



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117683088 A

(43) 申请公布日 2024. 03. 12

(21) 申请号 202311699937.8	C07K 1/04 (2006.01)
(22) 申请日 2023.12.12	C07K 1/06 (2006.01)
(71) 申请人 中国海洋大学	C07K 1/107 (2006.01)
地址 266100 山东省青岛市崂山区金家岭	A61K 38/10 (2006.01)
街道香港东路23号	A61K 47/64 (2017.01)
(72) 发明人 于日磊 李天苗 陈琴	A61P 29/00 (2006.01)
(74) 专利代理机构 北京象合知识产权代理事务	A61P 35/00 (2006.01)
所(普通合伙) 11893	A61P 25/00 (2006.01)
专利代理师 封明艳	
(51) Int. Cl.	
C07K 7/08 (2006.01)	
C07K 19/00 (2006.01)	
C12N 15/62 (2006.01)	
C12N 15/12 (2006.01)	
C07K 1/10 (2006.01)	

权利要求书3页 说明书13页 附图3页

(54) 发明名称

一种具有血浆稳定性的多肽及其制备方法

(57) 摘要

本发明属于生物技术和生物医药领域,具体涉及一种具更好的血浆稳定性的活性多肽及其制备方法;具体公开了一种通过对Mr1.1[S4Dap]的结构进行修饰获得的多肽,所述修饰包括但不限于亚甲硫缩醛修饰、三氮唑修饰、主链环化、酰胺键修饰、侧链环化和非天然氨基酸修饰,其被修饰后的活性肽能够在保持原有活性的基础上,显著提升血浆稳定性,进一步提高了其用药稳定性。

1. 一种具有血浆稳定性的活性多肽,所述多肽是通过Mr1.1[S4Dap]的结构进行修饰获得,所述修饰包括但不限于亚甲硫缩醛修饰、三氮唑修饰、主链环化修饰、酰胺键修饰、侧链环化和非天然氨基酸修饰;其中:

Mr1.1[S4Dap]的序列为:GCCDapHPACSVNPDIC*;

所述甲硫缩醛修饰多肽是指在Mr1.1[S4Dap]肽的第2位和第8位和/或第3位和第16位通过与含有亚甲基的化合物,形成的亚甲基(-CH₂-)偶联多肽;

所述甲硫缩醛修饰多肽如SCS-1、SCS-2和SCS-3所示;

所述三氮唑修饰多肽是指在Mr1.1[S4Dap]肽的第3位和第16位分别引入含有炔基的氨基酸和叠氮基团的氨基酸,通过其炔基和叠氮基形成三氮唑环偶联;所述含有炔基的氨基酸包括但不限于炔丙基甘氨酸(Prg),所述含有叠氮基团的氨基酸包括但不限于叠氮基-L-高丙氨酸(Aza);

所述三氮唑修饰多肽如PrgAza和Aza Prg所示;

所述主链环化修饰多肽是指在Mr1.1[S4Dap]肽的C末端引入一定长度的Linker通过酰胺键偶联合成主链环化的多肽;所述Linker由氨基酸组成,所述Linker选自GAAG、GGAAG、GGAAGG、-GGAAGAG、GEGEGE和GDapGDapGDap中的一种或多种;

所述主链环化修饰多肽如cMr1.1[S4Dap]-4、cMr1.1[S4Dap]-5、cMr1.1[S4Dap]-6、cMr1.1[S4Dap]-7、cMr1.1[S4Dap]-6-a、或cMr1.1[S4Dap]-6-b所示;

所述酰胺键修饰多肽是指在Mr1.1[S4Dap]肽的第3位和第16位分别引入侧链为氨基和侧链为羧基的氨基酸通过其侧链形成酰胺键偶联多肽;所述侧链为氨基的氨基酸选自:2,3-二氨基丙酸(Dap)、2,4-二氨基丁酸(Dab)和赖氨酸(K)中的一种或多种,所述侧链为羧基的氨基酸选自:天冬氨酸(D)和谷氨酸(E)中的一种或多种;

所述酰胺键修饰多肽如DapD、DabD、KD、EDap、EDab和EK所示;

所述侧链环化修饰多肽是指在Mr1.1[S4Dap]肽的氨基端和羧基端分别引入侧链为氨基和侧链为羧基的氨基酸通过其侧链形成酰胺键偶联,合成其侧链环化多肽,所述侧链为氨基的氨基酸选自2,3-二氨基丙酸(Dap)、2,4-二氨基丁酸(Dab)和赖氨酸(K)中的一种或多种;所述侧链为羧基的氨基酸选自:天冬氨酸(D)和谷氨酸(E)中的一种或多种;

所述侧链环化修饰多肽如cDapD、cDapE、cDabD、cDabE、cKD、cKE、cDDap、cDDab、cDK、cEDap、cEDab和cEK所示;

所述非天然氨基酸修饰多肽是指Mr1.1[S4Dap]肽的第3位和/或第16位的氨基酸替换为侧链含有 β,β -二甲基的半胱氨酸类似物;所述含有 β,β -二甲基的半胱氨酸类似物包括但不限于青霉胺(Penicillamine, Pen);

所述非天然氨基酸修饰多肽如Mr1.1[C3Pen, S4Dap]和Mr1.1[S4Dap, C16Pen]所示。

2. 一种多聚体,由两个或多个多肽单体聚合而成,其中至少一个多肽单体为权利要求1所述的具有血浆稳定性的活性多肽;所述多聚体的各多肽单体之间通过共价键连接。

3. 一种融合蛋白或缀合物,所述融合蛋白或缀合物含有权利要求1所述的具有血浆稳定性的活性多肽。

4. 本发明提供一种核酸分子,其编码权利要求1-3所述的活性多肽、多聚体或融合蛋白或缀合物。

5. 一种构建体,其特征在于,所述建构体包含权利要求1-3的所述的活性多肽、多聚体

或融合蛋白或缀合物的核酸分子。

6. 一种宿主细胞,其包含权利要求4-5的核酸分子和/或构建体,或者所述宿主细胞被权利要求4-5的核酸分子和/或前述的构建体转化或转染。

7. 一种药物组合物,所述药物组合物包含权利要求1-6任一项所述的活性多肽、多聚体、融合蛋白或缀合物、核酸分子、构建体、宿主细胞,以及可选的药学上可接受的辅料。

8. 如权利要求1-7任一项所述的活性多肽、多聚体、融合蛋白或缀合物、核酸分子、构建体、宿主细胞、药物组合物在 $\alpha 9\alpha 10nAChR$ 抑制剂中的用途,其中所述 $\alpha 9\alpha 10nAChR$ 包括人 $\alpha 9\alpha 10nAChR$ 、鼠 $\alpha 9\alpha 10nAChR$ 。

9. 如权利要求1-7任一项所述的活性多肽、前述多聚体、前述融合蛋白或缀合物、前述核酸分子、前述构建体、前述宿主细胞、前述药物组合物在制备治疗镇痛、抗肿瘤、和/或治疗神经系统疾病中的应用。

10. 一种如权利要求1所述的具有血浆稳定性的活性多肽得制备方法,其特征在于,所述活性多肽在线性肽合成的基础上,对线性肽的结构进行修饰获得;所述修饰方法包括但不限于亚甲硫缩醛修饰、三氮唑修饰、主链环化、酰胺键修饰、侧链环化和非天然氨基酸修饰;所述制备方法包括如下步骤:

S1、线性肽的合成:通过氨基酸、偶联剂、碱催化剂制备线性多肽;

S2、粗肽的制备和/或肽链修饰;

当所述活性肽的修饰方法为甲硫缩醛修饰时,其修饰合成步骤包括:

S-A-1、称取合成的粗肽;

S-A-2、加入二硫键还原剂、赋酸剂反应,在第2位和第8位和/或第3位和第16位与含有亚甲基的化合物形成亚甲基偶联($-CH_2-$)的多肽;

S-A-3、二硫键 $Cys^{II}-Cys^{IV}$ 的折叠;

其中,所述二硫键还原剂优选TCEP $\cdot HCl$;所述赋酸剂优选 Et_3N ;

当所述活性肽的修饰方法为三氮唑修饰时,其修饰合成步骤包括:

S-B-1、Fmoc-Pr $g-OH$ 或Fmoc-Aza- OH 替换Cys3或Cys16或Cys16和Cys3进行线性肽的合成,得到氨基酸侧链去保护的粗肽;

S-B-2、二硫键 $Cys^{II}-Cys^{IV}$ 的折叠;

S-B-3、通过铜催化的叠氮-炔基环加成反应获得三氮唑环偶联的多肽;

T-当所述活性肽的修饰方法为主链环化修饰时,其修饰合成步骤包括:

S-C-1、选择半胱氨酸左侧位阻最小的氨基酸为断点,在C末端引入一定长度的Linker,在树脂上完成线性肽的合成;

S-C-2、通过将上述粗肽,溶于缓冲液中;并加入 $NaNO_2$ 溶液在冷胼中反应形成首尾环化的多肽;

S-C-3、 Cys^I-Cys^{III} 、 $Cys^{II}-Cys^{IV}$ 的氧化折叠;

其中,所述断点优选Gly1-Cys2;

所述Linker选自:GAAG、GGAAG、GGAAGG、-GGAAGAG、GEGEGE和GDapGDapGDap中的一种或多种;所述缓冲液优选buffer(盐酸胍和磷酸二氢钠缓冲液,盐酸胍/磷酸二氢钠,0.2M磷酸盐缓冲液含6M $Gn \cdot HCl$);

当所述活性肽的修饰方法为酰胺键修饰时,其修饰合成步骤包括:

S-D-1、以Fmoc-A(Aloc)-OH或Fmoc-B(A11)-OH替换Cys3和/或Cys16(A:碱性氨基酸;B:酸性氨基酸)进行线性肽的合成,树脂上正交脱保护;

S-D-2、通过引入侧链为氨基和侧链为羧基的氨基酸,通过侧链形成酰胺键偶联合成二硫键修饰为酰胺键的多肽;

S-D-3、N末端脱保护,Cys^{II}-Cys^{IV}的氧化折叠;

其中,所述侧链为氨基的氨基酸选自:2,3-二氨基丙酸(Dap)、2,4-二氨基丁酸(Dab)和赖氨酸(K)中的一种或多种,所述侧链为羧基的氨基酸选自:天冬氨酸(D)和谷氨酸(E)中的一种或多种;

当所述活性肽的修饰方法为侧链环化修饰时,其修饰合成步骤包括:

S-E-1、在Mr1.1[S4Dap]的N及C末端额外引入Fmoc-A(A1loc)-OH或Fmoc-B(A11)-OH完成线性肽的合成;

S-E-2、树脂上正交脱保护、通过引入侧链为氨基和侧链为羧基的氨基酸,其侧链形成酰胺键偶联,合成侧链环化的多肽;

S-E-3、N末端脱保护,Cys^I-Cys^{III}、Cys^{II}-Cys^{IV}折叠;

其中,所述侧链为氨基的氨基酸选自2,3-二氨基丙酸(Dap)、2,4-二氨基丁酸(Dab)和赖氨酸(K)中的一种或多种;所述侧链为羧基的氨基酸选自:天冬氨酸(D)和谷氨酸(E)中的一种或多种;

当所述活性肽的修饰方法为非天然氨基酸修饰时,其修饰合成步骤包括:

S-F-1:以Fmoc-Pen(Trt)-OH取代Cys3或Cys16进行线性肽的合成;

S-F-2:第一对二硫键:以适量比例的水/乙腈溶解粗肽,通入空气室温反应实现含有 β , β -二甲基的半胱氨酸类似物与半胱氨酸的氧化折叠;

S-F-3:第二对二硫键:在S-F-2中产物中,滴加碘/乙腈溶液实现Cys^{II}-Cys^{IV}折叠;其中,所述含有 β , β -二甲基的半胱氨酸类似物优选青霉胺(Penicillamine, Pen);

S3.分离纯化:梯度洗脱得到终产物。

一种具有血浆稳定性的多肽及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术和生物医药领域,具体涉及一种具有血浆稳定性的活性多肽及其制备方法。

背景技术

[0002] 芋螺毒素是由海洋软体动物芋螺(Conus)分泌的一类用于自卫和捕食的活性肽类毒素。芋螺毒素分子质量小,通常由10-30个氨基酸残基组成,大多富含半胱氨酸,具有高度保守的二硫键骨架。芋螺毒素种类繁多,可达5万种以上,其一级结构多变,但信号肽及前导肽序列保守。根据保守的信号肽序列,芋螺毒素可分为:A、M、O、I、P、S、T等超家族(superfamily),再依据家族中毒素的半胱氨酸骨架,结合其药理活性,又可分为 α 、 μ 、 ω 、 δ 、 Ψ 、 σ 、 λ 、 κ 、 γ 等家族。芋螺毒素能特异性地作用于体内多种(钾、钠、钙等)离子通道、细胞膜上的各种神经递质和激素的受体,从而干扰细胞或神经中的信号传递。因此,在治疗慢性疼痛、急性疼痛、癫痫、神经保护、心血管疾病、精神失常、运动失调、痉挛症、癌症及中风等方面具有广泛的应用前景。

[0003] 在神经型nAChRs的各种亚型中, $\alpha 9\alpha 10$ 亚型在生物医药领域备受关注; $\alpha 9\alpha 10$ 烟碱型乙酰胆碱受体是由 $\alpha 9$ 和 $\alpha 10$ 两种亚基组成的跨膜五聚体,是一种配体门控离子通道,该受体最早被发现存在于耳蜗毛细胞中,介导橄榄耳蜗胆碱能纤维和传出神经之间的突触传递,后被证明在白细胞、背根神经节、垂体、皮肤角质细胞和精液中也有分布。研究表明,乙酰胆碱受体中的 $\alpha 9\alpha 10$ 亚型可能是治疗慢性疼痛,特别是神经性疼痛的潜在靶点(McIntosh, J.M.; Absalom, N.; Chebib, M.; Elgoyhen, A.B. Vincler, M., Alpha9 nicotinic acetylcholine receptors and the treatment of pain. Biochemical pharmacology 2009, 78(7), 693-702. Satkunanathan, N.; Livett, B.; Gayler, K. Sandall, D.; Down, J.; Khalil, Z., Alpha-conotoxin Vc1.1 alleviates neuropathic pain and accelerates functional recovery of injured neurones. Brain research 2005, 1059(2), 149-58.)。 $\alpha 9\alpha 10$ nAChR阻断剂具有治疗神经痛、预防神经受伤和加速受伤神经恢复的功能,可能是通过免疫机制发挥作用(Holtman, J.R.; Dwoskin, L.P.; Dowell, C.; Wala, E.P.; Zhang, Z.; Crooks, P.A.; McIntosh, J.M., The novel small molecule $\alpha 9\alpha 10$ nicotinic acetylcholine receptor antagonist 5ZZ-204G is an analgesic. European journal of pharmacology 2011, 670(2-3), 500-8. Zheng, G.; Zhang, Z.; Dowell, C.; Wala, E.; Dwoskin, L.P.; Holtman, J.R.; McIntosh, J.M.; Crooks, P.A., Discovery of non-peptide, small molecule antagonists of $\alpha 9\alpha 10$ nicotinic acetylcholine receptors as novel analgesics for the treatment of neuropathic and tonic inflammatory pain. Bioorganic & medicinal chemistry letters 2011, 21(8), 2476-9)。此外, $\alpha 9\alpha 10$ nAChR还与伤口愈合、耳部疾病、肺癌、乳腺癌以及皮肤病等诸多疾病密切相关。研究表明, $\alpha 9\alpha 10$ 乙酰胆碱受体(nAChR)的拮抗剂在动物疼痛模型中表现出了良好的镇痛效果,其中 α -芋螺毒素Vc1.1、Rg1A和GeXIVA是目前活性较好的鼠源 $\alpha 9\alpha 10$ nAChR抑制剂,三者在不同动物疼痛

模型中均表现出了卓越的镇痛作用,而之前发现的 α -芋螺毒素RgIA和Vc1.1,对大鼠 $\alpha 9\alpha 10$ nAChRs的阻断活性很强,尤其在啮齿动物 $\alpha 9\alpha 10$ nAChR上的活性远高于其在人 $\alpha 9\alpha 10$ nAChR上的活性,二者相比下降了300—400倍(Zhangsun D,Zhu X,Kaas Q et al.alpha0-Conotoxin GeXIVA disulfide bond isomers exhibit differential sensitivity for various nicotinic acetylcholine receptors but retain potency and selectivity for the human $\alpha 9\alpha 10$ subtype.Neuropharmacology 2017;127:243-252)。

[0004] 芋螺毒素Mr1.1最初发现作用 $\alpha 7$ nAChR (Peng,C.,Chen,W.,Sanders,T.,Chew,G.,Liu,J.,Hawrot,E.and Chi,C.(2010) Chemical synthesis and characterization of two $\alpha 4/7$ -conotoxins. Acta Biochim.Biophys.Sin. (Shanghai) 42:745-753), Mr1.1能够特异性作用于老鼠 $\alpha 7$ nAChR,并在体内显示镇痛活性。我们却发现Mr1.1及PeIA针对人 $\alpha 9\alpha 10$ nAChR的活性显著优于Vc1.1与RgIA(专利申请号:202110225081.5)。我们后续针对Mr1.1进行了突变体设计,发现在其序列4号位、9号位、10号位进行引入Dap突变,可以显著提高活性(专利申请号:202110225081.5)。

[0005] 前期通过非天然氨基酸修饰等手段对 α -Conotoxins Mr1.1进行结构修饰,其中其单类似物Mr1.1[S4Dap]对 $\alpha 9\alpha 10$ 乙酰胆碱受体展示出高活性与高选择性。基于多肽类药物物理化学性质不稳定、分子量大不易透过细胞膜、不能口服等特性,本申请进一步对Mr1.1[S4Dap]进行结构修饰,以求在保持活性的前提下极大地提高其稳定性。

发明内容

[0006] 本申请针对多肽类药物物理化学性质不稳定、分子量大不易透过细胞膜、不能口服等特性,通过对Mr1.1[S4Dap]进行不同的结构优化,得到了一种具有更好的血浆稳定性的多条,用药稳定性进一步提高,在此技术上完成了本发明。

[0007] 第一方面,本发明提供一种具有血浆稳定性的活性多肽,所述多肽是通过Mr1.1[S4Dap]的结构进行修饰获得,所述修饰包括但不限于亚甲硫缩醛修饰、三氮唑修饰、主链环化修饰、酰胺键修饰、侧链环化和非天然氨基酸修饰;其中:

[0008] Mr1.1[S4Dap]的序列为:GCCDapHPACSVNPNPIC*;

[0009] 所述甲硫缩醛修饰多肽是指在Mr1.1[S4Dap]肽的第2位和第8位和/或第3位和第16位通过与含有亚甲基的化合物,形成的亚甲基(-CH₂-)偶联多肽。

[0010] 在本发明的一些实施方式中,所述甲硫缩醛修饰多肽如SCS-1、SCS-2和SCS-3所示。

[0011] 所述三氮唑修饰多肽是指在Mr1.1[S4Dap]肽的第3位和第16位分别引入含有炔基的氨基酸和叠氮基团的氨基酸,通过其炔基和叠氮基形成三氮唑环偶联;所述含有炔基的氨基酸包括但不限于炔丙基甘氨酸(Prg),所述含有叠氮基团的氨基酸包括但不限于叠氮基-L-高丙氨酸(Aza);

[0012] 在本发明的一些实施方式中所述三氮唑修饰多肽如PrgAza和AzaPrg所示。

[0013] 所述主链环化修饰多肽是指在Mr1.1[S4Dap]肽的C末端引入一定长度的Linker通过酰胺键偶联合成主链环化的多肽;所述Linker由氨基酸组成,所述Linker选自GAAG、GGAAG、GGAAGG、GGAAGAG、GEGEGE和GDapGDapGDap中的一种或多种;

[0014] 在本发明的一些实施方式中所述主链环化修饰多肽如cMr1.1[S4Dap]-4、cMr1.1

[S4Dap]-5、cMr1.1[S4Dap]-6、cMr1.1[S4Dap]-7、cMr1.1[S4Dap]-6-a、或cMr1.1[S4Dap]-6-b所示。

[0015] 所述酰胺键修饰多肽是指在Mr1.1[S4Dap]肽的第3位和第16位分别引入侧链为氨基和侧链为羧基的氨基酸通过其侧链形成酰胺键偶联多肽；所述侧链为氨基的氨基酸选自2,3-二氨基丙酸(Dap)、2,4-二氨基丁酸(Dab)和赖氨酸(K)中的一种或多种,所述侧链为羧基的氨基酸选自:天冬氨酸(D)和谷氨酸(E)中的一种或多种。

[0016] 在本发明的一些实施方式中所述酰胺键修饰多肽如DapD、DabD、KD、EDap、EDab和EK所示。

[0017] 所述侧链环化修饰多肽是指在Mr1.1[S4Dap]肽的氨基端和羧基端分别引入侧链为氨基和侧链为羧基的氨基酸通过其侧链形成酰胺键偶联,合成其侧链环化多肽,所述侧链为氨基的氨基酸选自:2,3-二氨基丙酸(Dap)、2,4-二氨基丁酸(Dab)和赖氨酸(K)中的一种或多种;所述侧链为羧基的氨基酸选自天冬氨酸(D)和谷氨酸(E)中的一种或多种。

[0018] 在本发明的一些实施方式中所述侧链环化修饰多肽如cDapD、cDapE、cDabD、cDabE、cKD、cKE、cDDap、cDDab、cDK、cEDap、cEDab和cEK所示。

[0019] 所述非天然氨基酸修饰多肽是指Mr1.1[S4Dap]肽的第3位和/或第16位的氨基酸替换为侧链含有 β,β -二甲基的半胱氨酸类似物;所述含有 β,β -二甲基的半胱氨酸类似物优选青霉胺(Penicillamine, Pen)。

[0020] 在本发明的一些实施方式中所述非天然氨基酸修饰多肽如Mr1.1[C3Pen, S4Dap]和Mr1.1[S4Dap, C16Pen]所示。

[0021] 进一步的,所述非天然氨基酸修饰多肽优选cMr1.1[S4Dap]-6、cMr1.1[S4Dap]-7、cMr1.1[S4Dap]-6-b、cDDap、cDDab和Mr1.1[S4Dap, C16Pen]。

[0022] 进一步的,所述非天然氨基酸修饰多肽优选Mr1.1[S4Dap, C16Pen]。

[0023] 第二方面,本发明提供一种多聚体,由两个或多个多肽单体聚合而成,其中至少一个多肽单体为第一方面所述的多肽;所述多聚体的各多肽单体之间通过共价连接。

[0024] 进一步的,所述多聚体为同源二聚体或异源二聚体;

[0025] 进一步的,所述多聚体,其中组成多聚体的各多肽单体之间通过柔性linker或PEG连接臂连接。

[0026] 第三方面,本发明提供一种融合蛋白或缀合物,所述融合蛋白或缀合物含有第一方面所述的具有血浆稳定性的活性多肽。

[0027] 第四方面,本发明提供一种核酸分子,其编码前述任一项所述的活性多肽、或前述融合蛋白或缀合物。

[0028] 第五方面,本发明提供一种构建体,其包含前述的核酸分子。

[0029] 第六方面,本发明提供一种宿主细胞,其包含前述的核酸分子和/或前述的构建体,或者所述宿主细胞被前述的核酸分子和/或前述的构建体转化或转染。

[0030] 第七方面,本发明提供一种药物组合物,所述药物组合物包含前述任一项所述的活性多肽、前述多聚体、前述融合蛋白或缀合物、前述核酸分子、前述构建体、前述宿主细胞,以及可选的药学上可接受的辅料。

[0031] 第八方面,本发明提供前述任一项所述的活性多肽、前述多聚体、前述融合蛋白或缀合物、前述核酸分子、前述构建体、前述宿主细胞、前述药物组合物在 $\alpha 9\alpha 10$ nAChR抑制剂

中的用途,其中所述 $\alpha 9\alpha 10nAChR$ 包括人 $\alpha 9\alpha 10nAChR$ 、鼠 $\alpha 9\alpha 10nAChR$ 。

[0032] 第九方面,本发明提供前述任一项所述的活性多肽、前述多聚体、前述融合蛋白或缀合物、前述核酸分子、前述构建体、前述宿主细胞、前述药物组合物在制备治疗镇痛、抗肿瘤、和/或治疗神经系统疾病中的应用。

[0033] 进一步,本发明所述的应用,其中所述活性多肽、多聚体、核酸分子、构建体、宿主细胞、和/或药物组合物,可与任选的镇痛、抗肿瘤、和/或治疗神经系统疾病的活性成分联用或联合制药。

[0034] 进一步,本发明所述的应用,其中所述疾病包括神经痛、成瘾、帕金森症、癫痫症、局部缺血、兴奋性神经元细胞死亡、痴呆、乳腺癌、肺癌、骨癌、脑脊髓炎、癌症与癌症化疗、酒精中毒、坐骨神经痛、糖尿病、三叉神经痛、硬化症、带状疱疹、机械伤和手术伤、艾滋病、头部神经瘫痪、药物中毒、工业污染中毒、淋巴神经痛、骨髓瘤、多点运动神经痛、慢性先天性感觉神经病、急性剧烈自发性神经痛、挤压神经痛、脉管炎、血管炎、局部缺血、尿毒症、儿童胆汁肝脏疾病、慢性呼吸障碍、复合神经痛、多器官衰竭、脓毒病/脓血症、肝炎、卟啉症、维生素缺乏、慢性肝脏病、原生胆汁硬化、高血脂症、麻疯病、莱姆关节炎、感觉神经束膜炎或过敏症。

[0035] 第十方面,本方提供第一方面所述的活性多肽的制备方法,其特征在于,所述活性多肽在线性肽合成的基础上,对线性肽的结构进行修饰获得;所述修饰方法包括但不限于亚甲硫缩醛修饰、三氮唑修饰、主链环化、酰胺键修饰、侧链环化和非天然氨基酸修饰;所述制备方法包括如下步骤:

[0036] S1、线性肽的合成:通过氨基酸、偶联剂、碱催化剂制备线性多肽;

[0037] S2、粗肽的制备和/或肽链修饰;

[0038] 当所述活性肽的修饰方法为甲硫缩醛修饰时,其修饰合成步骤包括:

[0039] S-A-1、称取合成的粗肽;

[0040] S-A-2、加入二硫键还原剂、赋酸剂反应,在第2位和第8位和/或第3位和第16位与含有亚甲基的化合物形成亚甲基偶联($-CH_2-$)的多肽;

[0041] S-A-3、二硫键 $Cys^{II}-Cys^{IV}$ 的折叠;

[0042] 其中,所述二硫键还原剂优选TCEP $\cdot HCl$;所述赋酸剂优选 Et_3N ;

[0043] 当所述活性肽的修饰方法为三氮唑修饰时,其修饰合成步骤包括:

[0044] S-B-1、Fmoc-Prg-OH或Fmoc-Aza-OH替换Cys3或Cys16或Cys16和Cys3进行线性肽的合成,得到氨基酸侧链去保护的粗肽;

[0045] S-B-2、二硫键 $Cys^{II}-Cys^{IV}$ 的折叠;

[0046] S-B-3、通过铜催化的叠氮-炔基环加成反应获得三氮唑环偶联的多肽;

[0047] 当所述活性肽的修饰方法为主链环化修饰时,其修饰合成步骤包括:

[0048] S-C-1、选择半胱氨酸左侧位阻最小的氨基酸为断点,在C末端引入一定长度的Linker,在树脂上完成线性肽的合成;

[0049] S-C-2、通过将上述粗肽,溶于缓冲液中;并加入 $NaNO_2$ 溶液在冷胼中反应形成首尾环化的多肽;

[0050] S-C-3、 Cys^I-Cys^{III} 、 $Cys^{II}-Cys^{IV}$ 的氧化折叠;

[0051] 其中,所述断点优选Gly1-Cys2;

[0052] 所述Linker选自:GAAG、GGAAG、GGAAGG、GGAAGAG、GEGEGE和GDapGDapGDap中的一种或多种;所述缓冲液优选buffer(盐酸胍/磷酸二氢钠,0.2M磷酸盐缓冲液含6M $\text{Gn} \cdot \text{HCl}$);

[0053] 当所述活性肽的修饰方法为酰胺键修饰时,其修饰合成步骤包括:

[0054] S-D-1、以Fmoc-A(Aloc)-OH或Fmoc-B(A11)-OH替换Cys3和/或Cys16(A:碱性氨基酸;B:酸性氨基酸)进行线性肽的合成,树脂上正交脱保护;

[0055] S-D-2、通过引入侧链为氨基和侧链为羧基的氨基酸,通过侧链形成酰胺键偶联合成二硫键修饰为酰胺键的多肽;

[0056] S-D-3、N末端脱保护,Cys^{II}-Cys^{IV}的氧化折叠;

[0057] 其中,所述侧链为氨基的氨基酸选自2,3-二氨基丙酸(Dap)、2,4-二氨基丁酸(Dab)和赖氨酸(K)中的一种或多种,所述侧链为羧基的氨基酸选自:天冬氨酸(D)和谷氨酸(E)中的一种或多种。

[0058] 当所述活性肽的修饰方法为侧链环化修饰时,其修饰合成步骤包括:

[0059] S-E-1、在Mr1.1[S4Dap]的N及C末端额外引入Fmoc-A(Alloc)-OH或Fmoc-B(A11)-OH完成线性肽的合成;

[0060] S-E-2、树脂上正交脱保护、通过引入侧链为氨基和侧链为羧基的氨基酸,其侧链形成酰胺键偶联,合成侧链环化的多肽;

[0061] S-E-3、N末端脱保护,Cys^I-Cys^{III}、Cys^{II}-Cys^{IV}折叠;

[0062] 其中,所述侧链为氨基的氨基酸选自:2,3-二氨基丙酸(Dap)、2,4-二氨基丁酸(Dab)和赖氨酸(K)中的一种或多种;所述侧链为羧基的氨基酸选自天冬氨酸(D)和谷氨酸(E)中的一种或多种。

[0063] 当所述活性肽的修饰方法为非天然氨基酸修饰时,其修饰合成步骤包括:

[0064] S-F-1:以Fmoc-Pen(Trt)-OH取代Cys3或Cys16进行线性肽的合成;

[0065] S-F-2:第一对二硫键:以适量比例的水/乙腈溶解粗肽,通入空气室温反应实现含有 β,β -二甲基的半胱氨酸类似物与半胱氨酸的氧化折叠;

[0066] S-F-3:第二对二硫键:在S-F-2中产物中,滴加碘/乙腈溶液实现Cys^{II}-Cys^{IV}折叠;其中,所述含有 β,β -二甲基的半胱氨酸类似物优选青霉胺(Penicillamine, Pen);

[0067] S3.分离纯化:梯度洗脱得到终产物。

[0068] 有益效果:

[0069] 本申请通过对Mr1.1[S4Dap]进行结构优化,其被修饰后的活性肽能够在保持原有活性的基础上,显著提升血浆稳定性,进一步提高了其用药稳定性。

附图说明

[0070] 图1Mr1.1[S4Dap]结构优化策略示意图。

[0071] 图2Mr1.1[S4Dap]及其突变体(10nM)对由 $\alpha 9 \alpha 10$ nAChR介导的ACh诱发的峰值电流幅度变化的抑制条形图。

[0072] 图3Mr1.1[S4Da]及其活性维持或提升突变体的血浆稳定性。

[0073] 图4在Mr1.1[S4Dap](10pM-3 μ M)和Mr1.1[S4Dap,C16Pen](10pM-3 μ M)的作用下,获得的对由 $\alpha 9 \alpha 10$ nAChR介导的ACh诱发的峰值电流振幅的浓度-效应曲线。

[0074] 图5Mr1.1[S4Dap]和Mr1.1[S4Dap,C16Pen]在给定剂量下,单次给药后的测试结

果。 $\text{mean} \pm \text{SEM} (n=8)$ 。

具体实施方式

[0075] 下面对本发明的具体实施方式作进一步说明。在此需要说明的是,对于这些实施方式的说明用于帮助理解本发明,但并不构成对本发明的限定。此外,下面所描述实施方式中所涉及的技术特征只要彼此之间未构成冲突就可以相互组合。

[0076] 下述实施例中的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法,下述实施例中所用的试验材料,如无特殊说明,均为可通过常规的商业途径购买得到。

[0077] 本文所述“分离的”多肽或其片段、变体或衍生物意图为不在其天然周围环境中的多肽。不要求特定的纯化水平。例如,分离的多肽可以是从其原生或天然环境中移出的。出于本发明的目的在宿主细胞中表达的重组产生的多肽和蛋白质被认为是分离的,通过任何适合的技术分离、分级或者部分或实质性纯化的天然或重组多肽也被认为是分离的。

[0078] 本发明的多肽还包括前述多肽的片段、衍生物、类似物或变体以及其任何组合。在提及本发明的多肽时,术语“片段”、“变体”、“衍生物”以及“类似物”包括保持相应多肽的至少一些生物活性和/或功能。

[0079] 本发明的多肽可以是分离的、化学合成的,或重组的。相应地,本发明多肽可用常规分离提取方法、或可用常规方法人工合成,也可用重组方法生产。优选地,本发明的活性多肽可通过固相Fmoc化学合成。例如,本发明通过Fmoc固相多肽合成技术,根据修饰策略不同选择不同的树脂,以哌啶作为Fmoc保护基脱除试剂,HCTU和DIPEA作为偶联条件。

[0080] 实施例

[0081] 在前期研究基础上,运用不同的结构修饰策略对Mr1.1[S4Dap]进行修饰,并测试其活性和血浆稳定性,选择活性及稳定性最好的化合物进行体内活性的测试。

[0082] 实施例1Mr1.1[S4Dap]系列突变体合成

[0083] 除首尾环化外,基于酰胺化的Mr1.1[S4Dap]及其类似物的C末端,均在RAM树脂(取代度0.615mmol/g)上进行氨基酸之间的偶联。

[0084] (1) 根据树脂的载样量及多肽合成量进行树脂称量;

[0085] (2) 以二氯甲烷/N,N-二甲基甲酰胺(1:1)对树脂进行溶胀,使反应位点充分暴露,用20%的哌啶脱除树脂上的Fmoc保护基;

[0086] (3) C末端氨基酸与树脂之间的共价偶联,通过氨基酸(4eq)、偶联剂HCTU(4eq)、碱催化剂DIPEA(8eq)一锅法室温反应一小时来完成;

[0087] (4) 重复脱保护、氨基酸偶联过程直至线性肽合成完毕。每次操作完成后,用DMF、DCM各冲洗两遍以进行阶段性的粗纯化。

[0088] 1.1粗肽的制备

[0089] 20%哌啶溶液脱除N端Fmoc保护基,以三氟乙酸(TFA)/三异丙基硅烷(TIPS)/H₂O(90/5/5)室温反应3小时将多肽链从固相载体上切割下来,加入3倍于切割液的DCM溶液通过旋蒸去除绝大部分的切割液,进而加入适量冰乙醚使多肽析出并经离心得到粗肽,最后用LC-MC确证分子量。

[0090] 对于Cys侧链巯基保护基的选择:含一对二硫键则用一般采用Acm做保护基;含两对二硫键一般,Cys2、Cys8以Trt为保护基,Cys3、Cys16以Acm为保护基;具体合成所选保护

基如合成路线所示。

[0091] 1.2定性氧化折叠

[0092] 基于Mr1.1[S4Dap]及其非天然氨基酸及环化类似物的I型半胱氨酸骨架结构,其二级结构的形成采用分步定向氧化折叠策略。第一对二硫键:即Cys^I-Cys^{III},因Trt酸敏感性,故在切割过程中会使得Cys的巯基裸露出来,采用空气氧化将其连接。具体操作:以适量比例的水/乙腈溶解粗肽,将溶液的pH调成碱性,通入空气室温反应48h实现连接。第二对二硫键:即Cys^{II}-Cys^{IV},将一步氧化后的产物置于茄型瓶中,滴加碘/乙腈溶液(5mg/ml)直至颜色为棕黄色,而后置于恒温摇床中反应,LC-MS实时监测反应程度直至完全反应。

[0093] 1.3分离纯化

[0094] 粗肽分离纯化的操作步骤:首先:取粗肽溶液(氧化折叠后的溶液)10ml,用0.22μm的有机系微孔滤膜对其进行滤过处理;其次,选择合适的方法(A90-85%5min,85-75%10min,75-5520min,流速6mL/min,检测波长为214及254nm)用半制备高效液相将粗肽以梯度洗脱的方式进行分离纯化,其中洗脱剂为bufferA(100%H₂O,0.05%TFA)、buffer B(100%MeCN,0.05%TFA);第三,以LC-MS确证分子量以对目标产物进行收集;最后,对目标产物进行纯度分析(洗脱剂同纯化部分,A90-50%50min,流速为1mL/min,检测波长为220nm),纯度达标即主产物含量≥95%则冻干收集并置于-20℃冰箱中冷冻保存。

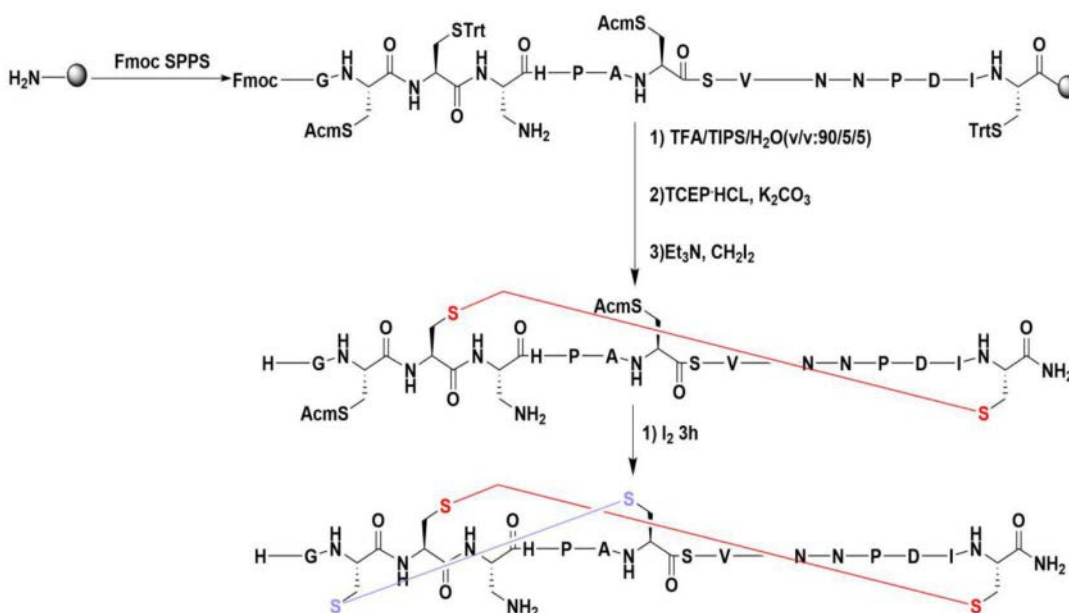
[0095] 实施例2Mr1.1[S4Dap]的修饰

[0096] Mr1.1[S4Dap]结构优化策略示意图见图1。

[0097] 2.1亚甲硫缩醛修饰

[0098] Mr1.1[S4Dap]-SCS的合成:称取粗肽60.0mg,溶于5.3mL去离子水中配成6.4mM溶液,将TCEP·HCl(19.6mg,68μmol,2eq)和K₂CO₃(18.8mg,136μmol,4eq)溶于10.8mL去离子水中共配成19.0mM溶液,室温反应两小后加入溶于四氢呋喃(THF)(900μL)的Et₃N(47.6μL,340μmol,10eq)溶液进行搅拌反应,而后逐滴加入THF(890μL)溶解的CH₂I₂(16.5μL,204μmol,6eq)室温避光反应6h形成-Cys-CH₂-Cys-,最后减压浓缩除去THF。二硫键Cys^{II}-Cys^{IV}的折叠及分离纯化操作同上。

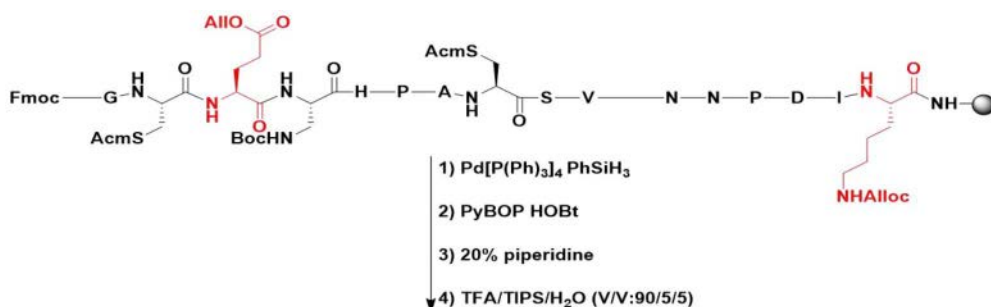
[0099]



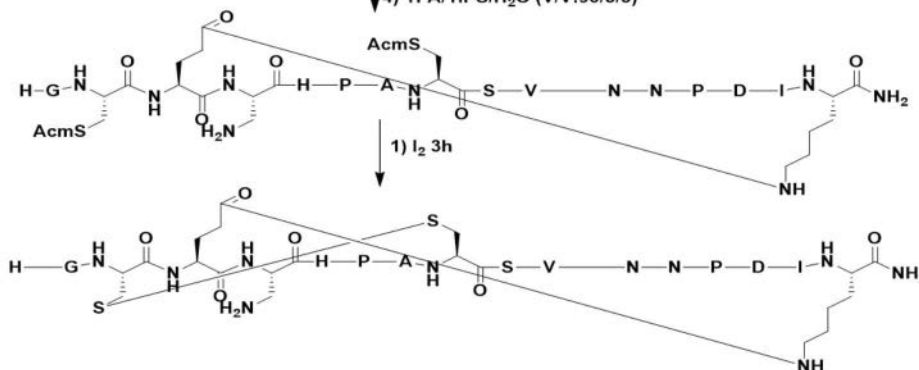
[0100] 合成路线1亚甲硫缩醛修饰路线

[0101] 2.2酰胺键修饰

[0102] 线性肽的合成:以Fmoc-A(Aloc)-OH或Fmoc-B(A11)-OH替换Cys3、Cys16(A:碱性氨基酸;B:酸性氨基酸)进行线性肽的合成;树脂上正交脱保护:线性肽合成完毕后不进行N末端氨基的脱保护以保证酰胺键形成于酸/碱性氨基酸上的侧链;以合成量0.1mM为例,加入溶解于4ml DCM的Pd(PPh₃)₄(24mg)和PhSiH₃(240μL)恒温摇床反应3h进行3位、16位氨基酸侧链的脱保护操作,使得酸性氨基酸侧链的羧基及碱性氨基酸侧链的氨基充分裸露;以PyBOP(208mg,4mmol,4eq)、HOBt(54mg,4mmol,4eq)为偶联试剂、DIPEA(85μL,4.8mmol,4.8eq)为碱催化剂实现氨基酸侧链的偶联。N末端脱保护及后续操作同上。



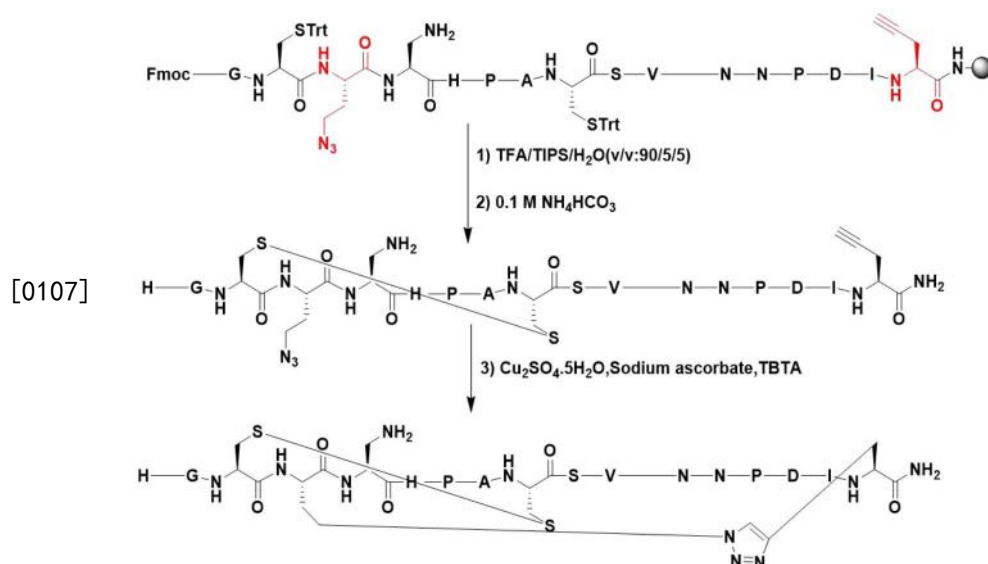
[0103]



[0104] 合成路线2酰胺键修饰路线

[0105] 2.3三氮唑修饰

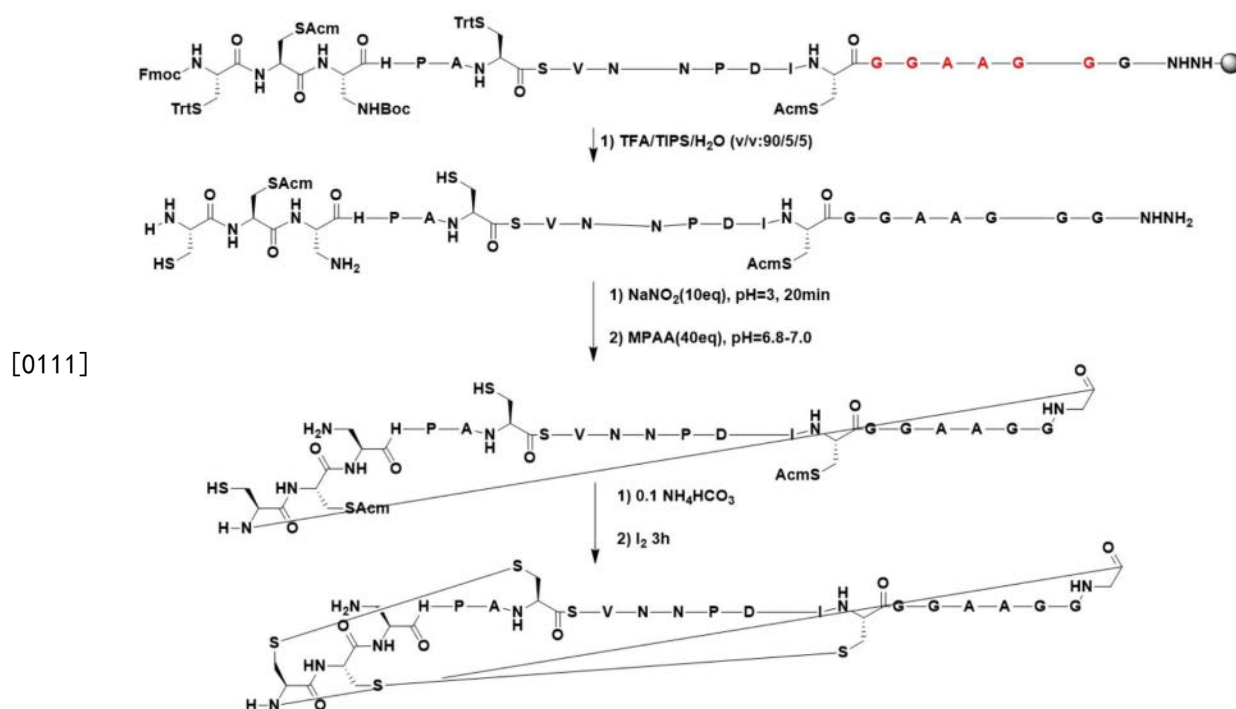
[0106] 线性肽的合成:Fmoc-Prg-OH或Fmoc-Aza-OH替换Cys3、Cys16或反之进行线性肽的合成,经系列上述操作得到氨基酸侧链去保护的粗肽;1,4-Disubstituted 1,2,3-triazoles肽类似物的合成:经铜催化的叠氮-炔基环加成反应实现且反应过程均在氮气保护下完成,首先将20mg多肽在纯水中充分溶解,加入CuSO₄·S₂O(4eq)及TBTA(4eq)的预混合溶液,接着以注入的方式将抗坏血酸钠加入并在37℃下反应8h,LC-MS监测反应进行的程度。Cys^{II}-Cys^{IV}的氧化折叠及分离纯化操作同上。



[0108] 合成路线3三氮唑修饰路线

[0109] 2.4主链环化

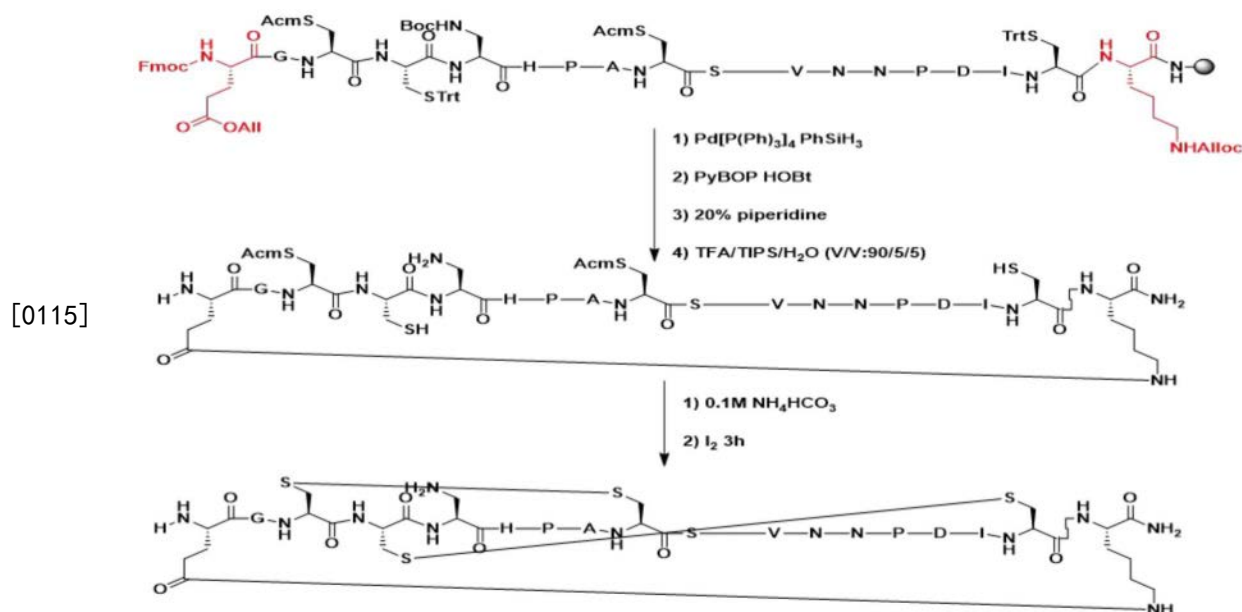
[0110] 线性肽的合成:首先基于Mr1.1[S4Dap]的序列(GCCDapHPACSVNNPDIC)及NCL反应特点,选择Gly1-Cys2为断点;第二根据目标产物在C末端引入一定长度的Linker,氨基酸组成为Gly、Ala;最后,在2-Cl-(Trt)-NHNH₂树脂上完成线性肽的合成;首尾环化:称量粗肽25mg溶于pH=3的buffer中,将其转移至双颈瓶并通入氮气以保护后续反应,注入溶解于pH=7buffer的NaNO₂溶液并于-15℃的冷阱中反应20min,反应完成后快速加入溶于pH=7buffer的MPAA溶液并以HCL/NaOH调节pH=7,室温反应8h;Cys^I-Cys^{III}:经LC-MS及分析液相确证,在首尾环化过程中已经实现二硫键的连接。Cys^{II}-Cys^{IV}的氧化折叠及分离纯化操作同上。



[0112] 合成路线4主链环化修饰路线

[0113] 2.5侧链环化

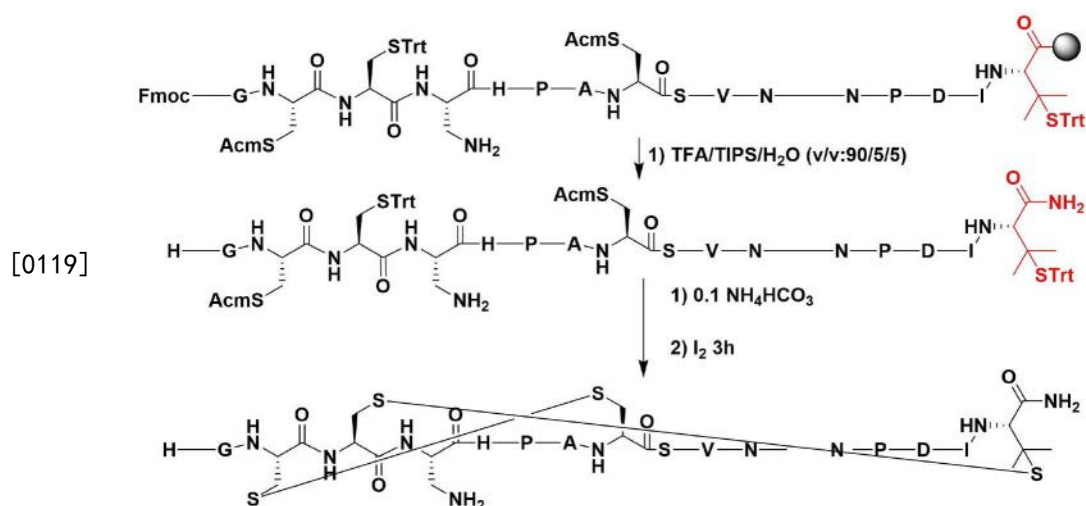
[0114] 线性肽的合成:在Mr1.1的N及C末端额外引入Fmoc-A(Alloc)-OH或Fmoc-B(Alloc)-OH完成线性肽的合成。后续树脂上正交脱保护、侧链环化操作同酰胺键修饰;Cys^I-Cys^{III}、Cys^{II}-Cys^{IV}的氧化折叠及分离纯化操作同上。



[0116] 合成路线5侧链环化修饰路线

[0117] 2.6非天然氨基酸修饰

[0118] Mr1.1[C3Pen,S4Dap]及Mr1.1[S4Dap,C16Pen]的合成:以Fmoc-Pen(Trt)-OH取代Cys3或Cys16进行线性肽的合成。第一对二硫键:因Trt酸敏感性,故在切割过程中会使得Cys的巯基裸漏出来,采用空气氧化将其连接。具体操作:以水/乙腈(体积比为1:2)溶解粗肽,将溶液的pH调成碱性,通入空气室温反应48h实现连接。第二对二硫键:将一步氧化后的产物置于茄型瓶中,滴加碘/乙腈溶液(5mg/ml)直至颜色为棕黄色,而后置于恒温摇床中反应,LC-MS实时监测反应程度直至完全反应。



[0120] 合成路线6非天然氨基酸修饰路线

[0121] 多肽合成结果如表1所示:

[0122] 表1合成多肽示例

Peptide		Sequence		Peptide		Sequence	
Mr1.1[S4Dap]		GCCDapHPACSVNNPDIC*				主链环化	
		亚甲硫缩醛修饰		cMr1.1[S4Dap]-4		c[GCCDapHPACSVNNPDIC-GAAG]	
SCS-1		GCCDapHPACSVNNPDIC*		cMr1.1[S4Dap]-5		c[GCCDapHPACSVNNPDIC-GGAAG]	
SCS-2		GCCDapHPACSVNNPDIC*		cMr1.1[S4Dap]-6		c[GCCDapHPACSVNNPDIC-GGAAGG]	
SCS-3		GCCDapHPACSVNNPDIC*		cMr1.1[S4Dap]-7		c[GCCDapHPACSVNNPDIC-GGAAGAG]	
		三氮唑修饰		cMr1.1[S4Dap]-6-a		c[GCCDapHPACSVNNPDIC-GEGEGE]	
PrgAza		GCPrgDapHPACSVNNPDIAza*		cMr1.1[S4Dap]-6-b		c[GCCDapHPACSVNNPDIC-GDapGDapGDap]	
AzaPrg		GCAzaDapHPACSVNNPDIPrg*				侧链环化	
		酰胺键修饰		cDapD		c[DapGCCDapHPACSVNNPDICD]*	
[0123]	DapD		GCDapDapHPACSVNNPDID*	cDapE		c[DapGCCDapHPACSVNNPDICE]*	
	DabD		GCDabDapHPACSVNNPDID*	cDabD		c[DabGCCDapHPACSVNNPDICD]*	
	KD		GCKDapHPACSVNNPDID*	cDabE		c[DabGCCDapHPACSVNNPDICE]*	
	EDap		GCEDapHPACSVNNPDIDap*	cKD		c[KGCCDapHPACSVNNPDICD]*	
	EDab		GCEDapHPACSVNNPDIDab*	cKE		c[KGCCDapHPACSVNNPDICE]*	
	EK		GCEDapHPACSVNNPDIK*	cDDap		c[DGCCDapHPACSVNNPDICDap]*	
			非天然氨基酸修饰	cDDab		c[DGCCDapHPACSVNNPDICDab]*	
	Mr1.1[C3Pen,S4Dap]		GCPenDapHPACSVNNPDIC*	cDK		c[DGCCDapHPACSVNNPDICK]*	
	Mr1.1[S4Dap,C16Pen]		GCCDapHPACSVNNPDIPen*	cEDap		c[EGCCDapHPACSVNNPDICDap]*	
				cEDab		c[EGCCDapHPACSVNNPDICDab]*	
				cEK		c[EGCCDapHPACSVNNPDICK]*	

[0124] 实施例3电生理活性测试

[0125] 使用体外转录试剂盒制备人 $\alpha 9\alpha 10$ 乙酰胆碱受体的cRNA,其浓度用UV260m下的OD值进行测算。解剖收集非洲爪蟾卵母细胞,在第一天和第二天将两个亚基的cRNA注射入蛙卵中,注射量均为5ng,在ND-96中培养。注射后1-4天将表达了 $\alpha 9\alpha 10$ 乙酰胆碱受体的卵母细胞用于电生理学活性测试。

[0126] 具体测试方法为:将1个注射过cRNA的爪蟾卵母细胞置于直径为4mm深度为2mm的30uL Sylgard记录槽中,重力灌注含有0.1mg/ml牛血清白蛋白(BSA)的ND96灌注液(96.0mM NaCl,2.0mM KCl,1.8mM CaCl₂1.0mM MgCl₂,5mM HEPES,pH 7.1-7.5)。所有的芋螺毒素溶液也含有0.1mg/mLBSA以减少非特异性吸附,用转换阀可以在灌注毒素或乙酰胆碱之间进行自由切换,ACh门控的电流由双电极电压钳放大器设置在“慢”档,以及clamp gain在最大值($\times 2000$)位置时进行在线记录。用外径1mm内径0.75mm的玻璃毛细管拉制玻璃电极,并充满

3M KC1作为电压和电流电极。膜电压钳制在-70mV,整个系统均由电脑控制和记录数据。ACh脉冲为每隔5min自动灌注1s的ACh,ACh的浓度为6 μ M。每条多肽至少记录6个卵母细胞的电流反应情况,测试的电流数据用GraphPad Prism软件进行统计分析。

[0127] 结果如图2所示:二硫键在多肽与受体相互作用方面起着重要作用;其中linker为cMr1.1[S4Dap]-6、cMr1.1[S4Dap]-7、cMr1.1[S4Dap]-6-b展现出与原肽相当的活性或者略有提升,可见能够维持多肽原有的三维结构。

[0128] 当N端引入酸性氨基酸残基时,整体上活性优于N端为碱性氨基酸残基且部分化合物的活性较原来有所提高,其中cDDap、cDDab对受体的抑制率可达90%,优于原肽。

[0129] 二硫键修饰多肽与天然二硫键相比仅在方向与长度上略有不同,但该微小的结构修饰已经引起了多肽三维结构的巨大变化。

[0130] 非天然氨基酸修饰中Mr1.1[S4Dap,C16Pen]展现出与原肽相当的活性。

[0131] 实施例4血浆稳定性分析

[0132] 经过活性测试,筛选出能够维持多肽原有活性或活性得以提升的多肽,我们进行了血浆稳定性实验。

[0133] 样品的制备:以去离子水溶解多肽样品,按1:9的比例加入人血清使其终浓度为1mg/mL;取样及样品处理:按一定的时间间隔($t=0\text{min}, 30\text{min}, 1\text{h}, 2\text{h}, 4\text{h}, 8\text{h}, 12\text{h}, 24\text{h}$)平行取样三次,每次取样80 μ L,然后以等量20%的TFA溶液使血清蛋白变性以阻断其对多肽的降解,最后离心处理样品以沉淀血清蛋白(15000rpm,5min);样品分析:用分析液相(Phenomenex C18分析柱)对样品进行分析(洗脱剂同纯化部分,A90-50%50min,流速为1mL/min,检测波长为220nm),以0min样品的分析结果为对照来计算各取样点多肽的降解情况。

[0134] 结果如图3所示:与原肽相比,几乎所有肽的血浆稳定性均得以提升,其中Mr1.1[S4Dap,C16Pen]在24h时仍有90%的保留率,血浆稳定性大幅度提升,可见Pen侧链上的双甲基能够抑制血浆蛋白酶的降解。

[0135] 实施例5浓度-效应曲线

[0136] 经过活性及稳定性测试,选定Mr1.1[S4Dap,C16Pen]进行后续的浓度-效应曲线研究,方法同电生理部分。

[0137] 如图4所示浓度-效应曲线,其中第16位的Cys修饰为Pen后能够维持活性,根据其效应曲线,通过GraphPad Prism软件计算得到Mr1.1[S4Dap,C16Pen]的 IC_{50} 为4.0nM。

[0138] 实施例4动物体内镇痛活性的表征分析

[0139] 镇痛活性的测试采用的是奥沙利铂诱导的大鼠冷痛模型。于济南朋悦动物繁育中心购置~150g的大鼠,分为四组进行适应性训练,训练一周待大鼠适应环境后,对其中两组进行造模,造模过程如下:第一周:将大鼠随机分为两组,数量比为(实验组:对照组=1:5)。其中实验组在本周的前两天腹腔注射奥沙利铂,对照组注射等量的5%的葡萄糖溶液。3-7天:以丙酮实验为评判标准,对两组实验动物进行测试,将实验组中对冷痛行为不敏感的大鼠剔除。第二周:重复第一周的给药操作,在第三天将先前的实验组大鼠随机分5组(Mr1.1[S4Dap,C16Pen]高剂量、中剂量、低剂量组;Mr1.1[S4Dap]组,生理盐组),并开始进行测试。

[0140] 丙酮实验:将大鼠放置在高架钢丝网上并使其提前适应环境30min,之后在不同的测试时间点将60微升的丙酮通过微量注射器喷射到大鼠后爪中心,在60s内观察大鼠行为

并进行打分实验评分标准:0,无反应;0.5,看向爪子;1,退缩或抬爪子;1.5,抓挠或爪子弯曲;2,爪子快速退缩;3,长时间抓挠;4,爪子弹开;5,长时间舔受刺激的爪子。

[0141] 冷板实验:将大鼠放置在15℃的冷板上,在三分钟内观察老鼠的行为,记录出现冷痛行为的时间。获得的数据用GraphPad Prism软件进行统计分析。

[0142] 建立了奥沙利铂诱导的冷痛模型,并测试了Mr1.1[S4Dap]和Mr1.1[S4Dap,C16Pen]的体内镇痛效果。

[0143] 测试了以500μg/kg尾静脉给药剂量的Mr1.1[S4Dap]和Mr1.1[S4Dap,C16Pen]在大鼠上的镇痛活性,通过冷板实验和丙酮实验对单次给药后72h内的镇痛效果进行了测试。

[0144] 表2动物分组级给药实验设计

[0145]

组别	动物数量	给药剂量
Mr1.1[S4Dap]	8	500μg/kg
Mr1.1[S4Dap,S16Pen]	8	500μg/kg
Mr1.1[S4Dap,S16Pen]	8	200μg/kg
Mr1.1[S4Dap,S16Pen]	8	50μg/kg

[0146] 丙酮实验结果:在基线时各组大鼠的冷痛阈值没有统计学差异,随着化疗药物奥沙利铂的应用,从第三天开始,模型组大鼠冷痛阈值明显降低并能够稳定持续一周。Mr1.1[S4Dap,C16Pen]能够在奥沙利铂诱导的神经痛模型中显示出明显的镇痛活性,且具有显著的剂量依赖性。高剂量组(500μg/kg)在给药24小时以后,仍能大幅度降低大鼠对冷刺激的反应;在给药后48小时后药效逐渐降低。而相同剂量的Mr1.1[S4Dap]在1h时能够与改造后化合物产生相当的镇痛效果,但其镇痛时间能够维持24小时,在48小时的测试中已经完全失去活性。

[0147] 冷板实验与丙酮实验的结果一致,Mr1.1[S4Dap,C16Pen](500μg/kg)能够在48h内显著抑制奥沙利铂诱导的冷痛。

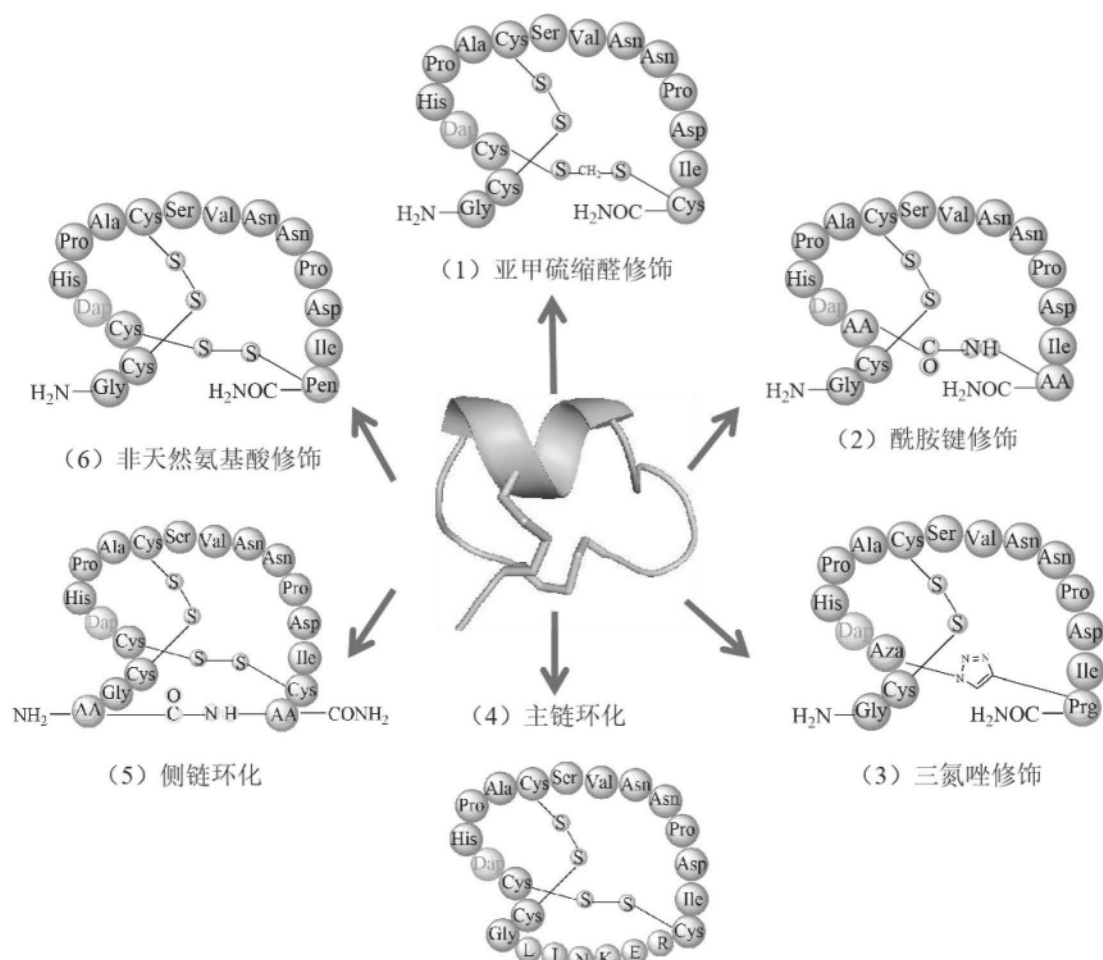


图1

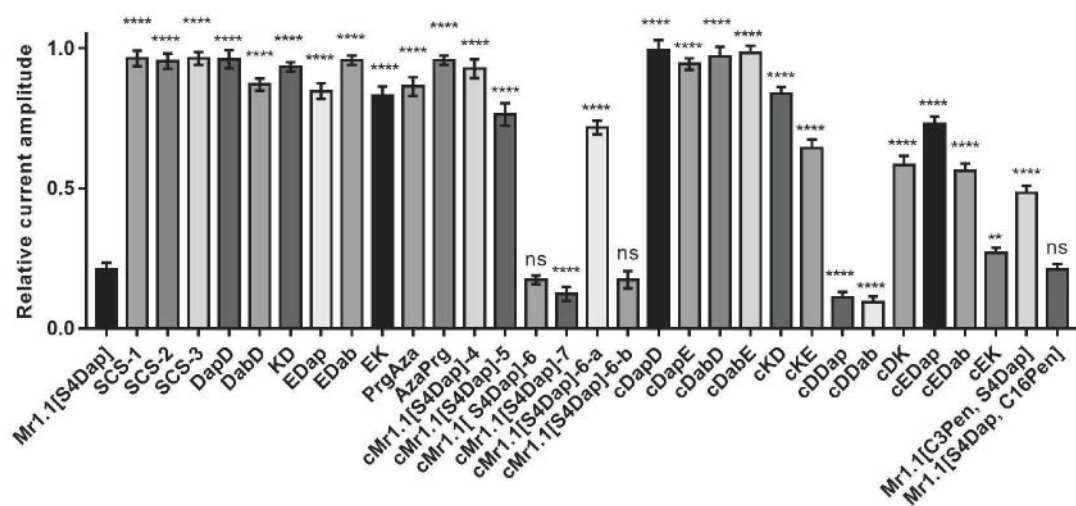


图2

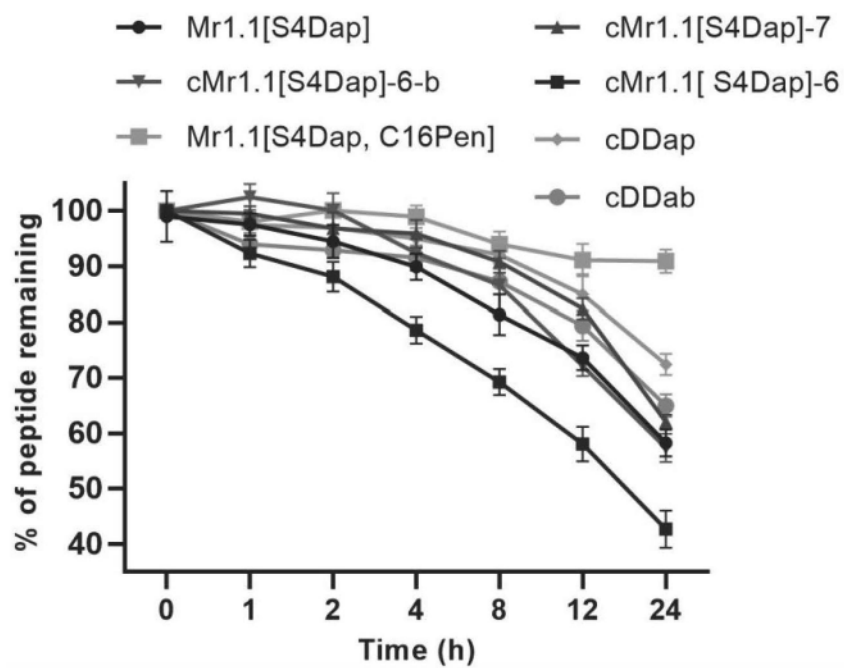


图3

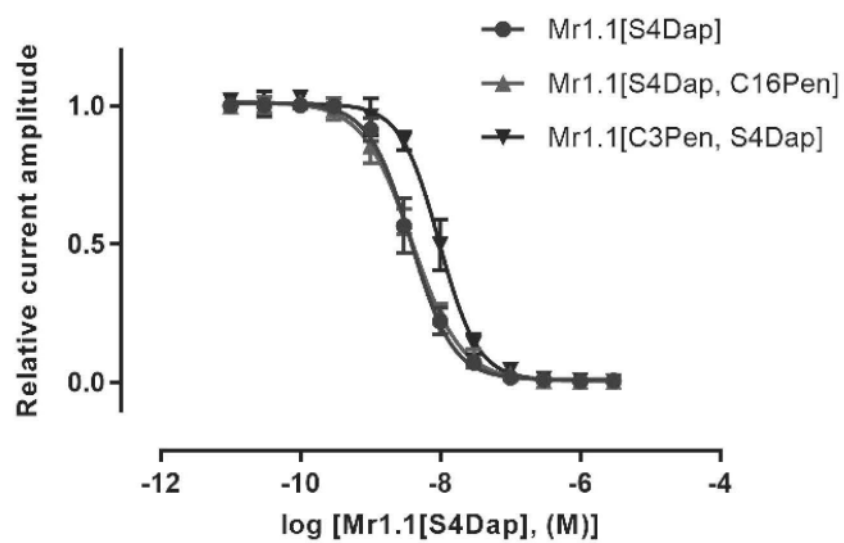


图4

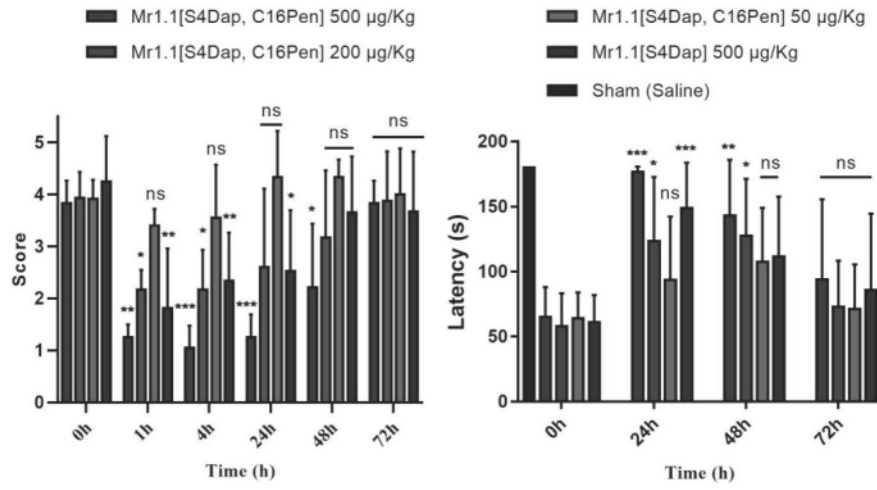


图5