

多肽药学上可接受的盐及其应用

技术领域

本发明涉及生物技术领域，具体涉及多肽药学可接受的盐及其应用。

背景技术

目前脑卒中的主要治疗措施及药物包括血管介入、溶栓、抗血小板、抗凝、降纤及神经保护剂治疗。血管介入、溶栓一般要求在卒中发生后极早期进行，血管介入需要在具有一定能力的医院完成；抗血小板、抗凝药物一般需要配合溶栓药物后期使用，效果有限且存在一定的出血风险；神经保护剂虽然具有较好的潜力，但是一般针对急性期的治疗用药。目前，还没有针对促进卒中病人亚急性期及恢复期康复的治疗药物上市。

先前研究显示，内皮素受体 B 激动剂在促进脑卒中病人长期恢复及后期康复中体现了巨大的潜力。内皮素(Endothelin, ET)是一种含有 21 个氨基酸的多肽，可以分为 ET-1、ET-2、ET-3 三种亚型，它们与蛇毒 sarafotoxin b 和 c(S6b, S6c)具有结构同源性。内皮素是目前已知的作用最强且效应最持久的血管活性肽，有强烈的血管收缩和促平滑肌细胞迁移、增殖作用，广泛作用于体内多种系统，与高血压、充血性心力衰竭、糖尿病、癌症及纤维化等疾病有着密切联系。

内皮素主要通过与其靶细胞膜上的内皮素受体(Endothelin receptor, ETR)结合后发挥其生物学效应，在心脑血管疾病、肾脏疾病、糖尿病、自身免疫性疾病和肿瘤等众多疾病的发生发展中扮演了重要的角色。人的 ETR 分为 ETA 和 ETB 两种亚型，均为 G 蛋白偶联受体(G-protein-coupled receptor, GPCR)，但两者功能存在差异。ETA 被认为是基本的缩血管和促生长受体，而 ETB 在血管系统中抑制细胞生长和血管收缩，因其参与 ET-1 的清除被称为“清除受体”。内皮素及其受体多样性地广泛分布于各组织，通过不同的亚型和信号传递系统介导复杂的生物学效应，与多种疾病有密切联系，其中 ETA 和 ETB 受体发挥了重要的作用。

研究显示，内皮素 B 受体(ETBR)激动剂在促进神经血管单元再生、改善神经系统供血供氧、促进脑卒中病人长期恢复及后期康复中体现了巨大的潜力，目前发现的 ETBR 激动剂化合物中，sovateltide(IRL-1620, Suc-DEEAVYFAHLDIIW)是唯一一个推进到临床研究阶段的 ETBR 激动剂，但 IRL-1620 由于半衰期很短(不到 2 分钟)，暴露量很低，在临床前研究及临床研究中需要反复多次给药，大大降低了其药效持续性和患者依从性。

因而，亟需开发新的内皮素受体激动剂。

发明内容

有鉴于此，本申请提供了一种新的多肽药学可接受的盐及其应用。

本申请提供的多肽及其药学上可接受的盐是建立在对于 ETBR 激动剂的机理研究之上，属于 ETBR 的高选择性激动剂。本申请提供的多肽及其药学上可接受的盐通过构效关系研究和结构修饰延长了药物的半衰期和体内暴露量，减少了给药次数，在动物实验中的副作用比目前唯一进入临床研究阶段的 ETBR 激动剂 IRL-1620 更低，药物的安全窗口更大。本申请提供的多肽及其药学上可接受的盐可以用于与 ETBR 受

体相关的疾病治疗,如缺血性脑卒中病人恢复期的康复问题,促进卒中病人更好的恢复。具体地,本申请提供以下技术方案:

第一方面,本申请提供了多肽的药学可接受的盐,其中所述多肽包含氨基酸序列 Fum-DEEAVYFAHK(-AEEA- γ E-C12)DVIW(SEQ ID NO: 1)或其功能性变体。

在一些实施方案中,所述功能性变体为 SEQ ID NO: 1 发生一处或多处保守型取代后产生的变体。

在一些实施方案中,所述保守型取代选自 D 和 E 之间的取代, V、L 和 I 之间的取代, Y、F 和 W 之间的取代, H、K 和 R 之间的取代。

在一些实施方案中,所述功能性变体具有与 SEQ ID NO: 1 相同或相似的 ETBR 受体激活活性。

在一些实施方案中,所述药学可接受的盐选自钠盐、钾盐、铵盐、三氟乙酸盐、醋酸盐、盐酸盐、硫酸盐和磷酸盐。

在一些实施方案中,所述药学可接受的盐选自钠盐、钾盐和铵盐。

在一些实施方案中,所述药学可接受的盐为钠盐。

第二方面,本申请提供了药物组合物,其包含第一方面所述的多肽的药学可接受的盐,以及药学可接受的载体、赋形剂和/或稀释剂。

在一些实施方案中,所述药学组合物为预冻干制剂。

在一些实施方案中,所述药学组合物包含氯化钠和/或任选的海藻糖和/或环糊精。

在一些实施方案中,药物组合物为冻干制剂,优选通过将以上所述预冻干制剂冻干而制备。

在一些实施方案中,药物组合物为复原制剂,优选通过将以上所述的冻干制剂与水溶液结合而制备。

在一些实施方案中,所述药物组合物用于治疗与 ETBR 受体相关的疾病。

在一些实施方案中,所述药物组合物用于治疗、改善或预防神经系统损伤及该损伤引起的相关的疾病、神经退行性疾病、焦虑、癫痫、主动脉瓣狭窄或新生儿缺氧缺血性脑病。

第三方面,本申请提供了促进个体中神经血管单元再生、改善神经系统供血供氧,治疗、改善或预防个体中的神经系统损伤及该损伤引起的相关的疾病、神经退行性疾病、焦虑、癫痫、主动脉瓣狭窄或新生儿缺氧缺血性脑病的方法,所述方法包括向所述个体施用第一方面所述的多肽的药学可接受的盐或第二方面所述的药物组合物。

第四方面,本申请提供了第一方面所述的多肽的药学可接受的盐或第二方面所述的药物组合物在制备用于促进神经血管单元再生、改善神经系统供血供氧,治疗、改善或预防个体中的神经系统损伤及该损伤引起的相关的疾病、神经退行性疾病、焦虑、癫痫、主动脉瓣狭窄或新生儿缺氧缺血性脑病的药物中的用途。

在第二、第三或第四方面的一些实施方案中,所述神经系统损伤及该损伤引起的相关的疾病包括脑卒中、脊髓损伤、脑或脊髓的缺血性或创伤性损伤以及中枢神经系统(CNS)神经元的损伤,所述脑卒中包括缺血性卒中、出血性卒中和由缺血性卒中转化的出血性卒中;所述神经退行性疾病包括阿尔茨海默氏病、肌萎缩性侧索硬化症(ALS)、帕金森氏病或亨廷顿氏病。

在第二、第三或第四方面的一些实施方案中,所述个体是哺乳动物,例如非灵长类或灵长类动物,例如人。

第五方面,本申请还提供了药物,其包含第一方面所述的多肽的药学可接受的盐或第二方面所述的药物组合物,以及任选的其他任意有效成分。

本申请还提供了制备所述多肽的药学可接受的盐的方法，包括以下步骤：

步骤 1：经固相多肽合成获得所述多肽的肽树脂；

步骤 2：裂解、纯化制得所述多肽；以及

步骤 3：由所述多肽制备盐。

此外，本申请还提供了所述多肽(SEQ ID NO: 1)及其药学上可接受的盐在制备治疗与个体中 ETBR 受体相关疾病的药物中的用途。

在一些实施方案中，所述与 ETBR 受体相关疾病包括神经系统损伤及该损伤引起的相关的疾病、神经退行性疾病、焦虑、癫痫、主动脉瓣狭窄或新生儿缺氧缺血性脑病中的一种或多种。

在一些实施方案中，所述神经系统损伤及该损伤引起的相关的疾病包括脑卒中、脊髓损伤、脑或脊髓的缺血性或创伤性损伤以及中枢神经系统(CNS)神经元的损伤。

在一些实施方案中，所述神经退行性疾病包括阿尔茨海默氏病、肌萎缩性侧索硬化症(ALS)、帕金森氏病或亨廷顿氏病。

在一些实施方案中，所述脑卒中包括缺血性脑卒中、出血性脑卒中和由缺血性卒中转化成的出血性卒中。

相应地，本申请还提供了药物，其包括所述多肽的药学上可接受的盐，以及药学上可接受的辅料或助剂。

在一些实施方案中，所述药物还包括其他任意有效成分。

另一些发明，本申请还提供了治疗与 ETBR 受体相关疾病的方法，其包括向个体施用所述多肽的药学上可接受的盐；所述药物组合物；或所述药物。

在本申请的一些实施方案中，所述与 ETBR 受体相关疾病包括神经系统损伤及该损伤引起的相关的疾病、神经退行性疾病、焦虑、癫痫、主动脉瓣狭窄或新生儿缺氧缺血性脑病中的一种或多种。

在一些实施方案中，所述神经系统损伤及该损伤引起的相关的疾病包括脑卒中、脊髓损伤、脑或脊髓的缺血性或创伤性损伤以及中枢神经系统(CNS)神经元的损伤。

在一些实施方案中，所述神经退行性疾病包括阿尔茨海默氏病、肌萎缩性侧索硬化症(ALS)、帕金森氏病或亨廷顿氏病。

在一些实施方案中，所述脑卒中包括缺血性脑卒中、出血性脑卒中和由缺血性卒中转化成的出血性卒中。

附图说明

为了更清楚地说明本发明实施例或现有技术中的技术方案，下面将对实施例或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍。

图 1 示出实施例 2 中多肽对人 ETB 受体活性 EC50 测定结果。

图 2 示出实施例 2 中多肽对犬 ETB 受体活性 EC50 测定结果。

图 3 示出实施例 2 中多肽对大鼠 ETB 受体活性 EC50 测定结果。

图 4 示出实施例 2 中多肽对小鼠 ETB 受体活性 EC50 测定结果。

图 5 示出实施例 9 中一周三次给药后第 7 天 Garcia JH 评分结果，其中 1 为生理盐水组，2 和 3 分别为 30μg/Kg 和 100μg/Kg 的 BX-229-Na 皮下给药组，4 为假手术组。

图 6 示出实施例 9 中一周三次给药后第 14 天 Garcia JH 评分结果，其中 1 为生理盐水组，2 和 3 分别为 30μg/Kg 和 100μg/Kg 的 BX-229-Na 皮下给药组，4 为假手术组。

图 7 示出实施例 9 中一周三次给药后 VEGF-A 蛋白表达量的变化, 其中 1 为生理盐水组, 2 和 3 分别为 30 μ g/Kg 和 100 μ g/Kg 的 BX-229-Na 皮下给药组, 4 为假手术组。

图 8 示出实施例 9 中一周三次给药后 BDNF 蛋白表达量的变化, 其中 1 为生理盐水组, 2 和 3 分别为 30 μ g/Kg 和 100 μ g/Kg 的 BX-229-Na 皮下给药组, 4 为假手术组。

图 9 示出实施例 10 中建模后 BX-229 皮下给药组和 IRL-1620 静脉给药组第 8 天和 15 天评分(*代表有显著差异 $P < 0.05$), 其中 1 和 3 为 30 μ g/Kg 的 BX-229-Na 皮下给药组, 2 和 4 为 3 $\times$ 2.7 μ g/Kg 的 IRL-1620 静脉给药组。

具体实施方式

本发明公开了多肽药学上可接受的盐及其应用, 本领域技术人员可以借鉴本文内容, 适当改进工艺参数实现。特别需要指出的是, 所有类似的替换和改动对本领域技术人员来说是显而易见的, 它们都被视为包括在本发明。本发明的方法及应用已经通过较佳实施例进行了描述, 相关人员明显能在不脱离本发明内容、精神和范围内对本文所述的方法和应用进行改动或适当变更与组合, 来实现和应用本发明技术。

除非另外指明, 本申请中所用的术语具有本领域技术人员通常理解的含义。

本申请中对于氨基酸使用的单字母或三字母缩写遵循国际惯例。

本说明书和权利要求书中, 词语“包括”、“包含”和“含有”意指“包括但不限于”, 且并非意图排除其它部分、添加物、组分或步骤。

第一方面, 本申请提供了多肽的药学可接受的盐, 其中所述多肽包含氨基酸序列 Fum-DEEAVYFAHK(-AEEA- γ E-C12)DVIW(SEQ ID NO: 1)或其功能性变体。

术语“功能性变体”是指与母体具有相同或相近的生物学功能和性质的变体。作为非限制性的实例, “功能性变体”可以通过在母体中进行一处或多处保守型取代获得。

在一些实施方案中, 所述保守型取代选自 D 和 E 之间的取代, V、L 和 I 之间的取代, Y、F 和 W 之间的取代, H、K 和 R 之间的取代。

在一些实施方案中, 本文所公开的功能性变体还包括与以上提到的肽具有至少 60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 甚至更高的同一性的氨基酸序列。本领域已知, 两种蛋白之间的“同一性”通过将一种蛋白的氨基酸序列和它的保守氨基酸取代的第二种蛋白的序列进行比对来确定。使用本领域技术人员公知的计算机算法和方法确定两种蛋白之间的同一性程度。两个氨基酸序列之间的同一性优选地通过利用 BLASTP 算法确定。

在一些实施方案中, 本文所公开的功能性变体包括与以上提到的肽相比, 具有 1、2、3、4、5 或更多处的氨基酸残基的取代、缺失、添加和/或插入区别于上述公开的具体的肽。

如上所述, 功能性变体可以通过一个或多个取代、缺失、添加和/或插入区别于上述公开的具体的肽。这些变体可以是天然存在的或可以是合成产生的, 例如, 通过修饰一个或多个本文公开的上述肽序列并按照本文所述用本领域内公知的多种技术中的任何一种评估其生物活性。

可通过固相合成或重组方法合成本申请的活性肽。可使用科学文献和专利文献中所述的多种方案和方法合成拟肽, 所述科学文献和专利文献例如为 Organic Syntheses Collective Volumes, Gilman 等(编) John Wiley&Sons, Inc., NY, al-Obeidi (1998) Mol. Biotechnol. 9: 205-223; Hruby (1997) Curr. Opin. Chem. Biol. 1: 114-119; Ostergaard

(1997) Mol. Divers. 3: 17-27; Ostresh (1996) Methods Enzymol. 267: 220-234.

此外，本发明提供了制备多肽(SEQ ID NO: 1)的药学上可接受的盐的方法，其包括以下步骤：

步骤 1：称取 0.50g(0.25mmol)的 Fmoc-Trp(Boc)-Wang Resin 于反应器中，加入 DCM 10mL 溶胀 10min，抽滤，DMF 洗 2 次，加 25%的 4-甲基哌啶/DMF(体积比)反应 30min，去除 Fmoc 基团。抽滤，用 DMF 洗涤树脂 4 遍，DCM 洗涤 2 遍，茚三酮检测，树脂溶液蓝色；称取 Fmoc-Ile-OH(1mmol, 4 eq.)和 HBTU(1mmol, 4 eq.)，DMF 溶解，加入 DIEA(2mmol, 8 eq.)，混合均匀，加入树脂中，室温(25°C±5°C)磁力搅拌反应 1h，抽滤，DMF、MeOH 和 DCM 依次洗涤 3 遍，茚三酮检测，树脂无色透明，溶液浅黄色，反应完全。加入 25%的 4-甲基哌啶/DMF(体积比)去除 Fmoc 基团。依次循环，完成 Val、Asp(OtBu)、Lys(Dde)、His(Trt)、Ala、Phe、Tyr(tBu)、Val、Ala、Glu(OtBu)、Glu(OtBu)、Asp(OtBu)和 OtBu-Fum 的偶合。随后，向肽树脂中加入 2% 水合肼/DMF 反应，10min×3 次，以脱除 Lys 侧链的 Dde，然后依次缩合 AEEA、Glu-α-OtBu 以及 C12-OH。

步骤 2：肽树脂抽干，加入预冷裂解液(TFA: TIS: H₂O=95:2.5:2.5)15mL，室温(25°C±5°C)搅拌反应 3h，抽出反应液，树脂用少量 TFA 洗涤 2 次，抽出。合并反应液，加入预冷的甲基叔丁基醚约 200mL，析出白色沉淀，离心(5000rpm×5min)，倒去上清液，沉淀复加入甲基叔丁基醚，涡旋，离心，弃去上清。沉淀放入真空干燥器中干燥 12h，得到粗品。将粗肽用约 1%氨水溶解，过滤，滤液用制备液相纯化。制备柱：C18-10-100, 30×250mm。流速：25mL/min。A 相：0.1%TFA/水，B 相：0.1%TFA/90%乙腈/水。梯度洗脱以得到目标化合物纯品。将纯度>95%的目标化合物组分合并，用水泵及旋转蒸发仪在 40°C左右减压旋出乙腈，所得浓缩液用液氮冷冻成固体，然后使用冻干机冷冻干燥 48h，得到目标化合物。经质谱鉴定，分子量正确([M-2]²=1137.3)。

步骤 3：多肽(SEQ ID NO: 1)的盐(BX-229-Na)的制备

在此以制备钠盐为例。

将步骤 2 所得到的多肽(SEQ ID NO: 1)固体溶于 0.1N 的氢氧化钠水溶液(含 10 当量的氢氧化钠)中，用制备液相转盐。制备柱：C18-10-100, 30×250mm。流速：25mL/min。A 相：水，B 相：乙腈。上样后水冲洗 15min，然后梯度洗脱将产物从制备柱上洗脱下来。将纯度>95%的目标化合物组分合并，用水泵及旋转蒸发仪在 40°C左右减压旋出乙腈，所得浓缩液用液氮冷冻成固体，然后使用冻干机冷冻干燥 48h，得到目标化合物。

在本发明的一些具体实施方案中，所述纯化采用的制备柱包括 C18-10-100, 30×250mm，采用的流速为 25mL/min；所述制备液相包括 A 相：0.1%TFA/水，B 相：0.1%TFA/90%乙腈/水。

不希望被任何理论所束缚，用一种与药物带相反电荷的分子或离子与药物结合成盐，预期能改善药物某些不理想的理化性质或生物药学性质，如改变药物的溶解度或溶出度、降低吸湿性、提高稳定性、改变熔点等。理想的盐形式的最终确定需要根据理化性质和生物药学性质之间寻找平衡。选择药物的药学可接受的盐型应优先考虑以下要求：溶解性、引湿性、不同状态下对环境因素的稳定性。

本申请的多肽的药学可接受的盐可以为任何合适的药学可接受的盐形式。在一些实施方案中，多肽的药学可接受的盐为钠盐。在一些实施方案中，多肽的药学可接受的盐为钾盐。在一些实施方案中，多肽的药学可接受的盐为铵盐。在一些实施方案中，多肽的药学可接受的盐是三氟乙酸盐、醋酸盐。在一些具体实施方案中，多肽的药学

可接受的盐为盐酸盐、硫酸盐或磷酸盐。

第二方面，本申请提供了药物组合物，其包含第一方面所述的多肽的药学可接受的盐，以及药学可接受的载体、赋形剂和/或稀释剂。

可将本申请所述的多肽的药学上可接受的盐制备为冻干制剂形式。在一些实施方案中，本申请提供冻干制剂。冻干制剂由预冻干制剂通过冻干而制备，其至少包含活性成分、缓冲液、填充剂和水，其中活性成分即为本申请的多肽药学上可接受的盐。填充剂为冻干化合物提供结构。在一些实施方案中，填充剂选自甘露醇、海藻糖、右旋糖酐-40、甘氨酸、乳糖、山梨醇、环糊精和蔗糖等，其中优选海藻糖和环糊精。在一些实施方案中，本申请的冻干制剂包含以上所述的多肽药学上可接受的盐以及海藻糖和环糊精。

可将冻干制剂复原，即用溶液将冻干制剂再水化为肉眼看不见的微粒的溶液。在一些实施方案中，本申请提供复原制剂，其通过将冻干制剂与水溶液结合而制备。在一些实施方案中，所述水溶液为注射用水。在一些实施方案中，所述水溶液为生理盐水。

术语“冻干”涉及一种工艺，待干燥的原料先被冷冻，然后在真空环境下升华而去除冰或冻结的溶剂。

在一些实施方案中，本文公开的多肽药学上可接受的盐可以以药物组合物的形式被施用。药物组合物可以通过常规的混合、溶解、制粒、制锭、研磨、乳化、包封、捕获或冻干方法制造。

可以使用一种或多种生理学可接受的便于将多肽药学上可接受的盐加工成可药用制剂的载体、稀释剂、赋形剂或辅料，以常规方式配制药物组合物。适当的配制依赖于选择的施用途径。

在一些实施方案中，施用可以是肠胃外、静脉内、经口、皮下、动脉内、颅内、鞘内、腹膜内、局部、鼻内或肌内的，优选静脉内施用。

在一些实施方案中，用于肠胃外施用的药物组合物优选是无菌和基本等渗的。对注射而言，可以将多肽药学上可接受的盐配制进水溶液中，优选配制进生理学兼容的缓冲液例如 Hank's 溶液、Ringer's 溶液，或生理盐水或乙酸缓冲液中(以减轻注射位点处的不适)。溶液可以含有配制剂例如悬浮剂、稳定剂和/或分散剂。

或者，多肽药学上可接受的盐可以是用于在使用前用合适的运载体(例如无菌无热源水)构建的粉末形式。

对跨粘膜施用而言，在配制物中使用适合要穿透的屏障的穿透剂。该施用途径可被用于将化合物递送至鼻腔或用于舌下施用。

在一些实施方案中，对经口施用而言，可以将多肽药学上可接受的盐与可药用的载体一起配制为片剂、丸剂、锭剂、胶囊、液体、凝胶、糖浆、浆体、悬浮液等，用于由被治疗的患者经口摄入。对于口服固体配制物例如粉末、胶囊和片剂而言，合适的赋形剂包括填充剂例如糖，如乳糖、蔗糖、甘露醇和山梨糖醇；纤维素制剂例如玉米淀粉、小麦淀粉、水稻淀粉、马铃薯淀粉、明胶、西黄蓍胶、甲基纤维素、羧甲基纤维素、羧甲基纤维素钠和/或聚维酮(PVP)；制粒剂和粘合剂。如果需要，可以添加崩解剂，例如交联的聚乙烯吡咯烷酮、琼脂，或海藻酸或其盐，例如海藻酸钠。如果需要，可以使用标准技术对固体剂型进行糖包裹或肠溶衣包裹。对于口服液体制剂例如悬浮液、酏剂和溶液而言，合适的载体、赋形剂或稀释剂包括水、甘油、油、醇。另外，可以添加调味剂、防腐剂、着色剂等。

除了先前所述的配制物以外，也可以将多肽药学上可接受的盐配制成储存制剂。

可以通过植入(例如皮下或肌内)或通过肌内注射来施用这类长效配制物。因此,例如可将化合物与合适的多聚体材料或疏水材料(例如配制为可接受的油中的乳剂)或离子交换树脂配制在一起,或配制为略溶的衍生物,例如配制为略溶的盐。

或者,可以使用其他药物递送系统。可使用脂质体和乳剂递送嵌合肽。也可以使用某些有机溶剂例如二甲基亚砜。另外,可以使用持续释放的系统(例如含有治疗剂的固体聚合物的半渗透性基质)递送化合物。

根据其化学性质,持续释放胶囊可释放嵌合肽数周直至超过 100 天。根据治疗试剂的化学性质和生物稳定性,可以使用用于蛋白质稳定的其他策略。

多肽的药学可接受的盐以有效达到预期目的(例如减轻损伤性脑卒中和相关病症的损伤效果)的量使用。治疗有效量表示:相对于未用本文公开的多肽药学上可接受的盐治疗的患者(或动物模型)对照群体中的中枢神经系统损伤而言,在用本文公开的多肽药学上可接受的盐治疗的患者(或动物模型群体)中,足以显著降低脑卒中引起的损伤的多肽药学上可接受的盐的量。如果与未通过本文公开的方法治疗的可比较的患者对照群体中的平均输出(通过梗死体积或残疾指数测定)相比,个体经治疗的患者达到更良好的输出,则该量也被认为是治疗上有效的。如果个体被治疗的患者在 Rankin 标度中显示 2 或更少的残疾以及在 Barthel 标度中显示 75 或更多,则所述量也被认为是治疗上有效的量。如果与可比较的未治疗群体相比,被治疗的患者群体在残疾标度上显示显著改进(即更少残疾)的分值分布,则剂量也被认为是治疗上有效的,参见 Lees 等, N Engl J Med 2006; 354:588-600。治疗上有效的方案表示治疗上有效的剂量和达到上述预期目的所需的施用频率的组合。

在一些实施方案中,施用的多肽药学上可接受的盐的量取决于被治疗的受试者、受试者的体重、痛苦的严重性、施用方式和开处方的医师的调整。在症状可检测时,甚至不可检测时可重复治疗。治疗可单独提供或者与其他药物组合提供。

在一些实施方案中,本文公开的多肽药学上可接受的盐的治疗上有效的剂量能够提供治疗益处而不引起重大的毒性。可以通过标准药物步骤在细胞培养物或实验动物中测定嵌合肽的毒性,例如通过测定 LD50(使 50 % 群体致死的剂量)或 LD100(使 100 % 群体致死的剂量)来实现。毒性效应和治疗效应的剂量比例是治疗指数。优选显示高治疗指数的多肽的药学可接受的盐(参见例如 Fingl 等, 1975, In: The Pharmacological Basis of Therapeutics, 第 1 章, 第 1 页)。

第三方面,本申请提供了治疗、改善或预防个体与 ETBR 受体相关的疾病的方法。

在一些实施方案中,与 ETBR 受体相关的疾病包括神经系统损伤及该损伤引起的相关的疾病、神经退行性疾病、焦虑、癫痫、主动脉瓣狭窄或新生儿缺氧缺血性脑病中的一种或多种;所述神经系统损伤及该损伤引起的相关的疾病包括脑卒中、脊髓损伤、脑或脊髓的缺血性或创伤性损伤以及中枢神经系统(CNS)神经元的损伤。

在一些实施方案中,神经退行性疾病包括阿尔茨海默氏病、肌萎缩性侧索硬化症(ALS)、帕金森氏病或亨廷顿氏病。

在一些实施方案中,脑卒中包括缺血性脑卒中、出血性脑卒中和由缺血性卒中转化成的出血性卒中。

在一些实施方案中,所述方法包括向所述个体施用第一方面所述的多肽药学上可接受的盐或第二方面所述的药物组合物。

脑卒中是由 CNS 中受损的血流导致的病症。可能的原因包括栓塞、出血和血栓形成。CNS 组织的死亡被称作梗死。梗死体积(即脑中由脑卒中导致的死亡的神经元细胞的体积)可以被用作脑卒中导致的病理学损伤程度的指标。症状性效果既取决于

梗死体积，也取决于梗死在脑中位于何处。残疾指数可被用作症状性损伤的度量，例如 Rankin 中风输出标度(Rankin Stroke Outcome Scale, Rankin, Scott MedJ; 2: 200-15 (1957))和 Barthel 指数(Barthel Index)。Rankin 标度以如下直接评价患者的全局病症为基础：

0 完全没有症状。

1 尽管有症状但是没有显著的残疾；能够进行所有日常工作和活动。

2 轻微残疾；不能进行所有先前的活性，但是能够照顾自己的事务而不需要帮助。

3 需要一些帮助的中度残疾，但是能够行走而不需要帮助。

4 中度到严重的残疾，不受帮助时不能行走，并且不受帮助时不能照顾自身的身体需要。

5 严重残疾；卧床不起，失禁，并需要持久的护理和关注。

Barthel 指数以关于患者进行 10 种基本日常生活活动的能力的一系列问题为基础，所述问题得到 0 和 100 之间的分数，较低的分数表示较多的残疾(Mahoney 等, Maryland State Medical Journal 14: 56-61(1965))。

或者可使用 NIH 脑卒中量表测量脑卒中严重性/输出，所述 NIH 脑卒中量表可在万维网 ninds.nih.gov/doctors/NIH_Stroke_Scale_Booklet.pdf 上获得。该量表以患者实行 11 组功能的能力为基础，所述功能包括评价患者的意识、运动、感受和语言功能水平。

缺血性脑卒中更明确地表示为由于通向大脑的血流被堵塞而引起的一类脑卒中。这类堵塞的潜在病症最常见地是沿血管壁的脂肪沉着物的发生。该病症被称作动脉粥样硬化。这些脂肪沉着物能够引起两种梗阻。脑血栓形成是指在血管的阻塞部分产生的血栓(血块)。“脑栓塞”通常是指血液中的各种栓子(如心脏内的附壁血栓、动脉粥样硬化的斑块、脂肪、肿瘤细胞、纤维软骨或空气等)随血流进入脑动脉而阻塞血管，当侧枝循环不能代偿时，引起该动脉供血区脑组织缺血性坏死，出现局灶性神经功能缺损。栓塞的第二个重要原因是不规则的心搏，称作动脉肌纤维震颤。其引起下述病症，其中血块可在心中形成，移动并转移至脑。缺血性脑卒中的其他潜在原因是出血、血栓形成、动脉或静脉的切割、心脏停搏、任何原因(包括出血)引起的休克，和医源性原因，如对脑血管或导向脑的血管的直接手术损伤或心脏手术。缺血性脑卒中构成所有脑卒中病例的约 83 %。

第四方面，本申请提供了第一方面所述的多肽药学上可接受的盐或第二方面所述的药物组合物在用于治疗、改善或预防个体中的脑卒中、阿尔茨海默氏病、脊髓损伤、主动脉瓣狭窄或新生儿缺氧缺血性脑病中的用途。相应地，本申请还提供了第一方面所述的多肽药学上可接受的盐或第二方面所述的药物组合物在制备用于治疗、改善或预防个体中的脑卒中、阿尔茨海默氏病、脊髓损伤、主动脉瓣狭窄或新生儿缺氧缺血性脑病的药物中的用途。

类似地，本申请提供了第一方面所述的多肽药学上可接受的盐或第二方面所述的药物组合物在用于治疗、改善或预防个体与 ETBR 受体相关的疾病中的用途。相应地，本申请还提供了第一方面所述的多肽药学上可接受的盐或第二方面所述的药物组合物在制备用于治疗、改善或预防个体与 ETBR 受体相关的疾病的药物中的用途。

在一些实施方案中，与 ETBR 受体相关的疾病包括神经系统损伤及该损伤引起的相关的疾病、神经退行性疾病、焦虑、癫痫、主动脉瓣狭窄或新生儿缺氧缺血性脑病中的一种或多种；所述神经系统损伤及该损伤引起的相关的疾病包括脑卒中、脊髓损伤、脑或脊髓的缺血性或创伤性损伤以及中枢神经系统(CNS)神经元的损伤。

在一些实施方案中，神经退行性疾病包括阿尔茨海默氏病、肌萎缩性侧索硬化症

(ALS)、帕金森氏病或亨廷顿氏病。

在一些实施方案中，脑卒中包括缺血性脑卒中、出血性脑卒中和由缺血性卒中转化成的出血性卒中。

本申请所述的“个体”，是指包含鸟类、爬行类和哺乳类的动物。在一些实施方案中，所述个体是哺乳动物，包括灵长类和非灵长类动物，例如人、黑猩猩、牛、马、猪、绵羊、山羊、狗、猫，以及诸如大鼠和小鼠的啮齿类动物。

应当理解，以上详细描述仅为了使本领域技术人员更清楚地了解本申请的内容，而并非意图在任何方面加以限制。本领域技术人员能够对所述实施方案进行各种改动和变化。

在本申请中，缩写或英文全称的中文解释如下：

缩写或英文	含义
Boc	叔丁氧羰基
DCM	二氯甲烷
DIEA	二异丙基乙胺
DMF	N,N-二甲基甲酰胺
MeOH	甲醇
Fmoc	芴甲氧羰基
HBUTU	O-苄并三氮唑-四甲基脲六氟磷酸酯
OtBu	-O-C(CH ₃) ₃
Dde	1-(4, 4-二甲基-2, 6-二氧化代环己亚基)乙基
Resin	树脂
Trt	三苯甲基
TFA	三氟醋酸
TIS	三异丙基硅烷
Suc	丁二酰基
Fum	富马酰基
AEEA	氨基乙氧基乙氧基乙酸
C12	月桂酰基

实施例

以下实施例用于说明本申请，但不用来限制本申请的范围。在不背离本申请精神和实质的情况下，对本申请方法、步骤或条件所作的修改或替换，均属于本申请的范围。

若未特别指明，实施例中所用的试剂均为常规市售试剂，实施例中所用的技术手段均为本领域技术人员所熟知的常规手段。

除非特别指明，以下各实施例中使用的主要试剂和溶剂如无特别说明均可通过商购购得，例如购自吉尔生化(上海)有限公司或生工生物工程(上海)股份有限公司等。对照 IRL-1620 根据文献(Michihiro Takai, et al., BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, Vol. 184, No. 2, 1992, Pages 953-959)报道的序列和合成方法合成得到。

实施例 1: BX-229 多肽及其盐的制备

本实施例按如下方法制备合成 BX-229 多肽(SEQ ID NO.: 1, Fum-DEEAVYFAHK (-AEEA- γ E-C12)DVIW)及其不同的盐。

1)BX-229 的合成

称取 0.50g(0.25mmol)的 Fmoc-Trp(Boc)-Wang Resin 于反应器中,加入 DCM 10mL 溶胀 10min, 抽滤, DMF 洗 2 次, 加 25%的 4-甲基哌啶/DMF(体积比)反应 30min, 去除 Fmoc 基团。抽滤, 用 DMF 洗涤树脂 4 遍, DCM 洗涤 2 遍, 茚三酮检测, 树脂溶液蓝色; 称取 Fmoc-Ile-OH(1mmol, 4 eq.)和 HBTU(1mmol, 4 eq.), DMF 溶解, 加入 DIEA(2mmol, 8 eq.), 混合均匀, 加入树脂中, 室温(25°C $\pm$ 5°C)磁力搅拌反应 1h, 抽滤, DMF、MeOH 和 DCM 依次洗涤 3 遍, 茚三酮检测, 树脂无色透明, 溶液浅黄色, 反应完全。加入 25%的 4-甲基哌啶/DMF(体积比)去除 Fmoc 基团。依次循环, 完成 Val、Asp(OtBu)、Lys(Dde)、His(Trt)、Ala、Phe、Tyr(tBu)、Val、Ala、Glu(OtBu)、Glu(OtBu)、Asp(OtBu)和 OtBu-Fum 的偶合。随后, 向肽树脂中加入 2%水合肼/DMF 反应, 10min $\times$ 3 次, 以脱除 Lys 侧链的 Dde, 然后依次缩合 AEEA、Glu- α -OtBu 以及 C12-OH。肽树脂抽干, 加入预冷裂解液(TFA: TIS: H₂O=95:2.5:2.5)15mL, 室温(25°C $\pm$ 5°C)搅拌反应 3h, 抽出反应液, 树脂用少量 TFA 洗涤 2 次, 抽出。合并反应液, 加入预冷的甲基叔丁基醚约 200mL, 析出白色沉淀, 离心(5000rpm $\times$ 5min), 倒去上清液, 沉淀复加入甲基叔丁基醚, 涡旋, 离心, 弃去上清。沉淀放入真空干燥器中干燥 12h, 得到粗品。将粗肽用约 1%氨水溶解, 过滤, 滤液用制备液相纯化。制备柱: C18-10-100, 30 $\times$ 250mm。流速: 25mL/min。A 相: 0.1%TFA/水, B 相: 0.1%TFA/90%乙腈/水。梯度洗脱以得到目标化合物纯品。将纯度>95%的目标化合物组分合并, 用水泵及旋转蒸发仪在 40°C左右减压旋出乙腈, 所得浓缩液用液氮冷冻成固体, 然后使用冻干机冷冻干燥 48h, 得到目标化合物 BX-229。经质谱鉴定, 分子量正确([M-2]²=1137.3)。

2)BX-229 钠盐的制备

将所得到的 BX-229 固体溶于 0.1N 的氢氧化钠水溶液(含 10 当量的氢氧化钠)中, 用制备液相转盐。制备柱: C18-10-100, 30 $\times$ 250mm。流速: 25mL/min。A 相: 水, B 相: 乙腈。上样后水冲洗 15min, 然后梯度洗脱将产物从制备柱上洗脱下来。将纯度>95%的目标化合物组分合并, 用水泵及旋转蒸发仪在 40°C左右减压旋出乙腈, 所得浓缩液用液氮冷冻成固体, 然后使用冻干机冷冻干燥 48h, 得到目标化合物 BX-229 钠盐。

3)BX-229 钾盐的制备

将所得到的 BX-229 固体溶于 0.1N 的氢氧化钾水溶液(含 10 当量的氢氧化钾)中, 用制备液相转盐。制备柱: C18-10-100, 30 $\times$ 250mm。流速: 25mL/min。A 相: 水, B 相: 乙腈。上样后水冲洗 15min, 然后梯度洗脱将产物从制备柱上洗脱下来。将纯度>95%的目标化合物组分合并, 用水泵及旋转蒸发仪在 40°C左右减压旋出乙腈, 所得浓缩液用液氮冷冻成固体, 然后使用冻干机冷冻干燥 48h, 得到目标化合物 BX-229 钾盐。

4)BX-229 铵盐的制备

将所得到的 BX-229 固体溶于 5%的氨水溶液中(pH 值约 9), 用制备液相转盐。制备柱: C18-10-100, 30 $\times$ 250mm。流速: 25mL/min。A 相: 水, B 相: 乙腈。上样后水冲洗 15min, 然后梯度洗脱将产物从制备柱上洗脱下来。将纯度>95%的目标化合物组分合并, 用水泵及旋转蒸发仪在 40°C左右减压旋出乙腈, 所得浓缩液用液氮冷冻成固体, 然后使用冻干机冷冻干燥 48h, 得到目标化合物 BX-229 铵盐。

实施例2: BX-229-Na对不同物种ETB受体活性EC50测定

本实施例测试了实施例1所制备的BX-229-Na对不同物种ETB受体的激动活性,并与IRL-1620进行对比。

293T-17细胞按照每孔65万铺于6孔板,37℃,5%CO₂培养箱中培养过夜后,转染含人ETB受体基因的表达载体PCDNA3.1-hETB(人hETB序列,CBI登录号:NM_000115.5),每孔转染2.5μg质粒,继续培养48h,在荧光显微镜下观察细胞表达绿色荧光后,用胰酶消化并计数。BX-229-Na对人ETB受体的活性测定采用Cisbio Bioassays的IP-One Gq试剂盒,用试剂盒中的Stim Buffer悬浮细胞,将细胞悬液加入96孔检测板,每个孔加入7μL细胞悬液(含3万细胞),将实施例1制备的多肽BX-229-Na以及IRL-1620分别用Stim B稀释为11个浓度梯度,每个浓度梯度用Stim B溶解为2×的浓度,加7μL于上述待测细胞中,阴性对照孔加7μL PBS溶液于上述细胞中。封板于37℃的细胞培养箱中孵育1h。检测测试孔、阳性对照孔人内皮素ET1(ET1,SEQ ID NO.:2,CSCSSLMDKECVYFCHLDIIW(C1-C15,C3-C11)),PBS对照孔各添加3μL IP1 d2 工作液添和3μL IP1 Tb cryptotote Antibody 工作液。封板避光室温(25℃±5℃)作用1h。拆下板密封,在ID5酶标仪上测定吸光度为665nm和620nm数值。计算每个孔受体和供体发射信号的比率,即(665nm 信号/620nm 信号)×10⁴数值。不同浓度下待测样本测定的665nm 信号/620nm 信号数值的平均值为F,先计算待测多肽各个浓度相对于阳性对照样品人内皮素ET1的激活率,以此激活率为纵坐标,以多肽浓度的对数值为横坐标,绘制点图,采用Prism软件中四参数拟合的方法拟合生成曲线,计算多肽对人ETB受体的EC50值。

对犬、大鼠和小鼠ETB受体活性EC50测定的操作同上,仅转染质粒分别为含犬ETB受体基因的表达载体PCDNA3.1-DET(犬ETB序列,NCBI登录号:NM_001010943.2),含大鼠ETB受体基因的表达载体PCDNA3.1-RETB(大鼠ETB受体序列,NCBI登录号:X57764.1),含小鼠ETB受体基因的表达载体PCDNA3.1-mETB(小鼠ETB序列,NCBI登录号:NM_001276296)。

为得到更可靠的数据,在同一次实验中对测试,并进行多次重复,选取曲线拟合最好的三次数据进行平均,得到的均值作为最终细胞活性结果,如表1和图1至图4所示。

表1 BX-229-Na和IRL-1620对ETB受体的激动活性(EC50, nM)

	人	犬	大鼠	小鼠
IRL-1620	15.50±3.26	18.33±3.46	6.08±1.99	12.45±6.81
BX-229-Na	19.77±9.20	8.89±7.90	7.86±0.99	5.33±3.40

实施例3: BX-229-Na对人ETA受体的活性

本实施例测试了实施例1所制备的BX-229-Na对人ETA受体的活性。

293T-17细胞按照每孔65万铺于6孔板,37℃,5%CO₂培养箱中培养过夜后,转染含人ETA受体基因的表达载体PCDNA3.1-hETA(hETA序列,NCBI登录号:L06622.1),每孔转染2.5μg质粒,继续培养48h,在荧光显微镜下观察细胞表达绿色荧光后,用胰酶消化并计数。BX-229-Na对人ETA受体的活性测定采用Cisbio Bioassays的IP-One Gq试剂盒,用试剂盒中的Stim Buffer悬浮细胞,将细胞悬液加入96孔检测板,每个孔加入7μL细胞悬液(含3万细胞),将实施例1所制备的多肽

BX-229-Na 及阳性对照多肽人内皮素 ET1(SEQ ID NO.: 2)分别用 Stim B 溶解为 2× 的浓度，加 7μL 于上述待测细胞中，阴性对照孔加 7μL 入 PBS 溶液于上述细胞中。封板于 37℃ 的细胞培养箱中孵育 1h。检测测试孔、阳性对照孔、PBS 对照孔各添加 3μL IP1 d2 工作液和 3μL IP1 Tb cryptotat Antibody 工作液。封板避光室温(25℃±5℃)作用 1h。拆下板密封，在 ID5 酶标仪上测定吸光度为 665nm 和 620nm 数值。计算每个孔受体和供体发射信号的比率，即(665nm 信号/620nm 信号)×10⁴ 数值。特定浓度下待测样本测定的 665nm 信号/620nm 信号数值的平均值为 F3、同等浓度阳性对照品人内皮素 ET1 测定的 665nm 信号/620nm 信号数值平均值为 F5，PBS 阴性对照测定的 665nm 信号/620nm 信号数值平均值为 T3。待测多肽样品相对于阳性对照样品 ET1 的活性百分比=(F3-T3)×100/(F5-T3)，结果见表 2，表明 BX-229-Na 为 ETB 受体选择性激动剂。

表 2 BX-229-Na 对人 ETA 受体的活性

	hETAR激动活性	MW
BX-229-Na	0.68%@100μM	2276

实施例4: BX-229多肽的半衰期测定

本实施例测试了实施例 1 所制备的多肽 BX-229 的半衰期，并与对照 IRL-1620 进行对比。

血浆样本给药及处理方法: 分别采用 BX-229 和对照 IRL-1620 注射 3 只 C57 BL/6 小鼠，60μg/mL，每只鼠注射 200μL，注射药物后 1min，5min，15min，30min 采血，采血后立即加入蛋白酶抑制剂，3200rpm，4 度离心 10min。取血浆后加入 2 倍体积的乙腈沉淀蛋白后 10000rpm 离心 5min，0.22μm 滤器过滤后，上液质联用仪器检测，根据对照药品和检测药品的积分面积计算血药浓度，不同药物各个时间点的 3 个检测值计算平均值。同时准备空白鼠血浆沉淀蛋白后样本作为对照，结果见表 3。

表 3 BX-229 和 IRL-1620 的半衰期数据

化合物编号	静脉给药剂量	半衰期(min)	AUC _{last 0-30 min} (ng.h/mL)
IRL-1620	0.48 mpk	<2.6	130
BX-229	1 mpk	77	3393

液质联用检测条件:

仪器型号: Agilent InfinityLab LC/MSD 1260-G6125C

色谱柱: Poroshell 120 SB-C18 4.6*100mm, 2.7μm

流动相 A: 0.1%甲酸-超纯水 流动相 B: 0.1%甲酸-乙腈

梯度设置:

时间(min)	A 相	B 相	流速
0	90%	10%	0.4mL/min
18	0	100%	0.4mL/min
20	0	100%	0.4mL/min

柱温: 45℃; 进样量: 20μl;

离子源: ESI; 干燥器温度: 350℃; 干燥器流量: 12L/min; 雾化压力: 45psi; 毛细管电压: 4000v。

扫描类型：SIM；碎裂电压：135v；扫描/驻留时间：200ms。

实施例5: BX-229多肽静脉给药急性毒性初步研究

本实施例进行了实施例1所制备的BX-229多肽的静脉给药急性毒性初步研究，并与IRL-1620进行对比。

静脉给药急性毒性实验中,雄性 SD 大鼠,体重 200-230g,给药量范围为 120μg/Kg 至 30μg/Kg 之间,从高剂量到低剂量分别给药 BX-229 和对照 IRL-1620,尾静脉注射给药,给药后观察 24h,如果某一给药剂量出现大鼠死亡,降低给药剂量注射观察。初步观察大鼠的毒性反应和死亡情况,统计大鼠死亡时间和不出现死亡的剂量。通过大鼠不出现死亡的剂量,初步判定多肽急性毒性的大小,结果见表 4。急性毒性研究显示,大鼠能耐受 IRL-1620 和 BX-229 的最大耐受剂量分别为 30μg/Kg、60μg/Kg, BX-229 多肽注射 SD 大鼠的最大耐受剂量明显优于 IRL-1620。

表 4 BX-229 和 IRL-1620 静脉给药急性毒性试验结果

药物	动物编号	静脉给药剂量	动物状态观察记录
IRL-1620	1	120μg/Kg	给药后 5 分钟呼吸急促, 身体发紫, 持续 4 分钟后死亡
	2	60μg/Kg	给药后 3 分钟呼吸急促, 持续 5 分钟后死亡
	3	30μg/Kg	给药后 13 分钟呼吸急促, 持续 17 分钟不喜动, 1.5 小时恢复正常
	4	30μg/Kg	给药后 15 分钟呼吸急促, 持续 10 分钟不喜动, 1.5 小时恢复正常
	5	30μg/Kg	给药后 25 分钟趴卧不动, 持续 65 分钟不喜动, 第 2 天早晨死亡(估计在夜间死亡)
BX-229	1	120μg/Kg	给药后 26 分钟死亡, 鼻腔有白色分泌物, 腹泻
	2	120μg/Kg	给药后 26 分钟死亡, 鼻腔有白色分泌物, 腹泻
	3	90μg/Kg	给药后 1 小时死亡
	4	90μg/Kg	给药后 25 分钟呼吸急促, 持续 25 分钟后逐渐恢复, 不喜动
	5	90μg/Kg	给药后 1 小时呼吸急促, 皮肤发紫, 持续 30 分钟后逐渐恢复
	6	90μg/Kg	给药后 45 分钟呼吸急促, 腹泻, 持续 25 分钟后逐渐恢复
	7	90μg/Kg	给药后 44 分钟呼吸急促, 持续 8 分钟后抽搐死亡
	8	90μg/Kg	给药后 43 分钟呼吸急促, 持续 30 分钟后逐渐恢复
	9	60μg/Kg	给药后 1 小时内无明显反应, 1 小时后呼吸急促, 持续 10 分钟后逐渐恢复正常
	10	60μg/Kg	给药后 1 小时内无明显反应, 1 小时后呼吸急促, 持续 10 分钟后恢复正常

实施例6: BX-229多肽皮下给药急性毒性初步研究

本实施例进行了实施例 1 所制备的 BX-229 多肽的皮下给药急性毒性初步研究，并与 IRL-1620 进行对比。

皮下给药急性毒性实验中，雄性 SD 大鼠，体重 200-230g，给药量范围为 60μg/Kg 至 960μg/Kg 之间，分别皮下给药 BX-229 和对照 IRL-1620 后观察 48h。初步观察大鼠的毒性反应和死亡情况，统计大鼠死亡时间和不出现死亡的剂量。通过大鼠不出现死亡的剂量，初步判定多肽急性毒性的大小。实验结果见表 5。由表中结果可见，BX-229 多肽皮下给药的急性毒性远远小于 IRL-1620。

表 5 BX-229 和 IRL-1620 皮下给药急性毒性试验结果

药物	动物编号	静脉给药剂量	动物状态观察记录
IRL-1620	1	60μg/Kg	给药后 25 分钟呼吸急促，持续 15 分钟后恢复正常
	2	60μg/Kg	给药后 26 分钟呼吸急促，持续 16 分钟后恢复正常
	3	60μg/Kg	给药后 25 分钟呼吸急促，持续 15 分钟后恢复正常
	4	60μg/Kg	给药后 30 分钟呼吸急促，持续 17 分钟后恢复正常
	5	60μg/Kg	给药后 25 分钟呼吸急促，持续 16 分钟后恢复正常
	6	120μg/Kg	给药后 26 分钟呼吸急促，持续 23 分钟后死亡
	7	120μg/Kg	给药后 26 分钟呼吸急促，持续 24 分钟后逐渐恢复
	8	120μg/Kg	给药后 26 分钟呼吸急促，持续 26 分钟后死亡
	9	120μg/Kg	给药后 28 分钟呼吸急促，持续 22 分钟后逐渐恢复
	10	120μg/Kg	给药后 27 分钟呼吸急促，持续 23 分钟后逐渐恢复
BX-229	1	120μg/Kg	给药后观察 24 小时无明显反应
	2	120μg/Kg	给药后观察 24 小时无明显反应
	3	240μg/Kg	给药后观察 48 小时无明显异常反应
	4	240μg/Kg	给药后观察 48 小时无明显异常反应
	5	480μg/Kg	给药后观察 48 小时无明显异常反应
	6	480μg/Kg	给药后观察 48 小时无明显异常反应
	7	960μg/Kg	给药后观察 2 小时无明显异常反应，10 分钟后死亡
	8	960μg/Kg	给药后观察 48 小时无明显异常反应
	9	960μg/Kg	给药后观察 48 小时无明显异常反应
	10	960μg/Kg	给药后观察 48 小时无明显异常反应

	11	960μg/Kg	给药后观察 48 小时无明显异常反应
--	----	----------	--------------------

实施例7: BX-229多肽静脉给药对SD大鼠血压的影响

本实施例测试了实施例 1 所制备的 BX-229 多肽静脉给药对 SD 大鼠血压的影响，并与 IRL-1620 进行对比。

SD 雄性大鼠通过异氟烷麻醉后，颈部备毛，沿颈部正中开口，暴露气管；打开小动物呼吸机和麻醉机，麻醉机气麻浓度设置为 1.2；出口通道连接呼吸机进气口；呼吸机潮气量设置为 2mL，呼吸频率为 90 次/min，呼吸比为 1: 2；呼吸机出气端连接塑料软管，将塑料软管插进大鼠气道中。

打开生物信号数据采集和分析系统机器和软件，数据采集板一端与塑料软管连接，另一端与连接有 1mL 注射器的联通器阀门连接，将注射器中注满带有肝素的生理盐水；将肝素生理盐水注入数据采集板，排出整个空间内的空气，直到肝素生理盐水从另一端塑料软管口流出；游离出大鼠右颈总动脉，颈总动脉远心端打死结，近心端打活结，用显微剪在结点中间的动脉上剪开 1/2 大小的口子，将有肝素生理盐水的塑料软管插入剪开的口子并固定，使软管不能随意前后挪动；用生物信号数据采集和分析系统的调零阀将初始值血压归零；打开颈总动脉近心端活结，可见软件出现动物实时血压数据，等待动物血压趋于稳定后，尾静脉给药实时观察记录动物血压变化。IRL-1620 给药剂量 5μg/Kg，BX-229 给药剂量 6.6μg/Kg。

结果见表 6。可见，5μg/Kg IRL620、6.6μg/Kg BX-229 多肽对大鼠血压有一定影响，能引起血压的降低，5μg/Kg IRL620 给药后能引起大鼠血压瞬时较快的变化，2min 内就降到最低血压，血压最大降低幅度为基线血压的 16.1%±2.4%，6.6μg/Kg BX-229 对大鼠血压的影响较为平缓，血压缓慢降低，20-35 分钟内缓慢降低到最低血压，血压最大降低幅度分别为基线血压的 17.0%±2.0%。

表 6 BX-229 和 IRL-1620 静脉给药对 SD 大鼠血压的影响

药物(给药浓度)	IRL-1620(5μg/Kg)	BX-229(6.6μg/Kg)
血压降低基线血压百分比的最大值(n=3)	16.1%±2.4%	17.0%±2.0%
从基线血压降到最低血压的时间	小于 2 分钟	20-30 分钟

实施例 8: BX-229 多肽不同盐型稳定性对比实验

1、制备样品:

配液: 分别称取 1mg 原料至 1.5mL 离心管中，加入 1mL 生理盐水溶解；每个原料配 3 份溶液，分别在 40℃、25℃、5℃条件下各放置 1 管；

粉末: 分别称取 1mg 原料至 1.5mL 离心管中，每个原料配 6 份溶液；
分别在 40℃、25℃条件下各放置 3 管；

2、检测方法: HPLC 法

柱子: Poroshell 120 SB-C18 2.7μm 4.6*100mm

梯度: 10-100%B 0-10min 流速: 2ml/min

柱温: 35℃

进样体积: 5μL

流动相 A: 0.05%TFA-2%乙腈-98%超纯水

流动相 B: 0.05%TFA-10%超纯水-90%乙腈

3、检测结果:

HPLC 检测不同条件下放置后的不同盐型样品纯度(%), 如表 11 所示:

表 7 不同条件下放置后的 BX-229 多肽盐型样品纯度(%)

	钠盐粉末	钾盐粉末	铵盐粉末	钠盐溶液	钾盐溶液	铵盐溶液
0 天	99.6	99.6	97.23	99.6	99.6	97.23
40°C, 1 周	99.6	99.6	97.92	99.6	99.6	94.26
40°C, 2 周	99.6	99.6	97.96	98.74	99.67	94.69
40°C, 4 周	99.4	99.42	96.51	97.53	97.86	79.51
25°C, 1 个月	99.76	99.63	97.81	99.64	98.42	88.51

可见, 40°C下放置 1 周或 2 周, 钠盐、钾盐粉末稳定, 铵盐粉末不太稳定; 钠盐、钾盐溶液稳定, 铵盐溶液不稳定。40°C下放置 4 周, 钠盐、钾盐粉末稳定, 铵盐粉末不太稳定。钠盐、钾盐溶液不太稳定, 铵盐溶液很不稳定。25°C下放置 1 个月, 钠盐、钾盐粉末稳定, 铵盐粉末不太稳定; 钠盐溶液稳定。

实施例9: BX-229钠盐一周三次皮下给药对小鼠tMCAO 模型的药效

本实施例测试了实施例 1 所制备的 BX-229 钠盐(BX-229-Na)对小鼠 tMCAO 模型的药效。

雄性 C57 /6J 小鼠 51 只, 10-12 周龄, 体重 25-30g, 实验前, 饲养至少 2D 以适应环境(斯贝福)。建立 tMCAO 小鼠模型, 小鼠采用异氟烷麻醉。体温由恒温毯控制, 监测小鼠体温并维持体温在 37±0.5°C。在小鼠颅骨上的皮肤上做正中切口, 并向外侧牵拉皮肤, 将可弯曲的微针尖固定在小鼠颅骨左侧顶骨表面。颈部正中切口分离右侧颈总动脉(CCA)、颈外动脉(ECA)和颈内动脉(ICA)。根据 Longa 的方法(Longa et al., 1989), 通过颈外动脉切开术引入硅橡胶涂层的线栓(瑞沃德, 线头直径 0.22mm-0.23mm, MSMC23B120PK50), 并通过颈内动脉缓慢地向大脑中动脉的起始部推进。为了确保大脑中动脉的持续成功阻断, 使用激光散斑血流仪监测所有卒中动物的局部脑血流(通常稳定后, 血流能降低 40-60%), 建模插栓后 45min 拔栓, 缝合切口后, 皮下注射 1mL 37°C温生理盐水, 小鼠置于加热垫上直至恢复。为了减轻疼痛, 麻醉苏醒后给小鼠皮下注射痛立定。建模当天定义为 D1, 第二天为 D2, 依次类推。

将建模成功的 C57 tMCAO 小鼠随机分为 3 组, 生理盐水组、30µg/Kg 的 BX-229-Na 给药组、100µg/Kg 的 BX-229-Na 给药组, 各组分别于栓塞后 4.5h 颈部皮下给药 1 次(D1), D3 和 D6 相同时间点相同部位再各给药一次。本次实验分组及给药方案见表 8。假手术组 6 只。按 2mL/kg 颈部皮下注射给药。给药后 7D 和 14D 完成 Garcia JH 评分。14D 评分结束后, 小鼠安乐死, 取梗死侧脑组织, 提取总蛋白, ELISA 的方法检测各实验组 VEGF-A 和 BDNF 蛋白标志物的变化。

表 8 实验分组及给药方案

组别	数量	t-MCAO 建立	CPD	剂量 (µg/kg)	体积 (mL/kg)	给药频率
1	15	tMCAO	生理盐水	-	2	D1: tMCAO 栓塞后 4.5 h 颈部皮下 2 点注射, D3 和
2	15	tMCAO	BX-229	30	2	

组别	数量	t-MCAO 建立	CPD	剂量 (μg/kg)	体积 (mL/kg)	给药频率
3	15	tMCAO	BX-229	100	2	D6: 按照 D1 相同时间点和部位各给药 1 次
4	6	假手术	生理盐水	-	2	

实验结果显示, 从 7D Garcia JH-15 分评分结果分析, 假手术组和生理盐水溶剂对照组 7D 评分有显著差异, BX-229-30μg/Kg 和 BX-229-100μg/Kg 给药组的评分结果好于生理盐水组, 有一定的剂量依赖趋势, BX-229-100μg/Kg 给药组 Garcia JH-15 分评分总分比生理盐水组高 1 分。从 14D Garcia JH-15 分评分结果分析, 假手术组和生理盐水溶剂对照组 14D 评分有显著差异, BX-229-30μg/Kg 和 BX-229-100μg/Kg 给药组的评分结果好于生理盐水组, 有剂量依赖关系, BX-229-100μg/Kg 给药组 Garcia JH-15 分评分和生理盐水组相比有显著差异(P<0.05)。结果见图 5 和图 6。

结果显示, BX-229-Na-30μg/Kg 三次给药组, BX-229-Na-100μg/Kg 三次给药组 VEGF-A 和 BDNF 蛋白的表达量较生理盐水组相比有一定提高, BX-229-Na-100μg/Kg 三次给药组 VEGF-A 蛋白的表达量高于假手术组, 和生理盐水组相比有显著差异。BX-229-Na-100μg/Kg 三次给药组 BDNF 蛋白的表达量高于假手术组。结果请参见图 7 和图 8, 以及表 9 和表 10。

表 9 VEGF-A 蛋白表达量的变化

组别	VEGF-A pg/ml
1	426±115
2	441±102
3	562±56
4	505±122

表 10 BDNF 蛋白表达量的变化

组别	BDNF pg/ml
1	977±459
2	1103±582
3	1334±665
4	1093±151

实施例10: BX-229钠盐皮下给药和IRL-1620静脉给药对tMCAO小鼠模型的药效

本实施例测试了实施例 1 所制备的 BX-229 钠盐(BX-229-Na)皮下给药对小鼠 tMCAO 模型的药效, 并与 IRL-1620 静脉给药(IRL-1620 的给药方式和剂量来自于临床给药信息推导的动物等效方法)进行对比。tMCAO 小鼠建模方法参照实施例 9。

手术后将建模成功的 tMCAO 小鼠随机分为模型组和不同处理组。实验详细分组如下: (1)2.7μg/Kg 的 IRL-1620 给药组建模后 D1, D3, D6 天每天三次给药, D1 天建模后 2 小时静脉给药, 此后每隔 2 小时各给药 1 次, D3 和 D6 给药时间同 D1; (2)30μg/Kg 的 BX-229 给药组 D1-D7 天连续 7 天给药, D1 天给药时间为建模后 4.5 小时皮下给药 1 次, D2-D7 天给药时间同 D1; (3)模型(生理盐水)组; 以及(4)假手术组(假手术组使用同样的方式不结扎血管不插入线栓)。模型组和假手术组给予相同剂量的溶媒生理盐水。

结果显示, 30μg/Kg 的 BX-229-Na 给药组 D1-D7 天连续 7 天皮下给药组第 7 天神经行为学评分好于 3×2.7μg/Kg 的 IRL-1620 D1、D3 和 D6 天静脉给药组, 小鼠各项功能较 IRL-1620 组有较大的改善, 神经行为学评分有较大的恢复, 具体见图 9。可见,

相比之下，BX-229-Na 采用皮下给药的方式，且给药频次更低，使用更方便，患者依从性更好。

以上对本发明所提供的多肽及其应用进行了详细介绍。本文应用了具体个例对本发明的原理及实施方式进行了阐述，以上实施例的说明只是用于帮助理解本发明的方法及其核心思想。应当指出，对于本技术领域技术人员来说，在不脱离本发明原理的前提下，还可以对本发明进行若干改进和修饰，这些改进和修饰也落入本发明权利要求的保护范围内。

权 利 要 求

1、多肽的药学上可接受的盐，其中所述多肽包含氨基酸序列 Fum-DEEAVYFAHK (-AEEA- γ E-C12)DVIW(SEQ ID NO: 1)或其功能性变体，所述药学上可接受的盐选自钠盐、钾盐、铵盐、三氟乙酸盐、醋酸盐、盐酸盐、硫酸盐和磷酸盐。

2、如权利要求 1 所述的多肽药学上可接受的盐，所述药学上可接受的盐选自钠盐、钾盐和铵盐，优选为钠盐。

3、如权利要求 1 或 2 所述的药物组合物，所述多肽的功能性变体为 SEQ ID NO: 1 中 D 和 E 之间的取代，V、L 和 I 之间的取代，Y、F 和 W 之间的取代，H、K 和 R 之间的取代，或它们的任意组合，并且所述多肽的功能性变体具有与 SEQ ID NO: 1 相同或相似的 ETBR 受体激活活性。

4、制备权利要求 1 至 3 任一项所述的多肽的药学上可接受的盐的方法，其包括以下步骤：

经固相多肽合成，获得所述多肽的肽树脂；

裂解并纯化，获得所述多肽；以及

由所述多肽制备盐。

5、药物组合物，其包含权利要求 1-3 中任一项所述的多肽的药学上可接受的盐，以及药学上可接受的载体、赋形剂和/或稀释剂。

6、如权利要求 5 所述的药物组合物，其中所述药物组合物为预冻干制剂的形式，或冻干制剂的形式，或冻干制剂与水溶液相结合而获得的复原制剂的形式。

7、如权利要求 6 所述的药物组合物，其中所述药物组合物包含氯化钠；和/或任选地，所述药物组合物包含海藻糖和/或环糊精。

8、权利要求 1 至 3 中任一项所述的多肽的药学上可接受的盐，或权利要求 5 至 7 中任一项所述的药物组合物在制备治疗与 ETBR 受体相关的疾病的药物中的用途；

优选地，其中所述与 ETBR 受体相关的疾病包括神经系统损伤及该损伤引起的相关的疾病、神经退行性疾病、焦虑、癫痫、主动脉瓣狭窄或新生儿缺氧缺血性脑病中的一种或多种；

更优选地，所述神经系统损伤及该损伤引起的相关的疾病包括脑卒中、脊髓损伤、脑或脊髓的缺血性或创伤性损伤以及中枢神经系统(CNS)神经元的损伤；所述神经退行性疾病包括阿尔茨海默氏病、肌萎缩性侧索硬化症(ALS)、帕金森氏病或亨廷顿氏病；

更优选地，所述脑卒中包括缺血性脑卒中、出血性脑卒中和由缺血性卒中转化的出血性卒中。

9、药物，其特征在于，其包括：权利要求 1 至 3 中任一项所述的多肽的药学可接受的盐，或权利要求 5 至 7 中任一项所述的药物组合物，

药学上可接受的辅料或助剂，以及

任选的其他任意有效成分。

10、治疗与 ETBR 受体相关疾病的方法，其特征在于，其包括向受试者施用权利要求 1 至 3 中任一项所述的多肽的药学上可接受的盐；权利要求 5 至 7 中任一项所述的药物组合物，或权利要求 9 所述的药物；

优选地，所述与 ETBR 受体相关疾病包括神经系统损伤及该损伤引起的相关的疾病、神经退行性疾病、焦虑、癫痫、主动脉瓣狭窄或新生儿缺氧缺血性脑病中的一种

或多种;

更优选地,所述神经系统损伤及该损伤引起的相关的疾病包括脑卒中、脊髓损伤、脑或脊髓的缺血性或创伤性损伤以及中枢神经系统(CNS)神经元的损伤;

更优选地,所述神经退行性疾病包括阿尔茨海默氏病、肌萎缩性侧索硬化症(ALS)、帕金森氏病或亨廷顿氏病;

更优选地,所述脑卒中包括缺血性脑卒中、出血性脑卒中和由缺血性卒中转化成的出血性卒中。