



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102131514 B

(45) 授权公告日 2014. 08. 20

(21) 申请号 200980129114. 3

(22) 申请日 2009. 06. 08

(30) 优先权数据

61/059, 910 2008. 06. 09 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2011. 01. 25

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2009/046571 2009. 06. 08

(87) PCT国际申请的公布数据

W02009/152079 EN 2009. 12. 17

(73) 专利权人 帕拉丁科技公司

地址 美国新泽西州

(72) 发明人 施亦群 舒布赫·D·夏尔马 杨炜
新·陈

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理
有限公司 11262

代理人 陶贻丰 郑霞

(51) Int. Cl.

A61K 38/00 (2006. 01)

A61K 31/44 (2006. 01)

(56) 对比文件

US 2007027091 A1, 2007. 02. 01,

WO 2005000339 A2, 2005. 01. 06,

US 2007293423 A1, 2007. 12. 20,

US 2007027091 A1, 2007. 02. 01,

US 2007293423 A1, 2007. 12. 20,

WO 2005000339 A2, 2005. 01. 06,

审查员 易方方

权利要求书1页 说明书22页

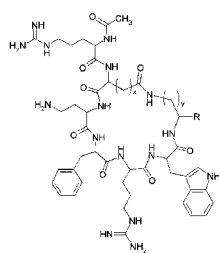
序列表8页 附图1页

(54) 发明名称

用于治疗性功能障碍的黑皮质素受体特异性
肽

(57) 摘要

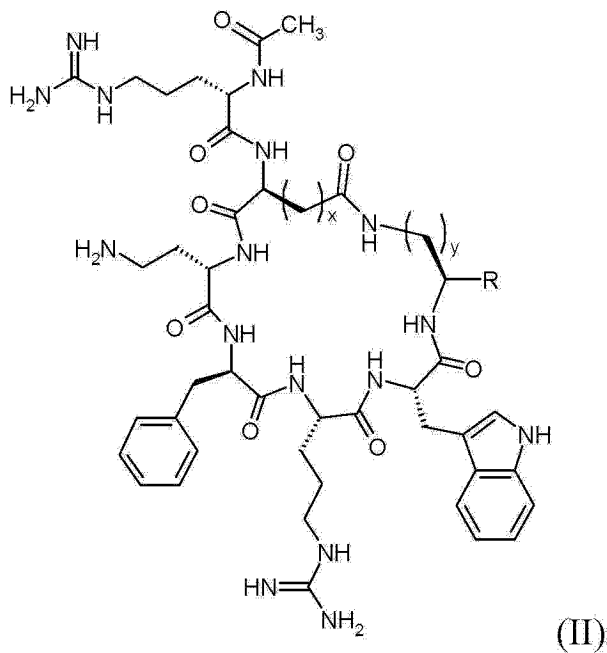
一种下式的黑皮质素受体激动剂环肽：



其中 R、x 和 y 如说明书中所定

义；包含上式的肽的组合物和制剂；以及防止、减轻或治疗黑皮质素受体介导的疾病、适应症、病症和综合征的方法，所述黑皮质素受体介导的疾病、适应症、病症和综合征包括性功能障碍，例如雄性勃起功能障碍和雌性性功能障碍。

1. 一种环肽,所述环肽具有式 (II) :



或其药学上可接受的盐,

其中:

R 是 $-C(=O)-NH_2$; x 是 1; 并且 Y 是 4; 或者

R 是 $-C(=O)-OH$; x 是 2; 并且 Y 是 3。

2. 如权利要求 1 所述的环肽,所述环肽是 Ac-Arg- 环 (Asp-Dab-D-Phe-Arg-Trp-Lys)-NH₂ (SEQ ID NO:4)。

3. 如权利要求 1 所述的环肽,所述环肽是 Ac-Arg- 环 (Glu-Dab-D-Phe-Arg-Trp-Orn)-OH (SEQ ID NO:7)。

4. 一种药物组合物,所述药物组合物包含权利要求 1 所述的环肽或其药学上可接受的盐和药学上可接受的载体。

5. 权利要求 4 所述的药物组合物在制备用于在人或非人哺乳动物中治疗雄性勃起功能障碍的药物中的用途。

6. 一种药物组合物,所述药物组合物包含权利要求 1 的环肽或其药学上可接受的盐和第二性功能障碍药剂。

7. 根据权利要求 1-3 中任一项所述的肽,用作治疗雄性勃起功能障碍的药物。

8. 根据权利要求 1-3 中任一项所述的肽,用于治疗雄性勃起功能障碍。

用于治疗性功能障碍的黑皮质素受体特异性肽

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求 2008 年 6 月 9 日提交的题目为“Melanocortin Receptor-Specific Peptides for Treatment of Sexual Dysfunction (用于治疗性功能障碍的黑皮质素受体特异性肽)”的美国临时专利申请系列第 61/059,910 号的文件的优先权和权益,并且该专利申请的说明书及其权利要求书通过引用并入本文。

[0003] 发明背景

[0004] 发明领域(技术领域):

[0005] 本发明涉及可用于治疗黑皮质素受体介导的疾病、适应症、病症和综合征的黑皮质素受体特异性肽。

[0006] 相关技术说明:

[0007] 下面的讨论按作者和公布年份提到了大量出版物,并且由于接近的公布日期,某些出版物不被认为是关于本发明的现有技术。本文的这些出版物的讨论是为了使背景更完整而给出的,并且不应被理解为是为了确定专利性而承认这些出版物是现有技术。

[0008] 已经鉴定了一组黑皮质素受体类型和亚型,包括在正常人黑色素细胞和黑素瘤细胞上表达的黑皮质素-1 受体(MC1-R)、在肾上腺细胞中表达的 ACTH(促肾上腺皮质激素)的黑皮质素-2 受体(MC2-R)、主要在下丘脑、中脑和脑干的细胞中表达的黑皮质素-3 和黑皮质素-4 受体(MC3-R 和 MC4-R)以及在广泛分布的外周组织中表达的黑皮质素-5 受体(MC5-R)。

[0009] 已经进行了大量工作来确定黑皮质素受体的结构,包括编码该受体的核酸序列和构成该受体的氨基酸序列二者。MC4-R 是 G 蛋白偶联的 7 次跨膜受体,据信它主要在脑中表达。

[0010] 据信 MC4-R 特异性的肽以及其次的 MC3-R 特异性的肽可用于调节哺乳动物能量稳态,包括用作减少食物摄入和体重增加的剂。据信 MC4-R 激动剂肽可用于治疗包括雄性勃起功能障碍的性功能障碍以及用于减少食物摄入和体重增加,诸如用于治疗肥胖症。MC4-R 激动剂肽还可用于减少主动的乙醇消耗、治疗药瘾以及类似作用。这种肽以及 MC1-R 和 MC3-R 激动剂肽还可用于治疗循环休克、局部缺血、出血性休克、炎症疾病和相关疾病、适应症、病症和综合征。相反,据信 MC4-R 拮抗剂肽可用于体重增加帮助,诸如用于治疗恶病质、肌肉衰减综合征(sarcopenia)、消耗综合征(wasting syndrome)或疾病以及食欲缺乏。这种肽还可用于治疗抑郁和相关疾患。

[0011] 黑皮质素受体特异性肽包括环状 α -促黑激素(α -MSH)类似物肽,例如 Ac-Nle-环(-Asp-His-D-Phe-Arg-Trp-Lys)-NH₂(SEQ ID NO:1)(参见美国专利第 5,674,839 号和第 5,576,290 号)和 Ac-Nle-环(-Asp-His-D-Phe-Arg-Trp-Lys)-OH(SEQ ID NO:2)(参见美国专利第 6,579,968 号和 6,794,489 号)。这些和其他黑皮质素受体特异性肽一般含有天然 α -MSH 的中心四肽序列,His⁶-Phe⁷-Arg⁸-Trp⁹(SEQ ID NO:3),或其模拟物或变型,包括用 D-Phe 取代 Phe⁷。被确定对一种或多种黑皮质素受体特异性的其他肽或肽样化合物公开于美国专利第 5,731,408 号、第 6,054,556 号、第 6,350,430 号、

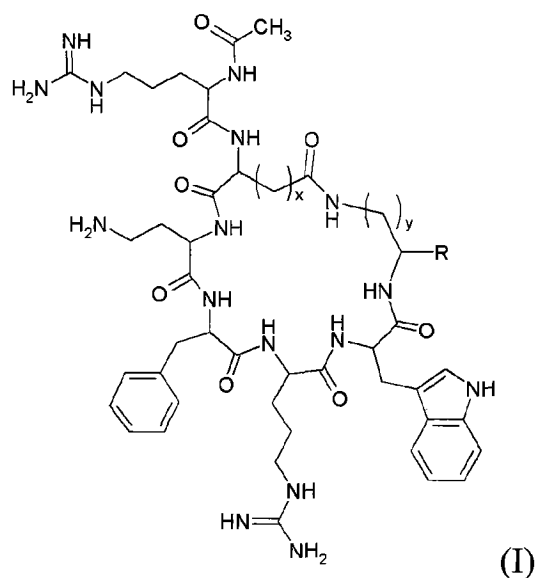
第 6,476,187 号、第 6,600,015 号、第 6,613,874 号、第 6,693,165 号、第 6,699,873 号、第 6,887,846 号、第 6,951,916 号、第 7,008,925 号、和第 7,176,279 中；美国公布的专利申请公布第 2001/0056179 号、第 2002/0143141 号、第 2003/0064921 号、第 2003/0105024 号、第 2003/0212002 号、第 2004/0023859 号、第 2005/0130901 号、第 2005/0187164 号、第 2005/0239711 号、第 2006/0105951 号、第 2006/0111281 号、第 2006/0293223 号、第 2007/0027091 号、第 2007/0105759 号、第 2007/0123453 号、第 2007/0244054 号、和第 2008/0039387 号中；以及国际专利申请第 WO 98/27113 号、第 WO 99/21571 号、第 WO 00/05263 号、第 WO 99/54358 号、第 WO 00/35952 号、第 WO 00/58361 号、第 W001/30808 号、第 WO 01/52880 号、第 WO 01/74844 号、第 WO 01/85930 号、第 WO 01/90140 号、第 WO 02/18437 号、第 WO 02/26774 号、第 W003/006604 号、第 WO 2004/046166 号、第 WO 2005/000338 号、第 W02005/000339 号、第 WO 2005/000877 号、第 WO 2005/030797 号、第 W02005/060985 号、第 W02006/048449 号、第 WO 2006/048450 号、第 W02006/048451 号、第 WO 2006/048452 号、第 WO 2006/097526 号、第 W02007/008684 号、第 WO 2007/008704 号、和第 WO 2007/009894 号中。

[0012] 尽管科学文献中的大量论文以及大量专利申请和授权专利证明了对黑皮质素受体特异性肽的强烈的科学关注和药学关注，但是还没有黑皮质素受体特异性肽被批准为任何治疗适应症的药物。事实上，还没有任何治疗适应症的任何黑皮质素受体特异性肽已发展到通过 II 期临床试验的报告。仍存在对于药学应用并且尤其是用于治疗性功能障碍的黑皮质素受体特异性肽的显著的和大量的需要。本发明是在这种背景下进行的。

[0013] 发明简述

[0014] 在一个方面，本发明涉及式 (I) 的环肽或其药学上可接受的盐：

[0015]



[0016] 其中：

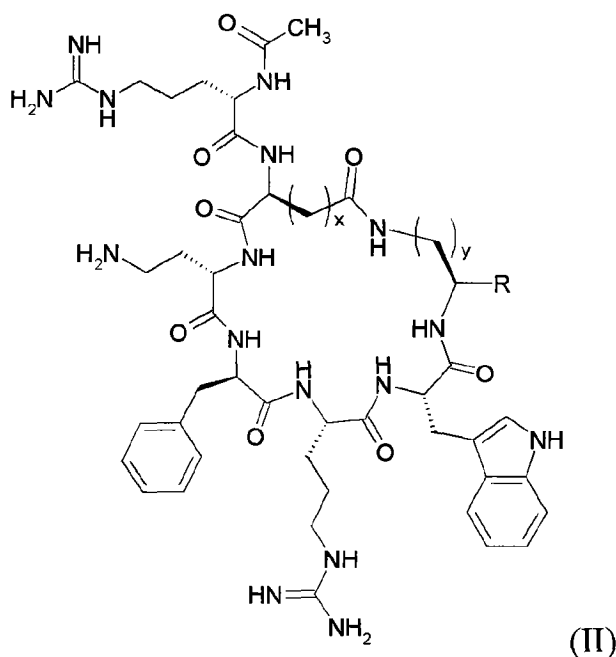
[0017] R 是 $-C(=O)-OH$ 或 $-C(=O)-NH_2$ ；

[0018] x 是 1 或 2；并且

[0019] Y 是 3 或 4。

[0020] 环肽可以是式 (II) 之一：

[0021]



[0022] 因此环肽可以是

[0023] Ac-Arg-环 (Asp-Dab-D-Phe-Arg-Trp-Lys)-NH₂ (SEQ ID NO :4)、

[0024] Ac-Arg-环 (Asp-Dab-D-Phe-Arg-Trp-Lys)-OH (SEQ ID NO :5)、

[0025] Ac-Arg-环 (Glu-Dab-D-Phe-Arg-Trp-Orn)-NH₂ (SEQ ID NO :6) 或

[0026] Ac-Arg-环 (Glu-Dab-D-Phe-Arg-Trp-Orn)-OH (SEQ ID NO :7)。

[0027] 在另一方面,本发明提供包含本发明的环肽或其药学上可接受的盐以及药学可接受载体的药物组合物。

[0028] 在另一方面,本发明提供用于治疗黑皮质素受体介导的疾病、适应症、病症和综合征的基于黑皮质素受体特异性肽的药物组合物。

[0029] 在另一方面,本发明提供用于治疗性功能障碍和其他 MC4-R 相关疾患的基于肽的黑皮质素受体特异性药物,其中所述肽是选择性的 MC4-R 配体。

[0030] 在另一方面,本发明提供对 MC4-R 特异性的肽,并且所述肽是激动剂。

[0031] 在另一方面,本发明提供用于治疗性功能障碍而没有明显的心血管副作用的黑皮质素受体特异性药物,没有明显的心血管副作用包括没有明显的血压增加。

[0032] 在另一方面,本发明提供在大的剂量范围内有效的特异性 MC4-R 环肽。

[0033] 本发明的其他方面和新颖特征以及其他应用性范围将部分在下面的详述中结合附图描述,并且部分地在本领域技术人员检查了下文之后变得明显,或者可以由本发明的实践而得知。本发明的方面可以借助于具体由所附的权利要求书所提出的手段和组合来实现和获得。

[0034] 附图简述

[0035] 并入说明书并形成说明书一部分的附图图解了本发明的一个或多个实施方案,并且与说明书一起用于解释本发明的原理。附图仅为图解本发明的一个或多个优选实施方案的目的,并且不应理解为限制了本发明。

[0036] 图 1 是在施用媒介物 (○)、通过静脉内注射施用剂量为 1 μmol/kg 的布美诺肽

(bremelanotide) (□)、通过皮下注射施用剂量为 $0.84 \mu\text{mol/kg}$ (▽) 和 $3.0 \mu\text{mol/kg}$ (△) 的实施例 8.1 的环肽之后,在交叉研究中使用通过遥测监测的手术植入的血压传感器测定的收缩压的曲线图。

[0037] 图 2 是在通过皮下注射施用剂量为 1mg/kg 的两种不同批次的实施例 8.4 的环肽 (△,▽) 和通过静脉内注射施用剂量为 1mg/kg 的布美诺肽 (□) 之后,在交叉研究中使用通过遥测监测的手术植入的血压传感器测定的收缩压的曲线图。

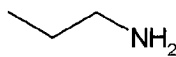
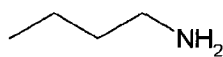
[0038] 发明详述

[0039] 1.0 定义.

[0040] 在进行本发明的说明之前,如本文所述定义某些术语。

[0041] 在给出的关于根据本发明的肽的序列中,氨基酸残基具有如美国专利商标局所公布的 Manual of Patent Examining Procedure (美国专利审查程序手册),第 8 版的第 2400 章中所给出的它们的常规意思。因此,“Nle”是正亮氨酸,“Asp”是天冬氨酸,“His”是组氨酸,“Phe”是苯丙氨酸,“Arg”是精氨酸,“Trp”是色氨酸,并且“Lys”是赖氨酸,等等。应理解“D”异构体通过在三字母代码或氨基酸名称之前的“D”指示,因此例如 D-Phe 是 D-苯丙氨酸。上文未涵盖的氨基酸残基具有下列定义:

[0042]

缩写	常用名	侧链结构
Dab	2,4-二氨基丁酸	
Orn	鸟氨酸	

[0043] 术语“Ac”意指乙酰基 $\text{CH}_3\text{-C}(=\text{O})\text{-}$ 。

[0044] “酰胺”包括具有与羰基连结的三价氮 ($\text{-C}(=\text{O})\text{-NH}_2$) 的化合物,诸如甲酰胺、乙酰胺、丙酰胺以及类似物。

[0045] “胺”包括含有氨基 (-NH_2) 的化合物。

[0046] 如在药物组合物中的术语“组合物”旨在涵盖包含活性成分和构成载体的惰性成分的产品,以及直接或间接由下列过程产生的任何产品:任何两种或更多种成分的组合、复合或聚集;或一种或多种成分的解离;或一种或多种成分的其他类型的反应或相互作用。因此,本发明中所采用的药物组合物涵盖通过混合活性成分和一种或多种药学上可接受的载体制备的任何组合物。

[0047] 所谓黑皮质素受体“激动剂”意指可以与黑皮质素受体相互作用并启动药理学反应的内源物质、药物物质或化合物,包括诸如本发明的肽的化合物,所述药理学反应包括但不限于腺苷酸环化酶激活、黑皮质素受体的特征 (characteristic)。对于本发明,是黑皮质素-4 受体 (MC4-R) 的激动剂的黑皮质素受体激动剂是优选的,但是对于某些应用,是 MC4-R 和黑皮质素-1 受体 (MC1-R) 的激动剂的黑皮质素受体激动剂是优选的,并且对于其他应用,是 MC1-R、黑皮质素-3 受体 (MC3-R)、MC4-R 和黑皮质素-5 受体 (MC5-R) 的一个或多个的激动剂的黑皮质素受体激动剂是优选的。

[0048] 所谓“ α -MSH”意指肽 $\text{Ac-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val-NH}_2$ (SEQ IDNO:8) 及其类似物和同系物,包括但不限于 NDP- α -MSH。

[0049] 所谓“NDP- α -MSH”意指肽 $\text{Ac-Ser-Tyr-Ser-Nle-Glu-His-D-Phe-Arg-Trp-Gly-L}$

ys-Pro-Val-NH₂ (SEQ IDNO :9) 及其类似物和同系物。

[0050] 所谓“EC₅₀”意指产生激动剂的最大可能反应的 50% 的该激动剂摩尔浓度, 所述激动剂包括部分激动剂。举例而言, 如在 MC4-R 细胞表达系统中的 cAMP 测定所测得的, 在 72nM 的浓度下产生测试化合物的最大可能反应的 50% 的测试化合物具有 72nM 的 EC₅₀。除非另外指明, 否则与 EC₅₀ 测定相关的摩尔浓度是以纳摩尔 / 升 (nM) 计的。

[0051] 所谓“Ki (nM)”意指平衡抑制解离常数, 它表示在不存在放射性配体或其他竞争剂的条件下与平衡时受体结合位点的一半结合的竞争性化合物的摩尔浓度。一般地, Ki 的数值与化合物对受体的亲和力反相关, 使得如果 Ki 低, 则亲和力高。Ki 可以使用 Cheng 和 Prusoff 的公式确定 (Cheng Y., Prusoff W.H., Biochem. Pharmacol. 22 :3099-3108, 1973) :

[0052]

$$K_i = \frac{EC_{50}}{1 + \frac{[配体]}{K_D}}$$

[0053] 其中“配体”是放射性配体的浓度, 并且 K_D 是放射性配体产生该放射性配体的 50% 受体占有的受体亲和力的倒数。除非另外指明, 否则与 Ki 测定相关的摩尔浓度以 nM 计。Ki 可以关于特定受体 (例如, MC1-R、MC3-R、MC4-R 或 MC5-R) 和特定配体 (例如, α-MSH 或 NDP-α-MSH) 而表达。

[0054] 所谓“抑制”意指在竞争性抑制测定中与已知的标准物相比受体结合的百分比减弱或减少。因此, “1 μM (NDP-α-MSH) 的抑制”意指在诸如下文所述的测定条件下, 由添加确定量的待测化合物如 1 μM 测试化合物引起的 NDP-α-MSH 结合的百分比减少。举例而言, 不抑制 NDP-α-MSH 结合的测试化合物具有 0% 的抑制, 并且完全抑制 NDP-α-MSH 结合的测试化合物具有 100% 的抑制。通常, 如下文所描述的, 使用放射性测定进行竞争性抑制测定, 如用 I¹²⁵- 标记的 NDP-α-MSH; 或者使用镧系螯合荧光测定, 如用 Eu-NDP-α-MSH。然而, 测试竞争性抑制的其他方法是已知的, 包括使用非放射性同位素的标记或标签系统, 并且一般本发明可采用用于测试竞争性抑制的本领域中已知的任何方法。因此, 可以看到“抑制”是确定测试化合物是否减弱 α-MSH 与黑皮质素受体的结合的一个量度。

[0055] 所谓“结合亲和力”意指化合物或药物结合其生物靶的能力, 在本文表示为 Ki (nM)。

[0056] 所谓“内在活性”意指在指定的黑皮质素受体表达细胞系统中化合物可达到的最大功能活性, 例如, 腺苷酸环化酶的最大刺激。将 α-MSH 或 NDP-α-MSH 达到的最大刺激指定为内在活性为 1.0 (或 100%) 并且将能够刺激 α-MSH 或 NDP-α-MSH 的最大活性的一半的化合物指定为具有 0.5 (或 50%) 的内在活性。将在本文所述的测定条件下具有 0.7 (70%) 或更高的内在活性的本发明化合物归类为激动剂, 具有 0.1 (10%) 和 0.7 (70%) 之间的内在活性的化合物归类为部分激动剂, 并且将具有低于 0.1 (10%) 的内在活性的化合物归类为无活性的或不具有内在活性。在一个方面, 本发明的环肽一般可以表征为关于 α-MSH 或 NDP-α-MSH 的 MC4-R 的部分激动剂。

[0057] 一般地, “功能活性”是在化合物刺激后受体信号传导的量度, 或受体相关的信号传导改变的量度, 诸如黑皮质素受体并且尤其是 MC4-R 或 hMC4-R。黑皮质素受体通过激活异源三聚体 G 蛋白启动信号转导。在一个方面, 黑皮质素受体经 Gα_s 传导信号, Gα_s 通

过腺苷酸环化酶催化 cAMP 的产生。因此,腺苷酸环化酶的刺激的测定如腺苷酸环化酶的最大刺激的测定是功能活性的一种量度,并且是本文所例示的主要量度。然而,应理解可以采用功能活性的替代性量度来实践本发明,并且所述替代性测量特定地涵盖在并包括在本发明的范围内。因此,在一个实例中,可以测量细胞内的游离钙,诸如下列文献中报道的和使用其中所公开的方法:Mountjoy K. G 等人, Melanocortin receptor-mediated mobilization of intracellular free calcium in HEK293 cells(在 HEK293 细胞中黑皮质素受体介导的细胞内游离钙动员). *Physiol Genomics* 5:11-19, 2001; 或 Kassack M. U. 等人, Functional screening of G protein-coupled receptors by measuring intracellular calcium with a fluorescence microplate reader(通过用荧光酶标仪测量细胞内钙进行 G 蛋白偶联受体的功能筛选). *Biomol Screening* 7:233-246, 2002。还可能的是通过测量磷脂酰肌醇 4,5-二磷酸的肌醇三磷酸或二酰甘油生成来测量激活,例如通过使用放射性测定进行。又一种功能活性量度是调节途径激活所导致的受体内化,诸如使用 Nickolls S. A. 等人, Functional selectivity of melanocortin 4 receptor peptide and nonpeptide agonists: evidence for ligand specific conformational states(黑皮质素 4 受体肽和非肽激动剂的功能选择性:配体特异性构象状态的证据). *J Pharm Exper Therapeutics* 313:1281-1288, 2005 中所公开的方法。又一种功能活性量度是与 G 蛋白受体激活相关的核苷酸的交换和交换率,例如 G 蛋白 α 亚基上的 GDP(鸟苷二磷酸)与 GTP(鸟苷三磷酸)的交换,这可以通过任何数目的方法测量,包括使用鸟苷 5'-(γ -[35 S] 硫代)-三磷酸的放射性测定,如在 Manning D. R., Measures of efficacy using G proteins as endpoints: differential engagement of G proteins through single receptors(使用 G 蛋白为终点的功效量度:通过单个受体的 G 蛋白差异衔接). *Mol Pharmacol* 62:451-452, 2002 中公开的。已经开发了多种基于基因的测定来测量 G 偶联蛋白的激活,例如在下列文献中公开的那些:Chen W. 等人, A colorimetric assay from measuring activation of Gs- and Gq-coupled signaling pathways(测量 Gs- 和 Gq- 偶联的信号传导途径激活的比色测定). *Anal Biochem* 226:349-354, 1995; Kent T. C. 等人, Development of a generic dual-reporter gene assay for screening G-protein-coupled receptors(用于筛选 G 蛋白偶联受体的非专属双报道基因的开发). *Biomol Screening*, 5:437-446, 2005; 或 Kotarsky K. 等人, Improved receptor gene assays used to identify ligands acting on orphan seven-transmembrane receptors(用于鉴定作用于孤儿七次跨膜受体的配体的改良受体基因测定). *Pharmacology & Toxicology* 93:249-258, 2003。已经将 Chen 等人的比色测定改造成用于测量黑皮质素受体激活,如在 Hruby V. J. 等人, Cyclic lactam α -melanocortin analogues of Ac-Nle⁴-cyclo[Asp⁵, D-Phe⁷, Lys¹⁰] α -melanocyte-stimulating hormone-(4-10)-NH₂ with bulky aromatic amino acids at position 7 shows high antagonist potency and selectivity at specific melanocortin receptors(在位置 7 处具有大的芳族氨基酸的 Ac-Nle⁴-cyclo[Asp⁵, D-Phe⁷, Lys¹⁰] α -促黑激素-(4-10)-NH₂ 的环状内酰胺 α -黑皮质素类似物显示出高的拮抗效价和对特定黑皮质素受体的选择性). *J Med Chem* 38:3454-3461, 1995 中公开的。一般地,可以通过任何方法测量功能活性,包括测定 G-偶联受体的激活和/或信号传导的方法,并且还包括可能在以后开发或报道的方法。上述论

文和本文所公开的方法的每一种均如同完整描述一样通过引用并入本文。

[0058] 如本文所用的术语“治疗”(“treat”、“treating”和“treatment”)涵盖在患者患指定的疾病或疾患时发生的降低该疾病或疾患的严重程度的作用。

[0059] 如本文所用的术语“治疗有效量”意指在被医生或其他临床医师治疗的哺乳动物中引发生物反应或医学反应的化合物的量,所述化合物包括本发明的肽。

[0060] 如本文所用,术语“预防有效的”或“预防”意指将防止或抑制患有医学病症的哺乳动物的痛苦或减轻患有医学病症的哺乳动物的痛苦的化合物的量,所述化合物包括本发明的肽,所述医学病症在患者开始患所指定的疾病或疾患之前医生或其他临床医师已试图防止、抑制或减轻。

[0061] “性功能障碍”意指抑制或削弱正常性功能的任何病症,所述正常性功能包括性交。该术语不限于生理病症并且包括心理病症或没有病理或疾患的正式诊断的察觉的削弱。性功能障碍包括雄性哺乳动物中的勃起机能障碍和雌性哺乳动物中的雌性性功能障碍。

[0062] “勃起机能障碍”是包括雄性哺乳动物无法达到功能勃起、射精或二者的疾患。因此勃起机能障碍与阳痿同义,并且包括不能够获得或维持坚硬至足以性交的勃起。勃起机能障碍的症状包括不能够达到或维持勃起、射精失败、早泄或不能达到性高潮。勃起机能障碍的增加通常与年龄相关并且可以由身体疾病引起或作为药物治疗的副作用引起。

[0063] “雌性性功能障碍”是包括性唤起障碍的疾患。术语“性唤起障碍”包括持续或复发的无法获得或维持润滑-膨胀性兴奋反应,直至性活动完成。雌性性功能障碍还可以包括抑制的性高潮和性交困难,性交困难是疼痛或困难的性交。雌性性功能障碍包括但不限于大量的疾病、病症和疾患种类,包括机能减退的性欲障碍、性快感缺乏、性唤起障碍、性交困难和阴道痉挛。机能减退的性欲障碍包括其中性幻想和对性活动的渴望持续性或复发性地较少或消失,从而引起显著的忧虑或交际困难。机能减退的性欲障碍可能由长期关系中的厌倦或不幸福、抑郁、对酒精或精神活性药物的依赖、处方药物的副作用或激素缺乏引起。性快感缺乏包括性活动中快感较少或消失。性快感缺乏可能由抑郁、药物或人际因素引起。性唤起障碍可能由减少的雌激素、疾病或使用利尿药物、抗组胺剂、抗抑郁剂或抗高血压剂的治疗引起。性交困难和阴道痉挛是由插入所导致的疼痛表征的性交疼痛疾病,并且可能由例如减少润滑的药物、子宫内膜异位症、盆腔炎症性疾病、炎性肠病或尿道问题引起。

[0064] 2.0 临床适应症和效用。

[0065] 本文所公开的组合物和方法可用于医学应用和动物饲养或兽医应用。通常,方法用于人,但是也可用于其他哺乳动物。术语“患者”旨在表示哺乳动物个体,并且遍及说明书和权利要求书中如此使用。本发明的主要应用包括人患者,但是本发明可应用于实验室动物、农场动物、动物园动物、野生动物、宠物、运动动物(sport animal)或其他动物。

[0066] 本发明的肽、组合物和方法可用于治疗性功能障碍,包括雄性勃起机能障碍和雌性性功能障碍二者。在一个具体实施方案中,本发明的肽、组合物和方法用于雄性患者以增加勃起机能,包括但不限于增加勃起机能以便容许阴道交合。在另一具体实施方案中,本发明的肽、组合物和方法用于治疗雌性性功能障碍,包括但不限于唤起成功率、性欲成功率和唤起和性欲水平的增加。对于雌性性功能障碍,终点可以但不必须由大量被验证的

手段的任一种来确定,所述手段包括但不限于:雌性性压抑量表 (Female Sexual Distress Scale)、雌性性接触概况 (Female Sexual Encounter Profile)、雌性性功能指数和总体评估问卷。被治疗雌性性功能障碍的患者可以是绝经前的女性或绝经后的女性。

[0067] 3.0 某些适应症的组合治疗。

[0068] 本发明的肽、组合物和方法可以通过与一种或多种其他药物活性化合物组合施用来用于治疗任何上述疾病、适应症、病症或综合征或黑皮质素受体介导的任何疾病、适应症、病症或综合征。这种组合施用可以借助于单一剂型,所述单一剂型包括本发明的肽和一种或多种其他药物活性化合物二者,这种单一剂型包括片剂、胶囊、喷雾剂、吸入粉末、注射液体或类似物。可选择地,组合施用可以借助于两种不同剂型的施用,一种剂型含有本发明的肽并且另一种剂型包含另一药物活性化合物。在这种情况下,剂型可以是相同的或不同的。下文示例了可以采用的某些组合治疗,但不旨在限制组合治疗。

[0069] 3.1 性功能障碍的组合治疗。

[0070] 有可能并且思考了使用与用于治疗性功能障碍的其他药物或剂组合的本发明环肽。这些其他药物和剂可以包括诱导勃起活性的剂,包括磷酸二酯酶-5 (PDE-5) 抑制剂、睾酮、前列腺素以及类似物。在本发明的优选实施方案中,本发明的环肽与治疗有效量的环-GMP 特异性磷酸二酯酶抑制剂或 α -肾上腺素能受体拮抗剂组合使用。题目为“Multiple Agent Therapy for Sexual Dysfunction (性功能障碍的多药剂治疗)”的美国专利申请号美国专利好 7, 235, 625 的教导和公开内容如同完整描述一样通过引用并入本文。

[0071] 因此,本发明提供治疗性功能障碍的方法,所述方法包括给具有性功能障碍或具有性功能障碍风险的患者施用治疗有效量的本发明环肽与治疗有效量的第二性功能障碍药剂的组合的步骤。本发明的环肽可以在治疗有效量的第二性功能障碍药剂施用的同时、之前或之后施用。优选地,在施用治疗有效量的第二性功能障碍药剂的一小时内,优选小于半小时之内施用本发明的肽。然而,对于某些形式的组合治疗,诸如与治疗有效量的激素或激素相关性功能障碍药剂的组合,所述激素或激素相关的性功能障碍药剂可以独立的时间表施用,以便在本发明肽和所述激素和激素相关的性功能障碍药剂施用之间没有固定的或特定的时间关系。因此,当患者希望或需要时,例如,激素或激素相关的性功能障碍药剂可以每日一次或以其他剂量或借助于贴剂或其他连续施用方案与本发明肽的施用一起施用。

[0072] 因此,本发明提供治疗性功能障碍的方法,所述方法包括给具有性功能障碍或具有性功能障碍风险的患者施用治疗有效量的本发明环肽与可用于治疗性功能障碍的另一化合物的组合的步骤。在组合治疗的优选实施方案中,性功能障碍是雌性性功能障碍。在组合治疗的尤其优选的实施方案中,性功能障碍是勃起机能障碍。

[0073] 本发明还提供了包含本发明的环肽和可用于治疗性功能障碍的第二化合物的药物组合物。在组合物的实施方案中,可用于治疗性功能障碍的其他化合物优选选自但不限于由下列组成的组:磷酸二酯酶抑制剂;环-GMP-特异性磷酸二酯酶抑制剂;前列腺素;阿朴吗啡;催产素调节剂; α -肾上腺素能拮抗剂;雄激素;选择性雄激素受体调节剂 (SARM);安非他酮 (bupropion);血管活性肠肽 (VIP);中性内肽酶抑制剂 (NEP);和神经肽 Y 受体拮抗剂 (NPY)。

[0074] 在方法和组合物的实施方案中,第二性功能障碍药剂是睾酮。

[0075] 在组合治疗的另一实施方案中,第二性功能障碍药剂是 V 型磷酸二酯酶 (PDE-5) 抑制剂。例如,PDE-5 抑制剂可以是 **Viagra[®]**,昔多芬的商标;**Levitra[®]**,伐地那非一盐酸盐的商标;或**Cialis[®]**,他达拉非 (tadalafil) 的商标。其他 PDE-5 抑制剂公开于 2007 年 6 月 22 日授权的并且题目为“Multiple Agent Therapy for Sexual Dysfunction (性功能障碍的多药剂治疗)”的美国专利第 7,235,625 号中,通过引用并入本文。

[0076] 在上述组合物的另一实施方案中,可用于治疗性功能障碍的化合物是雌激素激动剂/拮抗剂。在一个实施方案中,雌激素激动剂/拮抗剂是 (-)-顺-6-苯基-5-[-4-(2-吡咯烷-1-基-乙氧基)-苯基]-5,6,7,8-四氢-萘-2-醇(还称为拉索昔芬)或其光学异构体或几何异构体;药学上可接受的盐、N-氧化物、酯、季铵盐;或其前药。更优选地,雌激素激动剂/拮抗剂是 D-酒石酸盐的形式。

[0077] 在上述组合物的又一实施方案中,雌激素激动剂/拮抗剂选自由下列组成的组:他莫昔芬、4-羟基他莫昔芬、雷洛昔芬、屈洛昔芬、托瑞米芬、森可曼 (centchroman)、碘昔芬、6-(4-羟基-苯基)-5-[4-(2-哌啶-1-基-乙氧基)-苄基]-萘-2-醇、{4-[2-(2-氮杂-二环[2.2.1]庚-2-基)-乙氧基]-苯基}-[6-羟基-2-(4-羟基-苯基)-苯并[b]噻吩-3-基]-甲酮、EM-652、EM-800、GW 5368、GW 7604、TSE-424 或其光学异构体或几何异构体;以及药学上可接受的盐、N-氧化物、酯、季铵盐;及其前药。

[0078] 在又一实施方案中,本发明的环肽可以与任何已知的机械辅助设备或装置组合使用。

[0079] 本发明还提供用于治疗性功能障碍(包括勃起机能障碍)的药盒,所述药盒包括:包含本发明的环肽的第一药物组合物;包含可用于治疗性功能障碍的第二化合物的第二药物组合物;以及用于第一组合物和第二组合物的容器。

[0080] 4.0 施用和使用方法。

[0081] 施用和使用的方法依据具体的本发明肽的特征、待治疗的疾病、适应症、病症或综合征、以及本领域中已知的其他因素而变化。一般地,本领域中已知的或以后开发的任何施用和使用方法可用于本发明的肽。不限制上文,下列施用和使用方法对指定的适应症具有特定应用。

[0082] 可以通过皮下注射施用包含一种或多种本发明的肽的组合物。在一个方面,将本发明的环肽与诸如聚乙二醇 3350 的聚乙二醇和任选的一种或多种另外的赋形剂和防腐剂一起配制以用于制剂的深肌内注射,例如在臀肌或三角肌中,所述赋形剂和防腐剂包括但不限于诸如盐、聚山梨酸酯 80、调节 pH 的氢氧化钠或盐酸以及类似物等赋形剂。在另一方面,本发明的环肽可以与聚(原酸酯)和任选的一种或多种另外的赋形剂一起配制,所述聚(原酸酯)可以是自催化的聚(原酸酯),在聚合物骨架中具有任何可变百分比的乳酸。在一个方面,采用聚(D,L-丙交酯-共-乙交酯)聚合物。一般地,大量注射的和生物蚀解的聚合物的任一种可用于持续释放注射制剂中,所述注射的和生物蚀解的聚合物优选还是粘性聚合物。可选择地,可以采用其他持续释放制剂,包括容许皮下注射的制剂,所述其他制剂可以包括下列的一种或多种:毫微球/微球(例如,包含 PLGA 聚合物的组合物)、脂质体、乳液(例如油包水乳液)、凝胶、可溶性盐或在油中的悬浮液。制剂可以是依据环肽的浓度和量、所采用材料的持续释放速率和本领域的那些技术人员已知的其他因素而需要每日一次、每周一次、每月一次或基于其他间隔而注射的制剂。

[0083] 包含一种或多种本发明的肽的组合物可以以诸如片剂或胶囊的单剂型口服施用。在一个方面,单剂型包括肠溶包衣和任选的一种或多种增加摄入的剂、降低蛋白酶降解的剂、增加细胞透性的剂以及类似物。

[0084] 对于性功能障碍,在优选的方面,本发明的一种或多种肽被配制为使得它可以根据需要在诸如预期的性活动之前约小于1小时、小于2小时或小于约4小时施用。在一个方面,将组合物配制为用于皮下注射。在另一方面,将组合物配制为用于多种经皮施用途径的任一种,包括含服施用、经鼻施用、吸入施用以及类似途径。在另一方面,将组合物配制为用于经鼻施用,例如借助于递送约20至约200 μ L体积的含水组合物的计量喷雾装置,所述含水组合物包含多种其他剂的任一种,包括透性增强剂。

[0085] 5.0 制备方法.

[0086] 一般地,可以通过固相合成来合成本发明的肽并根据本领域中已知的方法纯化。可以使用采用多种树脂和试剂的大量熟知程序的任一种来制备本发明的肽。

[0087] 可以通过用于形成氨基酸之间的肽键的已知常规程序来容易地合成本发明的环肽。这种常规程序包括:例如,容许在羧基和其他反应性基团被保护的氨基酸或其残基的游离 α 氨基与氨基或其他反应性基团被保护的另—氨基酸或其残基的游离 α 羧基之间进行缩合的任何液相程序。在优选的常规程序中,可以通过固相合成来合成本发明的环肽并根据本领域中已知的方法纯化。可以使用采用多种树脂和试剂的大量熟知程序的任一种来制备本发明的肽。

[0088] 合成环肽的方法可以通过其中将期望序列中的每个氨基酸一次一个连续添加至另一氨基酸或其残基的程序进行;或者通过其中具有首先常规合成具有期望的氨基酸序列的肽片段并然后缩合以提供期望的肽的程序。然后将所得肽环化以产生本发明的环肽。

[0089] 固相肽合成方法是在本领域中熟知的和实践的。在这种方法中,本发明的肽的合成可以根据固相方法的一般原则通过将期望的氨基酸残基一次一个顺序掺入到增长的肽链中来进行这些方法公开于大量参考文献中,包括 Merrifield, R. B., Solid phase synthesis (Nobel lecture) (固相合成(诺贝尔讲座)). Angew Chem 24:799-810(1985) 以及 Barany 等人, The Peptides, Analysis, Synthesis and Biology (肽、分析、合成和生物学), 第2卷, Gross, E. 和 Meienhofer, J., 编辑. Academic Press 1-284(1980)。

[0090] 在肽的化学合成中,用合适的保护基团保护多个氨基酸残基的反应性侧链基团,所述保护基团保护该位点不发生化学反应直到该保护基团被移除。还常见的是在实体在羧基处反应时保护氨基酸残基或片段的 α 氨基,随后选择性移除 α 氨基保护基团以容许在该位点发生后续反应。特异性保护基团已经被公开并且是固相合成方法和液相合成方法中已知的。

[0091] 可以用合适的保护基团保护 α 氨基,包括尿烷型保护基团,例如苄氧羰基(Z)和取代的苄氧羰基,如对-氯苄氧羰基(Z-Cl)、对-硝基苄氧羰基(X-NO₂)、对-溴苄氧羰基(Z-Br)、对-联苯基-异丙氧羰基、9-芴基甲氧羰基(Fmoc)和对-甲氧基苄氧羰基(Moz);以及脂肪族尿烷型保护基团,例如叔-丁氧羰基(Boc)、二异丙基甲氧羰基、异丙氧羰基和烯丙氧羰基(Alloc)。Fmoc 优选用于 α 氨基保护。

[0092] 可以用下列合适的保护基团保护胍基:例如,硝基、对-甲苯磺酰基(Tos)、Z、五甲基色烷磺酰基(Pmc)、金刚烷基氧基羰基、五甲基二氢苯并呋喃-5-磺酰基(Pbf)和Boc。

Pbf 和 Pmc 是 Arg 的优选保护基团。

[0093] 本文所述的本发明的肽是使用固相合成制备的,例如借助于 SymphonyMultiplex Peptide Synthesizer(Rainin Instrument Company) 自动化肽合成仪,使用如厂家提供的编程模块并根据厂家的手册中所描述的方案进行。

[0094] 固相合成是通过将被保护的 α 氨基偶联至合适的树脂上而从肽的 C- 末端开始的。如下制备这种起始材料:经由酯键将 α 氨基被保护的氨基酸附连到对苄氧基苄醇 (Wang) 树脂、2- 氯三苯甲基氯树脂或酞树脂上;通过 Fmoc- 连接物如对 -[(R, S)- α -[1-(9H- 氟- 烯-9- 基) 甲氧基甲酰胺基]-2,4- 二甲氧基苄基]-苯氧乙酸 (Rink 连接物) 与二苯甲胺 (BHA) 树脂之间的酰胺键;或者通过本领域中熟知的其他方法。Fmoc- 连接物-BHA 树脂载体是商购获得的并且一般在可行时使用。通过按需要顺序添加氨基酸的重复循环加载树脂。在碱性条件下移除 α 氨基 Fmoc 保护基团。在 N, N- 二甲基甲酰胺 (DMF) 中的哌啶、哌嗪、二乙胺或吗啉 (20-40% v/v) 可用于这种目的。

[0095] 在移除 α 氨基保护基团之后,以期望顺序逐步偶联后续的被保护的氨基酸以获得中间物保护的肽-树脂。在肽的固相合成中用于偶联氨基酸的激活试剂是本领域中熟知的。在肽合成后,如果期望,可以使用本领域中熟知的方法移除被正交保护的侧链保护基团以便进一步衍生肽。

[0096] 通常,正交保护基团在适当时使用。例如,本发明的肽含有多个具有含氨基侧链的氨基酸。在一个方面,Allyl-Alloc 保护方案用于通过氨基酸的侧链形成内酰胺桥接的氨基酸并且在不同的反应条件下可裂解的正交保护基团用于具有含氨基侧链的其他氨基酸。因此,例如 Fmoc-Lys(Alloc)-OH、Fmoc-Orn(Alloc)-OH、Fmoc-Dap(Alloc)-OH、Fmoc-Dab(Alloc)-OH、Fmoc-Asp(OAll)-OH 或 Fmoc-Glu(OAll)-OH 氨基酸可用于环化后形成内酰胺桥接的位置,而具有含氨基侧链的其他氨基酸具有不同的正交保护基团,例如具有 Fmoc-Arg(Pbf)-OH、Fmoc-Lys(Pbf)-OH、Fmoc-Dab(Pbf)-OH 或类似保护基团。可以类似地采用其他保护基团,例如但不限于:Mtt/OPp(4- 甲基三苯甲基/2- 苯基异丙基)可用于在环化后形成内酰胺桥接的侧链,正交保护基团用于不可以使用适于 Mtt/OPp 裂解的条件裂解的其他位置。

[0097] 可以在固相合成期间或在从树脂上移除之后选择性地修饰肽中的反应性基团。例如,可以在位于树脂上时修饰肽以获得 N- 末端修饰,如乙酰化,或者可以使用裂解剂从树脂上移除,然后修饰。类似地,用于修饰氨基酸侧链的方法是肽合成的领域中的那些技术人员所熟知的。对肽上所存在的反应性基团进行的修饰的选择将部分地由肽中所期望的特征所确定。

[0098] 在本发明的肽中,在一个优选的实施方案中,N- 末端基团是通过引入 N- 乙酰基而修饰的。在一个方面,采用如下的方法:其中在移除 N- 末端的保护基团之后,使树脂结合的肽在存在诸如二异丙基乙胺的有机碱的条件下与在二氯甲烷中的乙酸酐反应。N- 末端乙酰化的其他方法是本领域中已知的,包括液相乙酰化,并且可以采用这些方法。

[0099] 在一个实施方案中,可以在从肽树脂上裂解之前将肽环化。对于通过反应性侧链部分的环化,将期望的侧链脱保护,并将肽悬浮于合适的溶剂中并添加环化偶联剂。合适的溶剂包括:例如 DMF、二氯甲烷 (DCM) 或 1- 甲基-2- 吡咯酮 (NMP)。合适的环化偶联剂包括:例如,2-(1H- 苯并三唑-1- 基)-1,1,3,3- 四甲基四氟硼酸脲 (TBTU)、2-(1H- 苯并三

唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基六氟磷酸脲(HBTU)、苯并三唑-1-基-氧基-三(二甲氨基)六氟磷酸磷(BOP)、苯并三唑-1-基-氧基-三(吡咯烷)六氟磷酸磷(PyBOP)、2-(7-氮杂-1H-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基四氟硼酸脲(TATU)、2-(2-氧代-1(2H)-吡啶基)-1,1,3,3-四甲基四氟硼酸脲(TPTU)或N,N'-二环己基碳二亚胺/1-羟基苯并三唑(DCCI/HOBt)。偶联常规上是通过使用如下的合适的碱启动的,例如N,N-二异丙基乙胺(DIPEA)、对称-可力丁(sym-collidine)或N-甲基吗啉(NMM)。

[0100] 然后可以使用如下的任何合适试剂将环化的肽从固相上裂解:在DCM中的乙胺或诸如三氟乙酸(TFA)、三异丙基硅烷(TIS)、二甲氧基苯(DMB)、水以及类似物等剂的多种组合。干燥所得的粗肽并且若存在剩余的氨基酸侧链保护基团,则使用如下的任何合适的试剂将其裂解,例如(在存在水的条件下的TFA、TIS、2-巯基乙烷(2-mercaptopethane, ME)和/或1,2-乙烷二硫醇(EDT)。通过添加冷的醚沉淀终产物并且通过过滤收集。通过反相高效液相色谱(RP-HPLC)使用诸如C₁₈柱子的合适的柱子进行最终的纯化,或者还可以采用分离或纯化的其他方法,例如基于肽的大小或电荷的方法。纯化后,可以通过任何数目的方法表征肽,例如高效液相色谱(HPLC)、氨基酸分析、质谱以及类似方法。

[0101] 尽管主要参考固相Fmoc化学法描述了合成,但是应理解可以采用其他化学方法和合成方法来制备本发明的环肽,例如但不限于:采用Boc化学法、溶液化学法和其他的化学方法的方法和合成方法。

[0102] 6.0 制剂。

[0103] 包含一种或多种本发明的环肽的组合物的制剂可以依据期望的施用途径而变化。因此,制剂可以适于皮下注射、或静脉内注射、用于局部应用、用于眼部应用、用于鼻腔喷雾应用、用于吸入应用、用于其他经皮应用和类似应用。

[0104] 6.1 本发明的环肽的盐形式。

[0105] 本发明的环肽可以呈任何药学上可接受的盐的形式。术语“药学上可接受的盐”是指由药学上可接受的无毒性碱或酸制备的盐,所述药学上可接受的无毒性碱或酸包括无机碱或有机碱和无机酸或有机酸。由无机碱衍生的盐包括:铝盐、铵盐、钙盐、铜盐、铁盐、亚铁盐、锂盐、镁盐、锰盐、亚锰盐、钾盐、钠盐、锌盐以及类似盐。尤其优选的是:铵盐、钙盐、锂盐、镁盐、钾盐和钠盐。由药学上可接受的无机无毒性碱衍生的盐包括下列物质的盐:伯胺、仲胺和叔胺、包括天然存在的取代的胺的取代的胺、环状胺、和碱性离子交换树脂,如精氨酸、甜菜碱、咖啡因、胆碱、N,N'-二苄基乙二胺、二乙胺、2-二乙氨基乙醇、2-二甲氨基乙醇、乙醇胺、二乙胺、N-乙基-吗啉、N-乙基哌啶、葡糖胺(glucamine)、葡萄糖胺(glucosamine)、组氨酸、海巴明(hydrabamine)、异丙胺、赖氨酸、甲基葡萄糖胺、吗啉、哌嗪、哌啶、聚胺树脂、普鲁卡因、嘌呤、可可碱、三乙胺、三甲胺、三丙胺、氨基丁三醇以及类似物。

[0106] 当本发明的环肽是碱性的时,可以由药学上可接受的无毒性酸制备酸加成盐,所述无毒性酸包括无机酸和有机酸。这种酸包括:乙酸、苯磺酸、苯甲酸、樟脑磺酸、羧酸、柠檬酸、乙磺酸、甲酸、富马酸、葡糖酸、谷氨酸、氢溴酸、盐酸、羟乙磺酸、乳酸、马来酸、苹果酸、扁桃酸、甲磺酸、丙二酸、粘酸、硝酸、扑酸、泛酸、磷酸、丙酸、琥珀酸、硫酸、酒石酸、对甲苯磺酸、三氟乙酸以及类似酸。本发明的肽的酸加成盐是在合适的溶剂中由肽和过量的下列酸制备的:例如盐酸、氢溴酸、硫酸、磷酸、乙酸、三氟乙酸、柠檬酸、酒石酸、马来酸、琥珀酸

或甲磺酸。乙酸盐、乙酸铵和三氟乙酸盐形式是尤其有用的。在本发明的肽包含酸性部分时,合适的药学上可接受的盐可以包括碱金属盐,如钠盐或钾盐;或碱土金属盐,如钙盐或镁盐。

[0107] 6.2 药物组合物.

[0108] 本发明提供包含本发明的环肽和药学上可接受的载体的药物组合物。载体可以是液体制剂,并且优选是缓冲溶液、等渗溶液、含水溶液。如下文所描述的,药学上可接受的载体还包括诸如稀释剂、载体以及类似物的赋形剂;和诸如稳定剂、防腐剂、增溶剂、缓冲剂以及类似物的添加剂。

[0109] 如可能期望的,可以将本发明的环肽组合物配制或化合成包含至少一种本发明的环肽以及一种或多种药学上可接受的载体的药物组合物,所述药学上可接受的载体包括诸如稀释剂、载体以及类似物的赋形剂和诸如稳定剂、防腐剂、增溶剂、缓冲剂和类似物的添加剂。制剂的赋形剂可以包括聚乙烯吡咯酮、明胶、羟基纤维素、阿拉伯胶、聚乙二醇、甘露醇(manniton)、氯化钠和柠檬酸钠。对于注射或其他液体施用制剂,含至少一种或多种缓冲组分的水是优选的,并且还可以采用稳定剂、防腐剂和增溶剂。对于固体施用制剂,可以采用多种增稠性添加剂、填充添加剂、膨胀添加剂和载体添加剂的任一种,例如淀粉、糖、脂肪酸和类似物。对于局部施用制剂,可以采用多种乳剂、软膏、凝胶、洗剂以及类似形式的任一种。对于大多数药物制剂,按重量或体积计,非活性成分将组成制剂的较大部分。对于药物制剂,还构思了多种控释(measured-release)、缓释或延时释放(time-release)的任一种并且可以采用添加剂,以便可以配制计量以实现本发明的肽在一段时间内的递送。

[0110] 一般地,施用给患者的本发明的环肽的实际量将依据施用模式、使用的制剂以及期望的反应而在相当广泛的范围内变化。

[0111] 在具体应用中,可以根据常规的药物化合技术将本发明的环肽作为活性成分以混合物形式与药物载体组合。载体可以依据期望用于施用的制剂形式而采取多种形式,例如,口服、肠胃外(包括静脉内)、尿道、阴道、直肠、经鼻、含服、舌下或类似形式。在制备用于口服剂型的组合物中,可以采用任何常见的药物介质,诸如,水、二醇、油、醇、调味剂、防腐剂、着色剂以及在口服液体制剂如悬浮液、酏剂和溶液情况下的类似物;或载体,例如淀粉、糖、微晶纤维素、稀释剂、粒化剂、润滑剂、粘合剂、崩解剂以及在口服固体制剂如粉剂、硬胶囊和软胶囊以及片剂情况下的类似物。

[0112] 由于片剂和胶囊易于施用,所以它们代表了有利的口服剂量单元形式。如果需要,可以通过标准的含水或不含水技术包被片剂。在这种治疗上有用的组合物中活性肽的量是使得将获得有效剂量的量。在另一有利的剂量单元形式中,可以采用舌下构造,例如薄片、圆片、片剂或类似物。

[0113] 片剂、丸剂、胶囊以及类似形式还可以含有粘合剂,例如西黄蓍胶、阿拉伯胶、玉米淀粉或明胶;赋形剂,例如磷酸二钙;崩解剂,例如玉米淀粉、土豆淀粉或海藻酸;润滑剂,例如硬脂酸镁;以及甜味剂,例如蔗糖、乳糖或糖精。当剂量单元形式是胶囊时,除了上述类型的材料外它还可以含有液体载体,如脂肪油。

[0114] 可以采用多种其他材料作为包衣或用于改变剂量单元的物理形式。例如,可以用虫胶、糖或二者来包被片剂。除了活性成分外,糖浆或酏剂可以含有:作为甜味剂的蔗糖、作为防腐剂的羟苯甲酸甲酯和羟苯甲酸丙酯、染料和如樱桃味或橙味的调味剂。

[0115] 还可以肠胃外施用环肽。可以在水中与诸如羟丙基纤维素的表面活性剂适当混合而制备这些活性肽的溶液或悬浮液。还可以在甘油、液体聚乙二醇和它们在油中的混合物中制备分散液。这些制剂可以任选地含有防腐剂以防止微生物的生长。

[0116] 适于注射用途的药物形式包括无菌水溶液或分散液以及用于临时制备无菌注射溶液或分散液的无菌粉末。在所有情况下,形式必须是无菌的并且必须是流动的,流动的程度为可以通过注射器施用的程度。形式必须在制造和储存的条件下是稳定的,并且必须保存在抵抗诸如细菌和真菌等微生物的污染作用的条件下。载体可以是含有下列物质的溶剂或分散介质,例如水;乙醇;多元醇,例如甘油、丙二醇或液体聚乙二醇;他们的合适混合物以及植物油。

[0117] 可以借助于经鼻施用而治疗性地应用本发明的环肽。所谓“经鼻施用”意指任何本发明的环肽的鼻内施用的任何形式。肽可以在含水溶液中,例如包含盐水、柠檬酸盐或其他常见赋形剂或防腐剂的溶液。肽还可以呈干燥制剂或粉末制剂形式。

[0118] 本发明的环肽可以与增加药物的有效的经鼻吸收的多种剂的任一种一起配制,所述药物包括肽药物。这些剂应增加经鼻吸收而没有不可接受的粘膜损伤。美国专利第 5,693,608 号、第 5,977,070 号和第 5,908,825 号以及其他专利教导了可以采用的大量药物组合物,所述药物组合物包含吸收促进剂,并且上述专利和本文引用的所有参考文献和专利的每一个的教导均通过引用并入。

[0119] 如果是在含水溶液中,则可以借助于盐水、乙酸盐、磷酸盐、柠檬酸盐、乙酸盐或可以在任何生理上可接受的 pH 的其他缓冲剂适当地缓冲环肽,所述生理上可接受的 pH 一般为约 pH 4 至约 pH 7。还可以采用缓冲剂的组合,例如磷酸盐缓冲盐水、盐水和乙酸盐缓冲剂以及类似物。在盐水的情况下,可以采用 0.9% 盐水溶液。在乙酸盐、磷酸盐、柠檬酸盐以及类似物的情况下,可以采用 50mM 溶液。除了缓冲剂外,可以采用合适的防腐剂来防止或限制细菌和其他微生物生长。可以采用的一种此类防腐剂是 0.05% 苯扎氯铵。

[0120] 在替代性实施方案中,可以将本发明的环肽直接施用至肺中。可以借助于计量剂量吸入器来进行肺内施用,计量剂量吸入器是容许在吸气期间被患者启动时自我施用本发明肽的计量推注的装置。在这种实施方案的一个方面,环肽可以呈干燥的颗粒形式,例如在约 0.5 和 6.0 μm 之间的粒子,以便使粒子具有足以停留在肺表面并且不会被呼出的质量,但是还小得足以使它们不会在到达肺之前沉积在气道表面上。可以使用多种不同技术的任一种来制备干粉微粒,包括但不限于:微研磨、喷雾干燥和快速冷冻气雾剂然后冻干。经由微粒,可以将肽沉积到深肺,从而能够快速和有效地吸入到血流中。另外,经由这种方法,不需要渗透促进剂,渗透促进剂在经皮、经鼻或口服粘膜递送途径中有时是需要的。可以采用多种吸入器的任一种,包括基于推进剂的气雾剂、喷雾器、单剂量干粉吸入器和多剂量干粉吸入器。目前使用的常见装置包括计量剂量吸入器,它用于递送用于治疗哮喘、慢性阻塞性肺疾病以及类似疾病的药物。优选的装置包括被设计为形成粒度通常小于约 6.0 μm 的细粉的烟或气雾剂的干粉吸入器。

[0121] 可以借助于制备方法来控制微粒大小,包括平均大小分布。对于微研磨,研磨头的大小、转子的速度、加工时间以及类似参数控制微粒大小。对于喷雾干燥,喷嘴大小、流速、干燥器热度以及类似参数控制微粒大小。对于借助于快速冷冻气雾剂、然后冻干的制备,喷嘴大小、流速、气雾化溶液的浓度以及类似参数控制微粒大小。可以采用这些参数和其他参

数来控制微粒大小。

[0122] 本发明的环肽可以借助于注射来治疗性地施用,通常是延时释放注射制剂的深肌肉内注射,例如在臀肌或三角肌中。在一个实施方案中,本发明的环肽与诸如聚乙二醇 3350 的聚乙二醇和任选的一种或多种另外的赋形剂和防腐剂一起配制,所述赋形剂和防腐剂包括但不限于诸如盐、聚山梨酸酯 80、调节 pH 的氢氧化钠或盐酸以及类似物等赋形剂。在另一实施方案中,本发明的环肽可以与聚(原酸酯)和任选的一种或多种另外的赋形剂一起配制,所述聚(原酸酯)可以是自催化的聚(原酸酯),在聚合物骨架中具有任何可变百分比的乳酸。在一个实施方案,采用聚(D,L-丙交酯-共-乙交酯)聚合物。一般地,大量注射的和生物蚀解的聚合物的任一种可用于延时释放注射制剂中,所述注射的和生物蚀解的聚合物优选还是粘性聚合物。制剂可以是依据环肽的浓度和量、聚合物的生物侵蚀率以及本领域的那些技术人员已知的其他因素而需要每周一次、每月一次或基于其他间隔而注射的制剂。

[0123] 6.3 本发明的肽的口服制剂

[0124] 在一个方面,将本发明的环肽配制为用于口服递送。优选将肽配制和制备为使得其包装在肠道推进剂中,更优选使得其在片剂或胶囊经过胃并且任选进一步经过小肠的一部分之前不被释放。在这种应用的上下文中,应理解,术语肠道包衣或材料是指将基本上完整地通过胃但是在小肠中迅速崩解释放活性药物的包衣或材料。可以使用的一种肠道包衣溶液包含乙酸邻苯二甲酸纤维素和任选的其他成分,例如氢氧化铵、三醋汀、乙醇、亚甲蓝和纯化水。已经将乙酸邻苯二甲酸纤维素用于制药工业中以用于肠道包衣单剂型,例如片剂和胶囊,并且其在小于约 5.8 的 pH 下不溶于水。包含乙酸邻苯二甲酸纤维素的肠道包衣提供抵抗胃的酸性环境的保护,但是在十二指肠的环境(pH 为约 6-6.5)中开始溶解,并且在剂型到达回肠(pH 为约 7-8)之时完全溶解。除了乙酸邻苯二甲酸纤维素之外,其他肠道包衣材料是已知的并且可用于本发明的肽,包括但不限于琥珀酸羟丙基甲基乙基纤维素、邻苯二甲酸羟丙基甲基纤维素、聚乙酸乙烯邻苯二甲酸酯和甲基丙烯酸-甲基丙烯酸甲酯共聚物。所采用的肠道包衣促进剂型主要在胃外的部位溶解,并且可以选择其使得肠道包衣在约至少 6.0 的 pH 下溶解,更优选在约 6.0 至约 8.0 的 pH 下溶解。在一个优选的方面,肠道包衣在接近回肠处溶解并分解。

[0125] 可以采用多种渗透促进剂的任一种来增加肠道包衣溶解后肠中的摄入。在一个方面,渗透促进剂增加细胞旁或跨细胞运输系统。细胞旁运输的增加是通过打开细胞的紧密连接达到的;跨细胞运输的增加可能是通过增加细胞膜的流动性达到的。这种渗透促进剂的代表性非限制实例包括钙螯合剂、胆汁盐(例如胆酸钠)和脂肪酸。本发明的肽可以为在肠道包衣胶囊中包含脂肪酸以增加细胞旁运输的肠道包衣单剂型,所述脂肪酸例如油酸盐、棕榈酸盐、硬脂酸盐、癸酸钠或共轭亚油酸。

[0126] 在一个方面,诸如片剂或胶囊的单剂型任选还包含已知的常见大小和量的下列物质:诸如聚维酮的常见药物粘合剂、稀释剂、助流剂、诸如微晶纤维素的填充剂、诸如硬脂酸镁的润滑剂、诸如交联羧甲基纤维素钠的崩解剂、防腐剂、着色剂以及类似物。在一些实施方案中,进一步添加充当肠蛋白酶底物的肽或多肽。

[0127] 6.4 施用途径.

[0128] 如果包含本发明的一种或多种环肽的组合物是通过注射施用的,则注射可以是静

脉内的、皮下的、肌内的、腹膜内的或本领域中已知的其他方式。本发明的肽可以通过本领域中已知的任何方式配制,包括但不限于如下制剂:片剂、胶囊、锭剂、悬浮剂、粉剂、冻干制剂、栓剂、滴眼液、皮肤贴剂、口服可溶性制剂、喷雾、气雾剂以及类似制剂,并且本发明的肽可以与缓冲剂、粘合剂、赋形剂、稳定剂、抗氧化剂和本领域中已知的其他剂一起混合和配制。一般地,可以采用跨细胞的表皮层将本发明的肽引入的任何施用途径。因此施用方式可以包括通过粘膜的施用、含服施用、口服施用、皮肤施用、吸入施用、经鼻施用、尿道施用、阴道施用、直肠施用以及类似方式。

[0129] 6.5 治疗有效量。

[0130] 一般地,施用给患者的本发明的环肽的实际量将依据施用模式、使用的制剂以及期望的反应而在相当广泛的范围内变化。通过上述方式的任一种或本领域中已知的任何其他方式施用足以带来期望的治疗效果的量的用于治疗剂量。因此,治疗有效量包括足以治疗性地减轻患者的性功能障碍或预防或延缓性功能障碍的发病或复发的本发明肽或药物组合物的量。

[0131] 一般地,本发明的环肽是高活性的。例如,环肽可以依据所选择的具体肽、期望的治疗反应、施用途径、制剂和本领域中的那些技术人员已知的其他因素而以约 0.1、0.5、1、5、50、100、500、1000 或 5000 $\mu\text{g/kg}$ 体重施用。

[0132] 7.0 在本发明的肽的评定中所采用的测试和测定。

[0133] 可以通过测定结合、功能状态和功效的多种测定系统和动物模型来测试本发明的黑皮质素受体特异性环肽。

[0134] 7.1 使用 $[I^{125}]$ -NDP- α -MSH 的竞争性抑制测定。

[0135] 竞争性抑制结合测定使用由表达重组的 hMC4-R、hMC3-R 或 hMC5-R 的 HEK-293 细胞制备的膜匀浆和由 B-16 小鼠黑素瘤细胞(含有内源 MC1-R)制备的膜匀浆进行。在一些情况下,采用表达重组 hMC1-R 的 HEK-293 细胞。在下面的实例中,所有的 MC3-R、MC4-R 和 MC5-R 值均是人重组受体的值。MC1-R 值是 B-16 小鼠黑素瘤细胞的值,除非标题是“hMC1-R”,在这种情况下该值是人重组 MC1-R 的值。在预涂覆 0.5% 牛血清白蛋白(Fraction V)的 96 孔 GF/B Millipore multiscreen 滤板(MAFBNOB10)中进行测定。用在缓冲液中的 0.2nM(对于 hMC4-R)、0.4nM(对于 MC3-R 和 MC5-R)或 0.1nM(对于小鼠 B16 MC1-R 或 hMC1-R) $[I^{125}]$ -NDP- α -MSH(Perkin Elmer)和递增浓度的本发明环肽孵育膜匀浆,所述缓冲液含有具有 100mM NaCl、2mM CaCl_2 、2mM MgCl_2 、0.3mM 1,10-菲咯啉和 0.2% 牛血清白蛋白的 25mM HEPES 缓冲液(pH 7.5)。在 37°C 孵育 60 分钟后,过滤测定混合物并用冰冷的缓冲液洗涤膜三次。干燥滤器并在伽玛计数器中计数结合的放射活性。通过在存在 1 μM NDP- α -MSH 的情况下 $[I^{125}]$ -NDP- α -MSH 结合的抑制来测量非特异性结合。最大的特异性结合(100%)定义为在不存在和存在 1 μM NDP- α -MSH 的情况下与细胞膜结合的放射活性(cpm)之差。将在存在测试化合物的条件下获得的放射活性(cpm)相对于 100% 特异性结合标准化以测定 $[I^{125}]$ -NDP- α -MSH 结合的百分比抑制。一式三份进行各测定并且记述实际的平均值,小于 0% 的结果报道为 0%。使用 Graph-Pad Prism® 曲线拟合软件测定本发明的环肽的 K_i 值。本文报道的与 hMC1-R 和 hMC4-R 结合的数据采用了 $[I^{125}]$ -NDP- α -MSH, 与 hMC3-R 结合的一些数据也如此。

[0136] 7.2 使用 Eu-NDP- α -MSH 的竞争性结合测定。

[0137] 可选择地,采用 Eu-NDP- α -MSH(PerkinElmer Life Sciences 目录号 AD0225)通过镧系螯合物的时间分辨荧光法 (TRF) 测定来进行竞争性抑制结合测定。在与 [I^{125}]-NDP- α -MSH 的比较研究中,获得了在实验误差范围内的百分比抑制和 k_i 相同值。通常,测定 K_i 值的竞争实验通过用在含有下列物质的溶液中的 9 种不同浓度的本发明环肽和 1nM Eu-NDP- α -MSH 孵育由 HEK-293 细胞制备的膜匀浆而进行:具有 100mM NaCl、2mM $CaCl_2$ 、2mM $MgCl_2$ 、0.1% BSA 和 0.3 mM 1,10-菲咯啉的 25mM HEPES 缓冲液。在 37°C 孵育 90 分钟滞后,通过经由 AcroWell 96 孔滤板 (Pall LifeSciences) 的过滤终止反应。用 200 μ L 冰冷的磷酸盐缓冲盐水洗涤滤板 4 次。添加 DELFIA 增强液 (PerkinElmer Life Sciences) 至各孔。将板在振荡器上孵育 15 分钟并在 340nm 激发波长和 615nm 发射波长下读数。一式两份进行每个测定并采用平均值。通过用 Graph-Pad Prism® 软件使用单点定斜率竞争结合模型测定 k_i 值。本文所报道的关于与 hMC5-R 结合的数据和关于 hMC3-R 和 hMC4-R 的一些数据采用了 Eu-NDP- α -MSH。

[0138] 7.3 使用 [I^{125}]-AgRP (83-132) 的竞争性结合测定。

[0139] 使用 [I^{125}]-AgRP (83-132) 的竞争性结合研究使用自表达 hMC4-R 的细胞分离的膜匀浆进行。在预涂覆 0.5% 牛血清白蛋白 (Fraction V) 的 96 孔 GF/B Millipore multiscreen 滤板 (MAFB NOB10) 中进行测定。测定混合物含有具有下列物质的 25mM HEPES 缓冲液 (pH 7.5): 100mM NaCl、2mM $CaCl_2$ 、2mM $MgCl_2$ 、0.3mM 1,10-菲咯啉、0.5% 牛血清白蛋白、膜匀浆、放射性配体 [I^{125}]-AgRP (83-132) (Perkin Elmer) 和总体积为 200 μ L 的递增浓度的本发明肽。在 0.2nM 的放射性配体浓度下测量结合。在 37°C 孵育 1 小时后,过滤反应混合物并用含有 500mM NaCl 的测定缓冲液洗涤。从板上冲压出干燥的圆片并在伽玛计数仪上计数。总的放射性配体结合不超过添加至反应混合物中的总数的 10%。使用 Graph-Pad Prism® 曲线拟合软件测定本发明的环肽的 K_i 值。

[0140] 7.4 激动剂活性的测定。

[0141] 检测细胞内 cAMP 的积累,将其作为本发明的环肽引发表达 MC4-R 的 HEK-293 细胞中的功能反应的能力的量度。通过在不含酶的细胞解离缓冲液中孵育而使表达重组 hMC4-R 的汇合的 HEK-293 细胞从培养板脱离。将分散的细胞悬浮在含有下列物质的 Earle's 平衡盐溶液中: 10mM HEPES (pH 7.5)、1mM $MgCl_2$ 、1mM 谷氨酰胺、0.5% 白蛋白和 0.3mM 3-异丁基-1-甲基-黄嘌呤 (IBMX)、磷酸二酯酶抑制剂。将细胞以 0.5×10^5 个细胞/孔的密度在 96 孔板中铺板并预孵育 30 分钟。在 37°C 下将细胞暴露于本发明的测试环肽中,所述环肽以 200 μ L 的总测定体积,0.05-5000nM 的浓度范围溶解在 DMSO 中 (DMSO 终浓度为 1%)。使用 NDP- α -MSH 作为参考激动剂。在孵育阶段结束时,通过添加 50 μ L 裂解缓冲液 (cAMP EIA 试剂盒, Amersham) 然后剧烈吸打来破坏细胞。使用 cAMP EIA 试剂盒 (Amersham) 测定裂解物中 cAMP 的水平。通过用 Graph-Pad Prism® 软件的非线性回归分析进行数据分析。将本发明环肽的最大功效与参考黑皮质素激动剂 NDP- α -MSH 所达成的最大功效进行比较。

[0142] 7.5 食物摄入和体重改变。

[0143] 对于通过静脉内 (IV) 或皮下注射途径施用的选择的肽进行了食物摄入和体重改变的评定。雄性 SD (Sprague-Dawley) 大鼠自 Hilltop Lab Animals, Inc. (Scottsdale, PA) 或其他卖主获得。将动物分别圈养在常规的聚苯乙烯吊笼中并保持受控的 12 小时开/关光周期。随意提供水和丸状食物。向大鼠静脉内给药媒介物或选择的肽 (0.3 至 1.0mg/

kg),或皮下给药媒介物或选择的肽(最多 30mg/kg 的剂量)。在给药后 24 小时的时间内测定体重和食物摄入的改变。还测量了给药后 48 小时和 72 小时的时间内的体重和食物摄入改变,以测定出体重和食物摄入改变的影响回复至基线水平的逆转。

[0144] 7.6 阴茎勃起的诱导。

[0145] 用选择的肽评定了本发明的肽诱导雄性大鼠阴茎勃起(PE)的能力。在具有随意的食物和水的条件下,将重量为 250-300g 的雄性 SD 大鼠保持在 12 小时开/关光周期中。所有的行为研究均在上午 9 点至下午 4 点之间进行。经由静脉内途径给 6-8 只大鼠的小组施用多种剂量。处理后,立即将大鼠放置在单独的聚苯乙烯笼(27cm 长,16cm 宽且 25cm 高)中进行行为观察,通常通过远程录像监测。观察大鼠 1 小时,以 10 分钟仓(bin)记录打哈欠次数、理毛行为发作次数和 PE 次数。

[0146] 8.0 本发明的肽

[0147] 式(I)中所涵盖的环肽含有一个或多个不对称元素,例如立体中心、立体轴以及类似物,以便使式(I)中所涵盖的肽可以以不同的立体异构形式存在。对于包括式(I)中涵盖的肽在内的具体的肽和一般性描述的肽,在所有的手性中心或其他异构中心的所有异构体形式都旨在涵盖在本文中,所述异构体形式包括对映体和非对映体。本发明的肽每种包含多个手性中心,并且除了对映纯的制剂的本发明肽的使用外,还可以作为外消旋混合物或富对映体混合物使用。通常,使用诸如指定的 L-氨基酸或 D-氨基酸的手性纯的试剂采用使得能保持异构体纯度的试剂、条件和方法来合成本发明的肽,但是还可能且构思的是可以制备外消旋混合物。任选地可以使用熟知的技术来分离这种外消旋混合物,并且可以单独地使用各对映体。在其中肽可以以互变异构形式存在的情况和温度、溶剂和 pH 具体条件下,各互变异构形式无论呈平衡形式还是主要呈一种形式都被构思为包括在本发明中。因此光学活性形式的式(I)肽的单个对映体可以通过不对称合成、由光学上纯的前体合成或通过外消旋体拆分获得。

[0148] 式(II)肽是式(I)肽的具体立体异构形式,但本发明不应被理解为局限于(II)所涵盖的立体异构形式。

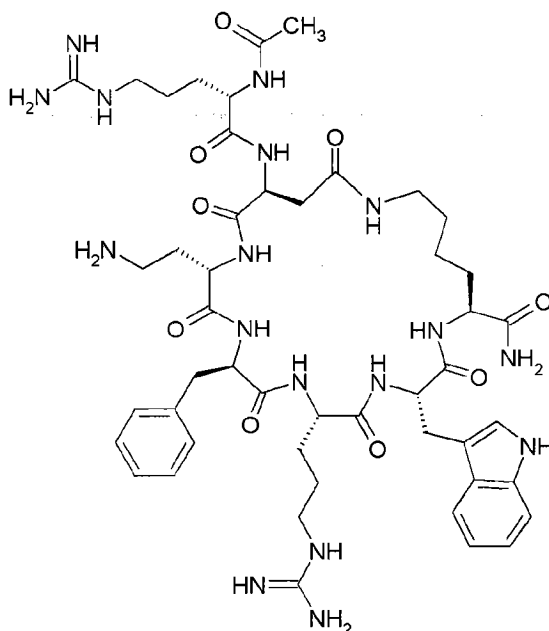
[0149] 本发明还旨在包括本发明肽的前药,所述前药在施用后通过代谢过程进行化学转化,然后变为活性的药理肽。一般地,这种前药是本发明肽的功能衍生物,它在体内易于转化为式(I)的肽。前药是在体内释放活性的式(I)母体肽药物的任何共价键合的化合物。用于选择和制备合适的前药衍生物的常规程序描述于例如"Design of Prodrugs(前药设计)",编辑 H. Bundgaard, Elsevier, 1985 中。前药的典型实例在官能部分具有生物学不稳定的保护基团,例如通过羟基、羧基或氨基官能团的酯化。因此例如但不限于,前药包括其中采用酯前药形式的式(I)肽,诸如,式(I)的 R 基团的低级烷基酯,例如其中 R 是 -OH,所述低级烷基酯在烷基中可以包括 1-8 个碳;或者在芳烷基中具有 6-12 个碳的芳烷基酯。泛泛地说,前药包括可以在体内被氧化、还原、胺化、脱氨化、羟化、脱羟基化、水解、脱水、烷化、脱烷基化、酰化、脱酰化、磷酸化、脱磷酸化而产生式(I)的活性母体肽药物的化合物。

[0150] 本发明还包括与式(I)中所描述的肽相同,但是情况如下的肽:式(I)中描绘的一个或多个原子被原子质量或质量数与天然常见的原子质量或质量数不同的原子取代。可以掺入本发明的化合物中的同位素的实例包括氢、碳、氮和氧的同位素,例如分别为 ^2H 、 ^3H 、 ^{13}C 、 ^{14}C 、 ^{15}N 、 ^{18}O 和 ^{17}O 。含有上述同位素和/或其他原子的其他同位素的本发明肽和所述化合

物的药学上可接受的盐或溶剂合物在本发明的范围内。某些同位素标记的本发明化合物，例如掺入了诸如 ^3H 和 ^{14}C 的放射活性同位素的那些化合物，可能在多种测定中 useful，例如药物和 / 或基底组织分布测定。较重的同位素的取代，例如用氘 (^2H) 取代一个或多个氢原子，可以在某些情况下提供药理优点，包括增加的代谢稳定性。同位素标记的式 (I) 肽一般可以通过用同位素标记的试剂取代非同位素标记的试剂来制备。

[0151] 8.1 合成下列结构的肽：

[0152]



[0153] 此肽具有氨基酸序列 Ac-Arg-环 (Asp-Dab-D-Phe-Arg-Trp-Lys)-NH₂。实施例 8.1 的环肽是作为乙酸盐 (AcOH) 和三氟乙酸 (TFA) 盐形式制备的。实施例 8.1 的环肽具有分子式 C₄₈H₇₁N₁₇O₉，并且具有 1030.19 的计算分子量。乙酸盐形式的实施例 8.1 环肽的分子量为 1210.34，并且 TFA 盐形式的分子量是 1372.25。

[0154] 在使用 NDP- α -MSH 的竞争性研究中评定了实施例 8.1 的环肽对 MC1-R、MC3-R、MC4-R 和 MC5-R 的结合，并且发现其对 MC4-R 是选择性的，对 MC4-R 的 K_i 值为 4.0nM (4 次研究的平均值)，对 MC1-R 的 K_i 值为 9nM (5 次研究的平均值)，对 MC3-R 的 K_i 值为 150nM (2 次研究的平均值) 并且对 MC5-R 的 K_i 值为 2270nM (2 次研究的平均值)。在功能研究中，测得实施例 8.1 的环肽是 MC4-R 的激动剂，对 MC4-R 的内在活性为 91%，其中 NDP- α -MSH 是 100%，并且 EC₅₀ 是 0.3nM (5 次研究的平均值)。

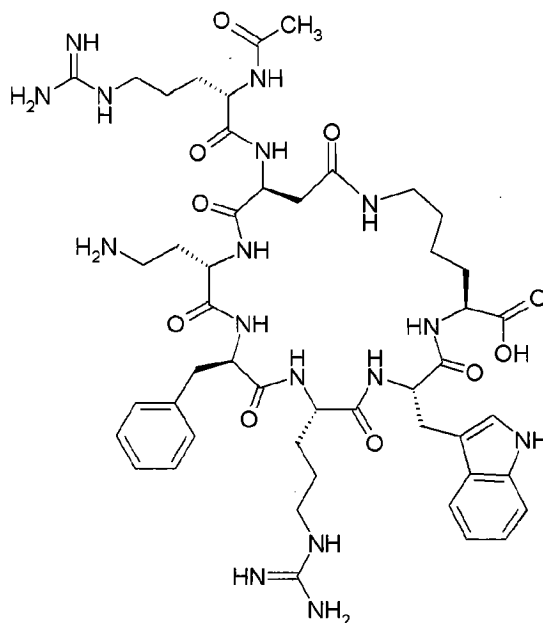
[0155] 在大鼠阴茎勃起研究中，使用布美诺肽 (bremelanotide) (式 Ac-Nle-环 (Asp-His-D-Phe-Arg-Trp-Lys)-OH) 的非特异性 MC4-R 激动剂) 作为阳性对照，发现与媒介物对照相比实施例 8.1 的环肽在大鼠模型中导致观察到的自发勃起统计学上显著地增加。通过皮下途径仅施用媒介物导致了 1 小时内每只大鼠平均 0.429 $\pm$ 0.202 的自发勃起 (n = 7)，而皮下施用剂量为 0.3mg/kg 的实施例 8.1 的环肽导致了 1 小时内每只大鼠平均 2.286 $\pm$ 0.286 的自发勃起 (n = 7) 并且剂量为 1.0mg/kg 时导致 1 小时内每只大鼠平均 4.571 $\pm$ 1.088 的自发勃起 (n = 7)。以 1mg/kg 的剂量静脉内施用阳性对照布美诺肽导致了 1 小时内每只大鼠平均 4 $\pm$ 0.535 的自发勃起 (n = 7)。

[0156] 令人吃惊地和有利地，发现在使用通过遥测监测的手术植入的压力传感器的收缩

压大鼠模型中,实施例 8.1 的环肽导致了与在阴茎勃起研究中产生相当结果的剂量的布美诺肽相比较少的收缩压增加。图 1 显示了交叉研究的结果,该研究使用 8 只植入了传感器的动物,所述动物通过皮下注射接受剂量为 $0.84 \mu\text{mol/kg}$ 和 $3.0 \mu\text{mol/kg}$ 的实施例 8.1 的环肽和静脉内注射的剂量为 $1 \mu\text{mol/kg}$ 的布美诺肽,其中在相伴的研究中,相同剂量和施用途径的每只大鼠每小时的阴茎勃起显示与 $1 \mu\text{mol/kg}$ 的布美诺肽相比 $3.0 \mu\text{mol/kg}$ 的实施例 8.1 的环肽具有相同或更高的阴茎勃起结果。在包括通过相同施用途径的相同量的实施例 8.1 的环肽和布美诺肽的比较的其他研究中,获得了基本上类似的结果。

[0157] 8.2 合成下列结构的肽:

[0158]

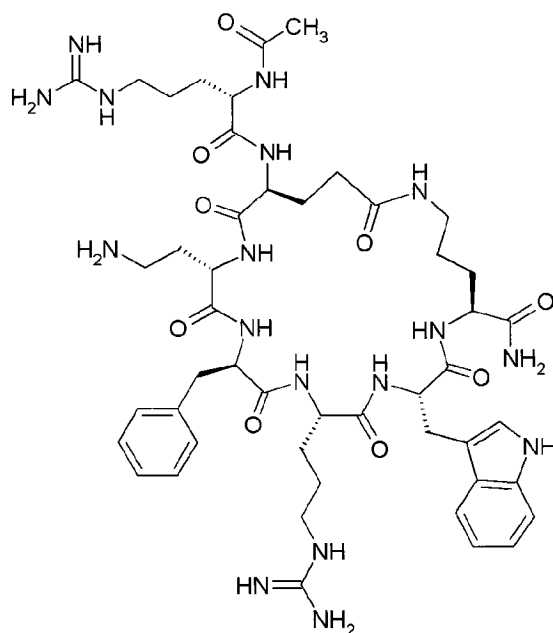


[0159] 此肽具有氨基酸序列 Ac-Arg-环 (Asp-Dab-D-Phe-Arg-Trp-Lys)-OH。实施例 8.2 的环肽是作为 TFA 盐形式制备的。实施例 8.2 的环肽具有分子式 $\text{C}_{48}\text{H}_{70}\text{N}_{16}\text{O}_{10}$, 并且具有 1031.17 的计算分子量。TFA 盐形式的实施例 8.2 的环肽的分子量为 1373.23。

[0160] 在使用 NDP- α -MSH 的竞争性研究中评定了实施例 8.2 的环肽对 MC1-R、MC3-R、MC4-R 和 MC5-R 的结合, 并且发现其对 MC4-R 是选择性的, 对 MC4-R 的 K_i 值为 57nM (2 次研究的平均值), 对 MC1-R 的 K_i 值为 234nM (3 次研究的平均值), 对 MC3-R 的 K_i 值为 5804nM (2 次研究的平均值) 并且对 MC5-R 的 K_i 值超过 10,000nM (2 次研究的平均值)。在功能研究中, 测得实施例 8.1 的环肽是 MC4-R 的激动剂, 对 MC4-R 的内在活性为 91%, 其中 NDP- α -MSH 是 100%, 并且 EC_{50} 是 4nM (4 次研究的平均值)。

[0161] 8.3 合成下列结构的肽:

[0162]

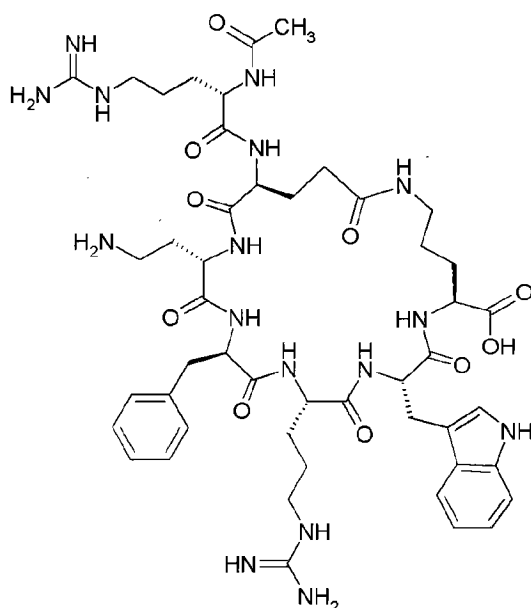


[0163] 此肽具有氨基酸序列 Ac-Arg- 环 (Glu-Dab-D-Phe-Arg-Trp-Orn)-NH₂。实施例 8.3 的环肽是作为 TFA 盐形式制备的。实施例 8.3 的环肽具有分子式 C₄₈H₇₁N₁₇O₉, 并且具有 1030.19 的计算分子量。TFA 盐形式的实施例 8.3 的环肽的分子量为 1372.25。

[0164] 在使用 NDP- α -MSH 的竞争性研究中评定了实施例 8.3 的环肽对 MC1-R、MC3-R、MC4-R 和 MC5-R 的结合, 并且发现其对 MC4-R 的 K_i 值为 0.65nM(2 次研究的平均值), 对 MC1-R 的 K_i 值为 1nM(3 次研究的平均值), 对 MC3-R 的 K_i 值为 74nM(2 次研究的平均值) 并且对 MC5-R 的 K_i 值为 300nM(2 次研究的平均值)。在功能研究中, 测得实施例 8.3 的环肽是 MC4-R 的激动剂, 对 MC4-R 的内在活性为 94%, 其中 NDP- α -MSH 是 100%, 并且 EC₅₀ 是 0.3nM(5 次研究的平均值)。

[0165] 8.4 合成下列结构的肽:

[0166]



[0167] 此肽具有氨基酸序列 Ac-Arg- 环 (Glu-Dab-D-Phe-Arg-Trp-Orn)-OH。实施例 8.4 的环肽是作为乙酸盐和 TFA 盐形式制备的。实施例 8.4 的环肽具有分子式 C₄₈H₇₀N₁₆O₁₀, 并且

具有 1031.17 的计算分子量。乙酸盐形式的实施例 8.4 环肽的分子量为 1211.32, 并且 TFA 盐形式的分子量是 1373.23。

[0168] 在使用 NDP- α -MSH 的竞争性研究中评定了实施例 8.4 的环肽对 MC1-R、MC3-R、MC4-R 和 MC5-R 的结合, 并且发现其对 MC4-R 的 K_i 值为 8nM(2 次研究的平均值), 对 MC1-R 的 K_i 值为 4nM(1 次研究), 对 MC3-R 的 K_i 值为 410nM(1 次研究) 并且对 MC5-R 的 K_i 值为 2366nM(2 次研究的平均值)。在功能研究中, 测得实施例 8.4 的环肽是 MC4-R 的激动剂, 对 MC4-R 的内在活性为 91%, 其中 NDP- α -MSH 是 100%, 并且 EC_{50} 是 3nM(9 次研究的平均值)。

[0169] 在大鼠阴茎勃起研究中, 使用布美诺肽为阳性对照, 发现与媒介物对照相比实施例 8.4 的环肽在大鼠模型中导致观察到的自发勃起统计学上显著地增加。通过皮下途径仅施用媒介物导致了 1 小时内每只大鼠平均 0.429 ± 0.202 的自发勃起 ($n = 7$), 而皮下施用剂量为 0.3mg/kg 的实施例 8.4 的环肽导致了 1 小时内每只大鼠平均 2.571 ± 0.685 的自发勃起 ($n = 7$) 并且剂量为 1.0mg/kg 时导致 1 小时内每只大鼠平均 5.286 ± 0.918 的自发勃起 ($n = 7$)。以 1mg/kg 的剂量静脉内施用布美诺肽的阳性对照导致了 1 小时内每只大鼠平均 4 ± 0.535 的自发勃起 ($n = 7$)。

[0170] 令人吃惊地和有利地, 发现在使用通过遥测监测的手术植入的压力传感器的收缩压大鼠模型中, 实施例 8.4 的环肽导致了与在阴茎勃起研究中产生相当结果的剂量的布美诺肽相比较少的收缩压增加。图 2 显示了交叉研究的结果, 该研究使用 8 只植入了传感器的动物, 所述动物通过皮下注射接受剂量为 1mg/kg 的实施例 8.4 的环肽和静脉内注射的剂量为 1mg/kg 的布美诺肽, 其中在相伴的研究中, 相同剂量和施用途径的每只大鼠每小时的阴茎勃起显示出与 1mg/kg 的布美诺肽相比 1mg/kg 的实施例 8.4 的环肽具有相同或更高的阴茎勃起结果。在包括相同施用途径的相同量的实施例 8.4 的环肽和布美诺肽的比较的其他研究中, 获得了基本上类似的结果。

[0171] 尽管具体参考这些优选的实施方案详细描述了本发明, 但是其他实施方案可以达到相同的结果。本发明的改变和修改对于本领域的那些技术人员来说是明显的并且本发明旨在涵盖所有这些修改和等同物。上文所引用的所有参考文献、申请、专利和公布的整个公开内容均通过引用并入本文。

[0001]

序列表

<110> 帕拉丁科技公司
施亦群
舒布赫·D·夏尔马
杨炜
新·陈

<120> 用于治疗性功能障碍的黑皮质素受体特异性肽

<130> 0906-097

<150> 61/059, 910
<151> 2008-06-09

<160> 9

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 由人 NDP- α -MSH 衍生的合成的黑皮质素结合肽

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1).. (1)
<223> 乙酰化

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1).. (1)
<223> Nle

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2).. (7)
<223> 环肽内酰胺键

<220>

[0002]

<221> MISC_FEATURE

<222> (4).. (4)

<223> D-Phe

<220>

<221> MOD_RES

<222> (7).. (7)

<223> 酰胺化

<400> 1

Xaa Asp His Xaa Arg Trp Lys

1 5

<210> 2

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 由人 NDP- α -MSH 衍生的合成的黑皮质素结合肽

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1).. (1)

<223> 乙酰化

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1).. (1)

<223> Nle

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2).. (7)

<223> 环肽内酰胺键

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (4).. (4)

<223> D-Phe

[0003]

<400> 2

Xaa Asp His Xaa Arg Trp Lys

1

5

<210> 3

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 由 α -MSH 衍生的合成的黑皮质素受体结合核心序列

<400> 3

His Phe Arg Trp

1

<210> 4

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 本发明的合成的黑皮质素受体结合肽

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1).. (1)

<223> 乙酰化

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2).. (7)

<223> 环肽内酰胺键

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (3).. (3)

<223> Dab

[0004]

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> D-Phe

<220>

<221> MOD_RES

<222> (7)..(7)

<223> 酰胺化

<400> 4

Arg Asp Xaa Xaa Arg Trp Lys

1

5

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 本发明的合成的黑皮质素受体结合肽

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> 乙酰化

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(7)

<223> 环肽内酰胺键

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> Dab

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> D-Phe

[0005]

<400> 5

Arg Asp Xaa Xaa Arg Trp Lys
1 5

<210> 6

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 本发明的合成的黑皮质素受体结合肽

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1).. (1)

<223> 乙酰化

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2).. (7)

<223> 环肽内酰胺键

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (3).. (3)

<223> Dab

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (4).. (4)

<223> D-Phe

<220>

<221> MOD_RES

<222> (7).. (7)

<223> Orn

<220>

<221> MOD_RES

<222> (7).. (7)

[0006]

<223> 酰胺化

<400> 6

Arg Glu Xaa Xaa Arg Trp Xaa
1 5

<210> 7

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 本发明的合成的黑皮质素受体结合肽

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1).. (1)

<223> 乙酰化

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2).. (7)

<223> 环肽内酰胺键

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (3).. (3)

<223> Dab

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (4).. (4)

<223> D-Phe

<220>

<221> MOD_RES

<222> (7).. (7)

<223> Orn

<400> 7

[0007]

Arg Glu Xaa Xaa Arg Trp Xaa
1 5

<210> 8
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 由人 α -MSH 衍生的合成的黑皮质素结合序列

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> 乙酰化

<220>
<221> MOD_RES
<222> (13)..(13)
<223> 酰胺化

<400> 8

Ser Tyr Ser Met Glu His Phe Arg Trp Gly Lys Pro Val
1 5 10

<210> 9
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 由人 NDP- α -MSH 衍生的合成的黑皮质素结合序列

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> 乙酰化

<220>

[0008]

<221> MOD_RES
<222> (4).. (4)
<223> Nle

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7).. (7)
<223> D-Phe

<220>
<221> MOD_RES
<222> (13).. (13)
<223> 酰胺化

<400> 9

Ser Tyr Ser Xaa Glu His Xaa Arg Trp Gly Lys Pro Val
1 5 10

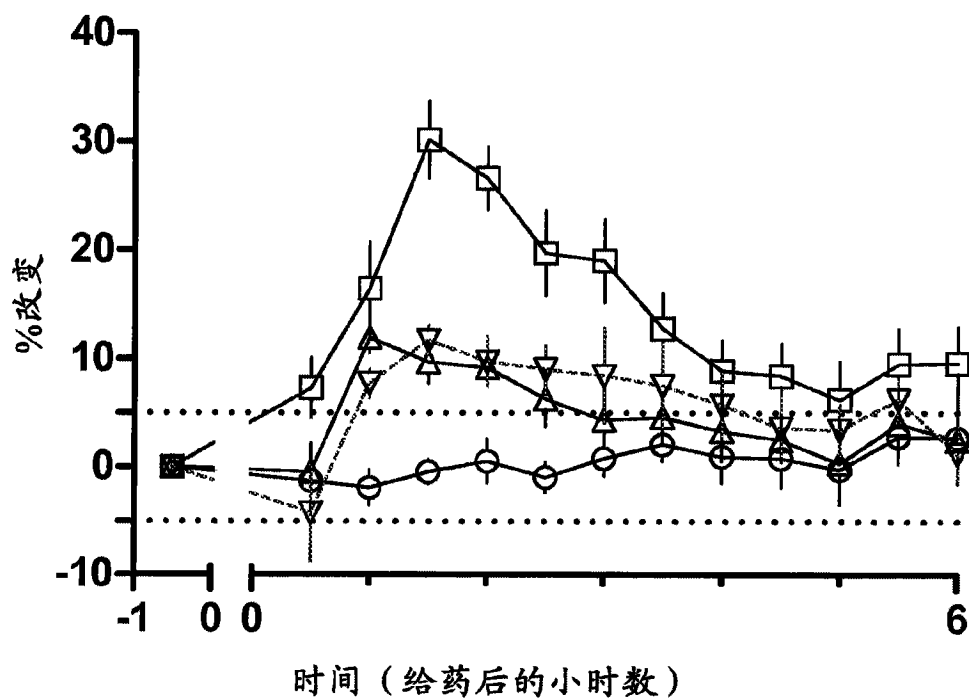


图 1

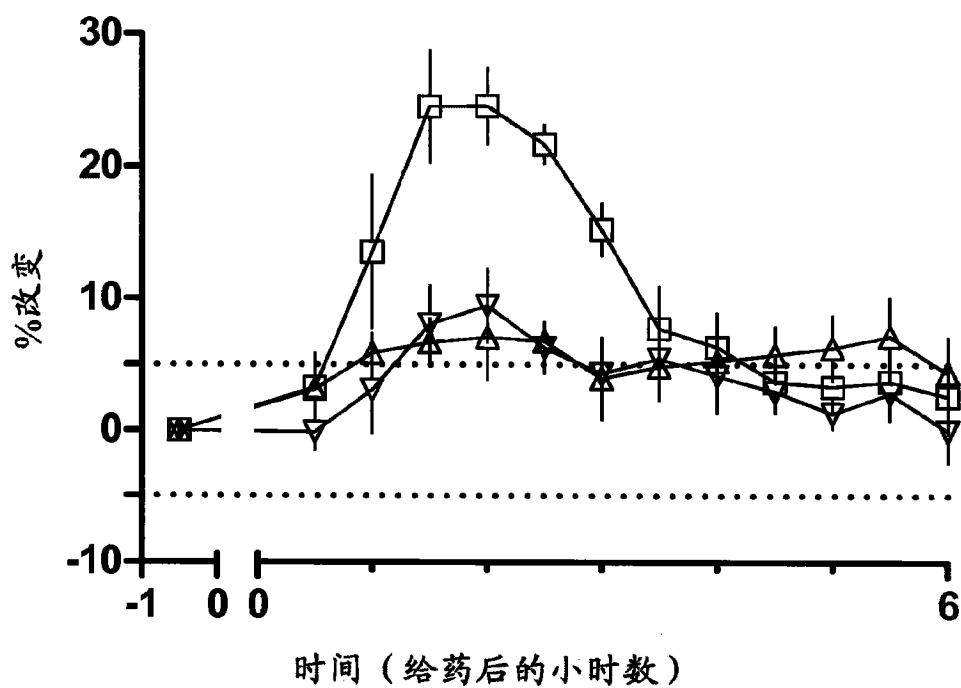


图 2