



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101296708 B

(45) 授权公告日 2011. 12. 07

(21) 申请号 200680039895. 3

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2006. 10. 24

A61K 47/48 (2006. 01)

(30) 优先权数据

C07K 14/575 (2006. 01)

60/730, 291 2005. 10. 26 US

A61K 38/00 (2006. 01)

60/740, 342 2005. 11. 29 US

审查员 刘瑞华

60/743, 364 2006. 02. 28 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2008. 04. 25

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2006/041550 2006. 10. 24

(87) PCT申请的公布数据

W02007/050651 EN 2007. 05. 03

(73) 专利权人 伊莱利利公司

地址 美国印第安纳州

(72) 发明人 B·K·博奎斯特 张连山

J·阿尔西纳-费尔南德斯

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 黄革生 隗永良

权利要求书 17 页 说明书 49 页 附图 1 页

(54) 发明名称

选择性 VPAC2 受体肽激动剂

(57) 摘要

本发明涵盖了选择性激活 VPAC2 受体并用于糖尿病治疗的肽。

1. 加入聚乙二醇的 VPAC2 受体肽激动剂,其含有选自以下的序列:

SEQ ID NO :17

HSDAVFTEQY (OMe) TRAibRAibQLAAAibOrnY (OMe) LQSIKAibOrn ;

SEQ ID NO :18

HSDAVFTEK (CO (CH₂)₂SH) Y (OMe) TOrnLRAibQVAAAibOrnYLQSIOrnOrn ;

SEQ ID NO :19

HSDAVFTEQY (OMe) TOrnLRAibQVAAAibOrnYLQSIOrnK (W) Orn ;

SEQ ID NO :20

HSDAVFTEQY (OMe) TOrnLRAibQVAAAibK (CO (CH₂)₂SH) YLQSIOrnOrn ;

SEQ ID NO :21

HSDAVFTEQY (OMe) TOrnLRAibQVAAK (CO (CH₂)₂SH) OrnYLQSIOrnOrn ;

SEQ ID NO :22

HSDAVFTEQY (OMe) TOrnLRAibQVCAAibOrnYLQSIOrnOrn ;

SEQ ID NO :23

HSDAVFTEQY (OMe) TOrnLRCQVAAAibOrnYLQSIOrnOrn ;

SEQ ID NO :24

HSDAVFTEQY (OMe) TOrnLRAibQLAAAibOrnYLQSIOrnOrn ;

SEQ ID NO :25

HSDAVFTEQY (OMe) TOrnLRAibQVAAAibOrnYAibQSIOrnOrn ;

SEQ ID NO :26

HSDAVFTEQY (OMe) TOrnLRAibQVAAAibOrnYLQAibIOrnOrn ;

SEQ ID NO :27

HSDAVFTEQY (OMe) TOrnLRAibQVAAbuAibOrnYLQAibIOrnOrn ;

SEQ ID NO :28

HSDAVFTEQY (OMe) TOrnLRAibQLAAAibOrnYLQAibIOrnOrn ;

SEQ ID NO :29

HSDAVFTEQY (OMe) TOrnLRAibQLAAAibOrnYAibQAibIOrnOrn ;

SEQ ID NO :30

HSDAVFTEQY (OMe) TOrnLRAibQLAAbuAibOrnYAibQSIOrnOrn ;

SEQ ID NO :31

HSDAVFTEQY (OMe) TOrnLRAibQLAAbuAibOrnYLQSIOrnOrn ;

SEQ ID NO :32

HSDAVFTEQY (OMe) TOrnLRAibQLAAbuAibOrnYAibQAibIOrnOrn ;

SEQ ID NO :33

HSDAVFTEQY (OMe) TOrnLRAibQLAAAibOrnYAibQSIOrnOrn ;

SEQ ID NO :34

HSDAVFTEQY (OMe) TOrnLRK (W) QVAAAibOrnYLQSIOrnOrn ;

SEQ ID NO :35

HSDAVFTEQY (OMe) TOrnLRAibQVAAAibOrnYLK (W) SIOrnOrn ;

SEQ ID NO :36

HSDAVFTEQY (OMe) TOrnLRAibQK (W) AAAibOrnYLQSIOrnOrn ;

SEQ ID NO :37

HSDAVFTEQY (OMe) TOrnLRK (CO (CH₂)₂SH) QVAAAibOrnYLQSIOrnOrn ;

SEQ ID NO :38

HSDAVFTEQY (OMe) TOrnLRAibQVAAAibK (W) YLQSIOrnOrn ;

SEQ ID NO :39

HSDAVFTEQY (OMe) TOrnLRAibQVAAAibCYLQSIOrnOrn ;

SEQ ID NO :40

HSDAVFTEQY (OMe) TOrnLRAibQLAAbuAibOrnYLQAibIOrnOrn ;

SEQ ID NO :41

HSDAVFTEQY (OMe) TOrnLRAibQVAAAibOrnYLQSK (W) OrnOrn ;

SEQ ID NO :42

HSDAVFTEQY (OMe) TOrnLRAibQLAAbuAibOrnYLQAibIOrnCOrn ;

SEQ ID NO :43

HSDAVFTEQY (OMe) TOrnLRAibQLAAbuAibOrnYLQAibCOrnOrn ;

SEQ ID NO :44

HSDAVFTEQY (OMe) TOrnLRAibQCAAbuAibOrnYLQAibIOrnOrn ;

SEQ ID NO :45

HSDAVFTEQY (OMe) TOrnLRCQLAAbuAibOrnYLQAibIOrnOrn ;

SEQ ID NO :94

HSDAVFTEQY (OMe) TOrnLRAibQVK (CO (CH₂)₂SH) AAibOrnYLQSIOrnOrn ;

SEQ ID NO :95

HSDAVFTEQY (OMe) TOrnLRAibQLAAbuAibOrnYLQSIOrnCOrn ;

SEQ ID NO :96

HSDAVFTEQY (OMe) TOrnLRAibQLAAbuAibOrnYLQSCOrnOrn ;

SEQ ID NO :97

HSDAVFTEQY (OMe) TOrnLRAibQLAAbuAibOrnYLQAibIOrnK (CO (CH₂)₂SH) Orn ;

SEQ ID NO :98

HSDAVFTEQY (OMe) TOrnLRAibQLAAbuAibOrnYLQSIOrnK (CO (CH₂)₂SH) Orn ;

SEQ ID NO :99

HSDAVFTEQY (OMe) TOrnLRK (W) QLAAbuAibOrnYLQAibIOrnOrn ;

SEQ ID NO :100

HSDAVFTEQY (OMe) TOrnLRAibQLAAAibOrnYLQSIOrnOrnC ;

SEQ ID NO :101

HSDAVFTEQY (OMe) TOrnLRAibQVAAAibOrnYLQSIOrnOrnC ;

SEQ ID NO :102

HSDAVFTEQY (OMe) TOrnLRAibQLAAbuAibOrnYLQSIOrnOrnC ;

SEQ ID NO :103

HSDAVFTEQY (OMe) TOrnLRAibQLAAbuAibOrnY (OMe) LQAibIOrnOrn ;

SEQ ID NO :104

HSDAVFTEQY (OMe) TOrnLRAibQLAAbuAibOrnY (OMe) LQAibIOrnCOrn ;

SEQ ID NO :105

HSDAVFTEQY (OMe) TOrnLRAibQCAAbuAibOrnY (OMe) LQAibIOrnOrn ;

SEQ ID NO :106

HSDAVFTEQY (OMe) TOrnLRAibQLAAbuAibOrnYLQAibIOrnOrnC ;

SEQ ID NO :107

HSDAVFTEQY (OMe) TOrnLRAibQLAAbuAibOrnY (OMe) LQSIOrnOrn ;

SEQ ID NO :108

HSDAVFTEQY (OMe) TOrnLRAibQCAAbuAibOrnY (OMe) LQSIOrnOrn ;

SEQ ID NO :109

HSDAVFTEQY (OMe) TOrnLRAibQLAAbuAibOrnY (OMe) LQSIOrnCOrn ;

SEQ ID NO :110

HSDAVFTEQY (OMe) TOrnLRAibQLAbuAAibOrnYLQSIOrnOrn ;

SEQ ID NO :111

HSDAVFTEQY (OMe) TOrnLRAibQK (CO (CH₂)₂SH) AAbuAibOrnYLQAibIOrnOrn ;和

SEQ ID NO :112

HSDAVFTEQY (OMe) TOrnLRAibQK (W) AAbuAibOrnYLQAibIOrnOrn ;

以及 C 末端延伸,其中 C 末端延伸的 N 端连接在肽序列的 C 端,并且其中 C 末端延伸选自 :

SEQ ID NO :5	GGPSSGAPPPS
SEQ ID NO :6	GGPSSGAPPPS-NH ₂
SEQ ID NO :7	GGPSSGAPPPC
SEQ ID NO :8	GGPSSGAPPPC-NH ₂
SEQ ID NO :9	GRPSSGAPPPS
SEQ ID NO :10	GRPSSGAPPPS-NH ₂
SEQ ID NO :11	GGPSSGAPPPCC
SEQ ID NO :12	GGPSSGAPPPCC-NH ₂

并且其中 :

肽激动剂包含至少一个 Cys 残基,其共价的连接 PEG 分子,或者

肽激动剂包含至少一个 Lys 残基,其共价的连接 PEG 分子,或者

肽激动剂包含至少一个 K (W),其共价的连接 PEG 分子,或者

肽激动剂包含至少一个 K (CO (CH₂)₂SH),其共价的连接 PEG 分子,或者

肽激动剂的羧基端氨基酸共价的连接 PEG 分子,或者它们的组合。

2. 根据权利要求 1 的加入聚乙二醇的 VPAC2 受体肽激动剂,其中 C 末端延伸是 SEQ ID NO:11 或 SEQ ID NO:12。

3. 根据权利要求 1 的加入聚乙二醇的 VPAC2 受体肽激动剂,其中至少有一个 PEG 分子与 C 末端延伸中的残基共价的连接。

4. 根据前述权利要求中任一项的加入聚乙二醇的 VPAC2 受体肽激动剂,其中 PEG 分子是分支的。

5. 根据权利要求 1 至 3 中任一项的加入聚乙二醇的 VPAC2 受体肽激动剂,其中 PEG 分子是线性的。

6. 根据权利要求 1-3 任一项的加入聚乙二醇的 VPAC2 受体肽激动剂,其中每一个 PEG 分子的分子量是 20,000、30,000、40,000 或 60,000 道尔顿。

7. 根据权利要求 1-3 任一项的加入聚乙二醇的 VPAC2 受体肽激动剂,其在肽激动剂的 N 端还含有 N 末端修饰,其中 N 末端修饰选自:

(a) 添加 D- 组氨酸、异亮氨酸、甲硫氨酸或正亮氨酸;

(b) 添加肽,其含有序列 Ser-Trp-Cys-Glu-Pro-Gly-Trp-Cys-Arg (SEQ ID NO:93),其中 Arg 与肽激动剂的 N 端相连;

(c) 添加 C₁-C₁₆ 烷基,其用一个或多个独立的选自芳基、C₁-C₆ 烷氧基、-NH₂、-OH、卤素和 -CF₃ 的取代基任选的取代;

(d) 添加 -C(O)R¹,其中 R¹ 是用独立的选自芳基、C₁-C₆ 烷氧基、-NH₂、-OH、卤素、-SH 和 -CF₃ 的一个或多个取代基任选的取代的 C₁-C₁₆ 烷基;用独立的选自 C₁-C₆ 烷基、C₂-C₆ 烯基、C₂-C₆ 炔基、C₁-C₆ 烷氧基、-NH₂、-OH、卤素和 -CF₃ 的一个或多个取代基任选的取代的芳基;用独立的选自 C₁-C₆ 烷基、C₂-C₆ 烯基、C₂-C₆ 炔基、C₁-C₆ 烷氧基、-NH₂、-OH、卤素和 -CF₃ 的一个或多个取代基任选的取代的芳基 C₁-C₄ 烷基;-NR²R³,其中 R² 和 R³ 独立的是氢、C₁-C₆ 烷基、芳基或芳基 C₁-C₄ 烷基;-OR⁴,其中 R⁴ 是用独立的选自芳基、C₁-C₆ 烷氧基、-NH₂、-OH、卤素和 -CF₃ 的一个或多个取代基任选的取代的 C₁-C₁₆ 烷基,用独立的选自 C₁-C₆ 烷基、C₂-C₆ 烯基、C₂-C₆ 炔基、C₁-C₆ 烷氧基、-NH₂、-OH、卤素和 -CF₃ 的一个或多个取代基任选的取代的芳基,或者用独立的选自 C₁-C₆ 烷基、C₂-C₆ 烯基、C₂-C₆ 炔基、C₁-C₆ 烷氧基、-NH₂、-OH、卤素和 -CF₃ 的一个或多个取代基任选的取代的芳基 C₁-C₄ 烷基;或者 5- 吡咯烷 -2- 酮;

(e) 添加 -SO₂R⁵,其中 R⁵ 是芳基、芳基 C₁-C₄ 烷基或 C₁-C₁₆ 烷基;

(f) 形成用 C₁-C₆ 烷基或 -SR⁶ 任选的取代的琥珀酰亚胺基团,其中 R⁶ 是氢或 C₁-C₆ 烷基;

(g) 添加甲硫氨酸亚砷;

(h) 添加生物素基 -6- 氨基己酸;和

(i) 添加 -C(=NH)-NH₂。

8. 根据权利要求 7 的加入聚乙二醇的 VPAC2 受体肽激动剂,其中 N 末端修饰是添加选自以下的基团:乙酰基、丙酰基、丁酰基、戊酰基、己酰基、甲硫氨酸、甲硫氨酸亚砷、3- 苯基丙酰基、苯乙酰基、苯甲酰基、正亮氨酸、D- 组氨酸、异亮氨酸、3- 巯丙酰基、生物素基 -6- 氨基己酸和 -C(=NH)-NH₂。

9. 根据权利要求 8 的加入聚乙二醇的 VPAC2 受体肽激动剂,其中 N 末端修饰是添加乙酰基或己酰基。

10. 根据权利要求 1 的加入聚乙二醇的 VPAC2 肽受体激动剂,其含有选自以下的氨基酸序列:

激 动 剂 #	SEQ ID NO	序 列
P410	46	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TO _{rn} LRAibQVAAAibK(W-PEG40K)YLQSIOrnOrnGGPSSGAPPPS-NH ₂

P417	47	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TRaibRAibQLAAaibOr nY(OMe)LQSIKAibOrnGGPSSGAPPPC(PEG40K) -NH₂
P451	48	C6-HSDAVFTEK(CO(CH₂)₂SPEG40K)Y(OMe)TO r nLRAibQVAAAibOrnYLQSIOrnOrnGGPSSGAPP PS-NH₂
P454	49	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TO r nLRAibQVAAAib OrnYLQSIOrnK(WPEG40K)OrnGGPSSGAPPPS- NH₂
P460	50	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TO r nLRAibQVAAAibC(PEG40K)YLQSIOrnOrnGGPSSGAPPPS-NH₂
P472	51	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TO r nLRAibQVAAAibK(CO(CH₂)₂SPEG40K)YLQSIOrnOrnGGPSSGAPPP S-NH₂
P473	52	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TO r nLRAibQVAAAibK(CO(CH₂)₂SPEG20K)YLQSIOrnOrnGGPSSGAPPP S-NH₂
P475	53	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TO r nLRAibQVAAK(CO(CH₂)₂SPEG40K)OrnYLQSIOrnOrnGGPSSGAPPP S-NH₂
P478	54	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TO r nLRAibQVC(PEG40 K)AAibOrnYLQSIOrnOrnGGPSSGAPPPS-NH₂

P483	55	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TO_{rn}LRC(PEG40K)QVAAibOrnYLQSIOrnOrnGGPSSGAPPPS-NH₂
P485	56	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TO_{rn}LRK(CO(CH₂)₂SPEG40K)QVAAAibOrnYLQSIOrnOrnGGPSSGAPPPS-NH₂
P507	57	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TO_{rn}LRAibQVAAAibOrnYAibQSIOrnOrnGGPSSGAPPPC(PEG40K)-NH₂
P509	58	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TO_{rn}LRAibQVAAAibOrnYLQAibIO_{rn}OrnGGPSSGAPPPC(PEG40K)-NH₂
P511	59	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TO_{rn}LRAibQVAAbuAibOrnYLQAibIO_{rn}OrnGGPSSGAPPPC(PEG40K)-NH₂
P513	60	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TO_{rn}LRAibQLAAAibOrnYAibQSIOrnOrnGGPSSGAPPPC(PEG20K)C(PEG20K)-NH₂
P515	61	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TO_{rn}LRAibQLAAAibOrnYLQAibIO_{rn}OrnGGPSSGAPPPC(PEG20K)C(PEG20K)-NH₂
P517	62	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TO_{rn}LRAibQLAAbuAibOrnYLQAibIO_{rn}OrnGGPSSGAPPPC(PEG20K)C(PEG20K)-NH₂

P519	63	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TO_{rn}LRAibQLAAaibOr nYAibQAibIO_{rn}OrnGGPSSGAPPPC(PEG20K)C(P EG20K)-NH₂
P521	64	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TO_{rn}LRAibQLAAbuAib OrnYAibQSIOrnOrnGGPSSGAPPPC(PEG20K)C(PEG20K)-NH₂
P523	65	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TO_{rn}LRAibQLAAbuAib OrnYLQSIOrnOrnGGPSSGAPPPC(PEG20K)C(PE G20K)-NH₂
P525	66	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TO_{rn}LRAibQLAAbuAib OrnYAibQAibIO_{rn}OrnGGPSSGAPPPC(PEG20K) C(PEG20K)-NH₂
P529	67	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TO_{rn}LRK(WPEG40K)Q VAAAibOrnYLQSIOrnOrnGGPSSGAPPPS-NH₂
P531	68	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TO_{rn}LRAibQVAAAibOr nYLK(WPEG40K)SIOrnOrnGGPSSGAPPPS-NH₂
P533	69	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TO_{rn}LRAibQK(WPEG40 K)AAAibOrnYLQSIOrnOrnGGPSSGAPPPS-NH₂
P535	70	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TO_{rn}LRAibQVAAAibOr nYLQSK(WPEG40K)OrnOrnGGPSSGAPPPS-NH₂

P537	71	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TO_{rn}LRAibQLAAbuAib OrnYLQAibIO_{rn}C(PEG40K)OrnGGPSSGAPPPS- NH₂
P541	72	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TO_{rn}LRAibQLAAbuAi bOrnYLQAibC(PEG40K)OrnOrnGGPSSGAPPPS- NH₂
P545	73	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TO_{rn}LRAibQC(PEG40K)AAbuAibOrnYLQAibIO_{rn}OrnGGPSSGAPPPS-N H₂
P547	74	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TO_{rn}LRC(PEG40K)QLA AbuAibOrnYLQAibIO_{rn}OrnGGPSSGAPPPS-NH₂
P480	113	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TO_{rn}LRAibQVK(CO(CH₂)₂SPEG40K)AAibOrnYLQSIOrnOrnGGPSSGA PPPS-NH₂
P481	114	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TO_{rn}LRAibQVK(CO(CH₂)₂SPEG20K)AAibOrnYLQSIOrnOrnGGPSSGA PPPS-NH₂
P539	115	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TO_{rn}LRAibQLAAbuA ibOrnYLQSIOrnC(PEG40K)OrnGGPSSGAPPPS- NH₂
P543	116	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TO_{rn}LRAibQLAAbuAib OrnYLQSC(PEG40K)OrnOrnGGPSSGAPPPS-NH₂

P549	117	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TO_{rn}LRAibQLAAbuAib OrnYLQAibIO_{rn}K(CO(CH₂)₂SPEG20K)OrnGGPS SGAPPPC(PEG20K)-NH₂
P551	118	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TO_{rn}LRAibQLAAbuAib OrnYLQSIOrnK(CO(CH₂)₂SPEG20K)OrnGGPSSG APPPC(PEG20K)-NH₂
P555	119	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TO_{rn}LRAibQLAAbuAib OrnYLQSIOrnC(PEG20K)OrnGGPSSGAPPPC(PE G20K)-NH₂
P557	120	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TO_{rn}LRK(WPEG40K)Q LAAbuAibOrnYLQAibIO_{rn}OrnGGPSSGAPPPS-N H₂
P560	121	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TO_{rn}LRAibQLAAaibOr nYLQSIOrnOrnC(PEG40K)GGPSSGAPPPS-NH₂
P562	122	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TO_{rn}LRAibQVAAaibOr nYLQSIOrnOrnC(PEG20K)GGPSSGAPPPC(PEG2 0K)-NH₂
P564	123	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TO_{rn}LRAibQLAAbuAib OrnYLQAibIO_{rn}OrnC(PEG40K)GGPSSGAPPPS- NH₂

P566	124	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TO rnLRAibQLAAbuA ibOrnYLQSIOrnOrnC(PEG40K)GGPSSGAPPPS- NH₂
P572	125	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TO rnLRAibQLAAbuAib OrnYLQSIOrnOrnC(PEG20K)GGPSSGAPPPC(PE G20K)-NH₂
P574	126	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TO rnLRAibQLAAbuAib OrnY(OMe)LQAibIO rnOrnGGPSSGAPPPC(PEG2 0K)C(PEG20K)-NH₂
P576	127	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TO rnLRAibQLAAbuAib OrnY(OMe)LQAibIO rnC(PEG40K)OrnGGPSSGA PPPS-NH₂
P578	128	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TO rnLRAibQC(PEG40K)AAbuAibOrnY(OMe)LQAibIO rnOrnGGPSSGAP PPS-NH₂
P580	129	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TO rnLRAibQLAAbuAib OrnYLQAibIO rnOrnC(PEG20K)GGPSSGAPPPC(PEG20K)-NH₂
P582	130	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TO rnLRAibQLAAbuAib OrnY(OMe)LQSIOrnOrnGGPSSGAPPPC(PEG20 K)C(PEG20K)-NH₂

P584	131	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TO_{rn}LRAibQLAAbuAib OrnY(OMe)LQSIOrnC(PEG40K)OrnGGPSSGAPP PS-NH₂
P586	132	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TO_{rn}LRAibQC(PEG40K)AAbuAibOrnY(OMe)LQSIOrnOrnGGPSSGAPPP S-NH₂
P588	133	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TO_{rn}LRAibQLAAbuAib OrnY(OMe)LQSIOrnC(PEG20K)OrnGGPSSGAPP PC(PEG20K)-NH₂
P590	134	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TO_{rn}LRAibQLAbuAAib OrnYLQSIOrnOrnGGPSSGAPPPC(PEG20K)C(PE G20K)-NH₂
P597	135	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TO_{rn}LRAibQK(CO(CH₂)₂ SPEG20K)AAbuAibOrnYLQAibIO_{rn}OrnGGPSSG APPPC(PEG20K)-NH₂
P599	136	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TO_{rn}LRAibQK(CO(CH₂)₂SPEG40K)AAbuAibOrnYLQAibIO_{rn}OrnGG PSSGAPPPS-NH₂
P601	137	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TO_{rn}LRAibQK(WPEG40 K)AAbuAibOrnYLQAibIO_{rn}OrnGGPSSGAPPPS- NH₂

P469	139	C6-HSDAVFTEK(CO(CH₂)₂SPEG20K)Y(OMe)TO rnLRAibQVAAAibOrnYLQSIOrnOrnGGPSSGAPP PS-NH₂
P486	140	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TO rnLRK(CO(CH₂)₂SPE G20K)QVAAAibOrnYLQSIOrnOrnGGPSSGAPPP S-NH₂
P553	141	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TO rnLRAibQLAAbuAib OrnYLQAibIO rnC(PEG20K)OrnGGPSSGAPPPC(PEG20K)-NH₂
P570	144	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TO rnLRAibQLAAbuAib OrnYLQAibIO rnOrnGGPSSGAPPPC(PEG30K)C(PEG30K)-NH₂
P595	146	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TO rnLRAibQC(PEG20K)AAbuAibOrnYLQAibIO rnOrnGGPSSGAPPPC(P EG20K)-NH₂
P476	147	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TO rnLRAibQVAAK(CO(CH₂)₂SPEG20K)OrnYLQSIOrnOrnGGPSSGAPPP S-NH₂
P602	148	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TO rnLRAibQLAAbuAib OrnYAibQSIOrnOrnGGPSSGAPPPC(PEG30K)C(PEG30K)-NH₂

11. 加入聚乙二醇的 VPAC2 肽受体激动剂,其含有选自以下的氨基酸序列:

激动剂 #	SEQ ID NO	序列
P470	75	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TO _{rn} K(CO(CH ₂) ₂ SPEG20K)RAibQVAAAibOr _n YLQSIOr _n Or _n GGPSSGAPPPS-NH ₂
P490	76	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TO _{rn} LRAibQVAAAibOr _n YLK(CO(CH ₂) ₂ SPEG20K)SIOr _n Or _n GGPSSGAPPC(PEG20K)-NH ₂
P492	77	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TO _{rn} LRAibQVAK(CO(CH ₂) ₂ SPEG20K)AibOr _n YLQSIOr _n Or _n GGPSSGAPPC(PEG20K)-NH ₂
P495	78	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TO _{rn} LRAibQVAAAibOr _n YLQK(CO(CH ₂) ₂ SPEG20K)IO _{rn} Or _n GGPSSGAPPPC(PEG20K)-NH ₂
P497	79	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TO _{rn} LRAibQVAAAibOr _n YLQSK(CO(CH ₂) ₂ SPEG20K)Or _n Or _n GGPSSGAPPPC(PEG20K)-NH ₂

P499	80	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TO_{rn}LRAibQVAAAibOr nYLQSIOrnK(CO(CH₂)₂SPEG20K)OrnGGPSSGA PPPC(PEG20K)-NH₂
P501	81	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TO_{rn}LRAibQVAAAibOr nYLC(PEG20K)SIOrnOrnGGPSSGAPPPC(PEG20 K)-NH₂
P503	82	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TO_{rn}LRAibQVAAAibOr nYLQSC(PEG20K)OrnOrnGGPSSGAPPPC(PEG2 0K)-NH₂
P505	83	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TO_{rn}LRAibQVAAAibOr nYLQSIOrnC(PEG20K)OrnGGPSSGAPPPC(PEG2 0K)-NH₂
P402	138	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TO_{rn}LRAibQVAAAibOr nYLQSIOrnOrnGGPSSGAPPPK(W-PEG40K)-NH₂
P558	142	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TO_{rn}LRAibQC(PEG20K)AAAibOrnYLQSIOrnOrnGGPSSGAPPPS-NH₂
P568	143	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TO_{rn}LRAibQC(PEG20K)AAAibOrnYLQSIOrnOrnGGPSSGAPPPC(PEG20 K)-NH₂
P593	145	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TO_{rn}LRAibQLAAbuAib OrnYAibQAibIO_{rn}OrnGGPSSGAPPPK(WPEG40 K)-NH₂

12. 加入聚乙二醇的 VPAC2 受体肽激动剂,其含有下式的序列 :Xaa₁-Xaa₂-Xaa₃-Xaa₄-Xaa₅-Xaa₆-Thr-Xaa₈-Xaa₉-Xaa₁₀-Thr-Xaa₁₂-Xaa₁₃-Xaa₁₄-Aib-Xaa₁₆-Xaa₁₇-Xaa₁₈-Abu-Aib-Xaa₂₁-Xaa₂₂-Xaa₂₃-Xaa₂₄-Xaa₂₅-Xaa₂₆-Xaa₂₇-Xaa₂₈-Xaa₂₉-Xaa₃₀-Xaa₃₁-Xaa₃₂-Xaa₃₃-Xaa₃₄-Xaa₃₅-Xaa₃₆-Xaa₃₇-Xaa₃₈-Xaa₃₉-Xaa₄₀

式 4 (SEQ ID NO :4)

其中：

Xaa₁ 是 :His、dH 或不存在

Xaa₂ 是 :dA、Ser、Val、Gly、Thr、Leu、dS、Pro 或 Aib；

Xaa₃ 是 :Asp 或 Glu；

Xaa₄ 是 :Ala、Ile、Tyr、Phe、Val、Thr、Leu、Trp、Gly、dA、Aib 或 NMeA；

Xaa₅ 是 :Val、Leu、Phe、Ile、Thr、Trp、Tyr、dV、Aib 或 NMeV；

Xaa₆ 是 :Phe、Ile、Leu、Thr、Val、Trp 或 Tyr；

Xaa₈ 是 :Asp、Glu、Ala、Lys、Leu、Arg 或 Tyr；

Xaa₉ 是 :Asn、Gln、Asp、Glu、Ser、Cys、Lys 或 K(CO(CH₂)₂SH)；

Xaa₁₀ 是 :Tyr、Trp、Tyr(OMe)、Ser、Cys 或 Lys；

Xaa₁₂ 是 :Arg、Lys、Glu、hR、Orn、Lys(异丙基)、Aib、Cit、Ala、Leu、Gln、Phe、Ser 或 Cys；

Xaa₁₃ 是 :Leu、Phe、Glu、Ala、Aib、Ser、Cys、Lys 或 K(CO(CH₂)₂SH)；

Xaa₁₄ 是 :Arg、Leu、Lys、Ala、hR、Orn、Lys(异丙基)、Phe、Gln、Aib、Cit、Ser 或 Cys；

Xaa₁₆ 是 :Gln、Lys、Glu、Ala、hR、Orn、Lys(异丙基)、Cit、Ser、Cys、K(CO(CH₂)₂SH) 或 K(W)；

Xaa₁₇ 是 :Val、Ala、Leu、Ile、Met、Nle、Lys、Aib、Ser、Cys、K(CO(CH₂)₂SH) 或 K(W)；

Xaa₁₈ 是 :Ala、Ser、Cys、Lys、K(CO(CH₂)₂SH)、K(W)、Abu 或 Nle；

Xaa₂₁ 是 :Lys、His、Arg、Ala、Phe、Aib、Leu、Gln、Orn、hR、K(Ac)、Cit、Ser、Cys、Val、Tyr、Ile、Thr、Trp、K(W) 或 K(CO(CH₂)₂SH)；

Xaa₂₂ 是 :Tyr、Trp、Phe、Thr、Leu、Ile、Val、Tyr(OMe)、Ala、Aib、Ser、Cys、Lys、K(W) 或 K(CO(CH₂)₂SH)；

Xaa₂₃ 是 :Leu、Phe、Ile、Ala、Trp、Thr、Val、Aib、Ser、Cys、Lys、K(W) 或 K(CO(CH₂)₂SH)；

Xaa₂₄ 是 :Gln、Glu、Asn、Ser、Cys、Lys、K(CO(CH₂)₂SH) 或 K(W)；

Xaa₂₅ 是 :Ser、Asp、Phe、Ile、Leu、Thr、Val、Trp、Gln、Asn、Tyr、Aib、Glu、Cys、Lys、K(CO(CH₂)₂SH) 或 K(W)；

Xaa₂₆ 是 :Ile、Leu、Thr、Val、Trp、Tyr、Phe、Aib、Ser、Cys、Lys、K(CO(CH₂)₂SH) 或 K(W)；

Xaa₂₇ 是 :Lys、hR、Arg、Gln、Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Met、Asn、Pro、Ser、Thr、Val、Trp、Tyr、Lys(异丙基)、Cys、Leu、Orn、dK、K(W) 或 K(CO(CH₂)₂SH)；

Xaa₂₈ 是 :Asn、Asp、Gln、Lys、Arg、Aib、Orn、hR、Cit、Pro、dK、Ser、Cys、K(CO(CH₂)₂SH) 或 K(W)；

Xaa₂₉ 是 :Lys、Ser、Arg、Asn、hR、Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Pro、Gln、Thr、Val、Trp、Tyr、Cys、Orn、Cit、Aib、K(W)、K(CO(CH₂)₂SH) 或不存在；

Xaa₃₀ 是 :Arg、Lys、Ile、Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Ser、Thr、Val、Trp、Tyr、Cys、hR、Cit、Aib、Orn、K(W)、K(CO(CH₂)₂SH) 或不存在；

Xaa₃₁ 是 :Tyr、His、Phe、Thr、Cys、Ser、Lys、Gln、K(W)、K(CO(CH₂)₂SH) 或不存在；

Xaa₃₂ 是 :Ser、Cys、Lys 或不存在；

Xaa₃₃ 是 :Trp 或不存在；

Xaa₃₄ 是 :Cys 或不存在 ;
Xaa₃₅ 是 :Glu 或不存在 ;
Xaa₃₆ 是 :Pro 或不存在 ;
Xaa₃₇ 是 :Gly 或不存在 ;
Xaa₃₈ 是 :Trp 或不存在 ;
Xaa₃₉ 是 :Cys 或不存在 ;和
Xaa₄₀ 是 :Arg 或不存在

其中,如果 Xaa₂₉、Xaa₃₀、Xaa₃₁、Xaa₃₂、Xaa₃₃、Xaa₃₄、Xaa₃₅、Xaa₃₆、Xaa₃₇、Xaa₃₈ 或 Xaa₃₉ 不存在,下游出现的下一个氨基酸就是肽激动剂序列中的下一个氨基酸,

以及 C 末端延伸,其中 C 末端延伸的 N 端与式 4 的肽的 C 端相连,且其中 C 末端延伸选自:

SEQ ID NO :5	GGPSSGAPPPS
SEQ ID NO :6	GGPSSGAPPPS-NH ₂
SEQ ID NO :7	GGPSSGAPPPC
SEQ ID NO :8	GGPSSGAPPPC-NH ₂
SEQ ID NO :9	GRPSSGAPPPS
SEQ ID NO :10	GRPSSGAPPPS-NH ₂
SEQ ID NO :11	GGPSSGAPPPCC
SEQ ID NO :12	GGPSSGAPPPCC-NH ₂

并且其中:

肽激动剂包含至少一个 Cys 残基,其共价的连接 PEG 分子,或者
肽激动剂包含至少一个 Lys 残基,其共价的连接 PEG 分子,或者
肽激动剂包含至少一个 K(W),其共价的连接 PEG 分子,或者
肽激动剂包含至少一个 K(CO(CH₂)₂SH),其共价的连接 PEG 分子,或者
肽激动剂的羧基端氨基酸共价的连接 PEG 分子,或者
它们的组合。

13. 含有根据权利要求 1 至 12 中任一项的加入聚乙二醇的 VPAC2 受体肽激动剂以及一种或多种可药用的稀释剂、载体或赋形剂的药物组合物。

14. 根据权利要求 1-3、11、12 中任一项的加入聚乙二醇的 VPAC2 受体肽激动剂,其用作药物。

15. 根据权利要求 1 至 12 中任一项的加入聚乙二醇的 VPAC2 受体肽激动剂的用途,其用于制备治疗非胰岛素依赖型糖尿病或胰岛素依赖型糖尿病的药物。

选择性 VPAC2 受体肽激动剂

[0001] 本发明涉及选择性 VPAC2 受体肽激动剂。

[0002] 特别的,本发明涉及与一个或多个聚乙二醇分子或其衍生物共价连接的选择性 VPAC2 受体肽激动剂。

[0003] 2 型糖尿病,或非胰岛素依赖型糖尿病 (NIDDM),是糖尿病最常见的形式,影响 90% 的糖尿病患者。患有 NIDDM 的患者具有受损的 β - 细胞功能,导致胰岛素生产不足和 / 或降低的胰岛素敏感度。如果不控制 NIDDM,血液中会积累过多的葡萄糖,导致高血糖症。随着时间推移,可以产生越来越多严重的并发症,包括肾官能障碍、心血管问题、视力丧失、下肢溃烂、神经病和局部缺血。NIDDM 的治疗包括改善饮食、运动、控制体重以及使用多种口服药物。通过服用此类口服药物,患有 NIDDM 的个体可以初步控制他们的血糖水平。然而,这类药物不能减慢 NIDDM 患者中 β - 细胞功能的进行性丧失,因此,不足以在疾病晚期控制血糖水平。而且,用目前可获得的药物进行治疗将 NIDDM 患者暴露在潜在的副作用下,例如低血糖症、胃肠道问题、液体潴留、水肿和 / 或体重增加。

[0004] 垂体的腺苷酸环化酶活化肽 (PACAP) 和血管活性肠肽 (VIP) 与例如促胰液素和胰高血糖素属于同一个肽家族。PACAP 和 VIP 通过三个 G 蛋白偶联受体作用,并通过 cAMP 介导的和其它 Ca^{2+} 介导的信号转导途径发挥作用。这类受体已知如 PACAP- 优选的 1 型 (PAC1) 受体 (Isobe 等人, Regul. Pept., 110 :213-217 (2003) ;Ogi 等人, Biochem. Biophys. Res. Commun., 196 :1511-1521 (1993)) 和两种 VIP- 共享的 2 型受体 (VPAC1 和 VPAC2) (Sherwood 等人, Endocr. Rev., 21 :619-670 (2000) ;Hammar 等人, Pharmacol Rev, 50 :265-270 (1998) ;Couvineau 等人, J. Biol. Chem., 278 :24759-24766 (2003) ;Sreedharan, 等人, Biochem. Biophys. Res. Commun., 193 :546-553 (1993) ;Lutz 等人, FEBS Lett., 458 :197-203 (1999) ;Adamou 等人, Biochem. Biophys. Res. Commun., 209 :385-392 (1995))。在 US 6, 242, 563 和 WO 2000/05260 中公开了一系列 PACAP 同源物。

[0005] PACAP 具有与所有三种受体可比较的活性,而 VIP 选择性的激活两种 VPAC 受体 (Tsutsumi 等人, Diabetes, 51 :1453-1460 (2002))。VIP (Eriksson 等人, Peptides, 10 :481-484 (1989)) 和 PACAP (Filipsson 等人, JCEM, 82 :3093-3098 (1997)) 在静脉给药时,都已表现出不仅刺激人体胰岛素分泌,而且增加胰高血糖素分泌和肝葡萄糖排出。因此, PACAP 或 VIP 刺激一般不会导致糖血的净改善。PACAP 或 VIP 对多种受体的激活作用还对神经、内分泌腺、心血管、生殖、肌肉和免疫系统具有广泛的生理学效应 (Gozes 等人, Curr. Med. Chem., 6 :1019-1034 (1999))。在大鼠中 VIP 诱导的水样腹泻显示出仅由 VPAC 受体之一, VPAC1 介导 (Ito 等人, Peptides, 22 :1139-1151 (2001) ;Tsutsumi 等人, Diabetes, 51 :1453-1460 (2002))。VPAC1 和 PAC1 受体在 α - 细胞和肝细胞上表达,因此最有可能涉及肝葡萄糖排出。

[0006] 在毒蜥 (Heloderma Suspectum) 的唾液分泌物中发现了毒蜥外泌肽 -4 (Eng 等人, J. Biol. Chem., 267 (11) :7402-7405 (1992))。这是 39 个氨基酸的肽,具有葡萄糖依赖性促胰岛素分泌的活性。WO2000/66629 中描述了特殊的加入聚乙二醇的毒蜥外泌肽和毒蜥外泌肽激动肽。

[0007] 最新的研究表明选择性作用于 VPAC2 受体的肽能够刺激胰腺分泌胰岛素,而不产生胃肠副作用也不增加胰高血糖素的释放和肝葡萄糖排出 (Tsutsumi 等人, Diabetes, 51 : 1453-1460 (2002))。最初通过修饰的 VIP 和 / 或 PACAP 鉴定选择性作用于 VPAC2 受体的肽。(见例如, Xia 等人, J Pharmacol Exp Ther., 281 :629-633 (1997) ;Tsutsumi 等人, Diabetes, 51 :1453-1460 (2002) ;WO 01/23420 和 WO 2004/06839.)

[0008] 然而,目前报道过的许多 VPAC2 受体肽激动剂具有不令人满意的效价、选择性和稳定性谱,会阻碍它们的临床可行性。此外,由于多肽在制剂中的稳定性问题,以及这类多肽在体内短暂的半衰期,许多此类肽都不适合作为商业的候选物。另外,已经鉴定了一些 VPAC2 受体肽激动剂被二肽基肽酶 (DPP-IV) 灭活。短的血清半衰期可以妨碍这类激动剂作为治疗剂的应用。因此需要新的治疗,其克服与目前 NIDDM 药物相关的困难。

[0009] 本发明寻求提供改善的化合物,其对 VPAC2 受体具有选择性,并且只有存在高血糖水平时才诱导胰脏分泌胰岛素。本发明的化合物是相信也改善 β 细胞功能的肽。这类肽可在不引起胃肠 (GI) 副作用或相应的增加肝葡萄糖排出的条件下具有诱导胰岛素分泌的生理效应,而且与已知的 VPAC2 受体肽激动剂相比,一般具有增强的选择性、效价和 / 或体内肽稳定性。

[0010] 本发明还寻求提供选择性的 VPAC2 受体肽激动剂,其具有降低的清除率和改善的体内稳定性。在延长的时期内以最少次数施用本发明的激动剂是理想的。

[0011] 根据发明的第一个方面,提供了加入聚乙二醇的 VPAC2 受体肽激动剂,其包含选自以下的序列:

- [0012] SEQ ID NO :17 HSDAVFTEQY (OMe) TRAIbRAIbQLAAAIbOrnY (OMe) LQSIKAibOrn ;
[0013] SEQ ID NO :18 HSDAVFTEK (CO(CH₂)₂SH) Y (OMe) TOrnLRAIbQVAAAibOrnYLQSIOrnOrn ;
[0014] SEQ ID NO :19 HSDAVFTEQY (OMe) TOrnLRAIbQVAAAibOrnYLQSIOrnK (W) Orn ;
[0015] SEQ ID NO :20 HSDAVFTEQY (OMe) TOrnLRAIbQVAAAibK (CO(CH₂)₂SH) YLQSIOrnOrn ;
[0016] SEQ ID NO :21 HSDAVFTEQY (OMe) TOrnLRAIbQVAAK (CO(CH₂)₂SH) OrnYLQSIOrnOrn ;
[0017] SEQ ID NO :22 HSDAVFTEQY (OMe) TOrnLRAIbQVCAAibOrnYLQSIOrnOrn ;
[0018] SEQ ID NO :23 HSDAVFTEQY (OMe) TOrnLRCQVAAAibOrnYLQSIOrnOrn ;
[0019] SEQ ID NO :24 HSDAVFTEQY (OMe) TOrnLRAIbQLAAAIbOrnYLQSIOrnOrn ;
[0020] SEQ ID NO :25 HSDAVFTEQY (OMe) TOrnLRAIbQVAAAibOrnYAibQSIOrnOrn ;
[0021] SEQ ID NO :26 HSDAVFTEQY (OMe) TOrnLRAIbQVAAAibOrnYLQAibIOrnOrn ;
[0022] SEQ ID NO :27 HSDAVFTEQY (OMe) TOrnLRAIbQVAAbuAibOrnYLQAibIOrnOrn ;
[0023] SEQ ID NO :28 HSDAVFTEQY (OMe) TOrnLRAIbQLAAAIbOrnYLQAibIOrnOrn ;
[0024] SEQ ID NO :29 HSDAVFTEQY (OMe) TOrnLRAIbQLAAAIbOrnYAibQAibIOrnOrn ;
[0025] SEQ ID NO :30 HSDAVFTEQY (OMe) TOrnLRAIbQLAAbuAibOrnYAibQSIOrnOrn ;
[0026] SEQ ID NO :31 HSDAVFTEQY (OMe) TOrnLRAIbQLAAbuAibOrnYLQSIOrnOrn ;
[0027] SEQ ID NO :32 HSDAVFTEQY (OMe) TOrnLRAIbQLAAbuAibOrnYAibQAibIOrnOrn ;
[0028] SEQ ID NO :33 HSDAVFTEQY (OMe) TOrnLRAIbQLAAAIbOrnYAibQSIOrnOrn ;
[0029] SEQ ID NO :34 HSDAVFTEQY (OMe) TOrnLRK (W) QVAAAibOrnYLQSIOrnOrn ;
[0030] SEQ ID NO :35 HSDAVFTEQY (OMe) TOrnLRAIbQVAAAibOrnYLK (W) SIOrnOrn ;
[0031] SEQ ID NO :36 HSDAVFTEQY (OMe) TOrnLRAIbQK (W) AAAibOrnYLQSIOrnOrn ;

- [0032] SEQ ID NO :37 HSDAVFTEQY (OMe) TOrnLRK (CO (CH₂)₂SH) QVAAAibOrnYLQSIOrnOrn ;
- [0033] SEQ ID NO :38 HSDAVFTEQY (OMe) TOrnLRAibQVAAAibK (W) YLQSIOrnOrn ;
- [0034] SEQ ID NO :39 HSDAVFTEQY (OMe) TOrnLRAibQVAAAibCYLQSIOrnOrn ;
- [0035] SEQ ID NO :40 HSDAVFTEQY (OMe) TOrnLRAibQLAAbuAibOrnYLQAibIOrnOrn ;
- [0036] SEQ ID NO :41 HSDAVFTEQY (OMe) TOrnLRAibQVAAAibOrnYLQSK (W) OrnOrn ;
- [0037] SEQ ID NO :42 HSDAVFTEQY (OMe) TOrnLRAibQLAAbuAibOrnYLQAibIOrnCOrn ;
- [0038] SEQ ID NO :43 HSDAVFTEQY (OMe) TOrnLRAibQLAAbuAibOrnYLQAibCOrnOrn ;
- [0039] SEQ ID NO :44 HSDAVFTEQY (OMe) TOrnLRAibQCAAbuAibOrnYLQAibIOrnOrn ;
- [0040] SEQ ID NO :45 HSDAVFTEQY (OMe) TOrnLRCQLAAbuAibOrnYLQAibIOrnOrn ;
- [0041] SEQ ID NO :94 HSDAVFTEQY (OMe) TOrnLRAibQVK (CO (CH₂)₂SH) AAibOrnYLQSIOrnOrn ;
- [0042] SEQ ID NO :95 HSDAVFTEQY (OMe) TOrnLRAibQLAAbuAibOrnYLQSIOrnCOrn ;
- [0043] SEQ ID NO :96 HSDAVFTEQY (OMe) TOrnLRAibQLAAbuAibOrnYLQSCOrnOrn ;
- [0044] SEQ ID NO :97 HSDAVFTEQY (OMe) TOrnLRAibQLAAbuAibOrnYLQAibIOrnK (CO (CH₂)₂SH) Orn ;
- [0045] SEQ ID NO :98 HSDAVFTEQY (OMe) TOrnLRAibQLAAbuAibOrnYLQSIOrnK (CO (CH₂)₂SH) Orn ;
- [0046] SEQ ID NO :99 HSDAVFTEQY (OMe) TOrnLRK (W) QLAAbuAibOrnYLQAibIOrnOrn ;
- [0047] SEQ ID NO :100 HSDAVFTEQY (OMe) TOrnLRAibQLAAAibOrnYLQSIOrnOrnC ;
- [0048] SEQ ID NO :101 HSDAVFTEQY (OMe) TOrnLRAibQVAAAibOrnYLQSIOrnOrnC ;
- [0049] SEQ ID NO :102 HSDAVFTEQY (OMe) TOrnLRAibQLAAbuAibOrnYLQSIOrnOrnC ;
- [0050] SEQ ID NO :103 HSDAVFTEQY (OMe) TOrnLRAibQLAAbuAibOrnY (OMe) LQAibIOrnOrn ;
- [0051] SEQ ID NO :104 HSDAVFTEQY (OMe) TOrnLRAibQLAAbuAibOrnY (OMe) LQAibIOrnCOrn ;
- [0052] SEQ ID NO :105 HSDAVFTEQY (OMe) TOrnLRAibQCAAbuAibOrnY (OMe) LQAibIOrnOrn ;
- [0053] SEQ ID NO :106 HSDAVFTEQY (OMe) TOrnLRAibQLAAbuAibOrnYLQAibIOrnOrnC ;
- [0054] SEQ ID NO :107 HSDAVFTEQY (OMe) TOrnLRAibQLAAbuAibOrnY (OMe) LQSIOrnOrn ;
- [0055] SEQ ID NO :108 HSDAVFTEQY (OMe) TOrnLRAibQCAAbuAibOrnY (OMe) LQSIOrnOrn ;
- [0056] SEQ ID NO :109 HSDAVFTEQY (OMe) TOrnLRAibQLAAbuAibOrnY (OMe) LQSIOrnCOrn ;
- [0057] SEQ ID NO :110 HSDAVFTEQY (OMe) TOrnLRAibQLAbuAAibOrnYLQSIOrnOrn ;
- [0058] SEQ ID NO :111 HSDAVFTEQY (OMe) TOrnLRAibQK (CO (CH₂)₂SH) AAbuAibOrnYLQAibIOrnOrn ;
- [0059] 和
- [0060] SEQ ID NO :112 HSDAVFTEQY (OMe) TOrnLRAibQK (W) AAbuAibOrnYLQAibIOrnOrn ;
- [0061] 以及 C 末端延伸, 其中 C 末端延伸的 N 端与肽序列的 C 末端相连, 其中 C 末端延伸包含下式的氨基酸序列 :
- [0062] Xaa₁-Xaa₂-Xaa₃-Xaa₄-Xaa₅-Xaa₆-Xaa₇-Xaa₈-Xaa₉-Xaa₁₀-Xaa₁₁-Xaa₁₂
- [0063] 式 3 (SEQ ID NO :3)
- [0064] 其中 :
- [0065] Xaa₁ 是 :Gly、Cys 或不存在 ;
- [0066] Xaa₂ 是 :Gly、Arg 或不存在 ;
- [0067] Xaa₃ 是 :Pro、Thr 或不存在 ;
- [0068] Xaa₄ 是 :Ser 或不存在 ;
- [0069] Xaa₅ 是 :Ser 或不存在 ;

- [0070] Xaa₆ 是 :Gly 或不存在 ;
- [0071] Xaa₇ 是 :Ala 或不存在 ;
- [0072] Xaa₈ 是 :Pro 或不存在 ;
- [0073] Xaa₉ 是 :Pro 或不存在 ;
- [0074] Xaa₁₀ 是 :Pro 或不存在 ;
- [0075] Xaa₁₁ 是 :Ser、Cys 或不存在 ;和
- [0076] Xaa₁₂ 是 :Cys 或不存在 ;
- [0077] 其中,C 末端延伸的 Xaa₁ 至 Xaa₁₂ 中至少有 5 个是存在的,以及其中如果 Xaa₁、Xaa₂、Xaa₃、Xaa₄、Xaa₅、Xaa₆、Xaa₇、Xaa₈、Xaa₉、Xaa₁₀ 或 Xaa₁₁ 空缺,出现在下游的下一个氨基酸就是 C 末端延伸的下一个氨基酸,且其中 C 末端氨基酸可被酰胺化,
- [0078] 并且其中 ;
- [0079] 肽激动剂包含至少一个 Cys 残基,其共价的连接 PEG 分子,或者
- [0080] 肽激动剂包含至少一个 Lys 残基,其共价的连接 PEG 分子,或者
- [0081] 肽激动剂包含至少一个 K(W),其共价的连接 PEG 分子,或者
- [0082] 肽激动剂包含至少一个 K(CO(CH₂)₂SH) 残基,其共价的连接 PEG 分子,或者
- [0083] 肽激动剂的羧基端氨基酸共价的连接 PEG 分子,或者
- [0084] 它们的组合。
- [0085] 优选的,式 3 的 C 末端延伸的 Xaa₁ 至 Xaa₁₂ 中至少有 6 个存在。更优选的,C 末端延伸的 Xaa₁ 至 Xaa₁₂ 中至少有七、八、九、十、十一或全部都存在。
- [0086] 更优选的,加入聚乙二醇的 VPAC2 受体肽激动剂的 C 末端延伸选自 :
- [0087]

SEQ ID NO :5	GGPSSGAPPPS
SEQ ID NO :6	GGPSSGAPPPS-NH ₂
SEQ ID NO :7	GGPSSGAPPPC
SEQ ID NO :8	GGPSSGAPPPC-NH ₂
SEQ ID NO :9	GRPSSGAPPPS
SEQ ID NO :10	GRPSSGAPPPS-NH ₂
SEQ ID NO :11	GGPSSGAPPPCC
SEQ ID NO :12	GGPSSGAPPPCC-NH ₂

- [0088] 甚至更优选的,加入聚乙二醇的 VPAC2 受体肽激动剂的 C 末端延伸是 SEQ ID NO :11 或 SEQ ID NO :12。
- [0089] 根据本发明的第一个方面,PEG 分子可以共价的连接到位于 VPAC2 受体肽激动剂任何位置的任何 Lys、Cys、K(W) 或 K(CO(CH₂)₂SH) 残基上。
- [0090] 当加入聚乙二醇的 VPAC2 受体肽激动剂含有选自 SEQ ID NO :22、23、39、42、43、44、45、95、96、100、101、102、104、105、106、108 和 109 中的序列时,优选的半胱氨酸残基是加入聚乙二醇的。
- [0091] 当加入聚乙二醇的 VPAC2 受体肽激动剂含有选自 SEQ ID NO :19、34、35、36、38、41、99 和 112 中的序列时,优选的 K(W) 残基是加入聚乙二醇的。
- [0092] 当加入聚乙二醇的 VPAC2 受体肽激动剂含有选自 SEQ ID NO :18、20、21、37、94、97、98 和 111 中的序列时,优选的 K(CO(CH₂)₂SH) 残基是加入聚乙二醇的。
- [0093] 当加入聚乙二醇的 VPAC2 受体肽激动剂含有 C 末端延伸时,PEG 分子可以共价的

连接到所述 C 末端延伸的一个或多个 Cys 残基上。当序列选自含有一个或多个 Lys、Cys、K(V) 或 $K(CO(CH_2)_2SH)$ 残基的 SEQ ID NO:17 至 45 和 94 至 112, 并且 C 末端延伸含有一个或多个 Cys 残基时, 一方或双方序列中都可以有一个或多个加入聚乙二醇的残基。

[0094] 优选的, 至少有一个 PEG 分子共价的连接到 VPAC2 受体肽激动剂的 C 末端延伸的残基上。

[0095] 当有一个以上的 PEG 分子时, 可以是 Lys、Cys、 $K(CO(CH_2)_2SH)$ 、K(W) 和羧基端氨基酸加入聚乙二醇的组合。例如, 如果有两个 PEG 分子, 其中一个可以连接 Lys 残基, 一个可以连接 Cys 残基。

[0096] 优选的, PEG 分子是分枝的。或者, PEG 分子可以是线性的。

[0097] 优选的, PEG 分子的分子量在 1000 道尔顿和 100,000 道尔顿之间。更优选的, PEG 分子是选自 10,000、20,000、30,000、40,000、50,000 和 60,000 道尔顿。甚至更优选的, 是选自 20,000、30,000、40,000 或 60,000 道尔顿。当有两个 PEG 分子共价连接到本发明的肽激动剂时, 每个是 1,000 至 40,000 道尔顿且优选的, 具有分子量为 20,000 和 20,000 道尔顿, 10,000 和 30,000 道尔顿, 30,000 和 30,000 道尔顿, 或 20,000 和 40,000 道尔顿。

[0098] 加入聚乙二醇的 VPAC2 受体肽激动剂序列在肽 N 端的 Xaa₁ 之前还可以含有组氨酸残基。

[0099] 优选的, 根据本发明第一方面的加入聚乙二醇的 VPAC2 受体肽激动剂, 在肽激动剂的 N 端, 还另外包含 N 末端修饰, 其中 N 末端修饰是选自:

[0100] (a) 添加 D-组氨酸、异亮氨酸、甲硫氨酸或正亮氨酸;

[0101] (b) 添加肽, 其含有序列 Ser-Trp-Cys-Glu-Pro-Gly-Trp-Cys-Arg (SEQ ID NO: 93), 其中 Arg 与肽激动剂的 N 端相连;

[0102] (c) 添加 C_1-C_{16} 烷基, 其用一个或多个独立的选自芳基、 C_1-C_6 烷氧基、 $-NH_2$ 、 $-OH$ 、卤素和 $-CF_3$ 的取代基任选的取代;

[0103] (d) 添加 $-C(O)R^1$, 其中 R^1 是用独立的选自芳基、 C_1-C_6 烷氧基、 $-NH_2$ 、 $-OH$ 、卤素、 $-SH$ 和 $-CF_3$ 的一个或多个取代基任选的取代的 C_1-C_{16} 烷基; 用独立的选自 C_1-C_6 烷基、 C_2-C_6 烯基、 C_2-C_6 炔基、 C_1-C_6 烷氧基、 $-NH_2$ 、 $-OH$ 、卤素和 $-CF_3$ 的一个或多个取代基任选的取代的芳基; 用独立的选自 C_1-C_6 烷基、 C_2-C_6 烯基、 C_2-C_6 炔基、 C_1-C_6 烷氧基、 $-NH_2$ 、 $-OH$ 、卤素和 $-CF_3$ 的一个或多个取代基任选的取代的芳基 C_1-C_4 烷基; $-NR^2R^3$, 其中 R^2 和 R^3 独立的是氢、 C_1-C_6 烷基、芳基或芳基 C_1-C_4 烷基; $-OR^4$, 其中 R^4 是用独立的选自芳基、 C_1-C_6 烷氧基、 $-NH_2$ 、 $-OH$ 、卤素和 $-CF_3$ 的一个或多个取代基任选的取代的 C_1-C_{16} 烷基, 用独立的选自 C_1-C_6 烷基、 C_2-C_6 烯基、 C_2-C_6 炔基、 C_1-C_6 烷氧基、 $-NH_2$ 、 $-OH$ 、卤素和 $-CF_3$ 的一个或多个取代基任选的取代的芳基, 或者用独立的选自 C_1-C_6 烷基、 C_2-C_6 烯基、 C_2-C_6 炔基、 C_1-C_6 烷氧基、 $-NH_2$ 、 $-OH$ 、卤素和 $-CF_3$ 的一个或多个取代基任选的取代的芳基 C_1-C_4 烷基; 或者 5-吡咯烷-2-酮;

[0104] (e) 添加 $-SO_2R^5$, 其中 R^5 是芳基、芳基 C_1-C_4 烷基或 C_1-C_{16} 烷基;

[0105] (f) 形成用 C_1-C_6 烷基或 $-SR^6$ 任选的取代的琥珀酰亚胺基团, 其中 R^6 是氢或 C_1-C_6 烷基;

[0106] (g) 添加甲硫氨酸亚砷;

[0107] (h) 添加生物素基-6-氨基己酸 (6-氨基己酸 (aminocarproic acid)); 和

[0108] (i) 添加 $-C(=NH)-NH_2$ 。

[0109] 优选的, N 末端修饰是添加选自以下的基团:乙酰基、丙酰基、丁酰基、戊酰基、己酰基、甲硫氨酸、甲硫氨酸亚砷、3-苯基丙酰基、苯乙酰基、苯甲酰基、正亮氨酸、D-组氨酸、异亮氨酸、3-巯丙酰基、生物素基-6-氨基己酸和 $-C(=NH)-NH_2$ 。特别优选的 N 末端修饰是添加乙酰基或己酰基。

[0110] 本领域技术人员可知, 加入聚乙二醇的 VPAC2 受体肽激动剂含有选自 SEQ ID NO: 17 至 45 和 94 至 112 的肽序列的多种组合, 基于上述公开可以产生本文中描述的 C 末端延伸和 N 末端修饰。

[0111] 优选的根据本发明第一个方面的加入聚乙二醇的 VPAC2 受体肽激动剂含有选自以下的氨基酸序列:

[0112]

激动剂 #	SEQ ID NO	序列
P410	46	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQVAAAibK(W-PEG40K)YLQSIOrnOrnGGPSSGAPPPS-NH ₂
P417	47	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TRAibRAibQLAAAibOrnY(OMe)LQSIKAibOrnGGPSSGAPPPC(PEG40K)-NH ₂
P451	48	C6-HSDAVFTEK(CO(CH ₂) ₂ SPEG40K)Y(OMe)TOrnLRAibQVAAAibOrnYLQSIOrnOrnGGPSSGAPPPS-NH ₂
P454	49	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQVAAAibOrnYLQSIOrnK(WPEG40K)OrnGGPSSGAPPPS-NH ₂
P460	50	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQVAAAibC(PEG40K)YLQSIOrnOrnGGPSSGAPPPS-NH ₂
P472	51	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQVAAAibK(CO(CH ₂) ₂ S-PEG40K)YLQSIOrnOrnGGPSSGAPPPS-NH ₂

[0113]

P473	52	C6-HSDAVFTEQY (OMe)TornLRAibqVAAAibK (CO (CH ₂) ₂ S PEG20K)YLQSIOrnOrnGGPSSGAPPPS-NH ₂
P475	53	C6-HSDAVFTEQY (OMe)TornLRAibqVAAK (CO (CH ₂) ₂ SPEG 40K)OrnYLQSIOrnOrnGGPSSGAPPPS-NH ₂
P478	54	C6-HSDAVFTEQY (OMe)TornLRAibqVC (PEG40 K)AAibOrnYLQSIOrnOrnGGPSSGAPPPS-NH ₂
P483	55	C6-HSDAVFTEQY (OMe)TornLRC (PEG40K)QVA AAibOrnYLQSIOrnOrnGGPSSGAPPPS-NH ₂
P485	56	C6-HSDAVFTEQY (OMe)TornLRK (CO (CH ₂) ₂ SPE G40K)QVAAAibOrnYLQSIOrnOrnGGPSSGAPPP S-NH ₂
P507	57	C6-HSDAVFTEQY (OMe)TornLRAibqVAAAibOr nYAbqSI OrnOrnGGPSSGAPPPC (PEG40K) -NH ₂
P509	58	C6-HSDAVFTEQY (OMe)TornLRAibqVAAAibOr nYLQAibI OrnOrnGGPSSGAPPPC (PEG40K) -NH ₂
P511	59	C6-HSDAVFTEQY (OMe)TornLRAibqVAAbuAib OrnYLQAibIOrnOrnGGPSSGAPPPC (PEG40K) -N H ₂
P513	60	C6-HSDAVFTEQY (OMe)TornLRAibqLAAibOr nYAbqSI OrnOrnGGPSSGAPPPC (PEG20K)C (PEG20K) -NH ₂

[0114]

P515	61	C6-HSDAVFTEQY (OMe)TornLRAibQLAAAIbOr	nYLQAibI	OrnOrnGGPSSGAPPPC (PEG20K)C (PEG20K)-NH ₂
P517	62	C6-HSDAVFTEQY (OMe)TornLRAibQLAAbuAib	OrnYLQAibIOrnOrnGGPSSGAPPPC (PEG20K)C (PEG20K)-NH ₂	
P519	63	C6-HSDAVFTEQY (OMe)TornLRAibQLAAAIbOr	nYAIbQAibIOrnOrnGGPSSGAPPPC (PEG20K)C (PEG20K)-NH ₂	
P521	64	C6-HSDAVFTEQY (OMe)TornLRAibQLAAbuAib	OrnYAIbQSIOrnOrnGGPSSGAPPPC (PEG20K)C (PEG20K)-NH ₂	
P523	65	C6-HSDAVFTEQY (OMe)TornLRAibQLAAbuAib	OrnYLQSI	OrnOrnGGPSSGAPPPC (PEG20K)C (PEG20K)-NH ₂
P525	66	C6-HSDAVFTEQY (OMe)TornLRAibQLAAbuAib	OrnYAIbQ	AibIOrnOrnGGPSSGAPPPC (PEG20K)C (PEG20K)-NH ₂
P529	67	C6-HSDAVFTEQY (OMe)TornLRK (WPEG40K)Q	VAAAIbOrnYLQSIOrnOrnGGPSSGAPPPS-NH ₂	
P531	68	C6-HSDAVFTEQY (OMe)TornLRAibQVAAAIbOr	nYLK (W	PEG40K)SIOrnOrnGGPSSGAPPPS-NH ₂

[0115]

P533	69	C6-HSDAVFTEQY (OMe) TOrnLRAibqK (WPEG40 K) AAAib OrnYLQSIOrnOrnGGPSSGAPPPS-NH ₂
P535	70	C6-HSDAVFTEQY (OMe) TOrnLRAibqVAAAibOr nYLQSK (WPEG40K) OrnOrnGGPSSGAPPPS-NH ₂
P537	71	C6-HSDAVFTEQY (OMe) TOrnLRAibqLAAbuAib OrnYLQAibIOrnC (PEG40K) OrnGGPSSGAPPPS-NH ₂
P541	72	C6-HSDAVFTEQY (OMe) TOrnLRAibqLAAbuAib OrnYLQAibC (PEG40K) OrnOrnGGPSSGAPPPS-NH ₂
P545	73	C6-HSDAVFTEQY (OMe) TOrnLRAibqC (PEG40K) AAbuAib OrnYLQAibIOrnOrnGGPSSGAPPPS-NH ₂
P547	74	C6-HSDAVFTEQY (OMe) TOrnLRC (PEG40K) QLA AAbuAibOrnYLQAibIOrnOrnGGPSSGAPPPS-NH ₂
P480	113	C6-HSDAVFTEQY (OMe) TOrnLRAibqVK (CO(CH ₂) ₂ SPEG40K) AAibOrnYLQSIOrnOrnGGPSSGAPP PS-NH ₂
P481	114	C6-HSDAVFTEQY (OMe) TOrnLRAibqVK (CO(CH ₂) ₂ SPEG20K) AAibOrnYLQSIOrnOrnGGPSSGAPP PS-NH ₂
P539	115	C6-HSDAVFTEQY (OMe) TOrnLRAibqLAAbuAib OrnYLQSI OrnC (PEG40K) OrnGGPSSGAPPPS-NH ₂

[0116]

P543	116	C6-HSDAVFTEQY (OMe) TOrnLRAibqLAAbuAib OrnYLQSC (PEG40K) OrnOrnGGPSSGAPPPS-NH ₂
P549	117	C6-HSDAVFTEQY (OMe) TOrnLRAibqLAAbuAib OrnYL QAibIOrnK (CO(CH ₂) ₂ SPEG20K) OrnGGPSSGAPP PC (PEG20K) -NH ₂
P551	118	C6-HSDAVFTEQY (OMe) TOrnLRAibqLAAbuAib OrnYL QSIOrnK (CO(CH ₂) ₂ SPEG20K) OrnGGPSSGAPP C (PEG20K) -NH ₂
P555	119	C6-HSDAVFTEQY (OMe) TOrnLRAibqLAAbuAib OrnYLQSI OrnC (PEG20K) OrnGGPSSGAPPPC (PEG20K) -NH ₂
P557	120	C6-HSDAVFTEQY (OMe) TOrnLRK (WPEG40K) Q LAAbuAib OrnYLQAibIOrnOrnGGPSSGAPPPS-NH ₂

P560	121	C6-HSDAVFTEQY (OMe) TOrnLRAibQLAAAibOr nYLQSIOrn OrnC (PEG40K) GGPSSGAPPPS-NH ₂
P562	122	C6-HSDAVFTEQY (OMe) TOrnLRAibQVAAAibOr nYLQSIOrnOrnC (PEG20K) GGPSSGAPPPC (PEG2 OK) -NH ₂
P564	123	C6-HSDAVFTEQY (OMe) TOrnLRAibQLAABuAib OrnYLQAibIOrnOrnC (PEG40K) GGPSSGAPPPS- NH ₂

[0117]

P566	124	C6-HSDAVFTEQY (OMe)TornLRAibQLAAbuAib	OrnYLQSI	OrnOrnC (PEG40K) GGPSSGAPPPS-NH ₂
P572	125	C6-HSDAVFTEQY (OMe)TornLRAibQLAAbuAib	OrnYLQSI	OrnOrnC (PEG20K) GGPSSGAPPPC (PEG20K)-NH ₂
P574	126	C6-HSDAVFTEQY (OMe)TornLRAibQLAAbuAib	OrnY (OMe) LQAibIOrnOrnGGPSSGAPPPC (PEG20K) C (PEG20K)-NH ₂	
P576	127	C6-HSDAVFTEQY (OMe)TornLRAibQLAAbuAib	OrnY (OMe) LQAibIOrnC (PEG40K) OrnGGPSSGA	PPPS-NH ₂
P578	128	C6-HSDAVFTEQY (OMe)TornLRAibQC (PEG40K)	AAbuAib	OrnY (OMe) LQAibIOrnOrnGGPSSGAPPPS-NH ₂
P580	129	C6-HSDAVFTEQY (OMe)TornLRAibQLAAbuAib	OrnYLQAibIOrnOrnC (PEG20K) GGPSSGAPPPC (	PEG20K)-NH ₂
P582	130	C6-HSDAVFTEQY (OMe)TornLRAibQLAAbuAib	OrnY (OMe) LQSIOrnOrnGGPSSGAPPPC (PEG20K) C (PEG20K)-NH ₂	
P584	131	C6-HSDAVFTEQY (OMe)TornLRAibQLAAbuAib	OrnY (OMe) LQSIOrnC (PEG40K) OrnGGPSSGAPP	PS-NH ₂
P586	132	C6-HSDAVFTEQY (OMe)TornLRAibQC (PEG40K)	AAbuAib	OrnY (OMe) LQSIOrnOrnGGPSSGAPPPS-NH ₂

[0118]

P588	133	C6-HSDAVFTEQY (OMe) TOrnLRAibQLAAbuAib	OrnY (OMe) LQSIOrnC (PEG20K) OrnGGPSSGAPP	PC (PEG20K) -NH ₂
P590	134	C6-HSDAVFTEQY (OMe) TOrnLRAibQLAAbuAAib	OrnYLQSI OrnOrnGGPSSGAPPPC (PEG20K) C (PEG20K) -NH ₂	
P597	135	C6-HSDAVFTEQY (OMe) TOrnLRAibqK(CO(CH ₂) ₂)	SPEG20K) AAbuAibOrnYLQAibIOrnOrnGGPSSG	APPPC (PEG20K) -NH ₂
P599	136	C6-HSDAVFTEQY (OMe) TOrnLRAibqK(CO(CH ₂) ₂)	SPEG40K) AAbuAibOrnYLQAibIOrnOrnGGPSSG	APPPS-NH ₂
P601	137	C6-HSDAVFTEQY (OMe) TOrnLRAibqK(WPEG40	K) AAbuAibOrnYLQAibIOrnOrnGGPSSGAPPPS-	NH ₂
P469	139	C6-HSDAVFTEK (CO(CH ₂) ₂) SPEG20K) Y (OMe) TOr	nLRAibQVAAAibOrnYLQSIOrnOrnGGPSSGAPP	PS-NH ₂
P486	140	C6-HSDAVFTEQY (OMe) TOrnLRK (CO(CH ₂) ₂) SPE	G20K) QVAAAibOrnYLQSIOrnOrnGGPSSGAPPP	S-NH ₂
P553	141	C6-HSDAVFTEQY (OMe) TOrnLRAibQLAAbuAib	OrnYLQAibIOrnC (PEG20K) OrnGGPSSGAPPPC (	PEG20K) -NH ₂
P570	144	C6-HSDAVFTEQY (OMe) TOrnLRAibQLAAbuAib	OrnYLQAibIOrnOrnGGPSSGAPPPC (PEG30K) C (	PEG30K) -NH ₂

[0119]

P595	146	C6-HSDAVFTEQY (OMe)TornLRai b QC (PEG20K)AAbuAi b OrnYLQAI b IOrnOrnGGPSSSGAPPPC (PEG20K)-N H ₂
P476	147	C6-HSDAVFTEQY (OMe)TornLRai b QVAAK (CO(CH ₂) ₃ SPEG 20K)OrnYLQSIOrnOrnGGPSSSGAPPPS-NH ₂
P602	148	C6-HSDAVFTEQY (OMe)TornLRai b QLAAbuAi b OrnYAIbQSIOrnOrnGGPSSSGAPPPC (PEG30K)C(PEG30K)-NH ₂

[0120] 更优选的,根据本发明第一方面的加入聚乙二醇的 VPAC2 受体肽激动剂含有选自 SEQ ID NO :47、64、66、115、119、122、126、130 和 144 的氨基酸序列。

[0121] 根据本发明的第二个方面,提供了加入聚乙二醇的 VPAC2 受体肽激动剂,其含有选自以下的氨基酸序列:

[0122]

激动剂 #	SEQ ID NO	序列
P470	75	C6-HSDAVFTEQY (OMe) TOrnK (CO (CH ₂) ₂ SPeG2 OK) RAibQVAAAibOrnYLQSIOrnOrnGGPSSGAP PPS-NH ₂
P490	76	C6-HSDAVFTEQY (OMe) TOrnLRAibQVAAAibOrnYLK (CO (CH ₂) ₂ SPeG20K) SIOrnOrnGGPSSGAPP PC (PEG20K) -NH ₂

[0123]

P492	77	C6-HSDAVFTEqY (OMe)TOrnLRAIbqVAK (CO (C	H ₅) ₂ SPEG20K)Ai bOrnYLQSIOrnOrnGGPSSGAPP	PC (PEG20K)-NH ₂
P495	78	C6-HSDAVFTEqY (OMe)TOrnLRAIbqVAAAi bOr	nYLQK (CO (CH ₂) ₂ SPEG20K) IO rnOrnGGPSSGAP	PPC (PEG20K)-NH ₂
P497	79	C6-HSDAVFTEqY (OMe)TOrnLRAIbqVAAAi bOr	nYLQSK (CO (CH ₂) ₂ SPEG20K)OrnOrnGGPSSGAP	PPC (PEG20K)-NH ₂
P499	80	C6-HSDAVFTEqY (OMe)TOrnLRAIbqVAAAi bOr	nYLQSIOrnK (CO (CH ₂) ₂ SPEG20K)OrnGGPSSGA	PPPC (PEG20K)-NH ₂
P501	81	C6-HSDAVFTEqY (OMe)TOrnLRAIbqVAAAi bOr	nYLC (PEG20K)SIOrnOrnGGPSSGAPPPC (PEG20	K)-NH ₂
P503	82	C6-HSDAVFTEqY (OMe)TOrnLRAIbqVAAAi bOr	nYLQSC (PEG20K)OrnOrnGGPSSGAPPPC (PEG2	OK)-NH ₂
P505	83	C6-HSDAVFTEqY (OMe)TOrnLRAIbqVAAAi bOr	nYLQSIOrnC (PEG20K)OrnGGPSSGAPPPC (PEG2	OK)-NH ₂
P402	138	C6-HSDAVFTEqY (OMe)TOrnLRAIbqVAAAi bOr	nYLQSIOrnOrnGGPSSGAPPPK (W-PEG40K)-NH ₂	
P558	142	C6-HSDAVFTEqY (OMe)TOrnLRAIbqC (PEG20K	)AAAi bOrnYLQSIOrnOrnGGPSSGAPPPS-NH ₂	
P568	143	C6-HSDAVFTEqY (OMe)TOrnLRAIbqC (PEG20K	)AAAi bOrnYLQSIOrnOrnGGPSSGAPPPC (PEG20	K)-NH ₂

[0124]

P593	145	C6-HSDAVFTEQY (OMe)TornLRAibQLAAbuAib OrnYAbQAbIOrnOrnGGPSSGAPPPK (WPEG40 K)-NH ₂
------	-----	--

[0125] 更优选的,根据本发明第二个方面的加入聚乙二醇的 VPAC2 受体肽激动剂含有 SEQ ID NO :80 或 SEQ ID NO :83 的氨基酸序列。

[0126] 根据本发明的第三个方面,是提供了含有下式的氨基酸序列的加入聚乙二醇的 VPAC2 受体肽激动剂:

[0127] Xaa₁-Xaa₂-Xaa₃-Xaa₄-Xaa₅-Xaa₆-Thr-Xaa₈-Xaa₉-Xaa₁₀-Thr-Xaa₁₂-Xaa₁₃-Xaa₁₄-Xaa₁₅-Xaa₁₆-Xaa₁₇-Xaa₁₈-Abu-Xaa₂₀-Xaa₂₁-Xaa₂₂-Xaa₂₃-Xaa₂₄-Xaa₂₅-Xaa₂₆-Xaa₂₇-Xaa₂₈-Xaa₂₉-Xaa₃₀-Xaa₃₁-Xaa₃₂-Xaa₃₃-Xaa₃₄-Xaa₃₅-Xaa₃₆-Xaa₃₇-Xaa₃₈-Xaa₃₉-Xaa₄₀

[0128] 式 4 (SEQ ID NO :4)

[0129] 其中：

[0130] Xaa₁ 是 :His、dH 或不存在

[0131] Xaa₂ 是 :dA、Ser、Val、Gly、Thr、Leu、dS、Pro 或 Aib；

[0132] Xaa₃ 是 :Asp 或 Glu；

[0133] Xaa₄ 是 :Ala、Ile、Tyr、Phe、Val、Thr、Leu、Trp、Gly、dA、Aib 或 NMeA；

[0134] Xaa₅ 是 :Val、Leu、Phe、Ile、Thr、Trp、Tyr、dV、Aib 或 NMeV；

[0135] Xaa₆ 是 :Phe、Ile、Leu、Thr、Val、Trp 或 Tyr；

[0136] Xaa₈ 是 :Asp、Glu、Ala、Lys、Leu、Arg 或 Tyr；

[0137] Xaa₉ 是 :Asn、Gln、Asp、Glu、Ser、Cys、Lys 或 K(CO(CH₂)₂SH)；

[0138] Xaa₁₀ 是 :Tyr、Trp、Tyr(OMe)、Ser、Cys 或 Lys；

[0139] Xaa₁₂ 是 :Arg、Lys、Glu、hR、Orn、Lys(异丙基)、Aib、Cit、Ala、Leu、Gln、Phe、Ser 或 Cys；

[0140] Xaa₁₃ 是 :Leu、Phe、Glu、Ala、Aib、Ser、Cys、Lys 或 K(CO(CH₂)₂SH)；

[0141] Xaa₁₄ 是 :Arg、Leu、Lys、Ala、hR、Orn、Lys(异丙基)、Phe、Gln、Aib、Cit、Ser 或 Cys；

[0142] Xaa₁₅ 是 :Lys、Ala、Arg、Glu、Leu、hR、Orn、Lys(异丙基)、Phe、Gln、Aib、K(Ac)、Cit、Ser、Cys、K(W) 或 K(CO(CH₂)₂SH)；

[0143] Xaa₁₆ 是 :Gln、Lys、Glu、Ala、hR、Orn、Lys(异丙基)、Cit、Ser、Cys、K(CO(CH₂)₂SH) 或 K(W)；

[0144] Xaa₁₇ 是 :Val、Ala、Leu、Ile、Met、Nle、Lys、Aib、Ser、Cys、K(CO(CH₂)₂SH) 或 K(W)；

[0145] Xaa₁₈ 是 :Ala、Ser、Cys、Lys、K(CO(CH₂)₂SH)、K(W)、Abu 或 Nle；

[0146] Xaa₂₀ 是 :Lys、Gln、hR、Arg、Ser、His、Orn、Lys(异丙基)、Ala、Aib、Trp、Thr、Leu、Ile、Phe、Tyr、Val、K(Ac)、Cit、Cys、K(CO(CH₂)₂SH) 或 K(W)；

[0147] Xaa₂₁ 是 :Lys、His、Arg、Ala、Phe、Aib、Leu、Gln、Orn、hR、K(Ac)、Cit、Ser、Cys、Val、Tyr、Ile、Thr、Trp、K(W) 或 K(CO(CH₂)₂SH)；

[0148] Xaa₂₂ 是 :Tyr、Trp、Phe、Thr、Leu、Ile、Val、Tyr(OMe)、Ala、Aib、Ser、Cys、Lys、K(W) 或 K(CO(CH₂)₂SH)；

[0149] Xaa₂₃ 是 :Leu、Phe、Ile、Ala、Trp、Thr、Val、Aib、Ser、Cys、Lys、K(W) 或 K(CO(CH₂)₂SH)；

[0150] Xaa₂₄ 是 :Gln、Glu、Asn、Ser、Cys、Lys、K(CO(CH₂)₂SH) 或 K(W)；

[0151] Xaa₂₅ 是 :Ser、Asp、Phe、Ile、Leu、Thr、Val、Trp、Gln、Asn、Tyr、Aib、Glu、Cys、Lys、K(CO(CH₂)₂SH) 或 K(W)；

[0152] Xaa₂₆ 是 :Ile、Leu、Thr、Val、Trp、Tyr、Phe、Aib、Ser、Cys、Lys、K(CO(CH₂)₂SH) 或 K(W)；

[0153] Xaa₂₇ 是 :Lys、hR、Arg、Gln、Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Met、Asn、Pro、Ser、

Thr、Val、Trp、Tyr、Lys(异丙基)、Cys、Leu、Orn、dK、K(W) 或 $K(CO(CH_2)_2SH)$;

[0154] Xaa₂₈ 是 :Asn、Asp、Gln、Lys、Arg、Aib、Orn、hR、Cit、Pro、dK、Ser、Cys、 $K(CO(CH_2)_2SH)$ 或 K(W) ;

[0155] Xaa₂₉ 是 :Lys、Ser、Arg、Asn、hR、Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Pro、Gln、Thr、Val、Trp、Tyr、Cys、Orn、Cit、Aib、K(W)、 $K(CO(CH_2)_2SH)$ 或不存在 ;

[0156] Xaa₃₀ 是 :Arg、Lys、Ile、Ala、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Ser、Thr、Val、Trp、Tyr、Cys、hR、Cit、Aib、Orn、K(W)、 $K(CO(CH_2)_2SH)$ 或不存在 ;

[0157] Xaa₃₁ 是 :Tyr、His、Phe、Thr、Cys、Ser、Lys、Gln、K(W)、 $K(CO(CH_2)_2SH)$ 或不存在 ;

[0158] Xaa₃₂ 是 :Ser、Cys、Lys 或不存在 ;

[0159] Xaa₃₃ 是 :Trp 或不存在 ;

[0160] Xaa₃₄ 是 :Cys 或不存在 ;

[0161] Xaa₃₅ 是 :Glu 或不存在 ;

[0162] Xaa₃₆ 是 :Pro 或不存在 ;

[0163] Xaa₃₇ 是 :Gly 或不存在 ;

[0164] Xaa₃₈ 是 :Trp 或不存在 ;

[0165] Xaa₃₉ 是 :Cys 或不存在 ;和

[0166] Xaa₄₀ 是 :Arg 或不存在

[0167] 其中,如果 Xaa₂₉、Xaa₃₀、Xaa₃₁、Xaa₃₂、Xaa₃₃、Xaa₃₄、Xaa₃₅、Xaa₃₆、Xaa₃₇、Xaa₃₈ 或 Xaa₃₉ 不存在,下游出现的下一个氨基酸就是肽激动剂序列中的下一个氨基酸,

[0168] 以及 C 末端延伸,其中 C 末端延伸的 N 端与式 4 的肽的 C 端相连,

[0169] 其中 C 末端延伸含有下式的氨基酸序列 :

[0170] Xaa₁-Xaa₂-Xaa₃-Xaa₄-Xaa₅-Xaa₆-Xaa₇-Xaa₈-Xaa₉-Xaa₁₀-Xaa₁₁-Xaa₁₂

[0171] 式 3 (SEQ ID NO :3)

[0172] 其中 :

[0173] Xaa₁ 是 :Gly、Cys 或不存在 ;

[0174] Xaa₂ 是 :Gly、Arg 或不存在 ;

[0175] Xaa₃ 是 :Pro、Thr 或不存在 ;

[0176] Xaa₄ 是 :Ser 或不存在 ;

[0177] Xaa₅ 是 :Ser 或不存在 ;

[0178] Xaa₆ 是 :Gly 或不存在 ;

[0179] Xaa₇ 是 :Ala 或不存在 ;

[0180] Xaa₈ 是 :Pro 或不存在 ;

[0181] Xaa₉ 是 :Pro 或不存在 ;

[0182] Xaa₁₀ 是 :Pro 或不存在 ;

[0183] Xaa₁₁ 是 :Ser、Cys 或不存在 ;和

[0184] Xaa₁₂ 是 :Cys 或不存在 ;

[0185] 其中 C 末端延伸的 Xaa₁ 至 Xaa₁₂ 中至少五个是存在的,并且其中如果 Xaa₁、Xaa₂、Xaa₃、Xaa₄、Xaa₅、Xaa₆、Xaa₇、Xaa₈、Xaa₉、Xaa₁₀ 或 Xaa₁₁ 不存在,下游出现的下一个氨基酸就是 C 末端延伸的下一个氨基酸,其中 C 末端氨基酸可以被酰胺化,

[0186] 并且其中；

[0187] 肽激动剂包含至少一个 Cys 残基，其共价的连接 PEG 分子，或者

[0188] 肽激动剂包含至少一个 Lys 残基，其共价的连接 PEG 分子，或者

[0189] 肽激动剂包含至少一个 K(W)，其共价的连接 PEG 分子，或者

[0190] 肽激动剂包含至少一个 $K(CO(CH_2)_2SH)$ ，其共价的连接 PEG 分子，或者

[0191] 肽激动剂的羧基端氨基酸共价的连接 PEG 分子，或者

[0192] 它们的组合。

[0193] 优选的，本发明第三个方面的加入聚乙二醇的 VPAC2 受体肽激动剂含有式 4 (SEQ ID NO :4) 的序列，其中 Xaa₃ 是 Asp 或 Glu，Xaa₈ 是 Asp 或 Glu，Xaa₉ 是 Asn 或 Gln，Xaa₁₀ 是 Tyr 或 Tyr(OMe)，Xaa₁₂ 是 Arg、hR、Lys 或 Orn，Xaa₁₄ 是 Arg、Gln、Aib、hR、Orn、Cit、Lys、Ala、或 Leu、Xaa₁₅ 是 Lys、Aib、Orn 或 Arg，Xaa₁₆ 是 Gln 或 Lys，Xaa₁₇ 是 Val、Leu、Ala、Ile、Lys 或 Nle，Xaa₂₀ 是 Lys、Val、Leu、Aib、Ala、Gln 或 Arg，Xaa₂₁ 是 Lys、Aib、Orn、Ala、Gln 或 Arg，Xaa₂₃ 是 Leu 或 Aib，Xaa₂₅ 是 Ser 或 Aib，Xaa₂₇ 是 Lys、Orn、hR 或 Arg，Xaa₂₈ 是 Asn、Gln、Lys、hR、Aib、Orn、或 Pro 且 Xaa₂₉ 是 Lys、Orn、hR 或是不存在。

[0194] 优选的，本发明第三个方面的加入聚乙二醇的 VPAC2 受体肽激动剂含有式 4 (SEQ ID NO :4) 的序列，其中 Xaa₂₃ 或 Xaa₂₅ 是 Aib。甚至更优选的，Xaa₂₃ 和 Xaa₂₅ 都是 Aib。

[0195] 优选的，本发明第三个方面的加入聚乙二醇的 VPAC2 受体肽激动剂含有式 4 的序列，其中 Xaa₁₄ 或 Xaa₁₅ 是 Aib。

[0196] 可选的，本发明第三个方面的加入聚乙二醇的 VPAC2 受体肽激动剂含有式 4 的序列，其中 Xaa₂₀ 或 Xaa₂₁ 是 Aib。

[0197] 更优选的，Xaa₁₄ 或 Xaa₁₅ 是 Aib 以及 Xaa₂₀ 或 Xaa₂₁ 是 Aib。特别优选的 Xaa₁₅ 是 Aib 以及 Xaa₂₀ 是 Aib。

[0198] 优选的，本发明第三个方面的加入聚乙二醇的 VPAC2 受体肽激动剂含有式 4 的序列，其中 Xaa₁₅ 是 Aib，Xaa₂₀ 是 Aib，且 Xaa₁₂、Xaa₂₁、Xaa₂₇ 和 Xaa₂₈ 都是 Orn。更优选的，Xaa₁₅ 是 Aib，Xaa₂₀ 是 Aib，Xaa₁₂、Xaa₂₁、Xaa₂₇ 和 Xaa₂₈ 都是 Orn，Xaa₈ 是 Glu，Xaa₉ 是 Gln 以及 Xaa₁₀ 是 Tyr(OMe)。甚至更优选的，Xaa₁₅ 是 Aib，Xaa₂₀ 是 Aib，Xaa₁₂、Xaa₂₁、Xaa₂₇ 和 Xaa₂₈ 都是 Orn，Xaa₈ 是 Glu，Xaa₉ 是 Gln，Xaa₁₀ 是 Tyr(OMe)，以及 Xaa₂₃ 和 / 或 Xaa₂₅ 是 Aib。Xaa₈、Xaa₉、Xaa₁₀、Xaa₁₂、Xaa₁₅、Xaa₂₀、Xaa₂₁、Xaa₂₃、Xaa₂₅、Xaa₂₇ 和 Xaa₂₈ 中的任一个或多个可以是加入聚乙二醇的 Lys、Cys、 $K(CO(CH_2)_2SH)$ 或 K(W)，同时所有其它位置具有上述优选的氨基酸取代。

[0199] 优选的，式 3 的 C 末端延伸的 Xaa₁ 至 Xaa₁₂ 中至少有 6 个存在。更优选的，C 末端延伸的 Xaa₁ 至 Xaa₁₂ 中有七、八、九、十、十一或全部都存在。

[0200] 优选的，根据本发明第三个方面的加入聚乙二醇的 VPAC2 受体肽激动剂的 C 末端延伸选自：SEQ ID NO :5、6、7、8、9、10、11 和 12。

[0201] 更优选的，根据本发明第三个方面的加入聚乙二醇的 VPAC2 受体肽激动剂的 C 末端延伸是 SEQ ID NO :11 或 SEQ ID NO :12。

[0202] 根据本发明的第三个方面，PEG 分子可以共价的连接位于 VPAC2 受体肽激动剂任何位置的任何 Lys、Cys、K(W) 或 $K(CO(CH_2)_2SH)$ 残基上。C 末端延伸可以含有一个或多个可以被加入聚乙二醇的 Cys 残基。当根据式 4 的序列含有一个或多个 Lys、Cys、K(W) 或 $K(CO(CH_2)_2SH)$ 残基并且 C 末端延伸含有一个或多个 Cys 残基时，在一方或双方序列中可以

有一个或多个加入聚乙二醇的残基。

[0203] 优选的,至少有一个 PEG 分子共价的连接式 4 中的残基。更优选的,有 PEG 分子共价的连接式 4 下列位置上的一个或多个残基:9、13、15、16、17、18、20、21、24、25、26 和 28。

[0204] 优选的,有至少一个 PEG 分子共价的连接 VPAC2 受体肽激动剂的 C 末端延伸的残基。

[0205] 当有一个以上的 PEG 分子时,可以是 Lys、Cys、K(CO(CH₂)₂SH)、K(W) 和羧基端氨基酸加入聚乙二醇作用的组合。例如,如果有两个 PEG 分子,其中一个可以连接 Lys 残基,一个可以连接 Cys 残基。

[0206] 优选的,PEG 分子是分枝的。可选的,PEG 分子可以是线性的。

[0207] 优选的,PEG 分子的分子量在 1000 道尔顿和 100,000 道尔顿之间。更优选的,PEG 分子是选自 10,000、20,000、30,000、40,000、50,000 和 60,000 道尔顿。甚至更优选的,是选自 20,000、30,000、40,000 或 60,000 道尔顿。当有两个 PEG 分子共价连接到本发明的肽激动剂时,每个是 1,000 至 40,000 道尔顿且优选的,它们具有分子量为 20,000 和 20,000 道尔顿,10,000 和 30,000 道尔顿,30,000 和 30,000 道尔顿,或 20,000 和 40,000 道尔顿。

[0208] 优选的,本发明第三个方面的加入聚乙二醇的 VPAC2 受体肽激动剂,还在肽激动剂的 N 端含有 N 末端修饰,其中 N 末端修饰是选自:

[0209] (a) 添加 D- 组氨酸、异亮氨酸、甲硫氨酸或正亮氨酸;

[0210] (b) 添加肽,其含有序列 Ser-Trp-Cys-Glu-Pro-Gly-Trp-Cys-Arg (SEQ ID NO: 93),其中 Arg 与肽激动剂的 N 端相连;

[0211] (c) 添加 C₁-C₁₆ 烷基,其用一个或多个独立的选自芳基、C₁-C₆ 烷氧基、-NH₂、-OH、卤素和 -CF₃ 的取代基任选的取代;

[0212] (d) 添加 -C(O)R¹,其中 R¹ 是用独立的选自芳基、C₁-C₆ 烷氧基、-NH₂、-OH、卤素、-SH 和 -CF₃ 的一个或多个取代基任选的取代的 C₁-C₁₆ 烷基;用独立的选自 C₁-C₆ 烷基、C₂-C₆ 烯基、C₂-C₆ 炔基、C₁-C₆ 烷氧基、-NH₂、-OH、卤素和 -CF₃ 的一个或多个取代基任选的取代的芳基;用独立的选自 C₁-C₆ 烷基、C₂-C₆ 烯基、C₂-C₆ 炔基、C₁-C₆ 烷氧基、-NH₂、-OH、卤素和 -CF₃ 的一个或多个取代基任选的取代的芳基 C₁-C₄ 烷基;-NR²R³,其中 R² 和 R³ 独立的是氢、C₁-C₆ 烷基、芳基或芳基 C₁-C₄ 烷基;-OR⁴,其中 R⁴ 是用独立的选自芳基、C₁-C₆ 烷氧基、-NH₂、-OH、卤素和 -CF₃ 的一个或多个取代基任选的取代的 C₁-C₁₆ 烷基,用独立的选自 C₁-C₆ 烷基、C₂-C₆ 烯基、C₂-C₆ 炔基、C₁-C₆ 烷氧基、-NH₂、-OH、卤素和 -CF₃ 的一个或多个取代基任选的取代的芳基,或者用独立的选自 C₁-C₆ 烷基、C₂-C₆ 烯基、C₂-C₆ 炔基、C₁-C₆ 烷氧基、-NH₂、-OH、卤素和 -CF₃ 的一个或多个取代基任选的取代的芳基 C₁-C₄ 烷基;或者 5- 吡咯烷 -2- 酮;

[0213] (e) 添加 -SO₂R⁵,其中 R⁵ 是芳基、芳基 C₁-C₄ 烷基或 C₁-C₁₆ 烷基;

[0214] (f) 形成用 C₁-C₆ 烷基或 -SR⁶ 任选的取代的琥珀酰亚胺基团,其中 R⁶ 是氢或 C₁-C₆ 烷基;

[0215] (g) 添加甲硫氨酸亚砷;

[0216] (h) 添加生物素基 -6- 氨基己酸 (6- 氨基己酸 (aminocarproic acid));和

[0217] (i) 添加 -C(=NH)-NH₂。

[0218] 优选的,N 末端修饰是添加选自以下的基团:乙酰、丙酰、丁酰、戊酰、己酰、甲硫氨酸、甲硫氨酸亚砷、3- 苯基丙酰基、苯乙酰、苯甲酰、正亮氨酸、D- 组氨酸、异亮氨酸、3- 巯丙

酰、生物素基 -6- 氨基己酸和 $-C(=NH)-NH_2$ 。特别优选的 N 末端修饰是添加乙酰基或己酰基。

[0219] 本领域技术人员可知,加入聚乙二醇的 VPAC2 受体肽激动剂含有根据式 4 的肽序列的多种组合,基于上述公开可以产生本文中描述的 C 末端延伸和 N 末端修饰。

[0220] 优选的,根据本发明第三个方面的加入聚乙二醇的 VPAC2 受体肽激动剂含有选自以下的氨基酸序列:SEQ ID NO:59、62、64、65、66、71、72、73、74、115、116、117、118、119、120、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、135、136、137、141、144、146 和 148。

[0221] 根据本发明的第四个方面,是提供含有本发明的加入聚乙二醇的 VPAC2 受体肽激动剂,以及一个或多个可药用稀释剂、载体和 / 或赋形剂的药物组合物。

[0222] 根据本发明的第五个方面,是提供本发明的加入聚乙二醇的 VPAC2 受体肽激动剂,其用作药物。

[0223] 根据本发明的第六个方面,是提供本发明的加入聚乙二醇的 VPAC2 受体肽激动剂制备治疗非胰岛素依赖型糖尿病的药物的用途。

[0224] 根据本发明的其它方面,是提供本发明的加入聚乙二醇的 VPAC2 受体肽激动剂制备治疗胰岛素依赖型糖尿病的药物的用途。

[0225] 本发明提供治疗在有需要的患者中的糖尿病的方法其包括施用本发明的加入聚乙二醇的 VPAC2 受体肽激动剂,其中糖尿病可以是非胰岛素依赖型糖尿病或胰岛素依赖型糖尿病。

[0226] 本发明还提供含有本发明的加入聚乙二醇的 VPAC2 受体肽激动剂的药物组合物,用于治疗非胰岛素依赖型糖尿病或胰岛素依赖型糖尿病。

[0227] 根据本发明的替代实施方案,是提供加入聚乙二醇的 VPAC2 受体肽激动剂,其含有选自 SEQ ID NO:17 至 45 和 94 至 112 的序列;

[0228] 以及 C 末端延伸,其中 C 末端延伸的 N 端与肽序列的 C- 端相连,其中 C 末端延伸含有下式的氨基酸序列:

[0229] $Xaa_1-Xaa_2-Xaa_3-Xaa_4-Xaa_5-Xaa_6-Xaa_7-Xaa_8-Xaa_9-Xaa_{10}-Xaa_{11}-Xaa_{12}-Xaa_{13}$

[0230] 式 1 (SEQ ID NO:1)

[0231] 其中,

[0232] Xaa_1 是:Gly、Cys、Lys、K(W)、K(CO(CH₂)₂SH) 或不存在;

[0233] Xaa_2 是:Gly、Arg、Cys、Lys、K(W)、K(CO(CH₂)₂SH) 或不存在;

[0234] Xaa_3 是:Pro、Thr、Ser、Ala、Cys、Lys、K(W)、K(CO(CH₂)₂SH) 或不存在;

[0235] Xaa_4 是:Ser、Pro、His、Cys、Lys、K(W)、K(CO(CH₂)₂SH) 或不存在;

[0236] Xaa_5 是:Ser、Arg、Thr、Trp、Lys、Cys、K(W)、K(CO(CH₂)₂SH) 或不存在;

[0237] Xaa_6 是:Gly、Ser、Cys、Lys、K(W)、K(CO(CH₂)₂SH) 或不存在;

[0238] Xaa_7 是:Ala、Asp、Arg、Glu、Lys、Gly、Cys、K(W)、K(CO(CH₂)₂SH) 或不存在;

[0239] Xaa_8 是:Pro、Ser、Ala、Cys、Lys、K(W)、K(CO(CH₂)₂SH) 或不存在;

[0240] Xaa_9 是:Pro、Ser、Ala、Cys、Lys、K(W)、K(CO(CH₂)₂SH) 或不存在;

[0241] Xaa_{10} 是:Pro、Ser、Ala、Arg、Lys、His、Cys、K(W)、K(CO(CH₂)₂SH) 或不存在;

[0242] Xaa_{11} 是:Ser、Cys、His、Pro、Lys、Arg、K(W)、K(CO(CH₂)₂SH) 或不存在;

[0243] Xaa₁₂ 是 :His、Ser、Arg、Lys、Cys、K(W)、K(CO(CH₂)₂SH) 或不存在 ;和

[0244] Xaa₁₃ 是 :His、Ser、Arg、Lys、Cys、K(W)、K(CO(CH₂)₂SH) 或不存在 ;

[0245] 条件是如果 Xaa₁、Xaa₂、Xaa₃、Xaa₄、Xaa₅、Xaa₆、Xaa₇、Xaa₈、Xaa₉、Xaa₁₀、Xaa₁₁ 或 Xaa₁₂ 不存在,下游出现的下一个氨基酸是 C 末端延伸的下一个氨基酸,其中 C 末端氨基酸可以被酰胺化,

[0246] 并且其中 ;

[0247] 肽激动剂包含至少一个 Cys 残基,其共价的连接 PEG 分子,或者

[0248] 肽激动剂包含至少一个 Lys 残基,其共价的连接 PEG 分子,或者

[0249] 肽激动剂包含至少一个 K(W) 残基,其共价的连接 PEG 分子,或者

[0250] 肽激动剂包含至少一个 K(CO(CH₂)₂SH),其共价的连接 PEG 分子,或者

[0251] 肽激动剂的羧基端氨基酸共价的连接 PEG 分子,或者

[0252] 它们的组合。

[0253] 优选的,式 1 的 C 末端延伸具有不会超过三个的下列任一项 :Cys、Lys、K(W) 或 K(CO(CH₂)₂SH)。更优选的 C 末端延伸具有不超过两个的任一上述残基。如果 C 末端延伸有两个 Cys 残基,优选的 Cys 残基位于 C- 端。甚至更优选的 C 末端延伸有不超过一个的任一上述残基。如果 C 末端延伸只有一个 Cys 残基,优选的 Cys 残基位于 C- 端。

[0254] 优选的,根据上面替代实施方案的加入聚乙二醇的 VPAC2 受体肽激动剂的 C 末端延伸含有下式的氨基酸序列 :

[0255] Xaa₁-Xaa₂-Xaa₃-Xaa₄-Xaa₅-Xaa₆-Xaa₇-Xaa₈-Xaa₉-Xaa₁₀-Xaa₁₁-Xaa₁₂-Xaa₁₃

[0256] 式 2 (SEQ ID NO :2)

[0257] 其中 :

[0258] Xaa₁ 是 :Gly、Cys、Lys 或不存在 ;

[0259] Xaa₂ 是 :Gly、Arg、Cys、Lys 或不存在 ;

[0260] Xaa₃ 是 :Pro、Thr、Ser、Ala、Cys、Lys 或不存在 ;

[0261] Xaa₄ 是 :Ser、Pro、His、Cys、Lys 或不存在 ;

[0262] Xaa₅ 是 :Ser、Arg、Thr、Trp、Lys、Cys 或不存在 ;

[0263] Xaa₆ 是 :Gly、Ser、Cys、Lys 或不存在 ;

[0264] Xaa₇ 是 :Ala、Asp、Arg、Glu、Lys、Gly、Cys 或不存在 ;

[0265] Xaa₈ 是 :Pro、Ser、Ala、Cys、Lys 或不存在 ;

[0266] Xaa₉ 是 :Pro、Ser、Ala、Cys、Lys 或不存在 ;

[0267] Xaa₁₀ 是 :Pro、Ser、Ala、Arg、Lys、His、Cys 或不存在 ;

[0268] Xaa₁₁ 是 :Ser、Cys、His、Pro、Lys、Arg 或不存在 ;

[0269] Xaa₁₂ 是 :His、Ser、Arg、Lys、Cys 或不存在 ;和

[0270] Xaa₁₃ 是 :His、Ser、Arg、Lys、Cys 或不存在 ;

[0271] 条件是如果 Xaa₁、Xaa₂、Xaa₃、Xaa₄、Xaa₅、Xaa₆、Xaa₇、Xaa₈、Xaa₉、Xaa₁₀、Xaa₁₁ 或 Xaa₁₂ 不存在,下游出现的下一个氨基酸是 C 末端延伸的下一个氨基酸,其中 C 末端氨基酸可以被酰胺化。

[0272] 优选的,式 1 或 2 的 C 末端延伸的 Xaa₁ 至 Xaa₁₃ 中至少有 1 个存在。更优选的, C 末端延伸的 Xaa₁ 至 Xaa₁₃ 中至少有二、三、四、五、六、七、八、九、十、十一、十二个或全部是存

在的。

[0273] 更优选的,根据上面的替代实施方案,加入聚乙二醇的 VPAC2 受体肽激动剂的 C 末端延伸含有下式的氨基酸序列:

[0274] $Xaa_1-Xaa_2-Xaa_3-Xaa_4-Xaa_5-Xaa_6-Xaa_7-Xaa_8-Xaa_9-Xaa_{10}-Xaa_{11}-Xaa_{12}$

[0275] 式 3 (SEQ ID NO :3)

[0276] 其中:

[0277] Xaa_1 是 :Gly、Cys 或不存在;

[0278] Xaa_2 是 :Gly、Arg 或不存在;

[0279] Xaa_3 是 :Pro、Thr 或不存在;

[0280] Xaa_4 是 :Ser 或不存在;

[0281] Xaa_5 是 :Ser 或不存在;

[0282] Xaa_6 是 :Gly 或不存在;

[0283] Xaa_7 是 :Ala 或不存在;

[0284] Xaa_8 是 :Pro 或不存在;

[0285] Xaa_9 是 :Pro 或不存在;

[0286] Xaa_{10} 是 :Pro 或不存在;

[0287] Xaa_{11} 是 :Ser、Cys 或不存在;和

[0288] Xaa_{12} 是 :Cys 或不存在;

[0289] 条件是如果 Xaa_1 、 Xaa_2 、 Xaa_3 、 Xaa_4 、 Xaa_5 、 Xaa_6 、 Xaa_7 、 Xaa_8 、 Xaa_9 、 Xaa_{10} 或 Xaa_{11} 不存在,下游出现的下一个氨基酸是 C 末端延伸的下一个氨基酸,其中 C 末端氨基酸可以被酰胺化。

[0290] 优选的,式 3 的 C 末端延伸的 Xaa_1 至 Xaa_{12} 中的至少一个存在。更优选的,C 末端延伸的 Xaa_1 至 Xaa_{12} 中至少有二、三、四、五、六、七、八、九、十、十一或全部都存在。

[0291] 可以用于本发明的任一方面和实施方案的可选的 C 末端延伸包含下式的氨基酸序列:

[0292] $Xaa_1-Xaa_2-Xaa_3-Xaa_4-Xaa_5-Xaa_6-Xaa_7-Xaa_8-Xaa_9-Xaa_{10}$

[0293] 式 13 (SEQ ID NO :13)

[0294] 其中:

[0295] Xaa_1 是 :Ser、Cys、Lys、K(W)、K(CO(CH₂)₂SH) 或不存在;

[0296] Xaa_2 是 :Arg、Ser、hR、Orn、His、Cys、Lys、K(W)、K(CO(CH₂)₂SH) 或不存在,

[0297] Xaa_3 是 :Thr、Cys、Lys、K(W)、K(CO(CH₂)₂SH) 或不存在;

[0298] Xaa_4 是 :Ser、Cys、Lys、K(W)、K(CO(CH₂)₂SH) 或不存在;

[0299] Xaa_5 是 :Pro、Ser、Ala、Cys、Lys、K(W)、K(CO(CH₂)₂SH) 或不存在;

[0300] Xaa_6 是 :Pro、Ser、Ala、Arg、Cys、Lys、K(W)、K(CO(CH₂)₂SH) 或不存在;

[0301] Xaa_7 是 :Pro、Ser、Ala、Cys、Lys、K(W)、K(CO(CH₂)₂SH) 或不存在;

[0302] Xaa_8 是 :Lys、K(W)、Pro、Cys、K(CO(CH₂)₂SH) 或不存在;

[0303] Xaa_9 是 :K(E-C₁₆)、Ser、Cys、Lys、K(W)、K(CO(CH₂)₂SH) 或不存在;和

[0304] Xaa_{10} 是 :Ser、Cys、Lys、K(W)、K(CO(CH₂)₂SH) 或不存在。

[0305] 优选的如果式 13 的 Xaa_1 、 Xaa_2 、 Xaa_3 、 Xaa_4 、 Xaa_5 、 Xaa_6 、 Xaa_7 、 Xaa_8 或 Xaa_9 不存在,

下游的下一个氨基酸是 C 末端延伸的下一个氨基酸。C 末端氨基酸可以被酰胺化。

[0306] 优选的,式 13 的 C 末端延伸的 Xaa₁ 至 Xaa₁₀ 中的至少 1 个存在。更优选的,C 末端延伸的 Xaa₁ 至 Xaa₁₀ 中至少有二、三、四、五、六、七、八、九或全部都存在。

[0307] 更优选的,在本发明的任一方面和实施方案中可以使用的可选的 C 末端延伸是选自:

[0308]

SEQ ID NO :85	SRTSPPP
SEQ ID NO :86	SRTSPPP-NH ₂
SEQ ID NO :87	SSTSPRPPSS
SEQ ID NO :88	SSTSPRPPSS-NH ₂
SEQ ID NO :89	SRTSPPPK(W)
SEQ ID NO :90	SRTSPPPK(W)-NH ₂
SEQ ID NO :91	SRTSPPPC
SEQ ID NO :92	SRTSPPPC-NH ₂

[0309] 本发明的 VPAC2 受体肽激动剂的优点是具有超过已知 VPAC2 受体肽激动剂的增强的选择性、效价和 / 或稳定性。特别是,添加毒蜥外泌肽 -4 的 C 末端序列,或该 C 末端序列的变体作为 c- 加帽序列,出乎意料的增加了 VPAC2 受体的选择性并增加蛋白水解的稳定性。

[0310] 一个或多个 PEG 分子与 VPAC2 受体肽激动剂的特定残基的共价连接可获得具有生物活性的、加入聚乙二醇的 VPAC2 受体肽激动剂,其与未加入聚乙二醇的 VPAC2 受体肽激动剂相比,具有延长的半衰期和降低的清除率。

[0311] 术语“VPAC2”用于指代并联系本发明的激动剂激活的特定受体 (Lutz 等人, FEBS Lett., 458 :197-203(1999) ;Adamou 等 人, Biochem. Biophys. Res. Commun., 209 : 385-392(1995))。该术语也用指代并联系本发明的激动剂。

[0312] 本发明的“选择性 VPAC2 受体肽激动剂”或“VPAC2 受体肽激动剂”是选择性激活 VPAC2 受体,诱导胰岛素分泌的肽。优选的,本发明的选择性 VPAC2 受体肽激动剂的序列具有 28 至 40 个天然存在的和 / 或非天然存在的氨基酸,可以或不额外的含有 C 末端延伸。

[0313] “选择性的加入聚乙二醇的 VPAC2 受体肽激动剂”或“加入聚乙二醇的 VPAC2 受体肽激动剂”是选择性 VPAC2 受体肽激动剂 (其共价的连接一个或多个聚乙二醇 (PEG) 分子) 或其衍生物,其中,每个 PEG 连接半胱氨酸或赖氨酸、K(W) 或 K(CO(CH₂)₂SH),或肽的羧基端。

[0314] 选择性的加入聚乙二醇的 VPAC2 受体肽激动剂可以含有 C 末端延伸。本发明的“C 末端延伸”包括具有 1 至 13 个天然存在的或非天然存在的氨基酸的序列,所述氨基酸在 C 末端延伸的 N 端通过肽键与序列 C 端连接。C 末端延伸中的任一个 Cys、Lys、K(W) 或 K(CO(CH₂)₂SH) 残基可以共价的连接 PEG 分子,和 / 或 C 末端延伸的羧基端氨基酸可以共价的连接 PEG 分子。

[0315] 本文中使用的关于术语 C 末端延伸的术语“连接”,包括直接在肽序列的 C 端添加或附着氨基酸或化学基团。

[0316] 任选的,选择性的加入聚乙二醇的 VPAC2 受体肽激动剂还可以具有 N 末端修饰。本文使用的术语“N 末端修饰”包括直接在肽的 N 端添加或附着氨基酸或化学基团,以及形成

化学基团,其与肽的 N 端的氮结合。

[0317] N 末端修饰可以包括在 VPAC2 受体肽激动剂肽序列上添加一个或多个天然存在的或非天然存在的氨基酸,优选的是不超过 10 个氨基酸,其中一个氨基酸是更优选的。可以添加到 N 末端的天然存在的氨基酸包括甲硫氨酸和异亮氨酸。添加到 N 末端的修饰的氨基酸可以是 D- 组氨酸。或者,下列氨基酸可以添加到 N 末端:SEQ ID NO:93Ser-Trp-Cys-Glu-Pro-Gly-Trp-Cys-Arg,其中,Arg 与肽激动剂的 N 端相连。优选的,添加到 N 端的任何氨基酸通过肽键与 N 端相连。

[0318] 本文中使用的关于 N 末端修饰的术语“连接”,包括直接在 VPAC2 受体激动剂的 N 末端添加或附着氨基酸或化学基团。可以在形成肽键的常规偶联条件下实现上述 N 末端修饰的添加。

[0319] 还可以通过添加烷基基团(R),优选的 C_1 - C_{16} 烷基基团来修饰肽激动剂的 N 端,形成 $(R)NH-$ 。

[0320] 可选的,可以通过添加一组式 $-C(O)R^1$ 形成式 $R^1C(O)NH-$ 的酰胺来修饰肽激动剂的 N 端。添加一组式 $-C(O)R^1$ 可以通过与式 R^1COOH 的有机酸反应来实现。现有技术已经表明了用酰化修饰氨基酸序列的 N 端(例如,Gozes 等人, J. Pharmacol Exp Ther, 273: 161-167(1995))。添加一组式 $-C(O)R^1$ 可以导致在 N 端形成尿素基团(见 W001/23240, W02004/06839)或氨基甲酸基团。此外,通过添加焦谷氨酸,或 6- 氨基己酸可以修饰 N 端。

[0321] 肽激动剂的 N 端可以通过添加一组式 $-SO_2R^5$ 来修饰,以在 N 端形成磺胺基团。

[0322] 肽激动剂的 N 端还可以通过琥珀酸酐反应来修饰,以在 N 端形成琥珀酰亚胺基团。琥珀酰亚胺与肽 N 端的氮结合。

[0323] 可以通过添加甲硫氨酸亚砷、生物素基-6- 氨基己酸或 $-C(=NH)-NH_2$ 可选的修饰 N 端。添加 $-C(=NH)-NH_2$ 是胍基化(guanidation)修饰,使 N 端氨基酸的末端 NH_2 变成 $-NH-C(=NH)-NH_2$ 。

[0324] 本发明的大多数序列,包括 N 末端修饰和 C 末端延伸,都含有 20 个天然存在的氨基酸的标准单字母或三字母代码。使用的其他代码定义如下:

[0325] C6 = 己酰基

[0326] d = 各种氨基酸的 D 同种型(非天然存在的)

[0327] 例如, dA = D- 丙氨酸, dS = D- 丝氨酸, dK = D- 赖氨酸

[0328] hR = 高精氨酸

[0329] Aib = 氨基异丁酸

[0330] OMe = 甲氧基

[0331] Nle = 正亮氨酸

[0332] Nme = 与氨基酸的 α 氨基连接的 N- 甲基,

[0333] 例如, NmeA = N- 甲基丙氨酸, NmeV = N- 甲基缬氨酸

[0334] Orn = 鸟氨酸

[0335] $K(CO(CH_2)_2SH) = \epsilon-(3'-\text{巯丙酰})-\text{赖氨酸}$

[0336] $K(W) = \epsilon-(L-\text{色氨酰})-\text{赖氨酸}$

[0337] Abu = α - 氨基 -n- 丁酸或 2- 氨基丁酸

[0338] Cit = 瓜氨酸

- [0339] K(Ac) = ε - 乙酰赖氨酸
- [0340] PEG = 聚乙二醇
- [0341] PEG40K = 40,000 道尔顿 PEG 分子
- [0342] PEG30K = 30,000 道尔顿 PEG 分子
- [0343] PEG20K = 20,000 道尔顿 PEG 分子
- [0344] 天然存在的 VIP 是作为有 28 个氨基酸的单一序列。然而,PACAP 以具有酰胺化羧基的 38 个氨基酸的肽 (PACAP-38) 或者 27 个氨基酸的肽 (PACAP-27) 存在 (Miyata 等人, Biochem Biophys Res Commun,170 :643-648(1990))。VIP、PACAP-27 和 PACAP-38 的序列如下：
- [0345]

肽	Seq. ID #	序列
VIP	SEQ ID NO : 14	HSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLSILN
PACAP-27	SEQ ID NO : 15	HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLA AVL-NH ₂
PACAP-38	SEQ ID NO : 16	HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLA AVLGKRYQ RVKNK-NH ₂

- [0346] 本文中使用的术语“天然存在的氨基酸”意指人类遗传密码子编码的 20 个氨基酸 (即,20 个标准氨基酸)。上述 20 个氨基酸是 :丙氨酸、精氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸、甘氨酸、组氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、丝氨酸、苏氨酸、色氨酸、酪氨酸和缬氨酸。
- [0347] “非天然存在的氨基酸”的实例包括合成的氨基酸和由身体修饰的氨基酸。其包括 D- 氨基酸,精氨酸样氨基酸 (例如,高精氨酸),及其它在侧链具有额外亚甲基的氨基酸 (“高”氨基酸),以及修饰的氨基酸 (如正亮氨酸、赖氨酸 (异丙基)- 其中赖氨酸的侧链酰胺被异丙基修饰)。还包括氨基酸如鸟氨酸,氨基异丁酸和 2- 氨基丁酸。
- [0348] 本文中使用的“选择性”指与其它已知受体相比,VPAC2 受体肽激动剂对 VPAC2 受体具有增加的选择性。通过 VPAC2 受体结合亲和力与 VPAC1 受体结合亲和力的比值,或者通过 VPAC2 受体结合亲和力与 PAC1 受体结合亲和力的比值测定选择性的程度。结合亲和力的测定描述在下文的实施例 4 中。
- [0349] “促胰岛素活性”指对升高的葡萄糖水平作出反应,刺激胰岛素分泌的能力,从而导致细胞摄取葡萄糖和降低血浆葡萄糖水平。可以通过本领域已知的方法评价促胰岛素活性,包括用测量 VPAC2 受体结合活性或受体活化作用 (例如,胰岛素瘤细胞系或胰岛分泌胰岛素、静脉葡萄糖耐量试验 (IVGTT)、腹膜内葡萄糖耐量试验 (IPGTT) 和口服葡萄糖耐量试验 (OGTT)) 的实验。人体内促胰岛素活性的常规测量是通过测量胰岛素水平或 C 肽水平。本发明的选择性加入聚乙二醇的 VPAC2 受体肽激动剂具有促胰岛素活性。
- [0350] 本文中使用的“体外效价”是在基于细胞的测定中对肽活化 VPAC2 受体的能力的测量。体外效价表示为“EC₅₀”,是在单一剂量反应实验中导致活性 50% 最大增长的化合物有效浓度。出于本发明的目的,用两种不同的测定确定体外效价 :DiscoverX 和 Alpha Screen。上述测定的其它细节参见实施例 3 和 5。同时,上述测定以不同的方式实施,结果证明了两种测定之间的普遍相关性。
- [0351] 术语“血浆半衰期”指之前在血浆中循环的相关分子一半被清除的时间。替代使用的术语是“消除半衰期”。在血浆半衰期或清除半衰期中使用的术语“延长的”或“更长的”指如在可比较的条件下确定的,与参照分子 (例如,未加入聚乙二醇的形式的肽或天然肽)

相比,加入聚乙二醇的 VPAC2 受体肽激动剂的半衰期有统计学上的显著增加。本文中报道的半衰期是消除半衰期;其对应于消除的终端对数线性率。本领域的技术人员已知半衰期是衍生的参数,作为清除率和分布容积的函数而变化。

[0352] 清除率是对身体排除药物的能力的测量。当清除率由于例如药物修饰作用而降低时,预期半衰期将增长。然而,只有当分布容积没有改变时,该互反关系才是精确的。等式 $t_{1/2} \approx 0.693 (V/C)$ 给出了终端对数线性半衰期 ($t_{1/2}$)、清除率 (C) 和容积分布 (V) 之间有效的近似关系。清除率不表示移除了多少药物,而是表示为了实现消除,必须完全脱离药物的生物流体如血液或血浆的体积。清除率表示为每单位时间的体积。

[0353] 本文中使用的“百分比(%)序列同一性”用于指序列,其在比对时具有位于替换的氨基酸是那些与初始蛋白质相比不改变蛋白质活性或功能的氨基酸。例如,相互具有至少 85% 同一性的两个氨基酸序列,在相似的位置上具有至少 85% 相似(相同或保守替换的残基),其中当比对时最优允许高达 3 个间隔,条件是间隔影响的氨基酸残基总共不超过 15 个。

[0354] 本文中用于计算百分比序列同一性的参照肽是:

[0355]

P487 SEQ ID NO :84	C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQLAA AibOrnYLQSIOrnOrnGGPSSGAPPPS-NH ₂
--------------------	--

[0356] 百分比序列同一性可以通过以下来计算:确定在本发明涵盖的肽和参照肽如 P487 (SEQ ID NO :84) 之间不同的残基数目,获得该数目并以其除以参照肽的氨基酸数目(例如,P487 是 39 个氨基酸),再乘以一百,并从得数中减去 100。例如,有 39 个氨基酸的序列有 4 个氨基酸与 P487 不同,其百分比(%)序列同一性为 90% (例如, $100 - ((4/39) \times 100)$)。对于超过 39 个氨基酸的序列,出于上述计算的目的,与 P487 序列不同的残基数目将包括超过 39 个的额外的氨基酸。例如,有 40 个氨基酸的序列,其中有 4 个氨基酸与 P487 序列中的 39 个氨基酸不同,并且在羧基端有一个 P487 序列中不存在的额外的氨基酸,它共有 5 个氨基酸与 P487 不同。因此,该序列有 87% 的百分比(%)序列同一性(例如, $100 - ((5/39) \times 100)$)。可以使用本领域普遍已知的方法确定序列同一性的程度(见例如,Wilbur, W. J. 和 Lipman, D. J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80 :726-730 (1983) 以及 Myers E. 和 Miller W., Comput. Appl. Biosci. 4 :11-17 (1988))。一个可用来确定相似度的程序是 MegAlign Lipman-Pearson 的单对 (one pair) 方法(使用缺省参数),其可以从 DNASTAR 公司,1128, Selfpark Street, Madison, Wisconsin, 53715, USA 作为 Lasergene 系统的部分获得。另一个可以使用的程序是 Clustal W。这是由 Thompson 等人 (Nucleic Acids Research, 22 (22) :4673-4680 (1994)) 开发的用于 DNA 或蛋白质序列的多序列比对软件包。该工具对于实施相关序列的跨物种比较并观察序列保守性是有效的。Clustal W 是用于 DNA 或蛋白质的常规目的多序列比对程序。它产生不同序列的生物学有意义的多序列比对。它计算选定序列的最佳匹配,将其排列从而可以看出同一性、相似性和差别。通过观看 Cladograms 或 Phylograms 可以看出进化关系。

[0357] 本发明的选择性加入聚乙二醇的 VPAC2 受体肽激动剂的序列是选择性用于 VPAC2 受体,并与 P487 (SEQ ID NO :84) 优选的具有在 60% 至 70%、60% 至 65%、65% 至 70%、70% 到 80%、70% 至 75%、75% 至 80%、80% 至 90%、80% 至 85%、85% 至 90%、90% 至 97%、90% 至 95% 或 95% 至 97% 范围内的序列同一性。优选的,序列与 P487 (SEQ ID NO :84) 有

大于 82% 的序列同一性。更优选的,序列与 P487 (SEQ ID NO :84) 有大于 90% 的序列同一性。甚至更优选的,序列与 P487 (SEQ ID NO :84) 有大于 92% 的序列同一性。还更优选的,序列与 P487 (SEQ ID NO :84) 有大于 95% 的序列同一性或 97% 的序列同一性。

[0358] 本文中使用的术语“ C_1-C_{16} 烷基”意指单价饱和直链、支链或环链的烃基,其具有 1 至 16 个碳原子,或者当成环状时,具有 3 至 16 个碳原子。因此,术语“ C_1-C_{16} 烷基”包括,例如甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基、正庚基、正辛基、环丙基、环丁基、环戊基和环己基。 C_1-C_{16} 烷基基团可以用一个或多个取代基任选的取代,所述取代基包括例如芳基、 C_1-C_6 烷氧基、-OH、卤素、 $-CF_3$ 和 -SH。

[0359] 本文使用的术语“ C_1-C_6 烷基”意指单价饱和直链、支链或环链的烃基,其具有 1 至 6 个碳原子或者当成环状时,具有 3 至 6 个碳原子。因此,术语“ C_1-C_6 烷基”包括,例如甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基、环丙基、环丁基、环戊基和环己基。 C_1-C_6 烷基基团可以用一个或多个取代基任选的取代。

[0360] 本文使用的术语“ C_2-C_6 烯基”意指单价直链、支链或环链的烃基,其具有至少一个双键和 2 至 6 个碳原子,或者当成环状时,具有 3 至 6 个碳原子。因此,术语“ C_2-C_6 烯基”包括乙烯基、丙-2-烯基、丁-3-烯基、戊-4-烯基和异丙烯基。 C_2-C_6 烯基可以用一个或多个取代基任选的取代。

[0361] 本文使用的术语“ C_2-C_6 炔基”意指单价直链或支链的烃基,其具有至少一个三键和 2 至 6 个碳原子。因此,术语“ C_2-C_6 炔基”包括丙-2-炔基、丁-3-炔基和戊-4-炔基。 C_2-C_6 炔基基团可以用一个或多个取代基任选的取代。

[0362] 本文使用的术语“ C_1-C_6 烷氧基”意指单价不取代的饱和直链或支链的烃基,其具有与二价 O 基的取代点相连的 1 至 6 个碳原子。因此,术语“ C_1-C_6 烷氧基”包括,例如甲氧基、乙氧基、正丙氧基、异丙氧基、正丁氧基、异丁氧基、仲丁氧基和叔丁氧基。 C_1-C_6 烷氧基基团可以用一个或多个取代基任选的取代。

[0363] 术语“卤”或“卤素”意指氟、氯、溴或碘。

[0364] 当单独使用或作为基团的一部分使用时,术语“芳基”是 5 至 10 元的芳香基团或芳香杂环基团,其包括苯基、5 或 6-元的单环芳香杂环基(其中每元都可以被 1、2、3、4 或 5 个取代基任选的取代(取决于可用的取代位置数量))、萘基或 8-、9- 或 10-元二环芳香杂环基(其中每元都可以被 1、2、3、4、5 或 6 个取代基任选的取代(取决于可用的取代位置数量))。在芳基该定义中,合适的取代基包括 C_1-C_6 烷基、 C_2-C_6 烯基、 C_2-C_6 炔基、 $-NH_2$ 、-OH、卤素、-SH 和 CF_3 。

[0365] 本文使用的术语“芳基 C_1-C_4 烷基”意指用芳基取代的 C_1-C_4 烷基。因此,术语“芳基 C_1-C_4 烷基”包括苯甲基、1-苯乙基(α -甲苄基)、2-苯乙基、1-萘甲基或 2-萘甲基。

[0366] 术语“萘基”包括 1-萘基和 2-萘基。1-萘基是优选的。

[0367] 本文使用的术语“苯甲基”意指通过 $-CH_2-$ 基与取代点连接的单价未取代的苯基。

[0368] 本文使用的术语“5- 或 6-元单环芳香杂环基”意指环内共有 5 或 6 个原子的单环芳香基,其中 1 至 4 个上述原子是各自独立的选自 N、O 和 S。优选的基团在环内有 1 或 2 个原子,其各自独立的选自 N、O 和 S。五元单环芳香杂环基团的实例包括吡咯基(又称 azolyl)、呋喃基(furanyl)、噻吩基、吡唑基(也称 1H-吡唑基和 1,2-diazolyl)、咪唑基、噁唑基(又称 1,3-噁唑基)、异噁唑基(又称 1,2-噁唑基)、噻唑基(又称 1,3-噻唑基)、

异噻唑基（又称 1,2-噻唑基）、三唑基、噁二唑基、噻二唑基、四唑基、噁三唑基和噻三唑基。6 元单环芳香杂环基团的实例包括吡啶基、嘧啶基、吡嗪基、哒嗪基和三嗪基。

[0369] 本文使用的术语“8-、9- 或 10- 元二环芳香杂环基团”意指环系统中共有 8、9 或 10 个原子的融合耳环芳香基，其中 1 至 4 个上述原子各自独立的选自 N、O 和 S。优选的基团在环系统内有 1 至 3 个原子，它们各自独立的选自 N、O 和 S。合适的 8- 元二环芳香杂环基包括咪唑并 [2,1-b] [1,3] 噻唑基、噻吩并 [3,2-b] 噻吩基、噻吩并 [2,3-d] [1,3] 噻唑基和噻吩并 [2,3-d] 咪唑基。合适的 9- 元二环芳香杂环基包括吡啶基、异吡啶基、苯并呋喃基（又称苯并 [b] 呋喃基）、异苯并呋喃基（又称苯并 [c] 呋喃基）、苯并噻吩基（又称苯并 [b] 噻吩基）、异苯并噻吩基（又称苯并 [c] 噻吩基）、吡唑基、苯并咪唑基、1,3 苯并噁唑基、1,2- 苯并异噁唑基、2,1- 苯并异噁唑基、1,3 苯并噻唑基、1,2- 苯并异噻唑基、2,1- 苯并异噻唑基、苯并三唑基、1,2,3- 苯并噁二唑基、2,1,3- 苯并噁二唑基、1,2,3- 苯并噻二唑基、2,1,3- 苯并噻二唑基、噻吩并吡啶基、嘌呤基 (purinyl) 和咪唑并 [1,2-a] 吡啶。合适的 10- 元二环芳香杂环基包括喹啉基、异喹啉基、噌啉、喹唑啉基、喹喔啉基、1,5- 萘啶基 (naphthyridyl)、1,6- 萘啶基、1,7- 萘啶基和 1,8- 萘啶基。

[0370] 本文使用的术语“PEG”意指聚乙二醇分子。PEG 典型的形态是具有末端羟基的线性聚合物，并具有式 $\text{HO}-\text{CH}_2\text{CH}_2-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{OH}$ ，其中 n 是从约 8 至约 4000。末端的氢可以用保护基团取代例如烷基或链烷醇基。优选的，PEG 具有至少一个羟基基团，更优选的，其是末端的羟基基团。正是该羟基基团优选被活化与肽反应。有多种形式的 PEG 可用于本发明。本领域存在多种 PEG 衍生物适合用于本发明。（见例如，美国专利号：5445090；5900461；5932462；6436386；6448369；6437025；6448369；6495659；6515100 和 6514491，以及 Zalipsky, S. Bioconjugate Chem. 6:150-165, 1995）。在本发明中共价连接 VPAC2 受体肽激动剂的 PEG 分子并不意图被限定为特定类型。PEG 分子的分子量优选的是 500-100,000 道尔顿。PEG 可以是线性或分支的。本发明的加入聚乙二醇的 VPAC2 受体肽激动剂可以有一、二或三个 PEG 分子与肽连接。更优选的是每个加入聚乙二醇的 VPAC2 受体肽激动剂有一个或两个 PEG 分子，但是，当每个肽分子有一个以上的 PEG 分子时，优选的是不超过 3 个。进一步考虑 PEG 分子的两端可以是同 - 或异 - 官能化的，用于将两个或多个 VPAC2 受体肽激动剂交联在一起。当存在两个 PEG 分子时，PEG 分子优选的是每个 20,000 道尔顿 PEG 分子或每个 30,000 道尔顿 PEG 分子。但是，也可以使用具有不同分子量的 PEG 分子，例如，一个 10,000 道尔顿 PEG 分子和 1 个 30,000 PEG 分子，或一个 20,000 道尔顿 PEG 分子和一个 40,000 道尔顿 PEG 分子。

[0371] 在本发明中，PEG 分子可以共价的连接 Cys 或 Lys 残基，或连接 C 末端残基。PEG 分子还可以共价的连接与 Lys 残基 (K(W)) 的侧链偶联的 Trp 残基。可选的， $\text{K}(\text{CO}(\text{CH}_2)_2\text{SH})$ 基团可以被加入聚乙二醇以形成 $\text{K}(\text{CO}(\text{CH}_2)_2\text{S}-\text{PEG})$ 。肽激动剂中的任一个 Lys 残基都可以用 K(W) 或 $\text{K}(\text{CO}(\text{CH}_2)_2\text{SH})$ 取代，后者可以随后被加入聚乙二醇的。此外，肽激动剂中的任何 Cys 残基可以用修饰的半胱氨酸残基例如，hC 取代。修饰的 Cys 残基可以共价的连接 PEG 分子。

[0372] 本文使用的术语“加入聚乙二醇作用”意指如上所述在本发明的 VPAC2 受体肽激动剂上共价的连接一个或多个 PEG 分子。

[0373] 根据本发明优选的实施方案，提供了加入聚乙二醇的 VPAC2 受体肽激动剂，其含

有选自:SEQ ID NO:17 至 45 和 94 至 112 的肽序列,以及选自 SEQ ID NO:5、6、7、8、9、10、11 和 12 的 C 末端延伸。特别优选的, C 末端延伸是 SEQ ID NO:11 或 SEQ ID NO:12。

[0374] 根据本发明更优选的实施方案,提供了加入聚乙二醇的 VPAC2 受体肽激动剂,其含有选自:SEQ ID NO:17 至 45 和 94 至 112 的肽序列,以及选自 SEQ ID NO:5、6、7、8、9、10、11 和 12 的 C 末端延伸,其中 VPAC2 受体肽激动剂还包括 N 末端修饰,该修饰是添加乙酰基、丙酰基、丁酰基、戊酰基、己酰基、甲硫氨酸、甲硫氨酸亚砷、3- 苯基丙酰基、苯乙酰基、苯甲酰基、正亮氨酸、D- 组氨酸、异亮氨酸、3- 巯丙酰、生物素基 -6- 氨基己酸和 $-C(=NH)-NH_2$ 。在该实施方案中,更优选的 N 末端修饰是添加乙酰基或己酰基。

[0375] 根据本发明另一优选的实施方案,提供了加入聚乙二醇的 VPAC2 受体肽激动剂,其含有式 4(SEQ ID NO:4) 的肽序列,以及选自 SEQ ID NO:5、6、7、8、9、10、11 和 12 的 C 末端延伸,其中加入聚乙二醇的 VPAC2 受体肽激动剂还包括 N 末端修饰,该修饰是添加乙酰基、丙酰基、丁酰基、戊酰基、己酰基、甲硫氨酸、甲硫氨酸亚砷、3- 苯基丙酰基、苯乙酰基、苯甲酰基、正亮氨酸、D- 组氨酸、异亮氨酸、3- 巯丙酰、生物素基 -6- 氨基己酸 (6- 氨基己酸) 和 $-C(=NH)-NH_2$ 。在该实施方案中,更优选的 N 末端修饰是添加乙酰基或己酰基。

[0376] 根据本发明更优选的实施方案,提供了加入聚乙二醇的 VPAC2 受体肽激动剂,其含有式 4(SEQ ID NO:4) 的肽序列 (其中 Xaa_{15} 是 Aib, Xaa_{20} 是 Aib, Xaa_{12} 、 Xaa_{21} 、 Xaa_{27} 和 Xaa_{28} 都是 Orn), 以及选自 SEQ ID NO:5、6、7、8、9、10、11 和 12 的 C 末端延伸,并且其中加入聚乙二醇的 VPAC2 受体肽激动剂还包括 N 末端修饰,该修饰是添加乙酰基、丙酰基、丁酰基、戊酰基、己酰基、甲硫氨酸、甲硫氨酸亚砷、3- 苯基丙酰基、苯乙酰基、苯甲酰基、正亮氨酸、D- 组氨酸、异亮氨酸、3- 巯丙酰、生物素基 -6- 氨基己酸 (6- 氨基己酸) 和 $-C(=NH)-NH_2$ 。在该实施方案中,更优选的 Xaa_{15} 是 Aib, Xaa_{20} 是 Aib, Xaa_{12} 、 Xaa_{21} 、 Xaa_{27} 和 Xaa_{28} 都是 Orn, Xaa_8 是 Glu, Xaa_9 是 Gln 以及 Xaa_{10} 是 Tyr(OMe)。特别优选的 Xaa_{15} 是 Aib, Xaa_{20} 是 Aib, Xaa_{12} 、 Xaa_{21} 、 Xaa_{27} 和 Xaa_{28} 都是 Orn, Xaa_8 是 Glu, Xaa_9 是 Gln, Xaa_{10} 是 Tyr(OMe), 以及 Xaa_{23} 和 / 或 Xaa_{25} 是 Aib。

[0377] 蛋白质的加入聚乙二醇作用可以克服使用肽或蛋白质作为治疗剂相关的许多药理学和毒理学 / 免疫学的问题。但是,对于任何单个的肽都不确定,与肽的未加入聚乙二醇的形式相比,肽的加入聚乙二醇的形式是否会显著的丧失生物活性。

[0378] 加入聚乙二醇的蛋白质的生物活性可以被以下因素影响,例如:i) PEG 分子的大小;ii) 特定的连接位点;iii) 修饰的程度;iv) 不利的偶联条件;v) 连接是否使用接头或者是否聚合物直接连接;vi) 有害副产物的产生;vii) 活化的聚合物造成的破坏;或 viii) 电荷的滞留。对细胞因子加入聚乙二醇作用实施的工作展现了例如加入聚乙二醇作用具有的效果。根据使用的偶联反应,细胞因子的聚合物修饰导致了生物活性的显著下降 [Francis, G.E. 等人, (1998) PEGylation of cytokines and other therapeutic proteins and peptides: the importance of biological optimization of coupling techniques, Intl. J. Hem. 68:1-18]。维持加入聚乙二醇的肽的生物活性甚至比维持蛋白质的更困难。由于肽比蛋白质小,通过加入聚乙二醇作用的修饰对生物活性可能具有更大的影响。

[0379] 本发明的 VPAC2 受体肽激动剂通过共价的连接一个或多个 PEG 分子来修饰,并且由于减慢的蛋白水解降解和肾清除率,其一般具有改善的药物动力学谱。加入聚乙二醇作

用将增加 VPAC2 受体肽激动剂的表现尺寸,从而降低肾清除率和改变生物分布。加入聚乙二醇的作用可以保护 VPAC2 受体肽激动剂的抗原表位,从而降低网状内皮的清除率和被免疫系统识别,还降低蛋白水解酶如 DPP-IV 的降解。

[0380] 一个或多个 PEG 分子与小的、生物学活化的 VPAC2 受体肽激动剂的共价连接造成了负面影响激动剂的风险,例如,通过使内在的二级结构和生物活性构象不稳定并降低生物活性,从而使激动剂不适合作为治疗剂。但是,本发明基于这样的发现,即一个或多个 PEG 分子与 VPAC2 受体肽激动剂的特定残基的共价结合,令人惊奇的获得了生物活化的、加入聚乙二醇的 VPAC2 受体肽激动剂,其与未加入聚乙二醇的 VPAC2 受体肽激动剂相比,具有延长的半衰期和降低的清除率。本发明的化合物包括选择性加入聚乙二醇的 VPAC2 受体肽激动剂。

[0381] 为了确定 VPAC2 受体肽激动剂中潜在的加入聚乙二醇作用位点,可以进行丝氨酸扫描。肽中特定位置的 Ser 残基被取代,检测 Ser- 修饰的肽的效价和选择性。如果 Ser 取代对效价只有最低限度的影响,而且 Ser- 修饰的肽选择作用于 VPAC2 受体,则然后用 Cys 或 Lys 残基取代该 Ser 残基,并作为直接或间接的加入聚乙二醇作用位点。残基的间接加入聚乙二醇作用是与加入聚乙二醇作用位点的残基结合的化学基团或残基的加入聚乙二醇作用。Lys 的间接加入聚乙二醇作用包括 K(W) 和 K(CO(CH₂)₉SH) 的加入聚乙二醇作用。

[0382] 本文描述的发明提供了加入聚乙二醇的 VPAC2 受体肽激动剂。加入聚乙二醇作用可以增加选择性 VPAC2 受体肽激动剂的半衰期,获得具有至少一个小时,优选的至少 3、5、7、10、15、20 或 24 小时以及最优选的至少 48 小时的消除半衰期的加入聚乙二醇的 VPAC2 受体肽激动剂。本发明的加入聚乙二醇的 VPAC2 受体肽激动剂优选的具有 200ml/h/kg 或更少的清除率值,更优选的 180、150、120、100、80、60ml/h/kg 或更少,以及最优选的少于 50、40 或 20ml/h/kg。

[0383] 本发明涵盖了这样的发现,即在 VPAC2 受体肽激动剂的肽序列的 C 末端添加的特定氨基酸可以保护肽并且增加活性、选择性和 / 或效价。例如,上述 C 末端延伸可以稳定肽的螺旋结构,稳定位于 C 末端附近的、倾向于 于被酶切的位点。此外,本文公开的许多 C 末端延伸肽可以对于 VPAC2 受体是更具选择性的,并且可以比 VIP、PACAP 和其它已知的 VPAC2 受体肽激动剂具有更高的效价。优选的 C 末端延伸的实例是毒蜥外泌肽 -4 延伸肽作为 C- 加帽序列。毒蜥外泌肽 -4 是在毒蜥 (*Heloderma Suspectum*) (Eng 等人, *J. Biol. Chem.*, 267(11):7402-7405(1992)) 的唾液分泌物中发现的。其它 C 末端延伸的实例是毒蜥皮肤和毒蜥肽。毒蜥皮肤和毒蜥肽也是在毒蜥的唾液分泌物中发现的。

[0384] 此外还发现 VPAC2 受体肽激动剂的 N 末端修饰作用可以提高效价和 / 或提供对抗 DPP-IV 切割的稳定性。

[0385] VIP 和一些已知的 VPAC2 受体肽激动剂对多种酶的切割作用易感,因此具有短的体内半衰期。下文讨论了在 VPAC2 受体肽激动剂上的多种酶切位点。对切割位点的讨论是相对于 VIP (SEQ ID NO:14) 中的氨基酸位置,并可适用于本文中提到的序列。

[0386] 由二肽基肽酶 IV (DPP-IV) 对肽激动剂的切割作用发生在位置 2 (VIP 中的丝氨酸) 和位置 3 (VIP 中的天冬氨酸) 之间。通过添加 N 末端修饰,致使本发明的激动剂对在该区域的 DPP-IV 切割更稳定。可以改善对抗 DPP-IV 切割的稳定性的 N 末端修饰作用的实例包括添加乙酰基、丙酰基、丁酰基、戊酰基、己酰基、甲硫氨酸、甲硫氨酸亚砷、3- 苯基丙酰

基、苯乙酰基、苯甲酰基、正亮氨酸、D-组氨酸、异亮氨酸、3-巯丙酰、生物素基-6-氨基己酸和 $-C(=NH_2)-NH_2$ 。优选的，N 末端修饰是添加乙酰基或己酰基。

[0387] 在野生型的 VIP 的氨基酸 10 和 11 (酪氨酸和苏氨酸) 以及 22 和 23 (酪氨酸和亮氨酸) 之间有胰凝乳蛋白酶切割位点。使在位置 10 和 / 或 11 以及位置 22 和 / 或 23 的取代可以增加肽在这些位点的稳定性。例如，在位置 10 和 / 或 22 用 Tyr(OMe) 取代酪氨酸可以增加稳定性。

[0388] 在野生型 VIP 12 和 13 位的氨基酸之间有胰蛋白酶切割位点。一些氨基酸使得肽对该位点的切割较不易感，例如，鸟氨酸位于第 12 位和氨基异丁酸位于第 13 位时。

[0389] 在野生型 VIP 和本领域已知的许多 VPAC2 受体肽激动剂中，在位置 14 和 15 的碱性氨基酸之间与位置 20 和 21 的碱性氨基酸之间有切割位点。因为上述位点的取代，本发明的选择性加入聚乙二醇的 VPAC2 受体肽激动剂具有改善的体内蛋白水解稳定性。上述位点优选的取代是使肽对胰蛋白酶样酶，包括胰蛋白酶的切割较不易感的取代。例如，位于第 15 位的氨基异丁酸、位于第 20 位的氨基异丁酸和位于第 21 位的鸟氨酸都是优选的取代，其可以产生改善的稳定性。实施例 7 中示例了代表性编号的选择性加入聚乙二醇的 VPAC2 受体肽激动剂的改善的稳定性，其具有对肽酶切割的抗性，并被本发明所涵盖。

[0390] 在野生型 VIP 的位置 25 和 26 的氨基酸之间也有切割位点。

[0391] VPAC2 受体肽激动剂在涵盖了位置 27、28、29、30 和 31 的氨基酸区域对酶切也是易感的。添加 C 末端延伸可以使肽激动剂对神经内肽酶 (NEP) 更稳定，还可以增加 VPAC2 受体的选择性。胰蛋白酶样酶也可以攻击该区域。如果发生上述攻击，肽激动剂可以失去其具有额外的羧肽酶活性的 C 末端延伸，导致肽的失活形式。增加对该区域切割的抗性的优选取代包括位置 27 的鸟氨酸，位置 28 的鸟氨酸或氨基异丁酸和位置 29 的鸟氨酸。

[0392] 除了选择性加入聚乙二醇的 VPAC2 受体肽激动剂 (其具有对多种肽酶切割的抗性)，本发明的选择性加入聚乙二醇的 VPAC2 肽受体激动剂还可以涵盖这样的肽，即与本领域已知的一些肽相比，具有对 VPAC2 受体增加的选择性、增加的效价和 / 或增加的稳定性的肽。实施例 3、4 和 5 中表明了本发明的多种加入聚乙二醇的 VPAC2 受体肽激动剂的增加的效价和选择性。

[0393] 实施例 3 的表 1 提供了选择性加入聚乙二醇的 VPAC2 受体肽激动剂及其相应的体外效价结果的表。优选的，本发明的选择性加入聚乙二醇的 VPAC2 受体肽激动剂具有低于 200nM 的 EC_{50} 值。更优选的， EC_{50} 值低于 100nM。甚至更优选的， EC_{50} 值低于 50nM。仍然更优选的， EC_{50} 值低于 30nM。

[0394] 实施例 4 的表 2 提供了加入聚乙二醇的 VPAC2 受体肽激动剂及其相应的与人 VPAC2、VPAC1 和 PAC1 的受体结合结果的列表。上述测定的其它细节参见实施例 4。选择性的程度是通过 VPAC2 受体结合亲和力与 VPAC1 受体结合亲和力的比例，以及 VPAC2 受体结合亲和力与 PAC1 受体结合亲和力的比例来确定的。优选的，本发明的激动剂具有选择性比例，其中对 VPAC2 受体的亲和力比对 VPAC1 和 / 或 PAC1 受体至少大 50 倍。更优选的，对 VPAC2 的亲和力比对 VPAC1 和 / 或 PAC1 至少大 100 倍。甚至更优选的，对 VPAC2 的亲和力比对 VPAC1 和 / 或 PAC1 至少大 200 倍。仍然更优选的，对 VPAC2 的亲和力比对 VPAC1 和 / 或 PAC1 至少大 500 倍。更优选的，对 VPAC2 的亲和力比对 VPAC1 和 / 或 PAC1 的比值至少大 1000 倍。

[0395] 在本文中使用的“选择性 VPAC2 受体肽激动剂”还包括本文中描述的激动剂的可药用盐。本发明的选择性 VPAC2 受体肽激动剂可以具有足够的酸性、足够的碱性、或双官能基团，相应的与任意数目的无机碱，和无机和有机酸反应，从而形成盐。一般用于形成酸加成盐的酸是无机酸例如盐酸、氢溴酸、氢碘酸、硫酸、磷酸等等，和有机酸例如对甲苯磺酸、甲磺酸、草酸、对溴苯-磺酸、碳酸、琥珀酸、柠檬酸、苯甲酸、乙酸、三氟乙酸等等。该类盐的实例包括硫酸盐、焦硫酸盐、硫酸氢盐、亚硫酸盐、亚硫酸氢盐、磷酸盐、磷酸一氢盐、磷酸二氢盐、偏磷酸盐、焦磷酸盐、氯化物、溴化物、碘化物、乙酸盐、丙酸盐、癸酸盐、辛酸盐、丙烯酸盐、甲酸盐、异丁酸盐、己酸盐、庚酸盐、丙炔酸盐、草酸盐、丙二酸盐、琥珀酸盐、辛二酸盐、癸二酸盐、延胡索酸盐、马来酸盐、丁炔-1,4-二酸盐、己炔-1,6-二酸盐、苯甲酸盐、氯苯甲酸盐、甲基苯甲酸盐、二硝基苯甲酸盐、羟基苯酸盐、甲氧基苯甲酸盐、邻苯二甲酸盐、磺酸盐、二甲苯磺酸盐、苯乙酸盐、苯基丙酸盐、苯基丁酸盐、柠檬酸盐、乳酸盐、 γ -羟基丁酸盐、甘醇酸盐、酒石酸盐、甲磺酸盐、丙磺酸盐、萘-1-磺酸盐、萘-2-磺酸盐、扁桃酸盐，等等。

[0396] 碱加成盐包括从无机碱衍生的，例如铵或碱金属或碱土金属氢氧化物、碳酸盐、碳酸氢盐，等等。可用于制备本发明的盐的这类碱因此包括氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化胺、碳酸钾，等等。

[0397] 本发明的选择性加入聚乙二醇的 VPAC2 受体肽激动剂优选的按药物组合物配制。可以使用的标准药物配制技术例如描述在 Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA 中。本发明的选择性加入聚乙二醇的 VPAC2 受体肽激动剂可以配制为通过口腔、局部、口服、经皮、鼻或肺途径施用，或者通过肠胃外施用。

[0398] 肠胃外施用可包括，例如全身施用如通过肌内、静脉内、皮下、真皮内或腹膜内注射。选择性加入聚乙二醇的 VPAC2 受体肽激动剂可以与作为药物组合物的一部分的可接受的药物载体、稀释剂或赋形剂一起联合向受试者施用，用于治疗 NIDDM 或以下讨论的疾病。药物组合物可以是溶液，或者如果肠胃外施用，是加入聚乙二醇的 VPAC2 受体肽激动剂的悬液或者加入聚乙二醇的 VPAC2 受体肽激动剂与二价金属阳离子例如锌复合的悬液。合适的药物载体可以包含惰性成分，其不与肽或肽衍生物相互作用。用于肠胃外施用的合适的药物载体包括，例如无菌水、生理盐水、制菌盐水（含有约 0.9% mg/ml 苯甲醇的盐水）、磷酸缓冲的盐溶液、Hank 溶液、Ringer- 乳酸盐等等。合适赋形剂的一些实例包括乳糖、葡萄糖、蔗糖、海藻糖、山梨醇和甘露醇。

[0399] 本发明的加入聚乙二醇的 VPAC2 受体肽激动剂可以配制成使血浆水平在延长的时间段中维持在有效范围内的施用。有效的口服肽药物递送的主要障碍是低下的生物利用率，这是由于酸和酶造成肽的降解、通过上皮膜的低吸收、以及在暴露于消化道内的酸性 pH 环境后肽转变为不可溶的形式。肽的口服递送系统例如本发明涵盖的那些是本领域已知的。例如，加入聚乙二醇的 VPAC2 受体肽激动剂可以用小球体包入胶囊然后口服递送。例如，可以将加入聚乙二醇的 VPAC2 受体肽激动剂包入到由商业上可获得的、生物相容的、生物可降解的聚合物组成的微球体中，多聚（交酯-共-乙交酯）-COOH 和橄榄油作为填充物（参见 Joseph 等人, Diabetologia 43:1319-1328 (2000)）。其它类型的微球体技术如来自奥克美斯公司 (Alkermes) 的 **Medisorb®** 和 **Prolease®** 生物可降解的聚合物也是可以商业获得的。 **Medisorb®** 多聚物可以用任意的交酯异构体产生。交酯：乙交酯的比

例可以在 0 : 100 和 100 : 0 之间变动, 允许产生宽范围的聚合物性质。这可用于设计具有范围在数周至数月的再吸收时间的递送系统和可植入装置。Emisphere 也已发表了多篇讨论肽和蛋白质的口服递送技术的文章。例如, 参见 Leone-bay 等人的 W095/28838, 其公开了由修饰的氨基酸组成的特殊载体, 用来促进吸收。

[0400] 本文中描述的选择性加入聚乙二醇的 VPAC2 受体肽激动剂可用于治疗具有多种疾病和病症的受试者。本发明涵盖的激动剂通过作用于受体, 指如 VPAC2 受体, 行使其生物学效应。因此可以用本发明的加入聚乙二醇的 VPAC2 激动剂治疗具有疾病和 / 或病症的受试者, 所述受试者对 VPAC2 受体刺激或 VPAC2 受体肽激动剂施用具有有利的反应。这类受试者是所谓的“需要用 VPAC2 激动剂治疗”或“需要 VPAC2 受体刺激”。

[0401] 本发明的选择性加入聚乙二醇的 VPAC2 受体肽激动剂可用于治疗糖尿病, 包括 1 型和 2 型糖尿病 (非胰岛素依赖型糖尿病或 NIDDM)。激动剂还可以用于治疗需要用 VPAC2 受体激动剂预防疗法的受试者, 例如有发展 NIDDM 的风险的受试者。该治疗还可以延迟糖尿病和糖尿病并发症的发作。其它可以用本发明的激动剂治疗的受试者包括那些患有葡萄糖耐量降低 (IGT) (糖尿病分类的专家委员会 (Expert Committee on Classification of Diabetes Mellitus), Diabetes Care 22 (增补 1) : S5, 1999) 或空腹葡萄糖异常 (IFG) (Charles 等人, Diabetes 40 : 796, 1991) 的受试者, 那些体重超过根据受试者身高和体格的正常体重约 25% 的受试者, 有一位或多位亲代患有 NIDDM 的受试者, 已患有妊娠糖尿病的受试者, 和患有由于例如降低的内源性胰岛素分泌造成的代谢疾病的受试者。选择性加入聚乙二醇的 VPAC2 受体肽激动剂可用于防止具有葡萄糖耐量降低的受试者继续发展 NIDDM, 防止胰腺 β -细胞衰退, 诱导 β -细胞增殖, 改善 β -细胞功能, 活化休眠的 β -细胞, 使细胞分化成 β -细胞, 刺激 β -细胞复制, 以及抑制 β -细胞凋亡。在本发明的方法中使用本发明的激动剂可以治疗或预防的其它疾病和病症包括: 青春晚期糖尿病 (MODY) (Herman 等人, Diabetes 43 : 40, 1994); 成人隐性自身免疫糖尿病 (LADA) (Zimmet 等人, Diabetes Med. 11 : 299, 1994); 妊娠糖尿病 (Metzger, Diabetes, 40 : 197, 1991); 代谢综合征 X、血脂异常、高血糖症、高胰岛素血症、高甘油三酯血症和抗胰岛素性。

[0402] 本发明的选择性加入聚乙二醇的 VPAC2 受体肽激动剂还可用于治疗糖尿病的继发性原因 (糖尿病分类专家委员会 (Expert Committee on Classification of Diabetes Mellitus), Diabetes Care 22 (增补 1) : S5, 1999)。该继发性原因包括糖皮质激素过多、生长激素过多、嗜铬细胞瘤和药物引起的糖尿病。可以引起糖尿病的药物包括但不限于, 吡甲硝苯脲、烟酸、糖皮质激素类、苯妥英、甲状腺素、 β -肾上腺素能药、 α -干扰素和用于治疗 HIV 感染的药物。

[0403] 本发明的选择性加入聚乙二醇的 VPAC2 受体肽激动剂在抑制食物摄取和治疗肥胖症中是有效的。

[0404] 本发明的选择性加入聚乙二醇的 VPAC2 受体肽激动剂也可在预防或治疗例如下述疾病中是有效的, 所述疾病例如动脉粥样硬化症、高脂血症、高胆固醇血症、低 HDL 水平、高血压、原发性肺动脉高压、心血管疾病 (包括动脉粥样硬化、冠心病和冠状动脉病)、脑血管病和外周血管病; 以及用于治疗狼疮、多囊性卵巢综合征、癌发生 (carcinogenesis), 和增生、雄性和雌性生殖问题、性功能障碍、溃疡、睡眠障碍、脂类和碳水化合物代谢障碍、生理节律功能障碍、生长障碍、能量内稳态障碍、免疫病包括自身免疫病 (例如, 系统性红斑

狼疮),以及急性和慢性炎症、类风湿性关节炎和败血症性休克。

[0405] 本发明的选择性加入聚乙二醇的 VPAC2 受体肽激动剂还可以用于治疗与以下相关的生理障碍:例如细胞分化产生脂类聚集细胞,调节例如异常胰腺 β -细胞功能、胰腺分泌肿瘤和/或自身免疫低血糖症所涉及的胰岛素灵敏度和血糖水平(其中所述低血糖症是由于对胰岛素的自身抗体、对胰岛素受体的自身抗体或对胰腺 β -细胞有刺激的自身抗体,导致形成粥样硬化斑块的巨噬细胞分化、炎症反应、癌发生、增生、脂肪细胞基因表达、脂肪细胞分化、胰腺 β -细胞量下降、胰岛素分泌、组织对胰岛素的灵敏度、脂肪肉瘤细胞生长、多囊性卵巢病、持续无排卵、雄激素增多症、孕酮产生、类固醇生成、细胞内的氧化还原电位和氧化应激、氧化氮合酶(NOS)产生、 γ -谷氨酰转肽酶增加、过氧化氢酶、血浆三酰甘油、HDL 和 LDL 胆固醇水平,等等。

[0406] 此外,本发明的选择性加入聚乙二醇的 VPAC2 受体肽激动剂可以用于治疗哮喘(Bolin 等人,Biopolymer 37:57-66(1995);美国专利号 5,677,419;显示多肽 R3P0 在松驰豚鼠气管平滑肌中起作用);低血压诱导(VIP 在哮喘患者中诱导低血压、心动过速和面潮红(Morice 等人,Peptides 7:279-280(1986);Morice 等人,Lancet 2:1225-1227(1983)));用于治疗雄性生殖问题(Siow 等人,Arch. Androl. 43(1):67-71(1999));作为抗凋亡/神经保护剂(Brenneman 等人,Ann. N. Y. Acad. Sci. 865:207-12(1998));在缺血事件中保护心脏(Kalfin 等人,J. Pharmacol. Exp. Ther. 1268(2):952-8(1994);Das 等人,Ann. N. Y. Acad. Sci. 865:297-308(1998));用于调控昼夜节律钟及其相关疾病(Hamar 等人,Cell 109:497-508(2002);Shen 等人,Proc. Natl. Acad. Sci. 97:11575-80,(2000));以及作为抗溃疡剂(Tuncel 等人,Ann. N. Y. Acad. Sci. 865:309-22,(1998))。

[0407] 选择性加入聚乙二醇的 VPAC2 受体肽激动剂的“有效量”是向需要 VPAC2 受体刺激的受试者施用,不引起不令人接受的副作用而获得需要的治疗和/或预防效果的量。“需要的治疗效应”包括一个或多个下列:1) 与疾病或病症相关的症状的改善;2) 延迟与疾病或病症相关的症状的发作;3) 与没有治疗相比延长的寿命;和 4) 与没有治疗相比更好的生活质量。例如,用于治疗 NIDDM 的加入聚乙二醇的 VPAC2 激动剂的“有效量”是与没有治疗相比,可获得对血糖浓度的更大控制的量,从而获得糖尿病并发症例如视网膜病、神经病或肾病发作的延迟。用于预防 NIDDM 的选择性加入聚乙二醇的 VPAC2 受体肽激动剂的“有效量”是与没有治疗相比,可以延迟血糖水平升高的发作的量,所述升高的血糖水平需要用抗低血糖药物如磺酰脲类、噻唑烷二酮类、胰岛素和/或氯苯呱哌嗪类(bisguanidines)治疗。

[0408] 施用给受试者的选择性加入聚乙二醇的 VPAC2 受体肽激动剂的“有效量”也取决于疾病的类型和严重程度,以及受试者的特征,例如一般健康、年龄、性别、体重和药物耐受性。有效的使患者血糖正常化的选择性加入聚乙二醇的 VPAC2 肽受体激动剂的剂量取决于多种因素,其中包括但不限于,受试者的性别、重量和年龄,不能调节血糖的严重程度,施途径和生物利用率,肽的药物动力学谱、效价和配方。

[0409] 本发明的选择性加入聚乙二醇的 VPAC2 受体肽激动剂的典型剂量范围从每日约 1 μ g 至每日约 5000 μ g。优选地,剂量范围从每日约 1 μ g 至每日约 2500 μ g,更优选的从每日约 1 μ g 至每日约 1000 μ g。甚至更优选的,剂量范围从每日约 5 μ g 至每日约 100 μ g。其它优选的剂量范围从每日约 10 μ g 至每日约 50 μ g。最优选的,剂量是每日约 20 μ g。

[0410] “受试者”是哺乳动物,优选的人类,但也可以是动物例如陪伴动物(例如,狗、猫,等等)、农场动物(例如,牛、羊、猪、马,等等)和实验室动物(例如,大鼠、小鼠、豚鼠,等等)。

[0411] 本发明的选择性加入聚乙二醇的 VPAC2 受体肽激动剂可以用固相肽合成技术的标准方法制备。肽合成仪是可以商业获得,例如 Rainin-PTISymphony 肽合成仪(Tucson, AZ)。固相合成的试剂是可商业获得的,例如从格莱科派普公司(Glycopep)(Chicago, IL)。固相肽合成仪可用于根据生产商说明书阻断干扰性基团,保护待反应的氨基酸、偶联、去偶联和将未反应氨基酸加帽。

[0412] 通常,在树脂上生长的肽链的 α -N- 保护氨基酸和 N 末端氨基酸是在室温、惰性溶剂偶联的,所述惰性溶剂例如在二甲基甲酰胺、N- 甲基吡咯烷酮或二氯甲烷,并有偶联剂(例如二环己基碳二亚胺和 1- 羟基苯并三唑)和碱(如二异丙基乙胺)的存在。 α -N- 保护基团是用试剂如三氟醋酸或哌啶从获得的肽树脂去掉的,并重复与下一个待添加到肽链上的需要的 N- 保护氨基酸的偶联反应。合适的胺保护基团是本领域普遍已知的,并描述在例如 Green 和 Wuts, “Protecting Groups in Organic Synthesis”, John Wiley 和 Sons, 1991 中。实例包括叔丁氧羰基(tBoc)和芴甲氧羰基(Fmoc)。

[0413] 选择性 VPAC2 受体肽激动剂还可以使用叔丁氧羰基-或芴甲氧羰基- α -氨基酸,在适当的侧链保护下用标准自动化固相合成规程合成。在完成合成后,可以通过 α -氨基基团与下述反应完成 N 末端修饰,所述例如(i) 活化酯(使用与上述相似的引入 α -N- 保护氨基酸的规程);(ii) 醛,在存在还原剂时(还原性氨基化步骤);和(iii) 胍基化试剂。然后,从固相支持物上切除肽,并同时用标准氟化氢方法或三氟醋酸(TFA)进行侧链去保护。然后,用在 VYDAC C18 柱上,使用 0.1% TEA 中的乙腈梯度的反相层析进一步纯化粗肽。为了去除乙腈,从含有 0.1% TEA、乙腈和水的溶液中冻干肽。通过分析反相层析验证纯度。通过质谱验证肽的特性(Identity of peptides)。肽可以溶于中性 pH 的含水缓冲液中。

[0414] 本发明的肽激动剂还可以用本领域已知的重组方法,使用真核和原核细胞宿主制备。

[0415] 一旦制备和纯化了肽,便在 Cys 或 Lys 残基,在 K(W) 或 $K(CO(CH_2)_2SH)$,或在羧基端氨基酸上共价的连接至少一个 PEG 分子进行修饰。本领域已经描述了多种方法生产共价缀合 PEG 的肽,并且本发明使用的特定方法并非意图进行限定(综述文章参见, Roberts, M. 等人 Advanced Drug Delivery Reviews, 54 :459-476, 2002)。

[0416] 可使用的 PEG 分子的实例是甲氧基-PEG2-MAL-40K, 分支的 PEG 马来酰亚胺(奈克塔公司(Nektar), Huntsville, Alabama)。其它实例包括但不限于大的 mPEG-SBA-20K(奈克塔公司(Nektar)), mPEG2-ALD-40K(奈克塔公司(Nektar)) 和甲氧基-PEG-MAL-30K(陶氏公司(Dow))。

[0417] PEG 的羧基端连接可以通过酶促偶联,使用重组 VPAC2 受体肽激动剂作为前体来连接,或者用本领域已知的替代方法例如描述在美国专利 4, 343, 898 或 Int'l. J. Pept. & Prot. Res. 43 :127-38(1994) 中。

[0418] 制备本发明的加入聚乙二醇的 VPAC2 受体肽激动剂的一个方法涉及 使用 PEG- 马来酰亚胺将 PEG 直接连接到肽的巯基上。可以通过添加或插入 Cys 或 hC 残基到肽的上述位置上或其中来实现巯基官能团的引入。还可以在肽的侧链上引入巯基官能团(例如,

用含有巯基的酸如巯基丙酸酰化赖氨酸的 ϵ -氨基基团)。本发明的加入聚乙二醇作用过程使用迈克尔加成 (Michael addition) 形成稳定的硫醚接头。反应是高度特异的并且在温和条件下在其它官能团存在时进行。PEG 马来酰亚胺作为反应聚合物用于制备定义明确的、生物活性的 PEG-蛋白质缀合物。优选的过程使用相对于 PEG 马来酰亚胺来说摩尔过量 (优选 1 至 10 摩尔过量) 的含有巯基的 VPAC2 受体肽激动剂来驱动反应完成。优选的在 pH4.0 和 9.0 之间室温实施反应 10 分钟至 40 小时。通过常规分离方法可方便的分离过量的未加入聚乙二醇的含有巯基的肽与加入聚乙二醇的产物。优选的用反相 HPLC 或大小排阻层析分离加入聚乙二醇的 VPAC2 受体肽激动剂。实施例 8 中提出了 VPAC2 受体肽激动剂的加入聚乙二醇作用需要的特定条件。可以用 PEG 马来酰亚胺或分支的 PEG 马来酰亚胺实施半胱氨酸加入聚乙二醇的作用。

[0419] 制备本发明的加入聚乙二醇的 VPAC2 受体肽激动剂的替代方法涉及使用 PEG-琥珀酰亚胺衍生物来向赖氨酸残基加入聚乙二醇。为了实现位点特异性加入聚乙二醇作用, 用 Arg 残基取代没有用于加入聚乙二醇的作用的 Lys 残基。

[0420] 加入聚乙二醇作用的另一个方法是通过 Pictet-Spengler 反应。将 PEG 分子掺入到 VPAC2 受体选择性肽上需要 Trp 残基及其游离胺。实现它的一种方法是在固相合成中, 通过酰胺键在 Lys 侧链的胺上, 位点特异性的引入 Trp 残基 (参见实施例 10)。

[0421] 本发明的多种优选的特征和实施方案仅通过参考下列附图以及实施例来描述, 其中: 附图 1 显示在葡萄糖注射前 24 小时用 P505 或 P525 处理的动物中对静脉内葡萄糖负荷 (glucose challenge) 的胰岛素反应的增强。载体处理的动物中的胰岛素反应显示作为参考。

[0422] 实施例 1- 通过固相 t-Boc 化学过程制备选择性 VPAC2 受体肽激动剂:

[0423] 将约 0.5-0.6 克 (0.38-0.45 毫摩尔) Boc Ser(Bzl)-PAM 树脂置于标准 60mL 反应容器中。在美国应用生物系统公司 (Applied Biosystems) ABI430A 肽合成仪上运行双偶联。

[0424] 从米德维斯特生物技术公司 (Midwest Biotech) (Fishers, IN) 获得下列的侧链保护氨基酸 (2 毫摩尔柱体 (cartridge) 的 Boc 氨基酸) 并用于合成:

[0425] Arg- 甲苯磺酰基 (TOS)、Asp- δ - 环己基酯 (OcHx)、Glu- δ - 环己基酯 (OcHx)、His- 苄氧基甲基 (BOM)、Lys-2- 氯苄氧基羰基 (2Cl-Z)、Ser-0- 二苄醚 (OBzl)、Thr-0- 二苄醚 (OBzl)、Trp- 甲酰基 (CHO) 和 Tyr-2- 溴苄氧基羰基 (2Br-Z)。

[0426] 三氟乙酸 (TFA)、二异丙基乙胺 (DIEA)、DMF 中的 0.5M 羟基苯并三唑 (HOBt) 和二氯甲烷中的 0.5M 二环己基碳二亚胺 (DCC) 是从 PE- 应用生物系统公司 (Applied Biosystems) (Foster City, CA) 购买的。二甲基甲酰胺 (DMF-Burdick 和 Jackson) 和二氯甲烷 (DCM-Mallinkrodt) 是从梅斯化学公司 (Mays Chemical Co.) (Indianapolis, IN) 购买的。

[0427] 使用都是用 DCC 形成的对称酐或 HOBt 酯实施标准双偶联。在合成完成后, 去掉 N 端 Boc 基团, 如果序列中存在 Trp, 用 DMF 中的 20% 哌啶处理肽基树脂从而对 Trp 侧链脱甲酰基化。为了酰化 N 端, 在肽树脂上加入 4 倍过量的相应酸的对称酐。用在 DCM 中二异丙基碳二亚胺 (DIC) 活化制备对称酐。将反应进行 4 小时并通过茚三酮检测监控。用 DCM 洗涤后, 将树脂转移到 TEFLON 反应容器并在真空中干燥。

[0428] 通过反应容器与 HF(氢氟酸)装置(潘尼苏拉实验室(Penninsula Laboratories))的接触进行切割。加入 1mL 间甲酚每克/树脂,并在预冷的容器中浓缩入 10mL HF(购自 AGA 公司,Indianapolis, IN)。如果存在甲硫氨酸,则加入 1mL DMS 每克树脂。反应在冰浴中搅拌 1 小时。真空去掉 HF。残渣悬浮在乙醚中。过滤固体并用乙醚洗涤。将每种肽抽提到含水乙酸中,并且冰冻干燥或者直接上样到反相柱上。

[0429] 在 2.2×25cm VYDAC C18 柱上和缓冲液 A(水中含 0.1% TFA)中进行纯化。在 HPLC(沃特氏公司(Waters))上以 10mL/分钟运行 20%至 90% B(乙腈中的 0.1% TFA)的梯度 120 分钟以上,同时在 280nm(4.0A) 监控 UV 并且收集一分钟级分。合并适当的级分,冷冻并冻干。用 HPLC(0.46×15cm METASIL AQ C18)和 MALDI 质谱分析干燥产物。

[0430] 实施例 2- 通过固相 Fmoc 化学过程制备选择性 VPAC2 受体肽激动剂:

[0431] 在每个反应容器中加入约 114mg(50 毫摩尔)Fmoc Ser(tBu)WANG 树脂(购自格莱科派普公司(Glycopep), Chicago, IL)。在 Rainin Symphony 肽合成仪上进行合成。用 75mg(50 微摩尔)Rink Amide AM 树脂(来普普利莫公司(Rapp Polymere.) Tuebingen, 德国)制备具有 C 末端酰胺的类似物。

[0432] 下列 Fmoc 氨基酸购自格莱科派普公司(Glycopep)(Chicago, IL)和诺华生物化学公司(NovaBiochem)(La Jolla, CA): Arg-2,2,4,6,7-五甲基二氢苯并呋喃-5-磺酰基(Pbf)、Asn-三苯甲基(Trt)、Asp-β-t-丁酯(tBu)、Glu-δ-t-丁酯(tBu)、Gln-三苯甲基(Trt)、His-三苯甲基(Trt)、Lys-t-叔丁氧羰基(Boc)、Ser-叔丁基醚(OtBu)、Thr-叔丁基醚(OtBu)、Trp-叔丁氧羰基(Boc)、Tyr-叔丁基醚(OtBu)。

[0433] 溶剂二甲基甲酰胺(DMF-Burdick 和 Jackson)、N-甲基吡咯烷酮(NMP-Burdick 和 Jackson)、二氯甲烷(DCM-Mallinkrodt)购自梅斯化学公司(Mays Chemical Co.)(Indianapolis, IN)。

[0434] 羟基苯并三唑(HOBt)、二异丙基碳二亚胺(DIC)、二异丙基乙胺(DIEA)和哌啶(Pip)购自阿尔德里克化学公司(Aldrich Chemical Co)(Milwaukee, WI)。

[0435] 所有的氨基酸都以 0.3M 溶解在 DMF 中。用 20% Pip/DMF 去保护 20 分钟后,进行三个小时 DIC/HOBt 活化偶联。在去保护和偶联后用 DMF 洗涤每个树脂。在最后的偶联和去保护后,用 DMC 洗涤肽基树脂并在真空的反应容器中干燥。为了 N 末端酰化作用,向肽树脂上加入 4 倍过量的相应酸的对称酐。通过在 DCM 中 DIC 活化制备对称酐。将反应进行 4 小时并用茚三酮检测监控。然后用 DCM 洗涤肽树脂并在真空中干燥。

[0436] 切割反应与切割混合物混合 2 小时,所述切割混合物由每 10mL TFA 的 0.2mL 苯硫基甲烷、0.2mL 甲醇和 0.4mL 三异丙基硅烷组成,以上均购自阿尔德里克化学公司(Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI)。如果序列中存在 Cys,则加入 2% 乙二硫醇。向 TFA 滤出物加入 40mL 乙醚。沉淀剂在 2000rpm 离心 2 分钟。倾去上清。将沉淀重悬在 40mL 乙醚中,再离心,再倾出,在氮气中干燥,然后真空干燥。

[0437] 0.3-0.6mg 的每种产物溶解在 1mL 0.1% TFA/乙腈(ACN)中,其中取 20μL 用 HPLC 分析[0.46×15cm METASIL AQ C18, 1mL/分钟, 45°C, 214nm(0.2A), A = 0.1% TFA, B = 0.1% TFA/50% ACN。梯度 = 50% B 至 90% B 30 分钟以上]。

[0438] 在 2.2×25cm VYDAC C18 柱上和缓冲液 A(水中的 0.1% TFA)中进行纯化。在 HPLC(沃特氏公司(Waters))上以 10mL/分钟运行 20%至 90% B(乙腈中的 0.1% TFA)的

梯度 120 分钟以上,同时在 280nm(4.0A) 监控 UV,并且收集一分钟级分。合并适当的级分,冷冻并冻干。用 HPLC(0.46×15cm METASIL AQ C18) 和 MALDI 质谱分析干燥产品。

[0439] P521

[0440] (C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQLAAbuAibOrnYAibQSIOrnOrnGGPSSGAPPPCC-NH₂) 的前体:用上述 FMoc 规程进行合成。通过分析 HPLC: $t_R = 10.9$ 分钟(HPLC 条件如上述),以及 MALDI-TOF:计算的 $m/z = 4290.0$,测量的 $m/z = 4290.8[M+H]^+$ 表征肽。用反相制备 HPLC 纯化后,合并并冻干纯级分:获得的最终冻干粉末为 14.8mg。

[0441] P525

[0442] (C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQLAAbuAibOrnYAibQAibIOrnOrnGGPSSGAPPPCC-NH₂) 的前体:如对 P521 前体的描述。分析 HPLC: $t_R = 11.0$ 分钟。MALDI-TOF:计算的 $m/z = 4288.0$,测量的 $m/z = 4288.8[M+H]^+$ 。获得的最终冻干粉末为 18.7mg。

[0443] P574

[0444] (C6-HSDAVFTEQY(OMe)TOrnLRAibQLAAbuAibOrnY(OMe)LQAibIOrnOrnGGPSSGAPPPCC-NH₂) 的前体:如对 P521 前体的描述。分析 HPLC: $t_R = 11.7$ 分钟。MALDI-TOF:计算的 $m/z = 4330.1$,测量的 $m/z = 4330.7[M+H]^+$ 。获得的最终冻干粉末为 46.2mg。

[0445] 实施例 3- 对人 VPAC2 受体的体外效价:

[0446] α 筛选:细胞在培养瓶中用 PBS 洗涤一次。然后用无酶的解离缓冲液漂洗细胞。移除解离的细胞。然后将细胞离心下来,并在刺激缓冲液中洗涤。对每一个数据点,使用 50,000 个悬浮在刺激缓冲液中的细胞。对于该缓冲液,加入 α 筛选受体微珠连同刺激物。孵育该混合物 60 分钟。加入裂解缓冲液和 α 筛选供体微珠,并将其孵育 60 至 120 分钟。在合适的仪器(例如,皮尔金艾尔莫公司(Perkin-Elmer)的 AlphaQuest)上读取 α 筛选信号(指示胞内 cAMP 水平)。包括 α 筛选供体和受体微珠的步骤在弱光下实施。从原始信号或基于绝对 cAMP 水平计算 cAMP 生成的 EC₅₀,所述绝对 cAMP 水平用在每块平板上实施的标准曲线确定。

[0447] 每种激动剂的结果都至少来自单次运行中进行的两次分析。对于一些激动剂,结果是一次以上运行的平均值。检测的肽浓度是:10000、1000、100、10、3、1、0.1、0.01、0.003、0.001、0.0001 和 0.00001nM。

[0448] DiscoverX:在测定的前一天,将稳定表达人 VPAC2 受体的 CHO-S 细胞系按 50,000 细胞/孔接种在 96 孔微量滴定板上。允许细胞在 200 μ L 培养基中贴壁 24 小时。在实验当天,去掉培养基。并且洗涤细胞两次。细胞在测定缓冲液加 IBMX 中室温孵育 15 分钟。然后,加入刺激物并溶解在测定缓冲液中。刺激物存在 30 分钟。然后,温和的去掉测定缓冲液。加入 DiscoverX cAMP 试剂盒的细胞裂解试剂。然后,使用生产商描述的用于显现 cAMP 信号的标准规程(迪斯卡 Rx 有限公司(DiscoverX Inc.),美国)。从原始信号或基于绝对 cAMP 水平计算 cAMP 生成的 EC₅₀ 值,所述绝对 cAMP 水平用在每块平板上实施的标准曲线确定。

[0449] 每种激动剂的结果都是两次独立运行的平均值。肽的一般检测浓度是:1000、300、100、10、1、0.3、0.1、0.01、0.001、0.0001 和 0nM。

[0450] 表 1 报道了不同测定模式的人 VPAC2 受体的活性(EC₅₀(nM))。

[0451] 表 1. 人 VPAC2 受体的肽效价

[0452]

激动剂 #	人 VPAC2 受体： α 筛选 (EC_{50} ;nM)	人 VPAC2 受体： DiscoveRx (EC_{50} ;nM)
VIP	1.0	0.7
PACAP-27	2.3	0.8
P410	128.8	
P417	14.7	
P451	68.6	
P454	59.9	
P460	430.2	
P470	83.3	
P472	123.3	
P473	26.5	
P475	109.3	
P478	49.9	
P483	33.5	
P485	44.5	
P490	115.6	
P492	509.6	
P495	116.7	
P497	176.1	
P499	57.7	
P501	130.9	
P503	146.8	
P505	40.5	
P507	27.1	
P509	13.0	
P511	7.6	
P513	28.9	
P517	7.5	
P519	30.3	
P521	22.1	
P523	5.8	
P525	25.0	
P529	170.5	
P531	94.6	
P533	2382.0	
P535	98.4	
P537	32.0	
P541	45.8	
P545	45.0	
P547	62.0	
P539	10.7	47.3
P543	84.2	8.9
P551	15.6	
P553	15.0	
P555	22.5	8.1
P557		108.3
P560	13.8	11.3
P562	30.2	24.2
P566	11.8	7.8

P568	128.6	
P570	13.4	4.5
P572	11.2	
P574	21.2	36.1
P576	55.0	
P578	205.3	
P580	10.9	
P582	20.3	
P584	51.2	
P586	122.4	
P588	54.0	
P590	4.1	
P602	42.1	7.2

[0453] 实施例 4- 选择性：

[0454] 结合测定：使用从稳定的 VPAC2 细胞系（参见实施例 3）或从瞬时转染人 VPAC1 或 PAC1 的细胞制备的膜。用 ^{125}I - 标记的 VIP 作为 VPAC1 和 VPAC2，以及 ^{125}I - 标记的 PACAP-27 作为 PAC1 的示踪物，实施滤膜结合试验。

[0455] 用于该测定的溶液和仪器包括：

[0456] 预浸液：蒸馏水中的 0.5% 聚乙烯胺

[0457] 用于冲洗滤板的缓冲液：25mM HEPES pH 7.4

[0458] 封闭缓冲液：25mM HEPES pH 7.4 ;0.2% 无蛋白酶 BSA

[0459] 测定缓冲液：25mM HEPES pH 7.4 ;0.5% 无蛋白酶 BSA

[0460] 稀释和测定平板：PS-Microplate, U 型

[0461] 滤板：Multiscreen FB Opaque 板；1.0 μM B 型 Glasfiber 滤膜

[0462] 为了制备滤板，用真空过滤吸去预浸液。平板用 200 μL 冲洗缓冲液冲洗两次。加入 200 μL 封闭缓冲液到滤板上。然后将滤板与 200 μL 预浸液在室温孵育 1 小时。

[0463] 在测定平板中装入 25 μL 测定缓冲液，25 μL (2.5 μg) 悬浮在测定缓冲液中的膜，25 μL 在测定缓冲液中的激动剂，和 25 μL 在测定缓冲液中的示踪物（约 40000cpm）。装好的平板振荡孵育 1 小时。

[0464] 进行从测定平板到滤板的转移。真空过滤吸去封闭缓冲液，并用冲洗缓冲液洗涤两次。从测定平板转移 90 μL 到滤板。吸去从测定平板转移的 90 μL ，并用 200 μL 冲洗缓冲液洗涤三次。去掉塑料支持物。在 60°C 干燥 1 小时。加入 30 μL Microscint。计数。

[0465] 表 2 中报道了人 VPAC2、VPAC1 和 PAC1 的受体结合 (IC_{50})。

[0466] 表 2

[0467]

激动剂 #	人 VPAC2 受体结 合 (IC50 ;nM)	人 VPAC1 受体结合 (IC50 ;nM)	人 PAC1 受体结合 (IC50 ;nM)
VIP	5. 1	3. 3	> 1000
PACAP-27	2. 6	4. 5	10. 2
P410	264. 4	> 25000	
P417	24. 1	> 25000	
P451	595. 7		
P454	36. 6	> 25000	
P460	914. 5	> 25000	
P470	262. 9		
P473	256. 4	> 25000	
P475	436. 0		

[0468]

P478	30. 0		
P483	37. 3	> 25000	
P485	17. 3		
P490	13. 2		
P492	156. 0		
P495	142. 1		

P497	146.0		
P499	34.0	> 25000	
P501	111.0		
P503	41.5		
P505	26.1	> 25000	> 25000
P509	11.2	> 25000	
P511	7.2	> 25000	> 25000
P513	50.5		
P517	3.7	> 25000	
P519	51.6		
P521	67.1		
P523	4.8		
P525	41.8	> 25000	> 25000
P529	192.4		
P531	69.7		
P533	959.0		
P535	145.4	> 25000	
P537	17.2	> 25000	> 25000
P539	13.5		
P541	59.8	> 25000	
P543	56.3		
P545	79.9	> 25000	> 25000
P547	5.6		
P551	16.6	> 25000	> 25000
P553	21.7	> 25000	> 25000
P555	15.4	> 25000	> 25000
P557	380.0		
P560	11.6		
P562	42.8	> 25000	> 25000
P566	8.2		
P570	4.1	> 25000	> 25000
P572	14.9	> 25000	> 25000
P574	32.3	> 25000	> 25000
P580	20.7	> 25000	> 25000
P582	48.3	> 25000	> 25000
P590	7.4	> 25000	> 25000
P602	28.0	> 25000	> 25000

[0469] 实施例 5- 大鼠 VPAC1 和 VPAC2 受体的体外效价；

[0470] DiscoverX :CHO-PO 细胞用可商业获得的转染试剂（英杰生命技术公司 (Invitrogen) 的 Lipofectamine) 瞬时转染大鼠 VPAC1 或 VPAC2 受体 DNA。细胞按 10,000/孔的密度接种在 96 孔平板中,并允许其在 200mL 培养基中生长 3 天。在第 3 天,实施检测。

[0471] 在实验当天,去掉培养基。并且洗涤细胞两次。细胞在测定缓冲液加 IBMX 中室温孵育 15 分钟。然后,加入刺激物并将其溶解在测定缓冲液中。刺激物存在 30 分钟。然后,温和的去掉测定缓冲液。加入 DiscoverX cAMP 试剂盒的细胞裂解试剂。然后,使用生产商描述的用于显现 cAMP 信号的标准规程（迪斯卡 Rx 公司 (DiscoverX Inc.),美国）。从原始信号或基于绝对 cAMP 水平计算 cAMP 生成的 EC₅₀ 值,所述绝对 cAMP 水平用在每块平板上实施的标准曲线确定。

[0472] 每种激动剂的结果都是两次独立运行的平均值。大鼠 VPAC1 和 VPAC2 的结果只

用 DiscoverX 测定产生。肽的一般检测浓度是：1000、300、100、10、1、0.3、0.1、0.01、0.001、0.0001 和 0nM。

[0473] 表 3 报道了大鼠 VPAC2 和 VPAC1 受体的活性 (EC_{50} (nM))。

[0474] 表 3。

[0475]

激动剂 #	大鼠 VPAC1 受体：DiscoverX： $(EC_{50};nM)$	大鼠 VPAC2 受体：DiscoverX： $(EC_{50};nM)$
VIP	0.01	0.6
P410	> 1000	318.5
P417	232.3	8.7
P454	1229.5	79.6
P460	> 1000	1163.1
P470	> 1000	110.9
P472	> 1000	284.6
P473	> 1000	25.5
P475	> 1000	220.4
P478	2053.8	120.1
P483	223.9	128.4
P485	734.9	42.5
P490	> 1000	191.8
P492	> 4000	962.7
P497	> 1000	344.7
P499	803.8	68.2
P501	> 1000	272.1
P503	> 4000	520.3
P505	639.4	42.6
P507	> 1000	94.9
P509	328.4	28.2
P511	61.9	13.9
P517	92.4	10.0
P521	602.4	33.1
P523	20.4	5.3
P525	1137.3	44.0
P529	1182.9	199.3
P531	300.7	69.9
P535	> 1000	317.6
P537	205.8	38.8
P539	32.6	21.0
P541	665.1	101.9
P543	355.0	101.1
P545	380.5	99.5
P547	76.2	149.8
P551	171.9	13.2
P553	261.8	22.0
P555	68.9	32.5
P557	581.1	397.2
P560	155.6	20.4
P562	393.4	52.5
P566	52.7	13.1
P568	> 1000	250.3

P570	86.7	21.3
P572	94.5	10.8
P574	162.9	33.8
P576	460.9	67.4
P578	269.4	305.6
P580	1.1	11.9
P582	137.4	31.0
P584	188.1	67.2
P586	501.6	186.8
P588	406.3	311.2
P590	245.0	6.9
P602	209.0	36.9

[0476] 实施例 6- 体内测定：

[0477] 静脉葡萄糖耐量试验 (IVGTT)：普通 Wistar 大鼠禁食过夜，并在实验前麻醉。将血液取样导管插入大鼠。一般在葡萄糖负荷前 24h 皮下给予激动剂。从颈动脉中取血样。在给予激动剂和葡萄糖注射之前立即取血样。在初始血样后，静脉内 (i. v.) 注射混合的葡萄糖。给予 0.5g/kg 体重的葡萄糖负荷，每 kg 体重注射总量 1.5mL 有葡萄糖和激动剂的载体。变动肽浓度按 $\mu\text{g/kg}$ 产生需要的剂量。在给予葡萄糖后的 2、4、6 和 10 分钟取血样。动物对照组接受只有葡萄糖但没有加入激动剂的相同载体。在一些实例中，取 20 和 30 分钟的葡萄糖后血样。在血样中加入抑酶肽 (250–500kIU/ml 血)。然后用标准方法分析血浆的葡萄糖和胰岛素。

[0478] 使用使用储存在 PBS 中的配制和校准的肽。一般，该储液是预稀释的 100 μM 储液。但是，使用的是具有每 mL 约 1mg 激动剂的更浓缩的储液。特定浓度一般是已知的。最大反应中的变异性最主要是由于载体剂量的变异性。规程细节如下：

[0479]

物种 / 品系 / 体重	大鼠 /Wistar Unilever/ 约 275–300g
治疗时程	单剂量
给药体积 / 途径	1.5mL/kg/ 静脉内 (iv)
载体	水中的 8% PEG300、0.1% BSA
食物 / 水方案	大鼠在手术前禁食过夜。
生活状态参数	在测试结束时处死动物。
IVGTT：在每组大鼠上实施 (具有两根导管，颈静脉和颈动脉)，戊巴比妥麻醉。	葡萄糖静脉内推注：在时间 = 0 时作为 10% 溶液 (5mL/kg) 的 500mg/kg。化合物静脉内 (iv)：在葡萄糖血液取样前 0–240 分钟 (从颈动脉取 300 μL ；EDTA 作为抗凝剂；抑酶肽和 PMSF 作为抗蛋白水解物；置于冰上)；0、2、4、6 和 10、20 和 30 分钟。确定的参数：胰岛素 + 葡萄糖
毒物动力学	在胰岛素测量后剩余的血浆样品保存在 -20°C 并确定化合物水平。

[0480] 表 4a

[0481]

激动剂 #	葡萄糖 & 化合物间的 时间	%增加 AUC；剂量 = 0.09 mg/kg	%增加 AUC；剂量 = 0.1mg/kg	%增加 AUC；剂量 = 0.3mg/kg
P505	24h		12	74
P511	24h		38	59
P525	24h		72	208
P570	24h		36	
P602	24h	73		198

[0482] AUC = 曲线下面积 (胰岛素, 葡萄糖后 0-10 分钟)

[0483] 加入聚乙二醇的肽的药物动力学谱: 将健康的 Fisher 344 大鼠 (每组 3 只动物) 注射 100 μ g 激动剂 /kg (激动剂量基于肽含量并溶于 PBS 缓冲液)。在给药后 3、12、24、48、72、96 和 168 小时取血样, 用直接针对肽的 N 末端的放射免疫测定 (RIA) 分析血浆中的肽含量。然后用模型非依赖性方法计算 PK 参数 (WinNonlin Pro, 法赛特公司 (Pharsight Corp.), Mountain View, CA, USA)。

[0484] 表 4b. 加入聚乙二醇的肽激动剂的 PK 参数。N = 3 的平均值和 (SD) 值。

[0485]

激动剂#	Cmax (ng/mL)	Tmax (h)	AUC _{0-last} (ng*h/mL)	T1/2 (h)	Cl/F (mL/h/kg)	Vd/F (mL/kg)
P499	132 (9)	24 (<1)	6650 (1294)	25 (5)	15 (2)	529 (85)
P505	160 (30)	12 (<1)	7006 (890)	22 (5)	13 (1)	425 (116)
P511	100 (16)	16 (7)	3067 (374)	NC NC	NC NC	NC NC
P521	233 (29)	12 (<1)	7633 (1871)	19 (6)	13 (3)	380 (208)
P525	133 (21)	16 (7)	4740 (486)	22 (3)	20 (2)	642 (126)
P539	102 (16)	24 (<1)	4013 (511)	15 (2)	25 (3)	540 (129)
P545	139 (48)	72 (42)	12737 (2492)	43 (5)	7 (2)	457 (66)
P555	102 (9)	16 (7)	4918 (597)	13 (1)	20 (3)	389 (65)
P562	120 (67)	24 (21)	5456 (2157)	25 (7)	19 (6)	673 (315)
P570	71 (34)	20 (7)	3891 (1309)	25 (4)	25 (7)	877 (326)
P574	70 (6)	20 (7)	3408 (312)	18 (2)	28 (2)	727 (71)

[0486] *NC = 由于数据不充分未计算

[0487] 实施例 7- 大鼠血清的稳定性研究：

[0488] 为了确定 VPAC2 受体肽激动剂在大鼠血清中的稳定性, 获得了 CHO-VPAC2 细胞克隆 #6 (96 孔平板 /50,000 细胞 / 孔, 培养 1 天)、PBS1× (Gibco)、在 100 μM 储液中的用于分析的肽, 处死的普通 Wistar 大鼠的大鼠血清、抑酶肽和 DiscoverX 测定试剂盒。在使用前将大鼠血清储存在 4℃ 并在两周内使用。

[0489] 在第 0 天, 制备两份 100 μL 等分试样的大鼠血清中的 10 μM 肽, 通过对于每个等分试样在 90 μL 大鼠血清中加入 10 μL 肽储液。在这些等分试样之一中加入 250kIU 抑酶肽 /mL。有抑酶肽时等分试样储存在 4℃。没有抑肽酶时等分试样储存在 37℃。将等分试样孵育 24 或 72 小时。

[0490] 在第 1 天, 将第 0 天制备的等分试样孵育 24 或 72 小时后, 制备含有 PBS+1.3mM CaCl₂、1.2mM MgCl₂、2mM 葡萄糖和 0.25mM IBMX 的孵育缓冲液。对于每种研究的肽, 制备装有 11 个连续 5× 稀释的肽 (对于 4℃ 和 37℃ 等分试样)。如果初步筛选 (参见实施例 3) 中肽的 EC₅₀ 大于 1nM, 使用 2000nM 作为最大浓度, 如果肽的 EC₅₀ 低于 1nM, 使用 1000nM 作为最大浓度。带有细胞的平板用孵育缓冲液洗涤两次。允许平板每孔维持 50 μL 孵育培养基 15 分钟。从平板向细胞转移每孔 50 μL 溶液, 使用初步筛选提示的最大浓度, 一式两份, 所述平板是制备的, 其对每种所研究肽的 4℃ 和 37℃ 等分试样, 具有 11 个连续 5× 稀释的肽。该步骤将肽浓度稀释了一倍。细胞在室温孵育 30 分钟。去掉上清。加入 40 μL / 孔的 DiscoverX 抗体 / 抽提缓冲液。细胞在振荡器 (300rpm) 上孵育 1 小时。然后进行 DiscoverX 试剂盒的普通程序。在柱 12 中包括 cAMP 标准物。从 cAMP 测定数据确定 EC₅₀ 值。通过公式 EC_{50,4℃} / EC_{50,37℃} 估计每种条件的活性肽的剩余量。

[0491] 表 537℃ 大鼠血清中 24h 或 72h 后估计的肽稳定性

[0492]

激动剂 #	24 小时稳定性 (stab) (%)	72 小时稳定性 (%)
VIP	0.2	
P417	265	
P472	66	
P473	86	
P475	61	
P478	34	
P483	22	
P485	65	
P492	131	
P503	174	
P505	133	161
P521		294
P523		281
P525	298	353
P529		119
P543	119	
P539	123	
P555	117	
P557	131	
P560	192	

P562	213	
P566	152	
P574	288	
P602	573	

[0493] ¹ 值 > 100% 可代表从 PEG 缀合物释放完整的肽

[0494] 实施例 8- 使用硫羟基化学过程的选择性 VPAC2 受体肽激动剂的加入聚乙二醇作用：

[0495] 一般在允许硫醚键形成的条件下进行加入聚乙二醇的反应。特别的，溶液的 pH 范围在约 4 至 9 之间，含有硫羟基的肽的浓度范围在 PEG 马来酰亚胺浓度的 0.7 至 10 摩尔过量之间。一般在室温下进行加入聚乙二醇的作用。然后用反相 HPLC 或大小排阻层析 (SEC) 分离加入聚乙二醇的 VPAC2 受体肽激动剂。用分析 RP-HPLC、HPLC-SEC、SDS-PAGE 和 / 或 MALDI 质谱描述加入聚乙二醇的肽激动剂的特征。

[0496] 一般通过在一端或两端添加半胱氨酸或高半胱氨酸或含有硫羟基的部分，或者通过在序列中插入半胱氨酸或高半胱氨酸或含有硫羟基的部分来 将硫羟基官能团引入到选择性 VPAC2 受体肽激动剂中或其上。含有硫羟基的 VPAC2 受体肽激动剂通过硫醚键与 40kDa、30kDa 或 20kDa 的 PEG 马来酰亚胺反应生产与 PEG 通过硫醚键共价连接的衍生物。

[0497] P505 的合成

[0498] 将 19mg 肽前体（未加入聚乙二醇的 P505）和 162mg 平均分子量为 20,000 道尔顿的甲氧基 -PEG- 马来酰亚胺 (NOF, 日本) 溶解在 2mL 含有 10mM EDTA (pH6.8) 的 100mM NH₄Ac 缓冲液中，使反应进行 4 小时。在制备 RP-HPLC 纯化后，获得 97mg 冻干粉末产品。用 RP-HPLC 和大小排阻 HPLC 描述加入聚乙二醇的肽激动剂的特征，并检测其体外活性。

[0499] P525 的合成

[0500] 18.7mg 肽前体（未加入聚乙二醇的 P525）和 157mg 平均分子量为 20,000 道尔顿的甲氧基 -PEG- 马来酰亚胺溶解在 2mL 含有 10mM EDTA (pH6.8) 的 100mM NH₄Ac 缓冲液中，使反应进行 4 小时。在制备 RP-HPLC 纯化后，获得 114mg 冻干粉末产品。用 RP-HPLC 和大小排阻 HPLC 描述加入聚乙二醇的肽激动剂的特征，并检测其体外活性。

[0501] P572 的合成

[0502] 22.3mg 肽前体（未加入聚乙二醇的 P572）和 177mg 平均分子量为 20,000 道尔顿的甲氧基 -PEG- 马来酰亚胺溶解在 2mL 含有 10mM EDTA (pH6.8) 的 100mM NH₄Ac 缓冲液中，使反应进行 4 小时。在制备 RP-HPLC 纯化后，获得 137mg 冻干粉末产品。用 RP-HPLC 和大小排阻 HPLC 描述加入聚乙二醇的受体肽激动剂的特征，并检测其体外活性。

[0503] P574 的合成

[0504] 31.9mg 肽前体（未加入聚乙二醇的 P574）和 283mg 平均分子量为 20,000 道尔顿的甲氧基 -PEG- 马来酰亚胺溶解在 3mL 含有 10mM EDTA (pH6.8) 的 100mM NH₄Ac 缓冲液中，使反应进行 4 小时。在两次运行制备 RP-HPLC 纯化后，获得 171mg 冻干粉末产品。用 RP-HPLC 和大小排阻 HPLC 描述加入聚乙二醇的肽激动剂的特征，并检测其体外活性。

[0505] P602 的合成

[0506] 20mg 肽前体（未加入聚乙二醇的 P602）和 223mg 平均分子量为 30,000 道尔顿的甲氧基 - 聚（乙二醇）马来酰亚胺 - 丙酰胺（凯罗技术公司 (ChirotechTechnology Ltd.)，英国）溶解在 2mL 含有 10mM EDTA (pH6.8) 的 100mM NH₄Ac 缓冲液中，使反应进行 4 小时。在

制备 RP-HPLC 纯化后,获得 132mg 冻干粉末产品。用 RP-HPLC 和大小排阻 HPLC 描述加入聚乙二醇的肽激动剂的特征,并检测其体外活性。

[0507] 实施例 9- 通过酰化赖氨酸侧链的加入聚乙二醇作用

[0508] 为了实现选择性 VPAC2 受体肽激动剂的位点特异性加入聚乙二醇作用,将除了计划加入聚乙二醇的赖氨酸残基以外的所有 Lys 残基都转变成 Arg 残基。PEG 分子可使用 mPEG-SBA-20K(奈克塔公司 (Nektar),批号:PT-04E-11)。优选的在室温下进行加入聚乙二醇反应 2-3 小时。用制备 HPLC 纯化肽。

[0509] 实施例 10- 通过 Pictet-Spengler 反应的加入聚乙二醇作用

[0510] 为了进行通过 Pictet-Spengler 反应的加入聚乙二醇作用,需要具有其游离胺的 Trp 残基将 PEG 分子掺入到选择性 VPAC2 受体肽激动剂上。将 Trp 残基偶联到 Lys 残基的侧链上。深入的 SAR 表示该修饰没有改变亲本肽在其体外效价和选择性上的性质。

[0511] 反应使用具有功能性醛的 PEG,例如 mPEG2-BUTYRALD-40K(奈克塔公司 (Nektar), USA)。位点特异性的加入聚乙二醇的作用涉及在 PEG 和肽之间形成四咪啉环。加入聚乙二醇的作用在冰醋酸中室温进行 1 至 48 小时。反应使用 1 至 10 摩尔过量的 PEG 乙醛。在去掉醋酸后,通过制备 RP-HPLC 分离加入聚乙二醇的 VPAC2 受体肽激动剂。

[0512] P535 的合成

[0513] 27.7mg 肽前体(未加入聚乙二醇的 P535)和 590mgmPEG2-BUTYRALD-40K 溶解在 3mL 乙酸中,使反应进行 2 天。产物用制备 RP-HPLC 分离,产生 94mg 的加入聚乙二醇的肽激动剂冻干粉末。用 RP-HPLC 和大小排阻 HPLC 描述加入聚乙二醇的肽激动剂的特征,并检测其体外活性。

[0514] P557 的合成

[0515] 23mg 肽前体(未加入聚乙二醇的 P557)和 460mgmPEG2-BUTYRALD-40K 溶解在 3mL 乙酸中,使反应进行 2 天。产物用制备 RP-HPLC 分离,产生 50mg 的加入聚乙二醇的肽激动剂冻干粉末。用 RP-HPLC 和大小排阻 HPLC 描述加入聚乙二醇的肽激动剂的特征,并检测其体外活性。

[0516] 本发明的其它改变对本领域技术人员是显而易见的,且不脱离本发明的范围。

IVGTT- 用不同剂量的 P505 和 P525 处理的禁食、清醒、插管的雄性 Wistar 大鼠

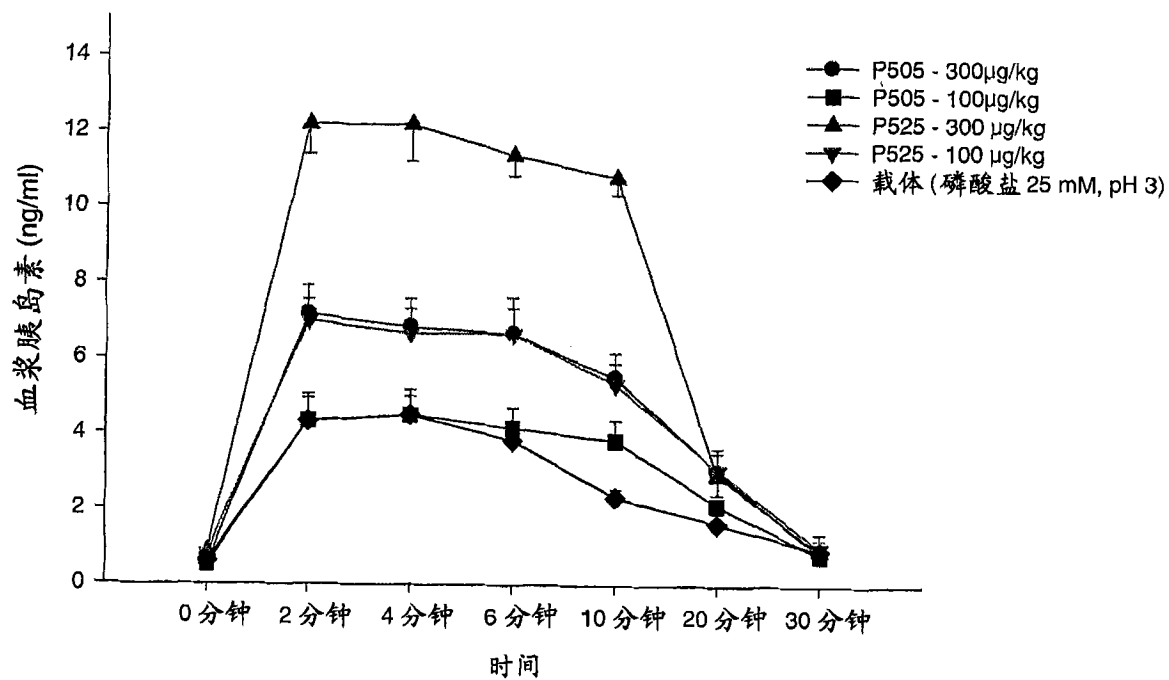


图 1. 在正常 Wistar 大鼠中 P505 和 P525 的促胰岛素活性。
在静脉内葡萄糖负荷之前 24 小时注射化合物