



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101939019 B

(45) 授权公告日 2014. 07. 16

(21) 申请号 200980104457. 4

A61K 38/04 (2006. 01)

(22) 申请日 2009. 02. 06

(56) 对比文件

(30) 优先权数据

61/026, 882 2008. 02. 07 US

US 2007129306 A1, 2007. 06. 07,

LowellBradford B et al..Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes..

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2010. 08. 06

《Science》. 2005, 第 307 卷 (第 5708 期), 384-387.

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2009/033440 2009. 02. 06

Thomas Dolca A et al..Mitochondrial targeting with antioxidant peptide

(87) PCT国际申请的公布数据

W02009/100363 EN 2009. 08. 13

ss-31 prevents mitochondrial

depolarization, reduces islet cell apoptosis, increases islet cell yield, and

(73) 专利权人 康奈尔大学

地址 美国纽约州

专利权人 东卡罗莱娜大学

improve posttransplantation function..

《Journal of the american society of

nephrology》. 2006, 第 18 卷 (第 1 期), 213-222.

(72) 发明人 P·达雷尔·诺伊弗

伊桑·J·安德森 黑兹尔·H·塞托

审查员 于仁涛

(74) 专利代理机构 北京康信知识产权代理有限

责任公司 11240

代理人 李丙林 张英

(51) Int. Cl.

A61K 38/00 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书30页 附图11页

(54) 发明名称

用于预防或治疗胰岛素抵抗性的方法

(57) 摘要

本发明提供在哺乳动物受试者体内预防或治疗胰岛素抵抗性的方法。这些方法包括对该受试者给予有效量的一种芳香族的阳离子肽, 这种肽具有至少一个净正电荷; 最少四个氨基酸; 最多约二十个氨基酸; 在净正电荷的最小数目 (p_m) 与氨基酸残基总数 (r) 之间的一种关系, 其中 $3p_m$ 是小于或等于 $r+1$ 的最大数目; 以及在芳基团的最小数目 (a) 与净正电荷的总数 (p_t) 之间的一种关系, 其中除了在 a 是 1 时 $2a$ 是小于或等于 p_t+1 的最大数目, p_t 还可以是 1。

1. 治疗学上有效量的肽 D-Arg-2' 6' Dmt-Lys-Phe-NH₂ 在用于制备在哺乳动物受试者体内治疗或预防胰岛素抵抗性的药物中的应用。
2. 如权利要求 1 所述的应用,其中该受试者是一个人。
3. 如权利要求 1 所述的应用,其中该受试者正经受饮食诱导的胰岛素抵抗性。
4. 如权利要求 1 所述的应用,其中该胰岛素抵抗性是与 II 型糖尿病相关联的。
5. 如权利要求 1 所述的应用,其中该胰岛素抵抗性是与肥胖症相关联的。
6. 如权利要求 1 所述的应用,其中该胰岛素抵抗性是与冠状动脉疾病、肾功能障碍、动脉硬化、高血脂症、原发性高血压、或脂肪肝相关联的。
7. 如权利要求 1 所述的应用,其中该肽是在 II 型糖尿病发作之前给药的。
8. 如权利要求 1 所述的应用,其中该肽是口服、局部、全身、静脉内、皮下、或肌内给药的。

用于预防或治疗胰岛素抵抗性的方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求 2008 年 2 月 7 日提交的美国临时专利申请号 61/026,882 的优先权, 该文件通过引用全文结合在此。

[0003] 政府权利

[0004] 本发明是在 NIH 拨款 DK073488 和 DK056112 所给予的美国政府支持下作出的。美国政府在本发明中具有一定的权利。

技术领域

[0005] 本发明总体上涉及预防或者治疗胰岛素抵抗性的方法。具体地讲, 本发明涉及以有效量给予芳香族的阳离子肽类以预防或治疗在哺乳动物的骨骼肌组织中的胰岛素抵抗性。

[0006] 背景

[0007] 在此提供了以下说明以帮助读者的理解。所提供的信息或引用的文献并非被承认是本发明的现有技术。

[0008] 肥胖已经成为一种全世界的流行病, 其后果表现为在 21 世纪中面对人类健康的一种主要挑战。骨骼肌对胰岛素的敏感性下降是与肥胖相关联的一种早期的疾病, 并且其持续对于 II 型糖尿病和心血管疾病是一种显著的危险因素。在骨骼肌中脂类的积聚一直与胰岛素抵抗性的发展相关联, 这种胰岛素抵抗性目前归结于促炎性的脂类代谢物 (如脂肪酰基-CoA、甘油二酯、和 / 或神经酰胺) 的产生和细胞内积聚的适应不良应答; 并且与拮抗胰岛素信号的应激敏感性丝氨酸 / 苏氨酸激酶的激活相关联。来自肥胖个体的骨骼肌特征还在于: 通过代谢基因的表达降低、呼吸量减少、以及较小并且较少量的线粒体证明的线粒体功能的显著降低, 从而导致以下推测, 即: 由于获得的或遗传的线粒体不足使氧化脂肪的能力下降可能是在不同代谢情况中发展的脂类积聚和胰岛素抵抗性的一种潜在原因。

[0009] 概述

[0010] 本发明总体上涉及通过对需要它们的受试者给予治疗学上有效量的芳香族的阳离子肽类以便治疗或预防在骨骼肌组织中的胰岛素抵抗性。在多个具体的实施方案中, 这些芳香族的阳离子肽通过减少所发生的骨骼肌线粒体机能障碍和活性氧簇的过量产生来治疗或者预防饮食诱导的胰岛素抵抗性。

[0011] 在一个方面中, 本发明提供治疗或预防在一种哺乳动物受试者体内的胰岛素抵抗性以及相关并发症的方法, 该方法包括对所述哺乳动物受试者给予一个治疗学上有效量的一种芳香族的阳离子肽。在一些实施方案中, 该芳香族的阳离子肽是一种肽, 这种肽具有:

[0012] 至少一个净正电荷;

[0013] 最少四个氨基酸;

[0014] 最多约二十个氨基酸;

[0015] 在该净正电荷的最小数目 (p_m) 与氨基酸残基总数 (r) 之间的一种关系, 其中 $3p_m$ 是小于或等于 $r+1$ 的最大数目; 以及在芳基的最小数目 (a) 与净正电荷的总数 (p_t) 之间的

一种关系,其中除了在 a 是 1 时 2a 是小于或等于 p_t+1 的最大数目, p_t 还可以是 1。在多个具体实施方案中,这种哺乳动物受试者是人。

[0016] 在一个实施方案中, $2p_m$ 是小于或等于 $r+1$ 的最大数目,并且可以等于 p_t 。这种芳香族的阳离子肽可以是一种水溶性的肽,该肽具有最少两个或者最少三个正电荷。

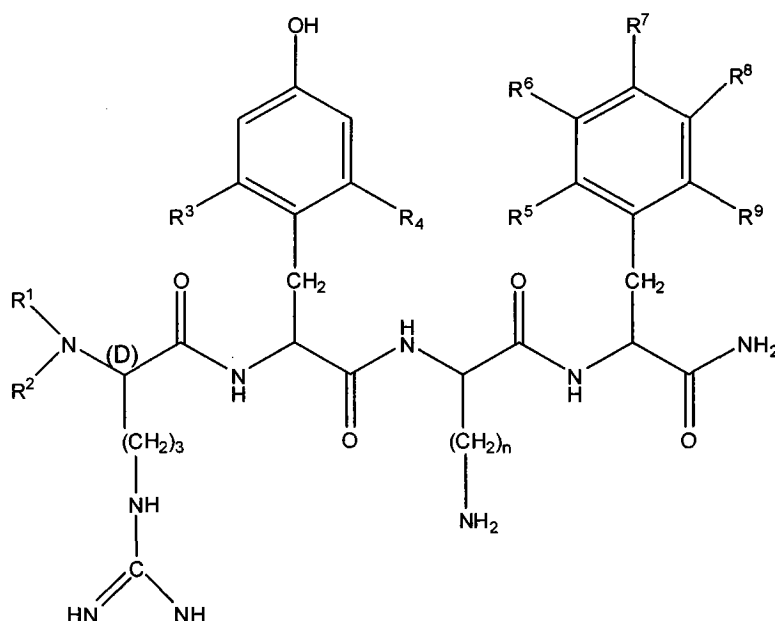
[0017] 在一个实施方案中,这种肽包括一种或多种非自然发生的氨基酸,例如一种或多种 D-氨基酸。在一些实施方案中,在 C 端的该氨基酸的 C-端羧基是酰胺化的。在某些实施方案中,该肽具有最少四个氨基酸。该肽可以具有最大数约为 6、最大数约为 9、或最大数约为 12 个氨基酸。

[0018] 在一些实施方案中,这种肽具有阿片样物质受体促效剂活性。在其他实施方案中,这种肽不具有阿片样物质受体促效剂活性。

[0019] 在一个实施方案中,这种肽在 N 端包括一种酪氨酸或一种 2',6'-二甲基酪氨酸 (Dmt) 残基。例如,这种肽可以具有化学式 Tyr-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ (SS-01) 或 2',6'-Dmt-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ (SS-02)。在一个实施方案中,这种肽在 N 端包括一种苯丙氨酸或一种 2',6'-二甲基苯丙氨酸残基。例如,这种肽可以具有化学式 Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ (SS-20) 或 2',6'-Dmt-D-Arg-Phe-Lys-NH₂。在一种具体的实施方案中,该芳香族的阳离子肽具有化学式: D-Arg-2',6'-Dmt-Lys-Phe-NH₂ (SS-31)。

[0020] 在一个实施方案中,该肽是由化学式 I 定义的:

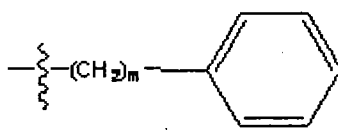
[0021]



[0022] 其中 R^1 和 R^2 是各自独立地选自:

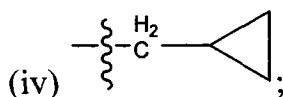
[0023] (i) 氢;

[0024] (ii) 直链的或支链的 C_1 - C_6 烷基;

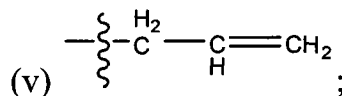
[0025] (iii)  其中 $m = 1-3$;

[0026] ;

[0027]



[0028]

[0029] R^3 和 R^4 是各自独立地选自：

[0030] (i) 氢；

[0031] (ii) 直链的或支链的 C_1 - C_6 烷基；[0032] (iii) C_1 - C_6 烷氧基；

[0033] (iv) 氨基；

[0034] (v) C_1 - C_4 烷氨基；[0035] (vi) C_1 - C_4 二烷氨基；

[0036] (vii) 硝基；

[0037] (viii) 羟基；

[0038] (ix) 卤素，其中“卤素”包括氯、氟、溴、以及碘； R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、以及 R^9 各自是独立地选自：

[0039] (i) 氢；

[0040] (ii) 直链的或支链的 C_1 - C_6 烷基；[0041] (iii) C_1 - C_6 烷氧基；

[0042] (iv) 氨基；

[0043] (v) C_1 - C_4 烷氨基；[0044] (vi) C_1 - C_4 二烷氨基；

[0045] (vii) 硝基；

[0046] (viii) 羟基；

[0047] (ix) 卤素，其中“卤素”包括氯、氟、溴、以及碘；并且 n 是从 1 至 5 的整数。[0048] 在一个具体的实施方案中， R^1 和 R^2 是氢； R^3 和 R^4 是甲基； R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 以及 R^9 全部是氢；并且 n 是 4。

[0049] 在一些实施方案中，本发明的这些芳香族的阳离子肽被用于治疗或者预防在哺乳动物受试者体内胰岛素抵抗性相关的并发症，这些并发症包括但不限于：高胰岛素血、II 型糖尿病、异常脂类代谢、异常血管内皮的功能、视网膜病、冠状动脉病、心血管疾病、肾功能障碍、高血压、脂肪肝、神经病变、以及高尿酸血症。由长期胰岛素抵抗性所引起的潜在性心血管疾病的具体实例包括心肌梗死、出血性或缺血性中风（脑梗死）。

[0050] 本发明的这些芳香族阳离子肽可以用多种方式给药。在一些实施方案中，这些肽可以是口服、局部、鼻内、静脉内、皮下或经皮（如通过离子电渗疗法）给药的。

[0051] 在另一方面，本发明提供一种预防和 / 或治疗糖尿病、肥胖、高脂血、动脉硬化、脑血管疾病、高血压或者心脏病的方法，该方法包括对需要它们的受试者给予一个治疗学上的有效量的芳香族的阳离子肽。在一种具体的实施方案中，该芳香族的阳离子肽包括 D-Ar g-2' 6' Dmt-Lys-Phe-NH₂ (SS-31)。

[0052] 附图简要说明

[0053] 图 1 是一系列曲线图,显示过量饮食脂肪对骨骼肌线粒体 H_2O_2 排放的影响。图 1A 是一个典型的轨迹,该轨迹比较了从饲喂标准食物、高脂肪食物 3 天、或高脂肪食物 3 周的大鼠制备的来自渗透性作用骨骼肌纤维的线粒体 H_2O_2 排放率。图 1B 是一个曲线图,显示在饲喂一种正常饮食的对照大鼠和饲喂一种高脂饮食大鼠中渗透性作用大鼠骨骼肌纤维的线粒体氧化剂的排放潜能。

[0054] 图 2 是一个曲线图,显示在抗霉素 A 存在下从饲喂高脂肪的大鼠制备的骨骼肌纤维中线粒体 H_2O_2 排放(与饲喂对照食物的大鼠相比较)。在抗霉素 A 存在下用丙酮酸酯和苹果酸酯滴定测量了两组的线粒体 H_2O_2 排放。

[0055] 图 3 是一系列图解,显示本发明的 SS-31 肽对肌肉组织的氧化状态的影响。受试者包括饲喂一种正常饮食的大鼠(Ct1)、一种高脂饮食(HF)的大鼠、或一种高脂饮食与每日给予 SS-31(HF+SS-31)的大鼠。图 3A 和 3B 是分别地显示体外和体内 SS-31 抗氧化剂活性的剂量反应曲线的图示。图 3C 和 3D 是显示在饲喂标准食物的对照大鼠、饲喂一种高脂饮食的大鼠、或饲喂一种高脂饮食与每日给予 SS-31 的大鼠中渗透性作用大鼠骨骼肌纤维的线粒体氧化剂排放潜能并且测定琥珀酸酯激发的 H_2O_2 排放(FIG. 3C)以及棕榈酰肉毒碱激发的 H_2O_2 排放(图 3D)的图示。图 3E 和 3F 是显示在饲喂标准食物的对照大鼠、饲喂一种高脂饮食的大鼠、或饲喂一种高脂饮食与每日给予 SS-31 的大鼠的呼吸率的图解。在两种基本(PM_4 、 PCM_4)和最大的 ADP- 激发的(PM_3 、 PCM_3)呼吸状态下用丙酮酸酯和苹果酸酯(图 3E)、或棕榈酰肉毒碱和苹果酸酯(图 3F)测量了呼吸作用。图 3G 是显示在饲喂标准食物的对照大鼠、饲喂一种高脂饮食的大鼠、或饲喂一种高脂饮食与每日给予 SS-31 的大鼠中的总谷胱甘肽的图解。图 3H 是显示在饲喂标准食物的对照大鼠、饲喂一种高脂饮食的大鼠、或饲喂一种高脂饮食与每日给予 SS-31 的大鼠中的 GSH/GSSG 的比率的图解。在摄取口服葡萄糖之前(-)或在摄取口服葡萄糖 1 小时之后(+)进行分析。数据用平均数 $\pm$ S. E. M 表示;n = 4-6, *P < 0.05 对比标准饮食的对照,†P < 0.05 对比 SS-31 处理的。

[0056] 图 4 是一系列图解,显示本发明的 SS-31 肽在肌肉组织中对胰岛素抵抗性的作用。图 4A 是显示在饲喂标准食物的对照大鼠、饲喂一种高脂饮食的大鼠、或饲喂一种高脂饮食与每日给予 SS-31 的大鼠中的血浆葡萄糖清除率的曲线图。图 4B 是显示在相同实验受试者的禁食血浆胰岛素水平的曲线图。图 4C 是显示增加的自我平衡模型评估(HOMA)的图解,并且图 4D 是显示在饲喂标准食物的对照大鼠、饲喂一种高脂饮食的大鼠、或饲喂一种高脂饮食与每日给予 SS-31 的大鼠中的对于葡萄糖与胰岛素二者的更大的曲线下面积(AUC)的图解。数据用平均数 $\pm$ S. E. M 表示;n = 9-10, *P < 0.05 对比标准饮食的对照,†P < 0.05 对比 SS31 处理的。图 4E 是响应于葡萄糖负荷在大鼠骨骼肌匀浆中磷酸化的 Akt 和总的 Akt 的免疫印迹。图 4F 是显示使用光密度测定法对这些印迹的量化的图示。数据用平均数 $\pm$ S. E. M 表示;n = 4-5, ‡P < 0.05 对比非葡萄糖负荷的动物。

[0057] 图 5 是一系列曲线图,显示来自瘦的和肥胖的人类受试者肌肉组织的氧化状况。图 5A 和 5B 是显示从肥胖和瘦的人类男性的股肌获得的活组织检查制备的渗透性作用纤维线粒体 H_2O_2 排放的图示。测量了琥珀酸酯支持的(图 5A)和棕榈酰肉毒碱支持的(图 5B) H_2O_2 二者排放。图 5C 是显示在肥胖样本中与瘦的样本相比较的 H_2O_2 排放/ O_2 消耗的比率的图示。图 5D 是显示在基本(PCM_4)或最大(PCM_3)状况两者之一中在谷氨酸/苹果酸酯(GM_4)、ADP(GM_3)、以及棕榈酰肉毒碱/苹果酸酯存在下呼吸作用的图示。图 5E 是显示在肥胖骨骼

肌与瘦的骨骼肌相比中总的谷胱甘肽 (GSH_t) 的图示。图 5F 是显示在肥胖骨骼肌与瘦的骨骼肌相比中 GSH/GSSG 比率的图示。数据用平均数 $\pm$ S. E. M 表示 ;n = 4-5, *P < 0.05 (与该对应实验中的瘦的男性相比)。

[0058] 详细说明

[0059] 应当理解的是以下通过不同的详细水平描述了本发明的某些方面、方式、实施方案、变化和特征,以便提供对本发明的一种实质性理解。

[0060] 在本发明的实践中,使用了许多在分子生物学、蛋白生物化学、细胞生物学、免疫学、微生物学、以及重组 DNA 的常规方法。这些技术在以下文献中是众所周知的并且对应地说明于:如 Current Protocols in Molecular Biology, Vols. I-III, Ausubel, Ed. (1997); Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989); DNA Cloning: A Practical Approach, Vols. I and II, Glover, Ed. (1985); Oligonucleotide Synthesis, Gait, Ed. (1984); Nucleic Acid Hybridization, Hames & Higgins, Eds. (1985); Transcription and Translation, Hames & Higgins, Eds. (1984); Animal Cell Culture, Freshney, Ed. (1986); Immobilized Cells and Enzymes (IRL Press, 1986); Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning; the series, Meth. Enzymol., (Academic Press, Inc., 1984); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells, Miller & Calos, Eds. (Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1987); and Meth. Enzymol., Vols. 154 and 155, Wu & Grossman, and Wu, Eds. 检测和测量多肽基因表达产物 (即基因翻译水平) 水平的方法在本领域中是众所周知的,并且包括多肽检测方法的使用,比如抗体检测和量化技术。(还见 Strachan & Read, Human Molecular Genetics, Second Edition. (John Wiley and Sons, Inc., NY, 1999))。

[0061] 以下提供了在本说明书中使用的某些术语的定义。除非另外定义,此处所使用的所有技术和科学术语一般具有与本发明所属技术领域普通技术人员通常理解的相同意义。

[0062] 在本说明书和所附的权利要求中使用的单数的形式“一种 / 一个”、以及“该”包括复数指代物,除非内容上清楚的另有所指。例如,提及“一个细胞”包括两个或更多个细胞、以及类似物的一种组合。总体而言,此处所使用的命名法和以下说明的细胞培养、分子遗传学、有机化学、分析化学及核酸化学及杂交中的实验室程序都是本领域所熟知且常用的。

[0063] 如在此使用的,对一个受试者“给予”一种试剂、药物、或者肽包括将一种化合物以任何途径引入或者递送至一个受试者以执行其预期的功能。可以通过任何适当的途径进行给药,包括口服、鼻内、非肠道 (静脉内的、肌内、腹膜内、或者皮下地)、或者局部。给药包括自身给药和该通过他人给药。

[0064] 如在此使用的,术语“生物样品”是指来源于活细胞或接触了活细胞的样品材料。术语“生物样品”是旨在包括从一位受试者连同存在于一位受试者体内的组织、细胞、以及流体分离的组织、细胞、以及生物学流体。本发明的生物样品包括但不限于例如:全血、血浆、精液、唾液、泪液、尿液、排泄物、汗液、口腔物、皮肤、脑脊髓液、以及毛发。还可以从内脏器官的活组织检查或从肿瘤获得生物样品。可以从用于诊断或研究的受试者获得生物样品,或可以从未患病的个体获得生物样品作为对照或用于基础研究。

[0065] 如在此使用的,术语“氨基酸”包括自然发生的氨基酸以及合成的氨基酸,连同那些以类似于这些自然发生的氨基酸的方式发挥作用的氨基酸类似物以及氨基酸模拟物。自

然发生的氨基酸是由遗传密码子编码的氨基酸,连同随后被修饰的那些氨基酸,例如羟基脯氨酸、 γ -羧基谷氨酸酯、以及 O-磷酸丝氨酸。氨基酸类似物是指具有与自然发生的氨基酸相同的基本化学结构的化合物,即,结合一个氢、一个羧基、一个氨基、以及一个 R 基团的一种 α -碳,例如,同型丝氨酸、正亮氨酸、蛋氨酸亚砷、甲硫氨酸甲基砷。这些类似物具有被修饰的 R 基团(如正亮氨酸)或被修饰的肽骨架,但保留与自然发生的氨基酸相同的基本化学结构。氨基酸模拟物是指这样的化学化合物,它们具有与氨基酸的普通化学结构不同的结构,但以与自然发生的氨基酸类似方式发挥作用。在此氨基酸可以由国际理论和应用化学联合会-国际生物化学联合会生物化学命名法委员会(the IUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commission)推荐的通过它们的常见已知的三字母符号或通过的单字母符号来表示。

[0066] 如在此使用的,术语一种组合物的“有效量”或“药学上有效量”或“治疗学上有效量”是足以达到一种希望的治疗的和/或预防性的效果的量,如导致与胰岛素抵抗性相关联的症状的预防或减少的一种量值。给予受试者的本发明的一种组合物量值取决于该疾病的类型和严重程度并且取决于该个体的特征,比如总体上健康状态、年龄、性别、体重、以及对药物的耐受性。它还将取决于疾病的程度、严重程度和类型。熟练的专业人员将能根据这些以及其他因素确定适当的剂量。本发明的这些组合物还可以与一种或多种额外的治疗化合物结合给药。在本发明的这些方法中,这种芳香族的阳离子肽可以给予患有由一种疾病或病症所引起的一种或多种胰岛素抵抗性迹象的受试者。给予这些芳香族的阳离子肽的有效量可以改进在受试者体内胰岛素抵抗性的至少一种迹象或症状,如体重、禁食葡萄糖/胰岛素/游离脂肪酸、葡萄糖耐量(OGTT)、在体外肌肉胰岛素灵敏度、胰岛素信号的标志物(如 AKT-P、IRS-P)、线粒体功能(如呼吸作用或 H_2O_2 排放)、细胞内氧化应激的标志物(如脂类过氧化作用、GSH/GSSG 比率、或乌头酸酶活性)、以及线粒体酶活性。例如,这些芳香族的阳离子肽的一种“治疗学上有效量”是平均水平,其中胰岛素抵抗性的这些生理效应在最小意义上是得到了改善。

[0067] 一种“分离的”或者“纯化的”多肽或者肽是基本上不含细胞物质或其他来自该制剂自其衍生的细胞或组织来源的污染多肽,或基本上没有在化学合成时的化学前体或其他化学制品。例如,一种分离的芳香族的阳离子肽应当是不含妨碍该制剂的诊断或治疗用途的物质。这类干扰物质可能包括酶、激素及其他蛋白质的以及非蛋白质的溶质。

[0068] 如在此使用的,术语“医学病症”包括但不局限于任何病症或者疾病,这些病症或疾病表现为一种或多种生理的和/或心理学的症状,对于它们而言治疗和/或预防是令人希望的,并且包括上述的和新识别的疾病及其他失调。例如,一种医学病症可以是胰岛素抵抗性、高胰岛素血、II 型糖尿病、异常脂类代谢、异常血管内皮的功能、冠状动脉病、心血管疾病、脑血管疾病、肾功能障碍、高血压、脂肪肝、神经病变、和高尿酸血症。

[0069] 如在此使用的,术语“多肽”、“肽”和“蛋白”在此是可互换地使用来指一种包括通过肽键或改变的肽键(如肽等排体)彼此结合的一种或更多种氨基酸的一种聚合物。多肽既涉及到短链(通常称之为肽类、糖肽类或者寡聚体类)、也涉及到较长的链(通常称之为蛋白)。多肽类可以包含除了这 20 个基因编码的氨基酸以外的多种氨基酸。多肽类包括通过自然过程改性的氨基酸序列(比如翻译后处理)、或通过在本领域中众所周知的化学修饰技术改性的氨基酸序列。这类改性在基本文献中很好的做了说明,并且在专题论文连同

在多卷研究文献中更详细地做了说明。

[0070] 如在此使用的,术语“进行治疗”或者“治疗”或者“减轻”涉及治疗性的治疗和预防性的或预防措施两者,其中目标是预防或者减缓(减小)该靶向的病理病症或者失调。根据本发明的这些方法如果一位受试者在接受一种治疗量的这种芳香族的阳离子肽之后,该受试者显示一种具体疾病或病症的一种或多种迹象和症状的可观察和/或可测量的下降或消失,则这位受试者被成功地对胰岛素抵抗性进行了“治疗”。例如,对于胰岛素抵抗性,治疗可能包括空腹血糖或者胰岛素水平的下降、或在响应于口服葡萄糖负荷的葡萄糖与胰岛素曲线之下的面积减少。还应当理解,所说明的医学病症的治疗或预防的不同方式是旨在表达的含义是“实质性”的,它不仅包括完全的而且包括小于完全的治疗或预防,并且其中获得了一些生物学或者医学的相关的结果。

[0071] 诸位发明人已经发现,出人意料的是芳香族的阳离子肽可以在哺乳动物组织中预防或者治疗胰岛素抵抗性;具体是预防或治疗在骨骼肌组织中的胰岛素抵抗性。在一些病例中,这种胰岛素抵抗性可以是起因于一种高脂饮食或者、更概括地说营养过量。本发明的这些肽在治疗糖尿病、前趋性糖尿病或肥胖胰岛素抵抗性、非糖尿病患者中是有益的。无意将本发明限制于一种特定的作用机理,据信线粒体完整性和胰岛素灵敏度的丢失源自一种常见的代谢障碍,即氧化应激。营养过量,特别是来自高脂饮食的营养过量可能增加在骨骼肌中的线粒体活性氧簇(ROS)排放和总的氧化应激,导致急性和慢性线粒体机能障碍二者,以及胰岛素抵抗性的发展。本发明的这些芳香族的阳离子肽减轻这些作用,由此改进在骨骼肌组织中的线粒体功能,因此改进胰岛素灵敏度。本发明还提供了使用本发明肽的方法以预防或者治疗糖尿病、前趋性糖尿病、相关代谢疾病、以及由此出现的并发症。

[0072] 诸位发明人发现了高脂饮食/肥胖诱导的胰岛素抵抗性与线粒体生物能量学有关。其意义是代谢底物的过度供给引起线粒体呼吸系统变得更少、产生ROS排放的增加、以及总的氧化还原环境变成一种更氧化的状态,这种氧化状态若持续就会导致胰岛素抵抗性的发展。将线粒体生物能量学与胰岛素抵抗性的病原学相连系具有多种临床上的意义。人们已知在人类中胰岛素抵抗性(NIDDM)的标准护理经常导致体重增加,并且在选择的个体中增加的血糖变异性伴有所产生的代谢和临床上的后果。在此显示的这些实例证明用靶向线粒体的抗氧化剂(如一种芳香族的阳离子肽)治疗线粒体缺陷提供了一种新的并且出人意料的方法用于胰岛素抵抗性的代谢性校正而没有胰岛素增加的生长和新陈代谢作用。

[0073] 本发明涉及通过某些芳香族的阳离子肽来减少胰岛素抵抗性。这些芳香族的阳离子肽是水溶性的并且是高度极性的。尽管有这些性质,但这些肽能够很容易穿过细胞膜。本发明中有用的芳香族阳离子肽包括最少3个通过肽键共价连接的氨基酸,并且优选包括最少4个通过肽键共价连接的氨基酸。本发明的芳香族阳离子肽中的氨基酸最大数目为通过肽键共价连接的约20个氨基酸。优选的氨基酸的最大数目为约12个,更优选为约9个,并且最优选为约6个。最佳的情况是,存在于该肽中的氨基酸数目是4。

[0074] 在本发明中有用的芳香族阳离子肽的这些氨基酸可以是任何氨基酸。如在此使用的,术语“氨基酸”是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。优选地,至少一个氨基是位于相对于羧基的 α 位。这些氨基酸可以是自然发生的。自然发生的氨基酸包括(例如)在哺乳动物蛋白质中通常发现的20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)、以及缬氨酸 (Val)。其他自然发生的氨基酸包括例如在与蛋白质合成无关的代谢过程中合成的氨基酸。例如,在产生豚的过程中哺乳动物代谢合成的鸟氨酸和瓜氨酸这些氨基酸。自然发生的氨基酸的另一个实例包括羟基脯氨酸 (Hyp)。

[0075] 在本发明中有用的这些肽可任选地含有一种或多种非自然发生的氨基酸。最佳的状态是该肽不含有自然发生的氨基酸。这些非自然发生的氨基酸可以是左旋 (L-)、右旋 (D-)、或它们的混合物。非自然发生的氨基酸是那些通常不是在生物体正常代谢过程中合成、并且不是在蛋白质中自然发生的氨基酸。另外,本发明中优选的可用的非自然发生的氨基酸也不被普通的蛋白酶识别。非自然发生的氨基酸可以存在于这种肽的任何位置处。例如,这种非自然发生的氨基酸可以位于 N- 端, C- 端或在 N- 端和 C- 端之间的任何位置。

[0076] 例如,这些非自然的氨基酸可以包括例如未在天然氨基酸中发现的烷基、芳基或烷芳基的基团。非天然存的烷基氨基酸的一些实例包括 α -氨基丁酸、 β -氨基丁酸、 γ -氨基丁酸、 δ -氨基戊酸、 ϵ -氨基己酸。非天然存的芳基氨基酸的一些实例包括邻、间和对氨基苯甲酸。非天然存的烷芳基氨基酸的一些实例包括邻、间和对氨基苯乙酸、以及 γ -苯基- β -氨基丁酸。非自然发生的氨基酸包括自然发生的氨基酸的衍生物。自然发生的氨基酸的衍生物可以包括(例如)向自然发生的氨基酸上添加一个或多个化学基团。

[0077] 例如,一个或多个化学基团可以被添加到苯丙氨酸或酪氨酸残基的芳香环的 2'、3'、4'、5'、或 6' 位中的一个或多个位置上,或色氨酸残基的苯并环的 4'、5'、6' 或 7' 位中的一个或多个位置上。该基团是可以添加到芳香环上的任何化学基团。这些基团的一些实例包括支链或直链的 C_1 - C_4 烷基,如甲基、乙基、正丙基、异丙基、丁基、异丁基或叔丁基, C_1 - C_4 烷氧基(即烷氧基),氨基, C_1 - C_4 烷氨基和 C_1 - C_4 二烷氨基(例如甲氨基、二甲氨基),硝基,羟基,卤(即氟、氯、溴或碘)。自然发生的氨基酸的非自然发生的衍生物的一些具体实例包括正缬氨酸 (Nva),正亮氨酸 (Nle)。

[0078] 在本发明的这些方法中有用的肽中的氨基酸修饰的另一个实例是这种肽的天冬氨酸或谷氨酸残基的羧基衍生化。衍生化的一个实例是用氨或用如甲胺、乙胺、二甲胺或二乙胺这些伯胺或仲胺酰胺化。衍生化的另一个实例包括用如甲醇或乙醇进行的酯化。另外一种这样的修饰包括赖氨酸、精氨酸或组氨酸残基的氨基衍生化。一些合适的酰基包括,例如一个包括任何上述 C_1 - C_4 烷基的苯甲酰基或链烷酰基,如乙酰基或丙酰基。

[0079] 优选的是非自然发生的氨基酸对普通蛋白酶是抵抗性的,更优选的是对其不敏感的。对蛋白酶抵抗性的或不敏感的非自然发生的氨基酸的实例包括任何上述自然发生的 L- 氨基酸的右旋 (D-) 型,以及 L- 和 / 或 D- 型非自然发生的氨基酸。D- 氨基酸不是正常存在于蛋白质中的,尽管在某些抗菌肽中发现过它们,它们是通过除细胞正常的核糖体蛋白合成机制以外的手段合成的。如在此所使用的,这些 D 氨基酸可以认为是非自然发生的氨基酸。

[0080] 为了使其对蛋白酶的敏感性降到最低,本发明的方法中有用的肽应该具有少于五个,优选少于四个,更优选少于三个,且最优选少于两个毗邻的可以被普通蛋白酶识别的 L- 氨基酸,无论这些氨基酸是否是自然发生的或非自然发生的。最佳的情况是,该肽仅含有 D- 氨基酸,而不含有 L- 氨基酸。如果该肽含有蛋白酶敏感的氨基酸序列,则至少这些氨基

酸中的一个优选为非自然发生的 D- 氨基酸,由此提供蛋白酶抗性。蛋白酶敏感序列的实例包括容易被普通蛋白酶如肽链内切酶和胰蛋白酶切开的两个或多个毗邻的碱性氨基酸。碱性氨基酸的实例包括精氨酸、赖氨酸和组氨酸。

[0081] 在生理 pH 下这些芳香族阳离子肽应当具有相对于该肽中氨基酸残基总数的最小数目的净正电荷。生理 pH 下净正电荷的最小数目以下将表示为 (p_m)。这种肽中氨基酸残基总数以下将表示为 (r)。以下讨论的净正电荷的最小数目都是在生理 pH 条件下。术语“生理 pH”在本文是指哺乳动物身体的组织和器官细胞中的正常 pH。例如人的生理 pH 通常约为 7.4,但是哺乳动物中正常的生理 pH 可以从约 7.0 到约 7.8 之间的任意 pH。

[0082] “净电荷”本文中是指由存在于该肽中的氨基酸所携带的正电荷数和负电荷数的差值。在本说明书中,应当理解的是净电荷是在生理 pH 下测量的。在生理 pH 下具有正电荷的自然发生的氨基酸包括 L- 赖氨酸、L- 精氨酸和 L- 组氨酸。在生理 pH 下具有负电荷的自然发生的氨基酸包括 L- 天冬氨酸和 L- 谷氨酸。

[0083] 典型的是,肽具有一个正电荷的 N- 端氨基和一个负电荷的 C- 端羧基。在生理 pH 下这些电荷彼此抵消。作为计算净电荷的一个实例,这种肽 :Tyr-Arg-Phe-Lys-Glu-His-Trp-D-Arg 具有一个负电荷氨基酸 (即, Glu) 和四个正电荷氨基酸 (即,两个 Arg 残基,一个 Lys、以及一个 His)。因此上述肽含有三个净正电荷。

[0084] 在本发明的一个实施方案中,这些芳香族阳离子肽具有在生理 pH 下净正电荷最小数目 (p_m) 和氨基酸残基总数 (r) 之间的一种关系,其中 $3p_m$ 是小于或等于 $r+1$ 的最大数。在这种实施方案中,净正电荷最小数目 (p_m) 与氨基酸残基总数 (r) 之间的关系如下:

[0085] 表 1. 氨基酸数目和净正电荷 ($3p_m \leq p+1$)

[0086]

(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

[0087] 在另一个实施方案中,这些芳香族阳离子肽具有在净正电荷最小数目 (p_m) 和氨基酸残基总数 (r) 之间的一种关系,其中 $2p_m$ 是小于或等于 $r+1$ 的最大数。在这种实施方案中,净正电荷最小数目 (p_m) 与氨基酸残基总数 (r) 之间的关系如下:

[0088] 表 2. 氨基酸数目和净正电荷 ($2p_m \leq p+1$)

[0089]

(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

[0090] 在一种实施方案中,净正电荷最小数目 (p_m) 与氨基酸残基总数 (r) 是相等的。在另一实施方案中,这些肽含有三或四个氨基酸残基并且具有最少一个净正电荷,优选为最少两个净正电荷以及更优选为最少三个净正电荷。

[0091] 同样很重要的是该芳香族阳离子肽与净正电荷总数 (p_t) 相比具有最小数目的芳香基团。芳香基的最小数目以下将表示为 (a)。具有一个芳香基团的自然发生的氨基酸包括的氨基酸是组氨酸、色氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸。例如,六肽 Lys-Gln-Tyr-D-Arg-Phe-Trp

具有两个（由赖氨酸和精氨酸残基贡献的）净正电荷和 3 个芳香基（由酪氨酸、苯丙氨酸和色氨酸残基贡献的）。

[0092] 在本发明的这些方法中有用的芳香族阳离子肽还应当具有在芳香基最小数目 (a) 和生理 pH 下净正电荷总数 (P_t) 之间的一种关系, 其中除了当 p_t 是 1 时 $3a$ 是小于或等于 p_t+1 的最大数目, a 还可以是 1。在这种实施方案中, 芳香基的最小数目 (a) 与净正电荷总数 (p_t) 之间的关系如下:

[0093] 芳香族基团和净正电荷 ($3a \leq p+1$ 或 $a = p_t = 1$)

[0094]

(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

[0095] 在另一个实施方案中, 这些芳香族阳离子肽具有芳香基团最小数目 (a) 与净正电荷总数 (p_t) 之间的一种关系, 其中 $2a$ 是小于或等于 p_t+1 的最大数。在这种实施方案中, 芳香族氨基酸残基最小数目 (a) 与净正电荷总数目 (p_t) 之间的关系如下:

[0096] 表 4. 芳香族基团和净正电荷 ($3a \leq p+1$ 或 $a = p_t = 1$)

[0097]

(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

[0098] 在另一个实施方案中, 芳香基数目 (a) 和净正电荷总数 (P_t) 是相等的。

[0099] 羧基, 尤其是 C- 端氨基酸的端羧基, 优选例如氨进行酰胺化来形成 C- 端酰胺。另一种可选的方案是, C- 端氨基酸的端羧基可以用任何伯胺或仲胺酰胺化。该伯胺或仲胺可以是, 例如烷基, 尤其是支链或直链 C_1 - C_4 烷基、或芳基胺。因此, 该肽 C- 端的氨基酸可以转化成一个酰胺基、N- 甲基酰胺基、N- 乙基酰胺基、N, N 二甲酰胺基、N, N- 二乙酰胺基、N- 甲基 -N- 乙基酰胺基、N- 苯基酰胺基、或 N- 苯基 -N- 乙基酰胺基的基团。这些未发生在本发明的芳香族阳离子肽的 C- 端的天冬酰胺残基、谷酰胺残基、天冬氨酸残基和谷氨酸残基的自由羧基基团不论它们位于该肽的任何位置都可以被酰胺化。这些内部位置的酰胺化可以用氨或任何上述的伯胺或仲胺来进行。

[0100] 在一个实施方案中, 在本发明的方法中有用的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一种三肽。在一个具体的实施方案中, 在本发明的方法中有用的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一种三肽。

[0101] 在本发明的方法中有用的芳香族阳离子肽包括但不限于下列肽的实例:

[0102] Lys-D-Arg-Tyr-NH₂

[0103] Phe-D-Arg-His

[0104] D-Tyr-Trp-Lys-NH₂

[0105] Trp-D-Lys-Tyr-Arg-NH₂

[0106] Tyr-His-D-Gly-Met

[0107] Phe-Arg-D-His-Asp

- [0108] Tyr-D-Arg-Phe-Lys-Glu-NH₂
- [0109] Met-Tyr-D-Lys-Phe-Arg
- [0110] D-His-Glu-Lys-Tyr-D-Phe-Arg
- [0111] Lys-D-Gln-Tyr-Arg-D-Phe-Trp-NH₂
- [0112] Phe-D-Arg-Lys-Trp-Tyr-D-Arg-His
- [0113] Gly-D-Phe-Lys-Tyr-His-D-Arg-Tyr-NH₂
- [0114] Val-D-Lys-His-Tyr-D-Phe-Ser-Tyr-Arg-NH₂
- [0115] Trp-Lys-Phe-D-Asp-Arg-Tyr-D-His-Lys
- [0116] Lys-Trp-D-Tyr-Arg-Asn-Phe-Tyr-D-His-NH₂
- [0117] Thr-Gly-Tyr-Arg-D-His-Phe-Trp-D-His-Lys
- [0118] Asp-D-Trp-Lys-Tyr-D-His-Phe-Arg-D-Gly-Lys-NH₂
- [0119] D-His-Lys-Tyr-D-Phe-Glu-D-Asp-D-His-D-Lys-Arg-Trp-NH₂
- [0120] Ala-D-Phe-D-Arg-Tyr-Lys-D-Trp-His-D-Tyr-Gly-Phe
- [0121] Tyr-D-His-Phe-D-Arg-Asp-Lys-D-Arg-His-Trp-D-His-Phe
- [0122] Phe-Phe-D-Tyr-Arg-Glu-Asp-D-Lys-Arg-D-Arg-His-Phe-NH₂
- [0123] Phe-Try-Lys-D-Arg-Trp-His-D-Lys-D-Lys-Glu-Arg-D-Tyr-Thr
- [0124] Tyr-Asp-D-Lys-Tyr-Phe-D-Lys-D-Arg-Phe-Pro-D-Tyr-His-Lys
- [0125] Glu-Arg-D-Lys-Tyr-D-Val-Phe-D-His-Trp-Arg-D-Gly-Tyr-Arg-D-Met-NH₂
- [0126] Arg-D-Leu-D-Tyr-Phe-Lys-Glu-D-Lys-Arg-D-Trp-Lys-D-Phe-Tyr-D-Arg-Gly
- [0127] D-Glu-Asp-Lys-D-Arg-D-His-Phe-Phe-D-Val-Tyr-Arg-Tyr-D-Tyr-Arg-His-Phe-NH₂
- [0128] Asp-Arg-D-Phe-Cys-Phe-D-Arg-D-Lys-Tyr-Arg-D-Tyr-Trp-D-His-Tyr-D-Phe-Lys-Phe
- [0129] His-Tyr-D-Arg-Trp-Lys-Phe-D-Asp-Ala-Arg-Cys-D-Tyr-His-Phe-D-Lys-Tyr-His-Ser-NH₂
- [0130] Gly-Ala-Lys-Phe-D-Lys-Glu-Arg-Tyr-His-D-Arg-D-Arg-Asp-Tyr-Trp-D-His-Trp-His-D-Lys-Asp
- [0131] 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

[0132] 在一个实施方案中,在本发明的方法中有用的肽具有 μ -阿片样物质受体激动剂活性(即,它们激活该 μ -阿片样物质受体)。 μ -阿片样物质活性可以通过对克隆的 μ -阿片样物质受体的放射性配体结合测定或通过使用豚鼠回肠的生物测定而评估(Schiller et al, Eur J Med Chem, 35 :895-901, 2000 ;Zhao et al., JPharmacol Exp Ther 307 : 947-954, 2003)。 μ -阿片样物质受体的激活典型的具有止痛作用。在一些情况下,优选的是具有 μ -阿片样物质受体激动剂活性的芳香族阳离子肽。例如,在如急性疾病或病症这样的短期治疗过程中,使用可激活 μ -阿片样物质受体的芳香族阳离子肽可能是有益的。这些急性疾病和病症经常与中度或重度疼痛相关联。在这些情况下,该芳香族阳离子肽的止痛作用在对病人或其他哺乳动物的治疗方案中可能是有益的。然而不能激活 μ -阿片样物质受体的芳香族阳离子肽也可以根据临床需要与或不与止痛剂结合使用。

[0133] 可替代的,在其他情况下优选的是不具有 μ -阿片样物质受体激动剂活性的芳香族阳离子肽。例如,在如慢性疾病或病症这样的长期治疗过程中,使用能激活 μ -阿片样物质受体的芳香族阳离子肽可能是禁忌的。在这些情况下,该芳香族阳离子肽潜在的副作用或成瘾作用可能会妨碍具有 μ -阿片样物质受体激活作用的芳香族阳离子肽在对病人或其他哺乳动物的治疗方案中的使用。潜在的副作用可以包括镇静、便秘和呼吸抑制。在这些情况下,不能激活 μ -阿片样物质受体的芳香族阳离子肽可能是一种恰当的治疗药物。

[0134] 在本发明的方法中有用的具有 μ -阿片样物质受体激动剂活性的肽典型的是在 N-端(即,第一个氨基酸位置)含有酪氨酸残基或酪氨酸衍生物的那些肽。优选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);以及2'-羟基-6'-甲基酪氨酸(Hmt)。

[0135] 在一个实施方案中,具有 μ -阿片样物质受体激动剂活性的肽具有化学式: Tyr-D-Arg-Phe-Lys-NH₂(在此称作“SS-01”)。SS-01 具有由酪氨酸、精氨酸和赖氨酸这些氨基酸提供的三个净正电荷,以及由苯丙氨酸和酪氨酸这些氨基酸提供的两个芳香基团。SS-01 的酪氨酸可以是酪氨酸修饰的衍生物(如2',6'-二甲基酪氨酸),从而生成具有化学式2',6'-Dmt-D-Arg-Phe-Lys-NH₂的化合物(在本文中称作“SS-02”)。SS-02 分子量为640,并且在生理 pH 下带有3个净正电荷。SS-02 以非能量依赖的方式很容易穿过许多哺乳动物细胞类型的质膜(Zhao et al., J. Pharmacol Exp Ther. 304:425-432, 2003)。

[0136] 不具有 μ -阿片样物质受体激动剂活性的肽通常在 N-末端(即,氨基酸的位置1)不含有酪氨酸残基或酪氨酸衍生物。在 N-末端的氨基酸除酪氨酸以外可以是任意自然发生的或非自然发生的氨基酸。在一个实施方案中,N-末端氨基酸是苯丙氨酸或其衍生物。苯丙氨酸的衍生物实例包括: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)、以及2'-羟基-6'-甲基苯丙氨酸(Hmp)。

[0137] 不具有 μ -阿片样物质受体激动剂活性的芳香族的阳离子肽的一种实例具有化学式 Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂(在此称作“SS-20”)。可替代地,该 N-末端苯丙氨酸可以是苯丙氨酸的衍生物如2',6'-二甲基苯丙氨酸(2' 6' Dmp)。在氨基酸位置1含有2',6'-二甲基苯丙氨酸的 SS-01 具有化学式2',6'-Dmp-D-Arg-Phe-Lys-NH₂。在一个实施方案中,SS-02 的氨基酸序列是重新排列的,使得 Dmt 不位于 N-末端。这样的一种不具有 μ -阿片样物质受体激动剂活性的芳香族的阳离子肽的一种实例具有化学式 D-Arg-2' 6' Dmt-Lys-Phe-NH₂(SS-31)。

[0138] SS-01、SS-20、SS-31、以及它们的衍生物可以进一步包括功能类似物。如果该类似物具有与 SS-01、SS-20 或 SS-31 相同的功能,则该肽被称作是 SS-01、SS-20 或 SS-31 的功能类似物。例如,该类似物可以是 SS-01、SS-20 或 SS-31 的取代变体,在该取代变体中一个或多个氨基酸被另一种氨基酸取代。

[0139] SS-01、SS-20 或 SS-31 适宜的取代变体包括保守的氨基酸取代。氨基酸按照它们的物理化学性质可以分组如下:

[0140] (a) 非极性氨基酸:Ala(A) Ser(S) Thr(T) Pro(P) Gly(G) Cys(C);

[0141] (b) 酸性氨基酸:Asn(N) Asp(D) Glu(E) Gln(Q);

[0142] (c) 碱性氨基酸:His(H) Arg(R) Lys(K);

[0143] (d) 疏水性氨基酸 :Met (M) Leu (L) Ile (I) Val (V) ;以及

[0144] (e) 芳香族氨基酸 :Phe (F) Tyr (Y) Trp (W) His (H) 。

[0145] 肽中的一个氨基酸被同组的另一个氨基酸取代称作保守取代、并且这可以保留初始肽的物理化学性质。相比之下,肽中的一个氨基酸被不同组的另一个氨基酸取代通常更有可能改变初始肽的性质。

[0146] 在一些实施方案中,用氨基酸类似物取代这些芳香族的阳离子肽中一种或多种自然存在的氨基酸。在本发明的实践中,能激活 μ -阿片样物质受体有用的类似物的实例包括但不限于表 5 中所示的芳香族阳离子肽。

[0147] 表 5. 具有 μ -阿片样物质活性的肽类似物

[0148]

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 (若存在)	C-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
2'6'Dmt	D-Arg	Phe	Lys		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 ₂

[0149]

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 (若存在)	C-端修饰
			NH-atn		
2'6'Dmt	D-Arg	Phe	dnsLys		NH ₂
2'6'Dmt	D-Cit	Phe	Lys		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
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
Tyr	D-Lys	Phe	Dap		NH ₂
Tyr	D-Lys	Phe	Arg		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
3'5'Dmt	D-Lys	Phe	Dap		NH ₂
3'5'Dmt	D-Lys	Phe	Arg		NH ₂
Tyr	D-Lys	Tyr	Lys		NH ₂
Tyr	D-Lys	Tyr	Orn		NH ₂

[0150]

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 (若存在)	C-端修饰
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
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

[0151]

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 (若存在)	C-端修饰
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
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
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

[0152] Dab = 二氨基丁酸

[0153] Dap = 二氨基丙酸

[0154] Dmt = 二甲基酪氨酸

[0155] Mmt = 2' - 甲基酪氨酸

[0156] Tmt = N, 2', 6' - 三甲基酪氨酸

[0157] Hmt = 2' - 羟基, 6' - 甲基酪氨酸

[0158] dnsDap = β -丹磺酰基-L- α , β -二氨基丙酸

[0159] atnDap = β -氨基萘酰-L- α , β -二氨基丙酸

[0160] Bio = 生物素

[0161] 在本发明的实践中有用的,不能激活 μ -阿片样物质受体类似物的实例包括但不限于表 6 中所示的芳香族阳离子肽。

[0162] 表 6. 缺乏 μ -阿片样物质活性的肽类似物

[0163]

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-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
Phe	Lys	Dmt	D-Arg				NH ₂
Phe	Lys	D-Arg	Dmt				NH ₂
Phe	D-Arg	Phe	Lys				NH ₂
Phe	D-Arg	Dmt	Lys				NH ₂
Phe	D-Arg	Lys	Dmt				NH ₂
Phe	Dmt	D-Arg	Lys				NH ₂
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

[0164]

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-端修饰
D-Arg	Lys	Trp	Dmt				NH ₂
Cha	D-Arg	Phe	Lys				NH ₂
Ala	D-Arg	Phe	Lys				NH ₂

[0165] Cha = 环己基

[0166] 在表 5 和 6 中显示的这些肽的氨基酸可能或者是 L- 或者是 D- 构型。

[0167] 这些肽的合成

[0168] 在本发明的方法中有用的这些肽可以通过本领域公知的任何方法来合成。化学合成该蛋白适宜的方法包括：例如由 Stuart 和 Young 在“Solid Phase Peptide Synthesis, 第二版, Pierce Chemical Company(1984)”以及在“Methods Enzymol. 289, Academic Press, Inc, New York(1997)”中所描述的那些方法。

[0169] 芳香族阳离子肽的预防性的和治疗的用途。

[0170] 总体上。本发明的这些芳香族阳离子肽在预防或治疗疾病中是有用的。具体地说, 本发明提供了预防性的和治疗的方法二者, 这些方法用于治疗处于(或易感于)一种失调的危险中或患有与胰岛素抵抗性相关联的一种失调的受试者。胰岛素抵抗性通常与 II 型糖尿病、冠状动脉病、肾功能障碍、动脉硬化、肥胖、高血脂症、以及特发性高血压相关联。胰岛素抵抗性还与脂肪肝相关联, 脂肪肝可以发展为慢性炎症(NASH; “非酒精性脂肪性肝炎”)、纤维化、和肝硬化。累积地, 胰岛素抵抗性综合症(包括但不限于: 糖尿病)成为超过 40 岁的人发病和死亡的许多主要原因的基础。因此, 本发明提供用于在一位受试者体内预防和/或治疗胰岛素抵抗性和相关联的综合征的方法, 这些方法包括对需要它们的一位受试者给予有效量的一种芳香族的阳离子肽。例如, 本发明的一种芳香族的阳离子肽组合可以给予一位受试者试图改进哺乳动物骨骼肌组织对胰岛素的敏感性。在一个实施方案中, 在将该肽与显示出引起一种或多种这些病况的副作用的药物(如奥氮平(olanzapine, Zyprexa®))给予时, 本发明的这些芳香族的阳离子肽对预防药物诱发的肥胖、胰岛素抵抗性、和/或糖尿病是有用的。

[0171] 测定基于该芳香族的阳离子肽的治疗的生物效应。在本发明的不同实施方案中, 进行适当的在体外或者在体内测定以测定基于该特异的芳香族的阳离子肽的治疗的作用, 以及是否其给予表明用于在一位受试者体内所影响的组织的治疗。在不同实施方案中, 可以用参与该受试者失调的类型的代表性的细胞进行在体外测定以测定是否一种给定的基于该芳香族的阳离子肽治疗对这种或这些细胞类型发挥预期效果。在对受试验的人测试之前, 可以在适当的动物模型体系中对供治疗之用的化合物进行测试, 这些动物模型体系包括但不限于: 大鼠、小鼠、鸡、牛、猴、兔、以及类似动物。类似地, 对于体内试验, 在对受试验的人给药之前, 可以使用在本领域中已知的任何动物模型系统。通过量化体重、禁食葡萄糖/胰岛素/游离脂肪酸、葡萄糖耐量(OGTT)、在体外肌肉胰岛素灵敏度、胰岛素信号的标志物(如 Akt-P, IRS-P)、线粒体功能(如呼吸、或 H₂O₂ 排放)、细胞内氧化应激的标志物(如脂类过氧化作用、GSH/GSSG 比率、或乌头酸酶活性)、或线粒体酶活性, 可以容易地检出胰岛素抵抗性或灵敏度增加或降低。

[0172] 预防性的方法。在一方面中, 本发明提供在一位受试者体内用于预防与在骨骼肌

组织中胰岛素抵抗性相关联的一种疾病或病症的一种方法,该方法通过对该受试者给予调整胰岛素抵抗性的一种或多种信号或标志物的一种芳香族的阳离子肽,这些信号或标志物例如:体重、禁食葡萄糖/胰岛素/游离脂肪酸、葡萄糖耐量(OGTT)、在体外肌肉胰岛素灵敏度、胰岛素信号的标志物(如Akt-P、IRS-P)、线粒体功能(如呼吸作用或H₂O₂排放)、细胞内氧化应激的标志物(如脂类过氧化作用、GSH/GSSG比率、或乌头酸酶活性)、以及线粒体酶活性。

[0173] 处于通过异常线粒体功能或胰岛素抵抗性导致或促成的一种疾病的危险中的受试者可以通过如在此描述的诊断或预测测定的任何一种或其组合而被识别。在预防性的应用中,对于一位受试者(该受试者对一种疾病或病症是易感的或者另外处于一种疾病或病症的危险中)以一种足以消除或减少该危险的量值给予芳香族的阳离子肽的药用组合物或药剂,减轻该疾病的严重程度或延迟其发作,包括该疾病的生物化学的、组织学和/或行为的症状、在该疾病的发展期间存在的并发症和中间病理性的表现型。一种预防性的芳香族的阳离子肽的给药可以发生在该反常的症状特征显示之前,这样使得一种疾病或失调得到预防或可替代地延迟其发展。取决于反常类型,如一种起提高或改进线粒体功能作用的芳香族的阳离子肽可以用于治疗该受试者。该适当的化合物可以基于在此所说明的筛选测定而被确定。

[0174] 治疗方法。本发明的另一个方面包括在一种用于治疗目的的受试者体内调整胰岛素抵抗性或灵敏度的方法。在治疗的应用中,对于一位受试者(该受试者被怀疑患有有一种疾病或病症或者已经患有这样一种疾病或病症)以一种足以治愈或至少部分阻止该疾病的症状(生物化学的、组织学、和/或行为的),包括在该疾病的发展期间存在的并发症和中间病理性的表现型其并发症的量值给予给予组合物或药剂。对于完成治疗或预防性处理适当的一个量值被定义为一个治疗学上或预防性地有效剂量。这些调整的方法可以在体外进行(如通过用该芳香族的阳离子肽培养该细胞),或可替代的在体内进行(如通过对一位受试者给予该芳香族的阳离子肽)。这样,本发明提供对经受一种胰岛素抵抗性相关联的疾病或失调的一位个体进行治疗的方法。

[0175] 给药方式和有效剂量

[0176] 可以采用在本领域中人士已知的任何方法用于将一种肽与一种细胞、器官或组织进行接触。适当的方法包括在试管中、在活体外、或者在体内的方法。在体内方法典型地包括对一种哺乳动物、优选一个人给予一种芳香族的阳离子肽(如上说明的那些)。在在活体中用于进行治疗时,本发明的这些芳香族的阳离子肽以有效量(即具有希望的治疗作用的量值)给予该受试者。它们通常通过胃肠外的或口服的给药。该剂量和给药方案将取决于该胰岛素抵抗性相关疾病或失调的程度、使用的该具体的芳香族的阳离子肽的这些特征,如其治疗指数、该受试者以及该受试者的病史。

[0177] 在临床前测试和临床测试中可以用医生和临床医师们熟悉的方法来测定有效量。有效量的在本发明的这些方法中有用的肽,优选以一种药物组合物形式,可以通过给予药物化合物的众多公知方法中的任意一种来给予需要它们的哺乳动物。这种肽可以全身给药或局部给药。

[0178] 在此描述的这些芳香族阳离子肽可以结合入药物的组合物中单独或组合给予受试者用于治疗或预防在此描述的病症。这类组合物典型地包括该活化剂和一种药物学可接

受的载体。如在此使用的,术语“药物学可接受的载体”包括与药物的给药相适合的盐、溶剂、分散液分散液分散液介质、包衣、抗菌剂和抗真菌剂、等渗的和吸收延迟试剂、以及类似物。还可以在这些组合中加入补充性活性化合物。

[0179] 多种药用组合物被典型地配制成与其预定的给药途径相适合。给药途径的实例包括:胃肠外的(如静脉内的、真皮内的、腹膜内的、或皮下)、口服的、吸入、经皮的(局部的)、经粘膜的给药。被用于胃肠外的、真皮内的、或皮下应用的溶液或悬浮液可以包括以下组分:一种无菌的稀释剂比如注射用水、盐溶液、固定油、聚乙二醇、甘油、丙二醇或者其他的合成溶液;抗菌剂比如苯甲醇或者对羟基苯甲酸甲酯;抗氧化剂比如维生素 C 或者亚硫酸氢钠;螯合剂比如乙二胺四乙酸;缓冲剂比如醋酸盐、柠檬酸盐、或者磷酸盐以及用于张度调节的试剂比如氯化钠或者右旋糖。pH 可以用酸类或者碱类来调节,比如盐酸或者氢氧化钠。该胃肠外的制剂可以被包装在由玻璃或塑料制成的安瓿、一次性注射器、或多剂量的小瓶中。为了患者或治疗医师的方便起见,该剂量配制可以一种包含全部必要设备的试剂盒以提供(如药物的小瓶、稀释剂的小瓶、注射器、以及针头)用于一种治疗过程(如 7 天的治疗)。

[0180] 适合于可注射使用的药物组合物可以包括无菌水溶液(其中水溶性的)或分散液分散液分散液以及用于临时制备无菌的可注射的溶液或分散液分散液分散液的无菌的粉末。对于静脉内的给药,适当的载体包括生理盐水、抑菌水、Cremophor ELTM(BASF, Parsippany, N. J.)或磷酸酯缓冲盐水(PBS)。在所有情况下,一种用于肠胃外给药的组合物必须是无菌的并且应当是在容易注射的程度上存在的液体。在制造和存储条件下它应当是稳定的,并且必须被保存以防止微生物(比如细菌和真菌类)的污染作用。

[0181] 这些芳香族的阳离子肽组合物可以包括一种载体,该载体可以是一种溶剂或者分散介质,该溶剂或分散介质包含例如:水、乙醇、多元醇(例如:甘油、丙二醇、以及液体聚乙二醇、以及类似物)、以及它们的适宜的混合物。例如,通过使用一种包衣(如卵磷脂)、通过维持分散体中所需颗粒的大小、以及通过使用表面活性剂,可维持适当的流动性。防止微生物的作用可以通过不同的抗菌的以及抗真菌剂获得,例如:对羟基苯甲酸酯类、氯叔丁醇、苯酚、维生素 C、硫汞撒、以及类似物。可以包括谷胱甘肽及其他抗氧化剂以预防氧化。在许多情况下,优选在该组合物中包含等渗试剂,例如糖、多元醇(如甘露醇、山梨醇)或氯化钠。这些可注射的组合物的延长吸收可以通过将一种延迟吸收的试剂(例如单硬脂酸铝或明胶)包括在该组合物中而造成。

[0182] 按照需要,通过将活性化合物以需要的量加入具有以上列举的多种组分中的一种组分或多个组分的一个组合的适当溶剂中的,然后进行无菌微过滤,可以制备无菌注射液。通常,分散液是通过将活性化合物加入到无菌运载体(它包括基础分散介质及以上列举的所需的其他组分)来制备。在用于制备无菌注射液的无菌粉末情况下,通常的制备方法包括真空干燥及冷冻干燥,它们可以产生活性成分加上任何来自其预先无菌过滤的溶液的其他希望的组分的粉末。

[0183] 口服的组合物通常包括一种惰性稀释剂或一种可食用的载体。为了口服的治疗给药的目的,可以将赋形剂加入该活性物质并且以片剂、药片、或胶囊如明胶胶囊的形式来使用。口服的组合物还可以使用一种用作嗽口水的液体载体而被制备。药物相容的粘合剂、和/或佐剂物质可以作为该组合物的一部分被包括。这些片剂、丸剂、胶囊、药片以及类似物

可含有任何以下成份、或一种相似性质的多种化合物：一种粘合剂比如微晶纤维素、黄耆树胶或者明胶；一种赋形剂比如淀粉或乳糖、一种分裂剂比如海藻酸、Primogel、或玉米淀粉；一种润滑剂比如硬脂酸镁或者 Sterotes；一种助流剂比如胶体二氧化硅；一种甜味剂比如蔗糖或糖精；或一种香料比如薄荷、水杨酸甲酯、或桔子调味剂。

[0184] 为了通过吸入给药，可以将这些化合物以一种气溶胶喷雾剂的形式来递送，该气溶胶喷雾剂来自一种包含适当的推进剂（如一种气体，比如二氧化碳）的压力容器或分配器或一种喷雾器。这类方法包括在美国专利号 6,468,798 中所说明的那些。

[0185] 如在此所说明的一种治疗的化合物的全身性给药还可以通过经粘膜的或经皮的方式。对于经粘膜的或经皮的给药而言，可以该配方使用对欲渗透的屏障适当的渗透剂类。此类渗透剂通常是本领域中已知的，并且它包括，例如，用于经黏膜的给药，清洁剂、胆酸盐及梭链孢酸衍生物。经黏膜的给药可通过使用鼻喷剂而完成。为了经皮的给药，这些活性化合物被配制成软膏、油膏剂、凝胶、或乳剂（如在本领域中通常已知的）。在一个实施方案中，经皮的给药可以通过离子电渗疗法来进行。

[0186] 一种治疗的蛋白或肽可以配制在一种载体系统中。该载体可以是胶体体系。该胶体体系可以是一种脂类体、一种磷脂双层运载体。在一个实施方案中，该治疗的蛋白被包在一种脂类体胶囊中同时保持蛋白完整性。如在本领域中的一个普通技术人员应当理解的，有多种的方法以制备脂类体。（见 Lichtenberget al., Methods Biochem. Anal., 33:337-462(1988);Anselem et al., Liposome Technology, CRC Press(1993)）。脂类体配制品可以延迟清除并且增加细胞吸收（见 Reddy, Ann. Pharmacother., 34(7-8):915-923(2000)）。

[0187] 该载体还可以是一种聚合物，如一种可生物降解的生物相容的聚合基质。在一个实施方案中，该治疗的蛋白可以被包埋在该聚合基质中同时保持蛋白完整性。该聚合物可以是天然的，比如多肽类、蛋白类或多糖类；或者合成的，比如聚 α -羟基酸类。实例包括由一下物质制成的载体，如：胶原、纤连蛋白、弹性蛋白、醋酸纤维素、硝酸纤维素、多糖、纤维素、明胶、以及它们的组合。在一个实施方案中，该聚合物是聚乳酸 (PLA) 或共聚乳酸 / 乙醇酸 (PGLA)。该聚合物基体可以按多种的形式和大小（包括微球和纳球 (nanospheres)）来制备和分离。聚合物配制品可以导致治疗作用的持续时间延长。（见 Reddy, Ann. Pharmacother., 34(7-8):915-923(2000)）。对于人生长激素 (hGH) 的一种聚合物配制品已经在临床试验中使用。（见 Kozarich and Rich, Chemical Biology, 2:548-552(1998)）。

[0188] 持续释放配制品的聚合物微球实例被说明于以下文献中：PCT 公布 W099/15154(Tracy et al)、美国专利号 5,674,534 和 5,716,644(都属于 Zale et al)、PCT 公布 W0 96/40073(Zale et al)、以及 PCT 公布 W0 00/38651(Shah et al)、美国专利号 5,674,534 和 5,716,644、以及 PCT 公布 W0 96/40073(说明了包含促红细胞生成素颗粒的一种聚合物基体，用一种盐来使该聚合物基体稳定以防聚集)。

[0189] 在一些实施方案中，用将会保护这些治疗的化合物以防迅速从体内消除的载体来制备这些治疗的化合物，如受控释放配制品，包括植入物和微囊化的递送系统。可以使用可生物降解的、生物相容性的聚合物，例如乙烯-醋酸乙烯酯、聚酐、聚乙醇酸、胶原、聚原酸酯以及聚乳酸。此类配制品可以用已知的技术制备。这些物质还可以被商业的获得，如从 Alza 公司和 Nova Pharmaceuticals, Inc. 脂质体悬浮液（包括靶向至具有对细胞特异性

抗原的单克隆抗体的特异性细胞的脂质体)还可以用作药理学上可接受的载体。这些可以根据在本领域中的普通技术人员已知的方法而制备,例如,如在美国专利号 4,522,811 中所说明的。

[0190] 这些治疗的化合物还可以被配制以提高细胞内递送的。例如,在本领域中已知的脂类体递送系统,见、如:Chonn and 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);and Gregoriadis,“Engineering Liposomes for Drug Delivery:Progress and Problems,”Trends Biotechnol.13(12):527-37(1995). Mizguchi et al., Cancer Lett. 100:63-69(1996),说明了在体内和在体外两者中通过利用融合基因的(fusogenic)脂质体将蛋白递送给细胞。

[0191] 这些治疗剂的剂量、毒性和疗效可以通过在细胞培养或实验动物中的标准药物的程序而被测定,如用于确定 LD_{50} (对于 50% 的种群具致命性的剂量) 和 ED_{50} (对于 50% 的种群具治疗有效性的剂量)。在毒性和治疗的作用之间的剂量比率是治疗指数,并且它可以用 LD_{50}/ED_{50} 的比率来表示。展示了高治疗指数的化合物是优选的。当可以使用那些展示了毒性副作用的化合物时,应当注意设计一种将这类化合物靶向受影响的组织位点的递送系统以便使对未感染的细胞的潜在损害最小化,并且由此减少副作用。

[0192] 从该细胞培养测定和动物研究获得的数据可被用于配制用于人类的一定范围的剂量。这类化合物的剂量优选地在循环浓度的范围之内,该循环浓度包括具有很少或没有毒性的 ED_{50} 。该剂量可以根据被采用的剂型和使用的给药途径在本范围之内变化。对于在本发明的方法中使用的任何化合物,该治疗学上的有效剂量可以从细胞培养测定而初始估计。一种剂量可以在动物模型中被配制以达到在细胞培养中确定的一种循环血浆浓度范围,该范围包括 IC_{50} (即该测试化合物的完成半最大症状的抑制的浓度)。这类信息可用于更精确的确定在人类中有用的剂量。在血浆中的水平可以被测量,例如通过高效液相色谱法。

[0193] 通常地,本发明的这些芳香族的阳离子肽足以完成一种治疗的或者预防性的作用的一种有效量,范围从约 0.000001mg/ 千克体重每天到约 10,000mg/ 千克体重每天。优选地,该剂量范围是从约 0.0001mg/ 千克体重每天至约 100mg/ 千克体重每天。例如剂量可以是 1mg/kg 体重或者 10mg/kg 体重每天,每两天或每三天或在 1-10mg/kg 每周、1-10mg/kg 每两周或 1-10mg/kg 每三周的范围内。在一个实施方案中,一个单一剂量的肽范围从 0.1-10,000 微克/kg 体重。在一个实施方案中,在一种载体中的芳香族的阳离子肽浓度范围为 0.2-2000 μ g/ml。一种示例性的治疗方式要求每天或一周给药一次。间隔还可以是无规律的,如由在该受试者体内测量的葡萄糖或胰岛素的血液水平所指示,并且因此调节剂量或给药。在一些方法中,剂量被调节至达到一种希望的禁食葡萄糖或者禁食胰岛素浓度。在治疗性应用中,有时需要在相对较短的间隔内给予相对较高的剂量,直至病情缓减或终止,并且优选地直至患者显示疾病症状的部分或完全改善。此后,可以给予患者预防性的方案。

[0194] 在一些实施方案中,一种芳香族的阳离子肽的治疗学上的有效量可以定义为在靶组织中约 10^{-11} 至 10^{-6} 摩尔,如约 10^{-7} 摩尔的一种肽浓度。这种浓度可以通过全身性 0.01

至 100mg/kg 的剂量或通过体表面积等效剂量而被递送。剂量的时间表应当是被优化的以保持在靶组织的该治疗的浓度,最优选地通过每日或每周单次的给药、而且包括连续给药(如胃肠外的注入或经皮的应用)。

[0195] 熟练的技术人员将会理解,某些因素可以影响有效地治疗一位受试者所要求的剂量以及时间,这些因素包括但不局限于该疾病或者失调的严重程度、以前的处理、该受试者总体的健康状态和/或年龄、及其他存在的疾病。此外,用在此描述的这些治疗的组合物的一个治疗学上的有效量对一位受试者的治疗可以包括一个单次治疗或者一系列治疗。

[0196] 与本发明一致的被治疗的哺乳动物可以是任何哺乳动物,包括如农场动物,如羊、猪、牛和马;宠物动物,如狗和猫;实验动物,如大鼠、小鼠和兔。在一种优选实施方案中,该哺乳动物是人。

[0197] 标记的芳香族的阳离子肽和诊断方法

[0198] 在此所披露的方法包括:对一种细胞或一位受试者提供一种标记的芳香族的阳离子肽,其中该肽具有一种可检测出的结合至一种肽的标记。在一个实施方案中,一种特殊的标记与一种特殊的肽的一种特定组合允许用于检测该肽在一种细胞内中的位置。

[0199] 标记的芳香族的阳离子肽。在一个实施方案中,本发明的这些芳香族的阳离子肽与一种标记部分(即可检出基团)偶联。于本发明的芳香族的阳离子肽结合的该具体的标记或可检出基团不是本发明的关键方面,只要它不显著的妨碍本发明的芳香族的阳离子肽的比活性。可检测的基团可以是任何具有可检测的物理或化学特性的物质。此类可检测的标记在免疫测定和成像的领域中已得到很好的发展,通常,在此类方法中有用的大部分任何标记都能被应用至本发明中。因此,标记是可通过光谱学、光化学、生物化学、免疫化学、电学、光学或化学手段可检测的任何组分。本发明中有用的标记包括磁珠(例如 DYNABEADS™)、荧光染料(例如,异硫氰酸荧光素、德克萨斯红、碱性玫瑰精等)、放射性标记(例如 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{35}S 、 ^{125}I 、 ^{121}I 、 ^{112}In 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$)、其他成像剂例如微泡(用于超声成像)、 ^{18}F 、 ^{11}C 、 ^{15}O 、(用于正电子发射断层成像)、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{111}In (用于单光子发射断层成像)、酶(例如,辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶以及其他在 ELISA 中常用的酶)、以及比色标记,如胶体金或有色玻璃或塑料珠(例如,聚苯乙烯、聚丙烯、胶乳等)。描述这类标记的用途的专利包括:美国专利号 3,817,837;3,850,752;3,939,350;3,996,345;4,277,437;4,275,149;以及 4,366,241,通过引用将它们的全文结合在此并且用于所有的目的。还见 Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals(第 6 版,Molecular Probes,Inc.,Eugene OR)。

[0200] 根据在本领域中众所周知的方法,可以将该标记直接或间接偶合到一种测定的所希望的成分上。如以上所指,可使用许多种标记,标记的选择取决于所需的灵敏度、与化合物的结合的容易程度、稳定性要求、可用的仪器、以及可支配的供应物。

[0201] 非放射性标记常常是通过间接手段连接的。通常,一种配体分子(如生物素)被共价地结合到该分子上。然后该配体与一种抗配体(如抗生蛋白链菌素)分子结合,该分子是固有地可检测的或者与信号系统(如一种可检测的酶、一种荧光化合物、或一种化学发光化合物)共价结合。可以使用多种配体和抗配体。其中一种配体具有一种天然的抗配体,如生物素、甲状腺素、以及肾上腺皮质素,它可被用于连合这些标记的自然发生的抗配体。

[0202] 这些分子还可以被直接结合至生成信号的化合物,如通过用一种酶或荧光基团结合。作为标记的所感兴趣的酶主要是水解酶,特别是磷酸酶、酯酶以及糖苷酶、或氧化还原酶,特别是过氧化物酶。作为标记部分的有用的荧光化合物包括但是不局限于如:荧光素及其衍生物、碱性玫瑰精及其衍生物、丹磺酰基、伞形酮、以及类似物。作为标记部分的有用的化学发光化合物包括但是不限于如:荧光素、以及 2,3-二氢酞嗪二酮,如鲁米诺。对于可以使用的各种标记或信号产生体系的评述,见美国专利号 4,391,904。

[0203] 检测标记的手段是本领域普通技术人员熟知的。因此,例如,当该标记是一种放射性标记时,检测手段包括闪烁计数器或如在放射自显影法中的照相胶片。当该标记是荧光标记时,可通过用具有适当光波长激发荧光染料并检测产生的荧光可对其进行检测。可通过照相胶片、通过使用电子探测器(例如电荷耦合器件(CCD)或光电倍增管及其类似物)方法,可对该荧光进行视觉上的检测。类似地,可通过提供酶的适当底物并检测产生的反应产物来对酶标记进行检测。最后,可通过观察与该标记相关的颜色对简单的比色标记进行简单地检测。因此,在各种试纸条测定中,所偶联的金经常显示成粉红色,而各种结合的珠显示出珠的颜色。

[0204] 标记的芳香族的阳离子肽的诊断应用。

[0205] 在一个实施方案中,该方法包括对一种细胞或一位受试者给予该标记的芳香族的阳离子肽并且完成一种希望的定位。在本发明的一个实施方案中,该方法包括对一个人细胞给予该标记的芳香族的阳离子肽并且完成一种希望的定位。一种希望的定位将一种标记的芳香族的阳离子肽特异性地放在在一种希望的细胞组分(如线粒体)中。在本领域中的普通技术人员将会认可的是:本发明的任何数目的标记的芳香族的阳离子肽可以被递送至一种细胞,并且该方法保持在本发明的精神和范围之内。此外,在本领域中的普通技术人员将会认可的是:来自不同类型来源的不同类型的细胞的细胞成像在本发明的精神和范围之内。

[0206] 本发明的标记的芳香族的阳离子肽可被用于在体外和/或在体内以检出所感兴趣的靶分子。在许多情况中,这些标记的芳香族的阳离子肽仅仅可以在一种同源的测定中被添加以测试样品、在检出该靶标之前不要求添加多种试剂和/或洗涤步骤。本发明的标记的芳香族的阳离子肽可以在体外通过简单的添加至包含这些靶分子或细胞的一种测试样品而与靶分子或细胞区室接触。用于在体外测定的测试样品可以是,如:分子文库、细胞溶解产物、来自色谱柱的分析物洗脱物、以及类似物。该在体外测定经常在一种容器中进行,比如例如:一种多孔板的一个孔、一种试管、一种 Eppendorf 管、一种分光光度计样品池、一种分析系统的导管、一种微流体系统的通道、一种开放的阵列、以及类似物。

[0207] 其中本发明的标记的芳香族的阳离子肽被给予至活细胞,可以发生与靶标在该细胞表面或在该细胞本身之内的结合,例如该标记的芳香族的阳离子肽被转移进入该细胞以使其与一种细胞内的靶分子相接触。在一些情况下,该标记的芳香族的阳离子肽可以穿透一种细胞(怀疑该细胞仅仅通过将该细胞暴露给包含这些标记的芳香族的阳离子肽的一种培养基而被动的包含一种选定的靶标)。在其他的实施方案中,该标记的芳香族的阳离子肽通过在本领域中已知的机制被主动的转移进入该细胞,比如例如:穿孔、注射、转导、连同转移肽、以及类似机制。

[0208] 在用这些标记的芳香族的阳离子肽接触这些细胞后,这些方法可以包括用一种能

源刺激该细胞。在一个实施方案中,该能源是一种光源。在一个实施方案中,该标记的芳香族的阳离子肽的显影剂是由该能源激活的。在一个实施方案中,在通过该能源将它照明时,该标记的芳香族的阳离子肽的显影剂给出一种可检测信号。在本发明的一个实施方案中,该显影剂给出响应于该能源的一种可检测出的荧光。

[0209] 在本发明的一个实施方案中,通过响应于该光源的显影剂给出的该荧光可以被观测到并且测量。在本发明的一个实施方案中,该荧光用一种共聚焦显微镜观察和测量。在本领域中的普通技术人员将会认可的是:被用于观测和测量荧光的不同装置是在本发明的精神和范围之内。

[0210] 实例

[0211] 本发明将通过以下实例进一步说明,这些实例不得以任何方式解释为限制性的。

[0212] 实例 1- 在饲喂一种高脂饮食的大鼠中的线粒体机能障碍

[0213] 为确定饮食诱导的肥胖对该对照的骨骼肌中细胞氧化还原平衡的潜在影响,开发了一种新颖的方法来测量在渗透性作用骨骼肌纤维束中线粒体 H_2O_2 排放速率。见 Anderson et al., J. Clin Invest (doi:10.1172/JCI37048)。在通过 NADH- 连接的复合物 I 底物支持的基本 (状态 4) 呼吸期间,该过氧化物形成速率是低的,代表总的 O_2 利用的 0.1-0.5% (Anderson&Neufer, Am J Physiol Cell Physiol 290, C844-851 (2006); St-Pierre et al., J Biol Chem 277, 44784-44790 (2002))。然而,主要地通过琥珀酸酯、一种 $FADH_2$ - 连接的复合物 II 底物支持的呼吸,通过生成反向电子流返回复合物 I 引出过氧化物产生的高速率 (Anderson&Neufer, Am J Physiol Cell Physiol 290, C844-851 (2006); St-Pierre et al., J Biol Chem 277, 44784-44790 (2002); Liu et al., J Neurochem 80, 780-787 (2002); Turrens et al., Biochem J 191, 421-427 (1980))。这种实例说明的方法用于测量在渗透性作用肌肉组织中的线粒体功能,并且检验高脂饮食对线粒体功能的影响。

[0214] 动物和试剂。从 Charles River 实验室 (Wilmington, MA) 获得三十只雄性 Sprague-Dawley 大鼠,并且将它们收容在一个温度 ($22^{\circ}C$) 和光线受控的房间中并且让它们自由得到食物和水。对最初的三十只大鼠中的二十只保持一种高 (60%) 脂肪饮食 (Research Dyets, Bethlehem, PA)。从麻醉动物获得骨骼肌 (100mg/kg 皮下注射氯胺酮-甲苯噻嗪)。在手术后,在使其麻醉时通过颈脱位杀死动物。Amplex Red Ultra 试剂获自 Molecular Probes (Eugene, OR)。Stigmatellin 和辣根过氧化物酶 (HRP) 获自 Fluka Biochemika (Buchs, Switzerland), 并且全部其他的化学制品是购自 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)。全部的动物研究是经东方卡罗莱纳州大学学会的动物管理和使用委员会 (the East Carolina University Institutional Animal Care and Use Committee) 批准的。

[0215] 渗透性作用肌纤维束的制备。简言之,切下比目鱼肌、RG、以及 WG 肌肉的小部分 (25mg), 并且放置入冰冷缓冲液 X 中,该缓冲液包含 60mM K-MES、35mM KCl、7.23mM K_2EGTA 、2.77mM CaK_2EGTA 、20mM imidazole、0.5mM DTT、20mM taurine、5.7mM ATP、15mM PCr、以及 6.56mM $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (pH 7.1、295mosmol/kg H_2O)。该肌肉已被修剪掉结缔组织并且切成纤维束 (2×7 mm, 4-8mg 湿重)。在解剖显微镜下用一对针尖钳子轻轻地将纤维与彼此分离成该纤维束的最大表面面积,仅留下小的接触区域。为浸透这些肌纤维,将每个纤维束置于包含 50 μ g/ml 皂苷的冰冷缓冲液 X 中,并且在 $4^{\circ}C$ 下在旋转器上孵育达 30 分钟。在渗透性作用之后,将这些渗透性作用纤维束 (PmFB) 在包含 (以 mM) 110K-MES、35KCl、1EGTA、10 K_2HPO_4 、

3MgCl₂-6H₂O、5mg/ml BSA、0.1 谷氨酸酯、以及 0.05 苹果酸酯 (pH 7.4, 295mOsm) 的冰冷却缓冲液 Z 中洗涤, 并且在 4℃ 下在一种旋转器上保持在缓冲液 Z 中直到分析 (小于 2 小时)。

[0216] 线粒体呼吸和 H₂O₂ 排出物的测量。在 30℃ 下在缓冲液 Z 中使用 Oroboros O₂K Oxygraph (Innsbruck, Austria) 实施高分辨率呼吸运动测定。在呼吸状态 4 期间在 30℃ 下在缓冲液 Z (10 μg/ml 寡霉素) 中通过使用具有温度控制和磁力搅拌 (> 1000rpm) 的一种 Spex Fluoromax 3 (Jobin Yvon, Ltd.) 荧光分光计对 Amplex Red 的氧化进行连续监测来测量线粒体的 H₂O₂ 排放。在由 HRP 催化的 Amplex Red 试剂与 H₂O₂ 1 : 1 化学算法反应以产生该荧光化合物试卤灵和相等摩尔的 O₂。试卤灵具有 563nm/587nm 的激发 / 发射特性并且一旦形成就是极端稳定的。在基线荧光 (仅有反应物) 被确定以后, 在 37℃ 下通过将一种渗透性作用纤维束添加入 300 μl 包含 5 μM Amplex Red 和 0.5U/ml HRP 的缓冲液 Z 启动与琥珀酸酯的反应。对于这些琥珀酸酯实验, 将该纤维束在不含底物的缓冲液 Z 中简单洗涤以从该洗液除去残余丙酮酸酯和苹果酸酯。在有说明时: 10 μg/ml 寡霉素被引入该反应缓冲液以阻断 ATP 合酶并且确保呼吸状态 4。在每种实验的结束时, 在 ddH₂O 中洗涤 PmFBs 以移出盐类并且在一种冷冻干燥器 (LabConco) 中冷冻干燥。该呼吸速率被表示为 pmol · s⁻¹ · mg 干重⁻¹, 并且线粒体 H₂O₂ 排放表示为 pmol · min⁻¹ · mg 干重⁻¹。

[0217] 统计分析。数据用平均数 ± SE 表示。使用一种 one-way ANOVA 与 Student-Newman-Keuls 方法对于在各组之中的显著性的分析进行统计分析。显著水平设定在 P < 0.05。

[0218] 结果。为提供对产生和 / 或排放与累进的增加的代谢通量 (没有改变 ATP 要求) 有关的 H₂O₂ 的该呼吸系统潜在能力的一种更好的测量, 对响应于在由该复合物 I 底物丙酮酸酯和苹果酸酯支持的呼吸状态 4 期间琥珀酸酯的滴定的 H₂O₂ 排放的改变进行持续监测。通过将 H₂O₂ 排放速率对琥珀酸酯浓度绘图, 可以推论的是: 在该呼吸系统的氧化剂排放潜能中, 该曲线的左移应当表明一种增强而向右移动应当表明一种减少。图 1A 显示一种代表性的轨迹, 该轨迹比较了从饲喂标准食物、猪油 3 天、高脂肪食物 3 周的大鼠制备的来自渗透性作用骨骼肌纤维的线粒体 H₂O₂ 排放率。该试验是通过将少量谷氨酸酯和苹果酸酯 (G/M) 添加至一种不供能的纤维束 (FB) 而起始的, 随后连续增加琥珀酸酯的浓度 (以 mM)。

[0219] 出人意料地, 从一种标准高碳水化合物食物饮食转换为 100% 脂肪 (猪油) 达 3 天的大鼠、或转换为 60% 高脂饮食达 3 周的大鼠中诱导了在线粒体 H₂O₂ 排放的最大速率的一种显著的 3 至 4 倍的增加, 在敏感性中极少至没有变化 (图 1A 和图 1B)。在琥珀酸酯滴定结束时添加鱼藤酮消除了 H₂O₂ 排放 (未显示), 证实复合物 I 作为来自对照和高脂肪进食大鼠两者过氧化物产物的来源。还通过在抗霉素 (复合物 III 抑制剂) 存在下丙酮酸酯 / 苹果酸酯滴定测量了线粒体氧化剂排放潜能, 再次揭示了在高脂肪进食大鼠中 H₂O₂ 排放的大于 2 倍的更高的最大速率 (图 2)。这些发现证明了: 在尽可能少的转换为一种高脂饮食后在少至三天之内在骨骼肌中该线粒体氧化剂排放潜能就明显增加。

[0220] 实例 2- 在饲喂一种高脂饮食的大鼠中芳香族的阳离子肽对 ROS 产物的作用

[0221] 与通过碳水化合物代谢比较, 在通过脂肪酸支持的基本呼吸期间过氧化物产物是更多的, 增加由一种高脂饮食诱导的线粒体氧化剂排放潜能的可能性可以通过在氧化剂产物持续的上升而促成 (即, 通过一种 ROS 诱导的 ROS 释放机制)。为测试这种假说, 在饲喂高脂肪的大鼠中检验了该芳香族的阳离子肽 SS-31 对线粒体功能的影响。SS-31 是

独特性在于它特异性地定位在线粒体内膜之内,它在线粒体内膜内清除 ROS 而没有影响膜电位或者呼吸控制。这种小的肽抗氧化剂已经显示在经受心肌顿抑的心脏中有效地降低 ROS(Zhao et al., J BiolChem 279,34682-34690(2004)),在移植以后在胰腺小岛细胞中有效地降低 ROS(Thomas et al., Journal of the American Society of Nephrology 16, TH-FC067(2005)),并且在帕金森氏综合征和肌萎缩侧索硬化疾病的动物模型中有效地降低 ROS(Petri et al., J Neurochem 98,1141-1148(2006);Szeto et al., AAPS J 8, E521-531(2006))。

[0222] 饲喂高脂肪组的 10 只大鼠每日接受腹膜内注射溶解在磷酸酯缓冲盐水中的 SS-31(1.5mg/kg)。在体外(图 3A)和在体内(图 3B)建立了对于 SS-31 的剂量相应曲线。根据在实例 1 中所说明的方法测量线粒体功能。两种剂量相应曲线都揭示:在琥珀酸酯支持的呼吸期间线粒体 H_2O_2 排放减少大于 50%。

[0223] 下一步,将大鼠置于一种高脂饮食(60%)达六周,有或者没有每日给予 SS-31。对渗透性作用纤维实施琥珀酸酯滴定实验再次揭示在饲喂高脂肪的大鼠中 H_2O_2 排放的最大速率中的一种显著的 3 倍增加(图 3C)。来自饲喂高脂肪的大鼠的渗透性作用纤维在由棕榈酰肉毒碱支持的基本呼吸期间还产生接近一种 2 倍的更高的 H_2O_2 排放速率(图 3D)。然而,在用 SS-31 处理的饲喂高脂肪的大鼠中,在琥珀酸酯和棕榈酰肉毒碱支持的呼吸两者期间完全防止了线粒体氧化剂排放潜能的增加(图 3C 和 3D)。在来自饲喂高脂肪的大鼠纤维中由丙酮酸酯/苹果酸酯支持的基本呼吸被轻微地增加了,提示一些程度的解偶联(图 3E)。然而,在饲喂高脂肪的大鼠中,丙酮酸酯/苹果酸酯或棕榈酰肉毒碱支持的呼吸基本率不受 SS-31 处理影响(图 3E 和 3F),表明用 SS-31 处理 H_2O_2 排放的正常化不是由一种增加的质子泄漏介导的。SS-31 处理还不影响在饲喂高脂肪的大鼠中的重量增加(数据未显示)。共同地,这些发现证明:一种靶向线粒体的抗氧化剂(比如本发明的这些芳香族的阳离子肽)的给药足以预防或者补偿通过一种高脂饮食诱导的线粒体氧化剂排放潜力的增加。因此,在哺乳动物受试者体内在预防或治疗由线粒体机能障碍所引起的胰岛素抵抗性的方法中,本发明的这些芳香族的阳离子肽的给药是有用的。

[0224] 正在不断地被认识到:许多蛋白的细胞内的定位和活性(如,受体、激酶/磷酸酶、转录因子、等等)通过包含特异性硫醇(-SH)残基的氧化状态被可逆的控制,从而导致以下概念,即,在细胞内的氧化还原环境中的改变影响该细胞的总的生物学状况(Schafer and Buetner, Free Radic Biol Med 30,1191-1212(2001))。谷胱甘肽(GSH)、在细胞中最大量的氧化还原缓冲物通过谷胱甘肽过氧化物酶在 H_2O_2 存在下被可逆的氧化为 GSSG,并且通过谷胱甘肽还原酶与由 NADPH 提供的电子还原回到 GSH。GSH/GSSG 的比率是非常动态的、大大地反映该细胞的总的氧化还原环境。

[0225] 蛋白均浆通过使 100mg 的粉末状的冰冻的肌肉在一种包含(以 mM)下列物质的缓冲液中匀浆来制备:10Tris、1EDTA、1EGTA、2 原钒酸钠(NaOrthovanadate)、2 焦磷酸钠(NaPyrophosphate)、5NaF、蛋白酶抑制剂混合物(完全的),在 pH7.2 下。在匀浆以后,将 1% Triton X-100 添加入该蛋白悬浮液,涡旋混合(cotexed)并且允许将其置于冰上达 5 分钟。然后将这些管在 10,000rpm 下旋转达 10 分钟以使该不能溶解的碎片成小球。对于 GSSG 测量,将组织在一种包含 20mM 甲基-2-乙烯基吡啶三氟甲磺酸酯的溶液中匀浆以清除在该样品中的全部还原的硫醇。然后使用这些试剂测量总的 GSH 和 GSSG,并且根据该制造

商的说明书（如需要具有小的改进）由该 GSH/GSSG 测定（Oxis Research）提供校准的设置。

[0226] 出人意料地，已经发现：无论 SS-31 处理，高脂肪饲喂导致在总的细胞谷胱甘肽含量（GSht）中的一种约 30% 的减少（图 3G），证明了高脂肪摄入危害了在骨骼肌中 GSH 介导的氧化还原缓冲能力。为建立在由高脂饮食造成的线粒体氧化剂排放增加与其对骨骼肌的总的氧化还原环境的影响之间的一种连接，在两种状态之下在饲喂食物和饲喂高脂肪大鼠的骨骼肌中测量了 GSH 和 GSSG 两者；这是在禁食 10 小时和给予一种标准葡萄糖负荷 1 小时以后（口服的强饲法，禁食 10 小时）。在饲喂食物的对照中，葡萄糖摄取引出在该 GSH/GSSG 比率（标准化为 GSht，图 3H）中的一种约 50% 减少，估计可能反映响应于该胰岛素激发的葡萄糖代谢作用增加的一种急性的转入一种更氧化状态。在饲喂高脂肪的大鼠中，在禁食 10 小时的状态中相对于饲喂食物的对照中该 GSH/GSSG 比率已经下降约 50%，并且响应于该葡萄糖摄取进一步减少。然而，SS-31 处理甚至在响应于葡萄糖摄取时保持了该 GSH/GSSG 比率接近对照水平。这些发现证明了一种高脂饮食使在骨骼肌中该细胞内的氧化还原环境改变成一种更氧化的状态。用 SS-31 处理能保持在骨骼肌中该细胞内的氧化还原态，估计可能通过清除原发氧化剂并且由此补偿由一种高脂饮食诱导的总的 GSH- 介导的氧化还原缓冲能力的减少。因此，一种靶向线粒体的抗氧化剂（比如本发明的这些芳香族的阳离子肽）的给药或者预防或者补偿在饲喂一种高脂饮食的大鼠中发展的代谢机能障碍。因此，在哺乳动物受试者体内在预防或治疗这种代谢机能障碍的方法中，本发明的这些芳香族的阳离子肽的给药是有用的。

[0227] 实例 3- 口服葡萄糖耐量测试

[0228] 为确定是否在细胞内的氧化还原环境中线粒体来源的改变可能关联高脂饮食诱导的胰岛素抵抗性的病原学，在高脂饮食六周以后的大鼠中进行了口服葡萄糖耐量试验。在实验的日子里，在经由强饲法给予 2g/kg 葡萄糖溶液之前 10 小时，将食物移出。在全血样品中测定了葡萄糖水平（Lifescan, Milpitas, CA）。使用一种大鼠 / 小鼠 ELISA 试剂盒（Linco Research, St. Charles, MO）测定血清胰岛素水平。禁食数据用来确定如禁食胰岛素（ $\mu\text{U/ml}$ ） $\times$ 禁食葡萄糖（mM）/22.5 计算的自我平衡模型评估（HOMA）。

[0229] 与饲喂标准食物的大鼠相比较，在饲喂高脂肪的大鼠中响应于该口服葡萄糖负荷的血糖（图 4A）和胰岛素（图 4B）是更高的并且更持久。将用 SS-31 处理饲喂高脂肪的大鼠用响应于该口服的葡萄糖负荷血糖和胰岛素两者进行标准

[0230] 增加的自我平衡模型评估（HOMA，图 4C）、和在对于血糖和胰岛素两者的该曲线之下更大的面积（图 4D）证实在饲喂高脂肪的大鼠中胰岛素抵抗性的发展。用 SS-31 处理饲喂高脂肪的大鼠完全封阻了胰岛素抵抗性的发展（图 4C 和图 4D）。为进一步评估胰岛素敏感性，在禁食 10 小时以后或在接受一种口服的葡萄糖负荷 1 小时以后测量了在来自动物的骨骼肌中该胰岛素信号蛋白 Akt 的磷酸化状态。响应于葡萄糖摄取，在饲喂食物对照的骨骼肌中 AKT 磷酸化增加约 5 倍，但是在饲喂高脂肪的大鼠中无变化（图 4E 和 4F），证实了在该胰岛素信号的该水平下存在胰岛素抵抗性。用 SS-31 处理高脂肪饲喂的大鼠完全保持了响应于葡萄糖摄取的 Akt 磷酸化（图 4E 和 4F），再次表明胰岛素敏感性的保持。因此，一种靶向线粒体的抗氧化剂（比如本发明的这些芳香族的阳离子肽）的给药预防在饲喂一种高脂饮食的大鼠中发展的胰岛素抵抗性。因此，在哺乳动物受试者体内在预防或治疗胰岛素

抵抗性的方法中,本发明的这些芳香族的阳离子肽的给药是有用的。

[0231] 实例 4- 在受试人中的线粒体机能障碍

[0232] 为了加强在细胞内氧化还原环境中来自线粒体的改变与胰岛素抵抗性之间的联系、并且为了查看是否相同的现象可转移到人类,在从瘦的、胰岛素敏感的 ($BMI = 21.6 \pm 1.2 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-2}$, $HOMA = 1.2 \pm 0.4$) 以及肥胖的、胰岛素抵抗性的 ($BMI = 43.0 \pm 4.1 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-2}$, $HOMA = 2.5 \pm 0.7$, $P < 0.05$) 多位男性人类受试者的通过肌肉活组织检查所获得的渗透性作用骨骼肌纤维束中,对线粒体 H_2O_2 排放和呼吸的对照进行了测量。

[0233] 招募了混合种族的八位健康的男性 (年龄 18-31 岁) 参与这项调查研究:五位归为瘦的类型 ($BMI \leq 24.9 \text{ kg/m}^2$), 并且三位归为病态的肥胖类型 ($BMI \geq 35 \text{ kg/m}^2$)。全部的参与者为非吸烟者,没有代谢疾病史。这些受试者都没有患有任何疾病或者进行任何已知改变代谢作用的药物治疗。在该试验当天,受试者到实验室报道随后禁食过夜 (约 12 小时)。获得了一种禁食的血样用于测定葡萄糖和胰岛素 (Labcorps)。记录身高和体重,并且在局部皮下麻醉 (1%利多卡因) 下通过经皮针吸活组织检查技术从股肌外侧的外廉获得了骨骼肌活组织检查。将活组织检查样品的一部分在液 N_2 中快速冷冻用于蛋白质分析,另一部分被用于制备渗透性作用纤维束。

[0234] 结果。与瘦者比较,在肥胖者中响应于琥珀酸酯的滴定线粒体 H_2O_2 排放是约高 2 倍 (图 5A),并且在由脂肪酸支持的基本呼吸期间接近高 4 倍 (图 5B)。尽管在 H_2O_2 排放方面不同、基本 O_2 利用在瘦的受试者与肥胖受试者之间是相似的 (图 5C);结果是,在谷氨酸酯 / 苹果酸酯 / 琥珀酸酯期间线粒体自由基泄漏速率是约高 2 倍,并且在由棕榈酰肉毒碱支持的基本呼吸期间为 > 4 倍 (图 5D)。在由该复合物 I 底物谷氨酸酯 / 苹果酸酯支持的呼吸期间来自这些肥胖受试者的渗透性作用肌纤维中最大的 ADP- 激发的 O_2 消耗是约低 35% (图 5C),并且与肥胖相关联的骨骼肌呼吸量整体减少相一致。最后,类似于饲喂一种高脂饮食的大鼠,总的细胞 GSH 含量和 GSH/GSSG 比率二者都是比肥胖人类的骨骼肌中低约 50% (图 5E 和 5F),表现出一种总的较低的氧化还原缓冲容量和一种明确的更氧化的细胞内氧化还原环境二者。

[0235] 总之,这些发现共同地建立了线粒体 ROS 排放,并且造成转入一种更氧化的骨骼肌氧化还原环境作为高脂饮食诱导的胰岛素抵抗性的一种潜在原因。线粒体的 H_2O_2 排放潜能的增加似乎是促成这种移入氧化还原环境的主要因素。因此,一种靶向线粒体的抗氧化剂 (比如本发明的这些芳香族的阳离子肽) 的给药预防或补偿了由营养过量发展的代谢机能异常。因此,在受试验的人中在预防或治疗胰岛素抵抗性的方法中,本发明的这些芳香族的阳离子肽的给药是有用的。

[0236] 实例 5- 在 Zucker 大鼠模型中通过本发明的芳香族的阳离子肽对胰岛素抵抗性的预防和治疗

[0237] 为进一步在一方面证明胰岛素抵抗性的预防,并且在另一方面证明胰岛素抵抗性的治疗,对肥胖 (fa/fa) Zucker 大鼠 (一种饮食诱导的胰岛素抵抗性的模型) 测试了本发明的这些芳香族的阳离子肽。与该饲喂高脂肪 6 周的 sprague-Dawley 大鼠模型相比较 (如被用于实例 1-3),该肥胖 Zucker 大鼠发展了一种非常高程度的肥胖和胰岛素抵抗性。如在该饲喂高脂肪的大鼠中,线粒体机能障碍 (增加的氧化剂排放潜能) 在来自肥胖 Zucker 大鼠的渗透性作用纤维中也是明显的。

[0238] 第一,为检查本发明的这些芳香族的阳离子肽的预防胰岛素抵抗性的作用,对年轻的 Zucker 大鼠(约 3-4 周龄)给予 SS-31 达约 6 周。因为这些年轻的大鼠还没有展示胰岛素抵抗性的迹象或症状,它们提供了用于对防止胰岛素抵抗性的方法的效力进行评定的一种有用的模型。经由皮下注射(i. p.)或口服给药(即喝水或强饲法)将 SS-31 (1.0-5.0mg/kg 体重)给予这些大鼠。

[0239] 预计 SS-31 给药将减少或防止在肥胖(fa/fa) Zucker 大鼠中正常发展的整体和肌肉胰岛素抵抗性的发展。测量结果包括体重、禁食葡萄糖/胰岛素/游离脂肪酸、葡萄糖耐量(OGTT)、在体外肌肉胰岛素灵敏度(孵育)、胰岛素信号的标志物(Akt-P, IRS-P)、对渗透性作用纤维上的线粒体功能研究(呼吸、H₂O₂ 排放)、细胞内氧化应激的标志物(脂类过氧化作用、GSH/GSSG 比率、乌头酸酶活性)、以及线粒体酶活性。在对照大鼠与给予 SS-31 的 fa/fa 大鼠之间做了一种比较。对照包括野生型和不给予 SS-31 的 fa/fa 大鼠。通过与以上列举的胰岛素抵抗性或线粒体机能障碍相关联的一种或多种标志物的下降表明了本发明的这些芳香族的阳离子肽对胰岛素抵抗性的成功预防。

[0240] 第二,为检查本发明的这些芳香族的阳离子肽的治疗胰岛素抵抗性的作用,对 Zucker 大鼠(约 12 周龄)给予 SS-31 达约 6 周。因为这些大鼠显示了肥胖和胰岛素抵抗性的迹象,它们提供了用于对治疗胰岛素抵抗性的方法的效力进行评定的一种有用的模型。经由 i. p. 或口服给药(即喝水或强饲法)将 SS-31 (1.0-5.0mg/kg 体重)给予这些大鼠。

[0241] 预计 SS-31 给药将改善或减少在这些较老的肥胖(fa/fa) Zucker 大鼠中正常发展的全身和肌肉胰岛素抵抗性。测量结果包括体重、禁食葡萄糖/胰岛素/游离脂肪酸、葡萄糖耐量(OGTT)、在体外肌肉胰岛素灵敏度(孵育)、胰岛素信号的标志物(Akt-P, IRS-P)、对渗透性作用纤维的线粒体功能研究(呼吸、H₂O₂ 排放)、细胞内氧化应激的标志物(脂类过氧化作用、GSH/GSSG 比率、乌头酸酶活性)、以及线粒体酶活性。在对照大鼠与给予 SS-31 的 fa/fa 大鼠之间做了一种比较。对照包括野生型和不给予 SS-31 的 fa/fa 大鼠。通过与以上列举的胰岛素抵抗性或线粒体机能障碍相关联的一种或多种标志物的下降表明了本发明的这些芳香族的阳离子肽对胰岛素抵抗性的成功治疗。

[0242] 等效物

[0243] 本发明不得就本申请中所说明的这些具体实施方案而言而受到限制,这些实施方案是旨在作为本发明的个别方面的单独的解说。无需背离本发明的精神和范围即可以做出对本发明的许多修改和变化,这对本领域的那些普通技术人员将是清楚的。除了在此已经列举的那些之外,从以上说明中在本发明范围内的功能等效方法和装置将对在本领域中的普通技术人员将是清楚的。这类修改和变化是旨在落入所附的权利要求的范围之内。本发明将仅仅由所附的权利要求的条件连同这些权利要求有权得到的等效物的全部范围所限制。应当理解的是本发明不限于具体的方法、试剂、化合物组合物或生物系统,它们当然可以变化。还应当理解,在此使用的术语仅仅是用于说明具体实施方案的目的,而且并非旨在是限制性的。

[0244] 在以下权利要求之内给出了其他的实施方案。

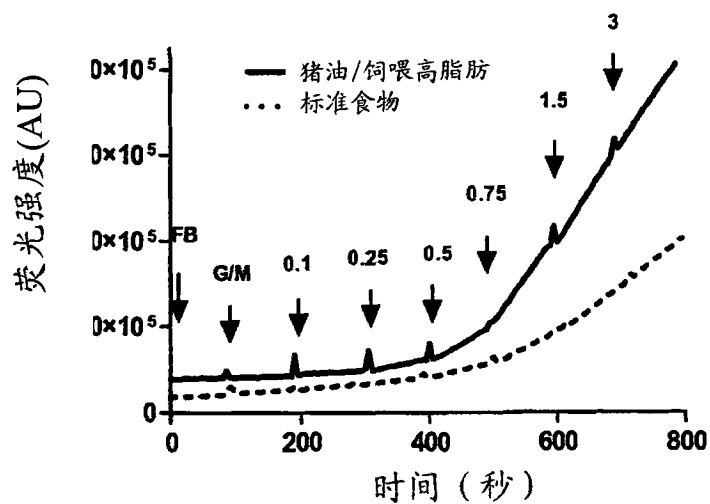


图 1A

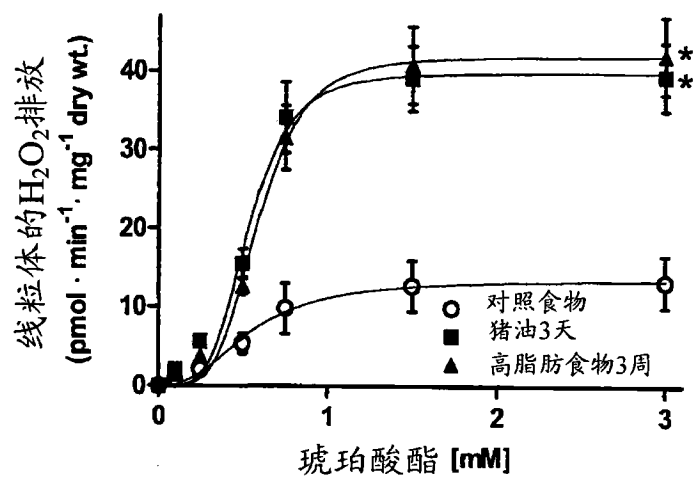


图 1B

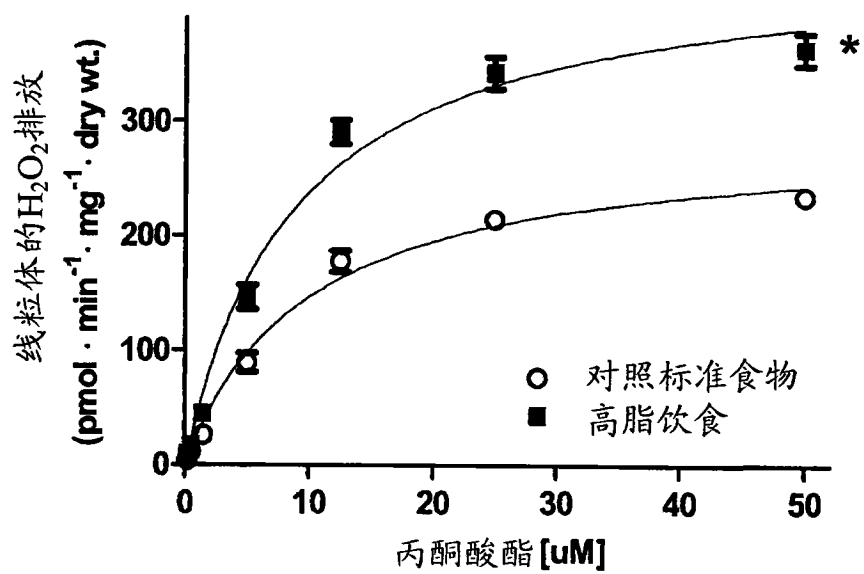


图 2

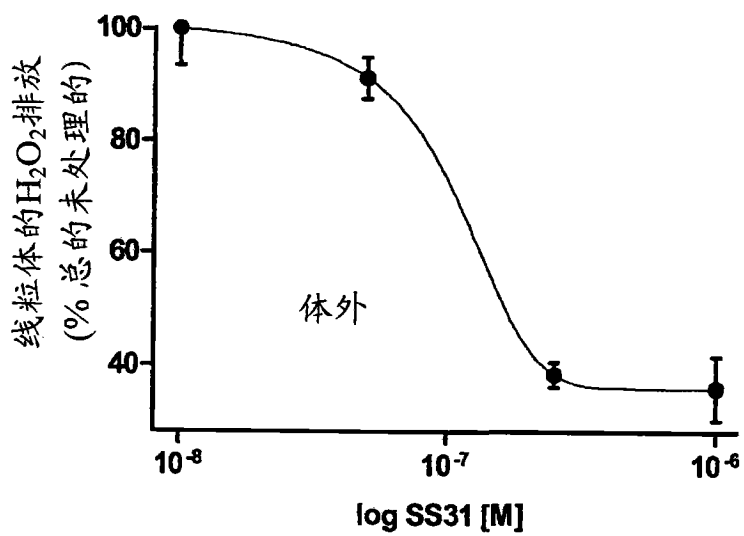


图 3A

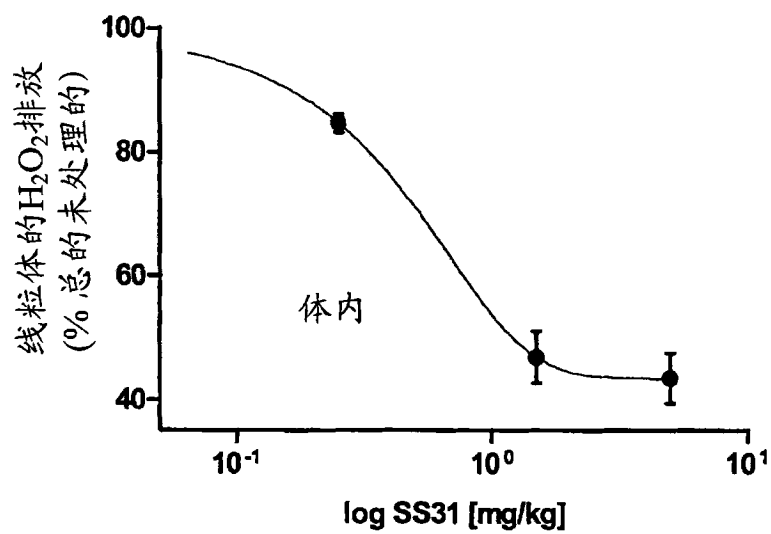


图 3B

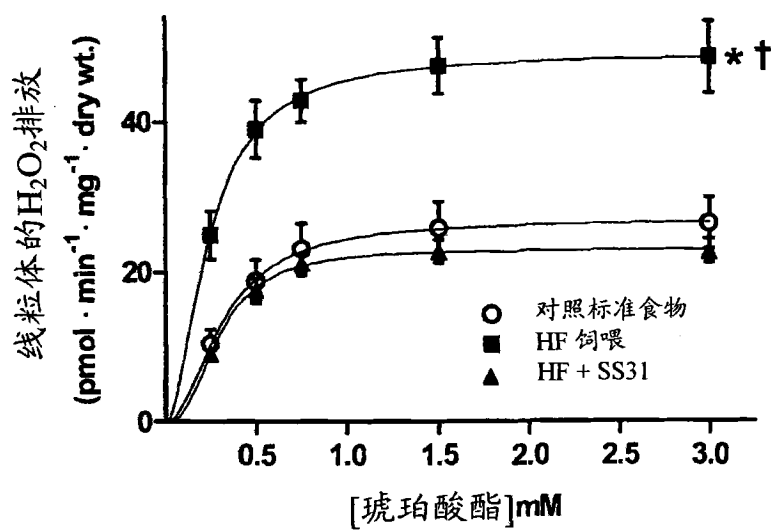


图 3C

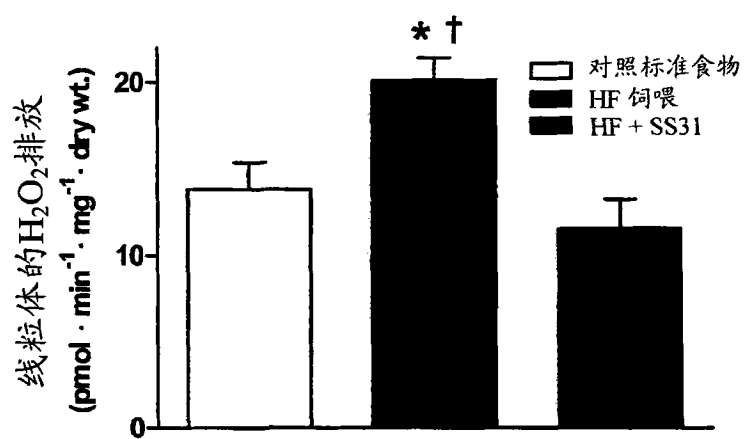


图 3D

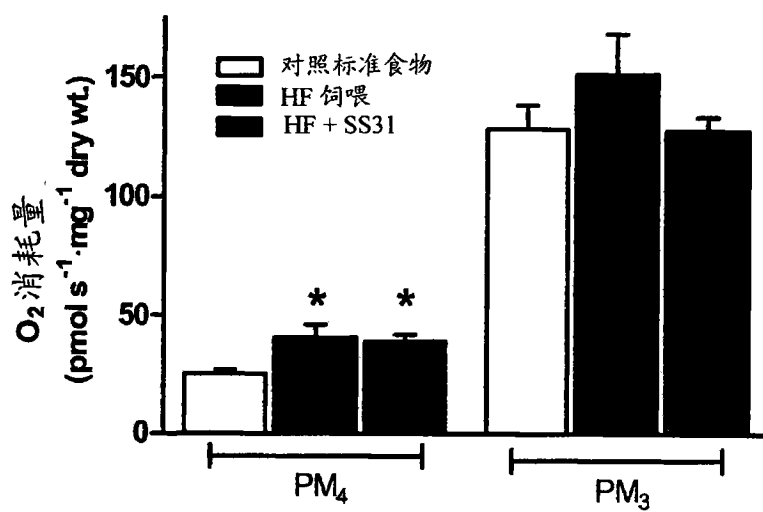


图 3E

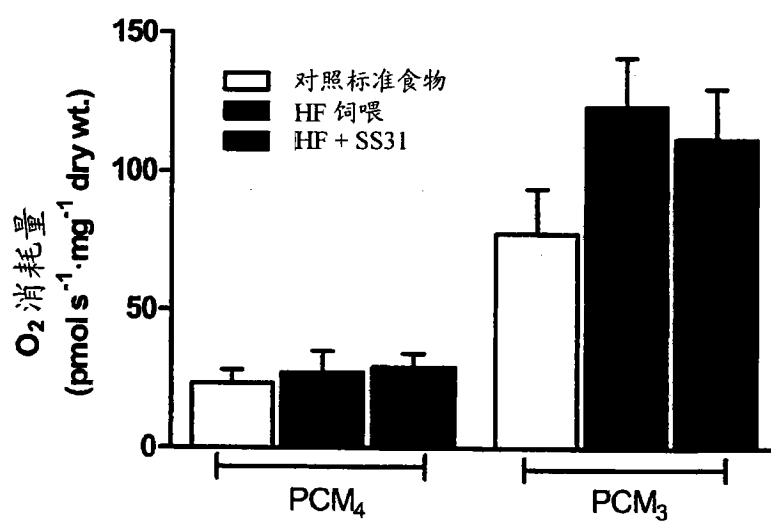


图 3F

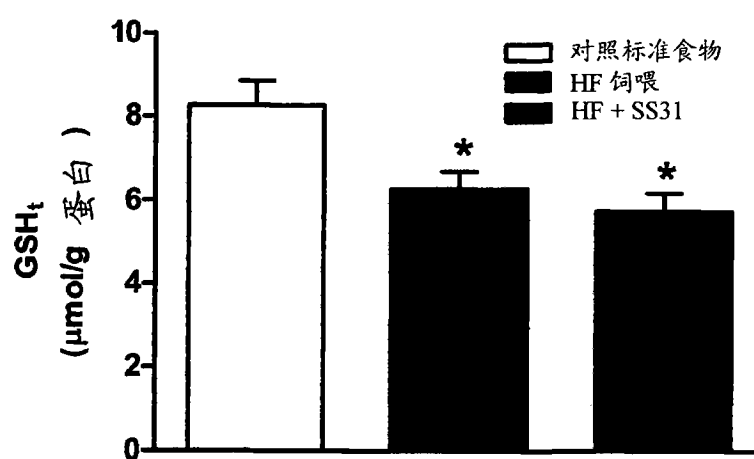


图 3G

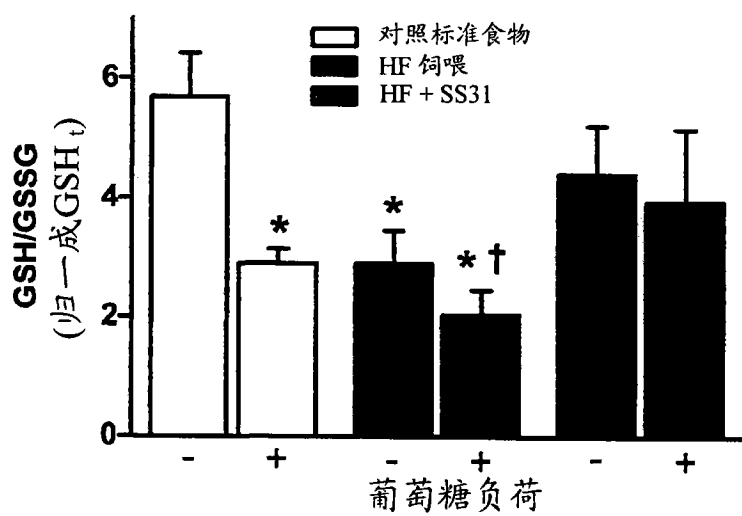


图 3H

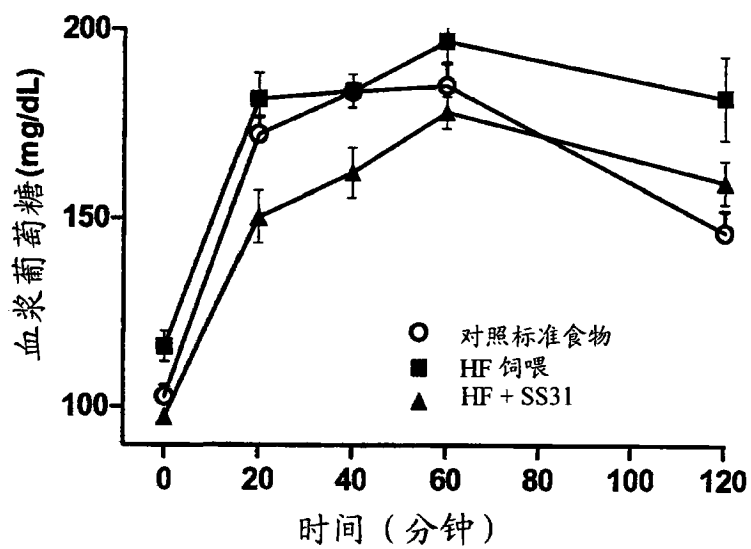


图 4A

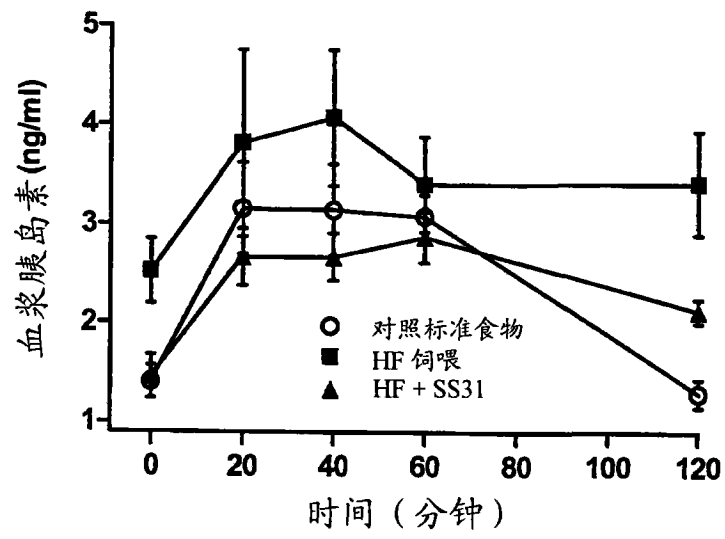


图 4B

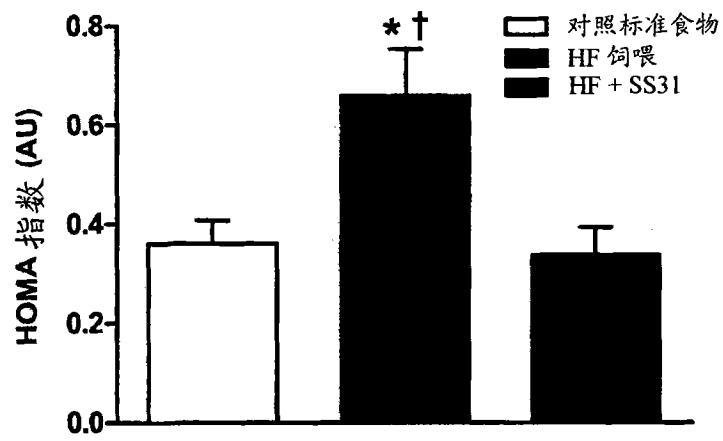


图 4C

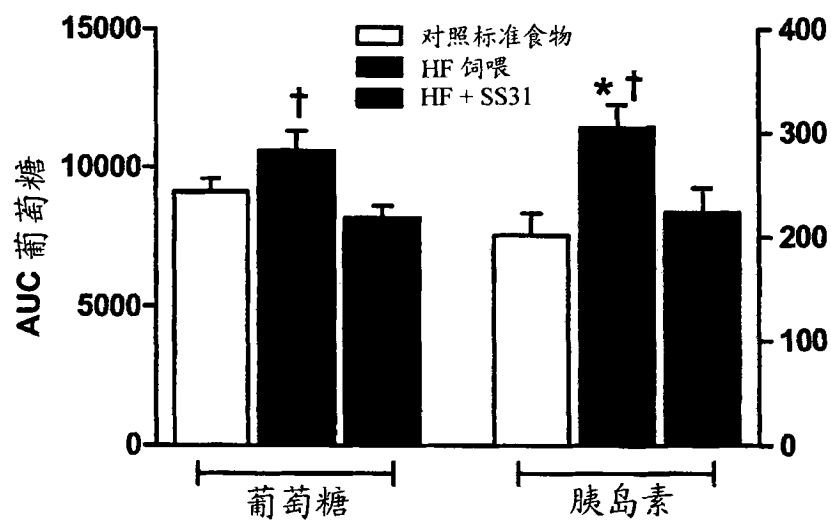


图 4D

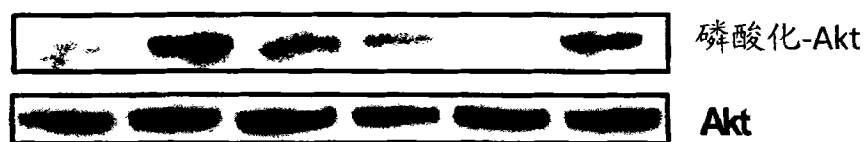


图 4E

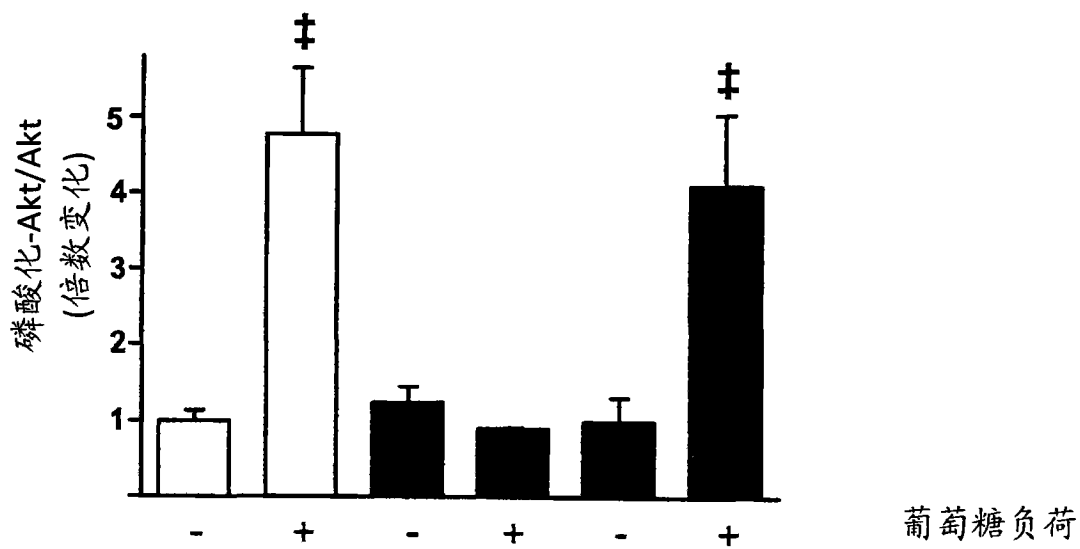


图 4F

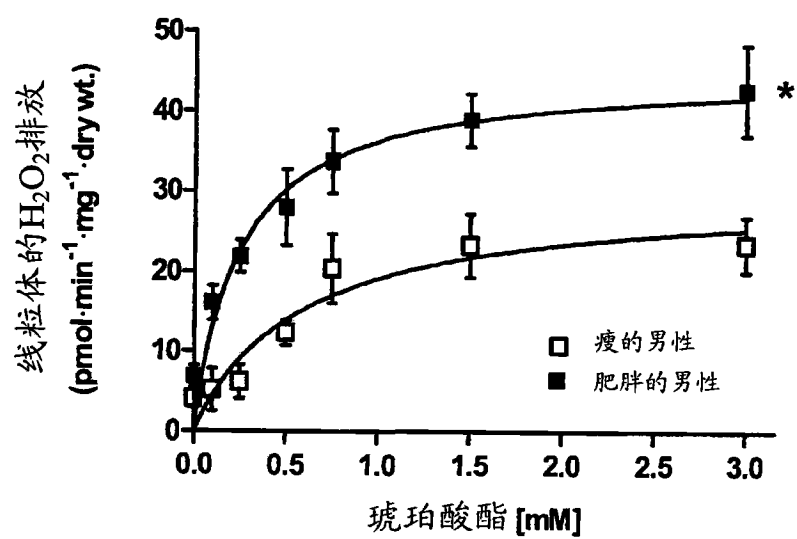


图 5A

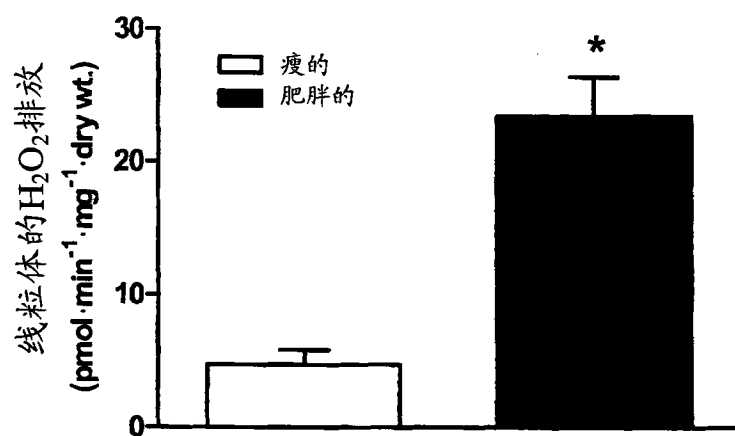


图 5B

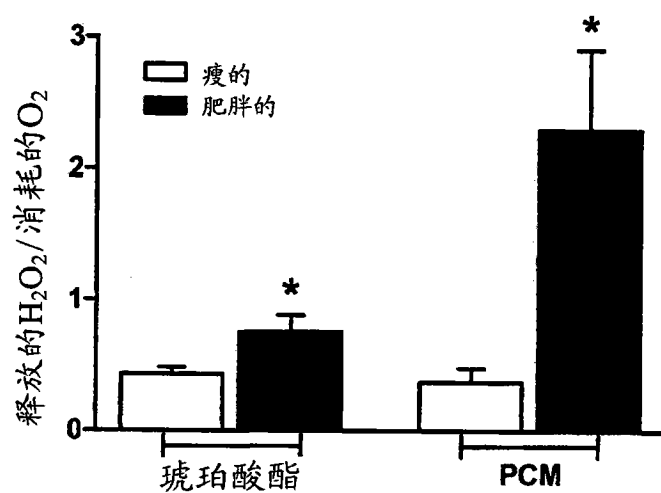


图 5C

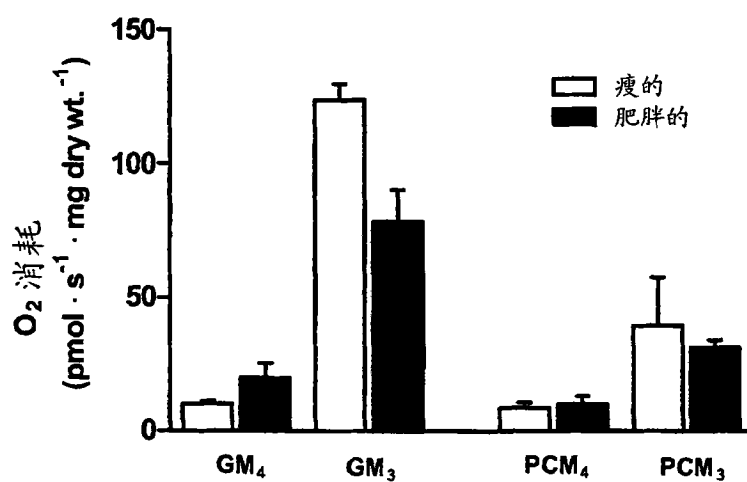


图 5D

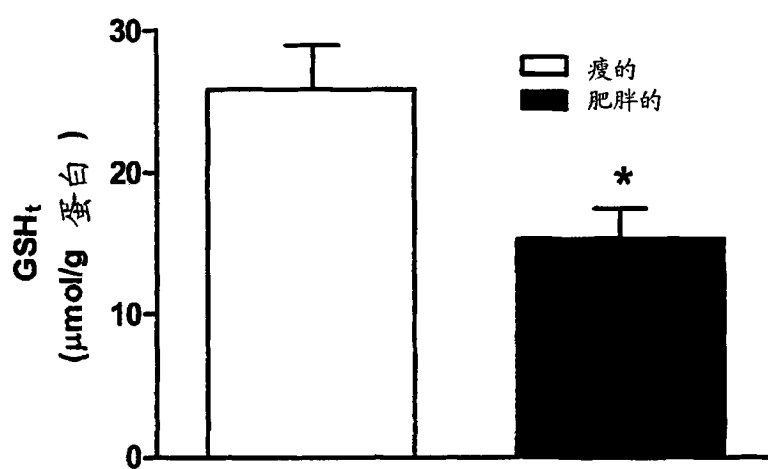


图 5E

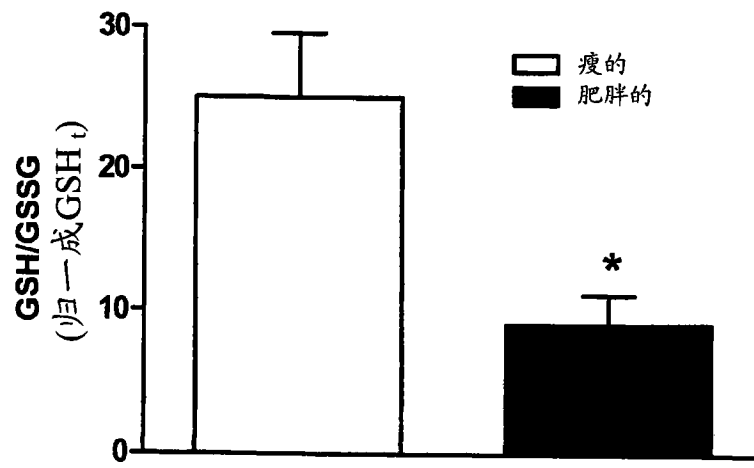


图 5F