



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106928338 A

(43)申请公布日 2017.07.07

(21)申请号 201511031583.5

(22)申请日 2015.12.31

(71)申请人 杭州阿德莱诺泰制药技术有限公司

地址 310018 浙江省杭州市经济技术开发区6号大街452号

(72)发明人 张晓 厉保秋 路杨 杨东晖
何南海 沈柯 周俊

(51) Int. Cl.

C07K 14/505(2006.01)

C07K 1/10(2006.01)

C07K 1/06(2006.01)

C07K 1/04(2006.01)

A61K 38/18(2006.01)

A61K 47/60(2017.01)

A61P 7/06(2006.01)

权利要求书2页 说明书17页
序列表2页 附图3页

(54)发明名称

促红细胞生成素肽及衍生物和聚合物、制备方法和应用

(57)摘要

本发明涉及蛋白多肽领域,具体涉及一类促红细胞生成素肽、衍生物和聚合物及其制备方法和用途。一种促红细胞生成素肽,其序列为SEQ ID No.1:R₁YR₂CR₃R₄GPR₅TWVCR₆R₇R₈,其中,R₁、R₂、R₅、R₆、R₇和R₈分别独立地为L型或D型氨基酸;R₃为Lys、Glu、Asp、Gln、Asn、Met、Ser、Tyr、Pro或Ile,所述R₃为L型或D型氨基酸;R₄为Met、Phe或Ile,所述R₄为L型氨基酸。本发明的促红细胞生成素肽可用于治疗贫血症或由贫血引起的相关疾病,具体地说,促红细胞生成素肽对于制备疗效更显著副作用更低的治疗贫血症或由贫血引起的相关疾病的药物将是有益的。

1. 一种促红细胞生成素肽,其序列为SEQ ID No.1:R₁YR₂CR₃R₄GPR₅TWVCR₆R₇R₈,

其中,R₁、R₂、R₅、R₆、R₇和R₈分别独立地为L型或D型氨基酸;

R₃为Lys、Glu、Asp、Gln、Asn、Met、Ser、Tyr、Pro或Ile,所述R₃为L型或D型氨基酸;

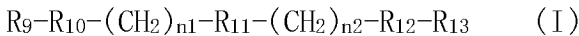
R₄为Met、Phe或Ile,所述R₄为L型氨基酸。

2. 根据权利要求1所述的促红细胞生成素肽,其特征在于,其中,R₁为Leu;R₂为Ala;R₃为Lys、Met、Ser、Tyr或Ile;R₄为Met或Phe;R₅为Ile;R₆为Pro;R₇为Leu;R₈为Arg。

3. 根据权利要求1或2所述的促红细胞生成素肽,其特征在于,所述的促红细胞生成素肽中的氨基酸分别独立地为经保护基团修饰的氨基酸;所述的保护基团优选为叔丁氧羰基、氧叔丁基、三苯甲基、2,2,4,6,7-五甲基二氢苯并咪喃-5-磺酰基或烯丙基中的一种或几种。

4. 一种促红细胞生成素肽衍生物,其特征在于,权利要求1-3任一项所述的促细胞生成素肽的C端、N端或者侧链的任一位置采用聚乙二醇进行修饰。

5. 一种促细胞生成素肽衍生物,其特征在于,所述的促红细胞生成素肽衍生物的通式为式(I)所示,



其中R₉、R₁₃选自权利要求1或2所述的促红细胞生成素肽;n₁、n₂分别独立地选自0~10的整数;R₁₀、R₁₂分别独立地选自CO或CH₂基;R₁₁选自N(CH₂)_{n₃}NHR₁₄、NCO(CH₂)_{n₃}NHR₁₄、CHOCONH(CH₂)_{n₃}NHR₁₄、CHSCON(CH₂)_{n₃}NHR₁₄或CHNHCON(CH₂)_{n₃}NHR₁₄中的一种,其中n₃选自2~10的整数,R₁₄为甲氧基聚乙二醇。

6. 根据权利要求5所述的促红细胞生成素肽衍生物,其特征在于甲氧基聚乙二醇的分子量为5,000~100,000道尔顿,优选为5000~50000道尔顿,更优选为5000~30000道尔顿。

7. 一种促细胞生成素肽聚合物,其特征在于,所述的促细胞生成素肽聚合物采用权利要求1-3任一项所述的促红细胞生成素肽或者采用权利要求4-6任一项所述的促红细胞生成素肽衍生物作为重复结构单元,优选为促红细胞生成素肽或促细胞生成素肽衍生物的二聚体或2~10个重复结构单元的多聚体。

8. 根据权利要求7所述的促红细胞生成素肽聚合物,其聚合方式选自S-S、C-N、C-O、C=N、C-C、C=C、C-S、CO-S、CO-NH键中的一种,优选为CO-NH、CO-S或S-S键。

9. 一种促红细胞生成素肽的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:

(1)采用固相合成法,依照促红细胞生成素肽的连接次序在偶联剂和反应溶剂的作用下,依次进行氨基酸的偶联,合成具有全保护的促红细胞生成素肽;

(2)裂解得到促红细胞生成素肽。

10. 根据权利要求9所述的制备方法,其特征在于,所述偶联剂选自以下几种组合中的一种:(1)N,N'-二异丙基碳二亚胺和1-羟基苯并三唑,

(2)六氟磷酸苯并三唑-1-基-氧基三吡咯烷基磷、1-羟基苯并三唑和N,N'-二异丙基乙胺,

(3)2-(7-偶氮苯并三氮唑)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸酯和N,N'-二异丙基乙胺,

(4)六氟磷酸苯并三唑-1-基-氧基三吡咯烷基磷、1-羟基苯并三唑和N-甲基吗啡啉,

(5)2-(7-偶氮苯并三氮唑)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸酯和N-甲基吗啡啉;

所述反应溶剂选自N,N'-二甲基甲酰胺、二氯甲烷、N-甲基吡咯烷酮、二甲基亚砷中的

一种或几种以上。

11. 一种药物组合物, 该药物组合物包含治疗有效量的游离形式或可药用盐形式的权利要求1-3任一项所定义的促红细胞生成素肽或者权利要求4-6任一项所述的促红细胞生成素肽衍生物或者权利要求7-8任一项所述的促红细胞生成素肽聚合物作为活性成分: 一种或多种药用载体物质和/或稀释剂。

12. 权利要求1-3任一项所述的促红细胞生成素肽或权利要求4-6任一项所述的促红细胞生成素肽衍生物或权利要求7-8任一项所述的促红细胞生成素肽聚合物在用于治疗红细胞生成素不足或者低或者有缺陷的血红细胞群体的疾病的药物中的用途。

13. 权利要求1-3任一项所述的促红细胞生成素肽或权利要求4-6任一项所述的促红细胞生成素肽衍生物或权利要求7-8任一项所述的促红细胞生成素肽聚合物在治疗红细胞生成素不足或者低或者有缺陷的血红细胞群体的疾病中的用途。

促红细胞生成素肽及衍生物和聚合物、制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及蛋白多肽领域,具体涉及一类促红细胞生成素肽(EPO肽)及其衍生物和聚合物、制备方法和应用,进一步来说涉及这类促红细胞生成素肽用于治疗 and 预防贫血等相关疾病的用途。

背景技术

[0002] 促红细胞生成素(EPO)是一种调节红系造血的糖蛋白激素,EPO只有结合到红系祖细胞表面有活性的促红细胞生成素受体(EPOR)才能发挥生物效应。EPO是一种唾液酸糖蛋白,其分子含196个氨基酸残基,等电点为4.5,PH稳定范围宽(PH3-9),耐热(80°C5-15分钟仍有活性)。成熟的EPO分子含166个氨基酸残基。红细胞的发育要经过干细胞、祖细胞、前体细胞、网织细胞等过程,其间必须要有相应的细胞因子作用细胞才能增殖、分化。促红细胞生成素是红细胞最重要的必不可少的细胞因子。它不仅可以刺激骨髓红系祖细胞的增殖、转化、成熟,使骨髓中网织红细胞生成并释放入血,而且可刺激血红蛋白的合成最终导致外周血红细胞数量的增加。EPO通过以下方式发挥作用:(1)作为分裂原,刺激有丝分裂,促进祖细胞增殖。(2)延迟DNA裂解,减少细胞凋亡,维持细胞由G0/G1期向S期转变。(3)激活红系特异基因(如珠蛋白基因等),诱导细胞分化。人EPO在血浆中的浓度通常较低(10-26U/L),当肾脏及肝动脉血氧浓度降低时,EPO的合成可反应性的增加。

[0003] EPO的敏感性与EPOR有密切关系。EPO必须与其受体结合后使其二聚化引起信号下传才能发挥其生物作用。红系祖细胞对EPO的敏感性与EPOR的数量有关。EPOR主要表达于CFU-E阶段,随红细胞的成熟而衰减,网织红细胞和成熟红细胞表面无EPOR。很多研究显示,缺氧时CFU-E的EPOR数量可增高而提高EPO的敏感性。1989年成功地克隆了鼠EPOR cDNA。1991年人的EPOR cDNA也成功克隆。人与鼠的EPO受体都由507个氨基酸组成。EPO受体可分为3个区域,即胞外配基结合区、跨膜区和胞浆信号传导区。在组成EPOR的氨基酸中,24个氨基酸形成单一肽链,223个氨基酸形成胞浆外部分,24个氨基酸形成跨膜部分,236个氨基酸形成胞浆部分。其胞外区有5氨基结构WSXWS,缺和插入研究表明其是EPO结合位点的必须组份,该位点改变,可改变EPO的敏感性。另研究发现,EPOR羧基端第40-90位氨基酸有将信号下调的作用。研究表明,EPO的反应性并不依赖于EPOR的一级结构,二级结构及高级结构对EPO受体功能更为重要。二级结构及高级结构改变时,可以影响EPO的敏感性。另外P85和P100也与EPO相偶联,EPOR可被EPO等激活,形成同源二聚体,导致EPO受体自身磷酸化,参与信号传导,将信息传导到细胞核。在EPO受体的胞质区有二个同源盒,是增殖信息的传递部位。它的改变可引起信息传导改变,故对EPO敏感性有重要影响。EPO受体分为高亲和力与低亲和力两种,其比例改变可以直接影响EPO的敏感性。

[0004] 自1906年法国科学家Carnot和Deflandre发现EPO来,人们在这一个多世纪中对EPO的认识不断深入并取得了许多巨大的成果。1989年6月,Amgen公司利用基因工程技术成功研制并上市了全球首个重组人促红细胞生成素(rhEPO)产品——Epopgen(阿法依泊汀),主要在治疗肾性贫血、恶性肿瘤放化疗导致的贫血等症状疗效显著。2001年9月,Amgen公司

的一种“高糖基化”的长效重组促红素产品——Arnesp(阿法达贝泊汀)获得FDA批准,并于2002年正式上市。2007年11月,Roche公司上市了另外一种长效重组促红素产品——Mircera(聚乙二醇化的倍他依泊汀)。而在多肽领域,截止到目前仍未有针对EPO受体的激动剂类药物上市,存在巨大的研发空间及市场潜力。

发明内容

[0005] 本发明所解决的现有技术的问题是:现有的EPO多肽,其生物活性较低,生物利用度不高,半衰期短导致临床依从性不好,此类蛋白分子的稳定性差、易分解,不易保存、运输和使用。

[0006] 为了解决上述问题,本发明提供了一种促红细胞生成素肽及其相关的衍生物,可以显著提高EPOR的活性及效力,较之于EPO,半衰期长,临床依从性好,稳定性高于EPO,运输保存和使用都优于EPO。

[0007] 具体而言,本发明提供了如下技术方案:

[0008] 第一方面,本发明提供了一种促红细胞生成素肽,其序列为SEQ ID No.1:
 $R_1YR_2CR_3R_4GPR_5TWVCR_6R_7R_8$,

[0009] 其中, R_1 、 R_2 、 R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 分别独立地为L型或D型氨基酸;

[0010] R_3 为Lys、Glu、Asp、Gln、Asn、Met、Ser、Tyr、Pro或Ile,所述 R_3 为L型或D型氨基酸;

[0011] R_4 为Met、Phe或Ile,所述 R_4 为L型氨基酸。

[0012] 优选的, R_1 为Leu; R_2 为Ala; R_3 为Lys、Met、Ser、Tyr或Ile; R_4 为Met或Phe; R_5 为Ile; R_6 为Pro; R_7 为Leu; R_8 为Arg。

[0013] 优选的,所述的促红细胞生成素肽中的氨基酸分别独立地为经保护基团修饰的氨基酸;所述的保护基团优选为叔丁氧羰基、氧叔丁基、三苯甲基、2,2,4,6,7-五甲基二氢苯并呋喃-5-磺酰基或烯丙基中的一种或几种。

[0014] 第二方面,本发明提供了一种促红细胞生成素肽衍生物,在以上任一所述的促红细胞生成素肽的C端、N端或者侧链的任一位置采用聚乙二醇进行修饰。

[0015] 第三方面,本发明还提供了一种促细胞生成素肽衍生物,所述的促红细胞生成素肽衍生物的通式为式(I)所示,

[0016] $R_9-R_{10}-(CH_2)_{n1}-R_{11}-(CH_2)_{n2}-R_{12}-R_{13}$ (I)

[0017] 其中 R_9 、 R_{13} 选自权利要求1或2所述的促红细胞生成素肽; $n1$ 、 $n2$ 分别独立地选自0~10的整数; R_{10} 、 R_{12} 分别独立地选自CO或 CH_2 基; R_{11} 选自 $N(CH_2)_{n3}NHR_{14}$ 、 $NCO(CH_2)_{n3}NHR_{14}$ 、 $CHOCONH(CH_2)_{n3}NHR_{14}$ 、 $CHSCON(CH_2)_{n3}NHR_{14}$ 或 $CHNHCON(CH_2)_{n3}NHR_{14}$ 中的一种,其中 $n3$ 选自2~10的整数, R_{14} 为甲氧基聚乙二醇。

[0018] 优选的,所述甲氧基聚乙二醇的分子量为5,000~100,000道尔顿,优选为5000~50000道尔顿,更优选为5000~30000道尔顿。

[0019] 第四方面,本发明同时提供了一种促细胞生成素肽聚合物,所述的促细胞生成素肽聚合物采用以上任一项所述的促红细胞生成素肽或者采用以上任一项所述的促红细胞生成素肽衍生物作为重复结构单元。

[0020] 优选的,所述的促红细胞生成素肽为促红细胞生成素肽或促细胞生成素肽衍生物的二聚体或2~10个重复结构单元的多聚体。

[0021] 优选的,所述的促红细胞生成素肽聚合物,其聚合方式选自S-S、C-N、C-O、C=N、C-C、C=C、C-S、CO-S、CO-NH键中的一种。

[0022] 更优选的,所述的促红细胞生成素肽聚合物的聚合方式为CO-NH、CO-S或S-S键。

[0023] 第五方面,本发明还提供了一种促红细胞生成素肽的制备方法,包括如下步骤:

[0024] (1)采用固相合成法,依照促红细胞生成素肽的连接次序在偶联剂和反应溶剂的作用下,依次进行氨基酸的偶联,合成具有全保护的促红细胞生成素肽;

[0025] (2)裂解得到促红细胞生成素肽。

[0026] 优选的,所述偶联剂选自以下几种组合中的一种:(1)N,N'-二异丙基碳二亚胺和1-羟基苯并三唑,

[0027] (2)六氟磷酸苯并三唑-1-基-氧基三吡咯烷基磷、1-羟基苯并三唑和N,N'-二异丙基乙胺,

[0028] (3)2-(7-偶氮苯并三氮唑)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸酯和N,N'-二异丙基乙胺,

[0029] (4)六氟磷酸苯并三唑-1-基-氧基三吡咯烷基磷、1-羟基苯并三唑和N-甲基吗啡啉,

[0030] (5)2-(7-偶氮苯并三氮唑)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸酯和N-甲基吗啡啉;

[0031] 所述反应溶剂选自N,N'-二甲基甲酰胺、二氯甲烷、N-甲基吡咯烷酮、二甲基亚砷中的一种或几种以上。

[0032] 第六方面,本发明还提供了一种药物组合物,该药物组合物包含治疗有效量的游离形式或可药用盐形式的以上任一项所定义的促红细胞生成素肽或者以上任一项所述的促红细胞生成素肽衍生物或者以上任一项所述的促红细胞生成素肽聚合物作为活性成分:一种或多种药用载体物质和/或稀释剂。

[0033] 第七方面,本发明还提供了以上任一项所述的促红细胞生成素肽或以上任一项所述的促红细胞生成素肽衍生物或以上任一项所述的促红细胞生成素肽聚合物在用于治疗红细胞生成素不足或者低或者有缺陷的血红细胞群体的疾病的药物中的用途。

[0034] 第八方面,本发明也提供了以上任一项所述的促红细胞生成素肽或以上任一项所述的促红细胞生成素肽衍生物或以上任一项所述的促红细胞生成素肽聚合物在治疗红细胞生成素不足或者低或者有缺陷的血红细胞群体的疾病中的用途。

[0035] 本发明的有益效果为:本发明的促红细胞生成素肽及衍生物和聚合物可用于治疗贫血症或由贫血引起的相关疾病,具体地说,促红细胞生成素肽及衍生物和聚合物对于制备疗效更显著副作用更低的治疗贫血症或由贫血引起的相关疾病的药物将是有益的。

附图说明

[0036] 图1为¹²⁵I-EPO竞争性结合实验检测rhEPO与重组EPO受体的结合活性图。

[0037] 图2为不同编号的EPO肽与重组EPO受体的结合活性图。

[0038] 图3为rhEPO与无rhEPO的FD₅₀-1/rhEPOR增殖曲线图。

[0039] 图4为编号为1331的EPO肽的FD₅₀-1/rhEPOR增殖曲线图。

[0040] 图5为编号为1331的EPO肽与EPO的磷酸化检测图。

具体实施方式

[0041] 如上所述,本发明的目的在于:提供一种促红细胞生成素肽、聚合物和衍生物及其制备方法和用途。

[0042] 其中,本发明的促红细胞生成素肽可以作为促红细胞生成素受体的激动剂,本发明中所定义的激动剂是指对作用受体有较强的亲和力,也有较强的内在活性,能通过受体兴奋发挥作用的物质,即能与该作用受体结合并能促进该受体活性的物质;其中本发明中所述的促红细胞生成素肽特指对EPOR有较强的亲和力,从而使EPOR表现出活性的多肽。

[0043] 本发明人研究发现促红细胞生成素肽在一定程度上可与EPOR相互作用,具体作用表现为此类肽结合EPOR并且刺激EPO-依赖性细胞的增殖。此类 EPOR生成素肽可以作为EPO的替代物,因此在治疗相关疾病上存在巨大的潜力。

[0044] 所述的促红细胞生成素肽为包括长度为16个氨基酸的单体肽激动剂。

[0045] 其中,在本发明的一种优选实施方式中,所述的促红细胞生成素肽的序列为SEQ ID No.2:H-Leu-Tyr-Ala-Cys-Lys-Met-Gly-Pro-Ile-Thr-Trp-Val-Cys-Pro-Leu-Arg-OH;

[0046] 在本发明的另一种优选实施方式中,所述的促红细胞生成素肽的序列为:SEQ ID No.3:H-Leu-Tyr-Ala-Cys-Tyr-Met-Gly-Pro-Ile-Thr-Trp-Val-Cys-Pro-Leu-Arg-OH;

[0047] 在本发明的又一种优选实施方式中,所述的促红细胞生成素肽的序列为:其序列为SEQ ID No.4:H-Leu-Tyr-Ala-Cys-Ile-Met-Gly-Pro-Ile-Thr-Trp-Val-Cys-Pro-Leu-Arg-OH;

[0048] 在本发明的另一种优选实施方式中,所述的促红细胞生成素肽的序列为SEQ ID No.5:H-Leu-Tyr-Ala-Cys-Ser-Met-Gly-Pro-Ile-Thr-Trp-Val-Cys-Pro-Leu-Arg-OH;

[0049] 在本发明的又一种优选实施方式中,所述的促红细胞生成素肽的序列为SEQ ID No.6:H-Leu-Tyr-Ala-Cys-Met-Met-Gly-Pro-Ile-Thr-Trp-Val-Cys-Pro-Leu-Arg-OH;

[0050] 在本发明的再一种优选实施方式中,所述的促红细胞生成素肽的序列为SEQ ID No.7:H-Leu-Tyr-Ala-Cys-Lys((PEG)10)-CH₂CH₂-Phe-Gly-Pro-Ile-Thr-Trp-Val-Cys-Pro-Leu-Arg-OH。

[0051] 同时本发明提供了一种促红细胞生成素肽衍生物,其中所述促红细胞生成素肽衍生物是指单体肽氨基酸的N端、C端或氨基酸侧链的任一位置采用聚乙二醇进行修饰。

[0052] 同时,本发明提供了一种促红细胞生成素肽聚合物,其中聚合物为二聚物或者多聚物,聚合物将促红细胞生成素肽作为重复结构单元,其重复结构单元的重复个数优选为2~10个,单体肽与单体肽之间采用S-S、C-N、C-O、C=N、C-C、C=C、C-S、CO-NH键等方式进行连接,优选采用S-S或CO-NH键进行缩聚。而且通过二聚或多聚的方式,此类多肽化合物也可以显示出显著的效力和活性。

[0053] 而且,本发明提供了一种促红细胞生成素肽衍生物,其通式为式(I)所示,

[0054] $R_9-R_{10}-(CH_2)_{n_1}-R_{11}-(CH_2)_{n_2}-R_{12}-R_{13}$ (I)

[0055] 其中R₉、R₁₃选自权利要求1或2所述的促红细胞生成素肽;n₁、n₂分别独立地选自0~10的整数;R₁₀、R₁₂分别独立地选自CO或CH₂基;R₁₁选自N(CH₂)_{n₃}NHR₁₄、NCO(CH₂)_{n₃}NHR₁₄、CHOCONH(CH₂)_{n₃}NHR₁₄、CHSCON(CH₂)_{n₃}NHR₁₄或CHNHCON(CH₂)_{n₃}NHR₁₄中的一种,其中n₃选自2~10的整数,R₁₄为甲氧基聚乙二醇。甲氧基聚乙二醇的分子量为5,000~100,000道尔顿,优选

为(5000~50000道尔顿),更优选为(5000~30000道尔顿)。

[0056] 本发明还提供了促红细胞生成素肽的制备方法,但不局限于下列方法:

[0057] 本发明的路线以如下序列为例进行描述:H-Leu-Tyr-Ala-Cys-Lys-Met-Gly-Pro-Ile-Thr-Trp-Val-Cys-Pro-Leu-Arg-OH

[0058] 采用固相合成法,以CTC树脂/王树脂为起始树脂,按照所述的促红细胞生成素肽主链肽序依次偶联具有N端Fmoc保护且侧链保护的氨基酸;最后肽树脂裂解,纯化,冻干后得到目标化合物。

[0059] 为此本发明提供了促红细胞生成素肽的合成方法,其步骤如下:

[0060] 步骤1,在活化剂系统的存在下,由树脂固相载体和Fmoc-Arg(Pbf)-OH偶联得到Fmoc-Arg(Pbf)-树脂;

[0061] 步骤2,通过固相合成法,按照促红细胞生成素肽主链肽序依次偶联具有N端Fmoc保护且侧链保护的氨基酸;

[0062] 步骤3,裂解,纯化,冻干,得到促红细胞生成素肽及其类似物。

[0063] 其中,步骤1所述树脂固体载体采用2-CTC树脂,所述活化剂系统选自DIEA、TMP或NMM,所述Fmoc-Arg(Pbf)-树脂为0.10~0.80mmol/g取代度的Fmoc-Arg(Pbf)-CTC树脂可以自己合成,也可以直接通过购买得到。

[0064] 其中,步骤1所述树脂固体载体采用王树脂,所述活化剂系统由DIC、HOBt和DMAP组成,所述Fmoc-Arg(Pbf)-树脂为0.10~0.80mmol/g取代度的 Fmoc-Arg(Pbf)-王树脂可以自己合成,也可以直接通过购买得到。

[0065] 其中,步骤2所述的固相合成方法,包括如下步骤:

[0066] 1)采用由体积比为1:4的哌啶和DMF组成的去保护液脱除Fmoc-Arg(Pbf)-树脂上的Fmoc保护基,得到H-Arg(Pbf)-树脂;

[0067] 2)在偶联剂和反应溶剂的作用下,H-Arg(Pbf)-树脂和Fmoc保护且侧链保护的亮氨酸偶联得到Fmoc-Leu-Arg(Pbf)-树脂;

[0068] 3)重复步骤1)、2),按照促红细胞生成素肽主链肽序依次进行氨基酸的偶联,偶联氨基酸顺序为:

[0069] Fmoc-Pro-OH、Fmoc-Cys(Trt)-OH、Fmoc-Val-OH、

[0070] Fmoc-Trp(Boc)-OH、Fmoc-Thr(tBu)-OH、Fmoc-Ile-OH、Fmoc-Pro-OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Met-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-Cys(Trt)-OH、Fmoc-Ala-OH、Fmoc-Tyr(tBu)-OH、Fmoc-Leu-OH;

[0071] 所述偶联剂选自以下几种组合中的一种:(1)N,N'-二异丙基碳二亚胺和1-羟基苯并三唑,

[0072] (2)六氟磷酸苯并三唑-1-基-氧基三吡咯烷基磷、1-羟基苯并三唑和N,N'-二异丙基乙胺,

[0073] (3)2-(7-偶氮苯并三氮唑)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸酯和N,N'-二异丙基乙胺,

[0074] (4)六氟磷酸苯并三唑-1-基-氧基三吡咯烷基磷、1-羟基苯并三唑和N-甲基吗啡啉,

[0075] (5)2-(7-偶氮苯并三氮唑)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸酯和N-甲基吗啡啉;

[0076] 所述反应溶剂选自N,N'-二甲基甲酰胺、二氯甲烷、N-甲基吡咯烷酮、二甲基亚砷中的一种或几种以上。

[0077] 下面结合附图和具体的实施例对本发明作进一步的详细的说明。但是,这些实施例仅是用于说明本发明,而不是对本发明范围的限制。

[0078] 其中,实施例中所用的试剂和仪器的厂商型号如下:

[0079] Fmoc-Arg(Pbf)-王树脂,购自吉尔生化(上海)有限公司;

[0080] 氨基酸,购自吉尔生化(上海)有限公司;

[0081] 二甲基甲酰胺,购自浙江江山化工股份有限公司;

[0082] 哌啶,购自上海凌峰化学试剂有限公司;

[0083] DCM(二氯甲烷),购自浙江衢化氟化学有限公司;

[0084] MeOH(甲醇),购自(临海市浙东特种试剂厂)

[0085] 苯甲醚,购自上海凌峰化学试剂有限公司;

[0086] TFA(三氟醋酸),购自浙江化工院科技有限公司;

[0087] DIC(N,N'-二异丙基碳二亚胺),购自淄博天堂山化工有限公司;

[0088] HOBt(1-羟基苯并三唑),购自苏州昊帆生物科技有限公司;

[0089] DIEA(N,N'-二异丙基乙胺),购自苏州昊帆生物科技有限公司;

[0090] C18柱,C8柱,购自Daisogel;

[0091] 质谱仪,型号MALDI-TOF 4700,厂商AB SCIEX;

[0092] 制备型高效液相色谱仪,型号LC3000,厂商北京创新通恒科技有限公司。

[0093] 其中,本发明中所用的细胞:中国仓鼠卵巢细胞(Chinese hamster ovary,CHO)和小鼠骨髓细胞(FDCP-1),均购自于:ATCC公司。

[0094] RPMI培养基,购自:Thermo Fisher SCIENTIFIC;

[0095] 本发明中一些常用的缩写具有以下含义;

[0096] Fmoc:苄氧羰基

[0097] Fmoc-AA:苄氧羰基保护的氨基酸

[0098] DIC:N,N'-二异丙基碳化二亚胺

[0099] DCC:N,N'-二环己基碳二亚胺

[0100] PyBOP:六氟磷酸苯并三唑-1-基-氧基三吡咯烷基磷

[0101] HATU:2-(7-偶氮苯并三氮唑)-N,N,N',N'-四甲基脒六氟磷酸酯

[0102] HOBt:1-羟基苯并三唑

[0103] tBu:叔丁基

[0104] OtBu:叔丁氧基

[0105] Trt:三苯甲基

[0106] Boc:叔丁氧羰基

[0107] Pbf:2,2,4,6,7-五甲基二氢苯并呋喃-5-磺酰基

[0108] Cys:半胱氨酸

[0109] Pro:脯氨酸

[0110] Leu:亮氨酸

[0111] Gly:甘氨酸

- [0112] Arg:精氨酸
- [0113] Ala:丙氨酸
- [0114] Lys:赖氨酸
- [0115] Tyr:酪氨酸
- [0116] Met:蛋氨酸
- [0117] Ile:异亮氨酸
- [0118] Thr:苏氨酸
- [0119] Trp:色氨酸
- [0120] Val:缬氨酸
- [0121] DMF:N,N'-二甲基甲酰胺
- [0122] MeOH:甲醇
- [0123] DCM:二氯甲烷
- [0124] NMP:N-甲基吡咯烷酮
- [0125] DMSO:二甲基亚砷
- [0126] TFA:三氟醋酸
- [0127] Piperidine:六氢吡啶
- [0128] DMAP:4-二甲氨基吡啶
- [0129] DIEA:N,N'-二异丙基乙胺
- [0130] TMP:2,4,6-三甲基吡啶。
- [0131] 实施例中提到的真空干燥和冷冻干燥用到的冻干设备型号及生产厂家说明如下:
- [0132] 冻干设备:冻干机FD-3(北京博医康实验仪器有限公司);
- [0133] 冻干条件:将冻干盘放入冰箱冷冻室(-20℃)中,预冻6h。开启冻干机,打开制冷,预冷30min以上,设置冻干曲线如下:
- [0134] 第一段:在-27℃运行16h;第二段:在-5℃运行4h;第三段:在5℃运行2h;第四段:在30℃运行16h。
- [0135] (一)促红细胞生成素肽(EPO肽)的制备
- [0136] 实施例一
- [0137] 促红细胞生成素肽的合成,其序列为SEQ ID No.2:H-Leu-Tyr-Ala-Cys-Lys-Met-Gly-Pro-Ile-Thr-Trp-Val-Cys-Pro-Leu-Arg-OH的合成
- [0138] (1)称取0.1mmol取代度为0.52mmol/g的Fmoc-Arg(Pbf)-王树脂,加入固相反应柱中,用DMF洗涤1次,用DMF溶胀Fmoc-Arg(Pbf)-王树脂30分钟后,用DMF:吡啶体积比为4:1的混合溶液脱去Fmoc保护,然后用DMF洗涤6次,称取Fmoc-Leu-OH 0.5mmol、HOBt 0.5mmol加入体积比为1:1的DCM和DMF混合溶液,冰水浴下加入80μl DIC(0.5mmol)活化后,加入上述装有树脂的反应柱中,室温下反应2小时后,以茚三酮法检测判断反应终点,如果树脂无色透明,则表示反应完全;树脂显色,则表示反应不完全,需要再反应1小时,此判断标准适用于后续氨基酸偶联中以茚三酮法检测判断反应终点。
- [0139] (2)重复上述脱除Fmoc保护和加入相应氨基酸偶联的步骤,依次完成Fmoc-Pro-OH、Fmoc-Cys(Trt)-OH、Fmoc-Val-OH、Fmoc-Trp(Boc)-OH、Fmoc-Thr(tBu)-OH、Fmoc-Ile-OH、Fmoc-Pro-OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Met-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-Cys(Trt)-OH、

Fmoc-Ala-OH、Fmoc-Tyr(tBu)-OH、Fmoc-Leu-OH的偶联。偶联完毕,将肽树脂用DMF洗涤3次,DCM洗涤3次,MeOH洗涤3次,DCM洗涤3次,MeOH洗涤3次,抽干得到0.751g粗肽树脂。

[0140] (3)裂解:称取0.751g全保护的肽树脂,加入到25mL的三口圆底烧瓶中,按TFA:苯甲醚=95:5的体积比配置裂解液10mL,将裂解液加入上述树脂中,室温反应2小时,过滤,用少量TFA洗涤裂解后的树脂3次,合并滤液,浓缩,将浓缩后的液体加入到冰乙醚中沉淀1小时,离心,无水乙醚离心洗涤6次,真空干燥,得到粗肽186.2mg。

[0141] (4)纯化,冻干:将上述粗肽用50mL水溶解后,然后通过C18柱进行两次纯化,脱盐,旋蒸浓缩,冻干后得到目标产物(18.7mg,10.11%)。其中 纯化条件为,流动相为:A相:0.1%TFA;B相:乙腈;梯度程序为:15%B,60分钟内至60%B;检测波长220nm;收集目的峰馏分。脱盐的条件为流动相:A相:20mmol/L乙酸铵的水溶液:乙腈=95:5;B相:水:乙腈=95:5;C相:0.03%醋酸的水溶液:乙腈=95:5;D相:0.03%醋酸的水溶液:乙腈=50:50;梯度程序为:以流动相A等梯度洗脱15分钟,转换成流动相B等梯度洗脱10分钟,转换成流动相C等梯度洗脱10分钟,转换成流动相D等梯度洗脱25分钟;检测波长220nm;收集目的峰馏分。同时用MALDI-TOF分析产物,发现质子化的分子离子峰的m/z值为1850.3627(理论量为1849)。

[0142] 实施例二

[0143] 促红细胞生成素肽的合成,其序列为SEQ ID No.3:H-Leu-Tyr-Ala-Cys-Tyr-Met-Gly-Pro-Ile-Thr-Trp-Val-Cys-Pro-Leu-Arg-OH的合成

[0144] (1)称取0.1mmol取代度为0.52mmol/g的Fmoc-Arg(Pbf)-王树脂,加入固相反应柱中,用DMF洗涤1次,用DMF溶胀Fmoc-Arg(Pbf)-王树脂30分钟后,用DMF:吡啶体积比为4:1的混合溶液脱去Fmoc保护,然后用DMF洗涤6次,称取Fmoc-Leu-OH 0.5mmol、HOBt 0.5mmol加入体积比为1:1的DCM和DMF混合溶液,冰水浴下加入80 μ l DIC(0.5mmol)活化后,加入上述装有树脂的反应柱中,室温下反应2小时后,以茚三酮法检测判断反应终点,如果树脂无色透明,则表示反应完全;树脂显色,则表示反应不完全,需要再反应1小时,此判断标准适用于后续氨基酸偶联中以茚三酮法检测判断反应终点。

[0145] (2)重复上述脱除Fmoc保护和加入相应氨基酸偶联的步骤,依次完成Fmoc-Pro-OH、Fmoc-Cys(Trt)-OH、Fmoc-Val-OH、Fmoc-Trp(Boc)-OH、Fmoc-Thr(tBu)-OH、Fmoc-Ile-OH、Fmoc-Pro-OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Met-OH、Fmoc-Tyr(tBu)-OH、Fmoc-Cys(Trt)-OH、Fmoc-Ala-OH、Fmoc-Tyr(tBu)-OH、Fmoc-Leu-OH的偶联。偶联完毕,将肽树脂用DMF洗涤3次,DCM洗涤3次,MeOH洗涤3次,DCM洗涤3次,MeOH洗涤3次,抽干得到0.726g粗肽树脂。

[0146] (3)裂解:称取0.726g全保护的肽树脂,加入到25mL的三口圆底烧瓶中,按TFA:苯甲醚=95:5的体积比配置裂解液10mL,将裂解液加入上述树脂中,室温反应2小时,过滤,用少量TFA洗涤裂解后的树脂3次,合并滤液,浓缩,将浓缩后的液体加入到冰乙醚中沉淀1小时,离心,无水乙醚离心洗涤6次,真空干燥,得到粗肽167.9mg。

[0147] (4)纯化,冻干:将粗肽用50ml水溶解后,而后通过C8柱2次纯化、转盐、冷冻干燥后得到目标产物(17.5mg,9.26%),用MALDI-TOF分析产物,发现质子化的分子离子峰的m/z值为1885.8624(理论量为1885)。

[0148] 实施例三

[0149] 促红细胞生成素肽的合成,其序列为SEQ ID No.4:H-Leu-Tyr-Ala-Cys-Ile-Met-Gly-Pro-Ile-Thr-Trp-Val-Cys-Pro-Leu-Arg-OH的合成

[0150] (1)称取0.1mmol取代度为0.52mmol/g的Fmoc-Arg(Pbf)-王树脂,加入固相反应柱中,用DMF洗涤1次,用DMF溶胀Fmoc-Arg(Pbf)-王树脂30分钟后,用DMF:吡啶体积比为4:1的混合溶液脱去Fmoc保护,然后用DMF洗涤6次,称取Fmoc-Leu-OH 0.5mmol、HOBt 0.5mmol加入体积比为1:1的DCM和DMF混合溶液,冰水浴下加入80 μ l DIC(0.5mmol)活化后,加入上述装有树脂的反应柱中,室温下反应2小时后,以茚三酮法检测判断反应终点,如果树脂无色透明,则表示反应完全;树脂显色,则表示反应不完全,需要再反应1小时,此判断标准适用于后续氨基酸偶联中以茚三酮法检测判断反应终点。

[0151] (2)重复上述脱除Fmoc保护和加入相应氨基酸偶联的步骤,依次完成Fmoc-Pro-OH、Fmoc-Cys(Trt)-OH、Fmoc-Val-OH、Fmoc-Trp(Boc)-OH、Fmoc-Thr(tBu)-OH、Fmoc-Ile-OH、Fmoc-Pro-OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Met-OH、Fmoc-Ile-OH、Fmoc-Cys(Trt)-OH、Fmoc-Ala-OH、Fmoc-Tyr(tBu)-OH、Fmoc-Leu-OH的偶联。偶联完毕,将肽树脂用DMF洗涤3次,DCM洗涤3次,MeOH洗涤3次,DCM洗涤3次,MeOH洗涤3次,抽干得到0.689g粗肽树脂。

[0152] (3)称取0.689g全保护的肽树脂,加入到25mL的三口圆底烧瓶中,按TFA:苯甲醚=95:5的体积比配置裂解液10mL,将裂解液加入上述树脂中,室温反应2小时,过滤,用少量TFA洗涤裂解后的树脂3次,合并滤液,浓缩,将浓缩后的液体加入到冰乙醚中沉淀1小时,离心,无水乙醚离心洗涤6次,真空干燥,得到粗肽163.7mg。

[0153] (4)纯化,冻干:将粗肽用50ml水溶解后,而后通过C18柱2次纯化、转盐、冷冻干燥后得到目标产物(17.3mg,9.40%),用MALDI-TOF分析产物,发现质子化的分子离子峰的m/z值为1835.8972(理论量为1835)。

[0154] 实施例四:

[0155] 促红细胞生成素肽的合成,其序列为SEQ ID No.5:H-Leu-Tyr-Ala-Cys-Ser-Met-Gly-Pro-Ile-Thr-Trp-Val-Cys-Pro-Leu-Arg-OH的合成

[0156] (1)称取0.1mmol取代度为0.52mmol/g的Fmoc-Arg(Pbf)-王树脂,加入固相反应柱中,用DMF洗涤1次,用DMF溶胀Fmoc-Arg(Pbf)-王树脂30分钟后,用DMF:吡啶体积比为4:1的混合溶液脱去Fmoc保护,然后用DMF洗涤6次,称取Fmoc-Leu-OH 0.5mmol、HOBt 0.5mmol加入体积比为1:1的DCM和DMF混合溶液,冰水浴下加入80 μ l DIC(0.5mmol)活化后,加入上述装有树脂的反应柱中,室温下反应2小时后,以茚三酮法检测判断反应终点,如果树脂无色透明,则表示反应完全;树脂显色,则表示反应不完全,需要再反应1小时,此判断标准适用于后续氨基酸偶联中以茚三酮法检测判断反应终点。

[0157] (2)重复上述脱除Fmoc保护和加入相应氨基酸偶联的步骤,依次完成Fmoc-Pro-OH、Fmoc-Cys(Trt)-OH、Fmoc-Val-OH、Fmoc-Trp(Boc)-OH、Fmoc-Thr(tBu)-OH、Fmoc-Ile-OH、Fmoc-Pro-OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Met-OH、Fmoc-Ser(tBu)-OH、Fmoc-Cys(Trt)-OH、Fmoc-Ala-OH、Fmoc-Tyr(tBu)-OH、Fmoc-Leu-OH的偶联。偶联完毕,将肽树脂用DMF洗涤3次,DCM洗涤3次,MeOH洗涤3次,DCM洗涤3次,MeOH洗涤3次,抽干得到0.689g粗肽树脂。

[0158] (3)裂解:称取0.689g全保护的肽树脂,加入到25mL的三口圆底烧瓶中,按TFA:苯甲醚=95:5的体积比配置裂解液10mL,将裂解液加入上述树脂中,室温反应2小时,过滤,用少量TFA洗涤裂解后的树脂3次,合并滤液,浓缩,将浓缩后的液体加入到冰乙醚中沉淀1小时,离心,无水乙醚离心洗涤6次,真空干燥,得到粗肽175.4mg。

[0159] (4)纯化,冻干:将粗肽用50ml水溶解后,而后通过C18柱2次纯化、转盐、冷冻干燥

后得到目标产物(19.8mg, 10.94%),用MALDI-TOF分析产物,发现质子化的分子离子峰的m/z值为1809.9533(理论量为1809)。

[0160] 实施例五

[0161] 促红细胞生成素肽的合成,其序列为SEQ ID No.6:H-Leu-Tyr-Ala-Cys-Met-Met-Gly-Pro-Ile-Thr-Trp-Val-Cys-Pro-Leu-Arg-OH的合成

[0162] (1)称取0.1mmol取代度为0.52mmol/g的Fmoc-Arg(Pbf)-王树脂,加入固相反应柱中,用DMF洗涤1次,用DMF溶胀Fmoc-Arg(Pbf)-王树脂30分钟后,用DMF:吡啶体积比为4:1的混合溶液脱去Fmoc保护,然后用DMF洗涤6次,称取Fmoc-Leu-OH 0.5mmol、HOBt 0.5mmol加入体积比为1:1的DCM和DMF混合溶液,冰水浴下加入80 μ l DIC(0.5mmol)活化后,加入上述装有树脂的反应柱中,室温下反应2小时后,以茚三酮法检测判断反应终点,如果树脂无色透明,则表示反应完全;树脂显色,则表示反应不完全,需要再反应1小时,此判断标准适用于后续氨基酸偶联中以茚三酮法检测判断反应终点。

[0163] (2)重复上述脱除Fmoc保护和加入相应氨基酸偶联的步骤,依次完成Fmoc-Pro-OH、Fmoc-Cys(Trt)-OH、Fmoc-Val-OH、Fmoc-Trp(Boc)-OH、Fmoc-Thr(tBu)-OH、Fmoc-Ile-OH、Fmoc-Pro-OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Met-OH、Fmoc-Met-OH、Fmoc-Cys(Trt)-OH、Fmoc-Ala-OH、Fmoc-Tyr(tBu)-OH、Fmoc-Leu-OH的偶联。偶联完毕,将肽树脂用DMF洗涤3次,DCM洗涤3次,MeOH洗涤3次,DCM洗涤3次,MeOH洗涤3次,抽干得到0.730g粗肽树脂。

[0164] (3)裂解:称取0.730g全保护的肽树脂,加入到25mL的三口圆底烧瓶中,按TFA:苯甲醚=95:5的体积比配置裂解液10mL,将裂解液加入上述树脂中,室温反应2小时,过滤,用少量TFA洗涤裂解后的树脂3次,合并滤液,浓缩,将浓缩后的液体加入到冰乙醚中沉淀1小时,离心,无水乙醚离心洗涤6次,真空干燥,得到粗肽165.7mg。

[0165] (4)纯化,冻干:将粗肽用50ml水溶解后,而后通过C18柱2次纯化、转盐、冷冻干燥后得到目标产物(17.1mg, 9.24%),用MALDI-TOF分析产物,发现质子化的分子离子峰的m/z值为1853.8677(理论量为1853)。

[0166] 实施例六

[0167] 促红细胞生成素肽的合成,其序列为SEQ ID No.7:H-Leu-Tyr-Ala-Cys-Lys((PEG)10)-CH₂CH₂-Phe-Gly-Pro-Ile-Thr-Trp-Val-Cys-Pro-Leu-Arg-OH的合成

[0168] (1)称取0.1mmol取代度为0.52mmol/g的Fmoc-Arg(Pbf)-王树脂,加入固相反应柱中,用DMF洗涤1次,用DMF溶胀Fmoc-Arg(Pbf)-王树脂30分钟后,用DMF:吡啶体积比为4:1的混合溶液脱去Fmoc保护,然后用DMF洗涤6次,称取0.177g Fmoc-Leu-OH(0.5mmol)、0.068g HOBt(0.5mmol)加入体积比为1:1的DCM和DMF混合溶液,冰水浴下加入80 μ l DIC(0.5mmol)活化后,加入上述装有树脂的反应柱中,室温下反应2小时后,以茚三酮法检测判断反应终点,如果树脂无色透明,则表示反应完全;树脂显色,则表示反应不完全,需要再反应1小时,此判断标准适用于后续氨基酸偶联中以茚三酮法检测判断反应终点。

[0169] (2)重复上述脱除Fmoc保护和加入相应氨基酸偶联的步骤,依次完成Fmoc-Pro-OH、Fmoc-Cys(Trt)-OH、Fmoc-Val-OH、Fmoc-Trp(Boc)-OH、Fmoc-Thr(tBu)-OH、Fmoc-Ile-OH、Fmoc-Pro-OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Phe-OH、Fmoc-Lys(Dde)-OH、Fmoc-Cys(Trt)-OH、Fmoc-Ala-OH、Fmoc-Tyr(tBu)-OH、Boc-Leu-OH的偶联,将3%水合肼DMF溶液加入树脂反应30min后,偶联Fmoc-NH-PEG10-CH₂CH₂COOH。偶联完毕,将肽树脂用DMF洗涤3次,DCM洗涤3次,

MeOH洗涤3次,DCM洗涤3次,MeOH洗涤3次,抽干得到0.825g 粗肽树脂。

[0170] (3)裂解:称取0.825g全保护的肽树脂,加入到25mL的三口圆底烧瓶中,按TFA:苯甲醚=95:5的体积比配置裂解液10mL,将裂解液加入上述树脂中,室温反应2小时,过滤,用少量TFA洗涤裂解后的树脂3次,合并滤液,浓缩,将浓缩后的液体加入到冰乙醚中沉淀1小时,离心,无水乙醚离心洗涤6次,真空干燥,得到粗肽193.7mg。

[0171] (4)纯化,冻干:将粗肽用50ml水溶解后,而后通过C18或C8柱2次纯化、转盐、冷冻干燥后得到目标产物(19.4mg,8.16%),用MALDI-TOF分析产物,发现质子化的分子离子峰的m/z值为2377.7428(理论量为2377)。

[0172] (二)促红细胞生成素肽(EPOR肽)的活性测定

[0173] 实验方法与结果

[0174] 1、EPO肽的制备

[0175] EPO肽:将实施例一到实施例五得到的目标多肽分别编号为1329,1330,1331,1332,1333,备用。

[0176] 2、EPO受体的表达纯化及其固定

[0177] 我们在EPOR胞外段(EPO ECD)羧基端接上HPAP(人胎盘碱性磷酸酶)的羧基端信号序列,并在两序列前加入凝血酶酶切位点,将其融合表达于CHO细胞中。聚乙烯板上固定有HPAP抗体,可以用来识别HPAP部分,从而将EPO-R固定在检测孔中。

[0178] 细胞培养所需的RPMI培养液中均包含1%BSA。HPAP信号序列可以通过磷脂酰聚糖将融合蛋白锚定在细胞表面。重组EPOR用磷脂酶c处理后,用抗HPAP区域抗体(mAb179)将融合蛋白固定在聚苯乙烯孔中。

[0179] 3、¹²⁵I-EPO竞争性结合实验检测rhEPO与重组EPO受体的结合活性

[0180] 按照上述步骤重组表达EPOR(rhEPOR),并将rhEPOR固定于聚苯乙烯微孔中,然后加入放射性标记的¹²⁵I-rhEPO(600ci/mmol),其中一孔仅加入1uM rhEPO作为非特异性检测对照孔。4℃孵育2h后洗涤微孔,ALLFIT方法分析数据。其结果如图1所示,¹²⁵I-rhEPO与rhEPO竞争性结合rhEPOR,加入了rhEPO的溶液,其放射活性下降,而且随着加入的rhEPO的浓度升高(从 10^{-12} M, 10^{-11} M, 10^{-10} M, 10^{-9} M, 10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M),溶液的放射活性结合率值越低。通过图1曲线由ALLDFIT分析方法计算得到rhEPO与重组EPOR的解离系数大约为200pM,与天然受体的解离值接近。

[0181] 其中,放射活性结合率是指,放射性标记¹²⁵I-EPO与EPO肽或rhEPO竞争性结合EPOR时,结合的放射性标记¹²⁵I-EPO与总浓度¹²⁵I-EPO之比,即 $[\text{¹²⁵I-EPO}]_{\text{结合浓度}}/[\text{¹²⁵I-EPO}]_{\text{总浓度}} \times 100\%$;其中,解离系数是指50%受体被配体结合时配体的浓度,用来反映反应的亲和力。

[0182] 4、EPO肽的结合活性测定

[0183] EPO肽(肽编号1329,1330,1331,1332,1333)分别溶解于100%的DMSO中,使终浓度分别为50mM,作为EPO肽储备液。将EPO肽储备液分别用结合液(磷酸盐溶液,Na₂CO₃1.59g,NaHCO₃2.94g,加蒸馏水定容至1000mL)稀释至使用浓度(10^{-10} M, 10^{-9} M, 10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M, 10^{-5} M, 10^{-4} M, 10^{-3} M),后加入固定有EPOR的聚苯乙烯微孔中,再加入放射性标记¹²⁵I-rhEPO与EPO肽竞争性结合EPOR受体,其中一孔仅加入1uM rhEPO作为非特异性检测对照孔。4℃孵育2h后洗涤微孔,ALLFIT方法分析数据。其结果如图2所示,加入放射性标记的¹²⁵I-rhEPO,

^{125}I -rhEPO与EPO短肽竞争性结合EPOR受体,从图2可以看出,含有五种多肽的溶液的放射活性均呈现了不同程度的下降,而且短肽的浓度越高,放射活性结合率越低;其中,编号为1331的肽溶液的放射活性下降速度最快,而且当肽1331的浓度为 10^{-6}M 时,放射活性下降到20%以下,当肽1331的浓度为 10^{-4}M 时,几乎检测不到放射活性。图2的实验结果表明肽1331的活性最佳。

[0184] 5、EPO肽的体外活性测定

[0185] 为了测定EPO肽能否作用于EPOR真核细胞。我们用全长人源EPOR转染FDCP-1细胞,制备得到FDCP-1/hEPOR细胞。其中,FDCP-1细胞为小鼠骨髓的一种造血祖细胞。

[0186] EPO的FDCP-1/rhEPOR增殖曲线:FDCP-1/hEPOR细胞于含10%FCS、1nM rhEPO RPMI中培养至密度为 $10^6/\text{mL}$ 后,用PBS洗涤去除rhEPO,并用不含rhEPO的培养液继续培养过夜。将细胞按每孔 10^5 个细胞铺板,并按指示量加入rhEPO(10^{-12}M , 10^{-11}M , 10^{-10}M , 10^{-9}M),48小时后利用MTT实验,在570nm波长处比色测定细胞增殖,其结果如图3所示。图3中的曲线代表的含义分别为:利用rhEPO刺激FDCP-1/rhEPOR细胞后的细胞增殖曲线以及无rhEPO刺激的细胞增殖曲线。图3的结果表明相比较无rhEPO的培养液,利用含rhEPO的培养液培养,可以促进FDCP-1/rhEPOR细胞的增殖,而且随着rhEPO的浓度增加,FDCP-1/rhEPOR细胞的增殖越快。图3的结果表明rhEPO可以刺激重组FDCP-1/rhEPOR细胞的增殖。

[0187] 编号为1331的EPO短肽的FDCP-1/rhEPOR增殖曲线:将EPO短肽1331溶解于100%的DMSO中,终浓度为50mM。并用无血清RPMI稀释至使用浓度(10^{-7}M , 10^{-6}M , 10^{-5}M , 10^{-4}M)。FDCP-1/hEPOR细胞于含10%FCS、1nM rhEPO RPMI中培养至密度为 $10^6/\text{mL}$ 后,用PBS洗涤去除rhEPO,并用不含rhEPO的培养液继续培养过夜。将细胞按每孔 10^5 个细胞铺板,并按指示量加入EPO短肽1331,48小时后利用MTT实验,在570nm波长处比色测定细胞增殖,其结果如图4所示。从图4的结果显示,EPO刺激细胞株增殖,EC50值为 10^{-20}pM 。图4的结果表明,肽1331作为EPOR激动剂,能刺激细胞增殖。增殖作用的发生均依赖于EPO的存在。

[0188] 图3和图4的实验结果表明,细胞增殖活性的发生依赖于EPO短肽,而非EPO的污染。同时我们在EPO短肽的FDCP-1/hEPOR增殖实验中添加1%兔多克隆血清。多克隆血清可完全抑制EPO活性,结果显示多克隆血清的加入并未对EPO短肽的增殖活性有影响。

[0189] 6、络氨酸酶磷酸化分析

[0190] EPO与EPOR结合后,EPOR形成二聚体,然后通过信号传导途径调节红系细胞的增生和分化,其中涉及多种信号通路途径。在此过程中,EPO可以激活多种蛋白受体,导致如JAK2、VAV、EPOR、SHC的磷酸化激活。 $2 \times 10^6/\text{mL}$ FDCP-1/rhEPOR细胞用含10%FCS,2nM rhEPO培养,收集后重悬于无rhEPO培养液中继续培养24h。而后细胞计数并按照每孔 $0.5 \times 10^6/\text{mL}$ 铺板。细胞分别用rhEPO(10^{-5}M)和编号为1331的EPO肽(10^{-5}M)刺激10min,采用无菌水作为对照组。采用免疫印迹(immunoblotting)方式检测磷酸化类别。抗体采用抗络氨酸磷酸化单克隆抗体作为检测抗体。

[0191] 其结果如图5所示,其中C为marker的蛋白分子量,marker购自于北京博奥森生物技术有限公司。

[0192] 结果显示rhEPO诱导的磷酸化蛋白分子量大约为140,95,70,55KD。这些蛋白可对应于JAK2,VAV,EPOR,SHC。肽1331与EPO产生相同的磷酸化类别,因此肽1331在人体中与EPO信号传导的调控过程一致。

[0193] 最后说明的是,以上优选实施例仅用以说明本发明的技术方案而非限制,尽管通过上述优选实施例已经对本发明进行了详细的描述,但本领域技术人员应当理解,可以在形式上和细节上对其作出各种各样的改变,而不偏离本发明权利要求书所限定的范围。

[0194]

SEQUENCE LISTING

<110> 杭州阿德莱诺泰制药技术有限公司

<120> 促红细胞生成素肽及衍生物和聚合物、制备方法和应用

<130> PCT150003

<160> 7

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221>

<222> (1),(3),(9),(14),(15),(16)

<223> Xaa 分别独立地为 L 型或 D 型氨基酸

<220>

<221>

<222> (5)

<223> Xaa 为 Lys、Glu、Asp、Gln、Asn、Met、Ser、Tyr、Pro 或 Ile, L 型或 D 型氨基酸

<220>

1 5 10 15

<210> 4
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<400> 4

Leu Tyr Ala Cys Ile Met Gly Pro Ile Thr Trp Val Cys Pro Leu Arg

1 5 10 15

[0196] <210> 5
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<400> 5

Leu Tyr Ala Cys Ser Met Gly Pro Ile Thr Trp Val Cys Pro Leu Arg

1 5 10 15

<210> 6
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<400> 6

Leu Tyr Ala Cys Met Met Gly Pro Ile Thr Trp Val Cys Pro Leu Arg

1 5 10 15

<210> 7

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

[0197]

<220>

<221>

<222> (5)

<223> Xaa 分别 Lys-PEG10-CH₂CH₂-

<400> 7

Leu Tyr Ala Cys Xaa Phe Gly Pro Ile Thr Trp Val Cys Pro Leu Arg

1 5 10 15

[0001]

SEQUENCE LISTING

<110> 杭州阿德莱诺泰制药技术有限公司

<120> 促红细胞生成素肽及衍生物和聚合物、制备方法和应用

<130> PCT150003

<160> 7

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221>

<222> (1), (3), (9), (14), (15), (16)

<223> Xaa分别独立地为L型或D型氨基酸

<220>

<221>

<222> (5)

<223> Xaa为Lys、Glu、Asp、Gln、Asn、Met、Ser、Tyr、Pro或Ile, L型或D型氨基酸

<220>

<221>

<222> (6)

<223> Xaa为Met、Phe或Ile, L型氨基酸

<400> 1

Xaa	Tyr	Xaa	Cys	Xaa	Xaa	Gly	Pro	Xaa	Thr	Trp	Val	Cys	Xaa	Xaa	Xaa
1			5					10						15	

<210> 2

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 2

Leu	Tyr	Ala	Cys	Lys	Met	Gly	Pro	Ile	Thr	Trp	Val	Cys	Pro	Leu	Arg
1			5					10						15	

<210> 3

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 3

Leu Tyr Ala Cys Tyr Met Gly Pro Ile Thr Trp Val Cys Pro Leu Arg
1 5 10 15

<210> 4
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<400> 4

Leu Tyr Ala Cys Ile Met Gly Pro Ile Thr Trp Val Cys Pro Leu Arg
1 5 10 15

<210> 5
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<400> 5

Leu Tyr Ala Cys Ser Met Gly Pro Ile Thr Trp Val Cys Pro Leu Arg
1 5 10 15

[0002]

<210> 6
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<400> 6

Leu Tyr Ala Cys Met Met Gly Pro Ile Thr Trp Val Cys Pro Leu Arg
1 5 10 15

<210> 7
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221>
<222> (5)
<223> Xaa分别Lys-PEG10-CH₂CH₂-

<400> 7

Leu Tyr Ala Cys Xaa Phe Gly Pro Ile Thr Trp Val Cys Pro Leu Arg
1 5 10 15

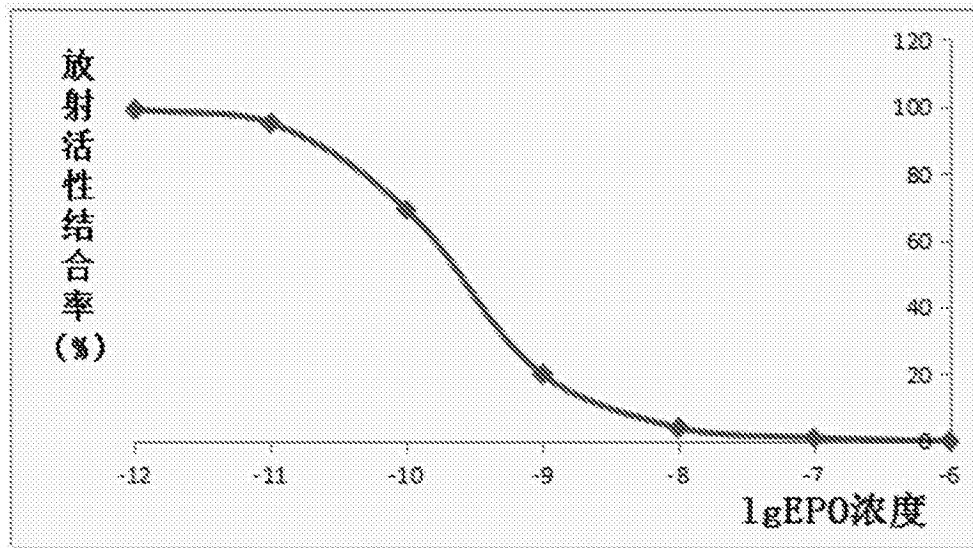


图1

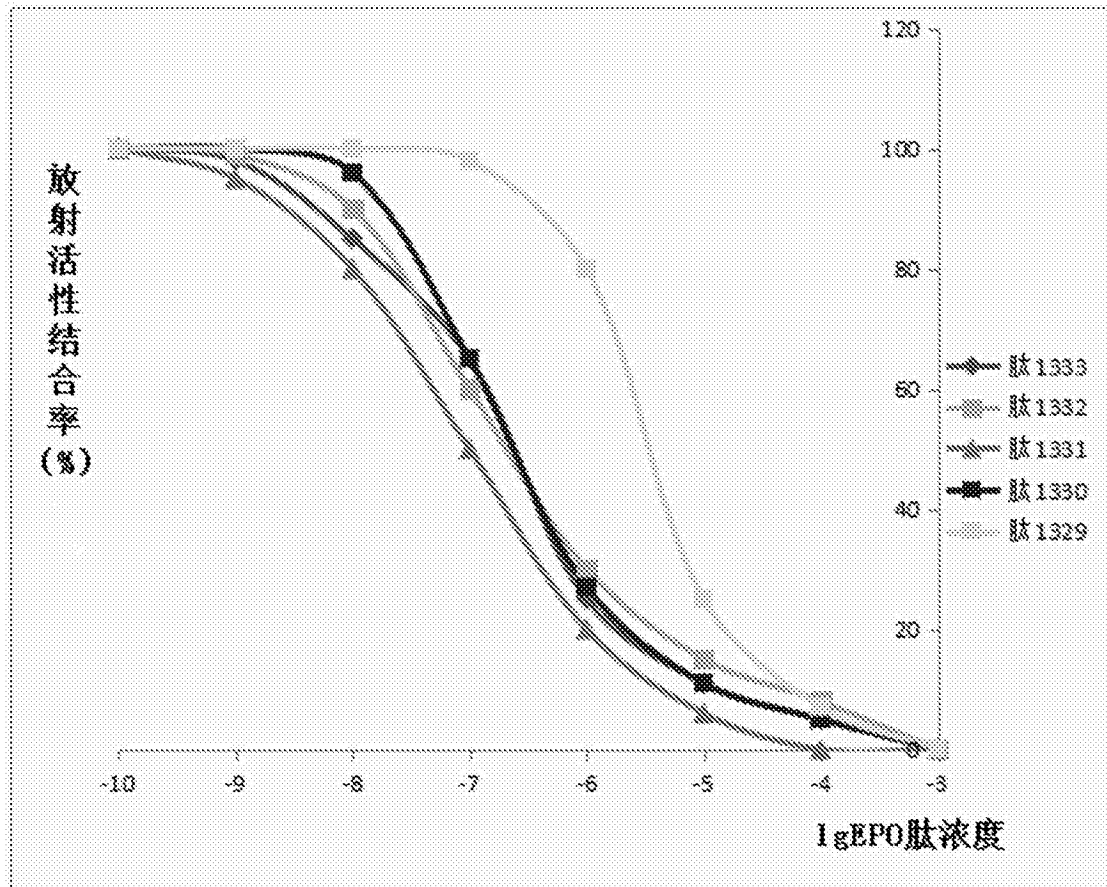


图2

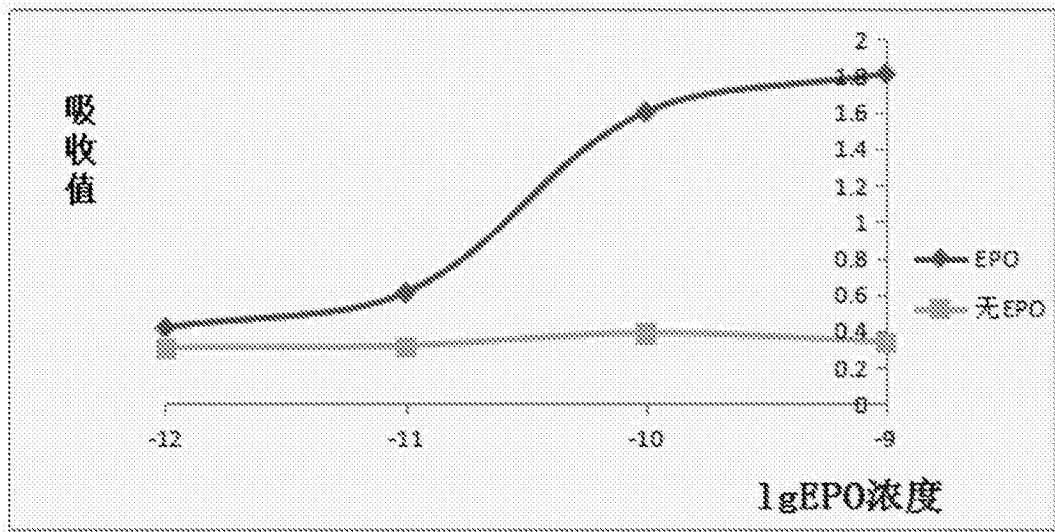


图3

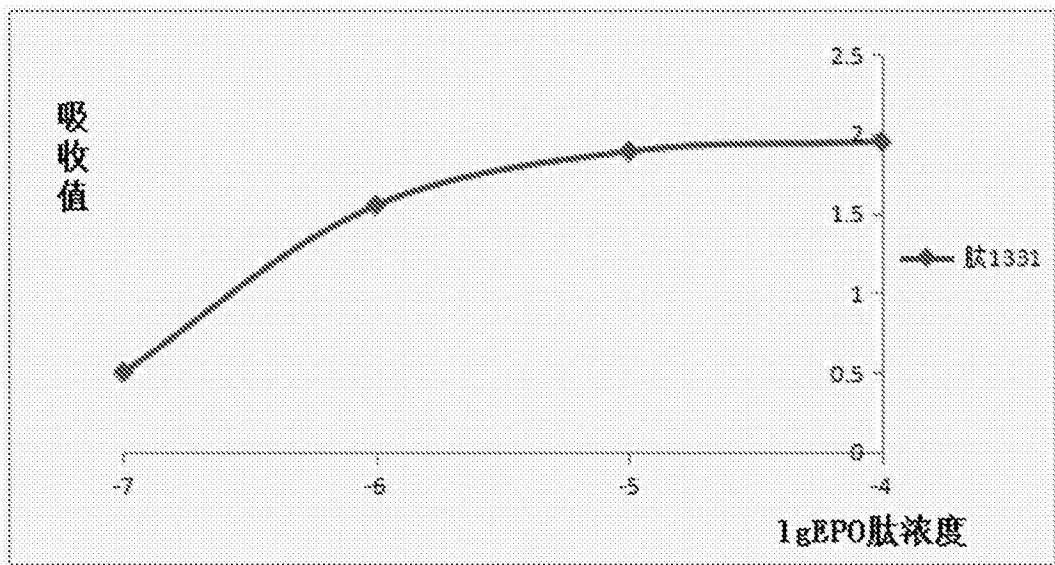


图4

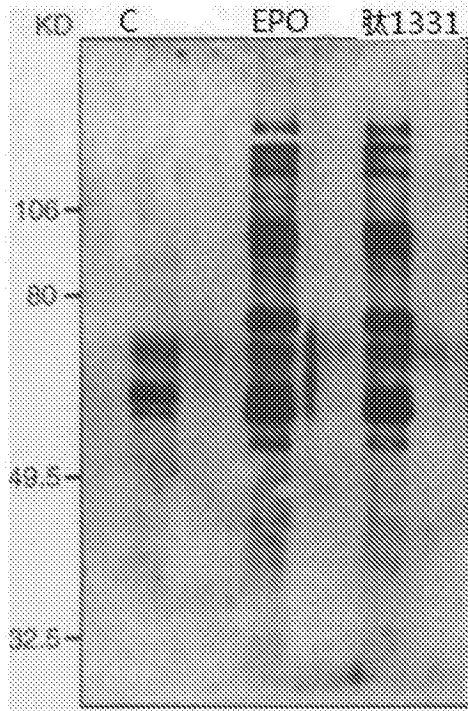


图5