

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2023 年 2 月 2 日 (02.02.2023)



(10) 国际公布号
WO 2023/006083 A1

(51) 国际专利分类号:

C07K 7/06 (2006.01) *A61P 25/00* (2006.01)
C07K 7/08 (2006.01) *A61P 9/12* (2006.01)
A61K 38/08 (2019.01) *A61P 25/28* (2006.01)
A61K 38/10 (2006.01) *A61P 25/16* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2022/109048

(22) 国际申请日: 2022 年 7 月 29 日 (29.07.2022)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

202110873573.5 2021年7月30日 (30.07.2021) CN

(71) 申请人: 英纳氏 (珠海) 药业有限公司 (INNERSE (ZHUHAI) PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [CN/CN]; 中国广东省珠海市横琴区豆蔻路1号粤澳合作中医药科技产业园科研总部大楼301室-83 (集中办公区), Guangdong 519031 (CN)。

(72) 发明人: 李健雄 (LI, Jianxiong); 中国湖北省武汉市东湖开发区高新大道666号光谷生物城B1, Hubei 430075 (CN)。

(74) 代理人: 北京律智知识产权代理有限公司 (BEIJING INTELLEGAL INTELLECTUAL PROPERTY AGENT LTD.); 中国北京市朝阳区慧忠路5号B1605、B1606、B1607, Beijing 100101 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

— 包括国际检索报告 (条约第21条 (3))。

(54) Title: NEUROPROTECTIVE POLYPEPTIDE COMPOUND AND APPLICATION THEREOF

(54) 发明名称: 一种神经保护多肽化合物及其应用

(57) Abstract: The present invention relates to the technical field of medicines, and disclosed are a neuroprotective polypeptide compound and an application thereof. The neuroprotective polypeptide compound comprises a polypeptide having the following chemical formula and a salt thereof: (M)m-(Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Glu/Asp-Ser/Thr-Asp/Glu-Val/Leu)-(N)n; m and n are integers from 0 to 3, but m and n are not zero at the same time; M is beta-Ala-His, beta-Ala-1-Methyl-His or beta-Ala-3-Methyl-His, and N is beta-Ala-His, beta-Ala-1-Methyl-His or beta-Ala-3-Methyl-His. An intravenous dosage of only 3 mg/kg can unexpectedly achieve a significant therapeutic effect, and achieve the same effect as NA1. The polypeptide compound can be used in combination with a hemolytic drug to provide a new possibility for the treatment of stroke.

(57) 摘要: 本发明公开了一种神经保护多肽化合物及其应用, 属于药物技术领域。包括具有如下化学式的多肽及其盐: (M)m-(Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Glu/Asp-Ser/Thr-Asp/Glu-Val/Leu)-(N)n; m和n为0-3的整数, 但m和n不同时为零; M为beta-Ala-His、beta-Ala-1-Methyl-His或beta-Ala-3-Methyl-His, N为beta-Ala-His、beta-Ala-1-Methyl-His或beta-Ala-3-Methyl-His。只需要3mg/kg的静脉注射剂量, 出乎意料地可达到显著的治疗效果, 与NA1达到了同样的效果。该多肽化合物可以与溶血药物组合使用, 为脑卒中治疗提供了新的可能。

WO 2023/006083 A1

一种神经保护多肽化合物及其应用

技术领域

本发明属于药物技术领域，特别涉及一种神经保护多肽化合物及其应用。

背景技术

Nerinetide (NA-1) 是一种神经保护剂，可通过终止细胞内 NO 自由基的产生，来干扰突触后密度蛋白 95 (PSD-95)。它在临床前缺血性脑卒中模型中可减少脑缺血再灌注的梗死面积，并改善其功能预后。针对成年的 12 小时治疗窗口内的大血管闭塞急性缺血性脑卒中患者，随机接受单次剂量为 2.6mg/kg 最大剂量为 270mg 的 Nerinetide，或者接受生理盐水安慰剂。研究的主要终点是随机化 90 天后的功能预后良好，定义为修正的 Rankin 量表 (mRS) 评分为 0-2 分；次要终点是神经功能残疾、日常生活活动中的功能独立性、良好的功能结果 (mRS0-1) 和死亡率。该实验共有 1105 例患者参与，其中 Nerinetide 组 549 人，安慰剂组 556 人。90 天内 mRS 评分为 0-2 的患者比例为：Nerinetide 组 337 人 (61.4%)，安慰剂组 329 人 (59.2%)。两组间的次要结果相似。同时本研究发现现在接受阿替普酶的患者中，Nerinetide 治疗导致阿替普酶效果受抑制。两组间严重不良事件发生率相同。参见 Michael D Hill et al. Efficacy and safety of nerinetide for the treatment of acute ischaemic stroke (ESCAPE-NA1): a multicentre, double-blind, randomised controlled trial. Lancet. 2020, 395 (10227), P878-887。

Nerinetide 是一条由 NMDAR GluN2B 亚单位的 C 端 9 个残基和核转运激活蛋白衍生的穿膜肽 TAT 组成的融合肽，可以结合 PSD-95 的 PDZ-1 或 PDZ-2 结构域，从而抑制 nNOS 的 NO 的产生，所以也叫 Tat-NR2B9c，其具体的氨基酸序列为：Tyr-Gly-Arg-Lys-Lys-Arg-Arg-Gln-Arg-Arg-Arg-Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Glu-Ser-Asp-Val。后面的部分序列 Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Glu-Ser-Asp-Val 为 NR2B9c 的序列，具体抑制 nNOS 的 NO 的产生。前面的部分序列 Tyr-Gly-Arg-Lys-Lys-Arg-Arg-Gln-Arg-Arg-Arg 则是提升 NR2B9c 的生物利用度。像 NR2B9c 这样的活性肽的氨基酸序列由来自 NMDA 受体 C 末端的 3-25

个氨基酸或来自连接到内化肽的 PSD-95 受体的 PDZ 结构域 1 和/或 2 组成(A. Tasker, T. Doucette, M. Tymianski, K. Mendoza, M. P. Belmares, D. Garman, 和 P. S. Lu, 2013, United States Patent 8,536,129)。这类活性肽具有包含 [E/D/N/Q]-[S/T]-[D/E/Q/N]-[V/L] 的氨基酸序列, 比如 KLSSIETDV 和 KLSSIESDV。

肌肽(L-Carnosine), 是一种由 β -丙氨酸和 L-组氨酸两种氨基酸组成的二肽。肌肽具有很强的抗氧化能力, 对人体有益。肌肽已被证实可清除在氧化应激过程中使细胞膜的脂肪酸过度氧化而形成的活性氧自由基(ROS)以及 α - β 不饱和醛。肌肽具有抗炎、抗糖化、抗氧化和螯合作用, 可作为一种非处方食品补充剂, 在预防和辅助治疗心血管疾病和神经退行性等慢性疾病方面具有良好的前景。在动物实验里, 肌肽的神经保护机制可以防止永久性脑部缺血。肌肽还是一种重要的细胞内抗氧化剂。肌肽不仅无毒, 而且具备强的抗氧化性, 因此以它作为一种新型的食品添加剂与药用试剂已经引起广泛关注。肌肽参与细胞内的过氧化反应, 除了具有抑制细胞膜的过氧化过程, 还能抑制细胞内的相关的过氧化反应。1900 年, 俄国学者 Gulewitsch 最早发现了肌肽, 之后各国学者又在不同的肌肉组织中还提取分离了其它组氨酸二肽衍生物, 如鹅肌肽(Anserine), 其是一种由 β -丙氨酸和 1-甲基-L-组氨酸两种氨基酸组成的二肽, 以及鲸肌肽或蛇肌肽(Balenine, 又称 Ophidine), 蛇肌肽则是由 β -丙氨酸和 3-甲基-L-组氨酸组成的二肽。不同物种之间这几种组氨酸二肽的含量及比例也各不相同, 具有一定的特异性。除了在肌肉组织中存在着组氨酸二肽以外, 这些二肽还存在于别的组织中, 如脑组织。这些肌肽衍生物具有水溶性和较强的而且具有显著的抗氧化、抗衰老、降尿酸等功能, 在食品工业中已用作天然的抗氧化剂和降尿酸食疗, 也同样具有一定的神经保护功能。

尽管肌肽以及肌肽衍生物都有一定的脑保护作用, 但是它们往往需要较大的剂量, 单独使用肌肽、鹅肌肽和蛇肌肽等效果并不好, 本领域仍然需要新的神经保护方法。

发明内容

本发明人将肌肽以及肌肽衍生物与像 NR2B9c 这样的活性肽组合起来产

生了新型多肽，出乎意外地发现该类全新组合的多肽完全不同于 Nerinetide，具有良好的神经保护效果，且神经保护效果不受阿替普酶等溶血栓产品的影响，从而为神经保护等提供了新的办法。

本发明提供了一种神经保护多肽化合物，它包含由 beta-丙氨酸与组氨酸、1-甲基组氨酸或 3-甲基组氨酸等组成的肌肽、鹅肌肽、蛇肌肽等，以及以 NR2B9c 为代表的活性肽，活性肽的氨基酸序列为 Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Glu/Asp-Ser/Thr-Asp/Glu-Val/Leu，尤其是 NR2B9c Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Glu-Ser-Asp-Val，从而形成了一系列兼具肌肽、鹅肌肽或蛇肌肽与 Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Glu/Asp-Ser/Thr-Asp/Glu-Val/Leu 特征的组合多肽化合物。这些肽类出乎意料之外地透过血脑屏障，通过静脉途径给药展示了很好的生物活性，从而在治疗神经系统疾病，尤其是脑损伤，脑卒中方面显示了广阔的前景。

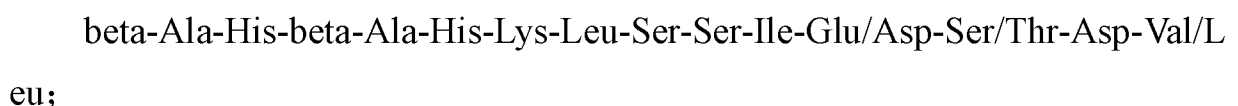
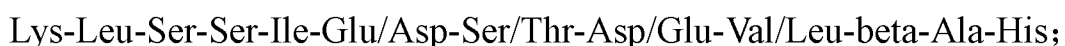
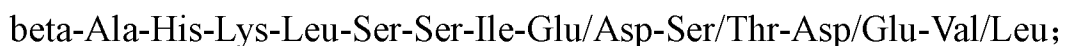
一方面，提供了一种神经保护多肽化合物，包括具有如下化学式的多肽及其盐：



式中，m 为 0-3 的整数，n 为 0-3 的整数，但 m 和 n 不同时为零；M 为 beta-Ala-His、beta-Ala-1-Methyl-His 或 beta-Ala-3-Methyl-His，N 为 beta-Ala-His、beta-Ala-1-Methyl-His 或 beta-Ala-3-Methyl-His。Glu/Asp 表示该位置的氨基酸可以是 Glu 或 Asp 中的任何一个，Ser/Thr 表示该位置的氨基酸可以是 Ser 或 Thr 中的任何一个，Asp/Glu 表示该位置的氨基酸可以是 Asp 或 Glu 中的任何一个，Val/Leu 表示该位置的氨基酸可以是 Val 或 Leu 中的任何一个。

优选地，Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Glu/Asp-Ser/Thr-Asp/Glu-Val/Leu 为 Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Glu-Ser-Asp-Val。

在一些实施方案中，本发明的神经保护多肽化合物包括具有如下化学式的多肽及其盐：



Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Glu/Asp-Ser/Thr-Asp/Glu-Val/Leu-beta-Ala-His-beta-Ala-His;

beta-Ala-His-Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Glu/Asp-Ser/Thr-Asp/Glu-Val/Leu-beta-Ala-His;

beta-Ala-His-beta-Ala-His-beta-Ala-His-Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Glu/Asp-Ser/Thr-Asp-Val/Leu;

beta-Ala-His-beta-Ala-His-Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Glu/Asp-Ser/Thr-Asp-Val/Leu-beta-Ala-His;

beta-Ala-His-Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Glu/Asp-Ser/Thr-Asp/Glu-Val/Leu-beta-Ala-His-beta-Ala-His;

Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Glu/Asp-Ser/Thr-Asp/Glu-Val/Leu-beta-Ala-His-beta-Ala-His-beta-Ala-His;

式中, His 为 His、1-Methyl-His 或 3-Methyl-His, 即前面简称的 M 或 N, 分别对应肌肽, 鹅肌肽和蛇肌肽。

具体地, 本发明的神经保护多肽化合物包括具有如下化学式的多肽及其盐:

beta-Ala-His-Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Glu-Ser-Asp-Val;

beta-Ala-His-Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Asp-Ser-Asp-Val;

beta-Ala-His-Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Glu-Thr-Asp-Val;

beta-Ala-His-Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Glu-Thr-Glu-Val;

beta-Ala-His-Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Glu-Ser-Glu-Val;

beta-Ala-His-Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Asp-Thr-Asp-Val;

beta-Ala-His-Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Asp-Ser-Glu-Val;

beta-Ala-His-Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Asp-Thr-Glu-Val;

Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Glu-Ser-Asp-Val-beta-Ala-His;

Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Asp-Ser-Asp-Val-beta-Ala-His;

Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Glu-Thr-Asp-Val-beta-Ala-His;

Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Glu-Thr-Glu-Val-beta-Ala-His;

Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Glu-Ser-Glu-Val-beta-Ala-His;

Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Asp-Thr-Asp-Val-beta-Ala-His;

Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Asp-Ser-Glu-Val-beta-Ala-His;
Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Asp-Thr-Glu-Val-beta-Ala-His;
beta-Ala- (1-methyl-His)-Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Glu-Ser-Asp-Val;
beta-Ala-(1-methyl-His)-Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Asp-Ser-Asp-Val;
beta-Ala-(1-Methyl-His)-Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Glu-Thr-Asp-Val;
beta-Ala-(1-Methyl-His)-Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Glu-Thr-Glu-Val;
beta-Ala-(1-Methyl-His)-Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Glu-Ser-Glu-Val;
beta-Ala-(1-Methyl-His)-Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Asp-Thr-Asp-Val;
beta-Ala-(1-Methyl-His)-Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Asp-Ser-Glu-Val;
beta-Ala-(1-Methyl-His)-Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Asp-Thr-Glu-Val;
Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Glu-Ser-Asp-Val-beta-Ala-(1-Methyl-His);
Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Asp-Ser-Asp-Val-beta-Ala-(1-Methyl-His);
Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Glu-Thr-Asp-Val-beta-Ala-(1-Methyl-His);
Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Glu-Thr-Glu-Val-beta-Ala-(1-Methyl-His);
Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Glu-Ser-Glu-Val-beta-Ala-(1-Methyl-His);
Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Asp-Thr-Asp-Val-beta-Ala-(1-Methyl-His);
Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Asp-Ser-Glu-Val-beta-Ala-(1-Methyl-His);
Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Asp-Thr-Glu-Val-beta-Ala-(1-Methyl-His);
beta-Ala-(3-methyl-His)-Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Glu-Ser-Asp-Val;
beta-Ala-(3-methyl-His)-Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Asp-Ser-Asp-Val;
beta-Ala-(3-Methyl-His)-Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Glu-Thr-Asp-Val;
beta-Ala-(3-Methyl-His)-Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Glu-Thr-Glu-Val;
beta-Ala-(3-Methyl-His)-Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Glu-Ser-Glu-Val;
beta-Ala-(3-Methyl-His)-Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Asp-Thr-Asp-Val;
beta-Ala-(3-Methyl-His)-Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Asp-Ser-Glu-Val;
beta-Ala-(3-Methyl-His)-Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Asp-Thr-Glu-Val;
Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Glu-Ser-Asp-Val-beta-Ala-(3-Methyl-His);
Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Asp-Ser-Asp-Val-beta-Ala-(3-Methyl-His);
Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Glu-Thr-Asp-Val-beta-Ala-(3-Methyl-His);
Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Glu-Thr-Glu-Val-beta-Ala-(3-Methyl-His);

Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Glu-Ser-Glu-Val-beta-Ala-(3-Methyl-His);
Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Asp-Thr-Asp-Val-beta-Ala-(3-Methyl-His);
Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Asp-Ser-Glu-Val-beta-Ala-(3-Methyl-His);
Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Asp-Thr-Glu-Val-beta-Ala-(3-Methyl-His)。

优选地，本发明的神经保护多肽化合物包括具有如下化学式的多肽及其盐：

beta-Ala-His-Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Glu-Ser-Asp-Val;
Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Glu-Ser-Asp-Val-beta-Ala-His;
beta-Ala- (1-methyl-His)-Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Glu-Ser-Asp-Val;
Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Glu-Ser-Asp-Val-beta-Ala-(1-Methyl-His);
beta-Ala-(3-methyl-His)-Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Glu-Ser-Asp-Val;
Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Glu-Ser-Asp-Val-beta-Ala-(3-Methyl-His)。

更优选地，本发明的神经保护多肽化合物包括具有如下化学式的多肽及其盐：

beta-Ala-His-Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Glu-Ser-Asp-Val;
Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Glu-Ser-Asp-Val-beta-Ala-His。

最优选地，本发明的神经保护多肽化合物包括具有如下化学式的多肽及其盐：

beta-Ala-His-Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Glu-Ser-Asp-Val。

另一方面，还提供了前述神经保护多肽化合物在制备药物（尤其是治疗神经系统疾病药物）中的应用。还提供了前述神经保护多肽化合物用于治疗神经系统疾病。还提供了利用前述神经保护多肽化合物治疗神经系统疾病的方法。

具体地，神经系统疾病可以是缺血性脑卒中、出血性脑卒中、脑创伤、阿尔茨海默病、帕金森病或其它神经退行性疾病。优选地，神经系统疾病是缺血性脑卒中。

本发明提供的神经保护多肽化合物可以制备为药物。前述药物为注射剂、口服用药、舌下用药、喷雾用药或肛门用药等，优选为注射剂。具体地，注射剂为粉针剂或者注射液。进一步地，前述药物采用静脉的方式给药。前述药物也可以作为活性成分制备其它剂型，以便于相应的医疗应用。作为神经

保护用药，开发的制剂可以包括口服给药和舌下给药制剂，作为脑卒中现场急救用药，开发的制剂可以包括喷雾给药，肛门给药等制剂，便于没有行动能力的患者得到救治。

进一步地，前述药物中包括药学上可接受的稀释剂或/和载体等。

又一方面，还提供了通过固相合成制备本发明各类神经保护多肽化合物的方法，但其中的一些肽用液相合成或片段合成更加方便。多肽药物成盐是改善药物分子理化性质、提高其成药性的常见手段之一，前述药物可以是任何形式的盐。

再一方面，还提供了本文所述的神经保护多肽化合物与溶栓药物的组合。

所述溶栓药物可以为以链激酶和尿激酶为代表的第一代溶栓药，以组织纤溶酶原激活剂（tissue—type plasminogen activator, tPA）阿替普酶和尿激酶原为代表的第二代溶栓药物，或者基于重组人组织型纤溶酶原激活剂（rtPA）的第三代溶栓药物。本领域已知很多这样的市售产品，比如注射用尿激酶（天津生物化学制药有限公司），注射用重组链激酶(例如思凯通)，注射用阿替普酶(例如爱通立)，注射用重组人 TNK 组织型纤溶酶原激活剂(例如铭复乐)。

本文所述神经保护多肽化合物与溶栓药物可以先后或同时单独施用，或者以任何合适的比例混合作为组合药物施用。

所述组合可用于制备药物，尤其是治疗神经系统疾病药物。

所述神经系统疾病可以是缺血性脑卒中、出血性脑卒中、脑创伤、阿尔茨海默病、帕金森病或其它神经退行性疾病。优选地，神经系统疾病是缺血性脑卒中。

为了确定本文提供的合成肽在神经系统疾病方面的应用，用 SD 大鼠作为实验对象，采用脑中动脉阻断法(MCAO)制备脑缺血大鼠模型，缺血 1-2 小时后静脉注射药物，22-24 小时对每只动物做行为学观察和评分。行为学观察之后，将实验大鼠进行安乐死并取出其大脑，脑组织切片，TTC 染色后进行量化分析，计算脑梗死体积%。

本发明人创造性地把神经保护多肽化合物与像 NR2B9c 这样的活性肽、肌肽、鹅肌肽或蛇肌肽等组合起来，开发的组合多肽出乎意料地通过静脉注射透过血脑屏障，进入大脑，有效地在治疗神经系统疾病中发挥了作用。该

类合成肽优选地应用于治疗缺血性脑卒中、出血性脑卒中、脑创伤、阿尔茨海默病、帕金森病及其他神经退行性疾病。本发明只需要 3mg/kg 的合成多肽静脉注射剂量，出乎意料地可达到显著的治疗效果，与已有临床活性的标准多肽 NA1 达到了同样的效果。

同时本发明的合成肽便于合成，合成过程中还可以使用肌肽，鹅肌肽或蛇肌肽的衍生物作为合成片段，代替对应的两个氨基酸来进一步简化目标肽的合成。

附图说明

图 1：模型组的脑组织的切片图。

图 2：S1 组的脑组织的切片图。

图 3：S3 组的脑组织的切片图。

图 4：假手术组的脑组织的切片图。

图 5：脑梗死范围和脑梗死抑制率结果，其中 A：脑梗死范围（Infarction Area %），B：脑梗死抑制率（Inhibition Ratio %）；** 表示与模型对照组相比 $P < 0.01$ ，***表示与模型对照组相比 $P < 0.005$ 。

图 6：NSS 评分结果，图中数据均以均值±标准差（Mean ± SD）表示，其中 A：NSS 评分结果，B：术后 1 天各给药组 NSS 评分相对于模型对照组降低率结果；*表示与模型对照组动物相比 $P \leq 0.05$ 。

图 7：模型对照组动物 TTC 染色结果图。

图 8：S3 组动物 TTC 染色结果图。

图 9：t-PA 组动物 TTC 染色结果图。

图 10：S3+tPA 组动物 TTC 染色结果图。

具体实施方式

为使本发明的目的、技术方案和优点更加清楚，下面将结合附图对本发明作进一步地详细描述。

实例 1：beta-Ala-His-Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Glu-Ser-Asp-Val 的合成

1. 在活化剂系统（HoBT,DIC）的存在下，由固相载体 2-CTC 树脂和 Fmoc-Val-OH 偶联得到 Fmoc-Val-CTC 树脂。

2. 用 20%哌啶脱除 Fmoc-Val-CTC 上的 Fmoc 保护基,脱除干净后用 DMF 洗涤干净。

3. 称取 3 倍过量的 Fmoc-Asp (OtBu) -OH, 与三倍过量的活化剂, 加入少量 DMF 充分溶解, 溶解完之后加入至洗涤干净的树脂中, 反应 1h 后用 DMF 洗涤干净。

4. 重复第二步骤与第三步骤, 按照主链顺序从 Ser 到 β -Ala 依次偶联具有 N 端 Fmoc 保护且侧链带保护的氨基酸。

5. 合成完毕之后进行裂解, 裂解试剂配比为 TFA: EDT: Tis: TA: 苯甲醚: H_2O =80: 5: 1: 5: 5: 4 (体积比), 按 1g 肽树脂需 10ml 裂解试剂配比, 室温下裂解约 2h (120r/min), 裂解之后用冰甲基叔丁基醚沉淀, 下层沉淀即为粗品。

6. 取上步的粗肽溶解, 在制备型 HPLC 上用 0.1%TFA/乙腈纯化。

7. 纯化完之后进行冻干, 冻干结束后取出粉末进行分装, 质检得多肽 beta-Ala-His-Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Glu-Ser-Asp-Val。

实例 2: Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Glu-Ser-Asp-Val-beta-Ala-His 的合成

1. 在活化剂系统 (HoBT, DIC) 的存在下, 由固相载体 2-CTC 树脂和 Fmoc-His(Trt)-OH 偶联得到 Fmoc-His(Trt)-CTC 树脂。

2. 用 20%哌啶脱除 Fmoc-His(Trt)-CTC 上的 Fmoc 保护基, 脱除干净后用 DMF 洗涤干净。

3. 称取 3 倍过量的 Fmoc-beta-Ala-OH, 与三倍过量的活化剂, 加入少量 DMF 充分溶解, 溶解完之后加入至洗涤干净的树脂中, 反应 1h 后用 DMF 洗涤干净。

4. 重复第二步骤与第三步骤, 按照主链顺序从 Val 到 Lys 依次偶联具有 N 端 Fmoc 保护且侧链带保护的氨基酸。

5. 合成完毕之后进行裂解, 裂解试剂配比为 TFA: EDT: Tis: TA: 苯甲醚: H_2O =80: 5: 1: 5: 5: 4 (体积比), 按 1g 肽树脂需 10ml 裂解试剂配比, 室温下裂解约 2h (120r/min), 裂解之后用冰甲基叔丁基醚沉淀, 下层沉淀即为粗品。

6. 取上步的粗肽溶解, 在制备型 HPLC 上用 0.1%TFA/乙腈纯化。

7.纯化完之后进行冻干，冻干结束后取出粉末进行分装,质检得多肽 Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Glu-Ser-Asp-Val-beta-Ala-His。

实例 3: beta-Ala-His-Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Glu-Ser-Asp-Val-beta-Ala-His 的合成

1. 在活化剂系统 (HoBT,DIC) 的存在下, 由固相载体 2-CTC 树脂和 Fmoc-His(Trt)-OH 偶联得到 Fmoc-His(Trt)-CTC 树脂。

2. 用 20%哌啶脱除 Fmoc-His(Trt)-CTC 上的 Fmoc 保护基, 脱除干净后用 DMF 洗涤干净。

3. 称取 3 倍过量的 Fmoc-beta-Ala-OH, 与三倍过量的活化剂, 加入少量 DMF 充分溶解, 溶解完之后加入至洗涤干净的树脂中, 反应 1h 后用 DMF 洗涤干净。

4. 重复第二步骤与第三步骤, 按照主链顺序从 Val 到 beta-Ala 依次偶联具有 N 端 Fmoc 保护且侧链带保护的氨基酸。

5. 合成完毕之后进行裂解, 裂解试剂配比为 TFA: EDT: Tis: TA: 苯甲醚: H₂O=80: 5: 1: 5: 5: 4 (体积比), 按 1g 肽树脂需 10ml 裂解试剂配比, 室温下裂解约 2h (120r/min), 裂解之后用冰甲基叔丁基醚沉淀, 下层沉淀即为粗品。

6. 取上步的粗肽溶解, 在制备型 HPLC 上用 0.1%TFA/乙腈纯化。

7. 纯化完之后进行冻干, 冻干结束后取出粉末进行分装,质检得多肽 beta-Ala-His-Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Glu-Ser-Asp-Val-beta-Ala-His。

实例 4: 同样的办法也可以合成如下多肽

beta-Ala-(1-Methyl-His)-Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Glu-Ser-Asp-Val;
Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Glu-Ser-Asp-Val-beta-Ala-(1-Methyl-His);
beta-Ala-(1-Methyl-His)-Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Glu-Ser-Asp-Val-beta-Ala-(1-Methyl-His);
beta-Ala-(1-Methyl-His)-Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Glu-Ser-Asp-Val;
Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Glu-Ser-Asp-Val-beta-Ala-(1-Methyl-His);
beta-Ala-(1-Methyl-His)-Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Glu-Ser-Asp-Val-beta-Ala-(1-

Methyl-His)。

实例 5：动物实验方法

小动物监护仪：深圳市荣显达科技有限公司，VT200。

SD 大鼠：中国食品药品鉴定研究院，180-200g。

线栓：迈越生物（M8507）。

TTC 染色液：源叶生物（R24053）。

动物模型操作步骤：

对实验用 SD 大鼠进行称重，使用水合氯醛麻醉。麻醉后对大鼠四肢进行固定，仰卧，连接小动物监护仪，对大鼠体温、血压和心率等重要生理指标进行监护。对大鼠颈部进行脱毛，用 75%酒精棉球消毒后对实验大鼠颈部进行长度 2cm 左右的正中切口，通过钝性分开大鼠颌下腺，分离过程中尽量避免对腺体的破坏，然后钝性分离出实验大鼠左侧的颈总动脉（CCA），沿着 CCA 向上小心分离出颈内动脉（ICA）和颈外动脉（ECA）。分离过程中避免损伤迷走神经。使用两个动脉夹分别将 CCA 和 ICA 夹闭，剪断 ECA 远端并将硅胶线栓从 ECA “端口”插入，插到 ICA 动脉夹处短暂松一下动脉夹并迅速将线栓头端插过动脉夹后再次夹闭 ICA，然后轻轻松开 ICA 上的动脉夹并不断使线栓插入，直到线栓黑标插过 ECA 和 ICA 的分叉，线栓头端堵住大脑中动脉后用缝合线将 ECA “端口”和线栓紧紧系紧，以防止大鼠醒后线栓“退出”或出血。松开并拿掉 CCA 和 ICA 上的动脉夹，使组织恢复原位，并滴加适量的青霉素以防伤口感染。使用医用带线缝合针进行缝合，封好之后再次用碘伏消毒。观察小动物监护仪判断实验大鼠指标是否正常，然后将大鼠放在小动物电热毯上使其保持体温直至苏醒放置动物笼中。

给药流程：

将待测药物配成 3mg/mL 的溶液。在结扎后 1-2 h 尾静脉给药。

给药时将大鼠用固定器固定，利用 1mL 注射器按照 3mg/kg 剂量吸取待测药物，然后对大鼠进行尾静脉推注，注射时缓缓推注以降低实验大鼠的心肺负荷。

动物分为不同的试验小组，每组六只。

模型组：结扎后尾静脉给等量的生理盐水；

药 物 组 S1(NA1) 和 S3
(beta-Ala-His-Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Glu-Ser-Asp-Val)，结扎后尾静脉给药；

假手术组：分离颈内动脉（ICA）和颈外动脉（ECA）后不做结扎处理，尾静脉给等量的生理盐水。

行为学观察：

结扎后 22-24 h 对每只动物做行为学观察和评分。

按照如下评分表，让未参与该实验的技术员盲评。

0 分：正常直线行走；

1 分：前肢无力；

2 分：后肢无力；

3 分：轻度转圈；

4 分：严重转圈；

5 分：偏瘫。

TTC 染色和量化分析：

行为学观察之后，将实验大鼠进行安乐死并取出其大脑。将脑组织横切成 6 片 2mm 厚的切片，再移至 TTC 染色液中，37℃孵箱中避光孵育 10 min，拍照（结果见图 1-4）。然后将 TTC 染色后的脑组织和剩余的少量未进行 TTC 染色的脑组织-20℃保存。

使用 Image J 软件对 TTC 染色后的照片做量化分析。

脑梗死体积%=（总梗死面积*切片厚度）/（总脑切片面积*切片厚度）*100 %。

实验结果：

1、TTC 量化结果如表 1 所示：

表 1

编号	1	2	3	4	5	6	平均值
模型组	0.407	0.402	0.392	0.420	0.377	0.340	0.390
S1(NA1)	0.187	0.218	0.153	0.145	0.107	0.134	0.157
S3	0.128	0.186	0.075	0.158	0.210	0.146	0.128
假手术组	0.048	0.038	0.042	0.051	0.039	0.044	0.044

从表 1 的结果可见,注射生理盐水的脑缺血大鼠,梗死体积 0.390 ± 0.028 ; 注射 3mg/kg Ala-His-Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Glu-Ser-Asp-Val (S3) 的脑缺血大鼠,梗死体积 0.150 ± 0.047 。作为对照的假手术组的结果则为梗死体积 0.044 ± 0.005 。与模型组比较, S3 有明显的生物活性且 S3 与 S1 没有统计学区别,其中,NA1(Nerinetide)是一种神经保护剂(Michael Tymianski and Jonathan D. Garman. Model systems and treatment regimes for treatment of neurological disease. 2015, US Patent, US8940699B2), 可通过终止细胞内 NO 自由基的产生来干扰突触后密度蛋白 95 (PSD-95), 在临床前缺血性脑卒中模型中可减少动物实验性(猕猴)脑缺血再灌注的梗死面积,并改善其功能预后,因此是一个很好的阳性对照产品。Hill 博士研究了静脉注射新型神经肽 NA-1 (2.6mg/kg) 用于血管内血栓切除术的急性缺血性脑卒中(AIS)患者的疗效和安全性,结果表明使用 NA1 治疗可改善患者预后。(Michael D Hill et al. Efficacy and safety of nerinetide for the treatment of acute ischaemic stroke (ESCAPE-NA1): a multicentre, double-blind, randomised controlled trial.Lancet. Published online February 20,2020)。

2、行为学测评结果如表 2 所示:

表 2

编号	1	2	3	4	5	6	平均值	标准误差
模型组	4	4	3	5	4	3	3.8	0.8
S1	2	2	2	2	1	3	2.0	0.6
S3	3	4	1	2	3	2	2.5	1.0
假手术组	0	0	0	0	0	0	0.0	0.0

从表 2 可以看出本发明提供的合成肽具有生理活性。注射生理盐水的脑缺血大鼠,行为学评分为 3.8 ± 0.8 ; 注射 3mg/kg beta-Ala-His-Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Glu-Ser-Asp-Val (S3) 的脑缺血大鼠,评分为 2.5 ± 1.0 ; 作为比较,静脉给予 3mg/kg NA1 的脑缺血大鼠,评分为 2.0 ± 0.6 。作为对照的假手术组的结果则为 0.0 ± 0.0 。与模型组比较, S3 有明显的生物活性,且 S3 和 S1 没有统计学区别。

实例 6：S3（beta-Ala-His-Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Glu-Ser-Asp-Val）与脑卒中药物 t-PA 的联合给药试验

1. 供试品配制：t-PA 选择广州铭康生物工程有限公司的注射用重组人 TNK 组织型纤溶酶原激活剂（铭复乐），1.0x10E7IU/16mg/只。以动物体重为 300 g 举例，配制方法如下表 3。

表 3

组别	给药剂 量 (mg/kg)	给药浓 度 (mg/mL)	配制方法
S3 组	3	1	称取 9 mg S3 加入 9 mL 灭菌注射用水中，配制成 1 mg/ mL 的溶液。
t-PA 组	3	1	取一瓶 t-PA 溶液，加入 10 mL 灭菌注射用水，配制成 2 mg/ mL 的母液，取 4.5 mL 母液加入 10.5 mL 灭菌注射用水，配制成 1 mg/ mL 的溶液。
S3+t-PA 组	3（S3） +3 （t-PA）	1（S3） +1 （t-PA）	方法同 S3 和 t-PA。

给药制剂配制均在生物安全柜内进行无菌操作，所使用的耗材等需经过灭菌处理。

S3 配制避光保存于冰盒，注射前使其温度恢复至常温，t-PA 配制后放置于常温暂存。

2. 动物品系/级别

品系：Sprague-Dawley（SD）大鼠；

等级：SPF 级；

进入适应期动物数量和性别：40 只，雄性；

使用动物数量和性别：36 只，雄性；

动物年龄及体重

体重：进入适应期时 151.78 - 186.9 g，分组时体重 242.95 - 289.31 g；

年龄：适应期时约 5-7 周龄，试验分组时 6-8 周龄；

来源：斯贝福（北京）生物科技有限公司；

动物环境适应：动物接收后适应环境5天，适应期的主要检查内容包括是否与订购时要求的质量指标一致、一般状态、体重是否达到试验要求的体重范围，不合格的动物不纳入本试验；

动物饲养：塑料大鼠笼具（L×W×H：46.6 cm × 30 cm ×21.5 cm）；环境适应期 5 只/笼，正式试验 3-4 只/笼；

饲养环境条件标准：中华人民共和国国家标准 GB14925-2010；

饲养环境控制系统：WINCC7.3 EMS 系列机房环境监控系统；

温度：室温 20-26 °C（日温差≤4 °C）；

相对湿度：40-70 %；

光照：人工照明，12/12 小时昼夜明暗交替；

换气次数：每小时空气更换不少于 15 次；

饲料种类：大小鼠育成饲料，饲料批号 21103213，购自北京科澳协力饲料有限公司。

适应期动物一般状态观察未见任何异常，适应期结束后动物体重为 185.46-230.82g，未达到动物造模需要的体重，因此动物适应期延长到 12 天。适应期结束后选择体重在 240-290 g 内的动物进行分组造模，给药 24 h 后 S3 组编号为 2M006 的动物被发现死亡，解剖发现模型对照组编号为 1M005 的动物脑部组织缺失，确定为脑部发育异常，另外 S3 组编号为 2M001 和 S3+t-PA 组编号为 4M002 的动物解剖发现蛛网膜下腔出血，S3+t-PA 组编号为 4M009 脑梗死范围为 25.19%，大于本组其余动物的平均值±3 标准差判定为离群值，以上动物的数据不纳入最终统计分析，各组其余动物数据均纳入最终统计分析，最终纳入统计分析的动物数量分别为模型对照组 8 只、S3 组 7 只、t-PA 组 9 只和 S3+t-PA 组 7 只。

3. 造模

1) 麻醉诱导：将大鼠放入充满 3.0%异氟烷的麻醉诱导盒进行麻醉诱导；

2) 固定：经过麻醉诱导的动物转移至操作台上，使用小动物气体麻醉机以 2.0 %-2.5 %异氟烷按 200 mL/min 进行麻醉维持，观察大鼠眼睑反射和痛觉反应，在眼睑反射反应及四肢和尾部痛觉反应消失后方可开始手术；

3) 大脑缺血再灌注手术步骤：

A. 分离暴露血管：手术区域备皮后，将大鼠置于手术显微镜下，沿正中线用眼科剪剪开大鼠皮肤，长度约 2cm，经右侧颈旁入路，显微镊钝性分离并牵开右侧颈部的肌肉组织，显露右侧颈总动脉（common carotid artery, CCA），然后沿颈总动脉向上分离，继续显露颈外动脉（external carotid artery, ECA）、颈内动脉（internal carotid artery, ICA）；

B. 结扎 CCA 近心端，用动脉夹暂时夹闭 Y 形分支处 CCA，在 CCA 结扎部位至 ICA 暂闭部位穿线，系一松结（预结扎）备用，并在预结扎近心端剪一小口；

C. 线栓推入：将 4-0 号线栓经 CCA 的切口插入，再缓慢轻轻地推入颈内动脉，到达 ICA 的动脉夹处暂停，进一步套紧预结扎线（避免推线栓时出血过多），然后将阻断 ICA 血流的动脉夹取出，立即将线栓推入 ICA 直到进入颅内，此时注意不要将线栓插入颈内动脉的另一分支翼腭动脉（翼腭动脉属于 ICA 在颅外的分支，当线栓进入该动脉深度为 10 mm 左右时即不能继续插入，此时，稍微退出线栓，调整方向，重新操作）；

D. 固定线栓、缝合切口：当线栓插入深度距离颈总动脉分叉约 18 mm 左右时，如果有轻微阻力感，说明线栓的头端已经进入大脑前动脉（cerebral anterior artery, ACA），线栓侧壁已经堵塞了大脑中动脉开口，此时停止插入，并记录时间，移去 CCA 上的动脉夹，观察无活动性出血后关闭切口；

E. 大脑再灌注：缺血大鼠置于室温，120 min 后即可进行诱导麻醉，在维持麻醉状态下缓慢地轻拉线栓，使其头端回到颈总动脉内，即实现大脑中动脉再灌注；

F. 碘伏消毒切口。

4. 动物分组

组别设计:共设置4个组,分别为模型对照组、S3组、t-PA组和S3+t-PA组;

动物数量: 各组9只动物, 合计36只;

性别比例: 根据JW Simpkins和RL Roof等的报道, 在成年大鼠中雌性激素和黄体酮等对缺血性脑梗死具有神经保护作用, 为排除雌激素和黄体酮等对试验结果的影响, 本试验全部动物均为雄性;

分组方法: 根据分组前最近一次大鼠体重进行随机分组;

具体分组信息见下表4。

表 4

组别	药物	给药剂 量 (mg/kg)	给药浓 度 (mg/mL)	给药体 积 (mL)	给药途 径	动物编号
模型对照组	溶媒	—	—	6	i.v.	1M001-1M008
S3组	S3	3	1	3+3 ^a	i.v.	2M001-2M008
t-PA组	t-PA	3	1	3+3 ^b	i.v.	3M001-3M008
S3+t-PA组	S3+t-PA	3+3	1+1	3+3 ^c	i.v.	4M001-4M008

注: 动物编号的首位数字代表组别(1、2、3和4分别代表模型对照组、S3组、t-PA组和S3+t-PA组), 第二位字母代表性别(M为雄性), 后3位数字代表动物序列号, a表示给予3 mL S3和3 mL 无菌注射用水, b表示给予3 mL t-PA和3 mL 无菌注射用水, C表示给予3 mL S3和3 mL t-PA;

给药途径: 尾静脉注射给药;

给药时间: 缺血再灌注后即刻(5min内);

给药频率及周期: 给药1次;

造模当天定义为D0, 前一天定义为D-1。

5. 观察和测定内容

一般状态观察

观察动物: 所有计划观察的存活实验动物;

观察时间: 每天观察一次, 如果动物出现异常, 可增加观察频率;

观察内容：包括但不限于一般表现、行为状态、眼睛、口腔、鼻口部、耳、毛发及皮肤、粪便、尿、生殖器等毒性症状，若出现异常，需进行详细描述。

体重

测定动物：所有计划测定的存活实验动物；

测定时间：适应期至少测量体重 2 次，手术前 24h 称量 1 次用于分组，术后 24 h 称量 1 次。

行为学评价

Bederson 评分

检测时间：造模当天缺血 50 - 60 min 后，用于评估动物缺血是否成功；

测定动物：所有手术存活动物；

检测方法：参考 Bederson 评分标准对动物进行评分；

表 5：大鼠 Bederson 评分标准

分值	评分标准
0	无神经损伤症状
1	从尾部提起大鼠，大鼠手术对侧前肢曲屈
2	大鼠置于光滑平面上，用手推梗死侧对侧肩部，抵抗力降低
3	动物自由行走时向梗死对侧倾倒或者转圈
4	瘫软，肢体无自发活动

缺血后评分大于等于 1 分的大鼠为造模成功，造模未成功大鼠则淘汰。

大鼠神经功能评分

检测时间：造模前 24 h、造模后 24h 和 72h 各评分一次；

测定动物：所有计划测定的存活实验动物；

检测方法：对动物进行运动功能测试、感觉测试、平衡测试和反射和异常动作测试，具体参考大鼠神经功能评分表（NSS）。

表 6: 大鼠神经功能评分表 (NSS)

分类	分值
运动功能测试 (6分)	
从尾部提起大鼠 (3分)	
前肢屈曲	1
后肢屈曲	1
头部在30秒内上仰超过10度	1
将大鼠放于平台上 (正常0分, 最多3分)	
正常行走	0
无法笔直爬行	1
围绕偏瘫侧打转	2
向偏瘫侧跌倒	3
感觉测试 (2分)	
放置实验 (视觉和触觉测试)	1
本体感觉测试 (深感觉, 将患肢置于桌子边缘, 观察肢体收缩反应)	1
平衡测试 (6分)	
抓住横杆一侧	1
抱住横杆, 一肢体掉下	2
抱住横杆, 两肢体掉下或抱横杆旋转>60秒	3
尽力平衡, 但失败掉下 (>40秒)	4
尽力平衡, 但失败掉下 (>20秒)	5
掉下 (<20秒)	6
反射和异常动作 (4分)	
耳廓反射	1
角膜反射	1
惊吓反射	1
抽搐、肌阵挛、肌张力异常	1

解剖及病理学检查

解剖时间：D1（相当于造模后 24h）（造模当天定义为 D0）；

解剖动物：所有入组存活动物；

麻醉及安乐死方法：采用 3 %戊巴比妥钠进行腹腔注射麻醉，注射剂量为 60 mg/kg，麻醉后腹主动脉放血安乐死。

病理学（TTC 染色）评价

检测动物：所有活体动物；

检查方法：安乐死动物快速取脑，并将鼠脑置于-20℃冰箱内冷冻至脑组织变硬后取出，将大鼠大脑切成 2 mm 厚的切片，切片位置从嗅球向后，总共 6-8 片，分别放置于装有 0.5% TTC 溶液（PBS 配制）的六孔板格中，然后置于 37℃ 恒温箱中避光温孵 20 min，取出后置于 10%甲醛溶液中避光保存。

正常组织经染色后呈玫瑰红色，梗死组织呈白色。将每个脑平面按序摆放在滤纸上，数码相机拍照，小心取下白色组织并称重，以梗死组织重量占全脑重量的百分比作为梗塞范围（%）或者以图像处理计算脑梗死范围。并以梗塞范围计算各药物治疗组的抑制率（%），抑制率计算公式如下：

$$\text{抑制率（\%）} = \frac{\text{模型组梗塞范围} - \text{治疗组梗塞范围}}{\text{模型组梗塞范围}} \times 100\%。$$

统计分析

计量指标采用均数±标准差表示。样本数小于 3 时，该组数据不纳入统计比较。

数据经 Excel 2010、GraphPad Prism 7、SPSS 22.0 和 Stata 15.0 软件进行录入与统计分析。计量指标先采用 LEVENE 方差齐性检验，当方差齐时（ $p > 0.05$ ），可直接引用方差分析的结果判断总体差异是否有统计学意义，总体差异有统计学意义时（ $p < 0.05$ ），用 Dunnett-t 检验对组间差异进行比较，总体差异无统计学意义时（ $p \geq 0.05$ ），统计分析结束；当 LEVENE 方差齐性检验显示方差不齐时（ $p \leq 0.05$ ），则采用非参数检验（Kruskal-Wallis H 检验），Kruskal-Wallis H 检验显示总体差异有统计学意义时（ $p < 0.05$ ），用

Mann-Whitney U 检验进行组间差异的比较，当 Kruskal-Wallis H 检验显示总体差异无统计学意义时 ($p \geq 0.05$)，统计分析结束。

6. 试验结果

S3 和 S3+t-PA 对模型动物脑梗死范围的影响：

急性缺血性脑卒中治疗的中心环节是尽量减少缺血所致的神经细胞病变程度及范围，本试验采用缺血再灌注后即刻进行药物干预，24h 后对造模动物脑部进行 TTC 染色，通过测定各组动物梗死范围并计算抑制率，对 S3 和 S3 联合 t-PA 的抗缺血性脑卒中药效学进行评价。动物脑梗死范围及脑梗死抑制率见表 7 及图 5、7-10。

术后 24 h 模型对照组脑梗死范围为 $21.493 \pm 2.734\%$ 。S3 组、t-PA 组和 S3+t-PA 组动物脑梗死范围分别为 $16.248 \pm 1.749\%$ 、 $18.522 \pm 1.372\%$ 和 $17.203 \pm 2.098\%$ ，相对于模型对照组均显著降低 ($P \leq 0.05$)，S3 组、t-PA 组和 S3+t-PA 组动物脑梗死抑制率分别为 $32.279 \pm 7.291\%$ 、 $22.802 \pm 5.719\%$ 和 $28.301 \pm 8.746\%$ ，以上结果提示本试验条件下 S3 组、t-PA 组和 S3+t-PA 对缺血性脑卒中大鼠脑梗死具有显著的抑制作用；根据各药物组的平均脑梗死抑制率计算预估 S3 和 t-PA 的联合用药的 Q 值，得 Q 值为 0.593，提示本试验条件下 3 mg/kg S3 和 3 mg/kg t-PA 对脑梗死的抑制无显著的协同效应。

表 7：各组动物脑梗死范围和脑梗死抑制率

组别	全脑重量 (g)	梗死区重量 (g)	梗死范围 (%)	脑梗死抑制 率 (%)	Q 值
模型对照 组(N=8)	1.298 ± 0.094	0.31 ± 0.044	23.993 ± 3.531	-	
S3 组 (N=7)	1.435 ± 0.03	0.233 ± 0.024	$16.248 \pm 1.749^{***}$	32.279 ± 7.291	0.593
t-PA 组 (N=9)	1.406 ± 0.058	0.26 ± 0.022	$18.522 \pm 1.372^*$	22.802 ± 5.719	
S3+t-PA 组(N=7)	1.378 ± 0.099	0.236 ± 0.027	$17.203 \pm 2.098^{**}$	28.301 ± 8.746	

备注：表中数据均以均值±标准差（Mean ± SD）表示；“N”代表各组进行统计分析的动物数量，“-”表示该项没有数据，**表示与模型对照组相比 $P < 0.01$ ，***表示与模型对照组相比 $P < 0.005$ ；Q 值为 $S3+t-PA$ 组平均脑梗死抑制率/（ $S3$ 组平均脑梗死抑制率+ $t-PA$ 平均脑梗死抑制率- $S3$ 组平均脑梗死抑制率× $t-PA$ 平均脑梗死抑制率），Q 值的判断标准为 $Q < 0.85$ 为拮抗作用， $0.85 \leq Q < 1.15$ 为相加作用， $Q \geq 1.15$ 为协同作用。

S3 和 S3+t-PA 对模型动物神经行为学评分的影响：

临床上脑梗死治疗的主要目的是尽量恢复患者的神经功能，提高卒中后生活质量。本试验于缺血后 1 h 对动物进行 Bederson 评分，对动物缺血情况进行判断，于造模后 24h 参照 NSS 评分表对存活动物的神经行为功能进行评估，从而对 S3 和 S3+t-PA 神经功能改善效果进行评估。动物 Bederson 评分结果见表 8 和 10，NSS 评分结果见表 9、10 和图 6。

缺血后 1 h，所有模型动物 Bederson 评分均为 3 分，提示所有模型动物缺血成功。

术后 1 天缺血再灌注模型对照组组动物 NSS 得分为 7.75 ± 1.71 ，S3 组、t-PA 组和 S3+t-PA 组动物 NSS 评分分别为 6.71 ± 1.79 、 6.83 ± 0.75 和 5.36 ± 1.30 ，其中 S3+t-PA 组动物 NSS 相对于模型对照组显著降低（ $P = 0.0385$ ），计算各给药组动物 NSS 评分相对于模型对照组降低率，得 S3 组、t-PA 组和 S3+t-PA 组动物 NSS 得分降低率分别为 $13.36 \pm 23.1\%$ 、 $11.83 \pm 9.62\%$ 和 $30.88 \pm 16.79\%$ ，根据 NSS 降低率计算 S3 和 t-PA 的联合用药的 Q 值，得 Q 值为 1.308 提示对 NSS 评分的改善 S3 和 t-PA 具有协同作用，以上结果提示在本试验条件下 S3 联合 t-PA 对脑卒中大鼠神经行为具有显著改善效果，且 S3 和 t-PA 对缺血再灌注大鼠神经功能损伤的改善具有协同作用。

表 8： 动物 Bederson 评分结果

组别	Bederson
模型对照组(N=8)	3±0
S3 组(N=7)	3±0
t-PA 组(N=9)	3±0

S3+t-PA 组(N=7) 3±0

注：表中数据均以均值±标准差（Mean ± SD）表示；“N”代表各组进行统计分析的动物数量。

表 9. 动物 NSS 评分结果

组别	NSS		NSS 降低率 (%)	Q 值
	D0	D2		
模型对照组(N=8)	0.00±0.00	7.75±1.71	-	1.308
S3 组(N=7)	0.00±0.00	6.71±1.79	13.36±23.1	
t-PA 组(N=9)	0.00±0.00	6.83±0.75	11.83±9.62	
S3+t-PA 组(N=7)	0.00±0.00	5.36±1.30*	30.88±16.79	

注：表中数据均以均值±标准差（Mean ± SD）表示；“N”代表各组进行统计分析的动物数量；*表示与模型对照组动物相比 P<0.05；Q 值为 S3+t-PA 组平均 NSS 降低率/（S3 组平均 NSS 降低率+t-PA 平均脑梗死降低率- S3 组平均脑梗死降低率×t-PA 平均脑梗死降低率），Q 值的判断标准为 Q<0.85 为拮抗作用，0.85≤Q<1.15 为相加作用，Q≥1.15 为协同作用。

S3 和 S3+tPA 对模型动物体重的影响：

脑缺血再灌注作为一个急性损伤模型，实验动物在 MCAO 造模后体重会急剧下降，试验动物体重作为综合反映动物健康状况最基本的灵敏指标之一，本试验在术前 1 天、术后 1 天对存活动物进行体重监测，动物体重变化进行观察记录。实验表明造模前和造模 24 h 后各组动物体重无显著差异，以上结果提示本试验条件下各组对动物体重变化无明显影响。

一般状态观察结果：

模型对照组和各给药组动物行 MCAO 造模后，均出现步态不稳、流涎和转圈等症状，组间未见任何差异；术后 24 小时，存活动物多出现步态不稳、转圈、竖毛、流涎、鼻周、眼周和口周污秽等脑卒中相关的异常症状，各组间异常症状种类和严重程度没有明显差异。

综上，本试验采用经典的线栓法建立 MCAO 缺血再灌注模型，对 S3 和 S3 联合 t-PA 给药的抗卒中效果进行评价，同时探索 S3 和 t-PA 是否存在协同

效应。模型对照组和各给药组均在缺血再灌注时即刻（5 min 内）给药 1 次。术后 1 天参照 NSS 评分对神经功能损伤进行评估并解剖动物对脑组织进行 TTC 染色测定脑梗死范围，通过脑梗死范围和神经功能改善，评价 S3 和 S3 联合 t-PA 对大鼠缺血性脑卒中的神经保护作用，结果表明：

A) S3 和 S3 联合 t-PA 对卒中大鼠脑梗死具有显著的抑制效果。术后 1 天 S3 组、t-PA 组和 S3+t-PA 组动物脑梗死范围相对于模型对照组均显著降低 ($P \leq 0.05$)，S3 组、t-PA 组和 S3+t-PA 组动物脑梗死抑制率分别为 $32.279 \pm 7.291\%$ 、 $22.802 \pm 5.719\%$ 和 $28.301 \pm 8.746\%$ ，以上结果提示本试验条件下 S3 组、t-PA 组和 S3+t-PA 对缺血性脑卒中大鼠脑梗死具有显著的抑制作用。

B) S3 联合 t-PA 对卒中大鼠神经功能损伤具有显著的抑制效果。术后 24 h，S3 组、t-PA 组和 S3+t-PA 组动物 NSS 评分相对于模型对照组有不同程度降低，其中 S3+t-PA 组动物 NSS 相对于模型对照组显著降低 ($P=0.0385$)，各给药组动物 NSS 评分相对于模型对照组降低百分比分别为 $13.36 \pm 23.1\%$ 、 $11.83 \pm 9.62\%$ 和 $30.88 \pm 16.79\%$ ，以上结果提示在本试验条件下 S3 联合 t-PA 对缺血性脑卒中大鼠神经功能损伤均具显著的改善。

C) S3 与 t-PA 对卒中大鼠神经功能损伤的改善具有协同效应。本试验中根据神经功能降低率和脑梗死抑制率分别计算 S3 联合 t-PA 在 NSS 评分和脑梗死抑制率方面的 Q 值，S3 联合 t-PA 在 NSS 评分和脑梗死抑制方面的 Q 值分别为 1.308 和 0.593，其中在 NSS 评分中的 Q 值大于 1.15，提示 S3 和 t-PA 在改善脑卒中大鼠神经功能损伤方面具有协同效应，而在脑梗死抑制方面在本实验条件下无明显的协同效果。

概言之，本试验结果表明 S3、t-PA 和 S3 联合 t-PA 在急性缺血性脑卒中有明显治疗效果，且在对急性缺血性脑卒中大鼠神经行为改善方面 S3 和 t-PA 具有协同效应。

表 10：神经行为学评分个体数据汇总

组别	动物编号	系统编号	Bederson Scores	NSS		NSS 降低率(%)
				D0	D2	
模型对照	1M001	10486	3	0	9	

组	1M002	10494	3	0	9.5	
	1M003	10495	3	0	10	
	1M004	10483	3	0	7.5	
	1M006	10481	3	0	5	
	1M007	10513	3	0	7	
	1M008	10514	3	0	8.5	
	1M009	10493	3	0	5.5	
S3 组	2M002	10491	3	0	7.5	3.23
	2M003	10512	3	0	3.5	54.84
	2M004	10482	3	0	8	-3.23
	2M005	10516	3	0	6	22.58
	2M007	10504	3	0	5	35.48
	2M008	10498	3	0	8.5	-9.68
	2M009	10502	3	0	8.5	-9.68
t-PA组	3M001	10501	3	0	7	9.68
	3M002	10499	3	0	8	-3.23
	3M003	10488	3	0	7.5	3.23
	3M004	10503	3	0	6.5	16.13
	3M005	10477	3	0	6.5	16.13
	3M006	10489	3	0	7.5	3.23
	3M007	10497	3	0	6	22.58
	3M008	10496	3	0	5.5	29.03
	3M009	10507	3	0	7	9.68
S3+t-PA组	4M001	10505	3	0	5	35.48
	4M003	10508	3	0	7	9.68
	4M004	10511	3	0	3.5	54.84
	4M005	10509	3	0	6.5	16.13
	4M006	10478	3	0	3.5	54.84
	4M007	10484	3	0	6	22.58
	4M008	10479	3	0	6	22.58

4M001 10505 3 0 5 35.48

表 11： 脑梗死范围个体数据汇总

组别	动物 编号	系统 编号	左脑 重(g)	右脑 重(g)	全脑 重(g)	梗死 区重 (g)	梗死 范围 (%)	脑梗 死抑 制率 (%)
模型对 照组	1M001	10486	0.530	0.575	1.105	0.296	26.787	-
	1M002	10494	0.577	0.679	1.256	0.363	28.901	-
	1M003	10495	0.643	0.741	1.384	0.346	25.000	-
	1M004	10483	0.614	0.689	1.303	0.313	24.021	-
	1M006	10481	0.664	0.736	1.400	0.247	17.643	-
	1M007	10513	0.653	0.715	1.368	0.301	22.003	-
	1M008	10514	0.628	0.724	1.352	0.367	27.145	-
	1M009	10493	0.601	0.617	1.218	0.249	20.443	-
S3 组	2M002	10491	0.681	0.707	1.388	0.223	16.066	33.038
	2M003	10512	0.681	0.731	1.412	0.217	15.368	35.947
	2M004	10482	0.669	0.744	1.413	0.281	19.887	17.114
	2M005	10516	0.705	0.752	1.457	0.223	15.305	36.209
	2M007	10504	0.683	0.768	1.451	0.200	13.784	42.552
	2M008	10498	0.691	0.793	1.484	0.250	16.846	29.786
	2M009	10502	0.677	0.761	1.438	0.237	16.481	31.308
t-PA 组	3M001	10501	0.735	0.791	1.526	0.291	19.069	20.521
	3M002	10499	0.696	0.761	1.457	0.268	18.394	23.336
	3M003	10488	0.636	0.748	1.384	0.229	16.546	31.037
	3M004	10503	0.640	0.732	1.372	0.289	21.064	12.207
	3M005	10477	0.686	0.731	1.417	0.272	19.195	19.996
	3M006	10489	0.661	0.728	1.389	0.260	18.719	21.984
	3M007	10497	0.667	0.752	1.419	0.230	16.209	32.445
	3M008	10496	0.566	0.736	1.302	0.239	18.356	23.493

	3M009	10507	0.641	0.743	1.384	0.265	19.147	20.196
S3+PA 组	4M001	10505	0.717	0.832	1.549	0.218	14.074	41.343
	4M003	10508	0.639	0.716	1.355	0.232	17.122	28.639
	4M004	10511	0.653	0.770	1.423	0.207	14.547	39.371
	4M005	10509	0.656	0.731	1.387	0.267	19.250	19.768
	4M006	10478	0.602	0.600	1.202	0.217	18.053	24.756
	4M007	10484	0.665	0.755	1.420	0.287	20.211	15.762
	4M008	10479	0.636	0.675	1.311	0.225	17.162	28.469

表 12： 动物体重（g）数据汇总

组别	动物编号	系统编号	体重（g）	
			D0	D2
模型对照组	1M001	10486	281.17	212.52
	1M002	10494	248.53	195.65
	1M003	10495	286.46	223.12
	1M004	10483	289.31	221.54
	1M006	10481	274.52	235.65
	1M007	10513	262.70	209.17
	1M008	10514	252.64	193.31
	1M009	10493	271.27	228.21
S3组	2M002	10491	281.72	232.57
	2M003	10512	266.48	249.67
	2M004	10482	253.24	201.22
	2M005	10516	286.91	228.45
	2M007	10504	258.64	202.45
	2M008	10498	247.34	195.33
	2M009	10502	273.73	217.36
t-PA组	3M001	10501	289.15	230.57
	3M002	10499	246.68	203.58
	3M003	10488	263.91	203.63

	3M004	10503	259.23	199.35
	3M005	10477	273.31	205.31
	3M006	10489	281.77	223.28
	3M007	10497	281.59	223.30
	3M008	10496	273.94	217.60
	3M009	10507	251.02	200.68
S3+t-PA组	4M001	10505	288.39	247.50
	4M003	10508	272.53	219.13
	4M004	10511	273.92	218.05
	4M005	10509	283.71	218.91
	4M006	10478	263.60	202.12
	4M007	10484	266.20	210.77
	4M008	10479	248.95	199.20
	4M001	10505	288.39	247.50

以上所述仅为本发明的较佳实施例，并不用以限制本发明，凡在本发明的精神和原则之内，所作的任何修改、等同替换、改进等，均应包含在本发明的保护范围之内。

权利要求书

1. 一种神经保护多肽化合物，其特征在于，包括具有如下化学式的多肽及其盐：

(M)m-(Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Glu/Asp-Ser/Thr-Asp/Glu-Val/Leu)-(N)n；

式中，m 和 n 为 0-3 的整数，但 m 和 n 不同时为零；

M 为 beta-Ala-His、beta-Ala-1-Methyl-His 或 beta-Ala-3-Methyl-His，N 为 beta-Ala-His、beta-Ala-1-Methyl-His 或 beta-Ala-3-Methyl-His。

2. 根据权利要求 1 所述的神经保护多肽化合物，其特征在于，包括具有如下化学式的多肽及其盐：

beta-Ala-His-Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Glu/Asp-Ser/Thr-Asp/Glu-Val/Leu；

Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Glu/Asp-Ser/Thr-Asp/Glu-Val/Leu-beta-Ala-His；

beta-Ala-His-beta-Ala-His-Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Glu/Asp-Ser/Thr-Asp-Val/Leu；

Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Glu/Asp-Ser/Thr-Asp/Glu-Val/Leu-beta-Ala-His-beta-Ala-His；

beta-Ala-His-Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Glu/Asp-Ser/Thr-Asp/Glu-Val/Leu-beta-Ala-His；

beta-Ala-His-beta-Ala-His-beta-Ala-His-Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Glu/Asp-Ser/Thr-Asp-Val/Leu；

beta-Ala-His-beta-Ala-His-Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Glu/Asp-Ser/Thr-Asp-Val/Leu-beta-Ala-His；

beta-Ala-His-Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Glu/Asp-Ser/Thr-Asp/Glu-Val/Leu-beta-Ala-His-beta-Ala-His；

Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Glu/Asp-Ser/Thr-Asp/Glu-Val/Leu-beta-Ala-His-beta-Ala-His-beta-Ala-His；

式中，His 为 His、1-Methyl-His 或 3-Methyl-His。

3. 根据权利要求 1 所述的神经保护多肽化合物，其特征在于，包括具有

如下化学式的多肽及其盐：

beta-Ala-His-Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Glu-Ser-Asp-Val;
beta-Ala-His-Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Asp-Ser-Asp-Val;
beta-Ala-His-Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Glu-Thr-Asp-Val;
beta-Ala-His-Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Glu-Thr-Glu-Val;
beta-Ala-His-Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Glu-Ser-Glu-Val;
beta-Ala-His-Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Asp-Thr-Asp-Val;
beta-Ala-His-Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Asp-Ser-Glu-Val;
beta-Ala-His-Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Asp-Thr-Glu-Val;
Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Glu-Ser-Asp-Val-beta-Ala-His;
Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Asp-Ser-Asp-Val-beta-Ala-His;
Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Glu-Thr-Asp-Val-beta-Ala-His;
Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Glu-Thr-Glu-Val-beta-Ala-His;
Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Glu-Ser-Glu-Val-beta-Ala-His;
Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Asp-Thr-Asp-Val-beta-Ala-His;
Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Asp-Ser-Glu-Val-beta-Ala-His;
Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Asp-Thr-Glu-Val-beta-Ala-His;
beta-Ala- (1-methyl-His)-Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Glu-Ser-Asp-Val;
beta-Ala-(1-methyl-His)-Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Asp-Ser-Asp-Val;
beta-Ala-(1-Methyl-His)-Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Glu-Thr-Asp-Val;
beta-Ala-(1-Methyl-His)-Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Glu-Thr-Glu-Val;
beta-Ala-(1-Methyl-His)-Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Glu-Ser-Glu-Val;
beta-Ala-(1-Methyl-His)-Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Asp-Thr-Asp-Val;
beta-Ala-(1-Methyl-His)-Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Asp-Ser-Glu-Val;
beta-Ala-(1-Methyl-His)-Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Asp-Thr-Glu-Val;
Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Glu-Ser-Asp-Val-beta-Ala-(1-Methyl-His);
Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Asp-Ser-Asp-Val-beta-Ala-(1-Methyl-His);
Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Glu-Thr-Asp-Val-beta-Ala-(1-Methyl-His);
Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Glu-Thr-Glu-Val-beta-Ala-(1-Methyl-His);
Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Glu-Ser-Glu-Val-beta-Ala-(1-Methyl-His);

Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Asp-Thr-Asp-Val-beta-Ala-(1-Methyl-His);
Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Asp-Ser-Glu-Val-beta-Ala-(1-Methyl-His);
Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Asp-Thr-Glu-Val-beta-Ala-(1-Methyl-His);
beta-Ala-(3-methyl-His)-Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Glu-Ser-Asp-Val;
beta-Ala-(3-methyl-His)-Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Asp-Ser-Asp-Val;
beta-Ala-(3-Methyl-His)-Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Glu-Thr-Asp-Val;
beta-Ala-(3-Methyl-His)-Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Glu-Thr-Glu-Val;
beta-Ala-(3-Methyl-His)-Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Glu-Ser-Glu-Val;
beta-Ala-(3-Methyl-His)-Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Asp-Thr-Asp-Val;
beta-Ala-(3-Methyl-His)-Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Asp-Ser-Glu-Val;
beta-Ala-(3-Methyl-His)-Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Asp-Thr-Glu-Val;
Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Glu-Ser-Asp-Val-beta-Ala-(3-Methyl-His);
Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Asp-Ser-Asp-Val-beta-Ala-(3-Methyl-His);
Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Glu-Thr-Asp-Val-beta-Ala-(3-Methyl-His);
Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Glu-Thr-Glu-Val-beta-Ala-(3-Methyl-His);
Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Glu-Ser-Glu-Val-beta-Ala-(3-Methyl-His);
Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Asp-Thr-Asp-Val-beta-Ala-(3-Methyl-His);
Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Asp-Ser-Glu-Val-beta-Ala-(3-Methyl-His);
Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Asp-Thr-Glu-Val-beta-Ala-(3-Methyl-His)。

4. 根据权利要求 1 所述的神经保护多肽化合物, 其特征在于, 包括具有如下化学式的多肽及其盐:

beta-Ala-His-Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Glu-Ser-Asp-Val;
Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Glu-Ser-Asp-Val-beta-Ala-His;
beta-Ala- (1-methyl-His)-Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Glu-Ser-Asp-Val;
Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Glu-Ser-Asp-Val-beta-Ala-(1-Methyl-His);
beta-Ala-(3-methyl-His)-Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Glu-Ser-Asp-Val;
Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Glu-Ser-Asp-Val-beta-Ala-(3-Methyl-His)。

5. 根据权利要求 1 所述的神经保护多肽化合物, 其特征在于, 包括具有

如下化学式的多肽及其盐：

beta-Ala-His-Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Glu-Ser-Asp-Val；
Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Glu-Ser-Asp-Val-beta-Ala-His。

6. 根据权利要求 1 所述的神经保护多肽化合物，其特征在于，包括具有如下化学式的多肽及其盐：

beta-Ala-His-Lys-Leu-Ser-Ser-Ile-Glu-Ser-Asp-Val。

7. 权利要求 1-6 任一项所述的神经保护多肽化合物用在医药中。

8. 权利要求 1-6 任一项所述的神经保护多肽化合物用于治疗神经系统疾病，例如缺血性脑卒中、出血性脑卒中、脑创伤、阿尔茨海默病、帕金森病或其它神经退行性疾病。

9. 包含权利要求 1-6 任一项所述的神经保护多肽化合物的药物，例如注射剂、口服用药、舌下用药、喷雾用药或肛门用药。

10. 权利要求 1-6 任一项所述的神经保护多肽化合物与溶栓药物的组合。

11. 权利要求 10 任一项所述的组合，用于治疗神经系统疾病，例如缺血性脑卒中、出血性脑卒中、脑创伤、阿尔茨海默病、帕金森病或其它神经退行性疾病。

» MCAO模型组

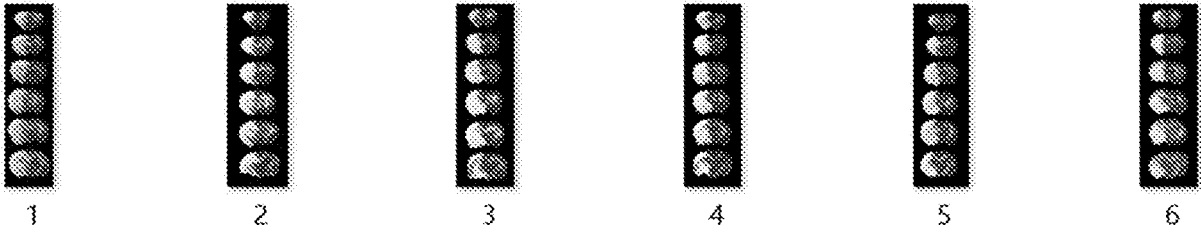


图 1

» S1

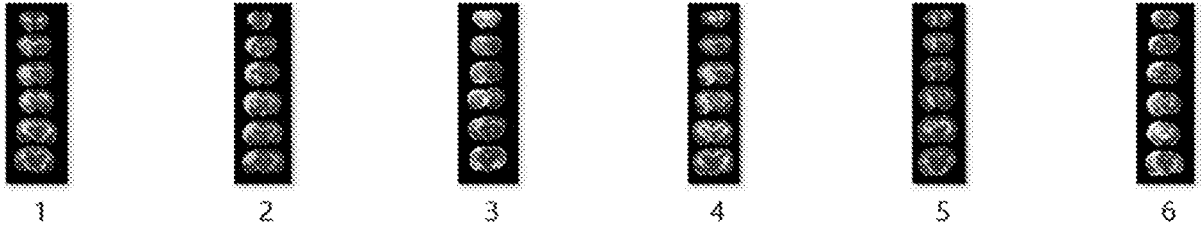


图 2

» S3

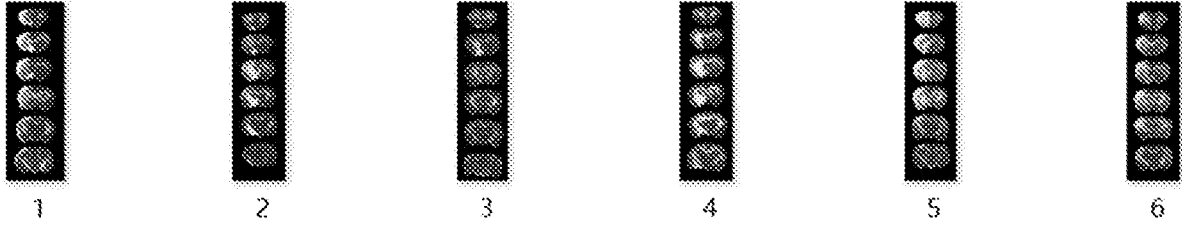


图 3

假手术组

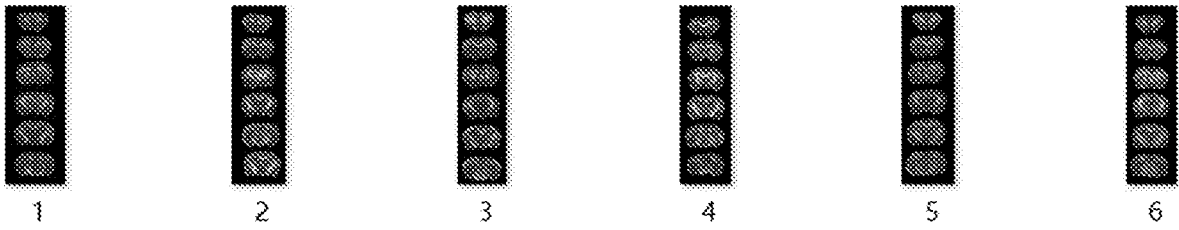


图 4

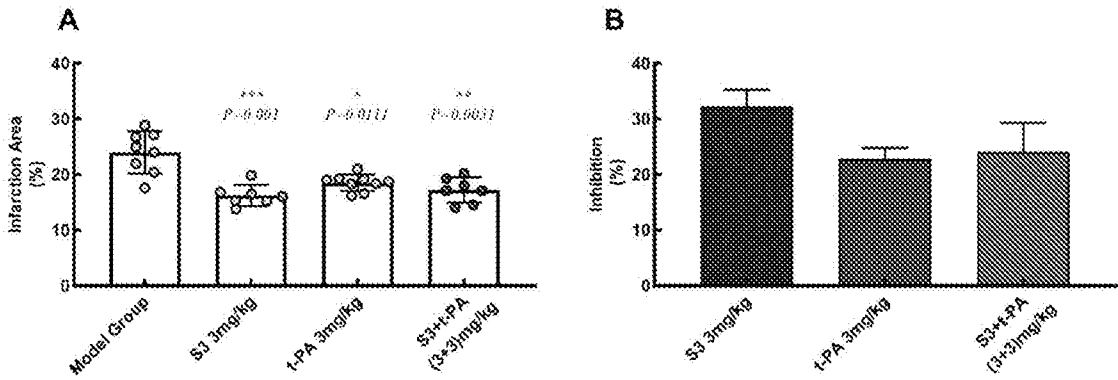


图 5

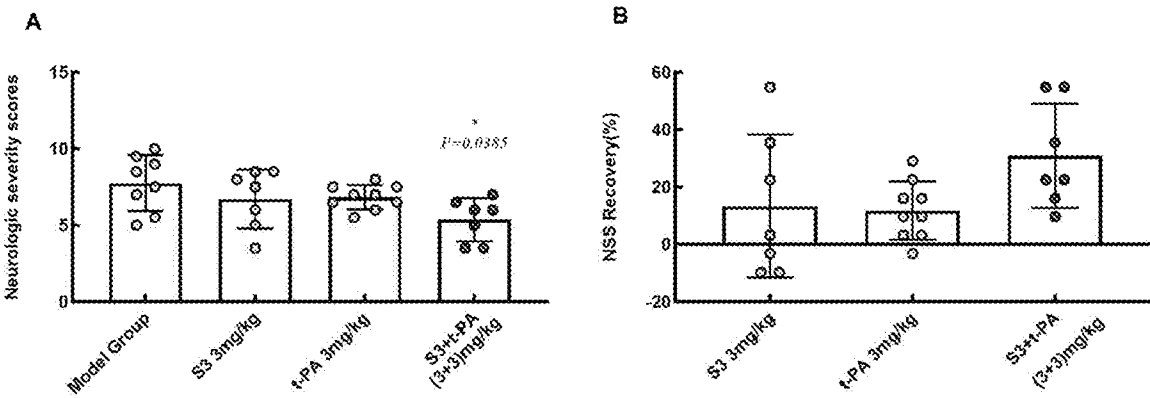


图 6

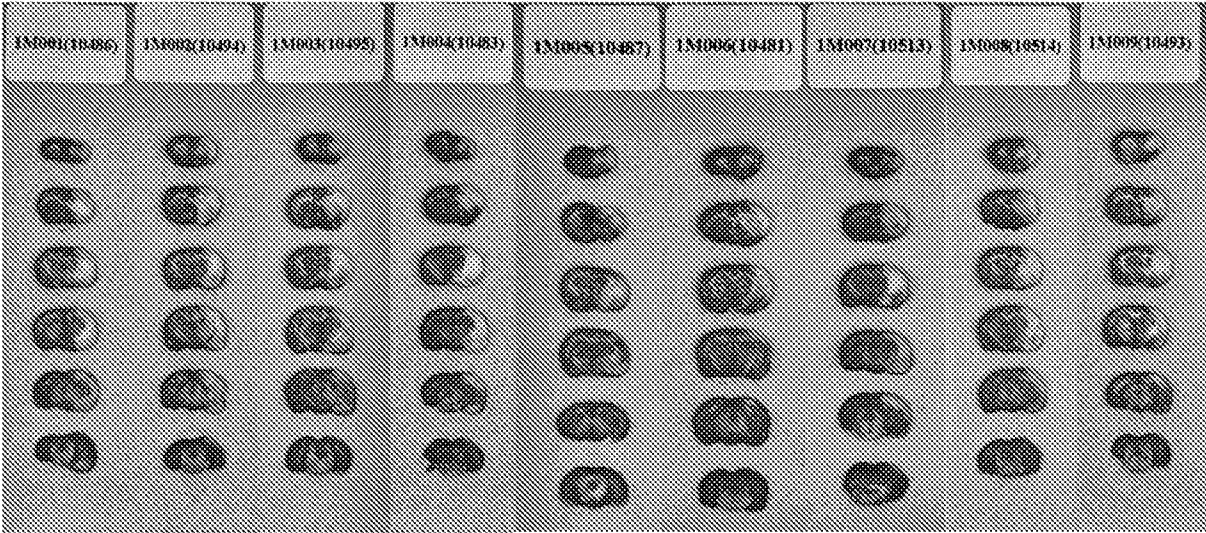


图 7

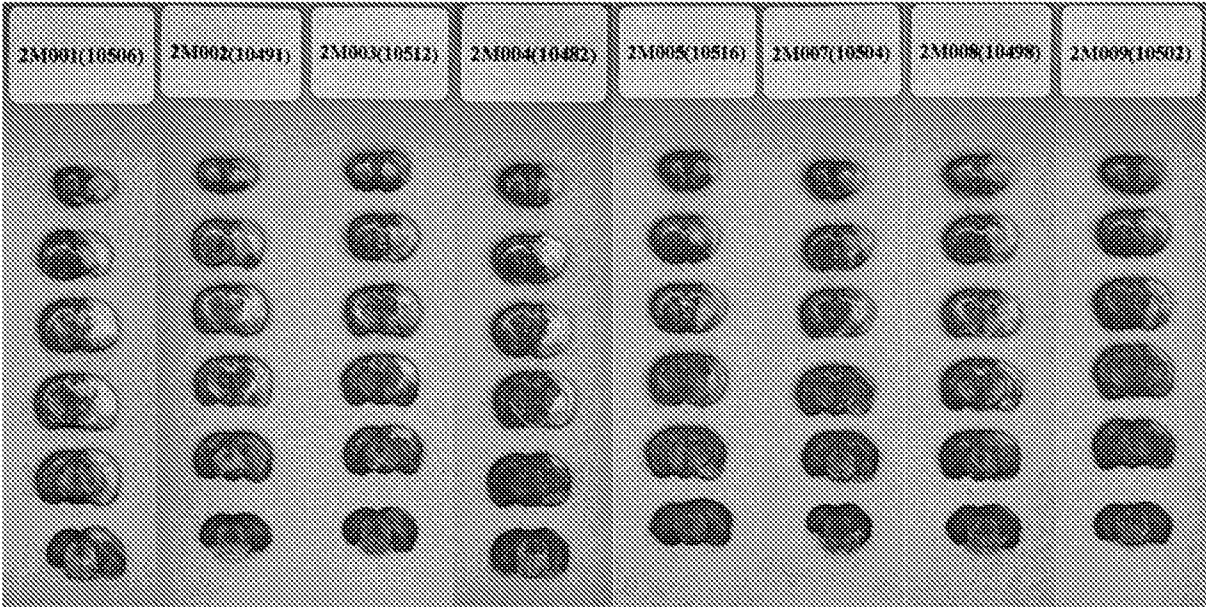


图 8

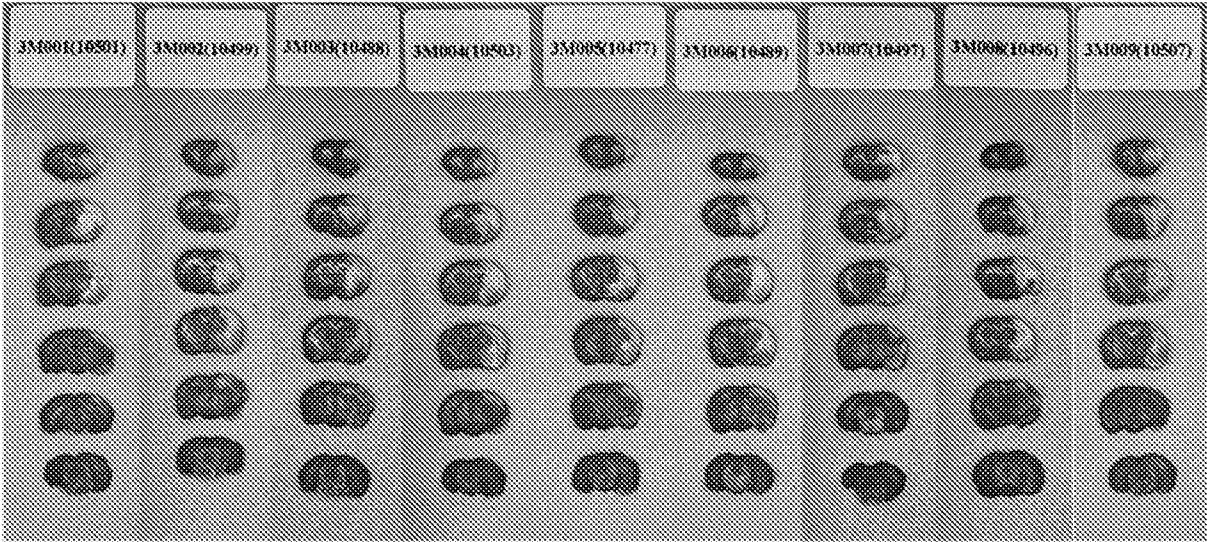


图 9

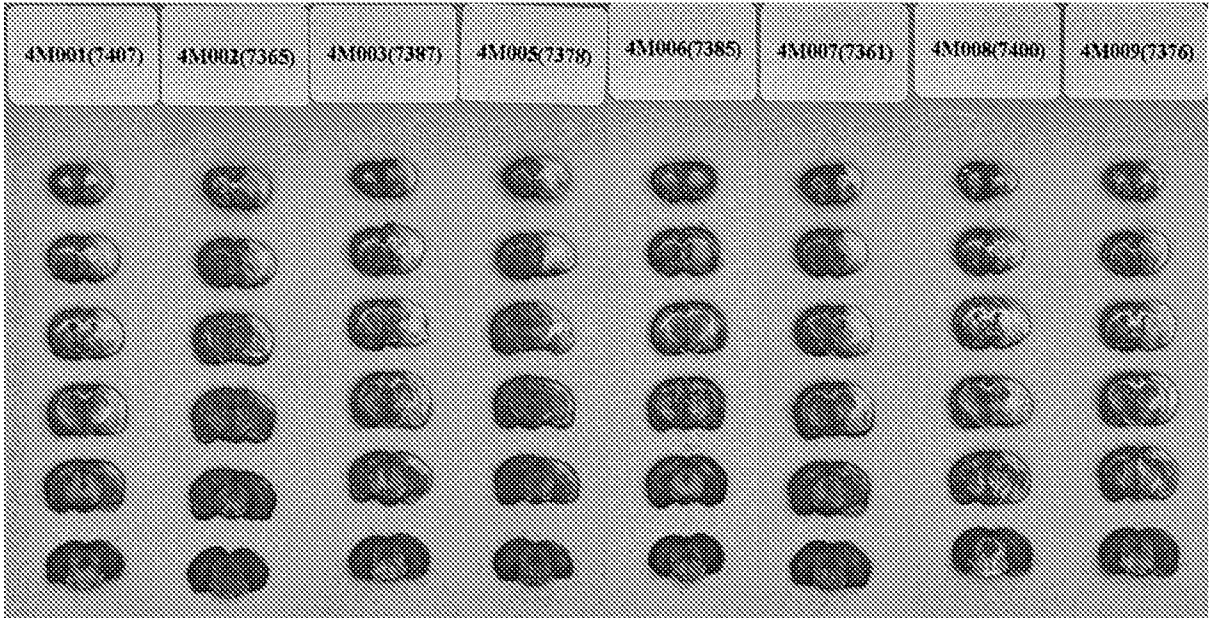


图 10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/109048

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 7/06(2006.01)i; C07K 7/08(2006.01)i; A61K 38/08(2019.01)i; A61K 38/10(2006.01)i; A61P 25/00(2006.01)i; A61P 9/12(2006.01)i; A61P 25/28(2006.01)i; A61P 25/16(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K; A61K; A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNKI, CNABS, CNTXT, WPABS, WPABSC, DWPI, ENTXT, ENTXTC, ISI web of science: 神经保护, 肽, 突触后密度蛋白, neuroprotection, peptides, PSD-95, NR2B9c, 肌肽, L-Carnosine, 鹅肌肽, Anserine, 鲸肌肽, 蛇肌肽, Balenine, Ophidine等; GENBANK, EMBL, STN, 中国专利生物序列检索系统和检索的序列, Chinese Patent Biological Sequence Retrieval System and searched sequences: 权利要求中的序列, sequences in the claims.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CN 106267149 A (NANJING MEDICAL UNIVERSITY) 04 January 2017 (2017-01-04) claims 1-4, and description, paragraph [0003]	1-11
Y	CN 113150065 A (WUHAN INNERSE PHARMACEUTICAL INC.) 23 July 2021 (2021-07-23) claims 1-10, and description, paragraphs [0002]-[0003]	1-11
Y	CN 103648518 A (NONO INC.) 19 March 2014 (2014-03-19) abstract, and claims 1-15	10-11
Y	CN 106265594 A (NANJING MEDICAL UNIVERSITY) 04 January 2017 (2017-01-04) claims 1-2, and description, paragraph [0003]	1-11
PX	CN 113735938 A (INNERSE (ZHUHAI) PHARMACEUTICAL CO., LTD.) 03 December 2021 (2021-12-03) claims 1-9	1-9
PY	CN 113735938 A (INNERSE (ZHUHAI) PHARMACEUTICAL CO., LTD.) 03 December 2021 (2021-12-03) claims 1-9	10-11



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 “E” earlier application or patent but published on or after the international filing date
 “L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 “O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 “P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 “X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 “Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 “&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

13 October 2022

Date of mailing of the international search report

28 October 2022

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration (ISA/
CN)
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing
100088, China

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed:
 - ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - ☐ on paper or in the form of an image file.
 - b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
 - ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:
 - [1] With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the present report was completed to the extent that a meaningful search can be conducted in the case that no sequence table complies with WIPO Standard ST.26.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/109048**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **7-8**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
 - [1] PCT Rule 39.1(iv)-methods for the treatment of a human or animal body by surgery or therapy, as well as diagnostic methods.
 - [2] The search for claims 7-8 was conducted on the basis of the reasonably expected subject matter, i.e., an application of the neuroprotective polypeptide compound according to any one of claims 1-6 in the preparation of a drug.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2022/109048

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	106267149	A	04 January 2017	None			
CN	113150065	A	23 July 2021	None			
CN	103648518	A	19 March 2014	DK	2723363	T3	15 October 2018
				RS	57798	B1	31 December 2018
				EP	2723363	A2	30 April 2014
				PL	2723363	T3	31 December 2018
				JP	2017193535	A	26 October 2017
				US	2014248257	A1	04 September 2014
				KR	20210109661	A	06 September 2021
				HU	E040564	T2	28 March 2019
				KR	20140053971	A	08 May 2014
				SI	2723363	T1	31 December 2018
				EP	3427748	A1	16 January 2019
				AU	2012274910	A1	16 January 2014
				US	2019091283	A1	28 March 2019
				KR	20190107195	A	18 September 2019
				PT	2723363	T	08 November 2018
				CY	1121379	T1	29 May 2020
				WO	2012176172	A2	27 December 2012
				ES	2912042	T3	24 May 2022
				HU	E058238	T2	28 July 2022
				LT	2723363	T	25 October 2018
				KR	20220106862	A	29 July 2022
				EP	4052721	A1	07 September 2022
				HR	P20181526	T1	14 December 2018
				US	2021308209	A1	07 October 2021
				PT	3427748	T	03 May 2022
				PL	3427748	T3	30 May 2022
				HR	P20220519	T1	27 May 2022
				JP	2020189859	A	26 November 2020
				DK	3427748	T3	19 April 2022
				ES	2690994	T3	23 November 2018
				CA	2839630	A1	27 December 2012
				KR	20200092437	A	03 August 2020
				JP	2019038831	A	14 March 2019
				JP	2014520142	A	21 August 2014
CN	106265594	A	04 January 2017	None			
CN	113735938	A	03 December 2021	None			

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2022/109048

A. 主题的分类

C07K 7/06(2006.01)i; C07K 7/08(2006.01)i; A61K 38/08(2019.01)i; A61K 38/10(2006.01)i; A61P 25/00(2006.01)i; A61P 9/12(2006.01)i; A61P 25/28(2006.01)i; A61P 25/16(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C07K; A61K; A61P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

CNKI, CNABS, CNTXT, WPABS, WPABSC, DWPI, ENTXT, ENTXTC, ISI web of science和检索词:神经保护, 肽, 突触后密度蛋白, neuroprotection, peptides, PSD-95, NR2B9c, 肌肽, L-Carnosine, 鹅肌肽, Anserine, 鲸肌肽, 蛇肌肽, Balenine, Ophidine等; GENBANK, EMBL, STN, 中国专利生物序列检索系统和检索的序列: 权利要求中的序列。

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
Y	CN 106267149 A (南京医科大学) 2017年1月4日 (2017 - 01 - 04) 权利要求1-4, 说明书第[0003]段	1-11
Y	CN 113150065 A (武汉英纳氏药业有限公司) 2021年7月23日 (2021 - 07 - 23) 权利要求1-10, 说明书第[0002]-[0003]段	1-11
Y	CN 103648518 A (诺诺公司) 2014年3月19日 (2014 - 03 - 19) 摘要, 权利要求1-15	10-11
Y	CN 106265594 A (南京医科大学) 2017年1月4日 (2017 - 01 - 04) 权利要求1-2, 说明书第[0003]段	1-11
PX	CN 113735938 A (英纳氏珠海药业有限公司) 2021年12月3日 (2021 - 12 - 03) 权利要求1-9	1-9
PY	CN 113735938 A (英纳氏珠海药业有限公司) 2021年12月3日 (2021 - 12 - 03) 权利要求1-9	10-11

☐ 其余文件在C栏的续页中列出。

☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2022年10月13日

国际检索报告邮寄日期

2022年10月28日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中国国家知识产权局(ISA/CN)
中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

传真号 (86-10)62019451

受权官员

李晨

电话号码 86-10-62411100

第I栏

核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1. c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 国际检索是基于下列序列表进行的:

a. ☒ 作为国际申请的一部分提交的:

☒ 附件C/ST. 25文本文件形式

☐ 纸件或图形文件形式

b. ☐ 根据细则13之三. 1(a) 仅为国际检索目的以附件C/ST. 25文本文件形式与国际申请同时提交的:

c. ☐ 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的:

☐ 附件C/ST. 25文本文件形式(细则13之三. 1(a))

☐ 纸件或图形文件形式(细则13之三. 1(b) 和行政规程第713段)

2. ☐ 另外, 在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下, 提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围(如适用)的所需声明。

3. 补充意见:

[1] 对于国际申请中公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 本报告是在没有符合WIPO标准ST. 26的序列表的情况下能进行有意义的检索的程度下完成的。

第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. ☒ 权利要求： 7-8
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
[1] PCT细则39.1(iv)——处置人体或者动物体的外科手术方法或治疗方法，以及诊断方法。
[2] 针对权利要求7-8的检索是基于合理预期的主题进行的，即：权利要求1-6任一项所述神经保护多肽化合物在制备药物中的应用。
2. ☐ 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索， 具体地说：
3. ☐ 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2022/109048

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	106267149	A	2017年1月4日	无			
CN	113150065	A	2021年7月23日	无			
CN	103648518	A	2014年3月19日	DK	2723363	T3	2018年10月15日
				RS	57798	B1	2018年12月31日
				EP	2723363	A2	2014年4月30日
				PL	2723363	T3	2018年12月31日
				JP	2017193535	A	2017年10月26日
				US	2014248257	A1	2014年9月4日
				KR	20210109661	A	2021年9月6日
				HU	E040564	T2	2019年3月28日
				KR	20140053971	A	2014年5月8日
				SI	2723363	T1	2018年12月31日
				EP	3427748	A1	2019年1月16日
				AU	2012274910	A1	2014年1月16日
				US	2019091283	A1	2019年3月28日
				KR	20190107195	A	2019年9月18日
				PT	2723363	T	2018年11月8日
				CY	1121379	T1	2020年5月29日
				WO	2012176172	A2	2012年12月27日
				ES	2912042	T3	2022年5月24日
				HU	E058238	T2	2022年7月28日
				LT	2723363	T	2018年10月25日
				KR	20220106862	A	2022年7月29日
				EP	4052721	A1	2022年9月7日
				HR	P20181526	T1	2018年12月14日
				US	2021308209	A1	2021年10月7日
				PT	3427748	T	2022年5月3日
				PL	3427748	T3	2022年5月30日
				HR	P20220519	T1	2022年5月27日
				JP	2020189859	A	2020年11月26日
				DK	3427748	T3	2022年4月19日
				ES	2690994	T3	2018年11月23日
				CA	2839630	A1	2012年12月27日
				KR	20200092437	A	2020年8月3日
				JP	2019038831	A	2019年3月14日
				JP	2014520142	A	2014年8月21日
CN	106265594	A	2017年1月4日	无			
CN	113735938	A	2021年12月3日	无			