(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 116744957 A
(43)申请公布日 2023.09.12

(21)申请号 202180068718.2
(22)申请日 2021.09.30
(30)优先权数据
FR2010186 2020.10.06 FR
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2023.04.06
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/FR2021/051694 2021.09.30
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2022/074313 FR 2022.04.14
(71)申请人 克莱蒙奥弗涅大学
地址 法国克莱蒙费朗
申请人 国家科学研究中心
辛格玛克勒蒙特公立大学
国立健康与医学研究所
蒙彼利埃大学
(72)发明人 杰罗姆·巴斯罗莱斯
埃曼努埃尔·博里内特
克劳德·泰勒弗米尔
奥利维尔·罗伊 莱昂内尔·纳顿
优素福·艾苏尼
(74)专利代理机构 北京派特恩知识产权代理有限公司 11270
专利代理师 陈万青 李雪
(51)Int.Cl.
A61K 38/02(2006.01)

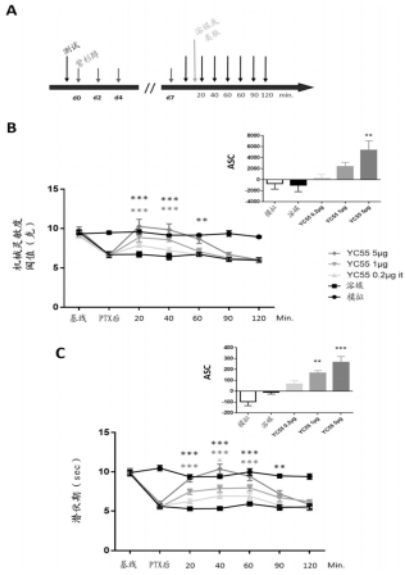
权利要求书4页 说明书24页 附图18页

(54)发明名称

新类肽及其在预防或治疗慢性疼痛中的用途

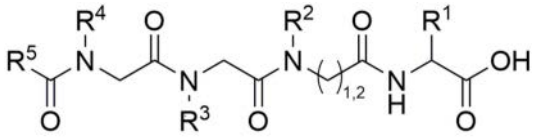
(57)摘要

本发明涉及用于预防和/或治疗慢性疼痛、特别是由周围神经病引起的慢性疼痛的新拟肽(或类肽)分子。



CN 116744957 A

1.一种以下通式(I)的类肽：



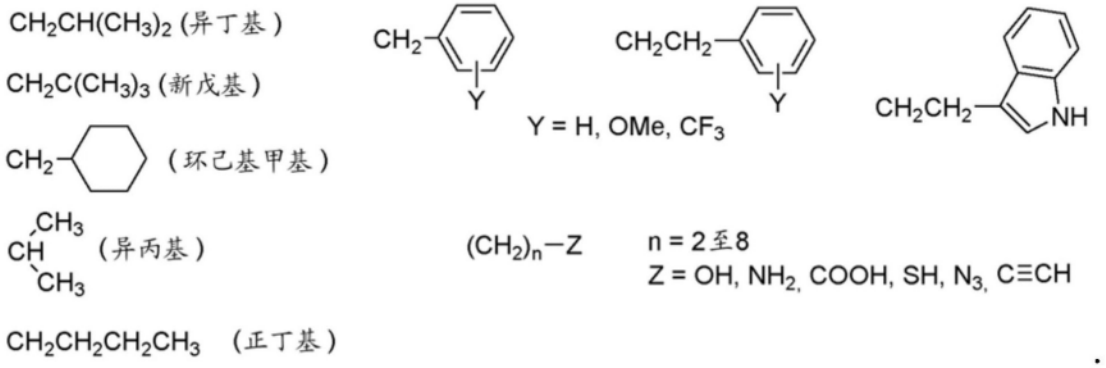
I

其中

R^1独立地是CH_3(L-Ala)、$CH(CH_3)_2$(L-Val)、$CH(CH_3)CH_2CH_3$(L-Ile)、$CH_2CH(CH_3)_2$(L-Leu和D-Leu)、$CH_2C(CH_3)_3$、$C(CH_3)_3$、CH_2(环丁基)；

R^2和R^3独立地选自：$CH_2CH(CH_3)_2$、$CH_2CH_2NH_2$、CH_2CH_2OH、$CH_2CH_2CH_2OH$、$CH_2CH(OH)CH_3$、CH_2CONH_2、$CH_2CH_2CONH_2$；

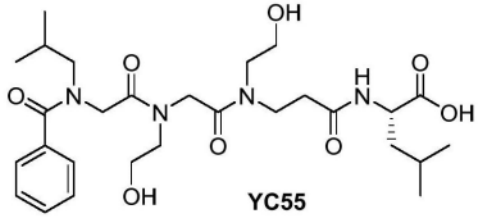
R^4是选自以下项的脂族或芳族基团：

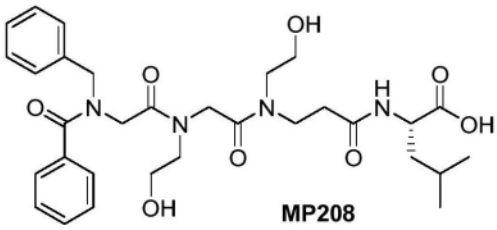


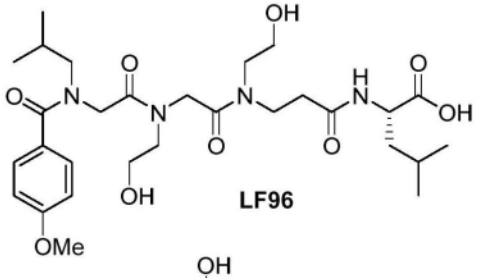
;

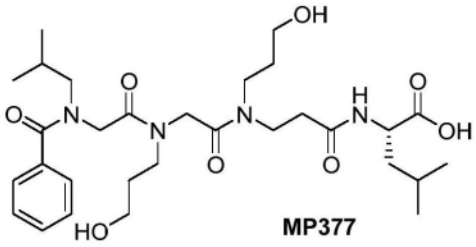
R^5独立地是CH_3、$CH(CH_3)_2$、$CH_2C_6H_5$、C_6H_4X(其中在邻位、间位或对位的X独立地是H、OMe、CF_3、CH_3、CH_2CH_3、F、Br、Cl、NO_2)、3-吲哚基、3-喹啉基。

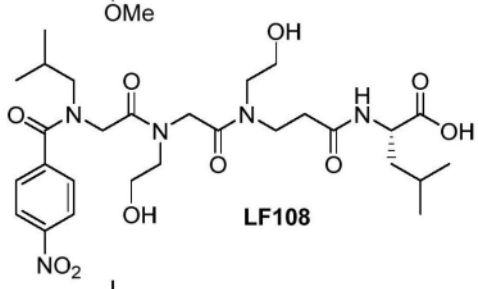
2.根据权利要求1所述的下式的类肽：

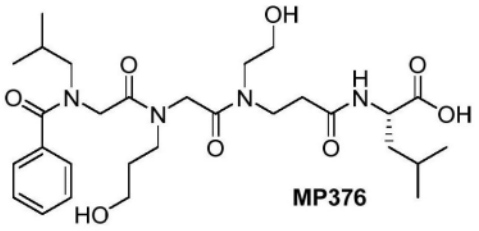

YC55

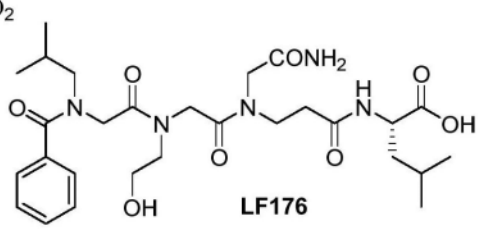

MP208

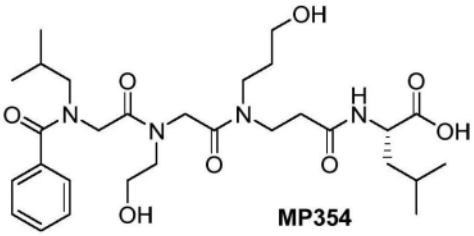

LF96

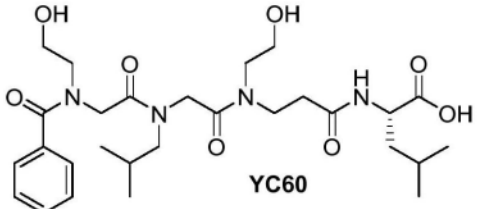

MP377

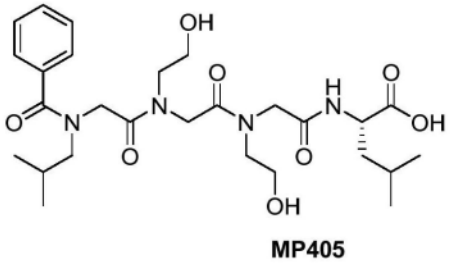

LF108

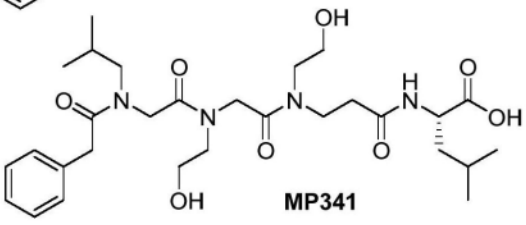

MP376

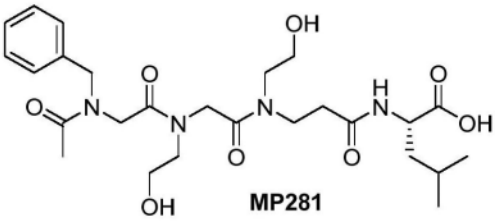

LF176

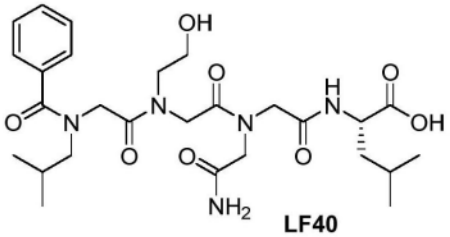

MP354

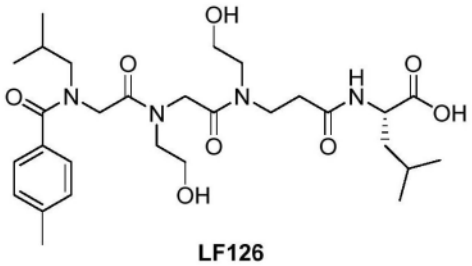

YC60


MP405

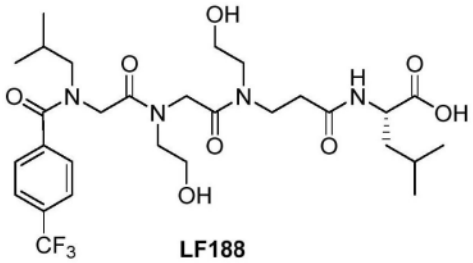

MP341


MP281

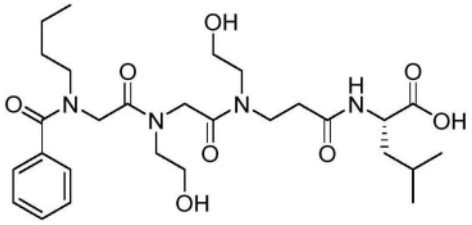

LF40



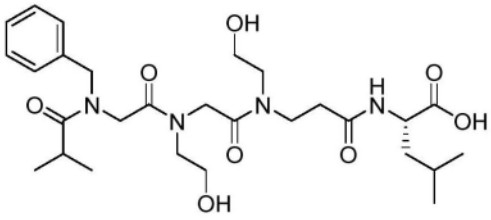
LF126



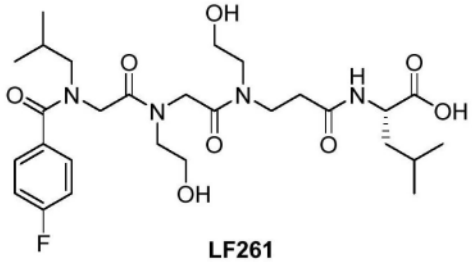
LF188



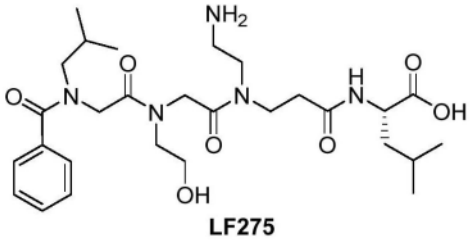
LF222



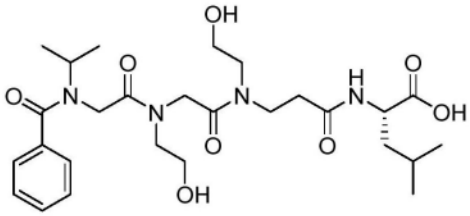
LF239



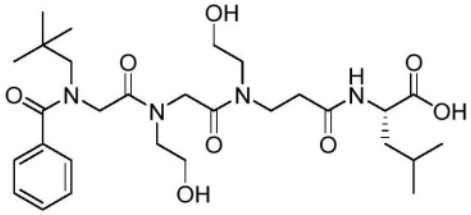
LF261



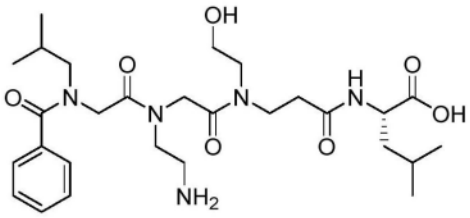
LF275



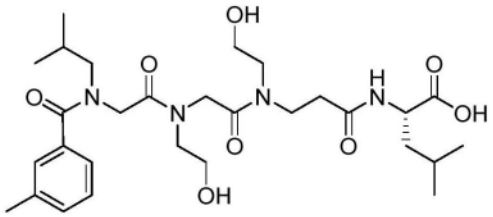
LF295



LF306

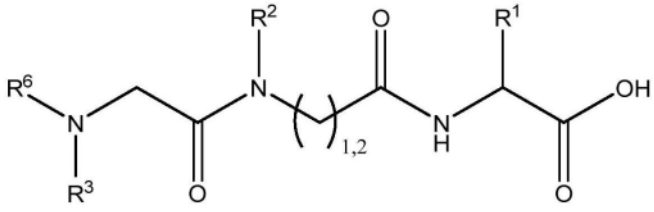


LF329



LF400

3.一种以下通式(II)的类肽：



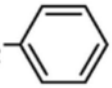
II

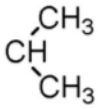
其中

R^1、R^2和R^3根据权利要求1所定义；

R^6是R^3、H、COR^5(其中R^5如上所定义)或R^7；

R^7独立地是以下项中的一者：

$(CH_2)_wCH_3$烷基(w＝1至4)  (苯基甲基)

 (异丙基)  (苯基)  (环己基)

。

4.一种药物组合物,所述药物组合物包含根据权利要求1至3中任一项所述的类肽和药学上可接受的载体。

5.根据权利要求1至3中任一项所述的类肽或根据权利要求4所述的药物组合物用作药物。

6.根据权利要求1至3中任一项所述的类肽或根据权利要求4所述的药物组合物用于预防或治疗慢性疼痛。

7.根据权利要求6所述用于用途的类肽,其中所述慢性疼痛是神经性起源的。

新类肽及其在预防或治疗慢性疼痛中的用途

技术领域

[0001] 本发明涉及用于预防和/或治疗慢性疼痛,特别是由周围神经病变(例如由化疗诱导)引起的慢性疼痛的新型拟肽分子(或类肽,也称为肽-类肽杂合体或类肽聚体(peptomer))。

[0002] 在下文的描述中,方括号([])中的引用是指正文末尾处的参考文献。

现有技术

[0003] 慢性疼痛影响着全世界15亿人,他们的治疗响应明显不足(Finnerup NB等人,2015年)[1]。最近的流行病学研究估计,慢性疼痛影响着大约20%的成年人和50%的老年人(von Hehn等人,2012年)[2]。在全球范围内,60%患有疼痛的人无法工作,并且20%报告由于疼痛失去了工作。同时,2010年止痛药销量为200亿单位,高于2005年的140亿单位(+9.3%)。在2017年,全球疼痛市场达到610.5亿美元,并且预计到2023年将达到771.3亿美元,从2017年至2023年年增长率为4%。

[0004] 神经性疼痛影响着约7%的普通人群和25%的慢性疼痛患者。存在两种类型的神经性疼痛:周围神经性疼痛(取决于其起源,其可能涉及神经丛、根或躯干的区域,或者在多神经病的背景下更加弥散)和中枢神经性疼痛(影响感觉通路或疼痛控制的损伤)。化疗诱导的周围神经病是许多抗癌剂的常见不良反应,其特征在于显著的慢性疼痛,对患者的生活质量具有持续影响,并且导致剂量调整,具有降低临床功效的风险。越来越差的止痛药典(Di-antalvic于2011年停用)的特征在于陈旧且通常耐受性差的治疗。

[0005] 创新已经停滞了超过50年,其中提出的大多数新药是现有药物的简单再配制或组合。最近的荟萃分析示出,迄今为止,除了加巴喷丁和度洛西汀具有仍然低的功效评分之外,没有对神经性疼痛的治疗是真正有效的(Hershman等人,2014年)[3]。

[0006] 包括四个HCN1-4成员的HCN离子通道家族(Ludwig等人,Nature,1998年;Santoro等人,1998年;Seifert等人,1999年)[4-6]可为开发新降低心率的药物和新型止痛药提供极好的机会。HCN通道广泛分布在疼痛途径中并且在神经性疼痛的发展和维持中起重要作用(Dunlop等人,2009年;Lewis等人,2011年)[7,8]。非选择性HCN阻断剂已经示出,在神经性疼痛的啮齿动物模型中减少了疼痛症状(Descoeur等人,2011年;Young等人,2014年)[9,10]。然而,它们的心脏和视觉副作用(例如,pan-HCN阻断剂)限制了它们用于治疗神经性疼痛的临床转化。

[0007] 有趣的是,HCN通道功能受辅助亚基即在心脏中不表达的Rab8b相互作用蛋白(TRIP8b)的紧密调节。该细胞质蛋白经由两个接触位点与HCN通道亚基的C末端结合(Lewis等人,2009年)[11]。此外,通过X-射线晶体学测定了与代表HCN2的C末端的6个氨基酸肽复合的TRIP8b的三角形四肽(TPR)区的原子结构(Bankston等人,2012年)[12]。

[0008] 在目前的背景下,其中大部分工作集中于开发直接作用于HCN通道的抑制剂,靶向TRIP8b和/或TRIP8b-HCN相互作用可提供调节疼痛状态中的HCN活性而没有影响心脏和视觉功能的风险的新可能性。

具体实施方式

[0009] 本发明基于以下假设:导致由HCN通道诱导的电流(Ih)降低的TRIP8b-HCN相互作用的破坏可在由奥沙利铂诱导的急性和慢性周围神经病的啮齿动物模型中具有止痛作用,从而忠实地再现人的症状学。

[0010] 该策略的功效的证据最初使用NUCC-5953(来自20,000个分子文库筛选的分子)进行验证,其能够破坏TRIP8b-HCN相互作用(Han等人,2015年)[13]。因此,发明人证明,通过鞘内(图2)或全身(图3)注射NUCC-5953,奥沙利铂诱导的急性冷超敏性以剂量依赖性方式逆转。没有观察到运动活性的改变。原始数据还示出,施用NUCC-5953降低了膜寻址,并因此降低了在神经性动物中观察到的HCN1和HCN2的活性(图5B)。此外,体外应用NUCC-5953示出对心脏细胞中HCN激活诱导的电流没有影响(与HCN通道的非特异性阻断剂相反,图6)。

[0011] 然后,发明人决定基于两种蛋白质的相互作用模式设计TRIP8b-HCN相互作用的特异性阻断剂。然而,虽然蛋白-蛋白相互作用(PPI)在所有水平的细胞功能中发挥重要作用,使它们成为不可否认的治疗目标,但有效的PPI抑制剂的设计仍然是真正的挑战。尽管低分子量分子经过广泛筛选,但不太适合与涉及大表面(>800Å)的相互作用竞争。此外,为了设计有效的抑制剂,重要的是能够以其生物活性"热区段"构象模拟蛋白/蛋白识别区段。肽是设计这些新抑制剂的首选化合物,条件是它们可解决代谢和构象稳定性以及细胞渗透到达细胞内靶标的问题。

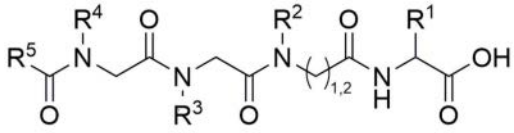
[0012] 然后,发明人经由类肽(N取代的甘氨酸低聚物)的合成转向拟肽化学,这些类肽特别适于开发靶向蛋白-蛋白相互作用的抑制剂,并且也可称为类肽聚体(即,组合"类肽"单体和"氨基酸"单体的低聚物—Ostergaard等人,1997年,[17]—即,肽-类肽杂合体)。

[0013] 这些是合成肽模拟物,其寡聚性质允许在大小和化学多样性方面的大模块性。

[0014] 它们允许精细的结构设计并且具有比肽更好的生物利用度(蛋白酶抗性、更好的膜渗透性、非免疫原性骨架)。

[0015] 因此,发明人设计了靶向TRIP8b的TPR结构域和HCN的C末端之间的相互作用的新类肽,这些新类肽能够在奥沙利铂诱导的急性神经病模型中发挥止痛作用,而没有不利的心脏或视觉影响。

[0016] 因此,本发明涉及以下通式(I)的类肽:

[0017] 

I

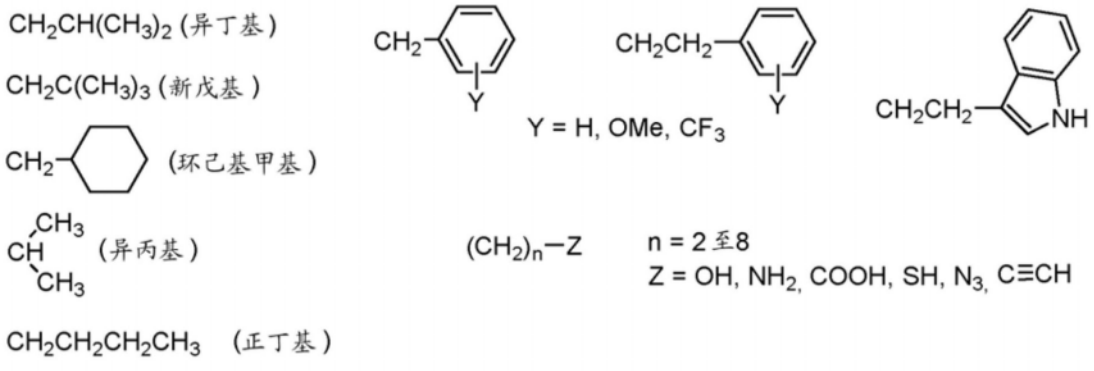
[0018] 其中

[0019] R^1独立地是CH_3(L-Ala)、$CH(CH_3)_2$(L-Val)、$CH(CH_3)CH_2CH_3$(L-Ile)、$CH_2CH(CH_3)_2$(L-Leu和D-Leu)、$CH_2C(CH_3)_3$、$C(CH_3)_3$、CH_2(环丁基);

[0020] R^2、R^3和R^4是在从伯胺合成期间顺序掺入的类肽单元的侧链;

[0021] R^2和R^3独立地选自:$CH_2CH(CH_3)_2$、$CH_2CH_2NH_2$、CH_2CH_2OH、$CH_2CH_2CH_2OH$、$CH_2CH(OH)CH_3$、CH_2CONH_2、$CH_2CH_2CONH_2$。具有醇或胺官能团的侧链已经以被保护的形式掺入低聚物中:用于醇官能团的甲硅烷基醚和用于胺官能团的氨基甲酸叔丁酯(Boc);

[0022] R^4是选自以下项的脂族或芳族基团：

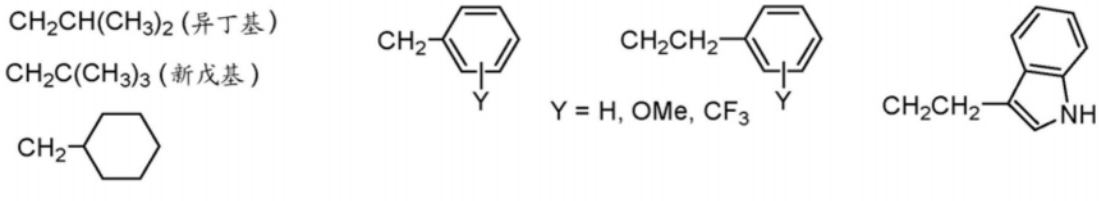


[0023] ；

[0024] R^5独立地是CH_3、$CH(CH_3)_2$、$CH_2C_6H_5$、C_6H_4X(其中在邻位、间位或对位的X独立地是H、OMe、CF_3、CH_3、CH_2CH_3、F、Br、Cl、NO_2)、3-吲哚基、3-喹啉基。

[0025] 有利地，R_4是选自以下项的脂族或芳族基团：

[0026]



。

[0027] 有利地，R^5独立地是CH_3、$CH_2C_6H_5$、C_6H_4X(其中在邻位、间位或对位的X独立地是H、OMe、CF_3、CH_3、CH_2CH_3、F、Br、Cl)、3-吲哚基、3-喹啉基。

[0028] 有利地，本发明的类肽选自通式(I)的类肽，其中：

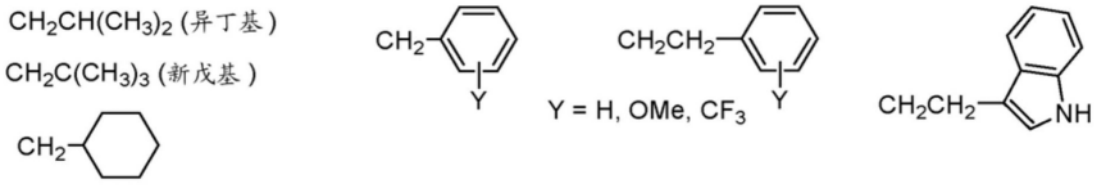
[0029] -R^1独立地是CH_3(L-Ala)、$CH(CH_3)_2$(L-Val)、$CH(CH_3)CH_2CH_3$(L-Ile)、$CH_2CH(CH_3)_2$(L-Leu和D-Leu)、$CH_2C(CH_3)_3$、$C(CH_3)_3$、CH_2(环丁基)；

[0030] -R^2、R^3和R^4是在从伯胺合成期间顺序掺入的类肽单元的侧链；

[0031] -R^2和R^3独立地选自：$CH_2CH_2NH_2$、CH_2CH_2OH、$CH_2CH_2CH_2OH$、$CH_2CH(OH)CH_3$、CH_2CONH_2、$CH_2CH_2CONH_2$。具有醇或胺官能团的侧链已经以被保护的形式掺入低聚物中：用于醇官能团的甲硅烷基醚和用于胺官能团的氨基甲酸叔丁酯(Boc)；

[0032] --R^4是选自以下项的脂族或芳族基团：

[0033]

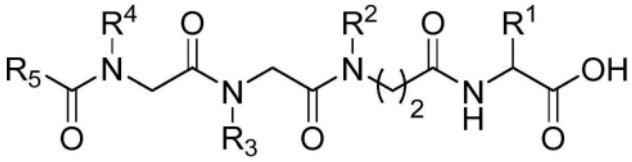


；

[0034] -R^5独立地是CH_3、$CH_2C_6H_5$、C_6H_4X(其中在邻位、间位或对位的X独立地是H、OMe、CF_3、CH_3、CH_2CH_3、F、Br、Cl)、3-吲哚基、3-喹啉基。

[0035] 优选地，本发明的通式(I)的类肽在第二单元上具有2个碳原子(从C末端开始)。

[0036] 有利地，本发明的类肽选自以下通式(I')的类肽：

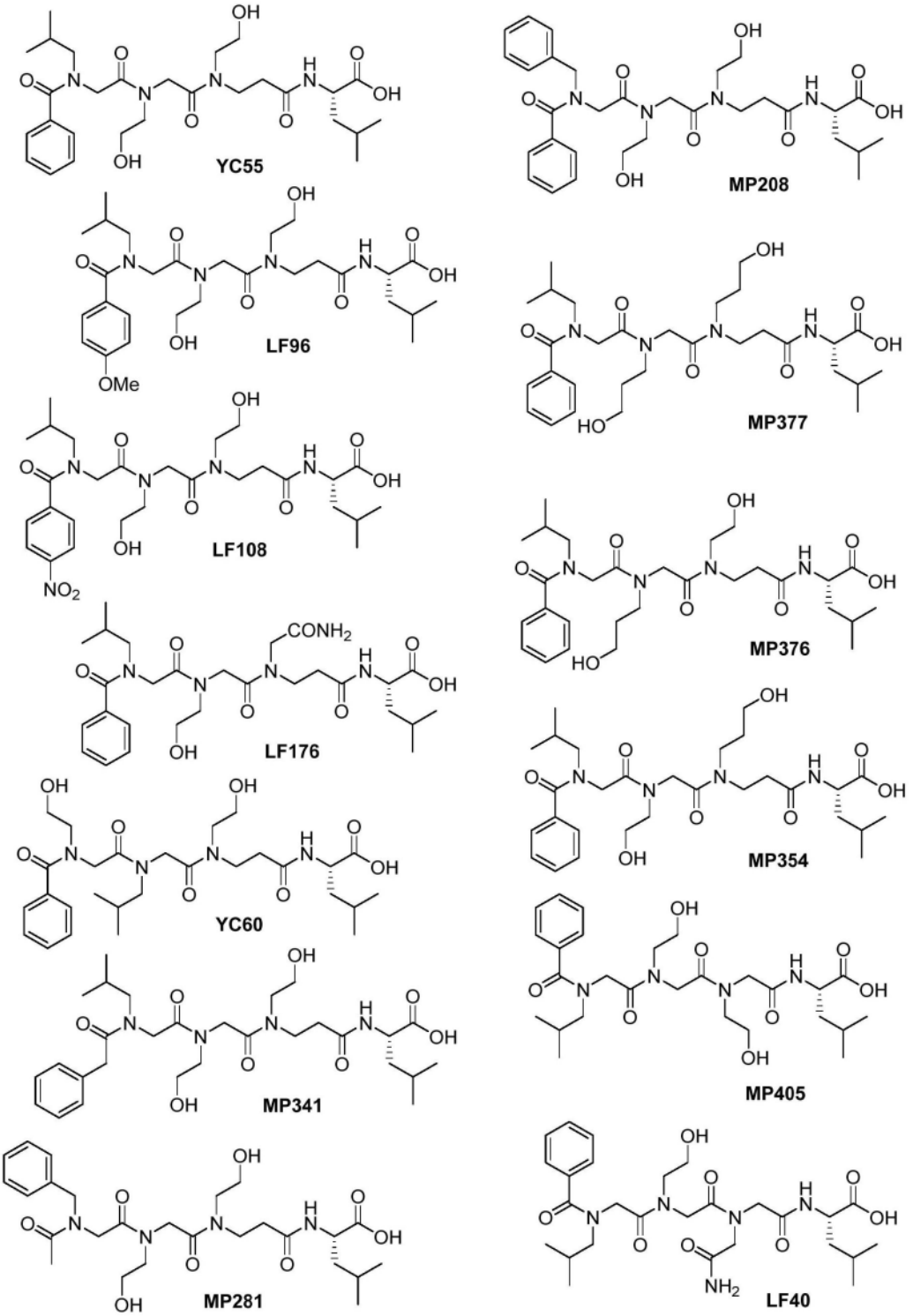
[0037] 

I'

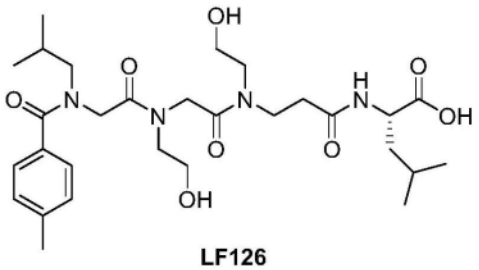
[0038] 其中

[0039] R^1、R^2、R^3、R^4和R^5如上所定义。

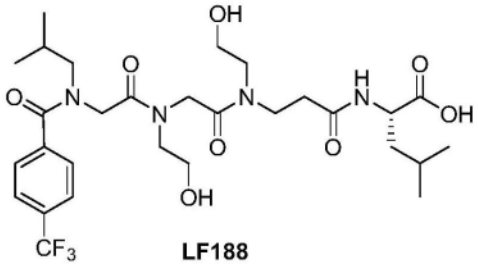
[0040] 根据具体实施方案，本发明的类肽具有以下式：

[0041] 

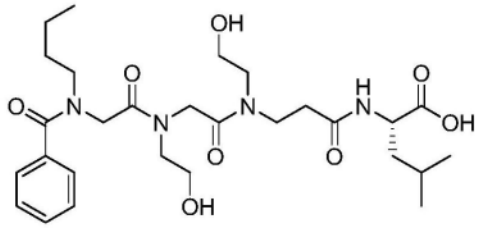
[0042]



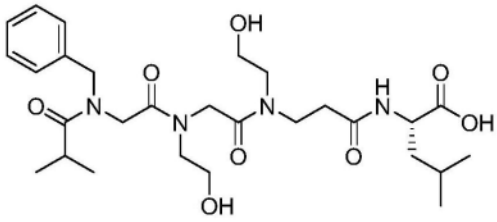
LF126



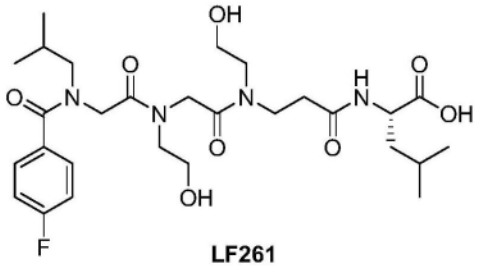
LF188



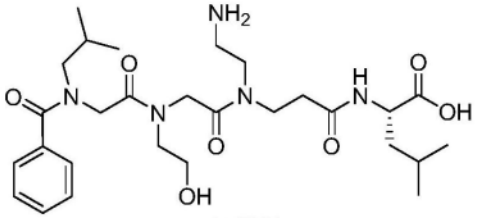
LF222



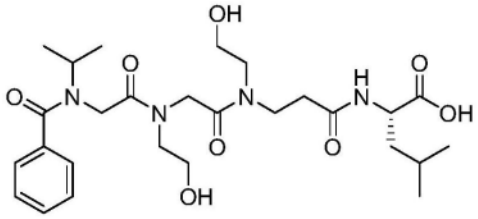
LF239



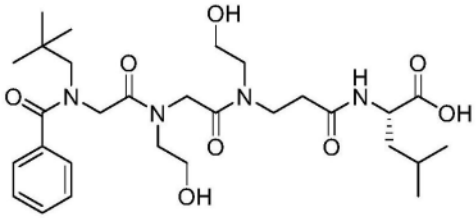
LF261



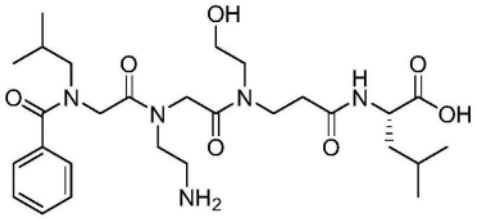
LF275



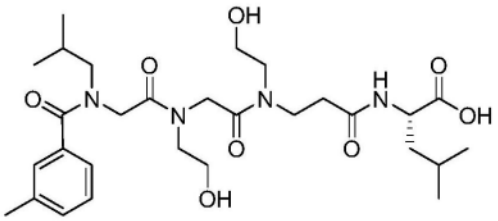
LF295



LF306

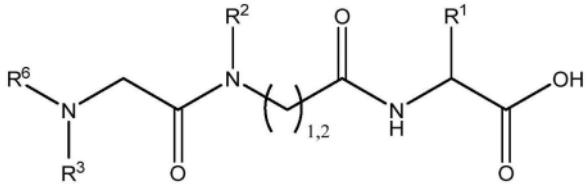


LF329



LF400

[0043] 本发明还涉及用于合成通式(I)的类肽的中间体,所述类肽包含3个单元。所述合成中间体是以下通式(II)的类肽:

[0044] 

II

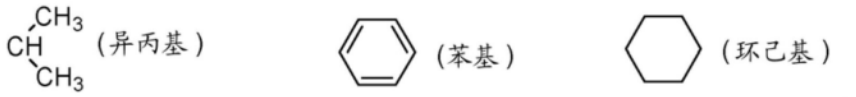
[0045] 其中

[0046] R^1、R^2和R^3如上所定义；

[0047] R^6是H、R^3、COR^5(其中R^5如上所定义)或R^7；

[0048] R^7独立地是以下基团：



[0049] 

。

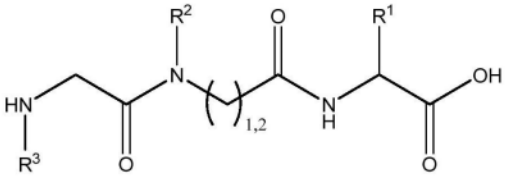
[0050] 具体地，本发明涉及式(II)的类肽，其中R^6是H。

[0051] 具体地，本发明涉及式(II)的类肽，其中R^6是COR^5。

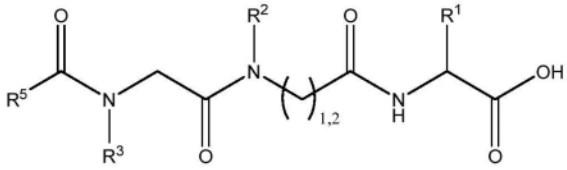
[0052] 具体地，本发明涉及式(II)的类肽，其中R^6是R^7。

[0053] 具体地，本发明涉及式(II)的类肽，其中R^6是R^3。

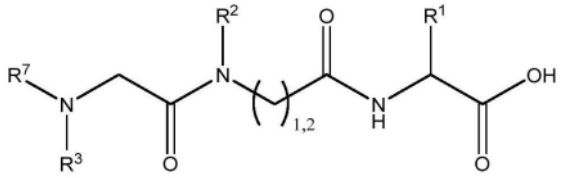
[0054] 有利地，根据本发明的类肽可选自以下通式(IIa)、(IIb)、(IIc)和(IId)的类肽：



IIa

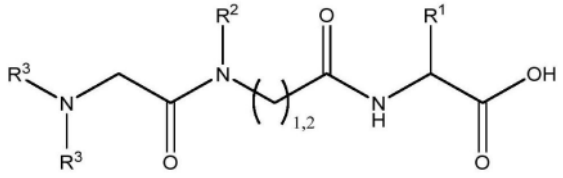
[0055] 

IIb



IIc

[0056]

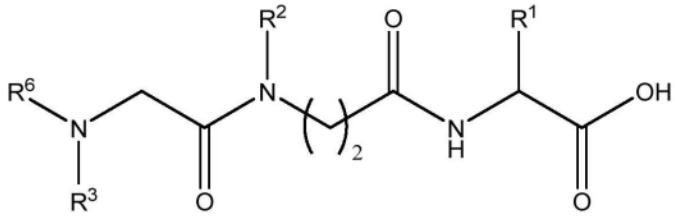


IId

[0057] 其中

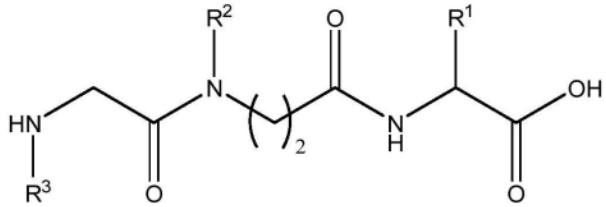
[0058] R^1、R^2、R^3、R^5和R^7如上所定义。

[0059] 优选地，本发明的式(II)、(IIa)、(IIb)、(IIc)或(IId)的类肽在第二单元上具有2个碳原子(从C末端开始)。有利地，类肽选自以下式(II')、(II'a)、(II'b)、(II'c)或(II'd)的类肽：

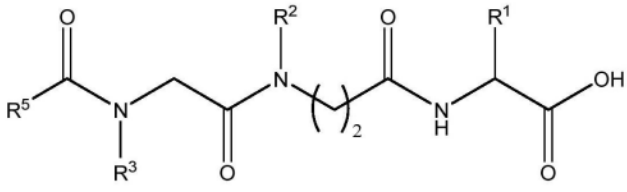


II'

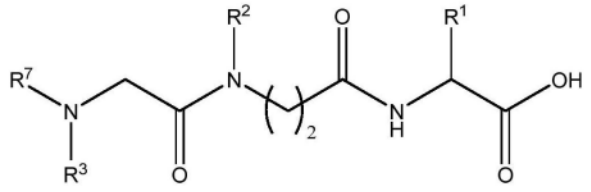
[0060]



II'a

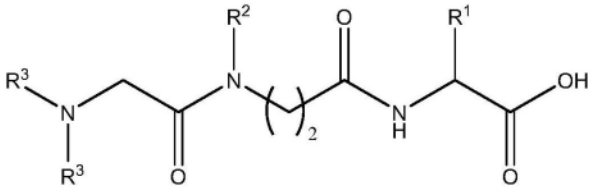


II'b



II'c

[0061]



II'd

[0062] 其中

[0063] R^1、R^2、R^3、R^5、R^6和R^7如上所定义。

[0064] 本发明还涉及包含根据本发明的类肽和药学上可接受的载体的药物组合物。

[0065] 本发明还涉及根据本发明的用作药物的类肽或药物组合物。

[0066] 本发明还涉及根据本发明的类肽或药物组合物用于预防或治疗慢性疼痛,特别是神经性起源的慢性疼痛,更特别是例如由化疗诱导的周围神经性疼痛。

[0067] 在止痛药领域的治疗创新停止的背景下,本发明的类肽和它们的治疗潜力可对改善患有由抗癌药诱导的神经性疼痛的患者的生活质量和可能的它们的存活具有显著影响。此外,由于HCN通道也涉及各种神经性疼痛和炎性疼痛病症的病因,因此本发明的类肽为对各种类型的慢性疼痛具有更广泛活性的新类别的止痛药铺平了道路。

附图说明

[0068] 图1示出了在施用溶媒或奥沙利铂(6mg/kg,i.p.)之后4天,HCN1(A)、HCN2(B)和TRIP8b(C)蛋白在DRG神经元中的表达。在溶媒或奥沙利铂(6mg/kg,i.p.)施用之后4天(D)或重复(每周两次共3周)溶媒或奥沙利铂施用之后(E),TRIP8b蛋白在脊髓背角中的表达,N=3/组,Mann-Whitney检验。

[0069] 图2表示用溶媒或NUCC5953(0.2μg、1μg或5μg,i.t.)治疗的OIPN(奥沙利铂诱导的神经病模型小鼠)(n=8)中的(A)研究设计、(B)爪浸渍潜伏期阈值(以秒计)的平均值+/-SEM的时间进程和(C)剂量依赖性止痛作用的曲线下面积(AUC,sec.min);*p<0.05,**p<0.01,***p<0.001,相对于溶媒组,双因素方差分析和Tukey事后检验。

[0070] 图3表示用溶媒、NUCC5953(4mg/kg,s.c.)或度洛西汀(30mg/kg,s.c.)治疗的OIPN小鼠(n=8)中的(A)研究设计、(B)爪浸渍潜伏期(sec)的平均值+/-SEM的时间进程和(C)剂量依赖性止痛作用的曲线下面积(AUC,sec.min);*p<0.05,**p<0.01,***p<0.001,相对于溶媒组,双因素方差分析和Tukey事后检验。

[0071] 图4表示柱状图,其示出了用溶媒或NUCC5953(4mg/kg,s.c.)治疗的小鼠经受递增速度(从4rpm至40rpm,持续10分钟)的转棒测试的摔倒潜伏期(A)和摔倒速度(B)。

[0072] 图5表示(A)研究设计(B)用溶媒(V)、奥沙利铂(O)或奥沙利铂+NUCC5953(5nmol,i.t.)(N)治疗的动物的DRG中HCN1、HCN2和TRIP8b的亚细胞(膜)表达。

[0073] 图6表示与伊伐布雷定(VIA)相比,NUCC5953对If电流振幅没有影响。

[0074] 图7表示小鼠的心率(HR):(A)基线值,(B)注射NUCC5953(4mg/kg,s.c.)之后30分钟的平均心率,以及(C)30分钟结束时的平均值;值是平均值+/-SEM(n=3)。

[0075] 图8表示TRIP8b与SNL肽相互作用的分子动力学。

[0076] 图9表示用溶媒或类肽YC55(0.2μg、1μg或5μg,i.t.)治疗的OIPN小鼠(n=8)中的(A)研究设计、(B)爪浸渍潜伏期(sec)的平均值+/-SEM的时间进程和(C)剂量依赖性止痛作用的曲线下面积(AUC,sec.min);*p<0.05,**p<0.01,***p<0.001,相对于溶媒组,双因素方差分析和Tukey事后检验。

[0077] 图10表示用溶媒或类肽YC55(2.5mg/kg、5mg/kg或10mg/kg,s.c.)治疗的OIPN小鼠(n=8)中的(A)研究设计、(B)爪浸渍潜伏期阈值(以秒计)的平均值+/-SEM的时间进程和(C)剂量依赖性止痛作用的曲线下面积(AUC,sec.min);*p<0.05,**p<0.01,***p<0.001,相对于溶媒组,双因素方差分析和Tukey事后检验。

[0078] 图11表示柱状图,其示出了用溶媒、YC55(2.5mg/kg、5mg/kg或10mg/kg,s.c.)或安定(2.5mg/kg,s.c.)治疗的小鼠经受递增速度(4rpm至40rpm,持续10分钟)的转棒测试的摔倒潜伏期(A)和摔倒速度(B)。***p<0.001给定分子的给药后T30min(■)相对于T0(□),学生t检验。

[0079] 图12表示用溶媒或类肽YC55(0.2μg、1μg或5μg,i.t.)治疗的PTX大鼠(n=7至9)的(A)研究设计、(B)机械阈值(以g计)和爪浸渍潜伏期阈值(以sec计)的平均值+/-SEM的时间进程和(C)曲线下面积(AUC,sec.min);*p<0.05,**p<0.01,***p<0.001,相对于溶媒组,双因素方差分析和Tukey事后检验

[0080] 图13表示用溶媒(●)或类肽YC55(■)(5μg,i.t.)治疗的神经性大鼠(n=7至9)的(A)研究设计、(B)爪浸渍潜伏期阈值(以sec计)的平均值+/-SEM的时间进程;***p<0.001,相对于溶媒组,双因素方差分析和Tukey事后检验。

[0081] 图14表示用溶媒或类肽MP208、MP405或YC55(5μg,i.t.)治疗的OIPN小鼠(n=7至9)的(A)研究设计、(B)爪浸渍潜伏期阈值(以秒计)的平均值+/-SEM的时间进程和(C)止痛作用的曲线下面积(AUC,sec.min);*p<0.05,**p<0.01,***p<0.001,相对于溶媒组,双因素方差分析和Tukey事后检验。

[0082] 图15描绘了用溶媒或类肽MP376、MP354或MP341(10mg/kg,s.c.)治疗的OIPN小鼠(n=7至9)的(A)研究设计、(B)爪浸渍潜伏期阈值(以秒计)的平均值+/-SEM的时间进程和(C)止痛作用的曲线下面积(AUC,sec.min);*p<0.05,**p<0.01,***p<0.001,相对于溶媒组,双因素方差分析和Tukey事后检验。

[0083] 图16表示用溶媒或类肽LF108、LF306或LF188(5μg,i.t.)治疗的OIPN小鼠(n=7至9)的(A)研究设计、(B)爪浸渍潜伏期阈值(以秒计)的平均值+/-SEM的时间进程和(C)止痛作用的曲线下面积(AUC,sec.min);*p<0.05,**p<0.01,***p<0.001,相对于溶媒组,双因素方差分析和Tukey事后检验。

[0084] 图17表示用溶媒或类肽LF295、LF400或LF329(5μg,i.t.)治疗的OIPN小鼠(n=7至9)的(A)研究设计、(B)爪浸渍潜伏期阈值(以秒计)的平均值+/-SEM的时间进程和(C)止痛作用的曲线下面积(AUC,sec.min);*p<0.05,**p<0.01,***p<0.001,相对于溶媒组,双因素方差分析和Tukey事后检验。

[0085] 图18表示用溶媒或类肽LF126、LF261或LF275(5μg,i.t.)治疗的OIPN小鼠(n＝7至9)的(A)研究设计、(B)爪浸渍潜伏期阈值(以秒计)的平均值+/-SEM的时间进程和(C)止痛作用的曲线下面积(AUC,sec.min);*p<0.05,**p<0.01,***p<0.001,相对于溶媒组,双因素方差分析和Tukey事后检验。

[0086] 图19表示用溶媒或类肽LF222、LF239或LF176(5μg,i.t.)治疗的OIPN小鼠(n＝7至9)的(A)研究设计、(B)爪浸渍潜伏期阈值(以秒计)的平均值+/-SEM的时间进程和(C)止痛作用的曲线下面积(AUC,sec.min);*p<0.05,**p<0.01,***p<0.001,相对于溶媒组,双因素方差分析和Tukey事后检验。

[0087] 图20表示用溶媒或类肽LF369(5μg,i.t.)治疗的OIPN小鼠(n＝7至9)的(A)研究设计、(B)爪浸渍潜伏期阈值(以秒计)的平均值+/-SEM的时间进程和(C)止痛作用的曲线下面积(AUC,sec.min);*p<0.05,**p<0.01,***p<0.001,相对于溶媒组,双因素方差分析和Tukey事后检验。

[0088] 实施例

[0089] 实施例1:材料和方法

[0090] 动物

[0091] 实验在由Janvier Laboratories(France)提供的20g至24g雄性C57Bl/6JRj小鼠或150g至175g雄性Sprague-Dawley大鼠上进行,维持12h光/暗循环并随意饮用喂食和饮水。对于给定的测试,在安静的房间中由相同的实验者盲目地进行行为实验,非常小心以最小化或避免动物的不适。所有动物规程均由当地动物伦理委员会批准,并且根据由欧洲共同体提供的关于动物护理和使用的指导方针(指令2010/63/EU)进行实验。

[0092] 行为测试

[0093] Von Frey测试:用0.07g、0.6g或1.4g的校准Von Frey细丝评估机械灵敏度。以增加刚度的顺序垂直于后爪的跖面施加细丝五次,并按压直到它们弯曲。对给定细丝力的响应数量进行计数。

[0094] 浸渍测试:将尾巴或爪浸入设定为10℃或46℃的水浴中直到观察到收缩(截止时间:30s)。计算两次单独测定的停用潜伏期的平均值(Janssen,Niemegeers&Dony,1963年)[14]。

[0095] 大鼠的爪压测试:使大鼠经受之前由Randall和Selitto(1957年)描述的爪压测试[15]。用Ugo Basile止痛计(Apelex,探针尖端直径1mm,重30g)通过对大鼠的右后爪加压直到获得疼痛信号(发声阈值)(截止750g)来测量以克表示的疼痛阈值。在治疗之前,通过处理大鼠而不使它们经受爪压来使它们适应测试。然后,在获得两个连续的稳定发声阈值之后,在15min、30min、45min、60min、90min和120min之后评价治疗效果。结果表示为发声阈值,以克计。为了研究总体效果,使用梯形法从每个时间点的个体分数计算抗痛觉过敏作用的时间进程曲线下面积(AUC,g.min)。当研究作用的时间过程时,通过双因素方差分析来分析数据,随后进行Bonferroni检验。使用单因素方差分析随后进行Student Newman-Keuls检验来分析由CSA确定的不同治疗的效果。统计学显著性水平设定为p<0.05。

[0096] 转棒测试:对于转棒测试(Bioseb),首先使动物习惯于保持在固定圆筒上10分钟,然后以4rpm的转速切换到另一个10分钟。在训练之后立即给予动物药物,并在30分钟后进行测试。该测试包括测量当旋转在5分钟内从4rpm线性增加至40rpm时动物的摔倒潜伏期。

计算3次试验中两个最接近值的平均值。

[0097] 活体心率记录:使用TA10EA-F20遥感发射器(DSI)在皮下袋中进行ECG遥感记录,其中将成对的线电极放置在胸部上,如先前所公开(Mesirca等人,2014年)[27]。

[0098] 动物疼痛模型

[0099] 小鼠中奥沙利铂诱导的急性神经病:在第一次行为评估之后立即给小鼠腹膜内(i.p.)注射溶解在5%葡萄糖中的6mg/kg奥沙利铂。在施用之后90h,对应于达到峰值痛觉过敏所需的时间(Descoeur等人,2011年)[9],进行冷敏感和机械敏感的第二次评价。

[0100] 大鼠中急性紫杉醇诱导的神经病:在第D0、D2、D4和D7天,给大鼠i.p.注射二甲基亚砜(DMSO;溶剂)或1mg/kg/1mL紫杉醇(Sigma-Aldrich,Lyon,France)。在第一次注射紫杉醇的当天(D0)以及在注射紫杉醇之后的第10天(D10)和第14天(D14)进行行为测试。

[0101] 大鼠中脊神经结扎诱导的神经病:根据Kim和Chung的规程(1992年)[16],将大鼠置于仰卧位并用10mg/kg甲苯噻嗪和75mg/kg氯胺酮(i.p)麻醉。然后剃去脊柱左侧的毛以暴露皮肤。平行于脊柱切开皮肤并分离脊椎旁肌肉。移除L5横突直到暴露出L5脊神经。分离L5神经并用丝线结扎。最后,缝合肌肉和皮肤切口,并用碘伏和75%乙醇对伤口进行消毒。在模拟组中,大鼠经历相同的外科手术而不进行神经结扎。

[0102] 离体测试

[0103] RNA分离和定量:将腰段L4至L6的DRG对进行解剖并合并。根据制造商的说明书(Thermofisher)使用TRIzol®试剂(氮)提取RNA。通过Agilent2100Bioanalyzer(Agilent Technologies)评估RNA质量,保留RIN(RNA完整性数量)大于8的样品用于进一步分析。根据Invitrogen提供的方案,用SuperScript II逆转录酶进行逆转录。对于实时定量PCR,使用Light Cycler Fast Start DNA试剂盒(Roche diagnostics)进行扩增,并且利用Mastercycler Realplex热循环仪(Eppendorf)测量实时DNA的量。使用标准浓度曲线对每个三份中cDNA的相对量进行平均,并对GUS基因cDNA进行归一化。

[0104] 扩增条件如下:在95℃下预温育7min,随后在95℃下预温育20s并在引物对的特异性杂合温度下预温育20秒共50个循环,然后在72℃下预温育20秒。

[0105] RNA测序:我们对来自用奥沙利铂(3mg/kg,i.p.)或溶媒治疗的小鼠的L4-L5-L6 DRG进行RNA测序分析,每周两次,持续3周。在实验结束时(D21),麻醉并杀死小鼠,并快速收获L4-L5-L6 DRG,在液氮中冷冻并在-80℃下储存直到使用。根据制造商的方案使用RNeasy Micro试剂盒(Qiagen)提取来自L4-L5-L6 DRG的总RNA,并使用Ribo-Zero Plus rRNA耗竭试剂盒(Illumina)移除核糖体RNA。使用Take3核酸定量板(Epoch,BioTek,USA)测定RNA浓度。用毛细管电泳仪(Fragment Analyser,Agilent®)分析RNA完整性并送到Fasteris(https://www.fasteris.com)进行RNA测序。使用Illumina TruSeq方案制备文库,并且使用HiSeq 2500平台(Illumina)进行基于SBS的测序。在不同步骤中进行分析:由Benjamin Bertin和Yoan Renaud(GreD,Clermont-Ferrand)进行的剪接位点定位(TopHat2)、计数(HTSeq计数)、过滤、归一化(edgeR、DESeq和DESeq2)和差异分析(edgeR、DESeq和DESeq2)。

[0106] 膜分级:将组织在含有蛋白酶抑制剂的HEPES缓冲液(20mM HEPES pH7.4、320mM蔗糖、5mM EDTA、5mM EGTA)中在4℃下均质化,超声处理并在4℃下以1000g离心15min。弃去沉淀。对于细胞器旋转,将上清液在4℃下以15,000g离心10min,并保留细胞器沉淀。对于胞质

旋转,将上清液在4℃下以100,000g离心1h。胞质级分在上清液中,并且膜级分在沉淀中。然后将膜沉淀重悬浮于SB缓冲液(20mM HEPES pH 7.4、1M KI、5mM EDTA、5mM EGTA,4度下)中,并在4℃下以100,000g离心1小时以移除弱结合的膜蛋白。然后将膜级分重悬浮于含有Triton(1%)和蛋白酶抑制剂的RB缓冲液(20mM HEPES pH 7.4、100mM NaCl、5mM EDTA、5mM EGTA)中。在冰浴中超声处理之后,随后将膜级分在4℃下温和搅拌2小时。将溶解的膜级分在4℃下以100,000g离心1小时。膜级分在上清液中。

[0107] 蛋白质印迹:将来自三只小鼠的L4至L6 DRG合并,并在含有triton(1%)和蛋白酶抑制剂的裂解缓冲液中均质化。将匀浆在4℃下以18,000g离心20min并收集上清液。在7.5%凝胶上通过SDS-PAGE分离50μg的总蛋白。在转移到硝酸纤维素膜上并用BSA(5%)饱和之后,一抗以1/500的稀释度用于HCN1和HCN2(Neuromab)、1/1000的稀释度用于TRIP8b(Neuromab)以及1/5000的稀释度用于肌动蛋白β(Sigma-Aldrich)。用TBST连续洗涤3次之后,将对应HRP偶联的二抗(ThermoFisher)以1:10,000的稀释度温育,并用化学发光底物(SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate,Thermofisher)检测。

[0108] 膜片钳记录:在分离的起搏器心脏细胞上进行电生理学实验,如先前所述(Marger等人,2011年)[28]。采用Axopatch 200A放大器(Axon Instruments Inc.,Foster USA),使用全细胞膜片钳技术记录由HCN通道产生的If电流。约5m MΩ电阻的记录电极充满了含有以下项的细胞内溶液(mM/L):K+-天冬氨酸盐,130;NaCl,10;ATP-Na+盐,2;磷酸肌酸,6.6;GTP-Mg2+,0.1;CaCl2,0.04(pCa=7);Hepes-KOH,10;(用KOH调节pH=7.2)。使用含有5mM BaCl2的Tyrode细胞外溶液来阻断IK1电流。将NUCC5953(5μM)对If电流振幅和动力学的作用与伊伐布雷定(3μM)的作用进行比较,两者均在细胞外溶液中稀释。使用pClamp软件(版本9,Axon Instruments Inc.)进行数据采集。

[0109] 体外测定

[0110] 荧光偏振测定:使用基于荧光偏振(FP)的测定来鉴定能够破坏HCN和TRIP8b尾之间的相互作用的化合物,如所公开的(Han等人,2015年)[13]。

[0111] 实施例2:结果

[0112] 第一次观察到小鼠DRG和TG神经元中TRIP8b mRNA(从DRG小鼠获得的RNAseq数据示出剪接变体2-5:NM_01163516、NM_01163517、NM_01289505、NM_01310460的存在(FPKM>1))和蛋白的存在。另外,与对照组相比,奥沙利铂治疗动物的周围神经元中HCN1-2通道和TRIP8b的转录物和蛋白表达显著增加,表明这2种蛋白参与OIPN(奥沙利铂诱导的神经病模型小鼠)的发展(图1A至图1C)。与溶媒相比,单次(图1D)或重复施用奥沙利铂之后(图1E)治疗的动物脊髓中TRIP8b蛋白表达的分析示出在奥沙利铂作用下TRIP8b蛋白明显增加。

[0113] 使用能够破坏TRIP8b-HCN相互作用的分子NUCC5953(Han等人,2015年)[13],示出奥沙利铂诱导的急性冷超敏性可以剂量依赖性方式i.t.或(0.2μg/小鼠;1μg/小鼠;5μg/小鼠;图2)或系统性(4mg/kg;图3)逆转。

[0114] 当用NUCC5953(4mg/kg)皮下施用治疗小鼠时,在转棒测试中没有观察到运动活性的改变(图4)。

[0115] 同时,原始数据还表明NUC5953的施用降低了来自OIPN动物的DRG神经元的膜级分中HCN1和HCN2以及TRIP8b蛋白的过度表达(图5)。

[0116] 对分离的心脏起搏器细胞的膜片钳实验示出NUCC5953对If电流振幅没有影响,这

与pan-HCN阻断剂伊伐布雷定相反(图6)。

[0117] 当以止痛剂量(4mg/kg,i.p.)施用时,NUCC5953不影响活体心率(图7)。这些结果表明,在三只小鼠中,平均心率在NUCC5953注射之前(A)、在注射时(B)和在注射之后30分钟(C)没有改变。

[0118] 实施例3:拟肽的设计

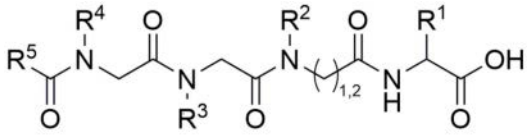
[0119] 拟肽的设计

[0120] A-四聚拟肽

[0121] 设计并合成了模拟HCN2通道羧基末端序列的拟肽化合物。这些拟肽的设计是基于对TRIP8b与HCN2的C末端区的共晶体的广泛X射线结构研究,可在蛋白数据库(pdb:4EQF)中获得。进行了完成和改善该结构的预备建模工作。缺失部分通过来自不同PEX5结构(PDB:1FCH、3R9A、4KXK、4KYO、2J9Q、2C0M和2C0L)的序列同源性建模,示出与TRIP8b的序列同一性范围为30%至60%。所得模型鉴定了负责形成HCN-TRIP8b复合物的残基之间的接触。具体地,该研究鉴定了TRIP8b的TPR结构域中的两个疏水袋,这两个疏水袋对于配体与该蛋白结构域的良好亲和性是必需的(图8)。

[0122] TRIP8b的疏水袋1提供了配体的C末端残基的侧链锚定。配体与位于TRIP8b中心区附近的疏水袋2的有效相互作用被鉴定为HCN的CNBD结构域的结合位点,也增强了抑制剂的亲和性。通过分子动力学(MD)设计和评估了带有能够靶向这些疏水袋的各种侧链的几种4残基肽-类肽杂合寡聚体。

[0123] 基于结构的设计鉴定了在TRIP8b的SNL肽结合位点(TPR结构域)处相互作用的拟肽配体。这些配体具有由以上LF108式或以下通式(I)表示的式:

[0124] 

I

[0125] 其中

[0126] R^1、R^2、R^3、R^4和R^5如上所定义。

[0127] 这些化合物是肽-类肽杂合寡聚体(类肽聚体)(Ostergaard等人,1997年)[17]。它们包含四个残基,包括位于序列C末端的α-氨基酸和三个连续的类肽残基。第三残基(来自N末端)是β-类肽单元或α-类肽单元。通常称为"类肽"的α-类肽是指N取代的甘氨酸低聚物(Simon等人,1992年)[18]。与肽相比,侧链附接到酰胺键的氮原子而不是α-碳原子。β-类肽是由N取代的β-氨基丙酸单元组成的寡聚体(Hamper等人,1998年)[19]。因此,与α-类肽残基相比,β-类肽残基在骨架中含有另外的亚甲基基团。类肽具有用于开发生物活性化合物的有利特征。它们适于使用迭代"亚单体"方法固相合成,其中每个新单元在两个步骤中构建(Zuckermann等人,1992年)[20]。类肽可掺入多种侧链,包括蛋白原侧链和非天然侧链(Culf等人,2010年)[21]。"亚单体"合成使用简单的起始分子,诸如用于构建α-单元的溴乙酸和伯胺以及用于构建β-类肽单元的丙烯酰氯和伯胺。掺入侧链的伯胺可大批地商购获得,或者可在适当时在它们使用之前制备。基于N,N-二取代酰胺(叔酰胺)的类肽主链已示出对蛋白酶有抗性(Miller等人,1995年)[22]。叔酰胺键的存在还赋予了它们更好的细胞渗透性(Kwon等人,2007年;Vollrath等人,2013年)[23,24],并且一些研究倾向于示出类肽

比肽免疫原性更低(Li等人,2010年;Chongsiriwatana等人,2008年)[25,26]。

[0128] 在2-氯三苯甲基氯(2-CTC)树脂上进行合成,导致在裂解之后在类肽聚体的C末端产生羧酸。固定在支持物上的第一残基,α-氨基酸,主要选自疏水性蛋白原氨基酸,包括对应于SNL肽的C末端的L-亮氨酸。α-氨基酸以受保护的N-Fmoc形式固定在树脂上。在移除Fmoc基团之后,通过“亚单体化学”方法实现类肽残基的链延伸。实施了已知的方案,但需要一些技术调整来合成β-类肽单体。将N末端酰化,然后在酸性条件下用六氟异丙醇(HFIP)裂解并用在二氯甲烷中的三氟乙酸(TFA)将侧链脱保护。

[0129] 通过LC-MS分析粗类肽聚合化合物,然后在C18快速层析柱上纯化,其中在214nm和220nm处进行UV检测。收集纯级分并冻干。通过反相HPLC在Nucleodur®C4柱(5μm,300Å,250mm×4.6mm)上分析纯化合物。下表2示出了化合物的HRMS和HPLC数据。

[0130] 表2

[0131]

分子参考	预期质量	观察质量/式	保留时间(min)色谱 LCMS[a]或 HPLC[b]	HPLC 纯度(%)[c]
YC55	564.3159	565.3227 $[M+H]^+$ / $C_{28}H_{45}N_4O_8$	22,02[b]	97
YC60	564.3159	565.3229 $[M+H]^+$ / $C_{28}H_{45}N_4O_8$	3,74[a]	n.d.
MP208	598.3003	599.3075 $[M+H]^+$ / $C_{31}H_{43}N_4O_8$	22,86[b]	92
MP281	536.2846	537.2919 $[M+H]^+$ / $C_{26}H_{41}N_4O_8$	20,69[b]	96
MP341	578.3316	579.3388 $[M+H]^+$ / $C_{29}H_{47}N_4O_8$	4,05[a]	n.d.
MP354	578.3316	579.3388 $[M+H]^+$ / $C_{29}H_{47}N_4O_8$	3,81[a]	n.d.
MP376	578.3316	579.3388 $[M+H]^+$ / $C_{29}H_{47}N_4O_8$	3,76[a]	n.d.
MP377	592.3472	593.3545 $[M+H]^+$ / $C_{30}H_{49}N_4O_8$	3,81[a]	n.d.
MP405	550.3003	551.3075 $[M+H]^+$ / $C_{27}H_{43}N_4O_8$	21,59[b]	85
LF40	563.2955	564.3021 $[M+H]^+$ / $C_{27}H_{42}N_5O_8$	21,66[b]	91

[0132]

LF96	594.3265	595.3337 $[M+H]^+$ / $C_{29}H_{47}N_4O_8$	22,06 [b]	92
LF108	609.3010	608.2939 $[M+H]^-$ / $C_{28}H_{42}N_5O_{10}$	22,07 [b]	92
LF176	577.3112	578.1388 $[M+H]^+$ / $C_{28}H_{44}N_5O_8$	21,53 [b]	97
LF126	578.3316	579.3381 $[M+H]^+$ / $C_{29}H_{47}N_4O_8$	24,53 [b]	89
LF188	632.3033	633.3099 $[M+H]^+$ / $C_{29}H_{44}F_3N_4O_8$	23,30 [b]	98
LF222	564.3159	565.3229 $[M+H]^+$ / $C_{28}H_{45}N_4O_8$	21,55 [b]	94
LF239	564.3159	565.3228 $[M+H]^+$ / $C_{28}H_{45}N_4O_8$	21,12 [b]	95
LF261	582.3065	583.3138 $[M+H]^+$ / $C_{28}H_{44}FN_4O_8$	21,34 [b]	98
LF275	563.3319	564.3395 $[M+H]^+$ / $C_{28}H_{46}N_5O_7$	30,79 [b]	94
LF295	550.3003	551.3068 $[M+H]^+$ / $C_{27}H_{43}N_4O_8$	20,36 [b]	86
LF306	578.3316	579.3387 $[M+H]^+$ / $C_{29}H_{47}N_4O_8$	21,32 [b]	95
LF329	563.3319	564.3383 $[M+H]^+$ / $C_{28}H_{46}N_5O_7$	20,90 [b]	95
LF400	578.3316	579.3381 $[M+H]^+$ / $C_{29}H_{47}N_4O_8$	21,78 [b]	91
LF369	389.4490	390.2231 $[M+H]^+$ $C_{17}H_{32}N_3O_7$	18,32 [b]	90

[0133] [a] LCMS。UHPLC Ultimate 3000RSLC链(ThermoScientific),Kinetex EVO C18柱(100×2.1mm;1.7μm)(Phenomenex),流速:0.45mL/min,柱温箱:30℃,H_2O梯度(0.1%甲酸/ACN(0.1%甲酸):t=0min 95:5;t=7.5min 1:99;t=8.5min 1:99;t=9min 95:5;t=11min 95:5。

[0134] [b] HPLC。1100系列Agilent链,Nucleodur® C4柱(5μm,300Å,250mm×4.6mm),流速0.5mL/min。H2O/ACN梯度(0.1% TFA):t=0min 95:5;t=5min 95:5;t=25min 5:95;t=35min 5:95;t=40min 95:5;t=50min 95:5。

[0135] [c] UV 214nm检测。

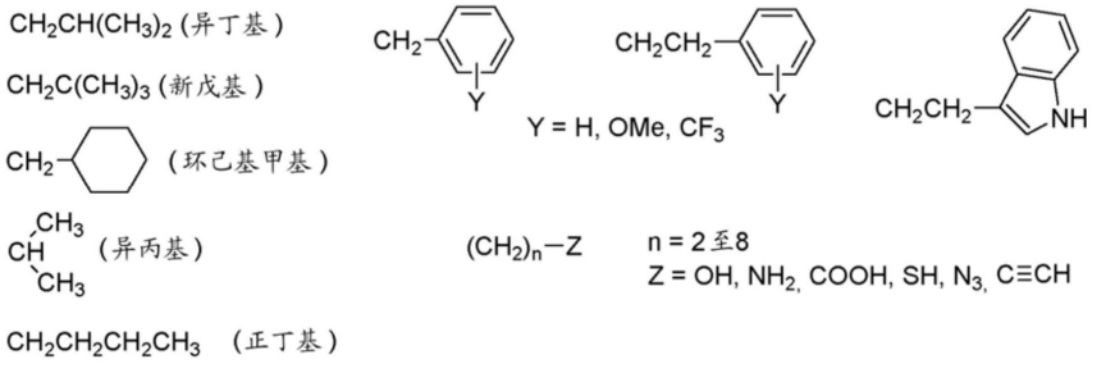
[0136] 侧链

[0137] R^1独立地是CH_3(L-Ala)、$CH(CH_3)_2$(L-Val)、$CH(CH_3)CH_2CH_3$(L-Ile)、$CH_2CH(CH_3)_2$(L-Leu和D-Leu)、$CH_2C(CH_3)_3$、$C(CH_3)_3$、CH_2(环丁基);

[0138] R^2、R^3和R^4是在从伯胺合成期间顺序掺入的类肽单元的侧链;

[0139] R^2和R^3独立地选自:$CH_2CH(CH_3)_2$、$CH_2CH_2NH_2$、CH_2CH_2OH、$CH_2CH_2CH_2OH$、$CH_2CH(OH)CH_3$、CH_2CONH_2、$CH_2CH_2CONH_2$。具有醇或胺官能团的侧链已经以被保护的形式掺入低聚物中:用于醇官能团的甲硅烷基醚和用于胺官能团的氨基甲酸叔丁酯(Boc);

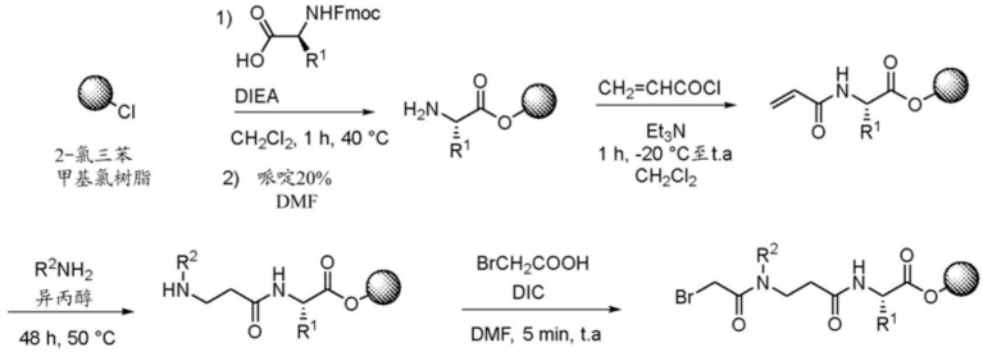
[0140] R^4是选自以下项的脂族或芳族基团:

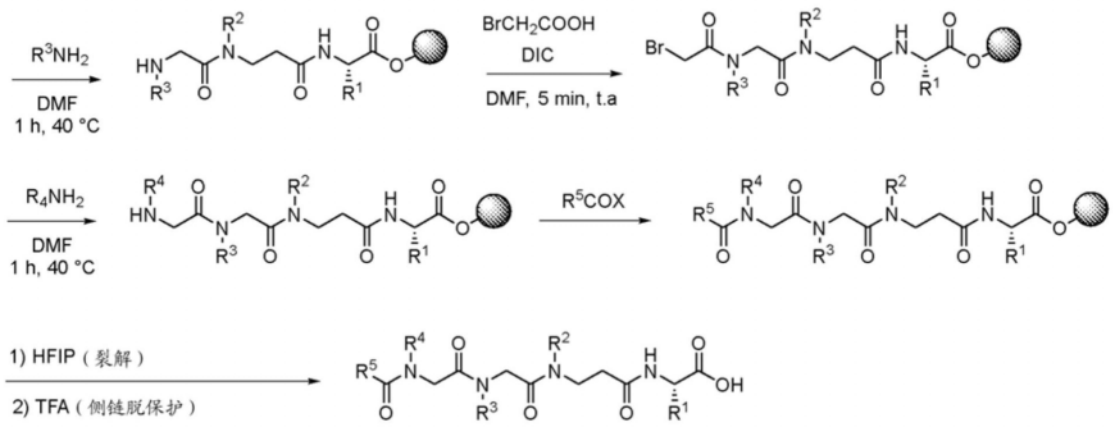
[0141] 

;

[0142] R^5独立地是CH_3、$CH(CH_3)_2$、$CH_2C_6H_5$、C_6H_4X(其中在邻位、间位或对位的X独立地是H、OMe、CF_3、CH_3、CH_2CH_3、F、Br、Cl、NO_2)、3-吲哚基、3-喹啉基。

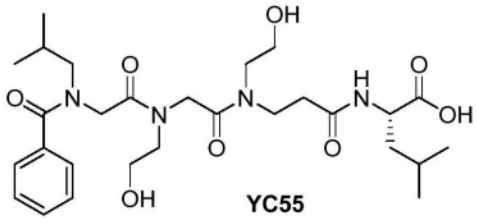
[0143] 用于合成N-酰化类肽聚体的2-氯三苯甲基氯树脂的代表性合成方案在C末端掺入α-氨基酸,随后掺入β-类肽残基和两个α-类肽残基。

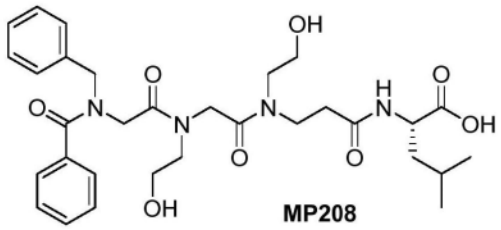


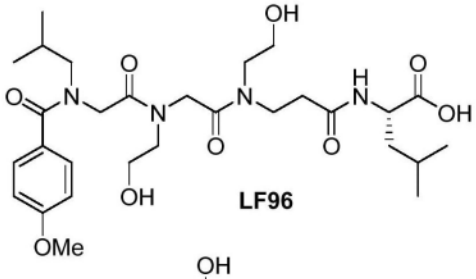
[0144] 

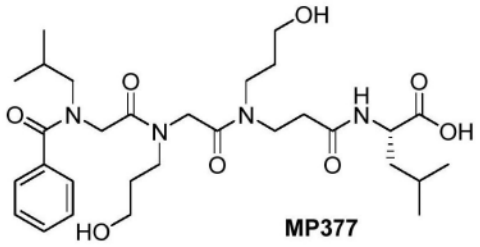
[0145] DIEA:二异丙基乙胺;Fmoc:芴基甲氧基羰基;DMF:N,N-二甲基甲酰胺;DIC:二异丙基碳二亚胺;HFIP:1,1,1,3,3,3-六氟异丙醇;t.a.:室温;TFA:三氟乙酸合成的分子

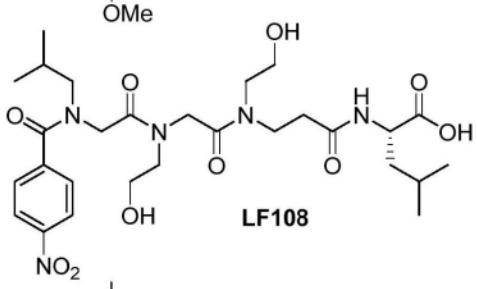
[0146]

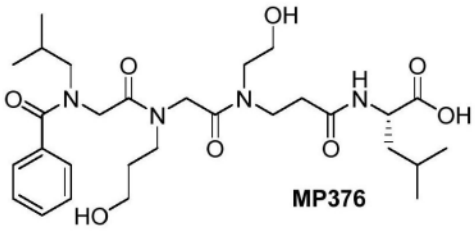

YC55

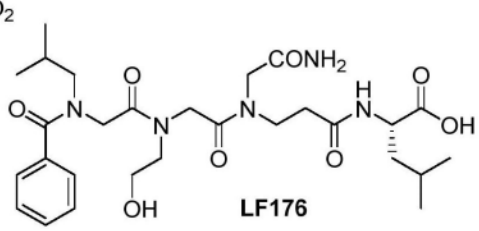

MP208

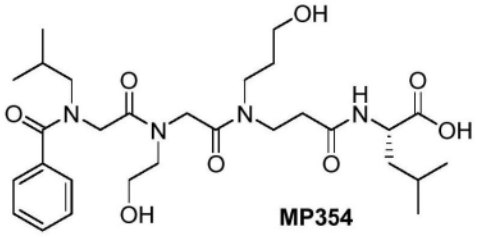

LF96

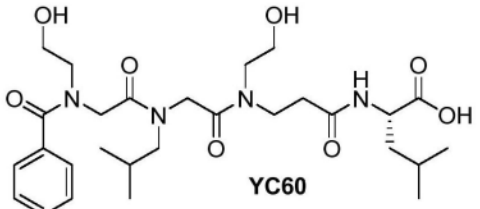

MP377

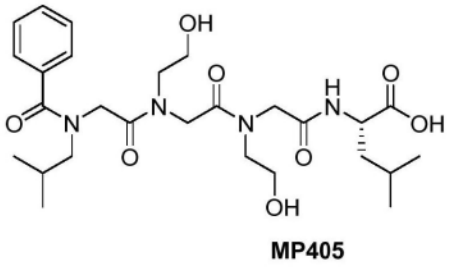

LF108

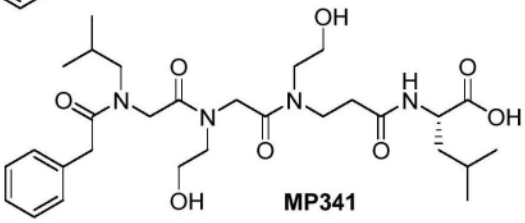

MP376

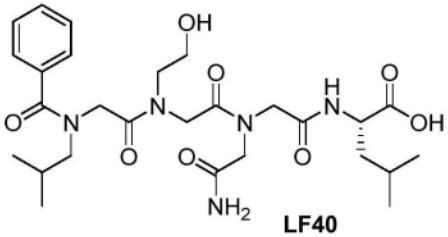

LF176

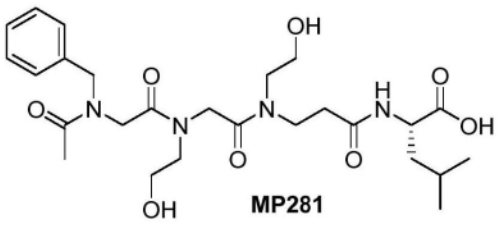

MP354


YC60

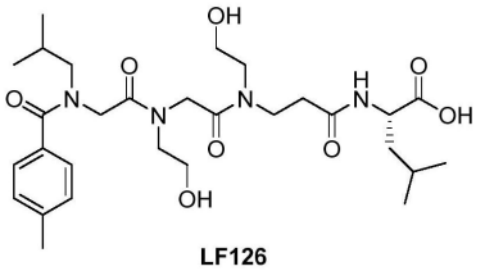

MP405


MP341

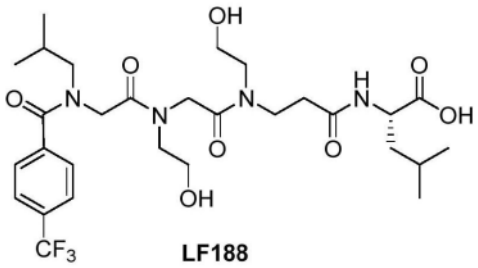

LF40


MP281

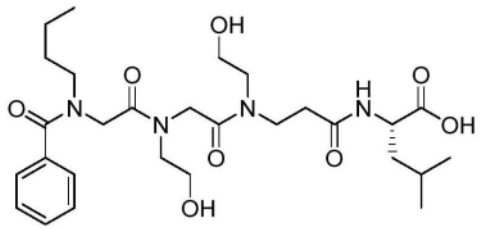
[0147]



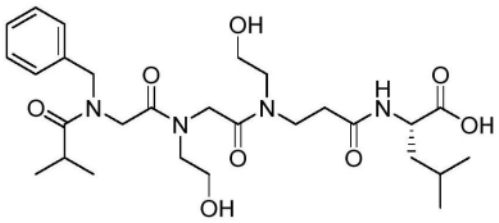
LF126



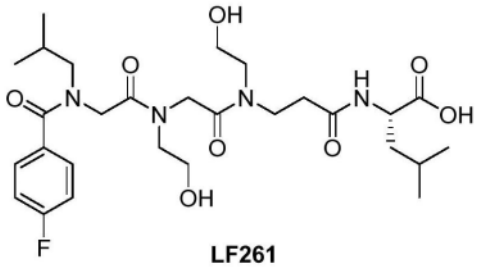
LF188



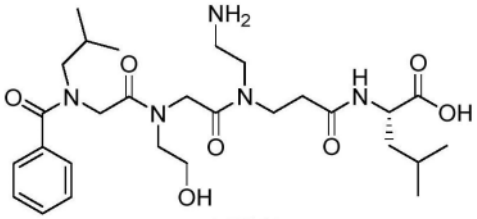
LF222



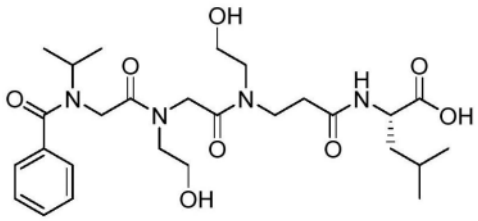
LF239



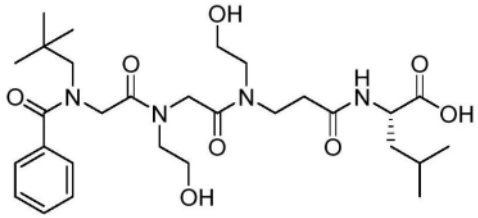
LF261



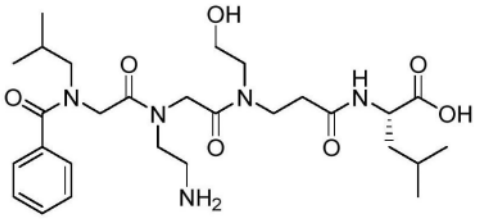
LF275



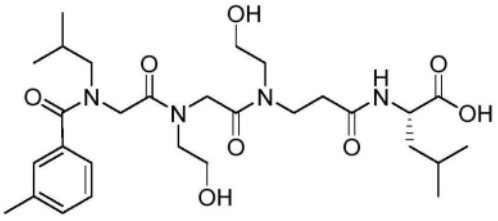
LF295



LF306



LF329



LF400

[0148] 合成

[0149] 对应于通式(I)的化合物在2-氯三苯甲基氯树脂(Novabiochem 100目至200目)上在配备有烧结和旋塞阀的5mL塑料注射器中合成。在反应期间将注射器放置在轨道式振荡器加热平台上。

[0150] 在用L-亮氨酸位于C末端和β-类肽残基位于该氨基酸之前描述的典型合成中,将2-氯三苯甲基氯树脂(1.33mmol g-1、0.100g、0.133mmol)在2mL干燥CH_2Cl_2中溶胀(2×

20min)。在过滤之后,加入0.12mL 2.2M的Fmoc-Leu-OH的CH_2Cl_2溶液(2.0当量),然后加入2.0mL 0.4M的DIEA的CH_2Cl_2溶液(6.0当量)。将混合物在25℃下搅拌40min。沥干树脂,用CH_2Cl_2洗涤(2×2mL),并在相同条件下重复Fmoc-亮氨酸与树脂的结合。用CH_2Cl_2洗涤树脂(5×2mL)。通过加入2.0mL 20%哌啶的DMF溶液并在室温下搅拌15min来移除Fmoc基团。在相同条件下重复该操作,然后用DMF(5×2mL)洗涤树脂并沥干。

[0151] β-类肽残基的引入。通过在-20℃下用CH_2Cl_2洗涤两次来冷却树脂。加入冷却至-20℃的1.21mL 0.22M丙烯酰氯(2.0当量)的CH_2Cl_2溶液,然后加入0.8mL 0.5M的Et_3N(3.0当量)的冷却的CH_2Cl_2溶液(-20℃)。将树脂在25℃下搅拌1h,沥干,然后在相同条件下再次用丙烯酰氯处理。将树脂过滤并用CH_2Cl_2洗涤(5×2mL)并沥干。在50℃下,将所得丙烯酰胺用2.0M胺R^2NH_2的异丙醇溶液(12.0当量)处理24h。在过滤树脂之后,在相同条件下重复氮杂-迈克尔反应。在亚单体合成两个α-类肽残基之前,用异丙醇(5×2mL)洗涤树脂。

[0152] α类肽残基的合成。向树脂中加入2.0mL 0.4M溴乙酸的DMF溶液(6.0当量),随后加入2.13mL 0.5M CID的DMF溶液(8.0当量)。在25℃下搅拌5min之后,沥干树脂并用DMF(5×2mL)洗涤。然后将所得溴乙酰胺用2.0M胺R^3NH_2(20.0当量)在DMF中的溶液处理,并将混合物在搅拌平台上在40℃下放置1h。过滤树脂,并用DMF(5×2mL)洗涤。在相同条件下重复最后两个溴乙酰化和取代步骤,以构建带有所需R^4侧链的第四残基。然后根据下述一般方法之一酰化类肽聚体的N末端,然后将其从树脂膜上移除。

[0153] 为了裂解,将树脂用1.5mL 2.4M HFIP的CH_2Cl_2溶液处理。在25℃下搅拌40分钟之后,过滤树脂并用CH_2Cl_2洗涤(5×2mL)。减压移除溶剂。最后,通过在室温下用2mL 25%(v/v)TFA的CH_2Cl_2溶液处理类肽聚体10min,移除侧链的甲硅烷基化或Boc保护基团。将含有最终产物的反应混合物用CH_2Cl_2(5mL)稀释,然后真空完全蒸发。为了移除所有痕量的TFA,将溶解在CH_2Cl_2中的产物真空蒸发,重复该操作5次。

[0154] 树脂结合的类肽聚体N末端酰化的一般规程

[0155] 乙酰化:向树脂中加入1.56mL 1.7M乙酸酐的DMF溶液(20.0当量),随后加入0.8mL 2.0M DIEA的DMF溶液(12.0当量)。在25℃下搅拌90min之后,过滤树脂,并用DMF(5×2mL)洗涤。

[0156] 苯甲酰化:向树脂中加入0.8mL 1.0M苯甲酰氯的CH_2Cl_2溶液(6.0当量),随后加入0.8mL 2.0M DIEA的CH_2Cl_2溶液(12.0当量)。在25℃下搅拌40min之后,沥干树脂,并用CH_2Cl_2洗涤(5×2mL)。

[0157] 从羧酸酰化:在此处所述的由苯乙酸进行的典型偶联反应中,将2.0mL0.4M苯乙酸在DMF中的溶液(6.0当量)和2.13mL 0.5M DIC(8.0当量)的DMF溶液依次添加到树脂中。在25℃下搅拌1h之后,沥干树脂并用DMF(5×2mL)洗涤。

[0158] 在合成的化合物(YC55、YC-60)中,YC55在破坏TRIP8b-HCN相互作用方面表现出与NUCC5953相等的效力(表1:类肽的IC50)。

[0159] 表1

[0160]

	YC55	YC60	Acox3
IC50	8.862	12.71	0.6029

[0161] 在小鼠中奥沙利铂诱导的急性神经性疼痛中已经证实了鞘内或系统性注射的新型拟肽化合物的止痛作用。

[0162] 因此,当i.t.施用时,先导化合物YC55在OIPN小鼠中表现出剂量依赖性止痛作用(图9)。

[0163] 当s.c.施用时,化合物YC55还在OIPN小鼠中表现出剂量依赖性止痛作用(图10)。

[0164] 当用YC55皮下施用治疗小鼠时,在转棒测试中没有观察到运动活性的改变(图11)。

[0165] 当i.t.施用时,YC55还在紫杉醇诱导的神经病的大鼠模型中表现出剂量依赖性止痛作用(图12)。

[0166] 鞘内施用YC55在创伤性坐骨神经损伤诱导的神经病模型中示出抗痛觉过敏作用(图13),表明破坏TRIP8b相互作用的策略可能在几种神经性疼痛状态中具有止痛作用。

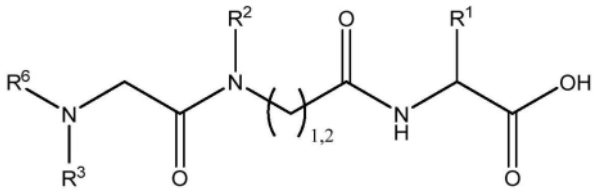
[0167] 在奥沙利铂诱导的小鼠神经病模型中,化合物MP208、MP405(5μg,i.t.)和MP341、MP354、MP376(10mg/kg,s.c.)显示了止痛作用(分别为图14和图15)。

[0168] 类似地,化合物LF108、LF306、LF188(图16)、LF400、LF329和LF295(图17)、LF275、LF261和LF126(图18)、LF239、LF222和LF176(图19)在奥沙利铂诱导的小鼠急性神经病模型中显示出止痛作用(5μg,i.t.)。

[0169] B-三聚拟肽

[0170] 三聚肽聚合化合物也是HCN_2通道的羧基末端序列的模拟物。它们的设计是基于TRIP8b与HCN2的C末端区的共晶体的广泛X射线结构研究(bp:4EQF)。

[0171] 这些配体具有由式LF369或以下通式(II)表示的式:

[0172] 

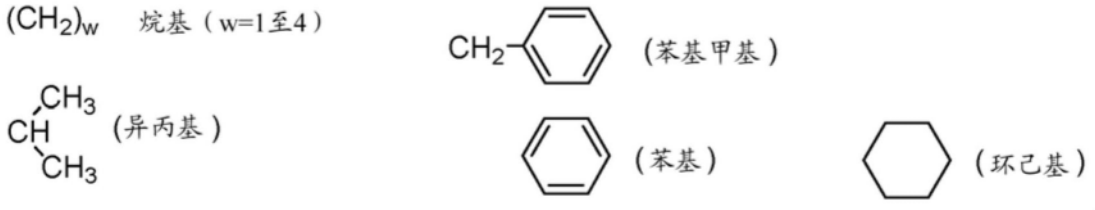
[0173] II

[0174] 其中

[0175] R^1、R^2和R^3如先前所定义;

[0176] R^6是H、R^3、COR^5(其中R^5如上所定义)或R^7;

[0177] R^7独立地是以下项中的一者:

[0178] 

。

[0179] 这些化合物是肽-类肽杂合寡聚体(类肽聚体)(Ostergaard等人,1997年)[17]。它们包含三个单元,包括位于序列C末端的α-氨基酸,随后是两个类肽残基。

[0180] 从被保护为叔丁基酯的α-氨基酸(Xaa-tBu,在合成LF369的情况下为L-Leu-tBu)在溶液中进行合成。这些合成也可在树脂上进行,如先前对于四聚体拟合所述。对于对应于通式(I)的分子,通过"亚单体化学"方法从该单元进行延伸。当核心单元是β-类肽类型时,其构建所必需的两个步骤是Xaa-tBu与丙烯酰氯的反应,随后是氮杂-迈克尔反应以向主链引入期望的侧链(R^2)。第三α-类肽单元通过用溴乙酸酰化二聚体随后用胺取代溴原子来构

建。在R^6是H的情况下，所用的胺是伯胺R^3NH_2。当R^6是COR^5时，用R^3NH_2处理之后获得的仲胺在偶联条件下用酰氯、酸酐或羧酸酰化。通过用仲胺R^3R^7NH处理N末端溴乙酰化二聚体，获得其中$R^6=R^7$的化合物。它们还可通过在N末端用NHR^3还原胺化化合物来获得。最后一步是通过用TFA处理使侧链和C末端脱保护。

[0181] 合成LF369的精确实验方案如下：

[0182] 在烧瓶中，将L-leu-tBu(1.74g,7.8mmol)溶解在45mL的无水THF中。在惰性氩气氛下将烧瓶冷却至0℃。加入三乙胺(2.3mL,31.4mmol,4当量)，然后加入丙烯酰氯(0.76mL,9.4mmol,1.2当量)。在0℃下搅拌3h之后，薄层色谱法(50/50环己烷/AcOEt)表明完全转化。通过过滤移除所形成的盐，真空蒸发滤液并通过硅胶色谱法(50/50环己烷/AcOEt)纯化获得的产物。分离丙烯酰胺，产率为93％(1.76g,7.27mmol)，为白色固体。

[0183] 氮杂-迈克尔反应。将先前所形成的丙烯酰胺(1.76g,7.27mmol)溶解在20mL乙醇中。加入具有被保护为叔丁基二甲基甲硅烷基醚的醇官能团的乙醇胺(2.68g,15.28mmol,2.1当量)，并将反应混合物加热回流60h。然后蒸发溶剂，并通过硅胶色谱法(90/10/0.1AcOEt/MeOH/Et3N)纯化反应粗产物，得到二聚体(2.74g,6.58mmol)，产率为90％，为淡黄色油状物。

[0184] 二聚体的酰化反应。将二聚体(2.74g,6.58mmol)溶解在10mL THF中，将反应器用氩气惰性化，然后冷却至-20℃。向溶液中加入三乙胺(1.1mL,7.89mmol,1.2当量)，随后加入2-溴乙酰溴(0.62mL,7.89mmol,1.2当量)。在-20℃下搅拌3h之后，过滤反应混合物。将所得滤液蒸发，并将反应粗产物在硅胶上层析(60/40/0.1环己烷/AcOEt/Et_3N)。分离溴乙酰化二聚体，产率为67％(2.36g,4.4mmol)，为淡黄色油状物。

[0185] 取代反应。将先前所获得的产物(2.36g,4.4mmol)溶解在10mL THF中。向该溶液中加入三乙胺(1.2mL,8.8mmol,2当量)，然后加入保护的乙醇胺$H_2NCH_2CH_2OTBDMS$(2.31g,13.2mmol,3当量)。将反应介质在氩气氛下在室温下搅拌过夜。然后过滤反应混合物并蒸发所得滤液。通过硅胶色谱法纯化粗产物(95/5/0.1AcOEt/MeOH/Et_3N)，得到三聚体(2.30g,3.64mmol)，产率为83％，为油状物。

[0186] 三聚体的乙酰化。将所得胺(2.3g,3.64mmol)溶解在20mL乙酸乙酯中。向溶液中加入三乙胺(2.02mL,14.5mmol,4当量)，然后加入乙酸酐(2.75mL,29mmol,8当量)。将反应在氩气下在室温下放置60h。在蒸发溶剂之后，所得粗产物经硅胶色谱纯化(90/10/0.1AcOEt/环己烷/Et3N)，得到N-乙酰化的三聚体，产率92％(2.27g,3.36mmol)，为无色油状物。

[0187] 侧链和C末端的脱保护。将三聚化合物(502mg,0.776mmol,1当量)溶解在4mL TFA/CH2Cl2/H2O(47.5:47.5:5)混合物中。在室温下搅拌2h之后，加入10mL二氯甲烷。将反应介质真空蒸发，然后与二氯甲烷共蒸发5次。然后将产物再溶解在5mL蒸馏水中，并在室温下搅拌2h。蒸发溶剂，然后与甲苯共蒸发五次，得到油状的LF369(362mg)。

[0188] 侧链

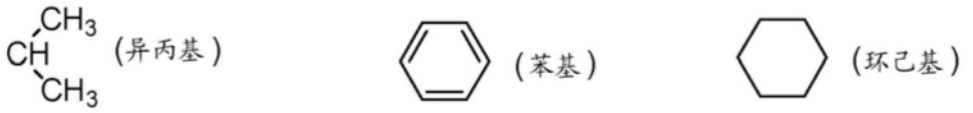
[0189] R^1、R^2和R^3如先前所定义；

[0190] R^6是R^3、H、COR^5(其中R^5如先前所定义)或R^7；

[0191] R^7独立地是以下项中的一者：



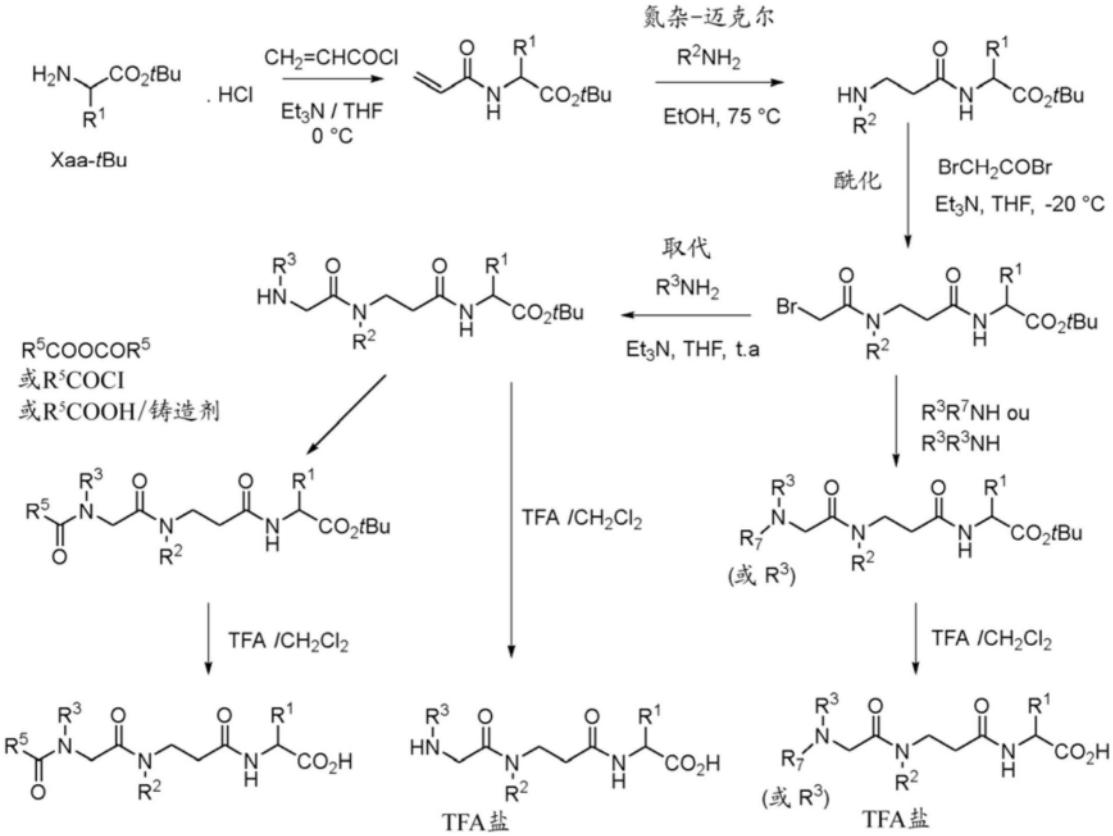
[0192]



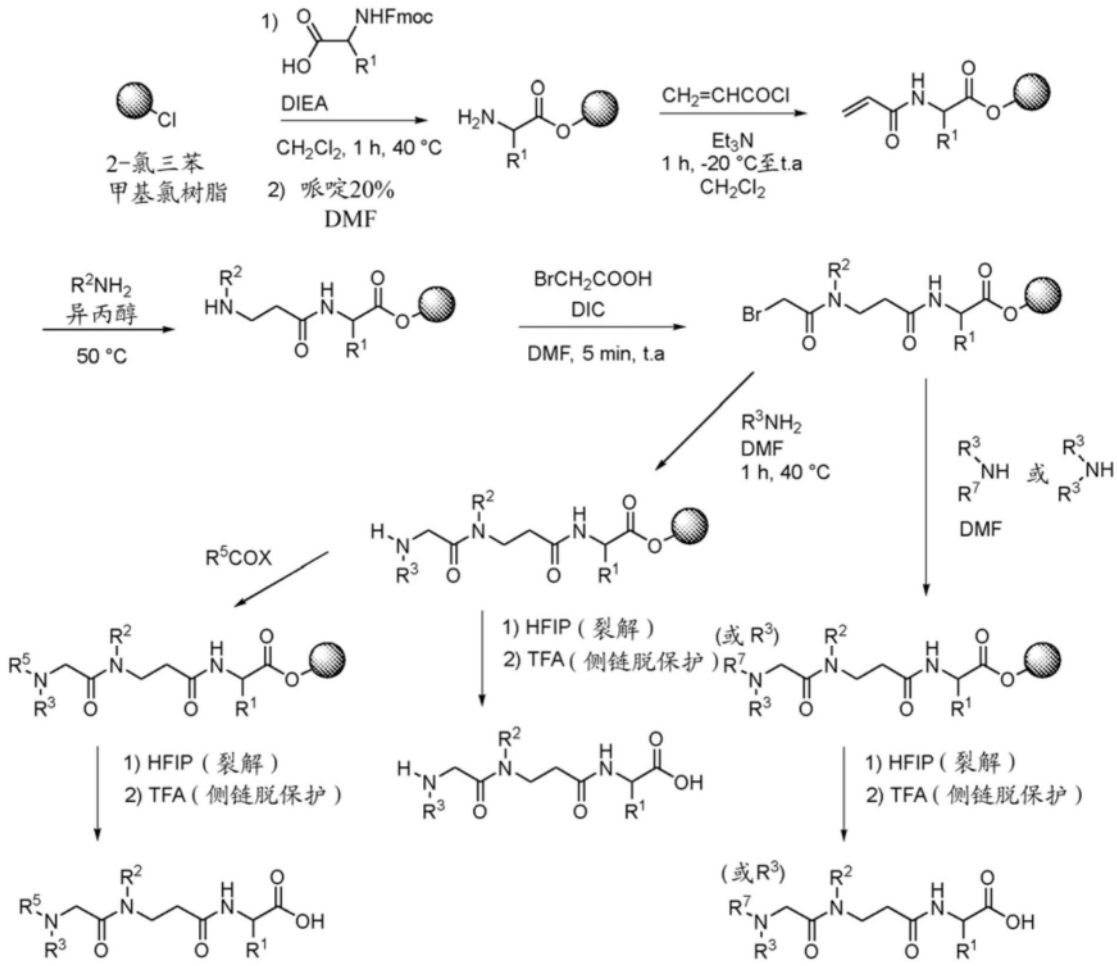
。

[0193] 通式(II)的类肽,例如LF369的溶液合成的代表性合成方案

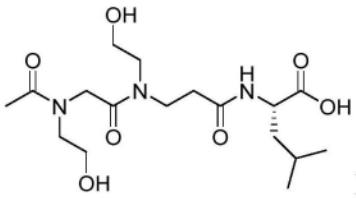
[0194]



[0195] 通式(II)的类肽,例如LF369的支持合成的代表性合成方案

[0196] 

[0197] 合成的分子

[0198] 

[0199] 合成

[0200] 化合物LF369(5μg,i.t.)在奥沙利铂诱导的神经病的小鼠模型中示出止痛作用(图20)。

[0201] 参考文献

[0202] 1. Finnerup et al.,Lancet Neurol.,14(2):162-173,2015

[0203] 2. von Hehn et al.,Neuron,73(4):638-652,2012

[0204] 3. Hershman et al.,J.Clin.Oncol.,32(18):1941-1967,2014

[0205] 4. Ludwig et al.,Nature,393(6685):587-591,1998

[0206] 5. Santoro et al.,Cell,93(5):717-729,1998

[0207] 6. Seifert et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,96(16):9391-9396,1999

[0208] 7. Dunlop et al.,Curr.Pharm.Des.,15(15):1767-1772,2009

[0209] 8. Lewis et al.,Mol.Cell Neurosci.,46(2):357-367,2011

[0210] 9. Descoeur et al.,EMBO Mol.Med.,3(5):266-278,2011

[0211] 10.Young et al.,Pain,155(9):1708-1719,2014

[0212] 11.Lewis et al.,J.Neurosci.,29(19):6250-6265,2009

[0213] 12.Bankston et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,109:7899,2012

[0214] 13.Han et al.,J.Biomol.Screen,20(9):1-8,2015

[0215] 14.Janssen et al.,Arzneimittelforschung,13:502-507,1963

[0216] 15.Randall et Selitto,Arch.Int.Pharmacodyn.Ther.,111(4):409-419,1957

[0217] 16.Kim et Chung,Pain,50(3):355-363,1992

[0218] 17.Ostergaard et al.,Molecular Diversity,3:17-27,1997(

[0219] 18.Simon et al.,Proc.Natl.Acad.Sci USA,89:9367-9371,1992

[0220] 19.Hamper et al.,J.Org.Chem.,63:708-718,1998

[0221] 20.Zuckermann et al.,J.Am.Chem.Soc.,114:10646-10647,1992

[0222] 21.Culf et al.,Molecules,15:5282-5335,2010

[0223] 22.Miller et al.,Drug Dev.Res.,35:20-32,1995

[0224] 23.Kwon et al.,J.Am.Chem.Soc.,129:1508-1509,2007

[0225] 24.Vollrath et al.,Organic&Biomolecular Chemistry,11:8497-8201,2013

[0226] 25.Li et al.,Cellular&Molecular Immunol.,7:133-142,2010

[0227] 26.Chongsiriwatana et al.,Proc.Natl.Acad Sci.USA,105:2794-2799,2008

[0228] 27.Mesirca et al.,Nat.Commun.,5:4664.doi:10.1038/ncomms5664,2014

[0229] 28.Marger et al.,Channels(Austin),5(3):241-250,2011。

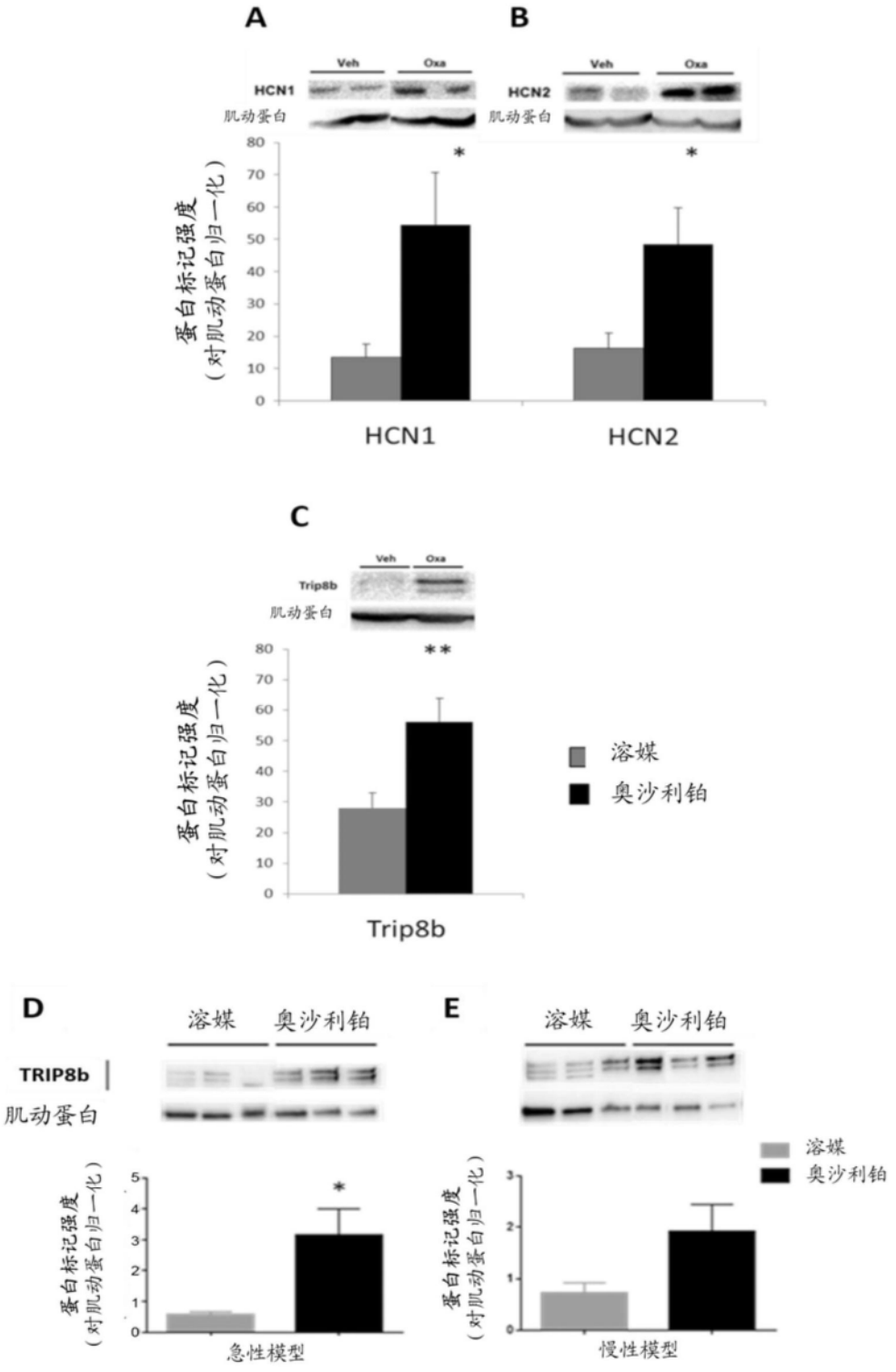

A
B
Veh
Oxa
HCN1
HCN2
肌动蛋白
蛋白标记强度
（对肌动蛋白归一化）
HCN1
HCN2
C
Trip8b
溶媒
奥沙利铂
D
E
TRIP8b
急性模型
慢性模型

图1

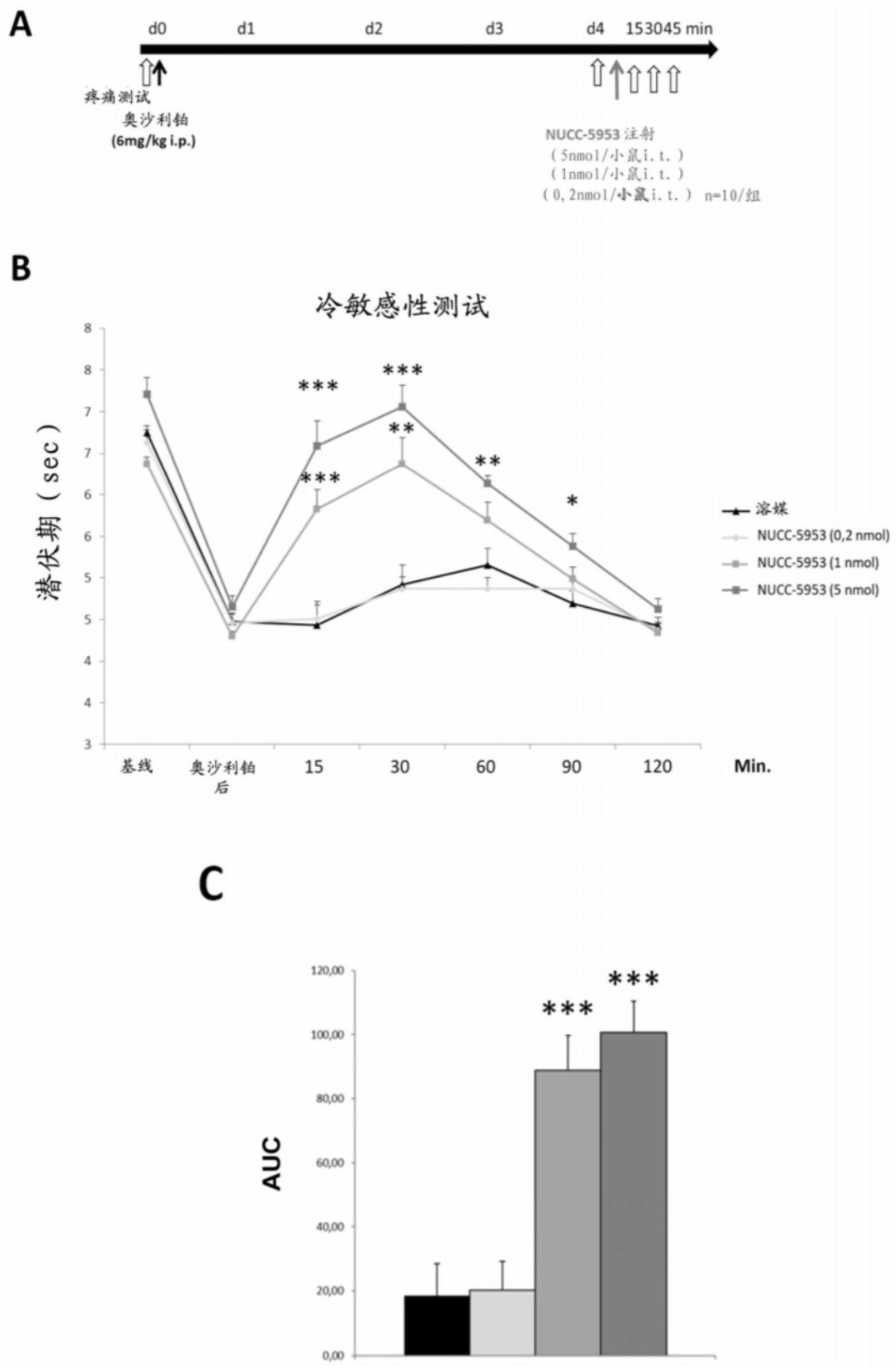

A
d0
d1
d2
d3
d4
153045 min
疼痛测试
奥沙利铂
(6mg/kg i.p.)
NUCC-5953 注射
(5nmol/小鼠i.t.)
(1nmol/小鼠i.t.)
(0,2nmol/小鼠i.t.) n=10/组
B
冷敏感性测试
潜伏期(sec)
溶媒
NUCC-5953 (0,2 nmol)
NUCC-5953 (1 nmol)
NUCC-5953 (5 nmol)
基线
奥沙利铂后
15
30
60
90
120
Min.
C
AUC
120,00
100,00
80,00
60,00
40,00
20,00
0,00

图2

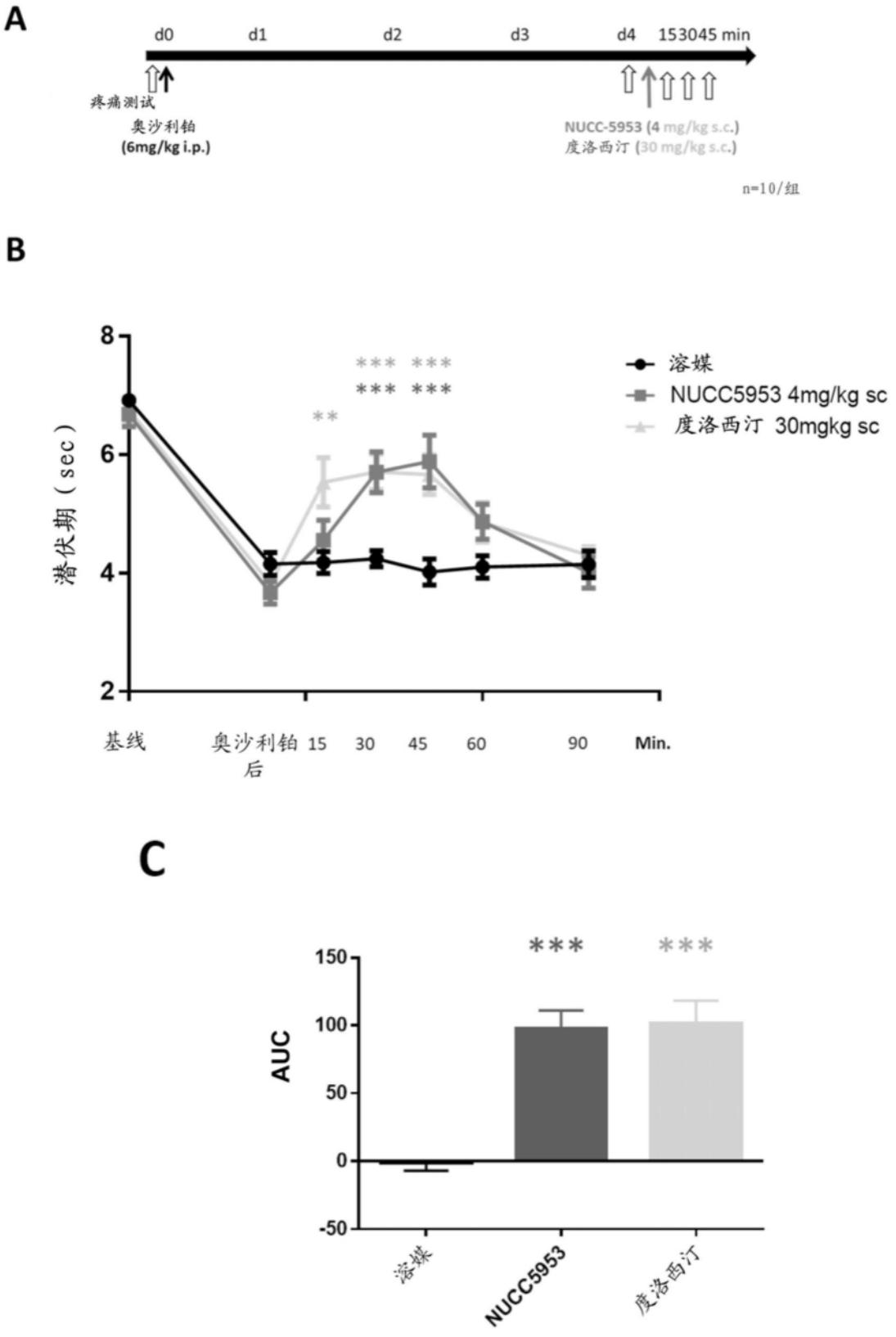

A
d0
d1
d2
d3
d4
153045 min
疼痛测试
奥沙利铂
(6mg/kg i.p.)
NUCC-5953 (4 mg/kg s.c.)
度洛西汀 (30 mg/kg s.c.)
n=10/组
B
潜伏期（sec）
8
6
4
2
**
*** ***
*** ***
溶媒
NUCC5953 4mg/kg sc
度洛西汀 30mgkg sc
基线
奥沙利铂后
15
30
45
60
90
Min.
C
AUC
150
100
50
0
-50
***
***
溶媒
NUCC5953
度洛西汀

图3

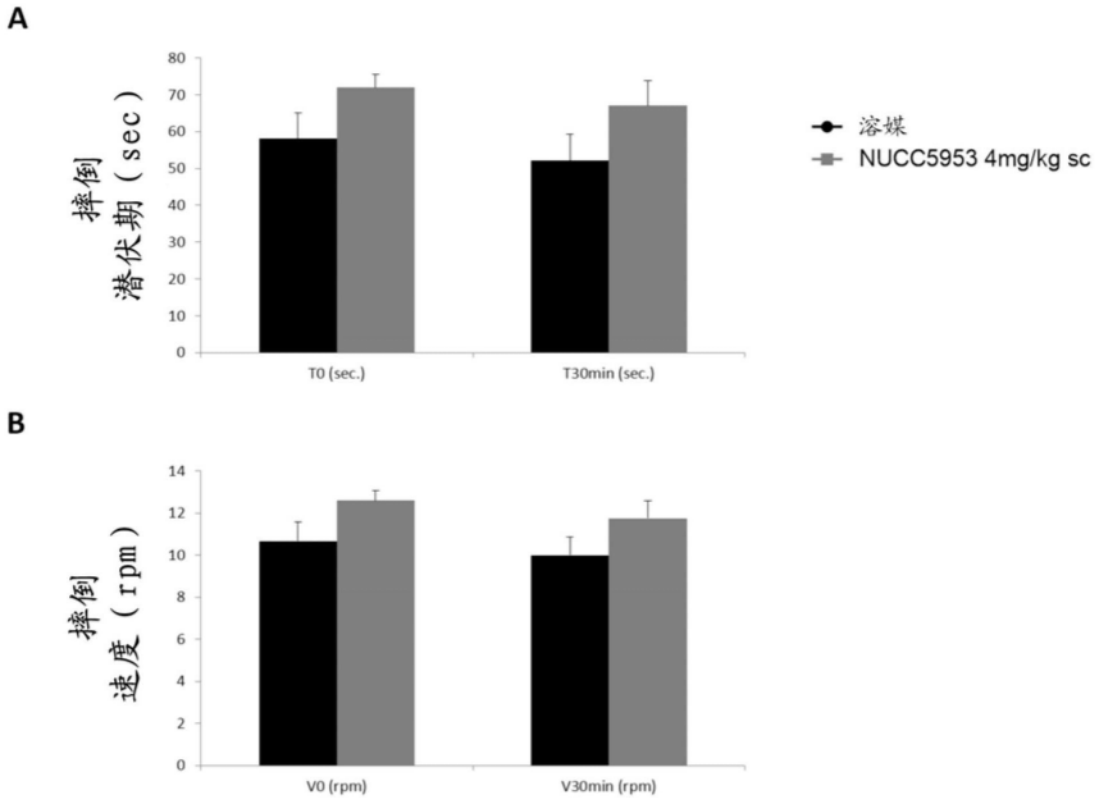

A
摔倒
潜伏期（sec）
80
70
60
50
40
30
20
10
0
T0 (sec.)
T30min (sec.)
溶媒
NUCC5953 4mg/kg sc
B
摔倒
速度（rpm）
14
12
10
8
6
4
2
0
V0 (rpm)
V30min (rpm)

图4

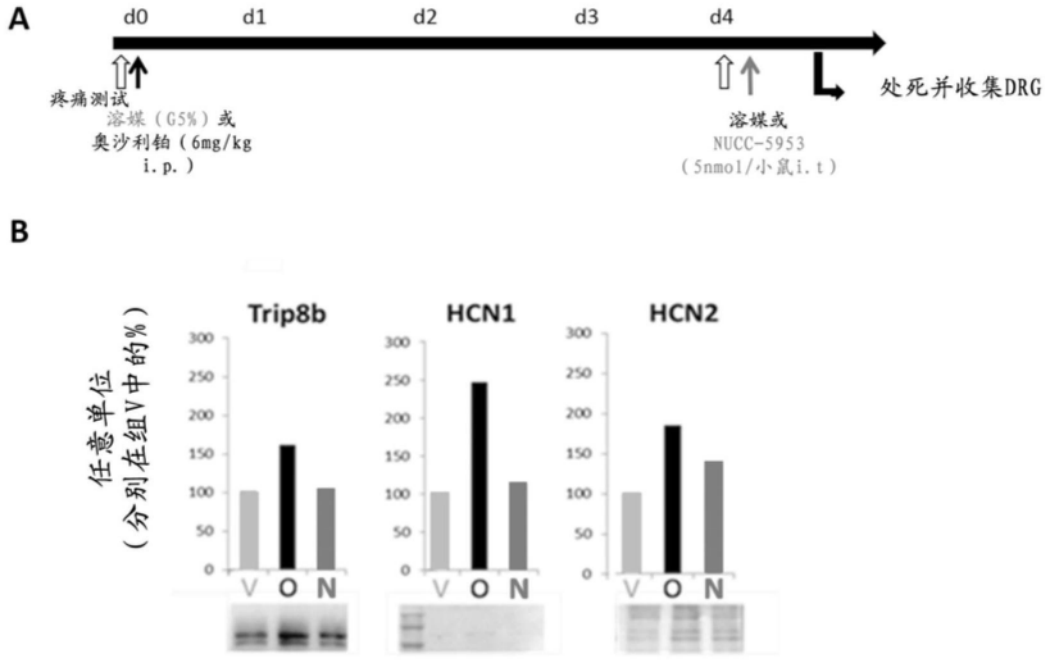

A
d0
d1
d2
d3
d4
疼痛测试
溶媒（G5%）或
奥沙利铂（6mg/kg
i.p.）
溶媒或
NUCC-5953
（5nmol/小鼠i.t）
处死并收集DRG
B
任意单位
（分别在组V中的%）
Trip8b
HCN1
HCN2
300
250
200
150
100
50
0
V O N

图5

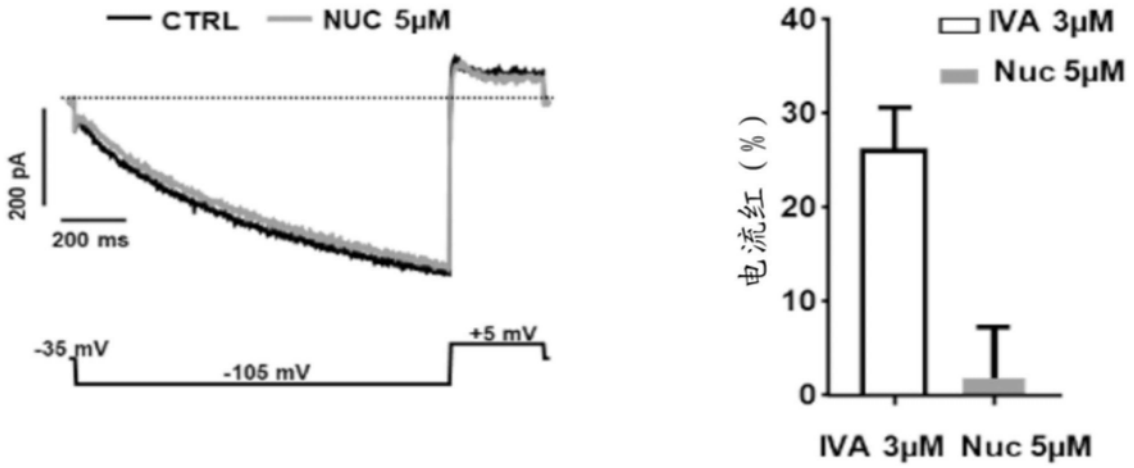

CTRL
NUC 5μM
200 pA
200 ms
-35 mV
-105 mV
+5 mV
IVA 3μM
Nuc 5μM
电流红（%）
40
30
20
10
0
IVA 3μM
Nuc 5μM

图6

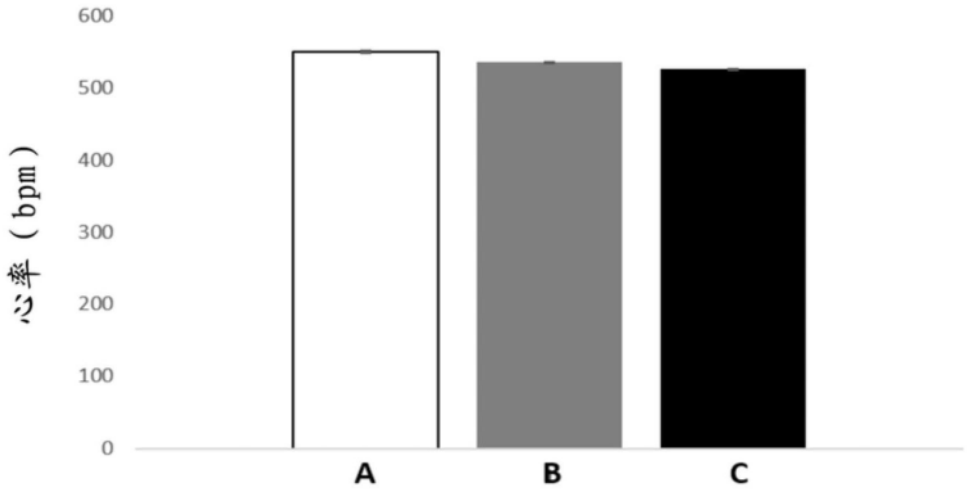

心率（bpm）
600
500
400
300
200
100
0
A
B
C

图7

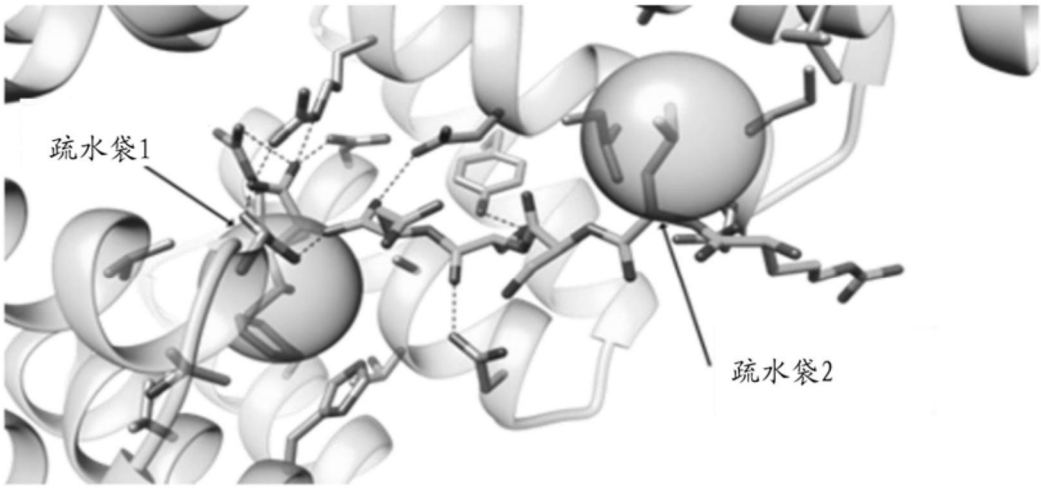


图8

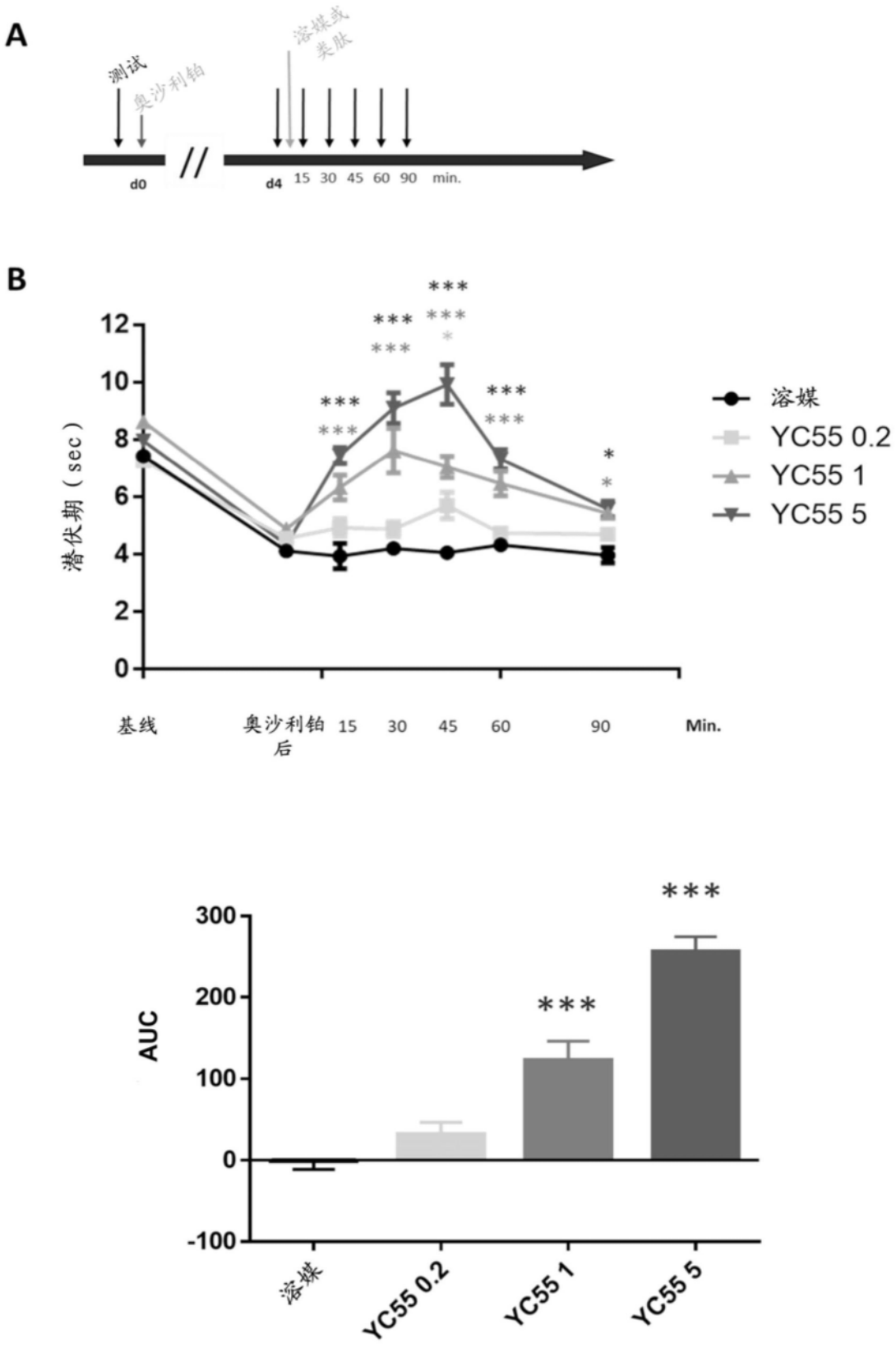

A
测试
奥沙利铂
溶媒或
类肽
d0
d4
15 30 45 60 90 min.
B
潜伏期（sec）
基线
奥沙利铂后
15 30 45 60 90 Min.
溶媒
YC55 0.2
YC55 1
YC55 5
AUC
溶媒
YC55 0.2
YC55 1
YC55 5

图9

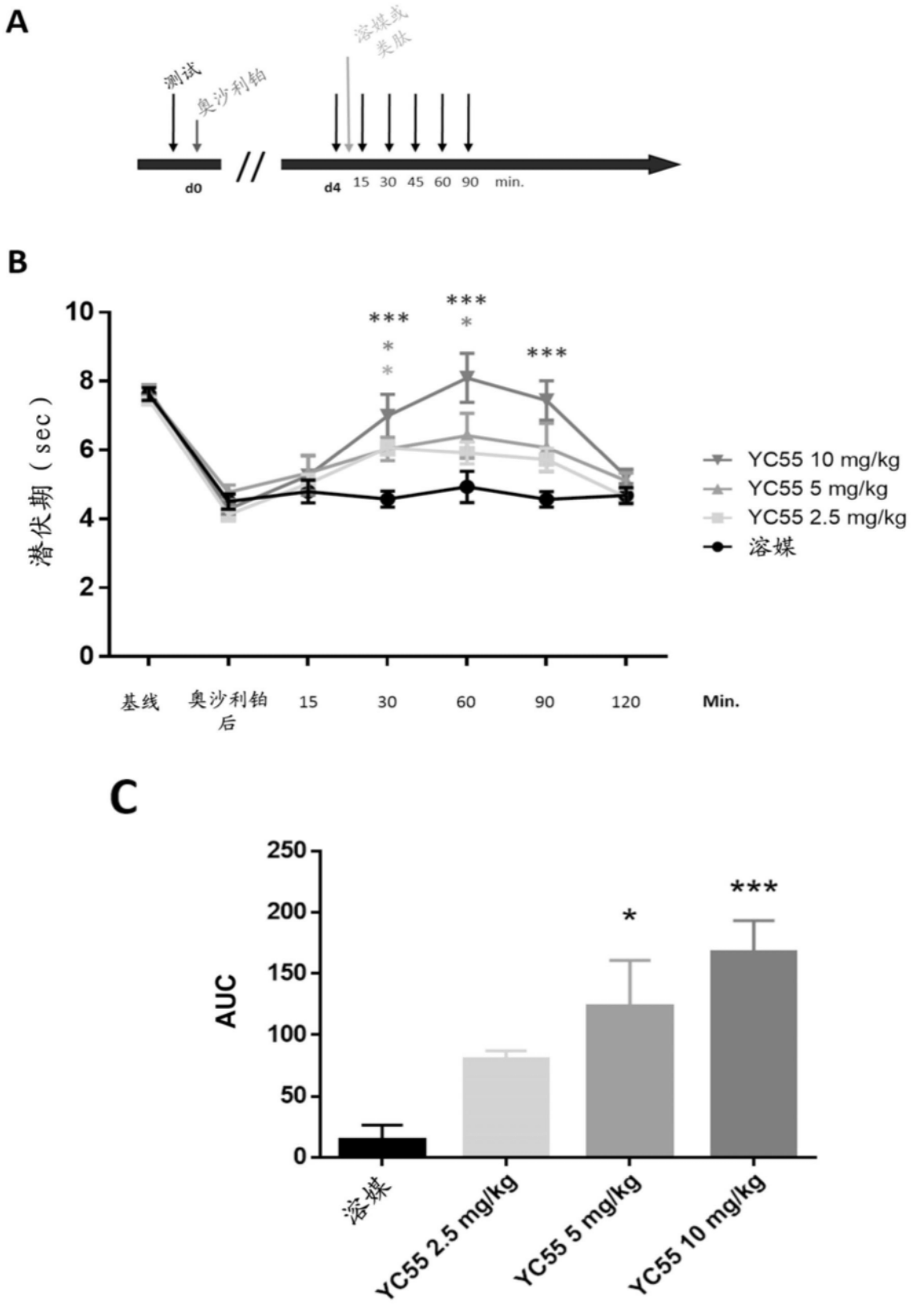

A
测试
奥沙利铂
溶媒或
类肽
d0
d4
15 30 45 60 90 min.
B
潜伏期（sec）
10
8
6
4
2
0
***
***
***
基线
奥沙利铂后
15
30
60
90
120
Min.
YC55 10 mg/kg
YC55 5 mg/kg
YC55 2.5 mg/kg
溶媒
C
AUC
250
200
150
100
50
0
*
***
溶媒
YC55 2.5 mg/kg
YC55 5 mg/kg
YC55 10 mg/kg

图10

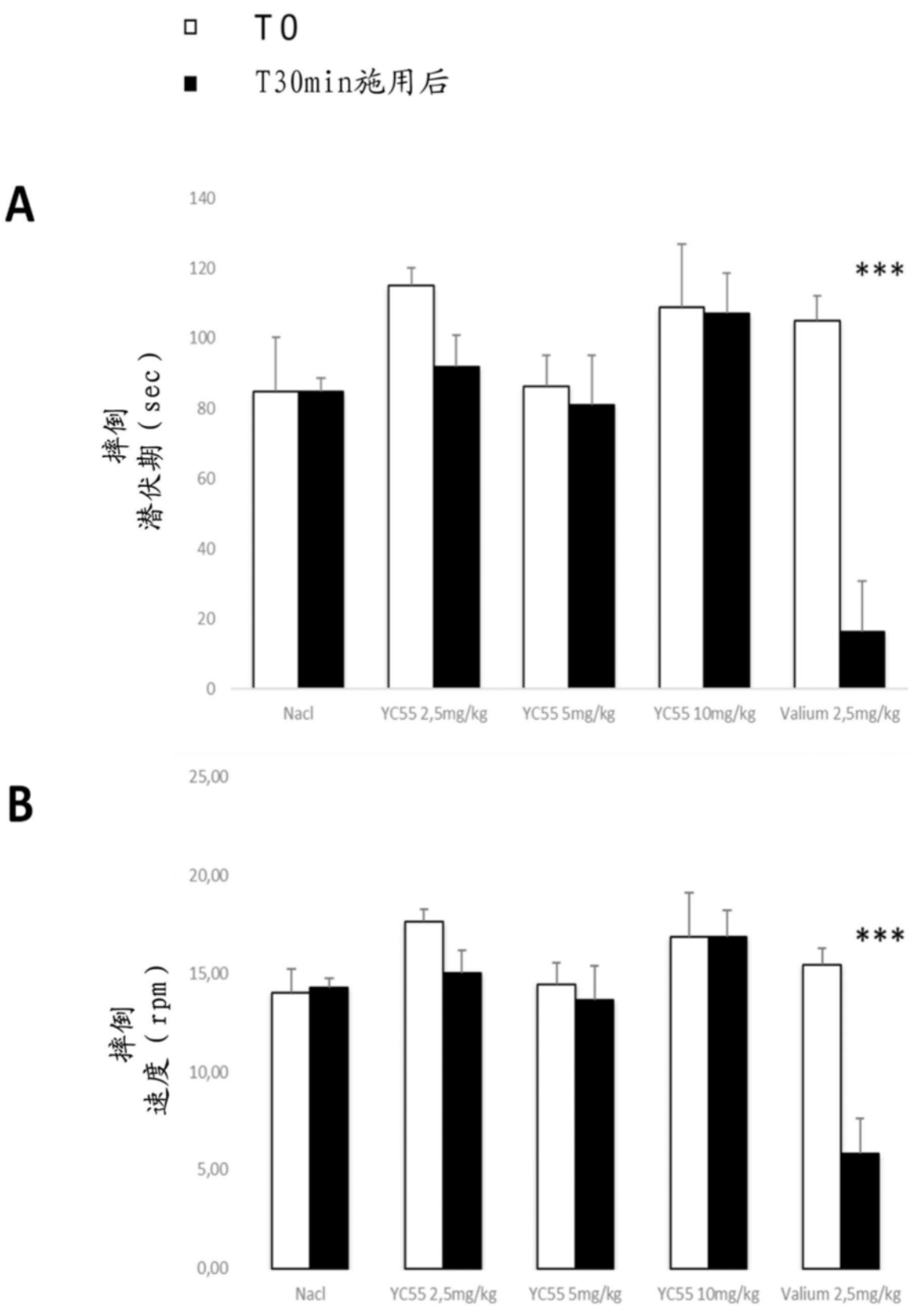

T0
T30min施用后
A
摔倒
潜伏期（sec）
140
120
100
80
60
40
20
0
***
Nacl
YC55 2,5mg/kg
YC55 5mg/kg
YC55 10mg/kg
Valium 2,5mg/kg
B
摔倒
速度（rpm）
25,00
20,00
15,00
10,00
5,00
0,00
***
Nacl
YC55 2,5mg/kg
YC55 5mg/kg
YC55 10mg/kg
Valium 2,5mg/kg

图11

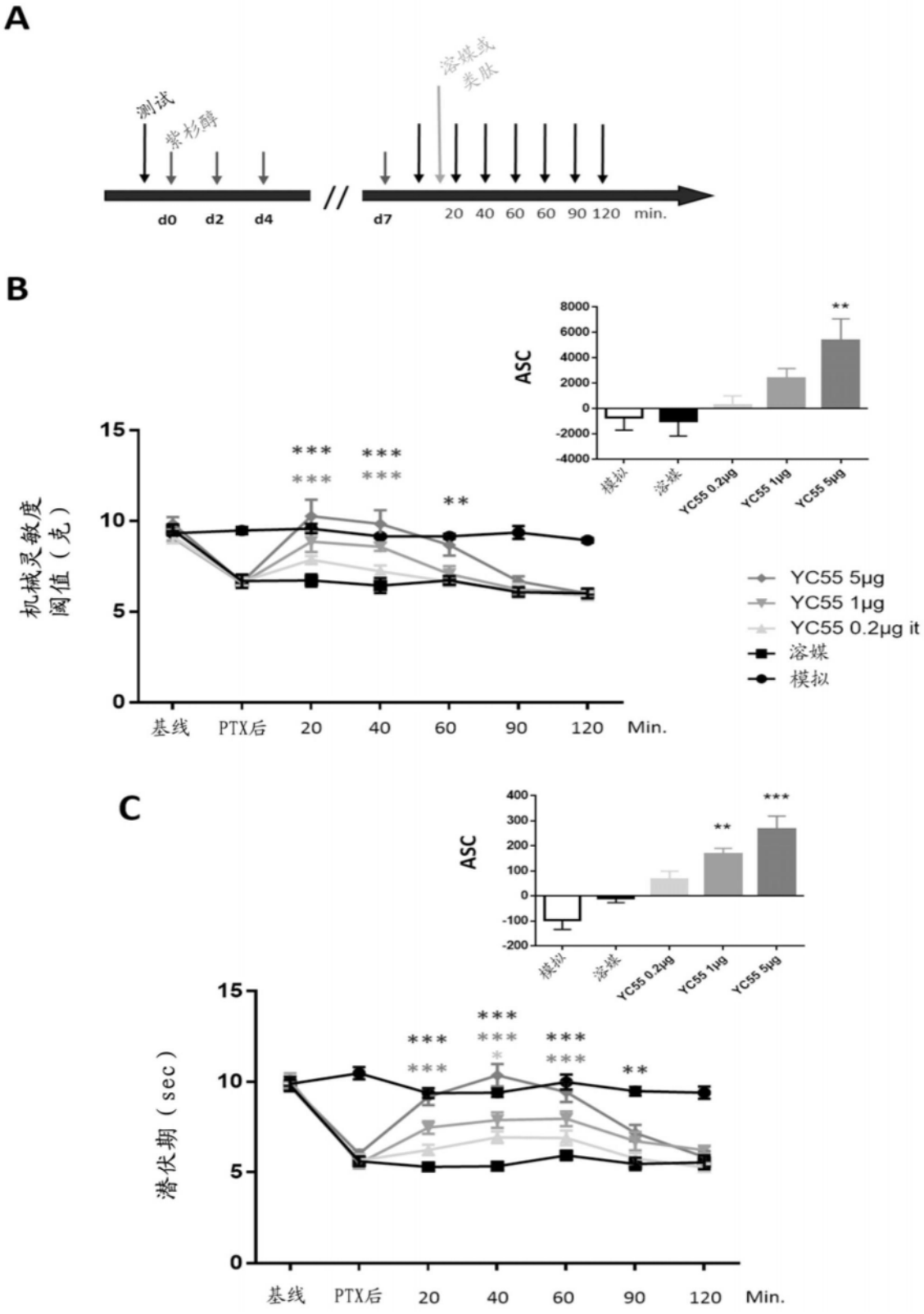

A
测试
紫杉醇
溶媒或
类肽
d0
d2
d4
d7
20 40 60 60 90 120 min.
B
机械灵敏度
阈值（克）
基线
PTX后
20
40
60
90
120
Min.
ASC
模拟
溶媒
YC55 0.2μg
YC55 1μg
YC55 5μg
YC55 5μg
YC55 1μg
YC55 0.2μg it
溶媒
模拟
C
潜伏期（sec）
基线
PTX后
20
40
60
90
120
Min.
ASC
模拟
溶媒
YC55 0.2μg
YC55 1μg
YC55 5μg

图12

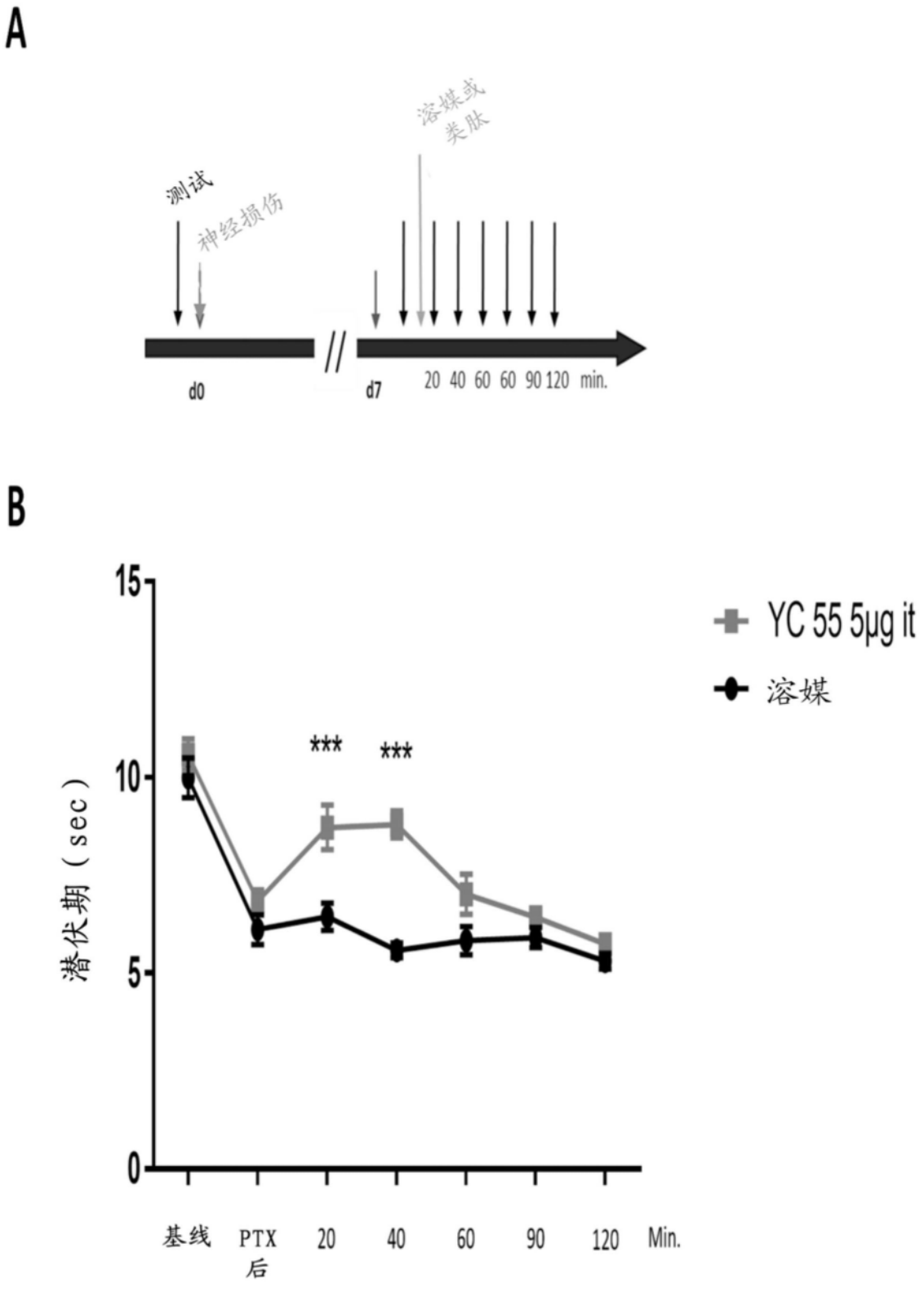

A
测试
神经损伤
溶媒或
类肽
d0
d7
20 40 60 60 90 120 min.
B
15
10
5
0
潜伏期（sec）
***
***
YC 55 5μg it
溶媒
基线
PTX
后
20
40
60
90
120
Min.

图13

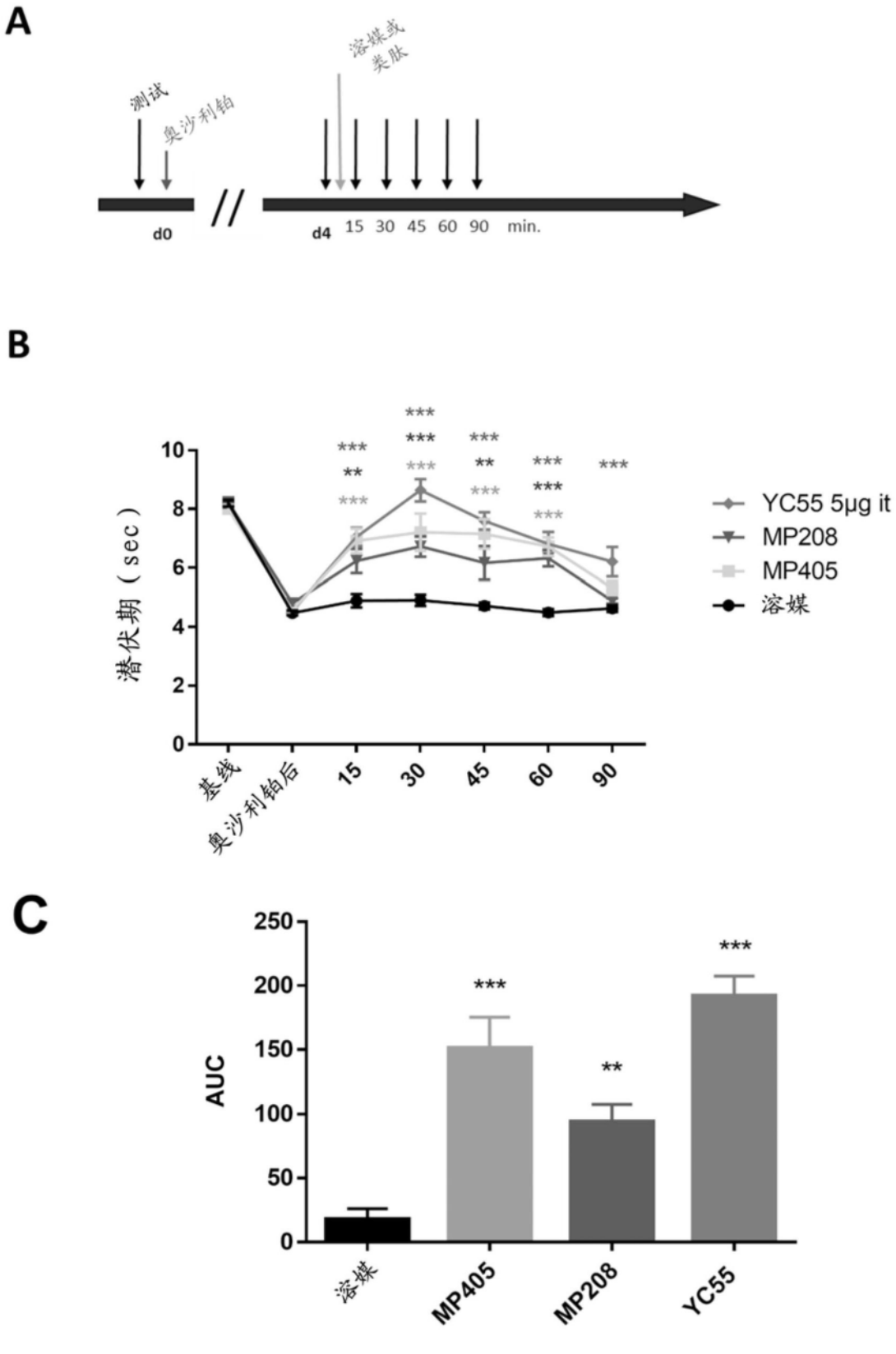

A
测试
奥沙利铂
溶媒或
类肽
d0
d4
15 30 45 60 90 min.
B
潜伏期（sec）
基线
奥沙利铂后
15
30
45
60
90
YC55 5μg it
MP208
MP405
溶媒
C
AUC
溶媒
MP405
MP208
YC55

图14

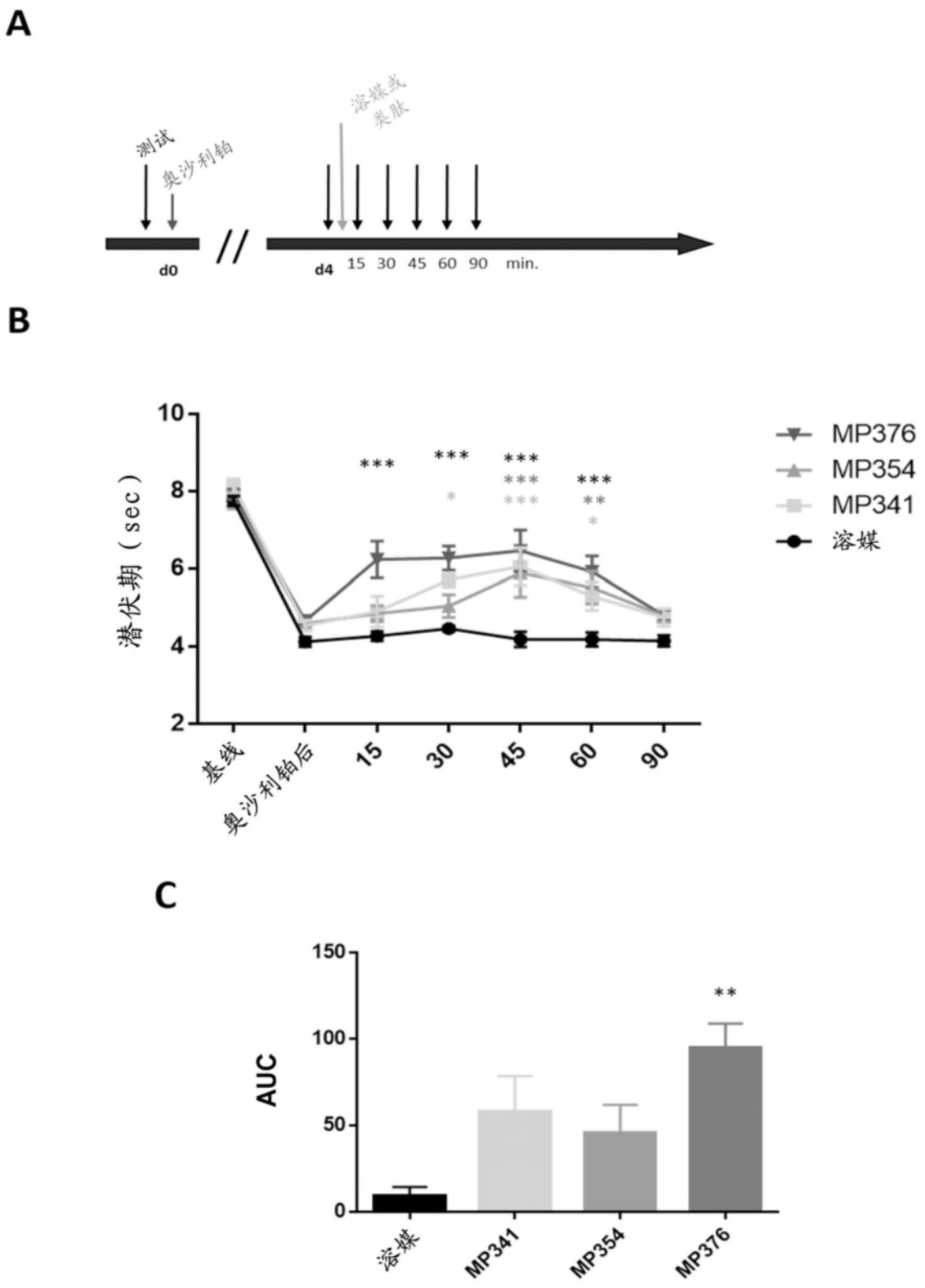

A
测试
奥沙利铂
溶媒或
类肽
d0
d4
15 30 45 60 90 min.
B
潜伏期（sec）
10
8
6
4
2
基线
奥沙利铂后
15
30
45
60
90
MP376
MP354
MP341
溶媒
C
AUC
150
100
50
0
溶媒
MP341
MP354
MP376

图15

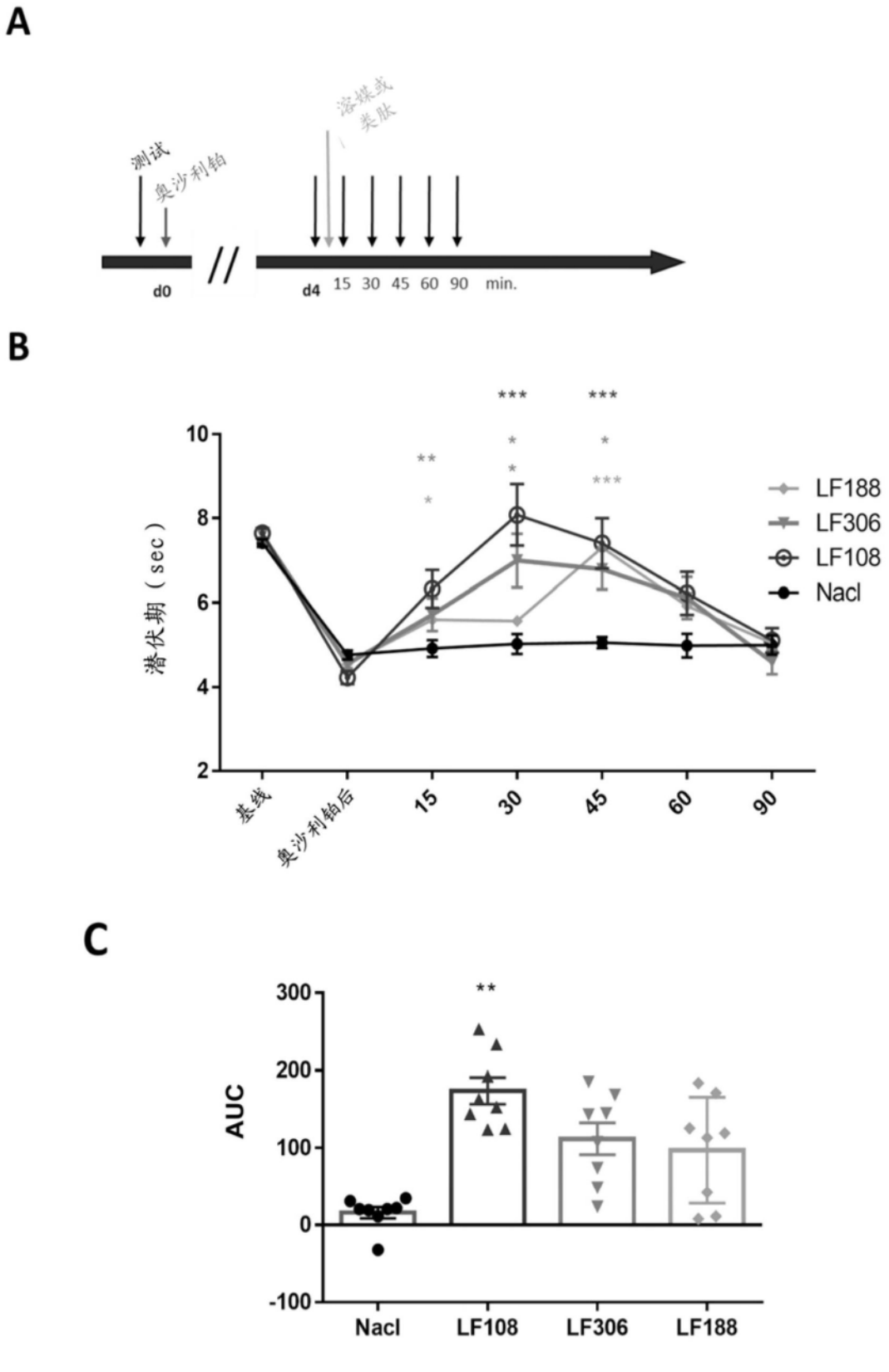

A
测试
奥沙利铂
溶媒或
类肽
d0
d4
15 30 45 60 90 min.
B
潜伏期（sec）
基线
奥沙利铂后
15
30
45
60
90
LF188
LF306
LF108
Nacl
C
AUC
Nacl
LF108
LF306
LF188

图16

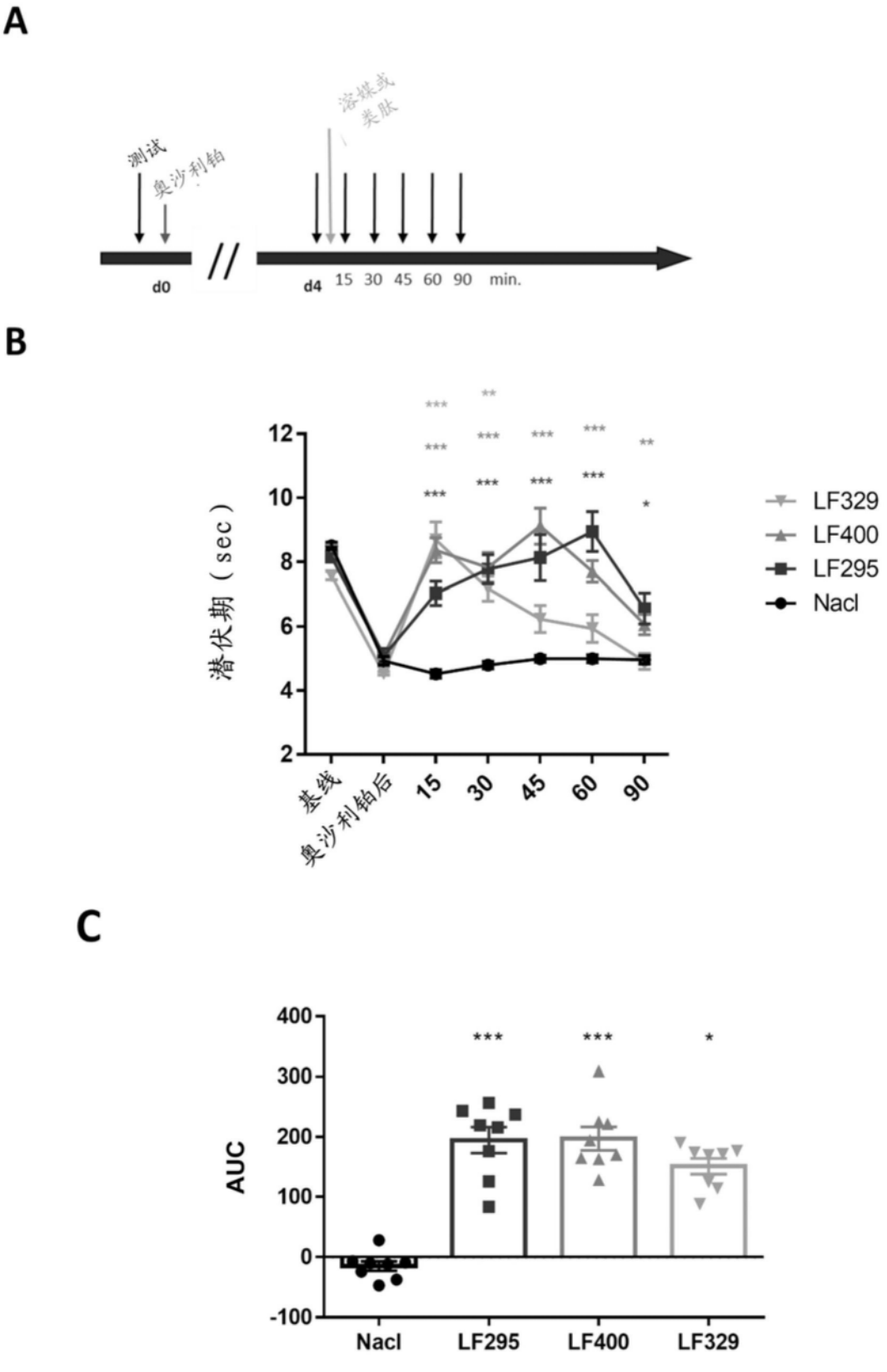

A
测试
奥沙利铂
溶媒或
类肽
d0
d4
15 30 45 60 90 min.
B
潜伏期（sec）
12
10
8
6
4
2
基线
奥沙利铂后
15
30
45
60
90
LF329
LF400
LF295
Nacl
C
AUC
400
300
200
100
0
-100
Nacl
LF295
LF400
LF329

图17

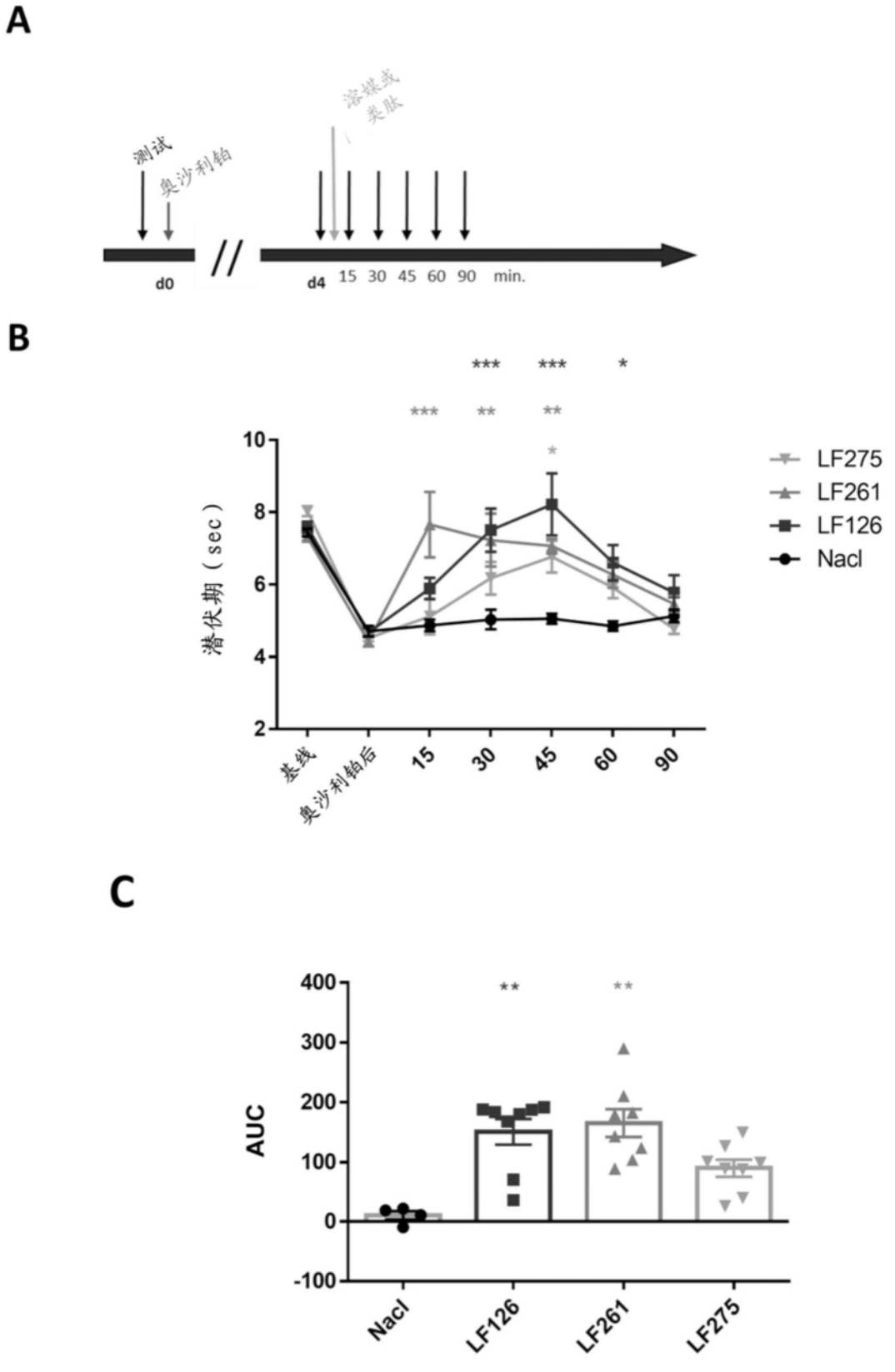

A
测试
奥沙利铂
溶媒或
类肽
d0
d4
15 30 45 60 90 min.
B
潜伏期（sec）
基线
奥沙利铂后
15
30
45
60
90
LF275
LF261
LF126
Nacl
C
AUC
Nacl
LF126
LF261
LF275

图18

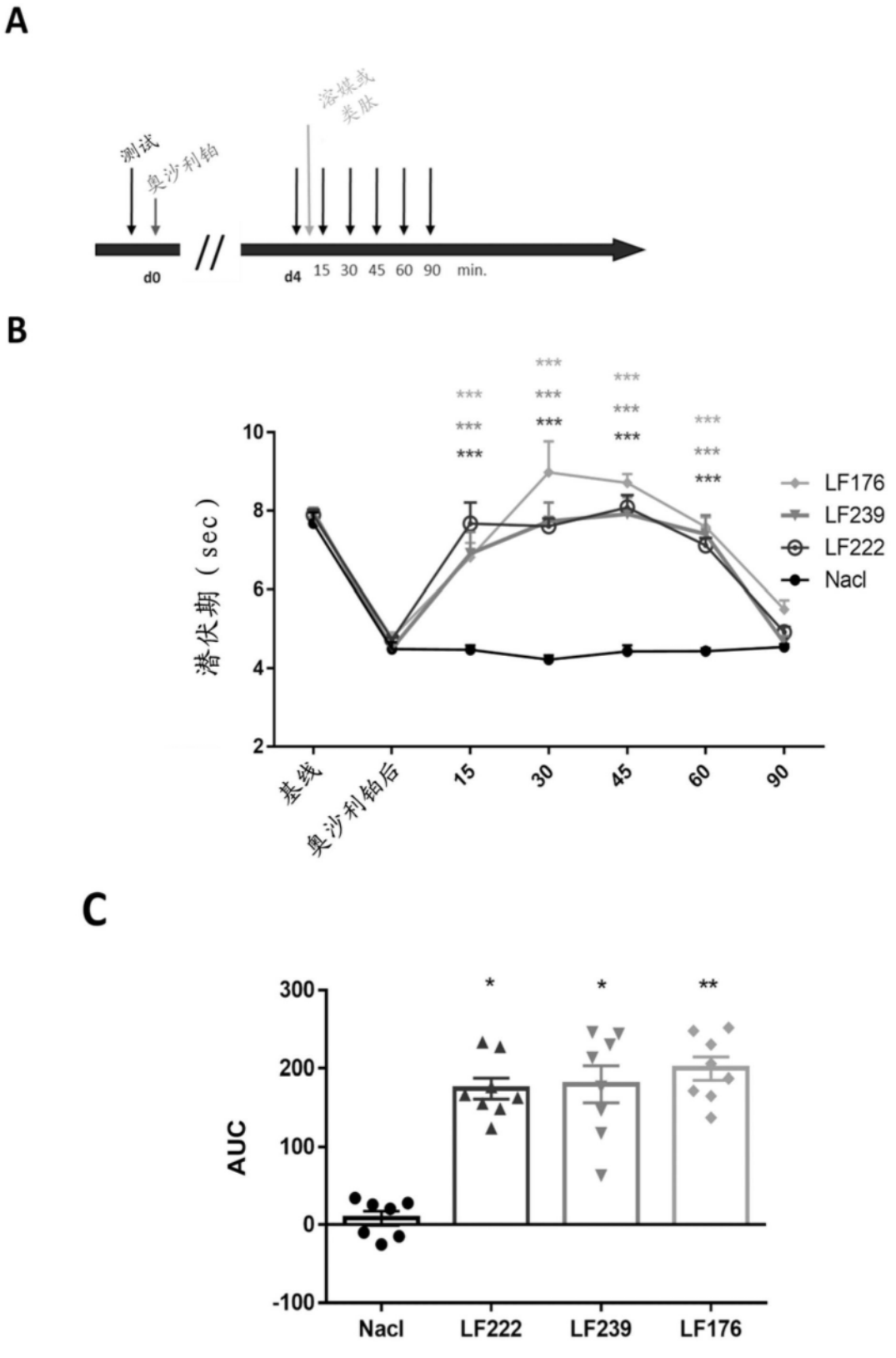

A
测试
奥沙利铂
溶媒或
类肽
d0
d4
15 30 45 60 90 min.
B
潜伏期（sec）
基线
奥沙利铂后
15
30
45
60
90
LF176
LF239
LF222
Nacl
C
AUC
Nacl
LF222
LF239
LF176

图19

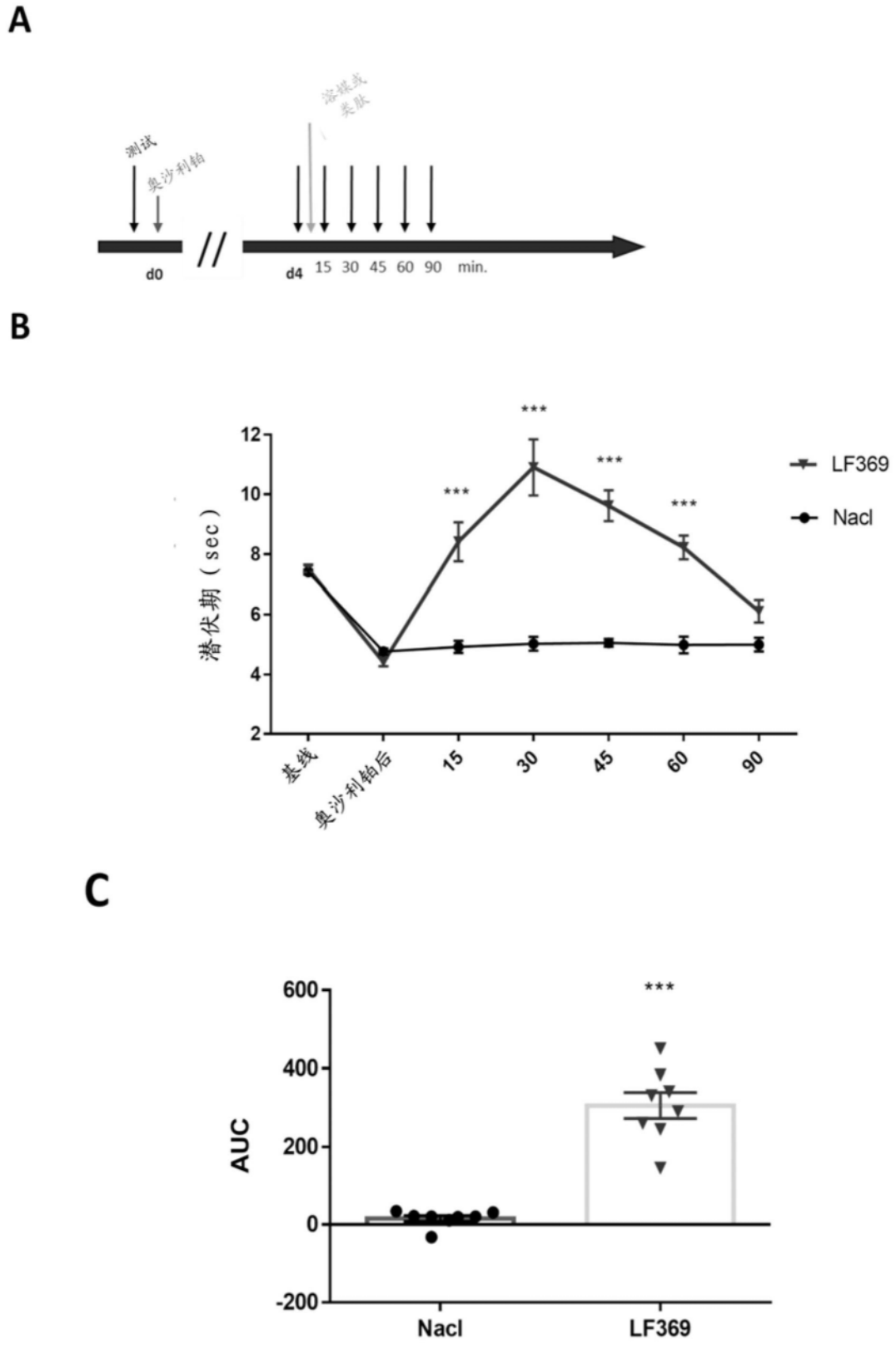

A
测试
奥沙利铂
溶媒或
类肽
d0
d4
15 30 45 60 90 min.
B
潜伏期（sec）
LF369
Nacl
基线
奥沙利铂后
15
30
45
60
90
***
C
AUC
Nacl
LF369

图20