys	Phe	Lys	Glu	Leu	Leu	Gln	Asn	Leu	Leu	Glu	Lys	Leu	Xaa
1				5					10					15	

Gln	Phe	Val	Asp
			20

<210> 41
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7).. (7)
<223> Aib

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (16).. (16)
<223> Aib

<400> 41

[0027]

Val Gln Lys Phe Lys Glu Xaa Leu Gln Asn Leu Leu Glu Lys Leu Xaa
1 5 10 15

Gln Phe Val Asp
20

<210> 42
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<220>
<221> misc_feature
<222> (7).. (7)
<223> Aib

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (16)..(16)

<223> Aib

<400> 42

Val Gln Lys Trp Lys Glu Xaa Leu Gln Asn Leu Leu Glu Lys Leu Xaa
1 5 10 15

Gln Phe Val Asp
20

<210> 43

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

[0028]

<220>

<223> 合成肽

<400> 43

Val Gln Lys Phe Lys Glu Leu Leu Gln Ala Leu Leu Glu Lys Leu Ala
1 5 10 15

Gln Phe Val Asp
20

<210> 44

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 44

Val Gln Lys Phe Lys Glu Leu Leu Gln Asn Leu Leu Glu Lys Leu Ala
1 5 10 15

Gln Phe Val Asp
20

<210> 45
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (16).. (16)
<223> Aib

[0029]

<400> 45

Val Gln Lys Trp Lys Glu Leu Leu Gln Ala Phe Leu Glu Lys Leu Xaa
1 5 10 15

Gln Phe Val Asp
20

<210> 46
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (16).. (16)

<223> Aib

<400> 46

Val Gln Lys Trp Lys Glu Leu Leu Gln Asn Phe Leu Glu Lys Leu Xaa
1 5 10 15

Gln Phe Val Asp
20

<210> 47

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

[0030]

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (16)..(16)

<223> Aib

<400> 47

Val Gln Lys Phe Lys Glu Leu Leu Gln Asn Phe Leu Glu Lys Leu Xaa
1 5 10 15

Gln Phe Val Asp
20

<210> 48

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (7).. (7)

<223> Aib

<400> 48

Val Gln Lys Trp Lys Glu Xaa Leu Gln Ala Phe Leu Glu Lys Leu Ala
1 5 10 15

Gln Phe Val Asp
20

<210> 49

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

[0031] <223> 合成肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (7).. (7)

<223> Aib

<400> 49

Val Gln Lys Trp Lys Glu Xaa Leu Gln Asn Phe Leu Glu Lys Leu Ala
1 5 10 15

Gln Phe Val Asp
20

<210> 50

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> Aib

<400> 50

Val Gln Lys Phe Lys Glu Xaa Leu Gln Asn Phe Leu Glu Lys Leu Ala
1 5 10 15

Gln Phe Val Asp
20

<210> 51

<211> 20

[0032]

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 51

Val Gln Lys Trp Lys Glu Phe Leu Gln Ala Phe Ala Glu Lys Phe Ala
1 5 10 15

Gln Phe Val Asp
20

<210> 52

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (12)..(12)

<223> Aib

<400> 52

Val Gln Lys Trp Lys Glu Phe Leu Gln Ala Phe Xaa Glu Lys Phe Ala
1 5 10 15

Gln Phe Val Asp
20

<210> 53

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

[0033]

<220>

<223> 合成肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (12)..(12)

<223> Aib

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (16)..(16)

<223> Aib

<400> 53

Val Gln Lys Trp Lys Glu Phe Leu Gln Ala Phe Xaa Glu Lys Phe Xaa
1 5 10 15

Gln Phe Val Asp

20

<210> 54
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (10).. (10)
<223> Aib

<400> 54

Val Gln Lys Trp Lys Glu Phe Leu Gln Xaa Phe Ala Glu Lys Phe Ala
1 5 10 15

[0034]

Gln Phe Val Asp
20

<210> 55
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (10).. (10)
<223> Aib

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (12).. (12)

<223> Aib

<400> 55

Val Gln Lys Trp Lys Glu Phe Leu Gln Xaa Phe Xaa Glu Lys Phe Ala
1 5 10 15

Gln Phe Val Asp
20

<210> 56

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

[0035]

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (10)..(10)

<223> Aib

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (12)..(12)

<223> Aib

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (16)..(16)

<223> Aib

<400> 56

Val Gln Lys Trp Lys Glu Phe Leu Gln Xaa Phe Xaa Glu Lys Phe Xaa
1 5 10 15

Gln Phe Val Asp
20

<210> 57
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 57

Val Gln Lys Trp Lys Glu Leu Leu Gln Asn Phe Leu Glu Lys Leu Ala
1 5 10 15

Gln Phe Val Asp
20

[0036]

<210> 58
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (16)..(16)
<223> Aib

<400> 58

Val Gln Lys Leu Lys Glu Leu Leu Gln Asn Leu Leu Glu Lys Leu Xaa
1 5 10 15

Gln Phe Val Asp
20

	<210>	59
	<211>	20
	<212>	PRT
	<213>	人工序列
	<220>	
	<223>	合成肽
	<220>	
	<221>	MISC_FEATURE
	<222>	(1)..(1)
	<223>	V、I 或 L
	<220>	
	<221>	MISC_FEATURE
	<222>	(2)..(2)
	<223>	Q 或 N
	<220>	
	<221>	MISC_FEATURE
[0037]	<222>	(3)..(3)
	<223>	K、R、H 或 Orn
	<220>	
	<221>	MISC_FEATURE
	<222>	(4)..(4)
	<223>	W、F、Y、I、V 或 L
	<220>	
	<221>	MISC_FEATURE
	<222>	(5)..(5)
	<223>	K、R、H 或 Orn
	<220>	
	<221>	MISC_FEATURE
	<222>	(6)..(6)
	<223>	E 或 D
	<220>	
	<221>	MISC_FEATURE
	<222>	(7)..(7)
	<223>	A、G、S、L、F、V、Amv 或 Aib

[0038]

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8).. (8)
<223> L、I、V、W、Aib、Amv、或 F

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (9).. (9)
<223> Q 或 N

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (10).. (10)
<223> A、G、S、Aib、Amv、V 或 N

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (11).. (11)
<223> L、I、V、W、Aib、Amv、或 F

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (12).. (12)
<223> A、G、S、L、F、V、Amv 或 Aib

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (13).. (13)
<223> E 或 D

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (14).. (14)
<223> A、G、S、V、Aib 或 Amv

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (15).. (15)
<223> L、I、V、W、Aib、Amv、或 F

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (16).. (16)
<223> K、R、H 或 Orn

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (17).. (17)
<223> Q 或 N

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (18).. (18)
<223> L、I、V、W、Aib、Amv、或 F

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (19).. (19)
<223> V、I 或 L

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (20).. (20)
<223> E 或 D

<400> 59

[0039]

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa
20

<210> 60
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (14).. (14)
<223> Aib

<400> 60

Val Gln Lys Trp Lys Glu Leu Leu Gln Asn Phe Leu Glu Xaa Leu Lys
1 5 10 15

Gln Phe Val Asp
20

<210> 61

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 61

[0040] Val Gln Lys Trp Lys Glu Leu Leu Gln Asn Phe Leu Glu Val Leu Lys
1 5 10 15

Gln Phe Val Asp
20

<210> 62

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (18)..(18)

<223> Aib

<400> 62

Val Gln Lys Trp Lys Glu Leu Leu Gln Asn Phe Leu Glu Phe Leu Lys
1 5 10 15

Gln Xaa Val Asp
20

<210> 63
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (14)..(14)
<223> Aib

[0041]

<400> 63

Val Gln Lys Phe Lys Glu Leu Leu Gln Asn Phe Leu Glu Xaa Leu Lys
1 5 10 15

Gln Phe Val Asp
20

<210> 64
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 64

Val Gln Lys Phe Lys Glu Leu Leu Gln Asn Phe Leu Glu Val Leu Lys

1 5 10 15

Gln Phe Val Asp

20

<210> 65

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (18)..(18)

<223> Aib

[0042]

<400> 65

Val Gln Lys Phe Lys Glu Leu Leu Gln Asn Phe Leu Glu Phe Leu Lys

1 5 10 15

Gln Xaa Val Asp

20

<210> 66

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (14)..(14)

<223> Aib

<400> 66

Val Gln Lys Trp Lys Glu Leu Leu Gln Asn Phe Leu Glu Xaa Phe Lys
1 5 10 15

Gln Leu Val Asp
20

<210> 67

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<220>

[0043] <221> MISC_FEATURE

<222> (18).. (18)

<223> Aib

<400> 67

Val Gln Lys Trp Lys Glu Leu Leu Gln Asn Phe Leu Glu Leu Phe Lys
1 5 10 15

Gln Xaa Val Asp
20

<210> 68

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (12).. (12)

<223> Aib

<400> 68

Val Gln Lys Trp Lys Glu Leu Leu Gln Asn Phe Xaa Glu Leu Leu Lys

1 5 10 15

Gln Phe Val Asp

20

<210> 69

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

[0044]

<220>

<223> 合成肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (8).. (8)

<223> Aib

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (14).. (14)

<223> Aib

<400> 69

Val Gln Lys Trp Lys Glu Leu Xaa Gln Asn Phe Leu Glu Xaa Leu Lys

1 5 10 15

Gln Phe Val Asp

20

<210> 70
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7).. (7)
<223> Aib

[0045]

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (14).. (14)
<223> Aib

<400> 70

Val Gln Lys Trp Lys Glu Xaa Leu Gln Asn Phe Leu Glu Xaa Leu Lys
1 5 10 15

Gln Phe Val Asp
20

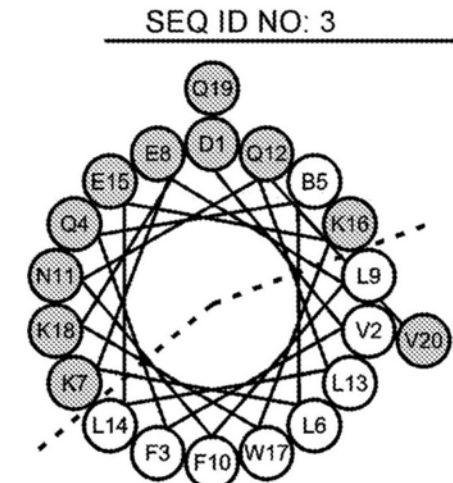


图 1A

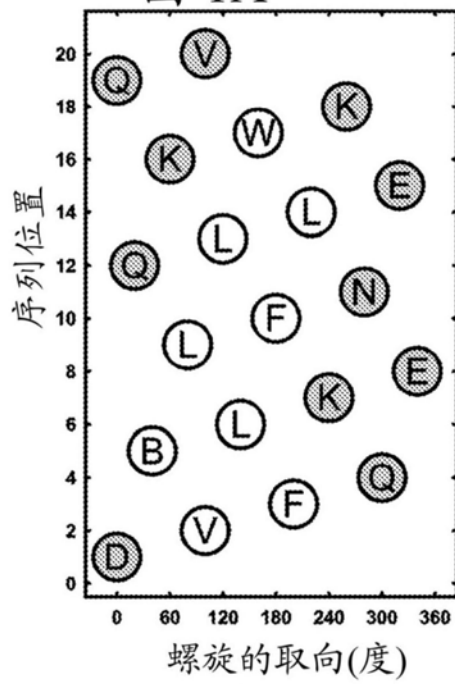


图 1C

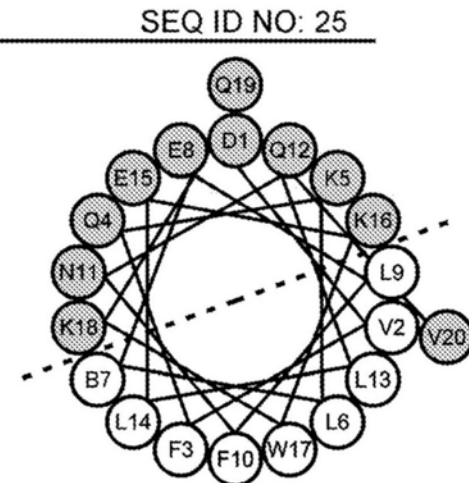


图 1B

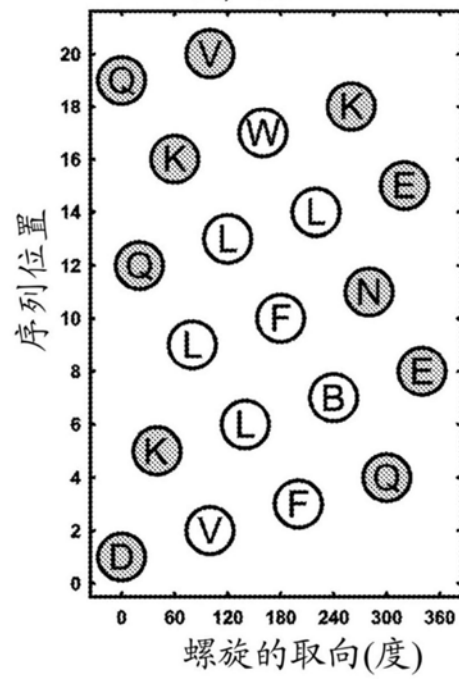


图 1D

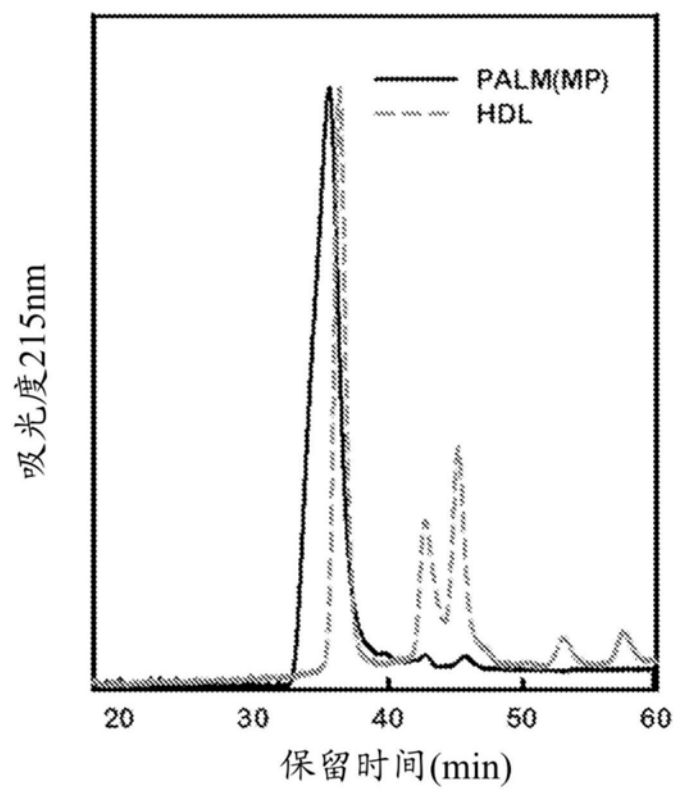


图2

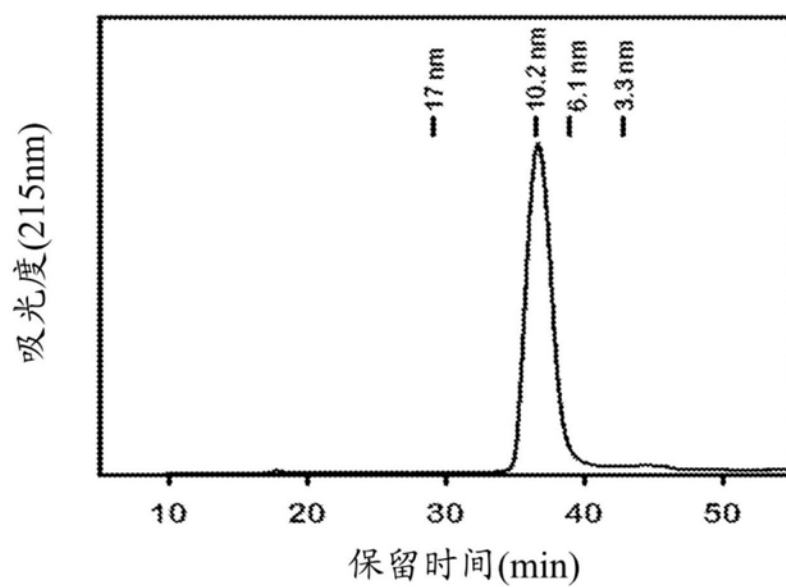


图3

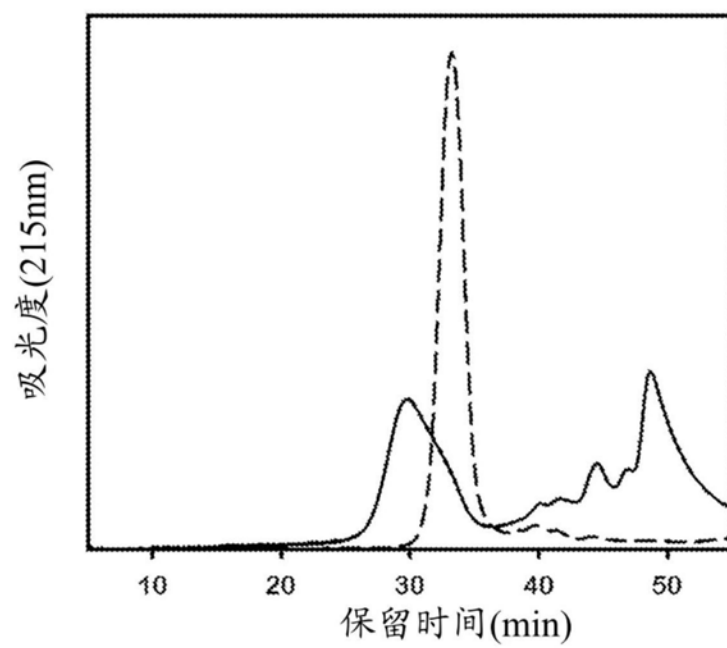


图4

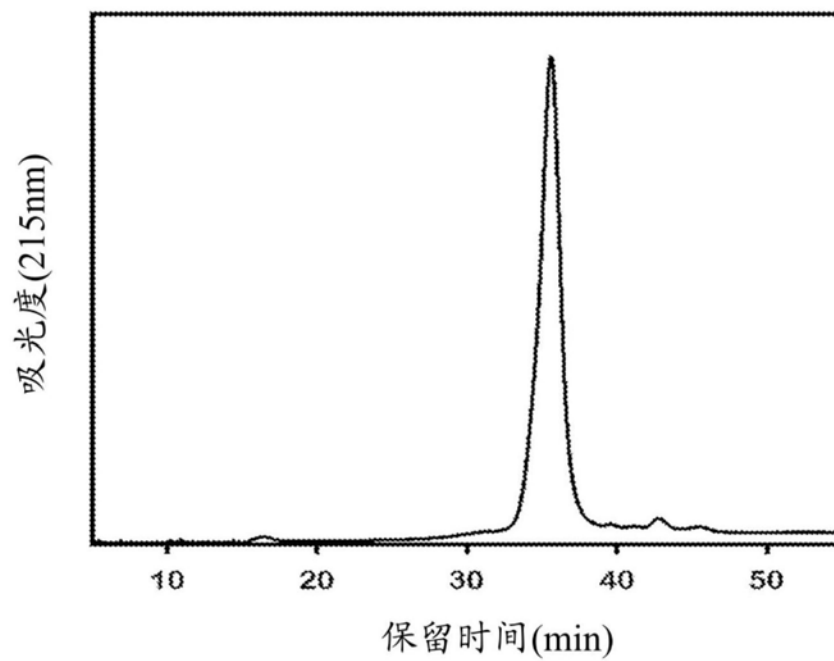


图5

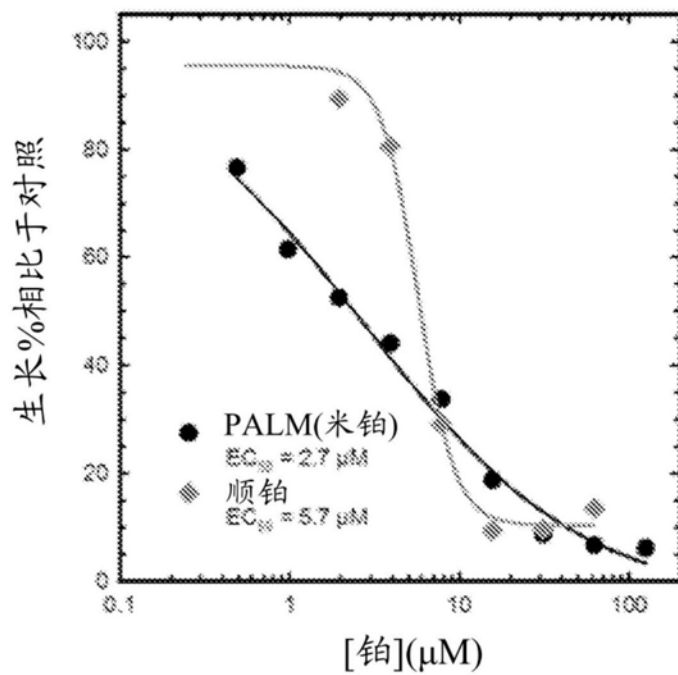


图6

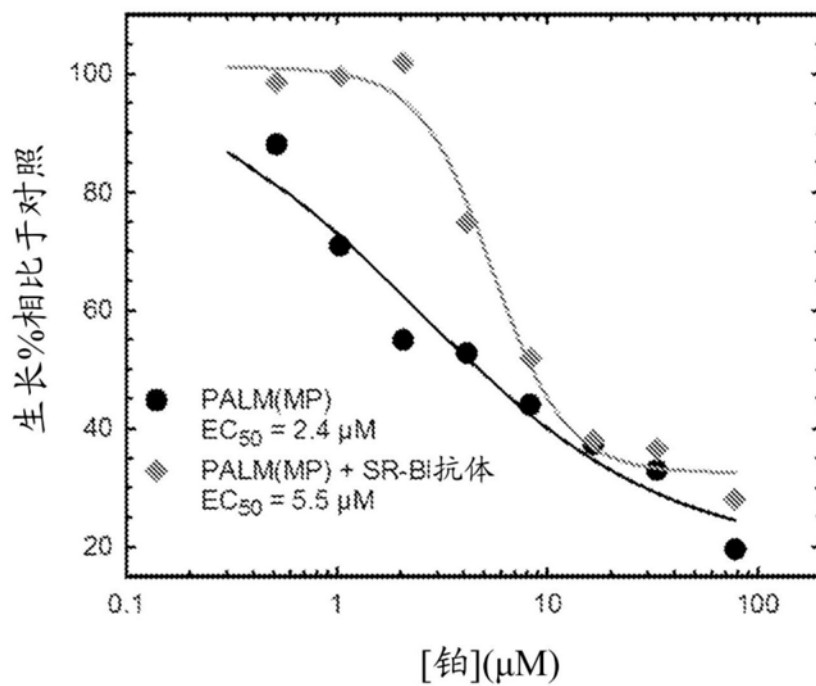


图7

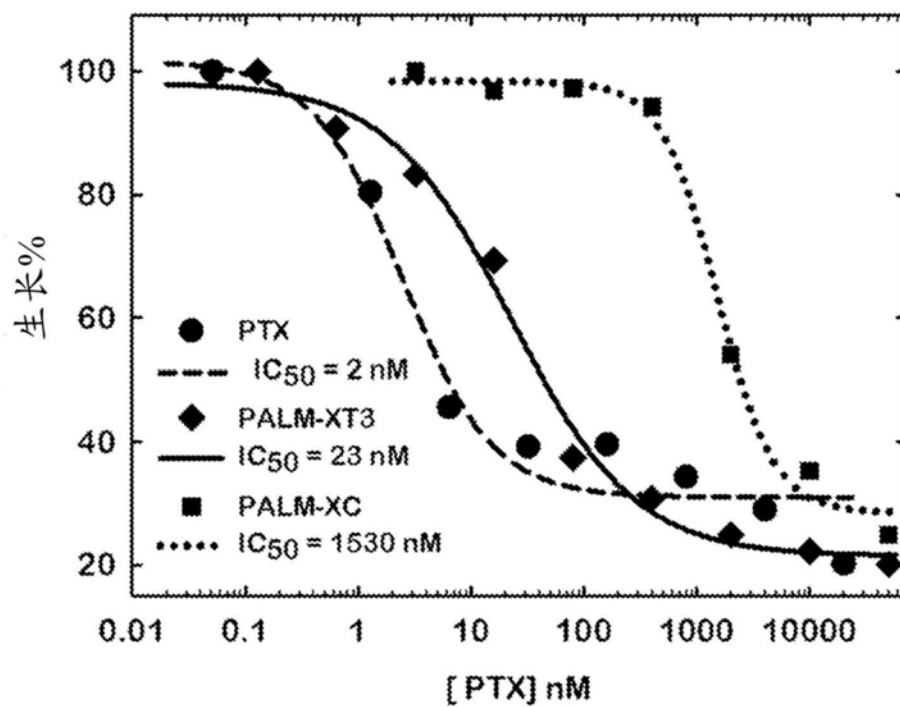


图8

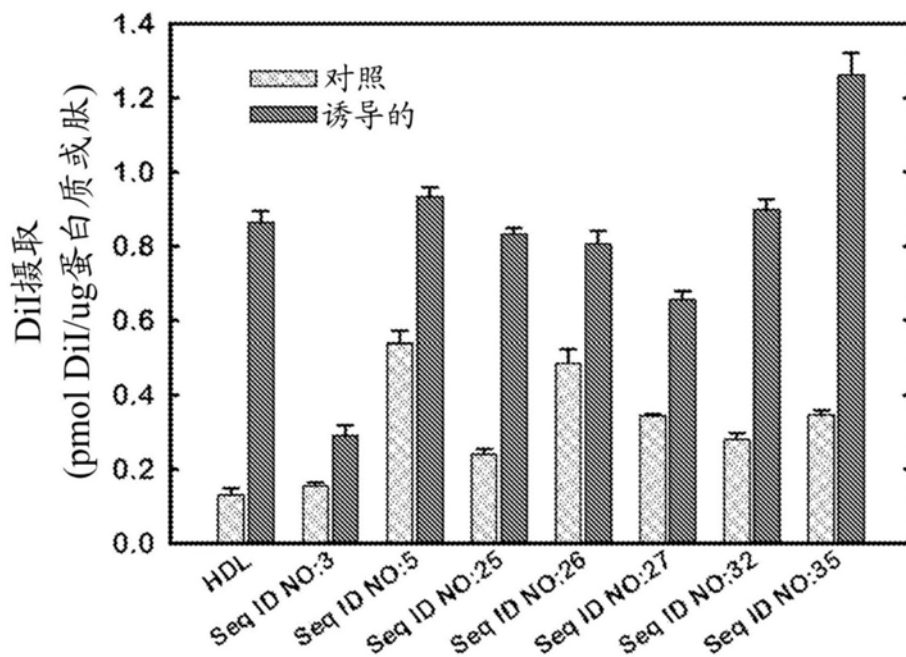


图9

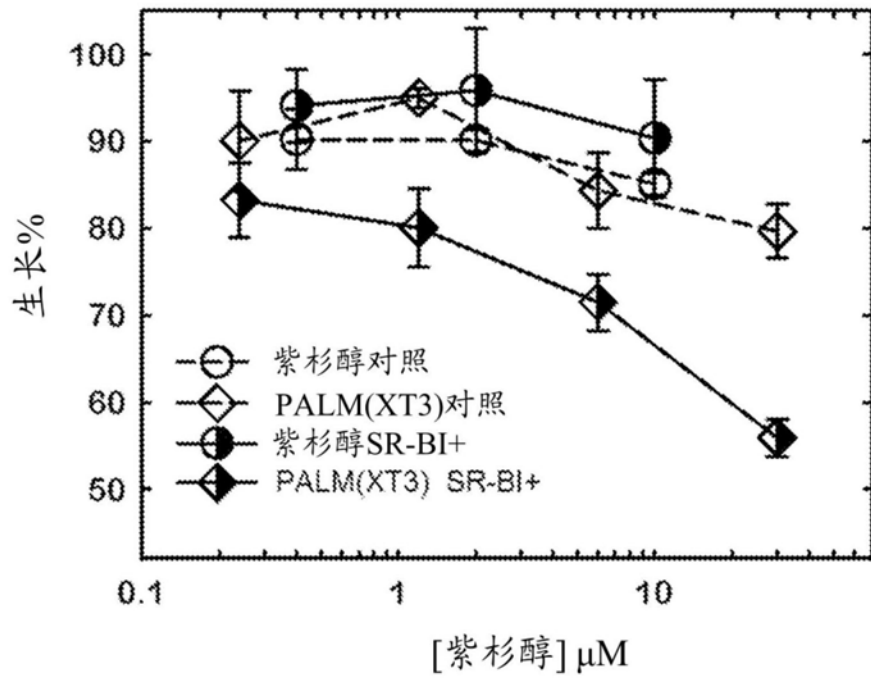


图10

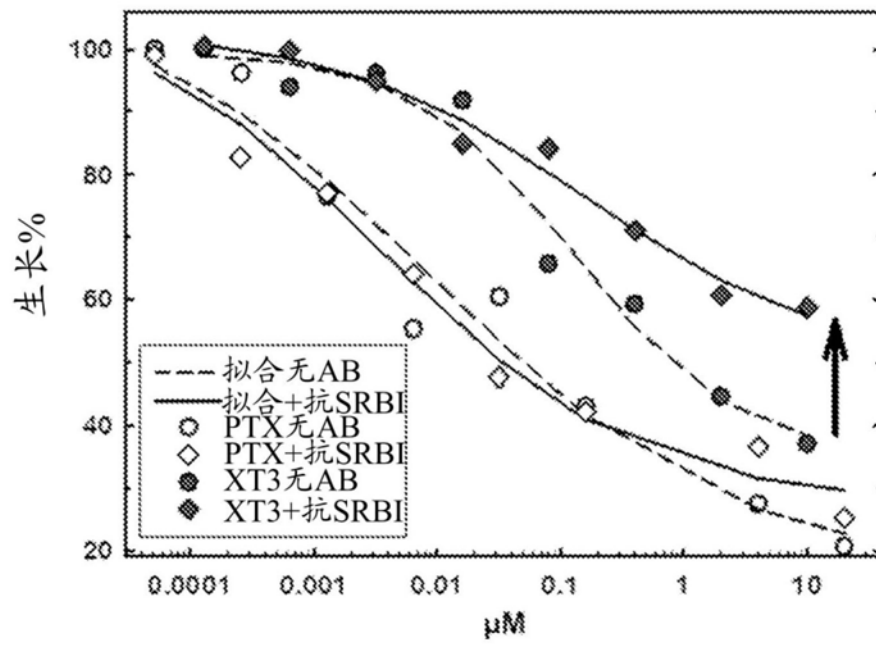


图11