



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104203262 A

(43) 申请公布日 2014. 12. 10

(21) 申请号 201380016624. 6

(22) 申请日 2013. 02. 22

(30) 优先权数据

61/602, 418 2012. 02. 23 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 09. 25

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2013/027430 2013. 02. 22

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/126775 EN 2013. 08. 29

(71) 申请人 康奈尔大学

地址 美国纽约

(72) 发明人 黑兹尔·H·司徒

(74) 专利代理机构 北京同达信恒知识产权代理

有限公司 11291

代理人 黄志华 石磊

(51) Int. Cl.

A61K 38/07(2006. 01)

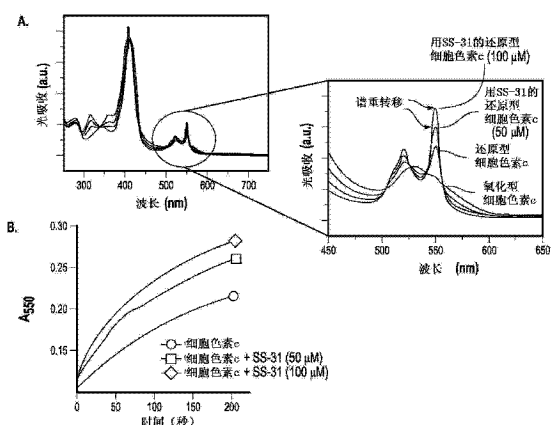
权利要求书2页 说明书53页 附图28页

(54) 发明名称

芳香族阳离子肽及其用途

(57) 摘要

本公开内容提供了芳香族阳离子肽组合物及其使用方法。该方法包括肽在电子传递、心磷脂过氧化的抑制、以及细胞凋亡和坏死的抑制中的用途,以治疗、预防或改善自身免疫疾病或病症的症状。



1. 一种用于治疗患有特征在于增加水平的心磷脂抗体的自身免疫疾病的受试者的方法,所述方法包括:

给所述受试者施用治疗有效量的芳香族阳离子肽或其药学可接受的盐。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述芳香族阳离子肽包含选自下述的一种或多种肽:2',6'-Dmt-D-Arg-Phe-Lys-NH₂(SS-02);Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂(SS-20);D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂(SS-31);2',6'-Dmt-D-Arg-Phe-(atn)Dap-NH₂(SS-19),其中(atn)Dap是β-萘苄酰-L-α,β-二氨基丙酸;和2',6'-Dmt-D-Arg-Ala-Lys-NH₂(SS-36),其中Ala是β-(6'-二甲基氨基-2'-萘酰)丙氨酸。

3. 根据权利要求1所述的方法,其中所述盐是乙酸盐或三氟乙酸盐。

4. 根据权利要求1所述的方法,其中所述肽包含D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂(SS-31)。

5. 根据权利要求1所述的方法,其中所述自身免疫疾病选自系统性红斑狼疮和抗磷脂综合征。

6. 根据权利要求5所述的方法,其中治疗包括减少或改善系统性红斑狼疮的一种或多种症状,其中所述系统性红斑狼疮的症状是选自下述的一种或多种症状:增加的心磷脂抗体水平,发热,血管血栓形成,血小板减少症,心脏瓣膜疾病,网状青斑,胸膜炎,胸腔积液,狼疮性肺炎,慢性弥漫性间质性肺疾病,肺性高血压,肺栓塞,肺出血,肺收缩综合征,心包炎,心肌炎,心内膜炎,贫血,低血小板和白细胞计数,延长部分凝血活酶时间,骨关节结核,肌痛,面颊疹,盘状狼疮,脱发,口、鼻、泌尿道和阴道溃疡,多发性神经病和颅内压增高综合征。

7. 根据权利要求1所述的方法,其中所述芳香族阳离子肽经口、肠胃外、静脉内、皮下、经皮、局部或通过吸入施用。

8. 一种用于减少患有自身免疫疾病的受试者中的心磷脂氧化的方法,所述方法包括:给所述受试者施用有效量的芳香族阳离子肽或其药学可接受的盐。

9. 根据权利要求8所述的方法,其中所述芳香族阳离子肽是选自下述的一种或多种:2',6'-Dmt-D-Arg-Phe-Lys-NH₂(SS-02);Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂(SS-20);D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂(SS-31);Dmt-D-Arg-Phe-(atn)Dap-NH₂(SS-19),其中(atn)Dap是β-萘苄酰-L-α,β-二氨基丙酸;和2',6'-Dmt-D-Arg-Ala-Lys-NH₂(SS-36),其中Ala是β-(6'-二甲基氨基-2'-萘酰)丙氨酸。

10. 根据权利要求8所述的方法,其中所述盐是乙酸盐或三氟乙酸盐。

11. 根据权利要求8所述的方法,其中所述自身免疫疾病的特征在于增加水平的针对心磷脂的抗体。

12. 根据权利要求8所述的方法,其中所述自身免疫疾病选自系统性红斑狼疮和抗磷脂综合征。

13. 根据权利要求12所述的方法,其中所述方法包括减少或改善系统性红斑狼疮的一种或多种症状,其中所述系统性红斑狼疮的症状是选自下述的一种或多种症状:增加的心磷脂抗体水平,发热,血管血栓形成,血小板减少症,心脏瓣膜疾病,网状青斑,胸膜炎,胸腔积液,狼疮性肺炎,慢性弥漫性间质性肺疾病,肺性高血压,肺栓塞,肺出血,肺收缩综合征,心包炎,心肌炎,心内膜炎,贫血,低血小板和白细胞计数,延长部分凝血活酶时间,骨关节

结核,肌痛,面颊疹,盘状狼疮,脱发,口、鼻、泌尿道和阴道溃疡,多发性神经病和颅内压增高综合征。

14. 根据权利要求 8 所述的方法,其中所述芳香族阳离子肽经口、肠胃外、静脉内、皮下、经皮、局部或通过吸入施用。

15. 一种用于减少患有自身免疫疾病的受试者中的炎症的方法,所述方法包括:

给具有自身免疫疾病的受试者施用有效量的芳香族阳离子肽或其药学可接受的盐。

16. 根据权利要求 15 所述的方法,其中所述芳香族阳离子肽是选自下述的一种或多种: $2', 6' -\text{Dmt-D-Arg-Phe-Lys-NH}_2$ (SS-02); $\text{Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH}_2$ (SS-20); $\text{D-Arg-2', 6' -Dmt-Lys-Phe-NH}_2$ (SS-31); $2', 6' -\text{Dmt-D-Arg-Phe-(atn)Dap-NH}_2$ (SS-19), 其中 (atn)Dap 是 β -氨茴酰-L- α, β -二氨基丙酸;和 $2', 6' -\text{Dmt-D-Arg-Ald-Lys-NH}_2$ (SS-36), 其中 Ald 是 β -(6'-二甲基氨基-2'-萘酰)丙氨酸。

17. 根据权利要求 15 所述的方法,其中所述盐是乙酸盐或三氟乙酸盐。

18. 根据权利要求 15 所述的方法,其中所述自身免疫疾病产生针对心磷脂的抗体。

19. 根据权利要求 15 所述的方法,其中所述自身免疫疾病选自系统性红斑狼疮和抗磷脂综合征。

20. 根据权利要求 19 所述的方法,其中所述方法包括减少或改善系统性红斑狼疮的一种或多种症状,其中所述系统性红斑狼疮的症状是选自下述的一种或多种症状:增加的心磷脂抗体水平,发热,血管血栓形成,血小板减少症,心脏瓣膜疾病,网状青斑,胸膜炎,胸腔积液,狼疮性肺炎,慢性弥漫性间质性肺疾病,肺性高血压,肺栓塞,肺出血,肺收缩综合征,心包炎,心肌炎,心内膜炎,贫血,低血小板和白细胞计数,延长部分凝血活酶时间,骨关节结核,肌痛,面颊疹,盘状狼疮,脱发,口、鼻、泌尿道和阴道溃疡,多发性神经病和颅内压增高综合征。

21. 根据权利要求 15 所述的方法,其中所述芳香族阳离子肽经口、肠胃外、静脉内、皮下、经皮、局部或通过吸入施用。

22. 根据权利要求 8 或 15 所述的方法,其中所述肽包含 $\text{D-Arg-2', 6' -Dmt-Lys-Phe-NH}_2$ (SS-31)。

23. 根据权利要求 1、8 或 15 所述的方法,其中所述肽包含 $2', 6' -\text{Dmt-D-Arg-Phe-(atn)Dap-NH}_2$ (SS-19), 其中 (atn)Dap 是 β -氨茴酰-L- α, β -二氨基丙酸。

24. 根据权利要求 1、8 或 15 所述的方法,其中所述肽包含 $2', 6' -\text{Dmt-D-Arg-Ald-Lys-NH}_2$ (SS-36), 其中 Ald 是 β -(6'-二甲基氨基-2'-萘酰)丙氨酸。

芳香族阳离子肽及其用途

[0001] 与相关申请的交叉参考

[0002] 本专利申请要求于 2012 年 2 月 23 日提交的美国临时申请号 61/602,418 的利益和优先权,所述美国临时申请全文以引用方式并入本文。

技术领域

[0003] 本技术总体涉及芳香族阳离子肽组合物和在治疗、预防或改善自身免疫疾病或病症症状中的使用方法。

背景技术

[0004] 自身免疫疾病的特征在于针对身体自身组织的方面的免疫应答。取决于主要临床和病理学疾病特点,自身免疫疾病可广泛分成两类:损害许多器官的自身免疫疾病(系统性)和其中仅单一器官或组织被自身免疫过程直接损害的自身免疫疾病(局限性)。系统性自身免疫疾病尤其例如类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、抗磷脂综合征和系统性硬化症通常特征在于与广泛多样的自身抗原反应的自身抗体,所述自身抗原包括 DNA、细胞表面分子和细胞内基质蛋白质。尽管系统性自身免疫的原因仍不明了,但已牵涉几种免疫机制,连同遗传和环境因子。

发明内容

[0005] 在一些方面,本技术提供了通过给受试者施用治疗有效量的芳香族阳离子肽或其药学可接受的盐,用于治疗患有自身免疫疾病的受试者,用于减少患有自身免疫疾病的受试者中的心磷脂氧化,和/或用于减少患有自身免疫疾病的受试者中的炎症的方法。在该方法的一些实施例中,自身免疫疾病的特征在于增加水平的针对心磷脂的抗体。在一些实施例中,自身免疫疾病是系统性红斑狼疮或抗磷脂综合征。

[0006] 在本文公开的方法的一些实施例中,施用于受试者的芳香族阳离子肽包括选自下述的一种或多种肽:2',6'-Dmt-D-Arg-Phe-Lys-NH₂(SS-02); Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂(SS-20); D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂(SS-31); 2',6'-Dmt-D-Arg-Phe-(atn)Dap-NH₂(SS-19), 其中 (atn)Dap 是 β-氨基苧酰-L-α,β-二氨基丙酸;和 2',6'-Dmt-D-Arg-Ald-Lys-NH₂(SS-36), 其中 Ald 是 β-(6'-二甲基氨基-2'-萘酰)丙氨酸。在一些实施例中,盐是乙酸盐或三氟乙酸盐。在一些实施例中,该肽包含 D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂(SS-31)。

[0007] 在一些实施例中,给有此需要的受试者施用治疗有效量的芳香族阳离子肽或其药学可接受的盐(例如用于治疗患有自身免疫疾病的受试者中的自身免疫疾病,减少心磷脂氧化和/或减少炎症)导致自身免疫疾病的一种或多种症状的减少。例如,在一些实施例中,受试者患有系统性红斑狼疮,并且芳香族阳离子肽施用减少或改善系统性红斑狼疮的一种或多种症状,其中所述系统性红斑狼疮的症状是选自下述的一种或多种症状:增加的心磷脂抗体水平,发热,血管血栓形成,血小板减少症,心脏瓣膜疾病,网状青斑,胸膜炎,胸

腔积液,狼疮性肺炎,慢性弥漫性间质性肺疾病,肺性高血压,肺栓塞,肺出血,肺收缩综合征,心包炎,心肌炎,心内膜炎,贫血,低血小板和白细胞计数,延长部分凝血活酶时间,骨关节结核,肌痛,面颊疹,盘状狼疮,脱发 (alopecia),口、鼻、泌尿道和阴道溃疡,多发性神经病和颅内压增高综合征。

[0008] 在一些实施例中,芳香族阳离子肽经口、肠胃外、静脉内、皮下、经皮、局部或通过吸入施用。

附图说明

[0009] 图 1A 和 1B 是显示肽 D-Arg-2', 6' -Dmt-Lys-Phe-NH₂ (SS-31) 增加细胞色素 c 还原率的图表。

[0010] 图 2(上图)是显示肽 D-Arg-2', 6' -Dmt-Lys-Phe-NH₂ (SS-31) 增强通过细胞色素 c 的电子扩散的图表。图 2(下图)是显示在 100mV/s 下具有渐增 SS-31 剂量 (20mM Tris- 硼酸盐 -EDTA (TBE) 缓冲液 pH7 的溶液中的细胞色素 c 的循环伏安图的图。

[0011] 图 3A 和 3B 是显示肽 D-Arg-2', 6' -Dmt-Lys-Phe-NH₂ (SS-31) 增加细胞色素 c 中的电子容量的图表。

[0012] 图 4 是显示肽 D-Arg-2', 6' -Dmt-Lys-Phe-NH₂ (SS-31) 诱导围绕细胞色素 c 血红素的新型 $\pi-\pi$ 相互作用的图表。

[0013] 图 5A 和 5B 是显示肽 D-Arg-2', 6' -Dmt-Lys-Phe-NH₂ (SS-31) 增加分离的线粒体中的 O₂ 消耗的图表。

[0014] 图 6 是显示肽 D-Arg-2', 6' -Dmt-Lys-Phe-NH₂ (SS-31) 增加分离的线粒体中的 ATP 合成的图表。

[0015] 图 7 是显示肽 D-Arg-2', 6' -Dmt-Lys-Phe-NH₂ (SS-31) 增强细胞色素 c 耗尽的丝状体中的呼吸的图表。

[0016] 图 8 是显示肽 D-Arg-2', 6' -Dmt-Lys-Phe-NH₂ (SS-31) 和 Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ (SS-20) 促进细胞色素 c 还原的图表。

[0017] 图 9 是显示如通过分离的大鼠肾线粒体中的 O₂ 消耗测量的,肽 D-Arg-2', 6' -Dmt-Lys-Phe-NH₂ (SS-31) 和 Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ (SS-20) 促进电子流量的图表。

[0018] 图 10 是显示肽 D-Arg-2', 6' -Dmt-Lys-Phe-NH₂ (SS-31) 和 Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ (SS-20) 增加分离的线粒体中的 ATP 生产率的图表。

[0019] 图 11A-11C 是显示肽 2', 6' -Dmt-D-Arg-Phe-(atn)Dap-NH₂ (SS-19) (图 11A)、2', 6' -Dmt-D-Arg-Ald-Lys-NH₂ (SS-36) (图 11C) 和 2', 6' -Dmt-D-Arg-Phe-Lys-Ald-NH₂ (SS-37) (图 11B) 与心磷脂的相互作用的图表。

[0020] 图 12A-12D 是显示肽 2', 6' -Dmt-D-Arg-Phe-(atn)Dap-NH₂ (SS-19) 与细胞色素 c 的相互作用的图表。

[0021] 图 13A-13D 是显示肽 2', 6' -Dmt-D-Arg-Phe-(atn)Dap-NH₂ (SS-19) (图 13A、13B)、2', 6' -Dmt-D-Arg-Phe-Lys-Ald-NH₂ (SS-37) (图 13C) 和 2', 6' -Dmt-D-Arg-Ald-Lys-NH₂ (SS-36) (图 13D) 与细胞色素 c 和心磷脂 (CL) 的相互作用的图表。

[0022] 图 14A-14E 是显示肽 2', 6' -Dmt-D-Arg-Phe-(atn)Dap-NH₂ (SS-19) (图 14B)、Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ (SS-20) (图 14D)、D-Arg-2', 6' -Dmt-Lys-P

he-NH₂(SS-31) (图 14A)、2',6'-Dmt-D-Arg-Ald-Lys-NH₂(SS-36) (图 14C) 和 D-Arg-Tyr-Lys-Phe-NH₂(SPI-231) (图 14E) 保护细胞色素 c 的血红素环境不受心磷脂的酰基链影响的图表。

[0023] 图 15A-15C 是显示肽 D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂(SS-31) (图 15A、15B)、Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂(SS-20) (图 15C)、D-Arg-Tyr-Lys-Phe-NH₂(SPI-231) (图 15C) 防止由心磷脂引起的细胞色素 c 还原的抑制的图表。

[0024] 图 16A-16B 是显示肽 D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂(SS-31) (图 16A) 和 Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂(SS-20) (图 16B) 增强分离的线粒体中的 O₂ 消耗的图表。

[0025] 图 17 是显示肽 D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂(SS-31) 增加分离的线粒体中的 ATP 合成的图表。

[0026] 图 18 是显示肽 D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂(SS-31) 增强细胞色素 c 耗尽的丝状体中的呼吸的图表。

[0027] 图 19A-19C 是显示肽 D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂(SS-31) (图 19A、19B)、2',6'-Dmt-D-Arg-Phe-(atn)Dap-NH₂(SS-19)、Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂(SS-20)、2',6'-Dmt-D-Arg-Ald-Lys-NH₂(SS-36)、2',6'-Dmt-D-Arg-Phe-Lys-Ald-NH₂(SS-37) 和 D-Arg-Tyr-Lys-Phe-NH₂(SPI-231) (图 19C) 防止细胞色素 c/ 心磷脂复合物中的过氧化物酶活性的图表。

[0028] 图 20A 是肽类似物 SS-02、[atn]SS-02 (也称为 SS-19)、[ald]SS-02 (也称为 SS-36) 和 SS-31 结构的图示。图 20B 显示了加入 1 μM [atn]SS-02 中的不同浓度心磷脂的代表性发射光谱。图 20C 显示了加入 1 μM [ald]SS-02 中的不同浓度心磷脂的代表性发射光谱。图 20D 显示了在添加 1 μM [ald]SS-02 后的 POPS、POPA、DPPG 和心磷脂的代表性发射光谱。图 20E 是显示加入心磷脂 (CL)、DPPG、POPS、POPA、PE 和 POPC 中的 [ald]SS-02 的相对荧光的条形图。图 20F 是比较加入不同浓度心磷脂和脂质体中的心磷脂中的 [atn]SS-02 的相对荧光的线图。图 20G 是显示加入 1 μM [atn]SS-02 中的不同浓度心磷脂 (25、50、75、100 μg/mL) 的相对荧光的条形图。

[0029] 图 21A 显示了加入不同浓度 (2、4、6 μM) 细胞色素 c 中的 [atn]SS-02 (1 μM) 的代表性发射光谱。图 21B 显示了加入不同浓度 (2、4、6 μM) 细胞色素 c 中的 [ald]SS-02 (1 μM) 的代表性发射光谱。图 21C 是通过添加渐增浓度 (1-10 μM) 的细胞色素 c 的 [atn]SS-02 (1 μM) 荧光猝灭的线图。图 21D 是在心磷脂 (10 μg/ml) 的存在和不存在下, [atn]SS-02 (1 μM) 和细胞色素 c (2 μM) 随着时间过去的相对荧光的图。图 21E 是在渐增浓度的单独的心磷脂或与脂质体混合的心磷脂中, 通过细胞色素 c 的 [atn]SS-02 (1 μM) 荧光猝灭的线图。图 21F 显示了在心磷脂 (CL) 的存在下, 以及在心磷脂和细胞色素 c 的存在下, 单独的 [ald]SS-02 的代表性发射光谱。图 21G 是比较在线粒体相对于细胞色素 c 缺乏丝状体中 [atn]SS-02 的荧光猝灭百分比的条形图。图 21H 显示了来自通过 2 μM 细胞色素 c (图 21H 中的标记 C) 的序贯添加, 伴随 75 μg/ml BSA (图 21H 中的标记 A) 的进一步添加猝灭的 [ant]SS-02 的代表性荧光发射光谱。图 21I 显示了来自通过 TMRM (图 21I 中的标记 C) 的序贯添加, 伴随 75 μg/ml BSA (图 21I 中的标记 A) 的进一步添加猝灭的 [ant]SS-02 的代表性荧光发射光谱。

[0030] 图 22A 是伴随不同浓度 (0、10、20、40 μM) SS-31 肽的添加, 关于细胞色素 c 和心磷

脂的混合物在 $A_{550/570}$ 中的变化的曲线图。图 22B 是比较关于不同肽（对照、SS-02、[atn]SS-02、[ald]SS-02 和 SS-31）的细胞色素 c 氧化率的条形图。

[0031] 图 23 是显示在 SS 肽类似物的不存在或存在下，单独的或具有心磷脂 (CL) 的复合物中的铁细胞色素 c 的索雷带 (Soret band) 的代表性圆二色光谱。

[0032] 图 24 是比较关于 SS-02、[atn]SS-02、[ald]SS-02 和 SS-31，作为对照百分比的细胞色素 c 过氧化率的条形图。

[0033] 图 25 是比较不同肽类似物 ($40 \mu\text{M}$; SS-02、[atn]SS-02、[ald]SS-02 和 SS-31) 在其促进通过抗坏血酸盐诱导的心磷脂-细胞色素 c 复合物还原的能力中的条形图。CL 是不含添加的 SS 肽类似物的心磷脂-细胞色素 c 复合物。

具体实施方式

[0034] 应当理解本发明的某些方面、模式、实施例、变化和特点在下文以不同的详细水平描述，以便提供本发明的基本理解。如本说明书中使用的某些术语的定义在下文提供。除非另有定义，本文使用的所有技术和科学术语一般具有与本发明所属领域普通技术人员通常理解相同的含义。

[0035] 在实践本公开内容中，使用细胞生物学、分子生物学、蛋白质生物化学、免疫学和细菌学的许多常规技术。这些技术是本领域众所周知的，并且在任何数目的可用出版物中提供，包括 Current Protocols in Molecular Biology, 第 I-III 卷, Ausubel, 编辑 (1997); Sambrook 等人, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第二版 (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989)。

[0036] 如本说明书和所附权利要求中使用的，单数形式“一个”、“一种”和“该 / 所述”包括复数所指对象，除非内容另有明确说明。例如，提及“细胞”包括两种或更多种细胞的组合等等。

[0037] 如本文使用的，试剂、药物或肽对受试者的“施用”包括将化合物引入或递送至受试者以执行其预期功能的任何途径。施用可通过任何合适途径执行，包括经口、经鼻、肠胃外（静脉内、肌内、腹膜内或皮下）、局部、经表皮、经直肠、皮内、经皮、吸入、动脉内、大脑内、骨内、鞘内、离子电渗法、经眼、阴道内等。施用包括自施用和通过另一者的施用。

[0038] 如本文使用的，术语“氨基酸”包括天然存在的氨基酸和合成氨基酸，以及氨基酸类似物和氨基酸模拟物，其以类似于天然存在的氨基酸的方式起作用。天然存在的氨基酸是由遗传密码编码的氨基酸，以及以后修饰的氨基酸，例如羟脯氨酸、 γ -羧基谷氨酸盐和 O-磷酸丝氨酸。氨基酸类似物指这样的化合物，其具有与天然存在的氨基酸相同的基本化学结构，即与氢、羧基、氨基和 R 基结合的 α -碳，例如高丝氨酸、正亮氨酸、甲硫氨酸亚砷、甲硫氨酸甲基砷。此类类似物具有经修饰的 R 基（例如正亮氨酸）或经修饰的肽主链，但保留与天然存在的氨基酸相同的基本化学结构。氨基酸模拟物指这样的化学化合物，其具有不同于氨基酸的一般化学结构的结构，但以类似于天然存在的氨基酸的方式起作用。氨基酸在本文中可由其通常已知的三字母符号或由 IUPAC-IUB 生物化学命名委员会推荐的单字母符号提及。

[0039] 如本文使用的，术语“有效量”指足以实现所需治疗和 / 或预防效应的数量。在治疗或预防应用的背景下，施用于受试者的组合物量将取决于疾病的类型和严重性，以及个

体的特征,例如一般健康、年龄、性别、体重和对药物的耐受。它还将取决于疾病的程度、严重性和类型。取决于这些及其他因素,技术人员将能够测定适当剂量。组合物还可与一种或多种另外的治疗性化合物组合施用。在一些实施例中,术语“有效量”指足以实现所需疗效,例如缓解 (alleviate) 或改善疾病或病症例如抗磷脂综合征或系统性红斑狼疮的体征或症状的数量。

[0040] 如本文使用的,“外源核酸”指这样的核酸 (例如 DNA、RNA),其并非天然存在于宿主细胞内,而是从外部源引入。如本文使用的,外源核酸指未整合到宿主细胞的基因组内而是保持分离的核酸,例如细菌质粒核酸。如本文使用的,“细菌质粒”指细菌起源的环状 DNA,其充当目的序列的载体和用于在细菌宿主细胞中表达序列的工具。

[0041] “分离的”或“纯化的”多肽或肽基本上不含来自试剂源自其的细胞或组织来源的细胞材料或其他污染多肽,或当化学合成时,基本上不含化学前体或其他化学品。例如,分离的芳香族阳离子肽或分离的细胞色素 c 蛋白质将不含这样的材料,其将干扰试剂的诊断或治疗用途,或干扰肽的电导或电子特性。此类干扰材料可包括酶、激素及其他蛋白质性和非蛋白质性溶质。

[0042] 如本文使用的,“诱导型启动子”指这样的启动子,其受某些条件例如温度或特定分子的存在影响,且仅在满足这些条件时,促进可操作地连接的目的核酸序列的表达。

[0043] 如本文使用的,“组成型启动子”指这样的启动子,其在所有或大多数环境条件下促进可操作地连接的目的核酸序列的表达。

[0044] 如本文使用的,术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”在本文中可互换使用,以意指包含通过肽键或经修饰的肽键彼此连接的两个或更多个氨基酸的聚合物,即肽等排物。多肽指通常被称为肽、糖肽或寡聚物的短链,和一般被称为蛋白质的更长链两者。多肽可含有 20 种基因编码的氨基酸以外的氨基酸。多肽包括通过天然过程例如翻译后加工、或通过本领域众所周知的化学修饰技术进行修饰的氨基酸序列。

[0045] 如本文使用的,“重组细菌”指已改造为携带和 / 或表达一种或多种外源核酸 (例如 DNA) 序列的细菌。

[0046] 如本文使用的,术语“处理”或“治疗”或“减轻”指治疗性处理和预防或防止措施两者,其中目的是预防或减慢 (减轻) 靶向病理学病症或障碍。还应当理解如所述的医学病症的多种治疗或预防模式意指“基本的”,其包括完全治疗或预防以及少于完全治疗或预防,并且其中达到一些生物学或医学相关结果。

[0047] 如本文使用的,障碍或病症的“预防”或“防止”指这样的化合物,相对于未经处理的对照样品,其降低经处理的样品中的障碍或病症的出现,或者相对于未经处理的对照样品,延迟障碍或病症的一种或多种症状的爆发或降低障碍或病症的一种或多种症状的严重性。

[0048] 芳香族阳离子肽

[0049] 本技术涉及芳香族阳离子肽的用途。在一些实施例中,该肽可用于涉及治疗或改善特征在于抗心磷脂抗体的存在的症状、病症或疾病 (例如抗磷脂综合征和系统性红斑狼疮) 的方面。

[0050] 芳香族阳离子肽是水溶性和高度极性的。尽管有这些特性,该肽仍可容易地穿透细胞膜。芳香族阳离子肽通常包括由肽键共价连接的最少三个氨基酸或最少四个氨基酸。

芳香族阳离子肽中存在的氨基酸的最大数目是由肽键共价连接的约二十个氨基酸。适当地,氨基酸的最大数目是约十二、约九或约六。

[0051] 芳香族阳离子肽的氨基酸可以是任意氨基酸。如本文使用的,术语“氨基酸”用于指含有至少一个氨基和至少一个羧基的任何有机分子。通常,至少一个氨基在相对于羧基的 α 位置处。氨基酸可以是天然存在的。天然存在的氨基酸包括例如在哺乳动物蛋白质中通常发现的二十种最常见的左旋 (L) 氨基酸,即丙氨酸 (Ala)、精氨酸 (Arg)、天冬酰胺 (Asn)、天冬氨酸 (Asp)、半胱氨酸 (Cys)、谷氨酰胺 (Gln)、谷氨酸 (Glu)、甘氨酸 (Gly)、组氨酸 (His)、异亮氨酸 (Ile)、亮氨酸 (Leu)、赖氨酸 (Lys)、甲硫氨酸 (Met)、苯丙氨酸 (Phe)、脯氨酸 (Pro)、丝氨酸 (Ser)、苏氨酸 (Thr)、色氨酸 (Trp)、酪氨酸 (Tyr) 和缬氨酸 (Val)。其他天然存在的氨基酸包括例如在与蛋白质合成不相关的代谢过程中合成的氨基酸。例如,氨基酸鸟氨酸和瓜氨酸在尿素生产过程中的哺乳动物代谢中合成。天然存在的氨基酸的另一个例子包括羟脯氨酸 (Hyp)。

[0052] 该肽任选含有一种或多种非天然存在的氨基酸。最佳地,该肽不具有天然存在的氨基酸。天然存在的氨基酸可以是左旋的 (L-)、右旋的 (D-) 或其混合物。非天然存在的氨基酸是这样的氨基酸,其通常在活生物体中的正常代谢过程中未合成,并且在蛋白质中未天然存在。另外,天然存在的氨基酸适当地也不由常见蛋白酶识别。天然存在的氨基酸可存在于肽中的任何位置处。例如,非天然存在的氨基酸可在 N 末端、C 末端或 N 末端和 C 末端之间的任何位置处。

[0053] 非天然氨基酸可例如包含在天然氨基酸中未发现的烷基、芳基或烷基芳基。非天然烷基氨基酸的一些例子包括 α -氨基丁酸、 β -氨基丁酸、 γ -氨基丁酸、 δ -氨基戊酸和 ϵ -氨基己酸。非天然芳基氨基酸的一些例子包括邻、间和对氨基苯甲酸。非天然烷基芳基氨基酸的一些例子包括邻、间和对氨基苯乙酸和 γ -苯基- β -氨基丁酸。非天然存在的氨基酸包括天然存在的氨基酸的衍生物。天然存在的氨基酸的衍生物可例如包括一个或多个化学基团对天然存在的氨基酸的添加。

[0054] 例如,一个或多个化学基团可加入苯丙氨酸或酪氨酸残基的芳环的 2'、3'、4'、5' 或 6' 位置或者色氨酸残基的苯并环的 4'、5'、6' 或 7' 位置中的一个或多个。基团可以是可加入芳环的任何化学基团。此类基团的一些例子包括分支或未分支的 C_1 - C_4 烷基,例如甲基、乙基、正丙基、异丙基、丁基、异丁基或叔丁基、 C_1 - C_4 烷基氧基 (即烷氧基)、氨基、 C_1 - C_4 烷基氨基和 C_1 - C_4 二烷基氨基 (例如甲基氨基、二甲氨基)、硝基、羟基、卤素 (即氟、氯、溴或碘)。天然存在的氨基酸的非天然存在的衍生物的一些具体例子包括正缬氨酸 (Nva) 和正亮氨酸 (Nle)。

[0055] 肽中的氨基酸修饰的另一个例子是肽的天冬氨酸或谷氨酸残基的羧基的衍生化。一个衍生化例子是由氨或者由伯胺或仲胺酰胺化,所述伯胺或仲胺例如甲胺、乙胺、二甲胺或二乙胺。另一个衍生化例子包括由例如甲醇或乙醇酯化。另一种此类修饰包括赖氨酸、精氨酸或组氨酸残基的氨基的衍生化。例如,此类氨基可以是酰化的。一些合适的酰基包括例如苯甲酰基或包含上文提及的 C_1 - C_4 烷基中的任一个的烷酰基例如乙酰基或丙酰基。

[0056] 非天然存在的氨基酸适当地对常见蛋白酶是抗性或不敏感的。对蛋白酶是抗性或不敏感的非天然存在的氨基酸的例子包括右旋 (D-) 形式的上述天然存在的 L-氨基酸中的任一个,以及 L-和 / 或 D-非天然存在的氨基酸。D-氨基酸通常不存在于蛋白质中,尽管它

们在某些肽抗生素中发现,所述肽抗生素由细胞的正常核糖体蛋白合成机制以外的方法合成。如本文使用的,D-氨基酸视为非天然存在的氨基酸。

[0057] 为了使蛋白酶敏感性降到最低,该肽应具有由常见蛋白酶识别的小于五个、小于四个、小于三个或小于两个连接 L-氨基酸,与氨基酸是天然存在的还是非天然存在的无关。在一个实施例中,该肽仅具有 D-氨基酸,且不具有 L-氨基酸。如果该肽含有蛋白酶敏感的氨基酸序列,则氨基酸中的至少一个优选是非天然存在的 D-氨基酸,由此赋予蛋白酶抗性。蛋白酶敏感序列的例子包括由常见蛋白酶例如内肽酶和胰蛋白酶容易切割的两个或更多个连接的碱性氨基酸。碱性氨基酸的例子包括精氨酸、赖氨酸和组氨酸。

[0058] 与肽中的氨基酸残基总数目相比较,芳香族阳离子肽应在生理 pH 下具有最小数目的净正电荷。在生理 pH 下的净正电荷的最小数目在下文将被称为 (p_m)。肽中的氨基酸残基总数目在下文将被称为 (r)。下文讨论的净正电荷的最小数目均在生理 pH 下。如本文使用的术语“生理 pH”指在哺乳动物机体的组织和器官的细胞中的正常 pH。例如,人的生理 pH 通常为大约 7.4,但哺乳动物中的正常生理 pH 可以是约 7.0-约 7.8 的任何 pH。

[0059] 如本文使用的“净电荷”指由肽中存在的氨基酸携带的正电荷数目和负电荷数目的平衡。在本说明书中,应当理解净电荷在生理 pH 下测量。在生理 pH 下带正电的天然存在的氨基酸包括 L-赖氨酸、L-精氨酸和 L-组氨酸。在生理 pH 下带负电的天然存在的氨基酸包括 L-天冬氨酸和 L-谷氨酸。

[0060] 通常,肽具有带正电的 N 末端氨基和带负电的 C 末端羧基。电荷在生理 pH 下彼此抵消。作为计算净电荷的例子,肽 Tyr-Arg-Phe-Lys-Glu-His-Trp-D-Arg 具有一个带负电的氨基酸(即 Glu)和四个带正电的氨基酸(即两个 Arg 残基、一个 Lys 和一个 His)。因此,上述肽具有净正电荷三。

[0061] 在一个实施例中,芳香族阳离子肽具有的在生理 pH 下的净正电荷的最小数目 (p_m) 和氨基酸残基的总数目 (r) 之间的关系为:其中 $3p_m$ 是小于或等于 $r+1$ 的最大数。在该实施例中,净正电荷的最小数目 (p_m) 和氨基酸残基总数目 (r) 之间的关系如下:

[0062] 表 1. 氨基酸数目和净正电荷 ($3p_m \leq p+1$)

[0063]

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

[0064] 在另一个实施例中,芳香族阳离子肽具有的在净正电荷的最小数目 (p_m) 和氨基酸残基的总数目 (r) 之间的关系为:其中 $2p_m$ 是小于或等于 $r+1$ 的最大数。在该实施例中,净正电荷的最小数目 (p_m) 和氨基酸残基总数目 (r) 之间的关系如下:

[0065] 表 2. 氨基酸数目和净正电荷 ($2p_m \leq p+1$)

[0066]

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

[0067] 在一个实施例中,净正电荷的最小数目 (p_m) 和氨基酸残基的总数目 (r) 相等。在另一个实施例中,该肽具有三个或四个氨基酸残基和最少一个净正电荷、适当地最少二个

净正电荷和更优选地最少三个净正电荷。

[0068] 还重要的是,芳香族阳离子肽具有与净正电荷的总数目 (p_t) 相比较最小数目的芳香族基团。芳香族基团的最小数目在下文将被称为 (a)。具有芳香族基团的天然存在的氨基酸包括氨基酸组氨酸、色氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸。例如,六肽 Lys-Gln-Tyr-D-Arg-Phe-Trp 具有净正电荷二 (由赖氨酸残基和精氨酸残基贡献) 以及三个芳香族基团 (由酪氨酸、苯丙氨酸和色氨酸残基贡献)。

[0069] 芳香族阳离子肽还应具有的在芳香族基团的最小数目 (a) 和在生理 pH 下的净正电荷的总数目 (p_t) 之间的关系为:其中 $3a$ 是小于或等于 p_t+1 的最大数,除了当 p_t 是 1 时, a 也可以是 1 之外。在该实施例中,芳香族基团的最小数目 (a) 和净正电荷的总数目 (p_t) 之间的关系如下:

[0070] 表 3. 芳香族基团和净正电荷 ($3a \leq p_t+1$ 或 $a = p_t = 1$)

[0071]

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

[0072] 在另一个实施例中,芳香族阳离子肽具有的在芳香族基团的最小数目 (a) 和净正电荷的总数目 (p_t) 之间的关系为:其中 $2a$ 是小于或等于 p_t+1 的最大数。在该实施例中,芳香族氨基酸残基的最小数目 (a) 和净正电荷的总数目 (p_t) 之间的关系如下:

[0073] 表 4. 芳香族基团和净正电荷 ($2a \leq p_t+1$ 或 $a = p_t = 1$)

[0074]

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

[0075] 在另一个实施例中,芳香族基团的数目 (a) 和净正电荷的总数目 (p_t) 相等。

[0076] 羧基尤其是 C 末端氨基酸的末端羧基适当地由例如氨酰胺化,以形成 C 末端酰胺。作为另外一种选择, C 末端氨基酸的末端羧基可由任一伯胺或仲胺酰胺化。所述伯胺或仲胺可以例如是烷基,尤其是分支的或无分支的 C_1 - C_4 烷基或者芳基胺。相应地,在肽的 C 末端处的氨基酸可转化为酰胺基、N-甲基酰胺基、N-乙基酰胺基、N,N-二甲基酰胺基、N,N-二乙基酰胺基、N-甲基-N-乙基酰胺基、N-苯基酰胺基或 N-苯基-N-乙基酰胺基。未存在于芳香族阳离子肽的 C 末端处的天冬酰胺、谷氨酰胺、天冬氨酸和谷氨酸残基的游离羧酸酯基团也可被酰胺化,不论它们是否存在于肽内。在这些内部位置处的酰胺化可以是由氨或者上述伯胺或仲胺中的任一个。

[0077] 在一个实施例中,芳香族阳离子肽是具有两个净正电荷和至少一个芳香族氨基酸的三肽。在特定实施例中,芳香族阳离子肽是具有两个净正电荷和两个芳香族氨基酸的三肽。

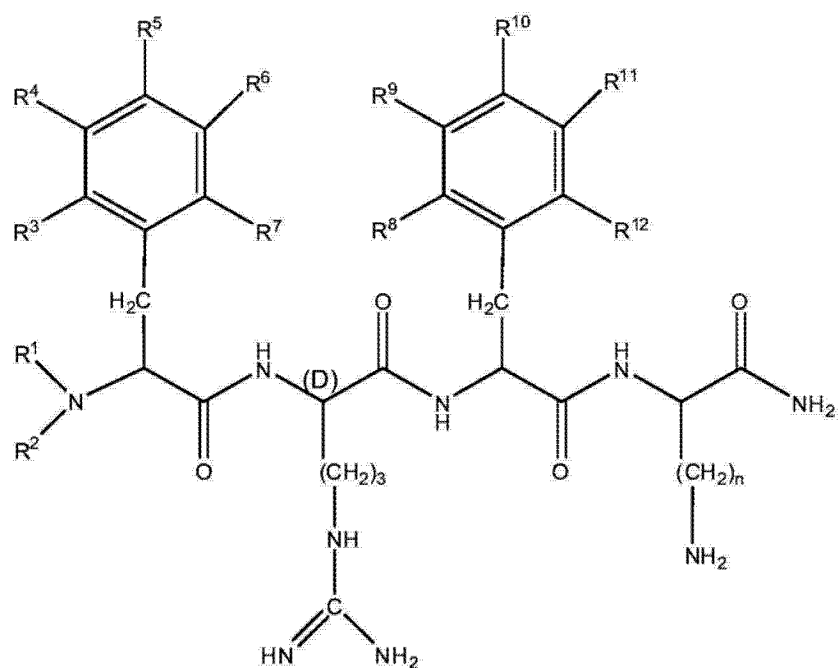
[0078] 在另外一个方面,本技术提供了芳香族阳离子肽或其药学可接受的盐例如乙酸盐或三氟乙酸盐。在一些实施例中,该肽包含

- [0079] 1. 至少一个净正电荷；
- [0080] 2. 最少三个氨基酸；
- [0081] 3. 最多约二十个氨基酸；
- [0082] 4. 净正电荷的最小数目 (p_m) 和氨基酸残基的总数目 (r) 之间的关系为：其中 $3p_m$ 是小于或等于 $r+1$ 的最大数；和
- [0083] 5. 芳香族基团的最小数目 (a) 和净正电荷的总数目 (p_t) 之间的关系为：其中 $2a$ 是小于或等于 p_t+1 的最大数，除了当 a 是 1 时， p_t 也可以是 1 之外。
- [0084] 在一些实施例中，该肽包含氨基酸序列 Tyr-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ (SS-01)、2', 6'-Dmt-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ (SS-02)、Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ (SS-20) 或 D-Arg-2', 6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ (SS-31)。在一些实施例中，该肽包含下述中的一种或多种：
- [0085] D-Arg-Dmt-Lys-Trp-NH₂；
- [0086] D-Arg-Trp-Lys-Trp-NH₂；
- [0087] D-Arg-2', 6'-Dmt-Lys-Phe-Met-NH₂；
- [0088] H-D-Arg-Dmt-Lys (N^a Me)-Phe-NH₂；
- [0089] H-D-Arg-Dmt-Lys-Phe (NMe)-NH₂；
- [0090] H-D-Arg-Dmt-Lys (N^a Me)-Phe (NMe)-NH₂；
- [0091] H-D-Arg (N^a Me)-Dmt (NMe)-Lys (N^a Me)-Phe (NMe)-NH₂；
- [0092] D-Arg-Dmt-Lys-Phe-Lys-Trp-NH₂；
- [0093] D-Arg-Dmt-Lys-Dmt-Lys-Trp-NH₂；
- [0094] D-Arg-Dmt-Lys-Phe-Lys-Met-NH₂；
- [0095] D-Arg-Dmt-Lys-Dmt-Lys-Met-NH₂；
- [0096] H-D-Arg-Dmt-Lys-Phe-Sar-Gly-Cys-NH₂；
- [0097] H-D-Arg-Ψ [CH₂-NH] Dmt-Lys-Phe-NH₂；
- [0098] H-D-Arg-Dmt-Ψ [CH₂-NH] Lys-Phe-NH₂；
- [0099] H-D-Arg-Dmt-Lys Ψ [CH₂-NH] Phe-NH₂；
- [0100] H-D-Arg-Dmt-Ψ [CH₂-NH] Lys-Ψ [CH₂-NH] Phe-NH₂；
- [0101] Lys-D-Arg-Tyr-NH₂；
- [0102] Tyr-D-Arg-Phe-Lys-NH₂；
- [0103] 2', 6'-Dmt-D-Arg-Phe-Lys-NH₂；
- [0104] Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂；
- [0105] Phe-D-Arg-Dmt-Lys-NH₂；
- [0106] D-Arg-2' 6' Dmt-Lys-Phe-NH₂；
- [0107] H-Phe-D-Arg-Phe-Lys-Cys-NH₂；
- [0108] Lys-D-Arg-Tyr-NH₂；
- [0109] D-Tyr-Trp-Lys-NH₂；
- [0110] Trp-D-Lys-Tyr-Arg-NH₂；
- [0111] Tyr-His-D-Gly-Met；
- [0112] Tyr-D-Arg-Phe-Lys-Glu-NH₂；
- [0113] Met-Tyr-D-Lys-Phe-Arg；

- [0114] D-His-Glu-Lys-Tyr-D-Phe-Arg ;
- [0115] Lys-D-Gln-Tyr-Arg-D-Phe-Trp-NH₂ ;
- [0116] Phe-D-Arg-Lys-Trp-Tyr-D-Arg-His ;
- [0117] Gly-D-Phe-Lys-Tyr-His-D-Arg-Tyr-NH₂ ;
- [0118] Val-D-Lys-His-Tyr-D-Phe-Ser-Tyr-Arg-NH₂ ;
- [0119] Trp-Lys-Phe-D-Asp-Arg-Tyr-D-His-Lys ;
- [0120] Lys-Trp-D-Tyr-Arg-Asn-Phe-Tyr-D-His-NH₂ ;
- [0121] Thr-Gly-Tyr-Arg-D-His-Phe-Trp-D-His-Lys ;
- [0122] Asp-D-Trp-Lys-Tyr-D-His-Phe-Arg-D-Gly-Lys-NH₂ ;
- [0123] D-His-Lys-Tyr-D-Phe-Glu-D-Asp-D-His-D-Lys-Arg-Trp-NH₂ ;
- [0124] Ala-D-Phe-D-Arg-Tyr-Lys-D-Trp-His-D-Tyr-Gly-Phe ;
- [0125] Tyr-D-His-Phe-D-Arg-Asp-Lys-D-Arg-His-Trp-D-His-Phe ;
- [0126] Phe-Phe-D-Tyr-Arg-Glu-Asp-D-Lys-Arg-D-Arg-His-Phe-NH₂ ;
- [0127] Phe-Tyr-Lys-D-Arg-Trp-His-D-Lys-D-Lys-Glu-Arg-D-Tyr-Thr ;
- [0128] Tyr-Asp-D-Lys-Tyr-Phe-D-Lys-D-Arg-Phe-Pro-D-Tyr-His-Lys ;
- [0129] Glu-Arg-D-Lys-Tyr-D-Val-Phe-D-His-Trp-Arg-D-Gly-Tyr-Arg-D-Met-NH₂ ; ,
- [0130] Arg-D-Leu-D-Tyr-Phe-Lys-Glu-D-Lys-Arg-D-Trp-Lys-D-Phe-Tyr-D-Arg-Gly ;
- [0131] D-Glu-Asp-Lys-D-Arg-D-His-Phe-Phe-D-Val-Tyr-Arg-Tyr-D-Tyr-Arg-His-Phe-NH₂ ;
- [0132] Asp-Arg-D-Phe-Cys-Phe-D-Arg-D-Lys-Tyr-Arg-D-Tyr-Trp-D-His-Tyr-D-Phe-Lys-Phe ;
- [0133] His-Tyr-D-Arg-Trp-Lys-Phe-D-Asp-Ala-Arg-Cys-D-Tyr-His-Phe-D-Lys-Tyr-His-Ser-NH₂ ;
- [0134] Gly-Ala-Lys-Phe-D-Lys-Glu-Arg-Tyr-His-D-Arg-D-Arg-Asp-Tyr-Trp-D-His-Trp-His-D-Lys-Asp ;
- [0135] Thr-Tyr-Arg-D-Lys-Trp-Tyr-Glu-Asp-D-Lys-D-Arg-His-Phe-D-Tyr-Gly-Val-Ile-D-His-Arg-Tyr-Lys-NH₂ ;
- [0136] Dmt-D-Arg-Phe-(atn)Dap-NH₂, 其中 (atn)Dap 是 β-氨基苄酰-L-α, β-二氨基丙酸 ;
- [0137] Dmt-D-Arg-Ald-Lys-NH₂, 其中 Ald 是 β-(6'-二甲基氨基-2'-萘酰)丙氨酸 ;
- [0138] Dmt-D-Arg-Phe-Lys-Ald-NH₂, 其中 Ald 是 β-(6'-二甲基氨基-2'-萘酰)丙氨酸 ;
- [0139] Dmt-D-Arg-Phe-(dns)Dap-NH₂, 其中 (dns)Dap 是 β-丹磺酰-L-α, β-二氨基丙酸 ;
- [0140] D-Arg-Tyr-Lys-Phe-NH₂ ; 和
- [0141] D-Arg-Tyr-Lys-Phe-NH₂。
- [0142] 在一些实施例中, “Dmt” 指 2', 6' -二甲基酪氨酸 (2', 6' -Dmt) 或 3', 5' -二甲基酪氨酸 (3', 5' -Dmt)。

[0143] 在一些实施例中,该肽由式 I 定义:

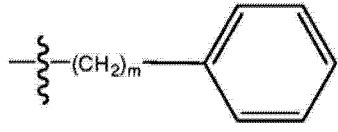
[0144]



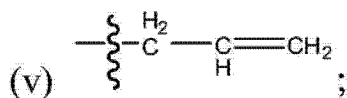
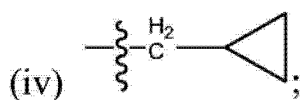
[0145] 其中 R^1 和 R^2 各自独立地选自

[0146] (i) 氢;

[0147] (ii) 线性或分支 C_1 - C_6 烷基;

[0148] (iii)  其中 $m = 1-3$;

[0149]



[0150] R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 、 R^{10} 、 R^{11} 和 R^{12} 各自独立地选自

[0151] (i) 氢;

[0152] (ii) 线性或分支 C_1 - C_6 烷基;

[0153] (iii) C_1 - C_6 烷氧基;

[0154] (iv) 氨基;

[0155] (v) C_1 - C_4 烷基氨基;

[0156] (vi) C_1 - C_4 二烷基氨基;

[0157] (vii) 硝基;

[0158] (viii) 羟基;

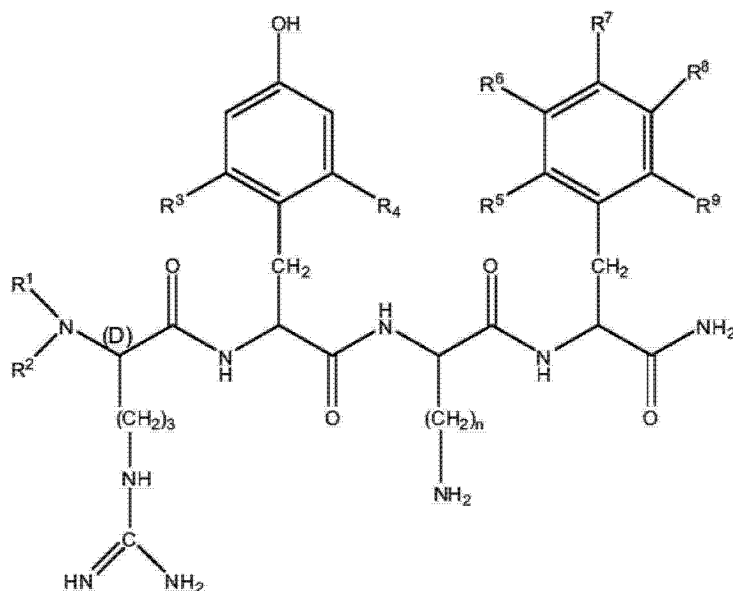
[0159] (ix) 卤素,其中“卤素”包含氯、氟、溴和碘;和

[0160] n 为 1-5 的整数。

[0161] 在一些实施例中, R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 、 R^{10} 、 R^{11} 和 R^{12} 均为氢; 并且 n 为 4。
 在另一个实施例中, R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 和 R^{11} 均为氢; R^8 和 R^{12} 为甲基; R^{10} 为羟基; 并且 n 为 4。

[0162] 在一些实施例中, 该肽由式 II 限定:

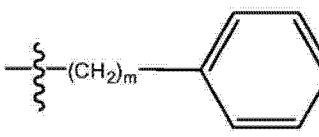
[0163]



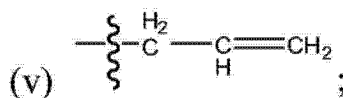
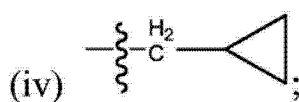
[0164] 其中 R^1 和 R^2 各自独立地选自

[0165] (i) 氢;

[0166] (ii) 线性或分支 C_1 - C_6 烷基

[0167] (iii)  其中 $m = 1-3$;

[0168]



[0169] R^3 和 R^4 各自独立地选自

[0170] (i) 氢;

[0171] (ii) 线性或分支 C_1 - C_6 烷基;

[0172] (iii) C_1 - C_6 烷氧基;

[0173] (iv) 氨基;

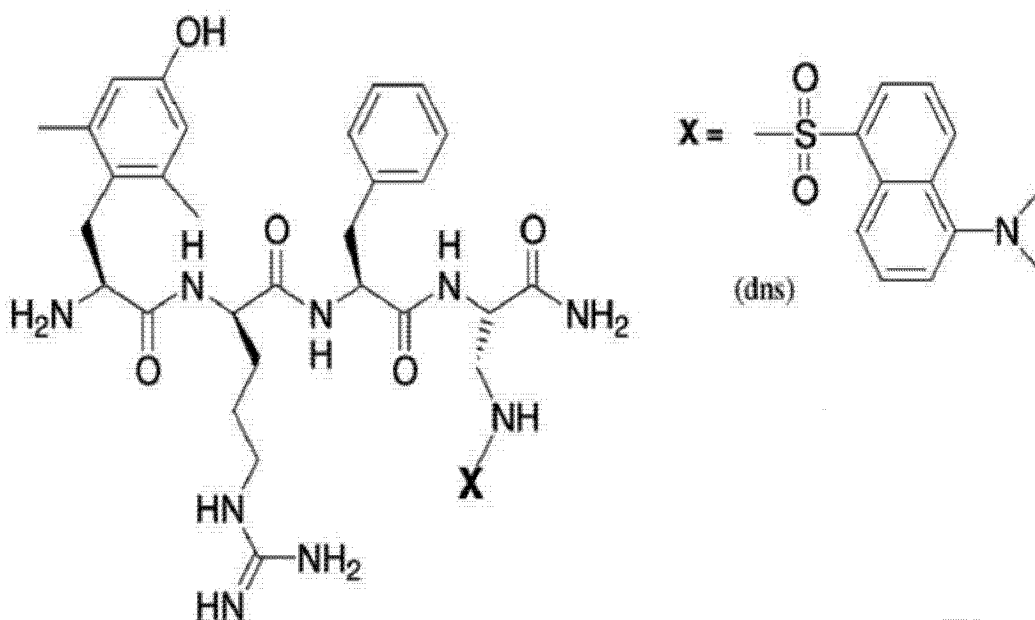
[0174] (v) C_1 - C_4 烷基氨基;

[0175] (vi) C_1 - C_4 二烷基氨基;

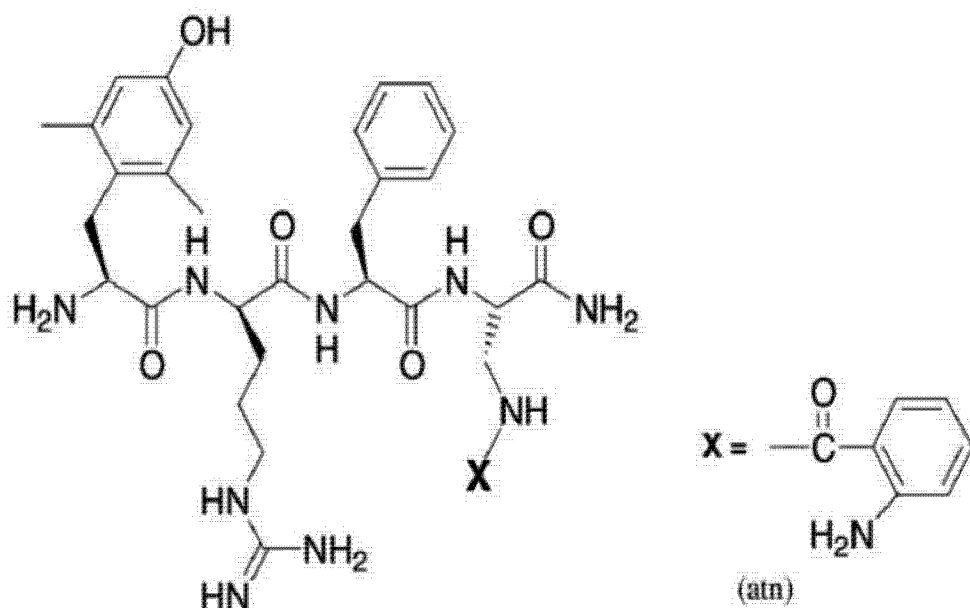
[0176] (vii) 硝基;

[0177] (viii) 羟基;

- [0178] (ix) 卤素, 其中“卤素”包含氯、氟、溴和碘;
- [0179] R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 和 R^9 各自独立地选自
- [0180] (i) 氢;
- [0181] (ii) 线性或分支 C_1 - C_6 烷基;
- [0182] (iii) C_1 - C_6 烷氧基;
- [0183] (iv) 氨基;
- [0184] (v) C_1 - C_4 烷基氨基;
- [0185] (vi) C_1 - C_4 二烷基氨基;
- [0186] (vii) 硝基;
- [0187] (viii) 羟基;
- [0188] (ix) 卤素, 其中“卤素”包含氯、氟、溴和碘; 和
- [0189] n 为 1-5 的整数。
- [0190] 在一些实施例中, 该肽由下式限定:
- [0191]



- [0192] 还表示为 2', 6' -Dmt-D-Arg-Phe-(dns)Dap-NH₂, 其中 (dns)Dap 是 β-丹磺酰-L-α, β-二氨基丙酸 (SS-17)。
- [0193] 在一些实施例中, 该肽由下式限定:
- [0194]



[0195] 还表示为 2', 6' -Dmt-D-Arg-Phe-(atn)Dap-NH₂, 其中 (atn)Dap 是 β-氨基酮酰-L-α, β-二氨基丙酸 (SS-19)。SS-19 也称为 [atn]SS-02。

[0196] 在特定实施例中, R¹ 和 R² 为氢 ;R³ 和 R⁴ 为甲基 ;R⁵、R⁶、R⁷、R⁸ 和 R⁹ 均为氢 ;并且 n 为 4。

[0197] 在一个实施例中,芳香族阳离子肽具有交替的芳香族和阳离子氨基酸的核心结构基序。例如,该肽可以是由下文所示式 III-VI 中的任一个限定的四肽:

[0198] 芳香族的-阳离子的-芳香族的-阳离子的(式 III)

[0199] 阳离子的-芳香族的-阳离子的-芳香族的(式IV)

[0200] 芳香族的-芳香族的-阳离子的-阳离子的(式V)

[0201] 阳离子的-阳离子的-芳香族的-芳香族的(式 VI)

[0202] 其中,芳香族的是选自下述的残基:Phe(F)、Tyr(Y)、Trp(W)和环己基丙氨酸(Cha);并且阳离子的是选自下述的残基:Arg(R)、Lys(K)、正亮氨酸(Nle)和2-氨基-庚酸(Ahe)。

[0203] 在一些实施例中,本文描述的芳香族阳离子肽包含所有左旋(L)氨基酸。

[0204] 在一个实施例中,芳香族阳离子肽具有

[0205] 1. 至少一个净正电荷；

[0206] 2. 最少三个氨基酸：

[0207] 3. 最多约二十个氨基酸；

[0208] 4. 净正电荷的最小数目 (p_m) 和氨基酸残基的总数目 (r) 之间的关系为 : 其中 $3p_m$ 是小于或等于 $r+1$ 的最大数 ; 和

[0209] 5. 芳香族基团的最小数目 (a) 和净正电荷的总数目 (p_t) 之间的关系为: 其中 $2a$ 是小于或等于 p_t+1 的最大数, 除了当 a 是 1 时, p_t 也可以是 1 之外。

[0210] 在另一个实施例中,本发明提供了用于降低经历线粒体通透性转换(MPT)的线粒体数目或防止哺乳动物的移除器官中的线粒体通透性转换,或者治疗或改善特征在于抗心磷脂抗体的存在的症状、病症或疾病例如抗磷脂综合征和系统性红斑狼疮的方法。该方法包括给移除器官施用有效量的具有下述特性的芳香族阳离子肽:

- [0211] 至少一个净正电荷；
- [0212] 最少三个氨基酸；
- [0213] 最多约二十个氨基酸；
- [0214] 净正电荷的最小数目 (p_m) 和氨基酸残基的总数目 (r) 之间的关系为：其中 $3p_m$ 是小于或等于 $r+1$ 的最大数；和
- [0215] 芳香族基团的最小数目 (a) 和净正电荷的总数目 (p_t) 之间的关系为：其中 $2a$ 是小于或等于 p_t+1 的最大数，除了当 a 是 1 时， p_t 也可以是 1 之外。
- [0216] 在另外一个实施例中，本发明提供了用于降低经历线粒体通透性转换 (MPT) 的线粒体数目或防止有此需要的哺乳动物中的线粒体通透性转换，或者治疗或改善特征在于抗心磷脂抗体的存在的症状、病症或疾病例如抗磷脂综合征和系统性红斑狼疮的方法。该方法包括给哺乳动物施用有效量的具有下述特性的芳香族阳离子肽：
- [0217] 至少一个净正电荷；
- [0218] 最少三个氨基酸；
- [0219] 最多约二十个氨基酸；
- [0220] 净正电荷的最小数目 (p_m) 和氨基酸残基的总数目 (r) 之间的关系为：其中 $3p_m$ 是小于或等于 $r+1$ 的最大数；和
- [0221] 芳香族基团的最小数目 (a) 和净正电荷的总数目 (p_t) 之间的关系为：其中 $3a$ 是小于或等于 p_t+1 的最大数，除了当 a 是 1 时， p_t 也可以是 1 之外。
- [0222] 芳香族阳离子肽包括但不限于下述示出肽：
- [0223] H-Phe-D-Arg Phe-Lys-Cys-NH₂
- [0224] D-Arg-Dmt-Lys-Trp-NH₂；
- [0225] D-Arg-Trp-Lys-Trp-NH₂；
- [0226] D-Arg-Dmt-Lys-Phe-Met-NH₂；
- [0227] H-D-Arg-Dmt-Lys (N^q Me) -Phe-NH₂；
- [0228] H-D-Arg-Dmt-Lys-Phe (NMe) -NH₂；
- [0229] H-D-Arg-Dmt-Lys (N^q Me) -Phe (NMe) -NH₂；
- [0230] H-D-Arg (N^q Me) -Dmt (NMe) -Lys (N^q Me) -Phe (NMe) -NH₂；
- [0231] D-Arg-Dmt-Lys-Phe-Lys-Trp-NH₂；
- [0232] D-Arg-Dmt-Lys-Dmt-Lys-Trp-NH₂；
- [0233] D-Arg-Dmt-Lys-Phe-Lys-Met-NH₂；
- [0234] D-Arg-Dmt-Lys-Dmt-Lys-Met-NH₂；
- [0235] H-D-Arg-Dmt-Lys-Phe-Sar-Gly-Cys-NH₂；
- [0236] H-D-Arg-Ψ [CH₂-NH] Dmt-Lys-Phe-NH₂；
- [0237] H-D-Arg-Dmt-Ψ [CH₂-NH] Lys-Phe-NH₂；
- [0238] H-D-Arg-Dmt-Lys Ψ [CH₂-NH] Phe-NH₂；and
- [0239] H-D-Arg-Dmt-Ψ [CH₂-NH] Lys-Ψ [CH₂-NH] Phe-NH₂，
- [0240] Tyr-D-Arg-Phe-Lys-NH₂，
- [0241] 2' , 6' -Dmt-D-Arg-Phe-Lys-NH₂，
- [0242] Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂，

- [0243] Phe-D-Arg-Dmt-Lys-NH₂,
[0244] D-Arg-2' 6' Dmt-Lys-Phe-NH₂,
[0245] H-Phe-D-Arg-Phe-Lys-Cys-NH₂,
[0246] Lys-D-Arg-Tyr-NH₂,
[0247] D-Tyr-Trp-Lys-NH₂,
[0248] Trp-D-Lys-Tyr-Arg-NH₂,
[0249] Tyr-His-D-Gly-Met,
[0250] Tyr-D-Arg-Phe-Lys-Glu-NH₂,
[0251] Met-Tyr-D-Lys-Phe-Arg,
[0252] D-His-Glu-Lys-Tyr-D-Phe-Arg,
[0253] Lys-D-Gln-Tyr-Arg-D-Phe-Trp-NH₂,
[0254] Phe-D-Arg-Lys-Trp-Tyr-D-Arg-His,
[0255] Gly-D-Phe-Lys-Tyr-His-D-Arg-Tyr-NH₂,
[0256] Val-D-Lys-His-Tyr-D-Phe-Ser-Tyr-Arg-NH₂,
[0257] Trp-Lys-Phe-D-Asp-Arg-Tyr-D-His-Lys,
[0258] Lys-Trp-D-Tyr-Arg-Asn-Phe-Tyr-D-His-NH₂,
[0259] Thr-Gly-Tyr-Arg-D-His-Phe-Trp-D-His-Lys,
[0260] Asp-D-Trp-Lys-Tyr-D-His-Phe-Arg-D-Gly-Lys-NH₂,
[0261] D-His-Lys-Tyr-D-Phe-Glu-D-Asp-D-His-D-Lys-Arg-Trp-NH₂,
[0262] Ala-D-Phe-D-Arg-Tyr-Lys-D-Trp-His-D-Tyr-Gly-Phe,
[0263] Tyr-D-His-Phe-D-Arg-Asp-Lys-D-Arg-His-Trp-D-His-Phe,
[0264] Phe-Phe-D-Tyr-Arg-Glu-Asp-D-Lys-Arg-D-Arg-His-Phe-NH₂,
[0265] Phe-Tyr-Lys-D-Arg-Trp-His-D-Lys-D-Lys-Glu-Arg-D-Tyr-Thr,
[0266] Tyr-Asp-D-Lys-Tyr-Phe-D-Lys-D-Arg-Phe-Pro-D-Tyr-His-Lys,
[0267] Glu-Arg-D-Lys-Tyr-D-Val-Phe-D-His-Trp-Arg-D-Gly-Tyr-Arg-D-Met-NH₂,
[0268] Arg-D-Leu-D-Tyr-Phe-Lys-Glu-D-Lys-Arg-D-Trp-Lys-D-Phe-Tyr-D-Arg-Gly,
[0269] D-Glu-Asp-Lys-D-Arg-D-His-Phe-Phe-D-Val-Tyr-Arg-Tyr-D-Tyr-Arg-His-Phe-NH₂,
[0270] Asp-Arg-D-Phe-Cys-Phe-D-Arg-D-Lys-Tyr-Arg-D-Tyr-Trp-D-His-Tyr-D-Phe-Lys-Phe,
[0271] His-Tyr-D-Arg-Trp-Lys-Phe-D-Asp-Ala-Arg-Cys-D-Tyr-His-Phe-D-Lys-Tyr-His-Ser-NH₂,
[0272] Gly-Ala-Lys-Phe-D-Lys-Glu-Arg-Tyr-His-D-Arg-D-Arg-Asp-Tyr-Trp-D-His-Trp-His-D-Lys-Asp, 以及
[0273] Thr-Tyr-Arg-D-Lys-Trp-Tyr-Glu-Asp-D-Lys-D-Arg-His-Phe-D-Tyr-Gly-Val-Ile-D-His-Arg-Tyr-Lys-NH₂ ;
[0274] Dmt-D-Arg-Phe-(atn)Dap-NH₂, 其中 (atn)Dap 是 β-氨基苄酰-L-α, β-二氨基丙酸 ;
[0275] Dmt-D-Arg-Phe-(dns)Dap-NH₂, 其中 (dns)Dap 是 β-丹磺酰-L-α, β-二氨基丙

酸；

[0276] Dmt-D-Arg-Ald-Lys-NH₂, 其中 Ald 是 β -(6'-二甲氨基-2'-萘酰)丙氨酸；

[0277] Dmt-D-Arg-Phe-Lys-Ald-NH₂, 其中 Ald 是 β -(6'-二甲氨基-2'-萘酰)丙氨酸和 D-Arg-Tyr-Lys-Phe-NH₂；和

[0278] D-Arg-Tyr-Lys-Phe-NH₂。

[0279] 在一些实施例中,可用于本发明的方法中的肽是具有酪氨酸残基或酪氨酸衍生物的肽。在一些实施例中,酪氨酸的衍生物包括 2'-甲基酪氨酸 (Mmt)；2',6'-二甲基酪氨酸 (2' 6' Dmt)；3',5'-二甲基酪氨酸 (3' 5' Dmt)；N,2',6'-三甲基酪氨酸 (Tmt)；和 2'-羟基-6'-甲基酪氨酸 (Hmt)。

[0280] 在一个实施例中,该肽具有式 Tyr-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ (在本文中被称为 SS-01)。SS-01 具有由氨基酸酪氨酸、精氨酸和赖氨酸贡献的净正电荷三,并且具有由氨基酸苯丙氨酸和酪氨酸贡献的两个芳香族基团。SS-01 的酪氨酸可以是经修饰的酪氨酸衍生物例如 2',6'-二甲基酪氨酸,以产生具有式 2',6'-Dmt-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ (在本文中被称为 SS-02) 的化合物。

[0281] 在合适的实施例中,在 N 末端处的氨基酸残基是精氨酸。此类肽的例子是 D-Arg-2' 6' Dmt-Lys-Phe-NH₂ (在本文中被称为 SS-31)。

[0282] 在另一个实施例中,在 N 末端处的氨基酸是苯丙氨酸或其衍生物。在一些实施例中,苯丙氨酸的衍生物包括 2'-甲基苯丙氨酸 (Mmp)、2',6'-二甲基苯丙氨酸 (Dmp)、N,2',6'-三甲基苯丙氨酸 (Tmp) 和 2'-羟基-6'-甲基苯丙氨酸 (Hmp)。此类肽的例子是 Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ (在本文中被称为 SS-20)。在一个实施例中,SS-02 的氨基酸序列重排,使得 Dmt 不在 N 末端处。此类芳香族阳离子肽的例子具有式 D-Arg-2' 6' Dmt-Lys-Phe-NH₂ (SS-31)。

[0283] 在另外一个实施例中,芳香族阳离子肽具有式 Phe-D-Arg-Dmt-Lys-NH₂ (在本文中被称为 SS-30)。作为另外一种选择,N 末端苯丙氨酸可以是苯丙氨酸的衍生物,例如 2',6'-二甲基苯丙氨酸 (2' 6' Dmp)。含有在氨基酸位置一处的 2',6'-二甲基苯丙氨酸的 SS-01 具有式 2',6'-Dmp-D-Arg-Dmt-Lys-NH₂。

[0284] 在一些实施例中,芳香族阳离子肽包含:2',6'-Dmt-D-Arg-Phe-(atn)Dap-NH₂ (SS-19),其中 (atn)Dap 是 β -氨基萘酰-L- α , β -二氨基丙酸、2',6'-Dmt-D-Arg-Ald-Lys-NH₂ (SS-36),其中 Ald 是 β -(6'-二甲氨基-2'-萘酰)丙氨酸、2',6'-Dmt-D-Arg-Phe-Lys-Ald-NH₂ (SS-37),其中 Ald 是 β -(6'-二甲氨基-2'-萘酰)丙氨酸、D-Arg-Tyr-Lys-Phe-NH₂ (SPI-231)、和 2',6'-Dmt-D-Arg-Phe-(dns)Dap-NH₂,其中 (dns)Dap 是 β -丹磺酰-L- α , β -二氨基丙酸 (SS-17)。

[0285] 本文提及的肽及其衍生物还可包括功能类似物。如果类似物具有与所述肽相同的功能,则肽视为功能类似物。类似物例如可以是肽的置换变体,其中一个或多个氨基酸由另一个氨基酸置换。适当的肽置换变体包括保守氨基酸置换。氨基酸可根据其物理化学特征如下分组：

[0286] (a) 非极性氨基酸 :Ala (A) Ser (S) Thr (T) Pro (P) Gly (G) Cys (C) ；

[0287] (b) 酸性氨基酸 :Asn (N) Asp (D) Glu (E) Gln (Q) ；

[0288] (c) 碱性氨基酸 :His (H) Arg (R) Lys (K) ；

[0289] (d) 疏水氨基酸 :Met (M) Leu (L) Ile (I) Val (V) ;和

[0290] (e) 芳香族氨基酸 :Phe (F) Tyr (Y) Trp (W) His (H) 。

[0291] 肽中的氨基酸由相同组的另一种氨基酸的置换被称为保守置换,并且可保存原始肽的物理化学特征。相比之下,肽中的氨基酸由不同组的另一种氨基酸的置换一般更可能改变原始肽的特征。可用于本发明实践的类似物的非限制性例子包括但不限于表 5 中所示的芳香族阳离子肽。

[0292] 表 5. 肽类似物的例子

[0293]

氨基酸 位置 1	氨基酸 位置 2	氨基酸 位置 3	氨基酸 位置 4	氨基酸 位置 5	氨基酸 位置 6	氨基酸 位置 7	C 末端修饰
D-Arg	Dmt	Lys	Phe				NH ₂
D-Arg	Dmt	Phe	Lys				NH ₂
D-Arg	Phe	Lys	Dmt				NH ₂
D-Arg	Phe	Dmt	Lys				NH ₂
D-Arg	Lys	Dmt	Phe				NH ₂
D-Arg	Lys	Phe	Dmt				NH ₂
D-Arg	Dmt	Lys	Phe	Cys			NH ₂
D-Arg	Dmt	Lys	Phe	Glu	Cys	Gly	NH ₂
D-Arg	Dmt	Lys	Phe	Ser	Cys		NH ₂
D-Arg	Dmt	Lys	Phe	Gly	Cys		NH ₂
Phe	Lys	Dmt	D-Arg				NH ₂
Phe	Lys	D-Arg	Dmt				NH ₂
Phe	D-Arg	Phe	Lys				NH ₂
Phe	D-Arg	Phe	Lys	Cys			NH ₂
Phe	D-Arg	Phe	Lys	Glu	Cys	Gly	NH ₂
Phe	D-Arg	Phe	Lys	Ser	Cys		NH ₂
Phe	D-Arg	Phe	Lys	Gly	Cys		NH ₂
Phe	D-Arg	Dmt	Lys				NH ₂
Phe	D-Arg	Dmt	Lys	Cys			NH ₂
Phe	D-Arg	Dmt	Lys	Glu	Cys	Gly	NH ₂
Phe	D-Arg	Dmt	Lys	Ser	Cys		NH ₂
Phe	D-Arg	Dmt	Lys	Gly	Cys		NH ₂
Phe	D-Arg	Lys	Dmt				NH ₂
Phe	Dmt	D-Arg	Lys				NH ₂

[0294]

氨基酸 位置 1	氨基酸 位置 2	氨基酸 位置 3	氨基酸 位置 4	氨基酸 位置 5	氨基酸 位置 6	氨基酸 位置 7	C 末端修饰
Phe	Dmt	Lys	D-Arg				NH ₂
Lys	Phe	D-Arg	Dmt				NH ₂
Lys	Phe	Dmt	D-Arg				NH ₂
Lys	Dmt	D-Arg	Phe				NH ₂
Lys	Dmt	Phe	D-Arg				NH ₂
Lys	D-Arg	Phe	Dmt				NH ₂
Lys	D-Arg	Dmt	Phe				NH ₂
D-Arg	Dmt	D-Arg	Phe				NH ₂
D-Arg	Dmt	D-Arg	Dmt				NH ₂
D-Arg	Dmt	D-Arg	Tyr				NH ₂
D-Arg	Dmt	D-Arg	Trp				NH ₂
Trp	D-Arg	Phe	Lys				NH ₂
Trp	D-Arg	Tyr	Lys				NH ₂
Trp	D-Arg	Trp	Lys				NH ₂
Trp	D-Arg	Dmt	Lys				NH ₂
D-Arg	Trp	Lys	Phe				NH ₂
D-Arg	Trp	Phe	Lys				NH ₂
D-Arg	Trp	Lys	Dmt				NH ₂
D-Arg	Trp	Dmt	Lys				NH ₂
D-Arg	Lys	Trp	Phe				NH ₂
D-Arg	Lys	Trp	Dmt				NH ₂
Cha	D-Arg	Phe	Lys				NH ₂
Ala	D-Arg	Phe	Lys				NH ₂

[0295] Cha = 环己基

[0296] 在某些情况下,使用还具有阿片样物质受体激动剂活性的肽可以是有利的。可用于本发明实践中的类似物的例子包括但不限于表 6 中所示的芳香族阳离子肽。

[0297] 表 6. 具有阿片样物质受体激动剂活性的肽

[0298]

氨基酸 位置 1	氨基酸 位置 2	氨基酸 位置 3	氨基酸 位置 4	氨基酸位 置 5 (如果存 在的话)	C 末端修 饰
Tyr	D-Arg	Phe	Lys		NH ₂
Tyr	D-Arg	Phe	Orn		NH ₂
Tyr	D-Arg	Phe	Dab		NH ₂
Tyr	D-Arg	Phe	Dap		NH ₂
Tyr	D-Arg	Phe	Lys	Cys	NH ₂
2'6'Dmt	D-Arg	Phe	Lys		NH ₂
2'6'Dmt	D-Arg	Phe	Lys	Cys	NH ₂
2'6'Dmt	D-Arg	Phe	Lys-NH(CH ₂) ₂ -NH-dns		NH ₂
2'6'Dmt	D-Arg	Phe	Lys-NH(CH ₂) ₂ -NH-atn		NH ₂
2'6'Dmt	D-Arg	Phe	dnsLys		NH ₂
2'6'Dmt	D-Cit	Phe	Lys		NH ₂
2'6'Dmt	D-Cit	Phe	Lys	Cys	NH ₂
2'6'Dmt	D-Cit	Phe	Ahp		NH ₂
2'6'Dmt	D-Arg	Phe	Orn		NH ₂
2'6'Dmt	D-Arg	Phe	Dab		NH ₂
2'6'Dmt	D-Arg	Phe	Dap		NH ₂
2'6'Dmt	D-Arg	Phe	Ahp(2-氨基 庚酸)		NH ₂
Bio-2'6' Dmt	D-Arg	Phe	Lys		NH ₂
3'5'Dmt	D-Arg	Phe	Lys		NH ₂
3'5'Dmt	D-Arg	Phe	Orn		NH ₂
3'5'Dmt	D-Arg	Phe	Dab		NH ₂
3'5'Dmt	D-Arg	Phe	Dap		NH ₂
Tyr	D-Arg	Tyr	Lys		NH ₂

[0299]

氨基酸 位置 1	氨基酸 位置 2	氨基酸 位置 3	氨基酸 位置 4	氨基酸位 置 5 (如果存 在的话)	C 末端修 饰
Tyr	D-Arg	Tyr	Orn		NH ₂
Tyr	D-Arg	Tyr	Dab		NH ₂
Tyr	D-Arg	Tyr	Dap		NH ₂
2'6'Dmt	D-Arg	Tyr	Lys		NH ₂
2'6'Dmt	D-Arg	Tyr	Orn		NH ₂
2'6'Dmt	D-Arg	Tyr	Dab		NH ₂
2'6'Dmt	D-Arg	Tyr	Dap		NH ₂
2'6'Dmt	D-Arg	2'6'Dmt	Lys		NH ₂
2'6'Dmt	D-Arg	2'6'Dmt	Orn		NH ₂
2'6'Dmt	D-Arg	2'6'Dmt	Dab		NH ₂
2'6'Dmt	D-Arg	2'6'Dmt	Dap		NH ₂
3'5'Dmt	D-Arg	3'5'Dmt	Arg		NH ₂
3'5'Dmt	D-Arg	3'5'Dmt	Lys		NH ₂
3'5'Dmt	D-Arg	3'5'Dmt	Orn		NH ₂
3'5'Dmt	D-Arg	3'5'Dmt	Dab		NH ₂
2'6'Dmt	D-Arg	2'6'Dmt	Lys	Cys	NH ₂
Tyr	D-Lys	Phe	Dap		NH ₂
Tyr	D-Lys	Phe	Arg		NH ₂
Tyr	D-Lys	Phe	Arg	Cys	NH ₂
Tyr	D-Lys	Phe	Lys		NH ₂
Tyr	D-Lys	Phe	Orn		NH ₂
2'6'Dmt	D-Lys	Phe	Dab		NH ₂
2'6'Dmt	D-Lys	Phe	Dap		NH ₂
2'6'Dmt	D-Lys	Phe	Arg		NH ₂
2'6'Dmt	D-Lys	Phe	Lys		NH ₂
3'5'Dmt	D-Lys	Phe	Orn		NH ₂
3'5'Dmt	D-Lys	Phe	Dab		NH ₂

[0300]

氨基酸 位置 1	氨基酸 位置 2	氨基酸 位置 3	氨基酸 位置 4	氨基酸位 置 5 (如果存 在的话)	C 末端修 饰
3'5'Dmt	D-Lys	Phe	Dap		NH ₂
3'5'Dmt	D-Lys	Phe	Arg		NH ₂
3'5'Dmt	D-Lys	Phe	Arg	Cys	NH ₂
Tyr	D-Lys	Tyr	Lys		NH ₂
Tyr	D-Lys	Tyr	Orn		NH ₂
Tyr	D-Lys	Tyr	Dab		NH ₂
Tyr	D-Lys	Tyr	Dap		NH ₂
2'6'Dmt	D-Lys	Tyr	Lys		NH ₂
2'6'Dmt	D-Lys	Tyr	Orn		NH ₂
2'6'Dmt	D-Lys	Tyr	Dab		NH ₂
2'6'Dmt	D-Lys	Tyr	Dap		NH ₂
2'6'Dmt	D-Lys	2'6'Dmt	Lys		NH ₂
2'6'Dmt	D-Lys	2'6'Dmt	Orn		NH ₂
2'6'Dmt	D-Lys	2'6'Dmt	Dab		NH ₂
2'6'Dmt	D-Lys	2'6'Dmt	Dap		NH ₂
2'6'Dmt	D-Arg	Phe	dnsDap		NH ₂
2'6'Dmt	D-Arg	Phe	atnDap		NH ₂
3'5'Dmt	D-Lys	3'5'Dmt	Lys		NH ₂
3'5'Dmt	D-Lys	3'5'Dmt	Orn		NH ₂
3'5'Dmt	D-Lys	3'5'Dmt	Dab		NH ₂
3'5'Dmt	D-Lys	3'5'Dmt	Dap		NH ₂
Tyr	D-Lys	Phe	Arg		NH ₂
Tyr	D-Orn	Phe	Arg		NH ₂
Tyr	D-Dab	Phe	Arg		NH ₂
Tyr	D-Dap	Phe	Arg		NH ₂
2'6'Dmt	D-Arg	Phe	Arg		NH ₂
2'6'Dmt	D-Lys	Phe	Arg		NH ₂

[0301]

氨基酸 位置 1	氨基酸 位置 2	氨基酸 位置 3	氨基酸 位置 4	氨基酸位 置 5 (如果存 在的话)	C 末端修 饰
2'6'Dmt	D-Orn	Phe	Arg		NH ₂
2'6'Dmt	D-Dab	Phe	Arg		NH ₂
3'5'Dmt	D-Dap	Phe	Arg		NH ₂
3'5'Dmt	D-Arg	Phe	Arg		NH ₂
3'5'Dmt	D-Lys	Phe	Arg		NH ₂
3'5'Dmt	D-Orn	Phe	Arg		NH ₂
Tyr	D-Lys	Tyr	Arg		NH ₂
Tyr	D-Orn	Tyr	Arg		NH ₂
Tyr	D-Dab	Tyr	Arg		NH ₂
Tyr	D-Dap	Tyr	Arg		NH ₂
2'6'Dmt	D-Arg	2'6'Dmt	Arg		NH ₂
2'6'Dmt	D-Lys	2'6'Dmt	Arg		NH ₂
2'6'Dmt	D-Orn	2'6'Dmt	Arg		NH ₂
2'6'Dmt	D-Dab	2'6'Dmt	Arg		NH ₂
3'5'Dmt	D-Dap	3'5'Dmt	Arg		NH ₂
3'5'Dmt	D-Arg	3'5'Dmt	Arg		NH ₂
3'5'Dmt	D-Lys	3'5'Dmt	Arg		NH ₂
3'5'Dmt	D-Orn	3'5'Dmt	Arg		NH ₂
Mmt	D-Arg	Phe	Lys		NH ₂
Mmt	D-Arg	Phe	Orn		NH ₂
Mmt	D-Arg	Phe	Dab		NH ₂
Mmt	D-Arg	Phe	Dap		NH ₂
Tmt	D-Arg	Phe	Lys		NH ₂
Tmt	D-Arg	Phe	Orn		NH ₂
Tmt	D-Arg	Phe	Dab		NH ₂
Tmt	D-Arg	Phe	Dap		NH ₂
Hmt	D-Arg	Phe	Lys		NH ₂

[0302]

氨基酸 位置 1	氨基酸 位置 2	氨基酸 位置 3	氨基酸 位置 4	氨基酸位 置 5 (如果存 在的话)	C 末端修 饰
Hmt	D-Arg	Phe	Orn		NH ₂
Hmt	D-Arg	Phe	Dab		NH ₂
Hmt	D-Arg	Phe	Dap		NH ₂
Mmt	D-Lys	Phe	Lys		NH ₂
Mmt	D-Lys	Phe	Orn		NH ₂
Mmt	D-Lys	Phe	Dab		NH ₂
Mmt	D-Lys	Phe	Dap		NH ₂
Mmt	D-Lys	Phe	Arg		NH ₂
Tmt	D-Lys	Phe	Lys		NH ₂
Tmt	D-Lys	Phe	Orn		NH ₂
Tmt	D-Lys	Phe	Dab		NH ₂
Tmt	D-Lys	Phe	Dap		NH ₂
Tmt	D-Lys	Phe	Arg		NH ₂
Hmt	D-Lys	Phe	Lys		NH ₂
Hmt	D-Lys	Phe	Orn		NH ₂
Hmt	D-Lys	Phe	Dab		NH ₂
Hmt	D-Lys	Phe	Dap		NH ₂
Hmt	D-Lys	Phe	Arg		NH ₂
Mmt	D-Lys	Phe	Arg		NH ₂
Mmt	D-Orn	Phe	Arg		NH ₂
Mmt	D-Dab	Phe	Arg		NH ₂
Mmt	D-Dap	Phe	Arg		NH ₂
Mmt	D-Arg	Phe	Arg		NH ₂
Tmt	D-Lys	Phe	Arg		NH ₂
Tmt	D-Orn	Phe	Arg		NH ₂
Tmt	D-Dab	Phe	Arg		NH ₂
Tmt	D-Dap	Phe	Arg		NH ₂

[0303]

氨基酸 位置 1	氨基酸 位置 2	氨基酸 位置 3	氨基酸 位置 4	氨基酸位 置 5 (如果存 在的话)	C 末端修 饰
Tmt	D-Arg	Phe	Arg		NH ₂
Hmt	D-Lys	Phe	Arg		NH ₂
Hmt	D-Orn	Phe	Arg		NH ₂
Hmt	D-Dab	Phe	Arg		NH ₂
Hmt	D-Dap	Phe	Arg		NH ₂
Hmt	D-Arg	Phe	Arg		NH ₂

[0304] Dab = 二氨基丁酸

[0305] Dap = 二氨基丙酸

[0306] Dmt = 二甲基酪氨酸

[0307] Mmt = 2' - 甲基酪氨酸

[0308] Tmt = N, 2', 6' - 三甲基酪氨酸

[0309] Hmt = 2' - 羟基, 6' - 甲基酪氨酸

[0310] dnsDap = β - 丹磺酰 -L- α , β - 二氨基丙酸

[0311] atnDap = β - 氨基苄酰 -L- α , β - 二氨基丙酸

[0312] Bio = 生物素

[0313] 具有阿片样物质受体激动剂活性的另外的肽包括 2', 6' -Dmt-D-Arg-Ald-Lys-NH₂ (SS-36), 其中 Ald 是 β - (6' - 二甲氨基 -2' - 萘酰) 丙氨酸和 2', 6' -Dmt-D-Arg-Phe-Lys-Ald-NH₂ (SS-37), 其中 Ald 是 β - (6' - 二甲氨基 -2' - 萘酰) 丙氨酸。

[0314] 具有 μ 阿片样物质受体激动剂活性的肽通常为在 N 末端 (即第一氨基酸位置) 处具有酪氨酸残基或酪氨酸衍生物的肽。适合的酪氨酸衍生物包括 2' - 甲基酪氨酸 (Mmt); 2', 6' - 二甲基酪氨酸 (2', 6' -Dmt); 3', 5' - 二甲基酪氨酸 (3', 5' -Dmt); N, 2', 6' - 三甲基酪氨酸 (Tmt); 和 2' - 羟基 -6' - 甲基酪氨酸 (Hmt)。

[0315] 不具有 μ 阿片样受体激动剂活性的肽通常在 N 末端 (即氨基酸位置 1) 处不具有酪氨酸残基或酪氨酸衍生物。在 N 末端处的氨基酸可以是酪氨酸以外的任何天然存在的氨基酸或非天然存在的氨基酸。在一个实施例中, 在 N 末端处的氨基酸是苯丙氨酸或其衍生物。苯丙氨酸的示例性衍生物包括 2' - 甲基苯丙氨酸 (Mmp)、2', 6' - 二甲基苯丙氨酸 (2', 6' -Dmp)、N, 2', 6' - 三甲基苯丙氨酸 (Tmp) 和 2' - 羟基 -6' - 甲基苯丙氨酸 (Hmp)。

[0316] 表 5 和 6 中所示的肽的氨基酸可以为 L- 或 D- 构型。

[0317] 在一些实施例中, 芳香族阳离子肽包括至少一个精氨酸和 / 或至少一个赖氨酸残基。在一些实施例中, 精氨酸和 / 或赖氨酸残基充当电子受体且参与质子偶联的电子传递。另外或可替代地, 在一些实施例中, 芳香族阳离子肽包含导致例如在 SS-31 中存在的“电

荷-环-电荷-环”构型的序列。另外或可替代地,在一些实施例中,芳香族阳离子肽包括含硫醇残基例如半胱氨酸和甲硫氨酸。在一些实施例中,包括含硫醇残基的肽直接贡献电子且还原细胞色素 c。在一些实施例中,芳香族阳离子肽包括在肽的 N 末端和 / 或 C 末端处的半胱氨酸 (cysteine)。

[0318] 在一些实施例中,提供了肽多聚体。例如,在一些实施例中,提供了二聚体。例如 SS-20 二聚体 :Phe-D-Arg-Phe-Lys-Phe-D-Arg-Phe-Lys。在一些实施例中,二聚体是 SS-31 二聚体 :D-Arg-2' 6' Dmt-Lys-Phe-D-Arg-2' 6' Dmt-Lys-Phe-NH₂。在一些实施例中,多聚体是三聚体、四聚体和 / 或五聚体。在一些实施例中,多聚体包括不同单体肽的组合 (例如与 SS-31 肽连接的 SS-20 肽)。在一些实施例中,这些更长的类似物可用作治疗分子。

[0319] 在一些实施例中,本文描述的芳香族阳离子肽包含所有左旋 (L) 氨基酸。

[0320] 肽合成

[0321] 可通过本领域众所周知的方法的任一种来合成肽。用于化学方式合成蛋白质的合适方法包括例如由 Stuart 和 Young 在 Solid Phase Peptide Synthesis, 第二版, Pierce Chemical Company (1984) 和在 Methods Enzymol., 289, Academic Press, Inc, New York (1997) 中描述的方法。

[0322] 使肽针对酶促降解稳定化的一种方法是用 D-氨基酸替换在经受切割的肽键处的 L-氨基酸。制备除了已经存在的 D-Arg 残基之外还含有一个或多个 D-氨基酸残基的芳香族阳离子肽类似物。防止酶促降解的另一种方法是使在肽的一个或多个氨基酸残基处的 α 氨基的 N-甲基化。这将防止肽键被任一肽酶裂解。例子包括 : H-D-Arg-Dmt-Lys (N^q Me)-Phe-NH₂ ; H-D-Arg-Dmt-Lys-Phe (NMe)-NH₂ ; H-D-Arg-Dmt-Lys (N^q Me)-Phe (NMe)-NH₂ ; 和 H-D-Arg (N^q Me)-Dmt (NMe)-Lys (N^q Me)-Phe (NMe)-NH₂。N^q-甲基化的类似物具有较低的氢键合能力并且可预期具有改善的肠道通透性。

[0323] 使肽酰胺键 (-CO-NH-) 针对酶促降解稳定化的可替代方法是其由还原的酰胺键 (Ψ [CH₂-NH]) 的替换。这可通过在固相肽合成中在 Boc-氨基酸-乙醛和生长肽链的 N 末端氨基酸残基的氨基之间的还原性烷基化反应来实现。预测还原的肽键由于氢键合能力下降而引起改善的细胞通透性。例子包括 : H-D-Arg- Ψ [CH₂-NH] Dmt-Lys-Phe-NH₂、H-D-Arg-Dmt- Ψ [CH₂-NH] Lys-Phe-NH₂、H-D-Arg-Dmt-Lys Ψ [CH₂-NH] Phe-NH₂、H-D-Arg-Dmt- Ψ [CH₂-NH] Lys- Ψ [CH₂-NH] Phe-NH₂ 等。

[0324] 脂质

[0325] 心磷脂是线粒体内膜的重要组分,在其中它构成约 20% 的总脂质组成。在哺乳动物细胞中,心磷脂几乎专一地在在线粒体内膜中发现,在其中它是涉及线粒体代谢的酶的最佳功能所需的。

[0326] 心磷脂是包含两个磷脂酰甘油的双磷脂酰甘油脂质种类,所述两个磷脂酰甘油由甘油主链连接以形成二聚体结构。它具有四个烷基且潜在携带两个负电荷。因为在心磷脂中存在四条不同的烷基链,所以该分子具有极大复杂性的潜力。然而,在大多数动物组织中,心磷脂含有 18-碳脂肪烷基链,在其各自上具有 2 个不饱和键。已提出 (18:2)₄ 酰基链配置是心磷脂对哺乳动物线粒体中的内膜蛋白质的高亲和力的重要结构需求。然而,用分离的酶制剂的研究指示它的重要性可取决于检查的蛋白质而改变。

[0327] 分子中的两个磷酸盐各自可捕获一个质子。尽管它具有对称结构,但一个磷酸盐

的电离在与电离两个不同的酸度水平下发生,其中 $pK_1 = 3$ 和 $pK_2 > 7.5$ 。因此,在正常生理条件(大约 7.0 的 pH)下,分子可仅携带一个负电荷。在磷酸盐上的羟基($-OH$ 和 $-O^-$)形成稳定的分子内氢键,形成二环共振结构。该结构捕获一个质子,其有助于氧化磷酸化。

[0328] 在由复合物 IV 催化的氧化磷酸化过程期间,大数量的质子从膜一侧转移到另一侧,引起大 pH 改变。不希望受理论束缚,已提出心磷脂充当线粒体膜内的质子阱,从而严格局限化质子池且使线粒体膜间隙中的 pH 降到最低。该功能被认为是由于独特的心磷脂结构,其如上所述可捕获二环结构内的质子,同时携带负电荷。因此,心磷脂可充当电子缓冲池,以释放或吸收质子以便维持在线粒体膜附近的 pH。

[0329] 另外,心磷脂已显示在细胞凋亡中起作用。细胞凋亡级联中的早期事件涉及心磷脂。如下文更详细地讨论的,心磷脂特异性氧合酶产生心磷脂-氢过氧化物,其促使脂质经历构象改变。氧化的心磷脂随后从线粒体内膜易位到线粒体外膜,在其中它被认为形成细胞色素 c 通过其释放到细胞溶质内的孔。细胞色素 c 可与刺激钙释放的 IP_3 受体结合,其还促进细胞色素 c 的释放。当细胞质钙浓度达到毒性水平时,细胞死亡。另外,线粒体外的细胞色素 c 与细胞凋亡活化因子相互作用,从而引起凋亡体复合物的形成和蛋白酶解半胱天冬酶级联的活化。

[0330] 另一个后果是细胞色素 c 以高亲和力与线粒体内膜上的心磷脂相互作用且与心磷脂形成复合物,所述复合物在传递电子中是非生产性的,但充当心磷脂特异性氧合酶/过氧化物酶。事实上,心磷脂与细胞色素 c 的相互作用获得其正常氧化还原电位比完整细胞色素 c 的氧化还原电位更负约负 ($-$)400mV 的复合物。因此,细胞色素 c/心磷脂复合物不能接受来自线粒体复合物 III 的电子,从而导致增强的其歧化获得 H_2O_2 的超氧化物产生。细胞色素 c/心磷脂复合物也不能接受来自超氧化物的电子。另外,心磷脂与细胞色素 c 的高亲和相互作用导致细胞色素 c 活化成心磷脂特异性过氧化物酶,其具有针对多不饱和分子心磷脂的过氧化的选择性催化活性。细胞色素 c/心磷脂复合物的过氧化物酶反应由作为氧化当量源的 H_2O_2 驱动。最终,该活性导致心磷脂氧化产物(主要是心磷脂 $-OOH$)及其还原产物(心磷脂 $-OH$)的蓄积。如上所述,已显示氧合的心磷脂种类在线粒体膜透化和促细胞凋亡因子(包括细胞色素 c 自身)释放到细胞溶质中起作用。参见例如 Kagan 等人, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61(2009)1375-1385 ;Kagan 等人, *Mol. Nutr. Food Res.* 2009 January ;53(1):104-114,所述两个参考文献均以引用的方式并入本文。

[0331] 细胞色素 c 是球状蛋白质,其主要功能是充当在线粒体电子传递链中的从复合物 III(细胞色素 c 还原酶)到复合物 IV(细胞色素 c 氧化酶)的电子载体。血红素辅基在 Cys14 和 Cys17 处附着至细胞色素 c,并且另外由两个配位轴向配体 His18 和 Met80 结合。与 Met80 的第 6 配位结合防止 Fe 与其他配体例如 O_2 、 H_2O_2 、NO 等的相互作用。

[0332] 细胞色素 c 池分布在膜间隙中,而剩余部分经由静电相互作用和疏水性相互作用与线粒体内膜(IMM)结合。细胞色素 c 是高阳离子蛋白质(在中性 pH 下的 $8+$ 净电荷),其可经由静电相互作用与 IMM 上的阴离子磷脂心磷脂松散结合。另外,如上所述,细胞色素 c 还可经由疏水性相互作用与心磷脂紧密结合。细胞色素 c 与心磷脂的该紧密结合起因于心磷脂的酰基链离开脂质膜的延伸且延伸到细胞色素 c 内部中的疏水通道内(Tuominen 等人, 2001 ;Kalanxhi&Wallace, 2007 ;Sinibaldi 等人, 2010)。这导致在细胞色素 c 血红素袋中的 Fe-Met80 键的破裂且导致血红素环境中的改变,如由索雷带(Soret band)区中的负

科顿 (Cotton) 峰的丧失 (Sinibaldi 等人, 2008)。它还导致血红素 Fe 对 H_2O_2 和 NO 的暴露。

[0333] 天然细胞色素 c 具有由于其第 6 配位的弱过氧化物酶活性。然而,在与心磷脂的疏水结合后,细胞色素 c 经历破坏 Fe-Met80 配位且增加血红素 Fe 对 H_2O_2 的暴露的结构改变,并且细胞色素 C 从电子载体转换为过氧化物酶,其中心磷脂是主要底物 (Vladimirov 等人, 2006 ; Basova 等人, 2007)。如上所述,心磷脂过氧化导致改变的线粒体膜结构,和来自 IMM 的细胞色素 c 释放,以起始半胱天冬酶介导的细胞死亡。

[0334] 因此,在一些实施例中,如本文公开的芳香族阳离子肽 (例如 D-Arg-2', 6' -Dmt-Lys-Phe-NH₂、Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂、2', 6' -Dmt-D-Arg-Phe-(atn)DapNH₂, 其中 (atn)Dap 是 β -氨基萘酰-L- α , β -二氨基丙酸、2', 6' -Dmt-D-Arg-Ald-Lys-NH₂, 其中 Ald 是 β -(6'-二甲氨基-2'-萘酰)丙氨酸、2', 6' -Dmt-D-Arg-Phe-Lys-Ald-NH₂, 其中 Ald 是 β -(6'-二甲氨基-2'-萘酰)丙氨酸、D-Arg-Tyr-Lys-Phe-NH₂、2', 6' -Dmt-D-Arg-Phe-(dns)Dap-NH₂, 其中 (dns)Dap 是 β -丹磺酰-L- α , β -二氨基丙酸;或其药学可接受的盐,例如乙酸盐或三氟乙酸盐)施用于有此需要的受试者。不希望受理论束缚,认为肽接触 (例如靶向) 细胞色素 c、心磷脂或两者,阻碍心磷脂-细胞色素 c 相互作用,抑制心磷脂/细胞色素 c 复合物的氧合酶/过氧化物酶活性,抑制心磷脂-氢过氧化物形成,抑制心磷脂至外膜的易位和/或抑制来自 IMM 的细胞色素 c 释放。另外或可替代地,在一些实施例中,本文公开的芳香族阳离子肽包括下述特征或功能中的一种或多种:(1) 是细胞可渗透的且靶向线粒体内膜;(2) 经由静电相互作用与心磷脂选择性结合,所述静电相互作用促进肽与细胞色素 c 的相互作用;(3) 与细胞色素 c 相互作用,所述细胞色素 c 是游离的且与心磷脂或松散结合或紧密结合;(4) 保护细胞色素 c 的疏水血红素袋和/或抑制心磷脂破坏 Fe-Met80 键;(5) 促进与血红素卟啉 (porphorin) 的 π - π^* 相互作用;(6) 抑制细胞色素 c 过氧化物酶活性;(7) 促进细胞色素 c 还原的动力学;(8) 防止由心磷脂引起的细胞色素 c 还原的抑制;(9) 促进线粒体电子传递链和 ATP 合成中的电子流量。在一些实施例中,肽促进电子传递的能力与肽抑制细胞色素 c/心磷脂复合物的过氧化物酶活性的能力不相关。因此,在一些实施例中,施用的肽抑制、延迟或降低心磷脂和细胞色素 c 之间的相互作用。另外或可替代地,在一些实施例中,施用的肽抑制、延迟或降低细胞色素 c/心磷脂复合物的形成。另外或可替代地,在一些实施例中,施用的肽抑制、延迟或降低细胞色素 c/心磷脂复合物的氧合酶/过氧化物酶活性。另外或可替代地,在一些实施例中,施用的肽抑制、延迟或降低细胞凋亡。

[0335] 另外或可替代地,在一些实施例中,该方法涉及增加含有细胞色素 c 的样品中的细胞色素 c 还原,包括使样品与有效量的芳香族阳离子肽或其盐例如乙酸盐或三氟乙酸盐接触。另外或可替代地,在一些实施例中,该方法涉及增强含有细胞色素 c 的样品中通过细胞色素 c 的电子扩散,包括使样品与有效量的芳香族阳离子肽接触。另外或可替代地,在一些实施例中,该方法涉及增强含有细胞色素 c 的样品中的细胞色素 c 中的电子容量,包括使样品与有效量的芳香族阳离子肽接触。另外或可替代地,在一些实施例中,该方法涉及诱导含有细胞色素 c 的样品中的围绕细胞色素 c 的新型 π - π 相互作用,包括使样品与有效量的芳香族阳离子肽接触。在一些实施例中,芳香族阳离子肽包含 D-Arg-2', 6' -Dmt-Lys-Phe-NH₂。另外或可替代地,在一些实施例中,芳香族阳离

子肽包含 Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂。在一些实施例中,该方法包括使样品与芳香族阳离子肽(例如 D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ 或 Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂)和心磷脂接触。在一些实施例中,该方法包括使样品与心磷脂接触。在一些实施例中,芳香族阳离子肽包含 2',6'-Dmt-D-Arg-Phe-(atn)Dap-NH₂(SS-19),其中 (atn)Dap 是 β-氨基苧酰-L-α,β-二氨基丙酸、2',6'-Dmt-D-Arg-Ald-Lys-NH₂(SS-36),其中 Ald 是 β-(6'-二甲氨基-2'-萘酰)丙氨酸、2',6'-Dmt-D-Arg-Phe-Lys-Ald-NH₂(SS-37),其中 Ald 是 β-(6'-二甲氨基-2'-萘酰)丙氨酸、D-Arg-Tyr-Lys-Phe-NH₂(SPI-231)和 2',6'-Dmt-D-Arg-Phe-(dns)Dap-NH₂,其中 (dns)Dap 是 β-丹磺酰-L-α,β-二氨基丙酸(SS-17)。

[0336] 芳香族阳离子肽的预防和治疗用途

[0337] 本文描述的芳香族阳离子肽可用于预防或治疗疾病。具体地,本公开内容提供了通过施用本文描述的芳香族阳离子肽来治疗处于疾病的危险中(或易受疾病影响)的受试者的预防和治疗方案。因此,本方法提供了通过将有效量的芳香族阳离子肽施用于有此需要的受试者来预防和/或治疗受试者中的疾病。

[0338] 在一个方面,本公开内容提供了降低经历线粒体通透性转变(MPT)的线粒体数目或防止有此需要的哺乳动物中的线粒体通透性转换的方法,该方法包括给哺乳动物施用有效量的本文描述的一种或多种芳香族阳离子肽。在另一个方面,本公开内容提供了用于增加有此需要的哺乳动物中的 ATP 合成率的方法,该方法包括给哺乳动物施用有效量的本文描述的一种或多种芳香族阳离子肽。在另外一个方面,本公开内容提供了用于降低有此需要的哺乳动物中的氧化损伤的方法,该方法包括给哺乳动物施用有效量的本文描述的一种或多种芳香族阳离子肽。

[0339] 氧化损伤。本文公开的肽可用于降低有此需要的哺乳动物中的氧化损伤。需要降低氧化损伤的哺乳动物是患有与氧化损伤相关的疾病、病症或治疗的哺乳动物。通常,通过例如活性氧种类(ROS)和/或活性氮种类(RNS)的自由基导致氧化损伤。ROS 和 RNS 的例子包括羟基自由基、超氧阴离子自由基、一氧化氮、氢、次氯酸(HOCl)和过氧亚硝酸盐阴离子。如果在施用有效量的上述芳香族阳离子肽后,哺乳动物、移除器官或细胞中的氧化损伤的量减少,则氧化损伤被视为“降低的”。通常,与未使用该肽治疗的对照受试者相比,如果氧化损伤减少至少约 10%、至少约 25%、至少约 50%、至少约 75%或至少约 90%,则氧化损伤被视为降低的。

[0340] 在一些实施例中,待治疗的哺乳动物可以是患有与氧化损伤相关的疾病或病症的哺乳动物。氧化损伤可出现在哺乳动物的任何细胞、组织或器官中。在人中,许多疾病涉及氧化性应激。例子包括动脉粥样硬化、帕金森氏病、心力衰竭、心肌梗塞、阿尔茨海默氏病、精神分裂症、双相型障碍、脆性 X 染色体综合征和慢性疲劳综合征。

[0341] 在一些实施例中,哺乳动物可经历与氧化损伤相关的治疗。例如,该哺乳动物可以经历再灌注。再灌注指对其中血流减少或阻塞的任何器官或组织的血流恢复。在再灌注期间的血流恢复导致呼吸爆发和自由基形成。

[0342] 在一个实施例中,由于缺氧或缺血,哺乳动物可具有减少或阻塞的血流。在缺氧或缺血过程中的血液供给的丧失或严重降低可以例如是由于血栓栓塞性中风、冠状动脉粥样硬化或周围性血管疾病。众多器官和组织遭受缺血或缺氧。此类器官的例子包括脑、心脏、

肾、肠和前列腺。受累组织通常为肌肉,例如心肌、骨骼肌或平滑肌。例如,心肌缺血或缺氧通常由动脉粥样硬化性或血栓性阻塞引起,所述动脉粥样硬化性或血栓性阻塞导致由心脏动脉和毛细血管供血而输送到心脏组织的氧降低或丧失。此类心肌缺血或缺氧可引起受累心肌的疼痛和坏死,并且最终可导致心力衰竭。

[0343] 该方法还可用于降低与任何神经变性疾病或病症相关的氧化损伤。神经变性疾病可影响中枢神经系统和周围神经系统的任何细胞、组织或器官。此类细胞、组织和器官的例子包括脑、脊髓、神经元、神经节、许旺细胞、星形细胞、少突胶质细胞和小神经胶质细胞。神经变性病症可以是急性病症例如中风或脑创伤或脊髓损伤。在另一个实施例中,神经变性疾病或病症可以是慢性神经变性病症。在慢性神经变性病症中,自由基例如可引起对蛋白质的损伤。此类蛋白质的例子为 β 淀粉样蛋白。与通过自由基的损伤相关的慢性神经变性疾病的例子包括帕金森氏症、阿尔茨海默氏病、亨廷顿氏病和肌萎缩侧索硬化症(也称为葛雷克氏病)。

[0344] 线粒体通透性转变。本文公开的肽可用于治疗与线粒体通透性转变(MPT)相关的任何疾病或病症。此类疾病和病症包括但不限于组织或器官的缺血和/或再灌注、缺氧和大量神经变性疾病中的任一种。需要抑制或预防MPT的哺乳动物是患有这些疾病或病症的哺乳动物。

[0345] 细胞凋亡。本文公开的肽可用于治疗与细胞凋亡相关的疾病或病症。示例性疾病或病症包括但不限于癌症例如结肠直肠癌、神经胶质瘤、肝癌、成神经细胞瘤、白血病和淋巴瘤和前列腺癌;自身免疫疾病例如重症肌无力(myasthenia gravis)、系统性红斑狼疮、炎性疾病、支气管哮喘、炎性肠病、肺炎;病毒感染例如腺病毒和杆状病毒和HIV-AIDS;神经变性疾病例如阿尔茨海默氏病、肌萎缩侧索硬化、帕金森氏病、色素性视网膜炎和癫痫;血液病例如再生障碍性贫血、脊髓发育不良综合征、T CD4+ 淋巴细胞减少症和G6PD缺乏;例如由心肌梗塞、脑血管意外、缺血肾损伤和多囊肾引起的组织损伤。因此,在一些实施例中,如本文公开的芳香族阳离子肽(例如D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂、Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂、2',6'-Dmt-D-Arg-Phe-(atn)Dap-NH₂,其中(atn)Dap是 β -氨基苄酰-L- α , β -二氨基丙酸、2',6'-Dmt-D-Arg-Ald-Lys-NH₂,其中Ald是 β -(6'-二甲氨基-2'-萘酰)丙氨酸、2',6'-Dmt-D-Arg-Phe-Lys-Ald-NH₂,其中Ald是 β -(6'-二甲氨基-2'-萘酰)丙氨酸和D-Arg-Tyr-Lys-Phe-NH₂、2',6'-Dmt-D-Arg-Phe-(dns)Dap-NH₂,其中(dns)Dap是 β -丹磺酰-L- α , β -二氨基丙酸,或其药学可接受的盐例如乙酸盐或三氟乙酸盐)施用于有此需要的受试者(例如哺乳动物例如人)。如上所述,认为肽接触(例如靶向)细胞色素c、心磷脂或两者,阻碍心磷脂-细胞色素c相互作用,抑制心磷脂-氢过氧化物形成,抑制心磷脂至外膜的易位、和/或抑制氧合酶/过氧化物酶活性。因此,在一些实施例中,施用的肽抑制、延迟或降低心磷脂和细胞色素c之间的相互作用。另外或可替代地,在一些实施例中,施用的肽抑制、延迟或降低细胞色素c/心磷脂复合物的形成。另外或可替代地,在一些实施例中,施用的肽抑制、延迟或降低细胞色素c/心磷脂复合物的氧合酶/过氧化物酶活性。另外或可替代地,在一些实施例中,施用的肽抑制、延迟或降低细胞凋亡。

[0346] a. 抗磷脂综合征和系统性红斑狼疮

[0347] 本文公开的肽可用于治疗自身免疫疾病或病症,例如系统性红斑狼疮。抗磷脂综

综合征 (APS) 和系统性红斑狼疮 (SLE) 是特征在于循环自身抗体的存在的系统性自身免疫疾病的例子,所述循环自身抗体包括抗心磷脂抗体、抗 β_2 糖蛋白 I 和狼疮抗凝物。与其他自身免疫疾病一样,免疫系统攻击身体的细胞和组织,导致炎症和组织损害。APS 与血管血栓形成,血小板减少症,心脏瓣膜疾病,网状青斑和 / 或妊娠发病例如胎儿死亡、流产和先兆子痫相关。SLE 可以是特征在于涉及结缔组织的炎症反应的 APS 子集。SLE 中的炎症症状或病症包括:发热;肺病症例如胸膜炎、胸腔积液、狼疮性肺炎、慢性弥漫性间质性肺疾病、肺性高血压、肺栓塞、肺出血和肺收缩综合征;心脏炎症包括心包炎、心肌炎和心内膜炎;血液学病症例如贫血、低血小板和白细胞计数;延长部分凝血活酶时间;肌肉骨骼问题例如关节疼痛和炎症、骨关节结核和肌痛;皮肤病症例如面颊疹,盘状狼疮,脱发,口、鼻、泌尿道和阴道溃疡;神经学病症例如头痛、抑郁、焦虑、多发性神经病、精神病、颅内压增高综合征。疾病过程的特征在于与缓解交替的急性爆发期。目前不存在用于 APS 或 SLE 的专门治疗,并且可用治疗通常仅涉及预防急性爆发,并且当其发生时,减少其严重性和持续时间。

[0348] 心磷脂氧化可以是 APS 和 SLE 两者的炎症方面中的重要过程。相应地,本公开内容的芳香族阳离子肽(例如但不限于:2',6'-Dmt-D-Arg-Phe-Lys-NH₂(SS-02);Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂(SS-20);和 D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂(SS-31);Dmt-D-Arg-Phe-(atn)Dap-NH₂(SS-19),其中 (atn)Dap 是 β -氨基苄酰-L- α , β -二氨基丙酸;和 2',6'-Dmt-D-Arg-Ald-Lys-NH₂(SS-36),其中 Ald 是 β -(6'-二甲基氨基-2'-萘酰)丙氨酸;2',6'-Dmt-D-Arg-Phe-Lys-Ald-NH₂(SS-37);或其药学可接受的盐,例如乙酸盐和三氟乙酸盐)可经由心磷脂对受试者中的心磷脂抗体的细胞外暴露和 / 或受试者中心磷脂抗体的产生,通过预防心磷脂氧化、细胞凋亡和所得的炎症用于治疗这两种疾病。

[0349] 1. 在细胞凋亡细胞上的心磷脂氧化和细胞外暴露

[0350] 本文公开的肽可用于预防、抑制或减少心磷脂氧化。心磷脂是几乎唯一地在线粒体内膜以及连接外膜和内膜的接触部位处发现的独特磷脂。心磷脂结构域是适当的嵴形成所需的,并且它们涉及呼吸复合物组构成更高级的超级复合物,以促进电子转移。心磷脂也是保持细胞色素 c 与呼吸复合物紧密接近所需的,用于有效电子转移。带正电的细胞色素 c 经由静电相互作用与高度阴离子的心磷脂相互作用。

[0351] 该心磷脂-细胞色素 c 相互作用通过心磷脂过氧化减弱,并且该游离细胞色素 c 丧失到细胞溶质内起始半胱天冬酶依赖性细胞凋亡 (Shidoji 等人,1999, Biochem Biophys Res Commun 264, 343-347)。脂质膜的重塑在细胞凋亡过程中发生,并且磷脂酰丝氨酸从质膜内部小叶移动到外部小叶。以相似方式,心磷脂及其代谢产物可从线粒体再定位至其他细胞内细胞器并至细胞表面 (M. Sorice 等人,2004, Cell Death Differ 11, 1133-1145)。因此,在细胞凋亡细胞表面上的心磷脂可以是抗心磷脂抗体的触发物。

[0352] 2. 心磷脂氧化和 APS

[0353] 心磷脂已显示在细胞凋亡细胞表面上表达,并且通过从具有 APS 的患者中纯化的抗心磷脂抗体识别 (M. Sorice 等人,2004, Cell Death Differ 11, 1133-1145)。此外,心磷脂的表达在磷脂酰丝氨酸易位至细胞表面和 DNA 断裂之前。Horkko 等人报道抗心磷脂抗体仅与氧化型心磷脂结合,并且不与还原型心磷脂结合 (Horkko 等人,1997, Proc Natl Acad Sci U S A 94:10356-10361)。这与心磷脂必须氧化以释放细胞色素 c 并再定位至细胞表面的事实一致。此外,氧化型心磷脂的反应基团可与 β_2 GP1 形成共价加合物,并且这些加合

物可以是抗心磷脂抗体的表位。

[0354] 3. 线粒体 ATP 耗尽和 SLE

[0355] 本文公开的肽（例如但不限于： $2'$ ， $6'$ -Dmt-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ (SS-02)；Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ (SS-20)；和 D-Arg- $2'$ ， $6'$ -Dmt-Lys-Phe-NH₂ (SS-31)；Dmt-D-Arg-Phe-(atn)Dap-NH₂ (SS-19)，其中 (atn)Dap 是 β -氨茴酰-L- α ， β -二氨基丙酸；和 $2'$ ， $6'$ -Dmt-D-Arg-Ald-Lys-NH₂ (SS-36)，其中 Ald 是 β -(6'-二甲基氨基-2'-萘酰)丙氨酸； $2'$ ， $6'$ -Dmt-D-Arg-Phe-Lys-Ald-NH₂ (SS-37)；或其药学可接受的盐，例如乙酸盐和三氟乙酸盐)可用于增强功能失调的线粒体中的 ATP 水平。异常 T 细胞活化和细胞死亡被认为是 SLE 病理学的基础，并且如同 APS，心磷脂过氧化可促成该现象。如 APS 中，在 SLE 患者中发现抗心磷脂抗体 (Woo 等人, Korean J Lab Med. 2010Feb;30(1):38-44)。来自 SLE 患者的淋巴细胞和 PMN 显示出升高的线粒体电位，增加的活性氧种类产生，减少的细胞内 ATP，增加的乳酸盐水平和减少的细胞内谷胱甘肽 (Perl 等人, 2004, Int Rev Immunol 23:293-313; Perl 等人, 2004, Trends Immunol 25, 360-367; Gergely, Jr. 等人, 2002, Arthritis Rheum 46:175-190; Li 等人, 2012, Clin Dev Immunol 2012, 548516)。因此，SLE 患者中的免疫细胞易于线粒体功能失调和氧化性应激。与该理论一致，SLE T 细胞显示出增强的自发性细胞凋亡 (Perl 等人, 2004, Trends Immunol 25, 360-367)。

[0356] 淋巴细胞坏死也可促成 SLE 中常见的炎症反应。淋巴细胞中的细胞内 ATP 浓度被认为是在细胞选择经由细胞凋亡或坏死而死亡中的关键开关。细胞内 ATP 中的缺乏促使淋巴细胞更可能死于坏死，这可促成 SLE 患者中的炎症。因此，不希望受理论束缚，SLE 患者的淋巴细胞中的 ATP 缺乏可使其易于通过坏死而死亡并且导致增加的炎症症状。

[0357] 4. 使用芳香族阳离子肽预防 APS 或 SLE 中的炎症

[0358] 本文公开的芳香族阳离子肽（例如但不限于： $2'$ ， $6'$ -Dmt-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ (SS-02)；Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ (SS-20)；和 D-Arg- $2'$ ， $6'$ -Dmt-Lys-Phe-NH₂ (SS-31)；Dmt-D-Arg-Phe-(atn)Dap-NH₂ (SS-19)，其中 (atn)Dap 是 β -氨茴酰-L- α ， β -二氨基丙酸；和 $2'$ ， $6'$ -Dmt-D-Arg-Ald-Lys-NH₂ (SS-36)，其中 Ald 是 β -(6'-二甲基氨基-2'-萘酰)丙氨酸； $2'$ ， $6'$ -Dmt-D-Arg-Phe-Lys-Ald-NH₂ (SS-37)；或其药学可接受的盐，例如乙酸盐和三氟乙酸盐)可用于预防心磷脂过氧化。此类肽还可通过防止心磷脂再定位至细胞表面，因此消除生成心磷脂抗体的表位，防止心磷脂与抗心磷脂抗体的反应，或通过防止淋巴细胞中的 ATP 耗尽和所得的坏死，用于预防 APS 和 SLE 中的炎症。心磷脂过氧化主要通过细胞色素 c 的过氧化物酶活性介导。约 15-20% 的线粒体细胞色素 c 经由疏水性相互作用在复合物中与心磷脂紧密结合，由此心磷脂的一条或多条酰基链插入细胞色素 c 的疏水通道内。酰基链插入细胞色素 c 内破坏 Met80 和血红素 Fe 之间的配位键，并且使血红素 Fe 的第六配位暴露于 H₂O₂，因此使该酶转换成可选择性催化心磷脂氧化的过氧化物酶。

[0359] 本文公开的芳香族阳离子肽（例如但不限于： $2'$ ， $6'$ -Dmt-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ (SS-02)；Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ (SS-20)；和 D-Arg- $2'$ ， $6'$ -Dmt-Lys-Phe-NH₂ (SS-31)；Dmt-D-Arg-Phe-(atn)Dap-NH₂ (SS-19)，其中 (atn)Dap 是 β -氨茴酰-L- α ， β -二氨基丙酸；和 $2'$ ， $6'$ -Dmt-D-Arg-Ald-Lys-NH₂ (SS-36)，其中 Ald 是 β -(6'-二甲基氨基-2'-萘酰)丙氨酸； $2'$ ， $6'$ -Dmt-D-Arg-Phe-Lys-Ald-NH₂ (SS-37)；或其药学可接受的盐，例如乙酸盐和三氟乙酸盐)是细胞可渗透的，并且可在线粒体内膜中选择性靶向并浓缩。芳香族

阳离子肽选择性靶向阴离子磷脂例如心磷脂、磷脂酰丝氨酸、磷脂酸和磷脂酰甘油，其中心磷脂与一些肽具有最高亲和力（参见例如实例 21）。在一些实施例中，芳香族阳离子肽与细胞色素 c 相互作用并且相互作用在心磷脂的存在下得到增强。在一些实施例中，该肽可穿透到与血红素紧密接近的细胞色素 c 蛋白质内，并且该穿透在心磷脂的存在下得到增强（参见例如实例 22-25）。

[0360] 不希望受理论束缚，通过穿透到细胞色素 c 的血红素环境内，可能芳香族阳离子肽干扰心磷脂和细胞色素 c 之间的结构相互作用，并且防止 Met80-Fe 配位的破裂并且防止细胞色素 c 变成过氧化物酶（参见例如实例 24）。这些芳香族阳离子肽还增加血红素区域中的 $\pi-\pi^*$ 相互作用并促进细胞色素 c 还原。

[0361] 本文公开的芳香族阳离子肽还增强线粒体呼吸，增加氧化磷酸化能力，并减少线粒体活性氧种类（参见例如实例 16 和 20）。因此，它们可保护淋巴细胞线粒体功能，减少心磷脂过氧化，抑制细胞凋亡和坏死，并且抑制或减少心磷脂的暴露以触发抗体产生和 / 或抑制心磷脂和心磷脂抗体之间的接触。

[0362] 测定基于芳香族阳离子肽的治疗剂的生物效应。在多个实施例中，进行合适的体外测定或体内测定，来测定特定的基于芳香族阳离子肽的治疗剂的效应以及其施用是否适应于治疗。在多个实施例中，可对代表性动物模型进行体外测定，以测定给定的基于芳香族阳离子肽的治疗剂是否在预防或治疗疾病方面发挥所需效应。在人受试者中的测试之前，可在合适的动物模型系统中测试用于治疗的化合物，所述动物模型系统包括但不限于大鼠、小鼠、鸡、猪、牛、猴、兔等等。类似地，对于体内测试，在施用于人受试者之前，可使用本领域已知的动物模型系统中的任一种。

[0363] 预防方法。在一个方面，本发明提供了通过将预防病症起始或进展的芳香族阳离子肽施用于受试者来预防受试者中的疾病的方法。在预防应用中，将芳香族阳离子肽的药物组合物或药剂施用于易遭受疾病或病症或者另外处于疾病或病症的危险中的受试者，其量足以消除或降低疾病的危险、减轻疾病的严重性或延迟疾病的发作，包括疾病的生物化学、组织学和 / 或行为症状、其并发症和在该疾病发展过程中呈现的中间病理表型。预防性芳香族阳离子肽的施用可在反常的症状特征体现之前发生，使得疾病或障碍得到预防或可替代地延迟其进展。可基于上文描述的筛选测定来测定适当的化合物。

[0364] 治疗方法。该技术的另一个方面包括为了治疗目的治疗受试者中的疾病的方法。在治疗应用中，将组合物或药剂施用于疑似患有此类疾病或已患有此类疾病的受试者，其量足以治愈或至少部分地防止该疾病的症状，包括其并发症和在该疾病发展过程中的中间病理表型。

[0365] 施用模式和有效剂量

[0366] 可采用本领域的技术人员已知的用于使细胞、器官或组织与肽接触的任何方法。合适方法包括体外、离体或体内方法。体内方法通常包括将芳香族阳离子肽（例如上文描述的芳香族阳离子肽）施用于哺乳动物、适当地施用于人。当在体内用于治疗时，芳香族阳离子肽可以有效量（即具有所需疗效的量）施用于受试者。剂量和给药方案将取决于受试者中的损伤的程度、所使用的特定的芳香族阳离子肽的特征（例如其治疗指数）、受试者以及受试者的病史。

[0367] 可在临床前试验和临床试验过程中通过医生和临床医生熟悉的方法来测定有效

量。在所述方法中有用的肽的有效量可通过用于施用药物组合物的多种众所周知方法中的任一种施用于有此需要的哺乳动物。肽可全身或局部施用。

[0368] 该肽可配制成药学可接受的盐。术语“药学可接受的盐”意指由对于施用于患者例如哺乳动物可接受的碱或酸制备成的盐（例如对于给定的给药方案，具有可接受的哺乳动物安全性的盐）。然而，应当理解，所述盐无需是药学可接受的盐，例如不预期施用于患者的中间化合物的盐。药学可接受的盐可源自药学可接受的无机碱或有机碱以及药学可接受的无机酸或有机酸。另外，当肽包含碱性部分（例如胺、吡啶或咪唑）和酸性部分（例如羧酸或四唑）两者时，可形成两性离子，且包括在如本文使用的术语“盐”中。源自药学可接受的无机碱的盐包括铵盐、钙盐、铜盐、铁盐、亚铁盐、锂盐、镁盐、锰盐、亚锰盐、钾盐、钠盐和锌盐等等。源自药学可接受的有机碱的盐包括伯胺盐、仲胺盐和叔胺盐，包括取代胺盐、环胺盐、天然存在的胺盐等等，例如精氨酸、甜菜碱、咖啡因、胆碱、N, N'-二苄乙烯二胺、二乙胺、2-二乙氨基乙醇、2-二甲氨基乙醇、乙醇胺、乙二胺、N-乙基吗啉、N-乙基哌啶、葡糖胺、葡萄糖胺、组氨酸、海巴明 (hydrabamine)、异丙胺、赖氨酸、葡甲胺、吗啉、哌嗪、哌啶 (piperadine)、多胺树脂、普鲁卡因、嘌呤、可可碱、三乙胺、三甲胺、三丙胺、氨基丁三醇等等。源自药学可接受的无机酸的盐包括硼酸盐、碳酸盐、氢卤酸（氢溴酸、盐酸、氢氟酸或氢碘酸）盐、硝酸盐、磷酸盐、氨基磺酸盐和硫酸盐。源自药学可接受的有机酸的盐包括脂肪族羧酸（例如柠檬酸、葡糖酸、乙醇酸、乳酸、乳糖酸、苹果酸和酒石酸）盐、脂肪族单羧酸（例如乙酸、丁酸、甲酸、丙酸和三氟乙酸）盐、氨基酸（例如天冬氨酸、谷氨酸）盐、芳香族羧酸（例如苯甲酸、对氯苯甲酸、二苯乙酸、龙胆酸、马尿酸和三苯基乙酸）盐、芳香族羧酸（例如邻羟基苯甲酸、对羟基苯甲酸、1-羟基萘-2-羧酸和 3-羟基萘-2-羧酸）盐、抗坏血酸盐、二羧酸（例如富马酸、马来酸、草酸和琥珀酸）盐、葡糖醛酸盐、扁桃酸盐、粘酸盐、烟酸盐、乳清酸盐、扑酸盐、泛酸盐、磺酸（例如苯磺酸、樟脑磺酸、乙二磺酸 (edislyic)、乙磺酸、羟乙磺酸、甲磺酸、萘磺酸、萘-1, 5-二磺酸、萘-2, 6-二磺酸和对甲苯磺酸）盐、辛那酸盐 (xinafoic acid) 等等。在一些实施例中，该盐是乙酸盐。另外或可替代地，在其他实施例中，该盐是三氟乙酸盐。

[0369] 本文描述的芳香族阳离子肽可掺入药物组合物内用于单独或组合施用于受试者，以治疗或预防本文描述的障碍。此类组合物通常包括活性剂和药学可接受的载体。如本文使用的，术语“药学可接受的载体”包括与药物施用相容的盐水、溶剂、分散介质、涂层、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等。补充性活性化合物也可掺入组合物内。

[0370] 通常将药物组合物配制成与其预期施用途径相容。施用途径的例子包括肠胃外（例如，静脉内、皮内、腹膜内或皮下）、经口、吸入、经皮（局部）、眼内、电离子透入和经粘膜施用。用于肠胃外、皮内或皮下应用的溶液或悬浮液可包括下述组分：无菌稀释剂，例如注射用水、盐水溶液、不挥发油、聚乙二醇、丙三醇、丙二醇或其他合成溶剂；抗菌剂，例如苯甲醇或对羟基苯甲酸甲酯；抗氧化剂，例如抗坏血酸或亚硫酸氢钠；螯合剂，例如乙二胺四乙酸；缓冲剂，例如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐；以及用于调节张度的试剂，例如氯化钠或右旋糖。可用酸或碱例如盐酸或氢氧化钠来调节 pH。肠胃外制剂可封装在玻璃或塑料制成的安瓿瓶、一次性注射器或多剂量小瓶中。为了患者或治疗医生的方便，剂量制剂可在试剂盒中提供，所述试剂盒含有治疗过程（例如治疗 7 天）所需的所有设备（例如，药物小瓶、稀释剂小瓶、注射器和针）。

[0371] 适合于注射用途的药物组合物可包括无菌水溶液（在水溶性的情况下）或者用于临时制备无菌注射液或分散体的分散体和无菌粉末。对于静脉内施用，合适的载体包括生理盐水、抑菌水、Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, N. J.) 或磷酸盐缓冲盐水 (PBS)。在所有情况下，用于肠胃外施用的组合物必须是无菌的，且应流动至存在容易注射性的程度。它在制造和储存条件下应是稳定的，且必须针对微生物例如细菌和真菌的污染作用进行防腐。

[0372] 芳香族阳离子肽组合物可包括载体，该载体可以是含有例如水、乙醇、多元醇（例如，丙三醇、丙二醇和液态聚乙二醇等等）及其合适混合物的溶剂或分散介质。可通过例如下述来保持适当的流动性：使用涂层例如卵磷脂，在分散体的情况下维持所需粒子大小，和使用表面活性剂。可通过多种抗菌剂和抗真菌剂来实现微生物作用的预防，例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、抗坏血酸、thiomerasol 等等。可包括谷胱甘肽及其他抗氧化剂以防止氧化。在许多情况下，将优选在组合物中包括等渗剂，例如糖、多元醇例如甘露醇、山梨糖醇或氯化钠。可通过在组合物中包括延迟吸收的试剂来造成可注射组合物的延长吸收，所述延迟吸收的试剂例如单硬脂酸铝或明胶。

[0373] 可通过将所需量的活性化合物掺入具有上文列举的成分之一或组合的适当溶剂中，根据需要随后过滤灭菌来制备无菌可注射溶液。一般地，通过将活性化合物掺入无菌媒介物中来制备分散体，所述无菌媒介物含有基本分散介质和来自上文列举的那些的所需其他成分。在用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末的情况下，典型的制备方法包括真空干燥和冷冻干燥，其可获得活性成分加上来自其先前灭菌过滤的溶液的任何另外所需成分的粉末。

[0374] 口服组合物一般包括惰性稀释剂或可食用载体。为了经口治疗施用的目的，活性化合物可与赋形剂一起掺入，并以片剂、锭剂或胶囊例如明胶胶囊的形式使用。还可使用流体载体制备口服组合物，以用作漱口剂。药学相容的粘合剂和 / 或辅助材料可被包括作为该组合物的一部分。片剂、丸剂、胶囊、锭剂等等可含有下述成分或具有相似性质的化合物中的任一种：粘合剂，例如微晶纤维素、黄蓍胶或明胶；赋形剂，例如淀粉或乳糖；崩解剂，例如海藻酸、羧甲淀粉钠 (Primogel) 或玉米淀粉；润滑剂，例如硬脂酸镁或 Sterotes；助流剂，例如胶态二氧化硅；甜味剂，例如蔗糖或糖精；或调味剂，例如薄荷、水杨酸甲酯或橙调味料。

[0375] 关于通过吸入施用，化合物可以来自含有合适推进剂（例如气体，例如二氧化碳）的加压容器或分配器或者喷雾器的气溶胶喷雾形式进行递送。此类方法包括美国专利号 6,468,798 中描述的方法。

[0376] 如本文描述的治疗性化合物的全身施用还可通过经粘膜或经皮方法来进行。对于经粘膜或经皮施用，适合于待渗透的屏障的渗透剂用于配制中。此类渗透剂一般是本技术领域已知的，并且对于经粘膜施用，包括例如去污剂、胆汁盐和夫西地酸衍生物。可通过使用鼻腔喷雾来完成经粘膜施用。对于经皮施用，将活性化合物配制成本领域一般已知的软膏、药膏、凝胶或乳膏。在一个实施例中，经皮施用可通过电离子透入来进行。

[0377] 治疗性蛋白质或肽可在载体系统中进行配制。该载体可以是胶态系统。该胶态系统可以是脂质体、磷脂双层媒介物。在一个实施例中，治疗性肽在脂质体中包封，同时维持肽完整性。如本领域技术人员理解的，存在多种制备脂质体的方法。（参见 Lichtenberg 等

人, *Methods Biochem. Anal.*, 33:337-462(1988); Anselem 等人, *Liposome Technology*, CRC Press(1993)。脂质体制剂可延迟清除并增加细胞摄取(参见 Reddy, *Ann. Pharmacother.*, 34(7-8):915-923(2000))。活性剂还可装载到由药学可接受的成分制备的颗粒内, 所述药学可接受的成分包括但不限于可溶、不可溶、可渗透、不可渗透、生物可降解或胃滞留的聚合物或脂质体。此类颗粒包括但不限于纳米颗粒、生物可降解的纳米颗粒、微粒、生物可降解的微粒、纳米球、生物可降解的纳米球、微球、生物可降解的微球、胶囊、乳剂、脂质体、颗粒以及病毒载体系统。

[0378] 该载体还可以是聚合物, 例如生物可降解、生物相容的聚合物基质。在一个实施例中, 治疗性肽可嵌入到聚合物基质中, 同时维持蛋白质完整性。聚合物可以是天然的, 例如多肽、蛋白质或多糖; 或合成的, 例如聚 α -羟酸。例子包括由例如下述物质制成的载体: 胶原蛋白、纤连蛋白、弹性蛋白、乙酸纤维素、硝酸纤维素、多糖、纤维蛋白、明胶及其组合。在一个实施例中, 聚合物是聚乳酸 (PLA) 或乳酸 / 乙醇酸共聚物 (PGLA)。聚合物基质可以多种形式和大小进行制备并分离, 包括微球和纳米球。聚合物制剂可导致疗效的延长持续时间(参见 Reddy, *Ann. Pharmacother.*, 34(7-8):915-923(2000))。用于人生长激素 (hGH) 的聚合物制剂已用在临床试验中。(参见 Kozarich 和 Rich, *Chemical Biology*, 2:548-552(1998))。

[0379] 聚合物微球持续释放制剂的例子在 PCT 公开 W099/15154(Tracy 等人)、美国专利号 5,674,534 和 5,716,644(两者均属于 Zale 等人)、PCT 公开 W096/40073(Zale 等人) 和 PCT 公开 W000/38651(Shah 等人) 中进行描述。美国专利号 5,674,534 和 5,716,644 以及 PCT 公开 W096/40073 描述了含有促红细胞生成素颗粒的聚合物基质, 所述促红细胞生成素颗粒用盐针对聚集进行稳定化。

[0380] 在一些实施例中, 治疗性化合物与保护该治疗性化合物不受从机体快速消除的载体一起制备, 所述载体例如控制释放制剂, 包括埋植剂和装入微胶囊的递送系统。可使用生物可降解、生物相容的聚合物, 例如乙烯乙酸乙烯酯、聚酐、聚乙醇酸、胶原、聚原酸酯和聚乳酸。可使用已知技术来制备此类制剂。还可例如从 Alza Corporation and Nova Pharmaceuticals, Inc. 商购获得材料。脂质体悬浮液(包括靶向具有针对细胞特异性抗原的单克隆抗体的特定细胞的脂质体)也可用作药学可接受的载体。这些可根据本领域技术人员已知的方法进行制备, 例如如美国专利号 4,522,811 中描述的。

[0381] 治疗性化合物还可配制为增强细胞内递送。例如, 脂质体递送系统是本领域已知的, 参见例如 Chonn 和 Cullis, "Recent Advances in Liposome Drug Delivery Systems," *Current Opinion in Biotechnology* 6:698-708(1995); Weiner, "Liposomes for Protein Delivery: Selecting Manufacture and Development Processes," *Immunomethods*, 4(3):201-9(1994); 和 Gregoriadis, "Engineering Liposomes for Drug Delivery: Progress and Problems," *Trends Biotechnol.*, 13(12):527-37(1995)。Mizguchi 等人, *Cancer Lett.*, 100:63-69(1996) 描述了使用膜融合脂质体在体内和在体外将蛋白质递送至细胞。

[0382] 可通过细胞培养或实验动物中的标准药学程序来测定治疗剂的剂量、毒性和治疗效果, 例如, 用于测定 LD50(对 50% 群体致命的剂量) 和 ED50(在 50% 群体中治疗有效的剂量)。毒性和疗效之间的剂量比是治疗指数, 并且它可表示为比率 LD50/ED50。显示出高

治疗指数的化合物是优选的。尽管可使用显示出毒性副作用的化合物,但应当小心设计递送系统,该递送系统将此类化合物靶向受累组织部位,以便使对未感染细胞的潜在损伤降到最低,且由此降低副作用。

[0383] 得自细胞培养测定和动物研究的数据可用于配制在人中使用的剂量范围中。此类化合物的剂量优选位于包括具有很少毒性或无毒性的 ED50 的循环浓度的范围中。取决于采用的剂型和利用的施用途径,剂量可在该范围内变化。对于该方法中使用的任何化合物,可最初由细胞培养测定来估计治疗有效剂量。可在动物模型中配制剂量来实现循环血浆浓度范围,其包括如在细胞培养中测定的 IC50 (即,实现症状的半数最大抑制的测试化合物浓度)。此类制剂可用于更准确地测定人中的有用剂量。可例如通过高效液相色谱法测量血浆水平。

[0384] 通常,足以实现治疗或预防效应的芳香族阳离子肽的有效量范围为约 0.000001mg/千克体重/天至约 10,000mg/千克体重/天。适当地,剂量范围为约 0.0001mg/千克体重/天至约 100mg/千克体重/天。例如,剂量可以是每天、每两天或每三天 1mg/kg 体重或 10mg/kg 体重,或者在每周、每两周或每三周 1-10mg/kg 的范围内。在一个实施例中,肽的单次剂量范围为 0.1-10,000 毫克/kg 体重。在一个实施例中,在载体中的芳香族阳离子肽浓度范围为 0.2-2000 毫克/每递送的毫升。示例性治疗方案需要每天一次或每周一次的施用。在治疗应用中,在相对短的间隔中相对高的剂量有时是需要的,直到疾病的进展降低或终止,且优选直到受试者显示疾病症状的部分或完全改善。其后,可对患者施用预防方案。

[0385] 在一些实施例中,芳香族阳离子肽的治疗有效量可限定为在靶标组织处 10^{-12} - 10^{-6} 摩尔、例如大约 10^{-7} 摩尔的肽浓度。该浓度可通过 0.01-100mg/kg 的全身剂量或体表面积等效剂量来递送。最佳化剂量的时间表,以维持在靶标组织处的治疗浓度,最优选通过每天或每周单次施用,但也包括连续施用(例如,肠胃外输注或经皮应用)。

[0386] 在一些实施例中,芳香族阳离子肽的剂量以约 0.001-约 0.5mg/kg/h、适当地 0.01-约 0.1mg/kg/h 提供。在一个实施例中,提供约 0.1-约 1.0mg/kg/h、适当地约 0.1-约 0.5mg/kg/h 的剂量。在一个实施例中,提供约 0.5-约 10mg/kg/h、适当地约 0.5-约 2mg/kg/h 的剂量。

[0387] 本领域技术人员应当理解,某些因素可影响有效治疗受试者的剂量和时机,包括但不限于疾病或障碍的严重性、先前治疗、一般健康和/或受试者的年龄以及存在的其他疾病。此外,使用本文描述的治疗有效量的治疗组合物治疗受试者可包括单次治疗或一系列治疗。

[0388] 依照本方法治疗的哺乳动物可以是任何哺乳动物,包括例如农场动物,如绵羊、猪、牛和马;宠物动物,例如犬和猫;实验室动物,例如小鼠、大鼠和兔。在优选实施例中,哺乳动物是人。

[0389] 电子转移中的芳香族阳离子肽

[0390] 线粒体 ATP 合成由通过线粒体内膜 (IMM) 的电子传递链 (ETC) 的电子流驱动。通过链的电子流可描述为一系列氧化/还原过程。电子从电子供体 (NADH 或 QH₂) 经过一系列电子受体 (复合物 I-IV),最终到终末电子受体分子氧。与 IMM 松散结合的细胞色素 c 在复合物 III 和 IV 之间转移电子。

[0391] 电子通过 ETC 的快速分流对于防止短路是重要的,所述短路将导致电子逃逸和自由基中间产物的生成。电子供体和电子受体之间的电子转移 (ET) 率随着它们之间的距离指数减少,并且超交换 ET 限制于 $20\text{\AA}$ 。长程 ET 可在多步电子跳跃过程中实现,其中在供体和受体之间的总体距离拆分成一系列更短和因此更快速的 ET 步骤。在 ETC 中,经过长距离的有效 ET 通过辅因子得到辅助,所述辅因子沿 IMM 策略性集中,包括 FMN、FeS 簇和血红素。芳香族氨基酸例如 Phe、Tyr 和 Trp 还可促进通过重叠 π 云对血红素的电子转移,并且这对于细胞色素 c 具体显示 (参见实验实例)。具有合适氧化电位的氨基酸 (Tyr、Trp、Cys、Met) 可通过充当中间电子载体来充当步石。另外,当 Tyr 输送电子时,Tyr 的羟基可丢失质子,并且附近碱性基团例如 Lys 的存在可导致甚至更有效的质子偶联的 ET。

[0392] 靶向线粒体的过氧化氢酶 (mCAT) 的过表达已显示在小鼠中改善老化 (例如降低症状) 和延长寿命。这些例子鉴定“可成药的 (druggable)”化学化合物,其可降低线粒体氧化性应激且保护线粒体功能。因为线粒体是细胞内活性氧种类 (ROS) 的主要源,所以抗氧化剂必须递送至线粒体,以便限制对线粒体 DNA、电子传递链 (ETC) 的蛋白质和线粒体脂质膜的氧化损伤。我们开发了选择性靶向且集中于线粒体内膜 (IMM) 的合成芳香族阳离子四肽家族。这些肽中的一些含有氧化还原活性氨基酸,其可经历单电子氧化且表现为线粒体靶向的抗氧化剂。本文公开的肽例如 D-Arg-2' 6' -Dmt-Tyr-Lys-Phe-NH₂ 肽在细胞和动物研究中降低线粒体 ROS,且保护线粒体功能。近期研究显示该肽可赋予与用线粒体过氧化氢酶过表达观察到的那种可比较的针对线粒体氧化性应激的保护。尽管自由基清除是最常用的降低氧化性应激的方法,但存在可使用的其他潜在机制,包括电子转移的促进,以降低电子泄漏和改善的线粒体还原电位。

[0393] 充足的环境证据指示氧化性应激促成正常老化和几种重大疾病的许多后果,所述重大疾病包括心血管疾病、糖尿病、神经变性疾病和癌症。氧化性应激一般定义为促氧化剂和抗氧化剂的不平衡。然而,尽管大量科学证据支持增加的氧化组织损伤,但使用抗氧化剂的大规模临床研究仍未证实在这些疾病中的显著健康益处。原因之一可能是由于可用抗氧化剂无法到达促氧化剂产生的部位。

[0394] 线粒体电子传递链 (ETC) 是 ROS 的主要细胞内生产者,并且线粒体自身对氧化性应激是最脆弱的。因此,保护线粒体功能将是防止由线粒体氧化性应激引起的细胞死亡的必要条件。过表达靶向线粒体的过氧化氢酶 (mCAT) 而不是过氧化物酶体 (pCAT) 的益处提供了下述概念验证:靶向线粒体的抗氧化剂将是克服老化的有害效应所必需的。然而,化学抗氧化剂充分递送至 IMM 仍然是挑战。

[0395] 一种肽类似物 D-Arg-2' 6' -Dmt-Tyr-Lys-Phe-NH₂ 具有固有的抗氧化剂能力,因为经修饰的酪氨酸残基是氧化还原活性的,并且可经历单电子氧化。我们已显示该肽可中和 H₂O₂、羟基原子团和过氧亚硝酸盐,并且抑制脂质过氧化。该肽在缺血再灌注损伤、神经变性疾病和新陈代谢综合症的动物模型中已证实显著的功效。

[0396] 靶向线粒体的肽的设计掺入且增强下述作用模式中的一种或多种:(i) 清除过量的 ROS,(ii) 通过促进电子转移来降低 ROS 产生,或 (iii) 增加线粒体还原能力。肽分子的优点在于它能够掺入可充当氧化还原中心、促进电子转移或增加巯基的天然或非天然氨基酸,同时保留线粒体靶向所需的芳香族阳离子基序。

[0397] 实例

[0398] 通过下述实例进一步举例说明本发明,所述实例不应解释为以任何方式限制本发明。

[0399] 一般方法

[0400] 细胞色素 c 还原:将渐增量的芳香族阳离子肽加入氧化型细胞色素 c 的溶液中。还原型细胞色素 c 的形成通过在 500nm 处的吸光度进行监控。细胞色素 c 还原率通过非线性分析(Prizm 软件)进行测定。

[0401] 时间分辨的 UV-可见吸收光谱法用于研究在肽的存在下的细胞色素 c 电子传递过程。还原型细胞色素 c 通过在宽带光谱范围(200-1100nm)处的吸光度进行监控。吸收改变用 UV/可见分光光度计(Ultrospec 3300pro, GE)在具有 1 或 2mm 径长的石英池中记录。N-乙酰半胱氨酸(NAC)和谷胱甘肽用作电子供体,以还原氧化型细胞色素 c。细胞色素 c 还原的速率常数通过添加多种浓度的肽进行估计。肽的剂量依赖性与细胞色素 c 还原动力学关联。

[0402] 线粒体 O₂ 消耗和 ATP 生产:新鲜线粒体如先前描述的从大鼠肾中分离。电子流量如先前描述的通过 O₂ 消耗(Oxygraph Clark 电极)进行测量,其中使用不同的 C1(谷氨酸盐/苹果酸盐)、C2(琥珀酸盐)和 C3(TMPD/抗坏血酸盐)底物。测定在低底物条件下进行,以便避免使酶反应饱和。分离的线粒体中的 ATP 生产使用萤光素酶方法(Biotherma)在 96 孔发光板阅读器(Molecular Devices)中动态测定。ATP 合成的初始最大速率经过第一分钟进行测定。

[0403] 循环伏安法:循环伏安法使用 Bioanalytical System CV-50W Voltammetric Analyzer 进行,其中使用具有 +0.237V 电位相对于 NHE 的 Ag/AgCl/1M KCl 参考电极(Biometra, Göttingen, 德国)和铂对电极。金丝电极根据建立的方案进行清洁。细胞色素 c 在溶液中的电化学研究使用巯基丙醇修饰的电极(在 20mM 巯基丙醇中温育 24 小时)进行。记录使用在 1MKCl 和 10mM 磷酸钠缓冲液, pH7.4/7.8 中的 20 μM 细胞色素 c 的循环伏安法。克式量电位计算为在不同扫描速率(100-400mV/s)下的阳极和阴极峰电位与来自根据 Randles-Sevcik 方程在不同扫描速率下的峰电流的扩散系数之间的中点。

[0404] 实例 1. 芳香族阳离子肽的合成

[0405] 使用固相肽合成并且所有的氨基酸衍生物均是商购可得的。在肽装配完成后,以通常方式从树脂切割肽。通过制备型反相色谱法净化粗制肽。通过 FAB 质谱法证实肽的结构特性(identity),并且通过分析型反相 HPLC 和薄层色谱法在三个不同的系统中评估其纯度。将达到 >98% 的纯度。通常,使用 5g 的树脂的合成运行获得约 2.0-2.3g 的纯肽。

[0406] 实例 2. 肽 D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂(SS-31) 促进细胞色素 c 还原。

[0407] 吸收光谱法(UltroSpec3300Pro;220-1100nm)用于测定 SS-31 是否调节细胞色素 c 还原(图 1)。用谷胱甘肽还原细胞色素 c 与 Q 带(450-650nm)中的多重转变相关,其中具有在 550nm 处的突出转变。SS-31 的添加产生显著的在 550nm 处的谱重转移(图 1A)。时间依赖性光谱法显示 SS-31 增加细胞色素 c 还原率(图 1B)。这些数据提示 SS-31 改变细胞色素 c 的电子结构且增强 Fe³⁺ 还原为 Fe²⁺ 血红素。相应地,本公开内容的芳香族阳离子肽可用于改变细胞色素 c 的结构和氧化状态,并且可用于预防或治疗特征在于细胞色素 c 功能失调的疾病或障碍。

[0408] 实例 3. 肽 D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂(SS-31) 增强通过细胞色素 c 的电

子扩散。

[0409] 执行伏安法 (CV), 以测定 SS-31 是否改变电子流和 / 或细胞色素 c 的还原 / 氧化电位 (图 2, 上图)。使用 Au 工作电极、Ag/AgCl 参考电极和 Pt 辅助电极完成 CV。SS-31 增加细胞色素 c 的还原和氧化过程两者的电流 (图 2, 上图)。SS-31 不改变还原 / 氧化电位 (图 2, 上图), 而是增加通过细胞色素 c 的电子流, 从而提示 SS-31 减少复合物 III 至 IV 之间的电阻。对于图 2(下图), 所有伏安测量均使用与 BASi C3Cell Stand 联接的 BASi-50W Voltammetric Analyzer 进行。Ag/AgCl 电极用作参考, 并且玻璃碳和铂电极用于标准测量。在每次测量前, 溶液用氮完全脱气, 以避免电极结垢。如图 2(下图) 中所示, 对于 Tris- 硼酸盐-EDTA (TBE) 缓冲液、缓冲液加上细胞色素 c、和缓冲液加上细胞色素 c 加上两种不同 SS31 剂量获得循环伏安图。电流 (电子扩散率) 增加几乎 200%, 因为 SS-31 剂量就细胞色素 c 而言加倍 (细胞色素 c:SS31 = 1:2)。结果指示 SS31 促进细胞色素 c 中的电子扩散。因此, 本公开内容的芳香族阳离子肽可用于预防或治疗特征在于细胞色素 c 功能失调的疾病或障碍, 用于增强通过细胞色素 c 的电子扩散, 并且用于设计更灵敏的生物检测器。

[0410] 实例 4. 肽 D-Arg-2', 6' -Dmt-Lys-Phe-NH₂ (SS-31) 增强细胞色素 c 中的电子容量。

[0411] 执行光致发光 (PL), 以检查 SS-31 对细胞色素 c 血红素的导带的电子结构的作用, 所述导带为负责电子传递的能态 (图 3)。Nd:YD04 激光器 (532.8nm) 用于激发细胞色素 c 中的电子 (图 3A)。细胞色素 c 状态中的强 PL 发射可在 650nm 处明确鉴定 (图 3B)。PL 强度随着 SS-31 的添加呈剂量依赖性增加, 从而意味着在细胞色素 c 中的导带中的可用电子态增加 (图 2B)。这提示 SS-31 增加细胞色素 c 导带的电子容量, 从而与 SS-31 介导的通过细胞色素 c 的电流的增加一致。相应地, 本公开内容的芳香族阳离子肽可用于预防或治疗特征在于细胞色素 c 功能失调的疾病或障碍, 用于增强细胞色素 c 中的电子容量, 并且用于治疗特征在于细胞色素 c 中的电子容量功能失调的疾病或障碍。

[0412] 实例 5. 肽 D-Arg-2', 6' -Dmt-Lys-Phe-NH₂ (SS-31) 诱导围绕细胞色素 c 血红素的新型 $\pi-\pi$ 相互作用。

[0413] 执行圆二色性 (Odis 分光偏振计, DSM20), 以监控索雷带 (在 415nm 处的负峰), 作为用于细胞色素 c 中的 $\pi-\pi^*$ 血红素环境的探针 (图 4)。SS-31 促进该峰至 440nm 的“红色”转变, 从而提示 SS-31 诱导细胞色素 c 内的新型血红素-酪氨酸 $\pi-\pi^*$ 转变, 而不变性 (图 4)。这些结果提示 SS-31 必须修饰血红素的中间环境, 或通过提供另外的 Tyr 用于对血红素的电子隧穿, 或通过降低内源 Tyr 残基和血红素之间的距离。围绕血红素的 $\pi-\pi^*$ 相互作用的增加将增强电子隧穿, 其将有利于电子扩散。相应地, 本公开内容的芳香族阳离子肽可用于预防或治疗特征在于细胞色素 c 功能失调的疾病或障碍, 并且诱导围绕细胞色素 c 血红素的新型 $\pi-\pi^*$ 相互作用。

[0414] 实例 6. 肽 D-Arg-2', 6' -Dmt-Lys-Phe-NH₂ (SS-31) 增加线粒体 O₂ 消耗。

[0415] 使用 Oxygraph 测定分离的大鼠肾线粒体的耗氧量 (图 5)。呼吸速率在不同浓度的 SS-31 的存在下在 2 态 (仅 400 μ M ADP)、3 态 (400 μ M ADP 和 500 μ M 底物) 和 4 态 (仅底物) 中进行测量。所有实验均一式三份完成, 其中 n = 4-7。结果显示 SS-31 促进对氧的电子转移, 而不使线粒体解偶联 (图 5)。相应地, 本公开内容的芳香族阳离子肽可用于促进对氧的电子转移, 而无需使线粒体解偶联, 增加 O₂ 消耗, 并且治疗与线粒体中的 O₂ 消耗功能

失调相关的疾病或病症。

[0416] 实例 7. 肽 D-Arg-2', 6' -Dmt-Lys-Phe-NH₂(SS-31) 增加分离的线粒体中的 ATP 合成。

[0417] 在添加 400mM ADP 后 1 分钟,通过测量从分离的线粒体收集的呼吸缓冲液中的 ATP 测定线粒体 ATP 合成率(图 6)。ATP 通过 HPLC 进行测定。所有实验均一式三份进行,其中 $n = 3$ 。SS-31 对分离的线粒体的添加剂量依赖性增加 ATP 合成率(图 6)。这些结果显示通过 SS-31 的电子转移的增强与 ATP 合成偶联。相应地,本公开内容的芳香族阳离子肽可用于增加线粒体中的 ATP 合成,并且用于治疗特征在于 ATP 合成功能失调的疾病或病症。

[0418] 实例 8. 肽 D-Arg-2', 6' -Dmt-Lys-Phe-NH₂(SS-31) 增强细胞色素 c 耗尽的丝状体中的呼吸。

[0419] 为了证实细胞色素 c 在 SS-31 对线粒体呼吸的作用中的作用,在由冷冻一次的大鼠肾线粒体制备的细胞色素 c 耗尽的丝状体中测定 SS-31 对线粒体 O₂ 消耗的作用(图 7)。在 500 μ M 琥珀酸盐连同或不连同 100 μ M SS-31 的存在下测量呼吸速率。实验一式三份执行,其中 $n = 3$ 。这些数据提示:1)SS-31 经由 IMM 紧密结合的细胞色素 c 起作用;2)SS-31 可挽救功能细胞色素 c 的下降。相应地,本公开内容的芳香族阳离子肽可用于预防或治疗特征在于细胞色素 c 功能失调的疾病或病症。

[0420] 实例 9. 肽 D-Arg-2', 6' -Dmt-Lys-Phe-NH₂(SS-31) 和 Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂(SS-20) 促进细胞色素 c 还原。

[0421] SS-31 和 SS-20 可加速由谷胱甘肽(GSH)作为还原剂诱导的细胞色素 c 还原的动力学(图 8)。细胞色素 c 的还原通过在 550nm 处的吸光度的增加进行监控。GSH 的添加导致在 550nm 处的吸光度的时间依赖性增加(图 8)。使用 N-乙酰半胱氨酸(NAC)作为还原剂获得相似结果(未示出)。SS-31 单独以 100 μ M 浓度的添加不还原细胞色素 c,但 SS-31 剂量依赖性增加 NAC 诱导的细胞色素 c 还原率,从而提示 SS-31 不贡献电子,而是加速电子转移。相应地,本公开内容的芳香族阳离子肽可用于预防或治疗特征在于细胞色素 c 功能失调的疾病或病症,并且用于促进细胞色素 c 还原。

[0422] 实例 10. 肽 D-Arg-2', 6' -Dmt-Lys-Phe-NH₂(SS-31) 和 Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂(SS-20) 增加线粒体电子流量和 ATP 合成。

[0423] SS-20 和 SS-31 两者均可促进电子流量,如通过分离的大鼠肾线粒体中的 O₂ 消耗测量的(图 9)。SS-20 或 SS-31 以 100 μ M 浓度加入呼吸缓冲液中的分离的线粒体,所述呼吸缓冲液含有 0.5mM 琥珀酸盐(复合物 II 底物)和 400 μ M ADP。当使用低浓度的复合物 I 底物(谷氨酸盐/苹果酸盐)时,观察到 O₂ 消耗的相似增加(数据未示出)。电子流量的增加与分离的线粒体中的 ATP 生产率的显著增加关联,所述分离的线粒体由低浓度的琥珀酸盐供能(图 10)。相应地,将 SS-20 和 SS-31 靶向 IMM 可促进电子传递链中的电子流量且改善 ATP 合成,尤其是在减少底物供应的条件下。

[0424] 实例 11. 细胞色素 c 分离和纯化

[0425] 分离且纯化细胞色素 c 的方法是本领域已知的。提供了一种示例性非限制性方法。细胞色素 c 具有几个带正电的基团,从而给予其约 10 的 pI。因此,它通常通过与膜上的磷脂负电荷的离子吸引而与线粒体膜结合。组织和线粒体首先通过在低 pH 下在硫酸铝溶液中在搅拌机中的匀浆化来打碎。带正电的铝离子可通过与带负电的磷脂结合置换来自

膜的细胞色素 c, 且释放溶液中的蛋白质。过量硫酸铝通过将 pH 升高至 8.0 得到去除, 其中铝以氢氧化铝的形式沉淀。

[0426] 在过滤以消除沉淀的氢氧化铝后, 离子交换色谱法用于根据其电荷分离蛋白质。细胞色素 c 具有几个带正电的基团; 通常, 柱由 Amberlite CG-50 带负电的或离子交换树脂制备。

[0427] 一旦已收集洗脱液, 硫酸铵沉淀就用于选择性沉淀细胞色素 c 制剂中的剩余污染蛋白质。大多数蛋白质在硫酸铵中以 80% 饱和沉淀, 然而, 细胞色素 c 保持可溶。溶液中存在的过量盐随后通过凝胶过滤色谱法进行去除, 所述凝胶过滤色谱法基于其大小分离蛋白质。

[0428] 为了评估纯化, 在每个纯化步骤时收集制剂样品。这些样品随后使用 Bradford 方法测定总蛋白质含量, 并且通过分光光度法测量其细胞色素 c 浓度。

[0429] 实例 12. 肽 2', 6' -Dmt-D-Arg-Phe-(atn)Dap-NH₂(SS-19)、2', 6' -Dmt-D-Arg-Phe-Lys-Ald-NH₂(SS-37) 和 Dmt-D-Arg-Ald-Lys-NH₂(SS-36) 与心磷脂 (CL) 的疏水结构域相互作用。

[0430] 肽 2', 6' -Dmt-D-Arg-(atn)Dap-Lys-NH₂(SS-19) 和 2', 6' -Dmt-D-Arg-Phe-Lys-Ald-NH₂(SS-37) 阳离子肽在中性 pH 下携带净正电荷。它们预期基于静电相互作用与阴离子磷脂心磷脂结合。小肽与脂质膜的相互作用可使用荧光光谱法 (Surewicz 和 Eppand, 1984) 进行研究。在与磷脂囊泡结合后, 固有 Trp 残基的荧光显示出增加的量子得率, 并且这还伴随最大发射的蓝移, 指示在更疏水环境中 Trp 残基的掺入。极性 - 灵敏的荧光探针掺入肽内, 并且荧光光谱法用于测定 SS-19、SS-37 和 SS-36 是否与 CL 相互作用。结果显示于图 11 中。

[0431] 肽 2', 6' -Dmt-D-Arg-Phe-(atn)Dap-NH₂(SS-19) 含有掺入二氨基丙酸内的氨苄酰。当在 320-330nm 处激发时, 氨苄酰衍生物发出在 410-420nm 范围中的荧光 (Hiratsuka T, 1983)。氨苄酰衍生物的量子得率强烈依赖于局部环境, 并且从水到 80% 乙醇可增加 5 倍, 连同发射最大值 ($\lambda_{\max}$) < 10nm 的蓝移 (Hiratsuka T, 1983)。使用 Hitachi F-4500 荧光分光光度计, 在 320nm 处的激发后, 监控单独和在渐增浓度的 CL (5-50 μ g/ml) 的存在下的 SS-19 (1 μ M) 荧光发射光谱。CL (5-50 μ g/ml) 的添加导致 SS-19 的量子得率的 2 倍增加, 没有 $\lambda_{\max}$ 的显著转变 (图 11A)。这些发现提示 SS-19 与 CL 的疏水结构域相互作用。

[0432] 肽 2', 6' -Dmt-D-Arg-Phe-Lys-Ald-NH₂(SS-37) 含有另外的氨基酸 aladan (Ald), 其已据报道对其环境的极性是特别敏感的, 并且它已用于探测蛋白质的静电特征 (Cohen 等人, 2002)。当在 350nm 处激发时, $\lambda_{\max}$ 从水中的 542nm 转变为庚烷中的 409nm, 伴随量子得率的显著增加 (Cohen 等人, 2001)。在 350nm 处的激发后, 监控单独和在渐增浓度的 CL 的存在下的 SS-37 (1 μ M) 荧光发射光谱。CL (5-50 μ g/ml) 的添加导致 SS-37 的量子得率的 3 倍增加以及 $\lambda_{\max}$ 的明确蓝移, 从不含 CL 的 525nm 到含有 50 μ g/ml CL 的 500nm (图 11B)。这些结果提供 SS-37 与 CL 的疏水结构域相互作用的证据。

[0433] 肽 2', 6' -Dmt-D-Arg-Ald-Lys-NH₂(SS-36) 含有 Ald 代替 SS-02 中的 Phe³。在 350nm 处的激发后, 监控单独和在渐增浓度的 CL 的存在下的 SS-36 (1 μ M) 荧光发射光谱。SS-36 对 CL 的添加最敏感, 其中添加低得多的 CL 量 (1.25-5 μ g/ml) 观察到量子得率和蓝移的急剧增加。 $\lambda_{\max}$ 从不含 CL 的 525nm 转变为含有少至 1.25 μ g/ml CL 的 500nm, 并且

使用 5 μ g/ml CL 的添加,量子得率增加超过 100 倍(图 11C)。这些结果提供 SS-36 与 CL 的疏水结构域强烈相互作用的证据。相应地,本公开内容的芳香族阳离子肽可用于预防或治疗特征在于心磷脂功能失调的疾病或病症。

[0434] 实例 13. 肽 2',6' -Dmt-D-Arg-Phe-(atn)Dap-NH₂(SS-19) 与细胞色素 c 的相互作用。

[0435] 荧光猝灭用于证实肽 Dmt-D-Arg-Phe-(atn)Dap-NH₂(SS-19) 与细胞色素 C 的相互作用。使用 Hitachi F-4500 荧光分光光度计,在 320nm 处的激发后,监控在 420nm 处 SS-19 的最大荧光发射。结果显示于图 12 中。

[0436] SS-19 荧光(10 μ M)通过 0.2mg 分离的大鼠肾脏肾线粒体的序贯添加得到猝灭(图 12A, M+ 箭头),从而提示 SS-19 由线粒体的摄取。当添加细胞色素 c 耗尽的丝状体(0.4mg)时,SS-19 的猝灭显著降低,从而提示细胞色素 c 在通过线粒体的 SS-19 猝灭中起重要作用(图 12B)。SS-19 荧光(10 μ M)通过 2 μ M 细胞色素 c 的序贯添加类似地猝灭(图 12C, C+ 箭头)。通过细胞色素 c 的猝灭不通过牛血清白蛋白的序贯添加移位(图 12C, A+ 箭头)(500 μ g/ml)。这些数据指示 SS-19 可能在血红素环境中的细胞色素 c 内部非常深入地相互作用。SS-19 与细胞色素 c 的相互作用线性依赖于添加的细胞色素 c 的量(图 12D)。相应地,本公开内容的芳香族阳离子肽可用于预防或治疗特征在于细胞色素 c 功能失调的疾病或病症。

[0437] 实例 14. 肽 2',6' -Dmt-D-Arg-Phe-(atn)Dap-NH₂(SS-19)、2',6' -Dmt-D-Arg-Phe-Lys-Ald-NH₂(SS-37) 和 2',6' -Dmt-D-Arg-Ald-Lys-NH₂(SS-36) 与细胞色素 c 和 CL 相互作用。

[0438] 荧光光谱法用于证实肽 2',6' -Dmt-D-Arg-Phe-(atn)Dap-NH₂(SS-19)、2',6' -Dmt-D-Arg-Phe-Lys-Ald-NH₂(SS-37) 和 2',6' -Dmt-D-Arg-Ald-Lys-NH₂(SS-36) 在 CL 的存在下与细胞色素 c 相互作用。结果显示于图 13 中。

[0439] 使用 Hitachi F-4500 荧光分光光度计,实时监控 SS-19(10 μ M) 的荧光发射(Ex/Em = 320nm/420nm)。细胞色素 C(2 μ M) 的添加导致荧光信号的立即猝灭(图 13A)。

[0440] 使用 Hitachi F-4500 荧光分光光度计,实时监控 SS-19(10 μ M) 的荧光发射(Ex/Em = 320nm/420nm)。CL(2 μ M) 的添加导致 SS-19 荧光的增加。与不含 CL 的细胞色素 C 的添加相比较,细胞色素 c(2 μ M) 的后续添加导致更大程度的 SS-19 荧光猝灭(图 13B)。这些数据指示 SS-19 与细胞色素 c 的相互作用在 CL 的存在下得到增强。CL 可通过充当两个阳离子分子的阴离子平台来加强 SS-19 和细胞色素 c 之间的相互作用。

[0441] 在 CL(50 μ g/ml) 的存在下,通过 2 μ M 细胞色素 c 的序贯添加,类似地猝灭 SS-37 荧光(10 μ M)(图 13C, C+ 箭头)。通过细胞色素 c 的猝灭不通过牛血清白蛋白(500 μ g/ml) 的序贯添加移位(图 13C, A+ 箭头)。因此,这些肽与 CL 的相互作用不干扰其在细胞色素 c 内部非常深入地相互作用的能力。

[0442] SS-36 还含有极性敏感的荧光氨基酸 aladan。CL(2.5 μ g/ml) 的添加导致 SS-36 荧光的增加(图 13D)。在细胞色素 c(2 μ M) 的后续添加后,SS-36 的发射光谱显示肽的荧光的急剧猝灭,伴随发射最大值的大蓝移(510nm 至 450nm)(图 13D)。这些数据提示该肽与细胞色素 c-CL 复合物内部深入的疏水结构域相互作用。相应地,本公开内容的芳香族阳离子肽可用于预防或治疗特征在于心磷脂和 / 或细胞色素 c 功能失调的疾病或病症,和 / 或

特征在于心磷脂 / 细胞色素 c 相互作用的功能失调的疾病或病症。

[0443] 实例 15. 肽 2', 6' -Dmt-D-Arg-Phe-(atn)Dap-NH₂(SS-19)、Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂(SS-20)、D-Arg-2', 6' -Dmt-Lys-Phe-NH₂(SS-31)、2', 6' -Dmt-D-Arg-Ald-Lys-NH₂(SS-36) 和 D-Arg-Tyr-Lys-Phe-NH₂(SPI-231) 保护细胞色素 c 的血红素环境不受 CL 的酰基链影响。

[0444] 执行圆二色性 (CD), 以检查肽对保护细胞色素 C 的血红素环境不受 CL 的酰基链影响的作用。对于血红素蛋白质, 索雷 CD 谱与血红素袋构象严格关联。特别地, 负 416-420nm 科顿效应视为天然细胞色素 C 中的 Fe(III)-Met80 配位的特征 (Santucci 和 Ascoli, 1997)。科顿效应的丧失揭示血红素袋区的改变, 所述改变涉及 Met80 从轴向配位到血红素铁的移位。使用 AVIV CD Spectrometer Model 410 获得 CD 谱。结果显示于图 14 中。

[0445] 在 30 μ g/ml CL 的不存在 (点线) 和存在 (虚线) 下, 加上不同肽的添加 (10 μ M) (实线), 记录细胞色素 C (10 μ M) 的索雷 CD 谱的改变 (图 14)。CD 测量使用 20mM HEPES, pH7.5, 在 25°C 下执行, 且表示为摩尔椭圆率 (θ) (m Deg)。CL 的添加导致负科顿效应的消失, 并且这通过这些肽的添加得到完全防止。这些结果提供肽与细胞色素 c 的血红素袋相互作用且保护 Fe-Met80 配位的明确证据。相应地, 本公开内容的芳香族阳离子肽可用于预防或治疗特征在于心磷脂和 / 或细胞色素 c 功能失调的疾病或病症, 和 / 或特征在于心磷脂 / 细胞色素 c 相互作用的功能失调的疾病或病症。此外, 本公开内容的芳香族阳离子肽可用于保护细胞色素 c 的血红素环境不受心磷脂的酰基链影响。

[0446] 实例 16. 肽 D-Arg-2', 6' -Dmt-Lys-Phe-NH₂(SS-31)、Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂(SS-20) 和 D-Arg-Tyr-Lys-Phe-NH₂(SPI-231) 防止由 CL 引起的细胞色素 c 还原的抑制。

[0447] 细胞色素 c 是线粒体中的呼吸复合物 III 和 IV 之间的电子载体。细胞色素 c 在它接受来自细胞色素 c 还原酶的电子后是还原的 (Fe²⁺), 并且它随后通过细胞色素 c 氧化酶氧化为 Fe³⁺。CL 结合的细胞色素 c 具有明显比天然细胞色素 c 更负的氧化还原电位, 并且细胞色素 c 的还原在 CL 的存在下得到显著抑制 (Basova 等人, 2007)。

[0448] 细胞色素 c (20 μ M) 的还原通过在 CL (100 μ g/ml) 的不存在或存在下添加谷胱甘肽 (500 μ M) 得到诱导 (图 15A)。使用 96 孔 UV-VIS 板阅读器 (Molecular Devices), 通过在 550nm 处的吸光度监控细胞色素 c 的还原。CL 的添加使细胞色素 c 还原率减少一半。SS-31 (20、40 或 100 μ M) 的添加剂量依赖性防止 CL 的抑制作用 (图 15A)。

[0449] SS-31 剂量依赖性克服 CL 对细胞色素 c 还原的动力学的抑制作用, 所述细胞色素 c 还原由 500 μ M GSH 或 50 μ M 抗坏血酸盐诱导 (图 15B)。SS-20 和 SP-231 也防止由 500 μ M GSH 引起的细胞色素 C 还原的 CL 抑制 (图 15C)。相应地, 本公开内容的芳香族阳离子肽可用于预防或治疗特征在于心磷脂和 / 或细胞色素 c 功能失调的疾病或病症, 和 / 或特征在于心磷脂 / 细胞色素 c 相互作用的功能失调的疾病或病症。此外, 本公开内容的芳香族阳离子肽可用于防止由心磷脂引起的细胞色素 c 还原的抑制。

[0450] 实例 17. 肽 D-Arg-2', 6' -Dmt-Lys-Phe-NH₂(SS-31) 和 Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂(SS-20) 增强分离的线粒体中的 O₂ 消耗。

[0451] SS-20 和 SS-31 两者均可促进电子流量, 如通过分离的大鼠肾线粒体中的 O₂ 消耗

测量的。SS-20 或 SS-31 以 $10\ \mu\text{M}$ 或 $100\ \mu\text{M}$ 浓度加入呼吸缓冲液中的分离的线粒体,所述呼吸缓冲液含有谷氨酸盐/苹果酸盐(复合物 I 底物)、 0.5mM 琥珀酸盐(复合物 II 底物)或 $3\ \mu\text{M}$ TMPD/ 1mM 抗坏血酸盐(细胞色素 C 的直接还原剂)。加入 $400\ \mu\text{M}$ ADP 以起始 3 态呼吸。结果显示于图 16 中。

[0452] 使用复合物 I 或复合物 II 底物,或当细胞色素 c 由 TMPD/抗坏血酸盐直接还原时,SS-31 增加 3 态呼吸中的 O_2 消耗(图 16A)。当使用这些底物时,SS-20 还增加 3 态呼吸中的 O_2 消耗(图 16B;使用谷氨酸盐/苹果酸盐和 TMPD/抗坏血酸盐的数据未示出)。

[0453] 这些数据提示 SS-31 增加电子传递链中的电子流量,并且作用位点在细胞色素 c 和复合物 IV(细胞色素 c 氧化酶)之间。相应地,本公开内容的芳香族阳离子肽可用于促进对氧的电子转移,而无需使线粒体解偶联,增加 O_2 消耗,并且治疗与线粒体中的 O_2 消耗功能失调相关的疾病或病症。

[0454] 实例 18. 肽 D-Arg-2', 6' -Dmt-Lys-Phe-NH₂(SS-31) 增加分离的线粒体中的 ATP 合成。

[0455] 电子传递链中的电子流量的增加可导致 ATP 合成的增加或者电子泄露和自由基生成的增加。分离的线粒体中的 ATP 合成由 HPLC 测定。SS-31 剂量依赖性增加 ATP 合成,提示电子流量的增加与氧化磷酸化偶联(图 17)。相应地,本公开内容的芳香族阳离子肽可用于增加线粒体中的 ATP 合成,并且用于治疗特征在于 ATP 合成功能失调的疾病或病症。

[0456] 实例 19. 肽 D-Arg-2', 6' -Dmt-Lys-Phe-NH₂(SS-31) 增强细胞色素 c 耗尽的丝状体中的呼吸。

[0457] 与线粒体心磷脂紧密结合的细胞色素 c 模型用于研究 SS-31 与线粒体中的细胞色素 c-CL 复合物的相互作用。在用洋地黄皂苷去除外膜后,用 120mM KCl 洗涤丝状体,以去除所有自由和静电结合的细胞色素 c,仅留下与 CL 紧密结合的细胞色素 c。D-Arg-Dmt-Lys-Phe-NH₂(SS-31) 以剂量依赖性方式增强丝状体中的复合物 II 呼吸,所述丝状体具有与线粒体内膜紧密结合的细胞色素 c(图 18)。这些数据提示 SS-31 与细胞色素 c-CL 复合物直接相互作用,并且促成从复合物 III 到复合物 IV 的电子转移。

[0458] 实例 20. 肽 D-Arg-2', 6' -Dmt-Lys-Phe-NH₂(SS-31) 防止 CL 将细胞色素 c 从电子载体转变为过氧化物酶活性。

[0459] 细胞色素 c 中的血红素的六配位防止 H_2O_2 与催化金属位点的直接相互作用,并且溶液中的天然细胞色素 c 是弱过氧化物酶。在与 CL 相互作用后,细胞色素 c 经历结构改变,伴随 Fe-Met80 配位的破裂。这导致血红素 Fe^{3+} 对 H_2O_2 的暴露,并且过氧化物酶活性急剧增加(Vladimirov 等人,2006;Sinibaldi 等人,2008)。细胞色素 c 过氧化物酶的作用机制类似于其他过氧化物酶例如辣根过氧化物酶(HRP)的作用机制。因此,能够使用 amplex 红-HRP 反应研究细胞色素 c 过氧化物酶活性。在过氧化物酶的存在下,amplex 红(AR)与 H_2O_2 反应,以形成红色荧光氧化产物试卤灵($\text{Ex/Em} = 571/585$)。

[0460] 使细胞色素 c($2\ \mu\text{M}$)与 20mM HEPES, $\text{pH}7.4$ 中的 CL($25\ \mu\text{g/ml}$)和 $10\ \mu\text{M}$ H_2O_2 混合。随后加入 amplex 红($50\ \mu\text{M}$),并且使用 Hitachi F4500 荧光分光光度计,实时监控荧光发射。amplex 红的添加引起由于试卤灵形成导致的荧光信号的快速增加,从而提供细胞色素 c/CL 复合物的过氧化物酶活性的直接证据(图 19A)。SS-31 的包括减少 amplex 红过氧化率,从而提示 SS-31 与细胞色素 c 直接相互作用,以防止 CL 诱导的过氧化物酶活性(图

19A)。

[0461] SS-31 的添加剂量依赖性降低细胞色素 c 过氧化物酶活性的动力学 (图 19B), 但对 HRP 活性没有作用 (数据未示出)。图 19C 显示多种肽在 $10\ \mu\text{M}$ 的固定浓度下关于其抑制细胞色素 c 过氧化物酶活性的能力的比较。相应地, 本公开内容的芳香族阳离子肽可用于预防或治疗特征在于心磷脂和 / 或细胞色素 c 功能失调的疾病或病症, 和 / 或特征在于心磷脂 / 细胞色素 c 相互作用的功能失调的疾病或病症。此外, 本公开内容的芳香族阳离子肽可用于抑制细胞色素 c 中的过氧化物酶活性。

[0462] 实例 21. 肽类似物 SS-02 与心磷脂和含有心磷脂的脂质体相互作用。

[0463] 荧光团标记的 SS-02 用于研究 SS-02 与磷脂心磷脂以及其他磷脂的相互作用。将荧光团 β -萘苄酰 (atn; $\lambda_{\text{ex}} = 320\text{nm}$) 和 aladan (ald; $\lambda_{\text{ex}} = 360\text{nm}$) 掺入 SS-02 的肽结构内, 如图 20A 中所示。所得的肽分别被称为 “[atn]SS-02” 或 “SS-19” 和 “[ald]SS-02” 或 “SS-36”。SS-31 的结构也显示用于比较。荧光团各自已知显示在疏水环境中增强的荧光发射。此外, ald 是介电感应探针, 随着其环境的极性降低, 其产生在其最大发射 (λ_{max}) 中的渐进性蓝移。atn 和 ald 荧光团两者也是非常小的, 因此它们基本上不改变四肽的理化性质 (P. W. Schiller 等人, 2005, J Pept Res 65, 556-563)。

[0464] 材料与方法

[0465] 1-棕榈酰-2-油酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱 (POPC)、1-棕榈酰-2-油酰-sn-甘油-3-磷酸盐 (POPA)、1-棕榈酰-2-油酰-sn-甘油-3-磷酸-L-丝氨酸 (POPS)、1-棕榈酰-2-油酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺 (PE) 和 1,2-二棕榈酰-sn-甘油-3-磷酸-(1'-外消旋-甘油) (DPPG) 得自 Avanti Polar Lipids Inc (Alabaster, AL)。

[0466] 使用以 1:1 比混合的个别磷脂 POPC 和心磷脂 (CL) 制备脂质体并在氮下干燥。随后通过涡旋使脂质在 20mM Hepes (pH 7.4) 中混合, 并且随后使用超声探头尖端超声波仪 (Cole-Palmer Ultrasonic Homogenizer, 20kHz, Cole-Parmer Instrument Company, Vernon Hills, IL), 在冰上超声处理五次 30 秒。脂质体在制备后立即使用。

[0467] 使用 Hitachi F-4500 荧光分光光度计测量 [atn]SS-02 和 [ald]SS-02 的发射强度中的变化。用于溶解多种磷脂的不同溶剂 (氯仿、甲醇和乙醇) 对 [atn]SS-02 和 [ald]SS-02 的荧光光谱具有可忽略不计的作用。所有实验均在低离子溶液 (去离子水) 中完成, 以优化肽与磷脂的静电相互作用。

[0468] 结果

[0469] 将渐增浓度的心磷脂 (5、10、25 和 $50\ \mu\text{g/mL}$) 加入 μM [atn]SS-02 中, 并且测量在 350nm 和 500nm 之间的发射强度。心磷脂的添加以浓度依赖性方式增加 [atn]SS-02 的发射强度 (图 20B 和 20G), 提示该肽与心磷脂的疏水环境的相互作用。渐增浓度的心磷脂 (1.25、2.5 和 $5\ \mu\text{g/mL}$) 对 $1\ \mu\text{M}$ [ald]SS-02 的添加显示甚至更显著的浓度依赖性效应 (图 20C)。此外, 心磷脂产生 aladan 的 λ_{max} 从 540nm 到 510nm 的蓝移, 进一步指示该化合物定位于疏水环境中。

[0470] 该 SS-02-磷脂相互作用对于具有阴离子首基的磷脂是特异性的, 所述磷脂例如磷脂酸 (POPA)、磷脂酰甘油 (DPPG)、磷脂酰丝氨酸 (POPS) 和心磷脂 (CL)。图 20D 显示了单独的 $1\ \mu\text{M}$ [ald]SS-02, 以及在 $10\ \mu\text{g/mL}$ POPS、POPA、DPPG 或心磷脂添加后的代表性发射光谱。心磷脂显示与 [ald]SS-02 的最高亲和力 (图 20D)。在 [ald]SS-02 和磷脂或中性胆固

醇（数据未示出）之间未观察到相互作用，所述磷脂在其首基中也含有带正电的胺，例如磷脂酰胆碱（POPC）和磷脂酰乙醇胺（POPE）（图 20E）。

[0471] [atn]SS-02 与游离心磷脂的相互作用也与 [atn]SS-02 以及心磷脂和 POPC 的脂质混合物的相互作用相比较。心磷脂通常连同磷脂酰胆碱和磷脂酰乙醇胺一起仅在线粒体内膜中发现。因为它的小首基和四条酰基链，心磷脂诱导膜弯曲，其中疏水部分在邻近分子之间暴露。当与其他双层磷脂混合时，心磷脂可能形成非双层微环境，可能导致与 SS-02 的不同相互作用。

[0472] 用由 1:1 比的 CL 和 POPC 组成的脂质体制备 $1\mu\text{M}$ [atn]SS-02 的混合物，并且测量发射强度。图 20F 中的图显示了在 [atn]SS-02 和心磷脂 / POPC 脂质体之间的相似浓度依赖性相互作用（图 20F）。这些结果证实 SS 肽对于心磷脂具有高亲和力，并且这负责 SS 肽在线粒体内膜中的选择性浓缩。相应地，本公开内容的芳香族阳离子肽可用于预防或治疗特征在于心磷脂和 / 或细胞色素 c 功能失调的疾病或病症，和 / 或特征在于心磷脂 / 细胞色素 c 相互作用的功能失调的疾病或病症。

[0473] 实例 22. 肽 SS-02 与可溶性细胞色素 c 相互作用。

[0474] 细胞色素 c 存在于线粒体中的三个池中：膜间隙中的游离可溶性池，经由静电相互作用与心磷脂松散附着的池，和经由疏水性相互作用与心磷脂处于紧密复合物中的约 15-20% 池。为了测定 SS-02 是否与细胞色素 c 相互作用，检查标记的 SS-02 通过细胞色素 c 的荧光猝灭。

[0475] 材料与方法

[0476] 在游离心磷脂或心磷脂 / POPC (1:1) 脂质体（如实例 22 中所述制备）的不存在或存在下，在添加细胞色素 c 后，通过 [atn]SS-02 ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 320/420\text{nm}$) 和 [ald]SS-02 ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 360/510\text{nm}$) 的荧光猝灭来检查 SS 肽与马心细胞色素 c 的相互作用（使用 Hitachi F-4500 荧光分光光度计）。用于溶解心磷脂和 POPC 的溶剂对这些肽的细胞色素 c 依赖性猝灭具有可忽略不计的作用。所有实验均在低离子溶液（去离子水）或 20mM Hepes pH 7.4 中完成。

[0477] 在添加新鲜的线粒体或丝状体悬浮液 (0.35mg) 后，通过 [atn]SS-02 ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 320/420$) 的荧光猝灭来测定通过分离的线粒体或细胞色素 c 缺乏丝状体的 [atn]SS-02 摄取。

[0478] 从称重 250-300g 的雄性 Sprague - Dawley 大鼠 (Charles River Laboratories International, Inc., Wilmington, MA) 的肾中分离线粒体。将摘除的肾切开，并且在洗涤缓冲液 (200mM 甘露醇、10mM 蔗糖、5mM HEPES、1g/L 无脂肪酸 BSA，用 KOH 至 pH 7.4) 中在冰上温育 10 分钟。将样品在分离缓冲液（具有 1mM EGTA 的洗涤缓冲液）中洗涤 2 次，匀浆化 3 分钟，并且随后在 20ml 分离缓冲液中以 $900\times g$ 离心 10 分钟。随后去除白色脂肪层，并且弃去团块。将上清液以 $11,000\times g$ 离心 10 分钟，并且将团块重悬浮于 $800\mu\text{l}$ 洗涤缓冲液中，并且在冰上保持用于进一步分析。

[0479] 通过首先用 3.3mg/ml 地高辛在冰上处理新鲜或解冻后的线粒体 45 分钟，以便去除线粒体外膜，来制备细胞色素 c 缺乏的丝状体。为了去除静电结合的细胞色素 c，随后将 150mM KCl pH7.4 加入混合物中，并且以 $19,000\times g$ 离心 30 分钟。收集团块并再溶解于洗涤缓冲液中，并且贮存于冰上直至使用时。仅响应 200nM 外源细胞色素 c 添加在线粒体呼

吸（氧消耗）中增加 4-5 倍的丝状体制剂用于研究中。

[0480] 结果

[0481] 荧光猝灭研究显示 SS 肽可与可溶性细胞色素 c 相互作用。细胞色素 c 的添加导致 [atn]SS-02 和 [ald]SS-02 两者的浓度依赖性猝灭，而无 $\lambda_{\max}$ 中的变化（图 21A 和 21B）。通过细胞色素 c 的该猝灭是剂量依赖性的，并且在 1:1 比的肽与细胞色素 c 时容易观察到（图 21C）。此外，该猝灭不能通过白蛋白取代。通过 2 μ M 细胞色素 c（图 21H 中的标记 C）的序贯添加猝灭 [ant]SS-02 的荧光发射。75 μ g/ml BSA（图 21H 中的标记 A）（总共 300 μ g/ml）的添加不逆转猝灭。[ant]SS-02 的荧光发射对于肽也是特异性的，因为用其他线粒体靶向荧光探针例如 TMRM（四甲基罗丹明甲酯）未观察到猝灭。2 μ M 细胞色素 c（图 21I 中的标记 C）的添加轻微猝灭 TMRM 荧光，并且 75 μ g/ml BSA（图 21I 中的标记 A）（总共 225 μ g/ml）的添加完全逆转猝灭。

[0482] 已知细胞色素 c 中的 Trp57 固有荧光 98% 被天然折叠的细胞色素 c 中的血红素基团猝灭，并且当细胞色素 c 解折叠时，减少至 40%（Tsong, 1973, Biochemistry 12:2209-2214）。因此，SS 肽类似物通过细胞色素 c 的此类显著猝灭提示该肽定位与血红素紧密接近，以允许对该共振受体的能量转移。

[0483] 发现 SS 肽与细胞色素 c 的相互作用在心磷脂的存在下得到增强。比较在心磷脂的不存在或存在下通过细胞色素 c 在 420nm 处的 [atn]SS-02 猝灭。2 μ M 细胞色素 c 对 1 μ M [atn]SS-02 的添加导致在不存在心磷脂的情况下荧光信号的 ~20% 猝灭，但在 10 μ g/mL 心磷脂的存在下的几乎 50% 猝灭（图 21D）。细胞色素 c 和 [atn]SS-02 之间的相互作用通过游离心磷脂或心磷脂脂质体以剂量依赖性方式得到增强（图 21E）。该发现显示心磷脂的存在允许 [atn]SS-02 甚至更接近地穿透至在细胞色素 c 内深处的血红素基团，以增加共振转移。

[0484] 极性敏感的 [ald]SS-02 允许进一步研究在心磷脂的存在下 SS-02 与细胞色素 c 的相互作用。细胞色素 c 对心磷脂和 [ald]SS-02 的添加促使 $\lambda_{\max}$ 从 510nm 到 450nm 的进一步蓝移，显示该肽进一步穿透到血红素的最深疏水环境内（图 21F）。

[0485] 最后，为了测定这些肽是否可与疏水结合心磷脂的细胞色素 c 相互作用，采取研究以检查通过细胞色素 c 缺乏丝状体的 [atn]SS-02 猝灭，所述细胞色素 c 缺乏丝状体已用 125mM KCl 处理以去除静电结合的细胞色素 c。图 21G 显示了 [atn]SS-02 的猝灭在细胞色素 c 缺乏丝状体中是可估计的，但小于含有所有三个细胞色素 c 池的完整线粒体中。总之，这些数据表明 SS 肽可与游离、静电结合的和疏水结合的细胞色素 c 相互作用，并且肽定位非常接近于血红素环境。相应地，本公开内容的芳香族阳离子肽可用于预防或治疗特征在于心磷脂和 / 或细胞色素 c 功能失调的疾病或病症，和 / 或特征在于心磷脂 / 细胞色素 c 相互作用的功能失调的疾病或病症。

[0486] 实例 23. SS-31 和 SS-02 抑制通过心磷脂的细胞色素 c 氧化。

[0487] 研究肽 SS-31 和 SS-02，以便测定它们是否对细胞色素 c 和心磷脂之间的相互作用具有任何功能作用。已知心磷脂改变细胞色素 c 的功能，并且容易地将亚铁细胞色素 c 氧化为铁细胞色素 c。在心磷脂的存在下亚铁细胞色素 c 的氧化可通过在细胞色素 c 的吸收光谱中 550nm 峰 (A_{550}) 的丧失进行检测。因此，肽 SS-31 和 SS-02 就其影响通过心磷脂引起的细胞色素 c 吸光度丧失的能力进行检查。

[0488] 材料与方法

[0489] 细胞色素 c (20 μ M) 通过 50 μ M 抗坏血酸还原,直至所有可用的功能活性的细胞色素 c 被还原。细胞色素 c 的还原通过在其吸收光谱中在 550nm 处的峰的出现进行监测 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA)。随后在 SS 肽的存在或不存在下,将 100 μ g/ml 心磷脂加入完全还原的细胞色素 c 中,并且细胞色素 c 的氧化随后为 550nm 峰的减少速率。氧化率基于 550nm 超过 750nm 吸光度强度中的变化的斜率进行计算。

[0490] 结果

[0491] 在细胞色素 c 的吸收光谱中 550nm 峰 (A_{550}) 的丧失通过 SS-31 的添加以浓度依赖性方式得到防止 (图 22A)。细胞色素 c 氧化的该抑制也对于 SS-02、[atn]SS-02 和 [ald]SS-02 观察到 (图 22B)。这些数据提示芳香族阳离子肽可干扰在血红素环境中的心磷脂和细胞色素 c 之间的结构相互作用。相应地,本公开内容的芳香族阳离子肽可用于预防或治疗特征在于心磷脂和 / 或细胞色素 c 功能失调的疾病或病症,和 / 或特征在于心磷脂 / 细胞色素 c 相互作用的功能失调的疾病或病症。此外,本公开内容的芳香族阳离子肽可用于抑制通过心磷脂的细胞色素 c 氧化。

[0492] 实例 24. SS-02 和 SS-31 肽类似物与细胞色素 c 的血红素紧密相互作用。

[0493] 圆二色性研究已显示在添加心磷脂后,在细胞色素 c 的索雷带中的主要负科顿峰的丧失。负科顿峰反映在血红素和芳香族残基侧链之间的电子间相互作用 ($\pi - \pi^*$) 和 Fe-Met80 连接的稳定性。因此,圆二色性分析用于检查 SS 肽类似物对心磷脂诱导的细胞色素 c 血红素环境中的变化的影响。

[0494] 材料与方法

[0495] 用配备样品温度控制器的 AVIA 62 DS 分光光度计收集圆二色 (CD) 光谱。在 30 μ g/ml 心磷脂和不同 SS 肽类似物 (SS-02、[atn]SS-02、[ald]SS-02 和 SS-31) 的存在或不存在下,用含有 20mM Hepes, pH7.4 和 10 μ M 细胞色素 c 的 10-mm 径长小室记录索雷区的 CD 光谱 (370-450nm)。最大脂质浓度保持很低,以避免由于广泛光散射的光谱失真。所有测量均在 25°C 下完成。所有光谱均就本底进行校正,并且显示的最终光谱代表至少三次实验的平均值。

[0496] 结果

[0497] 心磷脂 (30 μ g/ml) 对 10 μ M 细胞色素 c 的添加导致在 419nm 处的负科顿峰的丧失,并且这通过添加以与细胞色素 c 1:1 比的 SS-02 或其荧光类似物 ([atn]SS-02 和 [ald]SS-02) 或 SS-31 得到防止 (图 23)。这些数据显示这些芳香族阳离子肽与血红素紧密接近的细胞色素 c 相互作用,并且防止心磷脂破坏与芳香族侧链的 $\pi - \pi^*$ 相互作用,并且可能防止 Fe-Met80 配位的破裂。相应地,本公开内容的芳香族阳离子肽可用于预防或治疗特征在于心磷脂和 / 或细胞色素 c 功能失调的疾病或病症,和 / 或特征在于心磷脂 / 细胞色素 c 相互作用的功能失调的疾病或病症。

[0498] 实例 25. SS-02 和 SS-31 肽类似物抑制细胞色素 c 的过氧化物酶活性

[0499] 与五配位的血红素例如血红蛋白和肌红蛋白不同,细胞色素 c 中的 Fe 的两种轴向配体 (His18 和 Met80) 防止 H_2O_2 与催化金属位点的直接相互作用,并且细胞色素 c 在水中具有极低的过氧化物酶活性。在心磷脂的存在下,细胞色素 c 的过氧化物酶活性增加 2 个数量级。通过防止由心磷脂诱导的 Fe-Met80 键的破坏,芳香族阳离子肽可抑制细胞色素 c 过

氧化物酶活性。为了检查通过 SS 肽类似物的细胞色素 c 过氧化物酶活性抑制, **Amplex®** Red 用于测量在细胞色素 c、心磷脂和 H_2O_2 的存在下的过氧化物酶活性。

[0500] 材料与方法

[0501] 细胞色素 c 过氧化物酶活性的评价通过使用 **Amplex®** Red 测定 (Invitrogen/Life Technologies, Carlsbad, CA) 来实现。 **Amplex®** Red 是以 1:1 化学计量学与 H_2O_2 反应的试剂, 以在过氧化物酶的存在下产生高荧光试卤灵 ($\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 570/585$)。在该测定中, 加入细胞色素 c 代替辣根过氧化物酶。在添加 $50 \mu M$ **Amplex®** Red 试剂和 $10 \mu M$ H_2O_2 之前, 使 $2 \mu M$ 细胞色素 c 与心磷脂或心磷脂-POPC 脂质体 ($10 \mu g/ml$) 一起在 $20mM$ HEPES (pH7.4) 或去离子水中温育 1 分钟, 并且允许反应进行另外 5 分钟。使用 Hitachi F-4500 荧光分光光度计获得连续时间过程数据。当在心磷脂 ($100 \mu g/ml$) 的存在下, 在抑制细胞色素 c ($2 \mu M$) 过氧化物酶活性中比较不同 SS 肽类似物 ($10 \mu M$) 时, 使用微板荧光分光计 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA)。辣根过氧化物酶 (HRP) 用于比较, 并且优化 HRP 浓度 ($0.001U/ml$) 以匹配通过心磷脂-细胞色素 c 复合物的 **Amplex®** Red 过氧化率。

[0502] 结果

[0503] 所有四种 SS 肽类似物均抑制心磷脂-细胞色素 c 复合物的过氧化物酶活性 (图 24)。SS-02 和 [atn]SS-02 使细胞色素 c 的过氧化率减少至对照的约 70% 和 75% (分别地), 而 [ald]SS-02 和 SS-31 使细胞色素 c 的过氧化率减少至对照的约 20% 和 35% (分别地)。相应地, 本公开内容的芳香族阳离子肽可用于预防或治疗特征在于心磷脂和 / 或细胞色素 c 功能失调的疾病或病症, 和 / 或特征在于心磷脂 / 细胞色素 c 相互作用的功能失调的疾病或病症。此外, 本公开内容的芳香族阳离子肽可用于抑制细胞色素 c 中的过氧化物酶活性。

[0504] 实例 26. 比较不同肽类似物防止由心磷脂引起的细胞色素 c 还原的抑制的能力。

[0505] 尽管心磷脂的添加极大抑制通过谷胱甘肽或抗坏血酸盐诱导的细胞色素 c 还原率, 但 SS-31 的添加剂量依赖性防止该抑制 (参见实例 16 和图 14B)。采取研究以比较 SS-31 与 SS-02、[atn]SS-02 和 [ald]SS-02 阻断细胞色素 c 还原的抑制的能力。

[0506] 材料与方法

[0507] 使用 96 孔板阅读器 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA), 在 550nm 和 570nm 处记录通过抗坏血酸盐的细胞色素 c 还原的时间过程。对于所有反应, 细胞色素 c 在 SS 肽的存在或不存在与心磷脂一起预温育 1 分钟。发现 $20 \mu M$ 细胞色素 c 和 $100mg/ml$ 心磷脂是最佳的, 其中心磷脂将抑制 90% -100% 的细胞色素 c 还原, 与还原剂无关。加入抗坏血酸盐 ($50 \mu M$) 以起始细胞色素 c 的还原, 并且记录吸光度 5 分钟。还原率基于 550nm 超过 750nm 吸光度强度中的变化的斜率进行计算。

[0508] 结果

[0509] 如图 25 的条形图中所示, 细胞色素 c 还原率在心磷脂的存在下减少至 10%。SS-31 在防止心磷脂-细胞色素 c 复合物的所有功能中是四种肽中最有效的, 即使在心磷脂的存在下也具有允许 100% 细胞色素 c 还原率的能力。在 SS-02 的存在下的细胞色素 c 还原率为约 60%, 在 [atn]SS-02 的存在下的还原率为约 50%, 并且在 [ald]SS-02 的存在下的还原率为约 90%。相应地, 本公开内容的芳香族阳离子肽可用于预防或治疗特征在于心磷脂和 / 或细胞色素 c 功能失调的疾病或病症, 和 / 或特征在于心磷脂 / 细胞色素 c 相互作用

的功能失调的疾病或病症,例如系统性自身免疫疾病例如系统性红斑狼疮和 / 或抗磷脂综合征。本公开内容的芳香族阳离子肽可用于防止由心磷脂引起的细胞色素 c 还原的抑制。

[0510] 参考文献

[0511] Tuominen EKJ,Wallace CJA 和 Kinnunen PKJ.Phospholipid-cytochrome c interaction.Evidence for the extended lipid anchorage.J Biol Chem 277:8822-8826, 2002.

[0512] Kalanxhi E 和 Wallace CJA.Cytochrome c impaled:investigation of the extended lipid anchorage of a soluble protein to mitochondrial membrane models. Biochem J 407:179-187, 2007.

[0513] Sinibaldi F,Howes BD,Piro MC,Polticelli F,Bombelli C,Ferri T 等人 Extended cardiolipin anchorage to cytochrome c:a model for protein-mitochondrial membrane binding. J Biol Inorg Chem 15:689-700, 2010.

[0514] Sinibaldi F,Fiorucci L,Patriarca A,Lauceri R,Ferri T,Coletta M,Santucci R. Insights into Cytochrome c-cardiolipin interaction.Role played by ionic strength. Biochemistry 47:6928-6935, 2008.

[0515] Vladimirov YA,Proskurnina EV,Izmailov DY,Novikov AAm Brusnichkin AV,Osipov AN 和 Kagan VE.Mechanism of activation of cytochrome c peroxidase activity by cardiolipin. Biochemistry (Moscow) 71:989-997, 2006.

[0516] Basova LV,Kurnikov IV,Wang L,Ritob VB,Belikova NA, 等人 Cardiolipin switch in mitochondria:Shutting off the reduction of cytochrome c and turning on the peroxidase activity. Biochemistry 46:3423-3434, 2007.

[0517] Kagan VE,Bayir A,Bayir H,Stoyanovsky D, 等人 Mitochondria-targeted disruptors and inhibitors of cytochrome c/cardiolipin peroxidase complexes. Mol Nutr Food Res 53:104-114, 2009.

[0518] Surewicz WK 和 Epand RM. Role of peptide structure in lipid-peptide interactions:A fluorescence study of the binding of pentagastrin-related pentapeptides to phospholipid vesicles. Biochemistry 23:6072-6077, 1984.

[0519] Hiratsuka T. New ribose-modified fluorescent analogs of adenine and guanine nucleotides available as substrates for various enzymes. Biochimica et Biophysica Acta 742:496-508, 1983.

[0520] Cohen BE,McAnaney TB,Park ES,Jan YN,Boxer SG 和 Jan LY. Probing protein electrostatics with a synthetic fluorescent amino acid. Science 296:1700-1703, 2001.

[0521] Santucci R和Ascoli F. The solet circular dichroism spectrum as a probe for the heme Fe(III)-Met(80)axial bond in horse cytochrome c. J Inorganic Biochem 68:211-214, 1997.

[0522] 等价方案

[0523] 本发明并不限于在本申请中描述的特定实施例,所述特定实施例预期作为本发明的单个方面单独举例说明。如对于本领域技术人员显而易见的,可作出本申请的多种修改

和变化而不背离其精神和范围。根据上述说明书,除本文中列举的之外,在本发明范围内的功能上等价的方法和仪器对于本领域的技术人员将是显而易见的。此类修改和变化预期落入所附权利要求的范围内。本发明仅受所附权利要求书连同此类权利要求书赋予权力的等价物的全部范围限制。应当理解,本发明并不限于特定的方法、试剂、化合物、组合物和生物系统,当然,所述方法、试剂、组合物和生物系统可变化。还应理解,本文中使用的术语仅用于描述特定实例,并不预期是限制性的。

[0524] 另外,当本公开内容的特征或方面按照 Markush 组进行描述时,本领域技术人员将认识到本公开内容由此也按照 Markush 组的任何个别成员或成员亚组进行描述。

[0525] 如本领域的技术人员应当理解的,为了任何和所有目的,特别是在提供书面说明书方面,本文公开的所有范围还可涵盖任何和所有可能的子范围及其子范围的组合。任何列出的范围可容易地视为充分描述并使相同范围能够分解成至少相等的二分之一、三分之一、四分之一、五分之一、十分之一等。作为非限制性例子,本文讨论的每个范围可容易地分解成下三分之一、中三分之一和上三分之一等。如本领域技术人员还应理解的,所有的语言例如“上至”、“至少”、“大于”、“小于”等等包括所述数目,并且指随后可分解成如上文讨论的子范围的范围。最后,如本领域的技术人员应当理解的,范围包括每一个别成员。因此,例如,具有 1-3 个单元的组指具有 1、2 或 3 个单元的组。类似地,具有 1-5 个单元的组指具有 1、2、3、4 或 5 个单元的组等等。

[0526] 本文提及或引用的所有专利、专利申请、临时申请和出版物包括所有附图和表格全文以引用的方式并入,到它们不与本说明书的明确教导相矛盾的程度。

[0527] 在下述权利要求中阐述了其他实施例。

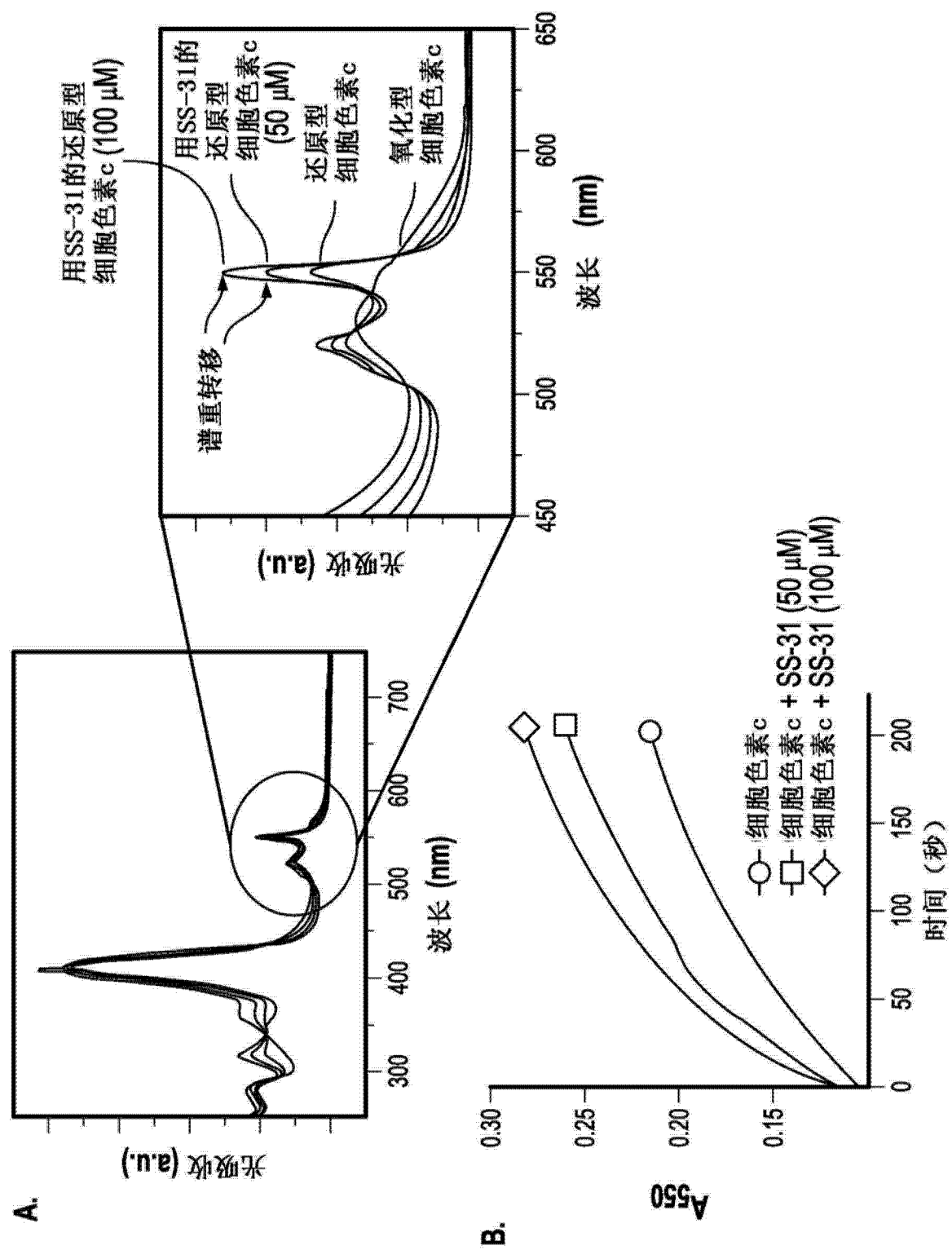


图 1

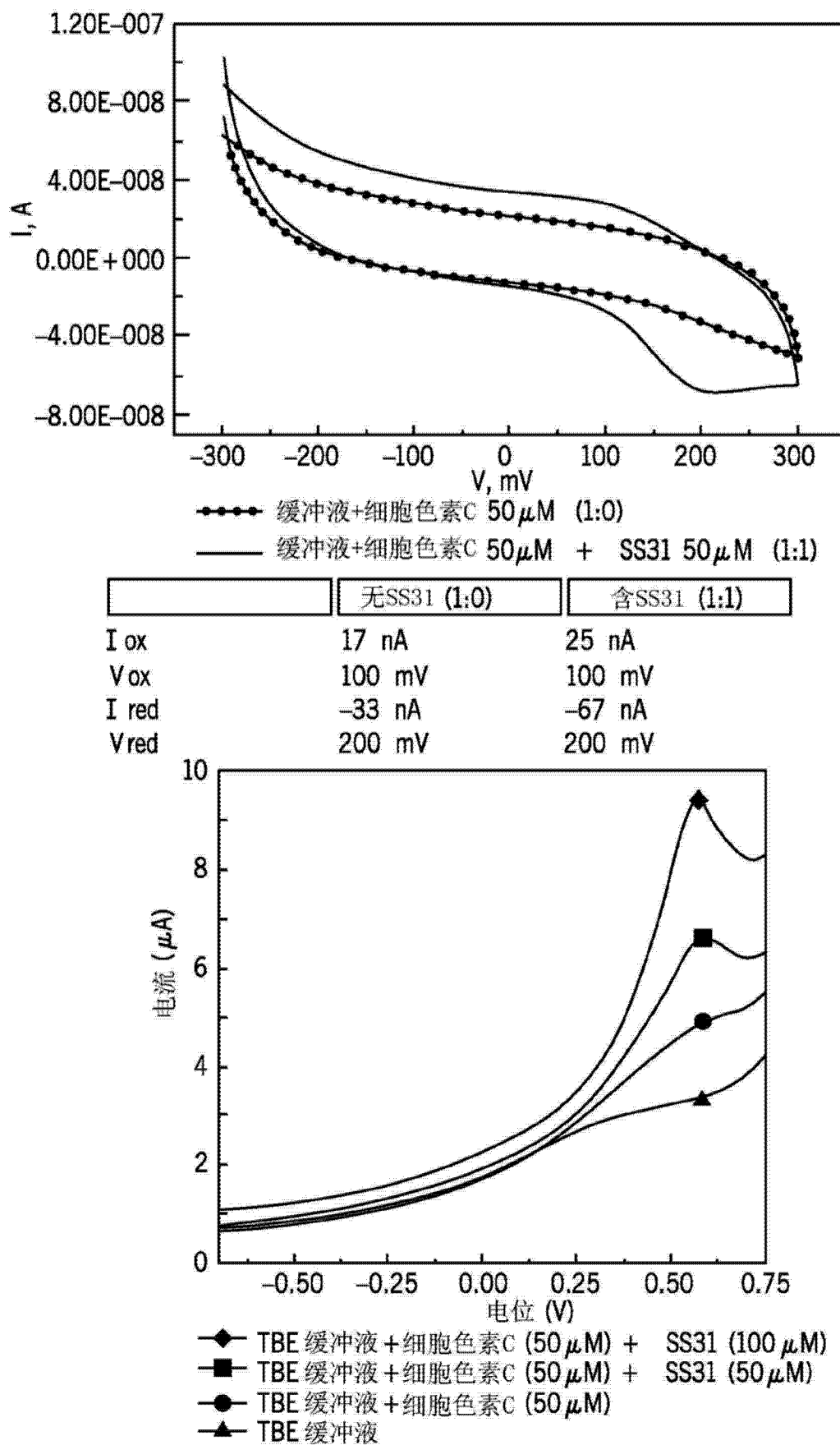


图 2

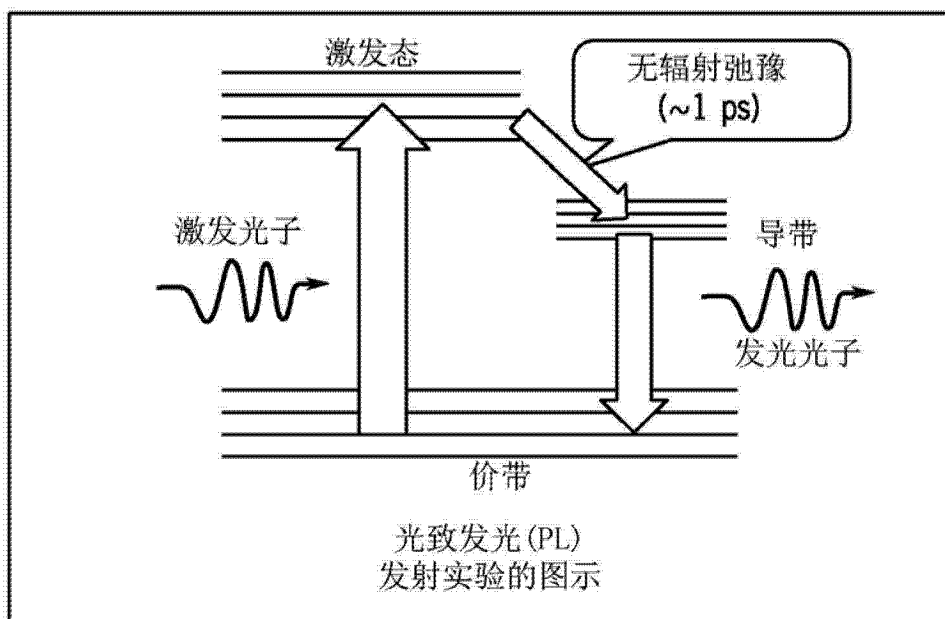


图 3A

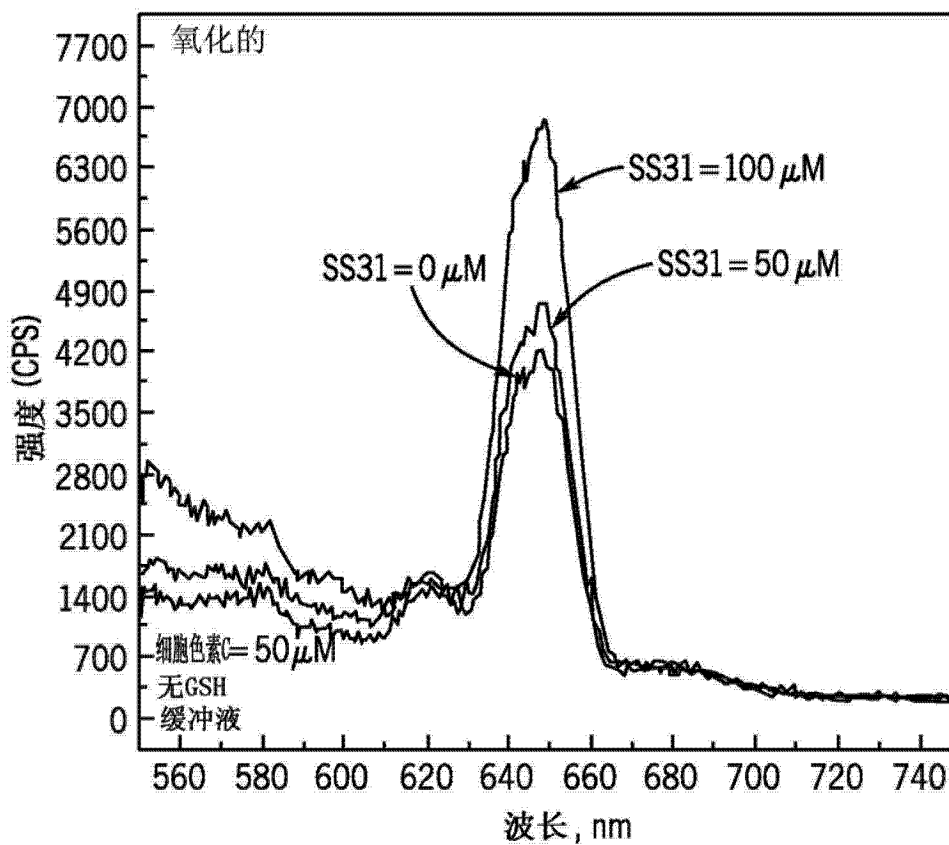


图 3B

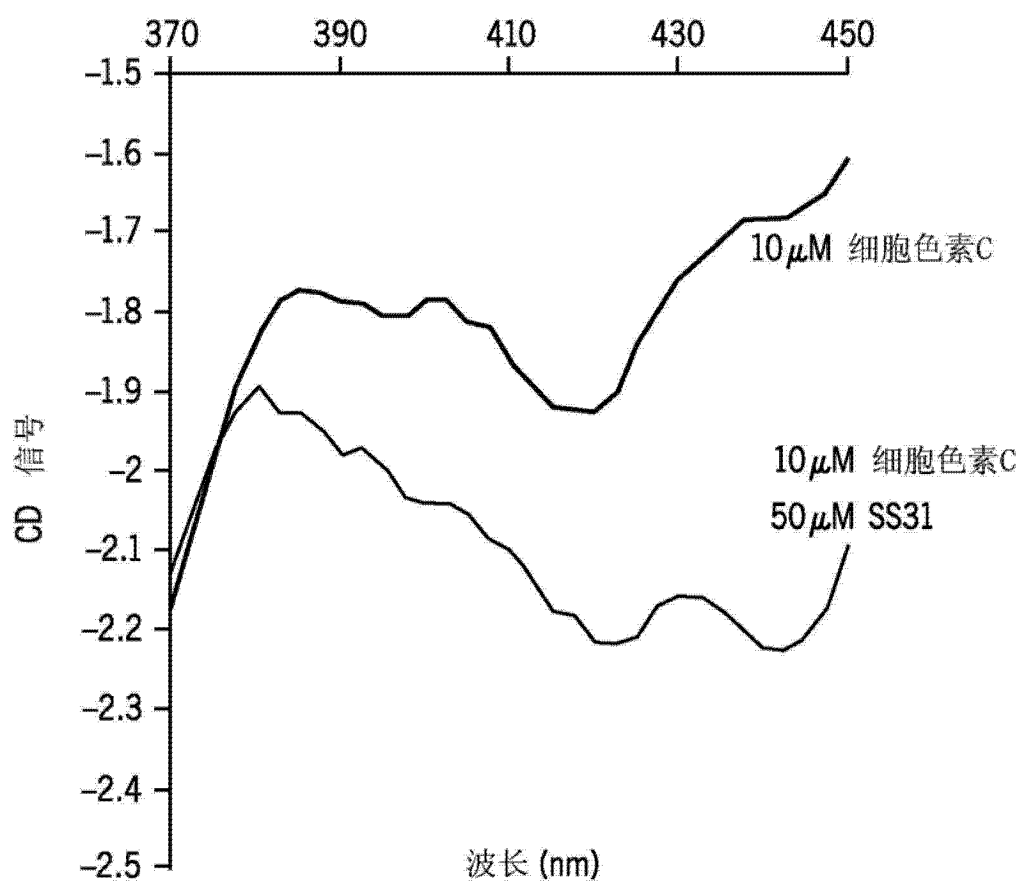


图 4

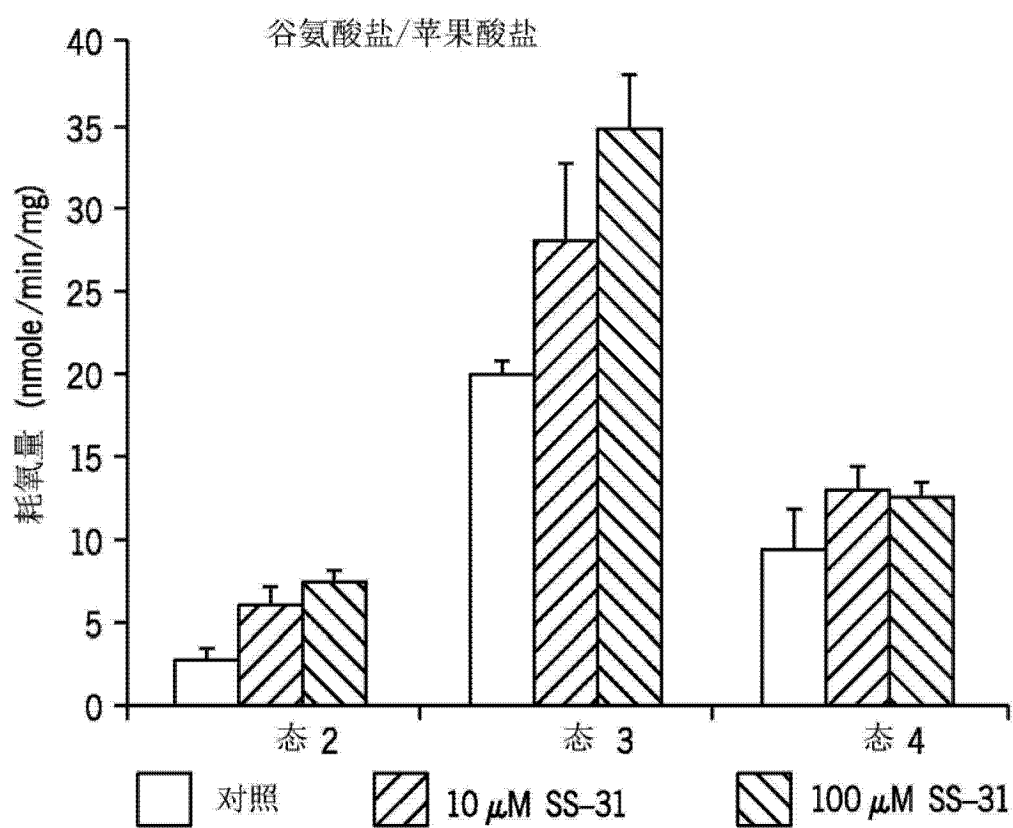


图 5A

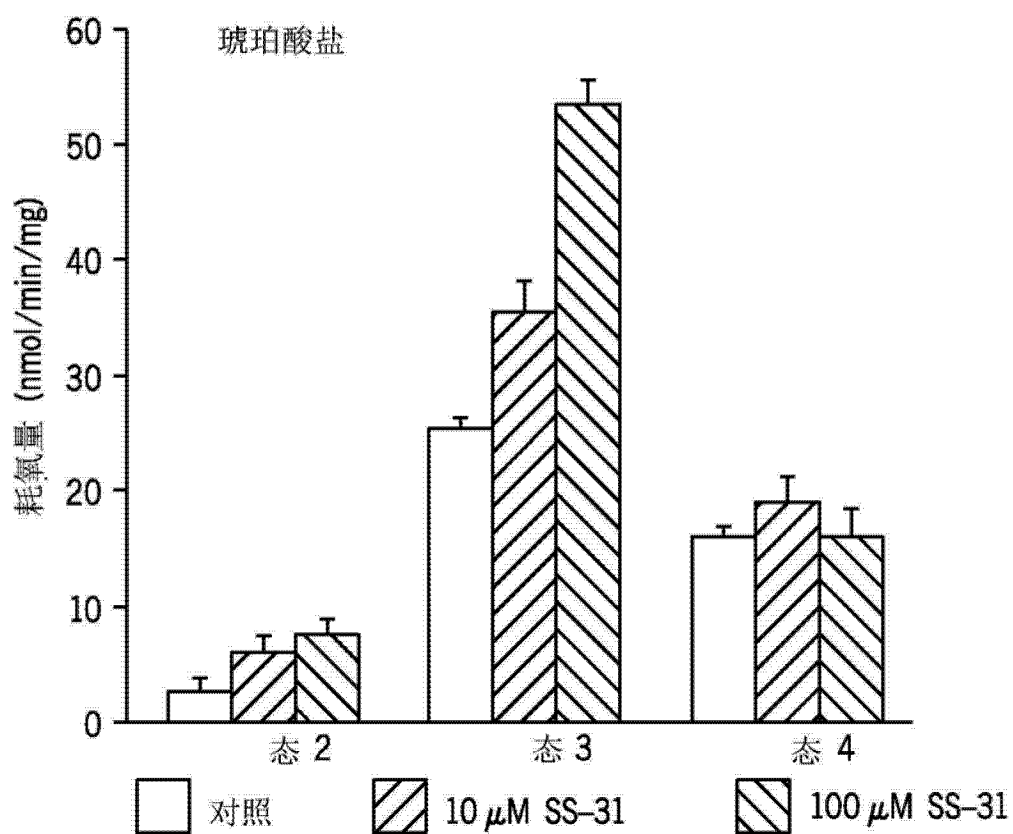


图 5B

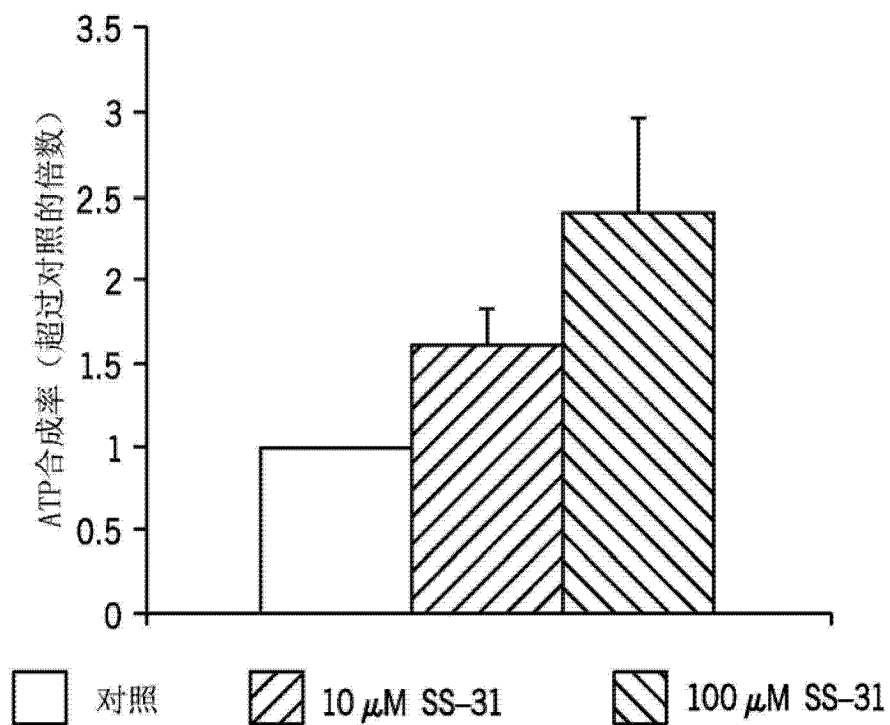


图 6

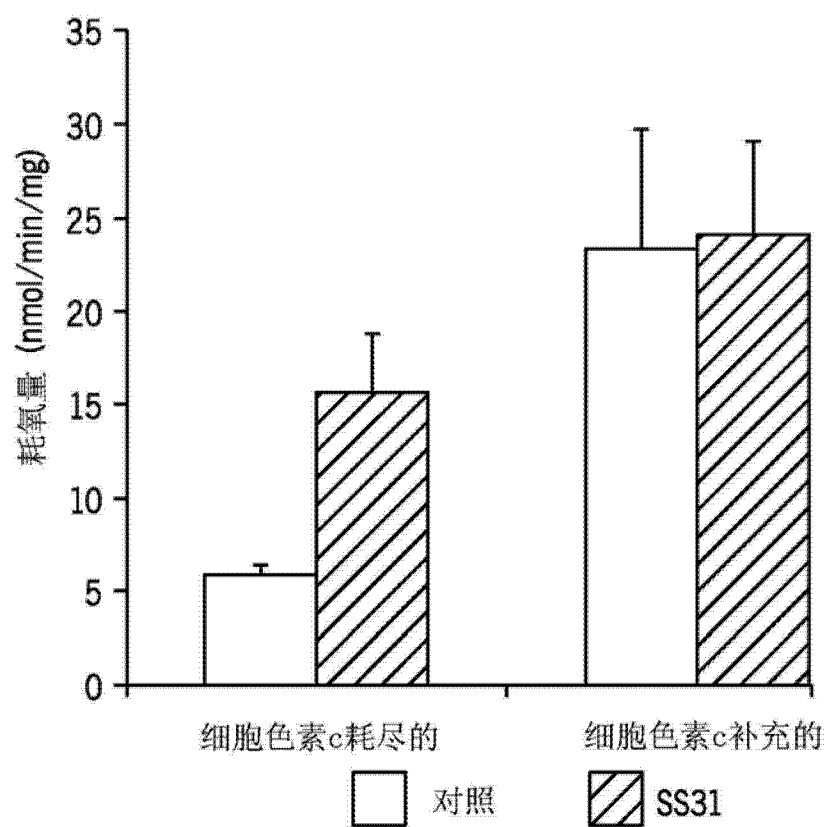


图 7

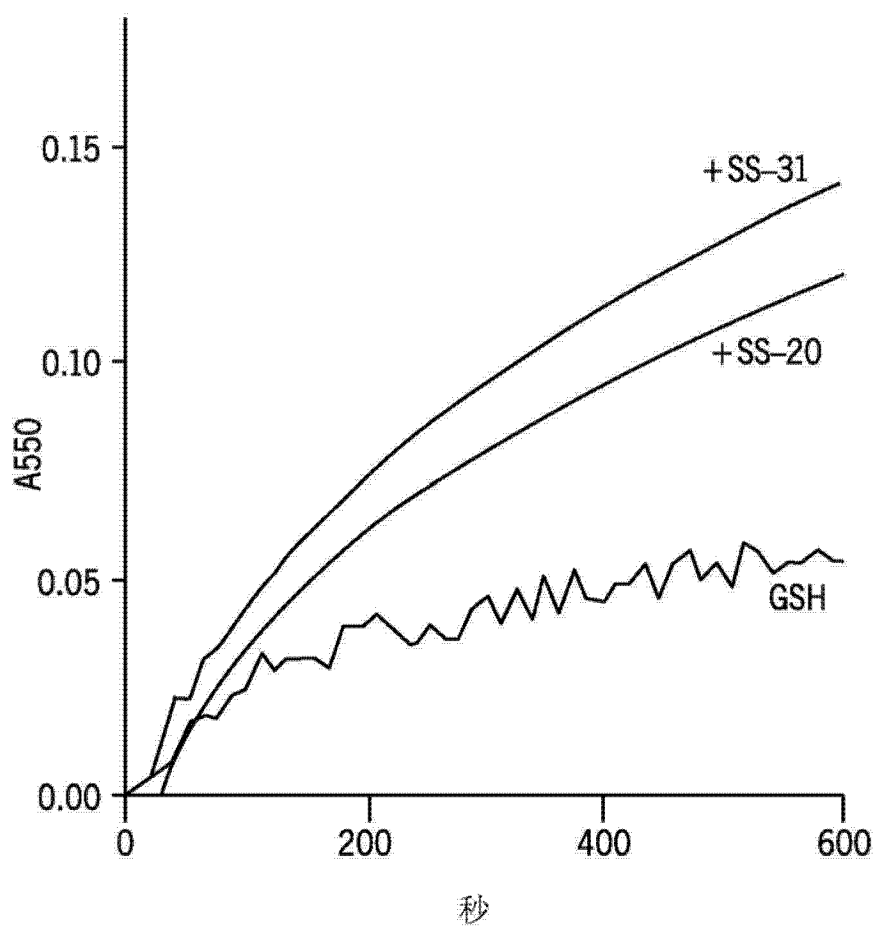


图 8

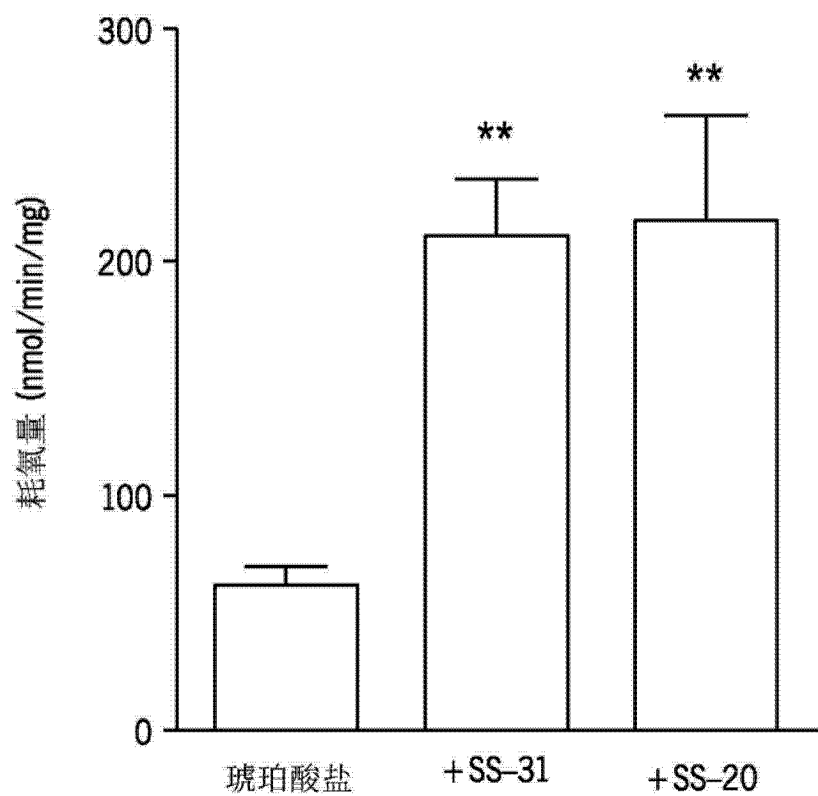


图 9

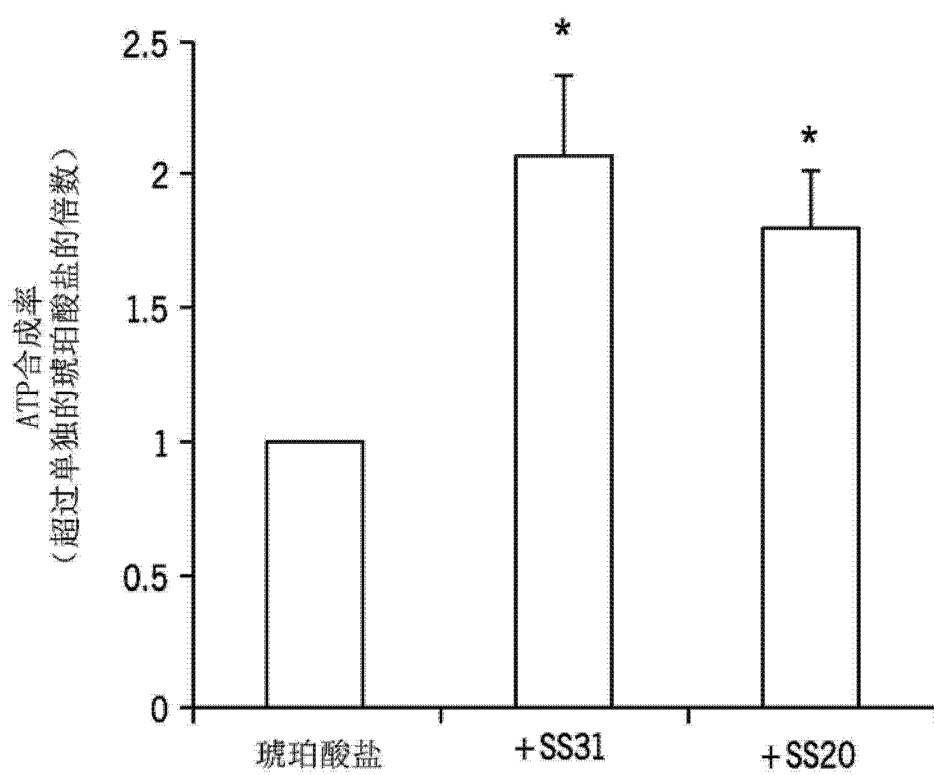


图 10

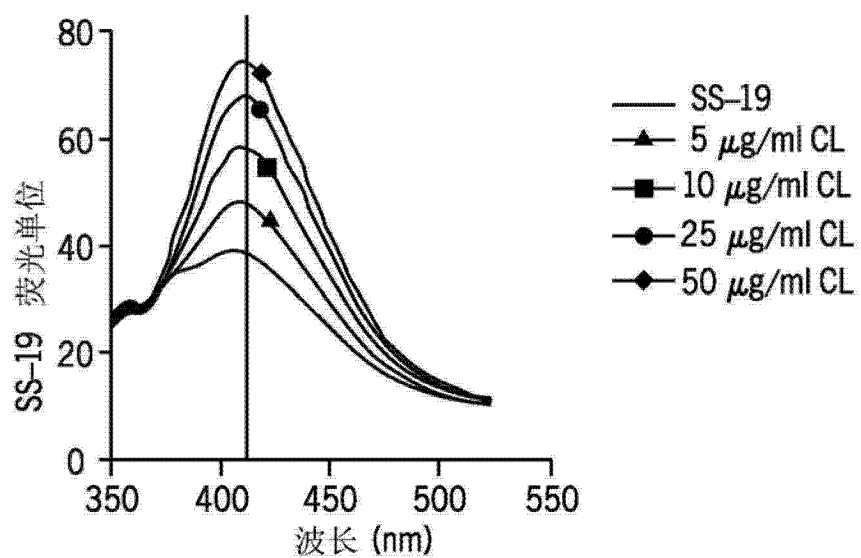


图 11A

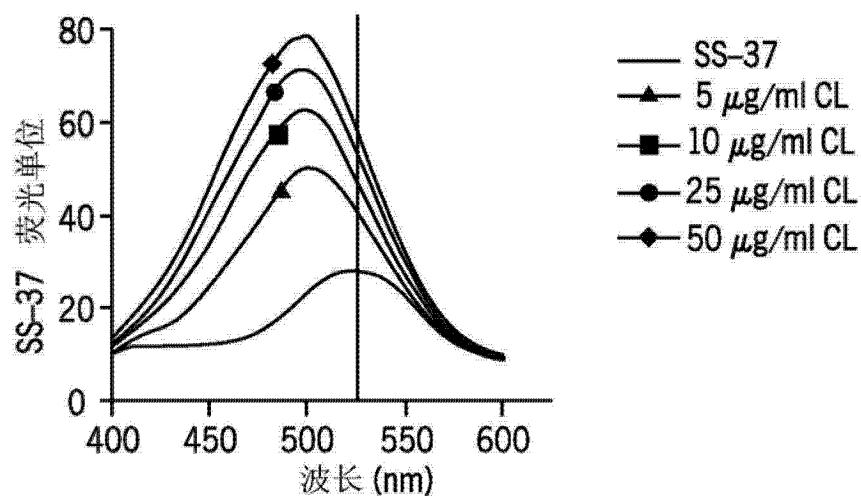


图 11B

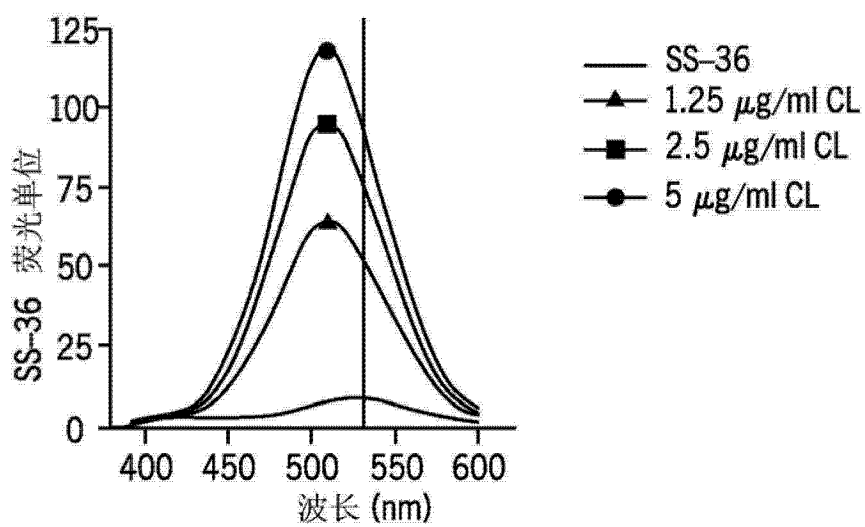


图 11C

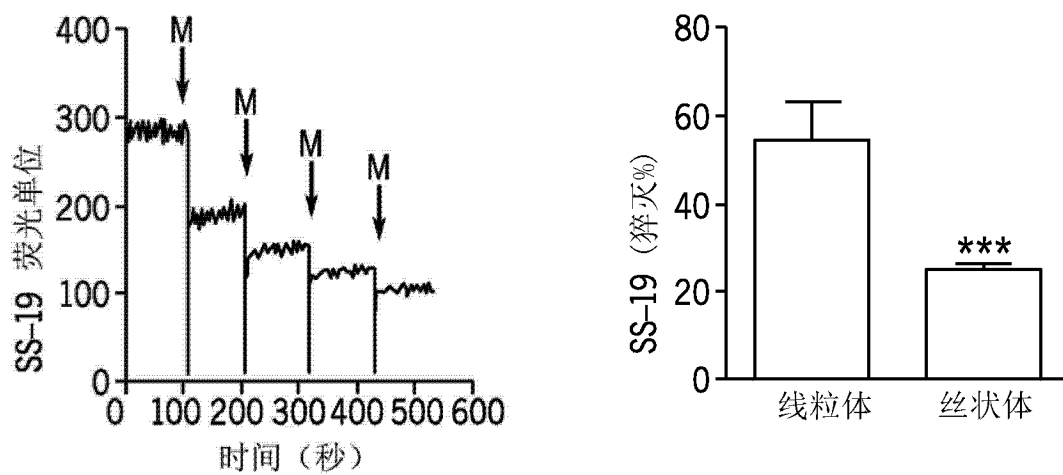


图 12B

图 12A

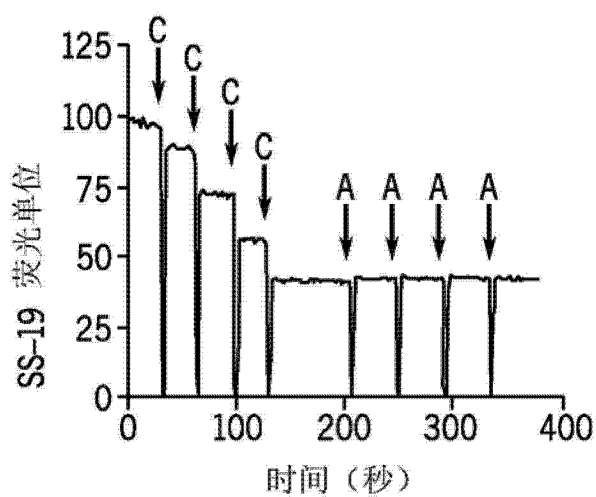


图 12C

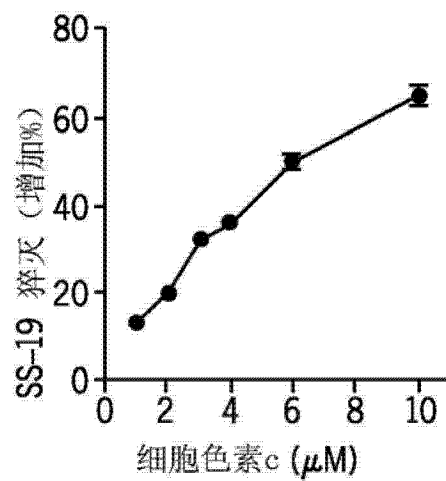


图 12D

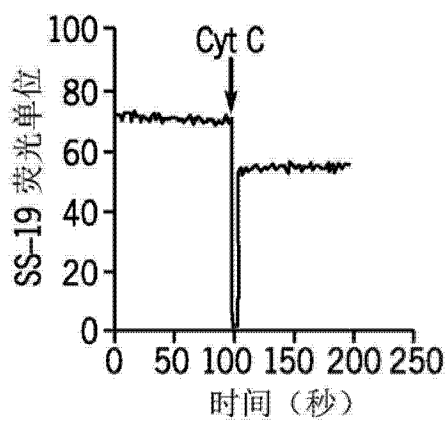


图 13A

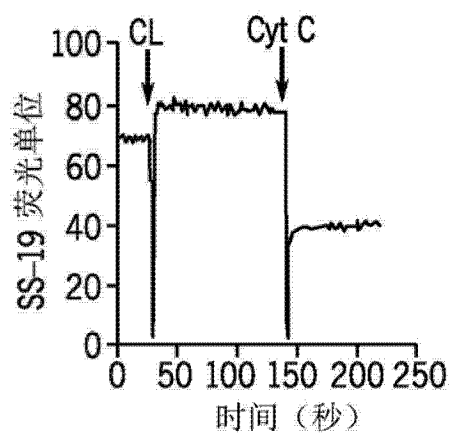


图 13B

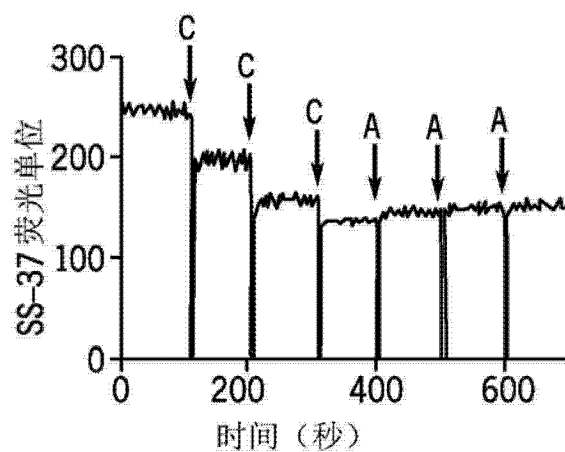


图 13C

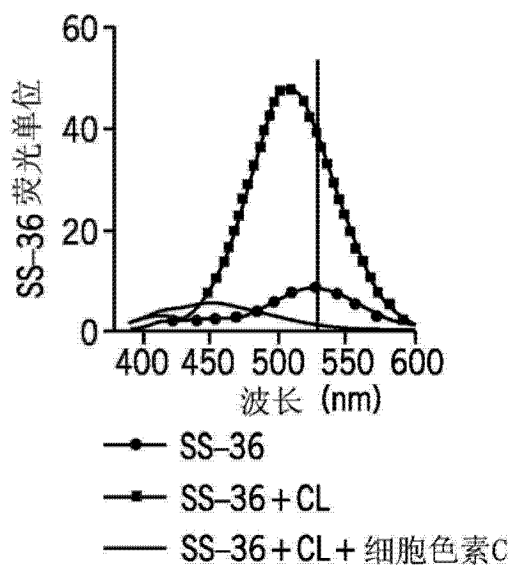


图 13D

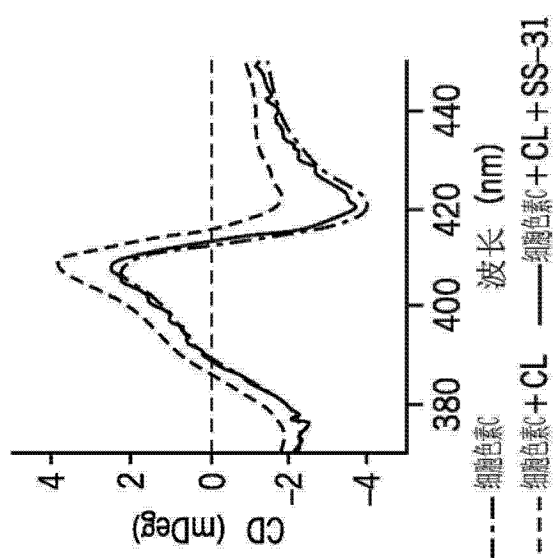


图 14A

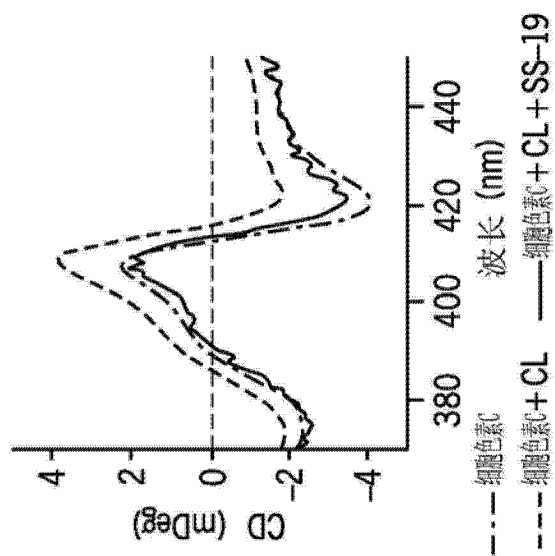


图 14B

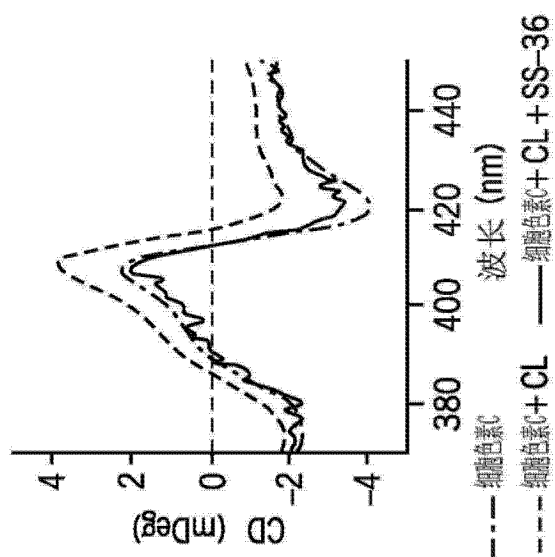


图 14C

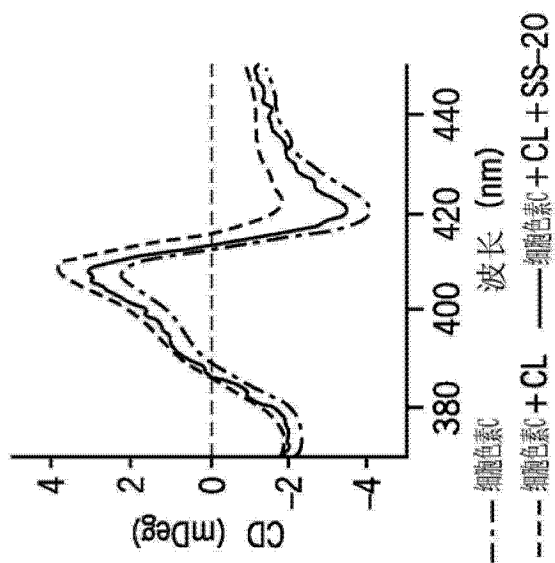


图 14D

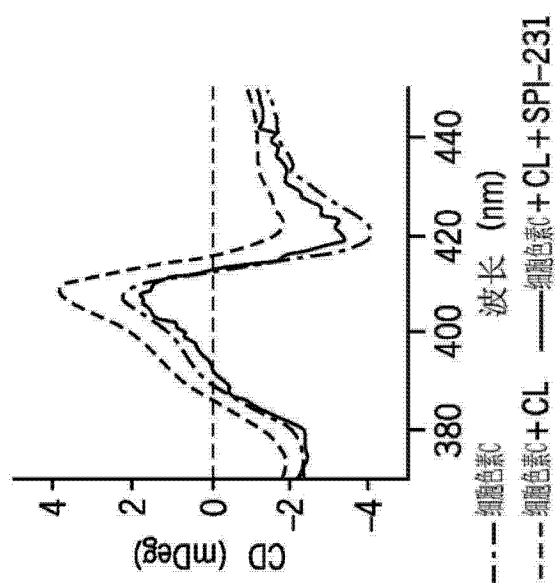


图 14E

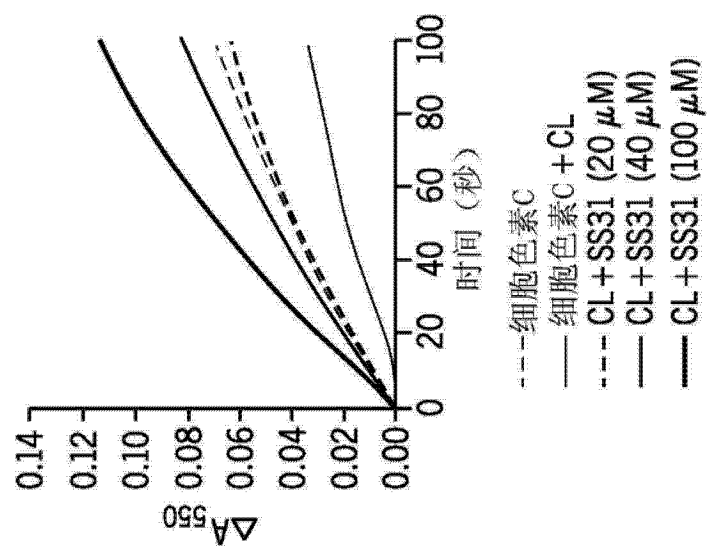


图 15A

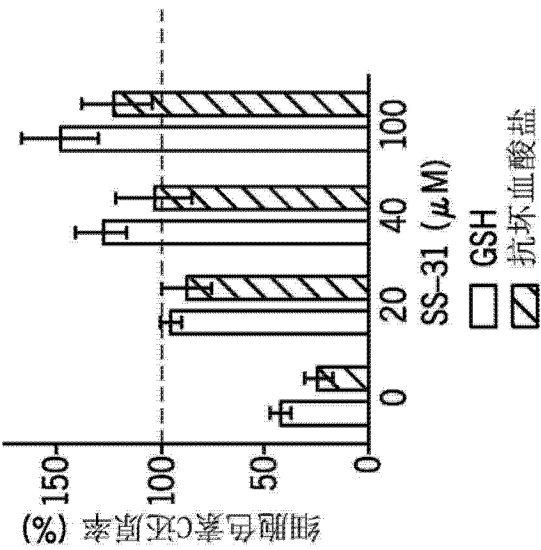


图 15B

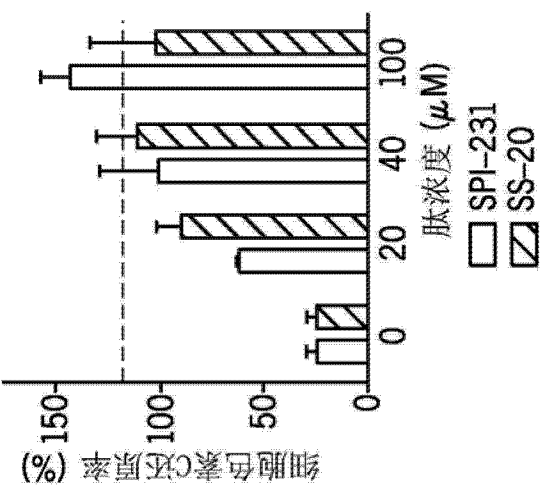


图 15C

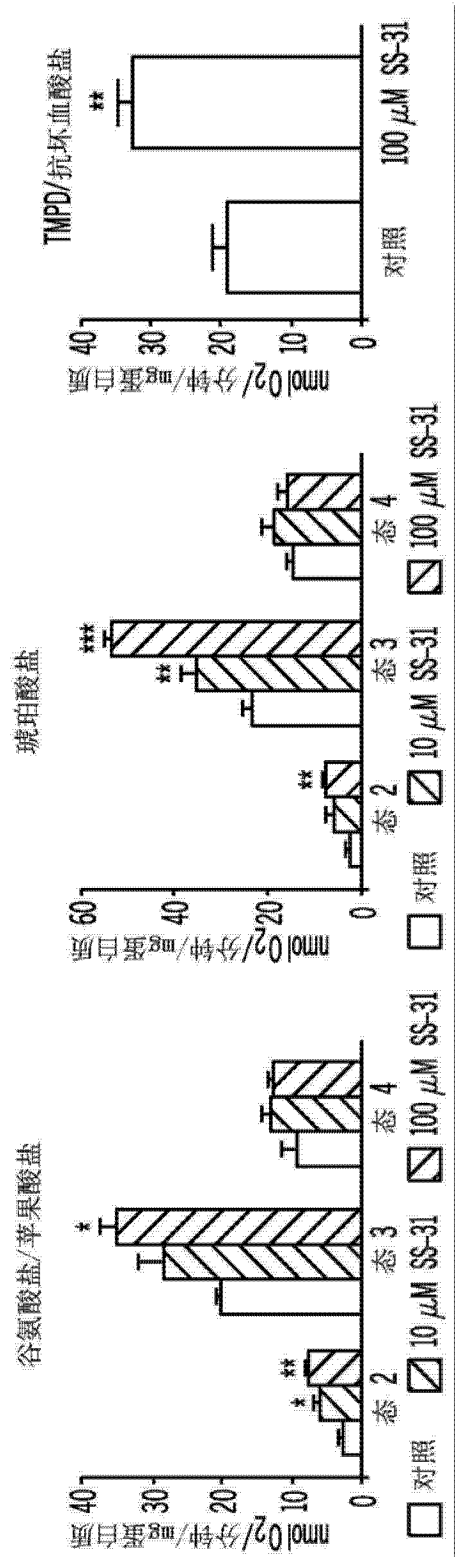


图 16A

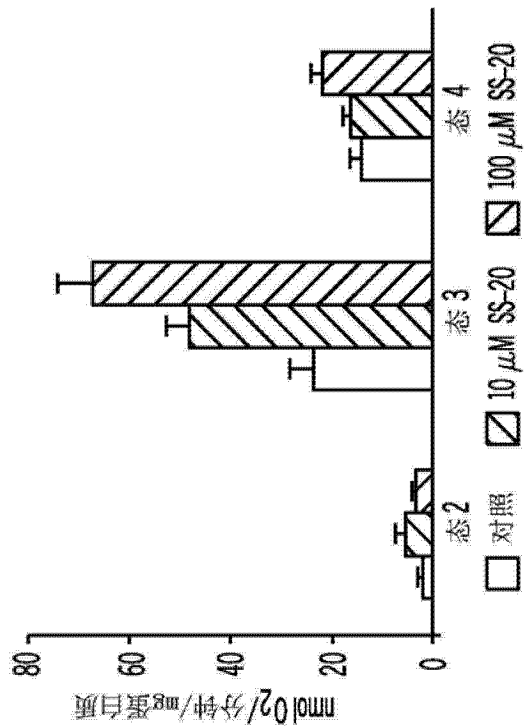


图 16B

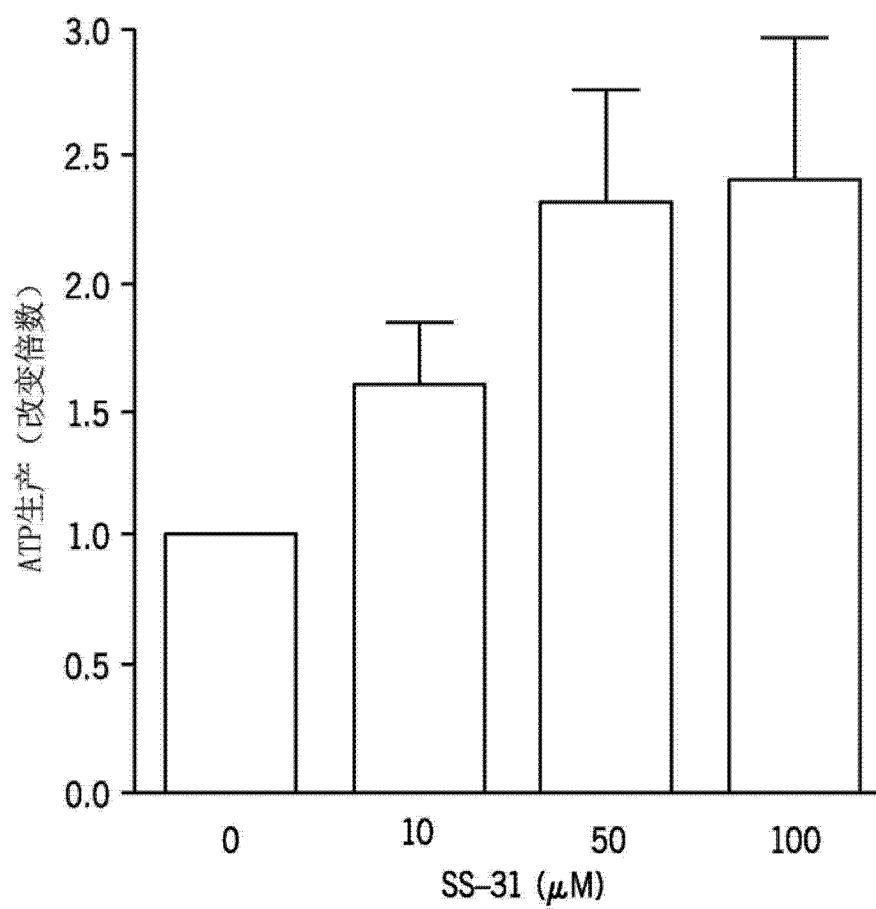


图 17

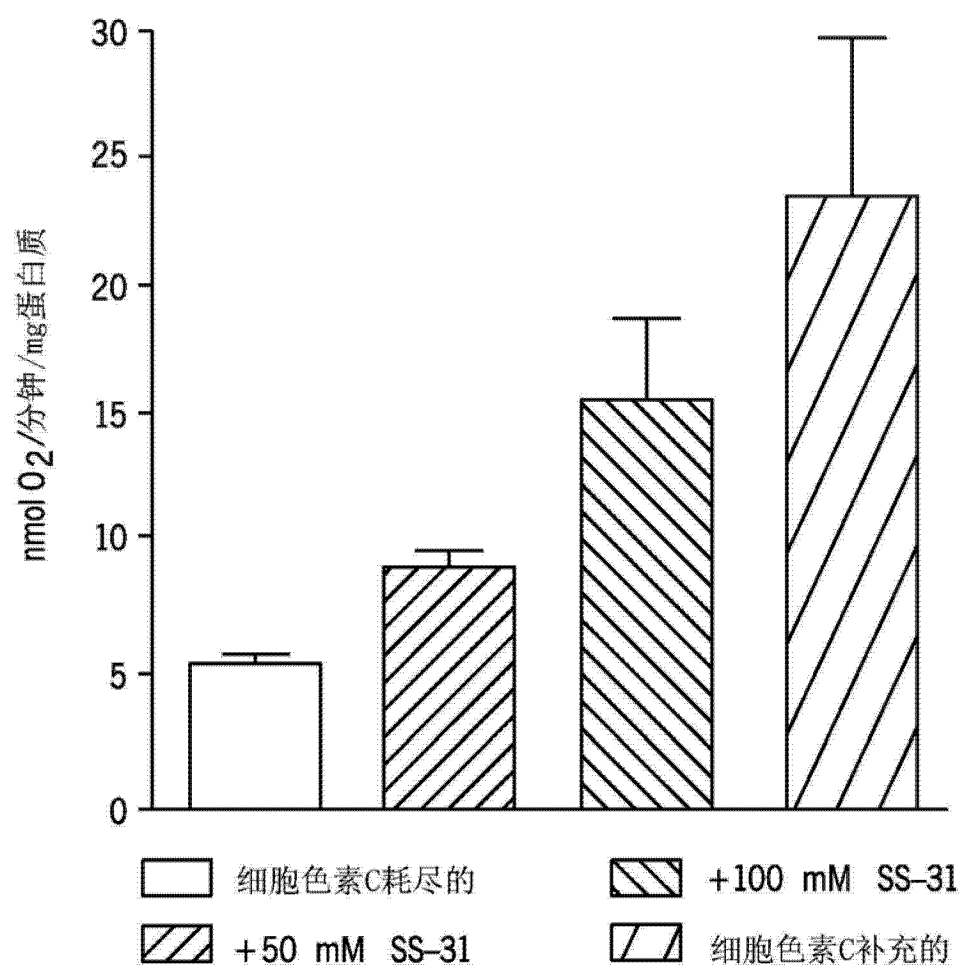


图 18

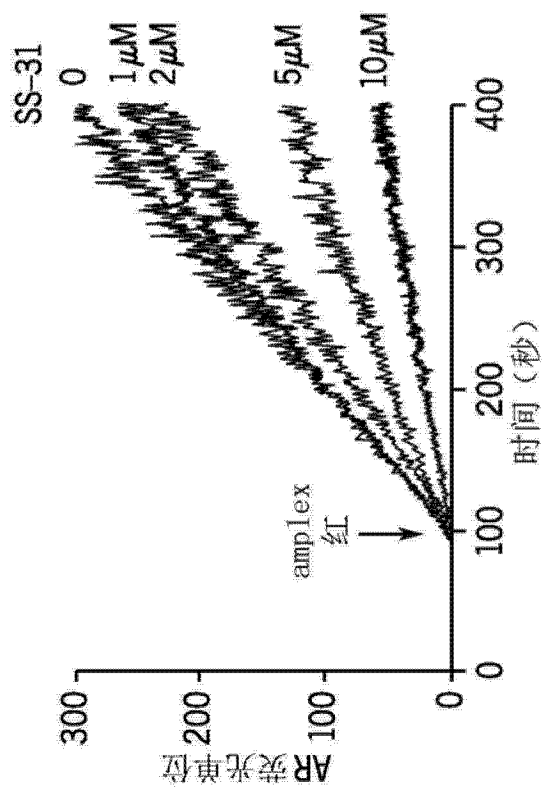


图 19A

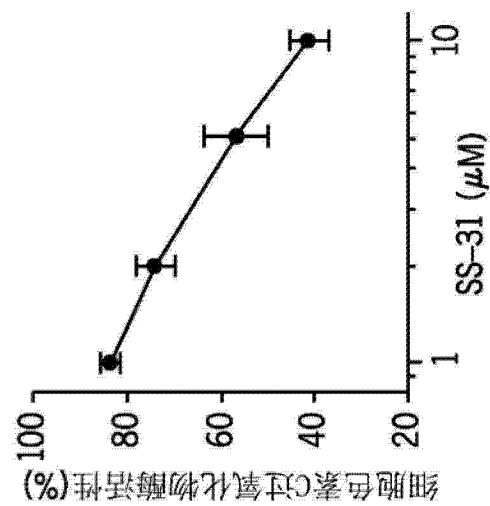


图 19B

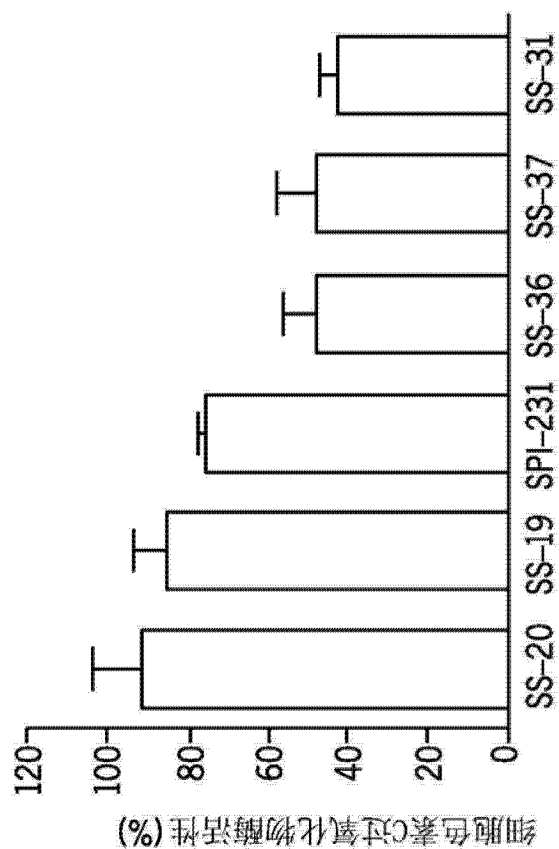


图 19C

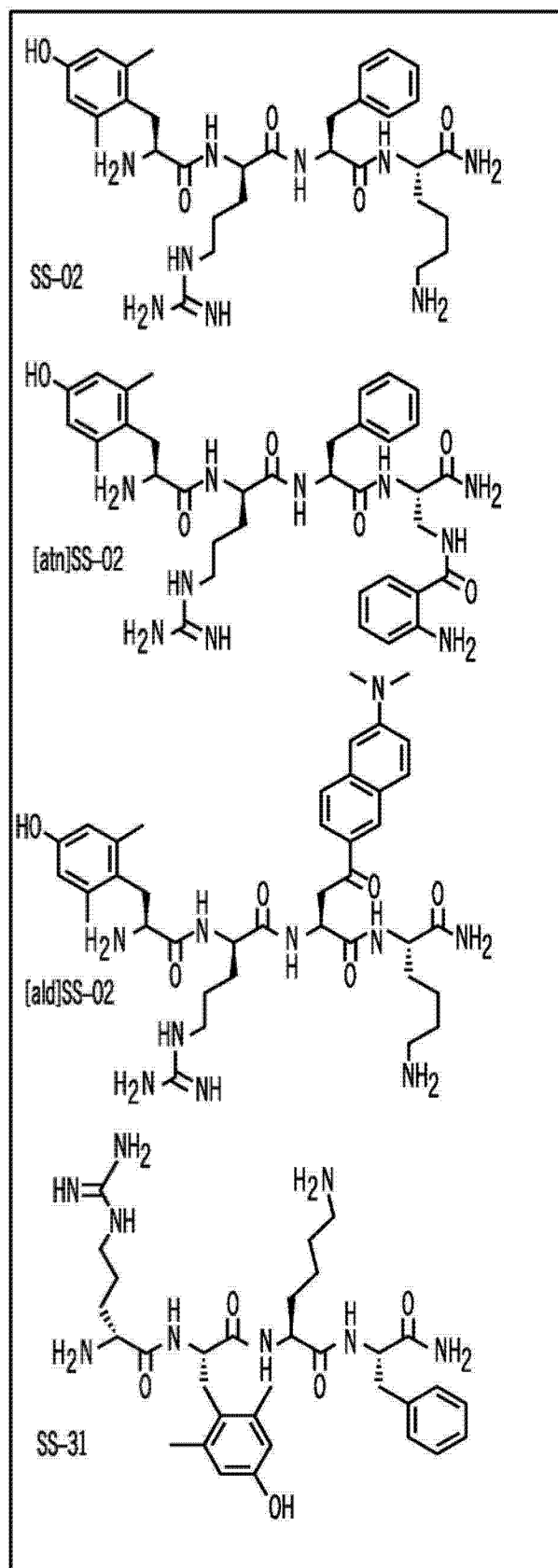


图 20A

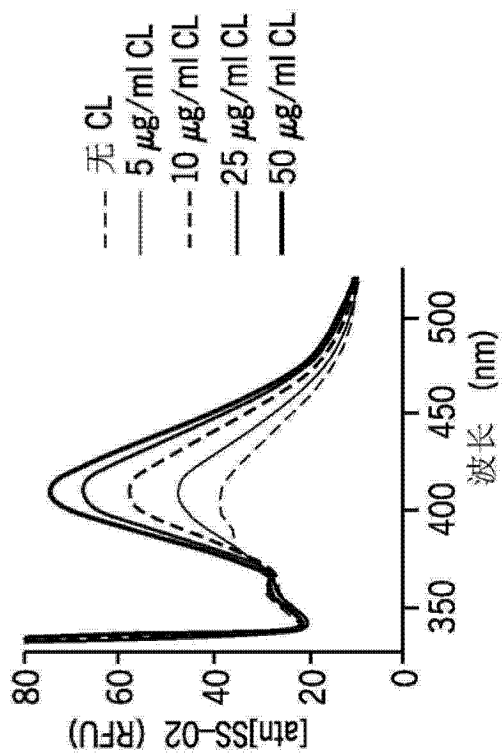


图 20B

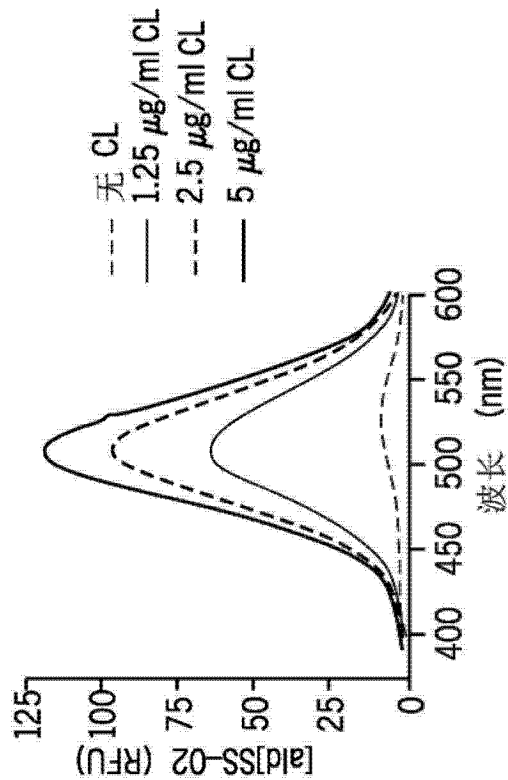


图 20C

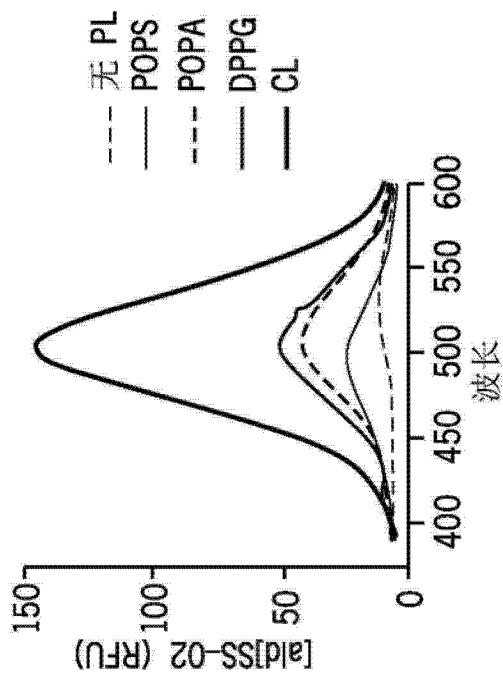


图 20D

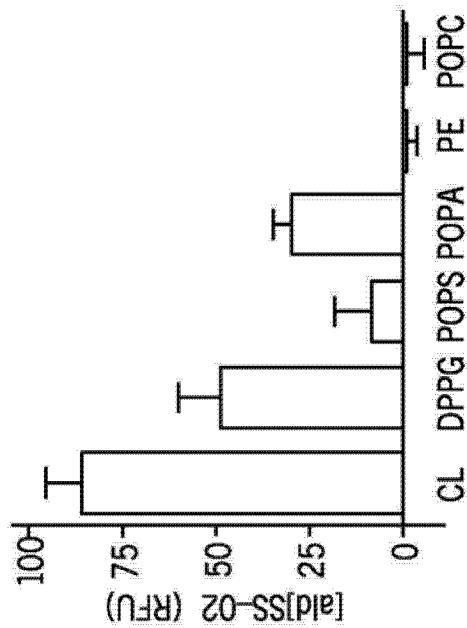


图 20E

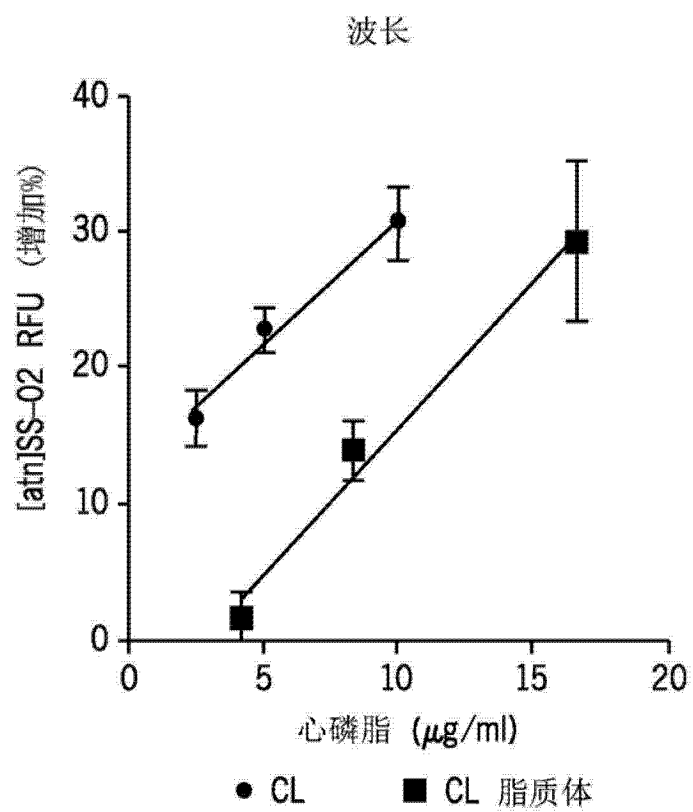


图 20F

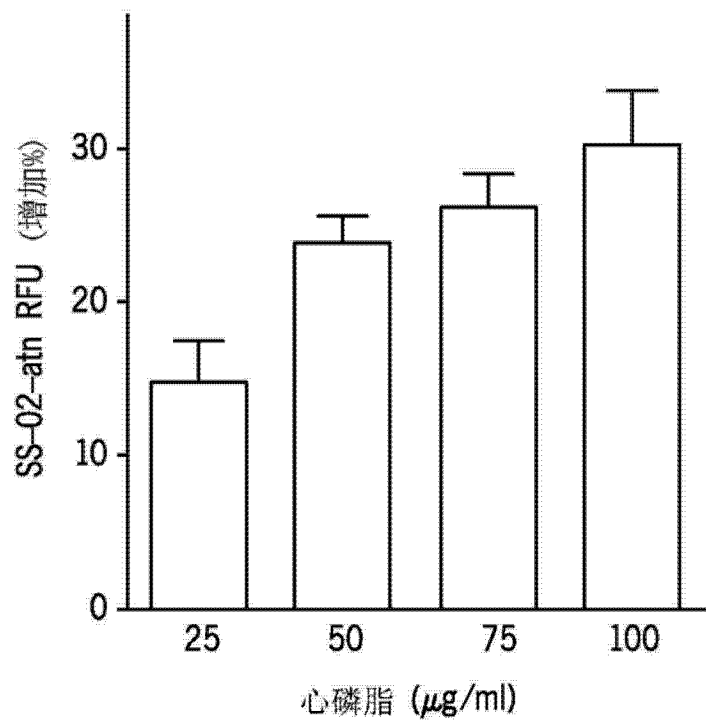


图 20G

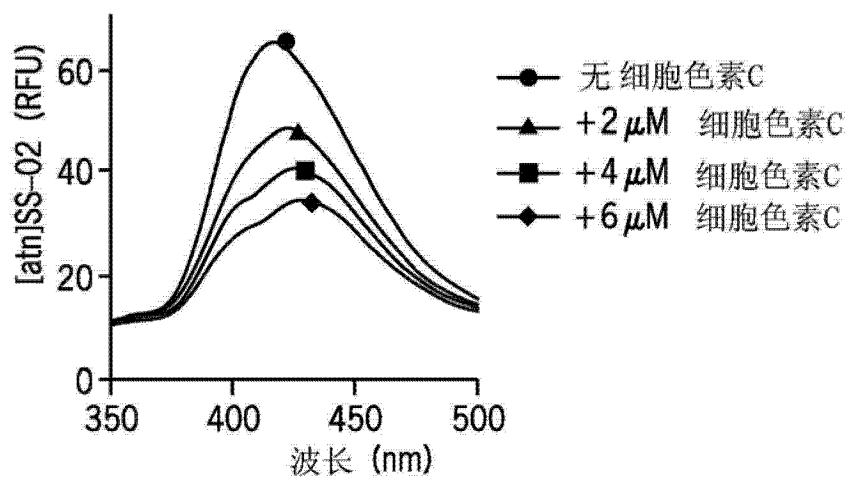


图 21A

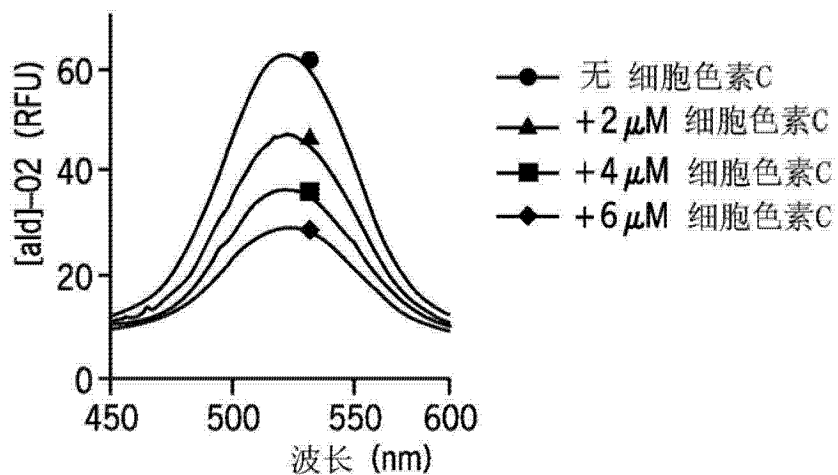


图 21B

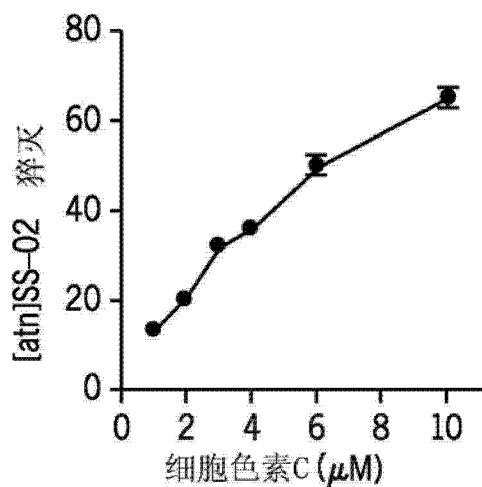


图 21C

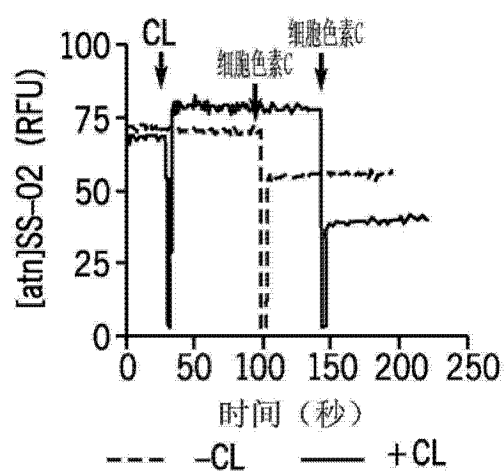


图 21D

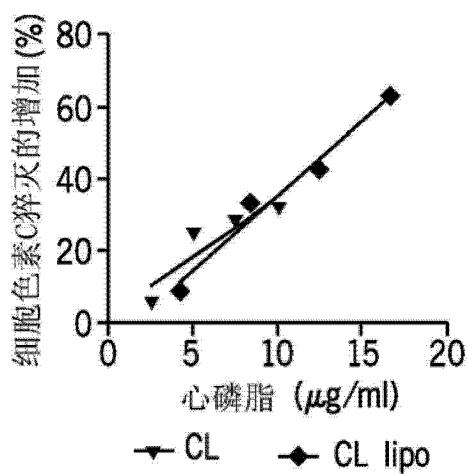


图 21E

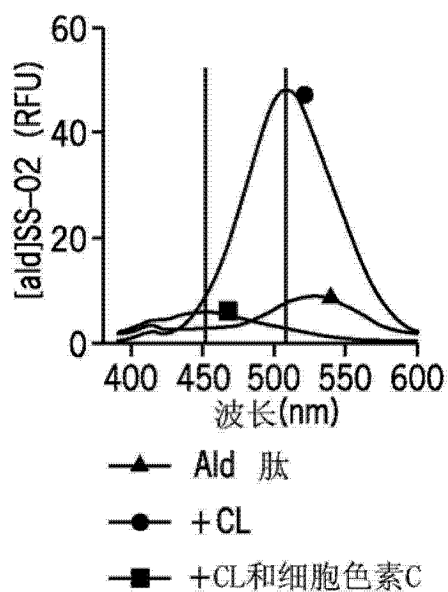


图 21F

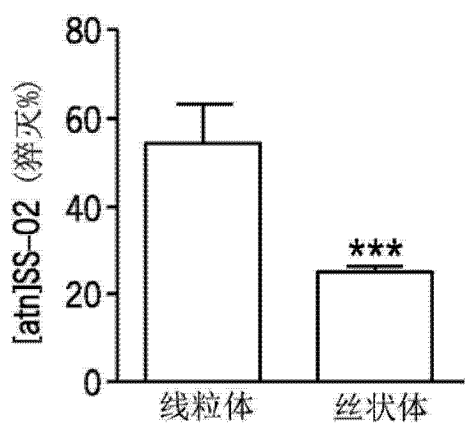


图 21G

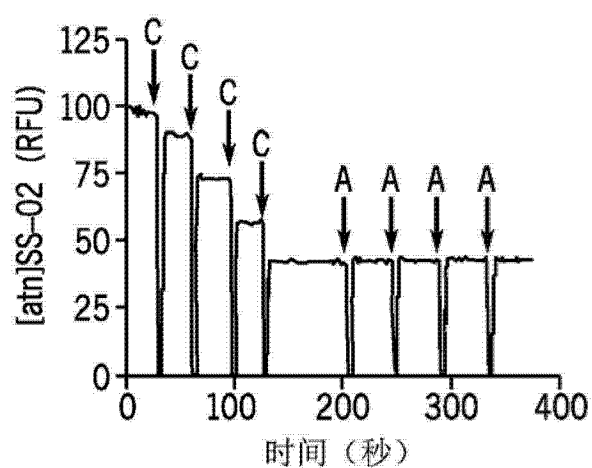


图 21H

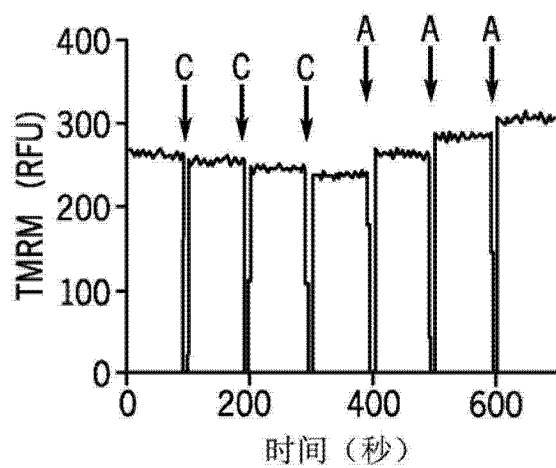


图 21I

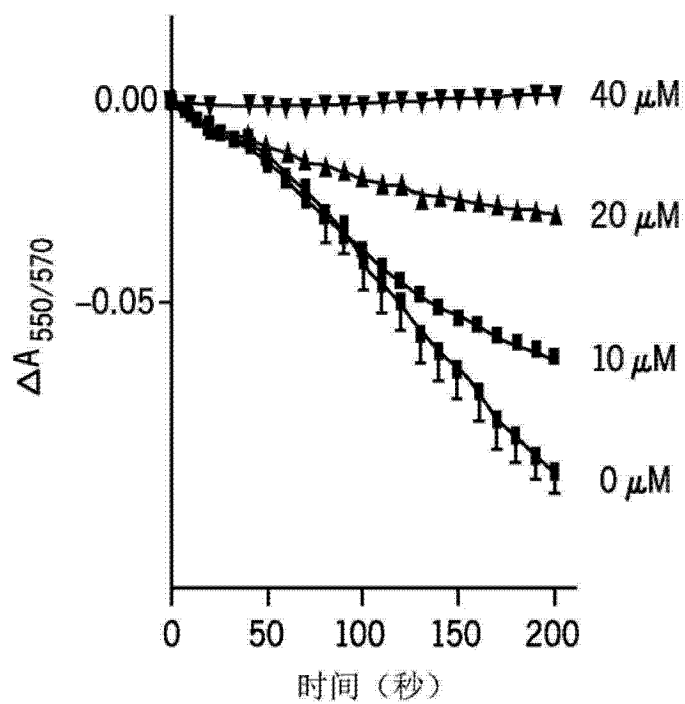


图 22A

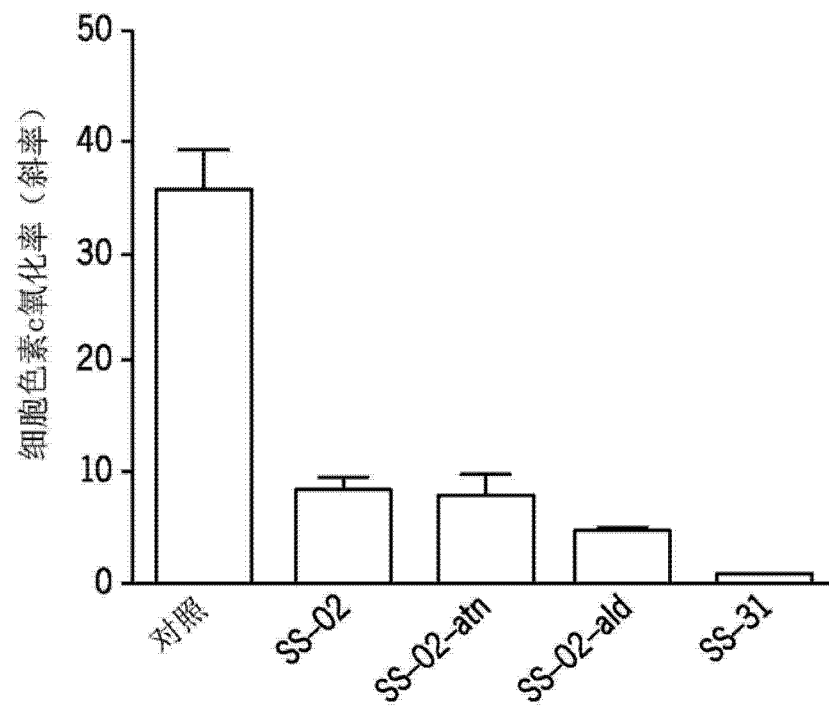


图 22B

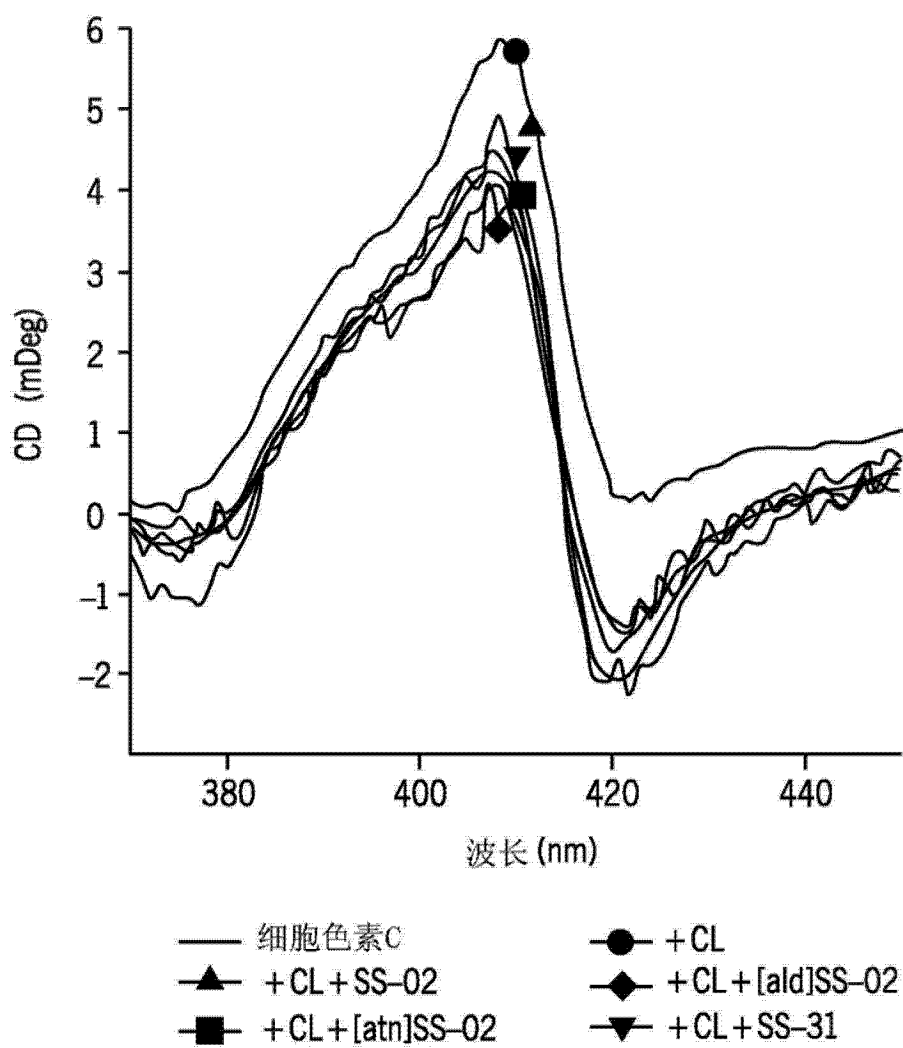


图 23

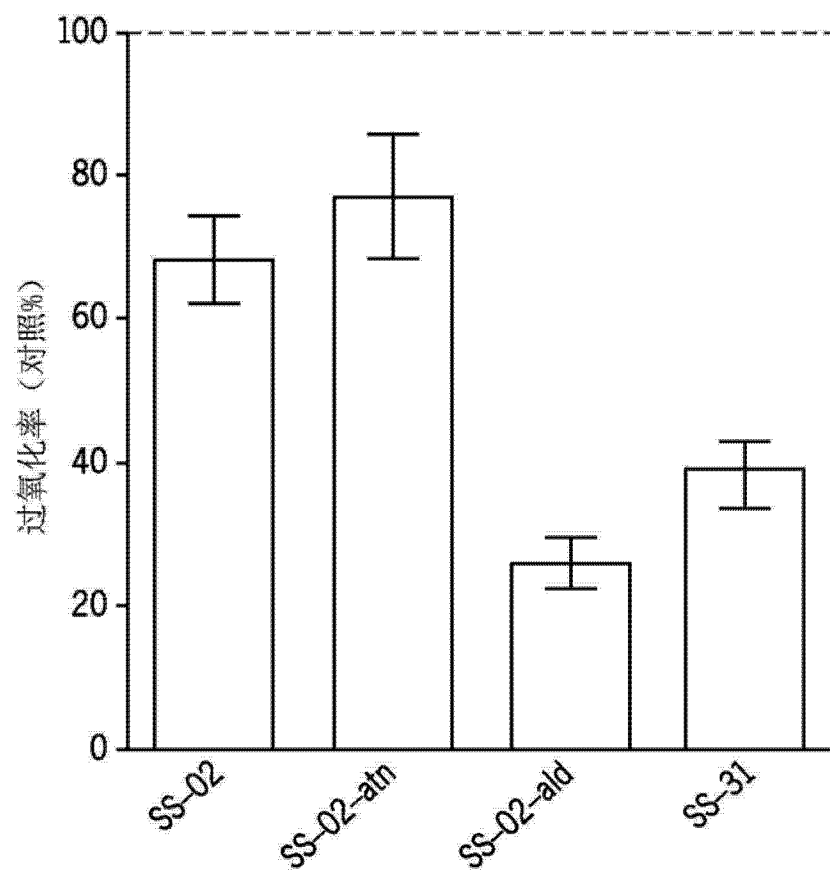


图 24

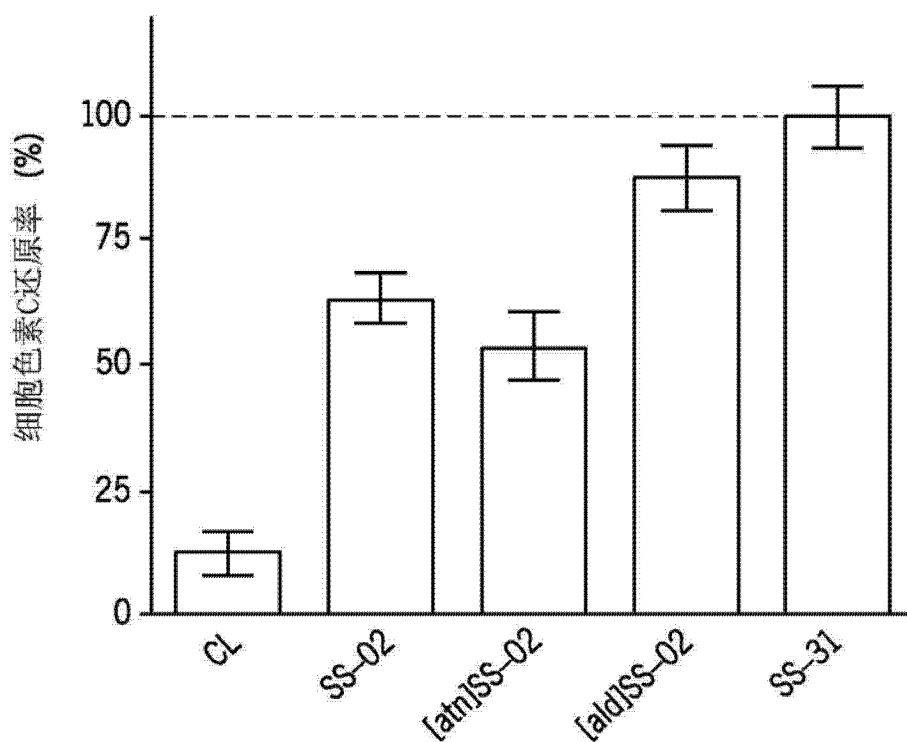


图 25