



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105407906 A

(43) 申请公布日 2016. 03. 16

(21) 申请号 201480022767. 2

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2014. 02. 28

A61K 38/06(2006. 01)

(30) 优先权数据

61/771, 534 2013. 03. 01 US

61/771, 642 2013. 03. 01 US

61/839, 753 2013. 06. 26 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 10. 21

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2014/019622 2014. 02. 28

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/134554 EN 2014. 09. 04

(71) 申请人 康德生物医疗技术公司

地址 摩纳哥摩纳哥城

(72) 发明人 D·特拉维斯·威尔逊

马克·班伯格

(74) 专利代理机构 北京同达信恒知识产权代理

有限公司 11291

代理人 黄志华 石磊

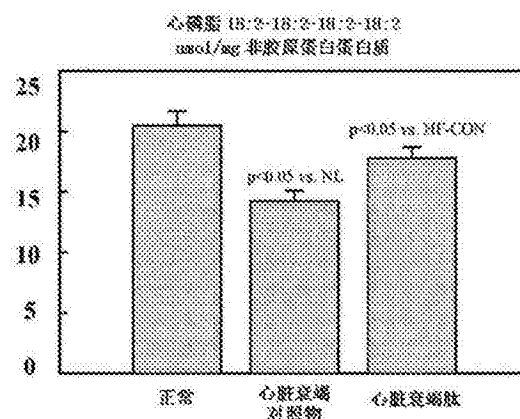
权利要求书2页 说明书29页 附图3页

(54) 发明名称

预防或治疗巴斯综合征的方法和组合物

(57) 摘要

本公开内容提供预防或治疗在哺乳动物受试者中的巴斯综合征、降低与巴斯综合征相关的危险因素和 / 或降低巴斯综合征的可能性或严重性的方法。所述方法包括向受检者施用有效量的芳族阳离子肽以增加在有此需要的受试者中的TAZ1 表达。



1. 一种治疗或预防在有此需要的受试者中的巴斯综合征的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的肽 D-Arg-2' 6' -Dmt-Lys-Phe-NH<sub>2</sub>或其药学上可接受的盐。

2. 根据权利要求 1 所述的方法,其中,与正常对照受试者相比较,所述受试者表现出降低的 TAZ1 表达水平。

3. 根据权利要求 1 至 2 中任一项所述的方法,其中,每天施用所述肽,持续 6 周或更久。

4. 根据权利要求 1 至 3 中任一项所述的方法,其中,每天施用所述肽,持续 12 周或更久。

5. 根据权利要求 1 至 4 中任一项所述的方法,其中,所述受试者已经被诊断为具有巴斯综合征。

6. 根据权利要求 5 所述的方法,其中,所述巴斯综合征包括心肌病、骨骼肌异常、中性粒细胞减少、发育迟缓、弱肌张力、在尿和血液中有有机酸的水平增加和频繁细菌感染中的一种或多种。

7. 根据权利要求 1 至 6 中任一项所述的方法,其中,所述受试者为人类。

8. 根据权利要求 1 至 7 中任一项所述的方法,其中,经口服、局部、全身、静脉内、皮下、腹膜内或肌肉内施用所述肽。

9. 根据权利要求 1 至 8 中任一项所述的方法,还包括对所述受试者单独、依次或同时地施用心血管剂。

10. 根据权利要求 9 所述的方法,其中,所述心血管剂选自抗心律不整剂、血管扩张剂、抗心绞痛剂、皮质类固醇、强心苷、利尿剂、镇静剂、血管紧张素转化酶 (ACE) 抑制剂、血管紧张素 II 拮抗剂、溶栓剂、钙通道阻断剂、血栓烷受体拮抗剂、自由基清除剂、抗血小板药物、 $\beta$ -肾上腺素受体阻断药物、 $\alpha$ -受体阻断药物、交感神经抑制剂、洋地黄制剂、强心药和抗高血脂药物构成的组。

11. 根据权利要求 1 至 10 中任一项所述的方法,其中,所述药学上可接受的盐包括乙酸盐或三氟乙酸盐。

12. 一种增加在有此需要的哺乳动物受试者中的 TAZ1 表达的方法,所述方法包括:向所述受试者施用治疗有效量的肽 D-Arg-2' 6' -Dmt-Lys-Phe-NH<sub>2</sub>或其药学上可接受的盐。

13. 根据权利要求 12 所述的方法,其中,在所述受试者中的 TAZ1 表达是正常对照受试者中的 TAZ1 表达水平的约二分之一至五分之一。

14. 根据权利要求 12 至 13 中任一项所述的方法,其中,每天施用所述肽,持续 6 周或更久。

15. 根据权利要求 12 至 14 中任一项所述的方法,其中,每天施用所述肽,持续 12 周或更久。

16. 根据权利要求 12 至 15 中任一项所述的方法,其中,所述受试者已经被诊断为具有巴斯综合征或疑似具有巴斯综合征或处于具有巴斯综合征的危险之中。

17. 根据权利要求 16 所述的方法,其中,所述巴斯综合征包括心肌病、骨骼肌异常、中性粒细胞减少、发育迟缓、弱肌张力、在尿和血液中有有机酸的水平增加和频繁细菌感染中的一种或多种。

18. 根据权利要求 12 至 17 中任一项所述的方法,其中,所述受试者为人类。

19. 根据权利要求 12 至 18 中任一项所述的方法, 其中, 经口服、局部、全身、静脉内、皮下、腹膜内或肌肉内施用所述肽。

20. 根据权利要求 12 至 19 中任一项所述的方法, 还包括对所述受试者单独、依次或同时地施用心血管剂。

21. 根据权利要求 20 所述的方法, 其中, 所述心血管剂选自抗心律不整剂、血管扩张剂、抗心绞痛剂、皮质类固醇、强心苷、利尿剂、镇静剂、血管紧张素转化酶 (ACE) 抑制剂、血管紧张素 II 拮抗剂、溶栓剂、钙通道阻断剂、血栓烷受体拮抗剂、自由基清除剂、抗血小板药物、 $\beta$ -肾上腺素受体阻断药物、 $\alpha$ -受体阻断药物、交感神经抑制剂、洋地黄制剂、强心药和抗高血脂药物构成的组。

22. 根据权利要求 12 至 22 中任一项所述的方法, 其中, 所述药学上可接受的盐包括乙酸盐或三氟乙酸盐。

23. 一种降低在具有与正常对照受试者相比减少的 TAZ1 表达的哺乳动物受试者中的巴斯综合征的危险的方法, 所述方法包括: 向所述受试者施用治疗有效量的肽 D-Arg-2' 6' -Dmt-Lys-Phe-NH<sub>2</sub>或其药学上可接受的盐。

24. 一种稳定在具有巴斯综合征或疑似具有巴斯综合征的哺乳动物受试者中的心磷脂再成型的方法, 所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的肽 D-Arg-2' 6' -Dmt-Lys-Phe-NH<sub>2</sub>或其药学上可接受的盐。

25. 根据权利要求 24 所述的方法, 其中, 所述哺乳动物受试者具有与正常对照受试者相比减少的 TAZ1 表达。

26. 根据权利要求 24 所述的方法, 其中, 所述心磷脂为心磷脂的 18:2 物质。

## 预防或治疗巴斯综合征的方法和组合物

[0001] 相关专利申请的交叉引用

[0002] 本申请要求 2013 年 3 月 1 日提交的美国临时专利申请 61/771,534、2013 年 3 月 1 日提交的美国临时专利申请 61/771,642 和 2013 年 6 月 26 日提交的美国临时专利申请 61/839,753 的优先权,其全部通过引用整体结合到本文中来。

### 技术领域

[0003] 本发明技术通常涉及预防或治疗巴斯综合征 (Barth Syndrome)、降低与巴斯综合征相关的危险因子和 / 或降低巴斯综合征的严重性的组合物和方法。具体地讲,本发明技术涉及施用有效量的芳族阳离子肽到有此需要的受试者以使 TAZ1 的表达水平正规化。

### 背景技术

[0004] 提供以下描述以帮助读者的理解。但并不承认所提供的信息或引用的参考文献为现有技术。

[0005] 巴斯综合征为以扩张型心肌病 (DCM)、骨骼肌病、中性粒细胞减少、生长延迟和有机酸尿为特征的磷脂新陈代谢的可遗传病症。巴斯综合征的发病率估计为 1/454,000 个活产婴儿,其中根据地理位置,估计的发病率范围为 1/400,000–1/140,000。巴斯综合征为 X- 连接的病症,且因此不成比例地影响着男性患者。

[0006] 巴斯综合征由在 TAZ 基因中的突变引起 (tafazzin ;Xq28), TAZ 基因编码 TAZ1, TAZ1 为在局部化到内部线粒体膜的磷脂 – 心磷脂的新陈代谢中包括的酰基转移酶。缺损的 TAZ1 功能引起心磷脂的异常再成型且连累到线粒体结构和呼吸链功能。

### 发明内容

[0007] 一方面,本发明技术涉及一种治疗在有此需要的受试者中的巴斯综合征的方法,所述方法包括:向所述受试者施用治疗有效量的肽 D-Arg-2'6'-Dmt-Lys-Phe-NH<sub>2</sub>或其药学上可接受的盐。

[0008] 在一些实施方案中,与正常对照受试者相比较,所述受试者表现出降低的 TAZ1 表达水平。在一些实施方案中,每天施用所述肽,持续 6 周或更久。在一些实施方案中,每天施用所述肽,持续 12 周或更久。

[0009] 在一些实施方案中,所述受试者已经被诊断为具有巴斯综合征。在一些实施方案中,所述巴斯综合征包括心肌病、骨骼肌异常、中性粒细胞减少、发育迟缓、弱肌张力、在尿和血液中有有机酸的水平增加和频繁细菌传染中的一种或多种。

[0010] 在一些实施方案中,所述受试者为人类。在一些实施方案中,所述肽经口服、局部、全身、静脉内、皮下、腹膜内或肌肉内施用。

[0011] 在一些实施方案中,所述方法还包括向所述受试者单独、依次或同时地施用心血管剂。在一些实施方案中,所述心血管剂选自抗心律不整剂、血管扩张剂、抗心绞痛剂、皮质类固醇、强心苷、利尿剂、镇静剂、血管紧张素转化酶 (ACE) 抑制剂、血管紧张素 II 拮抗

剂、溶栓剂、钙通道阻断剂、血栓烷受体拮抗剂、自由基清除剂、抗血小板药物、 $\beta$ -肾上腺素受体阻断药物、 $\alpha$ -受体阻断药物、交感神经抑制剂、洋地黄制剂、强心药 (inotrope) 和抗高血脂药物构成的组。

[0012] 在一些实施方案中,所述药学上可接受的盐包括乙酸盐或三氟乙酸盐。

[0013] 一方面,本公开内容提供一种增加在有此需要的哺乳动物受试者中 TAZ1 的表达的方法,所述方法包括:向所述受试者施用治疗有效量的肽 D-Arg-2' 6'-Dmt-Lys-Phe-NH<sub>2</sub> 或其药学上可接受的盐。

[0014] 在一些实施方案中,在所述受试者中 TAZ1 的表达是在正常对照受试者中 TAZ1 的表达水平的约二分之一至五分之一。在一些实施方案中,每天施用所述肽,持续 6 周或更久。在一些实施方案中,每天施用所述肽,持续 12 周或更久。

[0015] 在一些实施方案中,所述受试者已经被诊断为具有巴斯综合征或疑似具有巴斯综合征或处于具有巴斯综合征的危险之中。在一些实施方案中,所述巴斯综合征包括心肌病、骨骼肌异常、中性粒细胞减少、发育迟缓、弱肌张力、在尿和血液中有有机酸的水平增加和频繁细菌感染中的一种或多种。

[0016] 在一些实施方案中,所述受试者为人类。在一些实施方案中,所述肽经口服、局部、全身、静脉内、皮下、腹膜内或肌肉内施用。

[0017] 在一些实施方案中,所述方法还包括向所述受试者单独、依次或同时地施用心血管剂。在一些实施方案中,所述心血管剂选自抗心律不整剂、血管扩张剂、抗心绞痛剂、皮质类固醇、强心苷、利尿剂、镇静剂、血管紧张素转化酶 (ACE) 抑制剂、血管紧张素 II 拮抗剂、溶栓剂、钙通道阻断剂、血栓烷受体拮抗剂、自由基清除剂、抗血小板药物、 $\beta$ -肾上腺素受体阻断药物、 $\alpha$ -受体阻断药物、交感神经抑制剂、洋地黄制剂、强心药 (inotrope) 和抗高血脂药物构成的组。

[0018] 在一些实施方案中,所述药学上可接受的盐包括乙酸盐或三氟乙酸盐。

[0019] 一方面,本公开内容提供一种降低在与正常对照受试者相比具有减少的 TAZ1 表达的哺乳动物受试者中巴斯综合征的危险的方法,所述方法包括:向所述受试者施用治疗有效量的肽 D-Arg-2' 6'-Dmt-Lys-Phe-NH<sub>2</sub> 或其药学上可接受的盐。

[0020] 一方面,本公开内容提供一种稳定在具有巴斯综合征或疑似具有巴斯综合征的哺乳动物受试者中的心磷脂再成型的方法。在一些实施方案中,所述哺乳动物受试者具有与正常对照受试者相比减少的 TAZ1 表达。在一些实施方案中,所述心磷脂为心磷脂的 18:2 物质。

## 附图说明

[0021] 图 1 为示出在狗心脏衰竭模型中 D-Arg-2' 6'-Dmt-Lys-Phe-NH<sub>2</sub> 对心磷脂物质 18:2-18:2-18:2-18:2 的水平的影响的图表;

[0022] 图 2 为示出在狗心脏衰竭模型中 D-Arg-2' 6'-Dmt-Lys-Phe-NH<sub>2</sub> 对 TAZ1 表达水平的影响的图表;

[0023] 图 3 为在巴斯综合征患者中的线粒体的电子显微镜图像;

[0024] 图 4A 为在心脏病中的线粒体的超微结构的电子显微镜图像;

[0025] 图 4B 为在用 D-Arg-2' 6'-Dmt-Lys-Phe-NH<sub>2</sub> 治疗的心脏病中线粒体的超微结构的

电子显微镜图像；

[0026] 图 5A 为在心脏病中的线粒体的组织的电子显微镜图像；

[0027] 图 5B 为在用 D-Arg-2' 6' -Dmt-Lys-Phe-NH<sub>2</sub>治疗的心脏病中线粒体的组织的电子显微镜图像。

## 具体实施方式

[0028] 应当了解下文以各种详细程度描述本发明的某些方面、模式、实施方案、变体和特征以提供对本发明的充分理解。下文提供如在本说明书中所用的某些术语的定义。除非另外定义，否则本文使用的所有技术和科学术语通常具有与本发明所属领域中的普通技术人员通常理解的相同的含义。

[0029] 如在本说明书和所附权利要求书中所使用，除非上下文清楚地指明，否则单数形式的“一个 (a)”、“一种 (an)”以及“所述 (the)”包括复数个对象。例如，提及“一个细胞”包括两个或更多个细胞的组合等。

[0030] 本文使用的向受试者“施用”试剂、药物或肽包括向受试者引入或递送化合物以执行其预期功能的任何路径。施用可通过任何合适的路径进行，包括经口服、鼻内、肠胃外（静脉内、肌肉内、腹膜内或皮下）或局部进行。施用包括自施用和通过另一者施用。

[0031] 本文使用的术语“氨基酸”包括天然存在的氨基酸和合成氨基酸，以及以类似于天然存在的氨基酸的方式发挥作用的氨基酸类似物和氨基酸模拟物。天然存在的氨基酸为由遗传密码编码的那些氨基酸，以及随后进行修饰的氨基酸，例如羟基脯氨酸、 $\gamma$ -羧基谷氨酸和 O-磷酸丝氨酸。氨基酸类似物是指具有与天然存在的氨基酸相同的基本化学结构（即，与氢、羧基、氨基和 R 基团键结的  $\alpha$ -碳）的化合物，例如，高丝氨酸、正亮氨酸、甲硫氨酸亚砷、甲硫氨酸甲基砷。这些类似物具有修饰的 R 基团（例如，正亮氨酸）或修饰的肽主链，但是保留与天然存在的氨基酸相同的基本化学结构。氨基酸模拟物是指具有与氨基酸的一般化学结构不同的结构，但是以类似于天然存在的氨基酸的方式发挥作用的化学化合物。氨基酸可以通过其通常已知的三字母符号或通过 IUPAC-IUB 生物化学命名委员会 (IUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commission) 推荐的单字母符号在本文中提及。

[0032] 本文使用的术语“有效量”是指足以实现所要的治疗性和 / 或预防性作用的量，例如引起在有此需要的受试者中的例如 TAZ1 的表达水平增加（例如，正规化）的量。在治疗或预防应用的情况下，在一些实施方案中，向受试者施用的组合物的量将取决于疾病的类型和严重性及个体的特征，例如一般健康状况、年龄、性别、体重和药物耐受性。在一些实施方案中，其还将取决于疾病的程度、严重性和类型。技术人员将能够根据这些因素和其它因素确定适当的剂量。组合物也可与一种或多种额外的治疗性化合物组合施用。在本文所述的方法中，可将例如 D-Arg-2' 6' -Dmt-Lys-Phe-NH<sub>2</sub>的芳族阳离子肽或例如乙酸盐或三氟乙酸盐的其药学上可接受的盐施用到具有巴斯综合征的一种或多种体征、症状或危险因素的受试者，所述症状例如为心肌病、骨骼肌异常、中性粒细胞减少、发育迟缓、弱肌张力、在尿和血液中的有机酸水平增加和 / 或例如肺炎的频繁细菌感染。例如，“治疗有效量”的芳族阳离子肽包括如下水平，在施用之后受试者的 TAZ1 表达水平增加和 / 或巴斯综合征的一种或多种体征、症状或危险因子的存在、频率或严重性降低或消除。在一些实施方案中，治疗有效量降低或缓解巴斯综合征的生理作用和 / 或巴斯综合征的危险因子和 / 或发展巴斯综

合征的可能性。

[0033] 本文使用的术语“巴斯综合征”是指由 TAZ1 酰基转移酶缺乏引起的磷脂新陈代谢的可遗传病症。巴斯综合征的体征和症状包括心肌病、骨骼肌异常、中性粒细胞减少、发育迟缓、弱肌张力、在尿和 / 或血液中有有机酸的水平增加和 / 或例如肺炎的频繁细菌感染。

[0034] 本文使用的术语“TAZ1”或“tafazzin”是指由 TAZ 基因编码的人类 X 染色体酰基转移酶。TAZ1 同种型的说明性序列由例如 GenBank 登录号 NM\_000116.3、NM\_181311.2、NM\_181312.2 和 NM\_181313.2 给出。.

[0035] 本文使用的“分离的”或“纯化的”多肽或肽是指基本上不含来自产生该试剂的细胞或组织来源中的细胞物质或其它污染多肽,或当化学合成时基本上不含化学前体或其它化学品的多肽或肽。例如,分离的芳族阳离子肽将不含会干扰试剂的诊断性或治疗性用途的物质。这类干扰性物质可包括酶、激素和其它蛋白质溶质及非蛋白质溶质。

[0036] 本文使用的使受试者的 TAZ1 表达水平“正规化”是指朝“正常”或野生型表达水平的方向改变受试者的 TAZ1 表达水平。例如,使在与正常受试者相比具有降低的 TAZ1 表达的受试者中的 TAZ1 表达水平正规化是指增加 TAZ1 表达水平。在一些实施方案中,使在受试者中的 TAZ1 表达正规化是指缩减或降低与例如未治疗的对照受试者相比 TAZ1 表达的降低程度。

[0037] 本文使用的“增加”受试者的 TAZ1 表达水平意指增加在器官或组织中受试者的 TAZ1 水平(例如,受试者的 TAZ1 表达水平,例如 RNA 和 / 或蛋白水平)。在一些实施方案中,增加 TAZ1 表达水平为增加约 1%、约 5%、约 10%、约 15%、约 20%、约 25%、约 30%、约 35%、约 40%、约 45%、约 50%、约 55%、约 60%、约 65%、约 70%、约 75%、约 80%、约 85%、约 90%、约 95% 或更大。供选或额外地,在一些实施方案中,增加 TAZ1 表达水平度量在受试者中在 TAZ1 表达减小的程度方面的缩减或降低。在一些实施方案中,TAZ1 降低减小约 0.25 倍 - 约 0.5 倍、约 0.5 倍 - 约 0.75 倍、约 0.75 倍 - 约 1.0 倍或约 1.0 倍 - 约 1.5 倍。

[0038] 本文使用的术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”在本文中可互换地用来意指包含通过肽键或修饰的肽键彼此接合的两个或更多个氨基酸的聚合物,即肽等排体。“多肽”是指短链(常称作肽、糖肽或低聚物)和较长的链(一般称作蛋白质)两者。多肽可含有不同于基因编码的 20 种氨基酸的氨基酸。多肽包括通过天然过程如翻译后加工或通过本领域熟知的化学修饰技术所修饰的氨基酸序列。

[0039] 本文使用的术语“同时”治疗性使用是指通过相同路径并在相同时间或在基本上相同的时间施用至少两种活性成分。

[0040] 本文使用的术语“分别”治疗性使用是指在相同时间或在基本上相同的时间通过不同路径施用至少两种活性成分。

[0041] 本文使用的术语“依次”治疗性使用是指在不同时间施用至少两种活性成分,施用路径相同或不同。更特定地讲,依次使用是指在开始施用另一种或其它活性成分之前,完全施用活性成分之一。因此可以在施用另一种或多种活性成分之前数分钟、数小时或数天范围内施用活性成分之一。在这种情况下不存在同时治疗。

[0042] 本文使用的术语“治疗(treating)”或“治疗(treatment)”或“缓解”是指治疗性治疗,其中目的是预防、降低、减缓或减慢(减轻)所靶向的病理病状或病症。如果在根

据本文所述的方法接受治疗量的例如 D-Arg-2' 6' -Dmt-Lys-Phe-NH<sub>2</sub> 的芳族阳离子肽或例如乙酸盐或三氟乙酸盐的其药学上可接受的盐之后,受试者就巴斯综合征成功地受到“治疗”,则所述受试者显示出巴斯综合征的一种或多种体征和症状的可观察和/或可度量的降低,所述体征和症状例如为心肌病、骨骼肌异常、中性粒细胞减少、发育迟缓、弱肌张力、在尿和血液中有有机酸的水平增加和/或例如肺炎的频繁细菌感染。还应当了解,治疗或预防如所述的医学病状的多种模式意指“基本上”,这包括完全治疗,还包括亚完全治疗或预防,并且其中实现一些生物学上或医学上相关的结果。本文使用的治疗巴斯综合征还指治疗表征所述综合征的降低的 TAZ1 表达水平,由此引起与在治疗之前受试者的 TAZ1 表达水平相比 TAZ1 表达增加。

[0043] 本文使用的“预防 (prevention)”或“预防 (preventing)”病症或病状指如下化合物,在统计样品中,所述化合物相对于未处理的对照样品减少该病症或病状的症状在处理过的样品中出现,或相对于未处理的对照样品延迟该病症或病状的一种或多种症状的发作或降低其严重性。本文使用的预防巴斯综合征包括预防或延迟巴斯综合征的起始;预防、推迟或减慢巴斯综合征的进展或前进;和/或逆转巴斯综合征的进展。本文使用的预防巴斯综合征还包括防止巴斯综合征的一种或多种体征或症状的复发。

[0044] 芳族阳离子肽

[0045] 本发明技术涉及预防或治疗在有此需要的受试者中的巴斯综合征的方法和组合物。在一些实施方案中,所述方法和组合物预防在受试者中巴斯综合征的一种或多种体征或症状。在一些实施方案中,所述方法和组合物增加在受试者中的 TAZ1 表达水平。在一些实施方案中,所述方法和组合物降低具有巴斯综合征的危险因子的患者将发展巴斯综合征的一种或多种体征或症状的可能性。

[0046] 所述芳族阳离子肽为水溶性且高度极性的。尽管存在这些性质,但所述肽可容易地渗透细胞膜。芳族阳离子肽通常包含通过肽键共价连接的最少 3 个氨基酸或最少 4 个氨基酸。芳族阳离子肽中存在的最大氨基酸数目为约 20 个通过肽键共价连接的氨基酸。合适地,最大氨基酸数目为约 12 个,更优选约 9 个且最优选约 6 个。

[0047] 芳族阳离子肽的氨基酸可为任意氨基酸。本文使用的术语“氨基酸”用以指含有至少一个氨基和至少一个羧基的任何有机分子。通常,至少一个氨基在相对于羧基的位置处。氨基酸可为天然存在的。天然存在的氨基酸包括,例如,在正常情况下在哺乳动物蛋白质中见到的 20 种最常见的左旋 (L) 氨基酸,即丙氨酸 (Ala)、精氨酸 (Arg)、天冬酰胺 (Asn)、天冬氨酸 (Asp)、半胱氨酸 (Cys)、谷氨酰胺 (Gln)、谷氨酸 (Glu)、甘氨酸 (Gly)、组氨酸 (His)、异亮氨酸 (Ile)、亮氨酸 (Leu)、赖氨酸 (Lys)、甲硫氨酸 (Met)、苯丙氨酸 (Phe)、脯氨酸 (Pro)、丝氨酸 (Ser)、苏氨酸 (Thr)、色氨酸 (Trp)、酪氨酸 (Tyr) 和缬氨酸 (Val)。其它天然存在的氨基酸包括,例如,在与蛋白质合成不相关的代谢过程中合成的氨基酸。例如,氨基酸鸟氨酸和瓜氨酸在尿生成期间在哺乳动物代谢中合成。天然存在的氨基酸的另一实例包括羟脯氨酸 (Hyp)。

[0048] 所述肽任选含有一个或多个非天然存在的氨基酸。最佳地,所述肽不具有天然存在的氨基酸。非天然存在的氨基酸可为左旋的 (L-)、右旋的 (D-) 或其混合物。非天然存在的氨基酸为通常不在活有机体中的正常代谢过程中合成并且不天然存在于蛋白质中的氨基酸。另外,非天然存在的氨基酸合适地还不被常见的蛋白酶所识别。非天然存在的氨



基酸可以存在于肽中的任何位置处。例如,非天然存在的氨基酸可在 N- 末端、C- 末端或在 N- 末端和 C- 末端之间的任何位置处。

[0049] 非天然氨基酸可例如包含在天然氨基酸中未见到的烷基、芳基或烷基芳基。非天然烷基氨基酸的一些实例包括  $\alpha$ - 氨基丁酸、 $\beta$ - 氨基丁酸、 $\gamma$ - 氨基丁酸、 $\delta$ - 氨基戊酸和  $\epsilon$ - 氨基己酸。非天然芳基氨基酸的一些实例包括邻-、间- 和对- 氨基苯甲酸。非天然烷基芳基氨基酸的一些实例包括邻-、间- 和对- 氨基苯乙酸,以及  $\gamma$ - 苯基- $\beta$ - 氨基丁酸。非天然存在的氨基酸包括天然存在的氨基酸的衍生物。天然存在的氨基酸的衍生物可例如包括向天然存在的氨基酸添加一个或多个化学基团。

[0050] 例如,可以将一个或多个化学基团添加到苯丙氨酸残基或酪氨酸残基的芳族环的 2'、3'、4'、5' 或 6' 位或色氨酸残基的苯并环的 4'、5'、6' 或 7' 位中的一个或多个位置。所述基团可为可添加至芳族环的任何化学基团。这类基团的一些实例包括分支或未分支的  $C_1$ - $C_4$  烷基,例如甲基、乙基、正丙基、异丙基、丁基、异丁基或叔丁基; $C_1$ - $C_4$  烷氧基(即,烷氧基);氨基; $C_1$ - $C_4$  烷基氨基和  $C_1$ - $C_4$  二烷基氨基(例如,甲基氨基、二甲基氨基);硝基;羟基;卤素(即,氟、氯、溴或碘)。天然存在的氨基酸的非天然存在衍生物的一些具体实例包括正缬氨酸(Nva)和正亮氨酸(Nle)。

[0051] 在肽中氨基酸的修饰的另一实例为肽的天冬氨酸残基或谷氨酸残基的羧基衍生化。衍生化的一个实例是用氨或用伯胺或仲胺(例如,甲胺、乙胺、二甲胺或二乙胺)酰胺化。衍生化的另一实例包括用例如甲醇或乙醇酯化。另一种这样的修饰包括赖氨酸残基、精氨酸残基或组氨酸残基的氨基的衍生化。例如,这类氨基可以酰基化。一些合适的酰基例如包括苯甲酰基或包含上文提到的任一种  $C_1$ - $C_4$  烷基如乙酰基或丙酰基的烷酰基。

[0052] 非天然存在的氨基酸合适地抵抗常见的蛋白酶或对其不敏感。抵抗蛋白酶或对其不敏感的非天然存在的氨基酸的实例包括任一种上文提到的天然存在的 L- 氨基酸的右旋(D-) 形式以及 L- 和 / 或 D- 非天然存在的氨基酸。D- 氨基酸在正常情况下不出现于蛋白质中,不过它们存在于某些肽抗生素中,其中通过除细胞的正常核糖体蛋白合成机制之外的方式合成所述肽抗生素。将本文使用的 D- 氨基酸视为非天然存在的氨基酸。

[0053] 为了使蛋白酶敏感性最小化,所述肽应当具有少于 5 个、优选少于 4 个、更优选少于 3 个且最优选少于 2 个被常见蛋白酶识别的邻接 L- 氨基酸,无论这些氨基酸是否为天然存在的或是非天然存在的。最佳地,所述肽仅具有 D- 氨基酸并且不具有 L- 氨基酸。如果该肽含有蛋白酶敏感的氨基酸序列,则至少一个氨基酸优选为非天然存在的 D- 氨基酸,因而赋予蛋白酶抗性。蛋白酶敏感序列的实例包括被例如内肽酶和胰蛋白酶的常见蛋白酶容易地分裂的两个或多个连接碱性氨基酸。碱性氨基酸的实例包括精氨酸、赖氨酸和组氨酸。

[0054] 与在肽中的氨基酸残基总数相比,芳族阳离子肽应当在生理学 pH 下具有最小净正电荷数目。在生理学 pH 下的最小净正电荷数目将在下文称为 ( $p_m$ )。在肽中的氨基酸残基总数将在下文称为 ( $r$ )。下文论述的最小净正电荷数目均处于生理学 pH 下。本文使用的术语“生理学 pH”是指在哺乳动物身体的组织和器官的细胞中的正常 pH。例如,人类的生理学 pH 在正常情况下为约 7.4,但是在哺乳动物中的正常生理学 pH 可为约 7.0- 约 7.8 的任何 pH。

[0055] 本文使用的“净电荷”是指在肽中存在的氨基酸所携带的正电荷数和负电荷数的平衡值。在本说明书中,应当理解净电荷在生理学 pH 下测量。在生理学 pH 下带正电的天

然存在的氨基酸包括 L- 赖氨酸、L- 精氨酸和 L- 组氨酸。在生理学 pH 下带负电荷的天然存在的氨基酸包括 L- 天冬氨酸和 L- 谷氨酸。

[0056] 通常,肽具有带正电荷的 N- 末端氨基和带负电荷的 C- 端羧基。电荷在生理学 pH 下彼此抵消。作为计算净电荷的实例,肽 Tyr-Arg-Phe-Lys-Glu-His-Trp-D-Arg 具有 1 个带负电荷的氨基酸 (即, Glu) 和 4 个带正电荷的氨基酸 (即, 2 个 Arg 残基、1 个 Lys 和 1 个 His)。因此,上述肽具有 3 个净正电荷。

[0057] 在一个实施方案中,芳族阳离子肽在生理学 pH 下具有在最小净正电荷数目 ( $p_m$ ) 和氨基酸残基总数 ( $r$ ) 之间的如下关系,其中  $3p_m$  是小于或等于  $r+1$  的最大数字。在该实施方案中,在最小净正电荷数目 ( $p_m$ ) 和氨基酸残基总数 ( $r$ ) 之间的关系如下:

[0058] 表 1. 氨基酸数目和净正电荷 ( $3p_m \leq r+1$ )

[0059]

|           |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
|-----------|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| (r)       | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 |
| ( $p_m$ ) | 1 | 1 | 2 | 2 | 2 | 3 | 3 | 3  | 4  | 4  | 4  | 5  | 5  | 5  | 6  | 6  | 6  | 7  |

[0060] 在另一实施方案中,芳族阳离子肽具有在最小净正电荷数目 ( $p_m$ ) 和氨基酸残基总数 ( $r$ ) 之间的如下关系,其中  $2p_m$  为小于或等于  $r+1$  的最大数字。在该实施方案中,在最小净正电荷数目 ( $p_m$ ) 和氨基酸残基总数 ( $r$ ) 之间的关系如下:

[0061] 表 2. 氨基酸数目和净正电荷 ( $2p_m \leq r+1$ )

[0062]

|           |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
|-----------|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| (r)       | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 |
| ( $p_m$ ) | 2 | 2 | 3 | 3 | 4 | 4 | 5 | 5  | 6  | 6  | 7  | 7  | 8  | 8  | 9  | 9  | 10 | 10 |

[0063] 在一个实施方案中,最小净正电荷数目 ( $p_m$ ) 和氨基酸残基总数 ( $r$ ) 相等。在另一实施方案中,所述肽具有 3 或 4 个氨基酸残基和最少 1 个净正电荷,合适地,最少 2 个净正电荷且更优选最少 3 个净正电荷。

[0064] 同样重要的是,与净正电荷总数 ( $p_t$ ) 相比较,芳族阳离子肽具有最小芳基数。最小芳基数将在下文称为 ( $a$ )。具有芳基的天然存在氨基酸包括氨基酸:组氨酸、色氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸。例如,六肽 Lys-Gln-Tyr-D-Arg-Phe-Trp 具有 2 个净正电荷 (由赖氨酸残基和精氨酸残基贡献) 和 3 个芳基 (由酪氨酸残基、苯丙氨酸残基和色氨酸残基贡献)。

[0065] 芳族阳离子肽还应当具有最小芳基数 ( $a$ ) 和在生理学 pH 下净正电荷总数 ( $p_t$ ) 之间的如下关系,其中  $3a$  为小于或等于  $p_t+1$  的最大数字,例外之处在于当  $p_t$  为 1 时,  $a$  也可 为 1。在该实施方案中,最小芳基数 ( $a$ ) 和净正电荷总数 ( $p_t$ ) 之间的关系如下:

[0066] 表 3. 芳族基团和净正电荷 ( $3a \leq p_t+1$  或  $a = p_t = 1$ )

[0067]

|           |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
|-----------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| ( $p_t$ ) | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 |
| (a)       | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 2 | 2 | 3 | 3 | 3  | 4  | 4  | 4  | 5  | 5  | 5  | 6  | 6  | 6  | 7  |

[0068] 在另一实施方案中,芳族阳离子肽具有在最小芳基数 ( $a$ ) 和净正电荷总数 ( $p_t$ ) 之

间的如下关系,其中  $2a$  为小于或等于  $p_t+1$  的最大数字。在该实施方案中,在最小芳族氨基酸残基数目 ( $a$ ) 和净正电荷总数 ( $p_t$ ) 之间的关系如下:

[0069] 表 4. 芳族基团和净正电荷 ( $2a \leq p_t+1$  或  $a = p_t = 1$ )

[0070]

|           |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
|-----------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| ( $p_t$ ) | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 |
| ( $a$ )   | 1 | 1 | 2 | 2 | 3 | 3 | 4 | 4 | 5 | 5  | 6  | 6  | 7  | 7  | 8  | 8  | 9  | 9  | 10 | 10 |

[0071] 在另一实施方案中,芳族基团的数目 ( $a$ ) 和净正电荷的总数 ( $p_t$ ) 相等。

[0072] 羧基,尤其是 C-末端氨基酸的末端羧基,用例如氨适当地酰胺化以形成 C-末端酰胺。供选地,C-末端氨基酸的末端羧基可用任何伯胺或仲胺酰胺化。伯胺或仲胺可例如为烷基,特别是分支或未分支的  $C_1$ - $C_4$ 烷基;或芳基胺。因此,在所述肽的 C-末端的氨基酸可转化成酰胺基、N-甲基酰胺基、N-乙基酰胺基、N,N-二甲基酰胺基、N,N-二乙基酰胺基、N-甲基-N-乙基酰胺基、N-苯基酰胺基或 N-苯基-N-乙基酰胺基。不在所述芳族阳离子肽的 C-末端存在的天冬酰胺残基、谷氨酰胺残基、天冬氨酸和谷氨酸残基中的游离羧基也可以酰胺化,无论它们在肽内的任何位置存在。在这些内部位置处的酰胺化可用氨或上文描述的任何伯胺或仲胺进行。

[0073] 在一个实施方案中,芳族阳离子肽为具有 2 个净正电荷和至少一个芳族氨基酸的三肽。在一个特定的实施方案中,芳族阳离子肽为具有 2 个净正电荷和 2 个芳族氨基酸的三肽。

[0074] 芳族阳离子肽包括但不限于下列肽实例:

[0075]

表 5: 例示性肽

|                                                                                             |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|
| 2',6'-Dmp-D-Arg-2'6'-Dmt-Lys-NH <sub>2</sub>                                                |
| 2',6'-Dmp-D-Arg-Phe-Lys-NH <sub>2</sub>                                                     |
| 2',6'-Dmt-D-Arg-PheOrn-NH <sub>2</sub>                                                      |
| 2',6'-Dmt-D-Arg-Phe-Ahp(2-氨基庚酸)-NH <sub>2</sub>                                             |
| 2',6'-Dmt-D-Arg-Phe-Lys-NH <sub>2</sub>                                                     |
| 2',6'-Dmt-D-Cit-PheLys-NH <sub>2</sub>                                                      |
| Ala-D-Phe-D-Arg-Tyr-Lys-D-Trp-His-D-Tyr-Gly-Phe                                             |
| Arg-D-Leu-D-Tyr-Phe-Lys-Glu-D-Lys-Arg-D-Trp-Lys-D-Phe-Tyr-D-Arg-Gly                         |
| Asp-Arg-D-Phe-Cys-Phe-D-Arg-D-Lys-Tyr-Arg-D-Tyr-Trp-D-His-Tyr-D-Phe-Lys-Phe                 |
| Asp-D-Trp-Lys-Tyr-D-His-Phe-Arg-D-Gly-Lys-NH <sub>2</sub>                                   |
| D-Arg-2'6'-Dmt-Lys-Phe-NH <sub>2</sub>                                                      |
| D-Glu-Asp-Lys-D-Arg-D-His-Phe-Phe-D-Val-Tyr-Arg-Tyr-D-Tyr-Arg-His-Phe-NH <sub>2</sub>       |
| D-His-Glu-Lys-Tyr-D-Phe-Arg                                                                 |
| D-His-Lys-Tyr-D-Phe-Glu-D-Asp-D-Asp-D-His-D-Lys-Arg-Trp-NH <sub>2</sub>                     |
| D-Tyr-Trp-Lys-NH <sub>2</sub>                                                               |
| Glu-Arg-D-Lys-Tyr-D-Val-Phe-D-His-Trp-Arg-D-Gly-Tyr-Arg-D-Met-NH <sub>2</sub>               |
| Gly-Ala-Lys-Phe-D-Lys-Glu-Arg-Tyr-His-D-Arg-D-Arg-Asp-Tyr-Trp-D-His-Trp-His-D-Lys-Asp.      |
| Gly-D-Phe-Lys-His-D-Arg-Tyr-NH <sub>2</sub>                                                 |
| His-Tyr-D-Arg-Trp-Lys-Phe-D-Asp-Ala-Arg-Cys-D-Tyr-His-Phe-D-Lys-Tyr-His-Ser-NH <sub>2</sub> |
| Lys-D-Arg-Tyr-NH <sub>2</sub>                                                               |
| Lys-D-Gln-Tyr-Arg-D-Phe-Trp-NH <sub>2</sub>                                                 |
| Lys-Trp-D-Tyr-Arg-Asn-Phe-Tyr-D-His-NH <sub>2</sub>                                         |
| Met-Tyr-D-Arg-Phe-Arg-NH <sub>2</sub>                                                       |
| Met-Tyr-D-Lys-Phe-Arg                                                                       |
| Phe-Arg-D-His-Asp                                                                           |
| Phe-D-Arg-2'6'-Dmt-Lys-NH <sub>2</sub>                                                      |
| Phe-D-Arg-His                                                                               |
| Phe-D-Arg-Lys-Trp-Tyr-D-Arg-His                                                             |

[0076]

|                                                                                                           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH <sub>2</sub>                                                                         |
| Phe-Phe-D-Tyr-Arg-Glu-Asp-D-Lys-Arg-D-Arg-His-Phe-NH <sub>2</sub>                                         |
| Phe-Tyr-Lys-D-Arg-Trp-His-D-Lys-D-Lys-Glu-Arg-D-Tyr-Thr                                                   |
| Thr-Gly-Tyr-Arg-D-His-Phe-Trp-D-His-Lys                                                                   |
| Thr-Tyr-Arg-D-Lys-Trp-Tyr-Glu-Asp-D-Lys-D-Arg-His-Phe-D-Tyr-Gly-Val-Ile-D-His-Arg-Tyr-Lys-NH <sub>2</sub> |
| Trp-D-Lys-Tyr-Arg-NH <sub>2</sub>                                                                         |
| Trp-Lys-Phe-D-Asp-Arg-Tyr-D-His-Lys                                                                       |
| Tyr-Asp-D-Lys-Tyr-Phe-D-Lys-D-Arg-Phe-Pro-D-Tyr-His-Lys                                                   |
| Tyr-D-Arg-Phe-Lys-Glu-NH <sub>2</sub>                                                                     |
| Tyr-D-Arg-Phe-Lys-NH <sub>2</sub>                                                                         |
| Tyr-D-His-Phe-D-Arg-Asp-Lys-D-Arg-His-Trp-D-His-Phe                                                       |
| Tyr-His-D-Gly-Met                                                                                         |
| Val-D-Lys-His-Tyr-D-Phe-Ser-Tyr-Arg-NH <sub>2</sub>                                                       |

[0077] 在一个实施方案中,所述肽具有 mu-阿片样物质受体激动剂活性(即,它们使 mu-阿片样物质受体活化)。具有 mu-阿片样物质受体激动剂活性的肽通常为具有在 N-末端(即,第一个氨基酸位置)的酪氨酸残基或酪氨酸衍生物的那些肽。合适的酪氨酸衍生物包括 2'-甲基酪氨酸(Mmt);2',6'-二甲基酪氨酸(2'6'-Dmt);3',5'-二甲基酪氨酸(3'5'-Dmt);N,2',6'-三甲基酪氨酸(Tmt);和 2'-羟基-6'-甲基酪氨酸(Hmt)。

[0078] 在一个实施方案中,具有 mu-阿片样物质受体激动剂活性的肽具有式 Tyr-D-Arg-Phe-Lys-NH<sub>2</sub>。Tyr-D-Arg-Phe-Lys-NH<sub>2</sub>具有 3 个由氨基酸酪氨酸、精氨酸和赖氨酸贡献的净正电荷并具有 2 个由氨基酸苯丙氨酸和酪氨酸贡献的芳基。Tyr-D-Arg-Phe-Lys-NH<sub>2</sub>的酪氨酸可为修饰的酪氨酸衍生物,例如在 2',6'-二甲基酪氨酸中,以产生具有式 2'6'-Dmt-D-Arg-Phe-Lys-NH<sub>2</sub>的化合物。2'6'-Dmt-D-Arg-Phe-Lys-NH<sub>2</sub>具有 640 的分子量并在生理学 pH 下携带 3 个净正电荷。2'6'-Dmt-D-Arg-Phe-Lys-NH<sub>2</sub>以能量非依赖性方式容易地渗透几种哺乳动物细胞类型的质膜(Zhao 等, J. Pharmacol Exp Ther., 304:425-432, 2003)。

[0079] 供选地,在其它情况下,所述芳族阳离子肽不具有 mu-阿片样物质受体激动剂活性。例如,在长期治疗期间,例如在慢性疾病状态或情况下,可能禁忌使用活化 mu-阿片样物质受体的芳族阳离子肽。在这些情况下,所述芳族阳离子肽的潜在不利或上瘾影响可排除在人类患者或其它哺乳动物的治疗方案中使用活化 mu-阿片样物质受体的芳族阳离子肽。潜在不利影响可包括镇静、便秘和呼吸衰退。在这类情况下,不活化 mu-阿片样物质受体的芳族阳离子肽可为适当的治疗。不具有 mu-阿片样物质受体激动剂活性的肽通常在 N-末端(即,氨基酸位 1)处没有酪氨酸残基或酪氨酸衍生物。在 N-末端的氨基酸可为除酪氨酸外的任何天然存在或非天然存在的氨基酸。在一个实施方案中,在 N-末端的氨基酸为苯丙氨酸或其衍生物。苯丙氨酸的例示性衍生物包括 2'-甲基苯丙氨酸(Mmp)、2',6'-二甲基苯丙氨酸(2'6'-Dmp)、N,2',6'-三甲基苯丙氨酸(Tmp)和 2'-羟基-6'-甲基苯丙氨酸(Hmp)。

[0080] 不具有  $\mu$ -阿片样物质受体激动剂活性的芳族阳离子肽的实例具有式 Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH<sub>2</sub>。供选地, N-末端苯丙氨酸可为苯丙氨酸的衍生物, 例如 2', 6'-二甲基苯丙氨酸 (2' 6'-Dmp)。在氨基酸位 1 含有 2', 6'-二甲基苯丙氨酸的 Tyr-D-Arg-Phe-Lys-NH<sub>2</sub> 具有式 2' 6'-Dmp-D-Arg-Phe-Lys-NH<sub>2</sub>。在一个实施方案中, 2' 6'-Dmt-D-Arg-Phe-Lys-NH<sub>2</sub> 的氨基酸序列重排使得 Dmt 不在 N-末端。不具有  $\mu$ -阿片样物质受体激动剂活性的这一芳族阳离子肽的实例具有式 D-Arg-2' 6'-Dmt-Lys-Phe-NH<sub>2</sub>。

[0081] 本文列出的肽的合适取代变体包括保守氨基酸取代。氨基酸可根据它们的物理化学特性如下分组:

[0082] (a) 非极性氨基酸 :Ala(A) Ser(S) Thr(T) Pro(P) Gly(G) Cys(C) ;

[0083] (b) 酸性氨基酸 :Asn(N) Asp(D) Glu(E) Gln(Q) ;

[0084] (c) 碱性氨基酸 :His(H) Arg(R) Lys(K) ;

[0085] (d) 疏水氨基酸 :Met(M) Leu(L) Ile(I) Val(V) ;和

[0086] (e) 芳族氨基酸 :Phe(F) Tyr(Y) Trp(W) His(H)。

[0087] 在肽中的氨基酸被在同一组中的另一氨基酸取代称为保守取代且可保留原始肽的物理化学特性。相反, 在肽中氨基酸被不同组中的另一氨基酸取代通常更可能改变原始肽的特性。

[0088] 不活化  $\mu$ -阿片样物质受体的肽的实例包括但不限于在表 6 中所示芳族阳离子肽。

[0089]

表 6. 具有 Mu-阿片样物质活性的肽类似物

| 氨基酸<br>位 1      | 氨基酸<br>位 2 | 氨基酸<br>位 3 | 氨基酸位 4                                            | C-末端修<br>饰      |
|-----------------|------------|------------|---------------------------------------------------|-----------------|
| Tyr             | D-Arg      | Phe        | Lys                                               | NH <sub>2</sub> |
| Tyr             | D-Arg      | Phe        | Orn                                               | NH <sub>2</sub> |
| Tyr             | D-Arg      | Phe        | Dab                                               | NH <sub>2</sub> |
| Tyr             | D-Arg      | Phe        | Dap                                               | NH <sub>2</sub> |
| 2'6'Dmt         | D-Arg      | Phe        | Lys                                               | NH <sub>2</sub> |
| 2'6'Dmt         | D-Arg      | Phe        | Lys-NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -NH-<br>dns | NH <sub>2</sub> |
| 2'6'Dmt         | D-Arg      | Phe        | Lys-NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -NH-<br>atn | NH <sub>2</sub> |
| 2'6'Dmt         | D-Arg      | Phe        | dnsLys                                            | NH <sub>2</sub> |
| 2'6'Dmt         | D-Cit      | Phe        | Lys                                               | NH <sub>2</sub> |
| 2'6'Dmt         | D-Cit      | Phe        | Ahp                                               | NH <sub>2</sub> |
| 2'6'Dmt         | D-Arg      | Phe        | Orn                                               | NH <sub>2</sub> |
| 2'6'Dmt         | D-Arg      | Phe        | Dab                                               | NH <sub>2</sub> |
| 2'6'Dmt         | D-Arg      | Phe        | Dap                                               | NH <sub>2</sub> |
| 2'6'Dmt         | D-Arg      | Phe        | Ahp(2-氨基庚酸)                                       | NH <sub>2</sub> |
| Bio-2'6'<br>Dmt | D-Arg      | Phe        | Lys                                               | NH <sub>2</sub> |
| 3'5'Dmt         | D-Arg      | Phe        | Lys                                               | NH <sub>2</sub> |
| 3'5'Dmt         | D-Arg      | Phe        | Orn                                               | NH <sub>2</sub> |
| 3'5'Dmt         | D-Arg      | Phe        | Dab                                               | NH <sub>2</sub> |
| 3'5'Dmt         | D-Arg      | Phe        | Dap                                               | NH <sub>2</sub> |
| Tyr             | D-Arg      | Tyr        | Lys                                               | NH <sub>2</sub> |
| Tyr             | D-Arg      | Tyr        | Orn                                               | NH <sub>2</sub> |
| Tyr             | D-Arg      | Tyr        | Dab                                               | NH <sub>2</sub> |
| Tyr             | D-Arg      | Tyr        | Dap                                               | NH <sub>2</sub> |
| 2'6'Dmt         | D-Arg      | Tyr        | Lys                                               | NH <sub>2</sub> |
| 2'6'Dmt         | D-Arg      | Tyr        | Orn                                               | NH <sub>2</sub> |
| 2'6'Dmt         | D-Arg      | Tyr        | Dab                                               | NH <sub>2</sub> |
| 2'6'Dmt         | D-Arg      | Tyr        | Dap                                               | NH <sub>2</sub> |
| 2'6'Dmt         | D-Arg      | 2'6'Dmt    | Lys                                               | NH <sub>2</sub> |

[0090]

表 6. 具有 Mu-阿片样物质活性的肽类似物

| 氨基酸<br>位 1 | 氨基酸<br>位 2 | 氨基酸<br>位 3 | 氨基酸位 4 | C-末端修<br>饰      |
|------------|------------|------------|--------|-----------------|
| 2'6'Dmt    | D-Arg      | 2'6'Dmt    | Orn    | NH <sub>2</sub> |
| 2'6'Dmt    | D-Arg      | 2'6'Dmt    | Dab    | NH <sub>2</sub> |
| 2'6'Dmt    | D-Arg      | 2'6'Dmt    | Dap    | NH <sub>2</sub> |
| 3'5'Dmt    | D-Arg      | 3'5'Dmt    | Arg    | NH <sub>2</sub> |
| 3'5'Dmt    | D-Arg      | 3'5'Dmt    | Lys    | NH <sub>2</sub> |
| 3'5'Dmt    | D-Arg      | 3'5'Dmt    | Orn    | NH <sub>2</sub> |
| 3'5'Dmt    | D-Arg      | 3'5'Dmt    | Dab    | NH <sub>2</sub> |
| Tyr        | D-Lys      | Phe        | Dap    | NH <sub>2</sub> |
| Tyr        | D-Lys      | Phe        | Arg    | NH <sub>2</sub> |
| Tyr        | D-Lys      | Phe        | Lys    | NH <sub>2</sub> |
| Tyr        | D-Lys      | Phe        | Orn    | NH <sub>2</sub> |
| 2'6'Dmt    | D-Lys      | Phe        | Dab    | NH <sub>2</sub> |
| 2'6'Dmt    | D-Lys      | Phe        | Dap    | NH <sub>2</sub> |
| 2'6'Dmt    | D-Lys      | Phe        | Arg    | NH <sub>2</sub> |
| 2'6'Dmt    | D-Lys      | Phe        | Lys    | NH <sub>2</sub> |
| 3'5'Dmt    | D-Lys      | Phe        | Orn    | NH <sub>2</sub> |
| 3'5'Dmt    | D-Lys      | Phe        | Dab    | NH <sub>2</sub> |
| 3'5'Dmt    | D-Lys      | Phe        | Dap    | NH <sub>2</sub> |
| 3'5'Dmt    | D-Lys      | Phe        | Arg    | NH <sub>2</sub> |
| Tyr        | D-Lys      | Tyr        | Lys    | NH <sub>2</sub> |
| Tyr        | D-Lys      | Tyr        | Orn    | NH <sub>2</sub> |
| Tyr        | D-Lys      | Tyr        | Dab    | NH <sub>2</sub> |
| Tyr        | D-Lys      | Tyr        | Dap    | NH <sub>2</sub> |
| 2'6'Dmt    | D-Lys      | Tyr        | Lys    | NH <sub>2</sub> |
| 2'6'Dmt    | D-Lys      | Tyr        | Orn    | NH <sub>2</sub> |
| 2'6'Dmt    | D-Lys      | Tyr        | Dab    | NH <sub>2</sub> |
| 2'6'Dmt    | D-Lys      | Tyr        | Dap    | NH <sub>2</sub> |
| 2'6'Dmt    | D-Lys      | 2'6'Dmt    | Lys    | NH <sub>2</sub> |
| 2'6'Dmt    | D-Lys      | 2'6'Dmt    | Orn    | NH <sub>2</sub> |
| 2'6'Dmt    | D-Lys      | 2'6'Dmt    | Dab    | NH <sub>2</sub> |
| 2'6'Dmt    | D-Lys      | 2'6'Dmt    | Dap    | NH <sub>2</sub> |

[0091]



表 6. 具有 Mu-阿片样物质活性的肽类似物

| 氨基酸<br>位 1 | 氨基酸<br>位 2 | 氨基酸<br>位 3 | 氨基酸位 4 | C-末端修<br>饰      |
|------------|------------|------------|--------|-----------------|
| 2'6'Dmt    | D-Arg      | Phe        | dnsDap | NH <sub>2</sub> |
| 2'6'Dmt    | D-Arg      | Phe        | atnDap | NH <sub>2</sub> |
| 3'5'Dmt    | D-Lys      | 3'5'Dmt    | Lys    | NH <sub>2</sub> |
| 3'5'Dmt    | D-Lys      | 3'5'Dmt    | Orn    | NH <sub>2</sub> |
| 3'5'Dmt    | D-Lys      | 3'5'Dmt    | Dab    | NH <sub>2</sub> |
| 3'5'Dmt    | D-Lys      | 3'5'Dmt    | Dap    | NH <sub>2</sub> |
| Tyr        | D-Lys      | Phe        | Arg    | NH <sub>2</sub> |
| Tyr        | D-Orn      | Phe        | Arg    | NH <sub>2</sub> |
| Tyr        | D-Dab      | Phe        | Arg    | NH <sub>2</sub> |
| Tyr        | D-Dap      | Phe        | Arg    | NH <sub>2</sub> |
| 2'6'Dmt    | D-Arg      | Phe        | Arg    | NH <sub>2</sub> |
| 2'6'Dmt    | D-Lys      | Phe        | Arg    | NH <sub>2</sub> |
| 2'6'Dmt    | D-Orn      | Phe        | Arg    | NH <sub>2</sub> |
| 2'6'Dmt    | D-Dab      | Phe        | Arg    | NH <sub>2</sub> |
| 3'5'Dmt    | D-Dap      | Phe        | Arg    | NH <sub>2</sub> |
| 3'5'Dmt    | D-Arg      | Phe        | Arg    | NH <sub>2</sub> |
| 3'5'Dmt    | D-Lys      | Phe        | Arg    | NH <sub>2</sub> |
| 3'5'Dmt    | D-Orn      | Phe        | Arg    | NH <sub>2</sub> |
| Tyr        | D-Lys      | Tyr        | Arg    | NH <sub>2</sub> |
| Tyr        | D-Orn      | Tyr        | Arg    | NH <sub>2</sub> |
| Tyr        | D-Dab      | Tyr        | Arg    | NH <sub>2</sub> |
| Tyr        | D-Dap      | Tyr        | Arg    | NH <sub>2</sub> |
| 2'6'Dmt    | D-Arg      | 2'6'Dmt    | Arg    | NH <sub>2</sub> |
| 2'6'Dmt    | D-Lys      | 2'6'Dmt    | Arg    | NH <sub>2</sub> |
| 2'6'Dmt    | D-Orn      | 2'6'Dmt    | Arg    | NH <sub>2</sub> |
| 2'6'Dmt    | D-Dab      | 2'6'Dmt    | Arg    | NH <sub>2</sub> |
| 3'5'Dmt    | D-Dap      | 3'5'Dmt    | Arg    | NH <sub>2</sub> |
| 3'5'Dmt    | D-Arg      | 3'5'Dmt    | Arg    | NH <sub>2</sub> |
| 3'5'Dmt    | D-Lys      | 3'5'Dmt    | Arg    | NH <sub>2</sub> |
| 3'5'Dmt    | D-Orn      | 3'5'Dmt    | Arg    | NH <sub>2</sub> |
| Mmt        | D-Arg      | Phe        | Lys    | NH <sub>2</sub> |

[0092]

表 6. 具有 Mu-阿片样物质活性的肽类似物

| 氨基酸<br>位 1 | 氨基酸<br>位 2 | 氨基酸<br>位 3 | 氨基酸位 4 | C-末端修<br>饰      |
|------------|------------|------------|--------|-----------------|
| Mmt        | D-Arg      | Phe        | Orn    | NH <sub>2</sub> |
| Mmt        | D-Arg      | Phe        | Dab    | NH <sub>2</sub> |
| Mmt        | D-Arg      | Phe        | Dap    | NH <sub>2</sub> |
| Tmt        | D-Arg      | Phe        | Lys    | NH <sub>2</sub> |
| Tmt        | D-Arg      | Phe        | Orn    | NH <sub>2</sub> |
| Tmt        | D-Arg      | Phe        | Dab    | NH <sub>2</sub> |
| Tmt        | D-Arg      | Phe        | Dap    | NH <sub>2</sub> |
| Hmt        | D-Arg      | Phe        | Lys    | NH <sub>2</sub> |
| Hmt        | D-Arg      | Phe        | Orn    | NH <sub>2</sub> |
| Hmt        | D-Arg      | Phe        | Dab    | NH <sub>2</sub> |
| Hmt        | D-Arg      | Phe        | Dap    | NH <sub>2</sub> |
| Mmt        | D-Lys      | Phe        | Lys    | NH <sub>2</sub> |
| Mmt        | D-Lys      | Phe        | Orn    | NH <sub>2</sub> |
| Mmt        | D-Lys      | Phe        | Dab    | NH <sub>2</sub> |
| Mmt        | D-Lys      | Phe        | Dap    | NH <sub>2</sub> |
| Mmt        | D-Lys      | Phe        | Arg    | NH <sub>2</sub> |
| Tmt        | D-Lys      | Phe        | Lys    | NH <sub>2</sub> |
| Tmt        | D-Lys      | Phe        | Orn    | NH <sub>2</sub> |
| Tmt        | D-Lys      | Phe        | Dab    | NH <sub>2</sub> |
| Tmt        | D-Lys      | Phe        | Dap    | NH <sub>2</sub> |
| Tmt        | D-Lys      | Phe        | Arg    | NH <sub>2</sub> |
| Hmt        | D-Lys      | Phe        | Lys    | NH <sub>2</sub> |
| Hmt        | D-Lys      | Phe        | Orn    | NH <sub>2</sub> |
| Hmt        | D-Lys      | Phe        | Dab    | NH <sub>2</sub> |
| Hmt        | D-Lys      | Phe        | Dap    | NH <sub>2</sub> |
| Hmt        | D-Lys      | Phe        | Arg    | NH <sub>2</sub> |
| Mmt        | D-Lys      | Phe        | Arg    | NH <sub>2</sub> |
| Mmt        | D-Orn      | Phe        | Arg    | NH <sub>2</sub> |
| Mmt        | D-Dab      | Phe        | Arg    | NH <sub>2</sub> |
| Mmt        | D-Dap      | Phe        | Arg    | NH <sub>2</sub> |
| Mmt        | D-Arg      | Phe        | Arg    | NH <sub>2</sub> |

[0093]

表 6. 具有 Mu-阿片样物质活性的肽类似物

| 氨基酸位 1 | 氨基酸位 2 | 氨基酸位 3 | 氨基酸位 4 | C-末端修饰          |
|--------|--------|--------|--------|-----------------|
| Tmt    | D-Lys  | Phe    | Arg    | NH <sub>2</sub> |
| Tmt    | D-Orn  | Phe    | Arg    | NH <sub>2</sub> |
| Tmt    | D-Dab  | Phe    | Arg    | NH <sub>2</sub> |
| Tmt    | D-Dap  | Phe    | Arg    | NH <sub>2</sub> |
| Tmt    | D-Arg  | Phe    | Arg    | NH <sub>2</sub> |
| Hmt    | D-Lys  | Phe    | Arg    | NH <sub>2</sub> |
| Hmt    | D-Orn  | Phe    | Arg    | NH <sub>2</sub> |
| Hmt    | D-Dab  | Phe    | Arg    | NH <sub>2</sub> |
| Hmt    | D-Dap  | Phe    | Arg    | NH <sub>2</sub> |
| Hmt    | D-Arg  | Phe    | Arg    | NH <sub>2</sub> |

[0094] Dab = 二氨基丁酸

[0095] Dap = 二氨基丙酸

[0096] Dmt = 二甲基酪氨酸

[0097] Mmt = 2'-甲基酪氨酸

[0098] Tmt = N, 2', 6'-三甲基酪氨酸

[0099] Hmt = 2'-羟基-6'-甲基酪氨酸

[0100] dnsDap = β-丹酰基-L-α, β-二氨基丙酸

[0101] atnDap = β-邻氨基苯甲酰基-L-α, β-二氨基丙酸

[0102] Bio = 生物素

[0103] 不活化 mu-阿片样物质受体的肽的实例包括但不限于在表 7 中所示芳族阳离子肽。

[0104]

表 7. 缺乏 Mu-阿片样物质活性的肽类似物

| 氨基酸位 1 | 氨基酸位 2 | 氨基酸位 3 | 氨基酸位 4 | C-末端修饰          |
|--------|--------|--------|--------|-----------------|
| D-Arg  | Dmt    | Lys    | Phe    | NH <sub>2</sub> |
| D-Arg  | Dmt    | Phe    | Lys    | NH <sub>2</sub> |
| D-Arg  | Phe    | Lys    | Dmt    | NH <sub>2</sub> |
| D-Arg  | Phe    | Dmt    | Lys    | NH <sub>2</sub> |
| D-Arg  | Lys    | Dmt    | Phe    | NH <sub>2</sub> |

[0105]

表 7. 缺乏 Mu-阿片样物质活性的肽类似物

| 氨基酸<br>位 1 | 氨基酸<br>位 2 | 氨基酸<br>位 3 | 氨基酸<br>位 4 | C-末端修<br>饰      |
|------------|------------|------------|------------|-----------------|
| D-Arg      | Lys        | Phe        | Dmt        | NH <sub>2</sub> |
| Phe        | Lys        | Dmt        | D-Arg      | NH <sub>2</sub> |
| Phe        | Lys        | D-Arg      | Dmt        | NH <sub>2</sub> |
| Phe        | D-Arg      | Phe        | Lys        | NH <sub>2</sub> |
| Phe        | D-Arg      | Dmt        | Lys        | NH <sub>2</sub> |
| Phe        | D-Arg      | Lys        | Dmt        | NH <sub>2</sub> |
| Phe        | Dmt        | D-Arg      | Lys        | NH <sub>2</sub> |
| Phe        | Dmt        | Lys        | D-Arg      | NH <sub>2</sub> |
| Lys        | Phe        | D-Arg      | Dmt        | NH <sub>2</sub> |
| Lys        | Phe        | Dmt        | D-Arg      | NH <sub>2</sub> |
| Lys        | Dmt        | D-Arg      | Phe        | NH <sub>2</sub> |
| Lys        | Dmt        | Phe        | D-Arg      | NH <sub>2</sub> |
| Lys        | D-Arg      | Phe        | Dmt        | NH <sub>2</sub> |
| Lys        | D-Arg      | Dmt        | Phe        | NH <sub>2</sub> |
| D-Arg      | Dmt        | D-Arg      | Phe        | NH <sub>2</sub> |
| D-Arg      | Dmt        | D-Arg      | Dmt        | NH <sub>2</sub> |
| D-Arg      | Dmt        | D-Arg      | Tyr        | NH <sub>2</sub> |
| D-Arg      | Dmt        | D-Arg      | Trp        | NH <sub>2</sub> |
| Trp        | D-Arg      | Phe        | Lys        | NH <sub>2</sub> |
| Trp        | D-Arg      | Tyr        | Lys        | NH <sub>2</sub> |
| Trp        | D-Arg      | Trp        | Lys        | NH <sub>2</sub> |
| Trp        | D-Arg      | Dmt        | Lys        | NH <sub>2</sub> |
| D-Arg      | Trp        | Lys        | Phe        | NH <sub>2</sub> |
| D-Arg      | Trp        | Phe        | Lys        | NH <sub>2</sub> |
| D-Arg      | Trp        | Lys        | Dmt        | NH <sub>2</sub> |
| D-Arg      | Trp        | Dmt        | Lys        | NH <sub>2</sub> |
| D-Arg      | Lys        | Trp        | Phe        | NH <sub>2</sub> |
| D-Arg      | Lys        | Trp        | Dmt        | NH <sub>2</sub> |
| Cha        | D-Arg      | Phe        | Lys        | NH <sub>2</sub> |
| Ala        | D-Arg      | Phe        | Lys        | NH <sub>2</sub> |

[0106] Cha = 环己基丙氨酸

[0107] 在表 5-7 中示出的肽的氨基酸可以 L- 构型或 D- 构型。

[0108] 所述肽可通过本领域熟知的任何方法合成。化学合成蛋白质的合适方法例如包

括 Stuart 和 Young 在 Solid Phase Peptide Synthesis, 第二版本, Pierce Chemical Company(1984) 中和在 Methods Enzymol., 289, Academic Press, Inc., New York(1997) 中描述的那些。

#### [0109] 心磷脂再成型

[0110] 心磷脂为内部线粒体膜的一种重要组分, 其中其构成约 20% 的总脂质组合物。在哺乳动物细胞中, 心磷脂几乎排外地在内部线粒体膜中见到, 其中其对于在线粒体新陈代谢中包括的最佳功能是必不可少的。

[0111] 心磷脂包含与甘油主链连接的两个磷脂酰甘油以形成二聚结构的二磷脂酰甘油脂质的物质。其具有 4 个烷基且潜在地携带两个负电荷。因为在心磷脂中存在 4 个不同的烷基链, 所以所述分子具有极大复杂性的潜能。然而, 在大多数动物组织中, 心磷脂含有在其各自上具有两个不饱和键的 18- 碳脂肪烷基链 (18:2)。已经建议 18:2 构造对于心磷脂对在哺乳动物线粒体中的内膜蛋白的高亲和性是一项重要的结构要求。然而, 用分离的酶制剂的研究指示其重要性可能根据所检验的蛋白质而变化。

[0112] 在心磷脂中的两个磷酸酯各自可捕集一个质子。尽管其具有对称结构, 但是, 与两个磷酸酯离子化相比, 一个磷酸酯的离子化在不同的酸性水平下发生, 其中  $pK_1 = 3$  且  $pK_2 > 7.5$ 。因此, 在正常生理条件 (pH 约 7.0) 下, 所述分子可仅携带一个负电荷。在磷酸酯上的羟基 (-OH 和 -O-) 形成稳定的分子内氢键, 形成二环共振结构。该结构截留一个质子, 导致氧化磷酸化。

[0113] 在由复合体 IV 催化的氧化磷酸化过程期间, 大量质子从膜的一侧转移到另一侧, 导致大 pH 改变。在不希望受理论约束的情况下, 已经提议心磷脂充当在线粒体膜内的质子捕集器, 严格地局部化质子池并使在线粒体膜间间隙中的 pH 最小化。认为该功能归因于心磷脂的独特结构, 如上所述, 其可捕集在二环结构内的质子, 同时携带负电荷。因此, 心磷脂可充当电子缓冲池以释放或吸收电子, 从而维持在线粒体膜附近的 pH。

[0114] 另外, 已经显示心磷脂在细胞凋亡中起作用。在细胞凋亡级联中的早期事件包括心磷脂。如下文更详细地论述, 心磷脂特异性加氧酶生成心磷脂 - 氢过氧化物, 这促使该脂质经历构型改变。氧化的心磷脂随后从内部线粒体膜改变位置到外部线粒体膜, 其中认为形成细胞色素 c 经其释放到胞质液的孔。细胞色素 c 可结合 IP3 受体刺激钙释放, 其进一步促进细胞色素 c 释放。当细胞质钙浓度达成毒性水平时, 细胞死亡。另外, 线粒体外细胞色素 c 与细胞凋亡活化因子相互作用, 导致形成凋亡体复合体并活化蛋白水解半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶级联。

[0115] 对于心磷脂建议的其它作用为: 1) 参与膜的物理性质的稳定化 (Schlame 等, 2000; Koshkin 和 Greenberg, 2002; Ma 等, 2004), 例如, 膜流体性和渗透稳定性; 和 2) 经由与膜蛋白直接相互作用参与蛋白质功能 (Schlame 等, 2000; Palsdottir 和 Hunte, 2004)。心磷脂已经在与例如细胞色素 bc1 复合体 (复合体 III) 的内膜蛋白复合体的紧密联系中见到。并且, 其已经局部化到二聚细胞色素 c 氧化酶的接触部位, 且 cardiolipin 结合部位还在 ADP/ATP 载剂中见到 (AAC; 对于综述, 参见 Palsdottir 和 Hunte, 2004)。近来研究还提出心磷脂在呼吸链超级复合体 (呼吸体 (respirasome)) 的形成中的作用。

[0116] 主要的四酰基分子物质在心磷脂分子的 4 个脂肪酰基位置中的每一个中为 18:2 (称为 18:2-18:2-18:2-18:2 心磷脂物质)。心磷脂的再成型对于用亚油酸酯获得心磷

脂的该富集是必不可少的,因为心磷脂合酶对于胞啉-5'-二磷酸酯-1,2-二酰基-sn-甘油没有分子物质底物特异性。另外,心磷脂前体的物质图案充分相似,暗指心磷脂合成途径不是分子物质选择性的。心磷脂的分子组成的改变与各种疾病状态相关。

[0117] 心磷脂的再成型经由至少三种酶发生。线粒体心磷脂通过脱酰基-再酰基化循环再成型,其中新合成的心磷脂快速地脱酰基成为单链心磷脂 (MLCL) 且随后再酰基化回到心磷脂。MLCL AT1 负责脱酰基且 ALCAT1 负责再酰基化。除了这些线粒体和微粒体的酰基转移酶活性之外,线粒体心磷脂可通过线粒体心磷脂转酰酶再成型。Tafazzin (TAZ1) 为用亚油酸特异性再成型线粒体心磷脂的心磷脂转酰酶。

#### [0118] 巴斯综合征

[0119] 巴斯综合征为以扩张型心肌病 (DCM)、骨骼肌病、中性粒细胞减少、生长延迟和有机酸尿为特征的磷脂新陈代谢的可遗传病症。巴斯综合征的发病率估计为 1/454,000 个活产婴儿,其中根据地理位置,估计的发病率范围为 1/400,000-1/140,000。巴斯综合征为 X-连接的病症,且因此不成比例地影响着男性患者。

[0120] 巴斯综合征由在 TAZ 基因中的突变引起 (tafazzin ;Xq28),TAZ 基因编码 TAZ1,TAZ1 为在局部化到内部线粒体膜的磷脂-心磷脂的新陈代谢中包括的酰基转移酶。缺损的 TAZ1 功能引起心磷脂的异常再成型且连累到线粒体结构和呼吸链功能。TAZ1 在心肌和骨骼肌中以高水平表达且包括在线粒体的内膜的维持中。TAZ1 包括在维持心磷脂的水平中,这对于在线粒体中的能量产生是必不可少的。

[0121] 巴斯综合征的临床表现是高度变化的。大多数受试者在生命的前十年期间发展 DCM,且通常在生命的第一年期间,可伴随着心内膜弹性纤维组织增生症 (EFE) 和 / 或左心室致密化不全 (LVNC)。巴斯综合征的表现可在子宫内开始,导致心脏衰竭、胎儿水肿和流产或在妊娠的第二 / 第三个月死胎。特别是在青春期期间的室律不齐可导致心源性猝死。存在显著的中风危险。骨骼 (主要是近端) 肌病导致动作发展里程碑迟延、张力减低、严重嗜睡或运动不耐症。在新生儿期存在低血糖的倾向。90% 的患者显示具有败血病、严重细菌脓毒症、口腔溃疡和牙龈疼痛的轻微至严重间歇性或持久性中性粒细胞减少。可发生乳酸性酸中毒和轻微贫血。受影响的男孩通常显示青春期迟延和生长迟延,这在实质生长突增常发生时的接近二十岁或二十多岁才观察到。患者亦可呈现足够食物摄入方面的严重困难。阶段性腹泻是常见的。许多患者具有圆脸、眼睛深陷和耳朵凸出的类似脸部外观。

[0122] 在一些实施方案中,用例如 D-Arg-2'6'-Dmt-Lys-Phe-NH<sub>2</sub> 的芳族阳离子肽或例如乙酸盐或三氟乙酸盐的其药理学上可接受的盐治疗增加 TAZ1 在遭受巴斯综合征或处于遭受巴斯综合征的危险之中的哺乳动物受试者中的组织或器官中的表达。例如,但并非限制地,在一些实施方案中,TAZ1 表达水平在有此需要的受试者的心肌中增加。

[0123] 在一些实施方案中,增加 TAZ1 表达水平度量为在受试者中在 TAZ1 表达减小的程度方面的缩减或降低。在一些实施方案中,TAZ1 降低减小约 0.25 倍-约 0.5 倍、约 0.5 倍-约 0.75 倍、约 0.75 倍-约 1.0 倍或约 1.0 倍-约 1.5 倍。

#### [0124] 治疗方法

[0125] 以下论述仅通过举例提供,而并非想要加以限制。

[0126] 应当理解增加在有此需要的受试者中的 TAZ1 的表达水平 (例如, RNA 和 / 或蛋白质水平) 将降低任何数量的消极物理效应的危险、严重性、外观 / 发作。本发明技术的一个

方面包括治疗在诊断为具有降低的 TAZ1 表达水平或疑似具有降低的 TAZ1 表达水平或处于具有降低的 TAZ1 表达水平的危险之中的受试者中的降低的 TAZ1 表达的方法。本发明技术的一个方面包括治疗在诊断为具有巴斯综合征或疑似具有巴斯综合征或处于具有巴斯综合征的危险之中的受试者中的巴斯综合征的方法。在治疗应用中,将组合物或药物以足以治愈或至少部分地中止例如减小的 TAZ1 表达水平或巴斯综合征的疾病的症状的量施用到疑似遭受或已经遭受所述疾病的受试者,所述症状包括其并发症和在疾病发展中的中间病理表型。

[0127] 遭受减少的 TAZ1 表达水平或巴斯综合征的受试者可通过在本领域中已知的诊断或预后测定中的任一种或组合鉴别。例如,巴斯综合征的典型症状包括例如心肌病、骨骼肌异常、中性粒细胞减少、发育迟缓、弱肌张力、在尿和 / 或血液中有机的水平增加和 / 或例如肺炎的频繁细菌感染的症状。在一些实施方案中,所述受试者可表现出与正常受试者相比降低的 TAZ1 表达水平,其可使用在本领域中已知的技术测量。在一些实施方案中,所述受试者可在 TAZ 基因中表现出与巴斯综合征相关的一种或多种突变,其可使用在本领域中已知的技术检测。

#### [0128] 预防方法

[0129] 一方面,本发明技术提供一种预防或延迟在处于具有与正常受试者相比降低的 TAZ1 表达水平的危险之中的受试者中巴斯综合征或巴斯综合征的症状的发作的方法。在一些实施方案中,所述受试者可在 TAZ 基因中表现出与巴斯综合征相关的一种或多种突变,其可使用在本领域中已知的技术检测。处于具有降低的 TAZ1 表达水平或巴斯综合征的危险之中的受试者可通过例如在本领域中已知的诊断或预后测定中的任一种或组合来鉴别。在预防性应用中,将例如 D-Arg-2' 6' -Dmt-Lys-Phe-NH<sub>2</sub> 的芳族阳离子肽或例如乙酸盐或三氟乙酸盐的其药学上可接受的盐的医药组合物或药物以足以消除或降低例如巴斯综合征的疾病或病状的危险、减轻所述疾病的严重性或延迟所述疾病的开始的量施用到对所述疾病或病状敏感或另外处于所述疾病或病状的危险之中的受试者,所述疾病包括所述疾病的生物化学、组织和 / 或行为症状、其并发症和在疾病发展期间呈现的中间病理表型。预防性芳族阳离子的施用可在表征所述疾病或病症的症状的表现之前发生,使得所述疾病或病症的症状在其发展中得到预防或供选地延迟。

[0130] 处于降低的 TAZ1 表达水平或巴斯综合征的危险之中的受试者可表现出以下非限制性危险因子中的一种或多种:心肌病、骨骼肌异常、中性粒细胞减少、发育迟缓、弱肌张力、在尿和血液中有机的水平增加和 / 或例如肺炎的频繁细菌感染。

#### [0131] 基于芳族阳离子肽的治疗的生物学作用的确定

[0132] 在各种实施方案中,进行合适的体外或体内测定以确定基于芳族阳离子肽的具体治疗剂的作用且指出其施用是否适用于治疗。在各种实施方案中,体外测定可用代表性动物模型进行,以确定给定的基于芳族阳离子肽的治疗剂是否发挥增加 TAZ1 表达和预防或治疗巴斯综合征的所要作用。在人类受试者中试验之前,可在合适的动物模型系统中试验用于疗法中的化合物,所述动物模型系统包括但不限于大鼠、小鼠、鸡、奶牛、猴、兔等。类似地,对于体内试验,可在施用到人类受试者之前使用本领域已知的任何动物模型系统。在一些实施方案中,体外或体内试验涉及 D-Arg-2' 6' -Dmt-Lys-Phe-NH<sub>2</sub> 的生物功能或例如乙酸盐或三氟乙酸盐的其药学上可接受的盐。

[0133] 心脏衰竭已经在具有体积过载、压力过载、快速节奏、心肌缺血、心脏中毒药物或遗传修饰的模型的不同物种中诱发。高血压与发展心脏衰竭的增加了的危险相关。在一个小鼠模型中,血管紧张素 II (Ang II) 增加血压并诱发心肌细胞肥大、增加的纤维变性和受损的心肌细胞松弛。通过微型渗透泵向小鼠输注血管收缩素增加收缩压和舒张压,增加心脏重量和左心室厚度 (LVMI) 和受损的心肌性能指数 (MPI)。TAZ1 表达水平在心脏衰竭诱发之前、期间或之后的各种时间点监测。

[0134] 在第二说明性小鼠模型中,持续高水平的  $G\alpha_q$  表达可导致标志的肌细胞细胞凋亡,到 16 周龄引起心脏肥大和心脏衰竭 (D'Angelo 等,1998)。 $\beta$ -肾上腺素能受体 ( $\beta$ AR) 主要与异三聚体 G 蛋白耦联以刺激腺苷酰环化酶活性。该相关性产生细胞内 cAMP 和蛋白激酶 A 活化,其调节心肌收缩力和心率。 $G\alpha_q$  的过度表达导致对  $\beta$ -肾上腺素激动剂的反应减小并引起心脏衰竭。TAZ1 表达水平在心脏衰竭诱发之前、期间或之后的各种时间点监测。

[0135] 主动脉通过手术绑扎的实验性收缩也广泛用作心脏衰竭的模型。经主动脉的收缩 (TAC) 引起压力过载诱发的心脏衰竭,其中左心室 (LV) 质量增加。TAC 如由 Tamavski 0 等 (2004) 所述通过 7-0 双结丝缝合进行以收缩升主动脉。在 TAC 之后,小鼠在 4 周的时间内发展心脏衰竭。TAZ1 表达水平在心脏衰竭诱发之前、期间或之后的各种时间点监测。

#### [0136] 施用模式和有效剂量

[0137] 可采用使细胞、器官或组织与例如 D-Arg-2'6'-Dmt-Lys-Phe-NH<sub>2</sub> 的本发明技术的芳族阳离子肽或例如乙酸盐或三氟乙酸盐的其药学上可接受的盐接触的在本领域中的技术人员已知的任何方法。合适的方法包括体外、离体或体内方法。体内方法通常包括施用芳族阳离子肽如上文描述的那些到哺乳动物,合适地为人类。当用于体内疗法时,向受试者以有效量 (即,具有所要治疗作用的量) 施用例如 D-Arg-2'6'-Dmt-Lys-Phe-NH<sub>2</sub> 的芳族阳离子肽或例如乙酸盐或三氟乙酸盐的其药学上可接受的盐。

[0138] 剂量和剂量方案应取决于在所述受试者中感染的程度、所用的特定芳族阳离子肽的特征 (例如,其治疗指数)、受试者和受试者的病史。

[0139] 有效量可在前临床试验和临床试验期间通过医师和临床医生熟悉的方法确定。可通过用于施用医药化合物的众多熟知方法的任一种将有效量的可用于所述方法的肽施用到有此需要的哺乳动物。所述肽可全身地或局部地施用。

[0140] 所述肽可配制为药学上可接受的盐。术语“药学上可接受的盐”意指由可接受施用到例如哺乳动物的患者的碱或酸制备的盐 (例如,对于给定剂量方案,具有可接受的哺乳动物安全性的盐)。然而,应理解不要求如下盐为药学上可接受的盐,例如没有设计施用到患者的中间化合物的盐。药学上可接受的盐可衍生自药学上可接受的无机或有机碱和药学上可接受的无机或有机酸。另外,当肽含有例如胺、吡啶或咪唑的碱性部分和例如羧酸或四唑的酸性部分两者时,可形成两性离子且其包括在本文使用的术语“盐”内。衍生自药学上可接受的无机碱的盐包括铵、钙、铜、铁、亚铁、锂、镁、锰、亚锰、钾、钠和锌盐等。衍生自药学上可接受的有机碱的盐包括伯胺、仲胺和叔胺的盐,包括被取代的胺、环胺、天然存在的胺等,例如精胺酸、甜菜碱、咖啡因、胆碱、N,N'-二苄基乙二胺、二乙胺、2-二乙基氨基乙醇、2-二甲氨基乙醇、乙醇胺、乙二胺、N-乙基吗啉、N-乙基哌啶、葡萄糖胺、氨基葡萄糖、组氨酸、海卓胺、异丙胺、赖氨酸、甲基葡萄糖胺、吗啉、哌嗪、哌啶、多胺树脂、普鲁卡因、嘌呤、可



可碱、三乙胺、三甲胺、三丙胺、氨基丁三醇等。衍生自药学上可接受的无机酸的盐包括硼酸、碳酸、氢卤酸（氢溴酸、盐酸、氢氟酸或氢碘酸）、硝酸、磷酸、氨基磺酸和硫酸的盐。衍生自药学上可接受的有机酸的盐包括以下酸的盐：脂族羧酸（例如，柠檬酸、葡糖酸、乙二醇酸、乳酸、乳糖酸、苹果酸和酒石酸）、脂族单羧酸（例如，乙酸、丁酸、甲酸、丙酸和三氟乙酸）、氨基酸（例如，天冬氨酸和谷氨酸）、芳族羧酸（例如，苯甲酸、对氯苯甲酸、二苯基乙酸、龙胆酸、马尿酸和三苯基乙酸）、芳族羧酸（例如，邻羟基苯甲酸、对羟基苯甲酸、1-羟基萘-2-羧酸和3-羟基萘-2-羧酸）、抗坏血酸、二羧酸（例如，富马酸、马来酸、草酸和丁二酸）、葡萄糖醛酸、扁桃酸、粘液酸、烟碱酸、乳清酸、帕莫酸、泛酸、磺酸（例如，苯磺酸樟脑磺酸、edisyllic、乙磺酸、羟乙基磺酸、甲磺酸、萘磺酸、萘-1,5-二磺酸、萘-2,6-二磺酸和对甲苯磺酸）、1-羟基-2-萘甲酸(xinafoic acid)等。在一些实施方案中，所述盐为乙酸盐或三氟乙酸盐。

[0141] 可将例如 D-Arg-2'6'-Dmt-Lys-Phe-NH<sub>2</sub>的本文所述的芳族阳离子肽或例如乙酸盐或三氟乙酸盐的其药学上可接受的盐掺合到医药组合物中以便单独或组合地施用到受试者，从而治疗与预防本文所述的病症。这类组合物通常包含活性剂和药学上可接受的载剂。本文使用的术语“药学上可接受的载剂”包括与医药施用相容的盐水、溶剂、分散介质、涂料、抗菌和防真菌剂、等渗和吸收延迟剂等。补充活性化合物也可掺合到所述组合物中。

[0142] 医药组合物通常配制成与其预定施用路径相容。施用路径的实例包括肠胃外施用（例如，静脉内、皮内、腹膜内或皮下）、口服、吸入、透皮（局部）、眼内、离子电渗和经粘膜施用。用于肠胃外、皮内或皮下应用的溶液或悬浮液可包含以下组分：无菌稀释剂，例如注射用水、盐水溶液、固定油类、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其它合成溶剂；抗菌剂，例如苯醇或对羟基苯甲酸甲酯；抗氧化剂，例如抗坏血酸或亚硫酸氢钠；螯合剂，例如乙二胺四乙酸；缓冲剂，例如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐；和用于调节张力的试剂，例如氯化钠或右旋糖。pH可用例如盐酸或氢氧化钠的酸或碱调节。肠胃外制剂可装入由玻璃或塑料制成的安瓿、一次性注射器或多剂量小瓶中。为了患者或治疗医师的方便，剂量制剂可提供在含有对于治疗进程（例如，7天治疗）所需的所有设备（例如，药物小瓶、稀释剂小瓶、注射器和针）的试剂盒中。

[0143] 适合可注射用途的医药组合物可包括无菌水溶液（其中为水溶性的）或分散体以及用于临时制备无菌可注射溶液或分散体的无菌粉末。对于静脉内施用，合适的载剂包括生理盐水、抑菌水、Cremophor EL™(BASF, Parsippany, N. J.) 或磷酸盐缓冲盐水(PBS)。在所有情况下，用于肠胃外施用的组合物必须为无菌的且应为存在易于注射性的程度的流体。其在生产和储存条件下应该稳定且必须保持抵抗例如细菌和真菌的微生物的污染作用。

[0144] 芳族阳离子肽组合物可包含可为溶剂或分散介质的载剂，其含有例如水、乙醇、多元醇（例如，甘油、丙二醇和液态聚乙二醇等）以及其合适的混合物。恰当的流动性可例如通过使用例如卵磷脂的涂料、通过在分散体的情况下维持所需粒度或通过使用表面活性剂来维持。防止微生物作用可通过例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、抗坏血酸、硫柳汞(thiomersol)等的各种抗菌剂和防真菌剂来实现。可包含谷胱甘肽及其它抗氧化剂以防止氧化。在许多情况下，在所述组合物中将优选包含等渗剂，例如糖；多元醇，例如甘露糖醇、山梨糖醇；或氯化钠。可注射组合物的延长吸收可通过在组合物中包含例如单硬脂酸铝或明胶的延迟吸收的试剂来实现。

[0145] 无菌可注射溶液可通过将所需量的活性化合物和所需的上文所列成分中的一种或其组合一起掺合到适当溶剂中,接着通过过滤灭菌来制备。通常,分散体通过将活性化合物掺合到含有碱性分散介质和来自上文所列的其它所需成分的无菌赋形剂中来制备。在用于制备无菌注射溶液的无菌粉末的情况下,典型的制备方法包括真空干燥和冻干,其可产生活性成分加来自其先前无菌过滤的溶液的任何额外的所要成分的粉末。

[0146] 口服组合物通常包含惰性稀释剂或可食用的载剂。为了口服治疗施用,可将活性化合物与赋形剂掺合且以片剂、锭剂或胶囊剂如明胶胶囊的形式使用。口服组合物还可使用流体载剂制备,以作为漱口水使用。药学上相容的粘合剂和 / 或助剂物质可作为组合物的一部分而包含。片剂、丸剂、胶囊剂、锭剂等可含有任何下列成分或性质相似的化合物: 粘合剂,例如微晶纤维素、黄蓍胶或明胶; 赋形剂,例如淀粉或乳糖; 崩解剂,例如海藻酸、Primogel 或玉米淀粉; 润滑剂,例如硬脂酸镁或 Sterotes; 助流剂,例如胶体二氧化硅; 甜味剂,例如蔗糖或糖精; 或矫味剂,例如胡椒薄荷、水杨酸甲酯或橙味剂。

[0147] 对于通过吸入施用,化合物从含有例如气体如二氧化碳的合适推进剂的加压容器或分配器或者雾化器中以气溶胶喷雾剂的形式递送。这类方法包括在美国专利 6,468,798 号中描述的那些。

[0148] 如本文所述的治疗化合物的全身性施用也可经粘膜或透皮方法进行。对于经粘膜或透皮施用,在制剂中使用适合穿透屏障的渗透剂。这类渗透剂通常为本领域所知,且例如对于经粘膜施用包括洗涤剂、胆汁盐以及夫西地酸 (fusidic acid) 衍生物。经粘膜施用可通过使用鼻腔喷雾实现。对于透皮施用,将活性化合物配制成本领域通常已知的软膏、药膏、凝胶剂或霜剂。在一个实施方案中,透皮施用可通过离子电渗进行。

[0149] 治疗蛋白或肽可以在载体体系中配制。所述载剂可为胶体体系。所述胶体体系可为脂质体、磷脂双层赋形剂。在一个实施方案中,所述治疗肽封装在脂质体中,同时维持肽完整性。如本领域的技术人员应当了解,存在许多制备脂质体的方法。(参见 Lichtenberg 等, *Methods Biochem. Anal.*, 33:337-462(1988); Anselem 等, *Liposome Technology*, CRC Press(1993))。脂质体制剂可延迟清除并增加细胞吸收(参见 Reddy, *Ann. Pharmacother.*, 34(7-8):915-923(2000))。活性剂也可装载到由包括但不限于可溶性、不溶性、可渗透性、不可渗透性、生物可降解性或胃内滞留聚合物或脂质体的药学上可接受的成分制备的粒子中。这类粒子包括但不限于纳米粒子、生物可降解的纳米粒子、微粒、生物可降解的微粒、纳米球、生物可降解的纳米球、微球、生物可降解的微球、胶囊、乳液、脂质体、胶束和病毒载体体系。

[0150] 所述载剂还可为聚合物,例如生物可降解、生物相容的聚合物基质。在一个实施方案中,所述治疗肽可包埋在聚合物基质中,同时维持蛋白完整性。所述聚合物可为天然的,例如多肽、蛋白质或多糖,或者合成的,例如聚- $\alpha$ -羟基酸。实例包括由例如胶原蛋白、粘连蛋白、弹性蛋白、醋酸纤维素、硝酸纤维素、多糖、纤维蛋白、明胶及其组合制成的载剂。在一个实施方案中,所述聚合物为聚-乳酸 (PLA) 或共聚乳酸 / 乙醇酸 (PGLA)。聚合物基质可以包括微球或纳米球的多种形式和尺寸制备并分离。聚合物制剂可导致治疗作用的延长持续。(参见 Reddy, *Ann. Pharmacother.*, 34(7-8):915-923(2000))。用于人类生长激素 (hGH) 的聚合物制剂已经用于临床试验中。(参见 Kozarich and Rich, *Chemical Biology*, 2:548-552(1998))。

[0151] 聚合物微球持续释放制剂的实例描述在PCT公告W0 99/15154(Tracy等)、美国专利5,674,534号和5,716,644号(两者都属于Zale等)、PCT公告W0 96/40073(zale等)和PCT公告W0 00/38651(Shah等)。美国专利5,674,534号和5,716,644号和PCT公告W0 96/40073描述含有相对于与盐聚集稳定的红细胞生成素粒子的聚合物基质。

[0152] 在一些实施方案中,所述治疗化合物用将保护治疗化合物以防止其从身体中迅速消除的载体制备,例如受控释放制剂,包括植入剂和微囊化递送系统。可使用可生物降解的生物相容性聚合物,例如乙烯乙酸乙烯酯、聚酐、聚乙醇酸、胶原蛋白、聚原酸酯和聚乳酸。这类制剂可使用已知技术制备。这些物质也可例如自Alza Corporation和Nova Pharmaceuticals, Inc. 购得。脂质体混悬剂(包括具有针对细胞特异性抗原的单克隆抗体的靶向大肺泡上皮细胞的脂质体)也可用作药学上可接受的载体。这些物质可使用本领域技术人员所知的方法,例如如在美国专利4,522,811号中所述来制备。

[0153] 所述治疗化合物也可配制成增强细胞内递送。例如,脂质体递送体系在本领域中已知,参见例如Chonn和Cullis, "Recent Advances in Liposome Drug Delivery Systems," *Current Opinion in Biotechnology* 6:698-708(1995); Weiner, "Liposomes for Protein Delivery: Selecting Manufacture and Development Processes," *Immunomethods*, 4(3):201-9(1994); 和 Gregoriadis, "Engineering Liposomes for Drug Delivery: Progress and Problems," *Trends Biotechnol.*, 13(12):527-37(1995)。Mizguchi等, *Cancer Lett.*, 100:63-69(1996)描述融合脂质体体内或体外递送蛋白质到细胞中的用途。

[0154] 治疗剂的剂量、毒性和治疗功效可通过标准医药程序在细胞培养物和/或实验动物中确定,包括例如确定LD50(使50%的群体致命的剂量)和ED50(有效治疗50%的群体的剂量)。在毒性作用与治疗作用之间的剂量比为治疗指数,且其可表示为LD50/ED50的比率。优选表现出高治疗指数的化合物。虽然可使用表现出毒性副作用的化合物,但是应当小心设计将这类化合物靶向受影响组织的部位的递送体系以使对未感染细胞的潜在损害最小化且由此降低副作用。

[0155] 从细胞培养物测定和/或动物研究中获得的数据可用于配制用于人类的剂量范围。所述化合物的剂量优选在包括ED50而几乎没有毒性的循环浓度的范围内。所述剂量可根据所采用的剂型和所利用的施用路径而在该范围内变化。对于在所述方法中使用的任何化合物,最初可由细胞培养物测定估计治疗有效剂量。剂量可在动物模型中配制以达到包括如在细胞培养物中确定的IC50(即,试验化合物的浓度达到对症状的最大抑制作用的一半)的循环血浆浓度范围。可使用这类信息以更准确地确定在人类中的可用剂量。例如可通过高效液相色谱测量在血浆中的水平。

[0156] 通常,对于实现治疗性或预防性作用足够的芳族阳离子肽的有效量为约0.000001mg/公斤体重/天-约10,000mg/公斤体重/天。合适地,剂量范围为约0.0001mg/公斤体重/天-约100mg/公斤体重/天。例如,剂量可为每天、每隔一天或每隔两天1mg/kg体重/天或10mg/kg体重,或者在每周、每两周或每三周1-10mg/kg范围内。在一个实施方案中,单一剂量的肽为0.001-10,000微克/千克体重。在一个实施方案中,在载体中的芳族阳离子肽浓度为0.2-2000微克/递送毫升。例示性治疗方案要求每天或每隔一周施用一次。在治疗性应用中,有时需要在相对较短的间隔下的相对较高的剂量,直至疾病的进

展降低或终止,且优选直至受试者显示疾病症状的部分或完全缓解。此后,患者可按预防性方案施用。

[0157] 在一些实施方案中,治疗有效量的芳族阳离子肽可定义为在靶组织中  $10^{-12}$ – $10^{-6}$  摩尔浓度如约  $10^{-7}$  摩尔浓度的肽浓度。该浓度可通过 0.001–100mg/kg 或等效剂量的全身性剂量通过体表面积递送。应该优化剂量的进度以维持在靶组织中的治疗浓度,最优选通过每天或每周单次施用,而且包括连续施用(例如,肠胃外输注或透皮应用)。

[0158] 熟练技术人员应当了解某些因素可能影响有效治疗受试者所需要的剂量和时程,这些因素包括但不限于疾病或病症的严重性、先前的治疗、受试者的一般健康状况和/或年龄及其它存在的疾病。此外,用治疗有效量的本文所述的治疗组合物治疗受试者可包括单一治疗或一系列治疗。

[0159] 根据本发明方法治疗的受试者可为任何哺乳动物或动物,包括例如家畜,例如绵羊、猪、奶牛和马;玩赏动物,例如狗和猫;实验室动物,例如大鼠、小鼠和兔。在一个优选的实施方案中,所述哺乳动物为人类。

#### [0160] 芳族阳离子肽与其它治疗剂的组合法

[0161] 在一些实施方案中,例如 D-Arg-2' 6' -Dmt-Lys-Phe-NH<sub>2</sub> 的芳族阳离子肽或例如乙酸盐或三氟乙酸盐的其药学上可接受的盐可与一种或多种额外的试剂组合以预防或治疗降低的 TAZ1 表达水平或巴斯综合征。对于降低的 TAZ1 表达水平或巴斯综合征的药物治疗通常包括抗生素、粒细胞集落刺激因子 (G-CSF) 和用于控制心脏病状的试剂,包括但不限于例如利尿剂、ACE 抑制剂、地高辛(洋地黄)、钙通道阻断剂和  $\beta$ -阻断剂。在轻微情况下,可使用噻嗪利尿剂,例如以 25–50 毫克/天的氢氯噻嗪或以 250–500 毫克/天的氯噻嗪。然而,可能需要补充氯化钾,因为慢性多尿症导致 hypokalemis 碱中毒。此外,噻嗪利尿剂通常在具有巴斯综合征的晚期症状的患者中无效。ACE 抑制剂的典型剂量包括以 25–50 毫克/天的卡托普利和以 10 毫克/天的喹那普利。

[0162] 在一个实施方案中,例如 D-Arg-2' 6' -Dmt-Lys-Phe-NH<sub>2</sub> 的芳族阳离子肽或例如乙酸盐或三氟乙酸盐的其药学上可接受的盐与肾上腺素  $\beta$ -2 激动剂组合。“肾上腺素  $\beta$ -2 激动剂”是指肾上腺素  $\beta$ -2 激动剂及其类似物和衍生物,包括例如天然或合成的官能变体,其具有肾上腺素  $\beta$ -2 激动剂生物活性;以及肾上腺素  $\beta$ -2 激动剂的片段,其具有肾上腺素  $\beta$ -2 激动剂生物活性。术语“肾上腺素  $\beta$ -2 激动剂生物活性”是指模拟在受试者中肾上腺素和去甲肾上腺素的作用并改善在具有巴斯综合征的患者中的心肌收缩性的活性。通常已知的肾上腺素  $\beta$ -2 激动剂包括但不限于克仑特罗 (clenbuterol)、舒喘宁 (albuterol)、福莫特罗 (formoterol)、左沙丁胺醇 (levalbuterol)、羟异丙肾上腺素 (metaproterenol)、吡布特罗 (pirbuterol)、沙美特罗 (salmeterol) 和特布他林 (terbutaline)。

[0163] 在一个实施方案中,例如 D-Arg-2' 6' -Dmt-Lys-Phe-NH<sub>2</sub> 的芳族阳离子肽或例如乙酸盐或三氟乙酸盐的其药学上可接受的盐与肾上腺素  $\beta$ -1 拮抗剂组合。肾上腺素  $\beta$ -1 拮抗剂和肾上腺素  $\beta$ -1 阻断剂是指肾上腺素  $\beta$ -1 拮抗剂及其类似物和衍生物,包括例如天然或合成的官能变体,其具有肾上腺素  $\beta$ -1 拮抗剂生物活性;以及肾上腺素  $\beta$ -1 拮抗剂的片段,其具有肾上腺素  $\beta$ -1 拮抗剂生物活性。肾上腺素  $\beta$ -1 拮抗剂生物活性是指阻断肾上腺素对  $\beta$  受体的作用的活性。通常已知的肾上腺素的  $\beta$ -1 拮抗剂包括但不限于醋丁洛尔 (acebutolol)、阿替洛尔 (atenolol)、倍他洛尔 (betaxolol)、比索洛尔 (bisoprolol)、

艾司洛尔 (esmolol) 和美托洛尔 (metoprolol)。

[0164] 克仑特罗例如在包括 **Spiropent**® (Boehinger Ingelheim)、**Broncodil**® (Von Boch I)、**Broncoterol**® (Quimedical PT)、**Cesbron**® (Fidelis PT) 和 **Clenbuter**® (Biomedica Foscama) 的许多商标名称下得到。类似地,制备例如美托洛尔的肾上腺素  $\beta$ -1 拮抗剂及其类似物和衍生物的方法在本领域中熟知。美托洛尔尤其在商标名称 **Lopressor**® (美托洛尔酒石酸盐) 下购得,由 Novartis Pharmaceuticals Corporation, One Health Plaza, East Hanover, N. J. 07936-1080 生产。**Lopressor**® 的通用版本也自 Mylan Laboratories Inc., 1500 Corporate Drive, Suite 400, Canonsburg, Pa. 15317 和 Watson Pharmaceuticals, Inc., 360 Mt. Kemble Ave. Morristown, N. J. 07962 购得。美托洛尔也为在商标名称 Toprol **XL**® 下购得,由 Astra Zeneca, LP 生产。

[0165] 在一个实施方案中,将额外的治疗剂与芳族阳离子肽组合施用到受试者,从而产生增效的治疗作用。因此,在治疗巴斯综合征中可使用较低剂量的一种或两种治疗剂,产生增加的治疗功效和减小的副作用。

[0166] 在任何情况下,多种治疗剂可以任何顺序或甚至同时施用。如果同时施用,多种治疗剂可以单一一元化形式或以多种形式提供(仅举例而言,作为单一丸剂或作为两个单独的丸剂)。所述治疗剂中的一种可以多次剂量给予或者两者可作为多次剂量给予。如果不同时施用,则在多次剂量之间的时程可为大于零周至小于 4 周。另外,组合方法、组合物和制剂不限于仅使用两种试剂。

[0167] 实施例

[0168] 通过以下实施例进一步说明本发明,不应该将其视为以任何方式加以限制。

[0169] 实施例 1- 在心脏衰竭的狗模型中芳族阳离子肽对心脏线粒体心磷脂的影响

[0170] 该实施例说明芳族阳离子肽 D-Arg-2'6'-Dmt-Lys-Phe-NH<sub>2</sub>对在具有冠状微栓塞诱发的心脏衰竭的狗中的心脏线粒体心磷脂水平的影响。具体地讲,评价 D-Arg-2'6'-Dmt-Lys-Phe-NH<sub>2</sub>对 18:2-18:2-18:2-18:2 心磷脂物质的水平的影响。

[0171] 方法

[0172] 心脏衰竭在狗中经由多次连续的冠状动脉内微栓塞诱发,如在 Sabbah 等, Am J Physiol. (1991) 260:H1379-84 中所述,其整体以引用的方式结合到本文中。一半的狗接着用线粒体肽治疗;另一半的狗用药物赋形剂治疗并充当对照物。肽治疗在定义为约 30% 的左心室射血分数的心脏衰竭 (HF) 诱发时开始。肽的每日剂量为静脉内施用的 0.5mg/kg/天。在治疗期的最后 (12 周),将在赋形剂组和治疗组两者中的狗处死并移来自左心室的心肌样品,用盐水洗涤,并立即冷冻且在 -80°C 下储存。对于心磷脂分析,脂质用氯仿/甲醇溶液从心脏组织样品中提取 (Bligh Dyer 提取)。将单个脂质提取物用氯仿:甲醇 (1:1) 重构,用 N<sub>2</sub> 冲洗,且随后在 -20°C 下储存,之后经由电喷雾离子化质谱使用装备有自动纳米喷雾设备的三极-四极质谱仪分析。对于心磷脂的基于增强的多维质谱的鸟枪法脂质组学如 Han 等, "Shotgun lipidomics of cardiolipin molecular species in lipid extracts of biological samples," J Lipid Res 47(4) 864-879 (2006) 中所述进行。

[0173] 结果

[0174] 与来自正常受试者的心脏组织 (正常) 相比,18:2 心磷脂物质在未治疗的心脏衰

竭狗（心脏衰竭，对照物）显著降低（ $p < 0.05$ ）。然而，图 1，用 D-Arg-2' 6' -Dmt-Lys-Phe-NH<sub>2</sub> 治疗的 心脏衰竭狗（心脏衰竭，肽）具有与正常受试者类似但大于心脏衰竭对照受试者的 18:2 心磷脂水平（ $p < 0.05$ ）。图 1。

#### [0175] 结论

[0176] 18:2 心磷脂物质在心脏衰竭受试者中降低。18:2 心磷脂降低导致不良的氧化磷酸化和随后的 LV 功能障碍。用 D-Arg-2' 6' -Dmt-Lys-Phe-NH<sub>2</sub> 的慢性治疗使 18:2 心磷脂正规化，这产生改善的 LV 功能和线粒体 ATP 合成速率。

[0177] 这些结果显示例如 D-Arg-2' 6' -Dmt-Lys-Phe-NH<sub>2</sub> 的本发明的芳族阳离子肽或例如乙酸盐或三氟乙酸盐的其药学上可接受的盐可用于预防和治疗与异常心磷脂水平相关的疾病和病状。具体地讲，这些结果显示例如 D-Arg-2' 6' -Dmt-Lys-Phe-NH<sub>2</sub> 的本发明的芳族阳离子肽或例如乙酸盐或三氟乙酸盐的其药学上可接受的盐可用于包括向需要心磷脂水平正规化和再成型的受试者施用所述肽的方法中。

#### [0178] 实施例 2- 在心脏衰竭的狗模型中芳族阳离子肽对 TAZ1 表达的影响

[0179] 该实施例说明芳族阳离子肽 D-Arg-2' 6' -Dmt-Lys-Phe-NH<sub>2</sub> 对在具有冠状微栓塞诱发的心脏衰竭的狗中的 TAZ1 表达水平的影响。具体地讲，评价 D-Arg-2' 6' -Dmt-Lys-Phe-NH<sub>2</sub> 对 TAZ1 mRNA 水平的影响。

#### [0180] 方法

[0181] 使 12 只狗如上文在实施例 1 中所述遭受冠状微栓塞诱发的心脏衰竭（LV 喷血分数 ~ 30%）。对于三个月的试验，将受试者随机化到 D-Arg-2' 6' -Dmt-Lys-Phe-NH<sub>2</sub> 治疗组和对照组。受试者接收皮下注射 D-Arg-2' 6' -Dmt-Lys-Phe-NH<sub>2</sub> (0.5mg/kg/天,  $n = 6$ ) 或盐水（未治疗的 HF 对照物,  $n = 6$ ）。RNA 由在治疗期的最后所有受试者的 LV 组织和 6 个正常对照受试者的 LV 制备。TAZ1 mRNA 的水平通过实时 PCR 确定。mRNA 水平的改变使用 CT 法表示为倍数降低，其中正规化到甘油醛 1, 3- 二磷酸酯脱氢酶（GAPDH）内部对照。

#### [0182] 结果

[0183] 与正常受试者相比，TAZ1 mRNA 水平在接收盐水对照物的 心脏衰竭受试者中降低 2.25 倍。图 2。相对于正常受试者，用 D-Arg-2' 6' -Dmt-Lys-Phe-NH<sub>2</sub> 治疗将 TAZ1 的减小缩减到仅 1.23 倍。图 2。

#### [0184] 结论

[0185] 心脏衰竭与心磷脂再成型酶的失调相关，这可导致心磷脂的病理学再成型及结构和功能线粒体异常。用 D-Arg-2' 6' -Dmt-Lys-Phe-NH<sub>2</sub> 慢性治疗部分地逆转这些适应不良，因此允许恢复心磷脂的生理后生物合成再成型。

[0186] 这些结果显示例如 D-Arg-2' 6' -Dmt-Lys-Phe-NH<sub>2</sub> 的本发明的芳族阳离子肽或例如乙酸盐或三氟乙酸盐的其药学上可接受的盐可用于预防和治疗与降低的 TAZ1 表达水平相关的疾病和病状。具体地讲，这些结果显示例如 D-Arg-2' 6' -Dmt-Lys-Phe-NH<sub>2</sub> 的本发明的芳族阳离子肽或例如乙酸盐或三氟乙酸盐的其药学上可接受的盐可用于包括对需要使 TAZ1 表达水平正规化的受试者如具有巴斯综合征的受试者施用所述肽方法中。

#### [0187] 实施例 3- 芳族阳离子肽对线粒体超微结构和组织的影响

[0188] 该实施例说明例如 D-Arg-2' 6' -Dmt-Lys-Phe-NH<sub>2</sub> 的本发明的芳族阳离子肽或例如乙酸盐或三氟乙酸盐的其药学上可接受的盐可用于治疗巴斯综合征。

[0189] 使用本领域已知的标准制备来自具有巴斯综合症的受试者的组织样品和来自具有心脏病的受试者的样品以便使线粒体电子显微镜成像。将来自巴斯综合症受试者的组织样品染色并显示在线粒体超微结构和组织内的异常特征或结构（见在图 3 中的箭头），其一些以方框 b-d 突出显示。图 3。

[0190] 在来自心脏病受试者的组织样品中见到线粒体超微结构的类似紊乱。图 4A。用有效量的 D-Arg-2' 6' -Dmt-Lys-Phe-NH<sub>2</sub> 治疗心脏病受试者缓解线粒体的超微结构的异常特征。图 4B。

[0191] 此外，心脏病在线粒体方面的病理作用的缓解进一步显示，与在来自未用 D-Arg-2' 6' -Dmt-Lys-Phe-NH<sub>2</sub> 治疗的受试者的组织中的线粒体相比较，在来自用 D-Arg-2' 6' -Dmt-Lys-Phe-NH<sub>2</sub> 治疗的心脏病受试者的组织中的线粒体的组织改进。图 5A-5B。

[0192] 结果显示例如 D-Arg-2' 6' -Dmt-Lys-Phe-NH<sub>2</sub> 的芳族阳离子肽可用于降低具有异常线粒体超微结构的线粒体的数目和 / 或改善异常线粒体超微结构和维持在心脏病中的线粒体组织。可以预料例如 D-Arg-2' 6' -Dmt-Lys-Phe-NH<sub>2</sub> 的芳族阳离子肽对于在具有巴斯综合症的受试者中的异常线粒体超微结构将具有类似的影响。因而，本公开内容的芳族阳离子肽可用于治疗巴斯综合症的方法中。

[0193] 实施例 4- 芳族阳离子肽在治疗巴斯综合症中的用途

[0194] 该实施例将说明例如 D-Arg-2' 6' -Dmt-Lys-Phe-NH<sub>2</sub> 的本发明的芳族阳离子肽或例如乙酸盐或三氟乙酸盐的其药学上可接受的盐用于治疗巴斯综合症的用途。

[0195] 方法

[0196] 巴斯综合症患者将接收治疗有效量的例如 D-Arg-2' 6' -Dmt-Lys-Phe-NH<sub>2</sub> 的芳族阳离子肽或例如乙酸盐或三氟乙酸盐的其药学上可接受的盐的每天施用。肽可根据本领域中已知的方法经口服、局部、全身、静脉内、皮下、腹膜内或肌肉内施用。每周将针对与巴斯综合症相关的体征和症状的存在和 / 或严重性评价受试者，所述体征和症状包括但不限于例如心肌病、骨骼肌异常、中性粒细胞减少、发育迟缓、弱肌张力、在尿和血液中有机的水平增加和频繁细菌感染。治疗将维持到巴斯综合症的症状被缓解或消除的时间。

[0197] 结果

[0198] 可以预料接收治疗有效量的例如 D-Arg-2' 6' -Dmt-Lys-Phe-NH<sub>2</sub> 的芳族阳离子肽或例如乙酸盐或三氟乙酸盐的其药学上可接受的盐的巴斯综合症受试者将展示与巴斯综合症相关的症状的严重性降低或消除。

[0199] 这些结果将显示例如 D-Arg-2' 6' -Dmt-Lys-Phe-NH<sub>2</sub> 的本发明的芳族阳离子肽或例如乙酸盐或三氟乙酸盐的其药学上可接受的盐可用于治疗巴斯综合症。因此，所述肽可用于包括对需要治疗巴斯综合症的受试者施用芳族阳离子肽的方法中。

[0200] 等效方案

[0201] 本发明不限于在申请中描述的特定实施方案，预期这些实施方案为本发明的单个方面的单一说明。如本领域技术人员显而易见，本发明的许多改进和变化可在不脱离本发明的精神和范围下进行。除了上文列举的那些之外，在本发明的范围内的功能等效方法和设备对于本领域的技术人员从上述描述中将是显而易见的。希望这类改进和变化在所附权利要求书的范围内。本发明将仅受所附权利要求书以及授权所述权利要求书的等效物的完

整范围限制。应当理解,本发明不限于特定的方法、试剂、化合物、组合物或生物学系统,当然其可为变化的。还应该理解本文使用的术语仅是用于描述特定方面的目的,而并非旨在加以限制。

[0202] 另外,在根据马库什群组描述本公开内容的特征或方面情况下,本领域技术人员应认识到,本公开内容由此还根据马库什群组的任何单个成员或其成员的亚群进行描述。

[0203] 如本领域的技术人员应出于任何和全部目的所理解,特别地就提供书面描述而言,本文公开的全部范围还涵盖任何和全部可能的子范围和其子范围组合。任何列出的范围可以被容易地视为充分描述的范围并能够使其可拆分成至少相等的两部分、三部分、四部分、五部分、十部分等。作为一个非限制性实例,在本文中论述的每个范围可以容易地拆分成下三分之一、中三分之一和上三分之一等。如本领域的技术人员还应当理解,例如“直至”、“至少”、“大于”、“小于”等全部语言包括所列举的数字并且是指可以随后拆分成如上文讨论的子范围的范围。

[0204] 最后,如本领域的技术人员应当理解,一个范围包括每个单个成员。因此,例如,具有 1-3 个细胞的一个组涉及具有 1 个、2 个或 3 个细胞的多个组。类似地,例如,具有 1-5 个细胞的一个组涉及具有 1 个、2 个、3 个、4 个或 5 个细胞等的多个组。

[0205] 本文提到或引用的所有专利、专利申请、临时申请和公告以包括所有图和表的整体形式结合到本文中,其结合的程度不会与本说明书的明确教导不一致。

[0206] 其它实施方案在以下权利要求书中阐述。



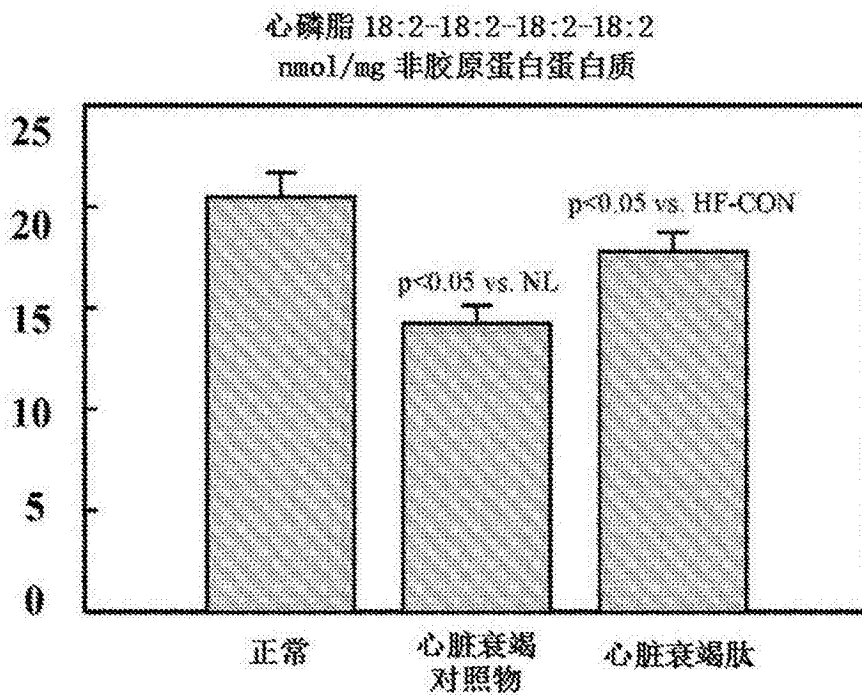


图 1

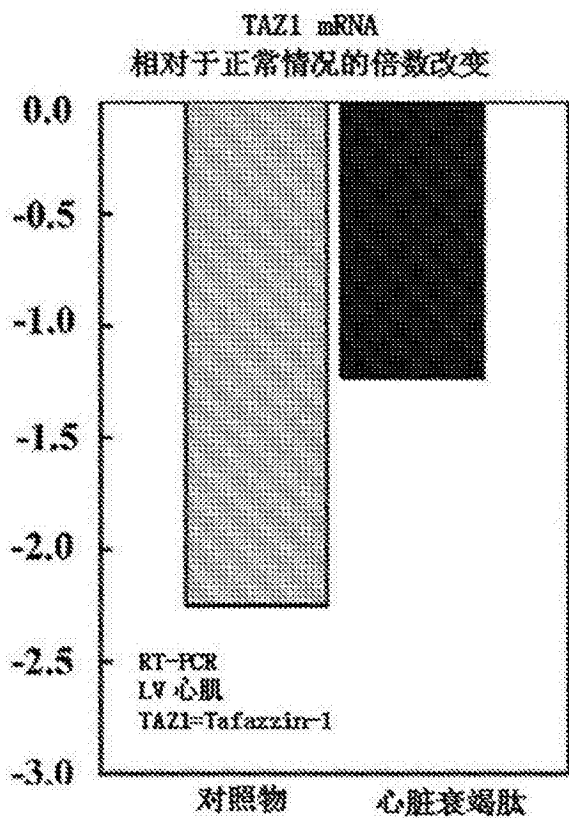


图 2

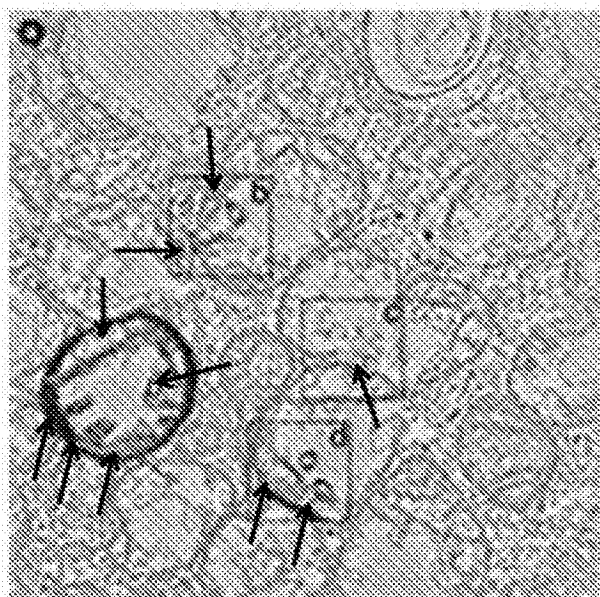


图 3

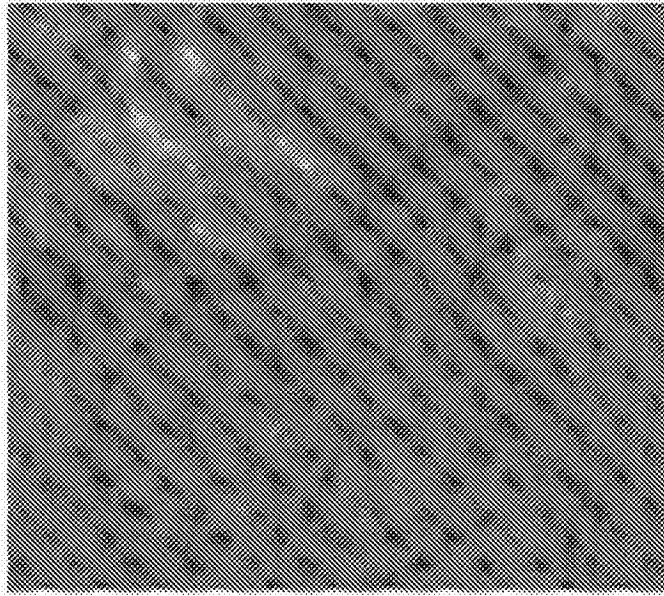


图 4A

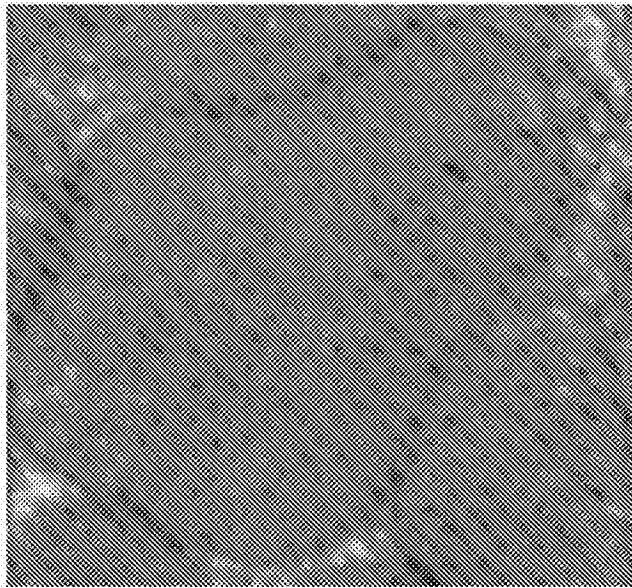


图 4B

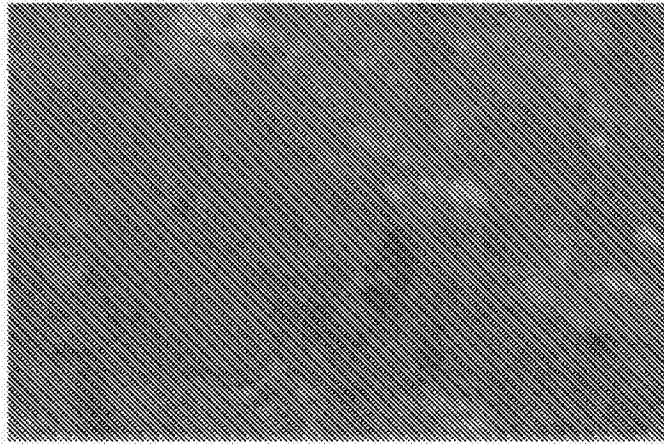


图 5A

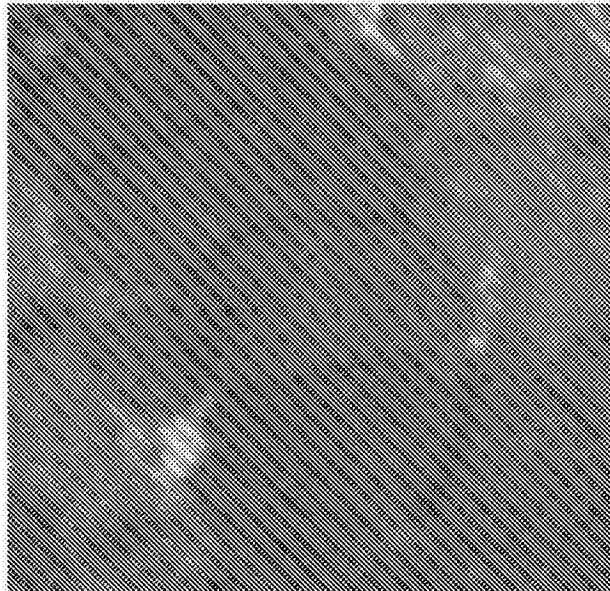


图 5B