

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

C07K 14/47 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200780027425.X

[43] 公开日 2009 年 7 月 22 日

[11] 公开号 CN 101490081A

[22] 申请日 2007.7.25

[21] 申请号 200780027425.X

[30] 优先权

[32] 2006.7.31 [33] EP [31] 06015911.8

[86] 国际申请 PCT/EP2007/006619 2007.7.25

[87] 国际公布 WO2008/014917 英 2008.2.7

[85] 进入国家阶段日期 2009.1.19

[71] 申请人 西根股份公司

地址 瑞士洛桑

[72] 发明人 托马斯·迈尔

[74] 专利代理机构 北京康信知识产权代理有限公司

代理人 章社杲 张 英

权利要求书 4 页 说明书 29 页 序列表 9 页
附图 4 页

[54] 发明名称

用于抑制神经元 NMDA 受体 (NMDAR) 与
NMDAR 相互作用蛋白的相互作用的融合肽

[57] 摘要

本发明提供了一种融合肽，该融合肽包含至少成分(I)以及成分(II)，其中成分(I)包括运载体肽，成分(II)选自抑制神经元 N-甲基-D-天冬氨酸受体(NMDAR)与 NMDAR 相互作用蛋白的相互作用的肽，其中成分(II)完全由 D-对映体氨基酸组成。本发明还提供了发明的药物组合物，该药物组合物包含本发明的融合肽，并提供了用于给予该药物组合物的方法，以及采用本发明的融合肽的试剂盒和应用。

1. 一种融合肽，至少包含成分(I)和成分(II)，其中成分(I)包含运载体肽，成分(II)选自抑制神经元 N-甲基-D-天冬氨酸受体(NMDAR)与 NMDAR 相互作用蛋白的相互作用的肽，其中成分(II)完全由 D-对映体氨基酸组成。
2. 根据权利要求 1 所述的融合肽，其中，成分(I)选自细胞穿透肽，所述细胞穿透肽包括：

(a) 蛋白质转导结构域(PTD)和源于蛋白质的 CPP，包括源于控制触角的基因的序列、pAntp (43-58)，包含序列 RQIKIWFQNRRMKWKK(SEQ ID NO: 1) 或 RQIKIWFQNRRMKWKK-酰胺(SEQ ID NO: 2)，包括源于人免疫缺陷病毒 1(HIV-1)的序列、TAT、TAT 的 37 至 72 区域、TAT 的 37 至 60 区域、TAT 的 48 至 60 区域或 49 至 57 区域、序列 GRKKRRQRRR(SEQ ID NO: 3)、YGRKKRRQRRR(SEQ ID NO: 4)、CGRKKRRQRRRPPQC(SEQ ID NO: 5) 或 CGRKKRRQRRRPPQCC(SEQ ID NO: 6)，包括具有序列 LGTYTQDFNKFHTFPQTAIGVGAP-NH₂(SEQ ID NO: 7)的 hCT(9-32)、包含序列 LLILRRRIRKQAHASHK-NH₂(SEQ ID NO: 8)的 pVEC、包含序列 RVIRVWFQNKRCCKDKK-NH₂(SEQ ID NO: 9) 的 pISL、包含序列 MANGLYWLLALFVTMWTDVGLCKKRPKP-NH₂(SEQ ID NO: 10)的小鼠 PRP(1-28)以及其包括人同系物的同系物、包含序列 RQGAARVTSWLGLQLRIAGKRLEGRSK-NH₂(SEQ ID NO: 11) 的 E^{ms} (194-220)、包含序列 KLIKGRTPIKFGK-NH₂(SEQ ID NO: 12)的 Restricon L3 (60-73)，或

(b) 模 型 肽 ， 包 括 包 含 序 列 DPKGDPKGVTVTVTVTVTGKGDPKPD-NH₂(SEQ ID NO: 13) 的 VT5、包含序列 KLALKLALKALKAALKLA-NH₂(SEQ ID NO: 14)的 MAP、精氨酸伸长序列，所述精氨酸伸长序列包括 RRRRRRRR，即(Arg)₇(SEQ ID NO: 15)，或 RRRRRRRR-NH₂，即 (Arg)₇-NH₂(SEQ ID NO: 16)，或 RRRRRRRR-C，即 (Arg)₇-C(SEQ ID NO: 17)，或 RRRRRRRR，即(Arg)₈(SEQ ID NO: 18)，或 RRRRRRRR-NH₂，即(Arg)₈-NH₂(SEQ ID NO: 19)，RRRRRRRRR，即 (Arg)₉(SEQ ID NO: 20)，或 RRRRRRRRRR-NH₂，即(Arg)₉-NH₂，(SEQ ID NO: 21)，或

(c) 设 计 的 CPP，包 括 包 含 序 列 GALFLGFLGAAGSTMGAWSQPKSKRKV(SEQ ID NO: 22)或 GALFLGFLGAAGSTMGAWSQPKSKRKV-半胱胺(SEQ ID NO: 23) 的 MPG、包 含 序 列 GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL-NH₂(SEQ ID NO: 24) 的 细 胞 膜 穿 透 肽、包 含 序 列 AGYLLGKINLKALAALAKKIL-NH₂(SEQ ID NO: 25)的细胞膜穿 透 肽 10、包 含 序 列 KETWWETWWTEWSQPKKKRKV(SEQ ID NO: 26) 或 KETWWETWWTEWSQPKKKRKV-半胱胺(SEQ ID NO: 27) 的 Pep-1，

或 所 述 成 分 (I) 可 以 选 自 包 含 序 列 WEAKLAKALAKALAKHLAKALAKALKACEA(SEQ ID NO: 28) 的 KALA 肽 或 选 自 包 含 序 列 TRSSRAGLQFPVGRVHRLLRK(SEQ ID NO: 29)的 Bulforin 2,或由D氨基酸组成的SEQ ID Nos: 1-29的逆-反同分异构体。

3. 根据权利要求 2 所述的融合肽, 其中, 成分(I)选自与权利要求 2 中所限定的 SEQ ID Nos: 1 至 29 中的一个序列具有约 60、70、80、90、95 或甚至 99% 的序列一致性的细胞穿透肽, 只要成分(I)仍然保留其生物学活性, 即, 引导本发明的融合肽穿过质膜的生物学活性。
4. 根据权利要求 3 所述的融合肽, 其中, 成分(II)选自 NMDA 受体亚单位 NR1 和 NR2、包含 PDZ-结合结构域的肽、包含 tSX_nV 基序的肽或来自突触后致密物-95 蛋白的肽、PSD-95、PSD-93、SAP102。
5. 根据权利要求 4 所述的融合肽, 其中, 成分(II)的长度为 5 至 40 个氨基酸, 更优选长度为 5 至 30 或 5 至 20 个氨基酸以及甚至更优选长度为 5 至 15 或甚至 5 至 10 个氨基酸。
6. 根据权利要求 4 或 5 所述的融合肽, 其中, 成分(II)选自包含序列 vdseisslk(SEQ. ID NO: 31)的序列。
7. 根据权利要求 4 至 6 中任一项所述的融合肽, 其中, 成分(II)选自一种包含与 SEQ ID NO: 31 的序列具有约 60、70、80、90、95 或甚至 99% 的序列一致性的序列。
8. 根据权利要求 1 至 7 中任一项所述的融合肽, 其中, 成分(I)完全由 L-氨基酸、D-氨基酸、或两者组成。
9. 根据权利要求 1 至 8 中任一项所述的融合肽, 其中, 成分(I)和(II)通过联结子连接。
10. 根据权利要求 1 至 9 中任一项所述的融合肽, 另外还包含成分(III), 其中成分(III)是用于纯化的标签。

11. 药物组合物，包含根据权利要求 1 至 10 中任一项所述的融合肽以及可选的药物载体。
12. 根据权利要求 1 至 10 中任一项所述的融合肽用于制备药物组合物的应用，所述药物组合物用于治疗、改善或预防与对哺乳动物细胞损害的损伤效应有关的疾病，所述疾病选自脑卒中或脊髓损伤、脑或脊髓的缺血性或创伤性损伤以及中枢神经系统(CNS)神经元的损伤，包括急性 CNS 损伤、缺血性脑卒中或脊髓损伤，以及缺氧、缺血、机械损伤，或用于为以下疾病提供神经保护效应或对其进行治疗：兴奋性中毒损伤和缺血性损伤、兴奋性中毒、缺少神经营养支持物、失连接、神经元的损伤，包括癫痫、慢性神经变性病症和神经性疼痛，包括与 PSD-95 和/或 NMDAR 相互作用有关的神经性疼痛。
13. 试剂盒，包括根据权利要求 11 所述的药物组合物和说明书或信息册，其中所述说明书或信息册具有所述药物组合物的应用的说明和/或信息。

用于抑制神经元 NMDA 受体(NMDAR)与 NMDAR 相互作用蛋白的相互作用的融合肽

本发明提供了一种融合肽，该融合肽至少包含成分(I)，其中成分(I)包括运载体肽，以及成分(II)，其选自对神经元 N-甲基-D-天冬氨酸受体(NMDAR)与 NMDAR 相互作用蛋白之间的相互作用进行抑制的肽，其中成分(II)完全由 D-对映体氨基酸组成。此外，本发明提供了一种发明的药物组合物，该药物组合物包含本发明的融合肽，并提供了用于给予该药物组合物的方法，以及采用本发明的融合肽的试剂盒和应用。

脑或脊髓的缺血性或创伤性损伤（如缺血性脑卒中）是主要的健康问题，因为它们频繁发生并且经常对中枢神经系统(CNS)神经元和对它们的突触（process）造成不可逆性损伤。因为损伤经常是严重的，所以目前卫生当局每年花费大笔费用用于治疗遭受上述损伤后果的痛苦的患者。然而，对于那些急性 CNS 损伤，目前仍然没有有效的药理学治疗。

临床上，脑或脊髓的缺血性或创伤性损伤（如缺血性脑卒中）表现为神经能力的急性恶化，从较小的病灶性缺损到灾难性全身性的机能障碍，或者甚至会导致待治疗患者的死亡。目前认为，最终的缺陷程度由最初物理损伤的特性和程度、以及使继发现象（secondary phenomena）发展的过程顺序所决定，其中继发现象进一步引起所涉及神经元细胞的死亡。由于这些过程并不是瞬时发生的，因而存在着持续时间还不确定的理论上的时间窗，在这段时间中及时干预可以中断导致延迟的神经毒性事件。虽然人们已经较多

地了解了关于触发和维持缺血性或创伤性神经元死亡进程的细胞机制，例如，谷氨酸运载体的逆转，但目前并没有有效可行的预防策略或有效的治疗方案。因此，对于包括脑卒中或脊髓损伤的上述疾病，目前还不能进行有效的临床上可行的药物治疗。

从科学角度来看，在体内缺氧性和创伤性 CNS 损伤中，CNS 组织灌注的局部减少介导神经元死亡。这样的局部灌注不足通常是由局部脉管系统的物理破裂、血管血栓形成、血管痉挛、或由栓塞块（embolic mass）引起的腔内阻塞引起的。人们认为形成的缺血通过有害地影响各种细胞稳态机制来损伤易受影响的神经元，而与其病因学无关。虽然对于精确失调的特性了解得不多，但神经元损伤的许多实验模型的共有特点是游离的胞内钙浓度($[Ca^{2+}]_i$)升高。神经元具有多种机制来使 $[Ca^{2+}]_i$ 限制于低水平，即生理功能所需要的大约 100 nM。人们普遍认为， $[Ca^{2+}]_i$ 长期升高会解除严格受控的 Ca^{2+} 依赖性过程，导致它们产生过量的反应产物、激活正常情况下休眠的酶促途径、或使调节的细胞保护机制失活。这反过来又会导致产生实验可观察到的细胞破坏，如脂解、蛋白水解、细胞骨架分解、pH 改变、自由基形成、线粒体功能异常、细胞肿胀、血浆完整性的丧失以及核固缩。

导致局部缺血发作过程中 Ca^{2+} 进入的有害水平的关键原因是 EAA 的过量释放。因此，防止 Ca^{2+} 神经毒性的经典方式是通过药理性阻断 Ca^{2+} 通过电位门控 Ca^{2+} 通道和/或兴奋性氨基酸 EAA-门控通道进入。这种策略的变化经常会减少体外 EAA 诱导的细胞或厌氧细胞死亡，借此来证实 Ca^{2+} 神经毒性假设。然而，各种 Ca^{2+} 通道拮抗剂和 EAA 拮抗剂均未能防止体内神经元损伤，尤其是在实验性脊髓损伤(SCI)、头部损伤以及全脑缺血中。不清楚这是否是由于药物浓度不足、不适当的 Ca^{2+} 流入阻断、或由于来自非 Ca^{2+} 依赖性的神经毒作用的作用。然而，很可能在不同 CNS 神经元类型中，通

过不同的途径来触发 Ca^{2+} 神经毒性。因此，成功的 Ca^{2+} 阻断通常会需要多种药物组合的方式 (polypharmaceutical approach)。注意到，已开发了 NMDAR 的许多拮抗剂。然而，在动物模型体内，那些拮抗剂仅在创伤以前立即给予药物是成功的，因此不可能转移到治疗通常发生在例如中风之后的典型临床情况中。此外，NMDAR 拮抗剂在人体内通常是不良耐受的，这使得具有较小的治疗浓度窗或有时甚至不存在治疗浓度窗，治疗浓度窗反映了在正常生理过程以及在病理生理过程中 NMDAR 的重要作用。

关于在哺乳动物神经系统中观察到的 Ca^{2+} 依赖的神经毒作用，N-甲基-D-天冬氨酸受体(NMDAR)活性触发细胞内信号通路的效力支配神经元的可塑性、发育、衰老以及疾病。通过抑制 NMDAR 支架蛋白 PSD-95 的表达研究了兴奋性中毒的 NMDAR 信号传导，研究结果揭示了选择性地减弱的 NMDAR 兴奋性中毒，然而并没有揭示通过其他谷氨酸或 Ca^{2+} 通道的兴奋性中毒(参见例如 US 20030050243)。从而 NMDAR 作为受体表达的功能未受到影响，同时借助于 NMDAR 的 NMDA 流和 ^{45}Ca 负载没有发生变化。此外，抑制 PSD-95 可通过 NMDAR，而不通过其他途径来选择性地阻断 Ca^{2+} 激活的一氧化氮产生，而不影响神经元一氧化氮合酶(nNOS)的表达或功能。因此，PSD-95 被认为是将 NMDAR 活性有效偶联于一氧化氮毒性以及将特异性赋予兴奋性中毒 Ca^{2+} 信号所必需的。

另外，已知通过 NMDAR 的钙内流在介导突触传递、神经元发育、以及可塑性方面具有关键作用(参见例如 Ghosh 和 Greenberg, *Science* 268, 239 (1995); Bliss 和 Collingridge, *Nature* 361, 31 (1993))。过多的 Ca^{2+} 内流会触发兴奋性中毒(参见例如 Olney, *Kainic acid as a tool in neurobiology.*, McGeer, Olney 和 McGeer, Eds. (Raven Press, 纽约, 1978), 第 95 页; Rothman 和 Olney, *TINS* 10, 299 (1987); Choi, *Ann NY Acad Sci* 747, 162 (1994))，该作用在神经系统疾病中

会损伤神经元, 其中神经系统疾病包括中风、癫痫、以及慢性神经变性病症(参见例如 Lipton 和 Rosenberg, *New Eng J Med* 330, 613 (1994))。应当注意到, 当通过 NMDAR 发生 Ca^{2+} 内流时, 可以最有效地触发快速 Ca^{2+} 依赖性神经毒性, 并且不能借助于使用通过与非 NMDAR 或电位敏感 Ca^{2+} 通道(VSCC)的相同量的 Ca^{2+} 来负载神经元而再现(参见例如 Sattler 等, *J Neurochem* 71, 2349 (1998); Tymianski 等, *J Neurosci* 13, 2085 (1993))。该观察结果表明, 通过 NMDAR 通道的 Ca^{2+} 内流可以功能性偶联于神经毒信号通路。因此, 不受限于理论, 认为通过 NMDAR 的致死 Ca^{2+} 信号传导可以由与它们进行物理相互作用的分子来确定。例如, NR2 NMDAR 亚单位, 通过它们的细胞内 C 端结构域, 结合于 PSD-95/SAP90(参见 Cho 等, *Neuron* 9, 929 (1992))、chapsyn-110/PSD-93、以及膜相关鸟苷酸激酶(MAGUK)家族的其他成员(参见例如 Kornau 等, *Science* 269, 1737 (1995); Brenman 等, *J Neurosci* 16, 7407 (1996); Muller 等, *Neuron* 17, 255 (1996))。结合 NMDAR 的 MAGUK 通常不同于与非 NMDAR 有关的 MAGUK(参见 Dong 等, *Nature* 386, 279 (1997); Brakeman 等, *Nature* 386, 284 (1997))。研究发现, 通过 NMDAR 的神经毒性 Ca^{2+} 信号的优先激活是由结合 NMDAR 的 MAGUK 的特殊性、或它们结合的细胞内蛋白的特殊性所决定的。PSD-95 是一种膜下支架分子(或膜下骨架分子), 其优先结合和集簇 NMDAR, 并通过另外的蛋白质-蛋白质相互作用, 可以将它们连接于细胞内信号分子(参见例如 Craven 和 Bredt, *Cell* 93, 495 (1998); Niethammer 等, *Neuron* 20, 693 (1998); Kim 等, *Neuron* 20, 683 (1998); Tezuka 等, *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 435(1999))。因此提示了干扰 PSD-95 可以影响通过 NMDAR 的神经毒性 Ca^{2+} 信号传导。

通常, 蛋白质-蛋白质相互作用支配与细胞生长、分化、以及通过调控蛋白质结构域(modular protein domain)和它们的同源结合配偶体(cognate binding partner)之间的动态联系(dynamic

association) 进行的细胞间通讯有关的信号(参见 Pawson 和 J. D. Scott, Science 278, 2075-2080 (1997))。更具体地, 离子型谷氨酸受体在中枢神经元的兴奋性突触处被组织进入突触后致密区(PSD)内的多蛋白信号传导复合物(参见 Sheng, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 98, 7058- 7061 (2001))。PSD 内的一种重要的组织蛋白 (organizing protein) 是 PSD-95, 其是膜相关的鸟苷酸激酶(MAGUK)家族的一个成员。PSD-95 包含多个结构域, 其将跨膜蛋白 (如谷氨酸受体(NMDAR)的 N-甲基-D-天冬氨酸亚型) 偶联于各种细胞内信号酶 (signaling enzyme)。通过其第二 PDZ 结构域(PDZ2), PSD-95 与 NMDAR 2B 亚单位(NR2B)和神经元一氧化氮合酶(nNOS)结合(参见 Brenman 等, Cell 84, 757-767 (1996))。这种相互作用将 NMDAR 活性与一氧化氮(NO)的产生相连结, 其中一氧化氮是一种信号分子, 其介导 NMDAR 依赖性的兴奋性中毒(参见 Dawson 等, Proc Natl Acad Sci USA 88, 6368-6371 (1991))。NR2 可以与 PSD-95 的 PDZ1 或 PDZ2 相互作用。然而, 如果 PSD-95 的 PDZ1 结构域与 NMDA 受体的 COOH 末端相互作用, 则 PDZ2 可以自由结合 nNOS 的 NH₂ 末端区(Cao 等, 2005, J.Cell Biol 168, 117-126; 以及 Christopherson 等, 2005, J. Biol. Chem. 274:27467-27473)。

虽然 NMDAR 在缺氧性/缺血性脑损伤中具有重要的神经毒作用(参见 Simon 等, Science 226, 850-852 (1984)), 但阻断 NMDAR 功能在动物和人类中可能是有害的(参见 Fix 等, Exp Neurol 123, 204-215 (1993); Davis 等, Stroke 31, 347-354 (2000); Morris 等, J. Neurosurg. 91, 737-743 (1999))。NMDAR 拮抗剂在发育中的脑中触发凋亡。此外, 当在创伤性脑损伤后的关键时期或在缓慢发展神经变性的过程中给予 NMDAR 拮抗剂时, NMDAR 拮抗剂会加剧在成体动物脑中的神经元损失(Ikonomidou 等, 2000, Proc Natl Acad Sci USA 97, 12885-12890; Olney 等, 2002, Brain Pathology 12, 488- 498)。此外, 通过利用 NMDAR 拮抗剂来阻断 NMDAR 功能会导致其他

不希望的副作用,例如认知功能障碍和精神错乱。因此,靶向 PSD-95 蛋白对于与兴奋性中毒有关的疾病是一种可替代的治疗方法,其可以防止发生阻断 NMDAR 功能的消极结果。然而,已证明 PSD-95 的突变或抑制作为脑损伤的疗法是不切实际的,并且不能在发生损伤后来使用。因此,提出了干扰 NMDAR/PSD-95 相互作用而不是改变 PSD-95 表达是否能抑制体外兴奋性中毒和体内缺血性脑损伤的疑问。

以上述观点来看,在本技术领域开发了一种方法(US 20030050243),以降低用化合物治疗哺乳动物细胞的损伤效果,其中该化合物可以降低或抑制 N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)受体与 NMDAR 相互作用蛋白之间的相互作用。根据 US 20030050243 的方法使用能够中断神经元 N-甲基-D-天冬氨酸受体(NMDAR)与 NMDAR 相互作用蛋白(例如神经元蛋白)的相互作用的肽化合物。此方法避免了 NMDAR 功能阻断所带来的缺点。根据 US 20030050243 的方法主要基于以下发现:突触后致密物-95 蛋白(PSD-95)与神经元 N-甲基-D-天冬氨酸受体(NMDAR)的相互作用导致介导兴奋性中毒的通路,因此,利用中断这种特定相互作用的选择性肽可以治愈缺血性脑损伤。更具体地,根据 US 20030050243,通过将在 PSD-95/NMDAR 相互作用复合体的任一侧结合于调控结构域的肽引入神经元中完成对相互作用的阻断。这种治疗减弱了下游 NMDAR 信号传递而不阻断 NMDAR 活性,保护培养的皮质神经元免受兴奋性中毒损伤并在患有短暂性局灶性脑缺血的大鼠中减小脑梗死体积。在体外兴奋性中毒和体内脑缺血发作以前或在发作后 1 小时,采用根据 US 20030050243 的治疗方法是有效的。因此,研究表明,这种方式可提供良好的基础来防止与阻断 NMDAR 活性有关的负面并发症。

然而,众所周知,体内给予用来靶向细胞内部位的肽化合物(例如用于特定疾病的治疗,以及用于体外细胞处理)在待治疗细胞中的生物利用度通常较差。这种不良的生物利用度主要是由于这些肽化合物对于它们的靶细胞的次最优方向(sub-optimal direction)。这可能是由于例如缺少适宜的运载体系统或使用不适合的运载体系统,其不能在体内在所期望的一个或多个靶细胞的位置有效地发挥作用,例如,其不能有效地靶向细胞质或特定的细胞目标(cellular destination)。虽然可以通过增加肽化合物的给予量或通过重复给予来克服这种效应,但给予以后体内肽化合物水平的增加会导致不希望发生的副作用。此外,肽化合物的重复给予通常持续需要医生,因此,在大多数情况下需要持续住院治疗。即使通过增加或重复给予肽化合物或通过利用更合适的运载体系统可以使这样的效应值得探讨(参见例如 US 20030050243,其中利用 TAT 作为运载体肽),它们另外也会经历早期降解(preterm degradation),因此,会再次显示出在体内的生物利用度较差。这种效应部分是由于细胞内过程,例如,通过分解酶(如蛋白酶或肽酶)的降解过程,或可以是由于这些肽的体内不稳定性或在血清、脑脊液(csf)等中的蛋白水解等。然而,通过增加或重复给予该肽化合物均没有消除肽的不稳定性。

因此,鉴于上述内容,本发明的一个目的是提供一种可替换方案来降低损伤对哺乳动物细胞的有害效应,更具体地,是提供可以抑制神经元 N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)受体与 NMDAR 相互作用蛋白的相互作用的化合物,从而克服至少一些现有技术的限制性,例如,由 US 20030050243 的化合物所例示的。

根据本发明,通过融合肽来实现上述目的,其中融合肽至少包含成分(I)和成分(II),其中成分(I)包含运载体肽,成分(II)选自抑制神经元 N-甲基-D-天冬氨酸受体(NMDAR)与 NMDAR 相互作用蛋

白的相互作用的肽，其中成分(II)完全由 D-对映体氨基酸组成。对本发明来说，在如本文中指出的序列中用小写字母表示 D-对映体氨基酸，而用大写字母表示 L-对映体氨基酸。

如上文限定的，本发明的融合肽包含作为成分(I)的运载体肽。这样的运载体肽可以选自将本发明的融合肽引入细胞质，或甚至进一步引导到特定的细胞内目标的任何运载体肽。用作成分(I)的运载体肽可以例如将本发明的融合肽引导到细胞内所期望的位置，例如，细胞核、核糖体、内质网、溶酶体、或过氧化物酶体。因此，在一种优选实施方式中，本发明的融合肽的运载体肽将共轭分子引导到规定的细胞位置。总之，用作本发明的融合肽的成分(I)的运载体肽优选引导本发明的融合肽穿过质膜，例如从细胞外细胞环境穿过质膜进入细胞质，从而增强本发明的融合肽的细胞摄取，尤其是通过增强其细胞通透性或通过增强其细胞内停留时间来增强其细胞摄取。

更优选地，如上文所限定的融合肽的成分(I)可以选自细胞膜穿透肽，其包括但不限于：(a)蛋白质转导结构域(PTD)和源于蛋白质的 CPP，如源于控制触角的基因 (Antennapedia) 的序列，例如 pAntp(43-58)，包含序列 RQIKIWFQNRRMKWKK (SEQ ID NO: 1) 或 RQIKIWFQNRRMKWKK-酰胺 (或氯化物) (SEQ ID NO: 2); 或源于人免疫缺陷病毒 1(HIV-1)的序列，例如，Tat，更优选来自 TAT 的 37 至 72 区、37 至 60 区、48 至 60 区或 49 至 57 区，例如包含序列 GRKKRRQRRR (SEQ ID NO: 3)、YGRKKRRQRRR (SEQ ID NO: 4)、CGRKKRRQRRRPPQC (SEQ ID NO: 5) 或 CGRKKRRQRRRPPQCC (SEQ ID NO: 6); hCT(9-32)，包含序列 LGTYTQDFNKFHTFPQTAIGVGAP-NH₂ (SEQ ID NO: 7); pVEC，包含序列 LLILRRRIKQAHASK-NH₂ (SEQ ID NO: 8); pISL，包含序列 RVIRVWFQNKRCDDKK-NH₂ (SEQ ID NO: 9); 小鼠 PRP (1

-28), 包含序列 MANGLYWLLALFVTMWTDVGLCKKRPKP-NH₂ (SEQ ID NO: 10)或其人同源序列; E^{ms}(194-220), 包含序列 RQGAARVTSWLGLQLRIAGKRLEGRSK-NH₂ (SEQ ID NO: 11); Restricocin L3 (60-73), 包含序列 KLIKGRTPIKFGK-NH₂ (SEQ ID NO: 12); 等等, (b) 模型肽, 例如 VT5, 包含序列 DPKGDPKGVTVTVTVTVTGKGDPKPD-NH₂ (SEQ ID NO: 13)、MAP, 包含序列 KLALKLALKALKALKLA-NH₂ (SEQ ID NO: 14)、精氨酸伸长序列 (arginine stretch), 该精氨酸伸长序列包括 RRRRRRRR, 即(Arg)₇ (SEQ ID NO: 15)、或 RRRRRRRR-NH₂, 即 (Arg)₇-NH₂ (SEQ ID NO: 16)、或 RRRRRRRR-C, 即(Arg)₇-C (SEQ ID NO: 17)、或 RRRRRRRR, 即 (Arg)₈ (SEQ ID NO: 18)、或 RRRRRRRR-NH₂, 即(Arg)₈-NH₂ (SEQ ID NO: 19)、RRRRRRRRR, 即(Arg)₉ (SEQ ID NO: 20)、或 RRRRRRRR-NH₂, 即(Arg)₉-NH₂, (SEQ ID NO: 21)等, 或(c) 设计的 CPP, 例如 MPG, 包含序列 GALFLGFLGAAGSTMGAWSQPKSKRKV (SEQ ID NO: 22) 或 GALFLGFLGAAGSTMGAWSQPKSKRKV-半胱胺 (cysteamide) (SEQ ID NO: 23)、细胞膜穿透肽 (Transportan), 具有序列 GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL-NH₂ (SEQ ID NO: 24)、细胞膜穿透肽 10, 包含序列 AGYLLGKINLKALAALAKKIL-NH₂ (SEQ ID NO: 25)、Pep-1, 包含序列 KETWWETWWTEWSQPKKKRKV (SEQ ID NO: 26) 或 KETWWETWWTEWSQPKKKRKV-半胱胺 (SEQ ID NO: 27)等, 或可以选自 KALA 肽, 包含序列 WEAKLAKALAKALAKHLAKALAKALKACEA (SEQ ID NO: 28)、选自 Bulforin 2, 包含序列 TRSSRAGLQFPVGRVHRLLRK (SEQ ID NO: 29), 等等。此外, 用作本发明的融合肽的成分(I)的肽还可以选自与按照如上述所限定的 SEQ ID NO: 1 至 29 中的任何肽序列具有大约 60、70、80、90、95 或甚至 99%的序列一致性的肽序列, 只要成分(I)仍然保留其生物学活性, 即, 引导本发明的融合肽穿过质

膜。通常基于本发明的融合肽所要给予的细胞系统的具体要求，例如，在特定细胞系统、膜中的转运效率等，来选择如上述所限定的穿透肽作为本发明的融合肽的成分(I)。如上文所示或如本技术领域已知的运载体肽的生物学活性可以由技术人员利用标准测定而容易地确定。例如，可以将运载体肽融合于蛋白质如 GFP，或可以用放射性标记、酶或荧光团等（其可以容易地在细胞中加以检测）来标记运载体肽。然后，将融合的运载体肽转染到细胞中或将其加入培养基上清中并可以通过利用生物物理学标准方法来监测细胞膜的通透性。

如上文所限定的，融合肽的成分(I)可以由天然存在的氨基酸，即 L-氨基酸组成，或由 D-氨基酸组成，即由包含 D-氨基酸的氨基酸序列（与天然序列相比具有逆-反次序）组成。术语“逆-反（retro-inverso）”是指线性肽的同分异构体，其中序列的方向被反转并且每个氨基酸残基的手性被反演。因此，本文中的以 L-型存在的任何序列在本文中也当然地披露为 D-对映体(逆-反)肽序列。根据本发明的 D-对映体(逆-反)肽序列可以例如通过针对相应的天然 L-氨基酸序列合成反向的氨基酸序列来加以构建。在 D-逆-反对映体肽中，例如本发明的融合肽的成分，在每个单酰胺键中的羰基和氨基的位置发生交换，而保护在每个 α 碳处的侧链基团的位置。如果将逆-反肽用作本发明的融合肽的成分，则具有各种有用的特性。例如，它们更有效地进入细胞，它们更稳定(尤其是在体内)并且表现出比相应的 L-肽更低的免疫原性。相反，天然存在的蛋白质通常包含 L-氨基酸。因此，几乎所有分解酶（如蛋白酶或肽酶）可断裂相邻 L-氨基酸之间的肽键。因此，由逆-反次序的 D-对映体氨基酸组成的本发明的融合肽，尤其是成分(II)以及可选地成分(I)，在很大程度上可抗蛋白水解。

可以通过化学合成相应的天然存在的 L-型氨基酸序列的反向氨基酸序列或通过技术人员已知的任何其他适宜的方法来实现如上文所限定的具有 D-对映体氨基酸的本发明融合肽的成分的制备。优选通过固相合成将 D 氨基酸连接于所期望的逆-反序列来进行上述合成。除了使用的 D 氨基酸并以逆-反次序氨基酸进行合成以外,本发明的 D 氨基酸序列的固相合成在化学上与基于 L 氨基酸的肽的合成相同。例如,在 Brown J.等 (1979), *Methods in Enzymology*, 68:109; Sambrook J, Maniatis T (1989) (上文) 中提供了用于构建任何所期望的 DNA 序列的一般方法。

可替换地,可以利用如上述所披露的化学合成来制备本发明的融合肽或其成分的 D-逆-反-对映体形式,其中利用本发明的融合肽或其成分的 L-型作为化学合成 D-逆-反-对映体形式的母体。

如上文所限定的,本发明的融合肽的成分(II)选自能够抑制神经元 N-甲基-D-天冬氨酸受体(NMDAR)与 NMDAR 相互作用蛋白(如相关蛋白,例如 PSD-95、神经元蛋白等)的相互作用的任何肽。这样的肽通常捕获(一种或多种) NMDAR 相互作用蛋白并由此抑制 NMDA 受体与这些蛋白质的相互作用,反之亦然。而且,这些肽并不阻断 NMDA 受体,因此避免了与 NMDA 受体的阻断有关的缺点。更具体地,如上文所限定的本发明的融合肽的成分(II)可以选自设计为通过模拟 NMDAR 的相互作用结构域(例如, NR2 的 C 端 PDZ 相互作用结构域)或通过模拟相关蛋白的相互作用结构域(例如, PSD-95 的 PDZ1 结构域)来中断 NMDAR 与其相关蛋白之间的相互作用(例如 PSD-95-NR2 相互作用)的任何肽。适宜作为本发明的融合肽的成分(II)的肽可以选自(但不限于)NMDA 受体亚单位 NR1 和 NR2。N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)受体的 NR1 和 NR2 亚单位由不同基因编码。在大鼠脑中, NR1 亚单位的四个 C 端变体(NR1-1 至 NR1-4)是单个基因编码的,并通过 C1 和 C2 外显子盒(exon cassette)

的选择性剪接而产生，而 NR2 亚单位(NR2 A-D)由四种不同的基因编码。功能性 NMDA 受体来自于 NR1 变体与不同 NR2 亚单位的异源多聚体组装 (heteromultimeric assembly)。NR2B 亚单位与突触后致密蛋白物 95(PSD-95)、SAP97 等、以及蛋白质的膜相关鸟苷酸样激酶(MAGUK)家族的成员发生相互作用。这种相互作用通过 NR2B 亚单位的 C 端 tSX_nV 细胞内基序与 PSD-95 和 SAP97 蛋白的 N 端 PDZ(PSD-95, discs-large, ZO-1)结构域的结合而发生。NR1-3 和 NR1-4 也都显示一致的 C 端 tSX_nV 基序。因此，用作本发明的融合肽的成分(II)的肽可以选自包含 tSX_nV 基序的肽，其中 S 是丝氨酸，X_n 是任何氨基酸(其中 n 为至少 1、2、3、4、5 等)，以及 V 是缬氨酸。特别优选地，用作本发明的融合肽的成分(II)的肽可以选自衍生自 NMDAR 的肽，其能够结合于突触后致密物-95 蛋白、结合于 PSD-95、结合于 PSD-93、或结合于 SAP102，更优选衍生自这样的肽，其结合 PDZ-结合结构域，如包含多肽的 PDZ2-结构域，优选相应于 PSD-95 的残基 65-248，编码 PSD-95 的第一和第二 PDZ 结构域(PDZ1-2)。通常，用作本发明的融合肽的成分(II)的上述肽包含长度为 5 至 40 个氨基酸，优选长度为 5 至 30 个或 5 至 20 个氨基酸，以及更优选长度为 5 至 15 个或甚至 5 至 10 个氨基酸。甚至更优选地，适宜作为本发明的融合肽的成分(II)的肽可以选自包含 D-对映体氨基酸序列 vdseisslk(SEQ ID NO: 31)的序列或与 SEQ ID NO: 31 的序列(或任何上述序列)具有约 60、70、80、90、95、或最优选 99%的序列一致性的序列。

如在本文中所限定的，术语“序列一致性”是指如下述对序列进行比较。为了确定两个氨基酸序列的一致性百分数 (percent identity)，出于最佳比较的目的，可以对序列进行比对(例如，可以在第一氨基酸序列的序列中引入空位)。然后可以比较在相应氨基酸位置的氨基酸。当第一序列中的一个位置被与第二序列中相应位置的相同氨基酸占据时，那么分子在该位置是相同的。两个序列之间

的一致性百分数是序列共有的相同位置数的函数。例如，如果提到特定肽相对于确定长度的参比多肽具有特定的一致性百分数时，该一致性百分数是相对于该参比肽的。因此，与参比多肽（其长度为100个氨基酸）具有50%一致性的肽可以是50个氨基酸的多肽，其与参比多肽的长度为50个氨基酸的部分完全一致。它还可以是长度为100个氨基酸的多肽，其整个长度中有50%与参比多肽相同。因此，认为具有特定的一致性百分数的特定肽，可以选自但不限于例如一种具体的肽，例如，按照用于成分(I)的 SEQ ID NO: 1 至 29 中的任一种，以及选自一种具体的肽，例如，按照用于成分(II)的 SEQ ID NO: 31，或选自例如按照用于整个融合肽的 SEQ ID NO: 33 和 35 的肽。当然，其他多肽将满足相同的标准。可以利用数学算法来完成两个序列的一致性百分数的确定。用于比较两个序列的数学算法的优选的、非限制性实例是 Karlin 等(1993), PNAS USA, 90:5873-5877 的算法。将这样的算法并入 NBLAST 程序中，其可以用来鉴别与本发明的氨基酸序列具有所期望的一致性的序列。为了获得用于比较目的的空位比对（gapped alignment），如在 Altschul 等(1997), Nucleic Acids Res, 25:3389-3402 中所描述的，可以采用空位 BLAST（gapped BLAST）。当采用 BLAST 和空位 BLAST 程序时，可以使用各程序(例如，NBLAST)的默认参数。可以利用 Genetic Computing Group's GAP(全局比对程序)的版本 9 进一步对这些序列进行比对，其中利用默认(BLOSUM62)矩阵(数值-4 至+11)，其空位开放罚分(对于空位的第一空值)为-12，且空位延伸罚分(在空位中的每个另外的连续空值)为-4。在比对以后，通过将匹配数表示为在所要求的序列中的氨基酸数目的百分率来计算一致性百分数。所描述的用于确定两个氨基酸序列的一致性百分数的方法可以相应地用于核酸序列。

如上文所限定的，本发明的融合肽的成分(II)完全由 D-对映体氨基酸组成，即，由包含如上文所限定的逆-反次序的 D-氨基酸的

氨基酸序列组成，并且可以如上文所述所披露的来制备。如用于本发明融合肽的成分(II)的逆-反肽具有如上文针对成分(I)已经描述的各种有用的特性，例如，形成本发明的融合肽的一部分的成分由于缺少这种成分的蛋白水解等而具有更长的生物利用度。

可以直接或经由联结子（或接头，linker）来连接本发明融合肽的成分(I)和(II)。本文中的“联结子（linker）”优选为寡肽或多肽并且可以用来连接如上文所限定的成分(I)和(II)。优选地，联结子的长度为 1-10 个氨基酸，更优选 1 至 5 个氨基酸，以及最优选 1 至 3 个氨基酸。有利地，联结子并不具有任何形成二级结构的特性，即，没有任何形成 α -螺旋或 β -片层结构的趋势，例如，如果联结子由至少 35% 的甘氨酸残基组成。联结子通常可以是全甘氨酸序列，例如 GG、GGG、GGGG、GGGGG 等。使用细胞内/内源可裂解的寡肽或多肽序列作为联结子可以使得在递送到靶细胞以后成分(II)与成分(I)分开。在这种情况下，可裂解的寡肽或多肽序列还包括蛋白酶可裂解的寡肽或多肽序列，其中蛋白酶裂解位点的选择通常取决于由经处理的细胞内源表达的蛋白酶。如果如上文所限定的联结子以寡肽或多肽序列的形式存在，则可以由 D-氨基酸或天然存在的氨基酸（即 L-氨基酸）组成。作为上述方法的一种可替换方法，可以由偶联剂或共轭（结合）剂（例如交联剂）使本发明融合肽的成分(I)和(II)偶联。有若干种可以使用的分子间交联剂，参见例如，Means 和 Feeney, *Chemical Modification of Proteins*, Holden-Day, 1974, 第 39-43 页。这些试剂包括，例如，N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫)丙酸酯(SPDP)或 N,N'-(1,3-亚苯基)双马来酰亚胺；N,N'-亚乙基-双-(碘乙酰胺)或具有 6 至 11 个碳亚甲基桥的其他这样的试剂；以及 1,5-二氟-2,4-二硝基苯。可用于此目的的其他交联剂包括 p,p'-二氟-m,m'-二硝基二苯基砷；二甲基己二酰亚胺酸酯（dimethyl adipimidate）；苯酚-1,4-二磺酰氯（phenol-1,4-disulfonylchloride）；亚己基二异氰酸酯或亚己基二异硫氰酸酯、或偶氮苯基-对-二异氰

酸酯；戊二醛以及二重氮基联苯胺（disdiazobenzidine）。交联剂可以是双同官能团的（homobifunctional），即，具有两个官能团，进行相同的反应。优选的双同官能团交联剂是双马来酰亚胺正己烷（BMH）。BMH 包含两个马来酰亚胺官能团，其在温和条件（pH 6.5-7.7）下特异性地与含巯基的化合物发生反应。两个马来酰亚胺基团通过烃链来连接。因此，BMH 用于包含半胱氨酸残基的蛋白质（或多肽）的不可逆交联。交联剂还可以是双异官能团的（heterobifunctional）。双异官能团交联剂具有两个不同的官能团，例如胺反应基团和巯基反应基团，它们会分别使具有游离胺和羟基的两种蛋白质发生交联。异双官能团交联剂的实例是琥珀酰亚胺 4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸酯（SMCC）、间-马来酰亚胺苯甲酰基-N-羟基琥珀酰亚胺酯（MBS）、以及琥珀酰亚胺 4-(对-马来酰亚胺基苯基)丁酸酯（SMPB），其是 MBS 的一种延长链类似物。这些具有伯胺的交联剂的琥珀酰亚胺基，以及巯基反应性马来酰亚胺与半胱氨酸残基的巯基形成共价键。由于交联剂在水中经常具有低溶解度，所以可以将亲水部分如磺酸酯（盐）基团加入交联剂，以改善其水溶性。硫代 MBS 和硫代 SMCC 是具有改善的水溶性的交联剂的实例。许多交联剂产生在细胞条件下基本上是不可裂解的共轭物（结合物）。因此，一些交联剂包含共价键，如二硫化物，其在细胞条件下是可裂解的。例如，Traut's 试剂、二硫代双(琥珀酰亚胺基丙酸酯)（DSP）、以及 N-琥珀酰亚胺基 3-(2-吡啶基二硫)丙酸酯（SPDP）是众所周知的可裂解交联剂。可裂解交联剂的使用可以使在递送到靶细胞以后成分(II)与成分(I)分开，只要细胞能够裂解交联剂的特定序列。为此，也可以采用直链二硫键（direct disulfide linkage）。化学交联还包括使用间隔臂（spacer arms）。间隔臂提供分子内柔性或调节共轭部分之间的分子内距离，从而有助于保存生物学活性。间隔臂可以具有蛋白质（或多肽）部分的形式，其包括间隔氨基酸，例如脯氨酸。可替换地，间隔臂可以是交联剂的一部分，如在“长链 SPDP”中（Pierce Chem. Co., Rockford, Ill., cat. No.

21651 H)。许多交联剂（包括上文所讨论的交联剂）是可商购的。关于它们的使用的详细说明可容易地获自商品供应商。关于蛋白质的交联和共轭物制备的一般参考文献是：Wong, Chemistry of Protein Conjugation and Cross-Linking, CRC Press (1991)。

如上文所限定的，本发明的融合肽可以可选地包含另外的成分(III)。这样的成分(III)优选为在合成之后用于纯化融合肽的标签。在本发明的上下文中，“用于纯化的标签”可以是任意种类的适用于重组蛋白纯化的标签，如六组氨酸-标签(his-标签、聚组氨酸-标签)、链霉亲和素(strep-标签)、SBP-标签(链霉亲和素结合标签)、GST(谷胱甘肽-S-转移酶)-标签、丹磺酰-标签等，或借助于抗体表位(抗体结合标签)，例如 myc-标签、Swal1-表位、FLAG-标签等。如上所述的标签优选位于如上文所限定的由成分(I)、(II)以及可选的成分(III)组成的(整个)融合肽的 C 端。例如，如上所述的标签优选位于成分(I)的 C 端（如果成分(I)位于融合肽的 C 端），或更优选地位于成分(II)的 C 端（如果成分(II)位于融合肽的 C 端）。此外，优先选择如上所述的成分(III)，以便不干扰成分(I)或(II)的生物功能，例如，本发明的融合肽的成分(I)的穿透细胞膜的能力，以及成分(II)的抑制 NMDAR 与 NMDAR 相互作用蛋白的相互作用能力。因此，优先选择非大体积的（non-bulky）标签作为成分(III)，如六组氨酸-标签、链抗生物素蛋白标签(strep-标签)、SBP-标签(链抗生物素蛋白结合标签)，或抗体表位，例如 myc-标签、Swal1-表位、FLAG-标签等。

此外，如果如上述所限定的成分(III)以寡肽或多肽的形式存在，则其可以由如上文所限定的 D-氨基酸或由天然存在的氨基酸（即，L-氨基酸）组成。因此，包含成分(I)、(II)和可选的成分(III)、以及如上文所限定的联结子的整个融合肽，可以由如上文所限定的 D-氨基酸组成。如果包含成分(I)、(II)和可选的成分(III)、以及如上文所限定的联结子的本发明的整个融合肽由 D-氨基酸组成，则就整体

而言,融合肽可以如上述针对本发明融合肽的 D-对映体成分所披露的制备,例如利用化学合成方法或任何其他适合的方法。

通常,可以适当地排列如上文所限定的本发明的融合肽的成分(I)、(II)以及可选的(III),即,以允许当排列在本发明的融合肽中成分(I)能够引导本发明的融合肽穿过质膜的任何次序进行排列。而且,成分(II)仍然应该能够抑制 N-甲基-D-天冬氨酸受体与 NMDAR 相互作用蛋白的相互作用。根据一种优选实施方式,成分(I)可以位于本发明的融合肽的 N 端,而成分(II)可以位于本发明的融合肽的 C 端。此外,如果在本发明的融合肽中包含如上文所限定的成分(III),则成分(III)可以位于本发明的整个融合肽的 C 端。因此本发明的融合肽的一种优选排列可以显示为从 N 端至 C 端为成分(I)、成分(II)、以及可选的成分(III)。然而,还可以选择其他排列,例如从 N 端至 C 端为成分(II)、成分(I)、以及可选的成分(III)。如果合适的话,可以将联结子插入如上文所限定的成分(I)和(II)之间。

本发明的融合肽还可以包含如上文所限定的成分(I)和/或成分(II)的“衍生物”。根据本发明的成分(I)和/或(II)的衍生物是指成分(I)或(II)的序列,其来源于如上文所限定的成分(I)或(II)的天然存在的(L-氨基酸)序列,通过在氨基酸序列的一个或多个位点置换一个或多个氨基酸、通过在天然存在序列的任何位点缺失一个或多个氨基酸、和/或通过在天然存在的肽序列的一个或多个位点插入一个或多个氨基酸而获得。如果用作本发明的融合肽的成分(I)或(II),“衍生物”应保留它们的生物学活性,例如,成分(I)的衍生物应能够将本发明的融合肽引入细胞质,或甚至进一步,如上文所限定的,引至特定的细胞目标,而成分(I)的衍生物应能够抑制神经元 N-甲基-D-天冬氨酸受体(NMDAR)与 NMDAR 相互作用蛋白的相互作用。在本发明的上下文中,衍生物还可以以如上文所限定的它们的 L-或 D-氨基酸序列的形式存在、或以这两种形式存在。

如果进行氨基酸的置换来制备本发明的融合肽的成分(I)和/或成分(II)的衍生物,则保守性(氨基酸)置换是优选的。保守性(氨基酸)置换通常包括在以下组内的置换:甘氨酸和丙氨酸;缬氨酸、异亮氨酸和亮氨酸;天冬氨酸和谷氨酸;天冬酰胺和谷氨酰胺;丝氨酸和苏氨酸;赖氨酸和精氨酸;以及苯丙氨酸和酪氨酸。因此,优选的保守性置换组是天冬氨酸-谷氨酸;天冬酰胺-谷氨酰胺;缬氨酸-亮氨酸-异亮氨酸;丙氨酸-缬氨酸;苯丙氨酸-酪氨酸;以及赖氨酸-精氨酸。通过这样的突变,例如,可以使本发明的融合肽的成分(I)和(II)的稳定性和/或有效性得到增强。如果将突变引入本发明的融合肽的成分(I)和(II),这些成分(I)和(II)仍然是与具有相应亲本序列的蛋白质(功能上)同源的,例如,在序列、在功能、以及在抗原特性或其他功能方面。本发明的融合肽的上述突变成分(I)和(II)可以具有变化的特性,对于某些应用而言,其可以优于成分(I)和(II)的未变化的序列(例如,增加的 pH 最适度、提高的温度稳定性等)。

本发明的融合肽的成分(I)的衍生物或成分(II)的衍生物分别被限定为与如上述所限定的本发明的融合肽的成分(I)或成分(II)的非修饰序列基本上一致,例如与 HIV TAT 蛋白转运序列(如果用作成分(I))基本一致。特别优选的氨基酸序列与天然存在的类似物具有至少 30%的序列一致性,优选至少 50%,甚至优选至少 60%,甚至优选至少 75%,甚至更优选至少 80%,还更优选 90%以及最优选至少 95%或甚至 99%。上文描述了用于合成或分离本发明的融合肽的成分(I)和(II)的功能化衍生物以及用于确定两个氨基酸序列的一致性百分数的适当方法。另外,用于生产如上述所披露的本发明的融合肽的成分(I)和(II)的衍生物的方法是众所周知的,并且能够按照本领域技术人员熟知的标准方法来实施(参见,如 Sambrook J, Maniatis T (1989), 见上)。

作为一种进一步的实施方式，本发明提供了包含如上文所限定的本发明的融合肽的药物组合物。优选地，这样的药物组合物包含本发明的融合肽，其具有如上述所限定的成分(I)和(II)、可选地具有成分(III)以及可选的联结子。另外，这样的药物组合物可以包含药用载体、佐剂、或赋形剂。本发明的“药用载体、佐剂、或赋形剂”是指无毒的载体、佐剂或赋形剂，其并不破坏与其一起进行配制的本发明的融合肽的药理活性。可以用于本发明的药物组合物中的药用载体、佐剂或赋形剂包括但不限于：离子交换剂、氧化铝、硬脂酸铝、卵磷脂、血清蛋白（如人血清白蛋白）、缓冲物质（如磷酸盐）、甘氨酸、山梨酸、山梨酸钾、饱和植物脂肪酸的部分甘油酯混合物、水、盐或电解质（如硫酸鱼精蛋白）、磷酸氢二钠、磷酸氢钾、氯化钠、锌盐、胶体氧化硅、三硅酸镁、聚乙烯吡咯烷酮、基于纤维素的物质、聚乙二醇、羧甲基纤维素钠、聚丙烯酸酯、蜡、聚乙烯-聚氧丙烯嵌段聚合物、聚乙二醇以及羊毛脂。

可以口服、肠胃外、通过吸入喷雾、局部、直肠、鼻部、口腔、阴道或经由植入型药盒（implanted reservoir）来给予本发明的药物组合物。

如在本文中所使用的，术语“肠道外”包括皮下、静脉内、肌内、关节内、滑膜内、胸骨内、鞘内、肝内、损伤内（intralesional）以及颅内注射或输注技术。优选口服、腹膜内或静脉内给予该药物组合物。本发明的药物组合物的无菌可注射形式可以是水性或油性的混悬剂。这些混悬剂可以按照本技术领域已知的技术使用适宜的分散剂或润湿剂以及悬浮剂来配制。无菌可注射制剂还可以是在无毒的肠道外可接受的稀释剂或溶剂中的无菌可注射溶液或混悬剂，例如在 1,3-丁二醇中的溶液。可以采用的可接受赋形剂和溶剂有水、林格液（Ringer's solution）以及等渗氯化钠溶液。此外，通常使用无菌、非挥发性油作为溶剂或悬浮介质。

为此目的，可以采用任何刺激性小的非挥发性油，包括合成的单酸甘油酯或二酸甘油酯。脂肪酸，如油酸和其甘油酯衍生物可用于制备注射物，就像天然药用油（如橄榄油或蓖麻油）一样，尤其是以它们的聚氧乙基化形式。这些油性溶液或混悬剂还可以包含长链醇稀释剂或分散剂，如羧甲基纤维素或通常用于配制包括乳剂和混悬剂的药用剂型的类似的分散剂。为了进行配制，还可以使用通常用于制备药用固体、液体、或其他剂型的其他常用的表面活性剂，如吐温、司盘类和其他乳化剂或生物利用度增强剂。

可以以任何口服剂型来口服给予本文的药用组合物，包括但不限于胶囊剂、片剂、水性混悬剂或溶液。在用于口服的片剂的情况下，通常使用的载体包括乳糖和玉米淀粉。通常还加入润滑剂，如硬脂酸镁。对于以胶囊剂形式的口服给药，有用的稀释剂包括乳糖和干玉米淀粉。当需要用于口服的水性混悬剂时，将活性成分与乳化剂和悬浮剂结合。如果需要的话，还可以加入某些甜味剂、香味剂或着色剂。

可替换地，如本文所限定的本发明的药物组合物可以以栓剂的形式给予，用于直肠给药。这样的栓剂可以通过将药剂与适宜的非刺激性赋形剂混合来制备，其中该赋形剂在室温下为固态，而在直肠温度下为液态，因而会在直肠中融化以释放药物。这样的物质包括可可脂、蜂蜡以及聚乙二醇。

还可以局部给予如本文所限定的本发明的药物组合物，尤其是当治疗的靶标包括通过局部施用容易进入的区域或器官时，其包括眼、皮肤、或下肠道（lower intestinal tract）的疾病。对于各种这些区域或器官，可以容易制备适合的局部配方。

可以以直肠栓剂剂型(参见上文)或以适合的灌肠剂剂型来局部施用于下肠道。还可以使用局部透皮贴剂。

为了局部施用，可以在适宜的软膏剂中配制如本文所限定的本发明的药物组合物，其包含如上述确定的并悬浮或溶解在一种或多种载体中的本发明的融合肽。用于局部给予本发明的融合肽的载体包括但不限于矿物油、液状石蜡、白软石蜡、丙二醇、聚氧乙烯、聚氧丙烯化合物、乳化蜡以及水。可替换地，可以在适宜的洗剂或乳膏剂中配制如本文所限定的本发明的药物组合物，其包含悬浮或溶解在一种或多种药用载体中的本发明的融合肽。适宜的载体包括但不限于矿物油、单硬脂山梨坦、聚山梨酯 60、十六烷基酯蜡、鲸蜡基-硬脂基醇（cetearyl alcohol）、2-辛基十二醇、苧醇以及水。

为了进行眼部应用，可以将本发明的药物组合物配制成在等渗、pH 经调节的无菌盐水中的微粒化混悬剂，或优选地，配制成在等渗、pH 经调节的无菌盐水中的溶液，其中含有或不含有防腐剂，如苯扎氯铵（benzylalkonium chloride）。可替换地，为了进行眼部应用，可以在软膏剂（如凡士林）中配制该药用组合物。

还可以通过鼻腔气雾剂或吸入剂来给予如本文所限定的本发明的药物组合物。可以按照药物剂型领域众所周知的技术来制备这样的组合物，并且可以制备成盐水中的溶液，其中采用苧醇或其他适宜的防腐剂、吸收促进剂（以增强生物利用度）、碳氟化合物、和/或其他常规增溶剂或分散剂。

最优选地，将本文的药用组合物配制为用于口服或肠道外给予，例如通过注射。

为了治疗目的，无毒的、损伤减少的、有效量的本发明的融合肽可以用于制备如上文所限定的本发明的药物组合物。因此，可以使一定量的本发明的融合肽结合于一种或多种载体物质以产生如上文所限定的组合物。本发明的药物组合物通常被制备成单(或多)剂量形式，其将随所治疗的宿主和给予的特定方式不同而变化。通

常，将本发明的药物组合物配制为可以在 0.001-100 mg/kg 体重/天的融合肽的剂量范围/剂量给予接受本发明的药物组合物的患者。优选的剂量范围/剂量在 0.01-50 mg/kg 体重/天变化，甚至进一步优选的剂量范围/剂量在 0.1-25 mg/kg 体重/天变化。然而，如上所述的剂量范围和治疗方案可以适当地适用于任何特定的患者，这取决于各种因素，其包括所采用的具体的本发明的融合肽的活性、年龄、体重、一般健康状况（general health）、性别、饮食、给药的时间、排泄速率、联合给药、治疗医生的判断以及待治疗的具体疾病的严重性。关于这一点，可以在初始剂量范围内进行给药，其中初始剂量范围可以在整个治疗的时间内而不同，例如通过在如上文所述的范围内增加或减少初始剂量范围。可替换地，通过给予特定的剂量范围，可以以连续方式进行给药，从而在整个治疗期间维持初始剂量范围。此外可以将两种给予形式结合，例如，如果在各种治疗阶段之间调整剂量范围(增加或减少)，就在单个阶段内保持恒定，从而各阶段的剂量范围彼此不同。

本发明的药物组合物可以用于治疗、改善或预防与对哺乳动物细胞伤害的损伤效应有关的疾病（如本文披露的），尤其用于治疗脑卒中或脊髓损伤、对脑或脊髓的缺血性或创伤性损伤、以及对中枢神经系统(CNS)神经元的损伤（包括但不限于急性 CNS 损伤）、缺血性脑卒中或脊髓损伤、以及缺氧、缺血、机械损伤、神经性疼痛，尤其是与 PSD-95 和/或 NMDAR 相互作用有关的神经性疼痛等。此外，本发明的药物组合物可以用来对兴奋性毒性损伤和缺血性损伤、兴奋性毒性、缺少神经营养性支持（neurotrophic support）、失连接（或切断，disconnection）、对神经元的损伤，包括例如癫痫、慢性神经变性病症等提供神经保护效应或对其进行治疗。关于这一点，兴奋性中毒尤其与中风创伤性脑损伤和中枢神经系统(CNS)的神经变性疾病有关，例如可如此得到治疗的多发性硬化症、阿尔茨海默病、肌萎缩侧索硬化(ALS)、纤维肌痛、帕金森病、以及亨廷

顿病。引起神经元周围谷氨酸浓度过高并可以如此得到治疗的其他常见病症是低血糖症和癫痫持续状态、青光眼/视网膜神经节细胞衰退等。

与对哺乳动物细胞伤害的损伤效应（如上述所限定的）以及与其他疾病或病症（如本文所述的）有关的疾病的治疗、改善或预防通常是通过在如上述所限定的剂量范围内给予如上述限定的本发明的药物组合物来进行的。可以在兴奋性中毒和/或(缺血性)脑损伤（即对哺乳动物细胞损害的损伤效应）发作前或发作时或发作后，给予本发明的药物组合物；例如，可以在脑卒中或脊髓损伤、对脑或脊髓的缺血性或创伤性损伤、以及一般地对中枢神经系统(CNS)神经元的损伤以后，在(长达)1 小时(0-1 小时)、长达 2 小时、长达 3-5 小时或长达 24 小时或更长的时间内给予本发明的药物组合物。

本发明还提供了试剂盒，该试剂盒包括至少一种上述配方的上文所限定的本发明的药物组合物(在一个或多个容器中)，以及涉及与本发明的药物组合物的应用有关的说明和/或信息的说明书或信息册。

虽然以上披露内容已描述和说明了本发明的某些优选的实施方式，但应当明了，本发明并不限于那些具体实施方式。而是，本发明包括功能上或机制上等效于已描述和说明的具体实施方式和特点的所有实施方式。

附图说明

以下附图是用来进一步说明本发明而不是限制本发明的范围。

图 1: 示出在了 20 μ M NMDA 存在下，SEQ ID NO: 32 和 33 的融合肽的效力的持续时间，具体地是 L-型 TAT-NR2B9c 肽

(L-TAT-L-NR2B9c 序列 YGRKKRRQRRR-KLSSIESDV(SEQ ID NO: 32), 与 US 20030050243 相同)与其 D-型(D-TAT-D-NR2B9c, 序列 vdseisslk-rrrqrrkrgy(SEQ ID NO: 33))相比。在此实验(以及以下实验)中, 平行于肽的添加测量细胞死亡率, 其中肽能够通过 NMDA 受体相互作用而抑制细胞死亡。如在图 1 中可以看出, 在任何单一实验中, 与 SEQ ID NO: 32 的比较化合物 L-TAT-L-NR2B9c 相比, 根据 SEQ ID NO: 33 的 D-TAT-D-NR2B9c 表现至少相等的效力, 而在多数情况下效力显著增加, 即神经元细胞的细胞死亡率(%)显著降低; 图 1 中的*表示 $P < 0.05$, @表示 $P < 0.07$ (配对 t 检验, 比较经肽处理的神经元与对照神经元)。尤其是, 如果肽培育和 NMDA 添加之间的间隔 ≥ 8 小时, 则 D-TAT-D-NR2B9c 显示其正效应。这揭示了 D-型的延长的药理活性。在 4 和 48 小时之间, 尤其是在 8 和 24 小时之间, 观测到最有效的治疗窗。

图 2: 示出了在 $40 \mu\text{M}$ NMDA 存在下, SEQ ID NO: 32 和 33 的融合肽的效力的持续时间, 具体地是 L-型 TAT-NR2B9c 肽 (L-TAT-L-NR2B9c 序列 YGRKKRRQRRR-KLSSIESDV(SEQ ID NO: 32), 与 US 20030050243 相同)与其 D-型(D-TAT-D-NR2B9c, 序列 vdseisslk-rrrqrrkrgy 反向(SEQ ID NO: 33))相比。如在图 2 中可以看出, 在任何单一实验中, 与根据 SEQ ID NO: 32 的比较化合物 L-TAT-L-NR2B9c 相比, 根据 SEQ ID NO: 33 的 D-TAT-D-NR2B9c 表现出至少相等的效力、而多数情况下效力显著增加, 即神经元细胞的细胞死亡率(%)显著降低。图 2 中的*表示 $P < 0.05$, @表示 $P < 0.07$ (配对 t 检验, 比较经肽处理的神经元与对照神经元)。如果时间窗短于 24 小时, 则本发明的融合肽的显著的正效应会变得显而易见。

图 3: 示出了在 $20 \mu\text{M}$ NMDA 存在下, SEQ ID NO: 34 和 35 的融合肽的效力的持续时间, 具体地是 L-型(Arg)₈-NR2B9c 肽

(L-(Arg)₈-L-NR2B9c 序列 RRRRRRRRR-KLSSIESDV(SEQ ID NO: 34))与其 D-型(D-(Arg)₈-D-NR2B9c, 序列 vdseisslk-rrrrrrrr(SEQ ID NO: 35))相比。如在图 3 中可以看出, 在任何单一实验中, 与根据 SEQ ID NO: 34 的比较化合物 L-(Arg)₈-L-NR2B9c 相比, 根据 SEQ ID NO: 35 的本发明的融合肽 D-(Arg)₈-D-NR2B9c 表现出至少相等的效力, 而在多数情况下效力显著增加, 即神经元细胞的细胞死亡率(%)显著降低; 在图 3 中的*表示 P<0.05, @表示 P<0.07(配对 t 检验, 比较经肽处理的神经元与对照神经元)。

图 4: 示出了在 40 μ M NMDA 存在下, SEQ ID NO: 34 和 35 的融合肽的效力的持续时间, 具体地是 L-型(Arg)₈-NR2B9c 肽 (L-(Arg)₈-L-NR2B9c 序列 RRRRRRRRR-KLSSIESDV(SEQ ID NO: 34))与其 D-型(D-(Arg)₈-D-NR2B9c, 序列 vdseisslk-rrrrrrrr(SEQ ID NO: 35))相比。如在图 4 中可以看出, 在任何单一实验中, 在长达 8 小时的时间点上, 与根据 SEQ ID NO: 34 的比较化合物 L-(Arg)₈-L-NR2B9c 相比, 根据 SEQ ID NO: 35 的本发明的融合肽 D-(Arg)₈-D-NR2B9c 表现出至少相等的效力、而在多数情况下效力显著增加, 即神经元细胞的细胞死亡率(%)显著降低; 在图 4 中的*表示 P<0.05, @表示 P<0.07(配对 t 检验, 比较经肽处理的神经元与对照神经元)。

实施例

以下实施例是用来进一步说明本发明而不是将本发明的范围局限于这些实施例。

实施例 1 本发明的融合肽的合成

按照标准程序, 通过 N^α-Boc 化学 SPPS, 在 MBHA 树脂 (Novabiochem, Merck)上人工合成 TAT-NR2B9C 肽。通过 TNBSA

显色试验来监测所有偶联。在 0°C 下, 用含有适合的清除剂的 90% HF 处理 1 小时使肽裂解并同时使肽脱树脂保护。将粗肽溶解于 20% 的乙酸水溶液, 用双蒸水稀释至 5% 乙酸溶液, 然后通过二乙醚洗涤来提取剩余的清除剂。然后将包含肽的溶液冻干以除去乙酸。借助于制备 RP-HPLC 在 Atlantis (Waters) dC₁₈ 柱上纯化肽 L/D-NR2B9C (15-45% 缓冲液 B, 以 15 mL/min, 经 45 分钟), 然后通过 ESI-MS 加以表征。

(Arg)₈-NR2B9C 肽是人工合成的。该合成在固相载体上、利用 Fmoc 策略在 Novabiochem 的 Fmoc-Val-NovaSyn TGA 树脂上进行, 其中负载为 0.22 mmol/g。在 ACT 自动装置上, 在对应于 145 μmol 的孔中, 使用 4 当量氨基酸、4 当量偶联剂 HOBt 以及 4 当量 DIPCDI 进行合成。由于合成需要, 每 3 个氨基酸进行双偶联:

-与 4 当量氨基酸、4 当量 HOBt 以及 4 当量 DIPCDI 的第一偶联

-与 4 当量氨基酸、4 当量 HATU 以及 4 当量 DIEA 的第二偶联。

在每次偶联以后, 用 DMF 中的 10% 乙酸酐进行加帽步骤(15 分钟)。

用 DMF 中的 20% 哌啶进行脱保护步骤(2×20 分钟)。保持在“n”位的 Fmoc 直到合成结束。在清除剂存在下, 在 86% TFA 溶液中进行裂解。在醚中沉淀肽。然后, 在 C-18 反相柱上利用 0 至 60% 乙腈梯度在 60 分钟内对肽进行纯化, 在 220 nm 处(对于肽键)和在 300 nm 处(对于 Fmoc 保护)进行 UV 检测。其后, 将具有 Fmoc 保护基团的肽冻干, 以后通过用 20 当量的 DEA 溶液处理来除去 Fmoc 保护基团。然后对肽进行再次纯化(利用和上述相同的条件), 然后冻干、分析并用于随后的实验中。

实施例2 对于兴奋性中毒损伤,由 TAT-NR2B9c 提供的神经保护的持续时间测试

方案:

将获自 E21 大鼠的大鼠皮质神经元在 Neurobasal-A 培养基+B-27 补充物(均来自 Invitrogen)、1 mM 谷氨酰胺、+50 单位/ml 青霉素、50 μ g/ml 链霉素中体外培养 7-9 天。

1. 在暴露于化合物之前的不同时间,从基于 Neurobasal-A 的培养基中除去神经元,并放入“转染培养基”(TM; Bading 等(1993), Science 260, 181-186)中: 10%最低基础培养基, Invitrogen (21090022), (包含 Earles 盐,但不含 L-谷氨酰胺), 90%盐-葡萄糖-甘氨酸(SGG)培养基 SGG: 114 mM NaCl、0.219% NaHCO₃、5.292 mM KCl、1 mM MgCl₂、2 mM CaCl₂、10 mM HEPES、1 mM 甘氨酸、30 mM 葡萄糖、0.5 mM 丙酮酸钠、0.1%酚红、胰岛素运铁蛋白-亚硒酸盐补充物(Sigma, 7.5 μ g 胰岛素/ml; 7.5 μ g 运铁蛋白/ml 和 7.5 ng 亚硒酸钠/ml); 最终摩尔渗透压浓度为 325 mosm/l)。所有随后的步骤在 TM 中进行。

2. 然后将神经元暴露于 10 μ M 的发明的融合肽 1 小时。(尤其是 L-型 TAT-NR2B9c 肽 (L-TAT-L-NR2B9c 序列 YGRKKRRQRRR-KLSSIESDV (SEQ ID NO: 32), 与 US 20030050243 相同)以及它们的 D-型(D-TAT-D-NR2B9c, 序列 vdseisslk-rrrqrkkrgy 反向 (SEQ ID NO: 33)))

3. 1 小时后在 TM 中将神经元洗涤一次以除去肽。

4. 在不同时间段以后,将神经元暴露于 20 或 40 μ M 的 NMDA 1 小时,其后将神经元置于 TM 中 24 小时。

5. 对神经元进行固定(3%多聚甲醛)并染色(DAPI, 4',6-二脒基-2-苯基吲哚)。固缩核的数目计数为总数的百分比(%)。实验重复进行三次。

结果

对于 NMDA(20 和 40 μ M), 在洗掉肽以后, D-型和 L-型 TAT-NR2B9c(L-TAT-L-NR2B9c 序列 YGRKKRRQRRR-KLSSIESDV(SEQ ID NO: 32), 与 US 20030050243 相同)、D-TAT-D-NR2B9c 序列 vdseisslk-rrrqrkkrgy 反向 (SEQ ID NO: 33))提供保护长达 4 小时。然而, 对于更低剂量的 NMDA, 在洗掉肽之后, 由 D-型提供的保护延长至长达 48 小时(图 1), 这表明它是作为治疗性药物的更有希望的候选物。对于 40 μ M NMDA, 它还提供显著的保护长达 24 小时, 而由 L-型获得的神经保护仅在 1 小时内是显著的(图 2)。

实施例 3 对于兴奋性中毒损伤, 由(Arg)₈-NR2B9c 提供的神经保护的持续时间测试

方案:

将获自 E21 大鼠的大鼠皮质神经元在 Neurobasal-A 培养基 +B-27 补充物(均来自 Invitrogen)、1 mM 谷氨酰胺、+50 单位/ml 青霉素、50 μ g/ml 链霉素中体外培养 7-9 天。

1. 在暴露于肽之前的不同时间, 从基于 Neurobasal-A 的培养基中除去神经元, 并放入包括胰岛素-运铁蛋白-亚硒酸盐补充物(Sigma)的 TM(参见上文)中。所有随后的步骤在 TM 中进行(参见上文)。

2. 然后将神经元暴露于 10 μ M 本发明的融合肽 1 小时。(尤其是 D-型 (Arg)₈-NR2B9c 肽 (D-TAT-D-NR2B9c, 序列 vdseisslk-rrrrrrrr (SEQ ID NO: 35)) 以及 L-型 (SEQ ID NO: 34))

3. 在 1 小时以后, 在 TM 中将神经元洗涤一次, 以除去肽。

4. 在不同时间段后, 将神经元暴露于 NMDA 1 小时, 其后将神经元置于 TM 中 24 小时。

5. 对神经元进行固定(3%多聚甲醛)并染色(DAPI, 4',6-二脒基-2-苯基吲哚)。将固缩核的数目计数为总数的百分比(%)。实验重复进行三次。

结果

对于 NMDA(20 μ M), 在洗掉肽以后, D-型 (Arg)₈-NR2B9c(D-(Arg)₈-D-NR2B9c (SEQ ID NO: 35)) 提供比 L-型更为优越的长达 8 小时的神经营养保护(图 3)。在更高的 NMDA 剂量(40 μ M) 下, D-型也表现出相同至更好的保护效果(图 4)。这些结果表明, D-型是作为治疗性药物的更有希望的候选物。总的说来, 虽然 D-(Arg)₈-D-NR2B9c (SEQ ID NO: 35)) 具有较短的神经营养活性持续时间, 但其类似于 D-TAT-D-NR2B9c (SEQ ID NO: 33)) 起作用, 这可以表明 D-TAT 具有比 D-(Arg)₈ 更显著的细胞穿透能力。

<110> 西根股份公司
<120> 用于抑制神经元NMDA受体 (NMDAR) 与NMDAR相互作用蛋白的相互作用的融合肽
<130> P23200BGSJ
<140> PCT/EP2007/006619
<141> 2007-07-25
<150> EP 06015911.8
<151> 2006-07-31
<160> 35
<170> PatentIn version 3.3
<210> 1
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> 序列的描述: 源自控制触角的基因的运载体肽pAntp (43-58)
<400> 1

Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys
1 5 10 15

<210> 2
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> 序列的描述: 源自控制触角的基因(43-58)的运载体肽pAntp

<220>
<221> MOD_RES
<222> (16)..(16)
<223> 酰胺化

<400> 2

Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys
1 5 10 15

<210> 3
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> 序列的描述: 源自(HIV)TAT的运载体肽

<400> 3

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
1 5 10

<210> 4
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> 序列的描述: 源自(HIV)TAT的运载体肽

<400> 4

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg

1	5	10	
---	---	----	--

<210> 5
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 <223> 序列的描述: 源自(HIV)TAT的运载体肽

 <400> 5

Cys	Gly	Arg	Lys	Lys	Arg	Arg	Gln	Arg	Arg	Arg	Pro	Pro	Gln	Cys
1				5				10						15

<210> 6
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 <223> 序列的描述: 源自(HIV)TAT的运载体肽

 <400> 6

Cys	Gly	Arg	Lys	Lys	Arg	Arg	Gln	Arg	Arg	Arg	Pro	Pro	Gln	Cys	Cys
1				5				10						15	

<210> 7
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 <223> 序列的描述: 肽hCT(9-32)的运载体肽

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (24)..(24)
 <223> 酰胺化

 <400> 7

Leu	Gly	Thr	Tyr	Thr	Gln	Asp	Phe	Asn	Lys	Phe	His	Thr	Phe	Pro	Gln
1				5					10					15	

Thr Ala Ile Gly Val Gly Ala Pro
 20

<210> 8
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 <223> 序列的描述: 运载体肽pVEC

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (18)..(18)
 <223> 酰胺化

 <400> 8

Leu	Leu	Ile	Ile	Leu	Arg	Arg	Arg	Ile	Arg	Lys	Gln	Ala	His	Ala	His
1				5				10						15	

Ser Lys

<210> 9
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> 序列的描述: 运载体肽pISL

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (16)..(16)
 <223> 酰胺化

<400> 9

Arg Val Ile Arg Val Trp Phe Gln Asn Lys Arg Cys Lys Asp Lys Lys
 1 5 10 15

<210> 10
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> 序列的描述: 运载体肽小鼠PRP (1-28)

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (28)..(28)
 <223> 酰胺化

<400> 10

Met Ala Asn Gly Leu Tyr Trp Leu Leu Ala Leu Phe Val Thr Met Trp
 1 5 10 15

Thr Asp Val Gly Leu Cys Lys Lys Arg Pro Lys Pro
 20 25

<210> 11
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> 序列的描述: 运载体肽Ems (194-220)

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (27)..(27)
 <223> 酰胺化

<400> 11

Arg Gln Gly Ala Ala Arg Val Thr Ser Trp Leu Gly Leu Gln Leu Arg
 1 5 10 15

Ile Ala Gly Lys Arg Leu Glu Gly Arg Ser Lys
 20 25

<210> 12
 <211> 13
 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> 序列的描述: 运载体肽局限曲霉素 (Restricocin) L3 (60-73)

<220>

<221> MOD_RES

<222> (13).. (13)

<223> 酰胺化

<400> 12

Lys Leu Ile Lys Gly Arg Thr Pro Ile Lys Phe Gly Lys
1 5 10

<210> 13

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> 序列的描述: 运载体肽VT5

<220>

<221> MOD_RES

<222> (26).. (26)

<223> 酰胺化

<400> 13

Asp Pro Lys Gly Asp Pro Lys Gly Val Thr Val Thr Val Thr Val Thr
1 5 10 15

Val Thr Gly Lys Gly Asp Pro Lys Pro Asp
20 25

<210> 14

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> 序列的描述: 运载体肽MAP

<220>

<221> MOD_RES

<222> (18).. (18)

<223> 酰胺化

<400> 14

Lys Leu Ala Leu Lys Leu Ala Leu Lys Ala Leu Lys Ala Ala Leu Lys
1 5 10 15

Leu Ala

<210> 15

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> 序列的描述: 运载体肽(Arg)7

<400> 15

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg

1 5

<210> 16
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> 序列的描述: 运载体肽(Arg)7-NH2

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7)..(7)
 <223> 酰胺化

<400> 16

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
 1 5

<210> 17
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> 序列的描述: 运载体肽(Arg)7-C

<400> 17

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Cys
 1 5

<210> 18
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> 序列的描述: 运载体肽(Arg)8

<400> 18

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
 1 5

<210> 19
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> 序列的描述: 运载体肽(Arg)8-NH2

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8)..(8)
 <223> AMIDATION

<400> 19

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
 1 5

<210> 20
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>

<223> 序列的描述: 运载体肽(Arg)9

<400> 20

Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg
1					5			

<210> 21

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> 序列的描述: 运载体肽(Arg)9-NH2

<220>

<221> MOD_RES

<222> (9)..(9)

<223> AMIDATION

<400> 21

Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg
1					5			

<210> 22

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> 序列的描述: 运载体肽MPG

<400> 22

Gly	Ala	Leu	Phe	Leu	Gly	Phe	Leu	Gly	Ala	Ala	Gly	Ser	Thr	Met	Gly
1				5					10					15	

Ala	Trp	Ser	Gln	Pro	Lys	Ser	Lys	Arg	Lys	Val
			20					25		

<210> 23

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> 序列的描述: 运载体肽MPG

<220>

<221> MOD_RES

<222> (27)..(27)

<223> 半胱胺修饰

<400> 23

Gly	Ala	Leu	Phe	Leu	Gly	Phe	Leu	Gly	Ala	Ala	Gly	Ser	Thr	Met	Gly
1				5					10					15	

Ala	Trp	Ser	Gln	Pro	Lys	Ser	Lys	Arg	Lys	Val
			20					25		

<210> 24

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> 序列的描述: 运载体肽MPG-NH2

<220>

<221> MOD_RES

<222> (27)..(27)

<223> 酰胺化

<400> 24

Gly Trp Thr Leu Asn Ser Ala Gly Tyr Leu Leu Gly Lys Ile Asn Leu
1 5 10 15

Lys Ala Leu Ala Ala Leu Ala Lys Lys Ile Leu
20 25

<210> 25

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> 序列的描述: 运载体肽细胞膜穿透蛋白10

<220>

<221> MOD_RES

<222> (21)..(21)

<223> 酰胺化

<400> 25

Ala Gly Tyr Leu Leu Gly Lys Ile Asn Leu Lys Ala Leu Ala Ala Leu
1 5 10 15

Ala Lys Lys Ile Leu
20

<210> 26

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> 序列的描述: 运载体肽Pep-1

<400> 26

Lys Glu Thr Trp Trp Glu Thr Trp Trp Thr Glu Trp Ser Gln Pro Lys
1 5 10 15

Lys Lys Arg Lys Val
20

<210> 27

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> 序列的描述: 运载体肽Pep-1

<220>

<221> MOD_RES

<222> (21)..(21)

<223> 半胱胺

<400> 27

Lys Glu Thr Trp Trp Glu Thr Trp Trp Thr Glu Trp Ser Gln Pro Lys
1 5 10 15

Lys Lys Arg Lys Val
20

<210> 28

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> 序列的描述: 运载体肽KALA

<400> 28

Trp Glu Ala Lys Leu Ala Lys Ala Leu Ala Lys Ala Leu Ala Lys His
1 5 10 15

Leu Ala Lys Ala Leu Ala Lys Ala Leu Lys Ala Cys Glu Ala
20 25 30

<210> 29

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> 序列的描述: 运载体肽Bulforin 2

<400> 29

Thr Arg Ser Ser Arg Ala Gly Leu Gln Phe Pro Val Gly Arg Val His
1 5 10 15

Arg Leu Leu Arg Lys
20

<210> 30

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> 序列的描述: NMDAR衍生的肽(L-型)

<400> 30

Lys Leu Ser Ser Ile Glu Ser Asp Val
1 5

<210> 31

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> 序列的描述: NMDAR 衍生的肽(D-型)

<400> 31

Val Asp Ser Glu Ile Ser Ser Leu Lys
1 5

<210> 32
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> 序列的描述: L-TAT-L-NR2B9c序列

<400> 32

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile
 1 5 10 15

Glu Ser Asp Val
 20

<210> 33
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> 序列的描述: D-TAT-D-NR2B9c

<400> 33

Val Asp Ser Glu Ile Ser Ser Leu Lys Arg Arg Arg Gln Arg Arg Lys
 1 5 10 15

Lys Arg Gly Tyr
 20

<210> 34
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> 序列的描述: L-(Arg)8-L-NR2B9c

<400> 34

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile Glu Ser Asp
 1 5 10

Val

<210> 35
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> 序列的描述: D-(Arg)8-D-NR2B9c

<400> 35

Val Asp Ser Glu Ile Ser Ser Leu Lys Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
 1 5 10 15

Arg

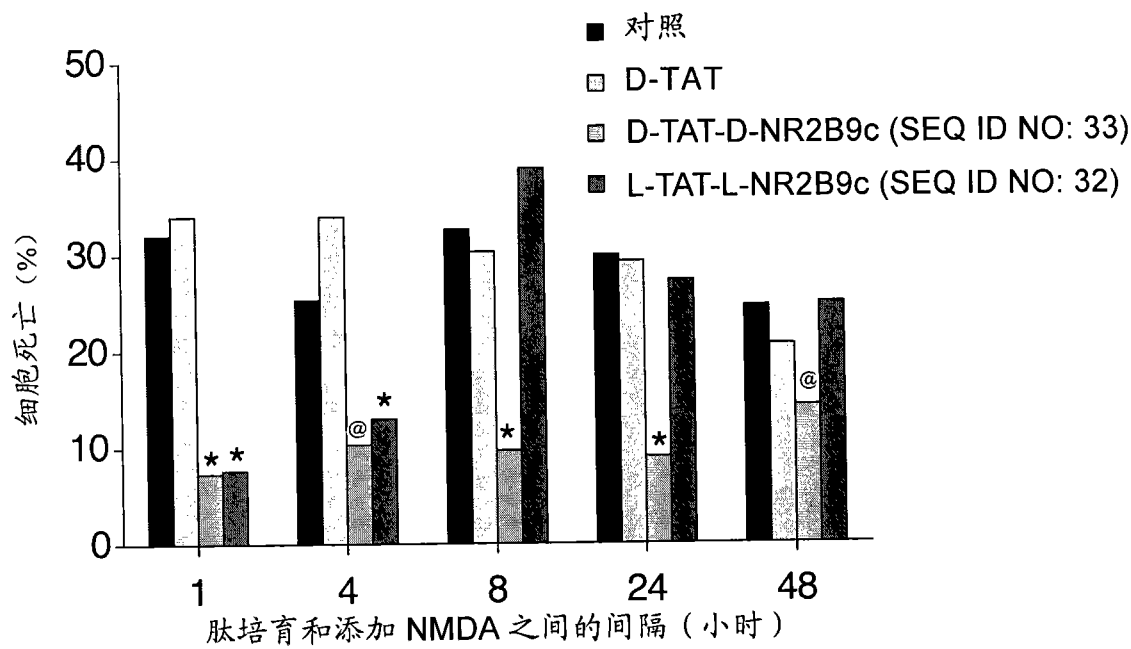


图 1

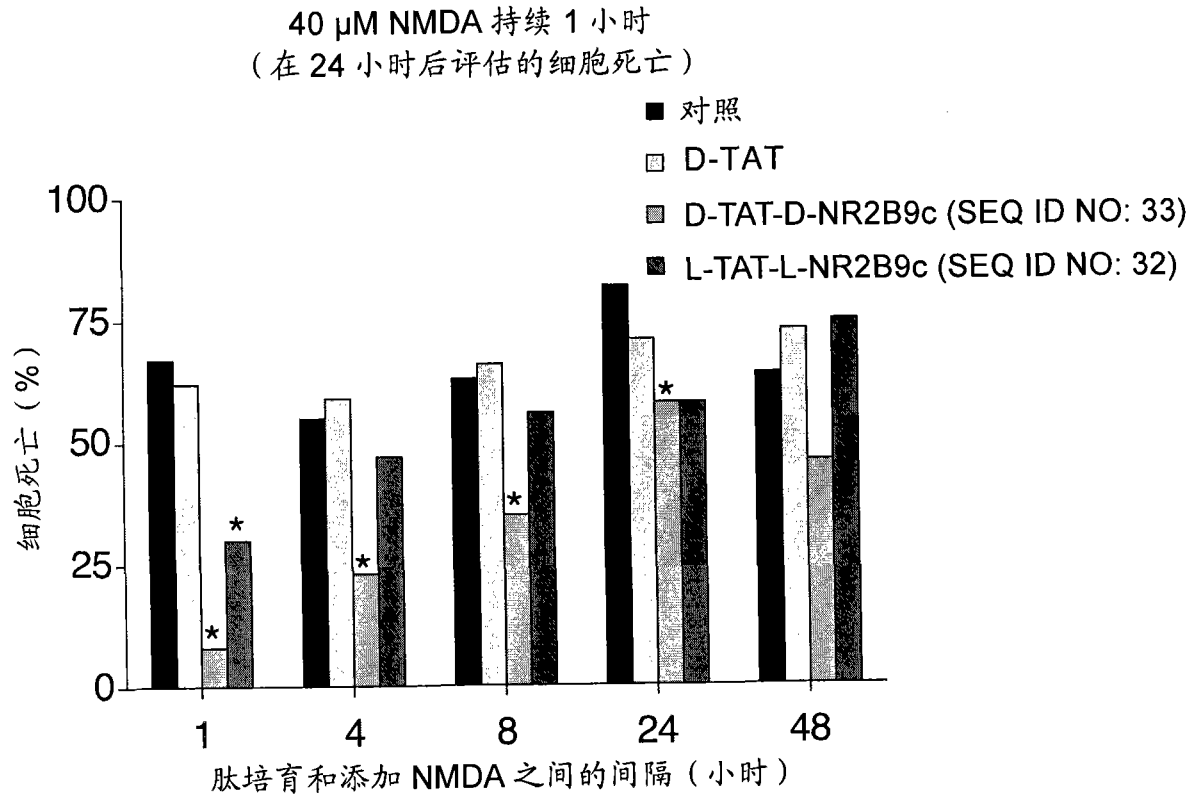


图 2

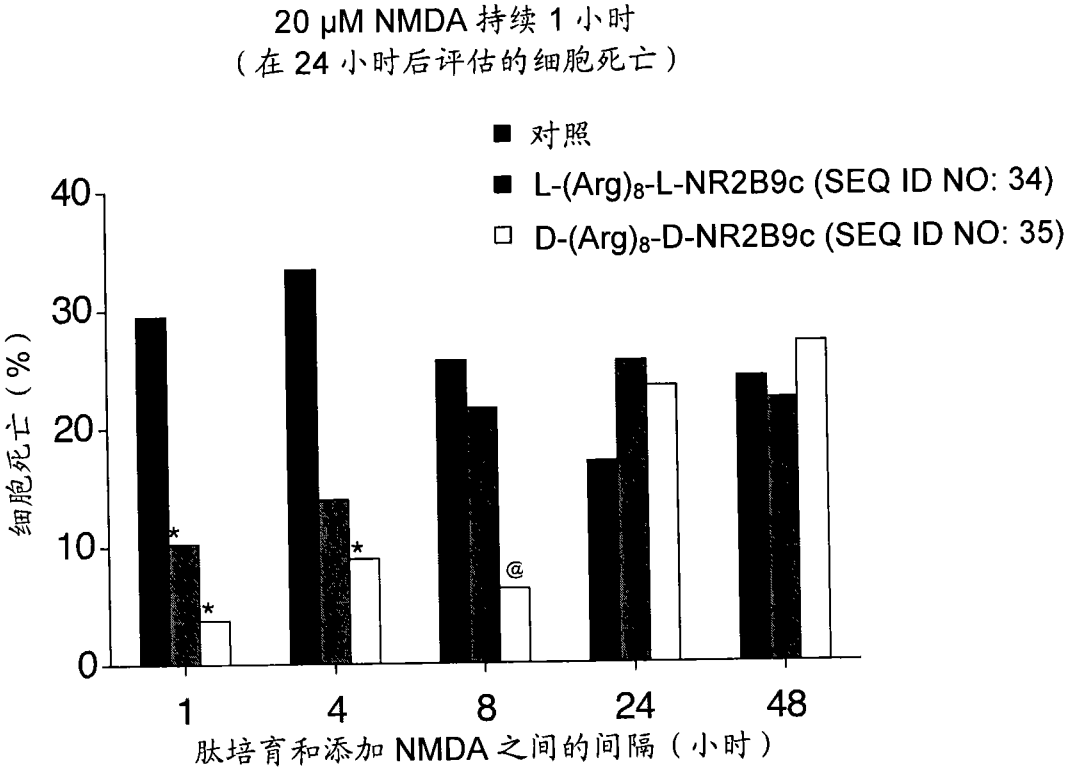


图 3

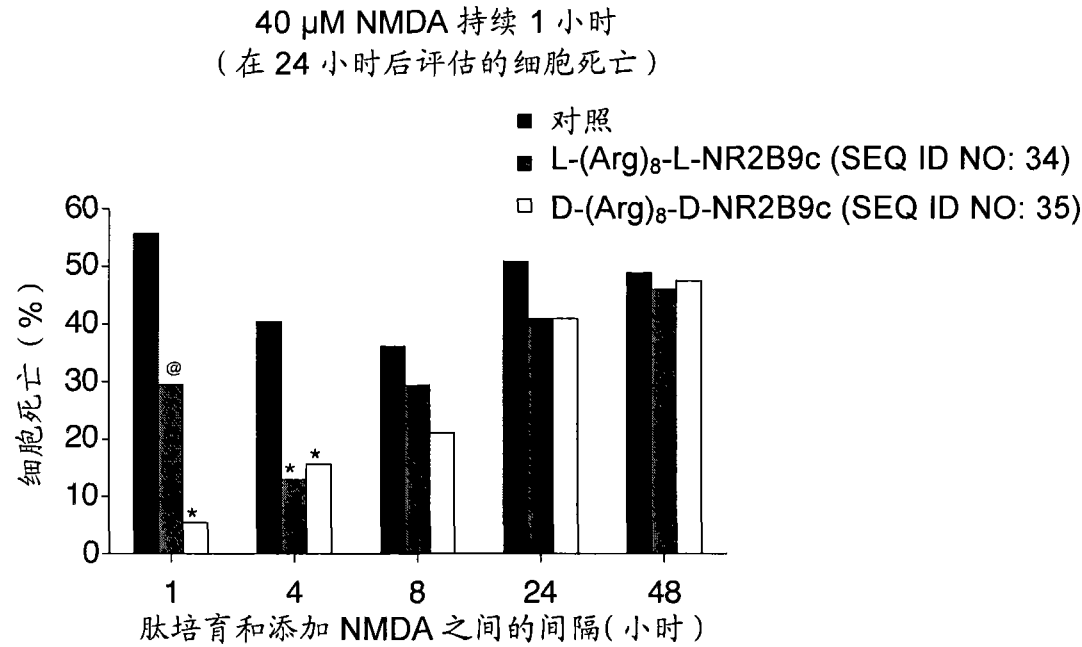


图 4