



(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 201632197 A

(43)公開日：中華民國 105 (2016) 年 09 月 16 日

(21)申請案號：105102112

(22)申請日：中華民國 105 (2016) 年 01 月 22 日

(51)Int. Cl. : A61K38/16 (2006.01)

A61K47/12 (2006.01)

A61K47/32 (2006.01)

A61K47/48 (2006.01)

(30)優先權：2015/01/23 美國

62/107,040

(71)申請人：諾華公司 (瑞士) NOVARTIS AG (CH)

瑞士

(72)發明人：肯特 艾倫 KANTER, AARON (US)；優瑟拉 愛咪 瑞察德森 USERA, AIMEE

RICHARDSON (US)；查克利 佛瑞德利克 ZECRI, FREDERIC (FR)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：15 項 圖式數：1 共 81 頁

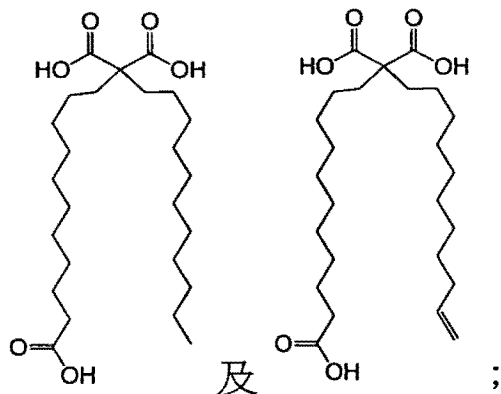
(54)名稱

具有改良半衰期之合成愛帕琳 (A P E L I N) 脂肪酸結合物

SYNTHETIC APELIN FATTY ACID CONJUGATES WITH IMPROVED HALF-LIFE

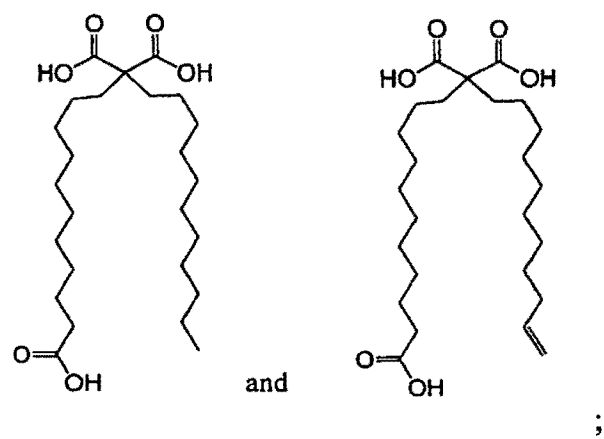
(57)摘要

本發明提供一種結合物或其醫藥學上可接受之鹽，其包含式 I 之合成多肽：Q-R-P-R-L-C*-H-K-G-P-(Nle)-C*-F(I)或其醯胺或酯；及脂肪酸，該脂肪酸選自：



其中該脂肪酸經由其中一個羧酸官能基，視情況經由聚乙二醇連接基團共價連接至該肽之 N 端；且其中用「*」標記之兩個半胱胺酸胺基在其側鏈之硫醇官能基之間形成二硫鍵。該等結合物為 APJ 受體之促效劑。本發明亦關於一種用於製造本發明結合物之方法，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)、心室性心動過速、動脈粥樣硬化、高血壓、再狹窄、缺血性心血管疾病、心肌症、心臟纖維化、心律不整、水滯留、糖尿病(包括妊娠性糖尿病)、肥胖症、周邊動脈疾病、腦血管事故、短暫性缺血性發作、創傷性腦損傷、肌肉萎縮性側索硬化、燒傷(包括曬傷)及先兆子癇。本發明進一步提供藥理學活性劑與醫藥組合物的組合。

The invention provides a conjugate, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, comprising a synthetic polypeptide of Formula I: Q-R-P-R-L-C*-H-K-G-P-(Nle)-C*-F (I) or a amide or ester thereof, and a fatty acid selected from:



wherein said fatty acid is covalently linked to the N-terminus of the peptide via one of its carboxylic acid functionality, optionally via a polyethylene glycol linker; and wherein the two cysteine amino acids labeled with “*” form a disulfide bond between the thiol functionalities of their side chain. The conjugates are agonist of the APJ receptor. The invention also relates to a method for manufacturing the conjugates of the invention, and its 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.

指定代表圖：

在皮下給藥之後，實例1及4之化合物的小鼠血漿曝露曲線

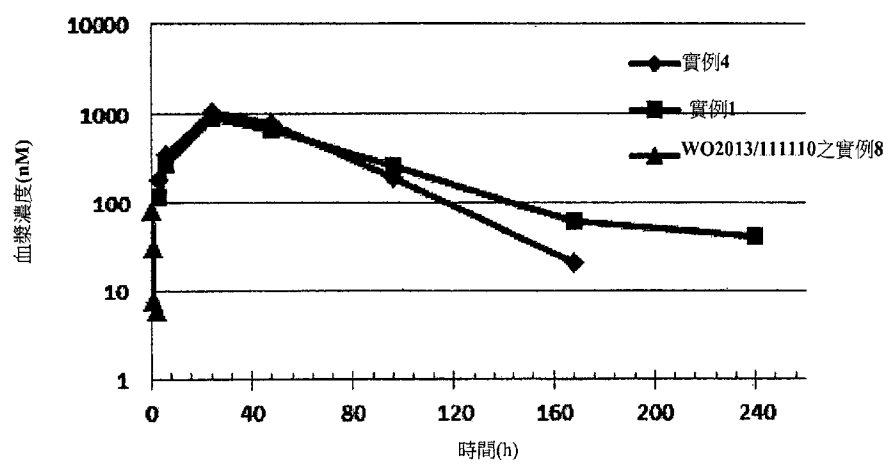
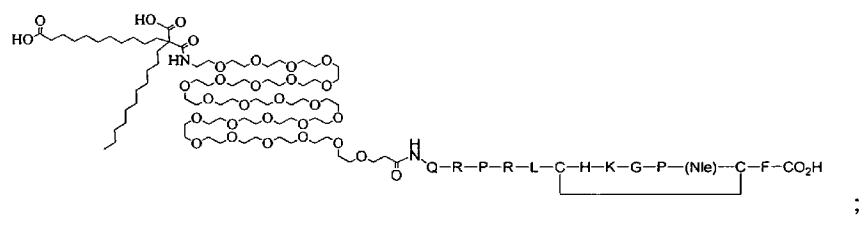
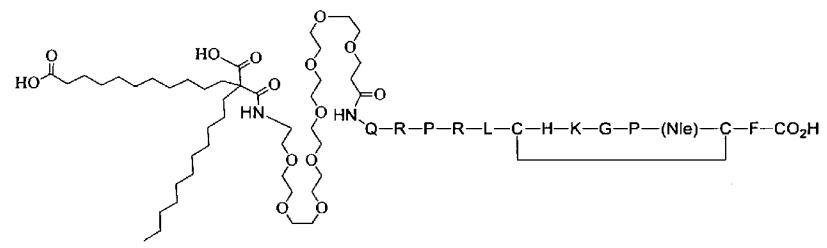


圖1

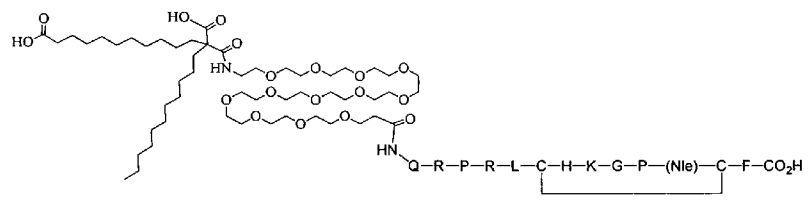
特徵化學式：



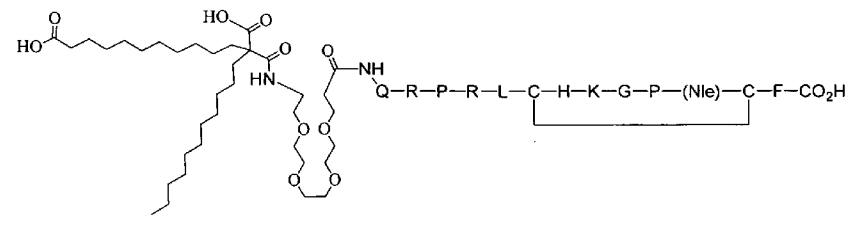
;



;



；及



發明摘要

※ 申請案號：105102112

※ 申請日：105. 1. 22

※IPC 分類：A61K ³⁸/₁₆ (2006.01)
A61K ⁴⁷/₁₂, ⁴⁷/₃₂, ⁴⁷/₄₈ (2006.01)

【發明名稱】

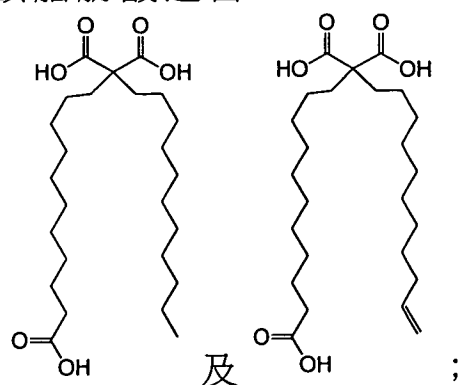
具有改良半衰期之合成愛帕琳(APELIN)脂肪酸結合物

SYNTHETIC APELIN FATTY ACID CONJUGATES WITH
IMPROVED HALF-LIFE

【中文】

本發明提供一種結合物或其醫藥學上可接受之鹽，其包含式I之合成多肽：

Q-R-P-R-L-C*-H-K-G-P-(Nle)-C*-F (I)或其鹽胺或酯；及脂肪酸，該脂肪酸選自：



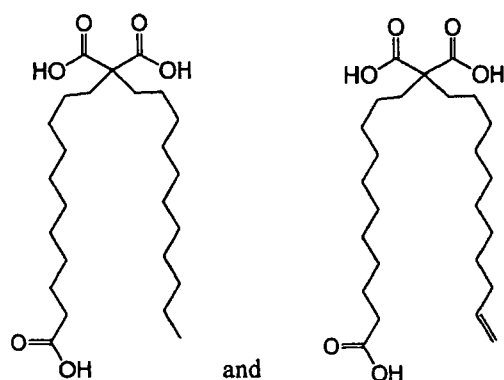
其中該脂肪酸經由其中一個羧酸官能基，視情況經由聚乙二醇連接基團共價連接至該肽之N端；且其中用「*」標記之兩個半胱氨酸胺基酸在其側鏈之硫醇官能基之間形成二硫鍵。該等結合物為APJ受體之促效劑。本發明亦關於一種用於製造本發明結合物之方法，及其治療性用途，諸如治療或預防急性失代償心臟衰竭(ADHF)、慢性心臟衰竭、肺高血壓、心房纖維性顫動、布魯加達症候群(Brugada syndrome)、心室性心動過速、動脈粥樣硬化、高血壓、再狹窄、缺

血性心血管疾病、心肌症、心臟纖維化、心律不整、水滯留、糖尿病(包括妊娠性糖尿病)、肥胖症、周邊動脈疾病、腦血管事故、短暫性缺血性發作、創傷性腦損傷、肌肉萎縮性側索硬化、燒傷(包括曬傷)及先兆子癇。本發明進一步提供藥理學活性劑與醫藥組合物的組合。

【英文】

The invention provides a conjugate, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, comprising a synthetic polypeptide of Formula I:

Q-R-P-R-L-C*-H-K-G-P-(Nle)-C*-F (I) or a amide or ester thereof; and a fatty acid selected from:



wherein said fatty acid is covalently linked to the N-terminus of the peptide via one of its carboxylic acid functionality, optionally via a polyethylene glycol linker; and wherein the two cysteine amino acids labeled with "*" form a disulfide bond between the thiol functionalities of their side chain. The conjugates are agonist of the APJ receptor. The invention also relates to a method for manufacturing the conjugates of the invention, and its 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.

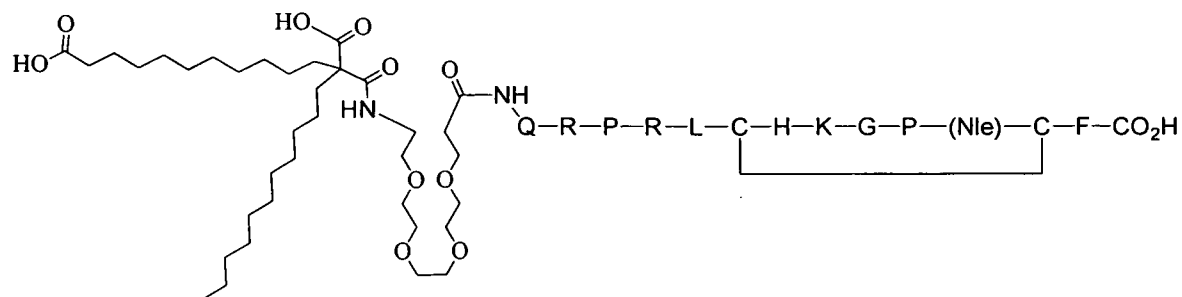
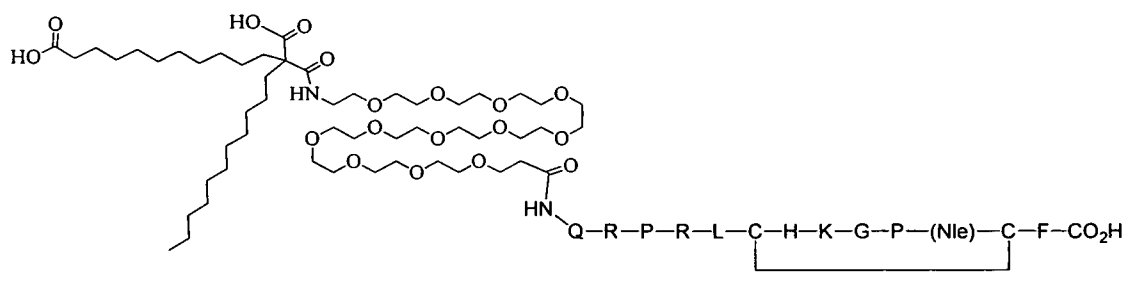
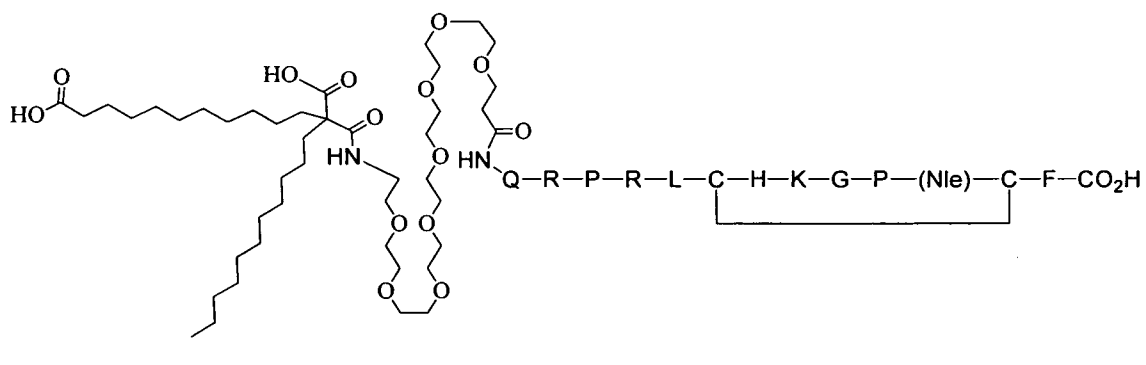
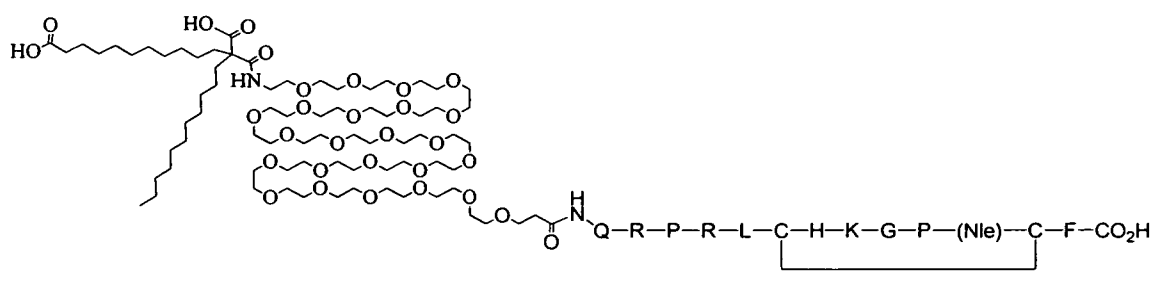
【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（1）圖。

【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】：



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】

具有改良半衰期之合成愛帕琳(APELIN)脂肪酸結合物
SYNTHETIC APELIN FATTY ACID CONJUGATES WITH
IMPROVED HALF-LIFE

【技術領域】

本發明係關於包含半合成生物分子之組合物，該等半合成生物分子為APJ促效劑多肽與脂肪酸部分之生物結合物。特定言之，本發明之生物結合物在保留APJ促效活性的同時，經由肽酶之作用而展現出相比於其對應的裸多肽及/或相比於先前所述之愛帕琳生物結合物而言，更大的抗蛋白水解性降解性。本發明另外關於製造該組合物及使用該等組合物作為醫藥活性劑治療心血管疾病的方法。

【先前技術】

在西方世界，心臟衰竭之發病率在大於65歲之成人中為約1/100。最常見病理為心肌收縮性及由此心輸出量(亦即隨時間推移，心臟之任一心室所排出之有效血液體積)方面存在慢性缺陷。患有慢性心臟衰竭之患者可具有代償能減退(亦即心臟不能維持足夠血液循環)之急性事件，其中心肌收縮性進一步降低。僅在美國每年就有約50萬例因「急性失代償心臟衰竭」(ADHF)而住院。

針對ADHF之現有療法包括利尿劑、血管擴張劑及促進心肌收縮劑，其直接提高心肌收縮性。現有靜脈內促進心肌收縮劑(多巴酚丁胺(dobutamine)、多巴胺(dopamine)、米利酮(milrinone)、左西孟旦(levosimendan))用於急性情況，儘管其與不良事件，諸如心律不整及提高之長期死亡率有關。此等可靠性已阻止了其在慢性心臟衰竭中之

S

應用。地高辛(Digoxin)為一種口服促進心肌收縮劑，但受較窄治療指數、提高之心律不整可能性及腎機能不全方面之禁忌症限制。

提高心肌收縮性而無心律不整或死亡缺陷之用於心臟衰竭之療法對於ADHF而言為迫切需要的，且亦可解決慢性心臟衰竭中大量未滿足的醫學需要。

愛帕琳為先前孤兒G-蛋白偶聯受體(GPCR)、APJ (亦稱為愛帕琳受體)、類血管收縮素1型受體、類血管收縮素II 1型受體及其類似物之內源性配位體。愛帕琳/APJ路徑廣泛地表現於心臟血管系統中，且愛帕琳在臨床前模型中已顯示出重大有益之心臟血管效應。人類中之急性愛帕琳投藥造成周邊及冠狀血管舒張且提高心輸出量(Circulation. 2010; 121:1818-1827)。因此，APJ促效作用正作為針對患有心臟衰竭之患者之重要治療目的而出現。據認為，愛帕琳受體APJ之活化可提高心肌收縮性且提供心臟保護，而無現有療法之缺陷。然而，天然愛帕琳在活體內展現出極短半衰期及作用持續時間。極短半衰期為傳遞此類治療性內源性肽公認的主要困難，因為經由肽酶作用而達成之血清清除率及蛋白水解性降解較快。

目前用於解決此缺點之一種方式為向患者投與大劑量之所關注的治療性肽，使得即使降解了一些治療性肽，仍足以保持治療上有效。然而，此方法使患者不舒適。因為大部分治療性肽無法經口投與，所以治療性肽將必須藉由靜脈內注射連續輸注、頻繁輸注或藉由不便之皮下注射途徑頻繁投與。對於頻繁投藥之需求亦產生多種具有不可接受的高的預計治療成本的潛在肽療法。大量經降解肽之存在亦會產生不當副作用。

投藥方面之不適及高成本為大部分具有吸引人之生物活性特徵之治療性肽不能開發作為候選藥物的兩個原因。

因此，一種延長肽之半衰期之方法為對治療性肽進行修飾，其

方式為使得其降解減緩同時仍維持生物活性。此類以合成方式修飾之多肽已在美國專利第8,673,848號(代理人案號PAT054961-US-NP)中有所描述。另一方法包括藉由使肽結合至一或多種可防止其經由腎臟消除之分子(諸如脂肪酸部分)來降低清除率。此類脂肪酸結合物之實例已在美國臨時申請案第62/082327號(PAT056274-US-PSP2)、美國專利申請案第14/336,290號(PAT055781-US-NP)及美國專利申請案第14/336,262號(PAT055418-US-NP)中有所描述。

然而，此類生物結合物可能仍然易受蛋白酶活性影響或可能活性不如其未結合之類似物。

因此，存在對具有提高之半衰期之經修飾治療性肽的需要，以便在活體內提供較長之作用持續時間，同時維持低毒性且保持經修飾肽之治療優勢。

【發明內容】

本發明係針對藉由修飾所關注的治療性肽或多肽(亦即APJ促效劑)來克服體內肽降解之問題。

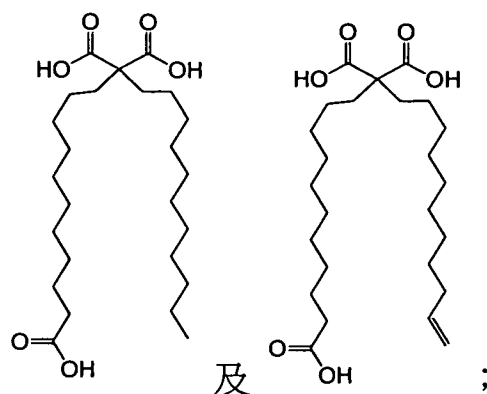
因此，本發明之目的為提供新穎結合物或其醫藥學上可接受之鹽，其包含a)具有下式(I)之肽：

a. 具有下式(I)之APJ促效劑肽：

Q-R-P-R-L-C*-H-K-G-P-(Nle)-C*-F (I)；或其鹽胺或酯，

或與其實質上等效之肽；其中用「*」標記之兩個半胱胺酸胺基酸在其側鏈之硫醇官能基之間形成二硫鍵；及

b. 脂肪酸，其選自：



其中該脂肪酸經由其中一個羧酸官能基，視情況經由聚乙二醇連接基團共價連接至該肽之N端。

在一個實施例中，本發明結合物具有以下優於野生型愛帕琳及/或優於裸(非結合)愛帕琳類似物(例如，Q-R-P-R-L-C*-H-K-G-P-(Nle)-C*-F)及/或由於其他先前所述之愛帕琳結合物之改良中之至少一者：半衰期延長；對投藥後及/或溶解後降解之免疫力較大；對APJ受體之促效活性較大。因此，本發明之愛帕琳結合物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況；及對APJ受體活性之活化有反應的病症及病況。

以上所列之式I胺基酸殘基中之任一者可以保守方式發生取代，其限制條件為本發明結合物仍然保留功能活性及結構性質(例如，半衰期延長、防止降解、構形限制)。可允許的保守胺基酸取代之原則及實例進一步解釋於本文中。

脂肪酸作為半衰期延長部分，以增強及/或不干擾本發明結合物之組成部分之生物功能的方式連接。例如，脂肪酸部分經由其中一個羧酸官能基連接至肽N端之胺基官能基(當不存在連接基團時)，形成醯胺鍵。或者，脂肪酸部分經由其中一個羧酸官能基連接至PEG連接基團之胺基官能基(當存在連接基團時)。

在一個實施例中，本發明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

的病症。在另一實施例中，本發明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)、心室性心動過速、動脈粥樣硬化、高血壓、再狹窄、缺血性心血管疾病、心肌症、心臟纖維化、心律不整、水滯留、糖尿病(包括妊娠性糖尿病)、肥胖症、周邊動脈疾病、腦血管事故、短暫性缺血性發作、創傷性腦損傷、肌肉萎縮性側索硬化、燒傷(包括曬傷)及先兆子癇。

在一較佳實施例中，本發明之愛帕琳結合物適用於治療急性失代償心臟衰竭(ADHF)。在另一較佳實施例中，愛帕琳結合物適用於治療慢性心臟衰竭。

在另一實施例中，本發明係關於一種用於治療需要此類治療之個體的對APJ受體之活化有反應之病症或疾病的方法，該方法包含：向個體投與有效量之本發明結合物，使得個體之對APJ受體之活化有反應的病症或疾病得以治療。

在另一實施例中，本發明係關於製造如本文中所述之結合物的方法。

在另一實施例中，本發明係關於醫藥組合物，其包含本發明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，其包括本發明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，該方法包含：向個體投與治療有效量之本發明結合物。

本發明之此等及其他態樣將在以下【實施方式】中加以說明。

【圖式簡單說明】

圖1表示在皮下給藥之後，實例1及4之化合物的小鼠血漿曝露曲

線。

【實施方式】

定義

出於解釋本說明書之目的，除非另外規定且在適當情況下，否則以下定義將適用，以單數形式使用之術語亦將包括複數且反之亦然。

如本文中所用，「對APJ受體之調節有反應的病症或疾病」、「對APJ之調節有反應的病症及病況」、「對APJ受體活性之調節有反應的病症及病況」、「對APJ受體活性之活化(或促效作用)有反應的病症」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、心室性心動過速、動脈粥樣硬化、高血壓、再狹窄、缺血性心血管疾病、心肌症、心臟纖維化、心律不整、水滯留、糖尿病(包括妊娠性糖尿病)、肥胖症、周邊動脈疾病、腦血管事故、短暫性缺血性發作、創傷性腦損傷、肌肉萎縮性側索硬化、燒傷(包括曬傷)及先兆子癇。

術語「APJ」(亦稱為「愛帕琳受體」、「類血管收縮素1型受體」、「類血管收縮素II 1型受體」及其類似者)表示具有380個殘基、7個跨膜結構域之Gi偶聯受體，其基因定位於人類中之染色體11之長臂上(NCBI參考序列：NP_005152.1，且由NCBI參考序列：NM_005161編碼)。APJ第一次在1993年使用簡併寡核苷酸引子自基因組人類DNA選殖(O'Dowd等人 Gene, 136:355-60, 1993)且與血管收縮素II受體1型共享顯著同源性。儘管有此同源性，然而，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將其命名為愛帕琳(Tatemoto等人，Biochem Biophys Res Commun 251, 471-6 (1998))。

如本文中所用，「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受體之「促效作用」，例如藉由投與本發明結合物。

術語「愛帕琳」表示具有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)，其經加工變成愛帕琳肽之生物學活性形式，諸如愛帕琳-36、愛帕琳-17、愛帕琳-16、愛帕琳-13、愛帕琳-12。全長成熟肽(稱為「愛帕琳-36」)包含36個胺基酸，但最有效之同功異型物為愛帕琳之13聚體(愛帕琳-13)之焦麩胺酸鹽化形式，稱為「Pyr-1-愛帕琳-13或Pyr¹-愛帕琳-13」。不同愛帕琳形式描述於例如美國專利6,492,324B1中。

術語「APJ促效劑肽」或「愛帕琳肽」可互換使用且包括如上文所定義之「愛帕琳」，其已經修飾以使降解降到最低且增強血清穩定性以及提供較佳發展概況。在某些實施例中，「APJ促效劑肽」或「愛帕琳肽」包括式(I)肽。

如本文中所用，術語「肽」或「多肽」可互換使用，其係指連接在一起之兩個或兩個以上胺基酸。使用此項技術中公認的三字母或單字母縮寫來表示構成本發明肽及多肽之胺基酸殘基。但當在前面冠以「D」時，該胺基酸為L-胺基酸。當單字母縮寫為大寫字母時，其係指L-胺基酸。當單字母縮寫為小寫字母時，其係指D-胺基酸。使用基團或字串或胺基酸縮寫來表示肽。表示肽時，左側為N端，且序列寫法為自N端至C端。

本發明肽含有非天然胺基酸(亦即，自然界中未出現之化合物)且或者可採用如此項技術中已知之其他胺基酸類似物。

某些非天然胺基酸可藉由描述於以下文獻中之技術引入：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。簡言之，此

等表現系統中之一些涉及定點突變誘發，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。隨後將此類表現載體引入可利用對所引入之無意義密碼子具有特異性之tRNA的宿主中，且饋入所選擇之非天然胺基酸。

一般熟習此項技術者應瞭解，可在本文中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)，而不會必然地降低其活性。如本文中所用，「通常以其取代物形式使用之胺基酸」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、天冬醯胺及麩醯胺酸。帶正電荷(鹼性)之胺基酸包括精胺酸、離胺酸及組胺酸。帶負電荷(酸性)之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-胺基酸取代其相應之D-胺基酸、用半胱胺酸取代高半胱胺酸或具有含硫醇側鏈之其他非天然胺基酸、用離胺酸取代高離胺酸、二胺基丁酸、二胺基丙酸、鳥胺酸或具有含胺基之側鏈之其他非天然胺基酸或用丙胺酸取代正纈胺酸或其類似物。

如本文中所用之術語「胺基酸」係指天然產生之胺基酸、以類似於天然產生之胺基酸之方式起作用的非天然胺基酸、胺基酸類似物及胺基酸擬似劑，若其結構允許D及L立體異構形式，則均呈其此類立體異構體形式。胺基酸在本文中可由其名稱、其通常已知之三字母符號或由IUPAC-IUB生物化學命名法委員會(Biochemical Nomenclature Commission)所推薦之單字母符號來提及。

術語「天然產生」係指該等物質存在於自然界中且無人為操縱。類似地，如本文中所用之「非天然產生」、「非天然」及其類似術語係指該物質不存在於自然界中或已經過人為結構修飾或合成。當結

合胺基酸使用時，術語「天然產生」係指20種習知胺基酸(亦即，丙胺酸(A或Ala)、半胱胺酸(C或Cy)、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)、麩醯胺酸(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))。

如本文中所用之術語「非天然胺基酸(non-natural amino acid/unnatural amino acid)」可互換使用，欲用以表示不能使用來自任何有機體之未經修飾或經修飾基因在任何有機體中以生物合成方式產生的胺基酸結構，不論相同或不同。該等術語係指不存在於天然產生之(野生型)愛帕琳蛋白質序列中之胺基酸殘基或本發明序列。此等物質包括(但不限於)不為20種天然產生之胺基酸、硒半胱胺酸、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中所描述)中之一者的經修飾胺基酸及/或胺基酸類似物。此類非天然胺基酸殘基可藉由取代天然產生之胺基酸及/或藉由將非天然胺基酸插入天然產生之(野生型)愛帕琳蛋白質序列或本發明序列中而引入。亦可併入非天然胺基酸殘基以便賦予愛帕琳分子所要功能，例如連接官能部分(例如PEG)之能力。當結合胺基酸使用時，如本文中所用之符號「U」將意指「非天然胺基酸(non-natural amino acid/unnatural amino acid)」。

此外，應理解，此類「非天然胺基酸」需要經修飾tRNA及經修飾tRNA合成酶(RS)以便併入蛋白質中。此等「所選擇之」正交tRNA/RS對藉由如Schultz等人開發之選擇方法或藉由隨機或靶向突變來產生。舉例而言，吡咯啉-羧基-離胺酸為一種「天然胺基酸」，因為其由自一種有機體轉移至宿主細胞中之基因以生物合成方式產生；

且因為其藉由使用天然tRNA及tRNA合成酶基因而併入蛋白質中，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年1月29日;125(4):935-9)為一種「非天然胺基酸」，因為儘管其以生物合成方式產生，但其藉由「經選擇之」正交tRNA/tRNA合成酶對而併入蛋白質中。

經修飾之經編碼胺基酸包括(但不限於)羧脯胺酸、 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、高脯胺酸、羧基離胺酸、別羧基離胺酸、3-羧基脯胺酸、4-羧基脯胺酸、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、奈胺、正纈胺酸、正白胺酸、鳥胺酸、戊基甘胺酸、哌啶甲酸及硫代脯胺酸。術語「胺基酸」亦包括作為某些生物體中之代謝物但未經用於併入蛋白質中之遺傳密碼編碼的天然產生之胺基酸。此類胺基酸包括(但不限於)鳥胺酸、D-鳥胺酸及D-精胺酸。

如本文中所用之術語「胺基酸類似物」係指具有與天然產生之胺基酸相同之基本化學結構的化合物，僅舉例而言，結合至氫、羧基、胺基及R基團之 α 碳。胺基酸類似物包括以化學方式可逆或不可逆地封端之天然及非天然胺基酸，或其C端羧基、其N端胺基及/或其側鏈官能基經化學修飾。此類類似物包括(但不限於)甲硫胺酸亞砷、甲硫胺酸砷、S-(羧甲基)-半胱胺酸、S-(羧甲基)-半胱胺酸亞砷、S-

(羧甲基)-半胱胺酸鹽、天冬胺酸-(β-甲酯)、N-乙基甘胺酸、丙胺酸羧鹽胺、高絲胺酸、正白胺酸及甲硫胺酸甲基鎂。

如本文中所用，術語「鹽胺」係指C端處之羧酸基團之鹽胺衍生物(例如， $-C(O)NH_2$ 、 $-C(O)NH-C_{1-6}$ 烷基、 $-C(O)NH-C_{1-2}$ 烷基苯基、 $-C(O)NH-NHBn$ 或 $-C(O)N(C_{1-6}烷基)_2$)。

術語「鹽胺」亦指N端處之胺基之衍生物(例如，脂肪酸之與愛帕琳肽之N端處之胺基官能基形成鹽胺鍵的-羧酸官能基)。

如本文中所用，術語「酯」係指C端處之羧酸基團之酯衍生物(例如 $-COOR$)，其中酯之R係指 C_{1-6} 烷基，諸如甲基、乙基、正丙基、異丙基、正丁基等； C_{3-8} 環烷基，諸如環戊基、環己基等； C_{6-10} 芳基，諸如苯基、 α -萘基等； C_{6-10} 芳基- C_{1-6} 烷基，例如苯基- C_{1-2} 烷基，諸如苯甲基、苯乙基、二苯甲基等，及 α -萘基- C_{1-2} 烷基，諸如 α -萘甲基，及其類似基團。亦可提及特戊鹽氧甲基酯及其類似物，其通常用作口服投藥的酯。當式I之APJ促效劑肽在除C端之外的位置處具有其他羧基或羧酸酯基團時，此類基團經鹽胺化或酯化之彼等多肽亦屬於本發明多肽之類別。在此類情況下，該等酯可例如為與上述C端酯相同種類之酯。

術語「結合物」及「生物結合物」可互換使用且欲指由APJ促效劑多肽或式I多肽與脂肪酸部分經由視情況選用之聚乙二醇(PEG)連接基團共價連接形成之實體。

術語「增加之半衰期」或「增加血清半衰期」或「延長半衰期」意謂經修飾之生物活性分子(例如愛帕琳13或類似物)相對於其未經修飾形式(或該肽之裸形式)而言，循環半衰期發生正向改變。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，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(例如愛帕琳13或其類似物)之血清半衰期，可確定血清半衰期或 $t_{1/2}$ 之相對增加量。增加量宜為至少約兩倍，但較小之增加量可為適用的。

本發明結合物

本文中描述本發明之各種實施例。應認識到，各實施例中指定之特徵可與其他指定特徵組合以提供其他實施例。

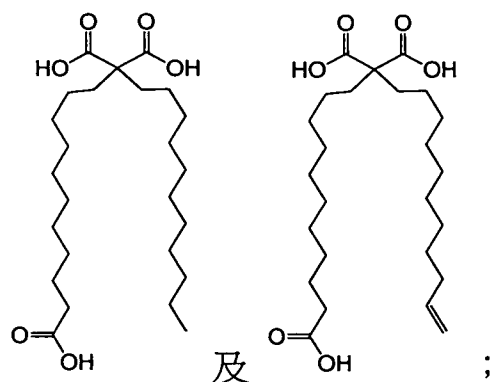
因此，在實施例1中，本發明提供一種結合物或其醫藥學上可接受之鹽，其包含

a. 具有下式(I)之APJ促效劑肽：

Q-R-P-R-L-C*-H-K-G-P-(Nle)-C*-F (I)；或其醯胺或酯，

或與其實質上等效之肽；其中用「*」標記之兩個半胱胺酸胺基在其側鏈之硫醇官能基之間形成二硫鍵；及

b. 脂肪酸，其選自：



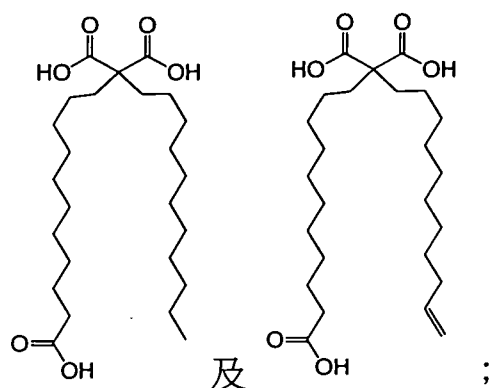
其中該脂肪酸經由其中一個羧酸官能基，視情況經由聚乙二醇連接基團共價連接至該肽之N端。

在實施例1A中，本發明係關於一種結合物或其醫藥學上可接受之鹽，其包含：

a. 具有下式(I)之APJ促效劑肽：

Q-R-P-R-L-C*-H-K-G-P-(Nle)-C*-F (I)；其中用「*」標記之兩個半胱胺酸胺基在其側鏈之硫醇官能基之間形成二硫鍵；及

b. 脂肪酸，其選自：

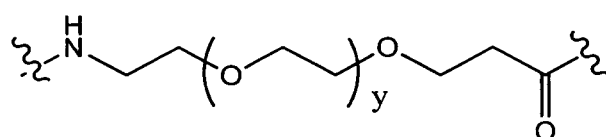


其中該脂肪酸經由其中一個羧酸官能基，視情況經由聚乙二醇連接基團共價連接至該肽之N端。

實施例1或1A中所述之脂肪酸已描述於美國臨時申請案第62/082327號(PAT056274-US-PSP2)中。

任何聚乙二醇連接基團為視情況選用的。連接基團在性質上為聚合物且為含有兩個反應基/官能基之聚乙二醇部分，該等反應基/官能基中之一者可與式I多肽反應且另一者可與脂肪酸部分反應。

在實施例2中，本發明係關於根據實施例1或1A之結合物，其中聚乙二醇(PEG)連接基團存在且具有式(III)：

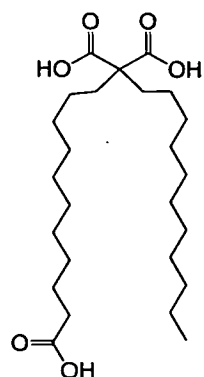


(III)，其中y為1至30，其中

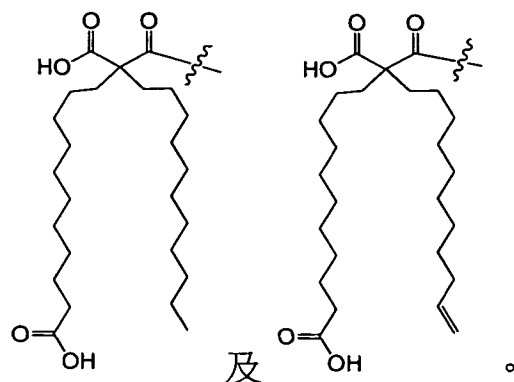
該PEG連接基團之羧基官能基與該式(I)肽之N端處之胺基官能基形成醯胺鍵且其中該PEG連接基團之胺基官能基與該脂肪酸之羧酸官能基中之一者形成醯胺鍵。

在實施例3中，本發明係關於根據實施例1、1A或2之結合物，其中聚乙二醇連接基團具有式(III)且y為2至25。

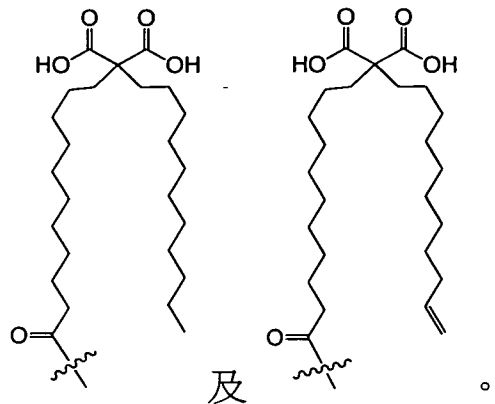
在實施例4中，本發明係關於根據前述實施例中任一者之結合物，其中該脂肪酸為：



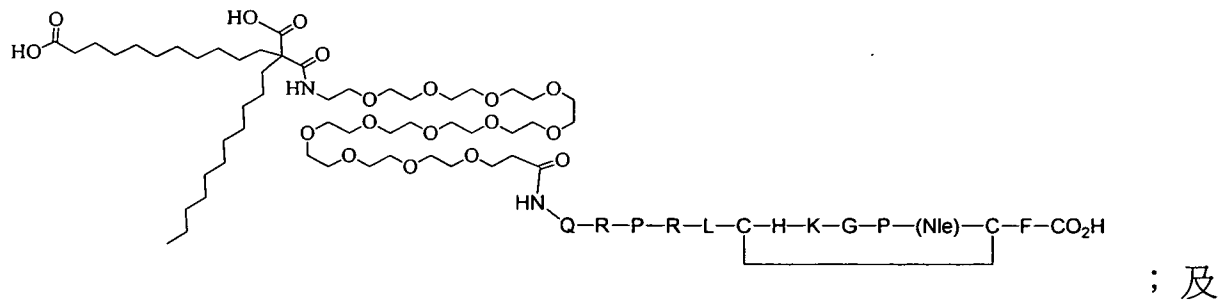
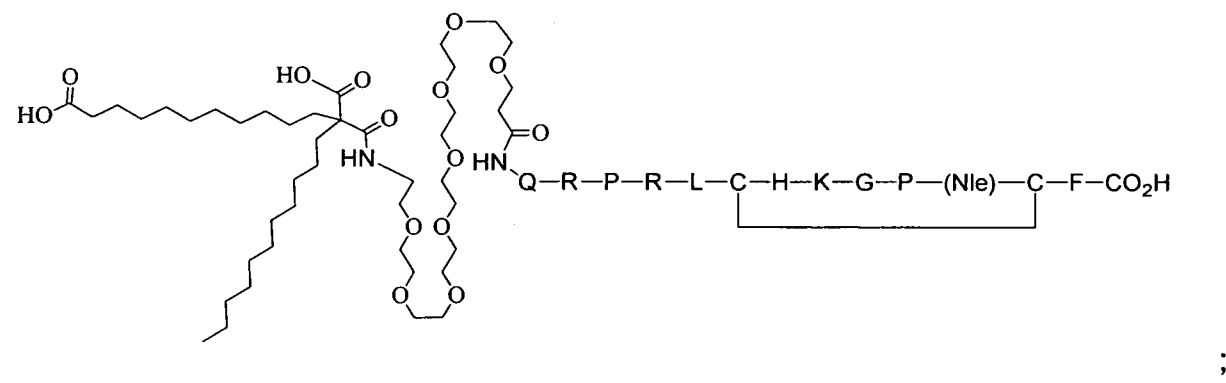
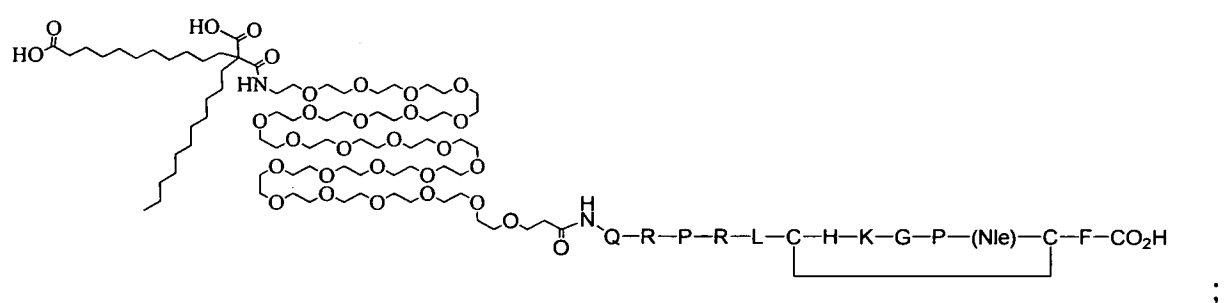
在實施例5中，本發明係關於根據前述實施例中任一者之結合物，其中該脂肪酸連接至PEG連接基團之胺基官能基，或若該PEG連接基團不存在，則該脂肪酸經由其偕位羧酸官能基中之一者連接至該肽N端之胺基官能基。此連接由下式表示，下式顯示與連接基團或與肽N端之連接點：

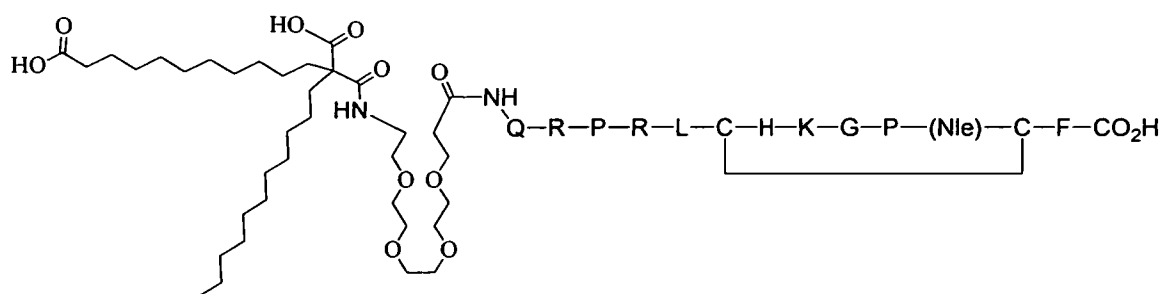


在實施例6中，本發明係關於根據實施例1至4中任一者之結合物，其中該脂肪酸連接至該PEG連接基團之胺基官能基，或若該PEG連接基團不存在，則該脂肪酸經由其末端羧酸官能基連接至該肽之胺基官能基。此連接由下式表示，下式顯示與連接基團或與肽N端之連接點：



在實施例7中，本發明係關於根據實施例1或1A之結合物，其選自以下：





;

或其醫藥學上可接受之鹽。

除非另外規定，否則術語「多肽」或「肽」、「APJ肽促效劑」及其類似術語係指式(I)之多肽或其醯胺、酯或醫藥學上可接受之鹽。

在實施例7A中，本發明結合物展現：1.相比於野生型愛帕琳、愛帕琳-13、pyr-1-愛帕琳-13及/或相應的式(I)之裸(非結合)愛帕琳肽或其類似物，實質上等效或改良之活性；及/或2.優於野生型愛帕琳、愛帕琳-13、pyr-1-愛帕琳-13及/或優於相應的式(I)之裸(非結合)愛帕琳肽或其類似物，改良之血漿穩定性。

在實施例7B中，本發明結合物展現：1.相比於美國專利申請第14/336,293號(PAT055781-US-NP)中所述之愛帕琳結合物及/或相比於美國申請案第14/336 262號(PAT055418-US-NP)中所述之愛帕琳脂肪酸結合物，實質上等效或改良之活性；及/或2.相比於愛帕琳結合物，更特定言之，相比於美國專利申請第14/336,293號(PAT055781-US-NP)中所述之愛帕琳結合物及/或相比於美國申請案第14/336 262號(PAT055418-US-NP)中所述之愛帕琳脂肪酸結合物，等效或改良之血漿穩定性。

在實施例7A及7B之一個態樣中，血漿穩定性改良為至少2倍。

在實施例7C中，本發明之脂肪酸結合物具有至少30分鐘之血漿穩定性。在另一實施例中，本發明之脂肪酸結合物具有至少60分鐘之血漿穩定性。在另一實施例中，本發明之脂肪酸結合物具有至少5 h，較佳至少10 h且更佳至少12 h之血漿穩定性。

在實施例7D中，本發明之愛帕琳脂肪酸結合物之 EC_{50} 小於400 nM。在另一實施例中，本發明之愛帕琳脂肪酸結合物之 EC_{50} 小於300 nM，較佳小於200 nM且更佳小於160 nM。在另一實施例中，本發明之愛帕琳脂肪酸結合物之 EC_{50} 小於100 nM。

本發明之愛帕琳脂肪酸結合物亦涵蓋與其實質上等效之愛帕琳脂肪酸結合物。本發明之愛帕琳脂肪酸結合物亦涵蓋含有與根據式I之肽或其醯胺、酯或鹽至少約95%一致之愛帕琳肽的結合物。

如本文中所用，短語「同源胺基酸序列」或其變異體係指以胺基酸水平方面至少某一指定百分比的同源性為特徵之序列，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且多肽具有相同結合及/或活性之彼等胺基酸序列。在一些實施例中，若胺基酸序列與比較物序列具有至少60%或大於60%、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物序列共享一或多個、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。

同源性亦可為在多肽含量上。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百分比計算為兩個序列比對時之精確匹配數除以「本發明序列」或「外來序列」之長度，無論哪個最短。結果以一致性百分比表示。

包含胺基酸序列與式I之胺基酸序列具有約80-99.9%、較佳90-99.9%之同源性的多肽且血漿穩定性優於愛帕琳-13及/或pyr-1-愛帕琳-13及/或相應的未結合肽的結合物屬於本發明結合物之類別。

儘管如此，活性程度相對於愛帕琳-13及/或pyr-1-愛帕琳-13及/或相應的未結合肽略微降低之結合物變異體仍可視為功能及生物變異體，但理想地，生物活性結合物具有相對於愛帕琳-13及/或pyr-1-愛

帕琳-13及/或相應的未結合肽而言類似或增強的生物性質。

術語「實質上等效」意謂受體結合活性、信號轉導活性及其類似活性之性質為等效的。因此，允許在諸如多肽之受體結合活性之強度及分子量之等級方面存在均等差異。

如本文中所述之多肽或藉由取代、缺失、添加或插入一或多個胺基酸而與其實質上等效之多肽可提及為含有在上述意義方面實質上等效之胺基酸序列的多肽。如本文中所述之多肽或藉由用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個胺基酸而與其實質上等效之多肽可提及為含有在上述意義方面實質上等效之胺基酸序列的多肽。形成二硫橋之2個半胱胺酸較佳不發生取代。其他修飾及更改可以包括用D-胺基酸替換L-胺基酸或其他變異，包括(但不限於)磷酸化、羧化、烷基化及其類似方法，只要包含此類肽之結合物之APJ促效活性得以維持且血漿穩定性優於愛帕琳-13之焦麩胺酸鹽化形式有所改良及/或優於相應的非結合肽有所改良即可。

製備式I之肽：

式I之愛帕琳肽可以藉由化學合成方法或藉由重組方法或兩種方法之組合製造。愛帕琳肽及/或肽-連接基團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。本發明肽可以藉由本身已知之肽合成程序製造。肽合成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製造：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，分離保護基，藉此可製造出所需肽。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)之組合純化及分離肽。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為適合鹽。反之，若經分離產物為鹽，則可藉由已知方法將其轉化為游離肽。

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、二苯甲胺樹脂、胺甲基樹脂、4-苯甲氧基苯甲醇樹脂、4-甲基二苯甲胺樹脂、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，且移除保護基，且若需要，形成二硫鍵以獲得目標多肽。

關於上文所提及之經保護胺基酸之縮合，可以使用各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'-(3-二甲基胺丙基)碳化二亞胺。關於用此類試劑活化，可以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⁵

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縮合的溶劑可恰當地選自己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°C至50°C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。若藉由採用寧海準反應(ninhydrin reaction)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足夠的縮合程度，則可用乙酸酐或乙醯咪唑使未反應之胺基乙醯化。

起始物質胺基酸之胺基保護基包括Z、Boc、第三戊氧基羰基、異冰片氧基羰基、4-甲氧基苯甲氧基羰基、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、二苯基磷硫基或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-硝基苯甲基、4-甲氧基苯甲基、4-氯苯甲基、苯甲醯甲基、苯甲氧基羰基肼基、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(例如苯甲醯基等)、苯甲氧基羰基及乙氧基羰基。適合於該醚化之基團包括苯甲基、四氫呋喃基及第三丁基。用於酪胺酸之酚系羥基之保護基包括Bzl、Cl₂-Bzl、2-硝基苯甲基、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、苯甲氧基甲基、Bum、Boc、Trt及Fmoc。

起始胺基酸之經活化羧基包括相應酸酐、疊氮化合物及活性

酯，例如與諸如五氯苯酚、2,4,5-三氯苯酚、2,4-二硝基苯酚、氰基甲基醇、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相應磷醯胺。

用於消除保護基之方法包括在催化劑(諸如鈀黑或鈀/碳)存在下使用氫氣進行催化還原；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進行酸處理；用二異丙基乙胺、三乙胺、哌啶、哌嗪進行鹼處理；用含在液態氨中之鈉金屬還原。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、苯酚、硫代苯甲醚、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團之2,4-二硝基苯基可藉由用硫酚處理來消除，而用於保護色胺酸之吡啶基團之甲醯基可藉由用稀氫氧化鈉溶液或稀氨水進行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。

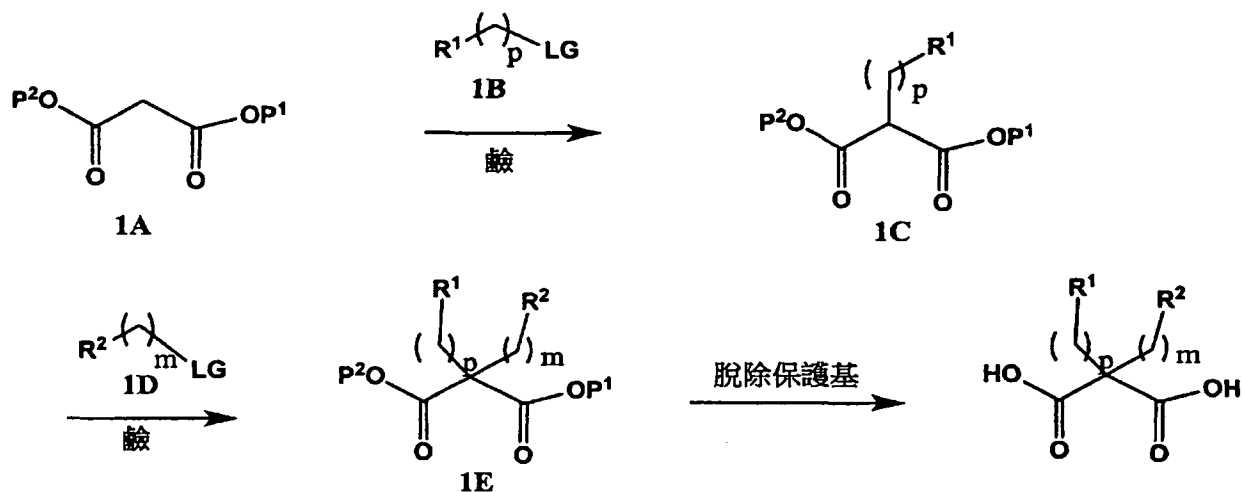
不應參與起始物質之反應之官能基的保護方法、可使用之保護基、保護基之移除方法及將參與反應之官能基的活化方法均可自己知基團及方法中明智地選擇。

獲得多肽之醯胺形式之另一種方法包含：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，且隨後選擇性地脫除將形成目標多肽之其餘部分之C端肽之 α -胺基及胺基酸或肽之 α -羧基的保護基，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描述的相同。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C端胺基酸之 α -羧基與所需醇縮合，得到胺基酸酯，且隨後進

行上述用於產生醯胺之程序。

合成脂肪酸部分

流程1描述根據實施例1之脂肪酸部分的合成。



流程1

其中 P^1 及 P^2 為羧酸保護基，諸如甲基、乙基、第三丁基、甲氧基、苄甲基、苄甲氧基、甲氧基甲基、甲硫基甲基、四氫吡喃基、苄甲醯甲基、N-鄰苯二甲醯亞胺、苄烯丙基、三苄甲基、9-蒎基、向陽基、三甲基矽烷基、第三丁基二甲基矽烷基或2-烷基-1,3-噁唑啉；其中 LG 為離去基，諸如鹵基(例如， Br 、 Cl 、 I)或三氟甲磺基氧基，且其中 R^1 為 CH_3 且 p 為10或 R^1 為 $CH=CH_2$ 且 p 為9且其中 m 為10且 R^2 為 CO_2H ；如實施例1中所述。

在鹼(例如，氫化鈉、碳酸鉀或鈉、氫氧化鈉、二異丙基胺基鋰、雙(三甲基矽烷基)胺基鈉、雙(三甲基矽烷基)胺基鉀、四甲基吡啶鋰、1,8-二氮雜環十一-7-烯、N,N-二異丙基乙胺或2,6-二第三丁基吡啶)存在下，在諸如DMF、THF或二甲基乙醯胺之溶劑中，用烷基化劑(**1B**)使經保護之丙二酸(**1A**)烷基化，產生經保護之二酸部分(**1C**)。

在如上所述之鹼性條件下，用烷基化劑(**1D**)使經保護之二酸部分(**1C**)經歷第二烷基化，以便獲得經二烷基化之經保護產物(**1E**)。根據

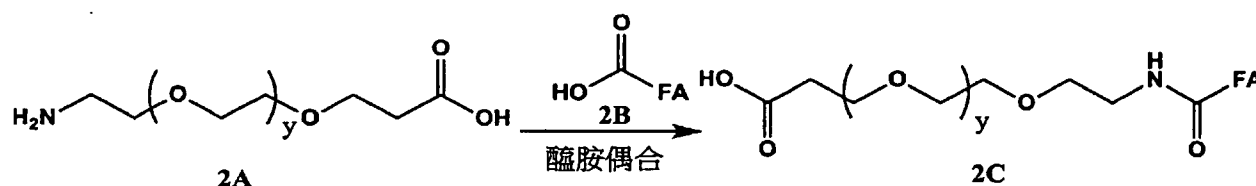
實施例1之脂肪酸藉由使用恰當的脫除保護基方法脫除保護基獲得。可施加標準方法，使用選自(但不限於)NaOH、KOH或LiOH之鹼或選自(但不限於)TFA、HCl或BCl₃之酸，使中間物(1E)水解。當P¹或P²為苯甲基或甲氧基苯甲基時，較佳的脫除保護基方法為在諸如(但不限於)鈦/碳之催化劑存在下氫化。

可以反轉兩個烷基化步驟之順序。另外，在R₂為CO₂H之情況下，可能需要在烷基化步驟之前保護此官能基。羧酸之保護基為此項技術中已知的(例如苯甲基)。

脂肪酸合成之更具體實例已描述於例如下文實驗部分中及臨時申請案第62/082327號(PAT056274-US-PSP2)中。

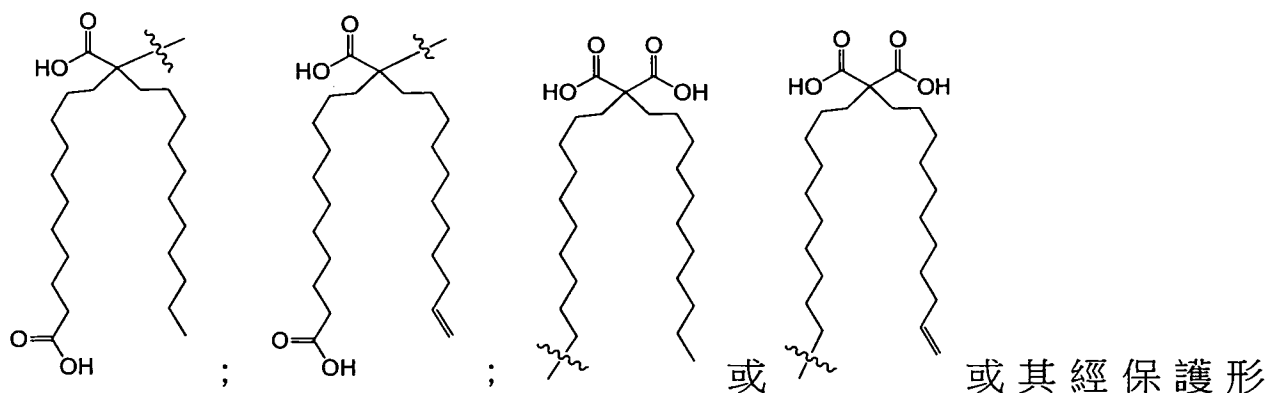
合成脂肪酸(FA)-PEG連接基團構築體：

流程2描述具有末端CO₂H官能基之脂肪酸-PEG連接基團構築體之合成。



流程2

其中FA為下式脂肪酸：



式，且y為1至30。羧酸之保護基已在上文流程1中加以描述。

可以使用肽縮合試劑，在存在或不存在諸如1-羥基苯并三唑、1-

經基-7-氮雜苯并三唑或二甲胺基吡啶之試劑的情況下，將脂肪酸(2B)連接至含PEG之連接基團(2A)，該等肽縮合試劑包括(但不限於)二環己基碳化二亞胺(DCC)、二異丙基碳化二亞胺(DIC)、1-乙基-3-(3-二甲基胺丙基)碳化二亞胺鹽酸鹽(EDC HCl)、六氟磷酸苯并三唑-1-基-氧基-參-吡咯啶基-鎘(PyBOP)或六氟磷酸苯并三唑-1-基-氧基-參-(二甲胺基)-鎘(BOP)。較佳地，使用NHS化學試劑將(2B)之酸官能基轉化為其活化形式，隨後使其與PEG連接基團(2A)之胺基官能基反應。

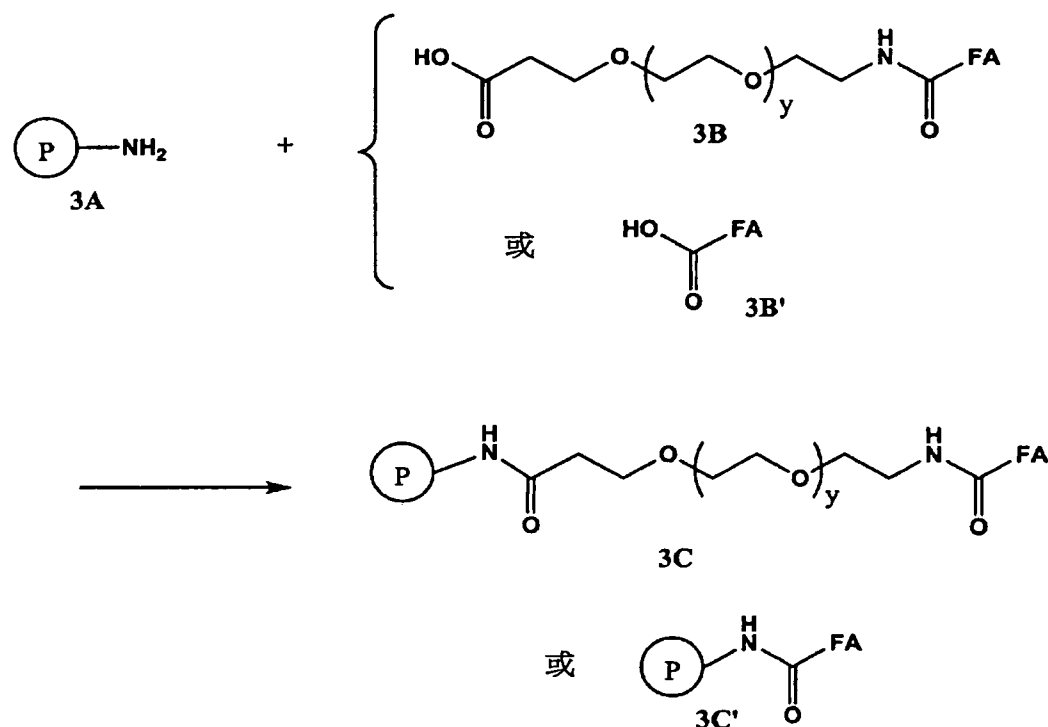
在脂肪酸及PEG連接基團上均存在額外羧酸官能基之情況下，可以在偶合反應之前引入保護基以便控制反應位點。羧酸之保護基描述於上文流程1中。或者，可以使用NHS化學試劑達成羧酸之選擇性活化。

脂肪酸-PEG構築體合成之更具體實例已描述於下文實驗部分中及臨時申請案第62/082327號(PAT056274-US-PSP2)中。

製備結合物

流程3描述將脂肪酸或脂肪酸-PEG構築體結合至式I之愛帕琳肽之N端的胺基官能基：

使用偶合條件經由直接連接結合



流程3

其中P為式I之愛帕琳肽且脂肪酸或脂肪酸-PEG構築體連接至該生物分子之N端，且其中FA如上文流程2中所定義。

脂肪酸-連接基團構築體(3B)或脂肪酸(3B')經由其羧酸反應性基團，使用標準醯胺偶合方法連接至肽(3A)之胺基殘基(N端之胺基官能基)。已知偶合方法已詳細描述於上文流程2中。較佳地，脂肪酸(3B')上或脂肪酸-PEG構築體(3B)上之酸官能基使用NHS化學試劑活化。

更詳細實驗條件已描述於下文實驗部分中及美國臨時申請案第62/082327號(PAT056274-US-PSP2)中。

醫藥組合物

本發明結合物可以各種方式中之任一者投與，包括皮下、肌肉內、靜脈內、腹膜內、吸入法、鼻內、經口等。尤其較佳的本發明實施例採用連續靜脈內投與本發明結合物或其醯胺、酯或鹽。另一較佳的本發明實施例採用皮下投與本發明結合物或其醯胺、酯或鹽。

本發明結合物可以藥團形式或以歷經一段時間之連續輸注形式投與。可使用可植入式泵。在本發明之某些實施例中，間歇性或連續

性結合物投藥持續一天至若干天(例如，2-3天或3天以上)或持續更長時間，例如數週、數月或數年。在一些實施例中，提供間歇性或連續性結合物投藥，持續至少約3天。在其他實施例中，提供間歇性或連續性結合物投藥，持續至少約一週。在其他實施例中，提供間歇性或連續性結合物投藥，持續至少約兩週。可能需要在投藥期間或在多個劑量之投與之間維持平均血漿結合物濃度在特定臨限值以上。合乎需要的濃度可以例如基於個體之生理條件、疾病嚴重程度等確定。此類合乎需要之值可藉由執行標準臨床試驗來鑑別。或者，肽及其結合物可經由FcRn機制經口傳遞。(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，其包含本發明之結合物或及其醯胺、酯或鹽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經口投與、非經腸投與及經直腸投與等特定投與途徑加以調配。另外，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、凍乾物、散劑或栓劑)或以液體形式(包括(但不限於)溶液、懸浮液或乳液)製造。醫藥組合物可經歷習知醫藥操作，諸如無菌製造、滅菌，及/或可含有習知惰性稀釋劑、成餅劑、張力劑、潤滑劑或緩衝劑以及佐劑，諸如防腐劑、穩定劑、濕潤劑、乳化劑及緩衝劑等。

在某些實施例中，醫藥組合物係用於皮下投與。適用於皮下投與蛋白質/多肽之調配物組分及方法為此項技術中已知的。參見例如已公開之美國專利申請案第2011/0044977號及美國專利第8,465,739號及美國專利第8,476,239號。通常，用於皮下投與之醫藥組合物含有適合穩定劑(例如，胺基酸，諸如甲硫胺酸；及或醣，諸如蔗糖)、緩衝劑及張力劑。

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)或分散液及用於臨時製備無菌可注射溶液或分散液之無菌散劑。

關於靜脈內投與，適合載劑包括生理食鹽水、抑菌水、Cremophor ELTM (BASF, Parsippany, N.J.)或磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)。在所有情況下，該組合物均應為無菌的且應為流體，其流動性達到存在容易注射能力之程度。較佳醫藥調配物在製造及儲存條件下穩定，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)及其適合混合物之溶劑或分散介質。可例如藉由使用諸如卵磷脂之包衣、在分散液之情況下藉由維持所需粒度及藉由使用界面活性劑來維持適當流動性。微生物作用之預防可藉由各種抗細菌劑及抗真菌劑達成，例如對羥基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、抗壞血酸、硫柳汞及其類似物。在許多情況下，較佳在組合物中包括等張劑，例如糖、多元醇，諸如甘露糖醇、胺基酸、山梨糖醇、氯化鈉。可藉由將延遲吸收之藥劑(例如單硬脂酸鋁及明膠)包括在組合物中而實現可注射組合物之延長吸收。

某些可注射組合物為等張水溶液或懸浮液，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，諸如防腐劑、穩定劑、濕潤劑或乳化劑、溶解促進劑、用於調控滲透壓之鹽及/或緩衝劑。此外，其亦可含有其他治療學上有價值之物質。該等組合物根據習知混合、粒化或塗覆方法分別製備，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：將活性化合物以所需量併入含以上所列舉成分中之一者或組合之適當溶劑中，視需要，接著進行過濾滅菌。一般而言，分散液係藉由將活性化合物併入含有基本分散介質及來自上文所列舉之彼等成分之其他所需成分的無菌媒劑

中來製備。在用於製備無菌可注射溶液之無菌散劑之情況下，較佳製備方法為真空乾燥及冷凍乾燥，其得到活性成分加上來自其先前經過無菌過濾之溶液之所需要的任何其他成分的散劑。

本發明進一步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速率的藥劑。該等藥劑在本文中稱為「穩定劑」，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。

如本文中所用，術語「醫藥學上可接受之鹽」係指保持本發明結合物之生物學有效性及特性之鹽，且其通常並非在生物學上或在其他方面不合需要的。在許多情況下，本發明結合物能夠藉助於胺基及/或羧基或其類似基團之存在而形成酸鹽及/或鹼鹽。

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。

可自其衍生鹽之無機酸包括例如氫氯酸、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

其類似者。醫藥學上可接受之鹼加成鹽可用無機鹼及有機鹼形成。

可自其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；經取代之胺，包括天然產生之經取代之胺；環胺；鹼離子交換樹脂及其類似物。某些有機胺包括異丙胺、苄星青黴素(benzathine)、膽酸鹽、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。一般而言，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。該等反應通常在水中或有機溶劑中，或在兩者之混合物中進行。一般而言，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。其他適合鹽之清單可見於例如「Remington's Pharmaceutical Sciences」，第20版，Mack Publishing Company, Easton, Pa., (1985)中；及「Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use」，Stahl及Wermuth (Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2002)中。

如本文中所用，術語「醫藥學上可接受之載劑」包括任何及所有溶劑、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、染料及其類似者以及其組合，如熟習此項技術者已知(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S

涵蓋其在治療或醫藥組合物中之用途。

本發明方法：

肽之愛帕琳家族為G蛋白偶聯APJ受體之唯一已知的天然配位體家族。愛帕琳基因編碼具有77個胺基酸之多肽，其經加工變成愛帕琳肽之生物活性形式，諸如愛帕琳-36、愛帕琳-17、愛帕琳-16、愛帕琳-13、愛帕琳-12及愛帕琳-13之焦麩胺酸鹽修飾形式(Pyr¹-愛帕琳-13)。此等愛帕琳肽中之任一者在結合至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偶聯促使細胞內pH、PLC活化及IP3產生量改變，該等改變使肌絲鈣敏感度增強且最終促使心肌收縮性提高。Gi偶聯抑制已活化Gs、腺苷酸環化酶及cAMP產生，且提高pAkt含量，產生心臟保護。在血管內皮細胞中，經由Gi、pAKT達成之APJ活化促使氧化氮(NO)產量增加，其使平滑肌鬆弛度提高，引起整體血管擴張。

患有慢性穩定性心臟衰竭之患者具有代償能減退之偶發性急性事件，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、血管擴張劑及促進心肌收縮劑，其直接提高心肌收縮性。現有靜脈內促進心肌收縮劑(多巴酚丁胺、多巴胺、米利酮、左西孟旦)因其不良事件(諸如心律不整及增加之長期死亡率)而熟知。本發明之合成愛帕琳脂肪酸結合物類似物提供一種用於ADHF之療法，其提高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大量未滿足的醫學需要。

實際上，人類之急性愛帕琳治療(5分鐘)產生冠狀血管舒張及改良之心輸出量。然而，天然愛帕琳展現出極短 $t_{1/2}$ (數秒)及活體內作用持續時間(幾分鐘)。本發明之強效合成結合物APJ促效劑相比於天然愛帕琳及/或相比於先前所述之合成愛帕琳肽及/或合成愛帕琳脂肪酸結合物具有較長半衰期，分別諸如美國專利第8,673,848號(代理人案

號PAT054961-US-NP)及美國專利申請案第14/336,293號(PAT055781-US-NP)中所述之彼等合成愛帕琳及/或合成愛帕琳脂肪酸結合物。

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 (如在其他促進心肌收縮劑之情況下所見)。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負荷而有益於心臟衰竭。綜合而言，本發明結合物可改良整體心臟功能，減少心律不整發生，且提供存活益處。

最近，已有多個聚焦愛帕琳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。愛帕琳已顯示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)保護胰臟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)調控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。

呈游離形式或呈醫藥學上可接受之鹽形式之包含式I多肽的結合物展現出有價值的藥理學性質，例如APJ受體促效性質，例如如接下來部分中所提供之活體外及活體內測試中所指示，且因此指定為療法。

本發明結合物或其醫藥學上可接受之鹽可適用於治療選自以下之適應症：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、心室性心動過速、動脈粥樣硬化、高血壓、再狹窄、缺血性心血管疾病、心肌症、心臟纖維化、心律不整、水滯留、糖尿病(包括妊娠性糖尿病)、肥胖症、周邊動脈疾病、腦血管事故、短暫性缺血性發作、創傷性腦損傷、肌肉萎縮性側索硬化、燒傷(包括曬傷)及先兆子癇。

因此，作為另一實施例，本發明提供如本文中所述之結合物或其醫藥學上可接受之鹽的用途，其用於治療與APJ受體活性相關之疾⁵

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組中，本發明提供如本文中所述之結合物或其醫藥學上可接受之鹽的用途，其用於製造用於治療與APJ受體活性相關之疾病的藥物。

因此，作為另一實施例，本發明提供結合物或其醫藥學上可接受之鹽在療法中之用途。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，該方法包含投與治療學上可接受之量的根據實施例1至7D中任一者之結合物或其醫藥學上可接受之鹽。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組中，本發明提供一種治療與APJ受體之活性相關之疾病的方法，該方法包含投與治療學上可接受之量的根據實施例1至7D中任一者之結合物或其醫藥學上可接受之鹽。

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，進行治療之恰當劑量濃度因此將部分地視所傳遞之分子、所用結合物所針對之適應症、投藥途徑及患者之體型(體重、體表或器官大小)及狀態(年齡及總體健康狀況)而改變。因此，臨床醫師可滴定劑量且修改投藥途徑以獲得最佳治療效果。視上文所提及之因素而定，典型劑量可在約0.1 $\mu\text{g/kg}$ 至高達約100 mg/kg 或大於100 mg/kg 之範圍內。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 之範圍內。

給藥頻率將視所用調配物中之雙功能蛋白質的藥物動力學參數而定。通常，臨床醫師投與組合物直至達到達成所需效果之劑量。因

此，組合物可以單次劑量或以一定時間內的兩次或兩次以上劑量(其可含有或可不含相同量之所需分子)或以連續輸注形式經由植入裝置或導管投與。適當劑量之進一步優化常規地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。

術語本發明結合物之「治療有效量」係指將引發個體之生物或醫學反應的本發明結合物之量，該生物或醫學反應例如改善症狀、緩解病狀、減慢或延遲疾病進展或預防疾病等。在一個非限制性實施例中，術語「治療有效量」係指當向個體投與時可有效(1)至少部分緩解、抑制、預防及/或改善某種病狀、病症或疾病或其症狀或(2)活化APJ受體的本發明生物結合物之量，該病狀、病症或疾病或其症狀(i)藉由活化APJ受體改善或(ii)與APJ受體之活性相關，或(iii)其特徵在於APJ受體之異常活性。

在另一非限制性實施例中，術語「治療有效量」係指當向細胞或組織或非細胞生物材料或培養基投與時，可有效至少部分活化APJ受體之本發明生物結合物的量。如一般技術者將瞭解，有效的特定藥劑之絕對量可視諸如所要生物終點、將傳遞之藥劑、目標組織等因素而改變。一般技術者瞭解，「治療有效量」可以單次劑量投與或可藉由投與多個劑量來達成。舉例而言，在用於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、液體滯留減少及/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。

如本文中所用，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動物(例如，人類)、牛、綿羊、山羊、馬、狗、貓、兔、大鼠、小鼠、魚、鳥及其類似者。在某些實施例中，個體為靈長類動物。在其他實施例中，個體為人類。

S

如本文中所用，術語「抑制(inhibit/inhibition/inhibiting)」係指減少或遏止既定病狀、症狀或病症或疾病，或顯著降低生物活動或過程之基線活性。

如本文中所用，術語「治療」(treat/treating/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，減緩或停滯或減少疾病或其至少一個臨床症狀之發展)。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。在又一實施例中，「治療」係指在身體上(例如，可辯別症狀之穩定化)、生理上(例如身體參數之穩定化)或在這兩方面調節疾病或病症。在又一實施例中，「治療」係指預防或延緩疾病或病症之起始或發展或進展。

如本文中所用，術語「預防(prevent/preventing/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。

如本文中所用，若個體將在生物學、醫學或生活品質上受益於治療，則該個體「需要」該治療。

如本文中所用，除非本文中另外指示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(the)」及類似術語應解釋為涵蓋單數及複數兩者。

除非本文中另外指示或另外與上下文明顯矛盾，否則本文中所描述之所有方法可以任何適合次序進行。本文中所提供之任何及所有實例或例示性語言(例如「諸如」)之使用僅意欲較好地闡明本發明，而不對以其他方式主張的本發明範疇造成限制。

根據本發明之結合物之活性可藉由下文所述之以下活體外方法評定。

hAPJ鈣通量分析：

將Chemi-5 APJ穩定細胞(Millipore # HTS068C)以10,000個細胞/孔塗於384孔格式之25 μ l生長培養基中，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。將生物結合物溶解於HBSS、HEPES及0.1% BSA緩衝液中，且自50 μ M至5 pM進行10倍連續稀釋，重複三次。使用FLIPR Tetra將生物結合物添加至具有染料之細胞中(1:5，最終生物結合物濃度介於10 μ M至1 pM範圍內)。細胞內之FLIPR染料在結合至鈣後發射螢光，同時遮蔽來自細胞外部之螢光。在FLIPR Tetra上使用470-495激發波長及515-575發射波長量測螢光。在生物結合物添加前10秒時開始進行讀數，總共持續3分鐘。針對各生物結合物濃度計算最大-最小值且繪製成圖，且使用GraphPad prism軟體針對由生物結合物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

萃取溶液：具有0.1%甲酸及400 ng/mL格列瑞得(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)，購自Bioreclamation LLC (Liverpool, NY)。

全血：雄性史-道二氏全血(具有肝素鈉)，購自Bioreclamation LLC (Liverpool, NY)

肺組織勻漿：雄性史-道二氏大鼠肺購自Bioreclamation LLC (Liverpool, NY)。在添加5×體積之1×PBS之後，使用polytron均質機使肺均質化。在4°C下以9000 rpm使勻漿離心10分鐘。再以3000 rpm使⁵

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 μ L 1 mg/mL工作溶液至995 μ L大鼠血漿或全血中來製備5000 ng/mL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 μ L工作溶液至995 μ L經稀釋之肺組織勻漿中。在水浴培育箱中於37°C下伴隨輕微震盪(65至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 μ L等分試樣轉移至96孔盤中，且緊接著使用150 μ L萃取溶液沈澱蛋白質。在完成培育實驗之後，在4°C下以4000 rpm使樣品培養培養盤離心10分鐘。隨後，使用吸液裝置(Tecan Temo)將上清液轉移至另一培養盤，且向所有樣品中添加50 μ L水。使培養盤渦旋，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大鼠血漿中來製備50,000 ng/mL測試物品。在水浴培育箱中於37°C下伴隨輕微震盪(65至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小時時，將培育樣品之50 μ L等分試樣轉移至96孔盤中，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。在完成反應之後，使用300 μ L乙腈進行蛋白質沈澱。在4°C下以4000 rpm使樣品培養盤離心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盤，且向所有樣品中添加50 μ L水。使培養盤渦旋，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 μm ，30 mm $\times$ 2.1 mm i.d.

移動相A：0.1%甲酸/乙腈

移動相B：0.1%甲酸/水

梯度程序：

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之質量範圍內全掃描

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換成相對於初始($t = 0$)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繪製剩餘百分比值的自然對數(Microsoft Excel)。藉由線性回歸確定此直線之斜率 k (Microsoft Excel)。

隨後藉由公式 $t_{1/2} = 0.693 \div k$ 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} 小時時獲取讀數。藉由計算

以下各者，估算以分鐘為單位之肽血漿半衰期：

- 1) $LN((t_0\text{時之}EC_{50})/(t_{24}\text{小時時之}EC_{50}))$ ，
- 2) 計算以上值之斜率且
- 3) $t_{1/2} = 0.693/(\text{斜率}^2)$ 。

表1：結合物之活性及穩定性

生物結合物	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	111.2	>1000
實例2	84.8	>1000
實例3	115.1	>1000
實例4	157.9	>1000
<i>pE-R-P-R-L-C*-H-K-G-P-Nle-C*-F-OH</i> (非結合環狀肽 - WO2013/111110之實例8)	1.0	132
比較實例：Pyr-1-愛帕琳-13	6.6	5.0

表2：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：

結合物	血漿穩定性 $t_{1/2}$ [min]	基於代替活性之血漿 穩定性 $t_{1/2}$ [min]
Pyr-1-愛帕琳13	6.6	5.0
<i>pE-R-P-R-L-C*-H-K-G-P-Nle-C*-F-OH</i> (非融合環狀類似物 - WO2013/111110之實例8)	163	132

經由皮下給藥評定活體內藥物動力學之方案及資料。

調配、給藥及樣品獲取：

將實例1及實例4以0.1 mg/ml濃度溶解於含30% (w/v) PEG300及5% (w/v)右旋糖之PBS中。藉由皮下(SC)注射至側腹中，向C57/B6小鼠(約20週齡)給予經溶解之化合物(每種化合物n=4)。注射體積為10 ml/kg。在給藥後3小時及6小時以及在給藥後1、2、4、7及10天，自隱靜脈抽取血液樣品。緊接著使血液樣品在4000×g下離心10分鐘。將血漿上清液(10 μ L)轉移至96孔盤且冷凍在-80°C下直至分析。

將WO2013/111110之實例8溶解於注射用無菌水(Hospira)中至1 mg/ml濃度。藉由皮下注射向C57/B6J小鼠(約22週齡)給予經溶解之化

合物($n = 4$)。在注射後15、30、60及120分鐘，自尾靜脈抽取血液樣品。緊接著使此等血液樣品離心且隨後將血漿上清液轉移至96孔盤且冷凍在 -80°C 下直至分析。

製備用於生物分析之樣品：

獲得各化合物之經預稱量之樣品(1-3 mg)且在DMSO中溶解至1 mg/ml。將此等樣品在小鼠血漿(BioReclamation)中連續稀釋至10,000、5,000、1,000、500、100、50、10、5及1 ng/ml之最終濃度，做出標準曲線用於分析。

將來自PK研究之血漿樣品解凍且藉由添加小鼠血漿稀釋至25 μL 總體積。

將各樣品及標準曲線樣品之25 μL 等分試樣配置於96孔盤上。向各樣品中添加150 μL 含有100 ng/ml格列瑞得作為內標之乙腈且使樣品渦旋30秒。隨後使樣品在 $4000\times g$ 下離心10分鐘。隨後將125 μL 上清液轉移至新的96孔盤。添加50 μL 水且藉由渦旋30秒進行混合。

LC/MS生物分析(Agilent 1290)：

使用CTC PAL自動進樣器將樣品(10 μL)轉移至HPLC中。LC管柱為ACE C18 $30\times 2.1\text{ mm}$ ，3.0 μm 珠粒。使用含溶劑A及溶劑B之二元溶劑系統，溶劑A由0.1%甲酸/水組成，溶劑B由0.1%甲酸/乙腈組成。將樣品加載至管柱上95%溶劑A (0-0.5 min)中且藉由5%至50%溶劑B (0.5至1.8 min)及50%至98%溶劑B (1.8至2.3 min)之梯度溶離。自2.3至2.9 min，使管柱保持在98%溶劑B下，且在2.9-3.0 min內，返回至95%溶劑A，且自3.0至3.5 min，用95%溶劑A平衡管柱。溶劑流動速率為700 $\mu\text{L}/\text{min}$ 且管柱溫度為 50°C 。

結果：在皮下給藥之後實例1及4之化合物之小鼠血漿曝露曲線示出在圖1中；且半衰期概述於表3中；

化合物	t _{1/2} [h]
實例1	43
實例4	23
<i>pE-R-P-R-L-C*-H-K-G-P-Nle-C*-F-OH</i> (非融合環狀類似物 - WO2013/111110之實例8)	0.52

表3

本發明結合物可以具有類似於愛帕琳-13或pyr-1-愛帕琳-13之APJ受體效能。在一個實施例中，本發明生物結合物之EC₅₀小於400 nM。在另一實施例中，本發明之愛帕琳脂肪酸結合物之EC₅₀小於300 nM，較佳小於200 nM且更佳小於160 nM。在又一實施例中，本發明生物結合物之EC₅₀小於100 nM。

本發明結合物之血漿穩定性優於愛帕琳-13或pyr-1-愛帕琳-13及/或優於未結合之類似物Q-R-P-R-L-C*-H-K-G-P-(Nle)-C*-F (或*pE-R-P-R-L-C*-H-K-G-P-Nle-C*-F-OH*)及/或優於先前所述之愛帕琳-脂肪酸結合物(美國專利申請案第14/336,290號(PAT055781-US-NP)之實例20)。在一個實施例中，血漿穩定性改良為至少2倍。在另一實施例中，血漿穩定性改良為至少10倍。在一個實施例中，本發明生物結合物具有至少30分鐘或至少60分鐘之血漿穩定性。在另一實施例中，本發明之脂肪酸結合物具有至少5 h，較佳至少10 h且更佳至少12 h之血漿穩定性。

本發明結合物可與一或多種其他治療劑同時、或在其之前、或在其之後投與。本發明結合物可藉由相同或不同投與途徑單獨投與，或以同一醫藥組合物形式與其他試劑一起投與。

在一個實施例中，本發明提供一種產品，其包含實施例1至7D中任一者之結合物或其醫藥學上可接受之鹽及至少一種其他治療劑，呈用於在療法中同時、單獨或依序使用之組合製劑形式。在一個實施例中，療法為治療對APJ受體之活化有反應的疾病或病狀。

以組合製劑形式提供之產品包括組合物，該組合物包含實施例1

至7D中任一者之結合物或其醫藥學上可接受之鹽及共同位於同一醫藥組合物中之其他治療劑；或實施例1至7D中任一者之結合物或其醫藥學上可接受之鹽及呈單獨形式(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，其包含實施例1至7D中任一者之結合物或其醫藥學上可接受之鹽及其他治療劑。如上所述，醫藥組合物視情況可包含醫藥學上可接受之賦形劑。

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各別醫藥組合物，其中至少一者含有根據實施例1至7D中任一者之結合物或其醫藥學上可接受之鹽。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。此類套組之一個實例為泡殼包裝，如通常用於包裝錠劑、膠囊及其類似物之泡殼包裝。

本發明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，本發明套組通常包含投藥指導。

在本發明之組合療法中，本發明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，本發明結合物及其他治療劑可在以下情況下結合為組合療法：(i)在將組合產品交給醫師之前(例如在套組包含本發明結合物及其他治療劑之情況下)；(ii)由醫師本人(或在醫師指導下)在投藥之前不久；(iii)在患者本人體內，例如在依序投與本發明結合物及其他治療劑期間。

因此，本發明提供根據實施例1至7D中任一者之結合物或其醫藥學上可接受之鹽的用途，其用於治療對APJ受體之促效作用有反應的疾病或病狀，其中該藥物經製備與另一治療劑一起投與。本發明亦提供另一治療劑之用途，其係用於治療對愛帕琳受體之促效作用有反應的疾病或病狀，其中該藥物與根據實施例1至7D中任一者之結合物或

其醫藥學上可接受之鹽一起投與。

本發明亦提供根據實施例1至7中任一者之結合物，其用於治療對APJ受體之促效作用有反應之疾病或病狀的方法中，其中該結合物經製備與另一治療劑一起投與。本發明亦提供另一治療劑，其用於治療對APJ受體之促效作用有反應之疾病或病狀的方法中，其中該另一治療劑經製備以用於與根據實施例1至7D中任一者之結合物或其醫藥學上可接受之鹽一起投與。

本發明亦提供根據實施例1至7D中任一者之結合物或其醫藥學上可接受之鹽的用途，其係用於治療對APJ受體之促效作用有反應的疾病或病狀，其中該患者預先(例如，在24小時內)經另一治療劑治療。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用途，其中該患者預先(例如，在24小時內)經根據實施例1至7D中任一者之結合物或其醫藥學上可接受之鹽治療。

在一個實施例中，該另一治療劑係選自促進心肌收縮劑、 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擬似劑、抗糖尿病劑、減肥藥、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「組合」包括共投與本發明結合物(例如根據實施例1至7D中任一者之結合物或其醫藥學上可接受之鹽或本文中另外描述之結合物)與第二藥劑或治療，首先投與本發明化合物，接著投與第二藥劑或治療，及首先投與第二藥劑或治療，接著投與本發明結合物。

術語「第二藥劑」包括此項技術中已知可治療、預防或減少本

文中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，例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、心室性心動過速、動脈粥樣硬化、高血壓、再狹窄、缺血性心血管疾病、心肌症、心臟纖維化、心律不整、水滯留、糖尿病(包括妊娠性糖尿病)、肥胖症、周邊動脈疾病、腦血管事故、短暫性缺血性發作、創傷性腦損傷、肌肉萎縮性側索硬化、燒傷(包括曬傷)及先兆子癇。

第二藥劑之實例包括促進心肌收縮劑、 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擬似劑、抗糖尿病劑、減肥藥、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。

如本文中所用之促進心肌收縮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。

如本文中所用之 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)。

如本文中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

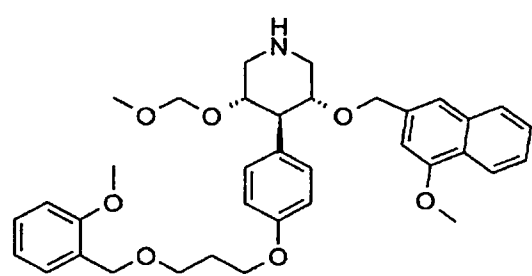
基輔酶A還原酶抑制劑)包括可用於降低血液中包括膽固醇在內的脂質含量的活性劑。實例包括阿托伐他汀(atorvastatin)、西立伐他汀(cerivastatin)、康百汀(compactin)、達伐他汀(dalvastatin)、二氫康百汀(dihydrocompactin)、氟多他汀(fluidostatin)、氟伐他汀(fluvastatin)、洛伐他汀(lovastatin)、匹伐他汀(pitavastatin)、美伐他汀(mevastatin)、普伐他汀(pravastatin)、羅素他汀(rosuvastatin)、利伐他汀(rivastatin)、辛伐他汀(simvastatin)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經酶促降解成血管收縮素II之分子。此類化合物可用於調控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。

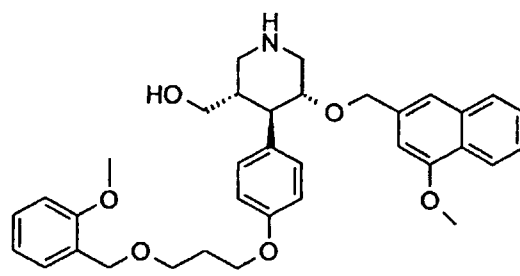
術語「腎素抑制劑」包括地特吉侖(ditekiren)(化學名稱：[1S-[1R*,2R*,4R*(1R*,2R*)]]-1-[(1,1-二甲基乙氧基)羰基]-L-脯胺醯基-L-苯丙胺醯基-N-[2-羥基-5-甲基-1-(2-甲基丙基)-4-[[[2-甲基-1-[(2-吡啶基甲基)胺基]羰基]丁基]胺基]羰基]己基]-N- α -甲基-L-組胺酸醯胺)；特拉吉侖(terlakiren)(化學名稱：[R-(R*,S*)]-N-(4-嗎啉基羰基)-L-苯丙

胺鹽基-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-半胱胺酸鹽基)；阿利吉侖 (Aliskiren)(化學名稱：(2*S*,4*S*,5*S*,7*S*)-5-胺基-N-(2-胺甲鹽基-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)壬鹽基)及占吉侖 (zankiren)(化學名稱：[1*S*-[1*R**[*R**(*R**)],2*S**,3*R**]]-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)磺鹽基]甲基]-1-側氧基-3-苯丙基]-胺基]-4-噻唑丙鹽基)，或其鹽酸鹽，或如由 Speedel 研發之 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「阿利吉侖」若未特別定義，則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「鈣離子通道阻斷劑(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)。實例包括胺氯地平(amlodipine)、苄普地爾(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

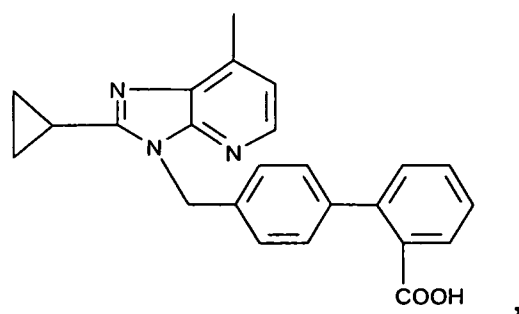
(fendiline)、加洛帕米(gallopamil)、米貝地爾(mibefradil)、阿尼帕米(anipamil)、替阿帕米(tiapamil)及維拉帕米，或其醫藥學上可接受之鹽。CCB可用作抗高血壓、抗心絞痛或抗心律不整之藥物。

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)。

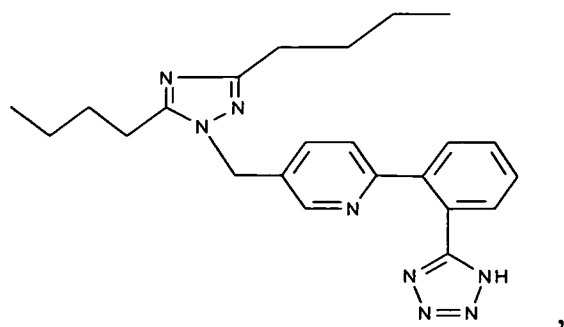
術語「ApoA-I擬似劑」包括D4F肽(例如式D-W-F-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-F-K-E-A-F)

血管收縮素II受體拮抗劑或其醫藥學上可接受之鹽應理解為結合至血管收縮素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。

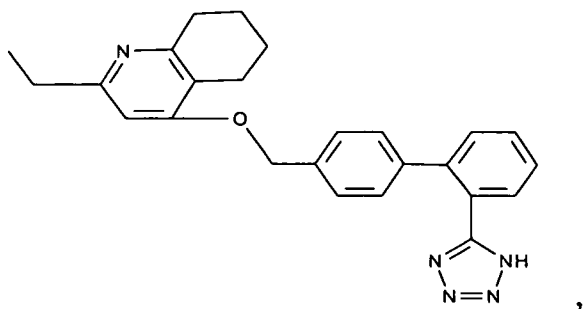
AT₁受體拮抗劑之類別包含具有不同結構特徵之化合物，基本上較佳為非肽化合物。舉例而言，可提及選自由以下組成之群之化合物：纈沙坦(valsartan)、洛沙坦(losartan)、坎地沙坦(candesartan)、依普羅沙坦(eprosartan)、依貝沙坦(irbesartan)、沙普立沙坦(saprisartan)、他索沙坦(tasosartan)、替米沙坦(telmisartan)、命名為E-1477之下式化合物



命名為SC-52458之下式化合物



及命名為ZD-8731之下式化合物

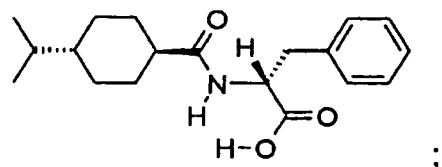


或在各情況下，其醫藥學上可接受之鹽。

較佳AT₁受體拮抗劑為坎地沙坦、依普羅沙坦、依貝沙坦、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，其促進自胰臟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-吡咯啶基胺基)羰基]-苯磺醯胺(格列派得(glycopyramide))、格列本脲(glibenclamide) (格列瑞得)、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)及甲苯基環拉醯胺

(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(glimepiride) (參見EP 31058)。

可以與本發明結合物組合使用之第二藥劑之其他實例包括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之生理響應。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抑制劑在各情況下一般地且特定地揭示於例如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，其特定揭示於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)，在該化合物中，Arg³⁶之羧基端醯胺官能基經GLP-1(7-36)NH₂分子及其變異體及類似物之第37位之Gly置換，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)且特定言之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-咪唑丙醯基 -GLP-1。亦特別較佳的為由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。

在定義「抗糖尿病劑」中亦包括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-苯并呋喃-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-環丙烷羧胺基)-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

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-苯并呋喃-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-(2,4-二氧雜噻唑啉-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；抗糖尿病含鈣化合物；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，特定言之，一種醫藥組合，其包含治療有效量之根據實施例1至7D中任一者之結合物或其醫藥學上可接受之鹽及一或多種治療活性劑，該/該等治療活性劑選自 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(vildagliptin))及GLP1肽促效劑。

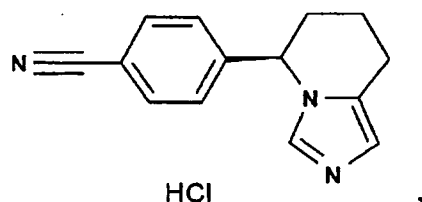
術語「減肥藥」包括脂肪酶抑制劑(例如羅氏鮮(orlistat))及食慾抑制劑(例如諾美婷(sibutramine)及苯丁胺(phentermine))。

醛固酮合成酶抑制劑或其醫藥學上可接受之鹽應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。用所謂的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。此類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，後者為最佳的。

較佳的為市售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(fadrozole)之鹽酸鹽的(+)-對映異構體(美國專利4617307及4889861)



或若適當，則為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且特定地揭示於例如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-腈苯基)-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-氟基-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-腈苯基)-6,7-二氫-5*H*-吡咯并[1,2-*c*]咪唑-5-甲酸4-氟苯甲酯；5-(4-氟基-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-氟基-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)聯苯基-3-甲腈，或在各情況下，其(R)或(S)對映異構體；或若適當，則為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。適用於本發明中之較佳醛固酮合成酶抑制劑包括(但不限於)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)鄰苯二甲腈；4-(8-(4-腈苯基)-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，如由Speedel所研發，或在各情況下，其(R)或(S)對映異構體；或若適當，則為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。適合於本發明中之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}-1H-吡啶-3-甲腈、嗎啉-4-甲酸[5-(6-氯-3-氰基-1-甲基-1H-吡啶-2-基)-吡啶-3-基甲基]-醯胺、N-[5-(6-氯-1-甲基-1H-吡啶-2-基)-吡啶-3-基甲基]-乙磺醯胺、C,C,C-三氟-N-[5-(1-甲基-1H-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-腈苯基)吡啶-3-基)丁烷-1-磺醯胺、N-(1-(5-(4-氰基-3-甲氧苯基)吡啶-3-基)乙基)乙磺醯胺、N-((5-(3-氯-4-腈苯基)吡啶-3-基)(環丙基)甲基)乙磺醯胺、N-(環丙基(5-(1H-吡啶-5-基)吡啶-3-基)甲基)乙磺醯胺、N-(環丙基(5-萘-1-基-吡啶-3-基)甲基)乙磺醯胺、乙磺酸[5-(6-氯-1-甲基-1H-吡咯并[2,3-b]吡啶-2-基-吡啶-3-基甲基]-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」係指抑制膽甾醇酯轉移蛋白(CETP)介導之自HDL轉運各種膽甾醇酯及三酸甘油酯至LDL及VLDL之化合物。此類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。實例包括揭示於美國專利第6,140,343號及美國專利第6,197,786號中之化合物(例如，[2R,4S]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-2H-喹啉-1-甲酸乙酯(托徹普(torcetrapib))；揭示於美國專利第6,723,752號中之化合物(例如(2R)-3-{[3-(4-氯-3-乙基-苯氧基)-苯基]-[3-(1,1,2,2-四氟-乙氧基)-苯基]-甲基}-胺基}-1,1,1-三氟-2-丙醇)；揭示於美國專利申請案第10/807,838號中之化合物；揭示於美國專利第5,512,548號中之多肽衍生物；分別揭示於*J. Antibiot.*, 49(8): 815- 816 (1996)及*Bioorg. Med. Chem. Lett.*; 6:1951-1954 (1996)中之膽甾醇酯之玫瑰菌素衍生物及含

磷酸酯的類似物。此外，CETP抑制劑亦包括揭示於WO2000/017165、WO2005/095409、WO2005/097806、WO2007/128568、WO2008/009435、WO2009/059943及WO2009/071509中之彼等化合物。

術語「NEP抑制劑」係指抑制中性肽鏈內切酶(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抑制劑亦包括如揭示於美國專利第US 5,155,100號中之經膦醯基/聯芳基取代之二肽衍生物。NEP抑制劑亦包括如揭示於PCT申請案第WO 2003/104200號中之N-巰基醯基苯丙胺酸衍生物。NEP抑制劑亦包括如揭示於PCT申請案第WO 2008/133896號、第WO 2009/035543號或第WO 2009/134741號中之雙作用抗高血壓劑。其他實例包括揭示於美國申請案第12/788,794號、第12/788,766號及第12/947,029號中之化合物。NEP抑制劑亦包括揭示於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號中之化合物。

在一個實施例中，本發明提供一種活化個體中之APJ受體之方法，其中該方法包含向個體投與治療有效量之根據前述實施例中任一者之結合物或其醫藥學上可接受之鹽。

在一個實施例中，本發明提供一種治療個體之對APJ受體之活化有反應的病症或疾病的方法，其中該方法包含向個體投與治療有效量之根據前述實施例中任一者之結合物或其醫藥學上可接受之鹽。 S

在一個實施例中，本發明提供一種治療對個體之APJ受體之活化(促效作用)有反應的病症或疾病的方法，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、心室性心動過速、動脈粥樣硬化、高血壓、再狹窄、缺血性心血管疾病、心肌症、心臟纖維化、心律不整、水滯留、糖尿病(包括妊娠性糖尿病)、肥胖症、周邊動脈疾病、腦血管事故、短暫性缺血性發作、創傷性腦損傷、肌肉萎縮性側索硬化、燒傷(包括曬傷)及先兆子癇。

在一個實施例中，本發明提供根據前述實施例中任一者之結合物或其醫藥學上可接受之鹽，其係用作藥物。

在一個實施例中，本發明提供根據前述實施例中任一者之結合物或其醫藥學上可接受之鹽的用途，其係用於製造供治療對APJ受體之活化有反應之病症或疾病用的藥物。在另一實施例中，本發明提供根據前述實施例中任一者之結合物或其醫藥學上可接受之鹽的用途，其係用於製造供治療對APJ受體之活化有反應的病症或疾病的藥物，其中該病症或疾病尤其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、心室性心動過速、動脈粥樣硬化、高血壓、再狹窄、缺血性心血管疾病、心肌症、心臟纖維化、心律不整、水滯留、糖尿病(包括妊娠性糖尿病)、肥胖症、周邊動脈疾病、腦血管事故、短暫性缺血性發作、創傷性腦損傷、肌肉萎縮性側索硬化、燒傷(包括曬傷)及先兆子癇。

本發明之範例：

縮寫	定義
AA	胺基酸
Ac	乙醯基
ACN	乙腈
AcOH	乙酸
BSA	牛血清白蛋白

Boc	第三丁氧羰基
CAD	荷電氣溶膠偵測器
DCC	二環己基碳化二亞胺
DCM	二氯甲烷
DIPEA或DIEA	<i>N,N'</i> -二異丙基乙胺
DMF	<i>N,N'</i> -二甲基甲醯胺
DTT	二硫蘇糖醇
ELSD	蒸發光散射偵測器
EtOAc	乙酸乙酯
FA	脂肪酸
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
HEP	庚烷
HEPES	4-(2-羥乙基)-1-哌嗪乙磺酸
HFIP	六氟異丙醇
HPLC	高效液相層析
LCMS	液相層析質譜分析
LN	自然對數(Logarithmus naturali/natural logarithm)
MeOH	甲醇
MS	質譜法
Nle	正白胺酸
NMR	核磁共振
Oxyma Pure	2-氰基-2-(羥亞胺基)乙酸乙酯
Pbf	2,2,4,6,7-五甲基二氫苯并呋喃-5-磺醯基
<i>p</i> E	焦麩胺酸鹽
PEG	聚乙二醇
PG	保護基
Pbf	五甲基-二氫苯并呋喃-5-磺醯基
PBS	磷酸鹽緩衝鹽水
Ph	苯基
PS	聚苯乙烯
POL	聚合物載體
rt	室溫
SPPS	固相肽合成
TCEP	參(2-羧乙基)膦
TFA	三氟乙酸
THF	四氫呋喃
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

方法

分析方法A：

- Acquity BEH 1.7 μ m 2.1 $\times$ 50 mm
- 溶離劑：A：水(0.1%甲酸)；B：ACN (0.1%甲酸)
- 流動速率：1 mL/min
- 梯度：0 min，2% B；1.76 min，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°C

分析方法B：

- Acquity BEH 1.7 μ m 2.1 $\times$ 50mm
- 溶離劑：A：水(0.1%甲酸)；B：ACN (0.1%甲酸)
- 流動速率：1 mL/min
- 梯度：0 min，40% B；1.40 min，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°C

分析方法C：

- Hilic 2.1 $\times$ 100 mm
- 溶離劑：A：CO₂；B：MeOH
- 流動速率：2 mL/min
- 梯度：0.15 min，2% B；1.65 min，2%至50% B；2.1 min，

50% B；2.25 min，2% B；2.5 min；2% B

- 質譜儀：單級四級桿ESI

- SCF : waters Acquity

- 溫度 : 55°C

分析方法D :

- Sunfire C18 3.5 μ m 3.0 $\times$ 3.0 mm

- 溶離劑 : A : 水(0.05%三氟乙酸) ; B : ACN

- 流動速率 : 2 mL/min

- 梯度 : 0 min , 5% B ; 4.3 min , 5%至80% B ; 4.70 min , 95% B ; 5.00 min , 95% B ; 5.10 min , 5% B

- 質譜儀 : Waters micromass ZQ ; 掃描範圍為120-1600之單級四極桿ESI

- HPLC : Agilent 1100系列

- 溫度 : 40°C

分析方法E :

- Xbridge C18管柱 , 3.5 μ M , 3.0 $\times$ 3.0 mm

- 溶離劑 : A : 水 + 5 mM氫氧化銨 ; B : ACN

- 流動速率 : 2 mL/min

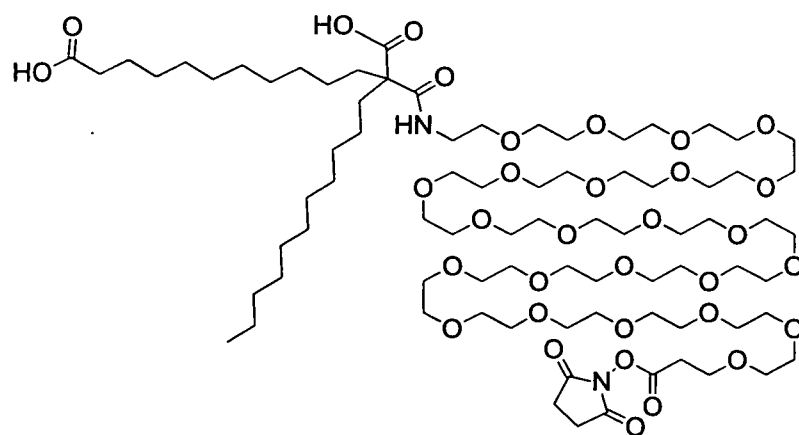
- 梯度 : 0.0 min , 2% B ; 1.70 min , 2%至95% B ; 2.00 min , 95% B ; 2.10 min , 5% B ;

- 質譜儀 : 單級四級桿ESI

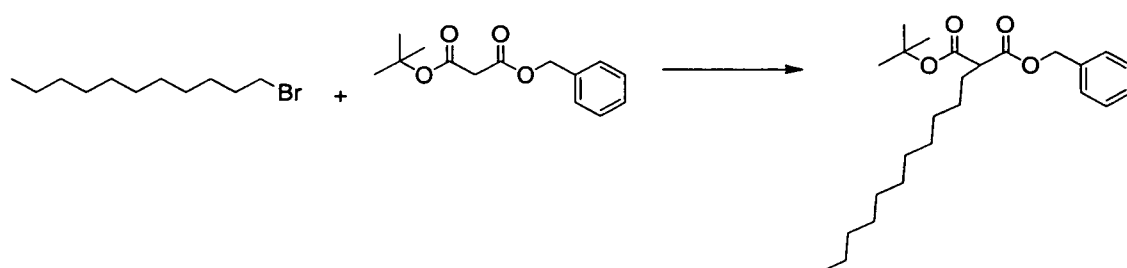
- HPLC : Agilent 1100系列

- 溫度 : 40°C

製備1號脂肪酸-連接基團構築體 :

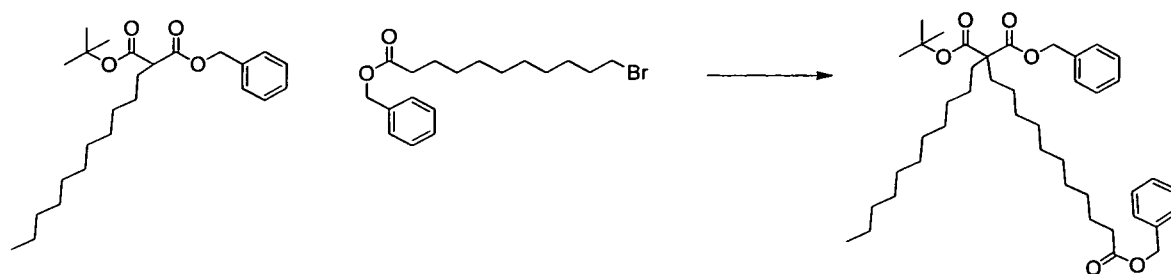


步驟1：2-十一基丙二酸1-苯甲酯3-第三丁酯



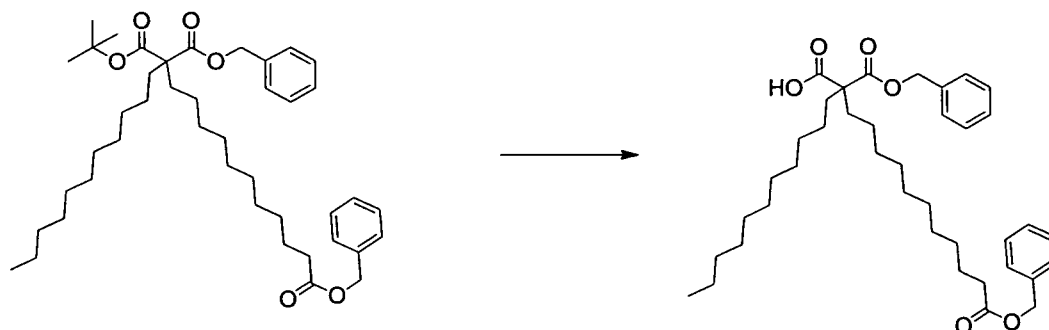
在0℃下在N₂下，向NaH (160 mg, 4.0 mmol)於DMF (8 mL)中之懸浮液中添加含丙二酸苯甲酯第三丁酯(1.0 g, 4.0 mmol)之DMF (2 mL)。攪拌混合物50分鐘，隨後添加含1-溴十一烷之DMF (2 mL)。再攪拌一小時後，使反應物升溫至室溫。使反應物維持隔夜。添加Et₂O (100 mL)及水(20 mL)以分配反應物。用Et₂O (100 mL)萃取水相且經Na₂SO₄乾燥經合併之有機物。蒸發溶劑且藉由急驟管柱(C18 12 g, 40-100% ACN/水 + 0.1% TFA)純化殘餘物，得到呈無色油狀之標題化合物(1.14 g, 2.82 mmol, 71%)：LCMS方法B 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2：二十二烷-1,11,11-三甲酸1,11-二苯甲酯11-第三丁酯



在0°C下在N₂下，向NaH (70.7 mg, 1.77 mmol)於DMF (6 mL)中之懸浮液中緩慢地添加2-十一基丙二酸1-苯甲酯3-第三丁酯(650 mg, 1.61 mmol)於DMF (1 mL)中之溶液。攪拌混合物40分鐘，隨後添加含11-溴十一烷酸苯甲酯(571 mg, 1.61 mmol)之DMF (1 mL)。在添加之後，將反應物升溫至室溫且攪拌隔夜。反應物用Et₂O (100 mL)稀釋且用水(20 mL)萃取。用Et₂O (100 mL)萃取水相且經Na₂SO₄乾燥經合併之有機物。蒸發溶劑。藉由急驟管柱(矽膠80 g, 0-10% EtOAc/HEP)純化殘餘物，得到呈無色油狀之標題化合物(823 mg, 1.21 mmol, 75%)：¹H NMR (400 MHz, 氯仿-*d*) δ ppm 0.84 - 0.94 (m, 3 H) 1.12 (m, *J*=6.60 Hz, 4 H) 1.19 - 1.33 (m, 28 H) 1.35 (s, 9 H) 1.66 (quin, *J*=7.40 Hz, 2 H) 1.85 (t, *J*=8.44 Hz, 4 H) 2.37 (t, *J*=7.52 Hz, 2 H) 5.14 (s, 2 H) 5.16 (s, 2 H) 7.30 - 7.42 (m, 10 H)。

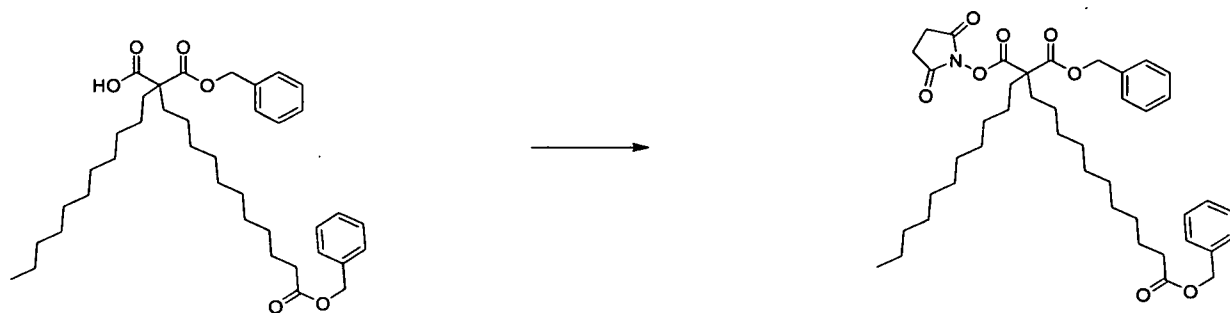
步驟3：13-(苯甲氧基)-2-((苯甲氧基)羰基)-13-側氧基-2-十一基十三烷酸



向步驟2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

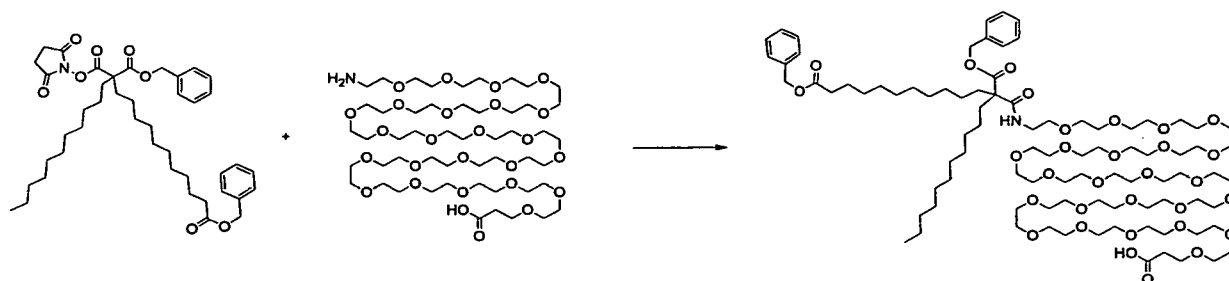
驟管柱(矽膠 12 g, 0-15% EtOAc/HEP)純化殘餘物, 得到標題化合物 (177 mg, 0.284 mmol, 96%): ^1H NMR (400 MHz, 氯仿-*d*) δ ppm 0.87 - 0.94 (m, 3 H) 0.94 - 1.05 (m, 2 H) 1.19 (br. s., 14 H) 1.23 - 1.37 (m, 16 H) 1.65 (quin, $J=7.40$ Hz, 2 H) 1.78 - 1.91 (m, 2 H) 1.93 - 2.05 (m, 2 H) 2.37 (t, $J=7.52$ Hz, 2 H) 5.14 (s, 2 H) 5.27 (s, 2 H) 7.31 - 7.44 (m, 10 H)。

步驟4: 二十二烷-1,11,11-三甲酸1,11-二苯甲酯11-(2,5-二側氧基環戊酯)



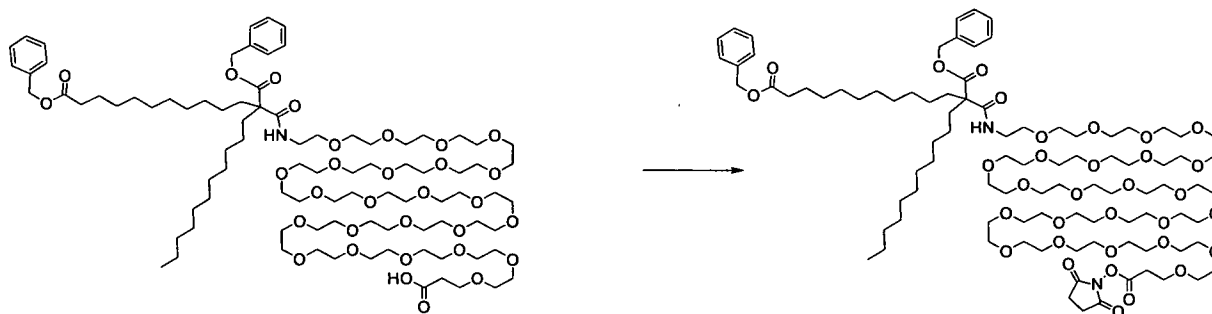
在 N_2 下, 向步驟3之酸(177 mg, 0.284 mmol)及N-羥基丁二醯亞胺(32.7 mg, 0.284 mmol)於DCM (2 mL)及THF (0.3 mL)中之溶液中添加DCC (58.6 mg, 0.284 mmol)於DCM (1 mL)中之溶液。在室溫下攪拌反應物4小時。蒸發溶劑且藉由急驟管柱(矽膠 12 g, 0-35% EtOAc/HEP)純化殘餘物, 得到呈無色油狀之標題化合物(153 mg, 0.213 mmol, 75%): ^1H NMR (400 MHz, 氯仿-*d*) δ ppm 0.86 - 0.93 (m, 3 H) 1.12 - 1.21 (m, 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5:



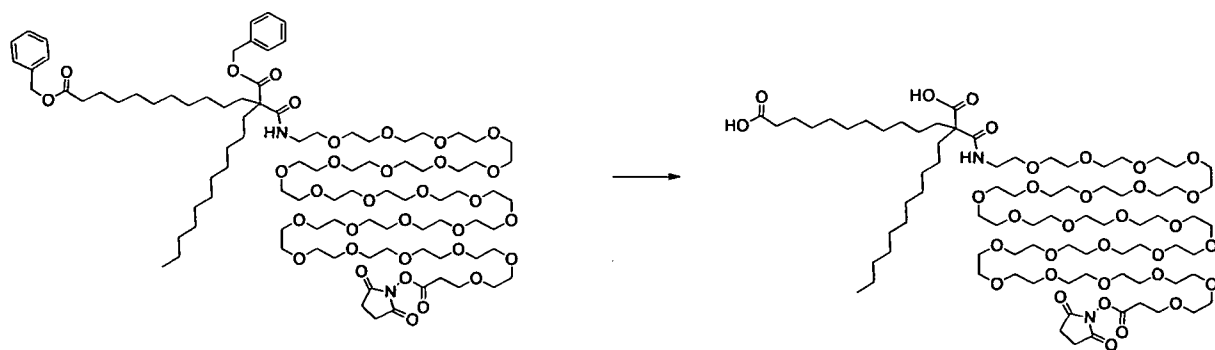
向裝有胺基-PEG24-甲酸之小瓶中添加步驟4之中間物(145 mg, 0.201 mmol)於THF (1.5 mL)及DCM (1.5 mL)中之溶液。添加DIPEA (88 μ L, 0.504 mmol)且在震盪器板上攪拌反應物15小時。蒸發溶劑且藉由超臨界流體層析(Waters HILIC 20 $\times$ 150 mm; 15-25% MeOH/CO₂)純化殘餘物, 得到所要偶合化合物(151 mg, 0.086 mmol, 43%): LCMS方法C; Rt = 1.30min, [M+2H]⁺ 876.4; ¹H NMR (400 MHz, 氯仿-*d*) δ ppm 0.86 - 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6:



向步驟5之化合物(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(矽膠12, 0-5% MeOH/DCM)純化殘餘物, 得到呈白色固體狀之經活化之NHS化合物(159 mg, 定量): LCMS方法B; Rt = 1.55 min, [M+H₃O+H]⁺ 933.9。

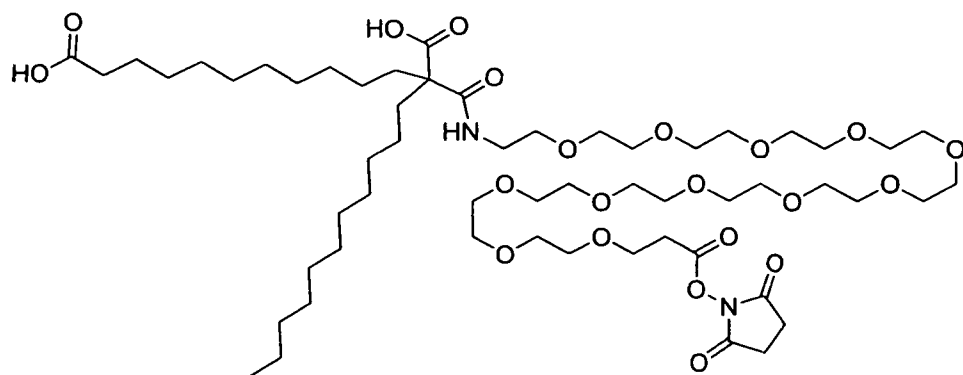
步驟7:



向步驟6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 μ mol)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 μ mol)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 $\times$ 50 mm, 45-70% ACN/水 + 0.1% TFA)純化殘餘物，得到脫除保護基之化合物(83 mg, 0.047 mmol, 54%)：LCMS方法B； R_t = 1.03 min, $[M+2H]/2$ 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)。

藉由用恰當的胺基-PEG n -甲酸替換胺基-PEG24-甲酸，以類似於1號脂肪酸-連接基團構築體之方式製備以下化合物。

製備2號脂肪酸-連接基團構築體：

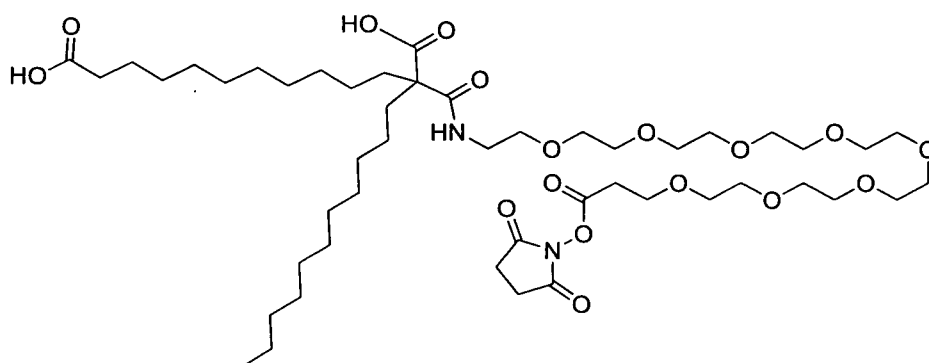


使用胺基-PEG12-甲酸製備2號脂肪酸-連接基團構築體且經分離為無色油狀物；

LCMS：方法A：CAD：Rt 1.64 min MS m/z 1138.0 [M-H]⁻；

¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ 7.36 (1H, br t), 3.76 (2H, t), 3.61-3.47 (46H, br m), 3.46-3.40 (2H, br m), 2.81 (2H, t), 2.74 (4H, br s), 2.24 (2H, t), 1.93 (2H, br t), 1.68-1.57 (2H, br m), 1.56-1.50 (2H, br m), 1.26-1.08 (34H, br m), 0.78 (3H, t)。

製備3號脂肪酸-連接基團構築體：



使用胺基-PEG8-甲酸製備3號脂肪酸-連接基團構築體且經分離為2部分，各部分之雜質略有不同且各部分為無色油狀物。

LCMS：方法A CAD：Rt 1.65 min MS m/z 963.8 [M+H]⁺；

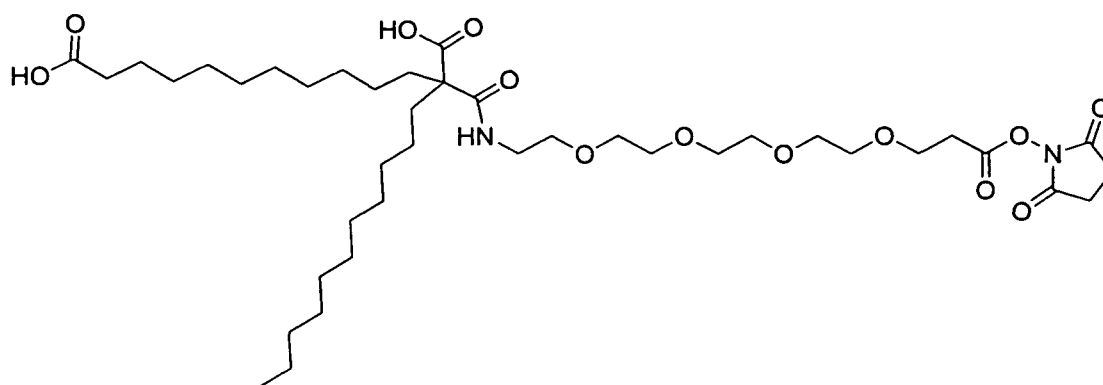
¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ 7.27 (1H, br m), 3.70 (2H, t), 3.56-3.41 (30H, br m), 3.41-3.34 (2H, br m), 2.75 (2H, t), 2.69 (4H, br s), 2.19 (2H, t), 1.87 (2H, br t), 1.63-1.52 (2H, br m), 1.52-1.43 (2H, br m), 1.22-1.02 (32H, br m), 0.78 (3H, t)。

LCMS：方法B：CAD：Rt 1.65 min MS m/z 963.8 [M+H]⁺；

¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ 7.48 (1H, m), 3.85 (2H, t), 3.71-3.56 (30H, br m), 3.56-3.49 (2H, br m), 2.90 (2H, t), 2.84 (4H, br s), 2.38-

2.32 (2H, m), 2.02 (2H, br t), 1.78-1.58 (4H, br m), 1.38-1.16 (32H, m), 0.88 (3H, t)。

製備4號脂肪酸-連接基團構築體：

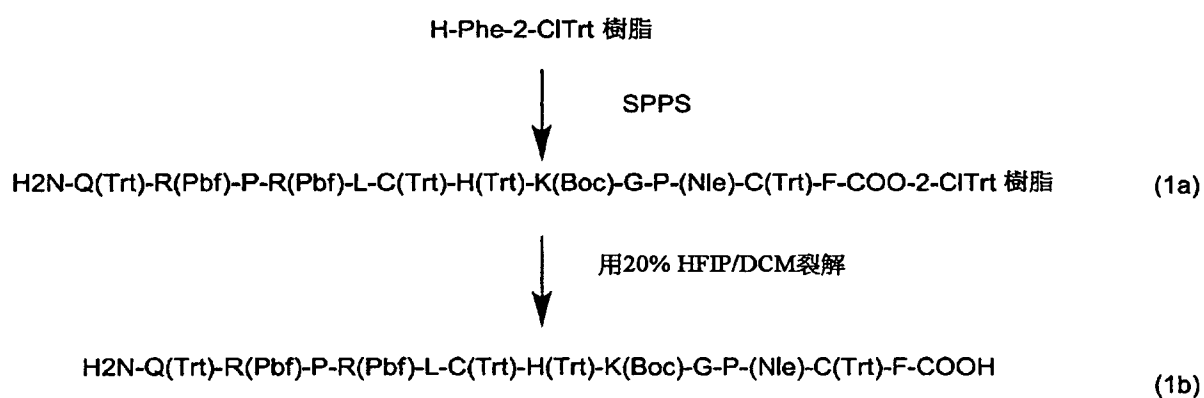
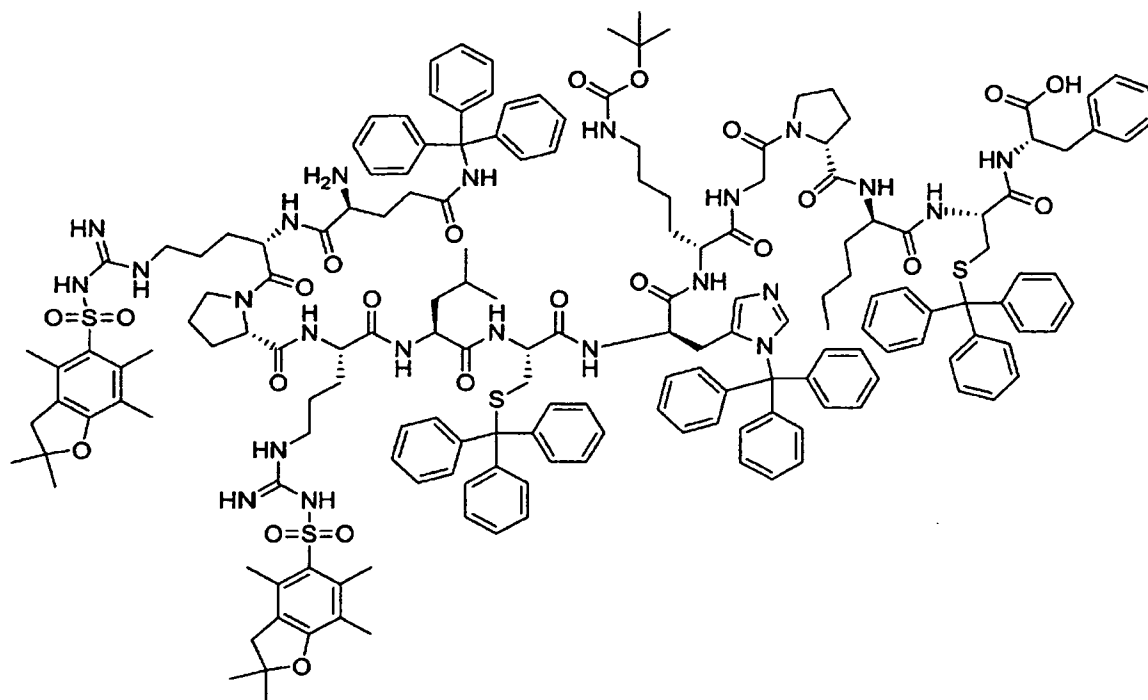


該脂肪酸-連接基團構築體使用胺基-PEG4-甲酸製備且經分離為淡黃色油狀物；

LCMS：方法A：CAD：Rt 1.66 min MS m/z 787.6 [M+H]⁺；

¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ 7.24 (1H, br t), 3.85 (2H, t), 3.71-3.57 (14H, br m), 3.56-3.48 (2H, br m), 2.90 (2H, t), 2.84 (4H, br s), 2.35 (2H, t), 2.10-1.99 (2H, br m), 1.74-1.58 (4H, br m), 1.38-1.18 (32H, br m), 0.88 (3H, t)。

製 備 H₂N-Q(Trt)-R(Pbf)-P-R(Pbf)-L-C(Trt)-H(Trt)-K(Boc)-G-P-(Nle)-C(Trt)-F-COOH



步驟1：製備中間物1a

在自動肽合成器(LIBERTY BLUE)上使用Arg殘基之習知雙重Arg對三批H-Phe-2-ClTrt樹脂(Novabiochem, 324 mg, 0.25 mmol, 0.73 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 × 7 mL，每次1分鐘)。
- 脫除保護基Fmoc：哌啶/DMF (1:4) (7 mL，75 °C，持續3 min)。
- 洗滌：DMF (3 × 7 mL，每次1分鐘)。

偶合	AA	偶合次數×反應時間	反應溫度
1	Fmoc-L-Cys(Trt)-OH	1 × 6 min	50°C
2	Fmoc-L-Nle-OH	1 × 5 min	75°C
3	Fmoc-L-Pro-OH	1 × 5 min	75°C
4	Fmoc-Gly-OH	1 × 5 min	75°C
5	Fmoc-L-Lys(Boc)-OH	1 × 5 min	75°C
6	Fmoc-L-His(Trt)-OH	1 × 6 min	50°C
7	Fmoc-L-Cys(Trt)-OH	1 × 6 min	50°C
8	Fmoc-L-Leu-OH	1 × 5 min	75°C
9	Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH	2 × 25 min	25°C
10	Fmoc-L-Pro-OH	1 × 5 min	75°C
11	Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH	2 × 25 min	25°C
12	Fmoc-L-Gln(Trt)-OH	1 × 5 min	75°C

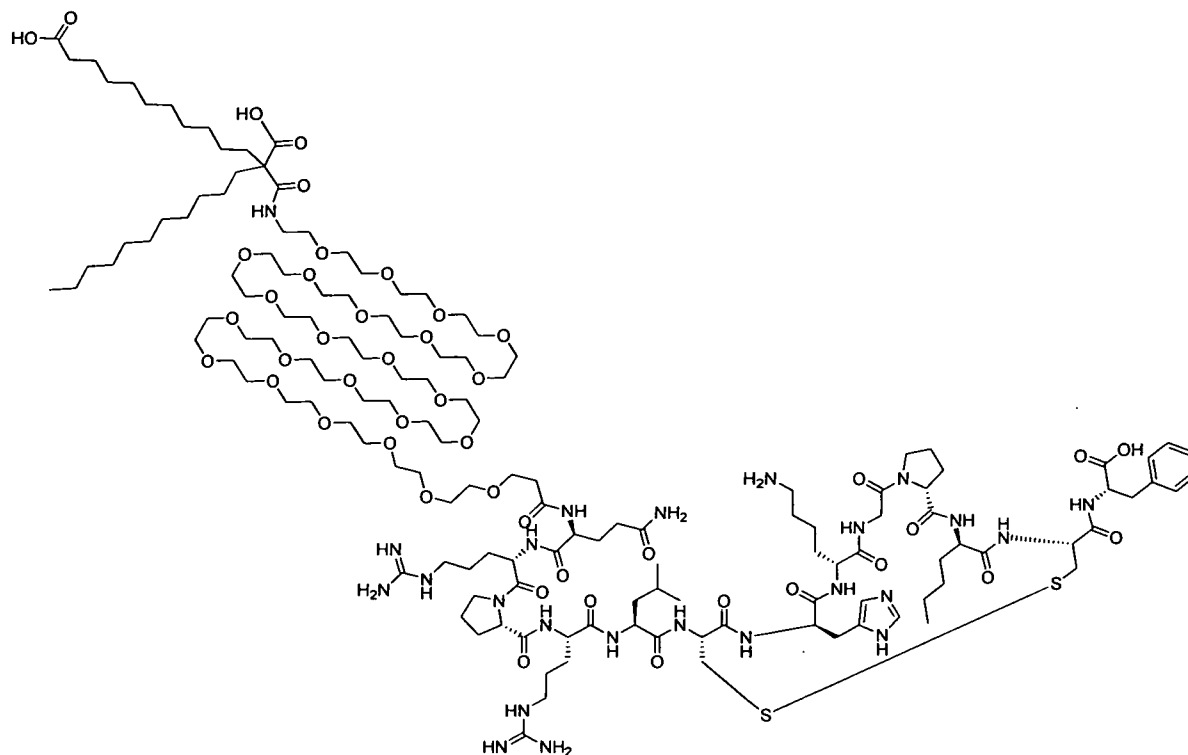
在肽組裝後，用DMF (3 × 10 mL)、DCM (3 × 10 mL)洗滌樹脂。

在室溫下真空乾燥肽樹脂，得到中間物**1a** (2.347 g, 0.75 mmol)。

步驟2：製備中間物**1b**，即 **H₂N-Q(Trt)-R(Pbf)-P-R(Pbf)-L-C(Trt)-H(Trt)-K(Boc)-G-P-(Nle)-C(Trt)-F-COOH**

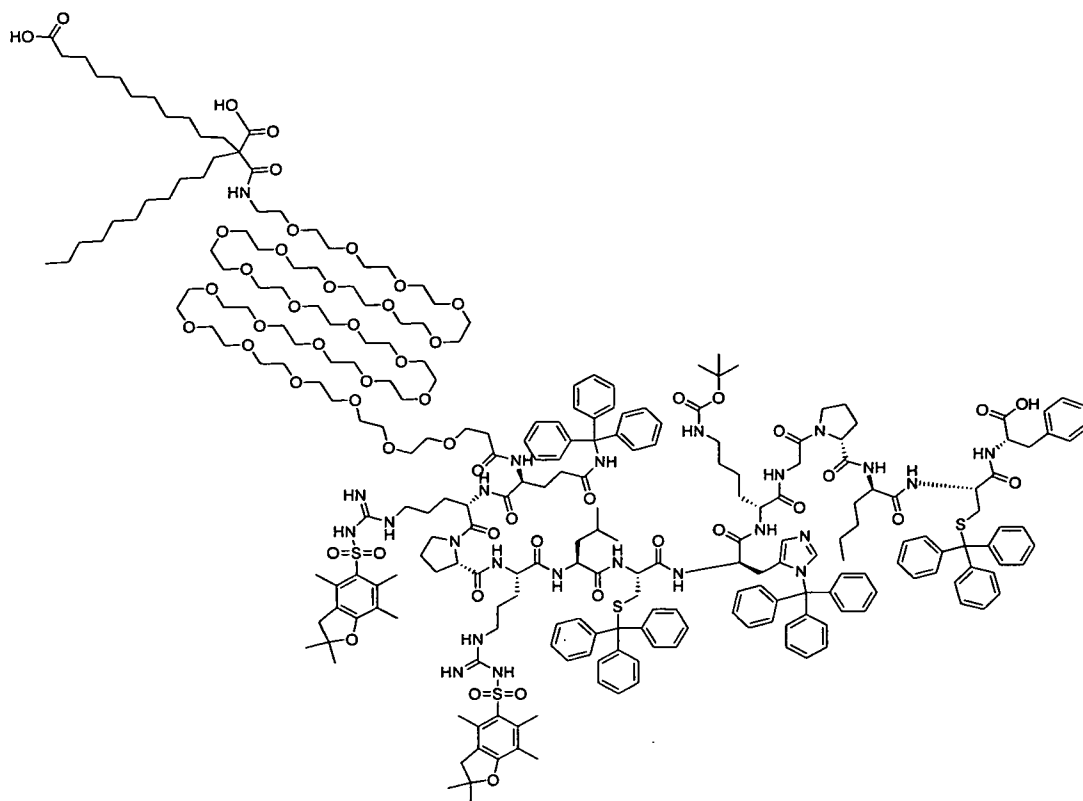
向中間物**1a** (2.347 g, 0.75 mmol)中添加24 mL 20% HFIP/DCM溶液，在室溫下震盪所得混合物20分鐘，隨後過濾，用DCM (3×10 mL)洗滌過濾物。以上程序執行4次以便得到完全裂解。真空濃縮經合併之濾液，得到粗中間物**1b** (2.09 g, 68%)，其未經純化直接用於下一步反應。LC/MS方法E：滯留時間：1.74 min；MS M/2+1：觀測值：1565.9，計算值：1564.458。

實例1：1號脂肪酸-連接基團：**Q-R-P-R-L-C*-H-K-G-P-(Nle)-C*-F**
(C₆-C₁₂二硫橋鍵)



步驟1：

向中間物**1b** (300 mg, 0.096 mmol)於THF (100 mL)中之溶液中添加含1號脂肪酸-連接基團構築體(960 mg, 0.575 mmol)之THF (35 mL)及水(15 mL)。在室溫下攪拌反應混合物。完成後，在部分真空下濃縮反應物且使其以粗產物形式進行下一個反應步驟，假定定量產率。(產物MW：4681.870)

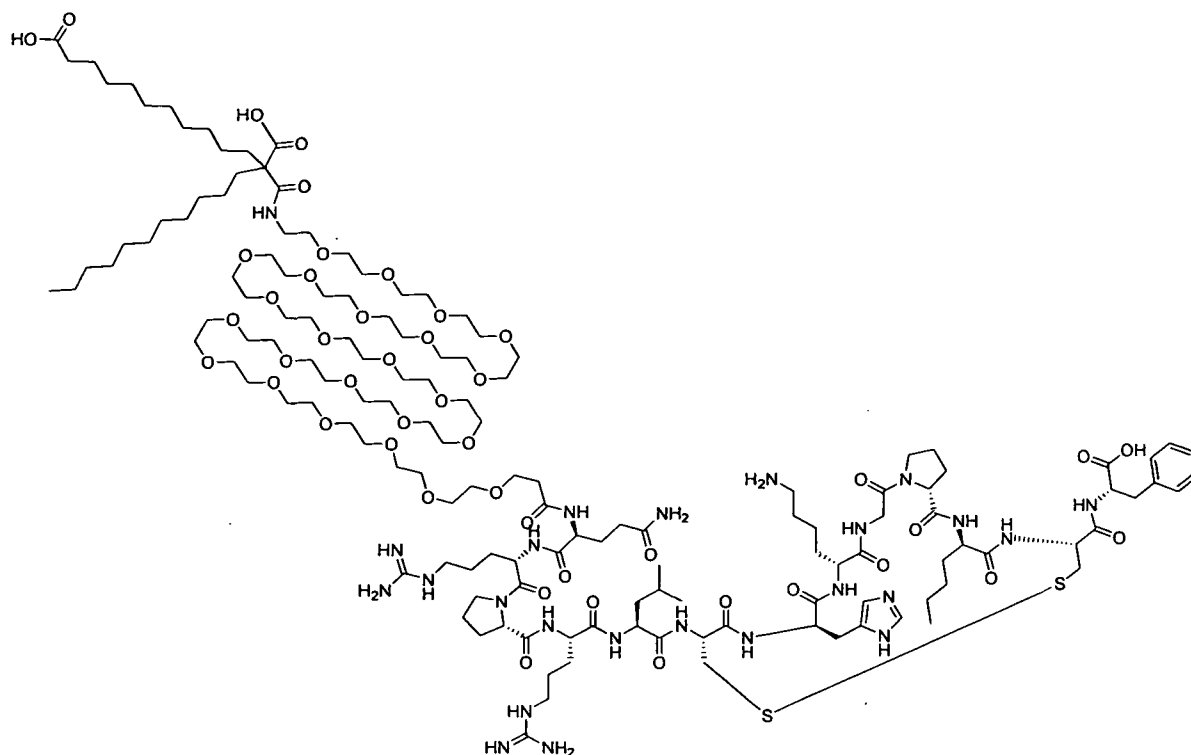


步驟2：脫除保護基：

向TFA (4.75 mL)、TIPS (0.125 mL)及水(0.125 mL)之溶液中添加DTT (296 mg, 1.920 mmol)。隨後向步驟1之化合物(449 mg, 0.096 mmol)中添加經預混合之混合物且在室溫下攪拌。完成後，在部分真空下濃縮反應物。用經冷卻之乙醚處理殘餘物，得到混濁的反應混合物，使其在室溫下靜置。藉由傾析掉乙醚分離所形成之所得膠狀物且再用經冷卻之乙醚沖洗。將膠狀物溶解於水(極少)中且加載至55 g C-18管柱上進行逆相層析。在20分鐘時間內，使用100%水(0.1% TFA)至100% ACN之溶劑梯度進行純化，得到呈淡黃色油狀之脫除保護基之化合物(160 mg, 54%產率)；

LCMS：方法D：ELSD：Rt 2.62 min MS m/z 1555.2 [(M/2)+H]⁺；

步驟3：環化-二硫鍵形成

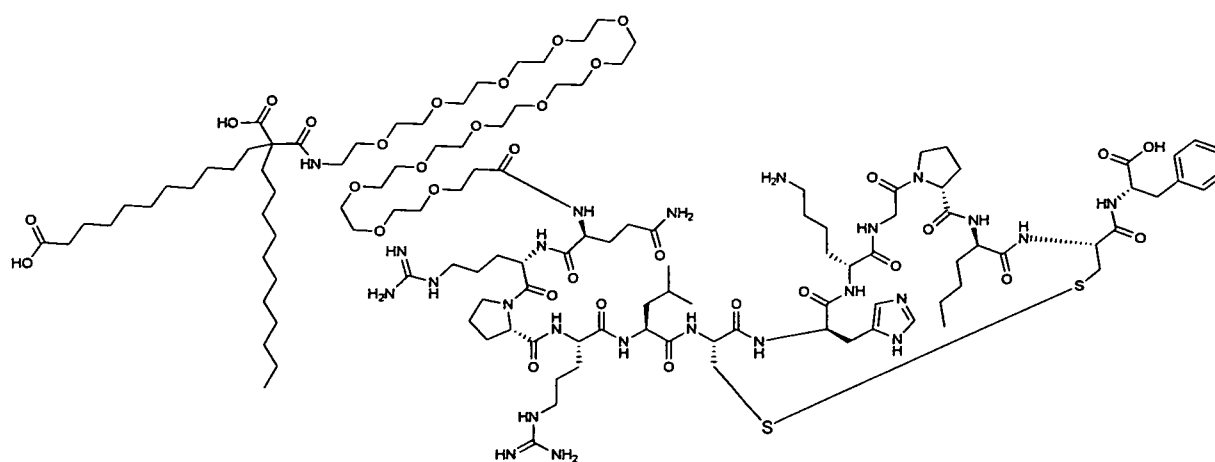


向步驟2之脫除保護基之化合物(160 mg, 0.051 mmol)於水(2 mL)中之溶液中添加碘(50 mM, 於AcOH中) (1.339 mL, 0.067 mmol)。在室溫下攪拌反應混合物。完成後, 將反應混合物直接加載至55 g C18 (55 μ g)管柱上進行逆相層析。在15分鐘時間內, 使用100%水(0.1% TFA)至100% ACN之溶劑梯度, 合併經LCMS之恰當部分且蒸發掉溶劑。凍乾所得殘餘物, 得到呈白色固體狀之標題化合物(實例1);

LCMS : 方法 D : ELSD : Rt 2.64 min ; MS m/z 1554.3 [(M/2)+H]⁺ ;

藉由用恰當的2號至4號脂肪酸-連接基團構築體替換1號脂肪酸-連接基團構築體, 以類似於實例1之方式製備以下實例。

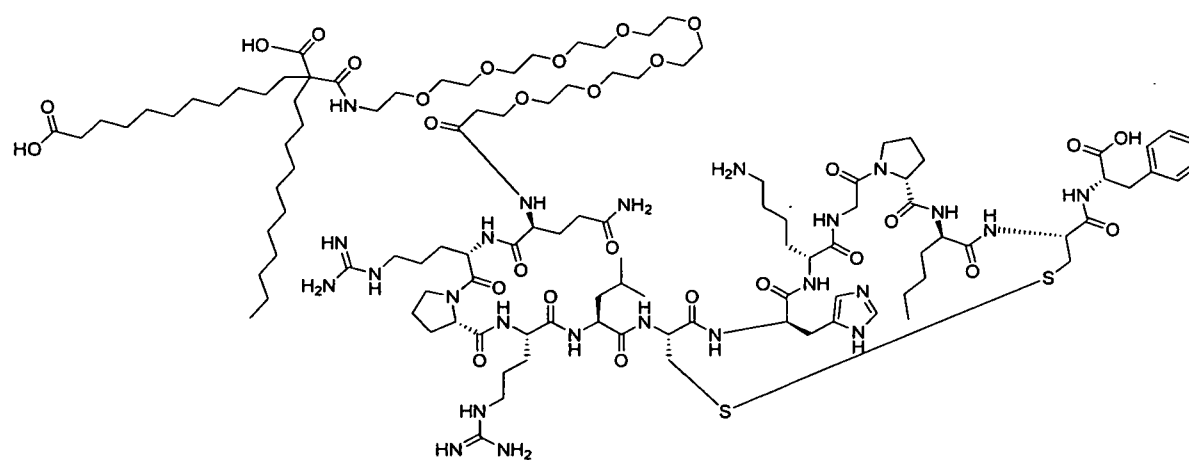
實例2 : 含2號脂肪酸-連接基團構築體之結合物



LCMS : 方法 D : ELSD : Rt 2.56 min ; MS m/z 1289.9

$[(M/2)+H]^+$;

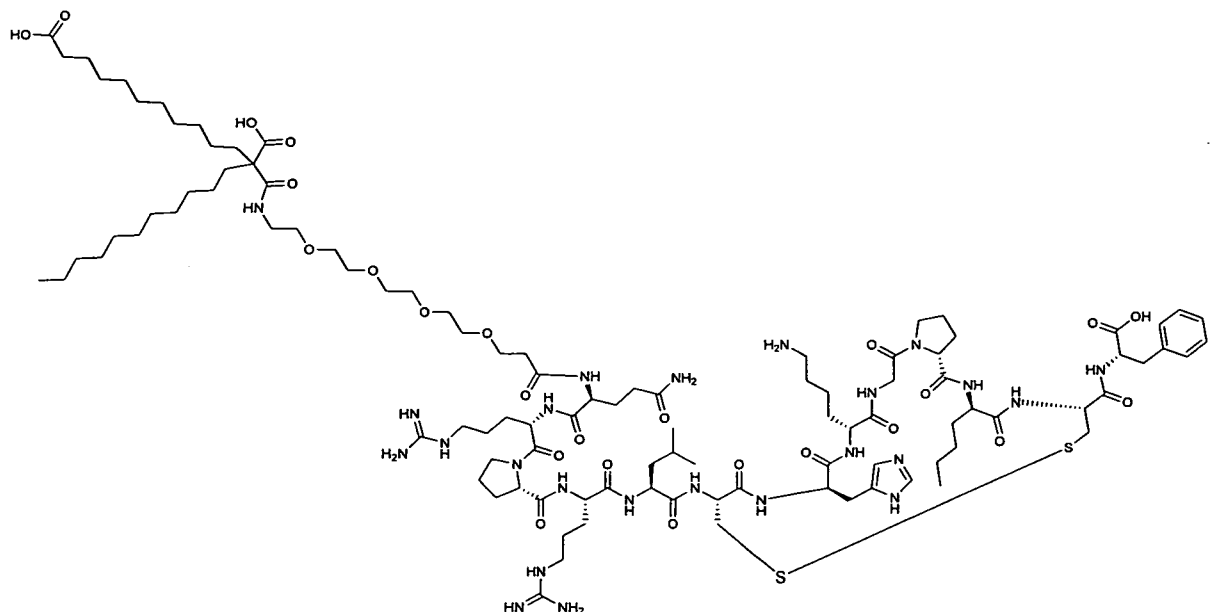
實例3：含3號脂肪酸-連接基團構築體之結合物



LCMS : 方法 D : ELSD : Rt 2.52 min ; MS m/z 1201.8

$[(M/2)+H]^+$;

實例4：含4號脂肪酸-連接基團構築體之結合物



LCMS : 方法 D : ELSD : Rt 2.49 min ; MS m/z 1113.6
[(M/2)+H]⁺;

已發現，以上實例中之結合物在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，以上實例中之結合物之血漿穩定性超過30分鐘，超過60分鐘，超過5小時，超過10小時，超過12小時。

可見本發明結合物適用作APJ受體之促效劑且因此適用於治療對APJ受體之活化有反應的疾病及病狀，諸如本文中所揭示之疾病。

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、改編及修改。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

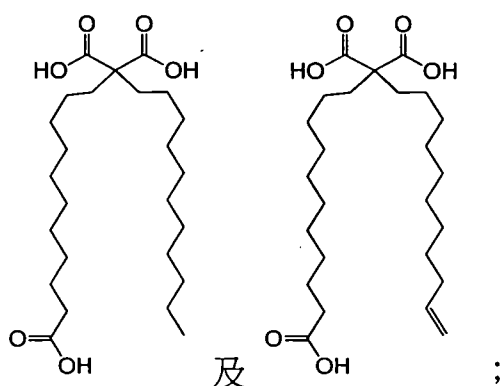
1. 一種結合物或其醫藥學上可接受之鹽，其包含：

a. 具有下式(I)之APJ促效劑肽：

Q-R-P-R-L-C*-H-K-G-P-(Nle)-C*-F (I)，或其鹽胺或酯；

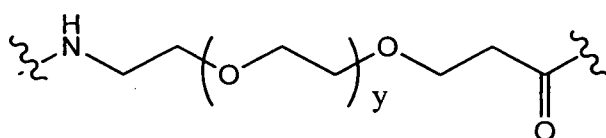
其中用「*」標記之兩個半胱胺酸胺基酸在其側鏈之硫醇官能基之間形成二硫鍵；及

b. 脂肪酸，其選自：



其中該脂肪酸經由其中一個羧酸官能基，視情況經由聚乙二醇連接基團共價連接至該肽之N端。

2. 如請求項1之結合物，其中該聚乙二醇(PEG)連接基團存在且具有式(III)：

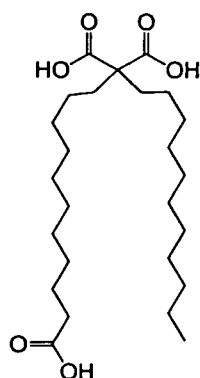


(III)，其中y為1至30，其

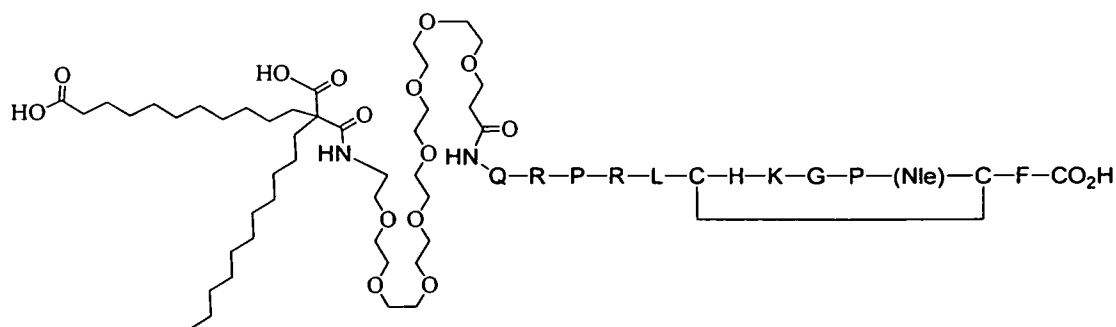
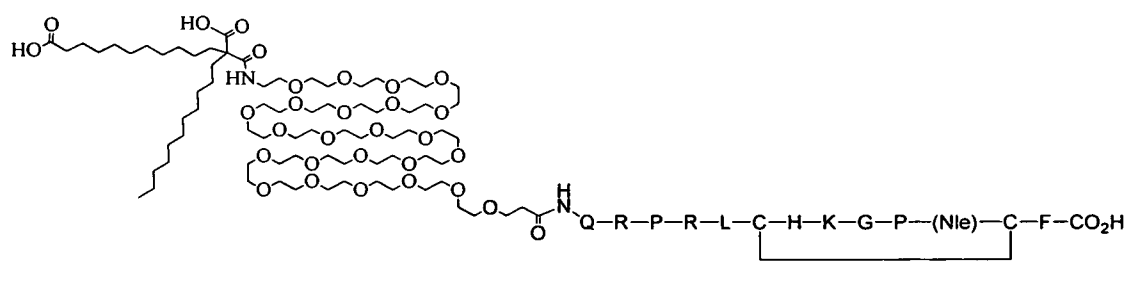
中該PEG連接基團之羧基官能基與該式(I)肽之N端處之胺基官能基形成鹽胺鍵且其中該PEG連接基團之胺基官能基與該脂肪酸之該等羧酸官能基中之一者形成鹽胺鍵。

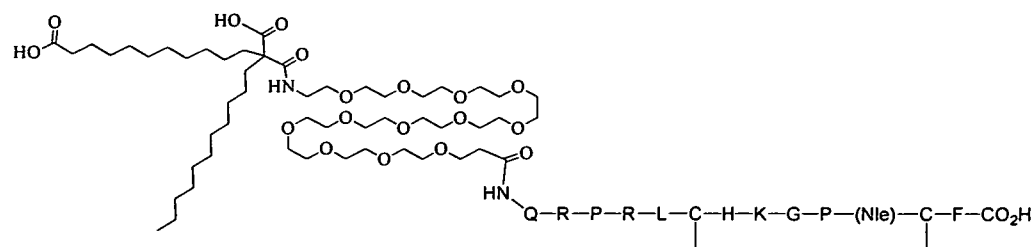
3. 如請求項1或2之結合物，其中該聚乙二醇連接基團具有式(III)且y為2至25。

4. 如請求項1或2之結合物，其中該脂肪酸為

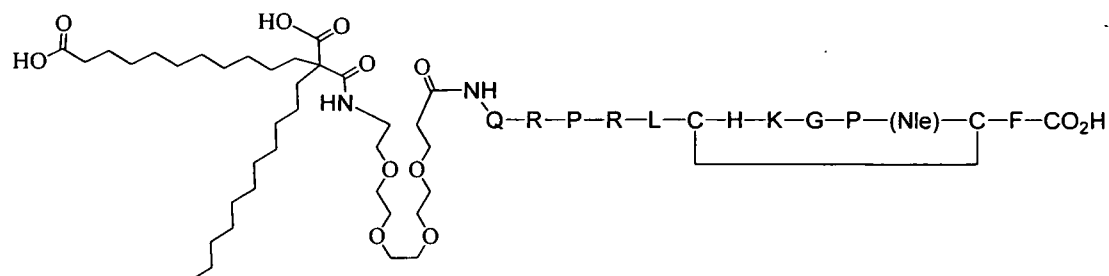


5. 如請求項1或2之結合物，其中該脂肪酸連接至該PEG連接基團之胺基官能基，或若該PEG連接基團不存在，則該脂肪酸經由其偕位羧酸官能基中之一者連接至該肽N端之胺基官能基。
6. 如請求項1或2之結合物，其中該脂肪酸連接至該PEG連接基團之胺基官能基，或若該PEG連接基團不存在，則該脂肪酸經由其末端羧酸官能基連接至該肽之胺基官能基。
7. 如請求項1之結合物，其選自：





；及



；

或其醫藥學上可接受之鹽。

8. 一種如請求項1至7中任一項之結合物或其醫藥學上可接受之鹽之用途，其係用於製造供治療或預防對APJ受體之促效作用有反應之疾病或病症用的藥物。

9. 如請求項8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)、心室性心動過速、動脈粥樣硬化、高血壓、再狹窄、缺血性心血管疾病、心肌症、心臟纖維化、心律不整、水滯留、糖尿病(包括妊娠性糖尿病)、肥胖症、周邊動脈疾病、腦血管事故、短暫性缺血性發作、創傷性腦損傷、肌肉萎縮性側索硬化、燒傷(包括曬傷)及先兆子癇。

10. 如請求項1或2之結合物或其醫藥學上可接受之鹽，其係用作藥物。

11. 如請求項1或2之結合物或其醫藥學上可接受之鹽，其係用於治療或預防對APJ受體之促效作用有反應的疾病或病症。

12. 如請求項1或2之結合物或其醫藥學上可接受之鹽，其係用於治

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、心室性心動過速、動脈粥樣硬化、高血壓、再狹窄、缺血性心血管疾病、心肌症、心臟纖維化、心律不整、水滯留、糖尿病(包括妊娠性糖尿病)、肥胖症、周邊動脈疾病、腦血管事故、短暫性缺血性發作、創傷性腦損傷、肌肉萎縮性側索硬化、燒傷(包括曬傷)或先兆子癇。

13. 一種組合，其包含治療有效量之如請求項1至7中任一項之結合物或其醫藥學上可接受之鹽，及一或多種治療活性共用製劑。
14. 如請求項13之組合，其中該共用製劑選自促進心肌收縮劑、 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擬似劑、抗糖尿病劑、減肥藥、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。
15. 一種醫藥組合物，其包含治療有效量之如請求項1至7中任一項之結合物或其醫藥學上可接受之鹽，及一或多種醫藥學上可接受之載劑。

圖式

在皮下給藥之後，實例1及4之化合物的小鼠血漿曝露曲線

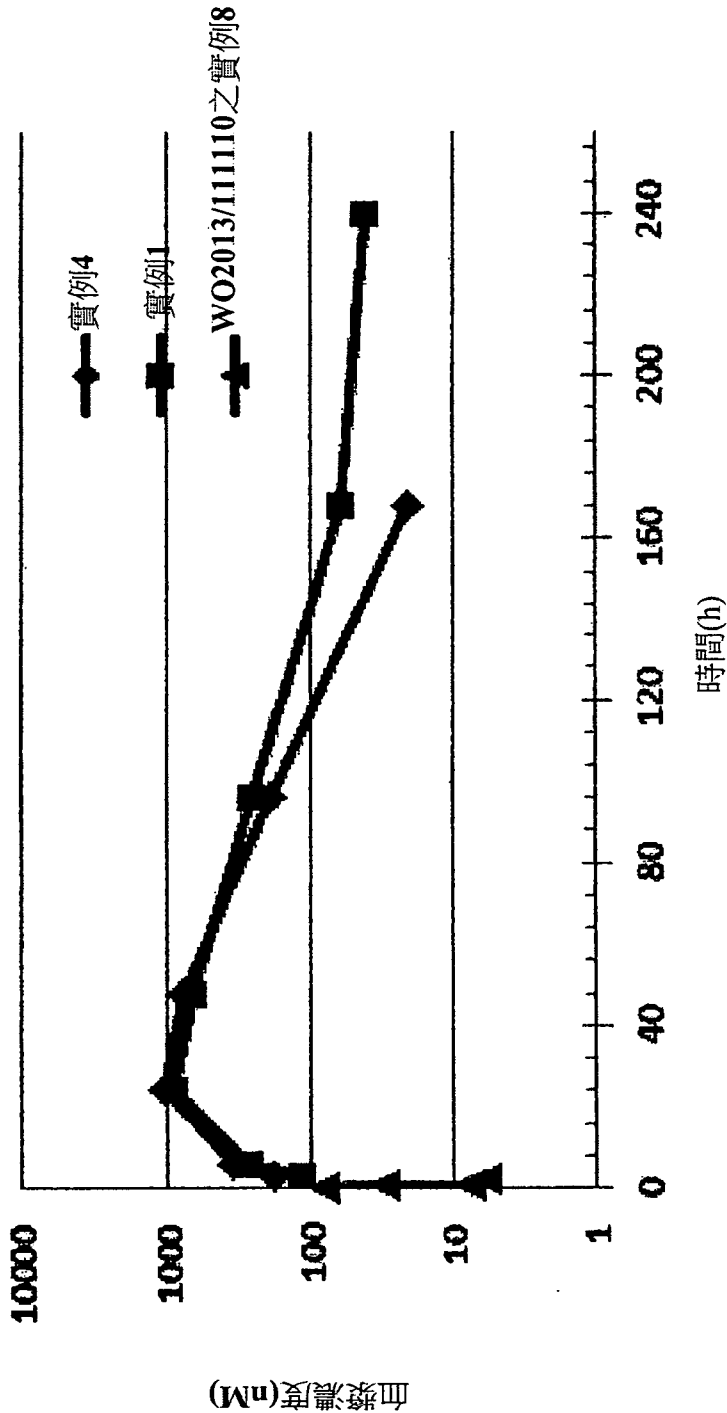


圖1