

## 一种化学修饰的多肽

本公开要求 2023 年 12 月 1 日提交的中国专利申请 CN202311639052.9 的优先权, 前述专利申请的全部内容通过引用并入本公开。

### 技术领域

本申请属于生物医药技术领域, 涉及一种化学修饰的多肽, 更具体涉及一种可用于治疗创伤性脑损伤和/或创伤性脑损伤后抑制神经损伤的修饰肽及其用途。

### 背景技术

创伤性脑损伤 (Traumatic Brain Injury, TBI) 是外界暴力直接或间接作用于头部所造成的损伤, 是儿童和年轻人的主要死亡原因之一。TBI 是一种严重的公共健康问题, 目前很少有措施可以用来反转由创伤所引起的初始脑损伤。由于严重受损并且可利用的治疗方法有限, 幸存者往往也患有运动性残疾、认知缺损和癫痫症等后遗症。TBI 的神经、经济和社会后果对于患者、患者家庭和整个社会而言都是破坏性的。

据不完全统计, 在中国因颅脑损伤致残者累计有 150-200 万, 每年新增 8-10 万; 每年有 20 万人因伤致死。在全部死亡者中约 60%-80% 是因颅脑损伤致死, 17% 因颅脑损伤致残。脊髓伤致残者累计有 50-60 万, 每年新增 23 万, 由此造成的医疗消耗高达 2000-3000 亿元/年。这些统计数据表明, 对于提高创伤后功能恢复的有效治疗手段存在迫切的需求。

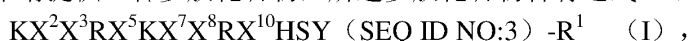
CN103230581A 提供了一种采用短肽序列 (KKNRNKLRRQHSY (SEQ ID NO:1)) 用于创伤性脑损伤后抑制神经细胞损伤的用途。

CN111363014A 提供了一种采用短肽序列 (YGRKKRRQRRRKKNRNKLRRQHSY (SEQ ID NO:2)), 该短肽可抑制创伤性脑损伤后坏死性神经细胞的死亡。

尽管有这些发现, 但对于具有以下性质中的一种或多种的短肽序列仍然存在需求: 进一步提高的多肽生物活性、改善的多肽稳定性、能够跨细胞膜、和减小的副作用。

### 发明内容

第一方面, 本申请提供一种多肽化合物, 所述多肽化合物含有通式 (I) 所示的结构:



其中, X<sup>2</sup> 选自 Lys、HoLys、Dap、DAB、Cit、Orn、D-Lys、D-HoLys、D-Dap、D-DAB、D-Cit、D-Orn 或侧链氨基被 Z1 修饰的 Lys; X<sup>3</sup> 和 X<sup>5</sup> 独立的选自 Asn、Asp、D-Asn 或 D-Asp; X<sup>7</sup> 选自 Ile、Leu、Val、Tel、D-Ile、D-Leu、D-Val 或 D-Tel; X<sup>8</sup> 选自 Arg、HomoArg、D-Arg 或 D-HomoArg; X<sup>10</sup> 选自 Glu、Gln、D-Glu 或 D-Gln;

R<sup>1</sup> 选自 -OH、-ol、-NR<sup>2</sup>R<sup>3</sup> 和 -OR<sup>4</sup>, 其中, R<sup>2</sup> 和 R<sup>3</sup> 分别独立地选自氢、C<sub>1-16</sub> 烷基、C<sub>3-12</sub> 环烷基和 3 至 12 元杂环烷基, 或者 R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup> 与相连的氮原子共同形成 3 至 12 元杂环烷基; R<sup>4</sup> 选自 C<sub>1-16</sub> 烷基、C<sub>3-12</sub> 环烷基和 3 至 12 元杂环烷基;

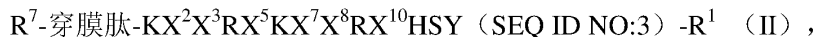
所述烷基、环烷基、杂环烷基任选的被一个或多个相同或不同的 R<sup>5</sup> 取代, R<sup>5</sup> 选自卤素、硝基、氰基、羟基、羰基、羧基、-NR<sub>a</sub>R<sub>b</sub>、巯基、C<sub>1-8</sub> 烷基、C<sub>1-8</sub> 烷氧基、卤代 C<sub>1-8</sub> 烷基、卤代 C<sub>1-8</sub> 烷氧基、C<sub>3-8</sub> 环烷基、C<sub>3-8</sub> 环烷基氧基、3 至 8 元杂环烷基、-SC<sub>1-3</sub> 烷基、-SO<sub>2</sub>C<sub>1-3</sub> 烷基、-SO<sub>2</sub>NR<sub>a</sub>R<sub>b</sub>、-S(O)C<sub>1-3</sub> 烷基、-C(O)NR<sub>a</sub>R<sub>b</sub>、-C(O)C<sub>1-3</sub> 烷基、-C(O)OC<sub>1-3</sub> 烷基、-OC(O)C<sub>1-3</sub> 烷基、C<sub>6-10</sub> 芳基、5 至 10 元杂芳基;

$R_a$ 、 $R_b$  各自独立地为氢或  $C_{1-8}$  烷基；或者  $R_a$ 、 $R_b$  与相连的氮原子共同形成 3 至 6 元杂环烷基；以及

$Z^1$  选自 -AEEA-COR<sup>6</sup>，其中， $R^6$  为  $C_{1-15}$  的烷基。

在一些具体实施方案中，所述多肽化合物在其 N 端或 C 端进一步包含穿膜肽。

在一些具体实施方案中，在所述多肽化合物 N 端包含穿膜肽，且所述穿膜肽的 N 端被  $R^7$  基团修饰，所述多肽化合物的结构如通式 (II) 所示：



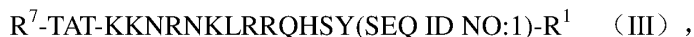
其中， $R^7$  选自氢、 $C_{1-16}$  烷基、 $C_{3-12}$  环烷基、3 至 12 元杂环烷基、 $R^8\text{CO-}$ 、和磷酸基，其中  $R^8$  选自  $C_{1-16}$  烷基、 $C_{3-12}$  环烷基和 3 至 12 元杂环烷基、 $C_{6-10}$  芳基、5 至 10 元杂芳基。

在一些具体实施方案中，所述多肽化合物在其 C 端包含穿膜肽，即在  $KX^2X^3RX^5KX^7X^8RX^{10}\text{HSY (SEQ ID NO:1)}$  与  $R^1$  基团之间包含穿膜肽。

在一些具体实施方案中，通式 (II) 中的穿膜肽选自 TAT 序列、MAP 序列、MTS 序列或 R9 序列或其变体。

在一些具体实施方案中，通式 (II) 中的穿膜肽为 TAT 序列或其变体，所述 TAT 序列至少包括转录反式激活蛋白中的第 49-57 位氨基酸片段。

在一些具体实施方案中，通式 (II) 所示多肽化合物中的穿膜肽为 TAT 序列，其中， $X^2$  选自 Lys； $X^3$  和  $X^5$  选自 Asn； $X^7$  选自 Leu； $X^8$  选自 Arg； $X^{10}$  选自 Gln；所述多肽化合物的结构如通式 (III) 所示：



其中，TAT 与 KKNRNKLRRQHSY (SEQ ID NO:1) 通过主链酰胺键连接，所述主链酰胺键中氮原子任意的被  $C_{1-3}$  烷基化，优选甲基化；

所述通式 (III) 中， $R^1$  选自 -OH、-ol、-NR<sup>2</sup>R<sup>3</sup> 和 -OR<sup>4</sup>，其中  $R^2$  和  $R^3$  分别独立地选自氢、 $C_{1-16}$  烷基、 $C_{3-12}$  环烷基和 3 至 12 元杂环烷基，或者  $R^2$ 、 $R^3$  与相连的氮原子共同形成 3 至 12 元杂环烷基； $R^4$  选自  $C_{1-16}$  烷基、 $C_{3-12}$  环烷基和 3 至 12 元杂环烷基；

所述烷基、环烷基、杂环烷基任意的被一个或多个相同或不同的  $R^5$  取代；

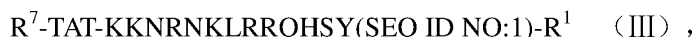
$R^5$  选自卤素、硝基、氰基、羟基、羰基、羧基、-NR<sub>a</sub>R<sub>b</sub>、巯基、 $C_{1-8}$  烷基、 $C_{1-8}$  烷氧基、卤代  $C_{1-8}$  烷基、卤代  $C_{1-8}$  烷氧基、 $C_{3-8}$  环烷基、 $C_{3-8}$  环烷基氧基、3 至 8 元杂环烷基、-SC<sub>1-3</sub> 烷基、-SO<sub>2</sub>C<sub>1-3</sub> 烷基、-SO<sub>2</sub>NR<sub>a</sub>R<sub>b</sub>、-S(O)C<sub>1-3</sub> 烷基、-C(O)NR<sub>a</sub>R<sub>b</sub>、-C(O)C<sub>1-3</sub> 烷基、-C(O)OC<sub>1-3</sub> 烷基、-OC(O)C<sub>1-3</sub> 烷基、 $C_{6-10}$  芳基、5 至 10 元杂芳基；

$R_a$ 、 $R_b$  各自独立地为氢或  $C_{1-8}$  烷基；或者  $R_a$ 、 $R_b$  与相连的氮原子共同形成 3 至 6 元杂环烷基；且  $R^7$  为氢时， $R^1$  不为 -OH；所述 TAT 序列至少包括转录反式激活蛋白中的第 49-57 位氨基酸片段；

$R^7$  选自氢、 $C_{1-16}$  烷基、 $C_{3-12}$  环烷基、3 至 12 元杂环烷基、 $R^8\text{CO-}$ 、和磷酸基，其中  $R^8$  选自  $C_{1-16}$  烷基、 $C_{3-12}$  环烷基和 3 至 12 元杂环烷基、 $C_{6-10}$  芳基、5 至 10 元杂芳基。

在一些具体实施方案中，本申请的通式 (III) 所示的化合物还可选自为其变体形式或者药学上可接受的盐。

在一些具体实施方案中，本申请提供了一种多肽化合物或其变体，或药学上可接受的盐，所述多肽化合物的结构如通式 (III) 所示：



其中，TAT 与 KKNRNKLRRQHSY (SEQ ID NO:1) 通过主链酰胺键连接，所述主链酰胺键中氮原子任意的被  $C_{1-3}$  烷基化，优选甲基化；

$R^7$  选自氢、 $C_{1-16}$  烷基、 $C_{3-12}$  环烷基、3 至 12 元杂环烷基、 $R^8CO-$ 、和磷酸基，其中  $R^8$  选自  $C_{1-16}$  烷基、 $C_{3-12}$  环烷基和 3 至 12 元杂环烷基、 $C_{6-10}$  芳基、5 至 10 元杂芳基；

$R^1$  选自  $-OH$ 、 $-ol$ 、 $-NR_2R_3$  和  $-OR_4$ ，其中  $R^2$  和  $R^3$  分别独立地选自氢、 $C_{1-16}$  烷基、 $C_{3-12}$  环烷基和 3 至 12 元杂环烷基，或者  $R^2$ 、 $R^3$  与相连的氮原子共同形成 3 至 12 元杂环烷基； $R^4$  选自  $C_{1-16}$  烷基、 $C_{3-12}$  环烷基和 3 至 12 元杂环烷基；

所述烷基、环烷基、杂环烷基任选的被一个或多个相同或不同的  $R^5$  取代；

$R^5$  选自卤素、硝基、氰基、羟基、羰基、羧基、 $-NR_aR_b$ 、巯基、 $C_{1-8}$  烷基、 $C_{1-8}$  烷氧基、卤代  $C_{1-8}$  烷基、卤代  $C_{1-8}$  烷氧基、 $C_{3-8}$  环烷基、 $C_{3-8}$  环烷基氧基、3 至 8 元杂环烷基、 $-SC_{1-3}$  烷基、 $-SO_2C_{1-3}$  烷基、 $-SO_2NR_aR_b$ 、 $-S(O)C_{1-3}$  烷基、 $-C(O)NR_aR_b$ 、 $-C(O)C_{1-3}$  烷基、 $-C(O)OC_{1-3}$  烷基、 $-OC(O)C_{1-3}$  烷基、 $C_{6-10}$  芳基、5 至 10 元杂芳基；

$R_a$ 、 $R_b$  各自独立地为氢或  $C_{1-8}$  烷基；或者  $R_a$ 、 $R_b$  与相连的氮原子共同形成 3 至 6 元杂环烷基；且  $R^7$  为氢时， $R^1$  不为  $-OH$ ；所述 TAT 序列至少包括转录反式激活蛋白中的第 49-57 位氨基酸片段。

在一些具体实施方案中，所述 TAT 序列选自 YGRKKRRQRRR (SEQ ID NO:4)、GRKKRRQRRR (SEQ ID NO:33)、YGRKKRRQRRRPPQ (SEQ ID NO:34) 或 GRKKRRQRRRQ (SEQ ID NO:35) 的短肽。

在一些具体实施方案中，所述 TAT 序列的变体为所述 TAT 序列中具有 1、2 或 3 个氨基酸取代、添加或删除。

在一些具体实施方案中，所述 TAT 序列的变体具有选自与 YGRKKRRQRRR (SEQ ID NO:4) 具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 99% 或 100% 同一性的序列。

在一些具体实施方案中，所述 TAT 序列的变体为所述 TAT 序列中至少一个 Gln 替换为 Glu、和/或至少一个 L-Arg 替换为 D-Arg、和/或至少一个 L-Lys 替换为 D-Lys 的氨基酸序列。

在一些具体实施方案中， $R^1$  选自  $-OH$ 、 $-NR^2R^3$ ，其中  $R^2$  和  $R^3$  分别独立地选自氢、 $C_{1-3}$  烷基。

在一些具体实施方案中， $R^1$  选自  $-OH$  或  $-NH_2$ 。

在一些具体实施方案中， $R^1$  为  $-OH$ 。

在一些具体实施方案中， $R^1$  为  $-NH_2$ 。

在另一些具体实施方案中， $R^7$  选自氢、甲基、乙酰基或磷酸基。

在一些具体实施方案中，所述多肽化合物中的  $R^7$  选自氢、 $C_{1-3}$  烷基或乙酰基。

在一些具体实施方案中， $R^7$  为氢。

在一些具体实施方案中， $R^7$  为甲基。

在一些具体实施方案中， $R^7$  为磷酸基。

在一些具体实施方案中，所述多肽化合物选自以下 SEQ ID NO:5- SEQ ID NO:29 所示的多肽化合物：

Me-YGRKKRRQRRRKKNRNLRRQHSY (SEQ ID NO:5)、

pYGRKKRRQRRRKKNRNLRRQHSY (SEQ ID NO:6)、

Ac-YGRKKRRQRRRKKNRNLRRQHSY (SEQ ID NO:7)、

$C_{15}H_{31}CO$ -YGRKKRRQRRRKKNRNLRRQHSY (SEQ ID NO:8)、

YGRKKRRQRRRKKNRNLRRQHSY- $NH_2$  (SEQ ID NO:9)、

Ac-YGRKKRRQRRRKKNRNLRRQHSY- $NH_2$  (SEQ ID NO:10)、

pYGRKKRRQRRRKKNRNLRRQHSY- $NH_2$  (SEQ ID NO:11)、

Me-YGRKKRRQRRRKKNRNKLRRQHSY-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:12)、  
C<sub>15</sub>H<sub>31</sub>CO-YGRKKRRQRRRKKNRNKLRRQHSY-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:13)、  
YGRKKRRQRRRKKNRNKIRRQHSY (SEQ ID NO:14)、  
YGRKKRRQRRRKKNRNKIRRQHSY-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:15)、  
YGRKKRRQRRRKKDRDKLRRQHSY (SEQ ID NO:16)、  
YGRKKRRQRRR-K(N-AEEA-Palmitic acid)-KNRNLRRQHSY (SEQ ID NO:17)、  
YGRKKRRQRRRKKNRNKLRRREHSY (SEQ ID NO:18)、  
YGRKKRRQRRRKKNRDKLRRREHSY (SEQ ID NO:19)、  
YGRKKRRERRRRKKDRNKLRRQHSY (SEQ ID NO:20)、  
Ac-YGRKKRRERRRRKKDRDKLRRREHSY-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:21)、  
Me-YGRKKRRERRRRKKDRDKLRRREHSY-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:22)、  
Ac-YGRKKRRERRRRKKDRDK(D-L)RREHSY-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:23)、  
Ac-YGRKKRRERRRRKKDRDKLRRQHSY-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:24)、  
Me-YGRKKRRERRRRKKDRDKLRRQHSY-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:25)、  
Ac-YGRKKRRERRRRKKDRDKVRREHSY-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:26)、  
Me-YAibRKKRRERRRRKKDRDKTleRREHSY-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:27)、  
Ac-YGRKKRRERRRRKKDRDKTleRREHSY-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:28) 和  
Ac-YGRK(D-K)(D-R)RER(D-R)RKKDRDK(D-L)(D-R)REHSY-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:29)。

第二方面，本申请提供一种分离的多核苷酸，所述分离的多核苷酸编码本申请的多肽化合物。

第三方面，本申请提供一种质粒，包含如上所述的多核苷酸。

第四方面，本申请提供一种表达载体，包含如上所述的多核苷酸。

第五方面，本申请提供一种宿主细胞，所述细胞含有上述的表达载体或质粒或基因组中整合有外源的如上所述的分离的多核苷酸。

第六方面，本申请提供一种药物组合物，所述的药物组合物包括前述多肽化合物或其变体或其药学上可接受的盐和可药用赋形物。

第七方面，本申请提供了上述多肽化合物或其变体，或药学上可接受的盐，或上述药物组合物在制备药物中的用途。在一些实施方案中，所述药物为治疗和/或预防创伤性脑损伤和/或创伤性脑损伤后抑制神经损伤的药物。

第八方面，本申请提供了治疗和/或预防创伤性脑损伤和/或创伤性脑损伤后抑制神经损伤的方法，所述方法包括向受试者施用上述多肽化合物或其变体，或药学上可接受的盐，或第六方面所述的药物组合物。

第九方面，本申请提供了将上述药物组合物用于治疗创和/或预防伤性脑损伤和/或创伤性脑损伤后抑制神经损伤的用途。

不受限于理论的束缚，本申请的发明人发现，本申请提供的多肽化合物中某些特定的修饰可以显著提高修饰后多肽的稳定性，和/或可降低谷氨酸诱导的神经细胞兴奋性死亡，提高神经细胞存活率的效果，从而显著提升本申请的多肽在治疗创伤性脑损伤以及创伤性脑损伤后抑制神经损伤方面的效果。

## 具体实施方式

下面通过具体实施方式来进一步说明本申请的技术方案。本领域技术人员应该明了，所

述实施例仅仅是帮助理解本申请，不应视为对本申请的具体限制。

为了能够更清楚地理解本申请的技术内容，下面对本申请的术语作进一步说明。

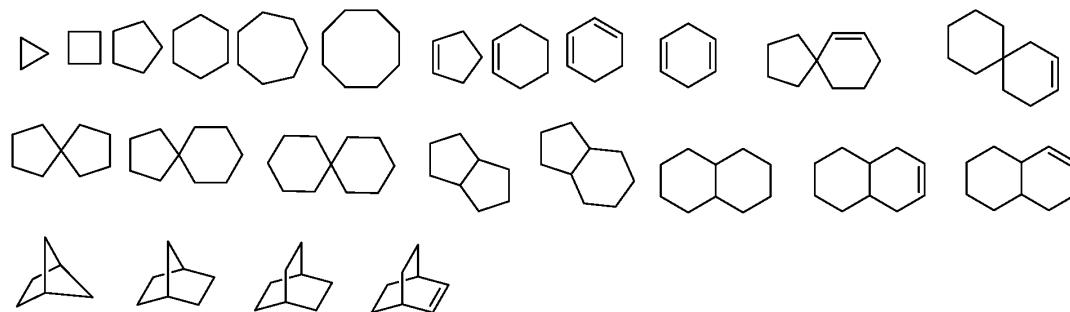
“变体”指一个或多个氨基酸被改变的氨基酸序列。变体可以具有“保守”改变，其中取代的氨基酸具有相似的结构或化学特性，例如以异亮氨酸(I)取代亮氨酸(L)、以天冬氨酸(D)取代天冬酰胺(N)、以谷氨酸(E)取代谷氨酰胺(Q)。变体可以具有“非保守”改变，例如以缬氨酸(V)取代亮氨酸(L)、以色氨酸(W)取代甘氨酸(G)、以非天然氨基酸取代天然氨基酸。可选地，变体可以以L-叔亮氨酸(Tle)取代亮氨酸(L)，以2-氨基异丁酸(Aib)取代甘氨酸(G)。类似的较少改变还可包括氨基酸缺失和/或者插入。

“Y-ol”是指酪氨酸醇。

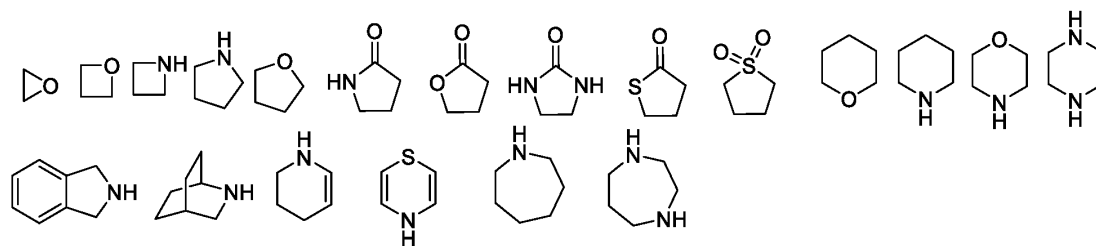
氨基酸通过酰胺键连接在一起，以形成共价肽键，该共价肽键将一个氨基酸的主链羧酸基团与另一个氨基酸的主链氨基基团连接起来，从而形成肽键( $-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-$ )或主链酰胺键。

“烷基”是指完全饱和的脂肪族烃基团。 $\text{C}_{1-16}$ 烷基指在链中具有1至16个碳原子的直链或支链烷基。 $\text{C}_{1-6}$ 烷基指在链中具有1至6个碳原子的直链或支链烷基。烷基的实例包括但不限于甲基、乙基、正丙基、异丙基、丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基、戊基、异戊基、叔戊基、己基、异己基。

“环烷基”是指每个碳环具有至少3个环原子的饱和或部分饱和的单环、稠环、桥环或螺环。 $\text{C}_{3-18}$ 环烷基指每个碳环具有3-18个环原子。 $\text{C}_{3-6}$ 环烷基指每个碳环具有3-6个环原子。环烷基的示例性实例包括但不限于下列实体：



“杂环烷基”是指环结构中具有至少1个选自氮、氧和硫的杂原子的饱和或部分饱和的单环、稠合多环、桥环结构或螺环结构。杂环基的示例性实例包括但不限于下列实体：



“芳基”是指具有共轭的 $\pi$ 电子体系的全碳单环或稠合多环(也就是共享毗邻碳原子对的环)基团。“ $\text{C}_{6-10}$ 芳基”指具有6至10个碳原子的单环或双环芳基，芳基的示例性实例包括但不限于下列实体：苯基、萘基等。

“杂芳基”是指具有环碳原子和环杂原子的单环、双环或多环的 $4n+2$ 芳族环体系(例如，具有以环状排列共享的6或10个 $\pi$ 电子)的基团，其中每个杂原子独立地选自氮、氧和硫。杂芳基的示例性实例包括但不限于下列实体：噻吩基、呋喃基、噻唑基、异噻唑基、咪唑基、吡咯基、吡唑基、吡啶基、哒嗪基、嘧啶基、吡嗪基等。

“卤素”指氟、氯、溴或碘。  
“卤代”指基团中一个或多个（如 1、2、3、4 或 5 个）氢被卤素所取代。  
氨基酸缩写与中文名称对照如表 1 所示。

表 1：氨基酸缩写与中文名称对照表

| 氨基酸缩写   | 中文名称  |
|---------|-------|
| Ala 或 A | 丙氨酸   |
| Arg 或 R | 精氨酸   |
| Asn 或 N | 天门冬氨酸 |
| Asp 或 D | 天冬氨酸  |
| Cys 或 C | 半胱氨酸  |
| Glu 或 E | 谷氨酸   |
| Gln 或 Q | 谷氨酰胺  |
| Gly 或 G | 甘氨酸   |
| His 或 H | 组氨酸   |
| Ile 或 I | 异亮氨酸  |
| Leu 或 L | 亮氨酸   |
| Lys 或 K | 赖氨酸   |
| Met 或 M | 甲硫氨酸  |
| Phe 或 F | 苯丙氨酸  |
| Pro 或 P | 脯氨酸   |
| Ser 或 S | 丝氨酸   |
| Thr 或 T | 苏氨酸   |
| Trp 或 W | 色氨酸   |
| Tyr 或 Y | 酪氨酸   |
| Val 或 V | 缬氨酸   |

HoLys 代表羟赖氨酸，全称 5-羟赖氨酸，5-hydroxylysine。  
Dap 代表二氨基庚二酸（2,6-Diaminoheptanedioic acid）。  
DAB 代表 2,4-二氨基丁酸（2,4-Diaminobutyric acid）。  
Cit 代表瓜氨酸（Citrulline）。  
Orn 代表鸟氨酸（Ornithine）。  
HomoArg 代表高精氨酸（Homoarginine）。

本申请的多肽序列中的氨基酸残基使用氨基酸缩写表示。  
本申请所使用的“Ac”和“NH<sub>2</sub>”分别指的是乙酰基和酰胺化末端。

未特别标注，本申请所述氨基酸为“L 型氨基酸”，由氨基酸缩写的大写单字母表示或三字母缩写；本申请的“D 型氨基酸”由氨基酸缩写的小写单字母表示或在三字母缩写前面加字母“D”或者由氨基酸缩写的大写单字母前面加上“D”。例如，“L 型亮氨酸”可由“Leu”表示或者由“L”代表，“D 型亮氨酸”可由“D-Leu”表示或者由“l”代表或由“D-L”表示。

Aib 代表 2-氨基异丁酸。  
Tle 代表 L-叔亮氨酸。

在一个实例中，转录反式激活蛋白中的第 49-57 位氨基酸片段序列为 RKKRRQRRR (SEQ ID NO:36)。

如本文所使用,“治疗”是指向个体施用有效量的本申请的多肽化合物以减轻症状或并发症,延缓疾病、阻碍病症的进展,减轻或缓解症状和并发症,和/或治愈或消除疾病或病症以及预防病症,其中预防应理解为出于对抗疾病或病症的目的而对个体施用本申请的多肽化合物以预防症状或并发症的发作。在一个实施方案中,“治疗”是指以减轻、改善、阻止或根除(治愈)症状或疾病状态为目的施用有效量的本申请的多肽化合物。

如本文所使用,“有效量”或“治疗有效量”是指能达到预期效果的药物或药剂的足够用量。本申请的肽:

本申请的肽可进一步在其N端或C端包含能够引导本申请的肽跨血脑屏障和神经细胞膜的穿膜肽。本领域中已知的合适的穿膜肽可应用于本申请,只要它们能够引导本申请的肽跨血脑屏障和神经细胞膜。示例性穿膜肽可选自TAT序列(选自“YGRKKRRQRRR (SEQ ID NO:4)”、“GRKKRRQRRR (SEQ ID NO:33)”、“YGRKKRRQRRRPPQ (SEQ ID NO:34)”或“GRKKRRQRRRQ (SEQ ID NO:35)”)、模型两亲性肽(model amphipathic peptide, MAP)序列(“KLALKLALKALKALKLA (SEQ ID NO:30)”)、膜转位肽(membranetranslocating peptide, MTS)序列(“AAVALLPAVLLALLAP (SEQ ID NO:31)”)或R9(“RRRRRRRRR (SEQ ID NO:32)”)序列。在一个特别优选的实施方式中,本申请的穿膜肽为TAT序列。任选地,本申请的肽可以被化学修饰,以促进其跨BBB和神经细胞膜,包括但不限于酰胺化、乙酰化、磷酸化、侧链修饰、棕榈酸化、变体等。

“药学上可接受的盐”是指化合物与药学上可接受的(相对无毒、安全、适合于患者使用)酸或碱反应得到的盐。当化合物中含有相对酸性的官能团时,可以通过在合适的惰性溶剂中用足量的药学上可接受的碱与化合物的游离形式接触的方式获得碱加成盐。药学上可接受的碱加成盐包括但不限于钠盐、钾盐、钙盐、铝盐、镁盐、铋盐、铵盐等。当化合物中含有相对碱性的官能团时,可以通过在合适的惰性溶剂中用足量的药学上可接受的酸与化合物的游离形式接触的方式获得酸加成盐。药学上可接受的酸加成盐包括但不限于盐酸盐、硫酸盐、甲磺酸盐等。

“药物组合物”表示一种或多种本申请的化合物或其药学上可接受的盐与其它化学组分的混合物,其它组分例如药学上可接受的载体和赋形剂。药物组合物的目的是促进化合物对生物体的给药。

“赋形剂”的种类实例非限制性地包括粘合剂、崩解剂、润滑剂、助流剂、稳定剂、填充剂和稀释剂等。

EC<sub>50</sub>是半数效应浓度,意味着产生50%效应所需的药物浓度。

mmol表示毫摩尔。

eq表示当量,指两种试剂或者物料的摩尔比。

DIC代表的化合物是N,N'-二异丙基碳二亚胺(N,N'-diisopropylcarbodiimide)。

TBTU代表的化合物是O-苯并三氮唑-N,N,N',N'-四甲基脲四氟硼酸酯。

DIPEA代表N,N-二异丙基乙胺。

Fmoc基团指芴甲氧羰基。

2-Cl-CTC-Resin 氯代(邻氯苯基)二苯基甲烷。

Fmoc-Tyr(tBu)-OH: N-芴甲氧羰基-O-叔丁基-L-酪氨酸。

Fmoc-Ser(tBu)-OH: N-芴甲氧羰基-O-叔丁基-L-丝氨酸。

Fmoc-His(Trt)-OH: N-芴甲氧羰基-N'-三苯甲基-L-组氨酸。

Fmoc-Gln(Trt)-OH: N-芴甲氧羰基-N'-三苯甲基-L-谷氨酰胺。

Fmoc-Leu-OH: N-苄氧羰基-L-亮氨酸。  
Fmoc-Lys(Boc)-OH: N-苄氧羰基-N-叔丁氧羰基-L-赖氨酸。  
Fmoc-Asn(Trt)-OH: 苄氧羰基-N-三苯甲基-L-天冬酰胺。  
Fmoc-Arg(Pbf)-OH: N-苄氧羰基-2,2,4,6,7-五甲基二氢苯并呋喃-5-磺酰-L-精氨酸。  
Fmoc-Gln(Trt)-OH: N-苄氧羰基-N'-三苯甲基-L-谷氨酰胺。  
Fmoc-Gly-OH: N-苄氧羰基-甘氨酸。  
Fmoc-N-Me-Tyr(tBu)-OH: O-叔丁基-N-[(9H-苄-9-基甲氧基)羰基]-N-甲基-L-酪氨酸。  
Fmoc-Tyr(H<sub>2</sub>PO<sub>3</sub>)-OH: N-苄氧羰基-O-磷酸基-L-酪氨酸。  
TFA 代表三氟乙酸。  
MPA 代表 2-巯基丙酸。  
TIS 代表三异丙基硅烷。  
HOBt 代表 1-羟基苯并三唑。

TBTU 的中文名为: O-苯并三氮唑-N,N,N',N'-四甲基脲四氟硼酸 DIPEA, 英文名称为: O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium tetrafluoroborate。

MK-801: Dizocilpine maleate (maleate)是一种有效, 选择性, 非竞争性的 NMDA 受体拮抗剂。

物料来源:

氨基酸物料均购买自吉尔生化(上海)有限公司; 缩合剂 DIC、HOBT 和 TBTU 均购买自苏州昊帆生物股份有限公司。

DMEM/F12 培养基购自白鲨生物。  
胎牛血清购自苏州依科赛生物科技股份有限公司。  
青霉素/链霉素混合溶液购自 Hyclone。  
谷氨酸购自 Sigma。  
碘化丙啶/Hoechst 染液购自 Sigma。  
4%多聚甲醛购自麦克林试剂。  
磷酸盐缓冲液购自白鲨生物。  
实施例编号与氨基酸序列号对应如表 2 所示:

表 2: 实施例编号与氨基酸序列号对应表

| 实施例   | 结构(序列号)                                                                   |
|-------|---------------------------------------------------------------------------|
| 实施例 1 | YGRKKRRQRRRKKNRNKLRRQHSY (SEQ ID NO:2)                                    |
| 实施例 2 | Me-YGRKKRRQRRRKKNRNKLRRQHSY (SEQ ID NO:5)                                 |
| 实施例 3 | pYGRKKRRQRRRKKNRNKLRRQHSY (SEQ ID NO:6)                                   |
| 实施例 4 | Ac-YGRKKRRQRRRKKNRNKLRRQHSY (SEQ ID NO:7)                                 |
| 实施例 5 | C <sub>15</sub> H <sub>31</sub> CO-YGRKKRRQRRRKKNRNKLRRQHSY (SEQ ID NO:8) |
| 实施例 6 | YGRKKRRQRRRKKNRNKLRRQHSY-NH <sub>2</sub> (SEQ ID NO:9)                    |
| 实施例 7 | Ac-YGRKKRRQRRRKKNRNKLRRQHSY-NH <sub>2</sub> (SEQ ID NO:10)                |
| 实施例 8 | pYGRKKRRQRRRKKNRNKLRRQHSY-NH <sub>2</sub> (SEQ ID NO:11)                  |
| 实施例 9 | Me-YGRKKRRQRRRKKNRNKLRRQHSY-NH <sub>2</sub> (SEQ ID NO:12)                |

|        |                                                                                            |
|--------|--------------------------------------------------------------------------------------------|
| 实施例 10 | C <sub>15</sub> H <sub>31</sub> CO-YGRKKRRQRRRKKNRNKLRRQHSY-NH <sub>2</sub> (SEQ ID NO:13) |
| 实施例 11 | YGRKKRRQRRRKKNRNKIRRQHSY (SEQ ID NO:14)                                                    |
| 实施例 12 | YGRKKRRQRRRKKNRNKIRRQHSY-NH <sub>2</sub> (SEQ ID NO:15)                                    |
| 实施例 13 | YGRKKRRQRRRKDRDKLRRQHSY (SEQ ID NO:16)                                                     |
| 实施例 14 | YGRKKRRQRRRK(N-AEEA-Palmitic acid)KNRNKLRRQHSY (SEQ ID NO:17)                              |
| 实施例 15 | YGRKKRRQRRRKKNRNKLRRHSY (SEQ ID NO:18)                                                     |
| 实施例 16 | YGRKKRRQRRRKDRDKLRRHSY (SEQ ID NO:19)                                                      |
| 实施例 17 | YGRKKRRRRRKDRNKLRRQHSY (SEQ ID NO:20)                                                      |
| 实施例 18 | Ac-YGRKKRRRRRKDRDKLRRHSY-NH <sub>2</sub> (SEQ ID NO:21)                                    |
| 实施例 19 | Me-YGRKKRRRRRKDRDKLRRHSY-NH <sub>2</sub> (SEQ ID NO:22)                                    |
| 实施例 20 | Ac-YGRKKRRRRRKDRDK(D-L)RRHSY-NH <sub>2</sub> (SEQ ID NO:23)                                |
| 实施例 21 | Ac-YGRKKRRRRRKDRDKLRRQHSY-NH <sub>2</sub> (SEQ ID NO:24)                                   |
| 实施例 22 | Me-YGRKKRRRRRKDRDKLRRQHSY-NH <sub>2</sub> (SEQ ID NO:25)                                   |
| 实施例 23 | Ac-YGRKKRRRRRKDRDKVRHSY-NH <sub>2</sub> (SEQ ID NO:26)                                     |
| 实施例 24 | Me-YAibRKRRRRRKDRDKTleRRHSY-NH <sub>2</sub> (SEQ ID NO:27)                                 |
| 实施例 25 | Ac-YGRKKRRRRRKDRDKTleRRHSY-NH <sub>2</sub> (SEQ ID NO:28)                                  |
| 实施例 26 | Ac-YGRK(D-K)(D-R)RER(D-R)RKKDRDK(D-L)(D-R)REHSY-NH <sub>2</sub> (SEQ ID NO:29)             |

制备实施例:

实施例 1: YGRKKRRQRRRKKNRNKLRRQHSY (SEQ ID NO: 2) 多肽的制备

根据专利 CN111363014A 中的方法制备得到 YGRKKRRQRRRKKNRNKLRRQHSY(SEQ ID NO:2)。

实施例 2: Me-YGRKKRRQRRRKKNRNKLRRQHSY (SEQ ID NO:5) 的合成

以 1 mmol 的合成规模为例

2.1 Fmoc-Tyr(tBu)-CTC-Resin 的合成

取替代度 1.08 mmol/g 的 2-Cl-CTC-Resin 3.0 克，加入多肽反应柱中，用 10 mL *N,N*-二甲基甲酰胺洗涤一次，用 20 mL 二氯甲烷溶胀 20 分钟，抽去溶液。

称取 1.4 eq 的 Fmoc-Tyr(tBu)-OH，4.2 eq 的 *N,N*-二异丙基乙胺加入多肽反应柱中，加入 20 mL *N,N*-二甲基甲酰胺反应三个小时，保持 30℃恒温。抽去溶液，用 *N,N*-二甲基甲酰胺洗涤 3 次，用 20 mL 的二氯甲烷/甲醇/*N,N*-二异丙基乙胺=17/2/1 的比例封闭液封闭两次，每次 20 分钟，结束后用 *N,N*-二甲基甲酰胺洗涤四次，用甲醇收缩三次，真空抽干。

称取 1 mmol 对应的树脂，用 *N,N*-二甲基甲酰胺溶胀 30 分钟。用 20%的哌啶/*N,N*-二甲基甲酰胺溶液脱保护基 2 次，每次 20 mL，时间分别是 5 和 10 分钟，结束后用 *N,N*-二甲基甲酰胺洗涤 6 次，每次 20 mL，期间多肽反应柱保持 30℃恒温。取少量树脂进行茚三酮茚检，树脂蓝黑色。

2.2 Fmoc-Ser(tBu)-OH 的偶联

称取 Fmoc-Ser(tBu)-OH (4eq), TBTU (4eq), *N,N*-二异丙基乙胺 (6eq) 加入多肽反应柱中, 加入 20mL *N,N*-二甲基甲酰胺反应两个小时, 保持 30°C 恒温。抽去溶液, 用 *N,N*-二甲基甲酰胺洗涤 3 次, 每次 20mL, 取少量树脂茚检, 树脂透明无色, 说明反应完全。

保持多肽反应柱 30°C, 用 20% 的哌啶/*N,N*-二甲基甲酰胺溶液脱保护基 2 次, 每次 20mL, 时间分别是 5 和 10 分钟, 结束后用 *N,N*-二甲基甲酰胺洗涤 6 次, 每次 20mL。取少量树脂进行茚三酮茚检, 树脂蓝黑色, 说明脱保护基完全。

### 2.3 Fmoc-His(Trt)-OH 的偶联

称取 Fmoc-His(Trt)-OH (4eq), HOBt (4eq), DIC (6eq) 加入多肽反应柱中, 加入 20mL *N,N*-二甲基甲酰胺反应两个小时, 保持 30°C 恒温。抽去溶液, 用 *N,N*-二甲基甲酰胺洗涤 3 次, 每次 20mL, 取少量树脂茚检, 树脂透明无色, 说明反应完全。

保持多肽反应柱 30°C, 用 20% 的哌啶/*N,N*-二甲基甲酰胺溶液脱保护基 2 次, 每次 20mL, 时间分别是 5 和 10 分钟, 结束后用 *N,N*-二甲基甲酰胺洗涤 6 次, 每次 20mL。取少量树脂进行茚三酮茚检, 树脂蓝黑色, 说明脱保护基完全。

### 2.4 Fmoc-Gln(Trt)-OH 的偶联

称取 Fmoc-Gln(Trt)-OH (4eq), HOBt (4eq), DIC (6eq) 加入多肽反应柱中, 加入 20mL *N,N*-二甲基甲酰胺反应两个小时, 保持 30°C 恒温。抽去溶液, 用 *N,N*-二甲基甲酰胺洗涤 3 次, 每次 20mL, 取少量树脂茚检, 树脂透明无色, 说明反应完全。

保持多肽反应柱 30°C, 用 20% 的哌啶/*N,N*-二甲基甲酰胺溶液脱保护基 2 次, 每次 20mL, 时间分别是 5 和 10 分钟, 结束后用 *N,N*-二甲基甲酰胺洗涤 6 次, 每次 20mL。取少量树脂进行茚三酮茚检, 树脂蓝黑色, 说明脱保护基完全。

### 2.5 Fmoc-Arg(Pbf)-OH 的偶联

称取 Fmoc-Arg(Pbf)-OH (4eq), HOBt (4eq), DIC (6eq) 加入多肽反应柱中, 加入 20mL *N,N*-二甲基甲酰胺反应两个小时, 保持 30°C 恒温。抽去溶液, 用 *N,N*-二甲基甲酰胺洗涤 3 次, 每次 20mL, 取少量树脂茚检, 树脂透明无色, 说明反应完全。

保持多肽反应柱 30°C, 用 20% 的哌啶/*N,N*-二甲基甲酰胺溶液脱保护基 2 次, 每次 20mL, 时间分别是 5 和 10 分钟, 结束后用 *N,N*-二甲基甲酰胺洗涤 6 次, 每次 20mL。取少量树脂进行茚三酮茚检, 树脂蓝黑色, 说明脱保护基完全。

### 2.6 Fmoc-Arg(Pbf)-OH 的偶联

称取 Fmoc-Arg(Pbf)-OH (4eq), HOBt (4eq), DIC (6eq) 加入多肽反应柱中, 加入 20mL *N,N*-二甲基甲酰胺反应两个小时, 保持 30°C 恒温。抽去溶液, 用 *N,N*-二甲基甲酰胺洗涤 3 次, 每次 20mL, 取少量树脂茚检, 树脂透明无色, 说明反应完全。

保持多肽反应柱 30°C, 用 20% 的哌啶/*N,N*-二甲基甲酰胺溶液脱保护基 2 次, 每次 20mL, 时间分别是 5 和 10 分钟, 结束后用 *N,N*-二甲基甲酰胺洗涤 6 次, 每次 20mL。取少量树脂进行茚三酮茚检, 树脂蓝黑色, 说明脱保护基完全。

### 2.7 Fmoc-Leu-OH 的偶联

称取 Fmoc-Leu-OH (4eq), HOBt (4eq), DIC (6eq) 加入多肽反应柱中, 加入 20mL *N,N*-二甲基甲酰胺反应两个小时, 保持 30°C 恒温。抽去溶液, 用 *N,N*-二甲基甲酰胺洗涤 3 次, 每次 20mL, 取少量树脂茚检, 树脂透明无色, 说明反应完全。

保持多肽反应柱 30°C, 用 20% 的哌啶/*N,N*-二甲基甲酰胺溶液脱保护基 2 次, 每次 20mL, 时间分别是 5 和 10 分钟, 结束后用 *N,N*-二甲基甲酰胺洗涤 6 次, 每次 20mL。取少量树脂进行茚三酮茚检, 树脂蓝黑色, 说明脱保护基完全。

### 2.8 Fmoc-Lys(Boc)-OH 的偶联

称取 Fmoc-Lys(Boc)-OH (4eq), HOBt (4eq), DIC (6eq) 加入多肽反应柱中, 加入 20mL *N,N*-二甲基甲酰胺反应两个小时, 保持 30°C 恒温。抽去溶液, 用 *N,N*-二甲基甲酰胺洗涤 3 次, 每次 20mL, 取少量树脂茚检, 树脂透明无色, 说明反应完全。

保持多肽反应柱 30°C, 用 20% 的哌啶/*N,N*-二甲基甲酰胺溶液脱保护基 2 次, 每次 20mL, 时间分别是 5 和 10 分钟, 结束后用 *N,N*-二甲基甲酰胺洗涤 6 次, 每次 20mL。取少量树脂进行茚三酮茚检, 树脂蓝黑色, 说明脱保护基完全。

### 2.9 Fmoc-Asn(Trt)-OH 的偶联

称取 Fmoc-Asn(Trt)-OH (4eq), HOBt (4eq), DIC (6eq) 加入多肽反应柱中, 加入 20mL *N,N*-二甲基甲酰胺反应两个小时, 保持 30°C 恒温。抽去溶液, 用 *N,N*-二甲基甲酰胺洗涤 3 次, 每次 20mL, 取少量树脂茚检, 树脂透明无色, 说明反应完全。

保持多肽反应柱 30°C, 用 20% 的哌啶/*N,N*-二甲基甲酰胺溶液脱保护基 2 次, 每次 20mL, 时间分别是 5 和 10 分钟, 结束后用 *N,N*-二甲基甲酰胺洗涤 6 次, 每次 20mL。取少量树脂进行茚三酮茚检, 树脂蓝黑色, 说明脱保护基完全。

### 2.10 Fmoc-Arg(Pbf)-OH 的偶联

称取 Fmoc-Arg(Pbf)-OH (4eq), HOBt (4eq), DIC (6eq) 加入多肽反应柱中, 加入 20mL *N,N*-二甲基甲酰胺反应两个小时, 保持 30°C 恒温。抽去溶液, 用 *N,N*-二甲基甲酰胺洗涤 3 次, 每次 20mL, 取少量树脂茚检, 树脂透明无色, 说明反应完全。

保持多肽反应柱 30°C, 用 20% 的哌啶/*N,N*-二甲基甲酰胺溶液脱保护基 2 次, 每次 20mL, 时间分别是 5 和 10 分钟, 结束后用 *N,N*-二甲基甲酰胺洗涤 6 次, 每次 20mL。取少量树脂进行茚三酮茚检, 树脂蓝黑色, 说明脱保护基完全。

### 2.11 Fmoc-Asn(Trt)-OH 的偶联

称取 Fmoc-Asn(Trt)-OH (4eq), HOBt (4eq), DIC (6eq) 加入多肽反应柱中, 加入 20mL *N,N*-二甲基甲酰胺反应两个小时, 保持 30°C 恒温。抽去溶液, 用 *N,N*-二甲基甲酰胺洗涤 3 次, 每次 20mL, 取少量树脂茚检, 树脂透明无色, 说明反应完全。

保持多肽反应柱 30°C, 用 20% 的哌啶/*N,N*-二甲基甲酰胺溶液脱保护基 2 次, 每次 20mL, 时间分别是 5 和 10 分钟, 结束后用 *N,N*-二甲基甲酰胺洗涤 6 次, 每次 20mL。取少量树脂进行茚三酮茚检, 树脂蓝黑色, 说明脱保护基完全。

### 2.12 Fmoc-Lys(Boc)-OH 的偶联

称取 Fmoc-Lys(Boc)-OH (4eq), HOBt (4eq), DIC (6eq) 加入多肽反应柱中, 加入 20mL *N,N*-二甲基甲酰胺反应两个小时, 保持 30°C 恒温。抽去溶液, 用 *N,N*-二甲基甲酰胺洗涤 3 次, 每次 20mL, 取少量树脂茚检, 树脂透明无色, 说明反应完全。

保持多肽反应柱 30°C, 用 20% 的哌啶/*N,N*-二甲基甲酰胺溶液脱保护基 2 次, 每次 20mL, 时间分别是 5 和 10 分钟, 结束后用 *N,N*-二甲基甲酰胺洗涤 6 次, 每次 20mL。取少量树脂进行茚三酮茚检, 树脂蓝黑色, 说明脱保护基完全。

### 2.13 Fmoc-Lys(Boc)-OH 的偶联

称取 Fmoc-Lys(Boc)-OH (4eq), HOBt (4eq), DIC (6eq) 加入多肽反应柱中, 加入 20mL *N,N*-二甲基甲酰胺反应两个小时, 保持 30°C 恒温。抽去溶液, 用 *N,N*-二甲基甲酰胺洗涤 3 次, 每次 20mL, 取少量树脂茚检, 树脂透明无色, 说明反应完全。

保持多肽反应柱 30°C, 用 20% 的哌啶/*N,N*-二甲基甲酰胺溶液脱保护基 2 次, 每次 20mL, 时间分别是 5 和 10 分钟, 结束后用 *N,N*-二甲基甲酰胺洗涤 6 次, 每次 20mL。取少量树脂进行茚三酮茚检, 树脂蓝黑色, 说明脱保护基完全。

#### 2.14 Fmoc-Arg(Pbf)-OH 的偶联

称取 Fmoc-Arg(Pbf)-OH (4eq), HOBt (4eq), DIC (6eq) 加入多肽反应柱中, 加入 20mL *N,N*-二甲基甲酰胺反应两个小时, 保持 30°C 恒温。抽去溶液, 用 *N,N*-二甲基甲酰胺洗涤 3 次, 每次 20mL, 取少量树脂茚检, 树脂透明无色, 说明反应完全。

保持多肽反应柱 30°C, 用 20% 的哌啶/*N,N*-二甲基甲酰胺溶液脱保护基 2 次, 每次 20mL, 时间分别是 5 和 10 分钟, 结束后用 *N,N*-二甲基甲酰胺洗涤 6 次, 每次 20mL。取少量树脂进行茚三酮茚检, 树脂蓝黑色, 说明脱保护基完全。

#### 2.15 Fmoc-Arg(Pbf)-OH 的偶联

称取 Fmoc-Arg(Pbf)-OH (4eq), HOBt (4eq), DIC (6eq) 加入多肽反应柱中, 加入 20mL *N,N*-二甲基甲酰胺反应两个小时, 保持 30°C 恒温。抽去溶液, 用 *N,N*-二甲基甲酰胺洗涤 3 次, 每次 20mL, 取少量树脂茚检, 树脂透明无色, 说明反应完全。

保持多肽反应柱 30°C, 用 20% 的哌啶/*N,N*-二甲基甲酰胺溶液脱保护基 2 次, 每次 20mL, 时间分别是 5 和 10 分钟, 结束后用 *N,N*-二甲基甲酰胺洗涤 6 次, 每次 20mL。取少量树脂进行茚三酮茚检, 树脂蓝黑色, 说明脱保护基完全。

#### 2.16 Fmoc-Arg(Pbf)-OH 的偶联

称取 Fmoc-Arg(Pbf)-OH (4eq), HOBt (4eq), DIC (6eq) 加入多肽反应柱中, 加入 20mL *N,N*-二甲基甲酰胺反应两个小时, 保持 30°C 恒温。抽去溶液, 用 *N,N*-二甲基甲酰胺洗涤 3 次, 每次 20mL, 取少量树脂茚检, 树脂透明无色, 说明反应完全。

保持多肽反应柱 30°C, 用 20% 的哌啶/*N,N*-二甲基甲酰胺溶液脱保护基 2 次, 每次 20mL, 时间分别是 5 和 10 分钟, 结束后用 *N,N*-二甲基甲酰胺洗涤 6 次, 每次 20mL。取少量树脂进行茚三酮茚检, 树脂蓝黑色, 说明脱保护基完全。

#### 2.17 Fmoc-Gln(Trt)-OH 的偶联

称取 Fmoc-Gln(Trt)-OH (4eq), HOBt (4eq), DIC (6eq) 加入多肽反应柱中, 加入 20mL *N,N*-二甲基甲酰胺反应两个小时, 保持 30°C 恒温。抽去溶液, 用 *N,N*-二甲基甲酰胺洗涤 3 次, 每次 20mL, 取少量树脂茚检, 树脂透明无色, 说明反应完全。

保持多肽反应柱 30°C, 用 20% 的哌啶/*N,N*-二甲基甲酰胺溶液脱保护基 2 次, 每次 20mL, 时间分别是 5 和 10 分钟, 结束后用 *N,N*-二甲基甲酰胺洗涤 6 次, 每次 20mL。取少量树脂进行茚三酮茚检, 树脂蓝黑色, 说明脱保护基完全。

#### 2.18 Fmoc-Arg(Pbf)-OH 的偶联

称取 Fmoc-Arg(Pbf)-OH (4eq), HOBt (4eq), DIC (6eq) 加入多肽反应柱中, 加入 20mL *N,N*-二甲基甲酰胺反应两个小时, 保持 30°C 恒温。抽去溶液, 用 *N,N*-二甲基甲酰胺洗涤 3 次, 每次 20mL, 取少量树脂茚检, 树脂透明无色, 说明反应完全。

保持多肽反应柱 30°C, 用 20% 的哌啶/*N,N*-二甲基甲酰胺溶液脱保护基 2 次, 每次 20mL, 时间分别是 5 和 10 分钟, 结束后用 *N,N*-二甲基甲酰胺洗涤 6 次, 每次 20mL。取少量树脂进行茚三酮茚检, 树脂蓝黑色, 说明脱保护基完全。

#### 2.19 Fmoc-Arg(Pbf)-OH 的偶联

称取 Fmoc-Arg(Pbf)-OH (4eq), HOBt (4eq), DIC (6eq) 加入多肽反应柱中, 加入 20mL *N,N*-二甲基甲酰胺反应两个小时, 保持 30°C 恒温。抽去溶液, 用 *N,N*-二甲基甲酰胺洗涤 3 次, 每次 20mL, 取少量树脂茚检, 树脂透明无色, 说明反应完全。

保持多肽反应柱 30°C, 用 20% 的哌啶/*N,N*-二甲基甲酰胺溶液脱保护基 2 次, 每次 20mL, 时间分别是 5 和 10 分钟, 结束后用 *N,N*-二甲基甲酰胺洗涤 6 次, 每次 20mL。取少量树脂进行茚三酮茚检, 树脂蓝黑色, 说明脱保护基完全。

#### 2.20 Fmoc-Lys(Boc)-OH 的偶联

称取 Fmoc-Lys(Boc)-OH (4eq), HOBt (4eq), DIC (6eq) 加入多肽反应柱中, 加入 20mL *N,N*-二甲基甲酰胺反应两个小时, 保持 30°C 恒温。抽去溶液, 用 *N,N*-二甲基甲酰胺洗涤 3 次, 每次 20mL, 取少量树脂茚检, 树脂透明无色, 说明反应完全。

保持多肽反应柱 30°C, 用 20% 的哌啶/*N,N*-二甲基甲酰胺溶液脱保护基 2 次, 每次 20mL, 时间分别是 5 和 10 分钟, 结束后用 *N,N*-二甲基甲酰胺洗涤 6 次, 每次 20mL。取少量树脂进行茚三酮茚检, 树脂蓝黑色, 说明脱保护基完全。

#### 2.21 Fmoc-Lys(Boc)-OH 的偶联

称取 Fmoc-Lys(Boc)-OH (4eq), HOBt (4eq), DIC (6eq) 加入多肽反应柱中, 加入 20mL *N,N*-二甲基甲酰胺反应两个小时, 保持 30°C 恒温。抽去溶液, 用 *N,N*-二甲基甲酰胺洗涤 3 次, 每次 20mL, 取少量树脂茚检, 树脂透明无色, 说明反应完全。

保持多肽反应柱 30°C, 用 20% 的哌啶/*N,N*-二甲基甲酰胺溶液脱保护基 2 次, 每次 20mL, 时间分别是 5 和 10 分钟, 结束后用 *N,N*-二甲基甲酰胺洗涤 6 次, 每次 20mL。取少量树脂进行茚三酮茚检, 树脂蓝黑色, 说明脱保护基完全。

#### 2.22 Fmoc-Arg(Pbf)-OH 的偶联

称取 Fmoc-Arg(Pbf)-OH (4eq), HOBt (4eq), DIC (6eq) 加入多肽反应柱中, 加入 20mL *N,N*-二甲基甲酰胺反应两个小时, 保持 30°C 恒温。抽去溶液, 用 *N,N*-二甲基甲酰胺洗涤 3 次, 每次 20mL, 取少量树脂茚检, 树脂透明无色, 说明反应完全。

保持多肽反应柱 30°C, 用 20% 的哌啶/*N,N*-二甲基甲酰胺溶液脱保护基 2 次, 每次 20mL, 时间分别是 5 和 10 分钟, 结束后用 *N,N*-二甲基甲酰胺洗涤 6 次, 每次 20mL。取少量树脂进行茚三酮茚检, 树脂蓝黑色, 说明脱保护基完全。

#### 2.23 Fmoc-Gly-OH 的偶联

称取 Fmoc-Gly-OH (4eq), HOBt (4eq), DIC (6eq) 加入多肽反应柱中, 加入 20mL *N,N*-二甲基甲酰胺反应两个小时, 保持 30°C 恒温。抽去溶液, 用 *N,N*-二甲基甲酰胺洗涤 3 次, 每次 20mL, 取少量树脂茚检, 树脂透明无色, 说明反应完全。

保持多肽反应柱 30°C, 用 20% 的哌啶/*N,N*-二甲基甲酰胺溶液脱保护基 2 次, 每次 20mL, 时间分别是 5 和 10 分钟, 结束后用 *N,N*-二甲基甲酰胺洗涤 6 次, 每次 20mL。取少量树脂进行茚三酮茚检, 树脂蓝黑色, 说明脱保护基完全。

#### 2.24 Fmoc-N-Me-Tyr(tBu)-OH 的偶联

称取 Fmoc-N-Me-Tyr(tBu)-OH (4eq), HOBt (4eq), DIC (6eq) 加入多肽反应柱中, 加入 20mL *N,N*-二甲基甲酰胺反应两个小时, 保持 30°C 恒温。抽去溶液, 用 *N,N*-二甲基甲酰胺洗涤 3 次, 每次 20mL, 取少量树脂茚检, 树脂透明无色, 说明反应完全。

保持多肽反应柱 30°C, 用 20% 的哌啶/*N,N*-二甲基甲酰胺溶液脱保护基 2 次, 每次 20mL, 时间分别是 5 和 10 分钟, 结束后用 *N,N*-二甲基甲酰胺洗涤 6 次, 每次 20mL。取少量树脂进

行茛三酮茛检，树脂蓝黑色，说明脱保护基完全。用甲醇收缩 3 次，每次 3 分钟，每次 20mL，真空抽干得肽树脂。

#### 2.25 肽树脂的裂解

取肽树脂重量 10eq 体积的冰冻裂解液（裂解液配比 TFA/MPA/TIS/水=90/5/2.5/2.5）加入装有多肽树脂的烧瓶中，保持恒温 25°C，反应 2 小时，过滤，将滤液加入 10eq 裂解液体积的冰冻甲基叔丁基醚中沉降 10 分钟，离心。用常温甲基叔丁基醚中反复洗涤 4 次，真空干燥（<50°C）3 小时得粗肽。

#### 2.26 纯化

流动相：0.1% 三氟乙酸的水/0.1% 三氟乙酸的乙腈；制备柱：ODS-PK C18，30mm×250mm×8mm；流速：25mL/min；柱温：25°C；波长：220nm。

梯度：水/乙腈:5:95-95:5，40 分钟。

对收集的样品进行减压浓缩和冻干后得到纯肽。ESI-MS  $m/z$  [M+1]<sup>+</sup>: 3282.94。

#### 实施例 3: pYGRKKRRQRRRKKNRNLRRQHSY (SEQ ID NO:6) 的合成

参考实施例 2 的制备方法，区别在于用 Fmoc-Tyr(H<sub>2</sub>PO<sub>3</sub>BZL)-OH 替换步骤 2.24 中的 Fmoc-N-Me-Tyr(tBu)-OH。

#### 3.1 纯化

流动相：0.1% 三氟乙酸的水/0.1% 三氟乙酸的乙腈；制备柱：ODS-PK C18，30mm×250mm×8mm；流速：25mL/min；柱温：25°C；波长：220nm。

梯度：水/乙腈:5:95-95:5，40 分钟。

对收集的样品进行减压浓缩和冻干后得到纯肽。ESI-MS  $m/z$  [M+1]<sup>+</sup>: 3348.89。

#### 实施例 4: Ac-YGRKKRRQRRRKKNRNLRRQHSY (SEQ ID NO:7) 的合成

参考实施例 2 的制备方法，区别在于用 Fmoc-Tyr(tBu)-OH 替换步骤 2.24 中的 Fmoc-N-Me-Tyr(tBu)-OH，在 Fmoc-Tyr(tBu)-OH 偶联、脱 Fmoc 保护并洗脱后，加入 30eq 的醋酸酐、15eq 的吡啶、20mL *N,N*-二甲基甲酰胺，反应一个小时，用 *N,N*-二甲基甲酰胺洗 6 次。用甲醇收缩 3 次，每次 3 分钟，每次 20mL，真空抽干得肽树脂。

#### 4.1 肽树脂的裂解

取肽树脂重量 10eq 体积的冰冻裂解液（裂解液配比 TFA/MPA/TIS/水=90/5/2.5/2.5）加入的冰冻甲基叔丁基醚中沉降 10 分钟，离心。用常温甲基叔丁基醚反复洗涤 4 次，真空干燥（<50°C）3 小时得粗肽。

#### 4.2 纯化

流动相：0.1% 三氟乙酸的水/0.1% 三氟乙酸的乙腈；制备柱：ODS-PK C18，30mm×250mm×8mm；流速：25mL/min；柱温：25°C；波长：220nm。

梯度：水/乙腈:5:95-95:5，40 分钟。

对收集的样品进行减压浓缩和冻干后得到纯肽。ESI-MS  $m/z$  [M+1]<sup>+</sup>: 3310.93。

#### 实施例 5: C<sub>15</sub>H<sub>31</sub>CO-YGRKKRRQRRRKKNRNLRRQHSY (SEQ ID NO:8) 的合成

参考实施例 2 的制备方法，区别在于用 Fmoc-Tyr(tBu)-OH 替换步骤 2.24 中的 Fmoc-N-Me-Tyr(tBu)-OH，在 Fmoc-Tyr(tBu)-OH 偶联、脱 Fmoc 保护并洗脱后，加入棕榈酸（4eq），HOBt（4eq），DIC（6eq）加入多肽反应柱中，加入 20mL *N,N*-二甲基甲酰胺反应两个小时，保持 30°C 恒温。抽去溶液，用 *N,N*-二甲基甲酰胺洗涤 3 次，每次 20mL，取少量树脂茛检，树脂透明无色，说明反应完全。用 20mL *N,N*-二甲基甲酰胺洗涤 6 次，用甲醇收缩 3 次，每次 3 分钟，每次 20mL，真空抽干得肽树脂。

### 5.1 肽树脂的裂解

取肽树脂重量 10eq 体积的冰冻裂解液（裂解液配比 TFA/MPA/TIS/水=90/5/2.5/2.5）加入装有多肽树脂的烧瓶中，保持恒温 25°C，反应 2 小时，过滤，将滤液加入 10eq 裂解液体积的冰冻甲基叔丁基醚中沉降 10 分钟，离心。用常温甲基叔丁基醚反复洗涤 4 次，真空干燥（<50°C）3 小时得粗肽。

### 5.2 纯化

流动相：0.1% 三氟乙酸的水/0.1% 三氟乙酸的乙腈；制备柱：ODS-PK C18，30mm×250mm×8mm；流速：25mL/min；柱温：25°C；波长：220nm。

梯度：水/乙腈:5:95-95:5，40 分钟。

对收集的样品进行减压浓缩和冻干后得到纯肽。ESI-MS  $m/z$   $[M+1]^+$ : 3507.15。

## 实施例 6: YGRKKRRQRRRKKNRNLRRQHSY-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:9) 的合成

以 1mmol 的合成规模为例

### 6.1 Fmoc-Tyr(tBu)-OH 的偶联

多肽反应柱 30°C 恒温，取替代度 0.338mmol/g 的 Rink-Amide-AM-Resin 3.0 克，加入多肽反应柱中，用 10mL *N,N*-二甲基甲酰胺洗涤一次，用 20mL 二氯甲烷溶胀 20 分钟，抽去溶液，用 20% 的哌啶/*N,N*-二甲基甲酰胺溶液脱保护基 2 次，每次 20mL，时间分别是 5 分钟和 10 分钟，结束后，用 *N,N*-二甲基甲酰胺洗涤 6 次，每次 20mL，真空抽干得肽树脂。取少量树脂进行茚三酮茚检，树脂蓝黑色，说明脱保护基完全。

称取 Fmoc-Tyr(tBu)-OH (4eq)，HOBt (4eq)，DIC (6eq) 加入多肽反应柱中，加入 20mL *N,N*-二甲基甲酰胺反应两个小时，保持 30°C 恒温。抽去溶液，用 *N,N*-二甲基甲酰胺洗涤 3 次，每次 20mL，取少量树脂茚检，树脂透明无色，说明反应完全。

保持多肽反应柱 30°C，用 20% 的哌啶/*N,N*-二甲基甲酰胺溶液脱保护基 2 次，每次 20mL，时间分别是 5 和 10 分钟，结束后用 *N,N*-二甲基甲酰胺洗涤 6 次，每次 20mL。取少量树脂进行茚三酮茚检，树脂蓝黑色，说明脱保护基完全。

步骤 6.2-6.24. 参考实施例 2 的步骤 2.2-2.24，区别在于用 HOBt 替换步骤 2.2 的 TBTU，DIC 替换步骤 2.2 的 DIPEA；用 Fmoc-Tyr(tBu)-OH 替换步骤 2.24 中的 Fmoc-N-Me-Tyr(tBu)-OH。

### 6.25 肽树脂的裂解

取肽树脂重量 10eq 体积的冰冻裂解液（裂解液配比 TFA/MPA/TIS/水=90/5/2.5/2.5）加入装有多肽树脂的烧瓶中，保持恒温 25°C，反应 2 小时，过滤，将滤液加入 10eq 裂解液体积的冰冻甲基叔丁基醚中沉降 10 分钟，离心。用常温甲基叔丁基醚反复洗涤 4 次，真空干燥（<50°C）3 小时得粗肽。

### 6.26 纯化

流动相：0.1% 三氟乙酸的水/0.1% 三氟乙酸的乙腈；制备柱：ODS-PK C18，30mm×250mm×8mm；流速：25mL/min；柱温：25°C；波长：220nm。

梯度：水/乙腈:5:95-95:5，40 分钟。

对收集的样品进行减压浓缩和冻干后得到纯肽。ESI-MS  $m/z$   $[M+1]^+$ : 3267.94。

## 实施例 7: Ac-YGRKKRRQRRRKKNRNLRRQHSY-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:10) 的合成

### 7.1 乙酰化

以实施例 6 步骤 6.24 的产物为起始原料，加入 30eq 的醋酸酐、15eq 的吡啶和 20mL *N,N*-二甲基甲酰胺，反应一个小时，用 *N,N*-二甲基甲酰胺洗 6 次。用甲醇收缩 3 次，每次 3 分钟，每次 20mL，真空抽干得肽树脂。

## 7.2 肽树脂的裂解

取肽树脂重量 10eq 体积的冰冻裂解液（裂解液配比 TFA/MPA/TIS/水=90/5/2.5/2.5）加入装有多肽树脂的烧瓶中，保持恒温 25°C，反应 2 小时，过滤，将滤液加入 10eq 裂解液体积的冰冻甲基叔丁基醚中沉降 10 分钟，离心。用常温甲基叔丁基醚反复洗涤 4 次，真空干燥（<50°C）3 小时得粗肽。

## 7.3 纯化

流动相：0.1% 三氟乙酸的水/0.1% 三氟乙酸的乙腈；制备柱：ODS-PK C18，30mm×250mm×8mm；流速：25mL/min；柱温：25°C；波长：220nm。

梯度：水/乙腈:5:95-95:5，40 分钟。

对收集的样品进行减压浓缩和冻干后得到纯肽。ESI-MS  $m/z$   $[M+1]^+$ : 3309.95。

## 实施例 8: pYGRKKRRQRRRKKNRNLRRQHSY-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:11) 的合成

### 8.1 Fmoc-Tyr(H<sub>2</sub>PO<sub>3</sub>BZL)-OH 的偶联

以实施例 6 步骤 6.23 的产物为起始原料，称取 Fmoc-Tyr(H<sub>2</sub>PO<sub>3</sub>BZL)-OH (4eq)，HOBt (4eq)，DIC (6eq) 加入多肽反应柱中，加入 20mL *N,N*-二甲基甲酰胺反应两个小时，保持 30°C 恒温。抽去溶液，用 *N,N*-二甲基甲酰胺洗涤 3 次，每次 20mL，取少量树脂茚检，树脂透明无色，说明反应完全。

保持多肽反应柱 30°C，用 20% 的哌啶/*N,N*-二甲基甲酰胺溶液脱保护基 2 次，每次 20mL，时间分别是 5 和 10 分钟，结束后用 *N,N*-二甲基甲酰胺洗涤 6 次，每次 20mL。取少量树脂进行茚三酮茚检，树脂蓝黑色，说明脱保护基完全。用甲醇收缩 3 次，每次 3 分钟，每次 20mL，真空抽干得肽树脂粗品。

### 8.2 肽树脂的裂解

取肽树脂重量 10eq 体积的冰冻裂解液（裂解液配比 TFA/MPA/TIS/水=90/5/2.5/2.5）加入装有多肽树脂的烧瓶中，保持恒温 25°C，反应 2 小时，过滤，将滤液加入 10eq 裂解液体积的冰冻甲基叔丁基醚中沉降 10 分钟，离心。用常温甲基叔丁基醚反复洗涤 4 次，真空干燥（<50°C）3 小时得粗肽。

### 8.3 纯化

流动相：0.1% 三氟乙酸的水/0.1% 三氟乙酸的乙腈；制备柱：ODS-PK C18，30mm×250mm×8mm；流速：25mL/min；柱温：25°C；波长：220nm。

梯度：水/乙腈:5:95-95:5，40 分钟。

对收集的样品进行减压浓缩和冻干后得到纯肽。ESI-MS  $m/z$   $[M+1]^+$ : 3347.90。

## 实施例 9: Me-YGRKKRRQRRRKKNRNLRRQHSY-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:12) 的合成

### 9.1 Fmoc-N-Me-Tyr(tBu)-OH 的偶联

以实施例 6 步骤 6.23 的产物为起始原料，称取 Fmoc-N-Me-Tyr(tBu)-OH (4eq)，HOBt (4eq)，DIC (6eq) 加入多肽反应柱中，加入 20mL *N,N*-二甲基甲酰胺反应两个小时，保持 30°C 恒温。抽去溶液，用 *N,N*-二甲基甲酰胺洗涤 3 次，每次 20mL，取少量树脂茚检，树脂透明无色，说明反应完全。

保持多肽反应柱 30°C，用 20% 的哌啶/*N,N*-二甲基甲酰胺溶液脱保护基 2 次，每次 20mL，时间分别是 5 和 10 分钟，结束后用 *N,N*-二甲基甲酰胺洗涤 6 次，每次 20mL。取少量树脂进行茚三酮茚检，树脂蓝黑色，说明脱保护基完全。用甲醇收缩 3 次，每次 3 分钟，每次 20mL，真空抽干得肽树脂。

### 9.2 肽树脂的裂解

取肽树脂重量 10eq 体积的冰冻裂解液（裂解液配比 TFA/MPA/TIS/水=90/5/2.5/2.5）加入装有多肽树脂的烧瓶中，保持恒温 25℃，反应 2 小时，过滤，将滤液加入 10eq 裂解液体积的冰冻甲基叔丁基醚中沉降 10 分钟，离心。用常温甲基叔丁基醚反复洗涤 4 次，真空干燥（<50℃）3 小时得粗肽。

### 9.3 纯化

流动相：0.1% 三氟乙酸的水/0.1% 三氟乙酸的乙腈；制备柱：ODS-PK C18，30mm×250mm×8mm；流速：25mL/min；柱温：25℃；波长：220nm。

梯度：水/乙腈:5:95-95:5，40 分钟。

对收集的样品进行减压浓缩和冻干后得到纯肽。ESI-MS  $m/z$   $[M+1]^+$ ：3281.95。

## 实施例 10：C<sub>15</sub>H<sub>31</sub>CO-YGRKKRRQRRRKKNRNLRRQHSY-NH<sub>2</sub>（SEQ ID NO:13）的合成

### 10.1 棕榈酸化

以实施例 6 步骤 6.24 的产物为起始原料，加入棕榈酸（4eq），HOBt（4eq），DIC（6eq）加入多肽反应柱中，加入 20mL *N,N*-二甲基甲酰胺反应两个小时，保持 30℃恒温。抽去溶液，用 *N,N*-二甲基甲酰胺洗涤 3 次，每次 20mL，取少量树脂茚检，树脂透明无色，说明反应完全。用 20mL *N,N*-二甲基甲酰胺洗涤 6 次，用甲醇收缩 3 次，每次 3 分钟，每次 20mL，真空抽干得肽树脂。

### 10.2 肽树脂的裂解

取肽树脂重量 10eq 体积的冰冻裂解液（裂解液配比 TFA/MPA/TIS/水=90/5/2.5/2.5）加入装有多肽树脂的烧瓶中，保持恒温 25℃，反应 2 小时，过滤，将滤液加入 10eq 裂解液体积的冰冻甲基叔丁基醚中沉降 10 分钟，离心。用常温甲基叔丁基醚反复洗涤 4 次，真空干燥（<50℃）3 小时得粗肽。

### 10.3 纯化

流动相：0.1% 三氟乙酸的水/0.1% 三氟乙酸的乙腈；制备柱：ODS-PK C18，30mm×250mm×8mm；流速：25mL/min；柱温：25℃；波长：220nm。

梯度：水/乙腈:5:95-95:5，40 分钟。

对收集的样品进行减压浓缩和冻干后得到纯肽，ESI-MS  $m/z$   $[M+1]^+$ ：3506.17。

## 实施例 11：YGRKKRRQRRRKKNRNLRRQHSY（SEQ ID NO:14）的合成

参考实施例 1 的制备方法，区别在于把制备步骤 7 中的 Fmoc-Leu-OH 换成 Fmoc-Ile-OH。制备得纯肽，ESI-MS  $m/z$   $[M+1]^+$ ：3268.92。

## 实施例 12：YGRKKRRQRRRKKNRNLRRQHSY-NH<sub>2</sub>（SEQ ID NO:15）的合成

参考实施例 6 的制备方法，区别在于把制备步骤 6.7 中的 Fmoc-Leu-OH 换成 Fmoc-Ile-OH，制备得纯肽，ESI-MS  $m/z$   $[M+1]^+$ ：3267.94。

## 实施例 13：YGRKKRRQRRRKDRDKLRRQHSY（SEQ ID NO:16）的合成

参考实施例 1 的制备方法，区别在于将实施例 1 中步骤 9 和步骤 11 中的 Fmoc-Asn(Trt)-OH 换成 Fmoc-Asp(otBu)-OH。制备得纯肽，ESI-MS  $m/z$   $[M+1]^+$ ：3270.89。

## 实施例 14：YGRKKRRQRRRK(N-AEEA-Palmitic acid)KNRNLRRQHSY（SEQ ID NO:17）的合成

以 1mmol 的合成规模为例，合成步骤同实施例 1 的方法，不同之处是将实施例 1 中步骤 13 中的 Fmoc-Lys(Boc)-OH 换成 Fmoc-Lys(Dde)-OH。

### 14.1 Fmoc-Lys(Dde)-OH 的偶联

称取 Fmoc-Lys(Dde)-OH (4eq), HOBt (4eq), DIC (6eq) 加入多肽反应柱中, 加入 20mL *N,N*-二甲基甲酰胺反应两个小时, 保持 30°C 恒温。抽去溶液, 用 *N,N*-二甲基甲酰胺洗涤 3 次, 每次 20mL, 取少量树脂茚检, 树脂透明无色, 说明反应完全。

用 20mL 5% 的水合肼/DMF 溶液脱保护基 Dde, 时间是 60 分钟, 结束后, 用 DMF 洗涤 6 次, 每次 20mL, 期间多肽反应柱保持 30°C 恒温。取少量树脂进行茚三酮茚检, 树脂蓝黑色, 说明脱保护基完全。

#### 14.2 Fmoc-AEEA-OH 的偶联

称取 4eq 的 Fmoc-AEEA-OH、4eq 的 HOBt, 6eq 的 DIC 加入多肽反应柱中, 加入 20mL DMF 反应两个小时, 保持 30°C 恒温。抽去溶液, 用 DMF 洗涤 3 次, 每次 20mL, 取少量树脂茚检, 树脂透明无色, 说明反应完全。

多肽反应柱 30°C 恒温, 用 20% 的哌啶/DMF 溶液脱 Fmoc 保护基 2 次, 每次 20mL, 时间分别是 5 分钟和 10 分钟, 结束后, 用 DMF 洗涤 6 次, 每次 20mL, 真空抽干得肽树脂。取少量树脂进行茚三酮茚检, 树脂蓝黑色, 说明脱保护基完全。

#### 14.3 棕榈酸化

加入棕榈酸 (4eq), HOBt (4eq), DIC (6eq) 加入多肽反应柱中, 加入 20mL *N,N*-二甲基甲酰胺反应两个小时, 保持 30°C 恒温。抽去溶液, 用 *N,N*-二甲基甲酰胺洗涤 3 次, 每次 20 mL, 取少量树脂茚检, 树脂透明无色, 说明反应完全。用 20 mL *N,N*-二甲基甲酰胺洗涤 6 次, 用甲醇收缩 3 次, 每次 3 分钟, 每次 20 mL, 真空抽干得肽树脂。

#### 14.4 肽树脂的裂解

取肽树脂重量 10eq 体积的冰冻裂解液 (裂解液配比 TFA/MPA/TIS/水=90/5/2.5/2.5) 加入装有多肽树脂的烧瓶中, 保持恒温 25°C, 反应 2 小时, 过滤, 将滤液加入 10eq 裂解液体积的冰冻甲基叔丁基醚中沉降 10 分钟, 离心。用常温甲基叔丁基醚反复洗涤 4 次, 真空干燥 (<50°C) 3 小时得粗肽。

#### 14.5 纯化

流动相: 0.1% 三氟乙酸的水/0.1% 三氟乙酸的乙腈; 制备柱: ODS-PK C18, 30 mm×250 mm×8 mm; 流速: 25 mL/min; 柱温: 25°C; 波长: 220 nm。

梯度: 水/乙腈: 5:95-95:5, 40 分钟。

对收集的样品进行减压浓缩和冻干后得到纯肽。ESI-MS  $m/z$   $[M+1]^+$ : 3652.2251。

#### 实施例 15: YGRKKRRQRRRKKNRNLRRHSY (SEQ ID NO:18) 的合成

参考实施例 1 的制备方法, 区别在于把实施例 1 步骤 4 中的 Fmoc-Gln(Trt)-OH 的换成 Fmoc-Glu (otBu) -OH。制备得纯肽, ESI-MS  $m/z$   $[M+1]^+$ : 3269.91。

#### 实施例 16: YGRKKRRQRRRKKNRDKLRRHSY (SEQ ID NO:19) 的合成

参考实施例 1 的制备方法, 区别在于把实施例 1 步骤 4 中的 Fmoc-Gln(Trt)-OH 和步骤 9 中的 Fmoc-Asn(Trt)-OH 分别换成 Fmoc-Glu (otBu) -OH 和 Fmoc-Asp (otBu) -OH。制备得纯肽, ESI-MS  $m/z$   $[M+1]^+$ : 3270.89。

#### 实施例 17: YGRKKRRERRRRKKDRNKLRRQHSY (SEQ ID NO:20) 的合成

参考实施例 1 的制备方法, 区别在于把实施例 1 步骤 11 中的 Fmoc-Asn(Trt)-OH 和实施步骤 17 中的 Fmoc-Gln(Trt)-OH 分别换成 Fmoc-Asp (otBu) -OH 和 Fmoc-Glu (otBu) -OH。制备得纯肽, ESI-MS  $m/z$   $[M+1]^+$ : 3270.89。

#### 实施例 18: Ac-YGRKKRRERRRRKKDRDKLRRHSY-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:21) 的合成

参考实施例 7 的制备方法, 区别在于把步骤 7.4 中的 Fmoc-Gln(Trt)-OH、步骤 7.9 中的 Fmoc-Asn(Trt)-OH、步骤 11 中的 Fmoc-Asn(Trt)-OH 和步骤 17 中 Fmoc-Gln(Trt)-OH 分别换成 Fmoc-Glu (otBu) -OH、Fmoc-Asp (otBu) -OH、Fmoc-Asp (otBu) -OH 和 Fmoc-Glu (otBu) -OH。制备得纯肽, ESI-MS m/z [M+1]<sup>+</sup>: 3314.89。

**实施例 19: Me-YGRKKRRERRRRKKDRDKLRREHSY-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:22) 的合成**

参考实施例 9 的制备方法, 区别在于把步骤 9.4 中的 Fmoc-Gln(Trt)-OH、步骤 9.9 中的 Fmoc-Asn(Trt)-OH、步骤 9.11 中的 Fmoc-Asn(Trt)-OH 和步骤 9.17 中 Fmoc-Gln(Trt)-OH 分别换成 Fmoc-Glu (otBu) -OH、Fmoc-Asp (otBu) -OH、Fmoc-Asp (otBu) -OH 和 Fmoc-Glu (otBu) -OH。制备得纯肽, ESI-MS m/z [M+1]<sup>+</sup>: 3286.89。

**实施例 20: Ac-YGRKKRRERRRRKKDRDKIRREHSY-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:23) 的合成**

参考实施例 18 的制备方法, 区别在于把步骤 18.7 中的 Fmoc-Leu-OH 换成 Fmoc-Leu-OH (D 构型)。制备得纯肽, ESI-MS m/z [M+1]<sup>+</sup>: 3314.89。

**实施例 21: Ac-YGRKKRRERRRRKKDRDKLRRQHSY-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:24) 的合成**

参考实施例 7 的制备方法, 区别在于把步骤 7.9 中的 Fmoc-Asn(Trt)-OH、步骤 7.11 中的 Fmoc-Asn(Trt)-OH 和步骤 7.17 中的 Fmoc-Gln(Trt)-OH 分别换成 Fmoc-Asp (otBu) -OH、Fmoc-Asp (otBu) -OH 和 Fmoc-Glu (otBu) -OH。制备得纯肽, ESI-MS m/z [M+1]<sup>+</sup>: 3313.90。

**实施例 22: Me-YGRKKRRERRRRKKDRDKLRRQHSY-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:25) 的合成**

参考实施例 9 的制备方法, 区别在于把步骤 9.9 中的 Fmoc-Asn(Trt)-OH、步骤 9.11 中的 Fmoc-Asn(Trt)-OH 和步骤 9.17 中的 Fmoc-Gln(Trt)-OH 分别换成 Fmoc-Asp (otBu) -OH、Fmoc-Asp (otBu) -OH 和 Fmoc-Glu (otBu) -OH。制备得纯肽, ESI-MS m/z [M+1]<sup>+</sup>: 3285.91。

**实施例 23: Ac-YGRKKRRERRRRKKDRDKVRREHSY-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:26) 的合成**

参考实施例 18 的制备方法, 区别在于把步骤 18.7 中的 Fmoc-Leu-OH 换成 Fmoc-Val-OH。制备得纯肽, ESI-MS m/z [M+1]<sup>+</sup>: 3300.87。

**实施例 24: Me-YAibRKKRRERRRRKKDRDKTleRREHSY-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:27) 的合成**

参考实施例 19 的制备方法, 区别在于把步骤 19.7 中的 Fmoc-Leu-OH 和步骤 19.23 中的 Fmoc-Gly-OH 分别换成 Fmoc-Tle-OH 和 Fmoc-Aib-OH。制备得纯肽, ESI-MS m/z [M+1]<sup>+</sup>: 3313.92。

**实施例 25: Ac-YGRKKRRERRRRKKDRDKTleRREHSY-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:28) 的合成**

参考实施例 18 的制备方法, 区别在于把步骤 18.7 中的 Fmoc-Leu-OH 换成 Fmoc-Tle-OH。制备得纯肽, ESI-MS m/z [M+1]<sup>+</sup>: 3313.88。

**实施例 26: Ac-YGRK(D-K)(D-R)RER(D-R)RKKDRDK(D-L)(D-R)REHSY-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:29) 的合成**

参考实施例 18 的制备方法, 区别在于把步骤 18.6 中的 Fmoc-Arg(Pbf)-OH 的、步骤 18.7 中的 Fmoc-Leu-OH、步骤 18.15 中的 Fmoc-Arg(Pbf)-OH、步骤 18.19 中的 Fmoc-Arg(Pbf)-OH 和步骤 18.20 中的 Fmoc-Lys(Boc)-OH 分别换成 Fmoc-Arg(Pbf)-OH (D 构型)、Fmoc-Leu-OH (D 构型)、Fmoc-Arg(Pbf)-OH (D 构型)、Fmoc-Arg(Pbf)-OH (D 构型) 和 Fmoc-Lys(Boc)-OH (D 构型)。制备得纯肽, ESI-MS m/z [M+1]<sup>+</sup>: 3312.89。

**效果例 1 PC-12 神经细胞在谷氨酸刺激下, 本申请的多肽化合物提高细胞存活率**

**1.1、PC-12 细胞系培养及细胞兴奋性死亡造模**

PC-12 细胞 (大鼠肾上腺髓质的神经母细胞瘤细胞系) 在 DMEM/F12 完全培养基中培养

至融合度 80-90%时, 将细胞消化收集重悬后, 以  $5\times 10^4$ /孔种在铺有爬片的 24 孔板中, 细胞培养 26 小时后, 用谷氨酸进行细胞兴奋性死亡造模诱导。造模方法为: 称量适量谷氨酸, 用 DMEM/F12 培养基配制成储液, 过滤后用培养基稀释, 以换液形式进行细胞给药。给药后继续孵育 24 小时。

1.2、小分子的施用

在谷氨酸造模前, 向上步孵育后的细胞给予 10nM 本申请的多肽化合物预处理 30min, 然后给与谷氨酸刺激。

1.3、碘化丙啶染色

对本申请的多肽化合物处理后的细胞进行碘化丙啶染色以评估细胞死亡。弃掉培养基后用 PBS 洗涤, 加入碘化丙啶/Hoechst, 孵育 30 分钟后取出, 弃掉染液, 用 PBS 清洗后固定封片, 在荧光显微镜下进行图像采集。对所采集图片的碘化丙啶阳性染色细胞和 Hoechst 阳性染色细胞进行计数并计算细胞存活率, 以 MK-801 为阳性化合物, 标准化存活率计算公式为:  $(\text{化合物组存活率}-\text{谷氨酸组存活率}) / (\text{阳性对照组存活率}-\text{谷氨酸组存活率}) \times 100\%$ 。具体数据见表格 3。

在上述化合物量效关系研究基础上, 进一步比较同一剂量 (10 nM) 下不同小分子化合物对于 PC-12 神经细胞兴奋性死亡的抑制作用, 具体数据见表 3。

表 3: 各多肽化合物对 PC-12 促进神经细胞存活的标准化存活率 (%)

| 实施例    | 标准化存活率 (%) |
|--------|------------|
| 实施例 1  | 41.00%     |
| 实施例 2  | 65.56%     |
| 实施例 4  | 85.00%     |
| 实施例 9  | 63.17%     |
| 实施例 10 | 49.46%     |
| 实施例 12 | 58.59%     |
| 实施例 14 | 84.14%     |
| 实施例 16 | 85.15%     |
| 实施例 18 | 87.20%     |
| 实施例 19 | 87.71%     |
| 实施例 20 | 87.36%     |
| 实施例 21 | 50.61%     |
| 实施例 22 | 79.97%     |
| 实施例 23 | 74.16%     |
| 实施例 24 | 85.77%     |
| 实施例 25 | 86.80%     |
| 实施例 26 | 82.39%     |

结果表明, 相比于实施例 1, 本申请的多肽化合物能有效抑制谷氨酸诱导的 PC-12 细胞的兴奋性死亡, 且表现出明显优势, 说明本申请的多肽化合物的生物活性明显提高。在此基础上, 对本申请的多肽化合物进行对 PC-12 神经保护作用的量效关系分析, 具体数据见表 4。

表 4：各多肽化合物对促进 PC-12 促进神经细胞存活的作用量效关系研究

| 实施例    | EC <sub>50</sub> (nM) |
|--------|-----------------------|
| 实施例 1  | 23.59                 |
| 实施例 2  | 12.61                 |
| 实施例 6  | 13.5                  |
| 实施例 7  | 8.72                  |
| 实施例 9  | 4.83                  |
| 实施例 16 | 18.77                 |
| 实施例 24 | 1.354                 |

结果表明，本申请的多肽化合物能有效抑制谷氨酸诱导的 PC-12 细胞的兴奋性死亡；相比于实施例 1，其 EC<sub>50</sub> 均明显降低，说明本申请的多肽化合物的生物活性明显提高。

**效果例 2：各化合物在大鼠体内的药代动力学特征**

静脉给药：SD 大鼠每组 3 只，分别经尾静脉给予实施例 1、实施例 2、实施例 3、实施例 6、实施例 7、实施例 17、实施例 19，给药剂量均为 10mg/kg，给药后所有 SD 大鼠自由饮食及饮水。给药后 3 min、10 min、30 min、1h、2h、6h、10h、24h 分别采集血浆，3 只/时间点。

样品处理：全血采用 EDTA-K<sub>2</sub> 抗凝，全血采集后 30min 内，于 2-8℃，离心力 3000g，离心 10min，离心后取分离血浆至新的 1.5mL 离心管中，于 -80℃ 中条件冻存。

分析方法：使用 Shimadzu LC30AD and AB Sciex QTRAP 6500+ 仪器，采用 LC-MS/MS 方法，检测大鼠血浆的各化合物浓度，计算给药后相关药代参数。实验结果如表 5 所示。

表 5：给药后相关药代参数

| 实施例    | V <sub>ss</sub> (L/kg) | T <sub>1/2</sub> (h) | MRT <sub>inf</sub> (h) |
|--------|------------------------|----------------------|------------------------|
| 实施例 1  | 1.29                   | 0.76                 | 0.87                   |
| 实施例 2  | 3.94                   | 1.73                 | 1.84                   |
| 实施例 3  | 7.90                   | 1.28                 | 1.71                   |
| 实施例 6  | 2.53                   | 1.23                 | 1.65                   |
| 实施例 7  | 3.58                   | 1.51                 | 1.93                   |
| 实施例 17 | 23.1                   | 1.66                 | 2.29                   |
| 实施例 19 | 9.11                   | 1.16                 | 1.73                   |

结果表明，本申请的多肽化合物，能有效提高多肽本身在体内的稳定性、跨细胞的能力；相比于实施例 1，其血浆半衰期 (T<sub>1/2</sub>) 明显延长，组织分布容积 (V<sub>ss</sub>) 明显增大，体内平均驻留时间明显延长 (MRT<sub>inf</sub>)，说明本申请的多肽化合物的能更好地从血液分布至组织中，在体内发挥作用的时间更长。

虽然在本文已经非常详细地描述了治疗神经损伤的组合物和方法的各种实施方案，但该实施方案仅仅作为本文描述的申请内容的非限制性实例而提供。因此，本领域技术人员将理解，可以对本申请进行各种变化和改变，而不偏离本申请的范围。实际上，本申请内容不旨在是穷尽性的或旨在限制本申请的范围。

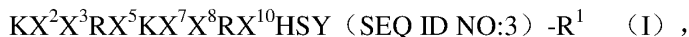
进一步，在代表性实施方案的描述中，本申请内容已经以特定步骤顺序给出本申请的方法和/或过程。然而，该方法或过程不应限于所描述的特定步骤顺序。其它步骤顺序是可能的。

因此，本文申请的特定步骤顺序不应解释为对本申请的限制。此外，针对方法和/或过程的申请内容不应限于以所描述的顺序进行它们的步骤。这样的顺序可以变化并且仍在本申请的范围内。

以上所述仅是本申请的具体实施方式，使本领域技术人员能够理解或实现本申请。对这些实施例的多种修改对本领域的技术人员来说将是显而易见的，本文中所定义的一般原理可以在不脱离本申请的精神或范围的情况下，在其它实施例中实现。因此，本申请将不会被限制于本文所述的这些实施例，而是要符合与本文所申请的原理和新颖特点相一致的最宽的范围。

## 权利要求书

1. 一种多肽化合物，其含有通式 (I) 所示的结构：



其中， $\text{X}^2$  选自 Lys、HoLys、Dap、DAB、Cit、Orn、D-Lys、D-HoLys、D-Dap、D-DAB、D-Cit、D-Orn 或侧链氨基被  $\text{Z}^1$  修饰的 Lys； $\text{X}^3$  和  $\text{X}^5$  独立的选自 Asn、Asp、D-Asn 或 D-Asp； $\text{X}^7$  选自 Ile、Leu、Val、Tel、D-Ile、D-Leu、D-Val 或 D-Tel； $\text{X}^8$  选自 Arg、HomoArg、D-Arg 或 D-HomoArg； $\text{X}^{10}$  选自 Glu、Gln、D-Glu 或 D-Gln；

$\text{R}^1$  选自 -OH、-ol、 $-\text{NR}^2\text{R}^3$  和  $-\text{OR}^4$ ，其中， $\text{R}^2$  和  $\text{R}^3$  分别独立地选自氢、 $\text{C}_{1-16}$  烷基、 $\text{C}_{3-12}$  环烷基和 3 至 12 元杂环烷基，或者  $\text{R}^2$ 、 $\text{R}^3$  与相连的氮原子共同形成 3 至 12 元杂环烷基； $\text{R}^4$  选自  $\text{C}_{1-16}$  烷基、 $\text{C}_{3-12}$  环烷基和 3 至 12 元杂环烷基；

所述烷基、环烷基、杂环烷基任选的被一个或多个相同或不同的  $\text{R}^5$  取代；

$\text{R}^5$  选自卤素、硝基、氰基、羧基、羰基、羧基、 $-\text{NR}_a\text{R}_b$ 、巯基、 $\text{C}_{1-8}$  烷基、 $\text{C}_{1-8}$  烷氧基、卤代  $\text{C}_{1-8}$  烷基、卤代  $\text{C}_{1-8}$  烷氧基、 $\text{C}_{3-8}$  环烷基、 $\text{C}_{3-8}$  环烷基氧基、3 至 8 元杂环烷基、 $-\text{SC}_{1-3}$  烷基、 $-\text{SO}_2\text{C}_{1-3}$  烷基、 $-\text{SO}_2\text{NR}_a\text{R}_b$ 、 $-\text{S}(\text{O})\text{C}_{1-3}$  烷基、 $-\text{C}(\text{O})\text{NR}_a\text{R}_b$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{C}_{1-3}$  烷基、 $-\text{C}(\text{O})\text{OC}_{1-3}$  烷基、 $-\text{OC}(\text{O})\text{C}_{1-3}$  烷基、 $\text{C}_{6-10}$  芳基、5 至 10 元杂芳基；

$\text{R}_a$ 、 $\text{R}_b$  各自独立地为氢或  $\text{C}_{1-8}$  烷基；或者  $\text{R}_a$ 、 $\text{R}_b$  与相连的氮原子共同形成 3 至 6 元杂环烷基；以及

$\text{Z}^1$  选自 -AEEA-COR<sup>6</sup>，其中， $\text{R}^6$  为  $\text{C}_{1-15}$  的烷基。

2. 如权利要求 1 所述的多肽化合物，其中，所述多肽化合物在其 N 端或 C 端进一步包含穿膜肽。

3. 如权利要求 2 所述的多肽化合物，其中，在所述多肽化合物 N 端包含穿膜肽，且所述穿膜肽的 N 端被  $\text{R}^7$  基团修饰，所述多肽化合物的结构如通式 (II) 所示：

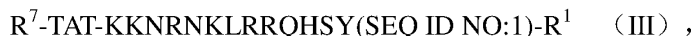


其中， $\text{R}^7$  选自氢、 $\text{C}_{1-16}$  烷基、 $\text{C}_{3-12}$  环烷基、3 至 12 元杂环烷基、 $\text{R}^8\text{CO}-$ 、和磷酸基，其中  $\text{R}^8$  选自  $\text{C}_{1-16}$  烷基、 $\text{C}_{3-12}$  环烷基和 3 至 12 元杂环烷基、 $\text{C}_{6-10}$  芳基、5 至 10 元杂芳基。

4. 如权利要求 2 或 3 所述多肽化合物，其中，所述穿膜肽选自 TAT 序列、MAP 序列、MTS 序列或 R9 序列或其变体。

5. 如权利要求 2-4 任一项所述的多肽化合物，其中，所述穿膜肽为 TAT 序列或其变体，所述 TAT 序列至少包括转录反式激活蛋白中的第 49-57 位氨基酸片段。

6. 如权利要求 2-4 任一项所述的多肽化合物，其中，所述穿膜肽为 TAT 序列，其中， $\text{X}^2$  选自 Lys； $\text{X}^3$  和  $\text{X}^5$  选自 Asn； $\text{X}^7$  选自 Leu； $\text{X}^8$  选自 Arg； $\text{X}^{10}$  选自 Gln；所述多肽化合物的结构如通式 (III) 所示：



其中，TAT 与 KKNRNKLRRQHSY (SEQ ID NO:1) 通过主链酰胺键连接，所述主链酰胺键中氮原子任选的被  $\text{C}_{1-3}$  烷基化，例如甲基化；

$\text{R}^1$  选自 -OH、-ol、 $-\text{NR}^2\text{R}^3$  和  $-\text{OR}^4$ ，其中  $\text{R}^2$  和  $\text{R}^3$  分别独立地选自氢、 $\text{C}_{1-16}$  烷基、 $\text{C}_{3-12}$  环烷基和 3 至 12 元杂环烷基，或者  $\text{R}^2$ 、 $\text{R}^3$  与相连的氮原子共同形成 3 至 12 元杂环烷基； $\text{R}^4$  选自  $\text{C}_{1-16}$  烷基、 $\text{C}_{3-12}$  环烷基和 3 至 12 元杂环烷基；

所述烷基、环烷基、杂环烷基任选的被一个或多个相同或不同的  $\text{R}^5$  取代；

$\text{R}^5$  选自卤素、硝基、氰基、羧基、羰基、羧基、 $-\text{NR}_a\text{R}_b$ 、巯基、 $\text{C}_{1-8}$  烷基、 $\text{C}_{1-8}$  烷氧基、卤代  $\text{C}_{1-8}$  烷基、卤代  $\text{C}_{1-8}$  烷氧基、 $\text{C}_{3-8}$  环烷基、 $\text{C}_{3-8}$  环烷基氧基、3 至 8 元杂环烷基、 $-\text{SC}_{1-3}$

烷基、-SO<sub>2</sub>C<sub>1-3</sub> 烷基、-SO<sub>2</sub>NR<sub>a</sub>R<sub>b</sub>、-S(O)C<sub>1-3</sub> 烷基、-C(O)NR<sub>a</sub>R<sub>b</sub>、-C(O)C<sub>1-3</sub> 烷基、-C(O)OC<sub>1-3</sub> 烷基、-OC(O)C<sub>1-3</sub> 烷基、C<sub>6-10</sub> 芳基、5 至 10 元杂芳基；

R<sub>a</sub>、R<sub>b</sub> 各自独立地为氢或 C<sub>1-8</sub> 烷基；或者 R<sub>a</sub>、R<sub>b</sub> 与相连的氮原子共同形成 3 至 6 元杂环烷基；且 R<sup>7</sup> 为氢时，R<sup>1</sup> 不为-OH；所述 TAT 序列至少包括转录反式激活蛋白中的第 49-57 位氨基酸片段；

R<sup>7</sup> 选自氢、C<sub>1-16</sub> 烷基、C<sub>3-12</sub> 环烷基、3 至 12 元杂环烷基、R<sup>8</sup>CO-、和磷酸基，其中 R<sup>8</sup> 选自 C<sub>1-16</sub> 烷基、C<sub>3-12</sub> 环烷基和 3 至 12 元杂环烷基、C<sub>6-10</sub> 芳基、5 至 10 元杂芳基。

7. 如权利要求 4-6 任一项所述的多肽化合物，其中，所述 TAT 序列选自 YGRKKRRQRRR (SEQ ID NO:4)、GRKKRRQRRR (SEQ ID NO:33)、YGRKKRRQRRRPPQ (SEQ ID NO:34) 或 GRKKRRQRRRQ (SEQ ID NO:35) 的短肽。

8. 如权利要求 6 或 7 所述的多肽化合物，其中，所述 TAT 序列的变体为所述 TAT 序列中具有 1、2 或 3 个氨基酸取代、添加或删除。

9. 如权利要求 6-8 任一项所述的多肽化合物，其中，所述 TAT 序列的变体具有选自与 YGRKKRRQRRR (SEQ ID NO:4) 具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 99% 或 100% 同一性的序列。

10. 如权利要求 6-9 任一项所述的多肽化合物，其中，所述 TAT 序列的变体为所述 TAT 序列中至少一个 Gln 替换为 Glu、和/或至少一个 L-Arg 替换为 D-Arg、和/或至少一个 L-Lys 替换为 D-Lys 的氨基酸序列。

11. 如权利要求 1-10 任一项所述的多肽化合物，其中 R<sup>1</sup> 选自-OH 或-NH<sub>2</sub>。

12. 如权利要求 3-11 任一项所述的多肽化合物，其中，R<sup>7</sup> 选自氢、C<sub>1-3</sub> 烷基或乙酰基。

13. 如权利要求 1-12 任一项所述的多肽化合物，其中，所述多肽化合物选自以下 SEQ ID NO:5- SEQ ID NO:29 所示的多肽化合物：

Me-YGRKKRRQRRRKKNRNLRRQHSY (SEQ ID NO:5)、  
pYGRKKRRQRRRKKNRNLRRQHSY (SEQ ID NO:6)、  
Ac-YGRKKRRQRRRKKNRNLRRQHSY (SEQ ID NO:7)、  
C<sub>15</sub>H<sub>31</sub>CO-YGRKKRRQRRRKKNRNLRRQHSY (SEQ ID NO:8)、  
YGRKKRRQRRRKKNRNLRRQHSY-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:9)、  
Ac-YGRKKRRQRRRKKNRNLRRQHSY-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:10)、  
pYGRKKRRQRRRKKNRNLRRQHSY-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:11)、  
Me-YGRKKRRQRRRKKNRNLRRQHSY-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:12)、  
C<sub>15</sub>H<sub>31</sub>CO-YGRKKRRQRRRKKNRNLRRQHSY-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:13)、  
YGRKKRRQRRRKKNRNLRRQHSY (SEQ ID NO:14)、  
YGRKKRRQRRRKKNRNLRRQHSY-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:15)、  
YGRKKRRQRRRKDRDKLRRQHSY (SEQ ID NO:16)、  
YGRKKRRQRRR-K(N-AEEA-Palmitic acid)-KNRNLRRQHSY (SEQ ID NO:17)、  
YGRKKRRQRRRKKNRNLRRQHSY (SEQ ID NO:18)、  
YGRKKRRQRRRKKNRDKLRRQHSY (SEQ ID NO:19)、  
YGRKKRRERRRKKNRNLRRQHSY (SEQ ID NO:20)、  
Ac-YGRKKRRERRRKKNRDKLRRQHSY-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:21)、  
Me-YGRKKRRERRRKKNRDKLRRQHSY-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:22)、  
Ac-YGRKKRRERRRKKNRDK(D-L)RRQHSY-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:23)、

Ac-YGRKKRRERRRRKKDRDKLRRQHSY-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:24)、  
Me-YGRKKRRERRRRKKDRDKLRRQHSY-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:25)、  
Ac-YGRKKRRERRRRKKDRDKVRREHSY-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:26)、  
Me-YAibRKKRRERRRRKKDRDKTleRREHSY-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:27)、  
Ac-YGRKKRRERRRRKKDRDKTleRREHSY-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:28) 和  
Ac-YGRK(D-K)(D-R)RER(D-R)RKKDRDK(D-L)(D-R)REHSY-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:29)。

14. 一种药物组合物，其包括权利要求 1-13 任一项所述多肽化合物或其变体、或药学上可接受的盐，以及可药用赋形剂。

15. 权利要求 1-13 任一项所述多肽化合物、或所述多肽化合物的变体或药学上可接受的盐，或权利要求 14 所述药物组合物在制备药物中的用途，其中，所述药物为治疗创伤性脑损伤和/或创伤性脑损伤后抑制神经损伤的药物。

16. 一种治疗创伤性脑损伤和/或创伤性脑损伤后抑制神经损伤的方法，其包括向受试者施用权利要求 1-13 任一项所述多肽化合物、或所述多肽化合物的变体或药学上可接受的盐、或权利要求 14 所述的药物组合物。

17. 如权利要求 1-13 任一项所述多肽化合物、或所述多肽化合物的变体或药学上可接受的盐、或权利要求 14 所述的药物组合物，其用于治疗创伤性脑损伤和/或创伤性脑损伤后抑制神经损伤的用途。