(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105612172 A
(43)申请公布日 2016.05.25

(21)申请号 201480052591.5
(22)申请日 2014.07.21
(30)优先权数据
61/858,263 2013.07.25 US
62/015,854 2014.06.23 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2016.03.24
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2014/047377 2014.07.21
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2015/013168 EN 2015.01.29
(71)申请人 诺华股份有限公司
地址 瑞士巴塞尔
(72)发明人 A·M·布鲁斯 P·格罗舍 C·吉马雷斯 A·坎特 C·娄 A·R·尤塞拉 八十岛华杨 J·袁 F·泽克里 H·赵
(74)专利代理机构 北京市中咨律师事务所 11247
代理人 杨春刚 黄革生
(51)Int.Cl.
C07K 14/47(2006.01)
A61K 38/17(2006.01)
A61P 9/04(2006.01)

权利要求书8页 说明书97页

(54)发明名称

用于治疗心力衰竭的环状多肽

(57)摘要

本发明提供了式I的环状多肽或其酰胺、酯或盐、或其生物缀合物，其中X1、X3、X4、X7、X8、X9、X10、X11、X12和X13如本文定义。该多肽是APJ受体的激动剂。本发明还涉及制备本发明的多肽或其生物缀合物的方法，及其治疗用途，诸如治疗或预防急性代偿失调性心力衰竭(ADHF)、慢性心力衰竭、肺性高血压、心房颤动、布鲁格达氏综合征、室性心动过速、动脉粥样硬化、高血压、再狭窄、局部缺血性心血管疾病、心肌病、心脏纤维化、心律不齐、水潴留、糖尿病(包括妊娠糖尿病)、肥胖症、外周动脉病、脑血管意外、暂时性缺血发作、创伤性脑损伤、肌萎缩侧索硬化、灼伤(包括晒伤)及先兆子痫。本发明还提供了药理学活性剂的组合以及药物组合物。X1-R-X3-X4-L-S-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13 (I)。

CN 105612172 A

1.具有下面式I的环状多肽：

X1-R-X3-X4-L-S-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13

I

其中：

X1是该多肽的N-末端，并且是不存在、Q、A或pE，或X1选自C、c、hC、D-hC；其中C、c、hC或D-hC的侧链与X7的侧链形成二硫键；

X3是P或X3选自C、c、hC和D-hC；其中C、c、hC或D-hC的侧链与X7的侧链形成二硫键；

X4是R或X4选自C、c、hC和D-hC；其中C、c、hC或D-hC的侧链与X7的侧链形成二硫键；

其中仅X1、X3和X4之一是选自C、c、hC和D-hC的含硫氨基酸；

X7是C、c、hC或D-hC；且X7的侧链与X1、X3或X4之一的C、c、hC或D-hC的侧链形成二硫键；

X8是K或F；

X9是G、A、a或不存在；

X10是P或不存在；

X11是D-Nle、Nle、M或f；且

X12是不存在或P、f、a、D-Nva或D-Abu；

X13是C-末端，并且是不存在或选自(N-Me)F、F、f、a、y和Nal；其中：

Nle是L-正亮氨酸；

D-Nle是D-正亮氨酸；

D-hC是D-高半胱氨酸

hC是L-高半胱氨酸；

Nal是L-萘丙氨酸；

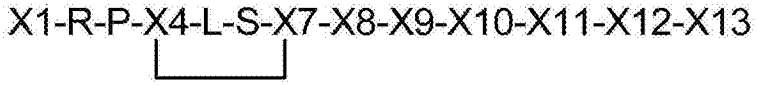
D-Nva是D-正缬氨酸；

D-Abu是D-2-氨基丁酸；

pE是L-焦谷氨酸；

或该多肽的酰胺、酯或盐；或基本上与其等价的多肽。

2.具有式II的权利要求1的多肽：



II

其中：

X1是该多肽的N-末端，并且其不存在或选自Q、A和pE；

X4是C、c、hC或D-hC；

X7是C、c、hC或D-hC；且X7的侧链与X4的侧链形成二硫键；

X8是K或F；

X9是G、A、a或不存在；

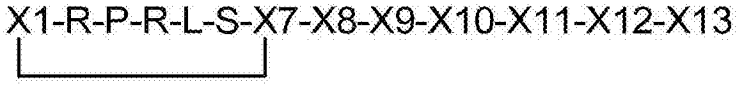
X10是P或不存在；

X11是D-Nle、Nle、M或f；且

X12不存在或选自P、f、a、D-Nva和D-Abu；

X13是C-末端，并且是不存在或选自F、(N-Me)F、f、a、y和Nal；或该多肽的酰胺、酯或盐。

3.具有式III的权利要求1的多肽：



III

其中

X1是该多肽的N-末端，并且选自C、c、hC和D-hC；

X7是C、c、hC或D-hC；其中X7的侧链与X1的侧链形成二硫键；

X8是K或F；

X9是G、A、a或不存在；

X10是P或不存在；

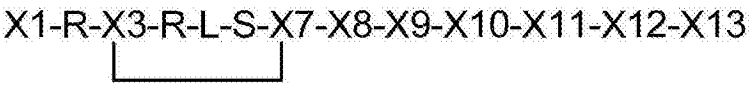
X11是D-Nle、Nle、M或f；且

X12不存在或选自P、f、a、D-Nva和D-Abu；

X13是C-末端，并且是不存在或选自(N-Me)F、F、f、a、y和Nal；

或该多肽的酰胺、酯或盐。

4.具有式IV的权利要求1的多肽：



IV

其中：

X1是该多肽的N-末端，并且是不存在、Q、A或pE；

X3是C、c、hC或D-hC；其中C、c、hC或D-hC的侧链；

X7是C、c、hC或D-hC；且X7的侧链与X3的C、c、hC或D-hC的侧链形成二硫键；

X8是K或F；

X9是G、A、a或不存在；

X10是P或不存在；

X11是D-Nle、Nle、M或f；且

X12不存在或选自P、f、a、D-Nva和D-Abu；

X13是C-末端，并且是不存在或选自(N-Me)F、F、f、a、y和Nal；或该多肽的酰胺、酯或盐。

5.根据权利要求1、2和4中任何一项所述的多肽，其中X1是pE；或该多肽的酰胺、酯或盐。

6.根据权利要求1、2和4中任何一项所述的多肽，其中X1不存在；或该多肽的酰胺、酯或盐。

7.根据权利要求1至4和6中任何一项所述的多肽，其中N-末端是酰胺；或该多肽的盐。

8.根据权利要求7所述的多肽，其中N-末端是式-NHR的酰胺，且R是乙酰基、苯甲酰基、苯甲酰甲基、琥珀酰基、辛酰基、4-苯基丁酰基、4-Cl-Ph-$(CH_2)_3C(O)$-或Ph-$CH_2CH_2NHC(O)$-；或该多肽的盐。

9.根据权利要求1至8中任何一项所述的多肽，其中X13是F或f；或该多肽的酰胺、酯或盐。

10.根据权利要求1至8中任何一项所述的多肽，其中X13不存在；或该多肽的酰胺、酯或

盐。

11.根据权利要求1-10中任何一项所述的多肽，其中X12不存在；或该多肽的酰胺和酯或盐。

12.根据权利要求1至11中任何一项所述的多肽，其中C-末端是酰胺；或该多肽的盐。

13.根据权利要求12所述的多肽，其中C-末端是式-C(O)-R2的酰胺并且R2是-NH_2、-NH-Me、-NH-NHBn或-NH-$(CH_2)_2$-Ph；或该多肽的盐。

14.根据权利要求1-13中任何一项所述的多肽，其中X8是K；或该多肽的酰胺、酯或盐。

15.根据权利要求1至14中任何一项所述的多肽，其中X9是G；或该多肽的酰胺、酯或盐。

16.根据权利要求1至15中任何一项所述的多肽，其中X10是P；或该多肽的酰胺、酯或盐。

17.根据权利要求1至16中任何一项所述的多肽，其中X11是Nle或D-Nle；或该多肽的酰胺、酯或盐。

18.根据权利要求1所述的多肽，其选自：

Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-F-*OH*
Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-*NH(苯乙基)*
Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-(N-Me)F-*OH*
Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-NH_2
Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-Nal-*OH*
Ac-C*-R-P-R-L-S-hC*-K-G-P-Nle-P-F-*OH*
Ac-hC*-R-P-R-L-S-hC*-K-G-P-Nle-P-F-*OH*
Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-a-*OH*
Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-*NMe(苯乙基)*
Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-f-*OH*
Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-*NH(苯乙基)*
Ac-c*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-F-*OH*
Ac-c*-R-P-R-L-S-hC*-K-G-P-Nle-P-F-*OH*

Ac-c*-R-P-R-L-S-c*-K-G-P-Nle-P-F-*OH*
Ac-C*-R-P-R-L-S-c*-K-G-P-Nle-P-F-*OH*
Ac-(D-hC)*-R-P-R-L-S-hC*-K-G-P-Nle-P-F-*OH*
Ac-(D-hC)*-R-P-R-L-S-(D-hC)*-K-G-P-Nle-P-F-*OH*
Ac-(D-hC)*-R-P-R-L-S-(hC)*-K-G-P-f-a-f-*OH*
Ac-c-R-P-R-L-S-(hC)-K-G-P-(D-Nle)-a-f-*OH*
*p*E-R-C*-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-F-*OH*
*p*E-R-C*-R-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-a-f-*OH*
*p*E-R-C*-R-L-S-C*-F-G-P-(D-Nle)-a-f-*OH*
*p*E-R-C*-R-L-S-C*-K-a-P-(D-Nle)-a-f-*OH*
*p*E-R-C*-R-L-S-C*-K-A-P-(D-Nle)-a-f-*OH*
*p*E-R-C*-R-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-NH_2
*p*E-R-C*-R-L-S-(D-hC)*-K-G-P-f-a-f-*OH*
*p*E-R-c*-R-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-(D-abu)-f-*OH*
*p*E-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-F-*OH*
*p*E-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-(N-Me)F-*OH*
*p*E-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-*NH(苯乙基)*
*p*E-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-Nle-*NH(苯乙基)*
*p*E-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-*NH(苯乙基)*
*p*E-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-a-f-*OH*
*p*E-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-f-*OH*
*p*E-R-P-C*-L-S-C*-F-G-P-(D-Nle)-a-f-*OH*
H-R-P-C*-L-S-C*-K-(D-Nle)-a-f-*OH*
*p*E-R-P-hC*-L-S-C*-K-G-P-f-a-f-*OH*
*p*E-R-P-c*-L-S-(D-hC)*-K-G-P-(D-Nle)-a-y-*OH*
*p*E-R-P-(D-hC)*-L-S-hC*-K-G-P-(D-Nle)-(D-Nva)-f-*OH*

其中用“*”标记的两个氨基酸代表形成二硫化物的氨基酸;或该多肽的酰胺、酯或盐。

19.包含以下的生物缀合物或其多聚体:

a.根据权利要求1至18中任何一项所述的肽或多肽，或其酰胺、酯或盐，和

b.延长半衰期的部分；

其中所述肽或多肽和延长半衰期的部分任选通过连接体共价连接或融合。

20.根据权利要求19所述的生物缀合物或其多聚体，其中延长半衰期的部分是IgG恒定域或其片段或人血清白蛋白。

21.根据权利要求19或20所述的生物缀合物，其中延长半衰期的部分是具有LALA突变(L234A,L235A)的FcLALA修饰的Fc片段。

22.根据权利要求21所述的生物缀合物，其中延长半衰期的部分是Fc结构域，其通过连接体与式I、II、III或IV的多肽融合，并且其中连接体具有下式：

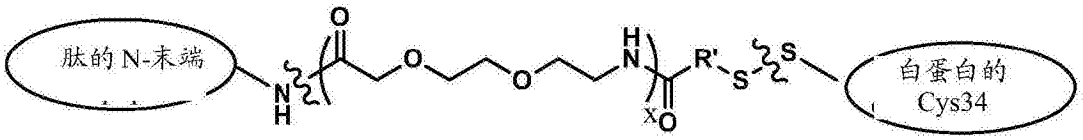
-[GGGGS]n-，n是1、2或3，或连接体是GS或GG，且式I、II、III或IV的多肽含有天然存在的氨基酸。

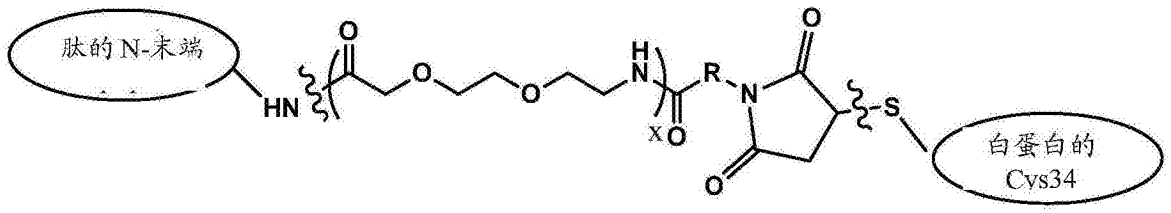
23.根据权利要求22所述的生物缀合物，其中多肽是选自以下的式I的多肽：QRPC*LSC*KGPMPF、C*RPRLSC*KGPMPF和QRC*RLSC*KGPMPF，其中用“*”标记的两个氨基酸表示通过它们的侧链形成二硫键或酰胺键的氨基酸。

24.根据权利要求22或23所述的生物缀合物，其中延长半衰期的部分是修饰的Fc结构域，其中C-末端赖氨酸已经被删除或被丙氨酸替换。

25.根据权利要求19或20所述的生物缀合物或其多聚体，其中延长半衰期的部分是人血清白蛋白。

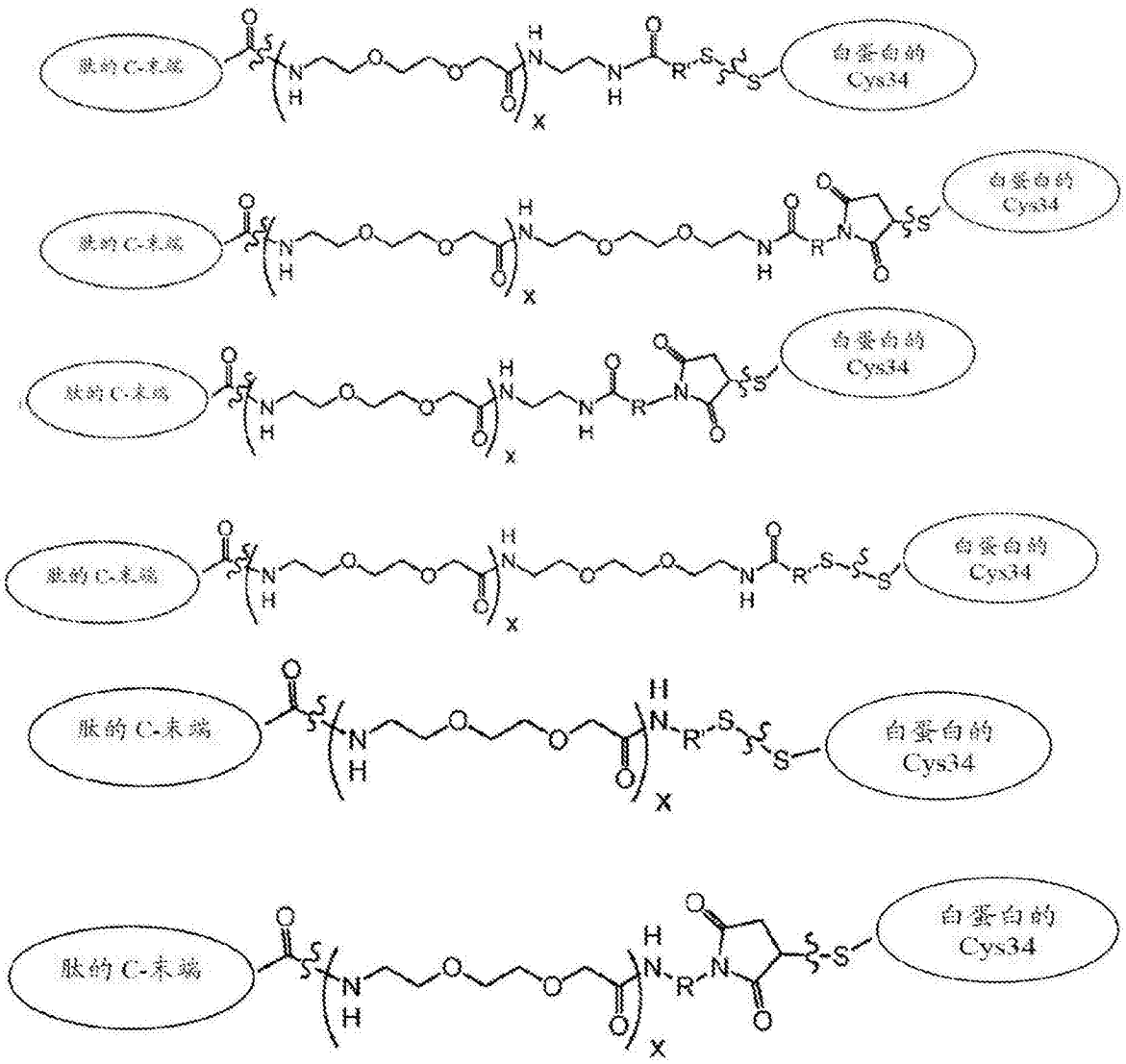
26.根据权利要求25所述的生物缀合物，其中人血清白蛋白通过下式的连接体化学连接至式I至IV中任何一式的多肽的N-末端：





其中x是1-20，R是线性的或支链的亚烷基、环烷基、芳基或杂芳基或其组合，R’是线性的或支链的亚烷基、芳基或环烷基或其组合。

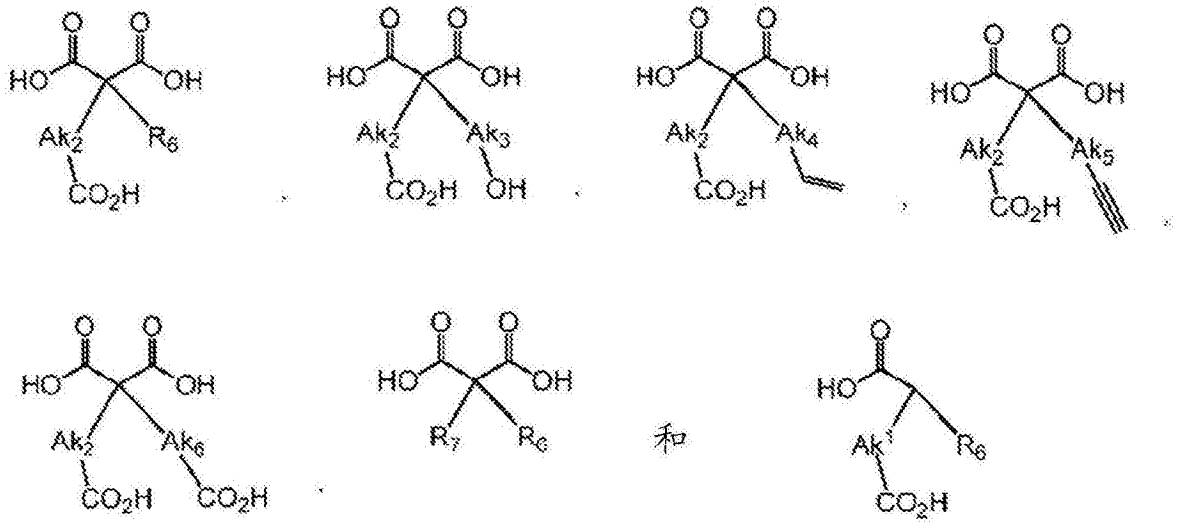
27.根据权利要求19或20所述的生物缀合物，其中人血清白蛋白通过下式的连接体化学连接至式I至IV中任何一式的多肽的C-末端：



其中x是1-20，R是线性的或支链的亚烷基、环烷基、芳基或杂芳基或其组合，R'是线性的或支链的亚烷基、芳基或环烷基或其组合。

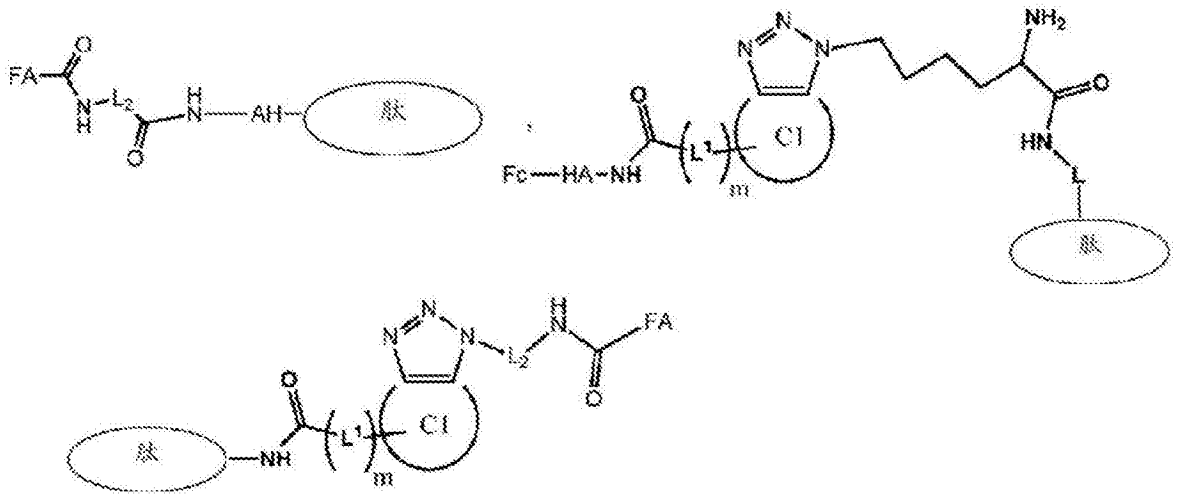
28.根据权利要求19所述的生物缀合物，其中延长半衰期的部分是脂肪酸。

29.根据权利要求28所述的生物缀合物，其中脂肪酸选自：



其中Ak^2、Ak^3、Ak^4、Ak^5和Ak^6独立地是(C_{8-20})亚烷基，R^6和R^7独立地是(C_{8-20})烷基。

30.根据权利要求19、28或29所述的生物缀合物，其具有下式：



或



其中肽是肽的N-末端，n是1、2或3，m是0或1，A是丙氨酸，H是组氨酸、L2是连接体，C1是任选被氟取代的单、二或三环碳环或杂环系统，并且L^1是C1-C20亚烷基连接体，其中亚烷基链任选被氧代(=O)取代，并且其中一个或多个碳被O或NH替换。

31.在有需要的个体中治疗或预防对APJ受体的激动响应的疾病或病症的方法，其包括向所述个体施用治疗有效量的根据权利要求1至30中任何一项所述的多肽或其酰胺、酯或盐、或其生物缀合物。

32.权利要求31的方法，其中所述疾病或病症选自：急性代偿失调性心力衰竭(ADHF)、慢性心力衰竭、肺性高血压、心房颤动、布鲁格达氏综合征、室性心动过速、动脉粥样硬化、高血压、再狭窄、局部缺血性心血管疾病、心肌病、心脏纤维化、心律不齐、水潴留、糖尿病(包括妊娠糖尿病)、肥胖症、外周动脉病、脑血管意外、暂时性缺血发作、创伤性脑损伤、肌萎缩侧索硬化、灼伤(包括晒伤)及先兆子痫。

33.根据权利要求1至30中任何一项所述的多肽或其酰胺、酯或盐、或其生物缀合物，其用作药物。

34.根据权利要求1至30中任何一项所述的多肽或其酰胺、酯或盐、或其生物缀合物，其用于治疗或预防对APJ受体的激动响应的疾病或病症。

35.根据权利要求1至30中任何一项所述的多肽、其酰胺、酯或盐、或其生物缀合物，其用于治疗急性代偿失调性心力衰竭(ADHF)、慢性心力衰竭、肺性高血压、心房颤动、布鲁格达氏综合征、室性心动过速、动脉粥样硬化、高血压、再狭窄、局部缺血性心血管疾病、心肌病、心脏纤维化、心律不齐、水潴留、糖尿病(包括妊娠糖尿病)、肥胖症、外周动脉病、脑血管意外、暂时性缺血发作、创伤性脑损伤、肌萎缩侧索硬化、灼伤(包括晒伤)及先兆子痫。

36.组合产品，其包含治疗有效量的根据权利要求1至30中任何一项所述的多肽、其酰胺、酯或盐、或其生物缀合物以及一种或多种治疗活性的共活性剂。

37.根据权利要求36的组合产品，其中所述共活性剂选自强心剂、β肾上腺素能受体阻断剂、HMG-Co-A还原酶抑制剂、血管紧张素II受体拮抗剂、血管紧张素转化酶(ACE)抑制剂、钙通道阻断剂(CCB)、内皮素拮抗剂、肾素抑制剂、利尿剂、ApoA-I模拟物、抗糖尿病剂、减肥剂、醛固酮受体阻断剂、内皮素受体阻断剂、醛固酮合酶抑制剂(ASI)、CETP抑制剂、抗凝剂、松弛素、BNP(奈西立肽)和/或NEP抑制剂。

38.药物组合物，其包含治疗有效量的根据权利要求1至30中任何一项所述的多肽、其酰胺、酯或盐、或其生物缀合物以及一种或多种药学上接受的载体。

用于治疗心力衰竭的环状多肽

技术领域

[0001] 本发明涉及包含修饰的肽及多肽序列的新组合物，所述肽及多肽序列被设计用于治疗其所施与个体的心血管疾病，且比其野生型对应物显示更好的对降解的抵抗性及等效或更高的生物活性。本发明还涉及制备所述组合物及使用所述组合物作为药物活性剂来治疗心血管疾病的方法。

[0002] 发明背景

[0003] 在西方世界中65岁以上成人心力衰竭的发病率为约1/100。最常见病理为心肌收缩力且因此心输出量(即，任一心室随时间排出的有效血液体积)的慢性短缺。患有慢性心力衰竭的患者在心肌收缩力进一步下降时会具有急性代偿失调发作(即，心脏无法维持足够的血液循环)。仅美国每年便有约50万人因“急性代偿失调性心力衰竭”(ADHF)住院。

[0004] 目前用于ADHF的疗法包括利尿剂、血管舒张剂及直接增加心肌收缩力的强心剂(inotropes)。当前静脉内强心剂(多巴酚丁胺(dobutamine)、多巴胺(dopamine)、米力农(milrinone)、左西孟旦(levosimendan)用于急性情况，尽管其与诸如心律不齐及增加的长期致命性等不良事件相关。这些倾向已阻止其应用于慢性心力衰竭。地高辛(Digoxin)是口服强心剂，但其受限于窄治疗指数、增加的致心律失常性可能以及肾功能不全中的禁忌证。

[0005] ADHF迫切地需要这样的心力衰竭疗法，其增加心肌收缩力而没有致心律失常性或致命性倾向，并且还可以解决慢性心力衰竭的巨大未满足的医疗需要。

[0006] Apelin是先前孤儿G-蛋白-偶联受体(GPCR)、APJ(也称为apelin受体、血管紧张素样-1受体、血管紧张素II样-1受体等)的内源性配体。Apelin/APJ通路广泛地表达于心血管系统中，并且在临床前模型中apelin已显示重大有益心血管作用。人类的急性apelin施用引起外周及冠状血管舒张并增加心输出量(Circulation.2010;121:1818-1827)。因此，APJ激动正成为患有心力衰竭的患者的重要治疗靶标。认为apelin受体APJ的活化增加心肌收缩力并提供心脏保护而无当前疗法的不利倾向。然而，天然apelin展示极短的半衰期及活体内作用持续时间。由于快速血清清除和经过肽酶作用的蛋白质水解降解，该非常短的半衰期是递送此类治疗内源肽的公认的主要困难。

[0007] 当前用于克服这一缺点的一种方法是向患者施用大剂量的感兴趣的治疗肽，从而即使一些治疗肽被降解，仍保留治疗有效的足够量。然而，该方法对患者是不舒适的。因为大多数治疗肽不能口服施用，治疗肽必须不断地输注、通过静脉注射频繁输注或通过不方便的皮下注射途径频繁施用。需要频繁施用还导致许多潜在肽治疗具有不可接受的突出的高治疗成本。大量的降解的肽的存在还可能产生不希望的副作用。

[0008] 施用的不舒适和高成本是为什么大多数具有有吸引力的生物活性性质的治疗肽不可能被开发为药物候选物的两个原因。

[0009] 因此，延长肽的半衰期的一种方法是以减慢它们的降解而仍保持生物活性的方式修饰治疗肽。

[0010] 因此，鉴定模拟apelin功能但具有增加的半衰期并显示与天然存在的apelin等效或更高生物活性的肽及多肽是所需要的。此外，鉴定显示出增加的构象限制(即，达成并维

持活性构象状态以使得肽及多肽可与其受体和/或其它通路靶点相互作用而无需额外折叠或复位的能力)的apelin类似物肽及多肽是所需要的。另外的方法包括通过将肽缀合至阻止它们通过肾清除的分子来降低清除速率。

[0011] 因此,需要具有增加的半衰期的修饰的治疗肽,以提供更长的体内作用持续时间,同时保持低毒性,保留所述修饰的肽的治疗优点。

发明内容:

[0012] 本发明涉及通过修饰感兴趣的治疗肽或多肽即APJ激动剂克服体内肽降解的问题。

[0013] 本发明的目的是提供新的肽及多肽或其生物缀合物,其可用作APJ激动剂且还具有以下优于野生型apelin及其它已知apelin类似物的至少一种改进:增加的半衰期;对施用后和/或溶解后降解更大的免疫性;及增加的构象限制,其全部同时展示与野生型apelin相同或更高的生物活性。因此,本发明的肽及多肽或其生物缀合物尤其可用于治疗或预防心血管疾病,例如心力衰竭、与心力衰竭相关的病症及病况及对APJ受体活性的活化响应的病症及病况。

[0014] 在一个实施方案中,本发明的肽及多肽或其生物缀合物尤其可用于治疗或预防与心力衰竭有关的病症或病况或对APJ受体活性的活化(或激动)响应的病症。在另一实施方案中,本发明的肽及多肽或其生物缀合物可用于治疗急性代偿失调性心力衰竭(ADHF)、慢性心力衰竭、肺性高血压、心房颤动、布鲁格达氏(Brugada)综合征、室性心动过速、动脉粥样硬化、高血压、再狭窄、局部缺血性心血管疾病、心肌病、心脏纤维化、心律不齐、水潴留、糖尿病(包括妊娠性糖尿病)、肥胖症、外周动脉疾病、脑血管意外、暂时性缺血发作、创伤性脑损伤、肌萎缩侧索硬化、灼伤(包括晒伤)及先兆子痫。

[0015] 本发明涉及如本文所述的肽及多肽、或其生物缀合物、药物组合物及其制备方法和用途。本发明的肽及多肽的实例包括如式I至IV中任一个所述的肽及多肽或其酰胺、酯或盐、以及本文具体列出的任何肽或多肽和其生物缀合物包括但不限于实验实施例。

[0016] 因此,本发明提供式(I)的肽或多肽:

[0017] X1-R-X3-X4-L-S-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13

[0018] I

[0019] 其中:

[0020] X1是该多肽的N-末端,并且其不存在或是Q、A或pE,或X1选自C、c、hC、D-hC;其中C、c、hC或D-hC的侧链与X7的侧链形成二硫键;

[0021] X3是P或X3选自C、c、hC和D-hC;其中C、c、hC或D-hC的侧链与X7的侧链形成二硫键;

[0022] X4是R或X4选自C、c、hC和D-hC;其中C、c、hC或D-hC的侧链与X7的侧链形成二硫键;

[0023] 其中仅X1、X3和X4之一是选自C、c、hC和D-hC的含硫氨基酸;

[0024] X7是C、c、hC或D-hC;且X7的侧链与X1、X3或X4之一的C、c、hC或D-hC的侧链形成二硫键;

[0025] X8是K或F;

[0026] X9是G、A、a或不存在;

[0027] X10是P或不存在;

[0028] X11是D-Nle、Nle、M或f;且

[0029] X12是不存在或是P、f、a、D-Nva或D-Abu;

[0030] X13是C-末端,并且是不存在或选自(N-Me)F、F、f、a、y和Nal;其中:

[0031] Nle是L-正亮氨酸;

[0032] D-Nle是D-正亮氨酸;

[0033] D-hC是D-高半胱氨酸

[0034] hC是L-高半胱氨酸;

[0035] Nal是L-萘丙氨酸(L-naphathaline);

[0036] D-Nva是D-正缬氨酸;

[0037] D-Abu是D-2-氨基丁酸;

[0038] pE是L-焦谷氨酸;

[0039] 或该多肽的酰胺、酯或盐;或基本上与其等价的多肽。

[0040] 如本文进一步说明,使用本领域公认的3字母或1字母缩写来表示构成本发明肽和多肽的氨基酸残基。除非当前面冠以"D"时,否则氨基酸为L-氨基酸。当1字母缩写为大写字母时,是指L-氨基酸。当1字母缩写为小写字母时,是指D-氨基酸。或者,D-氨基酸能够用缩写字母前面的D-字母表示,即当用"D"开头时,所述氨基酸是D-氨基酸。

[0041] 式I或本文所述其相关式(例如,式I至IV)的任一上文所列氨基酸残基可以以保守方式被取代,前提是本发明的肽或多肽仍保持功能活性及结构性质(例如,半衰期延长、免受降解、构象限制)。本文将进一步说明可允许的保守氨基酸取代的原则及实例。

[0042] 本发明还提供生物缀合物或其多聚体,其包含:

[0043] a.式I至IV中任何一式的肽或多肽,

[0044] b.延长半衰期的部分;

[0045] 其中所述肽或多肽和所述半衰期任选通过连接体共价连接或融合。

[0046] "任选通过连接体"意指根据式I-IV的肽或多肽直接共价连接或融合至延长半衰期的部分(即没有连接体)或通过连接体共价连接或融合至延长半衰期的部分。

[0047] 本发明的延长半衰期的部分能够共价融合、连结、连接或缀合至肽或多肽类似物。延长半衰期的部分能够是例如聚合物例如聚乙二醇(PEG)、胆固醇基团、碳水化合物或低聚糖;脂肪酸或与补救(salvage)受体结合的任何天然或合成的蛋白质、多肽或肽。优选地,延长半衰期的部分任选通过连接体共价连接至具有长血清半衰期的血浆蛋白质(白蛋白和免疫球蛋白)。在其它实施方案中,延长半衰期的部分是白蛋白结合残基。文中所用的"白蛋白结合残基"意指与人血清白蛋白非共价结合的残基。在一个实施方案中,白蛋白结合残基是亲脂性残基。在另一实施方案中,白蛋白结合残基是在生理pH下带负电荷的。白蛋白结合残基典型地包含能够带负电荷的羧酸。白蛋白结合残基的实例包括脂肪酸。在其它实施方案中,延长半衰期的部分是IgG恒定域或其片段(例如Fc区)、人血清白蛋白(HSA)或白蛋白-结合多肽或残基例如脂肪酸。优选地,生物缀合物的延长半衰期的部分是人血清白蛋白或Fc区。最优选地,生物缀合物的延长半衰期的部分是Fc区。

[0048] 延长半衰期的部分以提高和/或不干扰本发明的生物缀合物的组成部分例如本发明的肽或多肽(式I-IV)的生物学功能的方式连接。在一些实施方案中,本发明的多肽能够任选通过连接体融合至延长半衰期的部分。延长半衰期的部分能够是蛋白质例如IgG恒定

域或其片段(例如Fc区)、人血清白蛋白(HSA)或白蛋白-结合多肽或残基(例如脂肪酸)。文中公开的此类蛋白质还能够形成多聚体。

[0049] 在一些实施方案中,延长半衰期的部分(例如HSA、Fc、脂肪酸等)共价连接或融合至式I-IV中任何一式的肽或多肽的N-末端。在其它实施方案中,延长半衰期的部分(例如HSA、Fc、脂肪酸等)共价连接或融合至本发明的式I至IV中任何一式的肽或多肽的C-末端。

[0050] 本发明的多肽或其生物缀合物通过活化APJ受体,可用于治疗急性代偿失调性心力衰竭(ADHF)、慢性心力衰竭、肺性高血压、心房颤动、布鲁格达氏综合征、室性心动过速、动脉粥样硬化、高血压、再狭窄、局部缺血性心血管疾病、心肌病、心脏纤维化、心律不齐、水潴留、糖尿病(包括妊娠糖尿病)、肥胖症、外周动脉病、脑血管意外、暂时性缺血发作、创伤性脑损伤、肌萎缩侧索硬化、灼伤(包括晒伤)及先兆子痫。

[0051] 在一优选实施方案中,本发明的多肽或其生物缀合物可用于治疗急性代偿失调性心力衰竭(ADHF)。

[0052] 在另一实施方案中,本发明涉及用于在需要该治疗的个体中治疗对APJ受体活化响应的病症或疾病的方法,其包括:给该个体施用有效量的根据式I至IV中任一式的多肽或其酰胺、酯或盐或其生物缀合物,从而治疗该个体的对APJ受体活化响应的病症或疾病。

[0053] 在又一实施方案中,本发明涉及包含根据式I至IV中任一式的多肽或其酰胺、酯或盐或其生物缀合物及一或多种药学上可接受的载体的药物组合物。

[0054] 在再一实施方案中,本发明涉及包含根据式I至IV中任一式的多肽或其酰胺、酯或盐或其生物缀合物以及一或多种治疗活性剂的药物组合的组合产品。

[0055] 在另一实施方案中,本发明涉及在有需要的个体中活化APJ受体的方法,其包括:给该个体施用治疗有效量的根据式I至IV中任一式的多肽或其酰胺、酯或盐或其生物缀合物。

[0056] 发明详述

[0057] 出于解释本说明书的目的,除非另外指明,否则将适用下列定义,而且在合适的情况下,以单数使用的术语也可包括复数且反之亦然。

[0058] 如本文所用,“对APJ受体的调控响应的病症或疾病”、“对APJ的调控响应的病症及病况”、“对APJ受体活性的调控响应的病症及病况”、“对APJ受体活性的活化(或激动)响应的病症”等术语包括急性代偿失调性心力衰竭(ADHF)、慢性心力衰竭、肺性高血压、心房颤动、布鲁格达氏综合征、室性心动过速、动脉粥样硬化、高血压、再狭窄、局部缺血性心血管疾病、心肌病、心脏纤维化、心律不齐、水潴留、糖尿病(包括妊娠糖尿病)、肥胖症、外周动脉病、脑血管意外、暂时性缺血发作、创伤性脑损伤、肌萎缩侧索硬化、灼伤(包括晒伤)及先兆子痫。

[0059] 如本文所用,“APJ受体活性的活化”或“APJ受体的活化”是指APJ受体活性的增加。APJ受体活性的活化也称为APJ受体的“激动”,例如,通过施用本发明的肽及多肽实现。

[0060] 如本文所用,术语“多肽”及“肽”可互换使用,是指连接在一起的两个或更多个氨基酸。除下文表1中所列出的不常见或非天然氨基酸的缩写以外,使用本领域公认的3字母或1字母缩写来表示构成本发明的肽及多肽的氨基酸残基。除非当前面冠以“D”时,否则氨基酸是指L-氨基酸。当1字母缩写为大写字母时,是指D-氨基酸。当1字母缩写为小写字母时,是指L-氨基酸。使用基团或字符串或氨基酸缩写来表示肽。应指出肽的左侧为N-末端,

且序列从N-末端至C-末端书写。

[0061] 本发明的肽含有非天然氨基酸(即,自然界中不存在的化合物)且可备选地使用如本领域已知的其它氨基酸类似物。

[0062] 某些非天然氨基酸可通过以下所述的技术引入:Deiters等,J Am Chem Soc 125:11782-11783,2003;Wang和Schultz,Science 301:964-967,2003;Wang等,Science 292:498-500,2001;Zhang等,Science 303:371-373,2004或US专利No.7,083,970。简而言之,这些表达系统中的一些参与定向诱变,从而将无意义密码子(例如琥珀型TAG)引入编码本发明多肽的开放阅读框中。然后将这些表达载体引入可利用对所引入的无意义密码子特异性的tRNA的宿主中,并加载所选非天然氨基酸。对将其他部分与本发明的多肽缀合的目的有益的特殊非天然氨基酸包括具有乙炔及叠氮基侧链的那些。

[0063] 可例如通过添加化学实体,诸如碳水化合物基团、磷酸酯基团、法呢基、异法呢基、脂肪酸基团、缀合用连接体,官能化或其它修饰等来修饰本发明的肽中的一或多个天然或非天然氨基酸。这些修饰可以以位点特异性或非位点特异性方式实现。在一优选实施方案中,肽的修饰产生更稳定的肽(例如,显示更长的体内半衰期的肽)。这些修饰可包括引入额外的D-氨基酸等。这些修饰均不会实质上干扰肽的所需生物活性,且可赋予该肽所期望的性质,例如,增强的生物活性。

[0064] 相对于野生型蛋白,所述修饰增强了本发明蛋白的生物性质,而且在一些情形下作为例如标记和蛋白半衰期延长剂的连接点,以及用于将这些变体连结至固体载体的表面。

[0065] 在某些实施方案中,出于例如延长半衰期或者改良这些多肽和/或肽的生物性质的目的,使用这些修饰(诸如,位点特异性修饰)来连接缀合物(例如,PEG基团)至本发明的多肽和/或肽上。本文将进一步阐述这些技术。

[0066] 在其它实施方案中,这些修饰(例如,位点特异性修饰)用于连接延长本发明多肽的半衰期的其它聚合物及小分子及重组蛋白序列。一个此类实施方案包括连接脂肪酸或特异性白蛋白结合化合物至多肽和/或肽上。在其它实施方案中,这些修饰在特定氨基酸类型上进行并且可连接于多肽上的一或多个位点。

[0067] 在其它实施方案中,这些修饰(例如,位点特异性修饰)用作产生野生型和/或变体多聚体(例如,二聚体(同源二聚体或异源二聚体)或三聚体或四聚体)的连接手段。这些多聚体蛋白分子可额外地具有经氨基末端或羧基末端连接或融合至其它蛋白(例如Fc、人血清白蛋白(HSA)等)的基团诸如PEG、糖和/或PEG-胆固醇缀合物等。

[0068] 在其它实施方案中,这些位点特异性修饰用于制备蛋白、多肽和/或肽,其中位点特异性掺入吡咯赖氨酸或吡咯赖氨酸类似物或非天然存在的氨基酸(对-乙酰基-Phe、对-叠氮基-Phe)的位置允许受控定向及连接这些蛋白、多肽和/或肽至固体载体的表面上,或允许连接诸如PEG、糖和/或PEG-胆固醇缀合物的基团。

[0069] 在其它实施方案中,这些位点特异性修饰用于位点特异性交联蛋白、多肽和/或肽,由此形成异源寡聚物,包括但不限于异源二聚体及异源三聚体。在其它实施方案中,这些位点特异性修饰用于位点特异性交联蛋白、多肽和/或肽,由此形成蛋白-蛋白缀合物、蛋白-多肽缀合物、蛋白-肽缀合物、多肽-多肽缀合物、多肽-肽缀合物或肽-肽缀合物。在其它实施方案中,位点特定修饰可包括支化点以允许一种以上类型分子连接于蛋白、多肽或肽

的单一位点。

[0070] 在其它实施方案中，本文所列出的修饰可以以非位点特异性方式实现，并且产生本发明的蛋白-蛋白缀合物、蛋白-多肽缀合物、蛋白-肽缀合物、多肽-多肽缀合物、多肽-肽缀合物或肽-肽缀合物。

[0071] 在一些实施方案中，本发明提供包含至少一个结合至抗体(例如特异性结合如本文公开的肽或多肽的抗体)的式I至IV中任一式的肽或多肽的复合物。

[0072] 本领域技术人员应了解，可在本文所述任一多肽的序列中进行不同的氨基酸取代(例如，保守氨基酸取代)，而不必然降低其活性。如本文所用，“通常用作其取代物的氨基酸”包括保守取代(即，被具有可比的化学特性的氨基酸取代)。出于保守取代的目的，非极性(疏水性)氨基酸包括丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、甘氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、色氨酸及甲硫氨酸。极性(亲水性)中性氨基酸包括丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、酪氨酸、天冬酰胺及谷氨酰胺。带正电荷(碱性)氨基酸包括精氨酸、赖氨酸及组氨酸。带负电荷(酸性)氨基酸包括天冬氨酸及谷氨酸。氨基酸取代的实例包括用D-氨基酸取代其相应L-氨基酸，用高半胱氨酸或其它具有含硫醇侧链的非天然氨基酸取代半胱氨酸，用高赖氨酸、二氨基丁酸、二氨基丙酸、鸟氨酸或其它具有含氨基侧链的非天然氨基酸取代赖氨酸，或用正缬氨酸取代丙氨酸等。

[0073] 本文所用术语“氨基酸”是指天然存在的氨基酸、非天然氨基酸、氨基酸类似物及以类似于天然存在的氨基酸的方式起作用的氨基酸模拟物，若其结构允许D和L立体异构体，则均以其D和L立体异构体。本文通过其名称、它们公知的3字母符号、或通过IUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commission(生物化学命名委员会)推荐的1字母符号来表示氨基酸。

[0074] 术语“天然存在的”是指在自然界中发现且未经人工处理的物质。类似地，本文所用“非天然存在的”、“非天然的”等是指未在自然界中发现或经人类结构修饰或合成的物质。当与氨基酸联用时，术语“天然存在的”涉及20种常用氨基酸(即，丙氨酸(A或Ala)、半胱氨酸(C或Cys)、天冬氨酸(D或Asp)、谷氨酸(E或Glu)、苯丙氨酸(F或Phe)、甘氨酸(G或Gly)、组氨酸(H或His)、异亮氨酸(I或Ile)、赖氨酸(K或Lys)、亮氨酸(L或Leu)、甲硫氨酸(M或Met)、天冬酰胺(N或Asn)、脯氨酸(P或Pro)、谷氨酰胺(Q或Gln)、精氨酸(R或Arg)、丝氨酸(S或Ser)、苏氨酸(T或Thr)、缬氨酸(V或Val)、色氨酸(W或Trp)和酪氨酸(Y或Tyr))。

[0075] 本文所用术语“非天然氨基酸(non-natural amino acid)”和“非天然氨基酸(unnatural amino acid)”可互换使用，表示无法使用来自任一生物体的未经修饰或经修饰的基因(无论相同或不同)在任一生物体中以生物合成方式产生的氨基酸结构。这些术语是指在天然存在(野生型)apelin蛋白序列或本发明序列中不存在的氨基酸残基。这些包括但不限于不是20种天然存在的氨基酸之一的经修饰的氨基酸和/或氨基酸类似物、硒代半胱氨酸、吡咯赖氨酸(Pyl)或吡咯啉-羧基-赖氨酸(Pcl，例如描述于PCT专利公开WO2010/48582)。此类非天然氨基酸残基可通过取代天然存在的氨基酸和/或通过将非天然氨基酸插入天然存在(野生型)Apelin蛋白序列或本发明序列中而引入。还可掺入非天然氨基酸残基以赋予apelin分子期望功能，例如，连接官能部分(例如，PEG)的能力。当与氨基酸联用时，符号“Ü”意指本文所用“非天然氨基酸”。

[0076] 此外，应理解，这些“非天然氨基酸”需要经过修饰的tRNA及经过修饰的tRNA合成

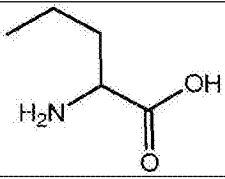
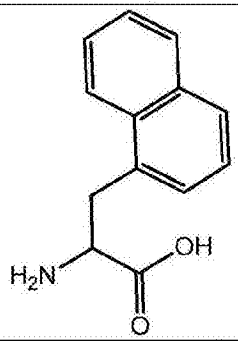
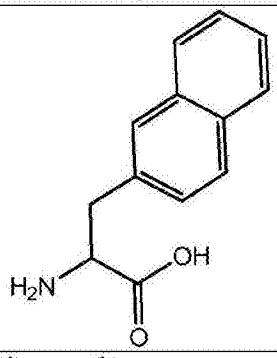
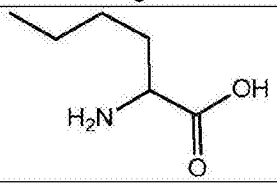
酶(RS)来掺入到蛋白中。这些“选择的”正交tRNA/RS对通过如Schultz等人开发的选择方法或通过随机或靶向突变而产生。例如,吡咯啉-羧基-赖氨酸是“天然氨基酸”,因为其是通过从一个生物体转化至宿主细胞中的基因,以生物合成方式产生的,并且因为其通过使用天然tRNA和tRNA合成酶基因而掺入到蛋白中,而对-氨基苯基丙氨酸(参见,Generation of a bacterium with a 21amino acid genetic code,Mehl RA,Anderson JC,Santoro SW,Wang L,Martin AB,King DS,Horn DM,Schultz PG.J Am Chem Soc.2003Jan 29;125(4):935-9)是“非天然氨基酸”,因为尽管以生物合成方式产生,但其是通过“选择”的正交tRNA/tRNA合成酶对掺入到蛋白中的。

[0077] 经修饰的编码氨基酸包括但不限于羟基脯氨酸、γ-羧基谷氨酸盐、O-磷酸丝氨酸、氮杂环丁烷甲酸、2-氨基己二酸、3-氨基己二酸、β-丙氨酸、氨基丙酸、2-氨基丁酸、4-氨基丁酸、6-氨基己酸、2-氨基庚酸、2-氨基异丁酸、3-氨基异丁酸、2-氨基庚二酸、叔丁基甘氨酸、2,4-二氨基异丁酸、锁链素、2,2'-二氨基庚二酸、2,3-二氨基丙酸、N-乙基甘氨酸、N-甲基甘氨酸、N-乙基天冬酰胺、高脯氨酸、羟基赖氨酸、别-羟基赖氨酸、3-羟基脯氨酸、4-羟基脯胺酸、异锁链素、别-异亮氨酸、N-甲基丙氨酸、N-甲基甘氨酸、N-甲基异亮氨酸、N-甲基戊基甘氨酸、N-甲基缬氨酸、萘丙氨酸、正缬氨酸、正亮氨酸、鸟氨酸、戊基甘氨酸、2-哌啶酸及硫代脯氨酸。术语“氨基酸”还包括为某些生物体中的代谢物,但未经用于掺入蛋白中的遗传密码编码的天然存在的氨基酸。这些氨基酸包括但不限于鸟氨酸、D-鸟氨酸及D-精氨酸。

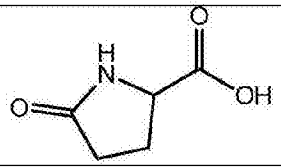
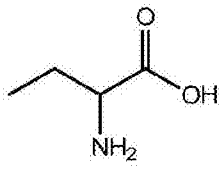
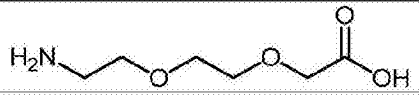
[0078] 本文所用术语“氨基酸类似物”是指具有与天然存在的氨基酸相同的基本化学结构(例如,结合至氢、羧基、氨基及R基团的α-碳)的化合物。氨基酸类似物包括被可逆地或不可逆地化学封闭、或其C-末端羧基、其N-末端氨基和/或其侧链官能基团经化学修饰的天然及非天然氨基酸。这些类似物包括但不限于甲硫氨酸亚砜、甲硫氨酸砜、S-(羧甲基)-半胱氨酸、S-(羧甲基)-半胱氨酸亚砜、S-(羧甲基)-半胱氨酸砜、天冬氨酸-(β-甲基酯)、N-乙基甘氨酸、丙氨酸甲酰胺、高丝氨酸、正亮氨酸及甲硫氨酸甲基锍。

[0079] 表1:如本发明中所述的非天然氨基酸:

[0080]

符号	名称	结构
Nva或nva (D-Nva)	L-正缬氨酸或D-正缬氨酸	
1-Nal	1-萘丙氨酸	
2-Nal	2-萘丙氨酸	
Nle或nle (D-Nle)	L-正亮氨酸或D-正亮氨酸	

[0081]

pE	焦谷氨酸	
Abu或abu (D-Abu)	2-氨基-丁酸	
O2Oc	8-氨基-3,6-二氧杂辛酸	

[0082] Nal是指1-萘丙氨酸和2-萘丙氨酸两者，优选2-萘丙氨酸。

[0083] 如本文所用，术语“酰胺”是指C-末端羧酸基团的酰胺衍生物(例如，-C(O)NH_2、-C(O)NH-C_{1-6}烷基、-C(O)NH-C_{1-2}烷基苯基、-C(O)NH-NHBn、-C(O)-4苯氧基哌啶或-C(O)N(C_{1-6}

烷基)$_2$)。

[0084] 术语“酰胺”还指N-末端氨基的衍生物(例如,-NHC(O)C_{1-16}烷基、-NHC(O)$(CH_2)_n$Ph(n是1至6的整数)、-NHC(O)$(CH_2)_2CO_2H$、4-Cl-Ph-$(CH_2)_3$C(O)NH-、$C_{11}H_{23}$C(O)NH-$(CH_2)_2$-O-$(CH_2)_2$-O-CH_2-C(O)-NH-、$C_{13}H_{27}$C(O)NH-$(CH_2)_2$-O-$(CH_2)_2$-O-CH_2-C(O)-NH-;$C_{15}H_{27}$C(O)NH-$(CH_2)_2$-O-$(CH_2)_2$-O-CH_2-C(O)NH-、Ph-CH_2CH_2NHC(O)-NH-或$CH_3(OCH_2CH_2)_m$C(O)NH-(m是1至12的整数)。

[0085] 如本文所用,术语“酯”是指C-末端羧酸基团的酯衍生物(例如-COOR),其中该酯的R是指C_{1-6}烷基,诸如甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基等;C_{3-8}环烷基,诸如环戊基、环己基等;C_{6-10}芳基,诸如苯基、α-萘基等;C_{6-10}芳基-C_{1-6}烷基,例如苯基-C_{1-2}烷基,诸如苄基、苯乙基、二苯甲基等;及α-萘基-C_{1-2}烷基,诸如α-萘基甲基等等。还可提及的是新戊酰基氧基甲基酯等,其通常用作口服施用的酯。当本发明的多肽在除C-末端以外的位置具有额外羧基或羧酸酯基团时,这些基团被酰胺化或酯化的那些多肽也落入本发明多肽的范围内。在此种情形下,这些酯例如与上文所提及的C-末端酯属于相同种类的酯。

[0086] 术语烷基是指包含1至20个碳原子的完全饱和的分支的或不分支的(或直链或线性的)烃基团。优选地,烷基包含1至7个碳原子,并更优选1至4个碳原子。

[0087] 术语芳基是指在环部分具有6-10个碳原子的单环的或二环的芳香烃基团。芳基的代表性实例是苯基或萘基。

[0088] 术语杂芳基包括单环或二环杂芳基,其含有5-10个选自碳原子和1至5个杂原子的环成员,并且每个杂原子独立地选自O、N或S,其中S和N可以被氧化至不同氧化状态。对于二环杂芳基系统,该系统是完全芳香的(即所有环都是芳香的)。

[0089] 术语环烷基是指3-12个碳原子、优选3-8或3-7个碳原子的饱和的或者不饱和但非芳香的单环、二环或三环烃基团。对于二环和三环环烷基系统,所有环都是非芳香的。

[0090] 术语杂环基是指饱和的或不饱和的非芳香的(部分不饱和的)环,其是4-、5-、6-或7-元单环,并且含有至少一个选自O、S和N的杂原子,其中N和S还能够任选被氧化至不同氧化状态。在一个实施方案中,杂环基基团表示含有5-7个环原子并且任选含有其它选自O、S或N杂原子的饱和的单环。

[0091] 术语“APJ”(也称为“apelin受体”、“血管紧张素样-1受体”、“血管紧张素II-样1受体”等)表示基因定位于人类11号染色体的长臂上的具有380个残基、7个跨膜结构域的Gi偶联受体(NCBI参考序列号:NP_005152.1,并由NCBI参考序列号:NM_005161编码)。APJ是1993年使用简并寡核苷酸引物从基因组人类DNA首次克隆得到的(O'Dowd等,Gene,136:355-60,1993)并与1型血管紧张素II受体具有显著同源性。尽管具有这一同源性,然而,血管紧张素II不结合APJ。尽管作为孤儿许多年,但已分离出内源性配体并命名为apelin(Tatemoto等,Biochem Biophys Res Commun 251,471-6(1998))。

[0092] 术语“apelin”,表示具有77个残基的前蛋白(NCBI参考序列号:NP_0059109.3,并由NCBI参考序列号:NM_017413.3编码),其被加工为apelin肽的生物活性形式,诸如apelin-36、apelin-17、apelin-16、apelin-13、apelin-12。全长成熟肽也称为“apelin-36”,包含36个氨基酸,但最高效亚型为apelin的13体(apelin-13)的焦谷氨酸化形式,其被称为“Pyr-1-apelin-13或Pyr^1-apelin-13”。不同apelin形式例如描述于美国专利6,492,324B1中。

[0093] 术语“缀合物”和“生物缀合物”可互换使用，并且意指由式I至IV中任何一式的多肽与延长半衰期的部分之间任选通过连接体共价连接形成的实体。术语“缀合物”或“生物缀合物”还旨在包括APJ激动剂多肽或式I、II、III或IV的多肽与延长半衰期的部分之间融合形成的实体。

[0094] 术语延长半衰期的部分能够被共价连接/连结或融合至肽或多肽类似物。延长半衰期的部分可能是例如聚合物例如聚乙二醇(PEG)、脂肪酸、胆固醇基团、碳水化合物或低聚糖；与补救(salvage)受体结合的任何天然或合成的蛋白质、多肽或肽。在其它实施方案中，延长半衰期的部分是白蛋白结合残基。文中所用的“白蛋白结合残基”意指与人血清白蛋白非共价结合的残基。在一个实施方案中，白蛋白结合残基是亲脂性残基。在另一实施方案中，白蛋白结合残基是在生理pH带负电荷的。白蛋白结合残基典型地包含能够带负电荷的羧酸。白蛋白结合残基的实例包括脂肪酸。在其它实施方案中，延长半衰期的部分任选通过连接体共价连接至具有长血清半衰期的血浆蛋白质(白蛋白和免疫球蛋白)。例如，延长半衰期的部分是IgG恒定域或其片段(例如Fc区)、人血清白蛋白(HSA)或白蛋白-结合多肽或残基例如脂肪酸。最优选地，生物缀合物的延长半衰期的部分是Fc区。

[0095] 术语“增加半衰期”或“增加血清半衰期”或“延长半衰期”意指相对于其未修饰的形式(或肽的裸形式)，修饰的生物学活性分子(例如apelin 13)的循环半衰期的正性变化。通过在施用生物学活性分子后的不同时间点采取血液样品并测定各样品中所述分子的浓度来测量血清半衰期。测量随时间的血清浓度变化允许计算修饰的分子(例如缀合的分子)的血清半衰期。通过将修饰的分子(例如缀合的分子)的血清半衰期与未修饰的分子(例如apelin 13)进行比较，可以测定血清半衰期或t1/2的相对增加。所述增加期望地为至少约两倍，但更小的增加可能是有用的。

[0096] 本发明的多肽：

[0097] 本文描述了本发明的各实施方案。应认识到，在每一实施方案中所描述的特征可与其它指明的特征组合，从而提供其它实施方案。

[0098] 在实施方案1中，本发明因此提供式(I)的肽或多肽：

[0099] X1-R-X3-X4-L-S-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13

[0100] I

[0101] 其中：

[0102] X1是该多肽的N-末端，并且是不存在、Q、A或pE，或X1选自C、c、hC、D-hC；其中C、c、hC或D-hC的侧链与X7的侧链形成二硫键；

[0103] X3是P或X3选自C、c、hC和D-hC；其中C、c、hC或D-hC的侧链与X7的侧链形成二硫键；

[0104] X4是R或X4选自C、c、hC和D-hC；其中C、c、hC或D-hC的侧链与X7的侧链形成二硫键；

[0105] 其中仅X1、X3和X4之一是选自C、c、hC和D-hC的含硫氨基酸；

[0106] X7是C、c、hC或D-hC；且X7的侧链与X1、X3或X4之一的C、c、hC或D-hC的侧链形成二硫键；

[0107] X8是K或F；

[0108] X9是G、A或a或不存在；

[0109] X10是P或不存在；

[0110] X11是D-Nle、Nle、M或f；且

[0111] X12是不存在或是P、f、a、D-Nva或D-Abu；

[0112] X13是C-末端，并且是不存在或选自(N-Me)F、F、f、a、y和Nal；其中：

[0113] Nle是L-正亮氨酸；

[0114] D-Nle是D-正亮氨酸；

[0115] D-hC是D-高半胱氨酸

[0116] hC是L-高半胱氨酸；

[0117] Nal是L-萘丙氨酸；

[0118] D-Nva是D-正缬氨酸；

[0119] D-Abu是D-2-氨基丁酸；

[0120] pE是L-焦谷氨酸；

[0121] 或该多肽的酰胺、酯或盐；或基本上与其等价的多肽。

[0122] 在实施方案2中，本发明因此提供式(II)的肽或多肽：

[0123] X1-R-P-X4-L-S-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13

II

[0124] 其中：

[0125] X1是该多肽的N-末端，并且是不存在、Q、A或pE；

[0126] X4是C、c、hC或D-hC；

[0127] X7是C、c、hC或D-hC；且X7的侧链与X4的侧链形成二硫键；

[0128] X8是K或F；

[0129] X9是G、A、a或不存在；

[0130] X10是P或不存在；

[0131] X11是D-Nle、M、Nle或f；且

[0132] X12不存在或选自P、f、a、D-Nva和D-Abu；

[0133] X13是C-末端，并且是不存在或选自F、(N-Me)F、f、a、y和Nal；或该多肽的酰胺、酯或盐、或基本上与其等价的多肽。

[0134] 在实施方案2A中，本发明因此提供式(II)的肽或多肽：

[0135] X1-R-P-X4-L-S-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13

II

[0136] 其中：

[0137] X1是该多肽的N-末端，并且是不存在或pE；

[0138] X4是C、c、hC或D-hC；

[0139] X7是C、c、hC或D-hC；且X7的侧链与X4的侧链形成二硫键；

[0140] X8是K或F；

[0141] X9是G、A、a或不存在；

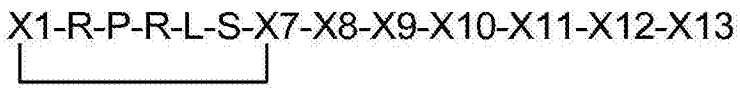
[0142] X10是P或不存在；

[0143] X11是D-Nle、Nle或f；且

[0144] X12不存在或选自P、f、a、D-Nva和D-Abu；

[0145] X13是C-末端，并且是不存在或选自F、(N-Me)F、f、a、y和Nal；或该多肽的酰胺、酯或盐、或基本上与其等价的多肽。

[0146] 在实施方案3中，本发明因此提供式III的肽或多肽：

[0147] 

III

[0148] 其中

[0149] X1是该多肽的N-末端，并且选自C、c、hC和D-hC；

[0150] X7是C、c、hC或D-hC；其中X7的侧链与X1的侧链形成二硫键；

[0151] X8是K或F；

[0152] X9是G、A、a或不存在；

[0153] X10是P或不存在；

[0154] X11是D-Nle、Nle、M或f；且

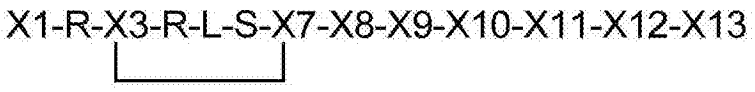
[0155] X12不存在或选自P、f、a、D-Nva和D-Abu；

[0156] X13是C-末端，并且是不存在或选自(N-Me)F、F、f、a、y和Nal；

[0157] 或该多肽的酰胺、酯或盐。

[0158] 在实施方案3A中，本发明涉及式III的多肽，其中X11是D-Nle、Nle或f，或其酰胺、酯或盐。

[0159] 在实施方案4中，本发明因此提供式IV的肽或多肽：

[0160] 

IV

[0161] 其中：

[0162] X1是该多肽的N-末端，并且是不存在、Q、A或pE；

[0163] X3是C、c、hC或D-hC；其中C、c、hC或D-hC的侧链；

[0164] X7是C、c、hC或D-hC；且X7的侧链与X3的C、c、hC或D-hC的侧链形成二硫键；

[0165] X8是K或F；

[0166] X9是G、A、a或不存在；

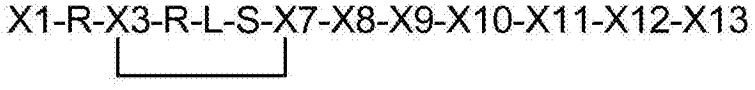
[0167] X10是P或不存在；

[0168] X11是D-Nle、Nle、M或f；且

[0169] X12不存在或选自P、f、a、D-Nva和D-Abu；

[0170] X13是C-末端，并且是不存在或选自(N-Me)F、F、f、a、y和Nal；或该多肽的酰胺、酯或盐。

[0171] 在实施方案4A中，本发明因此提供式IV的肽或多肽：

[0172] 

IV

[0173] 其中：

[0174] X1是该多肽的N-末端，并且是不存在或pE；

[0175] X3是C、c、hC或D-hC;其中C、c、hC或D-hC的侧链;

[0176] X7是C、c、hC或D-hC;且X7的侧链与X3的C、c、hC或D-hC的侧链形成二硫键;

[0177] X8是K或F;

[0178] X9是G、A、a或不存在;

[0179] X10是P或不存在;

[0180] X11是D-Nle、Nle或f;且

[0181] X12不存在或选自P、f、a、D-Nva和D-Abu;

[0182] X13是C-末端,并且是不存在或选自(N-Me)F、F、f、a、y和Nal;或该多肽的酰胺、酯或盐。

[0183] 在实施方案5中,本发明涉及根据实施方案1、2和4中任何一项所述的多肽,其中X1是pE;或该多肽的酰胺、酯或盐。

[0184] 在实施方案中5A,本发明涉及根据实施方案1、2和4中任何一项所述的多肽,其中X1是A或Q;或该多肽的酰胺、酯或盐。在该实施方案的一特别方面,所述肽通过其A或Q N-末端化学连接或融合至延长半衰期的部分。

[0185] 在实施方案6中,本发明涉及根据实施方案1、2、4和4A中任何一项所述的多肽,其中X1不存在;或该多肽的酰胺、酯或盐。

[0186] 在实施方案7中,本发明涉及根据实施方案1至4和6中任何一项所述的多肽,其中N-末端是酰胺;或该多肽的盐。

[0187] 在实施方案8中,本发明涉及根据实施方案7所述的多肽,其中N-末端是式-NHR的酰胺,且R是乙酰基、苯甲酰基、苯甲酰甲基、琥珀酰基、辛酰基、4-苯基丁酰基、4-Cl-Ph-$(CH_2)_3C(O)$-或Ph-$CH_2CH_2NHC(O)$-;或该多肽的盐。

[0188] 在实施方案8A中,本发明涉及实施方案1至4和7中任何一项的多肽,其中N-末端是式NHR1的酰胺,其中R1是$CH_3C(O)$-、CH_3-$(O-CH_2CH_2)_m$-C(O)-、棕榈酰(O2Oc)$_p$、肉豆蔻酰(O2Oc)$_p$、月桂酰(O2Oc)$_p$或Ph-$CH_2CH_2NHC(O)$-;且其中

[0189] p是1至4的整数;

[0190] m是1至12的整数;

[0191] 月桂酰(O2Oc)是$C_{11}H_{23}C(O)NH-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-O-CH_2-C(O)$-;

[0192] 肉豆蔻酰(O2Oc)是$C_{13}H_{27}C(O)NH-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-O-CH_2-C(O)$-;

[0193] 棕榈酰(O2Oc)是$C_{15}H_{31}C(O)NH-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-O-CH_2-C(O)$-;或该多肽的盐。N-末端酰胺的实例已经描述在2012年1月27日提交的US临时申请No.61/591,557(代理人卷号PAT054961-US-PSP)中,将其引入作为参考。

[0194] 在实施方案9中,本发明涉及根据实施方案1至8A中任何一项所述的多肽,其中X13是F或f;或该多肽的酰胺、酯或盐。

[0195] 在实施方案10中,本发明涉及根据实施方案1至8A中任何一项所述的多肽,其中X13不存在;或该多肽的酰胺、酯或盐。

[0196] 在实施方案11中,本发明涉及根据实施方案1-10中任何一项所述的多肽,其中X12不存在;或该多肽的酰胺和酯或盐。

[0197] 在实施方案12中,本发明涉及根据实施方案1至11中任何一项所述的多肽,其中C-末端是酰胺;或该多肽的盐。

[0198] 在实施方案13中，本发明涉及根据实施方案12所述的多肽，其中C-末端是式-C(O)-R2的酰胺并且R2是-NH_2、-NH-Me、-NH-NHBn、-N(CH_3)-(CH_2)$_2$-Ph或-NH-(CH_2)$_2$-Ph；或该多肽的盐。

[0199] 在实施方案14中，本发明涉及根据实施方案1-13中任何一项所述的多肽，其中X8是K；或该多肽的酰胺、酯或盐。

[0200] 在实施方案15中，本发明涉及根据实施方案1至14中任何一项所述的多肽，其中X9是G；或该多肽的酰胺、酯或盐。

[0201] 在实施方案16中，本发明涉及根据实施方案1至15中任何一项所述的多肽，其中X10是P；或该多肽的酰胺、酯或盐。

[0202] 19.

[0203] 在实施方案17中，本发明涉及实施方案1至16中任何一项所述的多肽，其中X11是Nle或D-Nle；或该多肽的酰胺、酯或盐。

[0204] 在实施方案17A中，本发明涉及实施方案1至17中任何一项所述的多肽，其中由X11-X12-X13基团组成的C-末端选自Nle-P-苯乙胺、Nle-P-(N-Me)F、Nle-P-NH2、Nle-苯乙胺、(D-Nle)-苯乙胺、Nle-P-f、D-Nle-a-f、(D-Nle)-NH2、(D-Nle)-f、(D-Nle)-a-d、(D-Nle)-a-y、(D-Nle)-(D-Nva)-f、Nle-P-F、Nle-P-a、Nle-P-NaI和(D-Nle)-(D-Abu)-f，或该多肽的盐。在该实施方案的一特别方面，本发明涉及根据实施方案17A所述的多肽，其中由X11-X12-X13部分组成的C-末端选自(D-Nle)-苯乙胺、(D-Nle)-a-f和f-a-f，或该多肽的盐。

[0205] 在一个实施方案17B中，本发明涉及实施方案1至17中任何一项的肽或多肽，其中氨基酸X1、X3、X4和X7至X13中的至少两个与Pyr-1-apelin-13中存在的相应氨基酸不同。在另一实施方案中，本发明涉及实施方案1至18中任何一项的肽或多肽，其中氨基酸X1、X3、X4和X7至X13中的至少三个与Pyr-1-apelin-13中存在的相应氨基酸不同。在另一实施方案中，本发明涉及实施方案1至18中任何一项的肽或多肽，其中氨基酸X1、X3、X4和X7至X13中的至少四个与Pyr-1-apelin-13中存在的相应氨基酸不同。

[0206] 在另一实施方案中，X1、X3、X4和X7-X13氨基酸是以下实施例部分中的X1、X3、X4和X7-X13氨基酸定义的那些。

[0207] 在另一实施方案中，本发明的个体多肽是在下文实施例部分列出的那些或其药学上可接受的盐。

[0208] 除非另有说明，否则术语“本发明的多肽”是指式(I)及其子式(式II、III或IV)的多肽；或其酰胺、酯或盐。

[0209] 除非另有说明，否则术语“本发明的多肽”、“本发明的肽”、“apelin肽激动剂”等是指式I及其子式(式II、III或IV)的肽和多肽；或其酰胺、酯或盐。本发明的肽和多肽显示出与本文所述的已知apelin肽和多肽(包括但不限于野生型apelin、apelin-13和pyr-1-apelin-13)基本上等价或改进的活性和/或血浆稳定性。

[0210] 本发明的肽及多肽还包括与根据式I、II、III或IV中任一式的肽及多肽或其酰胺、酯或盐以及与本文(包括但不限于实验实施例)具体列出的任何肽或多肽具有至少约95％同一性的肽及多肽。

[0211] 如本文所用，短语“同源氨基酸序列”或其变化形式是指以至少指定百分比的在氨

基酸水平上的同源性为特征的序列，且可与“序列同一性”互换使用。同源氨基酸序列包括那些含有保守氨基酸取代，且多肽具有相同结合和/或活性的氨基酸序列。在一些实施方案中，若氨基酸序列与比较物序列具有至少60％或更高、高至99％的同一性，则其为同源的。在一些实施方案中，若氨基酸序列与比较物序列共享一或多个、多至60个氨基酸取代、添加或缺失，则其为同源的。在一些实施方案中，同源氨基酸序列具有不超过5个或不超过3个保守氨基酸取代。

[0212] 同源性还可在多肽水平上。本发明的肽或多肽或其部分与不同氨基酸序列的同一性程度或百分比如下进行计算：将两个序列比对中精确匹配的数目除以“本发明序列”或“外源序列”中最短者的长度。结果表达为同一性百分数。

[0213] 包含与具体实施例中所述氨基酸序列具有约80-99.9％、优选90-99.9％同一性的氨基酸序列，且具有优于apelin-13或pyr-1-apelin-13的血浆稳定性的多肽落入本发明多肽的范围内。在一实施方案中，血浆稳定性提高至少2倍。在一实施方案中，本发明的多肽具有至少30分钟的血浆稳定性。在另一实施方案中，本发明的多肽具有至少60分钟、或至少80分钟，优选至少100分钟且更优选至少150分钟的血浆稳定性。

[0214] 术语“基本上等价”意味着受体-结合活性、信号转导活性等性质是等价的。因此，可允许甚至诸如受体结合活性的强度及多肽的分子量的等级存在差异。

[0215] 如本文所述的多肽或其通过取代、缺失、添加或插入一或多个氨基酸的基本等价物可称为以上意义的含有氨基酸序列的多肽的基本等价物。如本文所述的多肽或1个至5个、优选1个至3个且更优选1个或2个氨基酸被天然或非天然氨基酸取代的其基本等价物可称为以上意义的含有氨基酸序列的多肽的基本等价物。其他修饰和改变可包括用D-氨基酸替代L-氨基酸，或其他变化包括但不限于磷酸化、羧化、烷基化等，只要维持式I、II、III或IV的肽或多肽的apelin激动活性，并且血浆稳定性得以改进而优于apelin-13的焦谷氨酸化形式。

[0216] 在实施方案19中，本发明还涉及生物缀合物或其多聚体，其包含：

[0217] a.根据前述实施方案中任何一项的式I、II、III或IV的肽或多肽、其酰胺、盐或酯；

[0218] b.延长半衰期的部分；

[0219] 其中所述肽或多肽和所述延长半衰期的部分任选通过连接体共价连接或融合。

[0220] 在实施方案19A中，延长半衰期的部分任选通过连接体部分连接至式I、II、III或IV的肽的N-末端。

[0221] 在实施方案19B中，延长半衰期的部分任选通过连接体部分共价连接或融合至式I、II、III或IV的肽的C-末端。

[0222] 在实施方案19C中，延长半衰期的部分共价连接或融合至式I、II、III或IV的肽的侧链，例如延长半衰期的部分任选通过连接体部分共价连接或融合至K、Orn、Dab、Dap、hK或4-氨基-1sn的侧链的氨基基团。优选地，延长半衰期的部分任选通过连接体部分连接至式I、II、III或IV的肽的N-末端。

[0223] 在实施方案20中，本发明涉及根据实施方案19的生物缀合物或其多聚体，其中延长半衰期的部分是IgG恒定域或其片段、脂肪酸或人血清白蛋白。

[0224] 在实施方案21中，本发明涉及根据实施方案19或20的生物缀合物，其中延长半衰期的部分是具有LALA突变(L234A,L235A)的FcLALA修饰的Fc片段。

[0225] 在实施方案22中，本发明涉及根据实施方案21的生物缀合物，其中延长半衰期的部分是Fc结构域，其通过连接体融合或共价连接至式I、II、III或IV的多肽，其中连接体具有下式:-[GGGGS]n-，n是1、2或3，或连接体是GG或GS并且式I、II、III或IV的多肽含有天然存在的氨基酸。

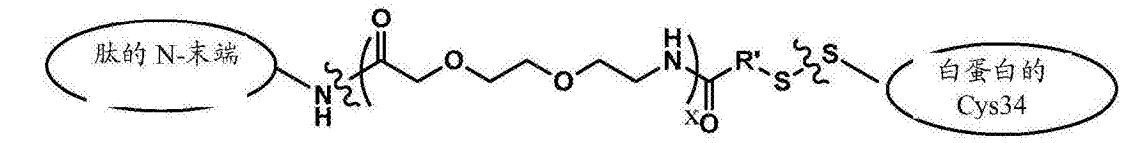
[0226] 在实施方案23中，本发明涉及根据实施方案22的生物缀合物，其中多肽是选自以下的式I的多肽:QRPC*LSC*KGPMPF、C*RPRLSC*KGPMPF和QRC*RLSC*KGPMPF，其中用“*”标记的两个氨基酸表示通过它们的侧链形成二硫键或酰胺键的氨基酸。

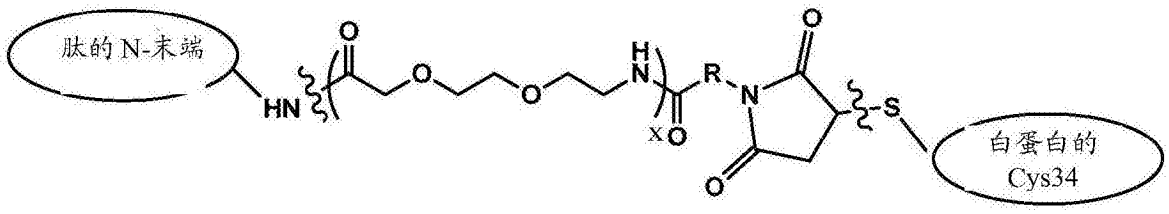
[0227] 在实施方案23A中，本发明涉及根据实施方案22或23的生物缀合物，其中延长半衰期的部分是修饰的Fc结构域，其中C-末端赖氨酸已经被删除或被丙氨酸替换。此类Fc-变体已经描述在共同提交的申请(US临时申请No.62/015848:代理人案卷号PAT055781-US-PSP02)并且与Apelin肽/多肽产生更稳定的融合蛋白质。

[0228] 在实施方案24中，本发明涉及根据实施方案19或20的生物缀合物或其多聚体，其中延长半衰期的部分是人血清白蛋白。

[0229] 在实施方案25中，本发明涉及根据实施方案24的生物缀合物，其中人血清白蛋白通过下式的连接体化学连接至式I至IV中任何一项的多肽的N-末端:

[0230]

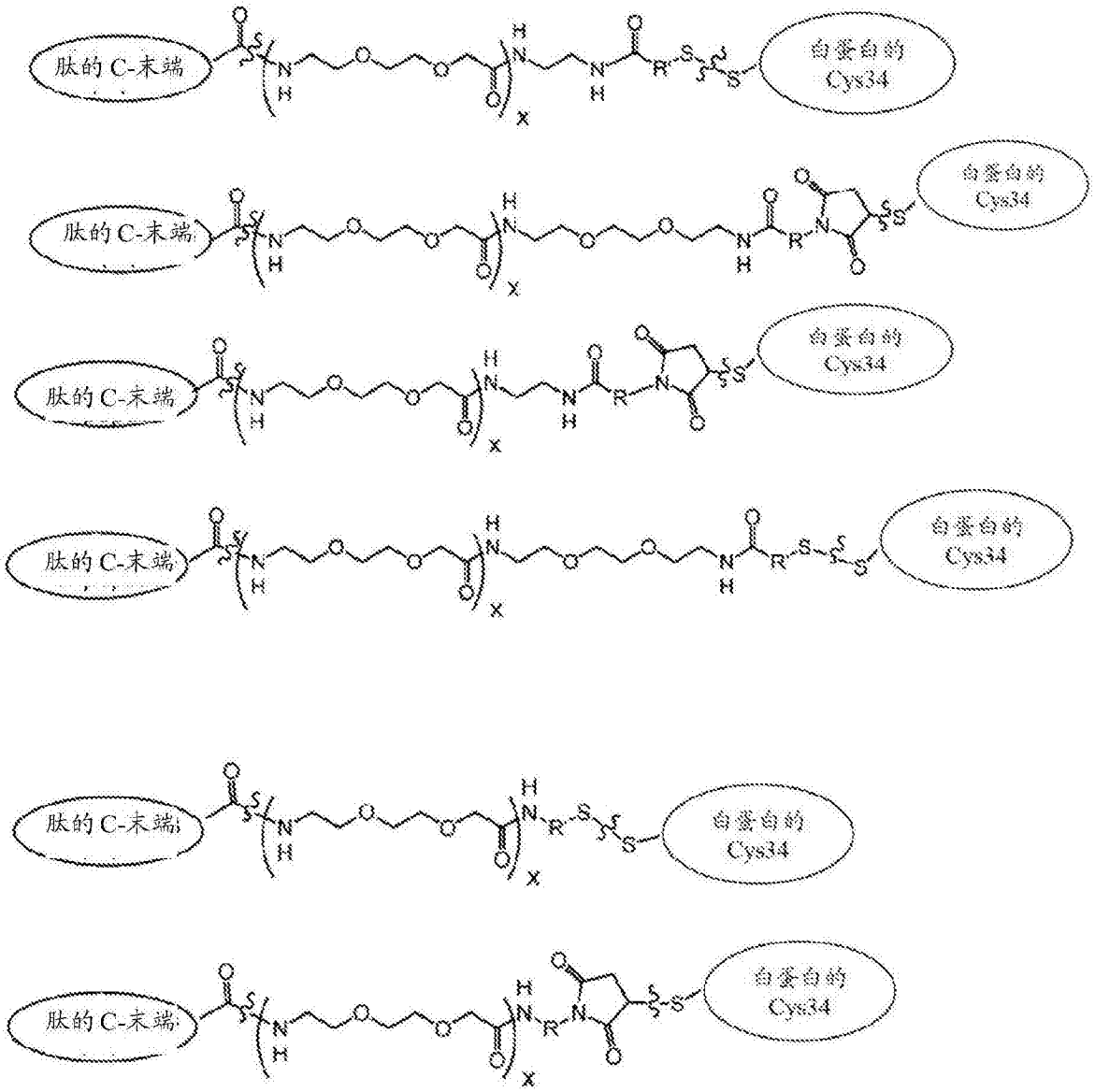




[0231] 其中x是1-20，R是线性的或支链的亚烷基、环烷基、芳基或杂芳基或其组合，R’是线性的或支链的亚烷基、芳基或环烷基或其组合。

[0232] 在实施方案26中，本发明涉及根据实施方案19或20的生物缀合物，其中人血清白蛋白通过下式的连接体化学连接至式I至IV中任何一项的多肽的C-末端:

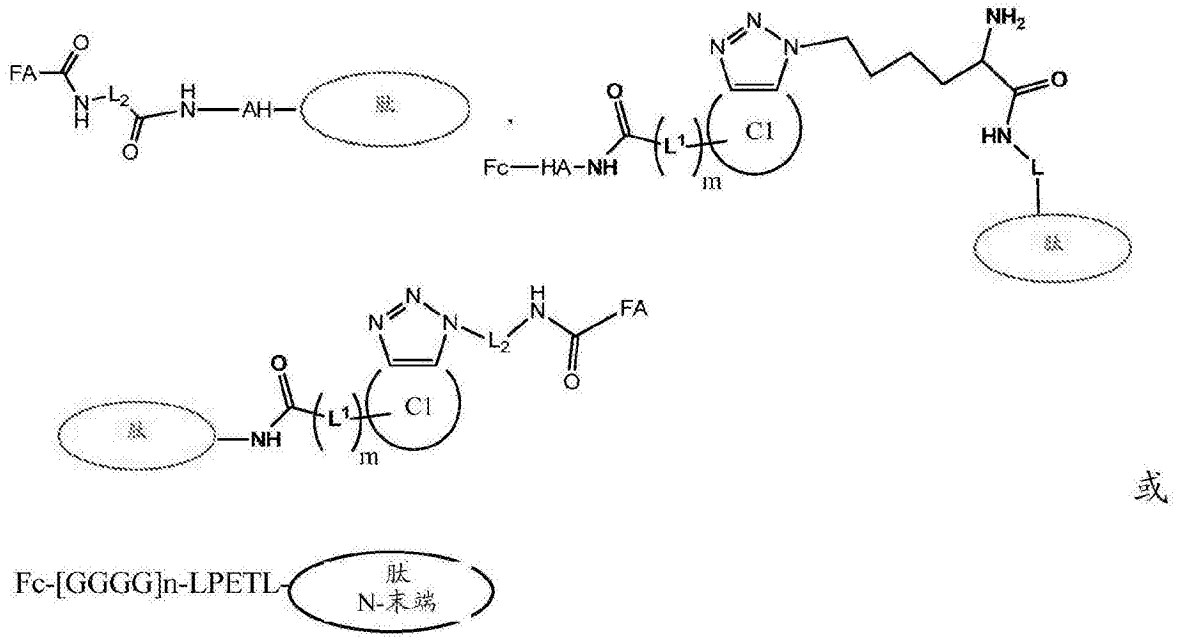
[0233]



[0234] 其中x是1-20,R是线性的或支链的亚烷基、环烷基、芳基或杂芳基或其组合,R'是线性的或支链的亚烷基、芳基或环烷基或其组合。

[0235] 在其它实施方案中,本发明的生物缀合物具有下式:

[0236]



或

[0237] 其中肽是肽的N-末端，A是丙氨酸，H是组氨酸，n是1、2或3，m是0或1，L和L2是连接体，C1是任选被氟取代的单、二或三环碳环或杂环系统，并且L^1是C1-C20亚烷基连接体，其中亚烷基链任选被氧代(=O)取代，并且其中一个或多个碳被O或NH替换。在该实施方案的一特别方面，L和L2是PEG连接体。

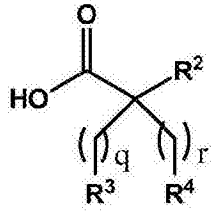
[0238] 延长半衰期的部分

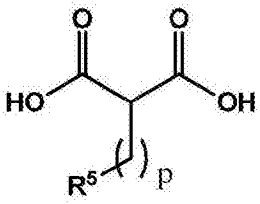
[0239] 本发明的延长半衰期的部分能够共价连结、连接、缀合或融合至肽或多肽类似物。延长半衰期的部分可能是例如聚合物例如聚乙二醇(PEG)、脂肪酸、胆固醇基团、碳水化合物或低聚糖；与补救(salvage)受体结合的任何天然或合成的蛋白质、多肽或肽。优选地，延长半衰期的部分任选通过连接体共价连接至有长血清半衰期的血浆蛋白质(白蛋白和免疫球蛋白)。例如，延长半衰期的部分是IgG恒定域或其片段(例如Fc区)、人血清白蛋白(HSA)或白蛋白-结合多肽或残基(例如脂肪酸)。优选地，生物缀合物的延长半衰期的部分是人血清白蛋白、脂肪酸或Fc区。

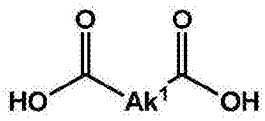
[0240] 延长半衰期的部分包括白蛋白，其是指血浆中最大量的蛋白质，具有为其单体形式的大约65至67千道尔顿的分子量，这取决于物种来源。术语“白蛋白”与“血清白蛋白”可互换使用，不意味着限定与本发明的修饰的肽形成缀合物的白蛋白的来源。因此，文中使用的术语“白蛋白”可以指从天然源例如血液或血清液纯化的白蛋白，或其可以涉及化学合成的或重组产生的白蛋白。本发明的修饰的肽或多肽优选任选通过连接体拴接至白蛋白的表面上的半胱氨酸-34的游离巯基。

[0241] 延长半衰期的部分包括脂肪酸，其能够被定义为C6-70烷基、C6-70烯基或C6-70炔基链，其各自被至少一个羧酸(例如1、2、3或4个CO2H)取代，并且还任选被羟基基团取代。脂肪酸的实例由式A1、A2和A3所定义：

[0242]







A1 A2 或 A3

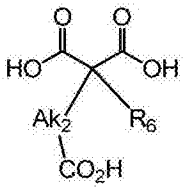
[0243] R^2是CO_2H、H；

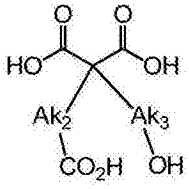
[0244] R^3、R^4和R^5相互独立地是H、OH、CO_2H、$-CH=CH_2$或-C≡CH；

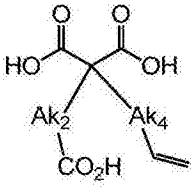
[0245] Ak^1是支链的C_6-C_{30}亚烷基；

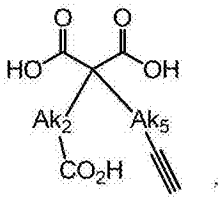
[0246] q、r和p相互独立地是6至30的整数；或其酰胺、酯或药学上可接受的盐。

[0247] 脂肪酸的实例选自：

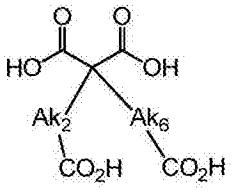


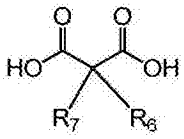




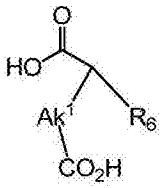


[0248]





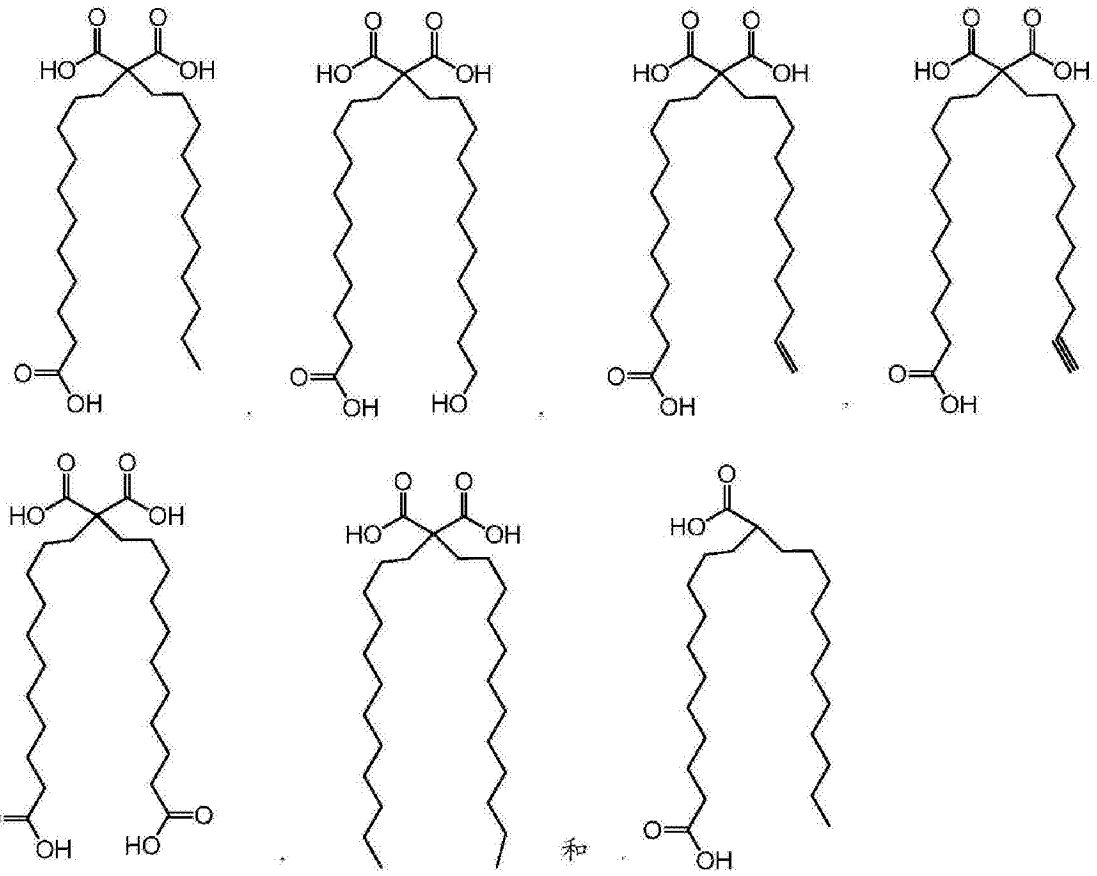
和



[0249] 其中Ak^2、Ak^3、Ak^4、Ak^5和Ak^6独立地是(C_{8-20})亚烷基，R^6和R^7独立地是(C_{8-20})烷基。

[0250] 更具体地，脂肪酸选自：

[0251]



[0252] 这些脂肪酸部分已经描述在共同提交的申请US临时申请No.62/015862代理人案卷号PAT056274-US-PSP中。

[0253] 延长半衰期的部分包括“天然的Fc”，其是指包含由消化完整抗体产生的或其它方式产生的非-抗原-结合片段(单体或多聚体形式的)的序列的分子或序列，并且可能含有铰链区。天然的Fc的原始免疫球蛋白源优选是人源的，并且能够是任何免疫球蛋白，尽管IgG1和IgG2是优选的。天然的Fc分子由能够通过共价(即二硫键)和非共价联结而连接为二聚体或多聚体形式的单体多肽构成。天然的Fc分子的单体亚基间的分子间二硫键的数目为1至4，这取决于类别(例如IgG、IgA和IgE)或亚类(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgA1和IgGA2)。天然的Fc的一个实例是由IgG的木瓜蛋白酶消化产生的二硫键键合的二聚体(参见Ellison等人，1982，Nucleic Acids Res.10:4071-9)。文中使用的术语“天然的Fc”概括指单体、二聚体和多聚体形式。

[0254] 延长半衰期的部分包括“Fc变体”，其是指由天然的Fc修饰的但仍包含补救受体FcRn(新生儿Fc受体)结合位点的分子或序列。国际公开号.WO 97/34631和WO 96/32478描述了示例性Fc变体以及与补救受体的相互作用，在此引入作为参考。因此，术语“Fc变体”可能包括从非人类天然的Fc人源化的分子或序列。此外，天然的Fc包含能够被移除的区域，因为它们提供本发明的生物缀合物不需要的结构特征或生物活性。因此，术语“Fc变体”包括这样的分子或序列，它们缺少1个或多个天然的Fc位点或残基或其中1个或多个Fc位点或残基被修饰，所述位点或残基影响或涉及(1)二硫键形成，(2)与选择的宿主细胞的不相容性，(3)一旦在选择的宿主细胞中表达时N-末端的异质性，(4)糖基化，(5)与补体相互作用，(6)

与Fc受体结合而不与补救受体结合，或(7)抗体依赖性细胞毒性(ADCC)。Fc变体在下文中进一步详细描述。

[0255] 延长半衰期的部分包括其中C-末端赖氨酸已经被删除或被丙氨酸替换的Fc变体。

[0256] 延长半衰期的部分涉及包括上面定义的天然的Fc和Fc变体和序列的“Fc结构域”。如Fc变体和天然的Fc分子，术语“Fc结构域”包括由消化完整抗体或其它方式产生的单体或多聚体形式的分子。在本发明的一些实施方案中，Fc结构域能够通过例如Fc结构域和肽序列之间的共价键缀合至式I'或式I-IV中任何一式的多肽。此类Fc蛋白能够通过Fc结构域的联结形成多聚体，并且这些Fc蛋白和它们的多聚体是本发明的一个方面。

[0257] 延长半衰期的部分包括"修饰的Fc片段"，其意指包含修饰的序列的抗体的Fc片段。Fc片段是包含CH2、CH3和部分铰链区的抗体部分。修饰的Fc片段可能获自例如IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。FcLALA是具有LALA突变(L234A,L235A)的修饰的Fc片段，其以降低的效力触发ADCC，并且弱地结合和活化人补体。Hessell等人2007Nature 449:101-104。对Fc片段的另外的修饰描述在例如U.S.专利No.7,217,798中。

[0258] 应用至Fc结构域或包含Fc结构域的分子的术语“多聚体”是指具有共价联结的两个或多个多肽链的分子。例如IgG分子典型地形成二聚体，并且因此包含二聚的IgG分子的生物缀合物将融合至两条式I、IA、II、III或IV的多肽链。

[0259] 连接体

[0260] 任何连接体基团是任选的。当存在时，其化学结构不是关键性的，因为其主要作为间隔臂。

[0261] 连接体是含有两个反应性基团/官能团的化学部分，其中一个反应性基团/官能团能够与多肽反应，另一个能够与延长半衰期的部分反应。连接体的两个反应性基团通过连接基团连接，连接基团的结构不是关键性的，只要其不干扰连接体与肽和延长半衰期的部分的偶联。

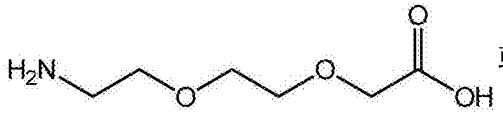
[0262] 连接体可能由通过肽键连接在一起的氨基酸构成。在本发明的一些实施方案中，连接体由通过肽键连接的1至20个氨基酸构成，其中氨基酸选自20种天然存在的氨基酸。在各实施方案中，所述1至20个氨基酸选自氨基酸甘氨酸、丝氨酸、丙氨酸、脯氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、半胱氨酸和赖氨酸。在一些实施方案中，连接体由多个非立体阻碍的氨基酸例如甘氨酸和丙氨酸构成。在一些实施方案中，连接体是聚甘氨酸、聚丙氨酸、甘氨酸和丙氨酸的组合(例如聚(Gly-Ala))或甘氨酸和丝氨酸的组合(例如聚(Gly-Ser))。在一些实施方案中，连接体包含多个氨基酸，所述氨基酸选自组氨酸、丙氨酸、甲硫氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺和甘氨酸。在一些实施方案中，连接体含有聚组氨酸部分。连接体的实例是包含基序(motif)AH、MHA或AHA的连接体。这些基序已经描述在共同未决的申请和共同提交的申请：代理人案卷号US临时申请No.62/015862:PAT056274-US-PSP和US临时申请No.62/015868:PAT056275-US-PSP，对于肽或多肽的N-末端处的选择性缀合是有益的。

[0263] 连接体的其它实例包含基序GGGGSGGGGSGGGGS、GGGGSGGGGS、GGGGS、GS或GG。

[0264] 在一些实施方案中，连接体包含酶的识别基序。一个实例是可能被包含在C-末端的LPXTG/A基序，其中X是任何氨基酸，最通常是E:谷氨酸(L:亮氨酸，P:脯氨酸，T:苏氨酸，G:甘氨酸，A:丙氨酸)。(Carla P.Guimaraes等人:“Site specific C-terminal and internal loop labeling of proteins using sortase-mediated reactions”,Nature

protocols,vol 8,No 9,2013,1787-1799)。

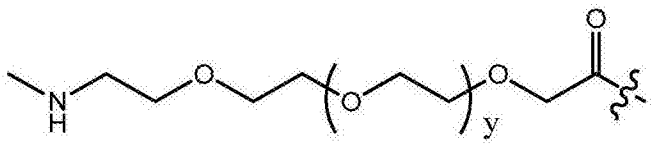
[0265] 在其它实施方案中，连接体包含1至20个氨基酸，其选自非天然的氨基酸。而3-15个氨基酸残基的连接体对于与延长半衰期的部分缀合是优选的，本发明考虑任何长度或组成的连接体。优选的氨基酸连接体是下式的020c：

[0266]  或其重复单元。

[0267] 文中描述的连接体是示例性的，并且更长的及包含其它残基的连接体也被本发明所考虑。本发明还考虑非肽连接体。

[0268] 连接体的连接部分可以包含一个或多个烷基基团、烷氧基基团、烯基基团、环烷基基团、芳基基团、杂芳基基团和杂环基团或其组合。例如，可能使用烷基连接体例如-NH-(CH_2)z-C(O)-或-S-(CH_2)z-C(O)-或-O-(CH_2)z-C(O)-，其中z是2-20。这些烷基连接体可能进一步被任何非立体阻碍的基团包括但不限于低级烷基(例如C1-C6)、低级酰基、卤素(例如Cl、Br)、CN、NH2或苯基取代。

[0269] 连接体还可能是聚合物性质的。连接体可以包含生物稳定的或生物可降解的聚合物链或单元。取决于键不稳定性，具有重复连接的聚合物在生理条件下可以具有不同的稳定程度。聚合物可以含有键例如例如聚碳酸酯(-O-C(O)-O-)、聚酯(-C(O)-O-)、聚氨基甲酸酯(-NH-C(O)-O-)、聚酰胺(-C(O)-NH-)。这些键以例示方式提供，但不意欲限制可在本发明的聚合物链或连接体中应用的键的类型。适当的聚合物包括例如聚乙二醇(PEG)、聚乙烯吡咯烷酮、聚乙烯醇、聚氨基酸、二乙烯醚马来酸酐、N-(2-羟基丙基)-甲基丙烯酰胺、葡聚糖、葡聚糖衍生物、聚丙二醇、聚氧乙基化多元醇(polyoxyethylated polyol)、肝素、肝素片段、多糖、纤维素和纤维素衍生物、淀粉和淀粉衍生物、聚烷二醇和其衍生物、聚烷二醇的共聚物和其衍生物、聚乙烯乙基醚等和其混合物。聚合物连接体是例如PEG。示例性非-肽连接体是聚乙二醇连接体：

[0270] 

[0271] 其中y是使连接体具有100至5000kD例如100至500kD的分子量的。

[0272] 优选地，连接部分含有一个或多个氨基酸部分例如(020c)单元或甘氨酸或丝氨酸、C_{1-4}亚烷基-C(O)-、C_{1-4}亚烷基、-NH-C_{2-6}亚烷基-NH-或-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-NH-二氨基单元或其组合，并且连接部分连接2个反应性基团或官能团。

[0273] 优选地，反应性基团或官能团是马来酰亚胺、巯基或吡啶-2-基二硫烷基。

[0274] 肽或多肽以及用于连接至延长半衰期的部分的肽-连接体构建物的制备：

[0275] 本发明的apelin肽和多肽和/或肽-连接体构建物可以通过合成化学方法或重组方法或该两种方法的组合产生。Apelin肽和/或肽-连接体构建物可以以全长制备或可以作为非全长片段合成并连接。本发明的肽和多肽可通过本身已知用于肽合成的方法来制备。用于肽合成的方法可以是任何固相合成和液相合成。因此，目标肽及多肽可通过缩合能够构成蛋白的部分肽或氨基酸与其剩余部分来制备，当产物具有保护基团时，脱除保护基团，由此可以制备期望的肽。用于缩合及脱除保护的已知方法包括以下文献(1)-(5)中所述的

方法。

[0276] (1)M.Bodanszky和M.A.Ondetti,Peptide Synthesis,Interscience Publishers,New York,1966,

[0277] (2)Schroeder和Luebke,The Peptide,Academic Press,New York,1965,

[0278] (3)Nobuo Izumiya等人.Fundamentals and Experiments in Peptide Synthesis,Maruzen,1975,

[0279] (4)Haruaki Yajima和Shumpei Sakakibara,Biochemical Experiment Series 1,Protein Chemistry IV,205,1977,以及

[0280] (5)Haruaki Yajima(编辑),Development of Drugs-Continued,14,Peptide Synthesis,Hirokawa Shoten。

[0281] 在反应后,可通过惯用的纯化技术(例如溶剂萃取、柱色谱、液相色谱和重结晶)的组合来纯化并分离肽。当如上所分离的肽为游离化合物时,可通过已知方法将其转化成适宜盐。相反地,如果所分离的产物是盐,则可通过已知方法将其转化成游离肽。

[0282] 可通过使用适用于酰胺化的用于肽合成的树脂来获得多肽的酰胺。所述树脂包括氯甲基树脂、羟甲基树脂、二苯甲胺树脂、氨甲基树脂、4-苄氧基苄醇树脂、4-甲基二苯甲胺树脂、PAM树脂、4-羟基甲基甲基苯基乙酰氨基甲基树脂、聚丙烯酰胺树脂、4-(2',4'-二甲氧基苯基-羟甲基)苯氧基树脂、4-(2',4'-二甲氧基苯基-Fmoc-氨甲基)苯氧基树脂、2-氯三苯甲基氯树脂等。使用此类树脂,通过本身已知的各种缩合技术,根据目标肽的序列使侧链的α-氨基和官能基团已经适当保护的氨基酸在该树脂上缩合。在系列反应结束时,从树脂移除肽或被保护的肽,并去除保护基团,并且在需要的情况下形成二硫键,以获得目标多肽。

[0283] 对于上述保护氨基酸的缩合,可使用多种用于肽合成的活化试剂,例如HATU、HCTU或例如碳二亚胺。碳二亚胺包括DCC、N,N'-二异丙基碳二亚胺和N-乙基-N'-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺。对于利用此类试剂的活化,可使用外消旋化抑制剂添加剂,例如HOBt或Oxyma Pure。被保护的氨基酸可与活化试剂及外消旋化抑制剂一起直接添加至树脂中或可预先活化为对称酸酐、HOBt酯或HOOBt酯,然后添加至树脂中。用于被保护的氨基酸的活化或与树脂缩合的溶剂可适当地选自已知可用于肽缩合反应的溶剂。例如,可提及的是N,N-二甲基甲酰胺、N-甲基吡咯啶酮、氯仿、三氟乙醇、二甲亚砜、DMF、吡啶、二噁烷、二氯甲烷、四氢呋喃、乙腈、乙酸乙酯或它们的合适的混合物。

[0284] 反应温度可选自迄今已知可用于肽键形成的范围,且通常为选自约-20℃-50℃的范围。活化的氨基酸衍生物通常以1.5-4倍过量的比例使用。若通过利用茚三酮反应的测试发现缩合不充分,则可在不去除保护基团的情况下重复缩合反应以实现充分缩合。如果重复缩合仍无法提供足够程度的缩合,则可用乙酸酐或乙酰基咪唑使未反应的氨基乙酰化。

[0285] 用于起始材料氨基酸的氨基的保护基团包括Z、Boc、叔-戊氧基羰基、异冰片基氧基羰基、4-甲氧基苄氧基羰基、Cl-Z、Br-Z、金刚烷基氧基羰基、三氟乙酰基、邻苯二甲酰基、甲酰基、2-硝基苯基亚磺酰基、二苯基硫膦基(diphenylphosphinothioyl)或Fmoc。可使用的羧基保护基团包括但不限于上述的C_{1-6}烷基、C_{3-8}环烷基及C_{6-10}芳基-C_{1-2}烷基以及2-金刚烷基、4-硝基苄基、4-甲氧基苄基、4-氯苄基、苯甲酰甲基、苄氧基羰基酰肼基、叔-丁氧基羰基酰肼基及三苯甲基酰肼基。

[0286] 丝氨酸及苏氨酸的羟基可通过酯化或醚化来保护。适用于所述酯化的基团包括碳衍生的基团，例如低级烷酰基(例如乙酰基等)、芳酰基(例如苯甲酰基等)、苄氧基羰基及乙氧基羰基。适用于所述醚化的基团包括苄基、四氢吡喃基及叔丁基。酪氨酸的酚羟基的保护基团包括Bzl、Cl_2-Bzl、2-硝基苄基、Br-Z及叔丁基。

[0287] 组氨酸的咪唑的保护基团包括Tos、4-甲氧基-2,3,6-三乙基苯磺酰基、DNP、苄氧基甲基、Bum、Boc、Trt和Fmoc。

[0288] 起始氨基酸的活化羧基包括相应酸酐、叠氮化物及活性酯，例如与诸如五氯苯酚、2,4,5-三氯苯酚、2,4-二硝基苯酚、氰基甲醇、对-硝基苯酚、HONB、N-羟基琥珀酰亚胺、N-羟基邻苯二甲酰亚胺、HOBt等醇形成的酯。起始氨基酸的活化氨基包括相应磷酰胺。

[0289] 消除保护基团的方法包括在催化剂(例如钯黑或靶碳)存在下使用氢气催化还原，用无水氢氟酸、甲磺酸、三氟甲磺酸、三氟乙酸或这些酸的混合物进行酸处理，用二异丙基乙胺、三乙胺、哌啶、哌嗪进行碱处理，在液氨中用金属钠还原。通过上述酸处理的消除反应通常在-20℃-40℃的温度下进行，并且可通过添加阳离子受体有利地进行，所述阳离子受体诸如苯甲醚、苯酚、苯甲硫醚、间-甲酚、对-甲酚、甲硫醚、1,4-丁二硫醇、1,2-乙二硫醇等。用于保护组氨酸的咪唑基团的2,4-二硝基苯基可通过用硫酚处理来消除，而用于保护色氨酸的吲哚基团的甲酰基可通过用稀氢氧化钠溶液或稀氨水碱处理以及在1,2-乙二硫醇、1,4-丁二硫醇存在下通过上述酸处理来消除。

[0290] 用于保护不应参与起始原料反应的官能基团的方法、可使用的保护基团、去除保护基团的方法及活化欲参与反应的官能基团的方法可全部从已知基团和方法中有判断地选择。

[0291] 另一获得多肽的酰胺形式的方法包含：首先使C末端氨基酸的α-羧基酰胺化，然后延长N-侧的肽链直至期望链长度，然后选择性地脱保护该C-末端肽的α-氨基及待形成目标多肽的剩余部分的氨基酸或肽的α-羧基，并在混合溶剂(例如提及上文所的那些)中缩合所述两个片段，其中该两个片段的α-氨基及侧链官能基团已经用上文所述的适宜保护基团保护。此缩合反应的参数可以与上文所述相同。通过上述方法，从通过缩合获得的被保护的肽中去除所有保护基团，从而提供期望的粗肽。可通过已知纯化程序来纯化这一粗肽并冻干主要级分，以提供目标酰胺化多肽。为获得多肽的酯，使C-末端氨基酸的α-羧基与期望的醇缩合，得到氨基酸酯，并且然后进行上文所述用于制造酰胺的程序。

[0292] 或者，重组表达方法是特别有用的。利用宿主细胞的重组蛋白表达(人工操纵以包含编码肽序列的核酸的细胞，且其将转录和翻译并任选分泌肽至细胞培养基中)是现有技术常规使用的。对于重组生产方法，编码肽的氨基酸序列的核酸典型地通过常规方法合成，并被整合至表达载体中。此类方法特别优选用于制备包含融合至另外的肽序列或其它蛋白质或蛋白质片段或结构域的肽的多肽组合物。宿主细胞可任选为至少选自以下的一种：E.Coli、COS-1、COS-7、HEK293、BHT21、CHO、BSC-1、Hep G2、653、SP2/0、293、heLa、骨髓瘤、淋巴瘤、酵母、昆虫或植物细胞或其任何衍生的、固定化的或转化的细胞。

[0293] 修饰的治疗肽或多肽和/或肽-连接体构建物包含反应性基团，其可与延长半衰期的部分上的可用的反应性官能团反应形成共价键。反应性基团是能够形成共价键的化学基团。反应性基团通常可以是羧基、磷酰基、酰基基团、酯或混合酸酐、马来酰亚胺、亚氨酸酯(imidate)、吡啶-2-基-二硫烷基，从而能够与在白蛋白或Fc结构域的目标位点的官能团如

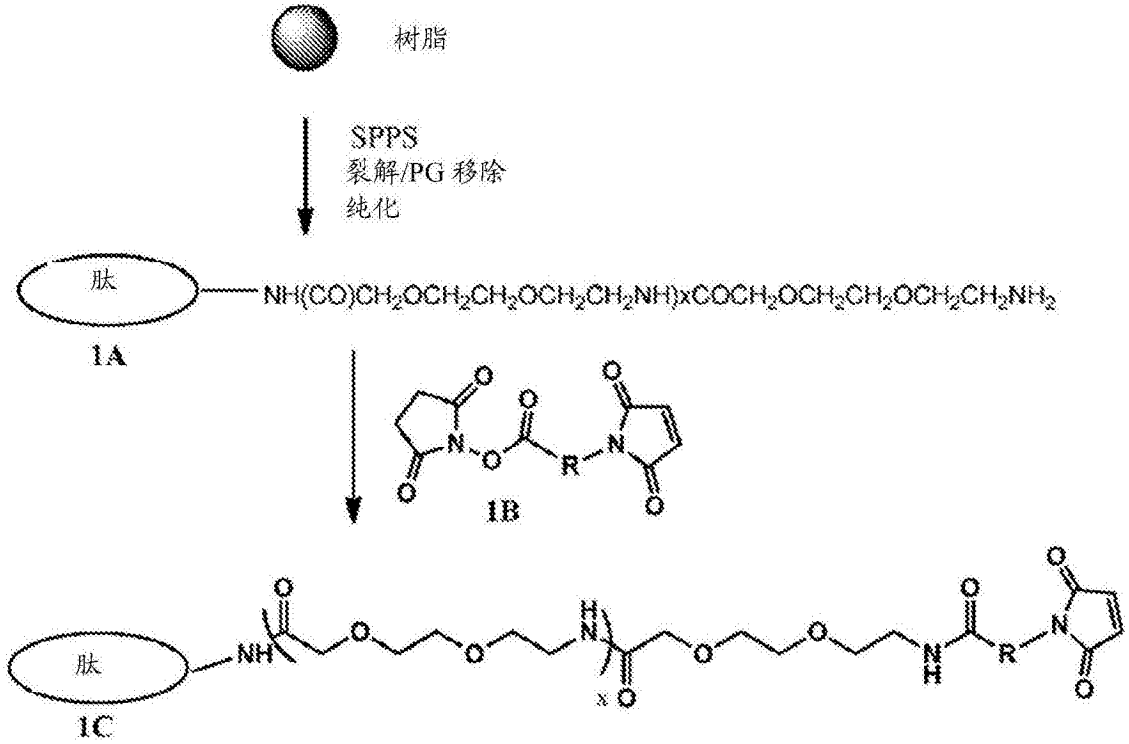
氨基基团、羟基基团、羧基基团或巯基形成共价键。用于连接至白蛋白的特别感兴趣的反应性基团包括含有马来酰亚氨基的基团和含有吡啶-2-基-二硫烷基的基团。

[0294] 官能团是白蛋白或Fc结构域上的基团，修饰的肽或多肽上的反应性基团能够与其反应形成共价键。官能团包括用于与酯反应性实体键合的羟基基团；用于与马来酰亚胺、含有马来酰亚氨基的基团或吡啶-2-基二硫烷基、亚氨酸酯(imidates)和硫酯基团反应的巯基；用于与羧酸、磷酰基基团、酰基基团键合的氨基基团；和用于与肼、酰肼或羟胺反应的羧基基团。

[0295] 流程1至3描述肽-连接体构建物的合成，其中肽是根据式I至IV中任何一项所述的肽。

[0296] 流程1描述连结至式I至IV的多肽的N-末端的含有马来酰亚胺的连接体的合成。

[0297]

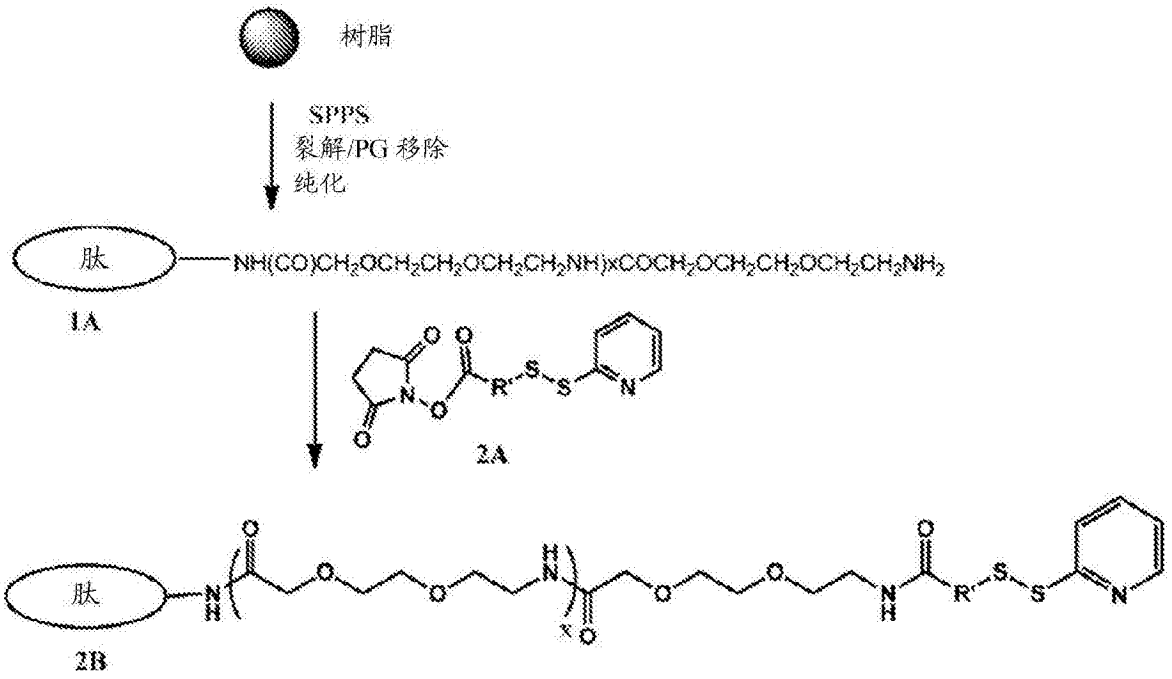


[0298] 流程1

[0299] 根据很好建立的酰胺偶联化学，使肽的N-末端与一个或多个020c氨基酸单元(x是1至20，优选1至10，并更优选3至6)偶联产生(1A)。(1A)的末端氨基官能团与活化的酸(1B)(其中R是线性的或支链的亚烷基、芳基、杂芳基、环烷基或其组合)反应，产生肽-含有马来酰亚胺的连接体构建物(1C)。活化的酸(1B)是可商业获得的或根据本领域技术人员已知的技术从其相应的羧酸容易地获得。优选地，R是线性的亚烷基，并且更优选R是-CH_2-CH_2-。备选地，对于在侧链中含有氨基官能团的肽(例如含有赖氨酸的肽)，在偶联反应前需要正交保护基例如Alloc，随后需要另外的脱保护步骤，以获得(1C)。

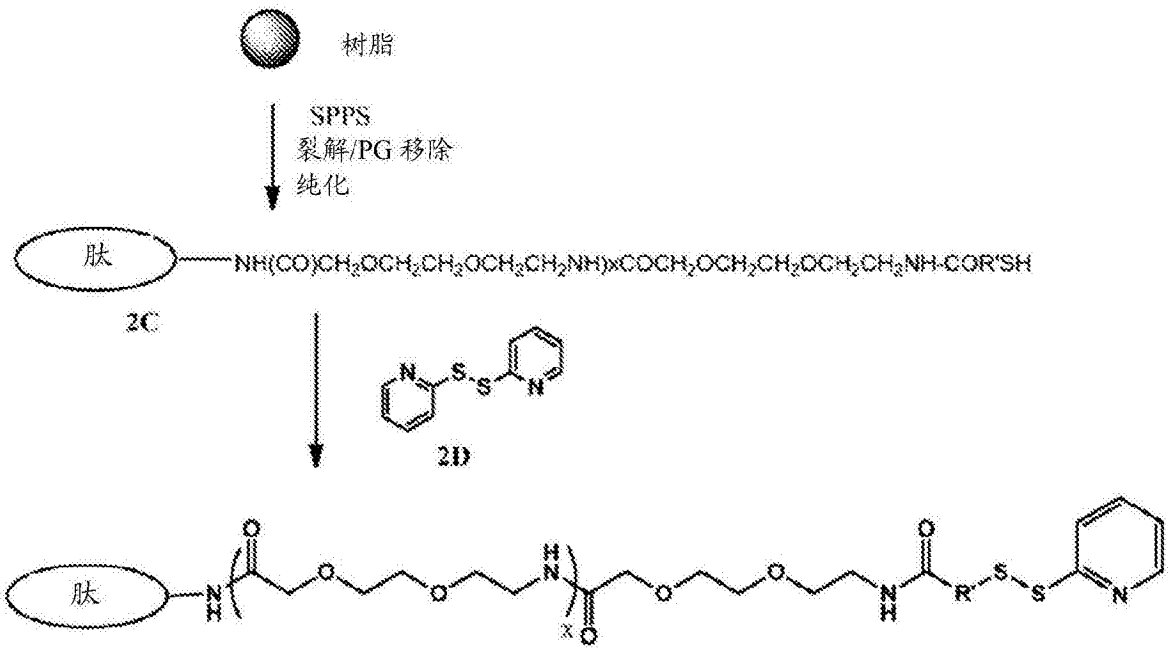
[0300] 流程2A和2B描述连结至根据式I至IV中任何一项所述的多肽的N-末端的含有吡啶-2-基-二硫烷基的连接体的合成。

[0301]



[0302] 流程2A

[0303]



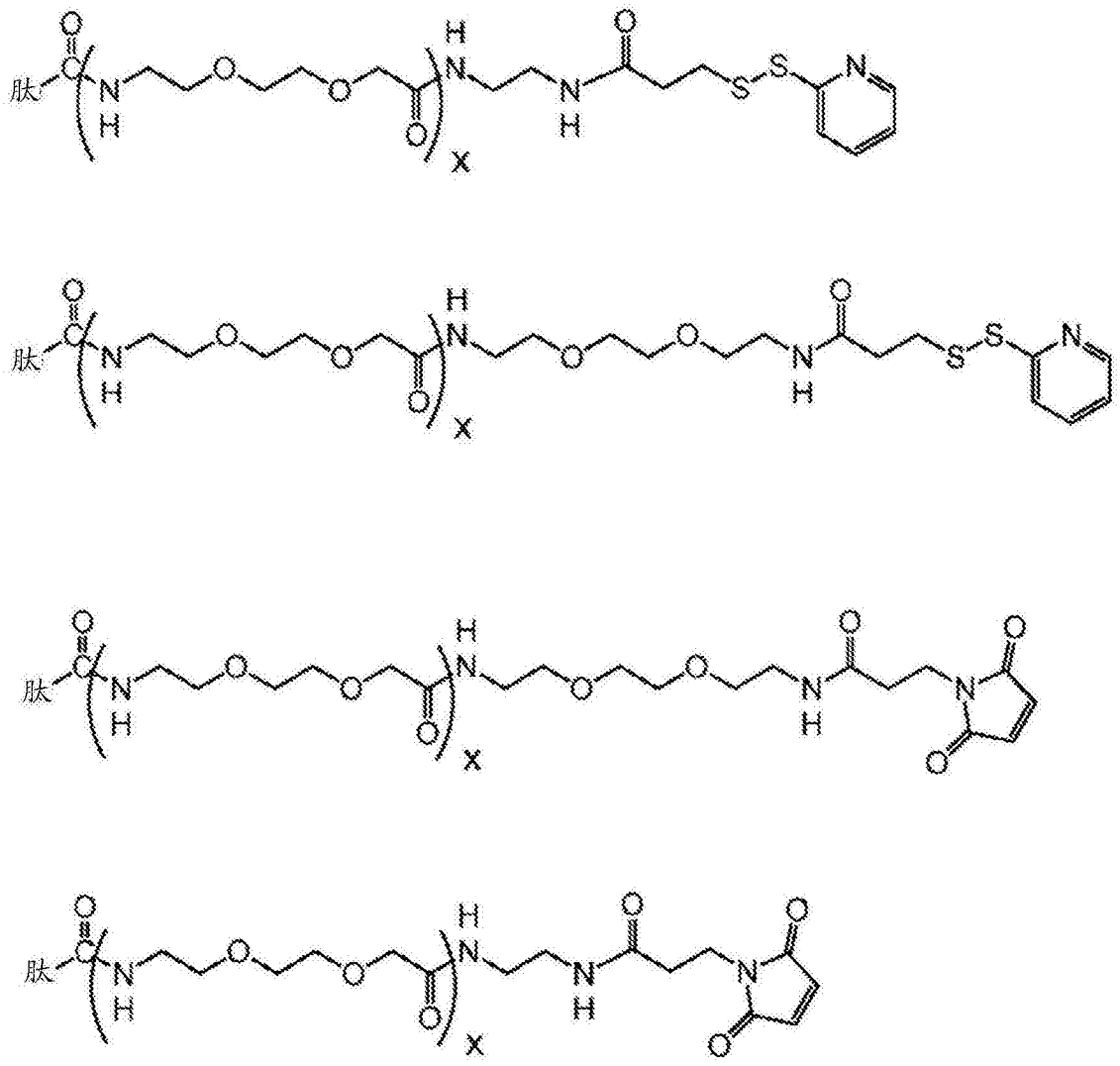
[0304] 流程2B

[0305] 肽-连接体构建物(1A)如流程1中所述那样制备,并进一步与式(2A)的活化的酸(其中R'是线性的或支链的亚烷基)反应,产生肽-含有吡啶-2-基-二硫烷基的连接体构建物(2B)。活化的酸(2A)是可商业获得的或根据本领域技术人员已知的技术从其相应的羧酸容易地获得。优选地,R'是-CH_2-CH_2-。备选地,肽-连接体构建物(2C)可采用HO_2C-R'-SH或其保护形式(例如三苯甲基或Acm基团,需要另外的脱保护步骤)制备,进一步与(2D)反应,产生肽-含有吡啶-2-基-二硫烷基的连接体构建物(2B)。

[0306] 采用二氨基单元例如-NH-CH_2CH_2-NH-或-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-NH-,以与流程1、2A

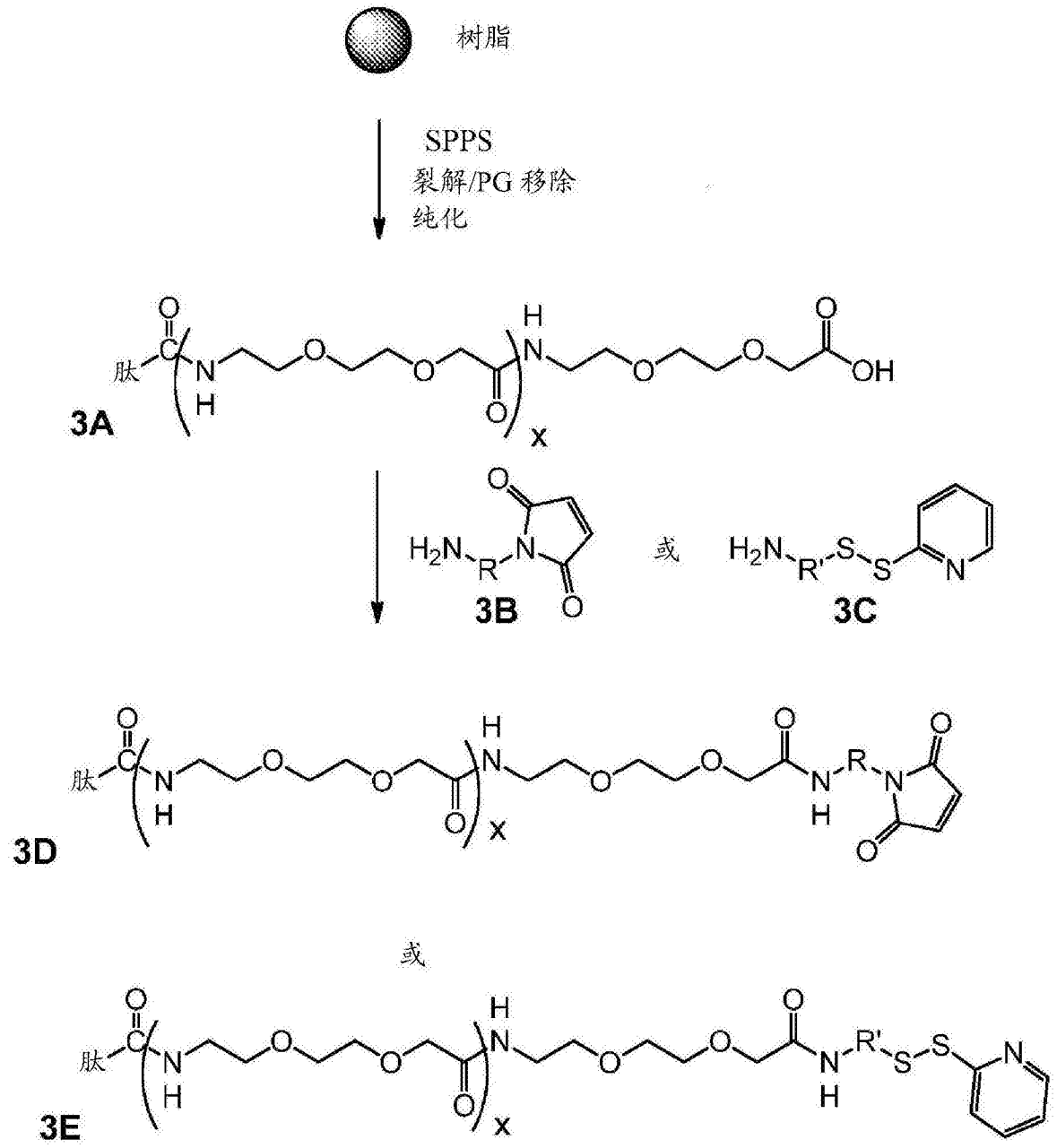
和2B中所述类似的方法将类似的反应性基团连结至肽的C-末端。此类肽-连接体构建物的非限制性实例是：

[0307]



[0308] 或者，可根据流程3A、3B和3C，将马来酰亚胺或吡啶-2-基-二硫烷基反应性基团连结至根据式I至IV中任何一项所述的多肽：

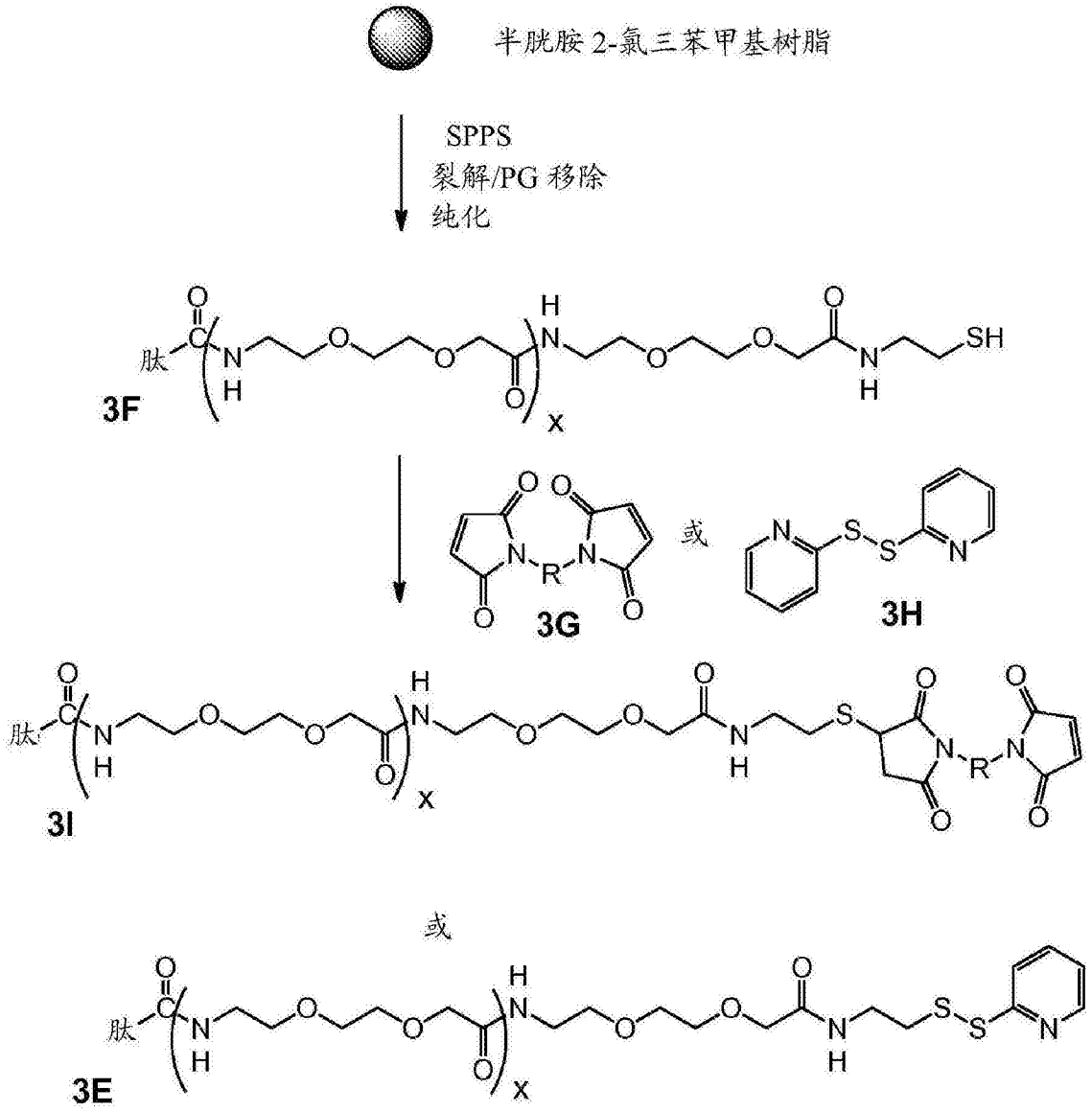
[0309]



[0310] 流程3A

[0311] 采用标准酰胺偶联条件，使肽的C-末端羧酸基团与一个或多个020c氨基酸单元偶联产生(3A)。末端羧酸官能团与(3B)或(3C)(其中R和R'如上所定义)的氨基基团反应，产生活化的肽-连接体构建物(3D)或(3E)。此外，当肽含有羧基官能团侧链(例如Glu或Asp)时，需要正交保护基(例如O-烯丙基)和另外的脱保护步骤。

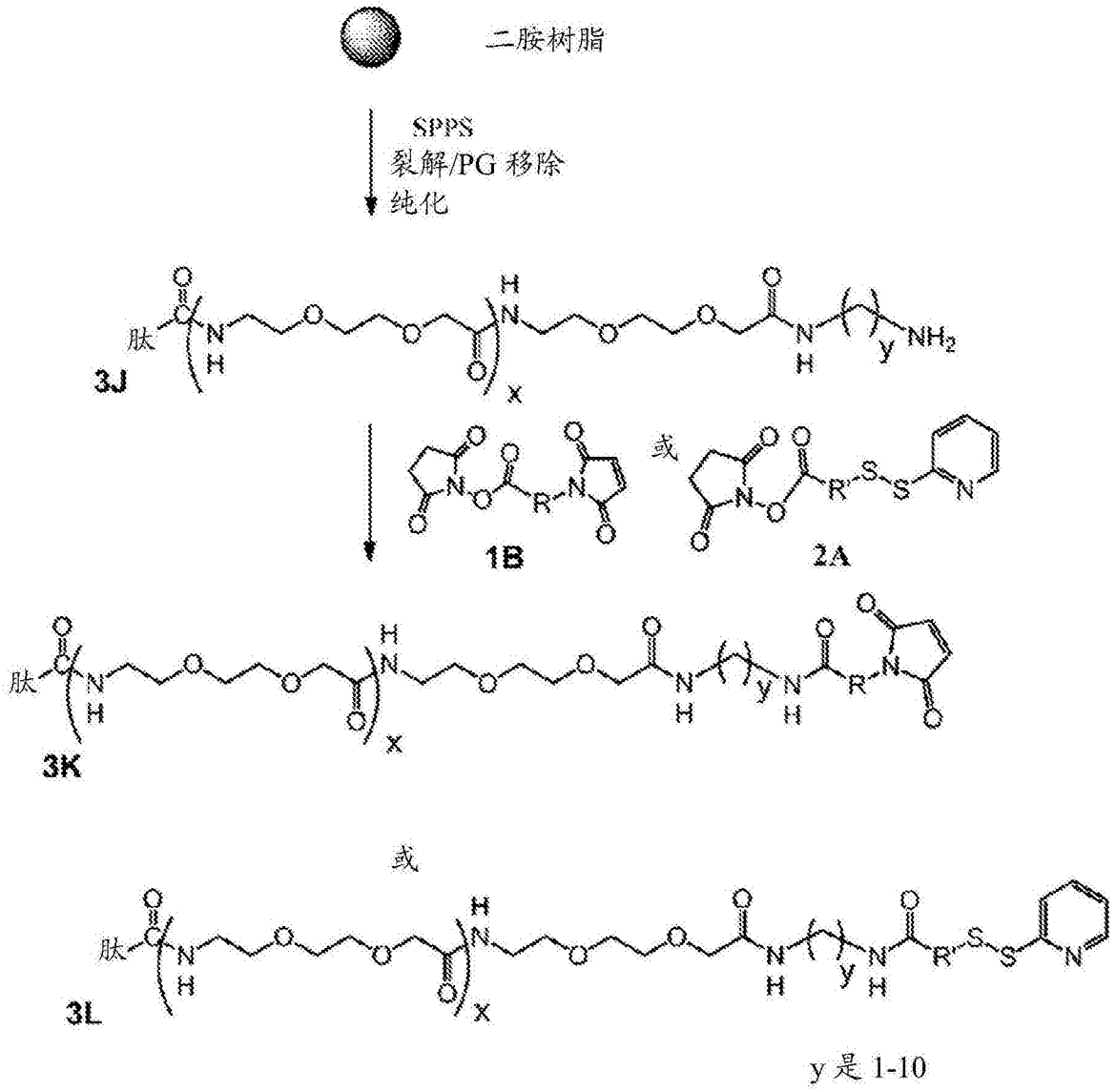
[0312]



[0313] 流程3B

[0314] 肽-连接体构建物3F可采用半胱胺2-氯三苯甲基树脂来获得，然后与3G或3H反应，分别产生肽-连接体构建物3I或3E。

[0315]



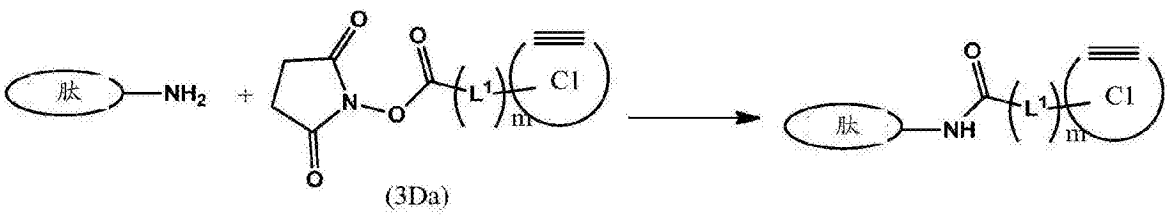
[0316] 流程3C

[0317] 肽-连接体构建物(3J)可从二胺树脂获得,并进一步与(1B)或(2A)反应,分别产生式(3K)或(3L)的肽-连接体构建物。

[0318] 流程1至3C描述肽-连接体构建物,其更特别用于与白蛋白制备生物缀合物。马来酰亚胺反应性基团和吡啶-2-基-二硫烷基反应性基团与白蛋白的半胱氨酸34的-SH官能团反应。

[0319] 流程3D和3E描述用于叠氮化物-炔Huisgen环加成(更通常称为点击化学)的肽-连接体构建物的制备。

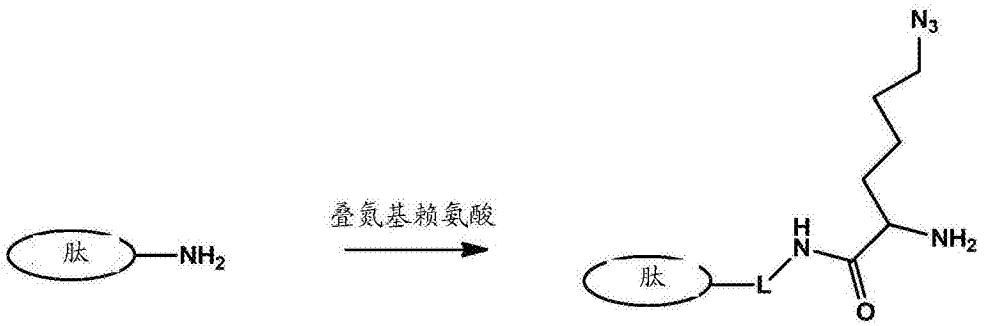
[0320]



[0321] 流程3D

[0322] 其中m是0或1，C1是任选被氟取代的单、二或三环碳环或杂环系统，L^1是C1-C20亚烷基连接体，其中亚烷基链任选被氧代(=O)取代，并且其中一个或多个碳被O或NH替换。环炔部分(3Da)可从商业来源容易地获得。此外，用于蛋白标记的点击化学的环炔已经描述在US 2009/0068738中，将其在此引入作为参考。具体实例已经描述在下面(实施例20)。点击柄可在肽的N-末端或赖氨酸残基侧链上引入。

[0323]



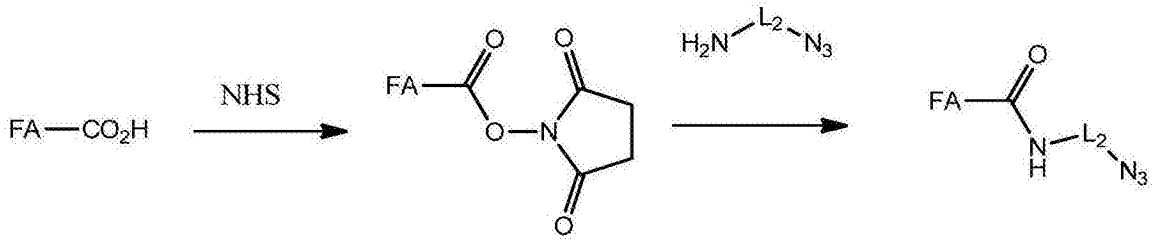
[0324] 流程3E

[0325] 流程3E描述任选通过连接体L(例如一个或多个选自甘氨酸和丝氨酸的氨基酸)在apelin肽的N-末端处引入叠氮基赖氨酸残基。叠氮化物官能团充当点击化学的柄。具体实例已经描述在共同提交的申请(代理人案卷号PAT055418-US-PSP2)中。

[0326] 延长半衰期的部分-连接体构建物的制备：

[0327] 流程3F和3G描述脂肪酸-连接体构建物的制备。

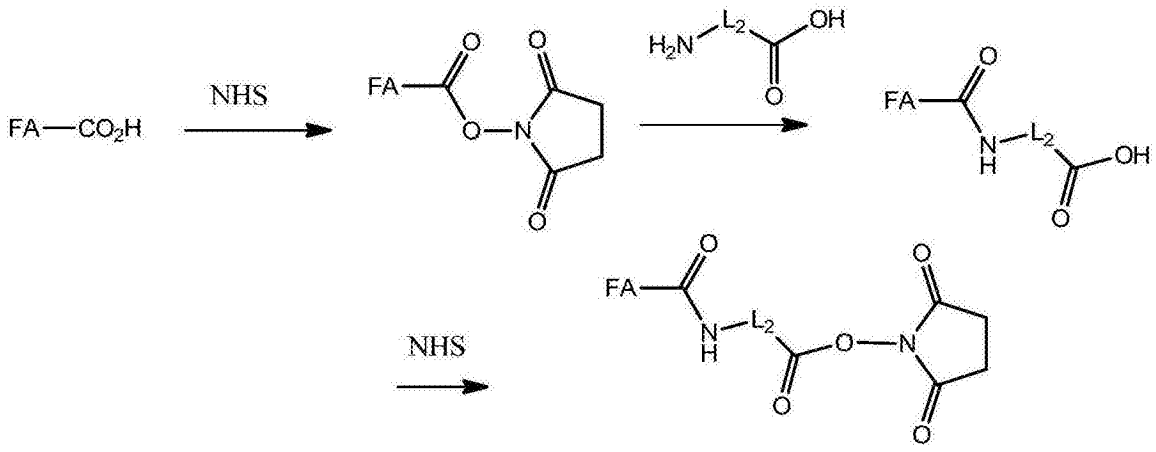
[0328]



[0329] 流程3F

[0330] 其中FA是脂肪酸，L2是连接基团(例如PEG)，NHS是N-羟基琥珀酰亚胺。此类脂肪酸-连接体构建物用于采用点击化学的缀合。在其中脂肪酸含有官能团例如羟基或另外的羧酸的情况中，可能需要保护此类官能团。

[0331]

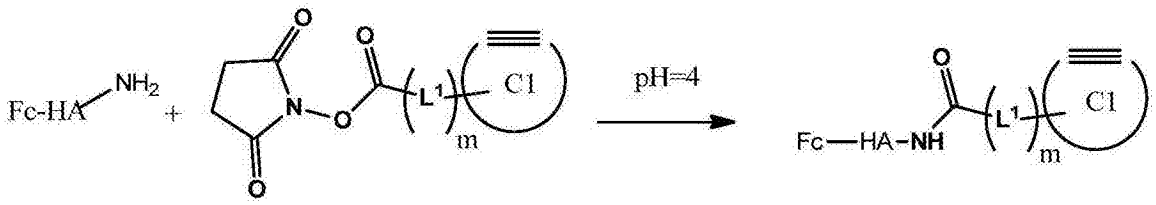


[0332] 流程3G

[0333] 其中FA、NHS和L2如上面流程3F中所定义。此类脂肪酸构建物用于与在肽优选N-末端上的氨基官能团缀合。

[0334] 流程3H描述Fc-连接体构建物的制备

[0335]



[0336] 流程3H

[0337] AH-Fc是在Fc的N-末端含有序列AH-的构建物。构建物采用重组方法制备。该AH-序列允许在低pH选择性修饰N-末端。此类选择性修饰已经公开在共同提交的申请(US临时申请No.62/015868:代理人案卷号PAT056275-US-PSP和US临时申请No.62/015862:PAT056274-US-PSP)。因此,在Fc构建物的N-末端引入点击柄。

[0338] 在另一实施方案中,Fc构建物在C-末端修饰以引入小的分选酶(Sortase)识别基序(LPXTG/A)。此类Fc-识别基序采用重组方法制备。此类构建物的实例是Fc-[GGGG]n-LPETGGLEVLFQGP,其中GGLEVLFQGP在分选酶处理期间被修剪。

[0339] Fc APJ肽融合蛋白的制备

[0340] 生物产生的多聚分子例如包含至少部分称为铰链的含有半胱氨酸的区域的抗体Fc可由重组表达的蛋白产物(其已经以多聚(例如二聚)形式分泌)制备。本发明还包括修饰的Fc融合蛋白,其中Fc区的氨基酸序列相对于天然存在的抗体中发现的Fc-或恒定区的氨基酸序列已经改变。例如,Fc-融合蛋白可以用突变工程改造(即修饰),以获得希望的FcRn结合亲和性/或血清半衰期特性。修饰的Fc-融合蛋白的实例已经公开在US专利号7,217,798中,将其引入作为参考。

[0341] 本发明的Fc-融合蛋白还可以被合成改变,例如通过连接连接体部分和肽或多肽部分来改变。此外,具有衍生自重组抗体的Fc结构域的“修饰的”Fc-融合蛋白可在任何表达系统包括原核和真核表达系统中制备或采用噬菌体展示方法制备。

[0342] Fc-连接体构建物例如Fc-[GGGGS]、Fc-[GGGGS]2、Fc-[GGGGS]3、Fc-GG和Fc-GS描

述在下面的实验部分。[GGGGS]、[GGGGS]2、[GGGGS]3、GS和GG连接体连结至Fc结构域的C-末端或Fc结构域的N-末端，其中Fc是天然的Fc或其变体。Fc变体的实例包括其中C-末端赖氨酸已经被删除或被丙氨酸替换的Fc。此类Fc变体已经描述在共同提交的申请(代理人案卷No PAT055781-US-PSP02)中。

[0343] 生物缀合物

[0344] 在本发明的一个实施方案中，根据式I至IV中任何一式所述的肽或多肽被缀合(化学/共价连结)至白蛋白的半胱氨酸34的巯基官能团。在该实施方案的一个方面，白蛋白-肽是指其中白蛋白缀合(化学连接)至肽的N-末端的生物缀合物。在另一实施方案中，白蛋白-肽是指其中白蛋白缀合(化学连接)至肽的C-末端的生物缀合物。

[0345] 在本发明的另一实施方案中，根据式I至IV中任何一式所述的肽或多肽融合至人IgG的Fc区的一个或多个结构域。抗体包含两个功能独立的部分：称为“Fab”的可变域，其结合抗原；和称为“Fc”的恒定域，其涉及效应子功能例如补体激活和被吞噬细胞攻击。Fc具有长的血清半衰期，而Fab是短寿的(Capon等人，1989，Nature 337:525-31)。当与治疗肽或多肽连接在一起时，Fc结构域能够提供更长的半衰期(C.Huang，Curr.Opin.Biotechnol.，2009，20，692-699)。

[0346] 在一个实施方案中，Fc-肽是指生物缀合物，其中Fc序列融合至根据式I至IV中任何一式所述的肽的N-末端。在另一实施方案中，肽-Fc是指其中Fc序列融合至肽的C-末端的生物缀合物。

[0347] Fc区可以是天然存在的Fc区或可以被改变以改善某些性质例如治疗性质、循环时间或减少聚集。

[0348] 蛋白治疗剂的通过与抗体的“Fc”结构域融合的有用的修饰在中PCT公开No.WO 00/024782中详细讨论。该文件讨论与“载体”例如聚乙二醇(PEG)、葡聚糖或Fc区连接。

[0349] 本发明的优选的实施方案是包含根据前述实施方案中任何一项的肽或多肽和延长半衰期的部分的生物缀合物，其中延长半衰期的部分是通过连接体融合至式I、III、IV或V的多肽的Fc结构域。在本发明的一个方面，连接体具有下式：-[GGGGS]n-，n是1、2或3，或连接体是GG或GS，并且式I、II、III或IV的多肽含有天然存在的氨基酸。适合于与Fc结构域融合的式I、II、III或IV的多肽的实例是：QRPC*LSC*KGPMPF、C*RPRLSC*KGPMPF和QRC*RLSC*KGPMPF。该实施方案的一个优选的方面是如上面所定义的Fc-肽融合的生物缀合物，其包含如文中所定义的修饰的Fc片段(例如FcLALA)和式I至IV中任何一式的肽或多肽。

[0350] 在另一实施方案中，本发明涉及根据前述实施方案中任何一项所述的生物缀合物，其中延长半衰期的部分是修饰的Fc结构域，其中C-末端赖氨酸已经被删除或被丙氨酸替换。

[0351] 已发现融合至Fc区的肽显示比未融合的相似物显著更高的体内半衰期。此外，与Fc区的融合允许多肽的二聚/多聚化。

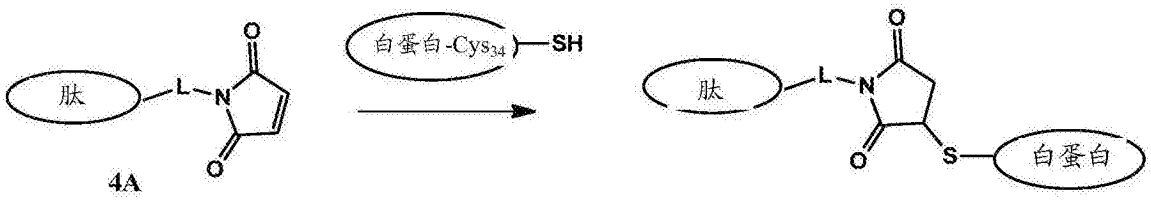
[0352] 本发明的另一实施方案是包含根据式I-IV中任何一式所述的肽或多肽和延长半衰期的部分的生物缀合物，其中延长半衰期的部分是化学连接至多肽的Fc结构域。

[0353] 制备缀合物：

[0354] 流程4和5举例说明用于将APJ激动剂肽或根据式I至IV中任何一式所述的肽与延长半衰期的部分例如Fc结构域或白蛋白缀合的化学反应。

[0355] 流程4举例说明式4A的肽-连接体与白蛋白的半胱氨酸34的缀合。

[0356]

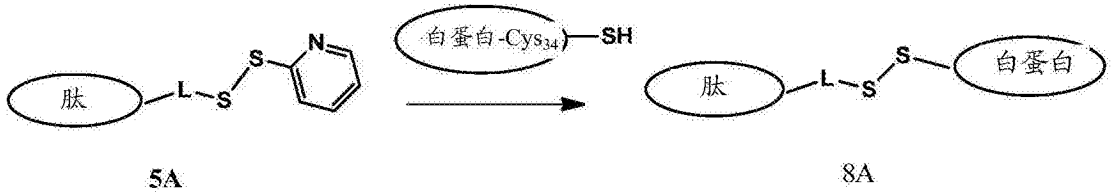


流程 4

[0357] 其中L表示肽和马来酰亚胺官能团间的连接基团。在一个特别实施方案中，L是流程1、3A、3B或3C中公开的连接基团。

[0358] 流程5举例说明式8A的肽-连接体构建物与白蛋白的半胱氨酸34的缀合。

[0359]

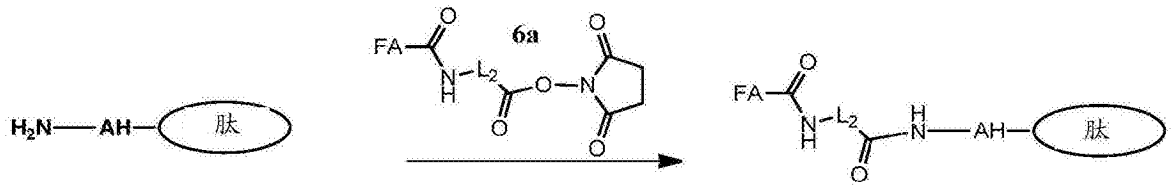


[0360] 流程5

[0361] 其中L表示肽和-S-S-吡啶官能团间的连接基团。在一个特别实施方案中，L是流程2、3A、3B或3C中公开的连接基团。

[0362] 缀合的其它方法已经描述在共同未决和共同提交的申请(US临时申请No.62/015862:代理人案卷号PAT056274-US-PSP、US临时申请No.62/015868:PAT056275-US-PSP和US临时申请No.62/015848PAT055781-US-PSP02)中。此类方法包括肽的选择性N-酰化，并总结在流程6中。

[0363]

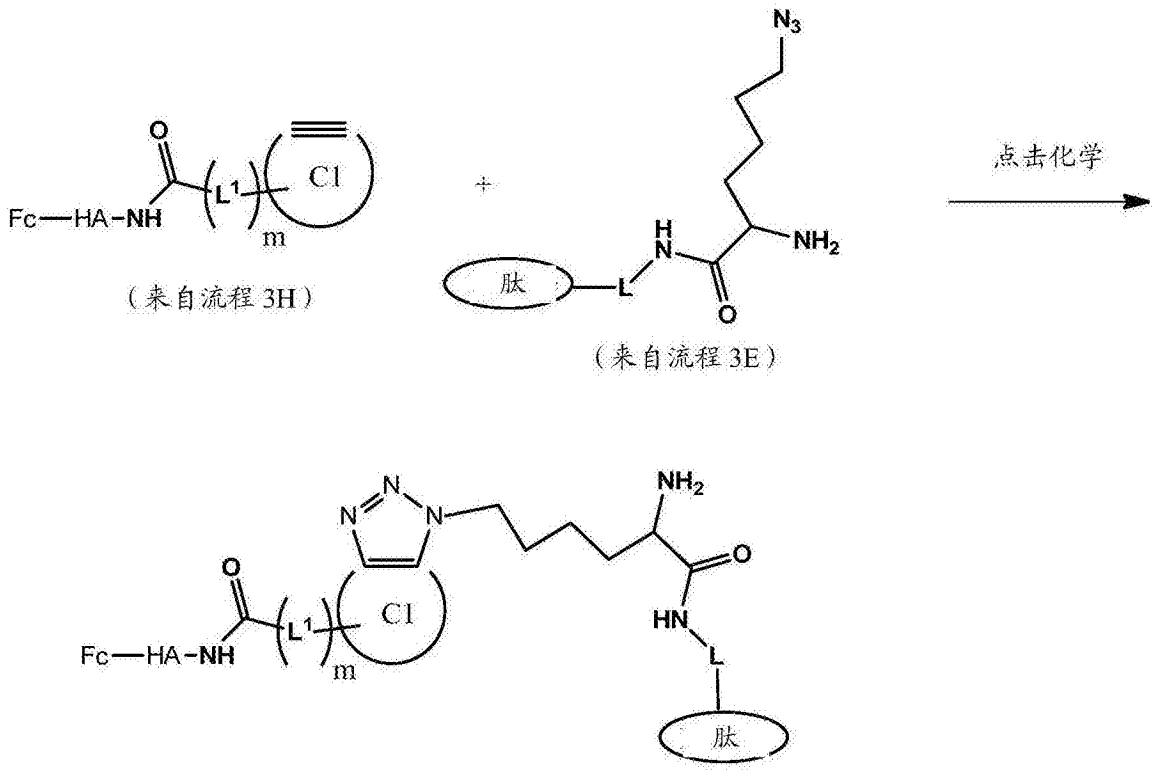


[0364] 流程6

[0365] 其中AH-是在肽的N-末端上引入的连接体，以利于N-末端的反应，H是组氨酸，A是丙氨酸，FA是上面描述的脂肪酸，例如式A1至A3的脂肪酸，并且L连接基团(例如PEG连接基团)。当采用低pH条件时，脂肪酸连接体构建物6a(如流程3G所示制备的)被选择性在N-末端引入到肽上。此方法已经描述在共同提交的专利申请(US临时申请No.62/015868:代理人案卷号PAT056275-US-PSP和US临时申请No.62/015848PAT055781-US-PSP02)中。

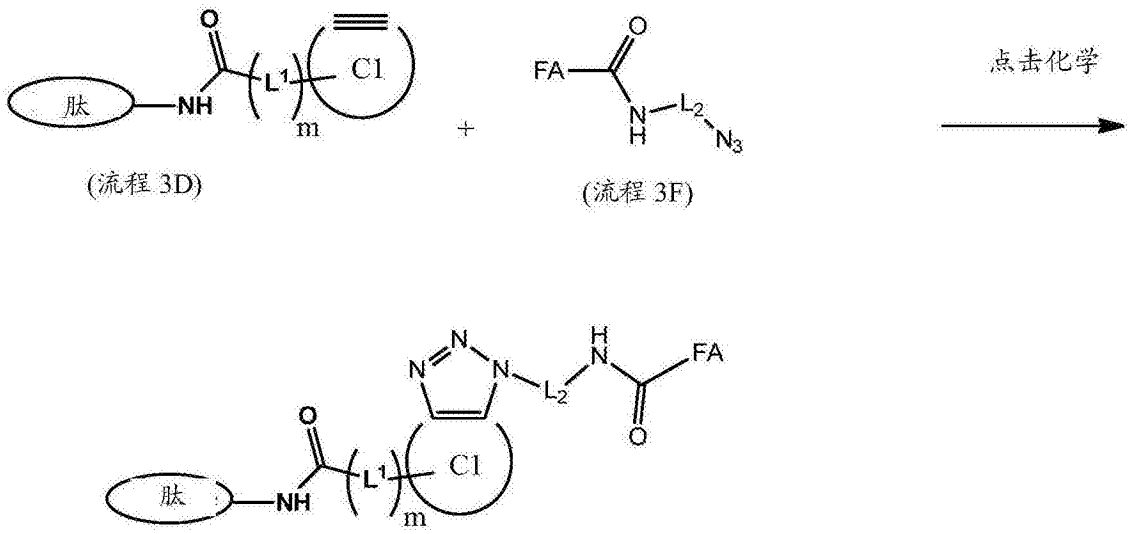
[0366] 流程7和8描述采用点击化学形成本发明的缀合物。

[0367]



[0368] 流程7

[0369]

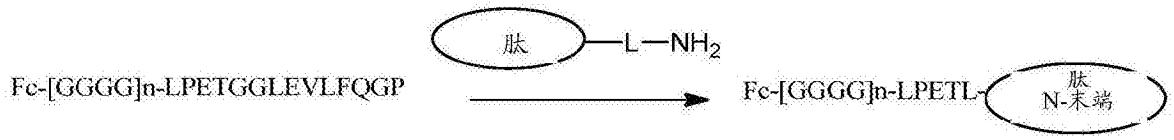


[0370] 流程8

[0371] 制备流程1-5中描述的缀合物和肽-连接体构建物的方法已经描述并示例在共提交的US申请(US临时申请no.61/858 251:代理人案卷号:PAT055326-US-PSP3和US临时申请No.61/858303:PAT055781-US-PSP)中,将其在此引入作为参考。

[0372] 流程9描述采用分选酶缀合APJ肽和Fc构建物。

[0373]



[0374] 其中n是1、2或3，L是任选的连接体(例如聚甘氨酸连接体)。

[0375] 药物组合物

[0376] 本发明的多肽或其酰胺、酯、盐或其生物缀合物可以以多种方式中的任一种施用，包括皮下、肌内、静脉内、腹腔内、鼻内、吸入、口服等。本发明尤其优选的实施方案使用本发明的多肽或其酰胺、酯、盐或其生物缀合物的连续静脉内施用。本发明的多肽或生物缀合物可作为推注或作为连续输注在一段时间内施用。可以使用可植入泵。在本发明的某些实施方案中，间歇或连续多肽或生物缀合物施用持续1天至数天(例如，2-3天或更多天)或更长时间段，例如，数周、数月或数年。在一些实施方案中，提供间歇或连续多肽施用至少约3天。在其它实施方案中，提供间歇或连续多肽或生物缀合物施用至少约1周。在其它实施方案中，提供间歇或连续多肽或生物缀合物施用至少约2周。在施用期间或在施用多个剂量之间维持平均血浆多肽浓度高于特定阈值可能是所期望的。可例如基于个体的生理状况、疾病严重性等来确定期望浓度。这些期望值可通过实施标准临床试验来确定。备选地，肽和其缀合物可通过FcRn机制被口服递送(Nat Rev Immunol.7(9),715-25,2007;Nat Commun.3;3:610,2012,Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 304:G262-G270,2013)。

[0377] 另一个方面，本发明提供包含本发明多肽或和其酰胺、酯、盐或其生物缀合物及一或多种药学上可接受的载体的药物组合物。该药物组合物可被配制用于特定施用途径例如，口服施用、胃肠外施用及直肠施用等。此外，本发明的药物组合物可以以固体形式(包括但不限于胶囊、片剂、丸剂、颗粒、粉剂或栓剂)或以液体形式(包括但不限于溶液剂、混悬剂或乳剂)制备。可对药物组合物进行常规医药操作(例如灭菌)和/或可含有常规惰性稀释剂、润滑剂或缓冲剂、以及辅助剂，例如防腐剂、稳定剂、润湿剂、乳化剂及缓冲剂等。

[0378] 适于注射的药物组合物通常包括无菌水溶液(当可溶于水时)或分散体和用于临时制备无菌可注射溶液或分散体的无菌粉末。

[0379] 对于静脉内施用而言，合适的载体包括生理盐水、抑菌水、Cremophor ELTM(BASF，Parsippany,N.J.)或磷酸盐缓冲液(PBS)。在所有情形下，组合物均应当是无菌的，并且应当是以易于注射的程度流动的。优选的药物制剂是在制造及储存条件下稳定的，而且必须能在抵抗微生物(例如细菌及真菌)污染作用的情况下保存。一般而言，相关载体可以是含有例如水、乙醇、多元醇(例如，甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)的溶剂或分散介质，及其适合的混合物。可通过例如使用诸如卵磷脂的包衣、在分散剂的情况下通过维持所需粒径、以及通过使用表面试剂来维持适当流动性。可通过各种抗细菌剂及抗真菌剂，例如对羟基苯甲酸、氯丁醇、苯酚、抗坏血酸、硫柳汞等，来实现对微生物作用的预防。在许多情况下，在组合物中包括等渗剂，例如，糖、多元醇(例如甘露醇)、山梨醇、氯化钠是优选的。可通过将可延迟吸收的物质例如单硬脂酸铝及明胶纳入组合物中来延长可注射组合物的吸收。

[0380] 某些可注射组合物是等渗水溶液或混悬液，且栓剂有利地从脂肪乳液或混悬液制备。所述组合物可被灭菌和/或含有辅助剂，例如防腐剂、稳定剂、润湿剂或乳化剂、溶解促进剂、调节渗透压的盐和/或缓冲剂。此外，它们还可以含有其它治疗上有价值的物质。所述

组合物分别根据常规混和、制粒或包衣方法来制备，并且含有约0.1-75%，或含有约1-50%的活性成分。

[0381] 无菌可注射溶液可通过以下方式制备：将所需量的活性化合物与上文所列举的成分中的一种或组合掺入适当溶剂中，如需要的那样，随后过滤灭菌。通常，分散体通过将活性化合物掺入含有碱性分散介质及来自那些上文所列举的所需其它成分的无菌载体中来制备。在用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末的情形下，优选的制备方法是真空干燥及冷冻干燥，其产生活性成分和来自先前经灭菌过滤的其溶液的任意另外的期望成分的粉末。

[0382] 口服组合物通常包括惰性稀释剂或可食用载体。出于口服治疗施用的目的，活性化合物可掺入到赋形剂中，并且以片剂、含锭(troches)、或胶囊(例如，明胶胶囊)的形式使用。口服组合物还可使用漱口用流体载体来制备。医药上相容的粘合剂和/或辅助材料可作为组合物的一部分被包含其中。片剂、丸剂、胶囊、含锭等可含有任何以下成分或具有类似性质的化合物：粘合剂，例如微晶纤维素、黄蓍胶或明胶；赋形剂，例如淀粉或乳糖；崩解剂，例如海藻酸、Primogel或玉米淀粉；润滑剂，例如硬脂酸镁或Sterotes；助流剂，例如胶体二氧化硅；甜味剂，例如蔗糖或糖精；或矫味剂，例如薄荷、水杨酸甲酯或橙香精。用于经口递送的制剂可有利地引入用于改进在胃肠道内的稳定性和/或增强吸收的物质。

[0383] 对于通过吸入施用而言，本发明治疗剂优选地从含有合适抛射剂(例如，诸如二氧化碳的气体)加压容器或分配器或从喷雾器以气溶胶喷雾剂形式递送。应注意到，肺为治疗剂的全身递送提供了很大的表面积。

[0384] 可将这些活性剂囊封于例如聚合微粒中，例如在美国公开20040096403中描述的那些，或与本领域已知的各种其它药物递送载体中的任一种联合。在本发明的其它实施方案中，活性剂与带电脂质联合递送，如例如在美国公开20040062718中所述的那样。应注意到，后一系统已用于施用治疗性多肽、胰岛素，这表明这一系统适用于施用肽物质。

[0385] 还可通过经黏膜或经皮方式来实施全身施用。

[0386] 适用于经皮施用的组合物包括有效量的本发明的多肽与合适的载体。适用于经皮递送的载体包括帮助穿过宿主皮肤的可吸收性药理上可接受的溶剂。例如，经皮装置为绷带形式，其包含背衬部件、含有该化合物(任选地含有载体)的贮库、任选的速度控制屏障(其以受控的和预定的速度在延长时间递送化合物至宿主皮肤)、以及将装置固定至皮肤上的工具。

[0387] 适用于局部施用(例如，施用至皮肤及眼睛)的组合物包括水溶液、混悬液、软膏、乳膏、凝胶或例如通过气溶胶递送的可喷雾制剂等。此类局部递送系统将尤其适用于真皮施用。因此，它们特别适用于本领域熟知的局部施用制剂，包括化妆品制剂。其可含有增溶剂、稳定剂、张力增加剂、缓冲剂和防腐剂。

[0388] 如本文所用，局部施用还可涉及吸入或鼻内施用。它们可在使用或未使用适宜抛射剂的情况下以干燥粉末形式(单独、作为混合物(例如与乳糖的干混合物)、或混合组分颗粒(例如与磷脂的))从干粉吸入器、或以气溶胶喷雾形式从加压容器、泵、喷射器、雾化器或喷雾器中方便地递送。

[0389] 本发明进一步提供药物组合物及剂型，其包含一种或多种可降低作为活性成分的本发明化合物分解速率的物质。本文称作“稳定剂”的此类物质包括但不限于抗氧化剂(诸如例如抗坏血酸)、pH缓冲剂或盐缓冲剂等。

[0390] 如本文所用，术语“药学上可接受的盐”是指保持了本发明多肽的生物有效性和性质的盐，并且其通常在生物上或在其它方面不是不期望的。在许多情形下，本发明的多肽通过氨基和/或羧基或与其类似的基团的存在，可形成酸和/或碱盐。

[0391] 可使用无机酸及有机酸来形成药学上可接受的酸加成盐，例如，乙酸盐、天冬氨酸盐、苯甲酸盐、苯磺酸盐、溴化物/氢溴酸盐、碳酸氢盐/碳酸盐、硫酸氢盐/硫酸盐、樟脑磺酸盐、氯化物/盐酸盐、chlortheophyllonate、柠檬酸盐、乙二磺酸盐、富马酸盐、葡庚糖酸盐、葡萄糖酸盐、葡糖醛酸盐、马尿酸盐、氢碘酸盐/碘化物、羟乙磺酸盐、乳酸盐、乳糖酸盐、月桂基硫酸盐、苹果酸盐、马来酸盐、丙二酸盐、扁桃酸盐、甲磺酸盐、甲基硫酸盐、萘酸盐、萘磺酸盐、烟酸盐、硝酸盐、十八烷酸盐、油酸盐、草酸盐、棕榈酸盐、巴莫酸盐、磷酸盐/磷酸氢盐/磷酸二氢盐、聚半乳糖醛酸盐、丙酸盐、硬脂酸盐、琥珀酸盐、磺基水杨酸盐、酒石酸盐、甲苯磺酸盐及三氟乙酸盐。

[0392] 可由其衍生盐的无机酸包括，例如，盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、磷酸等。

[0393] 可由其衍生盐的有机酸包括，例如，乙酸、丙酸、羟乙酸、草酸、马来酸、丙二酸、琥珀酸、富马酸、酒石酸、柠檬酸、苯甲酸、扁桃酸、甲烷磺酸、乙烷磺酸、甲苯磺酸、磺基水杨酸等。可与无机碱及有机碱来形成药学上可接受的碱加成盐。

[0394] 可由其衍生盐的无机碱包括，例如，铵盐及周期表第I族至第XII族的金属。在某些实施方案中，所述盐衍生自钠、钾、铵、钙、镁、铁、银、锌及铜；尤其适宜的盐包括铵盐、钾盐、钠盐、钙盐及镁盐。

[0395] 可由其衍生盐的有机碱可包括，例如，伯、仲和叔胺、取代胺包括天然存在的取代胺、环状胺、碱性离子交换树脂等。某些有机胺包括异丙基胺、苄星(benzathine)、胆碱盐、二乙醇胺、二乙胺、赖氨酸、葡甲胺、哌嗪及氨丁三醇。

[0396] 本发明的药学上可接受的盐可通过惯用化学方法从母体化合物、碱性或酸性部分来合成。通常，这些盐可通过使这些化合物的游离酸形式与化学计量的适当碱(例如Na、Ca、Mg或K的氢氧化物、碳酸盐、碳酸氢盐等)进行反应来制备，或通过使这些化合物的游离碱形式与化学计量的适当酸进行反应来制备。这些反应通常是在水或有机溶剂、或二者的混合物中进行。通常，在可行的情况下，使用非水性介质，如醚、乙酸乙酯、乙醇、异丙醇或乙腈是合乎需要的。其它适宜的盐的列表可例如在“Remington's Pharmaceutical Sciences”，第20版，Mack Publishing Company，Easton，Pa.，(1985)；以及Stahl和Wermuth的“Handbook of Pharmaceutical Salts:Properties，Selection，and Use”(Wiley-VCH，Weinheim，Germany，2002)中找到。

[0397] 如本文所用，术语“药学上可接受的载体”包括任何和所有的溶剂、分散介质、包衣材料、表面活性剂、抗氧化剂、防腐剂(例如抗菌剂、抗真菌剂)、等渗剂、吸收延迟剂、盐、防腐剂、药物、药物稳定剂、粘合剂、赋形剂、崩解剂、润滑剂、甜味剂、矫味剂、染料等及其组合，其对本领域技术人员而言是已知的(例如参见Remington's Pharmaceutical Sciences，第18版，Mack Printing Company，1990，pp.1289-1329)。除了其与活性成分不相容以外，在治疗或药物组合物中考虑使用任何常规载体。

[0398] 本发明方法：

[0399] Apelin肽家族是唯一已知的G蛋白偶联APJ受体的天然配体家族。Apelin基因编码77个氨基酸的多肽，该多肽被加工成apelin肽的生物活性形式，例如apelin-36、apelin-

17、apelin-16、apelin-13、apelin-12及apelin-13的经焦谷氨酸修饰的形式(Pyr^1-apelin-13)。这些apelin肽中的任一个在结合至APJ受体后，通过Gi和Gq蛋白转导信号。在心肌细胞中，Gi或Gq偶联引起细胞内pH、PLC活化及IP3产生的变化，从而增强肌丝钙敏感性并最终增加心肌收缩力。Gi偶联抑制活化的Gs、腺苷酰环化酶及cAMP产生，并增加pAkt水平，实现心脏保护。在血管内皮细胞中，通过Gi、pAKT的APJ活化增加一氧化氮(NO)产生，其提高平滑肌松弛，使得整体血管舒张。

[0400] 患有慢性稳定型心力衰竭的患者具有代偿失调的偶然急性发作，其中心肌收缩力进一步下降且症状恶化。这些加重称为急性代偿失调性心力衰竭(ADHF)。用于ADHF的当前疗法包括利尿剂、血管舒张剂及直接增加心肌收缩力的强心剂。当前静脉内强心剂(多巴酚丁胺、多巴胺、米力农、左西孟旦)的不良事件，例如心律不齐及增加的长期致命性，已为人们所熟知。本发明的合成apelin多肽类似物或其生物缀合物提供用于ADHF的疗法，其增加心肌收缩力，而没有致心律不齐性或致命性倾向，并且解决了慢性心力衰竭的巨大未满足的医学需要。

[0401] 实际上，人类急性apelin治疗(5min)，导致冠状血管舒张及改善的心输出量。然而，天然apelin在活体内显示极短的$t_{1/2}$(数秒)及作用持续时间(几分钟)。与天然apelin相比，本发明的高效的合成apelin肽激动剂或其生物缀合物具有更长的半衰期。

[0402] 在心肌细胞中APJ受体活化a)通过Gi/Gq、PLC和Ca2+改善心肌收缩力，以及b)通过Gi、pAkt活化提供心脏保护，但不会增加cAMP(如使用其它强心剂所看到的)。另外，在内皮细胞中，APJ激动导致动脉血管舒张，从而因减卸左心室的工作负担而进一步有益于心力衰竭。总之，这些合成apelin多肽类似物可改善整体心脏功能、减少心律不齐发生并提供存活益处。

[0403] 最近，已存在多个临床前研究出版物，其关注于Apelin可能涉及糖尿病及胰岛素抗性。已显示Apelin 1)通过改良肌肉、脂肪及心脏中的葡萄糖吸收从而降低血糖水平，2)保护胰β细胞不受ER应激及后续的凋亡，3)降低β细胞中的胰岛素分泌，及4)调节脂肪组织中儿茶酚胺诱导的脂解(lypolysis)。pAKT通路的活化已牵涉这些过程。

[0404] 游离形式或药学上可接受的盐形式的根据式I至IV中任一式的多肽或其药学上可接受的盐或其生物缀合物显示出有价值的药理学性质，例如APJ受体激动性质，例如如在下面部分中所提供的体外及体内测试所显示的那样，并且因此适用于治疗。

[0405] 本发明的多肽或其药学上可接受的盐或其生物缀合物可用于治疗选自以下的适应症：急性代偿失调性心力衰竭(ADHF)、慢性心力衰竭、肺性高血压、心房颤动、布鲁格达氏综合征、室性心动过速、动脉粥样硬化、高血压、再狭窄、局部缺血性心血管疾病、心肌病、心脏纤维化、心律不齐、水潴留、糖尿病(包括妊娠糖尿病)、肥胖症、外周动脉病、脑血管意外、暂时性缺血发作、创伤性脑损伤、肌萎缩侧索硬化、灼伤(包括晒伤)及先兆子痫。

[0406] 因此，作为其他实施方案，本发明提供式I至IV中任一式的多肽或其酰胺、酯或盐或其生物缀合物的用途，其用于治疗与APJ受体活性相关的疾病。在另一实施方案中，治疗选自对APJ受体的激动响应的疾病。在另一实施方案中，疾病选自上述列表，适宜地是急性代偿失调性心力衰竭。在此实施方案的又一子集中，本发明提供式I至IV中任一式的多肽或其酰胺、酯或盐或其生物缀合物在制备用于治疗与APJ受体活性相关的疾病的药物中的用途。

[0407] 因此，作为另一实施方案，本发明提供式I至IV中任一式的多肽或其酰胺、酯或盐或其生物缀合物在治疗中的用途。在另一实施方案中，该治疗选自可通过APJ受体的活化(激动)来治疗的疾病。

[0408] 在另一实施方案中，本发明提供了治疗对APJ受体的激动响应的疾病的方法，其包括施用治疗上可接受量的式I至IV中任一式的多肽或其酰胺、酯或盐或其生物缀合物。在另一实施方案中，该疾病选自上述列表，适宜地是急性代偿失调性心力衰竭。

[0409] 在此实施方案的又一子集中，本发明提供治疗与APJ受体的活性相关的疾病的方法，其包括施用治疗上可接受的量的式I至IV中任一式的多肽或其酰胺、酯或盐或其生物缀合物。

[0410] 治疗上使用的本发明药物组合物或组合的有效量将取决于，例如，治疗内容及目标。本领域技术人员应了解，用于治疗的适当剂量水平因此将部分地根据以下而改变：所递送的分子、使用融合蛋白变体的适应症、施用途径、以及患者的尺寸(体重、体表或器官尺寸)和情况(年龄及健康状况)。因此，临床医师可确定剂量并改变施用途径以获得最佳治疗效果。根据上述因素，典型剂量可以是约0.1μg/kg至高至约100mg/kg的范围，或更高。在其它实施方案中，剂量范围可以是0.1μg/kg直至约100mg/kg；或1μg/kg直至约100mg/kg。

[0411] 给药频率将取决于所用制剂中的双重功能蛋白的药物动力学参数。通常，临床医师将施用组合物直至达到可实现期望效果的剂量。因此，组合物可作为单一剂量施用，按时间以两个或更多个剂量施用(各剂量可以或可不含有相同量的期望分子)，或通过植入装置或导管以连续输注方式施用。适当剂量的进一步细分是本领域技术人员以常规方式实施并在他们所实施的常规任务的范围内。可通过使用适当剂量-反应数据来确定适当剂量。

[0412] 术语本发明多肽或其生物缀合物的“治疗有效量”是指激发个体的生物或医学反应(例如，改善症状、减轻病况、减缓或延迟疾病进程、或预防疾病等)的本发明多肽(或生物缀合物)的量。在一个非限制性实施方案中，术语“治疗有效量”是指当施用至个体时，可有效(1)至少部分地减轻、抑制、预防和/或改善(i)通过APJ受体的活化来改善的或(ii)与APJ受体的活性相关的或(iii)以APJ受体的异常活性为特征的病况、病症或疾病、或其症状；或(2)活化APJ受体的本发明多肽的量。

[0413] 在另一非限制性实施方案中，术语“治疗有效量”是指当施用至细胞或组织、或非细胞生物材料、或介质时，有效地至少部分地活化APJ受体的本发明多肽的量。本领域技术人员应了解，具体活性剂的绝对有效量可根据诸如以下的因素而变化：期望的生物学终点、所递送的活性剂、靶组织等。本领域技术人员了解，“治疗有效量”可以以单一剂量施用，或可通过施用多个剂量来实现。例如，在治疗心力衰竭的活性剂的情况下，有效量可以是足以实现患者的临床改善的量，例如，增加的运动耐受/能力、增加的血压、减少的流体滞留和/或改善的心脏功能定量实验的结果，例如，射血分数、运动能力(至力竭的时间)等。

[0414] 如本文所用，术语“个体”是指动物。通常，动物是哺乳动物。个体还指，例如，灵长类(例如，人类)、牛、绵羊、山羊、马、狗、猫、兔、大鼠、小鼠、鱼、鸟等。在某些实施方案中，个体式灵长类。在另一些实施方案中，个体是人类。

[0415] 如本文所用，术语”抑制”(“inhibit”、“inhibition”或“inhibiting”)是指减轻或压抑给定病况、症状、或病症、或疾病，或显著降低生物活性或过程的基线活性。

[0416] 在一实施方案中，如本文所用，术语“治疗”(“treat”、“treating”或“treatment”)

任意疾病或病症是指改善该疾病或病症(即,减缓或阻止或减轻该疾病或其至少一种临床症状的发展)。在另一实施方案中,“治疗”是指减轻或改善至少一个身体参数,包括患者不能感受到的那些。在又一实施方案中,“治疗”是指在身体方面调控疾病或病症(例如,稳定可感受到的症状)或在生理学方面调控疾病或病症(例如,稳定身体参数)或二者。在再一实施方案中,“治疗”是指预防或延迟疾病或病症的发作或发展或恶化。

[0417] 如本文所用,术语“预防”(“prevent”、“preventing”和“prevention”)是指预防个体病症的一或多种症状的复发、发作或发展,这是通过治疗(例如治疗剂)的施用或治疗组合(例如,治疗剂的组合)的施用而产生的。

[0418] 如本文所用,如果个体将在生物上、在医学上或在生活质量上受益于治疗,则该个体“需要”该治疗。

[0419] 如本文所用,除非本文另外指明或上下文明显矛盾,否则在本发明上下文中(尤其在权利要求上下文中)中所用的术语“一个/种”(“a”、“an”)、“该”(“the”)及类似术语理解为涵盖了单数与复数二者。

[0420] 除非本文另外指明或上下文另外明显矛盾,否则本文所述所有方法均可以任意适宜顺序实施。本文提供的任何和所有示例或示例性语言(如“例如”)的使用仅旨在更好地阐明本发明,而不对要求保护的本发明的范围进行任何限制。

[0421] 本发明多肽的活性可通过下文所述体外方法来评定。

[0422] hAPJ钙流量分析:

[0423] 将Chem-5APJ稳定细胞(Millipore#HTS068C)以384孔模式以10,000个细胞/孔平铺于25ul生长培养基中,然后在37℃组织培养箱中生长24小时。在分析前1小时,添加25ul/孔FLIPR钙4染料(Molecular Devices R8142)和2.5mM丙磺舒,并在37℃组织培养箱中培育细胞1小时。将肽溶解于HBSS、HEPES&0.1%BSA缓冲液中,并一式三份连续稀释10倍,从50uM至5pM。使用FLIPR Tetra将肽添加至具有染料的细胞中(1:5,最终肽浓度为10uM至1pM)。细胞内部的FLIPR染料在结合至钙后发射荧光,而来自细胞外部的荧光则被遮蔽。在FLIPR Tetra上使用470-495激发波长及515-575发射波长来量测荧光。在肽添加前10秒开始进行读数,总计读数3分钟。针对每一肽浓度计算最大-最小值并作图,并针对肽对钙流量的刺激使用GraphPad prism软件来计算曲线拐点处的EC_{50}值。

[0424] 血浆稳定性分析:

[0425] 材料:

[0426] 工作溶液:在Milli-Q水中制备1mg/mL测试物品

[0427] 提取溶液:具有0.1%甲酸及400ng/mL格列本脲(Glyburide)的甲醇:乙腈:水(1:1:1)。

[0428] 血浆:雄性Sprague-Dawley大鼠血浆(具有肝素钠),购自Bioreclamation LLC(Liverpool,NY)

[0429] 全血:雄性Sprague Dawley全血(具有肝素钠),购自Bioreclamation LLC(Liverpool,NY)

[0430] 肺匀浆:雄性大鼠Sprague Dawley肺购自Bioreclamation LLC(Liverpool,NY)。在添加5x体积1X PBS后,使用polytron匀质机将肺均质化。在4℃下将匀浆以9000rpm离心10min。将上清液以3000rpm再次离心30min,以制备透明上清液。使用市售试剂盒(Pierce,

Thermo Scientific)来测定蛋白浓度。

[0431] 样品制备程序:(肽)

[0432] 在以下生物基质中制备测试物质:肝素化大鼠血浆、肝素化大鼠全血或肺匀浆。通过将5uL 1mg/mL的工作溶液添加至995uL大鼠血浆或全血中,以5000ng/mL制备血浆及全血样品。通过以下方式制备肺匀浆样品:用磷酸盐缓冲盐水(PBS)将肺匀浆稀释至1mg/ml蛋白浓度,随后将5uL工作溶液添加至995uL稀释的肺匀浆中。在水浴培养箱中在37℃下培育样品并轻微震荡(65～75rpm)。在0min、5min、15min、30min、60min、120和240min时,将培育样品的25uL等分试样转移至96孔板中并立即使用150uL提取溶液来沉淀蛋白。在培育验完成后,在4℃下将样品板以4000rpm离心10分钟。此后,使用移液装置(Tecan Temo)将上清液转移至另一板中,并添加50uL水至所有样品中。在LC-MS分析前使板涡旋振荡。

[0433] 样品制备程序(缀合物)

[0434] 通过将5uL 1mg/mL工作溶液加至495uL大鼠血浆中,以50,000ng/mL制备测试品。将样品在37℃、温和振摇(65～75rpm)下在水浴培养箱中培育。在时间0hr、0.5hr、1hr、2hr、4hr、6和24hr,将50uL培育样品的等分试样转移到96孔板,将100uL 40mM TCEP(三(2-羧基乙基)膦)加至各样品。将反应混合物在37℃培育1小时。反应完成后,采用300uL乙腈沉淀蛋白质。将样品板在4℃以4000rpm离心10分钟。然后,使用移液装置(Tecan Temo)转移125uL上清液至另一板,向所有样品加入50uL水。在LC-MS分析前,将板涡漩。

[0435] 样品稳定性的LC-MS分析

[0436] HPLC:具有自动进样器的Agilent 1290HPLC

[0437] 柱:MAC-MOD ACE C18,3μm,30mm x 2.1mm i.d.

[0438] 流动相A:于乙腈中的0.1%甲酸

[0439] 流动相B:于水中的0.1%甲酸

[0440] 梯度程序

[0441]

时间 (分钟)	流量(mL)	流动相 A(%)	流动相 B(%)
0	0.4	95	5
0.5	0.4	95	5
1.5	0.4	5	95
4.1	0.4	5	95
4.2	0.4	95	5
5	0.4	95	5

[0442] 质谱:Agilent Q-TOF 6530

[0443] 数据采集模式:使用100-1000m/z质量范围的全扫描

[0444] 数据采集和分析软件:MassHunter

[0445] 数据分析:

[0446] 稳定性分析:通过将在每一时间点的峰面积转化成相对于初始(t=0)峰面积的剩余百分比,来测定稳定性半衰期(t1/2)值。

[0447] 剩余百分比=100x(样品峰面积)÷(t=0峰面积)

[0448] 计算剩余百分比值的自然对数并针对样品时间作图(Microsoft Excel)。通过线性回归来测定这一直线的斜率k(Microsoft Excel)。

[0449] 然后通过公式t1/2＝0.693÷k来计算稳定性半衰期。

[0450] 基于替代物活性的血浆稳定性分析：

[0451] 进行上文所述钙流量方案，并进行以下变化。也使用5％大鼠血浆(Bioreclamation#RATPLNAHP-M,经肝素Na处理)培育肽。在37℃组织培养箱中培育后，在时间点t_0和t_{24}小时进行读数。通过计算以下来估算肽血浆半衰期(以分钟为单位)：

[0452] 1)LN((在t_0时的EC_{50})/(在$t_{24小时}$时的EC_{50}))，

[0453] 2)计算以上值的斜率，并

[0454] 3)$t_{1/2}$＝0.693/(斜率^2)

[0455] 采用测试分析(如上文所述)，本发明的多肽显示出下文所提供的表2和3的效力及稳定性。

[0456] 表2：多肽的活性及稳定性

[0457]

肽	hAPJ Ca^{2+} 流量 EC_{50} [nM]	基于替代物活性的血浆稳定性 $t_{1/2}$ [min]
实施例 1	9.4	8
实施例 2	3.2	39
实施例 3	64.5	n.d.
实施例 4	74.6	506
实施例 5	1.6	5.0
实施例 6	21.4	5
实施例 7	11.8	9
实施例 8	13.1	662.5
实施例 9	23.4	109.2
实施例 10	46.9	57.4
实施例 11	32.2	32.8
实施例 12	21.4	10
实施例 13	12.2	10
实施例 14	48.7	7.5
实施例 15	193.5	17.7
实施例 16	14.1	7
实施例 17	410.3	11.4
实施例 18	174	50
实施例 19	79.3	50

[0458]

实施例 20	1.0	11.9
实施例 21	2.9	>1000
实施例 22	3.3	>1000
实施例 23	72.2	3157
实施例 24	85.8	1699
实施例 25	227	>1000
实施例 26	2292	52
实施例 27	86.5	82
实施例 28	3.1	13
实施例 29	4.2	705.0
实施例 30	0.4	660.7
实施例 31	0.5	43.1
实施例 32	3.0	>1000
实施例 33	1.9	>1000
实施例 34	0.6	>1000
实施例 35	2.0	155.0
实施例 35	66.7	8
实施例 36	4.2	34
实施例 37	937	47
实施例 38	175	41
实施例 40	2479	>1000
实施例 41	839	>1000
实施例 42	16.3	>1000
实施例 43	28.9	>1000
比较实施例: Pyr1-apelin-13	1.8	5.0

[0459] 表3:血浆稳定性分析与基于替代物活性的血浆稳定性分析之间的关系

[0460]

肽	血浆稳定性 t½ [min]	基于替代物活性的血浆稳定性 t½ [min]
Pyr-1-Apelin 13	6.6	5.0
Ex 32	377	>1000

[0461] 本发明的多肽或其生物缀合物可具有与apelin-13或pyr-1-apelin-13类似的APJ受体效力。在一个实施方案中，本发明的多肽或其生物缀合物具有小于100nM的EC_{50}。在另一实施方案中，本发明的多肽或其生物缀合物具有小于50nM、优选小于25nM且更优选小于15nM的EC_{50}。在再一实施方案中，本发明的多肽或其生物缀合物具有小于小于10nM的EC_{50}。

[0462] 本发明的多肽或其生物缀合物可具有优于apelin-13或pyr-1-apelin-13的血浆稳定性。在一个实施方案中，血浆稳定性提高至少2倍。在一个实施方案中，本发明的多肽或其生物缀合物具有至少30分钟的血浆稳定性。在另一实施方案中，本发明的多肽或其生物缀合物具有至少60分钟、至少80分钟、优选至少100分钟以及更优选至少150分钟的血浆稳定性。

[0463] 本发明的多肽或其生物缀合物可在施用一种或多种其它治疗剂的同时、或之前或之后施用。本发明的多肽或生物缀合物可通过相同或不同施用途径与其它活性剂分开施用，或在同一药组合物中与其它活性剂一起施用。

[0464] 在一个实施方案中，本发明提供了产品，其包含式I至IV中任一式的多肽或其酰胺、酯或盐或其生物缀合物，以及至少一种其它治疗剂，其用作在治疗中同时、分开或依序使用的组合制剂。在一个实施方案中，该治疗是对APJ受体的活化响应的疾病或病况的治疗。

[0465] 作为组合制剂提供的产品包括组合物，所述组合物在同一个药物组合物中一起包含式I至IV中任一式的多肽或其酰胺、酯、盐或其生物缀合物以及其它治疗剂，或以分开的形式(例如以药盒形式)包含式I至IV中任一式的多肽或其酰胺、酯或盐或其生物缀合物以及其它治疗剂。

[0466] 在一个实施方案中，本发明提供了药物组合物，其包含式I至IV中任一式的多肽或其酰胺、酯或盐或其生物缀合物及另外的治疗剂。任选地，该药物组合物可包含如上文所述的药学上可接受的赋形剂。

[0467] 在一个实施方案中，本发明提供包含两种或更多种分开的药物组合物的药盒，所述药物组合物的至少之一含有式I至IV中任一式的多肽或其酰胺、酯或盐或其生物缀合物。在一实施方案中，该药盒包含用于独立地保持这些组合物的装置，例如容器、分立式瓶或分立式箔片包。此类药盒的实例如通常用于包装片剂、胶囊等的泡罩包装。

[0468] 本发明药盒可用于施用不同剂型(例如，口服及胃肠外)，以不同的剂量间隔施用独立组合物，或用于相互之间调整独立组合物的剂量。为有助于依从性，本发明药盒通常包

含用于施用的说明书。

[0469] 在本发明的组合治疗中，本发明的肽或生物缀合物及其它治疗剂可由相同或不同制造商制造和/或配制。此外，可将本发明的肽或生物缀合物与其它治疗剂如下一起带入组合治疗中：(i)在发放组合产品给医师之前(例如在包含本发明化合物和其它治疗剂的药盒的情况下)；(ii)在即将施用前由医师自身(或在医师指导下)；(iii)由患者自己，例如在依序施用本发明多肽或生物缀合物与其它治疗剂期间。

[0470] 因此，本发明提供式I至IV中任一式的多肽或其酰胺、酯或盐或其生物缀合物的用途，其用于治疗对APJ受体的激动响应的疾病或病况，其中该药物被制备以与另一治疗剂一起施用。本发明还提供了另一治疗剂的用途，其用于治疗对apelin受体的激动响应的疾病或病况，其中该药物与式I至IV中任一式的多肽或其酰胺、酯或盐或其生物缀合物的一起施用。

[0471] 本发明还提供式I至IV中任一式的多肽、或其药学上可接受的盐或其生物缀合物，其用于治疗对APJ受体的激动响应的疾病或病况的方法中，其中该式I至IV中任一式的多肽或其酰胺、酯或盐或其生物缀合物被制备用于与另外的治疗剂一起施用。本发明还提供了另外的治疗剂，其用于治疗对APJ受体的激动响应的疾病或病况的方法中，其中该另外的治疗剂被制备用于与式I至IV中任一式的多肽或其酰胺、酯或盐或其生物缀合物一起施用。本发明还提供了式I至IV中任一式的多肽或其酰胺、酯或盐或其生物缀合物，其用于治疗对APJ受体的激动响应的疾病或病况的方法中，其中式I至IV中任一式的多肽或其酰胺、酯或盐或其生物缀合物与另外的治疗剂一起施用。本发明还提供了另外的治疗剂，其用于治疗对APJ受体的激动响应的疾病或病况的方法中，其中该另外的治疗剂与式I至IV中任一式的多肽或其酰胺、酯或盐或其生物缀合物一起施用。

[0472] 本发明还提供了式I至IV中任一式的多肽或其酰胺、酯或盐或其生物缀合物的用途，其用于治疗对AJP受体的激动响应的疾病或病况，其中该患者先前(例如在24小时内)已经由另外的治疗剂治疗。本发明还提供另外的治疗剂的用途，其用于治疗对APJ受体的激动响应的疾病或病况，其中该患者先前(例如在24小时内)已经由式I至IV中任一式的多肽或其酰胺、酯或盐或其生物缀合物治疗。

[0473] 在一个实施方案中，其它治疗剂选自强心剂、β肾上腺素能受体阻断剂、HMG-Co-A还原酶抑制剂、血管紧张素II受体拮抗剂、血管紧张素转化酶(ACE)抑制剂、钙通道阻断剂(CCB)、内皮素拮抗剂、肾素抑制剂、利尿剂、ApoA-I模拟物、抗糖尿病剂、减肥剂、醛固酮受体阻断剂、内皮素受体阻断剂、醛固酮合酶抑制剂(ASI)、CETP抑制剂、抗凝剂、松弛素、BNP(奈西立肽)和NEP抑制剂。

[0474] 术语与第二活性剂或治疗“组合”包括共施用本发明的多肽或生物缀合物(例如，根据式I至IV中任一式的多肽或本文以其他方式描述的多肽)与第二活性剂或治疗；首先施用本发明化合物，随后施用第二活性剂或治疗；以及首先施用第二活性剂或治疗，随后施用本发明的肽或生物缀合物。

[0475] 术语“第二活性剂”包括本领域已知的治疗、预防或减轻本文所述疾病或病症的症状的任何活性剂，所述疾病或病症例如是对APJ受体的活化响应的病症或疾病，例如，急性代偿失调性心力衰竭(ADHF)、慢性心力衰竭、肺性高血压、心房颤动、布鲁格达氏综合征、室性心动过速、动脉粥样硬化、高血压、再狭窄、局部缺血性心血管疾病、心肌病、心脏纤维化、

心律不齐、水潴留、糖尿病(包括妊娠糖尿病)、肥胖症、外周动脉病、脑血管意外、暂时性缺血发作、创伤性脑损伤、肌萎缩侧索硬化、灼伤(包括晒伤)及先兆子痫。

[0476] 第二活性剂的实例包括强心剂、β肾上腺素能受体阻断剂、HMG-Co-A还原酶抑制剂、血管紧张素II受体拮抗剂、血管紧张素转化酶(ACE)抑制剂、钙通道阻断剂(CCB)、内皮素拮抗剂、肾素抑制剂、利尿剂、ApoA-I模拟物、抗糖尿病剂、减肥剂、醛固酮受体阻断剂、内皮素受体阻断剂、醛固酮合酶抑制剂(ASI)、CETP抑制剂、抗凝剂、松弛素、BNP(奈西立肽)和/或NEP抑制剂。

[0477] 如本文所用,强心剂包括例如多巴酚丁胺、异丙基肾上腺素、米力农、氨力农(amirinone)、左西孟旦、肾上腺素(epinephrine)、去甲肾上腺素(norepinephrine)、异丙基肾上腺素及地高辛。

[0478] 如本文所用,β肾上腺素能受体阻断剂包括例如醋丁洛尔(acebutolol)、阿替洛尔(atenolol)、倍他洛尔(betaxolol)、比索洛尔(bisoprolol)、卡替洛尔(carteolol)、美托洛尔(metoprolol)、纳多洛尔(nadolol)、普萘洛尔(propranolol)、索他洛尔(sotalol)和噻吗洛尔(timolol)。

[0479] 如本文所用,抗凝剂包括达肝素(Dalteparin)、达那肝素(Danaparoid)、依诺肝素(Enoxaparin)、肝素、亭扎肝素(Tinzaparin)、华法林(Warfarin)。

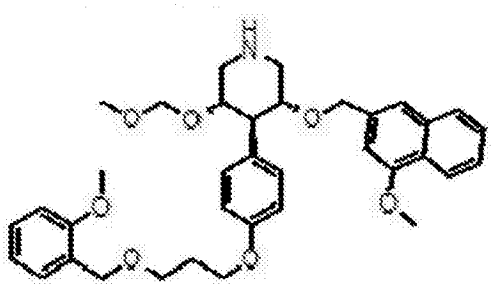
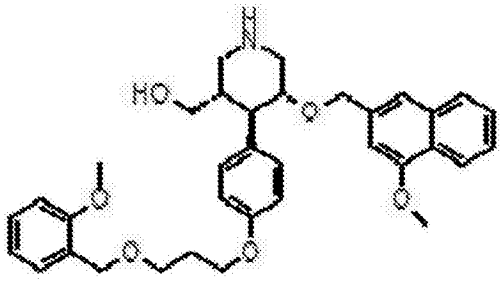
[0480] 术语“HMG-Co-A还原酶抑制剂”(也称为β-羟基-β-甲基戊二酰基-辅酶A还原酶抑制剂)包括可用于降低血液中脂质水平(包括胆固醇)的活性剂。实例包括阿托伐他汀(atorvastatin)、西立伐他汀(cerivastatin)、美伐他汀(compactin)、达伐他汀(dalvastatin)、二氢美伐他汀(dihydrocompactin)、氟斯他汀(fluindostatin)、氟伐他汀(fluvastatin)、洛伐他汀(lovastatin)、匹伐他汀(pitavastatin)、美伐他汀(mevastatin)、普伐他汀(pravastatin)、瑞舒伐他汀(rosuvastatin)、瑞伐他汀(rivastatin)、辛伐他汀(simvastatin)和维罗他汀(velostatin)或其药学上可接受的盐。

[0481] 术语“ACE-抑制剂”(也称为血管紧张素转化酶抑制剂)包括中断血管紧张素I至血管紧张素II的酶降解的分子。此类化合物可用于调节血压及治疗充血性心力衰竭。实例包括阿拉普利(alacepril)、贝那普利(benazepril)、贝那普利拉(benazeprilat)、卡托普利(captopril)、西罗普利(ceronapril)、西拉普利(cilazapril)、地拉普利(delapril)、依那普利(enalapril)、伊那普利拉(enaprilat)、福辛普利(fosinopril)、咪达普利(imidapril)、赖诺普利(lisinopril)、莫昔普利(moexipril)、莫维普利(moveltopril)、培哚普利(perindopril)、喹那普利(quinapril)、雷米普利(ramipril)、螺普利(spirapril)、替莫普利(temocapril)和群多普利(trandolapril)或其药学上可接受的盐。

[0482] 术语“内皮素拮抗剂”包括波生坦(bosentan)(参见EP 526708 A)、替唑生坦(tezosentan)(参见WO 96/19459)或其药学上可接受的盐。

[0483] 术语“肾素抑制剂”包括地替吉仑(ditekiren)(化学名称:[1S-[1R*,2R*,4R*(1R*,2R*)]]-1-[(1,1-二甲基乙氧基)羰基]-L-脯氨酰基-L-苯基丙氨酰基-N-[2-羟基-5-甲基-1-(2-甲基丙基)-4-[[[2-甲基-1-[[(2-吡啶基甲基)氨基]羰基]丁基]氨基]羰基]己基]-N-α-甲基-L-组氨酸酰胺);特拉吉仑(terlakiren)(化学名:[R-(R*,S*)]-N-(4-吗啉基羰基)-L-苯基丙氨酰基-N-[1-(环己基甲基)-2-羟基-3-(1-甲基乙氧基)-3-氧代丙基]-S-甲基-L-半胱氨酸酰胺);阿利吉仑(Aliskiren)(化学名:(2S,4S,5S,7S)-5-氨基-N-(2-

氨基甲酰-2,2-二甲基乙基)-4-羟基-7-{[4-甲氧基-3-(3-甲氧基丙氧基)苯基]甲基}-8-甲基-2-(丙-2-基)壬酰胺)和占吉仑(Zankiren)(化学名:[1S-[1R*[R*(R*)],2S*,3R*]]-N-[1-(环己基甲基)-2,3-二羟基-5-甲基己基]-α-[[2-[[(4-甲基-1-哌嗪基)磺酰]甲基]-1-氧代-3-苯基丙基]-氨基]-4-噻唑丙酰胺)或其盐酸盐、或由Speedel开发的SPP630、SPP635和SPP800,或式(A)和(B)的RO 66-1132和RO 66-1168:

[0484]  (A) 和  (B) ,或其药学上可接受的盐。

[0485] 倘若未明确定义,则术语"阿利吉仑"应理解为游离碱及其盐,尤其是其药学上可接受的盐,最优选其半富马酸盐。

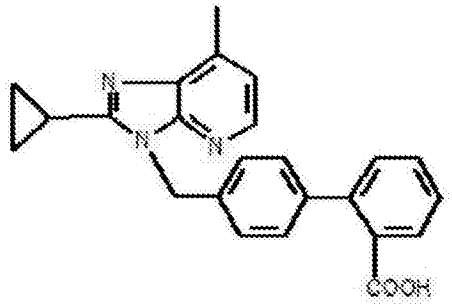
[0486] 术语"钙通道阻断剂(CCB)"包括二氢吡啶类(DHPs)及非DHPs(例如,地尔硫卓(diltiazem)型及维拉帕米(verapamil)型CCB)。实例包括氨氯地平(amlodipine)、苄普地尔(Bepridil)、地尔硫卓、非洛地平(felodipine)、瑞西丁(ryosidine)、伊拉地平(isradipine)、拉西地平(lacidipine)、尼卡地平(nicardipine)、硝苯地平(nifedipine)、尼古地平(niguldipine)、尼鲁地平(niludipine)、尼莫地平(nimodipine)、尼索地平(nisoldipine)、尼群地平(nitrendipine)、维拉帕米及尼伐地平(nivaldipine),优选地是选自以下的非-DHP代表物:氟桂利嗪(flunarizine)、普尼拉明(prenylamine)、地尔硫卓、芬地林(fendiline)、戈洛帕米(gallopamil)、米贝拉地尔(mibefradil)、阿尼帕米(anipamil)、噻帕米(tiapamil)及维拉帕米、或其药学上可接受的盐。CCB可用作抗高血压药、抗心绞痛药或抗心律不齐药。

[0487] 术语"利尿剂"包括噻嗪衍生物(例如,氯噻嗪、氢氯噻嗪、甲氯噻嗪及氯噻酮)。

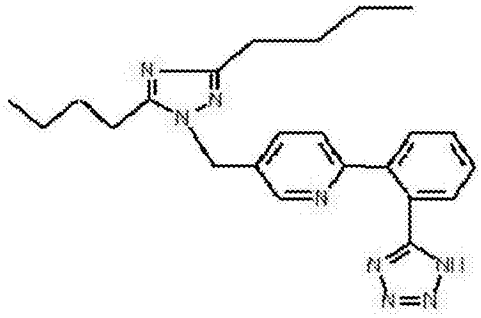
[0488] 术语"ApoA-I模拟物"包括D4F肽(例如,式D-W-F-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F)。

[0489] 血管紧张素II受体拮抗剂或其药学上可接受的盐应理解为可结合血管紧张素II受体的AT_1-受体亚型但不会活化该受体的活性成分。作为抑制AT_1-受体的结果,这些拮抗剂可例如用作抗高血压药或用于治疗充血性心力衰竭。

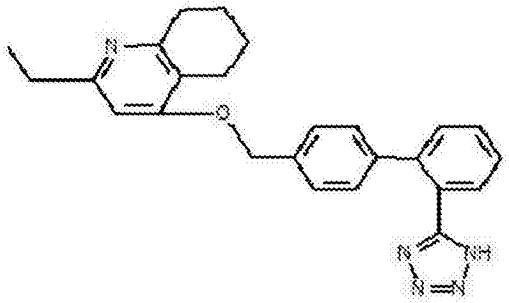
[0490] 这类AT_1受体拮抗剂包含具有不同结构特征的化合物,尤其优选的是非肽类。例如,可提及选自以下的化合物:缬沙坦(valsartan)、氯沙坦(losartan)、坎地沙坦(candesartan)、依普罗沙坦(eprosartan)、厄贝沙坦(irbesartan)、沙普立沙坦(saprisartan)、他索沙坦(tasosartan)、替米沙坦(telmisartan)、具有下式的命名为E-1477的化合物

[0491] 

[0492] 具有下式的命名为SC-52458的化合物

[0493] 

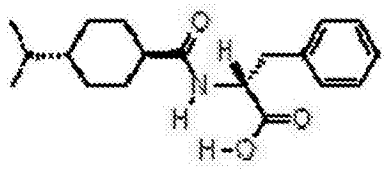
[0494] 以及具有下式的命名为ZD-8731的化合物

[0495] 

[0496] 或在每种情况下，其药学上可接受的盐。

[0497] 优选的AT_1-受体拮抗剂是坎地沙坦、依普罗沙坦、厄贝沙坦、氯沙坦、替米沙坦、缬沙坦。还优选的是那些已市售的活性剂，最优选为缬沙坦或其药学上可接受的盐。

[0498] 术语“抗糖尿病剂”包括可促进胰岛素从胰-细胞分泌的胰岛素分泌增强剂。实例包括双胍衍生物(例如，二甲双胍(metformin))、磺酰脲类(SU)(例如，甲苯磺丁脲(tolbutamide)、氯磺丙脲(chlorpropamide)、妥拉磺脲(tolazamide)、醋酸己脲(acetohexamide)、4-氯-N-[(1-吡咯啶基氨基)羰基]-苯磺酰胺(格隆平脲(glycopyramide))、格列苯脲(glyburide)、格列齐特(gliclazide)、1-丁基-3-metanilyl脲、磺胺丁脲(carbutamide)、格列波脲(glibonuride)、格列吡嗪(glipizide)、格列喹酮(gliquidone)、格列帕特(glisoxepid)、格列噻唑(glybuthiazole)、格列丁唑(glibuzole)、格列己脲(glyhexamide)、格列嘧啶(glymidine)、格列平脲(glypinamide)、苯磺丁脲(phenbutamide)及格列环脲(tolylcyclamide)、或其药学上可接受的盐。其它实例包括苯丙氨酸衍生物(例如，具有下式的那格列胺(nateglinide)[N-(反式-4-异丙基环己基羰基)-D-苯丙氨酸](参见EP 196222和EP 526171)

[0499] ;

[0500] 瑞格列奈[(S)-2-乙氧基-4-{2-[[3-甲基-1-[2-(1-哌啶基)苯基]丁基]氨基]-2-氧代乙基}苯甲酸](参见EP 589874、EP 147850 A2尤其是第61页实施例11,以及EP 207331 A1);(2S)-2-苄基-3-(顺式-六氢-2-异二氢吲哚基羰基)-丙酸钙二水合物(例如,米格列奈(mitiglinide)(参见EP 507534))以及格列美脲(glimepiride)(参见EP 31058)。

[0501] 可与本发明的肽及多肽组合使用的第二活性剂的其它实例包括DPP-IV抑制剂、GLP-1和GLP-1激动剂。

[0502] DPP-IV负责使GLP-1去活化。更具体而言,GLP-1产生GLP-1受体拮抗剂,从而缩短对GLP-1的生理学反应。GLP-1是胰胰岛素分泌的主要刺激物并对葡萄糖处理具有直接有益的效果。

[0503] DPP-IV(二肽基肽酶IV)抑制剂可为肽,或优选地是非肽。DPP-IV抑制剂在每种情形下概括地且具体地公开于例如WO 98/19998、DE 196 16 486 A1、WO 00/34241和WO 95/15309中,在每一情况下特别是公开在化合物权利要求及工作实施例的最终产物中,最终产物主题、药物制剂及权利要求均在此以引用这些公开的方式并入本申请中。优选的是分别具体公开于WO 98/19998的实施例3和WO 00/34241的实施例1的那些化合物。

[0504] GLP-1(胰高血糖素样肽-1)是促胰岛素蛋白,其阐述于例如W.E.Schmidt等人,Diabetologia,28,1985,704-707及US 5,705,483中。

[0505] 术语“GLP-1激动剂”包括GLP-1(7-36)NH_2的变体及类似物,它们具体公开于US 5,120,712、US 5,118666、US 5,512,549、WO 91/11457和C.Orskov等,J.Biol.Chem.264(1989)12826中。其它实例包括GLP-1(7-37),其中在该化合物中,Arg^{36}的羧基末端酰胺官能团被GLP-1(7-36)NH_2分子的37位的Gly替换,及其变体及类似物,包括GLN^9-GLP-1(7-37)、D-GLN^9-GLP-1(7-37)、乙酰基LYS^9-GLP-1(7-37)、LYS^{18}-GLP-1(7-37),以及尤其是GLP-1(7-37)OH、VAL^8-GLP-1(7-37)、GLY^8-GLP-1(7-37)、THR^8-GLP-1(7-37)、MET^8-GLP-1(7-37)和4-咪唑并丙酰基-GLP-1。尤其优选的是由Greig等人在Diabetologia 1999,42,45-50中描述的GLP激动剂类似物exendin-4。

[0506] “抗糖尿病剂”定义还包括胰岛素敏感性增强剂,其可恢复受损胰岛素受体功能以降低胰岛素抗性并因此增强胰岛素敏感性。实例包括降血糖药噻唑烷二酮衍生物(例如,格列酮(glitazone)、(S)-((3,4-二氢-2-(苯基-甲基)-2H-1-苯并吡喃-6-基)甲基-噻唑烷-2,4-二酮(恩格列酮(englitazone))、5-{[4-(3-(5-甲基-2-苯基-4-噁唑基)-1-氧代丙基)-苯基]-甲基}-噻唑烷-2,4-二酮(达格列酮(darglitazone))、5-{[4-(1-甲基-环己基)甲氧基)-苯基]甲基}-噻唑烷-2,4-二酮(环格列酮(ciglitazone))、5-{[4-(2-(1-吲哚基)乙氧基)苯基]甲基}-噻唑烷-2,4-二酮(DRF2189)、5-{4-[2-(5-甲基-2-苯基-4-噁唑基)-乙氧基)]苄基}-噻唑烷-2,4-二酮(BM-13.1246)、5-(2-萘基磺酰基)-噻唑烷-2,4-二酮(AY-31637)、双{4-[(2,4-二氧代-5-噻唑烷基)甲基]苯基}甲烷(YM268)、5-{4-[2-(5-甲基-2-苯基-4-噁唑基)-2-羟基乙氧基]苄基}-噻唑烷-2,4-二酮(AD-5075)、5-[4-(1-苯

基-1-环丙烷羰基氨基)-苄基]-噻唑烷-2,4-二酮(DN-108)5-{[4-(2-(2,3-二氢吲哚-1-基)乙氧基)苯基]甲基}-噻唑烷-2,4-二酮、5-[3-(4-氯-苯基])-2-丙炔基]-5-苯基磺酰基)噻唑烷-2,4-二酮、5-[3-(4-氯苯基])-2-丙炔基]-5-(4-氟苯基-磺酰基)噻唑烷-2,4-二酮、5-{[4-(2-(甲基-2-吡啶基-氨基)-乙氧基)苯基]甲基}-噻唑烷-2,4-二酮(罗格列酮(rosiglitazone))、5-{[4-(2-(5-乙基-2-吡啶基)乙氧基)苯基]-甲基}噻唑烷-2,4-二酮(吡格列酮(pioglitazone))、5-{[4-((3,4-二氢-6-羟基-2,5,7,8-四甲基-2H-1-苯并吡喃-2-基)甲氧基)-苯基]-甲基}-噻唑烷-2,4-二酮(曲格列酮(troglitazone))、5-[6-(2-氟-苄基氧基)萘-2-基甲基]-噻唑烷-2,4-二酮(MCC555)、5-{[2-(2-萘基)-苯并噁唑-5-基]-甲基}噻唑烷-2,4-二酮(T-174)和5-(2,4-二氧代噻唑烷-5-基甲基)-2-甲氧基-N-(4-三氟甲基-苄基)苯甲酰胺(KRP297))。

[0507] 其它抗糖尿病剂包括胰岛素信号通路调控剂,如蛋白酪氨酸磷酸酶(PTPases)抑制剂、抗糖尿病非小分子模拟物化合物和谷氨酰胺-果糖-6-磷酸酰氨基转移酶(GFAT)抑制剂;影响失调的肝葡萄糖产生的化合物,如葡萄糖-6-磷酸酶(G6Pase)抑制剂、果糖-1,6-双磷酸酶(F-1,6-Bpase)抑制剂、糖原磷酸化酶(GP)抑制剂、胰高血糖素受体拮抗剂及磷酸烯醇丙酮酸羧激酶(PEPCK)抑制剂;丙酮酸脱氢酶激酶(PDHK)抑制剂;胃排空的抑制剂;胰岛素;GSK-3抑制剂;类视色素X受体(RXR)激动剂;β-3AR激动剂;解偶联蛋白(UCPs)激动剂;非格列酮型PPARγ激动剂;双重PPARα/PPARγ激动剂;抗糖尿病含钒化合物;肠降血糖素(incretin)激素,如胰高血糖素-样肽-1(GLP-1)和GLP-1激动剂;β-细胞咪唑啉受体拮抗剂;米格列醇(miglitol);α_2-肾上腺素拮抗剂;及其药学上可接受的盐。

[0508] 在一个实施方案中,本发明提供组合产品、特别是药物组合产品,其包含治疗有效量的根据式I至IV中任一式所定义的多肽或其酰胺、酯或盐或其生物缀合物,以及一或多种选自以下的治疗活性剂:β-肾上腺素能受体阻断剂,例如醋丁洛尔、阿替洛尔、倍他洛尔、比索洛尔、美托洛尔、纳多洛尔、普萘洛尔、索他洛尔及噻吗洛尔;血管紧张素II受体拮抗剂,例如AT1阻断剂;抗糖尿病剂,例如DPPIV抑制剂(例如维格列汀(vildagliptin))及GLP-1肽激动剂。

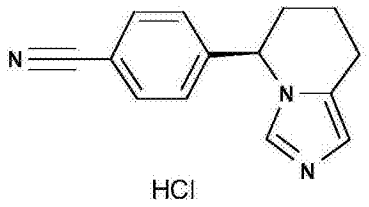
[0509] 术语"减肥剂"包括脂肪酶抑制剂(例如,奥利司他(orlistat))及食欲抑制剂(例如,西布曲明(sibutr胺)及芬特明(phentermine))。

[0510] 醛固酮合酶抑制剂或其药学上可接受的盐应当理解为是具有抑制醛固酮产生的性质的活性成分。醛固酮合酶(CYP11B2)是在肾上腺皮质中催化醛固酮产生的最后步骤(即,11-脱氧皮质酮至醛固酮的转化)的线粒体细胞色素P450酶。已知用所谓的醛固酮合酶抑制剂对醛固酮产生的抑制是治疗低钾血症、高血压、充血性心力衰竭、心房颤动或肾衰竭的成功变通方法。该醛固酮合酶抑制活性可由本领域技术人员按照标准分析(例如,US2007/0049616)来容易地测定。

[0511] 该类醛固酮合酶抑制剂包括甾体及非甾体醛固酮合酶抑制剂,且后者是优选的。

[0512] 优选的是市售醛固酮合酶抑制剂或那些已经卫生当局批准的醛固酮合酶抑制剂。

[0513] 该类醛固酮合酶抑制剂包含具有不同结构特征的化合物。非甾体醛固酮合酶抑制剂的实例是下式的法曲唑(fadrozole)盐酸盐的(+)-对映异构体(US专利4617307和4889861)

[0514] 

[0515] 或者，如果合适的话，其药学上可接受的盐。

[0516] 可用于所述组合产品的醛固酮合酶抑制剂是通常且特定地公开于例如US2007/0049616中的化合物及类似物，尤其是公开于化合物权利要求和工作实施例的最终产物中，最终产物的主题、药物制剂及权利要求在此通过引用这一公开的方式并入本申请中。适用于本发明的优选醛固酮合酶抑制剂包括但不限于4-(6,7-二氢-5H-吡咯并[1,2-c]咪唑-5-基)-3-甲基苄腈；5-(2-氯-4-氰基苯基)-6,7-二氢-5H-吡咯并[1,2-c]咪唑-5-甲酸(4-甲氧基苄基)甲基酰胺；4'-氟-6-(6,7,8,9-四氢-5H-咪唑并[1,5-a]氮杂䓬-5-基)联苯-3-甲腈；5-(4-氰基-2-甲氧基苯基)-6,7-二氢-5H-吡咯并[1,2-c]咪唑-5-甲酸丁基酯；4-(6,7-二氢-5H-吡咯并[1,2-c]咪唑-5-基)-2-甲氧基苄腈；5-(2-氯-4-氰基苯基)-6,7-二氢-5H-吡咯并[1,2-c]咪唑-5-甲酸4-氟苄基酯；5-(4-氰基-2-三氟甲氧基苯基)-6,7-二氢-5H-吡咯并[1,2-c]咪唑-5-甲酸甲基酯；5-(4-氰基-2-甲氧基苯基)-6,7-二氢-5H-吡咯并[1,2-c]咪唑-5-甲酸2-异丙氧基乙基酯；4-(6,7-二氢-5H-吡咯并[1,2-c]咪唑-5-基)-2-甲基苄腈；4-(6,7-二氢-5H-吡咯并[1,2-c]咪唑-5-基)-3-氟苄腈；4-(6,7-二氢-5H-吡咯并[1,2-c]咪唑-5-基)-2-甲氧基苄腈；3-氟-4-(7-亚甲基-6,7-二氢-5H-吡咯并[1,2-c]咪唑-5-基)苄腈；顺式-3-氟-4-[7-(4-氟-苄基)-5,6,7,8-四氢-咪唑并[1,5-a]吡啶-5-基]苄腈；4'-氟-6-(9-甲基-6,7,8,9-四氢-5H-咪唑并[1,5-a]氮杂䓬-5-基)联苯-3-甲腈；4'-氟-6-(9-甲基-6,7,8,9-四氢-5H-咪唑并[1,5-a]氮杂䓬-5-基)联苯-3-甲腈，或在每一情形下其(R)或(S)对映异构体；或若需要，其药学上可接受的盐。

[0517] 术语醛固酮合酶抑制剂还包括公开于WO2008/076860、WO2008/076336、WO2008/076862、WO2008/027284、WO2004/046145、WO2004/014914、WO2001/076574中的化合物及类似物。

[0518] 此外，醛固酮合酶抑制剂还包括下列中所公开的化合物及类似物：U.S.专利申请US2007/0225232、US2007/0208035、US2008/0318978、US2008/0076794、US2009/0012068、US20090048241和PCT申请WO2006/005726、WO2006/128853、WO2006128851、WO2006/128852、WO2007065942、WO2007/116099、WO2007/116908、WO2008/119744和欧洲专利申请EP1886695。适用于本发明的优选的醛固酮合酶抑制剂包括但不限于由Speedel开发的8-(4-氟苯基)-5,6-二氢-8H-咪唑并[5,1-c1[1,41噁嗪；4-(5,6-二氢-8H-咪唑并[5,1-c][1,4]噁嗪-8-基)-2-氟苄腈；4-(5,6-二氢-8H-咪唑并[5,1-c][1,4]噁嗪-8-基)-2,6-二氟苄腈；4-(5,6-二氢-8H-咪唑并[5,1-c][1,4]噁嗪-8-基)-2-甲氧基苄腈；3-(5,6-二氢-8H-咪唑并[5,1-c][1,4]噁嗪-8-基)苄腈；4-(5,6-二氢-8H-咪唑并[5,1-c][1,4]噁嗪-8-基)酞腈；4-(8-(4-氰基苯基)-5,6-二氢-8H-咪唑并[5,1-c][1,4]噁嗪-8-基)苄腈；4-(5,

6-二氢-8H-咪唑并[5,1-c][1,4]噁嗪-8-基)苄腈;4-(5,6-二氢-8H-咪唑并[5,1-c][1,4]噁嗪-8-基)萘-1-甲腈;8-[4-(1H-四唑-5-基)苯基1-5,6-二氢-8H-咪唑并[5,1-c][1,4]噁嗪;或在每一情形下其(R)或(S)对映异构体;或若需要,其药学上可接受的盐。

[0519] 可用于该组合产品的醛固酮合酶抑制剂是一般和具体地公开于例如WO 2009/156462和WO 2010/130796中的化合物及类似物,尤其是公开于化合物权利要求和实施例的最终产物,最终产物的主题、药物制剂及权利要求中。适用于本发明的组合的优选醛固酮合酶抑制剂包括3-(6-氟-3-甲基-2-吡啶-3-基-1H-吲哚-1-基甲基)-苄腈盐酸盐、1-(4-甲烷磺酰基-苄基)-3-甲基-2-吡啶-3-基-1H-吲哚、2-(5-苄氧基-吡啶-3-基)-6-氯-1-甲基-1H-吲哚、5-(3-氰基-1-甲基-1H-吲哚-2-基)-烟酸乙基酯、N-[5-(6-氯-3-氰基-1-甲基-1H-吲哚-2-基)-吡啶-3-基甲基]-乙磺酰胺、吡咯烷-1-磺酸5-(6-氯-3-氰基-1-甲基-1H-吲哚-2-基)-吡啶-3-基酯、N-甲基-N-[5-(1-甲基-1H-吲哚-2-基)-吡啶-3-基甲基]-甲磺酰胺、6-氯-1-甲基-2-{5-[(2-吡咯烷-1-基-乙基氨基)-甲基]-吡啶-3-基}-1H-吲哚-3-甲腈、6-氯-2-[5-(4-甲烷磺酰基-哌嗪-1-基甲基)-吡啶-3-基]-1-甲基-1H-吲哚-3-甲腈、6-氯-1-甲基-2-{5-[(1-甲基-哌啶-4-基氨基)-甲基]-吡啶-3-基}-1H-吲哚-3-甲腈、吗啉-4-甲酸[5-(6-氯-3-氰基-1-甲基-1H-吲哚-2-基)-吡啶-3-基甲基]-酰胺、N-[5-(6-氯-1-甲基-1H-吲哚-2-基)-吡啶-3-基甲基]-乙磺酰胺、C,C,C-三氟-N-[5-(1-甲基-1H-吲哚-2-基)-吡啶-3-基甲基]-甲磺酰胺、N-[5-(3-氯-4-氰基-苯基)-吡啶-3-基]-4-三氟甲基-苯磺酰胺、N-[5-(3-氯-4-氰基-苯基)-吡啶-3-基]-1-苯基-甲磺酰胺、N-(5-(3-氯-4-氰基苯基)吡啶-3-基)丁烷-1-磺酰胺、N-(1-(5-(4-氰基-3-甲氧基苯基)吡啶-3-基)乙基)乙磺酰胺、N-((5-(3-氯-4-氰基苯基)吡啶-3-基)(环丙基)甲基)乙磺酰胺、N-(环丙基(5-(1H-吲哚-5-基)吡啶-3-基)甲基)乙磺酰胺、N-(环丙基(5-萘-1-基-吡啶-3-基)甲基)乙磺酰胺、乙磺酸[5-(6-氯-1-甲基-1H-吡咯并[2,3-b]吡啶-2-基)-吡啶-3-基甲基]-酰胺和乙磺酸{[5-(3-氯-4-氰基-苯基)-吡啶-3-基]-环丙基-甲基}-乙基-酰胺。

[0520] 术语“内皮素受体阻断剂”包括波生坦及安立生坦(ambrisentan)。

[0521] 术语“CETP抑制剂”是指抑制胆固醇酯转移蛋白(CETP)介导的将各种胆固醇酯及甘油三酸酯从HDL转运至LDL和VLDL的化合物。此类CETP抑制活性很容易由本领域技术人员根据标准分析法(例如,U.S.Pat.No.6,140,343)测定。其实例包括公开于U.S.Pat.No.6,140,343和U.S.Pat.No.6,197,786中的化合物(例如[2R,4S]4-[(3,5-双-三氟甲基-苄基)-甲氧基羰基-氨基]-2-乙基-6-三氟甲基-3,4-二氢-2H-喹啉-1-甲酸乙酯(托彻普(torcetrapib));公开于U.S.Pat.No.6,723,752中的化合物(例如,(2R)-3-{[3-(4-氯-3-乙基-苯氧基)-苯基]-[[3-(1,1,2,2-四氟-乙氧基)-苯基]-甲基]-氨基}-1,1,1-三氟-2-丙醇);公开于美国专利申请第10/807,838号中的化合物;公开于U.S.Pat.No.5,512,548中的多肽衍生物;分别公开于J.Antibiot.,49(8):815-816(1996),和Bioorg.Med.Chem.Lett.;6:1951-1954(1996)中的胆固醇酯的玫瑰酮内酯(rosenonolactone)衍生物及含磷酸酯类似物。此外,CETP抑制剂还包括公开于WO2000/017165、WO2005/095409、WO2005/097806、WO 2007/128568、WO2008/009435、WO 2009/059943和WO2009/071509中的那些。

[0522] 术语“NEP抑制剂”是指抑制中性内肽酶(NEP)EC 3.4.24.11的化合物。实例包括坎

沙曲(Candoxatril)、坎沙曲拉(Candoxatrilat)、右卡多曲(Dexecadotril)、依卡曲尔(Ecadotril)、消旋卡多曲(Racecadotril)、山帕曲拉(Sampatrilat)、法西多曲(Fasidotril)、奥马曲拉(Omapatrilat)、吉莫曲拉(Gemopatrilat)、达格鲁曲(Daglutril)、SCH-42495、SCH-32615、UK-447841、AVE-0848、PL-37和(2R,4S)-5-联苯-4-基-4-(3-羧基-丙酰基氨基)-2-甲基-戊酸乙基酯或其药学上可接受的盐。NEP抑制剂还包括如美国专利US 5,155,100中所公开的膦酰基/联芳基取代的二肽衍生物。NEP抑制剂还包括如PCT申请WO 2003/104200中所公开的N-巯基酰基苯丙氨酸衍生物。NEP抑制剂还包括如PCT申请WO 2008/133896、WO 2009/035543或WO 2009/134741中所公开的双重作用抗高血压药。其它实例包括美国专利申请12/788,794、12/788,766和12/947,029中公开的化合物。NEP抑制剂还包括WO 2010/136474、WO 2010/136493、WO 2011/061271及美国临时申请号61/414171和61/414163中公开的化合物。

[0523] 在一个实施方案中,本发明提供活化个体的APJ受体的方法,其中该方法包括向该个体施用治疗有效量的根据式I至IV中任一式所定义的多肽或其酰胺、酯或盐或其生物缀合物。

[0524] 在一个实施方案中,本发明提供治疗个体的对APJ受体的活化响应的病症或疾病的方法,其中该方法包括向该个体施用治疗有效量的根据式I至IV中任一式所定义的多肽或其酰胺、酯或盐或其生物缀合物。

[0525] 在一个实施方案中,本发明提供治疗个体的对APJ受体的活化(激动)响应的病症或疾病的方法,其中该病症或疾病选自急性代偿失调性心力衰竭(ADHF)、慢性心力衰竭、肺性高血压、心房颤动、布鲁格达氏综合征、室性心动过速、动脉粥样硬化、高血压、再狭窄、局部缺血性心血管疾病、心肌病、心脏纤维化、心律不齐、水潴留、糖尿病(包括妊娠糖尿病)、肥胖症、外周动脉病、脑血管意外、暂时性缺血发作、创伤性脑损伤、肌萎缩侧索硬化、灼伤(包括晒伤)及先兆子痫。

[0526] 在一个实施方案中,本发明提供根据式I至IV中任一式所定义的多肽或其生物缀合物,其用作药物。

[0527] 在一个实施方案中,本发明提供如式I至IV中任一式所定义的多肽或其酰胺、酯或盐或其生物缀合物在制备药物中的用途,所述药物用于治疗对APJ受体的活化响应的病症或疾病。在另一实施方案中,本发明提供根据式I至IV中任一式所定义的多肽或其酰胺、酯或盐或其生物缀合物在制备用于治疗对APJ受体的活化响应的病症或疾病的药物中的用途,其中所述病症或疾病特别选自急性代偿失调性心力衰竭(ADHF)、慢性心力衰竭、肺性高血压、心房颤动、布鲁格达氏综合征、室性心动过速、动脉粥样硬化、高血压、再狭窄、局部缺血性心血管疾病、心肌病、心脏纤维化、心律不齐、水潴留、糖尿病(包括妊娠糖尿病)、肥胖症、外周动脉病、脑血管意外、暂时性缺血发作、创伤性脑损伤、肌萎缩侧索硬化、灼伤(包括晒伤)及先兆子痫。

[0528] 本发明的示例:肽及多肽合成

[0529]

缩写	定义
AA	氨基酸
Ac	乙酰基
Acm	乙酰氨基甲基
ACN	乙腈
AcOH	乙酸
Ac_2O	乙酸酐
ε-Ahx	ε-氨基己酸
AM	氨基甲基
BAL	主链酰胺连接体
BSA	牛血清白蛋白

[0530]

Boc	叔丁基氧基羰基
Bzl	苄基
DCM	二氯甲烷
DIC	N,N'-二异丙基碳二亚胺
DIPEA	N,N'-二异丙基乙胺
DMA	N,N'-二甲基乙酰胺
DMF	N,N'-二甲基甲酰胺
DMSO	二甲亚砜
DTT	二硫苏糖醇
DVB	二乙烯基苯
EDT	乙二硫醇
FA	甲酸
Fmoc	9-芴基甲基氧基羰基
HATU	2-(1H-9-氮杂苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脲鎓六氟磷酸盐
HBSS	Hank 缓冲盐溶液
HCTU	2-(6-氯-1H-苯并三唑-基)-1,1,3,3-四甲基脲鎓六氟磷酸盐
HEPES	4-(2-羟基乙基)-1-哌嗪乙磺酸盐
HFIP	六氟异丙醇
HOAt	1-羟基-7-氮杂苯并三唑
HSA	人血清清蛋白
HPLC	高效液相色谱
HRMS	高分辨率质谱法
ivDde	(4,4-二甲基-2,6-二氧代环己-1-亚基)-3-甲基丁基
LN	自然对数
MeOH	甲醇
MS	质谱
Nal	2-萘丙氨酸
Nle	正亮氨酸
NMP	N-甲基吡咯烷
Oxyma Pure	2-氰基-2-(羟基亚氨基)乙酸乙酯
Pbf	2,2,4,6,7-五甲基二氢苯并呋喃-5-磺酰基
*p*E	焦谷氨酸
PG	保护基团

[0531]

PBS	磷酸盐缓冲盐水
Ph	苯基
PhP	苯基脯氨酸
Pip	2-哌啶酸
Pol	聚合物载体
PS	聚苯乙烯
rt	室温
SEC	尺寸排阻色谱
SPPS	固相肽合成
TBME	叔丁基甲基醚
TCEP	三(2-羧基乙基)膦
*t*BuOH	叔丁醇
TFA	三氟乙酸
THF	四氢呋喃
TIS, TIPS	三异丙基硅烷
t_R	保留时间
Trt	三苯甲基
UPLC	超高效液相色谱
UV	紫外

[0532] 所述肽通过标准固相Fmoc化学来合成。所述肽是在Prelude™肽合成仪(Protein Technologies,Inc.,Tucson,USA)和Liberty微波肽合成仪(CEMCorporation,North Carolina,USA)上组装的。在C-末端上具有游离羧酸或在C-末端上具有N,N-二取代的羧酰胺的肽是从2-氯三苯甲基氯-PS-树脂(ABCR,Karlsruhe,德国或AnaSpec,Inc.,California,USA)合成的。在C-末端上具有未取代的甲酰胺的肽是从经Fmoc保护的Rink-Amide-AM-PS-树脂(Merck,Darmstadt,德国)合成的。在C-末端上具有N-单取代的甲酰胺的肽是从载有胺的BAL-AM-PS-树脂(EMC Microcollections,Tübingen,德国)合成的。

[0533] 所述肽通过制备型反相HPLC来纯化。使用以下柱：

[0534] ●Waters SunFire Prep C18OBD柱,5μm,30x100mm,部件号186002572(一个柱或两个串联柱)

[0535] ●Waters Atlantis Prep OBD T3柱,5μm,30x150mm,部件号186003703

[0536] ●Waters SunFire Prep C18OBD柱,5μm,30x50mm,部件号186002572

[0537] 流动相由洗脱剂A(在H_2O中的0.1％TFA)及洗脱剂B(ACN)组成。基于分离问题的具体要求来设计梯度。将纯化的产物从ACN/H_2O中冻干。

[0538] 通过分析型HPLC使用UV检测在λ＝214nm以及UPLC-MS使用电喷雾电离来进行产物的分析。

[0539] 表4中所例示的肽是使用下文所述的一般程序来合成的。未被取代的N-或C-末端分别由斜体H-或-OH表示。

[0540] 表4

[0541]

实施例	序列
实施例 1	Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-F-*OH*
实施例 2	Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-*NH(* 苯乙基 *)*
实施例 3	Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-(N-Me)F-*OH*
实施例 4	Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-NH_2
实施例 5	Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-Nal-*OH*
实施例 6	Ac-C*-R-P-R-L-S-hC*-K-G-P-Nle-P-F-*OH*
实施例 7	Ac-hC*-R-P-R-L-S-hC*-K-G-P-Nle-P-F-*OH*
实施例 8	Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-a-*OH*
实施例 9	Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-*NMe(* 苯乙基 *)*
实施例 10	Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-f-*OH*
实施例 11	Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-*NH(* 苯乙基 *)*
实施例 12	Ac-c*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-F-*OH*
实施例 13	Ac-c*-R-P-R-L-S-hC*-K-G-P-Nle-P-F-*OH*

[0542]

实施例 14	Ac-c*-R-P-R-L-S-c*-K-G-P-Nle-P-F-*OH*
实施例 15	Ac-C*-R-P-R-L-S-c*-K-G-P-Nle-P-F-*OH*
实施例 16	Ac-(D-hC)*-R-P-R-L-S-hC*-K-G-P-Nle-P-F-*OH*
实施例 17	Ac-(D-hC)*-R-P-R-L-S-(D-hC)*-K-G-P-Nle-P-F-*OH*
实施例 18	Ac-(D-hC)*-R-P-R-L-S-(hC)*-K-G-P-f-a-f-*OH*
实施例 19	Ac-c-R-P-R-L-S-(hC)-K-G-P-(D-Nle)-a-f-*OH*
实施例 20	*p*E-R-C*-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-F-*OH*
实施例 21	*p*E-R-C*-R-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-a-f-*OH*
实施例 22	*p*E-R-C*-R-L-S-C*-F-G-P-(D-Nle)-a-f-*OH*
实施例 23	*p*E-R-C*-R-L-S-C*-K-a-P-(D-Nle)-a-f-*OH*
实施例 24	*p*E-R-C*-R-L-S-C*-K-A-P-(D-Nle)-a-f-*OH*
实施例 25	*p*E-R-C*-R-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-NH_2
实施例 26	*p*E-R-C*-R-L-S-(D-hC)*-K-G-P-f-a-f-*OH*
实施例 27	*p*E-R-c*-R-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-(D-abu)-f-*OH*
实施例 28	*p*E-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-F-*OH*
实施例 29	*p*E-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-(N-Me)F-*OH*
实施例 30	*p*E-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-*NH(* 苯乙基 *)*
实施例 31	*p*E-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-Nle-*NH(Phenethyl)*
实施例 32	*p*E-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-*NH(* 苯乙基 *)*
实施例 33	*p*E-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-a-f-*OH*
实施例 34	*p*E-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-f-*OH*
实施例 35	*p*E-R-P-C*-L-S-C*-F-G-P-(D-Nle)-a-f-*OH*
实施例 35	*H*-R-P-C*-L-S-C*-K-(D-Nle)-a-f-*OH*
实施例 36	*p*E-R-P-hC*-L-S-C*-K-G-P-f-a-f-*OH*
实施例 37	*p*E-R-P-c*-L-S-(D-hC)*-K-G-P-(D-Nle)-a-y-*OH*
实施例 38	*p*E-R-P-(D-hC)*-L-S-hC*-K-G-P-(D-Nle)-(D-Nva)-f-*OH*

[0543] 其中标记“*”的两个氨基酸表示通过它们的侧链形成二硫键或酰胺键的氨基酸。

[0544] 分析方法

[0545] ●1a)HPLC-分析方法A

[0546] ●柱:Waters Xbridge™ C18(50x4.0mm),3.5μm;部件号:186003031

[0547] ●洗脱剂A:在水中的0.07％TFA/洗脱剂B:在ACN中的0.1％TFA

[0548] ●流速:1.5ml/min

[0549] ●温度:40℃

[0550] ●梯度

[0551]

:时间[min]	A[%]	B[%]
0.0	95	5
10.0	0	100
12.0	0	100
12.2	95	5

[0552] 1b)HPLC-分析方法B

[0553] ●柱:XBridge BEH300C18(100x4.6mm),3μm;部件号:186003612

[0554] ●洗脱剂A:在水中的0.1%TFA/洗脱剂B:在ACN中的0.1%TFA

[0555] ●流速:1.0ml/min

[0556] ●温度:40℃

[0557] ●梯度:

[0558]

时间[min]	A[%]	B[%]
0.0	98	2
18	2	98
20	2	98
22	98	2

[0559] 2a)UPLC-MS-分析方法C

[0560] ●柱:Acquity UPLC® BEH300C18(50x2.1mm),1.7μm;部件号:186003685

[0561] ●洗脱剂A:在水中的0.05%TFA/洗脱剂B:在ACN中的0.04%TFA

[0562] ●流速:1.0ml/min

[0563] ●温度:80℃

[0564] ●梯度:

[0565]

时间[min]	A[%]	B[%]
0.0	100	0
0.2	100	0
4.4	2	98
4.8	2	98
4.9	100	0
5.0	100	0

[0566] 2b)UPLC-HRMS-分析方法D

[0567] ●Waters Acquity UPLC® BEH C18,1.7μm,2.1x50mm;部件号:186002350

[0568] ●洗脱剂A:在水中的0.05%FA+3.75mM乙酸铵;洗脱剂B:在ACN中的0.04%FA

[0569] ●流速:1.0ml/min

[0570] ●温度:50℃

[0571] ●梯度:2至98%,历经4.4min

[0572] 3)分析方法E:

[0573] ●XBridge C18柱,3.5μm,3.0x 30mm

[0574] ●洗脱剂:A:水(0.1%甲酸);B:CAN

[0575] ●流速:2mL/min

[0576] ●梯度:0min 40%B;40%至95%B历经1.70min;2.0min 95%B;2.1min 40%B

[0577] ●质谱仪:单四级杆ESI扫描范围150-1600

[0578] ●HPLC:Agilent 1100series

[0579] ●温度:40C

[0580] 3)分析方法F:

[0581] ●Acquity BEH 1.7μm 2.1x50mm

[0582] ●洗脱剂:A:水(0.1%甲酸);B:ACN(0.1%甲酸)

[0583] ●流速:1mL/min

[0584] ●梯度:0min 2%B;2%至98%B历经1.7min;2.06min 98%B;2.16min 2%B

[0585] ●质谱仪:单四级杆ESI扫描范围120-1600

[0586] ●HPLC:waters Acquity

[0587] ●温度:50C

[0588] 3)分析方法G:

[0589] ●Acquity BEH 1.7μm 2.1x50mm

[0590] ●洗脱剂:A:水(0.1%甲酸);B:ACN(0.1%甲酸)

[0591] ●流速:1mL/min

[0592] ●梯度:0min 40%B;40%至98%B历经1.40min;2.05min 98%B;2.1min 40%B

[0593] ●质谱仪:单四级杆ESI扫描范围120-1600

[0594] ●HPLC:waters Acquity

[0595] ●温度:50C

[0596] 实施例1至38的肽的分析数据汇总于表5中,并且是使用上面所述分析方法产生的。

[0597] 表5

[0598]

	HPLC		质谱				
肽	t_R [min]	方法	$[M+2H]^{2+}$ (测量值)	$[M+3H]^{3+}$ (测量值)	方法	$[M+2H]^{2+}$ (计算值)	$[M+3H]^{3+}$ (计算值)
实施例 1	3.48	A	757.4	505.3	C	757.4	505.3
实施例 2	3.66	A	735.4	490.6	C	735.4	490.6
实施例 3	3.60	A	764.4	509.9	C	764.4	509.9
实施例 4	2.65	A	683.4	455.9	C	683.4	455.9
实施例 5	3.95	A	782.4	521.9	C	782.4	521.9
实施例 6	3.49	A	764.4	509.9	C	764.4	509.9
实施例 7	3.55	A	771.4	514.6	C	771.4	514.6
实施例 8	2.85	A	719.3	479.9	C	719.4	479.9
实施例 9	3.75	A	742.4	495.3	C	742.4	495.3
实施例 10	3.55	A	757.4	505.3	C	757.4	505.3
实施例 11	3.57	A	686.9	458.3	C	686.9	458.2
实施例 12	3.51	A	757.4	505.3	C	757.4	505.3
实施例 13	3.54	A	764.4	509.9	C	764.4	509.9
实施例 14	3.46	A	757.4	505.3	C	757.4	505.3
实施例 15	3.44	A	757.4	505.3	C	757.4	505.3
实施例 16	3.59	A	771.4	514.6	C	771.4	514.6
实施例 17	3.61	A	771.4	514.6	C	771.4	514.6
实施例 18	7.60	B	775.391	517.263	D	775.385	517.256
实施例 19	7.40	B	751.392	501.263	D	751.385	501.256
实施例 20	3.41	A	743.4	495.9	C	743.4	495.9
实施例 21	7.35	B	730.355	487.239	D	730.361	487.241
实施例 22	8.62	B	739.877	493.587	D	739.856	493.573
实施例 23	7.32	B	737.374	491.918	D	737.377	491.921
实施例 24	7.35	B	737.375	491.919	D	737.377	491.921
实施例 25	5.63	B	620.822	414.217	D	620.825	414.219
实施例 26	7.58	B	754.368	503.247	D	754.361	503.241
实施例 27	7.36	B	737.374	491.918	D	737.369	491.913
实施例 28	3.63	A	713.9	476.2	C	713.8	476.2
实施例 29	3.78	A	720.9	480.9	C	720.9	480.9
实施例 30	3.82	A	691.9	461.6	C	691.8	461.6
实施例 31	3.74	A	643.3	429.2	C	643.3	429.2
实施例 32	8.01	B	643.328	429.222	D	643.324	429.252
实施例 33	7.73	B	700.832	467.557	D	700.845	467.566
实施例 34	7.17	B	609.809	406.875	D	609.810	406.876
实施例 35	8.99	B	710.351		D	710.332	473.890
实施例 35	6.89	B	568.289	379.196	D	568.292	379.197
实施例 36	7.69	B	724.843	483.564	D	724.837	483.558
实施例 37	6.62	B	715.848	477.568	D	715.843	477.562
实施例 38	8.28	B	728.873		D	728.869	

[0599] 一般合成程序

[0600] 1)负载第一个氨基酸至2-氯三苯甲基氯树脂上及Fmoc-去除

[0601] 用DCM充分洗涤2-氯三苯甲基氯树脂(1eq.,1.0-1.6mmol/g)。将期望的氨基酸(通常相对于树脂的0.5-2eq.,视为1.6mmol/g负载)溶解于DCM(约10mL/克树脂)及DIPEA(相对于树脂为4eq.,视为1.6mmol/g负载)中。将该溶液添加至树脂中并在室温下将混悬液振摇3-16h。倒掉树脂中的液体,然后依次用DCM/MeOH/DIPEA(17:2:1)、DCM、DMA、DCM充分洗涤。

[0602] 对于Fmoc的去除以及负载的测定,将树脂与哌啶/DMA(1:4)或4-甲基哌啶/DMA(1:4)(12x 10mL/克初始树脂)反复地振摇并用DMA(2x 10mL/克初始树脂)洗涤。用MeOH稀释合并的溶液至250mL体积V/克初始树脂。用MeOH将此溶液的2mL等分试样(V_a)进一步稀释至250ml(V_t)。针对MeOH参考,测量299.8nm处的UV吸收度,得到吸收度A。依次用DMA、DCM、DMA、DCM充分洗涤树脂并在40℃下在高真空中干燥,得到mg树脂。

[0603] 根据下式计算树脂的负载:

[0604] 负载[mol/g]=(A x V_t x V)/(d xεx V_a x m)

[0605] (其中,d:比色皿宽度;ε=7800L $mol^{-1}cm^{-1}$)

[0606] 2)固相肽合成

[0607] 2a)在Prelude™合成仪上的合成循环A

[0608] 用DMA洗涤树脂。用哌啶/DMA(1:4)或4-甲基哌啶/DMA(1:4)重复处理来去除Fmoc。用DMA洗涤树脂。通过以下方式进行偶联:添加Fmoc-氨基酸(3eq.;在NMP中的0.3M溶液)、HCTU(3eq.;在NMP中的0.3M溶液)和DIPEA(4.5eq.;在NMP中的0.9M溶液),随后在室温下在氮气下,将该混悬液混合,通常混合15分钟至4小时,这取决于具体需求。在用DMA洗涤后,通常重复偶联步骤1至3次,这取决于具体需求。在用DMA洗涤后,通过添加Ac_2O/吡啶/DMA(1:1:8)的混合物并随后在室温下混合该混悬液来实施封端。将树脂用DMA洗涤。

[0609] 2a)在Prelude™合成仪上的合成循环B

[0610] 用DMA洗涤树脂。通过用4-甲基哌啶/DMA(1:4)重复处理来去除Fmoc。用DMA洗涤树脂。通过以下方式进行偶联:添加Fmoc-氨基酸(3eq.;在NMP中的0.2M溶液)、HCTU(3eq.;在NMP中的0.3M溶液)和DIPEA(3.3eq.;在NMP中的0.66M溶液),随后在室温下在氮气下,将该混悬液混合,通常混合15分钟至4小时,这取决于具体需求。在用DMA洗涤后,通常重复偶联步骤1至3次,这取决于具体需求。在用DMA洗涤后,通过添加Ac_2O/吡啶/DMA(1:1:8)的混合物并随后在室温下混合该混悬液来实施封端。将树脂用DMA洗涤。

[0611] 2b)在Prelude™合成仪上的合成循环C

[0612] 用DMA洗涤树脂。通过用哌啶/DMA(1:4)或4-甲基哌啶/DMA(1:4)重复处理来去除Fmoc。用DMA洗涤树脂。通过添加Ac_2O/吡啶/DMA(1:1:8)的混合物并随后在室温下混合该混悬液来实施封端。将树脂用DMA洗涤。

[0613] 2c)在Liberty™合成仪上的合成循环D

[0614] 将树脂用DMF和DCM洗涤。通过用20%哌啶/DMF(通常7ml/0.1mmol两次)处理来除去Fmoc。将树脂用DMF和DCM洗涤。通过以下方式进行偶联:添加Fmoc-氨基酸(5eq.;在DMF中的0.2M溶液)、HCTU(5eq.;在DMF中的0.5M溶液)和DIPEA(10eq.;在NMP中的2M溶液),随后在氮气下在75至50℃间以0-20瓦特微波功率,将该混悬液混合,这取决于具体需求。在用DMA洗涤后,偶联步骤可重复一次,这取决于具体需求。将树脂用DMF洗涤。

[0615] 3)从树脂裂解并伴随或不伴随保护基团去除

[0616] 3a)裂解方法A

[0617] 在室温下将树脂(0.1mmol)与95%aq.TFA/EDT/TIS(95:2.5:2.5)(3mL)振摇2小时。滤出裂解溶液,并添加新鲜的溶液(3mL)。在室温下振摇混悬液1小时,然后滤出裂解溶液。添加新鲜的溶液(3mL)并在室温下振摇混悬液1小时。滤出裂解溶液。将合并的裂解溶液缓慢地倾倒至冷庚烷/乙醚的混合物(1:1)(35mL)中,得到沉淀。离心混悬液并倾倒出上清液。用冷庚烷/乙醚(1:1)(10-20mL)洗涤残留物,离心混悬液并倾倒出上清液。将该步骤进行1-2次。在高真空中干燥固体。

[0618] 3b)裂解方法B

[0619] 在室温下将树脂(0.1mmol)与95%aq.TFA//TIS/DTT(95:2.5:2.5)(3mL)振摇3小时。滤出裂解溶液。用95%TFA水溶液(1mL)将树脂洗涤一次。将合并的裂解溶液以及洗涤溶液缓慢地倾倒至冷庚烷/乙醚的混合物(1:1)(10-15mL)中,得到沉淀。将混悬液离心并倾倒出上清液。将乙醚(10mL)加入到残留物中,将混悬液涡旋3min并离心。并倾倒出上清液,将洗涤过程重复两次。在高真空中干燥固体。

[0620] 3c)裂解方法C

[0621] 将HFIP/DCM(1:3)(3mL)加入到树脂(0.1mmol)中并将混悬液在室温下振摇20min。滤出裂解溶液并收集。将该过程重复两次。最后将树脂用HFIP/DCM(1:3)(1mL)洗涤一次。在真空中使合并的裂解溶液及洗涤溶液浓缩至干燥。将粗产物从ACN/H_2O中冻干。

[0622] 4)二硫化物形成

[0623] 4a)环化方法A

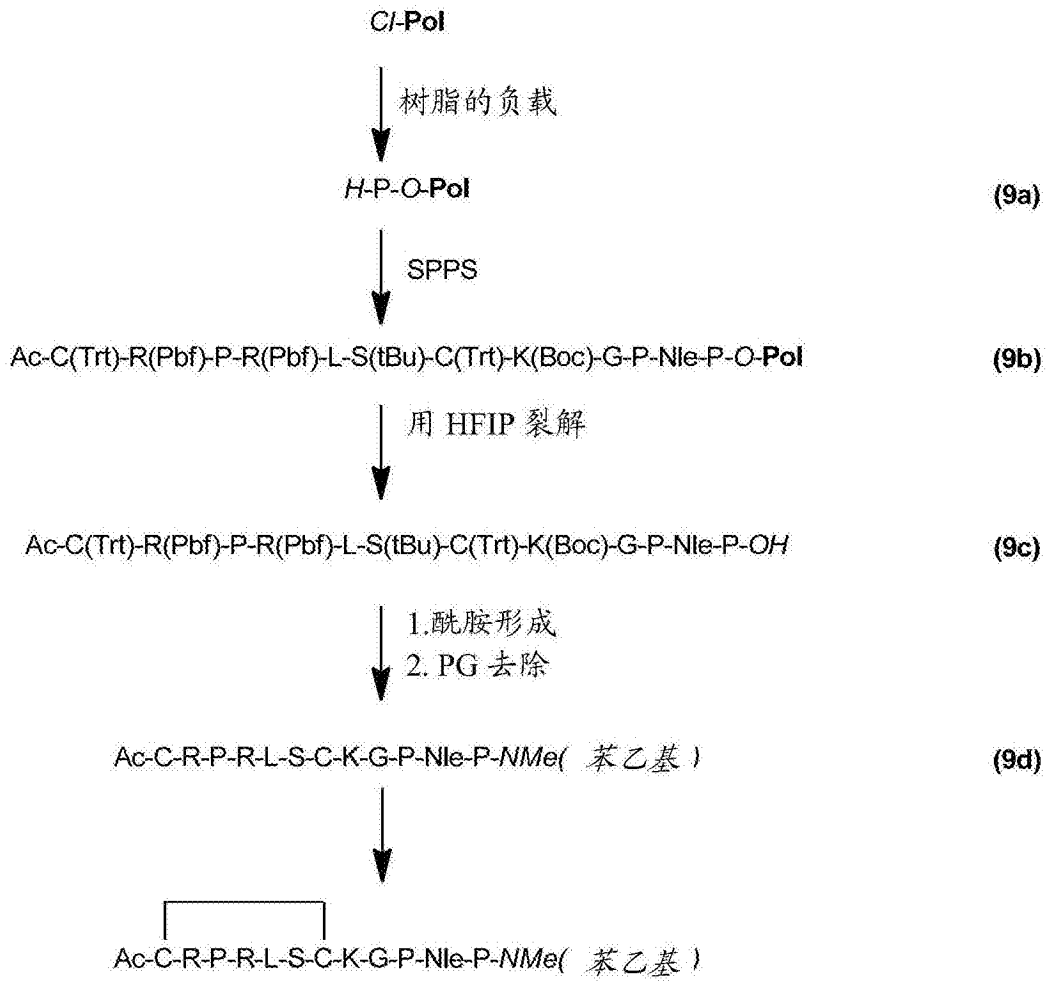
[0624] 将完全脱除保护的线性前体肽溶解于H_2O/DMSO(9:1)或(4:1)中,得到通常0.5-7mM的浓度。然后在室温下将反应混合物通常搅拌16-96小时,这取决于需求,并且然后在高真空中浓缩至干。

[0625] 4b)环化方法B

[0626] 将完全脱除保护的线性前体肽(1eq.)溶解于H_2O中,得到通常约1-25mM的浓度。将50mM I_2的AcOH溶液(1-2eq.)添加,并在室温下搅拌混合物直至达到完全转化。添加0.5M抗坏血酸的H_2O溶液以淬灭过量I_2。

[0627] 在下文中将阐述代表性实施例的合成。

[0628] 实施例9 Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-NMe(苯乙基)(二硫化物C^1-C^7)的合成



[0629]

实施例 9

[0630] ●中间体9a的制备

[0631] (用Fmoc-P-OH负载至2-氯三苯甲基氯树脂、Fmoc去除及树脂的负载的测定)

[0632] 将2-氯三苯甲基氯树脂(2.00g,3.20mmol)用DCM(3x)洗涤。加入Fmoc-P-OH(1.08g,3.20mmol)的DCM(20mL)和DIPEA(2.24mL,12.8mmol)的溶液并将混悬液在室温下振摇3h。将树脂用DCM/MeOH/DIPEA(17:2:1)(3x)、DCM(3x)、DMA(3x)、DCM(3x)充分地洗涤。

[0633] 然后将树脂用哌啶/DMA的混合物(1:4)(每次12mL)处理十二次(2min)。收集哌啶/DMA溶液,用于测定树脂负载(参见一般程序)。

[0634] 将树脂用DCM(3x)、DMA(3x)、DCM(3x)充分地洗涤并在真空下干燥得到中间体9a(2.25g;载量=1.12mmol/g)。

[0635] ●中间体9b的制备

[0636] (线性肽的组装)

[0637] 使中间体9a(89mg,0.10mmol)在Prelude™肽合成仪上进行固相肽合成。如下进行偶联:

[0638]

偶联	AA	偶联数x反应时间	合成循环
1	Nle	2x 1h	B
2	P	2x 30min	B

3	G	2x 1h	B
4	K(Boc)	2x 30min	B
5	C(Trt)	2x 30min	B
6	S(tBu)	2x 30min	B
7	L	2x 30min	B
8	R(Pbf)	4x 1h	B
9	P	2x 1h	B
10	R(Pbf)	4x 1h	B
11	C(Trt)	2x 1h	B
12	Ac	1x 10min	C

[0639] ●中间体9c的制备

[0640] (从树脂的HFIP裂解)

[0641] 将HFIP/DCM(1:3)(3mL)加入到中间体9b(0.100mmol)并将混悬液在室温下振摇20min。滤出裂解溶液并收集。将该过程重复两次。最后用HFIP/DCM(1:3)(1mL)将树脂洗涤一次。在真空下将合并的裂解和洗涤溶液浓缩至干。将粗产物从ACN/H_2O中冻干获得中间体9c(37.2mg,14.8μmol),为白色固体。

[0642] ●中间体9d的制备

[0643] (酰胺形成以及除去保护基团)

[0644] 将中间体9c(37.0mg,=14.7μmol)和TBTU(7.1mg,22.1μmol)溶解在DCM(5mL)中。加入DIPEA(5.1μl,29.4μmol)并将溶液在室温下搅拌2min。加入N-甲基-苯乙胺(3.2μl,22.1μmol),将反应在室温下搅拌1h 40min并在EtOAc/正丁醇(9:1)(50mL)和5%$NaHCO_3$水溶液(5mL)之间分配。将有机层用5%$NaHCO_3$水溶液(5mL)、盐水(5mL)洗涤,用Na_2SO_4干燥,过滤并在真空下浓缩至干。

[0645] 将残留物溶解在95%aq.TFA/TIS/EDT(95:2.5:2.5)(5mL)中。将反应混合物在室温下搅拌3h然后倾倒至冷庚烷/乙醚(1:1)(35mL)中。将混悬液离心并倾倒出溶剂。将残留物用冷乙醚/庚烷(1:1)(10mL)洗涤两次并在真空下干燥获得中间体9d(27.0mg,14.7μmol),为灰棕色固体。该产物不需要纯化用于下一步骤。

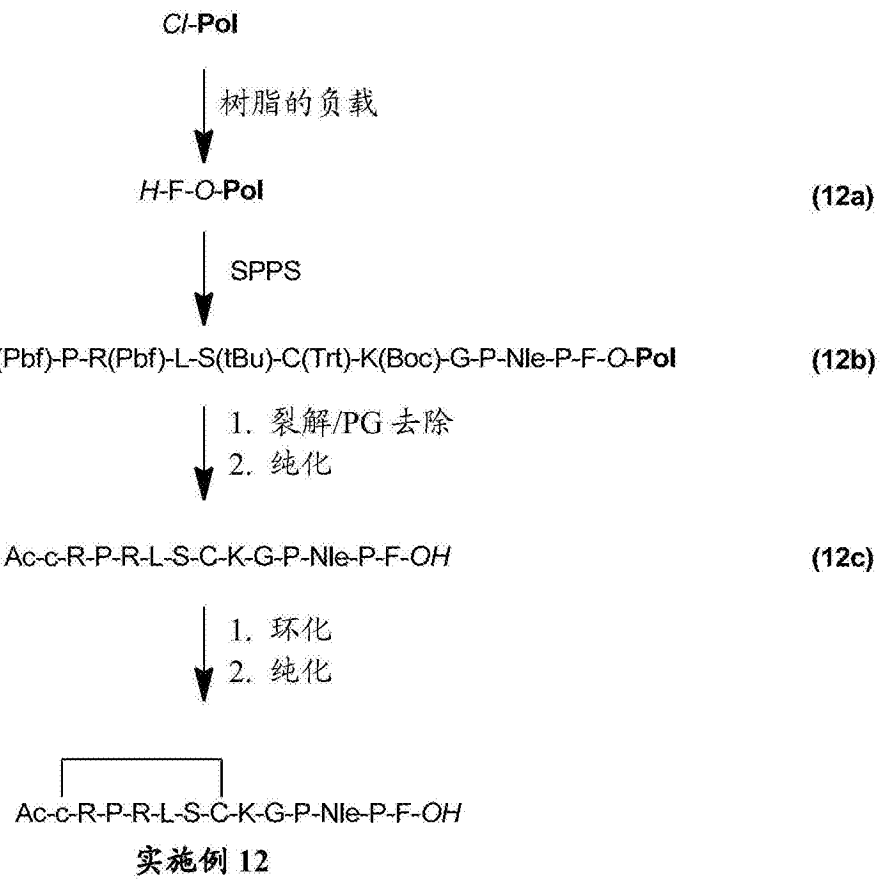
[0646] ●实施例9的制备

[0647] (二硫化物形成和纯化)

[0648] 将中间体9d(26.9mg,14.7μmol)溶解在H_2O(3.7mL)中(溶液轻微混浊)。加入50mM I_2的AcOH溶液(0.353mL,17.6μmol)并将混合物在室温下搅拌30min。加入0.5M抗坏血酸的H_2O溶液(0.044mL,22.1μmol)来淬灭过量的碘。将溶液浓缩至约3.5mL,然后提供至制备型反相HPLC。将各级分冻干,获得实施例9(6.8mg,3.7μmol),为白色固体。

[0649] 通过分析型HPLC(分析方法A;t_R=3.75min)和UPLC-MS(分析方法C;测量值:$[M+3]^{3+}$=495.3;计算值:$[M+3]^{3+}$=495.3)分析该纯产物。

[0650] 实施例12 Ac-c*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-F-OH(二硫化物C^1-C^7)的合成



[0651]

实施例 12

[0652] ●中间体12a的制备

[0653] (用Fmoc-F-OH负载至2-氯三苯甲基氯树脂、Fmoc去除及树脂的负载的测定)

[0654] 将2-氯三苯甲基氯树脂(10.0g,16.0mmol)用DCM(3x)洗涤。加入Fmoc-F-OH(12.4g,32.0mmol)的DCM(100mL)和DIPEA(11.2mL,64.0mmol)的溶液,并将混悬液在室温下振摇5h。将树脂用DCM/MeOH/DIPEA(17:2:1)(3x)、DCM(3x)、DMA(3x)、DCM(3x)充分地洗涤。

[0655] 然后用哌啶/DMA的混合物(1:4)(每次50mL)将树脂处理十二次(2min)然后用DMA(2x)洗涤。收集哌啶/DMA溶液和DMA洗涤溶液,用于测定树脂负载(参见一般程序)。

[0656] 将树脂用DCM(3x)、DMA(3x)、DCM(3x)充分地洗涤并在真空下干燥,得到中间体12a(12.8g;负载=0.79mmol/g)。

[0657] ●中间体12b的制备

[0658] (线性肽的组装)

[0659] 在Prelude™肽合成仪上使用中间体12a(127mg,0.10mmol)进行固相肽合成。如下进行偶联:

[0660]

偶联	AA	偶联数x反应时间	合成循环
1	P	2x 1h	A
2	Nle	2x 1h	A
3	P	2x 1h	A
4	G	2x 2h	A
5	K(Boc)	2x 1h	A

6	C(Trt)	1x 3h	A
7	S(tBu)	2x 1h	A
8	L	2x 1h	A
9	R(Pbf)	4x 3h	A
10	P	2x 2h	A
11	R(Pbf)	4x 3h	A
12	c(Trt)	1x 3h	A
13	Ac	1x 20min	C

[0661] ●中间体12c的制备

[0662] (从树脂裂解并伴随保护基团去除,然后纯化)

[0663] 将中间体12b(0.10mmol)用DCM(4x)小心地洗涤。加入95%aq.TFA/EDT/TIS(95:2.5:2.5)的混合物(2mL),并将混悬液在室温下振摇2h。滤出裂解溶液,并加入新鲜的裂解溶液(2mL)。将混悬液在室温下振摇1h然后滤出裂解溶液。加入新鲜的溶液(2mL)并将混悬液在室温下振摇1h。滤出裂解溶液。将合并的裂解溶液倾倒至冷庚烷/乙醚的混合物(1:1)(30mL)中,得到沉淀。将混合物离心并倾倒出上清液。将固体用冷的庚烷/乙醚(1:1)(10mL)再次洗涤,将混合物离心并将倒出上清液。将固体在真空下干燥。通过制备型HPLC纯化粗产物并冻干,获得中间体12c(53mg,0.029mmol)。

[0664] ●实施例12的制备

[0665] (环化和纯化)

[0666] 将中间体12c(53mg,0.029mmol)溶解在H_2O/DMSO(9:1)(18mL)中。将反应混合物在室温中搅拌40h然后在真空下浓缩至干。通过制备型HPLC纯化粗产物并冻干,获得实施例12,为白色固体(27.4mg;0.014mmol)。

[0667] 通过分析型HPLC(分析方法A;t_R=3.51min)和UPLC-MS(分析方法C;测量值:$[M+3]^{3+}$=505.3;计算值:$[M+3]^{3+}$=505.3)分析该纯产物。

[0668] 实施例18 Ac-(D-hC)*-R-P-R-L-S-(hC)*-K-G-P-f-a-f-OH(二硫化物C^1-C^7)的合成

[0669] 固体载体上的线性肽合成:

[0670] 通过标准Fmoc化学将Fmoc-D-Phe-Wang树脂(取代:0.66mmol/g)进行手工固相肽合成。将0.3mmol树脂在DMF中溶胀30分钟;排掉DMF,并将树脂用20%哌啶的DMF溶液处理30min以除去Fmoc基团。将树脂用DMF洗涤3次,并与预活化的Fmoc氨基酸溶液(Fmoc氨基酸/HBTU/HOBt/NMM=3:3:3:6eq)偶联2小时。每次偶联后进行茚三酮试验,以检查偶联效率。

[0671] 通过重复除去Fmoc保护基和偶联保护的氨基酸直到N-末端,在树脂上组装肽链。

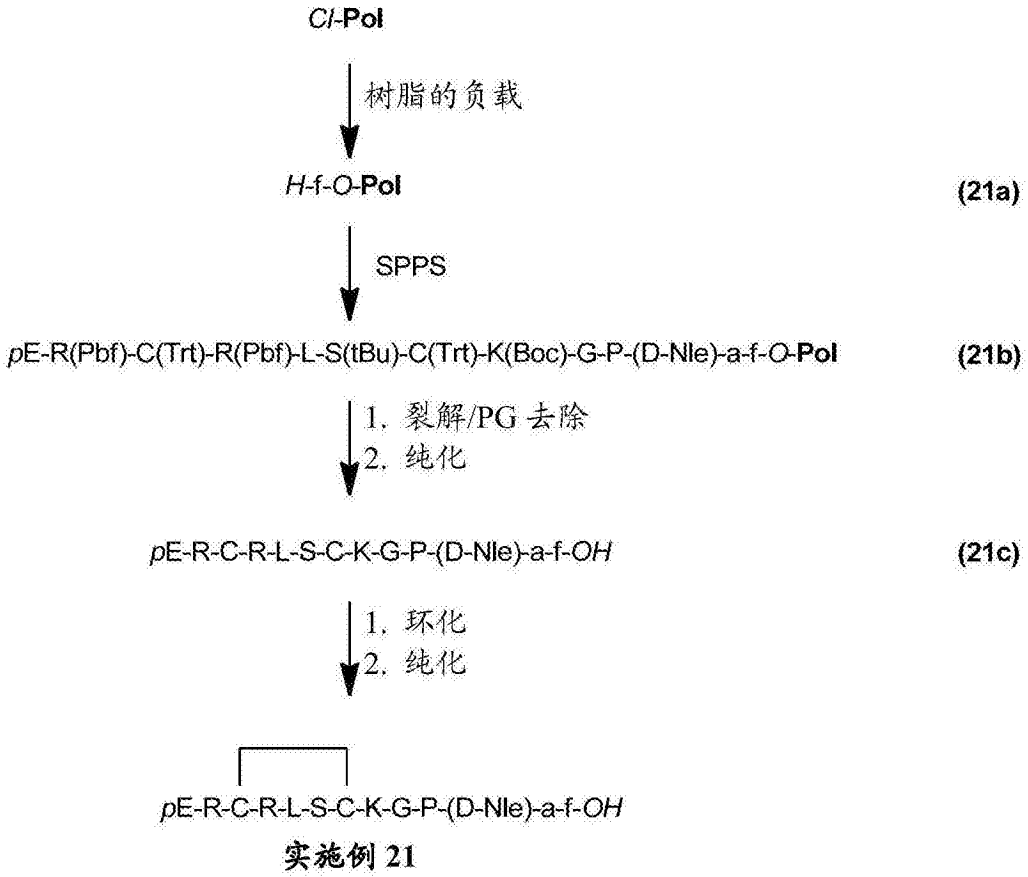
[0672] 在最后的氨基酸偶联后,将肽树脂用DMF和乙醚洗涤,并真空干燥。将干燥的肽树脂用TFA裂解混合物(TFA/苯甲硫醚/苯酚/EDT/H_2O=87.5:5:2.5:2.5:2.5,v/v)处理,用于裂解并除去侧链保护基。将粗肽从冷醚中沉淀,通过过滤收集并在高真空下干燥。将粗肽在HPLC(柱:2"-英寸Delta Pak C18,波长:215nm)上纯化,获得需要的产物。

[0673] 环化:

[0674] 将各粗肽以1mg/mL的浓度溶解在水-乙腈(A.C.S.试剂,Fisher)(大约80%:20%;水:乙腈,V:V)中,在剧烈搅拌下将0.1M I_2(A.C.S.试剂,Sigma Aldrich)的50%AcOH

(A.C.S.试剂,Fisher)/H_2O溶液滴加到所述溶液中,直到I_2颜色持续。一旦氧化完成(通过分析型HPLC和质谱法监测),在持续搅拌下滴加1M L-抗坏血酸(A.C.S.试剂,Sigma Aldrich)水溶液,以还原过量的I_2,直到溶液变为无色的。过滤后,将上面的溶液上载到2-英寸C18柱上(在215nm检测),采用TFA缓冲液(缓冲液A,0.1%TFA(A.C.S.级,NuGeneration Technology,LLC)的水溶液;缓冲液B,100%乙腈)纯化,将收集的>95%纯度的级分冻干。

[0675] 实施例21 pE-R-C*-R-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-a-f-OH(二硫化物C^3-C^7)的合成



[0676]

实施例 21

[0677] ●中间体21a的制备

[0678] (用Fmoc-f-OH负载至2-氯三苯甲基氯树脂、Fmoc去除及树脂的负载的测定)

[0679] 以与上文所述一般程序类似的方式使2-氯三苯甲基氯树脂(5.0g,8.01mmol)与Fmoc-f-OH(3.10g,8.01mmol)的DCM(50mL)和DIPEA(5.59mL,32.0mmol)溶液反应,得到中间体21a(5.87g,负载量=0.897mmol/g)。

[0680] ●中间体21b的制备

[0681] (线性肽组装)

[0682] 在Liberty™微波肽合成仪上使中间体21a(0.100mmol)进行固相肽合成。如下进行偶联:

[0683]

偶联	AA	偶联数 x 反应时间	温度 °C	微波功率	合成循环
1	a	1 x 7.5 min	50	20	D
2	D-Nle	1 x 7.5 min	50	20	D
3	P	1 x 7.5 min	50	20	D
4	G	1 x 7.5 min	50	20	D
5	K(Boc)	1 x 7.5 min	50	20	D
6	C(Trt)	1 x 2 min	50	0	D
		1x 4 min	50	25	
7	S	1 X 7.5 min	50	25	D
8	L	1 x 7.5 min	50	25	D
9	R(Pbf)	2 x 42 min	50	0	D
		2 x 7.5 min	50	25	
10	C(Trt)	1 x 2 min	50	0	D
		1x 4 min	50	25	
11	R(Pbf)	2 x 42 min	50	0	D
		2 x 7.5 min	50	25	
12	*p*E	1 x 7.5 min	50	25	D

[0684] ●中间体21c的制备

[0685] (从树脂裂解并伴随保护基团去除,然后纯化)

[0686] 将95%aq.TFA/EDT/DTT(95:2.5:2.5)的混合物(2mL)加入到中间体21b(0.1mmol)中。将混悬液在室温下振摇2h,然后滤出裂解溶液。然后将树脂再次用95%aq.TFA/EDT/TIS(95:2.5:2.5)(2mL)处理,在室温下振摇1h,并过滤。将合并的裂解和洗涤溶液倾倒至冷庚烷/乙醚的混合物(1:1)(11mL)中,得到沉淀。将混悬液离心并倾倒出上清液。将乙醚(10mL)加入到残留物中,将混悬液涡旋3min并离心,并倾倒出上清液,将洗涤过程重复两次。将固体在高真空下干燥,将粗品通过制备型HPLC纯化并从ACN/H_2O中冻干,获得中间体21c(55mg,0.030mmol)。

[0687] ●实施例21的制备

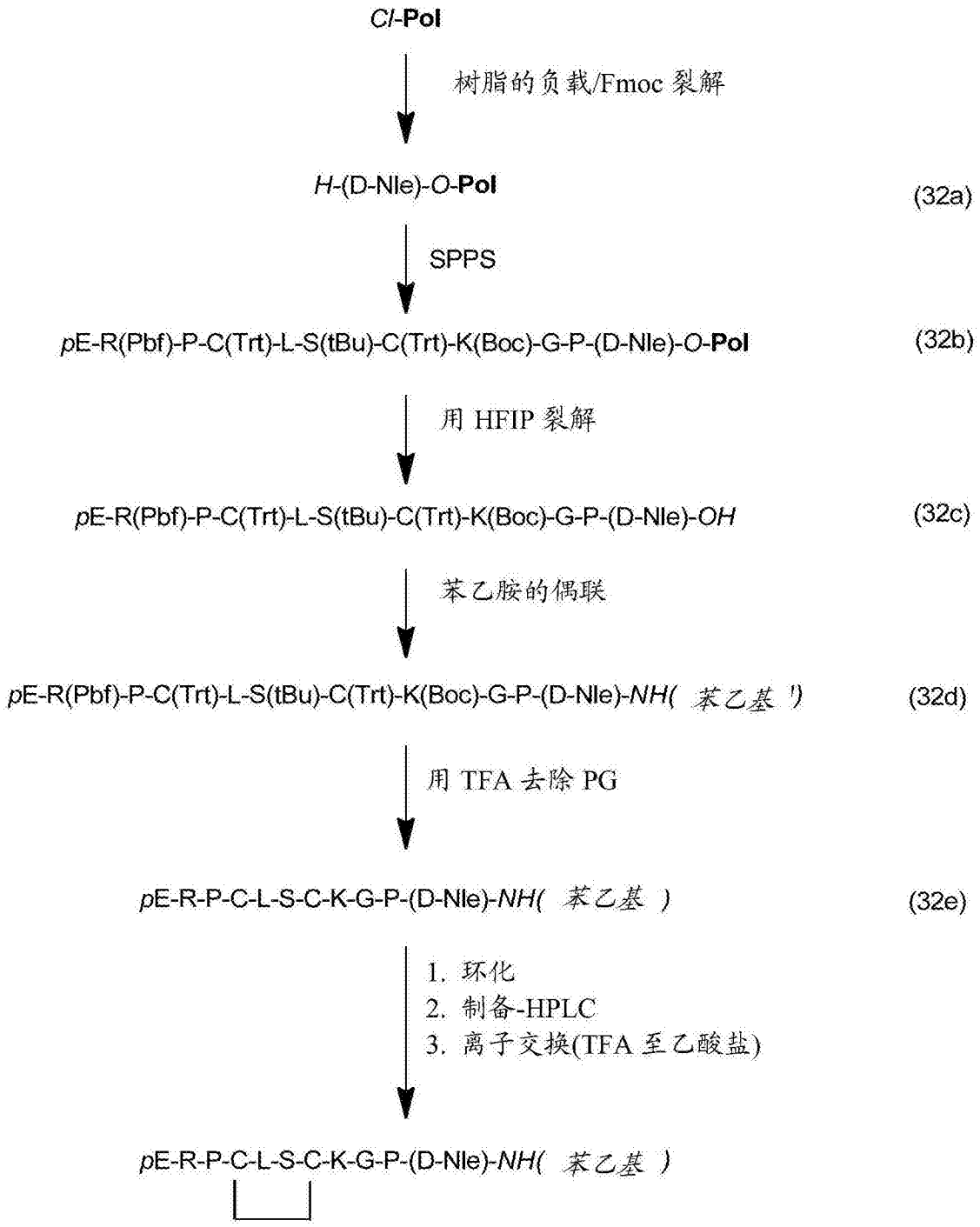
[0688] (环化和纯化)

[0689] 将中间体21c(18mg,9.97μmol)溶解在H_2O(1.0mL)中。将50mM I_2的AcOH溶液(0.24mL,12μmol)一次性加入到搅拌的溶液中,并将溶液在室温下搅拌过夜直至LCMS显示反应完全。加入0.5M抗坏血酸的H_2O溶液(24μmol,12μmol)来淬灭过量的I_2。将粗品通过制备型HPLC纯化并从ACN/H_2O中冻干,获得实施例21,为白色固体(12mg,6.32μmol)。

[0690] 通过分析型HPLC(分析方法B;t_R=7.35min)和UPLC-HRMS(分析方法D;测量值:$[M+2H]^{2+}$=730.355;计算值:$[M+2H]^{2+}$=730.361)分析该纯产物。

[0691] 实施例32 pE-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-NH(苯乙基)(二硫化物C^4-C^7)乙酸盐的合成

[0692]



实施例 32

[0693] ●中间体32a的制备

[0694] (用Fmoc-D-Nle-OH负载至2-氯三苯甲基氯树脂、Fmoc去除及树脂的负载的测定)

[0695] 将2-氯三苯甲基氯树脂(50.0g,85.0mmol)混悬在DCM(400mL)中,将混悬液搅拌10min,然后将溶剂排掉,将树脂用DCM(3x 200mL)洗涤。然后将Fmoc-D-Nle-OH(24.0g,68.0mmol)和DIPEA(96.5ml,552.5mmol)的DCM(120.0mL)溶液加入到树脂中,将混悬液用氮气充满并在室温下搅拌5min。加入另外部分的DIPEA(22.7ml,127.5mmol)并将反应混合物

在室温下搅拌过夜。

[0696] 将反应混合物排掉并将树脂用DCM(3x 250mL)洗涤,每次2min。将树脂用DCM/MeOH/DIPEA(70:15:15)(2x 250mL)的混合物淬灭,每次10min。

[0697] 通过用哌啶/DMF(1:3)(1x 300mL)处理树脂5min来裂解Fmoc基团。从树脂排掉液体,然后(1x 300mL)15min,洗涤步骤如下:DMF(6x 250mL,每次2min)、异丙醇(2x 250mL,每次2min)和TBME(6x 250mL,每次2min)。将树脂在真空中在35℃下干燥24小时,获得中间体32a(57.8g,载量=1.08mmol/g).

[0698] ●中间体32b的制备

[0699] (线性肽组装)

[0700] 在自动肽合成仪(CSBIO536™)上使中间体32a(18.5g,20.0mmol)进行固相肽合成。偶联循环如下定义:

[0701] 氨基酸偶联:AA(3.0eq.)、DIC(3.0eq.)、HOBt(3.0eq.)、DMF(参见如下表格)

[0702] ●洗涤:DMF(4x 150mL,每次2min)。

[0703] ●Fmoc脱保护:哌啶/DMF(1:3)(150mL,5min;然后150mL,15min)。

[0704] ●洗涤:DMF(6x 150mL,每次2min)。

[0705]

偶联	AA	偶联数x反应时间	偶联方法
1	Fmoc-L-Pro-OH	1x 120min	DIC/HOBt
2	Fmoc-Gly-OH	1x 120min	DIC/HOBt
3	Fmoc-L-Lys(Boc)-OH	1x 120min	DIC/HOBt
4	Fmoc-L-Cys(Trt)-OH	1x 120min	DIC/HOBt
5	Fmoc-L-Ser(tBu)-OH	1x 120min	DIC/HOBt
6	Fmoc-L-Leu-OH	1x 120min	DIC/HOBt
7	Fmoc-L-Cys(Trt)-OH	1x 120min	DIC/HOBt
8	Fmoc-L-Pro-OH	1x 120min	DIC/HOBt
9	Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH	1x 120min	DIC/HOBt
10	Boc-L-Pyr-OH	1x 120min	DIC/HOBt

[0706] 肽组装后,将树脂用DMF(6x 150mL,每次2min)、异丙醇(6x 150mL,每次2min)和TBME(6x 150mL,每次2min)洗涤,将肽树脂在高真空中在35℃下干燥过夜,得到中间体32b(57.6g,20.0mmol)。

[0707] ●中间体32c的制备

[0708] (从树脂的HFIP裂解)

[0709] 将一部分中间体32b(27g,9.37mmol)混悬在DCM(300mL)中并搅拌15min。从树脂排掉液体,然后用HFIP/DCM(3:7)(3x 270mL,每次15min)处理。滤出裂解溶液并收集。将树脂用DCM(3x 300mL)洗涤。在真空下将合并的裂解和洗涤溶液浓缩至干。将白色粉末在真空中在35℃下干燥过夜,得到中间体32c-批次1(23.5g,9.37mmol)。

[0710] 将另一部分中间体32b(28.0g,9.72mmol)重复上述的操作,获得中间体32c-批次2(26.1g,9.72mmol)。

[0711] ●中间体32d的制备

[0712] (苯乙胺的溶液相偶联)

[0713] 将中间体32c-批次2(20.0g,7.44mmol,1.0eq)和HATU(5.23g,13.8mmol,1.85eq)溶解在DMF(400mL)中。加入苯乙胺(1.67g,13.8mmol,1.85eq)和DIPEA(3.56g,27.6mmol,3.71eq)的DMF(60mL)溶液。

[0714] 将反应混合物在室温中搅拌30min然后冷却至0℃,然后加入盐水(460mL)。将混悬液搅拌10min,然后将产物通过过滤分离。将滤饼用H_2O(300mL)洗涤,然后将其小心地除去,然后溶解在DCM(300mL)中。将溶液用MgSO4干燥,然后在真空下浓缩至干。将粗产物进行硅胶快速色谱法(洗脱剂:DCM和DCM/iPrOH(8:2)),获得中间体32d-批次1(14.4g,6.6mmol).

[0715] 除了快速色谱法,用中间体32c-批次1(23.4g,9.37mmol)重复相同的操作,获得中间体32d-批次2(28.0g,9.37mmol)。

[0716] ●中间体32e的制备

[0717] (除去保护基团)

[0718] 将中间体32d-批次2(28.0g,9.37mmol)溶解在TFA/DCM/EDT/TIS(90:5:2.5:2.5)(290mL)中并将反应在室温下搅拌2h。

[0719] 滤出裂解溶液并倾倒至冷TBME(3L)(0-4℃)中。将混浊的混悬液在冰-水浴中搅拌30min,然后通过孔隙4的玻璃滤器过滤。因此将得到的白色固体用TBME(2x 100mL)洗涤然后在真空中在35℃下干燥过夜,获得中间体32e-批次1(8.9g,5.9mmol)。

[0720] 用中间体32d-批次1(14.4g,6.6mmol)重复相同的操作,得到中间体32e-批次2(9.6g,6.3mmol)。

[0721] ●实施例32的制备)

[0722] 1)环化

[0723] 将中间体32e(5.0g,3.3mmol)溶解在水(500mL)中。一次性地加入碘(1.18g,4.66mmol,1.41eq)的乙酸(93mL)溶液。将反应混合物在室温中搅拌10min。加入抗坏血酸(1.03g,5.83mmol,1.77eq)的水(5.8mL)溶液并将反应混合物搅拌10min,过滤并在4℃贮存直至纯化。

[0724] 重复同样的环化操作,直至18.3g(12.1mmol)中间体32e被处理。

[0725] 2)纯化

[0726] 将环肽溶液以每次进样0.5-5.0g肽分次提供至制备型HPLC。集合具有超过95%纯度的级分,并冷冻干燥,得到总量为4.89g(3.2mmol)的纯化的肽(TFA盐)。

[0727] 3)经离子交换形成乙酸盐

[0728] 将75g(100mL)的以其OH^-形式的强阴离子交换树脂(离子交换剂III,Merck)放置在垂熔玻璃滤器(孔隙度3),然后加入乙酸/水(1:3)(300mL)的溶液,将混悬液手动搅拌2min,然后从树脂排掉液体。用另一部分乙酸/水(1:3)(300mL)重复该过程。将树脂用去离子水洗涤,直至观察到中性的排除液。然后将树脂转移至装备垂熔玻璃滤器(孔隙度3)的4x 20cm柱。

[0729] 将4.8g的纯肽溶解在去离子水(50mL)中并加到柱中。将产物用去离子水(200mL)洗脱。通过TLC点样来控制产物的洗脱,收集富集的级分并冷冻干燥,得到实施例32(4.1g,2.9mmol)。

[0730] 通过分析型HPLC(分析方法B;t_R=8.01min)和UPLC-HRMS(分析方法D;测量值:[M+

$2H]^{2+}$=643.328;计算值:$[M+2H]^{2+}$=643.324)分析该纯产物。乙酸盐含量为7.99-8.27%并且水含量为1.94-1.96%。

[0731] 其它实施例以类似方式合成:

[0732] ●实施例1至8、10、11、13至17、20、28至31以与实施例12类似的方式合成。

[0733] ●实施例19、26、27、36-38以与实施例18类似的方式合成。

[0734] ●实施例22-25、33-35以与实施例21类似的方式合成。

[0735] 生物缀合物实施例:

[0736] 实施例39:白蛋白-PPA-02Oc-02Oc-02Oc-02Oc-Q-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)苯乙胺,其中PPA是3-(吡啶-2-基二硫烷基)丙酸

[0737] 步骤1:白蛋白脱帽

[0738] ●用TCEP脱帽

[0739] 在15mL管中,向白蛋白(500mg,Aldrich,冻干粉末,来自人血清)的10mL的PBS 1x缓冲液的溶液中一次性加入TCEP盐酸盐的溶液(1.074mg在生物等级纯化水中)。将得到的溶液在室温下振摇1hr,然后用两个Amicon Ultra-4离心滤器(30K MWCO)脱盐并洗涤。将滤液在4K g下旋转40mins并将滤液丢弃。将3mL的生物等级纯化水加入到各滤器用于每一洗涤(在14K g下旋转10mins)并将洗涤过程重复3次。将脱帽的HSA溶解在水(总共~20mL)中。将该溶液转移至50mL Falcon管中,并冻干得到结晶粉末(500mg)。

[0740] 将纯产物通过UPLC-MS(分析方法F;测量值:66439.0;期望值:66437)分析。

[0741] 测定在脱帽的HSA中的游离巯基数目

[0742] 在2mL管中,向该脱帽的HSA(2mg)的400μL的PBS pH 7.4的溶液加入6-马来酰亚氨基己酸(13μg)的水的溶液。将得到的溶液在室温下振摇2hr。UPLC-MS(分析方法G)显示仅有单加合物形成,测量值:66649.0;期望值:66648。

[0743] ●用DTT脱帽

[0744] 在15mL管中,向白蛋白(400mg,Aldrich,冻干粉末,来自人血清)的5mL的PBS 1x缓冲液的溶液中一次性加入DTT溶液(0.232μl,2mg/mL在生物等级纯化水中)。将得到的溶液在室温下振摇2hr,然后用二十个Amicon Ultra-0.5离心滤器(10K MWCO)脱盐并洗涤。将滤液在14K g下旋转10mins并将滤液丢弃。将生物等级纯化水加入到各滤器上端,用于每一洗涤(在14K g下旋转10mins)并将洗涤过程重复6次。将脱帽的HSA溶解在水(~20mL总共)中。将该溶液转移至50mL Falcon管中,并冻干得到晶体粉末(376mg)。

[0745] 将纯产物通过UPLC-MS(分析方法G;测量值:66438.5;期望值:66437)分析。

[0746] ●测定在脱帽HSA中的游离巯基数目

[0747] 在2mL管中,向该脱帽的HSA(3mg)的400μL的PBS pH 7.4溶液中加入3-马来酰亚氨基丙酸(25μg)的水溶液。将得到的溶液在室温下振摇过夜。UPLC-MS(分析方法G)显示仅有单加合物形成,测量值:66608.0;期望值:66606.

[0748] ●用半胱氨酸脱帽

[0749] 在2mL管中,向白蛋白(120mg,Aldrich,冻干粉末,来自人血清)的1mL 50mM PBS缓冲液pH 8.0溶液中一次性加入半胱氨酸(10.94mg)。将得到的溶液在室温下振摇1hr,然后用两个Amicon Ultra-0.5离心滤器(10K MWCO)脱盐并洗涤。将滤液在14K g下旋转10mins并将滤液丢弃。将生物等级纯化水加入到各滤器上端用于各洗涤(在14K g下旋转10mins)

并将洗涤过程重复5次。将脱帽的HSA溶解在水(4mL总共)中。将溶液转移至15mL Falcon管中,并冻干得到晶体粉末(108mg)。

[0750] 将纯产物通过UPLC-MS(分析方法G;测量值:66439;期望值:66437)分析。

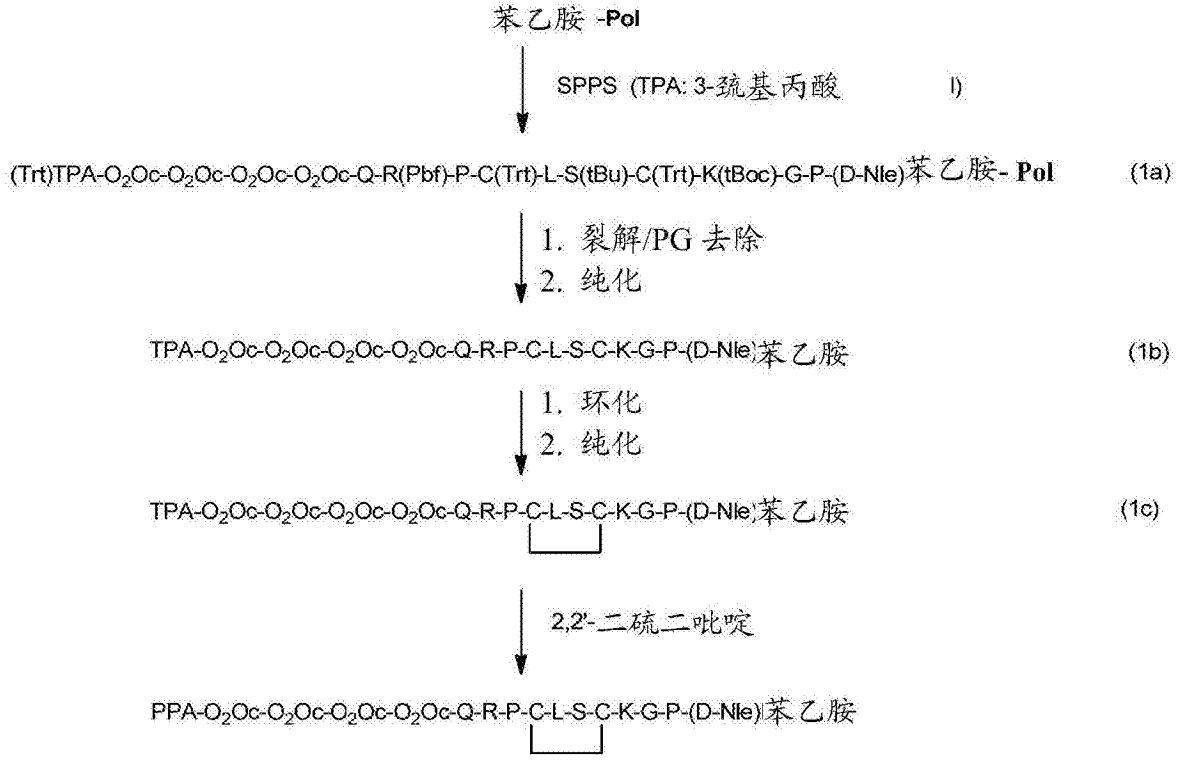
[0751] ●测定在脱帽HSA中的游离巯基数目

[0752] 在2mL管中,向该脱帽的HSA(3mg)的500μL PBS pH 7.4溶液中加入3-马来酰亚氨基丙酸(15μg)的水溶液。将得到的溶液在室温下振摇1hr。UPLC-MS(分析方法G)显示仅有单加合物形成,测量值:66608.0;期望值:66606.

[0753] 步骤2:

[0754] 肽-连接体构建物1的合成:PPA-O2Oc-O2Oc-O2Oc-O2Oc-Q-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)苯乙胺,其中PPA是3-(吡啶-2-基二硫烷基)丙酸

[0755]



肽-连接体构建物 1

[0756] ●中间体1a的制备

[0757] (线性肽组装)O2Oc-O2Oc-O2Oc-O2Oc-Q-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)苯乙胺

[0758] ●在Liberty™微波肽合成仪上使苯乙胺-AMEBA树脂(Aldrich,0.25mmol)进行固相肽的合成。如下进行偶联:

[0759]

偶联	AA	偶联数 x 反应时间	温度 °C	微波功率
1	D-Nle	1 x 7.5 min	50	20
2	P	1 x 7.5 min	50	20
3	G	1 x 7.5 min	50	20
4	K(tBoc)	1 x 7.5 min	50	20
5	C(Trt)	1 x 2 min	50	0
		1x 4 min	50	25
6	S(tBu)	1 x 7.5 min	50	20
7	L	1 x 7.5 min	50	25
8	C(Trt)	1 x 2 min	50	0
		1x 4 min	50	25
9	P	1 x 7.5 min	50	25
10	R(Pbf)	2 x 42 min	50	0
		2 x 7.5 min	50	25
11	Q(Trt)	1 x 7.5 min	50	25
12	O2Oc	1 x 7.5 min	50	25
13	O2Oc	1 x 7.5 min	50	25
14	O2Oc	1 x 7.5 min	50	25
15	O2Oc	1 x 7.5 min	50	25
16	TPA(Trt)	1 x 7.5 min	50	25

[0760] ●中间体1b的制备

[0761] (从树脂裂解并伴随保护基团去除,然后纯化)

[0762] 将由1.54g的DTT和0.75mL苯甲硫醚的6mL的TFA/TIPS/水(95:2.5:2.5)制成的溶液加入到中间体1a(0.25mmol)并将混悬液在室温下振摇5hr。滤出裂解溶液并将树脂用95%aq.TFA洗涤。将合并裂解和洗涤溶液倾倒至冷乙醚中,得到沉淀。将混悬液离心并倾出上清液。将乙醚加入至残留物中,将混悬液涡旋3min,离心,并倾倒出上清液。将洗涤过程重复3次。在真空下干燥固体。将粗品通过制备型HPLC纯化并从ACN/H_2O中冻干,获得中间体1b.

[0763] ●中间体1c的制备

[0764] (环化和纯化

[0765] 将中间体1b溶解在H_2O(2.0mL)中。将50mM I_2的AcOH溶液(1.3eq)一次加入到搅拌的溶液中,并将溶液在室温下搅拌过夜,并且LC/MS显示反应完全。将0.5M抗坏血酸的H_2O溶液加入淬灭过量的I_2。将粗品通过制备型HPLC纯化并从ACN/H_2O中冻干,获得中间体1c。

[0766] ●肽-连接体构建物1中间体1c的制备

[0767] 将中间体1c、2,2'-二硫二吡啶(3eq)的ACN混合物在25℃下振摇1hr。将反应混合物在MeOH中稀释并过滤。将溶液通过制备型HPLC纯化并从ACN/H_2O中冻干,获得肽-连接体构建物1。

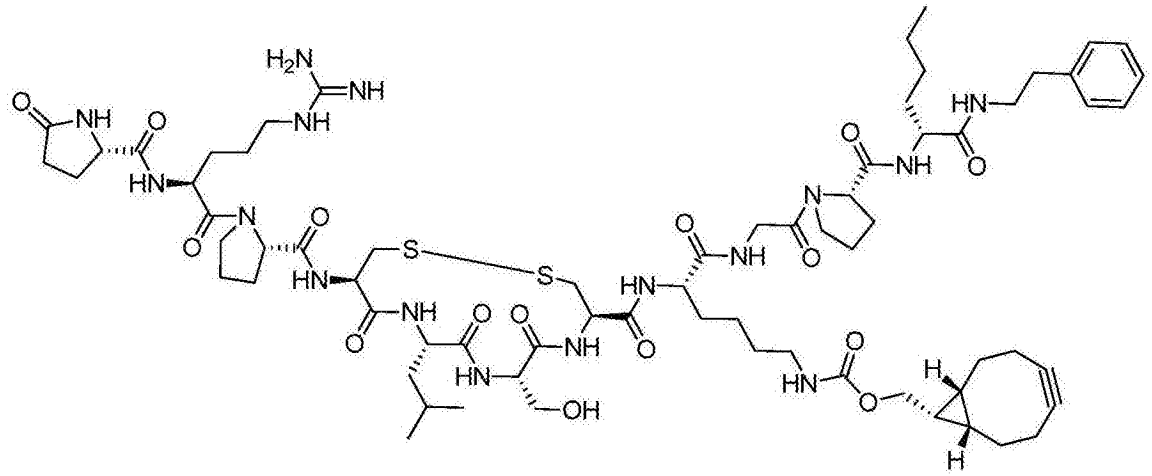
[0768] 步骤3:肽-连接体构建物/白蛋白缀合物

[0769] 将脱帽的HSA(100mg)的PBS缓冲液(6mL)溶液用PPA-O2Oc-O2Oc-O2Oc-O2Oc-Q-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)苯乙胺的溶液(2eq在水中)处理。将得到的溶液在室温下振摇1hr,然后用4Amicon Ultra-0.5离心滤器(10K MWCO)脱盐并洗涤。将滤液在13K g下旋转10mins并将滤液丢弃。将生物等级纯化水加入到各滤器上端用于各洗涤(在13K g下旋转10mins)并将洗涤过程重复6次。将缀合物溶解在水(4mL总共)中。将溶液转移至15mL Falcon管中,并冻干得到实施例39。

[0770] 实施例40:经BCN-PEG连接体缀合至脂肪酸的Apelin环肽:

[0771] 步骤1:Apelin环肽-BCN构建物的制备:pE-R-P-C*-L-S-CP-N^6-[[(1α,8α,9α)-二环[6.1.0]壬-4-炔-9-基甲氧基]羰基]-K-G-P-(D-Nle)-NH(苯乙基)[二硫化物C4-C7]的制备

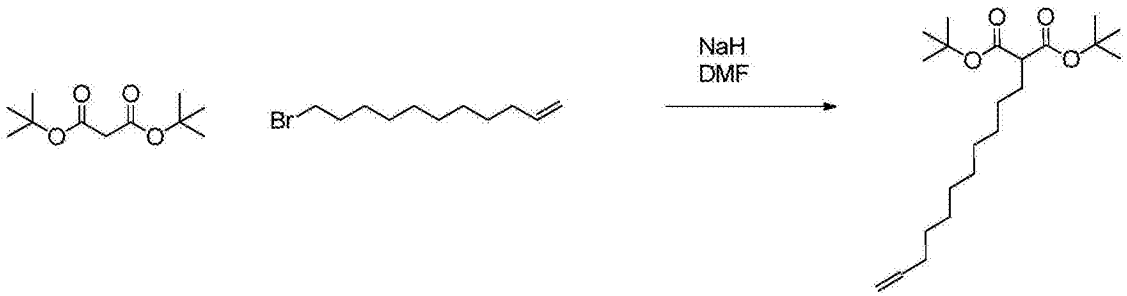
[0772]



[0773] 将pE-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-NH(苯乙基)三乙酸盐[二硫化物C4-C7](实施例32:100mg,0.068mmol)、碳酸氢钠(38mg,0.452mmol)和水(83uL)的DMF(1mL)混合物在室温下搅拌10mins,然后加入碳酸(1R,8S)-二环[6.1.0]壬-4-炔-9-基甲基酯琥珀酰亚氨基酯(Berry&associates,20mg,0.068mmol)。将反应混合物在室温中搅拌90mins。将1mL的水加入到混合物中,并将得到的溶液冻干得到粉末,其不需要进一步纯化用于下一步骤。

[0774] 步骤2:2-(十一-10-炔-1-基)丙二酸二叔丁基酯

[0775]

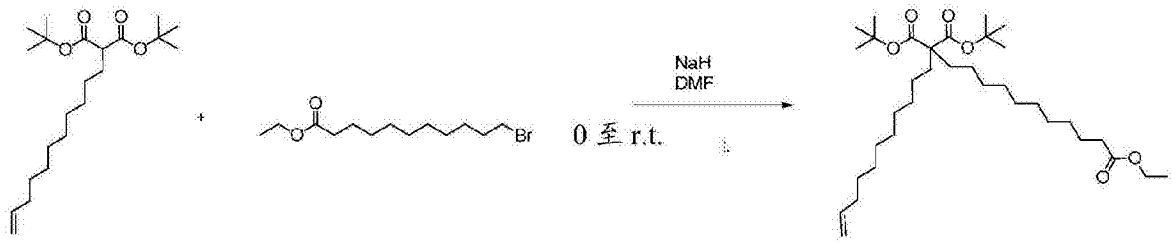


[0776] 在0℃、N_2下,将丙二酸二叔丁基酯(800mg,3.70mmol)溶解在DMF(9mL)中并加入NaH(148mg,3.70mmol)。将反应在0℃下搅拌30分钟并缓慢地滴加11-溴-癸-1-烯(3.33mmol),得到黄色溶液。将反应在0℃下搅拌2小时然后升温至r.t.并搅拌16小时。将混

合物溶取在EtOAc(75mL)中并用H_2O(25mL)洗涤。将水层用EtOAc(75mL)萃取并将合并的有机层用Na_2SO_4干燥,过滤并浓缩。将混合物经快速柱纯化(12g硅胶柱,0-20%EtOAc/庚烷),并将级分浓缩得到预期产物。

[0777] 步骤3:二十二-21-烯-1,11,11-三甲酸11,11-二叔丁基酯1-乙基酯

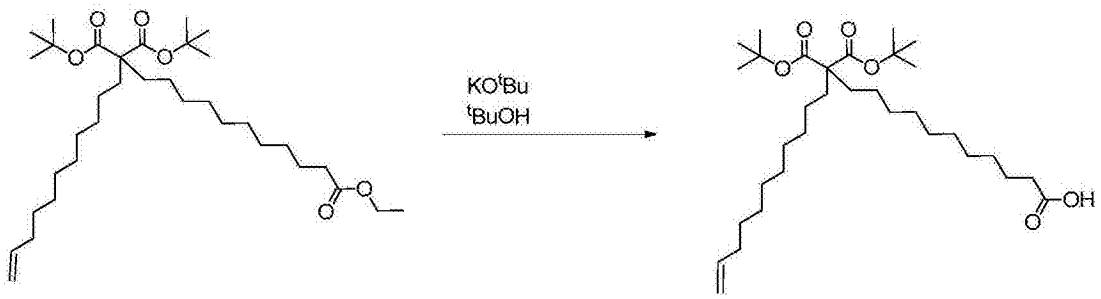
[0778]



[0779] 在0℃下,将来自步骤2的化合物(0.442mmol)溶解在DMF(2mL)中并加入NaH(21.23mg,0.531mmol)。将反应在0℃下搅拌15分钟并缓慢地滴加11-溴十一酸乙酯(143mg,0.486mmol)。将反应升温至r.t.并搅拌16小时。将混合物用EtOAc(40mL)稀释并用H_2O(20mL)洗涤一次。将水层用EtOAc(40mL)萃取一次并将有机层合并,用Na_2SO_4干燥,过滤并浓缩。将样品溶解在1mL DCM中并经快速柱(12g硅胶柱,0-20%EtOAc/庚烷,15min)纯化。将级分合并并浓缩得到预期产物。

[0780] 步骤4:12,12-双(叔丁氧基羰基)二十三-22-烯酸

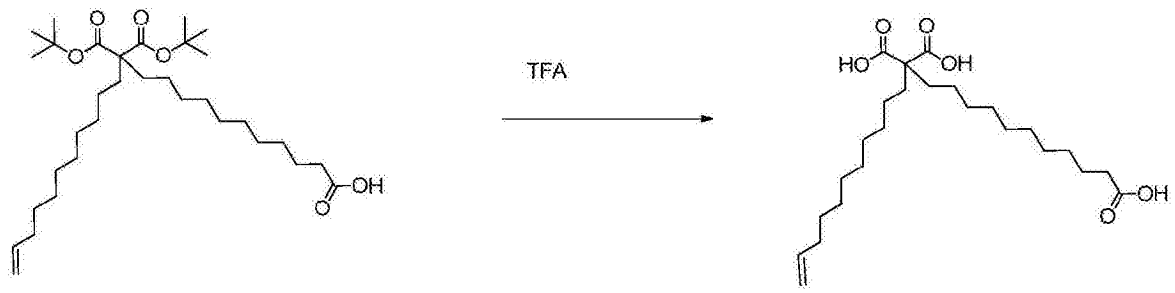
[0781]



[0782] 在30℃、N_2下,向由步骤3得到的化合物(0.037mmol)的^{t}BuOH(1mL)溶液加入KOtBu(114mg,1.012mmol)的^{t}BuOH(2mL)溶液。将混合物在r.t.下搅拌并通过TLC(1:1EtOAc/己烷,$KMnO_4$,回流)监测。反应完全后,将反应混合物用1M HCl(20mL)淬灭并用EtOAc(25mL)萃取两次。将有机层合并,用Na_2SO_4干燥,过滤并浓缩。该物质不需要进一步即用于下一步骤。

[0783] 步骤5:二十二-21-烯-1,11,11-三甲酸

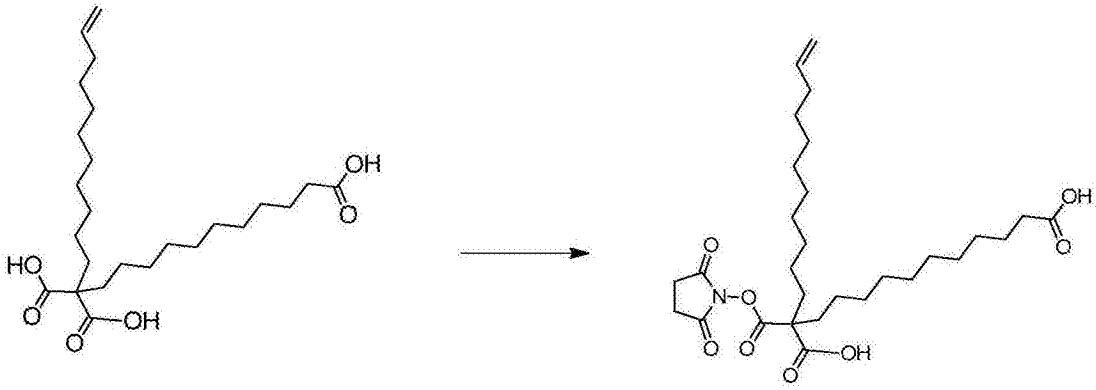
[0784]



[0785] 将TFA(2mL)加入到由步骤4得到的化合物(0.022mmol)中,并将反应在室温下搅拌1小时。将混合物用DCM(10mL)稀释并浓缩。将物质溶取在EtOAc(10mL)中并用H_2O(20mL)洗涤。将有机层用Na_2SO_4干燥,过滤并浓缩。将粗物质溶解在1mL MeOH中并通过MS-触发的HPLC

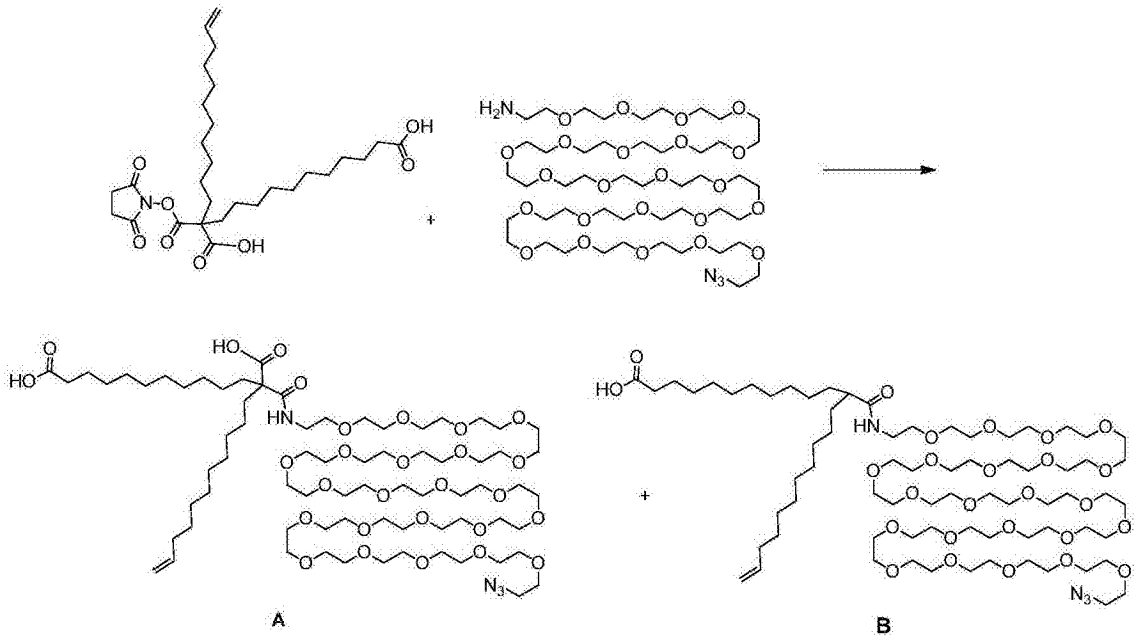
(Sunfire 30x50mm 5um柱ACN/H_2O w/0.1%TFA 75ml/min,1.5ml进样,45-70%ACN历经3.5min)纯化。

[0786] 步骤6:2-(((2,5-二氧代吡咯烷-1-基)氧基)羰基)-2-(十一-10-烯-1-基)十三烷二酸

[0787] 

[0788] 将DCC(187mg,0.908mmol)的DCM(2mL)混合物加入到N-羟基琥珀酰亚胺(99mg,0.862mmol)和二十二-21-烯-1,11,11-三甲酸(中间体45:400mg,0.908mmol)的DCM(7mL)和THF(0.7mL)溶液中。将反应搅拌过夜后蒸发溶剂。将残留物通过HPLC(Sunfire C18 30x50mm;55-80%ACN/水+0.1%TFA)纯化得到标题化合物(155mg,0.288mmol,32%):通过LCMS方法E Rt=1.51min,M+H 538.3;^{1}H NMR(400MHz,氯仿-d.)δppm 1.16-1.46(m,28H)1.60-1.87(m,3H)1.91-2.17(m,5H)2.38(t,J=7.03Hz,2H)2.86(br.s.,4H)3.68(dd,J=11.25,7.34Hz,1H)3.78(dd,J=11.31,5.20Hz,1H)3.99-4.10(m,1H).

[0789] 步骤7:脂肪酸-PEG连接体

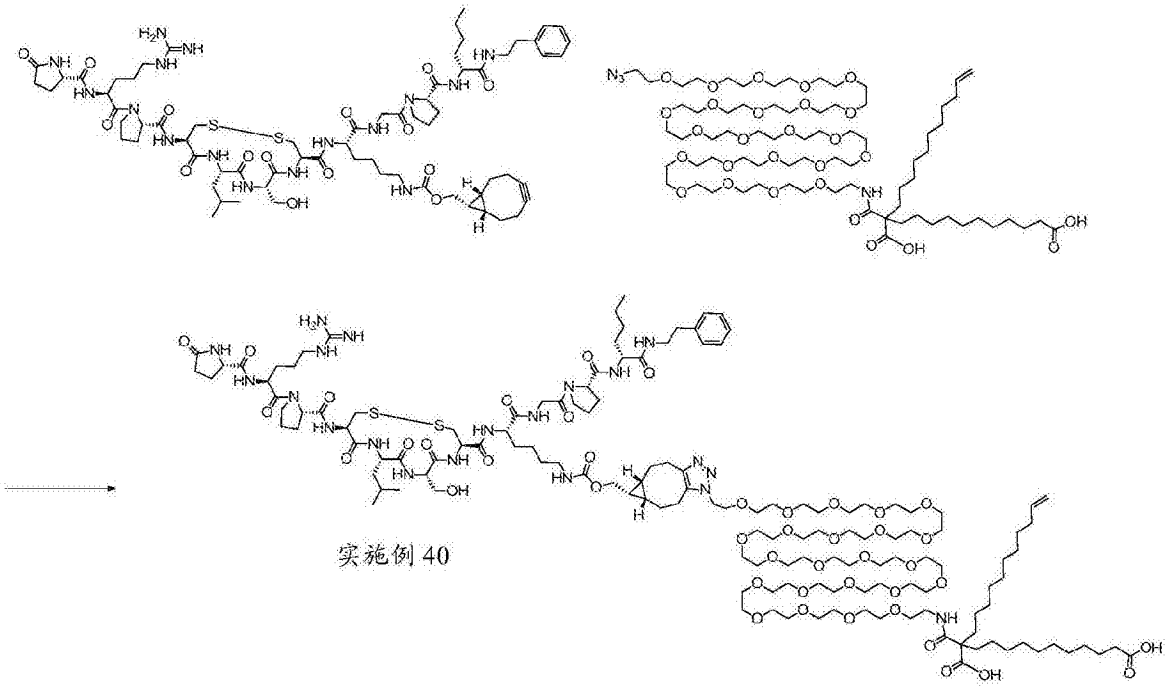
[0790] 

[0791] 将叠氮基-dPEG23-胺(Quanta Biodesign:164mg,0.149mmol)和由步骤6得到的化合物(80mg,0.149mmol)溶解在THF(2.5mL)中。加入DIPEA(39μL,0.233mmol)并将反应搅动过夜。将溶剂蒸发并将残留物通过HPLC(Sunfire C18 30x50mm;45-70%ACN/水+0.1%TFA)纯化得到化合物A(97mg,0.061mmol,41%)和B(32mg,0.021mmol,14%):LCMS ZQ1方法E Rt

＝1.35min,[M+2H]$^{+2}$ 761.9;^{1}H NMR(400MHz,乙腈-d3.)δppm 1.05-1.18(m,3H)1.19-1.32(m,20H)1.36(t,J＝7.15Hz,1H)1.48-1.59(m,2H)1.65-1.75(m,2H)2.01-2.06(m,2H)2.25(t,J＝7.46Hz,2H)3.33-3.39(m,2H)3.39-3.44(m,2H)3.50-3.67(m,98H)4.84-4.95(m,1H)4.95-5.06(m,1H)5.83(ddt,J＝17.07,10.29,6.68,6.68Hz,1H)7.31(t,J＝5.44Hz,1H);LCMS方法E Rt＝1.50min,[M+2H]$^{+2}$ 739.9;^{1}H NMR(400MHz,乙腈-d3)δppm 1.16-1.42(m,30H)1.42-1.63(m,5H)2.00-2.07(m,2H)2.22-2.28(m,2H)2.40-2.52(m,2H)3.25-3.33(m,2H)3.33-3.42(m,2H)3.42-3.50(m,2H)3.50-3.68(m,88H)4.86-5.06(m,2H)5.83(ddt,J＝17.04,10.26,6.71,6.71Hz,1H)6.40-6.74(m,1H).

[0792] 步骤8:实施例40的制备:

[0793]

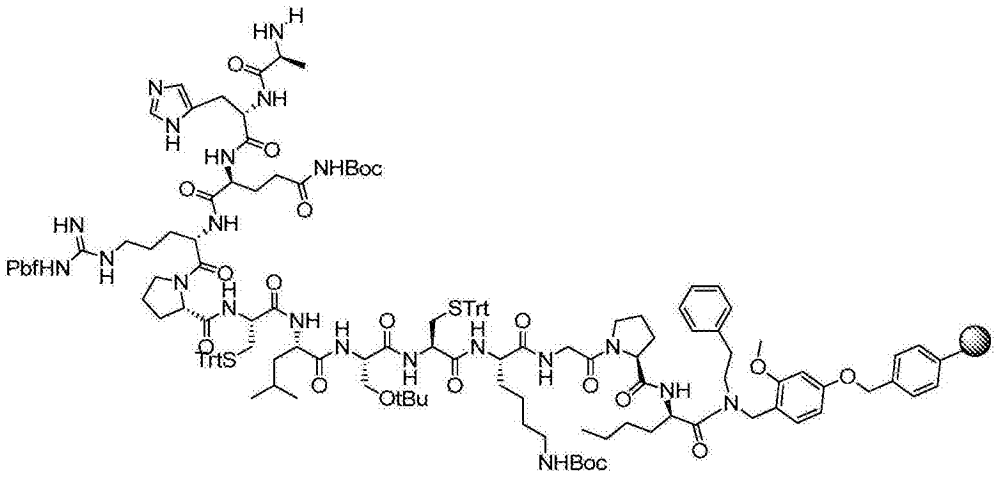


实施例 40

[0794] 将pE-R-P-C*-L-S-C*-N^{6}-[[(1α,8α,9α)-二环[6.1.0]壬-4-炔-9-基甲氧基]羰基]-K-G-P-(D-Nle)-NH(苯乙基)[二硫化物C4-C7](在1mL水中的由步骤1得到的50mg的产物,0.034mmol)和由步骤7得到的化合物A(52mg,在268uL水中)的混合物在室温下搅拌大约3hrs。然后将反应混合物通过制备型HPLC(Sunfire 30x50mm 5um柱ACN/H2O w/0.1%TFA 75ml/min,15-40%ACN 5min梯度)纯化。将产物级分冻干得到为TFA盐的标题产物(24mg,21%)。LCMS(Waters Acquity UPLC BEH C18 1.7um 2.1x50mm,50℃,洗脱剂A:水+0.1%甲酸,洗脱剂B:乙腈+0.1%甲酸,梯度2%至98%B/A历经5.15mins):保留时间:2.77mins;MS[M+2]$^{2+}$:测量值:1491.8808,计算值:1491.8560.

[0795] 实施例41:在N-端缀合到脂肪酸的Apelin环肽

[0796] 步骤1:A-H-Q-R-P-C-L-S-C-K-G-P-DNle-苯乙胺中间体41a的合成

[0797] 

[0798] 在自动肽合成仪(CEM Liberty Blue Microwave)上,使用苯乙胺-AMEBA树脂(Sigma Aldrich,0.1mmol,1.0mmol/g)进行固相肽合成,对Arg残基采用标准的双重Arg,并且双倍时间偶联DNle。将氨基酸制备为0.2M的DMF溶液。标准偶联循环定义如下:

[0799] ●氨基酸偶联:AA(5eq.)、HATU(5eq.)、DIEA(25eq.)

[0800] ●洗涤:DMF(3X 7mL)

[0801] ●Fmoc脱保护:20%哌啶/0.1M HOBt(2x 7mL)

[0802] ●洗涤:DMF(4x 7mL,然后1x 5mL)

[0803]

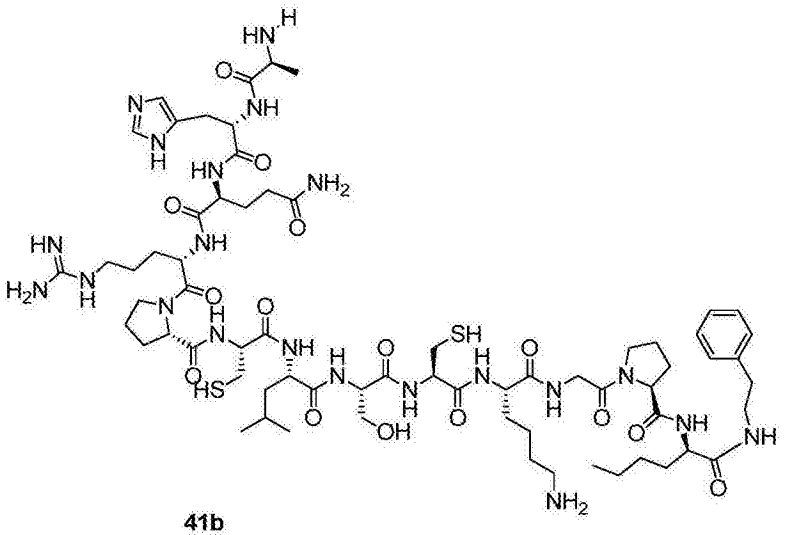
偶联	AA	偶联数 x 反应时间 (Temp)	偶联方法
1	Fmoc-D-Nle-OH	1 x 10 min (70°C)	DIEA/HATU
2	Fmoc-L-Pro-OH	1 x 5 min (70°C)	DIEA/HATU
3	Fmoc-L-Gly-OH	1 x 5 min (70°C)	DIEA/HATU
4	Fmoc-L-Lys-OH	1 x 5 min (70°C)	DIEA/HATU
5	Fmoc-L-Cys-OH	1 x 5 min (70°C)	DIEA/HATU
6	Fmoc-L-Ser-OH	1 x 5 min (70°C)	DIEA/HATU
7	Fmoc-L-Leu-OH	1 x 5 min (70°C)	DIEA/HATU
8	Fmoc-L-Cys-OH	1 x 5 min (70°C)	DIEA/HATU

[0804]

9	Fmoc-L-Pro-OH	1 x 5 min (70°C)	DIEA/HATU
10	Fmoc-L-Arg-OH	2 x 25 min (25°C)	DIEA/HATU
11	Fmoc-L-Gln-OH	1 x 5 min (70°C)	DIEA/HATU
12	Fmoc-L-His-OH	1 x 5 min (70°C)	DIEA/HATU
13	Fmoc-L-Ala-OH	1 x 5 min (70°C)	DIEA/HATU

[0805] 肽组装后，将树脂用DMF(2x 50mL)和DCM(2x 50mL)洗涤，然后在真空下干燥，得到中间体41a(276mg,0.1mmol)。

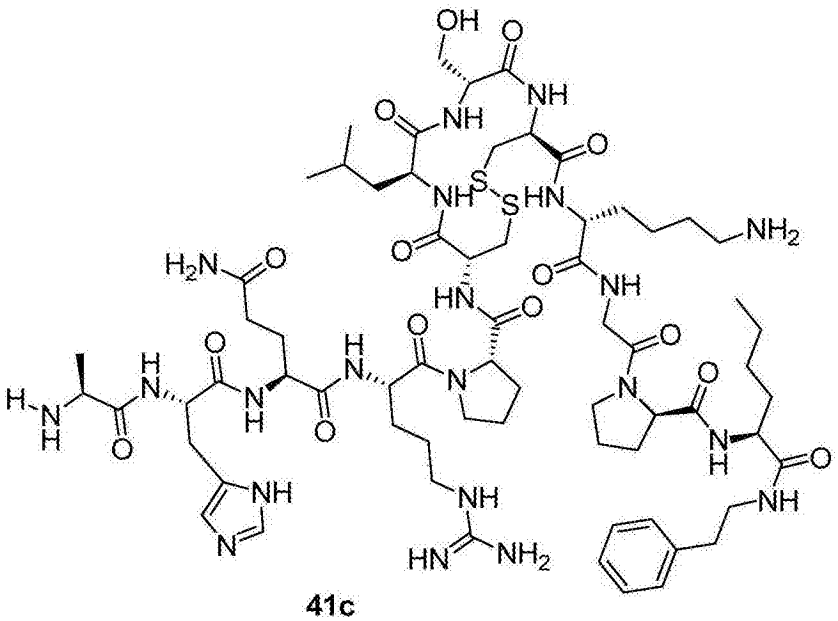
[0806] 步骤2:中间体41b的制备(从树脂裂解肽)

[0807] 

41b

[0808] 将中间体41a(276mg,0.1mmol)与4mL TFA溶液(37mL TFA,1mL H_2O,1mL TIPS,3.06g DTT)合并并在室温下振摇3小时。将溶液从树脂中移出并在40mL冷Et_2O中沉淀。将溶液涡旋并放置在冰中持续10分钟后在4000rpm下离心5分钟。除去溶剂并将白色固体用冷Et_2O(40mL每次)洗涤两次，离心(5分钟每次)并倾泻。将固体在真空下干燥过夜，得到中间体41b-批次1(17.4mg,0.012mmol)。LCMS(SQ2ProductAnalysis-Acidic-Peptide-Polar(产物分析-酸性-肽-极性),Acquity UPLC BEH C18柱,130 Å,1.7μm,2.1mm x 50mm,50℃):R_t=1.83分钟,MS[M^+H]1513.5.

[0809] 步骤3:中间体41c的制备(半胱氨酸残基的环化)

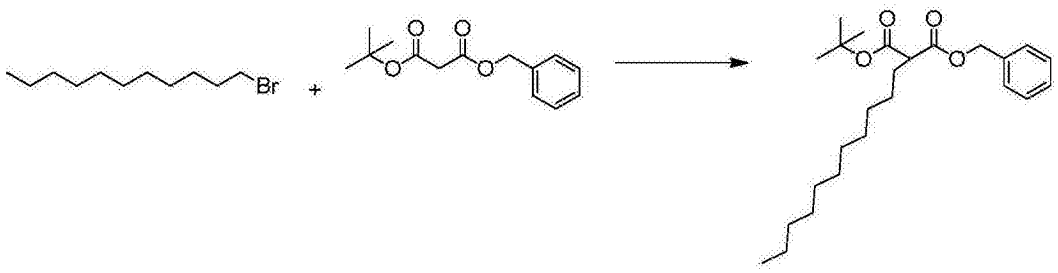
[0810] 

41c

[0811] 将中间体41b-批次1和2(29.6mg,0.020mmol)溶解在水(3mL)中并加入10滴DMSO得到轻微混浊溶液。缓慢地滴加碘(50mM在HOAc中,0.783mL,0.039mmol)并将反应在r.t.下混合过夜。粗反应的LCMS分析显示起始物质完全转化。滴加0.5M抗坏血酸直至颜色消散。将该

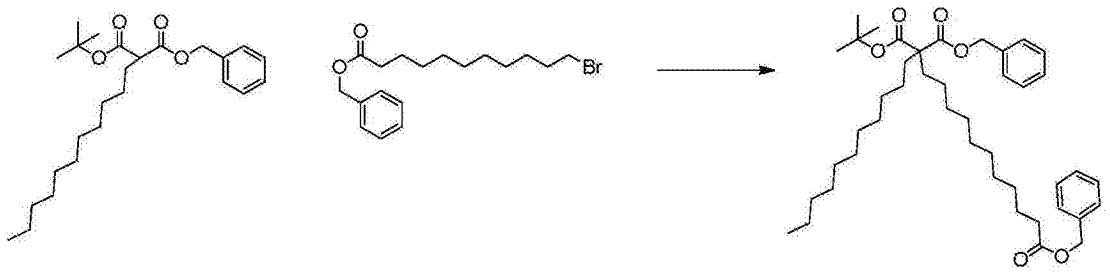
物质经MS-触发的HPLC纯化。将收集的级分冻干得到7mg的预期产物，为白色粉末(4.63μmol，24%)。LCMS(SQ2ProductAnalysis-Acidic-Peptide，Acquity UPLC BEH C18柱，130 Å，1.7μm，2.1mm x 50mm，50℃)：R_t＝0.90分钟，MS[M+H]1511.8.

[0812] 步骤4:2-十一烷基丙二酸1-苄基酯3-叔丁基酯

[0813] 

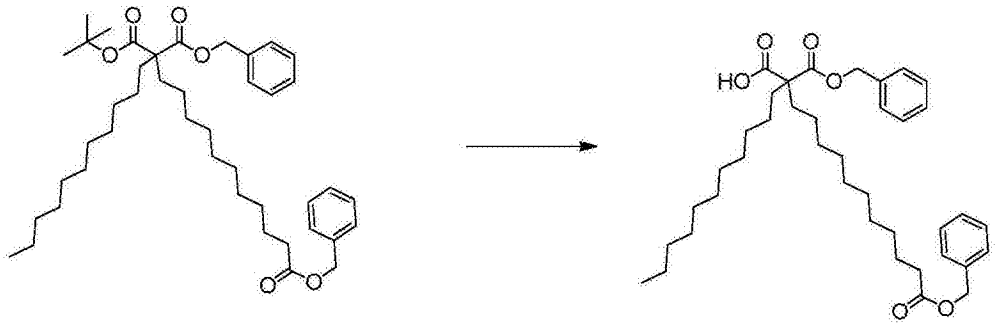
[0814] 在0℃、N_2中，向NaH(160mg，4.0mmol)的DMF(8mL)混悬液中加入丙二酸苄基酯叔丁基酯(1.0g，4.0mmol)的DMF(2mL)溶液。将该混合物搅拌50min后，加入1-溴十一烷的DMF(2mL)溶液。另外搅拌一小时后，使反应升至室温。将反应维持过夜。将Et_2O(100mL)和水(20mL)加入以分配反应物。将水相用Et_2O(100mL)萃取，将合并的有机物用Na_2SO_4干燥。蒸发溶剂并将残留物用快速柱(C1812g，40-100％ACN/水+0.1％TFA)纯化，得到标题化合物，为无色油状物(1.14g，2.82mmol，71％)：LCMS方法F Rt＝1.58min，M+Na 427.4；^{1}H NMR(400MHz，氯仿-d)δppm 0.84-0.96(m，3H)1.28(br.s，12H)1.31(m，J＝3.90Hz，6H)1.41(s，9H)1.88(q，J＝7.38Hz，2H)3.29(t，J＝7.58Hz，1H)5.19(q，J＝12.27Hz，2H)7.30-7.42(m，5H).

[0815] 步骤5:二十二烷-1，11，11-三甲酸1，11-二苄基酯11-叔丁基酯

[0816] 

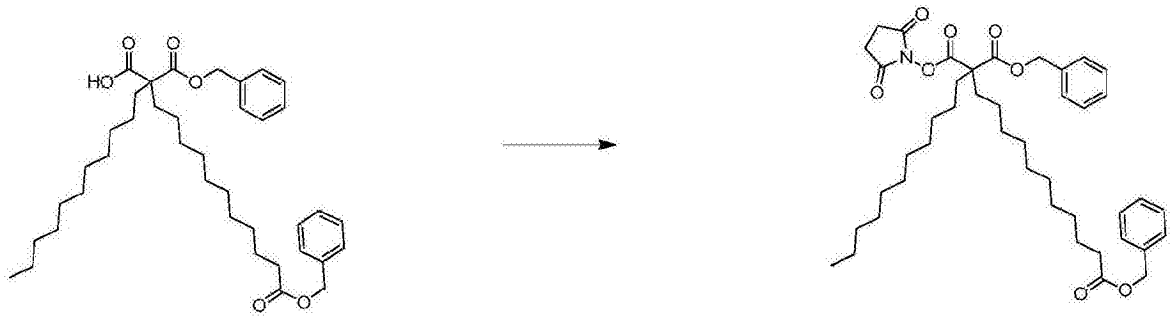
[0817] 以与实施例40中步骤3所类似的方式，用来自步骤4的化合物(177mg，0.284mmol)作为起始物质合成标题化合物，得到无色油状物(153mg，0.213mmol，75％)：^{1}H NMR(400MHz，氯仿-d)δppm 0.86-0.93(m，3H)1.12-1.21(m，2H)1.21-1.37(m，30H)1.66(quin，J＝7.40Hz，2H)1.89-2.07(m，4H)2.37(t，J＝7.58Hz，2H)2.84(br.s.，4H)5.13(s，2H)5.25(s，2H)7.30-7.47(m，10H).

[0818] 步骤6:13-(苄基氧基)-2-((苄基氧基)羰基)-13-氧代-2-十一烷基十三烷酸

[0819] 

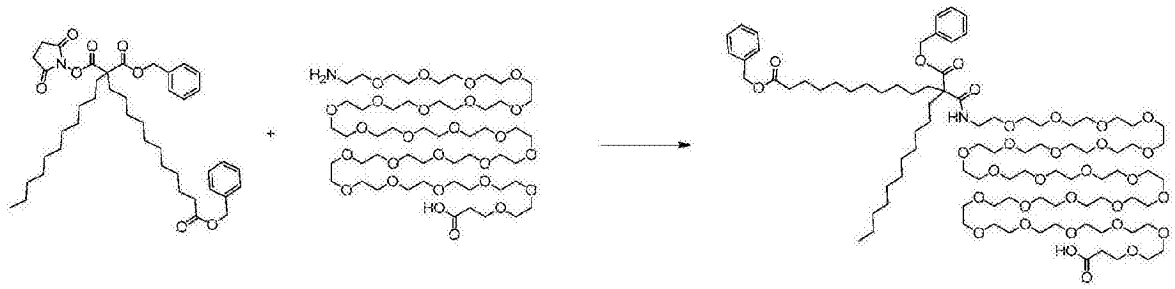
[0820] 向来自步骤5的化合物(200mg,0.295mmol)的DCM(3mL)溶液中加入TFA(0.6mL),并将反应在室温下搅拌3hrs。蒸发溶剂并将残留物通过快速柱(二氧化硅12g,0-15%EtOAc/HEP)纯化,得到标题化合物(177mg,0.284mmol,96%):^{1}H NMR(400MHz,氯仿-d)δppm 0.87-0.94(m,3H)0.94-1.05(m,2H)1.19(br.s.,14H)1.23-1.37(m,16H)1.65(quin,J=7.40Hz,2H)1.78-1.91(m,2H)1.93-2.05(m,2H)2.37(t,J=7.52Hz,2H)5.14(s,2H)5.27(s,2H)7.31-7.44(m,10H).

[0821] 步骤7:二十二烷-1,11,11-三甲酸1,11-二苄基酯11-(2,5-二氧代环戊基)酯

[0822] 

[0823] 以与实施例40中步骤6所类似的方式,由来自步骤6的化合物(177mg,0.284mmol)作为起始物质合成标题化合物,得到无色油状物(153mg,0.213mmol,75%):^{1}H NMR(400MHz,氯仿-d)δppm 0.86-0.93(m,3H)1.12-1.21(m,2H)1.21-1.37(m,30H)1.66(quin,J=7.40Hz,2H)1.89-2.07(m,4H)2.37(t,J=7.58Hz,2H)2.84(br.s.,4H)5.13(s,2H)5.25(s,2H)7.30-7.47(m,10H).

[0824] 步骤8:

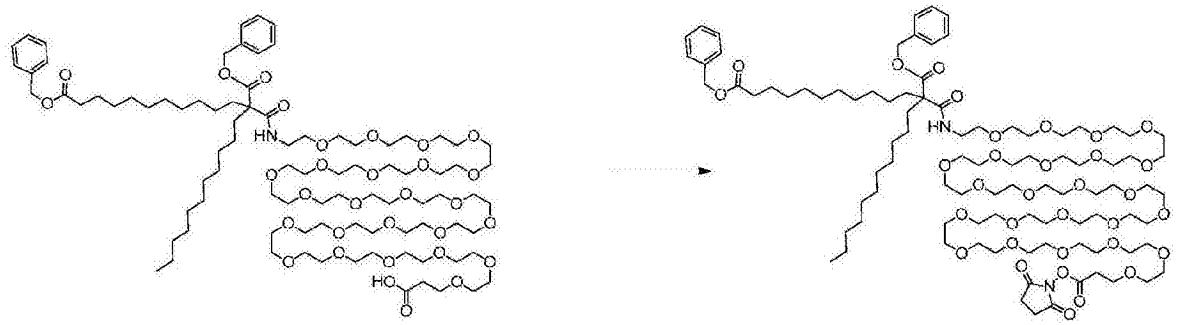
[0825] 

[0826] 将中间体34(145mg,0.201mmol)的THF(1.5mL)和DCM(1.5mL)溶液加入到装载氨基-PEG24-酸的小瓶中。加入DIPEA(88μL,0.504mmol)并将反应在振荡板上摇动15hrs。蒸发溶剂并将残留物通过超临界流体色谱(Waters HILIC 20x150mm;15-25%MeOH/CO_2)纯化得

到中间体35(151mg,0.086mmol,43%):LCMS方法E Rt=1.30min,[M+2H]+2 876.4;^{1}H NMR(400MHz,氯仿-d)δppm 0.86-0.93(m,3H)0.93-1.04(m,2H)1.19(br.s.,15H)1.23-1.37(m,15H)1.61-1.68(m,2H)1.78(td,J=12.44,4.34Hz,2H)1.92-2.05(m,2H)2.37(t,J=7.58Hz,2H)2.62(t,J=6.05Hz,2H)3.49(dd,J=6.72,2.32Hz,2H)3.52-3.59(m,2H)3.59-3.73(m,92H)3.80(t,J=6.05Hz,2H)5.13(s,2H)5.18(s,2H)7.31-7.42(m,10H)8.09(t,J=5.26Hz,1H).

[0827] 步骤9:

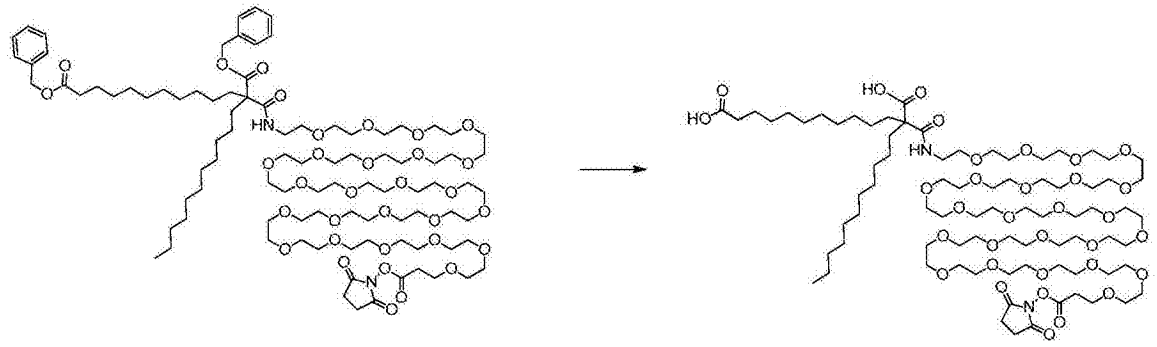
[0828]



[0829] 将DCC(22mg,0.103mmol)的DCM(0.265mL)混合物加入到中间体35(150mg,0.086mmol)和N-羟基琥珀酰亚胺的DCM(1.5mL)溶液中。将反应搅拌1.5hrs。加入另外的N-羟基琥珀酰亚胺(10mg)的THF(0.5mL)混合物和DCC(22mg)的DCM(0.265mL)混合物并将反应搅拌过夜。蒸发溶剂并将残留物通过快速柱(二氧化硅12,0-5%MeOH/DCM)纯化,得到中间体36(159mg,定量的),为白色固体:LCMS方法G Rt=1.55min,$[M+H_3O+H]^{+2}$933.9.

[0830] 步骤10:

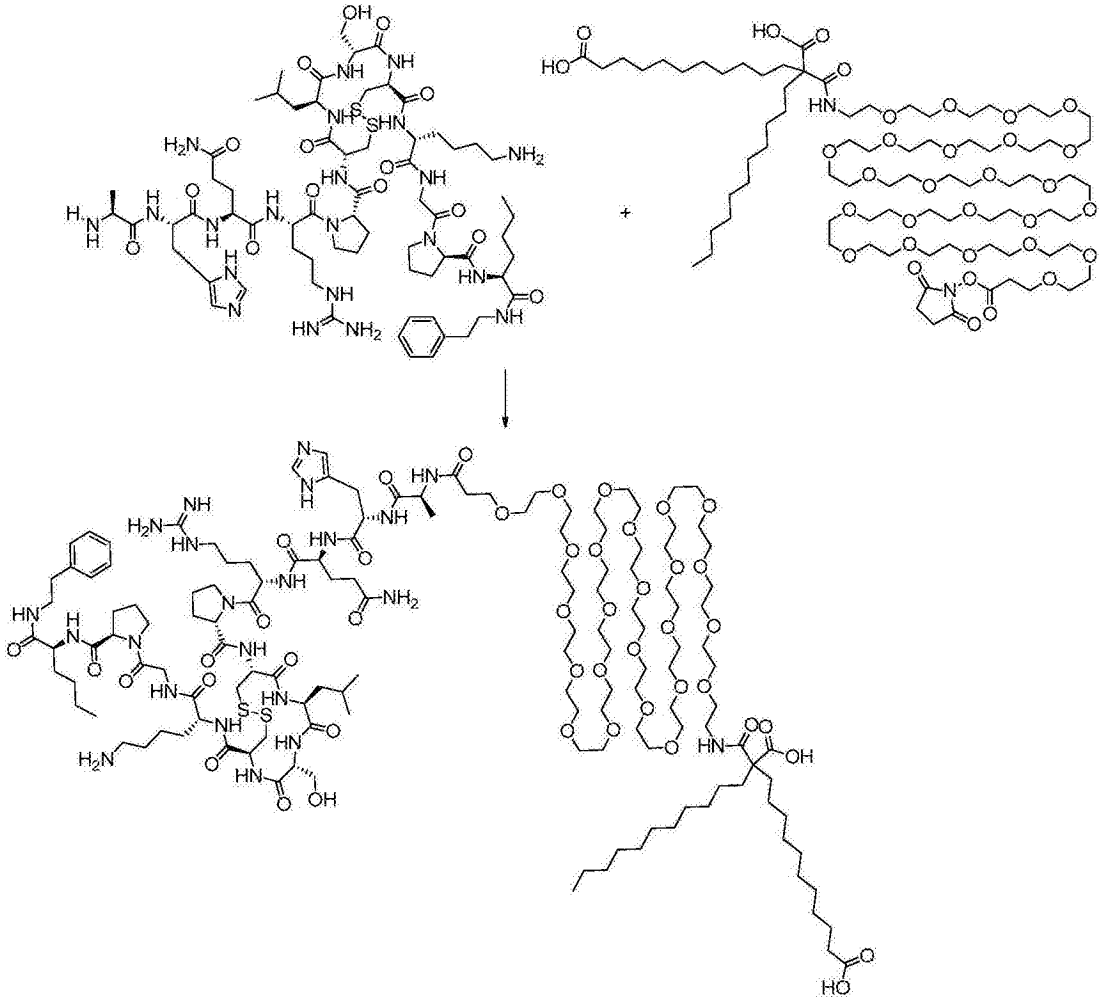
[0831]



[0832] 向来自步骤9的化合物(159mg,0.086mmol)的THF(5mL)溶液中加入10%Pd碳(4.6mg,4.3μmol)的THF(1mL)混悬液。将反应在氢气下放置并搅拌40min。加入更多的Pd碳(7mg,6.5μmol)并在氢气下再搅拌1hr。使反应通过膜滤器并蒸发滤液。将残留物通过HPLC(Sunfire C18 30x50mm,45-70%ACN/水+0.1%TFA)纯化,得到标题化合物(83mg,0.047mmol,54%):LCMS方法G Rt=1.03min,[M+2H]+2 835.2;^{1}H NMR(400MHz,氯仿-d)δppm 0.84-0.94(m,3H)1.17(br.s.,2H)1.21-1.39(m,30H)1.57-1.68(m,2H)1.69-1.80(m,2H)1.97-2.10(m,2H)2.34(t,J=7.21Hz,2H)2.86(s,4H)2.92(t,J=6.48Hz,2H)3.51-3.73(m,96H)3.87(t,J=6.48Hz,2H)7.45(t,J=4.46Hz,1H)

[0833] 步骤4:包含Apelin构建物A-H-Q-R-P-C-L-S-C-K-G-P-DNle-苯乙胺和脂肪酸-PEG

构建物的缀合物(N-末端缀合物)的制备-实施例41

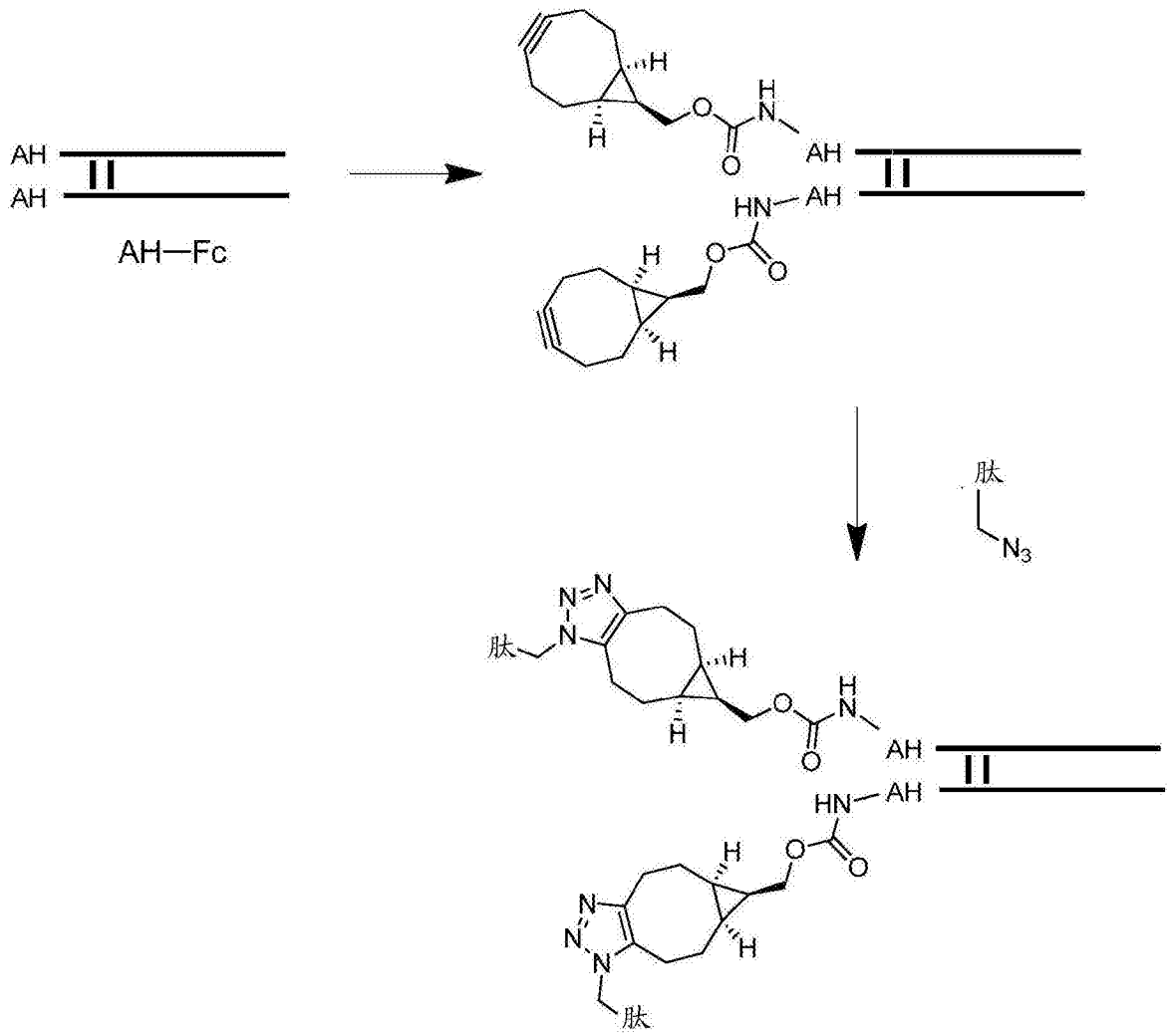
[0834] 

[0835] 在H_2O中制备NHS-脂肪酸(来自实施例40的步骤7的产物)的10mg/mL溶液。将中间体41c(1.5mg,0.993μmol)溶解在30mM pH4NaOAc缓冲液(672μL)中并加入NHS-脂肪酸(0.850mL,5.10μmol)。将反应在r.t.下混合16小时,此时加入另外的1.5mg的NHS-脂肪酸(10mg/mL在H_2O中)并将反应在r.t.混合16小时。加入8mg的NHS-脂肪酸(10mg/mL在H_2O中)并将反应在r.t.下混合3天并加入1.7mg的NHS-脂肪酸(10mg/mL在H_2O中)。将该混合物在r.t.下振摇16小时并经M-触发的HPLC纯化得到1.7mg的标题化合物,为白色粉末(0.510μmol,51%)。LCMS(SQ2产物分析-酸性-肽-极性,Acquity UPLC BEH C18柱,130 Å,1.7μm,2.1mm x 50mm,50℃):R_t=3.87分钟,MS[M+H+2/2]1533.1;[M+H+3/3]1022.9.

[0836] 实施例42:AH-Fc与apelin环肽的缀合物

[0837] 一般流程

[0838]



[0839] 步骤1:AH-Fc构建物的制备:

[0840] 构建物克隆:

[0841] 含有跟随有人Fc和短双-氨基酸序列(AH)的鼠Igκ链信号肽的DNA片段通过采用5'-NheI和3'-EcoRI限制位点的基因合成(GeneArt)进行密码子优化。将得到的序列用NheI和EcoRI限制酶切消化并连接(ligated)进载体pPL1146的NheI和EcoRI位点(CMV启动子的下游)。将连接物(ligation)转化到大肠杆菌(E coli)DH5α细胞中,通过DNA测序确定含有正确插入物的集落。显示的序列是对于有义链的,并且以5'至3'方向进行。

[0842] AH-Fc

[0843]

GCTAGCCACCATGGAAACTGACACCCTGCTGCTGTGGGTCCTGCTGCTGTGGGTGCCTGGCAGCACTGGCGCTCATGATAAGACACACACATGCCCCCCTTGTCCAGCACCAGAGG

[0844]

CAGCTGGAGGACCAAGCGTGTTCCTGTTTCCACCCAAGCCTAAAGACACACTGATGATCTCAAGGACCCCAGAAGTCACATGCGTGGTCGTGGACGTGTCTCACGAGGACCCCGAAGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTCGAGGTGCATAATGCTAAGACCAAACCCCGAGAGGAACAGTACAACAGCACCTATCGGGTCGTGTCCGTCCTGACAGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTATAAGTGCAAAGTGAGTAATAAGGCTCTGCCTGCACCAATCGAGAAAACAATT

TCTAAGGCTAAAGGGCAGCCAAGAGAACCCCAGGTGTACACTCTGCCTCCATCTAGGGAGGAAATGACAAAGAACCA
GGTCAGTCTGACTTGTCTGGTGAAAGGCTTCTACCCCTCCGACATCGCAGTGGAGTGGGAATCTAATGGCCAGCCTG
AAAACAATTACAAGACCACACCCCCTGTGCTGGACTCCGATGGGTCTTTCTTTCTGTATTCTAAGCTGACCGTGGAT
AAAAGTCGGTGGCAGCAGGGAAACGTCTTCTCATGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCATTACACACAGAA
GTCCCTGTCTCTGAGTCCAGGCAAATGAGAATTC

[0845] AH-Fc构建物的序列：

[0846]

1 METDTLLLWV LLLWVPGSTG AHDKTHTCPP CPAPEAAGGP SVFLFPPKPK
51 DTLMISRTPE VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS
101 TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK AKGQPREPQV
151 YTLPPSREEM TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTPPVL
201 DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSPGK

[0847] AH-Fc蛋白表达和纯化：

[0848] 采用标准聚乙稀亚胺方法，将AH-Fc表达质粒DNA以1x 10^6细胞/ml的密度转染到HEK293T细胞中。然后将500ml培养物在3L烧瓶中在FreeStyle 293培养基(Life Technologies)中在37℃生长4天。

[0849] 从澄清的条件培养基中纯化AH-Fc。短暂地使500ml条件培养基以4ml/min流过5ml HiTrap MabSelect SuRe柱(GELife Sciences)。将柱用20柱体积的含有0.1％Triton X-114的PBS洗涤，然后将AH-Fc蛋白用0.1M甘氨酸，pH 2.7洗脱，用1M Tris-HCl，pH9中和，并用PBS透析。蛋白质产量是每500ml条件培养基10至20mg，内毒素水平是＜1EU/mg，如通过Charles River ENDOSAFE PTS测试测量的。

[0850] AH-Fc蛋白的质量控制：

[0851] AH-Fc蛋白的LC/MS：峰是异质的，比二聚体预期的高大约3kDa。这是具有共有的N-连接的糖基化位点的Fc预期的N-连接的糖基化的特征。

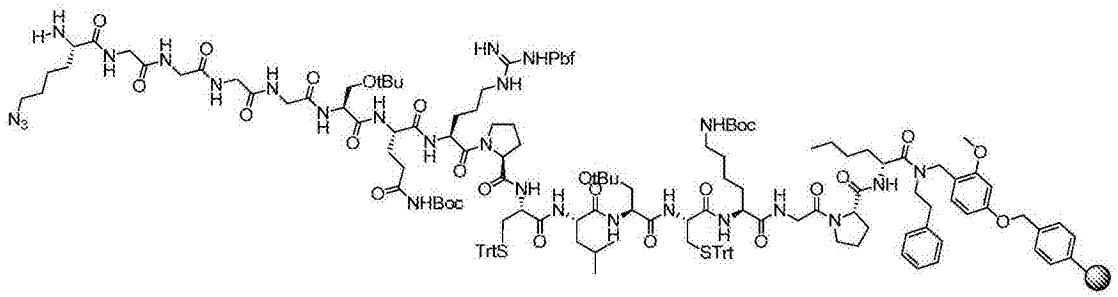
[0852] 还原的、N-去糖基化的AH-Fc蛋白的LC/MS：给出尖锐的峰。AH-Fc的分子量如预期的。在C-末端的半胱氨酸似乎保护蛋白质免于裂解。

[0853] Superdex 200上的分析尺寸排阻：Fc-Apelin蛋白质具有89至100％二聚体、0至10％四聚体和0至1％聚集体。

[0854] 还原SDS/PAGE：所有蛋白质主要作为预期大小的单体迁移。

[0855] 步骤2：NH_2-叠氮基Lys-GGGGS-Q-R-P-C-L-S-C-K-G-P-Dnle-苯乙胺的合成

[0856]



[0857] 在自动肽合成仪(CEM Liberty Blue Microwave)中采用苯乙胺-AMEBA树脂

(Sigma Aldrich,0.25mmol,1.0mmol/g)进行固相肽合成,对于Arg残基采用标准双重Arg,D-Nle和叠氮基赖氨酸偶联双倍时间。将氨基酸制备为0.2M的DMF溶液。标准偶联循环定义如下:

[0858] ●氨基酸偶联:AA(5eq.)、HATU(5eq.)、DIEA(25eq.)

[0859] ●洗涤:DMF(3X 7mL)

[0860] ●Fmoc脱保护:20%哌啶/0.1M HOBt(2x 7mL)

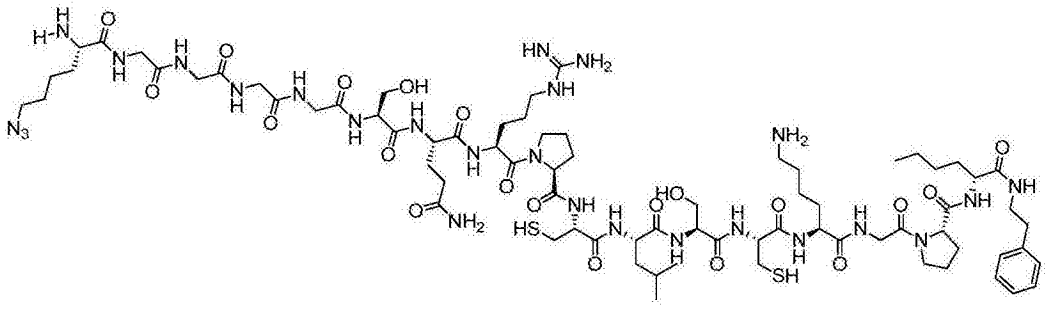
[0861] ●洗涤:DMF(4x 7mL,然后1x 5mL)

[0862]

偶联	AA	偶联数 x 时间 (温度)	偶联 方法
1	Fmoc-D-Nle-OH	1 x 10 min (70°C)	DIEA/HATU
2	Fmoc-L-Pro-OH	1 x 5 min (70°C)	DIEA/HATU
3	Fmoc-L-Gly-OH	1 x 5 min (70°C)	DIEA/HATU
4	Fmoc-L-Lys-OH	1 x 5 min (70°C)	DIEA/HATU
5	Fmoc-L-Cys-OH	1 x 5 min (70°C)	DIEA/HATU
6	Fmoc-L-Ser-OH	1 x 5 min (70°C)	DIEA/HATU
7	Fmoc-L-Leu-OH	1 x 5 min (70°C)	DIEA/HATU
8	Fmoc-L-Cys-OH	1 x 5 min (70°C)	DIEA/HATU
9	Fmoc-L-Pro-OH	1 x 5 min (70°C)	DIEA/HATU
10	Fmoc-L-Arg-OH	2 x 25 min (25°C)	DIEA/HATU
11	Fmoc-L-Gln-OH	1 x 5 min (70°C)	DIEA/HATU
12	Fmoc-L-Ser-OH	1 x 5 min (70°C)	DIEA/HATU
13	Fmoc-L-Gly-OH	1 x 5 min (70°C)	DIEA/HATU
14	Fmoc-L-Gly-Gly-Gly-OH	1 x 10 min (70°C)	DIEA/HATU
15	Fmoc-L-叠氮基 Lys-OH	1 x 10 min (70°C)	DIEA/HATU

[0863] 肽组装后,将树脂用DMF(2x 50mL)和DCM(2x 50mL)洗涤,然后在真空下干燥得到中间体42a(770mg,0.250mmol)。

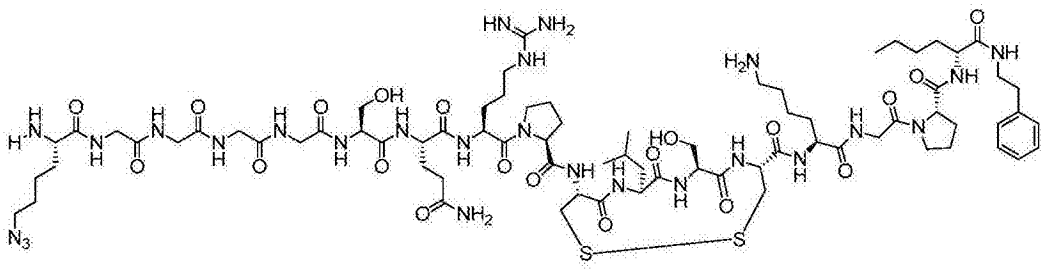
[0864] 步骤3:中间体42b的制备(从树脂裂解肽)

[0865] 

[0866] 将中间体42a(770mg,0.250mmol)分成两半,并将各样品与6mL TFA溶液(37mL TFA,1mL H_2O,1mL TIPS,2.569g(20eq.)DTT)合并,并在室温下振摇3小时。将溶液从树脂中

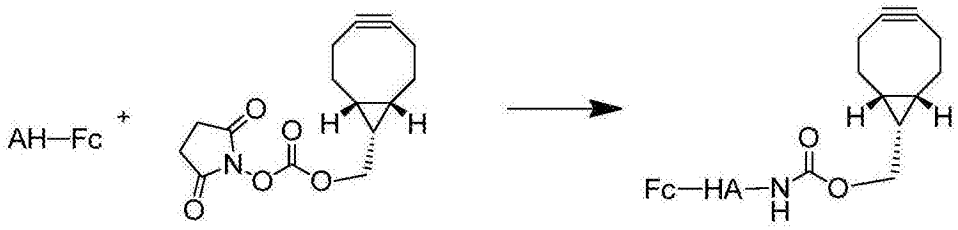
除去并在40mL冷Et_2O中沉淀。将溶液涡旋并放置在冰中持续10分钟，然后在4000rpm下离心5分钟。除去溶剂并将白色固体用冷Et_2O(40mL每次)再洗涤两次，离心(5分钟每次)并倾泻。将固体在真空下干燥过夜并经M-触发的HPLC纯化得到中间体43b，为白色粉末(80mg，0.045mmol，80％)。LCMS(SQ2产物分析-酸性-肽-极性，Acquity UPLC BEH C18柱，130 Å，1.7μm，2.1mm x 50mm，50℃)：R_t＝2.32分钟，MS[M+H+2/2]888.0.

[0867] 步骤4:中间体42c的制备(半胱氨酸残基的环化)

[0868] 

[0869] 将中间体42b(80mg，0.045mmol)溶解在水(1.25mL)中并缓慢地滴加碘(50mM在HOAc中，1.804mL，0.090mmol)并将反应在r.t.下混合3小时。粗反应物的LCMS分析显示起始物质完全转化。滴加0.5M抗坏血酸直至颜色消散。将该物质经MS-触发的HPLC纯化。将收集的级分冻干得到20.1mg的预期产物，为白色粉末(0.045mmol，25％)。LCMS(SQ2产物分析-酸性-肽-极性，Acquity UPLC BEH C18柱，130 Å，1.7μm，2.1mm x 50mm，50℃)：R_t＝2.17分钟，MS[M+H+2/2]886.8.

[0870] 步骤5:Fc-AH BCN的制备(在AH-Fc N-末端安装点击柄)

[0871] 

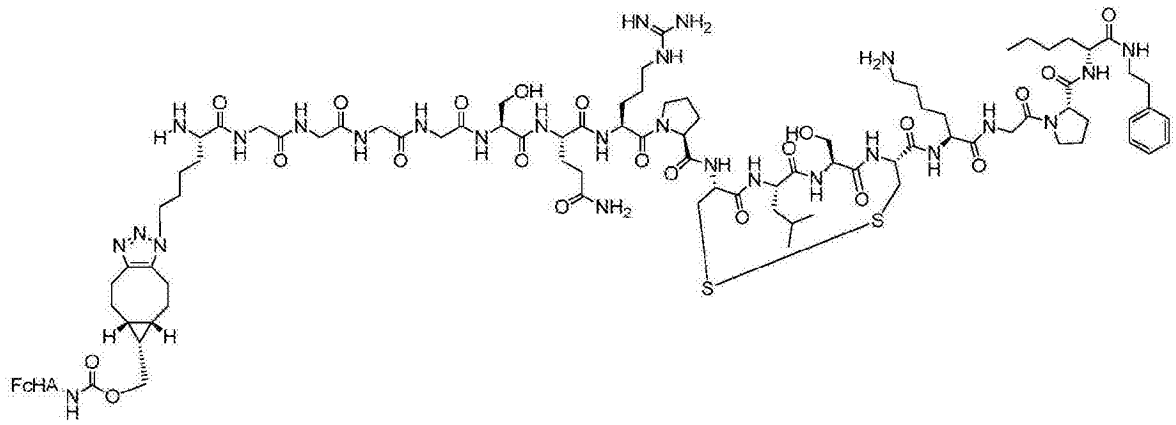
[0872] 将Fc-AH(来自步骤1:1mL，3mg/mL，0.117μmol)溶解在30mM NaOAc pH 4.0(4.3mL)中并缓慢地加入10mg/mL碳酸(1R，8S，9s)-二环[6.1.0]壬-4-炔-9-基甲基酯(2，5-二氧代吡咯烷-1-基)酯(BCN)的DMSO(0.70mL)的储备溶液并在r.t.将反应物放置在振摇板上3天。加入BCN(0.70mL)并将反应在r.t.下混合16小时。使用10kDa MWCO Amicon离心式过滤器通过稀释并浓缩反应物5次至体积为900μL，将溶液交换到30mM NaOAc pH 4.0中。将溶液离心并除去上清液。通过A280浓度测量为1.73mg/mL(1.56mg，26％)。LCMS(QT2，Protein_20-70kDa_3min，Proswift Monolith 4.6x 50mm，50℃，洗脱剂A:水+0.1％甲酸，洗脱剂B:CAN+0.1％甲酸，2-98％历经2min)R_t＝1.58min.

[0873]

标记的程度	计算值	测量值	% TIC (MS+) 强度
AH-Fc	51141	51141.5	18
AH-Fc +1BCN	51318	51317	31
AH-Fc +2BCN	51495	51496	31
AH-Fc +3BCN	51672	51671	20

[0874] 步骤6:实施例42:缀合至中间体43c的Fc-HA-BCN的制备

[0875]



[0876] 配制50mg/mL的中间体42c的在H_2O中的储备溶液。将中间体43c(53.7μL,1.515μmol)加入到Fc-HA-BCN(来自步骤5)在30mM NaOAc pH 4.0的储备溶液(1.73mg/mL,1.56mg,0.030μmol)并将反应在r.t.下混合16小时。采用50kDa MWCO Amicon离心式过滤器通过稀释和浓缩反应物5次至250μL体积,将溶液交换到30mM NaOAc pH 4.0中。通过A280测量浓度为3.32mg/mL(830μg,50%).LCMS(QT2,Protein_35-70kDa_3min,Proswift Monolith 4.6x 50mm,50℃,洗脱剂A:水+0.1%甲酸,洗脱剂B:CAN+0.1%甲酸,10-80%B,历经2min)R_t=1.43min,MS[M(糖基化的)+H]54524.5.

[0877] 实施例43:利用分选酶(Sortase)的Fc-apelin缀合物:



[0878]

[0879] 步骤1:Fc-分选酶构建物的制备:

[0880] 构建物克隆：

[0881] 将含有跟随有人Fc和分选酶识别序列(LPXTG)的鼠Igκ链信号肽的DNA片段通过采用5'-NheI和3'-EcoRI限制位点的基因合成(GeneArt)进行密码子优化。将得到的序列用NheI和EcoRI限制酶切消化并连接进载体pPL1146的NheI和EcoRI位点，其为CMV启动子的下游。将连接物转化到E coli DH5α细胞中，通过DNA测序确定含有正确插入物的集落。显示的序列是对于有义链的，并且以5'至3'方向进行。

[0882] Fc-分选酶

[0883]

GCTAGCCACCATGGAAACCGACACCCTGCTGCTGTGGGTGCTGCTGCTGTGGGTGCCAGGCAGCACCGGCGATAAGA
CCCACACCTGTCCTCCCTGTCCTGCCCCTGAAGCTGCTGGCGGCCCTAGCGTGTTCCTGTTCCCCCCAAAGCCCAAG
GACACCCTGATGATCAGCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCCACGAGGACCCTGAAGTGAA
GTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAACAGTACAACAGCACCT
ACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAAC
AAGGCCCTGCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGCGAACCCCAGGTGTACACACT
GCCCCCTAGCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTCGTGAAGGGCTTCTACCCCTCCGATA
TCGCCGTGGAATGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCACCCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGC
TCATTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACAGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGCAGCGTGAT

[0884]

GCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCTGGAAAAGGCGGCGGAGGCTCTCTGC
CTGAAACAGGCGGACTGGAAGTGCTGTTCCAGGGCCCCTAAGAATTC

[0885]

1 METDTLLLWV LLLWVPGSTG DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT
51 LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY
101 RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT
151 LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS
201 DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGKGGG
251 *GSLPETGGLEVLFQGP*

[0886] 蛋白表达和纯化：

[0887] 采用标准聚乙稀亚胺方法，将Fc-分选酶表达质粒DNA以1x 10^6细胞/ml的密度转染到HEK293T细胞中。然后使500ml培养物在3L烧瓶中在FreeStyle 293培养基(Life Technologies)中在37℃生长4天。

[0888] 从澄清的条件培养基中纯化Fc-分选酶蛋白。短暂地，使500ml条件培养基以4ml/min流过5ml HiTrap MabSelect SuRe柱(GE Life Sciences)。将柱用20柱体积的含有0.1％Triton X-114的PBS洗涤，然后将Fc-分选酶蛋白用0.1M甘氨酸，pH 2.7洗脱，用1M Tris-HCl，pH 9中和，并用PBS透析。蛋白质产量是每500ml条件培养基10至20mg，内毒素水平是＜1EU/mg，如通过Charles River ENDOSAFE PTS测试测量的。

[0889] Fc-分选酶蛋白的质量控制：

[0890] 天然的Fc-分选酶蛋白的LC/MS：峰是异质的，比二聚体预期的高大约3kDa。这是具有共有的N-连接的糖基化位点的Fc预期的N-连接的糖基化的特征。

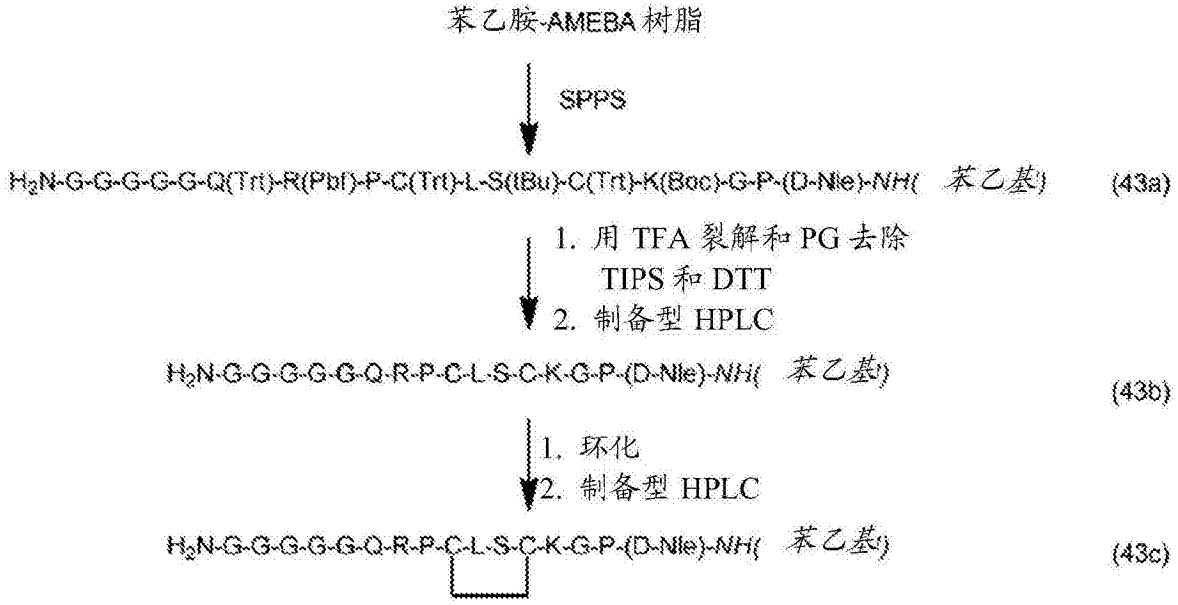
[0891] 还原的、N-去糖基化的Fc-分选酶蛋白的LC/MS:峰是尖锐的。分子量比理论值小2道尔顿,可能由于半胱氨酸x2还原。

[0892] Superdex 200上的分析尺寸排阻:Fc-分选酶蛋白具有89至100%二聚体、0至10%四聚体和0至1%聚集体。

[0893] 还原SDS/PAGE:所有蛋白质主要作为预期大小的单体迁移。

[0894] 步骤2:用于分选酶缀合的Apelin肽(H_2N-GGGGGQRPC*LSC*KGP(D-Nle)苯乙胺)的制备

[0895]



[0896] 步骤2a:中间体43a的制备

[0897] 在自动肽合成仪(CEM LIBERTY)上,采用苯乙胺-AMEBA树脂(Sigma Aldrich,0.25g,0.25mmol,1.0mmol/g)进行固相肽合成,对于Arg残基采用标准双重Arg。将氨基酸制备为0.2M的DMF溶液。

[0898] 偶联循环定义如下:

[0899] ●氨基酸偶联:AA(4.0eq.)、HATU(4.0eq.)、DIEA(25eq.)

[0900] ●洗涤:DMF(3x 10mL,每次1min).

[0901] ●Fmoc脱保护:哌啶/DMF(1:4)(10mL,75℃,1min;然后10mL,75℃,3min).

[0902] ●洗涤:DMF(4x 10mL,每次1min)。

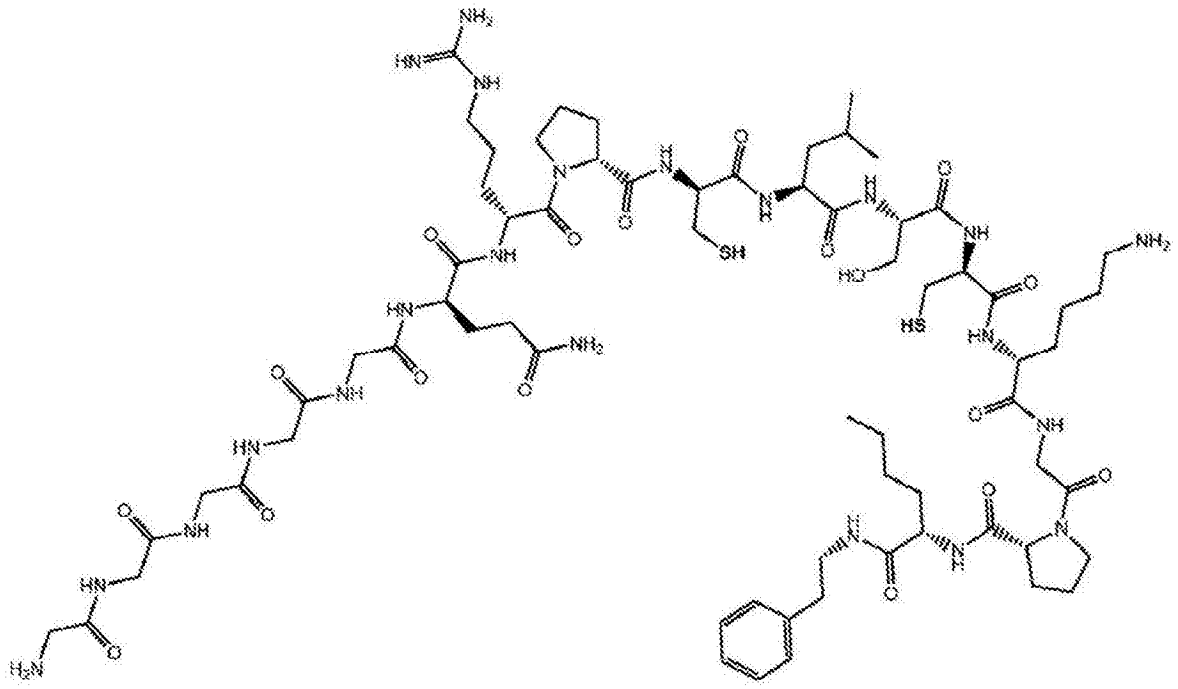
[0903]

偶联	AA	偶联数 x 反应时间	反应温度
1	Fmoc-D-Nle-OH	1x 5 min	75 ^{0}C
2	Fmoc-L-Pro-OH	1 x 5 min	75 ^{0}C
3	Fmoc-Gly-OH	1 x 5 min	75 ^{0}C
4	Fmoc-L-Lys(Boc)-OH	1 x 5 min	75 ^{0}C
5	Fmoc-L-Cys(Trt)-OH	1 x 6 min	在 25 ^{0}C 2 min 在 50 ^{0}C 4 min
6	Fmoc-L-Ser(tBu)-OH	1 x 5 min	75 ^{0}C
7	Fmoc-L-Leu-OH	1 x 5 min	75 ^{0}C
8	Fmoc-L-Cys(Trt)-OH	1 x 6 min	在 25 ^{0}C 2 min 在 50 ^{0}C 4 min
9	Fmoc-L-Pro-OH	1 x 5 min	75
10	Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH	2 x 30 min	在 25 ^{0}C 25 min 在 75 ^{0}C 5 min
11	Fmoc-L-Gln(Trt)-OH	1 x 5 min	75 ^{0}C
12	Fmoc-Gly-Gly-Gly-OH	1 x 5 min	75 ^{0}C
13	Fmoc-Gly-OH	1 x 5 min	75 ^{0}C
14	Fmoc-Gly-OH	1 x 5 min	75 ^{0}C

[0904] 肽组装后，将树脂用DMF(3x 10mL)、DCM(3x 10mL)洗涤。将肽树脂在真空在室温干燥，得到中间体43a(0.622g,0.25mmol)。

[0905] 步骤2b:中间体42b H_2N-G-G-G-G-G-Q-R-P-C-L-S-C-K-G-P-(D-Nle)-NH(苯乙基)的制备

[0906]



[0907] 1)裂解和除去保护基团

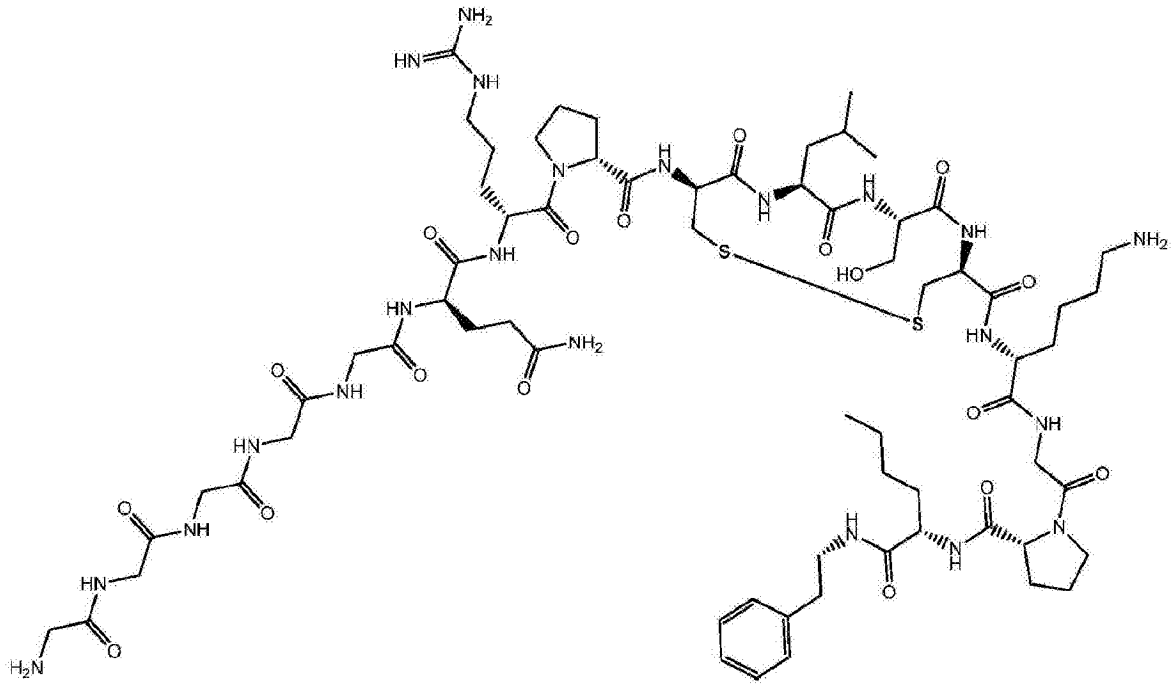
[0908] 向中间体43a(0.622g,0.25mmol)中加入3mL 95%TFA/2.5%H_2O/2.5%TIPS溶液和DTT(771mg,5.00mmol),将得到混合物在室温振摇3小时,然后过滤。将滤液滴入40mL冷乙醚中,然后在4000rpm离心5分钟。除去溶剂,并将白色固体用乙醚(3x 40mL)洗涤,涡漩并离心。将固体在高真空下在25℃干燥1小时。

[0909] 2)纯化

[0910] 然后将上面的白色固体用制备型HPLC(Sunfire™ Prep C18OBD™ 30x50mm 5um柱ACN/H_2O w/0.1%TFA 75ml/min,10-30%ACN 8min梯度)纯化。将产物级分冻干,得到为TFA盐的中间体43b(44mg,11%).

[0911] 步骤3:H_2N-G-G-G-G-G-Q-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-NH(苯乙基)(二硫化物C^9-C^{12}),中间体43c的制备

[0912]



[0913] 向在0.9mL H_2O中的中间体43b(44mg,0.028mmol)中滴加I_2(50mM的AcOH溶液,1.1mL 0.055mmol)。将该混合物在室温振摇过夜。LC/MS显示反应完成。向反应混合物中加入数滴0.5M抗坏血酸溶液(MeOH/H_2O=1/1),直到溶液颜色消失。将该混合物用MeOH稀释,用于HPLC纯化。纯化采用制备型HPLC(Sunfire™ Prep C18OBD™ 30x50mm 5um柱ACN/H2O w/0.1%TFA 75ml/min,10-30%ACN 8min梯度)进行。将产物级分冻干,得到H_2N-G-G-G-G-G-Q-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-NH(苯乙基)(二硫化物C^9-C^{12}),中间体43c,其为TFA盐(13mg,30%).LC/MS(QT2,ProductAnalysis-HRMS-Acidic,Waters Acquity UPLC BEH C18 1.7um 2.1x50mm,50℃,洗脱剂A:水+0.1%甲酸,洗脱剂B:乙腈+0.1%甲酸,梯度2%至98% B/A,历经5.15mins):保留时间:0.98mins;MS$[M+2]^{2+}$:测量值:1587.7993,计算值:1587.868.

[0914] 步骤3:Fc-分选酶和中间体43c的分选酶缀合

[0915] 1)化学酶促分选酶缀合

[0916] 在冰浴上,向在PBS(pH7.4)缓冲液中的Fc-分选酶(698μl,0.040μmol,3.15mg/mL)中加入H_2N-G-G-G-G-G-Q-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-NH(苯乙基)(二硫化物C^9-C^{12})(64.1μL,2.018μmoL,50mg/mL)的在Tris-8.0缓冲液中的溶液,随后加入520μM在50mM Tris-Cl pH7.4,150mM NaCl中的分选酶A(78μL,0.040μmoL)。将该混合物在室温振摇过夜。LC/MS显示反应完成。

[0917] 2)纯化和脱盐

[0918] 将上面溶液在ATTA XPRESS上以4mL/min流过5mL HiTrap Mab Select SuRe柱(GE Lifesciences#11-0034-95)。采用20柱体积(CV)PBS+0.1%Triton 114在柱上洗涤实施例43,并用0.1M甘氨酸,pH 2.7洗脱,用1M tris-HCl,pH 9中和,并用PBS透析。采用Zeba Sping脱盐柱将纯化的溶液脱盐,5mL(89891)得到1.5mL目标溶液,平均浓度是0.598mg/mL,并且回收率是90%。LCMS(QT2,Protein_20-70kDa_3min,AcQuity ProSwift RP-3U 4.6x

50mm,1.0mL/min,洗脱剂A:水+0.1%甲酸,洗脱剂B:乙腈+0.1%甲酸,梯度2%至98%B/A,历经3mins):R_t=1.55分钟,MS[M+H]58845.0000.

[0919] 实施例43的序列:

[0920]

1 METDTLLLWV LLLWVPGSTG DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT

51 LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY

101 RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT

151 LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS

201 DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGKGGG

251 *GSLPETGGGGGQRPC*LSC*KGP(D-Nle)苯乙胺*

[0921] 其中LSLSPGKGGG GSLPETGGGGG代表连接体和QRPC*LSC*KGP(D-Nle)苯乙胺多肽。

[0922] 已经发现在实施例下的多肽对于APJ受体效力具有约0.01nM至约1100nM范围的EC_{50}值。已经发现在实施例下的多肽具有高于2分钟、高于5分钟、高于10分钟、高于20分钟、高于50分钟和高于60分钟的血浆稳定性。

[0923] 可以看到,本发明的多肽可用作APJ受体的激动剂,并因此可用于治疗对APJ受体的活化响应的疾病和病况,例如文中公开的疾病。

[0924] 此外,这些肽的半衰期可通过形成包含根据式I至IV中任何一式的肽或多肽以及延长半衰期的部分例如人血清白蛋白或Fc结构域的生物缀合物而被进一步延长。

[0925] 如此描述了本发明的示例性实施方案,应当被本领域技术人员注意的是,这些公开内容仅是示例性,在本发明的范围内可以进行各种其它替换、适应和修改。因此,本发明不限于文中列举的具体实施方案。