(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 115362001 A
(43)申请公布日 2022.11.18

(21)申请号 202180027127.0
(22)申请日 2021.03.05
(30)优先权数据
20161493.0 2020.03.06 EP
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2022.10.08
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2021/055678 2021.03.05
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2021/176094 EN 2021.09.10
(71)申请人 哥本哈根大学
地址 丹麦哥本哈根
(72)发明人 K·L·马德森 U·格特赫
N·R·克里斯滕森
(74)专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494
专利代理师 封新琴
(51)Int.Cl.
A61P 25/00(2006.01)
A61K 38/00(2006.01)
A61K 47/54(2006.01)

权利要求书3页 说明书44页
序列表15页 附图23页

(54)发明名称

PICK1的脂质缀合的肽抑制剂

(57)摘要

本公开文本涉及脂质缀合的二价肽配体，其与蛋白激酶C相互作用蛋白1(PICK1)结合从而抑制PICK1。本公开文本的PICK1抑制剂包含含有PICK1的两个肽配体的肽部分以及含有连接所述两个肽配体的接头和脂质的非肽部分。此外，本公开文本涉及所述PICK1抑制剂用于治疗与适应不良的可塑性相关的疾病或障碍的治疗性和诊断性用途。

CN 115362001 A

1.一种包含肽部分和非肽部分的PICK1抑制剂,其中所述肽部分由以下项组成

a)包含以下通式的氨基酸序列的第一肽:

$X_1X_2X_3X_4X_5$;和

b)包含以下通式的氨基酸序列的第二肽:$X_1X_2X_3X_4X_5$;

其中

X_1是H、N、F或T,或不存在;

X_2是W、S、E或Y;或不存在;

X_3是L、V或I;

X_4是K、I或R;并且

X_5是V;

并且其中所述非肽部分包含:

c)将所述第一肽与所述第二肽连接的接头,和

d)亲脂性脂肪族基团。

2.根据权利要求1所述的PICK1抑制剂,其中所述第一肽和/或所述第二肽具有在3至5个氨基酸残基范围内的长度。

3.根据前述权利要求中任一项所述的PICK1抑制剂,其中所述第一肽和/或所述第二肽选自HWLKV(SEQ ID NO:54)、FEIRV(SEQ ID NO:34)、NSIIV(SEQ ID NO:5)、NSVRV(SEQ ID NO:8)、NSLRV(SEQ ID NO:53)、NSIRV(SEQ ID NO:6)、NYIIV(SEQ ID NO:13)、NYIRV(SEQ ID NO:14)、TSIRV(SEQ ID NO:18)、YIIV(SEQ ID NO:49)、SVRV(SEQ ID NO:44)、EIRV(SEQ ID NO:46)、LRV、IIV、VRV和IRV。

4.根据前述权利要求中任一项所述的PICK1抑制剂,其中所述第一肽和/或所述第二肽选自HWLKV(SEQ ID NO:54)、NSVRV(SEQ ID NO:8)、SVRV(SEQ ID NO:44)和LRV。

5.根据前述权利要求中任一项所述的PICK1抑制剂,其中所述接头是NPEG接头,如以下NPEG接头,其包含在1至24个范围内的其中一个或多个骨架氧原子被氮原子替代的乙二醇部分,如在1至20个范围内,例如在1至16个范围内,如在1至14个范围内,例如在1至12个范围内,例如在1至10个范围内,如在1至8个范围内,例如在1至6个范围内,如在1至4个范围内,例如在1至2个范围内的其中一个或多个骨架氧原子被氮原子替代的乙二醇部分,所述NPEG接头优选地包含4个其中一个或多个骨架氧原子被氮原子替代的乙二醇部分。

6.根据前述权利要求中任一项所述的PICK1抑制剂,其中所述接头具有根据式(III)的结构:



,式(III)。

7.根据前述权利要求中任一项所述的PICK1抑制剂,其中所述亲脂性脂肪族基团是脂肪族链,如脂肪族支链、脂肪族非支链、饱和链或不饱和链,或脂肪族环,如甾烷或类固醇,优选胆固醇。

8.根据前述权利要求中任一项所述的PICK1抑制剂,其中所述亲脂性脂肪族基团是C_4-

C_{26}脂肪酸，如C_{14}至C_{16}脂肪酸。

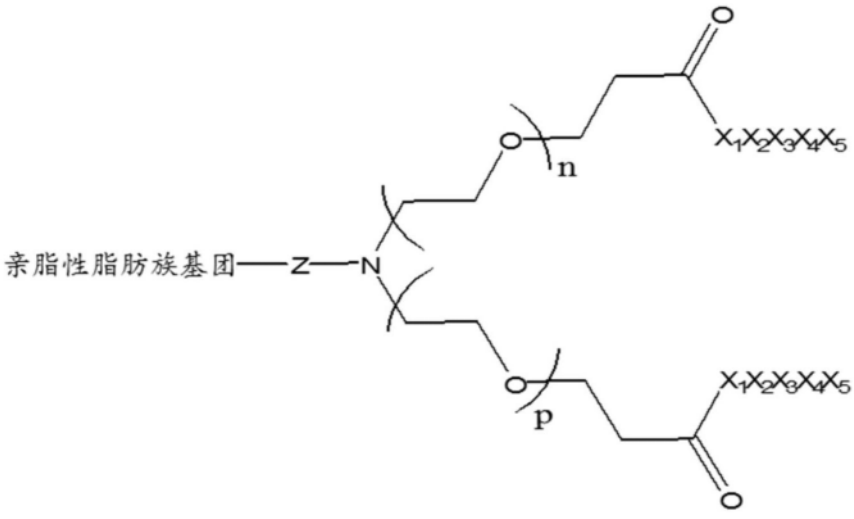
9.根据前述权利要求中任一项所述的PICK1抑制剂，其中所述亲脂性脂肪族基团选自癸酸、月桂酸、肉豆蔻酸、棕榈酸、十七烷酸、硬脂酸。

10.根据前述权利要求中任一项所述的PICK1抑制剂，其中所述亲脂性脂肪族基团是肉豆蔻酸。

11.根据前述权利要求中任一项所述的PICK1抑制剂，其中所述非肽部分进一步包含一个氨基酸，如Asp、β-Asp、β-Ser、β-高-Ser和β-Lys。

12.根据前述项目中任一项所述的PICK1抑制剂，所述PICK1抑制剂进一步包含可检测部分。

13.根据前述权利要求中任一项所述的PICK1抑制剂，其中所述PICK1抑制剂具有式(I)的一般结构：



式 (I)，

其中

Z是键或单个氨基酸；

n是0到12的整数；

p是0到12的整数。

14.一种包含PICK1抑制剂的胶束，所述PICK1抑制剂含有

a)包含以下通式的氨基酸序列的第一肽：

$X_1X_2X_3X_4X_5$(SEQ ID NO:1)；和

b)包含以下通式的氨基酸序列的第二肽：$X_1X_2X_3X_4X_5$(SEQ ID NO:1)；

其中：

X_1是H、N、F或T，或不存在；

X_2是W、S、E或Y；或不存在；

X_3是L、V或I；

X_4是K、I或R；并且

X_5是V；

c)将所述第一肽与所述第二肽连接的接头，和

d)亲脂性脂肪族基团。

15.一种包含根据权利要求1至8中任一项所述的PICK1抑制剂或根据权利要求14所述

的胶束的药物组合物。

16.根据前述权利要求中任一项所述的PICK1抑制剂、胶束或药物组合物，所述PICK1抑制剂、胶束或药物组合物用作药物。

17.根据前述权利要求中任一项所述的PICK1抑制剂、胶束或药物组合物，所述PICK1抑制剂、胶束或药物组合物用于预防和/或治疗与适应不良的可塑性相关的疾病或障碍，如疼痛、药物成瘾、肌萎缩侧索硬化症、癫痫、耳鸣、偏头痛、癌症、局部缺血、阿尔茨海默病和/或帕金森病。

18.根据权利要求17所述的PICK1抑制剂、胶束或药物组合物，其中所述疼痛是机械性或热性痛觉超敏或痛觉过敏，或其中所述疼痛是炎性疼痛。

19.根据权利要求1至8中任一项所述的PICK1抑制剂或根据权利要求14所述的胶束，所述PICK1抑制剂或胶束用于诊断与适应不良的可塑性相关的疾病或障碍。

PICK1的脂质缀合的肽抑制剂

技术领域

[0001] 本发明涉及脂质缀合的二价肽配体,其与蛋白激酶C相互作用蛋白1(PICK1)结合从而抑制PICK1。本发明还涉及所述PICK1抑制剂的治疗和诊断用途。

背景技术

[0002] 突触可塑性充当用于学习和记忆的分子底物。在谷氨酸能突触中,Glu的释放特别激活N-甲基-D天冬氨酸受体(NMDAR)和α-氨基-3-羟基-5-甲基-4-异噁唑-丙酸受体(AMPAR),二者均为配体门控离子通道。这些受体的激活允许AMPAR中的Na+和NMDAR中的Ca2+的流入。

[0003] 在患病状态(如中风和头部损伤后的缺血、神经性疼痛和成瘾)下,异常的突触刺激引起适应不良的可塑性,导致通过钙可渗透(CP)AMPA型谷氨酸受体(CP-AMPAR)的表达所致的谷氨酸能突触的超敏化。

[0004] 尽管许多疾病状态都涉及谷氨酸系统的过度激活或超敏化,但目前唯一使用的靶向谷氨酸系统的药物是用作麻醉剂的NMDA受体拮抗剂,如氯胺酮。已证明由于具有严重副作用的普遍问题,因此开发新的谷氨酸系统靶向药物很困难。诸如神经性疼痛、缺血后的兴奋性毒性和药物成瘾等疾病目前还没有任何有效疗法。因此,存在对于这些疾病的治疗方法的需要。

[0005] 蛋白激酶C相互作用蛋白1(PICK1)是含有PDZ结构域的支架蛋白,其在突触可塑性中发挥重要作用。PICK1主要通过控制AMPAR运输而对AMPAR功能至关重要。PICK1的PDZ结构域直接与AMPA受体(AMPAR)的GluA2亚基的C末端以及蛋白激酶A和C相互作用,从而调节AMPAR磷酸化和表面表达并转而通过调节单独突触的功效来调节突触可塑性。PICK1是细胞内支架蛋白,其主要涉及通过介导和促进经由其PDZ结构域的蛋白质间相互作用(PPI)来调节蛋白质运输和细胞迁移。PICK1的细胞作用的核心是其能够与包括各种蛋白质配偶体在内的许多细胞内分子以及膜磷脂结合并相互作用。PICK1是介导二聚化的功能性二聚体,其中两个PDZ结构域位于中央膜结合BAR结构域的两侧。

[0006] 蛋白质间相互作用(PPI)对于大多数生化和细胞过程至关重要,并且通常由支架和信号转导复合物介导。PPI的最丰富的人促进因子类别是突触后密度蛋白95(PSD-95)/Discs-large/ZO-1(PDZ)结构域家族。突触后密度蛋白中的PDZ结构域蛋白(如PICK1)动态地调节谷氨酸受体的表面表达和活性,因此代表了用于与适应不良的可塑性相关的疾病或障碍的治疗的有吸引力的药物靶标。然而,已证明开发足够有效的对于这些靶标的抑制剂是具有挑战性的。

[0007] 通过使用二价肽配体已成功尝试靶向PSD-95的PDZ结构域。PSD-95包含更多的PDZ结构域,包括共享配体偏好的PDZ1和PDZ2,从而产生了用二价配体靶向两个PDZ结构域的想法。Long等人(2003)提出了第一个二价抑制剂,其仅产生了对PSD-95PDZ12的适度亲和力。后来开发了更成功的二价肽配体(Bach等人2009)。

[0008] 将靶向PSD-95的二聚体肽配体用脂肪酸官能化。发现所述修饰提供了改善的肽血

浆半衰期和皮下稳定性,而不影响对PDZ结构域的亲和力(WO 2015/078477)。

[0009] 如上所述,非常需要提供有效的PICK1-PDZ结构域的抑制剂用于治疗与适应不良的可塑性相关的疾病或障碍。

发明内容

[0010] 本发明提供了一种针对蛋白激酶C相互作用蛋白1(PICK1)的高亲和力肽抑制剂。本发明人已令人惊讶地发现通过将脂质附接至PICK1的二价肽配体可以获得效力的显著增加。这种效力的增加对于提供有效的PICK1-PDZ结构域的抑制剂非常重要,所述抑制剂是开发与适应不良的可塑性相关的疾病或障碍的治疗方法所需的。不受理论的束缚,本公开文本的脂质缀合的二价肽配体的增加的效力被认为是胶束形成的结果,这转而导致在结合时形成更高的PICK1低聚构建体,从而抑制PICK1。从目前使用脂质缀合来提供改善的药代动力学,无法预见这种效力的增加。

[0011] 与直接靶向AMPA受体相比,通过靶向负责所述受体运输的支架蛋白PICK1,降低了所述化合物的可能的副作用风险。本公开文本的化合物将为患有诸如神经性疼痛、缺血后的兴奋性毒性或药物成瘾等病症的患者提供治疗。

[0012] 在第一方面,本公开文本提供了一种包含肽部分和非肽部分的PICK1抑制剂,其中所述肽部分由以下项组成

[0013] a)包含以下通式的氨基酸序列的第一肽:

[0014] $X_1X_2X_3X_4X_5$;和

[0015] b)包含以下通式的氨基酸序列的第二肽:

[0016] $X_1X_2X_3X_4X_5$;

[0017] 其中

[0018] X_1是H、N、F或T,或不存在;

[0019] X_2是W、S、E或Y;或不存在;

[0020] X_3是L、V或I;

[0021] X_4是K、I或R;并且

[0022] X_5是V;

[0023] 并且其中所述非肽部分包含:

[0024] c)将所述第一肽与所述第二肽连接的接头,和

[0025] d)亲脂性脂肪族基团。

[0026] 在第二方面,本公开文本提供了一种包含含有以下项的PICK1抑制剂的胶束

[0027] a)包含以下通式的氨基酸序列的第一肽:

[0028] $X_1X_2X_3X_4X_5$;和

[0029] b)包含以下通式的氨基酸序列的第二肽:

[0030] $X_1X_2X_3X_4X_5$;

[0031] 其中:

[0032] X_1是H、N、F或T,或不存在;

[0033] X_2是W、S、E或Y;或不存在;

[0034] X_3是L、V或I;

[0035] X_4是K、I或R;并且

[0036] X_5是V;

[0037] c)将所述第一肽与所述第二肽连接的接头,和

[0038] d)亲脂性脂肪族基团。

[0039] 在另一方面,本公开文本提供了一种药物组合物,所述药物组合物包含如本文公开的PICK1抑制剂或胶束。

[0040] 在另一方面,提供了如本文公开的PICK1抑制剂、胶束或药物组合物以用作药物。

[0041] 在另一方面,本公开文本提供了一种预防和/或治疗受试者的与适应不良的可塑性相关的疾病或障碍的方法,所述方法包括施用如本文公开的PICK1抑制剂、胶束或药物组合物。

[0042] 在另一方面,提供了一种诊断有需要的受试者的乳腺癌的方法,所述方法包括以下步骤:

[0043] a.从所述受试者获得组织样品;

[0044] b.用包含如本文公开的可检测部分的PICK1抑制剂对所述样品染色;

[0045] c.测定所述样品中PICK1的水平;以及

[0046] d.将所述样品中的PICK1水平与健康标准进行比较,

[0047] 其中所述样品中增加的PICK1水平表明所述个体患有乳腺癌。

[0048] 在另一方面,提供了一种用于预测患有乳腺癌的受试者的预后的方法,所述方法包括以下步骤:

[0049] a.从所述受试者获得组织样品;

[0050] b.用包含如本文公开的可检测部分的PICK1抑制剂对所述样品染色;

[0051] c.测定所述样品中PICK1的水平;以及

[0052] d.将所述样品中的PICK1水平与健康标准进行比较,

[0053] 其中所述样品中增加的PICK1水平表明不良

[0054] 预后。

附图说明

[0055] 图1:由尺寸排阻色谱法(SEC)显示的myr-$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$的浓度依赖性自组装。$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$用于对照。

[0056] 图2:a)使用一系列浓度的myr-$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$的小角X射线散射分析证实myr-$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$自组装成胶束结构。b)对距离分布函数(PDDF),针对不同浓度的myr-$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$。c)PDDF得到的样品参数。M_w/M_{wteo}表明在5-8个单独分子的范围内的myr-$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$的更高阶组装。

[0057] 图3:低聚myr-$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$与PICK1的结合。使用5FAM-$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$(相比于myr-$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$,5nM)或5FAM-HWLKV(相比于HWLKV,20nM)作为示踪剂时myr-$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$(Ki,app=3.0nM,SEM区间[2.3-3.8]nM,n=6)、HWLKV(Ki,app=6998nM,SEM区间[4972-9849]nM,n=3)和$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$(Ki,app=179nM,SEM区间[169-189],n=6)的荧光偏振竞争结合曲线(误差条显示为n=3的SEM)。

[0058] 图4:分别在不存在(灰色)或以4:1的PICK1:myr-$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$比率存在(黑色)

myr-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$的情况下PICK1的SEC洗脱曲线。洗脱曲线清楚地表明形成了更高阶的低聚物。

[0059] 图5:DAT C5(HWLKV)中单个氨基酸取代对结合亲和力的影响。在与荧光标记的HWLKV竞争的荧光偏振结合中测试了在序列HWLKV的位置X_1-X_5具有单个氨基酸取代的95个HWLKV肽的文库。数据以与参考肽HWLKV(设置为1)相比的倍数变化给出,其中较深的阴影指示亲和力增加(最多3倍)且较浅的阴影指示亲和力降低。白色指示结合中断且叉形指示不溶性肽。以%显示的肽不溶于缓冲液,而是溶于10%DMSO。

[0060] 图6:使用组合肽文库的FP竞争测量的亲和力倍数变化,所述组合肽文库结合了来自先前单个取代筛选的单个氨基酸替代。筛选建议NSVRV/TSIRV作为最佳5-mer序列,EIRV/YIIV作为最佳4-mer序列,IIV/IRV作为最佳3-mer序列。无法从最初的5-mer序列HWLKV预测这些序列。x指示不溶性或非结合肽。

[0061] 图7:不含脂质残基但具有不同的PEGx接头的测试的二价PICK1抑制剂的化学结构,所述接头连接至HWLKV的N末端胺(PEG$_0$-(C5)$_2$、PEG$_1$-(C5)$_2$、PEG$_2$-(C5)$_2$、PEG$_3$-(C5)$_2$、PEG$_4$-(C5)$_2$)或连接至序列HWLKV的赖氨酸(K)侧链胺(ac-(HWLK$_{PEG4}$V)$_2$)。

[0062] 图8:各种PEG接头化合物相对于单体C5(HWLKV)肽对纯化的PICK1的亲和力增加倍数。

[0063] 图9a-图9c:a)myr-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$对急性炎性疼痛的功效。体内实验揭示了myr-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$通过多种施用途径缓解炎性疼痛的完全弗氏佐剂模型中的诱发的疼痛的能力。a)皮下施用,b)皮下施用,2、10和50μmol/kg的剂量应答,c)鞘内施用。虚线曲线表示来自用作动物的内部对照的对侧左后爪的数据。所有数据均表示为平均值±SEM。缩写;adm.=施用,BL=基线,CFA=完全弗氏佐剂,i.pl.=足底,i.t.=鞘内,s.c.=皮下。

[0064] 图10:myr-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$对神经性疼痛的功效。体内实验揭示了myr-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$在疼痛的神经性SNI模型中缓解诱发的疼痛的能力。虚线曲线表示来自用作动物的内部对照的对侧左后爪的数据。所有数据均表示为平均值±SEM。缩写;PWT=缩爪阈值,SNI=保留性神经损伤。

[0065] 图11:小鼠经受SNI手术,并且在手术后9天,通过von Frey细丝证实了同侧后爪对von Frey细丝的反应阈值降低,这对应于神经性疼痛病症。在第9天,用10μmol/kg未脂化的NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$(灰色)处理小鼠,这没有引发疼痛缩爪阈值的显著增加。为了比较,显示了来自图10的对10μmol/kg myr-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$的反应(黑色虚线)。所有数据均表示为平均值±SEM。缩写;PWT=缩爪阈值,SNI=保留性神经损伤。

[0066] 图12:myr-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$在慢性疼痛1年后的效果。小鼠经受SNI手术并且在手术后2天,通过von Frey细丝证实同侧后爪对von Frey细丝的反应阈值降低,其中每月观察一次,持续1年(数据未显示)。在52周后,用10μmol/kg myr-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$处理小鼠,这在5h时产生了非常显著的PWT缓解。所有数据均表示为平均值±SEM。缩写;PWT=缩爪阈值,SNI=保留性神经损伤。

[0067] 图13:myr-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$对糖尿病性神经病变的功效。向小鼠给予单次腹膜内注射200μg/mL链脲佐菌素溶液以诱导糖尿病(STZ模型),并在注射前和注射后7天测试血糖。在手术后13天,通过von Frey细丝证实了同侧后爪对von Frey细丝的反应阈值降低,这对应于糖尿病性神经病变。皮下注射myr-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$显示出PWT的剂量依赖性增加,其功

效与普瑞巴林相似。所有数据均表示为平均值±SEM。缩写;PWT＝缩爪阈值,STZ＝链脲佐菌素。

[0068] 图14:PDZ结合基序的变体的功效。向小鼠的右后爪足底注射50μL的CFA。在CFA注射后第2天,向小鼠皮下注射0.4μmol/kg如图所示的具有C5序列取代基的myr-$NPEG_4$肽,并在第5天皮下注射2μmol/kg如图所示的具有C5序列取代基的myr-$NPEG_4$肽。用0.4μmol/kg myr-$NPEG_4$-$(NSVRV)_2$处理显著增加PWT,而2μmol/kg myr-$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$和myr-$NPEG_4$-$(SVRV)_2$显著增加PWT。在2μmol/kg下,myr-$NPEG_4$-$(NSVRV)_2$未充分溶解。所有数据均表示为平均值±SEM。缩写;PWT＝缩爪阈值,CFA＝完全弗氏佐剂。

[0069] 图15:myr-$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$缓解自发性疼痛的功效。向小鼠的右后爪足底注射50μL CFA,然后在带条纹的隔室中进行单次盐水注射,并且在左侧所示的设备的灰色隔室中进行单次myr-$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$注射(30μmol/kg)。在另一天,对隔室的偏好通过在每个隔室中所耗费的时间来确定。注射CFA的小鼠在它们被注射myr-$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$的隔室中耗费显著增加的时间量,这表明自发性疼痛的缓解。未处理小鼠(未用CFA处理)对myr-$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$的单次施用未显示出位置偏好。

[0070] 图16:myr-$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$的剂量依赖性血浆暴露。将myr-$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$以如图所示三个不同的剂量皮下施用至小鼠,并通过LC-MS测定不同时间处的血浆暴露。血浆浓度在注射后1h以剂量依赖性方式达到峰值并随着线性动力学而降低,但显示出与非脂化肽Tat-$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$相比无寿命增加。

[0071] 图17:myr-$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$的溶解度。以130mM(250mg/ml)溶解在PBS中的myr-$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$的照片。

[0072] 图18:本发明的不同化合物在炎性疼痛的动物模型中的功效测试的结果。向小鼠的右后爪足底注射50μL的CFA。在CFA注射后的第2-5天,向小鼠皮下注射2μmol/kg如图所示具有脂质取代基(X)的X-$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$。所有数据均表示为平均值±SEM。缩写;PWT＝缩爪阈值,CFA＝完全弗氏佐剂。

[0073] A:不饱和脂肪酸和脂肪二元酸。

[0074] B:脂肪酸长度。

[0075] C:氨基酸加合物和胆固醇。

[0076] 图19:mPD5对热超敏性的功效。向小鼠的右后爪足底注射50μL的CFA。在CFA注射后第3天,在Hargreaves测试中对用激光束刺激的PWL的降低证实了热超敏性。向小鼠皮下注射10μmol/kg(10μl PBS/g)的myr-$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$(mPD5)导致CFA注射爪(同侧)的PWL显著增加而不影响健康(对侧)爪的PWL。PBS注射不影响任何爪的PWL,n＝6只小鼠/组。所有数据均表示为平均值±SEM。缩写;PWT＝缩爪潜伏期,CFA＝完全弗氏佐剂。

具体实施方式

[0077] 定义

[0078] 本文的非肽是指PICK1抑制剂中不包含肽的一部分。肽应理解为包含经由一个或多个酰胺键连接的两个或更多个α-氨基酸或β-氨基酸。因此,非肽是指不包含经由一个或多个酰胺键连接的两个或更多个α-氨基酸或β-氨基酸的化合物。非肽部分可以包含单个氨基酸。

[0079] 本文的亲脂性脂肪族基团是指具有亲脂性特征的脂肪族基团。其可以包含脂肪族链或脂肪族环。如本文所用的术语脂质是指这种亲脂性脂肪族基团。所述亲脂性脂肪族基团可以包含官能团，所述官能团可以用于将亲脂性脂肪族基团附接至例如NPEG接头以形成本公开文本的PICK1抑制剂。亲脂性脂肪族基团的例子包括但不限于脂肪酸、甾烷、甾醇和类固醇。

[0080] 本文中的二价是指包含两个用于协调的位点(如包含两个能够协调与蛋白质(如PICK1)的结合的肽配体)的化合物。如本文所提及的二价肽配体可以是包含经由接头缀合的两个肽配体如以形成肽的二聚体的化合物。因此，如本文公开的二价肽配体也可以被称为二聚体肽配体。

[0081] 本文的官能团是指化合物中存在的化学基团。官能团包含反应性(如作为亲核试剂或亲电试剂)，并且可以用于将所述化合物与其他化合物缀合。官能团的例子包括但不限于羧酸、醇和胺。

[0082] 本文中的胶束结构或胶束是指PICK1抑制剂的排列。由于本文使用了所述术语，因此胶束在水溶液中具有如下排列，其中非极性尾向内且极性头向外(实施例3)。

[0083] 回转半径(R_g)是指主体的各种颗粒距所述主体的旋转轴的均方根距离。因此，回转半径是对所述主体大小的量度。

[0084] 本文中的可检测部分是指引起可检测信号的部分。可以使用本领域普通技术人员已知的用于检测的常规部分，如荧光团、发色团、放射性同位素或酶。

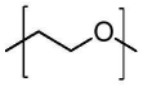
[0085] 根据IUPAC的建议，本文使用其1字母或3字母代码命名蛋白质氨基酸，参见例如http://www.chem.qmw.ac.uk/iupac。如果没有特别规定，氨基酸可以是D型或L型。在优选的实施方案中，本公开文本的氨基酸是L-氨基酸。

[0086] 本文中的α-羧酸是指与氨基酸的α-碳缀合的羧酸。

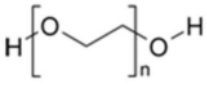
[0087] 本文中的α-胺是指与α-氨基酸的α-碳缀合的胺。

[0088] 本文中的β-胺是指与β-氨基酸的β-碳缀合的胺。

[0089] 乙二醇部分在此是指构成PEG或NPEG接头的结构单元。“乙二醇部分”的更技术的名称是“氧基乙烯”，并且所述单元的化学式如下所示：

[0090] 

[0091] PEG、聚乙二醇;PEG是乙二醇的聚合物，其具有$C_{2n+2}H_{4n+6}O_{n+2}$的化学式，并且重复结构为：

[0092] 

[0093] 其中PEG_x是指具有x个重复乙二醇单元的PEG接头，例如PEG_4，其对应于4个乙二醇部分的聚合物(x＝4)。PEG_0是指具有x＝0的接头并且是指包含经由每个丙酸部分的C3碳通过醚键共价结合的两个丙酸的接头。这种结构在本文中称为PEG_0(图7)并且具有根据式(III)的结构：

[0094] 

式 (III)。

[0095] NPEG是本文所述的接头类型，其源自经典的PEG接头，其中一个或多个骨架氧原子被氮原子替代。$NPEG_x$是指具有x个重复乙二醇单元的NPEG接头，例如$NPEG_4$，其对应于4个乙二醇部分的聚合物(x＝4)，其中一个或多个骨架氧原子被氮原子替代。$NPEG_0$是指如上定义的具有x＝0的接头，其中醚被胺替代。

[0096] PDZ，结合了被发现共享所述结构域的前三种蛋白质即突触后密度蛋白95(PSD-95)、果蝇同源物discs large肿瘤抑制因子(DlgA)和紧密连接蛋白1(zo-1)的首字母的首字母缩略词。PDZ结构域是信号传导蛋白中发现的80-90个氨基酸的常见结构域。含有PDZ结构域的蛋白质通常在将膜中的受体蛋白锚定至细胞骨架组分中起关键作用。

[0097] 酰胺键是通过羧酸与胺之间的反应形成的(通过同时消除水)。当所述反应发生在两个氨基酸残基之间时，由于所述反应而形成的键被称为肽连接(肽键)。

[0098] 酯键是通过羧酸与醇之间的反应形成的(通过同时消除水)。

[0099] Von Frey测试使用von Frey细丝评估触摸灵敏度。在小鼠安顿在具有穿孔地板的受限区域内的舒适位置后，将这些细丝施加到爪子的下面。细丝被校准为当向爪子施加设定的力时弯曲。细丝按渐增的硬度来呈现，直到检测到缩爪。

[0100] 不存在应理解为与不存在的氨基酸直接相邻的氨基酸残基通过常规的酰胺键彼此直接连接。

[0101] AMPAR也可以被称为AMPA受体、AMPA型谷氨酸受体或α-氨基-3-羟基-5-甲基-4-异噁唑丙酸(AMPA)受体，其是介导中枢神经系统(CNS)中的快速突触传递的谷氨酸的离子型跨膜受体。PICK1经由PDZ结构域与AMPAR相互作用。

[0102] 二价PICK1抑制剂的化学结构

[0103] 本公开文本提供了PICK1抑制剂，其包含能够与PICK1结合的二价肽配体，所述二价肽配体进一步与脂质缀合。脂质缀合的二价肽配体提供高效的PICK抑制剂，其可以用于治疗与适应不良的可塑性相关的疾病或障碍。

[0104] 在一个实施方案中，提供了一种包含肽部分和非肽部分的PICK1抑制剂，其中所述肽部分由以下项组成：

[0105] a)包含以下通式的氨基酸序列的第一肽：

[0106] $X_1X_2X_3X_4X_5$；和

[0107] b)包含以下通式的氨基酸序列的第二肽：

[0108] $X_1X_2X_3X_4X_5$；

[0109] 其中

[0110] X_1是H、N、F或T，或不存在；

[0111] X_2是W、S、E或Y；或不存在；

[0112] X_3是L、V或I；

[0113] X_4是K、I或R；并且

[0114] X_5是V；

[0115] 并且其中所述非肽部分包含：

[0116] c)将所述第一肽与所述第二肽连接的接头，和

[0117] d)亲脂性脂肪族基团。

[0118] 在一个实施方案中，提供了一种包含肽部分和非肽部分的PICK1抑制剂，其中所述肽部分由以下项组成：

[0119] a)由以下通式的氨基酸序列组成的第一肽：

[0120] $X_1X_2X_3X_4X_5$；和

[0121] b)由以下通式的氨基酸序列组成的第二肽：$X_1X_2X_3X_4X_5$；

[0122] 其中

[0123] X_1是H、N、F或T，或不存在；

[0124] X_2是W、S、E或Y；或不存在；

[0125] X_3是L、V或I；

[0126] X_4是K、I或R；并且

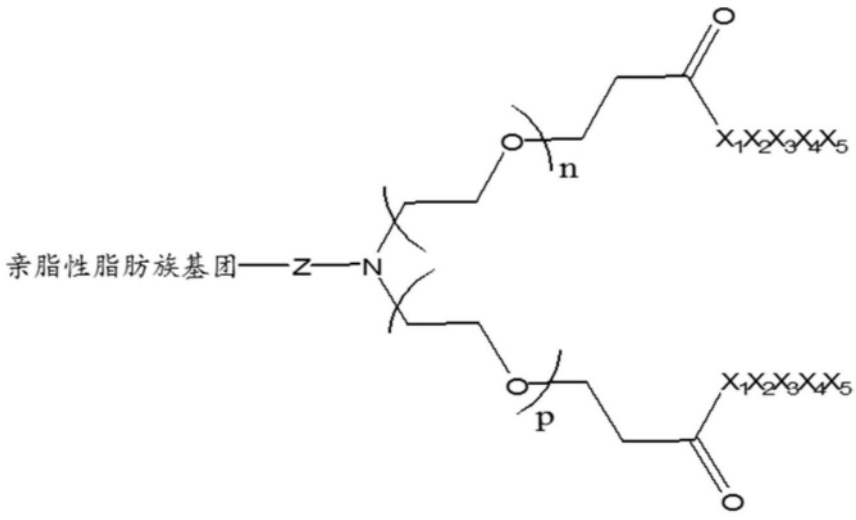
[0127] X_5是V；

[0128] 并且其中所述非肽部分包含：

[0129] c)将所述第一肽与所述第二肽连接的接头，和

[0130] d)亲脂性脂肪族基团。

[0131] 在一个实施方案中，所述PICK1抑制剂具有式(I)的一般结构：

[0132] 

式 (I)，

[0133] 其中

[0134] Z是键或单个氨基酸；

[0135] n是0到12的整数；

[0136] p是0到12的整数。

[0137] 肽部分

[0138] 本公开文本的PICK1抑制剂的肽配体部分提供了所述PICK1抑制剂与PICK1的PDZ结构域的结合。本公开文本的PICK1抑制剂的肽部分包含第一肽和第二肽。在一个实施方案中，所述第一肽和所述第二肽是相同的。在单独的实施方案中，所述第一肽和所述第二肽彼此不同。在一个实施方案中，所述第一肽和所述第二肽经由接头连接，如以形成二价肽配体。

[0139] 在一个实施方案中，所述第一肽和/或所述第二肽选自HWLKV(SEQ ID NO:54)、FEIRV(SEQ ID NO:34)、NSIIV(SEQ ID NO:5)、NSVRV(SEQ ID NO:8)、NSLRV(SEQ ID NO:53)、NSIRV(SEQ ID NO:6)、NYIIV(SEQ ID NO:13)、NYIRV(SEQ ID NO:14)、TSIRV(SEQ ID NO:18)、YIIV(SEQ ID NO:49)、SVRV(SEQ ID NO:44)、EIRV(SEQ ID NO:46)、LRV、IIV、VRV和IRV。

[0140] 在一个实施方案中，所述第一肽和/或所述第二肽选自HWLKV、NSVRV、NSLRV、NSIRV、TSIRV、EIRV、YIIV、IIV、VRV和IRV。

[0141] 在一个实施方案中，所述第一肽和/或所述第二肽选自NSVRV、NSLRV、NSIRV、TSIRV、EIRV、YIIV、IIV、VRV和IRV。

[0142] 在一个实施方案中，所述第一肽和/或所述第二肽选自HWLKV、FEIRV、NSIIV、NSVRV、NSLRV、NSIRV、YIIV、SVRV、VRV和LRV。

[0143] 在一个实施方案中，所述第一肽和/或所述第二肽选自FEIRV、NSIIV、NSVRV、NSLRV、NSIRV、YIIV、SVRV、VRV和LRV。

[0144] 在一个实施方案中，所述第一肽和/或所述第二肽是HWLKV、NSVRV或NSIRV。

[0145] 在一个实施方案中，所述第一肽和/或所述第二肽是HWLKV。

[0146] 在一个实施方案中，所述第一肽和/或所述第二肽包含以下通式的氨基酸序列：$X_1X_2X_3X_4X_5$，其中：

[0147] X_1是N、F或T，或不存在；

[0148] X_2是S、E或Y；或不存在；

[0149] X_3是V、L或I；

[0150] X_4是I或R；并且

[0151] X_5是V。

[0152] 在一个实施方案中，所述第一肽和/或所述第二肽包含以下通式的氨基酸序列：$X_1X_2X_3X_4X_5$，其中：

[0153] X_1是N或T，或不存在；

[0154] X_2是S、E或Y；或不存在；

[0155] X_3是V、L或I；

[0156] X_4是I或R；并且

[0157] X_5是V。

[0158] 在一个实施方案中，所述第一肽和/或所述第二肽包含以下通式的氨基酸序列：$X_1X_2X_3X_4X_5$，其中：

[0159] X_1是N或F，或不存在；

[0160] X_2是S、E或Y；或不存在；

[0161] X_3是V、L或I；

[0162] X_4是I或R；并且

[0163] X_5是V。

[0164] 在一个实施方案中，所述第一肽和/或所述第二肽包含具有如下长度的氨基酸序列，所述长度在3至15个氨基酸范围内，如在3至14个氨基酸范围内，例如在3至13个氨基酸范围内，如在3至12个氨基酸范围内，例如在3至11个氨基酸范围内，如在3至10个氨基酸范

围内，例如在3至9个氨基酸范围内，如在3至8个氨基酸范围内，例如在3至7个氨基酸范围内，如在3至6个氨基酸范围内，例如在3至5个氨基酸范围内。

[0165] 在优选的实施方案中，所述第一肽和/或所述第二肽包含如下氨基酸序列，其具有在3至5个氨基酸范围内的长度，如具有3个氨基酸的长度，如具有4个氨基酸的长度，如具有5个氨基酸的长度。

[0166] 如本公开文本的实施例12和图14所示，包含由具有5、4或3个氨基酸长度的第一肽和第二肽组成的肽部分的PICK1抑制剂显示出在减轻疼痛如减轻炎性疼痛方面的功效。

[0167] 先前已经证明了包含本公开文本的第一肽和/或第二肽的序列的较长肽对PICK1的相似或更高的亲和力(WO 2020/083905)。

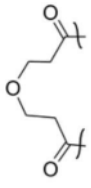
[0168] 非肽部分

[0169] 本公开文本的PICK1抑制剂包含非肽部分。PICK1抑制剂的非肽部分包含接头，其使所述第一肽和所述第二肽结合如以形成二价肽配体。所述非肽部分进一步包含可与所述接头缀合的脂质。在一个实施方案中，所述脂质与所述接头的氮原子直接连接。

[0170] 在单独的实施方案中，所述非肽部分进一步包含单个氨基酸。应当理解，如上所定义，所述非肽部分中单个氨基酸的存在不会将肽引入所述非肽部分中。如上文所定义，肽应理解为包含经由酰胺键连接的两个或更多个α-氨基酸或β-氨基酸。单个氨基酸的存在不会引入所定义的这种肽。在一个实施方案中，存在于非肽部分中的单个氨基酸的作用是提供用于附接可检测部分的柄。

[0171] 接头

[0172] 在一个实施方案中，所述接头是NPEG接头。所述NPEG接头可以包含在0至24个范围内的其中一个或多个骨架氧原子被氮原子替代的乙二醇部分，如在0至20个范围内，例如在0至16个范围内，如在0至14个范围内，例如在0至12个范围内，例如在0至10个范围内，如在0至8个范围内，例如在0至6个范围内，如在0至4个范围内，例如在0至2个范围内的其中一个或多个骨架氧原子被氮原子替代的乙二醇部分。优选地，所述NPEG接头包含4个乙二醇部分，其中一个或多个骨架氧原子被氮原子替代。在一个实施方案中，所述NPEG接头包含3个乙二醇部分，其中一个或多个骨架氧原子被氮原子替代。在一个实施方案中，所述NPEG接头包含2个乙二醇部分，其中一个或多个骨架氧原子被氮原子替代。在一个实施方案中，所述NPEG接头包含1个乙二醇部分，其中一个或多个骨架氧原子被氮原子替代。在一个实施方案中，所述NPEG接头包含0个乙二醇部分，其中一个或多个骨架氧原子被氮原子替代，即所述接头具有如图7中公开的PEG_0的结构，其中氧原子被氮替代。如上所定义，所述$NPEG_0$接头是指具有x＝0的接头并且是指包含经由每个丙酸部分的C3碳以胺键结合的两个丙酸部分的接头。在一个实施方案中，所述接头具有根据式(III)的结构，

[0173] ，式 (III)。

[0174] 在一个实施方案中，所述接头是NPEG接头。所述NPEG接头可以包含在1至24个范围内的乙二醇部分(其中一个或多个骨架氧原子被氮原子替代)，如在1至20个范围内，例如在1至16个范围内，如在1至14个范围内，例如在1至12个范围内，例如在1至10个范围内，如在1

至8个范围内，例如在1至6个范围内，如在1至4个范围内，例如在1至2个范围内的乙二醇部分(其中一个或多个骨架氧原子被氮原子替代)。

[0175] 所述NPEG接头的一个或多个氮原子可以位于沿所述NPEG接头的任何位置，例如像位于所述NPEG接头的中间或位于靠近所述NPEG接头的一端。

[0176] 在一个实施方案中，所述NPEG接头的一个骨架氧被氮原子替代。

[0177] 所述NPEG接头在每一端均包含官能团以提供与所述第一肽和所述第二肽的缀合。在一个实施方案中，所述NPEG接头在每一端均包含羧酸。所述NPEG接头的羧酸可以与所述第一肽和所述第二肽的N末端结合以提供所述接头经由酰胺键与所述第一肽和所述第二肽的缀合。

[0178] 亲脂性脂肪族基团

[0179] 本公开文本的PICK1抑制剂的非肽部分包含脂质。所述脂质可以直接与所述接头缀合或可以经由单个氨基酸与所述接头缀合。

[0180] 本公开文本的脂质是亲脂性脂肪族基团。本公开文本的PICK1抑制剂的非肽部分中存在的亲脂性脂肪族基团可以是脂肪族链或脂肪族环。

[0181] 在一个实施方案中，所述亲脂性脂肪族基团是脂肪族链。所述脂肪族链可以是支链或非支链。所述脂肪族链可以是饱和链或不饱和链。

[0182] 在一个实施方案中，所述亲脂性脂肪族基团是脂肪族环。所述脂肪族环可以包含甾烷结构，如甾醇。可替代地，所述脂肪族环可以包含类固醇，如胆固醇。在实施例16中证明了具有胆固醇的构建体在疼痛的动物模型中具有活性。优选地，所述胆固醇部分经由氨基酸(例如像天冬酰胺，例如βAsp)与N-PEG连接。

[0183] 在一个实施方案中，本公开文本的PICK1抑制剂的非肽部分中存在的亲脂性脂肪族基团进一步包含官能团，如羧酸、醇或胺。所述官能团提供了所述亲脂性脂肪族基团与所述PICK1抑制剂的其余部分的缀合，如与所述接头直接缀合或经由单个氨基酸与所述接头缀合。

[0184] 在一个实施方案中，所述亲脂性脂肪族基团包含醇。

[0185] 在一个实施方案中，所述亲脂性脂肪族基团包含羧酸。

[0186] 在一个实施方案中，所述亲脂性脂肪族基团是包含羧酸的脂肪族链，因此是脂肪酸。

[0187] 所述亲脂性脂肪族基团可以是C_4-C_{26}脂肪酸。所述亲脂性脂肪族基团可以是饱和脂肪酸或不饱和脂肪酸。在一个实施方案中，所述亲脂性脂肪族基团是C_{16}脂肪酸或C_{18}脂肪酸。

[0188] 在一个实施方案中，所述亲脂性脂肪族基团包含在4-26个范围内的碳原子，如在4至24个范围内，例如在4至22个范围内，如在4至20个范围内，例如在4至18个范围内，如在4至16个范围内，例如在4至14个范围内，如在4至12个范围内，例如在4至10个范围内，如在4至8个范围内，例如在4至6个范围内的碳原子。

[0189] 在一个实施方案中，所述亲脂性脂肪族基团包含在4至26个范围内的碳原子，如在6至26个范围内，例如在8至26个范围内，如在10至26个范围内，例如在12至26个范围内，如在14至26个范围内，例如在16至26个范围内，如在18至26个范围内，例如在20至26个范围内，如在22至26个范围内，例如在24至26个范围内的碳原子。

[0190] 在一个实施方案中，所述亲脂性脂肪族基团包含在4至26个范围内的碳原子，如在6至24个范围内，例如在8至22个范围内，如在10至20个范围内，例如在12至18个范围内，如在14至18个范围内，例如在14至16个范围内的碳原子或在16至18个范围内的碳原子。

[0191] 在一个实施方案中，所述亲脂性脂肪族基团选自乙酸、丁酸、己酸、辛酸、癸酸、月桂酸、肉豆蔻酸、棕榈酸、十七烷酸、硬脂酸、花生酸、山嵛酸、二十四烷酸、蜡酸、癸烯酸、月桂烯酸、肉豆蔻油酸、棕榈烯酸、油酸、亚油酸、亚麻酸、烯酸、芥酸。在优选的实施方案中，所述亲脂性脂肪族基团选自癸酸、月桂酸、肉豆蔻酸、棕榈酸、十七烷酸、硬脂酸。在更优选的实施方案中，所述亲脂性脂肪族基团是肉豆蔻酸。

[0192] 在亲脂性脂肪族基团是脂肪酸部分的实施方案中，其可以是饱和的或不饱和的顺式或反式构型。实施例16证明了对于C14脂肪酸部分，不饱和(顺式或反式)和饱和部分在体内具有相似的作用。在一个实施方案中，所述脂肪酸部分是多不饱和的，如具有一个、两个或三个双键。在一些实施方案中，一个双键在n-3或n-6位置。

[0193] 可以通过在与羧酸基团相反的一端具有另外的官能团来修饰脂肪酸部分。这种官能团可以是另外的羧酸、醇、酮或醛。实施例16证明了亲脂性脂肪族基团可以包含末端羧酸并且在疼痛的动物模型中具有功效。

[0194] 在一个实施方案中，所述亲脂性脂肪族基团是肉豆蔻酸，在本文中也被称为肉豆蔻酰基或myr。

[0195] 在一个实施方案中，所述亲脂性脂肪族基团选自肉豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸、二十二碳六烯酸(DHA)和顺式-9-十八碳烯酸。

[0196] 在一个实施方案中，所述亲脂性脂肪族基团是二酸，例如像十四烷二酸、十六烷二酸或十八烷二酸。

[0197] 任选的氨基酸

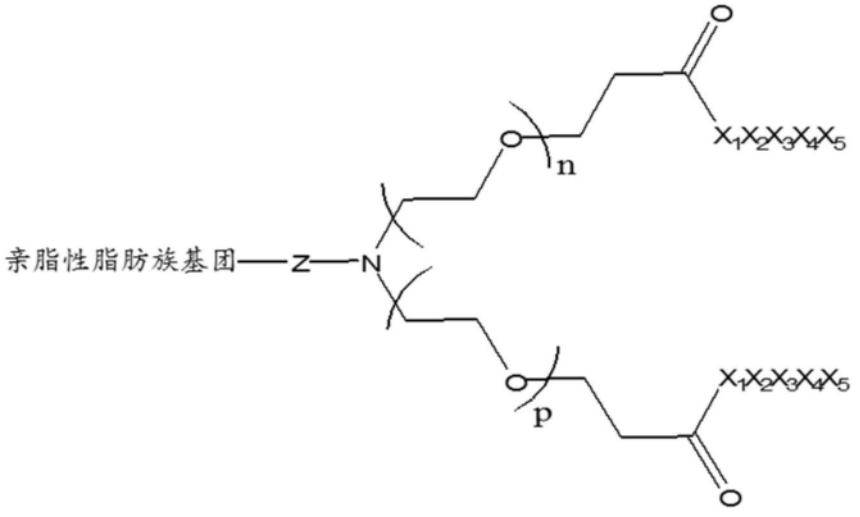
[0198] 所述非肽部分可以进一步包含单个氨基酸。存在于所述非肽部分中的这种单个氨基酸可以用于提供用于附接所述亲脂性脂肪族基团或用于附接可检测部分的柄。

[0199] 在一个实施方案中，所述一个氨基酸是α-氨基酸或β-氨基酸。所述一个氨基酸可以选自Asp、β-Asp、β-Ser(3-氨基-2-(羟甲基)丙酸)、β-高-Ser(3-氨基-4-羟基丁酸)和β-Lys(3,6-二氨基己酸)。

[0200] 如本发明人在实施例11中所示，所述亲脂性脂肪族基团对于本发明在体内具有功能作用是必需的。

[0201] 连接性

[0202] 在一个实施方案中，本公开文本的PICK1抑制剂的肽和非肽部分缀合以形成具有式(I)的一般结构的PICK1抑制剂。

[0203] 

式 (I)。

[0204] 应当理解,例如当亲脂性脂肪族基团被描述为脂肪酸时,只有脂肪酸的羧酸的羰基基团存在于所述PICK1抑制剂中。在脂肪酸与例如接头的胺缀合时,形成了酰胺键并伴随失水。因此,组合以形成本公开文本的PICK1抑制剂的不同组分可以从所描述的化合物产生。在亲脂性脂肪族基团为二酸的特定情况下,在一个实施方案中,仅一个羧酸与接头的胺反应形成酰胺,而第二个羧酸在最终的PICK1抑制剂中仍然是羧酸。

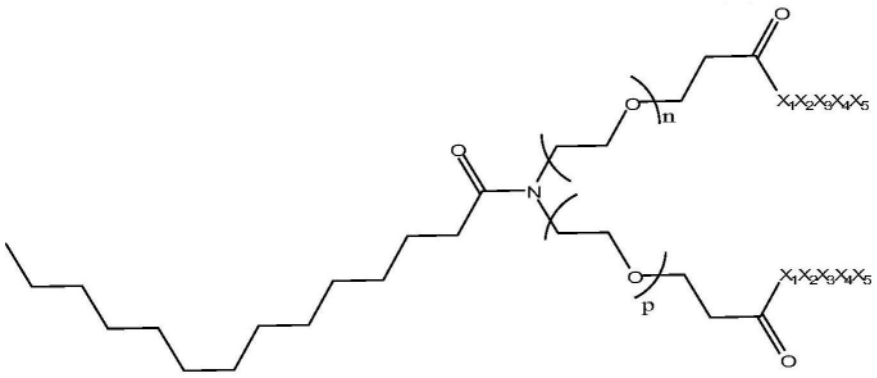
[0205] 本公开文本的NPEG接头可以例如在每一端包含羧酸。应当理解,在PICK1抑制剂中发现的所得NPEG接头不包含羧酸,而仅包含在将NPEG接头与所述第一肽和/或所述第二肽缀合时形成的酰胺键中存在的羰基基团。因此,在一个实施方案中,所述NPEG接头经由在NPEG接头的羧酸与所述第一肽和/或所述第二肽的N末端之间形成的酰胺键与所述第一肽和/或所述第二肽缀合。在一个实施方案中,所述NPEG接头经由在NPEG接头的羧酸与所述第一肽和/或所述第二肽中的氨基酸的侧链官能团之间形成的酰胺键与所述第一肽和/或所述第二肽缀合,如通过在NPEG接头的羧酸与所述第一肽和/或所述第二肽中的赖氨酸侧链的胺之间形成酰胺键从而形成酰胺。

[0206] 所述NPEG接头的氮原子可以进一步直接或经由单个氨基酸与亲脂性脂肪族基团缀合。因此,在一个实施方案中,所述亲脂性脂肪族基团经由诸如羧酸的官能团与NPEG接头的氮原子缀合,如通过形成酰胺缀合。

[0207] 在一个实施方案中,单个氨基酸经由α-羧酸与NPEG接头的氮原子缀合以形成酰胺并进一步与亲脂性脂肪族基团缀合。与亲脂性脂肪族基团的进一步缀合可以是经由α-胺或β-胺(分别为α-氨基酸或β-氨基酸)形成酰胺键或经由侧链官能团(如羧酸、醇或胺)形成酰胺键或酯键。

[0208] 优选的结构

[0209] 在一个实施方案中,所述PICK1抑制剂具有根据式(II)的结构

[0210] 

式 (II),

[0211] 其中

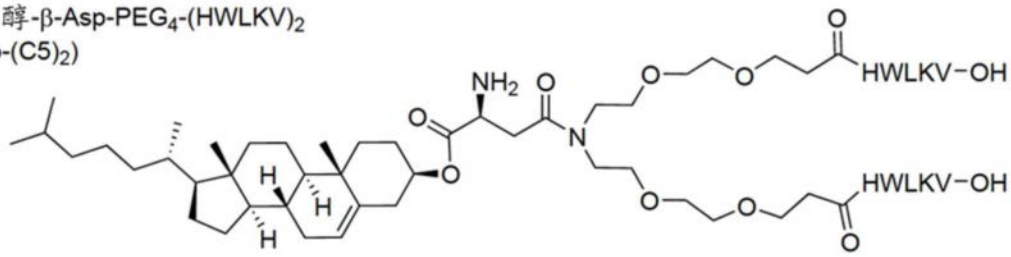
[0212] n是0到12的整数,优选2;

[0213] p是0到12的整数,优选2。

[0214] 在优选的实施方案中,所述PICK1抑制剂具有根据式(II)的结构,其中n是2且p是2。这种结构在本文中被称为myr-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$。

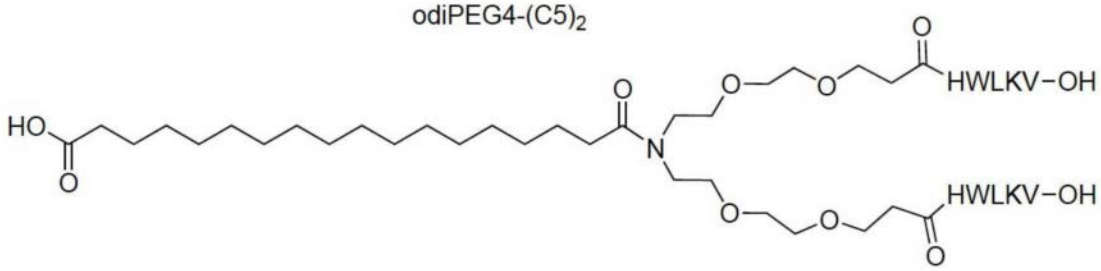
[0215] 下文公开了其他优选结构。所述不饱和可以呈反式或顺式构型。

胆固醇-β-Asp-PEG$_4$-(HWLKV)$_2$
(ChoAsp-(C5)$_2$)



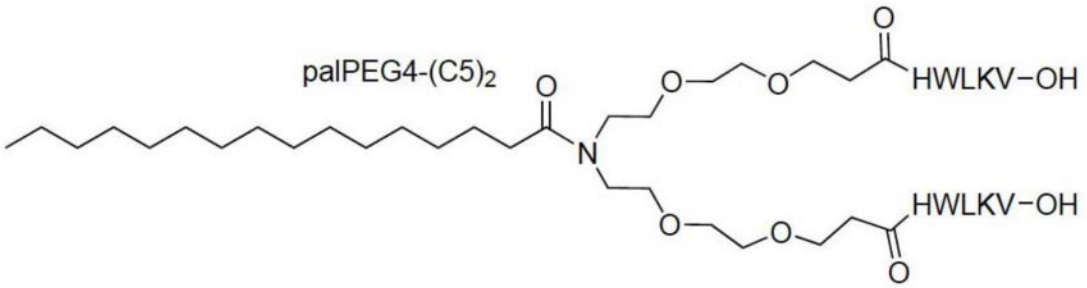
式 (IV)

[0216] odiPEG4-(C5)$_2$

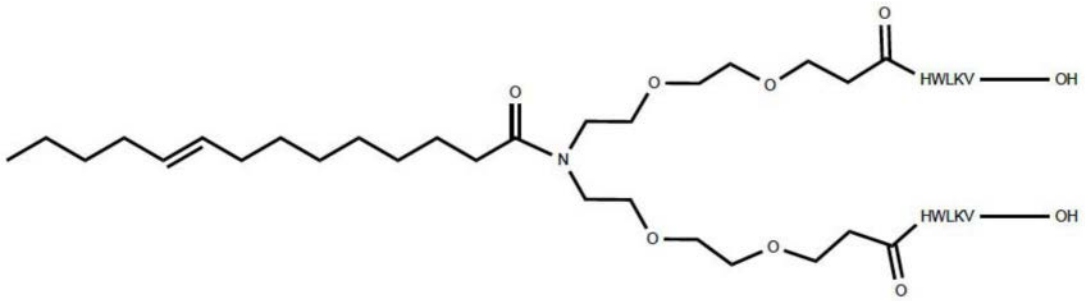


式 (V)

palPEG4-(C5)$_2$



式 (VI)

[0217] 

式 (VII)

[0218] 作用机制

[0219] 如本公开文本实施例3中所证明,已令人惊讶地发现本发明的PICK1抑制剂能够形成胶束结构。假设本发明的PICK1抑制剂与不包含脂质并因此不能形成胶束结构的二价肽配体相比改善的效力是由于形成了这种胶束结构。

[0220] 已知PICK1以二聚体构象存在,其中二聚化是由BAR结构域介导的。据报道,二聚体PICK1的二聚化提供了二聚体的二聚体如四聚体,其导致蛋白质功能的自动抑制(Karlsen,M.L.等人2015)。因此可以假设胶束PICK1抑制剂能够结合并汇集若干种PICK1蛋白,从而导致观察到的对PICK1的有效抑制。

[0221] 因此,在一个实施方案中,所述PICK1抑制剂在溶液中自组装成更高阶的结构,如自组装以形成胶束结构。

[0222] 在一个实施方案中,所述更高阶的结构具有至少15 Å的回转半径(Rg),如至少17 Å,例如至少19 Å,如至少20 Å,例如至少21 Å,如至少22 Å,例如至少23 Å。

[0223] 在一个实施方案中,所述更高阶的结构具有至少15 Å的回转半径(Rg),如至少17 Å,例如至少19 Å,如至少20 Å,例如至少21 Å,如至少22 Å,例如至少23 Å,如至少24 Å,例如至少25 Å,如至少26 Å,例如至少27 Å,如至少28 Å,例如至少29 Å,如至少30 Å,例如至少31 Å。

[0224] 在一个实施方案中,所述更高阶的结构是由在4至20个范围内的PICK1抑制剂形成的,如在4至18个范围内,例如在4至16个范围内,如在4至14个范围内,例如在4至12个范围内,如在4至10个范围内,例如在4至8个范围内,如在6至8个范围内的PICK1抑制剂形成。

[0225] 在一个实施方案中,所述更高阶的结构是由在4至40个范围内的PICK1抑制剂形成的,如在6至40个范围内,例如在8至40个范围内,如在10至40个范围内,例如在12至40个范围内,如在14至40个范围内,例如在16至40个范围内,如在18至40个范围内,例如在20至40个范围内,如在22至40个范围内,例如在24至40个范围内,如在26至40个范围内,例如在28至40个范围内,如在30至40个范围内,例如在32至40个范围内,如在34至40个范围内,例如在36至40个范围内,如在38至40个范围内的PICK1抑制剂形成的。

[0226] 在一个实施方案中,所述更高阶的结构是由在4至40个范围内的PICK1抑制剂形成的,如在4至38个范围内,例如在4至36个范围内,如在4至34个范围内,例如在4至32个范围内,如在4至30个范围内,例如在4至28个范围内,如在4至26个范围内,例如在4至24个范围内,如在4至22个范围内,例如在4至20个范围内,如在4至18个范围内,例如在4至16个范围内,如在4至14个范围内,例如在4至12个范围内,如在4至10个范围内,例如在4至8个范围

内，如在4至6个范围内的PICK1抑制剂形成的。

[0227] 在一个实施方案中，所述更高阶的结构是由在4至40个范围内的PICK1抑制剂形成的，如在6至38个范围内，例如在6至36个范围内，如在8至34个范围内，例如在8至32个范围内，如在10至30个范围内，例如在10至28个范围内，如在12至26个范围内，例如在14至24个范围内，如在16至24个范围内，例如在16至22个范围内，如在18至22个范围内，例如在19至21个范围内如20个PICK1抑制剂形成的。

[0228] 在一个实施方案中，提供了一种包含如本文公开的PICK1抑制剂的胶束。

[0229] 在一个实施方案中，提供了一种包含PICK1抑制剂的胶束，所述PICK1抑制剂含有

[0230] a)包含以下通式的氨基酸序列的第一肽：

[0231] $X_1X_2X_3X_4X_5$；和

[0232] b)包含以下通式的氨基酸序列的第二肽：

[0233] $X_1X_2X_3X_4X_5$；

[0234] 其中：

[0235] X_1是H、N、F或T，或不存在；

[0236] X_2是W、S、E或Y；或不存在；

[0237] X_3是L、V或I；

[0238] X_4是K、I或R；并且

[0239] X_5是V；

[0240] c)将所述第一肽与所述第二肽连接的接头，和

[0241] d)亲脂性脂肪族基团。

[0242] 如本文所证明，本公开文本的PICK1抑制剂能够与PICK1的PDZ结构域结合。

[0243] 在天然PICK1二聚体构象中，所述PICK1二聚体的PDZ结构域之间的距离估计为约180 Å。在包含具有4个乙二醇部分的长度的NPEG接头的PICK1抑制剂中，所述第一肽与所述第二肽之间的距离估计跨越约43 Å。因此，这种PICK1抑制剂将无法结合在单个PICK1二聚体中发现的两个PDZ结构域。这支持了以下假说：如本文公开的单个PICK1抑制剂将通过结合并汇集两个PICK1二聚体从而导致对PICK1的抑制。因此，如本文公开的由若干个PICK1抑制剂形成的胶束结构很可能能够结合并汇集两个或更多个PICK1二聚体，从而导致如本文公开的对PICK1的有效抑制。

[0244] 因此，在一个实施方案中，如本文公开的PICK1抑制剂或胶束结构与两个或更多个PICK1蛋白的PDZ结构域结合，从而导致对PICK1的抑制。在一个实施方案中，被本公开文本的PICK1抑制剂结合的两个或更多个PICK1蛋白存在于两个或更多个PICK1二聚体中。

[0245] 在一个实施方案中，PICK1抑制剂与PICK1的结合导致形成PICK1的更高低聚状态，如PICK1的三聚体、四聚体、五聚体、六聚体、七聚体或八聚体。在一个实施方案中，PICK1抑制剂与PICK1的结合导致形成PICK1的四聚体、六聚体或八聚体。

[0246] 在一个实施方案中，本公开文本的PICK1抑制剂汇集两个或更多个PICK1蛋白。在一个实施方案中，所述化合物汇集四个PICK1蛋白，如五个PICK1蛋白，例如六个PICK1蛋白，如七个PICK1蛋白，例如八个PICK1蛋白，如九个PICK1蛋白，例如10个PICK1蛋白。

[0247] 通过与本公开文本的PICK1抑制剂结合来抑制PICK1可以导致PICK1蛋白不再能够与AMPAR相互作用，从而防止PICK1控制AMPAR的运输。因此，在一个实施方案中，所述PICK1

抑制剂能够抑制PICK1与AMPAR之间的蛋白质间相互作用。因此，这可以防止PICK1下调GluA2并防止CP-AMPAR形成，从而防止响应于突触中异常水平的谷氨酸的适应不良类型的可塑性。这转而可以防止例如神经性疼痛和可卡因成瘾。

[0248] 本公开文本的PICK1抑制剂对PICK1的PDZ结构域具有高亲和力。在一个实施方案中，本公开文本的PICK1抑制剂对于PICK1具有如下Ki：低于10nM，如低于9nM，如低于8nM，如低于7nM，如低于6nM，如低于5nM，如低于4nM，如低于3nM，如低于2nM，如低于1nM，如低于0.5nM。

[0249] 本公开文本的PICK1抑制剂对于PICK1的PDZ结构域的亲和力可以通过如本文实施例4所述的荧光偏振(FP)来测定。

[0250] 本公开文本的PICK1抑制剂形成更高阶结构的能力可以通过如本文实施例3所述的尺寸排阻色谱法(SEC)或小角X射线散射(SAXS)来测定。

[0251] 可检测部分

[0252] 在一个实施方案中，本公开文本的PICK1抑制剂进一步包含可检测部分。可以使用本领域普通技术人员已知的用于检测的常规部分，如荧光团、发色团、放射性同位素或酶。PICK1抑制剂中可检测部分的存在允许在与所述PICK1抑制剂结合后标记PICK1并使其可视化。

[0253] 在一个实施方案中，所述可检测部分与所述第一肽和/或所述第二肽缀合。在一个实施方案中，所述可检测部分与所述非肽部分的单个氨基酸缀合。

[0254] 在一个实施方案中，所述可检测部分是荧光团，如5,6-羧基四甲基罗丹明(TAMRA)或吲哚二碳菁(Cy5)。

[0255] 在另一个实施方案中，所述可检测部分包含放射性同位素或由放射性同位素组成。所述放射性同位素可以选自^{125}I、^{99m}Tc、^{111}In、^{67}Ga、^{68}Ga、^{72}As、^{89}Zr、^{123}I、^{18}F和^{201}Tl。

[0256] 疾病和障碍

[0257] 本发明提供了一种用于治疗与适应不良的可塑性相关的疾病和/或障碍的药物组合物。在一个实施方案中，提供了一种包含如本文公开的PICK1抑制剂或如本文公开的胶束的药物组合物。所述药物组合物可以包含在药学上可接受的载体中的本公开文本的PICK1抑制剂或胶束。

[0258] 与NMDA型谷氨酸受体(NMDAR)形成对照，AMPA型谷氨酸受体(AMPAR)由于四聚体受体复合物中GluA2亚基的存在而通常仅可渗透单价阳离子(即Na^+和K^+)。然而，响应于强烈且持续的去极化的可塑性变化导致在若干种类型的突触中转变为具有增加的电导和Ca^{2+}渗透性的AMPAR(CP-AMPAR)，并且这种转变使突触具有超敏性。从机制上讲，CP-AMPAR的表达涉及初始PICK1依赖性的对含有GluA2的AMPAR的下调，这是由PICK1 PDZ结构域与AMPAR的GluA2亚基的C末端之间的相互作用介导的。这转而允许在突触中插入缺乏GluA2的受体(插槽假说)，从而使突触Ca^{2+}可渗透并且具有超敏性。

[0259] CP-AMPAR极为重要地涉及介导在大鼠中戒断可卡因自我施用后的渴望(Conrad等人2008)。在可卡因渴望的形成过程中，PICK1与中脑和伏隔核中VTA多巴胺能神经元中CP-AMPAR的表达有关(Luscher等人2011和Wolf等人2010)，这提示PICK1在可卡因成瘾中可作为靶标。已报道CPP缀合的PICK1二价肽抑制剂在大鼠中剂量依赖性地减弱恢复可卡因寻求(Turner等人2020)。因此，在一个实施方案中，本公开文本的PICK1抑制剂的施用减少了药

物成瘾如可卡因成瘾中的可卡因渴望。

[0260] 背角(DH)神经元中AMPA型谷氨酸受体(AMPAR)的上调引起中枢敏化,这是可持续很长一段时间的在DH中特定形式的突触可塑性(Woolf等人2000和Ji等人2003)。此外,外周炎性疼痛和神经损伤诱导的疼痛二者均引起Ca^{2+}可渗透的AMPAR(CP-AMPAR)的上调(Vikman等人2008、Gangadharan等人2011和Chen等人2013)。PICK1在神经性疼痛中的作用的初步证据来自Garry等人2003,其证明PICK1的肽抑制剂减轻由慢性压迫性损伤(CCI)诱导的疼痛。随后证明了shRNA介导的PICK1敲低减轻了完全弗氏佐剂(CFA)诱导的炎性疼痛,并且发现PICK1敲除小鼠完全不能响应于脊神经结扎(SNL)而产生疼痛(Wang等人2011和Atianjoh等人2010)。实际上,本公开文本的PICK1抑制剂的施用降低了神经性疼痛模型(SNI模型-实施例8)、炎性疼痛模型(CFA模型-实施例7和16)中的机械性痛觉超敏以及在炎性疼痛模型(CFA模型-实施例17)中的热性(热)痛觉超敏。因此,在一个实施方案中,所述疼痛是机械性或热性痛觉超敏或痛觉过敏。在另一个实施方案中,所述疼痛是炎性疼痛。

[0261] TAR DNA结合蛋白43(TDP-43)病理学和AMPA受体亚基GluA2的RNA编辑失败二者均是病因学相关的分子异常,其同时发生在大多数患有肌萎缩侧索硬化症(ALS)的患者的运动神经元中。通过AMPAR拮抗剂吡仑帕奈缓解了条件性敲除作用于RNA上的RNA编辑酶腺苷脱氨酶2(ADAR2)的小鼠模型中的疼痛症状,这表明通过本公开文本的PICK1抑制剂可能缓解症状。

[0262] 鉴于本公开文本的化合物对疼痛和成瘾的作用,可以预期对患有共病的患者(例如还患有成瘾的疼痛患者)也有良好功效。

[0263] 类似的中枢敏化被认为是产生痛觉过敏引发中的痛觉超敏的基础,其充当下背疼痛和偏头痛的实验模型(Kandasamy等人2015)。

[0264] 类似地,耳鸣的病因学与神经性疼痛有若干个相似之处,包括中枢敏化(Vanneste等人2019、Peker等人2016和Moller等人2007)。

[0265] 对于在培养的海马神经元中的氧-葡萄糖耗尽已经描述了PICK1在CP-AMPAR的表面稳定/插入中的作用(Clem等人2010和Dixon等人2009)。这引起了PICK1作为在防止缺血性损伤后神经死亡中的推定靶标。

[0266] PICK1的损失已被证明可在体外和体内保护神经元免受响应于淀粉样蛋白β的脊柱损失(Marcotte等人2018和Alfonso等人2014)。因此,PICK1是用于阿尔茨海默病的症状性治疗和可能的预防性治疗的推定靶标。

[0267] PICK1相互作用并抑制参与线粒体自噬的E3泛素连接酶帕金蛋白。帕金蛋白功能丧失与散发性和家族性帕金森病(PD)均相关。因此,PICK1 KO小鼠对1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(MPTP)介导的毒性具有抗性(He等人2018)。因此,PICK1是用于帕金森病的症状性和预防性治疗的推定靶标。

[0268] 谷氨酸受体的过度刺激导致细胞内钙浓度过高是癫痫中神经元细胞死亡的主要原因。GluR2(GluA2)假说指出,在神经损伤如癫痫发作后AMPA受体亚基GluR2蛋白被下调。这增加了形成缺乏GluR2的钙可渗透AMPA受体的可能性,从而可能进一步增强神经递质谷氨酸的毒性(Lorgen等人2017)。

[0269] 与乳腺癌、肺癌、胃癌、结直肠癌和卵巢癌中相邻的正常上皮细胞相比,PICK1在肿瘤细胞中过表达。如通过免疫染色乳腺癌组织微阵列判断,高水平的PICK1表达与缩短的总

存活期相关。因此，用PICK1 siRNA转染MDA-MB-231细胞降低体外细胞增殖和集落形成，并抑制在裸鼠中的致瘤性(Zhang等人2010)。因此，PICK1是用于癌症治疗和预后的推定靶标。

[0270] 在一个实施方案中，提供了如本文公开的PICK1抑制剂、胶束或药物组合物，所述PICK1抑制剂、胶束或药物组合物用作药物。

[0271] 在一个实施方案中，提供了如本文公开的PICK1抑制剂、胶束或药物组合物，所述PICK1抑制剂、胶束或药物组合物用于预防和/或治疗与适应不良的可塑性相关的疾病或障碍。

[0272] 在一个实施方案中，提供了一种预防和/或治疗受试者中与适应不良的可塑性相关的疾病或障碍的方法，所述方法包括向所述受试者施用本公开文本的PICK1抑制剂、胶束或药物组合物。

[0273] 在一个实施方案中，提供了本公开文本的PICK1抑制剂、胶束或药物组合物用于制造治疗与适应不良的可塑性相关的疾病和/或障碍的药物的用途。

[0274] 在一个实施方案中，所述与适应不良的可塑性相关的疾病或障碍是疼痛、药物成瘾、肌萎缩侧索硬化症、癫痫、耳鸣、偏头痛、癌症、局部缺血、阿尔茨海默病和/或帕金森病。

[0275] 在一个实施方案中，所述与适应不良的可塑性相关的疾病或障碍是疼痛，如神经性疼痛。所述疼痛可以是炎性疼痛或神经性疼痛。待治疗的疼痛可以是慢性疼痛，其可以是慢性神经性疼痛或慢性炎性疼痛。所述神经性疼痛可能是由于创伤性损伤、手术或疾病(如糖尿病或自身免疫性障碍)对周围或中枢神经系统的损害而诱导的。通过用化学疗法治疗可能诱导神经性疼痛。如果疼痛持续存在，则所述病症是慢性神经性疼痛。慢性炎性疼痛可能是由神经损伤后的炎症诱导的，也可能是由外来物质诱导的炎症引起的，其中由免疫细胞释放的介导物引起疼痛途径的敏化，即位于脊髓中的感觉神经元的“紧张”。因此，有效的镇痛药物必须能够到达脊髓组织并找到它的靶标，在这种情况下靶标是PICK1，才能具有缓解疼痛的作用。因此，所述化合物必须能够通过血脑屏障和/或血液脊髓屏障才能到达脊髓组织。

[0276] 在一个实施方案中，所述与适应不良的可塑性相关的疾病或障碍是药物成瘾，如可卡因成瘾、阿片类药物成瘾或吗啡成瘾。

[0277] 在一个实施方案中，所述与适应不良的可塑性相关的疾病或障碍是癌症，如乳腺癌，例如组织学分级、淋巴结转移、Her-2/neu阳性和三阴性基底样乳腺癌。

[0278] 在一个实施方案中，所述与适应不良的可塑性相关的疾病或障碍是肌萎缩侧索硬化症。

[0279] 在一个实施方案中，所述与适应不良的可塑性相关的疾病或障碍是癫痫。

[0280] 在一个实施方案中，所述与适应不良的可塑性相关的疾病或障碍是耳鸣。

[0281] 在一个实施方案中，所述与适应不良的可塑性相关的疾病或障碍是偏头痛。

[0282] 在一个实施方案中，所述与适应不良的可塑性相关的疾病或障碍是中风或局部缺血。

[0283] 在一个实施方案中，所述与适应不良的可塑性相关的疾病或障碍是阿尔茨海默病。

[0284] 在一个实施方案中，所述与适应不良的可塑性相关的疾病或障碍是帕金森病。

[0285] 在又另一个实施方案中，如本文公开的化合物用于预防和/或治疗头部损伤。

[0286] 在又另一个实施方案中，如本文公开的化合物用于预防和/或治疗和/或诊断癌症，如乳腺癌。

[0287] 有风险患上或目前患有上述障碍和疾病的受试者可以被给予预防性治疗以降低所述障碍或疾病发作的风险或者在所述障碍或疾病发作后被给予治疗性治疗。所述受试者可以是哺乳动物或人患者。

[0288] 施用

[0289] 医学领域中普通技术人员已知的常规方法可以用于将本公开文本的PICK1抑制剂施用至所述患者。可以将本公开文本的PICK1抑制剂单独施用或与其他治疗剂或干预组合施用。

[0290] 在一个实施方案中，将本公开文本的PICK1抑制剂通过肠胃外施用，如静脉内、腹膜内、肌肉内、鞘内、经皮、经粘膜或皮下施用来施用。在一个实施方案中，将本公开文本的PICK1抑制剂通过鞘内或皮下施用来施用。在优选的实施方案中，将本公开文本的PICK1抑制剂通过皮下施用来施用。如实施例15所证明，本公开文本的PICK1抑制剂具有高溶解度，使其适合于以有效剂量进行这种皮下施用。

[0291] 诊断

[0292] 本公开文本的PICK1抑制剂可以包含可检测部分。因此，这种PICK1抑制剂可以用于诊断，如通过检测组织或样品中的PICK1。

[0293] 因此，本公开文本提供了一种如本文公开的PICK1抑制剂，所述PICK1抑制剂用于诊断与适应不良的可塑性相关的疾病或障碍。

[0294] 与乳腺癌、肺癌、胃癌、结直肠癌和卵巢癌中相邻的正常上皮细胞相比，PICK1在肿瘤细胞中过表达。如通过免疫染色乳腺癌组织微阵列判断，高水平的PICK1表达与缩短的总存活期相关。因此，用PICK1 siRNA转染MDA-MB-231细胞降低体外细胞增殖和集落形成，并抑制在裸鼠中的致瘤性(Zhang等人2010)。因此，PICK1是用于癌症治疗和预后的推定靶标。

[0295] 在一个实施方案中，如本文公开的PICK1抑制剂用于诊断与适应不良的可塑性相关的疾病或障碍，所述与适应不良的可塑性相关的疾病或障碍是癌症，如乳腺癌。在一个实施方案中，所述乳腺癌选自组织学分级、淋巴结转移、Her-2/neu阳性和三阴性基底样乳腺癌。

[0296] 本公开文本进一步提供了一种诊断有需要的受试者的乳腺癌的方法，所述方法包括以下步骤：

[0297] a.从所述受试者获得组织样品；

[0298] b.用如本文公开的化合物对所述样品染色；

[0299] c.测定所述样品中PICK1的水平；以及

[0300] d.将所述样品中的PICK1水平与健康标准进行比较，

[0301] 其中所述样品中增加的PICK1水平表明所述个体患有乳腺癌。

[0302] 本公开文本进一步提供了一种用于预测患有乳腺癌的患者的预后的方法，所述方法包括以下步骤：

[0303] a.从所述受试者获得组织样品；

[0304] b.用如本文公开的化合物对所述样品染色；

[0305] c.测定所述样品中PICK1的水平；以及

[0306] d.将所述样品中的PICK1水平与健康标准进行比较，

[0307] 其中所述样品中增加的PICK1水平表明不良预后。

[0308] 在一个实施方案中，如本文公开的PICK1抑制剂用于将患有与适应不良的可塑性相关的疾病的受试者分层为用所述PICK1抑制剂治疗的反应者和非反应者。这种分层可以用于在初始化产生类似治疗机制(如PICK1抑制)的其他治疗方法(如基于AAV的疗法)之前评估与PICK1具有二价或多价相互作用的PICK1抑制剂的功效。这种分层的优点包括只有治疗机制(如PICK1抑制)的反应者接受基于AAV的疗法的长期不可逆治疗。基于AAV的疗法描述于共同未决的申请(PCT/EP2019/078736和EP20161524.2)中。

[0309] 因此，在一个实施方案中，本公开文本的PICK1抑制剂用于将患有与适应不良的可塑性相关的疾病和/或障碍的患者分层为所述基因疗法的可预测治疗反应者。

[0310] 在一个实施方案中，本公开文本的PICK1抑制剂用于将患有与适应不良的可塑性相关的疾病的受试者分层为用所述化合物治疗的反应者和非反应者。

[0311] 项目

[0312] 1.一种包含肽部分和非肽部分的PICK1抑制剂，其中所述肽部分由以下项组成

[0313] a)包含以下通式的氨基酸序列的第一肽：

[0314] $X_1X_2X_3X_4X_5$；和

[0315] b)包含以下通式的氨基酸序列的第二肽：$X_1X_2X_3X_4X_5$；

[0316] 其中

[0317] X_1是H、N、F或T，或不存在；

[0318] X_2是W、S、E或Y；或不存在；

[0319] X_3是L、V或I；

[0320] X_4是K、I或R；并且

[0321] X_5是V；

[0322] 并且其中所述非肽部分包含：

[0323] c)将所述第一肽与所述第二肽连接的接头，和

[0324] d)亲脂性脂肪族基团。

[0325] 2.根据前述项目中任一项所述的PICK1抑制剂，其中所述第一肽和/或所述第二肽选自HWLKV、FEIRV、NSIIV、NSVRV、NSLRV、NSIRV、NYIIV、NYIRV、TSIRV、YIIV、SVRV、EIRV、LRV、IIV、VRV和IRV。

[0326] 3.根据前述项目中任一项所述的PICK1抑制剂，其中所述第一肽和/或所述第二肽选自HWLKV、NSVRV、NSLRV、NSIRV、TSIRV、EIRV、YIIV、IIV、VRV和IRV。

[0327] 4.根据前述项目中任一项所述的PICK1抑制剂，其中所述第一肽和/或所述第二肽选自NSVRV、NSLRV、NSIRV、TSIRV、EIRV、YIIV、IIV、VRV和IRV。

[0328] 5.根据前述项目中任一项所述的PICK1抑制剂，其中所述第一肽和/或所述第二肽选自HWLKV、FEIRV、NSIIV、NSVRV、NSLRV、NSIRV、YIIV、SVRV、VRV和LRV。

[0329] 6.根据前述项目中任一项所述的PICK1抑制剂，其中所述第一肽和/或所述第二肽选自FEIRV、NSIIV、NSVRV、NSLRV、NSIRV、YIIV、SVRV、VRV和LRV。

[0330] 7.根据前述项目中任一项所述的PICK1抑制剂，其中所述第一肽和/或所述第二肽是HWLKV。

[0331] 8.根据项目1所述的PICK1抑制剂,其中:

[0332] X_1是N、F或T,或不存在;

[0333] X_2是S、E或Y;或不存在;

[0334] X_3是V、L或I;

[0335] X_4是I或R;并且

[0336] X_5是V。

[0337] 9.根据项目1所述的PICK1抑制剂,其中:

[0338] X_1是N或T,或不存在;

[0339] X_2是S、E或Y;或不存在;

[0340] X_3是V、L或I;

[0341] X_4是I或R;并且

[0342] X_5是V。

[0343] 10.根据项目1所述的PICK1抑制剂,其中:

[0344] X_1是N或F,或不存在;

[0345] X_2是S、E或Y;或不存在;

[0346] X_3是V、L或I;

[0347] X_4是I或R;并且

[0348] X_5是V。

[0349] 11.根据前述项目中任一项所述的PICK1抑制剂,其中所述第一肽与所述第二肽相同。

[0350] 12.根据前述项目中任一项所述的PICK1抑制剂,其中所述接头是NPEG接头。

[0351] 13.根据前述项目中任一项所述的PICK1抑制剂,其中所述NPEG接头包含在0至24个范围内的其中一个或多个骨架氧原子被氮原子替代的乙二醇部分,如在0至20个范围内,例如在0至16个范围内,如在0至14个范围内,例如在0至12个范围内,例如在0至10个范围内,如在0至8个范围内,例如在0至6个范围内,如在0至4个范围内,例如在0至2个范围内的其中一个或多个骨架氧原子被氮原子替代的乙二醇部分,所述NPEG接头优选地包含4个其中一个或多个骨架氧原子被氮原子替代的乙二醇部分。

[0352] 14.根据前述项目中任一项所述的PICK1抑制剂,其中所述NPEG接头的一个骨架氧被氮原子替代。

[0353] 15.根据前述项目中任一项所述的PICK1抑制剂,其中所述NPEG接头在每一端包含羧酸。

[0354] 16.根据前述项目中任一项所述的PICK1抑制剂,其中所述NPEG接头的一个或多个氮原子位于沿所述NPEG接头的任何位置,例如像位于所述NPEG接头的中间或位于靠近所述NPEG接头的一端。

[0355] 17.根据前述项目中任一项所述的PICK1抑制剂,其中所述NPEG接头经由在NPEG接头的羧酸与所述第一肽和/或所述第二肽的N末端之间形成的酰胺键与所述第一肽和/或所述第二肽缀合。

[0356] 18.根据前述项目中任一项所述的PICK1抑制剂,其中所述亲脂性脂肪族基团是脂肪族链或脂肪族环。

[0357] 19.根据前述项目中任一项所述的PICK1抑制剂,其中所述亲脂性脂肪族基团是脂肪族支链或非支链。

[0358] 20.根据前述项目中任一项所述的PICK1抑制剂,其中所述亲脂性脂肪族基团是脂肪族饱和或不饱和链。

[0359] 21.根据前述项目中任一项所述的PICK1抑制剂,其中所述亲脂性脂肪族基团是包含甾烷结构如甾醇的脂肪族环。

[0360] 22.根据前述项目中任一项所述的PICK1抑制剂,其中所述亲脂性脂肪族基团是包含类固醇如胆固醇的脂肪族环。

[0361] 23.根据前述项目中任一项所述的PICK1抑制剂,其中所述亲脂性脂肪族基团进一步包含官能团,如羧酸、醇或胺。

[0362] 24.根据前述项目中任一项所述的PICK1抑制剂,其中所述亲脂性脂肪族基团包含醇。

[0363] 25.根据前述项目中任一项所述的PICK1抑制剂,其中所述亲脂性脂肪族基团包含羧酸。

[0364] 26.根据前述项目中任一项所述的PICK1抑制剂,其中所述亲脂性脂肪族基团是脂肪酸。

[0365] 27.根据前述项目中任一项所述的PICK1抑制剂,其中所述亲脂性脂肪族基团是C_4-C_{26}脂肪酸。

[0366] 28.根据前述项目中任一项所述的PICK1抑制剂,其中所述亲脂性脂肪族基团是饱和脂肪酸或不饱和脂肪酸。

[0367] 29.根据前述项目中任一项所述的PICK1抑制剂,其中所述亲脂性脂肪族基团选自乙酸、丁酸、己酸、辛酸、癸酸、月桂酸、肉豆蔻酸、棕榈酸、十七烷酸、硬脂酸、花生酸、山嵛酸、二十四烷酸、蜡酸、癸烯酸、月桂烯酸、肉豆蔻油酸、棕榈烯酸、油酸、亚油酸、亚麻酸、烯酸、芥酸。

[0368] 30.根据前述项目中任一项所述的PICK1抑制剂,其中所述亲脂性脂肪族基团选自癸酸、月桂酸、肉豆蔻酸、棕榈酸、十七烷酸、硬脂酸。

[0369] 31.根据前述项目中任一项所述的PICK1抑制剂,其中所述亲脂性脂肪族基团是肉豆蔻酸。

[0370] 32.根据前述项目中任一项所述的PICK1抑制剂,其中所述亲脂性脂肪族基团是二酸,例如像十四烷二酸、十六烷二酸或十八烷二酸。

[0371] 33.根据前述项目中任一项所述的PICK1抑制剂,其中所述亲脂性脂肪族基团经由诸如羧酸的官能团与NPEG接头的氮原子缀合,如通过形成酰胺缀合。

[0372] 34.根据前述项目中任一项所述的PICK1抑制剂,其中所述非肽部分进一步包含一个氨基酸。

[0373] 35.根据项目14至15中任一项所述的PICK1抑制剂,其中所述一个氨基酸是α-氨基酸或β-氨基酸。

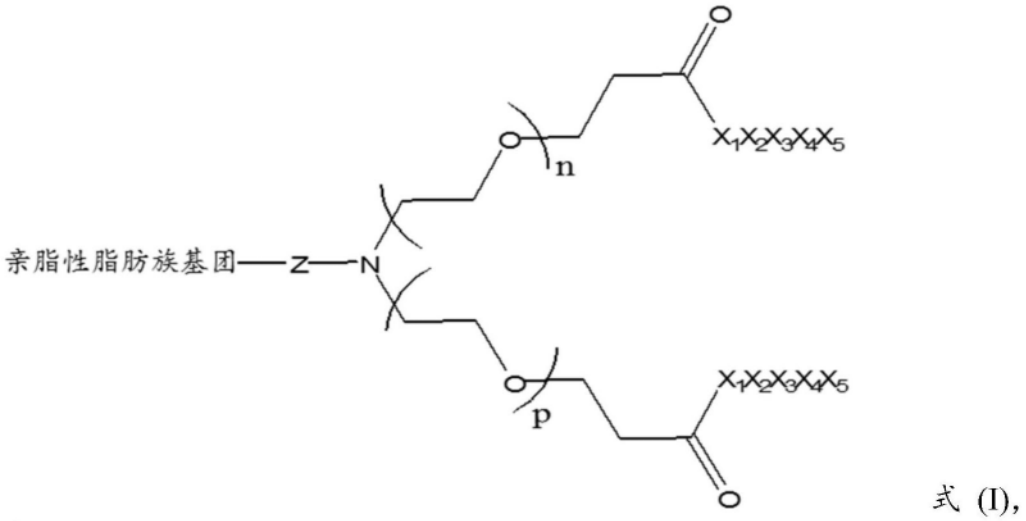
[0374] 36.根据项目14至16中任一项所述的PICK1抑制剂,其中所述一个氨基酸选自Asp、β-Asp、β-Ser、β-高-Ser和β-Lys。

[0375] 37.根据项目14所述的PICK1抑制剂,其中所述一个氨基酸经由α-羧酸与NPEG接头

的氮原子缀合以形成酰胺并进一步与亲脂性脂肪族基团缀合。

[0376] 38.根据项目14至17中任一项所述的PICK1抑制剂,其中所述一个氨基酸经由所述α-胺或β-胺与亲脂性脂肪族基团缀合以形成酰胺键或者经由侧链官能团如羧酸、醇或胺与亲脂性脂肪族基团缀合以形成酰胺键或酯键。

[0377] 39.根据前述项目中任一项所述的PICK1抑制剂,其中所述PICK1抑制剂具有式(I)的一般结构:

[0378] 

式 (I),

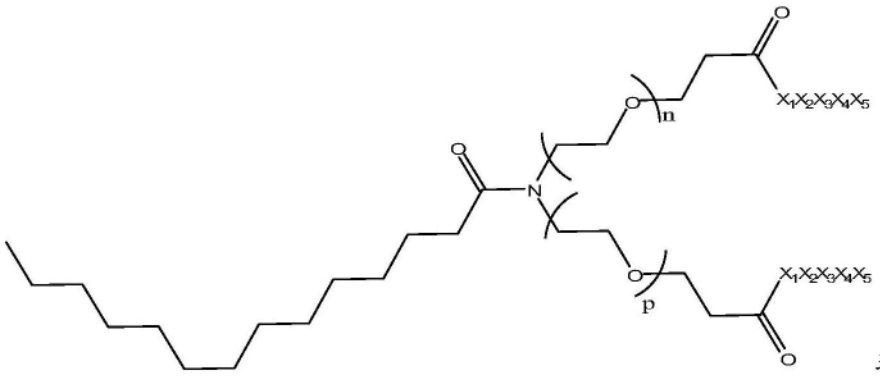
[0379] 其中

[0380] Z是键或单个氨基酸;

[0381] n是0到12的整数;

[0382] p是0到12的整数。

[0383] 40.根据前述项目中任一项所述的PICK1抑制剂,其中所述PICK1抑制剂具有根据式(II)的结构:

[0384] 

式 (II),

[0385] 其中

[0386] n是0到12的整数,优选2;

[0387] p是0到12的整数,优选2。

[0388] 41.根据前述项目中任一项所述的PICK1抑制剂,其中所述PICK1抑制剂在溶液中自组装成更高阶的结构,如自组装以形成胶束结构。

[0389] 42.根据前述项目20至21中任一项所述的PICK1抑制剂,其中所述更高阶的结构具有至少15 Å的回转半径(R_g),如至少17 Å,例如至少19 Å,如至少20 Å,例如至少21 Å,如至

少22 Å,例如至少23 Å,如至少24 Å,例如至少25 Å,如至少26 Å,例如至少27 Å,如至少28 Å,例如至少29 Å,如至少30 Å,例如至少31 Å。

[0390] 43.根据前述项目中任一项所述的PICK1抑制剂,其中所述PICK1抑制剂与PICK1的PDZ结构域结合。

[0391] 44.根据前述项目中任一项所述的PICK1抑制剂,其中所述PICK1抑制剂与两个或更多个PICK1蛋白的PDZ结构域结合。

[0392] 45.根据前述项目中任一项所述的PICK1抑制剂,其中所述PICK1抑制剂能够抑制PICK1与AMPAR之间的蛋白质间相互作用。

[0393] 46.根据前述项目中任一项所述的PICK1抑制剂,其中所述PICK1抑制剂能够抑制PICK1。

[0394] 47.根据前述项目中任一项所述的PICK1抑制剂,其中所述肽对于PICK1具有如下Ki:低于10nM,如低于9nM,如低于8nM,如低于7nM,如低于6nM,如低于5nM,如低于4nM,如低于3nM,如低于2nM,如低于1nM,如低于0.5nM。

[0395] 48.根据前述项目中任一项所述的PICK1抑制剂,其中所述PICK1抑制剂与PICK1的结合导致形成PICK1的更高低聚状态,如PICK1的三聚体、四聚体、五聚体、六聚体、七聚体或八聚体。

[0396] 49.根据前述项目中任一项所述的PICK1抑制剂,其中所述PICK1抑制剂与PICK1的结合导致PICK1的四聚体、六聚体或八聚体的形成。

[0397] 50.根据前述项目中任一项所述的PICK1抑制剂,所述PICK1抑制剂进一步包含可检测部分。

[0398] 51.根据前述项目中任一项所述的PICK1抑制剂,其中所述可检测部分与所述第一肽和/或所述第二肽缀合。

[0399] 52.根据前述项目中任一项所述的PICK1抑制剂,其中所述可检测部分与所述非肽部分的一个氨基酸缀合。

[0400] 53.根据项目27所述的PICK1抑制剂,其中所述可检测部分是荧光团、发色团或酶。

[0401] 54.根据项目27所述的PICK1抑制剂,其中所述可检测部分是5,6-羧基四甲基罗丹明(TAMRA)或吲哚二碳菁(Cy5)。

[0402] 55.根据项目27所述的PICK1抑制剂,其中所述可检测部分包含放射性同位素或由放射性同位素组成。

[0403] 56.根据项目30所述的PICK1抑制剂,其中所述放射性同位素选自^{125}I、^{99m}Tc、^{111}In、^{67}Ga、^{68}Ga、^{72}As、^{89}Zr、^{123}I、^{18}F和^{201}Tl。

[0404] 57.一种包含根据前述项目中任一项所述的PICK1抑制剂的胶束。

[0405] 58.一种包含根据项目1至56中任一项所述的PICK1抑制剂或根据项目57所述的胶束的药物组合物。

[0406] 59.根据前述项目中任一项所述的PICK1抑制剂、胶束或药物组合物,所述PICK1抑制剂、胶束或药物组合物用作药物。

[0407] 60.根据前述项目中任一项所述的PICK1抑制剂、胶束或药物组合物,所述PICK1抑制剂、胶束或药物组合物用于预防和/或治疗与适应不良的可塑性相关的疾病或障碍。

[0408] 61.一种提供受试者中与适应不良的可塑性相关的疾病或障碍的预防和/或治疗

的方法，所述方法包括向所述受试者施用根据前述项目中任一项所述的PICK1抑制剂、胶束或药物组合物。

[0409] 62.根据前述项目中任一项所述的PICK1抑制剂、胶束或药物组合物用于制造治疗与适应不良的可塑性相关的疾病和/或障碍的药物的用途。

[0410] 63.根据项目59至60中任一项所述的用于所述用途的PICK1抑制剂、胶束或药物组合物、根据项目61所述的方法或根据项目62所述的用途，其中所述与适应不良的可塑性相关的疾病或障碍是疼痛、药物成瘾、肌萎缩侧索硬化症、癫痫、耳鸣、偏头痛、癌症、局部缺血、阿尔茨海默病和/或帕金森病。

[0411] 64.根据项目59至60中任一项所述的用于所述用途的PICK1抑制剂、胶束或药物组合物、根据项目61所述的方法或根据项目62所述的用途，其中所述与适应不良的可塑性相关的疾病或障碍是疼痛，如炎性疼痛或神经性疼痛。

[0412] 65.根据项目64所述的用于所述用途的PICK1抑制剂、胶束或药物组合物，其中所述疼痛是机械性或热性痛觉超敏或痛觉过敏。

[0413] 66.根据项目59至60中任一项所述的用于所述用途的PICK1抑制剂、胶束或药物组合物、根据项目61所述的方法或根据项目62所述的用途，其中所述与适应不良的可塑性相关的疾病或障碍是药物成瘾，如可卡因成瘾、阿片类药物成瘾或吗啡成瘾。

[0414] 67.根据项目59至60中任一项所述的用于所述用途的PICK1抑制剂、胶束或药物组合物、根据项目61所述的方法或根据项目62所述的用途，其中所述与适应不良的可塑性相关的疾病或障碍是癌症，如乳腺癌，例如组织学分级、淋巴结转移、Her-2/neu阳性和三阴性基底样乳腺癌。

[0415] 68.根据项目59至60中任一项所述的用于所述用途的PICK1抑制剂、胶束或药物组合物、根据项目61所述的方法或根据项目62所述的用途，其中所述与适应不良的可塑性相关的疾病或障碍是肌萎缩侧索硬化症。

[0416] 69.根据项目59至60中任一项所述的用于所述用途的PICK1抑制剂、胶束或药物组合物、根据项目61所述的方法或根据项目62所述的用途，其中所述与适应不良的可塑性相关的疾病或障碍是癫痫。

[0417] 70.根据项目59至60中任一项所述的用于所述用途的PICK1抑制剂、胶束或药物组合物、根据项目61所述的方法或根据项目62所述的用途，其中所述与适应不良的可塑性相关的疾病或障碍是耳鸣。

[0418] 71.根据项目59至60中任一项所述的用于所述用途的PICK1抑制剂、胶束或药物组合物、根据项目61所述的方法或根据项目62所述的用途，其中所述与适应不良的可塑性相关的疾病或障碍是偏头痛。

[0419] 72.根据项目59至60中任一项所述的用于所述用途的PICK1抑制剂、胶束或药物组合物、根据项目61所述的方法或根据项目62所述的用途，其中所述与适应不良的可塑性相关的疾病或障碍是局部缺血。

[0420] 73.根据项目59至60中任一项所述的用于所述用途的PICK1抑制剂、胶束或药物组合物、根据项目61所述的方法或根据项目62所述的用途，其中所述与适应不良的可塑性相关的疾病或障碍是阿尔茨海默病。

[0421] 74.根据项目59至60中任一项所述的用于所述用途的PICK1抑制剂、胶束或药物组

合物、根据项目61所述的方法或根据项目62所述的用途，其中所述与适应不良的可塑性相关的疾病或障碍是帕金森病。

[0422] 75.根据项目1至56中任一项所述的PICK1抑制剂或根据项目57所述的胶束，所述PICK1抑制剂或胶束用于诊断与适应不良的可塑性相关的疾病或障碍。

[0423] 76.根据项目75所述的用于诊断的PICK1抑制剂，其中所述与适应不良的可塑性相关的疾病或障碍是癌症，如乳腺癌。

[0424] 77.根据项目76所述的用于所述用途的PICK1抑制剂，其中所述乳腺癌选自组织学分级、淋巴结转移、Her-2/neu阳性和三阴性基底样乳腺癌。

[0425] 78.一种诊断有需要的受试者的乳腺癌的方法，所述方法包括以下步骤：

[0426] a.从所述受试者获得组织样品；

[0427] b.用根据项目50-56所述的PICK1抑制剂对所述样品染色；

[0428] c.测定所述样品中PICK1的水平；以及

[0429] d.将所述样品中的PICK1水平与健康标准进行比较，

[0430] 其中所述样品中增加的PICK1水平表明所述个体患有乳腺癌。

[0431] 79.一种用于预测患有乳腺癌的受试者的预后的方法，所述方法包括以下步骤：

[0432] a.从所述受试者获得组织样品；

[0433] b.用根据项目50-56所述的PICK1抑制剂对所述样品染色；

[0434] c.测定所述样品中PICK1的水平；以及

[0435] d.将所述样品中的PICK1水平与健康标准进行比较，

[0436] 其中所述样品中增加的PICK1水平表明不良预后。

[0437] 实施例

[0438] 实施例1:PICK1表达和纯化

[0439] 如早前所述制备全长大鼠PICK1(pET41)(Madsen等人,2005)。简言之,PICK1在BL21-DE3-pLysS细胞中表达并在37℃下生长,在OD_{600}=0.6下用1mM异丙基β-D-1-硫代半乳糖苷(IPTG)诱导并在20℃下生长16h。收获培养物并将其重悬于每1L培养物中的50mM三氨基甲烷(Tris)、125mM NaCl、2mM二硫苏糖醇(DTT,Sigma)、1％Triton X-100(Sigma)、20μg/mL DNA酶1和1/2片complete蛋白酶抑制剂混合物(Roche)。将重悬的沉淀物在-80℃下冷冻,以供以后纯化。通过离心(在4℃下以36,000x g持续30min)清除裂解物,并且将上清液与谷胱甘肽-琼脂糖凝胶4B珠粒(GE Healthcare)在温和旋转下在4℃下孵育2h,然后以4,000x g离心5min。去除上清液并将珠粒在35mL 50mM Tris、125mM NaCl、2mM DTT和0.01％Triton-X100中洗涤两次。将珠粒转移到PD-10 Bio-Spin®色谱柱(Bio-Rad)并用另外3个柱体积洗涤。密封每个色谱柱,并且添加0.075U/μL Novagen®以在温和旋转下在4℃下裂解过夜。将PICK1在冰上洗脱,并在TECAN读板器或NanoDrop3000上测量280nm处的吸收。使用朗伯比尔定律(A=εcl)测定蛋白质浓度,εA280PICK1=32320$(cm*mol/L)^{-1}$。

[0440] 实施例2:化合物的合成

[0441] PEG_0-$(HWLKV)_2$、PEG_1-$(HWLKV)_2$、PEG_2-$(HWLKV)_2$、PEG_3-$(HWLKV)_2$、PEG_4-$(HWLKV)_2$、Ac-$(HWLK_{PEG4}V)_2$和$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$如Bach等人,2012中所述通过固相肽合成法合成。

[0442] 如Nissen等人,2015中所述将$NPEG_4$-(HWLKV)2进行肉豆蔻酰基化以提供myr-$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$。

[0443] 荧光标记的肽(5-FAM)是通过将5-FAM与NPEG接头的胺直接缀合或通过将5-FAM与肽的N末端经由6-氨基己酸(Ahx)接头缀合来制备的。

[0444] 实施例3:myr-NPEG-$(HWLKV)_2$的溶液内行为的表征

[0445] 为了测试myr-$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$的溶液内行为,我们进行了尺寸排阻色谱法(SEC),并与作为对照的未缀合的$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$进行比较。我们还在溶液中对myr-$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$进行了小角X射线散射(SAXS)以获得颗粒大小和形状的总体估计。

[0446] 材料与方法:

[0447] 尺寸排阻色谱法:使用具有Superdex200 Increase 10/300柱的Äkta纯化器进行尺寸排阻色谱法,其中将500μL $NPEG_4$-$(HWLKV)_2$或myr-$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$以指定浓度注射至柱中。测量在280nm处的吸光度谱,并使用Graph Pad Prism 8.3对洗脱体积作图。

[0448] 小角X射线散射:

[0449] 在含有50mM Tris(pH 7.4)、125mM NaCl的缓冲液中制备在0.18mg/ml至9.37mg/mL范围内的一系列浓度的myr-NPEG-$(HWLKV)_2$。在德国汉堡市DESY的P12 SAXS Beamline,Petra III处测量样品。在beamline上使用标准程序进行初步数据缩减,包括将数据径向平均并转换为绝对缩放散射强度I(q),其作为散射矢量q的函数,其中$q=4\pi\sin(\theta)/\lambda$($\lambda$=半散射角)。

[0450] SAXS数据的建模以两种方式进行,首先使用对距离分布函数然后使用多分散球体的分子约束核壳模型。简言之,假设肽聚集成多分散球形胶束。此处,疏水尾形成核心,并且它们被球形胶束中的亲水部分(壳)包围。对于建模,2.26e-10cm和2.96e-11cm的散射长度分别用于头部基团和尾。这是通过计算分子结构中的电子数量并乘以电子的散射长度来计算的。对于散射长度密度计算,假设C_{13}烷基链的分子体积是377 $Å^3$,如由Tanfords经验式($V=27.4+26.9n_C$)估算,其中n_C表示碳数,即在这种情况下是13。作为初步估计,假设亲水性头部基团的质量密度对应于可溶性蛋白质的质量密度(即1.35g/cm^3),这产生了2078 $Å^3$的分子体积。该值被视为拟合中的自由参数,并细化为约2010 $Å^3$的分子体积,其对应于1.39g/cm^3的质量密度,并且与对不同样品浓度的拟合相比变化很小。然后计算相对于水的过量散射长度密度(9.4e10 1/cm^2)。使用这种分子约束模型,核心和壳的体积通过拟合的聚集数N_{agg}在内部耦合。多分散性由N_{agg}的高斯函数描述。高斯在±3σ处被截断。来自WillItFit软件的模型模块“PolydisperseMicelles”用于拟合。通常,小的表面粗糙度和小的恒定背景是模型收敛所需的。

[0451] 将散射数据合并;减去缓冲液并使用分箱因子为1.02的WillItRebin进行分箱。使用bayesapp(http://www.bayesapp.org/)在区间[0.0122-0.4] $Å^{-1}$中拟合了对距离分布函数(pddf),拟合参数在下面的数据收集表中报告。

[0452]

样品详细信息						
	Myr-*N*PEG$_4$-(HWLKV)$_2$					
肽	C_{14}-PEG$_4$-(HWLKV)$_2$					
缓冲液	50mM Tris、125mM NaCl(pH 7.4)					
消光系数	11000 M^{-1} cm^{-1}					
分子量	1874 g/mol					
肽浓度	0.19 - 9.37 mg/ml					
SAXS数据收集详细信息						
仪器	P12, Petra III, DESY [1]					
数据收集日期	09-05-2019					
波长(Å)	1.24					
测量的q范围(Å^{-1})	0.0025-0.73					
绝对校准	水					
暴露时间(ms)	10					
温度(K)	293.35					
软件						
数据区间分组	WillItRebin					
对距离分布函数得到的结果						
分子量(kDa)	14.8	13.2	13.8	11.2	10.4	9.2
$n_{myr\text{-}NPEG4\text{-}(HWLKV)2}$	7.9	7.1	7.3	6.0	5.5	4.9
核壳模型获得的结果						
浓度	300 μM	400 μM	1000 μM	3000 μM	5000 μM	
$n_{myr\text{-}NPEG4\text{-}(HWLKV)2}$	19	22	22	21	19	

附注和参考文献

[1] C. E. Blanchet, A. Spilotros, F. Schwemmer, M. A. Graewert, A. Kikhney, C. M. Jeffries, D. Franke, D. Mark, R. Zengerle, F. Cipriani, S. Fiedler, M. Roessle, D. I. Svergun, *J Appl Crystallogr* **2015**, *48*, 431.
[2] S. Hansen, *Journal of Applied Crystallography* **2012**, *45*, 566.
[3] S. Hansen, *Journal of Applied Crystallography* **2014**, *47*, 1469.

[0453] 结果：

[0454] 在这一系列实验中，我们使用SEC和SAXS测试了myr-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$组装成更高阶的低聚结构的能力。

[0455] 尺寸排阻色谱法：进行SEC实验以显示与未缀合的NPEG-(HWLKV)$_2$相比，对myr-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$自组装的浓度依赖性，并发现myr-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$在较低洗脱体积下洗脱，这表明其具有较大的流体动力学半径，因此具有较大的分子组装(图1)。

[0456] 小角X射线散射：进行SAXS实验以显示myr-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$自组装的浓度依赖性，并且发现使用分析对距离分布函数的标准分析，myr-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$显然组装成胶束结构，其回转半径(Rg)为20-23.6 Å，由5-8个单独分子组成(图2a-图2c)。

[0457] 由于对距离分布函数没有考虑脂肪族基团的消极散射贡献，因此该分析低估了分子组装中的分子数量。使用如上所述的核壳模型分析数据表明myr-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$组装成胶束结构，如球形核壳形状，其外半径为20-24 Å，包含19-22个单独的myr-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$分子。

[0458] 结论

[0459] 本实施例证明本公开文本的PICK1抑制剂能够形成更高阶的结构，如溶液中的胶束结构。

[0460] 实施例4:myr-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$与PICK1的结合

[0461] 为了测试myr-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$与重组PICK1的结合，进行了荧光偏振。为了验证在结合后PICK1的更高阶复合物的形成，进行了尺寸排阻色谱法。

[0462] 材料与方法

[0463] 如实施例1中所述表达和纯化PICK1。

[0464] 荧光偏振:荧光偏振是在竞争模式下以固定浓度的蛋白质和示踪剂(5FAM-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$，5nM或5FAM-HWLKV，20nM)针对渐增浓度的指示的未标记的肽进行的。将板在黑色半面积Corning黑色非结合表面96孔板中在冰上孵育2小时。使用在488nm处的激发滤光片和在535nm处的长通发射滤光片在Omega POLARstar板阅读器上直接测量荧光偏振。使用GraphPad Prism 8.3绘制数据并拟合至One site competition，以提取$K_{i,app}$值。

[0465] 尺寸排阻色谱法:使用具有Superdex200 Increase 10/300柱的Äkta纯化器进行尺寸排阻色谱法，其中在不存在或存在10μM myr-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$的情况下，将500μL的40μM PICK1加载至柱中。测量在280nm处的吸光度谱，并使用Graph Pad Prism 8.3对洗脱体积作图。

[0466] 结果

[0467] 在这一系列实验中，我们使用荧光偏振测试了myr-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$与重组纯化的PICK1结合的能力，以及myr-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$当在复合时诱导PICK1的更高阶低聚物的能力，如SEC所证明(图4)。

[0468] 进行荧光偏振(FP)实验以测定对PICK1的结合亲和力。使用5FAM-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$或5FAM-HWLKV作为荧光示踪剂的竞争实验显示了myr-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$(Ki,app＝3.0nM，SEM区间[2.3-3.8]nM，n＝6)与HWLKV(Ki,app＝6998nM，SEM区间[4972-9849]nM，n＝3)相比的>1000倍亲和力增加，以及myr-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$与NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$(Ki,app＝179nM，SEM区间[169-189]，n＝6)相比>50倍亲和力增加(图3)。

[0469] 进行尺寸排阻色谱法以评价与PICK1复合的myr-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$的溶液内行为。洗脱体积表明myr-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$在结合后形成PICK1的更高阶低聚结构(图4)。

[0470] 结论

[0471] 本实施例证明本公开文本的PICK1抑制剂显示出与PICK1的高亲和力结合。与未缀合的NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$相比，脂质与二价肽配体的缀合提供了>50倍的亲和力增加。

[0472] 本实施例进一步证明本公开文本的PICK1抑制剂在结合时能够诱导PICK1的更高阶结构。蛋白质功能的抑制可能是由于这种对PICK1的更高阶结构的诱导所致。

[0473] 实施例5:优化PICK1结合肽配体的序列以鉴定高亲和力结合剂

[0474] 为了测试DAT-C5(HWLKV)序列(即位置X_1-X_5)中PICK1 PDZ结合基序的严格性以及推定地指示具有更好亲和力的肽，我们使用荧光偏振进行了95种五肽与纯化的PICK1的结合的初始研究，其中HWLKV序列中的每个残基被取代为19种其他天然氨基酸中的任一种。

[0475] 此外，我们采集了上述实验中获得的数据并将其用于指导设计从氨基酸的组合取代得到的52种不同的五肽、四肽和三肽。为了验证具有更好亲和力的推定肽，通过荧光偏振结合测定研究了与纯化的PICK1的结合亲和力。

[0476] 材料与方法：

[0477] 荧光偏振：荧光偏振是在竞争模式下以固定浓度的蛋白质和示踪剂(5FAM-HWLKV，20nM)针对渐增浓度的指示的未标记的肽进行的。将板在黑色半面积Corning黑色非结合表面96孔板中在冰上孵育20min，并使用在488nm处的激发滤光片和在535nm处的长通发射滤光片在Omega POLARstar板阅读器上直接测量荧光偏振。使用GraphPad Prism 6.0绘制数据并拟合至One site competition，以提取K_d值，所述值全部都与HWLKV亲和力相关，最终将其绘图。

[0478] 结果

[0479] 单个取代实验：

[0480] X_1和X_3的取代大部分破坏结合(用较浅的阴影表示)，但X_3被取代为V和I除外，这增加亲和力(图5)。在位置X_2，取代为R、C、I和L全部增加亲和力，并且大多数取代是耐受的。同样，X_4和X_5的取代通常具有良好的耐受性，但X_4中带正电荷的残基明显除外，这会降低亲和力。在位置X_4中取代为Y、E、S、Q、C、A和G增加亲和力。大多数取代(包括Y、F、T、S、Q、N、C、V、M、I、G、A)增加位置X_5中的亲和力，尽管若干个取代损害溶解度。

[0481] 52种组合肽：

[0482] 基于II类结合基序中的双取代，我们发现许多组合具有良好的耐受性，并且N在位置X_1，S/E在位置X_2，R在位置X_4通常具有更好或不受干扰的亲和力，而F在位置X_1则通常耐受性不佳(图6)。

[0483] 结论

[0484] 本实施例证明，通过氨基酸取代优化HWLKV序列提供了显示出对PICK1具有相等甚至更高亲和力的肽配体。

[0485] 实施例6：PEG的变体和PEG与肽配体的附接位点的变体

[0486] 在这一系列实验中，我们希望测试各种含有PEG_x(x＝0-4个乙二醇部分)的二价肽配体(图7)对纯化的PICK1的亲和力。此外，我们还希望测试当使用不同的接头附接时对纯化的PICK1的亲和力，其中PEG_4与序列HWLKV的赖氨酸(K)氨基酸的侧链连接(图7；ac-$(HWLK_{PEG4}V)_2$)。

[0487] 材料与方法

[0488] 如实施例1中所述表达和纯化PICK1。

[0489] 荧光偏振：荧光偏振是在竞争模式下以固定浓度的蛋白质和示踪剂(5FAM-$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$，5nM)针对渐增浓度的未标记的PEG_x-$(HWLKV)_2$进行的。将板在黑色半面积Corning黑色非结合表面96孔板中在冰上孵育2-4h，并使用在488nm处的激发滤光片和在535nm处的长通发射滤光片在Omega POLARstar板阅读器上测量荧光偏振。使用GraphPad Prism 6.0绘制数据并拟合至One site competition，以提取K_I值，所述值全部都与HWLKV肽的亲和力相关，最终将其作为亲和力增加倍数绘图。

[0490] 结果

[0491] 为了测试两个相同的五肽之间所需的最小距离，我们决定测试不同的PEG接头长度和位置。我们发现不同长度的PEG接头之间的亲和力变化很小，与HWLKV肽相比，所有这些接头都提供了增强的PICK1亲和力(图8)。

[0492] 此外，我们发现与PEG_4-HWLKV相比，将PEG_4接头附接至X_4赖氨酸侧链胺代替N末端

胺并没有显著改变亲和力。

[0493] 结论

[0494] 本实施例证明本公开文本的PICK1抑制剂中接头的长度和附接位点的变化具有良好的耐受性。

[0495] 实施例7:myr-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$在炎性疼痛中的功效评估

[0496] 在这一系列实验中,我们旨在评估myr-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$在小鼠的完全弗氏佐剂(CFA)模型中缓解炎性疼痛的功效。

[0497] 材料与方法。

[0498] 炎性疼痛:动物在实验开始前适应实验室至少60min。通过对两只后爪的von Frey测量来确定机械性疼痛阈值。在右后爪上诱导损伤,而对侧左后爪用作动物的内部对照。使用在0.04至2g(g=克力)(0.04、0.07、0.16、0.4、0.6、1.0、1.4、2.0)范围内的Von Frey细丝确定机械性疼痛阈值。在当前的实验中,以升序将细丝施加至后爪的前中央足底表面。将小鼠放在金属丝网上的PVC塑料盒(11.5cm x 14cm)中,并在测试之前允许适应30min。每根von Frey毛发施加五次,每次施加之间有足够的休息时间段,并记录下缩爪的次数。缩爪阈值被确定为这样的von Frey细丝,其引起在两根连续的细丝中5次施加中有至少3次阳性试验。阳性试验被定义为由细丝诱导的突然缩爪、退缩和/或舔爪。通过将50μL未稀释的完全弗氏佐剂(CFA)(F5881,Sigma)单侧注射至右后爪的足底表面来诱导炎性疼痛,而对照小鼠则注射相同量的0.9%盐水(B.Braun,德国)。所有足底注射均在动物处于异氟烷麻醉(2%)下时使用胰岛素针头(0.3mL BD Micro-Fine)进行,持续最长60秒。根据实验在单侧CFA注射后最多11天,施加Von Frey。通过不同途径给(鞘内(i.t.(7μL))或皮下(10μL/g))且以不同浓度(2、10或50μmol/kg)施用myr-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$。使用GraphPad Prism 6.0进行统计分析。进行单因素重复测量方差分析,随后进行邦弗朗尼事后检验。显著性水平设置为$p<0.05$。

[0499] 结果:

[0500] 下面呈现了myr-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$在使用3种不同治疗方法缓解CFA模型中的炎性疼痛方面的功效。

[0501] 第0天,向小鼠的右后爪足底注射50μL的CFA或盐水。两天后,向小鼠皮下注射50μmol/kg(10μL/g)myr-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$或盐水。在注射前以及注射后1、5和24小时使用von Frey细丝测试诱发的疼痛。双因素方差分析和邦弗朗尼事后分析揭示myr-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$的总体显著作用,其在注射后1小时测试时具有显著的疼痛缓解。此外,数据揭示将盐水代替CFA注射至后爪注射没有影响,并且CFA对痛觉过敏的影响在注射后11天时消失(图9a)。

[0502] 第0天,向小鼠的右后爪足底注射50μL的CFA或盐水。两天后,通过使用von Frey细丝确认痛觉过敏,并向小鼠皮下注射2、10或50μmol/kg(10μL/g)myr-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$或盐水(10μL/g)。在注射后1、5和24小时使用von Frey细丝再次测试诱发的疼痛。双因素方差分析及随后的邦弗朗尼事后分析揭示myr-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$的总体显著作用,其中对于所测试的最高浓度在注射后最多5小时有显著的疼痛缓解,并且对于两个较低浓度当在注射后1小时测试时有显著的疼痛缓解(图9b)。

[0503] 第0天,向小鼠的右后爪足底注射50μL的CFA或盐水。两天后,通过使用von Frey细丝确认痛觉过敏,并向小鼠鞘内注射20μM myr-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$或7μL体积的盐水。在注射后

1、5和24小时使用von Frey细丝再次测试诱发的疼痛。双因素方差分析及随后的邦弗朗尼事后分析揭示myr-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$的总体显著作用，其中在myr-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$施用后1小时和5小时有显著的疼痛缓解且在施用后24小时没有作用(图9c)。

[0504] 结论

[0505] 本实施例证明，在炎性疼痛的CFA模型中myr-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$显著减轻炎性疼痛，如增加的缩爪阈值所示(图9a-图9c)。此外，发现未损伤的对侧爪的缩爪阈值保持不变。myr-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$在皮下注射两剂后有效地减轻疼痛(图9a-图9b)。此外，myr-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$在鞘内注射后减轻炎性疼痛(图9c)，证实myr-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$抑制中枢敏化。

[0506] 实施例8:myr-NPEG4-(HWLKV)2在神经性疼痛中的功效评估

[0507] 在本实验中，我们旨在评估myr-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$在小鼠的保留性神经损伤(SNI)模型中缓解神经性疼痛的治疗功效。

[0508] 材料与方法

[0509] 神经性疼痛。SNI疼痛实验由表型专业知识——疼痛和CNS行为CRO在Stéphane Gaillard博士(CEO)的监督下进行。对8周龄C57Bl6J雄性小鼠(Charles River)进行研究。对麻醉的小鼠进行保留性神经损伤手术。对坐骨神经的腓骨和胫骨远端分支进行结扎和横切，使腓肠分支完好无损。在手术后7天，通过von Frey细丝证实了同侧后爪对von Frey细丝的反应阈值降低，这对应于神经性疼痛病症。用校准的von Frey细丝(“上/下”方法)测量手术小鼠的机械性阈值反应，并计算50％阈值(g)。实验者对小鼠治疗不知情。在手术前测量机械性阈值，并在第7天在药物施用后0h、1h、2h、3h、4h和6h再次测量。将所有化合物均在PBS中稀释并以10μL/g皮下施用。使用GraphPad Prism 6.0进行统计分析。进行单因素重复测量方差分析，随后进行邦弗朗尼事后检验。显著性水平设置为$p<0.05$。

[0510] 结果：

[0511] 小鼠接受了通过切断腓骨神经和胫骨神经导致部分神经损伤的手术，从而产生剩余腓肠神经的超敏反应(SNI)。七天后，通过使用von Frey细丝确认痛觉过敏，并向小鼠皮下注射2或10μmol/kg(10μL/g)myr-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$或盐水(10μL/g小鼠)。在注射后1、2、3、4和6小时使用von Frey细丝再次测试诱发的疼痛。双因素方差分析及随后的邦弗朗尼事后分析揭示myr-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$的总体显著作用，其中对于所测试的最高浓度在注射后最多3小时有显著的疼痛缓解，并且较低的浓度没有显著的疼痛缓解。

[0512] 结论

[0513] 本实施例证明，在神经性疼痛的SNI模型中，myr-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$显著减轻神经性疼痛，如治疗后小鼠的增加的缩爪阈值所示。此外，发现未损伤的对侧爪的缩爪阈值保持不变。这证实了myr-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$在皮下注射后以剂量依赖性方式有效地减轻疼痛(图10)。

[0514] 实施例9:NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$在神经性疼痛中的功效评估

[0515] 在本实验中，旨在评估NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$(不具有脂肪链，PD5)在小鼠的保留性神经损伤(SNI)模型后缓解神经性疼痛的治疗功效。

[0516] 材料与方法

[0517] 神经性疼痛。对8周龄C57Bl6J雄性小鼠(Charles River)进行研究。对麻醉的小鼠进行保留性神经损伤手术。对坐骨神经的腓骨和胫骨远端分支进行结扎和横切，使腓肠分支完好无损。在手术后9天，通过von Frey细丝证实了同侧后爪对von Frey细丝的反应阈值

降低,这对应于神经性疼痛病症。用校准的von Frey细丝(“上/下”方法)测量手术小鼠的机械性阈值反应,并计算50%阈值(g)。实验者对小鼠治疗不知情。在手术前测量机械性阈值,并在第9天在药物施用后0h、1h、2h、3h、4h和6h再次测量。将所有化合物均在PBS中稀释并以10μmol/kg(10μL/g)$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$以10μL/g皮下施用。使用GraphPad Prism 6.0进行统计分析。进行单因素重复测量方差分析,随后进行邦弗朗尼事后检验。显著性水平设置为$p<0.05$。

[0518] 结果:

[0519] 小鼠接受了通过切断腓骨神经和胫骨神经导致部分神经损伤的手术,从而产生剩余腓肠神经的超敏反应(SNI)。九天后,通过使用von Frey细丝确认痛觉过敏,并向小鼠皮下注射10μmol/kg(10μL/g)$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$(PD5)。在注射后1、2、3、4和6小时使用von Frey细丝再次测试诱发的疼痛。双因素方差分析及随后的邦弗朗尼事后分析揭示,使用不具有脂肪族基团的$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$治疗没有显著作用(图11)。为了比较,来自实施例8的myr-$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$和媒介物组(图10)以虚线显示。

[0520] 结论

[0521] 本实施例证明,在神经性疼痛的SNI模型中,$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$(不具有脂肪族链)未显著减轻神经性疼痛,如治疗后小鼠的增加的缩爪阈值所示。

[0522] 实施例10:myr-$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$在慢性神经性疼痛中的功效评估

[0523] 在本实验中,旨在评估myr-$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$在小鼠的保留性神经损伤(SNI)模型后1年缓解神经性疼痛的治疗功效。

[0524] 材料与方法

[0525] 神经性疼痛。对8周龄C57Bl6J雄性小鼠(Charles River)进行研究。对麻醉的小鼠进行保留性神经损伤手术。对坐骨神经的腓骨和胫骨远端分支进行结扎和横切,使腓肠分支完好无损。在手术后2天,通过von Frey细丝证实了同侧后爪对von Frey细丝的反应阈值降低,这对应于神经性疼痛病症。小鼠每月进行von Frey测试,并且在52周时保持痛觉过敏反应。

[0526] 用校准的von Frey细丝(“上/下”方法)测量手术小鼠的机械性阈值反应,并计算50%阈值(g)。实验者对小鼠治疗不知情。注射后,在2和5h测量机械性阈值。将所有化合物均在PBS中稀释并以10μL/g、30μmol/kg皮下施用。使用GraphPad Prism 6.0进行统计分析。进行单因素方差分析,随后进行邓尼特多重比较检验。****,$p<0.0001$。

[0527] 结果:

[0528] 小鼠接受了通过切断腓骨神经和胫骨神经导致部分神经损伤的手术,从而产生剩余腓肠神经的超敏反应(SNI)。2天后,通过使用von Frey细丝确认痛觉过敏(图12)。这在52周后没有改变。向小鼠皮下注射30μmol/kg(10μL/g)myr-$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$(10μL/g小鼠)。在注射后2和5小时使用von Frey细丝再次测试诱发的疼痛。单因素方差分析及随后的邓尼特多重比较检验揭示在5h时具有高度显著的治疗效果($p<0.0001$)

[0529] 结论

[0530] 本实施例证明,在神经性疼痛的SNI模型中,myr-$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$在诱导SNI损伤后全年显著减轻神经性疼痛,如治疗后小鼠的增加的缩爪阈值所示。

[0531] 实施例11:myr-$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$在糖尿病性神经病变中的功效评估

[0532] 在本实验中，旨在使用1型糖尿病的链脲佐菌素(STZ)模型评估myr-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$缓解糖尿病性神经病变的治疗功效。

[0533] 材料与方法

[0534] 糖尿病性神经病变(STZ)模型。通过单次腹膜内注射200μg/mL链脲佐菌素溶液(100μl/10g，Sigma-aldrich S0130，批号WXBB7152V)诱导糖尿病。在注射前和注射后7天检测血糖。所有注射的小鼠在D+7时呈现血糖浓度>350mg/dL，然后在D+14时用于化合物的镇痛测试。一只小鼠必须在

[0535] 注射后7天被安乐死。

[0536] 用校准的von Frey细丝(“上/下”方法)测量手术小鼠的机械性阈值反应，并计算50％阈值(g)。实验者对小鼠治疗不知情。手术后13天，通过von Frey证实同侧后爪对von Frey细丝的阈值反应降低，这对应于糖尿病性神经病变。在注射myr-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$后，在1、2、4和6h测量机械性阈值，并在第15天再次测量。将化合物稀释在PBS(媒介物)中并以10μL/g以如所示的剂量皮下施用(加巴喷丁，5MPK)。使用GraphPad Prism 6.0进行统计分析。进行单因素方差分析，随后进行邓尼特多重比较检验。****，p<0.0001。

[0537] 结果：

[0538] STZ施用后七天，所有小鼠呈现血糖急剧增加(从197.4+/-4.4mg/dL至533.5+/-10.4;参见附录)，证实了小鼠的糖尿病状态。如图13所示，STZ注射后13天，糖尿病诱导的神经性疼痛随着机械性反应阈值的降低明显建立(机械性痛觉超敏)。与媒介物组相比，普瑞巴林(5MPK)施用诱导机械性反应阈值的显著增加(施用后1h、2h和4h，p<0.001)，其中在+2h最大逆转高达基线的84.7％±10.5％。与媒介物组相比，2和10μmol/kg的myr-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$(mPD5)溶液均诱导机械性反应阈值的显著增加(对于最低浓度，在1h处p＝0.006且在2h处p＝0.003;对于10μmol/kg溶液，在1h和2h处p<0.001，在4h处p<0.006)。施用后2h后达到最大逆转(2和10μmol/kg溶液分别为基线的49.2％±7.9％和67.3％±4.5％)。有趣的是，我们还观察到在1h和2h处用mPD5治疗的两组之间的统计差异(分别为p＝0.013和p＝0.008)。

[0539] 结论

[0540] 在本研究中，我们已测试了myr-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$对STZ诱导的小鼠的神经性疼痛模型的镇痛作用。有趣的是，我们已观察到以10μmol/kg施用后长达4h的强烈且持久的作用。同时，我们还观察到所述肽的剂量依赖性作用，其中2μmol/kg剂量的作用较弱。需要注意的是，没有观察到明显的副作用。

[0541] 实施例12:myr-NPEG$_4$-(NSVRV)$_2$、myr-NPEG$_4$-(SVRV)$_2$和myr-NPEG$_4$-(LRV)$_2$在炎性疼痛中的功效评估

[0542] 在这一系列实验中，旨在评估如由实施例5中描述的肽优化定义的PDZ结构域结合序列的变体缓解小鼠的完全弗氏佐剂(CFA)模型中的炎性疼痛的功效。这定义了从实施例5中的筛选到体内功效的转化，并证明了较短结合基序(C4和C3)的作用。

[0543] 材料与方法。

[0544] 炎性疼痛(CFA模型)：动物在实验开始前适应实验室至少60min。通过对两只后爪的von Frey测量来确定机械性疼痛阈值。在右后爪上诱导损伤，而对侧左后爪用作动物的内部对照。

[0545] 使用在0.04至2g(g＝克力)(0.04、0.07、0.16、0.4、0.6、1.0、1.4、2.0)的范围内的Von Frey细丝确定机械性疼痛阈值。在本实验中，将细丝按升序施加至后爪的前中央足底表面。将小鼠放在金属丝网上的PVC塑料盒中(11.5cm x 14cm)中，并在测试前允许适应30min。每根von Frey毛发施加五次，每次施加之间有足够的休息时间段，并记录缩爪的次数。缩爪阈值被确定为这样的vonFrey细丝，其引起在两根连续的细丝中5次施加中有至少3次阳性试验。阳性试验被定义为由细丝诱导的突然缩爪、退缩和/或舔爪。

[0546] 通过将50μL未稀释的完全弗氏佐剂(CFA)(F5881，Sigma)单侧注射至右后爪的足底表面来诱导炎性疼痛，而对照小鼠则注射相同量的0.9％盐水(B.Braun，德国)。所有足底注射均在动物处于异氟烷麻醉(2％)下时使用胰岛素针头(0.3mL BD Micro-Fine)进行，持续最长60秒。根据实验在单侧CFA注射后最多6天，施加Von Frey。皮下(10μL/g)且以不同浓度(0.4和2μmol/kg)施用所述肽。使用GraphPad Prism 6.0进行统计分析。进行单因素重复测量方差分析，随后进行邓尼特事后检验。显著性水平设置为$p<0.05$。结果：

[0547] 第0天，向小鼠的右后爪足底注射50μL的CFA或盐水。在CFA注射后第2天，向小鼠皮下注射0.4μmol/kg(10μL/g)myr-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$、myr-NPEG$_4$-(NSVRV)$_2$、myr-NPEG$_4$-(SVRV)$_2$或myr-NPEG$_4$-(LRV)$_2$，并且在第5天向小鼠皮下注射2μmol/kg(10μL/g)myr-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$、myr-NPEG$_4$-(NSVRV)$_2$、myr-NPEG$_4$-(SVRV)$_2$或myr-NPEG$_4$-(LRV)$_2$。在此浓度下，myr-NPEG4-(NSVRV)$_2$未完全溶解。在第2天和第5天，在注射前以及注射后1、5和24小时使用von Frey细丝测试诱发的疼痛。对于每个施用日的双因素方差分析及随后的单独的邓尼特事后分析揭示最高亲和力化合物myr-NPEG4-(NSVRV)$_2$在0.4μmol/kg的皮下剂量下缓解疼痛，并且此外myr-NPEG4-(HWLKV)$_2$和myr-NPEG4-(SVRV)$_2$二者在2.0μmol/kg的皮下剂量下缓解疼痛(图XX)。在此浓度下，myr-NPEG4-(NSVRV)$_2$未完全溶解。myr-NPEG4-(LRV)$_2$在此剂量下显示出缓解疼痛的趋势，但这在实验中并不显著(图14)。

[0548] 结论

[0549] 本实施例证明在炎性疼痛的CFA模型中，与myr-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$类似，myr-NPEG$_4$-(NSVRV)$_2$、myr-NPEG$_4$-(SVRV)$_2$或myr-NPEG$_4$-(LRV)$_2$在2μmol/kg(10μL/g)下减轻炎性疼痛，如由增加的缩爪阈值所示(图14)。这证实了除C5 PICK1 PDZ结合基序之外的更短的PICK1 PDZ结合基序(C4和C3)的功效，并且此外与实施例5中观察到的亲和力一致。此外，携带优化的最高亲和力肽(NSVRV)的myr-NPEG$_4$-(NSVRV)$_2$(实施例5)在0.4μmol/kg(10μL/g)下显示出显著的疼痛缓解。

[0550] 实施例13：myr-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$在缓解自发性炎性疼痛中的功效评估

[0551] 本实验旨在评估myr-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$不仅缓解实验者触摸发炎的爪子诱发的疼痛，还缓解使用单次暴露位置偏好的持续性疼痛、自发性疼痛的能力。这被认为对于临床转化是至关重要的。

[0552] 材料与方法。

[0553] 炎性疼痛(CFA模型)：动物在实验开始前适应实验室至少60min。两只后爪的机械性疼痛阈值通过von Frey测量来确定。在右后爪上诱导损伤，而对侧左后爪用作动物的内部对照。使用在0.04至2g(g＝克力)(0.04、0.07、0.16、0.4、0.6、1.0、1.4、2.0)范围内的Von Frey细丝确定机械性疼痛阈值。在当前的实验中，以升序将细丝施加至后爪的前中央足底表面。将小鼠放在金属丝网上的PVC塑料盒(11.5cm x 14cm)中，并在测试之前允许适应

30min。每根von Frey细丝施加五次，每次施加之间有足够的休息时间段，并记录下缩爪的次数。缩爪阈值被确定为这样的von Frey细丝，其引起在两根连续的细丝中5次施加中有至少3次阳性试验。阳性试验被定义为由细丝诱导的突然缩爪、退缩和/或舔爪。通过将50μL未稀释的完全弗氏佐剂(CFA)(F5881，Sigma)单侧注射至右后爪的足底表面来诱导炎性疼痛。所有足底注射均在动物处于异氟烷麻醉(2％)下时使用胰岛素针头(0.3mL BD Micro-Fine)进行，持续最长60秒。Von Frey是在CFA注射前、在CFA注射后2天以及在CFA注射后5天，证实了下述单次暴露位置偏好实验前后的超敏性。使用GraphPad Prism 6.0进行统计分析。学生t检验。显著性水平设置为$p<0.05$。

[0554] 单次暴露位置偏好(sePP)：sePP实验在三隔间矩形装置中进行，其由中间的中性区(11，5x24cm)以及在两端的具有不同的地板纹理以及不同的墙壁图案的两个细长隔间(28x24cm)组成。在暴露时期期间，隔间由两个灰白色Plexiglas®隔板(24x40cm)彼此隔开，并且在测试当天，这些隔板被移除。

[0555] sePP方案在三天内进行，其中前两天进行暴露时期并且第三天进行测试。在所有三天中，在开始实验前，允许小鼠适应房间至少60min。mPD5总是与具有灰色墙壁和打孔地板的隔间匹配，先前已证明这是最不偏好的隔间。来自笼子的所有小鼠都同时进行了测试，但并非所有小鼠都被给予相同的治疗。

[0556] 在暴露日，将小鼠称重并皮下注射肽(30μmol/kg)或媒介物(10μL/g)并立即放入指定的隔间中持续60min。测试组在最不偏好的隔间中暴露于肽，在偏好的隔室中暴露于媒介物(PBS)，而对照组在两个隔间中都注射媒介物。

[0557] 对于在第3天的偏好测试，移除Plexiglas®，并且小鼠可以在三个隔间之间自由移动20分钟。通过Ethovision(Noldus，荷兰瓦格宁根)测量在不同隔间中所耗费的时间。另外在没有损伤的动物上进行实验，其显示没有mPD5依赖性偏好变化。

[0558] 结果：

[0559] 单次暴露于myr-$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$足以改变CFA损伤动物的位置偏好。在偏好测试中，与媒介物处理的对照小鼠相比，myr-$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$处理的动物在myr-$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$配对隔间中所耗费的时间显著更多(图15A和图15B)，这表明用myr-$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$处理的动物对该隔间的偏好。为了确保偏好的改变是由于疼痛缓解而不是肽本身改变了其偏好，在没有损伤的老鼠(未处理)上进行完全相同的实验，显示myr-$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$处理的动物的偏好没有改变。这进一步表明没有myr-$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$滥用倾向。

[0560] 结论：

[0561] 本实施例证明，具有炎性疼痛的小鼠使其偏好转变为先前在其中接受过myr-$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$的隔室，这表明小鼠感知到药物缓解持续性疼痛、自发性疼痛。这被认为对于转化潜力至关重要，因为大多数的患者痛苦与持续性疼痛有关。

[0562] 实施例14：与Tat-PD5相比不同浓度的mPD5的血浆浓度

[0563] 本实验旨在评估myr-$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$的血浆浓度和寿命，并确定与母体分子Tat-$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$相比，myr-$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$的酰化是否延长血浆半衰期。

[0564] 材料与方法：

[0565] myr-$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$的暴露mPD5曲线通过无锡DMPK测定，并通过向3只雄性C57BL/6N小鼠(禁食)皮下注射在无菌PBS中的每种浓度的mPD5(2、10和50μmuol/kg)来完成，并在

30min、1h、2h、5h、12h的时间采集血样，并对血浆进行LC-MS。从消除期的3个点确定下坡的三个点。

[0566] 生物素化Tat-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$的血浆暴露的测定。

[0567] 血样收集。将稀释在0.9％NaCl中的生物素化TAT-di-PEG4-DATC5(biot-TPD5；34mg/kg＝10μmol)或生物素化myr-di-PEG4-DATC5(biot-mPD5;10μmol)一次皮下注射至8周龄雄性C57bl6N小鼠(总共18只小鼠)，并在15min、30min、1h、2h和6h后使用含抑肽酶的BD Vacutainer®K3EDTA试管(BD Diagnostics)收集血样(每个时间点从6只小鼠收集血样)。将血样4℃下以3500RPM离心15min，并将血浆收集在新试管中并在-20℃下冷冻。

[0568] ELISA。将96孔NUNC IMMOBILIZER(目录号436006)板用稀释在100mM碳酸钠缓冲液(pH 9.6)中的15μg/mL生物素化白蛋白(Sigma-Aldrich，产品编号A8549)包被，并在室温下在振荡器上孵育2h。孵育后，将板用PBS-T(1X具有0.1％TWEEN®20的磷酸盐缓冲盐水(Sigma-Aldrich))洗涤3x，1个洗涤步骤是在室温下在振荡器上过夜。在单独的圆底96孔板(Thermo Scientific)中将具有0.1％PBST(1:5000)的预稀释的HRP缀合的链霉亲和素(DAKO，参考编号P0397，0.83g/L)与不同稀释度(10x和20x)的biot-TPD5混合并在振荡器上孵育20分钟。将溶液(100μL/孔)加载至包被的96孔板中并在室温下孵育1h。孵育后，将板用PBS-T洗涤3x并在3-5min内在100μL TMB plus(Sigma，SLBT4708，T0440-1L)中显影。通过添加100μL 0.2M硫酸(H2SO4)停止显影。将板在来自PerkinElmer(Hvidovre，丹麦)的Wallac VICTOR2 1420Multilabel计数器上在450nm(和570nm)处读数。将测得的吸光度校准至由biot-TPD5的标准稀释液生成的标准曲线。

[0569] 结果：

[0570] 对于myr-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$，我们观察到在半对数尺度指示1阶动力学上血浆浓度的初始增加在1h后达到最大浓度(在3.75mg/kg(2μmol/kg)注射之后1446±106ng/ml；在18.8mg/kg(10μmol/kg)注射之后6173±508ng/ml；在93.8mg/kg(50μmol/kg)注射之后20258±642ng/ml)，随后是线性消除期。最大剂量和曲线下面积二者均与剂量和$T_{1/2}$按比例缩放(在3.75mg/kg(2μmol/kg)注射后0.50±0.07h；在18.8mg/kg(10μmol/kg)注射后0.59±0.07h；在93.8mg/kg(50μmol/kg)注射后0.84±0.03h)(图16)。对于生物素化Tat-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$(10μmol/kg)，我们观察到血浆浓度增加在30min达到峰值，随后是非线性消除谱，其在后期减缓。最大浓度与对于myr-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$(10μmol/kg)观察到的最大浓度相似(图16)。

[0571] 结论：

[0572] myr-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$在皮下施用后以剂量依赖性方式分布至血浆中，并且以1阶动力学消除并且半衰期为30-45分钟。这与Tat-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$相似，行为影响一致，表明myr-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$上的酰化不会通过增加血浆暴露或寿命来发挥其作用。

[0573] 实施例15：myr-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$的溶解度和稳定性的评估

[0574] 目标是测定溶解度，这对于优选(皮下)施用途径以及化学稳定性很重要，化学稳定性对于myr-NPEG4-(HWLKV)$_2$的保质期至关重要。

[0575] 材料与方法：

[0576] 通过目测以渐增浓度溶解在10mM PBS中的样品来测定溶解度。由REDGLEAD通过将PBS中的myr-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$在5°和25°下放置30天然后通过HPLC-UV-MS方法来得到四种浓

度2、20、50和200μM的溶解度。

[0577] 结果：

[0578] 通过目测，我们确定myr-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$的溶解度为至少250mg/ml(130mM)(图17)；这可能是由于胶束结构。

[0579] 没有观察到降解，并且对于200和50μM的样品，纯度被确定为>98％。由于20和2μM的样品的低吸收，因此，即使在这两个样品中都没有发现降解也无法确定纯度。肽mPD5在媒介物组合物中在+5℃和+25℃下化学稳定至少30天。确认所有样品的质量，包括用于校准曲线的标准样品的质量。

[0580]

	标称浓度 mPD5(μM)	pH	UV-HPLC 峰面积	测量浓度 mPD5(μM)
30天在5℃下	200	7.37	6665	194
	50	7.39	3347	49
	20	7.40	1196	17
	2	7.37	37	0.5
	0		ND	<0.2
30天在25℃下	200	7.36	7005	203
	50	7.41	3325	48
	20	7.39	1161	17
	2	7.37	26	0.4
	0		ND	<0.2

[0581] 结论：

[0582] myr-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$显示出非常好的溶解度，其被认为足以用于人皮下给药(最大体积800μl)，且具有观察到的功效。此外，稳定性良好，表明所述化合物符合保质期要求。

[0583] 实施例16：亲脂性脂肪族链的变化

[0584] 在这一系列实验中，旨在评估在小鼠的完全弗氏佐剂(CFA)模型中通过脂肪族链取代实现的治疗功效和作用延长。

[0585] 材料与方法。

[0586] 炎性疼痛(CFA模型)：通过将50μL未稀释的完全弗氏佐剂(CFA)(F5881，Sigma)单侧注射至右后爪的足底表面来诱导炎性疼痛，而对照小鼠则注射相同量的0.9％盐水(B.Braun，德国)。所有足底注射均在动物处于异氟烷麻醉(2％)下时使用胰岛素针头(0.3mL BD Micro-Fine)进行，持续最长60秒。在右后爪上诱导损伤，而对侧左后爪用作动物的内部对照。

[0587] 动物在实验开始前适应实验室至少60min。通过对两只后爪的von Frey测量来确定机械性疼痛阈值。使用在0.04至2g(g＝克力)(0.04、0.07、0.16、0.4、0.6、1.0、1.4、2.0)范围内的Von Frey细丝确定机械性疼痛阈值。在当前的实验中，以升序将细丝施加至后爪的前中央足底表面。将小鼠放在金属丝网上的PVC塑料盒(11.5cm x 14cm)中，并在测试之前允许适应30min。每根von Frey毛发施加五次，每次施加之间有足够的休息时间段，并记录下缩爪的次数。缩爪阈值被确定为这样的von Frey细丝，其引起在两根连续的细丝中5次施加中有至少3次阳性试验。阳性试验被定义为由细丝诱导的突然缩爪、退缩和/或舔爪。

[0588] 根据实验在单侧CFA注射后最多5天，施加Von Frey。皮下以2μmol/kg施用肽(在PBS中10μL/g)，其中以交叉的时间表注射每种化合物5次以评估其在缓解炎性疼痛方面的

功效。使用GraphPad Prism 8.0进行统计分析。进行单因素重复测量方差分析,随后进行邓尼特事后检验。显著性水平设置为$p<0.05$。

[0589] 结果:

[0590] 在第0天,使用von Frey细丝确定小鼠基线缩爪反应,然后向右后爪足底注射50μL CFA或盐水。

[0591] 在CFA注射后第2-5天,向小鼠皮下注射PBS或2.0μmol/kg(10μL/g)myr(C14)-$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$、myr(C14)(不饱和,反式)-$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$、myr(C14)(不饱和,反式)-$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$、(C18)(二酸)-$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$、(C16)-$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$、胆固醇-β-Asp-$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$。

[0592] 在所有日子里,在注射前以及注射后2和5小时使用von Frey细丝测试诱发的疼痛。对于每个施用日进行双因素方差分析,随后单独进行邓尼特事后分析。

[0593] 注射PBS未引发疼痛缩爪阈值的任何变化,而myr(C14)-$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$(mPD5)引发了完全且高度显著的疼痛缓解(图18A)。类似地,myr(C14)(不饱和,反式)-$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$、myr(C14)(不饱和,顺式)-$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$、(C18)(二酸)-$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$引发高度显著的疼痛缓解。同样,将酰基链延伸至(C16)-$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$产生高度显著的疼痛缓解(图18B)。最后,胆固醇-β-Asp-$NPEG_4$-$(HWLKV)_2$产生显著的疼痛缓解(图18C)。

[0594] 结论

[0595] 本实施例证明,在炎性疼痛的CFA模型中,可以将不饱和引入酰基链中,也可以引入另外的酸基团使其成为二酸。此外,14至16个碳原子和18个碳原子(具有二酸)的酰基链在功效方面显现出是等效的。最后,亲脂性脂肪族基团(在这种情况下为胆固醇)经由β-Asp的缀合显示出活性。

[0596] 实施例17:mPD5缓解敏化热性疼痛的功效

[0597] 在本实验中,旨在评估mPD5对通过足底注射完全弗氏佐剂(CFA)引发的热性疼痛感觉的敏化的治疗功效。

[0598] 材料与方法。

[0599] 炎性疼痛(CFA模型):动物在实验开始前适应实验室至少60min。通过将辐射热光施加至两只后爪的足底表面进行Hargreave测试。通过自动化读数(Ugo Basile,意大利)测量反应潜伏期。在CFA注射之前进行两只后爪响应于辐射热刺激的基线缩爪潜伏期,并且发现两个预先选择的组之间没有差异。通过将10个50μL未稀释的完全弗氏佐剂(CFA)(F5881,Sigma)单侧注射至右后爪的足底表面来诱导炎性疼痛,而对照小鼠则注射相同量的0.9%盐水(B.Braun,德国)。所有足底注射均在动物处于异氟烷麻醉(2%)下时使用胰岛素针头(0.3mL BD Micro-Fine)进行,持续最长60秒。在CFA注射后第3天,将小鼠放在单独的红色圆柱体(直径8cm,高7.5cm)中,通过IR为20的基线读数确认热性痛觉过敏。对每只小鼠的每只后爪进行了三次测量。阳性试验被定义为由红外光诱导的突然缩爪、退缩和/或舔爪。在CFA注射前和CFA注射后3+4天进行测量。在第3天,在治疗前以及治疗后1、5和21小时进行测量。皮下(10μL/g)且以0或10μmol/kg的浓度施用肽和媒介物。使用GraphPad Prism 6.0进行统计分析。进行单因素重复测量方差分析,随后进行邦弗朗尼事后检验。显著性水平设置为$p<0.05$。

[0600] 结果:

[0601] 在足底注射CFA后第3天，使用Hargreave测试在注射的后爪(同侧)中确认热性痛觉过敏。在皮下施用10μmol/kg(10μL/g)myr-NPEG$_4$-(HWLKV)$_2$(mPD5)后，我们观察到敏化爪的缩爪潜伏期高度显著增加，而观察到对侧(健康)爪无显著变化。在5小时处疼痛缓解不太明显，并在第二天(21h)完全消失。PBS(媒介物)的类似注射未影响任一只爪的缩爪潜伏期(图19)。

[0602] 结论：

[0603] 本实施例证明，mPD5可以完全缓解在炎性疼痛的CFA模型中观察到的热性超敏性，而不会影响未受影响的健康爪的热敏感性。这将所述作用从传递对触摸的超敏性扩大到由不同的伤害感受器子集支配的重要疼痛形式。

[0604] 序列

[0605]

SEQ ID NO:	**序列**
SEQ ID NO: 1	$X_1X_2X_3X_4X_5$，其中： X_1是H、N、F或T，或不存在； X_2是W、S、E或Y；或不存在； X_3是L、V或I； X_4是K、I或R；并且 X_5是V；
SEQ ID NO: 2	$X_1X_2X_3X_4X_5$，其中： X_1是N、F或T，或不存在； X_2是S、E或Y；或不存在； X_3是V、L或I； X_4是I或R；并且 X_5是V
SEQ ID NO: 3	$X_1X_2X_3X_4X_5$，其中： X_1是N或T，或不存在； X_2是S、E或Y；或不存在； X_3是V、L或I； X_4是I或R；并且 X_5是V
SEQ ID NO: 4	$X_1X_2X_3X_4X_5$，其中： X_1是N或F，或不存在； X_2是S、E或Y；或不存在； X_3是V、L或I； X_4是I或R；并且 X_5是V
SEQ ID NO: 5	NSIIV
SEQ ID NO: 6	NSIRV
SEQ ID NO: 7	NSVIV
SEQ ID NO: 8	NSVRV
SEQ ID NO: 9	NEIIV
SEQ ID NO: 10	NEIRV

[0606]

SEQ ID NO: 11	NEVIV
SEQ ID NO: 12	NEVRV
SEQ ID NO: 13	NYIIV
SEQ ID NO: 14	NYIRV
SEQ ID NO: 15	NYVIV
SEQ ID NO: 16	NYVRV
SEQ ID NO: 17	TSIIV
SEQ ID NO: 18	TSIRV
SEQ ID NO: 19	TSVIV
SEQ ID NO: 20	TSVRV
SEQ ID NO: 21	TEIIV
SEQ ID NO: 22	TEIRV
SEQ ID NO: 23	TEVIV
SEQ ID NO: 24	TEVRV
SEQ ID NO: 25	TYIIV
SEQ ID NO: 26	TYIRV
SEQ ID NO: 27	TYVIV
SEQ ID NO: 28	TYVRV
SEQ ID NO: 29	FSIIV
SEQ ID NO: 30	FSIRV
SEQ ID NO: 31	FSVIV
SEQ ID NO: 32	FSVRV
SEQ ID NO: 33	FEIIV
SEQ ID NO: 34	FEIRV
SEQ ID NO: 35	FEVIV
SEQ ID NO: 36	FEVRV
SEQ ID NO: 37	FYIIV
SEQ ID NO: 38	FYIRV
SEQ ID NO: 39	FYVIV
SEQ ID NO: 40	FYVRV
SEQ ID NO: 41	SIIV
SEQ ID NO: 42	SIRV
SEQ ID NO: 43	SVIV
SEQ ID NO: 44	SVRV
SEQ ID NO: 45	EIIV
SEQ ID NO: 46	EIRV
SEQ ID NO: 47	EVIV
SEQ ID NO: 48	EVRV
SEQ ID NO: 49	YIIV
SEQ ID NO: 50	YIRV
SEQ ID NO: 51	YVIV
SEQ ID NO: 52	YVRV
SEQ ID NO: 53	NSLRV
SEQ ID NO: 54	HWLKV
N/A	IIV
N/A	IRV
N/A	VIV
N/A	VRV
N/A	LRV

[0607] N/A:不适用

[0608] 参考文献

[0609] ALFONSO,S.,et al.,Synapto-depressive effects of amyloid beta require PICK1.Eur J Neurosci,2014.39(7):p.1225-33.

[0610] ATIANJOH,F.E.,et al.,Spinal cord protein interacting with C kinase 1 is required for the maintenance of complete Freund's adjuvant-induced inflammatory pain but not for incision-induced post-operative pain.Pain,

2010.151(1):p.226-34.

[0611] BACH,A.et al.(2009).Design and synthesis of highly potent and plasma-stable dimeric inhibitors of the PSD-95-NMDA receptor interaction.Angew Chem Int Ed Engl 48,9685-9689.

[0612] BACH,A et al.,2012.A high-affinity,dimeric inhibitor of PSD-95bivalently interacts with PDZ1-2 and protects against ischemic brain damage.Proc Natl Acad Sci U S A,109,3317-22.BLANCHET,C.E.et al.J.Appl.Crystallogr.2015,48,431.

[0613] CHEN,S.R.,et al.,Nerve injury increases GluA2-lacking AMPA receptor prevalence in spinal cords:functional significance and signaling mechanisms.J Pharmacol Exp Ther,2013.347(3):p.765-72.

[0614] CLEM,R.L.,V.Anggono,and R.L.Huganir,PICK1 regulates incorporation of calcium-permeable AMPA receptors during cortical synaptic strengthening.J Neurosci,2010.30(18):p.6360-6.

[0615] CONRAD,K.L.,et al.,Formation of accumbens GluR2-lacking AMPA receptors mediates incubation of cocaine craving.Nature,2008.454(7200):p.118-21.

[0616] DIXON,R.M.,J.R.Mellor,and J.G.Hanley,Pick1-mediated glutamate receptor subunit 2(GLUR2)trafficking contributes to cell death in oxygen/glucose deprived hippocampal neurons.Journal of Biological Chemistry,2009.

[0617] GANGADHARAN,V.,et al.,Peripheral calcium-permeable AMPA receptors regulate chronic inflammatory pain in mice.J Clin Invest,2011.121(4):p.1608-23.

[0618] GARRY,E.M.,et al.,Specific involvement in neuropathic pain of AMPA receptors and adapter proteins for the GluR2 subunit.Mol.Cell Neurosci.,2003.24(1):p.10-22.

[0619] HANSEN S.et al.Journal of Applied Crystallography 2012,45,566.

[0620] HANSEN S.et al.Journal of Applied Crystallography 2014,47,1469.

[0621] HE,J.,et al.,PICK1 inhibits the E3 ubiquitin ligase activity of Parkin and reduces its neuronal protective effect.Proc Natl Acad Sci U S A,2018.115(30):p.E7193-E7201.

[0622] JI,R.R.,et al.,Central sensitization and LTP:do pain and memory share similar mechanisms?Trends Neurosci,2003.26(12):p.696-705.

[0623] KANDASAMY,R.and T.J.Price,The pharmacology of nociceptor priming.Handb Exp Pharmacol,2015.227:p.15-37.

[0624] KARLSEN,M.L.et al.2015.Structure of Dimeric and Tetrameric Complexes of the BAR Domain Protein PICK1 Determined by Small-Angle X-Ray Scattering.Structure 23,1258-70.

[0625] LONG,J.F.et al.Supramodular structure and synergistic target binding

of the N-terminal tandem PDZ domains of PSD-95.J.Mol.Biol.2003,327,203-214.

[0626] LORGEN,JØ.,PICK1facilitates lasting reduction of GluA2 concentration in the hippocampus during chronic epilepsy.Epilepsy Res,2017.137:25-32

[0627] LUSCHER,C.and R.C.Malenka,Drug-evoked synaptic plasticity in addiction:from molecular changes to circuit remodeling.Neuron,2011.69(4):p.650-63.

[0628] MADSEN,K.L.et al.,2005.Molecular determinants for the complex binding specificity of the PDZ domain in PICK1.Journal of Biological Chemistry 280,20539-20548.

[0629] MARCOTTE,D.J.,et al.,Lock and chop:A novel method for the generation of a PICK1 PDZ domain and piperidine-based inhibitor co-crystal structure.Protein Sci,2018.27(3):p.672-680.

[0630] MOLLER,A.R.,Tinnitus and pain.Prog Brain Res,2007.166:p.47-53.

[0631] NISSEN et al.Design,synthesis,and characterization of fatty acid derivatives of a dimeric peptide-based postsynaptic density-95(PSD-95) inhibitor.J.Med.Chem.2015 Feb 12;58(3):1575-80.

[0632] PEKER,S.and A.Sirin,Parallels between phantom pain and tinnitus.Med Hypotheses,2016.91:p.95-97.

[0633] TURNER et al.Administration of a novel high affinity PICK1 PDZ domain inhibitor attenuates cocaine seeking in rats.Neuropharmacology,164(1),2020,107901.

[0634] VANNESTE,S.,W.T.To,and D.De Ridder,Tinnitus and neuropathic pain share a common neural substrate in the form of specific brain connectivity and microstate profiles.Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry,2019.88:p.388-400.

[0635] VIKMAN,K.S.,B.K.Rycroft,and M.J.Christie,Switch to Ca2+-permeable AMPA and reduced NR2B NMDA receptor-mediated neurotransmission at dorsal horn nociceptive synapses during inflammatory pain in the rat.J Physiol,2008.586(2):p.515-27.

[0636] WANG,W.,et al.,Preserved acute pain and impaired neuropathic pain in mice lacking protein interacting with C Kinase 1.Mol Pain,2011.7:p.11.

[0637] WOLF,M.E.and C.R.Ferrario,AMPA receptor plasticity in the nucleus accumbens after repeated exposure to cocaine.Neurosci Biobehav Rev,2010.35(2):p.185-211.

[0638] WOOLF,C.J.and M.W.Salter,Neuronal plasticity:increasing the gain in pain.Science,2000.288(5472):p.1765-9.

[0639] ZHANG et al.Protein interacting with C alpha kinase 1(PICK1)is involved in promoting tumor growth and correlates with poor prognosis of human breast cancer.Cancer Sci.2010 Jun;101(6):1536-42.

序列表

<110> 哥本哈根大学

<120> PICK1的脂质缀合的肽抑制剂

<130> P5521PC00

<160> 54

<170> PatentIn 3.5版

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 一般DAT-C5变体

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (1)..(1)

<223> H, N, F或T; 或者不存在;

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (2)..(2)

<223> W, S, E或Y; 或者不存在;

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (3)..(3)

<223> L, V或I;

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (4)..(4)

<223> K, I或R;

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (5)..(5)

<223> V;

<400> 1

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

1 5

<210> 2

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列
<220>
<223> 通用DAT-C5变体
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (1)..(1)
<223> N, F或T; 或者不存在;
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (2)..(2)
<223> S, E或Y; 或者不存在;
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (3)..(3)
<223> V, L或I;
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (4)..(4)
<223> I或R;
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (5)..(5)
<223> V;
<400> 2
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5
<210> 3
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 通用DAT-C5变体
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (1)..(1)
<223> N或T; 或者不存在
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (2)..(2)

<223> S, E或Y; 或者不存在;
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (3)..(3)
<223> V, L或I;
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (4)..(4)
<223> I或R;
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (5)..(5)
<223> V;
<400> 3
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5
<210> 4
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 通用DAT-C5变体
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (1)..(1)
<223> N或F; 或者不存在;
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (2)..(2)
<223> S, E或Y; 或者不存在;
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (3)..(3)
<223> V, L或I;
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (4)..(4)
<223> I或R;
<220>

<221> 尚未归类的特征
<222> (5)..(5)
<223> V;
<400> 4
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5
<210> 5
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> DAT-C5变体
<400> 5
Asn Ser Ile Ile Val
1 5
<210> 6
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> DAT-C5变体
<400> 6
Asn Ser Ile Arg Val
1 5
<210> 7
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> DAT-C5变体
<400> 7
Asn Ser Val Ile Val
1 5
<210> 8
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> DAT-C5变体

<400> 8
Asn Ser Val Arg Val
1 5
<210> 9
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> DAT-C5变体
<400> 9
Asn Glu Ile Ile Val
1 5
<210> 10
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> DAT-C5变体
<400> 10
Asn Glu Ile Arg Val
1 5
<210> 11
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> DAT-C5变体
<400> 11
Asn Glu Val Ile Val
1 5
<210> 12
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> DAT-C5变体
<400> 12
Asn Glu Val Arg Val
1 5

<210> 13
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> DAT-C5变体
<400> 13
Asn Tyr Ile Ile Val
1 5
<210> 14
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> DAT-C5变体
<400> 14
Asn Tyr Ile Arg Val
1 5
<210> 15
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> DAT-C5变体
<400> 15
Asn Tyr Val Ile Val
1 5
<210> 16
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> DAT-C5变体
<400> 16
Asn Tyr Val Arg Val
1 5
<210> 17
<211> 5
<212> PRT

<213> 人工序列
<220>
<223> DAT-C5变体
<400> 17
Thr Ser Ile Ile Val
1 5
<210> 18
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> DAT-C5变体
<400> 18
Thr Ser Ile Arg Val
1 5
<210> 19
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> DAT-C5变体
<400> 19
Thr Ser Val Ile Val
1 5
<210> 20
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> DAT-C5变体
<400> 20
Thr Ser Val Arg Val
1 5
<210> 21
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> DAT-C5变体

<400> 21
Thr Glu Ile Ile Val
1 5
<210> 22
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> DAT-C5变体
<400> 22
Thr Glu Ile Arg Val
1 5
<210> 23
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> DAT-C5变体
<400> 23
Thr Glu Val Ile Val
1 5
<210> 24
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> DAT-C5变体
<400> 24
Thr Glu Val Arg Val
1 5
<210> 25
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> DAT-C5变体
<400> 25
Asp Ala Thr Cys Val Ala Arg Ile Ala Asn Thr Thr Tyr Ile Ile Val
1 5 10 15

<210> 26
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> DAT-C5变体
<400> 26
Thr Tyr Ile Arg Val
1 5
<210> 27
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> DAT-C5变体
<400> 27
Thr Tyr Val Ile Val
1 5
<210> 28
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> DAT-C5变体
<400> 28
Thr Tyr Val Arg Val
1 5
<210> 29
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> DAT-C5变体
<400> 29
Phe Ser Ile Ile Val
1 5
<210> 30
<211> 5
<212> PRT

<213> 人工序列
<220>
<223> DAT-C5变体
<400> 30
Phe Ser Ile Arg Val
1 5
<210> 31
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> DAT-C5变体
<400> 31
Phe Ser Val Ile Val
1 5
<210> 32
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> DAT-C5变体
<400> 32
Phe Ser Val Arg Val
1 5
<210> 33
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> DAT-C5变体
<400> 33
Phe Glu Ile Ile Val
1 5
<210> 34
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> DAT-C5变体

<400> 34
Phe Glu Ile Arg Val
1 5
<210> 35
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> DAT-C5变体
<400> 35
Phe Glu Val Ile Val
1 5
<210> 36
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> DAT-C5变体
<400> 36
Phe Glu Val Arg Val
1 5
<210> 37
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> DAT-C5变体
<400> 37
Phe Tyr Ile Ile Val
1 5
<210> 38
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> DAT-C5变体
<400> 38
Phe Tyr Ile Arg Val
1 5

<210> 39
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> DAT-C5变体
<400> 39
Phe Tyr Val Ile Val
1 5
<210> 40
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> DAT-C5变体
<400> 40
Phe Tyr Val Arg Val
1 5
<210> 41
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> DAT-C5变体
<400> 41
Ser Ile Ile Val
1
<210> 42
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> DAT-C5变体
<400> 42
Ser Ile Arg Val
1
<210> 43
<211> 4
<212> PRT

<213> 人工序列
<220>
<223> DAT-C5变体
<400> 43
Ser Val Ile Val
1
<210> 44
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> DAT-C5变体
<400> 44
Ser Val Arg Val
1
<210> 45
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> DAT-C5变体
<400> 45
Glu Ile Ile Val
1
<210> 46
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> DAT-C5变体
<400> 46
Glu Ile Arg Val
1
<210> 47
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> DAT-C5变体

<400> 47
Glu Val Ile Val
1
<210> 48
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> DAT-C5变体
<400> 48
Glu Val Arg Val
1
<210> 49
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> DAT-C5变体
<400> 49
Tyr Ile Ile Val
1
<210> 50
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> DAT-C5变体
<400> 50
Tyr Ile Arg Val
1
<210> 51
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> DAT-C5变体
<400> 51
Tyr Val Ile Val
1

<210> 52
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> DAT-C5变体
<400> 52
Tyr Val Arg Val
1
<210> 53
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> DAT-C5变体
<400> 53
Asn Ser Leu Arg Val
1 5
<210> 54
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> DAT-C5变体
<400> 54
His Trp Leu Lys Val
1 5

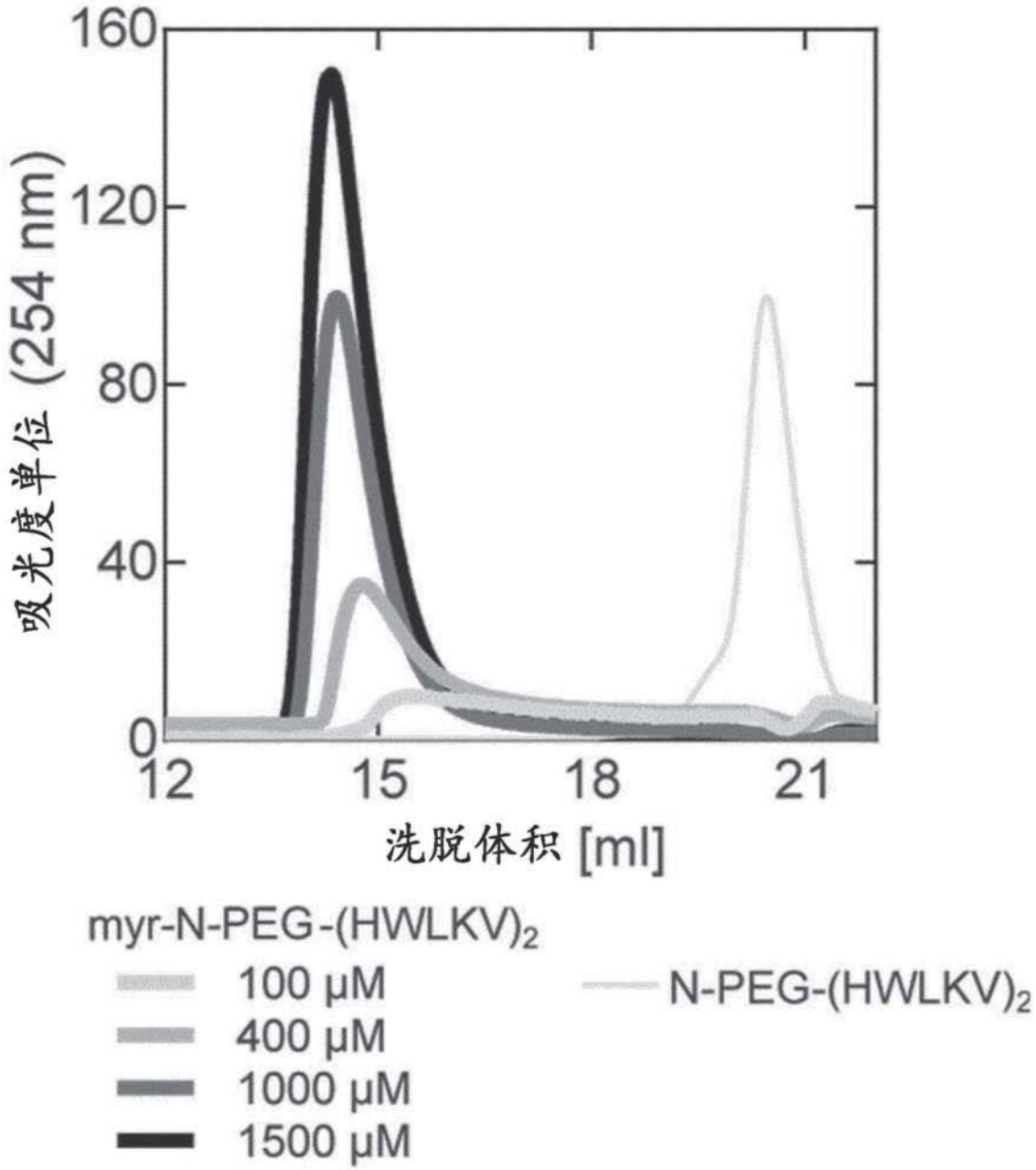
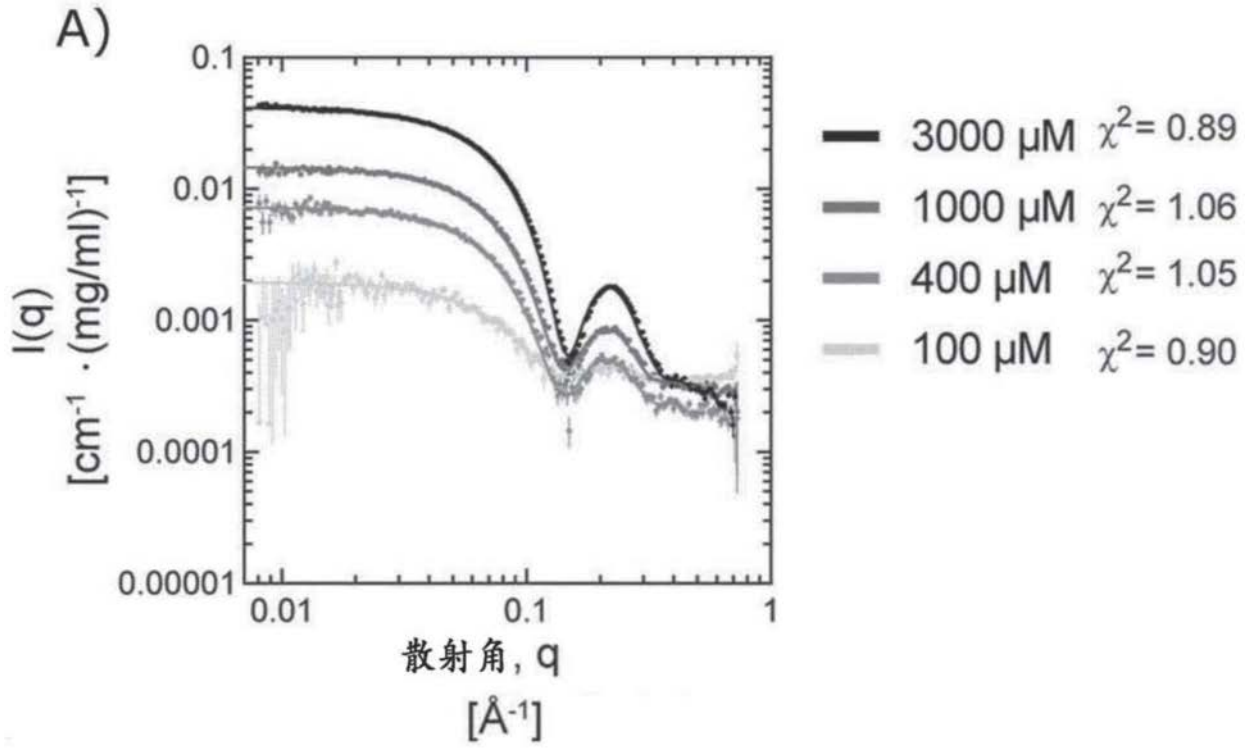

160
120
80
40
0
吸光度单位 (254 nm)
12
15
18
21
洗脱体积 [ml]
myr-N-PEG-(HWLKV)2
100 μM
400 μM
1000 μM
1500 μM
N-PEG-(HWLKV)2

Fig.1


A)
I(q)
[cm-1 · (mg/ml)-1]
0.1
0.01
0.001
0.0001
0.00001
0.01
0.1
1
散射角, q
[Å-1]
3000 μM χ2= 0.89
1000 μM χ2= 1.06
400 μM χ2= 1.05
100 μM χ2= 0.90

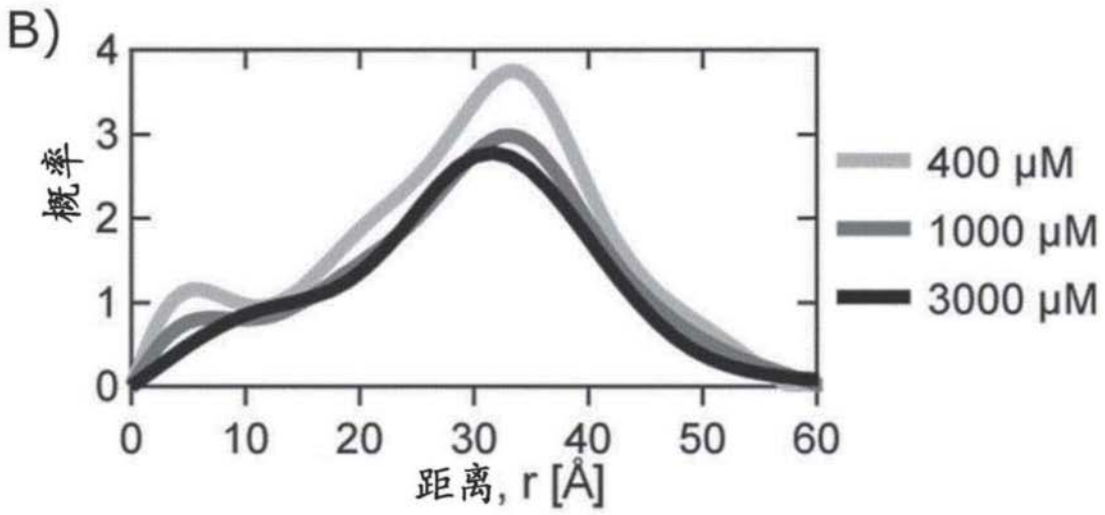

B)
概率
0
1
2
3
4
0
10
20
30
40
50
60
距离, r [Å]
400 μM
1000 μM
3000 μM

Fig.2

C)

	R_g	D_{max}	M_w	M_w/M_{wteo}
100 µM	20.1	51.0	14.8	7.9
400 µM	22.2	57.0	13.8	7.3
1000 µM	22.5	60.2	11.2	6.0
3000 µM	23.6	115.6	10.4	5.5
	[Å]	[Å]	[kDa]	

Fig.2(续)

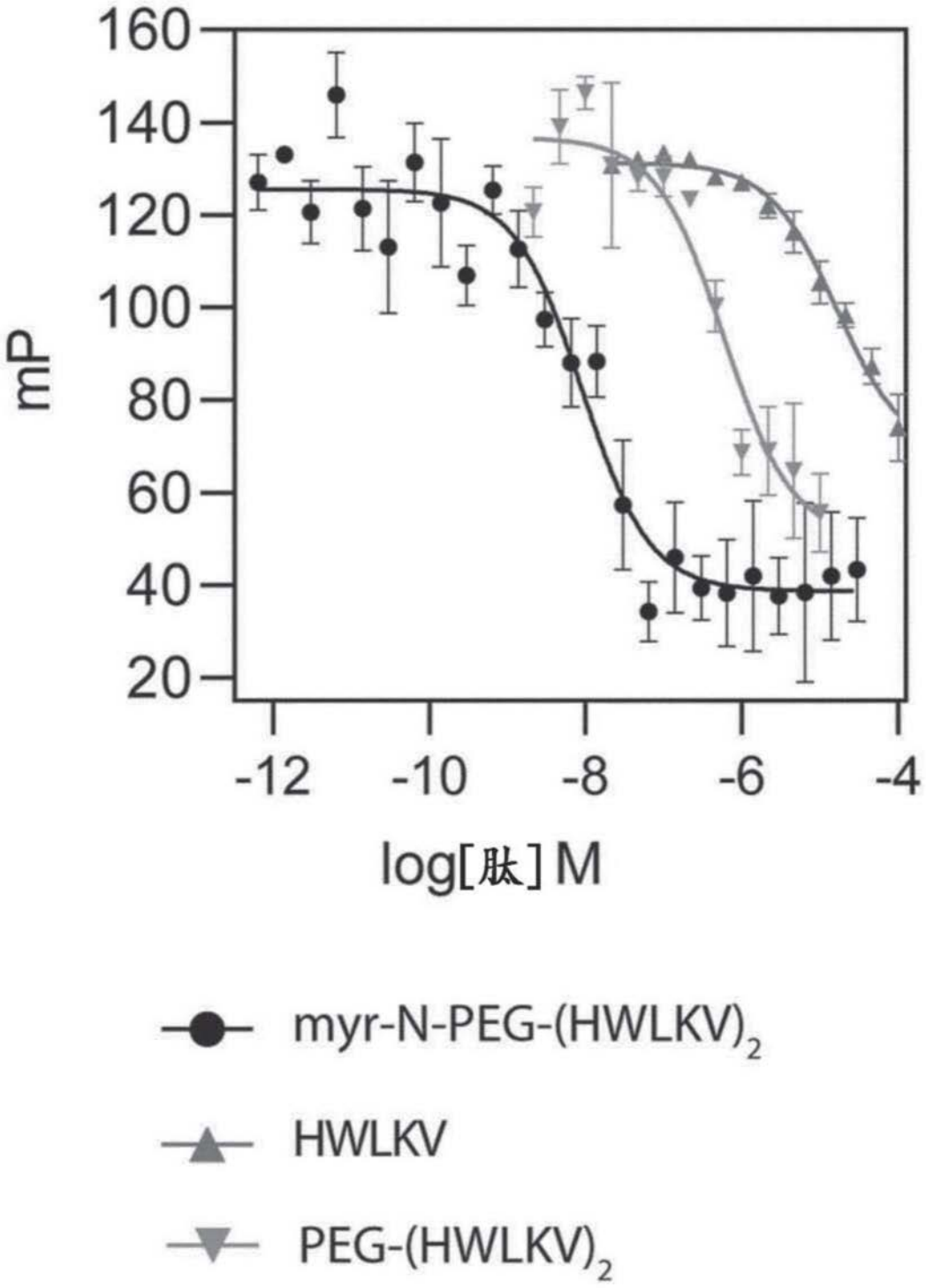

160
140
120
100
80
60
40
20
mP
-12
-10
-8
-6
-4
log[肽]M
myr-N-PEG-(HWLKV)2
HWLKV
PEG-(HWLKV)2

Fig.3

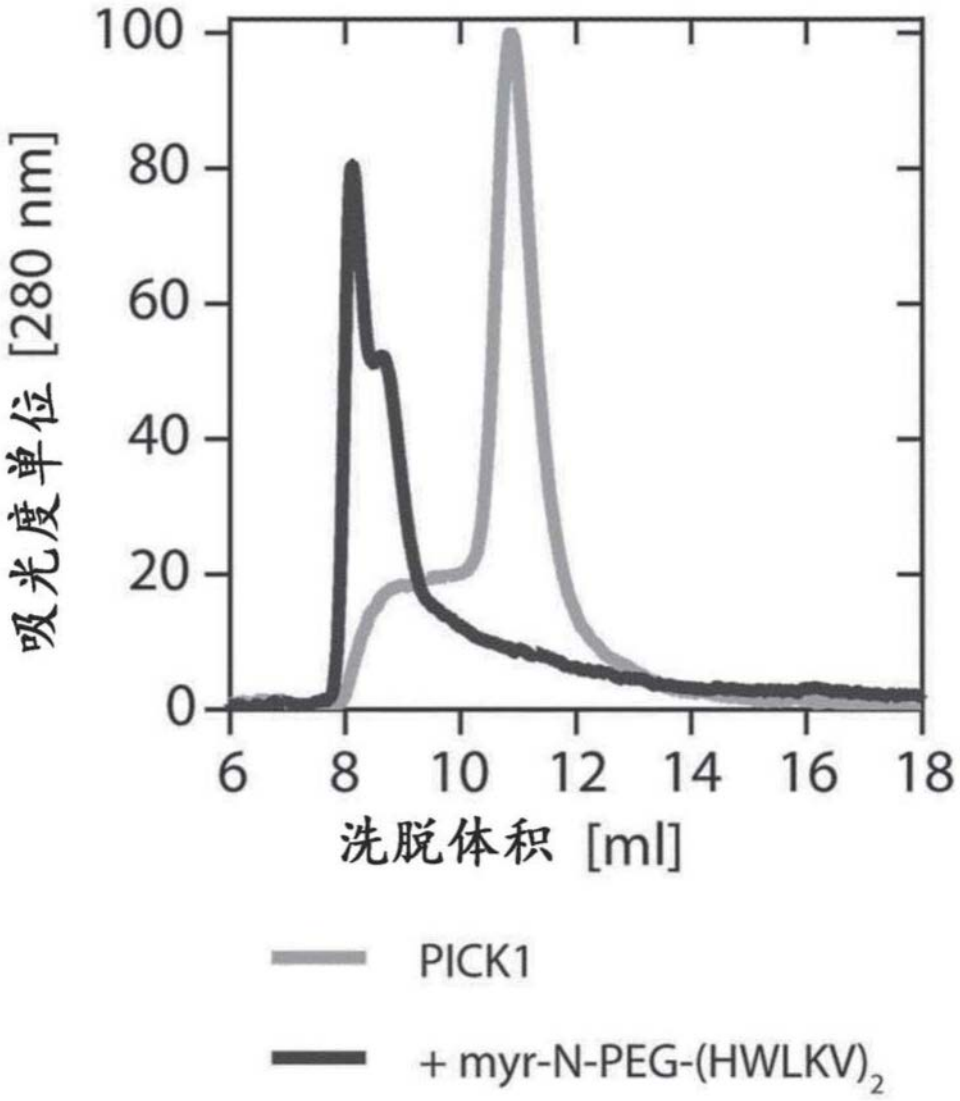

100
80
60
40
20
0
吸光度单位 [280 nm]
6
8
10
12
14
16
18
洗脱体积 [ml]
PICK1
+ myr-N-PEG-(HWLKV)2

Fig.4

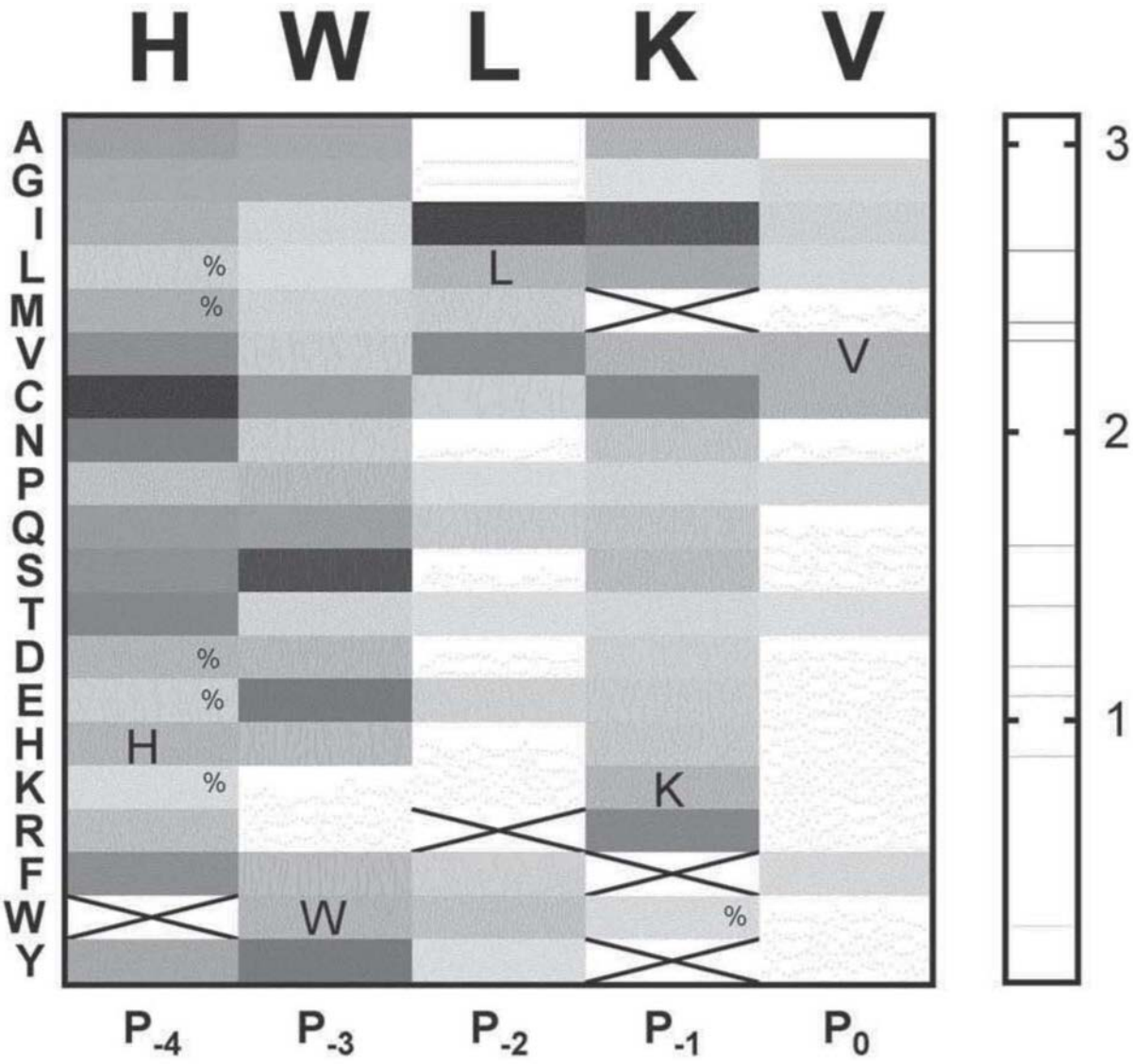


Fig.5

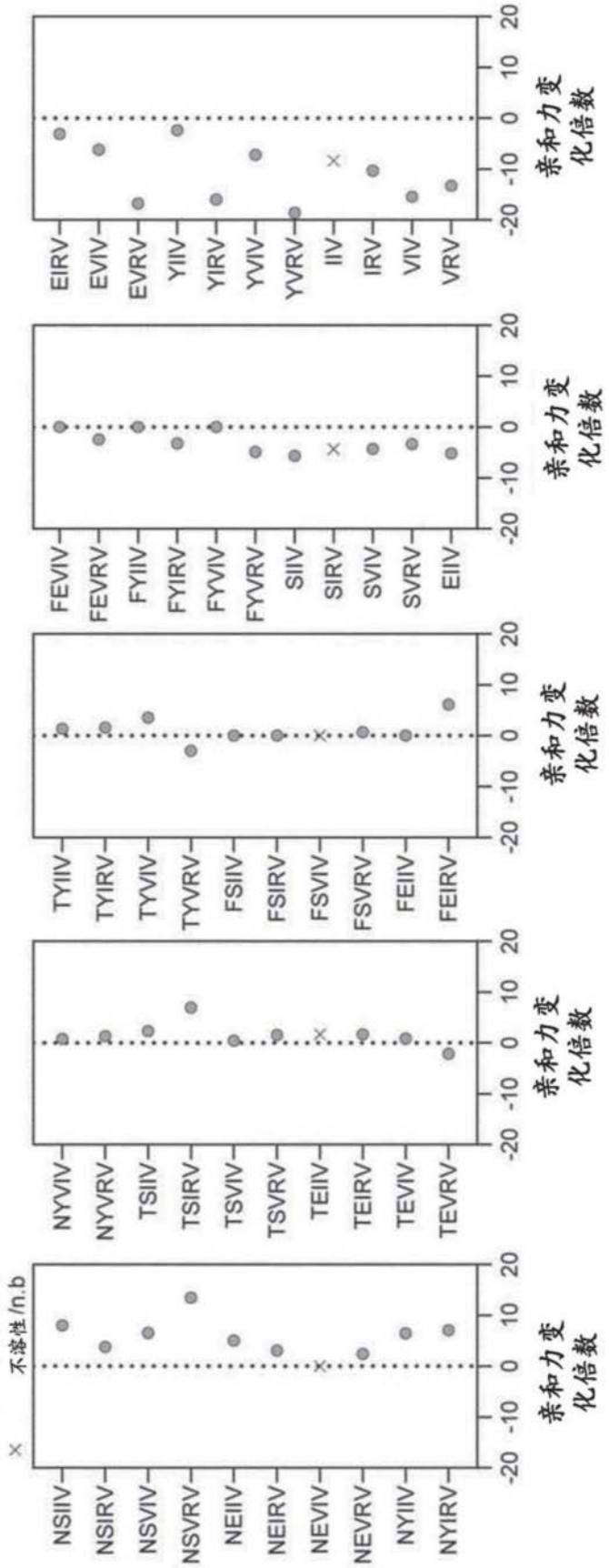

不溶性/n.b
NSIIV
NSIRV
NSVIV
NSVRV
NEIIV
NEIRV
NEVIV
NEVRV
NYIIV
NYIRV
NYVIV
NYVRV
TSIIV
TSIRV
TSVIV
TSVRV
TEIIV
TEIRV
TEVIV
TEVRV
TYIIV
TYIRV
TYVIV
TYVRV
FSIIV
FSIRV
FSVIV
FSVRV
FEIIV
FEIRV
FEVIV
FEVRV
FYIIV
FYIRV
FYVIV
FYVRV
SIIV
SIRV
SVIV
SVRV
EIIV
EIRV
EVIV
EVRV
YIIV
YIRV
YVIV
YVRV
IIV
IRV
VIV
VRV
-20 -10 0 10 20
亲和力变
化倍数

Fig.6

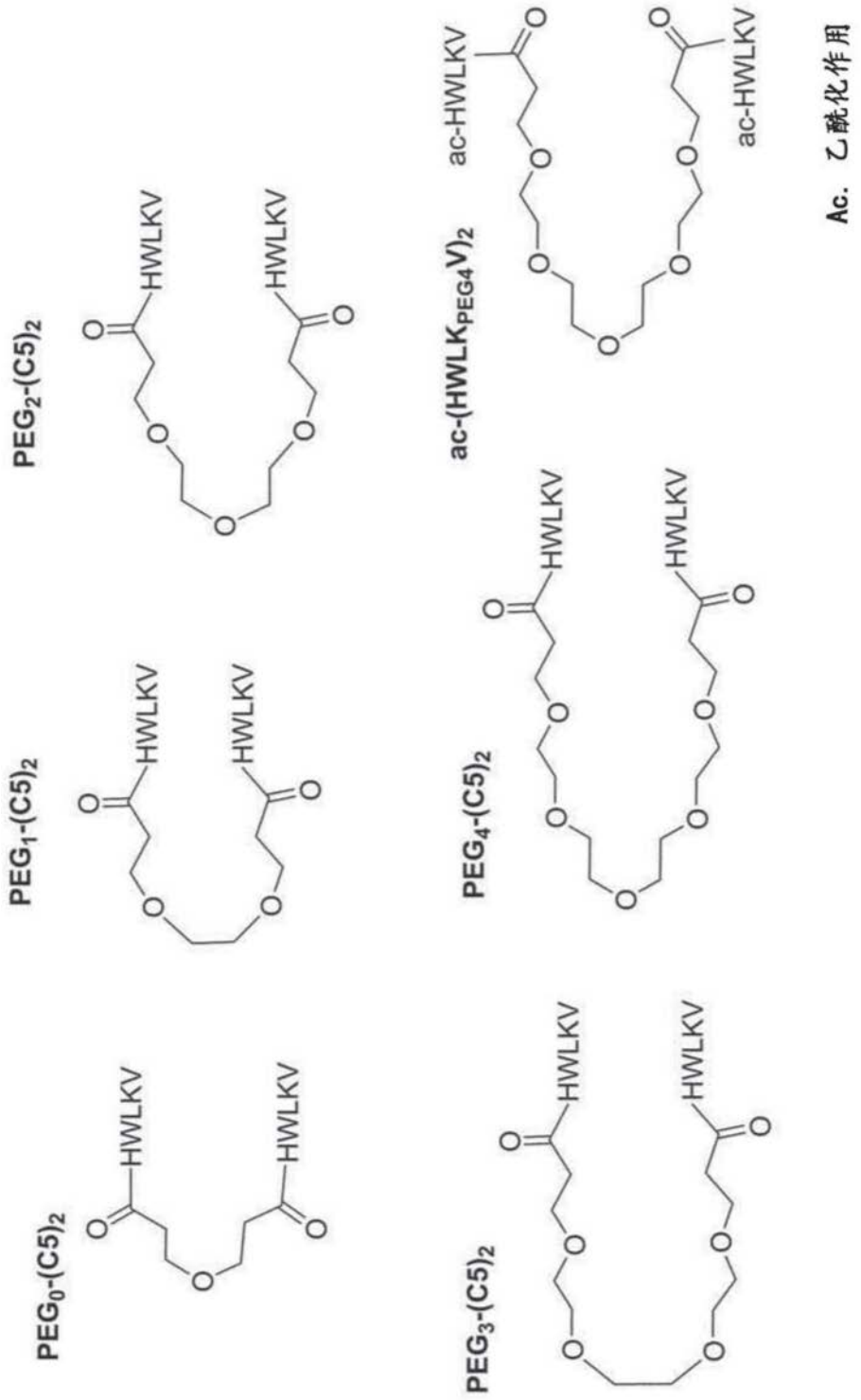

PEG2-(C5)2
HWLKV
HWLKV
PEG1-(C5)2
HWLKV
HWLKV
PEG0-(C5)2
HWLKV
HWLKV
ac-(HWLKPEG4V)2
ac-HWLKV
ac-HWLKV
PEG4-(C5)2
HWLKV
HWLKV
PEG3-(C5)2
HWLKV
HWLKV
Ac. 乙酰化作用

Fig.7

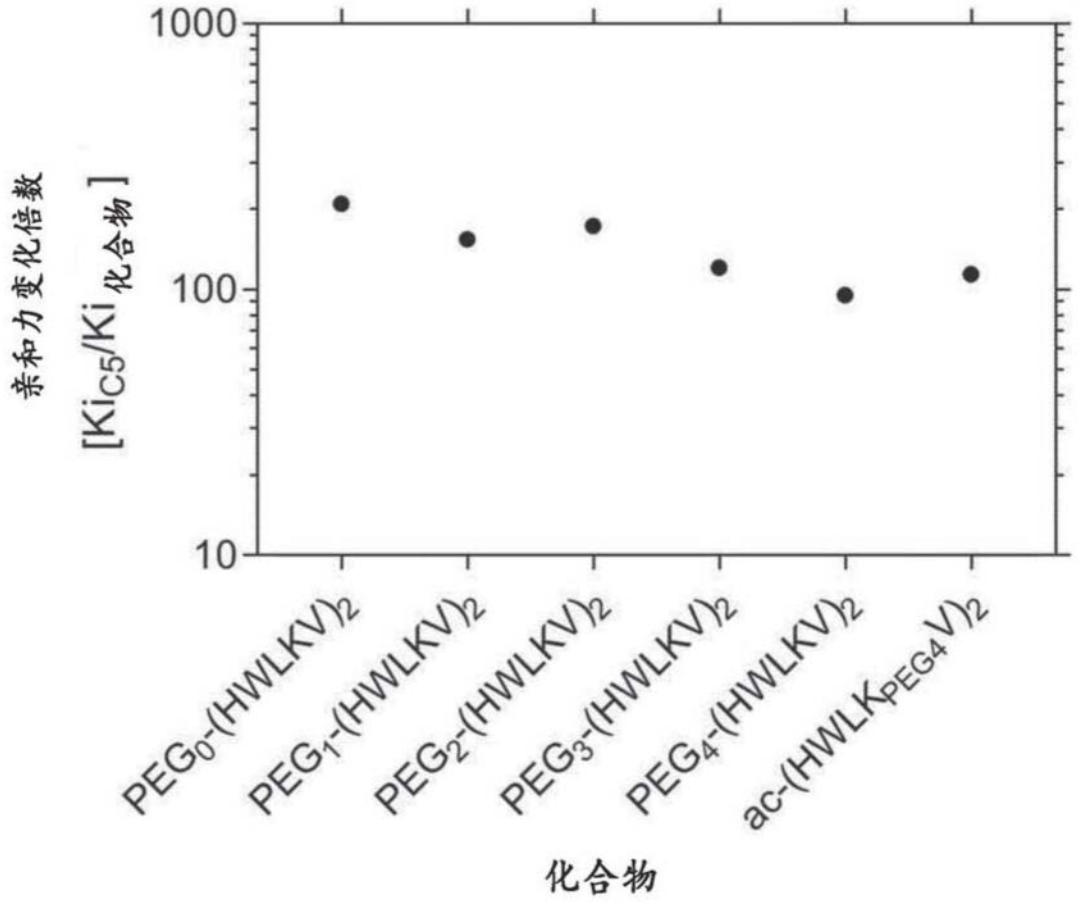

1000
100
10
亲和力变化倍数
[Ki$_{C5}$/Ki$_{化合物}$]
PEG$_0$-(HWLKV)$_2$
PEG$_1$-(HWLKV)$_2$
PEG$_2$-(HWLKV)$_2$
PEG$_3$-(HWLKV)$_2$
PEG$_4$-(HWLKV)$_2$
ac-(HWLK$_{PEG4}$V)$_2$
化合物

Fig.8

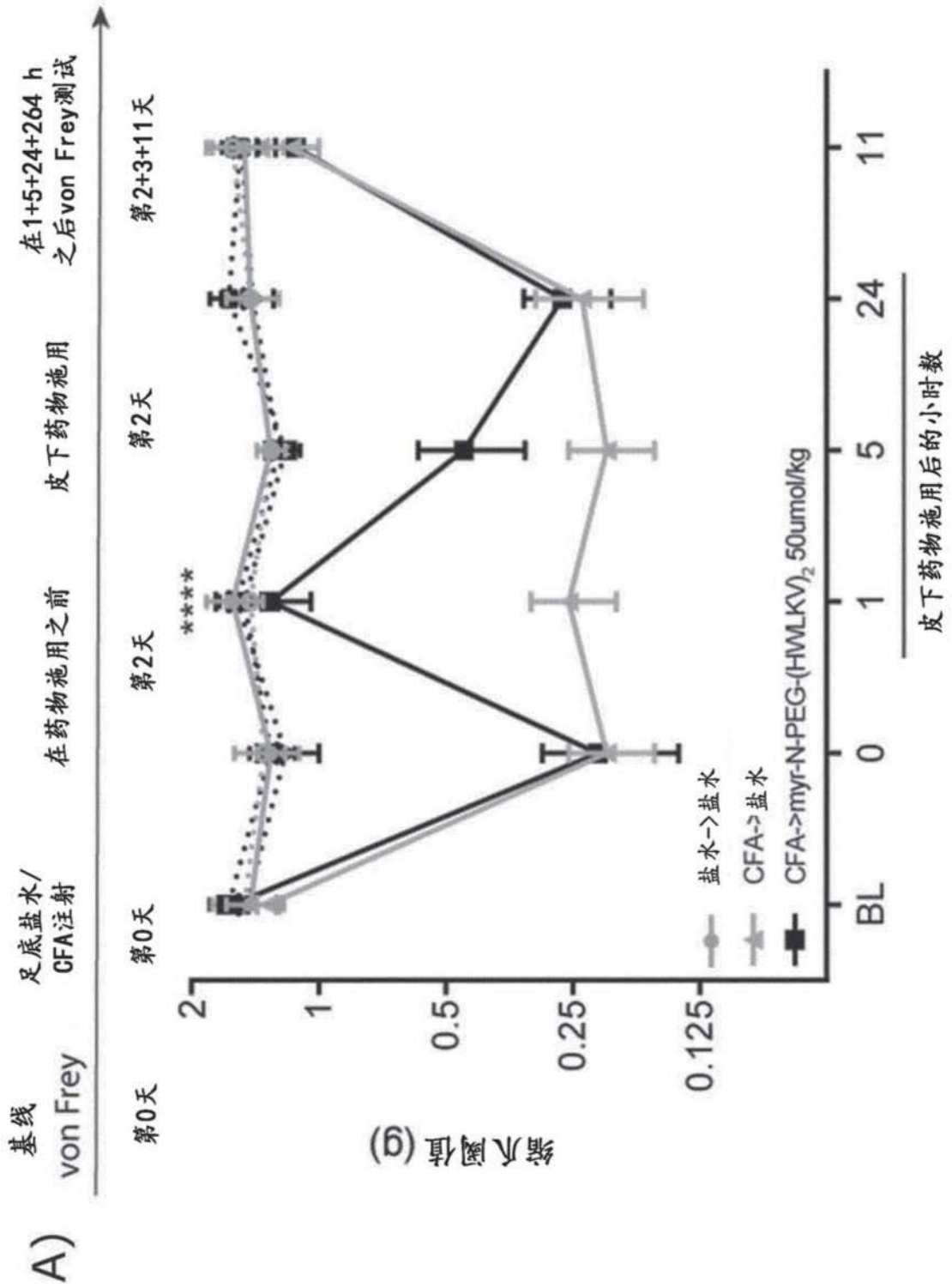

A)
基线
von Frey
第0天
足底盐水/
CFA注射
第0天
在药物施用之前
第2天
皮下药物施用
第2天
在1+5+24+264 h
之后von Frey测试
第2+3+11天
****
缩爪阈值 (g)
2
1
0.5
0.25
0.125
盐水->盐水
CFA->盐水
CFA->myr-N-PEG-(HWLKV)2 50umol/kg
BL
0
1
5
24
11
皮下药物施用后的小时数

Fig.9

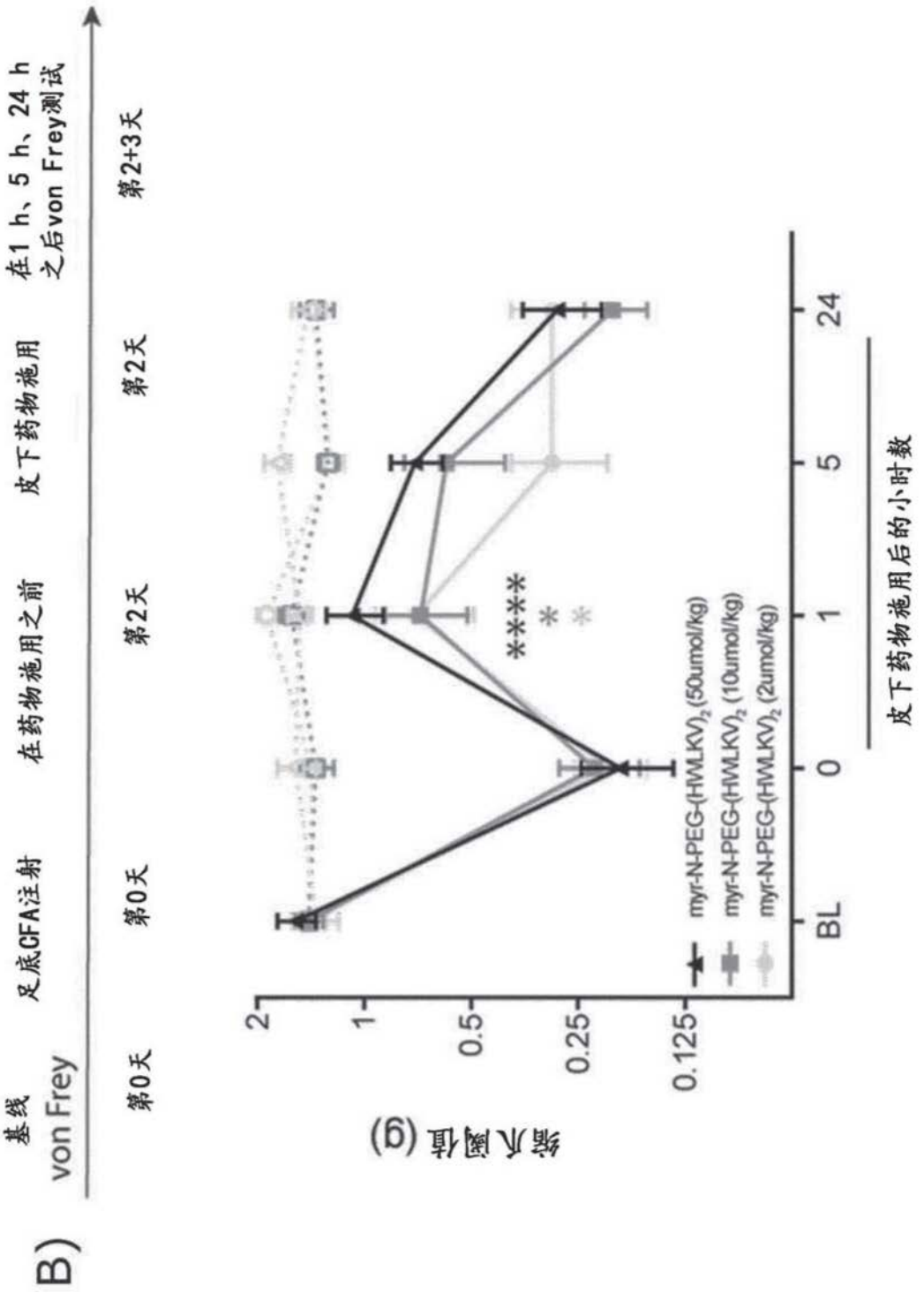

B)
基线
von Frey
第0天
足底CFA注射
第0天
在药物施用之前
第2天
皮下药物施用
第2天
在1 h、5 h、24 h
之后von Frey测试
第2+3天
缩爪阈值 (g)
2
1
0.5
0.25
0.125
****
*
*
myr-N-PEG-(HWLKV)2 (50umol/kg)
myr-N-PEG-(HWLKV)2 (10umol/kg)
myr-N-PEG-(HWLKV)2 (2umol/kg)
BL
0
1
5
24
皮下药物施用后的小时数

Fig.9(续)

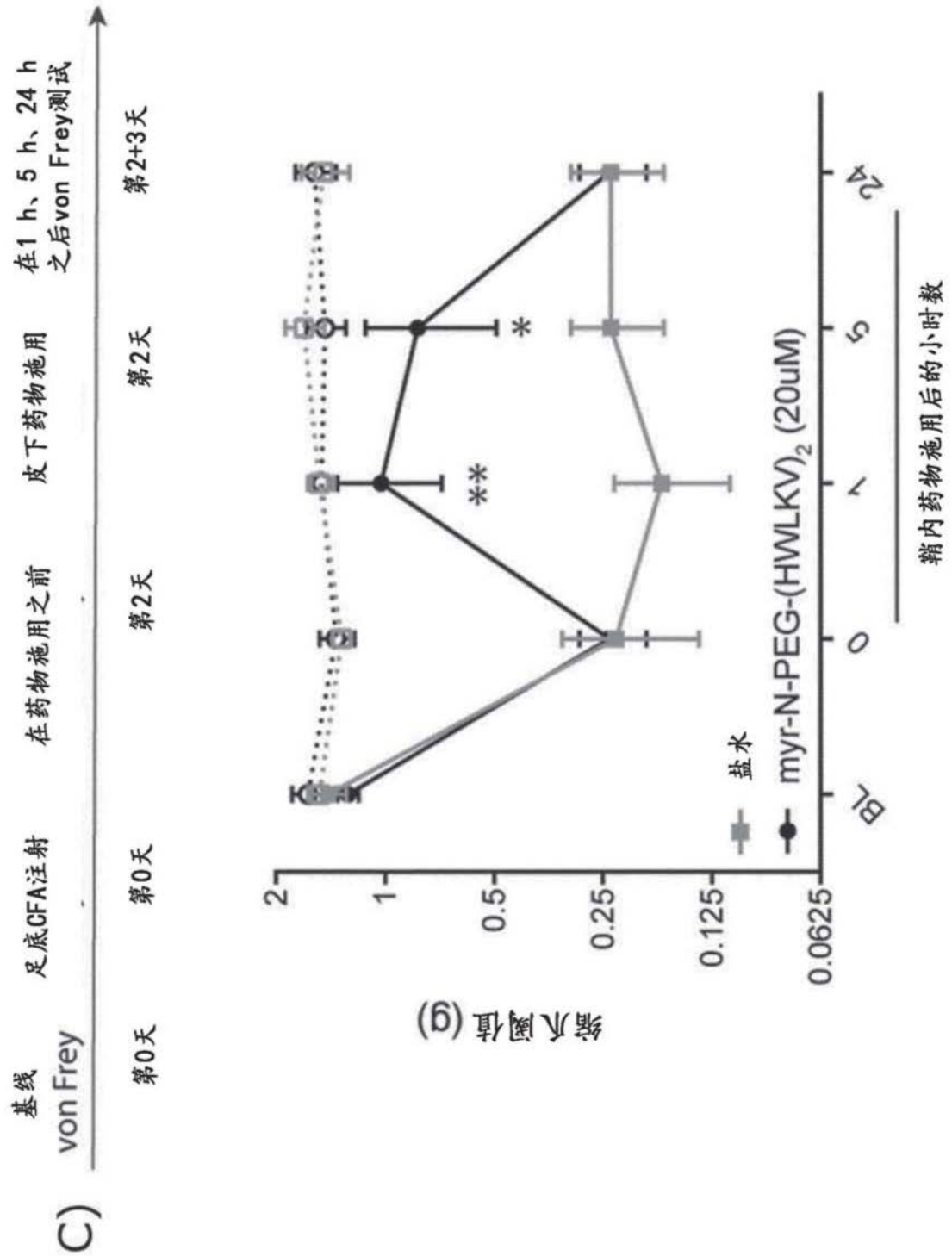

C)
基线
von Frey
第0天
足底CFA注射
第0天
在药物施用之前
第2天
皮下药物施用
第2天
在1 h、5 h、24 h之后von Frey测试
第2+3天
缩爪阈值 (g)
2
1
0.5
0.25
0.125
0.0625
盐水
myr-N-PEG-(HWLKV)2 (20uM)
BL
0
1
5
24
鞘内药物施用后的小时数
**
*

Fig.9(续)

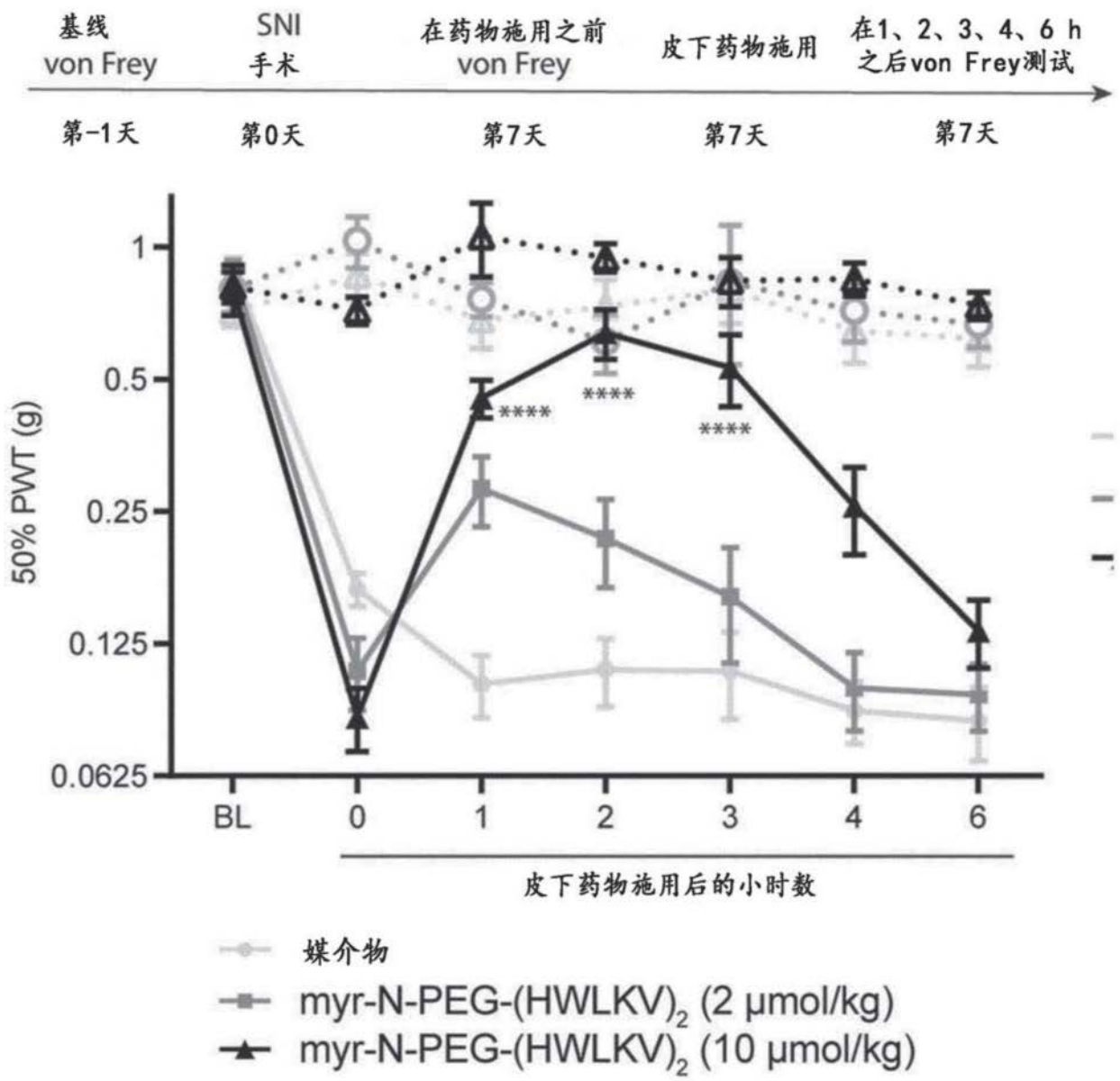

基线
von Frey
SNI
手术
在药物施用之前
von Frey
皮下药物施用
在1、2、3、4、6 h
之后von Frey测试
第-1天
第0天
第7天
第7天
第7天
50% PWT (g)
1
0.5
0.25
0.125
0.0625
****
****
****
BL
0
1
2
3
4
6
皮下药物施用后的小时数
媒介物
myr-N-PEG-(HWLKV)2 (2 μmol/kg)
myr-N-PEG-(HWLKV)2 (10 μmol/kg)

Fig.10

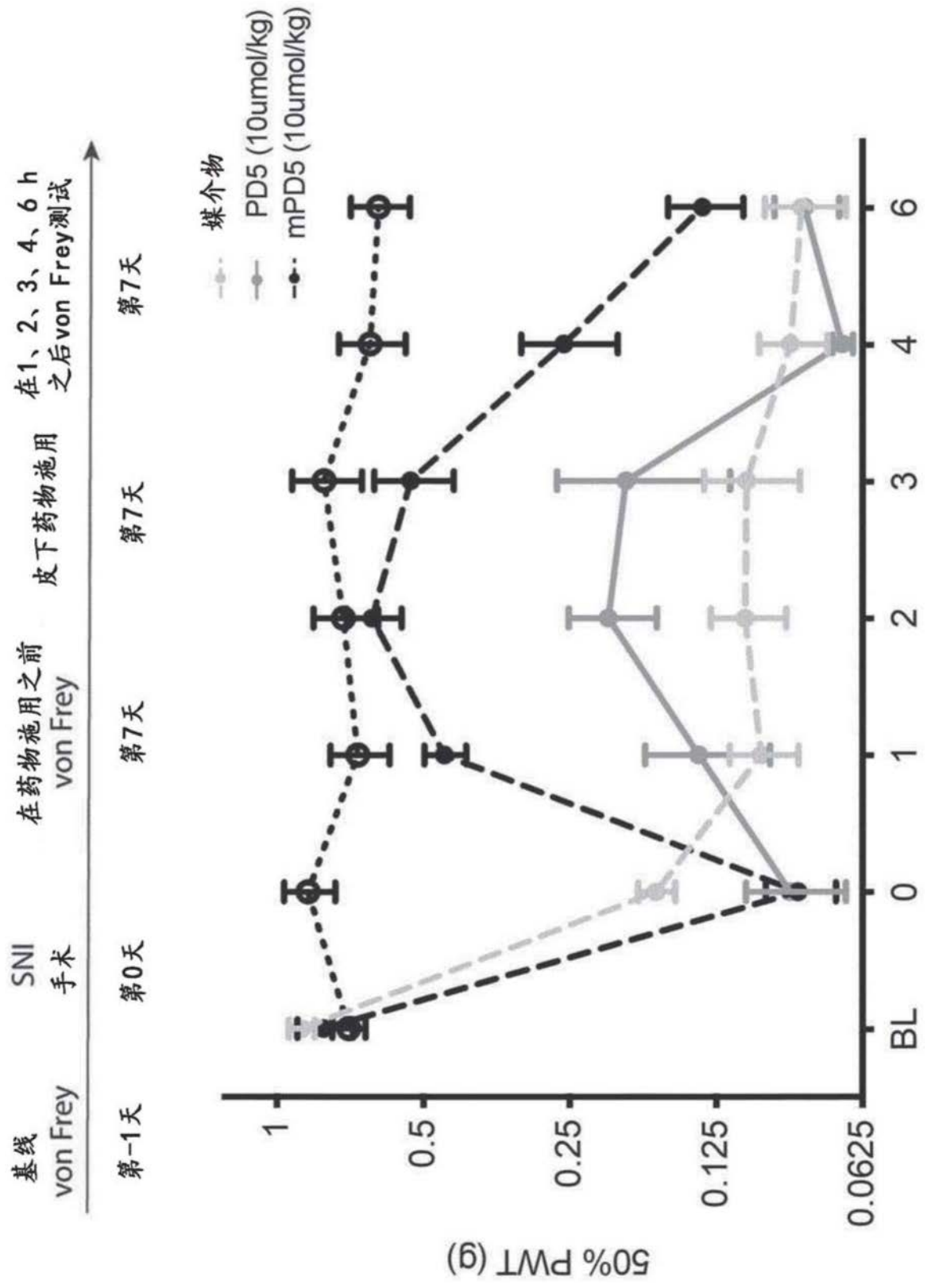

基线
von Frey
第-1天
SNI
手术
第0天
在药物施用之前
von Frey
第7天
皮下药物施用
第7天
在1、2、3、4、6 h
之后von Frey测试
第7天
媒介物
PD5 (10umol/kg)
mPD5 (10umol/kg)
50% PWT (g)
1
0.5
0.25
0.125
0.0625
BL
0
1
2
3
4
6

Fig.11

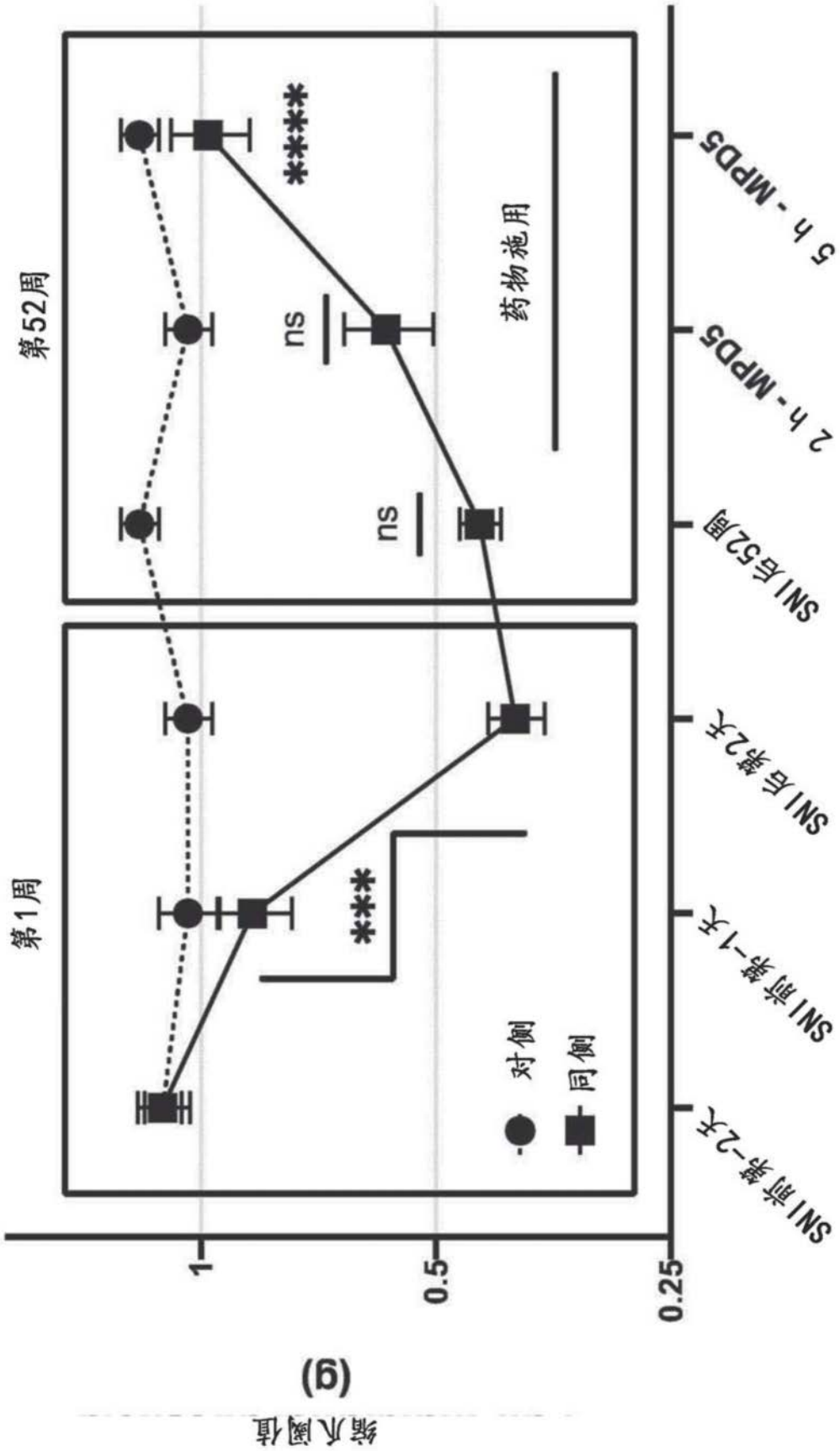

缩爪阈值
(g)
1
0.5
0.25
SNI 前-2天
SNI 前-1天
SNI 前2天
SNI 后52周
2 h - MPD5
5 h - MPD5
对侧
同侧
药物施用
第1周
第52周
****
ns
ns
****

Fig.12

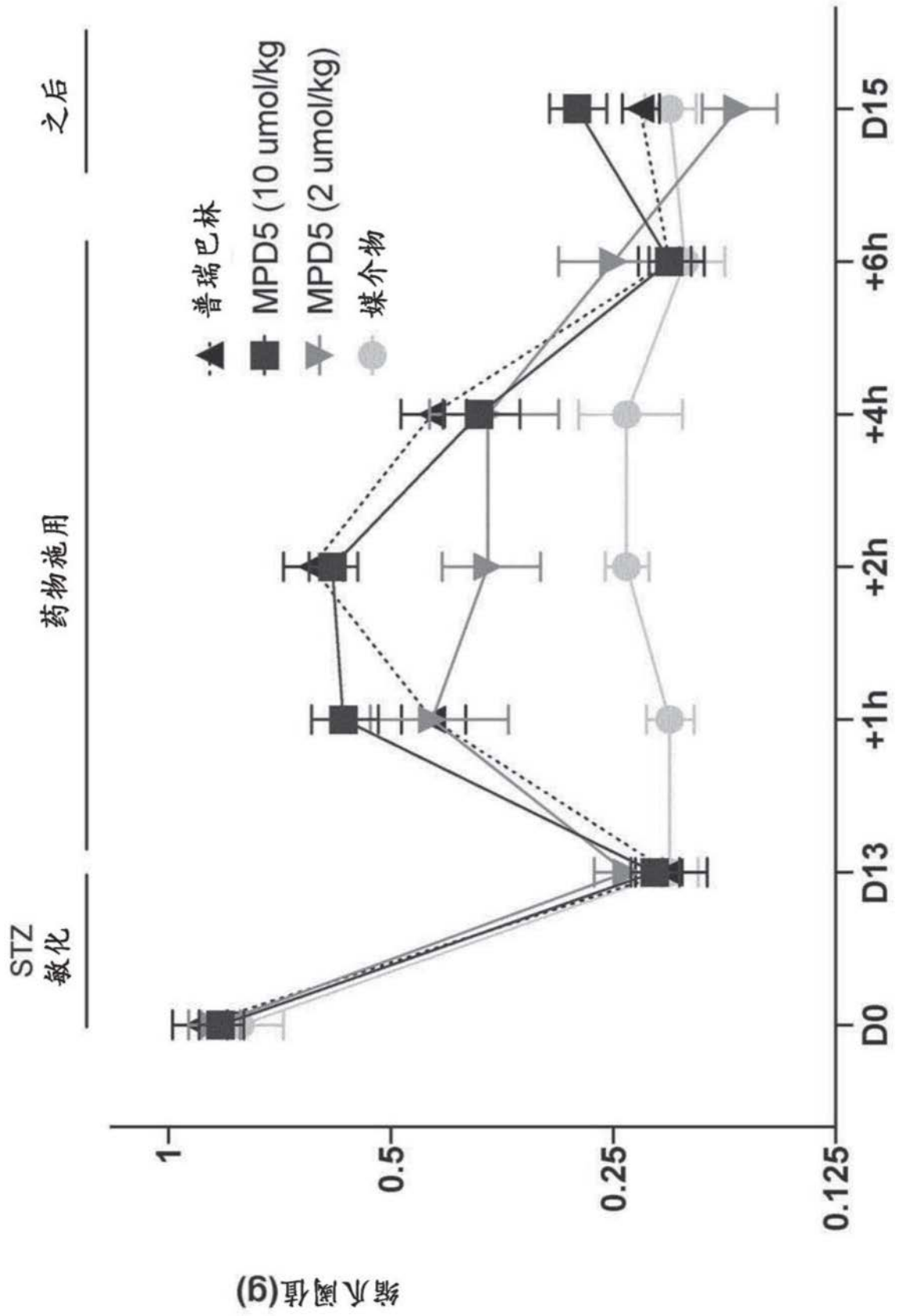

STZ
敏化
药物施用
之后
普瑞巴林
MPD5 (10 umol/kg
MPD5 (2 umol/kg)
媒介物
D0
D13
+1h
+2h
+4h
+6h
D15
1
0.5
0.25
0.125
缩爪阈值(g)

Fig.13

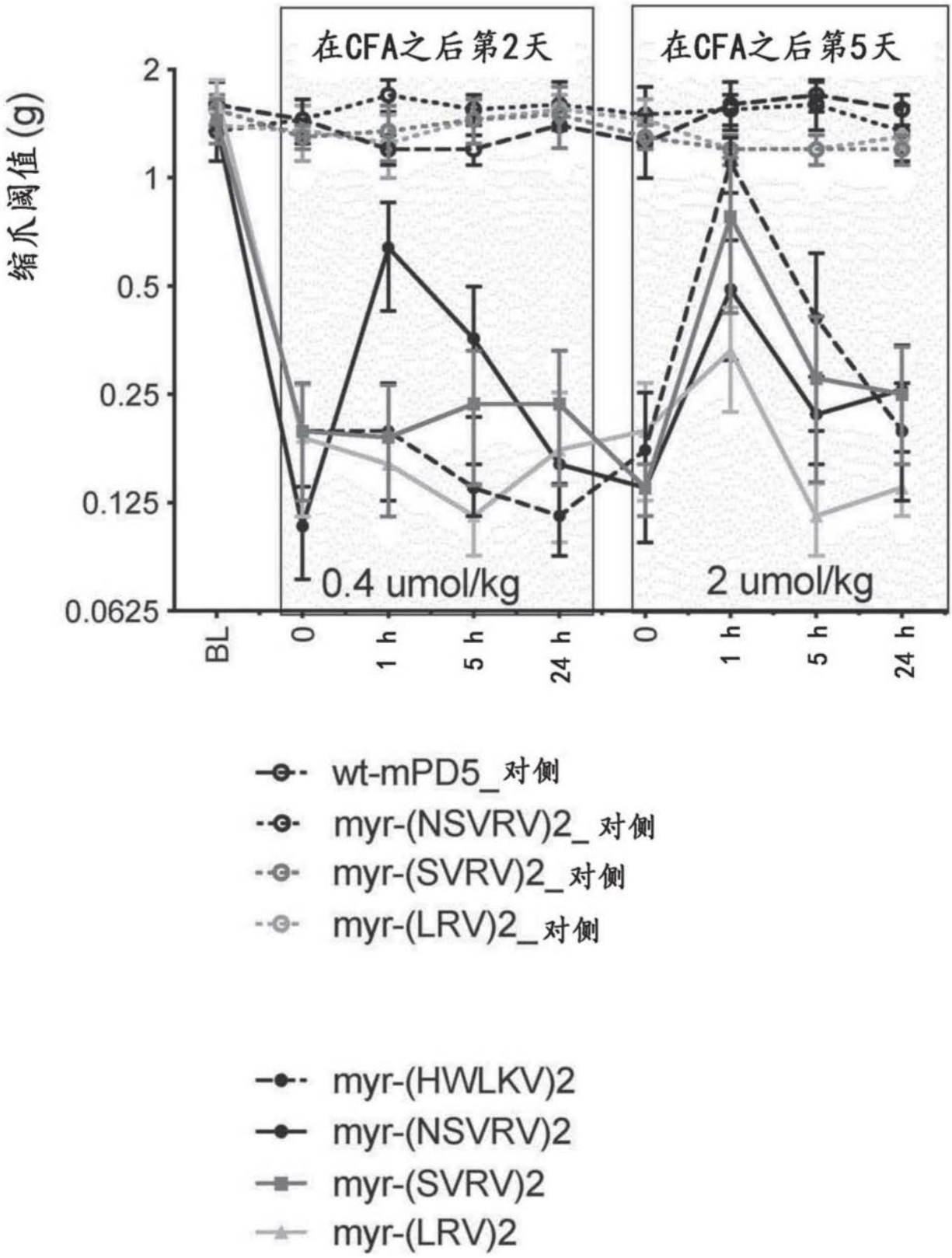

在CFA之后第2天
在CFA之后第5天
缩爪阈值(g)
2
1
0.5
0.25
0.125
0.0625
0.4 umol/kg
2 umol/kg
BL
0
1 h
5 h
24 h
0
1 h
5 h
24 h
wt-mPD5_对侧
myr-(NSVRV)2_对侧
myr-(SVRV)2_对侧
myr-(LRV)2_对侧
myr-(HWLKV)2
myr-(NSVRV)2
myr-(SVRV)2
myr-(LRV)2

Fig.14

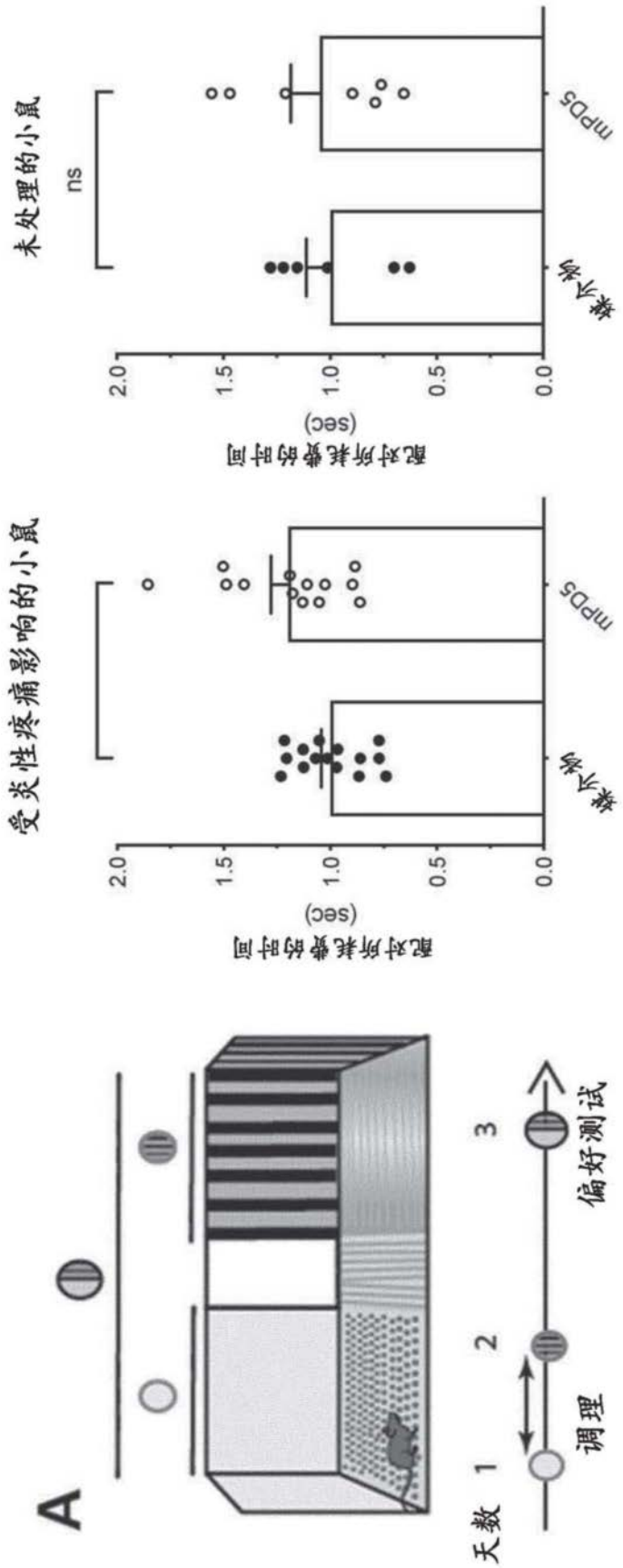

A
天数 1 2 3
调理
偏好测试
未处理的小鼠
ns
配对所耗费的时间
(sec)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
媒介
mPDS
受炎性疼痛影响的小鼠
配对所耗费的时间
(sec)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
媒介
mPDS

Fig.15

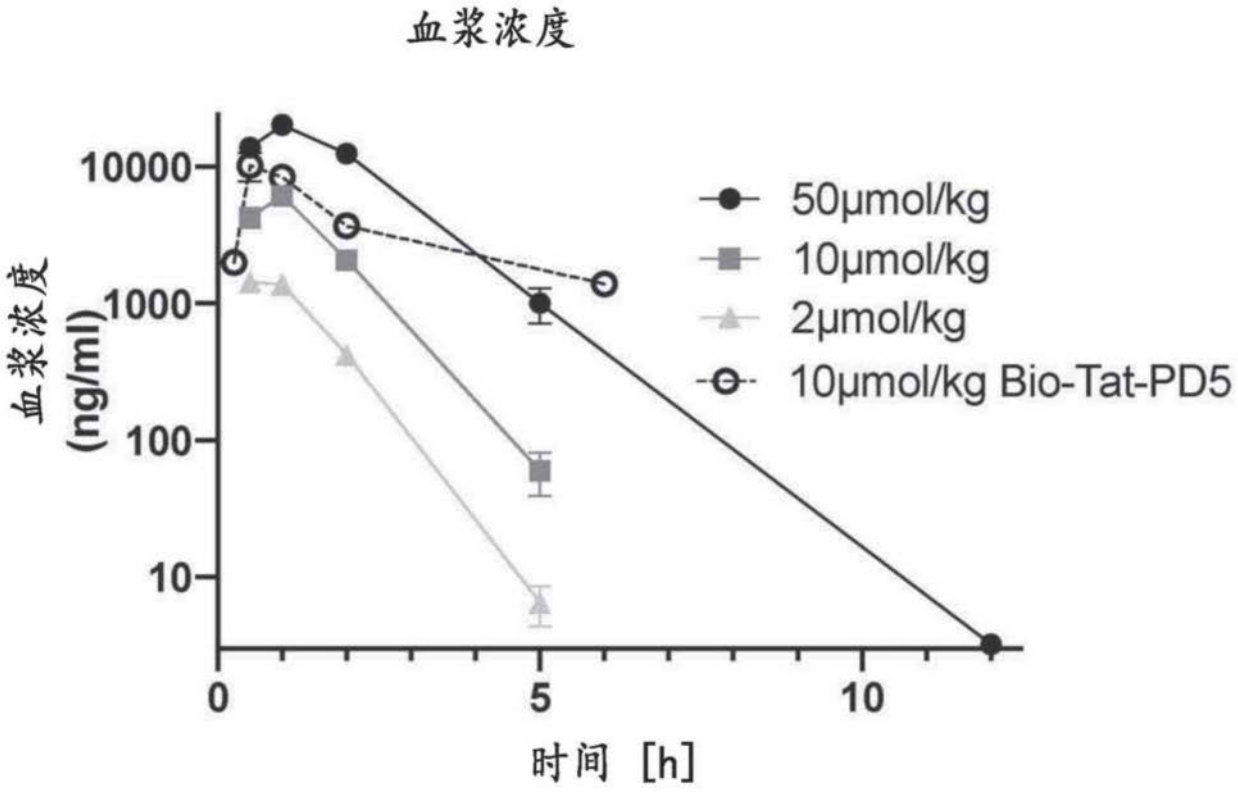

血浆浓度
10000
1000
100
10
血浆浓度 (ng/ml)
0
5
10
时间 [h]
50μmol/kg
10μmol/kg
2μmol/kg
10μmol/kg Bio-Tat-PD5

Fig.16


mPD5
250 mg/m
0.13M
IN PBS
200527NR

Fig.17

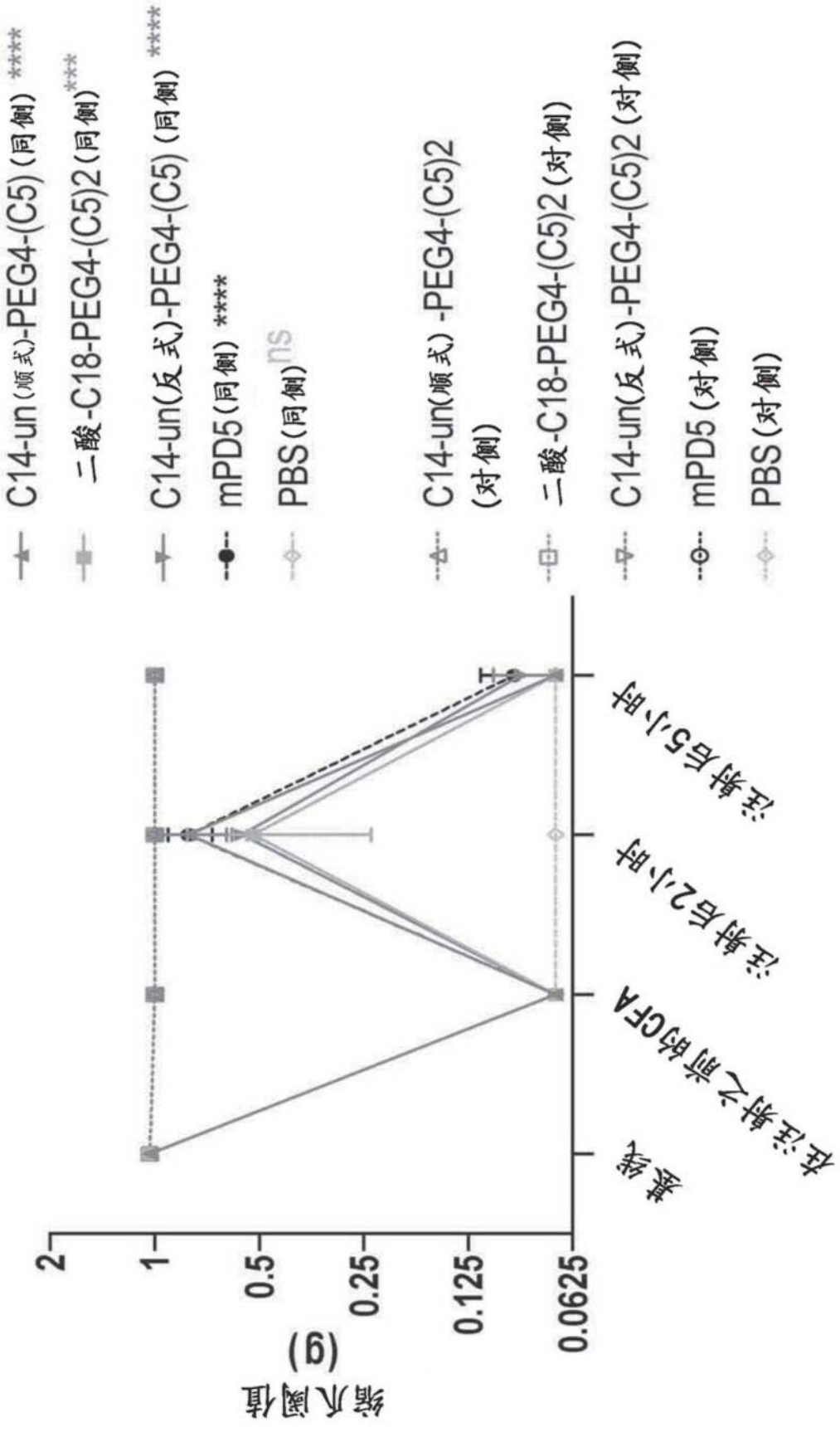

C14-un(顺式)-PEG4-(C5)(同侧) ****
二酸-C18-PEG4-(C5)2(同侧) ***
C14-un(反式)-PEG4-(C5)(同侧) ****
mPD5(同侧) ****
PBS(同侧) ns
C14-un(顺式)-PEG4-(C5)2 (对侧)
二酸-C18-PEG4-(C5)2(对侧)
C14-un(反式)-PEG4-(C5)2(对侧)
mPD5(对侧)
PBS(对侧)
缩爪阈值 (g)
2
1
0.5
0.25
0.125
0.0625
基线
在注射之前的CFA
注射后2小时
注射后5小时

Fig.18A

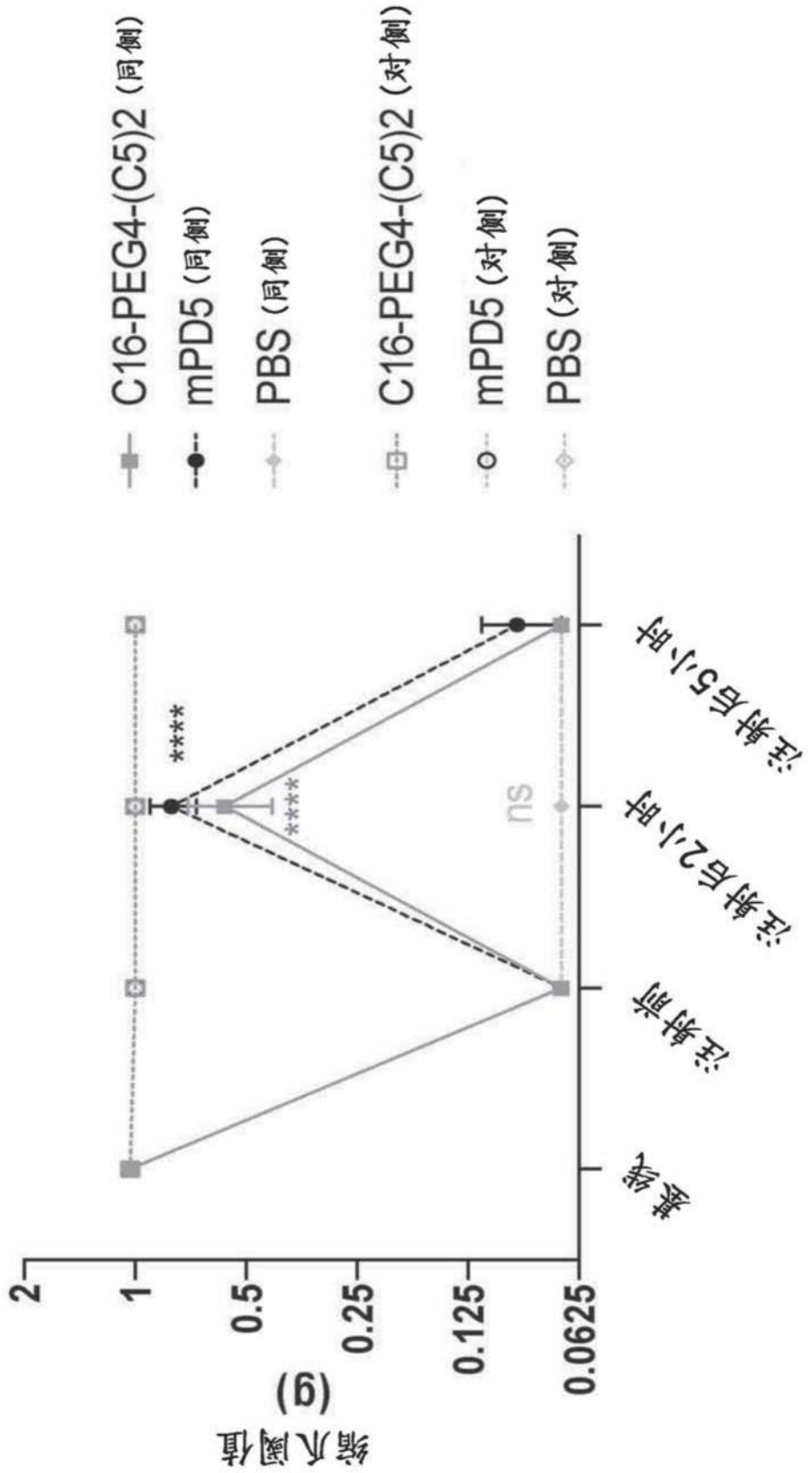

C16-PEG4-(C5)2 (同侧)
mPD5 (同侧)
PBS (同侧)
C16-PEG4-(C5)2 (对侧)
mPD5 (对侧)
PBS (对侧)
缩爪阈值 (g)
2
1
0.5
0.25
0.125
0.0625
****
****
ns
基线
注射前
注射后2小时
注射后5小时

Fig.18B

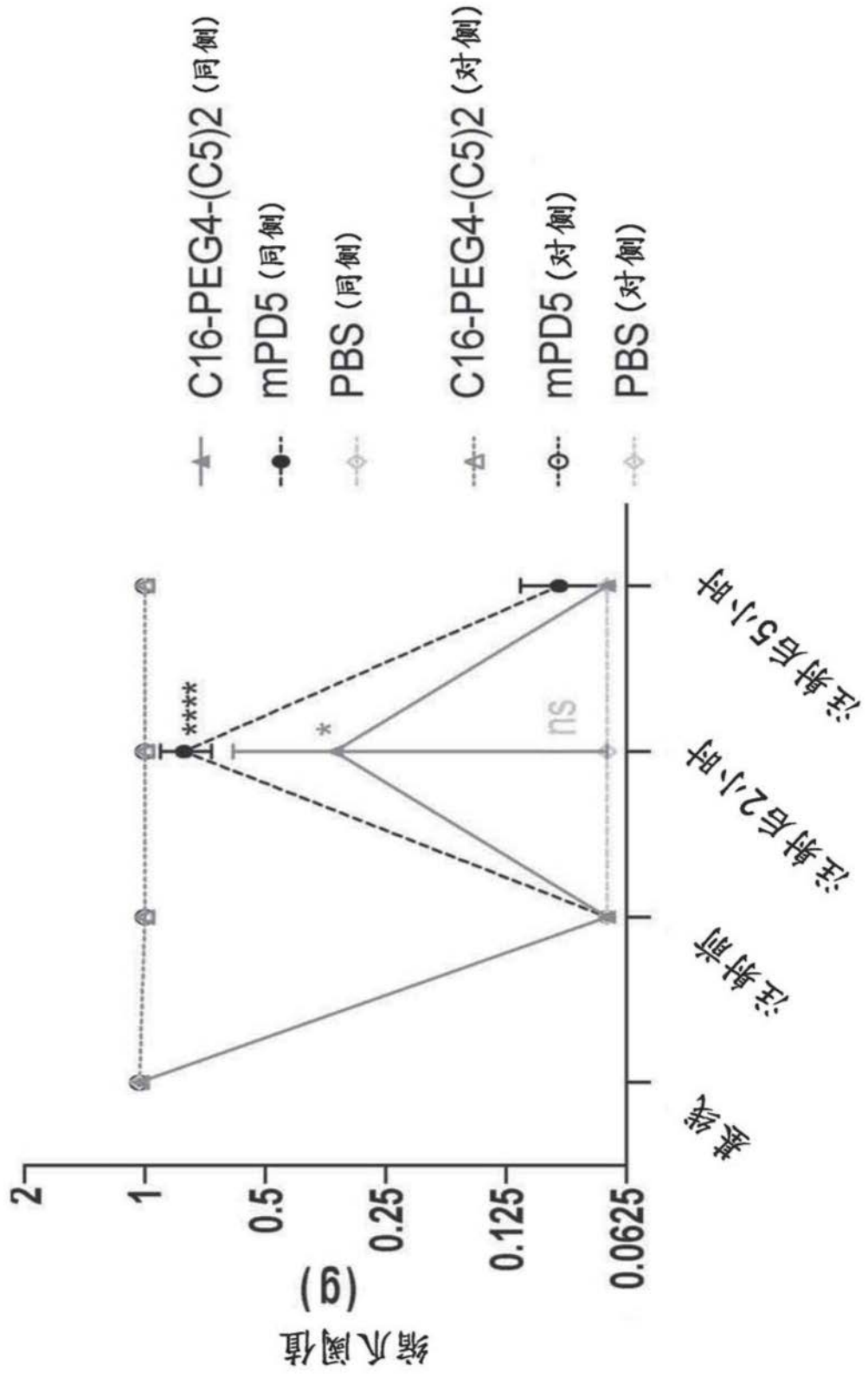

C16-PEG4-(C5)2 (同侧)
mPD5 (同侧)
PBS (同侧)
C16-PEG4-(C5)2 (对侧)
mPD5 (对侧)
PBS (对侧)
缩爪阈值 (g)
2
1
0.5
0.25
0.125
0.0625
****
*
ns
基线
注射前
注射后2小时
注射后5小时

Fig.18C

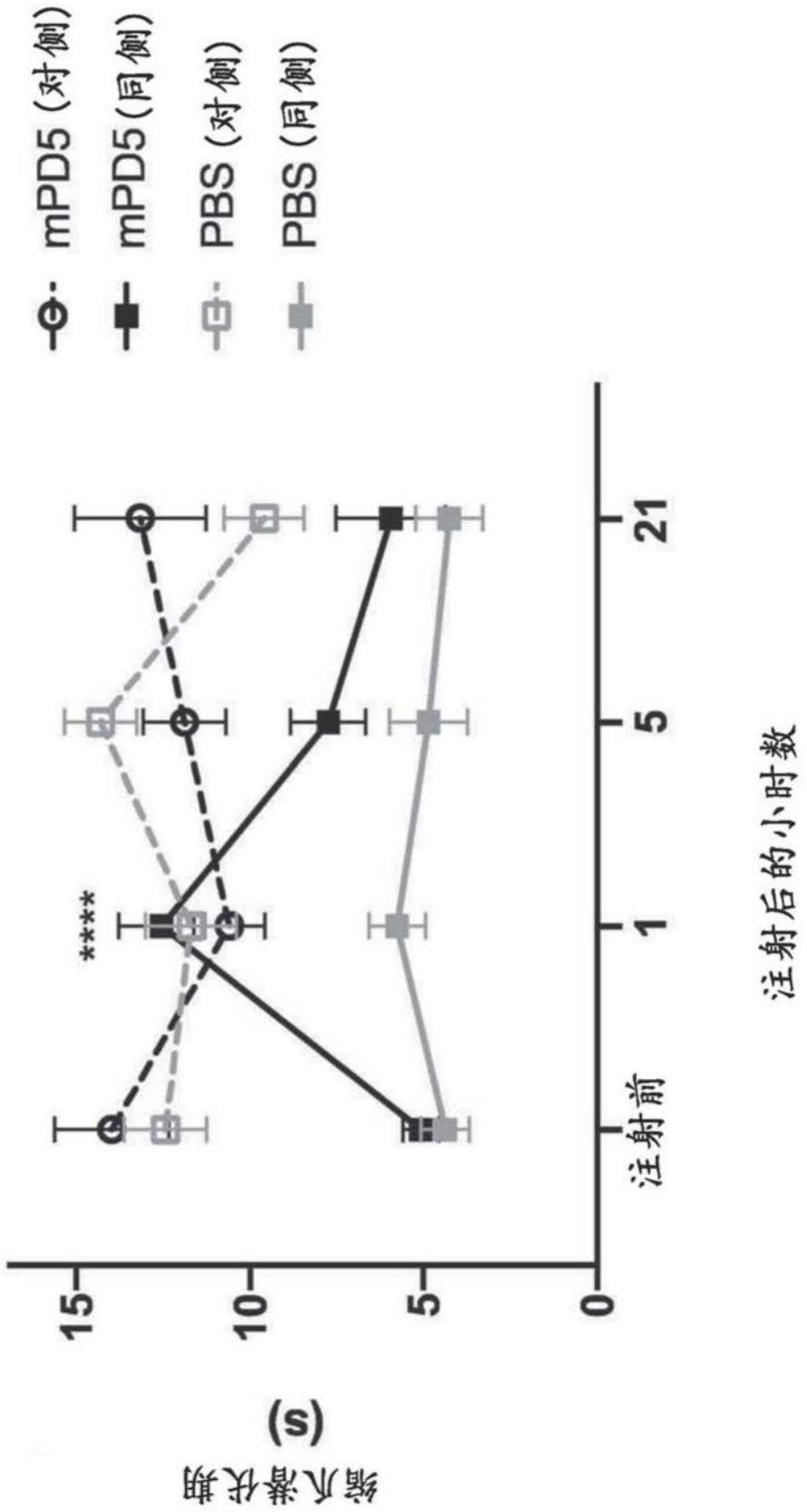


Fig.19