

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁷

C07K 7/02

C07K 1/107 C07K 14/575

A61K 38/22

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 99806239.1

[43]公开日 2001年6月27日

[11]公开号 CN 1301269A

[22]申请日 1999.3.26 [21]申请号 99806239.1

[30]优先权

[32]1998.4.3 [33]US [31]09/054,393

[86]国际申请 PCT/EP99/02076 1999.3.26

[87]国际公布 WO99/51626 英 1999.10.14

[85]进入国家阶段日期 2000.11.15

[71]申请人 B·M·R·A·有限公司

地址 荷兰鹿特丹

[72]发明人 M·穆特 J-S·拉克罗里克斯

E·格鲁兹曼

[74]专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事
务所

代理人 樊卫民

权利要求书2页 说明书27页 附图页数11页

[54]发明名称 模板结合的 NPY₂ 受体激动剂

[57]摘要

本发明涉及神经肽 Y(NPY)或 PYY 激动剂,其通过把这些肽或肽的一部分结合到使生物活性成倍提高的模板上而形成。一般的,模板由含有一个或多个萘环结构的环肽组成。激动剂可以用于治疗已知对 NPY 或 PYY 有反应的疾病和病症,特别是治疗哮喘、鼻炎和支气管炎。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

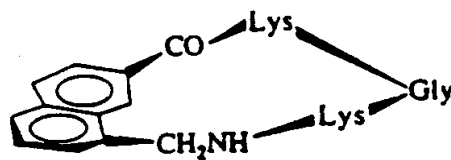
权利要求书

1. 一种神经肽 Y(NPY)激动剂, 其包含:

(a)一种包含长度为 3-10 个氨基酸的环化肽的模板, 其中环化肽上至少两个残基被萘环连接; 并且

(b)至少一个长度在 12-37 个氨基酸之间的线性肽共价结合到模板上, 其中线性肽具有选自 RHYINLITRQRY (SEQ ID NO:3) 和 RHYLNLVTRQRY(SEQ ID NO:4)的 C-末端序列, 并且其中线性肽 C-末端的酪氨酸被酰胺化。

2. 权利要求 1 的激动剂, 其中所说的模板有如下结构:



并且其中线性肽附着在模板的任一个或两个赖氨酸残基上。

3. 权利要求 2 的激动剂, 其中在线性肽 C 末端序列其 N 端之前有 1 至 24 个残基之间的 YPSKPDNPGEDAPAEDMARYYSAL (SEQ ID NO:5)。

4. 权利要求 3 的激动剂, 其中线性肽有序列 YSALRHYINLITRQRY (SEQ ID NO:6)。

5. 权利要求 2 的激动剂, 其中线性肽 C 末端序列的 N 末端之前有 1 至 24 个残基之间的 YPIKPEAPGEDASPEELNRYYSAL (SEQ ID NO:7)。

6. 权利要求 8 的激动剂, 其中线性肽有序列 YASLRHYLNLVTRQRY (SEQ ID NO:8)。

7. 任一前述权利要求的激动剂, 其中线性肽在其 N 末端还包含氨基乙酰化甘氨酸。

8. 任一前述权利要求的激动剂, 其中线性肽通过脲键与模板结合。

9. 权利要求 8 的激动剂, 其为 TASP-V。

10. 权利要求 8 的激动剂，其为 TASP-V2。
11. 一种用于治疗的药物组合物，包含任一前述权利要求的激动剂。
12. 选自 NPY、PYY、NPY 激动剂和 PYY 激动剂的药剂的用途，用于生产降低患支气管疾病或病症的患者中呼吸道阻力的药物。
13. 权利要求 12 的用途，其中药剂为 NPY 或 PYY。
14. 权利要求 12 的用途，其中药剂为包含 NPY 之 25-36 位氨基酸序列或 PYY 之 25-36 位氨基酸序列的肽。
15. 权利要求 12 至 14 中任一项的用途，其中药剂为 TASP-V 或 TASP-V2。
16. 权利要求 12 至 15 中任一项的用途，其中药物经改造以适于通过吸入施用剂量为 1 至 100 微克的药剂。
17. 权利要求 12 至 16 中任一项的用途，其中支气管疾病或病症为哮喘或支气管炎。
18. 权利要求 1 至 10 中任一项激动剂的用途，用于生产治疗对 NPY 或 PYY 有反应的疾病或病症的药物。
19. 权利要求 18 的用途，其中疾病或病症选自喉炎、慢性鼻窦炎、水肿、炎症、焦虑、充血性心力衰竭、心肌病、冠状动脉疾病、减弱的心脏迷走神经活性、高血压、老年性痴呆、癫痫、局部缺血、咽峡炎、心绞痛、心肌梗塞、艾滋病以及以降低的免疫反应性为特征的疾病。
20. 权利要求 18 的用途，用于增加体重或用作抗组胺药。

说明书

模板结合的 NPY Y2 受体激动剂

发明领域

本发明涉及与神经肽 Y(NPY)Y2 受体优先相互作用的新型激动剂。激动剂含有一个或多个源自神经肽 Y(NPY)或肽 YY(PYY)C 末端的序列的肽，所述的肽与促进这些肽正确折叠的模板结合。另外，本发明涉及通过给予 NPY、PYY 或这些肽的激动剂而降低支气管病患者呼吸道阻力的方法。

发明背景

神经肽 Y(NPY)是广泛分布在中枢和周围神经系统的酰胺化肽 (Tatemoto 等, 自然 (Nature) 296 卷: 659-660 页 (1982); Ekblad 等, 调节肽 (Regul.Peptides) 8 卷: 225-235 页 (1984))。它存在于支配心血管系统的所有的交感神经中, 并且是脑和心脏中最丰富的肽 (Tatemoto 等, 自然, 296 卷: 659-660 页 (1982 年))。另外, NPY 存在于血小板中 (Ericsson 等, 美国国家科学院院报 (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.) 84 卷: 5587-5591 页 (1987 年))、内皮 (著者同上); 肾上腺髓质 (Allen 等, 自主神经系统杂志 (J. Auton. Nerv. Sys.) 9 卷: 559-566 页 (1983 年)); 胰脏 (Jamal 等, 内分泌学 (Endocrinology) 129 卷: 3372-3380 页 (1991 年)); 肾脏 (Grouzmann 等, 肽 (Peptides), 15(8):1377-1382 页 (1994 年)) 以及垂体 (Gehlert 等, 肽, 15 (8): 651-656 页 (1994 年))。肽 YY(PYY)是有与 NPY 相似生物学作用并且主要见于肠中的紧密相关肽。

NPY 和肽 YY 的生物学作用通过很多称为 Y1、Y2、Y3、Y4/PP 和 Y5 的 G 蛋白偶联受体介导 (Herzog 等, 美国国家科学院院报, 89 卷: 5794-5798 页 (1992 年))。在它们之中, 与 Y1 和 Y2 受体相关的生理学作用被充分表征。接触 Y1 激动剂引起血压升高, 并且增强其它血管活性

物质的突触后作用(Wahlestedt 等, 药理实验治疗杂志(*J. Pharmacol. Exp. Ther.*) 234 卷: 735-741 页(1985 年))。相反地, Y2 受体主要位于突触前, 一经刺激, 介导神经递质释放的抑制(Westfall 等, 心血管药理杂志(*J. Cardiovasc. Pharmacol.*) 10 卷: 716-722 页(1987 年))。

NPY 有许多具有潜在治疗重要性的生物学作用。鼻内给予 NPY 降低鼻的呼吸道阻力和血管渗透性, 而不影响粘膜下腺体分泌(Baraniuk 等, 美国呼吸细胞分子生物学杂志(*Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol*) 3 卷: 165-173 页(1990 年); Baraniuk 等, 应用生理学杂志(*J. Appl. Physiol.*) 73 (5): 1867-72 页(1992 年))。在健康志愿者中, 内源性 NPY 鼻内预处理显著降低由辣椒素或组胺形成传入神经刺激所引起的血管扩张和鼻的分泌(Lacroix 等, 英国药理学杂志(*Br. J. Pharmacol.*) 118 卷: 2079-2084 (1996 年))。因为变应原引起的患者鼻反应在局部预先用肽处理之后显著减轻(Lacroix 等, 变应原临床免疫学杂志(*J. Allergy Clin. Immunol.*) 98 卷: 611-616 页(1996 年)), 所以最近提出在治疗鼻炎中治疗性应用 NPY。

NPY 在调节心血管系统、行为、焦虑和一些激素的分泌中也有相当重要的作用(Wahlestedt 等, 药理毒理学综述年鉴(*Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*) 33 卷: 309-352 页(1991 年))。其影响血压的中枢及周围控制、摄食行为的调节、肥胖、糖尿病和精神失常(Walker 等, 药理科学趋势(*Trends Pharmacol Sci*) 12 卷: 111-115 (1991 年); Sahu 等, 内分泌学代谢趋势(*Trends Endocrinol. Metab.*) 4 卷: 217-224(1993 年); Stanley 等, 美国国家科学院院报, 82 卷: 3940-3943 页(1985 年))。

B. NPY 和 PYY 结构

NPY 源自如 SEQ ID NO:1 显示的 97 个氨基酸前体(Minth 等, 美国国家科学院院报, 81 卷: 4577-4581 页(1984 年))。氨基酸 29-64 代表了经历加工的 36 个氨基酸序列, 导致 N 端甘氨酸的加入和 C 端酪氨酸的酰胺化。完整 NPY 序列是结合 Y1 受体必需的, 然而 C 末端片段对 Y2 受体有选择性(Ekblad 等, 调节肽, 8 卷: 225-235 页(1984 年))。

C 末端五肽酰胺对两种受体都很重要，并且可能代表了结合位点（Beck-Sickinger 等，欧洲生化杂志 (*Eur. J. Biochem.*) 225 卷: 947-958 页 (1994 年))。但是，在 Y1 系统中，33 位精氨酸和 35 位精氨酸不能换成 L-丙氨酸，而对于 Y2 受体来说，35 位精氨酸和 36 位酪氨酸是最重要的残基。比 NPY27-36 短的 NPY 片段不再能与 Y2 受体结合。

肽 YY 也与 Y2 受体结合。它长度为 36 个氨基酸，与 NPY 有 70% 序列同源性。其序列如 SEQ ID NO:2 所显示。

C. 模板装配的合成蛋白质或肽 (TASP)

为了避开一般与肽和蛋白质合成有关的折叠问题，最近采取了概念上不同的从头蛋白质设计的方法，模板装配的合成蛋白质或肽 (TASP) 的合成。该方法中，拓扑模板指导共价结合肽的区组 (block) 形成预先确定的三维包装排列 (图 1-3)，由此改良了其生物学和药代动力学特性 (Mutter 等, *Helv. Chim. Acta.* 71 卷: 835-47 页 (1988 年); Mutter 等, *生化科学趋势*, 13 卷: 260-5 页 (1988 年); Mutter 等, *美国化学协会杂志*, 114 卷: 1463-1470 页 (1992 年); Grouzmann 等, *欧洲生化杂志*, 234 卷: 44-49 页 (1995 年))。一般地，模板是约束肽、环糊精或多环系统。

最近，TASP 概念被用于设计通过 Y2 受体选择性拮抗 NPY 作用的化合物。具有 4 个结合位点的环肽和萘基衍生物用作模板，并且 NPY33-36 区段通过肽键结合 (Grouzmann 等, *生物化学杂志*, 292(12): 7699-7706 页 (1997 年))。研究了该 TASP 分子与 NPY Y1 和 Y2 受体的结合，并且因其阻止 NPY 引起的细胞内钙离子增加的能力而确立其拮抗活性。

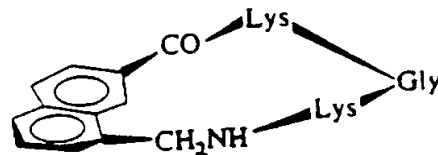
D. NPY Y2 受体相互作用的 TASP 激动剂

现在发现模板装配的合成肽能产生与 Y2 受体特异性相互作用的 NPY 和 PYY 激动剂。这些化合物可以用于治疗一些疾病，包括鼻炎。另外，已经发现 NPY、PYY 以及这些肽的激动剂可用于治疗支气管疾病以及相关疾病。

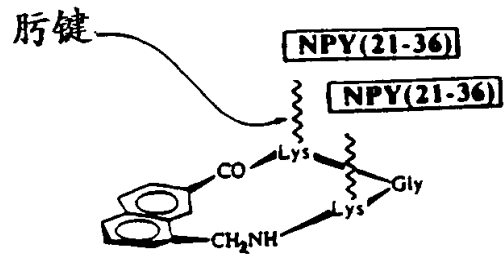
发明概述

本发明基于两个主要发现。第一个是能生产是 NPY 和 PYY 的激动剂的模板装配合成肽。这些激动剂能用于有效地治疗鼻炎和各种各样的其他生理病症。第二个发现是 NPY、PYY 及其激动剂降低支气管呼吸道阻力。如此，这些药剂可以用于治疗支气管炎、哮喘和相关病症。

第一方面，本发明涉及一种 NPY 的激动剂，它含有模板和一个或多个源自与模板共价结合之 NPY 或 PYY 的肽。模板是长度为 3 至 10 个氨基酸的环化肽，含有至少两个通过萘环连接的残基。至少一个，优选两个，长度为 12 至 27 个氨基酸之间的线性肽与模板例如通过脲键共价结合。结合肽的 C 末端序列具有序列 RHYINLITRQRY (SEQ ID NO:3)，或序列 RHYLNLVTRQRY (SEQ ID NO:4)。在上述任一种情况下，C 末端的酪氨酸应被酰胺化。在优选实施方案中，线性肽结合在如下模板的赖氨酸残基上：



NPY 序列的附加部分位于上面显示的 12 个氨基酸 C 末端序列之前，附加部分可长达见于 NPY 中全部附加的 24 个氨基酸：YPSKPDNPGED APAEDMARYYSAL(SEQ ID NO:5)。例如，NPY1-24、NPY2-24、NPY3-24 等可以位于 SEQ ID NO:3 的 N 末端之前。我们期望在此 24 个氨基酸序列内可进行保守性改变而不影响活性，特别是第 17 位的“M”可被 L 有效地替代。如果 Y2 受体特异的激动剂是需要的，那么不应使用全长 NPY 肽。最优选的与模板结合的肽拥有序列：YSALRHYINLITRQRY(SEQ ID NO:6)。氨基氧乙酰化甘氨酸可以位于这些肽的 N 末端之前。尽管这些肽通过其他共价键可与模板连接，一般优选脲键。最优选的结构为如下的 TASP-V：



或者，长达全部附加 24 个氨基酸的 PYY 序列之附加部分可以位于与 TASP 模板结合的线性肽之前：YPIKPEAPGEDASPEELNRYASL(SEQ ID NO:7)。在所有情况下，必须进行添加以保持 PYY 的正确序列顺序。与模板连接的最优选的 PYY 片段为：YASLRHYLNLVTRQRY(SEQ ID NO:8)。氨氧基乙酰甘氨酸可以位于这些连接的肽的 N 末端之前，并且它们优选通过肽键与模板结合。当 SEQ ID NO:8 的 PYY 片段用于替代 TASP-V 中 NPY 片段时，便产生第二个优选的激动剂。为了将此第二个激动剂与 TASP-V 区分开来，其被命名为 TASP-V2。

上述所有的肽激动剂可以掺入药物组合物中，并且为治疗对 NPY 或 PYY 有反应的疾病或病症而施予患者。通常，应该给予患者的激动剂剂量在约 1 至 100 微克。任何给药途径应与本发明目的相一致，但是一般采用非口服途径以避免药剂可能在肠道被破坏。

另一方面，本发明涉及通过施用 NPY、PYY 或者 NPY 或 PYY 激动剂，优选对 Y2 受体特异的激动剂来降低患支气管疾病或病症的患者之呼吸道阻力。当 NPY 或 PYY 用于治疗时，必须使用酰胺化的全长形式的肽。当治疗中使用 Y2 激动剂时，它应是最少含有 NPY 或 PYY 的 25-36 位氨基酸序列，但不是全长的 36 个氨基酸的肽。最优选的激动剂是 TASP-V 和 TASP-V2。

优选通过吸入方式给予药物组合物中的治疗剂来治疗支气管病症或疾病。单位剂量应给患者提供约 1 至 100 微克的活性药剂。用此步骤治疗的支气管疾病和病症尤其包括哮喘和支气管炎。

另一方面，本发明涉及对 NPY 或 PYY 有反应的疾病或病症的治疗方法改进。这通过给予单位剂量在 1 至 100 微克之间的优选对 Y2 受体特异的上述任一种 TASP 型激动剂而完成。对于“TASP 型激动剂”我们

指这样的激动剂，其中的肽共价结合到此处描述的那些模板上。优选的模板为上面所示，并且结合到模板上的线性肽应当含有 NPY 或 PYY 的 25-36 位氨基酸序列。线性肽还可含有构成完整 NPY 或 PYY 序列的附加连续氨基酸的任一部分。最优选的激动剂还是 TASP-V 和 TASP-V2。NPY 或 PYY 激动剂可以用作抗组胺剂，以使体重增加，或治疗鼻炎、哮喘或支气管炎。其它可以治疗的疾病和病症有喉炎、粘液粘稠病、慢性鼻窦炎、水肿、炎症、焦虑、充血性心力衰竭、心肌病、冠状动脉病、减弱的心脏迷走活性、高血压、老年性痴呆、癫痫、局部缺血、咽峡炎、心绞痛、心肌梗塞以及以降低的免疫反应性为特征的疾病，例如艾滋病。

附图简述

图 1: 用于构建功能蛋白质模拟物的模板装配的合成蛋白质 (TASP) 的概念。拓扑模板 (例如环肽, 见图 2) 诱导共价结合的肽区组 (例如生物活性化合物的片段) 折叠或空间重排, 得到预先确定的包装排列。强迫性空间接近以及模板装配肽之特异构型的诱导可以使生物活性和特异性增强, 并且以特征性的方式改变药代动力学。如图 3 所示, 符号代表化学选择性反应基团。

图 2: 多种分子可以用作模板, 例如环肽、单糖类、类固醇类、环糊精类、杯芳烃类或卟啉类。结构要求是选择性可定位的结合位点的适宜空间定向, 例如图示 (中间) 显示的正交保护的氨基基团。

图 3: 最近引入的化学选择性连接方法允许完全未保护的肽片段 (P) 在水溶液中缩合成相应的有功能的模板。

图 4: 导致结合进 TASP 模板中的转角 (turn) (1a, 2a 和 3a) 模拟物产生的反应 (源自 Eenest 等, *Helv.Chim.Acta.* 76 卷: 1539-1563 页 (1993 年), 见 1541 页)。

图 5: TASP-V 的合成。缩写: Lys=赖氨酸; Gly=甘氨酸; DIEA=二异丙基乙胺; 脰键=模板-赖氨酸^ε-N-CO-CH=NO-CH₂CO-肽; Fmoc=芴甲氧羰基; PyBOP=苯并三唑-1-基-氧基-三-吡咯烷-磷鎓六氟磷酸盐; Boc-AO-Osu=叔丁氧羰基-氧氧乙酰基-N-羟基丁二酸酯; T=苏氨酸; R=

精氨酸; Q=谷氨酰胺; Y=酪氨酸; Pmc=五甲基苯并二氢吡喃基磺酰基;
G=甘氨酸; L=亮氨酸; N=天冬酰胺; H=组氨酸; I=异亮氨酸; S=丝氨酸;
A=丙氨酸。

图 6: SK-N-MC 细胞上 Y1 受体之选择性肽替换 ^{125}I -NPY 的典型浓度反应性曲线。每个类似物进行 4 次实验。竞争剂浓度增加引起的 ^{125}I -NPY 与受体结合之抑制百分率显示于 y 轴。发现 NPY (\diamond) 和 Leu31、Pro34 NPY (\triangle) 与 SK-N-MC 细胞上的 Y1 受体结合的亲和力高, 但是发现 NPY13-36 (\circ) 和 TASP-V (\blacksquare) 亲和力低。

图 7: LN319 细胞上 Y2 受体之选择性肽替换 ^{125}I -NPY 的典型浓度反应性曲线。每个类似物进行 4 次实验。竞争剂浓度增加引起的 ^{125}I -NPY 与受体结合之抑制百分率显示于 y 轴。发现 NPY (\diamond)、NPY13-36 (\circ) 和 TASP-V (\blacksquare) 与 LN319 与细胞上 Y2 受体的结合的亲和力高。Leu31、Pro34 NPY (\triangle) 亲和力低。

图 8: 大鼠中测定的 TASP-V 的结合前活性, 表示为对在注射 TASP-V 后迷走神经刺激引起的脉冲间隙 (ΔPI) 增加的最大抑制百分率。

图 9: 大鼠中测定的 TASP-V 的结合前活性, 表示为此作用恢复一半所需的时间 (T_{50})。

图 10: 大鼠中测定的 TASP-V 的结合后活性, 为肽注射后的峰反应 (ΔBP)。

图 11: 大鼠中测定的 TASP-V 的结合后活性, 为此反应的持续时间 (BP 时程)。

图 12 (a 和 b 部分): 用 TASP-V 或安慰剂 (盐水喷雾) 预处理之后同侧鼻内给予组胺 (200 微克盐水中溶有 1 毫克), 主观 (图 a) 和客观 (图 b) 鼻呼吸道阻力 (NAR, 分别用视觉上类似的分值 0 至 5 级的等级以及前鼻塞测压计测定) 的时间过程的变化。用 TASP-V 预处理显著限制主观和客观鼻呼吸道阻力的增加。预处理 15 分钟后就得到最大作用 ($n=11$)。

* $p<0.05$, ** $p<0.01$ (变异 ANOVA 单边分析)。

图 13: 用 TASP-V 或安慰剂 (盐水喷雾) 预处理之后同侧鼻内给予组胺 (200 微克盐水中溶 1 毫克), 最小横截面面积 (MCSA, 用听觉量

鼻器法测定)的时间过程的变化。预先用 TASP-V 处理显著限制组胺攻击后横截面面积的降低。预处理 15 分钟后就得到最大作用 (n=11)。

*p<0.05, **p<0.01 (变异 ANOVA 单侧分析)。

图 14: 用前鼻塞测压计测定用安慰剂或 TASP-V 预处理之后的鼻内喷雾组胺 (200 微克盐水中溶 1 毫克) 对同侧鼻呼吸道阻力 (NAR) 的影响 (n=11)。用 TASP-V 预处理显著限制了鼻呼吸道阻力的增加 (n=11)。

*p<0.05(变异 ANOVA 单边分析)。

图 15: 用听觉量鼻器测定用安慰剂或 TASP-V 预处理之后的鼻内喷雾组胺 (200 微克盐水中溶 1 毫克) 对同侧最小横截面面积 (MCSA) 的影响。用 TASP-V 预处理显著限制了鼻横截表面的减少 (n=11)。*p<0.05(变异 ANOVA 单边分析)。

发明详述

在以下的描述中,参考了为化学和医学领域内的技术人员所熟知的各种方法学。这些方法学在陈述这些学科一般原则的标准参考文献著作内有描述。

I. TASP NYP Y2 激动剂的合成

A. 模板的制备

一般用于制备 TASP 模板的过程,尤其是用于 TASP-V 的模板的制备,在文献中(Ernest, 等等, *Helv. Chim. Acta* 76 卷:1539-1563 页; Ernest, 等等, 四面体通信 (Tetrahedron Lett.) 31 卷:4011-4014 页(1990 年)) 已有完整描述。基本途径为将一个人工的转角诱导模拟物引入到环化肽链中,从而使之约束成一个半刚性的空间排列。三个最常用的转角模拟物是: 8-氨基-5, 6, 7, 8-四氢萘基-2-酸; 8-(氨基甲基)-5, 6, 7, 8-四氢萘基-2-酸; 8-(氨基甲基)萘-2-酸。各个上述物质可从商品有售的 4-苯基丁酸合成。用于产生各种这些肽模拟物的基本反应路线列于图 4。

在掺入肽链之前,将转角模拟物中的反应基团转化成其 N-Boc 基和 N-Fmoc 衍生物。区组模拟物上的自由羧基与肽上的 N-末端氨基酸反应

形成酰胺键。肽上的 C-末端和模拟物上去保护的 NH-基团反应形成环状结构。依据所需的特定模板，上述的反应可相应不同。用于形成模板的肽一般长为 3-10 个单位之间，并且最优选的结构包括在任一末端与一或二个赖氨酸残基相邻的甘氨酸残基。以这种方式形成的典型的模板示于图 5 的结构 I。

环化模板上氨基酸的反应性侧链基团形成了衍生于 NPY 或 PYY 的一个或多个线性肽的附着位点。对于模板 I，赖氨酸的 ϵ -氨基可以用一个有助于肽附着的基团而衍生化。例如，如图 5 所示， ϵ -氨基可以和乙醛酸 1,1-二乙基乙缩醛琥珀酰亚胺酯反应形成而二乙基乙缩醛衍生物。水解之后，产生的乙醛官能团可以和线性 NPY 或 PYY 衍生的肽反应形成共价肽键。其它可以形成的共价键列于图 3，包括胺类、酰胺类、硫醚类、硫代酸酯类、噻唑烷类和咪唑烷类。对反应及反应产物纯化的完全描述见于前述 Ernest 的文献及下面实施例 1。

B. NPY 线性肽的合成

可用任何方法合成附着于模板的线性肽。一般地，肽可采用固相合成技术来制备 (Stewart, 等等, 固相肽合成, 第二版, (1984); Fields, 等等, 国际肽蛋白质研究杂志 (Int. J. Peptide Protein Res.) 35 卷: 161-214 页(1990)), 或通过涉及溶液中肽区段的偶联在内的片段缩合方法(Lloyd-Williams, 等等, 国际肽蛋白质研究杂志, 37 卷: 58-60 页(1990); Ernest, 等等, *Tetrahedron Lett.* 31 卷: 4015-4018 页 (1990)). 尽管固相合成已被优化从而能合成长达约 100 个氨基酸的蛋白质, 但是经过多步偶联反应副产物的累积可能会使目标产物的纯化费力而且费时。缩合策略的优点在于可使长达大约 30 个残基之肽区段的合成和纯化直接完成, 但其局限性是水溶液中的完全保护肽区段的溶解度较差, 而且 α -羧基活化的肽有外消旋化的倾向。通过使用最近发展的化学选择性连接方法可以避免这些合成方法所造成的许多困难 (Rose, 等等, 生物偶联物化学, 7 卷: 552-556 页(1996); Liu, 等等, 美国化学会杂志, 116 卷: 4149-4153 页(1994) Dawson, 等等, 美国化学会杂志, 115 卷:7263-7266 页(1993); Kemp, 等

等, 有机化学杂志. 58 卷:2216-2222 页(1993))。这些方法允许完全未保护的肽片段在水性介质中缩合(图 3)。

在选择附着到模板上的适合的线性肽时, NPY 或 PYY 结构可起指导作用。C-末端 25-36 位残基必须存在于线性肽中, 但是可以使用更长的区段, 甚至包括 NPY 或 PYY 序列的全长。此外, 可将保守性氨基酸替换引入序列。例如, 可以期望, NPY 序列中的一个疏水性氨基酸一般可被另一个疏水性氨基酸替换而基本不影响活性。为测定特定替换是否可接受, 可采用下面实施例 3 和 4 中的方法测试线性肽-模板化合物结合 NPY 受体和活化 cAMP 的能力。

C. TASP 激动剂的形成

将线性肽附着到模板上的优选方法是采用以上描述的化学选择性连接过程。特别地, 可采用标准方法制备有化学选择性可定位的功能团(如: 氨氧基和醛基)的肽区组和模板, 并且在侧链保护基团断裂后, 它们可反应产生生物活性的 TASP 分子。例如, 根据略述于图 5 中的策略, 衍生于各种链长和序列(例如, NPY2-36, NPY21-36, NPY25-36)的 NPY 片段可被选择性附着到模板上。可有效的采用相似策略来产生各种其它 TASP 分子(见例如, Grouzmann 等, 欧洲生物化学杂志, 234 卷:44-49 页(1995); Tuchscherer 等, 蛋白质科学. 1 卷:1377-1386 页(1992); Futaki, 等等, 四面体通信, 38 卷:6237-6240 页(1997); Grove, 等等, 美国化学会杂志. 115 卷:1100-1115 页(1993))。与能采用的适宜方法有关的其它指导使用 TASP-V 作为模型在实施例 1 中阐述。

一旦形成合适的 TASP 化合物, 可使用肽类化学中标准步骤将其纯化。发现有效的一个方法为使用乙腈的线性梯度通过反相 HPLC 来纯化化合物(见实施例 1)。

D. 化合物的活性测定

对上述方法合成的化合物进行分析来确定其模拟 NPY 或 PYY 作用的程度。可采用例如那些在实施例 3 中描述的放射性受体结合分析, 来

确定化合物是否选择性结合到 Y1 或 Y2 受体上。通过采用专一产生 Y2 (LN319 细胞) 或 Y1 (SK-N-MC 细胞) 的细胞系完成上述分析。为确定与受体相互作用的化合物是作为 NPY 激动剂还是拮抗剂起作用, 可以联合结合分析进行环腺苷酸分析。

或者, 任何可被用来证明 NPY 或 PYY 可测定作用的生物分析都可以用于 TASP 化合物活性筛选。例如, 可采用如实施例 6 中所述方法直接确定化合物对鼻炎和支气管痉挛的作用。

II. 采用 NPY、PYY 或其激动剂的治疗方法

通过上述方法合成的 TASP 化合物可被用于对 NPY 或 PYY 有反应的任何疾病或病症。由于其中含有短于 NPY 或 PYY 序列全长的线性肽激动剂优先与 Y2 受体相互作用, 可以预期, 这些化合物可以产生期望的治疗作用, 同时不期望的副作用更少。对于支气管疾病, 可给予激动剂、NPY 或 PYY 以减少呼吸道阻力。

给予患者激动剂、NPY 或 PYY 的每日总剂量应至少为将一种或多种与所治疗疾病或病症有关的综合症减轻到最小、减轻或消除所需的量。例如, 对于鼻炎, 给药量应足以减轻鼻溢和/或改变呼吸道阻力。通常, 单位剂量应在 1 到 100 微克活性药剂之内, 并采用本领域众所周知的方法决定最佳每日剂量。剂量可采用每天单次或多次的方案提供。

本发明并不局限于任何特定的剂型或给药方式。尽管吸入通常最为方便, 并且在治疗鼻炎和支气管病症时优选该方式, 非肠道的、透皮的、舌下的、经口的、经鼻的, 直肠的、阴道的、耳的、可植入的或其它给药方式同样可用。治疗剂既可以以基本纯的形式给予, 也可以作为包含有一或多种赋形剂、调味剂或其它活性成分的药用组合物的一部分给予。制剂可为固体或液体或采取任何一种当前用于人体给药的药物形式, 例如, 片剂、粉剂、溶液、霜、软膏、悬浮液、凝胶胶囊、颗粒、栓剂、透皮组合物或可注射制剂。

活性剂可以与药物制剂通常采用的载体, 例如滑石、阿拉伯树胶、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、可可黄油、水性或非水性溶剂, 油、石蜡衍生

物、甘醇等结合而整合到剂型中。本领域众所周知制备适宜配方的方法（见，例如，Remington's 药物科学，16 版，A.Oslo 编辑，Easton PA (1980) ）。

为确定施用的组合物对特定疾病或病症的作用，应在长时间的有规律施用的基础上评价患者。在一些病例中，需数星期时间才能观察治疗的全部治疗作用。另一些病例中，例如，支气管炎、哮喘和鼻炎的治疗中，象 TSAP-V 这样的激动剂将在给药后一小时之内产生缓解效果。由于对 Y2 受体特异的激动剂不会产生对呼吸道阻力的反弹作用，可以根据患者意愿反复给药。对于这些疾病优选的给药方式为吸入，并且如上所说，每单位给药剂量应包含大约 1 到 100 微克活性剂。

实施例

合成了新型 Y2 受体激动剂，TASP-V（图 5），并以其对随后的组胺攻击引发的功能反应的作用表征。通过对猪和人用 TASP-V 局部预处理，研究对组胺引起的支气管和鼻的反应的调节。结果证明：

1. TASP-V 鼻内预处理减轻组胺诱导的鼻阻塞。
2. TASP-V 支气管内预处理可减轻组胺攻击诱导的支气管狭窄。

实施例 1: Y2 受体激动剂 TASP-V 的合成

在衍生于鸟胰腺多肽晶体结构的分子动力学模拟的基础上，提出 NPY 三维结构是 1-8 位残基组成的多聚脯氨酸-II 型螺旋，接以 9-14 位的 β 转角。15-32 位的双亲 α 螺旋区段通过和多聚脯氨酸螺旋发生疏水性相互作用而稳定化，33-36 位残基采取 C-末端转角结构。

NPY 的 C-末端部分对于受体结合和生物活性是必需的。确信，N-末端 1-4 位区段可稳定 C-末端 25-32 位的 α -螺旋结构。反平行 PP-折叠为 NPY 受体结合的重要结构，而且其主要功能是将分子的联合 C-末端和 N-末端区段呈递给受体。由于 NPY33-36 四肽实际上并未与受体结合，必须假设，象通过 N-末端延伸达到构象稳定这样的因素特别重要。

环状模板的制备（I，图 5）已经在以前描述过（Ernest, 等等，四面

体通信, 31 卷: 4011-4014 页 (1990); Ernest, 等等, *Helv. Chim. Acta* 76 卷: 1539-1563 页 (1993)). 完全保护的神经肽 Y 类似物 NPY21-36 酰胺 (图 5 中的 IV) 的合成是在 Rink-酰胺树脂上采用苄氧羰基策略完成的 (Fields, 等等, 国际肽蛋白质研究杂志, 35 卷: 161-214 页 (1990)). 采用的所有的氨基酸为 N^α-保护的衍生物。侧链保护基团为酪氨酸 (t-Bu)、精氨酸(Pmc)、谷氨酰胺 (Trt)、苏氨酸 (t-Bu)、天门冬酰胺 (Trt) 和丝氨酸 (t-Bu)。根据已公开的循环 (Akaji, 等等, 化学药理学通报, 37 卷: 2661-2664 页 (1989)) 按半自动的方式构建肽, 其中包括: (i) 用 25% 吡啶/DMF(N,N-二甲基甲酰胺)对 Fmoc 进行 20 分钟的去保护, 以及 (ii) 通过在 PyBOP(苯并三唑-1 基-氧基-三(吡咯烷)-磷鎓-六氟磷酸盐) (1.7 当量) 和 DIEA(N,N-二异丙基乙胺) (3.5 当量) 的 DMF(N,N-二甲基甲酰胺)溶液中进行 45 分钟的 Fmoc 氨基酸衍生物的偶联。通过 Kaiser 试验 (Kaiser, 等等, 生物化学年鉴, 34 卷: 595-598 页 (1970)) 检验每个偶联是否完全。偶联和去保护之后的洗涤循环包括用 DMF 和二氯甲烷连续处理。在肽序列组装完之后, 使用 Boc-氨氧乙酰基-Osu 酯将用于化学选择性连接的功能性残基引入到 N-末端。

为了从树脂上断裂和从完全侧链保护的肽上部分去保护, 需用 10% 三氟乙酸-二氯甲烷 (5×15 毫升) 处理干燥的树脂 (800 毫克)。每次处理之后, 通过过滤分离树脂, 滤液在真空下浓缩。

为了使肽完全去保护, 按上述方法制备的残留液在三异丙基硅烷/水 (1:1, 0.5 毫升) 存在下用三氟乙酸-二氯甲烷 (9:1, 15 毫升) 再处理 90 分钟, 然后加入冷乙醚沉淀产物。通过离心收集粗的十八肽酰胺, 从水-乙腈 (1:1) 中冷冻干燥获得无色吸潮的固体 (300 毫克)。

冷冻干燥之后在 Vydac 218 TP54 柱 (5 μ m, C18, 25mm×250mm) 上通过制备性反相 HPLC 纯化粗产物, 使用乙腈中含 0.9% 三氟乙酸从 20% 到 60% 的线性梯度洗脱 30 分钟以上, 流速 18.0 毫升/分钟。测定 214nm 处紫外吸收以监测洗脱液, 适当的级分被冷冻干燥。总产率为 200 毫克 (45%)。神经肽 Y 的部分序列, NPY21-36 (IV 图 5), 通过电喷雾质谱和氨基酸序列分析来表征。

采用化学选择性连接方法有效合成 TASP-V (图 5)。肽键的形成 (Nyanguile 等, 肽科学通讯, 1(1)-9-16(1994); Liu, 等, 美国化学协会杂志, 116:4149-4153(1994), Dawson 等, 美国化学学会杂志, 115:7263-7266(1993)) 被用来将含有氨氧乙酰基的肽片段 IV 附着到环状肽模板 III 上。I 包含两个赖氨酸残基 (作为附着位点) 和 β -转角模拟物, 8-氨基-萘-2-酸 (Ernest, 等等, 四面体通信, 31 卷: 4011-4014 页 (1990); Ernest, 等等, *Helv. Chim. Acta* 76 卷: 1539-1563 页 (1993))。

赖氨酸 ϵ -氨基通过与乙醛酸 1,1-二乙基乙缩醛琥珀酰亚胺酯反应转化成二乙基乙缩醛功能基。通过分析性反相 HPLC 监测衍生化反应。有趣的是, 在反应到 $t_R=18.70$ 分钟和 $t_R=18.90$ 分钟时可观察到两个中间产物, 它们可被鉴定为含有一个衍生化赖氨酸残基的异构体模板。4 小时后, 通过制备性反相 HPLC 纯化模板分子 II (60% 产率) 并且用电喷雾质谱表征。

II 上的二乙基乙缩醛水解如下述进行: 用 1N 盐酸-乙酸-水 (2:1:2) 反复处理 II (图 5) 1 小时, 之后减压蒸发。由于邻位羰基的去活化作用, 反应显然被钝化, 三氟乙酸的使用被证明是无效的。然而, 使用 1N 盐酸可获得满意的结果。经分析性反相 HPLC 鉴定, 经六次处理后水解完全, 产生 III (80%)。经鉴定副产物 IIa 为仅在一个赖氨酸残基上带有醛基官能团的类似物。

连接反应进行如下: 模板二乙醛 III 溶于 1M 乙酸钠中, 用乙酸调节 pH 到 4.5。加入溶于 1M 乙酸钠中的 1.2 倍过量 (相应于醛基) 的 NPY21-36, (IV), 混合物室温搅拌。3 小时后, 通过反相 HPLC 检查缩合反应。观察到两个主要产物, 用 ESI-MS 表征。15 小时后, 缩合反应完全, 直接用制备性反相 HPLC 纯化粗产物 (45% 产量)。采用电喷雾质谱和氨基酸分析表征已分离的 TASP-V。

在反应方案的每一步之后, 将所形成的产物纯化以后再进行下一步。 α 螺旋 NPY 酰胺 (结构 IV) 和衍生的模板 II 和 III 在 Vydac 218TP1022 (5 μ m, C18, 22X250mm) 柱上纯化, 采用 B 缓冲液梯度洗脱 (缓冲液 A: 含 0.9% 三氟乙酸的水溶液; 缓冲液 B: 含 0.9% 三氟乙酸的乙腈溶液), 18 毫升/分钟洗脱 30 分钟以上, 在 214nm 处监测。采用 20-60% 缓冲液 B

的梯度纯化 α 螺旋 NPY 酰胺并在 19.8 分钟洗脱。采用 0-100%缓冲液 B 的梯度纯化衍生的模板 II 和 III, 分别在 21.9 分钟和 14.8 分钟将其洗脱。在相同类型的柱上纯化 TASP-V, 使用 10-50-80%缓冲液 B 的缓冲梯度, 18 毫升/分钟洗脱超过 40 分钟, 仍在 214nm 监测。TASP-V 在 25.7 分钟时洗脱。

实施例 2: 构象特性

在各种实验条件下主要通过圆二色谱 (CD) 在溶液中研究 TASP-V 的构象特性。为检测模板附着对二级和三级结构形成的影响, 还研究了相应单独的 (非模板附着的) 肽 IV。

在用 D(+)-10-樟脑磺酸校准的 Jobin Yvon 二色性扫描仪 Mark IV 上记录圆二色谱。使用路径长 0.1 厘米的石英小室, 在 295K 进行所有的测定, 各个图谱在 185nm 到 250nm 之间扫描, 重复三次取平均, 0.8nm 步长积分时间 1 秒。通过扣除相同实验条件下背景溶剂图谱来修正图谱, 并将其平滑化使之显示清晰。用总摩尔椭圆率除以肽中的氨基酸数计算 CD 密度, 以平均残余椭圆率 ($\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1}$) 表示。

TASP-V 的圆二色谱曲线显示了肽 α 螺旋构象的典型特征, 即, 在 222nm 处 ($\theta_M=31000\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1}$) 和 210nm 处 ($\theta_M=34000\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1}$) 为强的负 Cotton 作用, 202nm 处有零交叉, 194nm 处为强的正 Cotton 作用。单独的螺旋肽 IV 在 TFE 中显示微弱的螺旋性 (<30%) 时, 肽 IV 附着到环状模板 III 上, 导致二级结构含量急剧增加 (>80%), 显示了模板的强二级结构诱导作用。

实施例 3: TASP-V 对 NPY Y2 受体的选择性

A. 方法

细胞培养

SK-N-MC 细胞专一表达 NPY Y1 受体, 其衍生于人成神经细胞瘤, 根据 ATCC 条件 (Rockville, 美国) 进行培养。LN319 细胞, 专一表达 NPY Y2 受体, 从人体成胶质细胞瘤获得, 在 Dulbecco 改良 Eagle's 培

培养基中生长，培养基中添加 5%胎牛血清、谷氨酰胺、100IU 青霉素和 100 微克/毫升链霉素，细胞在 5%二氧化碳/95%空气的孵箱中 37°C 培养。组织培养基购自 Life Technologies (Basel, 瑞士)，胎牛血清购自 Seromed (柏林, 德国)。70%融合的细胞用 PBS 洗涤，用含有 0.4mM EDTA 的 0.15% 的胰蛋白酶消化收集。细胞被 1/3 稀释，种于 60 毫米细胞培养皿 (Nunc, 丹麦) 或者 12 毫米玻璃盖玻片 (Huber 和 Co, AG, Reinach, 瑞士)。培养基每三天更换一次。

Y1 放射受体结合分析

通过在含有 0.5%牛血清白蛋白、4mM MgCl₂、10mM HEPES 的 Eagle's 最低基本培养基中 37°C 孵育 1 小时，进行碘标记 NPY (Amersham, Buckinghamshire, 英国, 74 Tbq/mmol) 的结合。各种肽稀释物与专一表达 Y1 受体的 SK-N-MC 细胞一起孵育。然后细胞用缓冲液洗涤三遍，在 1%诺乃洗涤剂 P40 (Fluka, Neu-Ulm, 德国)、8M 尿素、3M 乙酸中裂解。在有 1 μ M 未标记的 NPY 存在下进行结合反应，估计非特异性结合。通过各种浓度的竞争性肽与未饱和剂量的碘标记的 NPY 一起孵育，得到取代曲线。在孵育期终点洗涤并裂解细胞，用 γ 计数器测定结合的放射活性。用 I¹²⁵-NPY 得到结合之半数最大抑制量，用 IC₅₀ 表示。各点代表至少四次实验的平均值。

Y2 放射受体结合分析

人成胶质细胞瘤细胞系 LN319，用于 Y2 结合研究 (Greber 等, 英国药理学杂志, 113 卷: 737-740 页 (1994))。进行结合实验之前，贴壁的 LN319 细胞用磷酸缓冲盐溶液充分洗涤。细胞收集到 pH7.4 的含有 145mM NaCl、2.5mM CaCl₂、1mM MgCl₂、10mM 葡萄糖、0.1% (w/v) 牛血清白蛋白、0.25mg/ml 枯草杆菌肽和 0.025mg/ml 抑肽酶的 50mM HEPES 中。4°C 600g 离心 15 分钟之后，沉淀重悬在收获缓冲液中。在 pH7.5 的含有 100mM NaCl、4mM MnCl₂、1mM EDTA、0.1%BSA、0.25mg/ml 枯草杆菌肽和 0.07mg/ml PMSF 的 50mM Tris 中进行结合。在室温孵育

45 分钟，离心分离未结合级分后确定结合的放射活性。

B 结果

如上所述，SK-N-MC 和 LN319 细胞分别表达 Y1 和 Y2 受体亚型。对于竞争性结合研究，除了天然 NPY，还使用了对 Y1 和 Y2 有不同选择性的肽。31 位亮氨酸和 34 位脯氨酸替换的 NPY 显示为 Y1 激动剂（Schwartz, 等等, 纽约科学院科学年鉴, 611 卷: 35-47 页 (1990)), 而有报道 NPY13-36 优先与 Y2 受体亚型结合。

图 6 和 7 描述了用两个细胞系获得的结合实验的结果。SK-N-MC 细胞(图 6)可以同样很好的结合 NPY 和 31 位亮氨酸、34 位脯氨酸 NPY, 二者有相似的竞争取代曲线。相反, NPY13-36 的结合能力要小 2000 倍。模板未结合到 SK-N-MC 细胞上 ($IC_{50} > 10\mu M$) 并且 TASP-V 显示出对 Y1 受体只有很弱的亲和力 ($IC_{50} = 2\mu M$)。

对 NPY 和 NPY13-36, LN319 细胞(图 7)显示了相似的高亲和力, IC_{50} 分别为 0.085 和 0.126nM。相反, 31 位亮氨酸, 34 位脯氨酸 NPY 对 Y2 受体结合较弱。模板显示对 LN319 细胞无亲和力 ($IC_{50} > 10\mu M$) 但是用 TASP-V 显示出对 Y2 受体有好的结合 ($IC_{50} = 0.379nM$)。

实施例 4: cAMP 的测定

含有生长至铺满的 LN319 细胞的六孔板洗涤后在 Eagle's 最低基本培养基中于 37°C 孵育 1 小时, 该培养基含有 0.5%BSA、4mM $MgCl_2$ 、10mMHepes、100 μM 巯基乙醇和 2.5 μM 毛喉素以及不同稀释度的数个待测肽中的一个。细胞在磷酸钠缓冲液 (100mM pH7.5) 中洗涤一遍, 然后用 0.75ml 0.1M HCl 裂解。离心后, 取出上清液冷冻干燥。使用商品可得试剂盒 (Amersham) 采用 RIA 测定 cAMP 浓度。

已发现, NPY 抑制毛喉素刺激的 cAMP 在 LN319 细胞中的蓄积, IC_{50} 为 2.5nM, TASP-V 的 IC_{50} 为 3.4nM。这些数据表明, TASP-V 是 Y2 受体的完全激动剂。

实施例 5: 大鼠体内实验

A. 方法

采用成年雌性 Wistar 大鼠 (体重 230-280 克) 进行实验, 用戊巴比妥钠麻醉 (Nembutal, Boehringer-Ingelheim; 60mg/kg, 腹腔注射)。静脉补充戊巴比妥以保持麻醉的外科平面。进行气管插管并连接到正压啮齿类呼吸机 (Ugo Basile 6025) 上。左股动脉进行插管, 通过已连接到笔式记录仪 (Grampac WR7400) 其中一个通道的 Gould-Statham 生理压力换能器 (P23XL) 进行连续的动脉血压纪录。通过直肠探头连续监测体温, 并使之保持在 $34 \pm 1^\circ\text{C}$ 。通过皮下针式电极纪录心电图, 并在存储示波器上显示。心电图在采用 Neurolog 模块 (Digitimer, 英国 NL200304600) 处理之后, 可用来得到逐跳脉搏间期 (连续心跳之间的 PI-时间)。用计数器检查触发。由于 PI 与迷走神经刺激频率之间线性相关, 故 PI 可以当作心率。

双侧迷走神经在颈部高位截断。这样做是为了终止 NPY 使血压增加时发生迷走神经性介导的对心脏的反射作用。用独立的矩形波刺激器 (Grass 仪器 SD9) 对右侧迷走神经向心端每 30 秒用一个 6 秒连串超大刺激 (2 赫兹, 1 毫秒, 7 伏) 进行刺激。选择的频率能使脉冲间歇增加大约 100 毫秒, 这一变量的次最大作用。左股静脉内插入套管以给予 NPY (Novabiochem, 人 NPY1-36) 和 TASP-V (用盐水稀释), 以及更多的麻醉剂。测定了两个参数来指示连接前活性; 注射肽之后, 迷走神经刺激引起脉冲间歇 (Δ PI) 增加的最大抑制百分率和该作用恢复一半的时间 (T50)。为指示连接后活性, 测定增压作用, 为注射肽之后的峰反应 (Δ BP) 以及该反应的时程 (BP 时程)。

B. 结果

如图 8 和 9 所示, 发现 TASP-V 没有连接后活性, 因为通过测定注射肽后的峰反应 (Δ BP) 以及该反应的持续时间 (BP 时程) 显示增压作用仅仅在激活 NPY Y1 和 Y2 受体的 NPY 很显著。相反, TASP-V 在 Δ PI 和 T50 方面显示了与在图 10 和 11 中描述的 NPY 所观察到的相似的连接

前活性。

实施例 6: TASP-V 对组胺诱导小型猪鼻炎和支气管痉挛的作用

A. 方法

动物

在雌雄 16 只饲养的猪（体重 20-30 公斤）进行实验。术前给药阿托品（0.05 毫克/公斤）和氯胺酮（Ketalar, ParkeDavis, 美国, 20 毫克/千克, 肌肉注射）并且用硫喷妥钠（5 毫克/千克, 静脉注射）将其麻醉。进行气管切开术并且使用体积调节的呼吸机（西门子 900 型）开始人工呼吸。手术中, 连续静脉注射灌流 Ringer's 液、硫喷妥钠（15 毫克/千克/小时）和溴化双哌雄双酯（0.25 毫克/千克/小时）。

手术过程

将导管置于股动脉以监测全身血压和心率, 并且将导管置于股静脉以给予硫喷妥钠和液体（300 毫升/小时）。按照以前报告（Lacroix 等, 斯基的纳维亚生理学学报, 132 卷: 83-90 页（1988 年））中所述相似的方法进行上颌动脉的手术制备。用置于蝶腭动脉附近并且与 T202 超声流量计（跨音速系统公司, Ithaca, 纽约, 美国）连接的跨音速流量探头（RB 143）监测鼻动脉血流。

组胺的给予

早先的实验（n=7）中, 每隔 30 分钟进行连续 3 次鼻和支气管组胺攻击, 研究对组胺的快速减敏。在受控条件下用手持喷雾器将组胺（1 毫升盐水中含 5 毫克, Sigma, St. Louis, 美国）喷入左鼻孔, 并且在鼻内喷入 TASP-V（1 毫升 0.9% NaCl 中含 85 微克）后 15 分钟重复。

其它实验中, 用喷雾器在气管内将组胺（3 毫升盐水中含 10 毫克）气雾化共 3 分钟, 该喷雾器固定在呼吸管的吸入分枝上, 并且在受控条件下补以氧气（4 升/分钟）。将 3 毫升盐水中 200 微克-400 微克 TASP-V 在气管内气雾化后 15 分钟重复该步骤。

参数的测定

所有动物中，记录在受控条件下用 TASP-V 预处理之前和之后支气管和鼻血管对组胺攻击的反应。通过使用 6 通道笔式痕迹记录仪 (Gould Electronics) 同时纪录下列参数：

1. 使用与压力换能器相连的股动脉导管测定心率和全身动脉血压。
2. 肺呼吸道阻力和顺应性。通过位于气管内管顶端的导管测定呼吸道压力。透肺压力通过显示气管和食道压力差异的差异压力换能器仪 (Hewlett-Packard 267B) 确定。依靠与气管内管相连的加热的 Fleisch 气流换能仪#2 将呼吸速度描记器 (Gould Godard, 17212 型) 测定的呼吸流信号积分来测定潮汐体积。在 4 道记录仪 (Hewlett-Packard, 7754GB) 上连续记录透肺压力、潮汐体积和流量。将透肺压力差异除以中等潮汐体积时的吸入加上呼出流量来确定跨肺总气流阻力 (粗值)。通过将潮汐体积除以零流量时的透肺压力差异得到动态肺顺应性 (Cdyn)。对于五次连续潮汐体积加以平均得呼吸参数的平均值。
3. 使用超声流量计探针的蝶腭动脉血流 (见上)。

B. 结果

最初三次鼻内组胺攻击导致蝶腭血流可复现的增加 $10 \pm 4\%$ ，以及血管阻力下降 $10 \pm 4\%$ 。支气管内不能引起快速减敏现象。呼吸道阻力可复现的增加 $100 \pm 27\%$ ，动态肺顺应性降低 $38 \pm 10\%$ 。在鼻或支气管途径攻击之后没有记录到心脏作用。鼻内或支气管内给予 TASP-V 没有引起心率或平均动脉血压的任何改变。

预先用 TASP-V 处理，可使组胺攻击造成的蝶腭血流增加有统计学意义地降低 $50 \pm 5.5\%$ ，45 分钟后有最大作用。TASP-V 预处理之后没有显著改变组胺引起的血管阻力的降低。

测试了两个不同剂量的 TASP-V。预先用 200 微克处理之后，组胺攻击引起的呼吸道阻力增加被减弱了 $15 \pm 10\%$ ，90 分钟后观察到最大作

用 ($P < 0.05$)。动态肺顺应性的降低 45 分钟后也有明显减低。当使用 400 微克的剂量时观察到更强的作用，呼吸道阻力增加被减弱 $50 \pm 45\%$ ，并且有相同的动力学 ($P < 0.05$)。

实施例 7: TASP-V 对组胺引起健康志愿者鼻炎的作用

11 个健康志愿者，6 男 5 女，年龄从 23 岁至 48 岁，进行了在随机双盲交叉基础上设计的每天的研究。排除准则包括异常鼻粘膜、解剖性鼻梗塞（例如梗塞性鼻息肉）、明显解剖性鼻畸形（例如显著衍生的隔膜）以及在前 30 天进行任何鼻部治疗，例如血管收缩药或皮质类固醇。

预处理

每次实验前由未参与实验的技术员制备 TASP-V（用盐水稀释）和安慰剂（盐水）。每个患者用盐水或 TASP-V（总共 200 微升 0.9% NaCl 中有 85 微克）进行局部预处理。采用一个物质并测试 2 小时以上，在两次测试之间经过 3 小时间歇后采用另一物质并测试相同时间。为了使交叉产生的偏差最小化，用随机和双盲分配法在一只鼻孔测试肽而在对侧鼻孔使用安慰剂。

刺激

预先用 85 微克 TASP-V 或安慰剂治疗后 15 分钟，在同只鼻孔内鼻内运用组胺（200 微升盐水中含 1 毫克，Sigma, St.Louis, 美国）。

参数的测定

在 TASP-V 预处理之前（T-30'，T-15'）测定下面例出的参数，然后预处理之后 15 分钟再测一次。组胺攻击之后，1 小时之内每 15 分钟重复测定相同参数（T15、30、45、60）。参数如下：

1. 症状：一种视觉上相似情况等级，使用分 0 至 5 级（其中 0 代表没有症状，5 为症状严重的程度）来评价主观鼻梗塞和鼻溢的程度。
2. 鼻分泌和喷嚏：组胺攻击后 15 分钟产生的鼻分泌物用一块预称重

纸中经鼻吹收集。同时还计数喷嚏数。

3. 鼻塞压力测量：用前鼻塞压力测量(Rhinotest MP 441,EVG Elektronik, Vertriebs, 德国)纪录每个鼻孔之鼻呼吸道阻力(NAR)。10次正常呼吸后获取平均阻力值,并且在150Pa压力下计算出值。
4. 听觉量鼻器法测量：使用听觉量鼻计(Rhinoclak, 德国)评估相对于呼吸流的鼻呼吸道阻力之最小横截面面积(MCSA),每次MCSA记录时,患者坐在ENT椅上,头固定在相同位置。

统计学分析

数据以平均值±标准差形式给出。Dunnett 比较之前采用成对学生-t 检验分析和单边方差分析(ANOVA)评估症状等级、NAR、鼻分泌的统计学差异。

B 结果

鼻内喷 TASP-V 不会产生任何主观的局部刺激、打喷嚏或鼻溢增加。没有记录到主观鼻阻力的显著改善(图 12a)。鼻塞测压计法和听觉量鼻器法没有证明任何显著的鼻呼吸道阻力或 MCSA 的改变(图 12b 和 13)。

所有的患者中,安慰剂之后组胺攻击引起痒、打喷嚏、鼻溢以及客观和主观鼻阻塞的快速发生(图 12-15)。组胺攻击后 15 分钟观察到最大阻塞作用。60 分钟后无统计性残留作用。

用 TASP-V 预处理不会显著减轻组胺攻击后主观或客观鼻溢或减少喷嚏的次数。然而,变应原攻击引起的鼻呼吸道阻力增加,表示为初值的百分数(T01 和 T02 的均值),可被 TASP-V 预处理显著减少(图 12b, 14)。15 和 30 分钟后观察到最大作用。相似地, TASP-V 预处理显著减弱组胺诱导的 MCSA 的减少,在 15 和 30 分钟有最大作用(图 13、15)。尽管不明显, TASP-V 预处理后组胺攻击引起的主观同侧鼻阻塞似乎有所减轻,15 和 30 分钟有最大作用(图 12a)。实验之后 24 小时之内患者没有报告有任何副作用。

序列表

(1) 一般信息:

(i) 申请人:

(A) 姓名: B.M.R.A. Corp. B.V.

(B) 街道: Zeemansstraat 13

(C) 城市: 3016 CN Rotterdam

(E) 国家: 荷兰

(F) 邮政编码: N/A

(ii) 发明名称: 模板结合的 NPY Y2 受体激动剂

(iii) 序列数目: 8

(iv) 计算机可读形式:

(A) 介质类型: 磁盘

(B) 计算机: IBM 兼容机

(C) 操作系统: PC-DOS/MS-DOS

(D) 软件: PatnetIn Release #1.0 Version #1.25(EPO)

(2) SEQ. ID. NO.1 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 97 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型:

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(iii) 假拟: 非

(iv) 反义: 否

(xi) SEQ. ID. NO.1 的序列描述:



Met Leu Gly Asn Lys Arg Leu Gly Leu Ser Gly Leu Thr Leu Ala Leu
 1 5 10 15

Ser Leu Leu Val Cys Leu Gly Ala Leu Ala Glu Ala Tyr Pro Ser Lys
 20 25 30

Pro Asp Asn Pro Gly Glu Asp Ala Pro Ala Glu Asp Met Ala Arg Tyr
 35 40 45

Tyr Ser Ala Leu Arg His Tyr Ile Asn Leu Ile Thr Arg Gln Arg Tyr
 50 55 60

Gly Lys Arg Ser Ser Pro Glu Thr Leu Ile Ser Asp Leu Leu Met Arg
 65 70 75 80

Glu Ser Thr Glu Asn Val Pro Arg Thr Arg Leu Glu Asp Pro Ala Met
 85 90 95

Trp

(2) SEQ. ID. NO.2 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 36 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型:

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(iii) 假拟: 非

(iv) 反义: 否

(xi) SEQ. ID. NO.2 的序列描述:

Tyr Pro Ile Lys Pro Glu Ala Pro Gly Glu Asp Ala Ser Pro Glu Glu
 1 5 10 15

Leu Asn Arg Tyr Tyr Ala Ser Leu Arg His Tyr Leu Asn Leu Val Thr
20 25 30

Arg Gln Arg Tyr
35

(2) SEQ. ID. NO.3 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 12 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型:

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(iii) 假拟: 非

(iv) 反义: 否

(xi) SEQ. ID. NO.3 的序列描述:

Arg His Tyr Ile Asn Leu Ile Thr Arg Gln Arg Tyr
1 5 10

(2) SEQ. ID. NO.4 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 12 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型:

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(iii) 假拟: 非

(iv) 反义: 否

(xi) SEQ. ID. NO.4 的序列描述:

Arg His Tyr Leu Asn Leu Val Thr Arg Gln Arg Tyr
1 5 10

(2) SEQ. ID. NO.5 的信息:**(i) 序列特征:****(A) 长度: 24 个氨基酸****(B) 类型: 氨基酸****(C) 链型:****(D) 拓扑结构: 线性****(ii) 分子类型: 肽****(iii) 假拟: 非****(iv) 反义: 否****(xi) SEQ. ID. NO.5 的序列描述:**

```

Tyr Pro Ser Lys Pro Asp Asn Pro Gly Glu Asp Ala Pro Ala Glu Asp
1           5           10           15

```

```

Met Ala Arg Tyr Tyr Ser Ala Leu
           20

```

(2) SEQ. ID. NO.6 的信息:**(i) 序列特征:****(A) 长度: 16 个氨基酸****(B) 类型: 氨基酸****(C) 链型:****(D) 拓扑结构: 线性****(ii) 分子类型: 肽****(iii) 假拟: 非****(iv) 反义: 否****(xi) SEQ. ID. NO.6 的序列描述:**

```

Tyr Ser Ala Leu Arg His Tyr Ile Asn Leu Ile Thr Arg Gln Arg Tyr
1           5           10           15

```

(2) SEQ. ID. NO.7 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 24 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型:

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(iii) 假拟: 非

(iv) 反义: 否

(xi) SEQ. ID. NO.7 的序列描述:

```

Tyr Pro Ile Lys Pro Glu Ala Pro Gly Glu Asp Ala Ser Pro Glu Glu
1           5           10           15
Leu Asn Arg Tyr Tyr Ala Ser Leu
                20
    
```

(2) SEQ. ID. NO.8 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 16 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型:

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(iii) 假拟: 非

(iv) 反义: 否

(xi) SEQ. ID. NO.8 的序列描述:

```

Tyr Ala Ser Leu Arg His Tyr Leu Asn Leu Val Thr Arg Gln Arg Tyr
1           5           10           15
    
```

说明书附图

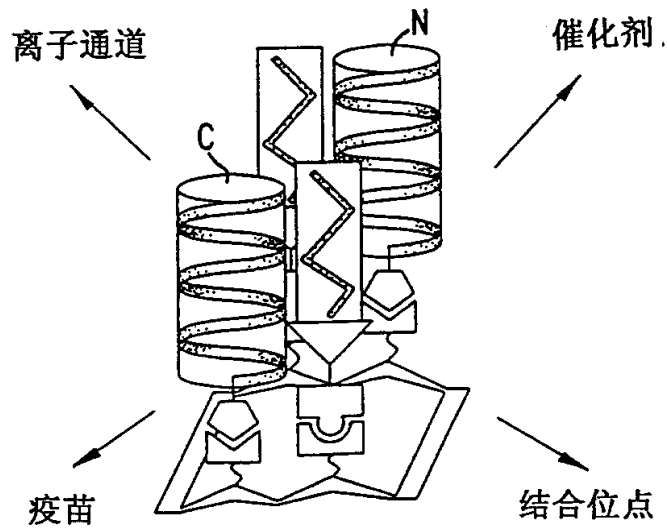
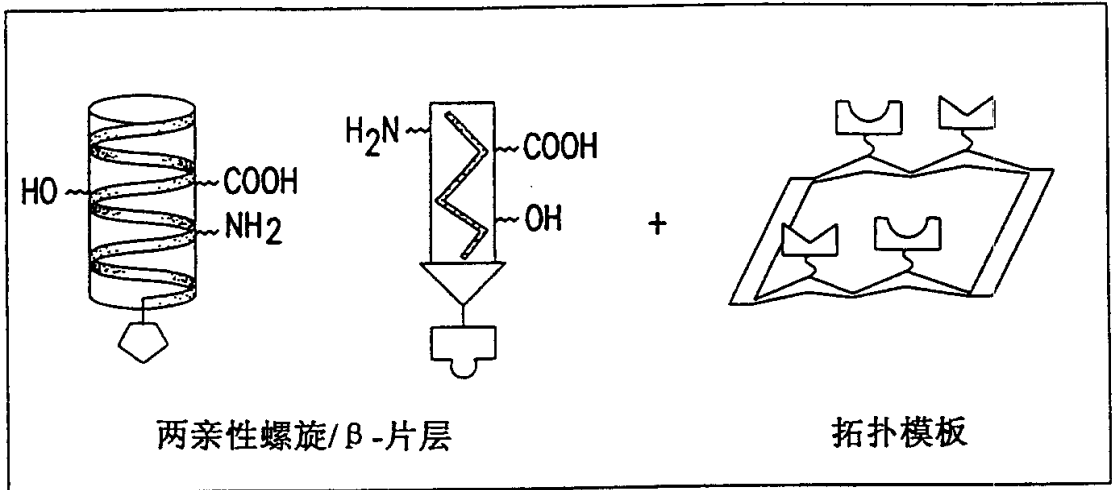


图 1

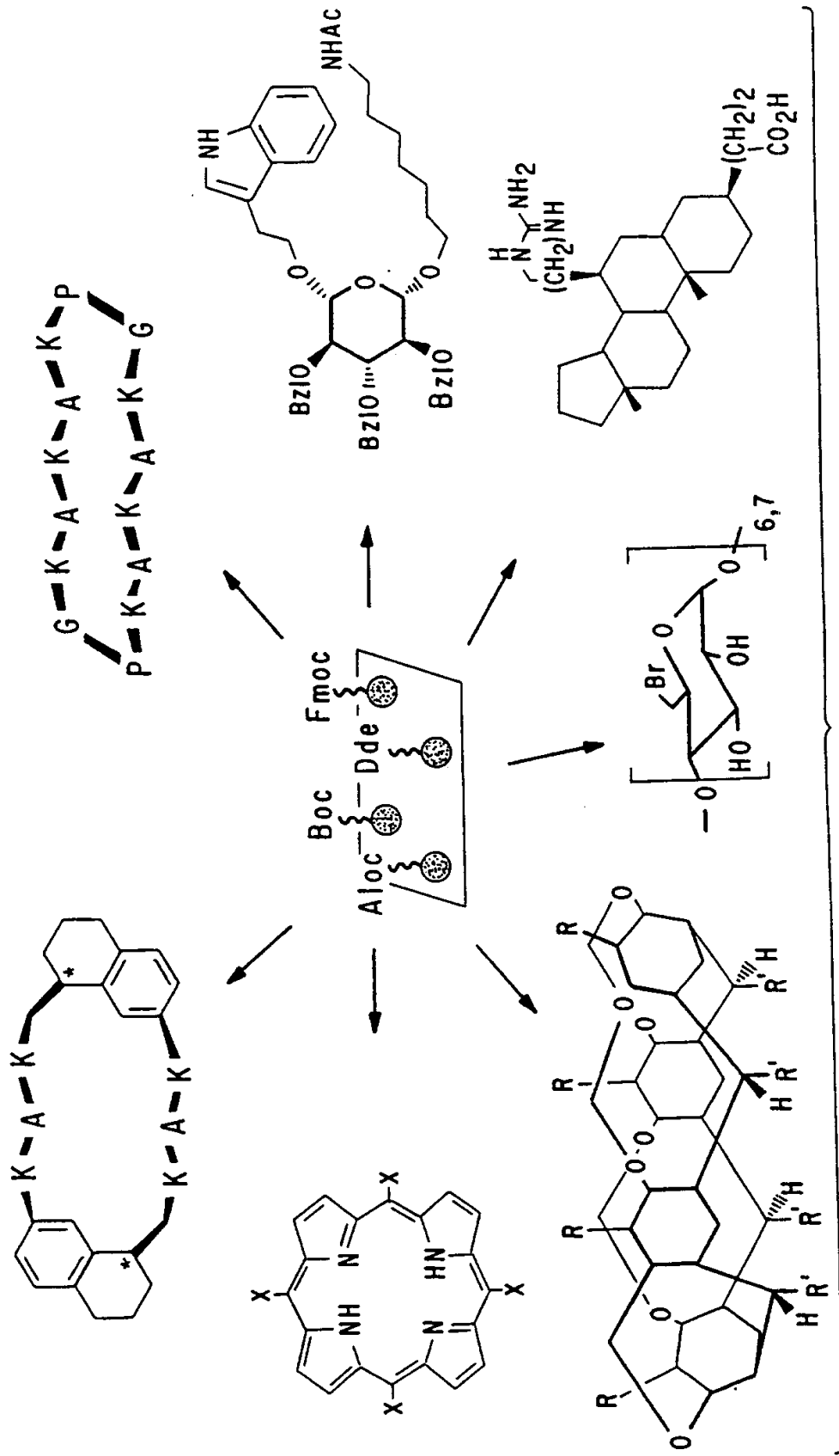


图 2

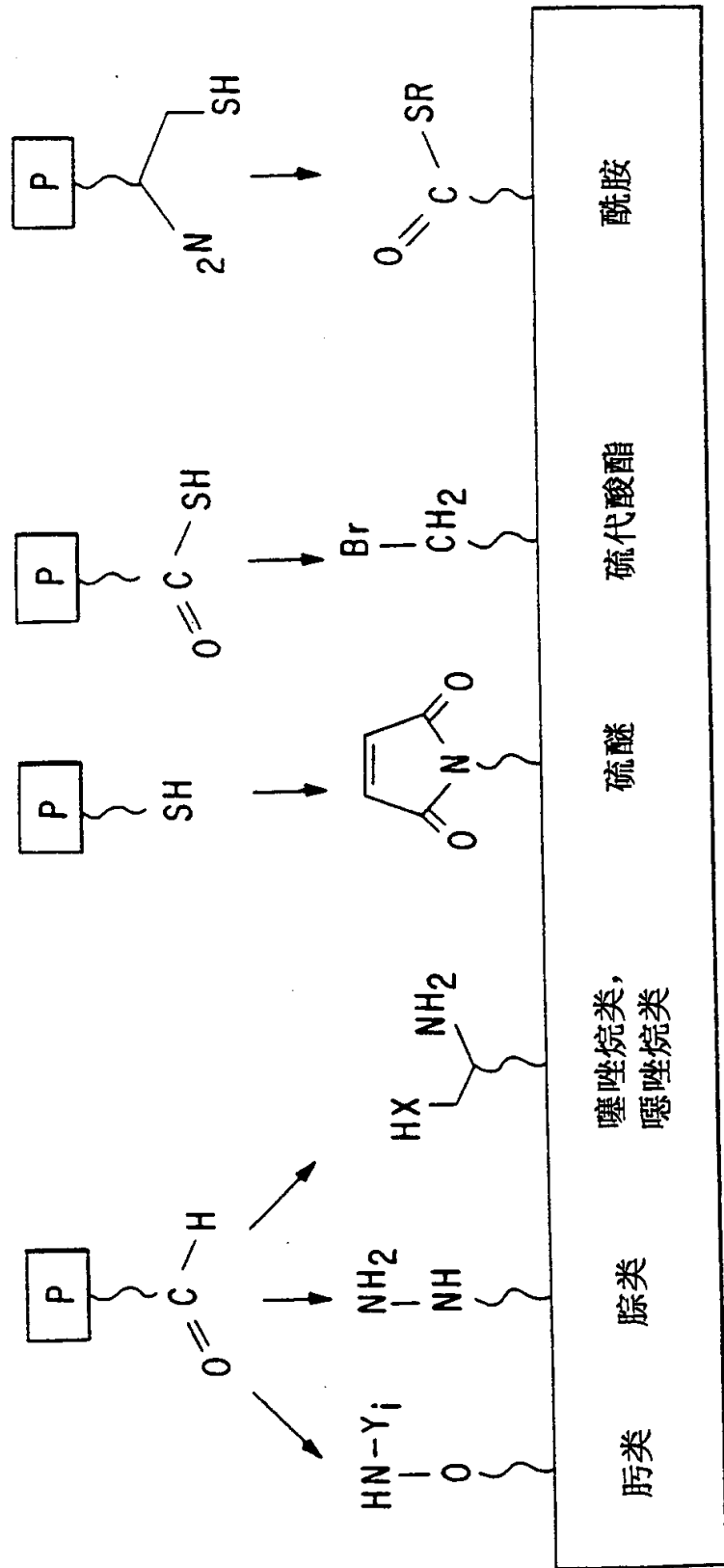


图 3

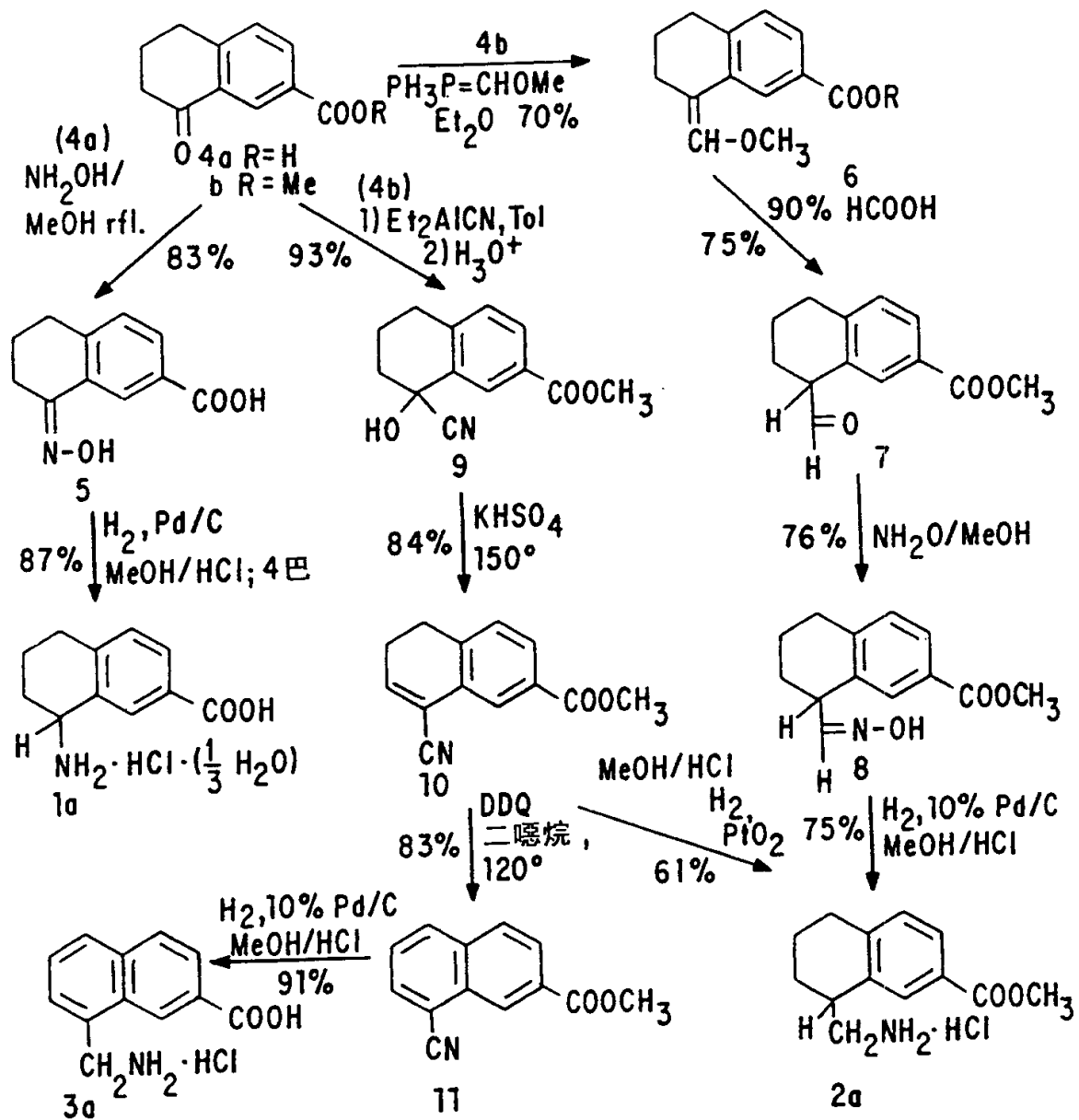


图 4

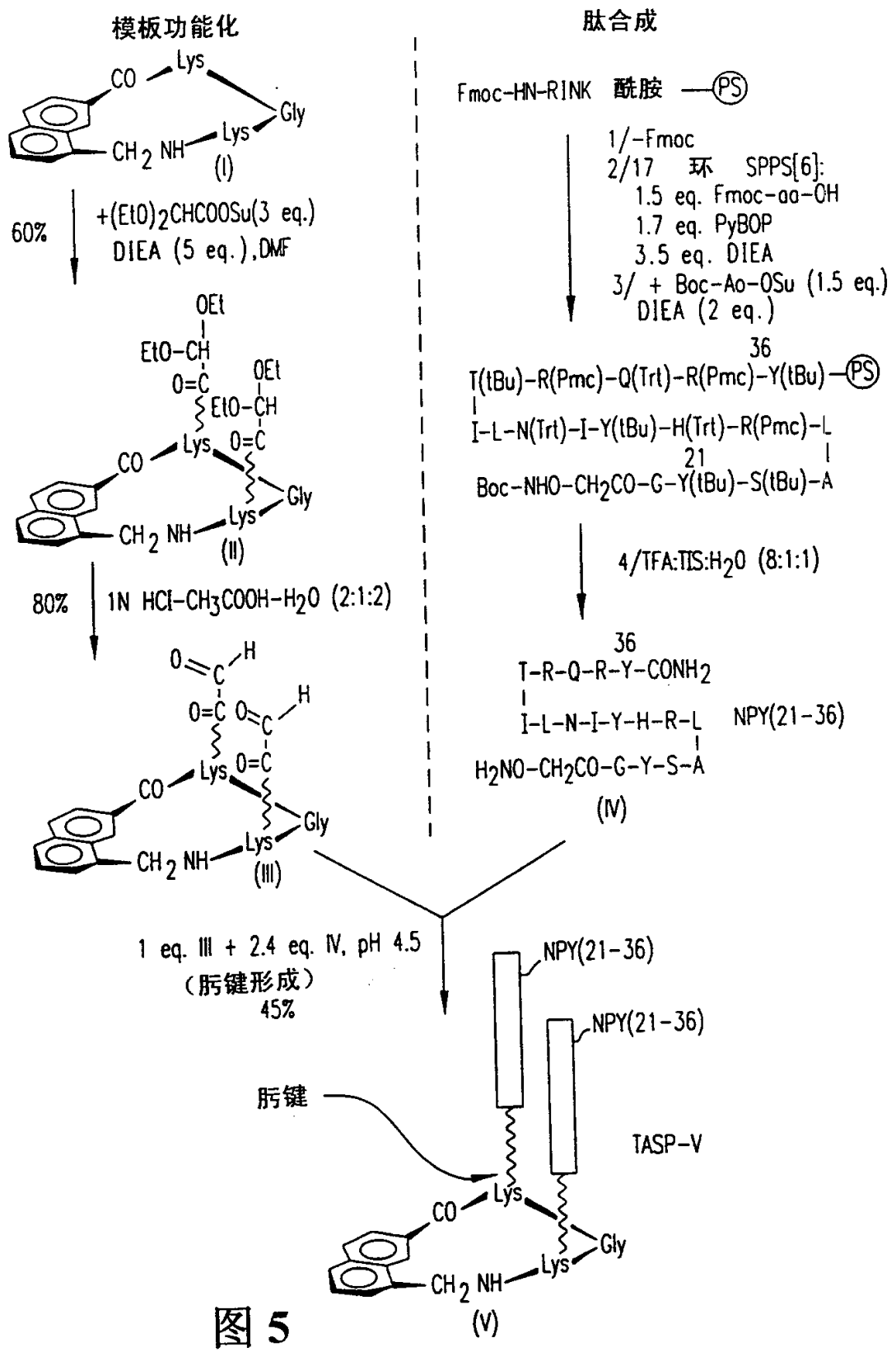


图 5

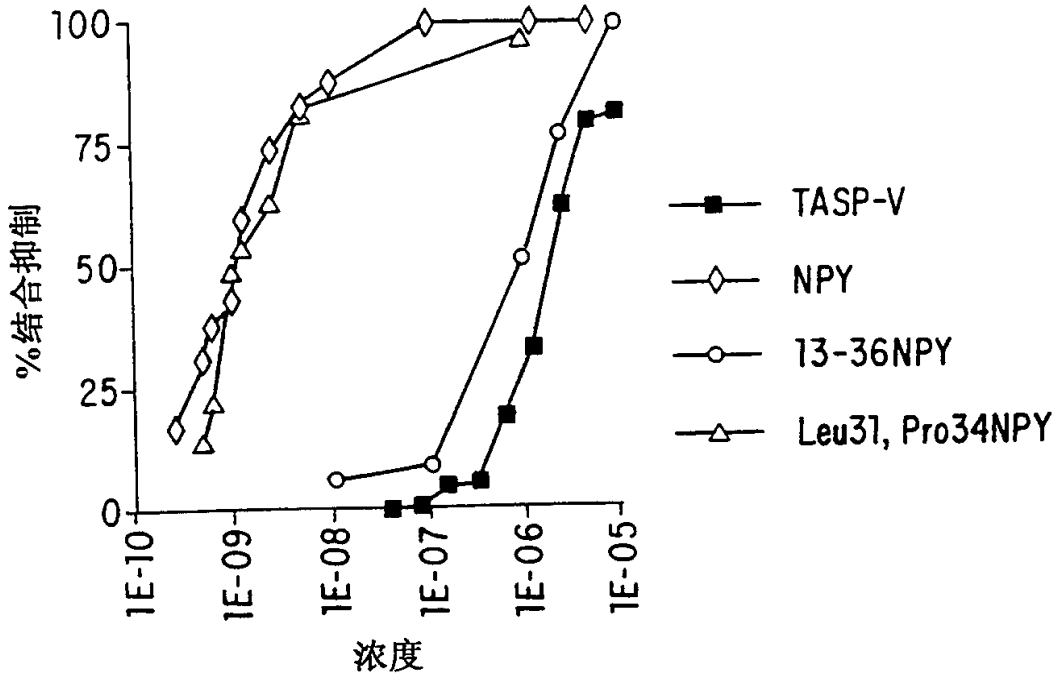


图 6

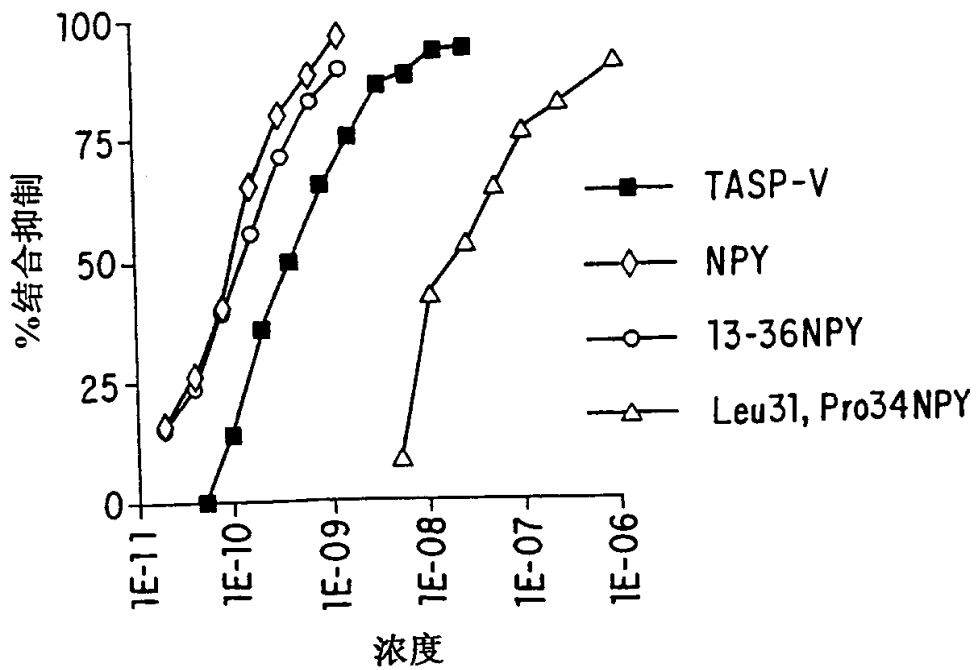


图 7

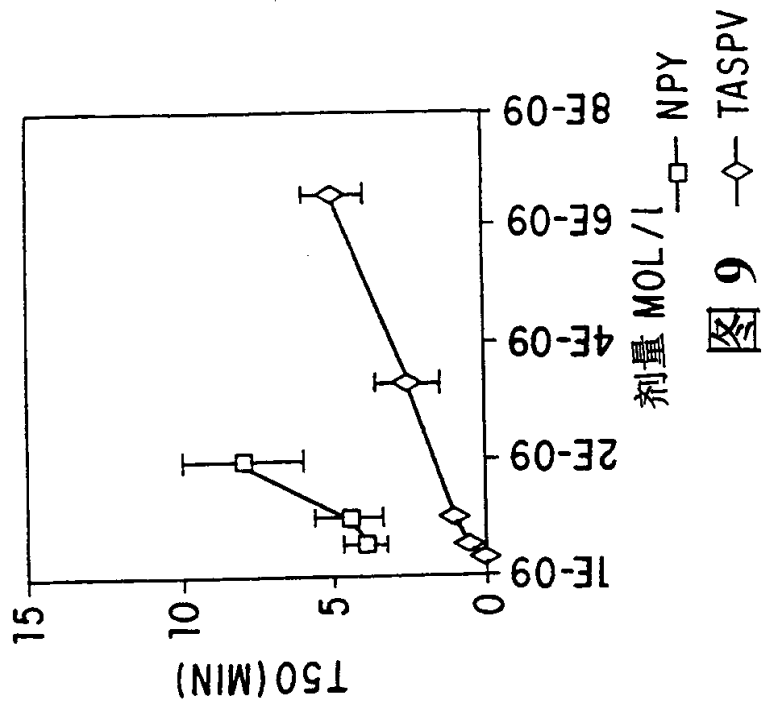


图 9

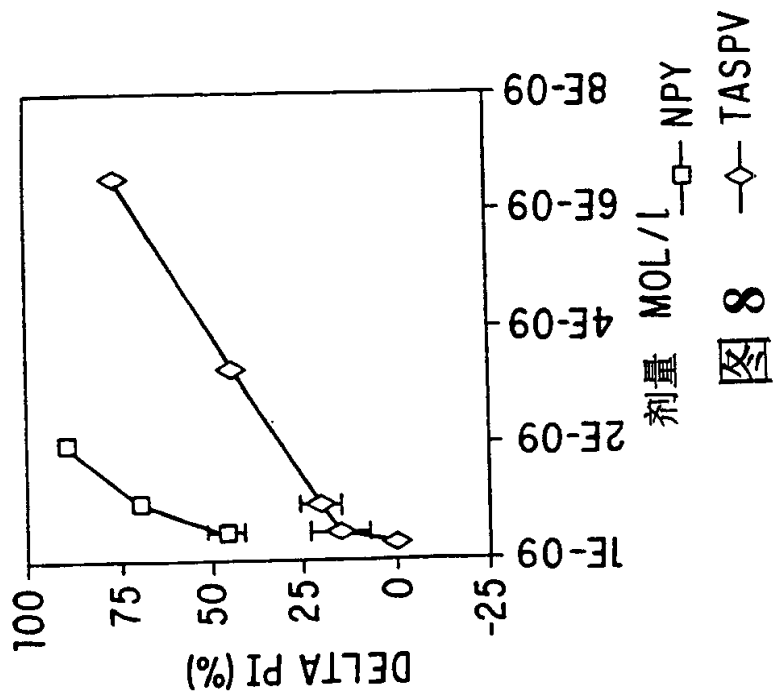


图 8

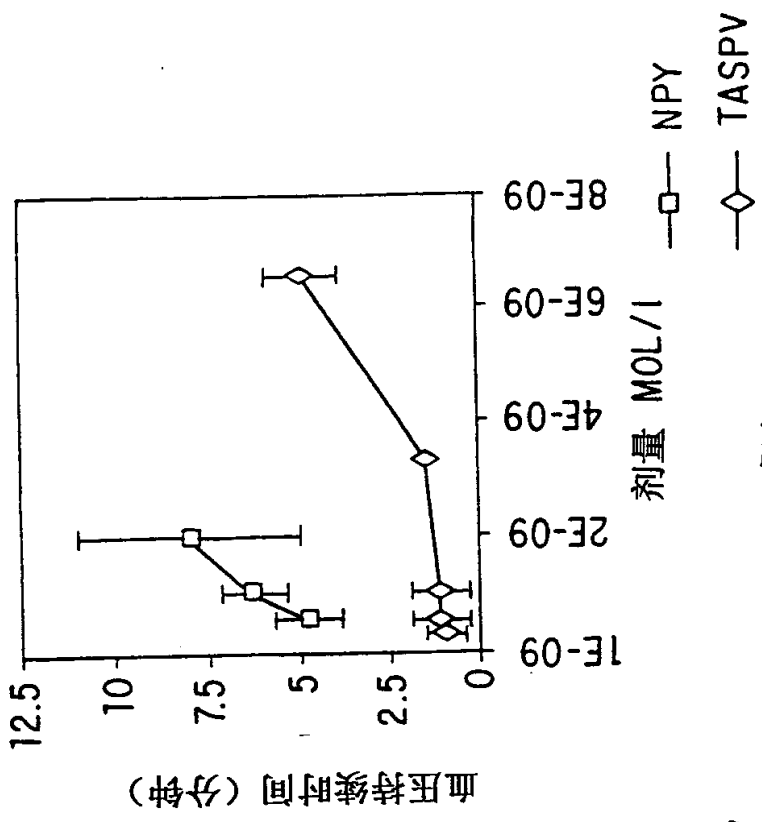


图 11

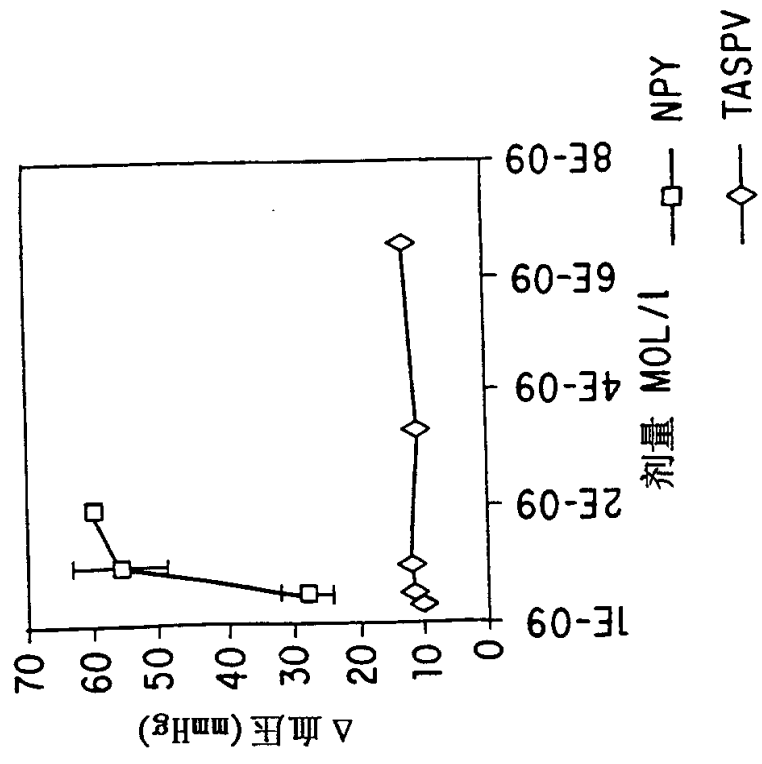


图 10

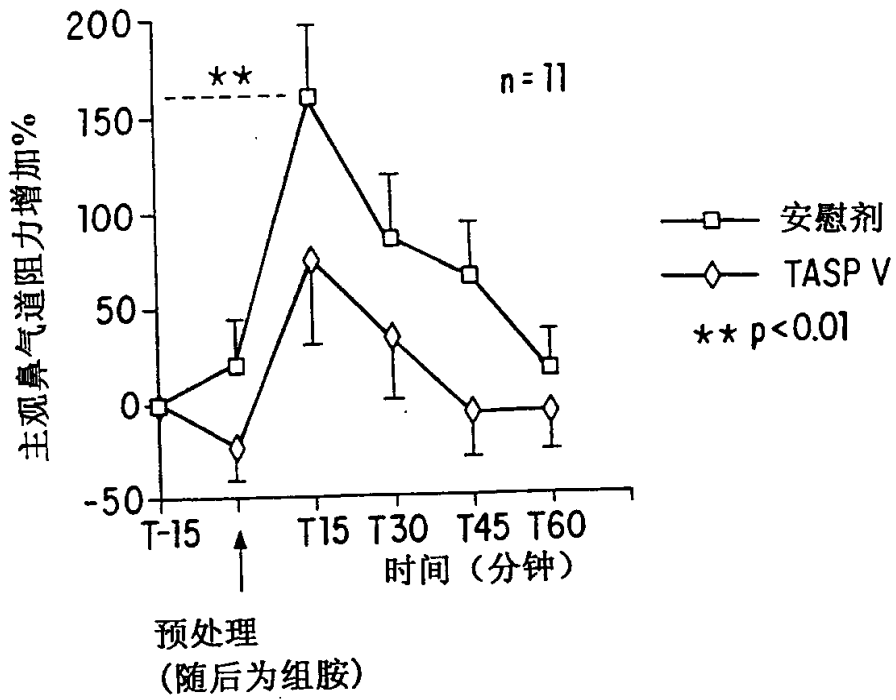


图 12A

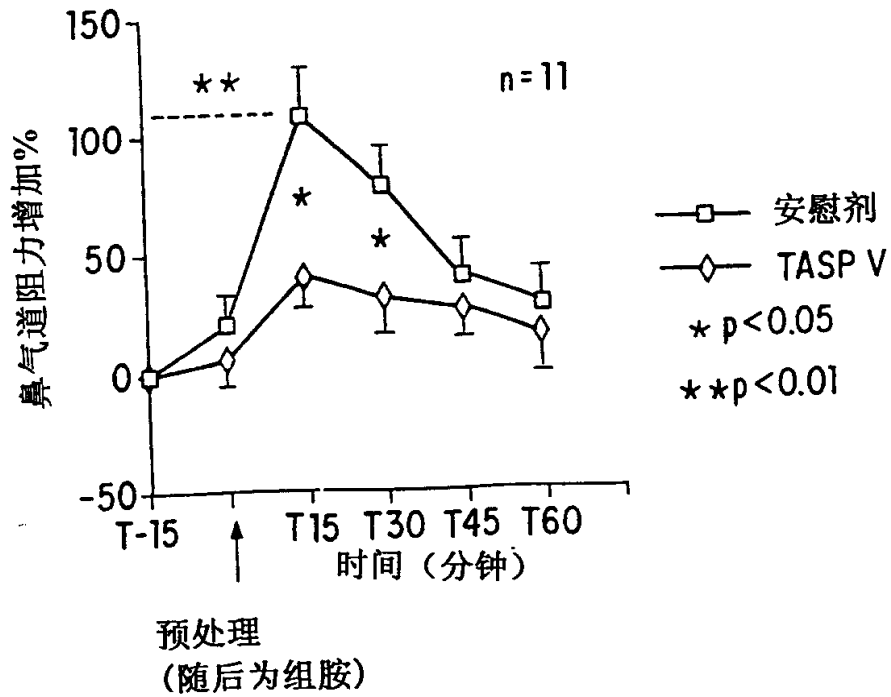


图 12B

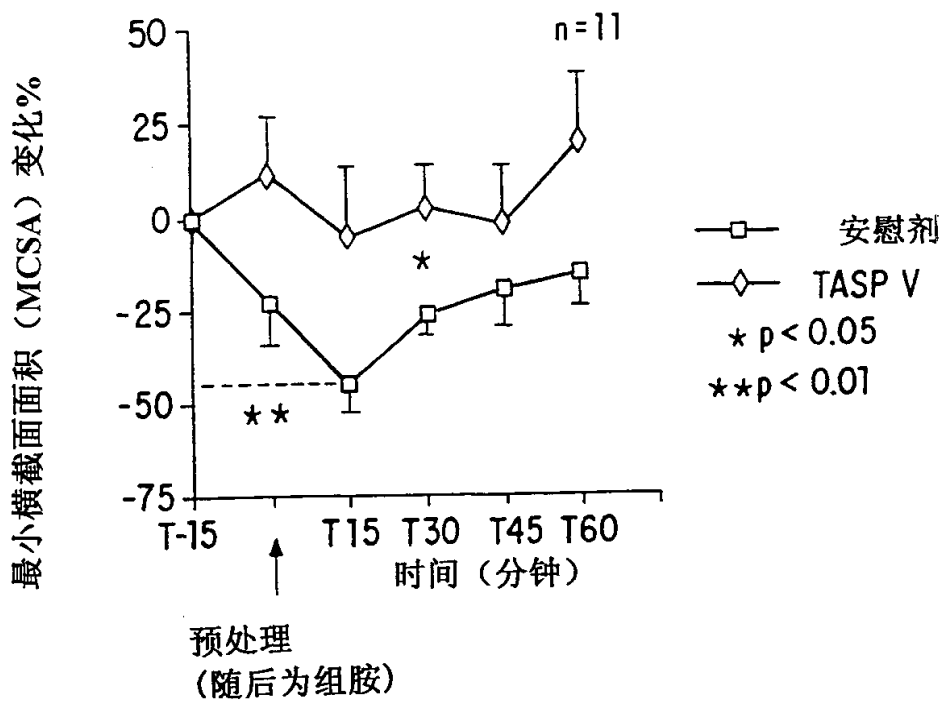


图 13

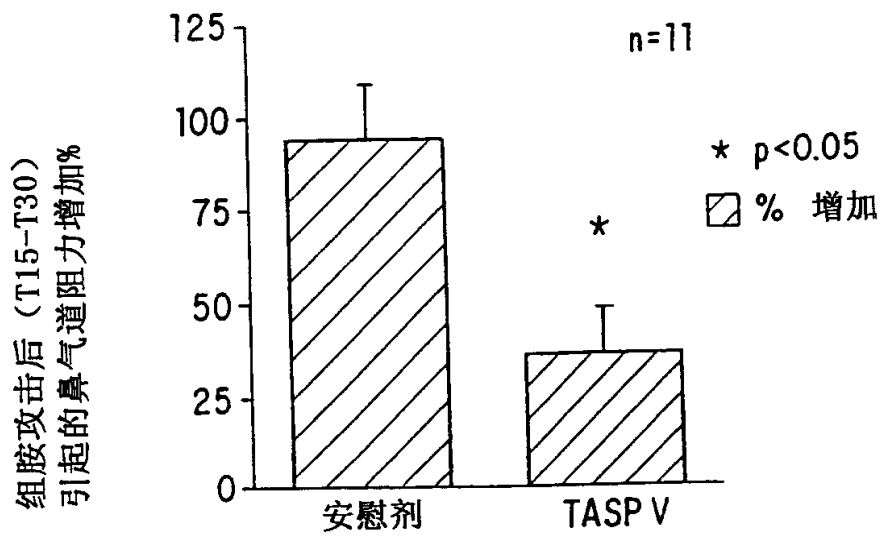


图 14

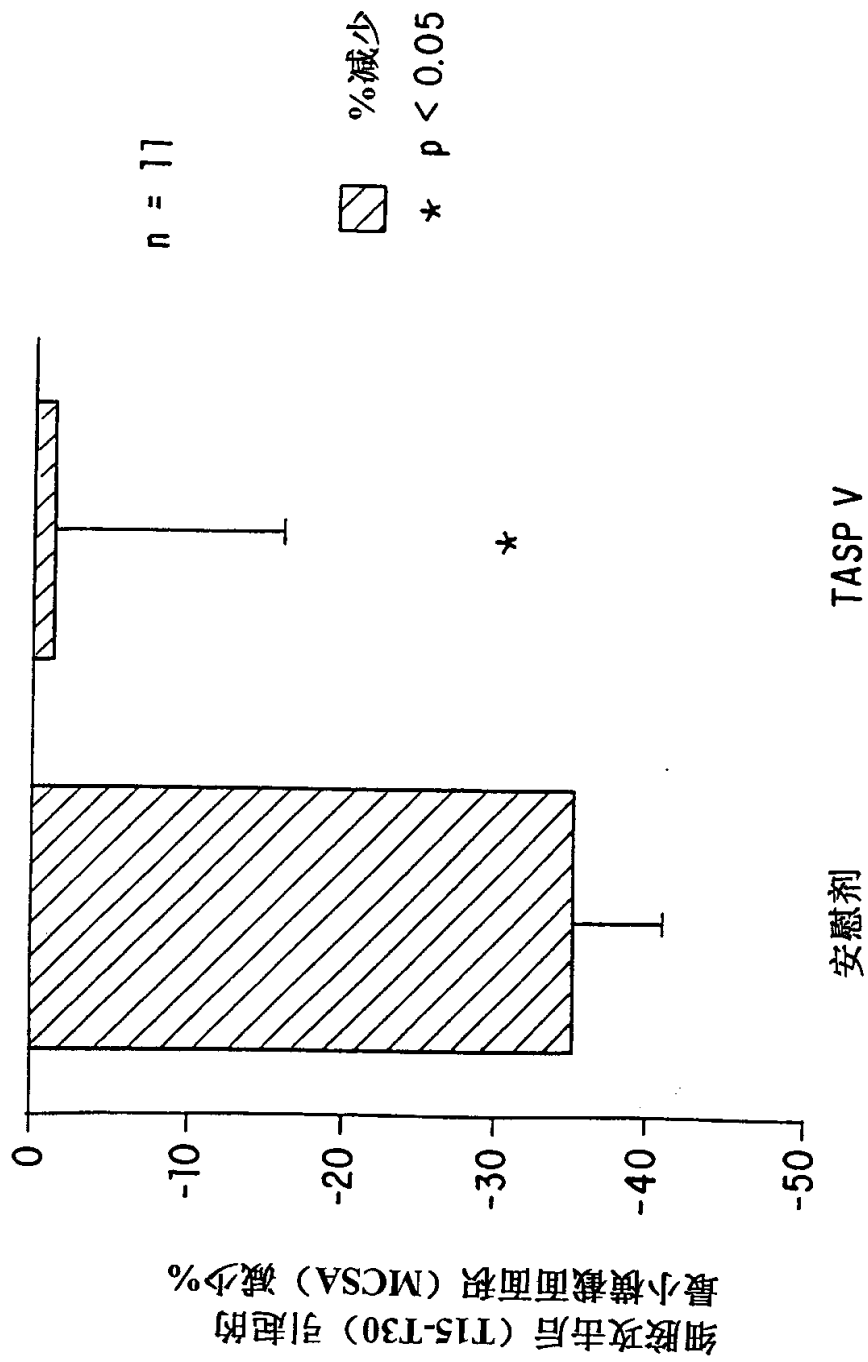


图 15