

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
C07K 14/775 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580031153.1

[43] 公开日 2007 年 11 月 21 日

[11] 公开号 CN 101076541A

[22] 申请日 2005.7.15

[21] 申请号 200580031153.1

[30] 优先权

[32] 2004.7.16 [33] US [31] 60/588,722

[86] 国际申请 PCT/US2005/025182 2005.7.15

[87] 国际公布 WO2006/020040 英 2006.2.23

[85] 进入国家阶段日期 2007.3.16

[71] 申请人 塔夫茨大学信托人

地址 美国麻萨诸塞州

[72] 发明人 W·W·巴乔夫钦 E·A·切法利

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 权陆军 梁 谋

权利要求书 3 页 说明书 22 页 附图 7 页

[54] 发明名称

载脂蛋白 A1 模拟物及其用途

[57] 摘要

本发明提供了来源于载脂蛋白 A-I 的肽模拟物,它用于有利地影响脂质参数和/或血浆胆固醇水平。本发明还提供了用于治疗血浆胆固醇水平升高的药物组合物和方法。

1. 一种肽模拟物, 其具有与包括 D-氨基酸序列 F-A-E-K-F-K-E-A-V-K-D-Y-F-A-K-F-W-D (SEQ ID NO:3)的肽基本上相似的三维构象。

2. 权利要求 1 的肽模拟物, 其中所述肽模拟物具有与 SEQ ID NO:3 至少 75% 同一的序列。

3. 权利要求 1 的肽模拟物, 其中所述肽模拟物由 SEQ ID NO:3 代表或是只具有 SEQ ID NO:3 的保守氨基酸置换的化合物。

4. 权利要求 1 的肽模拟物, 其中所述肽模拟物改善受试者中的脂质参数。

5. 权利要求 1 的肽模拟物, 其中所述肽模拟物是逆反式肽。

6. 权利要求 5 的肽模拟物, 其中所述肽模拟物由序列 Ac-F-A-E-K-F-K-E-A-V-K-D-Y-F-A-K-F-W-D-NH₂ (SEQ ID NO:2)代表。

7. 一种用于治疗哺乳动物中血浆胆固醇水平升高的肽模拟物, 其中所述肽模拟物具有与包括 D-氨基酸序列 Ac-F-A-E-K-F-K-E-A-V-K-D-Y-F-A-K-F-W-D-NH₂ (SEQ ID NO:2)的肽基本上相似的三维构象。

8. 权利要求 7 的肽模拟物, 其中所述肽模拟物包括 D-氨基酸序列 Ac-F-A-E-K-F-K-E-A-V-K-D-Y-F-A-K-F-W-D-NH₂ (SEQ ID NO:2)。

9. 权利要求 7 的肽模拟物, 其中所述肽模拟物进一步包括与所述肽模拟物的氨基或羧基末端偶联的保护基团。

10. 权利要求 7 的肽模拟物, 其中所述肽模拟物进一步包括与所述肽模拟物氨基末端偶联的第一种保护基团以及与所述肽模拟物羧基末端偶联的第二种保护基团。

11. 权利要求 10 的肽模拟物, 其中所述保护基团选自乙酰基、CH₃-(CH₂)_n-CO-、酰胺、Fmoc、叔丁氧基羰基、9-芴乙酰基、1-芴羧基、9-芴羧基、9-芴酮-1-羧基、苄氧基羰基、咕吨基、三苯甲基、4-甲基三苯甲基、4-甲氧基三苯甲基、4-甲氧基-2,3,6-三甲基-苯磺酰基、1,3,5-三甲基苯-2-磺酰基、4,4-二甲氧基二苯甲基、甲苯磺酰基、2,2,5,7,8-五甲基苯并二氢吡喃-6-磺酰基、4-甲苄基、4-甲氧苄基、苄氧基、苄基、苯甲酰基、3-硝基-2-吡啶亚磺酰基、1-(4,4-二甲基-2,6-

二氧亚环己基)乙基、2,6-二氯苄基、2-氯苄氧基羰基、2-溴苄氧基羰基、苄氧基甲基、环己氧基、叔丁氧基甲基、叔丁氧基、叔丁基和三氟乙酰基, 并且 n 是 0-12 的整数。

12. 一种用于治疗哺乳动物中血浆胆固醇水平升高的药物组合物, 其包括治疗有效量的权利要求 1 或 7 的肽模拟物。

13. 权利要求 12 的组合物, 其中所述组合物用于持续释放所述化合物。

14. 权利要求 12 的组合物, 其进一步包括第二种活性剂。

15. 权利要求 14 的组合物, 其中所述第二种活性剂治疗脂质紊乱。

16. 权利要求 14 的组合物, 其中所述第二种活性剂是抗高血压剂。

17. 权利要求 14 的组合物, 其中所述第二种活性剂是心血管试剂。

18. 权利要求 14 的组合物, 其中所述第二种活性剂是消炎药。

19. 一种用于治疗哺乳动物中胆固醇水平升高的方法, 其包括对所述哺乳动物施用治疗有效量的权利要求 12 的组合物。

20. 一种用于预防性治疗处于发展血浆胆固醇水平升高危险中的受试者的方法, 其包括对所述受试者施用药物有效量的权利要求 12 的组合物。

21. 一种用于治疗显示动脉粥样硬化症状的哺乳动物的方法, 其包括对所述哺乳动物施用治疗有效量的权利要求 12 的组合物。

22. 一种用于预防性治疗处于发展动脉粥样硬化危险中的受试者的方法, 其包括对所述受试者施用治疗有效量的权利要求 12 的组合物。

23. 一种在其需要时用于改善受试者中脂质参数的方法, 其包括对所述受试者施用治疗有效量的权利要求 12 的组合物。

24. 权利要求 23 的方法, 其进一步包括施用第二种活性剂。

25. 权利要求 24 的方法, 其中所述第二种活性剂治疗脂质紊乱。

26. 权利要求 24 的方法, 其中所述第二种活性剂是抗高血压剂。

27. 权利要求 24 的方法, 其中所述第二种活性剂是心血管试剂。

28. 权利要求 24 的方法, 其中所述第二种活性剂是消炎药。

29. 一种治疗患有通过改变脂质参数可治疗的疾病或状况的患者的方法，其包括对所述受试者施用治疗有效量的权利要求 12 的组合物。

30. 一种包括在药物可接受载体中的权利要求 1 或 7 的化合物的试剂盒，其进一步包括用于施用所述化合物来治疗血浆胆固醇水平升高的说明书。

31. 一种包括在药物可接受载体中的权利要求 1 或 7 的化合物的试剂盒，其进一步包括用于施用所述化合物来治疗动脉粥样硬化的说明书。

32. 一种包括在药物可接受载体中的权利要求 1 或 7 的化合物的试剂盒，其进一步包括用于施用所述化合物来改善脂质参数的说明书。

载脂蛋白 A1 模拟物及其用途

相关申请

本申请要求 2004 年 7 月 16 日提交的美国临时申请号 60/588,722 的利益。这个申请的完整内容引入本文作为参考。

发明背景

与脂质紊乱相关或由脂质紊乱引起的血管疾病，例如心血管、外周血管和脑血管疾病，是发达世界中特别是折磨老年人的最主要的死亡和残疾原因。此类疾病是在富裕国家包括美国中的死亡主因，其中心血管疾病是每年几乎一百万件不幸事件的起因，超过了所有死亡的一半；每年几乎有五百万受心血管疾病折磨的人住院。

动脉硬化指以动脉壁增厚和丧失弹性为特征的任何疾病组。在这些疾病中，最常见形式的血管疾病——动脉粥样硬化以及冠状动脉疾病有着最重要的影响。通常，血管内表面相对较光滑，从而允许血液容易地通过。在一种常见形式的血管疾病动脉粥样硬化中，在大动脉和中等动脉的内膜和内介质（inner media）内形成包含胆固醇、脂肪材料、钙和充满脂质的巨噬细胞的黄色斑块（粥样斑）沉积。斑块引起血管阻塞，从而促进凝固并导致对重要身体器官的血液供应不足，这导致器官衰竭，包括心脏病发作、中风或肾衰竭，并引起高血压。动脉粥样硬化是大多数冠状动脉疾病的基础。

粥样硬化病变发展的最早期（脂纹）涉及单核细胞进入血管的内皮下区域。同时，低密度脂蛋白胆固醇（“LDL”）保留在内皮下区域并氧化，从而导致这些现在分化为巨噬细胞的单核细胞摄取氧化修饰的 LDL 并保持局部化。此类巨噬细胞或泡沫细胞尺寸增加，并且其后续死亡以及来自血管平滑肌细胞（“VSMC”）的纤维状成分的分泌有助于斑块的形成。动脉粥样硬化可以被视为过度增生疾病，其中动脉壁中的某些正常 VSMC 变得异常增生，并且同时侵入且扩散进入内部血管衬里，从而阻断血液流动并使得血管对由局部血液凝固完全阻塞异常易感。此类完全阻塞可以导致由所述动脉服务的组织死亡。

尽管 LDL 水平升高一般是有害的并被视为对健康有害, 但 HDL 水平升高被视为保护免受动脉粥样硬化。HDL 胆固醇通常被称为“好的”胆固醇, 因为血清 HDL 浓度与冠心病之间的负关联至少与低密度脂蛋白 (LDL) 和冠心病之间的正关联一样强。载脂蛋白 A-I (“Apo A-I”) 和 A2 是 HDL 的主要脱辅基蛋白质组成成分, 并被视为抗动脉粥样硬化的, 这是由于其将胆固醇从动脉运输至肝脏用于分解代谢和排泄的能力。参见 Furchart, J. 和 Ailhaud, G. (1992) Clin. Chem. 38:793-797。

动脉粥样硬化的治疗包括利用设计为抑制胆固醇合成的药物来管理并减少 LDL 胆固醇, 所述药物例如 HMG-CoA 还原酶抑制剂 (抑制素)、烟酸、胆汁盐螯合剂或纤维酸 (fibrates) 衍生物。然而, 这些药物试剂并非没有显著的副作用。已知抑制素显示各种程度的肌肉毒性 (myotoxicity) (Rosenson, (2004) Am. J. Med. 116(6):408-16), 并且烟酸通常诱导血管扩张作用。纤维酸盐与众多不良作用有关, 包括肝脏酶升高、胃肠副作用和横纹肌溶解 (Muscari 等人 (2002) Cardiology 97(3): 115-21)。

Apo A-I 的几种 A 类两亲性螺旋肽类似物已显示对抗动脉粥样硬化发展有效, 所述类似物来源于 Apo A-I 的 8 个串联重复的 22-聚体序列 (Apo A-I 模拟肽)。Apo A-I 的 C 末端部分 (残基 193 - 243) 被认为活跃地参与蛋白质 - 脂质相互作用。Apo A-I 模拟肽增强了高密度脂蛋白 (HDL) 保护低密度脂蛋白 (LDL) 不受氧化并从 LDL 去除种子分子的能力。然而, 未清楚了解 Apo A-I 模拟肽是否不依赖于 HDL 介导的机制来保护 LDL 不受氧化。此类肽一般在体内迅速降解。

以前已显示包含 18 个 L-氨基酸的模拟肽 L-4F 及其 D-氨基酸类似物 D-4F 阻断 LDL 氧化以及 LDL 诱导的单核细胞趋化活性。此外, D-4F 已显示在经口施用后是稳定的, 从而导致 LDL 受体无效小鼠中的粥样硬化病变减少几乎 80%。Navab 等人, (2002) Circulation 105:290-292。L-4F 和 D-4F 具有一级氨基酸序列 Ac-D-W-F-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F-NH₂ (SEQ ID NO:1)。18-聚体有可能形成 A 类两亲性螺旋结构 (Segrest 等人 (1974) FEBS Lett. 38:247-253)。L-4F 通过不依赖于 HDL 介导的过程的机制抑制 LDL 和磷脂氧化。

然而，仍需要改进的药物试剂以治疗、预防或改变病因学基于脂质的血管病症的进展，所述病症例如动脉粥样硬化，并且一般为血脂异常（dyslipidemia）胆固醇升高或 HDL 降低。

发明概述

本发明提供了来源于载脂蛋白 A-I（“Apo A-I”）的肽的肽模拟物（peptidomimetics），它用于有利地影响血浆胆固醇水平和血管疾病，例如通过改变脂质参数。在某些实施方案中，肽模拟物具有与包含 D-氨基酸序列 F-A-E-K-F-K-E-A-V-K-D-Y-F-A-K-F-W-D (SEQ ID NO:3) 的肽基本上相似的三维构象。本发明的化合物可以有利地预防性地施用于处于脂质病因学血管疾病危险中或显示脂质病因学血管疾病症状的患者，所述疾病例如动脉粥样硬化、高胆固醇血症、高脂血症、PAD、CHD 及脑血管疾病。

本发明的化合物是肽模拟物，具体是逆反式（retro-inverso）构型的氨基酸聚合物。

本发明包括本文所公开的肽模拟物作为研究工具在例如测定其他化合物的抗动脉粥样硬化潜力，研究动物和动物模型中的脂蛋白-受体相互作用，以及阐明脂质代谢机制，包括鉴定用于脂质代谢研究的动物模型中的用途。

本发明还包括所公开的肽模拟物在医学中的用途。此外，本发明包括本文所公开的肽模拟物在制备用于治疗本文所公开的疾病或状况的药物中的用途。

附图简述

图 1 描述了来源于 Apo A-I 的肽和肽模拟物。

图 2A-D 描述了 ^{14}C -标记的磷脂及蛋白质或肽的洗脱图。

图 3A 和 B 描述了结合脂质的肽和 Apo A-I 促进 SR-BI-依赖性胆固醇流出的能力。

图 4A 和 B 描述了不含脂质的肽和 Apo A-I 促进 ABCA1-依赖性胆固醇流出的能力。

图 5 显示肽模拟物 L-4F、D-4F 和 Rev D4-F 抑制由内皮细胞引起的脂质过氧化。

图 6 显示肽模拟物 L-4F、D-4F 和 Rev D4-F 抑制由硫酸铜引起的脂质过氧化。

图 7 显示肽模拟物 L-4F、D-4F 和 Rev D4-F 抑制内皮细胞中的 MCP-1 mRNA 表达。

发明详述

I. 概况

在血管疾病和异常脂质参数之间存在强的关联，所述参数例如胆固醇水平升高，尤其是通常血液和心血管系统中的 LDL 胆固醇水平升高，以及 HDL 降低。有利地改变脂质参数以便控制在循环血液以及局部病灶中的胆固醇的量被认为在减少动脉粥样硬化的发生和后续发病率中有效。

本发明提供了载脂蛋白 A-I 的肽模拟物，它用于改变脂质参数以便有利地影响血浆胆固醇水平。本发明进一步地一般涉及用于治疗心血管系统中胆固醇水平异常升高的方法和组合物。

II. 定义

术语“氨基酸残基”是本领域已知的。一般而言，本文所使用的用于指定氨基酸和保护基团的缩写基于 IUPAC-IUB 生化命名委员会 (IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature) 的推荐(参见 Biochemistry (1972) 11:1726-1732)。在某些实施方案中，本发明申请中所使用的氨基酸是在蛋白质中发现的那些天然发生的氨基酸，或包含氨基和羧基的此类氨基酸的天然发生的合成代谢或分解代谢产物。特别合适的氨基酸侧链包括选自下述氨基酸的侧链：甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、半胱氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、丝氨酸、苏氨酸、甲硫氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、赖氨酸、精氨酸、脯氨酸、组氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸。

术语“氨基酸残基”进一步包括本文提及的任何具体氨基酸的类似物、衍生物和同种物 (congener)，以及 C-末端或 N-末端被保护的氨基酸衍生物 (例如，用 N-末端或 C-末端保护基团修饰)。例如，本发明预期氨基酸类似物的用途，其中所述氨基酸类似物的侧链被延长或缩短同时仍提供羧基、氨基或其他活性前体官能团用于环化，以

及具有适当官能团的不同侧链的氨基酸类似物的用途)。例如, 目的化合物可以包括氨基酸类似物, 例如, 氰丙氨酸、刀豆氨酸、黎豆氨酸、正亮氨酸、3-磷酸丝氨酸、高丝氨酸、二羟基苯丙氨酸、5-羟色氨酸、1-甲基组氨酸、3-甲基组氨酸、二氨基庚二酸、鸟氨酸或二氨基丁酸。具有适合于本文的侧链的其他天然发生的氨基酸代谢物或前体将由本领域技术人员识别并包括在本发明的范围内。

如本文所使用的, 术语“试剂”和“化合物”包括蛋白质和非蛋白质部分。试剂可以是小有机分子、多肽、蛋白质、肽复合物、肽模拟物、非肽基试剂或多核苷酸。

如本文所使用的, “改善”指缓和、减轻或减少疾病表现的症状程度或减少疾病表现发作的发生次数。

“脱辅基蛋白质”是在脂蛋白外壳中的特化蛋白质。尽管在脂蛋白中发现了不同量的不同脱辅基蛋白质, 但所有这些脱辅基蛋白质都在脂蛋白代谢中都起着重要作用。脂蛋白微粒上的某些脱辅基蛋白质与特定的细胞表面受体相互作用, 而其他的脱辅基蛋白质激活或灭活脂质代谢中涉及的酶。已经分离并表征了 10 种主要的脱辅基蛋白质, 它们由肝和肠合成并分泌。特定脂蛋白包括特定的微粒种类。例如, 载脂蛋白 (“Apo”) B-100 与 VLDL、IDL 和 LDL 相关, 而 Apo A 与 HDL 相关。Apo B-100 帮助从血液中去除胆固醇并且 Apo A 帮助 HDL 从组织中去除胆固醇。

Apo A-I 是主要的 HDL 脱辅基蛋白质并且是 HDL 正常生产所必需的。大多数血浆 HDL 前体是被称为前- β 1 HDL 的包含 Apo A-I 和磷脂的盘状微粒。盘状前- β 1 HDL 可以通过与 B 类 I 型清除剂受体相互作用从组织细胞膜例如动脉壁巨噬细胞获得游离 (未酯化的) 胆固醇, HDL 的 Apo A-I 与所述清除剂受体对接从而游离胆固醇去往或离开 HDL 微粒。游离胆固醇被前- β 1 HDL 获得后, 它被酯化、非极化并移入 HDL 核心。

认为“动脉粥样硬化”始于动脉内壁 (内皮或内皮细胞) 损伤。一旦内壁被损坏, 生物学过程的组合可以导致斑块积聚。响应于损伤, 巨噬细胞积聚在该位点并在内层下方迁移。巨噬细胞随后开始吸收来自血液的脂肪物质并成为泡沫细胞。泡沫细胞及其他物质例如增生的平滑肌细胞的积聚有助于斑块形成并最终在动脉壁中形成膨胀

部。随着时间推移，因为膨胀部继续吸收脂肪物质，所以斑块积聚使血管腔变窄并堵塞血液流动。进一步地，斑块积聚可以导致血管壁变硬并丧失其弹性，这可以增加对血液流动的阻力并升高血压。结果，血管疾病被视为进行性疾病，其症状通常直至人到中年或更年长时才明显。

积聚的斑块导致血管阻塞，从而促进凝固并导致对重要身体器官的血液供应不足，这导致氧和营养物供应减少，这导致器官衰竭，包括心脏病发作、中风或肾衰竭，并引起高血压。当动脉粥样硬化发生在冠状动脉（冠状动脉疾病（CAD）或冠心病（CHD））中时，该状况可以导致心脏氧不足，从而导致例如心脏缺血、心绞痛、心肌梗死、心律不齐的状况，并最终导致心脏病发作，这是近年来发病率和死亡率的主因。当动脉粥样硬化发生在外周动脉（外周动脉疾病（PAD））时，该状况可以引起腿肌肉氧不足，从而导致活动性下降并最终导致活动性丧失。

术语“ED₅₀”指产生其 50 % 最大反应或作用的药物剂量。

“有效量”的例如肽模拟物就目的治疗方法而言指制剂中的肽模拟物量，当用作所需剂量方案的部分时，根据待治疗的病症或所需作用的临床可接受标准，所述肽模拟物量抑制或引起，例如预防或产生粥样硬化病变形速度或数目的改变。

术语“保健供给者”指为个人、社区等提供保健服务的个人或组织。“保健供给者”的实例包括医生、医院、连续护理退休社区（continuing care retirement community）、有经验的护理机构、亚急性护理机构、诊所、多专业诊所、独立式的流动中心、家庭保健机构以及健康维护组织（HMO's）。

如本文所使用的，“抑制”指与在对照样品中将发生的量相比，量是减少的。在优选实施方案中，抑制剂量减少超过 50 %、再更优选超过 75 % 或甚至 100 %。

如本文所使用的，“说明材料”指文件或记录的介质，其包括关于药物组合物用途的书面或可听的说明。说明材料包括瓶上的标签，插入盒子中、印刷在盒子或硬纸盒上的纸，在这些位置任何一处给出的地址上的网站提供的说明等。

术语“LD₅₀”指导致 50 % 测试受试者死亡的药物剂量。

“脂质”是不溶于水的脂肪物质，并包括脂肪、油、蜡及相关化合物。它们可以在血液中制备（内源的）或在饮食中摄入（外源的）。脂质是正常身体功能所必需的，并且无论由外源的或内源的来源产生，它们都必须被细胞运输并随后被释放用于使用。脂质通过细胞产生、运输并释放用于使用被称为脂质代谢。尽管存在几类脂质，但两个主要种类是胆固醇和甘油三酯。胆固醇可以在饮食中摄入并通过身体中的大多数器官和组织，主要是肝脏中的细胞制备。胆固醇可以以其游离形式发现，或更通常地是与脂肪酸组合的，作为所谓的胆固醇酯。

由于其在水中的不溶解性，脂质例如胆固醇直到被包装在称为脂蛋白的特殊分子中才能在血液中运输。因此，胆固醇作为与脂蛋白结合的微粒在血流中循环。

“脂蛋白”是球状化合物，它们的结构是这样的，从而使得水不溶性脂质包含在部分水溶性的壳中。取决于脂蛋白的类型，内含物包括不同量的游离和酯化的胆固醇、甘油三酯和脱辅基蛋白质或载脂蛋白。存在5种主要类型的脂蛋白，它们在功能及其脂质和脱辅基蛋白质含量方面不同，并且根据密度的增加分类为：（i）乳糜微粒和乳糜微粒残留物、（ii）极低密度脂蛋白（“VLDL”）、（iii）中密度脂蛋白（“IDL”）、（iv）低密度脂蛋白（“LDL”）和（v）高密度脂蛋白（“HDL”）。胆固醇作为与脂蛋白结合的微粒在血流中循环。

LDL 当被氧化修饰时成为致动脉粥样化的，所述氧化修饰是在斑块形成中 LDL 被巨噬细胞的清除剂受体摄取所必需的步骤，这导致泡沫细胞的形成。模拟肽中 Apo A-I 的 A 类两亲性结构域负责其脂质结合特性。本发明的 Apo A-I 模拟肽通常通过去除 LDL 上的磷脂种子分子来改变 LDL 脂质参数，从而使得 LDL 分子对内皮细胞氧化有抵抗力。进一步地，认为本发明的 Apo A-I 模拟肽经常通过从 HDL 剥离氧化的胆固醇将促炎 HDL 转化为抗炎 HDL 来改变脂质参数 HDL。

脂质代谢的外源途径描述了下述过程，通过所述过程，饮食摄入的甘油三酯和胆固醇由乳糜微粒从消化道运输到血流中，并且在乳糜微粒将甘油三酯递送至脂肪和肌细胞后，乳糜微粒残留物将剩余的胆

固醇送回肝脏用于再循环。具体地，饮食脂肪从胃进入小肠并被分解且吸收进入小肠衬里，在那里它们被包装入乳糜微粒并进入血流。一旦乳糜微粒进入血流，其大部分甘油三酯就被脂蛋白脂酶释放，所述脂蛋白脂酶是在脂肪和肌细胞的毛细管壁中发现的酶。脂肪细胞及其他周围细胞利用或储存大部分的甘油三酯。乳糜微粒残留物随后包装剩余的甘油三酯以及大部分的饮食胆固醇并返回肝脏，在那里它们经由脱辅基蛋白质介导的特异性受体机制被肝细胞吸收，并且乳糜微粒残留物分解代谢为其组成成分部分。肝脏利用所得的胆固醇以形成胆汁酸和 VLDL。

脂质代谢的内源途径描述了内在合成的胆固醇被产生、运输和释放的过程。尽管所有细胞都可以制备胆固醇，但 70% 的胆固醇在肝脏中合成，因此，讨论将集中在肝脏合成的胆固醇上。肝脏中合成的甘油三酯与胆固醇（在肝脏中合成的或通过乳糜微粒残留物和 HDL 微粒送递的）和脂蛋白组合以形成 VLDL，进入血流并运输至外周细胞例如脂肪细胞和肌细胞。脂蛋白脂酶从 VLDL 去除大多数甘油三酯，所述甘油三酯用于燃料和储存。通过细胞释放甘油三酯用于使用后，VLDL 转化为 IDL，它由肝脏从血液中清除或转化为 LDL。LDL 富含胆固醇并将胆固醇送递给细胞或从血液中被清除。如果存在过量的胆固醇，那么它可以由血管壁中的细胞吸收，从而导致动脉粥样硬化。在肝脏和小肠中制备的 HDL 接受来自细胞的过量胆固醇并将其送回肝脏以从身体中去除。HDL 还通过将胆固醇转移给 VLDL、IDL 或 LDL 间接地将胆固醇送回肝脏。

“脂质参数”中的改善包括下述中的一种或多种：脂蛋白与血管粘附的倾向下降、动脉粥样硬化斑块量的减少（尽管血浆 LDL 和/或 HDL 浓度没有明显变化）、HDL 或 LDL 微粒氧化可能性的减少、动脉粥样硬化消退（例如根据颈动脉血管造影术或超声测量的）以及心脏事件的减少。

“肽模拟物”包括任何修饰形式的氨基酸链，例如磷酸化、加帽、脂肪酸修饰，并包括非天然的主链和/或侧链结构。如下文所述，肽模拟物包括氨基酸链和非肽小分子之间的结构连续体。肽模拟物一般保留可识别的肽样聚合物单位结构。因此，肽模拟物可以保留与天然肽结合的任何靶分子结合的功能。

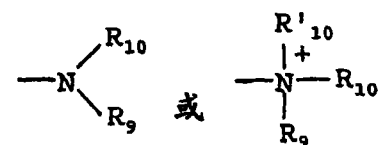
术语“预防”是本领域公认的，并且当相对于状况例如疾病例如高胆固醇血症复发或发作使用时，是本领域充分理解的，并且包括组合物的施用，相对于不接受该组合物的受试者，所述组合物减少受试者中医学状况症状发作频率或延迟其发作。

通过目的方法治疗的“受试者”或“患者”可以指人或非人动物。

如本文所使用的，“治疗”指减缓、停止或反转病症进程。在优选实施方案中，“治疗”指使进程倒转到病症消除的点。

如本文所使用的，术语“有害的胆固醇”指低密度脂蛋白（“LDL”）胆固醇和/或 LDL 和高密度脂蛋白（“HDL”）胆固醇的混合物，所述混合物具有对人们健康不利的 HDL/LDL 比。LDL 和 HDL 的含义是本领域众所周知的。一般而言，LDL 胆固醇水平升高是不希望的（高于 180 mg/dl），并且特定量的 HDL 胆固醇（高于 35 mg/dl）是对心血管健康有益的。具体地，高浓度的 LDL（高于 180 mg/dl）和低浓度的 HDL（低于 35 mg/dl）已显示是动脉粥样硬化发展的重要贡献者。其他疾病，例如外周血管疾病、中风和高胆固醇血症也受到不利的 HDL/LDL 比的负作用。“高胆固醇血症”一般定义为总胆固醇水平升高超过 200 mg/dl，特别是 LDL 水平超过 160 mg/dl。它可能是常染色体显性遗传疾病（家族性高胆固醇血症）。高胆固醇血症削弱血管舒张，从而导致高血压和循环受损。因此，控制每种类型的脂蛋白水平对于保持心血管健康是有效且必需的。

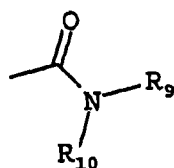
术语“胺”和“氨基”是本领域公认的并且指未取代的和取代的胺，例如可以由如下通式代表的部分：



其中 R_9 、 R_{10} 和 R'_{10} 各自独立代表氢、烷基、链烯基， $-(\text{CH}_2)_m-$ ，或 R_9 和 R_{10} 与它们所附着的 N 原子一起完成在环结构中含有 4 - 8 个原子的杂环； R_8 代表芳基、环烷基、环链烯基、杂环或多环；并且 m 为 0 或 1 - 8 的整数。在优选实施方案中， R_9 或 R_{10} 中只有一

个可以是羰基，例如 R_9 、 R_{10} 和氮不一起形成二酰亚胺。在再更优选的实施方案中，术语“胺”不包括酰胺，例如其中 R_9 和 R_{10} 中的一个代表羰基。在甚至更优选的实施方案中， R_9 和 R_{10} （以及任选的 R'_{10} ）各自独立代表氢、烷基、链烯基或 $-(CH_2)_m-R_8$ 。因此，如本文所使用的，术语“烷基胺”指如上定义的在其上附着有取代或未取代的烷基的胺基团，即， R_9 和 R_{10} 中至少一个是烷基。

术语“酰氨基”在本领域公认为氨基取代的羰基，并且包括可以由如下通式代表的部分：



其中 R_9 、 R_{10} 如上文所定义。酰胺的优选实施方案将不包括可能不稳定的二酰亚胺。

如本文所使用的，短语“保护基团”指保护可能的活性官能团不受所不希望的化学转化的临时取代基。此类保护基团的实例包括羧酸酯、醇的甲硅烷基醚、以及醛和酮分别的缩醛和酮缩醇。保护基团化学领域已得到综述(Greene, T.W.; Wuts, P.G.M. *Protective Groups in Organic Synthesis*, 2nd ed.; Wiley: New York, 1991)。

III. 示例性实施方案

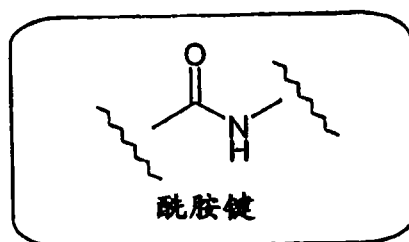
化合物

肽模拟物是基于或来源于肽和蛋白质的化合物。本发明的肽模拟物一般可以通过例如利用非天然的氨基酸、构象限制、同构替代(isosteric replacement)等对一种或多种天然氨基酸残基进行结构修饰获得。目的肽模拟物构成肽和非肽合成结构之间结构间隔的连续体。

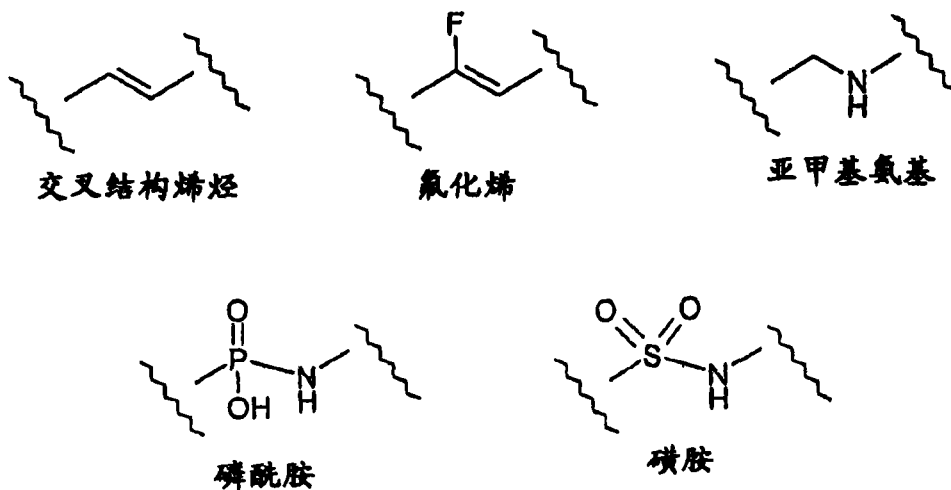
此类肽模拟物可以具有如不可水解(例如增加对抗蛋白酶或降解相应肽共聚物的其他生理条件的稳定性)、特异性增加和/或效价增加的属性。为了举例说明，本发明的肽类似物可以利用下述物质产生：例如，苯并二氮革类(例如参见 Freidinger 等人 "Peptides: Chemistry and Biology," G.R. Marshall ed., ESCOM Publisher:

Leiden, Netherlands, 1988), 取代的 γ 内酰胺环 (Garvey 等人 "Peptides: Chemistry and Biology," G.R. Marshall ed., ESCOM Publisher: Leiden, Netherlands, 1988, p123), C-7 模拟物 (Huffman 等人 "Peptides: Chemistry and Biology," G.R. Marshall ed., ESCOM Publisher: Leiden, Netherlands, 1988, p. 105), 酮-亚甲基假肽 (Ewenson 等人 (1986) J. Med. Chem. 29:295; 和 Ewenson 等人 "Peptides: Structure and Function (Proceedings of the 9th American Peptide Symposium)," Pierce Chemical Co. Rockland, IL, 1985), β -转角二肽核心 (Nagai 等人 (1985) Tetrahedron Lett. 26:647; 和 Sato 等人 (1986) J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1:1231), β -氨基醇 (Gordon 等人 (1985) Biochem. Biophys. Res. Commun. 126:419; 和 Dann 等人 (1986) Biochem. Biophys. Res. Commun. 134:71), 二氨基酮 (Natarajan 等人 (1984) Biochem. Biophys. Res. Commun. 124:141) 以及亚甲基氨基修饰的 (Roark 等人 "Peptides: Chemistry and Biology," G.R. Marshall ed., ESCOM Publisher: Leiden, Netherlands, 1988, p134)。同样地, 一般参见 Session III: Analytic and synthetic methods, in "Peptides: Chemistry and Biology," G.R. Marshall ed., ESCOM Publisher: Leiden, Netherlands, 1988)

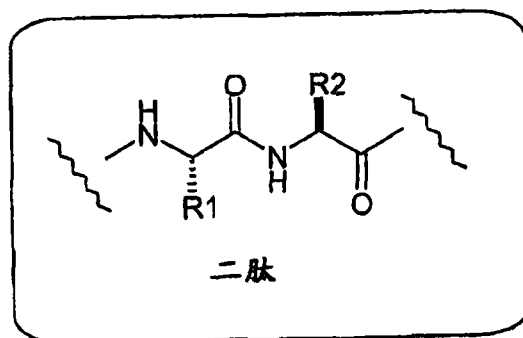
已开发了关于肽的酰胺键的众多替代物。经常使用的关于酰胺键的替代物包括下述基团 (i) 交叉结构烯烃、(ii) 氟代烯 (fluoroalkene)、(iii) 亚甲基氨基、(iv) 磷酰胺 (phosphonamide)、以及 (v) 磺胺。



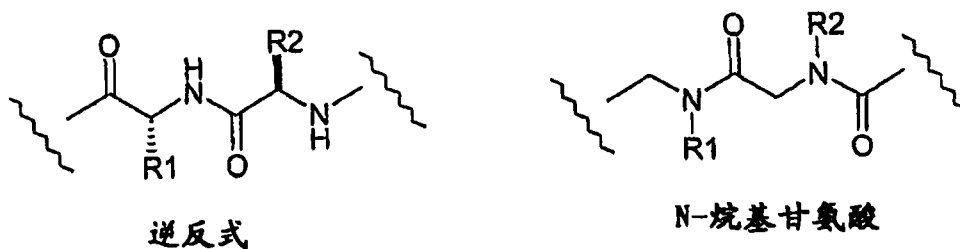
替代物的实例



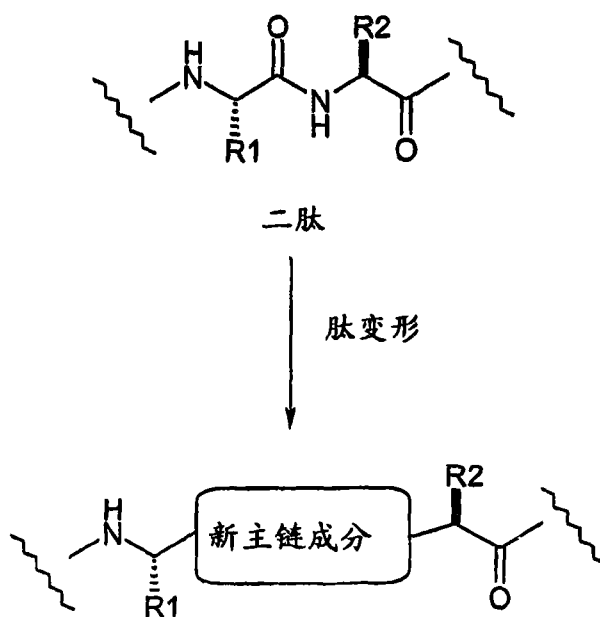
此外，可以使用基于多种肽主链的相当大修饰的肽模拟物。属于这个范畴的肽模拟物包括 (i) 逆反式类似物和 (ii) N-烷基甘氨酸类似物 (所谓的类肽)。



类似物的实例



此外，组合化学方法对肽模拟物共聚物的开发产生影响。例如，所谓的“肽变形(morphing)”策略的一个实施方案集中在肽类似物文库的随机产生，所述文库包括广泛的肽键取代物。



在本发明的一个优选实施方案中，肽模拟物是逆反式类似物。逆反式类似物可以根据本领域已知的方法以与合成基于 L-氨基酸的肽类似的方法进行制备。更具体而言，参见例如 Sisto 等人在美国专利号 4,522,752 中所述的方法。终产物或其中间体可以通过 HPLC 或任何其他适当的层析法进行纯化。

在另一说明性的实施方案中，肽模拟物可以作为反式对映（retro-enantio）类似物获得。这样的反式对映类似物可以由商业获得的 D-氨基酸（或其类似物）以及标准固相或溶液相肽合成技术来合成。

在再一说明性的实施方案中，可以制备交叉结构烯烃衍生物。肽的交叉结构烯烃类似物可以根据 Y.K. Shue 等人(1987) Tetrahedron Lett. 28:3225 的方法，并且还可根据本领域已知的其他方法来合成。应当理解依照所使用的试剂的性质，所引用的程序或其他可用程序中的变化可能是必需的。

更进一步地可能通过上述方法将合成的假二肽与其他假二肽偶联，以制备具有几种代替酰胺功能的烯属功能的假肽。例如可以制备对应于确定二肽序列的假二肽，并通过标准技术偶联在一起以产生在残基之间具有交替烯键的肽类似物。

再一类肽模拟物衍生物包括膦酸酯衍生物。此类膦酸酯衍生物的合成可以采用已知合成方案。参见，例如 Loots 等人 "Peptides:

Chemistry and Biology," (Escom Science Publishers, Leiden, 1988, p. 118); Petrillo 等人 "Peptides: Structure and Function (Proceedings of the 9th American Peptide Symposium)," Pierce Chemical Co. Rockland, IL, 1985).

在其他实施方案中, 修饰可以是导入碳水化合物或脂质部分。此类修饰还可改变肽在各种介质中的溶解性, 从而使得它们可以有利地制备为适当的药物组合物。修饰脂质基团包括法呢基和肉豆蔻酰基。修饰碳水化合物基团包括任何天然发生的糖和/或合成糖的单糖或寡糖和糖醇, 例如葡萄糖、半乳糖、鼠李糖、甘露糖、阿拉伯糖及其他糖以及其各自的醇。

本发明的化合物包括至少 15 个氨基酸残基, 并且更优选 18 个氨基酸残基。

在某些实施方案中, 本发明的肽模拟物具有与包括 D-氨基酸序列 F-A-E-K-F-K-E-A-V-K-D-Y-F-A-K-F-W-D (SEQ ID NO:3) 的肽基本上相似的三维构象。在特别的实施方案中, 肽在氨基到羧基方向上包括至少一个不是酰胺键的主链键, 例如相对于天然发生的肽的逆反式肽, 或至少一个不是酰胺键的主链键。

在一个示例性实施方案中, 肽模拟物与 SEQ ID NO:3 或 SEQ ID NO:2 具有至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90% 或至少 95% 的同一性。非同一的氨基酸残基可以是天然或非天然发生的。术语“百分比同一”指两个氨基酸序列之间或两个核苷酸序列之间的序列同一性。同一性可以通过比较每个序列中的位置而各自确定, 所述序列可以为了比较而进行比对。当被比较序列中的相同位置由相同碱基或氨基酸占据时, 那么分子在那个位置上是相同的; 当相同位点被相同或相似的氨基酸残基(例如, 空间和/或电子性质相似)时, 那么分子可以称作在那个位置上同源(相似的)。同源性、相似性或同一性百分比的表达指被比较序列在位置上共有的相同或相似氨基酸的数目的函数。同源性、相似性或同一性百分比的表达指被比较序列在位置上共有的相同或相似氨基酸的数目的函数。可以使用各种比对算法和/或程序, 包括 FASTA、BLAST 或 ENTREZ。FASTA 和 BLAST 可以作为 GCG 序列分析包(University of Wisconsin, Madison, Wis.)的部分获得, 并且可以与例如缺省设置一起使用。ENTREZ 通过

National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine, National Institutes of Health, Bethesda, MD 可以获得。在一个实施方案中,两个序列的百分比同一性可以通过缺口权重为 1 的 GCG 程序来测定,例如,每个氨基酸缺口都是加权的,就如同它是两个序列之间的单个氨基酸或核苷酸错配。

在可以与上述实施方案重叠的另一示例性实施方案中,SEQ ID NO: 3 或 SEQ ID NO:2 肽模拟物中的氨基酸由保守的氨基酸残基置换。术语“保守氨基酸置换”指来自一个此类组的氨基酸被来自相同组的不同氨基酸置换(概念上或其他方面)。限定单个氨基酸之间的共同特性的可使用的方式是分析同源生物相应蛋白质之间的氨基酸变化的标准化频率(Schulz, G. E.和 R. H. Schirmer., Principles of Protein Structure, Springer-Verlag)。根据此类分析,氨基酸组可以限定为其中组内的氨基酸优先互相交换,并且因此互相在其对整个蛋白质结构的影响方面最类似(Schulz, G. E.和 R. H. Schirmer, Principles of Protein Structure, Springer-Verlag)。一组以这种方式限定的氨基酸组的实例之一包括:(i)带电荷组,由 Glu 和 Asp、Lys、Arg 和 His 组成,(ii)带正电荷的组,由 Lys、Arg 和 His 组成,(iii)带负电荷的组,由 Glu 和 Asp 组成,(iv)芳族组,由 Phe、Tyr 和 Trp 组成,(v)氮环组,由 His 和 Trp 组成,(vi)大脂族非极性组,由 Val、Leu 和 Ile 组成,(vii)轻微极性组,由 Met 和 Cys 组成,(viii)小残基组,由 Ser、Thr、Asp、Asn、Gly、Ala、Glu、Gln 和 Pro 组成,(ix)脂族组,由 Val、Leu、Ile、Met 和 Cys 组成,以及(x)小羟基组,由 Ser 和 Thr 组成。

在优选实施方案中,本发明的肽模拟物是下述 D-氨基酸序列的逆反式肽:

F-A-E-K-F-K-E-A-V-K-D-Y-F-A-K-F-W-D (SEQ ID NO:3)

其中每个字母都代表常规的单字母氨基酸编码,不过是 D-氨基酸。

在更优选的实施方案中,本发明的肽模拟物是下述 D-氨基酸序列的逆反式肽:

Ac-F-A-E-K-F-K-E-A-V-K-D-Y-F-A-K-F-W-D-NH₂ (I) (SEQ ID NO:2)

其中每个字母都代表常规的单字母氨基酸编码，不过是 D-氨基酸。

在其他实施方案中，本发明的肽模拟物是 (I) 的类似物，其中一个或多个 D-氨基酸残基由其他 D-氨基酸或其他非天然的残基置换，所述氨基酸残基在置换后保留它们置换的残基的空间和离子或非离子特征。

包括 (I) 逆反式肽的本发明的肽模拟物可以被修饰从而使得氨基和/或羧基末端被保护基团保护，所述保护基团例如乙酰基、 $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_n-\text{CO}-$ 、酰胺、Fmoc、叔丁氧基羰基 (t-BOC)、9-芴乙酰基、1-芴羧基、9-芴羧基、9-芴酮-1-羧基、苄氧基羰基、咕吨基 (Xan)、三苯甲基 (Trt)、4-甲基三苯甲基 (Mtt)、4-甲氧基三苯甲基 (Mmt)、4-甲氧基-2,3,6-三甲基-苯磺酰基 (Mtr)、1,3,5-三甲基苯-2-磺酰基 (Mts)、4,4-二甲氧基二苯甲基 (Mbh)、甲苯磺酰基 (Tos)、2,2,5,7,8-五甲基苯并二氢吡喃-6-磺酰基 (Pmc)、4-甲苄基 (MeBzl)、4-甲氧苄基 (MeOBzl)、苄氧基 (BzlO)、苄基 (Bzl)、苯甲酰基 (Bz)、3-硝基-2-吡啶亚磺酰基 (3-nitro-2-pyridinesulphenyl) (Npys)、1-(4,4-二甲基-2,6-二氧亚环己基)乙基 (Dde)、2,6-二氯苄基 (2,6-DiCl-Bzl)、2-氯苄氧基羰基 (2-Cl-Z)、2-溴苄氧基羰基 (2-Br-Z)、苄氧基甲基 (Bom)、环己氧基 (cHxO)、叔丁氧基甲基 (Bum)、叔丁氧基 (tBuO)、叔丁基 (tBu) 和三氟乙酰基 (TFA)。变量 n 是 0 - 12，一般为 0 - 6，例如 0 - 4 的整数。

在某些实施方案中，本发明的肽模拟物可以进一步包括类似于翻译后修饰的修饰。此类修饰包括，但不限于，乙酰化、羧基化、糖基化、磷酸化、脂化和酰化。结果，修饰的肽模拟物可以包含非氨基酸成分，例如聚乙二醇、脂质、多糖或单糖以及磷酸盐。此类非氨基酸成分对于肽模拟物功能的作用可以通过例如工作实施例中所述的那些方法进行测试。

治疗组合物

本发明的另一方面提供了包括药物有效量的本发明的肽模拟物以及可接受的载体和/或赋形剂的药物组合物。药物可接受的载体包括生理学相容的任何溶剂、分散介质或包衣，它们优选不干扰或以其他方式抑制肽模拟物的活性。优选地，载体适合于静脉内、肌内、口、腹膜内、经皮、局部或皮下施用。一种示例性药物可接受的载体是生

理盐水。其他药物可接受的载体及其配制是众所周知的，并且一般在例如 *Remington's Pharmaceutical Science* (18th Ed., ed. Gennaro, Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990) 中得到描述。各种药物可接受的赋形剂是本领域众所周知的，并且可以在例如 *Handbook of Pharmaceutical Excipients* (4th ed., Ed. Rowe 等人 Pharmaceutical Press, Washington, D.C.) 中找到。组合物可以被配制为溶液、微乳剂、脂质体、胶囊、片剂或其他适当的形式。活性组分可以包被在材料中以保护其在到达靶作用部位之前不被环境灭活。

在本发明的某些实施方案中，药物组合物是持续释放制剂。本发明的肽模拟物可以与生物学相容的聚合物或基质混合，所述聚合物或基质控制共聚物进入紧靠的环境的释放速度。控制释放或持续释放的组合物包括在亲脂性库(depot) (例如，脂肪酸、蜡、油) 中的制剂。本发明还预期的是由聚合物 (例如泊洛沙姆或 poloxamine) 包被的微粒组合物。本发明组合物的其他实施方案合并了适合于各种施用途径，包括肠胃外、肺、鼻和口的微粒形式、保护包衣、蛋白酶抑制剂或渗透增强剂。可接受的载体包括羟甲基纤维素 (CMC) 和修饰的 CMC。

本发明的药物组合物优选在送递时是无菌和无致热原的，并且优选在制造和储存条件下是稳定的。

本发明的化合物可以作为分开的单位或与一种或多种下述物质的固定组合而组合使用：与有害的炎性分子或细胞因子结合的抗体，所述炎性分子或细胞因子例如白细胞介素-6、白细胞介素-8、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子以及肿瘤坏死因子- α ；酶抑制剂，例如蛋白酶抑制剂抑酶肽或环加氧酶抑制剂；抗生素，例如阿莫西林、利福平、红霉素；抗病毒剂，例如阿昔洛韦；类固醇类消炎药例如糖皮质激素；非类固醇类消炎药例如阿司匹林、布洛芬或扑热息痛；或非炎性细胞因子例如白细胞介素-4 或白细胞介素-10。其他细胞因子和生长因子，例如干扰素- β 、肿瘤坏死因子、抗血管原性 (antiangiogenic) 因子、促红细胞生成素、血小板生成素、白细胞介素、成熟因子、趋化蛋白质、及其保留相似生理学活性的变体和衍生物也可用作另外的成分。

本发明化合物还可与通常用于治疗糖尿病患者中脂质紊乱的药

物组合使用。此类药物包括，但不限于，HMG-CoA 还原酶抑制剂，烟酸、ezetimide、胆汁酸螯合剂纤维酸衍生物、MTP 抑制剂、ACAT 抑制剂和 CETP 抑制剂。HMG-CoA 还原酶抑制剂的实例为洛伐他汀、帕伐他汀、辛伐他汀、罗苏伐他汀（rosuvastatin）、氟伐地汀和阿伐他汀。胆汁酸螯合剂的实例为消胆胺、降胆宁和 colestevlam。纤维酸衍生物的实例为吉非贝齐和非诺贝特。

本发明的肽模拟物还可与抗高血压药物组合使用，所述抗高血压药物例如，利尿剂、 β -受体阻滞剂、组织蛋白酶 S 抑制剂、甲基多巴、 $\alpha 2$ -肾上腺素能激动剂、胍环定、利血平、 β -肾上腺素能受体拮抗剂、 $\alpha 1$ -肾上腺素能受体拮抗剂、胍屈嗪、米诺地尔、钙通道拮抗剂、ACE 抑制剂和血管紧张肽 II-受体拮抗剂。 β -受体阻滞剂的实例为醋丁洛尔、比索洛尔、艾司洛尔、心得安、阿替洛尔、拉贝洛尔、卡维洛尔和美托洛尔。ACE 抑制剂的实例为卡托普利、恩那普利、赖诺普利、贝那普利、福森普利、雷米普利、喹那普利、哌道普利、群多普利和莫西普利。

本发明的肽模拟物还可与心血管药物组合使用，所述心血管药物例如钙通道拮抗剂、 β -肾上腺素能受体拮抗剂和激动剂、醛甾酮拮抗剂、ACE 抑制剂、血管紧张肽 II 受体拮抗剂、硝基血管舒张剂和强心苷。

本发明的肽模拟物还可与消炎药组合使用，所述消炎药例如 H1-受体拮抗剂、H2-受体介导的激动剂和拮抗剂；COX-2 抑制剂、NSAID、水杨酸盐、扑热息痛、丙酸衍生物、enolic acids、二芳基取代的 fuanone、环加氧酶抑制剂、以及缓激肽激动剂和拮抗剂。

治疗方法

本发明一个方面提供了通过给受试者施用治疗有效量的一种或多种本发明肽模拟物来治疗显示发展动脉粥样硬化症状或处于发展动脉粥样硬化危险中的受试者的方法。

一般而言，本发明的一个实施方案是施用适当剂量（例如，每日剂量）的治疗组合物，所述适当剂量将是产生治疗效果例如减轻症状的最低有效剂量，但始终提供治疗有效的体内水平。治疗肽模拟物优选以至少约 2mg、至少约 5mg、至少约 10mg 或至少约 20mg /受试者 /天的剂量作为适当的最小起始剂量施用。在本文所述方法的一个实

施方案中，可以施用药 0.01 - 约 500mg/kg 的剂量。一般而言，本发明化合物的有效剂量是约 50 - 约 400 毫克化合物/千克患者/天。然而，本领域技术人员应当理解，本发明组合物的剂量将依赖于受试者和使用的具体施用途径而变。调整剂量以适合单个受试者在本领域中是常规的。此外，除其他事物之外，有效量可以基于化合物的尺寸、化合物的生物可降解性、化合物的生物活性以及化合物的生物利用度。如果化合物不会很快地降解，是生物可利用的并且具有很高的活性，则将需要较小的有效量和/或较不频繁的给药（例如，每天较少次数，少于每天 1 次）是合适的。适合于受试者的实际剂量可以在给定一般起始点时很容易地由本领域技术人员例如医师或兽医作为常规实践进行确定。

化合物可以每小时、每天、每周、每月、每年（例如，以时间释放形式）送递或作为一次性送递。送递可以是连续送递一段时间，例如静脉内送递。在本文所述方法的一个实施方案中，试剂每天送递至少一次。在一个实施方案中，试剂每天施用。在一个实施方案中，试剂每隔一天施用。在一个实施方案中，试剂每 6 - 8 天施用。在一个实施方案中，试剂每周施用。

在本文所述方法的一个实施方案中，施用途径可以是口、腹膜内、经皮、皮下、静脉内或肌肉注射、吸入、局部、损伤内、输注；脂质体介导的送递；局部、鞘内、牙龈袋、直肠、支气管内、鼻、跨粘膜、肠、眼睛或耳送递，或本领域技术人员可以容易认识到的本领域已知的其他任何方法。本发明组合物的其他实施方案合并了适合于各种施用途径，包括肠胃外、肺、鼻和口的微粒形式保护包衣、蛋白酶抑制剂或渗透增强剂。

本发明方法的一个实施方案是以持续释放的形式施用本发明的肽模拟物。此类方法包括应用持续释放的经皮贴剂或植入持续释放的胶囊或包衣的可植入的医学装置，从而使得治疗有效剂量的本发明肽模拟物连续送递给此类方法的受试者。本发明的化合物和/或试剂可以经由允许试剂或肽持续释放一段时间的胶囊来送递。控制释放或持续释放的组合物包括在亲脂性库（例如，脂肪酸、蜡、油）中的制剂。本发明还预期的是由聚合物（例如泊洛沙姆或 poloxamine）包被的微粒组合物。

在另一相关实施方案中，该方法进一步包括施用至少一种另外的治疗试剂。此类试剂可以是抗体、酶抑制剂、抗菌剂、抗病毒剂、类固醇、非类固醇类消炎药、抗代谢物、细胞因子或可溶性细胞因子受体。酶抑制剂可以是蛋白酶抑制剂或环加氧酶抑制剂。另外的试剂可以作为药物组合物的部分加入，或可以同时施用，或在另外的试剂的生理作用与本发明化合物的生理作用重叠的时间段内施用。更具体而言，另外的试剂可以同时施用，或在共聚物施用前1周、几天、24小时、8小时或紧在共聚物施用前施用。另外，另外的试剂可以在共聚物施用前1周、几天、24小时、8小时或紧在共聚物施用前施用。

本发明的另一实施方案是通过施用本发明的化合物预防性治疗处于发展自身免疫病危险中的受试者的方法。例如基于家族史、或与动脉粥样硬化相关的任何遗传标记来鉴别处于危险中的受试者。此类预防性治疗可以另外包括其他的药物试剂。

研究工具

本发明的肽模拟物还可用作研究工具。例如，本发明的肽模拟物可以用于评估其他化合物（包括其他肽模拟物）的抗动脉粥样硬化潜力。

另外，特别是当肽模拟物被标记时（例如，放射性标记、荧光标记），本发明的肽模拟物可以用于研究动物和动物模型中的脂蛋白-受体相互作用。

本发明的肽模拟物还可用于鉴别适合于阐明脂质代谢途径的适当的动物模型。例如肽模拟物可以用于鉴别其中脂质过氧化有助于动脉粥样硬化进展的动物模型。

IV. 实施例

实施例 1. 逆反式肽模拟物 Rev-D4F 的合成及纯化

逆反式肽模拟物 Rev-D4F 利用标准的肽合成方法进行合成并通过高效液相层析进行纯化。

为了评估纯化的 Rev-D4F 与磷脂相互作用的能力，将纯化的肽模拟物与 1,2-二肉豆蔻酰-sn-甘油-3-胆碱磷酸（1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine）（DMPC）混合，后者是与胆固醇结合的膜脂双层组分并通过凝胶过滤层析分级分离。与 L4F 和 D4F 类似，

Rev-D4F 自发地与 DMPC 有效结合, 并且所有肽模拟物都与磷脂共洗脱 (图 2B-D)。与此相反, 完整 Apo A-I 蛋白只有某些部分与磷脂自发地结合 (附图 2A)。

实施例 2. Rev-D4F 对 SR-BI-依赖性胆固醇流出的作用

检查了 Rev-D4F 以受体方式对胆固醇流出的作用。B 类 I 型清除剂受体 (“SR-BI”) 是正常表达在肝细胞表面上的 HDL 的受体。将氘标记的胆固醇与野生型 Apo A-I、L4F 肽、D4F 肽或 Rev-D4F 肽模拟物一起加到用 SR-BI 转染的细胞中, 并测定胆固醇流出的百分比。

当在按照重量的基础上与 Apo A-I 比较时, L4F、D4F 和 Rev-D4F 在促进流出方面都比 Apo A-I 蛋白质更有效。当在按照摩尔的基础上比较时, 所有模拟肽都不如 Apo A-I 蛋白质有效 (参见图 3A 和 B)。

实施例 3. Rev-D4F 对 ABCA1-依赖性胆固醇流出的作用

利用与 SR-BI 相同的方法, 只是除了转染了 ABCA1, 也检查了 Rev-D4F 以取决于 ATP 结合盒蛋白质 A1 (“ABCA1”) 的方式对胆固醇流出的作用。类似于 SR-BI-依赖性胆固醇流出, 在按照重量的基础上, L4F、D4F 和 Rev-D4F 在促进胆固醇流出方面都比 Apo A-I 有效。同样与 SR-BI-依赖性流出相似, 当在按照摩尔的基础上比较时, 所有这 3 种模拟肽都不如 Apo A-I 有效 (参见图 4A 和 B)。

实施例 4. 肽模拟物对血浆脂质氧化的作用

本研究基于抑制硫代巴比妥酸-活性物质 (TBARS) 浓度增加测量了 Rev-D4F、D-4F 和 L-4F 模拟肽抑制由人主动脉内皮细胞和硫酸铜 (II) 引起的脂质过氧化的能力。如图 5 和 6 所示, 所有这 3 种模拟物都显著降低在氧化剂的存在下脂质过氧化的量。此外, 与 Rev-D4F 相关的脂质过氧化的抑制明显大于与 D-4F 相关的抑制。

实施例 5. 肽模拟物对 MCP-1 mRNA 表达的作用

本研究分析了 Rev-D4F、D-4F 和 L-4F 模拟肽减少抗炎性标记单核细胞趋化蛋白-1 (MCP-1) 的水平的作用。基于 MCP-1 mRNA 的水平, 所有这 3 种肽模拟物都减少了 MCP-1 的量。

实施例 6. Rev-D4F 对 ApoE-无效小鼠的作用

在本研究中, 测量了 Rev-D4F、D-4F 和 L-4F 模拟肽对 ApoE-无效小鼠中动脉粥样硬化的比较作用。对 4 组 ApoE-无效小鼠 (4 周

龄, $n = 15$) 饲喂食物饮食, 并在饮用水中经口施用水 (对照)、Rev-D4F、D-4F 或 L-4F 模拟肽 (1.6mg/天, $n = 12$ /组) 6 周。用 NIH 软件进行了用油红 O 染色的主动脉根部横截面定量形态测定法。

Apo A-I 模拟肽不影响血浆总胆固醇、HDL-胆固醇和非 HDL 胆固醇水平。L-4F 对粥样硬化病变没有作用。Rev-D4F 和 D4F 两者都显著 ($p < 0.02$) 降低损伤区域, 与水对照比较分别降低 46% 和 33%。数据显示在 ApoE-无效小鼠中在早期损伤形成期阻止动脉粥样硬化中 Rev-D4F 至少与 D-4F 一样有效或比 D-4F 更有效。

等同方案

肽模拟物、其亚单位及上文所述其他组合物的预期等同方案包括以其他方式与其对应, 并且具有其相同一般特性 (例如生物相容的) 的此类材料, 其中对取代物进行不会不利影响此类分子达到其预期目的的功效的一种或多种简单改变。一般而言, 本发明的化合物可以通过一般反应方案中举例说明的方法, 例如下文所述或通过其修饰, 利用容易获得的原材料、试剂和常规合成程序来制备。在这些反应中, 还可能利用它们自身是已知的但本文没有提及的变量。

所有上文引用的参考文献均整体引入本文作为参考。

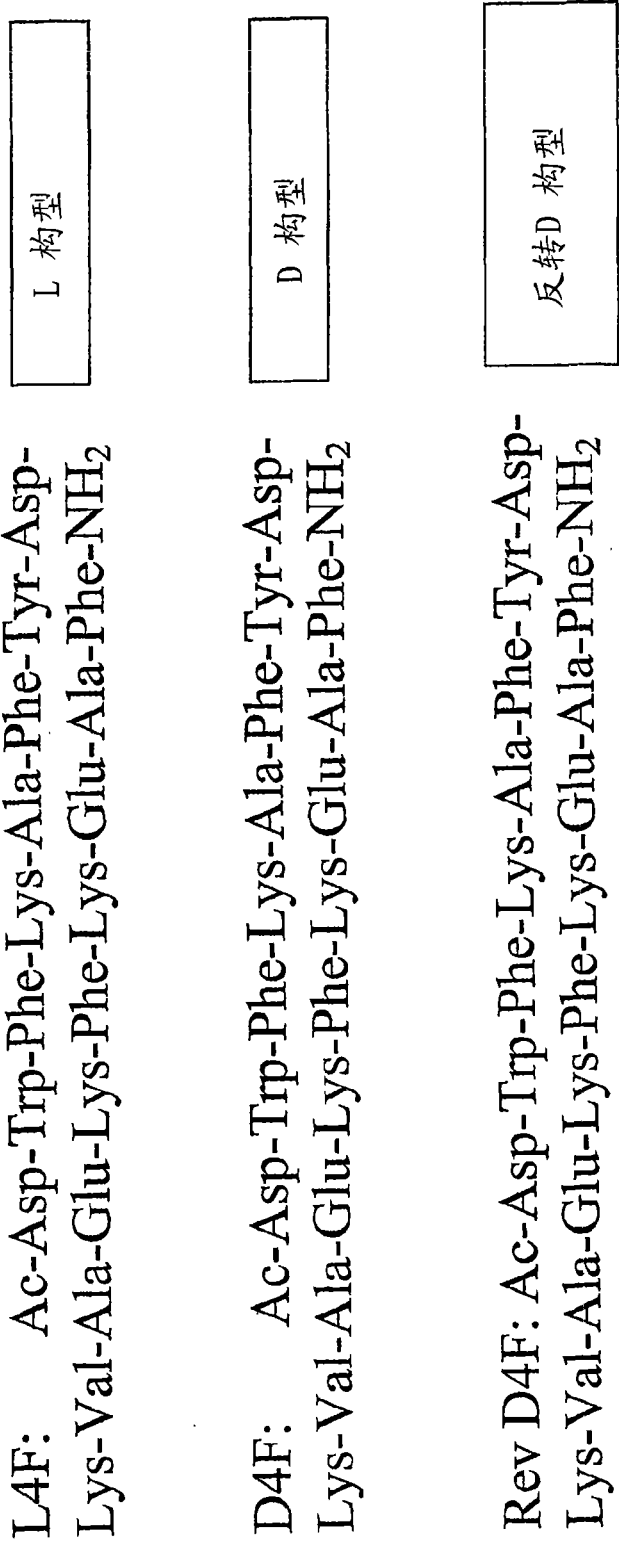


图 1

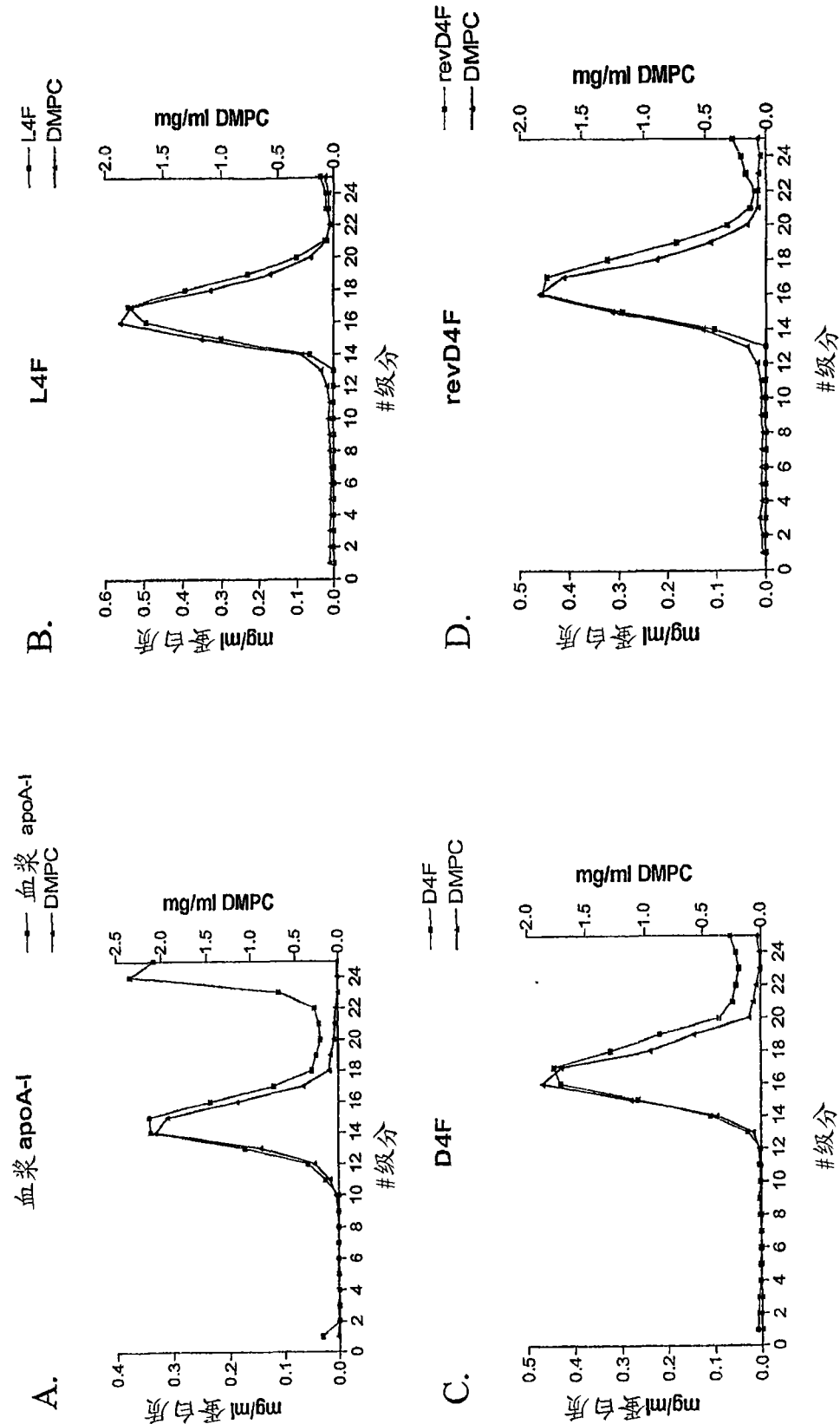


图 2

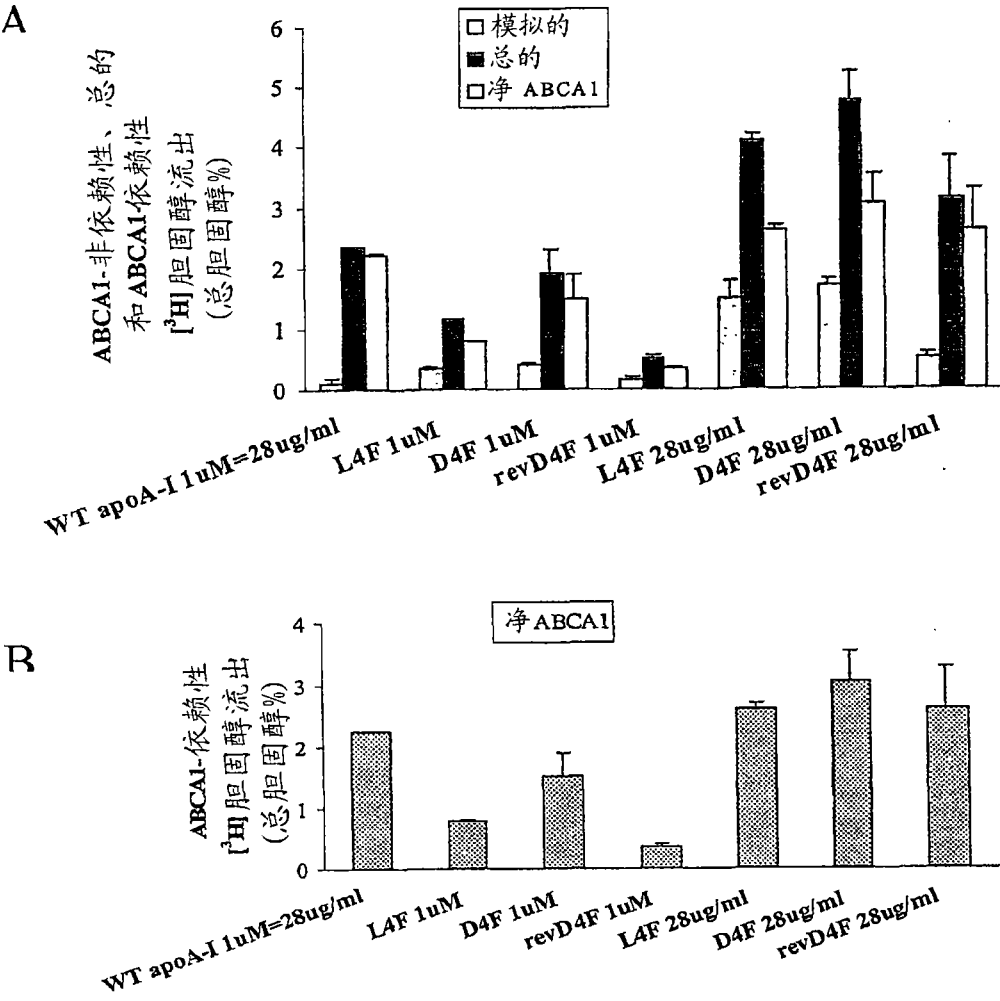


图 3

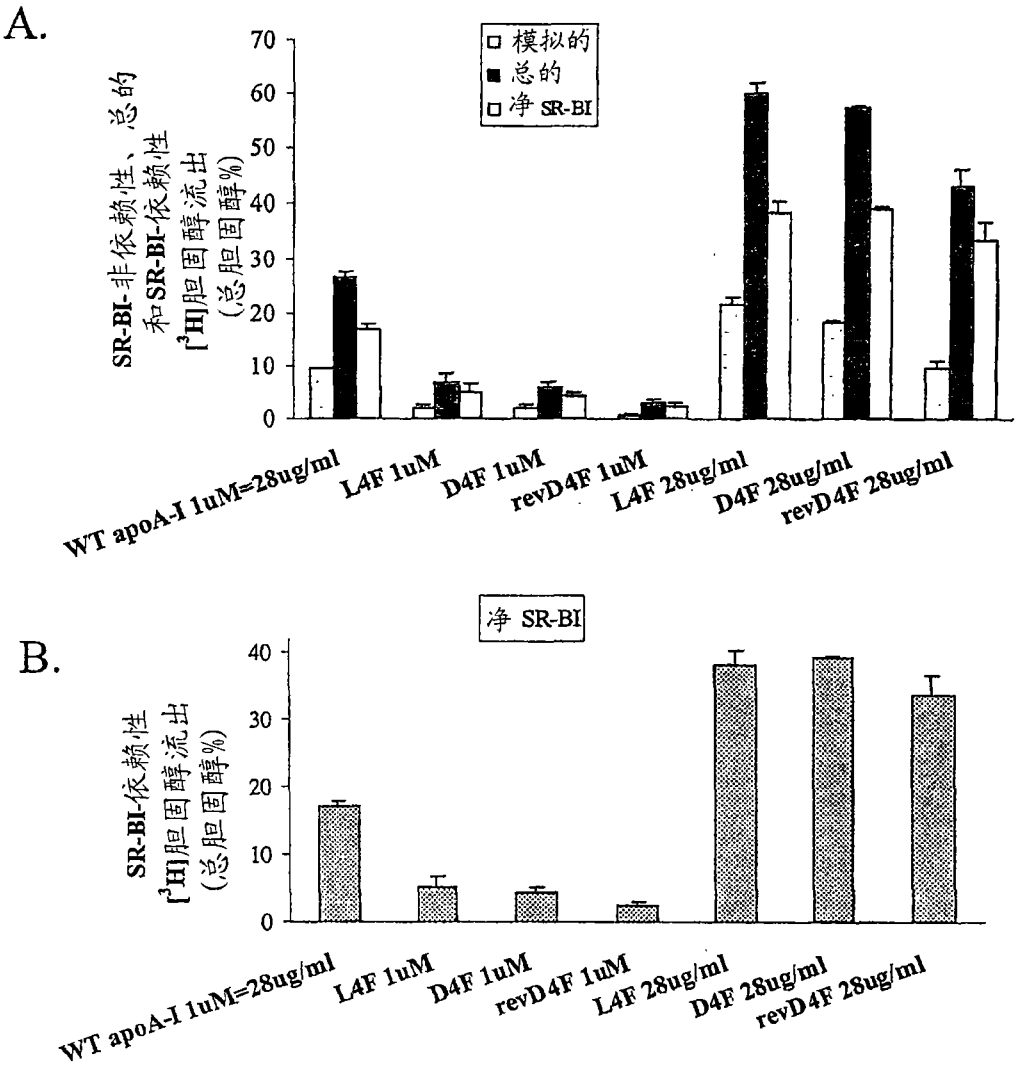


图 4

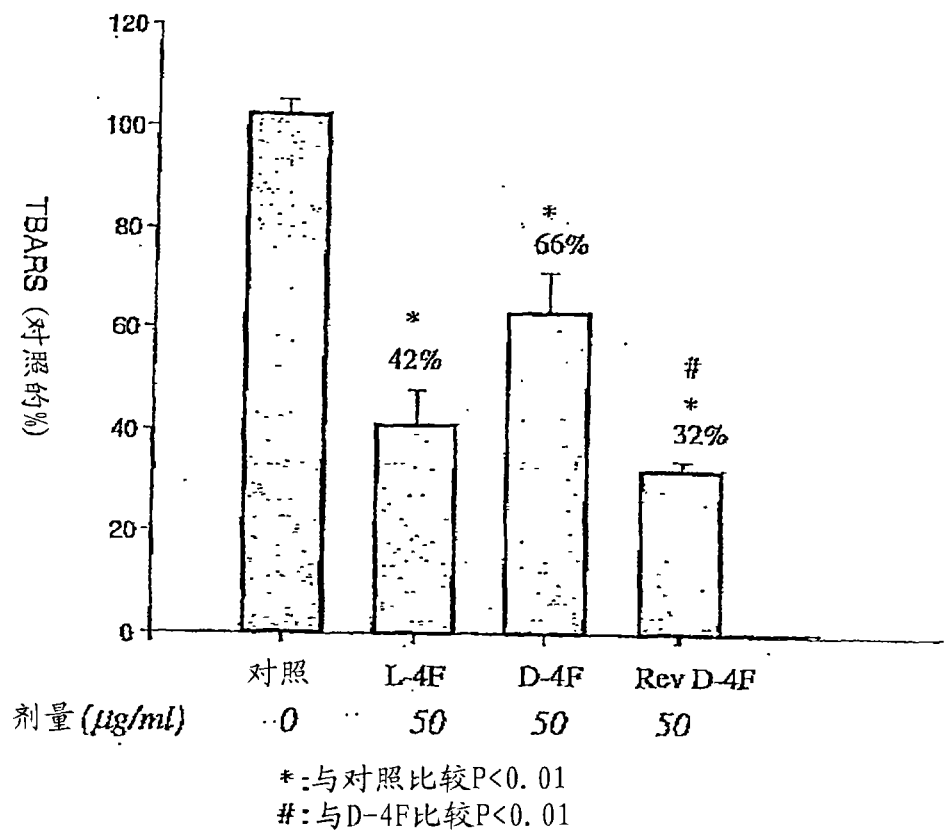


图 5

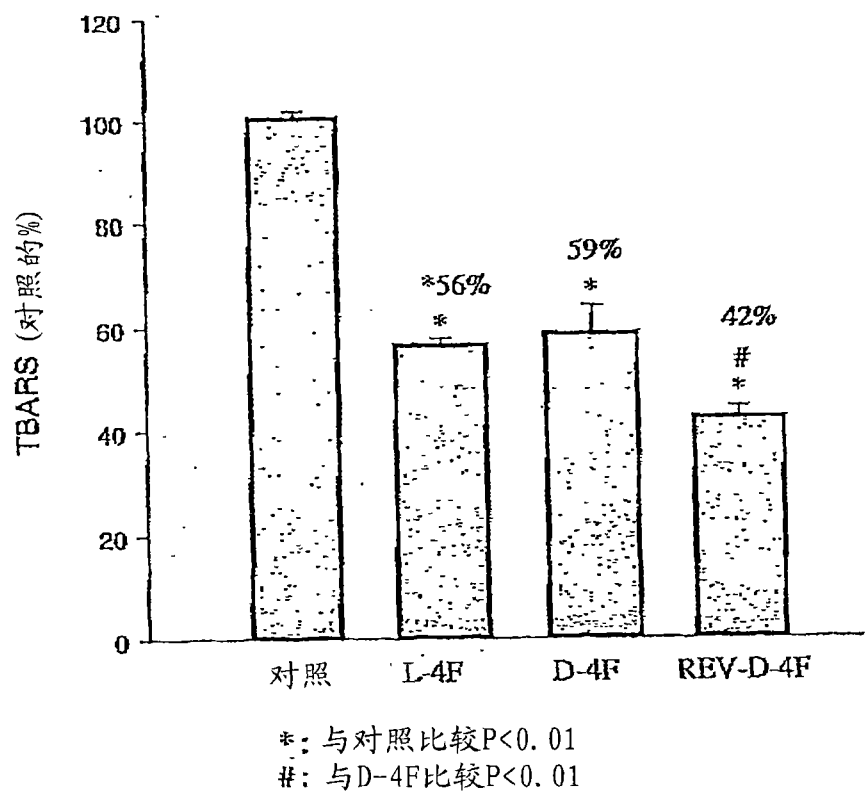


图 6

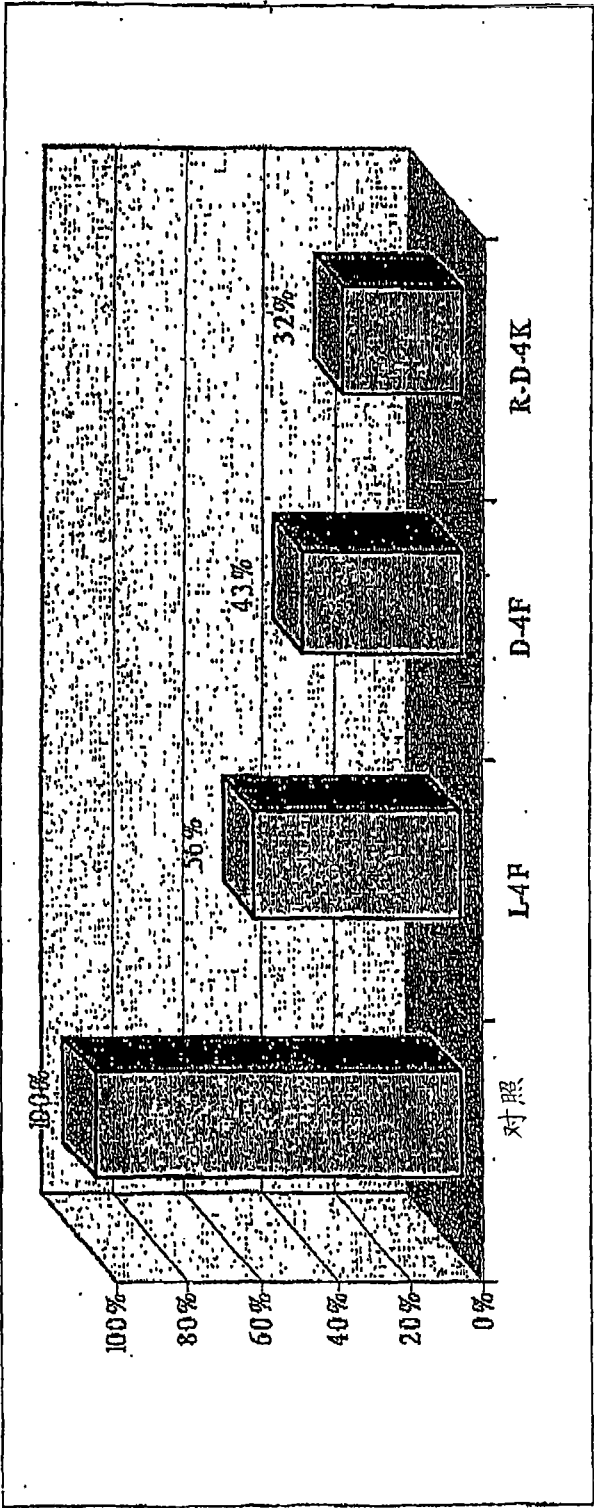


图 7