



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101501060 B

(45) 授权公告日 2012. 11. 07

(21) 申请号 200780029266. 7

(22) 申请日 2007. 07. 19

(30) 优先权数据

MI2006A001607 2006. 08. 09 IT

(85) PCT申请进入国家阶段日

2009. 02. 06

(86) PCT申请的申请数据

PCT/EP2007/006424 2007. 07. 19

(87) PCT申请的公布数据

W02008/017372 EN 2008. 02. 14

(73) 专利权人 法玛菲里克斯有限公司

地址 意大利那波利

(72) 发明人 玛丽亚·温琴扎·卡列罗

马里奥·德罗萨 温琴佐·帕沃纳

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 黄革生 林柏楠

(51) Int. Cl.

C07K 4/12(2006. 01)

A61K 38/03(2006. 01)

(56) 对比文件

US 2003/0009022 A1, 2003. 01. 09,

WO 01/71342 A2, 2001. 09. 27,

审查员 李晨

权利要求书 1 页 说明书 15 页

序列表 44 页

(54) 发明名称

用于治疗与异常细胞迁移相关的诸如癌症等疾病的具有药学活性的肽

(57) 摘要

成盐或未成盐形式的肽及其功能等同衍生物,具有通式 L<sub>1</sub>-X<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-X<sub>3</sub>-X<sub>4</sub>,其中:L<sub>1</sub>是H或酰基或任选地N-酰基化或N-烷基化和/或Cα-烷基化的任何天然或非天然的氨基酸;X<sub>1</sub>和X<sub>3</sub>是相同的或不同的,为任选地N-烷基化和/或Cα-烷基化的任何天然或非天然的碱性氨基酸;X<sub>2</sub>是任选地N-烷基化和/或Cα-烷基化的任何天然或非天然的氨基酸,前提为其并非甘氨酸或在α碳原子上由1-10个碳原子的线性或环状烷基单一取代的氨基酸,在α碳原子上由包含4-10个碳原子的线性或环状烷基单一取代的氨基酸,或在α碳原子上由包含1-8个碳原子的烷基单一取代的氨基酸,任选地由氨基甲酰基,羟基或芳基所取代;X<sub>4</sub>是任选地Cα-烷基化和/或在C末端酰胺化的任何天然或非天然疏水性氨基酸,或任选地N'-烷基化或N'-酰基化的任何疏水性氨基醇或疏水性偕二胺。

CN 101501060 B

1. 成盐或未成盐形式的肽,其序列为: Ace-Arg-Glu-Arg-Phe-NH<sub>2</sub> 或 Ace-Arg-Aib-Arg- $\alpha$  (Me)Phe-NH<sub>2</sub>。

2. 包含权利要求 1 所述肽之一的药物组合物,该肽与合适的载体或赋形剂相组合。

3. 权利要求 1 所述肽在制备用于预防和治疗恶性肿瘤引起的局部和转移性侵袭的药物中的用途。

4. 权利要求 1 所述肽在制备用于预防和治疗视网膜血管病和水肿的药物中的用途。

5. 权利要求 1 所述肽在制备用于预防和治疗视网膜病的药物中的用途。

6. 权利要求 1 所述肽在制备用于预防和治疗黄斑变性的药物中的用途。

## 用于治疗与异常细胞迁移相关的诸如癌症等疾病的具有药 学活性的肽

[0001] 本发明涉及成盐或未成盐形式的线性肽及其功能等同衍生物,包含四或五个氨基酸残基,其中至少一个是疏水性的并且至少两个是碱性的,下文称作“PICM”(细胞能动性肽抑制剂),以及涉及包含它们作为活性成分的药物组合物。本发明的化合物可有效治疗和预防肿瘤,特别是具有高度侵袭性和/或易于转移的那些肿瘤,并且可有效治疗与新血管发生和新血管形成相关联的病症,以及与异常细胞能动性相关的病症诸如自身免疫疾病和慢性炎症像类风湿性关节炎和牛皮癣,慢性肉芽肿,视网膜病,黄斑变性和水肿, Kaposi 氏肉瘤和与疱疹病毒感染相关联的疾病。

[0002] 发明背景

[0003] 目前的肿瘤治疗受到高度恶性细胞类型存在的限制,所述细胞类型在本性上不能对常规治疗起反应(神经胶质瘤,肉瘤等),或者受到发生的选择性益处的限制,其在治疗期间促进耐受性肿瘤克隆的选择和随后的增殖(Woodhouse, E. C. 等人, *Cancer* 80 : 1529-1537, 1997)。常规的治疗主要设计来抑制肿瘤的生长而不是阻止其转移扩散,而转移扩散仍然是治疗失败的主要原因(Shevde LA 等人 *Cancer Lett*, 198 : 1-20, 2003)。

[0004] 目前肿瘤治疗的一般特征是使用高度细胞毒性的化合物,尽管它们选择性地作用于恶性细胞上,但其不可避免地对于机体具有破坏性地系统作用。造成的结果是,目前的治疗通常包括非常高的社会、人和经济成本。

[0005] 这种总体情况表明 :a) 对于目前不能治疗的肿瘤迫切需要发展有效的治疗方法 ; b) 非常有必要减少副作用,在用目前的抗肿瘤药物治疗患者时,所述副作用使得患者的生活质量降低到无法接受的程度,甚至能够引发衰弱患者的死亡 ; c) 需要通过使用既干扰肿瘤生长过程也干扰肿瘤转移扩散的药物,来提高治疗的效力 ; d) 需要使肿瘤治疗的成本更加令人可以接受。

[0006] 最近有报告称源自人和鼠的肽 Metastin 的多种生物学作用(W000/24890, W0 01/75104, W0 02/85399) 包括预防或治疗癌症的作用。涉及 Metastin 及其衍生物的 W0 06/001499, 要求保护非常宽泛的化合物系列,该化合物系列估计有超过  $10^{10}$  种不同的结构,包含 4 到 54 个天然或非天然的氨基酸残基,对其报告了非常多的生物学活性,诸如抑制肿瘤的转移扩散和生长、控制胰腺功能和预防急性和慢性胰腺炎、控制胎盘功能以及用于治疗胎儿低常增生、葡萄糖代谢异常、脂代谢异常、不育症、子宫内膜异位症、青春期早熟、阿尔茨海默症、影响认知区域的病症、肥胖症、高脂血症、糖尿病 II 型、高血糖症、高血压、糖尿病性神经病、糖尿病性肾病、糖尿病性视网膜病变、水肿、泌尿系统病症、胰岛素抗性、不稳定型糖尿病、脂性萎缩、胰岛素变应性、动脉粥样硬化、血栓形成病症、脂毒症,以及用于提高性腺功能和刺激排卵的治疗中。考虑到这类分子的治疗应用,这些化合物每一种都同时存在的这些不同生物学作用当然代表了一种主要的限制,而不是益处。这种广泛的生物学作用与 Metastin 及其衍生物和特异性细胞受体 GPR54( 也称作 Kiss-1R, Kisspeptins 受体、Metastin 受体、hypogonadotropin 1 或 hOT7T175) 的相互作用紧密相关(Ohtaki T. 等人, *Nature* 411 : 613-617, 2001 ; Clements M. K. 等人, *Biochem. Biophys. Res.*

Commun. 284 :1189-1193, 2001 ;Muir A. I. 等人, J. Biol. Chem. 276 :28969-28975, 2001 ; Kotani M. 等人, J. Biol. Chem. 276 :34631-34636, 2001 ;Seminara S. B. 等人, N. Engl. J. Med. 349 :1614-1627, 2003 ;Grimwood J. 等人, Nature 428 :529-535, 2004 ;Colledge W. H. , Trends Endocrinol. Metab. 15 :448-453, 2004 ;Hori A. 等人, Biochem. Biophys. Res. Commun. 286 :958-963, 2001 ;Janneau J. -L. 等人, J. Clin. Endocrinol. Metab. 87 : 5336-5339, 2002 ;Ringel M. D. 等人, J. Clin. Endocrinol. Metab. 87 :2399-2399, 2002 ;de Roux N. 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 100 :10972-10976, 2003 ;Ikeguchi M. 等人, J. Cancer Res. Clin. Oncol. 129 :531-535, 2003 ;Ikeguchi M. 等人, Clin. Cancer Res. 10 : 1379-1383, 2004 ;Bilban M. 等人, J. Cell Sci. 117 :1319-1328, 2004 ;Becker J. A. J. 等人, Biochem. Biophys. Res. Commun. 326 :677-686, 2005 ;Semple R. K. 等人, J. Clin. Endocrinol. Metab. 90 :1849-1855, 2005)。

[0007] 关于 Metastin 及其衍生物的抗肿瘤活性, WO 06/001499 报道了一种限于实验动物模型的中度活性, 剂量为 70-140  $\mu$  g/kg, 其以不超过 20% 减少肿瘤质量。其还表明长期施用 Metastin 的一种类似物 Kisspeptin-54 将引发大鼠性腺萎缩的副作用 (E. L. Thomson 等人, Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 291, 1074-1082, 2006)。

#### [0008] 发明描述

[0009] 发明涉及成盐或未成盐形式的四肽或五肽及其功能等同衍生物, 其包含至少两个碱性以及至少一个疏水性氨基酸 (下文以代号 PICM 表示), 其在体外以 aM 浓度 ( $10^{-18}$ M) 抑制细胞迁移, 并在体内具有强大的抗肿瘤作用, 以低至 15  $\mu$  g/kg 的剂量将肿瘤质量减少 30-70%。它们对于所有与新血管发生和新血管形成相关联的病症有效, 并且在比治疗剂量高大约 1000 倍的剂量上不呈现任何急性或亚急性毒性。

[0010] 不像 Metastin 及其衍生物, 本发明肽的活性并不与细胞受体 GPR54 相关联, 而是与它们和 FPR 细胞受体的特异性相互作用密切关联。

[0011] 已知一些 FPR 受体拮抗剂 (Edwards 等人 Mol Pharmacol. 68 :1301-10, 2005 ; Karisson 等人 Biochem Pharmacol. 71 :1488-96, 2006), 它们全部在化学上都有别于 PICM。

[0012] 因此 PICM 代表新的一类活性成分, 其具有比 Metastin 及其衍生物以及 FPR 受体拮抗剂的活性强得多并且显著不同的生物学和药理学活性。

[0013] 在临床实践中, PICM 可低剂量起作用而有效对抗大量肿瘤, 并且不呈现任何系统性毒性或副作用。

[0014] PICM 还可有效治疗与新血管发生和新血管形成相关联的病症, 以及与异常细胞能动性相关的病症诸如自身免疫疾病和慢性炎症像类风湿性关节炎和牛皮癣, 慢性肉芽肿, 视网膜病, 黄斑变性和水肿, Kaposi 氏肉瘤和与疱疹病毒感染相关联的疾病。

#### [0015] 发明详述

[0016] 本发明的成盐或未成盐形式的肽及其功能等同衍生物具有通式  $L_1-X_1-X_2-X_3-X_4$ , 其中:  $L_1$  是 H 或酰基或任选地 N-酰基化或 N-烷基化和 / 或 C $\alpha$ -烷基化的任何天然或非天然的氨基酸; 优选地,  $L_1$  是 H 或酰基或任选地 N-酰基化或 N-烷基化和 / 或 C $\alpha$ -烷基化的 Glu、Gln, 任选地 N-酰基化和 / 或 C $\alpha$ -烷基化的 Pro、羟基-Pro、硫代-Pro、Azt、Pip、pGlu, 任选地 N-酰基化或 N-烷基化的 Aib、Ac3c、Ac4c、Ac5c、Ac6c; 甚至更加优选地  $L_1$  是 H 或酰基, 任选地 N-酰基化或 N-烷基化的 Aib、Ac3c、Ac4c、Ac5c 或 Ac6c;

[0017]  $X_1$  和  $X_3$  是相同的或不同的,为任选地 N-烷基化和 / 或 C $\alpha$ -烷基化的任何天然或非天然的碱性氨基酸;优选地,  $X_1$  和  $X_3$  是任选地 N-烷基化和 / 或 C $\alpha$ -烷基化的相同的或不同的氨基酸,选自任选地胍基化的 Arg、Orn、Lys,以及在间位或对位由胺基或胍基所取代的苯丙氨酸;

[0018]  $X_2$  是任选地 N-烷基化和 / 或 C $\alpha$ -烷基化的任何天然或非天然氨基酸,前提为其并非甘氨酸或在  $\alpha$  碳原子上由 1-10 个碳原子的线性或环状烷基单一取代的氨基酸,或在  $\alpha$  碳原子上由包含 4-10 个碳原子的线性或环状烷基单一取代的氨基酸,或在  $\alpha$  碳原子上由包含 1-8 个碳原子的烷基单一取代的氨基酸,任选地由氨基甲酰基,羟基或芳基所取代; $X_2$  优选地选自任选地 N-烷基化和 / 或 C $\alpha$ -烷基化的 Glu、Lys,任选地 N-烷基化的 Aib、Ac3c、Ac4c、Ac5c 和 Ac6c;更优选地,  $X_2$  选自任选地 N-烷基化的 Aib、Ac3c、Ac4c、Ac5c 和 Ac6c;

[0019]  $X_4$  是任选地 C $\alpha$ -烷基化和 / 或在 C 末端酰胺化的任何疏水氨基酸,或任选地 N'-烷基化或 N'-酰基化的任何疏水性氨基醇或任何疏水性偕二胺; $X_4$  优选地选自 Phe、h-Phe、Tyr、Trp、1-Nal、2-Nal、h-1-Nal、h-2-Nal、Cha、Chg 和 Phg,其任选地是 C $\alpha$ -烷基化的和 / 或在 C 末端酰胺化的。

[0020] “天然氨基酸”指构成活体生物的蛋白质的氨基酸。

[0021] “非天然氨基酸”指 D 系列的  $\alpha$ -氨基酸或  $\beta$ -氨基酸;脱氢氨基酸;在  $\alpha$  碳原子上由包含最多 11 个碳原子的烷基或芳基双取代的氨基酸;如上所定义天然氨基酸,在其侧链上包含由含有 1-11 个碳原子的烷基、酰基、芳基或酰基芳基所官能化的羟基、氨基或巯基;如上所定义天然氨基酸,在其侧链上包含由含有最多 11 个碳原子的伯胺或仲胺或脂族醇或芳香醇所官能化的羧基;环状氨基酸诸如 Azt、硫代-Pro、Ac3c、Ac4c、Ac5c、Ac6c 和 pGlu 酸;高氨基酸;由环烷基或芳基取代的氨基酸,诸如  $\beta$ -1-萘基-丙氨酸、 $\beta$ -2-萘基-丙氨酸、高- $\beta$ -1-萘基-丙氨酸、高- $\beta$ -2-萘基-丙氨酸、环己基-丙氨酸、环己基-甘氨酸和苯基-甘氨酸。其它非天然氨基酸在:“Diversity of synthetic peptides”, Konishi 等人 First International Peptide Symposium, Kyoto, Japan, 1997 中有报道。

[0022] 术语“任何碱性氨基酸”指如上所定义的任何天然或非天然氨基酸,在侧链上包含至少一个咪唑,氨基,胍基,吡啶鎓或脲基团。

[0023] 术语“任何疏水性氨基酸”指一系列  $\alpha$ -、 $\beta$ -和脱氢氨基酸:Leu、n-Leu、Ile、allo-Ile、Val、n-Val、Phe、h-Phe、Tyr、Trp、1-Nal、2-Nal、h-1-Nal、h-2-Nal、Cha、Chg 和 Phg;如上所定义天然和非天然氨基酸,在其侧链上包含由含有 1-11 个碳原子的烷基、酰基、芳基或酰基芳基所官能化的羟基、氨基或巯基;如上所定义天然和非天然氨基酸,在其侧链上包含由含有最多 11 个碳原子的伯胺或仲胺或脂族醇或芳香醇所官能化的羧基;在芳香环的邻位、间位和对位上由卤素或由烷基、O-烷基或 S-烷基单和双取代的苯丙氨酸; $\beta$ -2-和  $\beta$ -3-噻吩基丙氨酸、 $\beta$ -2-和  $\beta$ -3-咪唑基丙氨酸;由含有最多 11 个碳原子的烷基、酰基、芳基或酰基芳基所官能化的 2,3 二氨基丙氨酸和 2,4 二氨基丁酸的衍生物。

[0024] 术语“任何疏水性氨基醇”指如上所定义的“任何疏水性氨基酸”,其中羧基官能团由 OH 基团所取代。

[0025] 术语“任何疏水性偕二胺”指如上所定义的“任何疏水性氨基酸”,其中羧基官能团由  $\text{NH}_2$  基团所取代。

[0026] 术语“酰基”意指包含 1-9 个碳原子的酰基基团。  
[0027] 术语“N- 酰基化的”意指向末端氨基氮上导入如上所定义的酰基。  
[0028] 术语“N- 烷基化的”意指向酰胺氮上导入包含 1-9 个碳原子的烷基残基。  
[0029] 术语“酰胺化的”意指用包含总共 0-14 个碳原子的伯胺或仲胺酰胺化 C- 末端羧基。

[0030] 术语“C $\alpha$ - 烷基化的”意指向  $\alpha$  碳原子上导入包含 1-9 个碳原子的烷基残基。  
[0031] 术语“功能等同衍生物”意指具有通式 I 的化合物的衍生物,其特征是通过在肽化学中常用的结构修饰来调节它们的药物动力学或药物代谢动力学特性。这些包括假肽,其中一个或多个肽键由  $-\text{CH}_2-\text{NH}-$  所取代 (Guichard G 等人, J Biol Chem. ;270 : 26057-91995), 具有一个或多个反向肽键的衍生物 (Carotti A. 等人, Biopolymers 60, 322-332, 2001 ;Chorev, M. 等人 Science 204, 1210-12121979 ;Pallai, P. 等人 Biochemistry 24, 1933-1941. 1985 ;Rodriguez M. E. 等人 J. Med. Chem. 30, 758-7631987),  $\beta$ - 肽衍生物 (Horne W. S. 等人 J. Am. Chem. Soc. 1294178-41802007), 其中一个或多个肽键由至少一个  $\beta$ - 氨基酸形成,以及包含一个或多个脱氢氨基酸的衍生物 (Bnsetti V. 等人, Int. J. Biol. Macromol. 14, 23-281992)。具有从 N- 末端侧链延长的链的衍生物也是功能等同衍生物。

[0032] 下列是一些非天然氨基酸的常用缩写,这些非天然氨基酸可以包括在根据本发明的肽的通式中:

[0033] Azt = 杂氮环丁酸, Pip = 2- 哌啶酸, Aib =  $\alpha$ - 氨基 - 异丁酸, Ac3c = 1- 氨基环丙烷 -1- 羧酸, Ac4c = 1- 氨基环丁烷 -1- 羧酸, Ac5c = 1- 氨基环戊烷 -1- 羧酸, Ac6c = 1- 氨基环己烷 -1- 羧酸, Abu =  $\alpha$ - 氨基 - 正丁酸, n-Leu = 正亮氨酸, n-Val = 正缬氨酸, h-Phe = 高苯丙氨酸, 1-Nal =  $\beta$ -1- 萘基 - 丙氨酸, 2-Nal =  $\beta$ -2- 萘基 - 丙氨酸, h-1-Nal = 高- $\beta$ -1- 萘基 - 丙氨酸, h-2-Nal = 高- $\beta$ -2- 萘基 - 丙氨酸, Cha = 环己基 - 丙氨酸, Chg = 环己基 - 甘氨酸, Phg = 苯基 - 甘氨酸, pGlu = 焦谷氨酸, Dap = 2,3 二氨基 - 丙酸, Dab = 2,4 二氨基丁酸, N(Me)Arg = N- 甲基 - 精氨酸,  $\alpha$  (Me)Phe = C- $\alpha$ - 甲基 - 苯丙氨酸。

[0034] 优选地, L1 是乙酰基、Glu、pGlu、乙酰基 -Aib, X<sub>1</sub> 是 Arg 或 N(Me)Arg, X<sub>2</sub> 是 Glu、Aib、Ac5c, X<sub>3</sub> 是 Arg、N(Me)Arg, 而 X<sub>4</sub> 是 Phe-NH<sub>2</sub>、Tyr-NH<sub>2</sub>、Trp-NH<sub>2</sub>、 $\alpha$  (Me)Phe-NH<sub>2</sub>、Phe-OH、Tyr-OH、Trp-OH。

[0035] 根据本发明特别优选的肽选自 :Ace-Arg-Gln-Arg-Phe-NH<sub>2</sub> ;Ace-Arg-Glu-N(Me)Arg-Phe-NH<sub>2</sub> ;Ace-Arg-Aib-Arg-Phe-NH<sub>2</sub> ;Ace-Arg-Aib-N(Me)Arg-Phe-NH<sub>2</sub> ;Ace-Arg-Ac5c-Arg-Phe-NH<sub>2</sub> ;Ace-Arg-Ac5c-N(Me)Arg-Phe-NH<sub>2</sub> ;Ace-N(Me)Arg-Aib-Arg-Phe-NH<sub>2</sub> ;Ace-N(Me)Arg-Aib-N(Me)Arg-Phe-NH<sub>2</sub> ;Ace-Arg-Aib-N(Me)Arg-Phe-NH<sub>2</sub> ;Ace-Arg-Aib-Arg- $\alpha$  (Me)Phe-NH<sub>2</sub> ;Ace-N(Me)Arg-Aib-Arg- $\alpha$  (Me)Phe-NH<sub>2</sub> ;Ace-N(Me)Arg-Aib-N(Me)Arg- $\alpha$  (Me)Phe-NH<sub>2</sub> ;Ace-Arg-Aib-N(Me)Arg- $\alpha$  (Me)Phe-NH<sub>2</sub>。

[0036] 本发明的肽可以用文献中报道的各种技术合成;参见例如, Schroeder 等人 “The Peptides” vol 1, Academic Press, 1965 ;Bodanszky 等人 “PeptideSynthesis” Interscience Publisher, 1966 ;Barany & Merrifield, “ThePeptides ;Analysis, Synthesis, Biology”, 2, 第一章, Academic Press, 1980。这些技

术包括固相肽合成,溶液中的肽合成,有机化学合成方法,或其任意组合。所选的合成方法显然将取决于特定肽的组成。优选地,所用的方法将基于固相技术和经典溶液中方法的适当结合,其生产成本低,特别是在工业规模上。详细地,这些方法包括:i)在溶液中合成肽链片段,通过将适当活化的N-保护氨基酸连续偶联到氨基酸或C-保护的肽链上,分离中间产物,随后对所述片段的N和C末端进行选择去保护,必要时对侧链去保护来进行合成,直到获得所需肽;ii)在不可溶的多聚物介质上从C-末端到N-末端固相合成肽链。在合适清除剂存在的情况下,通过用无水氢氟酸或三氟乙酸水解将肽从树脂上去除。

[0037] 本发明的肽可有效作用于许多类型的人和动物肿瘤,阻止其生长和转移扩散。

[0038] 关于抗肿瘤效果和有效剂量,本发明的化合物是有益的,特别是与Metastin和在WO 06/001499中报道的有关肽相比。在较低的浓度下,本发明的肽在减弱肿瘤方面诱导有效得多的反应(Metastin衍生物减弱20%,本发明产物减弱70%)。

[0039] 对于推荐的治疗用途,根据本发明的肽可以以其本身,或以盐的形式配制成口服、胃肠外、局部、喷雾或经皮给药的药物组合物,也可以结合其它活性成分。人用单位剂量可以在很大范围内变化,一般从每剂0.1 $\mu$ g到每剂1g,优选地为每剂0.1mg到每剂100mg,其可以由本领域技术人员根据待治疗的病症、其严重程度和患者的体重、性别和年龄容易地确定。

[0040] 下列实施例更加详细地阐明了本发明。

[0041] 实施例1

[0042] 通式I的化合物PICM1的制备,其中:L<sub>1</sub>是Ace,X<sub>1</sub>和X<sub>3</sub>是Arg,X<sub>2</sub>是Glu,且X<sub>4</sub>是Phe-NH<sub>2</sub>。所以PICM1的%式为Ace-Arg-Glu-Arg-Phe-NH<sub>2</sub>。

[0043] 使用自动肽合成仪进行合成,以相当于0.5mmol胺基的2.5g Rink-酰胺树脂(0.2meq/g)起始。用30%哌啶的DMF溶液将Fmoc基团在两个连续的相中进行水解3min和7min。然后以列出的顺序对下列化合物进行反应:Fmoc-Phe-OH(0.581g),Fmoc-Arg(Pbf)-OH(0.974g),Fmoc-Glu(OtBu)-OH(0.638g),Fmoc-Arg(Pbf)-OH(0.974g)和乙酸(0.090g)。

[0044] 酰基化作用的持续时间是1h;随后洗涤树脂并以Kaiser茚三酮测定法测试反应。如果反应是阴性的,则在下一个氨基酸偶联之前将Fmoc基团按如上所述进行水解。通过将1.5mmol氨基酸溶解于4ml DMF中,并与活化剂混合物一起加入到去保护的树脂中而偶联所有氨基酸,所述混合物由含0.780g PyBop的2ml DMF溶液、含0.230g HOBT的2ml DMF溶液和250ml DIEA溶液组成。为了将肽从树脂上分离并同时侧链去保护,将干燥树脂置于反应器中,向所述反应器中加入重量比为9:0.5:0.3:0.2的TFA,苯硫基甲烷,巯基乙醇和茴香醚的溶液20ml。将反应混合物在搅动下放置2h。将过滤物减少到小体积并通过用醚沉淀抽提肽。将沉淀物溶于水并冻干。最后,通过反相色谱纯化肽并通过分析型HPLC进行表征,使用Vydac C18 0.46 $\times$ 25cm柱,在35min内,以1ml/min的流速,相对于0.1%(v/v)水性三氟乙酸(相A),用包含0.1%(v/v)三氟乙酸的乙腈(B相)的从5到70%的线性梯度进行洗脱,在210nm用UV检测。停留时间(Rt)=11.8min.;色谱纯度>99%。FAB-MS:(MH)<sup>+</sup>=650。

[0045] 实施例2

[0046] 式I的化合物PICM2的制备,其中L1是pGlu,X<sub>1</sub>和X<sub>3</sub>是Arg,X<sub>2</sub>是Glu和X<sub>4</sub>是

Tyr。所以 PICM2 的 % 式为 pGlu-Arg-Glu-Arg-Tyr-OH。

[0047] 使用自动肽合成仪进行合成,以相当于 0.5mmol 胺基的 2.5gFmoc-Tyr(tBu)-Novasyn-TGA 树脂 (0.2meq/g) 起始。用 30% 哌啶的 DMF 溶液将 Fmoc 基团在两个连续的相中进行水解 3min 和 7min。然后以列出的顺序对下列氨基酸进行反应: Fmoc-Arg(Pbf)-OH(0.974g), Fmoc-Glu(OtBu)-OH(0.638g), Fmoc-Arg(Pbf)-OH(0.974g) 和 Fmoc-pGlu-OH(0.638g)。

[0048] 酰基化作用的持续时间是 1h; 随后洗涤树脂并以 Kaiser 茚三酮测定法测试反应。如果反应是阴性的,则在下一个氨基酸偶联之前将 Fmoc 基团按如上所述进行水解。通过将 1.5mmol 氨基酸溶解于 4ml DMF 中,并与活化剂混合物一起加入到去保护的树脂中而偶联所有氨基酸,所述混合物由含 0.780g PyBop 的 2ml DMF 溶液,含 0.230g HOBT 的 2ml DMF 溶液和 250ml DIEA 溶液组成。为了将肽从树脂上分离并将侧链同时去保护,将干燥树脂置于反应器中,向所述反应器中加入重量比为 9 : 0.5 : 0.3 : 0.2 的 TFA, 苯硫基甲烷, 巯基乙醇和茴香醚的溶液 20ml。将反应混合物在搅动下放置 2h。将过滤物减少到小体积并通过用醚沉淀抽提肽。将沉淀物溶于水并冻干。最后,通过反相色谱纯化肽并通过分析性 HPLC 进行表征,使用 Vydac C18 0.46×25cm 柱,在 35min 内,以 1ml/min 的流速,相对于 0.1% (v/v) 水性三氟乙酸 (相 A),用包含 0.1% (v/v) 三氟乙酸的乙腈 (B 相) 的从 5 到 70% 的线性梯度进行洗脱,在 B 中,在 210nm 用 UV 检测。停留时间 (Rt) = 12.8min; 色谱纯度 > 99%。FAB-MS : (MH)<sup>+</sup> = 589。

[0049] 实施例 3

[0050] 用实施例 1 和 2 中所述的方法合成的肽的序列和特征数据。

[0051] 表 1 显示用实施例 1 中所述的方法合成的一系列肽的序列和特征数据,所述肽由 PICM3 到 PICM39 和 PICM54 到 PICM67 组成,以及用实施例 2 中所述的方法合成的一系列肽的序列和特征数据,所述肽由 PICM40 到 PICM53 组成,根据常用肽合成方法适当地调整以用于特异性序列合成。

[0052] 表 1- 根据本发明的肽序列的例子及其特征

[0053]

名称	L1	X1	X2	X3	X4	Rt(min)	MH <sup>+</sup>
PICM3	Glu	Arg	Glu	Arg	Phe-NH <sub>2</sub>	12.6	736
PICM4	Ace	Arg	Glu	Arg	Tyr-NH <sub>2</sub>	13.1	666
PICM5	Ace	Arg	Glu	Arg	Trp-NH <sub>2</sub>	14.3	689
PICM6	Ace	Arg	Glu	N(Me)Arg	Phe-NH <sub>2</sub>	12.9	664
PICM7	Ace	Arg	Glu	N(Me)Arg	Tyr-NH <sub>2</sub>	13.4	680
PICM8	Ace	Arg	Glu	N(Me)Arg	Trp-NH <sub>2</sub>	14.6	703
PICM9	pGlu	Arg	Glu	N(Me)Arg	Phe-NH <sub>2</sub>	12.7	732

PICM10	pGlu	Arg	Glu	N(Me)Arg	Tyr-NH <sub>2</sub>	13.2	748
PICM11	pGlu	Arg	Glu	N(Me)Arg	Trp-NH <sub>2</sub>	14.4	771
PICM12	pGlu	Arg	Glu	Arg	Phe-NH <sub>2</sub>	12.4	718
PICM13	pGlu	Arg	Glu	Arg	Tyr-NH <sub>2</sub>	12.8	734
PICM14	pGlu	Arg	Glu	Arg	Trp-NH <sub>2</sub>	14.0	757
PICM15	Ace	Arg	Aib	Arg	Phe-NH <sub>2</sub>	15.5	606
PICM16	Ace	Arg	Aib	Arg	Tyr-NH <sub>2</sub>	15.2	622
PICM17	Ace	Arg	Aib	Arg	Trp-NH <sub>2</sub>	16.4	645
PICM18	Ace-Aib	Arg	Aib	Arg	Phe-NH <sub>2</sub>	17.3	694
PICM19	Ace	Arg	Aib	N(Me)Arg	Phe-NH <sub>2</sub>	18.3	620
PICM20	Ace	Arg	Aib	N(Me)Arg	Tyr-NH <sub>2</sub>	18.1	636
PICM21	Ace	Arg	Aib	N(Me)Arg	Trp-NH <sub>2</sub>	19.3	659
PICM22	pGlu	Arg	Aib	N(Me)Arg	Phe-NH <sub>2</sub>	14.5	688
PICM23	pGlu	Arg	Aib	N(Me)Arg	Tyr-NH <sub>2</sub>	14.2	704
PICM24	pGlu	Arg	Aib	N(Me)Arg	Trp-NH <sub>2</sub>	16.0	727
PICM25	pGlu	Arg	Aib	Arg	Phe-NH <sub>2</sub>	15.4	674

[0054] (续)

[0055]

PICM26	pGlu	Arg	Aib	Arg	Tyr-NH <sub>2</sub>	15.2	690
PICM27	pGlu	Arg	Aib	Arg	Trp-NH <sub>2</sub>	16.6	713
PICM28	Ace	Arg	Ac5c	Arg	Phe-NH <sub>2</sub>	18.5	632
PICM29	Ace	Arg	Ac5c	Arg	Tyr-NH <sub>2</sub>	18.2	648

PICM30	Ace	Arg	Ac5c	Arg	Trp-NH <sub>2</sub>	19.4	671
PICM31	Ace	Arg	Ac5c	N(Me)Arg	Phe-NH <sub>2</sub>	19.3	646
PICM32	Ace	Arg	Ac5c	N(Me)Arg	Tyr-NH <sub>2</sub>	19.1	662
PICM33	Ace	Arg	Ac5c	N(Me)Arg	Trp-NH <sub>2</sub>	20.7	685
PICM34	pGlu	Arg	Ac5c	N(Me)Arg	Phe-NH <sub>2</sub>	17.6	714
PICM35	pGlu	Arg	Ac5c	N(Me)Arg	Tyr-NH <sub>2</sub>	17.4	730
PICM36	pGlu	Arg	Ac5c	N(Me)Arg	Trp-NH <sub>2</sub>	18.4	753
PICM37	pGlu	Arg	Ac5c	Arg	Phe-NH <sub>2</sub>	16.2	700
PICM38	pGlu	Arg	Ac5c	Arg	Tyr-NH <sub>2</sub>	16.0	716
PICM39	pGlu	Arg	Ac5c	Arg	Trp-NH <sub>2</sub>	17.1	739
PICM40	Ace	Arg	Glu	Arg	Phe-OH	11.7	651
PICM41	Ace	Arg	Glu	Arg	Tyr-OH	11.5	667
PICM42	Ace	Arg	Glu	Arg	Trp-OH	12.6	690
PICM43	Ace	Arg	Glu	Arg(Me)	Tyr-OH	12.3	681
PICM44	pGlu	Arg	Glu	Arg(Me)	Phe-OH	12.9	733
PICM45	pGlu	Arg	Glu	Arg	Trp-OH	14.5	572
PICM46	Ace	Arg	Aib	Arg	Phe-OH	15.7	607
PICM47	Ace	Arg	Aib	Arg(Me)	Phe-OH	16.6	621
PICM48	pGlu	Arg	Aib	Arg(Me)	Tyr-OH	14.6	705
PICM49	pGlu	Arg	Aib	Arg	Trp-OH	13.5	714
PICM50	Ace	Arg	Ac5c	Arg	Phe-OH	19.1	633
PICM51	Ace	Arg	Ac5c	Arg(Me)	Tyr-OH	18.9	663
PICM52	pGlu	Arg	Ac5c	Arg(Me)	Trp-OH	21.1	754

PICM53	pGlu	Arg	Ac5c	Arg	Trp-OH	20.3	740
PICM54	Ace	N(Me)Arg	Aib	Arg	Phe-NH <sub>2</sub>	16.5	618
PICM55	Ace	N(Me)Arg	Aib	N(Me)Arg	Phe-NH <sub>2</sub>	21.2	632

[0056] (续)

[0057]

PICM56	Ace	Arg	Aib	N(Me)Arg	Phe-NH <sub>2</sub>	16.6	618
PICM57	Ace	Arg	Aib	Arg	$\alpha$ (Me)Phe-NH <sub>2</sub>	14.3	618
PICM58	Ace	N(Me)Arg	Aib	Arg	$\alpha$ (Me)Phe-NH <sub>2</sub>	15.2	632
PICM59	Ace	N(Me)Arg	Aib	N(Me)Arg	$\alpha$ (Me)Phe-NH <sub>2</sub>	18.3	646
PICM60	Ace	Arg	Aib	N(Me)Arg	$\alpha$ (Me)Phe-NH <sub>2</sub>	19.1	632
PICM61	Ace-Aib	N(Me)Arg	Aib	Arg	Phe-NH <sub>2</sub>	20.6	703
PICM62	Ace-Aib	N(Me)Arg	Aib	N(Me)Arg	Phe-NH <sub>2</sub>	21.5	717
PICM63	Ace-Aib	Arg	Aib	N(Me)Arg	Phe-NH <sub>2</sub>	20.5	703
PICM64	Ace-Aib	Arg	Aib	Arg	$\alpha$ (Me)Phe-NH <sub>2</sub>	15.3	703
PICM65	Ace-Aib	N(Me)Arg	Aib	Arg	$\alpha$ (Me)Phe-NH <sub>2</sub>	16.2	717
PICM66	Ace-Aib	N(Me)Arg	Aib	N(Me)Arg	$\alpha$ (Me)Phe-NH <sub>2</sub>	17.1	731
PICM67	Ace-Aib	Arg	Aib	N(Me)Arg	$\alpha$ (Me)Phe-NH <sub>2</sub>	17.8	717

[0058] 实施例 4

[0059] PICM57 对细胞迁移表现出的剂量依赖型抑制。

[0060] 测试实施例 3 中所述 PICM57 对于人纤维肉瘤 HT1080 细胞的细胞迁移的作用。如文献中所报道的,使用装备了聚碳酸酯滤器的 Boyden 小室,该滤器具有直径 8  $\mu$ m(Nucleopore) 的孔,不含聚乙烯吡咯烷酮,并涂布了 5  $\mu$ g/ml 的玻连蛋白 (Promega) (Carriero 等人, Cancer Res. 59,5307,1999)。将无血清 DMEM(Dulbecco Modified Eagle Medium) 中的  $3 \times 10^4$  细胞留存于 Boyden 小室的上室中。在不断提高浓度的 PICM57 存在下,将下室充满包含 10% FBS(胎牛血清,作为趋化剂的来源)的 DMEM。将细胞于 37°C 在包含 5% CO<sub>2</sub> 的加湿空气中孵育 4h。孵育后,机械去除附于过滤器上表面的细胞,并将附于过滤器下表面的迁移细胞固定在乙醇中,用苏木精染色,并于 200 倍放大下随机选择计数每个过滤器的 10 个视野。将在缺少 PICM57 的情况下响应于 FBS 的定向性迁移取作 100%,以百分比的形式评估 PICM57 对于细胞迁移的作用。数据代表三次独立实验的平均数,每次实验一式两份。PICM57 对 HT1080 细胞趋向 FBS 的迁移的拮抗作用是剂量依赖型的(表 2)。它开始

于 1aM 的浓度,于 1fM 的浓度达到其最大值的 50%,并于 10fM 的浓度达到最大值 (66% 的抑制)。

[0061] 在相同实验条件下评估了在 Metastin[45-54] 存在时 FBS 诱导的迁移 (表 3)。数据表明需要比 PICM57 大 1000 倍的 Metastin[45-54] 浓度 (10nM Metastin[45-54] 对 10fM PICM57),以便获得对趋向 FBS 的定向性迁移的相当水平的抑制。

[0062] 表 2-PICM57 对于由 10% FBS 诱导的人纤维肉瘤 HT1080 细胞的定向性迁移的抑制作用,计算为趋向单独 10% FBS (视为 100%) 的迁移细胞的百分比。

[0063]

PICM57 浓度	0	1 aM	10 aM	100 aM	1 fM	10 fM	100 fM	1 pM	10 pM	100 pM	1 nM	10 nM	100 nM
趋向于 10% FBS 的细胞迁移 (%)	100	69	54	63	43	39	35	37	41	33	37	32	34

[0064] 表 3-PICM57, PICM1 和 Metastin[45-54] 对于由 10% FBS 诱导的 HT1080 细胞的定向性迁移的抑制作用比较,表示为与对照 (10% FBS) 相比迁移细胞的百分比。

[0065]

浓度	Metastin[45-54]	PICM1	PICM57
0	100	100	100
1aM	100	99	70
10aM	83	70	54
10fM	73	56	39
10pM	53	46	36
10nM	56	35	32

[0066] 实施例 5

[0067] PICM1 诱导的对细胞能动性不依赖于细胞系物种或组织发生起源的抑制。

[0068] 采用实施例 4 中所述的 Boyden 小室,并使用 10% FBS 作为趋化剂来源,在 100pM PICM1 存在 / 缺失的情况下,将源自各种组织的人或鼠起源的细胞系进行体外定向性迁移测试。将在缺少 PICM1 的情况下响应于 FBS 的方向性迁移取作 100%,将 PICM1 对于细胞迁移的作用评估为所述值的百分比。数据代表两次独立实验的平均数,每次实验一式两份。在所有测试的细胞系中,观察 PICM1 对于细胞迁移的抑制作用 (表 4)。尽管抑制程度在所用的细胞系之间有所不同,但它从未小于 50%,并且在不对 Metastin 响应的鼠黑素瘤 B16 细胞 (Ohtaki, T. 等人 (2001) Nature 411, 613-617) 中也观察到抑制作用。

[0069] 表 4-PICM1 肽对于由 10% FBS 诱导的人或鼠起源的多种肿瘤细胞系的能动性的抑制作用,表示为与对照 (10% FBS) 相比迁移细胞的百分比。

## [0070]

起源	细胞系名称	组织发生	10% FBS 100pM PICM1
人	MCF-7	乳腺癌	37
人	MDA-MB-231	乳腺癌	47
人	A431	皮肤癌	49
人	HeLa	宫颈腺癌	48
人	U937	单核细胞白血病	39
人	M14	黑素瘤	59
人	HT1080	纤维肉瘤	34
人	Saos2	骨肉瘤	43
鼠	B16	黑素瘤	50

## [0071] 实施例 6

[0072] 用 PICM57 预孵育的细胞的能动性抑制。

[0073] 将人纤维肉瘤 HT1080 细胞与 DMEM, 或与包含 100pM PICM57 的 DMEM 一起孵育 0、15、30、60 或 120min。将该细胞 :a) 用 PBS 洗涤 (磷酸缓冲盐溶液); b) 于 23°C 用 50mM 甘氨酸-HCl 缓冲液 (pH3.0) 洗涤 5 分钟以便从细胞表面除去肽 (Carriero. 等人 Clin. Cancer Res. 8, 1299-1308, 1997), 随后用 PBS 洗涤。将细胞重悬于 DMEM 中并如实施例 4 中所述在 Boyden 小室中进行细胞迁移测试, 使用 10% FBS 作为趋化剂。结果 (表 5) 表示为在缺失 FBS (基础迁移, 取作 100%) 情况下迁移的细胞的百分比。数据代表两次独立实验的平均数, 每次实验一式两份。细胞与 PICM57 的简单预孵育显著降低了它们趋向于 FBS 迁移的能力。15 分钟的接触足以使抑制与实施例 4 中所述的抑制相当。在细胞与 100pMPICM57 接触后酸处理 15 或 30min 完全消除了 PICM57 对于细胞能动性的抑制作用。

[0074] 表 5- 肽 PICM57 对于用 PICM57 预孵育过并接触过 10% FBS 梯度的人纤维肉瘤 HT1080 细胞能动性的抑制作用

预孵育 (min)	细胞迁移 (基础迁移的%)	
	无酸洗涤	有酸洗涤
0	100	100
[0075] 0	393	362
15	98	367
30	103	350
60	112	ND
120	120	ND

[0076] 实施例 7

[0077] PICM57 表现出的对细胞能动性的抑制作用是由 FPR 介导的, FPR 对于 fMLP 具有高亲和性的受体。

[0078] 利用缺少对于细菌源 fMLP(N- 甲酰基 -Met-Leu-Phe) 的甲酰基化肽具有高亲和性的受体的大鼠嗜碱性白血病细胞 RBL-2H3, 如实施例 4 中所述在 Boyden 小室中测试肽 PICM57 对于细胞迁移的作用 (Le, Y., Gong, W., Tiffany, H. L., Tumanov, A., Nedospasov, S., Shen, W., Dunlop, N. M., Gao, J. L., Murphy, P. M., Oppenheim, J. J., Wang, J. M. Amyloid(beta)42 activates a G-protein-coupled chemoattractant receptor, FPR-like-1. J. Neurosci. 21, RC123, 2001)。使用 50  $\mu$ g/ml 纤连蛋白或 10nM fMLP 作为趋化剂。结果表示为在缺失 FBS(基础迁移, 取作 100%) 情况下迁移的细胞的百分比。数据代表两次独立实验的平均数, 每次实验一式两份。与文献中报道的结果一致, RBL-2H3 细胞趋向纤连蛋白迁移但不趋向 fMLP 迁移。向趋化性梯度中加入 100pM PICM57 并未减弱纤连蛋白 - 依赖型的细胞迁移 (表 6)。相反地, 用 FPR 的 cDNA(RBL-2H3/ETFR) 稳定转染的 RBL-2H3 细胞获得了在由 10nM fMLP 构成的梯度中迁移的能力。向趋化性梯度中加入 100pM PICM57 并未减弱纤连蛋白依赖型的细胞迁移, 但是将趋向 fMLP 的细胞迁移减弱到基础水平 (表 6)。确定的结论即 PICM57 的靶标是 FPR 源自于以下观察结果, 即在结合测定中, 荧光标记的肽甲酰基 -Nle-Leu-Phe-Nle-Tyr-Lys(分子探针) 结合到 RBL-2H3/ETFR 细胞的表面由细胞与 10  $\mu$ M PICM57 预孵育特异性减弱了 60%。细胞与 10  $\mu$ M Metastatin[45-54] 预孵育并不改变荧光标记的衍生物甲酰基 -Nle-Leu-Phe-Nle-Tyr-Lys 肽与 RBL-2H3/ETFR 细胞表面的结合。

[0079] 表 6-PICM57 表现出的对 RBL-2H3/ETFR 细胞的 fMLP- 依赖型细胞能动性的抑制作用。

[0080]

趋化性	细胞迁移(基础迁移的%)			
	RBL-2H3	RBL-2H3 PICM57	RBL-2H3/ETFR	RBL-2H3/ETFR PICM57
----	100	100	100	100
10 nM fMLP	103	102	270	99
50 $\mu$ g/ml 纤连蛋白	272	275	220	215

[0081] 实施例 8

[0082] PICM57 对细胞增殖的作用。

[0083] 利用 96 孔板在 100pM 或 100nM PICM57 存在 / 缺失的情况下, 将人纤维肉瘤 HT1080 细胞 ( $1 \times 10^3$  细胞 / 孔) 接种在含 10% FBS 的 DMEM 中。在 24、48、72 或 96h, 除去未附着的细胞, 在用 PBS 反复漂洗后, 固定附着到板上的细胞并随后用包含 1mg/ml MTT (3-(4,5-二甲基噻唑基-2)-2,5-二苯基四唑溴化物, Sigma) 的无菌溶液于 37°C 染色 4h。随后用 100  $\mu$ l 二甲基亚砷除去染色并于 540nm 通过分光光度计读取相应的光学密度。在检查的任何时间两种浓度上 PICM57 的存在都没有改变 HT1080 细胞的增殖指数 (复制时间大约 18h) (表 7)。当连续 4 天每天除去培养基并向细胞中加入新鲜 10% FBS/PICM57 溶液时, 在并行的实验中获得相同结果。

[0084] 表 7- 肽 PICM57 对于人纤维肉瘤 HT1080 细胞的 FBS 依赖型增殖的作用, 通过分光光度计光学密度读数来评估 ( $\lambda$ : 540nm)。

[0085]

时间 (h)	FBS (OD)	FBS/100pM PICM57 (OD)	FBS/100pM PICM57 每 24h 达到的 (OD)	FBS/100nM PICM57 (OD)	FBS/100nM PICM57 每 24h 达到的 (OD)
48	0.5	0.45	0.51	0.53	0.56
72	0.94	0.92	1.07	1.05	1
96	2.1	2.02	2.3	2.18	2.2

[0086] 实施例 9

[0087] PICM1 和 PICM57 对于人纤维肉瘤 HT1080 细胞侵袭性的作用。

[0088] 用 Boyden 小室进行体外细胞侵袭测试, 所述 Boyden 小室使用无聚乙烯吡咯烷酮的滤器, 具有直径 8  $\mu$ m (Nucleopore) 的孔, 涂布有 70  $\mu$ g / 滤器的基质胶和包含作为趋化剂的 10% FBS 的 DMEM (Silvestri 等人 Int. J. Cancer 102, 562-571, 2002)。将人纤维肉瘤 HT1080 细胞 ( $2 \times 10^5$  细胞 / 样品) 留存在 Boyden 小室的上室的无血清培养基中。所述小室的下室包含 DMEM, 所述 DMEM 加入 10% FBS 作为趋化剂的来源, 并且包含于指定浓度进行测试的待测定肽。将由此装配的所述小室于 37°C 置于包含 5% CO<sub>2</sub> 的加湿环境中。18hr 后, 将已经穿过基质胶并附于滤器下表面的细胞固定, 染色并计数。数据代表两次独立实验的平均数, 每次实验一式两份。在表 8 中给出的结果, 表示为在存在 FBS 但缺失肽的情况下

(100%) 侵袭基质胶的细胞百分比。PICM1 和 PICM57 对于 HT1080 细胞侵袭性的抑制作用是剂量依赖型的。

[0089] 表 8-PICM1 和 PICM57 对由 10% FBS 诱导的人纤维肉瘤 HT1080 细胞侵袭的剂量响应性抑制作用。

趋向于 10% FBS 的细胞侵袭(%)		
肽浓度	PICM1	PICM57
0	100	100
1 aM	100	69
10 aM	101	59
10 fM	62	41
10 pM	55	37
10 nM	44	31

[0090]

[0091] 实施例 10

[0092] 体外 PICM1 和 PICM57 对于新血管发生的抑制作用。

[0093] 通过利用内皮细胞在原血管发生因子存在的情况下形成索状组织的能力来进行体外新血管发生测试,所述索状组织在多聚化的基质胶层上延伸形成微管网络。对于这种类型的测定,将  $5 \times 10^4$  HUVEC 细胞 (Human Umbilical Vein Endothelial Cells, 人脐带静脉内皮细胞) 接种在 24-孔板中,其中留有  $300 \mu\text{l}$  基质胶在用作原血管发生剂的  $40\text{ng/ml}$  VEGF (血管内皮生长因子),以及不同浓度的指定的肽存在时聚合。在  $5\% \text{CO}_2$  中于  $37^\circ\text{C}$  孵育 18 小时后,通过用倒置显微镜在随机选择的至少 5 个视野中计数微管结构的数目来评估微管形成。肽对于 VEGF 依赖型微管形成活性的作用计算为在 VEGF 存在时计数的微管结构的数目 (取作 100%) 的百分比。数据 (表 9) 代表两次实验的平均数,每次实验一式两份。体外 PICM1 和 PICM57 对于新血管发生的拮抗作用是剂量依赖型的。这种作用起始于浓度 aM 并于 pM 浓度达到峰值 (计数的微管结构数目的 20%); 于 fM 浓度达到最大作用的 50%。通过比较的方式显示了由 50nM 内皮他汀表现的抗血管发生作用以及由 metastatin [45-54] 表现的低抑制作用。

[0094] 表 9-PICM1 和 PICM57 对于 HUVEC 内皮细胞的 VEGF 依赖型微管形成活性的剂量依赖型抑制作用。

[0095]

VEGF-依赖型微管形成活性 (%)				
肽浓度	PICM57	PICM1	内皮他汀	Metastin[45-54]
0	100	100	ND	100
1 aM	96	104	ND	ND
10 aM	75	77	ND	ND
10 fM	53	65	ND	90
10 pM	23	30	ND	63
10 nM	19	22	30	65

[0096] 实施例 11

[0097] PICM57 的毒性

[0098] PICM57 对小鼠的急性毒性测试表明 LD50 为 30mg/Kg, 集中在 28mg/Kg (所有动物存活) 和 32mg/Kg (所有动物死亡) 的区间。PICM57 对大鼠的急性毒性测试表明 LD50 为 65mg/Kg, 集中在 58mg/Kg (所有动物存活) 和 70mg/Kg (所有动物死亡) 的区间。

[0099] 实施例 12

[0100] 体内抗转移作用

[0101] 在动物模型上评估 PICM1 的抗转移效力。将在实验模型中引发肺部转移的  $2 \times 10^6$  人纤维肉瘤 HT1080 细胞 (Schweinitz A 等人, J. Biol. Chem. 279 :33613, 2004), 悬浮在生理盐水溶液中并注射入 20 只 7 周龄的 CD1 裸小鼠尾部静脉中。接种肿瘤细胞 24 小时后, 每 48h 缓慢注射溶于 100l 生理盐水溶液中的 3mg/Kg PICM1 来处理 10 只动物的组, 动物固定不动。10 只对照动物接受相同的注射处理, 但是只用生理盐水溶液注射。每天对每只动物称重并观察呼吸困难情况。22 天后对照动物显示明显的呼吸困难症状。处死所有处理的和对照动物, 并进行尸体解剖。将肺、肝、肾、脾和心脏进行肉眼和显微分析。除了肺部以外, 对照或经处理动物的器官没有检查出任何组织形态学变化。不过, 肺部的肉眼分析显示在对照动物中有大量的胸膜下新生物, 经常伴随有坏死和出血特征, 这在经处理的动物中未观察到。在显微水平上, 对照动物的肺部解剖的连续切片显示平均 45% 的实质区域由转移性节结所占据, 经常是血管周边, 有中心坏死区域。相反地, 在显微水平上观察发现用 3mg/Kg PICM1 处理的动物没有显示转移的出现。

## 序列表

<110> 玛丽亚·温琴扎·卡列罗  
马里奥·德罗萨  
温琴佐·帕沃纳

<120> 具有药学活性的肽

<130>1066PCT

<160>65

<170>PatentIn version 3.3

<210>1

<211>5

<212>PRT

<213> 合成的肽

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(5)..(5)

<223> 酰胺化作用

<400>1

Glu Arg Glu Arg Phe

1 5

<210>2

<211>4

<212>PRT

<213> 合成的肽

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(1)..(1)

<223> 乙酰化作用

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(4)..(4)

<223> 酰胺化作用

<400>2

Arg Glu Arg Tyr

1

<210>3

<211>4

<212>PRT

<213> 合成的肽

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(1)..(1)

<223> 乙酰化作用

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(4)..(4)

<223> 酰胺化作用

<400>3

Arg Glu Arg Trp

1

<210>4

<211>4

<212>PRT

<213> 合成的肽

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(1)..(1)

<223> 乙酰化作用

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(3)..(3)

<223>X 是 N(Me)Arg

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(4)..(4)

<223> 酰胺化作用

<400>4

Arg Glu Xaa Phe

1

<210>5

<211>4

<212>PRT

<213> 肽

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(1)..(1)

<223> 乙酰化作用

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(3)..(3)

<223>X 是 N(Me)Arg

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(4)..(4)

<223> 酰胺化作用

<400>5

Arg Glu Xaa Tyr

1

<210>6

<211>4

<212>PRT

<213> 肽

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(1)..(1)

<223> 乙酰化作用

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(3)..(3)

<223>X 是 N(Me)Arg

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(4)..(4)

<223> 酰胺化作用

<400>6

Arg Glu Xaa Trp

1

<210>7

<211>5

<212>PRT

<213> 肽

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(1)..(1)

<223>X 是 pGlu

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(3)..(3)

<223>X 是 N(Me)Arg

<220>

<221>misc\_feature

<222>(4)..(4)

<223>Xaa 可以是任何天然发生的氨基酸

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(5)..(5)

<223> 酰胺化作用

<400>7

Xaa Arg Glu Xaa Phe

1 5

<210>8

<211>5

<212>PRT

<213> 肽

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(1).. (1)

<223>X 是 pGlu

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(3).. (3)

<223>X 是 N(Me)Arg

<220>

<221>misc\_feature

<222>(4).. (4)

<223>Xaa 可以是任何天然发生的氨基酸

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(5).. (5)

<223> 酰胺化作用

<400>8

Xaa Arg Glu Xaa Tyr

1 5

<210>9

<211>5

<212>PRT

<213> 肽

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(1).. (1)

<223>X 是 pGlu

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(3).. (3)

<223>X 是 N(Me)Arg

<220>

<221>misc\_feature

<222>(4).. (4)

<223>Xaa 可以是任何天然发生的氨基酸

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(5).. (5)

<223> 酰胺化作用

<400>9

Xaa Arg Glu Xaa Trp

1

5

<210>10

<211>5

<212>PRT

<213> 肽

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(1).. (1)

<223>X 是 pGlu

<220>

<221>misc\_feature

<222>(4).. (4)

<223>Xaa 可以是任何天然发生的氨基酸

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(5).. (5)

<223> 酰胺化作用

<400>10

Xaa Arg Glu Xaa Phe

1 5

<210>11

<211>5

<212>PRT

<213> 肽

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(1)..(1)

<223>X 是 pGlu

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(5)..(5)

<223> 酰胺化作用

<400>11

Xaa Arg Glu Arg Tyr

1 5

<210>12

<211>5

<212>PRT

<213> 肽

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(1)..(1)

<223>X 是 pGlu

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(5)..(5)

<223> 酰胺化作用

<400>12

Xaa Arg Glu Arg Trp

1 5

<210>13

<211>4

<212>PRT

<213> 肽

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(1)..(1)

<223> 乙酰化作用

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(2)..(2)

<223>Aib

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(4)..(4)

<223>Aib

<400>13

Arg Xaa Arg Phe

1

<210>14

<211>4

<212>PRT

<213> 肽

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(1)..(1)

<223> 乙酰化作用

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(2).. (2)

<223>Aib

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(4).. (4)

<223> 酰胺化作用

<400>14

Arg Xaa Arg Tyr

1

<210>15

<211>4

<212>PRT

<213> 肽

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(1).. (1)

<223> 乙酰化作用

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(2).. (2)

<223>Aib

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(4).. (4)

<223> 酰胺化作用

<400>15

Arg Xaa Arg Trp

1

<210>16

<211>5

<212>PRT

<213> 肽

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(1).. (1)

<223> 乙酰化作用

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(1).. (1)

<223>Aib

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(3).. (3)

<223>Aib

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(5).. (5)

<223> 酰胺化作用

<400>16

Xaa Arg Xaa Arg Phe

1

5

<210>17

<211>4

<212>PRT

<213> 肽

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(1).. (1)

<223> 乙酰化作用

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(2).. (2)

<223>Aib

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(3)..(3)

<223>X 是 N(Me)Arg

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(4)..(4)

<223> 酰胺化作用

<400>17

Arg Xaa Arg Phe

1

<210>18

<211>4

<212>PRT

<213> 肽

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(1)..(1)

<223> 乙酰化作用

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(2)..(2)

<223>Aib

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(3)..(3)

<223>X 是 N(Me)Arg

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(4)..(4)

<223> 酰胺化作用

<400>18

Arg Xaa Xaa Tyr

1

<210>19

<211>4

<212>PRT

<213> 肽

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(1).. (1)

<223> 乙酰化作用

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(2).. (2)

<223>Aib

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(3).. (3)

<223>X 是 N(Me)Arg

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(4).. (4)

<223> 酰胺化作用

<400>19

Arg Xaa Xaa Trp

1

<210>20

<211>5

<212>PRT

<213> 肽

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(1).. (1)

<223>X 是 pGlu

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(3).. (3)

<223>Aib

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(4).. (4)

<223>X 是 N(Me)Arg

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(5).. (5)

<223> 酰胺化作用

<400>20

Xaa Arg Xaa Xaa Phe

1

5

<210>21

<211>5

<212>PRT

<213> 肽

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(1).. (1)

<223>X 是 pGlu

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(3).. (3)

<223>Aib



Xaa Arg Xaa Xaa Trp  
1 5

<210>23

<211>5

<212>PRT

<213> 肽

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(1).. (1)

<223>pGlu

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(3).. (3)

<223>Aib

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(5).. (5)

<223> 酰胺化作用

<400>23

Xaa Arg Xaa Arg Phe  
1 5

<210>24

<211>5

<212>PRT

<213> 肽

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(1).. (1)

<223>pGlu

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(3).. (3)

<223>Aib

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(5)..(5)

<223> 酰胺化作用

<400>24

Xaa Arg Xaa Arg Tyr

1 5

<210>25

<211>5

<212>PRT

<213> 肽

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(1)..(1)

<223>pGlu

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(3)..(3)

<223>Aib

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(5)..(5)

<223> 酰胺化作用

<400>25

Xaa Arg Xaa Arg Trp

1 5

<210>26

<211>4

<212>PRT

<213> 肽

<220>

<221>MOD\_RES  
<222>(1).. (1)  
<223> 乙酰化作用

<220>  
<221>MOD\_RES  
<222>(2).. (2)  
<223>Ac5c

<220>  
<221>MOD\_RES  
<222>(4).. (4)  
<223> 酰胺化作用

<400>26  
Arg Xaa Arg Phe  
1

<210>27  
<211>4  
<212>PRT  
<213> 肽

<220>  
<221>MOD\_RES  
<222>(1).. (1)  
<223> 乙酰化作用

<220>  
<221>MOD\_RES  
<222>(2).. (2)  
<223>Ac5c

<220>  
<221>MOD\_RES  
<222>(4).. (4)  
<223> 酰胺化作用

<400>27

Arg Xaa Arg Tyr

1

<210>28

<211>4

<212>PRT

<213> 肽

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(1).. (1)

<223> 乙酰化作用

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(2).. (2)

<223>Ac5c

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(4).. (4)

<223> 酰胺化作用

<400>28

Arg Xaa Arg Trp

1

<210>29

<211>4

<212>PRT

<213> 肽

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(1).. (1)

<223> 乙酰化作用

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(2).. (2)

<223>Ac5c

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(3).. (3)

<223>N(Me) Arg

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(4).. (4)

<223> 酰胺化作用

<400>29

Arg Xaa Xaa Phe

1

<210>30

<211>4

<212>PRT

<213> 肽

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(1).. (1)

<223> 乙酰化作用

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(2).. (2)

<223>Ac5c

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(3).. (3)

<223>N(Me) Arg

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(4).. (4)

<223> 酰胺化作用

<400>30

Arg Xaa Xaa Tyr

1

<210>31

<211>4

<212>PRT

<213> 肽

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(1).. (1)

<223> 乙酰化作用

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(2).. (2)

<223>Ac5c

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(3).. (3)

<223>N(Me)Arg

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(4).. (4)

<223> 酰胺化作用

<400>31

Arg Xaa Xaa Trp

1

<210>32

<211>5

<212>PRT

<213> 肽

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(1)..(1)

<223>pGlu

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(3)..(3)

<223>Ac5c

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(4)..(4)

<223>N(Me)Arg

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(5)..(5)

<223> 酰胺化作用

<400>32

Xaa Arg Xaa Xaa Phe

1

5

<210>33

<211>5

<212>PRT

<213> 肽

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(1)..(1)

<223> 乙酰化作用

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(3)..(3)

<223>Ac5c

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(4)..(4)

<223>N(Me)Arg

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(5)..(5)

<223> 酰胺化作用

<400>33

Xaa Arg Xaa Xaa Tyr

1

5

<210>34

<211>5

<212>PRT

<213> 肽

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(1)..(1)

<223>pGlu

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(3)..(3)

<223>Ac5c

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(4)..(4)

<223>N(Me)Arg

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(5)..(5)

<223> 酰胺化作用

<400>34

Xaa Arg Xaa Xaa Trp

1 5

<210>35

<211>5

<212>PRT

<213> 肽

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(1).. (1)

<223>pGlu

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(3).. (3)

<223>Ac5c

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(5).. (5)

<223> 酰胺化作用

<400>35

Xaa Arg Xaa Arg Phe

1 5

<210>36

<211>5

<212>PRT

<213> 肽

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(1).. (1)

<223>pGlu

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(3).. (3)

<223>Ac5c

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(5)..(5)

<223> 酰胺化作用

<400>36

Xaa Arg Xaa Arg Tyr

1

5

<210>37

<211>5

<212>PRT

<213> 肽

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(1)..(1)

<223>pGlu

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(3)..(3)

<223>Ac5c

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(5)..(5)

<223> 酰胺化作用

<400>37

Xaa Arg Xaa Arg Trp

1

5

<210>38

<211>4

<212>PRT

<213> 肽

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(1).. (1)

<223> 乙酰化作用

<400>38

Arg Glu Arg Phe

1

<210>39

<211>4

<212>PRT

<213> 肽

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(1).. (1)

<223> 乙酰化作用

<400>39

Arg Glu Arg Tyr

1

<210>40

<211>4

<212>PRT

<213> 肽

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(1).. (1)

<223> 乙酰化作用

<400>40

Arg Glu Arg Trp

1

<210>41

<211>4

<212>PRT

<213> 肽

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(1).. (1)

<223> 乙酰化作用

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(3).. (3)

<223>N(Me)Arg

<400>41

Arg Glu Xaa Tyr

1

<210>42

<211>5

<212>PRT

<213> 肽

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(1).. (1)

<223>pGlu

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(4).. (4)

<223>Arg(Me)

<400>42

Xaa Arg Glu Xaa Phe

1

5

<210>43

<211>5

<212>PRT

<213> 肽

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(1).. (1)

<223>pGlu

<400>43

Xaa Arg Glu Arg Trp

1 5

<210>44

<211>4

<212>PRT

<213> 肽

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(1).. (1)

<223> 乙酰化作用

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(2).. (2)

<223>Aib

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(3).. (3)

<223>Arg(Me)

<400>44

Arg Xaa Xaa Phe

1

<210>45

<211>4

<212>PRT

<213> 肽

<220>

<221>MOD\_RES  
<222>(1).. (1)  
<223>乙酰化作用

<220>  
<221>MOD\_RES  
<222>(2).. (2)  
<223>Aib

<220>  
<221>MOD\_RES  
<222>(3).. (3)  
<223>Arg(Me)

<400>45  
Arg Xaa Xaa Phe  
1

<210>46  
<211>5  
<212>PRT  
<213>肽

<220>  
<221>MOD\_RES  
<222>(1).. (1)  
<223>pGlu

<220>  
<221>MOD\_RES  
<222>(3).. (3)  
<223>Aib

<220>  
<221>MOD\_RES  
<222>(4).. (4)  
<223>Arg(Me)

<400>46

Xaa Arg Xaa Xaa Tyr  
1 5

<210>47

<211>5

<212>PRT

<213> 肽

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(1).. (1)

<223>pGlu

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(3).. (3)

<223>Aib

<400>47

Xaa Arg Xaa Arg Trp  
1 5

<210>48

<211>4

<212>PRT

<213> 肽

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(1).. (1)

<223> 乙酰化作用

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(2).. (2)

<223>Ac5c

<400>48

Arg Xaa Arg Phe

1

<210>49

<211>4

<212>PRT

<213> 肽

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(1).. (1)

<223> 乙酰化作用

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(2).. (2)

<223>Ac5c

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(3).. (3)

<223>Arg(Me)

<400>49

Arg Xaa Xaa Tyr

1

<210>50

<211>5

<212>PRT

<213> 肽

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(1).. (1)

<223>pGlu

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(3).. (3)

<223>Ac5c

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(4)..(4)

<223>Arg(Me)

<400>50

Xaa Arg Xaa Xaa Trp

1 5

<210>51

<211>5

<212>PRT

<213>肽

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(1)..(1)

<223>pGlu

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(3)..(3)

<223>Ac5c

<400>51

Xaa Arg Xaa Arg Trp

1 5

<210>52

<211>4

<212>PRT

<213>肽

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(1)..(1)

<223>乙酰化作用

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(1).. (1)

<223>N(Me)Arg

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(2).. (2)

<223>Aib

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(4).. (4)

<223> 酰胺化作用

<400>52

Xaa Xaa Arg Phe

1

<210>53

<211>4

<212>PRT

<213> 肽

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(1).. (1)

<223> 乙酰化作用

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(1).. (1)

<223>N(Me)Arg

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(2).. (2)

<223>Aib

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(3).. (3)

<223>N(Me)Arg

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(4).. (4)

<223> 酰胺化作用

<400>53

Xaa Xaa Xaa Phe

1

<210>54

<211>4

<212>PRT

<213> 肽

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(1).. (1)

<223> 乙酰化作用

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(2).. (2)

<223>Aib

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(3).. (3)

<223>N(Me)Arg

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(4).. (4)

<223> 酰胺化作用

<400>54

Arg Xaa Xaa Phe

1

<210>55

<211>4

<212>PRT

<213> 肽

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(1).. (1)

<223> 乙酰化作用

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(2).. (2)

<223>Aib

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(4).. (4)

<223>  $\alpha$  (Me)Phe

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(4).. (4)

<223> 酰胺化作用

<400>55

Arg Xaa Arg Xaa

1

<210>56

<211>4

<212>PRT

<213> 肽

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(1).. (1)

<223> 乙酰化作用

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(1).. (1)

<223>N(Me)Arg

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(2).. (2)

<223>Aib

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(3).. (3)

<223>N(Me)Arg

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(4).. (4)

<223> $\alpha$  . (Me)Phe

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(4).. (4)

<223> 酰胺化作用

<400>56

Xaa Xaa Arg Xaa

1

<210>57

<211>4

<212>PRT

<213> 肽

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(1).. (1)

<223> 乙酰化作用

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(1).. (1)

<223>N(Me)Arg

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(2)..(2)

<223>Aib

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(3)..(3)

<223>N(Me)Arg

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(4)..(4)

<223> $\alpha$  (Me)Phe

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(4)..(4)

<223> 酰胺化作用

<400>57

Xaa Xaa Xaa Xaa

1

<210>58

<211>4

<212>PRT

<213> 肽

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(1)..(1)

<223> 乙酰化作用

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(2)..(2)

<223>Aib

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(3)..(3)

<223>N(Me)Arg

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(4)..(4)

<223> $\alpha$  (Me)Phe

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(4)..(4)

<223> 酰胺化作用

<400>58

Arg Xaa Xaa Xaa

1

<210>59

<211>5

<212>PRT

<213> 肽

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(1)..(1)

<223> 乙酰化作用

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(1)..(1)

<223>Aib

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(2)..(2)

<223>N(Me)Arg

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(3)..(3)

<223>Aib

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(4)..(4)

<223> 酰胺化作用

<400>59

Xaa Xaa Xaa Arg Phe

1

5

<210>60

<211>5

<212>PRT

<213> 肽

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(1)..(1)

<223> 乙酰化作用

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(1)..(1)

<223>Aib

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(2)..(2)

<223>N(Me)Arg

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(3)..(3)

<223>Aib

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(4).. (4)

<223>N(Me)Arg

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(5).. (5)

<223> 酰胺化作用

<400>60

Xaa Xaa Xaa Xaa Phe

1

5

<210>61

<211>5

<212>PRT

<213> 肽

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(1).. (1)

<223> 乙酰化作用

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(1).. (1)

<223>Aib

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(3).. (3)

<223>Aib

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(4).. (4)

<223>N(Me)Arg

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(5)..(5)

<223> 酰胺化作用

<400>61

Xaa Arg Xaa Xaa Phe

1

5

<210>62

<211>5

<212>PRT

<213> 肽

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(1)..(1)

<223> 乙酰化作用

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(1)..(1)

<223>Aib

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(3)..(3)

<223>Aib

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(4)..(4)

<223>  $\alpha$  (Me)Phe

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(4)..(4)

<223> 酰胺化作用

<220>

<221>misc\_feature

<222>(5)..(5)

<223>Xaa 可以是任何天然发生的氨基酸

<400>62

Xaa Arg Xaa Arg Xaa

1

5

<210>63

<211>5

<212>PRT

<213> 肽

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(1).. (1)

<223> 乙酰化作用

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(1).. (1)

<223>Aib

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(2).. (2)

<223>N(Me)Arg

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(3).. (3)

<223>Aib

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(5).. (5)

<223>  $\alpha$  (Me)Phe

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(5).. (5)

<223> 酰胺化作用

<400>63

Xaa Xaa Xaa Arg Xaa

1

5

<210>64

<211>5

<212>PRT

<213> 肽

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(1).. (1)

<223> 乙酰化作用

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(1).. (1)

<223>Aib

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(2).. (2)

<223>N(Me)Arg

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(3).. (3)

<223>Aib

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(4).. (4)

<223>N(Me)Arg

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(5).. (5)

<223>  $\alpha$  (Me)Phe

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(5).. (5)

<223> 酰胺化作用

<400>64

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

1

5

<210>65

<211>5

<212>PRT

<213> 肽

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(1).. (1)

<223> 乙酰化作用

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(1).. (1)

<223>Aib

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(3).. (3)

<223>Aib

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(4).. (4)

<223>N(Me)Arg

<220>

<221>MOD\_RES

<222>(5).. (5)

<223> α (Me)Phe

<220>

<221>MOD\_RES

<222> (5).. (5)

<223> 酰胺化作用

<400>65

Xaa Arg Xaa Xaa Xaa

1

5