



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104039341 A

(43) 申请公布日 2014. 09. 10

(21) 申请号 201280062142. X

A61P 27/02 (2006. 01)

(22) 申请日 2012. 12. 17

A61P 27/10 (2006. 01)

(30) 优先权数据

61/576, 720 2011. 12. 16 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 06. 16

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2012/070190 2012. 12. 17

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/090931 EN 2013. 06. 20

(71) 申请人 卡乐斯治疗公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 迈克尔·科兹洛夫斯基

(74) 专利代理机构 上海胜康律师事务所 31263

代理人 李献忠

(51) Int. Cl.

A61K 38/02 (2006. 01)

C07K 14/58 (2006. 01)

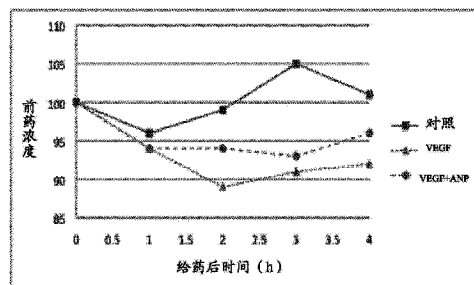
权利要求书3页 说明书30页 附图1页

(54) 发明名称

用于治疗视网膜病症和疾病的 ANP (心钠素)、BNP (脑钠素) 以及 CNP (C 型利钠肽) 相关肽及其衍生物的方法和用途

(57) 摘要

本发明提供用于治疗视网膜病症和疾病的诸如蛋白质、肽、肽模拟物、衍生物和类似物之类的 NP 化合物。



ABPE-19细胞 (ATCC) 生长于2.4厘米平底的transwell培养板上 (Corning公司) 的单层中。使用上述仪器表并 (WPI, World Precision Instruments公司) 测量跨上皮电阻 (TEER)。使用VEGF (10ng/mL) 的治疗降低了TEER值, 表示RPE细胞之间的连接被破坏。VEGF的作用被同时使用的ANP (1μM) 的治疗减弱。

1. 一种治疗需要治疗的受试者的视网膜病症或疾病的方法,其包括向受试者施用化合物,其中所述化合物包含保守的基序:(残基 1)-(残基 2)-(残基 3)-(残基 4)-(残基 5)-(残基 6)-(残基 7)-(残基 8),其中:

残基 1 是氨基酸或者其模拟物,其中主链选自 5 个或者更少原子的醚、酯、酮、烷基、亚烷基或者酰胺连接子,具有选自疏水性的、非极性以及非离子化的侧链的侧链,该侧链选自少于 12 个碳原子的苄基、烷基、亚烷基、烯基、烷基芳基;

残基 2 是氨基酸或者其模拟物,其中主链选自 5 个或者更少原子的醚、酯、酮、烷基、亚烷基或者酰胺连接子,具有侧链,该侧链是两亲性侧链、亲水性侧链、两性离子、甘氨酸 (G)、赖氨酸 (K)、精氨酸 (R)、谷氨酰胺 (Q)、和天冬酰胺 (N);

残基 3 是氨基酸或者其模拟物,其中主链选自 5 个或者更少原子的醚、酯、酮、烷基、亚烷基或者酰胺连接子,具有少于 5 个单元长的侧链、和甘氨酸 (G)、组氨酸 (H)、天冬酰胺 (N)、丝氨酸 (S)、亮氨酸 (L)、或丙氨酸 (A),但任何环其大小能为 5 或 6 个单元;

残基 4 是 5 个或更少原子的连接子或者氨基酸、醚、酯、酮、烷基、亚烷基、酰胺连接子,具有包括从 1 到约 12 个碳原子并且其上具有选自氨基、羟基、酰胺基、羧基、芳基、杂芳基和任何天然存在的 20 种氨基酸中的成分的侧链;

残基 5 是氨基酸或者其模拟物,其中主链选自 5 个或者更少原子的醚、酯、酮、烷基、亚烷基或者酰胺连接子,具有选自疏水性的、非极性的、非离子化的、脂肪族的侧链的侧链以及亮氨酸 (L)、异亮氨酸 (I)、缬氨酸 (V)、丙氨酸 (A)、或甲硫氨酸 (M);

残基 6 是氨基酸或者其模拟物,其中主链选自 5 个或者更少原子的醚、酯、酮、烷基、亚烷基或者酰胺连接子,具有极性侧链,或者氨基酸:丝氨酸 (S)、天冬氨酸 (D)、精氨酸 (R) 和谷氨酸 (E);

残基 7 是氨基酸或者其模拟物,其中主链选自 5 个或者更少原子的醚、酯、酮、烷基、亚烷基或者酰胺连接子,具有包括从 1 到约 12 个碳原子并且其上具有选自氨基、羟基、酰胺基、羧基、芳基、杂芳基和任何天然存在的 20 种氨基酸中的成分的侧链;

残基 8 是氨基酸或者其模拟物,其中主链选自 5 个或者更少原子的醚、酯、酮、烷基、亚烷基或者酰胺连接子,具有疏水性的、非极性的、和非离子化的侧链,以及氨基酸:丙氨酸 (A)、亮氨酸 (L)、异亮氨酸 (I)、缬氨酸 (V),具有选自 C1 至 C12 烷基、亚烷基和链烯基的侧链;以及

其中残基 1、残基 2、残基 3、残基 4、残基 5、残基 6、残基 7 和残基 8 中的每一个都共价地或非共价地结合到各自相邻的残基,并且其中所述化合物具有小于约 30 个残基。

2. 根据权利要求 1 中所述的方法,其中:

残基 1- 是选自苯丙氨酸 (F)、丙氨酸 (A)、亮氨酸 (L)、异亮氨酸 (I)、和缬氨酸 (V);

残基 2- 是选自甘氨酸 (G)、赖氨酸 (K)、精氨酸 (R)、谷氨酰胺 (Q)、和天冬酰胺 (N);

残基 3 是选自甘氨酸 (G)、组氨酸 (H)、天冬酰胺 (N)、丝氨酸 (S)、亮氨酸 (L)、和丙氨酸 (A);

残基 4- 是选自任意氨基酸;

残基 5- 是选自亮氨酸 (L)、异亮氨酸 (I)、缬氨酸 (V)、丙氨酸 (A)、和甲硫氨酸 (M);

残基 6- 是选自丝氨酸 (S)、天冬氨酸 (D)、精氨酸 (R)、和谷氨酸 (E);

残基 7- 是选自任意氨基酸;以及

残基 8 是选自丙氨酸 (A)、亮氨酸 (L)、异亮氨酸 (I)、和缬氨酸 (V)。

3. 根据权利要求 1 中所述的方法,其中:

残基 1- 是选自苯丙氨酸 (F)、丙氨酸 (A)、和亮氨酸 (L);

残基 2- 是选自甘氨酸 (G)、和赖氨酸 (K);

残基 3 是选自甘氨酸 (G)、天冬酰胺 (N)、丝氨酸 (S)、亮氨酸 (L)、和丙氨酸 (A);

残基 4- 是选自天然氨基酸;

残基 5- 是选自亮氨酸 (L) 和甲硫氨酸 (M);

残基 6- 是选自丝氨酸 (S)、天冬氨酸 (D)、和精氨酸 (R);

残基 7- 是选自天然氨基酸;以及

残基 8 是选自亮氨酸 (L) 和异亮氨酸 (I)。

4. 根据权利要求 3 中所述的方法,其中:残基 4- 是选自精氨酸 (R)、赖氨酸 (K)、丙氨酸 (A)、和亮氨酸 (L);和 / 或残基 7- 是选自精氨酸 (R)、脯氨酸 (P)、组氨酸 (H)、和丙氨酸 (A)。

5. 根据权利要求 1 中所述的方法,其中所述化合物包含:FGGRMDRI、FGLKLDRI、AGAALSPL、FKNLLDHL、LKSKLRAL、FGKRMDRI、FGGRIDRI、AGAALSPL、或 AGKALSPL。

6. 根据权利要求 1 中所述的方法,其中所述化合物包含 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141 或 142 个氨基酸残基,所述氨基酸残基包括所述(残基 1)-(残基 2)-(残基 3)-(残基 4)-(残基 5)-(残基 6)-(残基 7)-(残基 8)基序,或者共价地或非共价地结合到残基 1、残基 2、残基 3、残基 4、残基 5、残基 6、残基 7 或残基 8 的位置中的任何位置。

7. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述化合物具有小于约 150 个残基。

8. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述化合物具有小于约 140 个残基。

9. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述化合物具有介于约 10 个与 150 个之间的残基。

10. 根据权利要求 1 的方法,其中所述化合物具有介于约 10 个与 125 个之间的残基。

11. 根据权利要求 1 的方法,其中所述化合物具有介于约 10 个与 100 个之间的残基。

12. 根据权利要求 1 的方法,其中所述化合物的残基 1、残基 2、残基 3、残基 4、残基 5、残基 6、残基 7 或残基 8 的位置中的任何位置是 L-氨基酸、D-氨基酸、非天然存在的氨基酸、或氨基酸衍生物或类似物。

13. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述视网膜病症或疾病包括黄斑变性、增生型糖尿病视网膜病变 (PDR)、视网膜静脉闭塞、早产儿视网膜病变、弹性假黄瘤、视神经盘玻璃疣、极端近视或恶性近视变性。

14. 根据权利要求 13 所述的方法,其中所述黄斑变性包括“湿性”年龄相关性黄斑变性 (AMD)。

15. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述视网膜病症或疾病是由脉络膜血管扩展或生长进入视网膜引起的或与脉络膜血管扩展或生长进入视网膜相关联。

16. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述视网膜病症或疾病是由现有的视网膜脉管系统扩展或脉络膜血管生长进入视网膜(脉络膜新血管形成;CNV)引起的或与现有的视网膜脉管系统扩展或脉络膜血管生长进入视网膜(脉络膜新血管形成;CNV)相关联。

17. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述视网膜病症或疾病逐步恶化。

18. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述视网膜病症或疾病处于缓解期。

19. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述化合物施用于受试者的局部、区域、或全身。

20. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述化合物施用于受试者的一只眼睛或双眼。

21. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述化合物通过注射、输注、口服或局部给药。

22. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述化合物是通过玻璃体内注射施用于受试者。

23. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述治疗降低或者抑制视网膜病症或疾病的一种或多种症状的严重程度或持续时间,或减少或抑制视网膜病症或疾病的进展或恶化。

24. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述治疗降低或者抑制脉络膜血管扩展或生长进入受试者的视网膜。

25. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述受试者是视网膜病症的治疗或疗法的候选者、正在经历视网膜病症的治疗或疗法的候选者或者已经经历过视网膜病症的治疗或疗法的候选者。

26. 根据权利要求 1 所述的方法,进一步包括对所述受试者施用血管内皮生长因子(VEGF)拮抗剂或抑制剂至所述受试者。

27. 根据权利要求 26 所述的方法,其中所述化合物在施用所述血管内皮生长因子(VEGF)拮抗剂或抑制剂之前施用、与所述血管内皮生长因子(VEGF)拮抗剂或抑制剂以混合的方式基本上同时施用、或在施用所述血管内皮生长因子(VEGF)拮抗剂或抑制剂之后施用。

28. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述受试者是哺乳动物。

29. 根据权利要求 28 所述的方法,其中所述受试者是人。

用于治疗视网膜病症和疾病的 ANP(心钠素)、BNP(脑钠素)以及 CNP(C型利钠肽)相关肽及其衍生物的方法和用途

技术领域

[0001] 本发明涉及基于 ANP、BNP 和 CNP 以及其它结构上相关的肽的蛋白质、肽、和肽模拟物、以及它们的衍生物,以及用于治疗视网膜病症和疾病的方法和用途。

相关申请信息

[0002] 本申请要求 2011 年 12 月 16 日提交的、申请序列号:61/576,720 的申请的优先权,并且该申请全文通过引用特别地并入此处。

背景技术

[0003] 已经观察到,天然存在的肽、某些药物、和天然物质可以有不止一种观察到的活性。例如,许多药物有副作用,其可能出现与药物的主要预期效果完全无关的效果以及有时出现对药物的主要预期效果有害的效果。然而,并非所有的这些副作用都对正在服用这样的药物的患者的健康有害。

[0004] 在一些情况下,对天然存在的物质的效果的观察表明,这样的物质可以有一些新功用,但是在活体内该物质的主要观察到的效果可能优于 (overwhelm) 任何观察到的“新活性”。因此这样的观察留在体外或者离体探究 (curiosities) 中,因为所期望的新活性/效果仅仅是活性物质的副作用。

[0005] 这样的观察的一个例子是发现,包括 ANP、BNP、CNP、和尿扩张素的利钠肽 (NPs) 在人类中除了它们主要的心血管作用 (例如,血容量、血压和心脏功能的调节) 还具有生物活性,该生物活性包括代谢作用 (例如,脂肪代谢的控制) 和细胞生长调节 (例如,抗增殖的) 作用 [Potter, et al. Endocrine Rev. 27:47(2006) 和其中的参考文献; Vesely, D. L., Curr Heart Fail Rep. 4(3):147(2007)]。例如,已经报道了,某些 NPs 能杀死癌细胞或者无论在人类癌症的培养物中还是在人类癌症的动物模型中都能减弱它们的生长 [Baldini, et al, Cell Death Diff., 11:S210-S212(2004); Baldini, et al, Melanoma Res. 16:501-507(2006); Lelievre, et al., J. Biol. Chem, 276(47):43668, (2001); Levin, et al., Am. J. Physiol. 30:R453-R457(1991); Vesely, D. L., Eur J Clin Invest 38(8):562(2008)]。

[0006] 事实上,在 NP 类似物中已经令人惊讶的发现了抗增殖作用,并且模仿它们的肽模拟物往往表现出 NPRC- 比活性。其它已知的分子 [Baldini, et al, Cell Death Diff., 11:S210-S212(2004); Baldini, et al, Melanoma Res. 16:501(2006); Gower, et al., Mol. Cell Biochem, 293:103(2006); Lelievre, et al., J. Biol. Chem, 276(47):43668(2001); Levin E. R. and Frank, H. J. L., Am. J. Physiol. 30:R453-R457(1991)] 与这一发现的相关性很好。此外, NPRC 刺激调节 MAP 激酶 (MAPK) 信号通路 [Hashim, S., Li, Y, Anand-Srivastava, M. B., Am. J. Heart Cir. Physiol, 291:H3144-H3153(2006); Lelievre, et al., J. Biol.

Chem, 276(47):43668(2001)]。其它类型的 MAPK 抑制剂已被报道具有抗癌活性 [Dhillon, et al., Oncogen26:3279(2007)]。

[0007] 研究者已经注意到, NP 共用共同的结构特征, 该共同的结构特征可能对它们的受体结合特征和生物活性两者都有利 [He, X-L. et al, Science293:1657(2001) ;Moffatt, et al, J. Biol. Chem. 282:36454(2007) ;Potter et al. Endocrine Rev. 27:47(2006)]。这些共同的结构特征包括环结构和共用的氨基酸序列、或基序 (motif)。已经提出的这种基序的不同版本包括 CFGXXXDRIXXXGLGC [Potter, et al., Endocrine Rev. 27:47(2006)] 和 CFGXXXDRIXXXGLGCS [He, et al, Science293:1657(2001)]。在每种情况下, 两个 C 残基都被二硫桥连接。由 FGXX(L/M) DRI(G/S) 组成的 NP 基序也已经被提出 [Moffatt, et al, J. Biol. Chem. 282:36454(2007)]。该基序也在其它内源性肽中发现, 诸如骨织素 (osteocrine) 和肌肉素 (在后一种情况下, 用 L 残基替代 I 残基), 它们拥有一些 NP 的代谢作用和细胞生长调节作用, 但是缺少它们的心血管作用 [Moffatt, et al, J. Biol. Chem. 282:36454(2007) ; Nishizawa, H., et al., J. Biol. Chem. 279:19391(2004) ;Potter, et al., Endocrine Rev. 27:47(2006) 和其中的参考文献]。这种基序已经被称为利钠肽基序 (NM) [Moffatt, et al., J. Biol. Chem. 282:36454(2007)]。NP 的环结构看来是有必要的, 以便结合 NPRA 和 NPRB, 以及为获得心血管活性 [Collinson, P. O., Bus. Brief. Eur. Cardiol, 66(2005) 和其中的参考文献;Potter, et al. Endocrine Rev. 27:47(2006)], 并且 R14 残基 (根据 ANP 编号) 被认为是结合 NPRC 所必要的, 该 R14 残基是所有提出的基序的成分 [He, et al, Science293:1657(2001) ;Lancotot, et al, Patent US2007/0049251A1 ;Moffatt, et al, J. Biol. Chem. 282:36454(2007)]。

[0008] 在 NPs 的情况下, 三种特定类型的 NP 受体 (NPR) 被认为调节 NPs 的行为。A 型受体 (NPRA) 和 B 型受体 (NPRB) 被认为涉及 NP 通信, 因为它们有完整的鸟苷酸环化酶域 [Potter, et al., Endocrine Rev. 27:47(2006)]。没有鸟苷酸环化酶域的 C 型受体 (NPRC) 被认为是主要的清除受体 (即, 通过再摄取停用 NP), 但也有人认为它被连接到几个细胞内通信通路 [Gower, et al., Mol. Cell Biochem, 293:103(2006) ;Hashim et al. Am. J. Heart Cir. Physiol, 291:H3144-H3153(2006) ;Lelievre, et al., J. Biol. Chem., 276:43668(2001) ;Panayiotou et al. Proc. Brit. Pharm. Soc, 41:abs009P(2005) ; Prins, et al, J. Bio. Chem. 271:14156(1996) ;Segawa, et al., Naun.-Schmeid. Arch. Pharmacol. 357:70(1998)]。

[0009] 每个 NPs 显示与这些 NP 受体相互作用, 但它们对 NPRA、NPRB 和 NPRC 的亲和力各不相同。据推测, NP 的相对抗癌效力与它们对 NPRs 的结合亲和力有关 [Vesely, D. L., Eur J Clin Invest38:562(2008)]。

[0010] 视网膜处的新生血管生长是可对视力产生极其有害的影响的几种疾病的共同特征 [Alexander, L. J. Primary Care of the Posterior Segment. Third Edition, McGraw Hill, New York, 2002, pp94-98 ;Kanski, J. J. Age-related macular degeneration. In: Clinical ophthalmology: a systemic approach ;Butterworth, Heinemann, Elsevier, New York, 2007]。这些疾病包括增生型糖尿病视网膜病变 (PDR)、视网膜静脉闭塞、早产儿 (prematuria) 视网膜病变、“湿性”年龄相关性黄斑变性 (AMD)、弹性假黄瘤、视神经盘玻璃疣、极端近视和恶性近视变性。对于这些疾病中的前三者, 新生血管是现有视网膜脉管系统

的扩张,对于其余的疾病,是脉络膜血管生长到视网膜(脉络膜新生血管;CNV)的结果。

[0011] 无论是来自视网膜还是来自脉络膜循环的新的视网膜血管的增长都是由血管内皮生长因子(VEGF)刺激的[Ciulla, T. A., Rosenfeld, P. J. Curr Opin Ophthalmol;20:158(2009);Spaide, R. Etiology of late-age-related macular disease. In: Age related macular degeneration: A comprehensive textbook. Ilfara III, D. V., Liggett, P. E., Mieler, W. F. et al. (eds) 2006; Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia, pp23-39]。脉络膜血管侵入到视网膜也可能需要打破位于脉络膜与包含脉络膜内膜和视网膜色素上皮(RPE)细胞层的视网膜神经感觉层之间的屏障。VEGF也能促进RPE细胞之间的连接的弱化[Ablonczy, Z., Crosson, C. E. Exp Eye Res85:762(2007)]。VEGF抑制剂对由AMD(“湿性”AMD)导致的CNV的治疗是被认可的并且有效的,而且对PDR的治疗的早期结果已显示出希望[Ciulla, T. A., Rosenfeld, P. J. Curr Opin Ophthalmol;20:158(2009);Simo, R., Hernandez, C. Diabetologia51:1570(2008)]。

[0012] 不诉诸或限制本发明于特定的机械的基本原理,本文所述的发明是针对利钠肽(NPs)、类似物、其它肽及其衍生物的附加活性/作用。特别地,ANP、BNP和CNP以及其它结构上相关的蛋白质、肽、肽模拟物以及它们的衍生物对视网膜病症和疾病的治疗是有用的。NPRC-选择性NP类似物和肽模拟物也能产生NPs的活性/作用[Baldini, et al, Cell Death Diff., 11:S210-S212(2004);Baldini, et al, Melanoma Res. 16:501(2006);Gower, et al., Mol. Cell Biochem, 293:103(2006);Lelievre, et al., J. Biol. Chem, 276(47):43668(2001);Levin E. R. and Frank, H. J. L., Am. J. Physiol. 30:R453-R457(1991)]。

发明内容

[0013] 本发明提供了对视网膜病症和疾病的治疗有用的化合物。本文的包括基于ANP、BNP、CNP和其它结构上相关的肽的、诸如ANP、BNP、CNP蛋白质、肽和肽模拟物以及它们的衍生物和类似物之类的NPs的、并且在本文中统称为“NP-化合物”或简称为“化合物”的化合物任选地共享ANP、BNP、CNP和其它结构上相关的肽之间共同的保守的基序。这样的NP-化合物能可选地结合到NPRC,或者可选地调节NPRC活性。包含保守的基序但缺乏NPs或者NPRC的其它结构单元的发明化合物可以选择性的用于治疗视网膜疾病和病症,以及减少由其它结构单元引起的一种或者多种副作用,例如,减少由其它NPs或者NPRs介导的心血管或者其它副作用的发生。

[0014] NP-化合物包括含有拥有抗细胞增殖活性的基序的小肽。这种基序能够结合到C-型ANP受体,该C-型ANP受体也可以导致ERK活化的抑制。基于活性的组合,NP-化合物预期可有效地抑制活性和/或抑制VEGF的作用,这反过来将导致诸如与新血管生长(例如,血管形成)相关的视网膜病变之类的视网膜病症和疾病的治疗。NP-化合物在有关给药途径方面相比于目前有效的VEGF抑制剂有优势。目前抑制剂是大肽,并且因此必须通过玻璃体内注射给药,这是能引起严重的并发症的侵入性操作。诸如NP-化合物之类的较小的肽可能被口服或局部给药,从而减少或者避免了玻璃体内注射的并发症以允许更频繁的施用,以及除了治疗用途外还能起预防作用。

附图说明

[0015] 图 1 示出了培养基中的 RPE 细胞间的联系的由 VEGF 诱导的、作为它们的跨上皮电阻的减小而测定的弱化。这种减小因 ANP 而衰减。

具体实施方式

[0016] 本文公开了基于诸如 ANP、BNP、CNP 和其它结构上相关的肽（统称为“NP- 化合物”或简称为“化合物”）之类的 NPs 的对视网膜病症和疾病的治疗有用的蛋白质、肽和肽模拟物以及它们的衍生物。这样的 NP- 化合物包括具有与抗细胞增殖活性相关的对视网膜病症和疾病的治疗有用的保守的基序的那些化合物。因此，本发明提供了包括具有该保守的基序的化合物的 NP- 化合物，以及这样的化合物的包括例如用于治疗视网膜病症和疾病的方法在内的方法和用途。

[0017] 在各种实施方式中，NP- 化合物包括保守的基序，即八个残基的化合物，表示为（残基 1）-（残基 2）-（残基 3）-（残基 4）-（残基 5）-（残基 6）-（残基 7）-（残基 8）[式 I]，其中每个残基是连续的并且键合（共价或非共价）到各自相邻的残基。保守的基序的主链可以是直链或者环状链，诸如肽链或者肽模拟物链，一般为氨基酸序列，其可以由一种或者多种天然存在的氨基酸或者非天然氨基酸（包括 D- 或 L- 氨基酸， α 、 β 或者 γ 氨基酸，等等）组成。附加部分和 / 或残留物可以附加到该保守的基序。如本文所列的侧链可以附加到主链。因此，（残基 1）-（残基 2）-（残基 3）-（残基 4）-（残基 5）-（残基 6）-（残基 7）-（残基 8）可以有与该保守的基序的任何残基相邻的附加部分和 / 或残留物（例如，氨基酸），以及附加到该主链的侧链。

[0018] 末端残基的缺失并没有完全抑制活性，而是显著地降低活性。例如，式 1 的残基 1 和残基 8（两末端）的缺失有望降低活性比例较多，而不完全抹杀活性。因此，保守的基序也包括含有以下保守的基序化合物、肽和蛋白质：（残基 2）-（残基 3）-（残基 4）-（残基 5）-（残基 6）-（残基 7）[式 2]；（残基 2）-（残基 3）-（残基 4）-（残基 5）-（残基 6）-（残基 7）-（残基 8）[式 3]；以及（残基 1）-（残基 2）-（残基 3）-（残基 4）-（残基 5）-（残基 6）-（残基 7）[式 4]。

[0019] 每个残基 (Res)，此处指（分别如残基 1、残基 2、残基 3、残基 4、残基 5、残基 6、残基 7 和残基 8），按特异性增加的顺序被进一步限定如下文。显而易见的是，保守的基序的某些位置允许有在结构上的显著变化，而其他位置需要被特别限定。

[0020] 残基 1 是氨基酸或者其模拟物 (mimetic)，其中主链选自 5 个或者更少原子的醚、酯、酮、烷基、亚烃基或者酰胺连接子 (linker)，具有选自疏水性的、非极性的以及非离子化的侧链的侧链，该侧链选自少于 12 个碳原子的苄基、烷基、亚烃基、烯基、烷基芳基。

[0021] 残基 2 是氨基酸或者其模拟物，其中主链选自 5 个或者更少原子的醚、酯、酮、烷基、亚烃基或者酰胺连接子，具有侧链，该侧链是两亲性侧链、亲水性侧链、两性离子、甘氨酸 (G)、赖氨酸 (K)、精氨酸 (R)、谷氨酰胺 (Q)、和天冬酰胺 (N)。

[0022] 残基 3 是氨基酸或者其模拟物，其中主链选自 5 个或者更少原子的醚、酯、酮、烷基、亚烃基或者酰胺连接子，具有少于 5 个单元长的侧链、和甘氨酸 (G)、组氨酸 (H)、天冬酰胺 (N)、丝氨酸 (S)、亮氨酸 (L)、或丙氨酸 (A)，但任何环其大小可以是 5 或 6 个单元。

[0023] 残基 4 是 5 个或更少原子的连接子或者氨基酸、醚、酯、酮、烷基、亚烃基、酰胺连接

子,具有包括从 1 到约 12 个碳原子并且其上具有选自氨基、羟基、酰胺基、羧基、芳基、杂芳基和任何天然存在的氨基酸的成分的侧链。

[0024] 残基 5 是氨基酸或者其模拟物,其中主链选自 5 个或者更少原子的醚、酯、酮、烷基、亚烷基或者酰胺连接子,具有选自疏水性的、非极性的、非离子化的、脂肪族的侧链的侧链以及亮氨酸 (L)、异亮氨酸 (I)、缬氨酸 (V)、丙氨酸 (A)、或甲硫氨酸 (M)。

[0025] 残基 6 是氨基酸或者其模拟物,其中主链选自 5 个或者更少原子的醚、酯、酮、烷基、亚烷基或者酰胺连接子,具有极性侧链,或者氨基酸:丝氨酸 (S)、天冬氨酸 (D)、精氨酸 (R) 和谷氨酸 (E)。

[0026] 残基 7 是氨基酸或者其模拟物,其中主链选自 5 个或者更少原子的醚、酯、酮、烷基、亚烷基或者酰胺连接子,具有包括从 1 到约 12 个碳原子并且其上具有选自氨基、羟基、酰胺基、羧基、芳基、杂芳基和任何天然存在的氨基酸的成分的侧链。

[0027] 残基 8 是氨基酸或者其模拟物,其中主链选自 5 个或者更少原子的醚、酯、酮、烷基、亚烷基或者酰胺连接子,具有疏水性的、非极性的、和非离子化的侧链,以及氨基酸:丙氨酸 (A)、亮氨酸 (L)、异亮氨酸 (I)、缬氨酸 (V),具有选自 C1 至 C12 烷基、亚烷基和链烯基的侧链。

[0028] 如本文所限定的某些 NP- 化合物的保守基序包括“主链”,以及一个或多个附加到主链的“侧链”。举例而言,术语“主链”是由具有由 α 氨基酸构成的聚酰胺主链的天然存在的氨基酸构成的肽。在自然界中,这些往往是 L- α -氨基酸。保守的基序和向其上附加的残基可以包括一个或多个 D-氨基酸和非(不)-天然氨基酸,并且这些 D-类似物以及任何非(不)-天然氨基酸的主链被包含在主链的定义内。此外, β -氨基酸或 γ 氨基酸、 δ 氨基酸或 ϵ 氨基酸类似物也被包含在主链的定义中。由于该基序包括肽模拟物、其它部分以模仿聚酰胺主链,因此例如,由于例如提高的对酶促降解的抗性、提高的循环半衰期、提高的生物利用度、提高的疗效、延长的作用时间,等等,这种模拟物能赋予改善的生物稳定性和生物系统内(例如,患者)更长的半衰期。当提到在一个或多个残基上的肽模拟物时,“主链”包括,例如:醚、酯、酮、烷基、亚烷基或酰胺连接子,优选为 5 个或更少的原子,有附加到其上的“侧链”。

[0029] 举例而言,在天然存在的肽中,术语“侧链”是由连接到 L-聚酰胺主链上的基团构成,文献中提到的 20“侧链”是众所周知的。此外,不常见的侧链存在于自然界中,其中的一些是天然侧链的衍生物-这些被包含在“侧链”的定义中。不论侧链是以 L-构型或 D-构型的形式连接到主链,或者不论它们以 α -氨基酸、 β -氨基酸、 γ 氨基酸、 δ 氨基酸或 ϵ 氨基酸的形式位于特定的位置是无关紧要的,因为所有的都包含在侧链的定义中。术语侧链包括体现在天然存在的氨基酸和它们的变体中的功能的总称,因此巯基、砷基、羧基、氨基、酰氨基、羟基、烷基、烷芳基(或杂芳基)、芳基或杂芳基基团都包含在这个定义中。例如,示例性的疏水性侧链包括但不限于小于 12 个碳原子的苄基,烷基,亚烷基,烯基,烷基芳基。本领域技术人员鉴于说明书理解该术语“侧链”的广度和多样性。当涉及到肽模拟物时,已经将如上所定义的作为侧链的 1-3 个基团附到主链上。通常每个残基上存在多达 2 个侧链,并且更通常存在 1 个侧链(例如,残基 1、残基 2……等)。

[0030] 为了说明保守的基序,使用已知的氨基酸的寡肽,其举例说明而非限制本发明,而且为了说明非限制性的实施方式。例如,包含约 8 个氨基酸的寡肽形成保守的抗细胞增殖

基序。这样的基序可以通过增加的长度（例如，9、10、11、12、13、14、15、16、17、8、19、20 等，或更多个残基）显示出增加的活性。当然，包括在序列的一个或多个位置的非天然氨基酸、衍生物和类似物的肽模拟物，无论是在保守的基序的内部或在保守的基序的外部或附加到保守的基序上，都被包含。

[0031] 在特定实施方式中，ANP- 相关肽化合物具有的保守的基序表示为：(残基 1)-(残基 2)-(残基 3)-(残基 4)-(残基 5)-(残基 6)-(残基 7)-(残基 8)，其中残基 1 到残基 8 中的每一个定义为：

[0032] 残基 1- 疏水性的，非极性的，并且非离子化的侧链，例如包括苯丙氨酸 (F)、丙氨酸 (A)、亮氨酸 (L)、异亮氨酸 (I)、缬氨酸 (V) 的氨基酸。示例性的侧链包括烷基，亚烷基，烯基，烷基芳基，和类似物，通常小于 12 个碳原子，更通常的是 C1-C5 烷基或其上有芳基取代基的 C1-C3 烷基。

[0033] 残基 2- 是两亲性的或亲水性的侧链，其可以包括两性离子，例如包括甘氨酸 (G)、赖氨酸 (K)、精氨酸 (R)、谷氨酰胺 (Q)、天冬酰胺 (N) 的氨基酸。

[0034] 残基 3 是小尺寸的氨基酸侧链，通常为少于 5 个单元长的链，如果是烷基更优选 C1 至 C3 的长度，更优选为 C0-C2，例如包括甘氨酸 (G)、组氨酸 (H)、天冬酰胺 (N)、丝氨酸 (S)、亮氨酸 (L)、丙氨酸 (A) 的氨基酸，但任何环其大小可以是 5 或 6 个单元。

[0035] 残基 4- 是大约氨基酸大小的连接子，具有可以从 C1-C12 变化的侧链，并具有如通过在 20 种天然存在的氨基酸中发现的多样性所代表的任何成分。因此其上有与任何氨基酸类似大小的取代基的醚、酯、酮、烷基、亚烷基或酰胺连接子可能是合适的。

[0036] 残基 5- 是疏水性的、非极性的、非离子化的、脂肪族的、支链的，例如包括亮氨酸 (L)、异亮氨酸 (I)、缬氨酸 (V)、丙氨酸 (A)、或甲硫氨酸 (M) 的氨基酸。

[0037] 残基 6- 是极性的侧链，例如丝氨酸 (S)、天门冬氨酸 (D)、精氨酸 (R)、和谷氨酸 (E) 这样的氨基酸。

[0038] 残基 7- 是约氨基酸大小的连接子，具有可以从 C1-C12 变化的侧链，并具有如通过在 20 种天然存在的氨基酸中发现的多样性所表征的任何成分。因此其上有与任何氨基酸类似大小的取代基的醚、酯、酮、烷基、亚烷基或酰胺连接子可能是合适的。

[0039] 残基 8- 是疏水性的、非极性的、和非离子化的侧链，例如包括丙氨酸 (A)、亮氨酸 (L)、异亮氨酸 (I)、缬氨酸 (V) 的氨基酸。示例性的侧链将是烷基、亚烷基、烯基、和类似物，通常小于 12 个碳原子，更通常的是 C1-C5 烷基或其上有芳基取代基的 C1-C3 烷基。

[0040] 可以基于如下所选及所示的大小、极性、酸性或碱性、和疏水性，利用已知结构和已知参数来选择合适的侧链：

AA 1 字母	侧链	疏水的	pKa	极性	pI	pH	芳香族或 脂肪族	范德华 量
A	-CH ₃	X	-	-	6.01	-	-	67
C	-CH ₂ SH	X	8.18	-	5.05	酸性的	-	86
D	-CH ₂ COOH	-	3.90	X	2.85	酸性的	-	91
E	-CH ₂ CH ₂ COOH	-	4.07	X	3.15	酸性的	-	109
F	-CH ₂ C ₆ H ₅	X	-	-	5.49	-	芳香族	135
G	-H	-	-	-	6.06	-	-	48
H	-CH ₂ -C ₃ H ₃ N ₂	-	6.04	X	7.60	弱碱性的	芳香族	118
I	-CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	X	-	-	6.05	-	脂肪族	124
K	-(CH ₂) ₄ NH ₂	-	10.54	X	9.60	碱性的	-	135
L	-CH ₂ CH(CH ₃) ₂	X	-	-	6.01	-	脂肪族	124
M	-CH ₂ CH ₂ SCH ₃	X	-	-	5.74	-	-	124
N	-CH ₂ CONH ₂	-	-	X	5.41	-	-	96
P	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ -	X	-	-	6.30	-	-	90
Q	-CH ₂ CH ₂ CONH ₂	-	-	X	5.65	-	-	114
R	-(CH ₂) ₃ NH- C(NH)NH ₂	-	12.48	X	10.76	强碱性的	-	148
S	-CH ₂ OH	-	-	X	5.68	-	-	73
T	-CH(OH)CH ₃	-	-	X	5.60	弱酸性的	-	93
U	-CH ₂ SeH	X	5.73	-	-	-	-	-
V	-CH(CH ₃) ₂	X	-	-	6.00	-	脂肪族	105
W	-CH ₂ C ₈ H ₆ N	X	-	-	5.89	-	芳香族	163
Y	-CH ₂ -C ₆ H ₄ OH	-	10.46	X	5.64	-	芳香族	141

[0041] 此外,也可以考虑一个或多个氨基酸的取代、具有衍生物、类似物(肽模拟物)的主链的变化、以及如本文所述的其它变化。

[0042] 如本文所公开,本发明的包括保守的基序的NP化合物可以包括与该保守的基序的任何残基(例如,(残基1)-(残基2)-(残基3)-(残基4)-(残基5)-(残基6)-(残基7)-(残基8)中的任一项)相邻的附加部分和/或残基(例如,氨基酸或其模拟物)。通常情况下,本发明化合物中的残基算入保守的基序的数量总共将小于约150个残基(例如,氨基酸或其模拟物)。在各种具体实施方式中,残基的数量从约8个到多达约140个残基(例如,氨基酸或其模拟物)。残基的数量从约8个到多达约125个残基(例如,氨基酸或其模拟物)。在另外的实施方式中,残基的数量从约8个到多达约100个残基(例如,氨基酸或其模拟物)。在另外的实施方式中,残基的数量从约8个到多达约90个残基(例如,氨基酸或其模拟物),或介于约10个至80个残基(例如,氨基酸或其模拟物)之间,或介于约10个至70个残基(例如,氨基酸或其模拟物)之间,或介于约10个至60个残基(例如,氨基酸或其模拟物)之间,或介于约10个至50个残基(例如,氨基酸或其模拟物)之间,或介

于约 10 个至 40 个残基（例如，氨基酸或其模拟物）之间，或介于约 10 个至 30 个残基（例如，氨基酸或其模拟物）之间，或介于约 10 个至 25 个残基（例如，氨基酸或其模拟物）之间，或介于约 10 个至 20 个残基（例如，氨基酸或其模拟物）之间的长度。在具体的方面：

[0043] 虽然不希望受到任何特定理论或机制的束缚，但似乎结合到 NPRC 受体可预测活性。因此，虽然本发明的化合物包括具有和不具有该基序的物质以及具有保守的基序的不能结合 NPRC 受体的化合物，但典型的具有保守的基序的化合物能够结合 NPRC 受体，任选地，以及更典型地，能够结合具有平衡受体的 NPRC 受体，平衡受体结合亲和力到 NPRC 受体，该亲和力由至少在微摩尔范围内的 K_i 值确定。此外，似乎该保守的基序的化合物不需要形成环状结构的 C 残基，也不需要 R14 残基，该 R14 残基在所有先前确定的基序中已被认为是活性的关键。

[0044] ANP、CNP 和 BNP、以及诸如 LANP、KP、VDL、和 ANP 类似物、CANF 之类的其它相关肽共享保守的基序，所有这些都具有活性。比 ANP、LANP、KP 或 VDL 活性更弱的 CNP 在该基序的残基中的一个（L 代替 G、A、N 或 S）上具有稍大的氨基酸侧链。BNP 在此位置（K）处具有更大的侧链，以及该侧链的电子特性不同。也结合 NPRC 的小分子 ANP 衍生物还具有基于该基序可解释的结构。例如，在这些分子之一中的 R14 残基的等同物的消除并没有消除活性。因此，所有这些蛋白质、肽、模拟物、衍生物和类似物都被认为是在本文所阐述的 NP 化合物类之内。由于该保守的基序显著地不同于先前所描述的 NP 基序，并且由于 NP 基序被认为构成这些肽的心血管作用的基础，因此可预见包含该保守基序而不含 NP 基序的化合物具有所期望的活性且，比天然肽或蛋白质具有（如果有的话）更少的心血管副作用，因此也落入本发明的范围。

[0045] 在本发明中，保守的基序“残基”（即，氨基酸或其模拟物）以及它们的亚基可以是：a) 天然或非天然存在的；b) 通过化学合成生产；c) 通过重组 DNA 技术生产；d) 通过较大分子的化学的、生物化学的或酶促的片段化生产；e) 通过由上面列出的 a 至 d 的方法相结合得到的方法生产，或 f) 通过用于制备肽或氨基酸序列的任何其他手段生产。通过采用化学合成法，可能引入不是天然存在于该构造内的各种氨基酸，修饰 N- 或 C- 末端，等等，从而提供改进的稳定性（搁置或在体内）和配方、耐蛋白酶降解性等，并引入一个或多个氨基酸替代物到该构造内。

[0046] 如本文所用的术语“肽”包括由两个或更多个氨基酸（包括氨基酸的化学修饰物和衍生物）共价连接组成的任何结构。形成肽的全部或者部分的氨基酸可以是天然存在的氨基酸、这样的氨基酸的立体异构体和变型、非蛋白质氨基酸、翻译后修饰的氨基酸（例如，通过糖基化、酯或酰胺裂解，等等）、酶改性的氨基酸、具有由天然存在的部分修饰后得到的侧链部分的氨基酸、具有衍生自天然存在的部分的侧链部分的氨基酸、或者是完全合成的、或者不是天然存在的。术语“肽”还包括肽的二聚体或多聚体。“制造的”肽包括通过化学合成、DNA 重组技术、较大分子的生物化学的或酶促的片段化、上述的组合、或者在一般情况下通过涉及人工操纵的任何其它方法制成的肽。

[0047] 如本文所用的术语“氨基酸侧链部分”包括任何氨基酸的任何侧链，如同本文中定义的术语“氨基酸”。因此，这包括了存在于天然存在的氨基酸中的侧链部分。它进一步包括在改性的天然存在的氨基酸中的侧链部分，例如：天然存在的蛋白质氨基酸的立体异构体和变型、非蛋白质氨基酸、翻译后修饰的氨基酸、酶合成的氨基酸、氨基酸衍生物、设计以

模仿氨基酸的构造或结构等侧链部分。例如,本文所公开的或本领域技术人员已知的任何氨基酸的侧链部分包含在该定义之内。“氨基酸侧链部分的衍生物”包含在氨基酸侧链部分的定义范围内。

[0048] 本领域技术人员会认识到氨基酸侧链部分可以被衍生化,该衍生化包括对无论是天然存在的氨基酸侧链部分还是非天然氨基酸侧链部分的修饰或者无论是天然存在的氨基酸侧链部分还是非天然氨基酸侧链部分中的变型,其中所述修饰或变型包括,例如,但不限于:(a) 向现有的烷基、芳基、或芳烷基链加入一种或多种饱和或不饱和的碳原子;(b) 用另一种原子取代侧链中的碳,优选氧或氮;(c) 向侧链的碳原子增加末端基团,包括甲基(-CH₃)、甲氧基(-OCH₃)、硝基(-NO₂)、羟基(-OH)、或氰基(-C≡N);(d) 向包括羟基、硫醇或氨基的侧链部分加入合适的羟基、硫醇或氨基保护基团;或(e) 向包括环结构的侧链部分加入取代基或环取代基,该取代基包括羟基、卤素、烷基、或直接连接或通过醚键连接的芳基。对于氨基基团,合适的保护基是本领域技术人员公知的。提供的这样的衍生化至少保留部分活性在最终的化合物中,所有这样的衍生化都包含在“氨基酸侧链部分”的定义中。

[0049] 本文中的“氨基酸”包括天然存在的氨基酸和非天然存在的氨基酸(残基),如分别为 L- 和 D- 形式,以及它们的衍生物和类似物。天然存在的蛋白质氨基酸是由它们共同的三个字母的缩写和单字母的缩写简称(见 generally Synthetic Peptides:A User's Guide, G. A. Grant, editor, W. H. Freeman & Co., New York (1992), 将其通过参考并入此处)。“氨基酸”包括常规的 α-氨基酸以及 β-氨基酸、α, α 二取代的氨基酸和 N-取代的氨基酸,其中至少一个侧链是如本文所定义的氨基酸侧链部分。“氨基酸”还包括 N-烷基 α-氨基酸,其中 N-末端氨基基团具有 C1 ~ C6 直链的或支链的烷基取代基。因此,术语“氨基酸”包括天然存在的蛋白质氨基酸的衍生物(例如,立体异构体和变型),非蛋白质氨基酸,翻译后修饰的氨基酸,酶合成的氨基酸,氨基酸衍生物,设计以模仿氨基酸的构造或结构等。修饰的和寻常的氨基酸包含在本发明的化合物中,并通常被描述,例如,在 Synthetic Peptides:A User's Guide, cited above; Hruby V. J., Al-obeidi F., Kazmierski W., Biochem. J. 268:249-262 (1990); 和 Toniolo C., Int. J. Peptide Protein Res. 35:287 (1990) 中。

[0050] 此外,下述氨基酸以及它们的保护基团和修饰基团,包括:γ-氨基丁酸、12-氨基十二烷酸、α-氨基异丁酸、6-氨基己酸、4-(氨基甲基)环己烷羧酸、8-氨基辛酸、联苯基丙氨酸、叔丁氧羰基、苄基、苯甲酰基、瓜氨酸、二氨基丁酸、吡咯赖氨酸、二氨基丙酸、3,3-二苯基丙氨酸、orthonine、瓜氨酸、1,3-二氢-2H-异吡啶羧酸、乙基、苄氧羰基、庚酰(CH₃-(CH₂)₅-C(=O)-)、己酰(CH₃-(CH₂)₄-C(=O)-)、高精氨酸、高半胱氨酸、高赖氨酸、高苯丙氨酸、高丝氨酸、甲基、甲硫氨酸亚砷、甲硫氨酸砷、正缬氨酸(NVA)、苯基甘氨酸、丙基、异丙基、肌氨酸(SAR)、叔丁基丙氨酸、苄氧羰基。

[0051] 在本发明的化合物中,常规的氨基酸残基具有其常规含义。因此,“Nle”是正亮氨酸,等等。尽管可以预期无论是 D 残基还是 L 残基都有活性并且都包含在本发明中,但为了说明这些实例以及为了节省序列信息中的空间和时间,在实施例中列出的残基是 L-异构体构型,除非 D-异构体被指定,例如,如“D-Ala”或“D-A”为 D-丙氨酸。然而,在本发明的化合物的任何或所有位置的 D-氨基酸被包括在内。

[0052] 单个氨基酸,包括天然存在的蛋白质氨基酸的立体异构体和变型、非蛋白质氨基

酸、翻译后修饰的氨基酸、酶合成的氨基酸、包括衍生化的氨基酸的非天然存在的氨基酸、从任何前述的氨基酸衍生的 α , α -二取代的氨基酸（即, α , α -二取代的氨基酸, 其中至少一个侧链与残基的侧链相同, 该 α , α -二取代的氨基酸从该残基衍生得到）、从任何前述的氨基酸衍生的 β -氨基酸（即, 除了存在 β -碳之外, 与残基相同的 β -氨基酸, β -氨基酸从该残基衍生）等等, 包括前述的所有在此处可称为“残基”。除了 α -氨基酸的侧链部分外, 合适的取代基还包括 C1 至 C6 直链的或支链的烷基。Aib 是 α , α -二取代的氨基酸的例子。而 α , α -二取代的氨基酸可以参照用常规的 L- 和 D- 异构体命名, 但是应当理解, 这样的命名是为了方便, 以及其中 α -位的取代基不同, 这样的氨基酸可以可互换地用来表示衍生自含有所指定的氨基酸侧链部分的残基的 L- 或 D- 异构体（视情况而定）的 α , α -二取代的氨基酸。因此, (S)-2-氨基-2-甲基己酸可以用来表示衍生自 L-Nle 的 α , α -二取代氨基酸或用来表示衍生自 D-Ala 的 α , α -二取代的氨基酸。同样地, Aib 可以用来表示衍生自 Ala 的 α , α -二取代的氨基酸。每当提供 α , α -二取代的氨基酸, 应将其理解为包括其所有的 (R) 和 (S) 构型。

[0053] “N-取代的氨基酸”包括任何氨基酸, 其中的氨基酸侧链部分共价键合到主链上的氨基, 任选地, 在 α -碳位上除了 H 之外没有取代基。肌氨酸是 N-取代的氨基酸的例子。举例而言, 肌氨酸可以用来表示 Ala 衍生物的 N-取代的氨基酸, 因为肌氨酸的氨基酸侧链部分与 Ala 是相同的, 都是甲基。

[0054] 如本文中使用的术语“任何氨基酸”是指任何这样的天然存在的氨基酸或非天然存在的氨基酸（诸如 L- 形式和 D- 形式）、以及其衍生物、模拟物、改性形式以及它们的类似物。因此, 举例而言, “任何氨基酸”包括下述天然存在的残基中的任何一个, 如组氨酸、精氨酸、苯丙氨酸、丙氨酸、半胱氨酸、甘氨酸 (glycine)、谷氨酰胺、天冬氨酸、谷氨酸、赖氨酸 (lysine)、亮氨酸、甲硫氨酸、天冬酰胺、丝氨酸、酪氨酸、苏氨酸、色氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、缬氨酸、以及任何非天然的等同物、以及它们的衍生物、模拟物、改性形式和类似物。

[0055] 术语“肽模拟物”包括本文所公开的作为残基的模拟物的分子（称为“模拟物”), 包括但不限于哌嗪核心分子、酮基哌嗪核心分子和二氮杂草核心分子。除非另有说明, 否则本发明的化合物的氨基酸模拟物包括羧基基团和氨基基团两者以及对应于氨基酸侧链的基团, 或在甘氨酸模拟物的情况下, 没有氢以外的侧链。

[0056] 举例而言, 这些将包括模仿天然存在的氨基酸的立体构型、表面电荷分布、极性等的化合物, 但不必是氨基酸, 这将在生物系统内赋予稳定性。例如, 脯氨酸可以通过合适大小的其它内酰胺或内酯和取代方法取代; 亮氨酸可以被烷基酮、N-取代酰胺、以及氨基酸侧链长度上的使用烷基、烯基或其它取代基的变体取代, 其它的对于本领域技术人员可能是显而易见的。作出这样的取代的主要动因是提供与用于设计分子的残基大致相同的大小以及电荷以及构型的分子。这些变型的精制将通过测试化合物的结合力或其它分析, 以及分析构效关系来进行。这些方法是在从事药物化学和药物研发的技术人员的公知范围之内。

[0057] 本发明的 NP- 的化合物可具有一个以上的不对称中心, 并因此能够存在一个以上的立体异构形式。该化合物中一些也可以存在几何异构体和旋转异构体。此外, 本发明的一些化合物还可以具有构象的轴手性。本发明延伸到这些单独形式和以它们的混合物中的每一种, 包括外消旋体。一方面, 异构体可以通过常规的色谱法或通过使用拆分剂分离。另

一方面,单个的异构体或对映体纯的异构体,是通过诸如本文公开的方案或这些方案的变型之类的、采用使用手性中间体、试剂或催化剂的不对称合成方法的综合性方案制备的。

[0058] 保守的基序的末端或者任何包含该保守的基序的肽可以通过任何末端基团受到保护以防止降解。例如,在 C- 末端处,末端基团通过与其连接的构造的该 C- 末端的末端碳原子连接,或者通过末端羧基基团(如果提供的话)连接。末端环碳原子或者末端羧基基团(如果提供的话)可以形成残基的一部分,或者可以形成氨基酸代替物(surrogate)的一部分。例如,C- 末端封端基团形成氨基酸代替物的一部分,该封端基团是在该构造的 C- 末端位置。C- 末端封端基团包括,但不限于: $-(CH_2)_n-OH$ 、 $-(CH_2)_n-C(=O)-OH$ 、 $-(CH_2)_m-OH$ 、 $-(CH_2)_n-C(=O)-N(V1)(V2)$ 、 $-(CH_2)_n-C(=O)-(CH_2)_m-N(V1)(V2)$ 、 $-(CH_2)_n-O-(CH_2)_m-CH_3$ 、 $-(CH_2)_n-C(=O)-NH-(CH_2)_m-CH_3$ 、 $-(CH_2)_n-C(=O)-NH-(CH_2)_m-N(V1)(V2)$ 、 $-(CH_2)_n-C(=O)-N-((CH_2)_m-N(V1)(V2))-2$ 、 $-(CH_2)_n-C(=O)-NH-CH(-C(=O)-OH)-(CH_2)_m-N(V1)(V2)$ 、 $-(CH_2)_n-C(=O)-NH-(CH_2)_m-NH-C(=O)-CH(N(V1)(V2))-((CH_2)_m-N(V1)(V2))$ 、或 $-(CH_2)_n-C(=O)-NH-CH(-C(=O)-NH_2)-(CH_2)_m-N(V1)(V2)$, 包括上述基团的所有(R)或(S)构型,其中 V1 和 V2 各自独立地为 H、C1 至 C7 直链的或支链的烷基链, m 为 0 至 7 以及 n 为 0 至 2; 或任何 ω -氨基脂族基、末端芳基或芳烷基,包括诸如甲基、二甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基、戊基、己基、烯丙基、环丙甲基、己酰基、庚酰基、乙酰基、丙酰基(propionoyl)、丁酰基、苯基乙酰基、环己基乙酰基、萘基乙酰基、肉桂酰基、苯基、苄基、苯甲酰基、7'-氨基庚酰基、本领域公知的其它基团等基团; 或任何单个天然或非天然 α -氨基酸、 β -氨基酸或 α, α -二取代的氨基酸,包括上述基团的所有手性构型,任选地,与任何上述非氨基酸封端基团的组合。

[0059] 包含保守的基序的 NP- 化合物的 N- 末端,或包含该基序的化合物的 N- 末端,可以通过经由 NP- 化合物的 N- 末端的末端胺连接的末端基团连接的任何末端基团的保护防止被降解。末端胺可形成残基的一部分,或可形成氨基酸替代物的一部分。例如, N- 末端封端基团形成氨基酸替代物的一部分,其是在氨基酸替代物的 N- 末端位置。N- 末端封端基团包括,但不限于,任何 ω -氨基脂族基、酰基或终端的芳基或芳烷基,包括如甲基、二甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基、戊基、己基、烯丙基、环丙甲基、己酰基、庚酰基、乙酰基、丙酰基(propionoyl)、丁酰基、苯基乙酰基、环己基乙酰基、萘基乙酰基、肉桂酰基、苯基、苄基、苯甲酰基、7'-氨基庚酰基、本领域公知的其它基团等基团; 或者可选地 N- 末端封端基团是 $-(CH_2)_m-NH(V3)$ 、 $-(CH_2)_m-CH_3$ 、 $-C(=O)-(CH_2)_m-CH_3$ 、 $-C(=O)-(CH_2)_m-NH(V3)$ 、 $-C(=O)-(CH_2)_m-C(=O)-OH$ 、 $-C(=O)-(CH_2)_m-C(=O)-(V4)$ 、 $-(CH_2)_m-C(=O)-OH$ 、 $-(CH_2)_m-C(=O)-(V4)$ 、 $C(=O)-(CH_2)_m-O(V3)$ 、 $-(CH_2)_m-O(V3)$ 、 $C(=O)-(CH_2)_m-S(V3)$ 、或 $-(CH_2)_m-S(V3)$, 其中 V3 是 H 或 C1 至 C17 直链的或支链的烷基链,以及 V4 是 C1 至 C17 直链的或支链的烷基链以及 m 是 0 至 17。当苯环包括独立地含有羟基、卤素、烷基、或直接连接的芳基或通过醚键连接的芳基的一个或多个取代基时,苯环被“取代”。如果苯环经如此取代,则氨基酸残基可以被称为经取代的,如经取代的 Phe、经取代的 HPh。

[0060] 可以使用诸如寡核苷酸介导的(定点)诱变、丙氨酸扫描、和 PCR 诱变等本领域技术人员已知的方法来制造变体。定点诱变[Carter et al., Nucl. Acids Res., 13:4331(1986); Zoller et al., Nucl. Acids Res., 10:6487(1987)]、盒式诱变[Wellis

et al., *Gene*, 34:315 (1985)]、限制性选择诱变 [Wells et al., *Philos. Trans. R. Soc. London SerA*, 317:415 (1986)] 以及其它技术可以在克隆的 DNA 上进行,以产生本发明的化合物或其变体、衍生物、取代物或修饰物。

[0061] 所述化合物的共价修饰物落入本发明的范围内。一种类型的共价修饰包括靶向氨基酸残基与能与选定的侧链或肽的 N-末端残基或肽的 C-末端残基反应的有机衍生化试剂的反应。用双功能试剂衍生化是有用的,例如,用于交联肽至不溶于水的支持基质或表面,以在纯化抗肽抗体的方法中使用,并且反之亦然。常用的交联剂包括,例如,1,1-双(重氮乙酰基)-2-苯基乙烷、戊二醛、N-羟基琥珀酰亚胺酯,例如,具有 4-叠氮基水杨酸的酯、同双功能亚氨酸酯,包括诸如 3,3'-二硫代双(丙酸琥珀酰亚胺)之类的二琥珀酰亚胺酯、诸如双-N-马来酰亚胺-1,8-辛烷之类的双功能马来酰亚胺和诸如甲基-3-[(对-叠氮苯基)二硫代]丙酰亚胺之类的试剂。

[0062] 其他的修饰包括谷氨酰胺酰基和天冬酰胺酰基残基分别脱酰胺为相应的谷氨酰残基和天冬氨酰残基、脯氨酸和赖氨酸的羟基化、丝氨酰残基或苏氨酰残基的羟基的磷酸化、赖氨酸、精氨酸和组氨酸侧链的 α -氨基的甲基化 [T. E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W. H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983)]、N-末端胺的乙酰化、任何 C-末端羧基的酰胺化等。

[0063] 另一种类型的本发明的化合物的一个或多个残基的共价修饰包括糖基化。“糖基化”是指添加或删除一个或多个碳水化合物部分(无论是通过去除潜在的糖基化位点,还是通过利用化学和/或酶促手段删除糖基化)、和/或添加一个或多个糖基化位点,该糖基化位点可以存在于天然序列中或可以不存在于天然序列中。此外,该短语包括天然蛋白质的糖基化中的涉及存在的各种碳水化合物部分的性质和比例的改变的质的变化。

[0064] 通过改变氨基酸序列可实现该化合物的糖基化位点的添加。例如,通过添加一个或多个丝氨酸残基或苏氨酸残基(用于 O-连接的糖基化位点)或天冬酰胺(N-连接的糖基化位点)给该化合物、或通过替代该化合物的一个或多个丝氨酸残基或苏氨酸残基(用于 O-连接的糖基化位点)或天冬酰胺(N-连接的糖基化位点)可以做出这种改变。当然,该化合物可以任意地通过在 DNA 水平上的变化改变,特别是通过使 DNA 突变而改变,该 DNA 在预选碱基处编码肽、多肽,使得产生密码子,该密码子将翻译成所期望的氨基酸。增加肽、多肽上的碳水化合物部分的数量另外的方法是通过化学或酶促偶联糖苷至多肽(参见,例如, W087/05330;以及 Aplin and Wriston, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, pp. 259 (1981))。除去碳水化合物部分可通过化学或酶促方法实现,或通过编码作为糖基化的靶的氨基酸残基的密码子的突变替代实现。化学的去糖基化技术是已知的(参见,例如, Hakimuddin, et al., *Arch. Biochem. Biophys.*, 259:52 (1987) and Edge et al., *Anal. Biochem.*, 118:131 (1981))。通过使用多种内切和外切糖苷酶可以得到多肽上的碳水化合物部分的酶法分析产物(参见,例如, Thotakura et al., *Meth. Enzymol.* 138:350 (1987))。

[0065] 另一种类型的共价修饰包括联接该化合物至各种非蛋白质性质的聚合物中的任何一种,例如,聚乙二醇(PEG)、聚丙二醇(PPG)、或聚氧化烯(参见,例如, U. S. Pat. Nos. 4,640,835;4,496,689;4,301,144;4,670,417;4,791,192 和 4,179,337)。

[0066] 本发明的 NP-化合物也可以被修改以形成嵌合分子。根据本发明,有提供的化合物,其包括异源结构域。异源结构域可以是添加物或插入物。异源结构域可以包含任意的各

种不同类型的小的或大的功能部分。异源结构域的详细的、非限制性的实施例包括：例如，标记、可检测的标签和细胞毒性剂。这样的部分包括肽、核酸、碳水化合物、脂质或小的有机化合物，如药物（例如，细胞增殖剂），金属（金、银）等。

[0067] 标记和可检测的标签的具体实施例包括酶（辣根过氧化物酶、脲酶、过氧化氢酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶、氯霉素转移酶）；酶底物；配体（例如，生物素）；受体（抗生物素蛋白）；放射性核素（例如， C^{14} 、 S^{35} 、 P^{32} 、 P^{33} 、 H^3 、 I^{125} 、 I^{131} 、 Ga^{67} 和 Ga^{68} 、 Sc^{47} 、 In^{111} 、 Ra^{223} ）；T7- 标签、His- 标签、myc- 标签、HA- 标签和 FLAG- 标签；电子致密试剂；能量转移分子；顺磁性标签；荧光（荧光素、罗丹明、藻红蛋白（phycoerthrin））；发色团；化学致发光（咪唑、荧光素酶）和生物发光试剂。细胞毒性剂的具体实施例包括白喉毒素、霍乱毒素和蓖麻毒素。

[0068] 在一个实施方式中，异源结构域包含肽、异源多肽或稠合到化合物的氨基酸序列。嵌合分子可以包括融合该化合物与标签多肽，该标签多肽提供了抗标签抗体可选择性结合的表位。表位标签一般位于化合物的末端，例如，位于氨基末端或羧基末端。可以使用抗标记多肽的抗体检测表位标记的形式。另外，表位标记使化合物能够容易地通过使用抗标记抗体或结合到表位标记的其它类型的亲和基质的亲和纯化技术纯化。各种标记多肽及其各自的抗体是本领域技术人员公知的。在替代的实施方式中，嵌合分子可包括该化合物与免疫球蛋白或免疫球蛋白的特定区的融合。对于嵌合分子（也称为“免疫粘合素”）的二价形式，这样的融合可以至 IgG 分子的 Fc 区。

[0069] 例如，异源结构域的额外的实施例包括抗细胞增殖剂。抗细胞增殖剂的具体的、非限制性的实施例是本领域技术人员公知的。

[0070] 连接子序列可以被插入该化合物与异源结构域之间以使这两个实体至少部分地维持独特的功能或活性。连接子序列可以具有一种或多种属性，其中包括柔性结构、不能形成可促进任一结构域或与任一结构域相互作用的有序的二级结构或疏水性的或带电性质。通常存在于柔性蛋白区域的氨基酸包括甘氨酸、天冬酰胺和丝氨酸。其它诸如苏氨酸和丙氨酸之类的接近中性的氨基酸也可用于连接子序列。连接子序列的长度可以变化（参见，例如，美国专利：No. 6, 087, 329）。连接子还包括化学交联和共轭剂，如磺基琥珀酰亚胺基衍生物（磺基-SMCC、磺基-SMPB）、二琥珀酰亚胺辛二酸酯（DSS）、二琥珀酰亚胺基戊二酸酯（DSG）和二琥珀酰亚胺基酒石酸盐（DST）。

[0071] 用作化合物的修饰词“分离的”一词是指该化合物被操纵或由人工或被从处于其天然存在的生物体内的环境中的一个或多个其他成分隔开。一般地，如果这样的化合物存在于自然界中，化合物被分离为实质上没有通常与它们在性质上关联的一种或多种材料，例如，一种或多种蛋白质、核酸、脂质、碳水化合物、细胞膜等。因此，分离的化合物与生物体的细胞中的其它生物组分是基本分离的，其中该化合物天然存在于该生物体中，或与人工培养基是基本分离的，其中该化合物在该人工培养基中产生（例如，合成或通过细胞培养）。例如，分离的多肽基本上与其它多肽和核酸分离，并且不包括存在于数百万多肽或核酸序列中的多肽或多核苷酸的库，例如多肽库、基因组库或 cDNA 库。

[0072] 术语“分离的”不排除该化合物的其它物理形式，例如，分离的肽可以包括肽的多聚体、在其他肽内的二硫键或具有其它肽的二硫键、翻译后的修饰（例如，糖基化、磷酸化）和改性的形式或衍生的形式。术语分离也并不排除存在于给药后的受试者中的本发明的化

合物。在受试者中的这样的化合物可能因受试者服用化合物、或者在受试者服用药物前体后将药物前体形式转化成化合物产生。因此，明确的意图是，本发明的化合物包括药物前体，该药物前体在向受试者给药后转化为本发明的化合物。

[0073] 用作化合物的修饰词的术语“纯化的”是指化合物没有通常与它在性质上相关联的大部分或全部材料。因此，从细胞中分离出来的化合物，被认为是从细胞成分中分离时被纯化，而化学合成的化合物被认为从它的化学前体分离时基本上被纯化。因此，纯化物不需要绝对的纯度。此外，“纯化的”化合物可以与一种或多种其他分子结合。因此，术语“纯化的”并不排除化合物的组合。

[0074] “纯化的”化合物包括通过标准纯化方法制备的化合物。该术语还包括通过在宿主细胞中重组表达以及化学合成产生的蛋白质和核酸。“纯化的”也可以指其中的污染物水平低于人类或非人类动物用药的管理机构（例如，美国食品与药品管理局（FDA））认可的水平的化合物。

[0075] 实质纯度可以是分子质量的至少约 60% 或者更多。纯度还可以是约 70% 或 80% 或更多，并可以更大，例如，90% 或更多。纯度可以是更小，例如，在药物载体中的分子重量百分比的量可以小于 60%，但该化合物的相比于通常与它相关联的其它成分的相对比例会更大。纯度可以通过任何适当的方法测定，包括，例如，UV 光谱法、色谱法（例如，HPLC、气相）、凝胶电泳（例如，银或考马斯染色）和序列分析（肽和核酸）。

[0076] 本发明还包括在体内的用途和方法。例如，受试者可以通过施用例如，本发明的化合物治疗。

[0077] 根据本发明，提供了治疗受试者的视网膜病症或疾病的方法。这样的方法可以使用本文所阐述的任何本发明的化合物来实施。在一个实施方式中，方法包括向受试者施用能有效地治疗受试者的视网膜病症或疾病的量的具有保守的基序的化合物。

[0078] 如本文所用，术语“视网膜病症或疾病”及其语法变体是指影响视网膜的任何不良的，或不正常的情况。视网膜病症或疾病的非限制性的代表性的原因会是不良的或异常的血管生长、增殖、存活、侵入或扩展，这些情形例如，与相同组织的血管但不被认为是大于期望的或异常的参照量比较，是大于期望的或异常的。

[0079] 视网膜病症和疾病细胞（血管）生长、增殖和 / 或侵入或扩展到视网膜或其他组织。这样的疾病和病症包括由不良的、过度的或异常的血管大小或数量，或血管侵入或扩展、以及血管细胞数目、细胞生长、细胞增殖或细胞存活所表征的细胞增生条件。这样的病症和疾病的具体实施例包括脉络膜血管扩展或生长到视网膜或周围组织中。这样的病症和疾病的其它实施例包括现有的视网膜脉管系统的扩展或生长，或脉络膜血管生长为视网膜（也被称为脉络膜新生血管形成；CNV）。

[0080] 在各种实施方式中，方法包括向受试者施用治疗受试者的视网膜病症或疾病有效的量的本发明的化合物。在具体的方面，该病症或疾病是黄斑变性、增生性糖尿病视网膜病变（PDR）、视网膜静脉闭塞、早产儿视网膜病变、弹性假黄色瘤、视神经盘玻璃疣、极端近视或恶性近视变性。在进一步的方面，黄斑变性是“湿性”年龄相关性黄斑变性（AMD）。

[0081] 本发明的方法可用于减少或抑制视网膜病症或疾病，减少或抑制血管生长、存活或侵入到视网膜或附近组织中，减少或抑制视网膜病症或疾病的症状。因此，本发明的方法尤其包括：1) 减少或抑制血管生长、增殖、存活、迁移或侵入到视网膜或附近的组织中；2)

逆转或稳定血管生长、增殖、存活、迁移或侵入到视网膜或附近的组织中 ;3) 减少或抑制在视网膜或附近的组织中新血管的形成或建立 ;和 4) 减少或抑制视网膜病症或疾病的一种或多种症状。

[0082] 如本文所用,术语“治疗 (treat)”、“治疗 (treating)”、“治疗 (treatment)”及其语法变体是指使个别患者经受让该患者期望获得生理反应或结果的疗程 (protocol)、方案、过程或补救。因为不是每一个治疗的患者可能对特定治疗方法 (疗程、方案、过程或补救) 有反应,所以治疗并不要求每一位患者或患者群都实现所期望生理反应或结果。因此,尽管给定的疗程、方案、过程或补救的治疗方法将对某些患者有益,但某些患者或患者人群可能没有反应或反应小于最佳或未充分治疗。

[0083] 本发明的给药方法可以通过任何给药方式或通过包括例如全身、区域和局部给药的任何期望的途径实践,例如,在或接近视网膜病症或疾病的部位处给药。例如,受试者患有或需要治疗视网膜病症或疾病的一个或两个眼睛可通过眼睛 (多个) 的局部或区域治疗得到治疗,例如通过注射 (例如,玻璃体内注射)、滴注、或局部给药。

[0084] 示例性的给药途径包括注射 (例如,玻璃体内注射)、输注、静脉内的、动脉内的 (intrarterial)、皮内、肌内、皮下、胸腔、局部、透粘膜、眼内、口腔 (消化道) 和粘膜。特殊的给药途径可以部分根据视网膜病症或疾病的类型,以及药理学、生物利用度、化合物的稳定性等而定。

[0085] 本发明的方法尤其包括,提供在给定的受试者的条件中可检测的或可测量的改善的方法,该改善例如减轻或改善一种或多种病因、不利的 (物理的) 症状或与视网膜病症或疾病相关的后果,即,治疗效果或有益效果。治疗效果或有益效果是在视网膜病症或疾病中任何客观的或主观的、瞬间的、临时的、或长期的改善,或降低与视网膜病症或疾病相关联或由其引起的不良症状的发病、严重性、持续时间或频率。例如,当视网膜病症或疾病的一种或多种相关联的病状、不良症状或并发症的严重程度、持续时间或频率出现增加的或部分的减少,或视网膜病症或疾病的一种或多种生理学的、生物化学的或细胞的表现或特征出现抑制或逆转时,根据本发明的治疗方法就实现了令人满意的临床目的。因此,治疗效果或改善可以是治愈,如视网膜病症或疾病的破坏、或与视网膜病症或疾病相关的或由视网膜病症或疾病引起的大多数或所有的病状、不良症状或并发症中的一种或多种的消除。然而,治疗效果或改善不需要完全治愈或消除与视网膜病症或疾病相关的或由视网膜病症或疾病引起的所有的病状、不良症状或并发症。例如,减缓或延缓视网膜病症或疾病的进展或恶化,降低或抑制视网膜病症或疾病的进展或恶化,稳定视网膜病症或疾病,减少或降低血管的数量、或血管侵入或扩展 (血管形成) 到如视网膜 (例如,脉络膜血管扩展或生长到视网膜中) 或其它组织,或者降低或抑制血管细胞的数量、细胞生长、细胞增殖或细胞存活,或减少或抑制与任何由本发明的 NP 化合物引出的前述相关的一种或多种症状的严重程度、频率或持续时间,都落入本发明的方法和用途中。

[0086] 相应地,在各种实施方式中,方法或用途减缓或延缓视网膜病症或疾病的进展或恶化,降低或抑制视网膜病症或疾病的进展或恶化,稳定视网膜病症或疾病,减少或降低血管的数量、或血管侵入或扩展 (血管形成) 到如视网膜 (例如,脉络膜血管扩展或生长到视网膜中) 或其它组织中,减少或抑制血管细胞的数量、细胞生长、细胞增殖或细胞存活,或减少或抑制与任何前述相关的一种或多种症状的严重性、频率或持续时间。

[0087] 发明方法可能不会立即生效。例如,治疗之后可能没效果,或甚至出现视网膜病症或疾病的加重或恶化,但随着时间的推移在相应受试者中会出现对视网膜病症或疾病的预期的如本文所阐述或本领域技术人员已知的作用或活性。

[0088] 视网膜和/或脉管系统(血管密度、长度、数量等)的检查可以确定治疗的任何作用或本发明的化合物的用途。视网膜疾病和病症的其他症状如果有的话,可以被确定以测定治疗的作用。CNV 的发生和其治疗的有效性可以通过荧光血管造影、眼底断层摄影、眼底摄影、以及诸如视场分析或阿姆斯勒方格测试之类的功能装置来监测。

[0089] 本发明的化合物和方法可以与任何其他提供了期望的效果的治疗或治疗方法相结合。特别是,已表征为在视网膜疾病和病症(包括其症状)的治疗方面具有有益活性或功能的治疗和治疗方法都是适用的。示例性的治疗 and 治疗方法包括血管内皮生长因子(VEGF)的抑制剂和拮抗剂,即抗 VEGF 治疗方案、试剂和药物,以及抗细胞增殖疗程、治疗方案、试剂和药物。这样的治疗 and 治疗方法可以在本发明的任何其它方法之前进行或与其基本上同时进行。

[0090] 因此,本发明提供了组合方法和用途,其中任何的 NP 化合物与任何治疗方案、疗程或合剂组合使用、或以组合的方式给药(连续、顺序地或同时地)。在一个实施方式中,方法包括向受试者施用具有保守的基序的化合物和 VEGF 拮抗剂或抑制剂。可以在施用该化合物之前或基本上与之同时或者以与其混合的方式或在其之后施用血管内皮生长因子(VEGF)拮抗剂或抑制剂、或抗细胞增殖治疗、试剂或药物。

[0091] 如本文所用,“抗细胞增殖”、治疗、疗法、活性或效果是指任何对与异常的或不期望的细胞增殖(增生)、细胞增生性疾病、肿瘤、癌症或瘤形成、或转移相关的或由其引起的病状、不良症状或并发症治疗有用的治疗、治疗方案、试剂、药物、疗程或处理。抗细胞增殖治疗和疗法的实施例包括化学疗法、免疫疗法、放射疗法(电离或化学药品)、局部或区域热(高热)疗法和手术切除。

[0092] 本发明的方法还尤其包括导致降低另一种治疗方法或治疗方案、处理或补救的需求和使用的方法。例如,如果在给定的受试者中导致另一种治疗(如抗-VEGF 治疗或疗法)的频率降低或剂量的减少或消除,则本发明的方法对视网膜病症或疾病具有治疗效果。

[0093] 治疗方法或用途的剂量或“有效量”或“足够量”是预期具有效果(诸如治疗效果或改善)的量,其中包括:例如,一种、几种或全部与视网膜病症或疾病相关的或由其引起的病状、不良症状或并发症的任何客观的或主观的缓解或改善到可测量的或可检测的程度,尽管预防、抑制或延缓视网膜病症或疾病、不良症状或并发症的进展或恶化是令人满意的结果。因此,在视网膜病症或疾病的情况下,该量优选是有效的或足以向给定的受试者提供治疗效果,或减轻或改善给定的受试者的视网膜病症或疾病的病状、不良症状或并发症。根据治疗的状态或特殊的视网膜病症或疾病或该治疗或疗法的任何副作用所指示的,该剂量可以按比例增加或减少。

[0094] 示例性的非限制性的量(剂量)是在约 0.1 毫克/千克至约 100 毫克/千克的范围内,以及任何数值或该范围内的范围或值。可以施用更大的或更小的量(剂量),例如 0.01-500 毫克/千克,以及任何数值或范围或该范围内的值。附加的示例性的非限制性的量(剂量)的范围在约 0.5-50 毫克/千克、1.0-25 毫克/千克、1.0-10 毫克/千克,以及任何数值或范围或该范围内的值。

[0095] 本发明的方法可以每日、每周、每月或每年实施一次或数次（例如，1-10、1-5 或 1-3 次）。本领域技术人员将知道什么时候适合调整给药方案，例如增加、或减少、延迟或中断给药。示例性的非限制性的剂量时间表是每周 1-7 次，每 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20 或更多周 1-7 次，以及任何数值或范围或该范围内的值。

[0096] 当然，这是任何治疗或疗法的典型，不同的受试者将表现出对治疗不同的反应，以及一些可能对特殊的治疗方法或用途没反应或反应不充分。因此，有效量或足够量将至少部分取决于所治疗的病症（例如，视网膜病症或疾病的种类、严重程度、阶段等）、预期的治疗效果，以及个体差异（例如，受试者的生物利用度、性别、年龄等）和受试者基于遗传和表观遗传变异（例如，药物基因组学）对治疗的反应。

[0097] 术语“受试者”和“患者”在本文可互换使用，并指动物，通常为哺乳动物，例如人类、非人类灵长类动物（大猩猩、黑猩猩、猩猩、猕猴、长臂猿）、驯养动物（狗和猫）、农场和牧场动物（马、牛、山羊、绵羊、猪）、实验室和实验动物（小鼠、大鼠、兔、豚鼠）。受试者包括疾病模型动物（例如，如小鼠、大鼠和非人类灵长类），用于针对视网膜病症或疾病在体内的功效的研究。人类受试者包括年龄介于 1-5、5-10 和 10-18 岁之间的儿童，例如，新生儿、婴儿、幼儿和青少年，年龄介于 18-25 岁之间的青壮年，年龄介于 25-60 岁之间的成年人和例如年龄介于 60-65、65-70 以及 70-100 岁之间的老年人。

[0098] 受试者包括需要治疗的哺乳动物（如人类），也就是说，他们有视网膜病症或疾病。受试者还包括那些在有视网膜病症或疾病的风险中的群体。受试者进一步包括：由于授权这种治疗的临床或实验室诊断，需要接受视网膜病症或疾病治疗或疗法的受试者、正经历视网膜病症或疾病治疗或疗法的受试者，和已经经历了视网膜病症或疾病的治疗或疗法的并有复发或再发风险的，包括从视网膜病症或疾病中得到缓解但可能有复发的风险的受试者。

[0099] 有风险的受试者包括那些有视网膜病症或疾病的家族病史、遗传倾向、或者已经遭受过视网膜病症或疾病的先前的痛苦且存在复发或再发的风险的受试者。有风险的受试者包括老年受试者。

[0100] 因此，有风险的受试者可以被治疗以抑制或降低发展为视网膜病症或疾病的可能性，或抑制或降低视网膜病症或疾病已被治愈或治疗后遭受相同或不同的视网膜病症或疾病的复发或再发的可能性。这样的治疗的结果可以是降低形成视网膜病症或疾病的风险，或预防经治疗的有风险的受试者的视网膜病症或疾病、或病理学、不良症状或并发症。

[0101] 本发明进一步提供试剂盒，包括本发明的化合物、改性和变体形式、以及药物制剂，这些组分包装到适合的包装材料中，任选地与用于使用该试剂盒组分的说明组合，例如，用于执行本发明的方法的说明。在各种实施方式中，试剂盒包括本发明的化合物与用于治疗视网膜病症或疾病的说明。

[0102] 术语“包装材料”是指容纳试剂盒的组分的物理结构。该包装材料可以保持组分无菌，并可以由通常用于这种目的材料制成（例如，纸、波纹纤维、玻璃、塑料、箔、安瓿等）。标签或包装插入物可包括适当的书面说明，例如，实现本发明的方法或用途（例如，治疗视网膜病症或疾病）。因此，在其他的实施方式中，试剂盒包括含有用于在溶液中、体外、体内或离体实现本发明的方法或用途的说明的标签或包装插入物。

[0103] 因此，说明可以包括用于实现本文所述的发明的任何方法的说明。例如，本发明的

NP 化合物可以连同给受试者用药以治疗视网膜病症或疾病的说明书包装在容器、包装、或分配器中。说明还可以包括：满意的临床目的或不良症状或可能发生的并发症、储存信息、有效期、或者如美国食品和药物管理局这样的监管机构所要求的在人类受试者中使用的任何信息。

[0104] 该说明可以在“印刷品”上，例如，在试剂盒中的纸或纸板上，贴在试剂盒或包装材料的标签上，或连接到包含试剂盒的组分的小瓶或管上。说明可以包括语音或视频磁带以及额外地包含在计算机可读介质上，诸如磁盘（硬盘）、如 CD- 或 DVD-ROM/RAM 之类的光学 CD、磁带、如 RAM 和 ROM 之类的电子存储介质以及如磁性 / 光学存储介质的这样的混合介质。

[0105] 本发明试剂盒还可以包括缓冲剂、防腐剂或稳定剂。该试剂盒还可以包括用于活性分析的对照成分，例如，对照样品或标准样品。试剂盒的每个成分可以封装在单独的容器或以混合物的形式封装，所有的各种容器可以在单个或多个包装内。

[0106] 本发明的化合物，以及本发明的其它组分和方法可以被包含在药物制剂中或采用药物制剂。这样的药物制剂对受试者的体内或离体的治疗，或向受试者给药或传递到受试者是有用的。

[0107] 药物制剂包括“药学上可接受的”和“生理学上可接受”的载体、稀释剂或赋形剂。如本文所用，术语“药学上可接受的”和“生理学上可接受的”包括与药物施用相容的溶剂（水性或非水性）、溶液、乳液、分散介质、包衣、等渗剂和吸收促进或延迟剂。这样的制剂可以包含在液体中：乳剂、混悬剂、糖浆剂或酏剂中；或可以是固体形式：片剂（包衣或未包衣）、胶囊（硬或软）、粉末、颗粒、晶体、或微珠。补充的化合物（例如，防腐剂、抗菌、抗病毒和抗真菌剂）也可以掺入制剂中。

[0108] 药物制剂可制成能与特定的局部、区域、全身、或组织或器官系统的施用或递送模式或途径相容。因此，药物制剂包括载体、稀释剂、或适合于特定途径给药的赋形剂。本发明的组分的给药途径的具体的非限制性的实施例是通过输注或注射，例如，静脉内、动脉内、皮内、肌内、皮下、胸腔、局部、透粘膜、颅内、眼内、视网膜、口服（消化道）、粘膜给药、以及适合所述方法或用途的任何其他方式。

[0109] 用于胃肠外应用的溶液或悬浮液可包括：无菌稀释剂，如注射用水、生理盐水溶液、固定油、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其它合成溶剂；如苄醇或对羟基苯甲酸甲酯等抗菌剂；如抗坏血酸或亚硫酸氢钠等抗氧化剂；如乙二胺四乙酸等螯合剂；如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐等缓冲剂和如氯化钠或葡萄糖等调节张力的试剂。pH 可以用如盐酸或氢氧化钠之类的酸或碱调节。

[0110] 用于注射的药物制剂包括无菌水溶液（其中水可溶）或分散体和用于临时制备无菌注射水溶液或分散体的无菌粉末。对于静脉内给药，合适的载体包括生理盐水、抑菌水、Cremophor EL™ (BASF, 新泽西州帕西帕尼) 或磷酸盐缓冲盐水 (PBS)。载体可以是溶剂或分散介质，其包括，例如水、乙醇、多元醇（例如，甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等）、及其合适的混合物。例如，通过使用如卵磷脂之类的包衣，通过所要求的粒径在分散液中的维持和通过使用表面活性剂可以保持流动性。抗菌和抗真菌剂包括，例如，对羟基苯甲酸酯类、氯丁醇、苯酚、抗坏血酸和硫柳汞。组成中可以包含等渗剂，例如糖、如甘露醇、山梨醇之类的多元醇、氯化钠。包括例如单硬脂酸铝或明胶之类的延迟吸收的试剂可以延长可注射组分的

吸收。

[0111] 可无菌注射制剂可通过在适当的溶剂中与一种或以上成分的组合掺入所需量的 NP 化合物来制备。通常,分散体通过将活性化合物掺入含有基本分散介质和任何其他成分的无菌载体来制备。在用于制备可无菌注射液的无菌粉末的情况下,制备方法包括,例如,真空干燥和冷冻干燥,其从预先制备的活性成分加上任何其他期望成分的溶液产生活性成分加上任何其他期望成分的粉末。

[0112] 对于经粘膜或透皮给药,适于待渗透的屏障的渗透剂用于制剂中。这样的渗透剂是本领域公知的,并且例如,对于经粘膜给药,包括洗涤剂、胆汁盐和梭链孢酸衍生物。经粘膜给药可通过使用鼻喷雾剂、吸入装置(例如,抽吸器)或栓剂来实现。对于经皮给药, NP 化合物配制成软膏剂、油膏剂、凝胶剂、乳膏剂或贴剂。

[0113] 药物制剂可以使用保护药物免于快速从体内消除的载体来制备,如控释制剂或如单硬脂酸甘油酯或硬脂酸甘油酯之类的延时材料。该制剂也可使用如植入物和微囊化的递送系统之类的制品来输送,以实现局部、区域或全身递送或控释或缓释递送。

[0114] 诸如乙烯乙酸乙烯酯、聚酯、聚乙醇酸、胶原蛋白、聚原酸酯和聚乳酸之类的可生物降解的、生物相容的聚合物可以被使用。用于制备这样的制剂的方法是本领域技术人员公知的。该材料也可以从 Alza 公司(帕洛阿尔托,加利福尼亚州)购得。脂质体混悬液(包括靶向细胞的脂质体或使用抗体的组织或病毒衣壳蛋白)也可以用作药学可接受的载体。这些可根据已知的方法(例如,如在美国专利:No. 4,522,811 中所述的)制备。

[0115] 适于给药的额外的药物制剂是本领域公知的(见,例如, Gennaro(ed.), Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th ed., Lippincott, Williams & Wilkins (2000); Ansel et al., Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, 7th ed., Lippincott Williams & Wilkins Publishers (1999); Kibbe(ed.), Handbook of Pharmaceutical Excipients American Pharmaceutical Association, 3rd ed. (2000); 和 Remington's Pharmaceutical Principles of Solid Dosage Forms, Technomic Publishing Co., Inc., Lancaster, Pa., (1993))。

[0116] 按照本发明使用的化合物,包括药物制剂,可以以剂量单元形式进行包装以易于给药和剂量的均匀性。如本文所用的“剂量单元形式”是指适合作为单一剂量治疗的物理上分离的单元;每个单元都包含与载体、赋形剂、稀释剂、或媒介物相关联的经计算能产生所期望的治疗或治疗性(例如,有益的)效果的一定数量的化合物。该单元剂量形式将取决于多种因素,包括但不必限于:所使用的特定化合物、要达到的效果、以及待治疗的受试者的药效学和药物基因组学。

[0117] 按照本发明,提供了确定化合物具有活性的方法,以及用于测定化合物的活性的方法。在一个实施方式中,方法包括筛选用于抑制细胞增殖的化合物。被确定抑制细胞增殖的化合物是具有抗细胞增殖活性的化合物。在另一实施方式中,方法包括筛选用于结合 NPRC 或激活 NPRC 的化合物。被确定结合到 NPRC 或激活 NPRC 的化合物是具有抗细胞增殖活性的化合物。在又一实施方式中,方法包括筛选抑制血管细胞生长、增殖、存活或侵入的化合物。

[0118] 为了计算,评估或鉴定给定的化合物的活性或活性的量,可以使用多种分析方法。例如,细胞毒性和活力(细胞凋亡、裂解、生长增殖等)能以本领域中已知的比色法、

发光法、辐射法、或荧光法为基础进行测量。比色技术,例如,台盼蓝排除法 (Trypan Blue exclusion) 可用于确定细胞活力。简言之,细胞用台盼蓝染色,并用血细胞计数器计数。活细胞排除染料而死亡的和濒死的细胞吸收蓝色染料并且在光显微镜下很容易区分。中性红被活细胞吸附并在细胞溶酶体中聚集;可以使用光学显微镜通过确定中性红染色的细胞的数目来确定活细胞。

[0119] 测定细胞活力的荧光技术包括,例如,碘化丙啶,一种荧光 DNA 嵌入剂。碘化丙啶被活细胞排除但染色死细胞的细胞核。碘化丙啶标记的细胞的流式细胞仪然后可以用于定量活细胞和死细胞。乳酸脱氢酶 (LDH) 的释放表示结构损伤和细胞死亡,并且可以通过分光光度酶测定法来测定。溴脱氧尿嘧啶核苷 (BrdU) 被掺入到新合成的 DNA 并且可以用荧光染料标记的抗体来检测。荧光染料赫斯特 33258 标记 DNA 并且可以用于定量细胞的增殖 (例如,流式细胞仪)。荧光染料羧基荧光素二醋酸盐琥珀酰亚胺酯 (CFSE 或 CFDA-SE) 的定量掺入能提供细胞分裂分析 (例如,流式细胞仪)。此技术可用于在体外或体内。7-氨基放线菌素 D (7-AAD) 是经历与 DNA 有关的光谱移动的荧光嵌入剂,并且可以提供细胞分裂分析 (例如,流式细胞仪)。

[0120] 确定细胞增殖的辐射技术包括,例如, [^3H]-胸苷,它被掺入到活细胞的新合成的 DNA,并经常用于测定细胞的增殖。通过闪烁计数可以确定从死细胞释放的铬 (^{51}Cr) 的量以定量分析细胞活力。

[0121] 确定细胞活力的发光技术包括,例如,CellTiter-Glo 发光的细胞活力测定法 (Promega, 麦迪逊, 威斯康星州)。该技术确定存在的 ATP 的量来确定活细胞的数量。

[0122] 用于确定细胞活力和细胞的增殖性,以及因此确定本发明的化合物的抗细胞增殖活性的程度的商购试剂盒包括,例如,细胞增殖 Biotrak ELISA (Amersham Biosciences 皮斯卡塔韦, 新泽西州);Guava ViaCount™ 测定法,其基于荧光试剂的差分吸收提供快速的细胞计数和活力测定 (Guava Technologies, 海沃德, 加州);CyQUANT® 细胞增殖测定试剂盒 (Molecular Probes, Inc., 尤金, 俄勒冈州);和 CytoLux 检测试剂盒 (PerkinElmer Life Sciences Inc., 波士顿, 马萨诸塞州)。DELTA® 检测试剂盒 (PerkinElmer Life Sciences Inc., 波士顿, 马萨诸塞州) 可使用时间分辨荧光法测定细胞的增殖性和活力。Quantos™ 细胞增殖测定是测量来自裂解细胞 (Stratagene, 拉霍亚, 加州) 的 DNA 染料复合物的荧光的基于荧光的检测。CellTiter-Glo 细胞活力检测是用于测量细胞活力的发光检测 (Promega, 麦迪逊, 威斯康星州)。

[0123] 术语“接触”在参考如化合物 (例如,具有用于治疗视网膜病症或疾病的活性的保守的基序的化合物)、材料、样品或治疗物等组分使用时,是指该化合物和其它参考的实体之间的直接或间接的相互作用。直接相互作用的具体实施例是结合到 NPR。间接相互作用的具体实施例是该化合物作用于中间分子,中间分子反过来作用于参考的实体。因此,例如,使用本发明的化合物接触细胞,包括允许该化合物结合到细胞,或允许该化合物作用于中间体 (例如,受体),而该中间体反过来作用于细胞。

[0124] 术语“化验”和“测量”及其语法变体在本文可互换使用,并指任何定性或定量测定,或者定性和定量测定两者。当这些术语在参考活性使用时,设想有评估相对活性的任何手段,包括本文所述以及本领域中已知的各种方法。

[0125] 按照本发明,还提供了制备本发明的化合物的方法。在一个实施方式中,方法包括

使用编码化合物的核酸转化宿主细胞以及在允许所编码的化合物表达的条件下培养宿主细胞,以及任选地从转化的细胞分离或纯化化合物。

[0126] 因此,也提供了如本文所述表达本发明的化合物的宿主细胞。在具体实施方式中,被编码具有有抗细胞增殖活性的保守的基序的化合物的核酸转化的宿主细胞表达该化合物。

[0127] 除非另有定义,否则本文所使用的所有技术和科学术语具有的含义与本发明涉及的领域的普通技术人员通常理解的相同。虽然类似或等同于本文描述的方法和材料可以用于实践或试验本发明,但本文描述了合适的方法和材料。

[0128] 所有出版物、专利、Genbank 登录号和本文引用的其它参考文献通过参考以其整体并入。在冲突的情况下,以本说明书(包括定义)为准。

[0129] 如本文所用,单数形式“一(a)”、“一个(an)”以及“该”包括复数对象,除非上下文另有明确说明。因此,例如,提到“化合物”或“肽”或“模拟物”包括多个化合物、肽或模拟物,以及提及“治疗或疗法”可以包括多个同时的、按次序的或连续的治疗或疗法等等。

[0130] 如本文所用,所有数值或数值范围包括范围内全部整数或涵盖这样的范围以及这些值的分数或范围内的整数或涵盖范围的整数,除非上下文另有明确说明。因此,例如,提及的范围为8至50,包括范围内任何数值或范围或涵盖这样的值,例如8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30等等。

[0131] 本发明通常是通过在文中使用肯定的语言来描述许多实施方式而公开的。本发明还具体地包括这样的实施方式,其中特定的主题全部或部分被排除,如物质或材料、方法步骤和条件、疗程、过程、测定或分析。因此,尽管本发明一般不以本发明不包括什么的方式表达,但未明确包括在本发明中的方面还是被披露。

[0132] 已经描述了本发明的一些实施方式。然而,应理解的是,可以进行各种修改而不脱离本发明的精神和范围。因此,以下实施例旨在说明而不是限制在权利要求中描述的本发明的范围。例如,下面的非限制性的实施例包括用于确定活性的方法,以及描述了有限数量的示例性的肽和使用方法。这些示例性的组分和治疗方法不限制本发明,而是提供一般性指导以制备和使用本发明的化合物、组分以及使用本发明的方法。

[0133] 因此,本文的研究不应被理解为具体地限制本发明以及本发明的这种变型,本领域技术人员认知范围内的现在已知的或以后开发的这样的变形将被认为落入如本文所述的本发明以及在下文中的权利要求主张的范围之内。例如,在以下所示的示例性肽的每一种情况下,本发明的化合物可被示例性的肽取代。

[0134] 本文中使用的商标仅为实施例,反映在发明时使用的说明材料。本领域技术人员将认识到预计制造工艺等的变化很多。因此本实施例中,并且在它们中所使用的商标都是非限制性的,并且它们的意图并非限制性的,而仅仅是本领域技术人员可以选择如何执行本发明的一个或多个实施方式的说明。

实施例

实施例 1

[0135] 本实施例描述制备包括保守的基序的肽、蛋白质、片段和模拟物物的一般方法。

[0136] 期望的肽片段可化学合成。替代的方法包括通过酶消化产生肽片段,例如,通过使用酶处理蛋白质,该酶在由特定氨基酸残基限定的位点裂解蛋白质,从而产生肽片段。另

一种替代的方法涉及遗传方法。这样的技术包括表达编码该化合物的基因的全部或部分导入宿主细胞,如哺乳动物细胞、HeLa 细胞或 Cos 细胞或大肠杆菌。这样的宿主细胞可表达全长或片段,例如,单链抗体(参见,例如,Whitlow et al., In: Methods: A Companion to Methods in Enzymology 2:97 (1991), Bird et al., *Science* 242:423 (1988); 和美国专利号 4,946,778)。例如,使用合适的限制性内切酶消化编码肽化合物的 DNA,并分离期望片段,以及将其插入用于所述经编码的肽化合物的细胞表达的载体中。另一种合适的技术涉及通过聚合酶链式反应 (PCR) 分离和扩增编码期望多肽片段的 DNA 片段。限定 DNA 片段的期望末端的寡核苷酸被 PCR 中的 5' 引物和 3' 引物采用。

[0137] 在肽的制备中,变体的制造可以使用本领域中已知的不同的方法,诸如寡核苷酸介导的(定点)诱变、丙氨酸扫描、和 PCR 诱变。定点诱变 [Carter et al., *Nucl. Acids Res.*, 13:4331 (1986); Zoller et al., *Nucl. Acids Res.*, 10:6487 (1987)]、盒式诱变 [Wells et al., *Gene*, 34:315 (1985)]、限制性选择诱变 [Wells et al., *Philos. Trans. R. Soc. London SerA*, 317:415 (1986)] 或其它已知的技术可以在克隆的 DNA 上操作以产生变体 DNA。

实施例 2

[0138] 本实施例描述了表示有保守的基序的两种示例性的肽具有活性的数据。本实施例中还包括用于确定抗细胞增殖活性的基于细胞的示例性的试验描述。

[0139] 人胰腺癌细胞 (HPAC) 细胞自 ATCC 获得并在含有 2.5mM 谷氨酰胺、2mg/mL 的胰岛素、5ug/mL 转铁蛋白、1ng/mL EGF (表皮生长因子)、加 5% FBS (胎牛血清) 的达尔伯克改良伊格尔培养基与 Ham 氏 F12 培养基 (DME-F12) (1:1) 中繁殖。细胞培养物在 37°C 下,在 100% 的湿度气氛中 5% CO₂ 中培养。将细胞常规地引入 T- 烧瓶中汇合,用磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 漂洗,并用胰蛋白酶在室温下处理 5 分钟。用 10ml 培养基从平板上冲洗胰蛋白酶处理的细胞并计数。传代培养的活力普遍 ≥ 95%。

[0140] 100uL 培养基中约 10,000 个细胞放置于 96 孔板的每个孔中并培养过夜。使用具有以下序列的肽:精氨酸-15-半胱氨酸 (RSSCAGAALSPLGAC);脯氨酸-15-缬氨酸 (PNEEAGAALSPLPEV);丙氨酸-8-亮氨酸 (AGALSPL);C-ANP4-23 (RSSCFGGRIDRIGAC) 和,VDL (EVVPPQVLSEPNEEAGAALSPLPEVPPWTGEVSPAQR)。将肽溶解在 PBS 中并无菌过滤。将肽稀释到细胞培养基到以下的最终浓度:1、0.3、0.1、0.03 和 0.01uM。每个肽在 5 个重复孔中测试。将培养物在 37°C 下培育额外的 48 小时。

[0141] 使用 Calbiochem 公司的快速细胞增殖试剂盒 (目录号 QIA127) 测定细胞的活力。每个孔中加入 10 uL Calbiochem 公司显色剂并在 37°C 下培育额外的 1.5 小时。使用 Molecular Devices Thermomax 的酶标仪读取 450nm 处的光学密度。该板的模板示于表 I 中 (未标记孔含有细胞但没有肽并用作空白)。结果列于表 I,并以图形方式示于图 1 和图 2。

表 I. 96 孔板中的样品位置

板 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Arg-15-Cys 1	0.3	0.1	0.03	0.01			0.01	0.03	0.1	0.3	1
B		0.01	1	0.3	0.1	0.03	0.03	0.1	0.3	1	0.01	
C	Pro-15-Val 0.03	0.1	0.3	1	0.01			0.01	1	0.1	0.3	0.03
D		0.01	0.03	0.1	0.3	1	1	0.3	0.1	0.03	0.01	
E	Ala-8-Leu 0.01	0.3	0.1	0.03	1	1	1	0.3	0.1	0.03	0.01	
F	0.3	0.1	0.03	1	0.01			0.01	1	0.3	0.1	0.03
G		0.01	1	0.03	0.1	0.3	0.03	0.1	0.3	1	0.01	
H								0.01	0.03	0.1	0.3	1

板 2

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	ANP 1	0.3	0.1	0.03	0.01							
B		0.01	1	0.3	0.1	0.03						
C	C-ANP 0.03	0.1	0.3	1	0.01							
D		0.01	0.03	0.1	0.3	1	1	0.3	0.1	0.03	0.01	
E		0.01	0.03	0.1	0.3	1	1	0.3	0.1	0.03	0.01	
F								0.01	1	0.3	0.1	0.03
G							0.03	0.1	0.3	1	0.01	
H								0.01	0.03	0.1	0.3	1

数值表示肽的微摩尔浓度

表 II. 96- 孔板中的光学密度

Arg-15-Cys	1.0 μ M	0.3 μ M	0.1 μ M	0.03 μ M	0.01 μ M	0.0 μ M	0.0 μ M
	1.155	0.988	1.016	1.093	0.974	1.029	0.866
	1.005	0.957	0.917	0.894	0.920	0.858	0.988
	0.787	0.668	0.801	0.789	0.863	1.135	1.033
	0.944	0.913	0.990	0.955	0.840	1.279	1.003
	0.919	0.959	1.025	1.178	1.075	1.255	0.881
平均						0.999	1.013
标准偏差	0.962	0.897	0.950	0.982	0.934	1.050	0.854
	0.134	0.131	0.093	0.155	0.094		
						0.946	0.826
Pro-15-Val	1.0 μ M	0.3 μ M	0.1 μ M	0.03 μ M	0.01 μ M	0.922	0.971
	0.856	0.875	0.680	0.892	0.907	0.967	1.055
	0.752	0.817	0.895	0.765	0.905	0.804	0.871
	0.802	0.855	0.893	0.693	0.633	0.817	0.893
	1.083	1.024	1.156	1.151	1.209	0.966	0.774
	1.248	1.010	0.964	0.970	0.928	0.977	0.933
平均						0.892	1.014
标准偏差	0.948	0.916	0.918	0.894	0.916	0.962	0.873
	0.210	0.094	0.171	0.179	0.204		0.966
						0.974	1.010
Ala-8-Leu	1.0 μ M	0.3 μ M	0.1 μ M	0.03 μ M	0.01 μ M	0.847	0.926
	0.732	0.784	0.832	0.892	0.744	0.562	0.897
	1.216	0.802	1.006	0.937	0.878	0.941	0.868
	0.954	0.998	1.031	0.989	1.000	1.310	0.934
	0.834	1.357	0.910	0.921	0.892		0.988
	1.189	1.070	1.174	1.139	1.169	0.976	0.965
平均						0.171	0.820
标准偏差	0.985	1.002	0.991	0.976	0.937		0.878
	0.214	0.234	0.130	0.098	0.159		0.945
							1.005
ANP	1.0 μ M	0.3 μ M	0.1 μ M	0.03 μ M	0.01 μ M		0.932
	1.018	1.001	0.884	0.948	0.981		0.922
	0.819	0.889	0.889	0.882	0.815		0.744
	0.954	0.837	0.907	0.911	0.822		0.936
	0.829	0.934	0.862	0.951	0.965		0.892
	0.951	1.209	0.650	0.982	0.955		0.895
平均							0.906
标准偏差	0.914	0.974	0.838	0.935	0.908		0.914
	0.087	0.145	0.107	0.039	0.082		0.849
							0.836
C-ANP	1.0 μ M	0.3 μ M	0.1 μ M	0.03 μ M	0.01 μ M		0.877
	0.865	0.840	0.758	0.905	0.877		0.828
	0.925	0.928	1.027	0.882	0.971		1.016
	0.900	1.035	0.983	0.981	0.953		0.909
	0.955	0.975	0.960	0.948	0.932		0.911
	0.981	0.932	0.982	0.943	0.958		1.015
平均							0.998
标准偏差	0.925	0.942	0.942	0.932	0.938		0.964
	0.045	0.071	0.106	0.039	0.037		
						板 2 平均	0.922
						标准偏差	0.071

实施例 3

[0142] 这个实施例描述了具有保守的基序和预测在基序中发挥功能的保守的氨基酸的肽的活性 (表 III)。这个实施例也描述了具有预测具有活性的保守的基序的附加的示例性的肽序列 (表 IV)。

表 III

肽	Arg- SARDF Activity	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	
ANP	+										S	L	R	R	S	S	C	F	G	G	R	M	D	R	I	G	A	O	S	G	L	G	C	N	S	F	R	Y	
CNP	+															F	G	L	K	L	D	R	I																
KT-220 (VDL)	+	E	V	V	P	P	O	V	L	S	E	P	N	S	E	A	G	A	A	L	S	P	L	P	E	V	P	P	W	T	G	E	V	S	P	A	Q	R	
LANP	+															F	K	N	L	L	D	H	L																
KP	+															L	K	S	K	L	R	A	L																
BNP	+															F	G	K	R	M	D	R	I																
C-ANP 4-23	+										R	S	S	C	F	G	G	R	I	D	R	I	G	A	C														
保守氨基酸																F	A	L	G	K	N	S	G	L	A	¹⁵⁻¹⁷	L	M	S	D	R	¹⁵⁻¹⁷	I	L					
肽																																							
Pro-15-Val	+										P	N	E	E	A	G	A	A	L	S	P	L	P	E	V														
Arg-15-Cys	+										R	S	S	C	A	G	A	A	L	S	P	L	G	A	C														
3	ND										R	S	S	C	A	G	K	A	L	S	P	L	G	A	C														
Arg-8-Leu																A	G	A	A	L	S	P	L																

[0143] 表 III 中位置 15 至 21 对应保守的基序的残基 1- 残基 8。残基 1-8 中的每个残基的保守的氨基酸包括,例如,下列:(15)F、A、L;(16)G、K;(17)N、S、G、L、A;(18) 任何;(19) L、M;(20)S、D、R;(21) 任何;(22) I、L。残基 1-8 中的每个残基的保守的氨基酸包括,例如,残基 1:疏水的、非极性的、非离子化的残基;残基 2,非疏水性的(两亲性或亲水性)残基;残基 3,非离子化的残基或具有小侧链(0-2 碳主链,具有 3 和 4 个较弱碳)的残基;残基 4,任何残基;残基 5,疏水性的、非极性的、非离子化的或脂族残基;残基 6,极性残基;残基 7,任何残基;和残基 8,疏水性的、非极性的、非离子化的或脂族残基。

[0144] 符号“残基 1,残基 2”等,在此通过单字母缩写指氨基酸在该示例性的肽中的 8 聚体(8-mer)。“活性”可以通过诸如本文中所描述的或本领域技术人员公知的测定法之类的细胞增殖测定法来确定。当然,列举在表 IV 中的肽可以包括保守的基序的肽作为较大蛋白质的一部分。SEQ ID 号与肽数目相同。

表 IV

SEQ ID 号	残基	残基	残基	残基	残基	残基	残基	残基	预测 活性
1	F	G	N	A	L	S	P	I	+
2	F	G	S	R	L	D	S	I	+
3	F	G	G	N	L	R	T	I	+
4	F	G	L	D	L	D	W	I	+
5	F	G	A	C	L	R	Y	I	+
6	F	G	N	E	M	S	V	I	+
7	F	G	S	Q	M	D	A	I	+
8	F	G	G	G	M	R	R	I	+
9	F	G	L	H	M	S	N	I	+
10	F	G	A	I	M	D	D	I	+
11	F	K	N	L	L	R	C	I	+
12	F	K	S	K	L	S	E	I	+
13	F	K	G	M	L	D	Q	I	+
14	F	K	L	G	L	R	G	I	+
15	F	K	A	F	L	S	H	I	+
16	F	K	N	P	M	D	I	I	+
17	F	K	S	S	M	R	L	I	+
18	F	K	G	T	M	S	K	I	+
19	F	K	L	W	M	D	M	I	+
20	F	K	A	Y	M	R	G	I	+
21	A	G	N	V	L	S	F	I	+
22	A	G	S	A	L	D	P	I	+
23	A	G	G	R	L	R	S	I	+
24	A	G	L	N	L	S	T	I	+
25	A	G	A	D	L	D	W	I	+
26	A	G	N	C	M	R	Y	I	+
27	A	G	S	E	M	S	V	I	+
28	A	G	G	Q	M	D	A	I	+
29	A	G	L	G	M	R	R	I	+
30	A	G	A	H	M	S	N	I	+
31	A	K	N	I	L	D	D	I	+
32	A	K	S	L	L	R	C	I	+
33	A	K	G	K	L	S	E	I	+
34	A	K	L	M	L	D	Q	I	+
35	A	K	A	G	L	R	G	I	+
36	A	K	N	F	M	S	H	I	+
37	A	K	S	P	M	D	I	I	+
38	A	K	G	S	M	R	L	I	+
39	A	K	L	T	M	S	K	I	+
40	A	K	A	W	M	D	M	I	+
41	L	G	N	Y	L	R	G	I	+
42	L	G	S	V	L	S	F	I	+
43	L	G	G	A	L	D	P	I	+
44	L	G	L	R	L	R	S	I	+
45	L	G	A	N	L	S	T	I	+

46	L	G	N	D	M	D	W	I	+
47	L	G	S	C	M	R	Y	I	+
48	L	G	G	E	M	S	V	I	+
49	L	G	L	Q	M	D	A	I	+
50	L	G	A	G	M	R	R	I	+
51	L	K	N	H	L	S	N	I	+
52	L	K	S	I	L	D	D	I	+
53	L	K	G	L	L	R	C	I	+
54	L	K	L	K	L	S	E	I	+
55	L	K	A	M	L	D	Q	I	+
56	L	K	N	G	M	R	G	I	+
57	L	K	S	F	M	S	H	I	+
58	L	K	G	P	M	D	I	I	+
59	L	K	L	S	M	R	L	L	+
60	L	K	A	T	M	S	K	L	+
61	F	G	N	W	L	S	M	L	+
62	F	G	S	Y	L	D	G	L	+
63	F	G	G	V	L	R	F	L	+
64	F	G	L	A	L	D	P	L	+
65	F	G	A	R	L	R	S	L	+
66	F	G	N	N	M	S	T	L	+
67	F	G	S	D	M	D	W	L	+
68	F	G	G	R	M	D	R	I	+
69	F	G	L	E	M	S	V	L	+
70	F	G	A	Q	M	D	A	L	+
71	F	K	N	G	L	R	R	L	+
72	F	K	S	H	L	S	N	L	+
73	F	K	G	I	L	D	D	L	+
74	F	K	L	L	L	R	C	L	+
75	F	K	A	K	L	S	E	L	+
76	F	K	N	M	M	D	Q	L	+
77	F	K	S	G	M	R	G	L	+
78	F	K	G	F	M	S	H	L	+
79	F	K	L	P	M	D	I	L	+
80	F	K	A	S	M	R	L	L	+
81	A	G	N	T	L	S	K	L	+
82	A	G	S	W	L	D	M	L	+
83	A	G	G	Y	L	R	G	L	+
84	A	G	L	V	L	S	F	L	+
85	A	G	A	A	L	S	P	L	+
86	A	G	N	R	M	R	S	L	+
87	A	G	S	N	M	S	T	L	+
88	A	G	G	D	M	D	W	L	+
89	A	G	L	C	M	R	Y	L	+
90	A	G	A	E	M	S	V	L	+
91	A	K	N	Q	L	D	A	L	+
92	A	K	S	G	L	R	R	L	+
92	A	K	G	H	L	S	N	L	+
94	A	K	L	I	L	D	D	L	+
95	A	K	A	L	L	R	C	L	+
96	A	K	N	K	M	S	E	L	+

97	A	K	S	M	M	D	Q	L	+
98	A	K	G	G	M	R	G	L	+
99	A	K	L	F	M	S	H	L	+
100	A	K	A	P	M	D	I	L	+
101	L	G	N	S	L	R	L	L	+
102	L	G	S	T	L	S	K	L	+
103	L	G	G	W	L	D	M	L	+
104	L	G	L	Y	L	R	G	L	+
105	L	G	A	V	L	S	F	L	+
106	L	G	N	A	M	D	P	L	+
107	L	G	S	R	M	R	S	L	+
108	L	G	G	N	M	S	T	L	+
109	L	G	L	D	M	D	W	L	+
110	L	G	A	C	M	R	Y	L	+
111	L	K	N	E	L	S	V	L	+
112	L	K	S	Q	L	D	A	L	+
113	L	K	G	G	L	R	R	L	+
114	L	K	L	H	L	S	N	L	+
115	L	K	A	I	L	D	D	L	+
116	L	K	N	L	M	R	C	L	+
117	L	K	S	K	M	S	E	L	+
118	L	K	G	M	M	D	Q	L	+
119	L	K	L	G	M	R	G	L	+
120	L	K	A	F	M	S	H	L	+

[0145] 这些示例性的肽中的每个的抗细胞增殖活性可以在体外, 离体以及体内使用诸如实施例 1 或 4 所述的基于细胞的体外测定法之类的测定法进行分析。

实施例 4

[0146] 本实施例包括基于细胞的确定的抗细胞增殖活性的另一种示例性的测定法的描述。

[0147] 培养人卵巢癌细胞, 并根据前述的方法对肽进行测试 [Vesely, et al, Cancer Ther. 5:97-104(2007)]。如前面所述使用溴脱氧尿嘧啶核苷 (BrdU) 掺入人卵巢癌细胞以研究肽是否抑制 DNA 合成以及细胞增殖的迹象。[Vesely, D. L. Eur J Clin Invest. 38(8)562: (2008) 和其中的参考文献]。BrdU 来自加利福尼亚州圣何塞市 BD Bioscience。BrdU 与 1 μ M 血管扩张剂 VDL 一起培养 24 小时之后, 或者在没有肽激素的情况下培养 24 小时之后 (即, 对照), 在细胞培养基中 10 μ M 终浓度的 BrdU 被加入 45 分钟, 这是细胞处于细胞增殖的对数生长期的时间。此外, 如果相对于对照, 本发明的肽的加入在 24 小时内显著地降低了卵巢癌细胞的数目。

实施例 5

[0148] 本实施例包括测试 ANPs 对 NPR 的亲和力作为活性指标的描述。

[0149] 尽管不希望被理论所束缚, 但预测 NP 的相对效力将与 NPRs 的结合亲合力有关 [Vesely, D. L., Eur J Clin Invest. 38(8)562: (2008) 和其中的参考文献]。例如, 观察到 ANP 比 CNP 有更高的效力, 这与 ANP 在 NPRA 和 NPRC 处的更高的结合亲和力, 而 CNP 比 BNP 有更高的效力, 这与 CNP 尤其在 NPRC 处具有比 BNP 更高的结合亲合力一致 [Vesely, D. L., Eur J Clin Invest. 38(8)562: (2008) 和其中的参考文献]。

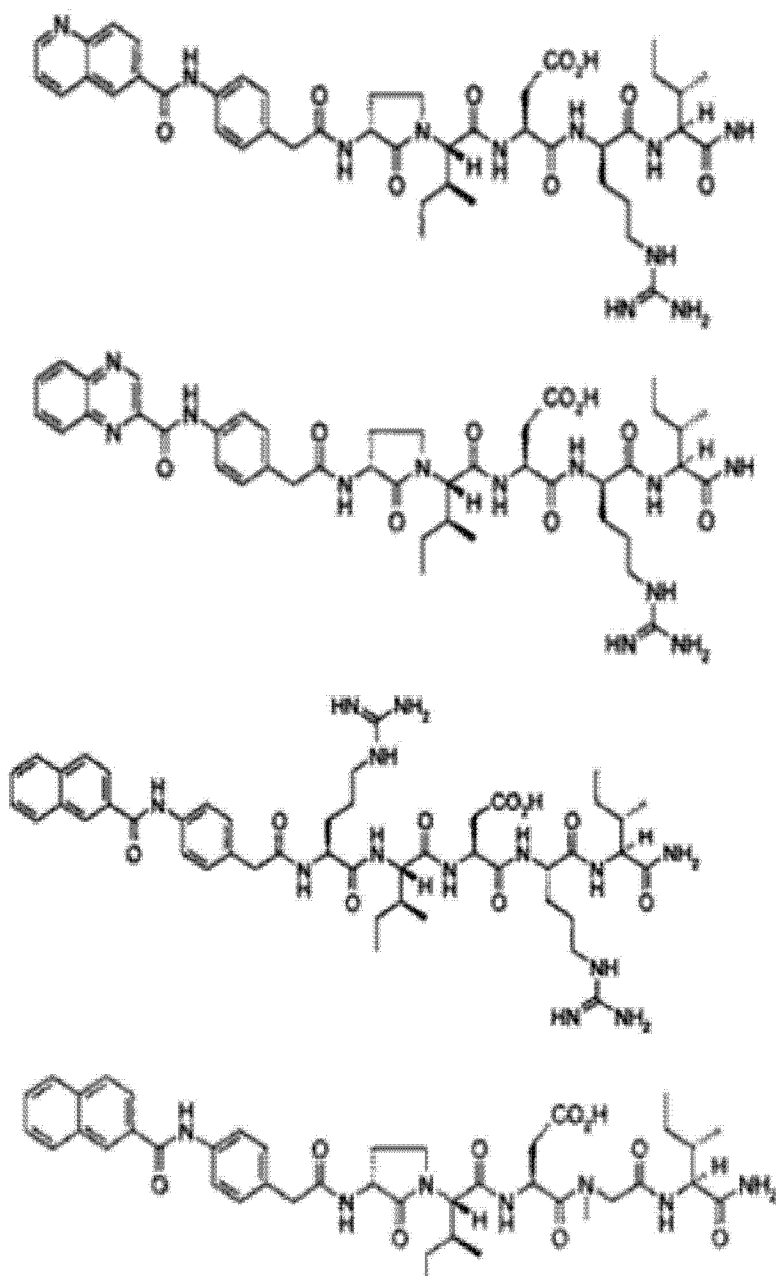
[0150] 利钠肽家族 (ANP、BNP、CNP) 的受体选择性, 使用由 Suga 等所描述的同源的测定系

统 [Suga, et al., Endocrinol. 130:229-239 (1992)]。C-受体的结合亲和力的排名次序遵循实施例 4 的基于细胞的测定法的趋势。因此,对诸如 NPRC 之类的 NPRs 的结合亲和力可以是活性的良好指标。

实施例 6

[0151] 本实施例包括具有保守的基序的肽模拟物的描述。

[0152] 似乎是该基序的肽模拟物的文献化合物被测定用于细胞增殖抑制活性(例如,实施例 1 和 4)或被测定用于 NPR 结合性(例如,实施例 5),并显示具有结合性。预测的肽模拟物包括:



实施例 7

[0153] 本实施例包括全身性的、区域或局部的各种可以接受的给药途径的描述。

[0154] 对于注射给药,可以通过常规方法使用 10.0 毫升生理盐水溶液和 7.0 毫克的肽调节至 pH = 7.4 来制备注射液。可以向体重约 70 千克的患者施用:一次注射,每日一次,持

续 4 天。

[0155] 对于输注给药,可以通过常规方法使用 1000.0 毫升生理盐水溶液和 400.0 毫克实施例 1 的肽调节至 $\text{pH} = 7.4$ 来制备静脉内输注成分。可以向体重约 58 公斤的患者施用:一小时输注,每日一次,连续 4 周。

[0156] 对于连续给药,如通过泵皮下注射给药,可以通过常规的方法使用 1000.0 毫升生理盐水溶液和 400.0 毫克的肽调节至 $\text{pH} = 7.4$ 来制备可注射的溶液。如 Vesely, D. L., *In vivo* 21:445-452 (2007) 中的描述,患者具有植入的泵以随着时间的推移分注组分。用植入的持续输注泵给体重约 47 公斤的患者间隔分注组分,每日三次长达 8 周。

实施例 8

[0157] 本实施例包括使用体外模型系统显示 NP 化合物在治疗视网膜病症和疾病中的活性的研究的描述。

[0158] 人视网膜色素上皮细胞 (ARPE-19) 购自 ATCC 并根据供应商的说明培养在 10% FBS 的 DMEM-F12 中。将细胞接种到插入 6 孔微量滴定板中的 2.4 厘米半径的 transwell 中 (Corning 公司), 并使其生长至汇合。2-3 周后, 如前所述使用具有 STX2 电极 (World Precision Instruments (世界精密仪器)) 的上皮电压电阻表 (EVOM) 测量跨越细胞层的电压 (跨上皮电阻, TEER) [Ablonczy, Z., Crosson, C. E. *Exp Eye Res* 85:762 (2007)]。用 VEGF (10ng/ml) 处理细胞降低阻力, 模仿发生在 AMD (图 1) 的 RPE 层的破坏。同时使用 ANP (1 μM) 处理则减弱 VEGF 的作用。其它的 NP 化合物可代替 ANP 进行评估, 以确定在 AMD 中的活性。

实施例 9

[0159] 本实施例包括使用啮齿动物模型系统显示 NP 化合物在治疗视网膜病症和疾病中的活性的研究的描述 [Noda, K., Nakazawa, T. et al, *FASEB J* ;22:2928 (2000)]。

[0160] 使用具有裂隙灯递送系统以及玻璃盖作为接触透镜的激光在麻醉下, 在动物 (通常为小鼠或大鼠) 中诱发 CNV。每个视网膜上设置几个激光灼伤。激光损伤斑处的气泡的形成确保 Bruch 膜的破裂。激光损伤后七天, CNV 病斑的尺寸可以采用裂隙灯检查或眼底照相在原位进行测量, 或在脉络膜铺片中测量。防止或逆转 CNV 的形成的试剂会降低病斑的大小。

实施例 10

[0161] 本实施例包括使用遗传的啮齿动物模型显示 NP 化合物在治疗视网膜病症和疾病中的活性的研究的描述。

[0162] 一定比例的快速老化鼠 (SAM) 在约 11 个月的生命后自发地形成 CNV 以及 AMD 的其他表现 (Majji, A. B., Cao, J. et al, *Invest Ophthalmol Vis Sci* ;41:3936 (2000))。可以给这些动物施用 NP 化合物以预防或逆转 CNV。替代地, RPE 细胞本身可以被基因工程化以高表达 VEGF。当再次引入到大鼠眼的视网膜下, 它们产生 CNV (Spilsbury, K. Garrett, K. L. et al, *Am J Pathol* ;157:135 (2000))。同样, 可以对这些动物施用 NP 化合物, 并确定它们对 CNV 的形成和持续性的效果。

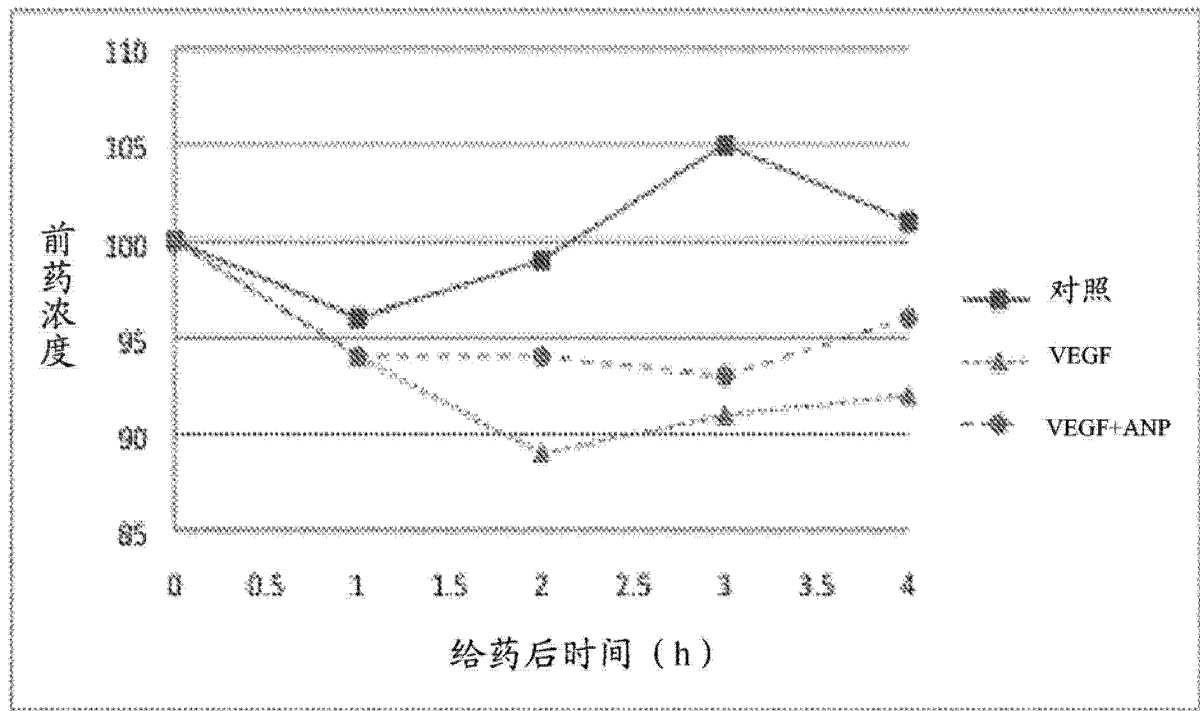


图1. ARPE-19细胞(ATCC)生长于2.4厘米半径的transwell培养板小室上(Corning司)的单层中。使用上皮伏欧表计(EVOM;Word Precision Instruments公司)测量跨上皮电阻(TEER)。使用VEGF(10ng/ml)的治疗降低了TEER值,表示RPE细胞之间的连接松动。VEGF的作用被同时使用的ANP(1uM)的治疗减弱。