



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201536814 A

(43)公開日：中華民國 104 (2015) 年 10 月 01 日

(21)申請案號：103124998

(22)申請日：中華民國 103 (2014) 年 07 月 21 日

(51)Int. Cl. : *C07K7/08 (2006.01)* *C07K14/47 (2006.01)*
A61K38/10 (2006.01) *A61K38/17 (2006.01)*
A61K47/48 (2006.01) *A61P9/00 (2006.01)*

(30)優先權：2013/07/25 美國 61/858,263
 2014/06/23 美國 62/015,854

(71)申請人：諾華公司(瑞士) NOVARTIS AG (CH)
 瑞士

(72)發明人：查克利 佛瑞德利克 (FR)；葛斯克 菲力普 GROSCHKE, PHILIPP (DE)；八十島
 加代 YASOSHIMA, KAYO (JP)；周 弘關 ZHAO, HONGJUAN (US)；元 強
 YUAN, JUN (US)；優瑟拉 愛咪 瑞察德森 USERA, AIMEE RICHARDSON
 (US)；樓長剛 LOU, CHANGGANG (CN)；肯特 艾倫 KANTER, AARON (US)；
 規馬拉伊斯 卡拉 GUIMARAES, CARLA (PT)；布魯斯 亞立山卓 馬歇爾
 BRUCE, ALEXANDRA MARSHALL (US)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：38 項 圖式數：0 共 152 頁

(54)名稱

用於治療心臟衰竭之合成環狀多肽

SYNTHETIC CYCLIC POLYPEPTIDES FOR THE TREATMENT OF HEART FAILURE

(57)摘要

本發明提供一種式 I' 之環狀多肽：X1-R-X3-X4-L-S-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13 I

或其醯胺、酯或鹽，或其生物結合物，其中 X1、X3、X4、X7、X8、X9、X10、X11、X12 及 X13 係如本文所定義。該多肽為 APJ 受體之促效劑。本發明亦關於一種用於製造本發明之多肽或其生物結合物之方法，及其治療性用途，諸如治療或預防急性失代償心臟衰竭(ADHF)、慢性心臟衰竭、肺高血壓、心房纖維性顫動、布魯加達症候群(Brugada syndrome)、心室性心搏過速、動脈粥樣硬化、高血壓、再狹窄、缺血性心血管疾病、心肌病、心臟纖維化、心律不整、水滯留、糖尿病(包括妊娠期糖尿病)、肥胖症、周邊動脈疾病、腦血管意外、短暫性缺血性發作、外傷性腦損傷、肌萎縮性側索硬化、燒傷(包括曬傷)及子癇前症。本發明另外提供藥理學活性劑之組合與醫藥組合物。

The invention provides a cyclic polypeptide of Formula I': X1-R-X3-X4-L-S-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13 I or an amide, an ester or a salt thereof, or a bioconjugate thereof, wherein X1, X3, X4, X7, X8, X9, X10, X11, X12 and X13 are defined herein. The polypeptides are agonist of the APJ receptor. The invention also relates to a method for manufacturing the polypeptides of the invention or bioconjugates thereof, and their therapeutic uses such as treatment or prevention of acute decompensated heart failure (ADHF), chronic heart failure, pulmonary hypertension, atrial fibrillation, Brugada syndrome, ventricular tachycardia, atherosclerosis, hypertension, restenosis, ischemic cardiovascular diseases, cardiomyopathy,

cardiac fibrosis, arrhythmia, water retention, diabetes (including gestational diabetes), obesity, peripheral arterial disease, cerebrovascular accidents, transient ischemic attacks, traumatic brain injuries, amyotrophic lateral sclerosis, burn injuries (including sunburn) and preeclampsia. The present invention further provides a combination of pharmacologically active agents and a pharmaceutical composition.

發明摘要

※ 申請案號： 103124998

※ 申請日： 103.7.21

※IPC 分類：C07K 7/08 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

A61K 38/10 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

A61P 9/00 (2006.01)

【發明名稱】

用於治療心臟衰竭之合成環狀多肽

SYNTHETIC CYCLIC POLYPEPTIDES FOR THE TREATMENT
OF HEART FAILURE

【中文】

本發明提供一種式I之環狀多肽：

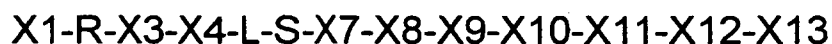
X1-R-X3-X4-L-S-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13

I

或其醯胺、酯或鹽，或其生物結合物，其中X1、X3、X4、X7、X8、X9、X10、X11、X12及X13係如本文所定義。該多肽為APJ受體之促效劑。本發明亦關於一種用於製造本發明之多肽或其生物結合物之方法，及其治療性用途，諸如治療或預防急性失代償心臟衰竭(ADHF)、慢性心臟衰竭、肺高血壓、心房纖維性顫動、布魯加達症候群(Brugada syndrome)、心室性心搏過速、動脈粥樣硬化、高血壓、再狹窄、缺血性心血管疾病、心肌病、心臟纖維化、心律不整、水滯留、糖尿病(包括妊娠期糖尿病)、肥胖症、周邊動脈疾病、腦血管意外、短暫性缺血性發作、外傷性腦損傷、肌萎縮性側索硬化、燒傷(包括曬傷)及子癇前症。本發明另外提供藥理學活性劑之組合與醫藥組合物。

【英文】

The invention provides a cyclic polypeptide of Formula I':



I

or an amide, an ester or a salt thereof, or a bioconjugate thereof, wherein X1, X3, X4, X7, X8, X9, X10, X11, X12 and X13 are defined herein. The polypeptides are agonist of the APJ receptor. The invention also relates to a method for manufacturing the polypeptides of the invention or bioconjugates thereof, and their therapeutic uses such as treatment or prevention of acute decompensated heart failure (ADHF), chronic heart failure, pulmonary hypertension, atrial fibrillation, Brugada syndrome, ventricular tachycardia, atherosclerosis, hypertension, restenosis, ischemic cardiovascular diseases, cardiomyopathy, cardiac fibrosis, arrhythmia, water retention, diabetes (including gestational diabetes), obesity, peripheral arterial disease, cerebrovascular accidents, transient ischemic attacks, traumatic brain injuries, amyotrophic lateral sclerosis, burn injuries (including sunburn) and preeclampsia. The present invention further provides a combination of pharmacologically active agents and a pharmaceutical composition.

【代表圖】

【本案指定代表圖】： 無

【本代表圖之符號簡單說明】：

無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

(無)

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】

用於治療心臟衰竭之合成環狀多肽

SYNTHETIC CYCLIC POLYPEPTIDES FOR THE TREATMENT
OF HEART FAILURE

【技術領域】

本發明係關於包含經修飾之肽及多肽序列之新穎組合物，其經設計以治療所投與個體之心血管疾病，且顯示出與其野生型對應物相比較大降解抗性及等效或較大的生物活性。本發明亦關於製造該等組合物及使用該等組合物作為醫藥活性劑以治療心血管疾病之方法。

【先前技術】

西方世界之心臟衰竭發病率為約1/100之65歲後之成人。最常見病變為心肌收縮性之慢性短缺及因此隨時間推移心輸出量(亦即由任一心室排出之有效血液容量)之慢性短缺。慢性心臟衰竭患者可具有急性失代償發作，亦即心臟無法維持足夠血液循環，其中心肌收縮性進一步衰退。僅美國每年存在約500K「急性失代償心臟衰竭」(ADHF)住院患者。

針對ADHF之現有療法包括利尿劑、血管擴張劑及收縮影響劑，其直接增加心肌收縮性。現有靜脈內收縮影響劑(多巴酚丁胺(dobutamine)、多巴胺(dopamine)、米利酮(milrinone)、左西孟旦(levosimendan))用於急性設定，儘管其與諸如心律不整及長期死亡率增加之不利事件相關聯。此等傾向已阻止其應用於慢性心臟衰竭。地高辛為口服收縮影響劑，但受治療指數狹窄、致心律不整可能性增加及腎功能不全之禁忌限制。

增加心肌收縮性而無致心律不整或死亡傾向之心臟衰竭療法為ADHF迫切需要的，但亦可解決慢性心臟衰竭之未滿足的巨大醫藥需求。

Apelin為先前孤兒G蛋白偶合受體(GPCR) APJ之內源性配位體，亦稱為Apelin受體、類血管收縮素-1受體、類血管收縮素II-1受體及其類似物。Apelin/APJ路徑廣泛表現於心血管系統中且Apelin已在臨床前模型中展示重要的有利心血管效應。人類之急性Apelin投與造成周邊及冠狀動脈血管擴張且增加心輸出量(Circulation. 2010; 121:1818-1827)。因此，APJ促效作用作為心臟衰竭患者之重要治療目標出現。咸信Apelin受體APJ之活化增加心肌收縮性且提供心肌保護，而無當前療法之傾向。然而，天然Apelin顯示出極短活體內半衰期及作用持續時間。極短半衰期為由於經由肽酶作用之快速血清清除及蛋白水解降解而公認的遞送該等治療性內源肽的重要難題。

目前已用於克服此缺點之一種方法為向患者投與大劑量所關注之治療性肽，以使得即使一些治療性肽降解仍保留足夠治療上有效的。然而，此方法對於患者而言為不適的。由於大部分治療性肽不能經口投與，故治療性肽將必須不斷注入、藉由靜脈內注射頻繁注入或藉由不便的皮下注射途徑頻繁投與。對頻繁投與的需要亦導致許多可能的肽治療劑具有不可接受的高預計治療成本。大量降解肽之存在亦可生成不希望有的副作用。

投與不適及高成本為大部分具有引入關注之生物活性概況的治療性肽無法作為藥物候選物開發的兩個原因。

因此，延長肽之半衰期之一種方法為以一定方式修飾治療性肽使其降解減慢同時仍維持生物活性。

因此，需要鑑定模擬Apelin功能但與天然存在之Apelin相比半衰期增加且顯示等效或較大生物活性之肽及多肽。此外，需要鑑定顯示

出構形限制(亦即達成及維持活性構形狀態的能力)增加的Apelin類似肽及多肽，以使得該等肽及多肽可與其受體及/或其他路徑目標相互作用而無需額外摺疊或再定位。額外方法包括藉由使肽結合於阻止其經由腎臟消除之分子而降低清除速率。

因此，需要半衰期延長之經修飾治療性肽以便提供較長活體內作用持續時間，同時維持低毒性，仍保留經修飾肽之治療性優勢。

【發明內容】

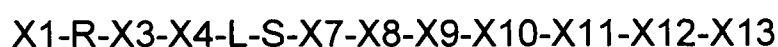
本發明係關於藉由修飾所關注之治療性肽或多肽(亦即APJ促效劑)克服體內肽降解之問題。

本發明之目標為提供新穎肽及多肽或其生物結合物，其適用作APJ促效劑且亦具有優於野生型Apelin及其他已知Apelin類似物之以下改良中之至少一者：半衰期增加；在投與後及/或在溶解後降解免疫性較大；及構形限制增加，同時全部顯示出與野生型Apelin相同或較大的生物活性。本發明之肽及多肽或其生物結合物因此特別適用於治療或預防心血管疾病，諸如心臟衰竭、與心臟衰竭相關之病症及病狀及對APJ受體活性之活化有反應之病症及病狀。

在一個實施例中，本發明之肽及多肽或其生物結合物特別適用於治療或預防與心臟衰竭相關之病症或病狀或對APJ受體活性之活化(或促效作用)有反應之病症。在另一實施例中，本發明之肽及多肽或其生物結合物適用於治療急性失代償心臟衰竭(ADHF)、慢性心臟衰竭、肺高血壓、心房纖維性顫動、布魯加達症候群(Brugada syndrome)、心室性心搏過速、動脈粥樣硬化、高血壓、再狹窄、缺血性心血管疾病、心肌病、心臟纖維化、心律不整、水滯留、糖尿病(包括妊娠期糖尿病)、肥胖症、周邊動脈疾病、腦血管意外、短暫性缺血性發作、外傷性腦損傷、肌萎縮性側索硬化、燒傷(包括曬傷)及子癇前症。

本發明係關於如本文所述之肽及多肽、或其生物結合物、醫藥組合物及其製造及使用方法。本發明之肽及多肽之實例包括根據式I至IV中之任一者之肽及多肽或其醯胺、酯或鹽，以及本文包括(但不限於)實驗性實例特定列舉之任何肽或或多肽及其生物結合物。

因此，本發明提供式(I)之肽或多肽：



I

其中：

X1為多肽之N端且為不存在的或為Q、A或pE，或X1係選自C、c、hC、D-hC；其中C、c、hC或D-hC之側鏈與X7之側鏈一起形成二硫鍵；

X3為P或X3係選自C、c、hC及D-hC；其中C、c、hC或D-hC之側鏈與X7之側鏈一起形成二硫鍵；

X4為R或X4係選自C、c、hC及D-hC；其中C、c、hC或D-hC之側鏈與X7之側鏈一起形成二硫鍵；

其中X1、X3及X4中僅一者為選自C、c、hC及D-hC之含硫胺基酸；

X7為C、c、hC或D-hC；且X7之側鏈與X1、X3或X4之C、c、hC或D-hC之側鏈一起形成二硫鍵；

X8為K或F；

X9為G、A、a或不存在；

X10為P或不存在；

X11為D-Nle、Nle、M或f；及

X12為不存在的或P、f、a、D-Nva或D-Abu；

X13為C端且為不存在的或係選自(N-Me)F、F、f、a、y及Nal；

其中：

Nle為L-正白胺酸；

D-Nle為D-正白胺酸；

D-hC為D-高半胱胺酸

hC為L-高半胱胺酸；

Nal為L-萘基丙胺酸；

D-Nva為D-正纈胺酸；

D-Abu為D-2-胺基丁酸；

pE為L-焦麩胺酸；

或該多肽之醯胺、酯或鹽；或其實質上等效的多肽。

如本文所進一步解釋，技術公認的三個字母或一個字母縮寫用以表示構成本發明之肽及多肽之胺基酸殘基。當一個字母縮寫為大寫字母時，其係指L-胺基酸。當一個字母縮寫為小寫字母時，其係指D-胺基酸。或者，D-胺基酸可用縮寫字母前面的D-字母表示，亦即當前面有「D」時，胺基酸為D-胺基酸。

以上列舉之本文所述之式I或其相關式(例如式I至IV)之胺基酸殘基中之任一者可以保守方式經取代，提供仍保留功能活性及結構特性(例如半衰期延長、避免降解、構形限制)之本發明之肽或多肽。許用保守胺基酸取代之原則及實例進一步解釋於本文中。

本發明另外提供一種生物結合物或其多聚體，其包含：

- a. 式I至IV中之任一者之肽或多肽，
- b. 半衰期延長部分；

其中該肽或多肽及該半衰期延長部分視情況經由連接子共價連接或融合。

「視情況經由連接子」意指根據式I-IV之肽或多肽直接與半衰期延長部分共價連接或融合(亦即無連接子)或經由連接子與半衰期延長部分共價連接或融合。

本發明之半衰期延長部分可與肽或多肽類似物共價融合、附接、連接或結合。半衰期延長部分可為例如聚合物，諸如聚乙二醇(PEG)、膽固醇基團、碳水化合物或寡醣；脂肪酸或結合於救助受體之任何天然或合成蛋白質、多肽或肽。較佳地，半衰期延長部分視情況經由連接子與具有長血清半衰期之血漿蛋白(白蛋白及免疫球蛋白)共價連接。在其他實施例中，半衰期延長部分為白蛋白結合殘基。如本文所用，「白蛋白結合殘基」意指與人類血清白蛋白非共價結合之殘基。在一個實施例中，白蛋白結合殘基為親脂性殘基。在另一實施例中，白蛋白結合殘基在生理pH值下帶負電荷。白蛋白結合殘基通常包含可帶負電荷之羧酸。白蛋白結合殘基之實例包括脂肪酸。在其他實施例中，半衰期延長部分為IgG恆定結構域或其片段(例如Fc區)、人類血清白蛋白(HSA)或白蛋白結合多肽或殘基(諸如脂肪酸)。較佳地，生物結合物之半衰期延長部分為人類血清白蛋白或Fc區。最佳地，生物結合物之半衰期延長部分為Fc區。

半衰期延長部分以一定方式附接以便增強及/或不干擾本發明之生物結合物之成分部分，例如本發明之肽或多肽(式I-IV)之生物功能。在一些實施例中，本發明之多肽可視情況經由連接子與半衰期延長部分融合。半衰期延長部分可為蛋白質，諸如IgG恆定結構域或其片段(例如Fc區)、人類血清白蛋白(HSA)或白蛋白結合多肽或殘基(例如脂肪酸)。本文所揭示之該等蛋白質亦可形成多聚體。

在一些實施例中，半衰期延長部分(例如HSA、Fc、脂肪酸等)與式I-IV中之任一者之肽或多肽的N端共價連接或融合。在其他實施例中，半衰期延長部分(例如HSA、Fc、脂肪酸等)與本發明之式I至IV中之任一者之肽或多肽的C端共價連接或融合。

本發明之多肽或其生物結合物經由APJ受體之活化而具有治療急性失代償心臟衰竭(ADHF)、慢性心臟衰竭、肺高血壓、心房纖維性

顫動、布魯加達症候群、心室性心搏過速、動脈粥樣硬化、高血壓、再狹窄、缺血性心血管疾病、心肌病、心臟纖維化、心律不整、水滯留、糖尿病(包括妊娠期糖尿病)、肥胖症、周邊動脈疾病、腦血管意外、短暫性缺血性發作、外傷性腦損傷、肌萎縮性側索硬化、燒傷(包括曬傷)及子癇前症之效用。

在一個較佳實施例中，本發明之多肽或其生物結合物適用於治療急性失代償心臟衰竭(ADHF)。

在另一實施例中，本發明係關於一種用於治療對APJ受體之活化有反應之病症或疾病的方法，在需要該治療之個體中，包含：向該個體投與有效量之根據式I至IV中之任一者之多肽或其醯胺、酯或鹽、或其生物結合物，以便治療該個體之對APJ受體之活化有反應之病症或疾病。

在另一實施例中，本發明係關於醫藥組合物，包含根據式I至IV中之任一者之多肽或其醯胺、酯或鹽、或其生物結合物，及一或多種醫藥學上可接受之載劑。

在另一實施例中，本發明係關於組合，包括根據式I至IV中之任一者之多肽或其醯胺、酯或鹽、或其生物結合物，及一或多種治療活性劑之醫藥組合。

在另一實施例中，本發明係關於一種用於活化有需要之個體之APJ受體的方法，包含：向該個體投與治療有效量之根據式I至IV中之任一者之多肽或其醯胺、酯或鹽、或其生物結合物。

【圖式簡單說明】

無

【實施方式】

出於解釋本說明書之目的，除非另外規定，否則以下定義將適用且只要適當，單數形式使用之術語亦包括複數個且反之亦然。

如本文所用，「對APJ受體調節有反應之病症或疾病」、「對APJ調節有反應之病症及病狀」、「對APJ受體活性調節有反應之病症及病狀」、「對APJ受體活性之活化(或促效作用)有反應之病症」及類似術語包括急性失代償心臟衰竭(ADHF)、慢性心臟衰竭、肺高血壓、心房纖維性顫動、布魯加達症候群、心室性心搏過速、動脈粥樣硬化、高血壓、再狹窄、缺血性心血管疾病、心肌病、心臟纖維化、心律不整、水滯留、糖尿病(包括妊娠期糖尿病)、肥胖症、周邊動脈疾病、腦血管意外、短暫性缺血性發作、外傷性腦損傷、肌萎縮性側索硬化、燒傷(包括曬傷)及子癇前症。

如本文所用，「APJ受體活性之活化」或「APJ受體之活化」係指APJ受體活性增加。APJ受體活性之活化亦稱為APJ受體「促效作用」，例如藉由投與本發明之肽及多肽。

如本中所用，術語「多肽」及「肽」可互換使用以指代兩個或兩個以上胺基酸連接在一起。除下表1中陳述之不常見或非天然胺基酸的縮寫之外，技術公認的三個字母或一個字母縮寫用以表示構成本發明之肽及多肽的胺基酸殘基。除了當前面有「D」時，胺基酸為L-胺基酸。當一個字母縮寫為大寫字母時，其係指D-胺基酸。當一個字母縮寫為小寫字母時，其係指L-胺基酸。群或串或胺基酸縮寫用以表示肽。肽經指定N端在左側且自N端至C端書寫序列。

本發明之肽含有非天然胺基酸(亦即不存在於自然界中之化合物)及如此項技術中已知可替代使用之其他胺基酸類似物。

某些非天然胺基酸可藉由Deiters等人, J Am Chem Soc 125:11782-11783, 2003 ; Wang及Schultz, Science 301:964-967, 2003 ; Wang等人, Science 292:498-500, 2001 ; Zhang等人, Science 303:371-373, 2004或美國專利第7,083,970號中所述之技術引入。簡言之，一些此等表現系統涉及定點突變誘發以將無意義密碼子(諸如琥珀TAG)引入編碼本發

明多肽之開放閱讀框架中。該等表現載體接著引入可利用特異性針對所引入之無意義密碼子且用所選非天然胺基酸填充之tRNA之宿主中。對使部分與本發明之多肽結合之目的有益的特定非天然胺基酸包括具有乙炔及疊氮基側鏈之彼等非天然胺基酸。

本發明之肽中之一或多個天然或非天然胺基酸可例如藉由添加以下化學個體加以修飾，諸如碳水化合物基、磷酸酯基、法呢基、異法呢基、脂肪酸基、用於結合、官能化或其他修飾之連接子等。該等修飾可以位點特異性或非位點特異性方式進行。在一個較佳實施例中，肽之修飾產生較穩定的肽(例如顯示出較大活體內半衰期之肽)。此等修飾可包括併入額外D-胺基酸等。修飾中無一者將實質上干擾肽之所需生物活性，但該等修飾可賦予肽所需特性，例如增強的生物活性。

該等修飾增強本發明蛋白質相對於野生型蛋白質之生物特性，以及在一些情況下，充當例如標記及蛋白質半衰期延長劑之附接點及用於使該等變異體固定於固體支撐物表面之目的。

在某些實施例中，該等修飾(例如位點特異性修飾)用以附接結合物例如PEG基至本發明之多肽及/或肽，用於例如延長半衰期或以其他方式改良該等多肽及/或肽之生物特性的目的。該等技術進一步描述於本文中。

在其他實施例中，該等修飾(例如位點特異性修飾)用以附接延長本發明多肽之半衰期的其他聚合物及小分子及重組蛋白質序列。一個此類實施例包括脂肪酸或特異性白蛋白結合化合物附接於多肽及/或肽。在其他實施例中，修飾在特定胺基酸類型處進行且可附接在多肽上之一或多個位點。

在其他實施例中，該等修飾(例如位點特異性修飾)用作產生野生型及/或變異多聚體，例如二聚體(均二聚體或雜二聚體)或三聚體或四

聚體之附接方式。此等多聚蛋白質分子可另外具有在胺基端或在羧基端與諸如Fc、人類血清白蛋白(HSA)等之其他蛋白質附接或融合的基團，諸如PEG、糖及/或PEG-膽固醇結合物。

在其他實施例中，該等位點特異性修飾用以產生蛋白質、多肽及/或肽，其中位點特異性併入吡咯離胺酸或吡咯離胺酸類似物或非天然存在之胺基酸(對乙醯基-Phe、對疊氮基-Phe)之位置使得該等蛋白質、多肽及/或肽可受控定向及附接於固體支撐物之表面上或具有附接之諸如PEG、糖及/或PEG-膽固醇結合物之基團。

在其他實施例中，該等位點特異性修飾用於位點特異性交聯蛋白質、多肽及/或肽，由此形成雜寡聚物，包括(但不限於)雜二聚體及雜三聚體。在其他實施例中，該等位點特異性修飾用於位點特異性交聯蛋白質、多肽及/或肽，由此形成蛋白質-蛋白質結合物、蛋白質-多肽結合物、蛋白質-肽結合物、多肽-多肽結合物、多肽-肽結合物或肽-肽結合物。在其他實施例中，位點特異性修飾可包括分支點以允許一種類型以上之分子附接在蛋白質、多肽或肽之單個位點。

在其他實施例中，本文中列舉之修飾可以非位點特異性方式進行且產生本發明之蛋白質-蛋白質結合物、蛋白質-多肽結合物、蛋白質-肽結合物、多肽-多肽結合物、多肽-肽結合物或肽-肽結合物。

在一些實施例中，本發明提供複合物，其包含與抗體，諸如特異性結合如本文所揭示之肽或多肽之抗體結合之至少一種式I-IV中之任一者之肽或多肽。

一般熟習此項技術者應理解，可在本文所述之任何多肽之序列中進行各種胺基酸取代，例如保守胺基酸取代，而不一定降低其活性。如本文所用，「常用作其取代物之胺基酸」包括保守取代(亦即用具有類似化學特徵之胺基酸取代)。出於保守取代之目的，非極性(疏水性)胺基酸包括丙胺酸、白胺酸、異白胺酸、纈胺酸、甘胺酸、脯

胺酸、苯丙胺酸、色胺酸及甲硫胺酸。極性(親水性)、中性胺基酸包括絲胺酸、蘇胺酸、半胱胺酸、酪胺酸、天冬醯胺及麩胺醯胺。帶正電荷之(鹼性)胺基酸包括精胺酸、離胺酸及組胺酸。帶負電荷之(酸性)胺基酸包括天冬胺酸及麩胺酸。胺基酸取代之實例包括用L-胺基酸取代其對應D-胺基酸、用半胱胺酸取代高半胱胺酸或其他具有含硫醇側鏈之非天然胺基酸、用離胺酸取代高離胺酸、二胺基丁酸、二胺基丙酸、鳥胺酸或其他具有含胺基側鏈之非天然胺基酸、或用丙胺酸取代正纈胺酸或其類似物。

如本文所用之術語「胺基酸」係指天然存在之胺基酸、非天然胺基酸、以類似於天然存在之胺基酸的方式起作用的胺基酸類似物及胺基酸模擬物，全部呈其D及L立體異構體形式(若其結構提供該等立體異構形式)。胺基酸在本文中藉由其名稱、其一般已知的三字母符號或藉由IUPAC-IUB生物化學命名委員會建議之一字母符號來提及。

術語「天然存在」係指在自然界中發現且未由人類操控之物質。類似地，如本文所用，「非天然存在」、「非天然」及其類似物係指未在自然界中發現或已由人類進行結構修飾或合成之物質。當與胺基酸相連使用時，術語「天然存在」係指20種習知胺基酸(亦即丙胺酸(A或Ala)、半胱胺酸(C或Cys)、天冬胺酸(D或Asp)、麩胺酸(E或Glu)、苯丙胺酸(F或Phe)、甘胺酸(G或Gly)、組胺酸(H或His)、異白胺酸(I或Ile)、離胺酸(K或Lys)、白胺酸(L或Leu)、甲硫胺酸(M或Met)、天冬醯胺(N或Asn)、脯胺酸(P或Pro)、麩胺醯胺(Q或Gln)、精胺酸(R或Arg)、絲胺酸(S或Ser)、蘇胺酸(T或Thr)、纈胺酸(V或Val)、色胺酸(W或Trp)及酪胺酸(Y或Tyr))。

如本文所用之術語「非天然胺基酸(non-natural amino acid及unnatural amino acid)」可互換意欲表示無法在任何生物體中使用來自任何生物體(無論相同或不同)之未修飾或經修飾之基因以生物合成方

式生成之胺基酸結構。該等術語係指天然存在之(野生型)Apelin蛋白質序列或本發明之序列中不存在之胺基酸殘基。此等包括(但不限於)並非20種天然存在之胺基酸中之一者的經修飾胺基酸及/或胺基酸類似物、硒代半胱胺酸、吡咯離胺酸(Pyl)或吡咯啉-羧基-離胺酸(Pcl，例如，如PCT專利公開案WO2010/48582中所述)。該等非天然胺基酸殘基可藉由取代天然存在之胺基酸及/或藉由插入非天然胺基酸而引入天然存在之(野生型)Apelin蛋白質序列或本發明之序列中。亦可併入非天然胺基酸殘基以使得所需功能賦予Apelin分子，例如連接官能性部分(例如PEG)之能力。當與胺基酸相連使用時，符號「U」應意指如本文所用之「非天然胺基酸」。

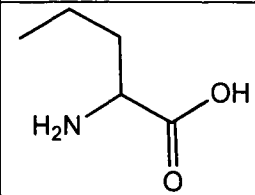
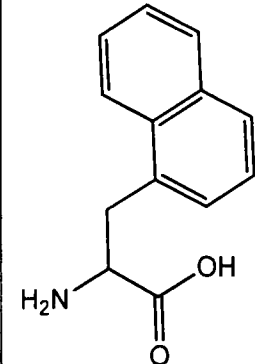
此外，應瞭解該等「非天然胺基酸」需要經修飾tRNA及經修飾tRNA合成酶(RS)以便併入蛋白質。此等「經選擇」垂直tRNA/RS對係藉由如Schultz等人所開發之選擇方法或藉由隨機或目標突變生成。舉例而言，吡咯啉-羧基-離胺酸為「非天然胺基酸」，因為其係藉由自一種生物體轉移至宿主細胞中之基因以生物合成方式生成及因為其藉由使用天然tRNA及tRNA合成酶基因併入蛋白質，而對胺基苯丙胺酸(參見Generation of a bacterium with a 21 amino acid genetic code, Mehl RA, Anderson JC, Santoro SW, Wang L, Martin AB, King DS, Horn DM, Schultz PG. J Am Chem Soc. 2003 Jan 29;125(4):935-9)為「非天然胺基酸」，因為雖然以生物合成方式生成，但其藉由「經選擇」垂直tRNA/tRNA合成酶對併入蛋白質。

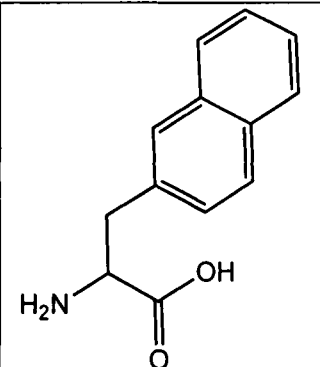
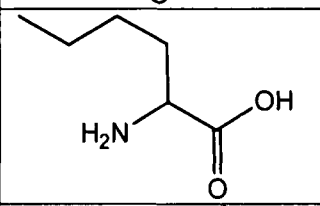
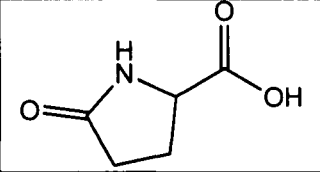
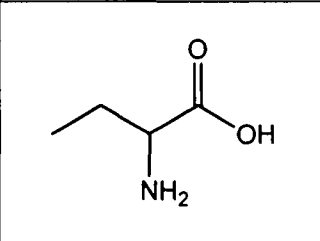
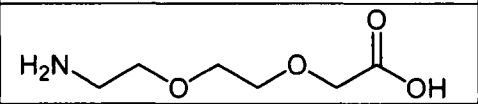
經修飾之編碼胺基酸包括(但不限於)羥基脯胺酸、 γ -羧基麩胺酸、O-磷絲胺酸、氮雜環丁烷羧酸、2-胺基己二酸、3-胺基己二酸、 β -丙胺酸、胺基丙酸、2-胺基丁酸、4-胺基丁酸、6-胺基己酸、2-胺基庚酸、2-胺基異丁酸、3-胺基異丁酸、2-胺基庚二酸、第三丁基甘胺酸、2,4-二胺基異丁酸、鎖鏈素、2,2'-二胺基庚二酸、2,3-二胺基

丙酸、N-乙基甘胺酸、N-甲基甘胺酸、N-乙基天冬醯胺酸、高脯胺酸、羥基離胺酸、別羥基離胺酸、3-羥基脯胺酸、4-羥基脯胺酸、異鎖鏈素、別異白胺酸、N-甲基丙胺酸、N-甲基甘胺酸、N-甲基異白胺酸、N-甲基戊基甘胺酸、N-甲基纈胺酸、蔡基丙胺酸、正纈胺酸、正白胺酸、鳥胺酸、戊基甘胺酸、哌啶酸及硫代脯胺酸。術語「胺基酸」亦包括在某些生物體中代謝但未由遺傳密碼子編碼以便併入蛋白質之天然存在之胺基酸。該等胺基酸包括(但不限於)鳥胺酸、D-鳥胺酸及D-精胺酸。

如本文所用之術語「胺基酸類似物」係指具有與天然存在之胺基酸相同的基礎化學結構的化合物，僅舉例而言，鍵結於氫、羧基、胺基及R基團之 α -碳。胺基酸類似物包括經可逆或不可逆地化學阻斷或C端羧基、N端胺基及/或側鏈官能基經化學修飾之天然及非天然胺基酸。該等類似物包括(但不限於)甲硫胺酸亞砒、甲硫胺酸砒、S-(羧甲基)-半胱胺酸、S-(羧甲基)-半胱胺酸亞砒、S-(羧甲基)-半胱胺酸砒、天冬胺酸-(β -甲酯)、N-乙基甘胺酸、丙胺酸甲醯胺、高絲胺酸、正白胺酸及甲硫胺酸甲基銻。

表1：如本發明中所述之非天然胺基酸：

符號	名稱	結構
Nva或nva (D-Nva)	L-正纈胺酸或D-正纈胺酸	
1-Nal	1-蔡基丙胺酸	

2-Nal	2-萘基丙胺酸	
Nle或nle (D-Nle)	L-正白胺酸或D-正白胺酸	
pE	焦麩胺酸	
Abu或abu (D-Abu)	2-胺基-丁酸	
O2Oc	8-胺基-3,6-二氧辛酸	

Nal係指1-萘基丙胺酸及2-萘基丙胺酸兩者，較佳為2-萘基丙胺酸。

如本文所用，術語「醯胺」係指在C端之羧酸基的醯胺衍生物(例如 -C(O)NH₂、-C(O)NH-C₁₋₆ 烷基、-C(O)NH-C₁₋₂ 烷基苯基、-C(O)NH-NHBn、-C(O)-4苯氧基哌啶或-C(O)N(C₁₋₆烷基)₂)。

術語「醯胺」亦指在N端之胺基的衍生物(例如 -NHC(O)C₁₋₁₆ 烷基、-NHC(O)(CH₂)_nPh (n為1至6之整數)、-NHC(O)(CH₂)₂CO₂H、4-Cl-Ph-(CH₂)₃C(O)NH-、C₁₁H₂₃C(O)NH-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-CH₂-C(O)-NH-、C₁₃H₂₇C(O)NH-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-CH₂-C(O)-NH-；C₁₅H₂₇C(O)NH-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-CH₂-C(O)-NH-、Ph-CH₂CH₂NHC(O)-NH- 或 CH₃(OCH₂CH₂)_mC(O)NH- (m為1至12之整數)。

如本文所用，術語「酯」係指在C端之羧酸基的酯衍生物(例如-COOR)形式，其中該酯之R係指C₁₋₆烷基，諸如甲基、乙基、正丙基、異丙基、正丁基等；C₃₋₈環烷基，諸如環戊基、環己基等；C₆₋₁₀芳基，諸如苯基、 α -萘基等；C₆₋₁₀芳基-C₁₋₆烷基，例如苯基-C₁₋₂烷基，諸如苯甲基、苯乙基、二苯甲基等，及 α -萘基-C₁₋₂烷基，諸如 α -萘基甲基及其類似基團。亦可提及特戊醯氧甲基酯及其類似物，其常用作用於口服之酯。當本發明之多肽在除C端以外的位置具有額外羧基或羧酸酯基時，該等基團經醯胺化或酯化之彼等多肽亦屬於本發明之多肽的類目。在該等情況下，酯可例如為與以上提及之C端酯相同種類的酯。

術語烷基係指包含1至20個碳原子之完全飽和分支鏈或未分支(或直鏈)烴部分。烷基較佳包含1至7個碳原子且更佳包含1至4個碳原子。

術語芳基係指在環部分中具有6-10個碳原子之單環或雙環芳族烴基。芳基之代表性實例為苯基或萘基。

術語雜芳基包括單環或雙環雜芳基，其含有5-10個選自碳原子之環成員及1至5個雜原子，且各雜原子獨立地選自O、N或S，其中S及N可氧化成各種氧化態。對於雙環雜芳基系統，該系統為完全芳族(亦即所有環皆為芳族)。

術語環烷基係指3-12個碳原子、較佳3-8或3-7個碳原子之飽和或不飽和但非芳族單環、雙環或三環烴基。對於雙環及三環環烷基系統，所有環皆為非芳族。

術語雜環基係指飽和或不飽和非芳族(部分不飽和)環，其為4員、5員、6員或7員單環且含有至少一個選自O、S及N之雜原子，其中N及S亦可視情況氧化成各種氧化態。在一個實施例中，雜環基部分表示含有5-7個環原子且視情況含有另一選自O、S或N之雜原子的

飽和單環。

術語「APJ」(亦稱為「Apelin受體」、「類血管收縮素-1受體」、「類血管收縮素II-1受體」及其類似物)表示具有380個殘基、7個跨膜結構域之Gi偶聯受體，其基因定位於人類染色體11之長臂上(NCBI參考序列：NP_005152.1，且由NCBI參考序列：NM_005161編碼)。1993年使用簡併寡核苷酸引子自基因組人類DNA中第一次克隆出APJ(O'Dowd等人 Gene, 136:355-60, 1993)且與血管收縮素II受體1型共享顯著之同源性。然而，儘管有此同源性，但血管收縮素II不結合APJ。儘管成為孤兒受體很多年，但已分離出內源配位體且名為Apelin (Tatemoto等人, Biochem Biophys Res Commun 251, 471-6 (1998))。

術語「Apelin」表示77個殘基之前蛋白(NCBI參考序列：NP_0059109.3，且由NCBI參考序列：NM_017413.3編碼)，其經加工成Apelin肽之生物活性形式，諸如Apelin-36、Apelin-17、Apelin-16、Apelin-13、Apelin-12。全長成熟肽(稱為「Apelin-36」)包含36個胺基酸，但最有效之同功異構物為Apelin之13聚體(Apelin-13)之焦麩胺酸鹽化形式，稱為「Pyr-1-Apelin-13或Pyr¹-Apelin-13」。不同Apelin形式描述於例如美國專利6,492,324B1中。

術語「結合物」及「生物結合物」可互換使用，且意欲指由於式I至IV中之任一者之多肽與半衰期延長部分之間視情況經由連接子之共價附接而形成的實體。術語「結合物」或「生物結合物」亦意欲包括由於APJ促效劑多肽或式I、II、III或IV之多肽與半衰期延長部分之間的融合而形成的實體。

術語半衰期延長部分可共價連接/附接或融合於肽或多肽類似物。半衰期延長部分可為例如聚合物，諸如聚乙二醇(PEG)、脂肪酸、膽固醇基團、碳水化合物或寡糖；或結合於救助受體之任何天然

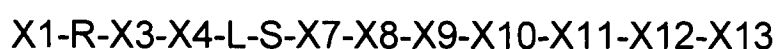
或合成蛋白質、多肽或肽。在其他實施例中，半衰期延長部分為白蛋白結合殘基。如本文所用，「白蛋白結合殘基」意指非共價結合於人類血清白蛋白之殘基。在一個實施例中，白蛋白結合殘基為親脂性殘基。在另一實施例中，白蛋白結合殘基在生理pH值下帶負電荷。白蛋白結合殘基通常包含可帶負電荷之羧酸。白蛋白結合殘基之實例包括脂肪酸。在其他實施例中，半衰期延長部分視情況經由連接子共價連接於具有長血清半衰期之血漿蛋白(白蛋白及免疫球蛋白)。舉例而言，半衰期延長部分為IgG恆定結構域或其片段(例如Fc區)、人類血清白蛋白(HSA)或白蛋白結合多肽或殘基(例如脂肪酸)。最佳地，生物結合物之半衰期延長部分為Fc區。

術語「增加之半衰期」或「增加血清半衰期」或「延長半衰期」意指經修飾之生物活性分子(例如Apelin 13)相對於其未經修飾形式(或該肽之裸形式)的循環半衰期中的正向變化。血清半衰期藉由如下方法量測：在投與生物活性分子之後的不同時間點時獲取血液樣品，且測定各樣品中該分子之濃度。量測血清濃度隨時間之變化允許計算經修飾分子(例如經結合分子)之血清半衰期。藉由比較經修飾分子(例如經結合分子)與未經修飾分子(例如Apelin 13)之血清半衰期，可確定血清半衰期或 $t_{1/2}$ 之相對增加。增加宜為至少約兩倍，但較小之增加可為適用的。

本發明之多肽：

本發明之各種實施例描述於本文中。應認識到，各實施例中規定之特徵可與其他規定特徵組合以提供其他實施例。

在實施例1中，本發明因此提供式(I)之肽或多肽：



I

其中：

X1為多肽之N端且為不存在的、Q、A或pE，或X1係選自C、c、hC、D-hC；其中C、c、hC或D-hC之側鏈與X7之側鏈一起形成二硫鍵；

X3為P或X3係選自C、c、hC及D-hC；其中C、c、hC或D-hC之側鏈與X7之側鏈一起形成二硫鍵；

X4為R或X4係選自C、c、hC及D-hC；其中C、c、hC或D-hC之側鏈與X7之側鏈一起形成二硫鍵；

其中X1、X3及X4中僅一者為選自C、c、hC及D-hC之含硫胺基酸；

X7為C、c、hC或D-hC；且X7之側鏈與X1、X3或X4之C、c、hC或D-hC之側鏈一起形成二硫鍵；

X8為K或F；

X9為G、A或a或不存在；

X10為P或不存在；

X11為D-Nle、Nle、M或f；及

X12為不存在的或為P、f、a、D-Nva或D-Abu；

X13為C端且為不存在的或係選自(N-Me)F、F、f、a、y及Nal；

其中：

Nle為L-正白胺酸；

D-Nle為D-正白胺酸；

D-hC為D-高半胱胺酸

hC為L-高半胱胺酸；

Nal為L-萘基丙胺酸；

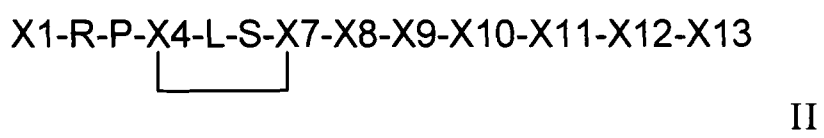
D-Nva為D-正纈胺酸；

D-Abu為D-2-胺基丁酸；

pE為L-焦麩胺酸；

或該多肽之醯胺、酯或鹽；或與其實質上等效的多肽。

在實施例2中，本發明因此提供式(II)之肽或多肽：



其中：

X1為多肽之N端且為不存在的、Q、A或pE；

X4為C、c、hC或D-hC；

X7為C、c、hC或D-hC；且X7之側鏈與X4之側鏈一起形成二硫鍵；

X8為K或F；

X9為G、A、a或不存在；

X10為P或不存在；

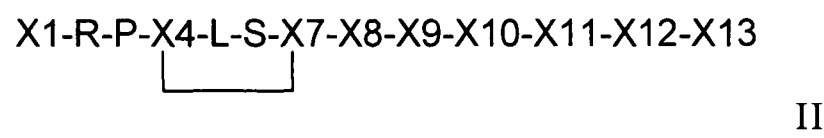
X11為D-Nle、M、Nle或f；及

X12為不存在的或係選自P、f、a、D-Nva及D-Abu；

X13為C端且為不存在的或係選自F、(N-Me)F、f、a、y及Nal；

或該多肽之醯胺、酯或鹽，或與其實質上等效的多肽。

在實施例2A中，本發明因此提供式(II)之肽或多肽：



其中：

X1為多肽之N端且為不存在的或pE；

X4為C、c、hC或D-hC；

X7為C、c、hC或D-hC；且X7之側鏈與X4之側鏈一起形成二硫鍵；

X8為K或F；

X9為G、A、a或不存在；

X10為P或不存在；

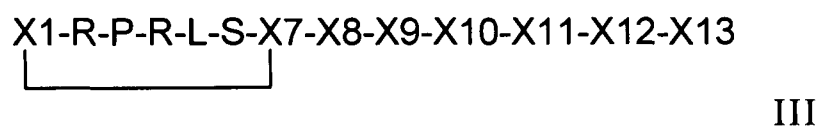
X11為D-Nle、Nle或f；及

X12為不存在的或係選自P、f、a、D-Nva及D-Abu；

X13為C端且為不存在的或係選自F、(N-Me)F、f、a、y及Nal；

或該多肽之醯胺、酯或鹽，或與其實質上等效的多肽。

在實施例3中，本發明因此提供式III之肽或多肽：



其中

X1為多肽之N端且係選自C、c、hC及D-hC；

X7為C、c、hC或D-hC；其中X7之側鏈與X1之側鏈一起形成二硫鍵；

X8為K或F；

X9為G、A、a或不存在；

X10為P或不存在；

X11為D-Nle、Nle、M或f；及

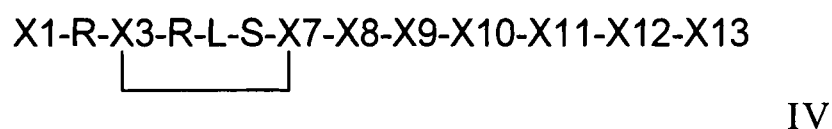
X12為不存在的或係選自P、f、a、D-Nva及D-Abu；

X13為C端且為不存在的或係選自(N-Me)F、F、f、a、y及Nal；

或該多肽之醯胺、酯或鹽。

在實施例3A中，本發明係關於式III之多肽，其中X11為D-Nle、Nle或f，或其醯胺、酯或鹽。

在實施例4中，本發明因此提供式IV之肽或多肽：



其中：

X1為多肽之N端且為不存在的、Q、A或pE；

X3為C、c、hC或D-hC；其中C、c、hC或D-hC之側鏈；

X7為C、c、hC或D-hC；且X7之側鏈與X3之C、c、hC或D-hC之側鏈一起形成二硫鍵；

X8為K或F；

X9為G、A、a或不存在；

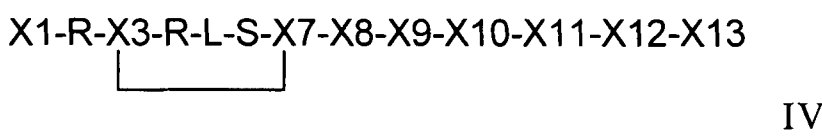
X10為P或不存在；

X11為D-Nle、Nle、M或f；及

X12為不存在的或係選自P、f、a、D-Nva及D-Abu；

X13為C端且為不存在的或係選自(N-Me)F、F、f、a、y及Nal；
或該多肽之醯胺、酯或鹽。

在實施例4A中，本發明因此提供式IV之肽或多肽：



其中：

X1為多肽之N端且為不存在的或pE；

X3為C、c、hC或D-hC；其中C、c、hC或D-hC之側鏈；

X7為C、c、hC或D-hC；且X7之側鏈與X3之C、c、hC或D-hC之側鏈一起形成二硫鍵；

X8為K或F；

X9為G、A、a或不存在；

X10為P或不存在；

X11為D-Nle、Nle或f；及

X12為不存在的或係選自P、f、a、D-Nva及D-Abu；

X13為C端且為不存在的或係選自(N-Me)F、F、f、a、y及NaI；或該多肽之醯胺、酯或鹽。

在實施例5中，本發明係關於根據實施例1、2及4中之任一者之多肽，其中X1為pE；或該多肽之醯胺、酯或鹽。

在實施例5A中，本發明係關於根據實施例1、2及4中之任一者之多肽，其中X1為A或Q；或該多肽之醯胺、酯或鹽。在此實施例之一個特定態樣中，肽經由其A或Q N端與半衰期延長部分化學連接或融合。

在實施例6中，本發明係關於根據實施例1、2、4及4A中之任一者之多肽，其中X1不存在；或該多肽之醯胺、酯或鹽。

在實施例7中，本發明係關於根據實施例1至4及6中之任一者之多肽，其中N端為醯胺；或該多肽之鹽。

在實施例8中，本發明係關於根據實施例7之多肽，其中N端為式-NHR之醯胺且R為乙醯基、苯甲醯基、苯甲醯甲基、丁二醯基、辛醯基、4-苯基丁醯基、4-Cl-Ph-(CH₂)₃C(O)-或Ph-CH₂CH₂NHC(O)-；或該多肽之鹽。

在實施例8A中，本發明係關於實施例1至4及7中之任一者之多肽，其中N端為式NHR1之醯胺，其中R1為CH₃C(O)-、CH₃-(O-CH₂CH₂)_m-C(O)-、軟脂醯基(O2Oc)_p、肉豆蔻醯基(O2Oc)_p、月桂醯基(O2Oc)_p或Ph-CH₂CH₂NHC(O)-；且其中

p為1至4之整數；

m為1至12之整數；

月桂醯基(O2Oc)為C₁₁H₂₃C(O)NH-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-CH₂-C(O)-；

肉豆蔻醯基(O2Oc)為C₁₃H₂₇C(O)NH-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-CH₂-C(O)-；

軟脂醯基(O2Oc)為C₁₅H₃₁C(O)NH-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-CH₂-C(O)-；

或該多肽之鹽。N端醯胺之實例已描述於2012年1月27日申請之美國臨時申請案第61/591,557號(代理人案號PAT054961-US-PSP)中，其係以引用的方式併入本文中。

在實施例9中，本發明係關於根據實施例1至8A中之任一者之多肽，其中X13為F或f；或該多肽之醯胺、酯或鹽。

在實施例10中，本發明係關於根據實施例1至8A中之任一者之多肽，其中X13不存在；或該多肽之醯胺、酯或鹽。

在實施例11中，本發明係關於根據實施例1-10中之任一者之多肽，其中X12不存在；或該多肽之醯胺、酯或鹽。

在實施例12中，本發明係關於根據實施例1至11中之任一者之多肽，其中C端為醯胺；或該多肽之鹽。

在實施例13中，本發明係關於根據實施例12之多肽，其中C端為式 $-C(O)-R_2$ 之醯胺且 R_2 為 $-NH_2$ 、 $-NH-Me$ 、 $-NH-NHBn$ 、 $-N(CH_3)-(CH_2)_2-Ph$ 或 $-NH-(CH_2)_2-Ph$ ；或該多肽之鹽。

在實施例14中，本發明係關於根據實施例1-13中之任一者之多肽，其中X8為K；或該多肽之醯胺、酯或鹽。

在實施例15中，本發明係關於根據實施例1至14中之任一者之多肽，其中X9為G；或該多肽之醯胺、酯或鹽。

在實施例16中，本發明係關於根據實施例1至15中之任一者之多肽，其中X10為P；或該多肽之醯胺、酯或鹽。

在實施例17中，本發明係關於根據申請專利範圍1至16中之任一者之多肽，其中X11為Nle或D-Nle；或該多肽之醯胺、酯或鹽。

在實施例17A中，本發明係關於根據實施例1至17中之任一者之多肽，其中由X11-X12-X13部分組成之C端係選自Nle-P-苯乙胺、Nle-P-(N-Me)F、Nle-P-NH₂、Nle-苯乙胺、(D-Nle)-苯乙胺、Nle-P-f、D-

Nle-a-f、(D-Nle)-NH₂、(D-Nle)-f、(D-Nle)-a-d、(D-Nle)-a-y、(D-Nle)-(D-Nva)-f、Nle-P-F、Nle-P-a、Nle-P-NaI及(D-Nle)-(D-Abu)-f，或該多肽之鹽。在此實施例之一個特定態樣中，本發明係關於根據實施例17A之多肽，其中由X11-X12-X13部分組成之C端係選自(D-Nle)-苯乙胺、(D-Nle)-a-f及f-a-f，或該多肽之鹽。

在一個實施例17B中，本發明係關於實施例1至17中之任一者之肽或多肽，其中胺基酸X1、X3、X4及X7至X13中之至少兩者不同於Pyr-1-Apelin-13中存在之對應胺基酸。在另一實施例中，本發明係關於實施例1至18中之任一者之肽或多肽，其中胺基酸X1、X3、X4及X7至X13中之至少三者不同於Pyr-1-Apelin-13中存在之對應胺基酸。在另一實施例中，本發明係關於實施例1至18中之任一者之肽或多肽，其中胺基酸X1、X3、X4及X7至X13中之至少四者不同於Pyr-1-Apelin-13中存在之對應胺基酸。

在另一實施例中，X1、X3、X4及X7-X13胺基酸為由下文實例部分中之X1、X3、X4及X7-X13胺基酸所定義之彼等胺基酸。

在另一實施例中，本發明之個別多肽為下文實例部分中列舉之彼等多肽或其醫藥學上可接受之鹽。

除非另外規定，否則術語「本發明之多肽」係指式(I)及其子式(式II、III或IV)之多肽；或其醯胺、酯或鹽。

除非另外規定，否則術語「本發明之多肽」、「本發明之肽」、「Apelin肽促效劑」及其類似術語係指式I及其子式(式II、III或IV)之肽及多肽；或其醯胺、酯或鹽。本發明之肽及多肽顯示與本文所述之已知Apelin肽及多肽相比實質上等效或改良之活性及/或血漿穩定性，該等已知Apelin肽及多肽包括(但不限於)野生型Apelin、Apelin-13及pyr-1-Apelin-13。

本發明之肽及多肽亦涵蓋與根據式I、II、III或IV中之任一者之

肽及多肽至少約95%一致的肽及多肽，或其醯胺、酯或鹽，以及本文包括(但不限於)實驗性實例中所特定列舉之任何肽或多肽。

如本文所用，片語「同源胺基酸序列」或其變異體係指藉由在胺基酸水準下至少規定百分比之同源性表徵的序列且可與「序列一致性」互換使用。同源胺基酸序列包括含有保守胺基酸取代之彼等胺基酸序列且該等多肽具有相同結合及/或活性。在一些實施例中，若胺基酸序列與比較序列具有至少60%或60%以上、至多99%之一致性，則其為同源的。在一些實施例中，若胺基酸序列與比較序列共有一或多個、至多60個胺基酸取代、添加或缺失，則其為同源的。在一些實施例中，同源胺基酸序列具有不超過5個或不超過3個保守胺基酸取代。

同源性亦可在多肽水準下。本發明之肽或多肽、或其部分與不同胺基酸序列之一致性程度或一致性百分比係以兩個序列比對精確匹配的數目除以「本發明序列」或「外來序列」中最短序列的長度來計算。結果以一致性百分比形式表示。

包含與特定實例中所述之胺基酸序列具有約80-99.9%、較佳90-99.9%之同源性之胺基酸序列且具有優於Apelin-13或pyr-1-Apelin-13之血漿穩定性的多肽屬於本發明之多肽的類目。在一個實施例中，血漿穩定性改良至少2倍。在一個實施例中，本發明之多肽具有至少30分鐘之血漿穩定性。在另一實施例中，本發明之多肽具有至少60分鐘或至少80分鐘，較佳至少100分鐘且更佳至少150分鐘之血漿穩定性。

術語「實質上等效」意指受體結合活性、信號轉導活性及其類似物之性質為等效的。因此，可允許甚至在諸如多肽之受體結合活性強度及分子量之等級中存在差異。

如本文所述之多肽或其藉由取代、缺失、添加或插入一或多個胺基酸之實質性等效物可作為上述意義中含有胺基酸序列實質性等效

物之多肽加以提及。如本文所述之多肽或其藉由經天然或非天然胺基酸取代1至5個、較佳1至3個且更佳1或2個胺基酸之實質性等效物可在以上意義中作為含有胺基酸序列實質性等效物之多肽加以提及。其他修飾及改變可包括用D-胺基酸置換L-胺基酸或其他變化形式，包括(但不限於)磷酸化、羧化、烷基化及其類似物，只要保持式I、II、III或IV之肽或多肽之Apelin促效活性且與Apelin-13之焦麩胺酸鹽化形式相比血漿穩定性得以改良即可。

在實施例19中，本發明另外關於生物結合物或其多聚體，包含：

- a. 根據前述實施例中之任一者之式I、II、III或IV之肽或多肽、其鹽、酯或酰胺；
- b. 半衰期延長部分；

其中該肽或多肽及該半衰期延長部分視情況經由連接子共價連接或融合。

在實施例19A中，半衰期延長部分視情況經由連接子部分附接於式I、II、III或IV之肽之N端。

在實施例19B中，半衰期延長部分視情況經由連接子部分共價連接或融合於式I、II、III或IV之肽之C端。

在實施例19C中，半衰期延長部分視情況經由連接子部分共價連接或融合於式I、II、III或IV之肽之側鏈，例如半衰期延長部分共價連接或融合於K、Orn、Dab、Dap、hK或4-胺基-1sn之側鏈的胺基。較佳地，半衰期延長部分視情況經由連接子部分附接於式I、II、III或IV之肽之N端。

在實施例20中，本發明係關於根據實施例19之生物結合物或其多聚體，其中該半衰期延長部分為IgG恆定結構域或其片段、脂肪酸或人類血清白蛋白。

在實施例21中，本發明係關於根據實施例19或20之生物結合物，其中該半衰期延長部分為具有LALA突變(L234A、L235A)之FcLALA修飾之Fc片段。

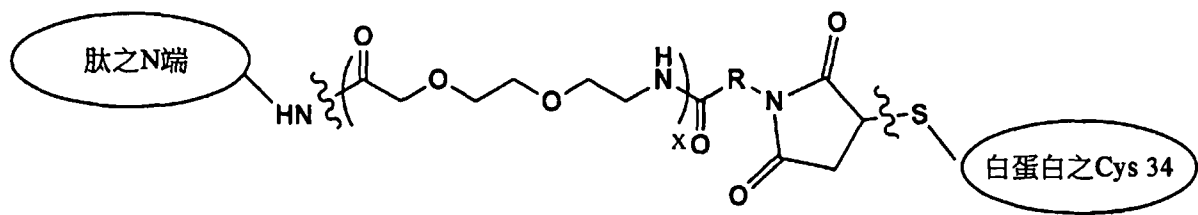
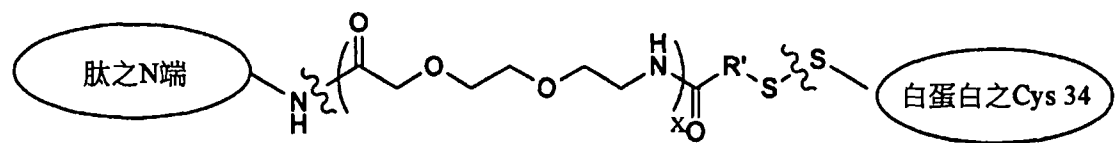
在實施例22中，本發明係關於根據實施例21之生物結合物，其中該半衰期延長部分為經由連接子融合或共價連接於式I、II、III或IV之多肽的Fc結構域，且其中該連接子具有下式： $-[GGGGS]_n-$ ， n 為1、2或3或該連接子為GG或GS，且式I、II、III或IV之多肽含有天然存在之胺基酸。

在實施例23中，本發明係關於根據實施例22之生物結合物，其中該多肽為式I之多肽，選自QRPC*LSC*KGPMPPF、C*RPRLSC*KGPMPPF及QRC*RLSC*KGPMPPF，其中用「*」標記之兩個胺基酸表示經由側鏈形成二硫鍵或醯胺鍵之胺基酸。

在實施例23A中，本發明係關於根據實施例22或23之生物結合物，其中該半衰期延長部分為C端離胺酸已缺失或經丙胺酸置換之經修飾Fc結構域。該等Fc變異體已描述於共同申請之申請案(美國臨時申請案第62/015848號：代理人案號PAT055781-US-PSP02)且已生成具有Apelin肽/多肽之較穩定融合蛋白。

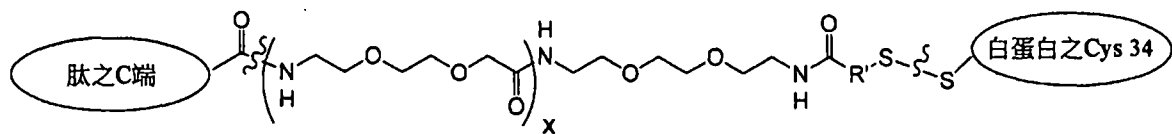
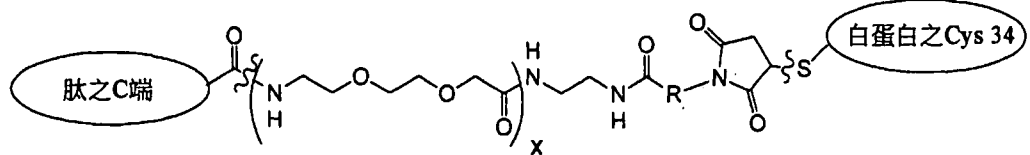
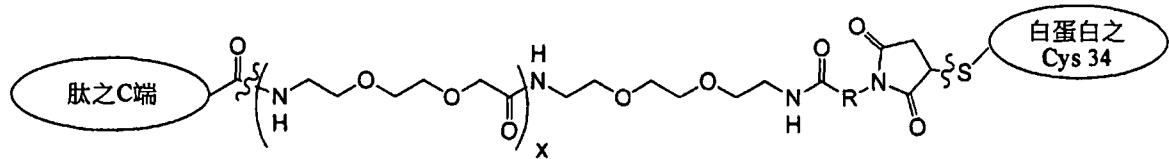
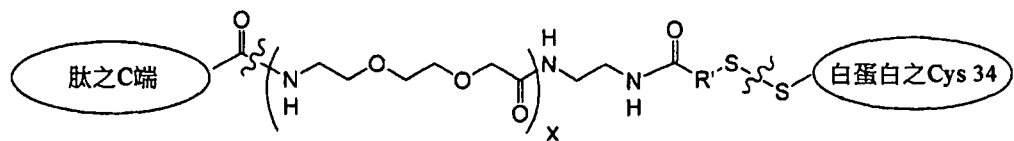
在實施例24中，本發明係關於根據實施例19或20之生物結合物或其多聚體，其中該半衰期延長部分為人類血清白蛋白。

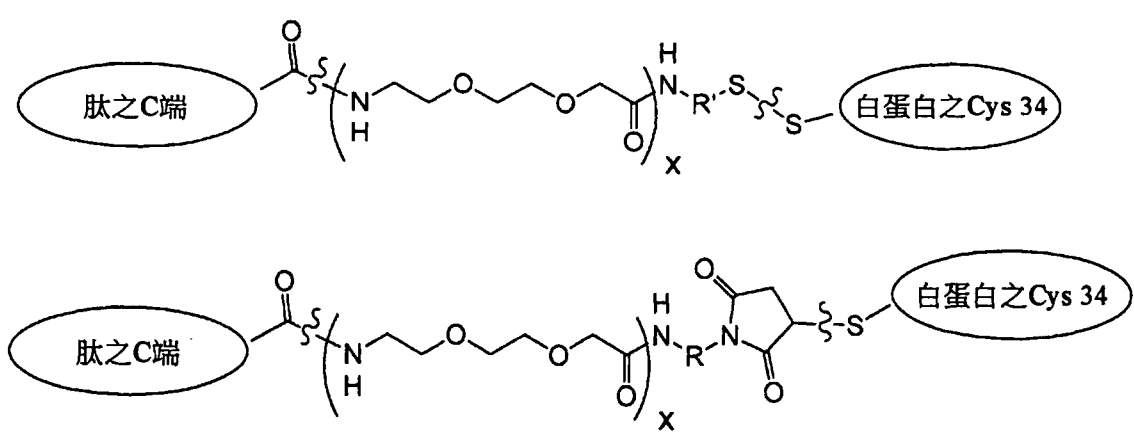
在實施例25中，本發明係關於根據實施例24之生物結合物，其中該人類血清白蛋白經由下式之連接子化學連接於式I至IV中之任一者之多肽的N端：



其中x為1-20，R為直鏈或分支鏈伸烷基、環烷基、芳基或雜芳基或其組合，R'為直鏈或分支鏈伸烷基、芳基或環烷基或其組合。

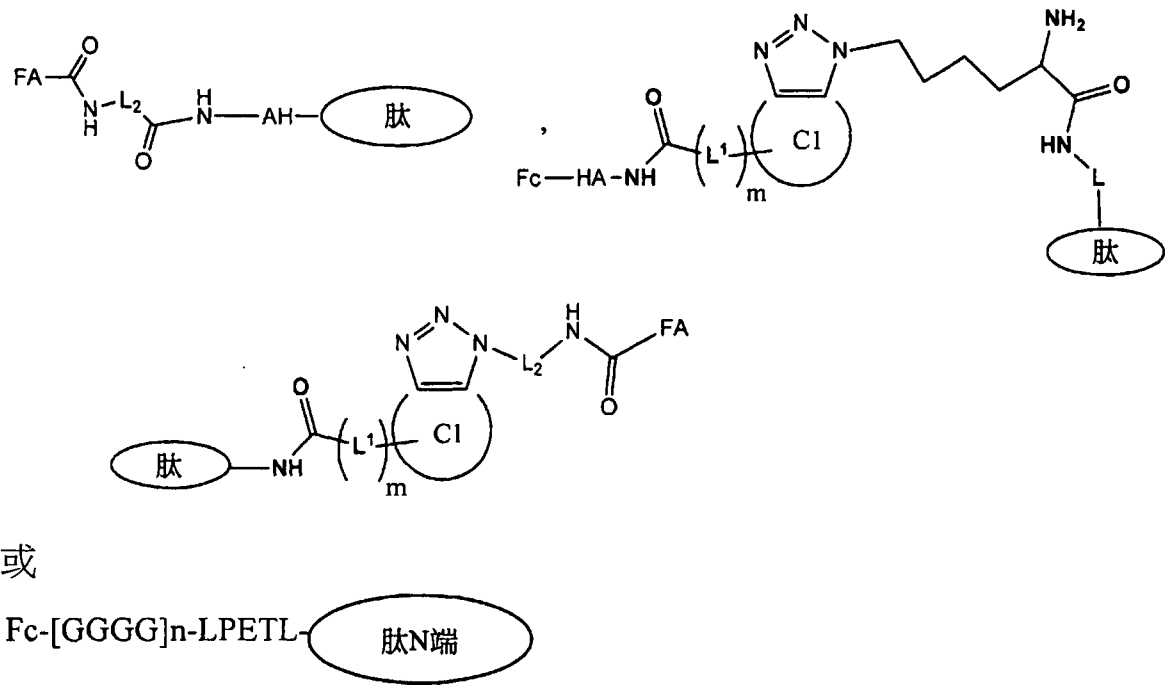
在實施例26中，本發明係關於根據實施例19或20之生物結合物，其中該人類血清白蛋白經由下式之連接子化學連接於式I至IV中之任一者之多肽的C端：





其中x為1-20，R為直鏈或分支鏈伸烷基、環烷基、芳基或雜芳基或其組合，R'為直鏈或分支鏈伸烷基、芳基或環烷基或其組合。

在其他實施例中，本發明之生物結合物具有下式：



其中肽為肽之N端，A為丙胺酸，H為組胺酸，n為1、2或3，m為0或1，L及L2為連接子，C1為視情況經氟取代之單、二或三環碳環或雜環系統且L¹為C1-C20伸烷基連接子，其中該伸烷基鏈視情況經側氧基(=O)取代，且其中一或多個碳經O或NH置換。在此實施例之一個特定態樣中，L及L2為PEG連接子。

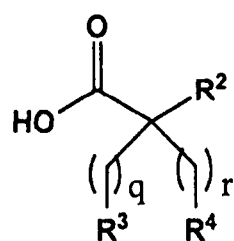
半衰期延長部分

本發明之半衰期延長部分可共價附接、連接、結合或融合於肽

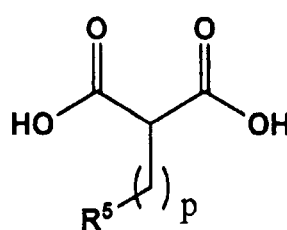
或多肽類似物。半衰期延長部分可為例如聚合物，諸如聚乙二醇(PEG)、脂肪酸、膽固醇基團、碳水化合物或寡醣；或結合於救助受體之任何天然或合成蛋白質、多肽或肽。較佳地，半衰期延長部分視情況經由連接子共價連接於具有長血清半衰期之血漿蛋白(白蛋白及免疫球蛋白)。舉例而言，半衰期延長部分為IgG恆定結構域或其片段(例如Fc區)、人類血清白蛋白(HSA)或白蛋白結合多肽或殘基(例如脂肪酸)。較佳地，生物結合物之半衰期延長部分為人類血清白蛋白、脂肪酸或Fc區。

半衰期延長部分包括白蛋白，其係指血漿中最豐富的蛋白質，其單體形式具有約65至67千道爾頓之分子量，視來源物種而定。術語「白蛋白」可與「血清白蛋白」互換使用且不意味著定義與本發明之經修飾肽一起形式結合物之白蛋白的來源。因此，如本文所用之術語「白蛋白」可係指自諸如血液或漿液之天然來源純化之白蛋白，或其可係指化學合成或重組產生之白蛋白。本發明之經修飾肽或多肽較佳視情況經由連接子繫栓於白蛋白表面上之半胱胺酸-34的游離硫醇基。

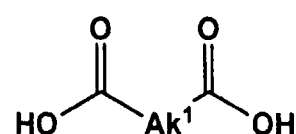
半衰期延長部分包括脂肪酸，其可定義為C6-70烷基、C6-70烯基或C6-70炔基鏈，其每一者經至少一個羧酸(例如1、2、3或4個CO₂H)取代且視情況另外經經基取代。脂肪酸之實例由式A1、A2及A3定義：



A1



A2



或 A3

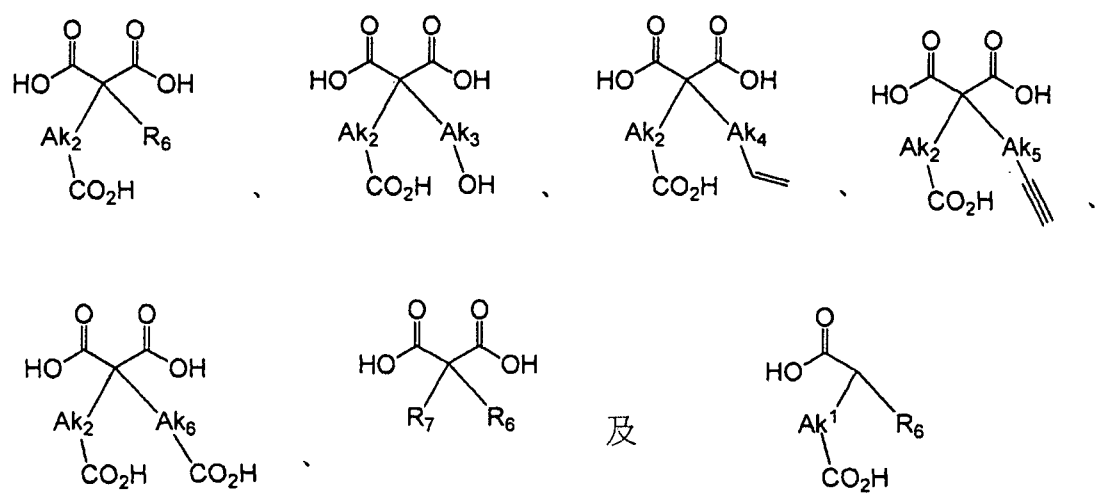
R²為CO₂H、H；

R^3 、 R^4 及 R^5 彼此獨立地為H、OH、 CO_2H 、 $-CH=CH_2$ 或 $-C\equiv CH$ ；

Ak^1 為分支鏈 C_6 - C_{30} 伸烷基；

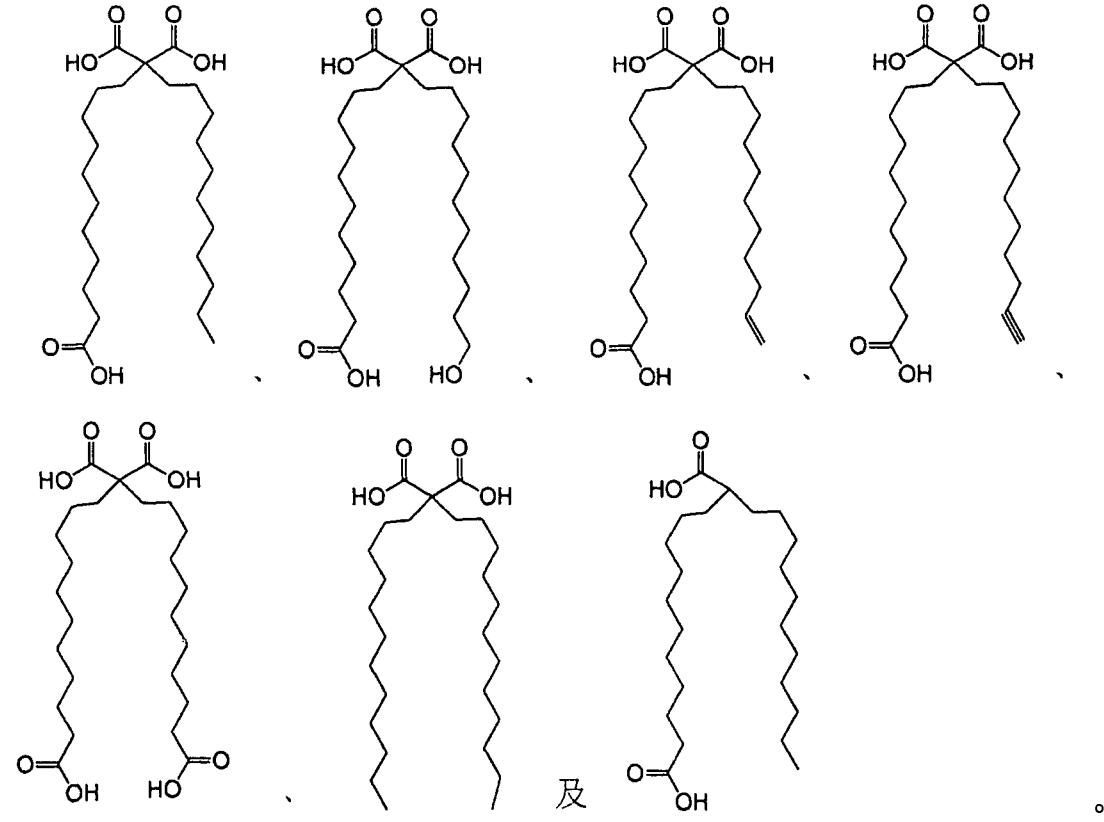
q 、 r 及 p 彼此獨立地為6至30之整數；或其鹽、胺、酯或醫藥學上可接受之鹽。

脂肪酸之實例係選自：



其中 Ak^2 、 Ak^3 、 Ak^4 、 Ak^5 及 Ak^6 獨立地為(C_{8-20})伸烷基， R^6 及 R^7 獨立地為(C_{8-20})烷基。

更特定言之，脂肪酸係選自：



此等脂肪酸部分已描述於共同申請之申請案美國臨時申請案第62/015862號代理人案號PAT056274-US-PSP中。

半衰期延長部分包括「天然Fc」(其係指包含由完整抗體之分解而產生或藉由其他方式產生之非抗原結合片段之序列的分子或序列，不論呈單體或多聚體形式)，且可含有鉸鏈區。天然Fc之原始免疫球蛋白來源較佳為人類來源且可為免疫球蛋白中之任一者，但IgG1及IgG2為較佳的。天然Fc分子由可藉由共價(亦即二硫鍵)及非共價締合連接成二聚體或多聚體形式之單體多肽組成。天然Fc分子之單體次單位之間的分子間二硫鍵的數目在1至4之範圍內，視類別(例如IgG、IgA及IgE)或子類別(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgA1及IgA2)而定。天然Fc之一個實例為由IgG之番木瓜蛋白酶分解產生之經二硫鍵結的二聚體(參見Ellison等人, 1982, *Nucleic Acids Res.* 10: 4071-9)。如本文所用，術語「天然Fc」對於單體、二聚體及多聚體形式為通用的。

半衰期延長部分包括「Fc變異體」，其係指自天然Fc修飾但仍包含救助受體FcRn(新生Fc受體)之結合位點的分子或序列。國際公開案第WO 97/34631號及第WO 96/32478號描述例示性Fc變異體，以及與救助受體之相互作用，且其在此以引用之方式併入。因此，術語「Fc變異體」可包含由非人類天然Fc人類化之分子或序列。此外，天然Fc包含可移除區，因為該等可移除區提供本發明之生物結合物不需要的結構特徵或生物活性。因此，術語「Fc變異體」包含缺乏一或多個天然Fc位點或殘基或一或多個Fc位點或殘基經修飾之分子或序列，該等Fc位點或殘基影響或參與：(1)二硫鍵形成，(2)與所選宿主細胞之不相容性，(3)在所選宿主細胞中表現後之N端異質性，(4)糖基化，(5)與補體之相互作用，(6)結合於除救助受體以外之Fc受體，或(7)抗體依賴性細胞毒性(ADCC)。Fc變異體於下文進一步詳述。

半衰期延長部分包括C端離胺酸已缺失或經丙胺酸置換之Fc變異

體。

半衰期延長部分係指「Fc結構域」，其涵蓋如上文所定義之天然Fc及Fc變異體及序列。如同Fc變異體及天然Fc分子，術語「Fc結構域」包括單體或多聚體形式之分子，無論由完整抗體分解或藉由其他方式產生。在本發明之一些實施例中，Fc結構域可經由例如Fc結構域與肽序列之間的共價鍵結合於式I'或式I-IV中之任一者的多肽。該等Fc蛋白質可經由Fc結構域之締合而形成多聚體，且此等Fc蛋白質及其多聚體均為本發明之一個態樣。

半衰期延長部分包括「經修飾Fc片段」，其將意指包含經修飾序列之抗體之Fc片段。Fc片段為包含CH2、CH3及一部分鉸鏈區之抗體的一部分。經修飾Fc片段可衍生自例如IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。FcLALA為具有LALA突變(L234A、L235A)之經修飾Fc片段，其以降低的效率觸發ADCC且較弱地結合及活化人類補體。Hessell等人2007 Nature 449:101-104。對Fc片段之額外修飾描述於例如美國專利第7,217,798號中。

如應用於Fc結構域或包含Fc結構域之分子之術語「多聚體」係指具有共價締合之兩個或兩個以上多肽鏈的分子。舉例而言，IgG分子通常形成二聚體且因此包含二聚體IgG分子之生物結合物將融合於式I、IA、II、III或IV之兩個多肽鏈。

連接子

任何連接子為視情況選用的。當存在時，其化學結構並不關鍵，因為其主要用作間隔子。

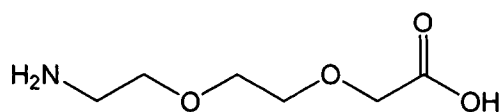
連接子為含有兩個反應性基團/官能基之化學部分，其中一個基團可與多肽反應且另一個可與半衰期延長部分反應。連接子之兩個反應性基團經由鍵聯基團連接，該鍵聯基團之結構並不關鍵，只要其不干擾連接子偶合於肽及半衰期延長部分。

連接子可由藉由肽鍵連接在一起之胺基酸組成。在本發明之一些實施例中，連接子由藉由肽鍵連接之1至20個胺基酸組成，其中該等胺基酸選自20種天然存在之胺基酸。在各種實施例中，1至20種胺基酸係選自胺基酸甘胺酸、絲胺酸、丙胺酸、脯胺酸、天冬醯胺、麩醯胺酸、半胱胺酸及離胺酸。在一些實施例中，連接子由多數無空間位阻之胺基酸(諸如甘胺酸及丙胺酸)組成。在一些實施例中，連接子為聚甘胺酸、聚丙胺酸、甘胺酸及丙胺酸之組合(諸如聚(Gly-Ala))，或甘胺酸與絲胺酸之組合(諸如聚(Gly-Ser))。在一些實施例中，連接子包含多數選自組胺酸、丙胺酸、甲硫胺酸、麩醯胺酸、天冬醯胺及甘胺酸之胺基酸。在一些實施例中，連接子含有聚組胺酸部分。連接子之實例為包含基元AH、MHA或AHA之連接子。該等基元已於同在申請中之申請案及共同申請之申請案代理人案號美國臨時申請案第62/015862號：PAT056274-US-PSP及美國臨時申請案第62/015868號：PAT056275-US-PSP中描述為有益於在肽或多肽之N端的選擇性結合。

連接子之其他實例包含基元GGGGSGGGSGGGGS、GGGGSGGGGS、GGGGS、GS或GG。

在一些其他實施例中，連接子包含酶之識別基元。實例為可包括在C端之LPXTG/A基元，其中X為任何胺基酸，最常為E：麩胺酸。(L：白胺酸，P：脯胺酸，T：蘇胺酸，G：甘胺酸，A：丙胺酸)。(Carla P. Guimaraes等人：「Site specific C-terminal and internal loop labeling of proteins using sortase-mediated reactions」，Nature protocols, 第8卷, No 9, 2013, 1787-1799)

在其他實施例中，連接子包含1至20個選自非天然胺基酸之胺基酸。儘管3至15個胺基酸殘基之連接子對於與半衰期延長部分結合而言為較佳的，但本發明涵蓋具有任何長度或組成之連接子。較佳胺基酸連接子為下式之O2Oc：

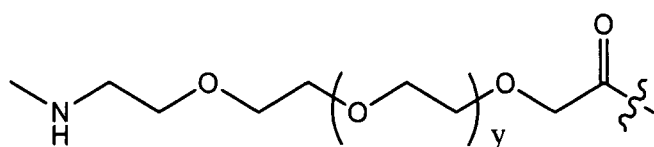


或其重複單元。

本文所述之連接子為例示性的，且本發明涵蓋長得多且包括其他殘基之連接子。本發明亦涵蓋非肽連接子。

連接子之鍵聯部分可包含一或多個烷基、烷氧基、烯基、環烷基、芳基、雜芳基及雜環基或其組合。舉例而言，可使用烷基連接子，諸如 $\text{-NH-(CH}_2\text{)}_z\text{-C(O)-}$ 或 $\text{-S-(CH}_2\text{)}_z\text{-C(O)-}$ 或 $\text{-O-(CH}_2\text{)}_z\text{-C(O)-}$ ，其中 z 為 2 至 20。此等烷基連接子可另外經任何無空間位阻之基團取代，包括(但不限於)低碳烷基(例如 C1-C6)、低碳醯基、鹵素(例如 Cl、Br)、CN、 NH_2 或苯基。

連接子亦可具有聚合性質。連接子可包括生物穩定或可生物降解之聚合物鏈或單元。具有重複鍵聯之聚合物在生理條件下可具有變化的穩定性程度，視鍵不穩定性而定。聚合物可含有諸如聚碳酸酯(-O-C(O)-O-)、聚酯(-C(O)-O-)、聚胺基甲酸酯(-NH-C(O)-O-)、聚醯胺(-C(O)-NH-)之鍵。此等鍵由舉例方式提供，且不意欲限制本發明之聚合物鏈或連接子中可採用之鍵的類型。適合之聚合物包括例如聚乙二醇(PEG)、聚乙烯吡咯啉酮、聚乙烯醇、聚胺基酸、二乙烯醚順丁烯二酸酐、N-(2-羥丙基)-甲基丙烯醯胺、聚葡萄糖、聚葡萄糖衍生物、聚丙二醇、聚氧乙基化多元醇、肝素、肝素片段、多醣、纖維素及纖維素衍生物、澱粉及澱粉衍生物、聚伸烷二醇及其衍生物、聚伸烷二醇與其衍生物之共聚物、聚乙烷基乙醚及其類似物與其混合物。聚合物連接子為例如 PEG。例示性非肽連接子為聚乙二醇連接子：



其中y為使得連接子之分子量為100至5000 kD，例如100至500 kD。

較佳地，鍵聯部分含有一或多個胺基酸部分，諸如(O₂O_c)單元或甘胺酸或絲胺酸、C₁₋₄伸烷基-C(O)-、C₁₋₄伸烷基、-NH-C₂₋₆伸烷基-NH-或-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-NH-二胺基單元或其組合及連接2個反應性基團或官能基之鍵聯部分。

較佳地，反應性基團或官能基為順丁烯二醯亞胺、硫醇或吡啶-2-基二硫基。

肽或多肽及用於附接半衰期延長部分之肽-連接子構築體之製備：

本發明之Apelin肽及多肽及/或肽-連接子構築體可藉由任一合成化學方法或藉由重組方法或兩種方法之組合而產生。Apelin肽及/或肽-連接子構築體可以全長形式製備或可以非全長片段形式合成且接合。本發明之肽及多肽可藉由用於肽合成之本身已知程序來產生。用於肽合成之方法可為固相合成及液相合成中之任一者。因此，所關注之肽及多肽可藉由如下方法產生：將能夠構成蛋白質之部分肽或胺基酸與其殘基部分縮合，且當產物具有保護基時，將保護基分離，接著可製造所需肽。用於縮合及脫除保護基之已知方法包括以下文獻(1)-(5)中所描述之程序。

(1) M. Bodanszky及M. A. Ondetti, Peptide Synthesis, Interscience Publishers, New York, 1966,

(2) Schroeder及Luebke, The Peptide, Academic Press, New York, 1965,

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

(4) Haruaki Yajima及Shumpei Sakakibara, Biochemical Experiment Series 1, Protein Chemistry IV, 205, 1977，及

(5) Haruaki Yajima (編), Development of Drugs-Continued, 14, Peptide Synthesis, Hirokawa Shoten.

反應之後，可藉由習知純化技術(諸如溶劑萃取、管柱層析、液相層析及再結晶)之組合將肽純化及分離。若如上所述分離之肽為游離化合物，則可藉由已知方法將其轉化成適合之鹽。相反地，若經分離產物為鹽，則可藉由已知方法將其轉化成游離肽。

多肽之醯胺可藉由使用適合於醯胺化之用於肽合成之樹脂獲得。樹脂包括氯甲基樹脂、羥甲基樹脂、二苯甲基胺樹脂、胺基甲基樹脂、4-苄氧基苄基醇樹脂、4-甲基二苯甲基胺樹脂、PAM樹脂、4-羥甲基甲基苯基乙醯胺基甲基樹脂、聚丙烯醯胺樹脂、4-(2',4'-二甲氧基苯基-羥甲基)苯氧基樹脂、4-(2',4'-二甲氧基苯基-Fmoc-胺甲基)苯氧基樹脂、2-氯三苯甲基氯樹脂等。使用此類樹脂，藉由本身已知的各種縮合技術根據目標肽之序列在樹脂上將側鏈之 α -胺基及官能基已經適合保護之胺基酸縮合。在系列反應結束時，將肽或經保護之肽自樹脂上移除，且將保護基移除，且若需要，形成二硫鍵以獲得目標多肽。

為了縮合上文提及之經保護胺基酸，可使用多種用於肽合成之活化試劑，諸如HATU、HCTU或例如碳化二亞胺。碳化二亞胺包括DCC、N,N'-二異丙基碳化二亞胺及N-乙基-N'-(3-二甲胺基丙基)碳化二亞胺。為了使用此類試劑進行活化，可使用外消旋抑制劑添加劑，例如HOBt或Oxyma Pure。經保護胺基酸可連同活化試劑及外消旋抑制劑一起直接添加至樹脂中，或經預活化為對稱酸酐、HOBt酯或HOObt酯，隨後添加至樹脂中。用於活化經保護胺基酸或使用樹脂之縮合的溶劑可恰當地選自已知適用於肽縮合反應之彼等溶劑當中。舉例而言，可提及N,N-二甲基甲醯胺、N-甲基吡咯啉酮、氯仿、三氟乙醇、二甲亞砷、DMF、吡啶、二噁烷、二氯甲烷、四氫呋喃、乙腈、

乙酸乙酯或其適合之混合物。

反應溫度可選自迄今已知適用於肽鍵形成之範圍且通常選自約-20℃至50℃之範圍。經活化胺基酸衍生物一般以1.5至4倍過量之比例使用。若藉由利用茚三酮反應之測試發現縮合不充分，則可重複縮合反應以在不移除保護基之情況下達成充分縮合。若重複縮合仍無法得到充分程度之縮合，則可用乙酸酐或乙醯咪唑使未反應之胺基乙醯化。

用於起始物質胺基酸之胺基之保護基包括Z、Boc、第三戊氧基羰基、異冰片氧基羰基、4-甲氧基苄氧基羰基、Cl-Z、Br-Z、金剛烷氧基羰基、三氟乙醯基、苯二甲醯基、甲醯基、2-硝基苯基次磺醯基、二苯基硫磷基或Fmoc。可使用之羧基保護基包括(但不限於)上文所提及之C₁₋₆烷基、C₃₋₈環烷基及C₆₋₁₀芳基-C₁₋₂烷基以及2-金剛烷基、4-硝基苄基、4-甲氧基苄基、4-氯苄基、苄醯甲基、苄氧基羰基肼基、第三丁氧基羰基肼基及三苯甲基肼基。

絲胺酸及蘇胺酸之羥基可藉由酯化或醚化來保護。適合於該酯化之基團包括碳衍生基團，諸如低碳烷醯基(例如乙醯基等)、芳醯基(例如苄醯基等)、苄氧羰基及乙氧羰基。適合於該醚化之基團包括苄基、四氫呋喃基及第三丁基。用於酪胺酸之酚羥基之保護基包括Bzl、Cl₂-Bzl、2-硝基苄基、Br-Z及第三丁基。

用於組胺酸之咪唑之保護基包括Tos、4-甲氧基-2,3,6-三乙基苯磺醯基、DNP、苄氧基甲基、Bum、Boc、Trt及Fmoc。

起始胺基酸之經活化羧基包括對應酸酐、疊氮化物及活性酯，例如與諸如五氯苯酚、2,4,5-三氯苯酚、2,4-二硝基苯酚、氰基甲醇、對硝基苯酚、HONB、N-羥基丁二醯亞胺、N-羥基鄰苯二甲醯亞胺、HOBt等醇的酯。起始胺基酸之經活化胺基包括對應磷醯胺。

用於消除保護基之方法包括在催化劑(諸如鈀黑或鈀/碳)存在下

使用氫氣之催化還原，使用無水氟化氫、甲磺酸、三氟甲磺酸、三氟乙酸或該等酸之混合物之酸處理，使用二異丙基乙胺、三乙胺、吡啶、哌嗪之鹼處理，使用含鈉金屬之液氨之還原。藉由上文所提及之酸處理達成之消除反應一般在-20℃至-40℃之溫度下進行，且有利地可在添加陽離子受體(諸如苯甲醚、酚、苯硫基甲烷、間甲酚、對甲酚、二甲硫、1,4-丁二硫醇、1,2-乙二硫醇)之情況下進行。用於保護組胺酸之咪唑基之2,4-二硝基苯基可藉由使用硫酚之處理來消除，而用於保護色胺酸之吲哚基之甲醯基可藉由使用稀氫氧化鈉溶液或稀氨水之鹼處理以及上文所提及之在1,2-乙二硫醇、1,4-丁二硫醇存在下之酸處理來消除。

不應參與可使用之起始物質、保護基之反應之用於保護官能基的方法、移除保護基之方法及活化將參與反應之官能基的方法均可自己知基團及方法中判斷性地選擇。

獲得多肽之醯胺形式之另一方法包含：首先使C端胺基酸之 α -羧基醯胺化，隨後將肽鏈向N側延長直至所需鏈長，且隨後選擇性脫除C端肽之 α -胺基及將形成目標多肽之其餘部分之胺基酸或肽之 α -羧基之保護基，且使 α -胺基及側鏈官能基已在諸如上文提及之混合溶劑中經上文所提及之適合之保護基保護的兩個片段縮合。此縮合反應之參數可與上文所述相同。藉由上述方法將所有保護基自藉由縮合獲得之經保護肽移除，由此得到所需粗肽。此粗肽可藉由已知純化程序純化，且主要部分經凍乾以得到目標醯胺化多肽。為獲得該多肽之酯，使用所需醇使C端胺基酸之 α -羧基縮合，得到胺基酸酯，且隨後進行用於產生醯胺之上述程序。

或者，重組表現方法特別適用。使用宿主細胞(經人工工程改造以包含編碼肽序列之核酸且將轉錄及轉譯該等核酸，且視情況分泌肽至細胞生長培養基中之細胞)之重組蛋白質表現常規用於此項技術

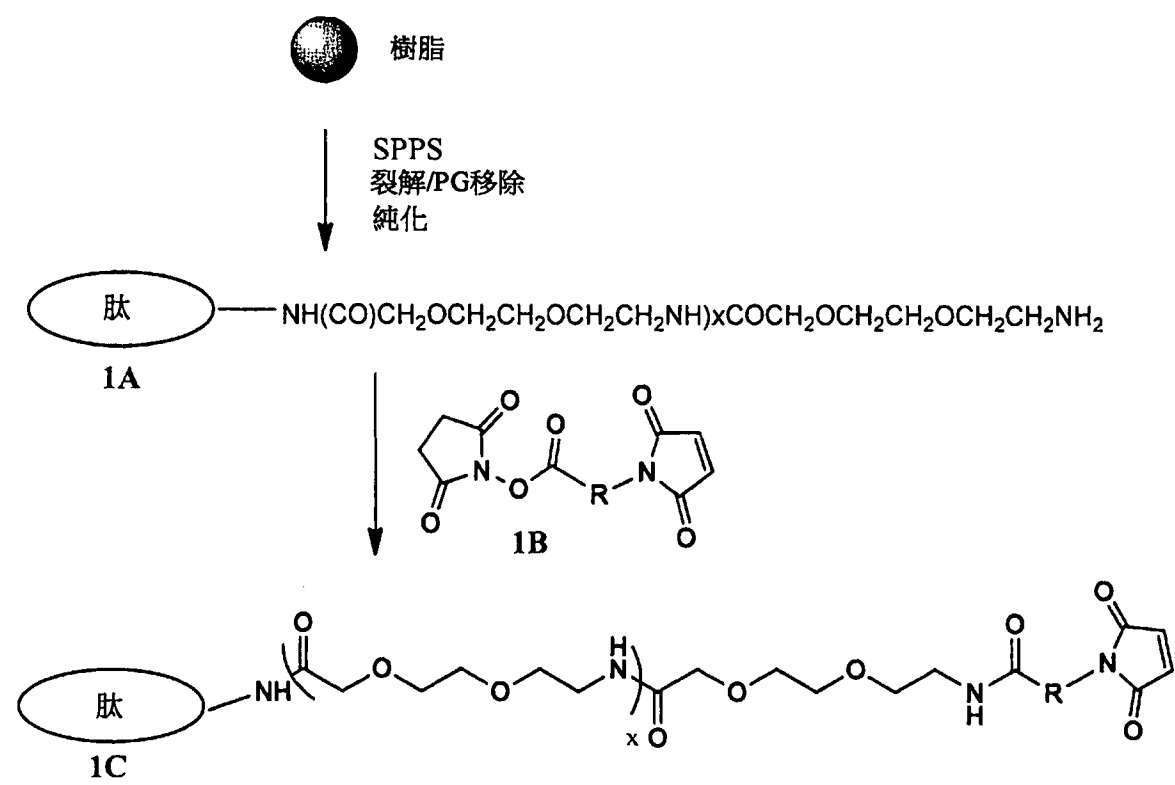
中。對於重組生產方法，編碼肽之胺基酸序列之核酸通常藉由習知方法合成且整合至表現載體中。該等方法尤其較佳用於製造包含與額外肽序列或其他蛋白質或蛋白質片段或結構域融合之肽之多肽組合物。宿主細胞可視情況為選自以下之至少一者：大腸桿菌細胞、COS-1細胞、COS-7細胞、HEK293細胞、BHT21細胞、CHO細胞、BSC-1細胞、Hep G2細胞、653細胞、SP2/0細胞、293細胞、海拉(heLa)細胞、骨髓瘤細胞、淋巴瘤細胞、酵母細胞、昆蟲細胞或植物細胞或其任何衍生之永生化或經轉形細胞。

經修飾之治療性肽或多肽及/或肽-連接子構築體包括可與半衰期延長部分上之可獲得之反應性官能基反應以形成共價鍵的反應性基團。反應性基團為能夠形成共價鍵之化學基團。反應性基團可一般為羧基、磷醯基、醯基、酯或混合酸酐、順丁烯二醯亞胺、醯亞胺酯、吡啶-2-基-二硫基，因此能夠與在白蛋白或Fc結構域之目標位點處之如胺基、羥基、羧基或硫醇基之官能基形成共價鍵。用於連接於白蛋白之尤其受關注之反應性基團包括含有順丁烯二醯亞胺基之基團及含有吡啶-2-基-二硫基之基團。

官能基為白蛋白或Fc結構域上能夠與經修飾肽或多肽上之反應性基團反應以形成共價鍵之基團。官能基包括與酯反應性實體鍵結之羥基、與順丁烯二醯亞胺、含有順丁烯二醯亞胺基之基團或吡啶-2-基二硫基、醯亞胺酯基及硫酯基反應之硫醇基；鍵結於羧酸、磷醯基、醯基之胺基；及與胼、醯胼或羥胺反應之羧基。

流程1至3描述肽-連接子構築體之合成，其中肽為根據式I至IV中任一者之肽。

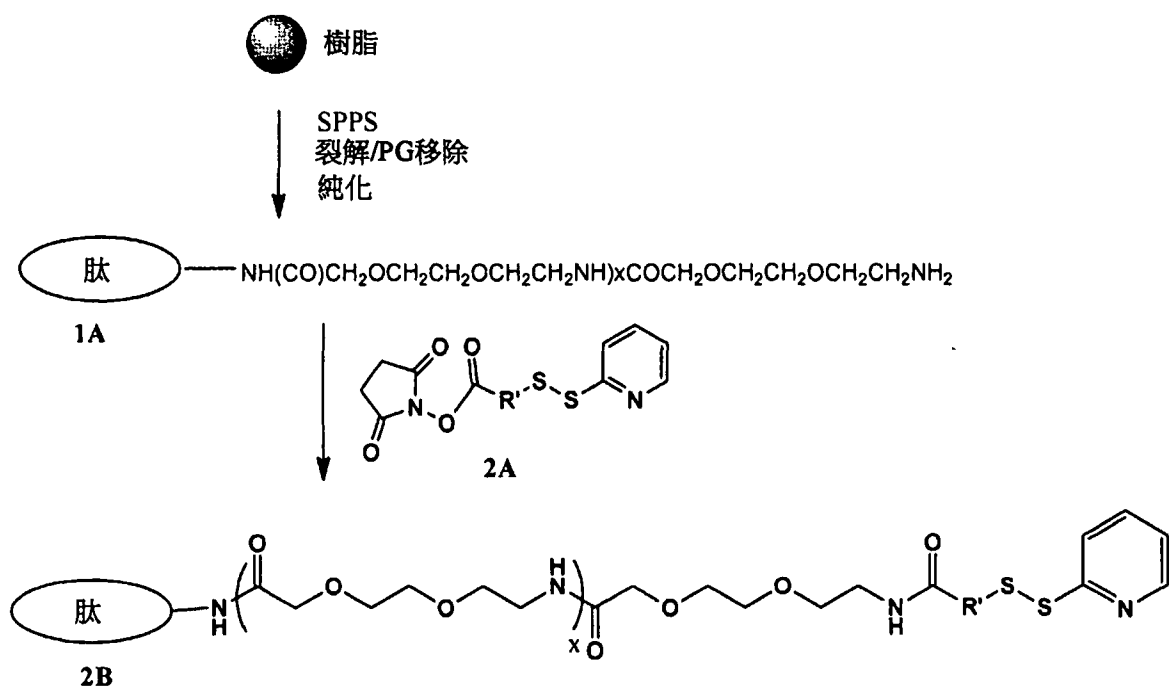
流程1描述附接於式I至IV之多肽之N端之含有順丁烯二醯亞胺之連接子的合成。



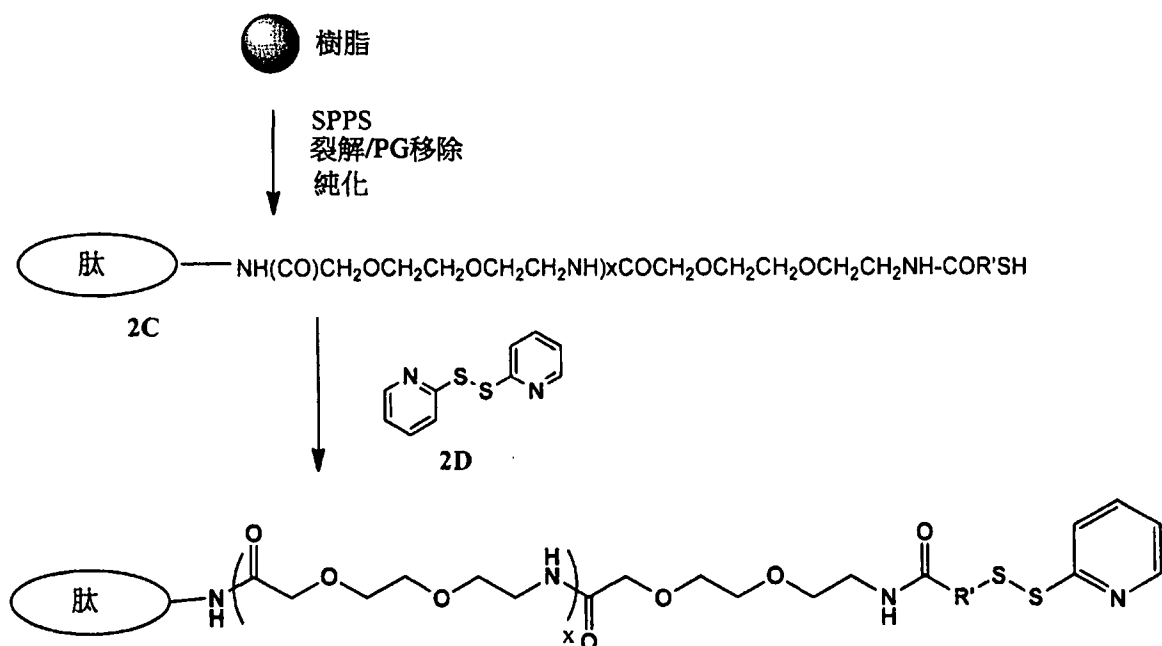
流程 1

根據良好確立之醯胺偶合化學方法使肽之N端與一或多個O2Oc
胺基酸單元(x為1至20，較佳1至10且更佳3至6)偶合以生成(1A)。使
(1A)之末端胺基官能基與經活化酸(1B)反應，其中R為直鏈或分支鏈
伸烷基、芳基、雜芳基、環烷基或其組合，以便生成肽-含有順丁烯
二醯亞胺之連接子構築體(1C)。經活化酸(1B)市售可得或易於根據一
般熟習此項技術者中之一些人已知的技術自其對應羧酸獲得。R較佳
為直鏈伸烷基，且更佳R為-CH₂-CH₂-。或者，對於側鏈中含有胺基官
能基之肽(例如含有離胺酸之肽)，在偶合反應之前需要諸如Alloc之正
交保護基，接著再進行脫除保護基步驟以便獲得(1C)。

流程2A及2B描述附接於根據式I至IV中之任一者之多肽之N端之
含有吡啶-2-基-二硫基之連接子的合成。



流程 2A

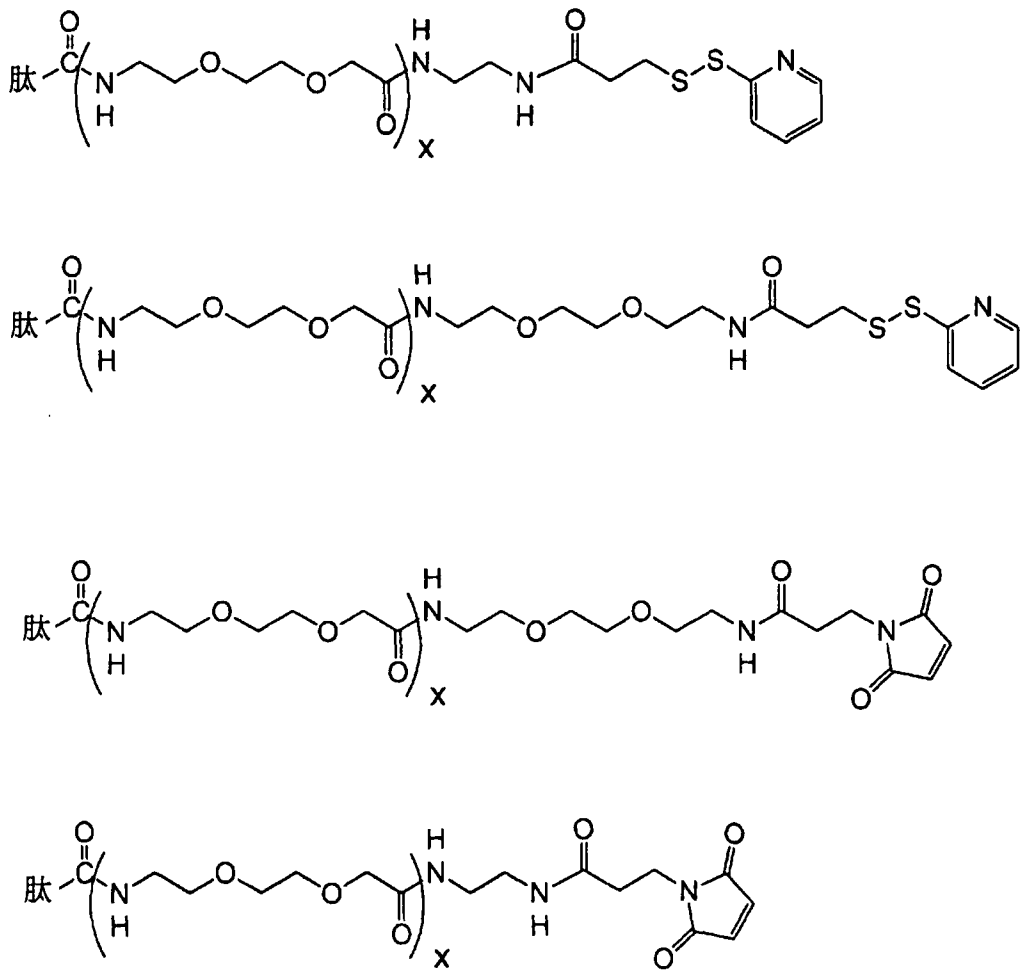


流程 2B

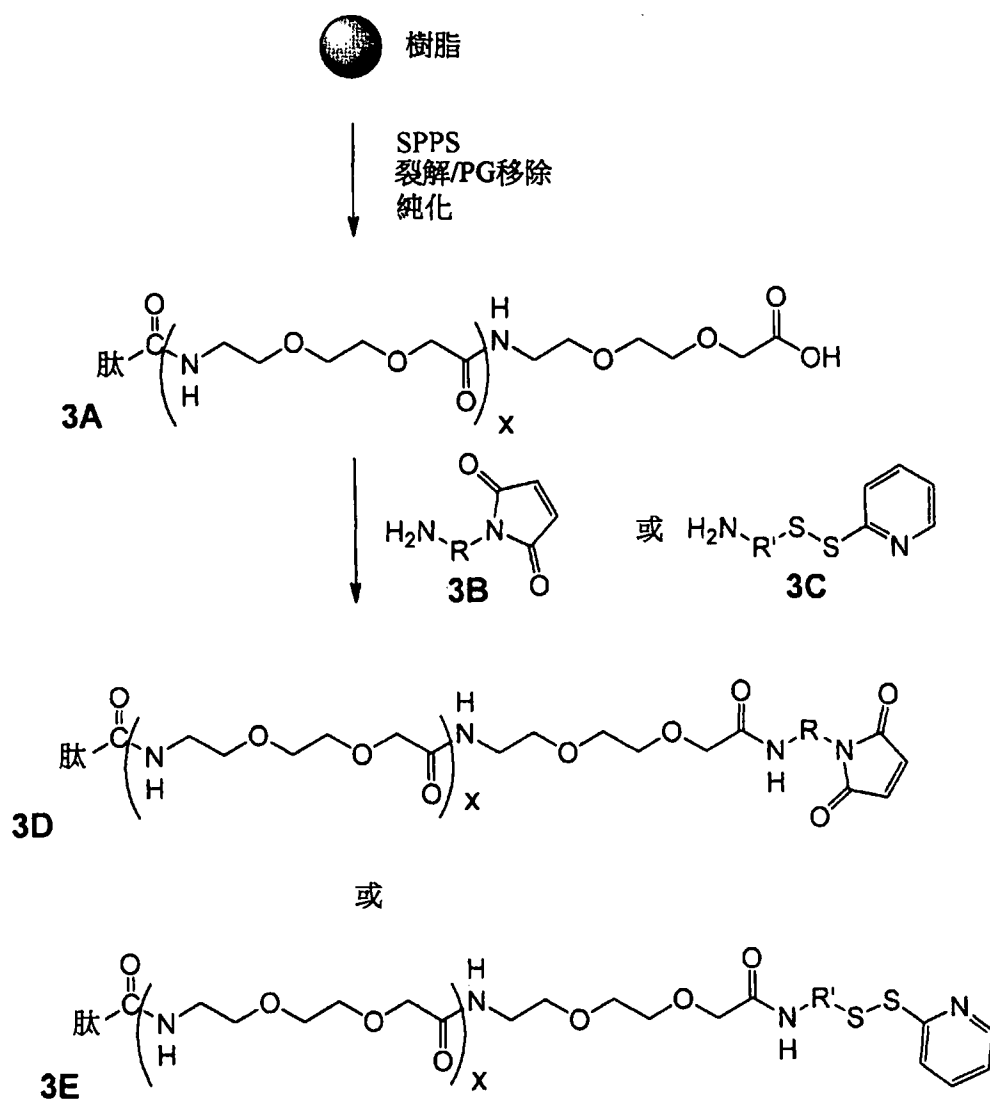
肽-連接子構築體(1A)如流程1中所描述製備，且進一步與式(2A)之經活化酸反應，其中R'為直鏈或分支鏈伸烷基，以生成肽-含有吡啶-2-基-二硫基之連接子構築體(2B)。經活化酸(2A)市售可得或易於根據一般熟習此項技術者中之一些人已知的技術自其對應羧酸獲得。R'較佳為-CH₂-CH₂-。或者，肽-連接子構築體(2C)可使用HO₂C-R'-SH或其經保護形式(例如三苯甲基或Acm基團，需要額外脫除保護基步

驟)來製備，且進一步與(2D)反應以生成肽-含有吡啶-2-基-二硫基之連接子構築體(2B)。

使用二胺單元(諸如-NH-CH₂CH₂-NH-或-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-NH-)，以與流程1、2A及2B中所述之類似方式使類似反應性基團附接於肽之C端。此類肽-連接子轉導物之非限制性實例為：

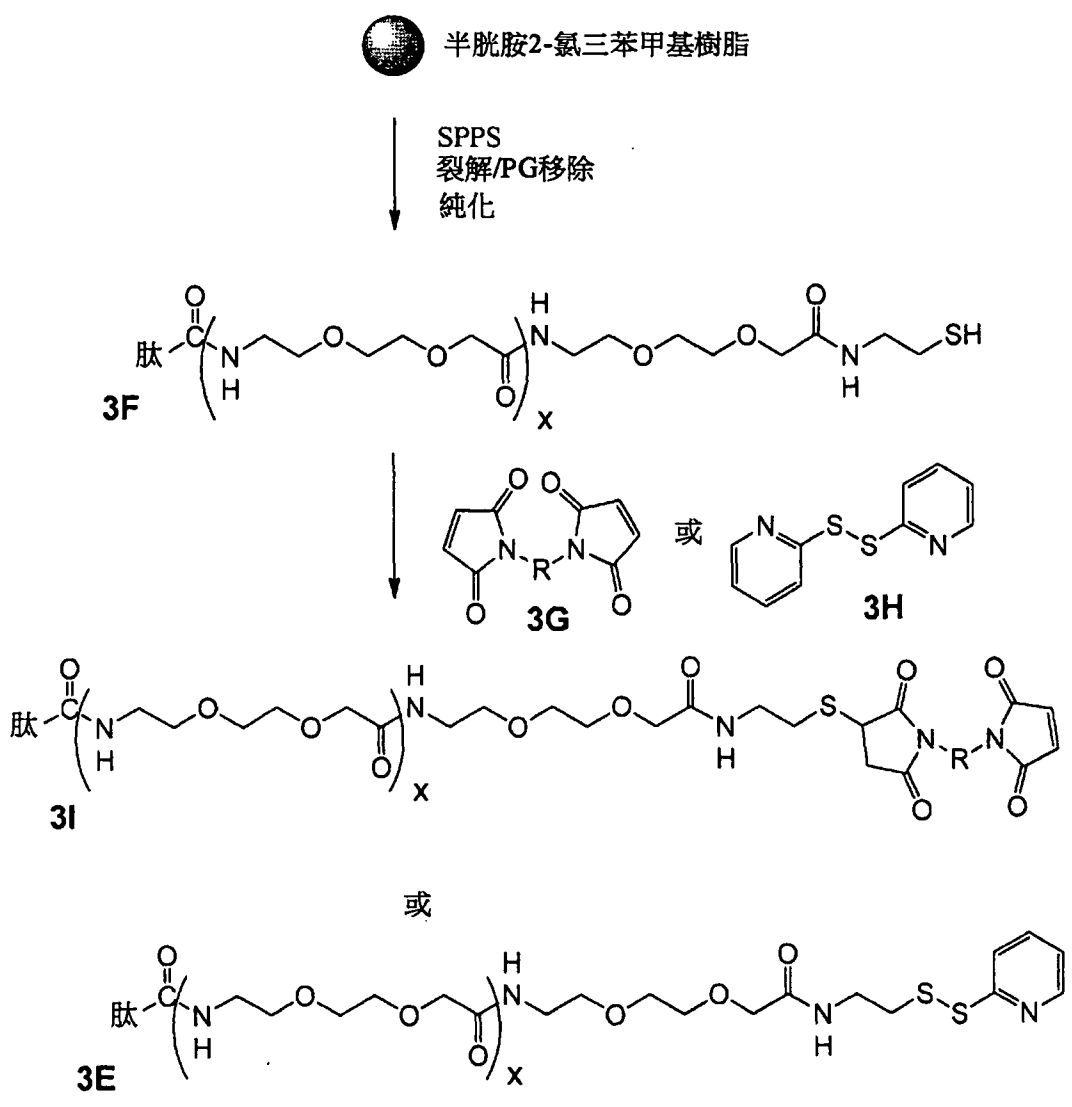


或者，可根據流程3A、3B及3C使順丁烯二醯亞胺或吡啶-2-基-二硫基反應性基團附接於根據式I至IV中之任一者之多肽：



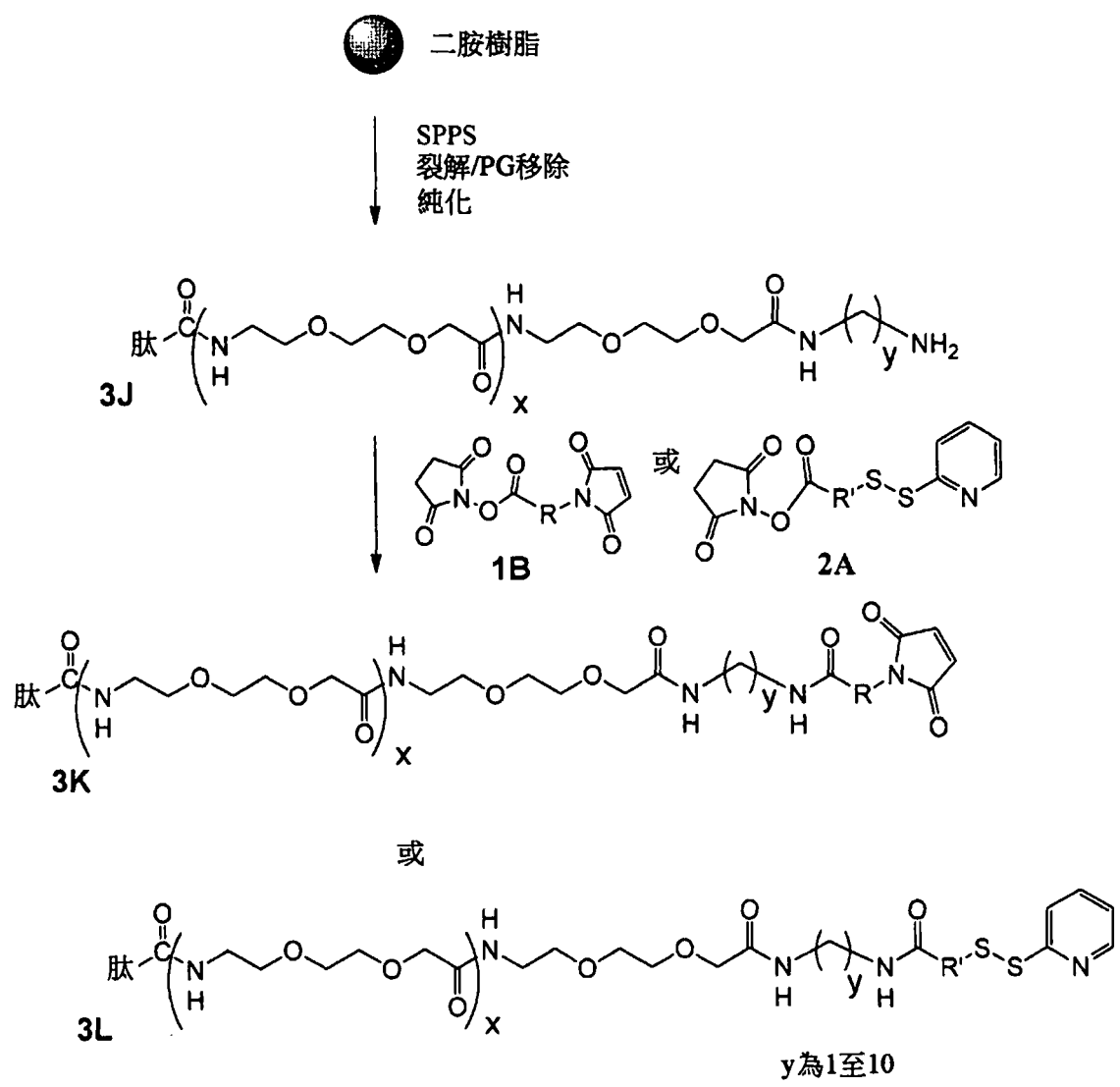
流程3A

使用標準醯胺偶合條件使肽之C端處之羧酸基與一或多個O2Oc胺基酸單元偶合以生成(3A)。末端羧酸官能基與(3B)或(3C)之胺基反應，其中R及R'如上文所定義，以便生成經活化之肽-連接子構築體(3D)或(3E)。另外，當肽含有羧基官能基側鏈(例如Glu或Asp)時，需要正交保護基(例如O-烯丙基)及額外脫除保護基步驟。



流程 3B

肽-連接子構築體 3F 可使用半胱胺2-氯三苯甲基樹脂獲得，且隨後與 3G 或 3H 反應以分別生成肽-連接子構築體 3I 或 3E。

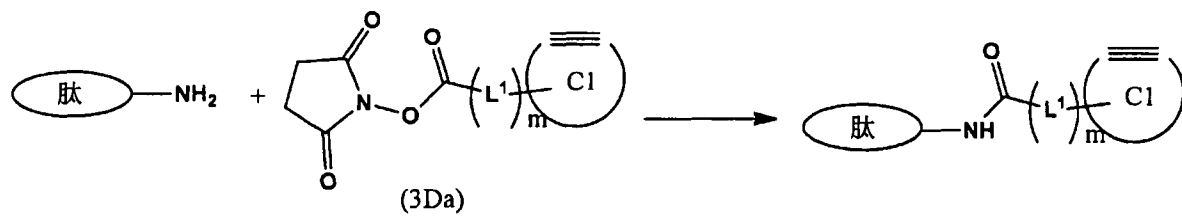


流程3C

肽-連接子構築體(3J)可獲自二胺樹脂且進一步與(1B)或(2A)反應以分別生成式(3K)或(3L)之肽-連接子構築體。

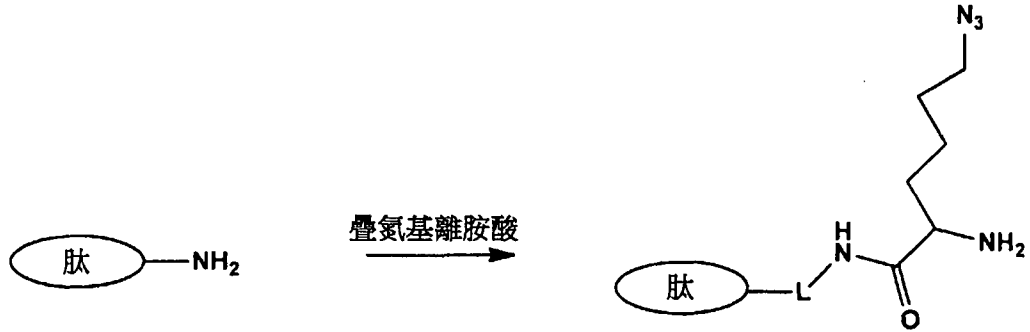
流程1至3C描述肽-連接子構築體，更特定言之用於與白蛋白一起製備生物結合物之肽-連接子構築體。順丁烯二醯亞胺反應性基團及吡啶-2-基-二硫基反應性基團與白蛋白之半胱胺酸34之-SH官能基反應。

流程3D及3E描述用於疊氮化物-炔烴胡伊斯根(Huisgen)環加成，更通常稱為點擊化學法之肽-連接子構築體之製備。



流程3D

其中m為0或1，C1為視情況經氟取代之單、二或三環碳環或雜環系統，L¹為C1-C20伸烷基連接子，其中該伸烷基鏈視情況經側氧基(=O)取代，且其中一或多個碳經O或NH置換。環炔部分(3Da)易於獲自商業來源。此外，用於蛋白質標記之點擊化學法中之環狀炔烴已描述於US 2009/0068738中，其以引用的方式併入本文中。特定實例已在下文描述(實例20)。可在肽之N端處或離胺酸殘基側鏈上引入點擊柄。

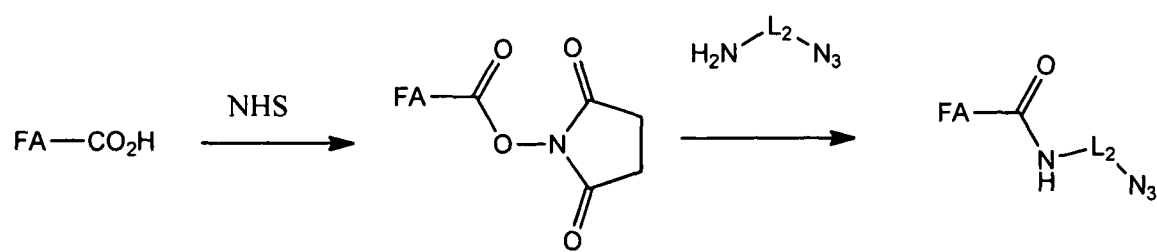


流程3E

流程3E描述在Apelin肽之N端處視情況經由連接子L(諸如一或多個選自甘胺酸及絲胺酸之胺基酸)引入疊氮基離胺酸殘基。疊氮化物官能基充當點擊化學法之柄。特定實例已描述於共同申請之申請案(代理人案號PAT055418-US-PSP2)中。

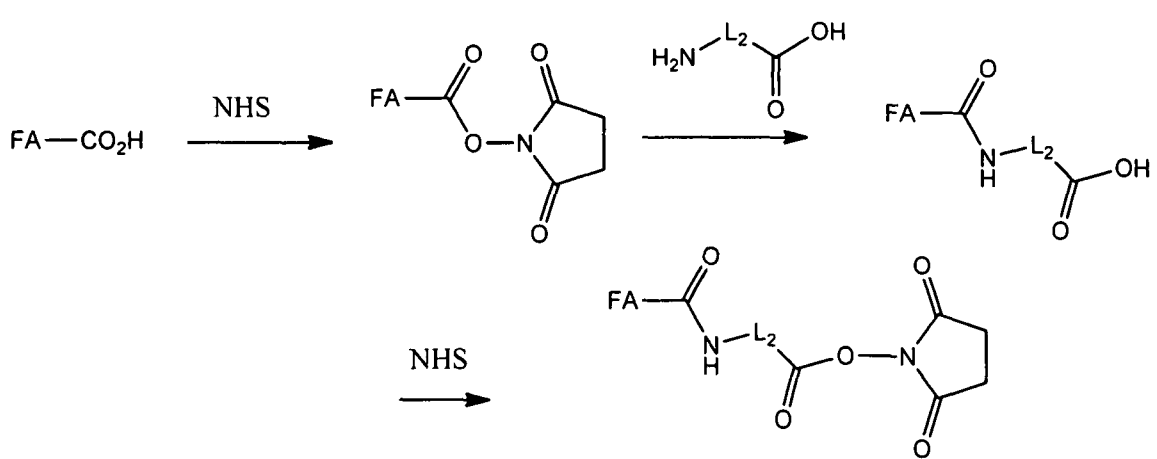
半衰期延長部分-連接子構築體之製備：

流程3F及3G描述脂肪酸-連接子構築體之製備。



流程3F

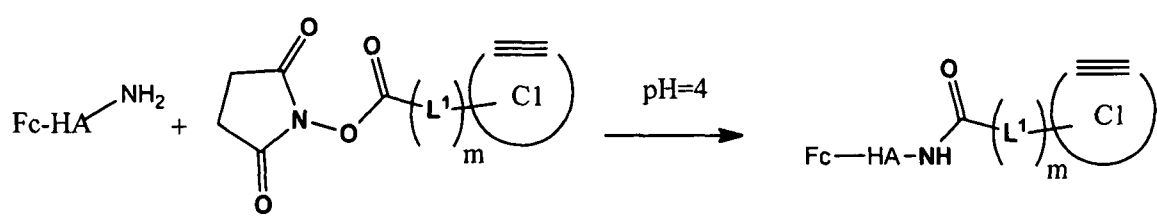
其中FA為脂肪酸，L2為鍵聯部分(例如PEG)，NHS為N-羥基丁二醯亞胺。該等脂肪酸-連接子構築體用於使用點擊化學法結合。在脂肪酸含有諸如羥基或額外羧酸之官能基的情形中，可能需要保護該等官能基。



流程3G

其中FA、NHS及L2係如上文流程3F中所定義。該等脂肪酸構築體用於與肽(較佳N端)上之胺基官能基結合。

流程3H描述Fc-連接子構築體之製備



流程3H

AH-Fc為在Fc之N端含有序列AH-之構築體。該構築體係使用重組方法來製備。AH-序列允許在低pH值下選擇性修飾N端。該選擇性

修飾已揭示於共同申請之申請案(美國臨時申請案第62/015868號：代理人案號PAT056275-US-PSP及美國臨時申請案第62/015862號：PAT056274-US-PSP)中。因此在Fc構築體之N端引入點擊柄。

在另一實施例中，Fc構築體在C端經修飾以引入小轉肽酶識別基元(LPXTG/A)。

該Fc-識別基元係使用重組方法來製備。該構築體之實例為：Fc-[GGGG]_n-LPETGGLEVLFFQGP，其中GGLEVLFFQGP在轉肽酶處理期間經剪除。

Fc APJ肽融合蛋白之製備

以生物學方式生成之多聚化分子，諸如包含稱為鉸鏈之含有半胱氨酸區之至少一部分的抗體Fc可由已呈多聚化(例如二聚體)形式分泌之重組表現蛋白質產物來製備。本發明亦包括經修飾Fc融合蛋白，其中該Fc區之胺基酸序列已相對於天然存在之抗體中發現之Fc區或恆定區之胺基酸序列變化。舉例而言，Fc-融合蛋白可藉由突變經工程改造(亦即經修飾)以便獲得FcRn結合親和力/或血清半衰期之所需特徵。經修飾Fc-融合蛋白之實例已揭示於美國專利第7,217,798號中，其以引用的方式併入。

本發明之Fc-融合蛋白亦可例如藉由附接連接子部分及肽或多肽部分而以合成方式加以改變。此外，具有來源於重組抗體之Fc結構域之「經修飾」Fc-融合蛋白可在包括原核及真核表現系統之任何表現系統中或使用噬菌體呈現方法來製得。

諸如Fc-[GGGGS]、Fc-[GGGGS]₂、Fc-[GGGGS]₃、Fc-GG及Fc-GS之Fc-連接子構築體描述於下文實驗部分中。[GGGGS]、[GGGGS]₂、[GGGGS]₃、GS及GG連接子附接於Fc結構域之C端或Fc結構域之N端，其中Fc為天然Fc或其變異體。Fc變異體之實例包括C端離胺酸已缺失或經丙胺酸置換之Fc。該Fc變異體已描述於共同申請

之申請案(代理人案號PAT055781-US-PSP02)中

生物結合物

在本發明之一個實施例中，根據式I至IV中之任一者之肽或多肽結合(化學/共價附接)於白蛋白之半胱胺酸34之硫醇官能基。在此實施例之一個態樣中，白蛋白-肽係指白蛋白結合(化學連接)於肽之N端之生物結合物。在另一實施例中，白蛋白-肽係指白蛋白結合(化學連接)於肽之C端之生物結合物。

在本發明之另一實施例中，根據式I至IV中之任一者之肽或多肽融合於人類IgG之Fc區之一或多個結構域。抗體包含兩個功能上獨立的部分，亦即稱為「Fab」之結合抗原之可變結構域及稱為「Fc」參與諸如補體活化及藉由吞噬細胞攻擊之效應功能的恆定結構域。Fc具有長血清半衰期，而Fab為短期的(Capon等人, 1989, *Nature* 337: 525-31)。當與治療性肽或多肽接合在一起時，Fc結構域可提供較長半衰期(C. Huang, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2009, 20, 692-699)。

在一個實施例中，Fc-肽係指Fc序列融合於根據式I至IV中之任一者之肽之N端的生物結合物。在另一實施例中，肽-Fc係指Fc序列融合於肽之C端之生物結合物。

Fc區可為天然存在之Fc區或可經改變以改良某些品質，諸如治療品質、循環時間或減少聚集。

蛋白質治療劑藉由與抗體之「Fc」結構域融合之適用修飾詳細論述於PCT公開案第WO 00/024782號中。此文件論述與諸如聚乙二醇(PEG)、聚葡萄糖之「媒劑」或Fc區之鍵聯。

本發明之較佳實施例為包含根據前述實施例中之任一者之肽或多肽及半衰期延長部分之生物結合物，其中該半衰期延長部分為經由連接子融合於式I、III、IV或V之多肽之Fc結構域。在本發明之一個態樣中，連接子具有下式：-[GGGGS]_n-，n為1、2或3或連接子為GG

或GS，且式I、II、III或IV之多肽含有天然存在之胺基酸。適合於與Fc結構域融合之式I、II、III或IV之多肽之實例為：QRPC*LSC*KGPM PF、C*RPRLSC*KGPM PF及QRC*RLSC*KGPM PF。此實施例之一個較佳態樣為如上文所定義之Fc-肽融合之生物結合物，包含經修飾Fc片段(例如FcLALA)及式I至IV中之任一者之肽或多肽，如本文所定義。

在另一實施例中，本發明係關於根據前述實施例中之任一者之生物結合物，其中該半衰期延長部分為C端離胺酸已缺失或經丙胺酸置換之經修飾Fc結構域。

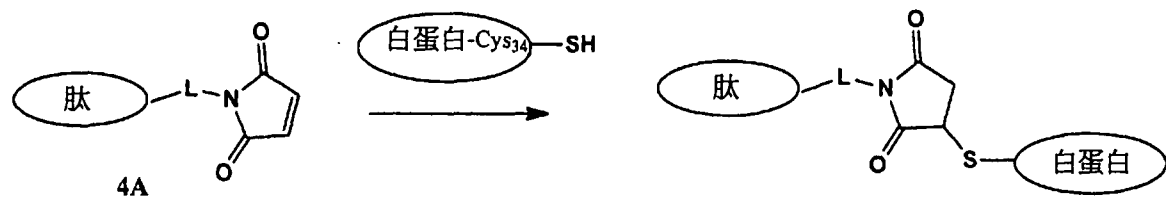
已發現融合於Fc區之肽展現實質上比未融合對應物大的活體內半衰期。此外，與Fc區融合允許多肽二聚化/多聚化。

在本發明之另一實施例中為包含根據式I-IV中之任一者之肽或多肽及半衰期延長部分之生物結合物，其中該半衰期延長部分為化學連接於多肽之Fc結構域。

製備結合物：

流程4及5說明用於使APJ促效劑肽或根據式I至IV中之任一者之肽與半衰期延長部分(諸如Fc結構域或白蛋白)結合之化學反應。

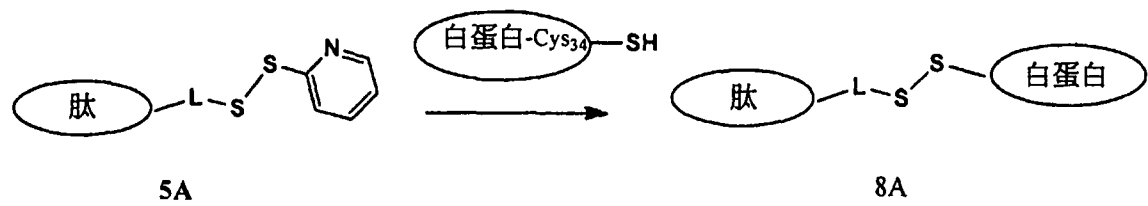
流程4說明式4A之肽-連接子與白蛋白之半胱胺酸34之結合



流程4

其中L表示肽與順丁烯二醯亞胺官能基之間的鍵聯部分。在一個特定實施例中，L為如流程1、3A、3B或3C中所揭示之鍵聯部分。

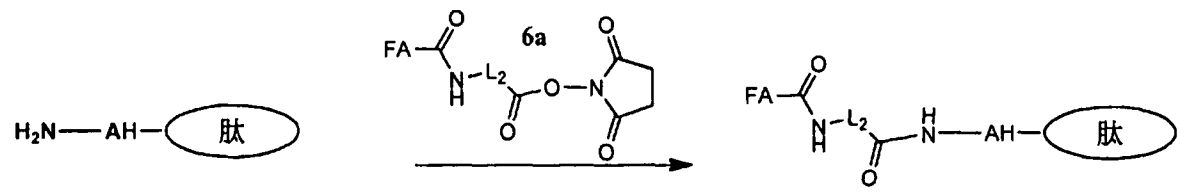
流程5說明式8A之肽-連接子構築體與白蛋白之半胱胺酸34之結合。



流程5

其中L表示肽與-S-S-吡啶官能基之間的鍵聯部分。在一個特定實施例中，L為如流程2、3A、3B或3C中所揭示之鍵聯部分。

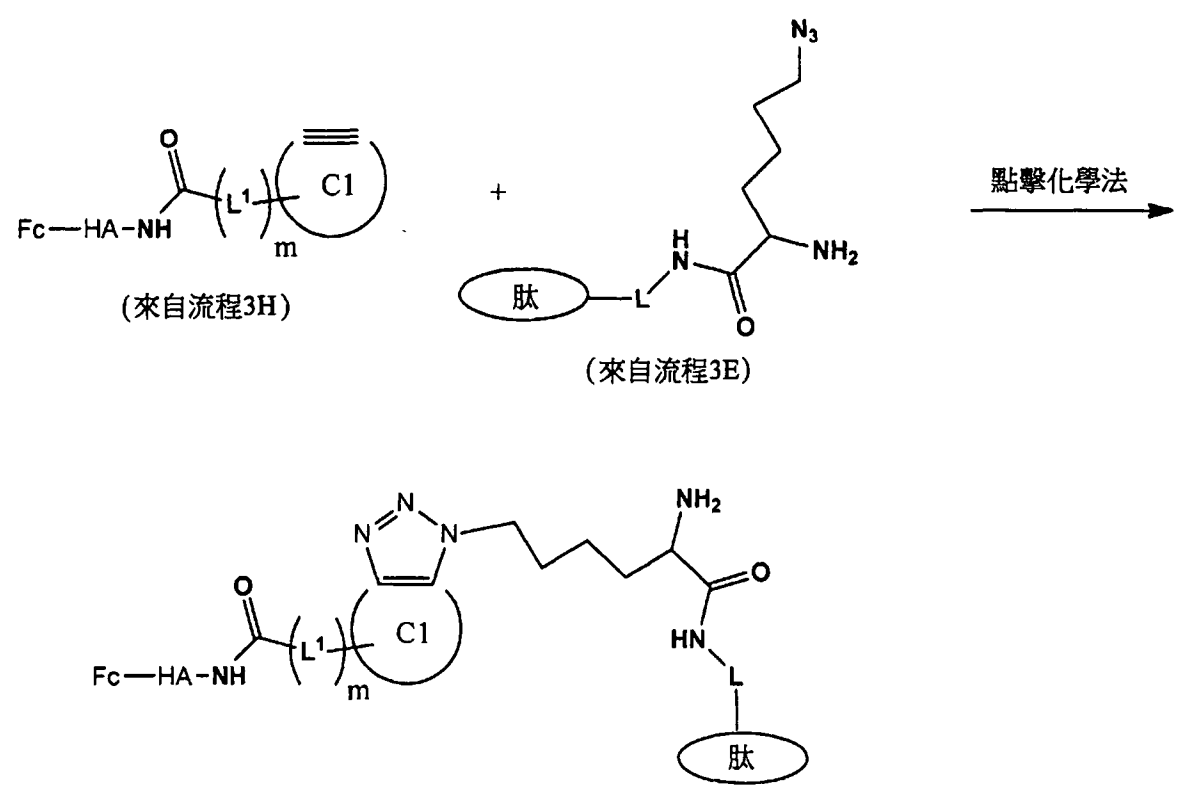
其他結合方法已描述於同在申請中且共同申請之申請案(美國臨時申請案第62/015862號：代理人案號PAT056274-US-PSP、美國臨時申請案第62/015868號：PAT056275-US-PSP及美國臨時申請案第62/015848號PAT055781-US-PSP02)中。該方法包括肽之選擇性N-醯化且概述於流程6中。



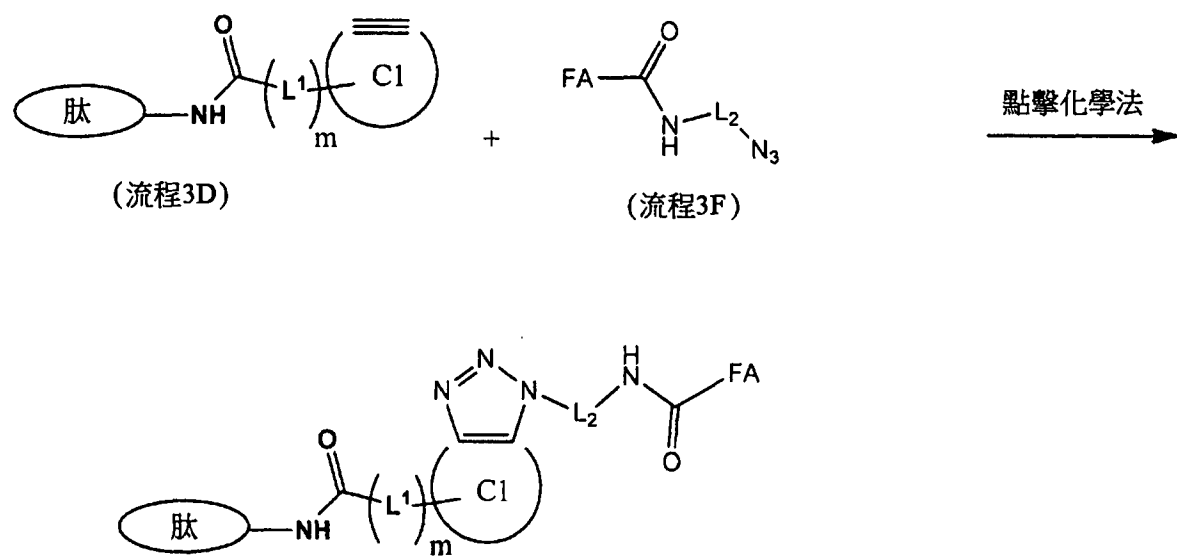
流程6

其中AH-為在肽之N端引入以有助於在N端之反應的连接子，H為組胺酸，A為丙胺酸，FA為如上文所述之脂肪酸，例如式A1至A3之脂肪酸，且L為鍵聯部分(例如PEG鍵聯部分)。當使用低pH值條件時，脂肪酸连接子構築體6a(如流程3G中所示製備)在N端選擇性引入於肽上。該方法已描述於共同申請之專利申請案(美國臨時申請案第62/015868號：代理人案號PAT056275-US-PSP及美國臨時申請案第62/015848號PAT055781-US-PSP02)中。

流程7及8描述使用點擊化學法形成本發明之結合物。



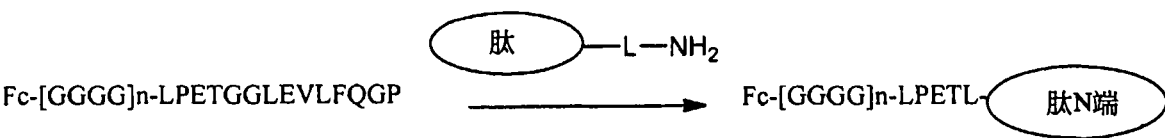
流程 7



流程 8

如流程1-5中所述製造結合物及肽-連接子構築體之方法亦已描述及例示於共同申請之美國申請案(美國臨時申請案第61/858 251號：代理人案號：PAT055326-US-PSP3及美國臨時申請案第61/858303號：PAT055781-US-PSP)中，其以引用的方式併入本文中。

流程9描述APJ肽與Fc構築體使用轉肽酶之結合



其中n為1、2或3，L為視情況選用之連接子(例如聚甘胺酸連接子)

醫藥組合物

本發明之多肽或其醯胺、酯或鹽、或其生物結合物可以多種方式中之任一者投與，包括皮下、肌肉內、靜脈內、腹膜內、鼻內、吸入、經口等。本發明之尤其較佳實施例採用連續靜脈內投與本發明之多肽或其醯胺、酯或鹽或其生物結合物。本發明之多肽或生物結合物可以大丸劑形式或以經一段時間之持續輸注形式投與。可使用可植入式泵。在本發明之某些實施例中，間歇或連續之多肽或生物結合物投與持續一天至數天(例如2-3天或更多天)，或持續更長時段，例如數週、數月或數年。在一些實施例中，提供間歇或連續之多肽投與持續至少約3天。在其他實施例中，提供間歇或連續之多肽或生物結合物投與持續至少約一週。在其他實施例中，提供間歇或連續之多肽或生物結合物投與持續至少約兩週。可能需要在投與期間或多次給藥之投與之間使平均血漿多肽濃度維持在一個特定臨限值以上。可例如基於個體之生理狀況、疾病嚴重性等確定所需濃度。該(等)所需值可藉由進行標準臨床試驗來鑑別。或者，肽及其結合物可經由FcRn機制經口遞送。(Nat Rev Immunol. 7(9), 715-25, 2007; Nat Commun. 3;3:610, 2012, Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 304: G262-G270, 2013)。

在另一態樣中，本發明提供一種醫藥組合物，其包含本發明之多肽或其醯胺、酯或鹽或其生物結合物及一或多種醫藥學上可接受之載劑。醫藥組合物可針對諸如口服投藥、非經腸投藥及經直腸投藥等之特定投藥途徑加以調配。此外，本發明之醫藥組合物可以固體形式(包括(但不限於)膠囊、錠劑、丸劑、顆粒劑、散劑或栓劑)或液體形



式(包括(但不限於)溶液、懸浮液或乳液)製成。醫藥組合物可經受諸如滅菌之習知醫藥操作，及/或可含有習知惰性稀釋劑、潤滑劑或緩衝劑，以及諸如防腐劑、穩定劑、潤濕劑、乳化劑及緩衝劑等之佐劑。

適於可注射使用之醫藥組合物通常包括無菌水溶液(其中水可溶)或分散液及用於無菌可注射溶液或分散液之即用型製備之無菌粉末。

對於靜脈內投與，適合之載劑包括生理食鹽水、抑菌水、Cremophor ELTM (BASF, Parsippany, N.J.)或磷酸鹽緩衝生理食鹽水(PBS)。在所有情況下，該組合物均應為無菌的且應具有流體性至存在易於注射能力之程度。較佳醫藥調配物在製造及儲存條件下為穩定的，且必須經保護以抵抗諸如細菌及真菌之微生物的污染作用。一般而言，相關載劑可為含有例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇及液態聚乙二醇及其類似物)及其適合之混合物之溶劑或分散介質。舉例而言，可藉由使用包衣(諸如卵磷脂)、藉由維持就分散液而言所需粒徑及藉由使用界面活性劑來維持適當之流動性。微生物活動之預防可藉由各種抗細菌及抗真菌劑達成，例如對羥基苯甲酸酯、氯丁醇、酚、抗壞血酸、硫柳汞及其類似物。在許多情況下，組合物中將較佳包括等滲劑，例如糖、多元醇(諸如甘露醇、山梨醇)、氯化鈉。藉由使組合物中包括延遲吸收之藥劑(例如單硬脂酸鋁及明膠)，可實現可注射組合物之延長吸收。

某些可注射組合物為等滲水溶液或懸浮液，且栓劑宜自脂肪乳液或懸浮液製備。該等組合物可經滅菌，及/或含有佐劑，諸如保藏劑、穩定劑、潤濕劑或乳化劑、溶解促進劑、用於調節滲透壓之鹽及/或緩衝劑。此外，其亦可含有其他治療上有價值之物質。該等組合物根據習知混合、粒化或包覆方法分別製備，且含有約0.1%-75%之活性成分或含有約1%-50%之活性成分。

無菌可注射溶液可藉由如下方法來製備：將所需量之活性化合物與上文所列舉之成分中之一者或組合併入適當溶劑中，視需要接著進行過濾滅菌。一般，分散液係藉由將活性化合物併入含有鹼性分散介質及上文所列舉之彼等成分之所需其他成分的無菌媒介中來製備。就用於製備無菌可注射溶液之無菌粉末而言，較佳製備方法為真空乾燥及冷凍乾燥，其由先前無菌過濾溶液產生活性成分加上任何其他所需成分的粉末。

經口組合物一般包括惰性稀釋劑或可食用載劑。出於經口治療性投與之目的，活性化合物可併有賦形劑且以錠劑、糖衣錠或膠囊(例如明膠膠囊)形式使用。經口組合物亦可使用流體載劑來製備以使用作漱口劑。可包括醫藥學上可相容之黏合劑及/或佐劑材料作為組合物之一部分。錠劑、丸劑、膠囊、糖衣錠及其類似物可含有以下成分或具有類似性質之化合物中之任一者：黏合劑，諸如微晶纖維素、黃耆膠或明膠；賦形劑，諸如澱粉或乳糖；崩解劑，諸如褐藻酸、澱粉羥基乙酸鈉或玉米澱粉；潤滑劑，諸如硬脂酸鎂或Sterotes；滑動劑，諸如膠狀二氧化矽；甜味劑，諸如蔗糖或糖精；或調味劑，諸如胡椒薄荷、水楊酸甲酯或橙調味劑。用於經口遞送之調配物宜併有改良胃腸道內之穩定性及/或增強吸收之藥劑。

對於藉由吸入之投與，本發明治療劑較佳自含有適合之推進劑(例如諸如二氧化碳之氣體)之加壓容器或分配器、或噴霧器以氣溶膠噴霧形式遞送。應注意，肺部提供較大表面積以便治療劑之全身遞送。

藥劑可囊封於例如聚合微米粒子(諸如美國公開案20040096403中所述之彼等粒子)中，或與此項技術中已知的多種其他藥物遞送媒劑中之任一者聯合。在本發明之其他實施例中，該等藥劑與如例如美國公開案20040062718中所述之填充脂質聯合來遞送。應注意，後一系

統已用於投與治療性多肽、胰島素，表明此系統用於投與肽劑之效用。

全身性投與亦可藉由經黏膜或經皮方式。

用於經皮施用之適合組合物包括有效量之本發明之多肽與適合載劑。適於經皮遞送之載劑包括可吸收的藥理學上可接受之溶劑，以輔助穿過主體皮膚。舉例而言，經皮裝置呈繃帶形式，其包含襯底部件、含有化合物及視情況存在之載劑的儲集層、視情況存在之在延長時段內以受控制及預定速率將化合物遞送至主體皮膚之速率控制障壁、及使裝置對於皮膚安全之構件。

適用於局部施用於例如皮膚及眼睛之組合物包括水溶液、懸浮液、軟膏、乳膏、凝膠或例如用於由噴霧劑或其類似物遞送之可噴霧調配物。該等局部遞送系統特別適合於經皮施用。因此，其特別適用於此項技術中熟知之局部調配物，包括化妝品。該等調配物可含有增溶劑、穩定劑、張力增強劑、緩衝劑及防腐劑。

如本文所用，局部施用亦可涉及吸入或鼻內施用。其宜以乾粉形式(單獨、作為混合物(例如與乳糖之乾式摻合物)或例如與磷脂之混合組分粒子)自乾粉吸入器遞送，或以噴霧劑噴霧形式，在使用或不使用適合之推進劑的情況下，自加壓容器、泵、噴射器、霧化器或噴霧器遞送。

本發明另外提供醫藥組合物及劑型，其包含一或多種降低作為活性成分之本發明化合物之分解比率的藥劑。在本文中稱為「穩定劑」之該等試劑包括(但不限於)諸如抗壞血酸之抗氧化劑、pH緩衝劑或鹽緩衝劑等。

如本文所用，術語「醫藥學上可接受之鹽」係指保持本發明多肽之生物學有效性及特性之鹽，且其通常並非生物學上或另外不合需要的。在許多情況下，本發明之多肽能夠憑藉胺基及/或羧基或與其

類似之基團的存在而形成酸式鹽及/或鹼式鹽。

醫藥學上可接受之酸加成鹽可用無機酸及有機酸形成，例如乙酸鹽、天冬胺酸鹽、苯甲酸鹽、苯磺酸鹽、溴化物/氫溴酸鹽、碳酸氫鹽/碳酸鹽、硫酸氫鹽/硫酸鹽、樟腦磺酸鹽、氯化物/鹽酸鹽、氯茶鹼鹽(chlorotheophyllonate)、檸檬酸鹽、乙二磺酸鹽、反丁烯二酸鹽、葡庚糖酸鹽、葡糖酸鹽、葡萄糖醛酸鹽、馬尿酸鹽(hippurate)、氫碘酸鹽/碘化物、羥乙磺酸鹽、乳酸鹽、乳糖酸鹽、月桂基硫酸鹽、蘋果酸鹽、順丁烯二酸鹽、丙二酸鹽、杏仁酸鹽、甲磺酸鹽、甲基磺酸鹽、萘甲酸鹽(naphthoate)、萘磺酸鹽、菸鹼酸鹽、硝酸鹽、十八酸鹽、油酸鹽、草酸鹽、棕櫚酸鹽、雙羥萘酸鹽、磷酸鹽/磷酸氫鹽/磷酸二氫鹽、聚半乳糖醛酸鹽、丙酸鹽、硬脂酸鹽、丁二酸鹽、磺基水楊酸鹽、酒石酸鹽、甲苯磺酸鹽及三氟乙酸鹽。

可衍生鹽之無機酸包括例如鹽酸、氫溴酸、硫酸、硝酸、磷酸及其類似物。可衍生鹽之有機酸包括例如乙酸、丙酸、乙醇酸、草酸、順丁烯二酸、丙二酸、丁二酸、反丁烯二酸、酒石酸、檸檬酸、苯甲酸、杏仁酸、甲磺酸、乙磺酸、甲苯磺酸、磺基水楊酸及其類似物。醫藥學上可接受之鹼加成鹽可用無機鹼及有機鹼形成。

可衍生鹽之無機鹼包括例如銨鹽及週期表之第I行至第XII行之金屬。在某些實施例中，鹽衍生自鈉、鉀、銨、鈣、鎂、鐵、銀、鋅及銅；特別適合之鹽包括銨鹽、鉀鹽、鈉鹽、鈣鹽及鎂鹽。

可衍生鹽之有機鹼包括例如一級胺、二級胺及三級胺；包括天然產生之經取代之胺的經取代之胺；環胺；鹼離子交換樹脂及其類似物。某些有機胺包括異丙胺、苄星(benzathine)、膽茶鹼(choline)、二乙醇胺、二乙胺、離胺酸、葡甲胺、哌嗪及緩血酸胺。

本發明之醫藥學上可接受之鹽可藉由習知化學方法由母體化合物、鹼性或酸性部分來合成。一般，該等鹽可藉由使此等化合物之游

離酸形式與化學計算量之適當鹼(諸如Na、Ca、Mg或K之氫氧化物、碳酸鹽、碳酸氫鹽或其類似物)反應，或藉由使此等化合物之游離鹼形式與化學計算量之適當酸反應來製備。該等反應通常於水中或有機溶劑中，或於兩者之混合物中進行。一般，在可實行時，需要使用如乙醚、乙酸乙酯、乙醇、異丙醇或乙腈之非水性介質。其他適合之鹽之清單可見於例如「Remington's Pharmaceutical Sciences」，第20版，Mack Publishing Company, Easton, Pa., (1985)；及「Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use」Stahl及Wermuth (Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2002)中。

如本文所用，術語「醫藥學上可接受之載劑」包括如熟習此項技術者已知的任何及所有溶劑、分散介質、包衣、界面活性劑、抗氧化劑、防腐劑(例如抗細菌劑、抗真菌劑)、等張劑、吸收延遲劑、鹽、防腐劑、藥物、藥物穩定劑、黏合劑、賦形劑、崩解劑、潤滑劑、甜味劑、調味劑、染料，及其類似物及其組合(參見例如，Remington's Pharmaceutical Sciences, 第18版，Mack Printing Company, 1990, 第1289-1329頁)。除非任何習知載劑與活性成分不相容，否則考慮將其用於治療或醫藥組合物中。

本發明之方法：

肽之Apelin家族為G蛋白偶聯APJ受體之唯一已知的天然配位體家族。Apelin基因編碼含77個胺基酸之多肽，其經加工成Apelin肽之生物活性形式，諸如Apelin-36、Apelin-17、Apelin-16、Apelin-13、Apelin-12及Apelin-13之焦麩胺酸鹽修飾形式(Pyr¹-Apelin-13)。此等Apelin肽中之任一者在結合於APJ受體時均經由Gi及Gq蛋白轉導信號。在心肌細胞中，Gi或Gq偶聯導致細胞內pH值、PLC活化及IP3產生方面之變化，該等變化使肌絲鈣敏感度增強且最終導致心肌收縮性增加。Gi偶聯抑制活化Gs、腺苷酸環化酶及cAMP產生，且增加pAkt

含量，引起心臟保護。在血管內皮細胞中，經由Gi、pAKT達成之APJ活化導致氧化氮(NO)產生增加，其使平滑肌鬆弛度增加，導致整體血管擴張。

患有慢性穩定性心臟衰竭之患者具有失代償之偶發性急性事件，其中心肌收縮性進一步降低且症狀惡化。此等惡化稱為急性失代償心臟衰竭(ADHF)。針對ADHF之現有療法包括利尿劑、血管擴張劑及收縮影響劑，其直接增加心肌收縮性。現有靜脈內收縮影響劑(多巴酚丁胺、多巴胺、米利酮、左西孟旦)因其不良事件(諸如心律不整及長期死亡率增加)而為人所熟知。本發明之合成Apelin多肽類似物或其生物結合物提供一種用於ADHF之療法，其增加心肌收縮性而無心律不整或死亡傾向，且解決慢性心臟衰竭中未滿足的巨大醫藥需求。

實際上，人類之急性Apelin治療(5分鐘)引起冠狀血管擴張及心輸出量改良。然而，天然Apelin展現出極短 $t_{1/2}$ (數秒)及活體內作用持續時間(幾分鐘)。本發明之強效合成Apelin肽促效劑或其生物結合物與天然Apelin相比具有較長半衰期。

心肌細胞中之APJ受體之活化a)經由Gi/Gq、PLC及Ca²⁺改良心肌收縮性，及b)經由Gi、pAkt活化提供心臟保護，但不增加cAMP(如在其他收縮影響劑之情況下所見)。此外，內皮細胞中之APJ促效作用導致動脈血管擴張，其進一步藉由解除左心室之工作而有益於心臟衰竭。綜合而言，合成Apelin多肽類似物可改良整體心臟功能，減少心律不整發生，且提供生存益處。

最近，已有多個聚焦Apelin在糖尿病及胰島素抗性方面之潛在涉及的臨床前研究出版物。Apelin已顯示1)藉由改良肌肉、脂肪及心臟中之葡萄糖吸收降低血糖含量，2)保護胰腺β細胞免於ER應激及隨後凋亡，3)降低β細胞中之胰島素分泌，及4)調節脂肪組織中兒茶酚胺誘導之脂肪分解。此等方法中已牽涉到pAKT路徑之活化。

根據式I至IV中之任一者之多肽或其醫藥學上可接受之鹽、或其呈游離形式或呈醫藥學上可接受之鹽形式之生物結合物展現有價值的藥理學特性，例如APJ受體促效特性，例如如隨後部分中提供之活體外及活體內測試所指示，且因此指示用於療法。

本發明之多肽或其醫藥學上可接受之鹽或其生物結合物可適用於治療選自如下疾病之適應症：急性失代償心臟衰竭(ADHF)、慢性心臟衰竭、肺高血壓、心房纖維性顫動、布魯加達症候群、心室性心搏過速、動脈粥樣硬化、高血壓、再狹窄、缺血性心血管疾病、心肌病、心臟纖維化、心律不整、水滯留、糖尿病(包括妊娠期糖尿病)、肥胖症、周邊動脈疾病、腦血管意外、短暫性缺血性發作、創傷性腦損傷、肌萎縮性側索硬化、燒傷(包括曬傷)及子癇前症。

因此，作為另一實施例，本發明提供式I至IV中之任一者之多肽或其醯胺、酯或鹽、或其生物結合物之用途，其係用於治療與APJ受體活性相關之疾病。在另一實施例中，療法係選自對APJ受體之促效作用有反應之疾病。在另一實施例中，疾病係選自前文提及之清單，宜為急性失代償心臟衰竭。在此實施例之另一子集中，本發明提供式I至IV中之任一者之多肽或其醯胺、酯或鹽、或其生物結合物之用途，其係用於製造用於治療與APJ受體活性相關之疾病之藥劑。

因此，作為另一實施例，本發明提供式I至IV中之任一者之多肽或其醯胺、酯或鹽、或其生物結合物之用途，其係用於療法。在另一實施例中，療法係選自可藉由APJ受體之活化(促效作用)治療之疾病。

在另一實施例中，本發明提供一種治療對APJ受體之促效作用有反應之疾病的方法，其包含投與治療上可接受之量之式I至IV中之任一者之多肽或其醯胺、酯或鹽、或其生物結合物。在另一實施例中，疾病係選自前文提及之清單，宜為急性失代償心臟衰竭。

在此實施例之另一子集中，本發明提供一種治療與APJ受體活性相關之疾病的方法，其包含投與治療上可接受之量之式I至IV中之任一者之多肽或其醯胺、酯或鹽、或其生物結合物。

治療上待採用之本發明之醫藥組合物或組合的有效量將視例如治療環境及目標而定。熟習此項技術者應瞭解，治療之適當劑量水準因此將部分視所遞送分子、使用融合蛋白變異體之適應症、投藥途徑及患者之尺寸(體重、體表或器官尺寸)及/或狀況(年齡及整體健康)而變化。因此，臨床醫師可滴定劑量並修改投藥途徑以獲得最佳治療效應。典型劑量可在約0.1 $\mu\text{g/kg}$ 至高達約100 mg/kg 或100 mg/kg 以上之範圍內變化，視上文所提及之因素而定。在其他實施例中，劑量可在0.1 $\mu\text{g/kg}$ 至高達約100 mg/kg ；或1 $\mu\text{g/kg}$ 至高達約100 mg/kg 範圍內變化。

給藥頻率將視所用調配物中之雙功能蛋白質的藥物代謝動力學參數而定。通常，臨床醫師投與組合物直至達到達成所需效應之劑量。因此，可以單次劑量或隨時間推移以兩次或兩次以上之劑量(其可含有或可不含相同量之所需分子)或經由植入裝置或導管以連續輸注形式投與組合物。適當劑量之進一步優化常規由一般熟習此項技術者來進行且在一般熟習此項技術者常規進行之任務的範圍內。可經由使用適當劑量-反應資料來確定適當劑量。

本發明之多肽或其生物結合物之術語「治療有效量」係指會引發個體之生物學或醫學反應，例如改善症狀、緩解病狀、減緩或延遲疾病進展或預防疾病等之本發明之多肽(或生物結合物)之量。在一個非限制性實施例中，術語「治療有效量」係指當投與個體時有效(1)至少部分緩解、抑制、預防及/或改善(i)藉由APJ受體之活化改善、或(ii)與APJ受體活性相關、或(iii)藉由APJ受體之異常活性表徵之病狀、病症或疾病或其症狀；或(2)活化APJ受體之本發明之多肽之量。

在另一非限制性實施例中，術語「治療有效量」係指當投與細胞或組織或非細胞生物材料或培養基時，有效至少部分活化APJ受體之本發明之多肽之量。如一般熟習此項技術者應瞭解，有效之特定藥劑之絕對量可視諸如所需生物學終點、待遞送之藥劑、目標組織等因素而變化。一般熟習此項技術者理解，「治療有效量」可以單次劑量投與或可藉由投與多次劑量而達成。舉例而言，在治療心臟衰竭之藥劑的情況下，有效量可為足以產生患者之臨床改良(例如運動耐量/能力提高、血壓上升、液體瀦留減少及/或關於心臟功能(例如射血分數、運動能力(達至力竭之時間)之定量測試的結果改良等)之量。

如本文所用，術語「個體」係指動物。動物通常為哺乳動物。個體亦指例如靈長類(例如，人類)、母牛、綿羊、山羊、馬、狗、貓、兔子、大鼠、小鼠、魚、鳥及其類似物。在某些實施例中，個體為靈長類。在其他實施例中，個體為人類。

如本文所用，術語「抑制(inhibit、inhibition或inhibiting)」係指減少或遏止既定病狀、症狀、或病症、或疾病，或顯著減少生物活動或過程之基線活性。

如本文所用，術語「治療(treat、treating或treatment)」任何疾病或病症在一個實施例中係指改善疾病或病症(亦即，減緩或阻止或減少疾病或其至少一種臨床症狀的發展)。在另一實施例中，「治療」係指緩解或改善至少一個生理參數，包括患者可能無法辯別之生理參數。在另一實施例中，「治療」係指身體上(例如，穩定可辯別之症狀)、生理上(例如穩定生理參數)或兩方面上調節疾病或病症。在另一實施例中，「治療」係指預防或延緩疾病或病症之起始或發展或進展。

如本文所用，術語「預防(prevent、preventing及prevention)」係指預防個體之病症之一或多個症狀的復發、發作或發展，該預防由投

與療法(例如治療劑)或投與療法之組合(例如治療劑之組合)產生。

如本文所用，若個體在生物學、醫學或生活質量上將受益於治療，則該個體「需要」該治療。

如本文所用，除非本文中另外指明或與上下文明顯矛盾，否則本發明之上下文中(尤其在申請專利範圍之上下文中)所用的術語「一(a/an)」、「該」及類似術語應解釋為涵蓋單數及複數兩者。

除非本文另外指明或與上下文明顯矛盾，否則本文所述之所有方法可以任何適合順序進行。使用本文提供之任何及所有實例或例示性語言(例如「諸如」)僅意欲較佳闡明本發明，而不對以其他方式主張的本發明之範疇造成限制。

根據本發明之多肽之活性可藉由下文描述之以下活體外方法評估。

hAPJ鈣通量分析：

將Chem-5 APJ穩定細胞(Millipore # HTS068C)以每孔25 μ L生長培養基中含10,000個細胞接種於384孔格式中，隨後在37°C組織培養恆溫箱中生長24小時。在分析前一小時，添加25微升/孔FLIPR Calcium 4染料(Molecular Devices R8142)與2.5 mM丙磺舒(probenecid)，且在37°C組織培養恆溫箱中培育細胞一小時。將肽溶解於HBSS、HEPES及0.1%BSA緩衝液中，且一式三份地自50 μ M至5 pM連續稀釋10倍。使用FLIPR Tetra將肽添加至具有染料之細胞中(1:5，最終肽濃度範圍介於10 μ M至1 pM)。細胞內之FLIPR染料在結合於鈣後發射螢光，而來自細胞外部之螢光經遮蔽。在FLIPR Tetra上使用470-495激發波長及515-575發射波長量測螢光。在肽添加前10秒時開始進行讀數，總共持續3分鐘。針對各肽濃度計算最大-最小值且進行標繪，且使用GraphPad prism軟體針對由肽達成之鈣通量刺激計算曲線反曲點處之EC₅₀值。

血漿穩定性分析：

材料：

工作溶液：在Milli-Q水中製備1 mg/mL測試物品

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

血漿：雄性史-道二氏大鼠(Sprague-Dawley rat)血漿(具有肝素鈉)，購買自Bioreclamation LLC (Liverpool, NY)。

全血：雄性史-道二氏大鼠全血(具有肝素鈉)，購買自Bioreclamation LLC (Liverpool, NY)

肺組織勻漿：雄性史-道二氏大鼠肺購買自Bioreclamation LLC (Liverpool, NY)。添加5倍體積的1X PBS後，使用polytron勻漿機使肺勻漿化。在4°C下以9000 rpm使勻漿離心10分鐘。再以3000 rpm使上清液離心30分鐘，得到透明上清液。使用市售套組(Pierce, Thermo Scientific)測定蛋白質濃度。

樣品製備程序：(肽)

在以下生物基質中之一者中製備測試物品：肝素化大鼠血漿、肝素化大鼠全血或肺組織勻漿。藉由添加5 µL 1 mg/mL工作溶液至995 µL大鼠血漿或全血中來以5000 ng/mL製備血漿及全血樣品。肺組織勻漿樣品藉由如下方法製備：用磷酸鹽緩衝生理食鹽水(PBS)將肺組織勻漿稀釋至1 mg/ml蛋白質濃度，接著添加5 µL工作溶液至995 µL稀釋肺組織勻漿中。在水浴恆溫箱中於37°C下伴隨輕微震盪(65~75 rpm)培育樣品。在時間0分鐘、5分鐘、15分鐘、30分鐘、60分鐘、120及240分鐘時，將培育樣品之25 µL等分試樣轉移至96孔板中，且緊接著使用150 µL提取溶液沈澱蛋白質。在培育實驗完成後，在4°C下以4000 rpm使樣品培養板離心10分鐘。隨後，使用吸液裝置(Tecan Temo)將上清液轉移至另一培養板，且向所有樣品中添加50 µL水。使

培養板渦旋，隨後進行LC-MS分析。

樣品製備程序(結合物)

藉由添加5 μ L 1 mg/mL工作溶液至495 μ L大鼠血漿中來以50,000 ng/mL製備測試物品。在水浴恆溫箱中於37°C 下伴隨輕微震盪(65~75 rpm)培育樣品。在時間0小時、0.5小時、1小時、2小時、4小時、6及24小時，將培育樣品之50 μ L等分試樣轉移至96孔板中，且向各樣品中添加100 μ L 40 mM TCEP (參(2-羧乙基)膦)。在37°C 下培育反應混合物1小時。在反應完成後，使用300 μ L乙腈進行蛋白質沈澱。在4°C 下以4000 rpm使樣品培養板離心10分鐘。隨後，使用吸液裝置(Tecan Temo)將125 μ L上清液轉移至另一培養板，且向所有樣品中添加50 μ L 水。使培養板渦旋，隨後進行LC-MS分析。

穩定性樣品之LC-MS分析

HPLC：具有自動進樣器之Agilent 1290 HPLC

管柱：MAC-MOD ACE C18, 3 μ m, 30mm $\times$ 2.1mm i.d.

移動相A：含0.1%甲酸之乙腈

移動相B：含0.1%甲酸之水

梯度程式：

時間(min)	流量(mL)	移動相A(%)	移動相B(%)
0	0.4	95	5
0.5	0.4	95	5
1.5	0.4	5	95
4.1	0.4	5	95
4.2	0.4	95	5
5	0.4	95	5

質譜儀：Agilent Q-TOF 6530

資料獲取模式：在100-1000 m/z之質量範圍下全掃描

資料獲取及分析軟體：MassHunter

資料分析：

穩定性分析：穩定性半衰期($t_{1/2}$)值藉由將各時間點處之峰面積轉化成相對於初始($t = 0$)峰面積之剩餘百分比來測定。

剩餘百分比 = $100 \times (\text{樣品峰面積}) \div (t = 0 \text{ 峰面積})$

針對樣品時間計算且標繪剩餘百分比的自然對數值(Microsoft Excel)。藉由線性回歸確定此直線之斜率 k (Microsoft Excel)。

隨後藉由式 $t_{1/2} = 0.693 \div k$ 計算穩定性半衰期。

基於代替活性之血漿穩定性分析：

遵循上述鈣通量方案，且有以下變化。同樣用5%大鼠血漿 (Bioreclamation # RATPLNAHP-M，經肝素鈉處理) 培育肽。在37°C 組織培養恆溫箱中培育後，在時間點 t_0 及 t_{24} 小時獲取讀數。藉由計算以下公式估算以分鐘為單位之肽血漿半衰期：

- 1) $LN((t_0\text{-之} EC_{50}) / (t_{24\text{小時}}\text{-之} EC_{50}))$ ，
- 2) 計算以上值的斜率及
- 3) $t_{1/2} = 0.693 / (\text{斜率}^2)$ 。

使用測試分析(如上所述)，本發明之多肽展現出根據表2及3之功效及穩定性，提供於下文。

表2：多肽之活性及穩定性

肽	hAPJ Ca^{2+} 通量 EC ₅₀ [nM]	基於代替活性之血漿穩定性 $t_{1/2}$ [min]
實例1	9.4	8
實例2	3.2	39
實例3	64.5	n.d.
實例4	74.6	506
實例5	1.6	5.0
實例6	21.4	5
實例7	11.8	9
實例8	13.1	662.5
實例9	23.4	109.2
實例10	46.9	57.4

實例11	32.2	32.8
實例12	21.4	10
實例13	12.2	10
實例14	48.7	7.5
實例15	193.5	17.7
實例16	14.1	7
實例17	410.3	11.4
實例18	174	50
實例19	79.3	50
實例20	1.0	11.9
實例21	2.9	>1000
實例22	3.3	>1000
實例23	72.2	3157
實例24	85.8	1699
實例25	227	>1000
實例26	2292	52
實例27	86.5	82
實例28	3.1	13
實例29	4.2	705.0
實例30	0.4	660.7
實例31	0.5	43.1
實例32	3.0	>1000
實例33	1.9	>1000
實例34	0.6	>1000
實例35	2.0	155.0
實例35	66.7	8
實例36	4.2	34
實例37	937	47
實例38	175	41
實例40	2479	>1000
實例41	839	>1000
實例42	16.3	>1000
實例43	28.9	>1000
比較實例： Pyr1-Apelin-13	1.8	5.0

表3：血漿穩定性分析與基於代替活性之血漿穩定性分析之間的相關性：

肽	血漿穩定性t½ [min]	基於代替活性之血漿穩定性t½ [min]
Pyr-1-Apelin 13	6.6	5.0
實例32	377	>1000

本發明之多肽或其生物結合物可具有與Apelin-13或pyr-1-Apelin-

13類似之APJ受體效能。在一個實施例中，本發明之多肽或其生物結合物具有小於100 nM之 EC_{50} 。在另一實施例中，本發明之多肽或其生物結合物具有小於50 nM、較佳小於25 nM且更佳小於15 nM之 EC_{50} 。在另一實施例中，本發明之多肽或其生物結合物具有小於10 nM之 EC_{50} 。

本發明之多肽或其生物結合物可具有優於Apelin-13或pyr-1-Apelin-13之血漿穩定性。在一個實施例中，血漿穩定性改良為至少2倍。在一個實施例中，本發明之多肽或其生物結合物具有至少30分鐘之血漿穩定性。在另一實施例中，本發明之多肽或其生物結合物具有至少60分鐘或至少80分鐘、較佳至少100分鐘且更佳至少150分鐘之血漿穩定性。

本發明之多肽或其生物結合物可與一或多種其他治療劑同時、或在之前或之後投與。本發明之多肽或生物結合物可藉由相同或不同投藥途徑分別投與，或以與其他藥劑相同之醫藥組合物形式共同投與。

在一個實施例中，本發明提供一種產品，其包含式I至IV中之任一者之多肽，或其醯胺、酯或鹽，或其生物結合物及至少一種作為用於療法中之同時、分別或依序使用之組合製劑的其他治療劑。在一個實施例中，療法為治療對APJ受體之活化有反應之疾病或病狀。

以組合製劑形式提供之產品包括含如下物質的組合物：式I至IV中之任一者之多肽，或其醯胺、酯或鹽，或其生物結合物，及共同在同一醫藥組合物中之其他治療劑，或式I至IV中之任一者之多肽，或其醯胺、酯或鹽，或其生物結合物，及呈獨立形式(例如呈套組形式)之其他治療劑。

在一個實施例中，本發明提供一種醫藥組合物，其包含式I至IV中之任一者之多肽，或其醯胺、酯或鹽，或其生物結合物，及其他治

療劑。如上所述，醫藥組合物視情況可包含醫藥學上可接受之載劑。

在一個實施例中，本發明提供一種套組，其包含兩種或兩種以上獨立醫藥組合物，其中至少一者含有式I至IV中之任一者之多肽，或其醯胺、酯或鹽或其生物結合物。在一個實施例中，該套組包含用於分別保留該等組合物之構件，諸如容器、分隔瓶或分隔箔片封包。該套組之實例為泡殼包裝，如通常用於錠劑、膠囊及其類似物之包裝。

本發明之套組可用於投與不同劑型(例如經口及非經腸)，用於以不同劑量區間投與各別組合物，或用於針對彼此滴定各別組合物。為輔助順應性，本發明之套組通常包含用於投藥之指導。

在本發明之組合療法中，本發明之肽或生物結合物及其他治療劑可由相同或不同製造商製造及/或調配。此外，本發明之肽或生物結合物及其他治療劑可一起進入組合療法：(i)在對醫師釋放組合產品之前(例如在包含本發明化合物及其他治療劑之套組的情況下)；(ii)由醫師自身(或在醫師指導下)在投與之前即刻；(iii)在患者自身中，例如在連續投與本發明之多肽或生物結合物及其他治療劑期間。

因此，本發明提供式I至IV中之任一者之多肽或其醯胺、酯或鹽、或其生物結合物之用途，其係用於治療對APJ受體之促效作用有反應之疾病或病狀，其中該藥劑經製備以用於與另一治療劑一起投與。本發明亦提供另一治療劑之用途，其係用於治療對Apelin受體之促效作用有反應之疾病或病狀，其中該藥劑與式I至IV中之任一者之多肽或其醯胺、酯或鹽或其生物結合物一起投與。

本發明亦提供一種式I至IV中之任一者之多肽，或其醫藥學上可接受之鹽或其生物結合物，用於治療對APJ受體之促效作用有反應之疾病或病狀的方法，其中該式I至IV中之任一者之多肽或其醯胺、酯或鹽或其生物結合物經製備以用於與另一治療劑一起投與。本發明亦

提供另一治療劑，用於治療對APJ受體之促效作用有反應之疾病或病狀的方法，其中該另一治療劑經製備以用於與式I至IV中之任一者之多肽或其醯胺、酯或鹽或其生物結合物一起投與。本發明亦提供一種式I至IV中之任一者之多肽或其醯胺、酯或鹽或其生物結合物，用於治療對APJ受體之促效作用有反應之疾病或病狀的方法，其中該式I至IV中之任一者之多肽或其醯胺、酯或鹽或其生物結合物與另一治療劑一起投與。本發明亦提供另一治療劑，用於治療對APJ受體之促效作用有反應之疾病或病狀的方法，其中該另一治療劑與式I至IV中之任一者之多肽或其醯胺、酯或鹽或其生物結合物一起投與。

本發明亦提供式I至IV中之任一者之多肽或其醯胺、酯或鹽或其生物結合物之用途，其係用於治療對APJ受體之促效作用有反應之疾病或病狀，其中患者先前(例如24小時內)已經另一治療劑治療。本發明亦提供另一治療劑之用途，其係用於治療對APJ受體之促效作用有反應之疾病或病狀，其中患者先前(例如24小時內)已經式I至IV中之任一者之多肽或其醯胺、酯或鹽或其生物結合物治療。

在一個實施例中，該另一治療劑係選自收縮影響劑、 β 腎上腺素激導性受體阻斷劑、HMG-Co-A還原酶抑制劑、血管收縮素II受體拮抗劑、血管收縮素轉化酶(ACE)抑制劑、鈣離子通道阻斷劑(CCB)、內皮素拮抗劑、腎素抑制劑、利尿劑、ApoA-I模擬物、抗糖尿病劑、減肥劑、醛固酮受體阻斷劑、內皮素受體阻斷劑、醛固酮合成酶抑制劑(ASI)、CETP抑制劑、抗凝劑、鬆弛素、BNP(奈西立肽(nesiritide))及NEP抑制劑。

術語與第二藥劑或治療劑「組合」包括共投與本發明之多肽或生物結合物(例如根據式I至IV中之任一者之多肽或本文另外描述之多肽)與第二藥劑或治療劑，首先投與本發明之化合物，接著投與第二藥劑或治療劑，及首先投與第二藥劑或治療劑，接著投與本發明之肽

或生物結合物。

術語「第二藥劑」包括此項技術中已知的治療、預防或減少本文所述之疾病或病症的症狀的任何藥劑，該疾病或病症為例如對APJ受體之活化有反應之病症或疾病，諸如急性失代償心臟衰竭(ADHF)、慢性心臟衰竭、肺高血壓、心房纖維性顫動、布魯加達症候群、心室性心搏過速、動脈粥樣硬化、高血壓、再狹窄、缺血性心血管疾病、心肌病、心臟纖維化、心律不整、水滯留、糖尿病(包括妊娠期糖尿病)、肥胖症、周邊動脈疾病、腦血管意外、短暫性缺血性發作、創傷性腦損傷、肌萎縮性側索硬化、燒傷(包括曬傷)及子癇前症。

第二藥劑之實例包括收縮影響劑、 β 腎上腺素激導性受體阻斷劑、HMG-Co-A還原酶抑制劑、血管收縮素II受體拮抗劑、血管收縮素轉化酶(ACE)抑制劑、鈣離子通道阻斷劑(CCB)、內皮素拮抗劑、腎素抑制劑、利尿劑、ApoA-I模擬物、抗糖尿病劑、減肥劑、醛固酮受體阻斷劑、內皮素受體阻斷劑、醛固酮合成酶抑制劑(ASI)、CETP抑制劑、抗凝劑、鬆弛素、BNP(奈西立肽)及/或NEP抑制劑。

如本文所用之收縮影響劑包括例如多巴酚丁胺、異丙基腎上腺素、米利酮、胺力農(amirinone)、左西孟旦、腎上腺素、去甲腎上腺素、異丙基腎上腺素及地高辛。

如本文所用之 β 腎上腺素激導性受體阻斷劑包括例如醋丁洛爾(acebutolol)、阿替洛爾(atenolol)、倍他洛爾(betaxolol)、比索洛爾(bisoprolol)、卡替洛爾(carteolol)、美托洛爾(metoprolol)、納多洛爾(nadolol)、普萘洛爾(propranolol)、索他洛爾(sotalol)及噻嗎洛爾(timolol)。

如本文所用之抗凝劑包括達肝素(Dalteparin)、達那肝素(Danaparoid)、依諾肝素(Enoxaparin)、肝素、亭紮肝素(Tinzaparin)、

華法林(Warfarin)。

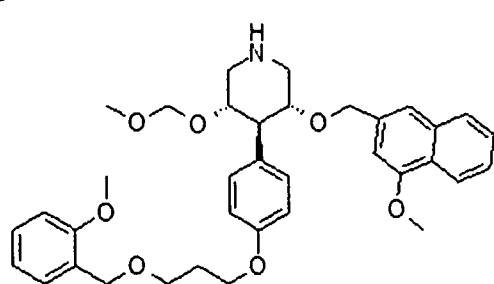
術語「HMG-Co-A還原酶抑制劑」(亦稱為 β -羥基- β -甲基戊二醯基輔酶A還原酶抑制劑)包括可用於降低血液中包括膽固醇在內的脂質含量的活性劑。實例包括阿托伐他汀(atorvastatin)、西立伐他汀(cerivastatin)、康百汀(compactin)、達伐他汀(dalvastatin)、二氫康百汀(dihydrocompactin)、氟多他汀(fluidostatin)、氟伐他汀(fluvastatin)、洛伐他汀(lovastatin)、匹伐他汀(pitavastatin)、美伐他汀(mevastatin)、普伐他汀(pravastatin)、羅素他汀(rosuvastatin)、利伐他汀(rivastatin)、辛伐他汀(simvastatin)及維洛他汀(velostatin)或其醫藥學上可接受之鹽。

術語「ACE抑制劑」(亦稱為血管收縮素轉化酶抑制劑)包括中斷血管收縮素I酶促降解成血管收縮素II之分子。此類化合物可用於調節血壓及用於治療充血性心臟衰竭。實例包括阿拉普利(alacepril)、貝那普利(benazepril)、貝那普拉(benazeprilat)、卡托普利(captopril)、西羅普利(ceronapril)、西拉普利(cilazapril)、地拉普利(delapril)、依那普利(enalapril)、依那普拉(enaprilat)、福辛普利(fosinopril)、咪達普利(imidapril)、賴諾普利(lisinopril)、莫西普利(moexipril)、莫福普利(moveltopril)、培哌普利(perindopril)、喹那普利(quinapril)、雷米普利(ramipril)、螺普利(spirapril)、替莫普利(temocapril)及群多普利(trandolapril)或其藥學上可接受之鹽。

術語「內皮素拮抗劑」包括波生坦(bosentan) (參見EP 526708 A)、替唑生坦(tezosentan) (參見WO 96/19459)或其醫藥學上可接受之鹽。

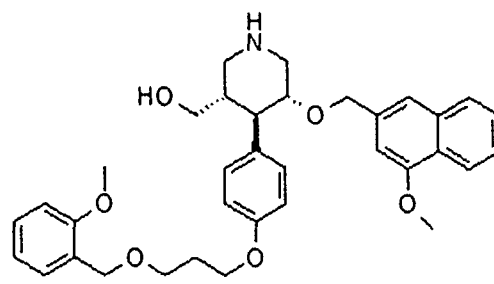
術語「腎素抑制劑」包括地特吉侖(ditekiren) (化學名稱：[1S-[1R*,2R*,4R*(1R*,2R*)]]-1-[(1,1-二甲基乙氧基)羰基]-L-脯胺醯基-L-苯丙胺醯基-N-[2-羥基-5-甲基-1-(2-甲基丙基)-4-[[[2-甲基-1-[(2-吡啶

基甲基)胺基]羰基]丁基]胺基]羰基]己基]-*N*- α -甲基-L-組胺醯胺)；特拉吉侖(terlakiren) (化學名稱：*[R-(R*,S*)]-N-(4-嗎啉基羰基)-L-苯丙胺醯基-N-[1-(環己基甲基)-2-羥基-3-(1-甲基乙氧基)-3-側氧基丙基]-S-甲基-L-半胱胺酸醯胺)*；阿力克倫(Aliskiren) (化學名稱：*(2S,4S,5S,7S)-5-胺基-N-(2-胺甲醯基-2,2-二甲基乙基)-4-羥基-7-{[4-甲氧基-3-(3-甲氧基丙氧基)苯基]甲基}-8-甲基-2-(丙-2-基)壬醯胺*)及占吉侖(zankiren) (化學名稱：*[1S-[1R*[R*(R*)],2S*,3R*]]-N-[1-(環己基甲基)-2,3-二羥基-5-甲基己基]- α -[[2-[(4-甲基-1-哌嗪基)磺醯基]甲基]-1-側氧基-3-苯丙基]-胺基]-4-噻唑丙醯胺*)或其鹽酸鹽、或由Speedel開發之SPP630、SPP635及SPP800、或式(A)及(B)之RO 66-1132及RO 66-1168：



(A)

及



(B)

，或其

醫藥學上可接受之鹽。

術語「阿力克倫」若未特別定義，應理解為游離鹼及其鹽，尤其為其醫藥學上可接受之鹽，最佳為其半反丁烯二酸鹽。

術語「鈣通道阻斷劑(CCB)」包括二氫吡啶(DHP)及非DHP (例如地爾硫卓(diltiazem)型及維拉帕米(verapamil)型CCB)。實例包括氨氯地平(amlodipine)、苕普地爾(Bepridil)、地爾硫卓、非洛地平(felodipine)、里奧斯汀(ryosidine)、伊拉地平(isradipine)、拉西地平(lacidipine)、尼卡地平(nicardipine)、硝苯地平(nifedipine)、尼古地平(niguldipine)、尼魯地平(niludipine)、尼莫地平(nimodipine)、尼索地平(nisoldipine)、尼群地平(nitrendipine)、維拉帕米及尼伐地平

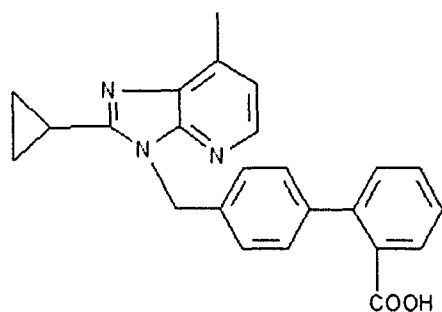
(nivaldipine)，且較佳為選自由以下組成之群的非DHP代表：氟桂利嗪 (flunarizine)、普尼拉明 (prenylamine)、地爾硫卓、芬地林 (fendiline)、加洛帕米 (gallopamil)、米貝地爾 (mibefradil)、阿尼帕米 (anipamil)、替阿帕米 (tiapamil) 及維拉帕米，或其醫藥學上可接受之鹽。CCB可用作抗高血壓、抗心絞痛或抗心律不整之藥物。

術語「利尿劑」包括噻嗪衍生物(例如氯噻嗪、氫氯噻嗪、甲氯噻嗪及氯噻酮)。

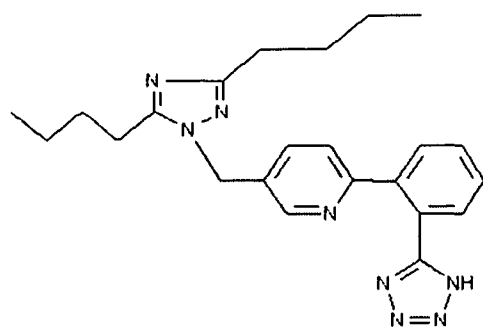
術語「ApoA-I模擬物」包括D4F肽(例如式D-W-F-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F)

血管收縮素II受體拮抗劑或其醫藥學上可接受之鹽理解為結合於血管收縮素II受體之AT₁受體亞型但未導致該受體活化之活性成分。由於AT₁受體之抑制，此等拮抗劑可例如用作抗高血壓藥或用於治療充血性心臟衰竭。

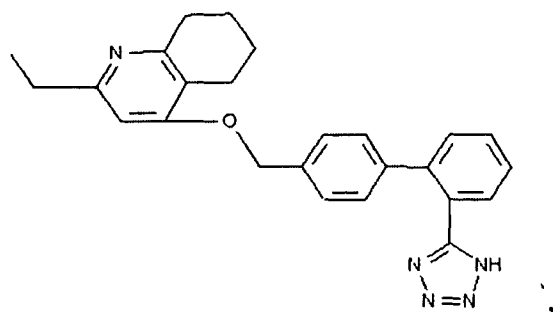
AT₁受體拮抗劑之類別包含具有不同結構特徵之化合物，基本上較佳為非肽化合物。舉例而言，可提及選自由以下組成之群之化合物：巹沙坦 (valsartan)、洛沙坦 (losartan)、坎地沙坦 (candesartan)、依普羅沙坦 (eprosartan)、依貝沙坦 (irbesartan)、沙普立沙坦 (sapisartan)、他索沙坦 (tasosartan)、替米沙坦 (telmisartan)、命名為E-1477之下式化合物



命名為SC-52458之下式化合物



及命名為ZD-8731之下式化合物

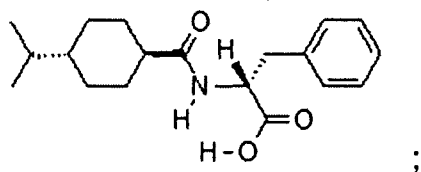


或在各種情況下，其醫藥學上可接受之鹽。

較佳AT₁受體拮抗劑為坎地沙坦、依普羅沙坦、伊貝沙坦、洛沙坦、替米沙坦、巰沙坦。已銷售之彼等藥劑亦較佳，最佳為巰沙坦或其醫藥學上可接受之鹽。

術語「抗糖尿病劑」包括胰島素分泌增強劑，其促進自胰腺β-細胞分泌胰島素。實例包括雙胍衍生物(例如二甲雙胍(metformin))、磺醯脲(SU)(例如甲苯磺丁脲(tolbutamide)、氯磺丙脲(chlorpropamide)、妥拉磺脲(tolazamide)、乙醯苯磺醯環己脲(acetohexamide)、4-氯-N-[(1-吡咯啉基胺基)羰基]-苯磺醯胺(格列派得(glycopyramide))、格列本脲(glibenclamide)(格列瑞得(glyburide))、格列齊特(gliclazide)、1-丁基-3-間胺苯磺醯基脲、磺胺丁脲(carbutamide)、格列波脲(glibonuride)、格列吡嗪(glipizide)、格列喹酮(gliquidone)、格列派特(glisoxepid)、格列噻唑(glybuthiazole)、格列丁唑(glibuzole)、格列己脲(glyhexamide)、格列嘧啶(glymidine)、格列平脲(glypinamide)、苯磺丁脲(phenbutamide)及甲苯環脲(tolylcyclamide))或其醫藥學上可接

受之鹽。其他實例包括苯丙胺酸衍生物(例如下式之那格列奈(nateglinide))[*N*-(反式-4-異丙基環己基羰基)-*D*-苯丙胺酸](參見EP 196222及EP 526171)



瑞格列奈(repaglinide) [(*S*)-2-乙氧基-4-{2-[[3-甲基-1-[2-(1-哌啶基)苯基]丁基]胺基]-2-側氧基乙基}苯甲酸] (參見EP 589874、EP 147850 A2 (詳言之第61頁之實例11)及EP 207331 A1)；(2*S*)-2-苯甲基-3-(順-六氫-2-異吲哚啉基羰基)-丙酸鈣二水合物(例如米格列奈(mitiglinide)(參見EP 507534))；及格列美脲(格列美脲)(參見EP 31058)。

本發明之肽及多肽可與之組合使用的第二藥劑的其他實例包括DPP-IV抑制劑、GLP-1及GLP-1促效劑。

DPP-IV負責使GLP-1不活化。更特定言之，DPP-IV產生GLP-1受體拮抗劑且由此縮短對GLP-1之生理反應。GLP-1為胰腺胰島素分泌之主要刺激劑，且對葡萄糖處置具有直接有益效應。

DPP-IV (二肽基肽酶IV)抑制劑可為肽或較佳為非肽。DPP-IV抑制劑在各種情況下一般地及特定地揭示於例如WO 98/19998、DE 196 16 486 A1、WO 00/34241及WO 95/15309中，在各種情況下詳言之在化合物申請專利範圍及實施例之最終產物中，最終產物、醫藥製劑及申請專利範圍之標的物以引用此等公開案之方式併入本申請案中。較佳為分別特定揭示於WO 98/19998之實例3及WO 00/34241之實例1中之彼等化合物。

GLP-1 (類升糖素肽-1)為一種促胰島素蛋白質，其描述於例如W.E. Schmidt等人, *Diabetologia*, 28, 1985, 704-707中及US 5,705,483

中。

術語「GLP-1促效劑」包括GLP-1(7-36)NH₂之變異體及類似物，其特別揭示於US 5,120,712、US 5,118,666、US 5,512,549、WO 91/11457及C. Orskov等人, J. Biol. Chem. 264 (1989) 12826中。其他實例包括GLP-1(7-37)，其中GLP-1(7-36)NH₂分子之Arg³⁶之羧基端醯胺官能基經在第37位之Gly移位之化合物及其變異體及類似物，包括GLN⁹-GLP-1(7-37)、D-GLN⁹-GLP-1(7-37)、乙醯基 LYS⁹-GLP-1(7-37)、LYS¹⁸-GLP-1(7-37)，及尤其 GLP-1(7-37)OH、VAL⁸-GLP-1(7-37)、GLY⁸-GLP-1(7-37)、THR⁸-GLP-1(7-37)、MET⁸-GLP-1(7-37)及4-咪唑并丙醯基-GLP-1。亦特別較佳為由Greig等人在Diabetologia 1999, 42, 45-50中所述之GLP促效劑類似物腸促胰島素類似物-4。

同樣包括在定義「抗糖尿病劑」中之為胰島素敏感度增強劑，其恢復減弱之胰島素受體功能，以減小胰島素抗性且因此增強胰島素敏感度。實例包括降血糖噻唑啉二酮衍生物(例如格列酮(glitazone)、(S)-((3,4-二氫-2-(苯基-甲基)-2H-1-苯并吡喃-6-基)甲基-噻唑啉-2,4-二酮(恩格列酮(englitazone))、5-{[4-(3-(5-甲基-2-苯基-4-噁唑基)-1-側氧基丙基)-苯基]-甲基}-噻唑啉-2,4-二酮(達格列酮(darglitazone))、5-{[4-(1-甲基-環己基)甲氧基]-苯基]甲基}-噻唑啉-2,4-二酮(環格列酮(ciglitazone))、5-{[4-(2-(1-吡啶基)乙氧基)苯基]甲基}-噻唑啉-2,4-二酮(DRF2189)、5-{4-[2-(5-甲基-2-苯基-4-噁唑基)-乙氧基]]苯甲基}-噻唑啉-2,4-二酮(BM-13.1246)、5-(2-萘磺醯基)-噻唑啉-2,4-二酮(AY-31637)、雙{4-[(2,4-二側氧基-5-噻唑啉基)甲基]苯基}甲烷(YM268)、5-{4-[2-(5-甲基-2-苯基-4-噁唑基)-2-羥基乙氧基]苯甲基}-噻唑啉-2,4-二酮(AD-5075)、5-[4-(1-苯基-1-環丙烷羰基胺基)-苯甲基]-噻唑啉-2,4-二酮(DN-108)、5-{[4-(2-(2,3-二氫吡啶-1-基)乙氧基)苯基]甲基}-噻唑啉-2,4-二酮、5-[3-(4-氯-苯基)]-2-丙炔基]-5-苯磺醯基)噻唑啉-

2,4-二酮、5-[3-(4-氯苯基)-2-丙炔基]-5-(4-氟苯基-磺醯基)噻唑啉-2,4-二酮、5-{{4-(2-(甲基-2-吡啶基-胺基)-乙氧基)苯基}甲基}-噻唑啉-2,4-二酮(羅格列酮(rosiglitazone))、5-{{4-(2-(5-乙基-2-吡啶基)乙氧基)苯基}-甲基}噻唑啉-2,4-二酮(吡格列酮(pioglitazone))、5-{{4-((3,4-二氫-6-羥基-2,5,7,8-四甲基-2*H*-1-苯并吡喃-2-基)甲氧基)-苯基}-甲基}-噻唑啉-2,4-二酮(曲格列酮(troglitazone))、5-[6-(2-氟-苯甲氧基)萘-2-基甲基]-噻唑啉-2,4-二酮(MCC555)、5-{{2-(2-萘基)-苯并噁唑-5-基}-甲基}噻唑啉-2,4-二酮(T-174)及5-(2,4-二側氧基噻唑啉-5-基甲基)-2-甲氧基-N-(4-三氟甲基-苯甲基)苯甲醯胺(KRP297))。

其他抗糖尿病劑包括胰島素信號傳導路徑調節劑，如蛋白質酪胺酸磷酸酶(PTPase)之抑制劑、抗糖尿病非小分子模擬化合物及麩醯胺酸-果糖-6-磷酸鹽醯胺轉移酶(GFAT)之抑制劑；影響失調肝葡萄糖產生之化合物，如葡萄糖-6-磷酸酶(G6Pase)之抑制劑、果糖-1,6-二磷酸酶(F-1,6-Bpase)之抑制劑、肝糖磷酸化酶(GP)之抑制劑、升糖素受體拮抗劑及磷酸烯醇丙酮酸羧激酶(PEPCK)之抑制劑；丙酮酸脫氫酶激酶(PDHK)抑制劑；胃排空抑制劑；胰島素；GSK-3之抑制劑；類視黃素X受體(RXR)促效劑； β -3 AR之促效劑；解偶聯蛋白質(UCP)之促效劑；非格列酮型PPAR γ 促效劑；雙重PPAR α /PPAR γ 促效劑；抗糖尿病含鈎化合物；腸促胰島素激素，如類升糖素肽-1 (GLP-1)及GLP-1促效劑； β -細胞咪唑啉受體拮抗劑；米格列醇(miglitol)； α_2 -腎上腺素激導性拮抗劑；及其醫藥學上可接受之鹽。

在一個實施例中，本發明提供一種組合，詳言之，一種醫藥組合，其包含治療有效量之根據式I至IV中之任一者之定義的多肽，或其醯胺、酯或鹽，或其生物結合物，及一或多種選自以下之治療活性劑： β -腎上腺素激導性受體阻斷劑，諸如醋丁洛爾、阿替洛爾、倍他洛爾、比索洛爾、美托洛爾、納多洛爾、普萘洛爾、索他洛爾及噻嗎

洛爾；血管收縮素II受體拮抗劑，諸如AT1阻斷劑；抗糖尿病劑，諸如DPPIV抑制劑(例如維格列汀)及GLP1肽促效劑。

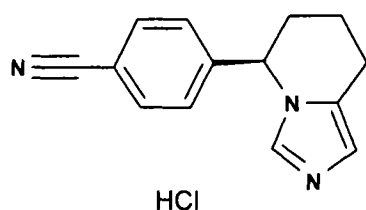
術語「減肥劑」包括脂肪酶抑制劑(例如奧利司他(orlistat))及食慾抑制劑(例如西布曲明(sibutramine)及苯丁胺(phentermine))。

醛固酮合成酶抑制劑或其醫藥學上可接受之鹽理解為具有抑制醛固酮產生之特性的活性成分。醛固酮合成酶(CYP11B2)為催化腎上腺皮質中醛固酮產生之最後步驟(亦即11-去氧皮質酮轉化成醛固酮)之粒線體細胞色素P450酶。用所謂醛固酮合成酶抑制劑抑制醛固酮產生已知為治療血鉀過低、高血壓、充血性心臟衰竭、心房纖維性顫動或腎衰竭之成功變化形式。該醛固酮合成酶抑制活性易於由熟習此項技術者根據標準分析(例如US 2007/0049616)來測定。

醛固酮合成酶抑制劑之類別包含類固醇及非類固醇醛固酮合成酶抑制劑，後者為最佳。

較佳為市售之醛固酮合成酶抑制劑或已由衛生當局批准之彼等醛固酮合成酶抑制劑。

醛固酮合成酶抑制劑之類別包含具有不同結構特徵之化合物。非類固醇醛固酮合成酶抑制劑之實例為下式之法屈唑之鹽酸鹽的(+)-對映異構體(美國專利4617307及4889861)



或若可用，其醫藥學上可接受之鹽。

適用於該組合之醛固酮合成酶抑制劑為一般地及特定地揭示於例如US2007/0049616中，詳言之化合物申請專利範圍及實施例之最終產物中之化合物及類似物，最終產物、醫藥製劑及申請專利範圍之標的物以引用此公開案之方式併入本申請案中。適用於本發明之較佳醛

固酮合成酶抑制劑包括(但不限於)4-(6,7-二氫-5*H*-吡咯并[1,2-*c*]咪唑-5-基)-3-甲基苯甲腈；5-(2-氯-4-氰基苯基)-6,7-二氫-5*H*-吡咯并[1,2-*c*]咪唑-5-甲酸(4-甲氧基苯甲基)甲基醯胺；4'-氟-6-(6,7,8,9-四氫-5*H*-咪唑并[1,5-*a*]氮呋-5-基)聯苯-3-甲腈；5-(4-氰基-2-甲氧基苯基)-6,7-二氫-5*H*-吡咯并[1,2-*c*]咪唑-5-甲酸丁酯；4-(6,7-二氫-5*H*-吡咯并[1,2-*c*]咪唑-5-基)-2-甲氧基苯甲腈；5-(2-氯-4-氰基苯基)-6,7-二氫-5*H*-吡咯并[1,2-*c*]咪唑-5-甲酸4-氟苯甲酯；5-(4-氰基-2-三氟甲氧基苯基)-6,7-二氫-5*H*-吡咯并[1,2-*c*]咪唑-5-甲酸甲酯；5-(4-氰基-2-甲氧基苯基)-6,7-二氫-5*H*-吡咯并[1,2-*c*]咪唑-5-甲酸2-異丙氧基乙酯；4-(6,7-二氫-5*H*-吡咯并[1,2-*c*]咪唑-5-基)-2-甲基苯甲腈；4-(6,7-二氫-5*H*-吡咯并[1,2-*c*]咪唑-5-基)-3-氟苯甲腈；4-(6,7-二氫-5*H*-吡咯并[1,2-*c*]咪唑-5-基)-2-甲氧基苯甲腈；3-氟-4-(7-亞甲基-6,7-二氫-5*H*-吡咯并[1,2-*c*]咪唑-5-基)苯甲腈；*順*-3-氟-4-[7-(4-氟-苯甲基)-5,6,7,8-四氫-咪唑并[1,5-*a*]吡啶-5-基]苯甲腈；4'-氟-6-(9-甲基-6,7,8,9-四氫-5*H*-咪唑并[1,5-*a*]氮呋-5-基)聯苯-3-甲腈；4'-氟-6-(9-甲基-6,7,8,9-四氫-5*H*-咪唑并[1,5-*a*]氮呋-5-基)聯苯-3-甲腈或在各種情況下，其(R)或(S)對映異構體；或若可用，其醫藥學上可接受之鹽。

術語醛固酮合成酶抑制劑亦包括 WO2008/076860、WO2008/076336、WO2008/076862、WO2008/027284、WO2004/046145、WO2004/014914、WO2001/076574中所揭示之化合物及類似物。

此外，醛固酮合成酶抑制劑亦包括美國專利申請案 US2007/0225232、US2007/0208035、US2008/0318978、US2008/0076794、US2009/0012068、US20090048241 及 PCT 申請案 WO2006/005726、WO2006/128853、WO2006128851、WO2006/128852、WO2007065942、WO2007/116099、WO2007/116908、WO2008/119744 及歐洲專利申請案 EP 1886695 中所揭示之化合物及類似物。適用於本發明之較佳醛固

酮合成酶抑制劑包括(但不限於)如由Speedel開發之8-(4-氟苯基)-5,6-二氫-8*H*-咪唑并[5,1-*c*][1,4]噁嗪；4-(5,6-二氫-8*H*-咪唑并[5,1-*c*][1,4]噁嗪-8-基)-2-氟苯甲腈；4-(5,6-二氫-8*H*-咪唑并[5,1-*c*][1,4]噁嗪-8-基)-2,6-二氟苯甲腈；4-(5,6-二氫-8*H*-咪唑并[5,1-*c*][1,4]噁嗪-8-基)-2-甲氧基苯甲腈；3-(5,6-二氫-8*H*-咪唑并[5,1-*c*][1,4]噁嗪-8-基)苯甲腈；4-(5,6-二氫-8*H*-咪唑并[5,1-*c*][1,4]噁嗪-8-基)酞腈；4-(8-(4-氰基苯基)-5,6-二氫-8*H*-咪唑并[5,1-*c*][1,4]噁嗪-8-基)苯甲腈；4-(5,6-二氫-8*H*-咪唑并[5,1-*c*][1,4]噁嗪-8-基)苯甲腈；4-(5,6-二氫-8*H*-咪唑并[5,1-*c*][1,4]噁嗪-8-基)萘-1-甲腈；8-[4-(1*H*-四唑-5-基)苯基]-5,6-二氫-8*H*-咪唑并[5,1-*c*][1,4]噁嗪或在各種情況下，其(R)或(S)對映異構體；或若可用，其醫藥學上可接受之鹽。

適用於該組合之醛固酮合成酶抑制劑為一般地及特定地揭示於例如WO 2009/156462及WO 2010/130796中，詳言之化合物申請專利範圍及實施例之最終產物中之化合物及類似物，最終產物、醫藥製劑及申請專利範圍之標的物。適用於本發明組合之較佳醛固酮合成酶抑制劑包括3-(6-氟-3-甲基-2-吡啶-3-基-1*H*-吡啶-1-基甲基)-苯甲腈鹽酸鹽、1-(4-甲磺醯基-苯甲基)-3-甲基-2-吡啶-3-基-1*H*-吡啶、2-(5-苯甲氧基-吡啶-3-基)-6-氯-1-甲基-1*H*-吡啶、5-(3-氰基-1-甲基-1*H*-吡啶-2-基)-菸鹼酸乙酯、*N*-[5-(6-氯-3-氰基-1-甲基-1*H*-吡啶-2-基)-吡啶-3-基甲基]-乙磺醯胺、吡咯啶-1-磺酸5-(6-氯-3-氰基-1-甲基-1*H*-吡啶-2-基)-吡啶-3-基酯、*N*-甲基-*N*-[5-(1-甲基-1*H*-吡啶-2-基)-吡啶-3-基甲基]-甲磺醯胺、6-氯-1-甲基-2-{5-[(2-吡咯啶-1-基-乙胺基)-甲基]-吡啶-3-基}-1*H*-吡啶-3-甲腈、6-氯-2-[5-(4-甲磺醯基-哌嗪-1-基甲基)-吡啶-3-基]-1-甲基-1*H*-吡啶-3-甲腈、6-氯-1-甲基-2-{5-[(1-甲基-哌啶-4-基胺基)-甲基]-吡啶-3-基}-1*H*-吡啶-3-甲腈、嗎啉-4-甲酸[5-(6-氯-3-氰基-1-甲基-1*H*-吡啶-2-基)-吡啶-3-基甲基]-醯胺、*N*-[5-(6-氯-1-甲基-1*H*-

吡啶-2-基)-吡啶-3-基甲基]-乙磺醯胺、*C,C,C*-三氟-*N*-[5-(1-甲基-1*H*-吡啶-2-基)-吡啶-3-基甲基]-甲磺醯胺、*N*-[5-(3-氯-4-氰基-苯基)-吡啶-3-基]-4-三氟甲基-苯磺醯胺、*N*-[5-(3-氯-4-氰基-苯基)-吡啶-3-基]-1-苯基-甲磺醯胺、*N*-(5-(3-氯-4-氰基-苯基)吡啶-3-基)丁-1-磺醯胺、*N*-(1-(5-(4-氰基-3-甲氧基-苯基)吡啶-3-基)乙基)乙磺醯胺、*N*-((5-(3-氯-4-氰基-苯基)吡啶-3-基)(環丙基)甲基)乙磺醯胺、*N*-(環丙基(5-(1*H*-吡啶-5-基)吡啶-3-基)甲基)乙磺醯胺、*N*-(環丙基(5-羰基-1-基-吡啶-3-基)甲基)乙磺醯胺、乙磺酸[5-(6-氯-1-甲基-1*H*-吡咯并[2,3-*b*]吡啶-2-基)-吡啶-3-基甲基]-醯胺及乙磺酸{[5-(3-氯-4-氰基-苯基)-吡啶-3-基]-環丙基-甲基}-乙基-醯胺。

術語「內皮素受體阻斷劑」包括波生坦及安立生坦(ambrisentan)。

術語「CETP抑制劑」係指抑制膽固醇酯轉移蛋白(CETP)介導之自HDL轉運各種膽固醇酯及甘油三酯至LDL及VLDL之化合物。該CETP抑制活性易於由熟習此項技術者根據標準分析(例如美國專利第6,140,343號)來測定。實例包括美國專利第6,140,343號及美國專利第6,197,786號中所揭示之化合物(例如[2*R*,4*S*]4-[(3,5-雙-三氟甲基-苯基)-甲氧羰基-胺基]-2-乙基-6-三氟甲基-3,4-二氫-2*H*-喹啉-1-甲酸乙酯(托塞曲匹(torcetrapib))；美國專利第6,723,752號中所揭示之化合物(例如(2*R*)-3-{[3-(4-氯-3-乙基-苯氧基)-苯基]-[3-(1,1,2,2-四氟-乙氧基)-苯基]-甲基}-胺基}-1,1,1-三氟-2-丙醇)；美國專利申請案第10/807,838號中所揭示之化合物；美國專利第5,512,548號中所揭示之多肽衍生物；分別揭示於*J. Antibiot.*, 49(8): 815- 816 (1996)及*Bioorg. Med. Chem. Lett.*; 6:1951-1954 (1996)中之玫瑰菌素衍生物及膽固醇酯之含磷酸鹽類似物。此外，CETP抑制劑亦包括揭示於WO2000/017165、WO2005/095409、WO2005/097806、WO

2007/128568、WO2008/009435、WO 2009/059943及WO2009/071509中之彼等化合物。

術語「NEP抑制劑」係指抑制中性內肽酶(NEP) EC 3.4.24.11之化合物。實例包括坎沙曲(Candoxatril)、坎沙曲拉(Candoxatrilat)、右卡多曲(Dexecadotril)、依卡曲爾(Ecadotril)、消旋卡多曲(Racecadotril)、山帕曲拉(Sampatrilat)、法西多曲(Fasidotril)、奧馬曲拉(Omapatrilat)、傑莫曲拉(Gemopatrilat)、達魯曲(Daglutril)、SCH-42495、SCH-32615、UK-447841、AVE-0848、PL-37及(2R,4S)-5-聯苯-4-基-4-(3-羧基-丙醯胺基)-2-甲基-戊酸乙酯或其醫藥學上可接受之鹽。NEP抑制劑亦包括如美國專利第US 5,155,100號中所揭示之經膦醯基/聯芳基取代之二肽衍生物。NEP抑制劑亦包括如PCT申請案第WO 2003/104200號中所揭示之N-巯基醯基苯丙胺酸衍生物。NEP抑制劑亦包括如PCT申請案第WO 2008/133896號、第WO 2009/035543號或第WO 2009/134741號中所揭示之雙作用抗高血壓劑。其他實例包括美國申請案第12/788,794號、第12/788,766號及第12/947,029號中所揭示之化合物。NEP抑制劑亦包括WO 2010/136474、WO 2010/136493、WO 2011/061271及美國臨時申請案第61/414171號及第61/414163號中所揭示之化合物。

在一個實施例中，本發明提供一種活化個體之APJ受體的方法，其中該方法包含向該個體投與治療有效量之根據式I至IV中之任一者之定義的多肽，或其醯胺、酯或鹽，或其生物結合物。

在一個實施例中，本發明提供一種治療個體之對APJ受體之活化有反應之病症或疾病的方法，其中該方法包含向該個體投與治療有效量之根據式I至IV中之任一者之定義的多肽，或其醯胺、酯或鹽或其生物結合物。

在一個實施例中，本發明提供一種治療個體之對APJ受體之活化

(促效作用)有反應之病症或疾病的方法，其中該病症或該疾病係選自急性失代償心臟衰竭(ADHF)、慢性心臟衰竭、肺高血壓、心房纖維性顫動、布魯加達症候群、心室性心搏過速、動脈粥樣硬化、高血壓、再狹窄、缺血性心血管疾病、心肌病、心臟纖維化、心律不整、水滯留、糖尿病(包括妊娠期糖尿病)、肥胖症、周邊動脈疾病、腦血管意外、短暫性缺血性發作、創傷性腦損傷、肌萎縮性側索硬化、燒傷(包括曬傷)及子癇前症。

在一個實施例中，本發明提供一種根據式I至IV中之任一者之定義的多肽或其生物結合物，以用作藥劑。

在一個實施例中，本發明提供根據式I至IV中之任一者之定義的多肽或其醯胺、酯或鹽或其生物結合物之用途，其係用於製造藥劑，以用於治療對APJ受體之活化有反應的病症或疾病。在另一實施例中，本發明提供根據式I至IV中之任一者之定義的多肽或其醯胺、酯或鹽或其生物結合物之用途，其係用於製造藥劑，以用於治療對APJ受體之活化有反應的病症或疾病，其中該病症或疾病詳言之係選自急性失代償心臟衰竭(ADHF)、慢性心臟衰竭、肺高血壓、心房纖維性顫動、布魯加達症候群、心室性心搏過速、動脈粥樣硬化、高血壓、再狹窄、缺血性心血管疾病、心肌病、心臟纖維化、心律不整、水滯留、糖尿病(包括妊娠期糖尿病)、肥胖症、周邊動脈疾病、腦血管意外、短暫性缺血性發作、創傷性腦損傷、肌萎縮性側索硬化、燒傷(包括曬傷)及子癇前症。

本發明之範例：肽及多肽合成

縮寫	定義
AA	胺基酸
Ac	乙醯基
Acm	乙醯胺基甲基
ACN	乙腈
AcOH	乙酸

Ac ₂ O	乙酸酐
ε-Ahx	ε-胺基己酸
AM	胺甲基
BAL	主鏈醯胺連接子
BSA	牛血清白蛋白
Boc	第三丁氧基羰基
Bzl	苯甲基
DCM	二氯甲烷
DIC	<i>N,N'</i> -二異丙基碳化二亞胺
DIPEA	<i>N,N'</i> -二異丙基乙胺
DMA	<i>N,N'</i> -二甲基乙醯胺
DMF	<i>N,N'</i> -二甲基甲醯胺
DMSO	二甲亞碸
DTT	二硫蘇糖醇
DVB	二乙烯苯
EDT	乙二硫醇
FA	甲酸
Fmoc	9-芴基甲氧羰基
HATU	六氟磷酸2-(1 <i>H</i> -9-氮雜苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲錄
HBSS	漢克氏緩衝鹽溶液(Hank's buffered salt solution)
HCTU	六氟磷酸2-(6-氯-1 <i>H</i> -苯并三唑-基)-1,1,3,3-四甲錄
HEPES	4-(2-羥乙基)-1-哌嗪乙磺酸
HFIP	六氟異丙醇
HOAt	1-羥基-7-氮雜苯并三唑
HSA	人類血清白蛋白
HPLC	高效液相層析
HRMS	高解析度質譜
ivDde	(4,4-二甲基-2,6-二側氧基環己-1-亞基)-3-甲基丁基
LN	自然對數(Logarithmus naturali, natural logarithm)
MeOH	甲醇
MS	質譜
Nal	2-萘基丙胺酸
Nle	正白胺酸
NMP	<i>N</i> -甲基吡咯啉
Oxyma Pure	2-氰基-2-(羥亞胺基)乙酸乙酯
Pbf	2,2,4,6,7-五甲基二氮苯并呋喃-5-磺醯基
<i>p</i> E	焦麩胺酸鹽
PG	保護基
PBS	磷酸鹽緩衝生理食鹽水
Ph	苯基
PhP	苯基脯胺酸
Pip	哌啶甲酸
Pol	聚合物支撐物
PS	聚苯乙烯
rt	室溫

SEC	尺寸排阻層析
SPPS	固相肽合成
TBME	第三丁基甲基醚
TCEP	參(2-羧乙基)膦
<i>t</i> BuOH	第三丁醇
TFA	三氟乙酸
THF	四氫呋喃
TIS, TIPS	三異丙基矽烷
<i>t</i> _R	滯留時間
Trt	三苯甲基
UPLC	超高效液相層析
UV	紫外線

肽係藉由標準固相Fmoc化學方法合成。在Prelude™肽合成器 (Protein Technologies, Inc., Tucson, USA)及Liberty微波肽合成器(CEM Corporation, North Carolina, USA)上組裝肽。由2-氯三苯甲基氯-PS-樹脂(ABCR, Karlsruhe, Germany或AnaSpec, Inc., California, USA)合成在C端具有游離羧酸或在C端具有經N,N-二取代之甲醯胺的肽。由受Fmoc保護之Rink-Amide-AM-PS-樹脂(Merck, Darmstadt, Germany)合成在C端具有未經取代之甲醯胺的肽。由負載有胺之BAL-AM-PS樹脂(EMC Microcollections, Tübingen, Germany)合成在C端具有經N-單取代之甲醯胺的肽。

肽係藉由製備型逆相HPLC來純化。使用以下管柱：

- Waters SunFire Prep C18 OBD管柱，5 μm，30×100 mm，部件編號186002572(一根管柱或串聯之兩根管柱)
- Waters Atlantis Prep OBD T3管柱，5 μm，30×150 mm，部件編號186003703
- Waters SunFire Prep C18 OBD管柱，5 μm，30×50 mm，部件編號186002572

移動相由溶離劑A(含0.1% TFA之H₂O)及溶離劑B (ACN)組成。梯度係基於分離問題之特定需求而設計。純產物係自ACN/H₂O凍乾。

藉由使用λ = 214 nm處之UV偵測的分析型HPLC及使用電噴霧電離的UPLC-MS對產物進行分析。

使用下文描述之通用程序合成例示於表4中之肽。未經取代之N或C端分別由斜體*H*-或-*OH*指示。

表4

實例	序列
實例1	Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-F- <i>OH</i>
實例2	Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-NH(苯乙基)
實例3	Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-(N-Me)F- <i>OH</i>
實例4	Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-NH ₂
實例5	Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-Nal- <i>OH</i>
實例6	Ac-C*-R-P-R-L-S-hC*-K-G-P-Nle-P-F- <i>OH</i>
實例7	Ac-hC*-R-P-R-L-S-hC*-K-G-P-Nle-P-F- <i>OH</i>
實例8	Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-a- <i>OH</i>
實例9	Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-NMe(苯乙基)
實例10	Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-f- <i>OH</i>
實例11	Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-NH(苯乙基)
實例12	Ac-c*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-F- <i>OH</i>
實例13	Ac-c*-R-P-R-L-S-hC*-K-G-P-Nle-P-F- <i>OH</i>
實例14	Ac-c*-R-P-R-L-S-c*-K-G-P-Nle-P-F- <i>OH</i>
實例15	Ac-C*-R-P-R-L-S-c*-K-G-P-Nle-P-F- <i>OH</i>
實例16	Ac-(D-hC)*-R-P-R-L-S-hC*-K-G-P-Nle-P-F- <i>OH</i>
實例17	Ac-(D-hC)*-R-P-R-L-S-(D-hC)*-K-G-P-Nle-P-F- <i>OH</i>
實例18	Ac-(D-hC)*-R-P-R-L-S-(hC)*-K-G-P-f-a-f- <i>OH</i>
實例19	Ac-c-R-P-R-L-S-(hC)-K-G-P-(D-Nle)-a-f- <i>OH</i>
實例20	<i>p</i> E-R-C*-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-F- <i>OH</i>
實例21	<i>p</i> E-R-C*-R-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-a-f- <i>OH</i>
實例22	<i>p</i> E-R-C*-R-L-S-C*-F-G-P-(D-Nle)-a-f- <i>OH</i>
實例23	<i>p</i> E-R-C*-R-L-S-C*-K-a-P-(D-Nle)-a-f- <i>OH</i>
實例24	<i>p</i> E-R-C*-R-L-S-C*-K-A-P-(D-Nle)-a-f- <i>OH</i>
實例25	<i>p</i> E-R-C*-R-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-NH ₂
實例26	<i>p</i> E-R-C*-R-L-S-(D-hC)*-K-G-P-f-a-f- <i>OH</i>
實例27	<i>p</i> E-R-c*-R-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-(D-abu)-f- <i>OH</i>
實例28	<i>p</i> E-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-F- <i>OH</i>
實例29	<i>p</i> E-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-(N-Me)F- <i>OH</i>
實例30	<i>p</i> E-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-NH(苯乙基)
實例31	<i>p</i> E-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-Nle-NH(苯乙基)
實例32	<i>p</i> E-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-NH(苯乙基)
實例33	<i>p</i> E-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-a-f- <i>OH</i>
實例34	<i>p</i> E-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-f- <i>OH</i>
實例35	<i>p</i> E-R-P-C*-L-S-C*-F-G-P-(D-Nle)-a-f- <i>OH</i>
實例35	<i>H</i> -R-P-C*-L-S-C*-K-(D-Nle)-a-f- <i>OH</i>
實例36	<i>p</i> E-R-P-hC*-L-S-C*-K-G-P-f-a-f- <i>OH</i>
實例37	<i>p</i> E-R-P-c*-L-S-(D-hC)*-K-G-P-(D-Nle)-a-y- <i>OH</i>
實例38	<i>p</i> E-R-P-(D-hC)*-L-S-hC*-K-G-P-(D-Nle)-(D-Nva)-f- <i>OH</i>

其中用「*」標記之兩個胺基酸表示經由側鏈形成二硫或醯胺鍵之胺基酸。

分析方法

1a) HPLC - 分析方法A

- 管柱：Waters Xbridge™ C18 (50×4.0 mm)，3.5 μm；部件編號：186003031
- 溶離劑A：含0.07% TFA之水/溶離劑B：含0.1% TFA之ACN
- 流量：1.5 ml/min
- 溫度：40℃
- 梯度：

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

1b) HPLC - 分析方法B

- 管柱：XBridge BEH300 C18 (100×4.6 mm)，3 μm；部件編號：186003612
- 溶離劑A：含0.1% TFA之水/溶離劑B：含0.1% TFA之ACN
- 流量：1.0 ml/min
- 溫度：40℃
- 梯度：

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

2a) UPLC-MS - 分析方法C

- 管柱：Acquity UPLC® BEH300 C18 (50×2.1 mm)，1.7 μm；部件編號：186003685

- 溶離劑A：含0.05% TFA之水/溶離劑B：含0.04% TFA之ACN
- 流量：1.0 ml/min
- 溫度：80℃
- 梯度：

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

2b) UPLC-HRMS - 分析方法D

● Waters Acquity UPLC® BEH C18，1.7 μm，2.1×50 mm；部件編號：186002350

● 溶離劑A：含0.05% FA + 3.75 mM乙酸銨之水；溶離劑B：含0.04% FA之ACN

- 流量：1.0 ml/min
- 溫度：50℃
- 梯度：4.4 min內2%至98%

3) 分析方法E：

- XBridge C18管柱，3.5 μm，3.0×30 mm
- 溶離劑：A：水(0.1%甲酸)；B：CAN
- 流速：2 mL/min
- 梯度：0 min 40% B；1.70 min內40%至95% B；2.0 min 95% B；2.1 min 40% B

- 質譜儀：掃描範圍150-1600之單級四極桿ESI
- HPLC：Agilent 1100系列
- 溫度：40℃

3) 分析方法F：

- Acquity BEH 1.7 μm 2.1 $\times$ 50mm
- 溶離劑：A：水(0.1%甲酸)；B：ACN (0.1%甲酸)
- 流速：1 mL/min
- 梯度：0 min 2% B；1.7 min內2%至98% B；2.06 min 98% B；

2.16 min 2% B

- 質譜儀：掃描範圍120-1600之單級四極桿ESI
- HPLC：waters Acquity
- 溫度：50 $^{\circ}\text{C}$

3) 分析方法G：

- Acquity BEH 1.7 μm 2.1 $\times$ 50mm
- 溶離劑：A：水(0.1%甲酸)；B：ACN (0.1%甲酸)
- 流速：1 mL/min
- 梯度：0 min 40% B；1.40 min內40%至98% B；2.05 min 98%

B；2.1 min 40% B

- 質譜儀：掃描範圍120-1600之單級四極桿ESI
- HPLC：waters Acquity
- 溫度：50 $^{\circ}\text{C}$

實例1至38之肽之分析資料彙總於表5中，且使用上文描述之分析方法產生。

表5

肽	HPLC		質譜				
	t_R [min]	方法	$[M+2H]^{2+}$ (量測)	$[M+3H]^{3+}$ (量測)	方法	$[M+2H]^{2+}$ (計算)	$[M+3H]^{3+}$ (計算)
實例1	3.48	A	757.4	505.3	C	757.4	505.3
實例2	3.66	A	735.4	490.6	C	735.4	490.6
實例3	3.60	A	764.4	509.9	C	764.4	509.9
實例4	2.65	A	683.4	455.9	C	683.4	455.9
實例5	3.95	A	782.4	521.9	C	782.4	521.9
實例6	3.49	A	764.4	509.9	C	764.4	509.9
實例7	3.55	A	771.4	514.6	C	771.4	514.6



實例8	2.85	A	719.3	479.9	C	719.4	479.9
實例9	3.75	A	742.4	495.3	C	742.4	495.3
實例10	3.55	A	757.4	505.3	C	757.4	505.3
實例11	3.57	A	686.9	458.3	C	686.9	458.2
實例12	3.51	A	757.4	505.3	C	757.4	505.3
實例13	3.54	A	764.4	509.9	C	764.4	509.9
實例14	3.46	A	757.4	505.3	C	757.4	505.3
實例15	3.44	A	757.4	505.3	C	757.4	505.3
實例16	3.59	A	771.4	514.6	C	771.4	514.6
實例17	3.61	A	771.4	514.6	C	771.4	514.6
實例18	7.60	B	775.391	517.263	D	775.385	517.256
實例19	7.40	B	751.392	501.263	D	751.385	501.256
實例20	3.41	A	743.4	495.9	C	743.4	495.9
實例21	7.35	B	730.355	487.239	D	730.361	487.241
實例22	8.62	B	739.877	493.587	D	739.856	493.573
實例23	7.32	B	737.374	491.918	D	737.377	491.921
實例24	7.35	B	737.375	491.919	D	737.377	491.921
實例25	5.63	B	620.822	414.217	D	620.825	414.219
實例26	7.58	B	754.368	503.247	D	754.361	503.241
實例27	7.36	B	737.374	491.918	D	737.369	491.913
實例28	3.63	A	713.9	476.2	C	713.8	476.2
實例29	3.78	A	720.9	480.9	C	720.9	480.9
實例30	3.82	A	691.9	461.6	C	691.8	461.6
實例31	3.74	A	643.3	429.2	C	643.3	429.2
實例32	8.01	B	643.328	429.222	D	643.324	429.252
實例33	7.73	B	700.832	467.557	D	700.845	467.566
實例34	7.17	B	609.809	406.875	D	609.810	406.876
實例35	8.99	B	710.351		D	710.332	473.890
實例35	6.89	B	568.289	379.196	D	568.292	379.197
實例36	7.69	B	724.843	483.564	D	724.837	483.558
實例37	6.62	B	715.848	477.568	D	715.843	477.562
實例38	8.28	B	728.873		D	728.869	

通用合成程序

1) 將第一胺基酸負載至2-氯三苯甲基氯樹脂上且移除Fmoc

用DCM充分洗滌2-氯三苯甲基氯樹脂(1當量，1.0-1.6 mmol/g)。將所需胺基酸(就1.6 mmol/g負載量而言，通常相對於樹脂0.5-2當量)溶解於DCM (每公克樹脂約10 mL)及DIPEA (就1.6 mmol/g負載量而言，相對於樹脂4當量)中。將溶液添加至樹脂中，且在室溫下震盪懸浮液3-16小時。將樹脂排出，且隨後依次用DCM/MeOH/DIPEA

(17:2:1)、DCM、DMA、DCM充分洗滌。

為移除Fmoc及測定負載量，將樹脂反覆地與哌啶/DMA (1:4)或4-甲基哌啶/DMA (1:4) (12 ×每公克初始樹脂10 mL)一起振盪，且用DMA (2 ×每公克初始樹脂10 mL)洗滌。用MeOH將合併之溶液稀釋至每公克初始樹脂250 mL之體積 V 。用MeOH將此溶液之2 mL等分試樣(V_a)進一步稀釋至250 mL (V_t)。以MeOH為參考在299.8 nm下量測UV吸收，得到吸收 A 。依次用DMA、DCM、DMA、DCM充分洗滌樹脂，且將其在40°C下之高真空中乾燥，得到 m g樹脂。

根據下式計算樹脂之負載量：

$$\text{負載量}[\text{mol/g}] = (A \times V_t \times V) / (d \times \epsilon \times V_a \times m)$$

(其中 d ：光析槽之寬度； $\epsilon = 7800 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

2) 固相肽合成

2a) Prelude™合成器上之合成循環A

用DMA洗滌樹脂。藉由反覆用哌啶/DMA (1:4)或4-甲基哌啶/DMA(1:4)處理來移除Fmoc。用DMA洗滌樹脂。藉由如下步驟進行偶合，添加Fmoc-胺基酸(3當量；NMP中之0.3 M溶液)、HCTU (3當量；NMP中之0.3 M溶液)及DIPEA (4.5當量；NMP中之0.9 M溶液)，接著在室溫下將懸浮液與氮氣混合，持續通常15分鐘至4小時，視特定需求而定。在用DMA洗滌後，通常重複偶合步驟1至3次，視特定需求而定。在用DMA洗滌後，藉由添加Ac₂O/吡啶/DMA (1:1:8)之混合物隨後在室溫下混合懸浮液來進行封端。用DMA洗滌樹脂。

2a) Prelude™合成器上之合成循環B

用DMA洗滌樹脂。藉由反覆用4-甲基哌啶/DMA (1:4)處理來移除Fmoc。用DMA洗滌樹脂。藉由如下步驟進行偶合，添加Fmoc-胺基酸(3當量；NMP中之0.2 M溶液)、HCTU (3當量；NMP中之0.3 M溶液)及DIPEA (3.3當量；NMP中之0.66 M溶液)，接著在室溫下將懸浮液與

氮氣混合，持續通常15分鐘至4小時，視特定需求而定。在用DMA洗滌後，通常重複偶合步驟1至3次，視特定需求而定。在用DMA洗滌後，藉由添加Ac₂O/吡啶/DMA (1:1:8)之混合物隨後在室溫下混合懸浮液來進行封端。用DMA洗滌樹脂。

2b) Prelude™合成器上之合成循環C

用DMA洗滌樹脂。藉由反覆用吡啶/DMA (1:4)或4-甲基吡啶/DMA(1:4)處理來移除Fmoc。用DMA洗滌樹脂。藉由添加Ac₂O/吡啶/DMA (1:1:8)之混合物及隨後在室溫下混合懸浮液來進行封端。用DMA洗滌樹脂。

2c) Liberty™合成器上之合成循環D

用DMF及DCM洗滌樹脂。藉由用20%吡啶/DMF處理(通常每0.1 mmol 7 ml，兩次)來移除Fmoc。用DMF及DCM洗滌樹脂。藉由如下步驟進行偶合，添加Fmoc-胺基酸(5當量；DMF中之0.2 M溶液)、HCTU (5當量；DMF中之0.5 M溶液)及DIPEA (10當量；NMP中之2 M溶液)，接著在75°C或50°C下將懸浮液與氮氣混合，使用微波功率0至20瓦持續通常5至50分鐘，視特定需求而定。在用DMF洗滌後，可能重複一次偶合步驟，視特定需求而定。用DMF洗滌樹脂。

3) 在有或無伴隨移除保護基之情況下自樹脂裂解

3a) 裂解方法A

在室溫下將樹脂(0.1 mmol)與95%水性TFA/EDT/TIS (95:2.5:2.5)(3 mL)一起震盪2小時。過濾出裂解溶液，且添加新鮮溶液(3 mL)。在室溫下震盪懸浮液1小時，隨後過濾出裂解溶液。添加新鮮溶液(3 mL)，且在室溫下震盪懸浮液1小時。過濾出裂解溶液。將合併之裂解溶液緩慢倒至冷的庚烷/乙醚(1:1)混合物(35 mL)上，得到沈澱物。將懸浮液離心，且倒出上清液。用冷的庚烷/乙醚(1:1) (10-20 mL)洗滌殘餘物，將懸浮液離心且倒出上清液。此步驟進行1-2

次。在高真空中乾燥固體。

3b) 裂解方法B

在室溫下將樹脂 (0.1 mmol) 與 95% 水性 TFA//TIS/DTT (95:2.5:2.5)(3 mL)一起震盪3小時。過濾出裂解溶液。用95%水性TFA (1 mL)沖洗樹脂一次。將合併之裂解及洗滌溶液緩慢倒至冷的庚烷/乙醚(1:1)混合物(10-15 mL)上，得到沈澱物。將懸浮液離心，且倒出上清液。將乙醚(10 mL)添加至殘餘物中，將懸浮液渦旋3分鐘且離心，並倒出上清液。重複洗滌過程兩次。在高真空中乾燥固體。

3c) 裂解方法C

將HFIP/DCM (1:3) (3 mL)添加至樹脂(0.1 mmol)中且在室溫下震盪懸浮液20分鐘。過濾出裂解溶液且收集。重複此程序兩次。最後，用HFIP/DCM (1:3) (1 mL)洗滌樹脂一次。合併之裂解及洗滌溶液真空濃縮至乾燥。粗產物自ACN/H₂O凍乾。

4) 二硫鍵形成

4a) 環化方法A

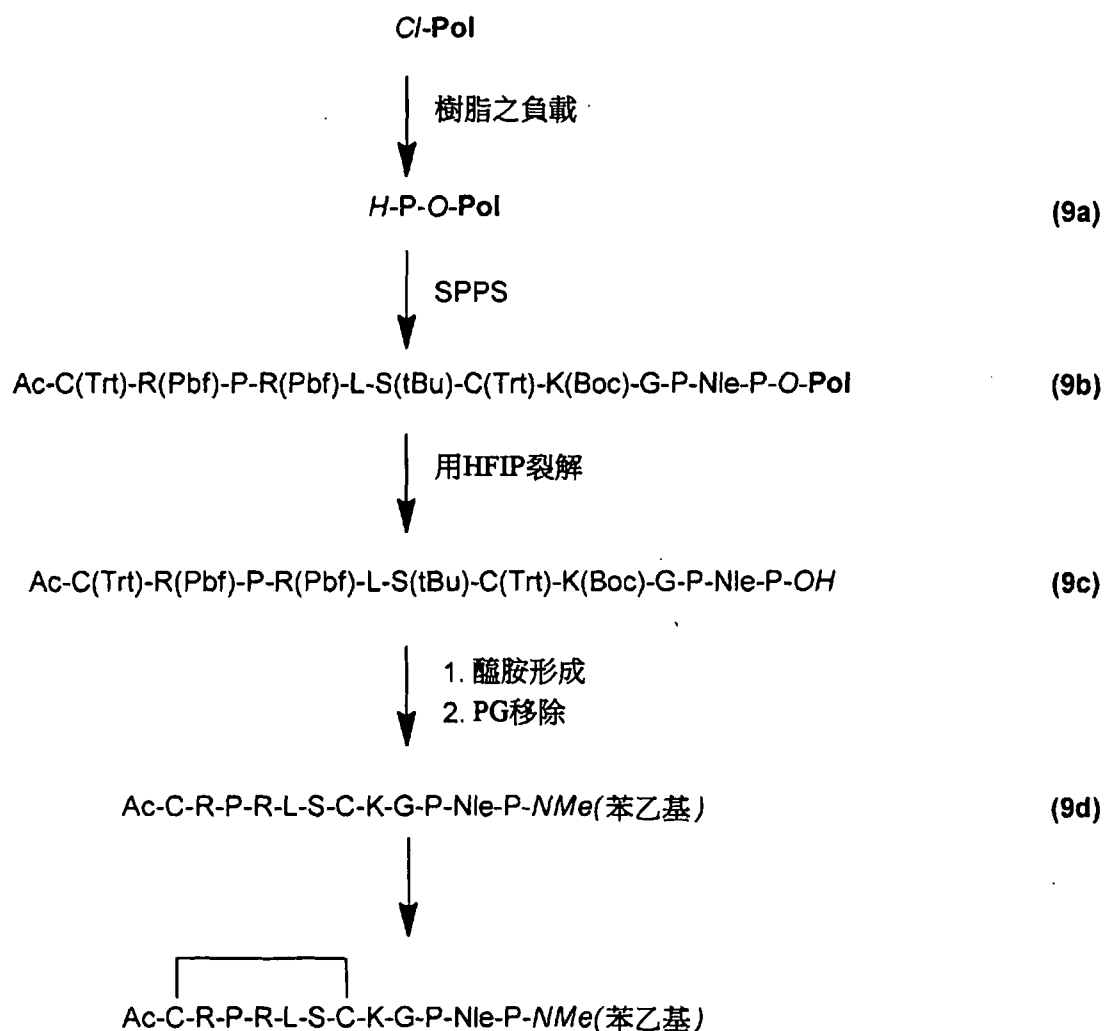
將完全脫除保護基之線狀前驅體肽溶解於H₂O/DMSO (9:1)或(4:1)中以通常得到0.5-7 mM之濃度。接著在室溫下攪拌反應混合物，視需求而定持續通常16-96小時，且隨後高真空濃縮至乾燥。

4b) 環化方法B

將完全脫除保護基之線狀前驅體肽(1當量)溶解於H₂O中以得到通常約1-25 mM之濃度。添加50 mM I₂於AcOH中之溶液(1-2當量)且在室溫下攪拌混合物直至實現完全轉化。添加含0.5 M抗壞血酸之H₂O以淬滅過量I₂。

下文中描述代表性實例之合成。

實例9 Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-NMe(苯乙基) (二硫鍵C¹-C⁷)之合成



實例9

● 中間物9a之製備

(使2-氯三苯甲基氯樹脂負載有Fmoc-P-OH，移除Fmoc及測定樹脂之負載量)

用DCM(3×)洗滌2-氯三苯甲基氯樹脂(2.00 g, 3.20 mmol)。添加Fmoc-P-OH (1.08 g, 3.20 mmol)於DCM (20 mL)及DIPEA (2.24 mL, 12.8 mmol)中之溶液且在室溫下震盪懸浮液3小時。用DCM/MeOH/DIPEA (17:2:1) (3×)、DCM (3×)、DMA (3×)、DCM (3×)充分洗滌樹脂。

接著用哌啶/DMA (1:4)混合物處理樹脂12次，持續2分鐘(每次12 mL)。收集哌啶/DMA溶液用於測定樹脂之負載量(參見通用程序)。

用DCM (3×)、DMA (3×)、DCM (3×)充分洗滌樹脂且真空乾燥以

得到中間物**9a** (2.25 g ; 負載量=1.12 mmol/g)。

● 中間物**9b**之製備

(線狀肽之組裝)

在Prelude™肽合成器上對中間物**9a** (89 mg , 0.10 mmol)進行固相肽合成。偶合進行如下：

偶合	AA	偶合次數×反應時間	合成循環
1	Nle	2×1 h	B
2	P	2×30 min	B
3	G	2×1 h	B
4	K(Boc)	2×30 min	B
5	C(Trt)	2×30 min	B
6	S(tBu)	2×30 min	B
7	L	2×30 min	B
8	R(Pbf)	4×1 h	B
9	P	2×1 h	B
10	R(Pbf)	4×1 h	B
11	C(Trt)	2×1 h	B
12	Ac	1×10 min	C

● 中間物**9c**之製備

(自樹脂HFIP裂解)

添加HFIP/DCM (1:3) (3 mL)至中間物**9b** (0.100 mmol)且在室溫下震盪懸浮液20分鐘。過濾出裂解溶液且收集。重複此程序兩次。最後，用HFIP/DCM (1:3) (1 mL)洗滌樹脂一次。合併之裂解及洗滌溶液真空濃縮至乾燥。粗產物自ACN/H₂O凍乾以得到呈白色固體狀之中間物**9c** (37.2 mg , 14.8 μmol)。

● 中間物**9d**之製備

(醯胺形成及保護基移除)

將中間物**9c** (37.0 mg , = 14.7 μmol)及TBTU (7.1 mg , 22.1 μmol)溶解於DCM (5 mL)中。添加DIPEA (5.1 μl , 29.4 μmol)且在室溫下攪拌溶液2分鐘。添加N-甲基-苯乙胺(3.2 μl , 22.1 μmol)，在室溫下攪拌反應物1小時40分鐘，接著分配於EtOAc/正丁醇(9:1) (50 mL)與5% NaHCO₃水溶液(5 mL)之間。用5% NaHCO₃水溶液(5mL)、鹽水(5mL)

洗滌有機層，經 Na_2SO_4 乾燥，過濾且真空濃縮至乾燥。

將殘餘物溶解於95% TFA/TIS/EDT (95:2.5:2.5)水溶液(5 mL)中。在室溫下攪拌反應混合物3小時，接著倒至冷的庚烷/乙醚(1:1) (35 mL)上。將懸浮液離心且傾析溶劑。用冷的乙醚/庚烷(1:1) (10 mL)洗滌殘餘物兩次且隨後真空乾燥，得到呈米色固體狀之**中間物9d** (27.0 mg, 14.7 μmol)。產物未經純化即可進行下一步驟。

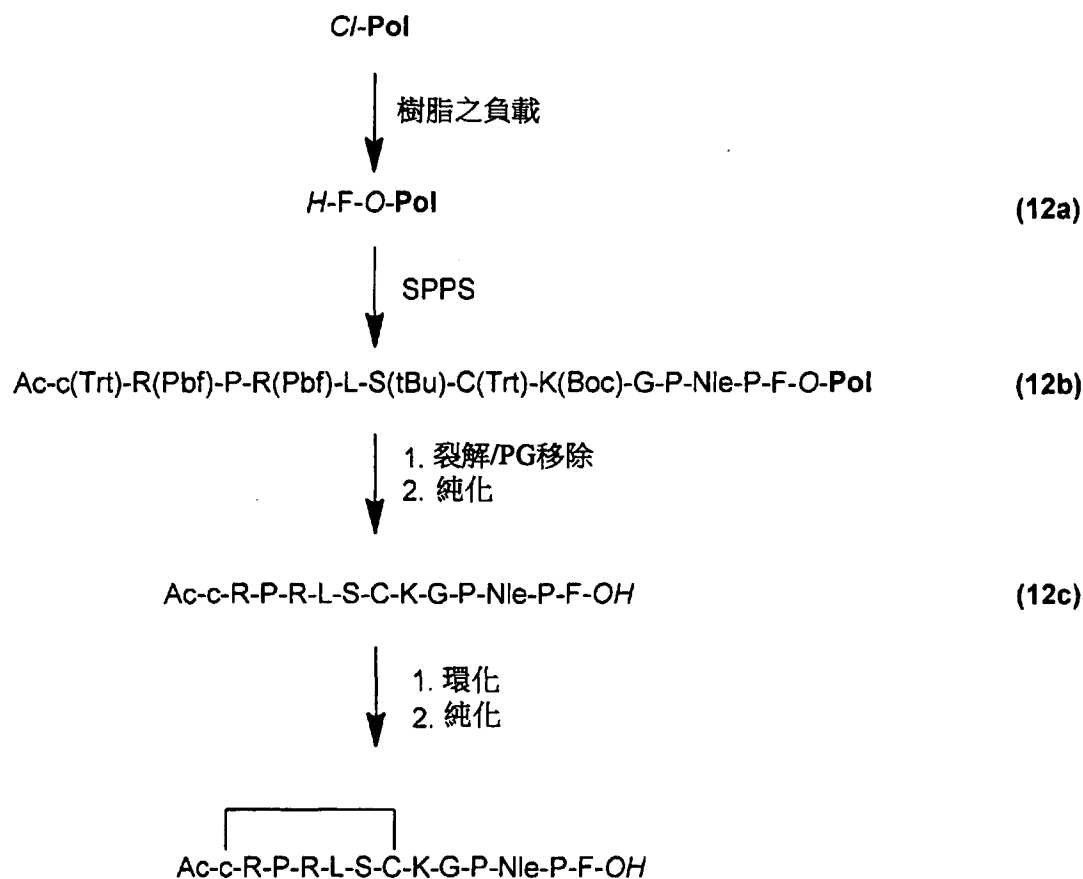
● **實例9**之製備

(二硫鍵形成及純化)

將**中間物9d** (26.9 mg, 14.7 μmol)溶解於 H_2O (3.7 mL)中(溶液略微混濁)。添加50 mM I_2 於AcOH中之溶液(0.353 mL, 17.6 μmol)且在室溫下攪拌混合物30分鐘。添加含0.5 M抗壞血酸之 H_2O (0.044 mL, 22.1 μmol)以淬滅過量碘。將溶液濃縮至約3.5 mL且隨後進行製備型逆相HPLC。凍乾溶離份以得到呈白色固體狀之**實例9** (6.8 mg, 3.7 μmol)。

藉由分析型HPLC(分析方法A； $t_R=3.75$ min)及UPLC-MS(分析方法C；量測值： $[\text{M}+3]^{3+}=495.3$ ；計算值： $[\text{M}+3]^{3+}=495.3$)分析純產物。

實例12 Ac-c*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-F-OH (二硫鍵 $\text{C}^1\text{-C}^7$)之合成



實例 12

● 中間物12a之製備

(使2-氯三苯甲基氯樹脂負載有Fmoc-F-OH，移除Fmoc及測定樹脂之負載量)

用DCM (3×)洗滌2-氯三苯甲基氯樹脂(10.0 g，16.0 mmol)。添加Fmoc-F-OH (12.4 g，32.0 mmol)於DCM (100 mL)及DIPEA (11.2 mL，64.0 mmol)中之溶液且在室溫下震盪懸浮液5小時。用DCM/MeOH/DIPEA (17:2:1) (3×)、DCM (3×)、DMA (3×)、DCM (3×)充分洗滌樹脂。

接著用哌啶/DMA (1:4)混合物處理樹脂12次，持續2分鐘(每次50 mL)，隨後用DMA (2×)洗滌。收集哌啶/DMA溶液及DMA洗滌溶液用於測定樹脂之負載量(參見通用程序)。

用DCM (3×)、DMA (3×)、DCM (3×)充分洗滌樹脂且真空乾燥以得到中間物12a (12.8 g；負載量=0.79 mmol/g)。

● 中間物12b之製備

(線狀肽之組裝)

在PreludeTM肽合成器上對中間物12a (127 mg, 0.10 mmol)進行固相肽合成。偶合進行如下：

偶合	AA	偶合次數×反應時間	合成循環
1	P	2×1 h	A
2	Nle	2×1 h	A
3	P	2×1 h	A
4	G	2×2 h	A
5	K(Boc)	2×1 h	A
6	C(Trt)	1×3 h	A
7	S(tBu)	2×1 h	A
8	L	2×1 h	A
9	R(Pbf)	4×3 h	A
10	P	2×2 h	A
11	R(Pbf)	4×3 h	A
12	c(Trt)	1×3 h	A
13	Ac	1×20 min	C

● 中間物12c之製備

(自樹脂裂解，伴隨保護基移除及純化)

用DCM (4×)仔細洗滌中間物12b (0.10 mmol)。添加95%水性TFA/EDT/TIS (95:2.5:2.5)混合物(2 mL)且在室溫下震盪懸浮液2小時。過濾出裂解溶液，且添加新鮮裂解溶液(2 mL)。在室溫下震盪懸浮液1小時，隨後過濾出裂解溶液。添加新鮮溶液(2 mL)，且在室溫下震盪懸浮液1小時。過濾出裂解溶液。將合併之裂解溶液倒至冷的庚烷/乙醚(1:1)混合物(30 mL)上，得到沈澱物。將混合物離心，且倒出上清液。再用冷的庚烷/乙醚(1:1) (10 mL)洗滌固體，將混合物離心且倒出上清液。真空乾燥固體。藉由製備型HPLC純化粗產物且凍乾以得到中間物12c (53 mg, 0.029 mmol)。

● 實例12之製備

(環化及純化)

將中間物12c (53 mg, 0.029 mmol)溶解於H₂O/DMSO (9:1) (18

mL)中。在室溫下攪拌反應混合物40小時，接著真空濃縮至乾燥。藉由製備型HPLC純化粗產物且凍乾以得到呈白色固體狀之**實例12** (27.4 mg ; 0.014 mmol)。

藉由分析型HPLC(分析方法A ; $t_R=3.51$ min)及UPLC-MS(分析方法C ; 量測值 : $[M+3]^{3+}=505.3$; 計算值 : $[M+3]^{3+}=505.3$)分析純產物。

實例18 Ac-(D-hC)*-R-P-R-L-S-(hC)*-K-G-P-f-a-f-OH (二硫鍵 C¹-C⁷)之合成

固體支撐物上之線狀肽合成：

經由標準Fmoc化學方法對Fmoc-D-Phe-Wang樹脂(取代：0.66 mmol/g)進行手動固相肽合成。使0.3 mmol樹脂在DMF中溶脹30分鐘；瀝乾DMF且用含20%哌啶之DMF處理樹脂30分鐘以移除Fmoc基團。樹脂藉由DMF洗滌3次且與預先活化之Fmoc胺基酸溶液(Fmoc胺基酸/HBTU/HOBt/NMM=3:3:3:6當量)偶合2小時。在每次偶合後進行茚三酮測試以檢查偶合效率。

藉由反覆移除Fmoc保護基及偶合受保護之胺基酸直至N端末尾而於樹脂上組裝肽鏈。

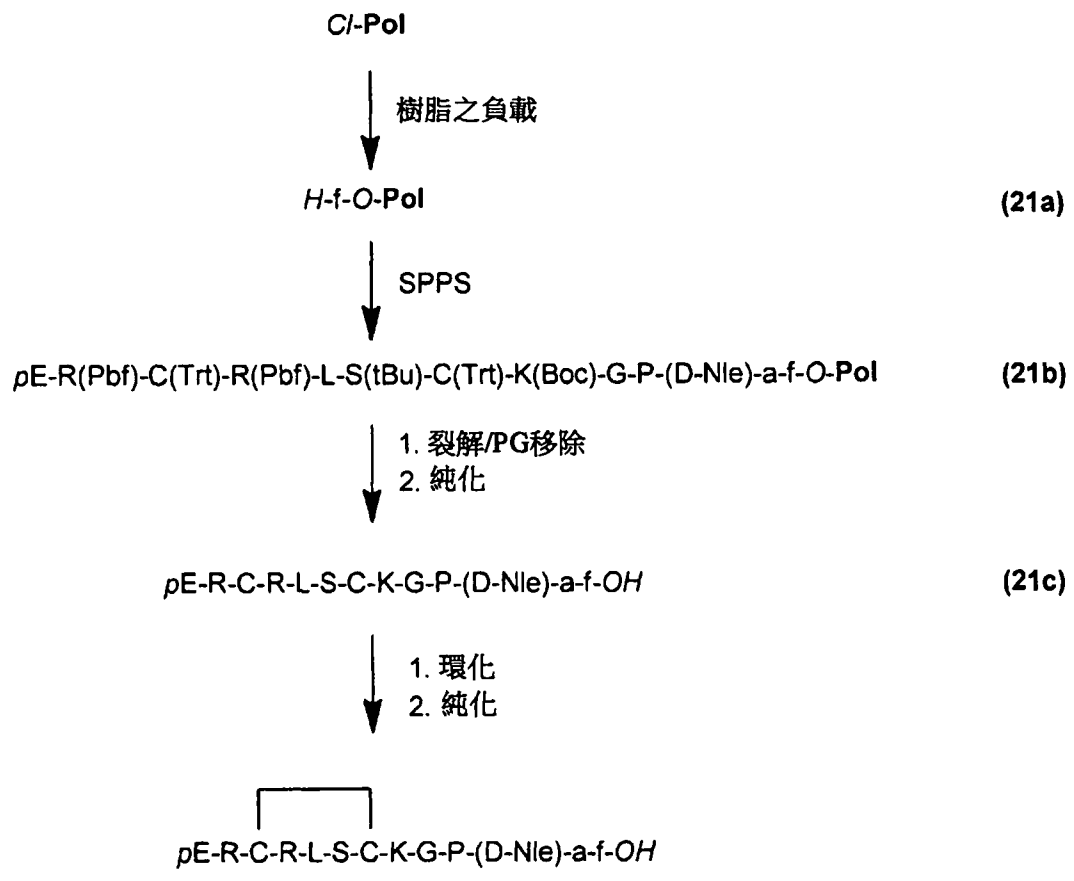
在偶合最後的胺基酸後，用DMF及乙醚洗滌肽樹脂且真空乾燥。用TFA裂解混合液(TFA/硫代苯甲醚/苯酚/EDT/H₂O = 87.5:5:2.5:2.5:2.5, v/v)處理經乾燥之肽樹脂用於裂解及移除側鏈保護基。自冷的乙醚沈澱粗肽，藉由過濾來收集且在高真空下乾燥。在HPLC(管柱：2"吋Delta Pak C18，波長：215 nm)上純化粗肽以得到所需產物。

環化：

將各粗肽以1 mg/mL之濃度溶解於水-乙腈(A.C.S.試劑, Fisher)中(約80%:20%；水:乙腈，V:V)，將含0.1 M I₂ (A.C.S.試劑, Sigma

Aldrich)之50% AcOH (A.C.S.試劑, Fisher)/H₂O逐滴添加至溶液中，同時劇烈攪拌直至I₂顏色持續。一旦完全氧化(藉由分析型HPLC及質譜監測)，逐滴添加1 M L-抗壞血酸(A.C.S.試劑, Sigma Aldrich)水溶液，同時持續攪拌以還原過量I₂直至溶液變為無色。在過濾後，將以上溶液負載至2吋C18管柱(在215 nm下偵測)上，且藉由使用TFA緩衝液(緩衝液A，含0.1% TFA (A.C.S.級, NuGeneration Technology, LLC)之水；緩衝液B，100%乙腈)純化，將所收集之純度>95%之溶離份凍乾。

實例21 *pE-R-C*-R-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-a-f-OH* (二硫鍵C³-C⁷)之合成



實例21

● 中間物21a之製備

(使2-氯三苯甲基氯樹脂負載有*Fmoc-f-OH*，移除*Fmoc*及測定樹脂之負載量)

以類似於上述通用程序之方式使2-氯三苯甲基氯樹脂(5.0 g，8.01 mmol)與*Fmoc-f-OH* (3.10 g，8.01 mmol)於DCM (50 mL)及DIPEA

(5.59 mL, 32.0 mmol)中之溶液反應，得到中間物**21a** (5.87 g, 負載量 = 0.897 mmol/g)。

● 中間物**21b**之製備

(線狀肽之組裝)

在Liberty™微波肽合成器上對中間物**21a** (0.100 mmol)進行固相肽合成。偶合進行如下：

偶合	AA	偶合次數×反應時間	溫度 ℃	微波功率	合成循環
1	a	1×7.5 min	50	20	D
2	D-Nle	1×7.5 min	50	20	D
3	P	1×7.5 min	50	20	D
4	G	1×7.5 min	50	20	D
5	K(Boc)	1×7.5 min	50	20	D
6	C(Trt)	1×2 min	50	0	D
		1×4 min	50	25	
7	S	1×7.5 min	50	25	D
8	L	1×7.5 min	50	25	D
9	R(Pbf)	2×42 min	50	0	D
		2×7.5 min	50	25	
10	C(Trt)	1×2 min	50	0	D
		1×4 min	50	25	
11	R(Pbf)	2×42 min	50	0	D
		2×7.5 min	50	25	
12	pE	1×7.5 min	50	25	D

● 中間物**21c**之製備

(自樹脂裂解，伴隨保護基移除，隨後純化)

將95%水性TFA/EDT/DTT (95:2.5:2.5)混合物(2 mL)添加至中間物**21b** (0.1 mmol)。在室溫下震盪懸浮液2小時，隨後過濾出裂解溶液。接著再用95%水性TFA/EDT/TIS (95:2.5:2.5) (2mL)處理樹脂，在室溫下振盪1小時且過濾。將合併之裂解及洗滌溶液倒至冷的庚烷/乙醚(1:1)混合物(11 mL)上，得到沈澱物。將懸浮液離心，且倒出上清液。將乙醚(10 mL)添加至殘餘物中，將懸浮液渦旋3分鐘且離心，並倒出上清液。重複洗滌過程兩次。高真空乾燥固體。藉由製備型HPLC純化粗物質且自ACN/H₂O凍乾，得到中間物**21c** (55 mg, 0.030

mmol)。

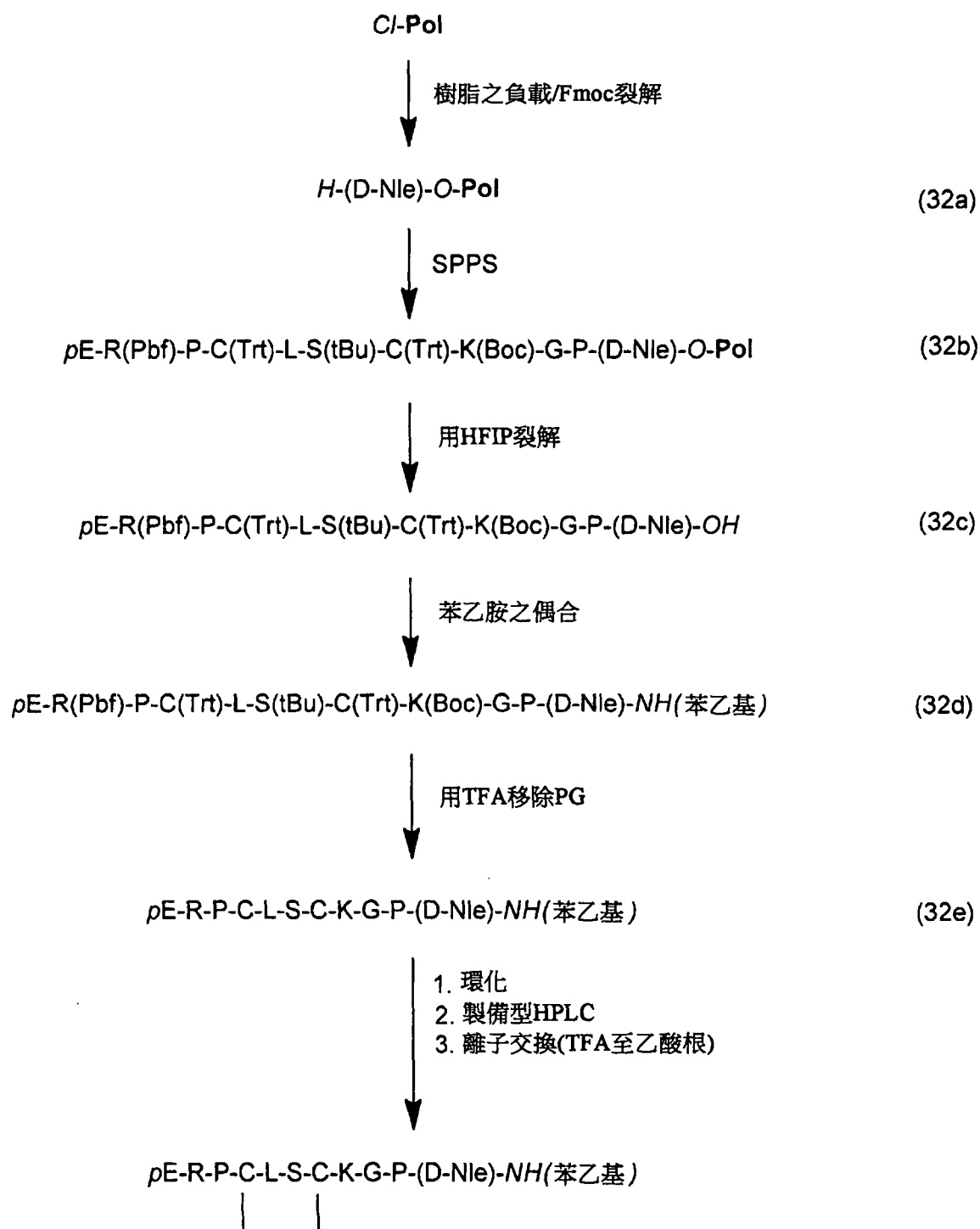
● **實例21**之製備

(環化及純化)

將中間物**21c** (18 mg, 9.97 μmol)溶解於 H_2O (1.0 mL)中。將50 mM I_2 於AcOH (0.24 mL, 12 μmol)中之溶液一次性添加至攪拌溶液，且在室溫下攪拌溶液隔夜直至LCMS展示反應完全。添加含0.5 M抗壞血酸之 H_2O (24 μmol , 12 μmol)以淬滅過量 I_2 。藉由製備型HPLC純化粗物質且自ACN/ H_2O 凍乾以得到呈白色固體狀之實例21 (12 mg, 6.32 μmol)。

藉由分析型HPLC(分析方法B； $t_R=7.35$ min)及UPLC-HRMS (分析方法D；量測值： $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}=730.355$ ；計算值： $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}=730.361$)分析純產物。

實例32 *pE-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-NH(苯乙基)(二硫鍵 $\text{C}^4\text{-C}^7$)*乙酸鹽之合成



實例32

● 中間物32a之製備

(使2-氯三苯甲基氯樹脂負載有Fmoc-D-Nle-OH，移除Fmoc及測定樹脂之負載量)

將2-氯三苯甲基氯樹脂(50.0 g，85.0 mmol)懸浮於DCM (400 mL)中，攪拌懸浮液10分鐘且隨後瀝乾溶劑，用DCM (3×200 mL)洗滌樹

脂。接著，將Fmoc-D-Nle-OH (24.0 g，68.0 mmol)及DIPEA (96.5 ml，552.5 mmol)於DCM (120.0 mL)中之溶液添加至樹脂，用氮氣沖洗懸浮液且在室溫下攪拌5分鐘。添加另一份DIPEA (22.7 ml，127.5 mmol)且在室溫下攪拌反應混合物隔夜。

瀝乾反應混合物且用DCM (3×250 mL)洗滌樹脂，每次持續2分鐘。用混合物DCM/MeOH/DIPEA (70:15:15) (2×250 mL)淬滅樹脂，每次持續10分鐘。

藉由用哌啶/DMF (1:3) (1×300 mL)處理樹脂5分鐘裂解Fmoc基團。瀝乾樹脂，接著用哌啶/DMF(1×300 mL)處理15分鐘，繼而為洗滌步驟：DMF (6×250 mL，每次2分鐘)、異丙醇(2×250 mL，每次2分鐘)及TBME (6×250 mL，每次2分鐘)。在35℃下真空乾燥樹脂24小時，得到中間物**32a** (57.8 g，負載量= 1.08mmol/g)。

● 中間物**32b**之製備
(線狀肽之組裝)

在自動肽合成器(CS BIO536™)上對中間物**32a** (18.5 g，20.0 mmol)進行固相肽合成。偶合循環定義如下：

- 胺基酸偶合：AA (3.0當量)，DIC (3.0當量)，HOBt (3.0當量)，DMF(參見下表)
- 洗滌：DMF (4×150mL，每次2分鐘)。
- 脫除Fmoc保護基：哌啶/DMF (1:3) (150 mL持續5分鐘接著150 mL持續15分鐘)。
- 洗滌：DMF (6×150mL，每次2分鐘)。

偶合	AA	偶合次數×反應時間	偶合方法
1	Fmoc-L-Pro-OH	1×120 min	DIC/HOBt
2	Fmoc-Gly-OH	1×120 min	DIC/HOBt
3	Fmoc-L-Lys(Boc)-OH	1×120 min	DIC/HOBt
4	Fmoc-L-Cys(Trt)-OH	1×120 min	DIC/HOBt
5	Fmoc-L-Ser(tBu)-OH	1×120 min	DIC/HOBt
6	Fmoc-L-Leu-OH	1×120 min	DIC/HOBt

7	Fmoc-L-Cys(Trt)-OH	1×120 min	DIC/HOBt
8	Fmoc-L-Pro-OH	1×120 min	DIC/HOBt
9	Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH	1×120 min	DIC/HOBt
10	Boc-L-Pyr-OH	1×120 min	DIC/HOBt

在肽組裝後，用DMF (6×150 mL，每次2分鐘)、異丙醇(6×150 mL，每次2分鐘)及TBME (6×150 mL，每次2分鐘)洗滌樹脂。在35℃下高真空乾燥肽樹脂隔夜以產生中間物**32b** (57.6 g，20.0 mmol)。

● 中間物**32c**之製備

(自樹脂HFIP裂解)

將一部分中間物**32b** (27 g，9.37 mmol)懸浮於DCM (300 mL)中且攪拌15分鐘。瀝乾樹脂，接著用HFIP/DCM (3:7) (3×270 mL，每次15分鐘)處理。過濾出裂解溶液且收集。用DCM (3×300 mL)洗滌樹脂。合併之裂解及洗滌溶液真空濃縮至乾燥。在35℃下真空乾燥白色粉末隔夜產生中間物**32c**-批次1 (23.5 g，9.37 mmol)。

用另一部分中間物**32b** (28.0 g，9.72 mmol)重複以上提及之程序，得到中間物**32c**-批次2 (26.1 g，9.72 mmol)。

● 中間物**32d**之製備

(苯乙胺之溶液相偶合)

將中間物**32c**-批次2 (20.0 g，7.44 mmol，1.0當量)及HATU (5.23 g，13.8 mmol，1.85當量)溶解於DMF (400 mL)中。添加苯乙胺(1.67 g，13.8 mmol，1.85當量)及DIPEA (3.56 g，27.6 mmol，3.71當量)於DMF (60 mL)中之溶液。

在室溫下攪拌反應混合物30分鐘，接著冷卻至0℃，接著添加鹽水(460 mL)。攪拌懸浮液10分鐘，接著藉由過濾分離產物。用H₂O (300 mL)洗滌濾餅，接著小心移出，隨後溶解於DCM (300 mL)中。溶液經MgSO₄乾燥，接著真空濃縮至乾燥。對粗產物進行矽膠急驟層析(溶離劑：DCM及DCM/iPrOH (8:2))以得到中間物**32d**-批次1 (14.4

g, 6.6 mmol)。

用中間物32c-批次1 (23.4 g, 9.37 mmol)重複同一程序，不包括急驟層析，得到中間物32d-批次2 (28.0 g, 9.37 mmol)。

● 中間物32e之製備

(保護基移除)

將中間物32d-批次2 (28.0 g, 9.37 mmol)溶解於TFA/DCM/EDT/TIS (90:5:2.5:2.5) (290 mL)中且在室溫下攪拌反應物2小時。

過濾出裂解溶液且倒至冷的TBME (3 L) (0-4°C)上。在冰-水浴中攪拌混濁懸浮液30分鐘，接著經由孔4玻璃過濾器過濾。用TBME (2×100 mL)洗滌由此獲得之白色固體，接著在35°C下真空乾燥隔夜，得到中間物32e-批次1 (8.9 g, 5.9 mmol)。

用中間物32d-批次1 (14.4 g, 6.6 mmol)重複同一程序，產生中間物32e-批次2 (9.6 g, 6.3 mmol)。

● 實例32)之製備

1) 環化

將中間物32e (5.0 g, 3.3 mmol)溶解於水(500 mL)中。一次性添加碘(1.18 g, 4.66 mmol, 1.41當量)於乙酸(93 mL)中之溶液。在室溫下攪拌反應混合物10分鐘。添加抗壞血酸(1.03 g, 5.83 mmol, 1.77當量)於水(5.8 mL)中之溶液且攪拌反應混合物10分鐘，過濾且在4°C下儲存直至純化。

重複相同環化程序直至已處理18.3 g (12.1 mmol)中間物32e。

2) 純化

每次注射0.5-5.0 g肽分多份對環狀肽溶液進行製備型HPLC。彙集純度高於95%之溶離份且冷凍乾燥以產生4.89 g (3.2 mmol)總量之經純化肽(TFA鹽)。

3) 藉由離子交換形成乙酸鹽

將75 g (100 mL)呈OH⁻形式之強陰離子交換劑樹脂(Ion exchanger III, Merck)置放於經燒結玻璃過濾器(孔隙度3)中且隨後添加乙酸/水(1:3)溶液(300 mL)，手動攪拌懸浮液2分鐘接著瀝乾樹脂。用另一份乙酸/水(1:3) (300 mL)重複該方法。用去離子水洗滌樹脂直至觀察到中性排出液。接著，將樹脂轉移至配備有經燒結玻璃過濾器(孔隙度3)之4×20 cm管柱。

將4.8 g經純化肽溶解於去離子水(50 mL)中且添加至管柱。用去離子水(200 mL)溶離產物。藉由TLC點樣進行產物溶離對照，彙集富集溶離份且冷凍乾燥以產生**實例32** (4.1 g, 2.9 mmol)。

藉由分析型HPLC(分析方法B； $t_R=8.01$ min)及UPLC-HRMS (分析方法D；量測值： $[M+2H]^{2+}=643.328$ ；計算值： $[M+2H]^{2+}=643.324$)分析純產物。乙酸鹽含量為7.99-8.27%且水含量為1.94-1.96%。

其他實例以類似方式合成：

- **實例1至8、10、11、13至17、20、28至31**以類似於**實例12**之方式合成。
- **實例19、26、27、36-38**以類似於**實例18**之方式合成。
- **實例22-25、33-35**以類似於**實例21**之方式合成。

生物結合物實例：

實例39：白蛋白-PPA-O2Oc-O2Oc-O2Oc-O2Oc-Q-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)苯乙胺，其中PPA為3-(吡啶-2-基二硫基)丙酸

步驟1：白蛋白去封端

- 用TCEP去封端

向15 mL管中之白蛋白(500 mg, Aldrich, 凍乾粉末，來自人類血清)於10 mL PBS 1×緩衝液中之溶液中添加一次TCEP鹽酸鹽溶液(生物級純水中之1.074 mg)。在室溫下震盪所得溶液1小時，隨後將其脫

鹽且用兩個Amicon Ultra-4離心過濾器(30K MWCO)洗滌。使過濾器在4K g下旋轉40分鐘，且棄去濾液。向各過濾器中添加3 mL生物級純水以用於各洗滌(在14K g下旋轉10分鐘)，且重複洗滌過程3次。將去封端HSA溶解於水(共約20 mL)中。將溶液轉移至50 mL Falcon管中且凍乾，得到結晶粉末(500 mg)。

藉由UPLC-MS (分析方法F；量測值：66439.0；預期值：66437)分析純產物。

- 測定去封端HSA中游離硫醇基團之數目

向2 mL管中之此去封端HSA (2 mg)於400 μ L PBS pH 7.4中之溶液中添加6-順丁烯二醯亞胺基己酸(13 μ g)水溶液。在室溫下震盪所得溶液2小時。UPLC-MS (分析方法G)顯示僅形成單加合物，量測值：66649.0；預期值：66648。

- 用DTT去封端

向15 mL管中之白蛋白(400 mg，Aldrich，凍乾粉末，來自人類血清)於5 mL PBS 1 $\times$ 緩衝液中之溶液中添加一次DTT (0.232 μ l，生物級純水中2 mg/mL)溶液。在室溫下震盪所得溶液2小時，隨後將其脫鹽且用二十個Amicon Ultra-0.5離心過濾器(10K MWCO)洗滌。使過濾器在14K g下旋轉10分鐘，且棄去濾液。向各過濾器之頂部添加生物級純水以用於各洗滌(在14K g下旋轉10分鐘)，且重複洗滌過程6次。將去封端HSA溶解於水(共約20 mL)中。將溶液轉移至50 mL Falcon管中且凍乾，得到結晶粉末(376 mg)。

藉由UPLC-MS (分析方法G；量測值：66438.5；預期值：66437)分析純產物。

- 測定去封端HSA中游離硫醇基團之數目

向2 mL管中之此去封端HSA (3 mg)於400 μ L PBS pH 7.4中之溶液中添加3-順丁烯二醯亞胺基丙酸(25 μ g)水溶液。在室溫下震盪所得溶

液隔夜。UPLC-MS (分析方法G)顯示僅形成單加合物，量測值：66608.0；預期值：66606。

- 用半胱胺酸去封端

向2 mL管中之白蛋白(120 mg, Aldrich, 凍乾粉末，來自人類血清)於1 mL 50 mM PBS緩衝液pH 8.0中之溶液中添加一次半胱胺酸(10.94 mg)。在室溫下震盪所得溶液1小時，隨後將其脫鹽且用兩個Amicon Ultra-0.5離心過濾器(10K MWCO)洗滌。使過濾器在14K g下旋轉10分鐘，且棄去濾液。向各過濾器之頂部添加生物級純水以用於各洗滌(在14K g下旋轉10分鐘)，且重複洗滌過程5次。將去封端HSA溶解於水(共4 mL)中。將溶液轉移至15 mL Falcon管中且凍乾，得到結晶粉末(108 mg)。

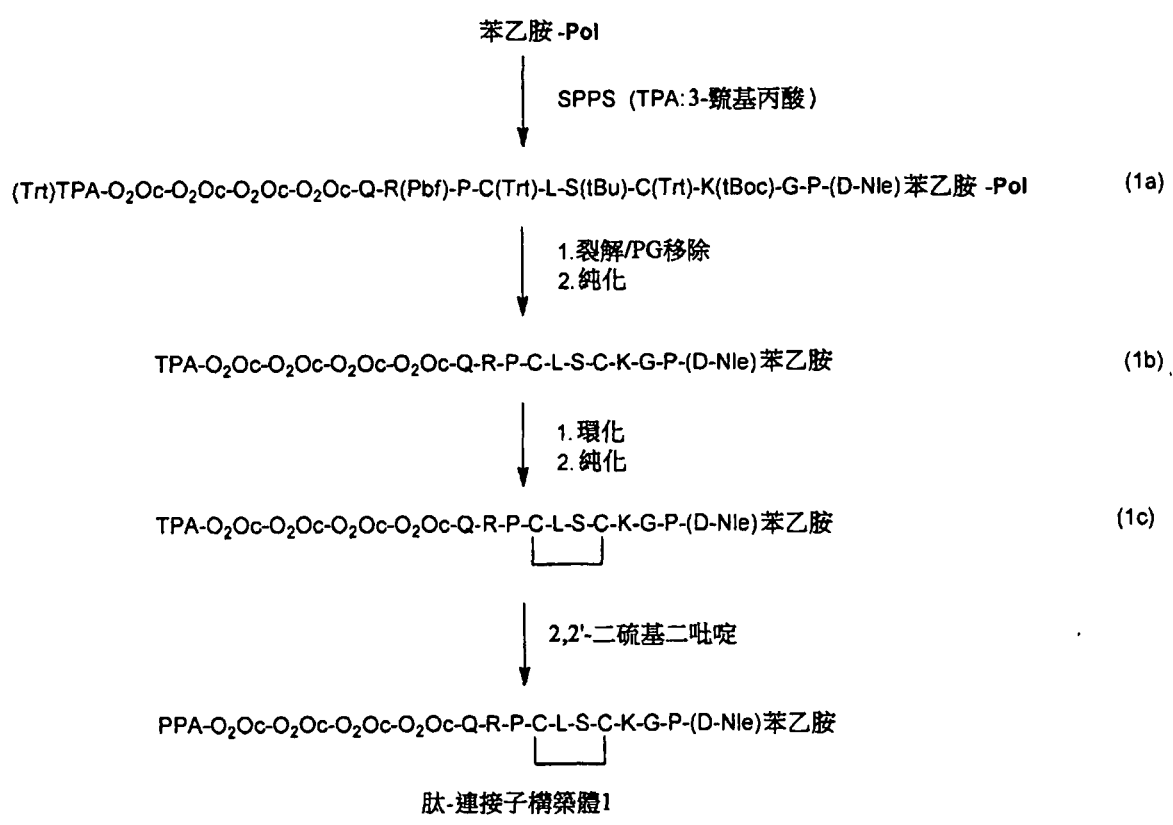
藉由UPLC-MS (分析方法G；量測值：66439；預期值：66437)分析純產物。

- 測定去封端HSA中游離硫醇基團之數目

向2 mL管中之此去封端HSA (3 mg)於500 μ L PBS pH 7.4中之溶液中添加3-順丁烯二醯亞胺基丙酸(15 μ g)水溶液。在室溫下震盪所得溶液1小時。UPLC-MS (分析方法G)顯示僅形成單加合物，量測值：66608.0；預期值：66606。

步驟2：

肽-連接子構築體1之合成：PPA-O2Oc-O2Oc-O2Oc-O2Oc-Q-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)苯乙胺，其中PPA為3-(吡啶-2-基二硫基)丙酸



● 中間物1a之製備

(線狀肽之組裝)O₂Oc-O₂Oc-O₂Oc-O₂Oc-Q-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle) 苯乙胺

● 在Liberty™微波肽合成器上對苯乙胺-AMEBA樹脂(Aldrich , 0.25 mmol)進行固相肽合成。偶合進行如下：

偶合	AA	偶合次數×反應時間	溫度 ℃	微波功率
1	D-Nle	1×7.5 min	50	20
2	P	1×7.5 min	50	20
3	G	1×7.5 min	50	20
4	K(tBoc)	1×7.5 min	50	20
5	C(Trt)	1×2 min	50	0
		1×4 min	50	25
6	S(tBu)	1×7.5 min	50	20
7	L	1×7.5 min	50	25
8	C(Trt)	1×2 min	50	0
		1×4 min	50	25
9	P	1×7.5 min	50	25
10	R(Pbf)	2×42 min	50	0
		2×7.5 min	50	25
11	Q(Trt)	1×7.5 min	50	25
12	O ₂ Oc	1×7.5 min	50	25
13	O ₂ Oc	1×7.5 min	50	25
14	O ₂ Oc	1×7.5 min	50	25
15	O ₂ Oc	1×7.5 min	50	25
16	TPA(Trt)	1×7.5 min	50	25

- **中間物1b之製備**

(自樹脂裂解，伴隨保護基移除，隨後純化)

將由含 1.54 g DTT 及 0.75 mL 硫代苯甲醚之 6 mL TFA/TIPS/水 (95:2.5:2.5) 製成之溶液添加至**中間物1a** (0.25 mmol) 且在室溫下震盪懸浮液 5 小時。過濾出裂解溶液且用 95% 水性 TFA 洗滌樹脂。將合併之裂解及洗滌溶液倒至冷的乙醚上，得到沈澱物。將懸浮液離心，且倒出上清液。將乙醚添加至殘餘物，將懸浮液渦旋 3 分鐘，離心且倒出上清液。重複洗滌過程 3 次。高真空乾燥固體。藉由製備型 HPLC 純化粗物質且自 ACN/H₂O 凍乾以得到**中間物1b**。

- **中間物1c之製備**

(環化及純化)

將**中間物1b**溶解於 H₂O (2.0 mL) 中。將 50 mM I₂ 於 AcOH (1.3 當量) 中之溶液一次性添加至攪拌溶液且在室溫下攪拌溶液隔夜，LC/MS 顯示反應完全。添加含 0.5 M 抗壞血酸之 H₂O 以淬滅過量 I₂。藉由製備型 HPLC 純化粗物質且自 ACN/H₂O 凍乾以得到**中間物1c**。

- **肽-連接子構築體1中間物1c之製備**

在 25°C 下振盪**中間物1c**、2,2'-二硫基二吡啶(3 當量)於 ACN 中之混合物 1 小時。用 MeOH 稀釋反應混合物且過濾。藉由製備型 HPLC 純化溶液且自 ACN/H₂O 凍乾，得到**肽-連接子構築體1**。

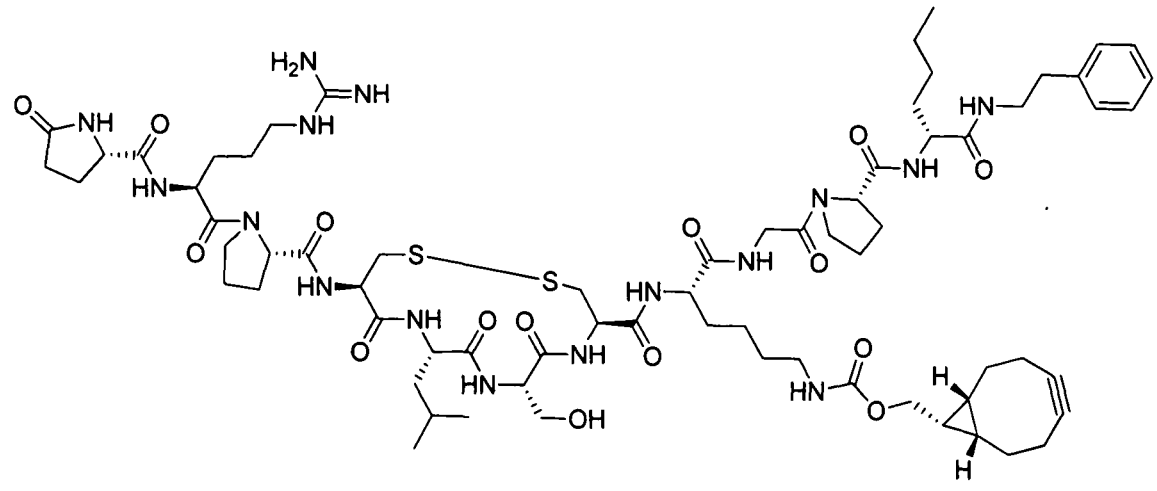
步驟3：肽-連接子構築體/白蛋白結合

用 PPA-O₂Oc-O₂Oc-O₂Oc-O₂Oc-Q-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle) 苯乙胺溶液(2 當量於水中)處理去封端 HSA (100 mg) 於 PBS 緩衝液(6 mL) 中之溶液。在室溫下震盪所得溶液 1 小時，隨後將其脫鹽且用 4 個 Amicon Ultra-0.5 離心過濾器(10K MWCO)洗滌。使過濾器在 13K g 下旋轉 10 分鐘且棄去濾液。向各過濾器之頂部添加生物級純水以用於各洗滌(在 13K g 下旋轉 10 分鐘)，且重複洗滌過程 6 次。將結合物溶解於

水(共4 mL)中。將溶液轉移至15 mL Falcon管且凍乾以得到**實例39**。

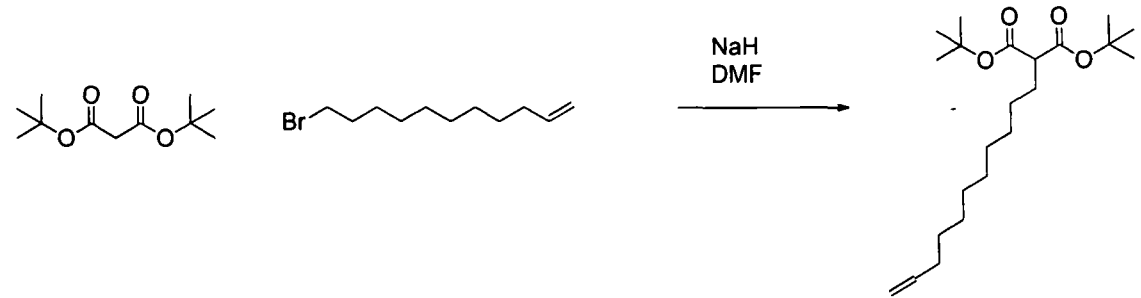
實例40：經由BCN-PEG連接子結合於脂肪酸之Apelin環狀肽：

步驟1：Apelin環狀肽-BCN構築體之製備：**pE-R-P-C*-L-S-CP-N⁶-**
[[*(1α,8α,9α)*-雙環[6.1.0]壬-4-炔-9-基甲氧基]羰基]-K-G-P-(D-Nle)-
NH(苯乙基)[二硫鍵C4-C7]之製備



在室溫下攪拌**pE-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-NH(苯乙基)**三乙酸鹽[二硫鍵C4-C7] (**實例32**：100 mg，0.068 mmol)、碳酸氫鈉(38 mg，0.452 mmol)及水(83 μL)於DMF (1 mL)中之混合物10分鐘，接著添加碳酸(*1R,8S*)-雙環[6.1.0]壬-4-炔-9-基甲基丁二醯亞胺基酯(**Berry & associates**，20 mg，0.068 mmol)。在室溫下攪拌反應混合物90分鐘。添加1 mL水至混合物，且凍乾所得溶液以得到粉末，其未經進一步純化即用於下一步驟。

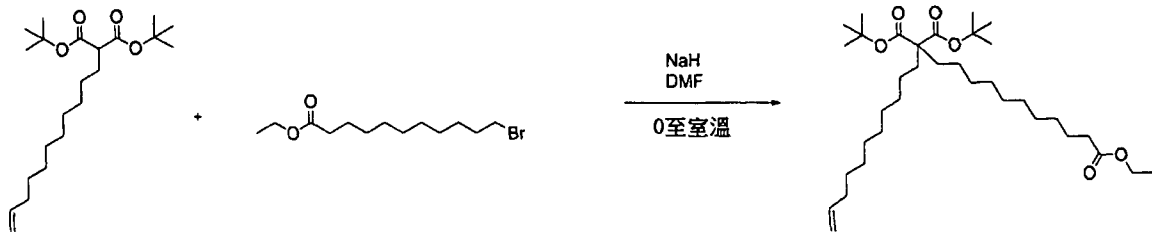
步驟2：2-(十一-10-炔-1-基)丙二酸二第三丁酯



在0°C下在N₂下，將丙二酸二第三丁酯(800 mg，3.70 mmol)溶解

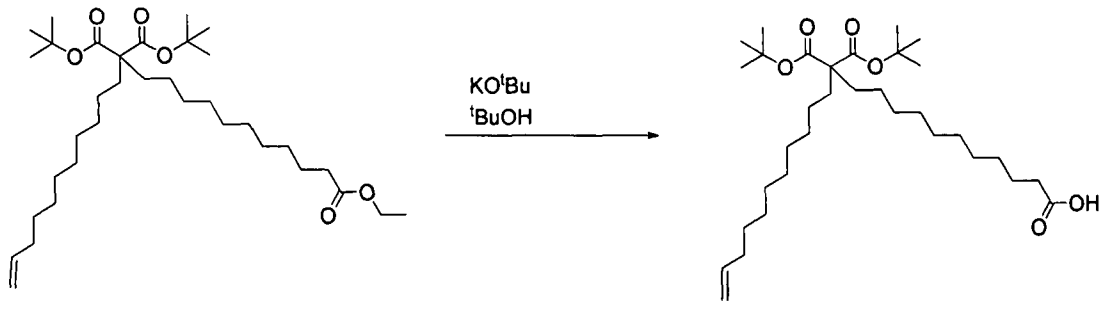
於DMF (9 mL)中且添加NaH (148 mg, 3.70 mmol)。在0°C下攪拌反應物30分鐘且緩慢逐滴添加11-溴-癸-1-烯(3.33 mmol)，產生黃色溶液。在0°C下攪拌反應物2小時，接著升溫至室溫且攪拌16小時。將混合物溶解於EtOAc (75 mL)中且用H₂O (25 mL)洗滌。用EtOAc (75 mL)萃取水層且經Na₂SO₄乾燥合併之有機層，過濾且濃縮。經由急驟管柱(12 g二氧化矽濾筒，0-20% EtOAc/庚烷)純化混合物且濃縮溶離份以產生所需產物。

步驟3：二十二-21-烯-1,11,11-三甲酸11,11-二第三丁基1-乙基酯



在0°C下將步驟2之化合物(0.442 mmol)溶解於DMF (2 mL)中且添加NaH (21.23 mg, 0.531 mmol)。在0°C下攪拌反應物15分鐘且緩慢逐滴添加11-溴十一酸乙酯(143 mg, 0.486 mmol)。使反應物升溫至室溫且攪拌16小時。用EtOAc (40 mL)稀釋混合物且用H₂O (20 mL)洗滌一次。用EtOAc (40 mL)萃取水層一次且合併有機層，經Na₂SO₄乾燥，過濾且濃縮。將樣品溶解於1 mL DCM中且經由急驟管柱(12 g二氧化矽管柱，0-20% EtOAc/庚烷，15分鐘)純化。合併溶離份且濃縮以得到所需產物。

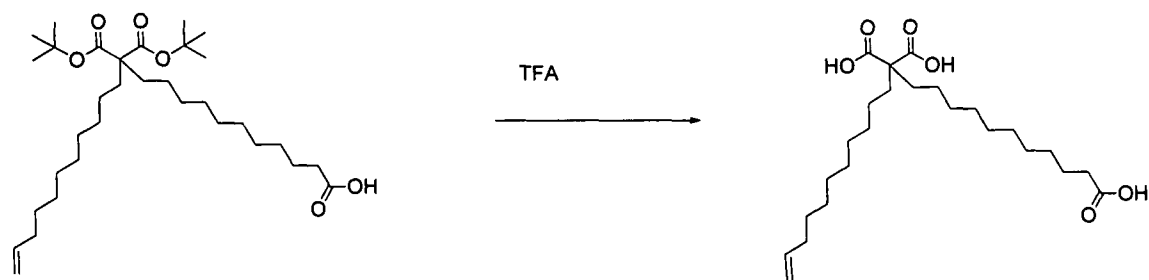
步驟4：12,12-雙(第三丁氧基羰基)二十三-22-烯酸



在30°C下在N₂下，向步驟3之化合物(0.037 mmol)於^tBuOH (1 mL)

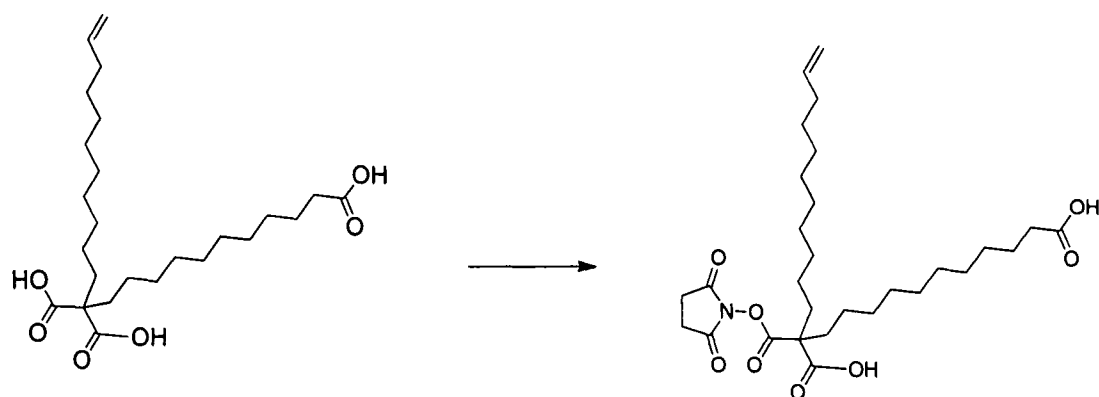
中之溶液中添加KOtBu (114 mg, 1.012 mmol)於^tBuOH (2 mL)中之溶液。在室溫下攪拌混合物且藉由TLC (1:1 EtOAc/己烷, KMnO₄, 回流)監測。在反應完全後, 用1 M HCl (20 mL)淬滅反應混合物且用EtOAc (25 mL)萃取兩次。合併有機層, 經Na₂SO₄乾燥, 過濾且濃縮。該物質未經進一步純化即繼續進行下一步驟。

步驟5：二十二-21-烯-1,11,11-三甲酸



將TFA (2 mL)添加至步驟4之化合物(0.022 mmol)且在室溫下攪拌反應物1小時。用DCM (10 mL)稀釋混合物且濃縮。將物質溶解於EtOAc (10 mL)中且用H₂O (20 mL)洗滌。經Na₂SO₄乾燥有機層, 過濾且濃縮。將粗物質溶解於1 mL MeOH中且經由MS觸發之HPLC (Sunfire 30×50mm 5μm管柱ACN/具有0.1% TFA之H₂O 75 ml/min, 1.5 ml注射量, 經3.5 min之45-70% ACN)純化。

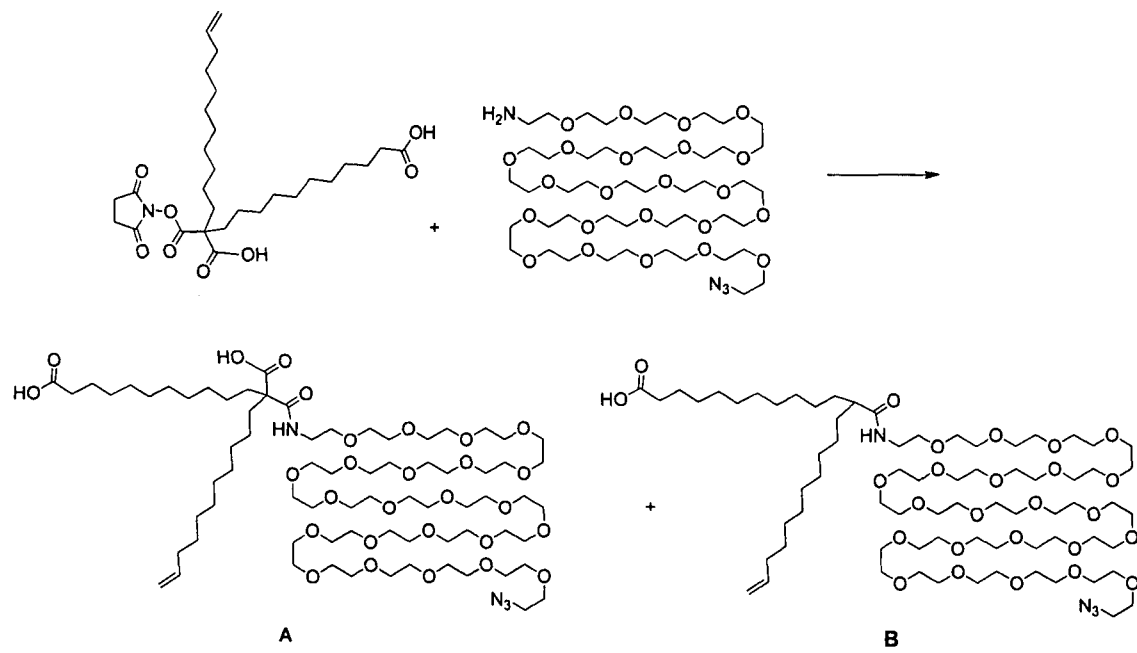
步驟6：2-(((2,5-二側氧基吡咯啉-1-基)氧基)羰基)-2-(十一-10-烯-1-基)十三烷二酸



向N-羥基丁二醯亞胺 (99 mg, 0.862 mmol)及二十二-21-烯-1,11,11-三甲酸(中間物45: 400 mg, 0.908 mmol)於DCM (7mL)及THF

(0.7mL)中之溶液中添加含DCC (187 mg, 0.908 mmol)之DCM (2 mL)。攪拌反應物隔夜，隨後蒸發溶劑。藉由HPLC (Sunfire C18 30×50 mm; 55-80%ACN/水+ 0.1% TFA)純化殘餘物以產生標題化合物 (155 mg, 0.288 mmol, 32%)：藉由LCMS方法E $R_t = 1.51$ min, $M+H$ 538.3; 1H NMR (400 MHz, 氯仿- d) δ ppm 1.16 - 1.46 (m, 28 H) 1.60 - 1.87 (m, 3 H) 1.91 - 2.17 (m, 5 H) 2.38 (t, $J=7.03$ Hz, 2 H) 2.86 (br. s., 4 H) 3.68 (dd, $J=11.25, 7.34$ Hz, 1 H) 3.78 (dd, $J=11.31, 5.20$ Hz, 1 H) 3.99 - 4.10 (m, 1 H)。

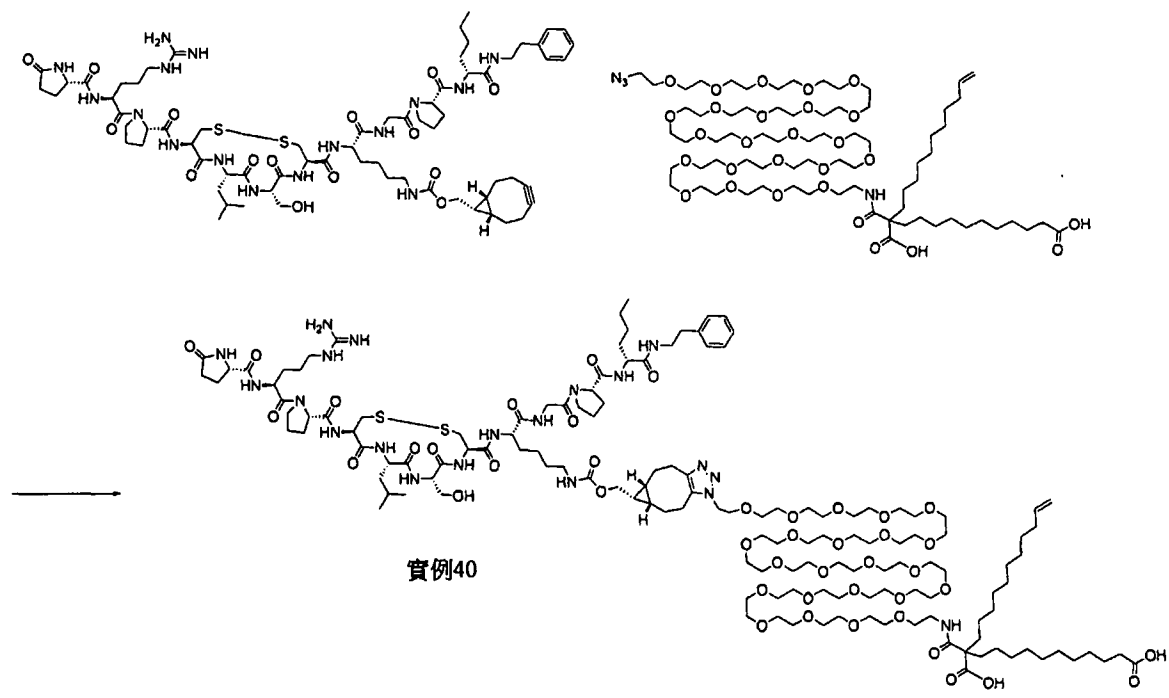
步驟7：脂肪酸-PEG連接子



將疊氨基-dPEG23-胺(Quanta Biodesign: 164 mg, 0.149 mmol)及步驟6之化合物(80 mg, 0.149 mmol)溶解於THF (2.5 mL)中。添加DIPEA (39 μ L, 0.233 mmol)且攪拌反應物隔夜。蒸發溶劑且藉由HPLC (Sunfire C18 30×50mm; 45-70% ACN/水+ 0.1% TFA)純化殘餘物，產生化合物A (97 mg, 0.061 mmol, 41%)及B (32 mg, 0.021 mmol, 14%)：LCMS ZQ1方法E $R_t = 1.35$ min, $[M+2H]^{+2}$ 761.9; 1H NMR (400 MHz, 乙腈- d_3) δ ppm 1.05 - 1.18 (m, 3 H) 1.19 - 1.32 (m, 20 H) 1.36 (t, $J=7.15$ Hz, 1 H) 1.48 - 1.59 (m, 2 H) 1.65 - 1.75 (m, 2 H)

2.01 - 2.06 (m, 2 H) 2.25 (t, $J=7.46$ Hz, 2 H) 3.33 - 3.39 (m, 2 H) 3.39 - 3.44 (m, 2 H) 3.50 - 3.67 (m, 98 H) 4.84 - 4.95 (m, 1 H) 4.95 - 5.06 (m, 1 H) 5.83 (ddt, $J=17.07, 10.29, 6.68, 6.68$ Hz, 1 H) 7.31 (t, $J=5.44$ Hz, 1 H) ; LCMS方法E $R_t = 1.50\text{min}$, $[M+2H]^{+2}$ 739.9 ; ^1H NMR (400 MHz, 乙腈- d_3) ppm 1.16 - 1.42 (m, 30 H) 1.42 - 1.63 (m, 5 H) 2.00 - 2.07 (m, 2 H) 2.22 - 2.28 (m, 2 H) 2.40 - 2.52 (m, 2 H) 3.25 - 3.33 (m, 2 H) 3.33 - 3.42 (m, 2 H) 3.42 - 3.50 (m, 2 H) 3.50 - 3.68 (m, 88 H) 4.86 - 5.06 (m, 2 H) 5.83 (ddt, $J=17.04, 10.26, 6.71, 6.71$ Hz, 1 H) 6.40 - 6.74 (m, 1 H) 。

步驟8：實例40之製備：

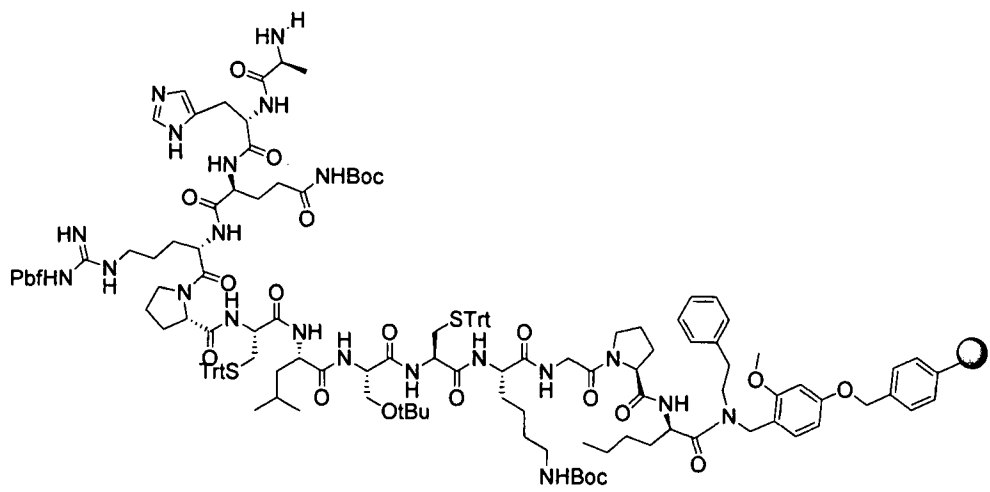


在室溫下攪拌pE-R-P-C*-L-S-C*- N^6 -[[$(1\alpha,8\alpha,9\alpha)$ -雙環[6.1.0]壬-4-炔-9-基甲氧基]羰基]-K-G-P-(D-Nle)-NH(苯乙基) [二硫鍵C4-C7] (含 50 mg步驟1之產物之1 mL水溶液，0.034 mmol)及步驟7之化合物A (52 mg，於268 μL 水中)之混合物約3小時。接著藉由製備型HPLC (Sunfire 30 $\times$ 50 mm 5 μm 管柱ACN/具有0.1% TFA之 H_2O 75 ml/min，15-40% ACN 5 min梯度)純化反應混合物。凍乾產物部分以得到呈

TFA鹽形式之標題產物(24 mg , 21%)。LCMS (Waters Acquity UPLC BEH C18 1.7um 2.1×50mm , 50℃ , 溶離劑A：水+ 0.1%甲酸 , 溶離劑B：乙腈+ 0.1%甲酸 , 經5.15分鐘2%至98% B/A之梯度)：滯留時間：2.77 mins；MS [M+2]²⁺：觀測值：1491.8808 , 計算值：1491.8560。

實例41：Apelin環狀肽在N端結合於脂肪酸

步驟1：A-H-Q-R-P-C-L-S-C-K-G-P-DNle-苯乙胺中間物41a之合成



在自動肽合成器(CEM Liberty Blue Microwave)上對苯乙胺-AMEBA樹脂(Sigma Aldrich , 0.1 mmol , 1.0 mmol/g)進行固相肽合成 , 其中Arg殘基之標準雙重Arg及DNle偶合雙倍時間。將胺基酸製備為於DMF中之0.2 M溶液。標準偶合循環定義如下：

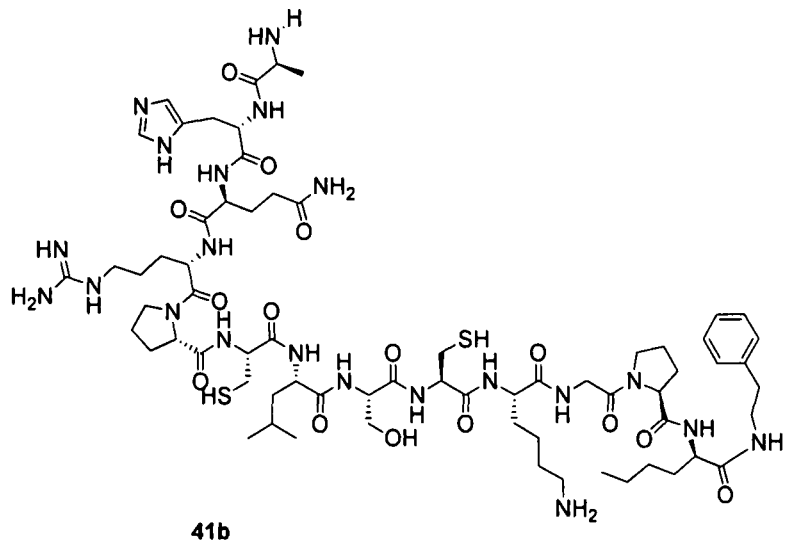
- 胺基酸偶合：AA (5當量)、HATU (5當量)、DIEA (25當量)
- 洗滌：DMF (3×7 mL)
- 脫除Fmoc保護基：20%哌啶/0.1 M HOBt (2×7mL)
- 洗滌：DMF (4×7 mL隨後1×5 mL)

偶合	AA	偶合次數×反應時間(溫度)	偶合方法
1	Fmoc-D-Nle-OH	1×10 min (70℃)	DIEA/HATU
2	Fmoc-L-Pro-OH	1×5 min (70℃)	DIEA/HATU
3	Fmoc-L-Gly-OH	1×5 min (70℃)	DIEA/HATU
4	Fmoc-L-Lys-OH	1×5 min (70℃)	DIEA/HATU
5	Fmoc-L-Cys-OH	1×5 min (70℃)	DIEA/HATU
6	Fmoc-L-Ser-OH	1×5 min (70℃)	DIEA/HATU
7	Fmoc-L-Leu-OH	1×5 min (70℃)	DIEA/HATU

8	Fmoc-L-Cys-OH	1×5 min (70℃)	DIEA/HATU
9	Fmoc-L-Pro-OH	1×5 min (70℃)	DIEA/HATU
10	Fmoc-L-Arg-OH	2×25 min (25℃)	DIEA/HATU
11	Fmoc-L-Gln-OH	1×5 min (70℃)	DIEA/HATU
12	Fmoc-L-His-OH	1×5 min (70℃)	DIEA/HATU
13	Fmoc-L-Ala-OH	1×5 min (70℃)	DIEA/HATU

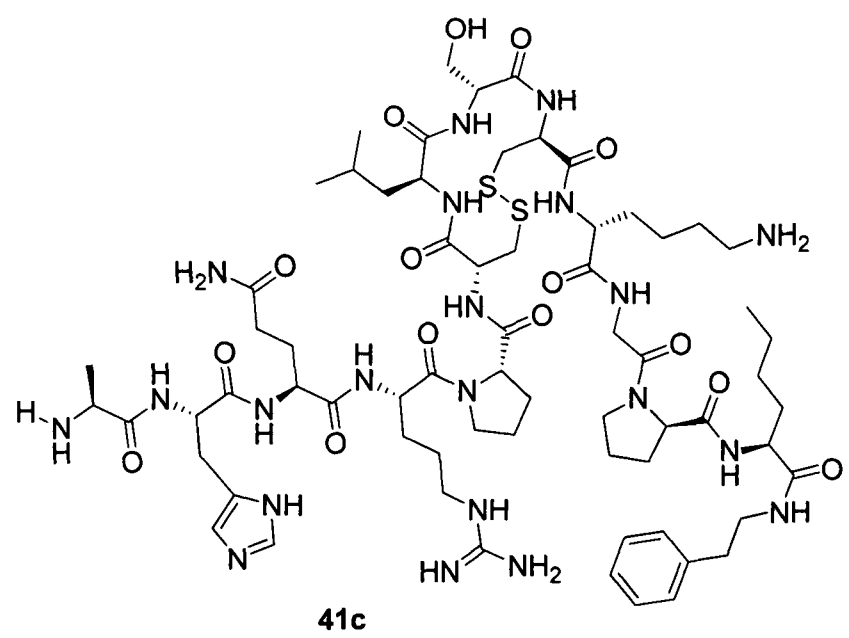
在肽組裝後，用DMF (2×50 mL)及DCM (2×50 mL)洗滌樹脂，接著真空乾燥得到中間物**41a** (276 mg，0.1 mmol)。

步驟2：中間物**41b**之製備(自樹脂裂解肽)



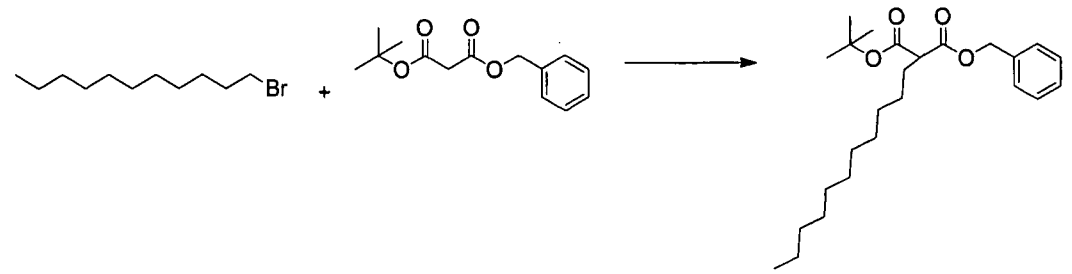
將中間物**41a** (276 mg，0.1 mmol)與4 mL TFA溶液(37 mL TFA，1 mL H₂O，1 mL TIPS，3.06 g DTT)合併且在室溫下震盪3小時。自樹脂移除溶液且沈澱至40 mL冷的Et₂O中。將溶液渦旋且於冰上靜置10分鐘，隨後在4000 rpm下離心5分鐘。移除溶劑且再用冷的Et₂O (每次40 mL)洗滌白色固體兩次，離心(每次5分鐘)且傾析。真空乾燥固體隔夜，產生中間物**41b**-批次1 (17.4 mg，0.012 mmol)。LCMS (SQ2 ProductAnalysis-Acidic-Peptide-Polar, Acquity UPLC BEH C18管柱，130 Å，1.7 μm，2.1 mm×50 mm，50℃)：R_t = 1.83分鐘，MS [M+H] 1513.5。

步驟3：中間物**41c**之製備(半胱胺酸殘基之環化)



將中間物41b-批次1及2 (29.6 mg , 0.020 mmol)溶解於水(3 mL)及10滴DMSO中，得到略微混濁的溶液。緩慢逐滴添加碘(50 mM於HOAc中，0.783 mL，0.039 mmol)且在室溫下混合反應物隔夜。粗物質反應之LCMS分析顯示起始物質完全轉化。逐滴添加0.5 M抗壞血酸直至顏色消散。經由MS觸發之HPLC純化物質。彙集之溶離份凍乾得到7 mg呈白色粉末狀之所需產物(4.63 μmol，24%)。LCMS (SQ2 ProductAnalysis-Acidic-Peptide, Acquity UPLC BEH C18管柱，130 Å，1.7 μm，2.1 mm×50 mm，50℃)：R_t = 0.90分鐘，MS [M+H] 1511.8。

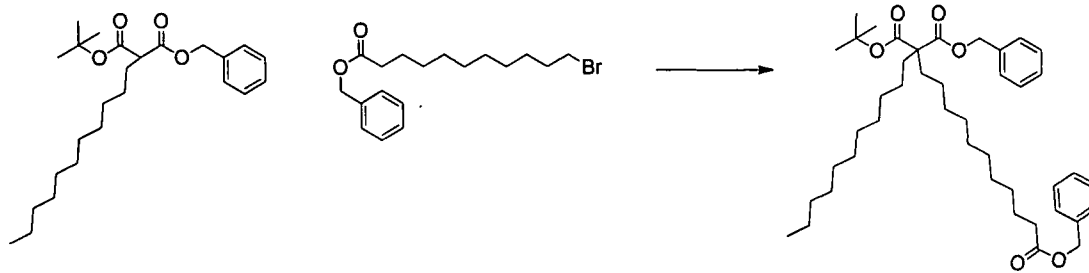
步驟4：2-十一基丙二酸1-苯甲基3-第三丁基酯



在0℃下在N₂下，向NaH (160 mg，4.0 mmol)於DMF (8 mL)中之懸浮液中添加含丙二酸苯甲基第三丁基酯(1.0 g，4.0 mmol)之DMF (2

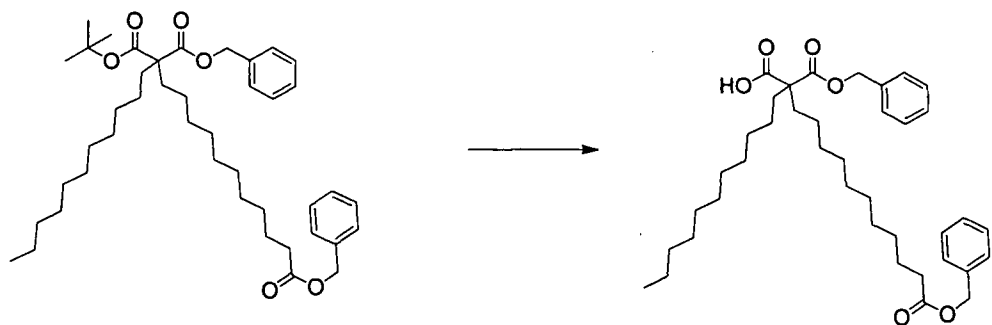
mL)。在添加含1-溴十一烷之DMF (2 mL)後，攪拌混合物50分鐘。再攪拌一小時後，使反應物升溫至室溫。使反應物維持隔夜。添加Et₂O (100 mL)及水(20 mL)以分配反應物。用Et₂O (100 mL)萃取水相且經Na₂SO₄乾燥合併之有機物。蒸發溶劑且藉由急驟管柱純化殘餘物(C18 12 g, 40-100%ACN/水+ 0.1% TFA)，產生呈無色油狀之標題化合物 (1.14 g, 2.82 mmol, 71%)：LCMS方法F Rt = 1.58min, M+Na 427.4；¹H NMR (400 MHz, 氯仿-*d*) δ ppm 0.84 - 0.96 (m, 3 H) 1.28 (br. s, 12 H) 1.31 (m, *J*=3.90 Hz, 6 H) 1.41 (s, 9 H) 1.88 (q, *J*=7.38 Hz, 2 H) 3.29 (t, *J*=7.58 Hz, 1 H) 5.19 (q, *J*=12.27 Hz, 2 H) 7.30 - 7.42 (m, 5 H)。

步驟5：二十二烷-1,11,11-三甲酸1,11-二苯甲基11-第三丁基酯



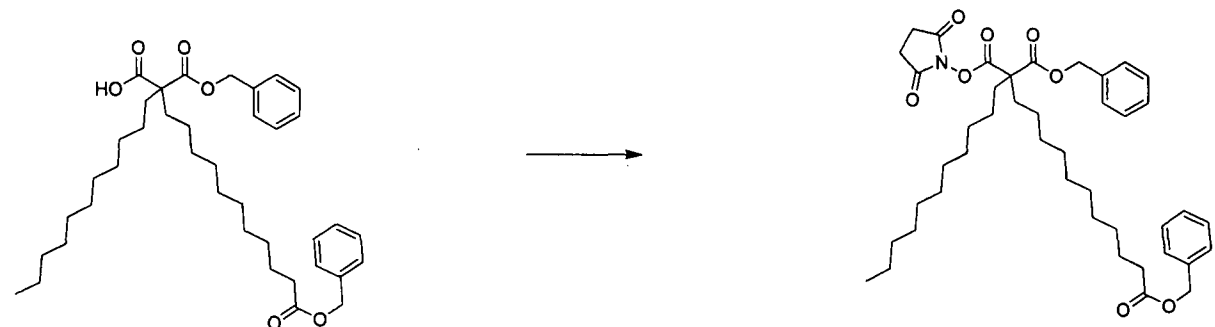
以類似於實例40之步驟3的方式，使用步驟4之化合物(177 mg, 0.284 mmol)作為起始物質合成標題化合物，產生無色油狀物(153 mg, 0.213 mmol, 75%)：¹H NMR (400 MHz, 氯仿-*d*) δ ppm 0.86 - 0.93 (m, 3 H) 1.12 - 1.21 (m, 2 H) 1.21 - 1.37 (m, 30 H) 1.66 (quin, *J*=7.40 Hz, 2 H) 1.89 - 2.07 (m, 4 H) 2.37 (t, *J*=7.58 Hz, 2 H) 2.84 (br. s., 4 H) 5.13 (s, 2 H) 5.25 (s, 2 H) 7.30 - 7.47 (m, 10 H)。

步驟6：13-(苯甲氧基)-2-((苯甲氧基)羰基)-13-側氧基-2-十一基十三酸



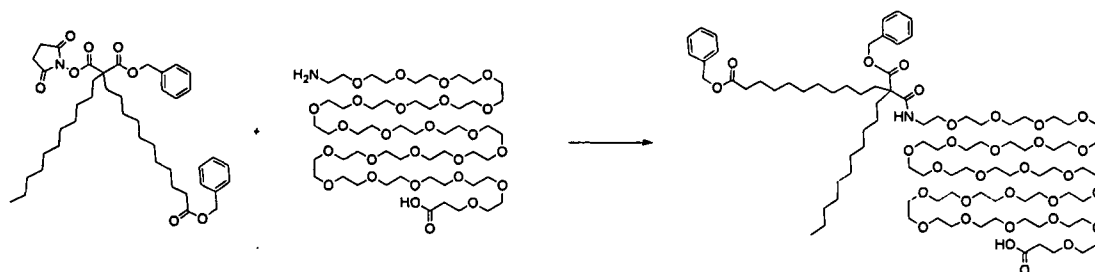
向步驟5之化合物(200 mg, 0.295 mmol)於DCM (3 mL)中之溶液中添加TFA (0.6 mL), 且在室溫下攪拌反應物3小時。蒸發溶劑且藉由急驟管柱(二氧化矽 12 g, 0-15% EtOAc/HEP)純化殘餘物, 產生標題化合物(177 mg, 0.284 mmol, 96%): ^1H NMR (400 MHz, 氯仿-*d*) δ ppm 0.87 - 0.94 (m, 3 H) 0.94 - 1.05 (m, 2 H) 1.19 (br. s., 14 H) 1.23 - 1.37 (m, 16 H) 1.65 (quin, $J=7.40$ Hz, 2 H) 1.78 - 1.91 (m, 2 H) 1.93 - 2.05 (m, 2 H) 2.37 (t, $J=7.52$ Hz, 2 H) 5.14 (s, 2 H) 5.27 (s, 2 H) 7.31 - 7.44 (m, 10 H)。

步驟7: 二十二烷-1,11,11-三甲酸1,11-二苯甲基11-(2,5-二側氧基環戊基)酯



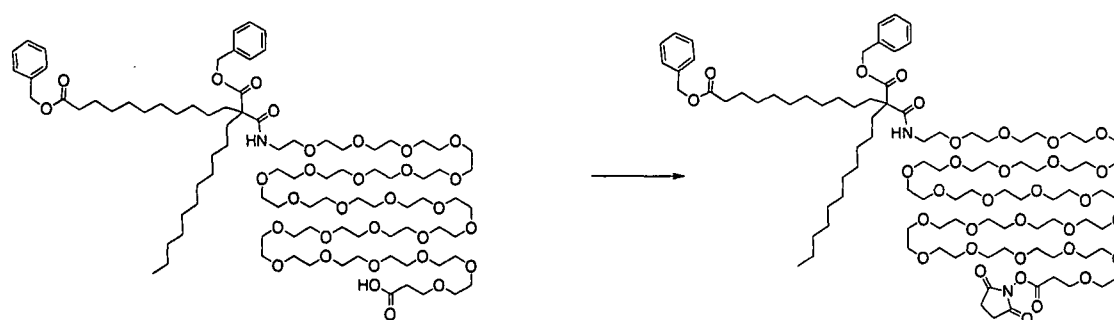
以類似於實例40之步驟6的方式, 使用步驟6之化合物(177 mg, 0.284 mmol)作為起始物質合成標題化合物, 產生無色油狀物(153 mg, 0.213 mmol, 75%): ^1H NMR (400 MHz, 氯仿-*d*) δ ppm 0.86 - 0.93 (m, 3 H) 1.12 - 1.21 (m, 2 H) 1.21 - 1.37 (m, 30 H) 1.66 (quin, $J=7.40$ Hz, 2 H) 1.89 - 2.07 (m, 4 H) 2.37 (t, $J=7.58$ Hz, 2 H) 2.84 (br. s., 4 H) 5.13 (s, 2 H) 5.25 (s, 2 H) 7.30 - 7.47 (m, 10 H)。

步驟8：



向裝有胺基-PEG24-酸之瓶中添加中間物**34** (145 mg, 0.201 mmol)於THF (1.5 mL)及DCM (1.5 mL)中之溶液。添加DIPEA (88 μ L, 0.504 mmol)且在震盪器板上攪拌反應物15小時。蒸發溶劑且藉由超臨界流體層析(Waters HILIC 20 $\times$ 150 mm; 15-25% MeOH/CO₂)純化殘餘物，產生中間物**35** (151 mg, 0.086 mmol, 43%)：LCMS方法E Rt = 1.30min, [M+2H]⁺ 876.4；¹H NMR (400 MHz, 氯仿-*d*) δ ppm 0.86 - 0.93 (m, 3 H) 0.93 - 1.04 (m, 2 H) 1.19 (br. s., 15 H) 1.23 - 1.37 (m, 15 H) 1.61 - 1.68 (m, 2 H) 1.78 (td, *J*=12.44, 4.34 Hz, 2 H) 1.92 - 2.05 (m, 2 H) 2.37 (t, *J*=7.58 Hz, 2 H) 2.62 (t, *J*=6.05 Hz, 2 H) 3.49 (dd, *J*=6.72, 2.32 Hz, 2 H) 3.52 - 3.59 (m, 2 H) 3.59 - 3.73 (m, 92 H) 3.80 (t, *J*=6.05 Hz, 2 H) 5.13 (s, 2 H) 5.18 (s, 2 H) 7.31 - 7.42 (m, 10 H) 8.09 (t, *J*=5.26 Hz, 1 H)。

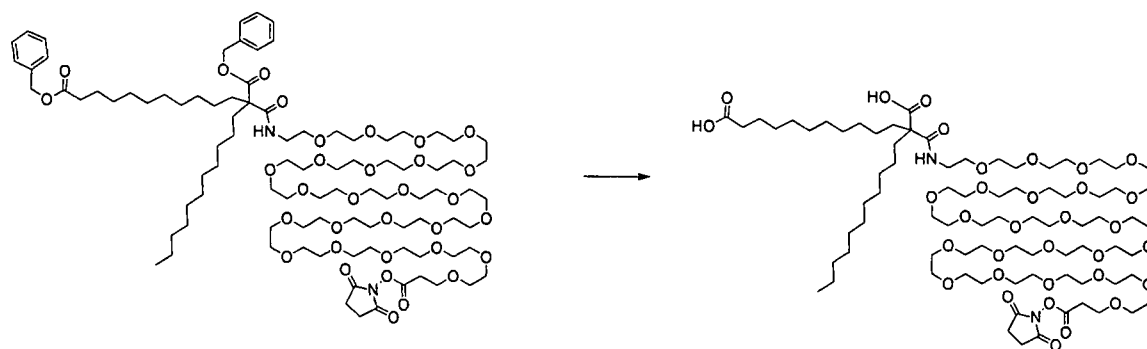
步驟9：



向中間物**35** (150 mg, 0.086 mmol)及N-羥基丁二醯亞胺於DCM (1.5 mL)中之溶液中添加含DCC (22 mg, 0.103 mmol)之DCM (0.265 mL)。攪拌反應物1.5小時。再添加含N-羥基丁二醯亞胺(10 mg)之THF

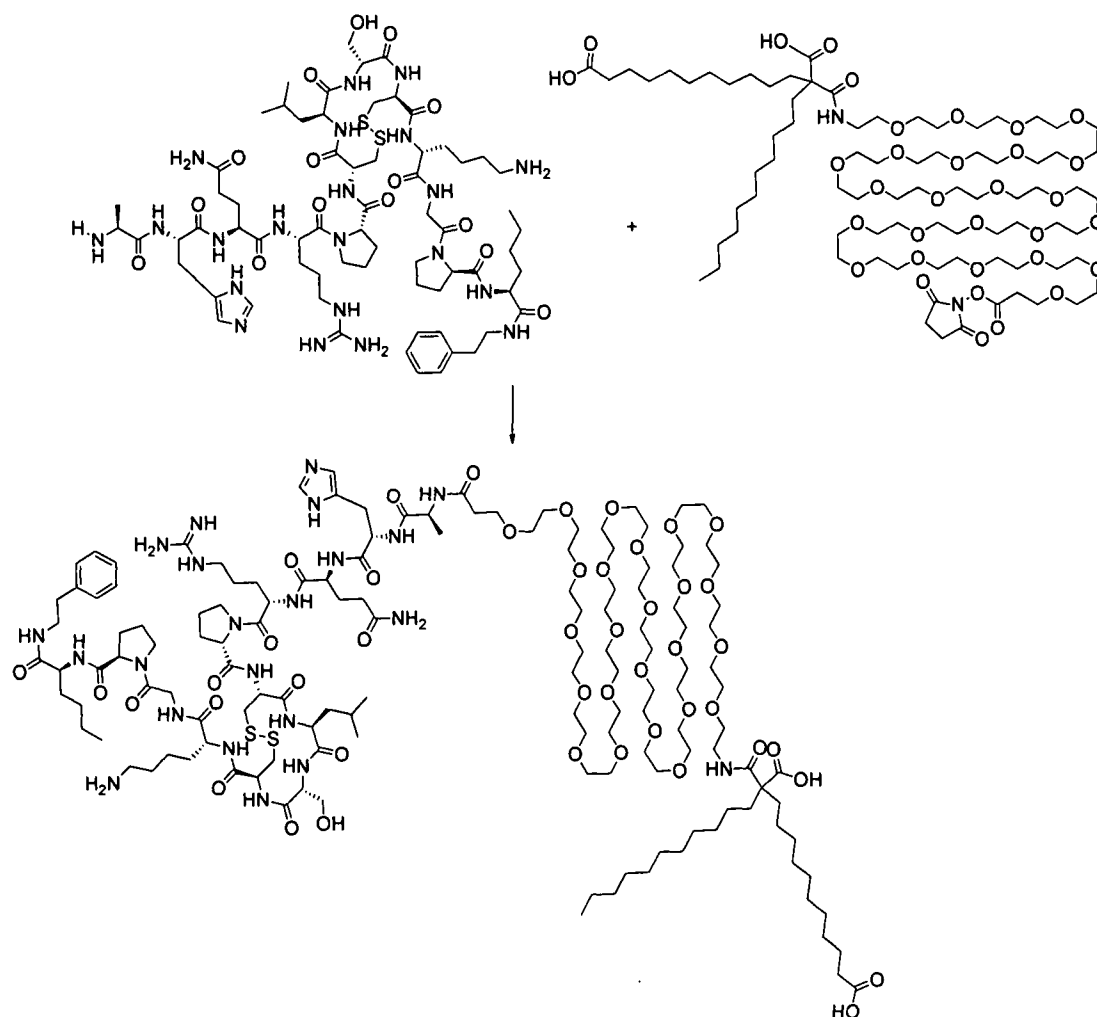
(0.5 mL)及含DCC(22 mg)之DCM (0.265 mL)且攪拌反應物隔夜。蒸發溶劑且藉由急驟管柱(二氧化矽 12, 0-5% MeOH/DCM)純化殘餘物, 產生呈白色固體狀之中間物**36** (159 mg, 定量): LCMS方法G $R_t = 1.55\text{min}$, $[M+H_3O+H]^{+2} 933.9$ 。

步驟10:



向步驟9之化合物(159 mg, 0.086 mmol)於THF (5 mL)中之溶液中添加10%鈀/碳(4.6 mg, 4.3 μmol)於THF (1 mL)中之懸浮液。將反應物置放在氫氣下且攪拌40分鐘。添加更多鈀/碳(7 mg, 6.5 μmol)且再在氫氣下攪拌1小時。使反應物穿過膜濾器且蒸發濾液。藉由HPLC (Sunfire C18 30 $\times$ 50mm, 45-70% ACN/水+ 0.1% TFA)純化殘餘物以產生標題化合物(83 mg, 0.047 mmol, 54%): LCMS方法G $R_t = 1.03\text{min}$, $[M+2H]^+ 835.2$; ^1H NMR (400 MHz, 氯仿- d) δ ppm 0.84 - 0.94 (m, 3 H) 1.17 (br. s., 2 H) 1.21 - 1.39 (m, 30 H) 1.57 - 1.68 (m, 2 H) 1.69 - 1.80 (m, 2 H) 1.97 - 2.10 (m, 2 H) 2.34 (t, $J=7.21$ Hz, 2 H) 2.86 (s, 4 H) 2.92 (t, $J=6.48$ Hz, 2 H) 3.51 - 3.73 (m, 96 H) 3.87 (t, $J=6.48$ Hz, 2 H) 7.45 (t, $J=4.46$ Hz, 1 H)。

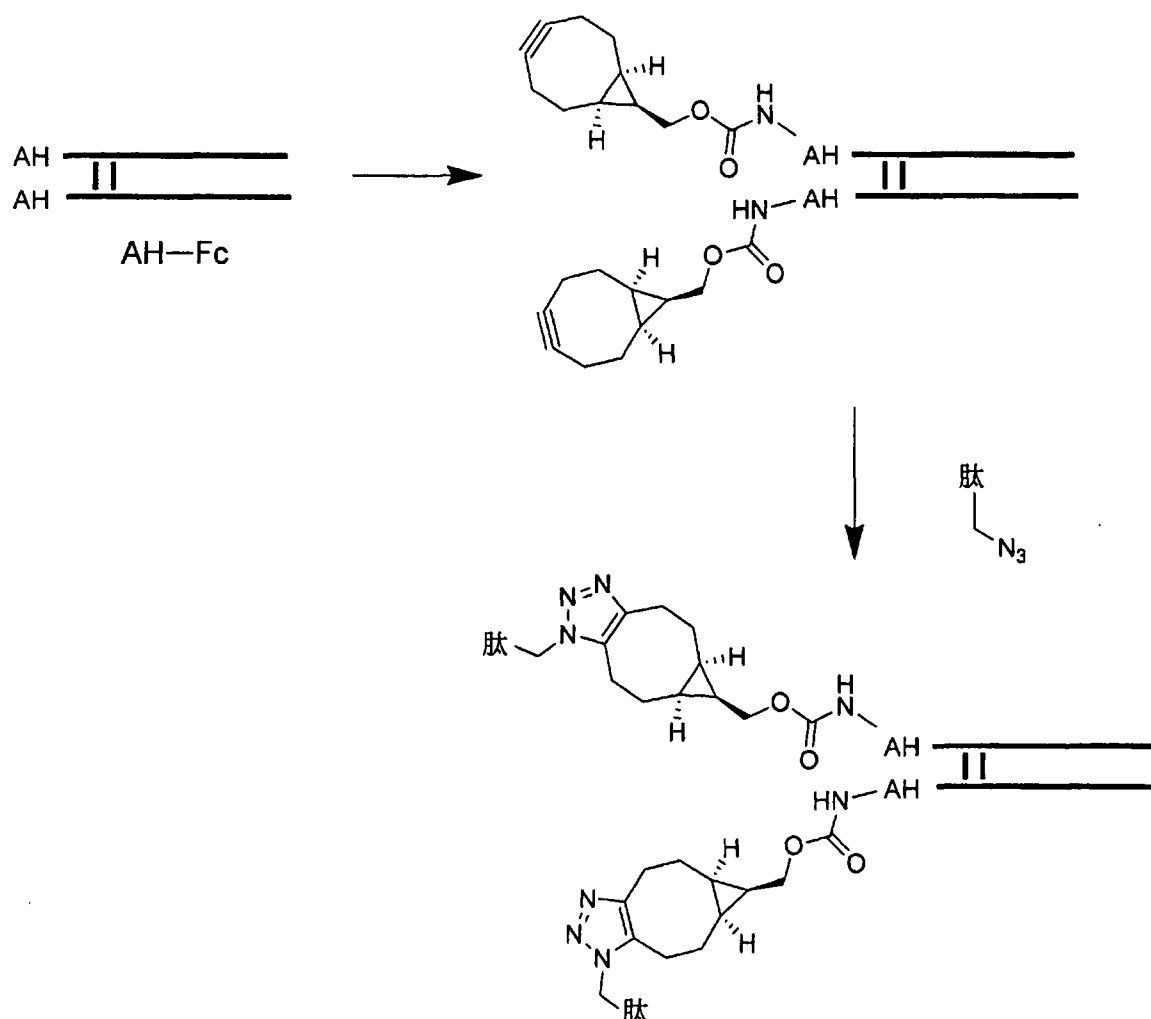
步驟4: 包含Apelin構築體A-H-Q-R-P-C-L-S-C-K-G-P-DNle-苯乙胺及脂肪酸-PEG構築體(N端結合)之結合物-實例41之製備



製備NHS-脂肪酸(實例40之步驟7之產物A)於H₂O中之10 mg/mL溶液。將中間物41c (1.5 mg, 0.993 μmol)溶解於30 mM pH4 NaOAc緩衝液(672 μL)中且添加NHS-脂肪酸(0.850 mL, 5.10 μmol)。在室溫下混合反應物16小時，此時再添加1.5 mg NHS-脂肪酸(10 mg/mL於H₂O中)且在室溫下混合反應物16小時。添加8 mg NHS-脂肪酸(10 mg/mL於H₂O中)且在室溫下混合反應物3天，並添加1.7 mg NHS-脂肪酸(10 mg/mL於H₂O中)。在室溫下震盪混合物16小時且經由M觸發之HPLC純化，得到1.7 mg呈白色粉末狀之標題化合物(0.510 μmol, 51%)。LCMS (SQ2 ProductAnalysis-Acidic-Peptide-Polar, Acquity UPLC BEH C18管柱, 130 Å, 1.7 μm, 2.1 mm×50 mm, 50°C): R_t = 3.87 min, MS [M+H+2/2] 1533.1; [M+H+3/3] 1022.9。

實例42：AH-Fc與Apelin環狀肽之結合

通用流程



步驟1：AH-Fc構築體之製備：

構築體選殖：

藉由基因合成(GeneArt)使含有小鼠Ig κ 鏈信號肽繼而人類Fc及短雙胺基酸序列(AH)之DNA片段之密碼子最佳化而具有5'-NheI及3'-EcoRI限制位點。所得序列用NheI及EcoRI限制消化且接合至CMV啟動子下游之載體pPL1146的NheI及EcoRI位點。將接合物轉形至大腸桿菌DH5 α 細胞中，且藉由DNA定序鑑別出含有正確插入物之菌落。所展示之序列屬於有義股且以5'及3'方向延伸。

AH-Fc

```
GCTAGCCACCATGGAACTGACACCCTGCTGCTGTGGGTCCTGCTGCTGTGGGTGCCT
GGCAGCACTGGCGCTCATGATAAGACACACACATGCCCCCTTGTCCAGCACCAGAGG
```

CAGCTGGAGGACCAAGCGTGTTCTGTTTCCACCCAAGCCTAAAGACACACTGATGATC
TCAAGGACCCCAGAAAGTCACATGCGTGGTCGTGGACGTGTCTCACGAGGACCCCGAAG
TCAAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTCGAGGTGCATAATGCTAAGACCAAACCCCGA
GAGGAACAGTACAACAGCACCTATCGGGTCGTGTCCGTCCTGACAGTGCTGCACCAGG
ATTGGCTGAACGGCAAAGAGTATAAGTGCAAAGTGAGTAATAAGGCTCTGCCTGCACCA
ATCGAGAAAACAATTTCTAAGGCTAAAGGGCAGCCAAGAGAACCCCGAGGTGTACACTCT
GCCTCCATCTAGGGAGGAAATGACAAAGAACCAGGTCAGTCTGACTTGTCTGGTGAAAG
GCTTCTACCCCTCCGACATCGCAGTGGAGTGGGAATCTAATGGCCAGCCTGAAAACAAT
TACAAGACCACACCCCCTGTGCTGGACTCCGATGGGTCTTTCTTTCTGTATTCTAAGCT
GACCGTGGATAAAAGTCGGTGGCAGCAGGGAAACGTCTTCTCATGCAGCGTGATGCAC
GAGGCCCTGCACAATCATTACACACAGAAGTCCCTGTCTCTGAGTCCAGGCAAATGAGA
ATTC

AH-Fc構築體之序列：

1 METDTLLLV LLLWPGSTG AHDKTHTCPP CPAPEAAGGP SVFLFPPKPK
51 DTLNISRTPE VTCVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS
101 TYRVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK AKGQPREPQV
151 YTLPPSREEM TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTTPVL
201 DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSPGK

AH-Fc蛋白質表現及純化：

AH-Fc表現質體DNA係使用標準聚乙炔亞胺方法以每毫升 1×10^6 個細胞之密度下轉染至HEK293T細胞中。500 ml培養物接著在37°C下於3 L燒瓶中之FreeStyle 293培養基(Life Technologies)中生長4天。

AH-Fc蛋白質自澄清條件培養基純化。簡言之，500 ml條件培養基以4 ml/min流經5 ml HiTrap MabSelect SuRe管柱(GE Life Sciences)。管柱用20管柱體積之含有0.1% Triton X-114之PBS洗滌，且隨後AH-Fc蛋白質用0.1 M甘胺酸pH 2.7溶離，用1 M Tris-HCl pH 9中和且相對於PBS進行透析。蛋白質產量為每500 ml條件培養基10至20 mg，且內毒素含量 <1 EU/mg，如藉由Charles River ENDOSAFE PTS測試所量測。

AH-Fc蛋白質之品質控制：

AH-Fc蛋白質之LC/MS：峰為非均質的且比二聚體之預期值大約3 kDa。此為具有共同N-連接糖基化位點之Fc所預期的N-連接糖基化

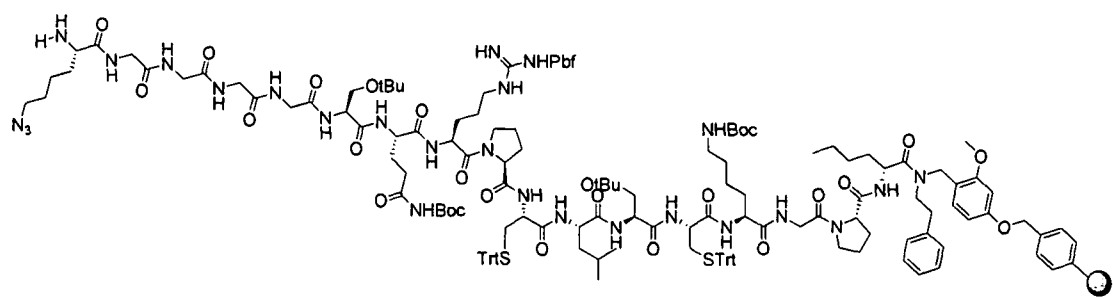
的特徵。

經還原、N-去糖基化之AH-Fc蛋白質之LC/MS：得到尖銳峰。AH-Fc之分子量正如預期的。在C端之半胱胺酸似乎保護蛋白質免於裂解。

在Superdex 200上之分析型尺寸排阻：Fc-Apelin蛋白質具有89%至100%之二聚體、0至10%之四聚體及0至1%之聚集物。

還原SDS/PAGE：所有蛋白質主要以預期尺寸之單體形式遷移。

步驟2：NH₂-疊氮基Lys-GGGGS-Q-R-P-C-L-S-C-K-G-P-Dnle-苯乙胺之合成



在自動肽合成器 (CEM Liberty Blue Microwave) 上對苯乙胺-AMEBA樹脂 (Sigma Aldrich，0.25 mmol，1.0 mmol/g) 進行固相肽合成，其中Arg殘基之標準雙重Arg、D-Nle及疊氮基離胺酸偶合雙倍時間。將胺基酸製備為於DMF中之0.2 M溶液。標準偶合循環定義如下：

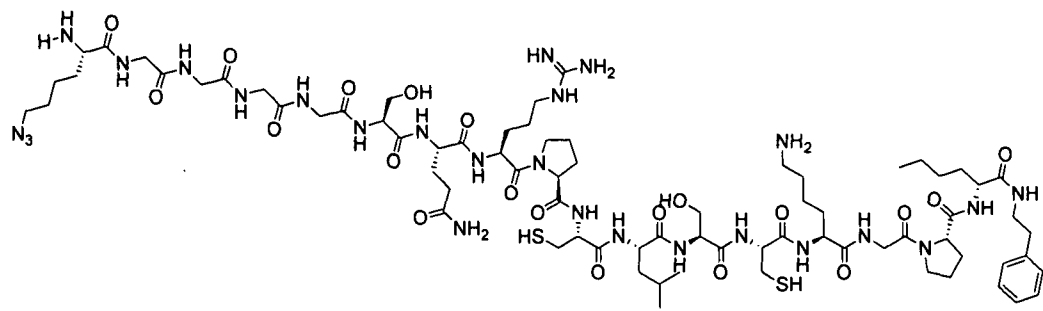
- 胺基酸偶合：AA (5當量)、HATU (5當量)、DIEA (25當量)
- 洗滌：DMF (3×7 mL)
- 脫除Fmoc保護基：20%哌啶/0.1 M HOBt (2×7mL)
- 洗滌：DMF (4×7 mL隨後1×5 mL)

偶合	AA	偶合次數×反應時間(溫度)	偶合方法
1	Fmoc-D-Nle-OH	1×10 min (70℃)	DIEA/HATU
2	Fmoc-L-Pro-OH	1×5 min (70℃)	DIEA/HATU
3	Fmoc-L-Gly-OH	1×5 min (70℃)	DIEA/HATU
4	Fmoc-L-Lys-OH	1×5 min (70℃)	DIEA/HATU
5	Fmoc-L-Cys-OH	1×5 min (70℃)	DIEA/HATU

6	Fmoc-L-Ser-OH	1×5 min (70℃)	DIEA/HATU
7	Fmoc-L-Leu-OH	1×5 min (70℃)	DIEA/HATU
8	Fmoc-L-Cys-OH	1×5 min (70℃)	DIEA/HATU
9	Fmoc-L-Pro-OH	1×5 min (70℃)	DIEA/HATU
10	Fmoc-L-Arg-OH	2×25 min (25℃)	DIEA/HATU
11	Fmoc-L-Gln-OH	1×5 min (70℃)	DIEA/HATU
12	Fmoc-L-Ser-OH	1×5 min (70℃)	DIEA/HATU
13	Fmoc-L-Gly-OH	1×5 min (70℃)	DIEA/HATU
14	Fmoc-L-Gly-Gly-Gly-OH	1×10 min (70℃)	DIEA/HATU
15	Fmoc-L-疊氮基Lys-OH	1×10 min (70℃)	DIEA/HATU

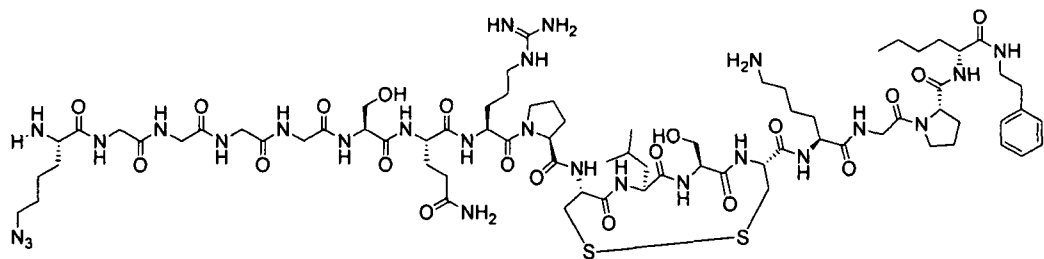
在肽組裝後，用DMF (2×50 mL)及DCM (2×50 mL)洗滌樹脂，接著真空乾燥得到中間物**42a** (770 mg，0.250 mmol)。

步驟3：中間物**42b**之製備(自樹脂裂解肽)



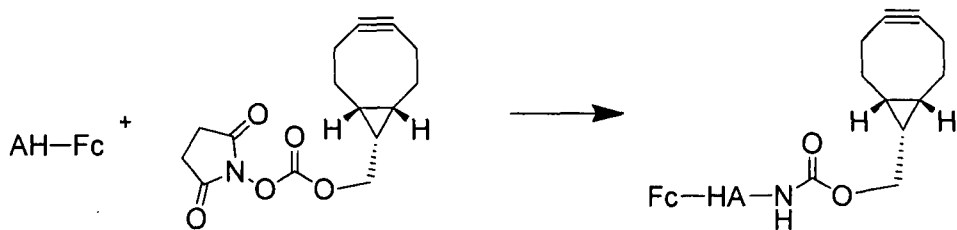
將中間物**42a** (770 mg，0.250 mmol)分成兩半且各樣品與6 mL TFA溶液(37 mL TFA、1 mL H₂O、1 mL TIPS、2.569 g (20當量) DTT)合併並在室溫下震盪3小時。自樹脂移除溶液且沈澱至40 mL冷的Et₂O中。將溶液渦旋且於冰上靜置10分鐘，隨後在4000 rpm下離心5分鐘。移除溶劑且再用冷的Et₂O (每次40 mL)洗滌白色固體兩次，離心(每次5分鐘)且傾析。真空乾燥固體隔夜且經由M觸發之HPLC純化，產生呈白色粉末狀之中間物**43b** (80 mg，0.045 mmol，80%)。LCMS (SQ2 ProductAnalysis-Acidic-Peptide-Polar，Acquity UPLC BEH C18管柱，130 Å，1.7 μm，2.1 mm×50 mm，50℃)：R_t = 2.32 min, MS [M+H+2/2] 888.0。

步驟4：中間物**42c**之製備(半胱胺酸殘基之環化)



將中間物**42b** (80 mg, 0.045 mmol)溶解於水(1.25 mL)中且緩慢逐滴添加碘(50 mM於HOAc中, 1.804 mL, 0.090 mmol), 並在室溫下混合反應物3小時。粗物質反應之LCMS分析顯示起始物質完全轉化。逐滴添加0.5 M抗壞血酸直至顏色消散。經由MS觸發之HPLC純化物質。彙集之溶離份凍乾得到20.1 mg呈白色粉末狀之所需產物(0.045 mmol, 25%)。LCMS (SQ2 ProductAnalysis-Acidic-Peptide-Polar, Acquity UPLC BEH C18管柱, 130 Å, 1.7 µm, 2.1 mm×50 mm, 50°C): $R_t = 2.17$ min, MS $[M+H+2/2]$ 886.8。

步驟5：Fc-AH BCN之製備(AH-Fc N端上點擊柄之安設)

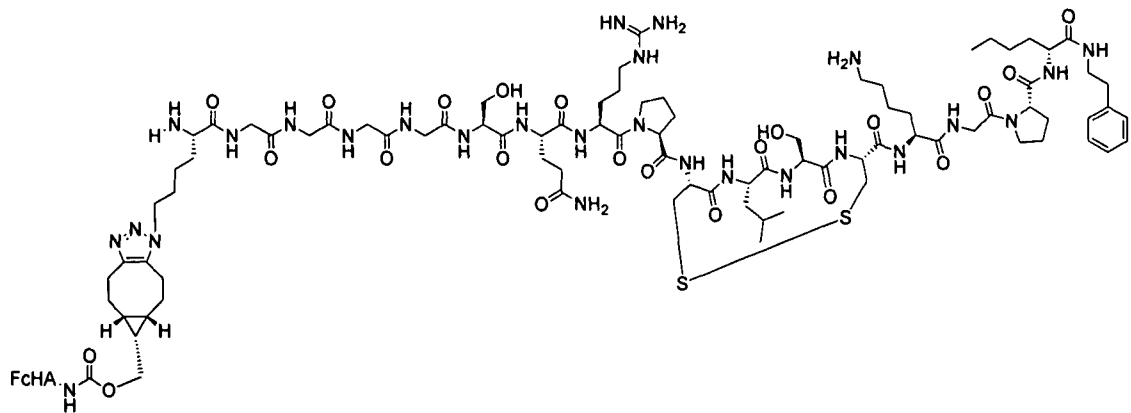


將**Fc-AH**(來自步驟1: 1 mL, 3 mg/mL, 0.117 µmol)溶解於30 mM NaOAc pH 4.0 (4.3 mL)中且緩慢添加碳酸(1R,8S,9s)-雙環[6.1.0]壬-4-炔-9-基甲基(2,5-二側氧基吡咯啶-1-基)酯(BCN)於DMSO (0.70 mL)中之10 mg/mL儲備溶液, 並在室溫下將反應物置於震盪器板上3天。添加BCN (0.25 mL)且在室溫下混合反應物3天。添加BCN (0.70 mL)且在室溫下混合反應物16小時。使用10 kDa MWCO Amicon離心過濾器藉由稀釋及濃縮反應物5次至900 µL之體積而將溶液更換成30 mM NaOAc pH 4.0。將溶液離心且移除上清液。藉由A280量測濃度為1.73 mg/mL (1.56 mg, 26%)。LCMS (QT2, Protein_20-70

kDa_3min，Proswift Monolith 4.6×50 mm，50℃，溶離劑A：水+0.1%甲酸，溶離劑B：CAN + 0.1% 甲酸，經2 min 2-98%) $R_t = 1.58$ min。

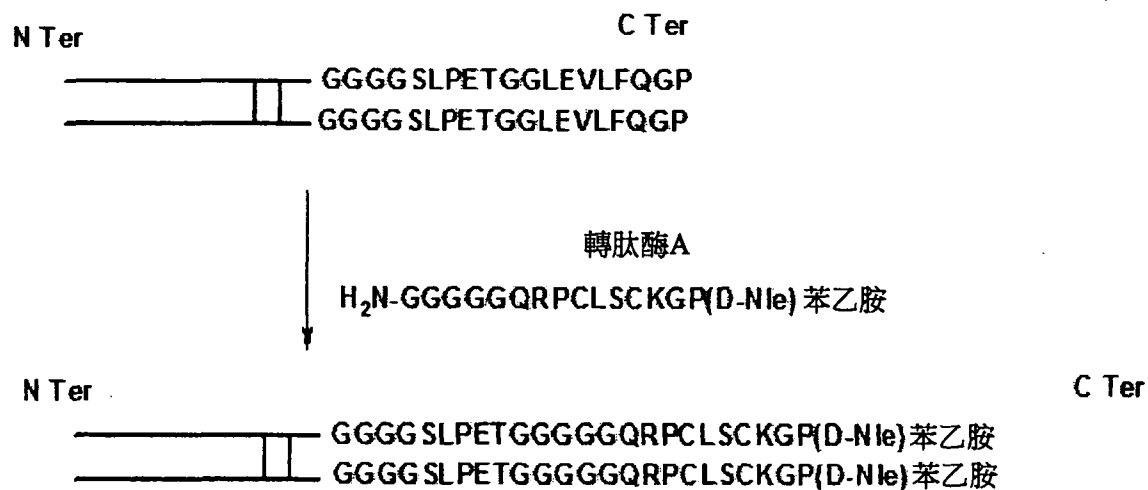
標記程度	計算值	觀測值	TIC (MS+)強度%
AH-Fc	51141	51141.5	18
AH-Fc +1BCN	51318	51317	31
AH-Fc +2BCN	51495	51496	31
AH-Fc +3BCN	51672	51671	20

步驟6：實例42之製備：結合於中間物43c之Fc-HA-BCN



製備中間物42c於H₂O中之50 mg/mL儲備溶液。將中間物43c (53.7 μL，1.515 μmol)添加至Fc-HA-BCN(來自步驟5)於30 mM NaOAc pH 4.0 (1.73 mg/mL，1.56 mg，0.030 μmol)中之儲備溶液且在室溫下混合反應物16小時。使用50 kDa MWCO Amicon離心過濾器藉由稀釋及濃縮反應物5次至250 μL之體積而將溶液更換成30 mM NaOAc pH 4.0。藉由A280量測濃度為3.32 mg/mL (830 μg，50%)。LCMS (QT2，Protein_35-70 kDa_3min，Proswift Monolith 4.6×50 mm，50℃，溶離劑A：水+0.1%甲酸，溶離劑B：CAN + 0.1%甲酸，經2 min 10-80% B) $R_t = 1.43$ min, MS [M(糖基化)+H] 54524.5。

實例43：使用轉肽酶之Fc-Apelin結合物：



步驟1：Fc-轉胺酶構築體之製備：

構築體選殖：

藉由基因合成(GeneArt)使含有小鼠Ig κ鏈信號肽繼而人類Fc及轉胺酶識別序列(LPXTG)之DNA片段之密碼子最佳化而具有5'-NheI及3'-EcoRI限制位點。所得序列用NheI及EcoRI限制消化且接合至CMV啟動子下游之載體pPL1146的NheI及EcoRI位點。將接合物轉形至大腸桿菌DH5α細胞中，且藉由DNA定序鑑別出含有正確插入物之菌落。所展示之序列屬於有義股且以5'及3'方向延伸。

Fc-轉胺酶

GCTAGCCACCATGGAAACCGACACCCTGCTGCTGTGGGTGCTGCTGCTGTGGGTGCCA
GGCAGCACCGGCGATAAGACCCACACCTGTCCTCCCTGTCCTGCCCCTGAAGCTGCTG
GCGGCCCTAGCGTGTTCCCTGTTCCCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCG
GACCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCACGAGGACCCTGAAGTGAA
GTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAG
GAACAGTACAACAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACT
GGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCAGCCCCCAT
CGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGCGAACCCAGGTGTACACACT
GCCCCCTAGCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTCGTGAAG
GGCTTCTACCCCTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAACGGCCAGCCCAGAGAACA
ACTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCTCATTCTTCCTGTACAGCAA
GCTGACAGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTTCAGCTGCAGCGTGAT

GCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCTGGAAAA
GGCGGCGGAGGCTCTCTGCCTGAAACAGGCGGACTGGAAGTGCTGTTCCAGGGCCCC
TAAGAATTC

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

蛋白質表現及純化：

Fc-轉肽酶表現質體DNA係使用標準聚乙炔亞胺方法以每毫升 1×10^6 個細胞之密度下轉染至HEK293T細胞中。500 ml培養物接著在 37°C 下於3 L燒瓶中之FreeStyle 293培養基(Life Technologies)中生長4天。

Fc-轉肽酶蛋白質自澄清條件培養基純化。簡言之，500 ml條件培養基以4 ml/min流經5 ml HiTrap MabSelect SuRe管柱(GE Life Sciences)。管柱用20管柱體積之含有0.1% Triton X-114之PBS洗滌，且隨後Fc-轉肽酶蛋白質用0.1 M甘胺酸pH 2.7溶離，用1 M Tris-HCl pH 9中和且相對於PBS進行透析。蛋白質產量為每500 ml條件培養基10至20 mg，且內毒素含量 <1 EU/mg，如藉由Charles River ENDOSAFE PTS測試所量測。

Fc-轉肽酶蛋白質之品質控制

天然Fc-轉肽酶蛋白質之LC/MS：峰為非均質的且比二聚體之預期值大約3 kDa。此為具有共同N-連接糖基化位點之Fc所預期的N-連接糖基化的特徵。

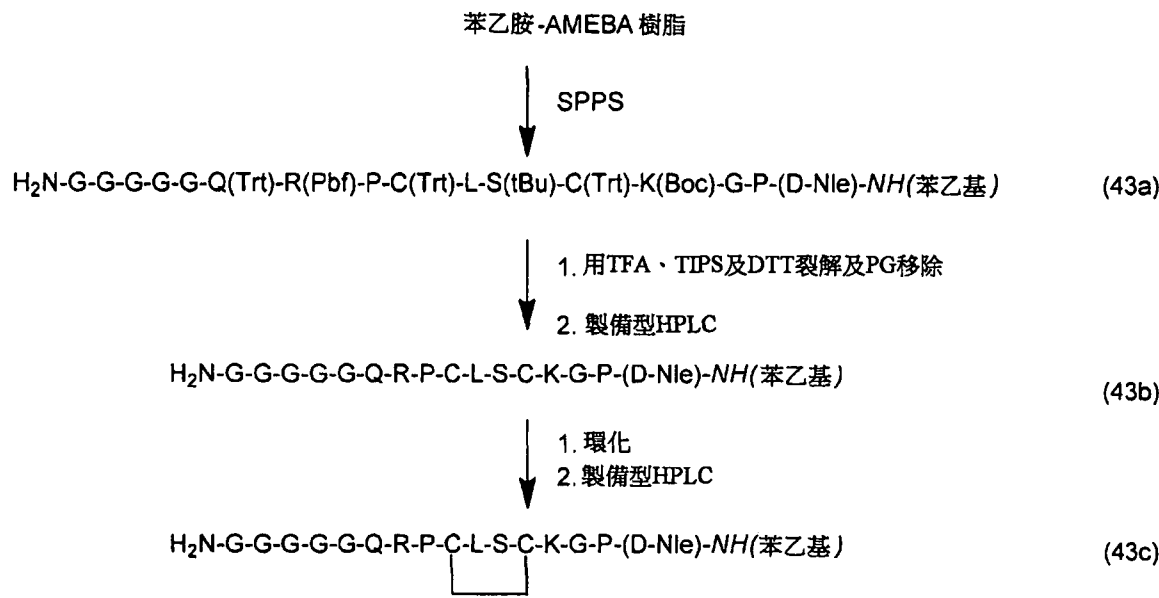
經還原、N-去糖基化之Fc-轉肽酶蛋白質之LC/MS：峰為尖銳的。分子量比理論值小2道爾頓，可能歸因於半胱胺酸x2還原。

在Superdex 200上之分析型尺寸排阻：Fc-轉肽酶蛋白質具有89%

至100%之二聚體、0至10%之四聚體及0至1%之聚集物。

還原SDS/PAGE：蛋白質主要以預期尺寸之單體形式遷移。

步驟 2：用於轉肽酶結合之 Apelin 肽 (H₂N-GGGGGQRPC*LSC*KGP(D-Nle)苯乙胺)之製備



步驟2a：中間物43a之製備

在自動肽合成器(CEM LIBERTY)上使用Arg殘基之標準雙重Arg對苯乙胺-AMEBA樹脂(Sigma Aldrich, 0.25 g, 0.25 mmol, 1.0 mmol/g)進行固相肽合成。將胺基酸製備為於DMF中之0.2 M溶液。

偶合循環定義如下：

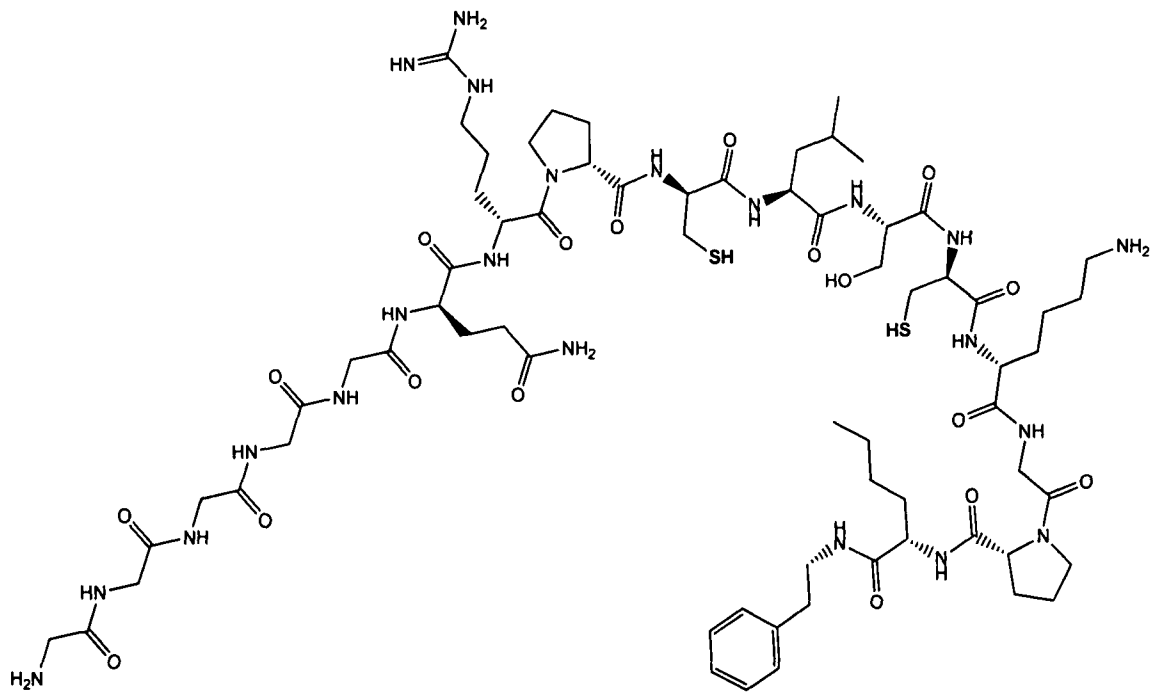
- 胺基酸偶合：AA (4.0當量)、HATU (4.0當量)、DIEA (25當量)
- 洗滌：DMF (3×10 mL, 每次1 min)。
- 脫除Fmoc保護基：哌啶/DMF (1:4) (10 mL, 75°C 持續1 min, 接著10 mL, 75°C 持續3 min)。
- 洗滌：DMF (4×10 mL, 每次1 min)。

偶合	AA	偶合次數×反應時間	反應溫度
1	Fmoc-D-Nle-OH	1×5 min	75°C
2	Fmoc-L-Pro-OH	1×5 min	75°C
3	Fmoc-Gly-OH	1×5 min	75°C
4	Fmoc-L-Lys(Boc)-OH	1×5 min	75°C

5	Fmoc-L-Cys(Trt)-OH	1×6 min	在25℃下2 min 在50℃下4 min
6	Fmoc-L-Ser(tBu)-OH	1×5 min	75℃
7	Fmoc-L-Leu-OH	1×5 min	75℃
8	Fmoc-L-Cys(Trt)-OH	1×6 min	在25℃下2 min 在50℃下4 min
9	Fmoc-L-Pro-OH	1×5 min	75℃
10	Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH	2×30 min	在25℃下25 min 在75℃下5 min
11	Fmoc-L-Gln(Trt)-OH	1×5 min	75℃
12	Fmoc-Gly-Gly-Gly-OH	1×5 min	75℃
13	Fmoc-Gly-OH	1×5 min	75℃
14	Fmoc-Gly-OH	1×5 min	75℃

在肽組裝後，用DMF (3×10 mL)、DCM (3×10 mL)洗滌樹脂。在室溫下真空乾燥肽樹脂得到中間物**43a** (0.622 g，0.25 mmol)。

步驟 2b： 中間物 **42b**, H₂N-G-G-G-G-G-Q-R-P-C-L-S-C-K-G-P-(D-Nle)-NH(苯乙基)之製備



1) 裂解及保護基移除

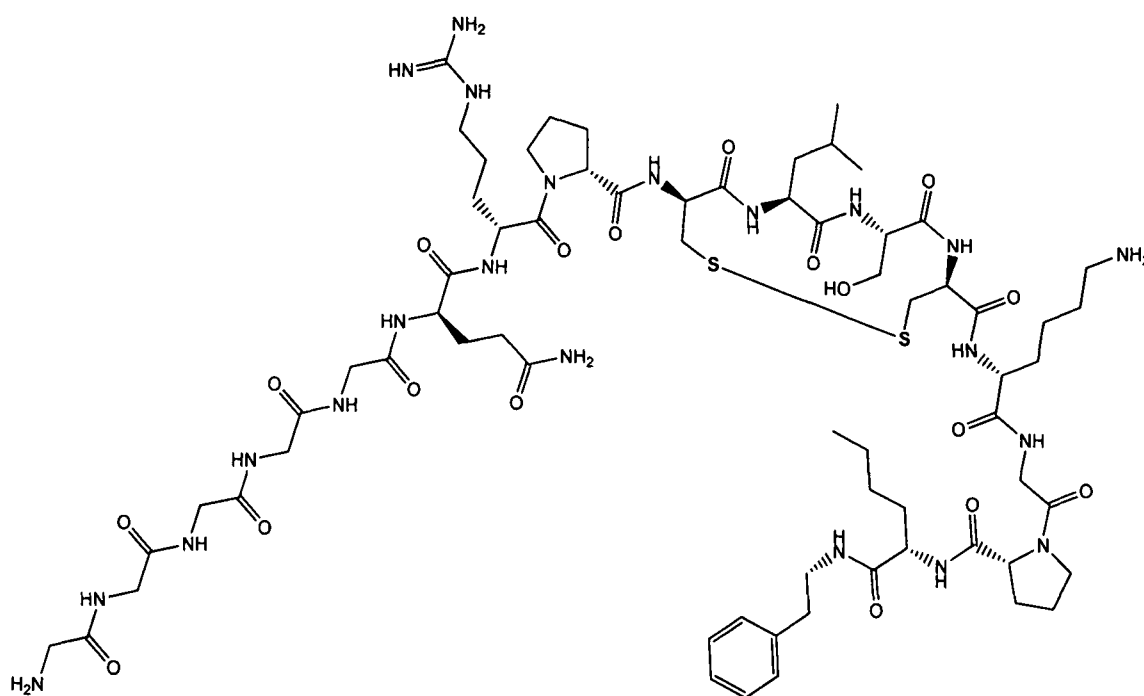
向中間物 **43a** (0.622 g，0.25 mmol) 中添加 95% TFA/2.5% H₂O/2.5% TIPS及DTT之3 mL溶液(771 mg，5.00 mmol)，在室溫下震盪所得混合物3小時，隨後過濾。將濾液滴至40 mL冷的乙醚中，接

著在4000 rpm下離心5分鐘。移除溶劑且用乙醚(3×40 mL)洗滌白色固體，渦旋並離心。在25℃下高真空乾燥固體1小時。

2) 純化

以上白色固體接著藉由製備型HPLC (Sunfire™ Prep C18 OBD™ 30×50mm 5um管柱ACN/H₂O w / 0.1% TFA 75 ml/min, 10-30% ACN 8 min梯度)純化。凍乾產物部分得到呈TFA鹽形式之中間物**43b** (44 mg, 11%)。

步驟3：H₂N-G-G-G-G-G-Q-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-NH(苯乙基) (二硫鍵C⁹-C¹²)，中間物**43c**之製備



向含中間物**43b** (44 mg, 0.028 mmol)之0.9 mL H₂O中逐滴添加I₂ (50 mM於AcOH中, 1.1 mL, 0.055 mmol)。在室溫下震盪混合物隔夜。LC/MS顯示反應完全。向反應混合物中添加數滴0.5 M抗壞血酸溶液(MeOH/H₂O = 1/1)，直至溶液之顏色消失。用MeOH稀釋混合物用於HPLC純化。藉由製備型HPLC (Sunfire™ Prep C18 OBD™ 30×50 mm 5 um管柱ACN/具有0.1% TFA之H₂O 75 ml/min, 10-30% ACN 8 min梯度)進行純化。凍乾產物部分得到呈TFA鹽形式之H₂N-G-G-G-G-

G-Q-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-NH(苯乙基) (二硫鍵C⁹-C¹²)，亦即中間物43c (13 mg, 30%)。LC/MS (QT2, ProductAnalysis-HRMS-Acidic, Waters Acquity UPLC BEH C18 1.7 μ m 2.1 $\times$ 50 mm, 50 $^{\circ}$ C, 溶離劑A: 水+ 0.1%甲酸, 溶離劑B: 乙腈+ 0.1%甲酸, 經5.15 min之梯度2%至98%B/A): 滯留時間: 0.98 min; MS [M+2]²⁺: 觀測值: 1587.7993, 計算值: 1587.868。

步驟3: Fc-轉肽酶與中間物43c之轉肽酶結合

1) 化學酶促轉肽酶結合

在冰浴上, 向含Fc-轉肽酶(698 μ l, 0.040 μ mol, 3.15 mg/mL)之PBS (pH7.4)緩衝溶液中添加H₂N-G-G-G-G-G-Q-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-NH(苯乙基) (二硫鍵C⁹-C¹²) (64.1 μ L, 2.018 μ mol, 50 mg/mL)於Tris-8.0緩衝液中之溶液, 繼而含520 μ M轉肽酶A (78 μ L, 0.040 μ mol)之50 mM Tris-Cl pH7.4、150 mM NaCl。在室溫下震盪混合物隔夜。LC/MS顯示反應完全。

2) 純化及脫鹽

使以上溶液在ATTA XPRESS上以4 mL/min流經5 mL HiTrap Mab Select SuRe管柱(GE Lifesciences # 11-0034-95)。在管柱上用20管柱體積(CV) PBS + 0.1% Triton 114洗滌實例43, 且用0.1 M甘胺酸pH 2.7溶離, 用1 M tris-HCl pH 9中和並相對於PBS進行透析。經純化溶液藉由使用Zeba Sping脫鹽管柱5 mL (89891)脫鹽以得到1.5 mL目標溶液, 平均濃度為0.598 mg/mL且回收率為90%。LCMS (QT2, Protein_20-70 kDa_3min, Acquity ProSwift RP-3U 4.6 $\times$ 50 mm, 1.0 mL/min, 溶離劑A: 水+ 0.1%甲酸, 溶離劑B: 乙腈+ 0.1%甲酸, 經3 min之梯度2%至98% B/A): R_t = 1.55 min, MS [M+H] 58845.0000。

實例43之序列:

1 METDTLLLWV LLLWVPGSTG DKTHTCPPCP APEAAGGPSV
FLFPPKPKDT

51 LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK
PREEQYNSTY

101 RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK
GQPREPQVYT

151 LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN
YKTTTPVLDS

201 DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS
LSLSPGKGGG

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

其中 LSLSPGKGGG *GSLPETGGGGG* 表示連接子且
*QRPC*LSC*KGP(D-Nle)* 苯乙胺表示多肽。

已發現下文實例中之多肽在APJ受體效能方面具有在約0.01 nM至約1100 nM範圍內之EC₅₀值。已發現下文實例中之多肽具有高於2分鐘、高於5分鐘、高於10分鐘、高於20分鐘、高於50分鐘及高於60分鐘之血漿穩定性。

可見本發明之多肽適用作APJ受體之促效劑且因此適用於治療對APJ受體之活化有反應之疾病及病狀，諸如本文所揭示之疾病。

此外，此等肽之半衰期可藉由形成包含根據式I至IV中之任一者之肽或多肽與半衰期延長部分(諸如人類血清白蛋白或Fc結構域)之生物結合物而進一步延長。

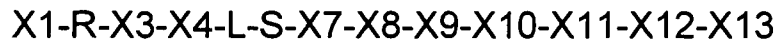
已如此描述本發明之例示性實施例，但一般熟習此項技術者應注意，揭露內容內之事實例僅為例示性，且可在本發明之範疇內進行各種其他替代、修改及變更。因此，本發明不限於如本文中所說明之特定實施例。

【符號說明】

無

申請專利範圍

1. 一種環狀多肽，其具有下式I：



I

其中：

X1為該多肽之N端且為不存在的、Q、A或pE，或X1係選自C、c、hC、D-hC；其中C、c、hC或D-hC之側鏈與X7之側鏈一起形成二硫鍵；

X3為P或X3係選自C、c、hC及D-hC；其中C、c、hC或D-hC之側鏈與X7之側鏈一起形成二硫鍵；

X4為R或X4係選自C、c、hC及D-hC；其中C、c、hC或D-hC之側鏈與X7之側鏈一起形成二硫鍵；

其中X1、X3及X4中僅一者為選自C、c、hC及D-hC之含硫胺基酸；

X7為C、c、hC或D-hC；且X7之側鏈與X1、X3或X4之C、c、hC或D-hC之側鏈一起形成二硫鍵；

X8為K或F；

X9為G、A、a或不存在；

X10為P或不存在；

X11為D-Nle、Nle、M或f；及

X12為不存在的或P、f、a、D-Nva或D-Abu；

X13為C端且為不存在的或係選自(N-Me)F、F、f、a、y及Nal；其中：

Nle為L-正白胺酸；

D-Nle為D-正白胺酸；

D-hC為D-高半胱胺酸

hC為L-高半胱胺酸；

Nal為L-萘基丙胺酸；

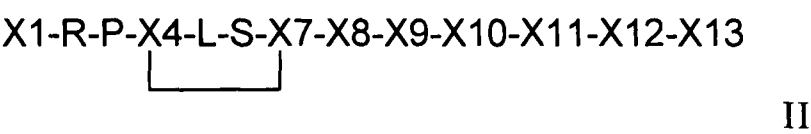
D-Nva為D-正纈胺酸；

D-Abu為D-2-胺基丁酸；

pE為L-焦麩胺酸；

或該多肽之醯胺、酯或鹽；或與其實質上等效之多肽。

2. 如請求項1之多肽，其具有式II：



其中：

X1為該多肽之N端且為不存在的或係選自Q、A及pE；

X4為C、c、hC或D-hC；

X7為C、c、hC或D-hC；且X7之側鏈與X4之側鏈一起形成二硫鍵；

X8為K或F；

X9為G、A、a或不存在；

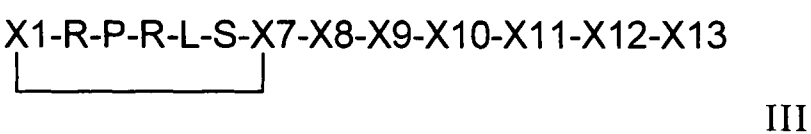
X10為P或不存在；

X11為D-Nle、Nle、M或f；及

X12為不存在的或係選自P、f、a、D-Nva及D-Abu；

X13為C端且為不存在的或係選自F、(N-Me)F、f、a、y及Nal；或該多肽之醯胺、酯或鹽。

3. 如請求項1之多肽，其具有式III：



其中

X1為該多肽之N端且係選自C、c、hC及D-hC；

X7為C、c、hC或D-hC；其中X7之側鏈與X1之側鏈一起形成二硫鍵；

X8為K或F；

X9為G、A、a或不存在；

X10為P或不存在；

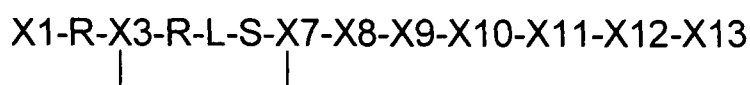
X11為D-Nle、Nle、M或f；及

X12為不存在的或係選自P、f、a、D-Nva及D-Abu；

X13為C端且為不存在的或係選自(N-Me)F、F、f、a、y及Nal；

或該多肽之醯胺、酯或鹽。

4. 如請求項1之多肽，其具有式IV：



IV

其中：

X1為該多肽之N端且為不存在的、Q、A或pE；

X3為C、c、hC或D-hC；其中C、c、hC或D-hC之側鏈；

X7為C、c、hC或D-hC；且X7之側鏈與X3之C、c、hC或D-hC之側鏈一起形成二硫鍵；

X8為K或F；

X9為G、A、a或不存在；

X10為P或不存在；

X11為D-Nle、Nle、M或f；及

X12為不存在的或係選自P、f、a、D-Nva及D-Abu；

X13為C端且為不存在的或係選自(N-Me)F、F、f、a、y及NaI；或該多肽之醯胺、酯或鹽。

5. 如請求項1、2及4中任一項之多肽，其中X1為pE；或該多肽之醯胺、酯或鹽。
6. 如請求項1、2及4中任一項之多肽，其中X1不存在；或該多肽之醯胺、酯或鹽。
7. 如請求項1至4中任一項之多肽，其中該N端為醯胺；或該多肽之鹽。
8. 如請求項7之多肽，其中該N端為式-NHR之醯胺且R為乙醯基、苯甲醯基、苯甲醯甲基、丁二醯基、辛醯基、4-苯基丁醯基、4-Cl-Ph-(CH₂)₃C(O)-或Ph-CH₂CH₂NHC(O)-；或該多肽之鹽。
9. 如請求項1至4中任一項之多肽，其中X13為F或f；或該多肽之醯胺、酯或鹽。
10. 如請求項1至4中任一項之多肽，其中X13不存在；或該多肽之醯胺、酯或鹽。
11. 如請求項1至4中任一項之多肽，其中X12不存在；或該多肽之醯胺及酯或鹽。
12. 如請求項1至4中任一項之多肽，其中該C端為醯胺；或該多肽之鹽。
13. 如請求項12之多肽，其中該C端為式-C(O)-R₂之醯胺，且R₂為-NH₂、-NH-Me、-NH-NHBn或-NH-(CH₂)₂-Ph；或該多肽之鹽。
14. 如請求項1至4中任一項之多肽，其中X8為K；或該多肽之醯胺、酯或鹽。
15. 如請求項1至4中任一項之多肽，其中X9為G；或該多肽之醯胺、酯或鹽。
16. 如請求項1至4中任一項之多肽，其中X10為P；或該多肽之醯

胺、酯或鹽。

17. 如請求項1至4中任一項之多肽，其中X11為Nle或D-Nle；或該多肽之醯胺、酯或鹽。

18. 如請求項1之多肽，其係選自：

Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-F-OH
Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-NH(苯乙基)
Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-(N-Me)F-OH
Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-NH ₂
Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-Nal-OH
Ac-C*-R-P-R-L-S-hC*-K-G-P-Nle-P-F-OH
Ac-hC*-R-P-R-L-S-hC*-K-G-P-Nle-P-F-OH
Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-a-OH
Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-NMe(苯乙基)
Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-f-OH
Ac-C*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-NH(苯乙基)
Ac-c*-R-P-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-F-OH
Ac-c*-R-P-R-L-S-hC*-K-G-P-Nle-P-F-OH
Ac-c*-R-P-R-L-S-c*-K-G-P-Nle-P-F-OH
Ac-C*-R-P-R-L-S-c*-K-G-P-Nle-P-F-OH
Ac-(D-hC)*-R-P-R-L-S-hC*-K-G-P-Nle-P-F-OH
Ac-(D-hC)*-R-P-R-L-S-(D-hC)*-K-G-P-Nle-P-F-OH
Ac-(D-hC)*-R-P-R-L-S-(hC)*-K-G-P-f-a-f-OH
Ac-c-R-P-R-L-S-(hC)-K-G-P-(D-Nle)-a-f-OH
pE-R-C*-R-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-F-OH
pE-R-C*-R-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-a-f-OH
pE-R-C*-R-L-S-C*-F-G-P-(D-Nle)-a-f-OH
pE-R-C*-R-L-S-C*-K-a-P-(D-Nle)-a-f-OH
pE-R-C*-R-L-S-C*-K-A-P-(D-Nle)-a-f-OH
pE-R-C*-R-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-NH ₂
pE-R-C*-R-L-S-(D-hC)*-K-G-P-f-a-f-OH
pE-R-c*-R-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-(D-abu)-f-OH
pE-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-F-OH
pE-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-(N-Me)F-OH
pE-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-Nle-P-NH(苯乙基)
pE-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-Nle-NH(苯乙基)
pE-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-NH(苯乙基)
pE-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-a-f-OH
pE-R-P-C*-L-S-C*-K-G-P-(D-Nle)-f-OH
pE-R-P-C*-L-S-C*-F-G-P-(D-Nle)-a-f-OH
H-R-P-C*-L-S-C*-K-(D-Nle)-a-f-OH
pE-R-P-hC*-L-S-C*-K-G-P-f-a-f-OH
pE-R-P-c*-L-S-(D-hC)*-K-G-P-(D-Nle)-a-y-OH
pE-R-P-(D-hC)*-L-S-hC*-K-G-P-(D-Nle)-(D-Nva)-f-OH

其中該用「*」標記之兩個胺基酸表示形成二硫鍵之胺基酸；

或該多肽之醯胺、酯或鹽。

19. 一種生物結合物或其多聚體，其包含：

a. 如請求項1至18中任一項之肽或多肽，或其醯胺、酯或鹽，
及

b. 半衰期延長部分；

其中該肽或多肽及半衰期延長部分視情況經由連接子共價連接或融合。

20. 如請求項19之生物結合物或其多聚體，其中該半衰期延長部分為IgG恆定結構域或其片段或人類血清白蛋白。

21. 如請求項19或20之生物結合物或其多聚體，其中該半衰期延長部分為具有LALA突變(L234A、L235A)之FcLALA經修飾Fc片段。

22. 如請求項21之生物結合物或其多聚體，其中該半衰期延長部分為Fc結構域，其經由連接子融合於式I、II、III或IV之多肽且其中該連接子具有下式：

-[GGGGS]_n-，n為1、2或3或該連接子為GS或GG，且該式I、II、III或IV之多肽含有天然存在之胺基酸。

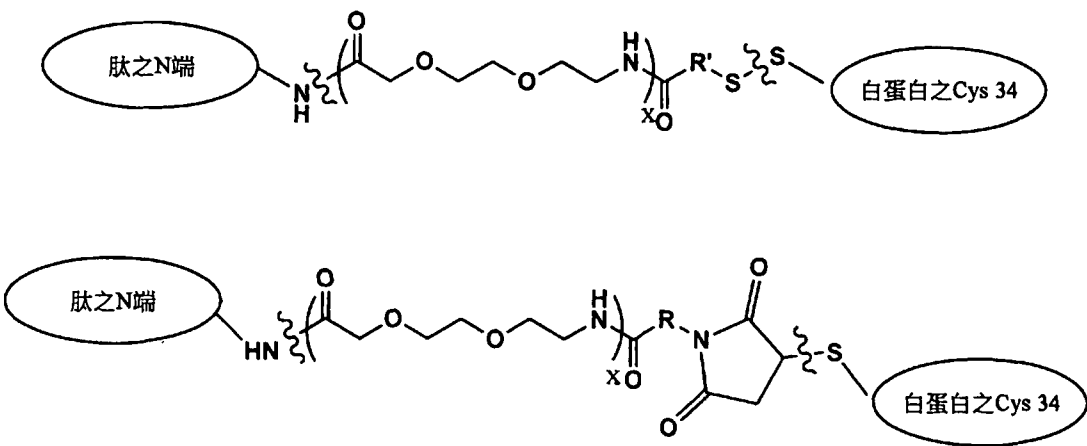
23. 如請求項22之生物結合物或其多聚體，其中該多肽為選自QRPC*LSC*KGPMPPF、C*RPRLSC*KGPMPPF及QRC*RLSC*KGPMPPF之式I之多肽，其中該用「*」標記之兩個胺基酸表示經由其側鏈形成二硫鍵或醯胺鍵之胺基酸。

24. 如請求項22之生物結合物或其多聚體，其中該半衰期延長部分為C端離胺酸已缺失或經丙胺酸置換之經修飾Fc結構域。

25. 如請求項19或20之生物結合物或其多聚體，其中該半衰期延長部分為人類血清白蛋白。

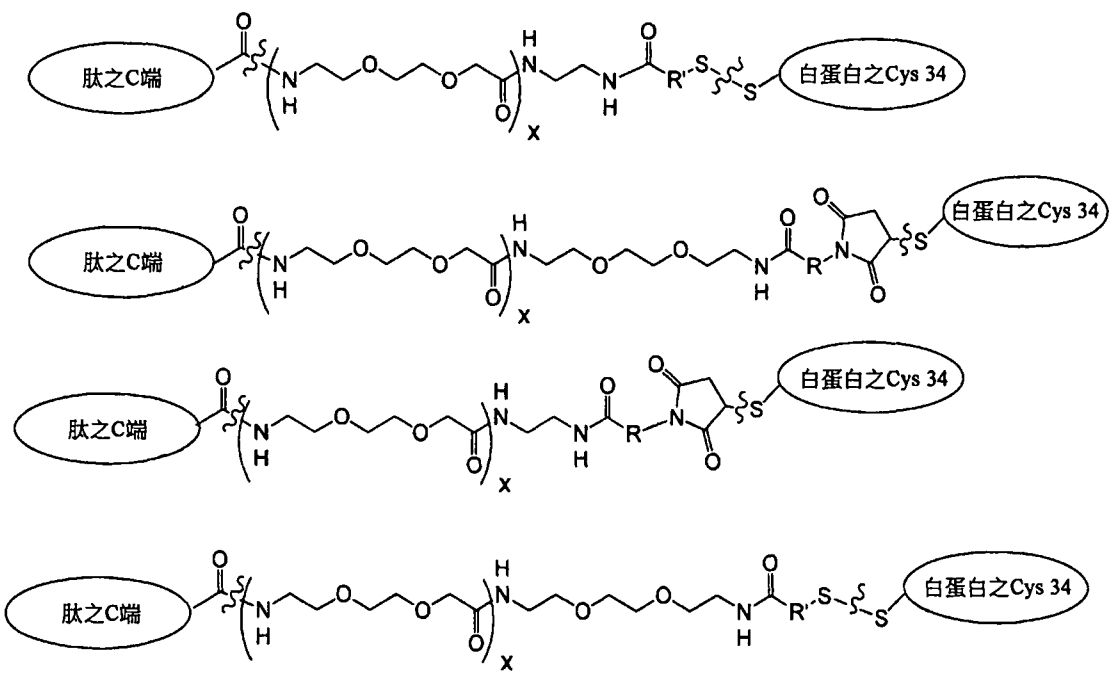
26. 如請求項25之生物結合物或其多聚體，其中該人類血清白蛋白

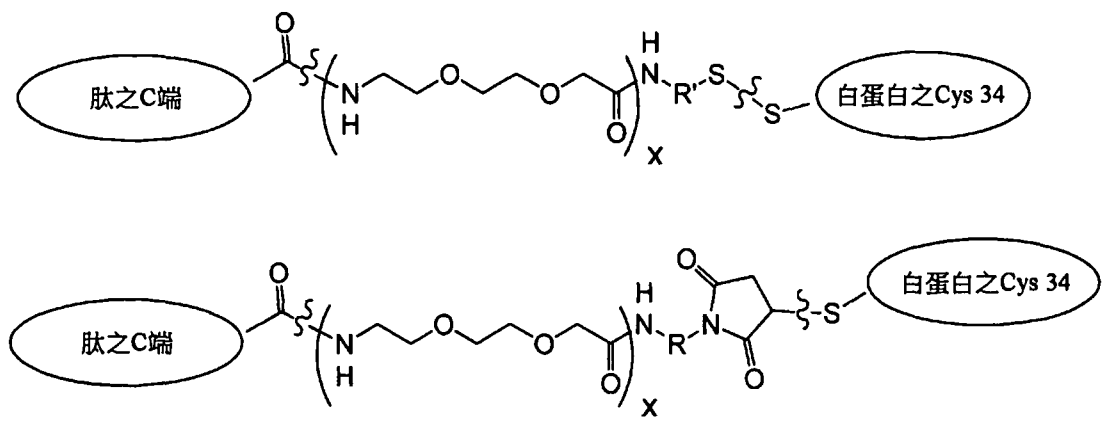
經由下式之連接子化學連接於式I至IV中之任一者之多肽之N端：



其中x為1至20，R為直鏈或分支鏈伸烷基、環烷基、芳基或雜芳基或其組合，R'為直鏈或分支鏈伸烷基、芳基或環烷基或其組合。

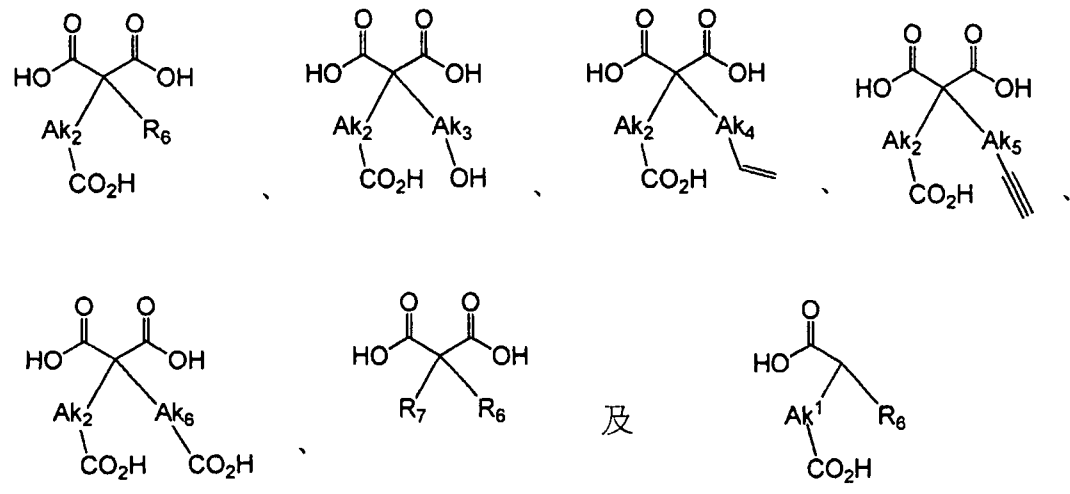
27. 如請求項19或20之生物結合物或其多聚體，其中該人類血清白蛋白經由下式之連接子化學連接於式I至IV中之任一者之多肽之C端：





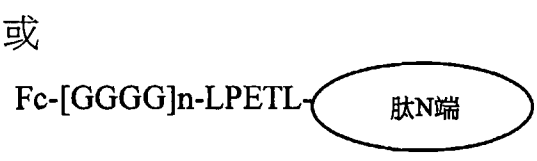
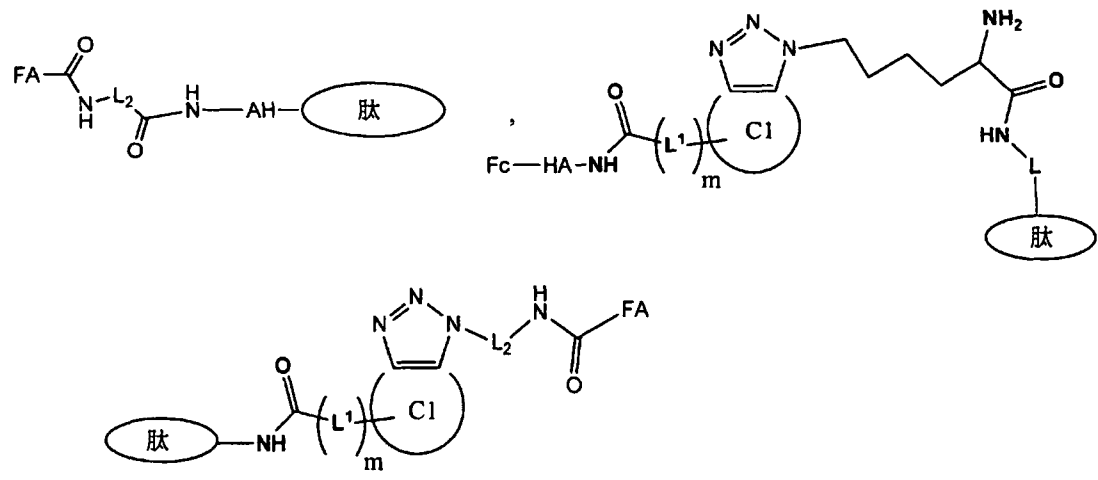
其中x為1至20，R為直鏈或分支鏈伸烷基、環烷基、芳基或雜芳基或其組合，R'為直鏈或分支鏈伸烷基、芳基或環烷基或其組合。

- 28. 如請求項19之生物結合物或其多聚體，其中該半衰期延長部分為脂肪酸。
- 29. 如請求項28之生物結合物或其多聚體，其中該脂肪酸係選自：



其中Ak²、Ak³、Ak⁴、Ak⁵及Ak⁶獨立地為(C₈₋₂₀)伸烷基，R⁶及R⁷獨立地為(C₈₋₂₀)烷基。

- 30. 如請求項19、28或29之生物結合物或其多聚體，其具有下式：



其中肽為該肽之N端，n為1、2或3，m為0或1，A為丙胺酸，H為組胺酸，L2為連接子，C1為視情況經氟取代之單、二或三環碳環或雜環系統且L¹為C1-C20伸烷基連接子，其中該伸烷基鏈視情況經側氧基(=O)取代，且其中一或多種碳經O或NH置換。

- 31. 一種如請求項1至30中任一項之多肽或其醯胺、酯或鹽或其生物結合物之用途，其用於製造供治療或預防有需要之個體對APJ受體之促效作用有反應之疾病或病症的藥劑。
- 32. 如請求項31之用途，其中該疾病或病症係選自急性失代償心臟衰竭(ADHF)、慢性心臟衰竭、肺高血壓、心房纖維性顫動、布魯加達症候群(Brugada syndrome)、心室性心搏過速、動脈粥樣硬化、高血壓、再狹窄、缺血性心血管疾病、心肌病、心臟纖維化、心律不整、水滯留、糖尿病(包括妊娠期糖尿病)、肥胖症、周邊動脈疾病、腦血管意外、短暫性缺血性發作、創傷性腦損傷、肌萎縮性側索硬化、燒傷(包括曬傷)及子癇前症。
- 33. 如請求項1至4、19、20、28及29中任一項之多肽或其醯胺、酯或鹽或其生物結合物，其用作藥劑。
- 34. 如請求項1至4、19、20、28及29中任一項之多肽或其醯胺、酯

或鹽或其生物結合物，其用於治療或預防對APJ受體之促效作用有反應之疾病或病症。

35. 如請求項1至4、19、20、28及29中任一項之多肽、其醯胺、酯或鹽或其生物結合物，其用於治療急性失代償心臟衰竭(ADHF)、慢性心臟衰竭、肺高血壓、心房纖維性顫動、布魯加達症候群、心室性心搏過速、動脈粥樣硬化、高血壓、再狹窄、缺血性心血管疾病、心肌病、心臟纖維化、心律不整、水滯留、糖尿病(包括妊娠期糖尿病)、肥胖症、周邊動脈疾病、腦血管意外、短暫性缺血性發作、創傷性腦損傷、肌萎縮性側索硬化、燒傷(包括曬傷)及子癇前症。
36. 一種組合，其包含治療有效量之如請求項1至30中任一項之多肽、其醯胺、酯或鹽或其生物結合物及一或多種治療活性輔劑。
37. 如請求項36之組合，其中該輔劑係選自收縮影響劑、 β 腎上腺素激導性受體阻斷劑、HMG-Co-A還原酶抑制劑、血管收縮素II受體拮抗劑、血管收縮素轉化酶(ACE)抑制劑、鈣離子通道阻斷劑(CCB)、內皮素拮抗劑、腎素抑制劑、利尿劑、ApoA-I模擬物、抗糖尿病劑、減肥劑、醛固酮受體阻斷劑、內皮素受體阻斷劑、醛固酮合成酶抑制劑(ASI)、CETP抑制劑、抗凝劑、鬆弛素、BNP(奈西立肽(nesiritide))及/或NEP抑制劑。
38. 一種醫藥組合物，其包含治療有效量之如請求項1至30中任一項之多肽、其醯胺、酯或鹽或其生物結合物，及一或多種醫藥學上可接受之載劑。