



# (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114729022 A

(43) 申请公布日 2022. 07. 08

(21) 申请号 202080076351.4

(22) 申请日 2020.09.03

(30) 优先权数据

62/895,201 2019.09.03 US

62/983,515 2020.02.28 US

63/020,945 2020.05.06 US

63/059,747 2020.07.31 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.04.28

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2020/049244 2020.09.03

(87) PCT国际申请的公布数据

W02021/046246 EN 2021.03.11

(71) 申请人 领导医疗有限公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 大卫·Y·刘

格雷戈里·托马斯·伯恩

鲁帕·塔拉纳特

苏尼尔·库马尔·古普塔

尼希特·巴楚拉尔·莫迪

(74) 专利代理机构 北京律诚同业知识产权代理

有限公司 11006

专利代理师 徐金国 吴启超

(51) Int.Cl.

G07K 14/575 (2006.01)

权利要求书19页 说明书69页

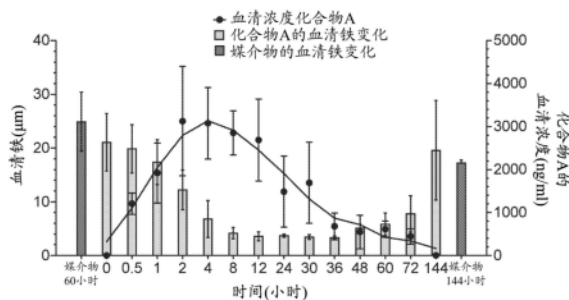
序列表26页 附图14页

(54) 发明名称

缀合的铁调素模拟物

(57) 摘要

本发明提供铁调素类似物和相关药物组合物及其在治疗真性红细胞增多症中的用途。



1. 一种用于治疗有需要的受试者的真性红细胞增多症的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的铁调素类似物或其药学上可接受的盐或溶剂化物,其中所述铁调素类似物包括包含式I或由式I组成的肽:

R1-X-Y-R2 (I) (SEQ ID NO:1)

其中

R1是氢、C1-C6烷基、C6-C12芳基、C1-C20烷酰基或pGlu;

R2是NH<sub>2</sub>或OH;

X是具有式II的肽序列

X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10 (II) (SEQ ID NO:2)

其中

X1是Asp、Ala、Ile、pGlu、bhAsp、Leu、D-Asp或不存在;

X2是Thr、Ala或D-Thr;

X3是His、Lys或D-His;

X4是Phe、Ala、Dpa或D-Phe;

X5是Pro、Gly、Arg、Lys、Ala、D-Pro或bhPro;

X6是Ile、Cys、Arg、Lys、D-Ile或D-Cys;

X7是Cys、Ile、Leu、Val、Phe、D-Ile或D-Cys;

X8是Ile、Arg、Phe、Gln、Lys、Glu、Val、Leu或D-Ile;

X9是Phe或bhPhe;以及

X10是Lys、Phe或不存在;

其中如果Y不存在,则X7是Ile;以及

Y是具有式III的肽序列

Y1-Y2-Y3-Y4-Y5-Y6-Y7-Y8-Y9-Y10-Y11-Y12-Y13-Y14-Y15 (III) (SEQ ID NO:3)

其中

Y1是Gly、Cys、Ala、Phe、Pro、Glu、Lys、D-Pro、Val、Ser或不存在;

Y2是Pro、Ala、Cys、Gly或不存在;

Y3是Arg、Lys、Pro、Gly、His、Ala、Trp或不存在;

Y4是Ser、Arg、Gly、Trp、Ala、His、Tyr或不存在;

Y5是Lys、Met、Arg、Ala或不存在;

Y6是Gly、Ser、Lys、Ile、Ala、Pro、Val或不存在;

Y7是Trp、Lys、Gly、Ala、Ile、Val或不存在;

Y8是Val、Thr、Gly、Cys、Met、Tyr、Ala、Glu、Lys、Asp、Arg或不存在;

Y9是Cys、Tyr或不存在;

Y10是Met、Lys、Arg、Tyr或不存在;

Y11是Arg、Met、Cys、Lys或不存在;

Y12是Arg、Lys、Ala或不存在;

Y13是Arg、Cys、Lys、Val或不存在;

Y14是Arg、Lys、Pro、Cys、Thr或不存在;以及

Y15是Thr、Arg或不存在;

其中所述包含式I或由式I组成的肽任选地在R1、X或Y上被聚乙二醇化,以及其中所述肽的氨基酸的侧链任选地缀合至亲脂性取代基或聚合部分。

2. 如权利要求1所述的方法,其中R1是氢、异戊酸、异丁酸或乙酰基。

3. 如权利要求1所述的方法,其中X是具有式IV的肽序列

X1-Thr-His-X4-X5-X6-X7-X8-Phe-X10 (IV) (SEQ ID NO:4)

其中

X1是Asp、Ida、pGlu、bhAsp或不存在;

X4是Phe或Dpa;

X5是Pro或bhPro;

X6是Ile、Cys或Arg;

X7是Cys、Ile、Leu或Val;

X8是Ile、Lys、Glu、Phe、Gln或Arg;以及

X10是Lys或不存在。

4. 如权利要求1-2中任一项所述的方法,其中X是具有式V的肽序列:

X1-Thr-His-X4-X5-Cys-Ile-X8-Phe-X10 (V) (SEQ ID NO:5)

其中

X1是Asp、Ida、pGlu、bhAsp或不存在;

X4是Phe或Dpa;

X5是Pro或bhPro;

X8是Ile、Lys、Glu、Phe、Gln或Arg;以及

X10是Lys或不存在。

5. 如权利要求1所述的方法,其中所述肽是根据式VI:

$R^1-X-Y-R^2$  (VI) (SEQ ID NO:6)

或其药学上可接受的盐,其中:

$R^1$ 是氢、异戊酸、异丁酸或乙酰基;

$R^2$ 是-NH<sub>2</sub>或-OH;

X是具有式VII的肽序列:

X1-Thr-His-X4-X5-Cys-Ile-X8-Phe-X10 (VII) (SEQ ID NO:7)

其中

X1是Asp、Ida、pGlu、bhAsp或不存在;

X4是Phe或Dpa;

X5是Pro或bhPro;

X8是Ile、Lys、Glu、Phe、Gln或Arg;以及

X10是Lys或不存在;

其中Y是具有式VIII的肽序列:

Y1-Pro-Y3-Ser-Y5-Y6-Y7-Y8-Cys-Y10 (VIII) (SEQ ID NO:8)

其中

Y1是Gly、Glu、Val或Lys;

Y3是Arg或Lys;

Y5是Arg或Lys；  
Y6是Gly、Ser、Lys、Ile或Arg；  
Y7是Trp或不存在；  
Y8是Val、Thr、Asp、Glu或不存在；以及  
Y10是Lys或不存在；  
其中所述肽在两个Cys之间包含二硫键；  
其中所述式I的肽任选地在R<sup>1</sup>、X或Y上被聚乙二醇化；  
其中所述肽的氨基酸的侧链任选地缀合至亲脂性取代基或聚合部分；以及  
其中Ida为亚氨基二乙酸；pGlu是焦谷氨酸；bhAsp是β-高天冬氨酸；并且bhPro是β-高脯氨酸。

6. 如权利要求1-2中任一项所述的方法，其中所述肽包含以下序列之一：

DTHFPICIFGPRSKGWVC (SEQ ID NO:9)；  
DTHFPCIIFGPRSKGWVCK (SEQ ID NO:10)；  
DTHFPCIIFEPRSKGWVCK (SEQ ID NO:11)；  
DTHFPCIIFGPRSKGWACK (SEQ ID NO:12)；  
DTHFPCIIFGPRSKGWVCKK (SEQ ID NO:13)；  
DTHFPCIIFVCHRPKGCYRRVCR (SEQ ID NO:14)；  
DTHFPCIKFGPRSKGWVCK (SEQ ID NO:15)；  
DTHFPCIKFKPRSKGWVCK (SEQ ID NO:16)；  
DTHFPCIIFGPRSRGWVCK (SEQ ID NO:17)；  
DTHFPCIKFGPKSKGWVCK (SEQ ID NO:18)；  
DTHFPCIKFEPRSKGCK (SEQ ID NO:19)；  
DTHFPCIKFEPKSKGWECK (SEQ ID NO:20)；  
DTHFPCIKFEPRSKKCK (SEQ ID NO:21)；  
DTHFPCIKFEPRSKGCK (SEQ ID NO:22)；  
DTHFPCIKFKPRSKGCK (SEQ ID NO:23)；  
DTHFPCIKFEPKSKGCK (SEQ ID NO:24)；  
DTHFPCIKF (SEQ ID NO:25)；  
DTHFPCIIF (SEQ ID NO:26)；或  
DTKFPCIIF (SEQ ID NO:27)；

其中所述肽任选地在R<sup>1</sup>、X或Y上被聚乙二醇化，并且其中所述肽的氨基酸的侧链任选地缀合至亲脂性取代基或聚合部分。

7. 如权利要求1-2中任一项所述的方法，其中所述铁调素类似物包含以下序列之一：

异戊酸-DTHFPICIFGPRSKGWVC-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:9)；  
异戊酸-DTHFPCIIFGPRSKGWVCK-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:10)；  
异戊酸-DTHFPCIIFEPRSKGWVCK-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:11)；  
异戊酸-DTHFPCIIFGPRSKGWACK-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:12)；  
异戊酸-DTHFPCIIFGPRSKGWVCKK-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:13)；  
异戊酸-DTHFPCIIFVCHRPKGCYRRVCR-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:14)；

异戊酸-DTHFPCI (K (PEG8)) FGPRSKGWVCK-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:28) ;  
异戊酸-DTHFPCIKF (K (PEG8)) PRSKGWVCK-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:16) ;  
异戊酸-DTHFPICIFGPRS (K (PEG8)) GWVC-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:29) ;  
异戊酸-DTHFPICIFGPRS (K (PEG4)) GWVC-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:30) ;  
异戊酸-DTHFPCIIFGPRSRGWVC (K (PEG8)) -NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:31) ;  
异戊酸-DTHFPCIIFGPRSRGWVC (K (PEG4)) -NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:32) ;  
异戊酸-DTHFPCIIFGPRSRGWVC (K (PEG2)) -NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:33) ;  
异戊酸-DTHFPCI (K (Pal)) FGPRSKGWVCK-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:34) ;  
异戊酸-DTHFPCIKF (K (Pal)) PRSKGWVCK-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:35) ;  
异戊酸-DTHFPCIKFGP (K (Pal)) SKGWVCK-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:36) ;  
异戊酸-DTHFPCIKFGPRS (K (Pal)) GWVCK-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:37) ;  
异戊酸-DTHFPCIKFGPRSKGWVC (K (Pal)) NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:38) ;  
异戊酸-DTHFPCI (K (PEG3-Pal)) FGPRSKGWVCK-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:39) ;  
异戊酸-DTHFPCIKF (K (PEG3-Pal)) PRSKGWVCK-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:40) ;  
异戊酸-DTHFPCIKFGP (K (PEG3-Pal)) SKGWVCK-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:41) ;  
异戊酸-DTHFPCIKFGPRS (K (PEG3-Pal)) GWVCK-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:42) ;  
异戊酸-DTHFPCIKFGPRSKGWVC (K (PEG3-Pal)) -NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:43) ;  
异戊酸-DTHFPCIKFGPRSKGWVC (K (PEG8)) -NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:44) ;  
异戊酸-DTHFPCI (K (isoGlu-Pal)) FEPRSKGCK-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:45) ;  
异戊酸-DTHFPCIKF-K (isoGlu-Pal) -PRSKGCK-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:46) ;  
异戊酸-DTHFPCIKFEP (K (isoGlu-Pal)) SKGCK-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:47) ;  
异戊酸-DTHFPCIKFEP (K (isoGlu-Pal)) SKGWECK-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:20) ;  
异戊酸-DTHFPCIKFEP (K (isoGlu-Pal)) GCK-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:48) ;  
异戊酸-DTHFPCIKFEP (K (isoGlu-Pal)) CK-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:21) ;  
异戊酸-DTHFPCIKFEP (K (isoGlu-Pal)) SKGCK-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:49) ;  
异戊酸-DTHFPCI-K (Dapa-Pal) -FEPRSKGCK-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:50) ;  
异戊酸-DTHFPCIK (F (Dapa-Pal)) PRSKGCK-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:23) ;  
异戊酸-DTHFPCIKFEP (K (Dapa-Pal)) SKGCK-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:24) ;  
异戊酸-DTHFPCIKFEP (K (Dapa-Pal)) GCK-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:51) ;  
异戊酸-DTHFPCIKFEP (K (Dapa-Pal)) CK-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:52) ;  
异戊酸-DTHFPCIKFEP (K (Dapa-Pal)) K-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:53) ;  
异戊酸-DTHFPCIKFEP (K (Dapa-Pal)) -NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:54) ;  
异戊酸-DTHFPCIKF (K (PEG11-Pal)) PRSK[Sar]CK-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:55) ;  
异戊酸-DTHFPCIKF-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:25) ;  
Hy-DTHFPCIKF-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:25) ;  
异戊酸-DTHFPCIIF-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:26) ;  
Hy-DTHFPCIIF-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:26) ;  
异戊酸-DTKFPCIIF-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:27) ;或  
Hy-DTKFPCIIF-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:27) 。

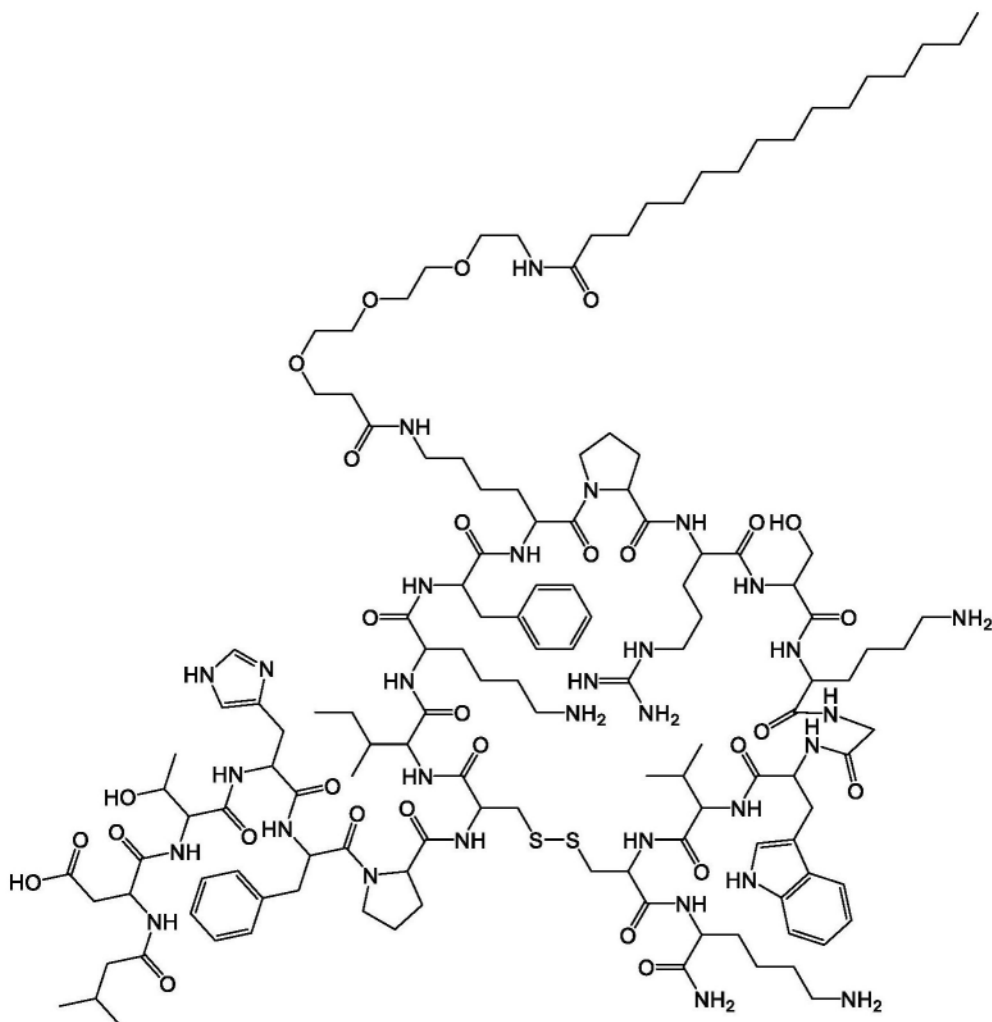
8. 如权利要求1-2中任一项所述的方法,其中所述铁调素类似物是:异戊酸-DTHFPCIIFGPRSKGWVCK-NH<sub>2</sub>(SEQ ID NO:10)或其药学上可接受的盐。
9. 如权利要求1-2中任一项所述的方法,其中所述铁调素类似物是:异戊酸-DTHFPCIIFEPRSKGWVCK-NH<sub>2</sub>(SEQ ID NO:11)或其药学上可接受的盐。
10. 如权利要求1-2中任一项所述的方法,其中所述铁调素类似物是:异戊酸-DTHFPCI(K(PEG8))FGPRSKGWVCK-NH<sub>2</sub>(SEQ ID NO:28)或其药学上可接受的盐。
11. 如权利要求1-2中任一项所述的方法,其中所述铁调素类似物是:异戊酸-DTHFPCIKF(K(PEG8))PRSKGWVCK-NH<sub>2</sub>(SEQ ID NO:16)或其药学上可接受的盐。
12. 如权利要求1-2中任一项所述的方法,其中所述铁调素类似物是:异戊酸-DTHFPCIIFGPRSRGWVC(K(PEG8))-NH<sub>2</sub>(SEQ ID NO:31)或其药学上可接受的盐。
13. 如权利要求1-2中任一项所述的方法,其中所述铁调素类似物是:异戊酸-DTHFPCI(K(Palm))FGPRSKGWVCK-NH<sub>2</sub>(SEQ ID NO:34)或其药学上可接受的盐。
14. 如权利要求1-2中任一项所述的方法,其中所述铁调素类似物是:异戊酸-DTHFPCIKF(K(Palm))PRSKGWVCK-NH<sub>2</sub>(SEQ ID NO:35)或其药学上可接受的盐。
15. 如权利要求1-2中任一项所述的方法,其中所述铁调素类似物是:异戊酸-DTHFPCIKFGP(K(Palm))SKGWVCK-NH<sub>2</sub>(SEQ ID NO:36)或其药学上可接受的盐。
16. 如权利要求1-2中任一项所述的方法,其中所述铁调素类似物是:异戊酸-DTHFPCIKFGPRSKGWVC(K(Palm))-NH<sub>2</sub>(SEQ ID NO:38)或其药学上可接受的盐。
17. 如权利要求1-2中任一项所述的方法,其中所述铁调素类似物是:异戊酸-DTHFPCI(K(PEG3-Palm))FGPRSKGWVCK-NH<sub>2</sub>(SEQ ID NO:39)或其药学上可接受的盐。
18. 如权利要求1-2中任一项所述的方法,其中所述铁调素类似物是:异戊酸-DTHFPCIKF(K(PEG3-Palm))PRSKGWVCK-NH<sub>2</sub>(SEQ ID NO:40)或其药学上可接受的盐。
19. 如权利要求1-2中任一项所述的方法,其中所述铁调素类似物是:异戊酸-DTHFPCIKFGP(K(PEG3-Palm))SKGWVCK-NH<sub>2</sub>(SEQ ID NO:41)或其药学上可接受的盐。
20. 如权利要求1-2中任一项所述的方法,其中所述铁调素类似物是:异戊酸-DTHFPCIKFGPRS(K(PEG3-Palm))GWVCK-NH<sub>2</sub>(SEQ ID NO:42)或其药学上可接受的盐。
21. 如权利要求1-2中任一项所述的方法,其中所述铁调素类似物是:异戊酸-DTHFPCIKFGPRSKGWVC(K(PEG3-Palm))-NH<sub>2</sub>(SEQ ID NO:43)或其药学上可接受的盐。
22. 如权利要求1-2中任一项所述的方法,其中所述铁调素类似物是:异戊酸-DTHFPCIKFGPRSKGWVC(K(PEG8))-NH<sub>2</sub>(SEQ ID NO:44)或其药学上可接受的盐。
23. 如权利要求1-2中任一项所述的方法,其中所述铁调素类似物是:异戊酸-DTHFPCI(K(isoGlu-Palm))FEPRSKGCK-NH<sub>2</sub>(SEQ ID NO:45)或其药学上可接受的盐。
24. 如权利要求1-2中任一项所述的方法,其中所述铁调素类似物是:异戊酸-DTHFPCIKF(K(isoGlu-Palm))PRSKGCK-NH<sub>2</sub>(SEQ ID NO:46)或其药学上可接受的盐。
25. 如权利要求1-2中任一项所述的方法,其中所述铁调素类似物是:异戊酸-DTHFPCIKFEP(K(isoGlu-Palm))SKGCK-NH<sub>2</sub>(SEQ ID NO:47)或其药学上可接受的盐。
26. 如权利要求1-2中任一项所述的方法,其中所述铁调素类似物是:异戊酸-DTHFPCIKFEPRS(K(isoGlu-Palm))GCK-NH<sub>2</sub>(SEQ ID NO:48)或其药学上可接受的盐。
27. 如权利要求1-2中任一项所述的方法,其中所述铁调素类似物是:异戊酸-DTHFPCI

(K (Dapa-Pa1m)) FEPRSKGCK-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:50) 或其药学上可接受的盐。

28. 如权利要求1-2中任一项所述的方法, 其中所述铁调素类似物是: 异戊酸-DTHFPCIKFEP (K (Dapa-Pa1m)) SKGCK-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:24) 或其药学上可接受的盐。

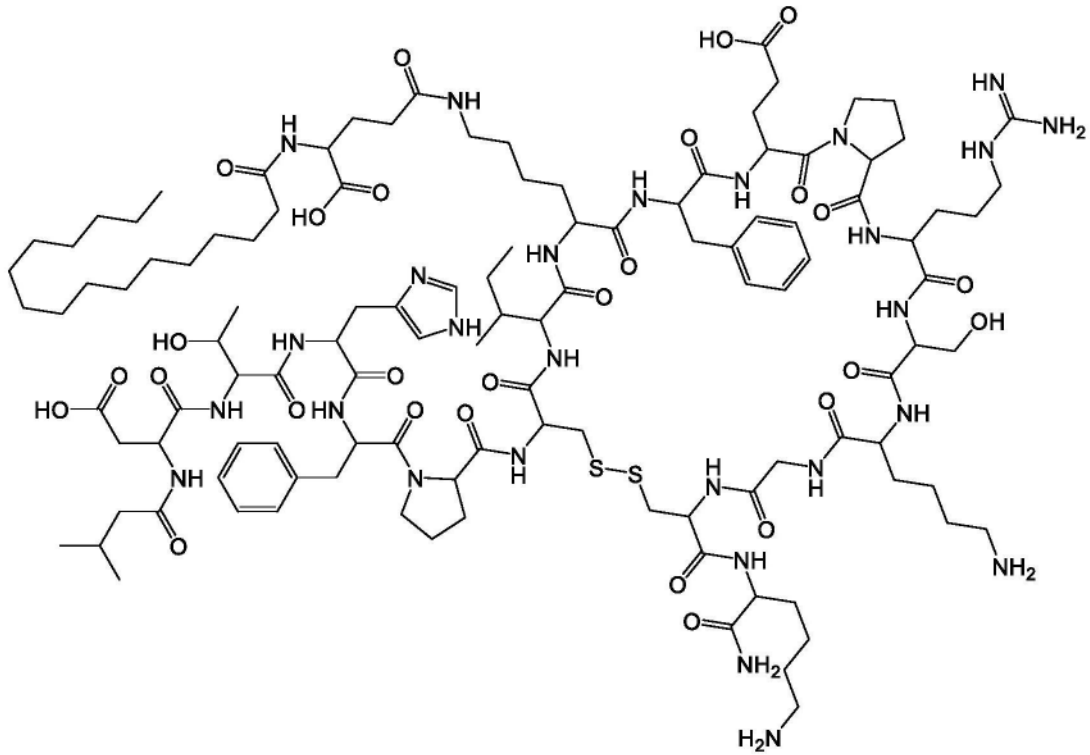
29. 如权利要求1-2中任一项所述的方法, 其中所述铁调素类似物选自由以下组成的组:

(a)



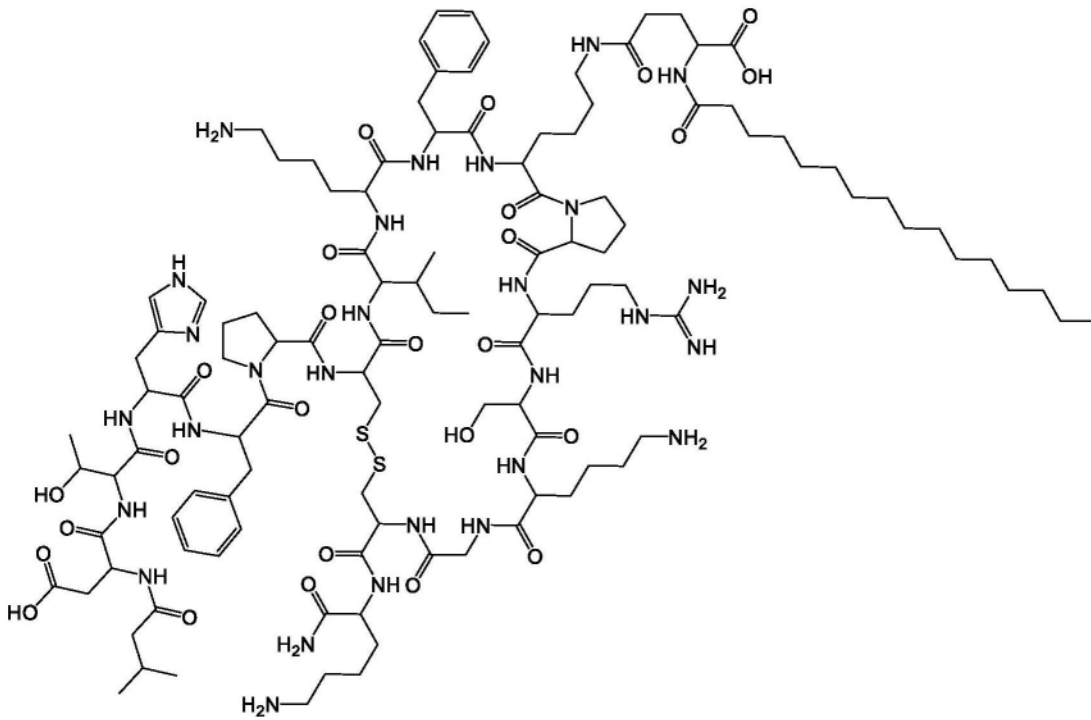
异戊酸-DTHFPCIKF (K (PEG3-Pa1m)) PRSKGWVCK-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:40) ;

(b)



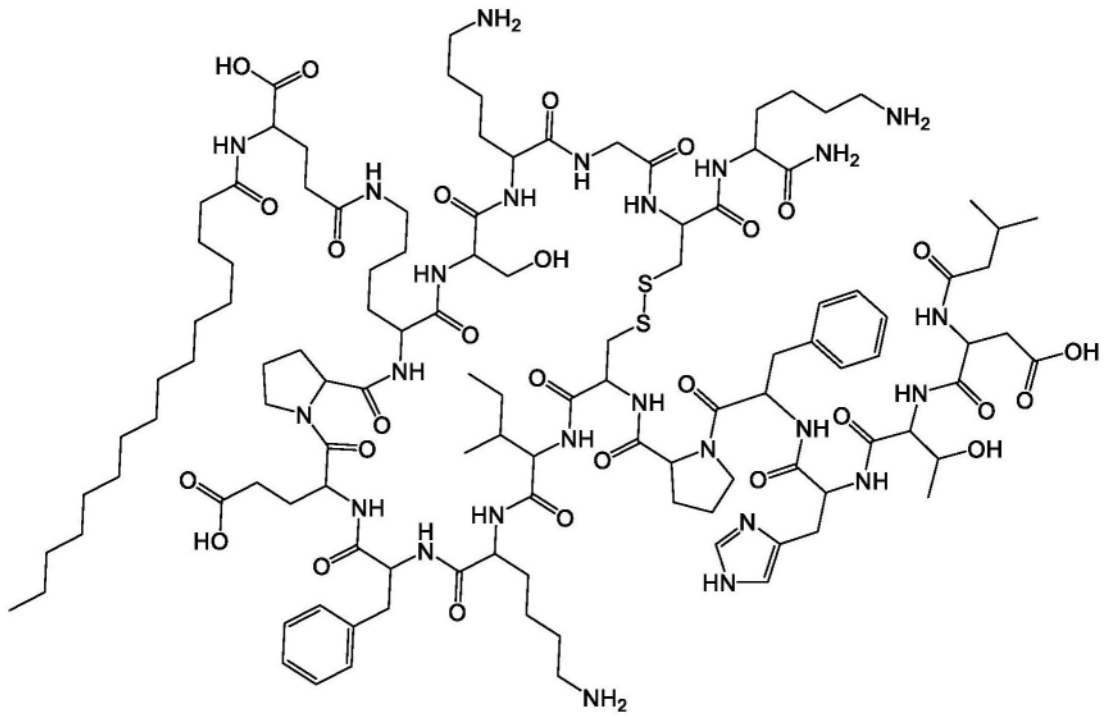
异戊酸-DTHFPCI (K (isoGlu-Palm)) FEPRSGCK-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:45) ;

(c)

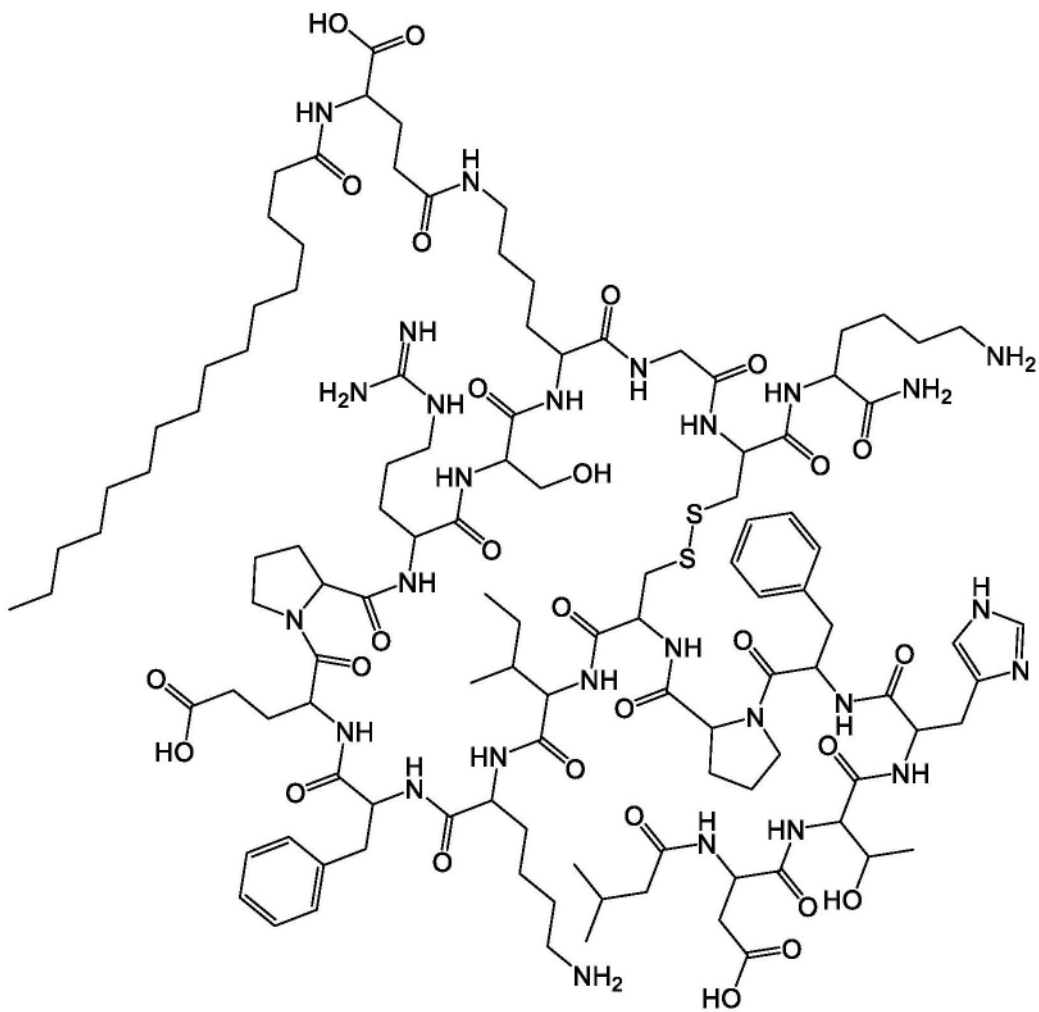


异戊酸-DTHFPCIKF (K (isoGlu-Palm)) PRSGCK-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:46) ;

(d)



异戊酸-DTHFPCIKFEP (K (isoGlu-Palm)) SKGCK-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:47); 以及  
(e)



异戊酸-DTHFPCIKFEPRS (K(isoGlu-Palm))GCK-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:48),  
其中所述氨基酸是L-氨基酸,及其药学上可接受的盐。

30. 如权利要求1-29中任一项所述的方法,其中将所述铁调素类似物以包含一种或多种药学上可接受的载剂、赋形剂或稀释剂的药物组合物施用给所述受试者。

31. 如权利要求30所述的方法,其中所述药物组合物通过口服、静脉内、腹膜内、皮内、皮下、肌内、鞘内、吸入、汽化、雾化、舌下、口颊、肠胃外、直肠、阴道或局部施用途径提供给所述受试者。

32. 如权利要求31所述的方法,其中所述药物组合物通过口服或皮下施用途径提供给所述受试者。

33. 如权利要求1-32中任一项所述的方法,其中所述铁调素类似物或药物组合物最多每周两次或最多每周一次提供给所述受试者。

34. 如权利要求1-33中任一项所述的方法,其中所述铁调素类似物是以约10mg至约100mg、约10mg至约70mg、约10mg至约60mg、约20mg至约50mg、约20mg至约40mg、约80mg、约70mg、约60mg、约50mg、约40mg、约30mg、约25mg、约20mg、约15mg或约10mg的剂量提供给所述受试者。

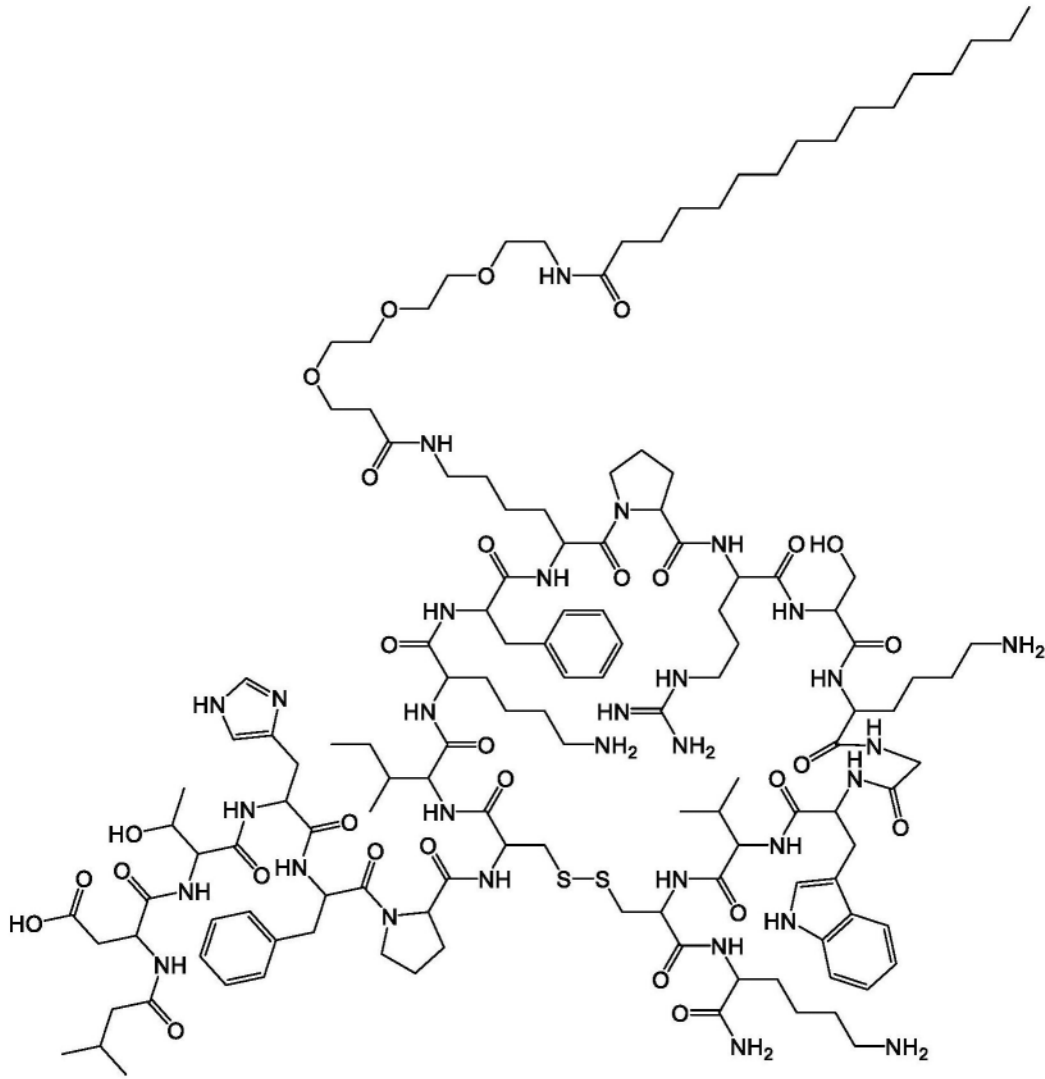
35. 如权利要求1-33中任一项所述的方法,其中所述肽或所述药物组合物以约10mg、约15mg、约20mg、约25mg、约30mg、约35mg或约40mg的剂量提供给所述受试者。

36. 如权利要求1-33中任一项所述的方法,其中所述肽或所述药物组合物以约15mg、约20mg、约25mg、约30mg或约40mg的剂量约每周一次提供给所述受试者。

37. 如权利要求1-33中任一项所述的方法,其中所述肽或所述药物组合物以约15mg、约20mg、约25mg、约30mg或约40mg的剂量约每周两次提供给所述受试者。

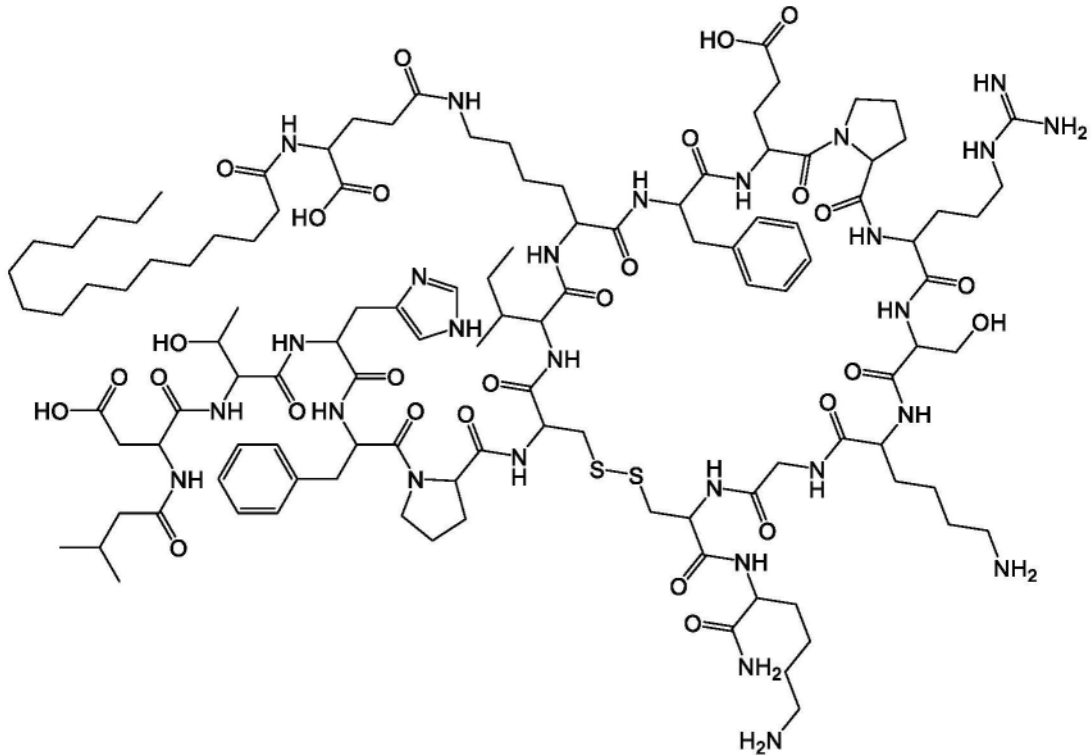
38. 如权利要求1所述的方法,其包括向所述受试者施用有效量的铁调素类似物,其中所述铁调素类似物选自自由以下组成的组:

(a)



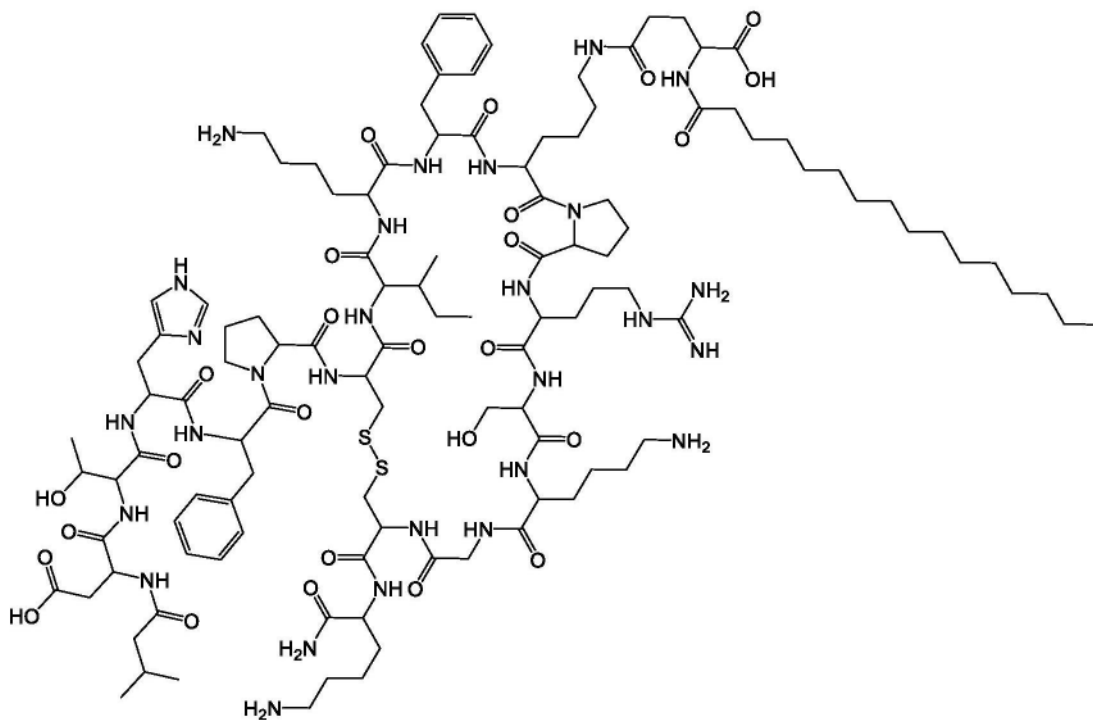
异戊酸-DTHFPCIKF (K (PEG3-Palm)) PRSKGWVCK-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:40) 或其药学上可接受的盐;

(b)

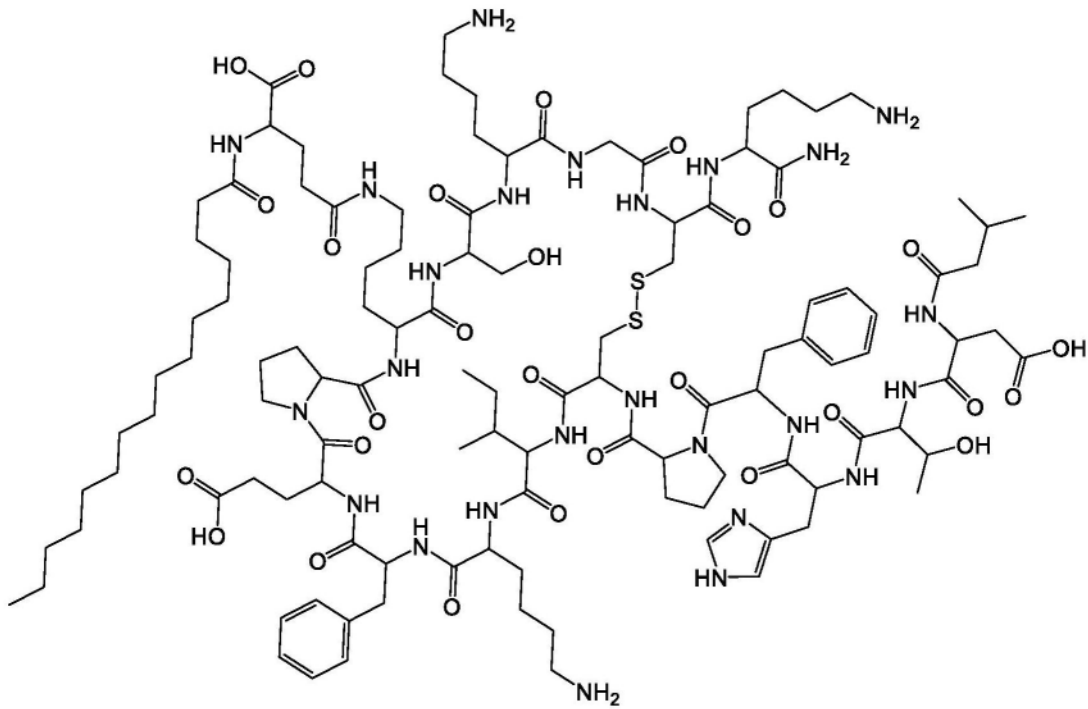


异戊酸-DTHFPCI (K(isoGlu-Palm)) FEPRSKGCK-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:45) 或其药学上可接受的盐;

(c)

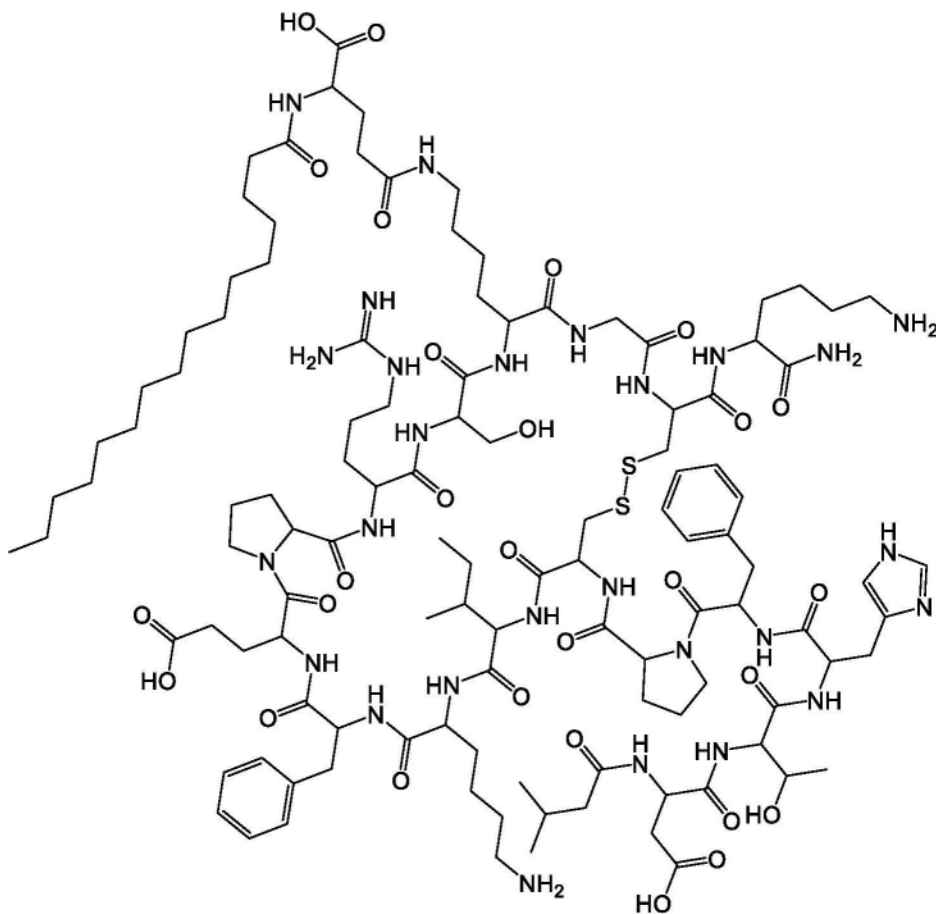


异戊酸-DTHFPCIK (K(isoGlu-Palm)) PRSKGCK-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:46) 或其药学上可接受的盐; (d)



异戊酸-DTHFPCIKFEP (K (isoGlu-Palm) )SKGCK-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:47) 或其药学上可接受的盐; 以及

(e)



异戊酸-DTHFPCIKFEPRS (K (isoGlu-Palm) )GCK-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:48) 或其药学上可接受的

的盐，

其中所述氨基酸是L-氨基酸；

任选地其中所述铁调素类似物包含两个Cys氨基酸之间的二硫键；

其中所述铁调素类似物或其药学上可接受的盐以约5mg至约200mg、约10mg、约15mg、约20mg、约25mg、约30mg、约35mg、约40mg、约50mg、约60mg、约70mg或约80mg的剂量约每周一次提供给所述受试者；

其中所述铁调素类似物或其药学上可接受的盐通过皮下施用途径提供给所述受试者；

其中所述受试者是人；

任选地，其中所述铁调素类似物或其药学上可接受的盐存在于还包含药学上可接受的载剂、赋形剂或稀释剂的药物组合物中。

39. 如权利要求1-33或38中任一项所述的方法，其中所述铁调素类似物或其药学上可接受的盐以约10mg的剂量提供给所述受试者。

40. 如权利要求1-33或38中任一项所述的方法，其中所述铁调素类似物或其药学上可接受的盐以约15mg的剂量提供给所述受试者。

41. 如权利要求1-33或38中任一项所述的方法，其中所述铁调素类似物或其药学上可接受的盐以约20mg的剂量提供给所述受试者。

42. 如权利要求1-33或38中任一项所述的方法，其中所述铁调素类似物或其药学上可接受的盐以约25mg的剂量提供给所述受试者。

43. 如权利要求1-33或38中任一项所述的方法，其中所述铁调素类似物或其药学上可接受的盐以约30mg的剂量提供给所述受试者。

44. 如权利要求1-33或38中任一项所述的方法，其中所述铁调素类似物或其药学上可接受的盐以约40mg的剂量提供给所述受试者。

45. 如权利要求1-33或38中任一项所述的方法，其中所述铁调素类似物或其药学上可接受的盐以约50mg的剂量提供给所述受试者。

46. 如权利要求1-33或38中任一项所述的方法，其中所述铁调素类似物或其药学上可接受的盐以约60mg的剂量提供给所述受试者。

47. 如权利要求1-33或38中任一项所述的方法，其中所述铁调素类似物或其药学上可接受的盐以约70mg的剂量提供给所述受试者。

48. 如权利要求1-33或38中任一项所述的方法，其中所述铁调素类似物或其药学上可接受的盐以约80mg的剂量提供给所述受试者。

49. 如权利要求38-48中任一项所述的方法，其中所述铁调素类似物是：异戊酸-DTHFPCIKF (K (PEG3-Palm)) PRSKGWVCK-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:40) 或其药学上可接受的盐。

50. 如权利要求38-48中任一项所述的方法，其中所述铁调素类似物是：异戊酸-DTHFPCI (K (isoGlu-Palm)) FEPRSKGCK-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:45) 或其药学上可接受的盐。

51. 如权利要求38-48中任一项所述的方法，其中所述铁调素类似物是：异戊酸-DTHFPCIKF (K (isoGlu-Palm)) PRSKGCK-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:46) 或其药学上可接受的盐。

52. 如权利要求38-48中任一项所述的方法，其中所述铁调素类似物是：异戊酸-DTHFPCIKFEP (K (isoGlu-Palm)) SKGCK-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:47) 或其药学上可接受的盐。

53. 如权利要求38-48中任一项所述的方法，其中所述铁调素类似物是：异戊酸-

DTHFPCIKFEPRS (K (isoGlu-Palm)) GCK-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:48) 或其药学上可接受的盐。

54. 如权利要求1-53中任一项所述的方法,其中所述真性红细胞增多症是需要放血的真性红细胞增多症。

55. 如权利要求1-54中任一项所述的方法,其中所述真性红细胞增多症是低风险患者中需要放血的真性红细胞增多症。

56. 如权利要求1-54中任一项所述的方法,其中所述受试者是低风险真性红细胞增多症患者或高风险真性红细胞增多症患者。

57. 如权利要求1-56中任一项所述的方法,其中所述受试者是有症状的需要放血的真性红细胞增多症患者。

58. 如权利要求1-54中任一项所述的方法,其中所述受试者是需要放血的真性红细胞增多症的低风险患者或需要放血的真性红细胞增多症的高风险患者。

59. 如权利要求1-58中任一项所述的方法,其中所述受试者被诊断患有真性红细胞增多症并且在向所述受试者施用所述药物组合物之前的24周内已经接受至少三次放血以达到目标血细胞比容 $\leq 45\%$ 。

60. 如权利要求1-33、38和49-59中任一项所述的方法,其中向所述受试者施用药约5mg至约200mg所述铁调素类似物或其药学上可接受的盐。

61. 如权利要求1-33、38和49-59中任一项所述的方法,其中向所述受试者施用药约10mg至约100mg所述铁调素类似物或其药学上可接受的盐。

62. 如权利要求1-33、38和49-59中任一项所述的方法,其中向所述受试者施用药约20mg至约100mg所述铁调素类似物或其药学上可接受的盐。

63. 如权利要求1-33、38和49-59中任一项所述的方法,其中向所述受试者施用药约20mg所述铁调素类似物或其药学上可接受的盐。

64. 如权利要求1-33、38和49-59中任一项所述的方法,其中向所述受试者施用药约40mg所述铁调素类似物或其药学上可接受的盐。

65. 如权利要求1-33、38和49-59中任一项所述的方法,其中向所述受试者施用药约80mg所述铁调素类似物或其药学上可接受的盐。

66. 如权利要求1-33、38和49-59中任一项所述的方法,其中向所述受试者施用药约100mg所述铁调素类似物或其药学上可接受的盐。

67. 如权利要求1-33、38和49-59中任一项所述的方法,其中向所述受试者施用药约120mg所述铁调素类似物或其药学上可接受的盐。

68. 如权利要求1-67中任一项所述的方法,其中所述铁调素类似物或其药学上可接受的盐或药物组合物通过皮下注射施用。

69. 如权利要求1-68中任一项所述的方法,其中所述铁调素类似物或其药学上可接受的盐或药物组合物在一段时间内约每周施用。

70. 如权利要求1-69中任一项所述的方法,其中所述铁调素类似物或其药学上可接受的盐的量在一段时间内增加。

71. 如权利要求1-69中任一项所述的方法,其还包括在施用所述铁调素类似物或其药学上可接受的盐后的一个或多个时间点测定所述受试者的血细胞比容,以及维持或调节施用于所述受试者的所述铁调素类似物或其药学上可接受的盐的量,其中如果所述受试者测

定的血细胞比容大于45,则增加所述量,其中如果所述受试者测定的血细胞比容小于37.5或40,则减少所述量,而如果所述受试者测定的血细胞比容在37.5和45之间或在40和44之间,则维持所述量。

72.如权利要求1-71中任一项所述的方法,其中所述受试者是哺乳动物。

73.如权利要求1-72中任一项所述的方法,其中所述受试者是人。

74.如权利要求72或权利要求73所述的方法,其中所述受试者通过细胞减灭疗法,任选地羟基脲来治疗。

75.如权利要求1-74中任一项所述的方法,其中所述方法导致所述受试者的血细胞比容水平降低至 $\leq 45\%$ 。

76.如权利要求1-75中任一项所述的方法,其中所述方法导致血细胞比容降低至少3%。

77.如权利要求1-76中任一项所述的方法,其中所述方法导致所述受试者中血清铁蛋白的增加。

78.如权利要求1-77中任一项所述的方法,其中所述方法不显著地改变所述受试者的血小板计数。

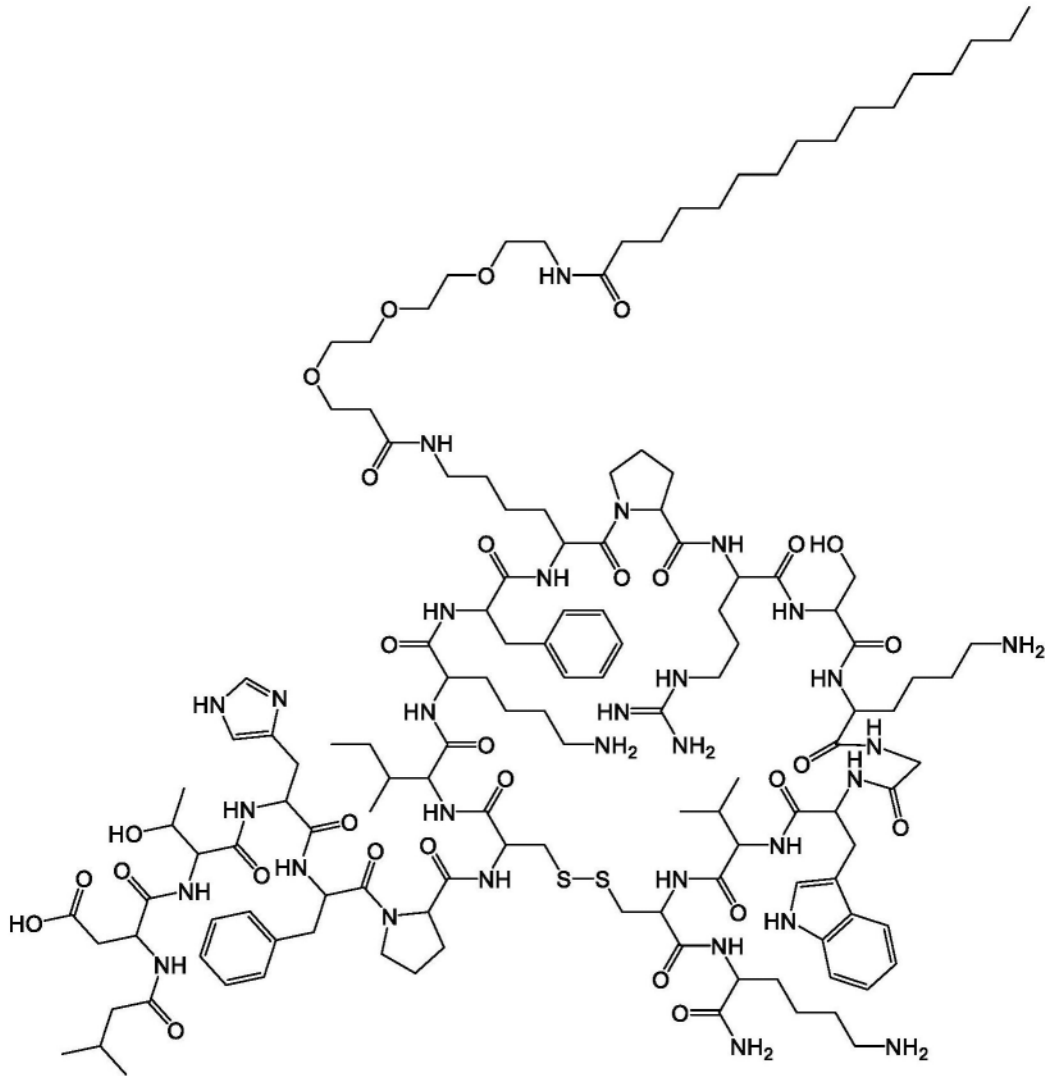
79.如权利要求1-78中任一项所述的方法,其中所述方法不显著地增加所述受试者血液或血清中的白细胞(leukocyte)或白细胞(white blood cell)。

80.如权利要求1-79中任一项所述的方法,其中所述受试者在治疗过程期间保持不放血,例如治疗约每周一次、约每两周一次或约每月一次,持续一段时间。

81.如权利要求1-80中任一项所述的方法,其中所述方法包括在一段时间内多次施用有效量的所述铁调素类似物或其药学上可接受的盐,任选地其中在所述时间段内约每周一次向所述受试者施用所述铁调素类似物或其药学上可接受的盐。

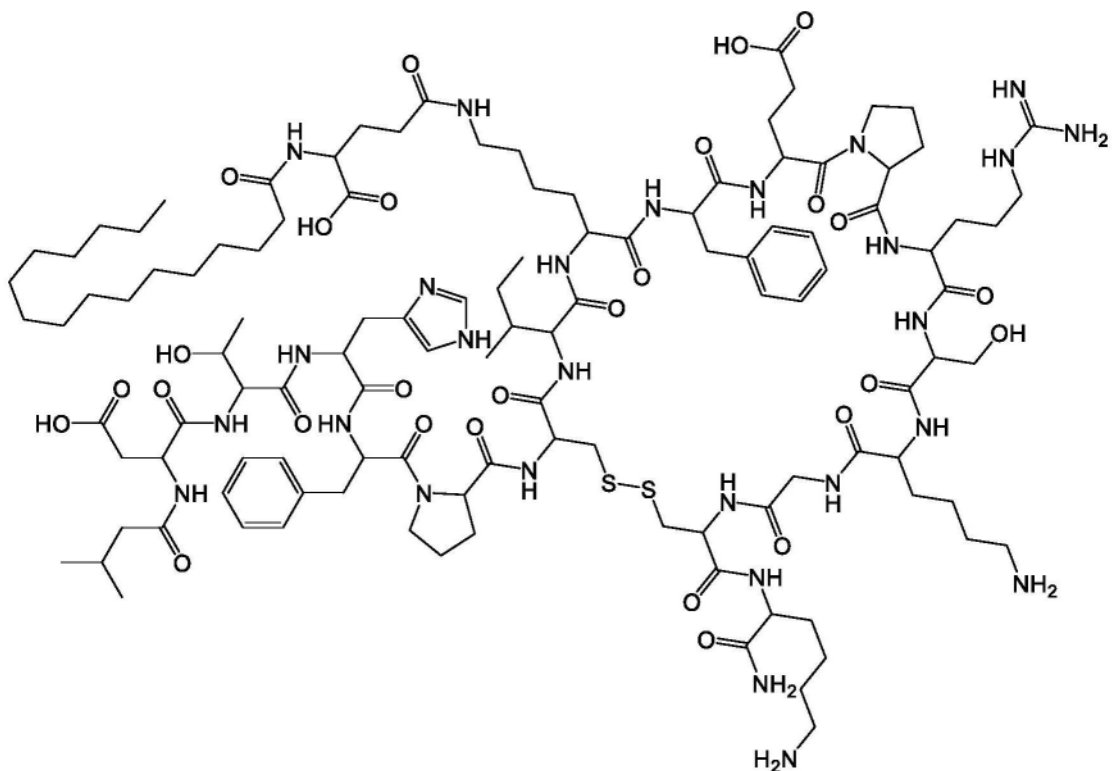
82.如权利要求81所述的方法,其中所述铁调素类似物选自以下组成的组:

(a)



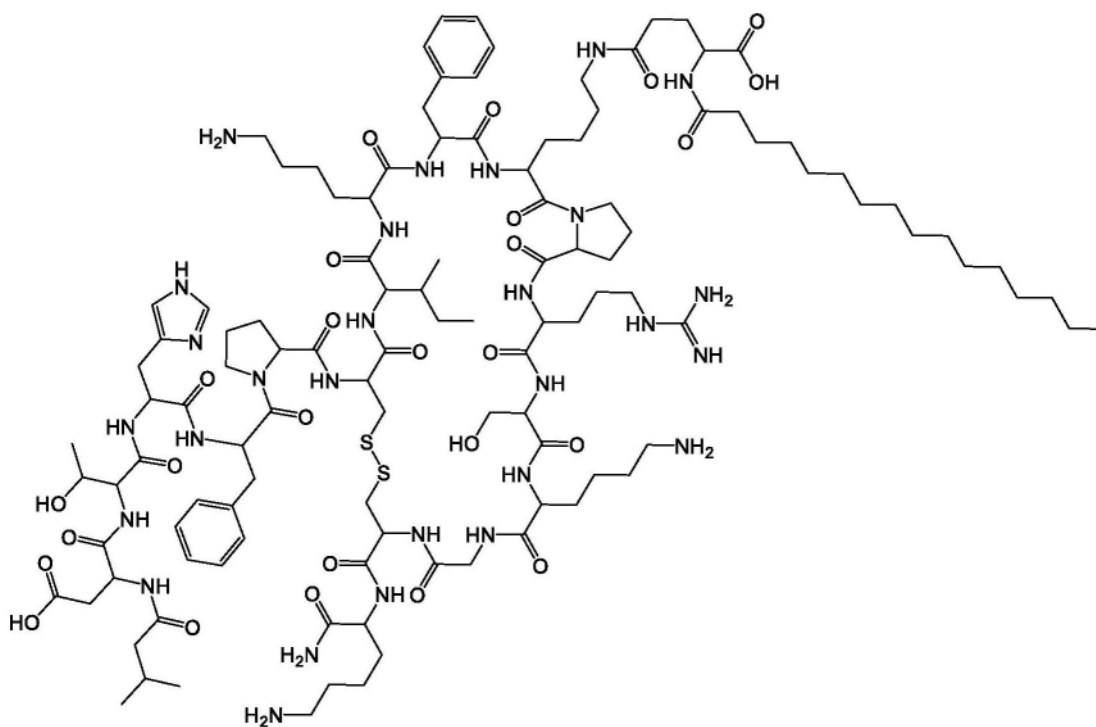
异戊酸-DTHFPCIKF (K (PEG3-Pal<sub>m</sub>)) PRSKGWVCK-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:40) 或其药学上可接受的盐;

(b)



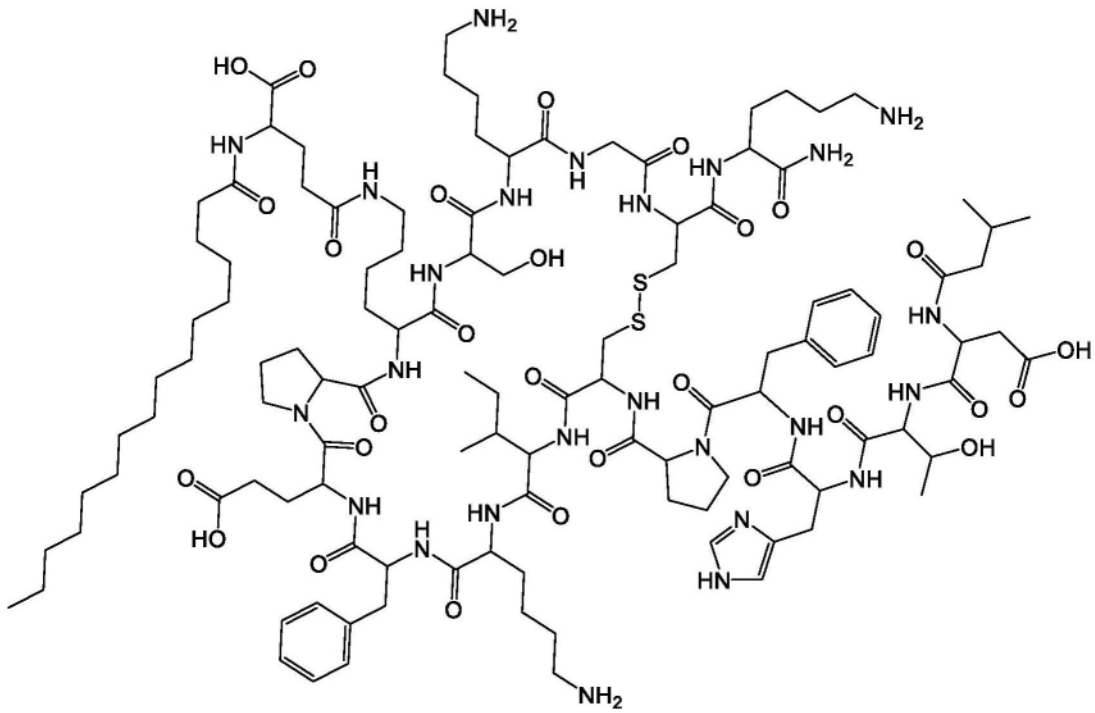
异戊酸-DTHFPCI (K(isoGlu-Palm)) FEPRSGKCK-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:45) 或其药学上可接受的盐;

(c)



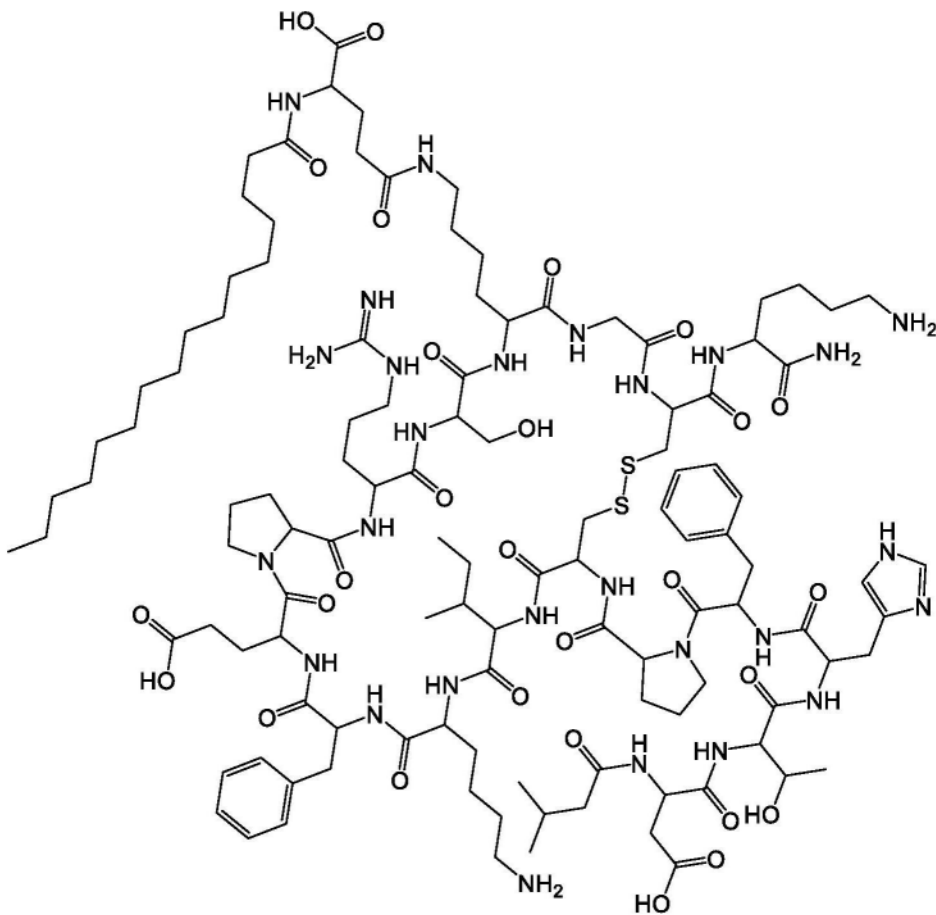
异戊酸-DTHFPCIKF (K(isoGlu-Palm)) PRSGKCK-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:46) 或其药学上可接受的盐;

(d)



异戊酸-DTHFPCIKFEP (K (isoGlu-Palm)) SKGCK-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:47) 或其药学上可接受的盐; 以及

(e)



异戊酸-DTHFPCIKFEPRS (K (isoGlu-Palm)) GCK-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:48) 或其药学上可接受的

的盐，

其中所述氨基酸是L-氨基酸；

任选地其中所述铁调素类似物包含两个Cys氨基酸之间的二硫键；

其中所述铁调素类似物或其药学上可接受的盐以约10mg、约15mg、约20mg、约25mg、约30mg、约35mg、约40mg、约50mg、约60mg、约70mg或约80mg的剂量在一段时间内约每周一次提供给所述受试者；

其中所述铁调素类似物或其药学上可接受的盐通过皮下施用途径提供给所述受试者；

其中所述受试者是人；

任选地，其中所述铁调素类似物或其药学上可接受的盐存在于还包含药学上可接受的载剂、赋形剂或稀释剂的药物组合物中；

其中所述方法还包括在所述多次施用所述铁调素类似物或其药学上可接受的盐中的一次或多次后测定所述受试者的血细胞比容，以及维持或调节施用于所述受试者的所述铁调素类似物或其药学上可接受的盐的量，其中如果所述受试者测定的血细胞比容高于基于所述受试者性别和怀孕状态的可接受范围，则下一次施用量增加，其中如果所述受试者测定的血细胞比容低于所述可接受的范围，则下一次施用量降低，而如果所述受试者测定的血细胞比容在所述可接受的范围内，则下一次施用量与先前施用量相同。

## 缀合的铁调素模拟物

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2019年9月3日提交的美国临时申请号62/895,201、2020年2月28日提交的美国临时申请号62/983,515、2020年5月6日提交的美国临时申请号63/020,945和2020年7月31日提交的美国临时申请号63/059,747的优先权,所有这些通过引用整体并入本文。

[0003] 序列列表

[0004] 本申请包含以ASCII格式通过电子方式提交的序列列表,该序列列表通过引用整体并入本文。创建于2020年9月1日的所述ASCII副本被命名为PRTH\_037\_05W0\_ST25.txt,并且大小为25KB。

### 技术领域

[0005] 本发明尤其涉及某些铁调素肽类似物,包括肽单体和肽二聚体,及其缀合物和衍生物,并且涉及所述肽类似物在治疗和/或预防真性红细胞增多症(PV)中的用途。

### 背景技术

[0006] 铁调素(也称为LEAP-1),一种由肝脏产生的肽激素,是人和其他哺乳动物中铁稳态的调节剂。铁调素通过与其受体铁输出通道铁转运蛋白结合起作用,引起其内化和降解。人铁调素是25个氨基酸肽(Hep25)。参见Krause等人(2000)FEBS Lett 480:147-150,和Park等人(2001)J Biol Chem 276:7806-7810。铁调素的生物活性25个氨基酸形式的结构是具有形成4个二硫键的8个半胱氨酸的简单发夹,如Jordan等人J Biol Chem 284:24155-67所述。N末端区域是铁调节功能所需的,并且5个N末端氨基酸残基的缺失导致铁调节功能的丧失。参见Nemeth等人(2006)Blood 107:328-33。

[0007] 异常铁调素活性与铁过载疾病相关,包括遗传性血色素沉着症(HH)和铁负载性贫血。遗传性血色素沉着病是主要由铁调素缺乏或在一些情况下由铁调素抗性引起的遗传性铁过载疾病。这允许从饮食中过量吸收铁和产生铁过载。HH的临床表现可包括肝病(例如肝硬化和肝细胞癌)、糖尿病和心力衰竭。目前,HH的唯一治疗是定期放血,这对患者来说是非常麻烦的。铁负载性贫血是红细胞生成无效的遗传性贫血,例如 $\beta$ -地中海贫血,其伴随严重的铁过载。铁过载引起的并发症是这些患者发病和死亡的主要原因。铁调素缺乏是非输血患者铁过载的主要原因,并导致输血患者铁过载。目前对这些患者的铁过载的治疗是铁螯合,这是非常麻烦的,有时是无效的,并伴有频繁的副作用。铁调素具有许多限制其作为药物的限制,包括部分由于蛋白质在折叠过程中的聚集和沉淀而难以合成的过程,这又导致高产品成本。

[0008] 美国专利US 9,822,157和US 10,030,061描述了新的铁调素类似物及其治疗铁过载疾病的用途,所述铁过载疾病包括遗传性血色素沉着病和铁负载性贫血。

[0009] PCT申请公开W015200916描述了另外的新的铁调素类似物及其治疗铁过载疾病的用途。

[0010] PCT申请公开W017117411描述了具有改善的体内半衰期的另外的新的铁调素类似

物及其治疗铁过载疾病的用途。

[0011] PCT申请公开W018048944描述了另外的新的铁调素类似物及其用于治疗预防受试者铁过载和/或降低受试者血清铁水平的用途。

[0012] PCT申请公开W018128828描述了另外的新的铁调素类似物及其用于治疗铁调素相关病症的用途,包括预防和治疗铁过载疾病如血色素沉着病、铁负载性贫血如地中海贫血以及与无效或增强的红细胞生成相关的疾病。

[0013] PCT申请公开W017068089描述了另外的新的铁调素类似物(铁转运蛋白抑制剂)及其治疗地中海贫血和血色素沉着病的用途。

[0014] 美国专利US9315545描述了另外的新的铁调素类似物及其用于治疗铁代谢疾病、 $\beta$ 地中海贫血、血色素沉着病、铁负载性贫血、酒精性肝病或慢性丙型肝炎的用途。

[0015] 真性红细胞增多症(PV)是一种慢性进行性三系克隆性病,其特征为髓系细胞、红系细胞和巨核细胞增殖/积聚增加,并且被世界卫生组织(WHO)表征为骨髓增生性赘生物(Arber等人,2016,127(20):2391-405)。诊断由两个标准定义;第一个是红细胞量增加,骨髓活检显示三系细胞过多和存在JAK2V617F或JAK2外显子12突变,第二个标准包括红细胞增多症、骨髓活检确认和血清促红细胞生成素水平低于正常(Arber等人,2016,127(20):2391-405)。

[0016] 美国估计有148,000人患有PV,诊断时中位年龄为61岁(Stein等人,J Clin Oncol.2015Nov 20;33(33):3953-60)。与血液粘度过高相关的红细胞增多症症状包括疲劳、骨痛、头痛、头晕、视觉障碍、非典型胸痛、瘙痒、红斑性肢痛和感觉异常(Tefferi等人,Blood Cancer J.2018,8(1):3)。临床特征包括脾肿大、血栓和出血并发症以及白血病转化的风险。

[0017] 由于PV是以红细胞生成增加为特征性疾病,已经在动物模型中证明高剂量的铁调素模拟物可以通过减少红细胞生成来改善此疾病(Casu等人,Blood.2016;128(2):265-276)。在表达引起人PV的直系同源JAK2突变的PV小鼠中,施用微型铁调素显著减少脾肿大并使血细胞比容正常化。这些研究表明,药物样微型铁调素具有作为未输血的 $\beta$ -地中海贫血和PV的未来治疗剂的潜力(Casu等人,Blood.2016;128(2):265-276)。

[0018] 显然需要用于治疗 and 预防PV,包括高风险患者或不能耐受放血的患者的PV的新治疗剂和方法。本发明解决了这类治疗PV的需要。

## 发明内容

[0019] 在一个具体方面,本发明提供了治疗有需要的受试者的真性红细胞增多症的方法,其包括向受试者施用有效量的铁调素类似物的药物组合物。

[0020] 在更具体的方面,本发明提供了治疗有需要的受试者的真性红细胞增多症的方法,其包括向受试者施用有效量的包含铁调素类似物和药学上可接受的载剂、稀释剂或赋形剂的药物组合物。

[0021] 在一个实施方案中,铁调素类似物包括包含式(I)的肽:

[0022] R1-X-Y-R2(I) (SEQ ID NO:1)

[0023] 或其药学上可接受的盐或溶剂化物,

[0024] 其中

- [0025] R1是氢、C1-C6烷基、C6-C12芳基、C1-C20烷酰基或pGlu；
- [0026] R2是NH<sub>2</sub>或OH；
- [0027] X是具有式II的肽序列
- [0028] X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10 (II) (SEQ ID NO:2)
- [0029] 其中
- [0030] X1是Asp、Ala、Ile、pGlu、bhAsp、Leu、D-Asp或不存在；
- [0031] X2是Thr、Ala或D-Thr；
- [0032] X3是His、Lys或D-His；
- [0033] X4是Phe、Ala、Dpa或D-Phe；
- [0034] X5是Pro、Gly、Arg、Lys、Ala、D-Pro或bhPro；
- [0035] X6是Ile、Cys、Arg、Lys、D-Ile或D-Cys；
- [0036] X7是Cys、Ile、Leu、Val、Phe、D-Ile或D-Cys；
- [0037] X8是Ile、Arg、Phe、Gln、Lys、Glu、Val、Leu或D-Ile；
- [0038] X9是Phe或bhPhe；以及
- [0039] X10是Lys、Phe或不存在；
- [0040] 其中如果Y不存在，则X7是Ile；以及
- [0041] Y是具有式III的肽序列
- [0042] Y1-Y2-Y3-Y4-Y5-Y6-Y7-Y8-Y9-Y10-Y11-Y12-Y13-Y14-Y15 (III) (SEQ ID NO:3)
- [0043] 其中
- [0044] Y1是Gly、Cys、Ala、Phe、Pro、Glu、Lys、D-Pro、Val、Ser或不存在；
- [0045] Y2是Pro、Ala、Cys、Gly或不存在；
- [0046] Y3是Arg、Lys、Pro、Gly、His、Ala、Trp或不存在；
- [0047] Y4是Ser、Arg、Gly、Trp、Ala、His、Tyr或不存在；
- [0048] Y5是Lys、Met、Arg、Ala或不存在；
- [0049] Y6是Gly、Ser、Lys、Ile、Ala、Pro、Val或不存在；
- [0050] Y7是Trp、Lys、Gly、Ala、Ile、Val或不存在；
- [0051] Y8是Val、Thr、Gly、Cys、Met、Tyr、Ala、Glu、Lys、Asp、Arg或不存在；
- [0052] Y9是Cys、Tyr或不存在；
- [0053] Y10是Met、Lys、Arg、Tyr或不存在；
- [0054] Y11是Arg、Met、Cys、Lys或不存在；
- [0055] Y12是Arg、Lys、Ala或不存在；
- [0056] Y13是Arg、Cys、Lys、Val或不存在；
- [0057] Y14是Arg、Lys、Pro、Cys、Thr或不存在；以及
- [0058] Y15是Thr、Arg或不存在；
- [0059] 其中所述式I肽任选地在R1、X或Y上被聚乙二醇化，并且其中所述肽的氨基酸的侧链任选地缀合至亲脂性取代基或聚合部分。在一个相关实施方案中，式II如上所示，但X3为D-Lys。
- [0060] 在一个实施方案中，R1是氢、异戊酸、异丁酸或乙酰基。
- [0061] 在本发明的任何铁调素类似物或二聚体的特定实施方案中，半衰期延长部分选自

C12(月桂酸)、C14(肉豆蔻酸)、C16(棕榈酸)、C18(硬脂酸)、C20、C12二酸、C14二酸、C16二酸、C18二酸、C20二酸、生物素和异戊酸。在某些实施方案中,半衰期延长部分与附接到肽的接头部分衔接。在某些实施方案中,半衰期延长部分将铁调素类似物的分子量增加约50D至约2KD。在各种实施方案中,半衰期延长部分增加铁调素类似物的血清半衰期、提高溶解度和/或提高生物利用度。

[0062] 在某些实施方案中,本发明的肽类似物或二聚体包含与N末端Asp残基缀合的异戊酸部分。

[0063] 在某些实施方案中,本发明的肽类似物包含酰胺化的C末端残基。

[0064] 在某些实施方案中,本发明的铁调素类似物或二聚体包含以下序列:Asp-Thr-His-Phe-Pro-Cys-Ile-Lys-Phe-Glu-Pro-Arg-Ser-Lys-Gly-Cys-Lys (SEQ ID NO:19),或包含与该序列具有至少80%、至少90%或至少94%同一性的序列。

[0065] 在某些实施方案中,本发明的铁调素类似物或二聚体包含序列:Asp-Thr-His-Phe-Pro-Cys-Ile-Lys-Phe-Pro-Arg-Ser-Lys-Gly-Cys-Lys (SEQ ID NO:19),或包含与此序列具有至少80%、至少90%或至少94%同一性的序列。

[0066] 在相关的实施方案中,本发明包括编码本发明的铁调素类似物或二聚体(或二聚体的单体亚基)的肽的多核苷酸。

[0067] 在另一个相关的实施方案中,本发明包括包含本发明多核苷酸的载体。

[0068] 在另一个实施方案中,本发明包括药物组合物,其包含本发明的铁调素类似物、二聚体、多核苷酸或载体,以及药学上可接受的载剂、赋形剂或媒介物。

[0069] 在另一个实施方案中,本发明提供了结合铁转运蛋白或诱导铁转运蛋白内化和降解的方法,其包括使铁转运蛋白与至少一种本发明的铁调素类似物、二聚体或组合物接触。

[0070] 在另一个实施方案中,本发明提供了治疗真性红细胞增多症的方法。

[0071] 在另一个实施方案中,本发明包括治疗有需要的受试者的真性红细胞增多症的方法,其包括向受试者提供有效量的本发明的铁调素类似物或药物组合物。在某些实施方案中,铁调素类似物或药物组合物通过口服、静脉内、腹膜内、皮内、皮下、肌内、鞘内、吸入、雾化、舌下、颊、肠胃外、直肠、阴道或局部施用途径提供给受试者。在某些实施方案中,铁调素类似物或药物组合物通过口服或皮下施用途径提供给受试者。在某些实施方案中,至多或约每天两次、至多或约每天一次、至多或约每两天一次、至多或约每周一次、或至多或约每月一次向受试者提供铁调素类似物或药物组合物。

[0072] 在特定实施方案中,以约10mg至约100mg、约10mg至约80mg或约10mg至约50mg的剂量向受试者提供铁调素类似物。在更特定实施方案中,以约20mg至约40mg的剂量向受试者提供铁调素类似物。在特定实施方案中,以约10mg、约15mg、约20mg、约25mg、约30mg、约40mg、约50mg、约60mg、约70mg或约80mg的剂量向受试者提供铁调素类似物。在特定实施方案中,约每周一次向受试者提供铁调素类似物。在另一个特定实施方案中,约一周两次例如皮下向受试者提供铁调素类似物。

[0073] 在某些实施方案中,任何公开的方法还包括在施用铁调素类似物后的一个或多个时间点测定受试者的血细胞比容水平,以及维持或调节施用于受试者的铁调素类似物或其药学上可接受的盐的量,其中如果受试者测定的血细胞比容大于44%或45%,则增加该量,其中如果受试者测定的血细胞比容小于37.5%或40%,则减少该量,而如果受试者测定的

血细胞比容在37.5%和45%之间、在37.5%和44%之间、在40%和45%之间、或在40%和44%之间,则维持该量。

[0074] 在另一个实施方案中,本发明提供了包含本发明的药物组合物的装置,用于将本发明的铁调素类似物或二聚体任选地口服或皮下递送至受试者。

[0075] 在又一个实施方案中,本发明包括试剂盒,其包含本发明的药物组合物,与试剂、装置或指导材料或其组合包装在一起。

[0076] 在所公开的任何方法的特定实施方案中,真性红细胞增多症是需要放血的真性红细胞增多症,或低风险患者中需要放血的真性红细胞增多症。

[0077] 在所公开的任何方法的特定实施方案中,受试者是低风险真性红细胞增多症患者、高风险真性红细胞增多症患者、有症状的需要放血的真性红细胞增多症患者、需要放血的真性红细胞增多症的高风险患者或需要放血的真性红细胞增多症的低风险患者。

[0078] 在所公开的任何方法的特定实施方案中,受试者被诊断为真性红细胞增多症,并且在向受试者施用铁调素类似物或肽之前的24周内已接受至少三次放血以达到目标血细胞比容 $\leq$ 45%。

[0079] 在所公开的任何方法的某些实施方案中,向受试者施用约5mg至约200mg铁调素类似物或肽,例如约10mg至约100mg、约20mg至约100mg、约20mg、约40mg、约80mg、约100mg或约120mg。

[0080] 在所公开的任何方法的某些实施方案中,药物组合物通过皮下注射施用。

[0081] 在所公开的任何方法的某些实施方案中,药物组合物在一段时间内约每周施用。

[0082] 在所公开的任何方法的某些实施方案中,施用的铁调素类似物或肽的量在一段时间内增加。

[0083] 在所公开的任何方法的某些实施方案中,受试者是哺乳动物,例如人。

[0084] 在所公开的任何方法的某些实施方案中,所述方法导致受试者的血细胞比容水平降低至 $\leq$ 45%,受试者的血细胞比容降低至少3%,和/或受试者的血清铁蛋白增加。在一些实施方案中,受试者在治疗过程期间保持不放血,例如治疗约每周一次,持续一段时间。

## 附图说明

[0085] 图1A和1B描述了从化合物A和化合物B的Cobas Iron2分析实验获得的数据。图1A是显示用化合物A治疗后指定时间的血清铁水平和化合物A的血清浓度的图。图1B是显示用化合物B治疗后指定时间的血清铁水平和化合物B的血清浓度的图。

[0086] 图2示出了在以每周一次1(●)、3(□)和10(■)mg/kg/剂的剂量皮下施用媒介物(○)或化合物A,施用4次,恢复期28天后雄性食蟹猴中血细胞比容和RBC指标的时间分布。化合物A诱导指示铁限制性红细胞生成的次级血液学指标(平均红细胞血红蛋白浓度MCHC和平均红细胞血红蛋白MCH)的变化。每个点代表在主要治疗中最多6只动物(所有组)和恢复阶段中最多2只动物(媒介物和10mg/kg化合物A)的平均值 $\pm$ SD。箭头指示何时施用化合物A。

[0087] 图3表明化合物A诱导血细胞比容(Hct)和次级血液学指标的显著变化。在以0.6(●)、2(□)和6(■)mg/kg的剂量每周一次皮下施用媒介物(○)或化合物A,连续13周,随后是35天恢复期之后,评估Hct、平均红细胞体积(MCV)、平均红细胞血红蛋白(MCH)、平均红细

胞血红蛋白浓度 (MCHC) 的变化。箭头表示从第1天开始的施用日。每个点代表主要阶段最多6只动物/性别和恢复阶段最多2只动物/性别的平均值 $\pm$ SD。

[0088] 图4显示胆红素分布与铁充足的食蟹猴中铁限制性红细胞生成一致。在以0.6 (●)、2 (□) 和6 (■) mg/kg的剂量每周一次皮下施用媒介物 (○) 或化合物A, 连续13周, 随后是35天恢复期之后, 雄性 (左) 和雌性食蟹猴 (右) 中的总胆红素水平。箭头表示从第1天开始的施用日。每个点代表主要阶段最多6只动物/性别和恢复阶段最多2只动物/性别的平均值 $\pm$ SD。

[0089] 图5示出了在以0.6 (●)、2 (□) 和6 (■) mg/kg的剂量每周一次皮下施用媒介物 (○) 或化合物A, 连续13周, 随后是35天恢复期之后, 雄性 (左) 和雌性食蟹猴 (右) 中的血小板分布。箭头表示从第1天开始的施用日。每个点代表主要阶段最多6只动物/性别和恢复阶段最多2只动物/性别的平均值 $\pm$ SD。

[0090] 图6提供了II期临床试验设计图。

[0091] 图7是显示对13名人类PV患者进行治疗性放血和用指定剂量的化合物A治疗的时间安排的时间线。

[0092] 图8是显示在指定时间点用化合物A治疗的PV患者中铁蛋白 (ng/mL) 水平的图。受试者编号与表9中所示的那些相关。

[0093] 图9是显示在指定时间点用化合物A治疗的PV患者中TSAT (%) 的图。受试者编号与表9中所示的那些相关。

[0094] 图10是显示在指定时间点用化合物A治疗的PV患者中MCV (fL) 的图。受试者编号与表9中所示的那些相关。

[0095] 图11是显示在指定时间点用化合物A治疗的PV患者中MCH (pg) 的图。受试者编号与表9中所示的那些相关。

[0096] 图12是显示在指定时间点用化合物A治疗的PV患者中血细胞比容 (%) 的图。受试者编号与表9中所示的那些相关。

[0097] 图13是显示在指定时间点用化合物A治疗的PV患者中红细胞 ( $10^6$ /uL) 的图。受试者编号与表9中所示的那些相关。

[0098] 图14是显示在指定时间点用指定剂量的化合物A治疗之前和之后PV患者中的血小板 ( $10^3$ /uL) 的图。对于图14-图16, 指示的受试者编号与表9中提供的受试者编号关联如下: 1501-01=3; 1501-02=5; 1502-1=1; 1502-02=2; 1502-04=4; 1505-01=6; 1505-02=7; 以及1509-01=8。

[0099] 图15是显示在指定时间点用指定剂量的化合物A治疗之前和之后PV患者中的网织红细胞 (%) 的图。

[0100] 图16是显示在指定时间点用指定剂量的化合物A治疗之前和之后PV患者中的白细胞 (/uL) 的图。

[0101] 图17A和17B示出了在施用指定量的化合物A后不同时间处PV患者中化合物A的血浆浓度。图17A显示了各个时间点的数据, 而图17B示出了特定时间间隔内的平均值。

## 具体实施方式

[0102] 本公开总体上涉及铁调素类似物肽治疗和预防真性红细胞增多症 (PV) 的用途。

[0103] 铁调素(也称为LEAP-1),一种由肝脏产生的肽激素,是人和其他哺乳动物中铁稳态的调节剂。铁调素通过与其受体铁输出通道铁转运蛋白结合起作用,引起其内化和降解。人铁调素是25个氨基酸肽(Hep25)。See Krause等人(2000)FEBS Lett 480:147-150,和Park等人(2001)J Biol Chem 276:7806-7810。铁调素的生物活性25个氨基酸形式的结构是具有形成4个二硫键的8个半胱氨酸的简单发夹,如Jordan等人J Biol Chem 284:24155-67所述。N末端区域是铁调节功能所需的,并且5个N末端氨基酸残基的缺失导致铁调节功能的丧失。See Nemeth等人(2006)Blood 107:328-33。

[0104] 异常铁调素活性与铁过载疾病相关,包括遗传性血色素沉着症(HH)和铁负载性贫血。遗传性血色素沉着病是主要由铁调素缺乏或在一些情况下由铁调素抗性引起的遗传性铁过载疾病。这允许从饮食中过量吸收铁和产生铁过载。HH的临床表现可包括肝病(例如肝硬化和肝细胞癌)、糖尿病和心力衰竭。铁负载性贫血是红细胞生成无效的遗传性贫血,例如β-地中海贫血,其伴随严重的铁过载。

[0105] 铁调素具有许多限制其作为药物的限制,包括部分由于蛋白质在折叠过程中的聚集和沉淀而难以合成的过程,这又导致高产品成本。本公开提供了具有铁调素活性并且还具有其他有利的物理性质如改进的溶解性、稳定性和/或效力的铁调素类似物肽,使得铁调素样生物制剂的生产可负担得起,并且用于治疗 and 预防真性红细胞增多症。

[0106] 本发明总体上还涉及铁调素类似物肽及其制备和使用方法。在某些实施方案中,铁调素类似物表现出一种或多种铁调素活性。在某些实施方案中,本发明涉及包含一个或多个肽亚基的铁调素肽类似物,所述肽亚基通过分子内键例如分子内二硫键形成环化结构。在特定实施方案中,与非环化铁调素肽及其类似物相比,环化结构具有增加的效力和选择性。在特定实施方案中,与铁调素或先前的铁调素类似物相比,本发明的铁调素类似物肽例如当口服递送时表现出增加的半衰期。

#### [0107] 定义和命名

[0108] 除非本文另有定义,否则本申请中使用的科学和技术术语应具有本领域普通技术人员通常理解的含义。通常,本文所述的与化学、分子生物学、细胞和癌症生物学、免疫学、微生物学、药理学以及蛋白质和核酸化学结合使用的命名和技术是本领域熟知和常用的那些。

[0109] 如本文所用,除非另外指明,否则以下术语具有赋予其的含义。

[0110] 在整个说明书中,词语“包括(comprise)”或例如“包括(comprises)”或“包括(comprising)”的变型将被理解为暗示包括所述整数(或组分)或整数(或组分)组,但不排除任何其他整数(或组分)或整数(或组分)组。

[0111] 单数形式“一(a)”,“一(an)”和“所述”包括复数,除非上下文另有明确说明。

[0112] 术语“包括”用于意指“包括但不限于”。“包括”和“包括但不限于”可互换使用。

[0113] 术语“患者”、“受试者”和“个体”可以互换使用并且是指人或非人动物。这些术语包括哺乳动物,例如人、灵长类动物、家畜动物(例如牛、猪)、伴侣动物(例如犬、猫)和啮齿动物(例如小鼠和大鼠)。术语“哺乳动物”是指任何哺乳动物物种,例如人、小鼠、大鼠、狗、猫、仓鼠、豚鼠、兔、家畜等。

[0114] 本文所用的术语“肽”泛指通过肽键连接在一起的两个或更多个氨基酸的序列。应当理解,该术语并不意味着氨基酸聚合物的特定长度,也不意图暗示或区分多肽是使用

重组技术、化学或酶促合成产生的，还是天然存在的。

[0115] 本文所用的术语“肽类似物”广泛地指包含与铁调素或其功能区共有的一个或多个结构特征和/或功能活性的肽单体和肽二聚体。在某些实施方案中，肽类似物包括与铁调素共享显著氨基酸序列同一性的肽，例如与野生型铁调素(例如人铁调素)氨基酸序列相比包含一个或多个氨基酸插入、缺失或取代的肽。在某些实施方案中，肽类似物包含一个或多个另外的修饰，例如与另一化合物缀合。术语“肽类似物”包括本发明的任何肽单体或肽二聚体。在某些情况下，“肽类似物”在本文中也可或可替代地称为“铁调素类似物”、“铁调素肽类似物”或“铁调素类似物肽”。

[0116] 如本文所用，表述“序列同一性”、“同一性百分比”、“同源性百分比”或例如包含“50%相同的序列”是指在比较窗口上序列在逐个核苷酸或逐个氨基酸的基础上相同的程度。因此，“序列同一性百分比”可以通过以下计算：在比较窗口上比较两个最佳对齐的序列，确定在两个序列中出现相同核酸碱基(例如，A、T、C、G、I)或相同氨基酸残基(例如，Ala、Pro、Ser、Thr、Gly、Val、Leu、Ile、Phe、Tyr、Trp、Lys、Arg、His、Asp、Glu、Asn、Gln、Cys和Met)的位置的数目以产生匹配位置的数目，将匹配位置的数目除以比较窗口中位置的总数(即，窗口大小)，并将结果乘以100以产生序列同一性百分比。

[0117] 序列之间的序列相似性或序列同一性(这些术语在本文中可互换使用)的计算可以如下进行。为了确定两个氨基酸序列或两个核酸序列的百分比同一性，可以将序列对齐用于最佳比较目的(例如，可以在第一和第二氨基酸或核酸序列中的一者或两者中引入空位用于最佳比对，并且可以忽略非同源序列用于比较目的)。在某些实施方案中，出于比较目的而对齐的参考序列的长度为参考序列长度的至少30%，优选至少40%，更优选至少50%、60%，甚至更优选至少70%、80%、90%、100%。然后比较对应氨基酸位置或核苷酸位置处的氨基酸残基或核苷酸。当第一序列中的位置被与第二序列中的对应位置相同的氨基酸残基或核苷酸占据时，则分子在该位置是相同的。

[0118] 两个序列之间的百分比同一性是序列共享的相同位置的数目的函数，并且考虑到空位的数目和每个空位的长度，需要引入它们以实现两个序列的最佳比对。

[0119] 可以使用数学算法来完成序列的比较和两个序列之间百分比同一性的确定。在一些实施方案中，两个氨基酸序列之间的同一性百分比使用被并入GCG软件包中的GAP程序中的Needleman和Wunsch, (1970, J. Mol. Biol. 48:444-453) 算法确定，使用Blossum 62矩阵或PAM250矩阵，空位权重16、14、12、10、8、6或4和长度权重1、2、3、4、5或6。在又一个优选的实施方案中，使用GCG软件包中的GAP程序确定两个核苷酸序列之间的百分比同一性，使用NWSgapdna.CMP矩阵，空位权重40、50、60、70或80和长度权重1、2、3、4、5或6。另一组示例性参数包括空位罚分为12、空位延伸罚分为4和移码空位罚分为5的Blossum 62评分矩阵。两个氨基酸或核苷酸序列之间的百分比同一性也可使用已并入ALIGN程序(版本2.0)中的E. Meyers和W. Miller (1989, Cabios, 4:11-17) 的算法确定，使用PAM120权重残差表，空位长度罚分12和空位罚分4。

[0120] 本文所述的肽序列可用作“查询序列”以对公共数据库进行搜索，例如以鉴定其他家族成员或相关序列。这样的搜索可使用Altschul等人(1990, J. Mol. Biol., 215:403-10)的NBLAST和XBLAST程序(2.0版)进行。BLAST核苷酸搜索可用NBLAST程序，得分=100，字长=12进行，以获得与本发明的核酸分子同源的核苷酸序列。BLAST蛋白质搜索可用XBLAST程

序,得分=50,字长=3进行,以获得与本发明蛋白质分子同源的氨基酸序列。为了获得用于比较目的的空位比对,可如Altschul等人(Nucleic Acids Res.25:3389-3402,1997)所述使用Gapped BLAST。当使用BLAST和Gapped BLAST程序时,可使用相应程序(例如XBLAST和NBLAST)的默认参数。

[0121] 本文所用的术语“保守取代”表示一个或多个氨基酸被另一个生物学上相似的残基替代。实例包括具有类似特征的氨基酸残基的取代,例如小氨基酸、酸性氨基酸、极性氨基酸、碱性氨基酸、疏水性氨基酸和芳族氨基酸。参见例如下表。在本发明的一些实施方案中,一个或多个Met残基被正亮氨酸(Nle)取代,所述正亮氨酸是Met的生物等排体,但与Met相反,不容易被氧化。在一些实施方案中,一个或多个Trp残基被Phe取代,或一个或多个Phe残基被Trp取代,而在一些实施方案中,一个或多个Pro残基被Npc取代,或一个或多个Npc残基被Pro取代。用内源性哺乳动物肽和蛋白质中通常不存在的残基进行保守取代的另一个实例是用例如鸟氨酸、刀豆氨酸、氨乙基半胱氨酸或另一种碱性氨基酸对Arg或Lys进行保守取代。在一些实施方案中,另一种保守取代是用bhPro或Leu或D-Npc(异烟酸)取代一个或多个Pro残基。关于肽和蛋白质中表型沉默取代的进一步信息,参见例如Bowie等人Science 247,1306-1310,1990。在下面的方案中,氨基酸的保守取代根据物理化学性质分组。I:中性,亲水性,II:酸和酰胺,III:碱性,IV:疏水性,V:芳族,大体积氨基酸。

[0122]

I	II	III	IV	V
A	N	H	M	F
S	D	R	L	Y
T	E	K	I	W
P	Q		V	
G			C	

[0123] 在下面的方案中,氨基酸的保守取代根据物理化学性质分组。VI:中性或疏水性,VII:酸性,VIII:碱性,IX:极性,X:芳族。

[0124]

VI	VII	VIII	IX	X
A	E	H	M	F
L	D	R	S	Y
I		K	T	W
P			C	
G			N	
V			Q	

[0125] 本文所用的术语“氨基酸”或“任何氨基酸”是指任何和所有氨基酸,包括天然存在的氨基酸(例如 $\alpha$ -氨基酸)、非天然氨基酸、修饰的氨基酸和非天然氨基酸。它包括D-和L-氨基酸。天然氨基酸包括在自然界中发现的那些,例如结合到肽链中以形成大量蛋白质的构建块的23种氨基酸。这些主要是L立体异构体,尽管在细菌包膜和一些抗生素中存在一些D-氨基酸。20种“标准”天然氨基酸列于上表中。“非标准”天然氨基酸是吡咯赖氨酸(存在于产甲烷生物体和其他真核生物中)、硒代半胱氨酸(存在于许多非真核生物以及大多数真核生物中)和N-乙酰甲硫氨酸(由细菌、线粒体和叶绿体中的起始密码子AUG编码)。“非天然的(Unnatural)”或“非天然的(non-natural)”氨基酸是天然存在的或化学合成的非蛋白原性

氨基酸(即,非天然编码的或在遗传密码中发现的那些)。已知超过140种天然氨基酸,并且可能有数千种组合。“非天然”氨基酸的实例包括 $\beta$ -氨基酸( $\beta^3$ 和 $\beta^2$ )、同型氨基酸、脯氨酸和丙酮酸衍生物、3-取代的丙氨酸衍生物、甘氨酸衍生物、环取代的苯丙氨酸和酪氨酸衍生物、线性核心氨基酸、二氨基酸、D-氨基酸和N-甲基氨基酸。非天然氨基酸还包括修饰的氨基酸。“修饰的”氨基酸包括已被化学修饰以包括不天然存在于氨基酸上的一个或多个基团或化学部分的氨基酸(例如,天然氨基酸)。

[0126] 本领域技术人员清楚,本文公开的肽序列从左到右显示,序列的左端是肽的N末端,序列的右端是肽的C末端。本文公开的序列包括在序列的氨基末端(N-末端)掺入“Hy-”部分和在序列的羧基末端(C-末端)掺入“-OH”部分或“-NH<sub>2</sub>”部分的序列。在这类情况下,除非另有说明,否则在所讨论的序列的N-末端的“Hy-”部分表示氢原子,对应于在N-末端存在游离伯或仲氨基,而在序列的C-末端的“-OH”或“-NH<sub>2</sub>”部分分别表示羟基或氨基,对应于在C-末端存在酰氨基(CONH<sub>2</sub>)。在本发明的每个序列中,C-末端“-OH”部分可以取代C-末端“-NH<sub>2</sub>”部分,反之亦然。还应当理解,氨基末端或羧基末端处的部分可以是键,例如共价键,特别是在氨基末端或羧基末端与接头或另一化学部分(例如PEG部分)结合的情况下。

[0127] 本文所用的术语“NH<sub>2</sub>”是指存在于多肽的氨基末端的游离氨基。本文所用的术语“OH”是指存在于肽的羧基末端的游离羧基。此外,本文所用的术语“Ac”是指通过酰化多肽的C-或N-末端的乙酰基保护。

[0128] 本文所用的术语“羧基”是指-CO<sub>2</sub>H。

[0129] 在大多数情况下,本文使用的天然存在和非天然存在的氨酰基残基的名称遵循IUPAC委员会对有机化学命名法和IUPAC-IUB委员会对生物化学命名法建议的命名惯例,如“Nomenclature of  $\alpha$ -Amino Acids (Recommendations,1974)”*Biochemistry*,14(2), (1975)中所述。就本说明书和所附权利要求中使用的氨基酸和氨酰基残基的名称和缩写与那些建议不同而言,读者将清楚它们。可用于描述本发明的一些缩写在下表的表1中定义。

[0130] 表1. 非天然氨基酸和化学部分的缩写

[0131]

缩写	定义
DIG	二甘醇酸
Dapa	二氨基丙酸
Daba	二氨基丁酸
Pen	青霉胺
Sarc 或 Sar	肌氨酸
Cit	瓜氨酸(Citroline)
Cav	Cavanine
NMe-Arg	N-甲基-精氨酸
NMe-Trp	N-甲基-色氨酸
NMe-Phe	N-甲基-苯丙氨酸
Ac-	乙酰基
2-Nal	2-萘基丙氨酸
1-Nal	1-萘基丙氨酸
Bip	联苯丙氨酸
$\beta$ Ala	$\beta$ -丙氨酸
Aib	2-氨基异丁酸
Azt	氮杂环丁烷-2-羧酸
Tic	(3S)-1,2,3,4-四氢异喹啉-羟基-3-羧酸
Phe(OMe)	酪氨酸(4-甲基)
N-MeLys	N-甲基-赖氨酸
N-MeLys(Ac)	N- $\epsilon$ -乙酰基-D-赖氨酸
Dpa	$\beta,\beta$ 二苯丙氨酸
NH <sub>2</sub>	游离胺
CONH <sub>2</sub>	酰胺
COOH	酸
Phe(4-F)	4-氟-苯丙氨酸
PEG3	NH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> (OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CO <sub>2</sub> H
m-PEG3	CH <sub>3</sub> OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> (OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CO <sub>2</sub> H
m-PEG4	CH <sub>3</sub> OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> (OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CO <sub>2</sub> H

[0132]

缩写	定义
m-PEG8	$\text{CH}_3\text{OCH}_2\text{CH}_2(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_7\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$
PEG11	O-(2-氨基乙基)-O'-(2-羧乙基)-十一乙二醇 $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_{11}\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$
PEG13	具有 13 个聚乙二醇单元的双功能 PEG 接头
PEG25	具有 25 个聚乙二醇单元的双功能 PEG 接头
PEG1K	具有 1000Da 的聚乙二醇分子量的双功能 PEG 接头
PEG2K	具有 2000Da 的聚乙二醇分子量的双功能 PEG 接头
PEG3.4K	具有 3400Da 的聚乙二醇分子量的双功能 PEG 接头
PEG5K	具有 5000Da 的聚乙二醇分子量的双功能 PEG 接头
IDA 或 Ida	亚氨基二乙酸
IDA-Palm	(棕榈基)-亚氨基二乙酸
hPhe	高苯丙氨酸
Ahx	氨基己酸
DIG-OH	乙醇酸一元酸
三嗪	氨基丙基三嗪二酸
Boc-三嗪	Boc-三嗪二酸
三氟丁酸	4,4,4-三氟丁酸
2-甲基三氟丁酸	2-甲基-4,4,4-丁酸
三氟戊酸	5,5,5-三氟戊酸
1,4-苯二乙酸	对苯二乙酸
1,3-苯二乙酸	间苯二乙酸
DTT	二硫苏糖醇
Nle	正亮氨酸
$\beta$ hTrp 或 bhTrp	$\beta$ -高色氨酸
$\beta$ hPhe 或 bhPhe	$\beta$ -高苯丙氨酸
Phe(4-CF <sub>3</sub> )	4-三氟甲基苯丙氨酸
$\beta$ Glu 或 bGlu	$\beta$ -谷氨酸
$\beta$ hGlu 或 bhGlu	$\beta$ -高谷氨酸
2-2-茛满	2-氨基茛满-2-羧酸
1-1-茛满	1-氨基茛满-1-羧酸
hCha	高环己基丙氨酸
环丁基	环丁基丙氨酸
hLeu	高亮氨酸
Gla	$\gamma$ -羧基谷氨酸
Aep	3-(2-氨基乙氧基)丙酸
Aca	(2-氨基乙氧基)乙酸
IsoGlu-辛酸	辛酰基- $\gamma$ -Glu
K-辛酸	辛酰基- $\epsilon$ -Lys

缩写	定义
Dapa(Palm)	十六酰基- $\beta$ -二氨基丙酸
IsoGlu-Palm	十六酰基- $\gamma$ -Glu
C-StBu	S-叔丁基硫代半胱氨酸
C-tBu	S-叔丁基半胱氨酸
Dapa(AcBr)	NY-(溴乙酰基)-2,3-二氨基丙酸
Tle	叔亮氨酸
Phg	苯基甘氨酸
Oic	八氢吡啶-2-羧酸
Chg	$\alpha$ -环己基甘氨酸
GP-(Hyp)	Gly-Pro-羟基 Pro
Inp	异哌啶酸
Amc	4-(氨基甲基)环己烷羧酸
甜菜碱	$(\text{CH}_3)_3\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$
D-Npc	异哌啶酸
Npc	哌啶甲酸

[0133] 在整个本说明书中,除非天然存在的氨基酸以其全名提及(例如丙氨酸、精氨酸等),否则它们以其常规三字母或单字母缩写指定(例如丙氨酸为Ala或A、精氨酸为Arg或R等)。在较不常见或非天然存在的氨基酸的情况下,除非它们以其全名提及(例如肌氨酸、鸟氨酸等),否则经常使用的三或四字符代码用于其残基,包括Sar或Sarc(肌氨酸,即N-甲基甘氨酸)、Aib( $\alpha$ -氨基异丁酸)、Daba(2,4-二氨基丁酸)、Dapa(2,3-二氨基丙酸)、 $\gamma$ -Glu( $\gamma$ -谷氨酸)、pGlu(焦谷氨酸)、Gaba( $\gamma$ -氨基丁酸)、 $\beta$ -Pro(吡咯烷-3-羧酸)、8Ado(8-氨基-3,6-二氧杂辛酸)、Abu(4-氨基丁酸)、bhPro( $\beta$ -高脯氨酸)、bhPhe( $\beta$ -高-L-苯丙氨酸)、bhAsp( $\beta$ -高-天冬氨酸)、Dpa( $\beta,\beta$ -二苯丙氨酸)、Ida(亚氨基二乙酸)、hCys(高半胱氨酸)、bhDpa( $\beta$ -高- $\beta,\beta$ -二苯丙氨酸)。

[0134] 此外, $R^1$ 在所有序列中可以被异戊酸或等同物取代。在一些实施方案中,其中本发明的肽与酸性化合物例如异戊酸、异丁酸、戊酸等缀合,这种缀合的存在以酸形式提及。因此,例如,但不以任何方式限制,代替通过引用异戊酰基来指示异戊酸与肽的缀合,在一些实施方案中,本申请可以将这样的缀合称为异戊酸。

[0135] 本文所用的术语“L-氨基酸”是指肽的“L”异构形式,相反地,术语“D-氨基酸”是指肽的“D”异构形式。在某些实施方案中,本文所述的氨基酸残基为“L”异构形式,然而,“D”异构形式的残基可取代任何L-氨基酸残基,只要肽保留所需的功能。

[0136] 除非另有说明,否则提及具有手性中心的所讨论的天然和非天然氨基酸的L-异构形式。适当时,氨基酸的D-异构形式以常规方式由常规三字母代码前的前缀“D”表示(例如Dasp、(D) Asp或D-Asp;Dphe、(D) Phe或D-Phe)。

[0137] 如本文所用,“Lys的低级同源物”是指具有赖氨酸结构但与赖氨酸相比在其侧链中具有一个或多个更少碳的氨基酸。

[0138] 如本文所用,“Lys的高级同源物”是指具有赖氨酸结构但与赖氨酸相比在其侧链中具有一个或多个额外碳原子的氨基酸。

[0139] 本文所用的术语“DRP”是指富含二硫键的肽。

[0140] 本文所用的术语“二聚体”广泛地指包含两个或更多个单体亚基的肽。某些二聚体

包含两个DRP。本发明的二聚体包括同二聚体和异二聚体。二聚体的单体亚基可以在其C或N末端连接,或者可以通过内部氨基酸残基连接。二聚体的每个单体亚基可以通过相同的位点连接,或每个可以通过不同的位点(例如,C末端、N末端或内部位点)连接。

[0142] 如本文所用,在本文公开的某些肽序列的上下文中,括号例如( )表示侧链缀合,括号例如[ ]表示非天然氨基酸取代或氨基酸和缀合的侧链。通常,当接头显示在肽序列的N末端时,它表示该肽与另一个肽二聚化,其中该接头附接到两个肽的N末端。通常,当接头显示在肽序列或结构的C末端时,它表示该肽与另一个肽二聚化,其中该接头附接到两个肽的C末端。

[0143] 术语“电子等排置换”或“电子等排取代”在本文中可互换使用,是指具有类似于指定氨基酸的化学和/或结构特性的任何氨基酸或其他类似物部分。在某些实施方案中,电子等排置换是用天然或非天然氨基酸的保守取代。

[0144] 本文所用的术语“环化”是指其中多肽分子的一部分与多肽分子的另一部分连接形成闭环的反应,例如通过形成二硫桥或其他类似键。

[0145] 本文所用的术语“亚基”是指连接形成二聚肽组合物的一对多肽单体中的一个。

[0146] 本文所用的术语“接头部分”广泛地指能够将两个肽单体亚基连接或接合在一起以形成二聚体的化学结构。

[0147] 在本发明的上下文中,术语“溶剂化物”是指在溶质(例如,根据本发明的铁调素类似物或其药学上可接受的盐)和溶剂之间形成的限定化学计量的络合物。在这方面,溶剂可以例如是水、乙醇或另一种药学上可接受的,通常是小分子有机物质,例如但不限于乙酸或乳酸。当所讨论的溶剂是水时,这种溶剂化物通常称为水合物。

[0148] 如本文所用的术语“药学上可接受的盐”表示本发明的肽或化合物的盐或两性离子形式,其是水或油可溶的或可分散的,其适用于治疗疾病而无过度毒性、刺激和过敏反应;其与合理的受益/风险比相称,并且对其预期用途有效。盐可在化合物的最终分离和纯化期间制备,或通过使氨基与合适的酸反应单独制备。代表性的酸加成盐包括乙酸盐、己二酸盐、藻酸盐、柠檬酸盐、天冬氨酸盐、苯甲酸盐、苯磺酸盐、硫酸氢盐、丁酸盐、樟脑酸盐、樟脑磺酸盐、二葡萄糖酸盐、甘油磷酸盐、半硫酸盐、庚酸盐、己酸盐、甲酸盐、富马酸盐、盐酸盐、氢溴酸盐、氢碘酸盐、2-羟基乙磺酸盐(羟乙基磺酸盐)、乳酸盐、马来酸盐、均三甲苯磺酸盐、甲磺酸盐、萘磺酸盐、烟酸盐、2-萘磺酸盐、草酸盐、双羟萘酸盐、果胶酸盐、过硫酸盐、3-苯基丙酸盐、苦味酸盐、新戊酸盐、丙酸盐、琥珀酸盐、酒石酸盐、三氯乙酸盐、三氟乙酸盐、磷酸盐、谷氨酸盐、碳酸氢盐、对甲苯磺酸盐和十一烷酸盐。此外,本发明化合物中的氨基可用甲基、乙基、丙基和丁基氯化物、溴化物和碘化物;二甲基、二乙基、二丁基和二戊基硫酸盐;癸基、月桂基、肉豆蔻基和硬脂基氯化物、溴化物和碘化物;以及苄基和苯乙基溴化物季铵化。可用于形成治疗上可接受的加成盐的酸的实例包括无机酸如盐酸、氢溴酸、硫酸和磷酸,以及有机酸如草酸、马来酸、琥珀酸和柠檬酸。药学上可接受的盐可以适当地是自例如酸加成盐和碱式盐的盐。酸加成盐的实例包括氯化物盐,柠檬酸盐和乙酸盐。碱式盐的实例包括其中阳离子选自碱金属阳离子如钠或钾离子、碱土金属阳离子如钙或镁离子、以及取代的铵离子如N(R1)(R2)(R3)(R4)+型离子的盐,其中R1、R2、R3和R4独立地通常表示氢、任取代的C1-6-烷基或任取代的C2-6-烯基。相关C1-6-烷基的实例包括甲基、乙基、1-丙基和2-丙基。可能相关的C2-6-烯基的实例包括乙烯基、1-丙烯基和2-丙烯基。药学上可

接受的盐的其他实例描述于“Remington’s Pharmaceutical Sciences”,第17版,Alfonso R.Gennaro (Ed.),Mark Publishing Company,Easton,PA,USA,1985(及其更近期的版本),“Encyclopaedia of Pharmaceutical Technology”,第3版,James Swarbrick (Ed.),Informa Healthcare USA (Inc.),NY,USA,2007和J.Pharm.Sci.66:2(1977)中。此外,对于合适的盐的综述,参见Handbook of Pharmaceutical Salts:Properties,Selection,and Use,Stahl和Wermuth(Wiley-VCH,2002)。其他合适的碱盐由形成无毒盐的碱形成。代表性实例包括铝盐、精氨酸盐、苜星青霉素盐、钙盐、胆碱盐、二乙胺盐、二乙醇胺盐、甘氨酸盐、赖氨酸盐、镁盐、葡甲胺(meglumine)盐、乙醇胺(olamine)盐、钾盐、钠盐、氨丁三醇(tromethamine)盐及锌盐。也可以形成酸和碱的半盐,例如半硫酸盐和半钙盐。

[0149] 本文所用的术语“N( $\alpha$ )甲基化”描述氨基酸的 $\alpha$ 胺的甲基化,通常也称为N-甲基化。

[0150] 如本文所用,术语“sym甲基化”或“Arg-Me-sym”描述精氨酸的胍基团的两个氮的对称甲基化。此外,术语“asym甲基化”或“Arg-Me-asym”描述精氨酸的胍基的单个氮的甲基化。

[0151] 本文所用的术语“酰化有机化合物”是指具有羧酸官能团的各种化合物,其用于在形成C末端二聚体之前酰化氨基酸亚基的N末端。酰化有机化合物的非限制性实例包括环丙基乙酸、4-氟苯甲酸、4-氟苯乙酸、3-苯基丙酸、琥珀酸、戊二酸、环戊烷羧酸、3,3,3-三氟丙酸、3-氟甲基丁酸、四面体-2H-吡喃-4-羧酸。

[0152] 术语“烷基”包括含有1至24个碳原子的直链或支链、非环状或环状的饱和脂族烃。代表性的饱和直链烷基包括但不限于甲基、乙基、正丙基、正丁基、正戊基、正己基等,而饱和支链烷基包括但不限于异丙基、仲丁基、异丁基、叔丁基、异戊基等。代表性的饱和环状烷基包括但不限于环丙基、环丁基、环戊基、环己基等,而不饱和环状烷基包括但不限于环戊烯基、环己烯基等。

[0153] 如本文所用,本发明的肽激动剂的“治疗有效量”意在描述足以治疗铁调素相关疾病的肽激动剂的量,所述疾病包括但不限于本文所述的任何疾病和病症(例如,铁代谢疾病)。在特定实施方案中,治疗有效量将实现适用于任何医学治疗的所需益处/风险比。

[0154] 血细胞比容是红细胞体积与全血体积之比。血细胞比容的正常范围在性别之间是不同的,男性为约45%至52%,女性为约37%至48%。PV治疗的临床目标是实现低于45%的血细胞比容。血细胞比容在本文中也可称为血细胞比容水平,并且应当理解,血细胞比容水平的数值,例如45,是指45%的血细胞比容。

[0155] 铁调素的肽类似物

[0156] 本发明提供了铁调素的肽类似物,其可以是单体或二聚体(统称为“铁调素类似物”)。

[0157] 在一些实施方案中,本发明的铁调素类似物结合铁转运蛋白,例如人铁转运蛋白。在某些实施方案中,本发明的铁调素类似物特异性结合人铁转运蛋白。如本文所用,“特异性结合”是指特异性结合剂与给定配体的相互作用优先于与样品中的其他剂的相互作用。例如,特异性结合给定配体的特异性结合剂在合适的条件下结合给定配体,其量或程度可观察地超过与样品中其他组分的任何非特异性相互作用的量或程度。合适的条件是允许给定的特异性结合剂和给定的配体之间相互作用的那些条件。这些条件包括pH、温度、浓度、溶剂、孵育时间等,并且在给定的特异性结合剂和配体对之间可以不同,但是可以由本领域

技术人员容易地确定。在一些实施方案中,本发明的铁调素类似物比铁调素参考化合物(例如,本文提供的铁调素参考化合物中的任一种)以更高的特异性结合铁转运蛋白。在一些实施方案中,本发明的铁调素类似物表现出比铁调素参考化合物(例如本文提供的铁调素参考化合物中的任一种)高至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200%、300%、400%、500%、700%、1000%或10,000%的铁转运蛋白特异性。在一些实施方案中,本发明的铁调素类似物表现出为铁调素参考化合物(例如本文提供的铁调素参考化合物中的任一种)的至少约5倍、或至少约10、20、50或100倍的铁转运蛋白特异性。

[0158] 在某些实施方案中,本发明的铁调素类似物表现出铁调素活性。在一些实施方案中,活性是体外或体内活性,例如本文所述的体内或体外活性。在一些实施方案中,本发明的铁调素类似物表现出铁调素参考化合物(例如本文提供的铁调素参考化合物中的任一种)表现出的活性的至少约50%、60%、70%、80%、90%、95%、97%、98%、99%或大于99%。

[0159] 在一些实施方案中,本发明的铁调素类似物表现出参考铁调素表现出的铁转运蛋白结合能力的至少约50%、60%、70%、80%、90%、95%、97%、98%、99%或大于99%。在一些实施方案中,与参考铁调素相比,本发明的铁调素类似物对结合铁转运蛋白(例如,人铁转运蛋白)具有更低的 $IC_{50}$ (即更高的结合亲和力)。在一些实施方案中,本发明的铁调素类似物在铁转运蛋白竞争性结合测定中的 $IC_{50}$ 比参考铁调素低至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200%、300%、400%、500%、700%或1000%。

[0160] 在某些实施方案中,与铁调素参考肽相比,本发明的铁调素类似物表现出增加的铁调素活性。在一些实施方案中,活性是体外或体内活性,例如本文所述的体内或体外活性。本发明的铁调素类似物表现出为参考铁调素的1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、30、40、50、60、70、80、90、100、120、140、160、180或200倍的铁调素活性。在某些实施方案中,本发明的铁调素类似物表现出比参考铁调素高至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、97%、98%、99%或大于99%、100%、200%、300%、400%、500%、700%或1000%的活性。

[0161] 在一些实施方案中,本发明的肽类似物表现出比参考铁调素高至少约50%、60%、70%、80%、90%、95%、97%、98%、99%或大于99%、100%、200%、300%、400%、500%、700%或1000%的诱导人铁转运蛋白降解的体外活性,其中所述活性根据本文所述的方法测量。

[0162] 在一些实施方案中,本发明的肽或肽二聚体表现出比参考铁调素高至少约50%、60%、70%、80%、90%、95%、97%、98%、99%或大于99%、100%、200%、300%、400%、500%、700%或1000%的诱导个体中游离血浆铁减少的体内活性,其中所述活性根据本文所述的方法测量。

[0163] 在一些实施方案中,活性是体外或体内活性,例如本文所述的体内或体外活性。在某些实施方案中,本发明的铁调素类似物表现出为参考铁调素的1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、30、40、50、60、70、80、90、100、120、140、160、180或200倍或高至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200%、300%、400%、500%、700%或1000%的活性,其中所述活性是用于诱导铁转运蛋白降解的体外活性,例如,根据本文实施例测量的;或其中所述活性是用于减少游离血浆铁的体内活

性,例如,根据本文实施例测量的。

[0164] 在一些实施方案中,本发明的铁调素类似物模拟Hep25(生物活性的人25个氨基酸形式)的铁调素活性,在本文中称为“微型铁调素”。如本文所用,在某些实施方案中,具有“铁调素活性”的化合物(例如铁调素类似物)是指当以剂量依赖性和时间依赖性方式施用(例如肠胃外注射或口服施用)时,化合物具有降低受试者(例如小鼠或人)的血浆铁浓度的能力。参见例如Rivera等人(2005),Blood106:2196-9所表明。在一些实施方案中,本发明的肽使受试者的血浆铁浓度降低至少约1.2、1.5、2、3、4、5、6、7、8、9或10倍或至少约5%、10%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或约99%。

[0165] 在一些实施方案中,本发明的铁调素类似物具有体外活性,如Nemeth等人(2006)Blood 107:328-33教导的在表达铁转运蛋白的细胞系中引起铁转运蛋白内化和降解的能力所测定的。在一些实施方案中,体外活性通过被工程化以呈现与绿色荧光蛋白融合的铁转运蛋白的细胞的剂量依赖性荧光损失来测量,如Nemeth等人(2006)Blood 107:328-33所述。将细胞的等分试样与分级浓度的Hep25或微型铁调素的参考制剂孵育24小时。如本文提供的,EC<sub>50</sub>值提供为给定化合物(例如本发明的铁调素类似物肽或肽二聚体)引起参考化合物产生的最大荧光损失的50%的浓度。Hep25制剂在该测定中的EC<sub>50</sub>为5-15nM,并且在某些实施方案中,本发明优选的铁调素类似物在体外活性测定中的EC<sub>50</sub>值为约1,000nM或更低。在某些实施方案中,本发明的铁调素类似物在体外活性测定(例如,Nemeth等人(2006)Blood 107:328-33或文中实施例中所述)中的EC<sub>50</sub>小于约0.01、0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、40、50、60、70、80、90、100、200或500nM中的任一个。在一些实施方案中,铁调素类似物或生物治疗组合物(例如,本文所述的药物组合物中的任一种)具有约1nM或更小的EC<sub>50</sub>值。

[0166] 可以使用本领域已知的用于计算根据本发明的铁调素类似物的铁调素活性和体外活性的其他方法。例如,在某些实施方案中,铁调素类似物或参考肽的体外活性通过它们内化细胞铁转运蛋白的能力来测量,这通过免疫组织化学或流式细胞术使用识别铁转运蛋白的胞外表位的抗体来确定。或者,在某些实施方案中,铁调素类似物或参考肽的体外活性通过它们抑制铁从预装载有铁的放射性同位素或稳定同位素的铁转运蛋白表达细胞流出的剂量依赖性能力来测量,如Nemeth等人(2006)Blood 107:328-33所述。

[0167] 在一些实施方案中,与参考铁调素相比,本发明的铁调素类似物表现出增加的稳定性(例如,通过半衰期、蛋白质降解速率测量)。在某些实施方案中,本发明的铁调素类似物的稳定性比参考铁调素增加至少约1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、30、40、50、60、70、80、90、100、120、140、160、180或200倍或至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200%、300%、400%或500%。在一些实施方案中,稳定性是本文所述的稳定性。在一些实施方案中,稳定性是血浆稳定性,例如任选地根据本文所述的方法测量。在一些实施方案中,稳定性是口服递送时的稳定性。

[0168] 在特定实施方案中,本发明的铁调素类似物表现出比参考铁调素更长的半衰期。在特定实施方案中,本发明的铁调素类似物在给定的一组条件(例如温度、pH)下的半衰期为至少约5分钟、至少约10分钟、至少约20分钟、至少约30分钟、至少约45分钟、至少约1小时、至少约2小时、至少约3小时、至少约4小时、至少约5小时、至少约6小时、至少约12小时、至少约18小时、至少约1天、至少约2天、至少约4天、至少约7天、至少约10天、至少约两周、至

少约三周、至少约1个月、至少约2个月、至少约3个月或更长、或其间的任何中间半衰期或范围、约5分钟、约10分钟、约20分钟、约30分钟、约45分钟、约1小时、约2小时、约3小时、约4小时、约5小时、约6小时、约12小时、约18小时、约1天、约2天、约4天、约7天、约10天、约两周、约三周、约1个月、约2个月、约3个月或更长、或其间的任何中间半衰期或范围。在一些实施方案中,本发明的铁调素类似物的半衰期由于其与一个或多个亲脂性取代基或半衰期延长部分(例如本文公开的任何亲脂性取代基或半衰期延长部分)缀合而延长。在一些实施方案中,本发明的铁调素类似物的半衰期由于其与一个或多个聚合部分(例如本文公开的任何聚合部分或半衰期延长部分)缀合而延长。在某些实施方案中,本发明的铁调素类似物在给定的一组条件下具有如上所述的半衰期,其中温度为约25℃、约4℃或约37℃,并且pH为生理pH或pH约7.4。

[0169] 在某些实施方案中,包含缀合的半衰期延长部分的本发明的铁调素类似物在口服、静脉内或皮下施用后与不含缀合的半衰期延长部分的相同类似物相比具有增加的血清半衰期。在特定实施方案中,本发明的铁调素类似物在口服、静脉内或皮下施用中的任一种后的血清半衰期为至少12小时、至少24小时、至少30小时、至少36小时、至少48小时、至少72小时或至少168小时。在特定实施方案中,其为12-168小时、24-168小时、36-168小时或48-168小时。

[0170] 在某些实施方案中,包含缀合的半衰期延长部分的本发明的铁调素类似物在口服、静脉内或皮下施用给受试者后导致血清铁浓度降低。在特定实施方案中,受试者的血清铁浓度降低至不向受试者施用铁调素类似物的情况下血清铁浓度的小于10%、小于20%、小于25%、小于30%、小于40%、小于50%、小于60%、小于70%、小于80%或小于90%。在特定实施方案中,降低的血清铁浓度在向受试者施用后保持至少1小时、至少4小时、至少10小时、至少12小时、至少24小时、至少36小时、至少48小时或至少72小时。在特定实施方案中,其保持12-168小时、24-168小时、36-168小时或48-168小时。在一个实施方案中,在例如静脉内、口服或皮下施用给受试者后约4小时或约10小时,受试者的血清铁浓度降低至小于20%。在一个实施方案中,在例如静脉内、口服或皮下施用后约24至约30小时,受试者的血清铁浓度降低至小于50%或小于60%。

[0171] 在一些实施方案中,使用本领域已知的任何合适的方法在体外测量半衰期,例如,在一些实施方案中,通过将铁调素类似物与预热的人血清(Sigma)在37℃孵育来测定本发明的铁调素类似物的稳定性。在不同的时间点(通常最多24小时)采集样品,并且通过从血清蛋白中分离铁调素类似物,然后使用LC-MS分析感兴趣的铁调素类似物的存在来分析样品的稳定性。

[0172] 在一些实施方案中,使用本领域已知的任何合适的方法体内测量铁调素类似物的稳定性,例如,在一些实施方案中,通过将肽或肽二聚体施用于受试者如人或任何哺乳动物(例如小鼠)来体内测定铁调素类似物的稳定性,然后在不同的时间点(通常最多24小时)通过抽血从受试者采集样品。然后如上文关于测定半衰期的体外方法所述分析样品。在一些实施方案中,本发明的铁调素类似物的体内稳定性通过本文实施例中公开的方法测定。

[0173] 在一些实施方案中,本发明提供了如本文所述的铁调素类似物,其中与参考铁调素相比,铁调素类似物表现出改善的溶解度或改善的聚集特征。溶解度可以通过本领域已知的任何合适的方法测定。在一些实施方案中,本领域已知的用于测定溶解度的合适方法

包括在各种缓冲液(乙酸盐pH4.0、乙酸盐pH5.0、Phos/柠檬酸盐pH5.0、phos柠檬酸盐pH6.0、Phos pH 6.0、Phos pH 7.0、Phos pH7.5、强PBS pH 7.5、Tris pH7.5、Tris pH 8.0、甘氨酸pH 9.0、水、乙酸(pH5.0和其他本领域已知的)中孵育肽(例如,本发明的铁调素类似物)并使用标准技术测试聚集或溶解度。这些包括例如但不限于视觉沉淀、动态光散射、圆二色性和荧光染料以测量表面疏水性,并检测聚集或原纤化。在一些实施方案中,改善的溶解度意指肽(例如,本发明的铁调素类似物)在给定液体中比参考铁调素更易溶。

[0174] 在某些实施方案中,本发明提供如本文所述的铁调素类似物,其中所述铁调素类似物表现出在特定溶液或缓冲液中,例如在水或本领域已知或本文公开的缓冲液中的溶解度相比于参考铁调素增加到至少约1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、30、40、50、60、70、80、90、100、120、140、160、180或200倍或增加至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200%、300%、400%或500%。

[0175] 在某些实施方案中,本发明提供如本文所述的铁调素类似物,其中所述铁调素类似物表现出减少的聚集,其中所述肽在溶液中的聚集在特定溶液或缓冲液中,例如在水或本领域已知或本文公开的缓冲液中相比于参考铁调素为至少约1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、30、40、50、60、70、80、90、100、120、140、160、180或200分之一倍或至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200%、300%、400%或500%。

[0176] 在一些实施方案中,本发明提供如本文所述的铁调素类似物,其中所述铁调素类似物表现出较少降解(即,较多降解稳定性),例如,比参考铁调素低大于或约10%、大于或约20%、大于或约30%、大于或约40%、或大于或约50%。在一些实施方案中,通过本领域已知的任何合适的方法测定降解稳定性。在一些实施方案中,本领域已知的用于测定降解稳定性的合适方法包括Hawe等人J Pharm Sci, VOL.101, NO.3, 2012, 第895-913页中所述的方法,其全文并入本文。在一些实施方案中,此类方法用于选择具有延长的保存期的有效序列。

[0177] 在一些实施方案中,本发明的铁调素类似物是合成制备的。在其他实施方案中,重组制备本发明的铁调素类似物。

[0178] 本发明的各种铁调素类似物单体和二聚体肽可仅由天然氨基酸构建。或者,这些铁调素类似物可包括非天然氨基酸,包括但不限于修饰的氨基酸。在某些实施方案中,修饰的氨基酸包括已被化学修饰以包括氨基酸上不天然存在的一个或多个基团或化学部分的天然氨基酸。本发明的铁调素类似物可另外包括D-氨基酸。此外,本发明的铁调素类似物肽单体和二聚体可包括氨基酸类似物。在特定实施方案中,本发明的肽类似物包括本文所述的任何肽类似物,其中所述肽类似物的一个或多个天然氨基酸残基被非天然氨基酸或D-氨基酸取代。

[0179] 在某些实施方案中,本发明的铁调素类似物包括一种或多种修饰的或非天然的氨基酸。例如,在某些实施方案中,铁调素类似物包括Daba、Dapa、Pen、Sar、Cit、Cav、HLeu、2-Nal、1-Nal、d-1-Nal、d-2-Nal、Bip、Phe(4-OMe)、Tyr(4-OMe)、βhTrp、βhPhe、Phe(4-CF<sub>3</sub>)、2-2-茛满、1-1-茛满、环丁基、βhPhe、hLeu、Gla、Phe(4-NH<sub>2</sub>)、hPhe、1-Nal、Nle、3-3-diPhe、环丁基-Ala、Cha、Bip、β-Glu、Phe(4-Guan)、高氨基酸、D-氨基酸和各种N-甲基化氨基酸中的一种或多种。本领域技术人员将理解,可以制备其他修饰的或非天然的氨基酸,以及用修饰

的或非天然的氨基酸对天然氨基酸进行各种其他取代,以达到类似的所需结果,并且此类取代在本发明的教导和精神内。

[0180] 本发明包括本文所述的任何铁调素类似物,例如游离或盐形式。

[0181] 本文所述的化合物包括同位素标记的化合物,其与本文提供的各种式和结构中所描述的那些相同,但一个或多个原子被具有与通常在自然界中发现的原子质量或质量数不同的原子质量或质量数的原子替代。可掺入本发明化合物的同位素的实例包括氢、碳、氮、氧、氟和氯的同位素,例如分别为<sup>2</sup>H、<sup>3</sup>H、<sup>13</sup>C、<sup>14</sup>C、<sup>15</sup>N、<sup>18</sup>O、<sup>17</sup>O、<sup>35</sup>S、<sup>18</sup>F、<sup>36</sup>Cl。本文所述的某些同位素标记的化合物,例如其中掺入放射性同位素如<sup>3</sup>H和<sup>14</sup>C的那些,可用于药物和/或底物组织分布测定。此外,用同位素如氘(即<sup>2</sup>H)取代可提供由更大的代谢稳定性产生的某些治疗优势,例如增加的体内半衰期或降低的剂量需求。

[0182] 本发明的铁调素类似物包括与接头部分(包括本文所述的任何特定接头部分)连接的本文所述的任何肽单体或二聚体。

[0183] 本发明的铁调素类似物包括肽,例如单体或二聚体,其包含与本文所述的铁调素类似物肽序列(例如本文公开的任一种肽)具有至少85%、至少90%、至少92%、至少94%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的肽单体亚基,包括但不限于表2和3中所示的任何氨基酸序列。

[0184] 在某些实施方案中,本发明的肽类似物或本发明的二聚体肽类似物的单体亚基包含以下或由以下组成:7至35个氨基酸残基、8至35个氨基酸残基、9至35个氨基酸残基、10至35个氨基酸残基、7至25个氨基酸残基、8至25个氨基酸残基、9至25个氨基酸残基、10至25个氨基酸残基、7至18个氨基酸残基、8至18个氨基酸残基、9至18个氨基酸残基、或10至18个氨基酸残基、以及任选地一个或多个另外的非氨基酸部分,如缀合的化学部分,例如半衰期延长部分、PEG或接头部分。在特定实施方案中,铁调素类似物的单体亚基包含或由7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34或35个氨基酸残基组成。在特定实施方案中,本发明的铁调素类似物的单体亚基包含或由10至18个氨基酸残基和任选地一个或多个另外的非氨基酸部分如缀合的化学部分,例如PEG或接头部分组成。在各种实施方案中,单体亚基包含或由7至35个氨基酸残基、9至18个氨基酸残基或10至18个氨基酸残基组成。在本文所述的各种式中的任一种的特定实施方案中,X包含以下或由以下组成:7至35个氨基酸残基、8至35个氨基酸残基、9至35个氨基酸残基、10至35个氨基酸残基、7至25个氨基酸残基、8至25个氨基酸残基、9至25个氨基酸残基、10至25个氨基酸残基、7至18个氨基酸残基、8至18个氨基酸残基、9至18个氨基酸残基、或10至18个氨基酸残基。

[0185] 在某些实施方案中,根据本发明的铁调素类似物包括PCT专利申请公开号W02014/145561、W02015/200916或W02017/117411中公开的任何和所有铁调素类似物,这些专利申请通过引用整体并入本文。

[0186] 肽单体铁调素类似物

[0187] 在一个具体方面,本发明提供了治疗有需要的受试者的真性红细胞增多症的方法,其包括向受试者施用铁调素类似物或其药学上可接受的盐,或有效量的包含铁调素类似物或其药学上可接受的盐的药物组合物。

[0188] 在更具体的方面,本发明提供了治疗有需要的受试者的真性红细胞增多症的方

法,其包括向受试者施用有效量的铁调素类似物或其药学上可接受的盐,或包含铁调素类似物或其药学上可接受的盐和药学上可接受的载剂、稀释剂或赋形剂的药物组合物。

[0189] 在一个实施方案中,铁调素类似物包括包含式(I)的肽:

[0190] R1-X-Y-R2 (I) (SEQ ID NO:1)

[0191] 或其药学上可接受的盐或溶剂化物,

[0192] 其中

[0193] R1是氢、C1-C6烷基、C6-C12芳基、C1-C20烷酰基或pGlu;

[0194] R2是NH<sub>2</sub>或OH;

[0195] X是具有式II的肽序列

[0196] X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10 (II) (SEQ ID NO:2) 其中

[0197] X1是Asp、Ala、Ile、pGlu、bhAsp、Leu、D-Asp或不存在;

[0198] X2是Thr、Ala或D-Thr;

[0199] X3是His、Lys或D-His;

[0200] X4是Phe、Ala、Dpa或D-Phe;

[0201] X5是Pro、Gly、Arg、Lys、Ala、D-Pro或bhPro;

[0202] X6是Ile、Cys、Arg、Lys、D-Ile或D-Cys;

[0203] X7是Cys、Ile、Leu、Val、Phe、D-Ile或D-Cys;

[0204] X8是Ile、Arg、Phe、Gln、Lys、Glu、Val、Leu或D-Ile;

[0205] X9是Phe或bhPhe;以及

[0206] X10是Lys、Phe或不存在;

[0207] 其中如果Y不存在,则X7是Ile;以及

[0208] Y是具有式III的肽序列

[0209] Y1-Y2-Y3-Y4-Y5-Y6-Y7-Y8-Y9-Y10-Y11-Y12-Y13-Y14-Y15 (III) (SEQ ID NO:3)

[0210] 其中

[0211] Y1是Gly、Cys、Ala、Phe、Pro、Glu、Lys、D-Pro、Val、Ser或不存在;

[0212] Y2是Pro、Ala、Cys、Gly或不存在;

[0213] Y3是Arg、Lys、Pro、Gly、His、Ala、Trp或不存在;

[0214] Y4是Ser、Arg、Gly、Trp、Ala、His、Tyr或不存在;

[0215] Y5是Lys、Met、Arg、Ala或不存在;

[0216] Y6是Gly、Ser、Lys、Ile、Ala、Pro、Val或不存在;

[0217] Y7是Trp、Lys、Gly、Ala、Ile、Val或不存在;

[0218] Y8是Val、Thr、Gly、Cys、Met、Tyr、Ala、Glu、Lys、Asp、Arg或不存在;

[0219] Y9是Cys、Tyr或不存在;

[0220] Y10是Met、Lys、Arg、Tyr或不存在;

[0221] Y11是Arg、Met、Cys、Lys或不存在;

[0222] Y12是Arg、Lys、Ala或不存在;

[0223] Y13是Arg、Cys、Lys、Val或不存在;

[0224] Y14是Arg、Lys、Pro、Cys、Thr或不存在;以及

[0225] Y15是Thr、Arg或不存在;

[0226] 其中所述式I肽任选地在R1、X或Y上被聚乙二醇化,并且其中所述肽的氨基酸的侧链任选地缀合至亲脂性取代基或聚合部分。

[0227] 在相关实施方案中,式II如以上对于X1、X2、X4、X5、X6、X7、X8、X9和X10所示,但X3是His、Lys、D-His或D-Lys。

[0228] 在一个实施方案中,R1是氢、异戊酸、异丁酸或乙酰基。在另一个实施方案中,R1是异戊酸或异丁酸。在特定实施方案中,R1是异戊酸。

[0229] 在一个实施方案中,X是具有式IV的肽序列:

[0230] X1-Thr-His-X4-X5-X6-X7-X8-Phe-X10 (IV) (SEQ ID NO:4)

[0231] 其中

[0232] X1是Asp、Ida、pGlu、bhAsp或不存在;

[0233] X4是Phe或Dpa;

[0234] X5是Pro或bhPro;

[0235] X6是Ile、Cys或Arg;

[0236] X7是Cys、Ile、Leu或Val;

[0237] X8是Ile、Lys、Glu、Phe、Gln或Arg;以及

[0238] X10是Lys或不存在。

[0239] 在另一个实施方案中,X是具有式V的肽序列:

[0240] X1-Thr-His-X4-X5-Cys-Ile-X8-Phe-X10 (V) (SEQ ID NO:5)

[0241] X1是Asp、Ida、pGlu、bhAsp或不存在;

[0242] X4是Phe或Dpa;

[0243] X5是Pro或bhPro;

[0244] X8是Ile、Lys、Glu、Phe、Gln或Arg;以及

[0245] X10是Lys或不存在。

[0246] 在一个特定实施方案中,肽是根据式VI:

[0247]  $R^1-X-Y-R^2$  (VI) (SEQ ID NO:6)

[0248] 或其药学上可接受的盐,其中:

[0249]  $R^1$ 是氢、异戊酸、异丁酸或乙酰基;

[0250]  $R^2$ 是 $-NH_2$ 或 $-OH$ ;

[0251] X是具有式VII的肽序列:

[0252] X1-Thr-His-X4-X5-Cys-Ile-X8-Phe-X10 (VII) (SEQ ID NO:7)

[0253] 其中

[0254] X1是Asp、Ida、pGlu、bhAsp或不存在;

[0255] X4是Phe或Dpa;

[0256] X5是Pro或bhPro;

[0257] X8是Ile、Lys、Glu、Phe、Gln或Arg;以及

[0258] X10是Lys或不存在;

[0259] 其中Y是具有式VIII的肽序列:

[0260] Y1-Pro-Y3-Ser-Y5-Y6-Y7-Y8-Cys-Y10 (VIII) (SEQ ID NO:8)

[0261] 其中

- [0262] Y1是Gly、Glu、Val或Lys；
- [0263] Y3是Arg或Lys；
- [0264] Y5是Arg或Lys；
- [0265] Y6是Gly、Ser、Lys、Ile或Arg；
- [0266] Y7是Trp或不存在；
- [0267] Y8是Val、Thr、Asp、Glu或不存在；以及
- [0268] Y10是Lys或不存在；
- [0269] 其中肽在两个Cys之间包含二硫键；
- [0270] 其中所述式I的肽任选地在R<sup>1</sup>、X或Y上被聚乙二醇化；
- [0271] 其中肽的氨基酸的侧链任选地缀合至亲脂性取代基或聚合部分；以及
- [0272] 其中Ida为亚氨基二乙酸；pGlu是焦谷氨酸；bhAsp是β-高天冬氨酸；并且bhPro是β-高脯氨酸。
- [0273] 在另一特定实施方案中，肽包含以下序列之一：
- [0274] DTHFPICIFGPRSKGWVC (SEQ ID NO:9)；
- [0275] DTHFPCIIFGPRSKGWVCK (SEQ ID NO:10)；
- [0276] DTHFPCIIFEPRSKGWVCK (SEQ ID NO:11)；
- [0277] DTHFPCIIFGPRSKGWACK (SEQ ID NO:12)；
- [0278] DTHFPCIIFGPRSKGWVCKK (SEQ ID NO:13)；
- [0279] DTHFPCIIFVCHRPKGCYRRVCR (SEQ ID NO:14)；
- [0280] DTHFPCIKFGPRSKGWVCK (SEQ ID NO:15)；
- [0281] DTHFPCIKFKPRSKGWVCK (SEQ ID NO:16)；
- [0282] DTHFPCIIFGPRSRGWVCK (SEQ ID NO:17)；
- [0283] DTHFPCIKFGPKSKGWVCK (SEQ ID NO:18)；
- [0284] DTHFPCIKFEPKSKGCK (SEQ ID NO:19)；
- [0285] DTHFPCIKFEPKSKGWECK (SEQ ID NO:20)；
- [0286] DTHFPCIKFEPKSKKCK (SEQ ID NO:21)；
- [0287] DTHFPCIKFEPKSKGCKK (SEQ ID NO:22)；
- [0288] DTHFPCIKFKPRSKGCK (SEQ ID NO:23)；
- [0289] DTHFPCIKFEPKSKGCK (SEQ ID NO:24)；
- [0290] DTHFPCIKF (SEQ ID NO:25)；
- [0291] DTHFPCIIF (SEQ ID NO:26)；或
- [0292] DTKFPCIIF (SEQ ID NO:27)；
- [0293] 其中所述肽任选地在R<sup>1</sup>、X或Y上被聚乙二醇化，并且其中肽的氨基酸的侧链任选地缀合至亲脂性取代基或聚合部分。
- [0294] 在另一个特定实施方案中，铁调素类似物或肽包含以下序列之一：
- [0295] 异戊酸-DTHFPICIFGPRSKGWVC-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:9)；
- [0296] 异戊酸-DTHFPCIIFGPRSKGWVCK-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:10)；
- [0297] 异戊酸-DTHFPCIIFEPRSKGWVCK-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:11)；
- [0298] 异戊酸-DTHFPCIIFGPRSKGWACK-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:12)；

- [0299] 异戊酸-DTHFPCIIFGPRSKGWVCK-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:13) ;
- [0300] 异戊酸-DTHFPCIIFVCHRPKGCYRRVCR-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:14) ;
- [0301] 异戊酸-DTHFPCI (K (PEG8)) FGPRSKGWVCK-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:28) ;
- [0302] 异戊酸-DTHFPCIKF (K (PEG8)) PRSKGWVCK-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:16) ;
- [0303] 异戊酸-DTHFPCIFGPRS (K (PEG8)) GWVC-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:29) ;
- [0304] 异戊酸-DTHFPCIFGPRS (K (PEG4)) GWVC-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:30) ;
- [0305] 异戊酸-DTHFPCIIFGPRSRGWVC (K (PEG8)) -NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:31) ;
- [0306] 异戊酸-DTHFPCIIFGPRSRGWVC (K (PEG4)) -NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:32) ;
- [0307] 异戊酸-DTHFPCIIFGPRSRGWVC (K (PEG2)) -NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:33) ;
- [0308] 异戊酸-DTHFPCI (K (PalM)) FGPRSKGWVCK-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:34) ;
- [0309] 异戊酸-DTHFPCIKF (K (PalM)) PRSKGWVCK-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:35) ;
- [0310] 异戊酸-DTHFPCIKFGP (K (PalM)) SKGWVCK-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:36) ;
- [0311] 异戊酸-DTHFPCIKFGPRS (K (PalM)) GWVCK-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:37) ;
- [0312] 异戊酸-DTHFPCIKFGPRSKGWVC (K (PalM)) NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:38) ;
- [0313] 异戊酸-DTHFPCI (K (PEG3-PalM)) FGPRSKGWVCK-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:39) ;
- [0314] 异戊酸-DTHFPCIKF (K (PEG3-PalM)) PRSKGWVCK-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:40) ;
- [0315] 异戊酸-DTHFPCIKFGP (K (PEG3-PalM)) SKGWVCK-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:41) ;
- [0316] 异戊酸-DTHFPCIKFGPRS (K (PEG3-PalM)) GWVCK-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:42) ;
- [0317] 异戊酸-DTHFPCIKFGPRSKGWVC (K (PEG3-PalM)) -NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:43) ;
- [0318] 异戊酸-DTHFPCIKFGPRSKGWVC (K (PEG8)) -NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:44) ;
- [0319] 异戊酸-DTHFPCI (K (isoGlu-PalM)) FEPRSKGCK-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:45) ;
- [0320] 异戊酸-DTHFPCIKF-K (isoGlu-PalM) -PRSKGCK-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:46) ;
- [0321] 异戊酸-DTHFPCIKFEP (K (isoGlu-PalM)) SKGCK-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:47) ;
- [0322] 异戊酸-DTHFPCIKFEP (K (isoGlu-PalM)) SKGWECK-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:20) ;
- [0323] 异戊酸-DTHFPCIKFEP (K (isoGlu-PalM)) GCK-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:48) ;
- [0324] 异戊酸-DTHFPCIKFEP (K (isoGlu-PalM)) CK-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:21) ;
- [0325] 异戊酸-DTHFPCIKFEP (K (isoGlu-PalM)) SKGCK-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:49) ;
- [0326] 异戊酸-DTHFPCI-K (Dapa-PalM) -FEPRSKGCK-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:50) ;
- [0327] 异戊酸-DTHFPCIK (F (Dapa-PalM)) PRSKGCK-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:23) ;
- [0328] 异戊酸-DTHFPCIKFEP (K (Dapa-PalM)) SKGCK-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:24) ;
- [0329] 异戊酸-DTHFPCIKFEP (K (Dapa-PalM)) GCK-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:51) ;
- [0330] 异戊酸-DTHFPCIKFEP (K (Dapa-PalM)) CK-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:52) ;
- [0331] 异戊酸-DTHFPCIKFEP (K (Dapa-PalM)) K-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:53) ;
- [0332] 异戊酸-DTHFPCIKFEP (K (Dapa-PalM)) -NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:54) ;
- [0333] 异戊酸-DTHFPCIKF (K (PEG11-PalM)) PRSK[Sar]CK-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:55) ;
- [0334] 异戊酸-DTHFPCIKF-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:25) ;
- [0335] Hy-DTHFPCIKF-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:25) ;
- [0336] 异戊酸-DTHFPCIIF-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:26) ;
- [0337] Hy-DTHFPCIIF-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:26) ;

- [0338] 异戊酸-DTKFPCIIF-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:27);或
- [0339] Hy-DTKFPCIIF-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:27)。
- [0340] 在一个更特定实施方案中,铁调素类似物或肽是:异戊酸-DTHFPCIIFGPRSKGWVCK-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:10)。
- [0341] 在一个更特定实施方案中,铁调素类似物或肽是:异戊酸-DTHFPCIIFEPRSKGWVCK-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:11)。
- [0342] 在一个更特定实施方案中,铁调素类似物或肽是:异戊酸-DTHFPCI (K (PEG8)) FGPRSKGWVCK-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:28)。
- [0343] 在一个更特定实施方案中,铁调素类似物或肽是:异戊酸-DTHFPCIKF (K (PEG8)) PRSKGWVCK-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:16)。
- [0344] 在一个更特定实施方案中,铁调素类似物或肽是:异戊酸-DTHFPCIIFGPRSRGWVC (K (PEG8)) -NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:31)。
- [0345] 在一个更特定实施方案中,铁调素类似物或肽是:异戊酸-DTHFPCI (K (Pal m)) FGPRSKGWVCK-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:34)。
- [0346] 在一个更特定实施方案中,铁调素类似物或肽是:异戊酸-DTHFPCIKF (K (Pal m)) PRSKGWVCK-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:35)。
- [0347] 在一个更特定实施方案中,铁调素类似物或肽是:异戊酸-DTHFPCIKFGP (K (Pal m)) SKGWVCK-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:36)。
- [0348] 在一个更特定实施方案中,铁调素类似物或肽是:异戊酸-DTHFPCIKFGPRSKGWVC (K (Pal m)) -NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:38)。
- [0349] 在一个更特定实施方案中,铁调素类似物或肽是:异戊酸-DTHFPCI (K (PEG3-Pal m)) FGPRSKGWVCK-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:39)。
- [0350] 在一个更特定实施方案中,铁调素类似物或肽是:异戊酸-DTHFPCIKF (K (PEG3-Pal m)) PRSKGWVCK-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:40)。
- [0351] 在一个更特定实施方案中,铁调素类似物或肽是:异戊酸-DTHFPCIKFGP (K (PEG3-Pal m)) SKGWVCK-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:41)。
- [0352] 在一个更特定实施方案中,铁调素类似物或肽是:异戊酸-DTHFPCIKFGPRS (K (PEG3-Pal m)) GWVCK-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:42)。
- [0353] 在一个更特定实施方案中,铁调素类似物或肽是:异戊酸-DTHFPCIKFGPRSKGWVC (K (PEG3-Pal m)) -NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:43)。
- [0354] 在一个更特定实施方案中,铁调素类似物或肽是:异戊酸-DTHFPCIKFGPRSKGWVC (K (PEG8)) -NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:44)。
- [0355] 在一个更特定实施方案中,铁调素类似物或肽是:异戊酸-DTHFPCI (K (isoGlu-Pal m)) FEPRSKGCK-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:45)。
- [0356] 在一个更特定实施方案中,铁调素类似物或肽是:异戊酸-DTHFPCIKF (K (isoGlu-Pal m)) PRSKGCK-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:46)。
- [0357] 在一个更特定实施方案中,铁调素类似物或肽是:异戊酸-DTHFPCIKFEP (K (isoGlu-Pal m)) SKGCK-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:47)。
- [0358] 在一个更特定实施方案中,铁调素类似物或肽是:异戊酸-DTHFPCIKFEPRS (K

(isoGlu-Palm) GCK-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:48)。

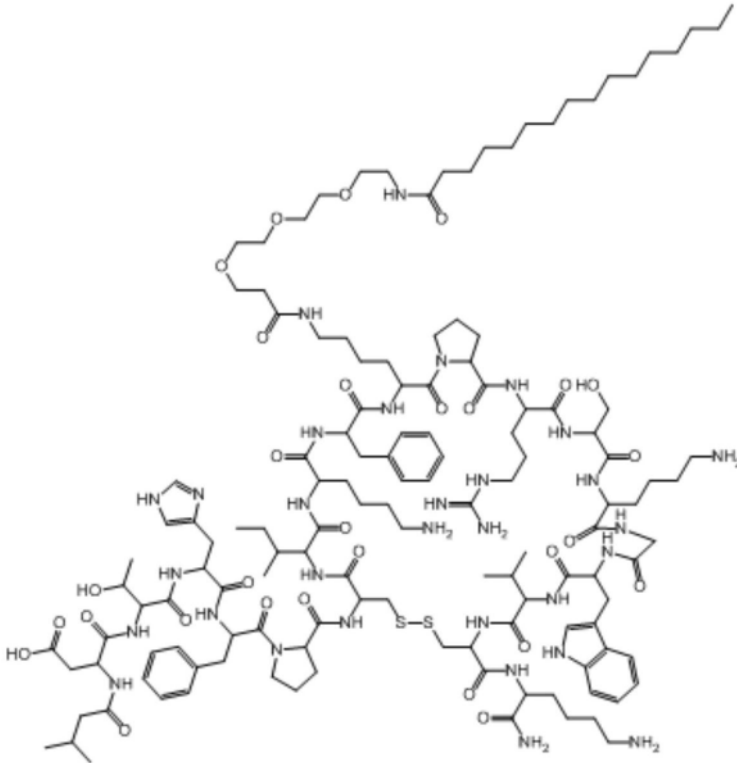
[0359] 在一个更特定实施方案中,铁调素类似物或肽是:异戊酸-DTHFPCI (K (Dapa-Palm) FEPRSKGCK-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:50)。

[0360] 在一个更特定实施方案中,铁调素类似物或肽是:异戊酸-DTHFPCIKFEP (K (Dapa-Palm) SKGCK-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:24)

[0361] 在一个更特定实施方案中,铁调素类似物或肽选自由以下组成的组:

[0362] (a)

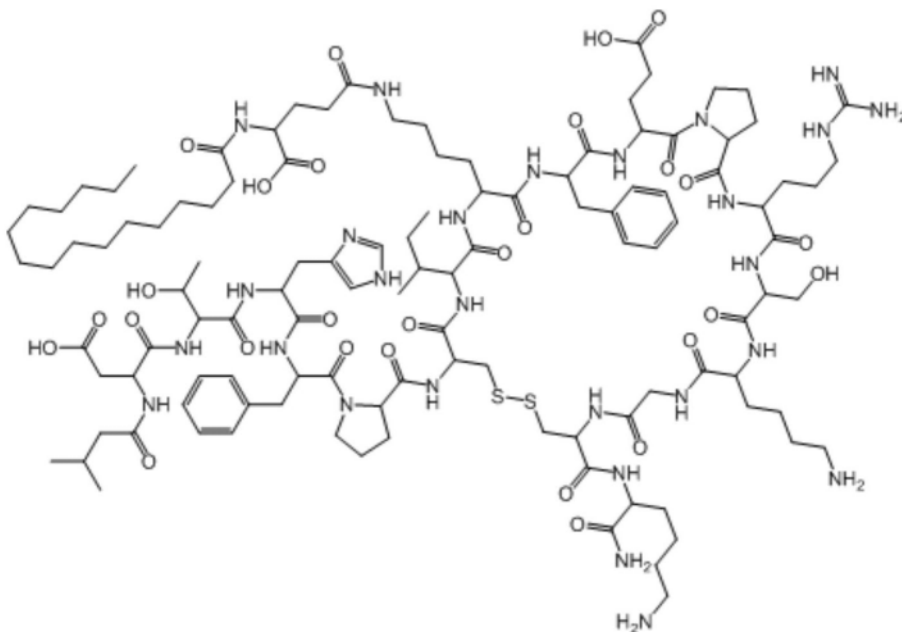
[0363]



[0364] 异戊酸-DTHFPCIKF (K (PEG3-Palm) PRSKGWVCK-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:40) ;

[0365] (b)

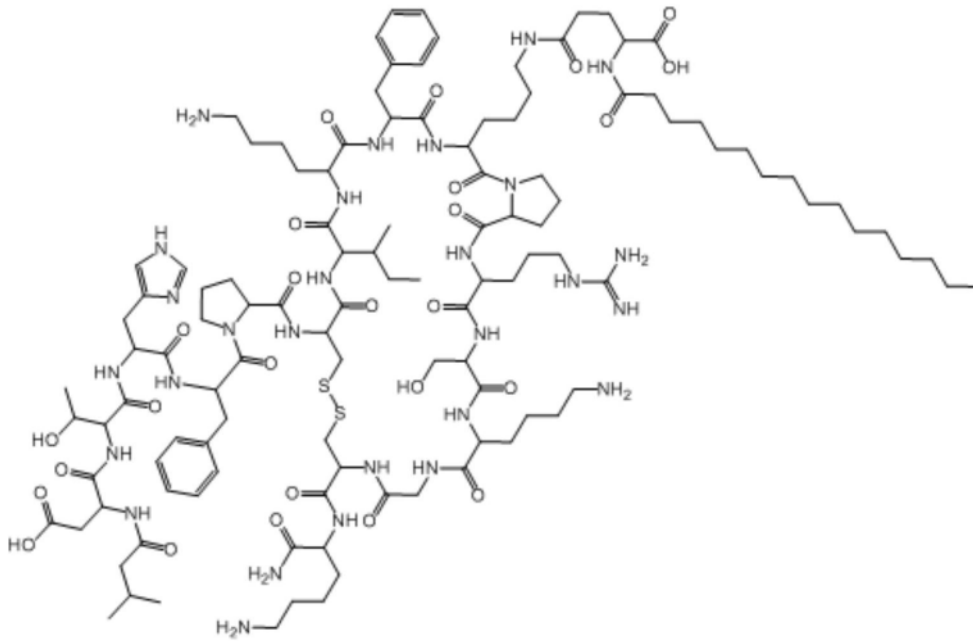
[0366]



[0367] 异戊酸-DTHFPCI (K (isoGlu-Palm)) FEPRSKGCK-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:45) ;

[0368] (c)

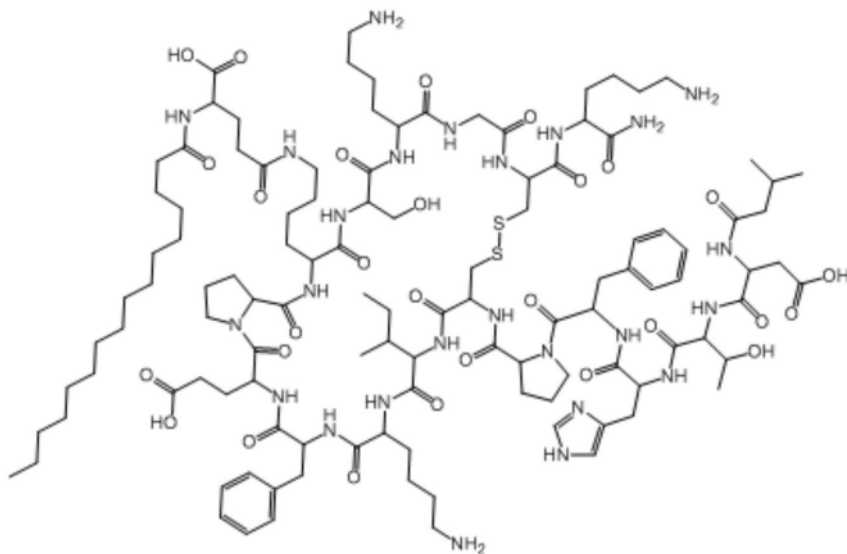
[0369]



[0370] 异戊酸-DTHFPCIKF (K (isoGlu-Palm)) PRSKGCK-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:46) ;

[0371] (d)

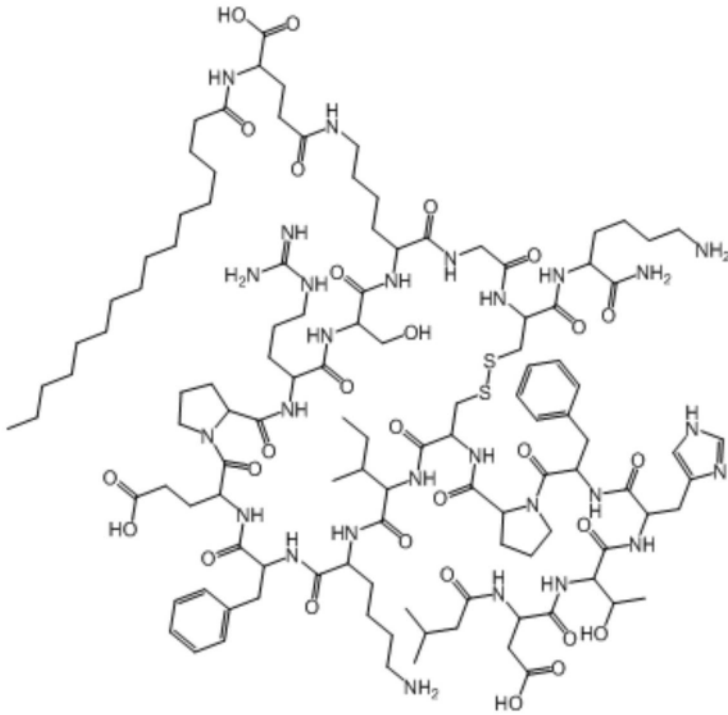
[0372]



[0373] 异戊酸-DTHFPCIKFEP (K (isoGlu-Palm)) SKGCK-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:47) ;以及

[0374] (e)

[0375]



[0376] 异戊酸-DTHFPCIKFEPRS (K(isoGlu-Palm))GCK-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:48), 和上述任一个的药学上可接受的盐, 其中氨基酸是L-氨基酸。

[0377] 在一些实施方案中, 本发明的铁调素类似物在二聚体构象中具有活性, 特别是当肽中存在游离半胱氨酸残基时。在某些实施方案中, 这或者作为合成的二聚体发生, 或者特别地, 当存在游离半胱氨酸单体肽并且在氧化条件下二聚化时发生。在一些实施方案中, 二聚体是同二聚体。在其他实施方案中, 二聚体是异二聚体。

[0378] 在某些实施方案中, 本发明的铁调素类似物二聚体是包含两个本发明的铁调素类似物肽单体的肽二聚体。

[0379] 在某些实施方案中, 本发明包括多肽, 其包含本文所述的氨基酸序列, 或具有与任何这些氨基酸序列具有至少85%、至少90%、至少92%、至少94%或至少95%同一性的任何氨基酸序列。在相关的实施方案中, 本发明包括包含两个多肽的二聚体, 每个多肽包含本文所述的氨基酸序列, 或具有与任何这些氨基酸序列具有至少85%、至少90%、至少92%、至少94%或至少95%同一性的任何氨基酸序列。

[0380] 在特定实施方案中, 单体亚基可以通过两个半胱氨酸残基之间的二硫桥(每个肽单体亚基中一个)二聚化, 或者它们可以通过另一个合适的接头部分(包括本文所述的那些)二聚化。一些单体亚基显示为具有均包含游离胺的C和/或N末端。因此, 为了产生肽二聚体抑制剂, 可以修饰单体亚基以消除C或N末端游离胺, 从而允许在剩余的游离胺处二聚化。此外, 在一些情况下, 一个或多个单体亚基的末端用选自以下组成的组的酰化有机化合物酰化: 2-甲基-三氟丁基、三氟戊基、乙酰基、辛基(Octonyl)、丁基、戊基、己基、棕榈基、三氟甲基丁酸、环戊烷羧酸、环丙基乙酸、4-氟苯甲酸、4-氟苯基乙酸、3-苯基丙酸、四氢-2H-吡喃-4-羧酸、琥珀酸和戊二酸。在一些情况下, 单体亚基包含游离羧基末端和游离氨基末端, 由此用户可以选择性地修饰亚基以在所需末端实现二聚化。因此, 本领域技术人员将理解, 本发明的单体亚基可以被选择性地修饰以获得用于所需二聚化的单一特定胺。

[0381] 还应理解, 本文公开的单体亚基的C末端残基可以是酰胺, 除非另有说明。此外, 应

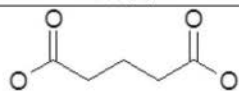
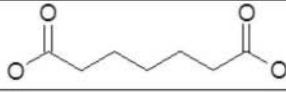

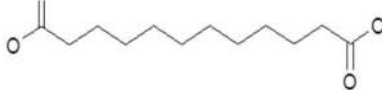
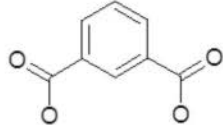
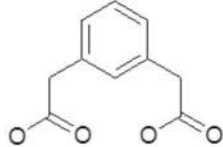
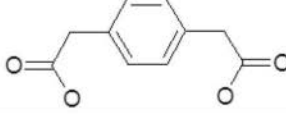
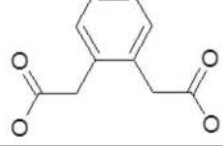
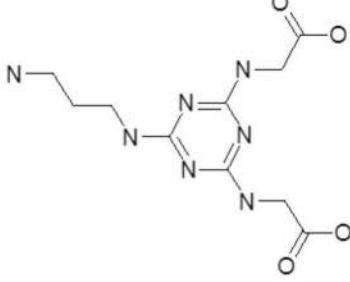
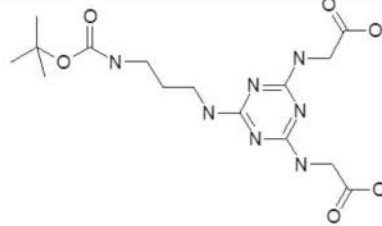
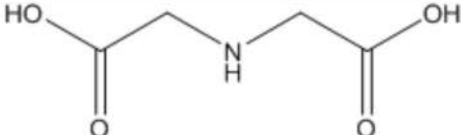
理解,在某些实施方案中,如本领域通常理解的,通过使用具有胺官能团的侧链的合适氨基酸来促进C末端的二聚化。关于N末端残基,通常应理解,二聚化可通过末端残基的游离胺实现,或可通过使用具有游离胺的合适的氨基酸侧链实现,如本领域通常理解的。

[0382] 此外,应理解包含在本发明的铁调素类似物肽单体中的一个或多个内部残基的侧链可用于二聚化的目的。在此类实施方案中,侧链在一些实施方案中是合适的天然氨基酸(例如,Lys),或替代地,它是包含适于缀合至例如本文所定义的合适的接头部分的侧链的非天然氨基酸。

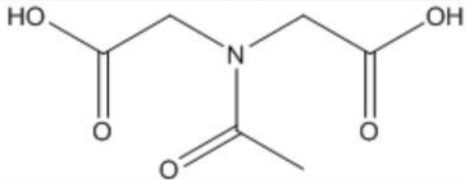
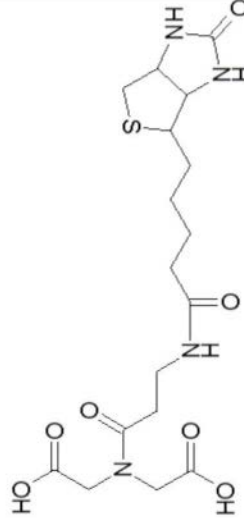
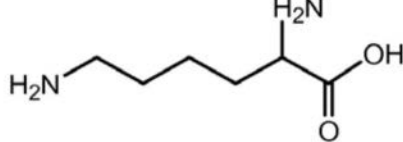
[0383] 连接单体亚基的接头部分可以包括与本文教导相容的任何结构、长度和/或大小。在至少一个实施方案中,接头部分选自由以下组成的非限制性组:半胱氨酸、赖氨酸、DIG、PEG4、PEG4-生物素、PEG13、PEG25、PEG1K、PEG2K、PEG3.4K、PEG4K、PEG5K、IDA、IDA-Palm、ADA、Boc-IDA、戊二酸、间苯二甲酸、1,3-苯二乙酸、1,4-苯二乙酸、1,2-苯二乙酸、三嗪、Boc-三嗪、IDA-生物素、PEG4-生物素、AADA、合适的脂族烃、芳烃、杂芳族烃和分子量为约400Da至约40,000Da的基于聚乙二醇的接头。合适的接头部分的非限制性实例提供于表2中。在特定实施方案中,这些接头部分中的任一个可替代地将半衰期延长部分连接至铁调素类似物。

[0384] 表2. 说明性接头部分

缩写	描述	结构
DIG	二甘醇酸	
PEG4	具有 4 个聚乙二醇单元的双功能 PEG 接头	
PEG13	具有 13 个聚乙二醇单元的双功能 PEG 接头	
PEG25	具有 25 个聚乙二醇单元的双功能 PEG 接头	
PEG1K	具有 1000Da 的聚乙二醇分子量的双功能 PEG 接头	
PEG2K	具有 2000Da 的聚乙二醇分子量的双功能 PEG 接头	
PEG3.4K	具有 3400Da 的聚乙二醇分子量的双功能 PEG 接头	
PEG5K	具有 5000Da 的聚乙二醇分子量的双功能 PEG 接头	
DIG	二甘醇酸	
[0385] β-Ala-IDA	β-Ala-亚氨基二乙酸	
Boc-β-Ala-IDA	Boc-β-Ala-亚氨基二乙酸	
Ac-β-Ala-IDA	Ac-β-Ala-亚氨基二乙酸	
Palm-β-Ala-IDA	棕榈基-β-Ala-亚氨基二乙酸	

缩写	描述	结构
GTA	戊二酸	
PMA	庚二酸(Pemilic acid)	
AZA	壬二酸	
DDA	十二烷二酸	
IPA	间苯二甲酸	
1,3-PD A	1,3-苯二乙酸	
1,4-PD A	1,4-苯二乙酸	
1,2-PD A	1,2-苯二乙酸	
三嗪	氨丙基三嗪二酸	
Boc-三 嗪	Boc-三嗪二酸	
IDA	亚氨基二乙酸	

[0386]

缩写	描述	结构
AIDA	n-乙酰亚氨基乙酸	
[0387] 生物素- $\beta$ -ala-I DA-	N-生物素- $\beta$ -Ala-亚氨基二乙酸	
Lys	赖氨酸	

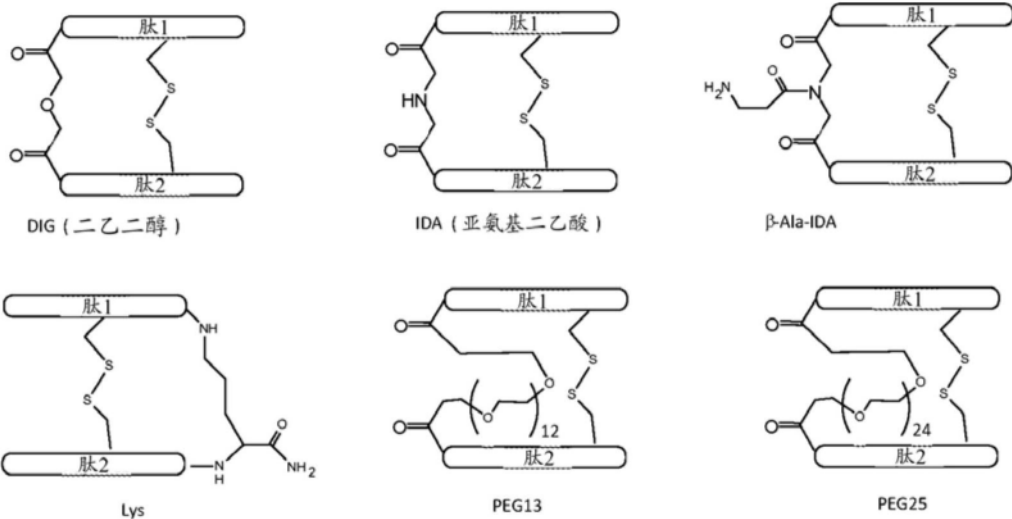
[0388] 本领域技术人员将理解,本文公开的C和N末端和内部接头部分是合适接头部分的非限制性实例,并且本发明可包括任何合适的接头部分。

[0389] 在任何铁调素类似物肽二聚体的某些实施方案中,每个肽单体亚基的N末端通过接头部分连接。

[0390] 在任何铁调素类似物肽二聚体的某些实施方案中,每个肽单体亚基的C末端通过接头部分连接。

[0391] 在某些实施方案中,包含在铁调素类似物肽二聚体的每个肽单体亚基中的一个或多个内部氨基酸残基(例如Lys残基)的侧链通过接头部分连接。

[0392] 在任何铁调素类似物肽二聚体的某些实施方案中,每个肽单体亚基的C末端、N末端或内部氨基酸(例如赖氨酸侧链)通过接头部分连接,并且铁调素类似物肽二聚体的至少两个半胱氨酸或Pen残基通过二硫桥连接。在一些实施方案中,肽二聚体具有如下所示的一般结构。此类铁调素类似物的非限制性示意性实例显示于以下说明中:



#### [0394] 肽类似物缀合物

[0395] 在某些实施方案中,本发明的铁调素类似物(包括单体和二聚体)包含一个或多个缀合的化学取代基,如亲脂性取代基和聚合部分,在本文中统称为半衰期延长部分。不希望受任何特定理论的束缚,据信亲脂性取代基与血流中的白蛋白结合,从而保护铁调素类似物免于酶促降解,从而延长其半衰期。此外,据信聚合物部分延长了半衰期并降低了血流中的清除率,并且在一些情况下增强了通过上皮的渗透性和在固有层中的保留。此外,还推测这些取代基在一些情况下可增强通过上皮的渗透性和在固有层中的保留。本领域技术人员熟知用于制备本发明上下文中使用的化合物的合适技术。对于非限制性合适化学的实例,参见例如W098/08871、W000/55184、W000/55119、Madsen等人(J. Med. Chem. 2007, 50, 6126-32)和Knudsen等人2000(J. Med. Chem. 43, 1664-1669)。

[0396] 在一个实施方案中,本发明的铁调素类似物中的一个或多个氨基酸残基(例如Lys残基)的侧链进一步缀合(例如共价附接)至亲脂性取代基或其他半衰期延长部分。亲脂性取代基可与氨基酸侧链中的原子共价键合,或者可通过一个或多个间隔基或接头部分与氨基酸侧链缀合。间隔基或接头部分(当存在时)可以提供铁调素类似物和亲脂性取代基之间的间隔。在特定实施方案中,半衰期延长部分通过接头部分与铁调素类似物缀合,所述接头部分在某些实施方案中是表2中所示的或在表2-7的任一个中公开或描绘的接头部分。

[0397] 在某些实施方案中,亲脂性取代基或半衰期延长部分包含具有4-30个C原子,例如至少8或12个C原子,优选24个C原子或更少,或20个C原子或更少的烃链。烃链可以是直链或支链的,并且可以是饱和或不饱和的。在某些实施方案中,烃链被形成与氨基酸侧链或间隔基附接的一部分的部分取代,例如酰基、磺酰基、N原子、O原子或S原子。在一些实施方案中,烃链被酰基取代,因此烃链可以形成烷酰基的一部分,例如棕榈酰基、己酰基、月桂酰基、肉豆蔻酰基或硬脂酰基。

[0398] 亲脂性取代基可与本发明铁调素类似物中的任何氨基酸侧链缀合。在某些实施方案中,氨基酸侧链包括羧基、羟基、硫醇、酰胺或胺基、用于与间隔基或亲脂性取代基形成酯、磺酰酯、硫酯、酰胺或磺酰胺。例如,亲脂性取代基可以与Asn、Asp、Glu、Gln、His、Lys、Arg、Ser、Thr、Tyr、Trp、Cys或Dbu、Dpr或Orn缀合。在某些实施方案中,亲脂性取代基缀合至Lys。在本文提供的任何式中显示为Lys的氨基酸可以被例如Dbu、Dpr或Orn替代,其中加入

亲脂性取代基。

[0399] 在本发明的其他实施方案中,替代地或另外地,本发明的铁调素类似物中的一个或多个氨基酸残基的侧链可以缀合至聚合部分或其他半衰期延长部分,例如,以增加溶解度和/或体内半衰期(例如,在血浆中)和/或生物利用度。还已知此类修饰降低治疗性蛋白质和肽的清除率(例如肾清除率)。

[0400] 如本文所用,“聚乙二醇”或“PEG”是通式 $H-(O-CH_2-CH_2)_n-OH$ 的聚醚化合物。PEG也称为聚环氧乙烷(PEO)或聚氧乙烯(POE),取决于它们的分子量PEO、PEE或POG,如本文所用,是指氧化乙烯的低聚物或聚合物。这三个名称在化学上是同义的,但PEG往往是指分子量低于20,000g/mol的低聚物和聚合物,PEO是指分子量高于20,000g/mol的聚合物,POE是指任何分子量的聚合物。PEG和PEO是液体或低熔点固体,取决于它们的分子量。在本公开中,这三个名称的使用没有区别。PEG通过氧化乙烯的聚合制备,并且在300g/mol至10,000,000g/mol的宽分子量范围内是可商购的。尽管具有不同分子量的PEG和PEO可用于不同的应用,并且由于链长效应而具有不同的物理性质(例如粘度),但是它们的化学性质几乎相同。聚合部分优选是水溶性的(两亲性的或亲水性的)、无毒的和药惰性的。合适的聚合部分包括聚乙二醇(PEG)、PEG的均聚物或共聚物、PEG的单甲基取代的聚合物(mPEG)或聚氧乙烯甘油(POG)。参见例如Int.J.Hematology 68:1(1998);Bioconjugate Chem.6:150(1995);和Crit.Rev.Therap.Drug Carrier Sys.9:249(1992)。还包括出于延长半衰期的目的而制备的PEG,例如单活化的烷氧基封端的聚环氧乙烷(POA),如单甲氧基封端的聚乙二醇(mPEG);也考虑双活化的聚环氧乙烷(二醇)或其他PEG衍生物。出于本发明的目的,通常选择的合适的聚合物的重量基本上在约200至约40,000的范围内变化。在某些实施方案中,使用分子量为200至2,000道尔顿或200至500道尔顿的PEG。也可以使用不同形式的PEG,这取决于用于聚合过程的引发剂,例如,常见的引发剂是单官能甲基醚PEG或甲氧基聚(乙二醇),缩写为mPEG。其他合适的引发剂是本领域已知的并且适用于本发明。

[0401] 低分子量PEG也可作为纯低聚物获得,称为单分散、均匀或离散的。这些用于本发明的某些实施方案中。

[0402] PEG也有不同的几何形状:支化PEG具有源自中心核基团的三至十个PEG链;星形PEG具有源自中心核基团的10至100个PEG链;梳形PEG具有通常接枝到聚合物主链上的多个PEG链。PEG也可以是线性的。通常包括在PEG名称中的数字表示它们的平均分子量(例如, $n=9$ 的PEG将具有约400道尔顿的平均分子量,并且将被标记为PEG 400。

[0403] 如本文所用,“PEG化”是将PEG结构偶联(例如共价地)至本发明的铁调素类似物的行为,其在某些实施方案中称为“PEG化的铁调素类似物”。在某些实施方案中,PEG化侧链的PEG是分子量为约200至约40,000的PEG。在某些实施方案中,缀合的半衰期延长部分的PEG部分是PEG3、PEG4、PEG5、PEG6、PEG7、PEG8、PEG9、PEG10或PEG11。在特定实施方案中,其为PEG11。在某些实施方案中,PEG化间隔基的PEG是PEG3或PEG8。在一些实施方案中,间隔基被PEG化。在某些实施方案中,PEG化间隔基的PEG是PEG3、PEG4、PEG5、PEG6、PEG7、PEG8、PEG9、PEG10或PEG11。在某些实施方案中,PEG化间隔基的PEG是PEG3或PEG8。

[0404] 在一些实施方案中,本发明包括与PEG缀合的铁调素类似物肽(或其二聚体),所述PEG例如通过酰胺、硫醇、经由点击化学或经由本领域已知的任何其他合适的方式共价衔接。在特定实施方案中,PEG通过酰胺键衔接,因此,使用的某些PEG衍生物将被适当地官能

化。例如,在某些实施方案中,作为O-(2-氨基乙基)-O'-(2-羧乙基)-十一乙二醇的PEG11具有用于附接至本发明的肽的胺和羧酸。在某些实施方案中,PEG25含有二酸和25个二醇部分。

[0405] 其他合适的聚合部分包括聚氨基酸,例如聚赖氨酸、聚天冬氨酸和聚谷氨酸(参见例如Gombotz,等人(1995),Bioconjugate Chem.,第6卷:332-351;Hudecz,等人(1992),Bioconjugate Chem.,第3卷,49-57和Tsukada,等人(1984),J.Natl.Cancer Inst.,第73卷,:721-729。聚合部分可以是直链的或支化的。在一些实施方案中,其具有500-40,000Da,例如500-10,000Da、1000-5000Da、10,000-20,000Da或20,000-40,000Da的分子量。

[0406] 在一些实施方案中,本发明的铁调素类似物可包含两个或更多个这样的聚合部分,在这种情况下,所有这样的部分的总分子量通常落在上文提供的范围内。

[0407] 在一些实施方案中,聚合部分可以偶联(通过共价键)至氨基酸侧链的氨基、羧基或硫醇基团。某些实例是Cys残基的硫醇基和Lys残基的 $\epsilon$ 氨基,并且也可以涉及Asp和Glu残基的羧基。

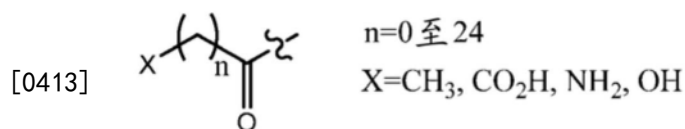
[0408] 本领域技术人员熟知可用于进行偶联反应的合适技术。例如,带有甲氧基的PEG部分可以使用可从Nektar Therapeutics AL商购获得的试剂通过马来酰亚胺基键与Cys硫醇基偶联。合适的化学的细节还参见WO 2008/101017和以上引用的参考文献。马来酰亚胺官能化的PEG也可以与Cys残基的侧链巯基缀合。

[0409] 如本文所用,二硫键氧化可在单个步骤内发生或为两步过程。如本文所用,对于单个氧化步骤,通常在组装期间使用三苯甲基保护基,从而允许在切割期间脱保护,随后进行溶液氧化。当需要第二个二硫键时,可以选择天然或选择性氧化。对于需要正交保护基的选择性氧化,Acm和Trityl用作半胱氨酸的保护基。切割导致去除一对保护的半胱氨酸,允许该对的氧化。然后进行半胱氨酸保护的Acm基团的第二氧化脱保护步骤。对于天然氧化,三苯甲基保护基用于所有半胱氨酸,允许肽的天然折叠。

[0410] 本领域技术人员熟知可用于进行氧化步骤的合适技术。

[0411] 在特定实施方案中,本发明的铁调素类似物包含半衰期延长部分,其可选自但不限于以下:Ahx-Palm、PEG2-Palm、PEG11-Palm、isoGlu-Palm、dapa-Palm、isoGlu-月桂酸、isoGlu-肉豆蔻酸、和isoGlu-异戊酸。

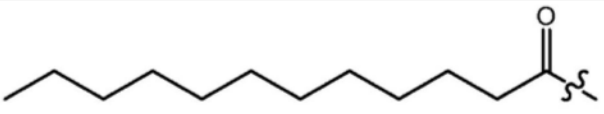
[0412] 在特定实施方案中,铁调素类似物包含具有如下所示结构的半衰期延长部分,其中 $n=0$ 至24或 $n=14$ 至24:

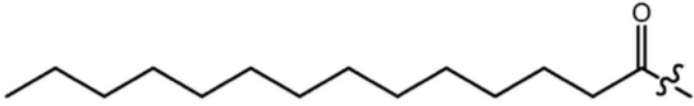
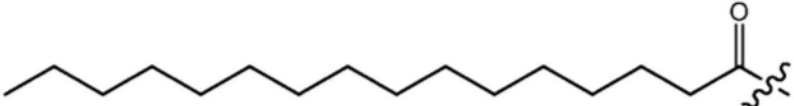
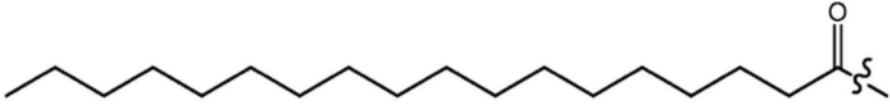

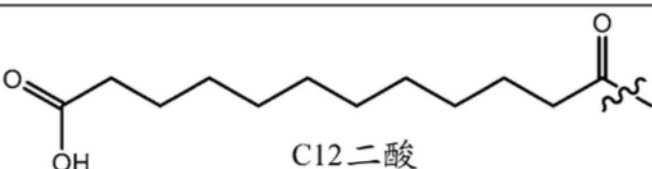
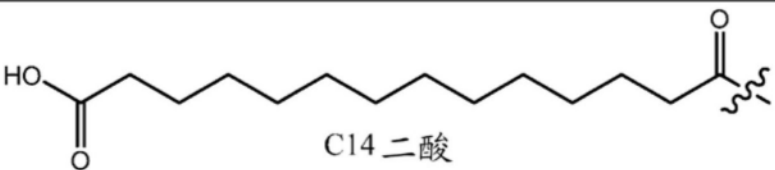
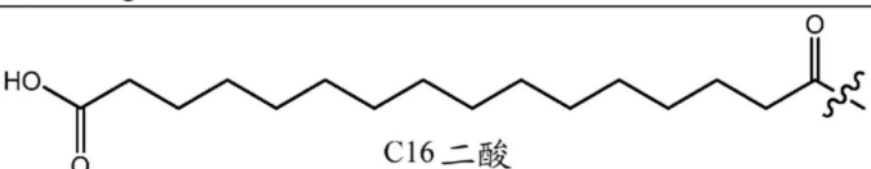
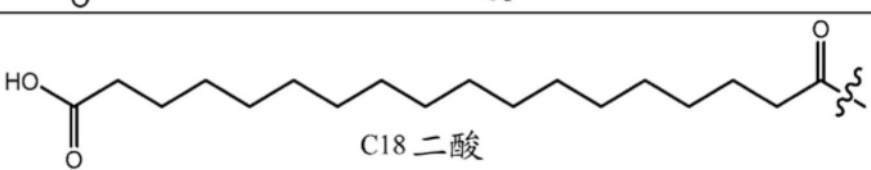
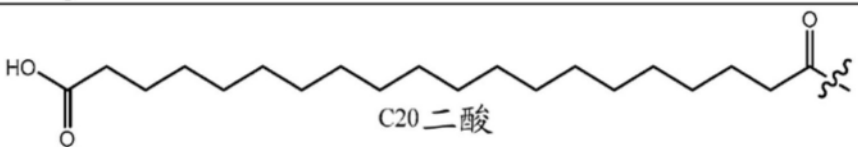


[0414] 在某些实施方案中,本发明的铁调素类似物包含表3所示的缀合的半衰期延长部分。

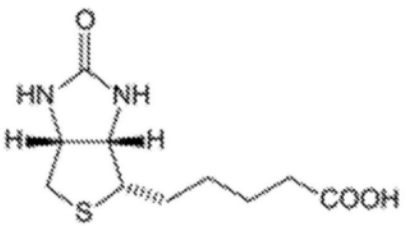
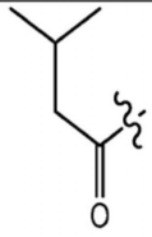
[0415] 表3. 说明性半衰期延长部分

[0416]

#	缀合物
C1	 C12 (月桂酸)

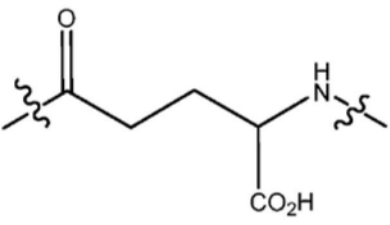
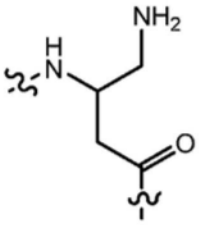
#	缀合物
C2	 <p>C14 (肉豆蔻酸)</p>
C3	 <p>C16 (Palm 或棕榈酸)</p>
C4	 <p>C18 (硬脂酸)</p>
C5	 <p>C20</p>
C6	 <p>C12 二酸</p>
C7	 <p>C14 二酸</p>
C8	 <p>C16 二酸</p>
C9	 <p>C18 二酸</p>
C10	 <p>C20 二酸</p>

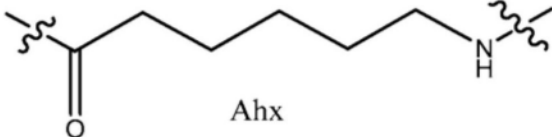
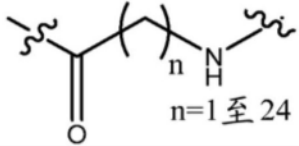
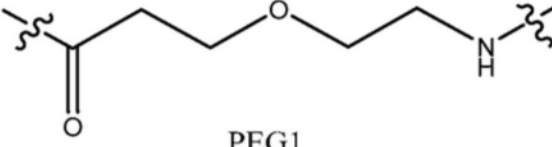
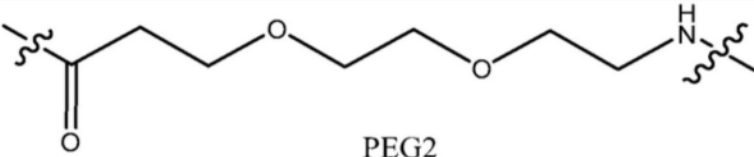
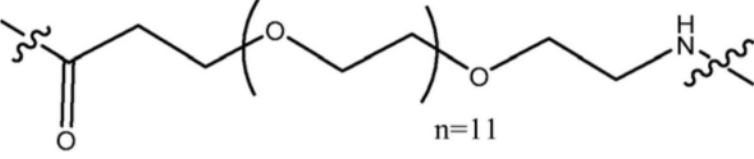
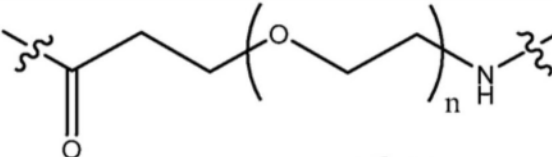
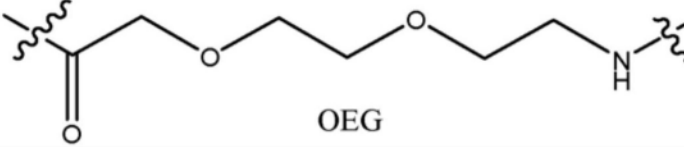
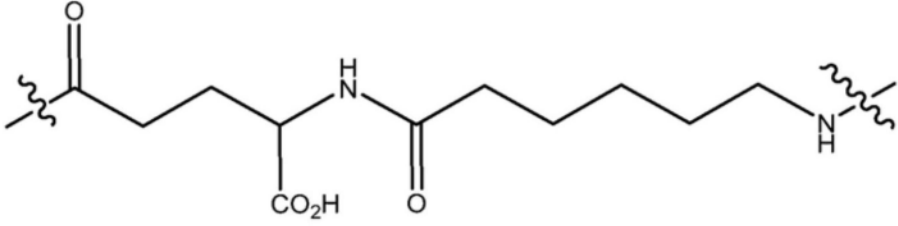
[0417]

#	缀合物
[0418] C11	 <p style="text-align: center;">生物素</p>
C12	 <p style="text-align: center;">异戊酸</p>

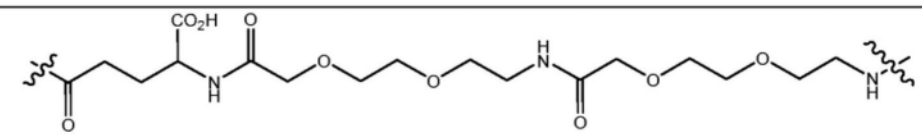
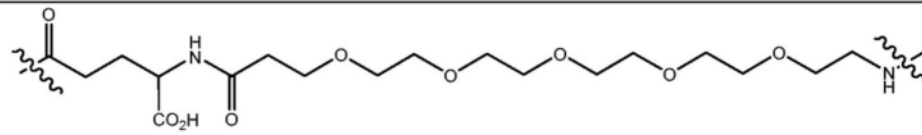
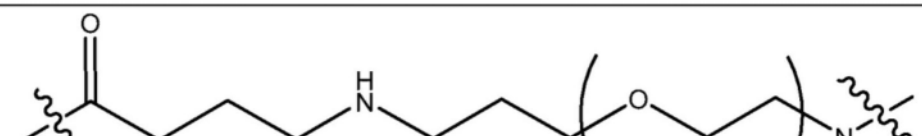
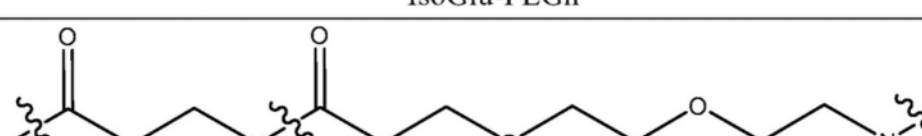
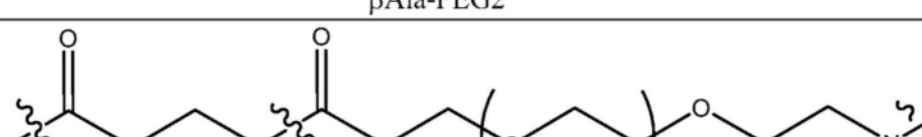
[0419] 在某些实施方案中,半衰期延长部分直接缀合至铁调素类似物,而在其他实施方案中,半衰期延长部分经由接头部分缀合至铁调素类似物肽,例如表2或4中所述的那些接头中的任一个。

[0420] 表4. 说明性接头部分

#	接头部分
[0421] L1	 <p style="text-align: center;">IsoGlu</p>
L2	 <p style="text-align: center;">Dapa</p>

#	接头部分
L3	 <p>Ahx</p>
L4	<p>基于Lipdic的接头:</p>  <p>n=1至24</p>
L5	 <p>PEG1</p>
L6	 <p>PEG2</p>
L7	 <p>n=11</p> <p>PEG11 (40个原子)</p>
L8	 <p>n=1至25</p> <p>基于PEG的接头</p>
L9	 <p>OEG</p>
L10	 <p>IsoGlu-Ahx</p>

[0422]

#	接头部分
L11	 <p style="text-align: center;">IsoGlu-OEG-OEG</p>
L12	 <p style="text-align: center;">IsoGlu-PEG5</p>
[0423] L13	 <p style="text-align: center;">IsoGlu-PEG<sub>n</sub> n=1-25</p>
L14	 <p style="text-align: center;">βAla-PEG2</p>
L15	 <p style="text-align: center;">βAla-PEG11 (40个原子)</p>

[0424] 关于表4中所示的接头结构,提及 $n=1$ 至24或 $n=1$ 至25等(例如,在L4、L8或L13中)指示 $n$ 可为所述范围内的任何整数。例如,对于表4中所示的L4, $n$ 可以是1、2、3等,其中当 $n=5$ 时,L4具有L3(Ahx)中所示的结构。

[0425] 在特定实施方案中,本发明的铁调素类似物包含表4中所示的任何接头部分和表3中所示的任何半衰期延长部分,包括表5中所示的任何下列组合。

[0426] 表5. 铁调素类似物中接头和半衰期延长部分的说明性组合

[0427]

接头	半衰期延长部分	接头	半衰期延长部分	接头	半衰期延长部分
L1	C1	L1	C2	L1	C3
L2	C1	L2	C2	L2	C3
L3	C1	L3	C2	L3	C3
L4	C1	L4	C2	L4	C3
L5	C1	L5	C2	L5	C3
L6	C1	L6	C2	L6	C3
L7	C1	L7	C2	L7	C3
L8	C1	L8	C2	L8	C3
L9	C1	L9	C2	L9	C3
L10	C1	L10	C2	L10	C3
L11	C1	L11	C2	L11	C3
L12	C1	L12	C2	L12	C3
L13	C1	L13	C2	L13	C3
L14	C1	L14	C2	L14	C3
L15	C1	L15	C2	L15	C3

[0428]

接头	半衰期延长部分	接头	半衰期延长部分	接头	半衰期延长部分
L1	C4	L1	C5	L1	C6
L2	C4	L2	C5	L2	C6
L3	C4	L3	C5	L3	C6
L4	C4	L4	C5	L4	C6
L5	C4	L5	C5	L5	C6
L6	C4	L6	C5	L6	C6
L7	C4	L7	C5	L7	C6
L8	C4	L8	C5	L8	C6
L9	C4	L9	C5	L9	C6
L10	C4	L10	C5	L10	C6
L11	C4	L11	C5	L11	C6
L12	C4	L12	C5	L12	C6
L13	C4	L13	C5	L13	C6
L14	C4	L14	C5	L14	C6
L15	C4	L15	C5	L15	C6

[0429]

接头	半衰期延长部分	接头	半衰期延长部分	接头	半衰期延长部分
L1	C7	L1	C8	L1	C9
L2	C7	L2	C8	L2	C9

[0430]	接头	半衰期延长部分	接头	半衰期延长部分	接头	半衰期延长部分
	L3	C7	L3	C8	L3	C9
	L4	C7	L4	C8	L4	C9
	L5	C7	L5	C8	L5	C9
	L6	C7	L6	C8	L6	C9
	L7	C7	L7	C8	L7	C9
	L8	C7	L8	C8	L8	C9
	L9	C7	L9	C8	L9	C9
	L10	C7	L10	C8	L10	C9
	L11	C7	L11	C8	L11	C9
	L12	C7	L12	C8	L12	C9
	L13	C7	L13	C8	L13	C9
	L14	C7	L14	C8	L14	C9
	L15	C7	L15	C8	L15	C9

[0431]	接头	半衰期延长部分	接头	半衰期延长部分	接头	半衰期延长部分
	L1	C10	L1	C11	L1	C12
	L2	C10	L2	C11	L2	C12
	L3	C10	L3	C11	L3	C12
	L4	C10	L4	C11	L4	C12
	L5	C10	L5	C11	L5	C12
	L6	C10	L6	C11	L6	C12
	L7	C10	L7	C11	L7	C12
	L8	C10	L8	C11	L8	C12
	L9	C10	L9	C11	L9	C12
	L10	C10	L10	C11	L10	C12
	L11	C10	L11	C11	L11	C12
	L12	C10	L12	C11	L12	C12
	L13	C10	L13	C11	L13	C12
	L14	C10	L14	C11	L14	C12
L15	C10	L15	C11	L15	C12	

[0432] 在某些实施方案中,铁调素类似物包含两个或更多个接头。在特定实施方案中,两个或更多个接头被多联体化,即彼此结合。

[0433] 在相关的实施方案中,本发明包括编码具有本文所述的任何铁调素类似物中存在的肽序列的多肽的多核苷酸。

[0434] 此外,本发明包括包含本发明多核苷酸的载体,例如表达载体。

[0435] 治疗方法

[0436] 真性红细胞增多症 (PV) 是一种慢性进行性三系克隆性病征,其特征为髓系细胞、红系细胞和巨核细胞增殖/积聚增加,并且被世界卫生组织 (WHO) 表征为骨髓增生性赘生物 (Arber等人,Blood,2016,127 (20) :2391-405)。诊断由两个标准定义;第一个是红细胞量增加,骨髓活检显示三系细胞过多和存在JAK2V617F或JAK2外显子12突变,第二个标准包括红细胞增多症、骨髓活检确认和血清促红细胞生成素水平低于正常 (Arber等人,Blood,2016,127 (20) :2391-405)。

[0437] 在正常红细胞个体的红细胞产生期间,红细胞生成受依赖于JAK2的促红细胞生成素调节,然而当JAK2被组成型激活时,促红细胞生成素非依赖性的红细胞产生导致红细胞增多症。约95%的PV患者具有JAK2V617F突变(Rampal等人,Blood.2014,123(22):e123-33,)。PV可进展为骨髓纤维化或经历白血病转化。PV慢性的红细胞增多症特征为Hgb>16.5g/dL或Hct>49%,女性为Hgb>16.0g/dL或Hct>48%。PV患者中高于44%的血细胞比容与所遭受的血栓栓塞并发症的数量的急剧增加有关(Pearson等人,Lancet.1978;2:1219-1221)。取骨髓活检以确认PV,来自原发性血小板增多症,并且对于年龄和三系生长必须显示细胞过多。

[0438] 美国估计有148,000人患有PV,诊断时中位年龄为61岁(Stein等人,J Clin Oncol.2015Nov 20;33(33):3953-60)。与血液粘度过高相关的红细胞增多症症状包括疲劳、骨痛、头痛、头晕、视觉障碍、非典型胸痛、瘙痒、红斑性肢痛和感觉异常(Tefferi等人,Blood Cancer J.2018,8(1):3)。临床特征包括脾肿大、血栓和出血并发症以及白血病转化的风险。

[0439] PV分为定义后续治疗方案的两个风险类别:高风险(年龄>60岁,有血栓形成史)和低风险(年龄<60岁,无血栓形成史)(Tefferi&Barbui,Am J Hematol.2017Jan;92(1):94-108)。在美国,可以使用另一种分类:高风险(年龄>60岁)和低风险(年龄<60岁)。所有PV患者均接受治疗性放血以降低血细胞比容和每日一次阿司匹林(81mg),以预防血栓出血性并发症。在引入治疗性放血之前,未治疗PV的中位存活期小于2年,死亡归因于血栓性并发症(Tefferi等人,2018)。采用目前的治疗,年龄小于60岁的患者从诊断时起的中位存活期为24年,而年龄大于60岁的患者为14年。治疗性放血的血细胞比容目标是男性<45%,女性<42%和怀孕期间<36%(Streiff等人,Blood.2002,99(4):1144-9),分别对应于15、14和12g/dL的Hgb水平。治疗性放血的目标是产生慢性缺铁状态,从而减少红细胞产生。此外,缺铁红细胞由于其尺寸减小而比正常红细胞血的粘度低。幸运的是,运动评估后证实慢性缺铁性PV患者没有经历与其正常红细胞对应物预期的缺铁相关的有氧缺陷(Rector等人,Medicine(Baltimore).1982Nov;61(6):382-9)。

[0440] 细胞减灭疗法用于高风险患者和不能耐受放血、表现出进行性脾肿大或血小板计数>1500×10<sup>9</sup>/L或进行性白细胞增多的那些低风险患者。细胞减灭剂包括但不限于羟基脲、干扰素α、鲁索替尼(Jakafi®)和白消安。在美国,羟基脲是40岁以上PV患者的一线治疗,因为与单独使用放血相比,它有效地改善骨髓抑制并降低血栓形成的风险。然而,需要考虑羟基脲对继发性白血病的长期风险。在超过8年的中位随访期后,真性红细胞增多症研究组报告,接受羟基脲的所评估PV患者中有5.4%发生白血病,而仅接受放血治疗的患者中有1.5%(Fruchtman等人,Semin Hematol.1997,34:17-23)。不耐受或抵抗羟基脲的患者可用聚乙二醇化IFN-α或白消安治疗。IFN-α优选用于年龄小于65岁的患者,白消安优选用于年龄较大的个体。

[0441] 约1/4的PV患者被认为是不受控制的,因为它们对羟基脲的反应不足或不耐受。**Jakafi®**(鲁索替尼)是一种JAK1/JAK2抑制剂,经美国食物和药物管理局批准用于对羟基脲抵抗或不耐受的PV患者。该批准基于3期研究,称为RESPONSE-随机、开放标签、多中心3期研究,用于对羟基脲抵抗或不耐受的真性红细胞增多症受试者的功效和安全性:JAK抑制剂INC424片剂对比最佳可用护理(BAT)。该试验评价了放血依赖性PV和脾肿大患者,这些患者

不耐受或抵抗羟基脲,并随机分配到鲁索替尼(n=110)或最佳可用(n=112)。复合主要终点包括第32周的血细胞比容控制( $<45\%$ )和脾减少(减少 $\geq 35\%$ )。第32周后,随机分配到最佳可用疗法的患者可交叉接受鲁索替尼。在32周时,77%随机分配到鲁索替尼的患者至少满足主要终点的1个分项,但只有1%接受BAT的患者达到主要终点。大多数(91%)达到主要终点的鲁索替尼治疗的患者在第48周具有确认的反应,维持主要反应1年的概率为94%。鲁索替尼组的血栓栓塞事件发生率较低,到第32周仅报告1例事件(门静脉血栓形成),接受BAT的患者中有6例事件。RESPONSE试验研究者得出结论,在对羟基脲反应不足或不耐受的PV患者中,鲁索替尼在不进行放血控制血细胞比容,使血细胞计数正常化,减少脾体积和改善PV相关症状(包括瘙痒、疲劳和盗汗)方面优于BAT。

[0442] 美国患者每年接受约8次放血,手术造成痛苦、麻烦和不便(Boccia等人,Blood,2017,130(Suppl 1),5271)。进行放血花费了大量时间,包括每次手术约半个工作日。此外,发生许多氧化还原/代谢循环(对此需要更多),因此如果真性红细胞增多症的放血疗法的最终目标是实现限制红细胞生成的慢性缺铁状态,那么这在理论上可用铁调素/铁调素模拟物获得。

[0443] 铁调素是一种25个氨基酸的肽,它控制全身铁稳态,并由肝脏响应血浆铁浓度和铁储量而产生。铁调素抑制细胞铁输出蛋白铁转运蛋白(FPN-1),FPN-1表达在参与铁吸收、再循环和储存的细胞表面上。在鼠PV模型中,铁调素调节全身铁限制,并且外源性铁调素模拟物的外源性施用减少Hgb浓度和脾肿大(Casu等人,Blood.2016;128(2):265-276)。

[0444] 当JAK2被组成型激活时,触发不依赖于促红细胞生成素的红细胞产生,导致红细胞增多症。防止突变Jak2的影响的方法是用铁调素或铁调素模拟肽诱导铁限制。低铁水平抑制在Jak2下游的点的促红细胞生成素信号传导,从而提供超驰信号。当将铁调素模拟肽施用给表达携带引起红细胞增多症的突变的人Jak2基因的转基因小鼠时,红细胞增多症特有的红细胞生成和血细胞比容的增加被逆转回到正常范围。参考文献(Casu等人Blood.2016;128(2):265-276)。

[0445] 在一些实施方案中,本发明提供了用于治疗患有与真性红细胞增多症相关的疾病或病症的受试者的方法,其中所述方法包括向所述受试者施用本发明的铁调素类似物。在一些实施方案中,施用给受试者的铁调素类似物存在于组合物(例如药物组合物)中。应当理解,通篇提及的铁调素类似物包括这些铁调素类似物的药学上可接受的盐。

[0446] 在一个实施方案中,提供了用于治疗患有特征在于增加的铁转运蛋白活性或表达的疾病或病症的受试者的方法,其中所述方法包括以足以(部分或完全)结合并激动所述受试者中的铁转运蛋白的量向所述个体施用本发明的铁调素类似物或组合物。在一个实施方案中,提供了治疗患有特征为铁代谢失调的疾病或病症的受试者的方法,其中所述方法包括向所述受试者施用本发明的铁调素类似物或组合物。

[0447] 在一些实施方案中,本发明的方法包括向有需要的受试者提供本发明的铁调素类似物或组合物。在特定实施方案中,有需要的受试者已被诊断患有或已被确定处于发展特征在于失调的铁水平的疾病或病症的风险(例如,铁代谢的疾病或病症;与铁过载相关的疾病或病症;以及与异常铁调素活性或表达相关的疾病或病症)。在特定实施方案中,受试者为哺乳动物(例如人)。

[0448] 在某些实施方案中,疾病或病症是真性红细胞增多症。在某些实施方案中,真性红

细胞增多症是需要放血的真性红细胞增多症。在一些实施方案中,真性红细胞增多症是低风险患者中需要放血的真性红细胞增多症。在一些实施方案中,受试者是高风险真性红细胞增多症患者。在一些实施方案中,受试者是低风险真性红细胞增多症患者。在一些实施方案中,受试者是有症状的需要放血的真性红细胞增多症患者。在一些实施方案中,受试者是需要放血的真性红细胞增多症的低风险患者。在一些实施方案中,受试者是需要放血的真性红细胞增多症的高风险患者。在一些实施方案中,受试者被诊断患有真性红细胞增多症并且在向受试者施用药物组合物之前的24周内已经接受至少三次放血以达到目标血细胞比容 $\leq 45\%$ 。在一些实施方案中,受试者是哺乳动物,例如人。

[0449] 因此,在一个实施方案中,提供了治疗患有或诊断为真性红细胞增多症的受试者的方法,其中所述方法包括向受试者施用有效治疗真性红细胞增多症的量的本文公开的铁调素类似物或组合物。在某些实施方案中,真性红细胞增多症是需要放血的真性红细胞增多症。在一些实施方案中,真性红细胞增多症是低风险患者中需要放血的真性红细胞增多症。在一些实施方案中,真性红细胞增多症是高风险患者中需要放血的真性红细胞增多症。在一些实施方案中,受试者是低风险真性红细胞增多症患者。在一些实施方案中,受试者是高风险真性红细胞增多症患者。在一些实施方案中,受试者是有症状的需要放血的真性红细胞增多症患者。在一些实施方案中,受试者是需要放血的真性红细胞增多症的低风险患者。在一些实施方案中,受试者被诊断患有真性红细胞增多症并且在向受试者施用药物组合物之前的24周内已经接受至少三次放血以达到目标血细胞比容 $\leq 45\%$ 。在一些实施方案中,受试者是哺乳动物,例如人。

[0450] 在某些实施方案中,本公开提供了治疗有需要的人类受试者的真性红细胞增多症的方法,其包括向受试者施用有效量的本文公开的铁调素类似物或其药学上可接受的盐、肽或组合物,例如具有SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:46;SEQ ID NO:47或SEQ ID NO:48的结构的肽。在某些实施方案中,真性红细胞增多症是需要放血的真性红细胞增多症。在一些实施方案中,真性红细胞增多症是低风险患者或高风险患者中需要放血的真性红细胞增多症。在一些实施方案中,受试者是低风险真性红细胞增多症患者。在一些实施方案中,受试者是高风险真性红细胞增多症患者。在一些实施方案中,受试者是有症状的需要放血的真性红细胞增多症患者。在一些实施方案中,受试者是需要放血的真性红细胞增多症的低风险患者。在一些实施方案中,受试者是需要放血的真性红细胞增多症的高风险患者。在一些实施方案中,受试者被诊断患有真性红细胞增多症并且在向受试者施用药物组合物之前的24周内已经接受至少三次放血以达到目标血细胞比容 $\leq 45\%$ 。

[0451] 在本文公开的任何方法的特定实施方案中,有效量为约5mg至约200mg或约10mg至约100mg,例如约10mg、约15mg、约20mg、约25mg、约30mg、约40mg、约50mg、约60mg、约70mg、约80mg、约100mg或约120mg。

[0452] 在一个实施方案中,本公开提供治疗患有需要放血的真性红细胞增多症的人类受试者的方法,其包括向受试者皮下施用有效量的本文公开的铁调素类似物,例如具有SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:46;SEQ ID NO:47或SEQ ID NO:48的结构的肽。在特定实施方案中,有效量为约10mg至约100mg,例如约10mg、约15mg、约20mg、约25mg、约30mg、约40mg、约50mg、约60mg、约70mg、约80mg或约100mg,并且将铁调素类似物约每周两次、约每周一次、约每隔一周一次或约每月一次施用于受试者。在特定实施方案中,约每周一次向受

试者施用约15mg、约20mg、约30mg、约40mg、约50mg、约60mg、约70mg或约80mg的铁调素类似物或其药学上可接受的盐。在特定实施方案中,当向妇女施用铁调素类似物时,可以施用减少量的铁调素类似物,例如约10mg至约60mg,例如约10mg、约15mg、约20mg、约25mg、约30mg、约40mg、约50mg或约60mg。在一些实施方案中,约每两周一次或约每月一次施用铁调素类似物或其药学上可接受的盐。在一些实施方案中,铁调素类似物或其药学上可接受的盐在一段时间内多次施用,例如至少6个月、至少或约1年、至少或约2年、至少或约5年的时间段、或受试者的一生。

[0453] 在本文公开的方法的特定实施方案中,铁调素类似物或其药学上可接受的盐或肽在组合物(例如药物组合物)中施用,并且在一些实施方案中,铁调素类似物或其药学上可接受的盐或肽(或组合物)通过皮下注射施用。在一些实施方案中,铁调素类似物或其药学上可接受的盐或肽(或组合物)在一段时间内(例如根据需要)约每周施用。在一些实施方案中,约每三天、约每周两次、约每四天、约每五天、约每周一次、约每两周一次、约每月一次、约每六周一次、约每八周一次、约每两个月一次或约每三个月一次施用铁调素类似物或肽(或组合物)。在特定实施方案中,约每周一次或约每两周一次施用。在特定实施方案中,约每周一次施用。在一些实施方案中,约每两周一次、约一个月一次或约每两个月一次施用。

[0454] 在本文公开的方法的各种实施方案中,铁调素类似物或其药学上可接受的盐的有效量是足以在受试者中实现约5ng/mL至约3500ng/mL、约100ng/mL至约3000ng/mL、约5ng/mL至约900ng/mL、或约5ng/mL至约250ng/mL、或约20ng/mL至150ng/mL的铁调素类似物或其药学上可接受的盐的血浆或血清浓度的量。有效量最佳地将患者维持在本文定义的期望的血细胞比容值范围内。

[0455] 在某些实施方案中,本公开提供治疗受试者中的PV的方法,其包括向受试者提供有效量的铁调素类似物或其药学上可接受的盐,其中向受试者提供实现约2ng/mL至约3500ng/mL、约5ng/mL至约3500ng/mL、约100ng/mL至约3000ng/mL、约5ng/mL至约900ng/mL、约5ng/mL至约250ng/mL、或约20ng/mL至150ng/mL的铁调素类似物或其药学上可接受的盐的血浆或血清浓度的铁调素类似物或其药学上可接受的盐的量。在某些实施方案中,要达到的血浆或血清浓度为至少约25ng/mL、至少约50ng/mL、至少约100ng/mL、至少约200ng/mL、至少约500ng/mL、至少约1000ng/mL、至少约1500ng/mL、至少约2000ng/mL、至少约2500ng/mL或至少约3000ng/mL。在某些实施方案中,例如对于化合物A,要实现的血浆或血清浓度为约200ng/mL至约3200ng/mL或约1000ng/mL至约3200ng/mL、或约1000ng/mL至约2000ng/mL、或约2000ng/mL至约3000ng/mL。在某些实施方案中,例如对于化合物A,要实现的血浆或血清浓度为至少4ng/mL、至少5ng/mL、至少8ng/mL、至少10ng/mL、至少12ng/mL、至少15ng/mL、至少17ng/mL或至少20ng/mL。在特定实施方案中,例如对于化合物A,要实现的血浆或血清浓度为至少约4ng/mL或至少约17ng/mL。在特定实施方案中,该血浆或血清水平在一次施用后达到并维持直到下一次施用铁调素类似物,例如化合物A或化合物B。在特定实施方案中,在施用铁调素类似物例如化合物A或化合物B后,达到该血浆或血清水平并维持至少四天、至少五天、至少六天或至少一周。在某些实施方案中,例如对于化合物A,要实现的血浆或血清浓度为至少约20ng/mL、至少约30ng/mL、至少约50ng/mL、至少约100ng/mL、至少约150ng/mL、至少约200ng/mL、至少约500ng/mL、至少约1000ng/mL、至少约1500ng/mL、至少约2000ng/mL、至少约2500ng/mL或至少约3000ng/mL。在某些实施方案中,例如对于

化合物A,要实现的血浆或血清浓度在施用后20-48小时内为至少约50ng/mL、在施用后20-48小时内为至少约100ng/mL、在施用后20-48小时内为至少约250ng/mL、在施用后20-48小时内为至少约400ng/mL、在施用后20-48小时内为至少约500ng/mL、在施用后20-48小时内为至少约800ng/mL、或在施用后20-48小时内为至少约1000ng/mL。在某些实施方案中,例如对于化合物A,要实现的血浆或血清浓度在施用后20-48小时内为约25ng/mL至约1000ng/mL、在施用后20-48小时内为约100ng/mL至约1000ng/mL、在施用后20-48小时内为约200ng/mL至约1000ng/mL、在施用后20-48小时内为约400ng/mL至约850ng/mL。在某些实施方案中,例如对于化合物B,要实现的血浆或血清浓度为约25ng/mL至约125ng/mL、或约50ng/mL至约125ng/mL。在某些实施方案中,例如对于化合物B,要实现的血浆或血清浓度为至少约25ng/mL、至少约50ng/mL或至少约100ng/mL。在某些实施方案中,该血浆或血清浓度是施用铁调素类似物或其药学上可接受的盐后的最大血浆或血清浓度。在某些实施方案中,该血浆或血清浓度在施用铁调素类似物或其药学上可接受的盐后维持一段时间,例如至少两天、至少三天、至少四天、至少五天、至少六天、至少一周、至少9天、至少12天或至少两周的一段时间。在某些实施方案中,例如对于化合物A,达到的血浆或血清浓度为约200ng/mL至约3200ng/mL或约1000ng/mL至约3200ng/mL、或约1000ng/mL至约2000ng/mL、或约2000ng/mL至约3000ng/mL,例如持续约4小时、约8小时、约12小时、约24小时、或约48小时。在某些实施方案中,例如对于化合物A,实现的血浆或血清浓度为至少约200ng/mL、至少约500ng/mL、至少约1000ng/mL、至少约1500ng/mL、至少约2000ng/mL、至少约2500ng/mL或至少约3000ng/mL,持续至少约4小时、约8小时、约12小时、约24小时、约48小时或约72小时。在某些实施方案中,例如对于化合物B,达到的血浆或血清浓度为约25ng/mL至约125ng/mL、或约50ng/mL至约125ng/mL,例如持续约4小时、约8小时、约12小时、约24小时或约48小时。在某些实施方案中,例如对于化合物B,达到的血浆或血清浓度为至少约25ng/mL、至少约50ng/mL或至少约100ng/mL,例如持续约4小时、约8小时、约12小时、约24小时或约48小时。在特定实施方案中。在特定实施方案中,皮下施用铁调素类似物或其药学上可接受的盐。在特定实施方案中,受试者患有需要放血的真性红细胞增多症。在特定实施方案中,向受试者施用约10mg至约100mg,例如约10mg、约15mg、约20mg、约25mg、约30mg、约40mg、约50mg、约60mg、约70mg、约80mg或约100mg的铁调素类似物或其药学上可接受的盐,并且约每周两次、约每周一次、约每隔一周一次、或约每月一次向受试者施用铁调素类似物或其药学上可接受的盐。在特定实施方案中,约每周一次或约每两周一次向受试者施用约15mg、约20mg、约30mg、约40mg、约50mg、约60mg、约70mg或约80mg的铁调素类似物或其药学上可接受的盐。在特定实施方案中,约每周一次向受试者施用约15mg、约20mg、约30mg、约40mg、约50mg、约60mg、约70mg或约80mg的铁调素类似物或其药学上可接受的盐。

[0456] 在某些实施方案中,用本文公开的铁调素类似物或其药学上可接受的盐治疗受试者,例如具有SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:46;SEQ ID NO:47或SEQ ID NO:48的结构的铁调素类似物,或化合物A或化合物B,与细胞减灭疗法例如羟基脲、干扰素或鲁索替尼组合。在特定实施方案中,当铁调素类似物与细胞减灭疗法组合使用时,可以施用减少量的铁调素类似物,例如约10mg至约60mg,例如约10mg、约15mg、约20mg、约25mg、约30mg、约40mg、约50mg或约60mg。

[0457] 本文公开的任何方法可进一步包括在施用铁调素类似物后测定受试者血细胞比

容的步骤。如图7所示,通过滴定施用给患者的铁调素类似物的量可将血细胞比容水平维持在所需水平。因此,这些方法可用于鉴定和施用最适合维持血细胞比容低于目标水平的铁调素类似物的浓度/剂量。在一些实施方案中,人的目标水平为45%或更低,例如本文所测量的。在某些实施方案中,男性的目标水平为45%或更低(例如,约37%至约45%);在一些情况下,女性(例如,非怀孕)的目标阈值水平为43%或更低,或42%或更低(例如,约35%至约42%或43%);并且在一些情况下,孕妇的目标水平为36%或更低(例如,约30%至约36%)。在一些实施方案中,基于对铁调素类似物剂量和血细胞比容反应(即血细胞比容的降低)之间关系的理解,实施所述方法以使患者的血细胞比容低于45%(或达到限定水平,例如42%)。因此,本公开提供了可以最大化患者血细胞比容低于期望目标水平的的时间并最小化高于该目标水平的波动的给药方案。

[0458] 在特定实施方案中,在施用铁调素类似物后约1天至约7天的时间段内测定受试者的血细胞比容。在特定实施方案中,如果确定受试者的血细胞比容高于45%,则与刚测定血细胞比容之前施用的剂量相比,在下次预定治疗时向受试者施用更高剂量的铁调素类似物。在特定实施方案中,如果确定受试者的血细胞比容高于受试者性别和怀孕状态所需的目标水平,则与刚测定血细胞比容之前施用的剂量相比,在下次预定治疗时向受试者施用更高剂量的铁调素类似物。在特定实施方案中,如果确定受试者的血细胞比容低于阈值水平,例如低于42%、低于40%、低于37.5%、低于36%或低于35%,则与刚测定血细胞比容之前施用的剂量相比,在下次预定治疗时向受试者施用更低剂量的铁调素类似物。在一些实施方案中,如果确定受试者的血细胞比容在可接受的范围内,例如在35%和42%之间、在35%和45%之间、在37.5%和45%之间、在40%和45%之间、或在40%和44%之间,则与刚测定血细胞比容之前施用的剂量相比,在下次预定治疗时向受试者施用相同剂量的铁调素类似物。可接受的范围可以根据受试者的性别和怀孕状态而变化。在某些实施方案中,男性的可接受范围为约37%至约45%,非怀孕女性的可接受范围为约35%至约42%或43%,怀孕女性的可接受范围为约30%至约36%。

[0459] 在特定实施方案中,所述方法包括在治疗过程中多次测定受试者的血细胞比容水平以监测给药剂量的有效性,并根据需要改变剂量以将受试者的血细胞比容维持在目标范围内,例如30%至35%、35%-41%、35%至45%、37.5%至45%、40%至45%或40%至43%。在某些实施方案中,在治疗过程中约每2周、约每3周、约每4周或约每8周测定受试者的血细胞比容水平。在某些实施方案中,在治疗过程中约每四周进行测定。在特定实施方案中,目标范围是对于受试者性别和怀孕状态可接受的范围。在某些实施方案中,任何所述方法包括维持或调节施用给受试者的铁调素类似物或其药学上可接受的盐的量,其中如果受试者测定的血细胞比容大于45%则增加该量,其中如果受试者测定的血细胞比容小于37.5%或40%则降低该量,而如果受试者测定的血细胞比容在37.5%和45%之间或在40%和44%之间则维持该量。

[0460] 在一个实施方案中,本公开提供用于治疗PV的方法,其包括向诊断为PV的患者皮下施用约10mg至约80mg剂量的铁调素类似物,例如化合物A,约每周一次,持续至少七周的时间段,其中所述方法导致所述受试者在七周期间不需要或不进行治疗性放血。在特定实施方案中,剂量为约10mg、约15mg、约20mg、约25mg、约30mg、约40mg、约50mg、约60mg、约70mg或约80mg。在特定实施方案中,受试者在用铁调素类似物治疗之前接受一次或多次治疗性

放血。在特定实施方案中，受试者在用铁调素类似物治疗前8周内接受一次或多次治疗性放血。在特定实施方案中，受试者是男性，并且他的血细胞比容水平在至少7周内维持在<45%。在特定实施方案中，受试者是非怀孕女性，并且她的血细胞比容水平维持在<42%或<43%，持续至少7周。在特定实施方案中，受试者是怀孕女性，并且她的血细胞比容水平维持在<36%，持续至少7周。在特定实施方案中，在第一次施用铁调素类似物后至少8周、至少12周、至少16周、至少6个月、至少1年或至少2年和治疗期间维持血细胞比容水平。

[0461] 在一个实施方案中，本公开提供用于治疗PV的方法，其包括向诊断为PV的患者皮下施用约10mg至约80mg剂量的铁调素类似物，例如化合物A，约每周一次，持续至少七周的时间段，其中所述方法导致所述受试者在七周期间不需要或不进行治疗性放血。在特定实施方案中，受试者在用铁调素类似物治疗之前接受一次或多次治疗性放血。在特定实施方案中，受试者在用铁调素类似物治疗前8周内接受一次或多次治疗性放血。在特定实施方案中，在七周内测量受试者的血细胞比容水平一次或多次，并且如果受试者的血细胞比容水平高于可接受的范围，则下一周剂量增加，或者如果受试者的血细胞比容水平低于可接受的范围，则下一周剂量降低。在特定实施方案中，受试者是男性，并且可接受的范围是约37%至约45%。在特定实施方案中，增加或减少的剂量也在约10mg至约80mg之间。在某些实施方案中，剂量增加或减少约5mg、约10mg、约15mg或约20mg。在特定实施方案中，剂量为约10mg、约15mg、约20mg、约25mg、约30mg、约40mg、约50mg、约60mg、约70mg或约80mg。在一个实施方案中，受试者是非怀孕女性，并且可接受的范围是约35%至约43%。在一个实施方案中，受试者为怀孕女性，并且可接受的范围为约30%至约36%。在特定实施方案中，受试者在第一次施用铁调素类似物后至少8周、至少12周、至少16周、至少6个月、至少1年、或至少2年和在治疗期间不需要或不进行放血。在特定实施方案中，治疗持续至少8周、至少12周、至少16周、至少6个月、至少1年或至少2年。

[0462] 在本文公开的方法的各种实施方案中，方法包括在一段时间内多次施用有效量的铁调素类似物或其药学上可接受的盐，例如，其中在所述时间段内约每周一次或约每周两次向受试者施用铁调素类似物或其药学上可接受的盐。有效量可以在施用之间变化，或者可以保持相同。时间段可以变化，例如一周至10年、一个月至10年、一个月至5年、一个月至2年或四个月至1年。在某些实施方案中，铁调素类似物选自由以下组成的组：

[0463] (a) 异戊酸-DTHFPCIKF (K (PEG3-Palm)) PRSKGWVCK-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:40) 或其药学上可接受的盐；(b) 异戊酸-DTHFPCI (K (isoGlu-Palm)) FEPRSKGCK-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:45) 或其药学上可接受的盐；

[0464] (c) 异戊酸-DTHFPCIKF (K (isoGlu-Palm)) PRSKGCK-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:46) 或其药学上可接受的盐；(d) 异戊酸-DTHFPCIKFEP (K (isoGlu-Palm)) SKGCK-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:47) 或其药学上可接受的盐；(e) 异戊酸-DTHFPCIKFEP (K (isoGlu-Palm)) GCK-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:48) 或其药学上可接受的盐，任选地其中铁调素类似物包含两个Cys氨基酸之间的二硫键。在特定实施方案中，通过皮下施用途径以约10mg、约15mg、约20mg、约25mg、约30mg、约35mg、约40mg、约50mg、约60mg、约70mg或约80mg的剂量在一段时间内约每周一次向受试者提供铁调素类似物或其药学上可接受的盐。有效量可以在施用之间而变化，或者其可以保持相同。在某些实施方案中，基于受试者在该时间段内的血细胞比容水平滴定剂量。因此，在某些实施方案中，方法还包括在多次施用铁调素类似物或其药学上可接受的盐中的一次或多次后测

定受试者的血细胞比容,并基于血细胞比容值维持或调节在下一次施用阶段间给予受试者的剂量。例如,如果受试者测定的血细胞比容高于基于受试者性别和怀孕状态的可接受范围,则下一次施用量可与先前施用量相比增加;如果受试者测定的血细胞比容低于可接受的范围,则下一次施用量可与先前施用量相比降低;或者,如果受试者测定的血细胞比容在可接受的范围内,则下一次施用量可以与先前施用量相同。在某些实施方案中,在施用铁调素类似物或其药学上可接受的盐后约三天、约四天、约五天、约六天或约七天测量受试者的血细胞比容。受试者的血细胞比容水平可以在每次施用铁调素类似物或其药学上可接受的盐后测定,或者可以仅在铁调素类似物或其药学上可接受的盐的某些施用后测定,例如每两周一次、每月一次、每两个月一次、每四个月一次或每六个月一次。

[0465] 在本文公开的方法和治疗方案的各种实施方案中,方法导致受试者的血细胞比容水平 $<45\%$ 。在某些实施方案中,在一段时间内,例如至少一个月、至少两个月、至少六个月或更长,受试者的血细胞比容维持在约 $37.5\%$ 至约 $45\%$ 的范围内(或在受试者性别和怀孕状态的可接受范围内)。在特定实施方案中,方法或治疗方案导致血细胞比容(Hct%)降低至少 $3\%$ 、至少 $5\%$ 、至少 $10\%$ 和/或放血降低至少 $10\%$ 、至少 $20\%$ 、至少 $40\%$ 或至少 $50\%$ (例如,在需要放血的患者中)。如本文所用,血细胞比容降低 $3\%$ 是指绝对降低,例如从 $46\%$ 降低至 $43\%$ 。

[0466] 在本文公开的方法的各种实施方案中,所述方法导致受试者血清铁蛋白水平增加。在特定实施方案中,血清铁蛋白水平在治疗方案期间或持续至少一个月、至少两个月、至少六个月或更长时间增加至少 $20\%$ 、至少 $30\%$ 、至少 $50\%$ 、至少 $100\%$ 或至少 $200\%$ 。在特定实施方案中,受试者的血清铁蛋白水平在一段时间内维持在约 $25\text{ng/mL}$ 至约 $150\text{ng/mL}$ 的范围内,例如至少一个月、至少两个月、至少六个月或更长时间。

[0467] 在本文公开的方法的各种实施方案中,所述方法导致或引起受试者的转铁蛋白饱和度(TSAT)水平和/或血清铁水平降低至少 $60\%$ 或至少 $80\%$ 。在一些实施方案中,受试者的TSAT水平降低至小于 $40\%$ 。在本文公开的方法的一些实施方案中,所述方法导致TSAT和/或血清铁水平适度增加或无变化,并且在某些实施方案中,TSAT和/或血清铁水平保持低于正常水平。

[0468] 在本文公开的方法的各种实施方案中,所述方法导致受试者的MCV和/或MCH增加。在特定实施方案中,在治疗方案期间,或持续至少一个月、至少两个月、至少六个月或更长时间,MCV和/或MCH增加至少 $10\%$ 、至少 $20\%$ 、至少 $30\%$ 、至少 $50\%$ 、至少 $100\%$ 或至少 $200\%$ 。

[0469] 在本文公开的方法的各种实施方案中,所述方法导致受试者的血细胞比容和/或红细胞计数降低至少 $10\%$ 、至少 $20\%$ 、至少 $30\%$ 、至少 $40\%$ 、至少 $50\%$ 、至少 $60\%$ 或至少 $80\%$ 。在一些实施方案中,受试者的TSAT水平降低至小于 $40\%$ 。在本文公开的方法的一些实施方案中,所述方法导致TSAT和/或血清铁水平适度增加或无变化,并且在某些实施方案中,TSAT和/或血清铁水平保持低于正常水平。

[0470] 在本文公开的方法的各种实施方案中,所述方法导致受试者不需要或不进行治疗性放血,例如持续至少7周、至少8周、至少9周、至少10周、至少11周或至少12周。

[0471] 在各种实施方案中,本文公开的方法可以在低风险或高风险PV患者中实施。在特定实施方案中,低风险PV患者是小于60岁的PV患者。在特定实施方案中,高风险PV患者是大于或等于60岁的PV患者。

[0472] 在特定实施方案中,治疗方案包括在一段时间内两次或更多次、三次或更多次、四次或更多次或连续施用铁调素类似物,例如约每周一次或约每两周一次,持续一段时间、至少一个月、至少两个月、至少六个月或更长时间。

[0473] 在本文公开的方法的各种实施方案中,所述方法不导致受试者血小板计数的显著变化,例如增加或减少大于50%。在某些实施方案中,受试者的血小板计数增加或减少不超过10%、20%、30%、40%或50%。

[0474] 在本文公开的方法的各种实施方案中,所述方法不导致受试者的红细胞计数的显著变化,例如增加或减少大于50%。在某些实施方案中,受试者的红细胞计数增加或减少不超过10%、20%、30%、40%或50%。

[0475] 在本文公开的方法的各种实施方案中,所述方法不导致受试者的白细胞或白细胞计数的显著变化,例如增加或减少大于50%。在某些实施方案中,受试者的白细胞或白细胞计数增加或减少不超过10%、20%、30%、40%或50%。

[0476] 在任何所公开方法的特定实施方案中,所述方法对受试者产生治疗益处,其可包括减轻或缓解PV的一种或多种症状。这些症状包括但不限于瘙痒、脱发、疲劳、头痛、视觉障碍、盗汗和血栓形成事件。

[0477] 在一些实施方案中,本发明的方法包括向有需要的受试者提供与第二治疗剂组合的本发明的铁调素类似物(即,第一治疗剂)。在某些实施方案中,在向受试者施用铁调素类似物之前和/或同时和/或之后向受试者提供第二治疗剂。在特定实施方案中,第二治疗剂是铁螯合剂。在某些实施方案中,第二治疗剂选自铁螯合剂去铁胺(Deferoxamine)和地拉罗司(Deferasirox) (Exjade™)。在另一个实施方案中,方法包括向受试者施用第三治疗剂。

[0478] 本发明提供了包含一种或多种本发明的铁调素类似物和药学上可接受的载剂、赋形剂或稀释剂的组合物(例如药物组合物)。药学上可接受的载剂、稀释剂或赋形剂是指任何类型的无毒固体、半固体或液体填充剂、稀释剂、封装材料或制剂助剂。

[0479] 术语“药学上可接受的载剂”包括任何标准药物载剂。用于治疗用途的药学上可接受的载剂在药学领域中是众所周知的,并且描述于例如“Remington's Pharmaceutical Sciences”,第17版,Alfonso R.Gennaro(Ed.),Mark Publishing Company,Easton,PA,USA,1985中。例如,可以使用微酸性或生理pH下的无菌盐水和磷酸盐缓冲盐水。合适的pH缓冲剂可以是例如磷酸盐、柠檬酸盐、乙酸盐、三(羟甲基)氨基甲烷(TRIS)、N-三(羟甲基)甲基-3-氨基丙磺酸(TAPS)、碳酸氢铵、二乙醇胺、组氨酸、精氨酸、赖氨酸或乙酸盐(例如乙酸钠)或其混合物。该术语还包括美国药典中列出的用于动物(包括人)的任何载剂用剂。

[0480] 在某些实施方案中,组合物包含两种或更多种本文公开的铁调素类似物。在某些实施方案中,组合选自以下之一:(i)其中所示的铁调素类似物肽单体中的任两种或更多种;(ii)本文所公开的铁调素类似物肽二聚体中的任两种或更多种;(iii)本文所公开的铁调素类似物肽单体中的任一种或多种,和本文所公开的铁调素类似物肽二聚体中的任一种或多种。

[0481] 应当理解,在药物组合物中包含本发明的铁调素类似物(即,一种或多种本发明的铁调素类似物肽单体或一种或多种本发明的铁调素类似物肽二聚体)还包括包含本发明的铁调素类似物的药学上可接受的盐或溶剂化物。在特定实施方案中,药物组合物还包含一种或多种药学上可接受的载剂、赋形剂或媒介物。

[0482] 在某些实施方案中,本发明提供包含铁调素类似物或其药学上可接受的盐或溶剂化物的药物组合物,其用于治疗如本文或其他地方所公开的多种病状、疾病或病症(参见例如本文的治疗方法)。在特定实施方案中,本发明提供了包含铁调素类似物肽单体或其药学上可接受的盐或溶剂化物的药物组合物,其用于治疗本文别处公开的多种病状、疾病或病症(参见例如本文的治疗方法)。在特定实施方案中,本发明提供了包含铁调素类似物肽二聚体或其药学上可接受的盐或溶剂化物的药物组合物,其用于治疗本文公开的多种病状、疾病或病症。

[0483] 本文所述的化合物包括同位素标记的化合物,其与本文提供的各种式和结构中所描述的那些相同,但一个或多个原子被具有与通常在自然界中发现的原子质量或质量数不同的原子质量或质量数的原子替代。可掺入本发明化合物的同位素的实例包括氢、碳、氮、氧、氟和氯的同位素,例如分别为 $^2\text{H}$ 、 $^3\text{H}$ 、 $^{13}\text{C}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{15}\text{N}$ 、 $^{18}\text{O}$ 、 $^{17}\text{O}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{18}\text{F}$ 、 $^{36}\text{Cl}$ 。本文所述的某些同位素标记的化合物,例如其中掺入放射性同位素如 $^3\text{H}$ 和 $^{14}\text{C}$ 的那些,可用于药物和/或底物组织分布测定。此外,用同位素如氘(即 $^2\text{H}$ )取代可提供由更大的代谢稳定性产生的某些治疗优势,例如增加的体内半衰期或降低的剂量需求。

[0484] 本发明的铁调素类似物可以配制成适合在储存或不储存的情况下施用的药物组合物,并且其通常包含治疗有效量的至少一种本发明的铁调素类似物,以及药学上可接受的载剂、赋形剂或媒介物。

[0485] 在一些实施方案中,本发明的铁调素类似物药物组合物为单位剂型。在此类形式中,组合物被分成含有适量活性组分的单位剂量。单位剂型可以作为包装制剂提供,该包装含有离散量的制剂,例如小瓶或安瓿中的包装片剂、胶囊或粉末。单位剂型本身也可以是例如胶囊、扁囊剂或片剂,或者它可以是适当数量的任何这些包装形式。单位剂型也可以以单剂量可注射形式提供,例如以含有液相(通常为水性)组合物的笔式装置的形式。组合物可以配制用于任何合适的施用途径和手段,例如本文公开的任一种施用途径和手段。

[0486] 在特定实施方案中,铁调素类似物或包含铁调素类似物的药物组合物悬浮在缓释基质中。本文所用的缓释基质是由可通过酶或酸碱水解或通过溶解降解的材料(通常为聚合物)制成的基质。一旦插入体内,基质就受到酶和体液的作用。缓释基质理想地选自生物相容性材料如脂质体、聚丙交酯(聚乳酸)、聚乙交酯(乙醇酸的聚合物)、聚丙交酯共乙交酯(乳酸和乙醇酸的共聚物)、聚酞、聚(原)酯、多肽、透明质酸、胶原、硫酸软骨素、羧酸、脂肪酸、磷脂、多糖、核酸、聚氨基酸、氨基酸如苯丙氨酸、酪氨酸、异亮氨酸、多核苷酸、聚乙烯基丙烯、聚乙烯吡咯烷酮和硅氧烷。生物可降解基质的一个实施方案是聚丙交酯、聚乙交酯或聚丙交酯共乙交酯(乳酸和乙醇酸的共聚物)之一的基质。

[0487] 在某些实施方案中,组合物肠胃外、皮下或口服施用。在特定实施方案中,组合物口服、脑池内、阴道内、腹膜内、直肠内、局部(如通过粉剂、软膏剂、滴剂、栓剂或经皮贴剂,包括玻璃体内、鼻内和经由吸入递送)或或经口颊施用。本文所用的术语“肠胃外”是指施用方式,其包括静脉内、肌内、腹膜内、胸骨内、皮下、皮内和关节内注射和输注。因此,在某些实施方案中,组合物被配制用于通过这些施用途径中的任一种递送。

[0488] 在某些实施方案中,用于肠胃外注射的药物组合物包含药学上可接受的无菌水性或非水性溶液、分散体、悬浮液或乳液、或无菌粉末,用于在临用前重构为无菌可注射溶液或分散体。合适的水性和非水性载剂、稀释剂、溶剂或媒介物的实例包括水、乙醇、多元醇

(如甘油、丙二醇、聚乙二醇等)、羧甲基纤维素及其合适的混合物、 $\beta$ -环糊精、植物油(如橄榄油)和可注射的有机酯如油酸乙酯。例如,通过使用包衣材料如卵磷脂,在分散体的情况下通过维持所需的粒度,以及通过使用表面活性剂,可以维持适当的流动性。这些组合物还可以含有佐剂,例如防腐剂、润湿剂、乳化剂和分散剂。可注射药物形式的延长吸收可通过包含延迟吸收的药剂如单硬脂酸铝和明胶来实现。

[0489] 可注射的贮库形式包括通过在一种或多种可生物降解的聚合物例如聚丙交酯-聚乙交酯、聚(原酸酯)、聚(酸酐)和(聚)二醇例如PEG中形成铁调素类似物的微囊基质而制备的那些。根据肽与聚合物的比例和所用特定聚合物的性质,可以控制铁调素类似物的释放速率。贮库注射制剂也可通过将铁调素类似物包埋在与身体组织相容的脂质体或微乳液中来制备。

[0490] 可注射制剂可例如通过经由细菌截留过滤器过滤或通过加入呈无菌固体组合物形式的灭菌剂来灭菌,所述灭菌剂可在临用前溶解或分散于无菌水或其他无菌可注射介质中。

[0491] 本发明的铁调素类似物也可在脂质体或其他基于脂质的载剂中施用。如本领域已知的,脂质体通常衍生自磷脂或其他脂质物质。脂质体由分散在水性介质中的单层或多层水合液晶形成。可以使用能够形成脂质体的任何无毒的、生理上可接受的和可代谢的脂质。除了本发明的铁调素类似物之外,脂质体形式的本发明组合物还可以含有稳定剂、防腐剂、赋形剂等。在某些实施方案中,脂质包括磷脂,包括天然和合成的磷脂酰胆碱(卵磷脂)和丝氨酸。形成脂质体的方法是本领域已知的。

[0492] 用于本发明的适合于肠胃外施用的药物组合物可以包括与接受者的血液等渗的肽抑制剂的无菌水溶液和/或悬浮液,通常使用氯化钠、甘油、葡萄糖、甘露醇、山梨醇等。

[0493] 在一些方面,本发明提供用于口服递送的药物组合物。本发明的组合物和铁调素类似物可根据本文所述的任何方法、技术和/或递送媒介物制备用于口服施用。此外,本领域技术人员将理解,本发明的铁调素类似物可被修饰或整合到本文未公开的系统或递送媒介物中,但在本领域中是熟知的,并且可用于口服递送肽。

[0494] 在某些实施方案中,用于口服施用的制剂可包含佐剂(例如间苯二酚和/或非离子表面活性剂,例如聚氧乙烯油基醚和正十六烷基聚乙醚)以人工增加肠壁的渗透性,和/或酶抑制剂(例如胰蛋白酶抑制剂、氟磷酸二异丙酯(DFF)或抑肽酶)以抑制酶降解。在某些实施方案中,用于口服施用的固体剂型的铁调素类似物可与至少一种添加剂混合,例如蔗糖、乳糖、纤维素、甘露醇、海藻糖、棉子糖、麦芽糖醇、葡聚糖、淀粉、琼脂、藻酸盐、壳多糖、壳聚糖、果胶、黄蓍胶、阿拉伯树胶、明胶、胶原、酪蛋白、白蛋白、合成或半合成聚合物或甘油酯。这些剂型还可以含有其他类型的添加剂,例如非活性稀释剂、润滑剂如硬脂酸镁、对羟基苯甲酸酯、防腐剂如山梨酸、抗坏血酸、 $\alpha$ -生育酚、抗氧化剂如半胱氨酸、崩解剂、粘合剂、增稠剂、缓冲剂、pH调节剂、甜味剂、调味剂或芳香剂。

[0495] 在特定实施方案中,与本发明的铁调素类似物相容的口服剂型或单位剂量可以包括铁调素类似物和非药物组分或赋形剂的混合物,以及可以被认为是成分或包装的其他不可重复使用的材料。口服组合物可包括液体、固体和半固体剂型中的至少一种。在一些实施方案中,提供了包含有效量的铁调素类似物的口服剂型,其中所述剂型包括丸剂、片剂、胶囊剂、凝胶剂、糊剂、饮料、糖浆剂、软膏剂和栓剂中的至少一种。在一些情况下,提供了一种

口服剂型,其被设计和配置为实现铁调素类似物在受试者小肠和/或结肠中的延迟释放。

[0496] 在一个实施方案中,包含本发明的铁调素类似物的口服药物组合物包含设计用于延迟铁调素类似物在小肠中释放的肠溶包衣。在至少一些实施方案中,提供了药物组合物,其在延迟释放药物制剂中包含本发明的铁调素类似物和蛋白酶抑制剂,例如抑肽酶。在一些情况下,本发明的药物组合物包含在pH约5.0或更高的胃液中可溶的肠溶包衣。在至少一个实施方案中,提供了包含肠溶包衣的药物组合物,所述肠溶包衣包含具有可解离羧基的聚合物,例如纤维素衍生物,包括羟丙基甲基纤维素邻苯二甲酸酯、乙酸邻苯二甲酸纤维素酯和乙酸偏苯三酸纤维素酯以及纤维素和其他碳水化合物聚合物的类似衍生物。

[0497] 在一个实施方案中,在肠溶包衣中提供了包含本发明的铁调素类似物的药物组合物,所述肠溶包衣被设计成在受试者的下胃肠道系统中以受控方式保护和释放药物组合物,并避免全身副作用。除肠溶包衣外,本发明的铁调素类似物可被包封、包衣、接合或以其他方式结合在任何相容的口服药物递送系统或组分内。例如,在一些实施方案中,本发明的铁调素类似物在脂质载剂系统中提供,所述脂质载剂系统包含聚合物水凝胶、纳米颗粒、微球、胶束和其他脂质系统中的至少一种。

[0498] 为了克服小肠中的肽降解,本发明的一些实施方案包括水凝胶聚合物载剂系统,其中含有本发明的铁调素类似物,由此水凝胶聚合物保护铁调素类似物免受小肠和/或结肠中的蛋白水解。本发明的铁调素类似物还可被配制成与载剂系统相容,所述载剂系统被设计成增加肽的溶解动力学并增强肽的肠吸收。这些方法包括使用脂质体、胶束和纳米颗粒来增加肽的胃肠道渗透。

[0499] 各种生物反应系统也可与本发明的一种或多种铁调素类似物组合以提供用于口服递送的药剂。在一些实施方案中,本发明的铁调素类似物与生物反应系统组合使用,例如水凝胶和具有氢键基团的粘膜粘附性聚合物(例如PEG、聚(甲基丙烯酸)[PMAA]、纤维素、Eudragit®、壳聚糖和藻酸盐),以提供用于口服施用的治疗剂。其他实施方案包括优化或延长本文公开的铁调素类似物的药物停留时间的方法,其中铁调素类似物表面的表面经修饰以包含通过氢键、具有连接的粘蛋白的聚合物或/和疏水相互作用的粘膜粘附性质。根据本发明的期望特征,这些修饰的肽分子可以展示增加的药物在受试者体内的停留时间。此外,靶向性粘膜粘附系统可特异性结合肠细胞和M细胞表面的受体,从而进一步增加含有铁调素类似物的颗粒的摄取。

[0500] 其他实施方案包括用于口服递送本发明的铁调素类似物的方法,其中将铁调素类似物与渗透增强剂组合提供给受试者,所述渗透增强剂通过增加细胞旁或跨细胞渗透来促进肽转运穿过肠粘膜。例如,在一个实施方案中,渗透增强剂与铁调素类似物组合,其中渗透增强剂包含长链脂肪酸、胆汁盐、两亲性表面活性剂和螯合剂中的至少一种。在一个实施方案中,包含N-[(羟基苯甲酰基)氨基]辛酸钠的渗透增强剂用于与本发明的铁调素类似物形成弱的非共价缔合,其中所述渗透增强剂有利于膜转运并且一旦到达血液循环就进一步解离。在另一个实施方案中,本发明的铁调素类似物与寡精氨酸缀合,从而增加肽进入各种细胞类型的细胞渗透。此外,在至少一个实施方案中,在本发明的肽抑制剂和选自由环糊精(CD)和树枝状聚合物组成的群组的渗透增强剂之间提供非共价键,其中所述渗透增强剂减少肽聚集并增加铁调素类似物分子的稳定性和溶解度。

[0501] 本发明的其他实施方案提供了用具有增加的半衰期的本发明的铁调素类似物治

疗受试者的方法。在一个方面,本发明提供了在体外或体内(例如,当施用于人类受试者时)具有至少几小时至一天的半衰期的铁调素类似物,每日一次(q.d.)或每日两次(b.i.d.)给予治疗有效量是足够的。在另一个实施方案中,铁调素类似物具有三天或更长的半衰期,每周(q.w.)给予治疗有效量是足够的。此外,在另一个实施方案中,铁调素类似物具有八天或更长的半衰期,每两周(b.i.w.)或每月给予治疗有效量是足够的。在另一个实施方案中,将铁调素类似物衍生化或修饰,使其与未衍生化或未修饰的铁调素类似物相比具有更长的半衰期。在另一个实施方案中,铁调素类似物含有一个或多个化学修饰以增加血清半衰期。

[0502] 当用于本文所述的至少一种治疗或递送系统中时,本发明的铁调素类似物可以以纯的形式使用,或者当存在这样的形式时,以药学上可接受的盐的形式使用。

[0503] 剂量

[0504] 本发明的铁调素类似物和组合物的总日用量可由主治医师在合理的医学判断范围内决定。用于任何特定受试者的具体治疗有效剂量水平将取决于多种因素,包括:a)所治疗的病症和病症的严重程度;b)使用的特定化合物的活性;c)使用的具体组合物、患者的年龄、体重、一般健康状况、性别和饮食;d)所用特定铁调素类似物的施用时间、施用途径和排泄速率;e)治疗的持续时间;f)与所用的特定铁调素类似物组合或同时使用的药物,以及医学领域熟知的类似因素。

[0505] 在特定实施方案中,本发明的铁调素类似物以单剂量或分剂量施用给人或其他哺乳动物宿主的总日剂量可以是例如0.0001至300mg/kg体重每天或1至300mg/kg体重每天的量。在某些实施方案中,本发明的铁调素类似物的剂量为约0.0001至约100mg/kg体重/天,例如约0.0005至约50mg/kg体重/天,例如约0.001至约10mg/kg体重/天,例如约0.01至约1mg/kg体重/天,分一个或多个剂量,例如1至3个剂量施用。

[0506] 在特定实施方案中,例如对于人类患者,总剂量为约10mg至约100mg、或约10mg至约70mg、约10mg至约60mg、约20mg至约50mg、约20mg至约40mg、约30mg、约25mg、约20mg、约15mg或约10mg。在特定实施方案中,每周一次向受试者提供铁调素类似物。在另一个特定实施方案中,例如对于人类患者,每周两次向受试者提供铁调素类似物。

[0507] 在更特定实施方案中,对于人类患者,总剂量为约10mg、约15mg、约20mg、约25mg、约30mg、约40mg、约50mg、约60mg、约70mg或约80mg,每周一次或两次。在更特定实施方案中,对于人类患者,总剂量为约10mg、约15mg、约20mg、约25mg、约30mg、约40mg、约50mg、约60mg、约70mg或约80mg,约每隔一周或约每月一次。

[0508] 在各种实施方案中,本发明的铁调素类似物可以连续施用(例如通过静脉内施用或另一种连续药物施用方法),或可以间隔施用给受试者,通常以规则的时间间隔,这取决于期望的剂量和由熟练的从业者为特定受试者选择的药物组合物。规则施用给药间隔包括例如每天一次、每天两次、每两天、三天、四天、五天或六天一次、每周一次或两次、每月一次或两次等。

[0509] 本发明的这类规则铁调素类似物施用方案在某些情况下,例如在长期施用阶段间,可有利地中断一段时间,以使接受药物治疗的受试者降低药物水平或停止服用药物治疗,通常被称为“药物休假”。药物休假可用于例如维持或恢复对药物的敏感性,尤其是在长期慢性治疗期间,或减少用药物长期慢性治疗受试者的不希望的副作用。药物休假的时间安排取决于规则给药方案的时间安排和药物休假的目的(例如,恢复药物敏感性和/或减少

连续长期施用的不希望副作用)。在一些实施方案中,药物休假可以是药物剂量的减少(例如在一定时间间隔内减少至低于治疗有效量)。在其他实施方案中,在使用相同或不同给药方案(例如以更低或更高剂量和/或施用频率)再次开始施用之前,药物的施用停止一定时间间隔。因此,本发明的药物休假可选自宽范围的时间段和给药方案。示例性的药物休假是两天或更多天、一周或更多周、或一个月或更多月、最多约24个月的药物休假。因此,例如,使用本发明的肽、肽类似物或二聚体的规则每日给药方案可以例如被一周、或两周、或四周的药物休假中断,此后恢复先前的规则给药方案(例如每日或每周给药方案)。预期多种其他药物休假方案可用于施用本发明的铁调素类似物。

[0510] 因此,铁调素类似物可以通过以下施用方案递送,所述施用方案包括被各自的药物休假分开的两个或更多个施用阶段。

[0511] 在每个施用阶段期间,根据预定的施用模式将治疗有效量的铁调素类似物施用给受体受试者。施用模式可以包括在施用阶段的持续时间内向受体受试者连续施用药物。或者,施用模式可包括将多个剂量的铁调素类似物施用给受体受试者,其中所述剂量被给药间隔隔开。

[0512] 给药模式可以包括每个施用阶段至少两个剂量、每个施用阶段至少五个剂量、每个施用阶段至少10个剂量、每个施用阶段至少20个剂量、每个施用阶段至少30个剂量或更多。

[0513] 所述给药间隔可以是规则的给药间隔,其可以如上所述,包括每天一次、每天两次、每两天、三天、四天、五天或六天一次、每周一次或两次、每月一次或两次、或规则但甚至更不频繁的给药间隔,这取决于本发明的铁调素类似物的特定剂型、生物利用度和药代动力学特征。

[0514] 施用阶段可具有至少两天、至少一周、至少2周、至少4周、至少一个月、至少2个月、至少3个月、至少6个月或更长的持续时间。

[0515] 当施用模式包括多个剂量时,随后的药物休假阶段的持续时间长于该施用模式中使用的给药间隔。在给药间隔不规则的情况下,药物休假阶段的持续时间可大于施用阶段过程中剂量之间的平均间隔。或者,药物休假的持续时间可长于施用阶段期间连续剂量之间的最长间隔。

[0516] 药物休假的持续时间可以是相关给药间隔(或其平均值)的至少两倍、相关给药间隔或其平均值的至少3倍、至少4倍、至少5倍、至少10倍或至少20倍。

[0517] 在这些限制内,药物休假阶段可具有至少两天、至少一周、至少2周、至少4周、至少一个月、至少2个月、至少3个月、至少6个月或更多的持续时间,这取决于先前施用阶段期间的施用模式。

[0518] 施用方案包括至少2个施用阶段。连续的施用阶段被各自的药物休假阶段分开。因此,施用方案可以包括至少3个、至少4个、至少5个、至少10个、至少15个、至少20个、至少25个、或至少30个施用阶段,或更多个,每个施用阶段被各自的药物休假阶段分开。

[0519] 连续的施用阶段可以利用相同的施用模式,尽管这可能不总是期望的或必需的。然而,如果其他药物或活性剂与本发明的铁调素类似物组合施用,则通常在连续施用阶段给予相同的药物或活性剂组合。在某些实施方案中,受体受试者是人。

[0520] 在一些实施方案中,本发明提供了包含至少一种本文公开的铁调素类似物的组合

物和药物。在一些实施方案中,本发明提供了制备用于治疗铁代谢疾病如铁过载疾病的包含至少一种本文所公开的铁调素类似物的药物的方法。在一些实施方案中,本发明提供制备用于治疗糖尿病(I型或II型)、胰岛素抗性或葡萄糖不耐受的包含至少一种本文所公开的铁调素类似物的药物的方法。还提供了治疗受试者如哺乳动物受试者,优选人受试者中的铁代谢疾病的方法,其包括向受试者施用至少一种本文公开的铁调素类似物或组合物。在一些实施方案中,铁调素类似物或组合物以治疗有效量施用。还提供了治疗受试者例如哺乳动物受试者,优选人类受试者的糖尿病(I型或II型)、胰岛素抗性或葡萄糖不耐受的方法,其包括向所述受试者施用至少一种本文所公开的铁调素类似物或组合物。在一些实施方案中,铁调素类似物或组合物以治疗有效量施用。

[0521] 在一些实施方案中,本发明提供了制备本文所公开的铁调素类似物或铁调素类似物组合物(例如药物组合物)的方法。

[0522] 在一些实施方案中,本发明提供包含至少一种本发明的铁调素类似物或其药学上可接受的盐或溶剂化物的装置,其用于将铁调素类似物递送至受试者。

[0523] 在一些实施方案中,本发明提供结合铁转运蛋白或诱导铁转运蛋白内化和降解的方法,其包括使铁转运蛋白与至少一种本文公开的铁调素类似物或铁调素类似物组合物接触。

[0524] 在一些实施方案中,本发明提供了试剂盒,其包含与试剂、装置、指导材料或其组合一起包装的至少一种本文所公开的铁调素类似物或铁调素类似物组合物(例如药物组合物)。

[0525] 在一些实施方案中,本发明提供了通过植入物或渗透泵、通过药筒或微型泵、或通过本领域技术人员熟知的其他方式向受试者施用本发明的铁调素类似物或铁调素类似物组合物(例如药物组合物)的方法。

[0526] 在一些实施方案中,本发明提供复合物,其包含至少一种本文所公开的铁调素类似物,所述铁调素类似物结合至铁转运蛋白(优选人铁转运蛋白)或抗体(诸如特异性结合本文所公开的铁调素类似物的抗体、Hep25或其组合)。

[0527] 在一些实施方案中,本发明的铁调素类似物在Fpn内化测定中具有小于500nM的测量值(例如EC<sub>50</sub>)。技术人员将认识到,铁调素类似物的功能取决于铁调素类似物的三级结构和所呈现的结合表面。因此,可以对编码铁调素类似物的序列进行不影响折叠或不在结合表面上并保持功能的微小改变。在其他实施方案中,本发明提供了与本文所述的任何铁调素类似物的氨基酸序列具有85%或更高(例如85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或99.5%)同一性或同源性的铁调素类似物,其表现出活性(例如铁调素活性),或减轻涉及铁调素的疾病或适应症的症状。

[0528] 在其他实施方案中,本发明提供了与本文提供的任何铁调素类似物或根据本文所述的任一式或铁调素类似物的肽的氨基酸序列具有85%或更高(例如85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或99.5%)同一性或同源性的铁调素类似物。

[0529] 在一些实施方案中,本发明的铁调素类似物可包含其功能片段或变体,其与本文所述的一种或多种特定肽类似物序列相比具有至多10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个氨基酸取代。

[0530] 除了本文实施例中描述的方法之外,本发明的铁调素类似物可以使用本领域已知

的方法产生,包括化学合成、生物合成或使用重组DNA方法的体外合成、以及固相合成。参见例如Kelly&Winkler(1990) Genetic Engineering Principles and Methods,第12卷, J.K.Setlow ed.,Plenum Press,NY,第1-19页;Merrifield(1964) J Amer Chem Soc 85: 2149;Houghten(1985) PNAS USA 82:5131-5135;以及Stewart&Young(1984) Solid Phase Peptide Synthesis,2ed.Pierce,Rockford,IL,通过引入并入文中。本发明的铁调素类似物可以用本领域已知的蛋白质纯化技术纯化,如反相高效液相色谱(HPLC)、离子交换或免疫亲和色谱、过滤或尺寸排阻或电泳。参见Olsnes,S.和A.Pihl(1973) Biochem.12(16): 3121-3126;以及Scopes(1982) Protein Purification, Springer-Verlag,NY,通过引入并入文中。或者,本发明的铁调素类似物可通过本领域已知的重组DNA技术制备。因此,本文考虑了编码本发明多肽的多核苷酸。在某些优选的实施方案中,多核苷酸是分离的。本文所用的“分离的多核苷酸”是指在与多核苷酸天然存在的环境不同的环境中的多核苷酸。

#### [0531] 实施例

[0532] 以下实施例展示本发明的某些具体实施方案。以下实施例使用本领域技术人员熟知和常规的标准技术进行,除非另外详细描述。应当理解,这些实施例仅用于说明目的,并不意图完全限定本发明的条件或范围。因此,它们不应以任何方式解释为限制本发明的范围。

#### [0533] 缩写:

[0534] DCM:二氯甲烷

[0535] DMF:N,N-二甲基甲酰胺

[0536] NMP:N-甲基吡咯烷酮

[0537] HBTU:O-(苄并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸盐

[0538] HATU:2-(7-氮杂-1H-苄并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脲六氟磷酸盐

[0539] DCC:二环己基碳二亚胺

[0540] NHS:N-羟基琥珀酰亚胺

[0541] DIPEA:二异丙基乙胺

[0542] EtOH:乙醇

[0543] Et<sub>2</sub>O:乙醚

[0544] H<sub>2</sub>:氢

[0545] TFA:三氟乙酸

[0546] TIS:三异丙基硅烷

[0547] ACN:乙腈

[0548] HPLC:高效液相色谱

[0549] ESI-MS:电喷雾电离质谱

[0550] PBS:磷酸盐缓冲盐水

[0551] Boc:叔丁氧羰基

[0552] Fmoc:芴基甲氧羰基

[0553] Ac:乙酰氨基甲基

[0554] IVA:异戊酸(或异戊酰基)

[0555] K():在本文提供的肽序列中,其中化合物或化学基团提供在紧接在赖氨酸残基之

后的括号中,应理解括号中的化合物或化学基团是缀合至赖氨酸残基的侧链。因此,例如但不以任何方式限制,K-[ (PEG8) ]-表示PEG8部分与该赖氨酸的侧链缀合。

[0556] Palm:表示棕榈酸(棕榈酰基)的缀合。

[0557] 本文所用的“C( )”是指涉及特定二硫键的半胱氨酸残基。例如,在铁调素中,存在四个二硫桥:第一个在两个C(1)残基之间;第二个在两个C(2)残基之间;第三个在两个C(3)残基之间;和第四个在两个C(4)残基之间。因此,在一些实施方案中,铁调素的序列书写如下:

[0558] Hy-DTHFPIC(1) IFC(2) C(3) GC(2) C(4) HRSKC(3) GMC(4) C(1) KT-OH;并且其他肽的序列也可以任选地以相同的方式书写。

[0559] 实施例1

[0560] 肽类似物的合成

[0561] 除非另外指明,否则以下所用的试剂和溶剂可以标准实验室试剂或分析级商购获得,并且无需进一步纯化即可使用。

[0562] 肽的固相合成程序

[0563] 使用优化的9-芴基甲氧基羰基(Fmoc)固相肽合成方案化学合成本发明的肽类似物。对于C末端酰胺,使用rink-酰胺树脂,尽管wang和三苯甲基树脂也用于产生C末端酸。侧链保护基团如下:Glu,Thr和Tyr:0-叔丁基;Trp和Lys:t-Boc(叔丁氧羰基);Arg:N- $\gamma$ -2,2,4,6,7-五甲基二氢苯并呋喃-5-磺酰基;His,Gln,Asn,Cys:三苯甲基。对于选择性二硫桥形成,Acm(乙酰氨基甲基)也用作Cys保护基。为了偶联,将4到10倍过量的在DMF中含有Fmoc氨基酸、HBTU和DIPEA(1:1:1.1)的溶液添加到溶胀的树脂[HBTU:0-(苯并三唑-1-yl)-N,N,N',N'-四甲基脒六氟磷酸盐;DIPEA:二异丙基乙胺;DMF:二甲基甲酰胺]。HATU(0-(7-氮杂苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脒六氟磷酸盐)代替HBTU用于提高困难区域的偶联效率。通过用DMF、哌啶(2:1)溶液处理除去Fmoc保护基。

[0564] 从树脂上切割肽的程序

[0565] 通过在含有三氟乙酸、水、乙二硫醇和三异丙基硅烷(90:5:2.5:2.5)的溶液中搅拌干树脂2至4小时来实现本发明的肽类似物(例如化合物2)的侧链脱保护和切割。除去TFA后,使用冰冷的乙醚沉淀肽。将溶液离心,倾析乙醚,然后用乙醚洗涤第二次。将肽溶解在含有0.1%TFA(三氟乙酸)的乙腈、水溶液(1:1)中,并且过滤所得溶液。使用电喷雾电离质谱法(ESI-MS)评估线性肽质量。

[0566] 肽的纯化程序

[0567] 使用反相高效液相色谱(RP-HPLC)纯化本发明的肽(例如化合物2)。使用C18柱(3 $\mu$ m,50x2mm)以1mL/min的流速进行分析。使用制备型RP-HPLC用C18柱(5 $\mu$ m,250x21.2mm)以20mL/min的流速纯化线性肽。使用缓冲液B在A中的线性梯度实现分离(缓冲液A:水性0.05%TFA;缓冲液B:0.043%TFA,90%乙腈水溶液)。

[0568] 肽的氧化程序

[0569] 方法A(单个二硫键氧化)。本发明的未受保护的肽的氧化通过向肽溶液(ACN:H<sub>2</sub>O,7:3,0.5%TFA)中逐滴添加含碘的MeOH(1mg/1mL)来实现。搅拌2分钟后,分批加入抗坏血酸直至溶液澄清,并且立即将样品加载到HPLC上进行纯化。

[0570] 方法B(两个二硫键的选择性氧化)。当存在多于一个二硫键时,经常进行选择性氧

化。在1mg/10mL肽的pH7.6  $\text{NH}_4\text{CO}_3$ 溶液中实现游离半胱氨酸的氧化。搅拌24小时后且纯化前,用TFA将溶液酸化至pH3,然后冻干。然后使用碘溶液对得到的单一氧化肽(具有ACM保护的半胱氨酸)进行氧化/选择性脱保护。将肽(1mg/2mL)溶解于MeOH/ $\text{H}_2\text{O}$ 中,在室温下将溶解于反应溶剂中的80:20碘添加至反应中(最终浓度:5mg/mL)。将溶液搅拌7分钟,然后分批加入抗坏血酸直至溶液澄清。然后将溶液直接加载到HPLC上。

[0571] 方法C(自然氧化)。当存在多于一个二硫键且不进行选择氧化时,进行天然氧化。在(肽:GSSG:GSH,1:10,100)的氧化和还原谷胱甘肽(肽/GSH/GSSG,1:100:10摩尔比)存在下,用100mM  $\text{NH}_4\text{CO}_3$  (pH7.4)溶液实现天然氧化。搅拌24小时后且RP-HPLC纯化前,用TFA将溶液酸化至pH3,然后冻干。

[0572] 产生二聚体的半胱氨酸氧化程序。本发明的未受保护的肽的氧化通过向肽溶液(ACN:H<sub>2</sub>O,7:3,0.5%TFA)中逐滴添加含碘的MeOH(1mg/1mL)来实现。搅拌2分钟后,分批加入抗坏血酸直至溶液澄清,并且立即将样品加载到HPLC上进行纯化。

[0573] 二聚化程序。

[0574] 乙醛酸(DIG)、IDA或Fmoc- $\beta$ -Ala-IDA通过在NMP(N-甲基吡咯烷酮)中以0.1M的最终浓度用2.2当量的N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)和二环己基碳二亚胺(DCC)处理1当量(缩写为“eq”)的所述酸而预活化为N-羟基琥珀酰亚胺酯。对于PEG13和PEG25接头,这些化学实体是购买的,预先形成为活化的琥珀酰亚胺酯。将约0.4当量的活化酯分批缓慢加入含肽的NMP(1mg/mL)中。将溶液搅拌10分钟,然后缓慢加入另外2-3等份的约0.05当量的接头。将溶液再搅拌3h,然后在真空下除去溶剂并将残余物通过反相HPLC纯化。进行在含20%哌啶的DMF中搅拌肽的另外步骤(2 $\times$ 10min),之后是另外的反相HPLC纯化。

[0575] 本领域技术人员将理解,可以使用肽合成的标准方法来产生本发明的化合物。

[0576] 接头活化和二聚化

[0577] 将肽单体亚基连接以形成铁调素类似物肽二聚体,如下所述。

[0578] 小规模DIG接头活化程序:将5mL NMP加入装有IDA二酸(304.2mg,1mmol)、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS,253.2mg,2.2当量,2.2mmol)和搅拌棒的玻璃小瓶中。在室温下搅拌混合物以完全溶解固体起始材料。然后向混合物中加入N,N'-二环己基碳二亚胺(DCC,453.9mg,2.2当量,2.2mmol)。在10分钟内出现沉淀,并将反应混合物在室温下进一步搅拌过夜。然后过滤反应混合物以除去沉淀的二环己基脲(DCU)。在用于二聚化之前,将活化的接头保存在封闭的小瓶中。活化接头的标称浓度为约0.20M。

[0579] 对于使用PEG接头的二聚化,不涉及预活化步骤。使用市售的预活化的双功能PEG接头。

[0580] 二聚化程序:将2ml无水DMF加入装有肽单体(0.1mmol)的小瓶中。用DIEA将肽的pH调节至8-9。然后将活化的接头(IDA或PEG13、PEG25)(相对于单体0.48当量,0.048mmol)加入单体溶液中。将反应混合物在室温下搅拌1小时。使用分析型HPLC监测二聚化反应的完成。二聚化反应的完成时间根据接头而变化。反应完成后,将肽在冷乙醚中沉淀并离心。弃去上清液乙醚层。沉淀步骤重复两次。然后使用反相HPLC(LunaC18载体,10 $\mu$ ,100A,流动相A:含有0.1%TFA的水,流动相B:含有0.1%TFA的乙腈(ACN),梯度为15%B在60分钟内变为45%B,流速为15ml/min)纯化粗品二聚体。然后将含有纯产物的级分在冻干机上冷冻干燥。

[0581] 半衰期延长部分的缀合

[0582] 在树脂上进行肽的缀合。Lys (ivDde) 用作关键氨基酸。在肽组装在树脂上之后,使用 $3 \times 5$ min含2%胍的DMF进行5min的ivDde基团的选择性脱保护。用HBTU、DIEA 1-2当量活化和酰化接头3小时,除去Fmoc,然后用油脂酸 (lipidic acid) 进行第二次酰化,得到缀合的肽。

[0583] 实施例2

[0584] 肽类似物活性

[0585] 在体外测试肽类似物诱导人铁转运蛋白的内化。内化后,肽被降解。该测定测量受体荧光的降低。

[0586] 编码人铁转运蛋白 (SLC40A1) 的cDNA克隆自Origene的cDNA克隆 (NM\_014585)。使用也编码用于亚克隆的末端限制性位点的引物通过PCR扩增编码铁转运蛋白的DNA,但没有终止密码子。将铁转运蛋白受体亚克隆到含有新霉素 (G418) 抗性标记的哺乳动物GFP表达载体中,使得铁转运蛋白的阅读框与GFP蛋白框内融合。通过DNA测序证实了编码蛋白质的DNA的保真度。HEK293细胞用于转染铁转运蛋白-GFP受体表达质粒。根据标准方案使细胞在生长培养基中生长并使用Lipofectamine (制造商的方案,Invitrogen) 用质粒转染。在生长培养基中使用G418选择稳定表达铁转运蛋白-GFP的细胞 (其中只有已摄取并掺入cDNA表达质粒的细胞存活),并在Cytomation MoFlo™细胞分选仪上分选数次,以获得GFP阳性细胞 (488nm/530nm)。进行细胞繁殖并以等分试样冷冻。

[0587] 为了测定铁调素类似物 (化合物) 对人铁转运蛋白的活性,将细胞在96孔板中在不含酚红的标准培养基中孵育。在培养箱中将化合物添加至期望的最终浓度,持续至少18小时。孵育后,通过全细胞GFP荧光 (Envision读板器,485/535滤光片对) 或通过Beckman Coulter Quanta™流式细胞仪测定剩余的GFP荧光 (表示为485nm/525nm处荧光强度的几何平均值)。在培养箱中添加化合物至期望的最终浓度,持续至少18小时但不超过24小时。

[0588] 在某些实验中,参考化合物包括天然铁调素、微型铁调素和RI-微型铁调素,其为微型铁调素的类似物。RI-微型铁调素中的“RI”是指逆反 (Retro Inverse)。逆反肽是在所有D氨基酸中具有反向序列的肽。一个实例是Hy-Glu-Thr-His-NH<sub>2</sub>变成Hy-DHis-DThr-DGlu-NH<sub>2</sub>。根据上述活性测定确定这些参考化合物对铁转运蛋白降解的EC<sub>50</sub>。这些肽作为对照标准。

[0589] 表6. 参考化合物

名称	序列	效力 EC <sub>50</sub> (nM)
铁调素	Hy-DTHFPIC(1)IFC(2)C(3)GC(2)C(4)HRSKC(3)GMC(4)C(1)KT-OH (SEQ ID NO: 56)	34
[0590] 微型铁调素	Hy-DTHFPICIF-NH <sub>2</sub> (SEQ ID NO: 57)	712
RI-微型铁调素	Hy-DPhe-DIle-DCys-DIle-DPro-DPhe-DHis-DThr-DAsp-NH <sub>2</sub> (SEQ ID NO: 58)	> 10 μM

[0591] 在授权专利US 9,822,157和US 10,030,061中提供了对本发明的各种肽类似物测定的效力EC<sub>50</sub>值 (nM) 和其他活性数据。这些专利的全部内容通过引用并入本文。

[0592] 实施例3

[0593] 真性红细胞增多症中的铁调素抑制

[0594] 测试本发明的铁调素类似物在真性红细胞增多症中的活性,如Casu等人, Blood.2016;128 (2) :265-276所述。

[0595] 铁调素是一种25个氨基酸的肽,它控制全身铁稳态,并由肝脏响应血浆铁浓度和铁储量而产生。铁调素抑制细胞铁输出蛋白铁转运蛋白(FPN-1),FPN-1表达在参与铁吸收、再循环和储存的细胞表面上。在真性红细胞增多症鼠模型中,铁调素调节全身铁限制,并且外源性铁调素模拟物的外源性施用减少Hgb浓度和脾肿大(Casu等人, Blood.2016;128 (2) :265-276)。

[0596] 当JAK2被组成型激活时,触发不依赖于促红细胞生成素的红细胞产生,导致红细胞增多症。防止突变Jak2的影响的方法是用铁调素或铁调素模拟肽诱导铁限制。低铁水平抑制在Jak2下游的点的促红细胞生成素信号传导,从而提供超驰信号。当将铁调素模拟肽施用给表达携带引起红细胞增多症的突变的人Jak2基因的转基因小鼠时,红细胞增多症特有的红细胞生成和血细胞比容的增加被逆转回到正常范围。(Casu等人, Blood.2016;128 (2) :265-276)。

[0597] 实施例4

[0598] 铁调素肽类似物的体内验证

[0599] 测试本发明的铁调素类似物的体内活性,以确定其减少血清中游离Fe<sup>2+</sup>的能力。

[0600] 在PK-PD实验中,向食蟹猴(n=3/组)以2.44mg/kg化合物A或2.93mg/kg化合物B皮下施用铁调素类似物(化合物A(SEQ ID NO:45)或化合物B(SEQ ID NO:55))或媒介物对照。在施用剂量后0.5h、1h、2h、4h、8h、12h、24h、30h、36h、48h、60h、72h和144h从施用铁调素类似物的猴子组中取出血清样品。血浆/血清中的铁含量使用比色测定在Cobas c 111上根据来自测定制造商的说明书测量(测定:IRON2:ACN 661)。从Cobas Iron2分析获得的数据示于图1A(化合物A)和图1B(化合物B)中(作为平均值与SD)。化合物A在化合物施用后8小时引起约5倍的血清铁减少。化合物B的血清铁减少在化合物施用后约12小时最大,并且其为给药前水平的12分之一。

[0601] 这些研究表明,当在食蟹猴中给药时,本发明的铁调素类似物降低血清铁水平至少60小时。化合物A和化合物B对血清铁的降低具有浓度依赖性作用。在铁调素类似物的血清浓度和其对应的作用之间也存在作用延迟,即,作用的最低点发生在从化合物的峰值血清浓度延迟的时间。对于化合物A,在200至3200ng/mL范围内的血清浓度是有效的,1000-3200ng/mL具有最大作用。对于化合物B,25-125ng/mL的血清浓度显示出作用,50-125ng/mL具有最大作用。

[0602] 实施例5

[0603] 肽限制红细胞生成的功效

[0604] 当在健康食蟹猴中施用时,测试本发明的铁调素类似物限制红细胞生成活性的功效。在重复剂量研究中,以0.6mg/kg/剂、2mg/kg/剂或6mg/kg/剂的三种不同剂量(n=6只/性别/高剂量或对照组和n=3只/性别/低或中剂量组)向食蟹猴皮下(SC)施用4个周剂量的化合物A或媒介物对照。

[0605] ≥3mg/kg/剂的化合物A引起药理学介导的贫血,特别是血细胞比容(Hct)和血红蛋白(Hgb)的剂量和时间依赖性降低(表7和图2)。在第29天,与并用对照相比,1、3和10mg/

kg化合物A治疗的雄性动物的Hgb水平分别降低0.1、2.7和7.2g/dL。在3和10mg/kg/剂雄性动物组中,hct水平绝对值分别降低了6%和22%。雄性动物产生与雌性动物相似的药理学反应。红细胞(RBC)长时间减少后发生网织红细胞增多症,第29天观察到统计学显著增加。停止给药后,RBC参数恢复到并用对照值。

[0606] 表7:在每周一次SC施用化合物A共4剂然后28天恢复期的NHP中,血细胞比容和血红蛋白相对于并用对照的变化

剂量 (mg/kg/剂)	第 7 天 <sup>1</sup>		第 29 天 <sup>1</sup>		第 56 天(恢复) <sup>1</sup>	
	M	F	M	F	M	F
%Hct						
0	36	35	40	37	41	38
1 <sup>2</sup>	+2	0	0	0	-	-
3	-1	-2	-6	-5	-	-
10	-1	-2	-22***	-17***	+4	0
Hgb(g/dL)						
0	11.1	11.4	12.2	11.8	13.1	12.5
1	+0.9	-0.5	-0.1	-0.8	-	-
3	-0.1	-0.9	-2.7**	-2.7**	-	-
10	-0.2	-1.4**	-7.2***	-6.5***	+1.2	-0.4

[0607] <sup>1</sup>在第1剂后6天和第4剂后7天及恢复动物的第56天(第4剂后34天)采集样品。

[0608] <sup>2</sup>变化代表来自并用对照的值,如果表示为每个个体动物的变化,即与给药前水平相比的变化,则数据可能更严格并且获得更大的统计学显著性(下组)。

[0609] 与并用对照相比,\*\*p<0.01和\*\*\*p<0.001。

[0610] 反映RBC的大小和Hgb含量的血细胞比容水平和二级血液学指标,包括平均红细胞体积(MCV)、平均红细胞血红蛋白浓度(MCHC)和平均红细胞Hgb/细胞(MCH)示于图2中。化合物A诱导的铁限制性红细胞生成后产生的RBC的大小(MCV)与并用对照相似,但与并用对照相比,它们表现出每个细胞Hgb浓度(MCHC和MCH)的剂量依赖性降低。在恢复时,媒介物对照组和10mg/kg化合物A给药组类似,显示血液学变化的可逆性。在最初铁充足的动物中,在扩大的和持续的铁限制性贫血后,预期观察到的血液学发现结果。

[0611] 实施例6

[0612] 肽限制红细胞生成的功效

[0613] 在另一个重复剂量研究中,将13个周剂量的化合物A或媒介物对照以三种不同的剂量皮下施用给食蟹猴,然后是5周恢复期。

[0614] 对食蟹猴(6只/性别/组)皮下施用0(0.9%盐水)、0.6、2或6mg/kg/剂的化合物A,QW,持续3个月,总共13个剂量(第1、8、15、22、29、36、43、50、57、64、71、78和85天)。在第92天(主要)处死一组动物(4只/性别/组),并且在35天恢复期(恢复)后,在第120天处死其余动物(2只/性别/组)。在开始治疗前(第-7天和第-3天)和在第27、55和90天获得主要和恢复动物的血液学样品两次,对应于第4、8和13剂量后的5天,和恢复动物的第119天。

[0615] 血液学变化与向铁充足的NHP施用的铁调素模拟物的预期药理学一致,并且包括RBC参数(RBC计数、Hgb和Hct)的剂量依赖性降低和网织红细胞的增加以及RBC指标的改变(降低的MCHC和MCH)和RBC形态的改变(例如小红细胞症和低色素症)(数据未示出)。与化合物A诱导的贫血一致,造血细胞过多发生在骨髓(股骨、胸骨)和髓外造血中,并且在≥2mg/

kg/剂下,在肝和脾中观察到血铁黄素沉积(与6mg/kg/剂下增加的器官重量相关)(数据未示出)。

[0616] 发生了与铁调素模拟物在诱导缺铁性贫血中的已知红细胞生成药理作用一致的血液学变化(表8)。在第90天,与并用对照相比,0.6、2和6mg/kg化合物A雌性动物的Hgb水平分别减少了1.3、3.0和5.6g/dL。雄性动物产生与雌性动物相似的药理学反应。在所有给药阶段时间点,应答于贫血,网织红细胞以剂量依赖性方式升高。停止给药后,RBC参数恢复到并用对照值。

[0617] 表8:在每周一次通过SC注射施用化合物A13周然后35天恢复期的NHP中,血细胞比容和血红蛋白相对于并用对照的变化

剂量 (mg/kg/ 剂)	第 27 天 <sup>1</sup>		第 55 天 <sup>1</sup>		第 90 天 <sup>1</sup>		第 119 天 <sup>1</sup> (恢复)	
	M	F	M	F	M	F	M	F
%Hct								
0	44	43	45	44	40	40	42	40
0.6 <sup>2</sup>	-3*	-4	-3**	-3	-3	-3	+3	+2
2	-5***	-7**	-7***	-7***	-4**	-7***	+4	+4
6	-17***	-16***	-21***	-13***	-17***	-14***	+4	+6
Hgb(g/dL)								
0	13.5	13.0	13.8	13.6	12.5	12.2	13.1	12.2
0.6	-1.0	-0.9	-1.0**	-1.4*	-1.2*	-1.3**	+0.7	+0.9
2	-1.3***	-2.6***	-3.0***	-3.5***	-2.4***	-3.0***	+1.1	+1.3
6	-5.9***	-5.7***	-7.2***	-5.6***	-6.2***	-5.6***	+0.9	+1.6

[0618] <sup>1</sup>在第4、8和13剂后5天和恢复动物的第119天采集样品。

[0619] <sup>2</sup>变化代表来自并用对照的值,如果表示为每个个体动物的变化,即与给药前水平相比的变化,则数据可能更严格并且获得更大的统计学显著性(下组)。

[0620] \*与并用对照相比 $p < 0.05$ 。\*\*与并用对照相比 $p < 0.01$ 。\*\*\*与并用对照相比 $p < 0.001$ 。

[0621] 在相同的研究中,化合物A诱导次级血液学指标的显著变化,如图3所示。MCHC和MCH的剂量依赖性降低与预期的与铁限制性红细胞生成相关的RBC流变学变化一致。停止给药后35天,血液学效应与并用对照相似。

[0622] 在治疗期间还观察到 $\geq 2\text{mg/kg/天}$ 的总胆红素(tBili)增加,与缺铁性贫血相关的RBC破坏有关(图4),并认为与最年轻的红系细胞网织红细胞的优先破坏有关(Robinson& Koepfel, 1971)。与预期的由化合物A诱导的缺铁性贫血一致,在6mg/kg/剂的最高评估剂量下,在雄性和雌性动物中均观察到血小板水平显著升高(图5)。在恢复时间点停止给药后,胆红素水平恢复到正常水平,而血小板水平逆转到正常限度内(与并用对照相比)。

[0623] 实施例7

[0624] 化合物A在需要放血的真性红细胞增多症患者中的2期研究

[0625] 背景:真性红细胞增多症(PV)患者通常用定期治疗性放血(有或没有并用细胞减灭疗法)治疗以保持血细胞比容 $< 45\%$ 。因此,具有高放血要求的PV患者可能在预约之间具有 $> 45\%$ 的血细胞比容。另一方面,大多数PV患者在诊断时缺铁,在反复放血后恶化。PV患者可能有缺铁症状(即使在没有贫血的情况下也会出现认知障碍和疲劳),并且补铁通常导致

放血率增加。最近的研究表明,可用的疗法部分地通过逆转缺铁来改善PV相关症状。因此,有症状的需要放血的PV患者存在未满足的治疗需求。我们假设铁调素模拟物促进脾巨噬细胞中铁的螯合,从而降低恶性红细胞生成的铁可用性以减少放血需求,同时逆转缺铁相关症状。

[0626] 化合物A是临床研究中用于多种血液病症的铁调素模拟剂。在野生型小鼠中,重复皮下注射化合物A暂时地降低血清铁并引起血细胞比容的剂量相关降低。化合物A作为单一剂量在62名健康受试者中的I期研究显示血清铁浓度从基线降低65%,转铁蛋白饱和度降低70%,没有显著的不良事件。

[0627] 目的:该3部分2期临床试验(在图6中概述)的主要目标是证明化合物A在需要放血的PV患者中的功效(减少放血要求)和安全性。次要目标是确定化合物A对患者报告结局和铁代谢标记物的影响。

[0628] 方法:合格标准包括PV诊断(按照2016年WHO标准)和在使用或不使用稳定剂量的细胞减灭疗法下,在入组前6个月内 $\geq 3$ 次放血达到目标血细胞比容 $\leq 45\%$ 。合格患者入组了2期试验的28周剂量发现部分。患者每周皮下施用10、20、40、60和80mg剂量的化合物A,进行个体化调整以维持血细胞比容 $< 45\%$ ,如图7所示。通过监测血清铁蛋白、血清铁、转铁蛋白饱和度(TSAT)、平均红细胞体积(MCV)和平均红细胞血红蛋白(MCH)来量化身体铁状态。

[0629] 结果:入组试验的13名受试者的可用功效数据:7/13名低风险PV,6/13名高风险PV;平均年龄57.4岁(范围31-74岁);其中6名单独接受TP,6名并用羟基脲,1名并用干扰素;入组前24周的TP=3-9;TP之间的中位时间=42天。患者特征见表9。

[0630]

表 9: 入组化合物 A 研究的受试者

受试者	年龄/性别	风险类别	筛选 HCT、WBC、PLT	等位基因(%)	先前进行细胞减灭疗法?	同时进行细胞减灭疗法?	化合物 A 之前的 PHL 数量	最大值 PHL 之间的周数	第 1 剂化合物 A 后无 PHL 的周数	化合物 A 暴露范围
3	64/M	H	42.3%, 4.310 <sup>9</sup> /L, 23410 <sup>9</sup> /L	52	Y(HU)	Y (HU1500mg)	3	15	26	10,20,10
5	52/M	L	45.8%, 12.810 <sup>9</sup> /L, 53410 <sup>9</sup> /L	77.7	--	N	3	9	23	10,20,40, 80
1	58/F	L	41.6%, 12.110 <sup>9</sup> /L, 99310 <sup>9</sup> /L	54.7	--	N	5	11	37(PHB@ W31 即随 机化后)	10,20,40, 80,40,6 0,40
2	71/M	H	43.6%, 6.710 <sup>9</sup> /L, 53610 <sup>9</sup> /L	36.1	--	N	4	10	37	10,20,40, 20,40
4	43/M	L	45.2%, 15.810 <sup>9</sup> /L, 79610 <sup>9</sup> /L	78.4	HU 停止 2013	N	9	10	24(PHB@ W12)	20,40,80, 60

[0631]

受试者	年龄/性别	风险类别	筛选 HCT、WBC、PLT	等位基因(%)	先前进行细胞减灭法?	同时进行细胞减灭法?	化合物 A 之前的 PHL 数量	最大值 PHL 之间的周数	第 1 剂化合物 A 后无 PHL 的周数	化合物 A 暴露范围
9	31/M	L	43.9%, 5.610 <sup>9</sup> /L, 33010 <sup>9</sup> /L		--	N	6	11	6	20,40
6	68/F	H	40.7%, 7.48K/ $\mu$ L, 579K/ $\mu$ L	16.6	Y(HU)	Y (HU500mg)	3	8	14	20,40,80, 40
7	74/F	H	41%, 8.68K/ $\mu$ L, 140K/ $\mu$ L	53.7	Y(HU)	Y (HU1500mg)	4	21	12	20,40
10	61/M	H	42.1%, 5.32K/ $\mu$ L, 637K/ $\mu$ L	34.5	Y(IFN)	Y (干扰素 180mcgqw)	6	13	1	20,40
12	50/M	L	44.8%, 5.86K/ $\mu$ L, 307K/ $\mu$ L		Y(IFN)	Y (干扰素)	4	21	12	20

[0632]

受试者	年龄/性别	风险类别	筛选 HCT、WBC、PLT	等位基因(%)	先前进行细胞减灭法?	同时进行细胞减灭法?	化合物 A 之前的 PHL 数量	最大值 PHL 之间的周数	第 1 剂化合物 A 后无 PHL 的周数	化合物 A 暴露范围
13	56/M	L	42.4%, 19.82K/ $\mu$ L, 328K/ $\mu$ L		--	N	6	13	1	20
11	52/F	L	38.5%, 4.1K/ $\text{mm}^3$ , 351K/ $\text{mm}^3$	32.3	Y(IFN)	Y (干扰素 45mcg)	6	8	3	20
8	66/F	H	45.9%, 8.3K/ $\mu$ L, 240K/ $\mu$ L	61.9	之前 HU 停止 >2 年	N	5	7	10	20,40,20

缩写: F=雌性, H=高, HCT=血细胞比容, HU=羟基脲, L=低, M=雄性, N=编号, PHB=放血, PLT=血小板, PHL=白细胞计数, Y=是。

[0633] 在适当的剂量调整后,所有受试者维持血细胞比容<45%。平均基线值为血清铁蛋白=14.2ng/mL(5,37);血清铁=33.0ug/dL(16.8,107.8);TSAT=7.6%(4,30)。在用化合

物A治疗期间,血清铁蛋白水平朝向正常逐渐增加(图8),反映铁储量增加。TSAT(图9)和血清铁值短暂变化但保持低于正常范围,反映了化合物A抑制铁从细胞内储量释放的药效学作用。这与增加的MCV(图10)和MCH(图11)以及降低的血细胞比容和红细胞计数相关,一起表明铁分布的正常化。

[0634] 8名受试者用化合物A治疗 $\geq 3$ 个月(图7)。3名受试者被随机分组。在研究的开放标签剂量发现部分期间,所有受试者都没有放血,除了一名受试者不依从治疗,在第4周和第9周之间错过计划治疗并且在约13周进行放血。3名受试者完成了第1部分(28周),没有TP,而在研究开始前的相似时期内需要3-5个TP。在28周剂量发现期期间,除2名受试者外,所有受试者的血细胞比容连续控制在45%以下(图12)。2名受试者的血细胞比容短暂 $>45\%$ ,但其中一名受试者在放血后仍保持在45%以下,两者均增加剂量。此外,除2名受试者外,所有受试者的红细胞数量均减少(图13),MCV均增加。这些发现结果表明在红细胞生成中铁的重新分布。最后,治疗前,平均铁相关参数与全身性缺铁一致,而血清铁蛋白向正常范围逐渐增加。最常见的不良事件是3名患者报告的注射部位反应(ISR)。大多数反应为1-2级,性质上是短暂的,没有患者中断药物。

[0635] 这些研究表明化合物A是良好耐受的。与入组前相比,治疗依从性受试者在可评价的治疗期结束时表现出显著降低的血细胞比容和低于45%的绝对水平以及增加的铁蛋白,表明缺铁的症状应在改善。受试者的血小板计数在治疗过程中大体保持稳定(图14)。受试者的网织红细胞%在治疗过程中表现出上升趋势(图15),尽管没有观察到成熟红细胞的类似增加(数据未示出)。受试者的白细胞计数在治疗过程中大体保持稳定,表明治疗没有引起炎症反应(图16)。如血小板和白细胞没有增加所证明的,PV疾病似乎没有进展。

[0636] 在PV患者中皮下给药10mg至80mg后的不同时间测量化合物A的血浆浓度。浓度以剂量依赖性方式增加并且基于剂量和取样时间而变化。化合物A浓度范围从低于可检测的( $<2\text{ng/mL}$ )到866ng/mL(图17A和17B)。

[0637] 结论:目前的结果支持铁调素模拟物(例如化合物A)在治疗PV患者(包括具有高治疗性放血要求的低风险PV患者)中的用途。假设化合物A和其他铁调素类似物促进脾巨噬细胞中铁的整合,从而降低恶性红细胞生成的铁可用性以减少放血需求,同时逆转缺铁相关症状。这些研究表明化合物A是治疗PV、逆转缺铁和消除PV患者对TP的需要的有效药剂。在TP依赖性PV患者中消除达7个月的TP要求是显著的和出乎意料的。目前的结果表明化合物A是在低和高风险患者中控制血细胞比容、逆转缺铁和消除治疗性放血的有效药剂。这些结果还建立了给药方案、施用途径和在整个治疗过程中监测和调节剂量的方法。

[0638] 在本说明书中提及和/或在申请数据表中列出的所有上述美国专利、美国专利申请公开、美国专利申请、外国专利、外国专利申请和非专利公开均通过引用整体并入本文。

[0639] 从上文可以理解,尽管为了说明的目的在此描述了本发明的具体实施方案,但是在不脱离本发明的精神和范围的情况下可以进行各种修改。

## 序列表

<110> 领导医疗有限公司 (Protagonist Therapeutics, Inc.)

大卫·Y·刘 (Liu, David Y.)

格雷戈里·托马斯·伯恩 (Bourne, Gregory Thomas)

鲁帕·塔拉纳特 (Taranath, Roopa)

苏尼尔·库马尔·古普塔 (Gupta, Suneel Kumar)

尼希特·巴楚拉尔·莫迪 (Modi, Nishit Bachulal)

<120> 缀合的铁调素模拟物

<130> PRTH-037/05W0 321085-2344

<150> US 62/895,201

<151> 2019-09-03

<150> US 62/983,515

<151> 2020-02-28

<150> US 63/020,945

<151> 2020-05-06

<150> US 63/059,747

<151> 2020-07-31

<160> 58

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 25

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 铁调素类似物式

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (1) .. (1)

<223> Xaa是Asp、Ala、Ile、pGlu、bhAsp、Leu、D-Asp或不存在

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (1) .. (1)

<223> N末端残基,被氢、C1-C6烷基、C6-C12芳基、C1-C20烷酰基或pGlu修饰

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (2) .. (2)

<223> Xaa是Thr、Ala或D-Thr

<220>

- <221> MOD\_RES  
<222> (3) .. (3)  
<223> Xaa是His、Lys或D-His  
<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (4) .. (4)  
<223> Xaa是Phe、Ala、Dpa或D-Phe  
<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (5) .. (5)  
<223> Xaa是Pro、Gly、Arg、Lys、Ala、D-Pro或bhPro  
<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (6) .. (6)  
<223> Xaa是Ile、Cys、Arg、Lys、D-Ile或D-Cys  
<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (7) .. (7)  
<223> Xaa是Cys、Ile、Leu、Val、Phe、D-Ile或D-Cys  
<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (8) .. (8)  
<223> Xaa是Ile、Arg、Phe、Gln、Lys、Glu、Val、Leu或D-Ile  
<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (9) .. (9)  
<223> Xaa是Phe或bhPhe  
<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (10) .. (10)  
<223> Xaa是Lys、Phe或不不存在  
<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (11) .. (11)  
<223> Xaa是Gly、Cys、Ala、Phe、Pro、Glu、Lys、D-Pro、Val、Ser或不不存在  
<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (12) .. (12)  
<223> Xaa是Pro、Ala、Cys、Gly或不不存在

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (13) .. (13)  
<223> Xaa是Arg、Lys、Pro、Gly、His、Ala、Trp或不存在  
<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (14) .. (14)  
<223> Xaa是Ser、Arg、Gly、Trp、Ala、His、Tyr或不存在  
<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (15) .. (15)  
<223> Xaa是Lys、Met、Arg、Ala或不存在  
<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (16) .. (16)  
<223> Xaa是Gly、Ser、Lys、Ile、Ala、Pro、Val或不存在  
<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (17) .. (17)  
<223> Xaa是Trp、Lys、Gly、Ala、Ile、Val或不存在  
<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (18) .. (18)  
<223> Xaa是Val、Thr、Gly、Cys、Met、Tyr、Ala、Glu、Lys、Asp、Arg或不存在  
<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (19) .. (19)  
<223> Xaa是Cys、Tyr或不存在  
<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (20) .. (20)  
<223> Xaa是Met、Lys、Arg、Tyr或不存在  
<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (21) .. (21)  
<223> Xaa是Arg、Met、Cys、Lys或不存在  
<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (22) .. (22)





- <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> 铁调素类似物式  
<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (1) .. (1)  
<223> Xaa是Gly、Cys、Ala、Phe、Pro、Glu、Lys、D-Pro、Val、Ser或不存在  
<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (2) .. (2)  
<223> Xaa是Pro、Ala、Cys、Gly或不存在  
<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (3) .. (3)  
<223> Xaa是Arg、Lys、Pro、Gly、His、Ala、Trp或不存在  
<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (4) .. (4)  
<223> Xaa是Ser、Arg、Gly、Trp、Ala、His、Tyr或不存在  
<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (5) .. (5)  
<223> Xaa是Lys、Met、Arg、Ala或不存在  
<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (6) .. (6)  
<223> Xaa是Gly、Ser、Lys、Ile、Ala、Pro、Val或不存在  
<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (7) .. (7)  
<223> Xaa是Trp、Lys、Gly、Ala、Ile、Val或不存在  
<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (8) .. (8)  
<223> Xaa是Val、Thr、Gly、Cys、Met、Tyr、Ala、Glu、Lys、Asp、Arg或不存在  
<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (9) .. (9)  
<223> Xaa是Cys、Tyr或不存在





<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (5) .. (5)  
 <223> Xaa是Pro或bhPro  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (8) .. (8)  
 <223> Xaa是Ile、Lys、Glu、Phe、Gln或Arg  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (10) .. (10)  
 <223> Xaa是Lys或不存在  
 <400> 5  
 Xaa Thr His Xaa Xaa Cys Ile Xaa Phe Xaa  
 1                      5                      10  
 <210> 6  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
 <220>  
 <223> 铁调素类似物式  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1) .. (1)  
 <223> Xaa是Asp、Ida、pGlu、bhAsp或不存在  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1) .. (1)  
 <223> N末端残基,被氢、异戊酸、异丁酸或乙酰基修饰  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (4) .. (4)  
 <223> Xaa是Phe或Dpa  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (5) .. (5)  
 <223> Xaa是Pro或bhPro  
 <220>  
 <221> MOD\_RES

- <222> (8) .. (8)  
<223> Xaa是Ile、Lys、Glu、Phe、Gln或Arg  
<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (10) .. (10)  
<223> Xaa是Lys或不存在  
<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (11) .. (11)  
<223> Xaa是Gly、Glu、Val或Lys  
<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (13) .. (13)  
<223> Xaa是Arg或Lys  
<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (15) .. (15)  
<223> Xaa是Arg或Lys  
<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (16) .. (16)  
<223> Xaa是Gly、Ser、Lys、Ile或Arg  
<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (17) .. (17)  
<223> Xaa是Trp或不存在  
<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (18) .. (18)  
<223> Xaa是Val、Thr、Asp、Glu或不存在  
<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (20) .. (20)  
<223> Xaa是Lys或不存在  
<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (20) .. (20)  
<223> C末端残基用NH<sub>2</sub>或OH修饰  
<400> 6





1	5	10	15
---	---	----	----

Val Cys  
 <210> 10  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 <220>  
 <223> 实验室制备-铁调素肽类似物  
 <400> 10

Asp Thr His Phe Pro Cys Ile Ile Phe Gly Pro Arg Ser Lys Gly Trp
1                    5                    10                    15

Val Cys Lys  
 <210> 11  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 <220>  
 <223> 实验室制备-铁调素肽类似物  
 <400> 11

Asp Thr His Phe Pro Cys Ile Ile Phe Glu Pro Arg Ser Lys Gly Trp
1                    5                    10                    15

Val Cys Lys  
 <210> 12  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 <220>  
 <223> 实验室制备-铁调素肽类似物  
 <400> 12

Asp Thr His Phe Pro Cys Ile Ile Phe Gly Pro Arg Ser Lys Gly Trp
1                    5                    10                    15

Ala Cys Lys  
 <210> 13  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 <220>  
 <223> 实验室制备-铁调素肽类似物  
 <400> 13

Asp Thr His Phe Pro Cys Ile Ile Phe Gly Pro Arg Ser Lys Gly Trp  
1                   5                   10                   15

Val Cys Lys Lys  
                  20

<210> 14

<211> 23

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 实验室制备-铁调素肽类似物

<400> 14

Asp Thr His Phe Pro Cys Ile Ile Phe Val Cys His Arg Pro Lys Gly  
1                   5                   10                   15

Cys Tyr Arg Arg Val Cys Arg  
                  20

<210> 15

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 实验室制备-铁调素肽类似物

<400> 15

Asp Thr His Phe Pro Cys Ile Lys Phe Gly Pro Arg Ser Lys Gly Trp  
1                   5                   10                   15

Val Cys Lys

<210> 16

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 实验室制备-铁调素肽类似物

<400> 16

Asp Thr His Phe Pro Cys Ile Lys Phe Lys Pro Arg Ser Lys Gly Trp  
1                   5                   10                   15

Val Cys Lys

<210> 17

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 实验室制备-铁调素肽类似物

<400> 17

Asp Thr His Phe Pro Cys Ile Ile Phe Gly Pro Arg Ser Arg Gly Trp  
1                   5                   10                   15

Val Cys Lys

<210> 18

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 实验室制备-铁调素肽类似物

<400> 18

Asp Thr His Phe Pro Cys Ile Lys Phe Gly Pro Lys Ser Lys Gly Trp  
1                   5                   10                   15

Val Cys Lys

<210> 19

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 实验室制备-铁调素肽类似物

<400> 19

Asp Thr His Phe Pro Cys Ile Lys Phe Glu Pro Arg Ser Lys Gly Cys  
1                   5                   10                   15

Lys

<210> 20

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 实验室制备-铁调素肽类似物

<400> 20

Asp Thr His Phe Pro Cys Ile Lys Phe Glu Pro Lys Ser Lys Gly Trp  
1                   5                   10                   15

Glu Cys Lys

<210> 21

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 实验室制备-铁调素肽类似物

<400> 21

Asp Thr His Phe Pro Cys Ile Lys Phe Glu Pro Arg Ser Lys Lys Cys

1                    5                    10                    15

Lys

<210> 22

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 实验室制备-铁调素肽类似物

<400> 22

Asp Thr His Phe Pro Cys Ile Lys Phe Glu Pro Arg Ser Lys Gly Cys

1                    5                    10                    15

Lys Lys

<210> 23

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 实验室制备-铁调素肽类似物

<400> 23

Asp Thr His Phe Pro Cys Ile Lys Phe Lys Pro Arg Ser Lys Gly Cys

1                    5                    10                    15

Lys

<210> 24

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 实验室制备-铁调素肽类似物

<400> 24

Asp Thr His Phe Pro Cys Ile Lys Phe Glu Pro Lys Ser Lys Gly Cys

1                    5                    10                    15

Lys

<210> 25

<211> 9

- <212> PRT  
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
 <220>  
 <223> 实验室制备-铁调素肽类似物  
 <400> 25  
 Asp Thr His Phe Pro Cys Ile Lys Phe  
 1                   5  
 <210> 26  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
 <220>  
 <223> 实验室制备-铁调素肽类似物  
 <400> 26  
 Asp Thr His Phe Pro Cys Ile Ile Phe  
 1                   5  
 <210> 27  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
 <220>  
 <223> 实验室制备-铁调素肽类似物  
 <400> 27  
 Asp Thr Lys Phe Pro Cys Ile Ile Phe  
 1                   5  
 <210> 28  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
 <220>  
 <223> 实验室制备-铁调素肽类似物  
 <400> 28  
 Asp Thr His Phe Pro Cys Ile Lys Phe Gly Pro Arg Ser Lys Gly Trp  
 1                   5                   10                   15  
 Val Cys Lys  
 <210> 29  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)



<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 实验室制备-铁调素肽类似物

<400> 33

Asp Thr His Phe Pro Cys Ile Ile Phe Gly Pro Arg Ser Arg Gly Trp

1                    5                    10                    15

Val Cys Lys

<210> 34

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 实验室制备-铁调素肽类似物

<400> 34

Asp Thr His Phe Pro Cys Ile Lys Phe Gly Pro Arg Ser Lys Gly Trp

1                    5                    10                    15

Val Cys Lys

<210> 35

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 实验室制备-铁调素肽类似物

<400> 35

Asp Thr His Phe Pro Cys Ile Lys Phe Lys Pro Arg Ser Lys Gly Trp

1                    5                    10                    15

Val Cys Lys

<210> 36

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 实验室制备-铁调素肽类似物

<400> 36

Asp Thr His Phe Pro Cys Ile Lys Phe Gly Pro Lys Ser Lys Gly Trp

1                    5                    10                    15

Val Cys Lys

<210> 37

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 实验室制备-铁调素肽类似物

<400> 37

Asp Thr His Phe Pro Cys Ile Lys Phe Gly Pro Arg Ser Lys Gly Trp

1                    5                    10                    15

Val Cys Lys

<210> 38

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 实验室制备-铁调素肽类似物

<400> 38

Asp Thr His Phe Pro Cys Ile Lys Phe Gly Pro Arg Ser Lys Gly Trp

1                    5                    10                    15

Val Cys Lys

<210> 39

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 实验室制备-铁调素肽类似物

<400> 39

Asp Thr His Phe Pro Cys Ile Lys Phe Gly Pro Arg Ser Lys Gly Trp

1                    5                    10                    15

Val Cys Lys

<210> 40

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 实验室制备-铁调素肽类似物

<400> 40

Asp Thr His Phe Pro Cys Ile Lys Phe Lys Pro Arg Ser Lys Gly Trp

1                    5                    10                    15

Val Cys Lys

<210> 41

<211> 19  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
 <220>  
 <223> 实验室制备-铁调素肽类似物  
 <400> 41  
 Asp Thr His Phe Pro Cys Ile Lys Phe Gly Pro Lys Ser Lys Gly Trp  
 1                   5                   10                   15  
 Val Cys Lys  
 <210> 42  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
 <220>  
 <223> 实验室制备-铁调素肽类似物  
 <400> 42  
 Asp Thr His Phe Pro Cys Ile Lys Phe Gly Pro Arg Ser Lys Gly Trp  
 1                   5                   10                   15  
 Val Cys Lys  
 <210> 43  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
 <220>  
 <223> 实验室制备-铁调素肽类似物  
 <400> 43  
 Asp Thr His Phe Pro Cys Ile Lys Phe Gly Pro Arg Ser Lys Gly Trp  
 1                   5                   10                   15  
 Val Cys Lys  
 <210> 44  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
 <220>  
 <223> 实验室制备-铁调素肽类似物  
 <400> 44  
 Asp Thr His Phe Pro Cys Ile Lys Phe Gly Pro Arg Ser Lys Gly Trp  
 1                   5                   10                   15  
 Val Cys Lys



Lys

<210> 49

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 实验室制备-铁调素肽类似物

<400> 49

Asp Thr His Phe Pro Cys Ile Lys Phe Glu Pro Arg Ser Lys Gly Cys

1                    5                    10                    15

Lys Lys

<210> 50

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 实验室制备-铁调素肽类似物

<400> 50

Asp Thr His Phe Pro Cys Ile Lys Phe Glu Pro Arg Ser Lys Gly Cys

1                    5                    10                    15

Lys

<210> 51

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 实验室制备-铁调素肽类似物

<400> 51

Asp Thr His Phe Pro Cys Ile Lys Phe Glu Pro Arg Ser Lys Gly Cys

1                    5                    10                    15

Lys

<210> 52

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 实验室制备-铁调素肽类似物

<400> 52

Asp Thr His Phe Pro Cys Ile Lys Phe Glu Pro Arg Ser Lys Lys Cys

1	5	10	15
---	---	----	----

Lys

<210> 53

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 实验室制备-铁调素肽类似物

<400> 53

Asp Thr His Phe Pro Cys Ile Lys Phe Glu Pro Arg Ser Lys Gly Cys
1                    5                    10                    15

Lys Lys

<210> 54

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 实验室制备-铁调素肽类似物

<400> 54

Asp Thr His Phe Pro Cys Ile Lys Phe Glu Pro Arg Ser Lys Gly Cys
1                    5                    10                    15

Lys

<210> 55

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 实验室制备-铁调素肽类似物

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (15) .. (15)

<223> Xaa是肌氨酸

<400> 55

Asp Thr His Phe Pro Cys Ile Lys Phe Lys Pro Arg Ser Lys Xaa Cys
1                    5                    10                    15

Lys

<210> 56

<211> 25

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)  
 <400> 56  
 Asp Thr His Phe Pro Ile Cys Ile Phe Cys Cys Gly Cys Cys His Arg  
 1                    5                    10                    15  
 Ser Lys Cys Gly Met Cys Cys Lys Thr  
                   20                    25  
 <210> 57  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 智人 (Homo sapiens)  
 <400> 57  
 Asp Thr His Phe Pro Ile Cys Ile Phe  
 1                    5  
 <210> 58  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
 <220>  
 <223> 实验室制备- 逆反微型铁调素类似物  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1) .. (1)  
 <223> D形式Phe  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2) .. (2)  
 <223> D形式Ile  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (3) .. (3)  
 <223> D形式Cys  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (4) .. (4)  
 <223> D形式Ile  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (5) .. (5)  
 <223> D形式Pro

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (6) .. (6)

<223> D形式Phe

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (7) .. (7)

<223> D形式His

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (8) .. (8)

<223> D形式Thr

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (9) .. (9)

<223> D形式Asp

<400> 58

Phe Ile Cys Ile Pro Phe His Thr Asp

1

5

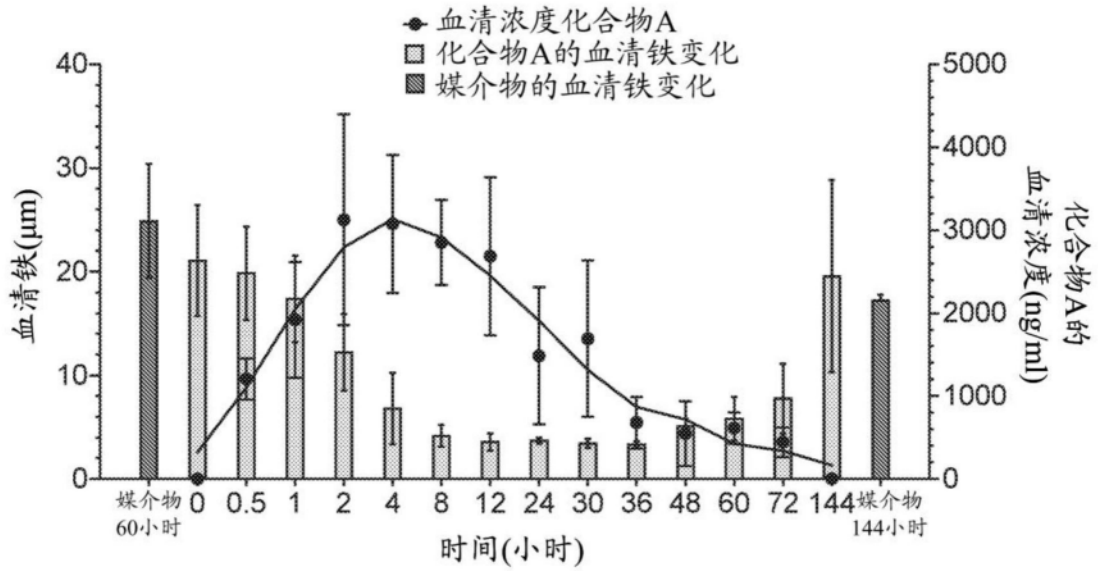


图1A

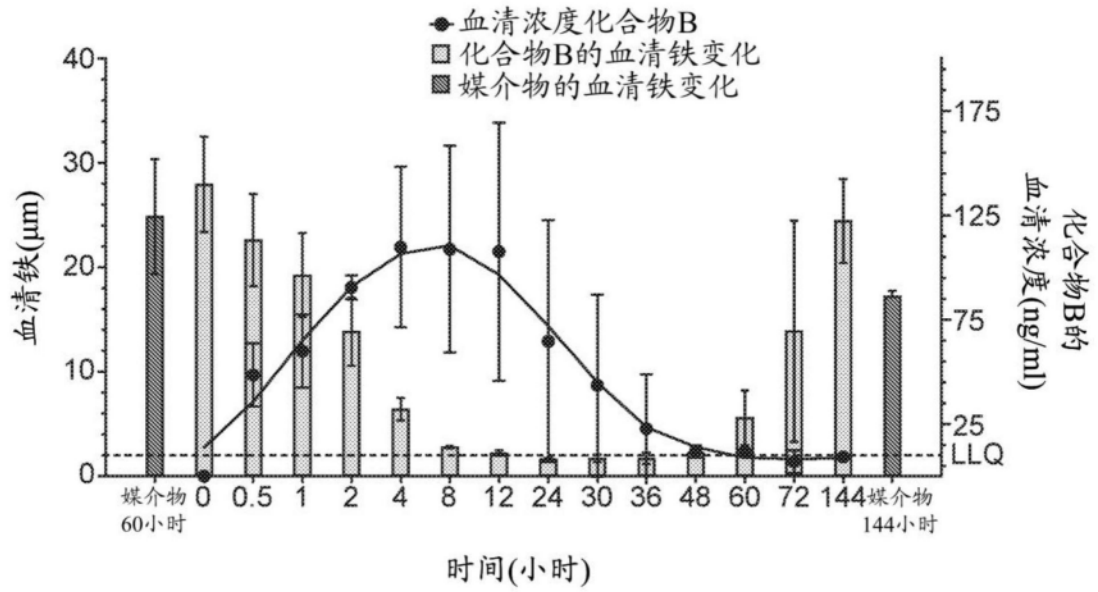


图1B

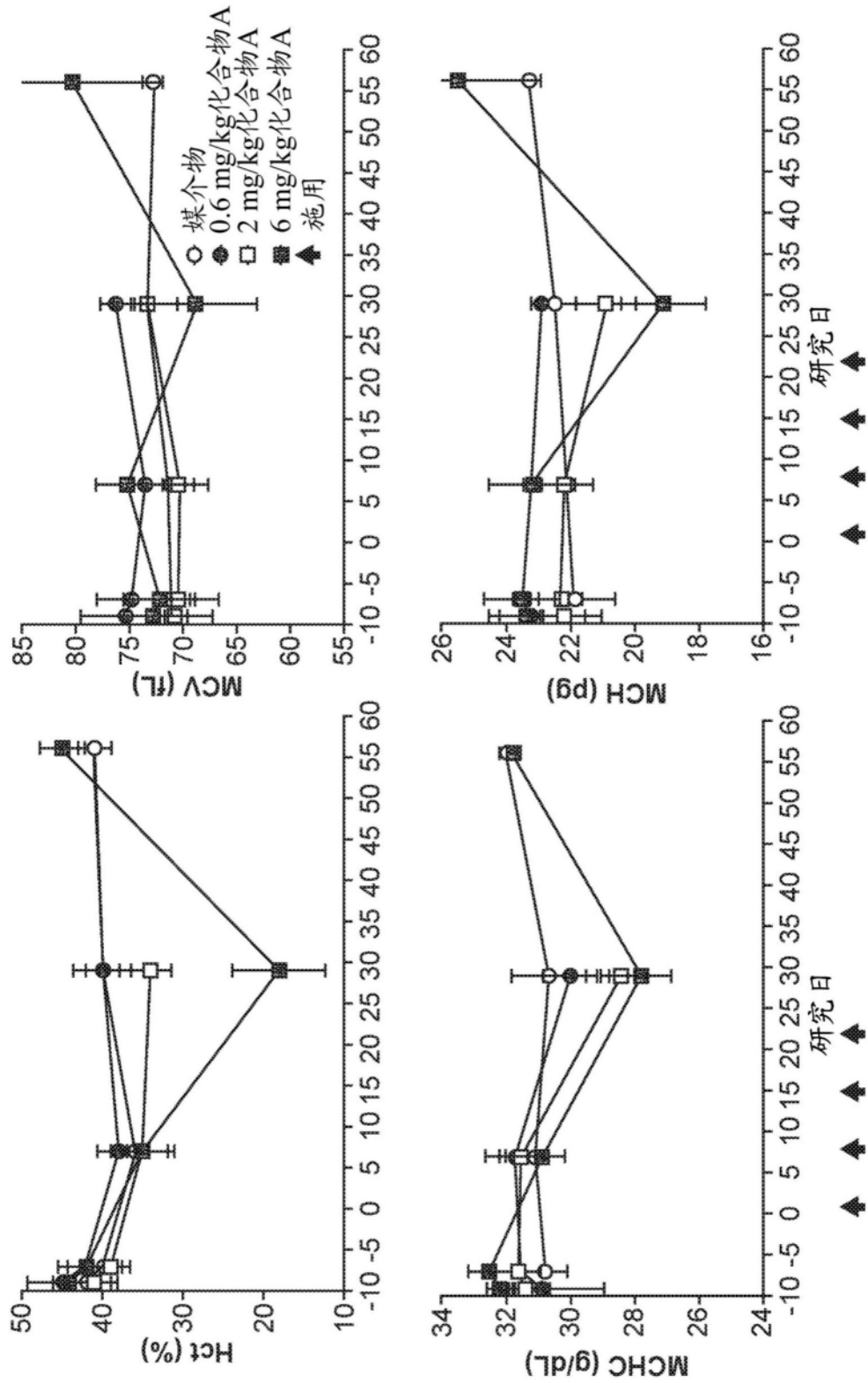


图2

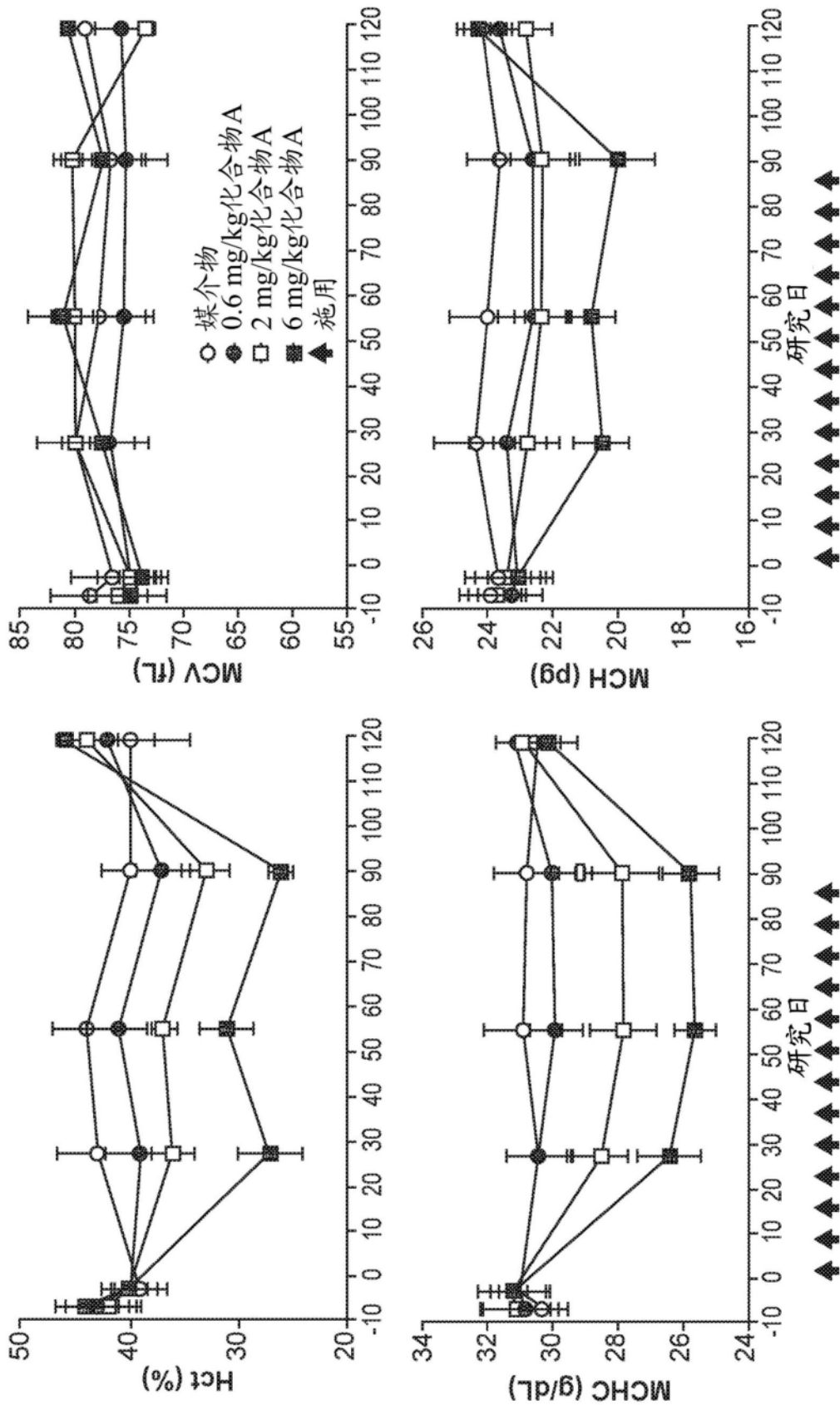


图3

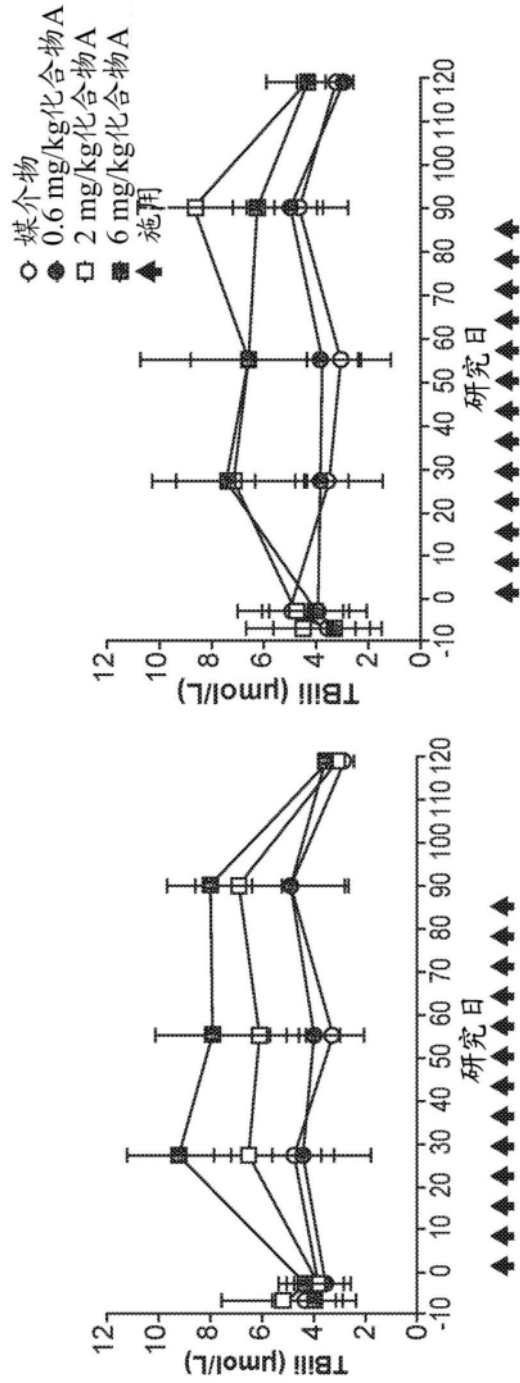


图4

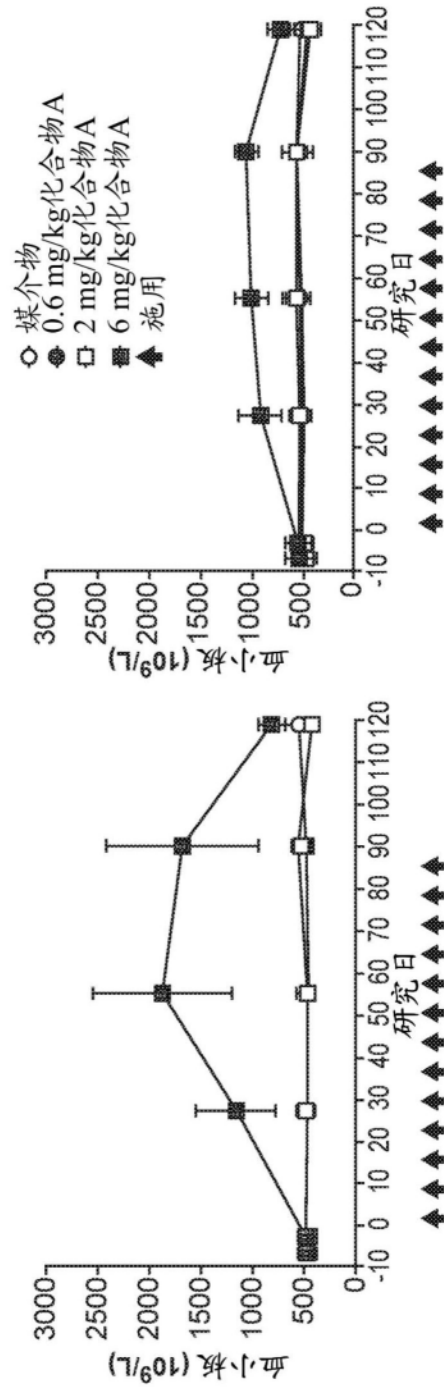
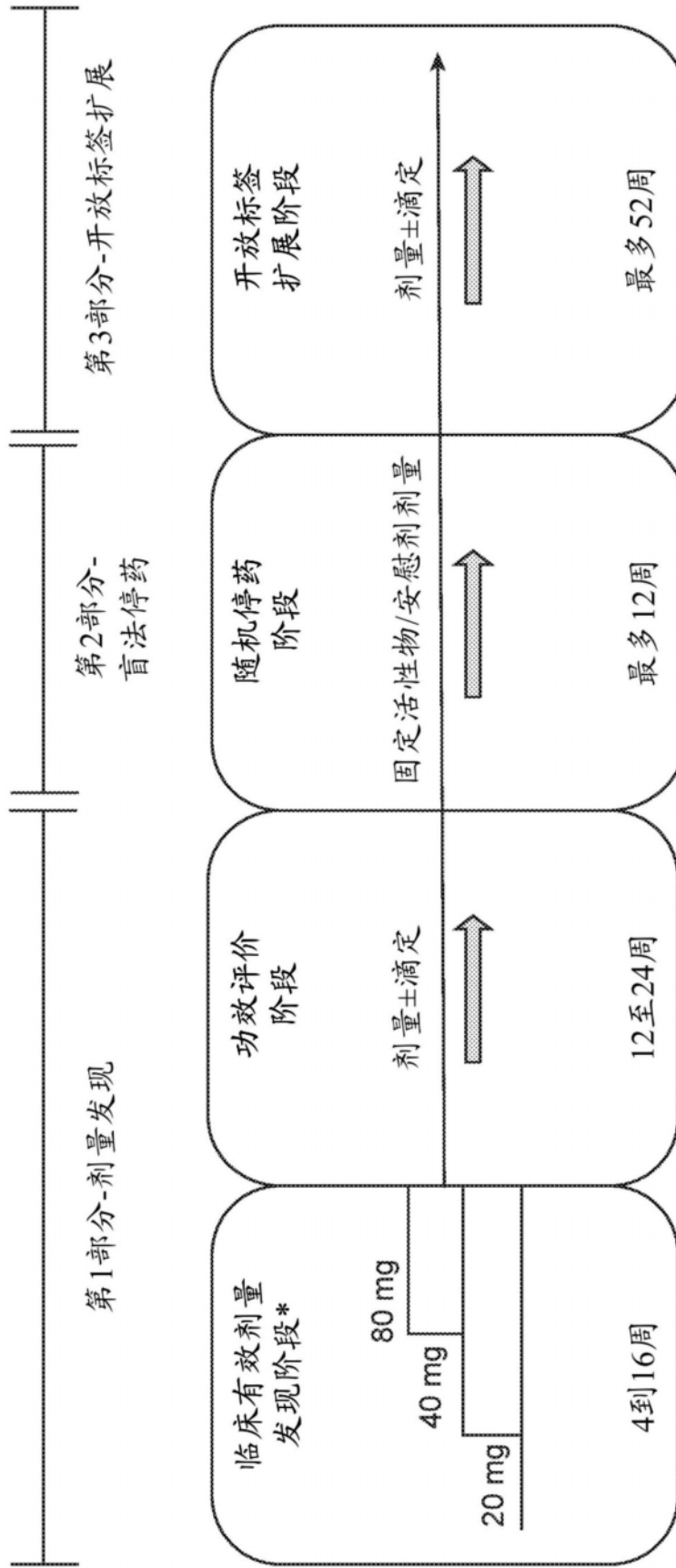


图5



\* 每4周滴定一次以维持血细胞比容≤45%

图6

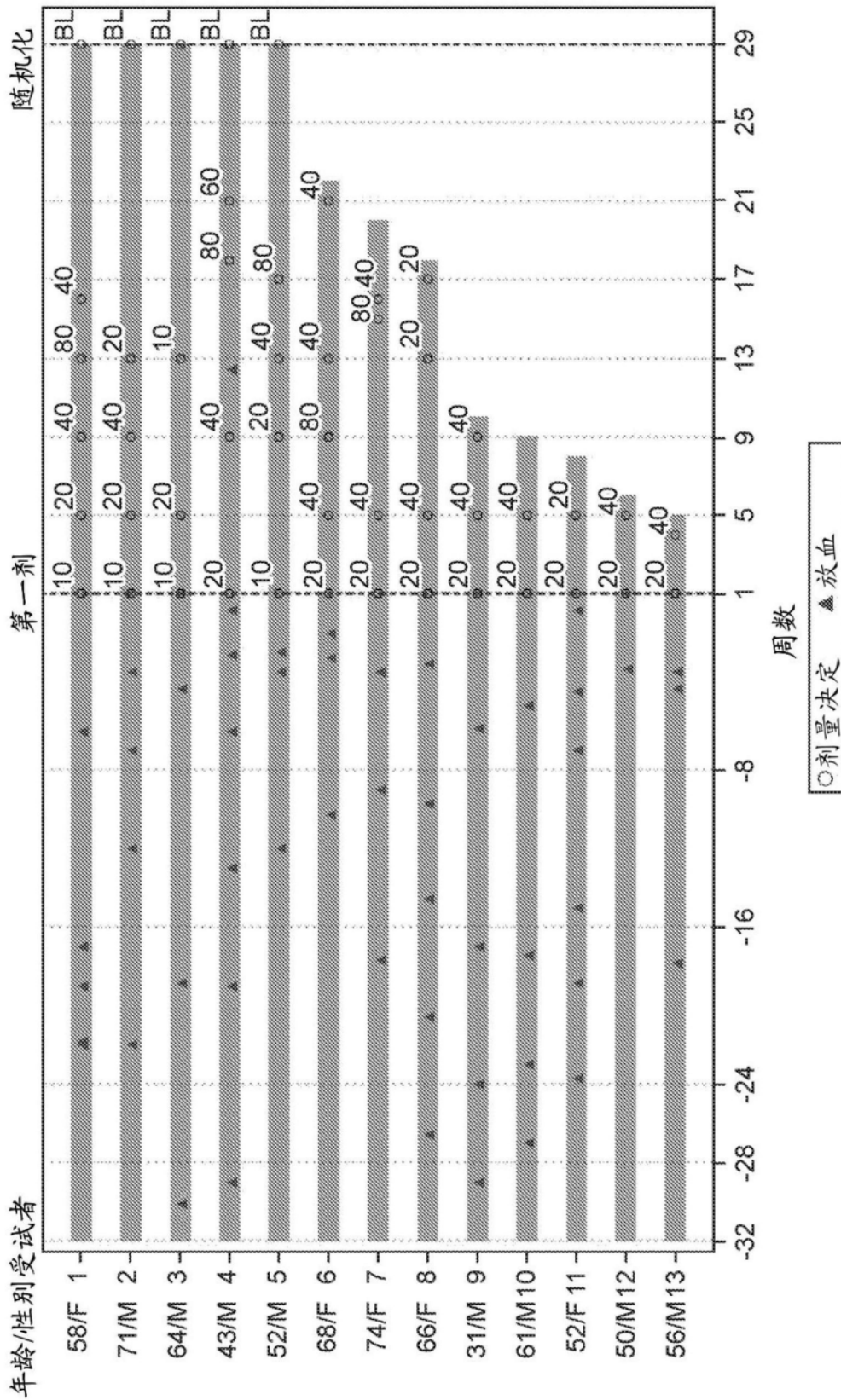


图7

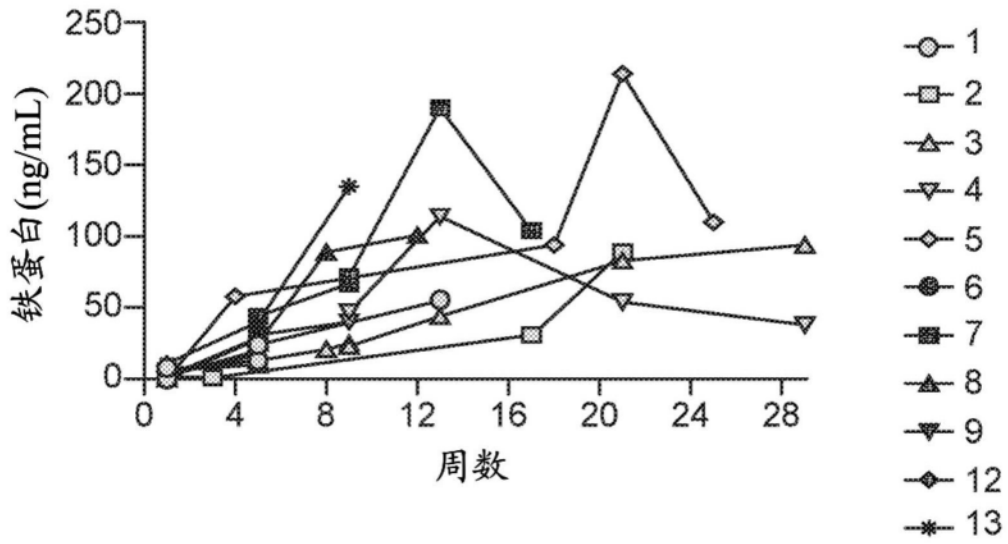


图8

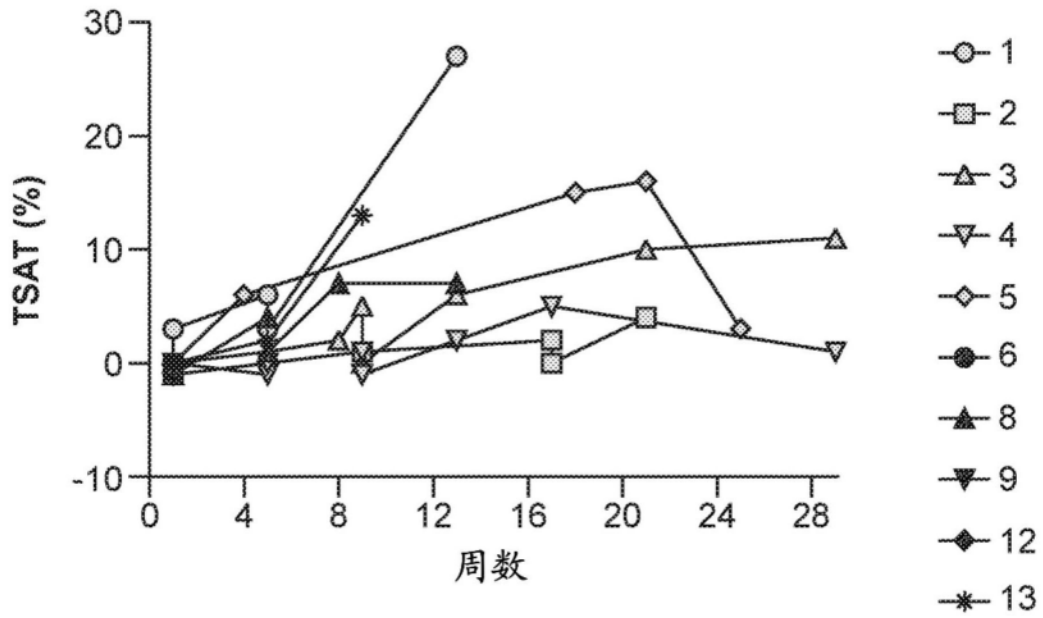


图9

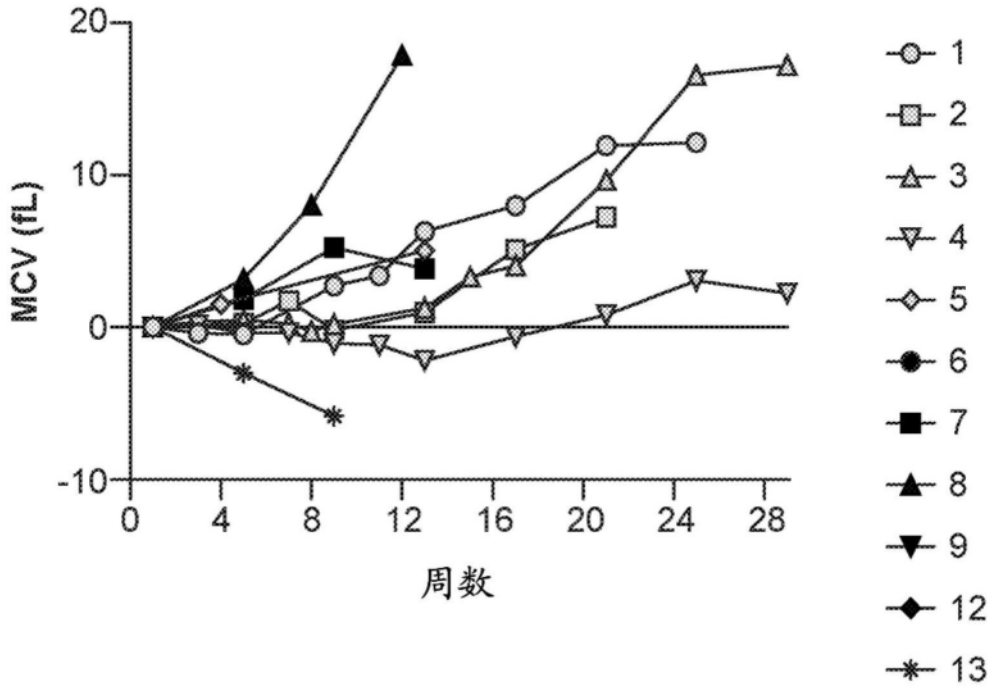


图10

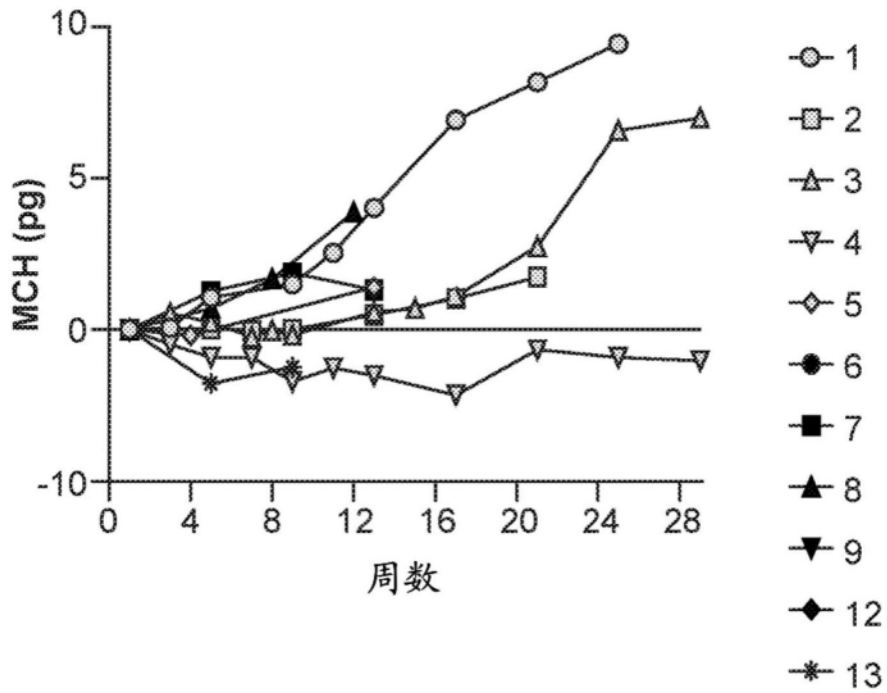


图11

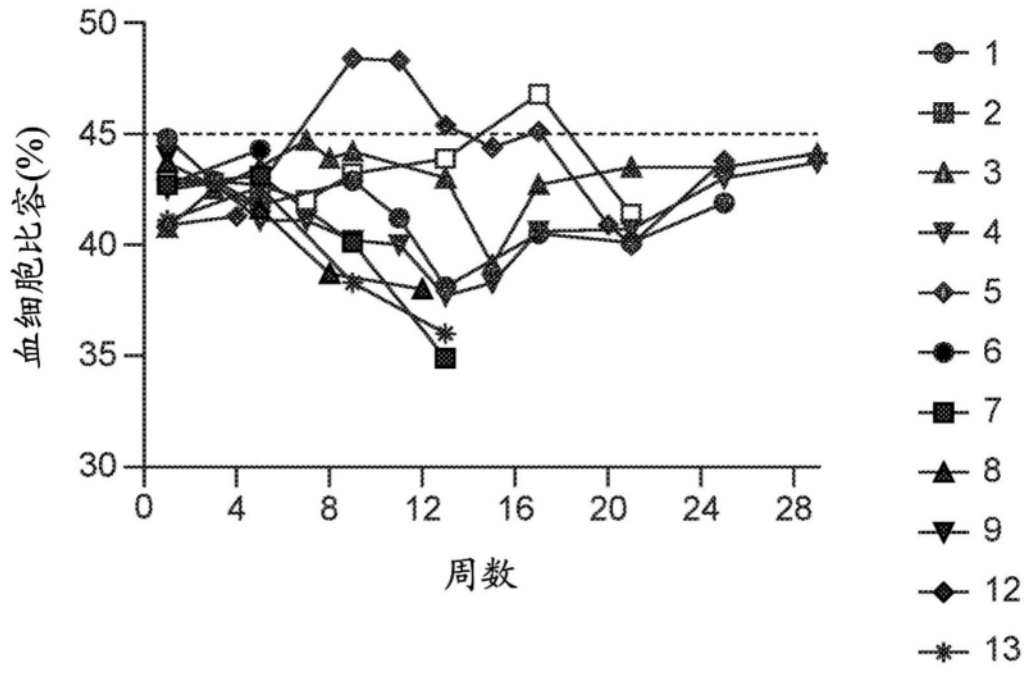


图12

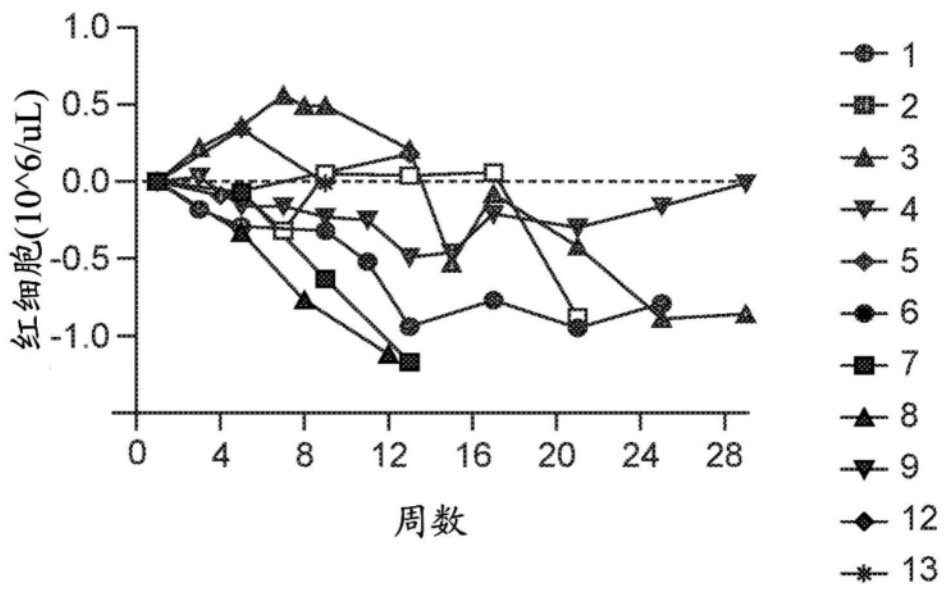


图13

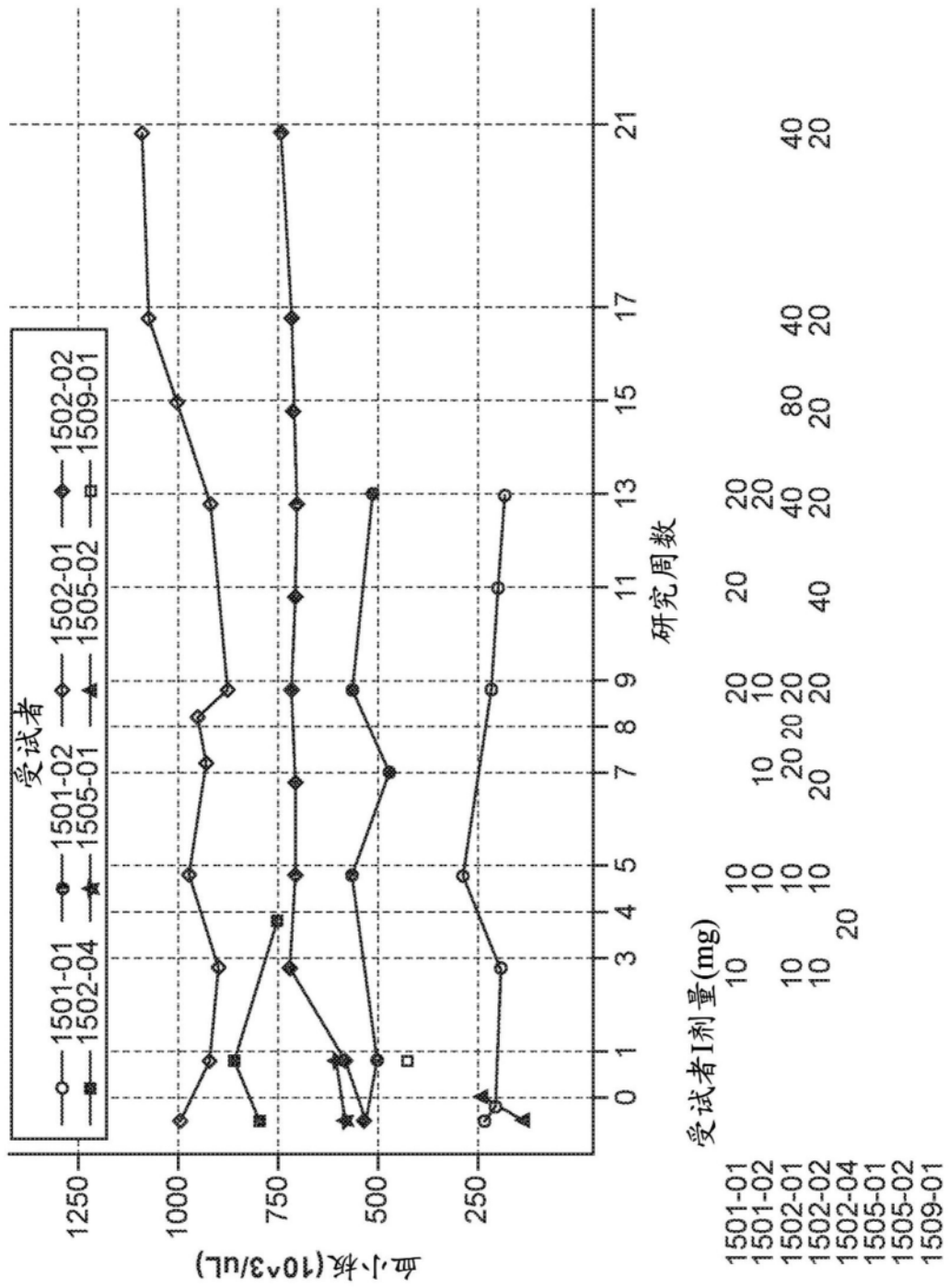


图14

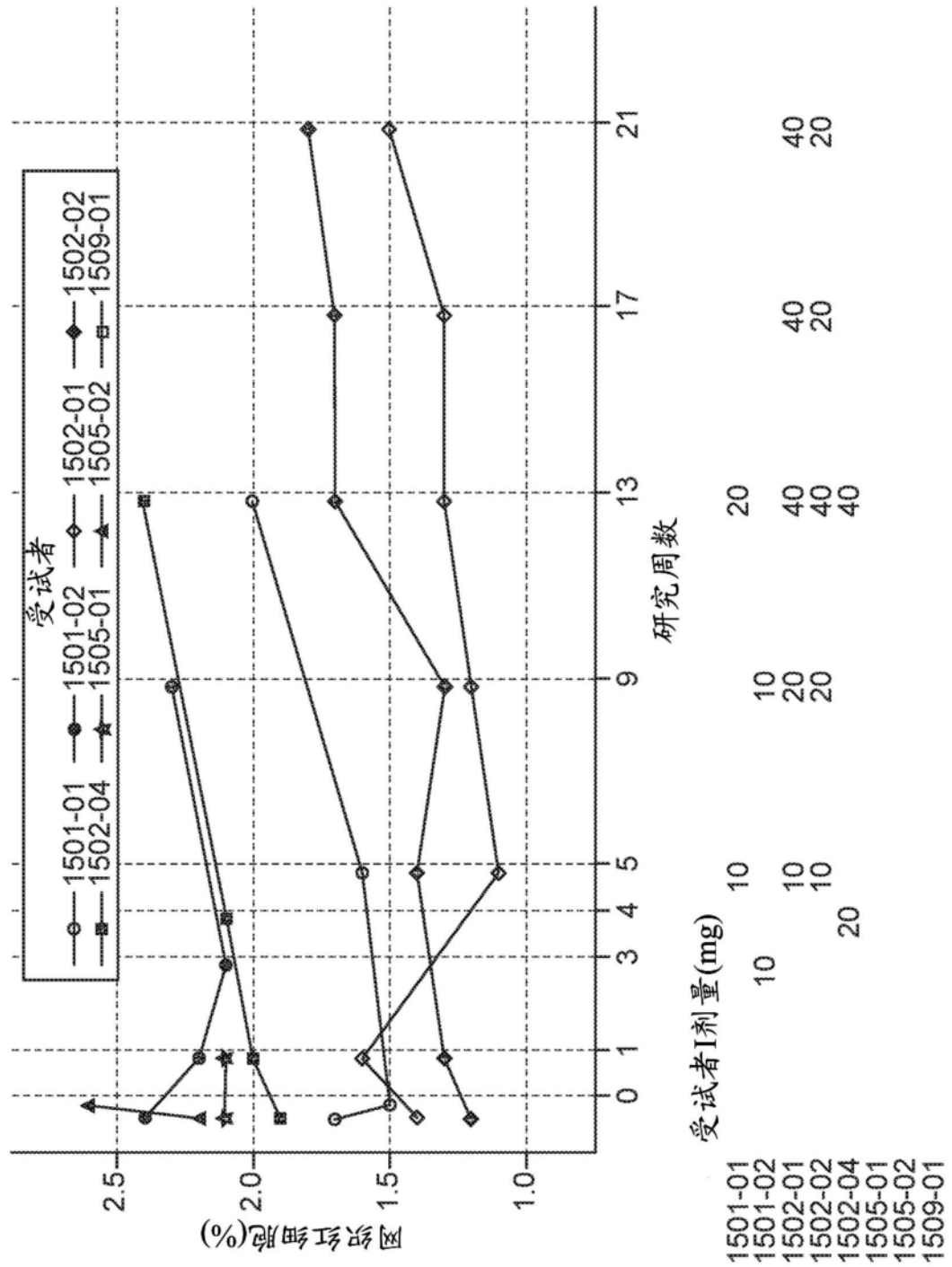


图15

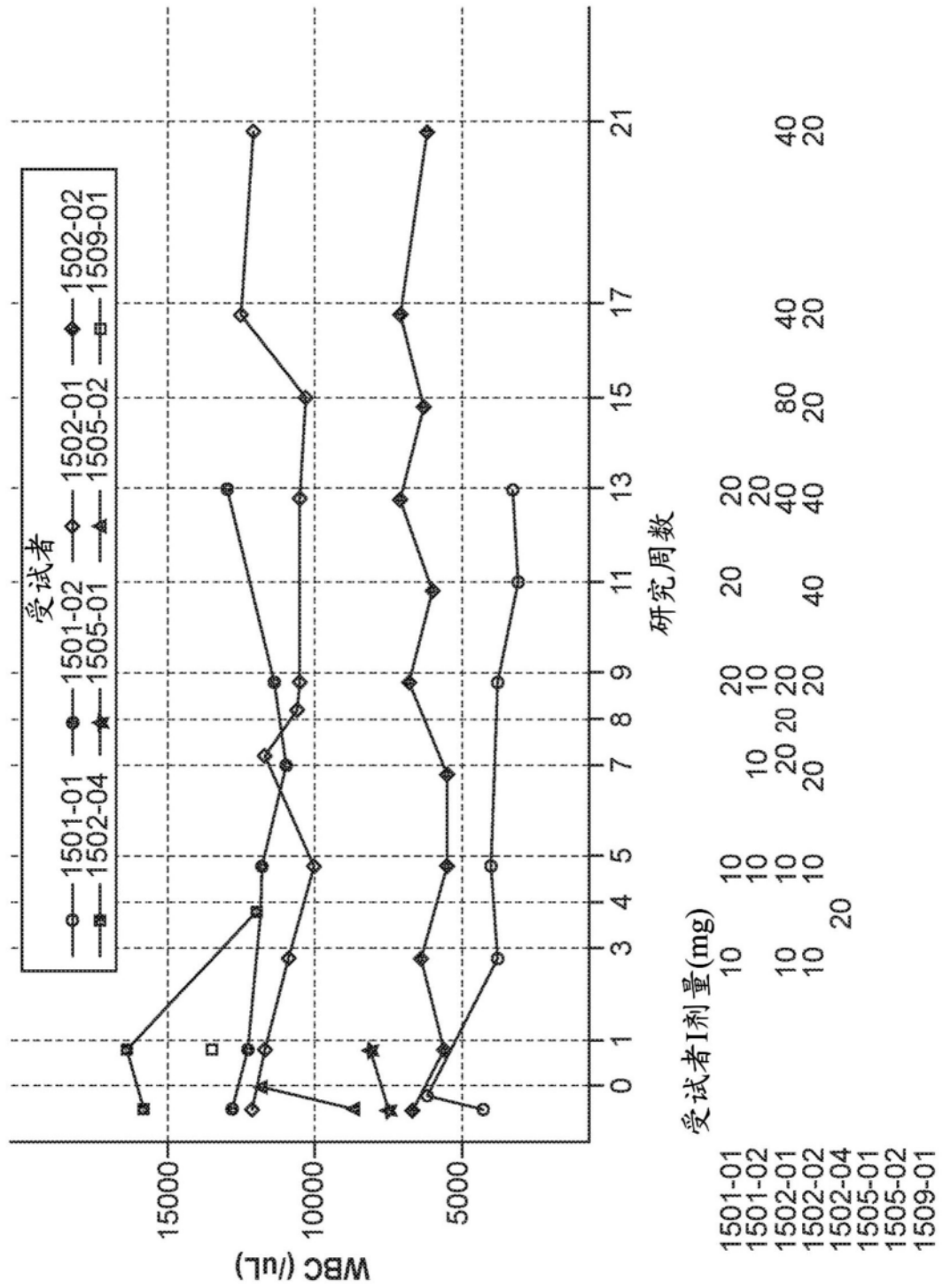


图16

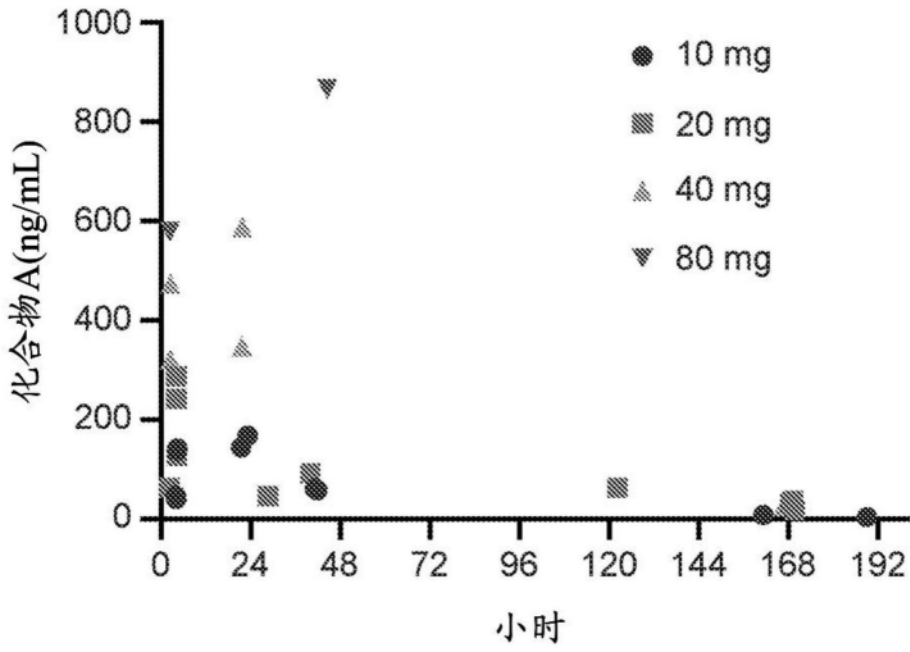


图17A

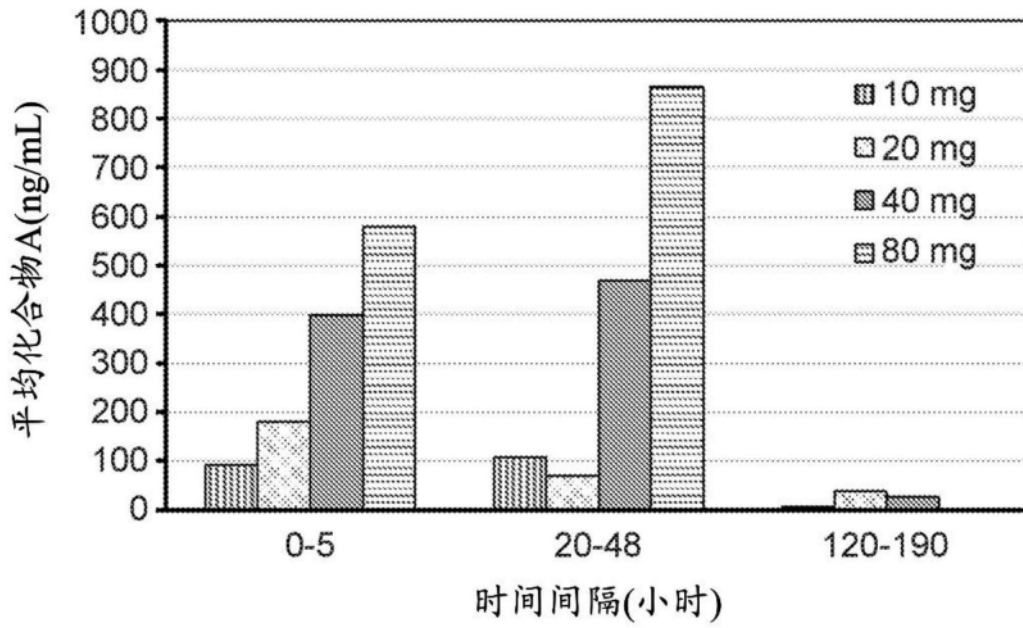


图17B