



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109310741 A

(43)申请公布日 2019.02.05

(21)申请号 201780038507.8

(74)专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262

(22)申请日 2017.04.28

代理人 贺淑东

(30)优先权数据

62/329,743 2016.04.29 US

(51)Int.Cl.

A61K 38/17(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.12.20

A61K 38/18(2006.01)

A61K 45/06(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2017/030100 2017.04.28

C07K 7/06(2006.01)

C07K 7/08(2006.01)

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/189988 EN 2017.11.02

C07K 14/47(2006.01)

C07K 14/505(2006.01)

(71)申请人 阿拉伊姆药品公司

地址 美国纽约州

C12N 15/63(2006.01)

A61P 31/12(2006.01)

(72)发明人 迈克尔·布莱尼 安东尼·赛拉米

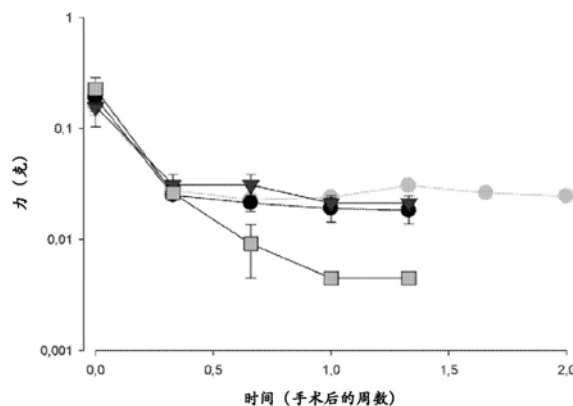
权利要求书2页 说明书53页
序列表4页 附图2页

(54)发明名称

用于预防和治疗与组织损伤相关的疾病和障碍的组织保护肽

(57)摘要

本文提供了具有组织保护活性的肽和肽类似物。肽和肽类似物用于预防和治疗与组织损伤相关的各种疾病和障碍。



1. 一种4至30个氨基酸的分离的肽,其包含在响应性细胞、组织或器官中具有组织保护活性的GDKA (SEQ ID NO:3)。

2. 一种分离的肽,其包含由GDKARYEREM (SEQ ID NO:1)、GDKARYEREA (SEQ ID NO:2) 或GDKA (SEQ ID NO:3) 组成的氨基酸序列。

3. 权利要求1所述的分离的肽,其包含GDKARYEREM (SEQ ID NO:1) 或GDKARYEREA (SEQ ID NO:2)。

4. 一种药物组合物,其包含权利要求1-3中任一项所述的分离的肽和药学上可接受的载体。

5. 权利要求4所述的药物组合物,其中所述组合物配制用于口服、鼻内、眼部、吸入、透皮、直肠、舌下或肠胃外施用。

6. 权利要求4所述的药物组合物,其中所述组合物配制为灌注溶液。

7. 一种治疗患有与组织损伤相关的疾病的对象的方法,所述方法包括向所述对象施用有效量的权利要求1-3中任一项所述的分离的肽或权利要求4-6中任一项所述的药物组合物的步骤。

8. 权利要求7所述的方法,其中所述与组织损伤相关的疾病是癌症、缺血性损伤、创伤性损伤、毒性或炎性损伤。

9. 权利要求7所述的方法,其中所述与组织损伤相关的疾病是心血管疾病、心肺疾病、呼吸疾病、肾病、泌尿系统疾病、生殖系统疾病、骨病、皮肤病、胃肠道疾病、内分泌异常、代谢异常、衰老、前驱糖尿病、认知功能障碍或中枢或外周神经系统的疾病或障碍。

10. 一种预防、治疗、改善或控制有需要的对象的癌症、肿瘤疾病、炎症或毒剂暴露的方法,包括向所述受试者施用有效量的权利要求1-3中任一项所述的分离的肽或权利要求4-6中任一项所述的药物组合物。

11. 权利要求7-10所述的方法,其中所述与组织损伤相关的疾病是癌症。

12. 权利要求11所述的方法,其中所述癌症是浸润性乳腺癌、侵袭前乳腺癌、炎性乳腺癌、佩吉特氏病、转移性乳腺癌、复发性乳腺癌、阑尾癌、胆管癌、肝外胆管癌、结肠癌、食道癌、胆囊癌、胃癌、肠癌、肝癌、胰腺癌、直肠癌、胃癌、肾上腺癌、膀胱癌、肾癌、阴茎癌、前列腺癌、睾丸癌、泌尿系统癌、宫颈癌、子宫内膜癌、输卵管癌、卵巢癌、子宫癌、阴道癌、外阴癌、眼癌、头颈癌、颌癌、喉癌、咽癌、口腔癌、鼻腔癌、唾液腺癌、鼻窦癌、咽喉癌、甲状腺癌、舌癌、扁桃腺癌、霍奇金病、白血病、急性淋巴细胞白血病、急性粒细胞白血病、急性髓性白血病、慢性淋巴细胞白血病、慢性髓性白血病、多发性骨髓瘤、淋巴瘤、B-细胞淋巴瘤、淋巴结癌、骨癌、骨肉瘤、黑色素瘤、皮肤癌、基底细胞癌、鳞状细胞癌、肉瘤、尤文氏肉瘤、卡波西氏肉瘤、脑癌、星形细胞瘤、胶质母细胞瘤、神经胶质瘤、脑垂体腺癌、脊髓癌、肺癌、腺癌、燕麦细胞癌、非小细胞肺癌、小细胞肺癌、鳞状细胞癌或间皮瘤。

13. 权利要求7-10所述的方法,其中所述与组织损伤相关的疾病为炎症。

14. 权利要求13所述的方法,其中所述炎症为阑尾炎、睑缘炎、支气管炎、滑囊炎、宫颈炎、胆管炎、胆囊炎、绒毛膜羊膜炎、结膜炎、膀胱炎、泪腺炎、皮炎、心内膜炎、子宫内膜炎、上颌炎、附睾炎、纤维组织炎、胃炎、牙龈炎、舌炎、化脓性汗腺炎、虹膜炎、喉炎、乳腺炎、心肌炎、肌炎、肾炎、脐炎、卵巢炎、睾丸炎、骨炎、耳炎、腮腺炎、心包炎、腹膜炎、咽炎、胸膜炎、静脉炎、局限性肺炎(肺炎)、前列腺炎、肾盂肾炎、鼻炎、输卵管炎、鼻窦炎、口腔炎、滑膜炎、扁

桃体炎、葡萄膜炎、尿道炎、阴道炎、外阴炎、哮喘、系统性红斑狼疮、重症肌无力、肌腱炎、脉管炎、慢性支气管炎、胰腺炎、骨髓炎、类风湿性关节炎、银屑病关节炎、肾小球肾炎、视神经炎、颞动脉炎、脑炎、脑膜炎、横贯性脊髓炎、皮炎、多肌炎、坏死性筋膜炎、肝炎、坏死性小肠结肠炎、盆腔炎、炎性肠病、溃疡性结肠炎、克罗恩病、回肠炎、肠炎、直肠炎、血管炎、血管狭窄、再狭窄、低血压、1型糖尿病、2型糖尿病、前驱糖尿病、未用药2型糖尿病、川崎病、德尔肯氏病、慢性阻塞性肺病、银屑病、动脉粥样硬化、硬皮病、干燥综合征、混合性结缔组织病、酒渣鼻、胃溃疡、十二指肠溃疡、阿尔茨海默病、成年发作型斯提耳氏病、急性视网膜色素上皮炎、白化病综合征、白塞氏病、白点综合征、急性后极部多灶性鳞状色素上皮病变、匍行性脉络膜炎、鸟枪弹样脉络膜视网膜病变、多灶性脉络膜炎伴全葡萄膜炎、弥漫性视网膜下纤维化综合征、点状内层脉络膜病变、多发性一过性白点综合征、弥漫性单侧亚急性视神经视网膜炎、环状肉芽肿、肠易激综合征、乳糜泻、胃肠炎、格雷夫斯病、多发性硬化、迪皮特朗挛缩、移植排斥疾病、同种异体移植物排斥、移植物抗宿主病、皮肤移植排斥、实体器官移植排斥、骨髓移植排斥、炎症性皮肤病、病毒皮肤病(如源自人乳头瘤病毒、HIV或RLV感染的那些)、细菌、真菌和/或其他寄生虫皮肤病、皮肤红斑狼疮、高IgG4病、过敏、过敏性疾病、由钝性创伤引起的炎症、由挫伤引起的炎症、炎症引起的过敏、风湿性疾病、儿童关节炎、类风湿性关节炎、Churg-Strauss综合征、纤维肌痛、巨细胞(颞)动脉炎、痛风、过敏性紫癜、过敏性血管炎、强直性脊柱炎、囊炎、风湿热、风湿性心脏病、系统性红斑狼疮、风湿性多肌痛、骨关节炎、结节性多动脉炎、赖特综合征、运动相关损伤、跑步膝、网球肘、肩周炎、阿基里斯腱炎、足底筋膜炎、滑囊炎、Osgood-Schlatter病、重复性压力损伤、累积性创伤疾病、局限性肌张力障碍、腕管综合征、交叉综合征、反射交感神经营养不良综合征、狭窄性腱鞘炎、狄魁文氏综合征、扳机指/扳机拇指、胸廓出口综合征、肌腱炎、腱鞘炎、桡管综合征、雷诺氏病、腱鞘囊肿、游戏指、Wii损伤(Wii-itis)、由感染引起的炎症。

15. 权利要求7-10所述的方法,其中所述与组织损伤相关的疾病是由暴露于毒剂引起的。

16. 权利要求15所述的方法,其中损伤毒剂是生物制剂、化学制剂或辐射剂。

17. 权利要求7-16所述的方法,其中所述对象为哺乳动物。

18. 权利要求17所述的方法,其中所述哺乳动物是人类。

19. 一种用于保护、维持或增强从哺乳动物分离的响应性细胞、组织或器官的活力的方法,包括使所述细胞、组织或器官暴露于权利要求4-6所述的药物组合物。

20. 一种分离的核酸,其包含编码权利要求1-3中任一项所述的分离的肽的核苷酸序列。

21. 一种表达载体,其包含权利要求20所述的核酸。

22. 一种宿主细胞,其包含权利要求21所述的表达载体。

23. 一种重组产生分离的肽的方法,其包括从权利要求22所述的宿主分离肽的步骤。

用于预防和治疗与组织损伤相关的疾病和障碍的组织保护肽

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2016年4月29日提交的第62/329,743序列号美国临时申请的优先权,其全部内容通过引用并入本文。

[0003] 电子提交的序列表的引用

[0004] 本申请通过引用并入序列表,该序列表作为题为“Seqlisting 12110-025-228.txt”的文本文件与本申请同时提交,于2017年4月27日创建并且大小为4,151字节。

[0005] 1. 引言

[0006] 本文提供了用于预防或治疗与组织损伤相关的疾病或障碍和/或与所述疾病或障碍的作用或症状相关的损伤的组织保护肽和肽类似物,所述疾病或障碍包括但不限于癌症、炎症和暴露于毒剂。还提供了用这些肽调节由与组织损伤相关的疾病或障碍引起的对象的反应和/或症状的方法和用途,以治疗、预防或改善所述疾病或障碍。

[0007] 另外,本文提供了包含肽和药学上可接受的载体、赋形剂或稀释剂的药物组合物,用于治疗有需要的对象中的与组织损伤相关的疾病或障碍;或与所述疾病或障碍的作用或症状相关的损伤,包括但不限于癌症、炎症和暴露于毒剂。

[0008] 2. 背景

[0009] 组织损伤可由例如缺血性损伤、创伤性损伤、毒性损伤或炎性损伤造成的组织的实质性损失引起,其中组织内的细胞被细胞凋亡或细胞坏死破坏。组织损伤可以发生在许多急性和慢性疾病和病症中。组织损伤发生的程度由许多因素介导,包括疾病或损伤的类型,与疾病或损伤相关的炎症或创伤的水平或严重程度,组织损伤的部位以及组织的血管充足程度。

[0010] 因此,需要组织保护性治疗,其具有很少或没有潜在的有害作用并且可以容易地向公众提供。

[0011] 3. 发明概述

[0012] 本文提供了在响应性细胞、组织或器官中具有组织保护活性的分离的肽和肽类似物。在某些实施方案中,本文提供了共享GDKA的共有序列(SEQ ID NO:3)的组织保护肽和肽类似物。在某些实施方案中,肽由氨基酸序列GDKARYEREM(SEQ ID NO:1)组成。在另一个实施方案中,所述肽包含氨基酸序列GDKARYEREM(SEQ ID NO:1)。在另一个实施方案中,所述肽由氨基酸序列GDKARYEREA(SEQ ID NO:2)组成。在另一个实施方案中,所述肽包含氨基酸序列GDKARYEREA(SEQ ID NO:2)。在另一个实施方案中,所述肽由氨基酸序列GDKA(SEQ ID NO:3)组成。在另一个实施方案中,所述肽包含氨基酸序列GDKA(SEQ ID NO:3)。

[0013] 在某些实施方案中,本文提供的分离的肽或肽类似物包含4至约30个氨基酸的长度,其特征在于本文提供的肽的氨基酸序列。在某些实施方案中,本文提供的分离的肽具有10至30个氨基酸的长度,并且包含GDKARYEREM(SEQ ID NO:1)或GDKARYEREA(SEQ ID NO:2)的氨基酸序列。在某些实施方案中,提供的分离的肽具有4至30个氨基酸的长度,并且包含GDKA(SEQ ID NO:3)的氨基酸序列。这样的分离的肽还在如本文所述的响应性细胞、组织或器官中具有组织保护活性。

[0014] 在某些实施方案中,本文提供了具有至少一种组织保护活性的分离的肽和肽类似物。示范性组织保护活性包括但不限于保护、维持、增强和恢复响应性哺乳动物细胞、组织或器官的功能或活力。因此,在一个实施方案中,本文提供了本文提供的分离的肽和肽类似物用于制备用于保护、维持、增强或恢复响应性哺乳动物细胞及其相关的细胞、组织和器官的功能或活力的药物组合物的用途。在相关的实施方案中,所述药物组合物用于向有需要的对象施用。

[0015] 本文提供了包含这样的组织保护肽和肽类似物和药学上可接受的载体、赋形剂或稀释剂的药物组合物,以及用于制备这样的组合物的方法及其治疗与组织损伤相关的疾病和障碍的用途。在其他方面,本文提供了使用本文所述的分离的肽或肽类似物用于制备药物组合物的方法,所述药物组合物用于在有需要的受试者中防御或预防响应性组织损伤,用于恢复或再生响应性组织或响应性组织功能。在一个具体方面,响应性哺乳动物细胞及其相关的细胞、组织或器官凭借紧密的内皮细胞屏障而在脉管系统的远端。在另一个具体方面,细胞、组织、器官或其他机体部分是从哺乳动物体内分离的,例如用于移植的那些。在一个方面,细胞、组织或器官是可兴奋的。在某些方面,可兴奋组织是中枢神经系统组织、外周神经系统组织、心脏组织或视网膜组织。另一方面,响应性细胞或其相关的细胞、组织或器官不是可兴奋的细胞、组织或器官,它们也不主要包含可兴奋的细胞或组织。

[0016] 在另一个实施方案中,本文提供了通过施用有效量的肽在有需要的患者中预防、治疗、改善或控制炎症、癌症或肿瘤障碍或暴露于毒剂的方法。

[0017] 在某些实施方案中,本文提供了调节癌症介质的活性、机体对毒剂的反应和炎症的方法。具体地,所述方法涉及调节炎性介质的活性。在某些实施方案中,本文提供的肽能够调节一种或多种炎性介质的作用。

[0018] 在另一个实施方案中,本文提供了使细胞生长停滞的方法,包括使需要生长停滞的细胞与有效量的肽接触。

[0019] 在另一个实施方案中,本文提供了引起癌症或肿瘤细胞死亡的方法,包括使癌症或肿瘤细胞与有效量的肽接触。

[0020] 在另一个实施方案中,本文提供了抑制血管生成至癌细胞或肿瘤细胞或减少引起有丝分裂或血管生成的分子的产生的方法。

[0021] 在另一个实施方案中,本文提供了用于治疗或预防与化学治疗或放射治疗相关的副作用的方法,包括向需要这样的治疗或预防的患者施用有效量的肽。与化学治疗或放射治疗相关的副作用包括恶病质、低血细胞计数、恶心、腹泻、口腔病变和脱发。

[0022] 在另一个实施方案中,本文提供了用于治疗或预防患者中的癌症或肿瘤疾病的方法,包括使癌症或肿瘤细胞与有效量的肽接触。

[0023] 在另一个实施方案中,本文提供了治疗或预防患者中的癌症或肿瘤疾病的方法,包括向需要这样的治疗或预防的患者施用有效量的肽。

[0024] 在某些实施方案中,本文提供了所述肽用于制备药物组合物的用途,所述药物组合物用于预防、治疗、改善或管理有需要的对象中的本文所述的疾病或障碍,包括但不限于癌症或肿瘤障碍。

[0025] 在另一个实施方案中,本文提供了治疗或预防与炎症或炎性病相关的症状的方法。在另一个实施方案中,本文提供了治疗或预防有需要的患者中的炎症或炎性病的方法。

法。可通过所述方法治疗的炎性病征是过敏和过敏性疾病、风湿性疾病以及运动相关损伤。

[0026] 在另一个实施方案中,本文提供了在需要治疗的人中治疗、预防、改善或管理暴露于毒剂的作用的方法。考虑的毒剂是生物、化学和放射性制剂。

[0027] 在另一个实施方案中,本文提供了治疗、预防、改善或控制中枢神经系统或外周神经系统的疾病或障碍的症状或作用的方法。

[0028] 在另一个实施方案中,本文提供了治疗、预防、改善或控制受试者的外周神经的创伤和/或炎症的症状或作用的方法,例如但不限于,坐骨神经损伤、表皮神经纤维减少、神经病变、疼痛、神经性疼痛、神经痛、带状疱疹后神经痛、肉瘤样小纤维神经病变、背痛、糖尿病神经病变或腕管综合征的症状或作用。在一个实施方案中,本文提供了治疗、预防、改善或控制神经病变或神经性疼痛的方法。

[0029] 在另一个实施方案中,本文提供了治疗、预防、改善或控制对象中的内分泌或代谢异常的症状的方法,如I型糖尿病或II型糖尿病或前驱糖尿病。

[0030] 在另一个实施方案中,本文提供了治疗、预防、改善或控制衰老的症状的方法。

[0031] 在某些实施方案中,本文提供了包含上述分离的肽的药物组合物,用于向有需要的对象施用。在具体方面,根据该实施方案,本文提供的药物组合物还包含药学上可接受的载体。这样的药物组合物可以配制用于经口、鼻内、眼部、鼻内、吸入、透皮、直肠、舌下、阴道或肠胃外施用,或以灌注溶液的形式配制用于维持离体细胞、组织或器官的活力。在相关的实施方案中,对象是哺乳动物,例如人。

[0032] 参考以下描述和所附权利要求,将更好地理解本公开内容的这些和其他特征、方面和优点。

[0033] 4. 缩写和术语

[0034] 4.1 缩写

[0035] 如本文所使用,基因编码的L-对映异构氨基酸的缩写是常规的,并且如下所示:

[0036]

氨基酸	单字母符号	常用缩写
丙氨酸	A	Ala
精氨酸	R	Arg
天冬酰胺	N	Asn
天冬氨酸	D	Asp
半胱氨酸	C	Cys
谷氨酰胺	Q	Gln
谷氨酸	E	Glu
甘氨酸	G	Gly
组氨酸	H	His
异亮氨酸	I	Ile
亮氨酸	L	Leu

[0037]

氨基酸	单字母符号	常用缩写
赖氨酸	K	Lys
蛋氨酸	M	Met
苯丙氨酸	F	Phe
脯氨酸	P	Pro
丝氨酸	S	Ser
苏氨酸	T	Thr
色氨酸	W	Trp
酪氨酸	Y	Tyr
缬氨酸	V	Val

[0038] 4.2术语

[0039] 除非另有定义,否则本文使用的所有技术和科学术语具有所提供的肽、方法、组合物和用途所属领域的技术人员通常理解的含义。如本文所使用,除非另有说明,否则以下术语具有归属于它们的含义。

[0040] (i) 如本文所使用,术语“约”或“大约”当与数字结合使用时是指引用的数字的1、5、10、15或20%内的任何数字。

[0041] (ii) 在本文提供的方法的上下文中,术语“与.....联合施用”是指在疾病、障碍或病症发作之前、同时和/或之后施用化合物。

[0042] (iii) 术语“过敏原”是指能够产生直接型超敏反应(过敏)的抗原物质。常见的过敏原包括但不限于细菌、病毒、动物寄生虫、昆虫和昆虫叮咬、化学品(乳胶)、灰尘、尘螨、霉菌、动物皮屑、药物(如抗生素、血清,磺胺类药物、抗惊厥药、胰岛素制剂、局部麻醉剂、碘和阿司匹林)、食物(如牛奶、巧克力、草莓、鸡蛋、大豆、坚果、鱼类、贝类、小麦),香水、植物、花粉和烟。

[0043] (iv) 术语“过敏性疾病”是指由过敏引起或与过敏有关的病症或疾病。过敏性疾病包括但不限于过敏性肺病、鼻炎、鼻窦炎、特应性湿疹、接触性皮炎、过敏性结膜炎(间歇性和持续性)、春季结膜炎(花粉症)、特应性角膜结膜炎、巨乳头性结膜炎、荨麻疹、血管性水肿、过敏性肺炎、嗜酸性粒细胞性支气管炎、血管炎、过敏性血管炎、抗中性粒细胞胞浆抗体(ANCA)相关性血管炎、韦格纳肉芽肿、组胺反应、Churg Strauss血管炎、显微镜下多脉管炎、颞动脉炎、乳糜泻、肥大细胞增多症和过敏性反应。

[0044] (v) 术语“过敏症状”或“过敏反应”是指机体对过敏原的反应。过敏反应可局限于一个区域(与过敏原接触的皮肤)或泛化。过敏反应可以包括但不限于皮疹、瘙痒、荨麻疹、肿胀、呼吸困难、哮喘、血管性水肿、吞咽困难、鼻塞、流鼻涕、气短、恶心、胃痉挛、腹痛、呕吐和/或低血压。

[0045] (vi) 术语“过敏”是指由暴露于特定抗原(过敏原)诱导的超敏反应状态,导致对随后暴露的有害免疫反应。

[0046] (vii) 术语“氨基酸”或对特定氨基酸的任何提及意指包括天然存在的蛋白质性氨

氨基酸以及非天然存在的氨基酸,例如氨基酸类似物。本领域技术人员将知道,除非另有特别说明,否则该定义包括天然存在的蛋白质性(L)-氨基酸,其光学(D)-异构体,化学修饰的氨基酸,包括氨基酸类似物,如青霉胺(3-巯基-D-缬氨酸),天然存在的非蛋白质性氨基酸,例如正亮氨酸和化学合成的氨基酸,其具有本领域已知的成为氨基酸的特征。另外,术语“氨基酸等价物”是指脱离天然存在的氨基酸结构但基本上具有氨基酸结构的化合物,使得它们可以在肽内被取代,所述肽尽管有所述取代,但能保留其生物活性。因此,例如,氨基酸等价物可以包括具有侧链修饰或取代的氨基酸,并且还包含相关的有机酸、酰胺等。术语“氨基酸”旨在包括氨基酸等价物。术语“残基”是指氨基酸和氨基酸等价物二者。如本领域公知的,氨基酸也可以分为以下类别:(1)酸性=Asp、Glu;(2)碱性=Lys、Arg、His;(3)非极性(疏水性)=Cys、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met、Trp、Gly、Tyr;和(4)不带电极性=Asn、Gln、Ser、Thr。非极性可以细分为:强疏水性=Ala、Val、Leu、Ile、Met、Phe;和中度疏水性=Gly、Pro、Cys、Tyr、Trp。以供选择的方式,氨基酸谱可以分为(1)酸性=Asp、Glu;(2)碱性=Lys、Arg、His;(3)脂族=Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Ser、Thr,其中Ser和Thr任性地单独归类为脂族-羟基;(4)芳族=Phe、Tyr、Trp;(5)酰胺=Asp、Glu;和(6)含硫=Cys和Met。(参见例如,Biochemistry,第4版,L.Stryer,WH Freeman和Co.编,1995,将其通过引用整体并入本文)。

[0047] (viii) 本文所用的术语“生物制剂”是指生物体或由它们衍生的物质(如细菌、病毒、真菌和毒素),其在人类、动物或植物中引起疾病或对人类、动物或植物造成危害,或导致物质变质。这些生物制剂在自然界中无处不在,并且可以设计或优化用于战争或恐怖主义(生物恐怖主义)。这些生物制剂可以由朊病毒、病毒、微生物(细菌和真菌)和一些单细胞和多细胞真核生物(即寄生虫)组成。特别地,生物制剂(在可获得的情况下,通过它们的通用名称、生物学名称和NATO标准参考字母代码识别)可以包括但不限于霉菌剂(霉菌球孢子菌(*Coccidioides mycosis*)、OC、波萨达斯球孢子菌(*Coccidioides posadasii*)、粗球孢子菌(*Coccidioides immitis*))、细菌剂(炭疽(皮肤、吸入、胃肠道)(炭疽杆菌(*Bacillus anthracis*))、N和TR)、鼠疫(腺鼠疫、肺鼠疫)(鼠疫耶尔森菌(*Yersinia pestis*),LE)、野兔热(土拉弗朗西斯菌(*Francisella tularensis*),UL(schu S4)、TT(湿型)、ZZ(干型)和SR和JT(425))、霍乱(霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*),H0)、牛布鲁氏菌病(AB)、猪布鲁氏菌病(US和NX)、山羊布鲁氏菌病(AM和BX)、流产布鲁氏菌(*Brucella abortus*)、马耳他布鲁氏菌(*Brucella melitensis*)、猪布鲁氏菌(*Brucella suis*)、细菌性痢疾(志贺氏菌病、弯曲菌病、沙门氏菌病)(Y)、鼻疽(鼻疽伯克霍尔德菌(*Burkholderia mallei*),LA)、类鼻疽(类鼻疽伯克霍尔德菌(*Burkholderia pseudomallei*),HI)、白喉(白喉棒状杆菌(*Corynebacterium diphtheriae*),DK)、李斯特菌病(单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*),TQ))、衣原体剂(鹦鹉病“鹦鹉热”(鹦鹉热衣原体(*Chlamydia psittaci*),SI)、立克次体剂(落矶山斑疹热(立氏立克次体(*Rickettsia rickettsii*),RI和UY)、Q热(贝氏柯克斯体(*Coxiella burnetii*),OU、MN(湿型)和NT(干型))、人斑疹伤寒(普氏立克次体(*Rickettsia prowazekii*),YE)、鼠斑疹伤寒(斑疹伤寒立克次体(*Rickettsia typhi*),AV))、病毒剂(黄热病(黄病毒科虫媒病毒(*Arbovirus flaviviridae*),OJ、UT和LU)、裂谷热(RVF白蛉热病毒属布尼病毒科(*Phlebovirus bunyaviridae*),FA)、甲病毒(例如:东方马脑炎(ZX)、西方马脑炎、委内瑞拉马脑炎(NU、TD

和FX)、天花(ZL)、日本乙型脑炎(AN)、猕猴疱疹病毒1(乙型疱疹病毒)、克里米亚-刚果出血热病毒、病毒性出血热(丝状病毒科(Filoviridae)埃博拉和马尔堡病毒)和沙粒病毒科(Arenaviridae)(拉沙和马丘波)、猴痘病毒、重构的1918流感病毒、南美出血热病毒(Flexal、瓜纳里托(Guanarito)、鸠宁(Junin)、马丘波(Machupo)、萨比亚(Sabia))、蜱媒脑膜脑炎(TEBV)病毒(中欧蜱媒脑炎、远东蜱媒脑炎、Kyasanur森林病、鄂木斯克出血热、俄罗斯春夏病毒)、亨得拉病毒、尼帕病毒、汉坦病毒(朝鲜出血热)、非洲马瘟病毒、优化猪瘟病毒、赤羽病病毒、禽流感病毒、蓝舌病毒、骆驼痘病毒、古典猪瘟病毒、口蹄疫病毒、山羊痘病毒、结节性皮肤病病毒、恶性卡他热病毒(狨羚疱疹病毒1型)、Menangle病毒、新城疫病毒、小反刍兽疫病毒、狂犬病病毒、牛瘟病毒、绵羊痘病毒、猪水疱病病毒、水疱性口炎病毒)、毒素(肉毒杆菌毒素(梭菌,X和XR)、蓖麻毒素(蓖麻(Ricinus communis),W和WA)、葡萄球菌肠毒素B(UC和PG)、石房蛤毒素(麻痹性贝毒)(TZ和SS)、河豚毒素(PP)、芋螺毒素、产气荚膜梭菌ε毒素、单端孢霉烯真菌毒素(T-2毒素)、志贺毒素)和simuants(molasis residium(MR)、球芽孢杆菌(*Bacillus globigii*)(BG、BS和U)、沙雷菌(*Serratia marescens*)(SM和P)、烟曲霉(*Aspergillus fumigatus*)突变体C-2(AF)、大肠杆菌(EC)、*Bacillus thursidius*BT)、草生欧文氏菌(EH)、荧光颗粒(FP))、黑麦麦角病、麻风病、狂犬病、肠伤寒、产气荚膜梭菌(气性坏疽)、黄曲霉毒素、鼠伤寒沙门氏菌、肠毒素、阿根廷出血热、耐多药肺结核(MTB)、玻利维亚出血热、嗜肺性军团菌、海生毒素、脚气、疟疾、糙皮病、登革热、*sclerotium rolfoil*、神经营养性脑炎、志贺氏菌(Y)、SEB(UC)和真菌毒素、蛇形菌素、反刍动物考德里氏体(*Cowdria ruminantium*)、山羊支原体(*Mycoplasma capricolum*)M.F38/山羊丝状支原体(*Mycoides capri*)、丝状支原体(*Mycoplasma mycoides*)丝状、相思豆毒素。生物制剂可以靶向人(例如天花、埃博拉病毒、重构的1918流感病毒、蓖麻毒素等)、动物例如家畜(例如非洲马瘟病毒、非洲猪瘟病毒、口蹄疫病等)或两者(东方马脑炎病毒等)。此外,考虑到它们可能被重新工程化以产生更强致命性从而被用作生物武器,即使非致命性生物制剂也可能具有威胁。因此,即使造成普通感冒的病毒也可能具有风险。

[0048] (ix) 本文使用的术语“癌症”是指任何呈现如下恶性性质的异常生长:(1) 不受正常限制地生长和分裂的能力,(2) 入侵并破坏邻近组织的能力,以及(3) 在一些情况下,扩散到机体中其它部位的能力。癌症包括中枢神经系统、外周神经系统、胃肠道/消化系统、泌尿生殖器系统、妇科、头颈、血液/血、肌肉骨骼/软组织、呼吸道、和乳腺的癌症或肿瘤障碍。癌症或肿瘤障碍的另外的实例包括但不限于脑(星形细胞瘤、胶质母细胞瘤、神经胶质瘤)、脊髓、脑垂体、乳腺(浸润性、侵袭前、炎性癌症、佩吉特氏病、转移性和复发性乳腺癌)、血(霍奇金病、白血病、多发性骨髓瘤、淋巴瘤)、淋巴结癌、肺(腺癌、燕麦细胞、非小细胞、小细胞、鳞状细胞、间皮瘤)、皮肤(黑色素瘤、基底细胞、鳞状细胞、卡波西氏肉瘤)、骨癌(尤文氏肉瘤、骨肉瘤、软骨肉瘤)、头颈(喉、咽(鼻腔和鼻窦)和食道癌)、口腔(颌、唾液腺、咽喉、甲状腺、舌和扁桃腺癌)、眼、妇科(宫颈、子宫内膜、输卵管、卵巢、子宫、阴道和外阴)、泌尿生殖系统(膀胱、肾、阴茎、前列腺、睾丸和泌尿系统癌)、肾上腺(皮质腺瘤、皮质癌、嗜铬细胞瘤)和胃肠道(阑尾、胆管(肝外胆管)结肠、胆囊、胃、肠、结肠、肝、胰腺、直肠、和胃癌)的癌症或肿瘤障碍,以及下面列举的癌症或肿瘤障碍:(关于这些障碍的综述,参见Fishman等,1985, *Medicine*, 第2版, J.B.Lippincott Co., Philadelphia): 白血病: 急性白血病、急性淋巴细胞白血病、急性髓细胞白血病、成髓细胞性白血病、前髓细胞性白血病、髓单核细胞性白血

病、单核细胞性红白血病、慢性白血病、慢性髓细胞性(粒细胞性)白血病、慢性淋巴细胞性白血病;真性红细胞增多症;胃癌;淋巴瘤(恶性和非恶性):霍奇金氏病、非霍奇金氏病、多发性骨髓瘤、华氏巨球蛋白血症、重链病;实体瘤、实体瘤肉瘤和癌:纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、成骨肉瘤、脊索瘤、血管肉瘤、内皮肉瘤、淋巴管肉瘤、淋巴管内皮肉瘤、滑膜瘤、间皮瘤、尤文氏瘤、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、结肠癌、胰腺癌、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、鳞状细胞癌、口腔鳞状细胞癌、肝细胞癌、基底细胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳头状癌、乳头状腺癌:囊腺癌、髓样癌、支气管癌、肾细胞癌、肝癌、胆管癌、绒毛膜癌、精原细胞瘤、胚胎性癌、维尔姆斯瘤、宫颈癌、宫颈腺癌、子宫癌、睾丸肿瘤、肺癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、神经胶质瘤、恶性神经胶质瘤、胶质母细胞瘤、多形性星形细胞神经胶质瘤、成神经管细胞瘤、颅咽管瘤、室管膜瘤、松果体瘤、成血管细胞瘤、听神经瘤、少突神经胶质瘤、脑膜瘤、黑色素瘤、成神经细胞瘤或成视网膜细胞瘤。

[0049] (x) 本文使用的术语“化学制剂”是指对人或动物造成严重死亡或伤害的化学物质。当化学制剂已经优化到使用弹药或散布装置递送的程度时,该制剂是化学武器。通常,用作武器的化学制剂可以根据其作用方法分类,例如:血液制剂、糜烂剂、神经制剂、肺部制剂和失能剂。当可获得时,以下各种化学制剂通过其NATO标准参考字母代码识别。

[0050] (xi) “血液制剂”是指阻止细胞使用氧气的化学制剂。该类别中的化学药剂包括但不限于肿(亚当氏毒气(二苯胺氯肿)、Clark I(二苯氯肿)、Clark II(二苯氰肿))和氰化物(氯化氰(CK)、氰化氢(AC)等)化合物。肿化合物引起血管内溶血,导致肾衰竭。氰化物化合物阻止细胞使用氧气,然后细胞被迫采用缺氧呼吸,产生过量乳酸,导致代谢酸中毒。血液制剂的受害者可能呈现的症状包括但不限于头痛、眩晕、恶心、呕吐、粘膜刺激、呼吸困难、意识障碍、昏迷、惊厥、过速-和过缓-心律异常、低血压、心血管性虚脱、和发绀。

[0051] (A) “神经制剂”是指使乙酰胆碱酯酶失活的化学制剂。神经递质乙酰胆碱在受害者的突触中累积,导致毒蕈碱和烟碱效应。该类别中的化合物包括但不限于环沙林(甲氟膦酸环己酯,GF)、沙林(甲氟膦酸异丙酯,GB)、硫代沙林、索曼(甲氟膦酸叔己酯,GC)、塔崩(N,N-二甲氨基膦酸乙酯,GA)、VX(0-乙基-[s]-[2-二异丙基氨基乙基-甲基硫代膦酸酯)、VR(N,N-二乙基-2-(甲基-(2-甲基丙氧基)磷酰基)磺酰基乙胺)、VE(0-乙基-S-[2-(二乙基氨基)乙基]硫代膦酸酯)、VG(0,0-二乙基-S-[2-(二乙基氨基)乙基]硫代膦酸酯)、VM(0-乙基-S-[2-(二乙基氨基)乙基]甲基硫代膦酸酯)、乙基沙林(乙氟膦酸异丙酯,GE)、EDMP(乙基-2-二异丙基氨基乙基甲基膦酸酯)、DF(甲基膦酰二氟)、诺维乔克(Novichok)剂、GV(P-[2-(二甲氨基)乙基]-N,N-二甲基膦酰胺氟)、Gd42、Gd83、塔美林酯、氟膦酸胆碱、磷酸硫代胆酸酯(phosphothiocholate)、DFP和杀虫剂(吩噻嗪、有机磷酸酯(dichorous、马拉硫磷、对硫磷、倍硫磷、美沙酮、对氧磷、毒死蜱、内吸磷、焦磷酸、TOCP))。神经制剂的受害者可能呈现的症状包括但不限于心动过缓、瞳孔缩小、唾液分泌过多、呕吐、腹泻、无意识的排尿、肌肉颤抖、初始去极化的弛缓性麻痹、棘波放电和惊厥、中间综合征、神经毒性酯酶抑制和有机磷酸酯诱发的延迟的神经病变。

[0052] (B) “糜烂剂”指是形成酸的化合物的制剂,其损伤受害者的皮肤和呼吸系统,导致灼烧和呼吸问题。该类别中的化学制剂包括但不限于硫芥子气(1,2-双(2-氯乙硫基)乙烷(倍半芥子气,Q)、1,3-双(2-氯乙硫基)-正丙烷、1,4-双(2-氯乙硫基)-正丁烷、1,5-双(2-氯乙硫基)-正戊烷、2-氯乙基氯甲基硫化物、双(2-氯乙基)硫化物(HD)、双(2-氯乙硫基)甲

烷、双(2-氯乙基硫甲基)醚、双(2-氯乙基硫乙基)醚、二-2'-氯乙基硫化物及其组合(HT、HL、HQ)、氮芥(双(2-氯乙基)乙胺(HN1)、双(2-氯乙基)甲胺(HN2)、三(2-氯乙基)胺(HN3)、2-氯-N-(2-氯乙基)-N-甲基乙胺-N-氧化物盐酸盐、环磷酰胺、苯丁酸氮芥、乌拉莫司汀、美法仑)、路易氏毒气(2-氯乙烯基二氯肿、双(2-氯乙烯基)氯肿、三(2-氯乙烯基)肿、二氯(2-氯乙烯基)肿)、乙基二氯肿、甲基二氯肿、苯基二氯肿和光气肟(二氯甲醛肟)。糜烂剂的受害者可能呈现的症状包括但不限于红斑、水肿、坏死和水疱、黑皮病、气管支气管炎、支气管痉挛、支气管阻塞、出血性肺水肿、呼吸衰竭、细菌肺炎、眼红斑、流泪、眼部不适、眼中严重疼痛、干眼、眼睑痉挛、虹膜炎、失明、恶心、呕吐、骨髓抑制、路易氏毒气休克、肝坏死和低灌注继发的肾衰竭。

[0053] (C)“肺部制剂”是指与糜烂剂相似但对呼吸系统具有更显著作用并导致呼吸系统充水和受害者窒息的试剂。该类别中的化学制剂包括但不限于亚当氏毒气、丙烯醛、双(氯甲基)醚、氯气、三氯硝基甲烷、diphosphogene、氯磺酸甲酯、氯化锡、氯化氢、氮氧化物和光气。肺部制剂的受害者可能呈现的症状包括但不限于灼烧(眼、鼻咽、口咽)、大量流泪、鼻溢、嘶哑咳嗽、呼吸困难、吞咽痛、结膜炎、角膜损伤、鼻-口咽损伤/水肿、声门结构的炎症引起的呼吸窘迫、分泌和/或喉痉挛、急性呼吸综合征、和反应性气道功能障碍综合征。

[0054] (D)“失能剂”是指不太致命且旨在主要通过生理或精神作用或二者丧失能力的试剂。常见的一类失能剂是催泪剂,其为刺激眼睛引发流泪、疼痛和甚至暂时失明的化学制剂。催泪剂包括但不限于a-氯甲苯、苄基溴、溴丙酮(BA)、溴苄基氰(CA)、溴甲基乙基酮、辣椒素(OC)、氯乙酰苯(CN)、氯甲酸氯甲酯、二苯氧氮平类(CR)、碘乙酸乙酯、邻氯苯亚甲基丙二腈(CS)、氯甲酸三氯甲酯和甲苄基溴。另外的失能剂包括但不限于二苯羟乙酸-3-奎宁环酯(迷幻剂;BZ)、氢氰酸(麻醉剂)、二苯氯肿(催嚏剂;DA)、二苯氰肿(DC)、KOLOKOL-1(芬太尼衍生物)、曼陀罗、Hellborne、颠茄、天仙子(Hyoscyamus falezlez)、吡啶(麦角酸二乙基酰胺(LSD-25))、大麻衍生物(DMHP)、安非他命、可卡因、咖啡因、尼古丁、土的宁、环戊并四唑、巴比妥(美索比妥)、阿片类药物、抗精神病剂(氟哌啶醇)、苯二氮卓类、芬太尼同源物、裸盖菇素(psilocybin)、伊博格碱、肉叶芸香碱、摇头丸、PCP、阿托品、东莨菪碱、奥昔布宁、尿多灵、抗胆碱能的抗组胺剂、贝那替秦和镇静剂。

[0055] 许多以上提到的化学物质具有除武器用途之外的用途,还可在制造业内使用。因此,这些化学制剂从制造厂或化学厂意外或有意地释放将对工厂的雇员以及住在这些工厂附近的人群造成风险。有毒的工业制造化学物质的实例包括但不限于氨、肼、三氯化硼、三氟化硼、二硫化碳、氯、乙硼烷、环氧乙烷、氟、甲醛、溴化氢、氯化氢、氰化氢、氟化氢、硫化氢、硝酸、光气、三氯化磷、二氧化硫、硫酸、六氟化钨、丙酮氰醇、丙烯醛、丙烯腈、烯丙醇、烯丙胺、氯碳酸烯丙酯、三溴化硼、一氧化碳、羰基硫、氯丙酮、氯乙酰基腈、氯磺酸、二酮、1,2-二甲基肼、二溴乙烷、硒化氢、甲烷磺酰氯、溴甲烷、氯甲酸甲酯、甲基氯硅烷、甲基肼、异氰酸甲酯、甲硫醇、二氧化氮、磷化氢、三氯氧磷、五氟化磷、六氟化硒、四氟化硅、铈化氢(stiloin)、三氧化硫、磺酰氯、磺酰氟、六氟化碲、正辛硫醇、四氯化钛、三氯乙酰氯、三氟乙酰氯、异硫氰酸烯丙酯、三氯化砷、溴、氯化溴、五氟化溴、三氟化溴、羰基氟、五氟化氯、三氟化氯、氯乙醛、氯乙酰氯、巴豆醛、氯化氰、硫酸二甲酯、二苯基甲烷-4,4'-二异氰酸酯、氯甲酸乙酯、氯硫代甲酸乙酯、乙基硫代膦酰二氯、乙基二氯磷酸、乙撑亚胺、六氯环戊二烯、碘化氢、五羰基铁、氯甲酸异丁酯、氯甲酸异丙酯、异氰酸异丙酯、氯甲酸正丁酯、异氰酸正

丁酯、一氧化氮、氯甲酸正丙酯、对硫磷、全氯甲硫醇、异氰酸仲丁酯、异氰酸叔丁酯、四乙基铅、焦磷酸四乙酯、四甲基铅、甲苯2,4-二异氰酸酯和甲苯2,6-二异氰酸酯。

[0056] (xii) 如本文所使用,“有效量”包括肽的量,该量足以调节任何与组织损伤相关的疾病或障碍或与疾病或障碍的作用或症状相关的损伤,例如,足以抑制、压制或缓解机体对与组织损伤相关的疾病或障碍的反应的有害作用,包括但不限于机体对癌症、炎症或暴露于毒性剂的反应。另外,“有效量”包括肽的量,该量足以减轻、改善、减少或预防任何与组织损伤相关的疾病或障碍,或在患有与组织损伤相关的疾病或障碍的患者中提供治疗益处。

[0057] (xiii) “可兴奋的组织”指包含可兴奋的细胞的组织。可兴奋的细胞是对电刺激活跃反应并且具有跨过其细胞膜的电荷差的细胞。可兴奋的细胞一般能够经受动作电位。这样的细胞典型地表达通道,例如电压门控、配体门控、和胁迫通道,这些通道允许离子流(钾、钠、钙、氯等)穿过膜。可兴奋的组织包括神经组织、肌肉组织和腺体组织。可兴奋的组织包括但不限于,神经组织,例如外周神经系统(耳朵和视网膜)和中枢神经系统(大脑和脊髓)的组织;心血管组织,例如心脏和相关神经的细胞;以及腺体组织,例如胰腺,其中T型钙通道以及细胞-细胞间隙连接参与胰岛素分泌。可兴奋的组织示例性列表包括器官和组织,其包括神经、骨骼肌、平滑肌、心肌、子宫、中枢神经系统、脊髓、脑、视网膜、嗅觉系统、听觉系统等。

[0058] 如本文使用的术语“宿主细胞”是指用核酸分子转染的特定对象的细胞以及这样的细胞的后代或潜在的后代。由于在随后的传代或在核酸分子向宿主细胞基因组的整合中可能发生的突变或环境影响,这样的细胞的后代可能与用核酸分子转染的亲代细胞不相同。

[0059] (xv) 如本文使用的术语“炎性病症”是指具有炎性组分的各种疾病或创伤,无论是机械或化学诱发的。其包括在一种或多种器官或组织中产生炎症的病症,该器官或组织包括但不限于脑、脊髓、结缔组织、心脏、肺、肾、尿道、胰腺、眼和前列腺。这样的病症的非限制性实例包括但不限于,阑尾炎、睑缘炎、支气管炎、滑囊炎、宫颈炎、胆管炎、胆囊炎、绒毛膜羊膜炎、结膜炎、膀胱炎、泪腺炎、皮炎、心内膜炎、子宫内膜炎、上颌炎、附睾炎、纤维组织炎、胃炎、牙龈炎、舌炎、化脓性汗腺炎、虹膜炎、喉炎、乳腺炎、心肌炎、肌炎、肾炎、脐炎、卵巢炎、睾丸炎、骨炎、耳炎、腮腺炎、心包炎、腹膜炎、咽炎、胸膜炎、静脉炎、局限性肺炎(肺炎)、前列腺炎、肾盂肾炎、鼻炎、输卵管炎、鼻窦炎、口腔炎、滑膜炎、扁桃体炎、葡萄膜炎、尿道炎、阴道炎、外阴炎、哮喘、系统性红斑狼疮、重症肌无力、肌腱炎、脉管炎、慢性支气管炎、胰腺炎、骨髓炎、关节炎(类风湿性和银屑病性)、肾小球肾炎、视神经炎、颞动脉炎、脑炎、脑膜炎、横贯性脊髓炎、皮肌炎、多肌炎、坏死性筋膜炎、肝炎、坏死性小肠结肠炎、盆腔炎、炎性肠病(结肠炎,例如,溃疡性结肠炎、克罗恩病、回肠炎和肠炎)、直肠炎、血管炎、血管狭窄、再狭窄、低血压、1型糖尿病、川崎病、德尔肯氏病、慢性阻塞性肺病、银屑病、动脉粥样硬化、硬皮病、干燥综合征、混合性结缔组织病、酒渣鼻、胃溃疡、十二指肠溃疡、阿尔茨海默病、成年发作型斯提耳氏病、急性视网膜色素上皮炎、白化病综合征、白塞氏病、白点综合征(急性后极部多灶性鳞状色素上皮病变、匍行性脉络膜炎、鸟枪弹样脉络膜视网膜病变、多灶性脉络膜炎伴全葡萄膜炎、弥漫性视网膜下纤维化综合征、点状内层脉络膜病变、多发性一过性白点综合征和弥漫性单侧亚急性视神经视网膜炎)、环状肉芽肿、肠易激综合征、克罗恩病、乳糜泻、胃肠炎、格雷夫斯病、多发性硬化、迪皮特朗挛缩、移植排斥疾病(包括同种异体移

植物排斥和移植物抗宿主病),例如皮肤移植排斥、实体器官移植排斥、骨髓移植排斥、炎症性皮肤病、病毒皮肤病(如源自人乳头瘤病毒、HIV或RLV感染的那些)、细菌、真菌和/或其他寄生虫皮肤病、皮肤红斑狼疮和高IgG4病。另外的“炎性病症”可以指由缺血性或非缺血性病症引起的炎症,包括但不限于,钝性创伤、挫伤、过敏和过敏性疾病、风湿性疾病(儿童关节炎、类风湿性关节炎、Churg-Strauss综合征、纤维肌痛、巨细胞(颞)动脉炎、痛风、过敏性紫癜、过敏性血管炎、强直性脊柱炎、囊炎、风湿热、风湿性心脏病、系统性红斑狼疮、风湿性多肌痛、骨关节炎(手、髌、膝关节等)、结节性多动脉炎、赖特综合征、运动相关损伤(跑步膝、网球肘、肩周炎、阿基里斯腱炎、足底筋膜炎、滑囊炎、Osgood-Schlatter病)、重复性压力损伤(累积性创伤疾病、局限性肌张力障碍、腕管综合征、交叉综合征、反射交感神经营养不良综合征、狭窄性腱鞘炎(狄魁文氏综合征、扳机指/扳机拇指)、胸廓出口综合征、肌腱炎、腱鞘炎、桡管综合征、雷诺氏病、腱鞘囊肿、游戏指、Wii损伤等)感染,包括病毒、真菌和细菌。“炎性病症”可以是急性的或慢性的。

[0060] (xvi) “分离的”或“纯化的”肽基本上不含细胞材料或其它污染蛋白,所述细胞材料或其它污染蛋白来自从其中获得所述蛋白或肽的细胞或组织来源,或当化学合成时基本上不含化学前体或其它化学物质。语言“基本上不含细胞材料”包括肽制剂,其中该肽与从中分离或重组生成该肽的细胞的细胞组分相分离。因此,基本不含细胞材料的肽包括肽制剂,其具有少于约30%、20%、10%或5%(按干重计)的异源蛋白(本文中称作“污染蛋白”)。当重组制备肽时,其也优选地基本上不含培养基,即培养基具有少于约20%、10%或5%的蛋白质制剂体积。当通过化学合成制备肽时,其可以基本上不含化学前体或其它化学物质,即它与蛋白合成中涉及的化学前体或其它化学物质分离。因此,这样的肽制剂除目标肽之外具有低于约30%、20%、10%、5%(按干重计)的化学前体或化合物。在一个实施方案中,本文提供的肽是分离的或纯化的。

[0061] (xvii) “分离的”核酸分子是与该核酸分子的天然来源中存在的其它核酸分子分离的核酸分子。此外,“分离的”核酸分子,如cDNA分子,在通过重组技术制备时基本不含其它细胞材料或培养基,或在化学合成时基本上不含化学前体或其它化学物质。在具体实施方案中,编码本发明的肽的核酸分子(多种核酸分子)是分离的或纯化的。

[0062] (xviii) 如本文所使用,术语“控制”包括提供一种或多种患者从肽获得的有益副作用,所述副作用在一个实施方案中不能逆转与组织损伤相关的疾病或障碍的损伤、作用或症状。在某些实施方案中,向患者施用肽来“控制”与组织损伤相关的疾病或障碍的症状,以防止症状的进展或恶化。

[0063] (xix) 术语“调节(modulate)”、“调节(modulation)”等是指化合物增加或减少机体对与组织损伤相关的疾病或障碍的反应的介质的功能和/或表达的能力,包括调节活性的转录和/或蛋白结合。如本文所述的调节包括直接或间接地抑制、拮抗、部分拮抗、活化、激动或部分激动与介质相关的功能或特征,和/或上调或下调介质的表达。在一个实施方案中,调节是直接的,并且所述调节可以通过介质的抑制剂或拮抗剂发生,该抑制剂或拮抗剂是与介质结合以部分或完全阻断刺激、降低、预防、抑制、延迟活化、灭活,脱敏或下调信号转导的化合物。可用于本文提供的方法的特定肽的抑制介质的功能的能力可以在生化分析(例如结合分析)、基于细胞的分析(例如瞬时转染分析)或体内分析(例如神经损伤、癌症、炎症、或化学或辐射损伤的动物模型,例如大鼠或小鼠模型)中证明。

[0064] (xx) 如本文关于肽内的结构所使用的,术语“基序”是指肽链的氨基酸序列内的一组连续的氨基酸,和/或所述肽的二级和/或三级结构内的一组线性或空间邻近的氨基酸。因为基序可以全部或部分地因为蛋白折叠而形成,在描述的基序中邻近的氨基酸可以在肽的线性氨基酸序列内被0个、1个或更多个、5个或更多个、10个或更多个、15个或更多个、或20个或更多个氨基酸分开。

[0065] (xxi) 如本文所使用,术语“肽”、“多肽”和“蛋白”可互换使用,而且最广义地指受约束的(即具有一些结构元件,例如存在启动 β 转角或 β 折叠片的氨基酸,或例如,通过存在的二硫键连接的Cys残基而环化)或不受约束的(例如线性)氨基酸序列。在某些实施方案中,本文提供的肽由少于30个氨基酸组成。然而,在阅读了本公开内容后,技术人员将认识到,不是特定肽的长度而是其与组织保护受体复合物结合和/或与本文描述的肽竞争结合的能力可区分出在本文提供的方法中有用的肽。术语“肽”、“多肽”和“蛋白”也指包含氨基酸等价物或其它非氨基酸基团而仍保留肽或蛋白的期望功能活性的化合物。肽等价物可以通过用相关的有机酸(如PABA)、氨基酸等价物等来替代一种或多种氨基酸,或通过侧链或官能团的取代或修饰而与常规的肽区别开来。

[0066] (xxii) 术语“预防与组织损伤相关的疾病或障碍的损伤、作用或症状”是指延迟这样的损伤、作用或症状的发作,阻碍其进展,阻碍其出现,防止、抑制或消除其出现,或降低其发生率。使用术语“预防”并不意味着施用了预防性治疗的患者群体中的所有患者将不再受到预防所针对的与组织损伤相关的疾病或障碍的影响或不再对其产生反应症状,而是患者群体在该疾病或障碍的损伤、作用或症状方面呈现减轻。例如,许多流感疫苗在施用了该疫苗的人群中并非100%有效地预防流感。本领域技术人员可以容易地确定预防性治疗将对其有益的患者和情况,例如但不限于,将要参与可能使其暴露于各种毒剂或创伤的活动的个体(例如参与军事行动的士兵、化学或食品加工工人、应急人员或现场急救员等)或可能暴露于毒剂的个体(例如居住在化学、核或制造设施附近的个体,或者处于军事或恐怖袭击威胁下的个体)。

[0067] (xxiii) 如本文所使用,“预防有效量”是指肽的量,其足以引起对与组织损伤相关的疾病或障碍导致的损伤、作用或症状的预防。预防有效量可以指肽的量,其足以预防与组织损伤相关的疾病或障碍导致的损伤、作用或症状。此外,关于另一种预防剂的预防有效量指与肽组合的该预防剂的量,该量在与组织损伤相关的疾病或障碍导致的损伤、作用或症状的预防中提供预防益处。当与肽的量联合使用时,术语“预防有效量”可以包括改善总体预防或增强另一种预防剂的预防功效或提供与另一种预防剂的协同作用的量。

[0068] (xxiv) 术语“肿瘤”是指缺乏癌性肿瘤的恶性性质的异常生长,并且一般是良性和非进行性肿瘤。肿瘤包括但不限于痣、子宫肌瘤、甲状腺腺瘤、肾上腺皮质腺瘤、垂体腺瘤和畸胎瘤。

[0069] (xxv) 本文使用的术语“辐射剂”是指任何可以杀死或损伤受试者而且可以用来引起城市或国家的破坏的放射性物质。暴露于辐射剂可能通过使用武器(核弹(裂变、聚变、中子、加强裂变、或盐弹)、包含贫铀的炮弹)、恐怖装置(“脏弹”)或者由于核武器爆炸或核电站故障而导致的放射性尘埃而发生。放射性制剂可以包括但不限于, ^{137}Cs 、 ^{60}Co 、 ^{241}Am 、 ^{252}Cf 、 ^{192}Ir 、 ^{238}Pu 、 ^{90}Sr 、 ^{226}Ra 、 ^{91}Sr 、 ^{92}Sr 、 ^{95}Zr 、 ^{99}Mo 、 ^{106}Ru 、 ^{131}Sb 、 ^{132}Te 、 ^{139}Te 、 ^{140}Ba 、 ^{141}La 、 ^{144}Ce 、 ^{233}U 、 ^{235}U 、 ^{238}U 、 ^{228}P 、 ^{229}P 、 ^{230}P 、 ^{231}P 、 ^{232}P 、 ^{233}P 、 ^{234}P 、 ^{235}P 、 ^{236}P 、 ^{237}P 、 ^{238}P 、 ^{239}P 、 ^{240}P 、 ^{241}P 、 ^{242}P 、 ^{243}P 、 ^{244}P

、²⁴⁵P、²⁴⁶P、²⁴⁷P和¹³¹I。暴露于放射性制剂可以导致癌变,不孕,白内障形成,放射性皮炎,β烧伤,γ烧伤,细胞丧失(特别是骨髓、消化道细胞),对造血、胃肠道、中枢神经、心血管、皮肤和/或生殖系统的损伤,急性辐射综合征,慢性辐射综合征和皮肤辐射综合征。急性辐射综合征通常由短时间内发生的对对象机体的大剂量辐射所引起。该综合征具有可预期的进程,首先感觉恶心,随后呕吐、一般疾病和疲劳、免疫系统抑制、毛发脱落、无法控制的出血(口、皮肤下、肾)、大量腹泻、谵妄、昏迷和死亡。皮肤辐射综合征是急性辐射综合征的一个子类,并且是指对皮肤的辐射作用,其包括但不限于炎症、红斑、干性或湿性脱屑、毛发脱落、起疱、变红、溃疡、皮脂腺和汗腺损伤、萎缩、纤维化、减轻或加重的皮肤色素沉着和细胞坏死。

[0070] (xxvi) 如本文所使用,术语“对象”、“患者”和“受害者”可互换使用。如本文所使用,术语“对象”和“多个对象”是指动物,例如哺乳动物,包括非灵长类动物(例如奶牛、猪、马、猫、狗、大鼠和小鼠)和灵长类动物(例如猴、猿或人)。

[0071] (xxvii) 如本文所使用,术语“与肿瘤或癌症相关的综合征”是指肿瘤通过“质量效应”(肿瘤引起的对重要器官的压迫)或“功能性肿瘤”(受肿瘤影响的器官过度产生激素)的直接作用导致的综合征。这样的综合征包括但不限于Beckwith-Wiedmann综合征、SBLA综合征、Li-Fraumeni综合征、血管增殖(Vasoproliferation)、家族性腺瘤性息肉病综合征(Gardner综合征)、遗传性非息肉结肠直肠癌、Turcot综合征、Cowden综合征、Carney Triad综合征、多发性内分泌腺瘤综合征(Werner (MEN-1)、Sipple (MEN-2a、MEN-2b)、Von Hippel-Lindau综合征、库欣综合征、爱迪生综合征、Verner Morrison综合征、Zollinger-Ellison综合征、WDHA综合征、胰性霍乱、Isaac综合征、波纹肌肉综合征、僵人综合征、副肿瘤共济失调、Yo综合征、Tr综合征、Hu综合征、CV-2综合征、CRMP-5综合征、斜视眼阵挛/肌阵挛、Ma综合征、Morvan纤维性舞蹈症、Bannayan-Riley-Runalcaba综合征、黑斑息肉综合征、Muir-Torre综合征、先天性巨结肠病、Lynch综合征、Lambert-Eaton Myastenic综合征、重症肌无力、神经性肌强直、副肿瘤小脑变性、副肿瘤性边缘叶脑炎、Sweets综合征、Birt-Hogg-Dube综合征、痣样基底细胞癌综合征、广义基底样毛囊综合征、错构瘤综合征、Bazex综合征、Brooke Spiegler综合征、家族性圆柱瘤、多发性家族性毛发上皮瘤、雄激素阻断综合征、治疗相关的骨髓增生异常综合征、嗜睡综合征、海湾战争综合征和生长抑制素瘤综合征。

[0072] (xxviii) 如本文所使用,术语“组织保护活性”或“组织保护”是指抑制或延迟细胞、组织或器官的损伤或死亡的作用。除非另有说明,细胞、组织或器官的损伤或死亡的“延迟”是相对于缺乏本文提供的肽的对照条件进行评估的。组织保护活性对表达组织保护受体复合物的组织、细胞和/或器官(即,分别为响应性组织细胞和/或器官)具有特异性,例如但不限于中枢神经系统的组织。在具体实施方案中,响应性细胞不是红细胞祖细胞。

[0073] (xxix) 本文使用的术语“组织保护受体复合物”指包含至少一个促红细胞生成素受体亚基和至少一个β共同受体亚基的复合物。组织保护受体复合物可以包含多个促红细胞生成素受体亚基和/或β共同受体亚基,以及其它类型的受体或蛋白。参见W0 2004/096148,其通过引用整体并入本文。

[0074] (xxx) 如本文所使用的术语“毒剂”是指以上提到的生物、化学和辐射剂。

[0075] (xxxi) 为了确定两条氨基酸序列的同一性百分比,序列被比对以实现最佳比较目的。然后比较相应氨基酸位置上的氨基酸残基。当第一条序列中的一个位置被与第二条序

列中的相应位置相同的氨基酸残基占据时,则两个分子在该位置是相同的。两条序列之间的同一性百分比是序列共享的相同位置的数目的函数(即,同一性% = 相同的重叠位置数目 x 100/位置总数)。在一个实施方案中,两条序列长度是相同的。在一个供选择的实施方案中,序列具有不同长度,并且因此同一性百分比是指较短序列与较长序列的一部分的比较,其中所述部分的长度与所述较短序列相同。

[0076] (xxxii) 如本文所使用,术语“治疗”包括消除、减少、管理或控制与组织损伤相关的疾病或障碍导致的损伤、作用或症状或与疾病或障碍的作用或症状相关的损伤。

[0077] 5. 附图简述

[0078] 图1显示了本文实施的肽对大鼠神经性疼痛的保留神经模型的作用。正方形表示接受溶媒的动物(对照),而三角形表示接受GDKA (SEQ ID NO:3) 肽的动物,黑色圆圈表示接受GDKARYEREM (SEQ ID NO:1) 肽的动物,浅灰色圆圈表示接受阳性对照的动物。来自第8,853,358号美国专利的SEQ ID NO:282的肽用作阳性对照。

[0079] 图2显示GDKA (SEQ ID NO:3) 肽对Akt磷酸化的活化。

[0080] 图3显示了本文实施的肽对糖尿病神经病变小鼠模型的保护作用。将接受GDKA (SEQ ID NO:3) 肽的小鼠与糖尿病神经病变模型中用PBS处理的小鼠进行比较。包括非糖尿病小鼠作为对照。来自第8,853,358号美国专利的SEQ ID NO:282的组织保护肽用作阳性对照。

[0081] 6. 详述

[0082] 6.1 分离的肽

[0083] 本文提供了一种调节机体对与组织损伤相关的疾病或障碍的反应的的作用的方法。此外,本文提供了通过施用共享GDKA的共有序列 (SEQ ID NO:3) 的肽或肽类似物来预防、治疗、改善或控制患有与组织损伤相关的疾病或障碍的患者中的损伤、作用或症状的方法。在某些实施方案中,肽由氨基酸序列GDKARYEREM (SEQ ID NO:1) 组成。在另一个实施方案中,肽包含氨基酸序列GDKARYEREM (SEQ ID NO:1)。在另一个实施方案中,肽由氨基酸序列GDKARYEREA (SEQ ID NO:2) 组成。在另一个实施方案中,肽包含氨基酸序列GDKARYEREA (SEQ ID NO:2)。在又一个实施方案中,肽由氨基酸序列GDKA (SEQ ID NO:3) 组成。在再一个实施方案中,肽包含氨基酸序列GDKA (SEQ ID NO:3)。在一个实施方案中,该方法中使用的肽是组织保护性的、神经保护性的、神经发生性的或抗凋亡的。

[0084] 本文提供的肽可以包含GDKARYEREM (SEQ ID NO:1)、GDKARYEREA (SEQ ID NO:2) 或GDKA (SEQ ID NO:3) 的氨基酸序列,其中所述肽包含5个氨基酸至最多达约30个氨基酸,其中所述氨基酸序列位于N-末端、C-末端或肽内的任何其他位置。此外,可以在肽中的一个或多个氨基酸残基处进行保守或非保守氨基酸取代,或用氨基酸等价物取代。可以进行保守和非保守取代二者。在另一个实施方案中,可以进行多于一个取代。因此,在一些实施方案中,本文提供的肽包括具有一个被保守取代、非保守取代或氨基酸等价物替代的氨基酸残基的肽。在具体实施方案中,本文提供的具有氨基酸序列GDKARYEREM (SEQ ID NO:1)、GDKARYEREA (SEQ ID NO:2) 或GDKA (SEQ ID NO:3) 的肽包括具有一个保守取代的氨基酸序列。具有本文所述的任何一种取代的肽包括维持其如本文所述的组织保护活性的肽,其可使用本文所述的一种或多种方法分析以分析组织保护活性。

[0085] 保守替代是在其侧链有关系的氨基酸家族中发生的替代。基因编码的氨基酸可分

为四个家族：(1) 酸性 = 天冬氨酸、谷氨酸；(2) 碱性 = 赖氨酸、精氨酸、组氨酸；(3) 非极性 (疏水性) = 半胱氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、蛋氨酸、色氨酸、甘氨酸、酪氨酸；和 (4) 不带电极性 = 天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸。非极性可以细分为：强疏水性 = 丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、蛋氨酸、苯丙氨酸；和中度疏水性 = 甘氨酸、脯氨酸、半胱氨酸、酪氨酸、色氨酸。以供选择的方式，氨基酸谱可以分为 (1) 酸性 = 天冬氨酸、谷氨酸；(2) 碱性 = 赖氨酸、精氨酸、组氨酸，(3) 脂族 = 甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、丝氨酸、苏氨酸，其中丝氨酸和苏氨酸任选地单独分类为脂族-羟基；(4) 芳族 = 苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸；(5) 酰胺 = 天冬酰胺、谷氨酰胺；和 (6) 含硫 = 半胱氨酸和蛋氨酸。(参见例如，Biochemistry, 第4版, L. Stryer, WH Freeman and Co. 编, 1995, 将其通过引用整体并入本文)。氨基酸等价物是指脱离天然存在的氨基酸的结构但基本上具有氨基酸结构的化合物，使得它们可以在肽内被取代，并且在取代的情况下仍保留其生物活性。因此，例如，氨基酸等价物可包括具有侧链修饰或取代的氨基酸，并且还包含相关的有机酸、酰胺等。

[0086] 因此，本领域普通技术人员将认识到，分离的肽与GDKARYEREM (SEQ ID NO:1)、GDKARYEREA (SEQ ID NO:2) 或GDKA (SEQ ID NO:3) 的氨基酸序列可以具有至少90%、至少85%、至少80%、至少75%、至少70%、至少65%、至少60%、至少55%、至少50%、至少45%、v 40%、至少35%、至少30%或至少20%的序列同一性。

[0087] 不希望被任何特别的理论束缚，为了组织保护，肽中的带电氨基酸对可以被空间定向，使得氨基甲酰基碳相距约3 埃 (Å) 至约5 Å，在一个实施方案中相距约4 Å 至约5 Å，以及在一个实施方案中相距约4.4 Å 至约4.8 Å。这可以多种方式实现，例如，通过在简单的线性肽中邻近的带电氨基酸实现，或者，对于可形成α螺旋的肽，用间隔氨基酸残基将带电氨基酸分开。应注意的是，当肽处于特定微环境内，例如处于细胞外-细胞表面膜界面处时，也可以赋予三级结构 (例如两亲性肽中的α螺旋) (参见, Segrest, 1990, Proteins 8:103-117, 其全部内容通过引用并入本文)。

[0088] 此外，对于包含带电氨基酸对而使得带电侧链 (带正电和负电的，或两个带负电的) 在空间上限制在彼此相距约6.5 Å 至约9 Å 的范围内的肽，预测其组织保护活性。这在α螺旋中可以通过将带电氨基酸对用一个或两个氨基酸分开来实现，这将使得电荷差不多在螺旋的同一侧，且具有所要求的约6.5 Å 至约9 Å 的分离。本领域技术人员可以为肽设计三级结构，这通常是获得带电氨基酸的合适三维位点以及设计小分子以模拟肽内电荷分离所需的。

[0089] 任意两个氨基酸的氨基甲酰基碳之间或任意两个氨基酸的侧链之间的空间距离可以通过任何本领域已知的或本文描述的方法推导。例如，当已知蛋白的三维结构时，在所述蛋白的关注的部分内的两条侧链的电荷分离或两个氨基甲酰基碳之间的空间距离可以基于公开的或本领域接受的所述关注的部分中氨基酸残基的三维坐标来计算。当蛋白的三维结构未知且因此关注的部分未知时，或其中基于本文的教导构建三维结构未知的全合成肽时，所述肽内的两条侧链的电荷分离或两个氨基甲酰基碳之间的空间距离可以使用本领域已知的蛋白建模软件预测的三维结构来估计。这样的软件的非限制性实例是Chemical Computing Group (Quebec, Canada) 的MOE™和Accelrys (San Diego, California) 的

Modeler。类似地,可从上述公司得到的这些预测软件也是本领域已知用于小分子设计的,且因此,本领域普通技术人员基于本文的教导将能够制备模拟公开的结构基序的小分子。

[0090] 6.2嵌合体

[0091] “嵌合”肽包括线性氨基酸序列,其包含本文提供的氨基酸序列,例如但不限于,GDKARYEREM (SEQ ID NO:1)、GDKARYEREA (SEQ ID NO:2)或GDKA (SEQ ID NO:3)。可用于本方法和组合物中的嵌合肽可由不同氨基酸序列的结构元件结合到单个肽中而组成。换言之,嵌合肽可以由本文提供的与结构/功能元件相邻的氨基酸序列组成。例如,通过连接两亲性肽螺旋可以增加本发明的肽的效力。

[0092] 两亲性肽螺旋是本领域熟知的,例如来自通过B类G-蛋白偶联受体进行信号转导的肽(例如Segrest等人,1990,Proteins 8:103,其全部内容通过引用并入本文),用于将肽配体定位到细胞膜。此类螺旋的实例包括但不限于,来自以下的高度疏水性区域:降钙素(肽A:ALSILVLLQAGS,SEQ ID NO:4);促肾上腺皮质激素释放激素(肽B:VALLPCPPCRA,SEQ ID NO:5); β 内啡肽(肽C:NAIKNAYKKG,SEQ ID NO:6);胰高血糖素(肽D:GSWQRSLQDTE,SEQ ID NO:7);分泌素(肽E:GGSARPAPP,SEQ ID NO:8);血管肠肽(肽F:NALAENDTPYY,SEQ ID NO:9);神经肽Y(肽G:GALAEAYPSKP,SEQ ID NO:10);促性腺激素释放激素(肽H:GCSSQHSYGL,SEQ ID NO:11);甲状旁腺激素(肽I:VMIVMLAICFL,SEQ ID NO:12);胰多肽(肽J:LRRYINMLTRP,SEQ ID NO:13);和降钙素基因相关肽(肽K:LALSILVLYQA,SEQ ID NO:14)(在Grace等人,2004,PNAS101:12836中公开,其全部内容通过引用并入本文)。例如,可用于本文提供的方法中的嵌合肽可以由具有GDKA (SEQ ID NO:3)的肽在羧基末端与胰多肽(肽J:LRRYINMLTRP,SEQ ID NO:13)的两亲性螺旋连接形成嵌合肽(GDKALRRYINMLTRP,SEQ ID NO:14)来制备。可以在两亲性螺旋的羧基末端进行另外的修饰而不影响其组织保护特性。因此,通过用序列TR (GDKALRRYINMLTRTR,SEQ ID NO:15)替代以上嵌合肽的末端Pro,生成可用于治疗与组织损伤相关的疾病或障碍或与疾病或障碍的作用或症状相关的损伤的肽的另外的实例。

[0093] 在某些实施方案中,在融合肽之间存在连接臂以提供灵活性,以使连接的肽可以呈现合适的结构定向,以与组织保护受体复合物结合。这样的融合肽可以具有协同效应,其可能通过增强的与组织保护受体复合物的结合或增长的生物半衰期,联合获得比单独的更强的组织保护作用。

[0094] 本领域普通技术人员将认识到将各种期望的结构元件组合到单个肽中,从而使这样的化合物在预防、治疗、改善或管理根据本文的公开内容的暴露于毒剂导致的损伤、作用或症状的方法中的有效性最大化的益处。这样的嵌合体可包含氨基酸肽和非氨基酸元件,例如接头或桥联原子或部分。

[0095] 6.3融合肽

[0096] 本文还考虑两种或多种上述肽、衍生的片段或嵌合体可以与相关或不相关的蛋白如白蛋白连接。可以生成这样的融合肽以实现协同益处,增加肽的循环半衰期,或增加肽穿透内皮屏障(如血脑屏障、血液-视网膜屏障等)的能力,或反之亦然,即作为转运机制起作用。

[0097] 6.4肽的制备

[0098] 可使用本领域熟知的重组或合成技术制备可用于本文提供的方法的肽。特别地,

固相蛋白合成非常适合长度相对短的肽且可以提供更高的产率和更一致的结果。另外,固相蛋白合成就肽的制备而言可以提供额外的灵活性。例如,可以在合成阶段将期望的化学修饰结合到肽中:高瓜氨酸可以替代赖氨酸用于肽的合成,从而消除了合成之后将肽氨基甲酰化的需要,或者具有保护的官能团的氨基酸在合成期间可以留在肽上。

[0099] 合成

[0100] 可用于本文提供的方法中的分离的肽和肽类似物可以使用常规的分步溶液相或固相合成法来制备(参见例如,Merrifield,R.B.,1963,J. Am. Chem. Soc. 85:2149-2154; Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins,Williams等人编,1997,CRC Press,Boca Raton Fla.,和其中引用的参考文献;Solid Phase Peptide Synthesis:A Practical Approach,Atherton&Sheppard编,1989,IRL Press,Oxford,England,和其中引用的参考文献)。

[0101] 供选择地,可用于本文提供的方法中的肽和肽类似物可以通过片段缩合法制备,如在例如,Liu等人,1996,Tetrahedron Lett. 37(7):933-936;Baca等人,1995,J. Am. Chem. Soc. 117:1881-1887;Tam等人,1995,Int. J. Peptide Protein Res. 45:209-216;Schnolzer和Kent,1992,Science 256:221-225;Liu和Tam,1994,J. Am. Chem. Soc. 116(10):4149-4153;Liu和Tam,1994,Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:6584-6588;Yamashiro和Li,1988,Int. J. Peptide Protein Res. 31:322-334中描述的。含有Gly(G)的肽尤其如此。可用于合成本文提供的肽和肽类似物的其它方法描述在Nakagawa等人,1985,J. Am. Chem. Soc. 107:7087-7092中。

[0102] 重组技术

[0103] 各种宿主-表达载体系统可以用于产生肽和肽类似物。这样的宿主-表达系统代表可以通过其产生并随后纯化目标肽的载体,其还代表当被合适的核苷酸编码序列转化或转染时可以原位显示修饰的促红细胞生成素基因产物的细胞。这些包括但不限于细菌、昆虫、植物、哺乳动物(包括人宿主系统),例如但不限于,被包含肽编码序列的重组病毒表达载体(例如杆状病毒)感染的昆虫细胞系统;被包含促红细胞生成素相关的分子编码序列的重组病毒表达载体(例如花椰菜花叶病毒CaMV;烟草花叶病毒TMV)感染,或被包含促红细胞生成素相关的分子编码序列的重组质粒表达载体(例如Ti质粒)转化的植物细胞系统;或含有重组表达构建体的哺乳动物细胞系统,包括人细胞系统,例如HT1080、COS、CHO、BHK、293、3T3、PERC6,所述重组表达构建体包含源自哺乳动物细胞基因组的启动子,例如金属硫蛋白启动子,或来自哺乳动物病毒的启动子,例如腺病毒晚期启动子;牛痘病毒7.5K启动子。

[0104] 此外,可以选择宿主细胞株,其调节插入序列的表达,或以期望的具体方式修饰和加工基因产物。蛋白产物的这些修饰和加工可能对蛋白功能是重要的。如本领域普通技术人员已知的,不同的宿主细胞具有特定的蛋白和基因产物的翻译后加工和修饰机制。可以选择合适的细胞系或宿主系统来确保表达的外源蛋白的正确修饰和加工。为此目的,可以使用真核宿主细胞,其具有用于适当加工初始转录物、糖基化和磷酸化基因产物的细胞机制。这样的哺乳动物宿主细胞包括人宿主细胞,包括但不限于HT1080、CHO、VERO、BHK、HeLa、COS、MDCK、293、3T3和WI38。

[0105] 对于重组肽的长期、高产量的制备,考虑稳定表达。例如,可以工程化稳定表达重组的组织保护细胞因子相关分子基因产物的细胞系。与使用包含病毒复制起点的表达载体

不同,宿主细胞用被合适的表达控制元件控制的DNA和选择标记转化,所述表达控制元件例如启动子、增强子、序列、转录终止子、聚腺苷酸化位点等。在引入外源DNA后,可以允许工程化细胞在富集培养基中生长1-2天,然后转换到选择性培养基。重组质粒中的选择标记赋予了对选择的抗性,并且允许细胞将质粒稳定地整合到其染色体中并生长以形成基因座,其转而可以被克隆并扩增成细胞系。本方法可有利地用于工程化表达组织保护产物的细胞系。

[0106] 另外的修饰

[0107] 在某些实施方案中,本文提供的肽由GDKARYEREM (SEQ ID NO:1)、GDKARYEREA (SEQ ID NO:2)或GDKA (SEQ ID NO:3)的氨基酸序列组成,并且携带化学修饰。在更具体的实施方案中,化学修饰是肽键的修饰。在某些更具体的实施方案中,化学修饰是肽的氨基酸的侧链的修饰。具体地,修饰本文提供的肽的第一个、第二个、第三个、第四个、第五个、第六个、第七个、第八个、第九个和第十个氨基酸最多达任何一个氨基酸的侧链。在一些实施方案中,修饰本文提供的肽的氨基末端。供选择地或另外地,在一些实施方案中,修饰本文提供的肽的羧基末端。在一些实施方案中,化学修饰是本文所述的修饰,包括但不限于产生非天然存在的氨基酸、氨基甲酰化、乙酰化、琥珀酰化、胍基化、硝化、三硝基苯基化、脒化或添加聚合物(例如聚乙二醇)的修饰。具有本文所述的任何一种修饰的肽包括维持其如本文所述的组织保护活性的肽,其可使用本文所述的一种或多种方法分析以分析组织保护活性。

[0108] 具有另外的修饰的肽也可以用于本文提供的方法中,用于预防、治疗、改善或管理与组织损伤相关的疾病或障碍或与疾病或障碍的作用或症状相关的损伤。例如,本文提供的肽可以用一种或多种(D)-氨基酸合成。使(L)-或(D)-氨基酸包含在本文提供的肽中的选择部分取决于肽的期望特征。例如,掺入一种或多种(D)-氨基酸可赋予肽在体外或体内增加的稳定性。掺入一种或多种(D)-氨基酸还可以增加或降低肽的结合活性,例如,使用本文所述的生物分析或本领域熟知的其他方法确定。

[0109] 通过对映异构(D)-氨基酸的相应序列替代(L)-氨基酸的序列的全部或部分,在肽链的相应部分中产生光学异构结构。(L)-氨基酸的序列的全部或部分的反转产生肽的逆类似物(retro-analogue)。对映异构(L至D或D至L)置换和序列反转的组合产生肽的逆反类似物。本领域技术人员已知对映异构、它们的逆类似物和它们的逆反类似物与亲本肽保持显著的拓扑关系,并且尤其是通常获得对于亲本肽及其逆反类似物的高度相似性。这种关系和相似性可以反映在肽的生物化学性质中,尤其是相应肽和类似物与受体蛋白的高度结合。肽的逆反类似物的性质的合成已经在例如Methods of Organic Chemistry (Houben-Weyl), Synthesis of Peptides and Peptidomimetics-Workbench Edition Volume E22c (Editor-in-chief Goodman M.) 2004 (George Thieme Verlag Stuttgart, New York) 以及其中引用的参考文献中进行了讨论,所有这些文献都通过引用整体并入本文。

[0110] 氨基酸“修饰”是指改变天然存在的氨基酸以制备非天然存在的氨基酸。含有非天然存在的氨基酸的本文提供的肽的衍生物可以通过化学合成或通过生物合成期间在肽中位点特异性掺入非天然氨基酸来产生,如Christopher J. Noren, Spencer J. Anthony-Cahill, Michael C. Griffith, Peter G. Schultz, 1989 Science, 244:182-188中所述,其内容通过引用整体并入本文。非天然存在的肽的非限制性实例包括2-噻吩基丙氨酸、烯丙基甘氨酸、3-甲基苯丙氨酸、3-吡啶基丙氨酸、4-噻唑基丙氨酸、4,4'-联苯丙氨酸、4-氨基甲

基苯丙氨酸、4-氟苯丙氨酸、3,4-二氯苯丙氨酸、哌啶酸、 β -丙氨酸、 β -高丝氨酸、 β -高苯丙氨酸、 β -高赖氨酸、 β -高色氨酸、2-氨基-3-苯并[1,3]二氧杂环戊烯-5-基-丙酸、3-氨基-3-(3-氟苯基)-丙酸、3-氨基-3-(3,5-二氯苯基)-丙酸、3-氨基-3-(3-吡啶基)-丙酸、3-氨基-3-(3-吡啶基)-丙酸、3-氨基-3-(3,4-二甲氧基苯基)-丙酸、3-氨基-3-(6-甲氧基吡啶-3-基)-丙酸、3-氨基-4-(3,4-二氟苯基)-丁酸、3-氨基-4-(4-氟苯基)-丁酸、3-氨基-5-己酸、2-四氢异喹啉-乙酸、3-氨基-5-苯基戊酸和氮杂环丁烷-3-羧酸。

[0111] 与治疗上有用的肽结构类似的肽模拟物可用于产生等同的治疗或预防作用。通常,肽模拟物在结构上类似于范例多肽(即,具有生物化学性质或药理学活性的多肽),但具有一个或多个任选地被选自以下的键替代的肽键: $-\text{CH}_2\text{-NH-}$ 、 $-\text{CH}_2\text{S-}$ 、 $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$ 、 $-\text{CH}=\text{CH-}$ (顺式和反式)、 $-\text{COCH}_2\text{-}$ 、 $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{-}$ 和 $-\text{CH}_2\text{SO-}$,所述替代通过本领域已知的和在以下参考文献中进一步描述的方法进行:Spatola,A.F.“Chemistry and Biochemistry of Amino Acids,Peptides,and Proteins,”B.Weinstein编,Marcel Dekker,New York,p267(1983);Spatola,A.F.,Vega Data(March 1983),Vol.1.Issue 3,“Peptide Backbone Modifications”(综述);Morely,J.S.,Trends Pharma Sci(1980)pp.463-468(综述);Hudson,D.等人,(1979)Int J Pept Prot Re 14:177-185($-\text{CH}_2\text{-NH-}$ 、 $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$);Spatola,A.F.等人,(1986)Life Sci 38:1243-1249($-\text{CH}_2\text{-S-}$);Hann,M.M.,(1982)J Chem Soc Perkin Trans I 307-314($-\text{CH}=\text{CH-}$,顺式和反式);Almquist,R.G.等人,(1980)J Med Chem 23:1392($-\text{COCH}_2\text{-}$);Jennings-White,C等人,(1982)Tetrahedron Lett 23:2533($-\text{COCH}_2\text{-}$);Szelke,M等人,European Appln.EP 45665(1982)CA:97:39405(1982)($-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{-}$);Holladay,M.W.等人,(1983)Tetrahedron Lett 24:4401-4404($-\text{C}(\text{OH})\text{CH}_2\text{-}$);和Hruby,V.J.,(1982)Life Sci 31:189-199($-\text{CH}_2\text{-S-}$);将文献通过引用整体并入本文。

[0112] 在另一个实施方案中,非肽键是 $-\text{CH}_2\text{NH-}$ 。这样的肽模拟物可以比肽实施方案具有显著的优势,包括,例如:更加经济的生产、更强的化学稳定性、增强的药理学特性(半衰期、吸收、效力、功效等)、改变的特异性(例如广谱生物活性)、降低的抗原性等。

[0113] 肽模拟物的各种设计是可能的。例如,特别考虑的是其中的必要构象被非肽稳定化的环肽,Lob1等人的第5,192,746号美国专利、Aversa等人的第5,576,423号美国专利、Shashoua的第5,051,448号美国专利和Gaeta等人的第5,559,103号美国专利描述了制备这些化合物的多种方法,将所有专利通过引用并入本文。模拟肽序列的非肽化合物的合成也是本领域已知的。Eldred等人,J.Med.Chem.37:3882(1994)(将其通过引用整体并入本文)描述了模拟肽序列的非肽拮抗剂。同样,Ku等人,J.Med.Chem 38:9(1995)(将其通过引用整体并入本文)进一步阐明了一系列这样的化合物的合成。

[0114] 合成后可以实施进一步的修饰。例如,根据20030072737-A1,肽可以被进一步化学修饰,即氨基甲酰化、乙酰化、琥珀酰化、胍基化、硝化、三硝基苯基化、脘化等。

[0115] 此外,肽可以由重组肽-突变蛋白(mutein)组成。公开的突变可包括取代;缺失,包括内部缺失;添加,包括产生融合蛋白的添加;或氨基酸序列内和/或与其邻近的氨基酸残基的保守取代(但这导致“沉默”改变);和非保守氨基酸改变;以及较大的插入和缺失。

[0116] 如上所述,保守或非保守氨基酸取代可以在一个或多个氨基酸残基处进行。可以进行保守和非保守取代二者。保守替代是在其侧链有关系的氨基酸家族中发生的替代。基因编码的氨基酸可分为四个家族:(1)酸性=Asp(D)、Glu(G);(2)碱性=Lys(K)、Arg(R)、

His (H) ; (3) 非极性 (疏水性) =Cys (C) 、Ala (A) 、Val (V) 、Leu (L) 、Ile (I) 、Pro (P) 、Phe (F) 、Met (M) 、Trp (W) 、Gly (G) 、Tyr (Y) ; 和 (4) 不带电极性 =Asn (N) 、Gln (Q) 、Ser (S) 、Thr (T) 。非极性可以细分为:强疏水性 =Ala (A) 、Val (V) 、Leu (L) 、Ile (I) 、Met (M) 、Phe (F) ; 和 中度疏水性 =Gly (G) 、Pro (P) 、Cys (C) 、Tyr (Y) 、Trp (W) 。以供选择的方式,氨基酸谱可以分为 (1) 酸性 =Asp (D) 、Glu (G) ; (2) 碱性 =Lys (K) 、Arg (R) 、His (H) 、(3) 脂族 =Gly (G) 、Ala (A) 、Val (V) 、Leu (L) 、Ile (I) 、Ser (S) 、Thr (T) , 其中 Ser (S) 和 Thr (T) 任选地单独分类为脂族-羟基; (4) 芳族 =Phe (F) 、Tyr (Y) 、Trp (W) ; (5) 酰胺 =Asn (N) 、Glu (Q) ; 和 (6) 含硫 =Cys (C) 和 Met (M) 。(参见例如, Biochemistry, 第4版, L.Stryer, WH Freeman and Co. 编, 1995, 将其通过引用整体并入本文)。

[0117] 供选择地, 突变可以沿着肽的全部或部分编码序列被随机引入, 例如通过饱和诱变, 且可以筛选得到的突变体的生物活性, 以确定保留活性的突变体。诱变后, 编码的肽可以被重组表达, 而且可确定重组肽的活性。

[0118] 在另一个实施方案中, 可以通过添加聚合物 (例如聚乙二醇)、糖、或另外的蛋白质 (例如融合构建体) 对肽进行进一步修饰以努力延长肽的半衰期或增强肽的组织保护作用。这些修饰的实例在 WO/04022577A3 和 WO/05025606A1 中公开, 将其通过引用并入本文。例如, 聚乙二醇聚合物可以连接到 GDKA (SEQ ID NO:3) 、GDKARYEREM (SEQ ID NO:1) 或 GDKARYEREA (SEQ ID NO:2) 以形成聚乙二醇化类似物。

[0119] 根据选择的结合化学和肽上已存在或产生的反应性位点的数目, 可以用可重现的方式附加一个、两个或选定数目的聚合物。PEG 及其衍生物与肽连接的主要模式是通过肽氨基酸残基的非特异性键合 (参见例如, 第4,088,538号美国专利、第4,496,689号美国专利、第4,414,147号美国专利和 PCT WO 87/00056) 。PEG 与肽连接的另一种模式是通过糖肽上的糖基残基的非特异性氧化 (参见例如 WO 94/05332) 。在这些非特异性方法中, PEG 以随机的、非特异性的方式添加到肽骨架上的反应性残基上。

[0120] 7. 测试肽的分析方法

[0121] 可以使用各种分析方法来确定上述肽在用于本文提供的治疗方法时的效用。用于组织保护的的分析方法描述于例如美国专利 6,531,121; 7,345,019; 7,410,941; 7,767,643; 和 8,071,554 中。另外, 本领域普通技术人员将认识到, 肽的预防、减轻或治疗与组织损伤相关的疾病或障碍或与疾病或障碍的作用或症状相关的损伤的能力可以通过各种体外和体内分析得到证实, 但是在某些实施方案中可以使用体内分析。

[0122] 7.1 组织保护分析方法和模型

[0123] 本方法中使用的肽显示组织保护特性, 即抗凋亡、神经发生、神经保护等特性。可以测试本文提供的肽的组织保护活性, 例如, 保护细胞、组织或器官。可以使用体外和体内分析进一步测试保护活性。指示组织保护活性的体外测试包括, 例如, 细胞增殖分析、细胞分化分析, 或检测被组织保护受体复合物例如组织保护细胞因子受体复合物上调的蛋白或核酸的存在和活性, 例如, 核仁蛋白、神经珠蛋白、细胞球蛋白或共济蛋白。例如, 神经珠蛋白可以参与促进氧的运输或短期储存。因此, 氧运输或储存分析可以用作确定或筛选具有调节组织保护活性的化合物的分析方法。

[0124] 神经珠蛋白响应缺氧或缺血而在中枢神经系统的细胞和组织中表达, 并且可提供保护以免受损伤 (Sun 等人 2001, PNAS 98:15306-15311; Schmid 等人, 2003,

J. Biol. Chem. 276:1932-1935, 将其各自通过引用整体并入本文)。细胞球蛋白可以在保护中扮演类似角色,但在各种组织中以不同的水平表达 (Pesce 等人, 2002, EMBO 3:1146-1151, 将其通过引用整体并入本文)。在一个实施方案中,可以在将肽与细胞接触之前和之后,测量细胞中的上调蛋白的水平。在某些实施方案中,与组织保护活性相关上调蛋白在细胞中的存在可以用于证实肽的组织保护活性。

[0125] 核仁蛋白可以保护细胞免于损伤。其在细胞中发挥多种作用,包括调节转录过程、序列特异性RNA-结合蛋白、胞质分裂、核生成、信号转导、T-细胞诱发的细胞凋亡、染色质重构或复制。其也可以充当细胞表面受体DNA/RNA解旋酶、DNA依赖性ATP酶、蛋白穿梭、转录因子组件、或转录抑制子 (Srivastava和Pollard, 1999, FASEB J., 13:1911-1922; 和Ginisty 等人, 1999, J. Cell Sci., 112:761-772, 将其各自通过引用整体并入本文)。

[0126] 上调蛋白的表达可以通过检测细胞中对应于该蛋白的mRNA水平来检测。mRNA可以与特异性结合编码该上调蛋白的核酸的探针杂交。杂交可以由例如Northern印迹、Southern印迹、阵列杂交、亲和色谱或原位杂交组成。

[0127] 也可以使用体外神经保护分析检测本发明的肽的组织保护活性。例如,可以通过胰蛋白酶消化由新生大鼠海马制备原代神经元培养物,并且通过如任何本领域已知的和/或本文描述的方法培养,例如在MEM-II生长培养基 (Invitrogen)、20mM D-葡萄糖、2mM L-谷氨酰胺、10% Nu-血清 (牛; Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ)、2% B27 补充剂 (Invitrogen)、26.2mM NaHCO₃、100U/ml青霉素和1mg/ml链霉亲和素中培养 (参见例如, Leist 等人, 2004, Science 305:239-242, 其全部内容通过引用并入本文)。在接种一天后,添加1 μ M胞嘧啶阿拉伯-呋喃糖苷。然后将培养了十三天的培养物用增加剂量的目标肽 (3-3000pM) 预孵育24h。在第14天,去除培养基,并用含300 μ M NMDA的PBS在室温 (RT) 下激发培养物。5min后,将预处理的培养基返回到培养物中,然后将该培养物返回培养箱24h。细胞在多聚甲醛中固定,用Hoechst 33342 (Molecular Probes, Eugene, OR) 染色,且对固缩的凋亡细胞核进行计数。包含NGF (50ng/ml) 和MK801 (1 μ M) 作为阳性对照。

[0128] 可以使用动物模型系统来证实化合物的组织保护活性,或证实通过本文描述的上述筛选方法确定的化合物的安全性和功效。然后可以使用动物模型测试在分析中确定的化合物对关注的一类组织损伤、疾病、病症或综合征的生物活性。这些包括被工程化以包含与功能性读出系统偶联的组织保护受体复合物的动物,例如转基因小鼠。

[0129] 可以用来测试确定的化合物的细胞或组织保护活性的功效的动物模型是本领域已知的且包括,例如,对Lewis大鼠中急性实验性过敏性脑脊髓炎发作的保护,在接受了脑创伤、脑缺血 (“中风”) 或由兴奋性毒素刺激的癫痫后的小鼠中恢复或保护其免受减弱的认知功能 (Brines 等人, 2000, PNAS, 97:10295-10672, 将其通过引用整体并入本文), 保护免受诱导的视网膜缺血 (Rosenbaum 等人, 1997, Vis. Res. 37:3443-51 将其通过引用整体并入本文), 保护免受坐骨神经损伤, 和保护免受心脏的缺血-再灌注损伤 (体外心肌细胞研究和体内缺血-再灌注损伤, 参见, 例如, Calvillo 等人, 2003, PNAS 100:4802-4806 和 Fiordaliso 等人, 2005, PNAS 102:2046-2051, 将其各自通过引用整体并入本文)。这些分析在Grasso 等人 (2004) Med Sci Monit 10:BR1-3、第W002/053580号PCT公开或PCT申请PCT/US2006/031061中进一步详细描述, 将其各自通过引用整体并入本文。用于确定肽的组织保护活性的其它分析是本领域技术人员熟知的。

[0130] 其中糖尿病由链脲佐菌素 (STZ) 诱导的糖尿病小鼠或大鼠模型是可获得的并且是本领域技术人员熟知的。STZ是衍生自不产色链霉菌 (*Streptomyces achromogenes*) 的葡糖胺-亚硝基脲化合物,其临床上用作治疗胰腺β细胞癌的化疗剂。STZ损害胰腺β细胞,导致低胰岛素血症和高血糖症。在高剂量下通常单独给予,STZ通过其类似于细胞毒性亚硝基脲化合物的烷基化性质靶向β细胞。在低剂量下通常在多次暴露中给予,STZ引发免疫和炎症反应,可能与谷氨酸脱羧酶自身抗原的释放有关。在低剂量STZ诱导中,β细胞的破坏和高血糖状态的诱导是炎性浸润(包括胰岛中的淋巴细胞)的结果。Graham等人 (Graham等人 2011*Comp Med*.61:356-360) 和Lenzen S. (Lenzen S.2008*Diabetologia* 51:216-226) 描述了STZ诱导的糖尿病小鼠或大鼠模型。

[0131] 正如Beiswenger等人所证明的,热缩足潜伏期的增加与表皮神经支配的丧失相关,表现为STZ诱导的糖尿病在鼠中开始后4周,表皮内神经纤维密度降低 (Beiswenger等人,2008*Neurosci Lett*.442:267)。Smith等人还报道了表皮内神经纤维的丧失是神经病变严重程度和进展的有效替代指标 (Smith等人,2006*Diabetes Care* 29:1294)。因此,可以测试肽对STZ诱导的糖尿病小鼠的热缩足潜伏期的组织保护作用,以证明其在糖尿病神经病变中保护免受神经损伤的能力。

[0132] 为了测试糖尿病神经病变小鼠模型中的肽,对雄性Swiss Webster小鼠单次注射STZ (180mg/kg i.p.) 以诱导胰岛素缺乏型糖尿病。此后3天确认高血糖,并且为了确保诱导足够的神经病变,仅使用血糖水平超过15mmol/l的小鼠。在未治疗的糖尿病四周后,组织保护性肽或对照治疗(磷酸盐缓冲盐水 (PBS)) 作为滴眼剂 (50微升的50纳摩尔溶液) 施用到双眼,持续5天/周。来自第8,853,358号美国专利的SEQ ID NO:282的肽用作阳性对照。治疗12周后,测试小鼠的爪热敏感性。为了测量热缩足潜伏期,将小鼠置于具有暖玻璃地板的外壳中,并将移动辐射热源导向一只后爪的足底表面。热量每秒升高0.9°C以确保缩足反应涉及热敏C-纤维的活化 (Yeomans等人,1996*Pain* 68:133)。从开始加热到缩足的时间记录在间隔5分钟的4次独立试验中,其中每只小鼠使用最后3次试验的中值。绘制缩足时间并在肽处理组和对照组之间进行比较。

[0133] 类似地,神经性疼痛的动物模型可用于测试组织保护肽的功效。在该研究中使用的大鼠是8周龄雌性Sprague-Dawley大鼠 (Charles River, Maastricht, The Netherlands)。用6%七氟烷诱导和3%维持麻醉动物。在动物左后肢的侧表面上形成小切口,暴露肌肉。通过股二头肌的两个头之间的钝性分离显示坐骨神经的三根分叉部。接下来,在大鼠中用5-0丝,在小鼠中用6-0丝将胫骨和腓总神经紧紧结扎,并切割以移除2-4mm的远端神经。腓肠神经保留完整。为了防止自发神经重新连接,将横切的神经移位。在手术过程中,要特别注意不要拉伸或触摸坐骨神经或腓肠神经。在大鼠中用4-0丝,在小鼠中用6-0丝将伤口分两层闭合,分别在大鼠和小鼠中施用单剂量的0.01和0.05mg/kg丁丙诺啡,以缓解术后疼痛。在暴露后,诱导保留性神经损伤 (SNI),并用4-0 (大鼠) 或6-0 (小鼠) 丝将伤口分两层封闭,并且施用单剂量的0.01 (大鼠) mg/kg丁丙诺啡用于缓解术后疼痛。在手术过程中,要特别注意不要拉伸或触摸暴露的神经。

[0134] 在诱导SNI后24小时开始治疗,其包括以2天间隔腹腔内注射组织保护肽或对照。来自第8,853,358号美国专利的SEQ ID NO:282的肽用作阳性对照。使用不同的von Frey毛发 (Semmes-Weinstein Monofilaments, North Coast Medical Inc., San Jose, CA) 测试触

觉异常性疼痛,其具有增加的刚度(0.004-15g),导致增量力施加在受影响的后爪的足底表面上。将毛发以1-2秒的间隔向测试区域内略微不同的位置施加10次。记录通过快速缩足引起疼痛反射所需的力,并且另外的纤丝没有施加到显示出反应的爪上。在肽处理组和对照组之间比较记录的力。

[0135] 类似地,可以利用竞争性分析来确定肽是否是组织保护性的。

[0136] 在96孔板中,在合适的生长培养基中接种8种1:2连续稀释的已知组织保护性化合物/生物标志物,和已知组织保护性化合物/生物标志物的相同稀释系列和过量的目标肽。每次稀释的最终体积应为约100 μ l。如上所述,将BaF3细胞再次接种到平板中并使其孵育。在适当的时间后,洗涤细胞并在荧光板读板仪上或通过本领域已知的任何其他合适的方法读取板以检测生物标志物。如果含有已知组织保护性化合物/生物标志物和目标肽的平板和/或孔的读数小于仅含有已知组织保护性化合物/生物标志物的平板的读数,则目标肽是组织保护性的。

[0137] 迄今发现的许多蛋白因子,包括所有已知的细胞因子,在一种或多种因子依赖性细胞增殖分析中表现出活性,因此这些分析起到方便地确认细胞因子活性的作用。肽的活性可以通过细胞系的许多常规因子依赖性细胞增殖分析中的任何一种来证明,包括但不限于32D、DA2、DA1G、T10、B9、B9/11、BaF3、MC9/G、M+(前B M+)、2E8、RB5、DA1、123、T1165、HT2、CTLL2、TF-1、Mo7e和CMK。在存在或不存在肽的情况下培养这些细胞,并通过例如测量氘标记的胸苷的掺入或通过基于3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基四唑溴化物(MTT)的代谢分解的比色分析来检测细胞增殖(Mosman, 1983, J. Immunol. Meth. 65:55-63, 将其通过引用整体并入本文)。

[0138] 另外,通过测量一种或多种磷酸化中间体来测量细胞信号转导途径的活化也是本领域普通技术人员所熟知的。例如,本文所述的肽的活性可以通过分析对于通过多种细胞因子受体的信号转导必需的Jak2的活化来测量(Parganas等人, 1998, Cell 93:385-395),或使用本领域熟知的方法(Liu等人, 2014, Nature 508:541-545)和/或实施例2中描述的方法,测量AKT通过磷酸化的活化来测量。本领域技术人员将认识到,这种信号转导途径的活化是分析本文所述肽的组织保护活性的间接方法。当与本文所述的一种或多种另外的组织保护分析组合时,测量信号转导途径的活化(例如,磷酸化)可以进一步提供本文所述的肽的组织保护活性的证据。

[0139] 在一种通过磷酸化活化AKT的分析中,HUVEC购自Cell Applications(San Diego, CA)并在潮湿培养箱中,在含有5%CO₂的空气中在37 $^{\circ}$ C下,在补充有2%胎牛血清(FCS)和青霉素/链霉素(P/S)的培养基EGM-2中生长。可以进行初步实验以确定在通过活化组织保护受体的化合物刺激后Akt磷酸化的时间进程。在一些分析中,Akt的磷酸化在被活化组织保护受体的化合物刺激后10分钟达到最大。在用组织保护肽或对照处理HUVEC后,制备细胞裂解物并使用抗Akt和抗磷酸-Akt抗体(Cell Signaling Technology, Danvers, MA)进行Western印迹。为了进行Western印迹,对细胞裂解物进行SDS-PAGE,并转移到硝酸纤维素膜(Amersham Biosciences, Piscataway, NJ)上。将膜在室温下用含有2%BSA和0.05%吐温20的PBS封闭1小时。将印迹在4 $^{\circ}$ C下孵育过夜或在室温下用抗磷酸-Akt的一抗孵育4小时,然后用辣根过氧化物酶缀合的二抗孵育1小时。然后用针对Akt的抗体重新探测印迹以确认相等的蛋白质负载。使用ECL(Amersham Biosciences, Piscataway, NJ)使免疫反应条带可视

化。在一些分析中,在对照细胞和肽处理的细胞之间比较磷酸化Akt条带的强度。在一些分析中,将对照细胞和肽处理的细胞的磷酸-Akt带的强度与总Akt带的强度的比率与进行比较。

[0140] 如果肽表现出组织保护活性,则本领域普通技术人员将认识到,使用一种本领域技术人员已知的神经保护和组织保护分析来证实结果将是有益的,所述分析例如但不限于P-19和PC-12细胞分析。另外,各种体内模型,例如与脊髓损伤、缺血性中风、外周神经损伤、伤口或心脏、眼睛、肾脏等的损伤有关的动物模型将有助于进一步表征肽。

[0141] 7.2对具体适应症的分析

[0142] 毒剂

[0143] 可以使用本领域已知的或本文描述的各种分析证明在本文提供的方法中使用的分离的肽在体外或体内抑制由暴露于毒剂所导致的损伤、作用或症状。

[0144] 可以在本领域的各种体外分析中检测在本文提供的方法中使用的另外的肽,以确定其预防、治疗、改善或控制由暴露于毒剂所导致的损伤、作用或症状的能力。一般而言,其通过以下实现:选择合适的细胞系,将该细胞与目标毒剂接触,用目标肽处理一部分细胞,并确定在毒剂的存在下以及在毒剂和目标肽的存在下细胞的存活或应答。如果细胞在肽的存在下显示改善的存活或损伤、作用或症状的减少,则该肽可以被认为是毒性暴露的可能的治疗剂。此外,本领域普通技术人员将认识到,肽作为保护剂的能力可以通过在毒剂激发前用肽处理细胞来评价。

[0145] 例如,对毒剂的合适分析包括但不限于:化学制剂:a) 皮肤细胞系,如J-774(源自小鼠巨噬细胞的细胞系)、CHO-K1(源自中国仓鼠卵巢细胞的上皮细胞系株)和HeLa(人宫颈癌)(Sawyer,T.等人,Hypothermia as an adjunct to vesicant-induced skin injury, *Eplasty* 2008;8:e25);b) 针对糜烂剂的角膜细胞系(Amir,A.等人,The corneal epithelium in sulfur mustard ocular injury-In vitro and ex vivo studies, *Proceedings of the U.S.Army Medical Defense Bioscience Review,Aberdeen Proving Ground,MD(2004)*);c) 巨噬细胞(Amir A.等人,Sulfur mustard toxicity in macrophages:effect of dexamethasone, *J Appl Toxicol*,20Suppl 1:S51-8(2000));d) 上呼吸道细胞系(Andrew,D.J.和C.D.Lindsay,Protection of human upper respiratory tract cell lines against sulphur mustard toxicity by glutathione esters, *Hum Exp Toxicol*17(7):387-95(1998);Calvet等人,Airway epithelial damage and release of inflammatory mediators in human lung parenchyma after sulfur mustard exposure, *Hum Exp Toxicol* 18(2):77-81(1999);Langford,A.M.等人,The effect of sulphur mustard on glutathione levels in rat lung slices and the influence of treatment with arylthiols and cysteine esters, *Hum Exp Toxicol*15(8):619-24);e) 皮肤模型(Blaha等人,Effects of CEES on inflammatory mediators,heat shock protein 70A,histology and ultrastructure in two skin models, *J Appl Toxicol* 20Suppl 1:S101-8(2000);Henemyre-Harris等人,An in vitro wound healing model to screen pharmacological interventions for the effective treatment of cutaneous sulfur mustard injuries, *Proceedings of the U.S.Army Medical Defense Bioscience Review,Aberdeen Proving Ground,MD(2004)*) (对于合适的体外研究的更多

文献,一般参见www.counteract.rutgers.edu/invitro.html); 辐射剂: a) 内皮细胞 (Abderrahmani, R. 等人, Role of plasminogen activator inhibitor type-1 in radiation-induced endothelial cell apoptosis, Radioprotection 2008, vol 43, no.5), b) 神经免疫细胞 (传入神经、肠感觉神经、肥大细胞) (Wang, J. 等人, Neuroimmune interactions: potential target for mitigating or treating intestinal radiation injury, British Journal of Radiology (2007) 80, S41-S48), c) 血或淋巴细胞培养物 (Lloyd DC 等人, Phys Med Biol 18 (3) :421-31 (1973); Lloyd DC 等人, Mutat. Res. 179 (2) : 197-208 (1987); Blakely WF 等人, Stem Cells 13 (Suppl 1) :223-30 (1995); Gotoh E 等人, Int. J. Radiation. Biol. 81 (1) :33-40 (2005)); 生物制剂: (a) 外周血单核细胞 (Rasha, H. 等人 Modeling of SEB-induced host gene expression to correlate in vitro to in vivo responses: Microarrays for biodefense and environmental applications, Biosensors and Bioelectronics (2004) vol.20, no.4, 719-727)。

[0146] 此外,本领域已知用于评价治疗剂对毒剂暴露的作用的合适的体内分析方法。考虑使用大鼠、小鼠、豚鼠、兔、猪、绵羊、雪貂、狗和非人灵长类动物的动物模型,以及特别易受毒剂影响的转基因动物 (CD46 小鼠)。特别地,本领域已知的分析包括但不限于: 化学制剂: (1) Reid, F.M., Sulfur mustard induced skin burns in weanling swine evaluated clinically and histopathologically, Journal of applied toxicology, vol.20 (S1), S153-S160 页 (2001); (2) Isidore, M.A. 等人, A dorsal model for cutaneous vesicant injury 2-chloroethyl ethyl sulfide using c57bl/6 mice, Cutaneous and ocular toxicology, Vol.26 (3), 265-276 (2007); (3) 一般参见www.counteract.rutgers.edu/animal.html; (4) Kassa J. 等人, The Choice: HI-6, pradoxime or Obidoxime against Nerve Agents?, www.asanlte.com/ASANews-97/Antidot-Choice.html, (5) Shih, TM 等人, Organophosphorus nerve agents-induced seizures and efficacy of atropine sulfate as anticonvulsant treatment, Pharmacol-Biochem-Behav. 1999 Sep, 64 (1), 147-53, (6) Luo, C 等人, Comparison of oxime reactivation and aging of the nerve agent-inhibited monkey and human acetylcholinesterases, Chemico-Biological Interactions, 175 (1-3), 261-266 (2008); 辐射剂: (1) W.F. Blakely 等人, In Vitro and Animal Models of Partial-Body Dose Exposure: Use of Cytogenetic and Molecular Biomarkers for Assessment of Inhomogeneous Dose Exposures and Radiation Injury, PB-Rad-Injury 2008 Workshop, May 5-6, 2008 AFRRRI, Bethesda, Maryland; (2) Augustine, A 等人, Meeting Report: Animal Models of Radiation Injury, Protection and Therapy, Radiation Research 164:100-109 (2005); (3) Houchen, C 等人 Prosurvival and antiapoptotic effects of PGE₂ in radiation injury are mediated by EP₂ receptor in intestine, Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 284:G490-G498, 2003; (4) Jichun Chen, Animal Models for Acquired Bone Marrow Failure Syndromes, Clinical Medicine & Research 3 (2) :102-108; 生物制剂: (1) Biodefense: Research Methodology and Animal Models, James R. Swearingen (editor) 2006 CRC Press。

[0147] 炎症

[0148] 另外,可使用炎症的各种体外模型来评价肽保护或治疗炎症对身体的损伤、症状或作用的能力。首先,可以通过已知方法在用肽治疗后在炎症分析中测量炎症介质的水平来确认肽调节炎症介质的能力,所述方法包括但不限于ELISA、细胞微珠阵列分析、高灵敏度和免疫浊度分析。例如,为确定肽是否调节TNF- α 或IL-1,可使用LPS-介导的细胞因子生成的鼠模型。鼠模型中的一些小鼠用目标肽预处理,然后用LPS激发,而其它的小鼠将被盐水处理。然后收集血液,并可以通过ELISA试剂盒(OPT-EIA小鼠TNF- α 和IL-1ELISA试剂盒(BD Biosciences))来确定血中的TNF- α 和IL-1水平。如果治疗的动物中的TNF- α 水平低于盐水处理的动物中的TNF- α 水平,那么可以认为该肽调节TNF- α 。在一些实施方案中,检测肽调节多于一种炎症介质的能力,并且在一个实施方案中,所述介质不是TNF- α 或者是除TNF- α 以外的介质,并且在一个实施方案中,所述介质是组胺。类似地,可以在另外的体外分析中检测肽,包括但不限于在Lopata, Andreas L., Specialized in vitro Diagnostic Methods In The Evaluation Of Hypersensitivity-An Overview, Current Allergy & Clinical Immunology, March 2006, Vol. 19, No. 1 (组胺和类胰蛋白酶分析)中公开的分析,和Arulmozhi等人, Pharmacological Investigations of Sapindus trifoliatus in various in vitro and in vivo models of inflammation, Indian Journal of Pharmacology, vol. 37:2, 96-102 (2005) (5-脂氧合酶(5-LO)、环加氧酶(COX)、白细胞三烯B4 (LTB4)和一氧化氮合酶(NOS))。

[0149] 此外,炎症的体内分析可用于评价肽作为针对毒剂的治疗剂的效用。体内分析,包括但不限于鼠EAE模型,利用转基因小鼠的分析,如严重结肠炎的MDBiosciences DSS IBD鼠模型、炎性肠病的MDBioscience TNBS IBD鼠模型、涉及第6,437,216号美国专利中公开的IL-1敲除小鼠的模型或涉及TNF- α 的转基因小鼠模型,如在以下所公开的:Probert等人 Spontaneous inflammatory demyelinating disease in transgenic mice showing CNS-specific expression of tumor necrosis factor α . Proc. Natl. Acad. Sci. 1995 USA 92, 11294-11298, Kontoyiannis等人 Impaired on/off regulation of TNF biosynthesis in mice lacking TNF AU-rich elements: implications for joint and gut-associated immunopathologies. Immunity 10:387-398, 1999, Keffer等人 Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis. EMBO J. 1991 Dec; 10 (13): 4025-31, 或使用化学或合成激发物以诱发炎症的模型,例如在JPET 307:373-385, 2003中公开的哮喘和慢性阻塞性肺病的模型,在EP 1 777 234中公开的佐剂性关节炎模型,鼠LPS休克模型,鼠LPS肺模型,急性爪炎症模型,或组氨酸激发的风团形成模型,如Brines M. & Cerami A. 2012, Molecular Medicine 18:486-496中所述。

[0150] 此外,使用熟知的临床研究检测化合物在人的功效,例如在Ravensberg等人“Validated safety predictions of airway responses to house dust mites in asthma,” Clinical and Experimental Allergy, 37:100-107 (2007)中公开的皮肤点刺试验和支气管激发试验;在Diamant等人“Methods used in clinical development of novel anti-asthma therapies,” Respiratory Medicine (2008) 102, 332-338中公开的哮喘研究;或在Boot等人“Nasal Nitric Oxide: longitudinal reproducibility and the effects of a nasal allergen challenge in patients with allergic rhinitis,”

Allergy 2007:62:378-384中公开的鼻过敏原激发。

[0151] 癌症

[0152] 可以使用本领域已知的或本文描述的各种分析证实在本文提供的方法中使用的分离的肽在体外或体内抑制肿瘤细胞增殖、细胞转化和肿瘤发生。这些分析可以使用癌症细胞系的细胞或来自患者的细胞。可以使用本领域熟知的许多分析来评估这些存活和/或生长；例如，细胞增殖可以通过测量³H-胸苷掺入，通过直接细胞计数，通过检测已知基因例如原癌基因（例如fos、myc）或细胞周期标记（Rb、cdc2、细胞周期蛋白A、D1、D2、D3或E）的转录、翻译或活性的变化来分析。这样的蛋白和mRNA水平和活性可以通过任何本领域熟知的方法确定。例如，蛋白可以通过已知的免疫诊断法来定量，例如使用市售抗体（例如，许多细胞周期标记抗体来自Santa Cruz, Inc.）的Western印迹或免疫沉淀。mRNA可以通过本领域熟知和常规的方法定量，例如通过northern分析、RNA酶保护、与逆转录相关的聚合酶链式反应等。细胞活力可以通过使用台盼蓝染色或本领域已知的其它细胞死亡或活力标志物来评估。分化可以基于形态学的改变等在视觉上评估。

[0153] 本文提供了通过本领域已知的各种技术进行的细胞周期和细胞增殖分析，包括但不限于以下：

[0154] 作为一个实例，溴脱氧尿苷（“BRDU”）掺入可被用作确定增殖细胞的分析。BRDU分析通过将BRDU掺入新合成的DNA中的来确定经历DNA合成的细胞群体。然后新合成的DNA可以使用抗BRDU抗体检测（参见Hoshino等人，1986, Int. J. Cancer 38, 369; Campana et al., 1988, J. Immunol. Meth. 107, 79）。

[0155] 细胞增殖也可以使用(³H)-胸苷掺入来检测（参见例如，Chen, J., 1996, Oncogene 13:1395-403; Jeoung, J., 1995, J. Biol. Chem. 270:18367-73）。该分析允许对S期DNA合成进行定量表征。在该分析中，合成DNA的细胞将使³H-胸苷掺入到新合成的DNA中。随后可以通过本领域标准技术测量所述掺入，例如通过闪烁计数器（例如Beckman LS 3800液体闪烁计数器）对放射性同位素计数。

[0156] 对增殖细胞核抗原（PCNA）的检测也可被用来测量细胞增殖。PCNA是36千道尔顿的蛋白，其在增殖细胞特别是在细胞周期的G1早期和S期中的表达升高，因此可以充当增殖细胞的标志物。通过使用抗-PCNA抗体免疫染色确定阳性细胞（参见Li等人，1996, Curr. Biol. 6:189-199; Vassilev等人，1995, J. Cell Sci. 108:1205-15）。

[0157] 可以通过对细胞群体的样本随时间计数（例如每日细胞计数）来测量细胞增殖。可以使用血细胞计数器和光学显微镜对细胞进行计数（例如HyLite血细胞计数器，Hausser Scientific）。为了获得目标细胞群体的生长曲线，将细胞数对时间作图。在一个实施方案中，通过该方法计数的细胞首先与染料台盼蓝（Sigma）混合，使得活细胞排除染料，且被计数为该群体的有活力的成员。

[0158] 可以例如基于细胞的DNA倍体值测量细胞的DNA含量和/或有丝分裂指数。例如，处于细胞周期的G1期的细胞一般包含2N DNA倍体值。其中DNA已经复制但还没有进行有丝分裂的细胞（例如，处于S-期的细胞）将呈现比2N高且最多达4N DNA含量的倍体值。倍体值和细胞周期动力学可以使用碘化丙啶分析进一步测量（参见例如，Turner, T.等人，1998, Prostate 34:175-81）。供选择地，DNA倍体可以通过在计算机微密度测定染色系统（参见例如，Bacus, S., 1989, Am. J. Pathol. 135:783-92）中对DNA Feulgen染色（其以化学计量方式

与DNA结合)的定量来确定。在另一个实施方案中,DNA含量可以通过制备染色体分散(chromosomal spread)来分析(Zabalou,S.,1994,Hereditas.120:127-40;Pardue,1994,Meth.Cell Biol.44:333-351)。

[0159] 细胞周期蛋白(例如CycA、CycB、CycE、CycD、cdc2、Cdk4/6、Rb、p21或p27)的表达提供了与细胞或细胞群体的增殖状态相关的关键信息。例如,抗增殖信号传导通路中的确定可以通过p21^{cip1}的诱导来表示。p21在细胞中的表达水平增加导致延迟进入细胞周期的G1期(Harper等人,1993,Cell 75:805-816;Li等人,1996,Curr.Biol.6:189-199)。p21诱导可以通过使用市售特异性抗-p21抗体(例如,来自Santa Cruz,Inc.)免疫染色来确定。类似地,细胞周期蛋白可以通过使用市售抗体进行的Western印迹分析来检测。在另一个实施方案中,在检测细胞周期蛋白前,细胞群体被同步。也可以通过FACS(荧光激活细胞分选仪)分析使用针对目标蛋白的抗体来检测细胞周期蛋白。

[0160] 对细胞周期长度或细胞周期速度的变化的检测也可被用于测量本文提供的肽对细胞增殖的抑制。在一个实施方案中,通过细胞群体的倍增时间来确定细胞周期的长度(例如,使用与本文提供的一种或多种肽接触或未与其接触的细胞)。在另一个实施方案中,使用FACS分析来分析细胞周期进展的阶段,或纯化G1、S和G2/M部分(参见例如,Delia,D.等人,1997,Oncogene 14:2137-47)。

[0161] 可以通过本文描述的方法或通过本领域已知的任何方法来检测细胞周期检查点(多个细胞周期检查点)的失效和/或细胞周期检查点(多个细胞周期检查点)的诱导。在不受限制的情况下,细胞周期检查点是确保某些细胞事件以特定的顺序发生的机制。检查点基因定义为在早期事件没完成前允许晚期事件发生的突变(Weinert,T.和Hartwell,L.,1993,Genetics,134:63-80)。细胞周期检查点基因的诱导或抑制可以例如通过Western印迹分析或通过免疫染色等分析。细胞周期检查点的失效可以进一步通过在特定事件没发生前细胞通过检查点的进展来评估(例如,在没有完全复制基因组DNA的情况下进展到有丝分裂)。

[0162] 除了特定细胞周期蛋白表达的影响,细胞周期中涉及的蛋白的活性和翻译后修饰可在细胞的调节和增殖状态中发挥不可或缺的作用。本发明提供了涉及通过本领域已知的任何方法检测翻译后修饰(例如,磷酸化)的分析。例如,检测磷酸化的酪氨酸残基的抗体是有市售的,并且可用在Western印迹分析中以检测具有这些修饰的蛋白质。在另一个实例中,修饰如十四烷基化可以用薄层色谱或反相HPLC检测(参见例如,Glover,C.,1988,Biochem.J.250:485-91;Paige,L.,1988,Biochem J.;250:485-91)。

[0163] 信号传导和细胞周期蛋白和/或蛋白复合物的活性通常由激酶活性介导。还提供了通过分析例如组蛋白H1分析对激酶活性的分析(参见例如,Delia,D.等人,1997,Oncogene 14:2137-47)。

[0164] 也可以使用本领域熟知的方法证明本文提供的方法中使用的肽在体外培养的细胞中改变细胞增殖。细胞培养模型的具体实例包括但不限于,针对肺癌的原发性大鼠肺肿瘤细胞(Swafford等人,1997,Mol.Cell.Biol.,17:1366-1374)和大细胞未分化癌细胞系(Mabry等人,1991,Cancer Cells,3:53-58);针对结肠癌的结肠直肠细胞系(Park和Gazdar,1996,J.Cell Biochem.Suppl.24:131-141);针对乳腺癌的多个已建立的细胞系(Hambly等人,1997,Breast Cancer Res.Treat.43:247-258;Gierthy等人,1997,

Chemosphere 34:1495-1505; Prasad和Church, 1997, Biochem. Biophys. Res. Commun. 232: 14-19; 针对前列腺癌的多种充分表征的细胞模型 (Webber等人, 1996, Prostate, 部分1, 29:386-394; 部分2, 30:58-64; 和部分3, 30:1361-42; Boulikas, 1997, Anticancer Res. 17: 1471-1505); 针对泌尿生殖器系统癌连续的人膀胱癌细胞系 (Ribeiro等人, 1997, Int. J. Radiat. Biol. 72:11-20); 移行细胞癌的器官培养物 (Booth等人, 1997, Lab Invest. 76:843-857) 和大鼠进展模型 (Vet等人, 1997, Biochim. Biophys. Acta 1360:39-44); 以及针对白血病和淋巴瘤的已建立的细胞系 (Drexler, 1994, Leuk. Res. 18:919-927, Tohyama, 1997, Int. J. Hematol. 65:309-317)。

[0165] 本文提供的肽也可被证明在体外抑制细胞转化(或进展为恶性表型)。在该实施方案中, 将具有转化的细胞表型的细胞与一种或多种本文提供的肽接触, 并检测与转化的表型相关的特征(与体内致瘤能力相关的一组体外特征)的变化, 例如但不限于软琼脂中的集落形成、更圆的细胞形态、更松的底层附着、接触抑制的丧失、贴壁依赖性的丧失、蛋白酶例如纤溶酶原激活物的释放、糖运输的增加、血清需求的降低或胚胎抗原的表达等(参见 Luria等人, 1978, General Virology, 第3版, John Wiley&Sons, New York, 第436-446页)。

[0166] 侵袭力的丧失或粘附的降低也可被用来证明本文提供的方法中使用的肽的抗癌作用。例如, 转移性癌症形成的关键方面是癌前细胞或癌细胞从疾病的原发部位脱离并在继发部位建立新的集落生长的能力。细胞侵袭外周部位的能力反映了癌状态的可能性。侵袭力的丧失可以通过本领域已知的各种技术测量, 包括例如对E-钙粘素介导的细胞-细胞粘附的诱导。这样的E-钙粘素介导的粘附可以导致表型反转和侵袭力丧失 (Hordijk等人, 1997, Science 278:1464-66)。

[0167] 侵袭力的丧失可以进一步通过抑制细胞迁移来检测。各种2-维和3-维细胞基质有市售 (Calbiochem-Novabiochem Corp. San Diego, Calif.)。可以通过显微镜、延时摄影或摄像, 或通过本领域允许测量细胞迁移的任何方法来检测细胞迁移穿过或进入基质。在相关实施方案中, 侵袭力的丧失通过对肝细胞生长因子 (HGF) 的反应来检测。HGF-诱导的细胞分散与细胞例如Madin-Darby犬肾 (MDCK) 细胞的侵袭力相关。该分析确定了在对HGF的反应中已经丧失了细胞分散活性的细胞群体 (Hordijk等人, 1997, Science 278:1464-66)。

[0168] 供选择地, 侵袭力的丧失可以通过细胞通过趋化小室 (Neuroprobe/Precision Biochemicals Inc. Vancouver, BC) 的迁移来测量。在该分析中, 在小室的一侧 (例如底部小室) 孵育化学引诱剂, 并将细胞接种到分隔出相对侧的滤器上 (例如顶部小室)。为了使细胞从顶部小室移动到底部小室, 细胞必须主动迁移通过滤器的小孔。然后可将已经迁移的细胞数目的棋盘分析与侵袭力相关联 (参见例如, Ohnishi, T., 1993, Biochem. Biophys. Res. Commun. 193:518-25)。

[0169] 在本文提供的方法中使用的肽也可被证实在体内抑制肿瘤形成。本领域已知大量的过度增殖障碍的动物模型, 包括肿瘤发生和转移性扩散 (参见表317-1, 第317章, "Principles of Neoplasia", Harrison's Principles of Internal Medicine, 第13版, Isselbacher等人编, McGraw-Hill, N.Y., p.1814, 和Lovejoy等人, 1997, J. Pathol. 181:130-135)。具体实例包括: 对于肺癌, 将肿瘤结节移植到大鼠中 (Wang等人, 1997, Ann. Thorac. Surg. 64:216-219) 或在耗尽NK细胞的SCID小鼠中建立肺癌转移 (Yono和Sone, 1997, Gan To Kagaku Ryoho 24:489-494); 对于结肠癌, 将人结肠癌细胞结肠癌移植到裸

小鼠中 (Gutman和Fidler,1995,World J.Surg.19:226 234),人溃疡性结肠炎的棉冠狨猴模型 (Warren,1996,Aliment.Pharmacol.Ther.10Supp 12:4547) 和具有腺瘤性息肉病肿瘤抑制物突变的小鼠模型 (Polakis,1997,Biochim.Biophys.Acta 1332:F127F147);对于乳腺癌,乳腺癌的转基因模型 (Dankort和Muller,1996,Cancer Treat.Res.83:71 88; Amundadittir等人,1996,Breast Cancer Res.Treat.39:119 135) 和大鼠中的肿瘤化学诱导 (Russo和Russo,1996,Breast Cancer Res.Treat.39:7-20);对于前列腺癌,化学诱导的和转基因啮齿动物模型,和人异种移植模型 (Royai等人,1996,Semin.Oncol.23:3540);泌尿生殖器系统癌,在大鼠和小鼠中诱发的膀胱肿瘤 (Oyasu,1995,Food Chem.Toxicol 33:747 755) 和将人移行细胞癌异种移植到裸大鼠中 (Jarrett等人,1995,J.Endourol.9:17);以及对于造血系统癌症,在动物中的移植的同种异体骨髓 (Appelbaum,1997,Leukemia 11 (Suppl.4):S15S17)。此外,已经描述了可适用于许多类型癌症的一般动物模型,包括但不限于p53-缺陷型小鼠模型 (Donehower,1996,Semin.Cancer Biol.7:269 278)、Min小鼠 (Shoemaker等人,1997,Biochem.Biophys.Acta,1332:F25F48) 和在大鼠中对肿瘤的免疫反应 (Frey,1997,Methods,12:173 188)。

[0170] 例如,可以向测试动物施用在本文提供的方法中使用的肽,在一个实施方案中,测试动物倾向于发展一类肿瘤,并且随后与没有施用本文提供的肽的动物相比,检查测试动物的降低的肿瘤形成的发生率。供选择地,可以向患有肿瘤的测试动物 (例如已经通过引入恶性、肿瘤性或转化的细胞,或通过施用致癌物在其中诱导肿瘤的动物) 施用本文提供的肽,并随后与没有施用本文提供的肽的动物比较,检查测试动物中的肿瘤消退。

[0171] 在某些实施方案中,其中细胞系 (例如小鼠巨噬细胞系,如mJ774) 被脂多糖刺激以分泌TNF α 的分析可用于测试本文所述肽的活性。该分析在Bohr等人2015,Journal of Molecular Medicine 93 (2):199-210中详细描述。

[0172] 8. 治疗用途

[0173] 8.1 机体反应的介质的调节

[0174] 本领域普通技术人员将认识到,本文提供的肽可以用于调节机体对与组织损伤相关的疾病或障碍的反应。特别地,可以用上述肽调节的介质的一个实例是炎症调节剂,包括但不限于,源自血浆的炎症介质,例如缓激肽、C3、C5a、因子XII、膜攻击复合物、Hageman因子、纤溶酶、凝血酶、淋巴因子 (巨噬细胞活化因子 (MAF)、巨噬细胞迁移抑制因子 (MMIF)、巨噬细胞趋化因子 (MCF)、白细胞迁移抑制因子 (LMIF)、组胺释放因子 (HRF) 和转移因子 (TF));白介素 (IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、...IL-15);肿瘤坏死因子 (TNF- α (恶病质素)、TNF- β (淋巴毒素));干扰素 (IFN- α 、IFN- β 、IFN- γ 、IFN- ω 、IFN- τ);集落刺激因子 (粒细胞集落刺激因子 (G-CSF)、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF)、巨噬细胞集落刺激因子 (M-CSF) 和多集落刺激因子 (IL-3));多肽生长因子 (酸性成纤维细胞生长因子 (aFGF)、碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF)、表皮生长因子 (EGF);神经生长因子 (NGF)、血小板源性生长因子 (PDGF) 和血管内皮生长因子 (VEGF));转化生长因子 (TGF- α 和TGF- β)、 α -趋化因子 (IL-8、中性粒细胞激活蛋白2 (NAP-2)、血小板因子-4 (PF-4) 和 β -血小板球蛋白 (BTG)); β -趋化因子 (单核细胞趋化蛋白1 (MCP-1)、MCP-3、MIP-1 α 、巨噬细胞炎症蛋白1 β (MIP-1 β)、活化调节的正常T细胞表达和假定分泌的趋化因子 (RANTES)) 和应激蛋白 (热休克蛋白 (HSP)、葡萄糖相关蛋白 (GSP)、泛素和超氧化物歧化酶 (Mn))、白血病抑制因子 (LIF)、制瘤素 (OSM)、睫状神

经营养因子(CNTF)、血小板碱性蛋白(PBP)、溶酶体颗粒、组胺、血清素、白三烯B4、一氧化氮和/或前列腺素。在一些实施方案中,肽抑制或压制介质的活性,并且在一些实施方案中,肽抑制TNF- α 、组胺、一氧化氮、和白介素的活性。在一些实施方案中,肽抑制两种或更多种炎性介质的活性。

[0175] 8.2各种疾病、障碍和病症的治疗或预防

[0176] 本文提供的组织保护肽和肽类似物也被用作治疗或预防各种疾病、障碍和病症的治疗剂。本领域技术人员也会认识到,这样的肽和肽类似物可以用来实现对组织保护受体复合物,例如组织保护细胞因子复合物的调节。可用于评估例如通过以上公开的发明分析而确定的化合物的治疗适应症的体外和体内技术在第PCT/US01/49479号PCT申请、第10/188,905号和第10/185,841号美国专利申请中公开。

[0177] 本文提供的上述组织保护肽和肽类似物一般地可用于对以下的预防、治疗性治疗或预防性治疗:具有初步神经或精神症状的人类中枢神经系统或外周神经系统的疾病或障碍、眼部疾病、心血管疾病、心肺疾病、呼吸疾病、肾、泌尿和生殖系统疾病、骨病、皮肤病、结缔组织疾病、胃肠道疾病、内分泌和代谢异常以及衰老。用途的实例包括但不限于,保护和修复由以下组织的创伤和产生的炎症所导致的损伤:脑(缺血性中风、钝性创伤、蛛网膜下出血)、脊髓(缺血、钝力创伤、病变)、外周神经(坐骨神经损伤、糖尿病神经病变、腕管综合征)、视网膜(黄斑水肿、糖尿病黄斑水肿、糖尿病视网膜病变、青光眼)和心脏(心肌梗塞、慢性心力衰竭、进行性心力衰竭)。特别地,这样的疾病、障碍和病症包括缺氧病症,其不利地影响响应性组织,如可兴奋的组织,包括但不限于以上4.2节(xi)中说明的那些,或那些响应性细胞组织或器官。因此,本文提供的组织保护肽和肽类似物可以用于治疗或预防各种病症和环境下由缺氧条件导致的对响应性组织的损伤。这些病症和环境的非限制性实例在本文下面的表格中提供。

[0178] 组织保护肽和肽类似物在干细胞活性的调节,刺激其向损伤区域迁移,并协助修复过程,例如发挥再生作用中同样被关注。

[0179] 在使用本文提供的组织保护肽和肽类似物可治疗和可预防的神经组织病理的保护的实例中,这样的病理包括由神经组织的氧合降低导致的病理。任何降低神经组织的氧气可利用性,导致应激、损伤和最终神经细胞死亡的病症,都可以使用本文提供的组织保护肽和肽类似物治疗。这些病症一般被称为缺氧和/或缺血,由以下产生或包括但不限于以下:中风、中风(缺血/灌注)、中风(大脑中动脉)、血管闭塞、产前或产后缺氧、窒息、气哽、接近溺水、一氧化碳中毒、烟雾吸入、创伤(包括手术和放疗)、窒息、癫痫、低血糖、慢性阻塞性肺病、肺气肿、吸入性肺气肿、成人呼吸窘迫综合征、低血压休克、败血性休克、过敏性休克、胰岛素休克、镰状细胞危象、严重肢体缺血、心脏停搏、节律异常、氮麻醉、血氧不足性缺氧(高原病、高原肺水肿、高原脑水肿、睡眠呼吸暂停、低通气、呼吸停止、分流)、高铁血红蛋白血症、组织中毒性缺氧、宫内缺氧和心肺旁路手术引起的神经功能缺损。

[0180] 在一个实施方案中,例如,使用上述分析确定的本文提供的组织保护肽和肽类似物,可以在手术过程或医疗过程之前、期间或之后,单独或作为组合物的一部分施用,以预防损伤或组织损伤的风险导致的损伤或组织损伤。例如,手术过程可以包括肿瘤切除或动脉瘤修复,而医疗过程可以包括分娩或接生。使用本文提供的组织保护肽和肽类似物可治疗的由低血糖引起或导致的其它病理包括胰岛素过量(也被称作医源性高胰岛素血症)、胰

岛瘤、生长激素缺乏、肾上腺皮质功能减退、药物过量和某些肿瘤。

[0181] 由可兴奋的神经组织损伤导致的其它病理包括癫痫障碍,例如癫痫、惊厥或慢性癫痫障碍。其它可治疗的病症和疾病包括但不限于疾病例如中风、多发性硬化、低血压、心脏停搏、慢性心力衰竭、阿尔茨海默氏病、帕金森氏病、脑瘫、脑或脊髓创伤、AIDS痴呆、年龄相关的认知功能丧失、记忆丧失、肌萎缩性侧索硬化症、癫痫障碍、酒精中毒、视网膜缺血、青光眼导致的视神经损伤和神经元缺失。

[0182] 本文提供的具体的组织保护肽和肽类似物可以用于治疗或预防由疾病病症或各种创伤引起的炎症,如物理或化学诱导的炎症。还考虑将组织保护肽和肽类似物用于治疗或预防一种或多种器官或组织的中的炎症病症,手术器官或组织包括但不限于大脑、脊髓、结缔组织、心脏、肺、肾和尿道、胰腺、眼和前列腺。这样的创伤的非限制性实例包括但不限于在4.2节(xv)中列举的那些。此外,组织保护肽可以用于治疗或预防由缺血性和非缺血性病症引起的炎症,包括但不限于过敏、过敏性疾病、过敏症状、风湿性疾病、运动相关损伤、暴露于毒剂、感染(包括病毒性、真菌性和细菌性),这样的病症的另外的实例在上面4.2节(iv)、(v)和(xv)中公开。炎症可以是急性或慢性的。在炎症领域中的进一步应用在2004年9月29日提交并作为W0 2005/032467公开的PCT/US2004/031789中记录。

[0183] 本文提供的具体的组织保护肽和肽类似物可以用于治疗脱髓鞘或髓鞘损害导致的中枢神经和外周神经系统疾病。这些疾病定义为主要包括起源未知的炎性髓鞘病变,髓鞘形成缺乏疾病例如脑白质营养不良和明显起因引起的疾病除外。多发性硬化(MS)是脱髓鞘疾病中的典型疾病,并且病理上其特征主要为炎性脱髓鞘和神经胶质增生的变化。因为其病因未知,其诊断是基于其临床特征进行的,即中枢神经系统病变的空间多样性和随时间的多样性。此外,脱髓鞘疾病中包括急性播散性脑脊髓炎(ADEM)、炎性弥漫性硬化、急性和亚急性坏死性出血性脑脊髓炎和横贯性脊髓炎。此外,外周神经组织依赖Schwann细胞来维持髓鞘,如果这些细胞被损害,则引起外周脱髓鞘疾病。

[0184] 本文提供的组织保护肽和肽类似物可以用于治疗或预防心脏的病症和损伤,包括任何涉及心脏和/或相关组织(例如心包、主动脉和其它相关血管)的慢性或急性病理事件,包括缺血-再灌注损伤;充血性心力衰竭;心脏停搏;心肌梗塞;动脉粥样硬化、二尖瓣漏、心房扑动、化合物如药物(例如多柔比星、赫赛汀、甲硫哒嗪和西沙必利)引起的心脏中毒;寄生性感染引起的心脏损伤(细菌、真菌、立克次体和病毒,例如梅毒、慢性克氏锥虫(*Trypanosoma cruzi*)感染);暴发性心脏淀粉样变性;心脏手术;心肌收缩/舒张;心脏移植;血管成形术、腹腔镜手术、创伤性心脏损伤(例如穿透性或钝性心脏损伤和主动脉瓣膜破裂)、胸主动脉瘤的手术修复;肾上腺主动脉瘤;心肌梗塞或心力衰竭引起的心源性休克;神经源性休克和过敏性反应。本文提供的组织保护肽和肽类似物也可以用于治疗有心脏病例如心力衰竭(即,心脏不能够以代谢组织需要的速率泵血,或心脏可以仅在具有提高的充盈压时可以这样做)风险的那些个体。这些有风险的患者将包括患有心肌梗塞、冠状动脉疾病、心肌炎、化学治疗、心肌病、高血压、瓣膜心脏疾病(最常见的是二尖瓣关闭不全和主动脉瓣狭窄)和毒素诱导的心肌病(例如乙醇、可卡因等)等或处于患上这些疾病的风险的患者。

[0185] 本文提供的组织保护肽和肽类似物可以用于治疗或预防眼例如视网膜组织的病症和损伤。这样的障碍包括但不限于视网膜缺血、黄斑变性、视网膜脱落、视网膜色素变性、

动脉硬化性视网膜病变、高血压性视网膜病变、视网膜动脉阻塞、视网膜静脉阻塞、视网膜水肿、低血压和糖尿病视网膜病变。

[0186] 在另一个实施方案中,本文提供的组织保护肽和肽类似物和本文所述的原理可以用于预防或治疗暴露于毒剂引起的损伤,即响应性组织的辐射或化学损伤。在一个实施方案中,上述肽可用作治疗剂,用于调节机体对毒剂的反应的介质,或压制或抑制这些调节剂的活性。另外,上述肽可用作治疗剂,用于治疗、预防、改善或管理暴露于毒剂的损伤、作用或症状。该肽可被用于治疗对各种毒剂的暴露,包括生物、化学或辐射剂。

[0187] 这些肽可以用于治疗由于生物制剂如朊病毒、病毒、微生物(细菌和真菌)以及一些单细胞和多细胞真核生物(即寄生虫)引起的损伤、作用或症状,包括但不限于,上面在第4.2节(viii)列出的那些生物毒素。此外,本文提供的肽可以用于预防、治疗、改善或控制化学制剂引起的损伤、作用或症状。这些药剂包括但不限于血液剂、糜烂剂、神经制剂、肺部制剂和失能剂。另外,本文提供的肽可以用于预防、治疗、改善或管理由于毒性暴露于工业化学品引起的损伤、作用或症状,所述工业化学品包括但不限于第4.2节(x)中所列举的那些。由于暴露于辐射剂引起的损伤、作用或症状是使用本文提供的肽可预防、可治疗或可管理的。所述肽可以预防、治疗、改善或管理由放射性制剂引起的损伤、作用或症状,包括 α 、 β 或 γ 辐射,且更具体地可以包括但不限于 ^{137}Cs 、 ^{60}Co 、 ^{241}Am 、 ^{252}Cf 、 ^{192}Ir 、 ^{238}Pu 、 ^{90}Sr 、 ^{226}Ra 、 ^{91}Sr 、 ^{92}Sr 、 ^{95}Zr 、 ^{99}Mo 、 ^{106}Ru 、 ^{131}Sb 、 ^{132}Te 、 ^{139}Te 、 ^{140}Ba 、 ^{141}La 、 ^{144}Ce 、 ^{233}U 、 ^{235}U 、 ^{238}U 、 ^{228}P 、 ^{229}P 、 ^{230}P 、 ^{231}P 、 ^{232}P 、 ^{233}P 、 ^{234}P 、 ^{235}P 、 ^{236}P 、 ^{237}P 、 ^{238}P 、 ^{239}P 、 ^{240}P 、 ^{241}P 、 ^{242}P 、 ^{243}P 、 ^{244}P 、 ^{245}P 、 ^{246}P 、 ^{247}P 和 ^{131}I 。此外,本领域普通技术人员将认识到,所述肽也可被用来预防、介导、治疗或改善由于这些毒剂的累积或协同使用(即,在散布生物制剂前使用放射性制剂使得受害者将对生物制剂更易感;将糜烂剂与神经制剂联合施用以防止受害者有效地寻求庇护或帮助;用具有生物或放射性制剂的污染子弹或榴霰弹以抑制愈合过程或使其复杂化等)所引起的损伤、作用或症状。在一个实施方案中,本文提供的肽将能够治疗、调节、改善或预防对例如以下两种或多种细胞、器官或组织中的数种不同类型的细胞、器官或组织的毒性作用:中枢神经、外周神经、眼、心血管、心肺、呼吸道、肾、泌尿、生殖、肌肉骨骼、皮肤、结缔组织、胃肠道、造血、内分泌、和代谢。此外,本文提供的肽可有效地作为同一种类中的超过一种毒剂(即针对多于一种类型的化学、生物或放射性制剂-例如针对糜烂剂和神经制剂的预防剂)或不同种类的毒剂(即用于暴露于放射性制剂和化学制剂的治疗剂)的治疗剂或预防剂。本文提供的组织保护肽和肽类似物的另外的用途是在中毒的治疗中,例如神经毒素中毒(例如软骨藻酸贝类中毒)、毒素(乙醇、可卡因等)、作为化疗剂的辐射暴露的结果(例如,顺铂神经毒性);羽扇豆中毒(neurolathyrism);关岛病;肌萎缩性侧索硬化症;和帕金森氏病。

[0188] 如上所述,本文提供了用于通过外周施用如上所述的组织保护肽增强哺乳动物中响应性细胞、组织和器官的组织功能的组织保护肽和肽类似物。各种疾病和病症适于使用该方法治疗。例如,甚至在不存在任何病症或疾病的情况下,该方法可用于增强可兴奋的组织的功能,引起认知功能增强。此外,组织保护细胞因子可用于改善伤口愈合的质量(例如,在严重缺血中的伤口愈合和穿刺活检愈合中的伤口愈合)、减少愈合需要的时间、改善愈合组织的质量和降低伤口引起的粘着的发生率。参见2004年9月29日提交并作为WO 2005/032467公开的PCT/US2004/031789。此外,本文提供的组织保护肽可以用于治疗、预防或管理化学制剂诱导的皮肤上的或沿着呼吸道的损伤,例如发疱剂或糜烂剂或工业化学物质。

[0189] 本文提供的肽的这些用途在下文中进一步详细描述,且包括在人和非人哺乳动物两者中学习和训练的增强。

[0190] 在另一个实施方案中,本文提供的组织保护肽和肽类似物一般可以用于预防、治疗性治疗、预防性治疗或控制以下的各种癌症或肿瘤障碍:中枢神经系统、外周神经系统、胃肠道/消化系统、泌尿生殖器系统、肾上腺、妇科、头颈部、血液/血、肌肉骨骼/软组织、呼吸道和乳腺。所述用途的实例包括但不限于,保护免受和修复第4.2节(ix)和(xxiv)中列举的癌症或肿瘤障碍导致的损伤。此外,本文提供的肽可以用于预防、治疗性治疗、预防性治疗或管理肿瘤或癌症相关的各种综合征,包括但不限于上面第4.2节(xxvii)中列举的那些。可以根据本发明的方法使用肽来解决上述综合征。例如,可以施用肽通过延迟疾病的肿瘤方面的发作、降低综合征相关的肿瘤生长的数目或总体上增强患有这些病症的那些患者的生活质量或寿命来解决遗传性综合征例如李法美尼症候群、遗传性非息肉结肠直肠癌、家族性腺瘤性息肉病、和VonHippel-Lindau综合征。也可以预防性地施用肽以解决与肿瘤障碍或癌症的某些治疗、化学治疗或放射治疗相关的综合征,例如雄激素阻断综合征、治疗相关的骨髓增生异常综合征或嗜睡综合征,以期望预防综合征或降低综合征的严重程度。

[0191] 此外,可以用肽来治疗或预防恶病质和与恶病质相关的疾病。这样的疾病包括但不限于癌症恶病质、厌食症、无力、贫血、肺结核、AIDS、充血性心力衰竭、肾衰竭、肝功能衰竭、慢性阻塞性肺病、肺气肿、吸入性肺气肿、肌肉萎缩、糖尿病和内毒素血症。

[0192] 使用本文提供的组织保护肽和肽类似物可治疗或可预防的病症和疾病包括但不限于,情绪障碍、焦虑症、抑郁症、孤独症、注意力缺乏多动障碍和认知功能障碍。这些病症得益于神经功能的增强。其它根据本文提供的教导可治疗的障碍包括睡眠中断,例如,睡眠呼吸暂停和旅行相关障碍;蛛网膜下的和动脉瘤的出血、低血压休克、震荡损伤、创伤性脑损伤、败血性休克、过敏性休克和各种脑炎和脑膜炎的后遗症,例如,结缔组织疾病相关的脑炎,例如狼疮。其它用途包括预防或保护免受神经毒素中毒,例如软骨藻酸贝类中毒、羽扇豆中毒和关岛病、肌萎缩性侧索硬化症、帕金森氏病;栓塞性或缺血性损伤的手术后治疗;全脑辐射;镰状细胞危象;和子痫。

[0193] 使用本文提供的组织保护肽和肽类似物可治疗或可预防的另外的一组状况包括遗传性或获得性线粒体功能障碍,其是各种神经性疾病的起因,典型的是神经损伤和死亡。例如,Leigh病(亚急性坏死性脑病)的特征是神经元脱落引起的进行性视力丧失和脑病,以及肌病。在这些情况下,有缺陷的线粒体代谢未能供应足够高能量的底物来为可兴奋的细胞的代谢提供原料。组织保护肽或肽类似物优化了各种线粒体疾病中的失效功能。如上所述,缺氧病症有害地影响可兴奋的组织。可兴奋的组织包括但不限于:神经组织,例如外周神经系统(耳朵和视网膜)和中枢神经系统(大脑和脊髓)的组织;心血管组织,例如心脏和相关神经的细胞;和腺体组织例如胰腺,其中T型钙通道以及细胞-细胞间隙连接参与胰岛素分泌。可兴奋的组织的示例性列表包括但不限于器官和组织,其包括神经、骨骼肌、平滑肌、心肌、子宫、中枢神经系统、脊髓、脑、视网膜、嗅觉系统和听觉系统。除了上述病症外,本文提供的组织保护肽和肽类似物可用于治疗吸入中毒,例如一氧化碳和烟雾吸入、严重哮喘、成人呼吸窘迫综合征、以及气哽和接近溺水。造成缺氧病症或通过其它手段诱导响应性组织例如可兴奋的组织损伤的另外的病症包括低血糖,其可能由胰岛素的不合适给药或伴随产生胰岛素的肿瘤(胰岛瘤)而发生。

[0194] 各种被描述起源于可兴奋的组织损伤的神经心理障碍是可使用本文提供的组织保护肽和肽类似物治疗的。涉及神经损伤且本发明的肽和肽类似物可治疗或可预防的慢性障碍,包括中枢神经系统和/或外周神经系统相关障碍,包括年龄相关的认知功能丧失和老年痴呆症、慢性癫痫障碍、阿尔茨海默氏病、帕金森氏病、痴呆、记忆丧失、肌萎缩性侧索硬化症、多发性硬化、结节性硬化症、威尔森氏病、脑性和进行性核上性麻痹、关岛病、路易体痴呆、朊病毒病,如海绵状脑病,例如克-雅氏病,亨廷顿舞蹈症、神经炎营养不良、神经病变、神经病变(顺铂诱导的)、神经病变(糖尿病诱导的)、神经病变(自发性;糖尿病诱导的)、神经病变(炎性)、神经病变(外周)、疼痛、癫痫持续状态、强直性肌营养不良、Freidrich共济失调和其它共济失调、以及抽动秽语综合征、癫痫障碍例如癫痫和慢性癫痫障碍、中风、脑或脊髓损伤、AIDS痴呆、酒精中毒、孤独症、视网膜缺血、青光眼、自主神经功能障碍例如高血压和睡眠障碍和神经精神障碍,其包括但不限于精神分裂症、分裂情感障碍、注意力缺乏症、恶劣心境障碍、严重抑郁症、躁狂症、强迫症、精神活性物质使用障碍、焦虑、惊恐障碍以及单相和双相情感障碍。另外的神经精神和神经退行性障碍包括例如在美国精神病学会的精神疾病诊断与统计手册(DSM)(American Psychiatric Association's Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders)中列举的那些。

[0195] 使用本文提供的组织保护肽和肽类似物可治疗或可预防的另外一组病症包括肾疾病,例如肾动脉闭塞、肾损伤、急性肾损伤、肾动脉闭塞和再灌注、急性和慢性肾衰竭、慢性肾病、肾缺血、肾缺血再灌注、双侧肾缺血和肾病(例如肾损伤、糖尿病肾病、造影剂或高血压肾病)。由于多种原因可以切断肾脏的血液供应,包括侵入血流的感染(败血症)引起的休克、内部或外部出血、失血性休克、多器官衰竭、由于严重腹泻或烧伤引起的体液损失、对输血的反应、心脏停搏或心律失常、手术损伤和肾移植。以上病症导致的肾的血液流动减少,可能将血流量降低到危险的低水平一段时间,其足以引起急性肾损伤或急性肾衰竭的发展。降低的血流量也导致肾脏中的细胞坏死或组织死亡,损伤肾小管细胞。肾衰竭也可以由疾病(间质性和糖尿病性)肾病综合征、感染、损伤(CPB-诱导的)、毒素(造影剂诱导的、化学治疗诱导的、环孢霉素)、自体免疫性炎症(例如狼疮、红细胞增多等)导致。本文提供的组织保护肽和肽类似物协助修复或防止该损伤,帮助改善急性肾衰竭。此外,本文提供的肽可被用于治疗、预防或改善尿路的疾病或障碍,包括但不限于尿路感染、刺激性膀胱、膀胱上皮细胞的细菌侵入和对膀胱的创伤或辐射损伤。

[0196] 关于适于上述组织保护肽和肽类似物治疗的各种病症和疾病,表1列举了另外的示范性的非限制性适应症。

[0197] 表1. 适于组织保护肽和肽类似物治疗的疾病和障碍

[0198]

细胞、组织或器官	功能障碍或病理	病症或疾病	类型
心脏	缺血	冠状动脉疾病	急性、慢性 稳定型、不稳定型
		心肌梗塞	心肌梗塞后综合征
		心绞痛	
		先天性心脏病	瓣膜心肌病
		变异型心绞痛	
		心脏破裂	动脉瘤性
		脉管炎	
	心律失常	心动过速、 心动过缓、 室上性、 心室传导异常	稳定型、不稳定型 过敏性 颈动脉窦淋巴结
	充血性心力衰竭	左、右、两侧心室、 收缩性、舒张性	心肌病, 如特发性 家族性、感染性、 代谢性、贮积病、 缺陷性、结缔组织 障碍、浸润和肉芽 肿、神经血管性
		心肌炎和心包炎	自身免疫性, 感 染性, 特发性
		肺心病	
	辐射损伤		
	钝性和穿透性创伤	手术、感染或炎症 导致的胸内粘连	

[0199]

细胞、组织或器官	功能障碍或病理	病症或疾病	类型
	毒素 s	可卡因毒性、阿霉素、重金属 (钴)	
血管	高血压	原发性、继发性	
	减压病		
	纤维肌性增生		
	动脉瘤	夹层、破裂、扩大	
	癌症	血管瘤 血管外皮细胞瘤	血管内皮瘤、 血管肉瘤
肺	阻塞性	哮喘 慢性支气管炎 肺气肿和气道阻塞	
	缺血性肺病	肺栓塞、 肺动脉血栓、 脂肪栓塞	
	环境性肺病		
	间质性肺病	肺纤维化、 特发性肺纤维化	
	先天性	囊性纤维化	
	肺心病		
	创伤		
	肺炎和局限性肺炎	感染性 (包括禽流感) 、寄生性、毒性、 创伤性、烧伤性、 吸入性	
	结节病		
	癌症和癌前病变		支气管类癌、燕麦 细胞癌
	辐射损伤		
胰腺	内分泌	糖尿病, I 型和 II 型	β 细胞衰竭、 功能障碍、 糖尿病神经病变
		其它内分泌细胞衰	

[0200]

细胞、组织或器官	功能障碍或病理	病症或疾病	类型
		竭	
	外分泌	胰腺外分泌衰竭	胰腺炎
	癌症和癌前病变	胰岛细胞腺瘤、 胰岛瘤、 胃泌素瘤	胰岛细胞癌
骨	骨质减少	原发性 继发性	性腺机能减退 固定化 绝经后的 年龄相关的 甲状旁腺机能亢进 甲状腺机能亢进 钙、镁、磷和/或 维生素 D 缺乏
	骨髓炎		
	缺血性坏死		
	创伤		
	佩吉特氏病		
	癌症	骨瘤	骨肉瘤
皮肤	脱发	斑秃 全秃	原发性 继发性 男性型脱发
	白癜风	局部 普遍化	原发性 继发性
	溃疡	糖尿病 褥疮 缺血	压疮、 压迫性溃疡、 褥疮
	外周血管疾病	感染、自体截肢	
	手术伤口、撕裂伤		
	烧伤		
	辐射损伤	皮肤辐射综合征	
	癌症和癌前病变	痣、乳头状瘤、脂	黑色素瘤、鳞状细

[0201]

细胞、组织或器官	功能障碍或病理	病症或疾病	类型
		溢性角化病、皮肤附件肿瘤	胞癌、表皮样癌、基底细胞癌和恶性皮肤附件肿瘤
自身免疫性障碍	红斑狼疮、干燥综合征、类风湿性关节炎、肾小球肾炎、脉管炎、纤维肌痛、强直性脊柱炎		
	Langerhans 组织细胞增生症		
Eye	视神经炎		
	钝性和穿透性损伤、手术伤口、感染、结节病、镰状 C 疾病、视网膜脱离、颞动脉炎		
	视网膜缺血、黄斑变性、视网膜色素变性、动脉硬化性视网膜病变、高血压性视网膜病变、视网膜动脉阻塞、视网膜静脉阻塞、低血压、糖尿病性视网膜病变、青光眼和黄斑水肿		
胚胎和胎儿障碍	窒息		
	缺血		
	癌症和癌前病变	粘液瘤、葡萄胎	粘液肉瘤、脊索瘤、绒毛膜癌
CNS	慢性疲劳综合征、急性和慢性低渗和高渗综合征、AIDS 痴		

[0202]

细胞、组织或器官	功能障碍或病理	病症或疾病	类型
	呆、电击死亡		
	脑型疟疾		
	脑炎	狂犬病、疱疹	
	脑膜炎		
	硬脑膜下血肿		
	尼古丁成瘾		
	药物的滥用和撤回	可卡因、海洛因、快克 (crack)、大麻、LSD、PCP、多药滥用、摇头丸、阿片类物质、镇静催眠药、安非他命、咖啡因、酒精	
	强迫症		
	精神病和抑郁症		
	注意力缺乏和多动症		
	椎管狭窄, 横贯性脊髓炎, Guillain Barré, 对外周神经、脊髓或脑的创伤性损伤, 神经根压迫, 肿瘤或血管畸形引起的压迫, 中暑	脑创伤/损伤、脑创伤/损伤 (钝力)、脑创伤/损伤 (伴有低血压-复苏)。	
	癌症和癌前病变	神经节细胞瘤、脑膜瘤、神经鞘瘤、神经鞘膜瘤	神经胶质瘤 (I-III 级)、间变性、多形性胶质母细胞 (IV 级)、成神经细胞瘤、成神经管细胞瘤、恶性脑膜瘤、恶性神经鞘瘤

[0203]

细胞、组织或器官	功能障碍或病理	病症或疾病	类型
ENT	耳鸣 Meunière 综合征 听力丧失		
	创伤性损伤、气压伤		
肾	肾衰竭	急性、慢性	血管性/缺血性、间质性疾病、糖尿病肾病、肾病综合征、感染、损伤、造影剂诱导的、化学治疗诱导的、环孢霉素、辐射诱导的、心肺旁路诱导的
	辐射损伤		
	过敏性紫癜		
	癌症或癌前病变	肾小管腺瘤	肾细胞癌、肾上腺样瘤
横纹肌	自身免疫障碍	重症肌无力 皮炎 多肌炎	
	肌病	遗传性代谢性、内分泌和毒性	
	中暑		
	挤压伤		
	横纹肌溶解		
	线粒体疾病		
	感染	坏死性筋膜炎	
	癌症或癌前病变	横纹肌瘤	横纹肌肉瘤
性功能障碍	中枢和外周（例如勃起功能障碍）	药物继发的阳痿，（糖尿病）	
肝	肝炎	病毒性、细菌性、寄生性	

[0204]

细胞、组织或器官	功能障碍或病理	病症或疾病	类型
	缺血性疾病		
	肝硬化、脂肪肝		
	浸润性/代谢性疾病、代谢综合征	代谢综合征（脂肪诱导的）、饮食诱导的胰岛素抵抗	
	癌症或癌前病变	肝腺瘤	肝癌：肝细胞癌
胃肠道	缺血性肠病		
	炎性肠病		
	坏死性小肠结肠炎		
	手术或穿孔后的伤口愈合	由手术或感染导致的腹部粘连	
	癌症或癌前病变	类癌	恶性类癌
器官移植	供体、器官和受体的治疗	移植排斥、移植物排斥、移植物功能延迟、移植物抗宿主病、胰岛细胞移植	
	供组织再生、植入或移植的细胞或组织培养物的生长	胰岛细胞移植或收获	
生殖道	不育	血管 自身免疫 子宫异常 着床障碍	
	癌症或癌前病变		精原细胞瘤、无性细胞瘤、绒毛膜癌、胚胎性癌、内胚窦瘤、畸胎瘤、Seroli-Leydig 肿瘤、卵巢男胚瘤、颗粒卵泡膜细胞瘤、门细胞瘤、脂

[0205]

细胞、组织或器官	功能障碍或病理	病症或疾病	类型
			质细胞瘤
内分泌	腺体功能亢进和功能减退		
	癌症或癌前病变	嗜碱性腺瘤、嗜酸性腺瘤、嫌色性细胞腺瘤、甲状旁腺腺瘤、C细胞增生、嗜铬细胞瘤	甲状旁腺腺癌、甲状腺髓样癌、恶性嗜铬细胞瘤
全身	休克 恶病质、癌症、恶病质	败血性、血液动力学性、厌食症、无力、贫血	
	寄生虫血症	疟疾、锥虫病、利什曼病	

[0206] 如上所述,这些疾病、障碍或病症仅说明本文提供的组织保护肽和肽类似物提供的益处范围。因此,本发明一般地提供了对机械损伤或人类疾病的后果的预防性(preventative)、治疗性或预防性(prophylactic)治疗。考虑对CNS和/或外周神经系统的疾病、障碍或病症的预防、或治疗性或预防性治疗。提供了对具有精神成分的疾病、障碍或病症的预防、或治疗性或预防性治疗。提供了对疾病、障碍或病症的预防、或治疗性或预防性治疗,包括但不限于具有眼、心血管、心肺、呼吸道、肾、泌尿、生殖、胃肠道、内分泌或代谢成分的疾病、障碍或病症。肽可用于在一种或多种,在一些实施方案中至少两种器官或组织中预防、治疗性治疗、预防性治疗或控制与组织损伤相关的疾病或障碍以及其损伤、作用或症状,所述器官或组织包括但不限于大脑、脊髓、结缔组织、皮肤、胃肠道、生殖器官、肝、心脏、肺、肾、尿路、胰腺、眼和前列腺。

[0207] 8.3疾病、障碍或病症的损伤、作用或症状的预防、治疗、改善或控制

[0208] 在另一个实施方案中,本文提供的治疗方法可用于预防、治疗、改善或控制上述疾病和障碍的损伤、作用或症状。特别地,本治疗方法可以用于解决症状,包括但不限于恶病质,癌变,不孕,白内障形成,放射性皮炎, β 烧伤, γ 烧伤,细胞丧失(特别是骨髓、消化道细胞),造血、胃肠道、中枢神经、心血管、皮肤、皮肤细胞因子水平和/或生殖系统的损伤,急性辐射综合征(恶心感、呕吐、一般疾病和疲劳、免疫系统抑制、毛发脱落、无法控制的出血(口、皮下、肾)、部分体内伽玛辐射后的循环促炎细胞因子减少、大量腹泻、谵妄、昏迷和死亡),慢性辐射综合征,皮肤辐射综合征(炎症、红斑、干性或湿性脱屑、毛发脱落、起疱、变红、溃疡、皮脂腺和汗腺损伤、萎缩、纤维化、减轻或加重的皮肤色素沉着和坏死),头痛,眩晕,恶心,呕吐,粘膜刺激,呼吸困难,意识损害,昏迷,惊厥,过速-和过缓-节律异常,低血压,心血管性虚脱,慢性心血管疾病,如心肌病、进行性心力衰竭、外周动脉供血不足、发绀、

心动过缓,瞳孔缩小,唾液分泌过多,腹泻,无意识的排尿,肌肉震颤,初始去极化的弛缓性麻痹,棘波放电和惊厥,中间综合征,神经毒性酯酶抑制,有机磷酸酯诱导的延迟的神经病变,红斑,水肿,坏死和水疱,黑皮病,气管支气管炎,支气管痉挛,支气管阻塞,出血性肺水肿,呼吸衰竭,细菌性肺炎,眼红斑,流泪,眼部不适,眼中严重疼痛,眼睑痉挛,虹膜炎,失明,骨髓抑制,路易式毒气休克,肝坏死,灌注不足继发的肾衰竭,灼烧感(眼、鼻咽、口咽),烧伤,大量流泪,鼻溢,嘶哑咳嗽,呼吸困难,吞咽痛,结膜炎,角膜损伤,鼻-口咽损伤/水肿,声门结构的炎症引起的呼吸窘迫、分泌和/或喉痉挛,急性呼吸综合征,定向障碍,行为改变和反应性气道功能障碍综合征。

[0209] 如上所述,这些与组织损伤相关的疾病或障碍或由此产生的损伤、作用或症状仅说明在本文提供的方法中使用的肽可解决的障碍的范围。因此,本发明一般提供了与组织损伤相关的疾病或障碍或与疾病或障碍的作用或症状相关的损伤的预防性(preventative)、治疗性或预防性(prophylactic)治疗。

[0210] 可通过施用有效量的本文提供的肽来治疗或预防与组织损伤相关的疾病或障碍或与疾病或障碍的作用或症状相关的损伤。在某些实施方案中,本文提供了治疗或预防本文描述的疾病或障碍的方法,包括向患有疾病或障碍的受试者施用能有效治疗或预防该疾病或障碍的量的本文提供的肽的步骤。在一个实施方案中,施用包含有效量的一种或多种本文提供的肽或其药学上可接受的盐的组合物。

[0211] 8.4与其它治疗剂联合治疗以产生累积或协同效应

[0212] 在某些实施方案中,本文提供了用于治疗、调节、改善或预防与组织损伤相关的疾病或障碍或与疾病或障碍的作用或症状相关的损伤的方法,该方法包括向有需要的患者施用有效量的肽和另一种合适的治疗剂,其各自根据适用于药物的方案施用。可以进行该方法来实现肽和治疗剂的作用的加成、协同或抵消(抵消治疗剂的副作用)益处。这包括肽和合适的治疗剂的同时、基本同时、或非同时施用。肽和合适的治疗剂的非同时施用,包括肽和合适的治疗剂的顺序、交替、和急性及慢性施用。此外,肽和合适的治疗剂可以在相同或分开的药物组合物中施用,并且如果分开施用,它们可以通过相同的施用途径或不同途径施用。合适的治疗方法和药剂可以包括但不限于氨基甲酸酯(吡斯的明、毒扁豆碱、氨基斯的明、新斯的明、更斯的明(synostigmine)、依斯的明、百亩威、单甲基克百威(decarbofuran)、抗胆碱能剂(苯海索、贝那替秦、比哌立登、莨菪碱、阿普罗芬、阿托品、东莨菪碱、阿地芬宁、卡拉美芬、五甲铵、美卡拉明、苯海索) PANPAL、氨基苯酚(氧化毒扁豆碱)、有机磷酸酯(TEPP、对氧磷、乙基-4-硝基苯基磷酸酯)、他克林、7-MEO-TA、石杉碱甲、胆碱酯酶(BuChE、AChE、三酯酶、对氧磷酶)、胍/重活化剂(HI-6、PAM、双复磷、双解磷、甲胍、HIo-7、BI-6、K048、K033、氯解磷定(2-PAM C1)、P2S、TMB4、2-PAMI)、苏拉明、苯二氮卓类、筒箭毒碱、美金刚、丙环定、尼莫地平、可乐定、解磷定、地西洋、脑啡肽、苯甲磺酰氟、碳酸氢钠、维生素E类似物(α -生育酚琥珀酸酯、 γ -生育三烯酚)、超氧化物歧化酶/过氧化氢酶模拟物(EUK189)、硒、苄基苯乙烯基砷、截短的鞭毛蛋白、他汀类、染料木黄酮、加兰他敏、降低体温、5-雄烯二醇、CpG-寡聚脱氧核苷酸、抗菌剂、干细胞移植、胰岛细胞移植、氨磷汀、坦波尔(Tempol)、异黄酮、苄砷类似物、GM-CSF、G-CSF、碘化钾、氢氧化铝、普鲁士蓝、螯合剂(二乙烯三胺五乙酸(Ca-DTPA)、二乙烯三胺五乙酸锌(Zn-DTPA))、角质细胞生长因子、肠肽激素、 β 葡聚糖、奥曲肽、己酮可可碱、血管紧张素转换酶抑制剂、血管紧张素II受体阻滞剂、高

铁血红蛋白形成剂(亚硝酸戊酯、亚硝酸钠)、硫代硫酸钠、钴化合物(羟钴胺素(维生素B12a))、类毒素、抗毒素、疫苗、被动抗体、化疗剂(包括但不限于甲氨蝶呤、紫杉醇、巯基嘌呤、硫鸟嘌呤、羟基脲、阿糖胞苷、环磷酰胺、异环磷酰胺、亚硝基脲、顺铂、卡铂、丝裂霉素、达卡巴嗪、丙卡巴肼、依托泊苷、喜树碱、博来霉素、多柔比星、伊达比星、柔红霉素、放线菌素D、普卡霉素、米托蒽醌、门冬酰胺酶、长春碱、长春新碱、长春瑞滨、紫杉醇和多西紫杉醇);辐射: γ -辐射;烷化剂;氮芥:环磷酰胺、异环磷酰胺、曲磷胺、苯丁酸氮芥;亚硝基脲:卡莫司汀(BCNU)、洛莫司汀(CCNU)、烷基磺酸白消安、曲奥舒凡;三氮烯:达卡巴嗪;含铂化合物:顺铂、卡铂、植物生物碱;长春花生物碱:长春新碱、长春碱、长春地辛、长春瑞滨;紫杉烷:紫杉醇、多西紫杉醇;DNA拓扑异构酶抑制剂表鬼臼毒素:依托泊苷、替尼泊苷、拓扑替康、9-氨基喜树碱伊立替康(Campto®)、克立那托;丝裂霉素:丝裂霉素C、丝裂霉素C;抗代谢物剂、抗叶酸剂:DHFR抑制剂:甲氨蝶呤、三甲曲沙;IMP脱氢酶抑制剂:麦考酚酸、噻唑咪林、利巴韦林EICAR;核糖核苷酸还原酶抑制剂:羟基脲;去铁胺;嘧啶类似物:尿嘧啶类似物、5-氟尿嘧啶、氟尿苷、去氧氟尿苷、雷替曲塞;胞嘧啶类似物:阿糖胞苷(ara C)、胞嘧啶阿拉伯糖苷氟达拉滨;嘌呤类似物:巯基嘌呤、硫鸟嘌呤;激素治疗;受体拮抗剂:抗雌激素、他莫昔芬、雷洛昔芬甲地孕酮;LHRH激动剂:戈舍瑞林、醋酸亮丙瑞林;抗-雄激素:氟他胺、比卡鲁胺;类视黄醇/Deltaoids维生素D3类似物:EB 1089/CB 1093/KH 1060;光动力学治疗:维替泊芬(BPD-MA)、酞菁光敏剂、Pc4去甲氧基-竹红菌素A(2BA-2-DMHA);细胞因子:干扰素- α 、干扰素- γ 、肿瘤坏死因子;异戊二烯化抑制剂:洛伐他汀;多巴胺能神经毒素:1-甲基-4-苯基吡啶鎓离子;细胞周期抑制剂:星孢菌素;放线菌素:放线菌素D、更生霉素;博来霉素:博来霉素A2、博来霉素B2、培洛霉素;葱环类:柔红霉素、多柔比星(阿霉素)、伊达比星、表柔比星、吡柔比星、佐柔比星、米托蒽醌;MDR抑制剂:维拉帕米;Ca²⁺ATP酶抑制剂:毒胡萝卜素;TNF- α 抑制剂/沙利度胺血管生成抑制剂3-(3,4-二甲氧基-苯基)-3-(1-氧代-1,3-二氢-异吲哚-2-基)-丙酰胺(SeICIDsTM)、ImiDsTM、RevlimidTM、ActimidTM。另一方面,本文提供的药物组合物可以在制剂中包含肽与至少一种呈现组织保护功能的小分子。合适的小分子包括但不限于类固醇(例如拉扎洛依和糖皮质激素)、抗氧化剂(例如辅酶Q₁₀、 α 硫辛酸和NADH)、抗分解代谢酶(例如谷胱甘肽过氧化物酶、超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、合成催化清除剂以及模拟物)、吲哚衍生物(例如吲哚胺、吡唑和咪唑)、硝酸中和剂、腺苷/腺苷激动剂、植物化学物质(黄酮类)、草药提取物(银杏(ginko biloba)和姜黄)、维生素(维生素A、E和C)、氧化酶电子受体抑制剂(例如,黄嘌呤氧化酶电子抑制剂)、矿物质(例如铜、锌和镁)、非类固醇抗炎药物(例如,阿司匹林、萘普生和布洛芬)及其组合。另外的药剂可以与本药物组合物联合使用,包括但不限于抗炎剂(例如皮质类固醇、泼尼松和氢化可的松)、糖皮质激素、类固醇、非类固醇抗炎药物例如,阿司匹林、布洛芬、双氯芬酸、和COX-2抑制剂)、 β -激动剂、抗胆碱剂和甲基黄嘌呤)、免疫调节剂(例如,有机小分子、T细胞受体调节剂、细胞因子受体调节剂、T-细胞消耗剂、细胞因子拮抗剂、单核因子拮抗剂、淋巴细胞抑制剂或抗癌剂)、金注射液、柳氮磺胺吡啶、青霉胺、抗血管生成剂(例如血管生成抑制因子)、TNF- α 拮抗剂(例如抗-TNF α 抗体)和内皮抑制素)、氨苯砜、补骨脂素(例如甲氧沙林和三甲沙林)、抗疟剂(例如羟基氯喹)、抗病毒剂、抗组胺剂和抗生素(例如红霉素和青霉素)。

[0213] 在其它实施方案中,用于治疗、调节、改善或预防与组织损伤相关的疾病或障碍或与疾病或障碍的作用或症状相关的损伤的本发明的方法进一步包括与诸如以下的治疗方

法联合施用肽:化学治疗、放射治疗(x-射线辐射,高能兆伏级(大于1MeV能量的辐射)、电子束、正电压x-射线辐射、发射 γ -射线的放射性同位素(镭、钴和其它元素的放射性同位素))、高压舱、心脏旁路机、血管成形术、体温降低、手术、血管成形术等,以实现肽和治疗方法的作用的加成、协同或抵消(抵消治疗方法的副作用)益处。作为实例,在具体实施方案中,可以向经历了作为癌症治疗的手术并同时接受化学治疗或放射治疗的患者施用肽。在另一个具体实施方案中,在施用肽之前或之后至少一小时、五小时、12小时、一天、一周、一个月或数月(例如多达三个月)施用化学治疗剂或放射治疗。另外,本文提供了用肽作为化学治疗或放射治疗的供选择的方案来治疗癌症或肿瘤疾病的方法,其中所述化学治疗或放射治疗已证明或可证明毒性过强,例如,对被治疗的患者造成不可接受或不可忍受的副作用。供选择地,本文提供了治疗方法,其中在用化学治疗或放射治疗进行治疗之前、同时或之后施用肽以试图预防或改善治疗方法的毒性副作用。如实施例2中证明的,根据本方法施用的肽能够改善已知化疗剂顺铂的副作用。尽管以上实例涉及癌症的治疗,但是可以理解,肽可以与本领域用于与组织损伤相关的疾病或障碍和与疾病或障碍的作用或症状相关的损伤(包括炎症和暴露于毒剂)的其它治疗方法联合施用以达到协同、加成或抵消效应。

[0214] 8.5肽的制剂和施用

[0215] 在一个实施方案中,本发明的方法提供了可将包含肽的药物组合物全身施用以保护或治疗靶向的细胞、组织或器官。这样的施用可以是肠胃外、通过吸入或经粘膜施用,例如经口、经颊、经鼻、经直肠、阴道内、舌下、经眼、粘膜下或透皮施用。在一些实施方案中,施用是肠胃外施用,例如通过静脉内或腹腔内注射,而且还包括但不限于动脉内、肌肉内、皮内和皮下施用。

[0216] 对于其它施用途径,例如通过使用灌流液、注射入器官或其它局部施用,将提供产生上述类似水平的肽的药物组合物。可以使用约15pM-30nM的水平。

[0217] 本文提供的药物组合物可以包含治疗有效量的化合物和药学上可接受的载体。在具体实施方案中,术语“药学上可接受的”是指已被联邦或州政府的管理机构批准,或者在美国药典或其它普遍认可的外国药典中列举的用于动物,且更具体地用于人。术语“载体”指与治疗剂一起施用的稀释剂、佐剂、赋形剂或溶媒。这些药学载体可以为无菌液体,例如水中的盐水溶液和油,包括石油、动物油、植物油或合成来源的油,例如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等。当静脉内施用药物组合物时,盐水溶液可以是载体。盐水溶液和右旋糖水溶液和甘油溶液也可以作为液体载体使用,特别是对于注射液而言。合适的药学赋形剂包括淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽、大米、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸钠、单硬脂酸甘油酯、滑石、氯化钠、脱脂奶粉、甘油、丙二醇、水、乙醇等。如果希望的话,组合物也可以包含少量的润湿或乳化剂或pH缓冲剂。这些组合物可以采用溶液、混悬剂、乳剂、片剂、丸剂、胶囊、散剂、缓释制剂等形式。可以用传统的粘合剂和载体例如甘油三酸酯将组合物配制为栓剂。本文提供的化合物可以被配制成中性或盐形式。药学上可接受的盐包括与游离氨基形成的盐,例如源自盐酸、磷酸、乙酸、草酸、酒石酸等的盐,以及与游离羧基形成的盐,例如源自钠、钾、铵、钙、氢氧化铁、异丙胺、三乙胺、2-乙基氨基乙醇、组氨酸、普鲁卡因等的盐。合的药学载体的实例描述于E.W.Martin的“Remington's Pharmaceutical Sciences”,其通过引用整体并入本文。这样的组合物将包含治疗有效量的化合物(其可以为纯化形式)以及合适量的载体,以便提供适合对患者施用的形式。制剂应当适合施用方式。

[0218] 还考虑提高肽,例如长效肽的经粘膜吸收的制剂。适用于口服施用的药物组合物可作为以下形式提供:胶囊或片剂;散剂或颗粒;溶液、糖浆或混悬剂(在水性或非水性液体中);可食用泡沫或泡沫(whip);或乳剂。片剂或硬明胶胶囊可以包含乳糖、淀粉或其衍生物、硬脂酸镁、糖精钠、纤维素、碳酸镁、硬脂酸或其盐。软明胶胶囊可以包含植物油、蜡、脂肪、半固体或液体多元醇等。溶液和糖浆可以包含水、多元醇和糖。

[0219] 可以用延迟活性剂在胃肠道中的崩解和/或吸收的材料(例如,可以使用单硬脂酸甘油酯或二硬脂酸甘油酯)对预期口服施用的活性剂进行包衣或将预期口服施用的活性剂与其混合。因此,可以实现活性剂在数小时内的持续释放,且如果必要的话,可以保护活性剂免于在胃内被降解。可以配制口服施用的药物组合物以促使活性剂由于特定的pH或酶条件而在特定的胃肠道位置释放。

[0220] 适用于透皮施用的药物组合物可以被提供为离散的贴剂,其旨在与受体表皮在延长的时间段中保持紧密接触。适用于局部施用的药物组合物可作为软膏、乳膏、混悬剂、洗液、散剂、溶液、糊剂、凝胶剂、喷雾剂、气溶胶或油提供。对于向皮肤、口、眼或其它外部组织的局部施用,可以使用局部软膏或乳膏。当配制在软膏中时,活性成分可以与石蜡或水混溶性软膏基质一起使用。供选择地,活性成分可以配制在具有水包油基质或油包水基质的乳膏中。适用于向眼局部施用的药物组合物包括滴眼剂。在这些组合物中,可将活性成分溶解或悬浮在合适的载体,例如水性溶剂中。适用于在口中局部施用的药物组合物包括锭剂、糖果锭剂和漱口剂。

[0221] 适用于鼻和肺施用的药物组合物可包含固体载体例如粉末(例如具有范围在20到500微米内的颗粒大小)。粉末可以用鼻嗅的方式施用,即由置于鼻附近的粉末容器经由鼻快速吸入。供选择地,适用于鼻施用的组合物可以包含液体载体,例如鼻喷雾剂或滴鼻剂。供选择地,化合物直接进入肺中的吸入可以通过深吸或通过由咬嘴进入口咽部的装置来实现。这些组合物可以包含活性成分的水溶液或油溶液。通过吸入施用的组合物可以使用专门适配的装置供应,包括但不限于加压气溶胶、喷雾器或吹入器,其可以被构造成以便于提供预定剂量的活性成分。在一个实施方案中,本文提供的药物组合物被直接施用到鼻腔,或通过鼻腔或口咽施用到肺。

[0222] 适用于直肠施用的药物组合物可以作为栓剂或灌肠剂提供。适用于阴道施用的药物组合物可以作为阴道栓剂、卫生棉条、乳膏、凝胶、糊剂、泡沫或喷雾制剂提供。

[0223] 适用于肠胃外施用的药物组合物包括水性和非水性的无菌注射液或混悬剂,其可包含抗氧化剂、缓冲液、抑菌剂和溶质,其使得组合物与预期受体的血液基本等渗。可存在于这样的组合物中的其它组分包括例如水、酒精、多元醇、甘油和植物油。适用于肠胃外施用的组合物可以存在于单位剂量或多剂量容器,例如密封的安瓿和小瓶中,并且可以冷冻干燥(冻干)状态储存,其仅需要在使用前即时加入无菌的液体载体,例如注射用无菌盐水溶液。临时注射溶液和混悬剂可以由无菌粉末、颗粒和片剂制备。在一个实施方案中,可提供包含肽的注射液的自动注射器以供救护车、急诊室和战场环境的紧急使用,甚至在居家环境中自我施用,特别是在可能发生创伤性截肢的情况下,例如由于割草机的不慎使用。通过尽可能快地向切断部分的多个部位施用肽,甚至在医务人员到达现场或在带有断趾的遭受痛苦的个体到达急诊室之前施用肽,可以增加断足或断趾中的细胞和组织在重新连接后存活的可能性。

[0224] 在一个实施方案中,组合物根据常规程序被配制或适用于对人进行静脉内施用的药物组合物。典型地,用于静脉内施用的组合物是在无菌的等渗水性缓冲液中的溶液。必要时,组合物也可以包含增溶剂和局部麻醉剂如利多卡因以减轻注射部位的疼痛。一般地,成分分开地或混合在一起以单位剂型提供,例如,作为干燥的冻干粉或无水浓缩物在气密容器例如指示活性剂的量的安瓿或小袋中提供。当组合物通过输注施用,它可以用含有无菌医药级水或盐水的输液瓶分配。当组合物通过注射施用,可以提供无菌盐水的安瓿,以便于各成分可以在施用前混合。

[0225] 栓剂一般包含范围在0.5%到10%重量的活性成分;口服制剂可以包含10%到95%的活性成分。

[0226] 可以提供灌流液组合物用于原位灌注。这样的药物组合物可以包含不适合对个体急性或慢性、局部或全身施用的肽的水平或肽的形式,但可作为器官浴、器官灌流液或原位灌流液发挥期望的功能,然后在暴露于或将经处理的器官或组织返回常规循环前去除或降低其中包含的肽的水平。

[0227] 本文还提供了药物包装或试剂盒,其包含装有本文提供的药物组合物的一种或多种成分的一个或多个容器。任选地与这样的容器(多个容器)相关联的可以由监管药物或生物产品的制造、使用或销售的政府机构规定的形式的通知,该通知反映了该机构对制造、使用或销售以供人类施用的批准。

[0228] 在另一个实施方案中,例如,可以在控释系统中递送肽。例如,可以使用静脉内输注、可植入的渗透泵、透皮贴剂、脂质体或其它施用方式施用肽。在一个实施方案中,可以使用泵(参见Langer,见上;Sefton,1987,CRC Crit.Ref.Biomed.Eng.14:201;Buchwald等人,1980,Surgery 88:507;Saudek等人,1989,N.Engl.J.Med.321:574,将其各自通过引用整体并入本文)。在另一个实施方案中,可以在囊泡特别是脂质体中递送化合物(参见Langer,Science 249:1527-1533(1990);Treat等人,Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer,Lopez-Berestein and Fidler(编),Liss,New York,pp.353-365(1989);WO 91/04014;第4,704,355号美国专利;Lopez-Berestein,同上,pp.317-327;一般参见同上)。在另一个实施方案中,可以使用聚合物材料(参见Medical Applications of Controlled Release,Langer和Wise(编),CRC Press:Boca Raton,Florida,1974;Controlled Drug Bioavailability,Drug Product Design and Performance,Smolen and Ball(编),Wiley:New York(1984);Ranger和Peppas,J.Macromol.Sci.Rev.Macromol.Chem.23:61,1953;还参见Levy等人,1985,Science 228:190;During等人,1989,Ann.Neurol.25:351;Howard等人,1989,J.Neurosurg.71:105(将其各自通过引用整体并入本文))。

[0229] 在又一个实施方案中,控释系统可以被放置在治疗靶点,即靶细胞、组织或器官的附近,因此仅需要全身剂量的一部分(参见例如,Goodson,pp.115-138,Medical Applications of Controlled Release,vol.2,同上,1984,将其通过引用整体并入本文)。其它的控释系统在Langer的综述中讨论(1990,Science 249:1527-1533,将其通过引用整体并入本文)。

[0230] 在另一个实施方案中,可经鼻、经颊、口服、经直肠、经阴道、经眼、经皮、肠胃外、吸入或舌下施用来施用经合适配制的肽。

[0231] 在具体实施方案中,可能希望向需要治疗的区域局部施用本文提供的肽;这可以通过例如但不限于以下方式实现:手术期间局部输注、表面施加(例如在手术后与伤口敷料联合施加)、通过注射、借助导管、借助栓剂、或借助植入物,所述植入物是多孔的、非多孔的或凝胶状的材料,包括膜例如硅橡胶膜或纤维。这些实施方案的非限制性实例可以是植入脉管系统、导管等的一部分中的被本文提供的肽包被的支架或其它骨架。

[0232] 基于对若干因素的考虑,技术人员可以容易地确定有效剂量的选择,这些因素是本领域普通技术人员已知的。这些因素包括肽的特定形式,及其药代动力学参数,例如生物利用度、代谢、半衰期等,这些参数将会在获取药物化合物的监管审批中通常使用的常规开发程序期间确立。剂量考虑的另外的因素包括:待治疗的病症或疾病或在正常个体中待实现的益处、患者的体重、施用途径、施用是急性还是慢性、伴随用药和其它已知将影响施用的药剂功效的因素。因此,精确的剂量应当根据从业医师的判断和每个患者的情况决定,例如,根据个体患者的病症和免疫状态,以及根据标准临床技术决定。

[0233] 另一方面,提供了用于灌注和储存供移植的器官的灌流液或灌注溶液,该灌注溶液包括有效保护响应性细胞和相关细胞、组织或器官的一定量的肽或肽类似物。移植包括但不限于:同种异体移植,其中从供体获取器官(包括细胞、组织或其它身体部分),并将其移植到不同的受体中,供体和受体是相同的物种;自体移植,其中从身体的一部分取出器官并在另一部分进行替换,包括台架手术程序(bench surgical procedure),其中可以取出器官,且在离体时对其进行切除、修复或者以其他方式操纵,例如用于肿瘤移除,然后将该器官返回到原始位置;或异种移植,其中在物种之间移植组织或器官。在一个实施方案中,灌注溶液是威斯康星大学(UW)溶液(第4,798,824号美国专利号,其通过引用整体并入本文),其包含5%羟乙基淀粉(具有约200,000至约300,000的分子量并且基本上不含乙二醇、氯乙醇、氯化钠和丙酮);25mM KH_2PO_4 ;3mM谷胱甘肽;5mM腺苷;10mM葡萄糖;10mM HEPES缓冲液;5mM葡萄糖酸镁;1.5mM CaCl_2 ;105mM葡萄糖酸钠;200,000单位青霉素;40单位胰岛素;16mg地塞米松;12mg酚红;且具有7.4-7.5的pH值和约320mOsm/l的渗透压,并补充了合适量的本文提供的肽。该特定灌流液仅说明通过包含有效量的肽而适用于本发明用途的许多这样的溶液。在另一个实施方案中,灌注溶液包含约1至约500ng/ml的肽,或约40至约320ng/ml的肽。如上所述,任何形式的肽都可被用于该方面。

[0234] 尽管出于贯穿本文的目的,考虑的肽的受体是人,但本文的方法同等地适用于其它哺乳动物,特别是驯化的动物、家畜、伴侣动物和动物园动物。然而,本发明不是如此限制的,其益处可被用于任何哺乳动物。

[0235] 在离体方法的另外的方面,可以使用任何肽,例如但不限于上述的肽。

[0236] 另一方面,提供了用于在没有通过内皮细胞屏障与脉管系统隔离的细胞、组织或器官中预防、治疗或控制组织与组织损伤相关的疾病或障碍或与疾病或障碍的作用或症状相关的损伤的方法和组合物,其通过将细胞、组织或器官直接暴露于包含肽的药物组合物,或向组织或器官的脉管系统施用或使其接触包含肽的药物组合物来实现。

[0237] 与其它基于促红细胞生成素的组织保护化合物类似,本文提供的肽可能可以从内腔表面运输到具有内皮细胞紧密连接的器官毛细血管的内皮细胞基底膜表面,包括例如脑、视网膜和睾丸。因此,可以治疗与组织损伤相关的疾病或障碍或与疾病或障碍的作用或症状相关的损伤对跨越屏障的细胞的影响。虽然不希望受任何特定理论的束缚,转胞吞作

用后,肽可以与细胞上的组织保护受体相互作用,例如,神经、眼(例如视网膜)、脂肪、结缔组织、毛发、牙齿、粘膜、胰腺、内分泌、耳、上皮、皮肤、肌肉、心脏、肺、肝、肾、小肠、肾上腺(例如肾上腺皮质、肾上腺髓质)、毛细血管、内皮、睾丸、卵巢、干细胞或子宫内膜细胞,并且受体结合可以启动信号转导级联,导致响应性细胞或组织内的基因表达程序的激活,从而保护细胞或组织或器官免受损害,例如由于暴露于毒剂、炎症、缺氧等造成的损害。在另一个实施方案中,根据第PCT/US01/49479号PCT申请、第10/188,905号和第10/185,841号美国专利申请的教导,肽可以与能够跨越屏障的化合物交联从而被运输跨越屏障,将所述文献通过引用并入本文。

[0238] 因此,下文详细描述了用于保护组织免受与组织损伤相关的疾病或障碍或与疾病或障碍的作用或症状相关的损伤的方法。

[0239] 在一个实施方案的实践中,哺乳动物患者经历了针对癌症治疗的全身化学治疗,放射治疗,其通常具有有害作用,例如神经、肺、心脏、卵巢或睾丸损伤。包含上述组织保护肽或肽类似物的药物组合物的施用在化学治疗和/或放射治疗之前和期间进行,以保护各种组织和器官免受化学治疗剂损伤,例如保护睾丸。治疗可以持续,直到化学治疗的循环水平已经降至对哺乳动物机体具有潜在危险的水平以下。

[0240] 在另一个实施方案的实践中,计划从汽车事故的受害者中获得各种器官用于移植给多个受体,其中一些需要运输延长的距离和时间段。在获取器官之前,用包含本文所述的组织保护肽和肽类似物的药物组合物灌注供体。获取的供运输的器官可用包含如本文所述的组织保护肽或肽类似物的灌流液灌注,并且储存在包含组织保护肽或肽类似物的浴中。可以用脉动灌注装置并使用包含根据本公开内容的组织保护肽和肽类似物的灌流液连续灌注特定器官。在运输期间和植入及原位器官再灌注时发生器官功能的最小恶化。

[0241] 在另一个实施方案中,在使个体暴露于毒剂的危险活动中的参与者可以服用一剂药物组合物,其包含的肽足以预防(即延迟发作、抑制、或停止)、保护或减轻暴露于毒剂的作用。特别地,该治疗方法可在各种涉及与毒剂接触的职业中具有应用,例如矿工、化学品制造商、军事人员(士兵、伞兵)、应急人员(警察、消防员、EMS和灾难救援人员)、建筑工人、食品加工者和动力反应堆的雇员。

[0242] 在另一个实施方案中,修复心脏瓣膜的手术程序需要暂时的心脏停搏和动脉闭塞。在手术前,将组织保护肽或肽类似物注入患者。这样的治疗预防了缺氧缺血性细胞损伤,特别是在再灌注后。此外,本文提供的药物组合物可以被预防性地使用以使个体为手术作好准备,试图限制手术程序相关的创伤或帮助个体从手术程序中恢复。虽然使用包含组织保护肽和肽类似物的药物组合物的本治疗方法为手术程序提供预防用途,但是其在诱导暂时缺血性事件的过程中可能特别有用,所述缺血性事件包括但不限于旁路程序(冠状动脉旁路)、血管成形术程序、截肢和移植,以及直接对响应性细胞、组织或器官进行的程序,如大脑和脊髓手术、和开心程序。这些程序可能涉及心肺(心脏肺脏)旁路的使用。

[0243] 在另一个实施方案中,在任何手术程序例如心肺旁路手术中,可以使用本文提供的组织保护肽或肽类似物。在一个实施方案中,如上所述的包含组织保护肽和肽类似物的药物组合物的施用在旁路程序之前、期间和/或之后进行,以保护脑、心脏和其它器官的功能。

[0244] 在其中肽被用作离体应用或体内应用以治疗与组织损伤相关的疾病或障碍或由

其产生的损伤、作用或症状的前述实例中,本文提供了剂量单位形式的药物组合物,其适用于预防、治疗或管理暴露于毒剂的损伤和效应或其症状,所述剂量单位形式包含量的范围在约.01pg至30mg、.5pg至25mg、1pg至20mg、500pg至10mg、1ng至10mg、500ng至10mg、1μg至10mg、500μg至10mg或1mg至10mg的肽,和药学上可接受的载体。在一个实施方案中,肽的量在约.5pg至1mg的范围内。在一个实施方案中,制剂包含非红细胞生成的肽。

[0245] 此外,该恢复性方面涉及本文的任何肽在制备用于恢复细胞、组织或器官功能障碍的药物组合物中的用途,其中治疗在造成功能障碍的初始损伤后和相当一段时间之后开始。此外,使用本文提供的肽的治疗可以跨越疾病或病症在急性期和慢性期的病程。

[0246] 本文提供的肽可以全身施用,每次施用的剂量为约1ng至约300μg/kg体重,例如约5-150μg/kg体重或约10-100μg/kg体重。例如,如果临床需要,可以每小时、每日重复施用,或在合适的间隔后重复施用,例如每1-12小时,每6到12小时;每2-6天,每2-4天;每1到12星期或每1到3星期。在一个实施方案中,有效量的肽和药学上可接受的载体可以被包装在单剂量小瓶或其它容器中。在另一个实施方案中,使用能够发挥本文所述的活性但不会造成血红蛋白浓度或血细胞压积增加的肽。这样的肽可以用于其中本文提供的方法旨在长期提供的情况。

[0247] 表2.序列

[0248]

SEQ ID No.	描述	序列
1	组织保护肽	GDKARYEREM
2	组织保护肽	GDKARYEREA
3	组织保护肽	GDKA
4	两亲性肽: 降钙素-肽 A	ALSILVLLQAGS
5	两亲性肽: 肽 B-促肾上腺皮质激素释放激素	VALLPCPPCRA
6	两亲性肽: 肽 C-β 内啡肽	NAIKNAYKKG
7	两亲性肽: 肽 D-胰高血糖素	GSWQRSLQDTE
8	两亲性肽: 肽 E-分泌素	GGSAARPAPP
9	两亲性肽: 肽 F-血管肠肽	NALAENDTPYY
10	两亲性肽: 肽 G-神经肽 Y	GALAEAYPSKP
11	两亲性肽: 肽 H-促性腺激素释放激素	GCSSQHWSYGL
12	两亲性肽: 肽 I-甲状旁腺激素	VMIVMLAICFL
13	两亲性肽: 肽 J-胰多肽	LRRYINMLTRP
14	两亲性肽: 肽 K-降钙素基因相关肽	LALSILVLYQA
15	SEQ ID NO: 3 和 14 的嵌合肽	GDKALRRYINMLTRP
16	SEQ ID NO: 3 和 14 的嵌	GDKALRRYINMLTRTR

[0249]

SEQ ID No.	描述	序列
	合肽, 具有 TR 替代	

9. 实施例

[0250] 提供以下实施例是为了说明,而不是为了限制。

[0251] 实施例1:在神经性疼痛模型中的功效

[0252] 该实施例表明组织保护肽保护动物免受神经损伤和疼痛。

[0253] 在该研究中使用的大鼠是8周龄雌性Sprague-Dawley大鼠(Charles River, Maastricht, The Netherlands)。用6%七氟烷诱导和3%维持麻醉动物。在动物左后肢的侧表面上形成小切口,暴露肌肉。通过股二头肌的两个头之间的钝性分离显示坐骨神经的三根分叉部。接下来,在大鼠中用5-0丝,在小鼠中用6-0丝将胫骨和腓总神经紧紧结扎,并切割以移除2-4mm的远端神经。腓肠神经保留完整。为了防止自发神经重新连接,将横切的神经移位。在手术过程中,要特别注意不要拉伸或触摸坐骨神经或腓肠神经。在大鼠中用4-0丝,在小鼠中用6-0丝将伤口分两层闭合,并且分别在大鼠和小鼠中施用单剂量的0.01和0.05mg/kg丁丙诺啡,以缓解术后疼痛。在暴露后,诱导保留性神经损伤(SNI),并用4-0(大鼠)或6-0(小鼠)丝将伤口分两层封闭,并且施用单剂量的0.01(大鼠)mg/kg丁丙诺啡用于缓解术后疼痛。在手术过程中,要特别注意不要拉伸或触摸暴露的神经。

[0254] 在诱导SNI后24小时开始治疗:其包括以2天间隔腹膜内注射五次30 μ g/kg肽(GDKA (SEQ ID NO:3)、GDKARYEREM (SEQ ID NO:1)或阳性对照)。来自第8,853,358号美国专利的SEQ ID NO:282的肽用作阳性对照。使用不同的von Frey毛发(Semmes-Weinstein Monofilaments, North Coast Medical Inc., San Jose, CA)测试触觉异常性疼痛,其具有增加的刚度(0.004-15g),导致增量力施加在受影响的后爪的足底表面上。将毛发以1-2秒的间隔向测试区域内略微不同的位置施加10次。记录通过快速缩足引起疼痛反射所需的力,并且另外的纤丝没有施加到显示出反应的爪上。

[0255] 如图1所示,接受溶媒的动物表现出对触觉的敏感性增加。相反,接受本文提供的肽的动物未显示出增加的敏感性。

[0256] 实施例2:AKT磷酸化的活化

[0257] 该实施例显示组织保护肽活化AKT。

[0258] HUVEC购自Cell Applications (San Diego, CA)并在潮湿培养箱中,在含有5%CO₂的空气中在37°C下,在补充有2%胎牛血清(FCS)和青霉素/链霉素(P/S)的培养基EGM-2中生长。初步实验显示Akt的磷酸化在被活化组织保护受体的化合物刺激后10分钟达到最大。在用GDKA (SEQ ID NO:3)肽处理HUVEC后,制备细胞裂解物并使用抗Akt和抗磷酸-Akt抗体(Cell Signaling Technology, Danvers, MA)进行Western印迹。简言之,对细胞裂解物进行SDS-PAGE,并转移到硝酸纤维素膜(Amersham Biosciences, Piscataway, NJ)上。将膜在室温下用含有2%BSA和0.05%吐温20的PBS封闭1小时。将印迹在4°C下孵育过夜或在室温下用抗磷酸-Akt的一抗孵育4小时,然后用辣根过氧化物酶缀合的二抗孵育1小时。然后用针对Akt的抗体重新探测印迹以确认相等的蛋白质负载。使用ECL (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ)使免疫反应条带可视化。

[0259] 如图2所示,GDKA (SEQ ID NO:3)肽活化AKT。

[0260] 实施例3:GDKA (SEQ ID NO:3)肽的组织保护活性

[0261] 该实施例显示组织保护肽保护动物免受神经损伤和神经病变。

[0262] 正如Beiswenger等人所证明的,热缩足潜伏期的增加与表皮神经支配的丧失相关,表现为STZ诱导的糖尿病在小鼠中开始后4周,表皮内神经纤维密度降低(Beiswenger等人,2008Neurosci Lett.442:267)。Smith等人还报道了表皮内神经纤维的丧失是神经病变严重程度和进展的有效替代指标(Smith等人,2006Diabetes Care 29:1294)。因此,测试了具有氨基酸序列GDKA (SEQ ID NO:3)的肽对STZ诱导的糖尿病小鼠的热缩足潜伏期的作用,

以证明其在糖尿病神经病变中保护免受神经损伤的能力。

[0263] 简言之,对雄性Swiss Webster小鼠单次注射STZ(180mg/kg i.p.)以诱导胰岛素缺乏型糖尿病。3天后确认高血糖,并且为了确保诱导足够的神经病变,仅使用血糖水平超过15mmol/l的小鼠。在未治疗的糖尿病四周后,组织保护性肽或对照治疗(磷酸盐缓冲盐水(PBS))作为滴眼剂(50微升的50纳摩尔溶液)施用到双眼,持续5天/周。来自第8,853,358号美国专利的SEQ ID NO:282的肽用作阳性对照。治疗12周后,测试小鼠的爪热敏感性。为了测量热缩足潜伏期,将小鼠置于具有暖玻璃地板的外壳中,并将移动辐射热源导向一只后爪的足底表面。热量每秒升高0.9°C以确保缩足反应涉及热敏C-纤维的活化(Yeomans等人,1996Pain 68:133)。从开始加热到缩足的时间记录在间隔5分钟的4次独立试验中,其中每只小鼠使用最后3次试验的中值。

[0264] 如图3所示,接受PBS治疗的糖尿病小鼠表现出增加的热潜伏期(热阈值),这与神经病变的发展一致。相反,接受GDKA(SEQ ID NO:3)肽的小鼠表现出与非糖尿病小鼠或用阳性对照处理的糖尿病小鼠相当的正常热阈值。接受GDKA(SEQ ID NO:3)肽的小鼠的热阈值也显著低于PBS处理的糖尿病小鼠。这些结果证明GDKA(SEQ ID NO:3)肽保护动物免受神经损伤和神经病变。

[0265] 本公开不限于具体实施方案所描述的范围,这些实施方案旨在作为本公开的各个方面的单一说明,并且功能上等同的方法和组件在本公开的范围。实际上,根据前面的描述和附图,除了本文显示和描述的那些以外,本公开的各种修改对于本领域技术人员而言将变得显而易见。这些修改旨在落入所附权利要求的范围内。

[0266] 出于所有目的,本文引用的所有参考文献均以引用的方式整体并入本文。

Val Met Ile Val Met Leu Ala Ile Cys Phe Leu

1 5 10

<210> 13

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 两亲性肽:肽J - 胰多肽

<400> 13

Leu Arg Arg Tyr Ile Asn Met Leu Thr Arg Pro

1 5 10

<210> 14

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 两亲性肽:肽K - 降钙素基因相关肽

<400> 14

Leu Ala Leu Ser Ile Leu Val Leu Tyr Gln Ala

1 5 10

<210> 15

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> SEQ ID NO: 3和14的嵌合肽

<400> 15

Gly Asp Lys Ala Leu Arg Arg Tyr Ile Asn Met Leu Thr Arg Pro

1 5 10 15

<210> 16

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> SEQ ID NO: 3和14的嵌合肽,具有TR替代

<400> 16

Gly Asp Lys Ala Leu Arg Arg Tyr Ile Asn Met Leu Thr Arg Thr Arg

1 5 10 15

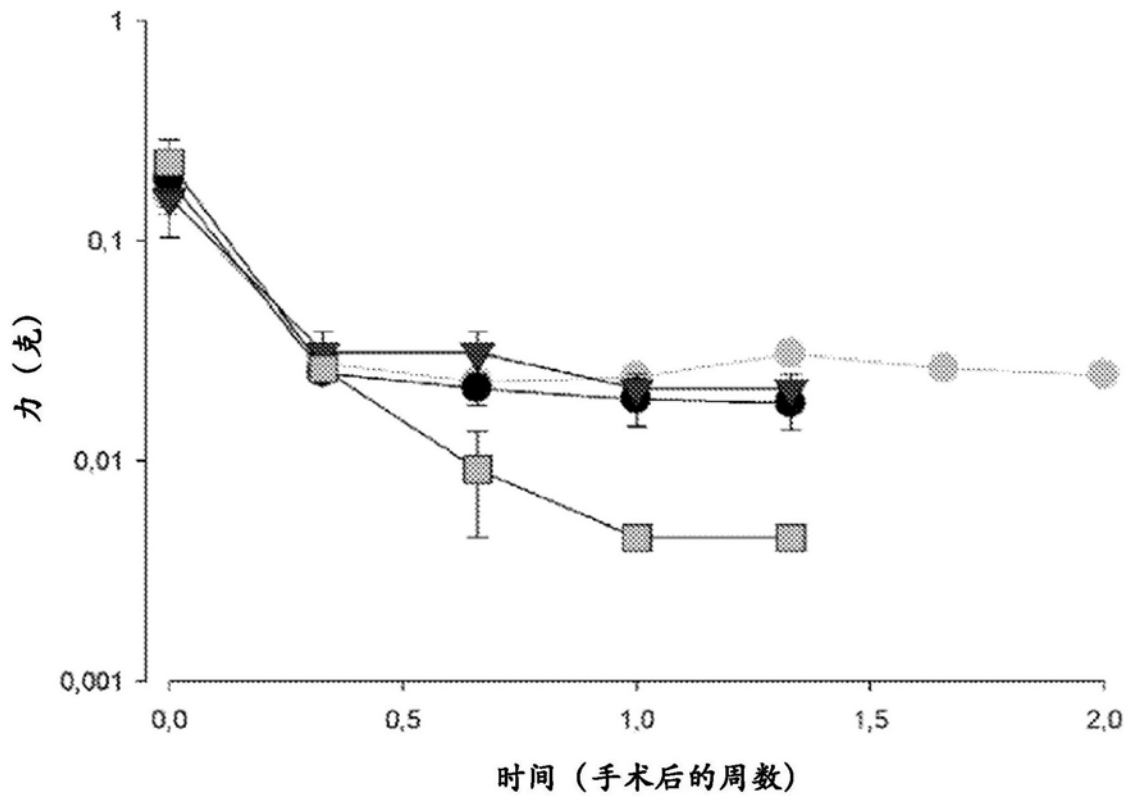


图1

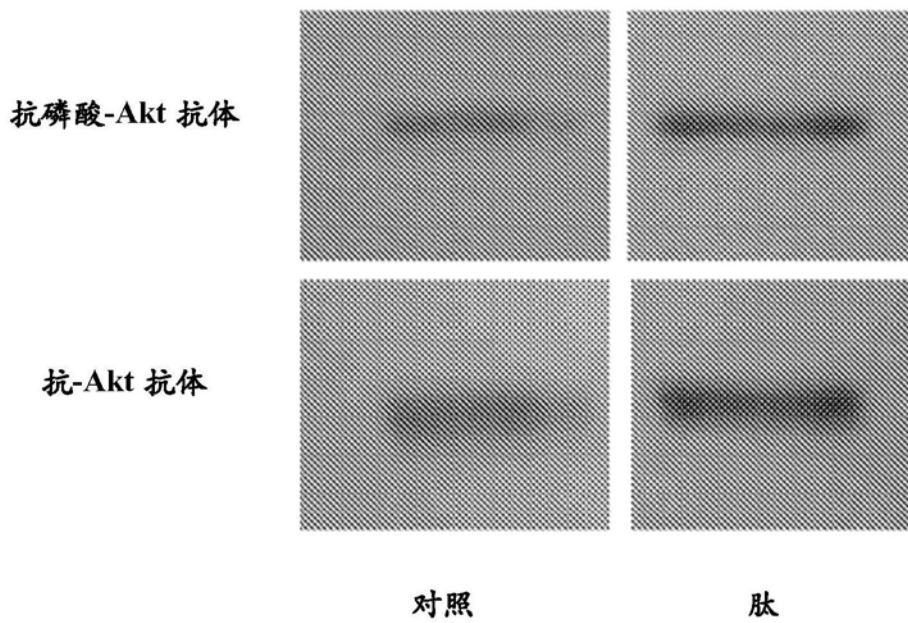


图2

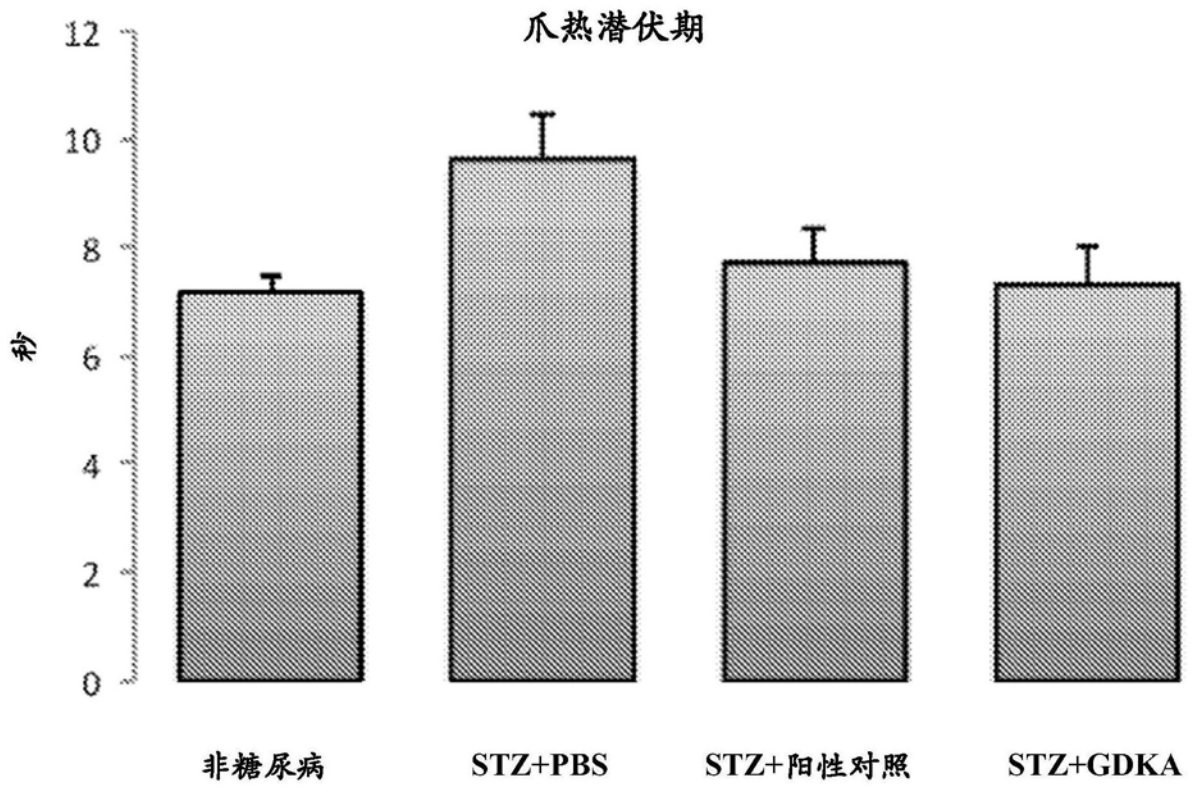


图3