

经修饰的多肽及其在镇痛领域的应用

相关申请的交叉引用

本申请要求对 2023 年 6 月 21 日提交的申请 PCT/CN2023/101880 享有优先权。在先申请视为本申请公开的一部分，并整体纳入本申请。

技术领域

本申请涉及生物医药领域，具体涉及一种肽或其衍生物及其在镇痛方面的用途。

背景技术

神经病理性疼痛是指由躯体感觉神经系统病变或疾病引起的疼痛，是一种常见的慢性疼痛，严重影响患者生活质量，据统计全球约 8% 的人口饱受其折磨 (GILRON I, BARON R, JENSEN T. Neuropathic pain: principles of diagnosis and treatment[J]. Mayo Clin Proc, 2015,90(4): 532-545)。代谢紊乱(例如糖尿病性神经痛)、神经卡压、肿瘤相关疼痛、脑卒中后疼痛、帕金森病相关性疼痛、脊髓损伤后性疼痛和三叉神经痛、舌咽神经痛、病毒感染如带状疱疹后神经痛等都属于典型的神经病理性疼痛(SZOK D, TAJTI J, NYÁRI A, et al. Therapeutic approaches for peripheral and central neuropathic pain [J]. Behav Neurol, 2019,2019: 8685954.和 Jensen TS, Baron R, Haanp M, et al. A new definition of neuropathic pain [J]. Pain, 2011, 152(10): 2204 -2205)。

周围神经病变的特点是神经损伤和轴突丢失可以分为遗传形式或后天形式。后天性周围神经病变与多种原因有关，包括接触有毒制剂，其中抗肿瘤化合物诱发的疼痛被称为化疗诱导周围神经病变(CIPN)。有综述总结了几项 CIPN 临床前研究中的神经免疫相互作用表明化疗药物和神经毒性之间的联系。研究已经证明了免疫反应的参与(先天的和适应性)以及介质(细胞因子和趋化因子)的刺激和分泌可能是疼痛症状的原因。此外，神经炎症成分也被显示在脊髓中，小胶质细胞和星形胶质细胞在 CIPN 中发挥重要作用(Front Immunol. 2021 Feb 4;11:626687)。

烟碱乙酰胆碱受体(nAChR)是自然界普遍存在的一种具有重要生理功能的膜蛋白，能调节生物体一系列的生理功能，如：痛觉、认知、记忆、焦虑等。乙酰胆碱受体广泛存在于神经细胞中，其与镇痛密切相关，其亚型主要

是 $\alpha 7$ 、 $\alpha 9\alpha 10$ 等(参见例如, Hone A.J. 等人, Nicotinic acetylcholine receptors in neuropathic and inflammatory pain, *FEBS lett.* 2018 April; 592(7): 1045–1062 和吴培等人, $\alpha 7$ 烟碱型乙酰胆碱受体在调控动物炎症反应中的作用, 动物营养学报, 2021, 33 (11):6001-6008)。芋螺为肉食性软体动物, 是芋螺科动物的总称。世界上约有 700 种芋螺, 主要分布在热带海域。芋螺毒素是芋螺分泌的神经毒液, 主要由 10~30 个氨基酸组成, 且包含二硫键。美国犹他大学 Olivera 教授的团队分离鉴定了多种芋螺毒素的序列和生物活性, 发现芋螺毒素可能成为治疗多种神经性疾病的潜在药物, 由此引发了国内外研究者对芋螺毒素开发、结构改造和作用机理研究的热潮。其中, Vc1.1, 也称为 ACV1, 含有 16 个氨基酸、两对二硫键的多肽, 是一种从维多利亚圆锥体(*Conus victoriae*)分离的具有止痛作用的 α -芋螺毒素。Vc1.1 是 $\alpha 9\alpha 10$ 烟碱乙酰胆碱受体(nAChR)的选择性拮抗剂, 在大鼠坐骨神经痛(CCI) 和神经病理性疼痛(PNL)模型中对神经性疼痛有治疗效果。但是由于人体和老鼠体内 $\alpha 9\alpha 10$ nAChR 的差异性, Vc1.1 本已进入二期临床, 结果在人体 $\alpha 9\alpha 10$ nAChR 上相比于老鼠 $\alpha 9\alpha 10$ nAChR 活性下降了 100 倍, 迫使相关机构中止了临床研究。Lorenzo Di Cesare Mannelli 等人通过对大鼠坐骨神经结扎在慢性压迫性损伤(CCI)模型研究了芋螺毒素多肽 RgIA 的镇痛效果及机制, 坐骨神经的组织学分析显示 RgIA 可以预防 CCI 引起轴突致密性和直径降低, 髓鞘丢失及纤维减少, 此外, RgIA 显著减少水肿和炎症浸润, 包括减少 CD86+巨噬细胞。在脊髓的背角中, RgIA 阻止了 CCI 诱导的小胶质细胞和星形胶质细胞的活化。这些数据表明, 多肽 RgIA 可能代表了一类新的治疗神经性疼痛的药物, 可以保护外周神经组织以及通过抑制神经胶质细胞活化来防止中枢适应不良可塑性(PAIN:155 (2014) 1986–1995)。

齐考诺肽(Ziconotide)于 2004 年通过 FDA 批准用于治疗剧烈性慢性疼痛, 它最初是由僧袍芋螺(*Conus magus*)的毒液分离得到的, 包含 25 个氨基酸和三对二硫键。作为选择性 Cav2.2 通道拮抗剂, 齐考诺肽阻断 Ca^{2+} 内流并抑制传入神经末梢释放兴奋性递质, 其镇痛效力是阿片类药物的 1000 倍。但鞘内注射的特殊给药方式及一系列中枢神经系统不良反应, 使得患者依从性差, 从而限制了齐考诺肽的普遍应用。

因此,迫切需要开发一种作用于烟碱乙酰胆碱受体且能有效镇痛和/或减少不良反应的改良肽。

发明内容

本申请多肽靶向的目标包括 $\alpha 7$ nAChR 和 $\alpha 9$ nAChR, 靶向的目标为人源序列的乙酰胆碱受体。这可避免芋螺毒素 Vc1.1 因种属差异而活性降低以及类似的风险。本申请多肽序列引入了多个非天然氨基酸且多肽结构中包含一对分子内二硫键, 增强了多肽的稳定性, 显著提高了多肽在体内的半衰期, 镇痛药效持续时间有了显著延长。疼痛是一个非常严重的临床问题, 对患者和家属的生活质量均会造成不良影响。但现有的止痛药并不能针对性地解决不同类型的疼痛, 并且还存在着长期用药的不良反应, 如阿片类药物的成瘾性, 长期使用会造成药物滥用的不良后果。多肽具有先天的安全性优势, 本申请的多肽合成工艺简单, 易于商业化生产, 可有望作为一类安全有效的新型镇痛药物。

本申请的多肽从动物实验结果看, 起效时间快于临床上的镇痛药物普瑞巴林, 且申请中的多肽相较于母肽 AJ003 在人源血浆中的稳定性有了显著提升, 从动物实验数据也可以发现改构后的多肽其镇痛药效的持续时间比母肽有了显著的延长。本申请的多肽属于非阿片类新型镇痛药物, 由于其作用靶点主要存在于外周神经组织, 因此后期在临床上不会引起药物成瘾性等毒副作用。与目前已上市的唯一一款芋螺毒素多肽齐考诺肽相比, 本申请的肽不用采取鞘内滴注的复杂给药方式, 有利于提高临床患者的用药依从性。此外齐考诺肽由 25 个氨基酸构成, 且肽序中含有 3 对二硫键, 制备工艺复杂, 大大增加了生产成本。本申请的肽由 13 个氨基酸构成, 只含有 1 对二硫键, 生产制备工艺简单, 固相多肽合成技术目前已非常成熟, 且其合成特点非常有利于自动化规模生产, 能够极大地降低药物生产成本, 减少患者的医疗负担。进一步, 本申请的肽给药剂量低, 在低剂量下也有明显的镇痛活性。

在本公开的第一个方面, 提供了一种包含选自 SEQ ID NO:1-34 中的任意一个序列的肽或其衍生物。

在本公开的第二个方面, 提供了一种包含选自具有保守取代的 SEQ ID NO:1-34 中的任意一个序列的肽或其衍生物。

在本公开的第三个方面，提供了一种以从 N 末端到 C 末端的顺序包含下式 I 或具有保守取代的式 I 的肽或其衍生物，

Gly-Ser-Cys-Ser-X1-X2-X3-X4-(D-Cys)-X5-X6-X7-X8 式 I

其中式 I 中的第 3 位 Cys 和第 9 位 D-Cys 形成一对分子内二硫键，D-Cys 代表 D 型半胱氨酸，氨基酸残基之间的“-”代表肽键，所述肽或其衍生物的 C 末端为游离羧基或酰胺，且 X1 为 Thr 或 D-Thr，X5 选自 Ala、Val 和 D-Val 中的任意一个，X2-X4 和 X6-X8 彼此独立地为任意一种氨基酸。

在本公开的一个实施例中，上述式 I 中的第 3 位 Cys 和第 9 位 D-Cys 形成一对分子内二硫键，所述肽或其衍生物的 C 末端为游离羧基或酰胺，且所述 X1 为 Thr 或 D-Thr，X5 选自 Ala、Val 和 D-Val 中的任意一个，X2 选自 Pro、D-Pro 和 Hyp 中的任意一个，X3 选自 Pro、D-Pro 和 Hyp 中的任意一个，X4 选自 Ser、D-Ser、Ala 和 Aib 中的任意一个，X6 选自 Ala、Leu、D-Leu、Ile、ABu 和 Nle 中的任意一个，X7 选自 Tyr、D-Tyr、Ala、Trp、Phe 和 Bip 中的任意一个，X8 选自 Ser、D-Ser、Ala、和 Orn 中的任意一个。

在本公开的一个实施例中，上述具有保守取代的式 I 具有 1、2、3、4 或 5 个氨基酸保守取代。在本公开的一个实施例中，上述具有保守取代的式 I 与没有发生保守取代的式 I 具有至少 65% 的序列同一性、具有至少 70% 的序列同一性、具有至少 75% 的序列同一性、具有至少 80% 的序列同一性、具有至少 84% 的序列同一性、具有至少 85% 的序列同一性、具有至少 90% 的序列同一性、具有至少 92% 的序列同一性或具有至少 95% 的序列同一性。

在本公开的一个优选实施例中，该肽或其衍生物包含选自以下的任意一个序列：SEQ ID NO：1-5、SEQ ID NO：10-16 和 SEQ ID NO：20-34，具有保守取代的 SEQ ID NO：1-5、SEQ ID NO：10-16 和 SEQ ID NO：20-34。在本公开的一个更优选的实施例中，该肽或其衍生物包含选自以下的任意一个序列：SEQ ID NO：26、28 和 32，具有保守取代的 SEQ ID NO：26、28 和 32。

在本公开的一个实施例中，上述具有保守取代的序列分别具有 1、2、3、4 或 5 个氨基酸保守取代。在本公开的一个实施例中，上述具有保守取代的序列与没有发生保守取代的序列具有至少 65% 的序列同一性、具有至少 70% 的序列同一性、具有至少 75% 的序列同一性、具有至少 80% 的序列同一性、

具有至少 84% 的序列同一性、具有至少 85% 的序列同一性、具有至少 90% 的序列同一性、具有至少 92% 的序列同一性或具有至少 95% 的序列同一性。

在本公开的第四个方面，提供了一种多核苷酸，其编码根据本公开所述的肽或其衍生物。

在本公开的第五个方面，提供了一种表达载体，其表达根据本公开所述的多核苷酸。

在本公开的第六个方面，提供了一种宿主细胞，其包含根据本公开所述的多核苷酸或根据本公开所述的表达载体。

在本公开的第七个方面，提供了一种药物组合物，其包含根据本公开所述的肽或其衍生物以及其药学上可接受的载体或盐。本公开还提供了一种药物组合物，其包含根据本公开所述的肽或其衍生物、多核苷酸、表达载体或根据本公开所述的宿主细胞，以及其药学上可接受的载体或盐。

在本公开的第八个方面，提供了根据本公开所述的肽或其衍生物或根据本公开所述的药物组合物在制备用于治疗疼痛的药物中的用途。本公开还提供了根据本公开所述的肽或其衍生物、根据本公开所述的多核苷酸、根据本公开所述的表达载体、根据本公开所述的宿主细胞或根据本公开所述的药物组合物在制备用于治疗疼痛的药物中的用途。

在本公开的第九个方面，提供了一种用于治疗疼痛的方法，该方法包括向有此需要的受试者施用治疗有效量的根据本公开所述的肽或其衍生物或根据本公开所述的药物组合物。本公开还提供了一种用于治疗疼痛的方法，该方法包括向有此需要的受试者施用治疗有效量的根据本公开所述的肽或其衍生物、多核苷酸、表达载体、宿主细胞或根据本公开所述的药物组合物。

附图说明

以下提供附图的简要说明，其用于说明本文所公开的示例性实施方式，而不是为了限制这些实施方式。

图 1 示出了实施例 3 中多肽 AJ003-1 主峰面积随时间变化的折线图。

图 2 示出了实施例 3 中多肽 AJ003-34 主峰面积随时间变化的折线图。

图 3 示出了实施例 3 中多肽 AJ003-35 主峰面积随时间变化的折线图。

图 4 示出了实施例 3 中多肽 AJ003-36 主峰面积随时间变化的折线图。

图 5 示出了实施例 3 中多肽 AJ003-37 主峰面积随时间变化的折线图。

图 6 示出了实施例 3 中多肽 AJ003-38 主峰面积随时间变化的折线图。

图 7 示出了实施例 3 中多肽 AJ003-39 在人源血浆体外半衰期预测结果。

图 8 示出了实施例 3 中多肽 AJ003-40 主峰面积随时间变化的折线图。

图 9 示出了实施例 3 中多肽 AJ003-41 主峰面积随时间变化的折线图。

图 10 示出了实施例 3 中多肽 AJ003-42 主峰面积随时间变化的折线图。

图 11 示出了实施例 5 中在大鼠紫杉醇慢性化疗痛模型中给药同一剂量的多肽在第 1 天的机械痛阈值。纵轴为机械痛阈值，横轴为不同组。结果显示为机械痛阈值(g)($\pm$ SD)。Graphpad, 单因素方差分析(n=7-8)。模型组与对照组: ##### $p < 0.0001$; 给药组与模型组: **** $p < 0.0001$; *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$; ns: 无统计学意义。普瑞巴林为 30 mg/kg·d·qd, 灌胃; AJ003、AJ003-34、AJ003-35、AJ003-36、AJ 003-39 和 AJ 003-40 为 1 mg/kg·d·qd, 皮下注射。

图 12 示出了实施例 5 中在大鼠紫杉醇慢性化疗痛模型中给药同一剂量的多肽在第 3 天的机械痛阈值。纵轴为机械痛阈值，横轴为不同组。结果显示为机械痛阈值(g)($\pm$ SD)。Graphpad, 单因素方差分析(n=7-8)。模型组与对照组: ##### $p < 0.0001$; 给药组与模型组: **** $p < 0.0001$; *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$; ns: 无统计学意义。普瑞巴林为 30 mg/kg·d·qd, 灌胃; AJ003、AJ003-34、AJ003-35、AJ003-36、AJ 003-39 和 AJ 003-40 为 1 mg/kg·d·qd, 皮下注射。

图 13 示出了实施例 5 中在大鼠紫杉醇慢性化疗痛模型中给药同一剂量的多肽在第 5 天的机械痛阈值。纵轴为机械痛阈值，横轴为不同组。结果显示为机械痛阈值(g)($\pm$ SD)。Graphpad, 单因素方差分析(n=7-8)。模型组与对照组: ##### $p < 0.0001$; 给药组与模型组: **** $p < 0.0001$; *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$; ns: 无统计学意义。普瑞巴林为 30 mg/kg·d·qd, 灌胃; AJ003、AJ003-34、AJ003-35、AJ003-36、AJ 003-39 和 AJ 003-40 为 1 mg/kg·d·qd, 皮下注射。

图 14 示出了实施例 5 中在大鼠紫杉醇慢性化疗痛模型中给药同一剂量的多肽在第 12 天的机械痛阈值。纵轴为机械痛阈值，横轴为不同组。结果显示为机械痛阈值(g)($\pm$ SD)。Graphpad, 单因素方差分析(n=7-8)。模型组与

对照组：#### $p < 0.0001$ ；给药组与模型组：**** $p < 0.0001$ ；*** $p < 0.001$ ；** $p < 0.01$ ；* $p < 0.05$ ；ns：无统计学意义。普瑞巴林为 30 mg/kg·d·qd，灌胃；AJ003、AJ003-34、AJ003-35、AJ003-36、AJ 003-39 和 AJ 003-40 为 1 mg/kg·d·qd，皮下注射。

图 15 示出了实施例 6 中在大鼠紫杉醇慢性化疗痛模型中给药不同剂量的多肽在第 1 天的机械痛阈值。纵轴为机械痛阈值，横轴为不同组。结果显示为机械痛阈值(g)($\pm$ SD)。Graphpad，单因素方差分析($n=8$)。模型组与对照组：#### $p < 0.0001$ ；给药组与模型组：**** $p < 0.0001$ ；*** $p < 0.001$ ；** $p < 0.01$ ；* $p < 0.05$ ；ns：无统计学意义。普瑞巴林为 30 mg/kg·d·qd，灌胃；AJ003 为 1 mg/kg·d·qd，皮下注射、AJ003-36-低剂量为 0.5 mg/kg·d·qd，皮下注射、AJ003-36-高剂量为 1.5 mg/kg·d·qd，皮下注射、AJ003-40-低剂量为 0.5 mg/kg·d·qd，皮下注射和 AJ003-40-高剂量为 1.5 mg/kg·d·qd，皮下注射。

图 16 示出了实施例 6 中在大鼠紫杉醇慢性化疗痛模型中给药不同剂量的多肽在第 4 天的机械痛阈值。纵轴为机械痛阈值，横轴为不同组。结果显示为机械痛阈值(g)($\pm$ SD)。Graphpad，单因素方差分析($n=8$)。模型组与对照组：#### $p < 0.0001$ ；给药组与模型组：**** $p < 0.0001$ ；*** $p < 0.001$ ；** $p < 0.01$ ；* $p < 0.05$ ；ns：无统计学意义。普瑞巴林为 30 mg/kg·d·qd，灌胃；AJ003 为 1 mg/kg·d·qd，皮下注射、AJ003-36-低剂量为 0.5 mg/kg·d·qd，皮下注射、AJ003-36-高剂量为 1.5 mg/kg·d·qd，皮下注射、AJ003-40-低剂量为 0.5 mg/kg·d·qd，皮下注射和 AJ003-40-高剂量为 1.5 mg/kg·d·qd，皮下注射。

图 17 示出了实施例 6 中在大鼠紫杉醇慢性化疗痛模型中给药不同剂量的多肽在第 7 天的机械痛阈值。纵轴为机械痛阈值，横轴为不同组。结果显示为机械痛阈值(g)($\pm$ SD)。Graphpad，单因素方差分析($n=8$)。模型组与对照组：#### $p < 0.0001$ ；给药组与模型组：**** $p < 0.0001$ ；*** $p < 0.001$ ；** $p < 0.01$ ；* $p < 0.05$ ；ns：无统计学意义。普瑞巴林为 30 mg/kg·d·qd，灌胃；AJ003 为 1 mg/kg·d·qd，皮下注射、AJ003-36-低剂量为 0.5 mg/kg·d·qd，皮下注射、AJ003-36-高剂量为 1.5 mg/kg·d·qd，皮下注射、AJ003-40-低剂量为 0.5 mg/kg·d·qd，皮下注射和 AJ003-40-高剂量为 1.5 mg/kg·d·qd，皮下注射。

图 18 示出了实施例 6 中在大鼠紫杉醇慢性化疗痛模型中给药不同剂量的多肽在第 12 天的机械痛阈值。。纵轴为机械痛阈值，横轴为不同组。结果

显示为机械痛阈值(g)($\pm$ SD)。Graphpad, 单因素方差分析(n=8)。模型组与对照组: ##### $p < 0.0001$; 给药组与模型组: **** $p < 0.0001$; *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$; ns: 无统计学意义。普瑞巴林为 30 mg/kg·d·qd, 灌胃; AJ003 为 1 mg/kg·d·qd, 皮下注射、AJ003-36-低剂量为 0.5 mg/kg·d·qd, 皮下注射、AJ003-36-高剂量为 1.5 mg/kg·d·qd, 皮下注射、AJ003-40-低剂量为 0.5 mg/kg·d·qd, 皮下注射和 AJ003-40-高剂量为 1.5 mg/kg·d·qd, 皮下注射。

图 19 示出了实施例 6 中在大鼠紫杉醇慢性化疗痛模型中给药不同剂量的多肽在第 14 天的机械痛阈值。。纵轴为机械痛阈值, 横轴为不同组。结果显示为机械痛阈值(g)($\pm$ SD)。Graphpad, 单因素方差分析(n=8)。模型组与对照组: ##### $p < 0.0001$; 给药组与模型组: **** $p < 0.0001$; *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$; ns: 无统计学意义。普瑞巴林为 30 mg/kg·d·qd, 灌胃; AJ003 为 1 mg/kg·d·qd, 皮下注射、AJ003-36-低剂量为 0.5 mg/kg·d·qd, 皮下注射、AJ003-36-高剂量为 1.5 mg/kg·d·qd, 皮下注射、AJ003-40-低剂量为 0.5 mg/kg·d·qd, 皮下注射和 AJ003-40-高剂量为 1.5 mg/kg·d·qd, 皮下注射。

图 20 示出了实施例 7 中在小鼠奥沙利铂急性化疗痛模型中给药不同剂量的多肽的机械痛阈值随时间的变化。结果显示为机械痛阈值(g)($\pm$ SD)。Graphpad, 单因素方差分析(n=8)。模型组与对照组: ##### $p < 0.0001$; 给药组与模型组: **** $p < 0.0001$; *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$; ns: 无统计学意义。

图 21 示出了实施例 9 中在大鼠 CCI 模型中给药不同剂量的多肽在第 1 天的机械痛阈值。结果显示为机械痛阈值(g)($\pm$ SD)。Graphpad, 单因素方差分析(n=7)。模型组与对照组: ##### $p < 0.0001$; 给药组与模型组: **** $p < 0.0001$; *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$; ns: 无统计学意义。

图 22 示出了实施例 9 中在大鼠 CCI 模型中给药不同剂量的多肽在第 4 天的机械痛阈值。结果显示为机械痛阈值(g)($\pm$ SD)。Graphpad, 单因素方差分析(n=7)。模型组与对照组: ##### $p < 0.0001$; 给药组与模型组: **** $p < 0.0001$; ** $p < 0.01$; ns: 无统计学意义。

图 23 示出了实施例 9 中在大鼠 CCI 模型中给药不同剂量的多肽在第 7 天的机械痛阈值。结果显示为机械痛阈值(g)($\pm$ SD)。Graphpad, 单因素方差

分析(n=7)。模型组与对照组:####p<0.0001;给药组与模型组:****p<0.0001; **p<0.01; *p<0.05。ns: 无统计学意义。

图 24 示出了实施例 9 中在大鼠 CCI 模型中给药不同剂量的多肽在第 10 天的机械痛阈值。结果显示为机械痛阈值(g)(±SD)。Graphpad, 单因素方差分析(n=7)。模型组与对照组:####p<0.0001;给药组与模型组:****p<0.0001; ***p<0.001; **p<0.01; *p<0.05。ns: 无统计学意义。

图 25 示出了实施例 9 中在大鼠 CCI 模型中给药不同剂量的多肽在第 14 天的机械痛阈值。结果显示为机械痛阈值(g)(±SD)。Graphpad, 单因素方差分析(n=7)。模型组与对照组:####p<0.0001;给药组与模型组:****p<0.0001; ***p<0.001; **p<0.01。ns: 无统计学意义。

图 26 示出了实施例 10 中在小鼠糖尿病神经痛模型中给药不同剂量多肽在第 1 天的机械痛阈值。结果显示为机械痛阈值(g)(±SD)。Graphpad, 单因素方差分析(n=7)。模型组与对照组:####p<0.0001;给药组与模型组:****p<0.0001; ***p<0.001; **p<0.01; *p<0.05。ns: 无统计学意义。

图 27 示出了实施例 10 中在小鼠糖尿病神经痛模型中给药不同剂量多肽在第 4 天的机械痛阈值。结果显示为机械痛阈值(g)(±SD)。Graphpad, 单因素方差分析(n=7)。模型组与对照组:####p<0.0001;给药组与模型组:****p<0.0001; ***p<0.001; **p<0.01; *p<0.05。ns: 无统计学意义。

图 28 示出了实施例 10 中在小鼠糖尿病神经痛模型中给药不同剂量多肽在第 8 天的机械痛阈值。结果显示为机械痛阈值(g)(±SD)。Graphpad, 单因素方差分析(n=7)。模型组与对照组:####p<0.0001;给药组与模型组:****p<0.0001; ***p<0.001; **p<0.01; *p<0.05。ns: 无统计学意义。

图 29 示出了实施例 10 中在小鼠糖尿病神经痛模型中给药不同剂量多肽在第 14 天的机械痛阈值。结果显示为机械痛阈值(g)(±SD)。Graphpad, 单因素方差分析(n=7)。模型组与对照组:####p<0.0001;给药组与模型组:****p<0.0001; ***p<0.001; **p<0.01; *p<0.05。ns: 无统计学意义。

图 30 示出了实施例 8 中在小鼠奥沙利铂急性化疗痛模型中给药不同多肽的机械痛阈值随时间的变化。结果显示为机械痛阈值(g)(±SD)。Graphpad, 单因素方差分析(n=3)。模型组与对照组:####p<0.0001;给药组与模型组:****p<0.0001; ***p<0.001; **p<0.01。ns: 无统计学意义。

图 31 示出了实施例 4 中 AJ003-40 在人源血浆 37°C 孵育 0 小时 HPLC 分析图谱。

图 32 示出了实施例 4 中 AJ003-40 在人源血浆 37°C 孵育 24 小时 HPLC 分析图谱。

图 33 示出了实施例 4 中 AJ003-24 在人源血浆 37°C 孵育 0 小时 HPLC 分析图谱。

图 34 示出了实施例 4 中 AJ003-24 在人源血浆 37°C 孵育 22 小时 HPLC 分析图谱。

具体实施方式

除非另有说明，否则在本说明书和权利要求书中使用的表示含量、浓度、比例、重量、粒径、百分比、技术效果等的所有数字在任何情况下均应理解为由术语“约”或“大致”修饰。因此，除非有相反的指示，否则以下说明书和所附权利要求书中列出的数字参数是近似值。

除非另有说明，本文使用的术语对所属技术领域的技术人员具有通常的理解含义。对于本领域技术人员来说，其可以根据通过本申请寻求得到的期望性质和效果而变化，应根据有效数字位数和常规舍入方法或者本领域技术人员理解的方式来解释每个数值参数。一般而言，本文使用的命名和本文所描述的有机化学、药物化学、生物学的实验操作是本领域公知的，而且在本领域中普遍采用。除非另有定义，本文使用的所有技术和科学术语一般具有本申请所属领域的普通技术人员通常理解的含义。在本文使用的术语存在多个定义的情况下，除非另有说明，以本部分的定义为准。

在本文中使用时，表述“A 和/或 B”包括三种情况：(1)A；(2)B；以及(3)A 和 B。表述“A、B 和/或 C”包括七种情况：(1)A；(2)B；(3)C；(4)A 和 B；(5)A 和 C；(6)B 和 C；以及(7)A、B 和 C。类似表述的含义可以此类推。

在本文中使用时，术语“彼此独立地”表示多个事件之间彼此没有影响。例如，“X 和 Y 彼此独立地选自 a、b、c、d、e、f、g 之任一”表示 X 可以是 a、b、c、d、e、f、g 之任一，Y 也可以是 a、b、c、d、e、f、g 之任一，X 的选择和 Y 的选择可以相同，也可以不同，二者互不干扰。

在本文中使用时，丙氨酸扫描(Cunningham 和 Wells, Science 244, 1081-1085, 1989)用于鉴定对于本发明的肽的活性(例如与乙酰胆碱受体的结合亲

和力)起关键作用的氨基酸,以便不对这些氨基酸进行取代。丙氨酸扫描将突变引入该分子的每一个残基,并检验所得到的分子的生物活性以确定对该分子的活性起关键作用的氨基酸残基。

如本文所用,术语“包括”,“包含”表示除了具有所列出的元素外,其他元素也不排除。

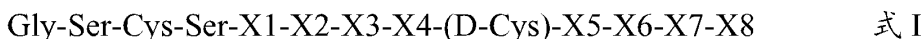
如本文所用,术语“同一性”是指两个(核苷酸或氨基酸)序列在比对中在相同位置处具有相同残基的程度,并且通常表示为百分数。优选地,同一性在被比较的序列的整体长度上确定。因此,具有完全相同序列的两个拷贝具有 100%同一性。本领域技术人员将认识到,一些算法可以用于使用标准参数来确定序列同一性,例如 Blast(Altschul 等(1997)Nucleic Acids Res.25: 3389-3402)、Blast2(Altschul 等(1990)J.Mol.Biol.215: 403-410)、Smith-Waterman(Smith 等(1981)J.Mol.Biol.147: 195-197)和 ClustalW。

肽或其衍生物

本申请提供了一种包含选自 SEQ ID NO:1-34 中的任意一个序列的肽或其衍生物。

在申请提供了一种包含选自具有保守取代的 SEQ ID NO:1-34 中的任意一个序列的肽或其衍生物。在一些实施方式中,具有保守取代的 SEQ ID NO:1-34 中的任意一个具有 1、2、3、4 或 5 个保守取代。在一些实施方式中,具有保守取代的 SEQ ID NO:1-34 中的任意一个与没有发生保守取代的序列具有至少 65%的序列同一性、具有至少 70%的序列同一性、具有至少 75%的序列同一性、具有至少 80%的序列同一性、具有至少 84%的序列同一性、具有至少 85%的序列同一性、具有至少 90%的序列同一性、具有至少 92%的序列同一性或具有至少 95%的序列同一性。

本申请提供了一种以从 N 末端到 C 末端的顺序包含下式 I 或具有保守取代的式 I 的肽或其衍生物,



其中式 I 中的第 3 位 Cys 和第 9 位 D-Cys 形成一对分子内二硫键, D-Cys 代表 D 型半胱氨酸,氨基酸残基之间的“-”代表肽键,所述所述肽或其衍生物的 C 末端为游离羧基或酰胺,且 X1 为 Thr 或 D-Thr, X5 选自 Ala、

Val 和 D-Val 中的任意一个, X2-X4 和 X6-X8 彼此独立地为任意一种氨基酸。

在一些实施方式中, 所述式 I 中的 X1 为 Thr 或 D-Thr。在一些实施方式中, 所述式 I 中的 X5 选自 Ala、Val 和 D-Val 中的任意一个。在一些实施方式中, 所述式 I 中的 X2 选自 Pro、D-Pro 和 Hyp 中的任意一个。在一些实施方式中, 所述式 I 中的 X3 选自 Pro、D-Pro 和 Hyp 中的任意一个。在一些实施方式中, 所述式 I 中的 X4 选自 Ser、D-Ser、Ala 和 Aib 中的任意一个。在一些实施方式中, 所述式 I 中的 X6 选自 Ala、Leu、D-Leu、Ile、ABu 和 Nle 中的任意一个。在一些实施方式中, 所述式 I 中的 X7 选自 Tyr、D-Tyr、Ala、Trp、Phe 和 Bip 中的任意一个。在一些实施方式中, 所述式 I 中的 X8 选自 Ser、D-Ser、Ala、和 Orn 中的任意一个。

在一些实施方式中, 上述具有保守取代的式 I 具有 1、2、3、4 或 5 个氨基酸保守取代。在本公开的一个实施例中, 上述具有保守取代的式 I 与没有发生保守取代的式 I 具有至少 65% 的序列同一性、具有至少 70% 的序列同一性、具有至少 75% 的序列同一性、具有至少 80% 的序列同一性、具有至少 84% 的序列同一性、具有至少 85% 的序列同一性、具有至少 90% 的序列同一性、具有至少 92% 的序列同一性或具有至少 95% 的序列同一性。

在一些实施方式中, 所述肽或其衍生物包含选自以下的任意一个序列: SEQ ID NO: 1-5、SEQ ID NO: 10-16 和 SEQ ID NO: 20-34, 具有保守取代的 SEQ ID NO: 1-5、SEQ ID NO: 10-16 和 SEQ ID NO: 20-34。在一些优选的实施方式中, 所述肽或其衍生物包含 SEQ ID NO: 26 或具有保守取代的 SEQ ID NO: 26。在一些优选的实施方式中, 所述肽或其衍生物包含 SEQ ID NO: 28 或具有保守取代的 SEQ ID NO: 28。在一些优选的实施方式中, 所述肽或其衍生物包含 SEQ ID NO: 32 或具有保守取代的 SEQ ID NO: 32。

在一些实施方式中, 上述具有保守取代的序列具有 1、2、3、4 或 5 个氨基酸保守取代。在一些实施方式中, 上述具有保守取代的序列与没有发生保守取代的序列具有至少 65% 的序列同一性、具有至少 70% 的序列同一性、具有至少 75% 的序列同一性、具有至少 80% 的序列同一性、具有至少 84% 的序列同一性、具有至少 85% 的序列同一性、具有至少 90% 的序列同一性、具有至少 92% 的序列同一性或具有至少 95% 的序列同一性。

在一些实施方式中，所述衍生物与所述肽相比包含选自以下的任何一种或多种修饰：氨基酸修饰、保守氨基酸取代、氨基酸残基中的氢被取代。

在本文中使用时，术语“肽”是指氨基酸以肽键链接在一起而形成的化合物。由三个或者三个以上氨基酸分子组成的肽为多肽。在本文中使用时，除非另有说明或与上下文相矛盾，否则术语“肽”涵盖所提及的肽本身及其药学上可接受的盐、前体药和代谢物。本申请的肽以本领域常用技术手段生成，包括但不限于固相合成法(如 Fmoc 肽合成法)和液相合成法。

在本文中使用时，多肽或其衍生物的位点编号是按照从 N 末端到 C 末端的顺序进行的，例如从肽的 N 末端开始的第一个氨基酸为第一位氨基酸，从肽的 N 末端开始的第二个氨基酸为第二位氨基酸，从肽的 N 末端开始的第三个氨基酸为第三位氨基酸，以此类推。

除另有定义，如本领域通常理解的，氨基酸序列或多肽序列的左手端为 N 末端/氨基端，氨基酸序列或多肽序列的右手端为 C 末端/羧基端。在本文中使用时，术语“前体药”指的是通过在生理条件下在活体内例如通过在酶、胃酸等作用下进行的氧化、还原、水解等反应而转化为本公开的肽或其衍生物的所有分子。

在本文中使用时，术语“代谢物”指的是在细胞或有机体(优选人)中的源自式本公开的肽或其衍生物的所有分子。

在本文中关于肽使用时，“氨基酸”与“氨基酸残基”具有相同含义，指的是：当氨基酸之间通过化学键而连接时，其部分基团由于参与了连接键的形成而损失，剩余的氨基酸部分即为氨基酸残基。

在本文中使用时，氨基酸的名称和缩写对应如下：

名称	缩写	单字母缩写
甘氨酸	Gly	G
丝氨酸	Ser	S
半胱氨酸	Cys	C
苏氨酸	Thr	T
脯氨酸	Pro	P
羟脯氨酸	Hyp	
丙氨酸	Ala	A
缬氨酸	Val	V
2-氨基异丁酸	Aib	
亮氨酸	Leu	L
异亮氨酸	Ile	I
2-氨基丁酸	ABu	

正亮氨酸	Nle	
酪氨酸	Tyr	Y
色氨酸	Trp	W
苯丙氨酸	Phe	F
联苯丙氨酸	Bip	
鸟氨酸	Orn	
肌氨酸	Sar	

天然氨基酸中，除了甘氨酸，均含有手性碳原子。除非另外指明，本申请中所述的光学活性氨基酸均为 L-构型。如习惯一样，本文中肽的结构是按氨基末端(N 末端)在左，羧基末端(C 末端)在右的方式写出的。

用在本文中的术语“氨基酸”包括天然氨基酸，以及在肽化学领域中制备天然肽的类似物时所常用的其它的“非蛋白” α -氨基酸/非天然氨基酸。

天然氨基酸是甘氨酸，丙氨酸，缬氨酸，亮氨酸，异亮氨酸，丝氨酸，甲硫氨酸，苏氨酸，苯丙氨酸，酪氨酸，色氨酸，半胱氨酸，脯氨酸，组氨酸，天冬氨酸，天冬酰胺，谷氨酸，谷氨酰胺，精氨酸，鸟氨酸和赖氨酸。“非蛋白” α -氨基酸/非天然氨基酸的例子有正亮氨酸，正缬氨酸，别异亮氨酸，高精氨酸，硫脯氨酸，脱氢脯氨酸，羟基脯氨酸(Hyp)，高丝氨酸，环己基甘氨酸(Chg)， α -氨基-正丁酸(Aba)，环己基丙氨酸(Cha)，氨基苯基丁酸(Pba)，在苯基部分被烷基、烷氧基、卤素或硝基取代的苯基丙氨酸，丝氨酸，苏氨酸和酪氨酸的 O-烷基化衍生物，S-烷基化的半胱氨酸，酪氨酸的 O-硫酸酯，以及天然氨基酸的 D-异构体。

在本文中使用时，肽的“衍生物”指的是：在所提及肽的基础上进行氨基酸修饰、保守氨基酸取代和/或氨基酸残基中的氢被取代而得到的产物。

在本文中使用时，术语“氨基酸修饰”的种类包括但不限于 N-末端修饰、C-末端修饰和侧链修饰。“氨基酸修饰”的方式包括但不限于羟基化、羧基化、烷基化、酰化、磷酸化、磺酸化、酰胺化、醛基化、醇基化、巯基乙胺化、酯基化、糖基化等修饰。

在本文中使用时，“保守氨基酸取代”通常可以描述为一个氨基酸残基被另一个具有相似化学结构和/或相似化学性质的氨基酸取代，并对肽的功能、活性或其他生物特性几乎没有影响的氨基酸取代。这种保守的氨基酸取代在本领域是众所周知的。这样的保守取代例如可以是以下组(a)-(c)中的一个氨基酸被同一组的另一个氨基酸取代：(a)小脂肪族、非极性或弱极性氨基酸残基：Ala, Ser, Thr, Pro 和 Gly; (b)带负电的极性氨基酸残基及其酰胺：Asp, Asn,

Glu 和 Gln; (c)带正电的极性氨基酸残基: His, Arg 和 Lys; (d) 大脂肪族、非极性氨基酸残基: Met, Leu, Ile, Val 和 Cys; (e)芳族氨基酸残基: Phe, Tyr 和 Trp。

在本文中使用时,氨基酸残基中的氢被取代可以是氨基酸残基中的氢被本领域已知的任何常规取代基取代,包括但不限于烷基、烯基、炔基、芳香基、烷氧基、羧基、醛基、羰基、羟基、卤素、氰基、酰基、磺酸基、氨基、巯基或硝基等。

多核苷酸、表达载体、宿主细胞

本申请提供了一种多核苷酸,该多核苷酸编码本公开所述的肽或其衍生物。

在本文中使用时,“多核苷酸”指任何长度的核苷酸(核苷酸或脱氧核苷酸)的多聚体。该名词指分子的初级结构。由此它既包括双链和单链的 RNA,又包括双链和单链的 DNA。它也包括如用甲基化作用和/或封端修饰的多核苷酸,以及未修饰形式的多肽核苷酸。本文所述的多核苷酸不一定是通过物理方法获得,也可以任何方式产生,包括诸如化学合成或者 DNA 复制,反转录或转录。

本申请提供了一种表达载体,该表达载体能够表达本公开所述的多核苷酸。

本申请提供了一种宿主细胞,该宿主细胞包含本公开所述的多核苷酸或本申请所述的表达载体。

在本文中使用时,“宿主细胞”用作表达载体或其他转化遗传片段的受体的细胞。它们包括已被转染的原始细胞和其后代。宿主细胞包括原核、酵母或其他真核细胞。

药物组合物

本申请提供了一种药物组合物,其包含本公开所述的肽或其衍生物,以及药学上可接受的载体或盐。

本申请还提供了一种药物组合物,其包含本公开所述的肽或其衍生物、多核苷酸、表达载体或根据本公开所述的宿主细胞,以及其药学上可接受的载体或盐。

如本文所用，术语“药物组合物”是指本公开的肽与其它化学组分例如载体、稳定剂、稀释剂、分散剂、悬浮剂、增稠剂和/或赋形剂的混合物。药物组合物有助于将该肽施用至生物体。本领域中存在施用肽的多种方式，包括但不限于，皮下注射、肌肉注射、静脉注射、腹腔注射、鞘内注射、口服、经皮、经肺、眼部和局部施用。

在本申请中，所述药物组合物可以配置为适用于通过所需要的给药途径施用至受试者的剂型。所述剂型包括但不限于片剂、胶囊、囊片、药丸、锭剂、粉末、糖浆、酏剂、混悬液、溶液、乳剂、透皮贴片、栓剂、吸入剂、霜剂、膏剂、洗液、糊剂、喷雾剂、冻干、注射剂和凝胶等。

在本文中使用时，术语“药学上可接受的盐”包括酸加成盐和碱加成盐。适当的酸加成盐是由形成无毒性盐的酸所形成的。其实例包括但不限于：乙酸盐、己二酸盐、天冬氨酸盐、苯甲酸盐、苯磺酸盐、碳酸氢盐/碳酸盐、硫酸氢盐/硫酸盐、硼酸盐、樟脑磺酸盐、柠檬酸盐、环己胺磺酸盐、乙二磺酸盐、甲酸盐、反丁烯二酸盐、葡萄糖庚糖酸盐、葡萄糖酸盐、葡萄糖醛酸盐、六氟磷酸盐、2-(4-羟苄基)苯甲酸盐、氢氯化物/氯化物、氢溴化物/溴化物、氢碘化物/碘化物、2-羟乙磺酸盐、乳酸盐、苹果酸盐、顺丁烯二酸盐、丙二酸盐、甲磺酸盐、甲基硫酸盐、茶酸盐、2-茶磺酸盐、烟碱酸盐、硝酸盐、乳清酸盐、草酸盐、十六酸盐、磷酸盐/磷酸氢盐/磷酸二氢盐、焦谷氨酸盐、葡萄糖二酸盐、硬脂酸盐、水杨酸盐、单宁酸盐、酒石酸盐、甲苯磺酸盐和三氟乙酸盐。适当的碱加成盐是由形成无毒性盐的碱所形成的。其实例包括但不限于：铝、精氨酸、钙、胆碱、二乙胺、二乙醇胺、甘氨酸、赖氨酸、镁、葡甲胺、乙醇胺、钾、钠、氨丁三醇和锌盐。还可形成酸和碱的半盐，例如半硫酸盐和半钙盐。关于合适的盐的综述，参见 Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use by Stahl and Wermuth (Wiley-VCH, 2002)。

术语“药学上可接受的载体”包括药学上可接受的材料、组合物或载体，例如液体或固体填充剂、稀释剂、赋形剂、溶剂或封装材料，其涉及在受试者内携带或输送本公开的肽或携带或输送本公开的肽至受试者，使得其可以执行其预期功能。每种盐或载体在与制剂的其它成分相容的意义上必须是“可接受的”，并且不对受试者有害。可以用作药学上可接受的载体的材料

的一些实例包括：糖，例如乳糖、葡萄糖和蔗糖；淀粉，例如玉米淀粉和马铃薯淀粉；纤维素及其衍生物，例如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和乙酸纤维素；粉末黄蓍胶；麦芽；明胶；滑石；赋形剂，例如可可脂和栓剂蜡类；油，例如花生油、棉籽油、红花油、芝麻油、橄榄油、玉米油和大豆油；二醇类，例如丙二醇；多元醇，例如甘油、山梨醇、甘露醇和聚乙二醇；酯类，例如油酸乙酯和月桂酸乙酯；琼脂；缓冲剂，例如氢氧化镁和氢氧化铝；藻酸；无热原水；等渗盐水；林格氏溶液；乙醇；磷酸盐缓冲溶液；稀释剂；造粒剂；润滑剂；粘合剂；崩解剂；润湿剂；乳化剂；着色剂；脱模剂；涂层剂；甜味剂；调味剂；加香剂；防腐剂；抗氧化剂；增塑剂；胶凝剂；增稠剂；硬化剂；定型剂；悬浮剂；表面活性剂；保湿剂；载体；稳定剂；和在药物制剂中使用的其它无毒的相容性物质，或其任何组合。

用途、疾病治疗方法

本申请提供了本公开所述的肽或其衍生物或本公开所述的药物组合物在制备用于治疗疼痛的药物中的用途。

本申请还提供了本公开所述的肽或其衍生物、本公开所述的多核苷酸、本公开所述的表达载体、本公开所述的宿主细胞或本公开所述的药物组合物在制备用于治疗疼痛的药物中的用途。

在一些实施方式中，所述制备的用于治疗疼痛的药物通过包括皮下注射、肌肉注射、静脉注射、腹腔注射、鞘内注射、口服、经皮、经肺、眼部或局部给药的方式施用。在优选的实施方式中，所述制备的用于治疗疼痛的药物通过皮下注射施用。

在一些实施方式中，所述疼痛包括作用于烟碱乙酰胆碱受体而引起的疼痛。在一些实施方式中，所述疼痛包括神经疼痛和炎症性疼痛。在一些实施方式中，所述疼痛包括化疗引起的疼痛、糖尿病性周围神经疼痛、坐骨神经痛、骨关节疼痛、带状疱疹后遗神经痛、感染疼痛、营养缺乏疼痛、炎症疼痛、慢性酒精中毒疼痛、甲状腺功能减退疼痛、自身免疫病疼痛、格林巴利综合症疼痛、中毒疼痛、药物引起的疼痛、肿瘤病变疼痛、遗传疾病疼痛和挫伤疼痛。

本申请进一步提供了本公开所述的肽或其衍生物、本公开所述的多核苷酸、本公开所述的表达载体、本公开所述的宿主细胞或本公开所述的药物组合物，其用于治疗疼痛的用途。

在一些实施方式中，所述疼痛包括作用于烟碱乙酰胆碱受体而引起的疼痛。在一些实施方式中，所述疼痛包括神经疼痛和炎症性疼痛。在一些实施方式中，所述疼痛包括化疗引起的疼痛、糖尿病性周围神经疼痛、坐骨神经痛、骨关节疼痛、带状疱疹后遗神经痛、感染疼痛、营养缺乏疼痛、炎症疼痛、慢性酒精中毒疼痛、甲状腺功能减退疼痛、自身免疫病疼痛、格林巴利综合症疼痛、中毒疼痛、药物引起的疼痛、肿瘤病变疼痛、遗传疾病疼痛和挫伤疼痛。

在一些实施方式中，所述肽或其衍生物或者药物组合物通过包括皮下注射、肌肉注射、静脉注射、腹腔注射、鞘内注射、口服、经皮、经肺、眼部或局部给药的方式施用。在优选的实施方式中，所述肽或其衍生物或者药物组合物通过皮下注射施用。

本申请提供了用于治疗疼痛的方法，该方法包括向有此需要的受试者施用治疗有效量的根据本公开所述的肽或其衍生物或根据本公开所述的药物组合物。

本申请还提供了用于治疗疼痛的方法，该方法包括向有此需要的受试者施用治疗有效量的根据本公开所述的肽或其衍生物、多核苷酸、表达载体、宿主细胞或根据本公开所述的药物组合物。

在一些实施方式中，所述疼痛包括作用于烟碱乙酰胆碱受体而引起的疼痛。在一些实施方式中，所述疼痛包括神经疼痛和炎症性疼痛。在一些实施方式中，所述疼痛包括化疗引起的疼痛、糖尿病性周围神经疼痛、坐骨神经痛、骨关节疼痛、带状疱疹后遗神经痛、感染疼痛、营养缺乏疼痛、炎症疼痛、慢性酒精中毒疼痛、甲状腺功能减退疼痛、自身免疫病疼痛、格林巴利综合症疼痛、中毒疼痛、药物引起的疼痛、肿瘤病变疼痛、遗传疾病疼痛和挫伤疼痛。

在一些实施方式中，所述肽或其衍生物或者药物组合物通过包括皮下注射、肌肉注射、静脉注射、腹腔注射、鞘内注射、口服、经皮、经肺、眼部

或局部给药的方式施用。在优选的实施方式中，所述肽或其衍生物或者药物组合物通过皮下注射施用。

在本文中使用时，术语“受试者”包括动物，如脊椎动物，优选哺乳动物，如狗、猫、猪、牛、羊、马、啮齿动物(例如小鼠、大鼠或豚鼠)或灵长类动物(例如大猩猩、黑猩猩和人)。

在本文中使用时，术语“治疗”是指缓解或改善疾病或障碍(即，减慢或阻止疾病或至少一种临床症状的发展)；或缓解或改善与该疾病或障碍相关的至少一种物理参数或生物标记。

在本文中使用时，术语“治疗有效剂量”是指相比于未接受该量的相应受试者，导致从中获益或治疗疾病的量，但该量在合理医学判断的范围内足够低以避免严重副作用。本文所述的肽或其衍生物、多核苷酸、表达载体、宿主细胞或药物组合物的治疗有效剂量将随着选择的肽或其衍生物、多核苷酸、表达载体、宿主细胞或药物组合物；给药途径；治疗的疾病的严重性；治疗患者的年龄、体型、体重和身体状况；治疗患者的医疗史；治疗的持续时间；并行治疗的性质；所需治疗效果等因素而改变，但仍可通过本领域技术人员以常规方式确定。

上文针对本公开的肽或其衍生物、多核苷酸、表达载体和宿主细胞所述的各种实施方式也适用于本公开的药物组合物、用途和方法(只要它们彼此之间不是内在矛盾的)，由此组合而形成的各种实施方式都视为本公开的一部分。

实施例

以下结合附图对本申请的示范性实施例做出说明，其中包括本申请实施例的各种细节以助于理解。应该理解的是，它们认为仅仅是示范性的，绝不旨在限制本申请的保护范围。本申请的保护范围仅通过权利要求来限定。因此，本领域普通技术人员应当认识到，可以对这里描述的实施例做出各种改变和修改，而不会背离本申请的范围。同样，为了清楚和简明，以下的描述中省略了对公知功能和结构的描述。

除非另有说明，否则以下实施例中所采用的试剂和仪器均为可以通过市购获得的常规产品。除非另有说明，否则按照常规条件或制造商建议的条件进行实验。

实施例 1：芋螺毒素多肽的合成

在前期研究的基础上，通过对母肽 AJ003 进行丙氨酸扫描、单一位点非天然氨基酸替换以及多位点组合改构，初步筛选出一批多肽化合物。

AJ003 的合成：使用 Fmoc-Ser(tBu)-wang 树脂(天津南开合成科技有限公司)为起始树脂，合成规模 1 mmol，称取树脂加入至多肽固相反应器(南京奎玉化玻仪器有限公司)中，加入二氯甲烷氮气鼓吹溶胀 30 分钟，再用 DMF(二甲基甲酰胺)洗涤 2 次。加 20%哌啶/DMF 溶液两次，每次反应 5 分钟。脱保护反应结束后，使用 DMF 洗涤树脂 6 次，每次约 3 分钟。按照该多肽序列，遵循化学合成多肽常规是从 C 末端向 N 末端逐个偶联氨基酸的原则，称取相应保护氨基酸、缩合试剂(HoBt、DIC)，反应约 1 小时，缩合反应结束后用 DMF 洗涤树脂 3 次。自此进行缩合循环(脱保护-洗涤-缩合-洗涤)，即再向反应容器加入 20%哌啶/DMF 溶液，进行脱保护反应，DMF 洗涤后加入保护氨基酸及相应缩合试剂进行缩合反应。采用缩合循环的方法逐个向 N 末端偶联保护氨基酸，直至偶联完该多肽所有氨基酸。用 20%哌啶/DMF 溶液脱除多肽 N 末端的 Fmoc 基团，使用二氯甲烷和甲醇对树脂进行交替洗涤，最后通过真空干燥的方式获得收缩干燥的肽树脂中间体。称取肽树脂重量，按照 1 克肽树脂 10 毫升裂解液的比例，配制裂解液。裂解液配方为 TFA:EDT:TIS:H₂O=90:5:2.5:2.5。向肽树脂加入裂解液，裂解反应 3 小时左右，最后收集滤液，用冰冻的甲基叔丁基醚沉降滤液，甲基叔丁基醚的使用量为滤液的 8 倍，充分搅拌沉降液，分杯离心，即获得粗肽沉淀，继续用甲基叔丁基醚洗涤离心，将沉淀真空干燥过夜，最终获得线性粗肽样品。将线性粗肽用水溶解后，加入碘单质作为氧化剂进行该多肽氧化成二硫键的反应。氧化约 30 分钟，利用 HPLC 进行氧化程度监测，最后向氧化体系滴加维生素 C 以终止氧化反应。将氧化完毕的多肽液用滤膜过滤后，使用反相高效液相色谱进行分离纯化，将接得的合格馏分合并后最终使用冷冻干燥机进行冻干，最终获得该多肽冻干纯品。

其他多肽的合成方法与上述多肽 AJ003 技术路线一致，均采用经典的 Fmoc 固相多肽合成技术获得线性粗肽。多肽序列 C 末端以酰胺结尾的多肽，所使用树脂为 Rink 酰胺-MBHA 树脂。将粗肽液通过碘单质氧化形成二硫

键多肽馏分，再经过反相高效液相色谱技术进行分离纯化，最后经冷冻干燥技术获得冻干纯品。本实施例中涉及的肽序列在表 1 中示出。

表 1. 多肽序列汇总表

SEQ ID No	多肽代号	多肽序列
1	AJ003	GSCSTPPS-(D-Cys)-VLYS(3,9 成二硫键)
2	AJ003-1	GSCS-(D-Thr)-PPS-(D-Cys)-VLYS(3,9 成二硫键)
3	AJ003-4	GSCS-(D-Thr)-PPS-(D-Cys)-VLYS-NH ₂ (3,9 成二硫键)
4	AJ003-5	GS-(D-Cys)-S-(D-Thr)-PPS-(D-Cys)-VLYS(3,9 成二硫键)
5	AJ003-6	G-(D-Ser)-(D-Cys)-(D-Ser)-(D-Thr)-(D-Pro)-(D-Pro)-(D-Ser)-(D-Cys)-(D-Val)-(D-Leu)-(D-Tyr)-(D-Ser)(3,9 成二硫键)
6	AJ003-8	Sar-SCS-(D-Thr)-PPS-(D-Cys)-VLYS(3,9 成二硫键)
7	AJ003-12	ASCS-(D-Thr)-PPS-(D-Cys)-VLYS(3,9 成二硫键)
8	AJ003-13	GACS-(D-Thr)-PPS-(D-Cys)-VLYS(3,9 成二硫键)
9	AJ003-14	GSCA-(D-Thr)-PPS-(D-Cys)-VLYS(3,9 成二硫键)
10	AJ003-16	GSCS-(D-Thr)-Hyp-PS-(D-Cys)-VLYS(3,9 成二硫键)
11	AJ003-17	GSCS-(D-Thr)-P-Hyp-S-(D-Cys)-VLYS(3,9 成二硫键)
12	AJ003-18	GSCS-(D-Thr)-PPA-(D-Cys)-VLYS(3,9 成二硫键)
13	AJ003-19	GSCS-(D-Thr)-PPS-(D-Cys)-ALYS(3,9 成二硫键)
14	AJ003-20	GSCS-(D-Thr)-PPS-(D-Cys)-VAYS(3,9 成二硫键)
15	AJ003-21	GSCS-(D-Thr)-PPS-(D-Cys)-VLAS(3,9 成二硫键)
16	AJ003-22	GSCS-(D-Thr)-PPS-(D-Cys)-VLYA(3,9 成二硫键)
17	AJ003-24	GSCS-(D-Thr)-PPG-(D-Cys)-VLYS(3,9 成二硫键)
18	AJ003-25	GSCS-(D-Thr)-PPS-(D-Cys)-Aib-LYS(3,9 成二硫键)
19	AJ003-26	GSCS-(D-Thr)-PPS-(D-Cys)-GLYS(3,9 成二硫键)
20	AJ003-27	GSCS-(D-Thr)-PPS-(D-Cys)-VIYS(3,9 成二硫键)
21	AJ003-28	GSCS-(D-Thr)-PPS-(D-Cys)-V-ABu-YS(3,9 成二硫键)
22	AJ003-29	GSCS-(D-Thr)-PPS-(D-Cys)-V-Nle-YS(3,9 成二硫键)
23	AJ003-30	GSCS-(D-Thr)-PPS-(D-Cys)-VLWS(3,9 成二硫键)
24	AJ003-32	GSCS-(D-Thr)-PPS-(D-Cys)-VL-Bip-S(3,9 成二硫键)
25	AJ003-33	GSCS-(D-Thr)-PPS-(D-Cys)-VLY-Orn- NH ₂ (3,9 成二硫键)

26	AJ003-34	GSCS-(D-Thr)-Hyp-Hyp-S-(D-Cys)-V-Nle-Bip-Orn- NH ₂ (3,9 成二硫键)
27	AJ003-35	GSCS-(D-Thr)-Hyp-Hyp-A-(D-Cys)-V-Nle-Bip-Orn- NH ₂ (3,9 成二硫键)
28	AJ003-36	GSCS-(D-Thr)-Hyp-Hyp-Aib-(D-Cys)-V-Nle-Bip-Orn- NH ₂ (3,9 成二硫键)
29	AJ003-37	GSCS-(D-Thr)-Hyp-Hyp-S-(D-Cys)-V-Nle-F-Orn- NH ₂ (3,9 成二硫键)
30	AJ003-38	GSCS-(D-Thr)-Hyp-Hyp-A-(D-Cys)-V-Nle-F-Orn- NH ₂ (3,9 成二硫键)
31	AJ003-39	GSCS-(D-Thr)-Hyp-Hyp-Aib-(D-Cys)-V-Nle-F-Orn- NH ₂ (3,9 成二硫键)
32	AJ003-40	GSCS-(D-Thr)-Hyp-Hyp-S-(D-Cys)-V-Nle-W-Orn- NH ₂ (3,9 成二硫键)
33	AJ003-41	GSCS-(D-Thr)-Hyp-Hyp-A-(D-Cys)-V-Nle-W-Orn- NH ₂ (3,9 成二硫键)
34	AJ003-42	GSCS-(D-Thr)-Hyp-Hyp-Aib-(D-Cys)-V-Nle-W-Orn-NH ₂ (3,9 成二硫键)

*D-Thr: D 型苏氨酸; 3,9 成二硫键: 序列的第三位和第九位的氨基酸残基之间形成二硫键。

实施例 2: BLI(生物膜层干涉技术)检测多肽与靶蛋白亲和力

BLI 是一种非标记技术, 它将发生在 BLI 生物传感器表面的光干涉信号转化为实时的响应信号。通过对分子结合过程的实时监测, 系统会测定结合常数(k_a 或 k_{on})和解离常数(k_d 或 k_{off}), 以及起始结合速率, 并通过拟合计算分析得到亲和力(K_D)。具体步骤是将 NTA 传感器 (赛多利斯) 放置于预湿盒, 将预湿盒放置于黑色 96 孔板, 每孔 200 μ L 的 PBS, 将 NTA 传感器预湿至少 15 min 以上。将靶蛋白 $\alpha 9$ nAChR 用 PBS 稀释为 5 μ g/mL, 每孔加 200 μ L。将待检测多肽用 PBS 溶解梯度 3 倍稀释, 浓度由高到低依次为 1000 nM、333.3 nM、111.1 nM、37.04 nM、12.35 nM、4.115 nM、1.372 nM, 最后再增加一个 PBS 孔作为零浓度对照孔。平衡仪器基线后, 先利用 NTA 传感器固化靶蛋白 $\alpha 9$ nAChR, 固化完成再平衡基线, 然后是进行结合 5 min、解离 5 min 过程。按照上述过程对待测多肽逐个进行亲和力检测。多肽与靶蛋白 $\alpha 7$ nAChR 的亲和力检测过程基本与 $\alpha 9$ nAChR 相同, 只是靶蛋白 $\alpha 7$ nAChR 的蛋白浓度为 20 μ g/mL。如下表 2、3 所示, BLI 实验检测了丙氨酸扫描多肽类似物与靶蛋白的亲和力, 明确了母肽可改构位点; 其次再利用 BLI 实验检测了单一位点非天然氨基酸突变改构肽与靶蛋白亲和力; 最后利用 BLI 实验

检测了多位点组合突变改构肽与靶蛋白亲和力，从而筛选出与靶蛋白高亲和力多肽用于后续筛选及研究其成药性。

表 2. 改构肽与 $\alpha 9$ nAChR 靶蛋白亲和力检测结果

靶蛋白亚型	多肽名称	SEQ ID No	KD 值(M)	R ²
$\alpha 9$ nAChR	AJ003	1	4.480E-09	0.9668
	AJ003-1	2	8.597E-08	0.9582
	AJ003-12	7	3.164E-05	0.907
	AJ003-13	8	6.692E-06	0.8692
	AJ003-14	9	1.394E-05	0.7426
	AJ003-16	10	3.532E-08	0.8284
	AJ003-17	11	1.097E-07	0.9197
	AJ003-18	12	4.264E-08	0.7964
	AJ003-19	13	3.173E-07	0.8726
	AJ003-20	14	1.632E-08	0.9347
	AJ003-21	15	5.142E-07	0.5396
	AJ003-22	16	1.634E-07	0.9068

表 3. 改构肽与 $\alpha 7$ nAChR 靶蛋白亲和力检测结果

靶蛋白亚型	多肽名称	SEQ ID No	K _D 值(M)	R ²
$\alpha 7$ nAChR	AJ003	1	2.232E-07	0.8646
	AJ003-1	2	2.202E-08	0.8363
	AJ003-4	3	3.378E-07	0.9225
	AJ003-5	4	4.004E-07	0.9354
	AJ003-6	5	5.322E-07	0.9223
	AJ003-8	6	6.420E-06	0.826
	AJ003-24	17	1.398E-05	0.9479
	AJ003-25	18	4.665E-06	0.9572
	AJ003-26	19	6.829E-06	0.9285
	AJ003-27	20	3.232E-07	0.8957
	AJ003-28	21	6.898E-07	0.7547
	AJ003-29	22	6.738E-07	0.8916
	AJ003-30	23	2.780E-08	0.8435
	AJ003-32	24	3.751E-07	0.9059
	AJ003-33	25	3.998E-07	0.8112
	AJ003-34	26	3.597E-07	0.9317
	AJ003-35	27	1.425E-07	0.88
	AJ003-36	28	4.080E-08	0.9165
	AJ003-37	29	6.867E-08	0.8223
	AJ003-38	30	1.867E-07	0.8901
	AJ003-39	31	4.099E-07	0.8756
	AJ003-40	32	4.645E-08	0.8453
	AJ003-41	33	1.095E-07	0.855
	AJ003-42	34	2.116E-08	0.8103

实施例 3：体外血浆稳定性预测多肽半衰期

多肽通常半衰期较短,在动物体内容易被各种酶及血液中的基质等降解。本研究中的改构肽在设计时对某些非活性关键位点氨基酸进行了非天然氨基酸替换,希望能提高多肽稳定性,更加利于成药。称取多肽用去离子水溶解为 2 mg/mL,再用乙腈稀释为 1 mg/mL 后用有机滤膜过滤,将滤液吸取 200 微升至液相小瓶作为多肽对照组。吸取 300 微升人源血浆(含 EDTA 抗凝剂)(南京森贝伽生物科技有限公司,批号 SBJ-P-HU011-100 mL)加入到 300 微升乙腈,置于离心机 4°C, 12000 转/分钟,离心 5 分钟。吸取上清液用有机滤膜过滤,将滤液吸取 200 微升至液相小瓶作为血浆空白对照组。另称量该多肽 10 mg,将 5 mL 人源血浆加入其中涡旋混匀,吸取 300 微升含有多肽的血浆加入到 300 微升乙腈,置于离心机 4°C, 12000 转/分钟,离心 5 分钟,吸取上清液用有机滤膜过滤,将滤液吸取 200 微升至液相小瓶作为多肽 0 min 时间点样品。将溶解多肽的血浆置于 37°C 水浴锅孵育,其余时间点操作同 0 min 时间点操作。其中多肽 AJ003 和 AJ003-1 取样点为 0 min、5 min、10 min、20 min、30 min、1 h、2 h、4 h、6 h、10 h、12 h、24 h,改构肽 AJ003-34、AJ003-35、AJ003-36、AJ003-37、AJ003-38、AJ003-39、AJ003-40、AJ003-41 和 AJ003-42 取样点为 0 min、10 min、30 min、1 h、4 h、6 h、10 h、12 h、24 h,每个多肽的系列样品均移交分析部门进行 HPLC 分析,记录样品主峰面积随血浆孵育时间的变化情况,在药代动力学处理软件 winolin 进行每个多肽体外半衰期预测。AJ003 样品因存在互变异构体,峰面积随时间不易准确积分比较。AJ003-1 是 AJ003 多肽第 5 位苏氨酸改构为 D-型苏氨酸的类似物,AJ003-1 与 AJ003 相比肽序仅差一个氨基酸构型的区别。如图 1-10 所示,AJ003-1 的体外血浆半衰期约 10.8 h,改构肽 AJ003-34、AJ003-35、AJ003-36、AJ003-37、AJ003-38、AJ003-39、AJ003-40、AJ003-41、AJ003-42 体外血浆半衰期分别是 61.9 h、45.3 h、65.3 h、71.0 h、26.7 h、43.0 h、84.0 h、30.0 h 和 61.4 h。整体来看,通过非天然氨基酸的突变,本项目其他改构肽在体外血浆稳定性与 AJ003-1(与 AJ003 只相差一个氨基酸)相比,稳定性有了显著提升。

实施例 4: AJ003-40 和 AJ003-24 的血浆稳定性实验

称量多肽 AJ003-40 和 AJ003-24 分别加入人源血浆加入其中涡旋混匀,配制为 2 mg/ml。各吸取 300 微升含有多肽的血浆加入到 300 微升乙腈,置

于离心机 4℃, 12000 转/分钟, 离心 5 分钟, 吸取上清液用有机滤膜过滤, 将滤液吸取 200 微升至液相小瓶作为多肽 0 小时时间点样品。将溶解多肽的血浆置于 37℃ 水浴锅孵育, 多肽 AJ003-40 于 24 小时时间点吸取 300 微升含有多肽的血浆加入到 300 微升乙腈, 置于离心机 4℃, 12000 转/分钟, 离心 5 分钟, 吸取上清液用有机滤膜过滤, 将滤液吸取 200 微升至液相小瓶作为多肽 24 小时时间点样品。多肽 AJ003-24 于 22 小时时间点吸取 300 微升含有多肽的血浆加入到 300 微升乙腈, 置于离心机 4℃, 12000 转/分钟, 离心 5 分钟, 吸取上清液用有机滤膜过滤, 将滤液吸取 200 微升至液相小瓶作为多肽 22 小时时间点样品。将两个多肽 0 小时和 24 小时样品进行 HPLC 分析, 如图 31 和图 32 所示, 多肽 AJ003-40 主峰面积由 0 小时的 15149.38 降低到 24 小时的 11829.51, 在 24 小时内主峰面积降解率为 21.9%; 如图 33 和图 34 所示, 多肽 AJ003-24 主峰面积由 0 小时的 746.80 降低到 22 小时的 267.45, 在 22 小时内主峰面积降解率为 64.2%。与多肽 AJ003-40 相比, 多肽 AJ003-24 降解速率更快, 说明 AJ003-24 在血浆稳定性比 AJ003-40 较差。

实施例 5: 紫杉醇化疗痛评价部分改构肽在同一剂量下的体内镇痛活性

180-200g 的 SPF (Specific Pathogen Free) 级 SD 雄性大鼠(上海市计划生育科学研究所实验动物经营部), 造模当天称量大鼠体重, 并用机械刺激检测大鼠基础痛阈值, 剔除体重差异和痛阈值差异较大动物, 余下大鼠根据实验方案开展造模。紫杉醇粉末用橄榄油溶解为 1 mg/mL, 每只大鼠每次腹腔注射量为 2 mg/kg。整个造模期间共注射 4 次, 分别在 1、3、5、7 天进行腹腔注射。阴性对照或空白对照组大鼠注射上述溶解紫杉醇的溶剂。根据文献报道, 此模型从造模开始算, 经过 15 天左右痛阈值发生明显下降, 标志着稳定的大鼠紫杉醇慢性化疗痛模型构建成功。按照实验方案设置的给药方式进行药物治疗, 具体如下表 4 所示。表 4 中的空白组代表没有进行疼痛建模的组, 模型组代表有疼痛建模但没有给与药物的组。在第 1、3、5、12 天在固定时间对大鼠进行给药, 其中在给药第 1、3、5 天给完药的 1h、2.5h、4h、5.5h 通过平头针刺激大鼠右后肢足底, 检测大鼠在相应时间点对机械刺激的痛阈值。在给药第 12 天检测了当天给药后 4h 和 7h 大鼠对机械刺激的痛阈值数值。如图 11-14 所示, 综合 4 次给药治疗的实验结果, 母肽 AJ003 在该

模型中 4 h 内跟模型组相比具有显著的镇痛活性，超过 4 h 后镇痛活性与模型组比较没有显著性。5 个候选改构肽(AJ003-34、AJ003-35、AJ003-36、AJ003-39、AJ003-40)中，AJ003-34、AJ003-36、AJ003-40 是镇痛候选最佳的 3 个，从第 12 天 7h 结果分析，尤以 AJ003-36 和 AJ003-40 的镇痛活性持续时间较长，可持续至 7h，且此改构肽与阳性药相比镇痛活性+在某些给药时间点略优于普瑞巴林，整体来看与阳性药普瑞巴林镇痛药效相当。AJ003-36 和 AJ003-40 可作为候选分子后续进一步研究。紫杉醇作为临床广泛使用的小分子化疗药物，在抗肿瘤的同时，因其自身对患者神经系统的损伤，造成许多癌症患者产生神经痛。通过紫杉醇多次低剂量腹腔注射诱导的 SD 雄性大鼠慢性化疗痛模型，模拟了临床上癌症患者接受紫杉醇利用该模型评价了 5 个改构肽以及母肽 AJ003 和阳性药普瑞巴林在该模型的镇痛效果。试验结果表明，每次给药后在相应时间点检测大鼠右后肢足底机械痛阈值，整体分析可以初步筛选出 AJ003-36 和 AJ003-40 可作为候选分子后续进一步研究。

表 4. 紫杉醇化疗痛模型筛选同一剂量下部分改构肽镇痛活性给药方案表

组别	药物	给药方式	剂量	动物数	给药频率
G1(空白组/对照组)	生理盐水	皮下注射	0 mg/kg(0.4 mL/200 g)	8 只	1 次/d, 4 次
G2(模型组)	生理盐水	皮下注射	0 mg/kg(0.4 mL/200 g)	8 只	1 次/d, 4 次
G3(阳性药组)	普瑞巴林	灌胃	30 mg/kg	8 只	1 次/d, 4 次
G4(AJ003 组)	AJ003	皮下注射	1 mg/kg	8 只	1 次/d, 4 次
G5(AJ003-34)	AJ003-34	皮下注射	1 mg/kg	8 只	1 次/d, 4 次
G6(AJ003-35)	AJ003-35	皮下注射	1 mg/kg	8 只	1 次/d, 4 次
G7(AJ003-36)	AJ003-36	皮下注射	1 mg/kg	8 只	1 次/d, 4 次
G8(AJ003-39)	AJ003-39	皮下注射	1 mg/kg	8 只	1 次/d, 4 次
G9(AJ003-40)	AJ003-40	皮下注射	1 mg/kg	8 只	1 次/d, 4 次

实施例 6：紫杉醇化疗痛评价不同剂量下改构肽体内镇痛活性

购买 180-200g 的 SPF 级 SD 雄性大鼠(上海市计划生育科学研究所实验动物经营部)，适应性喂养一周左右，造模当天称量大鼠体重，并用机械刺激检测大鼠基础痛阈值，剔除体重差异和痛阈值差异较大动物，余下大鼠根据

实验方案开展造模。紫杉醇粉末用橄榄油溶解为 1 mg/mL，每只大鼠每次腹腔注射量为 2 mg/kg。整个造模期间共注射 4 次，分别在 1、3、5、7 天进行腹腔注射。阴性对照或空白对照组大鼠注射上述溶解紫杉醇的溶剂。根据文献报道，此模型从造模开始算，经过 15 天左右痛阈值发生明显下降，标志着稳定的大鼠紫杉醇慢性化疗痛模型构建成功。按照实验方案设置的给药方式进行药物治疗，具体如下表 5 所示。从造模第 15 天开始，每天连续对动物进行给药治疗，并在给药第 1、4、7、12、14 天给完药第 2 h、4 h、6 h、8 h 通过平头针刺激大鼠右后肢足底，检测大鼠在相应时间点对机械刺激的痛阈值。结果见图 15-19。综合 5 次的给药治疗的实验结果，母肽 AJ003 在该模型中 4 h 内跟模型组相比具有显著的镇痛活性，超过 4 h 后镇痛活性与模型组比较没有显著性。2 个候选改构肽 AJ003-36 和 AJ003-40，其低剂量 0.5 mg/kg 镇痛活性与母肽 AJ003 的 1 mg/kg 的镇痛效果相当，在某些给药天数的相应时间点还优于母肽 AJ003。2 个候选改构肽 AJ003-36 和 AJ003-40，其高剂量 1.5 mg/kg 镇痛活性略优于阳性药普瑞巴林，且镇痛效果在给药 8 h 后与模型组相比仍然具有显著镇痛活性。

表 5. 紫杉醇化疗痛模型筛选不同剂量下部分改构肽镇痛活性给药方案表

组别	药物	给药方式	剂量	动物数	给药频率
G1(空白组/对照组)	生理盐水	皮下注射	0 mg/kg(0.4 mL/200 g)	8 只	1 次/d, 14 次
G2(模型组)	生理盐水	皮下注射	0 mg/kg(0.4 mL/200 g)	8 只	1 次/d, 14 次
G3 (阳性药组)	普瑞巴林	灌胃	30 mg/kg	8 只	1 次/d, 14 次
G4 (AJ003 组)	AJ003	皮下注射	1 mg/kg	8 只	1 次/d, 14 次
G5(AJ003-36 低剂量组)	AJ003-36	皮下注射	0.5 mg/kg	8 只	1 次/d, 14 次
G6(AJ003-36 高剂量组)	AJ003-36	皮下注射	2 mg/kg	8 只	1 次/d, 14 次
G7(AJ003-40 低剂量组)	AJ003-40	皮下注射	0.5 mg/kg	8 只	1 次/d, 14 次
G8(AJ003-40 高剂量组)	AJ003-40	皮下注射	2 mg/kg	8 只	1 次/d, 14 次

实施例:7: 奥沙利铂化疗痛评价不同剂量下候选改构肽体内镇痛活性

奥沙利铂用 5%葡萄糖溶液溶解为 1 mg/mL。造模组每只 C57 雄性小鼠(杭州子源实验动物科技有限公司)单次腹腔注射奥沙利铂量为 10 mg/kg。阴性对照或空白对照组注射 5%葡萄糖溶液。造模一周左右检测小鼠机械痛阈值, 每只小鼠测 3 次痛阈值, 计算平均值, 按照痛阈值随机分组。按照表 6 的给药方案对小鼠进行给药(总共给药 1 次), 并在给药后第 0.5、1、2、4、6、8 h 检测机械痛阈值。如图 20 所示, 在给药后 0.5 h、1 h、2 h、4 h 这 4 个时间点, 阳性药普瑞巴林、母肽 AJ003 以及候选改构肽 AJ003-36 的低中高三个剂量组与模型组相比均有显著的镇痛活性。在 6 h 时, 母肽 AJ003 与模型组相比没有显著性, 阳性药及改构肽 AJ003-36 的低中高不同剂量组仍与模型组比较有显著镇痛活性。在 8 h 时, 母肽 AJ003、AJ003-36 的低剂量组与模型组相比没有显著性, 阳性药及改构肽的中、高两个剂量组仍与模型组比较有显著镇痛活性。

表 6. 奥沙利铂化疗痛给药表

组别	药物	给药方式	剂量	动物数	给药频率
G1(空白组/对照组)	生理盐水	皮下注射	0 mg/kg(10 mL/kg)	8 只	1 次/d, 1 次
G2(模型组)	生理盐水	皮下注射	0 mg/kg(10mL/kg)	8 只	1 次/d, 1 次
G3(阳性药)	普瑞巴林	灌胃	60 mg/kg(6 mL/kg)	8 只	1 次/d, 1 次
G4(AJ003)	AJ003	皮下注射	2 mg/kg(10 mL/kg)	8 只	1 次/d, 1 次
G5(AJ003-36 低剂量组)	AJ003-36	皮下注射	1 mg/kg(10 mL/kg)	8 只	1 次/d, 1 次
G6(AJ003-36 中剂量组)	AJ003-36	皮下注射	2 mg/kg(10 mL/kg)	8 只	1 次/d, 1 次
G7(AJ003-36 高剂量组)	AJ003-36	皮下注射	3 mg/kg(10 mL/kg)	8 只	1 次/d, 1 次

实施例 8：奥沙利铂化疗痛评价多种多肽体内镇痛活性

奥沙利铂用 5%葡萄糖溶液溶解为 1 mg/mL。造模组每只 C57 雄性小鼠(上海必凯科翼生物科技有限公司)单次腹腔注射奥沙利铂量为 10 mg/kg。阴性对照或空白对照组注射 5%葡萄糖溶液。造模一周左右检测小鼠机械痛阈值, 每只小鼠测 3 次痛阈值, 计算平均值, 按照痛阈值随机分组。按照表 7 的给药方案对小鼠进行给药(总共给药 1 次), 并在给药后第 0.5、1、2、4、6、8 h 检测机械痛阈值。如图 30 所示, 在给药 0.5 h 开始, AJ003-36 给药组

与模型组相比，小鼠机械痛阈值明显降低，并具有显著性差异，而给药组 AJ003-24 和 AJ003-25 均没有降低小鼠的机械痛阈值。说明多肽 AJ003-36 可以有效缓解由奥沙利铂引起的小鼠化疗痛，而多肽 AJ003-24 和 AJ003-25 不能缓解该疼痛。

表 7. 小鼠奥沙利铂化疗痛模型实验给药表

组别	药物	给药方式	剂量	动物数	给药频率
G1(空白组 / 对照组)	生理盐水	皮下注射	0 mg/kg (10 mL/kg)	3 只	qd, 1 次
G2(模型组)	生理盐水	皮下注射	0 mg/kg (10 mL/kg)	3 只	qd, 1 次
G3 (AJ003-36)	AJ003-36	皮下注射	3 mg/kg (10 mL/kg)	3 只	qd, 1 次
G4 (AJ003-24)	AJ003-24	皮下注射	3 mg/kg (10 mL/kg)	3 只	qd, 1 次
G5 (AJ003-25)	AJ003-25	皮下注射	3 mg/kg (10 mL/kg)	3 只	qd, 1 次

实施例 9：大鼠 CCI 模型评价不同剂量下候选改构肽体内镇痛活性

神经病理性疼痛种类众多，运用动物模型可模拟临床神经病理性疼痛。SD 大鼠坐骨神经病理性疼痛模型主要有 CCI(慢性压迫性损伤模型)、SNI(坐骨神经分支选择结扎 SNI 模型)、SNL(脊神经选择性结扎 SNL 模型)、CCD(利用不锈钢钢丝穿过椎间孔来固定压迫背根神经节)四大类。其中，CCI 模型造模方法已经广泛运用于研究神经病理性疼痛，为进一步研究神经损伤修复的机制及策略提供基础(文晓娟, Medical Information. Jan. 2018. Vol. 31. No.1)。本实施例中使用的是 CCI 模型。

除对照组，其余 SD 大鼠用 10%水合氯醛生理盐水溶液按照每 100 g 体重 0.3 mL 的剂量腹腔注射麻醉后，进行手术造模。用手术剪小心剪开大鼠右后肢皮肤，划开肌肉，用羊肠线 4-0 对坐骨神经进行结扎三道，间隔 1 mm，然后缝合肌肉与皮肤，可涂抹抗生素于伤口处防止动物手术伤口感染。按照文献报道，手术后 7-10 天动物出现明显痛阈值下降，可持续一个月左右。造模 10 天左右检测大鼠足底痛阈值，每只大鼠测 3 次痛阈值，计算平均值，按照大鼠痛阈值进行随机分组。按照表 8 的给药方案进行给药，选择给药后 2 h、4 h、6 h、8 h 四个时间点进行大鼠足底痛阈值检测。

给药第 1 天，如图 21 所示，在 2 h 和 4 h 阳性药普瑞巴林、母肽 AJ003 以及候选改构肽 AJ003-36 的低中高三个剂量组与模型组相比均有显著的镇

痛活性。在 6 h 时，母肽 AJ003 与模型组相比没有显著性，阳性药及 AJ003-36 的低中高三个剂量组均仍与模型组比较有显著镇痛活性。在 8 h 时，母肽 AJ003 和 AJ003-36 的低剂量组与模型组相比没有显著性，阳性药及 AJ003-36 的中高两个剂量组均仍与模型组比较有显著镇痛活性。

给药第 4 天，如图 22 所示，在 2 h 和 4 h，阳性药普瑞巴林、母肽 AJ003 以及候选改构肽 AJ003-36 的低中高三个剂量组与模型组相比均有显著的镇痛活性。在 6 h 和 8 h 两个时间点，母肽 AJ003 和 AJ003-36 的低剂量组与模型组相比没有显著性，阳性药及 AJ003-36 的中高两个剂量组均仍与模型组比较有显著镇痛活性。

给药第 7 天，如图 23 所示，在 2 h 和 4 h，阳性药普瑞巴林、母肽 AJ003 以及候选改构肽 AJ003-36 的低中高三个剂量组与模型组相比均有显著的镇痛活性。在 6 h 时，母肽 AJ003 与模型组相比没有显著性，阳性药及 AJ003-36 的低中高三个剂量组均仍与模型组比较有显著镇痛活性。在 8 h 时，母肽 AJ003 和 AJ003-36 的低剂量组与模型组相比没有显著性，阳性药及 AJ003-36 的中高两个剂量组均仍与模型组比较有显著镇痛活性。

给药第 10 天，如图 24 所示，在 2 h 和 4 h，阳性药普瑞巴林、母肽 AJ003 以及候选改构肽 AJ003-36 的低中高三个剂量组与模型组相比均有显著的镇痛活性。在 6 h 时，母肽 AJ003 与模型组相比没有显著性，阳性药及 AJ003-36 的低中高三个剂量组均仍与模型组比较有显著镇痛活性。在 8 h 时，母肽 AJ003 和 AJ003-36 的低剂量组与模型组相比没有显著性，阳性药及 AJ003-36 的中高两个剂量组均仍与模型组比较有显著镇痛活性。

给药第 14 天，如图 25 所示，在 2 h 和 4 h，阳性药普瑞巴林、母肽 AJ003 以及候选改构肽 AJ003-36 的低中高三个剂量组与模型组相比均有显著的镇痛活性。在 6 h 时，母肽 AJ003 与模型组相比没有显著性，阳性药及 AJ003-36 的低中高三个剂量组均仍与模型组比较有显著镇痛活性。在 8 h 时，母肽 AJ003 和 AJ003-36 的低剂量组与模型组相比没有显著性，阳性药及 AJ003-36 的中高两个剂量组均仍与模型组比较有显著镇痛活性。

表 8. 大鼠 CCI 模型给药表

组别	药物	给药方式	剂量	动物数	给药频率
G1(空白组/对照组)	生理盐水	皮下注射	0 mg/kg (1 mL/kg)	7 只	qd, 14 次

G2(模型组)	生理盐水	皮下注射	0 mg/kg (1 mL/kg)	7 只	qd, 14 次
G3(阳性药)	普瑞巴林	灌胃	30 mg/kg (1 mL/kg)	7 只	qd, 14 次
G4(AJ003)	AJ003	皮下注射	1 mg/kg (1 mL/kg)	7 只	qd, 14 次
G5(AJ003-36 低剂量组)	AJ003-36	皮下注射	0.5 mg/kg (1 mL/kg)	7 只	qd, 14 次
G6(AJ003-36 中剂量组)	AJ003-36	皮下注射	1 mg/kg (1 mL/kg)	7 只	qd, 14 次
G7(AJ003-36 高剂量组)	AJ003-36	皮下注射	2 mg/kg (1 mL/kg)	7 只	qd, 14 次

实施例 10：小鼠糖尿病神经痛模型评价不同剂量下候选改构肽体内镇痛活性

除对照组，其余 C57 雄性小鼠(杭州子源实验动物科技有限公司)用高糖高脂饲料连续诱导十周左右，对造模组小鼠过夜断食空腹，用柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液溶解链脲佐菌素(萨恩化学技术(上海)有限公司)，给造模组小鼠腹腔注射链脲佐菌素 70mg/kg。注射链脲佐菌素约两周后，检测小鼠机械痛阈值，检测方法为将小鼠置于有孔隙铁丝网适应环境后，用平头针垂直刺激小鼠右后肢足底，利用生物信号采集系统收集痛阈值数据并记录，每只小鼠测 3 次痛阈值，最终计算平均值。按照小鼠痛阈值进行随机分组给药治疗。

给药第 1 天，按照表 9 的给药方案进行给药，选择给药后 0 h、2 h、4 h、6 h、8 h 五个时间点进行小鼠足底机械痛阈值检测。如图 26 所示，在 2 h 和 4 h，阳性药普瑞巴林、母肽 AJ003 以及候选改构肽 AJ003-36 的低中高三个剂量组与模型组相比均有显著的镇痛活性；在 6 h 和 8 h 两个时间点，母肽 AJ003 与模型组相比没有显著性，阳性药及 AJ003-36 的低中高三个剂量组均仍与模型组比较有显著镇痛活性。

给药第 4 天，按照表 9 的给药方案进行给药，选择给药后 0 h、2 h、4 h、6 h、8 h 五个时间点进行小鼠足底机械痛阈值检测。如图 27 所示，在 2 h 和 4 h，阳性药普瑞巴林、母肽 AJ003 以及候选改构肽 AJ003-36 的低中高三个剂量组与模型组相比均有显著的镇痛活性；在 6 h 和 8 h 两个时间点，母肽 AJ003 与模型组相比没有显著性，阳性药及 AJ003-36 的低中高三个剂量组均仍与模型组比较有显著镇痛活性。

给药第 8 天，按照表 9 的给药方案进行给药，选择给药后 0 h、2 h、4 h、6 h、8 h 五个时间点进行小鼠足底机械痛阈值检测。如图 28 所示，在 2 h 和 4 h，阳性药普瑞巴林、母肽 AJ003 以及候选改构肽 AJ003-36 的低中高三个剂量组与模型组相比均有显著的镇痛活性；在 6 h 和 8 h 两个时间点，母肽 AJ003 和 AJ003-36 的低剂量组与模型组相比没有显著性，阳性药及 AJ003-36 的中高两个剂量组仍与模型组比较有显著镇痛活性。

给药第 14 天，按照表 9 的给药方案进行给药，选择给药后 0 h、2 h、4 h、6 h、8 h 五个时间点进行小鼠足底机械痛阈值检测。如图 29 所示，在 2 h 和 4 h，阳性药普瑞巴林、母肽 AJ003 以及候选改构肽 AJ003-36 的低中高三个剂量组与模型组相比均有显著的镇痛活性；在 6 h 和 8 h 两个时间点，母肽 AJ003 与模型组相比没有显著性，阳性药及 AJ003-36 的低中高三个剂量组均仍与模型组比较有显著镇痛活性。

综合 4 次给药治疗的机械痛阈值检测结果，母肽 AJ003 在该模型中 4 h 内跟模型组相比具有显著的镇痛活性，超过 4 h 后镇痛活性与模型组比较没有显著性。候选改构肽 AJ003-36 的中高剂量在检测的 2~8 h 与模型组比较均有显著镇痛活性；AJ003-36 的低剂量组在第 8 天检测时与模型组相比没有显著性差异，而在其他 3 次检测时与模型组相比有显著镇痛活性；AJ003-36 的高剂量组镇痛活性略优于阳性药普瑞巴林。该实验提示候选改构肽 AJ003-36 通过皮下注射可治疗由糖尿病诱发的神经痛。

表 9. 小鼠糖尿病神经痛模型给药表

组别	药物	给药方式	剂量	动物数	给药频率
G1(空白组/对照组)	生理盐水	皮下注射	0 mg/kg (10 mL/kg)	7 只	qd, 14 次
G2(模型组)	生理盐水	皮下注射	0 mg/kg (10 mL/kg)	7 只	qd, 14 次
G3(阳性药)	普瑞巴林	灌胃	60 mg/kg (6 mL/kg)	7 只	qd, 14 次
G4(AJ003)	AJ003	皮下注射	2 mg/kg (10 mL/kg)	7 只	qd, 14 次
G5(AJ003-36 低剂量组)	AJ003-36	皮下注射	1 mg/kg (10 mL/kg)	7 只	qd, 14 次
G6(AJ003-36 中剂量组)	AJ003-36	皮下注射	2 mg/kg (10 mL/kg)	7 只	qd, 14 次
G7(AJ003-36 高剂量组)	AJ003-36	皮下注射	3 mg/kg (10 mL/kg)	7 只	qd, 14 次

权 利 要 求 书

1. 一种从 N 末端到 C 末端的顺序包含下式 I 或具有保守取代的式 I 的肽或其衍生物，

Gly-Ser-Cys-Ser-X1-X2-X3-X4-(D-Cys)-X5-X6-X7-X8 式 I

其中，

式 I 中的第 3 位 Cys 和第 9 位 D-Cys 形成一对分子内二硫键，D-Cys 代表 D 型半胱氨酸，氨基酸残基之间的“-”代表肽键，所述肽或其衍生物的 C 末端为游离羧基或酰胺，且 X1 为 Thr 或 D-Thr，X5 选自 Ala、Val 和 D-Val 中的任意一个，X2-X4 和 X6-X8 彼此独立地为任意一种氨基酸。

2、根据权利要求 1 所述的肽或其衍生物，其中所述 X2 选自 Pro、D-Pro 和 Hyp 中的任意一个，X3 选自 Pro、D-Pro 和 Hyp 中的任意一个，X4 选自 Ser、D-Ser、Ala 和 Aib 中的任意一个，X6 选自 Ala、Leu、D-Leu、Ile、ABu 和 Nle 中的任意一个，X7 选自 Tyr、D-Tyr、Ala、Trp、Phe 和 Bip 中的任意一个，X8 选自 Ser、D-Ser、Ala、和 Orn 中的任意一个。

3、根据权利要求 1 或 2 所述的肽或其衍生物，其包含选自以下的任意一个序列：SEQ ID NO：1-5、SEQ ID NO：10-16 和 SEQ ID NO：20-34，具有保守取代的 SEQ ID NO：1-5、SEQ ID NO：10-16 和 SEQ ID NO：20-34；优选地所述肽或其衍生物包含选自以下的任意一个序列：SEQ ID NO：26、28 和 32，具有保守取代的 SEQ ID NO：26、28 和 32。

4、根据权利要求 1-3 中任一项所述的肽或其衍生物，其中所述衍生物与所述肽相比包含选自以下的任意一种或多种修饰：氨基酸修饰、保守氨基酸取代、氨基酸残基中的氢被取代。

5、一种药物组合物，其包含根据权利要求 1-4 中任一项所述的肽或其衍生物以及药学上可接受的载体或盐。

6、权利要求 1-4 中任一项所述的肽或其衍生物或权利要求 5 所述的药物组合物在制备用于治疗疼痛的药物中的用途。

7、一种用于治疗疼痛的方法，所述方法包括向有此需要的受试者施用治疗有效量的权利要求 1-4 中任一项所述的肽或其衍生物或权利要求 5 所述的药物组合物。

8、根据权利要求 7 所述的方法，其中所述肽或其衍生物通过皮下注射、肌肉注射、静脉注射、腹腔注射、鞘内注射、口服、经皮、经肺、眼部或局部给药的方式施用。

9、根据权利要求 6 所述的用途或根据权利要求 7 所述的方法，其中所述疼痛包括化疗引起的疼痛、糖尿病性周围神经疼痛、坐骨神经痛、骨关节疼痛、带状疱疹后遗神经痛、感染疼痛、营养缺乏疼痛、炎症疼痛、慢性酒精中毒疼痛、甲状腺功能减退疼痛、自身免疫病疼痛、格林巴利综合症疼痛、中毒疼痛、药物引起的疼痛、肿瘤病变疼痛、遗传疾病疼痛和挫伤疼痛。