

· 综述 ·

胱氨酸结模体多肽的特征及其在药物设计和分子工程中的应用

邓宇晨^a, 顾嘉伟^b, 聂菲^c, 肖良^c (第二军医大学, a. 海军临床医学专业学员三队; b. 临床医学专业学员十一队; c. 海军医学系海洋生物技术教研室, 上海 200433)

[摘要] 胱氨酸结(cystine knot, CK)模体是由两对二硫键及其相连的肽链骨架形成的一个内部环以及从环中穿过的第三对二硫键组成的球形结构,广泛存在于真菌、植物、海洋软体动物、昆虫以及蜘蛛等生物的毒素多肽和蛋白质中。CK多肽结构非常稳定、生物活性多样,是一类在药物设计和分子工程研究中的理想模型分子。本文综述了抑制剂胱氨酸结(inhibitor cystine knot, ICK)多肽和环形胱氨酸结(cyclic cystine knot, CCK)多肽两类主要CK毒素的氨基酸序列、拓扑结构、排列组合、人工合成以及空间折叠等特征,并进一步阐述了其在药物设计与分子工程中的应用前景。

[关键词] 胱氨酸结; 环形胱氨酸结; 抑制剂胱氨酸结; Kalata B1

[中图分类号] O636; O629 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2016)06-0481-05

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2016.06.001

Cystine knot peptide's properties and its applications for drug design and molecular engineering

DENG Yuchen^a, GU Jiawei^b, NIE Fei^c, XIAO Liang^c (a. No. 3 Student Team, Naval Clinical Medicine; b. No. 11 Student Team, Clinical Medicine; c. Department of Marine Biotechnology, Faculty of Naval Medicine, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] The cystine knot (CK) motif comprises an internal ring formed by two disulfide bonds and their connecting backbone segments which is threaded by a third disulfide bond. It is present in peptides and proteins of a variety of species, including fungi, plants, marine molluscs, insects and spiders. CK polypeptide is one of the ideal model molecules for drug design and molecular engineering research because of its stable structure and variety of bioactivities. Here we summarized the main structural features of both inhibitor cystine knot (ICK) peptide and cyclic cystine knot (CCK) peptide, including primary sequence, topology, permutation, synthesis and folding characteristics, as well as its applications on drug design and molecular engineering.

[Key words] cystine knot; cyclic cystine knot; inhibitor cystine knot; Kalata B1

1993年, McDonald和Hendrickson根据NGF、TGF- β 2以及PDGF-BB等生长因子(growth factor, GF)的结构特征首先提出了“胱氨酸结(cystine knot, CK)”模体的概念^[1]。CK模体是由两对二硫键及其相连的肽链骨架形成一个内部环以及从环中穿过的第三对二硫键组成的球形空间结构,该结构广泛存在于各种富含二硫键的多肽或小分子蛋白中,且这些多肽或小分子蛋白的CK模体都具有相同的二硫键配对方式Cys I-Cys IV、Cys II-Cys V

和Cys III-Cys VI(N端到C端6个配对的Cys残基依次为I-VI)。由于这些早期发现的含CK模体结构的多肽或小分子蛋白都发挥了一定的抑制剂功能,但空间上并不与GF家族的CK模体结构完全重叠。因此,Issaacs于1995年将其归纳为抑制剂胱氨酸结(inhibitor cystine knot, ICK)家族^[2]。此外,有研究者还在植物中发现了一类含有环形蛋白骨架结构的环形胱氨酸结多肽(cyclic cysteine knot, CCK)的CK亚家族,其具有抑菌、溶血等多种生物毒性效应^[3]。

1 CK多肽

在植物、动物和真菌中已发现的CK多肽通常含有26~48个氨基酸残基,具有抑菌、抗病毒(如HIV)以及阻断离子通道等多种生物活性。一般来说,内部环较小的CK模体毒素主要来自于植物和

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81470518)

[作者简介] 邓宇晨,第二军医大学海军临床医学专业2013级本科学员。Tel:15618812995;E-mail:smmudeng@outlook.com

[通讯作者] 肖良,博士,副教授。研究方向:海洋生物毒素多肽。Tel:(021)81871129,15921431590;E-mail:hormat830713@hotmail.com

真菌,而内部环较大的 CK 多肽则更倾向于动物源性。不对称性是 CK 多肽内部环的主要特点之一,即在内部环的一侧连续 Cys 残基之间构成相连肽链骨架的残基数 $C^I X_m C^II$ 与另一侧肽链骨架的残基数 $C^IV X_n C^V$ 不同,通常接近 N 末端内部环一侧的残基数 ($m=3\sim 7$) 比靠近 C 末端内部环一侧的氨基酸残基数 ($n=1\sim 4$) 更多。CK 多肽的另一个主要特征是带有净正电荷,且通常动物源性的 CK 多肽比植物的所带正电荷要多^[4]。Cys I-Cys IV, Cys II-Cys V 以及 Cys III-Cys VI 这种独特的二硫键配对方式是形成 CK 模体的必要而非充分条件,如来自于芋螺毒素的非 CK 多肽 G III B^[5] 和 CK 多肽芋螺毒素 GS^[6] 都含有配对方式相同的三对二硫键,且都发挥 Na^+ 通道阻断剂的作用,但是 G III B 第三对二硫键并不穿过由第一、二对二硫键形成的二硫键平面,因而不属于 CK 模体多肽,说明功能相似且二硫键配对方式相同的多肽分子并不一定都是 CK 多肽。

2 CK 模体结构

2.1 ICK 1994 年, Pallaghy 等^[7] 将 ICK 多肽的共同序列总结为 $CX_{3-7} CX_{4-6} CX_{0-5} CX_{1-4} CX_{4-10} C$, 1998 年, Norton 等^[8] 通过研究分析将 ICK 共同序列调整为 $CX_{3-7} CX_{3-6} CX_{0-5} CX_{1-4} CX_{4-13} C$ ^[8], 此后, Criaiik 等^[9] 于 2001 年将 CK 多肽共同序列进一步调整为 $CX_{3-7} CX_{3-8} CX_{0-7} CX_{1-4} CX_{4-13} C$ 。除了由三对二硫键配对折叠形成的球形空间结构外,研究还发现 β 片层、氢键等一些与 CK 模体相关的特征结构。其中, β 片层一般含有 3~4 个氨基酸残基,是已知 ICK 多肽结构中最小的保守元件。部分 ICK 多肽,如 MVIIA, 缺失第 3 个 β 片层 $XXCX$ 的最后一个残基^[10], 许多 CCK 多肽的第 3 个 β 片层实际上是首尾相连的 β 发夹结构的一部分,其最小保守元件为 $XCX_{-xx}XCX$, 其中 $-xx-$ 为发夹转角中心的 2 个残基^[11]。

2.2 CCK 除 ICK 多肽外, CK 多肽还包括一类首尾相连形成环形蛋白骨架的 CCK 多肽分子,如 Kalata B1^[12] 等。目前已鉴定的 CCK 多肽主要来自于茜草科 (Rubiaceae) 和堇菜科 (Violaceae) 植物,其长度都在 30 个氨基酸残基左右,序列比对与进化分析表明 CCK 多肽的序列相似度非常高 (约 40%)。采用 NMR 研究 Kalata B1^[13]、Circulin A^[14] 以及 Cycloviolacin O1^[15] 等代表性 CCK 多肽的空间结构发现,其空间上都含有 CK 模体、转角以及局部 β 片层等特征结构,提示所有 CCK 多肽在空间结构上高度一致。此外,研究还发现 CCK 多肽的共同序列为 $CX_3 CX_4 CX_{4-7} CX_1 CX_{4-5} CX_{5-7}$, 其 Cys 残基间距比

ICK 多肽 Cys 残基的间距要小,说明 CCK 多肽的内部环在结构上比 ICK 多肽内部环更为紧凑^[16]。

3 CK 多肽的拓扑结构

环形和非环形 CK 多肽之间的拓扑结构存在本质区别。非环形 CK 多肽 (如 ICK 多肽) 的拓扑空间结构相对简单^[17], 三对二硫键 Cys I-Cys IV、Cys II-Cys V 以及 Cys III-Cys VI 在二维平面中可以画成没有交叉的情况; 而相比之下 CCK 多肽的空间拓扑结构则更为复杂, 无论如何, 三对二硫键都会在二维平面上形成交叉。最近研究者从瑞索思猴白细胞中鉴定的一个环形多肽虽然含有 Cys I-Cys IV、Cys II-Cys V 和 Cys III-Cys VI 三对配对方式相同的二硫键, 但却没有形成 CK 模体结构, 说明肽链骨架的环化是 CCK 多肽形成结节的必要而非充分条件^[18]。

此外, CK 多肽中是否真实存在结节也一直存有争议。CK 模体是由两对二硫键 Cys I-Cys IV 和 Cys II-Cys V 及其相邻肽链骨架组成的内部环以及从环中穿过的第三对二硫键 Cys III-Cys VI 折叠形成的球形结构, 一般将这个结构归类为结节是非常合理的。但是, 有研究发现通过几何变换的方法可以在不断裂任何二硫键的情况下将这种结节解开, 如一种人源性神经生长因子在其极为缓慢的展开过程中可以将穿透内部环的第三对二硫键抽离开来^[19], 这说明 ICK 多肽的拓扑结构以及空间折叠过程是相对简单的。而 CCK 多肽由于其首尾相连, 缺乏可供抽出的 N 末端或者 C 末端, 不可能在不断裂二硫键的情况下实现这种抽出第三对二硫键的变换机制, 这在某种程度上解释了 CCK 多肽具有极强的稳定性以及其作为分子工程模型的应用潜力。

4 CK 多肽的排列组合

越来越多的研究表明 CK 模体广泛存在于环形和非环形多肽毒素中, 这也启发研究者们开展对非环形多肽 N 或 C 末端的排列组合, 以及环形蛋白质在非环化状态下 N 或 C 末端排列组合对 CK 模体的结构与功能影响的作用研究。

以 CCK 多肽的代表性分子 Kalata B1 为例, Daly 等以环形 Kalata B1 肽链骨架上的 6 个 Cys 为界, 将其划分为 6 个肽段, 并分别进行剪切, 形成一系列的非环形 Kalata B1 多肽^[20]。研究发现, 除第 1 肽段 (Cys I-Cys II) 和第 4 肽段 (Cys IV-Cys V) 被剪切形成的非环形 Kalata B1 外, 其他 4 个肽段被删除后形成的非环形 Kalata B1 的拓扑结构与环形 Kalata B1 的空间拓扑结构相一致, 说明位于 CK 内部环两侧的第 1、4 两个肽段对 CK 空间结构的维持

非常重要^[20],删除这两个肽段会对 Kalata B1 的天然构象产生根本性的改变,从而影响 CK 结构的稳定性。相比之下,其余被剪切后的 4 个肽段仍然能维持天然 Kalata B1 的空间构象,多肽末端的位置没有受到影响,因而很好地保持了 CK 模体结构的完整性。尽管空间构象相一致,但被删除肽段的 4 个非环形 Kalata B1 多肽分子丧失了环形 Kalata B1 所具有的溶血活性,这可能与非环形 Kalata B1 的稳定性降低有关,或者 Kalata B1 的溶血活性本身就需要环形骨架的存在^[20]。

非环形 Kalata B1 多肽 N 或 C 末端排列组合的不同在一定程度上说明线性 CK 多肽同样可能存在不同的空间拓扑结构。除了第 1、4 肽段被删除后没有形成 CK 模体结构、不存在二硫键穿环的情况外,所有非环形 Kalata B1 多肽都维持 Cys I-Cys IV、Cys II-Cys V 以及 Cys III-Cys VI 三对二硫键的连接方式,但其成环和穿环二硫键的方式不同,其中第 2、5 肽段被删除的非环形 Kalata B1 多肽的内部环由 Cys II-Cys V 和 Cys III-Cys VI 二硫键组成,第 3 对穿环二硫键是 Cys I-Cys IV,而第 3、6 肽段被删除的 Kalata B1 多肽的内部环则是由 Cys I-Cys IV 和 Cys II-Cys V 组成,穿环二硫键为 Cys III-Cys VI^[20]。

5 CK 多肽的合成与折叠

5.1 ICK 多肽 芋螺毒素中含有多种 ICK 多肽分子,并且在缓解疼痛症状等方面展现出巨大的临床应用潜力,其人工合成和空间折叠过程也得到了广泛的研究。由于芋螺毒素多肽分子非常小且序列保守性很低,起初研究者们认为成熟的芋螺毒素可能并不包含正确折叠所需要的完整信息^[21],但包括 MVIIA 在内的许多芋螺毒素 CK 多肽都在体外实现了正确的空间折叠,并具有与天然 CK 多肽一致的生物活性。研究发现,芋螺毒素多肽的前导序列空间结构的正确折叠并不重要,相比之下,C 末端存在的一个翻译后会被切除的甘氨酸(Gly)时,折叠效率会明显增加^[22]。通过去除一个或多个二硫键来研究芋螺毒素 CK 多肽的空间结构和生物活性时发现,每个二硫键对于芋螺毒素 CK 多肽天然构象的稳定性,以及其余两个二硫键的正确形成都发挥了极为重要的作用^[11]。

马铃薯羧肽酶抑制剂(potato carboxypeptidase inhibitor, PCI)是另一个被广泛研究的 ICK 家族成员。它在体外折叠的过程中包含一个形成非特异性二硫键的起始阶段及其后续的调整、优化过程。这与 MVIIA 的折叠过程相似,但与天然多肽折叠明显不同的是,PCI 折叠过程中出现的中间产物具有

高度多样性。南瓜家族蛋白酶抑制剂(squash family of protease inhibitors)CK 多肽的折叠过程则具有更强的特异性,如两种胰蛋白抑制剂 EETI II 和 CMTI III 之间的序列相似性非常高,但属于南瓜家族的蛋白酶抑制剂 EETI II 在体外的折叠过程速度更快并且效率更高,这可能与 EETI II 近 C 末端含有特异性 GPNG 片段,具有很强的形成 β -转角的倾向性有关。由 GPNG 片段形成的 β -转角可以作为潜在的折叠起始位点,促使 EETI II 在折叠过程中先形成一个稳定的含有二硫键的中间产物,然后再形成正确的空间构象,从而提高其折叠速度和效率^[23]。

5.2 CCK 多肽 由于 CCK 多肽的环形特征,其空间构象更为复杂,人工合成与空间折叠的研究难度也相对更大^[24]。Kalata B1 的人工合成过程包括先形成二硫键再成环和先成环后配对二硫键两种方法。研究发现,线性 Kalata B1 前体在氧化过程仅会在疏水环境中产生一定数量正确折叠的天然多肽,这可能与折叠过程中需要稳定暴露的疏水性残基有关;而相比之下,环状 Kalata B1 前体形成正确的二硫键配对并折叠成天然构象的效率则非常高,说明环化过程有助于多肽的正确折叠并形成天然的空间构象^[24]。除 Kalata B1 外,Tam 等还通过 CCK 多肽环化的“thia zip”机制,人工合成并正确折叠了 Circulin B 和 Cyclopsychotride A 等多个 CCK 多肽。其中,Circulin B^[25]由于比 Kalata B1^[24]带有更多正电荷而具有较低的折叠效率,这可能与南瓜家族蛋白酶抑制剂 EETI II^[23]存在特殊转角区域的情况相类似,这有助于形成正确的天然空间构象。

总体而言,CK 多肽序列本身即含有与天然构象形成相关的大量信息。虽然成功折叠的 CK 多肽最终会形成 Cys I-Cys IV、Cys II-Cys V 以及 Cys III-Cys VI 的配对方式,但其在折叠的过程中并不会直接形成这种配对方式,存在一定的错配率,首对二硫键正确配对的百分率以及 1、2 两对二硫键成功配对的数量决定了最终正确配对的 CK 多肽比例,说明二硫键在其正确折叠的过程中扮演了非常重要的角色。部分 CK 多肽也存在一些特征性的片段或基团,如 EETI II^[23]的 GPNG 序列、MVIIA^[22]C 末端的 Gly 残基等,在其正确折叠的过程中发挥了重要的作用。此外,CK 多肽的折叠过程也存在明显的多样性,如 MVIIA 在折叠过程中可以形成差异非常大的不同二硫键中间产物;而 EETI II 折叠过程中形成的中间物则与其天然构象非常类似,并且非常稳定^[23]。

6 药物设计和分子工程

CK 多肽由于具有缓解疼痛、抑菌以及抗病毒等多种生物活性,可以作为新药研究过程中的先导化合物。如芋螺毒素 CK 多肽 MVIIA 及其类似肽,通过特异性阻断疼痛相关的 N 型 Ca^{2+} 通道而具有缓解疼痛的功效,并且已经通过了 III 期临床试验。第二代 MVIIA 类似肽则主要通过优化其对 N 型 Ca^{2+} 通道的选择性以减轻因其作用于 P/Q 型 Ca^{2+} 通道产生的副作用^[26],从而发挥缓解疼痛的治疗效应。部分 CCK 多肽因具有抑菌活性,可作为新型抑菌药物的先导多肽。研究发现,具有抗菌活性的 CCK 多肽分子其分子表面多含有大量的正电荷,使 CCK 多肽可以与带负电的细菌膜表面之间产生静电作用力,从而增加 CCK 多肽与细菌膜脂核以及阴离子表面之间的亲和力,并进一步促进其抑菌活性的发挥,因此 CCK 多肽的抑菌作用机制可能与其分子表面含有的大量正电荷有关^[27]。此外,研究还发现部分 CCK 多肽(如 Circulin 和 Cycloviolin)具有抗 HIV 的活性,虽然其抗 HIV 活性的具体作用机制尚不清楚,但在高浓度的 CCK 多肽(660 nmol/L)中并没有检测到对逆转录酶的影响,说明 CCK 多肽可能是通过逆转录酶以外的其他作用靶点发挥抗 HIV 活性的^[28],是一种具有抗 HIV 活性的潜在药物先导化合物。

CK 多肽因结构非常稳定,除了可作为药物先导化合物外,还可作为新药设计或分子工程研究中的理想分子模型。如以南瓜蛋白酶抑制剂的 CK 模体结构为分子框架,删除南瓜蛋白酶抑制剂 EETII 氨基末端的 27 个氨基酸残基,并加上另一种南瓜蛋白酶抑制剂 CPI 多肽羧基末端的 5 个氨基酸残基,所构建的融合蛋白同时具有 EETII 和 CPI 两种南瓜胰蛋白酶抑制剂的活性^[29],说明 CK 模体结构作为一种非常稳定的理想支架,通过改变其表面氨基酸残基或部分肽段,可以在新药设计或蛋白质工程中形成新的活性或功能分子,未来将同样具有极大的应用潜力。

总之,CK 模体是由三对二硫键折叠形成的球形空间结构,广泛存在于各种动物、植物以及真菌的多肽类毒素中。CK 多肽结构非常稳定,生物活性多样,因此可以作为药物先导化合物或分子模型,在蛋白质工程以及新药研究等方面具有较大的利用价值。

【参考文献】

[1] McDonald NQ, Hendrickson WA. A structural superfamily of growth factors containing a cystine knot motif [J]. Cell,

1993, 73(3): 421-424.

- [2] Isaacs NW. Cystine knots [J]. Curr Opin Struct Biol, 1995, 5(3): 391-395.
- [3] Park S, Stromstedt AA, Goransson U. Cyclotide structure-activity relationships: qualitative and quantitative approaches linking cytotoxic and anthelmintic activity to the clustering of physicochemical forces [J]. PLoS One, 2014, 9(3): e91430.
- [4] Reinwarth M, Nasu D, Kolmar H, et al. Chemical synthesis, backbone cyclization and oxidative folding of cystine-knot peptides: promising scaffolds for applications in drug design [J]. Molecules, 2012, 17(11): 12533-12552.
- [5] Sato K, Yamaguchi Y, Ishida Y, et al. Roles of basic amino acid residues in the activity of μ -conotoxin G III A and G III B, peptide blockers of muscle sodium channels [J]. Chem Biol Drug Des, 2015, 85(4): 488-493.
- [6] Green BR, Bulaj G, Norton RS. Structure and function of μ -conotoxins, peptide-based sodium channel blockers with analgesic activity [J]. Future Med Chem, 2014, 6(15): 1677-1698.
- [7] Pallaghy PK, Norton RS, Nielsen KJ, et al. A common structural motif incorporating a cystine knot and a triple-stranded β -sheet in toxic and inhibitory polypeptides [J]. Protein Sci, 1994, 3(10): 1833-1839.
- [8] Norton RS, Pallaghy PK. The cystine knot structure of ion channel toxins and related polypeptides [J]. Toxicon, 1998, 36(11): 1573-1583.
- [9] Craik DJ, Daly NL, Waine C. The cystine knot motif in toxins and implications for drug design [J]. Toxicon, 2001, 39(1): 43-60.
- [10] Schroeder CI, Nielsen KJ, Adams DA, et al. Effects of Lys2 to Ala2 substitutions on the structure and potency of ω -conotoxins MVIIA and CVID [J]. Biopolymers, 2012, 98(4): 345-356.
- [11] Almeida AM, Li R, Gellman SH. Parallel β -sheet secondary structure is stabilized and terminated by interstrand disulfide cross-linking [J]. J Am Chem Soc, 2012, 134(1): 75-78.
- [12] Henriques ST, Huang YH, Chaouis S, et al. The Prototypic Cyclotide Kalata B1 Has a Unique Mechanism of Entering Cells [J]. Chem Biol, 2015, 22(8): 1087-1097.
- [13] Skjeldal L, Gran L, Sletten K, et al. Refined structure and metal binding site of the kalata B1 peptide [J]. Arch Biochem Biophys, 2002, 399(2): 142-148.
- [14] Ravipati AS, Henriques ST, Poth AG, et al. Lysine-rich cyclotides: a new subclass of circular knotted proteins from Violaceae [J]. ACS Chem Biol, 2015, 10(11): 2491-2450.
- [15] Slazak B, Jacobsson E, Kuta E, et al. Exogenous plant hormones and cyclotide expression in *Viola uliginosa* (Violaceae) [J]. Phytochemistry, 2015, 117: 527-536.
- [16] Reinwarth M, Glotzbach B, Tomaszowski M, et al. Oxidative folding of peptides with cystine-knot architectures: kinetic studies and optimization of folding conditions [J]. Chembiochem, 2013, 14(1): 137-146.
- [17] Mao B. Topological chirality of proteins [J]. Protein Sci, 1993, 2(6): 1057-1059.

(下转第 496 页)

可避免药物在胃肠道中局部浓度过高,减少副作用,并且溶解特性可再现^[11]。因此,在设备不太复杂的前提下,多选择开发 TSH 缓释微丸/颗粒胶囊。

TSH 缓释制剂通常会结合肠溶聚合物来控制释或调整释放,如包衣控释膜、制备骨架缓释等,但仅用肠溶聚合物有时又达不到要求的释放表现,而且有可能在小肠段引起药物的大量释放(这种释放还呈现 pH 依赖性),因此,如本文所述,在丸芯/片芯和外包的衣膜上,可采用一种或几种控释聚合物组合应用来达到更有效的控释,并通过高速搅拌制粒、离心造粒包衣、流化床包衣、多层压片等工艺方法制备。本文所述的不同处方和工艺方法提供了制备 TSH 缓释制剂的不同思路和借鉴,但作为缓控释制剂,释放表现会受到较多因素影响,因此处方工艺的重现性和实现大生产仍是一大挑战。

【参考文献】

- [1] Kim JS, Kim MS, Park HJ, *et al.* Statistical optimization of tamsulosin hydrochloride controlled release pellets coated with the blend of HPMCP and HPMC [J]. *Chem Pharm Bull*, 2007, 55(6):936-939.
 - [2] 杨颖,伍良涌,谭文非. 盐酸坦索罗辛缓释片含量和释放度测定方法研究[J]. *今日药学*, 2013, 23(1):26-29.
 - [3] 朱彩燕,沈映冰,吕永丰,等. 离心造粒法制备盐酸坦索罗辛缓释微丸胶囊的工艺影响因素及体外释放度考察[J]. *中国药房*, 2011, 22(13): 1196-1199.
 - [4] 李昌其,杨继斌,石森林,等. 盐酸坦索罗辛缓释微丸胶囊的制备及处方工艺考察[J]. *上海医药*, 2012, 33(21): 45-48.
 - [5] 邢小敏,梁超峰,吴淳,等. LC-MS/MS 法测定坦索罗辛在比格犬血浆中的浓度及其缓释制剂的药学研究[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2011, 16(8): 884-889.
 - [6] 郭新颖. 盐酸坦索罗辛凝胶骨架缓释片剂的设计与评价[D]. 沈阳:沈阳药科大学, 2000.
 - [7] Park JS, Shim JY, Park JS, *et al.* Formulation variation and *in vitro-in vivo* correlation for a rapidly swellable three-layered tablet of tamsulosin HCl [J]. *Chem Pharm Bull*, 2011, 59(5):529-535.
 - [8] 北京红林制药有限公司. 一种盐酸坦洛新控释片制剂及其制备方法;CN101147729A [P]. 2008-03-26.
 - [9] 西梯茜生命工学股份有限公司. 含盐酸坦索罗辛的控释制剂;CN101128190A [P]. 2008-02-20.
 - [10] 山之内制药株式会社. 改善下腹和/或会阴疼痛的治疗剂;CN1694692A [P]. 2005-11-09.
 - [11] 兰贝克赛实验室有限公司. 坦洛新的控释药物组合物;CN1744889A [P]. 2006-03-08.
 - [12] 江苏大学,扬子江药业集团有限公司. 盐酸坦索罗辛缓释微丸制剂及其制备方法;CN101695478A [P]. 2010-04-21.
 - [13] 北京可信必诚医药科技发展有限公司. 一种盐酸坦索罗辛缓释微丸制剂及其制备方法;CN103315962A [P]. 2013-09-25.
 - [14] Okuda Y, Okamoto Y, Irisawa Y, *et al.* Formulation design for orally disintegrating tablets containing enteric-coated particles [J]. *Chem Pharm Bull*, 2014, 62(5):407-414.
- [收稿日期] 2015-10-21 [修回日期] 2016-04-26
[本文编辑] 李睿曼
-
- (上接第 484 页)
- [18] Tang YQ, Yuan J, Osapay G, *et al.* A cyclic antimicrobial peptide produced in primate leukocytes by the ligation of two truncated alpha-defensins [J]. *Science*, 1999, 286(5439): 498-502.
 - [19] Kliemann M, Weininger U, Balbach J, *et al.* Examination of the slow unfolding of pro-nerve growth factor argues against a loop threading mechanism for nerve growth factor [J]. *Biochemistry*, 2006, 45(11): 3517-3524.
 - [20] Daly NL, Craik DJ. Acyclic permutants of naturally occurring cyclic proteins. Characterization of cystine knot and beta-sheet formation in the macrocyclic polypeptide kalata B1 [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(25): 19068-19075.
 - [21] Olivera BM, Rivier J, Clark C, *et al.* Diversity of Conus neuropeptides [J]. *Science*, 1990, 249(4966): 257-263.
 - [22] Banerjee J, Gyanda R, Chang YP, *et al.* The chemical synthesis of alpha-conotoxins and structurally modified analogs with enhanced biological stability [J]. *Methods Mol Biol*, 2013, 1081: 13-34.
 - [23] Guo Y, Sun DM, Wang FL, *et al.* Diaminodiacid Bridges to Improve Folding and Tune the Bioactivity of Disulfide-Rich Peptides [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2015.
 - [24] Cheneval O, Schroeder CI, Durek T, *et al.* Fmoc-based synthesis of disulfide-rich cyclic peptides [J]. *J Org Chem*, 2014, 79(12): 5538-5544.
 - [25] Poth AG, Colgrave ML, Philip R, *et al.* Discovery of cyclotides in the fabaceae plant family provides new insights into the cyclization, evolution, and distribution of circular proteins [J]. *ACS Chem Biol*, 2011, 6(4): 345-355.
 - [26] Maciel IS, Azevedo VM, Pereira TC, *et al.* The spinal inhibition of N-type voltage-gated calcium channels selectively prevents scratching behavior in mice [J]. *Neuroscience*, 2014, 277: 794-805.
 - [27] Datta A, Kundu P, Bhunia A. Designing potent antimicrobial peptides by disulphide linked dimerization and N-terminal lipidation to increase antimicrobial activity and membrane perturbation: Structural insights into lipopolysaccharide binding [J]. *J Colloid Interface Sci*, 2016, 461: 335-345.
 - [28] Ireland DC, Wang CK, Wilson JA, *et al.* Cyclotides as natural anti-HIV agents [J]. *Biopolymers*, 2008, 90(1): 51-60.
 - [29] Moore SJ, Leung CL, Norton HK, *et al.* Engineering agatoxin, a cystine-knot peptide from spider venom, as a molecular probe for in vivo tumor imaging [J]. *PLoS One*, 2013, 8(4): e60498.
- [收稿日期] 2015-10-30 [修回日期] 2016-04-26
[本文编辑] 陈静