



## (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110114065 A

(43)申请公布日 2019.08.09

(21)申请号 201780073942.4

(74)专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

(22)申请日 2017.11.30

11105

代理人 张文辉

(30)优先权数据

62/428,492 2016.11.30 US

62/553,313 2017.09.01 US

(51)Int.Cl.

A61K 31/00(2006.01)

A61K 31/445(2006.01)

A61K 31/4535(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.05.29

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2017/064081 2017.11.30

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/102616 EN 2018.06.07

(71)申请人 珀杜研究基金会

地址 美国印第安纳州

(72)发明人 P.S.洛 S.A.洛 J.尼尔森

权利要求书3页 说明书27页

序列表33页 附图26页

(54)发明名称

通过甲状旁腺激素受体刺激进行的骨折靶向性骨再生

(57)摘要

本文公开了包括用于骨折和/或用于骨愈合的药物递送系统,其包含至少一种肽和靶向配体。一些实施方案包括肽递送系统,其至少包含与酸性肽或非肽聚阴离子连接的酸性、碱性、亲水性、疏水性或中性肽,用于将上述连接的肽靶向到骨折表面。在一些实施方案中,缀合肽表达通过PTH受体1起作用的合成代谢功能,并且各种形式的靶向配体将药物引导至生羟基磷灰石。该系统抵消了由游离合成代谢药物引起的一些副作用,例如高血钙浓度。



1. 化合物,其包含:

式X-Y-Z的化合物;

其中:

X是至少一种调节甲状旁腺激素受体活性的试剂;

Z是至少一种骨靶向分子;和

Y是连结和/或连接X和Z的接头;

或其药学上可接受的盐,或其代谢物。

2. 根据权利要求1的化合物,其中:

X是至少一种多肽,所述多肽与全长甲状旁腺激素相关肽 (SEQ ID NO:12) 具有至少80%序列同一性,与全长甲状旁腺激素 (SEQ ID NO:13) 具有至少80%序列同一性,和/或与全长阿巴帕肽 (abaloparatide) 或其类似物具有至少80%同一性;

Y是至少一种与全长甲状旁腺激素相关肽或甲状旁腺激素的氨基酸残基35-40、35-41、35-42、35-43、35-44、35-45、35-46、和/或35-84包含至少80%序列同一性的多肽,和/或至少一种组织蛋白酶K敏感多肽;和

Z是至少一种包含4个或更多个酸性氨基酸残基的多肽、多聚磷酸盐、氨基己二酸或其衍生物,和/或阿屈膦酸盐或其衍生物。

3. 根据权利要求1和2中任一项的化合物,其中:

X是至少一种与SEQ ID NO:1、2、3、4、5、6、7、8、和9具有至少80%序列同一性的多肽;

Y是至少一种与全长甲状旁腺激素相关肽的氨基酸残基35-46和/或41-46包含至少80%的序列同一性的多肽;和

Z是至少一种包含4个或更多个酸性氨基酸残基的多肽、多聚磷酸盐和/或阿屈膦酸盐或其衍生物。

4. 根据权利要求1-3中任一项的化合物,其中:

X是至少一种与全长阿巴帕肽或其类似物具有80%同一性的多肽;

Y是至少一种与全长甲状旁腺激素相关肽的氨基酸残基35-46包含至少80%序列同一性的多肽;和

Z是至少一种包含4个或更多个酸性氨基酸残基的多肽、多聚磷酸盐和/或阿屈膦酸盐或其衍生物。

5. 根据权利要求1-4中任一项的化合物,其中:

Z是至少一种包含6、7、8、9和/或10个酸性氨基酸残基的多肽。

6. 根据权利要求1-5中任一项的化合物,其中所述酸性氨基酸残基包含L-或D-天冬氨酸、L-或D-谷氨酸或其组合。

7. 根据权利要求1-6中任一项的化合物,其中所述酸性氨基酸残基还包含分支氨基酸和/或氨基酸支链。

8. 根据权利要求1-7中任一项的化合物,其中:

Y是至少一种包含式Gly-Gly-Pro-Nle的多肽,其中Nle包含正亮氨酸、亮氨酸、异亮氨酸和/或其等同物。

9. 根据权利要求1-8中任一项的化合物,其中式X-Y-Z的化合物是至少一种与SEQ ID NO:10和/或SEQ ID NO:11具有至少80%、90%和/或95%序列同一性的多肽。

10. 根据权利要求1-9中任一项的化合物, 其中式X-Y-Z的化合物是至少一种具有SEQ ID NO:10和/或SEQ ID NO:11的多肽。

11. 根据权利要求1-10中任一项的化合物, 其中X是甲状旁腺激素受体1的至少一种激动剂。

12. 根据权利要求1-11中任一项的化合物, 其中X是至少一种多肽, 所述多肽与全长甲状旁腺激素相关肽 (SEQ ID NO:12) 的前13个氨基酸具有至少80%序列同源性, 与全长甲状旁腺激素 (SEQ ID NO:13) 的前13个氨基酸具有至少80%序列同源性, 和/或与SEQ ID NO:3的前13个氨基酸具有至少80%同源性。

13. 治疗骨相关疾病的方法, 该方法包括以下步骤:

向受试者提供至少一种治疗有效剂量的权利要求1-12中任一项的化合物或其药学上可接受的盐或代谢物。

14. 根据权利要求13的方法, 其中所述受试者包括人、动物、细胞和/或组织。

15. 根据权利要求13和14中任一项的方法, 其中所述骨相关疾病包括骨质减少、骨质疏松、类风湿性关节炎、血液学、自身免疫、移植物排斥和/或骨折。

16. 根据权利要求13-15中任一项的方法, 权利要求1-10中任一项的化合物的有效剂量包含0.001nmol/kg/天至1000nmol/kg/天、0.01nmol/kg/天至1000nmol/kg/天、0.1nmol/kg/天至1000nmol/kg/天、1nmol/kg/天至500nmol/kg/天、1nmol/kg/天至250nmol/kg/天、1nmol/kg/天至100nmol/kg/天、10nmol/kg/天至75nmol/kg/天、和/或20nmol/kg/天至50nmol/kg/天。

17. 根据权利要求13-16中任一项的方法, 其中口服、胃肠外、直肠和/或透皮施用权利要求1-12中任一项的化合物。

18. 化合物, 其包含:

式X-Z的化合物;

其中:

X是至少一种肽; 和

Z是至少一种骨靶向分子;

或其药学上可接受的盐, 或其代谢物。

19. 根据权利要求18的化合物, 其中Z是至少一种优先和/或选择性地靶向骨折骨的分子。

20. 根据权利要求18和19中任一项的化合物, 其中X是至少一种具有少于60、50、40、30、20和/或10个氨基酸残基的肽。

21. 根据权利要求18-20中任一项的化合物, 其中X是至少一种具有多于1、2、3、4和/或5个氨基酸残基的肽。

22. 根据权利要求18-21中任一项的化合物, 其中X是至少一种肽, 其包含亲水肽、疏水肽、中性肽、阳离子肽和/或阴离子肽的肽和/或其任何组合。

23. 根据权利要求18-22中任一项的化合物, 其中:

X是至少一种包含与SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19或其类似物或代谢物具有至少80%序列同一性的序列的多肽; 和

Z是至少一种包含4个或更多个酸性氨基酸残基的多肽、多聚磷酸盐、氨基己二酸或其

衍生物、阿屈膦酸盐或其衍生物,和/或二膦酸盐或其衍生物。

24. 根据权利要求18-23中任一项的化合物,其中:

X是至少一种包含与SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19或其类似物或代谢物具有至少90%序列同一性的序列的多肽;和

Z是至少一种包含4个或更多个酸性氨基酸残基的多肽、多聚磷酸盐和/或二膦酸盐或其衍生物。

25. 根据权利要求18-24中任一项的化合物,其中X是至少一种多肽,其包含与SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18和/或SEQ ID NO:19具有至少95%序列同一性的序列。

26. 根据权利要求18-25中任一项的化合物,其中X是至少一种多肽,其包含与SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18和/或SEQ ID NO:19具有至少100%序列同一性的序列。

27. 根据权利要求18-26中任一项的化合物,其中Z是至少一种包含带负电荷的氨基酸残基的多肽。

28. 根据权利要求18-27中任一项的化合物,其中Z是至少一种包含4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19和/或20个带负电荷的氨基酸残基的多肽。

29. 根据权利要求18-28中任一项的化合物,其中Z是至少一种单-二膦酸盐、二-二膦酸盐、三-二膦酸盐和/或多-二膦酸盐。

30. 根据权利要求18-29中任一项的化合物,其中Z是至少一个酸性氨基酸残基,其包含L-或D-天冬氨酸、L-或D-谷氨酸或其组合。

31. 根据权利要求18-30中任一项的化合物,其中Z是至少一个酸性氨基酸残基,其包含分支氨基酸和/或氨基酸支链。

32. 根据权利要求18-31中任一项的化合物,其中Z是至少一个酸性氨基酸残基,其包含分支氨基酸和/或氨基酸支链。

33. 根据权利要求18-32中任一项的化合物,其中式X-Z的化合物包含与SEQ ID NO:23-81或其类似物或代谢物中的任一项具有至少80%序列同一性的序列。

34. 根据权利要求18-33中任一项的化合物,其中式X-Z的化合物包含与SEQ ID NO:23-81或其类似物或代谢物中的任一项具有95%序列同一性的序列。

35. 根据权利要求18-34中任一项的化合物,其中式X-Z的化合物包含与SEQ ID NO:23-81或其类似物或代谢物中的任一项具有100%序列同一性的序列。

36. 根据权利要求18-35中任一项的化合物,其还包含连接部分Y,其中Y是连结和/或连接X和Z的接头。

## 通过甲状旁腺激素受体刺激进行的骨折靶向性骨再生

[0001] 对相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2016年11月30日提交的美国临时申请No.62/428,492和2017年9月1日提交的美国临时申请No.62/553,313的权益,两者的全部公开内容均为在此通过引用明确地并入本文。

### 发明领域

[0003] 一般地,本文公开的各个方面和实施方案涉及由骨相关疾病诱发的疾病/症状的建模、治疗、降低对治疗的抗性、预防,和诊断。实施方案包括治疗骨相关疾病的方法,包括以下步骤:向受试者提供至少一种治疗有效剂量的本文公开的化合物。

[0004] 发明背景

[0005] 此部分介绍了可以帮助促进更好地理解本公开的方面。这些陈述应当从此角度来阅读,并且不应理解为承认何为现有技术或不为现有技术。

[0006] 健康骨骼是50-70%矿物质、20-40%有机基质、5-10%水和1-5%脂质的混合物,并且不断地被再循环到新骨中以帮助健康的骨骼来维持其刚性和柔韧性。在此再循环过程的开始,单核细胞接收几个信号,促使它们分化成破骨细胞。成骨细胞然后表达核因子κB受体激活剂配体(RANKL)到单核细胞中核因子κB受体激活剂(RANK)表面受体,启动TRAF6级联,使单核细胞定型为破骨细胞生成。然后,成熟的破骨细胞引发健康的分解代谢骨吸收。当间充质干细胞(MSC)被BMP-2/Runx2和Wnt/β-连环蛋白途径刺激成为成骨细胞时,合成代谢过程开始。接下来,成熟的成骨细胞沉积类骨质,其是主要由I型胶原构成的骨质基质组分,其矿化并成为新骨。

[0007] 在美国,骨折的年频率为约630万。仅这一点就是我们医疗保健系统的主要负担。婴儿潮一代的成熟以及发达国家大部分人口的普遍老龄化加剧了此问题。随着婴儿潮增加骨质疏松的频率,复杂和危及生命的骨折的频率将急剧增加。到2040年,单独的髌部骨折预计将增加160%至500,000/年。即使目前在21世纪,那些65岁及以上患有髌部骨折的人中约四分之一会因受伤后一年内不动相关的并发症而死亡。这提出了关键的公共健康问题。

[0008] 目前对骨折的临床治疗通常不包括使用位点特异性合成代谢药物。事实上,批准临床用于此类骨折的仅有药物是BMP-2(仅批准用于胫骨创伤)和BMP-7(停用),它们局部应用并用于治疗开放性长骨骨折和脊柱融合。当考虑到合成代谢物的使用85%是标签外时,明显需要更广泛地应用合成代谢药物来治疗诸如骨质疏松性骨折等骨质疾病。(Ong, K.L.et al.,Spine 35(2010)1794-1800)。FDA仍然明智地继续限制对已经开放并有感染风险的骨折的局部施用药物的批准使用。

[0009] 该限制使得治疗这些类型的骨折的临床相关方法成为需要。因此,期望具有系统性施用但是靶向骨折部位的骨折治疗药物。

[0010] 发明概述

[0011] 第一实施方案包括至少一种式X-Y-Z的化合物,或其药学上可接受的盐,或其代谢物,其中X是至少一种调节至少一种甲状旁腺激素受体活性的试剂;Z是至少一种骨靶向分

子;且Y是连结和/或连接X和Z的接头。在一些实施方案中,X是至少一种增强至少一种甲状旁腺激素受体活性的试剂。与这些实施方案一致,Z是至少一种与羟磷灰石和/或生骨(raw bone)结合的带负电荷的寡肽或其等同物。

[0012] 第二实施方案包括根据第一实施方案的化合物,其中X是至少一种多肽,所述多肽与全长甲状旁腺激素相关肽(SEQ ID NO:12)具有至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、和/或100%序列同一性,与全长甲状旁腺激素(SEQ ID NO:13)具有至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%和/或100%序列同一性,和/或与全长阿巴帕肽(abaloparatide)或其类似物具有至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%和/或100%的同一性;

[0013] Y是至少一种与全长甲状旁腺激素相关肽或甲状旁腺激素的氨基酸残基35-40、35-41、35-42、35-43、35-44、35-45、35-46、35-47、35-48、35-49、35-50、35-51、35-52、35-55、35-84、41-44、41-45、41-46、41-47、41-48、41-49、41-50、和/或41-84包含至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%和/或100%序列同一性的多肽,和/或至少一种组织蛋白酶K敏感多肽;和

[0014] Z是至少一种包含约4或更多,约4至约100,约4至约50,4至约20,约4至约15,约4至约10个酸性氨基酸残基的多肽,多聚磷酸盐、2-氨基己二酸(氨基己二酸)或其衍生物,和/或阿屈膦酸盐或其衍生物。在一些实施方案中,Z是至少一种包含约4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29和/或30个酸性氨基酸残基的多肽,多聚磷酸盐,2-氨基己二酸或其衍生物,和/或阿屈膦酸盐或其衍生物。在其他实施方案中,Z是与羟磷灰石和/或生骨结合的至少一个带负电的寡肽或其等同物。

[0015] 在一些实施方案中,X是至少一种多肽,其包括下述多肽,所述多肽与全长甲状旁腺激素相关肽(SEQ ID NO:12)具有至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%和/或100%序列同一性,与全长甲状旁腺激素(SEQ ID NO:13)具有至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、和/或100%序列同一性,和/或与全长阿巴帕肽或其类似物具有至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%,和/或100%同一性;Y是至少一种多肽,其包括下述多肽,所述多肽与全长甲状旁腺激素相关肽或甲状旁腺激素的氨基酸残基35-40、35-41、35-42、35-43、35-44、35-45、35-46、35-47、35-48、35-49、35-50、35-51、35-52、35-55、35-84、41-44、41-45、41-46、41-47、41-48、41-49、41-50、和/或41-84包含至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、和/或100%序列同一性,和/或至少一种组织蛋白酶K敏感多肽;且Z是至少一种多肽,其包括包含约4或更多,约4至约100,约4至约50,约4至约20,约4至约15,约4至约10个酸性氨基酸残基的多肽,多聚磷酸盐,氨基己二酸或其衍生物,和/或阿屈膦酸盐或其衍生物。在一些实施方案中,Z是至少一种多肽,其包括包含约4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、

24、25、26、27、28、29、和/或30个酸性氨基酸残基的多肽，多聚磷酸盐，氨基己二酸或其衍生物，和/或阿屈膦酸盐或其衍生物。

[0016] 第三实施方案包括根据前述实施方案中任一项的化合物，X是至少一种与SEQ ID NO:1、2、3、4、5、6、7、8和/或9中任一项具有至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%和/或100%序列同一性的多肽；Y是至少一种与全长甲状旁腺激素相关肽的氨基酸残基35-46和/或41-46包含至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、和/或100%序列同一性的多肽；Z是至少一种包含约4个或更多个酸性氨基酸残基的多肽，多聚磷酸盐和/或阿屈膦酸盐或其衍生物。在一些实施方案中，Z为至少一种多肽，其包含约4至约100，约4至约50，4至约20，约4至约15，约4至约10个酸性氨基酸残基，多聚磷酸盐，氨基己二酸或其衍生物，和/或阿屈膦酸盐或其衍生物。在其他实施方案中，Z是至少一种包含约4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、和/或30个酸性氨基酸残基的多肽，多聚磷酸盐，氨基己二酸或其衍生物，和/或其阿屈膦酸盐或其衍生物。

[0017] 第四实施方案包括根据第一至第三实施方案中任一项的化合物，其中X是至少一种与全长阿巴帕肽或其类似物具有约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%和/或100%同一性的多肽；Y是至少一种与全长甲状旁腺激素相关肽的氨基酸残基35-46包含至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%和/或100%序列同一性的多肽；且Z是至少一种包含约4或更多，约4至约100，约4至约50，4至约20，约4至约15，约4至约10个酸性氨基酸残基的多肽，多聚磷酸盐，2-氨基己二酸或其衍生物，和/或阿屈膦酸盐或其衍生物。在一些实施方案中，Z是至少一种包含约4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29和/或30个酸性氨基酸残基的多肽，多聚磷酸盐，2-氨基己二酸或其衍生物，和/或阿屈膦酸盐或其衍生物。

[0018] 第五实施方案包括根据第一至第四实施方案中任一项的化合物，其中Z是至少一种包含约6、7、8、9和/或10个酸性氨基酸残基的多肽。

[0019] 第六实施方案包括根据第一至第五实施方案中任一项的化合物，其中酸性氨基酸残基包括L-或D-天冬氨酸，L-或D-谷氨酸，或其组合。

[0020] 第七实施方案包括根据第一至第六实施方案中任一项的化合物，其中酸性氨基酸残基还包含分支氨基酸和/或氨基酸支链。

[0021] 第八实施方案包括根据第一至第七实施方案中任一项的化合物，其中Y是至少一种包含式Gly-Gly-Pro-Nle的多肽，其中Nle包含正亮氨酸，亮氨酸，异亮氨酸和/或其等同物。

[0022] 第九实施方案包括根据第一至第八实施方案中任一项的化合物，其中式X-Y-Z的化合物是至少一种与SEQ ID NO:10和/或SEQ ID NO:11中的任一项具有至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、和/或99%序列同一性的多肽。在一些实施方案中，式X-Y-Z的化合物是至少一种多肽，其包括与SEQ ID NO:10和/或SEQ ID NO:11中的任一项具有至少约80%、81%、

82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%和/或99%的序列同一性的多肽。

[0023] 第十实施方案包括根据第一至第九实施方案中任一项的化合物,其中式X-Y-Z的化合物是至少一种具有SEQ ID NO:10和/或SEQ ID NO:11的多肽。在一些实施方案中,式X-Y-Z的化合物是至少一种多肽,其包括具有SEQ ID NO:10和/或SEQ ID NO:11的多肽。

[0024] 第十一实施方案包括根据第一至第十实施方案中任一项的化合物,其中X是甲状旁腺激素受体1的至少一种激动剂。

[0025] 第十二实施方案包括根据第一至第十一实施方案中任一项的化合物,其中X是至少一种多肽,其与全长甲状旁腺激素相关肽(SEQ ID NO:12)的前13个氨基酸残基具有至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%和/或100%序列同源性,与全长甲状旁腺激素(SEQ ID NO:13)的前13个氨基酸残基具有至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%和/或100%序列同源性,和/或与SEQ ID NO:3的前13个氨基酸残基具有至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%和/或100%序列同源性。

[0026] 在一些实施方案中,X是至少一种多肽,其与全长甲状旁腺激素相关肽(SEQ ID NO:12)的氨基酸残基2、3、4、6、7、9、12和/或13具有至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%和/或100%序列同源性,与全长甲状旁腺激素(SEQ ID NO:13)的氨基酸残基2、3、4、6、7、9、12和/或13具有至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%和/或100%序列同源性,和/或与SEQ ID NO:3的氨基酸残基2、3、4、6、7、9、12和/或13具有至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%和/或100%序列同源性。

[0027] 第十三个实施方案包括治疗骨相关疾病的方法,该方法包括以下步骤:向受试者提供至少一个治疗有效剂量的第一至第十二实施方案中任一项的化合物,或其药学上可接受的盐或代谢物。

[0028] 第十四实施方案包括根据第十三实施方案的方法,其中受试者包括人,动物,细胞和/或组织。

[0029] 第十五实施方案包括根据第十三和/或第十四实施方案的方法,其中骨相关疾病包括骨质减少、骨质疏松、类风湿性关节炎、血液学、自身免疫、移植物排斥和/或骨折。

[0030] 第十六实施方案包括根据第十三至第十五实施方案的方法,根据第一至第十二实施方案中任一项的化合物的有效剂量包含约0.0001nmol/kg/天至约1000nmol/kg/天,约0.001nmol/kg/天至约1000nmol/kg/天,约0.01nmol/kg/天至约1000nmol/kg/天,约0.1nmol/kg/天至约1000nmol/kg/天,约0.0001nmol/kg/天至约500nmol/kg/天,约0.001nmol/kg/天至约500nmol/kg/天,约0.01nmol/kg/天至约500nmol/kg/天,约1nmol/kg/天至约500nmol/kg/天,约0.0001nmol/kg/天至约250nmol/kg/天,约0.001nmol/kg/天至约250nmol/kg/天,约0.01nmol/kg/天至约250nmol/kg/天,约1nmol/kg/天至250nmol/kg/天。



kg/天,约0.0001nmol/kg/天至约100nmol/kg/天,约0.001nmol/kg/天至约100nmol/kg/天,约0.01nmol/kg/天至约100nmol/kg/天,约1nmol/kg/天至约75nmol/kg/天,约1nmol/kg/天至约100nmol/kg/天,约1nmol/kg/天至约250nmol/kg/天,约1nmol/kg/天至约500nmol/kg/天,约10nmol/kg/天至约75nmol/kg/天,约10nmol/kg/天至约100nmol/kg/天,约10nmol/kg/天至约250nmol/kg/天,约10nmol/kg/天至约500nmol/kg/天,约20nmol/kg/天至约50nmol/kg/天,约20nmol/kg/天至约75nmol/kg/天,约20nmol/kg/天至约100nmol/kg/天,约20nmol/kg/天至约250nmol/kg/天,约20nmol/kg/天至约500nmol/kg/天,和/或约0.074nmol/kg/天。

[0031] 在一些实施方案中,根据第一至第十二实施方案中任一项的化合物的有效剂量包含约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、45、46、47、48、49、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、和/或200nmol/kg/天。在其他实施方案中,根据第一至第十二实施方案中任一项的化合物的有效剂量包含约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、45、46、47、48、49、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190和/或200pmol/kg/天。

[0032] 第十七实施方案包括根据第十三至第十五实施方案的方法,其中口服,胃肠外,直肠,透皮,舌下和/或鼻内施用第一实施方案至第十二实施方案中任一项的化合物。

[0033] 第十八实施方案包括化合物,其包含:式X-Z的化合物;其中:X是至少一种肽;和Z是至少一种骨靶向分子;或其药学上可接受的盐,或其代谢物。

[0034] 第十九实施方案包括根据第十八实施方案的化合物,其中Z是至少一种优先和/或选择性靶向骨折骨的分子。

[0035] 第二十实施方案包括根据第十八和第十九实施方案中任一项的化合物,其中X是至少一种具有少于70、69、68、67、66、65、64、63、62、61、60、59、58、57、56、55、54、53、52、51、50、49、48、47、46、45、44、43、42、41、40、39、38、37、36、35、34、33、32、31、30、29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11和/或10个氨基酸残基的肽。

[0036] 第二十一实施方案包括根据第十八至第二十实施方案中任一项的化合物,其中X是至少一种具有多于1、2、3、4、5、6、7、8、9和/或10个氨基酸残基的肽。

[0037] 第二十二实施方案包括根据第十八至第二十一实施方案中任一项的化合物,其中X是至少一种肽,其包含亲水肽,疏水肽,中性肽,阳离子肽和/或阴离子肽和/或其任何组合。

[0038] 第二十三实施方案包括根据第十八至第二十二实施方案中任一项的化合物,其中:X是至少一种包含与SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19或其类似物或代谢物中任一项具有至少约60%、70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%和/或90%序列同一性的序列的多肽;且Z是至少一种包含4个或更多个酸性氨基酸残基的多肽、多聚磷酸盐、氨基己二酸或其衍生物,阿屈膦酸盐或其衍生物,和/或二膦酸盐或其衍生物。

[0039] 第二十四实施方案包括根据第十八至第二十三实施方案中任一项的化合物,其中:X是至少一种包含与SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ

ID NO:18、SEQ ID NO:19或其类似物或代谢物中任一项具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、和/或99%序列同一性的序列的多肽；且Z是至少一种包含4个或更多个酸性氨基酸残基的多肽，多聚磷酸盐和/或二磷酸盐或其衍生物。

[0040] 第二十五实施方案包括根据第十八至第二十四实施方案中任一项的化合物，其中X是至少一种多肽，其包含SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18和/或SEQ ID NO:19中的任一项具有至少95%、96%、97%、98%和/或99%序列同一性的序列。

[0041] 第二十六实施方案包括根据第十八至第二十五实施方案中任一项的化合物，其中X是至少一种多肽，其包含与SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18和/或SEQ ID NO:19中的任一项具有至少100%序列同一性的序列。

[0042] 第二十七实施方案包括根据第十八至第二十六实施方案中任一项的化合物，其中Z是至少一种包含带负电荷的氨基酸残基的多肽。

[0043] 第二十八实施方案包括根据第十八至第二十七实施方案中任一项的化合物，其中Z是至少一种多肽，所述多肽包含2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、40、50、60、70、80、90和/或100个带负电荷的氨基酸残基。

[0044] 第二十九实施方案包括根据第十八至第二十八实施方案中任一项的化合物，其中Z为至少一个单-二磷酸盐，二-二磷酸盐，三-二磷酸盐，四-二磷酸盐，五-二磷酸盐，六-二磷酸盐和/或多-二磷酸盐。

[0045] 第三十实施方案包括根据第十八至第二十九实施方案中任一项的化合物，其中Z为至少一个酸性氨基酸残基，其包含L-或D-天冬氨酸，L-或D-谷氨酸，或其组合。

[0046] 第三十一实施方案包括根据第十八至第三十实施方案中任一项的化合物，其中Z为至少一个酸性氨基酸残基，其包含分支氨基酸和/或氨基酸的支链，或其组合。

[0047] 第三十二实施方案包括根据第十八至第三十一实施方案中任一项的化合物，其中Z是至少一个酸性氨基酸残基，其包含分支氨基酸和/或氨基酸的支链，或其组合。

[0048] 第三十三实施方案包括根据第十八至第三十二实施方案中任一项的化合物，其中式X-Z的化合物包含与SEQ ID NO:23-81或其类似物或代谢物中的任一项具有至少60%、70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%和/或90%序列同一性的序列。

[0049] 第三十四实施方案包括根据第十八至第三十三实施方案中任一项的化合物，其中式X-Z的化合物包含与SEQ ID NO:23-81或其类似物或代谢物中的任一项具有90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%和/或99%的序列同一性的序列。

[0050] 第三十五实施方案包括根据第十八至第三十四实施方案中任一项的化合物，其中式X-Z的化合物包含与SEQ ID NO:23-81或其类似物或代谢物中的任一项具有100%序列同一性的序列。

[0051] 第三十六实施方案包括根据第十八至第三十五实施方案中任一项的化合物，还包含连接部分Y，其中Y是连结和/或连接X和Z的接头。

[0052] 本公开内容包括用于靶向治疗骨折的化合物，该化合物包含式X-Y-Z，其中X是活性合成代谢肽或其有效片段，其是甲状旁腺激素受体1 (PTH1R) 的激动剂；Y是接头；且Z是与

羟磷灰石和/或生骨结合的带负电的寡肽或其等同物。可设想,PTH和PTHrP的许多变体可以具有PTHR1的激动活性,并且只要它们对PTHR1的亲合力在治疗价值范围内就可以替换PTH或PTHrP使用。

[0053] 本公开内容还提供了在残基29处具有2-甲基丙氨酰并且在残基34处胺化的SEQ ID NO:3的肽以治疗骨折。

[0054] 在一个实施方案中,前述活性合成代谢肽或其有效片段选自甲状旁腺激素相关肽(PTHrP),甲状旁腺激素(PTH),阿巴帕肽及其激动剂。

[0055] 在一些实施方案中,活性合成代谢肽或其有效片段具有SEQ ID NO:1-9,其中SEQ ID NO:3在残基29处具有2-甲基丙氨酰并且在残基34处胺化。

[0056] 在一个实施方案中,前述化合物具有SEQ ID NO:10的序列。

[0057] 在一些实施方案中,活性合成代谢肽或其有效片段是SEQ ID NO:1-3的变体,其中SEQ ID NO:1-3的至少2、3、4、6、7、9、12、13残基是保守的。

[0058] 在一些实施方案中,活性合成代谢肽或其有效片段是SEQ ID NO:1-3的n变体,其中1、5、10、11、或14-34可以用保守氨基酸取代。

[0059] 在一些实施方案中,作为PTHR1激动剂的前述活性合成代谢肽或其有效片段对PTHR1的治疗亲和力范围在约 $IC_{50}$  0.46nM和约 $IC_{50}$  135nM之间。

[0060] 在一些实施方案中,前述接头Y是任何活性合成代谢肽或其有效片段的至少一些延伸。例如,接头Y可以是至少一种选自天然PTHrP残基35-173的各种长度或其组合的不可释放片段。

[0061] 或者,接头Y可以是至少一种选自天然PTH残基35-84的各种长度或其组合的不可释放片段。

[0062] 在一些实施方案中,前述接头Y选自天然PTHrP残基35-173的各种长度或其组合,以及天然PTH残基35-84的各种长度或其组合。

[0063] 在一些实施方案中,前述接头Y是对骨重建期间在破骨细胞中产生的至少一种丰富部分敏感的可水解底物。例如,丰富部分可以是组织蛋白酶K。

[0064] 在一些实施方案中,前述接头Y是包含Gly-Gly-Pro-Nle序列的可水解底物,其中Nle是正亮氨酸,亮氨酸,异亮氨酸或其任何等同的疏水性修饰。

[0065] 在一些实施方案中,前述可水解底物包含对谷胱甘肽敏感的二硫键。

[0066] 在一些实施方案中,前述接头Y是可释放的酯。

[0067] 在一些实施方案中,前述化合物还包含至少一种包含聚乙二醇(PEG)的间隔物。

[0068] 在一些实施方案中,前述带负电荷的寡肽包含至少4个酸性氨基酸残基且不超过20个酸性氨基酸残基。

[0069] 在一些实施方案中,前述带负电荷的寡肽包含选自天冬氨酸,谷氨酸,D-天冬氨酸,D-谷氨酸及其组合的酸性氨基酸残基。

[0070] 在一些实施方案中,带负电的寡肽是线性酸性氨基酸链。

[0071] 在一些实施方案中,带负电荷的寡肽包含至少两个分支酸性氨基酸链,其中分支酸性氨基酸链通过至少一个赖氨酸连接。

[0072] 在一些实施方案中,Z为至少一种二膦酸盐。在其他实施方案中,Z是多聚膦酸盐。

[0073] 在一些实施方案中,Z是胶原模拟肽,其在骨折部位插入不完美的胶原原纤维。例

如,胶原模拟肽可以具有[Gly-Pro-Hyp]<sub>9</sub>-OH的结构。

[0074] 在一些实施方案中,Z为氨基己二酸( $\alpha$ -氨基己二酸)或在主链和酸之间具有超过一个碳的其衍生物。例如,Z可以是2-氨基丙二酸。

[0075] 本公开内容还提供了治疗骨折的方法,其通过向患有骨折的患者施用治疗量的任何前述化合物来进行。

[0076] 参考以下附图、相关描述和权利要求书,将更好地理解本发明的这些和其他特征、方面和优点。

[0077] 附图简述

[0078] 图1.图显示了从microCT收集的骨密度数据。分析来自每个骨折骨痂(fracture callus)的100个CT框(frames)(切片)的选择。框的堆叠选自骨痂最大的骨折区域。

[0079] 图2.图显示了从microCT收集的小梁间隔数据。较窄间隔与较高密度的骨相关,并且可以指示进展的愈合。分析来自每个骨折骨痂的100个CT框(切片)的选择。

[0080] 图3.图显示了从microCT收集的骨密度数据。分析来自每个骨折骨痂的100个CT框(切片)的选择。框的堆叠选自骨痂最大的骨折区域。

[0081] 图4.图显示了MC3T3E1细胞中靶向性和非靶向性PTHrP两者的碱性磷酸酶(ALP)表达比率。通过(经处理的ALP表达/媒介物对照ALP表达)计算ALP比率。相对于GAPDH标准化表达。

[0082] 图5.图显示了MC3T3E1细胞中靶向性和非靶向性PTHrP两者的骨桥蛋白(OPN)表达比率。通过(经处理的OPN表达/媒介物对照OPN表达)计算OPN比率。

[0083] 图6.图显示了MC3T3E1细胞中靶向性和非靶向性PTHrP两者的几种关键骨标志物的基因表达比率。活性标志物包括碱性磷酸酶(ALP)、胶原蛋白I- $\alpha$ (Coll- $\alpha$ )、骨钙蛋白(osteocalcin,OC)、骨保护蛋白(osteoprotegerin,OPG)、骨桥蛋白(OPN和Osterix(OSX))。通过(经处理基因的表达/媒介物对照基因表达)计算基因表达比率。

[0084] 图7.图显示了治疗后PTHrPD10(靶向性)或PTHrP(游离)对骨体积的影响。

[0085] 图8.图显示了治疗后阿巴帕肽D10(靶向性)、阿巴帕肽(非靶向)和盐水对骨体积的影响。

[0086] 图9.图显示了治疗后与多聚磷酸盐一起靶向的PTHrP或盐水对骨体积的影响。

[0087] 图10.图显示了治疗后与单一阿屈膦酸盐,三支阿屈膦酸盐一起靶向的PTHrP或游离PTHrP对骨体积的影响。

[0088] 图11.化学式,显示了不同碳链长度的酸性氨基酸的线性聚合物。

[0089] 图12.化学式,显示了不同碳链长度的酸性氨基酸的分支聚合物。

[0090] 图13.化学式,显示了非基于氨基酸的骨靶向配体。顶部代表二膦酸盐。底部代表多聚磷酸盐靶向配体。

[0091] 图14A.柱状图显示了使用用<sup>125</sup>I放射性标记的各种靶向配体,骨折股骨和健康股骨之间的相对计数的倍数差异。

[0092] 图14B.柱状图显示了使用用<sup>125</sup>I放射性标记的各种靶向配体,与健康股骨相比骨折股骨的每分钟计数。

[0093] 图15.近红外图像,其显示了在右股骨上的截骨术后10天,与10个L-天冬氨酸的线性聚合物缀合的LS288的靶向。由于注射部位,沿着背部可见一些脱靶信号。

[0094] 图16.近红外图像,其显示在右股骨上截骨术后3(下排)、6(中排)和10天(上排)时与10个L-天冬氨酸的线性聚合物缀合的LS288的靶向。在每对股骨中,左侧的股骨代表股骨骨折,而右侧的股骨代表健康的股骨。

[0095] 图17A.柱状图显示了放射性标记的缀合肽PreptincD10的相对分布,作为在每个个别器官中发现的总计数的百分比。计数按每克组织重量标准化。

[0096] 图17B.柱状图显示了使用放射性标记的<sup>125</sup>I PreptinD10,骨折股骨和健康股骨之间相对计数的倍数差异。

[0097] 图18A.柱状图显示了使用与L-Asp10、D-Asp10、L-Glu10或D-Glu10缀合的各种放射性标记的<sup>125</sup>I肽,骨折股骨和健康(非骨折)股骨之间的相对计数的倍数差异。

[0098] 图18B.柱状图显示了使用与L-Asp20、L-Glu20或D-Glu20缀合的各种放射性标记的<sup>125</sup>I肽,骨折股骨和健康(非骨折)股骨之间的相对计数的倍数差异。

[0099] 图18C.柱状图显示了使用与分支L-Asp10、分支D-Asp10、分支L-Asp4或分支L-Asp8缀合的各种放射性标记的<sup>125</sup>I肽,在股骨骨折和健康(非骨折)股骨之间的相对计数的倍数差异。

[0100] 图19A.柱状图显示了使用<sup>125</sup>I放射性标记的各种缀合肽,骨折股骨和健康(非骨折)股骨之间的相对计数的倍数差异。

[0101] 图19B.柱状图显示了使用<sup>125</sup>I放射性标记的各种缀合肽,骨折股骨和健康(非骨折)股骨之间的相对计数的倍数差异。

[0102] 图20A.柱状图显示了与L-Asp10(即10个L-天冬氨酸的线性聚合物)缀合的放射性标记的<sup>125</sup>I肽(例如Ck2.3C和PACAPC)的相对分布,作为在每个个别器官中发现的总计数的百分比。

[0103] 图20B.柱状图显示了与D-Asp10(即10个D-天冬氨酸的线性聚合物)缀合的放射性标记的<sup>125</sup>I肽(例如,ODPC、P4C、Ck2.3C和PACAPC)的相对分布,作为在每个个别器官中发现的总计数的百分比。

[0104] 图20C.柱状图显示了与L-Asp20(即20个L-天冬氨酸的线性聚合物)缀合的放射性标记的<sup>125</sup>I肽(例如,ODPC、P4C、Ck2.3C、CTCC和F109C)的相对分布,作为在每个个别器官中发现的总计数的百分比。计数按每克组织重量标准化。

[0105] 图21A.柱状图显示了与L-Glu10(即10个L-谷氨酸的线性聚合物)缀合的放射性标记的<sup>125</sup>I肽(例如,P4C、Ck2.3C和CTCC)的相对分布,作为在每个个别器官中发现的总计数的百分比。计数按每克组织重量标准化。

[0106] 图21B.柱状图显示了与D-Glu10(即10个D-谷氨酸的线性聚合物)缀合的放射性标记的<sup>125</sup>I肽(例如,ODPC、P4C、Ck2.3C、CTCC和F109C)的相对分布,作为在每个个别器官中发现的总计数的百分比。计数按每克组织重量标准化。

[0107] 图22A.柱状图显示了与L-Glu20(即20个L-谷氨酸的线性聚合物)缀合的放射性标记的<sup>125</sup>I肽(例如,P4C、Ck2.3C、F109C和PACAPC)的相对分布,作为在每个个别器官中发现的总计数的百分比。计数按每克组织重量标准化。

[0108] 图22B.柱状图显示了与D-Glu20(即20个D-谷氨酸的线性聚合物)缀合的放射性标记的<sup>125</sup>I肽(例如,ODPC、P4C、Ck2.3C和F109C)的相对分布,作为在每个个别器官中发现的总计数的百分比。计数按每克组织重量标准化。

[0109] 图23A.柱状图显示了与分支L-Asp10(即10个L-天冬氨酸的分支聚合物)缀合的放射性标记的<sup>125</sup>I肽(例如,ODPC、P4C、Ck2.3C、CTCC、F109C和PACAPC)的相对分布,作为在每个个别器官中发现的总计数的百分比。计数按每克组织重量标准化。

[0110] 图23B.柱状图显示了与分支D-Asp10(即10个D-天冬氨酸的分支聚合物)缀合的放射性标记的<sup>125</sup>I肽(例如,ODPC、P4C、Ck2.3C和CTCC)的相对分布,作为在每个个别器官中发现的总计数的百分比。计数按每克组织重量标准化。

[0111] 图24A.柱状图显示了与L-AAD10(即10个L-氨基己二酸线性聚合物)缀合的放射性标记的<sup>125</sup>I肽(例如,P4C、Ck2.3C、F109C和PACAPC)的相对分布,作为在每个个别器官中发现的总计数的百分比。计数按每克组织重量标准化。

[0112] 图24B.柱状图显示了与L-SDSDD(即,具有L-Ser-Asp-Ser-Asp-Asp的线性聚合物;SEQ ID NO:21)缀合的放射性标记的<sup>125</sup>I肽(例如,ODPC、CTCC、F109C和PACAPC)的相对分布,作为在每个个别器官中发现的总计数的百分比。计数按每克组织重量标准化。

[0113] 图24C.柱状图显示了与(DSS)<sub>6</sub>(即DSSDSSDSSDSSDSSDSS;SEQ ID NO:22)缀合的放射性标记的<sup>125</sup>I肽(例如,ODPC、P4C、Ck2.3C、CTCC、F109C和PACAPC)的相对分布,作为在每个个别器官中发现的总计数的百分比。计数按每克组织重量标准化。

[0114] 图25A.柱状图显示了与单-二膦酸盐、三-二膦酸盐或多聚膦酸盐缀合的放射性标记的<sup>125</sup>I PTHrP1-39C,与E10缀合的放射性标记的<sup>125</sup>I PTH1-34和与E20缀合的放射性标记的<sup>125</sup>I PTHrP1-39的相对分布。PTHrP1-39C是在40位处具有半胱氨酸(C)的PTHrP1-39,所述半胱氨酸与不同的靶向配体缀合。计数按每克组织重量标准化。

[0115] 图25B.柱状图显示了与单二膦酸盐、分支的L-Asp4(即YPegK[DDDD]<sub>2</sub>;还见SEQ ID NO:68)或分支的L-Asp8(即YPegK[DDDDDDDD]<sub>2</sub>;还见SEQ ID NO:69)缀合的放射性标记的<sup>125</sup>I酪氨酸的相对分布。“单二膦酸盐YC”是具有与单二膦酸盐缀合的半胱氨酸和酪氨酸的肽。计数按每克组织重量标准化。

[0116] 图26.图显示了治疗后PTH1-34E10和盐水对骨体积的影响。

[0117] 图27.图显示了治疗后PTHrPD10对骨体积的影响。

[0118] 序列表简述

[0119] SEQ ID NO:1.PTHrP 1-34

[0120] (AVSEHQLLHDKGKSIQDLRRRFFLHHLIAEIHTA)

[0121] SEQ ID NO:2.PTH 1-34

[0122] (SVSEIQLMHNLGKHLNSMERVEWLRKKLQDVHNF)

[0123] SEQ ID NO:3.阿巴帕肽1-34,具有残基29处的2-甲基丙氨酰和残基34处的胺化(AVSEHQLLHDKGKSIQDLRRRELLEKLLAKLHTA)

[0124] SEQ ID NO:4.PTHrP 1-35

[0125] (AVSEHQLLHDKGKSIQDLRRRFFLHHLIAEIHTAG)

[0126] SEQ ID NO:5.PTHrP 1-36

[0127] (AVSEHQLLHDKGKSIQDLRRRFFLHHLIAEIHTAGI)

[0128] SEQ ID NO:6.PTHrP 1-37

[0129] (AVSEHQLLHDKGKSIQDLRRRFFLHHLIAEIHTAGIR)

[0130] SEQ ID NO:7.PTHrP 1-38

- [0131] (AVSEHQLLHDKGKSIQDLRRRFFLHHLIAEIHTAGIRA)
- [0132] SEQ ID NO:8.PThrP 1-39
- [0133] (AVSEHQLLHDKGKSIQDLRRRFFLHHLIAEIHTAGIRAT)
- [0134] SEQ ID NO:9.PThrP 1-40
- [0135] (AVSEHQLLHDKGKSIQDLRRRFFLHHLIAEIHTAGIRATS)
- [0136] SEQ ID NO:10.PThrP1-46D10
- [0137] (VSEHQLLHDKGKSIQDLRRRFFLHHLIAEIHTAGIRATSEVSPNSDDDDDDDDDD)
- [0138] SEQ ID NO:11.PTH 1-46D10
- [0139] (SVSEIQLMHNLGKHLNSMERVEWLRKKLQDVHNFVALGAPLAPRDADDDDDDDDDDD)
- [0140] SEQ ID NO:12.PThrP
- [0141] (AVSEHQLLHDKGKSIQDLRRRFFLHHLIAEIHTAEIRATSEVSPNSKPSNTKNHPVRFSGSDDEGRY  
LTQETNKVETYKEQPLKTPGKKKKGKPGKRKEQEKKKRRTRSAWLDSGVTGSGLEGDHLSDTSTTSLELDSRRH)
- [0142] SEQ ID NO:13.PTH
- [0143] (SVSEIQLMHNLGKHLNSMERVEWLRKKLQDVHNFVALGAPLAPRDAGSQRP RKEDNVLVESHEKSL  
GEADKADVNVLTAKSQ)
- [0144] SEQ ID NO:14.FGF2的肝素结合域(“F109C”) (YKRSRYTC)
- [0145] SEQ ID NO:15.垂体腺苷酸环化酶活化多肽(“PACAPC”)
- [0146] (HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLA AVL GKRYKQ RVKNKC)
- [0147] SEQ ID NO:16.源自胶原III型的CTX区的趋化性隐藏肽(“CTCC”)
- [0148] (YIAGVGGEKSGGFYC)
- [0149] SEQ ID NO:17.酪蛋白激酶2beta链(“Ck2.3C”)
- [0150] (RQIKIWFQNRRMKWKKIPVGESLKD LIDQC)
- [0151] SEQ ID NO:18.骨桥蛋白衍生的肽(“ODPC”)
- [0152] (DVDVPDGRGDSLAYGC)
- [0153] SEQ ID NO:19.P4-BMP2(“P4C”) (KIPKASSVPTELSAISTLYLC)
- [0154] SEQ ID NO:20.PreptinD10 (DVSTSQAVLPDDFPYDDDDDDDDDD)
- [0155] SEQ ID NO:21.SDSDD
- [0156] SEQ ID NO:22.DSSDSSDSSDSSDSSDSS
- [0157] SEQ ID NO:23.PTH1-34E10
- [0158] (SVSEIQLMHNLGKHLNSMERVEWLRKKLQDVHNFEEEEEEEEEE)
- [0159] SEQ ID NO:24.PThrP1-36E10
- [0160] (AVSEHQLLHDKGKSIQDLRRRFFLHHLIAEIHTAGIEEEEEEEEEEE)
- [0161] SEQ ID NO:25.PThrP1-39E20
- [0162] (AVSEHQLLHDKGKSIQDLRRRFFLHHLIAEIHTAGIRATCma1EEEEEEEEEEEEEEEEEEEE), 其中ma1在本文呈现的所有序列中是马来酰亚胺。
- [0163] SEQ ID NO:26.与D10缀合的F109C (YKRSRYTCma1DDDDDDDDDD)
- [0164] SEQ ID NO:27.与D20缀合的F109C
- [0165] (YKRSRYTCma1DDDDDDDDDDDDDDDDDDDD)
- [0166] SEQ ID NO:28.与E10 (YKRSRYTCma1EEEEEEEEEE) 缀合的F109C

- [0167] SEQ ID NO:29.与E20缀合的F109C  
[0168] (YKRSRYTCMa1EEEEEEEEEEEEEEEEEEEE)  
[0169] SEQ ID NO:30.与AAD10缀合的F109C  
[0170] (YKRSRYTCMa1XXXXXXXXXX,其中X是己二酸)  
[0171] SEQ ID NO:31.与SDSDD缀合的F109C (YKRSRYTCMa1SDSDD) .  
[0172] SEQ ID NO:32.与(DSS)<sub>6</sub>缀合的F109C  
[0173] (YKRSRYTCMa1DSSDSSDSSDSSDSSDSS)  
[0174] SEQ ID NO:33.与D10缀合的PACAPC  
[0175] (HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLA AVL GKRYKQ RVKNKCMa1DDDDDDDDDD)  
[0176] SEQ ID NO:34.与D20缀合的PACAPC  
[0177] (HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLA AVL GKRYKQ RVKNKCMa1DDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDD)  
[0178] SEQ ID NO:35.与E10缀合的PACAPC  
[0179] (HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLA AVL GKRYKQ RVKNKCMa1EEEEEEEEEE)  
[0180] SEQ ID NO:36.与E20缀合的PACAPC  
[0181] (HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLA AVL GKRYKQ RVKNKCMa1EEEEEEEEEEEEEEEEEEEE)  
[0182] SEQ ID NO:37.与AAD10缀合的PACAPC  
[0183] (HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLA AVL GKRYKQ RVKNKCMa1XXXXXXXXXX,其中X是己二酸)。  
[0184] SEQ ID NO:38.与SDSDD缀合的PACAPC  
[0185] (HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLA AVL GKRYKQ RVKNKCMa1SDSDD) .  
[0186] SEQ ID NO:39.与(DSS)<sub>6</sub>缀合的PACAPC  
[0187] (HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLA AVL GKRYKQ RVKNKCMa1DSSDSSDSSDSSDSSDSS)  
[0188] SEQ ID NO:40.与D10缀合的CTCC  
[0189] (YIAGVGGEKSGGFYCMa1DDDDDDDDDD)  
[0190] SEQ ID NO:41.与D20缀合的CTCC  
[0191] (YIAGVGGEKSGGFYCMa1DDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDD)  
[0192] SEQ ID NO:42.与E10缀合的CTCC  
[0193] (YIAGVGGEKSGGFYCMa1EEEEEEEEEE)  
[0194] SEQ ID NO:43.与E20缀合的CTCC  
[0195] (YIAGVGGEKSGGFYCMa1EEEEEEEEEEEEEEEEEEEE)  
[0196] SEQ ID NO:44.与AAD10缀合的CTCC  
[0197] (YIAGVGGEKSGGFYCMa1XXXXXXXXXX,其中X是己二酸)  
[0198] SEQ ID NO:45.与SDSDD缀合的CTCC  
[0199] (YIAGVGGEKSGGFYCMa1SDSDD) .  
[0200] SEQ ID NO:46.与(DSS)<sub>6</sub>缀合的CTCC  
[0201] (YIAGVGGEKSGGFYCMa1DSSDSSDSSDSSDSSDSS)  
[0202] SEQ ID NO:47.与D10缀合的Ck2.3C  
[0203] (RQIKIWFQNRRMKWKKIPVGESLKD LIDQCMa1DDDDDDDDDD)  
[0204] SEQ ID NO:48.与D20缀合的Ck2.3C  
[0205] (RQIKIWFQNRRMKWKKIPVGESLKD LIDQCMa1DDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDD)



- [0206] SEQ ID NO:49.与E10缀合的Ck2.3C  
[0207] (RQIKIWFQNRRMKWKKIPVGESLKDLIDQCMa1EEEEEEEEEE)  
[0208] SEQ ID NO:50.与E20缀合的Ck2.3C  
[0209] (RQIKIWFQNRRMKWKKIPVGESLKDLIDQCMa1EEEEEEEEEEEEEEEEEEEE)  
[0210] SEQ ID NO:51.与AAD10缀合的Ck2.3C  
[0211] (RQIKIWFQNRRMKWKKIPVGESLKDLIDQCMa1XXXXXXXXXX,其中X是己二酸).  
[0212] SEQ ID NO:52.与SDSDD缀合的Ck2.3C  
[0213] (RQIKIWFQNRRMKWKKIPVGESLKDLIDQCMa1SDSDD)  
[0214] SEQ ID NO:53.与(DSS)<sub>6</sub>缀合的Ck2.3C  
[0215] (RQIKIWFQNRRMKWKKIPVGESLKDLIDQCMa1DSSDSSDSSDSSDSSDSS)  
[0216] SEQ ID NO:54.与D10缀合的ODPC  
[0217] (DVDVPDGRGDSLAYGCMa1DDDDDDDDDD)  
[0218] SEQ ID NO:55.与D20缀合的ODPC  
[0219] (DVDVPDGRGDSLAYGCMa1DDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDD)  
[0220] SEQ ID NO:56.与E10缀合的ODPC  
[0221] (DVDVPDGRGDSLAYGCMa1EEEEEEEEEE)  
[0222] SEQ ID NO:57.与E20缀合的ODPC  
[0223] (DVDVPDGRGDSLAYGCMa1EEEEEEEEEEEEEEEEEEEE)  
[0224] SEQ ID NO:58.与AAD10缀合的ODPC  
[0225] (DVDVPDGRGDSLAYGCMa1XXXXXXXXXX,其中X是己二酸)  
[0226] SEQ ID NO:59.与SDSDD缀合的ODPC  
[0227] (DVDVPDGRGDSLAYGCMa1SDSDD).  
[0228] SEQ ID NO:60.与(DSS)<sub>6</sub>缀合的ODPC  
[0229] (DVDVPDGRGDSLAYGCMa1DSSDSSDSSDSSDSSDSS)  
[0230] SEQ ID NO:61.与D10缀合的P4C  
[0231] (KIPKASSVPTLSAISTLYLCMa1DDDDDDDDDD)  
[0232] SEQ ID NO:62.与D20缀合的P4C  
[0233] (KIPKASSVPTLSAISTLYLCMa1DDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDD)  
[0234] SEQ ID NO:63.与E10缀合的P4C  
[0235] (KIPKASSVPTLSAISTLYLCMa1EEEEEEEEEE)  
[0236] SEQ ID NO:64.与E20缀合的P4C  
[0237] (KIPKASSVPTLSAISTLYLCMa1EEEEEEEEEEEEEEEEEEEE)  
[0238] SEQ ID NO:65.与AAD10缀合的P4C  
[0239] (KIPKASSVPTLSAISTLYLCMa1XXXXXXXXXX,其中X是己二酸)  
[0240] SEQ ID NO:66.与SDSDD缀合的P4C  
[0241] (KIPKASSVPTLSAISTLYLCMa1SDSDD).  
[0242] SEQ ID NO:67.与(DSS)<sub>6</sub>缀合的P4C  
[0243] (KIPKASSVPTLSAISTLYLCMa1DSSDSSDSSDSSDSSDSS)  
[0244] SEQ ID NO:68.分支D4Y (YPegKDDDDDDDD,其中Peg是聚乙二醇)

- [0245] SEQ ID NO:69.分支D8Y (YPegKDDDDDDDDDDDDDDDD,其中Peg是聚乙二醇)
- [0246] SEQ ID NO:70.与分支D10缀合的F109C
- [0247] (YKRSRYTCMa1K[DDDDDDDDDD]<sub>2</sub>).
- [0248] SEQ ID NO:71.与分支D10缀合的PACAPC
- [0249] [HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLA AVL GKRYKQ RVKNKCMa1K (DDDDDDDDDD)<sub>2</sub>]
- [0250] SEQ ID NO:72.与分支D10缀合的CTCC
- [0251] (YIAGVGGEKSGGFYCMa1K[DDDDDDDDDD]<sub>2</sub>)
- [0252] SEQ ID NO:73.与分支D10缀合的Ck2.3C
- [0253] (RQIKIWFQNRRMKWKKIPVGESLKD LIDQCMa1K[DDDDDDDDDD]<sub>2</sub>)
- [0254] SEQ ID NO:74.与分支D10缀合的ODPC
- [0255] (DVDVPDGRGDSLAYGCMa1K[DDDDDDDDDD]<sub>2</sub>)
- [0256] SEQ ID NO:75.与分支D10缀合的P4C
- [0257] (KIPKASSVPTLSAISTLYLCMa1K[DDDDDDDDDD]<sub>2</sub>)
- [0258] SEQ ID NO:76.与分支E10缀合的F109C
- [0259] (YKRSRYTCMa1K[EEEEEEEEEE]<sub>2</sub>)
- [0260] SEQ ID NO:77.与分支E10缀合的PACAPC
- [0261] (HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLA AVL GKRYKQ RVKNKCMa1K[EEEEEEEEEE]<sub>2</sub>)
- [0262] SEQ ID NO:78.与分支E10缀合的CTCC
- [0263] (YIAGVGGEKSGGFYCMa1K[EEEEEEEEEE]<sub>2</sub>)
- [0264] SEQ ID NO:79.与分支E10缀合的Ck2.3C
- [0265] (RQIKIWFQNRRMKWKKIPVGESLKD LIDQCMa1K[EEEEEEEEEE]<sub>2</sub>)
- [0266] SEQ ID NO:80.与分支E10缀合的ODPC
- [0267] (DVDVPDGRGDSLAYGCMa1K[EEEEEEEEEE]<sub>2</sub>)
- [0268] SEQ ID NO:81.与分支E10缀合的P4C
- [0269] (KIPKASSVPTLSAISTLYLCMa1K[EEEEEEEEEE]<sub>2</sub>)
- [0270] 发明详述
- [0271] 尽管在本文的附图和说明书中详细说明和描述了本公开的构思,但是附图中的结果及其描述应当认为是示例性的而非限制性的;应当理解,仅示出和描述了示例性实施方案,并且希望保护落入本公开精神内的所有改变和修改。
- [0272] 除非另外定义,否则科学和技术命名法具有与本公开内容所属领域普通技术人员通常理解的含义相同的含义。
- [0273] 如本文所用,除非另有明确说明或明确暗示,否则术语“约”是指值加上或减去10%的范围,例如,约1.0包含0.9至1.1的值。
- [0274] 除非另有说明或暗示,否则如本文所用的术语“治疗/处理”包括向人或动物患者施用至少一剂化合物,治疗包括预防或减轻至少一种疾病的可能性和/或严重性以及限制疾病的长度或疾病的严重程度,治疗可以导致或者可以不导致疾病的治愈。
- [0275] 如本文所用,除非另有明确说明或明确暗示,否则术语“治疗有效剂量”,“治疗有效量”等是指对人类或其他动物的健康和安乐具有净正面影响的化合物的一部分。治疗效果可以包括改善寿命,生活质量等,这些效果还可以包括降低的对形成疾病或恶化健康或

安乐的易感性。可以在单次剂量和/或治疗后立即实现效果,或者可以在一系列剂量和/或治疗后累积实现它们。“治疗有效量”通常是指当对受试者或动物施用以治疗疾病时足以影响期望的疾病治疗程度的量。

[0276] 如本文所用,“抑制”或“抑制活性”各自涵盖通过抑制剂直接或间接实现的酶活性或效果的或包含酶的途径的全部或部分的全部或部分降低或者通过抑制剂直接或间接实现的由酶活性直接或间接实现的途径的全部或部分降低。

[0277] 如本文所用,术语“药学上可接受的盐”定义为其中维持抑制剂的期望生物活性并且表现出最小的不希望毒理学效应的盐。此类盐的非限制性实例是(a)与无机酸(例如,盐酸,氢溴酸,硫酸,磷酸,硝酸等)形成的酸加成盐,和与有机酸(诸如例如乙酸,草酸,酒石酸,琥珀酸,苹果酸,抗坏血酸,苯甲酸,单宁酸,棕榈酸,聚谷氨酸,萘磺酸,萘二磺酸,聚半乳糖醛酸等)形成的盐;(b)与金属阳离子(例如锌,钙,铋,钡,镁,铝,铜,钴,镍,镉,钠,钾等)形成的碱加成盐,或与由氨,N,N-二苄基乙二胺,D-葡萄糖胺,四乙基铵或乙二胺形成的阳离子形成的加成盐;或(c) (a)及(b)的组合;例如单宁酸锌等。

[0278] 药学上可接受的盐包括本发明化合物的盐,其安全有效地用于哺乳动物并具有期望的治疗活性。药学上可接受的盐包括存在于本发明化合物中的酸性或碱性基团的盐。药学上可接受的酸加成盐包括但不限于盐酸盐,氢溴酸盐,氢碘酸盐,硝酸盐,硫酸盐,硫酸氢盐,磷酸盐,酸式磷酸盐,异烟酸盐,乙酸盐,乳酸盐,水杨酸盐,柠檬酸盐,酒石酸盐,泛酸盐,酒石酸氢盐,抗坏血酸盐,琥珀酸盐,马来酸盐,龙胆酸盐(gentisinate),富马酸盐,葡萄糖酸盐,葡萄糖醛酸盐(glucuronate),糖质酸盐(saccharate),甲酸盐,苯甲酸盐,谷氨酸盐,甲磺酸盐,乙磺酸盐,苯磺酸盐,对甲苯磺酸盐和双羟萘酸盐(即1,1'-亚甲基-双-(2-羟基-3-萘甲酸))盐。本发明的某些化合物可以与各种氨基酸形成药学上可接受的盐。合适的碱盐包括但不限于铝,钙,锂,镁,钾,钠,锌和二乙醇胺盐。关于可用于实施本发明的一些药学上可接受的盐的其他信息,请参见综述,诸如Berge, et al., 66J. PHARM. SCI. 1-19 (1977), Haynes, et al., J. Pharma. Sci., 第94卷, No. 10, Oct. 2005, 第2111-2120页以及参见例如P. Stahl, et al., Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use, (VCHA/Wiley-VCH, 2002); S.M. Berge, et al., “Pharmaceutical Salts,” Journal of Pharmaceutical Sciences, Vol. 66, No. 1, January 1977。

[0279] 药物制剂: 本发明化合物及其盐可以配制成用于施用的药物组合物。此类药物组合物及其制备方法对于人和非人哺乳动物都是本领域已知的。参见, 例如remington: The Science and practice of pharmacy, (A. Gennaro, et al., 编, 第19版, Mack Publishing Co., 1995)。制剂可以通过各种手段施用, 包括口服施用、肠胃外施用如注射(肌肉内、皮下、静脉内、腹膜内)等; 透皮施用, 如浸渍、喷雾、沐浴、洗涤、浇注(pouring-on)和点样(spotting-on), 以及撒粉(dusting)等。可以在含有本发明化合物或其盐的制剂中包含其他活性成分。

[0280] 本发明的药物制剂包括适合口服、肠胃外(包括皮下、皮内、肌肉内和静脉内)和直肠施用的那些。制剂可以以单位剂型存在, 并且可以通过药学领域熟知的任何方法制备。所有方法包括使活性成分, 即本发明化合物或盐与载体结合的步骤。通常, 制剂通过将活性成分与液体载体或细碎的固体载体或两者均匀且紧密地结合, 然后, 若必要的话, 将结合的混合物形成期望的制剂来制备。

[0281] 适于口服施用的本发明的药物制剂可以作为离散单位存在,例如胶囊,扁囊剂,片剂或锭剂,每个含有预定量的活性成分;作为粉末或颗粒;作为水性液体或非水性液体中的溶液或悬浮液,如糖浆,酏剂或顿服(draught),或作为水包油液体乳液或油包水液体乳液。制剂也可以是大丸剂(bolus)、煎膏剂或糊剂。

[0282] 适用于肠胃外施用的本发明的药物制剂包括水性和非水性无菌注射溶液,并且还可以包括抗氧化剂,缓冲剂,抑菌剂和使组合物与受体血液等张的溶液,水性和非水性无菌悬浮液,其可以含有例如悬浮剂和增稠剂。制剂可以在单一单位剂量或多剂量容器中呈现,并且可以在冻干条件下储存,需要在使用前添加无菌液体载体。

[0283] 药学上可接受的载体:除非另有说明或暗示,否则药学上可接受的载体在本文中用于描述除可以包含在制剂中的活性成分之外的任何成分。载体的选择在很大程度上取决于诸如特定施用方式,载体对溶解度和稳定性的影响以及剂型的性质等因素。

[0284] 片剂可以通过用药学上可接受的载体压制或模制活性成分来制备。压缩片剂可以通过在合适的机器中压制自由流动形式的活性成分(例如粉末或颗粒),与例如粘合剂,惰性稀释剂,润滑剂,崩解剂和/或表面活性剂混合来制备。模制片剂可以通过在合适的机器中模制用惰性液体稀释剂润湿的粉末状活性成分的混合物来制备。片剂可任选地包衣或刻痕,并可配制成提供活性成分的缓慢或控制释放。

[0285] 如本文所用,“骨相关疾病”包括但不限于骨质减少、骨质疏松、类风湿性关节炎、血液学、自身免疫、移植物排斥、骨癌和/或骨折。

[0286] 如本文所述,“治疗性亲和力指数”是治疗性配体的亲和力范围,通常由治疗性配体或其激动剂衔接受体介导的信号传导级联(事件)以实现期望的治疗效果的IC<sub>50</sub>表示。例如,若配体具有4nM-15nM的IC<sub>50</sub>以触发G蛋白偶联受体介导的实现配体治疗效果的响应,则配体具有约4nM至约15nM的IC<sub>50</sub>的治疗亲和力指数。当治疗配体具有不同的作用模式以实现其不同的治疗效果时,治疗亲和力指数可能是复杂的。例如,若治疗性配体的受体具有两种不同的构象,则每种构象可具有不同的治疗亲和力指数。

[0287] 如本文所用,除非另有明确说明或明确暗示,否则术语“PTHrP1-46D10”、“PTHrPD10”和“靶向性PTHrP”可互换使用以定义相同的化合物。

[0288] 如本文所用,除非另有明确说明或明确暗示,否则术语“PTHrP1-34”、“PTHrP”、“游离PTHrP”和“非靶向性PTHrP”可互换使用以定义相同的化合物。

[0289] 骨质疏松定义为与骨折风险增加相关的低骨矿物质密度和/或差的骨微结构。此种慢性疾病主要影响绝经后女性,但也可能是老年男性。此种疾病越来越多地被认为是与年龄相关的病态。骨质疏松患者中观察到的骨骼改变是骨形成相对于骨吸收相对不足的结果。骨质疏松治疗主要依赖于抗骨吸收药物。目前,一种治疗骨质疏松的替代治疗方法是基于甲状旁腺激素(PTH)的间歇施用。PTH主要由甲状旁腺细胞以包含84个氨基酸的激素原多肽分泌。有效的激素-受体相互作用仅需要34个N端氨基酸。PTH作用为增加血液中离子钙(Ca<sup>2+</sup>)的浓度。实质上,PTH作用为通过作用于甲状旁腺激素1受体来增加血液中钙的浓度,所述甲状旁腺激素1受体在骨和肾中以高水平存在。蛋白质hPTH-(1-34)结晶为略微弯曲的长螺旋二聚体。分析揭示了hPTH-(1-34)的延伸螺旋构象可能是生物活性构象。N端片段(甲状旁腺激素(PTH)的1-34)已经得到结晶,并且结构已经细化至0.9Å分辨率。

[0290] 由PTH治疗引起的骨合成代谢主要由PTH增加成骨细胞生成

(osteoblastogenesis) 和成骨细胞存活的能力决定。PTH和PTH相关蛋白 (PTHrP) ——骨中丰富的局部因子——在成骨细胞中以相似的亲和力与常见的PTH 1型受体相互作用。主要在骨质疏松啮齿类模型中的研究和绝经后女性中的有限数据表明,可以认为N端PTHrP肽是一种有前景的骨合成代谢疗法。

[0291] 甲状旁腺激素/甲状旁腺激素相关肽受体(也称为甲状旁腺激素受体1) (PTHr1)) 是人体中由PTHr1基因编码的蛋白质。PTHr1的功能为甲状旁腺激素 (PTH) 和甲状旁腺激素相关蛋白 (PTHrP) 的受体。

[0292] PTHr1属于家族B G蛋白偶联受体 (GPCR), 其主要在骨, 肾和软骨中表达, 但也在包括血管系统和某些发育器官的其他组织中表达。

[0293] 通常认为由PTH和PTHrP的前34个残基组成的N端片段含有相应的全长成熟多肽链中存在的受体相互作用的关键功能决定簇, 它们还分别包括84和141个氨基酸残基。PTH和PTHrP在家族B肽配体中是不同的, 因为它们包括延伸的C端区段。这些区段的生物学作用仍然模糊不清, 尽管已经鉴定出一些功能性应答, 如与PTH的C端部分对应的片段在骨细胞17中诱导促凋亡作用的能力和涵盖PTHrP中间区域的片段的能力。

[0294] 开发用于评估配体对与异三聚体G蛋白偶联后形成的构象 ( $R^G$  构象) 中的PTHr1或当PTHr1不与G蛋白偶联时形成的构象 ( $R^0$  构象) 中的PTHr1的亲力的膜结合测定法提供初始线索, 即结构上不同的PTH和PTHrP类似物可以以改变的亲和力结合不同受体构象状态。PTH (1-34) 和PTHrP (1-36) 的直接比较研究证明了, 虽然这两种肽对 $R^G$ 状态维持相似的亲和力, 但它们对 $R^0$ 状态不具有相同的亲和力, 其中PTH (1-34) 比PTHrP (1-36) 显示高得多的对 $R^0$ 的亲和力。

[0295] 阿巴帕肽、PTHrP和PTH在每种蛋白质的前13个氨基酸中具有高度同源性。只要每种活性合成代谢药物包含通过甲状旁腺激素触发信号传导并且在2, 3, 4, 6, 7, 9, 12和13残基处包含或含有最小同源性的肽, 可以将合成代谢肽变体与本公开中描述的各种接头, 任选地间隔物和靶向配体组合, 以实现骨折愈合剂的靶向递送。

[0296] 通常在cAMP测定法中揭示了此种改变的选择性的功能结果。PTH (1-34) 和PTHrP (1-36) 在常规cAMP剂量响应测定法中具有相似的效力(根据它们对 $R^G$ 状态的相似亲和力和 $G_{\alpha S}$ 介导的胞内cAMP产生机制)。然而, 由两种配体诱导的响应的持续时间(使用时间过程清洗测定法评估)是不同的, PTH (1-34) 比PTHrP (1-36) 显示更长的响应。通常, 在基于细胞的研究中观察到的cAMP响应的持续时间与PTH (1-34) 和PTHrP (1-36) 对 $R^0$ 状态表现出的不同亲和力相关, 而不与它们对 $R^G$ 状态的亲和力相关, 如在膜测定法中评估。由于 $R^0$ 状态不与G蛋白偶联, 因此在cAMP信号传导方面无活性, 可能是尽管 $R^0$ 复合物随时间相当稳定, 但是它们可以异构化为功能性G蛋白偶联状态。

[0297] 在PTH和PTHrP配体之间不同的 $R^0$ 对 $R^G$ 亲和力的一个关键结构决定因素可以追溯到第5位残基的身份; 因此, 用PTH的相应的异亮氨酸替换PTHrP (1-36) 中的His5显著增强对 $R^0$ 的亲和力, 并延长靶细胞中诱导的cAMP信号响应的持续时间。

[0298] 目前, 测试PTH、PTHrP或其激动剂的局部或系统施用以提供合成代谢剂, 从而治愈任何骨折。然而, 这些测试揭示了, 存在有使用那些蛋白质的副作用。例如, 局部应用PTH或PTHrP需要暴露骨骼并导致愈合时间增加, 疼痛和不适, 甚至感染的可能性。或者, PTH和PTHrP的系统性应用倾向于具有脱靶效应, 包括血钙水平的增加。因此, 希望开发骨合成代

谢剂递送系统并且可以减轻上述的副作用。

[0299] 本文公开了包含药物、接头和靶向配体的药物递送系统。本公开的一些方面提供了用于靶向和愈合骨折的化合物。这些化合物可以包含至少三个不同的结构/功能区：有效的合成代谢肽或参与甲状旁腺激素受体1 (PTHr1) 和随后的导致愈合的信号传导级联的任何激动剂；具有或没有间隔物的接头，以为合成代谢肽提供柔性的臂长度以达到骨折部位；和靶向配体，其通常包含带负电荷的寡肽或其等同物，以将化合物引导至骨折部位并特异性结合羟磷灰石和/或生骨。在一个特定方面，药物可以是甲状旁腺激素相关肽 (PTHrP) 中的前34个氨基酸。接头可以包括PTHrP的氨基酸35-46，其使药物与靶向配体间隔并且还给药物的长度留有余地，因为一些人认为氨基酸35-40可以增加受体结合。最后，靶向配体可以包括天冬氨酸十肽，尽管通过羧酸官能化的其他聚合物可能以类似的方式结合（例如各种组合和排列的D或L谷氨酸，D或L天冬氨酸和氨基己二酸）。

[0300] 包含SEQ ID NO:3 (阿巴帕肽1-34) 且具有残基29甲基Ala和残基34胺化的肽可以充当没有另外的接头或靶向配体的有效活性合成代谢剂以治疗骨折。

[0301] 可以想到PTH和PTHrP可以具有拥有PTHr1的激动活性的变体，并且可用于替换PTH或PTHrP以参与并实现骨折愈合的治疗效果。只要每种活性合成代谢药物包含通过甲状旁腺激素触发信号传导并且在2、3、4、6、7、9、12和13残基处包含或含有最小同源性的肽，所提出的合成代谢肽变体可以与本公开中描述的各种接头，任选地间隔物和靶向配体组合以实现骨折愈合剂的靶向递送。例如，PTH或PTHrP的残基1、5、10、11或14-34处的保守取代或修饰以及本文所述的接头序列和靶向配体的任何组合都考虑在本公开内容中保护。

[0302] 在本公开的一个方面，靶向配体包含含有多个天冬氨酸残基的酸性寡肽。D或L天冬氨酸残基的数目可以是约4至约10，或约10至约20个残基。寡肽可以是直链的或它可以是分支的。在一个示例性实施方案中，赖氨酸残基用作分支点。在本发明的另一个方面，天冬氨酸可以是L-天冬氨酸，D-天冬氨酸或任一对映体的混合物。在寡肽中包含D-天冬氨酸的优点在于，与仅包含天然存在的L-天冬氨酸的寡肽相比，它可以不太容易发生蛋白水解降解。

[0303] 在本公开的另一方面，酸性寡肽可以是不超过20个L或D-谷氨酸。在本发明的又一个方面，酸性寡肽可以是不超过20个L或D-天冬氨酸，或L或D-谷氨酸的组合。

[0304] 在本公开的一些方面，靶向配体可以是多聚磷酸盐或至少一种二磷酸盐。在本公开的另一方面，靶向配体可以是胶原模拟肽。此类胶原蛋白模拟肽在骨折部位插入不完美的胶原原纤维。在本公开的一个方面，胶原模拟肽可以具有[Gly-Pro-Hyp]<sub>9</sub>-OH的结构。

[0305] 在本公开内容的一些方面，靶向配体可以是氨基己二酸 ( $\alpha$ -氨基己二酸) 或其在骨架和酸之间具有超过一个碳的衍生物。例如，靶向配体可以是2-氨基丙二酸。

[0306] 在本公开的一些方面，靶向递送化合物还包含至少一种包含PEG (聚乙二醇) 的间隔物。

[0307] 在活性合成代谢化合物如PTH或PTHrP或它们各自的激动剂与靶向配体之间，可存在柔性长度的接头序列。在本公开的一些方面，接头可以是PTH或PTHrP活性片段的延伸的任何部分，即来自PTH的残基35-84或PTHrP的35-173。活性片段的此类延伸通常是不可释放的，并且接头序列可以是延伸的任何部分或延伸的不同部分的组合。

[0308] 在本公开的一些其他方面，接头可以是对骨重建期间在破骨细胞中产生的至少一

种丰富部分敏感的可水解底物。例如,组织蛋白酶K是在骨重塑期间在破骨细胞中产生的部分。包含Gly-Gly-Pro-Nle的接头序列(其中Nle是正亮氨酸,亮氨酸,异亮氨酸或具有疏水性修饰的任何其他等同物)可以充当组织蛋白酶K的底物。一旦靶向性化合物在破骨细胞部位处递送,组织蛋白酶K可以水解接头并释放活性合成代谢化合物以对骨愈合起作用。

[0309] 另一种可水解的接头可以包含二硫键,并且它可以在破骨细胞处通过谷胱甘肽释放。

[0310] 另一种可水解的接头可以是可释放的酯。

[0311] 通过以下实施例进一步证明了本公开的这些特征。

[0312] 材料与方法

[0313] 合成

[0314] 通过固相肽合成或通过重组表达合成肽。

[0315] 固相肽合成

[0316] 简言之,在能够鼓泡氮气的固相肽合成小瓶中,在DCM和DIPEA中将2-氯三苯甲基树脂(1.11mmol/g)与第一氨基酸以0.4mmol/g加载过夜。然后,用四次5mL DCM/MeOH/DIPEA(17:2:1)清洗,接着分别三次DCM和DMF清洗对树脂加帽。在每次氨基酸偶联反应后,通过与DMF中的20%(v/v)哌啶的3次10分钟温育除去Fmoc-基团。然后,用DMF清洗树脂3次,之后添加接着的氨基酸。用HBTU/DIPEA以5倍过量添加每种氨基酸。合成完成后,使用95:2.5:2.5三氟乙酸:水:三异丙基硅烷裂解肽。使用95:2.5:2.5和10倍过量的TCEP三氟乙酸:三异丙基硅烷:水:TCEP(三(2-羧乙基)膦)裂解含半胱氨酸的肽。

[0317] 重组蛋白表达

[0318] 产生氨苄青霉素抗性质粒,其含有T7启动子,硫氧还蛋白编码序列、HisTag序列、色氨酸残基和肽编码序列。用质粒转化感受态细胞,并将其在含有氨苄青霉素的琼脂板上铺板。选择单菌落并在氨苄青霉素(100ug/ml) LB培养基中于37℃扩充过夜。然后将感受态细胞在11氨苄青霉素(100μg/ml) LB培养基中进一步扩充15小时。在15小时时,添加IPTG以达到1mM的终浓度,并将培养基在37℃以180rpm搅拌5小时。然后将细胞沉淀并通过在含有6M盐酸胍的pH8的20mM Tris-HCL中超声处理裂解。然后,通过使用咪唑从HisTag洗脱来分离融合蛋白。将含有融合蛋白的级分透析并冻干。使用碘代苯甲酸法进行蛋白水解切割。使用阴离子交换柱纯化最终肽,透析并冻干以进一步使用

[0319] 表征

[0320] 使用HPLC/MS确认了肽分子量。

[0321] 小鼠骨折诱导。

[0322] 所有动物研究均根据Purdue的动物护理和使用委员会方案进行,并如文献中所述进行。从Harlan实验室获得的CD4Swiss小鼠(30-35g)用于这些实验。在无菌条件下使用异氟烷麻醉进行稳定的股骨骨折。对膝盖周围的皮肤剃光并首先用酒精垫清洁,然后用聚维酮碘溶液清洁。在内侧髌骨旁(medial parapatellar)产生皮肤切口。然后将髌骨脱臼并在髌骨下产生切口。使用25号针来扩展髓内管。然后插入22号锁定钉(其中将两端变平以产生旋转稳定性)。缝合伤口,然后使用三点弯曲装置将骨折断,该三点弯曲装置具有内置止动件(built-in stop)以防止过度损伤。在手术时施用皮下丁丙诺啡(0.05-0.1mg/kg),然后在手术后每12小时施用3-7天。

[0323] 给药:

[0324] 每天用31nmol/kg肽或盐水对照对小鼠皮下给药。在骨折后6小时施用第一剂,并在整个研究期间继续施用,最后一剂在安乐死前一天施用。

[0325] 骨密度分析

[0326] 使用Scanco $\mu$ CT 40来收集CT图像和骨骼数据。在浸入PBS以防止脱水的情况下扫描骨。使用ImageJ软件对图像分析骨密度、总体积(TV)、相对骨体积(BV/TV)、小梁厚度(Tb.Th)和小梁间隔(Tb.Sp)。感兴趣的体积包括骨折骨痂,以及骨折部位处皮质骨上的点之间的皮质骨和小梁骨两者。

[0327] 使用Prism GraphPad软件计算统计学分析。数据在结果中表示为平均值 $\pm$ 平均值的标准差(SEM)。未配对的学生t检验用于确定统计学显著性,P值小于0.05认为是统计学显著的。

[0328] 实施例1.用于靶向骨折愈合的PTHrP递送系统

[0329] 在本实施例中,合成了包含药物、接头和靶向配体的骨折靶向药物。

[0330] 药物的序列列于SEQ ID NO:10,其包含PTHrP的氨基酸残基1-46,然后是10个天冬氨酸。如上所述,残基1-34是PTHrP的活性部分,残基35-46是所提出的用于愈合骨折的药物的接头部分,并且10个天冬氨酸是靶向配体。

[0331] 在三组小鼠中产生闭合的股骨骨折。用靶向性PTHrP(31nmol/kg/天),PTHrP 1-34(31nmol/kg/天)或盐水每天对小鼠给药4周。在研究结束时,通过CO<sub>2</sub>对小鼠实施安乐死,收获股骨,并通过MicroCT确定骨密度。

[0332] 如图1所示,PTHrP的靶向性形式增加骨折周围的骨密度,其显著高于游离PTHrP和盐水。这指示使用与靶向配体序列连接的有效合成代谢剂的策略可以作用于骨折愈合。

[0333] 指示骨愈合进展的另一种方式是测量从microCT收集的小梁间隔数据。如图2所示,分析了来自每个骨折骨痂的100个CT框(切片)的选择。框的堆叠选自骨痂最大的骨折区域。从左到右,靶向性PTHrP(PTHrP 1-46,然后是10个天冬氨酸)和盐水对照。靶向性PTHrP比盐水对照具有统计学上更紧密的间隔。

[0334] 与传统的单一合成代谢剂施用(其通常在血液中引起高钙浓度)相比,本申请提供了替代方案,并且它优于局部施用骨折愈合剂的需要。这减轻高血钙水平或骨骼暴露相关感染等的风险。

[0335] 涵盖对前34个氨基酸的各种保守取代将导致在骨折小鼠中恢复相同或更好的骨密度。

[0336] 还涵盖使用超出1-34的PTHrP延伸序列的其他部分可以提供相似或更好的与10个天冬氨酸的靶向配体的连接。

[0337] 进一步涵盖使用本公开中描述的任何接头和靶向配体。例如,接头可以是PTH序列的天然肽的变体,或任何组织蛋白酶K敏感性接头,例如Gly-Gly-Pro-Nle,其中Nle是正亮氨酸或另一种疏水性氨基酸,例如亮氨酸或异亮氨酸。接头可以是可以在还原环境中释放的二硫化物接头。谷胱甘肽通常在某些类型的损伤中释放,并可以还原二硫键。涵盖二硫化物接头可以增加合成代谢剂的效力。接头也可以是在水解并且释放以提高愈合效率的酯。靶向配体通常是含有4个或更多个酸性氨基酸残基的酸性寡肽链,并且它们与羟磷灰石和/或生骨结合。这些酸性氨基酸残基可以是天冬氨酸或谷氨酸中的任一种或其组合。在一些情



况下,酸性寡肽可以用至少一个赖氨酸分支以增加骨折部位中的药物积累。支链可以是多个分支,例如2、3或4等。

[0338] 靶向配体的另一种选择是一个或多个二磷酸盐,即聚二磷酸盐。具有[Gly-Pro-Hyp]<sub>9</sub>-OH序列的胶原模拟肽。

[0339] 靶向配体的另一种选择是氨基己二酸( $\alpha$ -氨基己二酸)或其在骨架和酸之间具有超过一个碳的衍生物。例如,2-氨基丙二酸可用作PTHrP或其变体的靶向配体。

[0340] 可以将间隔物如PEG(聚乙二醇)添加到合成的靶向性药物递送系统以降低靶向配体干扰合成代谢效率的可能性。

[0341] 对于PTHrP变体-接头-靶向配体选择的各种不同组合,骨密度恢复的测试可以类似于本实施例中所述进行。具体地,将合成的药物-接头-靶向配体与PTHrP变体自身和盐水比较它们对骨折周围的骨密度的影响。PTHrP变体的靶向性形式会增加骨折周围的骨密度,显著高于游离PTHrP变体和盐水的。

[0342] 实施例2.合成代谢药物与接头选择和靶向配体的各种不同组合,以使药物靶向递送至骨折以进行愈合

[0343] 在本实施例中,将PTH的前34个氨基酸与本文所述的合适接头和合适的靶向配体一起合成。与实施例1中一样,接头可以是活性PTH延伸的任何区段,包括残基35-84,或实施例1中描述的其他接头。靶向配体可以是实施例1中描述的那些中的任一种。如图3所示,接头是氨基酸残基36-46,且靶向配体是10个天冬氨酸。可以将合成的药物-接头-靶向配体(PTH 1-46D10,SEQ ID NO:11)与PTH变体自身和盐水比较它们对骨折周围骨密度的影响。PTH变体的靶向性形式会增加骨折周围的骨密度,显著高于游离PTH变体和盐水的。图3显示了靶向性PTH 1-46D10在统计学上比盐水对照更密集。

[0344] 可以想到,在该实施例中可以使用一些其他有效的合成代谢药物来替换PTH(1-34)并实现骨折愈合。

[0345] 实施例3.阿巴帕肽1-34作为独立的骨折愈合剂

[0346] 在该实施例中,测试了具有29上作为甲基Ala且34上作为胺化的Ala修饰的残基的阿巴帕肽1-34(SEQ ID NO:3)。已经测试了阿巴帕肽治疗骨质疏松以预防骨折。测试其愈合实际骨折的能力,其是不同的过程。当然,将阿巴帕肽1-34与先前实施例中描述的接头和靶向配体连接可能会由于靶向性递送而增加骨折部位处的骨密度。

[0347] 现在参考图1,分析了来自每个骨折骨痂的100个CT框(切片)的选择。CT框在4周时拍摄。框的堆叠选自骨痂最大的骨折区域。从左至右,靶向性PTHrP(PTHrP 1-46,随后是10个天冬氨酸),游离未缀合的PTHrP(PTHrP1-34)和盐水对照。PTHrP的靶向性形式增加骨折周围的骨密度,显著高于游离PTHrP和盐水的。

[0348] 现在参考图2,较窄的间隔与较高密度的骨相关并且可以指示进展的愈合。CT框在4周时拍摄。分析来自每个骨折骨痂的100个CT框(切片)的选择。框的堆叠选自骨痂最大的骨折区域。从左到右,靶向性PTHrP(PTHrP 1-46,然后是10个天冬氨酸)和盐水对照。靶向性PTHrP比盐水对照具有统计学上更紧密的间隔。

[0349] 现在参考图3,分析来自每个骨折骨痂的100个CT框(切片)的选择。CT框在2周时拍摄。框的堆叠选自骨痂最大的骨折区域。从左到右,靶向性PTH(PTH 1-46,然后是10个天冬氨酸)和盐水对照。靶向性PTH在统计学上比盐水对照更密集。

[0350] 现在参考图4,在MC3T3E1细胞中分析了靶向性和非靶向性PTHrP两者的碱性磷酸酶 (ALP) 表达比率。通过 (经处理的ALP表达/媒介物对照ALP表达) 计算ALP比率。较高的表达水平与较高的成骨细胞活性相关,并且是涉及骨矿化的关键蛋白质。靶向配体的添加不降低药物的功效。

[0351] 现在参考图5,在MC3T3E1细胞中分析了靶向性和非靶向性PTHrP两者的骨桥蛋白 (OPN) 表达比率。通过 (经处理的OPN表达/媒介物对照OPN表达) 计算OPN比率。较高的表达水平与较大的成骨细胞活性相关,并且是涉及骨矿化的关键蛋白质。靶向性配体的添加不降低药物的功效。

[0352] 现在参考图6,在MC3T3E1细胞中分析了靶向性和非靶向性PTHrP的几种关键骨标志物的基因表达比率。活性标志物包括碱性磷酸酶 (ALP)、胶原蛋白I-alpha (Col1-alpha)、骨钙蛋白 (OC)、骨保护蛋白 (OPG)、骨桥蛋白 (OPN和Osterix (OSX))。通过 (经处理的基因表达/媒介物对照基因表达) 计算基因表达比率。靶向性PTHrP具有低至1pM的活性。

[0353] 表1. 测试化合物对小鼠的各种器官的影响

[0354]

小鼠ID	肝	肾
靶向性药物	无重大损伤	无重大损伤
靶向性药物	罕见, 显微镜下的单核聚集物(随机)	
靶向性药物	无重大损伤	无重大损伤
靶向性药物	轻度至中度多病灶淋巴浆细胞性中央小叶炎症	无重大损伤
靶向性药物	无重大损伤	轻度淋巴浆细胞性肾盂炎
对照	无重大损伤	无重大损伤
对照	无重大损伤	无重大损伤
对照	无重大损伤	轻度淋巴浆细胞性肾盂炎
对照	无重大损伤	轻度嗜中性肾盂炎
对照	罕见, 显微镜下的单核聚集物(随机)	无重大损伤

[0355] 现在参考表1,用31nmol/kg/天皮下注射PTHrPD10 (“靶向性药物”)或盐水处理小鼠。将Swiss ND4小鼠处理28天。在研究结束时处死小鼠并切出肝脏和肾脏。将器官固定在福尔马林中,并从每个器官制作石蜡切片。兽医病理学家对器官进行随机盲分析。未观察到可检测的毒性。记录的病变具有最小的意义,并且与明显的组织损伤(坏死)无关。病变类型

似乎不太可能引起临床体征或疾病。它们更可能在这些动物的正常范围内。

[0356] 现在参考图7,用31nmol/kg/天皮下注射PTHrPD10(靶向性)或PTHrP(游离)处理小鼠。将Swiss ND4小鼠处理14、28或56天。在每次研究的给药期结束时处死小鼠并切出股骨。使用scanco microCT测量骨折骨痂密度。选择每个骨折骨痂最厚直径的100个切片用于测量。“靶向性2”代表通过靶向性PTHrP给药2周(14天)的小鼠。“游离2”代表由未修饰的PTHrP给药2周(14天)的小鼠。“靶向性4”代表通过靶向性PTHrP给药4周(28天)的小鼠。“游离4”代表由未修饰的PTHrP给药4周(28天)的小鼠。“靶向性8”代表通过靶向性PTHrP给药8周(56天)的小鼠。“游离8”代表由未修饰的PTHrP给药8周(56天)的小鼠。在每个时间点,在靶向性PTHrP中相对于在游离PTHrP中可以观察到更大的密度。靶向性和游离PTHrP之间的最大差异是2周。那些结果指示,靶向性药物不仅改善骨折愈合,还可以加速骨折愈合。

[0357] 现在参考图8,用31nmol/kg/天皮下注射阿巴帕肽D10(靶向性)、阿巴帕肽(非靶向性)和盐水处理小鼠。将Swiss ND4小鼠处理28天。在研究结束时处死小鼠并切出股骨。使用scancomicroCT测量骨折骨痂密度。选择每个骨折骨痂最厚直径的100个切片用于测量。阿巴帕肽先前已用于治疗骨质疏松。这些结果指示,阿巴帕肽也可用于治疗骨折。这些结果指示靶向性阿巴帕肽的表现优于游离的阿巴帕肽。

[0358] 现在参考图9,用31nmol/kg/天皮下注射与多聚磷酸盐一起靶向的PTHrP或盐水处理小鼠。将Swiss ND4小鼠处理28天。在研究结束时处死小鼠并切出股骨。使用scancomicroCT测量骨折骨痂密度。选择每个骨折骨痂最厚直径的100个切片用于测量。与盐水相比,与多聚磷酸盐一起靶向的PTHrP增加骨折愈合。

[0359] 现在参考图10,用31nmol/kg/天皮下注射与单一阿屈膦酸盐,三支阿屈膦酸盐一起靶向的PTHrP或游离PTHrP处理小鼠。将Swiss ND4小鼠处理28天。在研究结束时处死小鼠并切出股骨。使用scancomicroCT测量骨折骨痂密度。选择每个骨折骨痂最厚直径的100个切片用于测量。与游离PTHrP相比,与单一阿屈膦酸盐或三支阿屈膦酸盐一起靶向的PTHrP增加骨折愈合。

[0360] 实施例4

[0361] 靶向配体可以包括但不限于寡聚酸性氨基酸。示例性的寡聚酸性氨基酸包括但不限于8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29和/或30个天冬氨酸(包含L和/或D氨基酸)的线性聚合物,8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29和/或30个谷氨酸(包含L和/或D氨基酸)的线性聚合物,10个酸性氨基酸(包含L和/或D氨基酸)的线性聚合物,在每个分支上具有4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19和/或20个残基(包含L和/或D氨基酸)的天冬氨酸的分支聚合物,在每个分支上具有4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19和/或20个残基(包含L和/或D氨基酸)的谷氨酸的分支聚合物和/或在每个分支上具有4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19和/或20个残基(包含L和/或D酸性氨基酸)的酸性氨基酸的分支聚合物。现在参考图11-12,显示了酸性氨基酸的示例性直链和分支聚合物。图13提供了非源自氨基酸的示例性靶向配体。

[0362] 靶向配体与含有马来酰亚胺的接头偶联。具有含有马来酰亚胺的接头的靶向配体通过半胱氨酸马来酰亚胺偶联方法进一步与具有不同化学性质的各种肽缀合。这些肽可以包含但不限于代表FGF2的肝素结合域的序列(SEQ ID NO:14),代表垂体腺苷酸环化酶激活

多肽的序列 (SEQ ID NO:15), 代表源自胶原III型的CTX区的趋化性隐藏肽的序列 (SEQ ID NO:16), 代表酪蛋白激酶2beta链的序列 (SEQ ID NO:17), 代表骨桥蛋白衍生肽的序列 (SEQ ID NO:18), 和/或代表P4-BMP2的序列 (SEQ ID NO:19)。缀合的肽通过Pierce碘化试剂碘化, 其中<sup>125</sup>I与缀合肽的组氨酸, 酪氨酸和/或色氨酸残基共价结合。

[0363] 与分支D10缀合的F109C具有式YKRSRYTCMa1K[DDDDDDDDDD]<sub>2</sub>(也可见SEQ ID NO:70)。

[0364] 与分支D10缀合的PACAPC具有式

[0365] HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLA AVL GKRYKQ RVKNKCMa1K[DDDDDDDDDD]<sub>2</sub>(也可见SEQ ID NO:71)。

[0366] 与分支D10缀合的CTCC具有式

[0367] YIAGVGGEKSGGFYCMa1K[DDDDDDDDDD]<sub>2</sub>(也可见SEQ ID NO:72)。

[0368] 与分支D10缀合的Ck2.3C具有式

[0369] RQIKIWFQNRRMKWKKIPVGESLKD LIDQCMa1K[DDDDDDDDDD]<sub>2</sub>(也可见SEQ ID NO:3)。

[0370] 与分支D10缀合的ODPC具有式DVDVPDGRGDSLAYGCMa1K[DDDDDDDDDD]<sub>2</sub>(也可见SEQ ID NO:74)。

[0371] 与分支D10缀合的P4C具有式KIPKASSVPTELSAISTLYLCMa1K[DDDDDDDDDD]<sub>2</sub>(也可见SEQ ID NO:75)。

[0372] 与分支E10缀合的F109C具有式YKRSRYTCMa1K[EEEEEEEEEE]<sub>2</sub>(也可见SEQ ID NO:76)。

[0373] 与分支E10缀合的PACAPC具有式HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLA AVL GKRYKQ RVKNKCMa1K[EEEEEEEEEE]<sub>2</sub>(也可见SEQ ID NO:77)。

[0374] 与分支E10缀合的CTCC具有式YIAGVGGEKSGGFYCMa1K[EEEEEEEEEE]<sub>2</sub>(也可见SEQ ID NO:78)。

[0375] 与分支E10缀合的Ck2.3C具有式RQIKIWFQNRRMKWKKIPVGESLKD LIDQCMa1K[EEEEEEEEEE]<sub>2</sub>(也可见SEQ ID NO:79)。

[0376] 与分支E10缀合的ODPC具有式DVDVPDGRGDSLAYGCMa1K[EEEEEEEEEE]<sub>2</sub>(也可见SEQ ID NO:80)。

[0377] 与分支E10缀合的P4C具有式KIPKASSVPTELSAISTLYLCMa1K[EEEEEEEEEE]<sub>2</sub>(也可见SEQ ID NO:81)。

[0378] 现在参考图14A和14B, 在截骨术后10天, 给成年雌性Swiss Weber小鼠注射1mCi的<sup>125</sup>I标记的缀合物。将半胱氨酸酪氨酸二肽与马来酰亚胺接头偶联。具有马来酰亚胺接头的半胱氨酸酪氨酸二肽与每种指定的靶向配体缀合。PTHrP-ASP10代表缀合肽, 其具有PTHrP的1-46与10个天冬氨酸的线性聚合物。Preptin-Asp10代表缀合肽, 其具有preptin的1-16与10个天冬氨酸的线性聚合物。进行注射后24小时的尸检并切出组织。然后通过γ计数器计数组织。股骨骨折相对于健康股骨的相对计数在此显示为比率。

[0379] 现在参考图15, 在右侧股骨上截骨术后10天, 对成年雌性Swiss Weber小鼠皮下注射与10个L-天冬氨酸的线性聚合物缀合的LS288。通过1秒780nm激发束对小鼠成像。在810nm处收集发射荧光1秒。注射部位靠近小鼠背部, 因此, 小鼠在背部显示高荧光。

[0380] 现在参考图16, 在右侧股骨上的截骨术后3、6和10天, 对成年雌性Swiss Weber小

鼠皮下注射与10个L-天氨酸的线性聚合物缀合的LS288。通过1秒780nm激发光束对小鼠成像。在810nm收集发射荧光1秒。顶行表示骨折后10天,中间行表示骨折后6天,且下排表示骨折后3天。与右侧健康股骨相比,每组左侧股骨是骨折的股骨。这证明在愈合过程期间骨折靶向性得到改善。

[0381] 现在参考图17,在截骨术后10天对成年雌性Swiss Weber小鼠注射0.25mCi放射性标记的<sup>125</sup>I PreptinD10缀合物,并在不同时间点处死。收集每个组织,然后用γ计数器定量(图17A)。使用放射性标记的<sup>125</sup>I PreptinD10在不同时间点计算骨折股骨和健康的股骨之间的相对计数的倍数差异(图17B)。

[0382] 现在参考图18和19,在截骨术后10天,对成年雌性Swiss Weber小鼠(12周龄)注射0.22mCi放射性标记的<sup>125</sup>I缀合肽。注射后14小时,处死每只小鼠,并且收集每个列出的器官并定量。将计数相对于样品的重量标准化。计算每个缀合肽的骨折股骨和健康(非骨折)股骨之间的相对计数的倍数差异。

[0383] 现在参考图20,在截骨术后10天,对成年雌性Swiss Weber小鼠(12周龄)注射与L-Asp10(图20A),D-Asp10(图20B)或L-Asp20(图20C)缀合的0.22mCi放射性标记的<sup>125</sup>I肽(例如,ODPC,P4C,Ck2.3C,CTCC,F109C和PACAPC)。注射后14小时,处死每只小鼠,并且收集每个列出的器官并定量。将计数相对于样品的重量标准化。所测试的所有缀合肽显示出相对于其他器官优先和/或选择性靶向到骨折骨。

[0384] 现在参考图21,截骨术后10天,对成年雌性Swiss Weber小鼠(12周龄)注射与L-Glu10(图21A)或D-Glu10(图21B)缀合的0.22mCi放射性标记的<sup>125</sup>I肽(例如,ODPC,P4C,Ck2.3C,CTCC和F109C)。注射后14小时,处死每只小鼠,并且收集每个列出的器官并定量。将计数相对于样品的重量标准化。所有测试的缀合肽显示出相对于其他器官优先和/或选择性靶向到骨折骨。肾脏中观察到的较高信号可能是由于肾脏上谷氨酸转运蛋白的高丰度。这些转运蛋白负责将谷氨酸再吸收到循环中而非实际摄入细胞中。这意味着信号可能会随着时间的推移而降低,这与在骨折股骨中观察到的摄取相反,其中带负电的分子将强烈地粘附到骨(参见例如图17)。关于涉及谷氨酸的吸收的更多详情,参见Hediger, M.A. Glutamate transporters in kidney and brain. *Am. J. Physiol.-Ren. Physiol.* 277, F487-F492 (1999); Kanai, Y. & Hediger, M.A. Primary structure and functional characterization of a high-affinity glutamate transporter. *Nature* 360, 467-471 (1992); 和 Kanai, Y. & Hediger, M.A. The glutamate and neutral amino acid transporter family: physiological and pharmacological implications. *Eur. J. Pharmacol.* 479, 237-247 (2003)。

[0385] 现在参考图22,截骨术后10天,对成年雌性Swiss Weber小鼠(12周龄)注射与L-Glu20(图22A)或D-Glu20(图22B)缀合的0.22mCi放射性标记的<sup>125</sup>I肽(例如,ODPC,P4C,Ck2.3C,CTCC,F109C和PACAPC)。注射后14小时,处死每只小鼠,并且收集每个列出的器官并定量。将计数相对于样品的重量标准化。大多数测试的缀合肽显示相对于其他器官优先和/或选择性靶向到骨折或肾脏。将谷氨酸聚合物延伸至20似乎略微改善对骨折骨的选择性,但是肾脏摄取仍然得到维持。

[0386] 现在参考图23,截骨术后10天对成年雌性Swiss Weber小鼠(12周龄)注射与分支L-Asp10(图23A)或分支D-Asp10(图23B)缀合的0.22mCi放射性标记的<sup>125</sup>I肽(例如,ODPC,

P4C, Ck2.3C, CTCC, F109C和PACAPC)。注射后14小时,处死每只小鼠,并且收集每个列出的器官并定量。将计数相对于样品的重量标准化。测试的所有缀合肽显示出相对于其他器官优先/或选择性靶向到骨折骨。有些似乎在肾脏中具有较高的摄取。

[0387] 现在参考图24,截骨术后10天对成年雌性Swiss Weber小鼠(12周龄)注射与L-AAD10(图24A)、L-SDSDD(图24B)或(DSS)<sub>6</sub>(图24C)缀合的0.22mCi放射性标记的<sup>125</sup>I肽(例如,0DPC, P4C, Ck2.3C, CTCC, F109C和PACAPC)。注射后14小时,处死每只小鼠,并且收集每个列出的器官并定量。将计数相对于样品的重量标准化。与L-AAD10缀合的肽似乎对骨折骨具有一定的靶向能力。与L-SDSDD缀合的肽表现出对骨折骨的中度靶向能力,并且还观察到肾中摄取增加。与(DSS)<sub>6</sub>缀合的肽似乎不具有对骨折骨的任何靶向能力。

[0388] 现在参考图25A,截骨术后10天对成年雌性Swiss Weber小鼠(12周龄)注射与单二磷酸盐,三-二磷酸盐,多聚磷酸盐,E10或E20缀合的0.22mCi的放射性标记的<sup>125</sup>I肽(例如,PTHrP1-36,和PTH1-34,和PTHrP1-39)。现在参考图25B,截骨术后10天对成年雌性Swiss Weber小鼠(12周龄)注射与单二磷酸盐(“单二磷酸盐YC”)、分支的L-Asp4(“分支的(L)D4Y”)或分支的L-Asp8(“分支的(L)D8Y”)缀合的0.22mCi放射性标记的<sup>125</sup>I酪氨酸。

[0389] 现在参考图26,处理后PTH1-34E10和生理盐水对骨体积的影响。每天用PTH1-34E10处理小鼠2周。在两周时处死小鼠并切出股骨用于microCT分析。

[0390] 现在参考图27,使用指定剂量处理后PTHrPD10和盐水对标准化骨体积的影响。每天用PTHrPD10处理小鼠4周。在四周时,处死小鼠并切出股骨用于microCT分析。

[0391] 含有谷氨酸的靶向配体比其他测试的靶向配体在肾脏中具有更高的摄取量,其中摄取范围为每克测量剂量的20-50%。此种摄取可能是由于在肾脏中表达的谷氨酸再摄取受体。它们比其他靶向配体相对于其他骨对骨折骨更具选择性,如通过骨折与非骨折递送比率在谷氨酸靶向配体中范围为7-12指示。将谷氨酸聚合物延伸至20产生适度的递送改善,从对于10聚体的每克测量剂量的20-50%改善到对于20聚体的每克测量剂量的40-70%。此种改善可能是由于带来的额外的谷氨酸对骨折部位处暴露的羟磷灰石的亲和力增加。延伸的20聚体谷氨酸靶向配体仍然存在与较短的10聚体相似的肾脏摄取问题。从L变为D对映体似乎对谷氨酸靶向配体没有一致的影响。

[0392] 天冬氨酸靶向配体似乎具有靶向配体的最高递送,递送累积范围为每克测量剂量的40-70%。然而,天冬氨酸靶向配体在骨折和非骨折骨之间的选择性似乎略低,对于L氨基酸天冬氨酸靶向,骨折骨与非骨折骨积累的比率约为4-6,对于D氨基酸天冬氨酸靶向配体为6-9。然而,它们不像谷氨酸靶向配体那样在肾脏中高积累,每克的测量剂量累积通常保持低于15%。分支形式比线性形式在其向骨折部位递送更多的能力上似乎没有表现得更好。

[0393] 将长度从10延伸至20改善了在与L-Glu20(标记为“(L)D20”)缀合的不同类型的肽间靶向配体的一致性,所有肽以每克的测量剂量的50-70%递送。从L变为D对映体似乎改善了天冬氨酸靶向配体的稳定性并增加了靶向性,如通过更高的递送速率和更好的选择性比率明显的。

[0394] 与AAD10缀合的肽似乎仅具有中度靶向能力。它仍然维持更为系统性的分布。但是,它仍然能够维持其相对于非骨折骨将2-5倍的经标记的化合物递送至骨折骨的能力的改善。与SDSDD缀合的肽似乎仅具有中等靶向能力,递送范围为20-40%。它仍然维持更系统

性的分布。但是，它仍然能够维持其相对于非骨折骨将3-5倍的经标记的化合物递送至骨折骨的能力的改善。与(DSS) 6缀合的肽似乎仅具有中度的对骨折骨的靶向能力。它仍然维持更系统性的分布。但是，它仍然能够维持其相对于非骨折骨将2-3倍的经标记的化合物递送至骨折骨的能力的改善。

[0395] 虽然已经在附图和前面的描述中详细说明和描述了新技术，但是认为它们是示例性的而不是限制性的，应当理解，仅示出和描述了优选实施方案，并且希望保护在新技术精神范围内的所有变化和修改。同样，虽然使用特定的示例，理论论据，说明和插图来说明新技术，但这些说明和随附的讨论决不应解释为限制所述技术。本申请中引用的所有专利、专利申请和对教科书、科学论文、出版物等的提及在它们与本说明书的明确教导不矛盾的程序上通过引用整体并入本文。

## 序列表

&lt;110&gt; 珀杜研究基金会

&lt;120&gt; 通过甲状旁腺激素受体刺激进行的骨折靶向性骨再生

&lt;130&gt; 67711-03

&lt;150&gt; 62/428,492

&lt;151&gt; 2016-11-30

&lt;150&gt; 62/553,313

&lt;151&gt; 2017-09-01

&lt;160&gt; 81

&lt;170&gt; PatentIn version 3.5

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 34

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 智人

&lt;400&gt; 1

Ala Val Ser Glu His Gln Leu Leu His Asp Lys Gly Lys Ser Ile Gln

1 5 10 15

Asp Leu Arg Arg Arg Phe Phe Leu His His Leu Ile Ala Glu Ile His

20 25 30

Thr Ala

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 34

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 智人

&lt;400&gt; 2

Ser Val Ser Glu Ile Gln Leu Met His Asn Leu Gly Lys His Leu Asn

1 5 10 15

Ser Met Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Lys Lys Leu Gln Asp Val His

20 25 30

Asn Phe

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 34

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 具有残基29处的2-甲基丙氨酰和残基34处胺化的阿巴帕肽1-34

&lt;400&gt; 3

Ala Val Ser Glu His Gln Leu Leu His Asp Lys Gly Lys Ser Ile Gln



1	5	10	15
Asp Leu Arg Arg Arg Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Ala Lys Leu His			
20	25	30	
Thr Ala			
<210> 4			
<211> 35			
<212> PRT			
<213> 智人			
<400> 4			
Ala Val Ser Glu His Gln Leu Leu His Asp Lys Gly Lys Ser Ile Gln			
1	5	10	15
Asp Leu Arg Arg Arg Phe Phe Leu His His Leu Ile Ala Glu Ile His			
20	25	30	
Thr Ala Gly			
35			
<210> 5			
<211> 36			
<212> PRT			
<213> 智人			
<400> 5			
Ala Val Ser Glu His Gln Leu Leu His Asp Lys Gly Lys Ser Ile Gln			
1	5	10	15
Asp Leu Arg Arg Arg Phe Phe Leu His His Leu Ile Ala Glu Ile His			
20	25	30	
Thr Ala Gly Ile			
35			
<210> 6			
<211> 37			
<212> PRT			
<213> 智人			
<400> 6			
Ala Val Ser Glu His Gln Leu Leu His Asp Lys Gly Lys Ser Ile Gln			
1	5	10	15
Asp Leu Arg Arg Arg Phe Phe Leu His His Leu Ile Ala Glu Ile His			
20	25	30	
Thr Ala Gly Ile Arg			
35			
<210> 7			
<211> 38			

<212> PRT

<213> 智人

<400> 7

Ala Val Ser Glu His Gln Leu Leu His Asp Lys Gly Lys Ser Ile Gln  
1                    5                    10                    15  
Asp Leu Arg Arg Arg Phe Phe Leu His His Leu Ile Ala Glu Ile His  
                  20                    25                    30  
Thr Ala Gly Ile Arg Ala  
                  35

<210> 8

<211> 39

<212> PRT

<213> 智人

<400> 8

Ala Val Ser Glu His Gln Leu Leu His Asp Lys Gly Lys Ser Ile Gln  
1                    5                    10                    15  
Asp Leu Arg Arg Arg Phe Phe Leu His His Leu Ile Ala Glu Ile His  
                  20                    25                    30  
Thr Ala Gly Ile Arg Ala Thr  
                  35

<210> 9

<211> 40

<212> PRT

<213> 智人

<400> 9

Ala Val Ser Glu His Gln Leu Leu His Asp Lys Gly Lys Ser Ile Gln  
1                    5                    10                    15  
Asp Leu Arg Arg Arg Phe Phe Leu His His Leu Ile Ala Glu Ile His  
                  20                    25                    30  
Thr Ala Gly Ile Arg Ala Thr Ser  
                  35                    40

<210> 10

<211> 56

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> PTHrP1-46D10

<400> 10

Ala Val Ser Glu His Gln Leu Leu His Asp Lys Gly Lys Ser Ile Gln

1	5	10	15
Asp Leu Arg Arg Arg Phe Phe Leu His His Leu Ile Ala Glu Ile His			
20	25	30	
Thr Ala Gly Ile Arg Ala Thr Ser Glu Val Ser Pro Asn Ser Asp Asp			
35	40	45	
Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp			
50	55		
<210> 11			
<211> 56			
<212> PRT			
<213> 人工			
<220>			
<223> PTH1-46D10			
<400> 11			
Ser Val Ser Glu Ile Gln Leu Met His Asn Leu Gly Lys His Leu Asn			
1	5	10	15
Ser Met Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Lys Lys Leu Gln Asp Val His			
20	25	30	
Asn Phe Val Ala Leu Gly Ala Pro Leu Ala Pro Arg Asp Ala Asp Asp			
35	40	45	
Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp			
50	55		
<210> 12			
<211> 141			
<212> PRT			
<213> 智人			
<400> 12			
Ala Val Ser Glu His Gln Leu Leu His Asp Lys Gly Lys Ser Ile Gln			
1	5	10	15
Asp Leu Arg Arg Arg Phe Phe Leu His His Leu Ile Ala Glu Ile His			
20	25	30	
Thr Ala Glu Ile Arg Ala Thr Ser Glu Val Ser Pro Asn Ser Lys Pro			
35	40	45	
Ser Pro Asn Thr Lys Asn His Pro Val Arg Phe Gly Ser Asp Asp Glu			
50	55	60	
Gly Arg Tyr Leu Thr Gln Glu Thr Asn Lys Val Glu Thr Tyr Lys Glu			
65	70	75	80
Gln Pro Leu Lys Thr Pro Gly Lys Lys Lys Lys Gly Lys Pro Gly Lys			
85	90	95	

Arg Lys Glu Gln Glu Lys Lys Lys Arg Arg Thr Arg Ser Ala Trp Leu  
 100 105 110  
 Asp Ser Gly Val Thr Gly Ser Gly Leu Glu Gly Asp His Leu Ser Asp  
 115 120 125  
 Thr Ser Thr Thr Ser Leu Glu Leu Asp Ser Arg Arg His  
 130 135 140

<210> 13

<211> 84

<212> PRT

<213> 智人

<400> 13

Ser Val Ser Glu Ile Gln Leu Met His Asn Leu Gly Lys His Leu Asn  
 1 5 10 15  
 Ser Met Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Lys Lys Leu Gln Asp Val His  
 20 25 30  
 Asn Phe Val Ala Leu Gly Ala Pro Leu Ala Pro Arg Asp Ala Gly Ser  
 35 40 45  
 Gln Arg Pro Arg Lys Lys Glu Asp Asn Val Leu Val Glu Ser His Glu  
 50 55 60  
 Lys Ser Leu Gly Glu Ala Asp Lys Ala Asp Val Asn Val Leu Thr Lys  
 65 70 75 80  
 Ala Lys Ser Gln

<210> 14

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> FGF2的肝素结合域("F109C")

<400> 14

Tyr Lys Arg Ser Arg Tyr Thr Cys  
 1 5

<210> 15

<211> 39

<212> PRT

<213> 智人

<400> 15

His Ser Asp Gly Ile Phe Thr Asp Ser Tyr Ser Arg Tyr Arg Lys Gln  
 1 5 10 15  
 Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Ala Ala Val Leu Gly Lys Arg Tyr Lys

	20	25	30
Gln Arg Val Lys Asn Lys Cys			
35			
<210> 16			
<211> 15			
<212> PRT			
<213> 智人			
<400> 16			
Tyr Ile Ala Gly Val Gly Gly Glu Lys Ser Gly Gly Phe Tyr Cys			
1	5	10	15
<210> 17			
<211> 30			
<212> PRT			
<213> 智人			
<400> 17			
Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys			
1	5	10	15
Ile Pro Val Gly Glu Ser Leu Lys Asp Leu Ile Asp Gln Cys			
	20	25	30
<210> 18			
<211> 16			
<212> PRT			
<213> 智人			
<400> 18			
Asp Val Asp Val Pro Asp Gly Arg Gly Asp Ser Leu Ala Tyr Gly Cys			
1	5	10	15
<210> 19			
<211> 20			
<212> PRT			
<213> 人工			
<220>			
<223> P4C (经修饰的BMP-2片段)			
<400> 19			
Lys Ile Pro Lys Ala Ser Ser Val Pro Thr Glu Leu Ser Ala Ile Ser			
1	5	10	15
Thr Leu Tyr Leu			
	20		
<210> 20			
<211> 26			

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> PreptinD10

<400> 20

Asp Val Ser Thr Ser Gln Ala Val Leu Pro Asp Asp Phe Pro Arg Tyr

1 5 10 15

Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp

20 25

<210> 21

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> SDSDD

<400> 21

Ser Asp Ser Asp Asp

1 5

<210> 22

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> (DSS) 6

<400> 22

Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp

1 5 10 15

Ser Ser

<210> 23

<211> 44

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> PTH1-34E10

<400> 23

Ser Val Ser Glu Ile Gln Leu Met His Asn Leu Gly Lys His Leu Asn

1 5 10 15

Ser Met Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Lys Lys Leu Gln Asp Val His

20 25 30

Asn Phe Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu  
35 40

<210> 24

<211> 46

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> PTHrP1-36E10

<400> 24

Ala Val Ser Glu His Gln Leu Leu His Asp Lys Gly Lys Ser Ile Gln  
1 5 10 15  
Asp Leu Arg Arg Arg Phe Phe Leu His His Leu Ile Ala Glu Ile His  
20 25 30  
Thr Ala Gly Ile Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu  
35 40 45

<210> 25

<211> 61

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> PTHrP1-39C-Ma1E20

<220>

<221> X

<222> (41) .. (41)

<223> X=马来酰亚胺

<400> 25

Ala Val Ser Glu His Gln Leu Leu His Asp Lys Gly Lys Ser Ile Gln  
1 5 10 15  
Asp Leu Arg Arg Arg Phe Phe Leu His His Leu Ile Ala Glu Ile His  
20 25 30  
Thr Ala Gly Ile Arg Ala Thr Cys Xaa Glu Glu Glu Glu Glu Glu  
35 40 45  
Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu  
50 55 60

<210> 26

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 与D10缀合的F109C

<220>

<221> X

<222> (9) .. (9)

<223> 马来酰亚胺

<220>

<221> X

<222> (9) .. (9)

<223> X=马来酰亚胺

<400> 26

Tyr Lys Arg Ser Arg Tyr Thr Cys Xaa Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp

1                      5                      10                      15

Asp Asp Asp

<210> 27

<211> 29

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 与D20缀合的F109C

<220>

<221> X

<222> (9) .. (9)

<223> X=马来酰亚胺

<400> 27

Tyr Lys Arg Ser Arg Tyr Thr Cys Xaa Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp

1                      5                      10                      15

Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp

20                      25

<210> 28

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 与E10缀合的F109C

<220>

<221> X

<222> (9) .. (9)

<223> X=马来酰亚胺

<400> 28



Tyr Lys Arg Ser Arg Tyr Thr Cys Xaa Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu  
1 5 10 15

Glu Glu Glu

<210> 29

<211> 29

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 与E20缀合的F109C

<220>

<221> X

<222> (9) .. (9)

<223> X=马来酰亚胺

<400> 29

Tyr Lys Arg Ser Arg Tyr Thr Cys Xaa Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu  
1 5 10 15

Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu  
20 25

<210> 30

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 与AAD10缀合的F109C

<220>

<221> X

<222> (9) .. (9)

<223> X=马来酰亚胺

<220>

<221> X

<222> (10) .. (19)

<223> X=己二酸

<400> 30

Tyr Lys Arg Ser Arg Tyr Thr Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa

<210> 31

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 与SDSDD缀合的F109C

<220>

<221> X

<222> (9) .. (9)

<223> X=马来酰亚胺

<400> 31

Tyr Lys Arg Ser Arg Tyr Thr Cys Xaa Ser Asp Ser Asp Asp

1 5 10

<210> 32

<211> 27

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 与 (DSS) 6缀合的F109C

<220>

<221> X

<222> (9) .. (9)

<223> X=马来酰亚胺

<400> 32

Tyr Lys Arg Ser Arg Tyr Thr Cys Xaa Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp

1 5 10 15

Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser

20 25

<210> 33

<211> 50

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 与D10缀合的PACAPC

<220>

<221> X

<222> (40) .. (40)

<223> X=马来酰亚胺

<400> 33

His Ser Asp Gly Ile Phe Thr Asp Ser Tyr Ser Arg Tyr Arg Lys Gln

1 5 10 15

Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Ala Ala Val Leu Gly Lys Arg Tyr Lys

	20		25		30
Gln Arg Val Lys Asn Lys Cys Xaa Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp					
35		40		45	
Asp Asp					
50					
<210> 34					
<211> 60					
<212> PRT					
<213> 人工					
<220>					
<223> 与D20缀合的PACAPC					
<220>					
<221> X					
<222> (40) .. (40)					
<223> X=马来酰亚胺					
<400> 34					
His Ser Asp Gly Ile Phe Thr Asp Ser Tyr Ser Arg Tyr Arg Lys Gln					
1	5		10		15
Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Ala Ala Val Leu Gly Lys Arg Tyr Lys					
20		25		30	
Gln Arg Val Lys Asn Lys Cys Xaa Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp					
35		40		45	
Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp					
50		55		60	
<210> 35					
<211> 50					
<212> PRT					
<213> 人工					
<220>					
<223> 与E10缀合的PACAPC					
<220>					
<221> X					
<222> (40) .. (40)					
<223> X=马来酰亚胺					
<400> 35					
His Ser Asp Gly Ile Phe Thr Asp Ser Tyr Ser Arg Tyr Arg Lys Gln					
1	5		10		15
Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Ala Ala Val Leu Gly Lys Arg Tyr Lys					
20		25		30	

Gln Arg Val Lys Asn Lys Cys Xaa Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu  
35 40 45

Glu Glu  
50

<210> 36

<211> 60

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 与E20缀合的PACAPC

<220>

<221> X

<222> (40) .. (40)

<223> X=马来酰亚胺

<400> 36

His Ser Asp Gly Ile Phe Thr Asp Ser Tyr Ser Arg Tyr Arg Lys Gln  
1 5 10 15

Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Ala Ala Val Leu Gly Lys Arg Tyr Lys  
20 25 30

Gln Arg Val Lys Asn Lys Cys Xaa Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu  
35 40 45

Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu  
50 55 60

<210> 37

<211> 50

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 与AAD10缀合的PACAPC

<220>

<221> X

<222> (40) .. (40)

<223> X=马来酰亚胺

<220>

<221> X

<222> (41) .. (50)

<223> X=己二酸

<400> 37

His Ser Asp Gly Ile Phe Thr Asp Ser Tyr Ser Arg Tyr Arg Lys Gln

1	5	10	15												
Met	Ala	Val	Lys	Lys	Tyr	Leu	Ala	Ala	Val	Leu	Gly	Lys	Arg	Tyr	Lys
	20		25		30										
Gln	Arg	Val	Lys	Asn	Lys	Cys	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
	35		40		45										
Xaa	Xaa														

50  
 <210> 38  
 <211> 45  
 <212> PRT  
 <213> 人工  
 <220>  
 <223> 与SDSDD缀合的PACAPC  
 <220>  
 <221> X  
 <222> (40) .. (40)  
 <223> X=马来酰亚胺  
 <400> 38

His	Ser	Asp	Gly	Ile	Phe	Thr	Asp	Ser	Tyr	Ser	Arg	Tyr	Arg	Lys	Gln
1	5	10	15												
Met	Ala	Val	Lys	Lys	Tyr	Leu	Ala	Ala	Val	Leu	Gly	Lys	Arg	Tyr	Lys
	20		25		30										
Gln	Arg	Val	Lys	Asn	Lys	Cys	Xaa	Ser	Asp	Ser	Asp	Asp			
	35		40		45										

<210> 39  
 <211> 58  
 <212> PRT  
 <213> 人工  
 <220>  
 <223> 与 (DSS) 6缀合的PACAPC  
 <220>  
 <221> X  
 <222> (40) .. (40)  
 <223> X=马来酰亚胺  
 <400> 39

His	Ser	Asp	Gly	Ile	Phe	Thr	Asp	Ser	Tyr	Ser	Arg	Tyr	Arg	Lys	Gln
1	5	10	15												
Met	Ala	Val	Lys	Lys	Tyr	Leu	Ala	Ala	Val	Leu	Gly	Lys	Arg	Tyr	Lys
	20		25		30										

Gln Arg Val Lys Asn Lys Cys Xaa Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser  
 35 40 45

Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser  
 50 55

<210> 40

<211> 26

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 与D10缀合的CTCC

<220>

<221> X

<222> (16) .. (16)

<223> X=马来酰亚胺

<400> 40

Tyr Ile Ala Gly Val Gly Gly Glu Lys Ser Gly Gly Phe Tyr Cys Xaa  
 1 5 10 15

Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp  
 20 25

<210> 41

<211> 36

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 与D20缀合的CTCC

<220>

<221> X

<222> (16) .. (16)

<223> X=马来酰亚胺

<400> 41

Tyr Ile Ala Gly Val Gly Gly Glu Lys Ser Gly Gly Phe Tyr Cys Xaa  
 1 5 10 15

Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp  
 20 25 30

Asp Asp Asp Asp  
 35

<210> 42

<211> 26

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 与E10缀合的CTCC

<220>

<221> X

<222> (16) .. (16)

<223> X=马来酰亚胺

<400> 42

Tyr Ile Ala Gly Val Gly Gly Glu Lys Ser Gly Gly Phe Tyr Cys Xaa

1 5 10 15

Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu

20 25

<210> 43

<211> 36

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 与E20缀合的CTCC

<220>

<221> X

<222> (16) .. (16)

<223> X=马来酰亚胺

<400> 43

Tyr Ile Ala Gly Val Gly Gly Glu Lys Ser Gly Gly Phe Tyr Cys Xaa

1 5 10 15

Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu

20 25 30

Glu Glu Glu Glu

35

<210> 44

<211> 26

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 与AAD10缀合的CTCC

<220>

<221> X

<222> (16) .. (16)

<223> X=马来酰亚胺

<220>

<221> X

<222> (17) .. (26)

<223> X=己二酸

<400> 44

Tyr Ile Ala Gly Val Gly Gly Glu Lys Ser Gly Gly Phe Tyr Cys Xaa

1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

20 25

<210> 45

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 与SDSDD缀合的CTCC

<220>

<221> X

<222> (16) .. (16)

<223> X=马来酰亚胺

<400> 45

Tyr Ile Ala Gly Val Gly Gly Glu Lys Ser Gly Gly Phe Tyr Cys Xaa

1 5 10 15

Ser Asp Ser Asp Asp

20

<210> 46

<211> 34

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 与 (DSS) 6缀合的CTCC

<220>

<221> X

<222> (16) .. (16)

<223> X=马来酰亚胺

<400> 46

Tyr Ile Ala Gly Val Gly Gly Glu Lys Ser Gly Gly Phe Tyr Cys Xaa

1 5 10 15

Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp

20 25 30



Ser Ser

<210> 47

<211> 41

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 与D10缀合的Ck2.3C

<220>

<221> X

<222> (31) .. (31)

<223> X=马来酰亚胺

<400> 47

Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys

1 5 10 15

Ile Pro Val Gly Glu Ser Leu Lys Asp Leu Ile Asp Gln Cys Xaa Asp

20 25 30

Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp

35 40

<210> 48

<211> 51

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 与D20缀合的Ck2.3C

<220>

<221> X

<222> (31) .. (31)

<223> X=马来酰亚胺

<400> 48

Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys

1 5 10 15

Ile Pro Val Gly Glu Ser Leu Lys Asp Leu Ile Asp Gln Cys Xaa Asp

20 25 30

Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp

35 40 45

Asp Asp Asp

50

<210> 49

<211> 41

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 与E10缀合的Ck2.3C

<220>

<221> X

<222> (31) .. (31)

<223> X=马来酰亚胺

<400> 49

Arg	Gln	Ile	Lys	Ile	Trp	Phe	Gln	Asn	Arg	Arg	Met	Lys	Trp	Lys	Lys
1				5					10					15	
Ile	Pro	Val	Gly	Glu	Ser	Leu	Lys	Asp	Leu	Ile	Asp	Gln	Cys	Xaa	Glu
			20					25					30		
Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu						
			35					40							

<210> 50

<211> 51

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 与E20缀合的Ck2.3C

<220>

<221> X

<222> (31) .. (31)

<223> X=马来酰亚胺

<400> 50

Arg	Gln	Ile	Lys	Ile	Trp	Phe	Gln	Asn	Arg	Arg	Met	Lys	Trp	Lys	Lys
1				5					10					15	
Ile	Pro	Val	Gly	Glu	Ser	Leu	Lys	Asp	Leu	Ile	Asp	Gln	Cys	Xaa	Glu
			20					25					30		
Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu
			35					40					45		
Glu	Glu	Glu													
			50												

<210> 51

<211> 41

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 与AAD10缀合的Ck2.3C

<220>

<221> X

<222> (31) .. (31)

<223> X=马来酰亚胺

<220>

<221> X

<222> (32) .. (41)

<223> X=己二酸

<400> 51

Arg	Gln	Ile	Lys	Ile	Trp	Phe	Gln	Asn	Arg	Arg	Met	Lys	Trp	Lys	Lys
1				5					10					15	
Ile	Pro	Val	Gly	Glu	Ser	Leu	Lys	Asp	Leu	Ile	Asp	Gln	Cys	Xaa	Xaa
			20					25					30		
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa						
			35					40							

<210> 52

<211> 36

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 与SDSDD缀合的Ck2.3C

<220>

<221> X

<222> (31) .. (31)

<223> X=马来酰亚胺

<400> 52

Arg	Gln	Ile	Lys	Ile	Trp	Phe	Gln	Asn	Arg	Arg	Met	Lys	Trp	Lys	Lys
1				5					10					15	
Ile	Pro	Val	Gly	Glu	Ser	Leu	Lys	Asp	Leu	Ile	Asp	Gln	Cys	Xaa	Ser
			20					25					30		
Asp	Ser	Asp	Asp												
			35												

<210> 53

<211> 49

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 与(DSS) 6缀合的Ck2.3C

<220>

<221> X

<222> (31) .. (31)

<223> X=马来酰亚胺

<400> 53

Arg	Gln	Ile	Lys	Ile	Trp	Phe	Gln	Asn	Arg	Arg	Met	Lys	Trp	Lys	Lys
1				5					10					15	
Ile	Pro	Val	Gly	Glu	Ser	Leu	Lys	Asp	Leu	Ile	Asp	Gln	Cys	Xaa	Asp
			20					25					30		
Ser	Ser	Asp	Ser	Ser	Asp	Ser	Ser	Asp	Ser	Ser	Asp	Ser	Ser	Asp	Ser
		35					40						45		

Ser

<210> 54

<211> 27

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 与D10缀合的ODPC

<220>

<221> X

<222> (17) .. (17)

<223> X=马来酰亚胺

<400> 54

Asp	Val	Asp	Val	Pro	Asp	Gly	Arg	Gly	Asp	Ser	Leu	Ala	Tyr	Gly	Cys
1				5					10					15	
Xaa	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp
			20						25						

<210> 55

<211> 37

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 与D20缀合的ODPC

<220>

<221> X

<222> (17) .. (17)

<223> X=马来酰亚胺

<400> 55

Asp	Val	Asp	Val	Pro	Asp	Gly	Arg	Gly	Asp	Ser	Leu	Ala	Tyr	Gly	Cys
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

1	5	10	15
Xaa	Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp		
	20	25	30

Asp Asp Asp Asp Asp  
35

<210> 56

<211> 27

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 与E10缀合的ODPC

<220>

<221> X

<222> (17) .. (17)

<223> X=马来酰亚胺

<400> 56

Asp Val Asp Val Pro Asp Gly Arg Gly Asp Ser Leu Ala Tyr Gly Cys

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

Xaa Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu

20	25
----	----

<210> 57

<211> 37

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 与E20缀合的ODPC

<220>

<221> X

<222> (17) .. (17)

<223> X=马来酰亚胺

<400> 57

Asp Val Asp Val Pro Asp Gly Arg Gly Asp Ser Leu Ala Tyr Gly Cys

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

Xaa Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu

20	25	30
----	----	----

Glu Glu Glu Glu Glu

35

<210> 58

<211> 27

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 与AAD10缀合的ODPC

<220>

<221> X

<222> (17) .. (17)

<223> X=马来酰亚胺

<220>

<221> X

<222> (18) .. (27)

<223> X=己二酸

<400> 58

Asp Val Asp Val Pro Asp Gly Arg Gly Asp Ser Leu Ala Tyr Gly Cys

1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

20 25

<210> 59

<211> 22

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 与SDSDD缀合的ODPC

<220>

<221> X

<222> (17) .. (17)

<223> X=马来酰亚胺

<400> 59

Asp Val Asp Val Pro Asp Gly Arg Gly Asp Ser Leu Ala Tyr Gly Cys

1 5 10 15

Xaa Ser Asp Ser Asp Asp

20

<210> 60

<211> 35

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 与 (DSS) 6缀合的ODPC

<220>

<221> X

<222> (16) .. (16)

<223> X=马来酰亚胺

<220>

<221> misc\_feature

<222> (17) .. (17)

<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

<400> 60

Asp	Val	Asp	Val	Pro	Asp	Gly	Arg	Gly	Asp	Ser	Leu	Ala	Tyr	Gly	Cys
1				5				10					15		
Xaa	Asp	Ser	Ser	Asp	Ser	Ser	Asp	Ser	Ser	Asp	Ser	Ser	Asp	Ser	Ser
			20				25						30		
Asp	Ser	Ser													
			35												

<210> 61

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 与D10缀合的P4C

<220>

<221> X

<222> (22) .. (22)

<223> X=马来酰亚胺

<400> 61

Lys	Ile	Pro	Lys	Ala	Ser	Ser	Val	Pro	Thr	Glu	Leu	Ser	Ala	Ile	Ser
1				5				10					15		
Thr	Leu	Tyr	Leu	Cys	Xaa	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp
			20				25						30		

<210> 62

<211> 42

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 与D20缀合的P4C

<220>

<221> X

<222> (22) .. (22)

<223> X=马来酰亚胺

&lt;400&gt; 62

Lys Ile Pro Lys Ala Ser Ser Val Pro Thr Glu Leu Ser Ala Ile Ser

1 5 10 15

Thr Leu Tyr Leu Cys Xaa Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp

20 25 30

Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp

35 40

&lt;210&gt; 63

&lt;211&gt; 32

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 与E10缀合的P4C

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; X

&lt;222&gt; (22) .. (22)

&lt;223&gt; X=马来酰亚胺

&lt;400&gt; 63

Lys Ile Pro Lys Ala Ser Ser Val Pro Thr Glu Leu Ser Ala Ile Ser

1 5 10 15

Thr Leu Tyr Leu Cys Xaa Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu

20 25 30

&lt;210&gt; 64

&lt;211&gt; 42

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 与E20缀合的P4C

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; X

&lt;222&gt; (22) .. (22)

&lt;223&gt; X=马来酰亚胺

&lt;400&gt; 64

Lys Ile Pro Lys Ala Ser Ser Val Pro Thr Glu Leu Ser Ala Ile Ser

1 5 10 15

Thr Leu Tyr Leu Cys Xaa Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu

20 25 30

Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu

35 40



<210> 65  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> 人工  
 <220>  
 <223> 与AAD10缀合的P4C  
 <220>  
 <221> X  
 <222> (22) .. (22)  
 <223> X=马来酰亚胺  
 <220>  
 <221> X  
 <222> (23) .. (32)  
 <223> X=己二酸  
 <400> 65

Lys	Ile	Pro	Lys	Ala	Ser	Ser	Val	Pro	Thr	Glu	Leu	Ser	Ala	Ile	Ser
1				5					10					15	
Thr	Leu	Tyr	Leu	Cys	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
			20					25						30	

<210> 66  
 <211> 27  
 <212> PRT  
 <213> 人工  
 <220>  
 <223> 与SDSDD缀合的P4C  
 <220>  
 <221> X  
 <222> (22) .. (22)  
 <223> X=马来酰亚胺  
 <400> 66

Lys	Ile	Pro	Lys	Ala	Ser	Ser	Val	Pro	Thr	Glu	Leu	Ser	Ala	Ile	Ser
1				5					10					15	
Thr	Leu	Tyr	Leu	Cys	Xaa	Ser	Asp	Ser	Asp	Asp					
			20					25							

<210> 67  
 <211> 40  
 <212> PRT  
 <213> 人工  
 <220>

<223> 与 (DSS) 6缀合的P4C

<220>

<221> X

<222> (22) .. (22)

<223> X=马来酰亚胺

<400> 67

Lys Ile Pro Lys Ala Ser Ser Val Pro Thr Glu Leu Ser Ala Ile Ser

1 5 10 15

Thr Leu Tyr Leu Cys Xaa Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp

20 25 30

Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser

35 40

<210> 68

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 分支 D4 Y

<220>

<221> X

<222> (2) .. (2)

<223> X=PEG (聚乙二醇)

<400> 68

Tyr Xaa Lys Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp

1 5 10

<210> 69

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 分支 D8 Y

<220>

<221> X

<222> (2) .. (2)

<223> X=PEG (聚乙二醇)

<400> 69

Tyr Xaa Lys Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp

1 5 10 15

Asp Asp Asp

&lt;210&gt; 70

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 与分支D10缀合的F109C

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; X

&lt;222&gt; (9) .. (9)

&lt;223&gt; X=马来酰亚胺

&lt;400&gt; 70

Tyr Lys Arg Ser Arg Tyr Thr Cys Xaa Lys Asp Asp Asp Asp Asp Asp

1 5 10 15

Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp

20 25 30

&lt;210&gt; 71

&lt;211&gt; 61

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 与分支 D10缀合的PACAPC

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; X

&lt;222&gt; (40) .. (40)

&lt;223&gt; X=马来酰亚胺

&lt;400&gt; 71

His Ser Asp Gly Ile Phe Thr Asp Ser Tyr Ser Arg Tyr Arg Lys Gln

1 5 10 15

Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Ala Ala Val Leu Gly Lys Arg Tyr Lys

20 25 30

Gln Arg Val Lys Asn Lys Cys Xaa Lys Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp

35 40 45

Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp

50 55 60

&lt;210&gt; 72

&lt;211&gt; 37

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工

&lt;220&gt;

<223> 与分支 D10缀合的CTCC

<220>

<221> X

<222> (16) .. (16)

<223> X=马来酰亚胺

<400> 72

Tyr Ile Ala Gly Val Gly Gly Glu Lys Ser Gly Gly Phe Tyr Cys Xaa

1 5 10 15

Lys Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp

20 25 30

Asp Asp Asp Asp Asp

35

<210> 73

<211> 52

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 与分支 D10缀合的Ck2.3C

<220>

<221> X

<222> (31) .. (31)

<223> X=马来酰亚胺

<400> 73

Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys

1 5 10 15

Ile Pro Val Gly Glu Ser Leu Lys Asp Leu Ile Asp Gln Cys Xaa Lys

20 25 30

Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp

35 40 45

Asp Asp Asp Asp

50

<210> 74

<211> 38

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 与分支 D10缀合的ODPC

<220>

<221> X

<222> (17) .. (17)

<223> X=马来酰亚胺

<400> 74

Asp	Val	Asp	Val	Pro	Asp	Gly	Arg	Gly	Asp	Ser	Leu	Ala	Tyr	Gly	Cys
1				5					10					15	
Xaa	Lys	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp
				20				25						30	
Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp									
				35											

<210> 75

<211> 43

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 与分支 D10缀合的P4C

<220>

<221> X

<222> (22) .. (22)

<223> X=马来酰亚胺

<400> 75

Lys	Ile	Pro	Lys	Ala	Ser	Ser	Val	Pro	Thr	Glu	Leu	Ser	Ala	Ile	Ser
1				5					10					15	
Thr	Leu	Tyr	Leu	Cys	Xaa	Lys	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp
				20				25						30	
Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp
				35				40							

<210> 76

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 与分支 E10缀合的F109C

<220>

<221> X

<222> (9) .. (9)

<223> X=马来酰亚胺

<400> 76

Tyr	Lys	Arg	Ser	Arg	Tyr	Thr	Cys	Xaa	Lys	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu
1				5					10					15	

Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu  
 20 25 30

<210> 77

<211> 61

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 与分支 E10缀合的PACAPC

<220>

<221> X

<222> (40) .. (40)

<223> X=马来酰亚胺

<400> 77

His Ser Asp Gly Ile Phe Thr Asp Ser Tyr Ser Arg Tyr Arg Lys Gln  
 1 5 10 15  
 Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Ala Ala Val Leu Gly Lys Arg Tyr Lys  
 20 25 30  
 Gln Arg Val Lys Asn Lys Cys Xaa Lys Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu  
 35 40 45  
 Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu  
 50 55 60

<210> 78

<211> 37

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 与分支 E10缀合的CTCC

<220>

<221> X

<222> (16) .. (16)

<223> X=马来酰亚胺

<400> 78

Tyr Ile Ala Gly Val Gly Gly Glu Lys Ser Gly Gly Phe Tyr Cys Xaa  
 1 5 10 15  
 Lys Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu  
 20 25 30  
 Glu Glu Glu Glu Glu  
 35

<210> 79

<211> 52

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 与分支 E10缀合的Ck2.3C

<220>

<221> X

<222> (31) .. (31)

<223> X=马来酰亚胺

<400> 79

Arg	Gln	Ile	Lys	Ile	Trp	Phe	Gln	Asn	Arg	Arg	Met	Lys	Trp	Lys	Lys
1				5					10					15	
Ile	Pro	Val	Gly	Glu	Ser	Leu	Lys	Asp	Leu	Ile	Asp	Gln	Cys	Xaa	Lys
			20					25					30		
Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu
			35					40					45		
Glu	Glu	Glu	Glu												
			50												

<210> 80

<211> 38

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 与分支 E10缀合的ODPC

<220>

<221> X

<222> (17) .. (17)

<223> X=马来酰亚胺

<400> 80

Asp	Val	Asp	Val	Pro	Asp	Gly	Arg	Gly	Asp	Ser	Leu	Ala	Tyr	Gly	Cys
1				5				10						15	
Xaa	Lys	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu
			20					25					30		
Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu										
			35												

<210> 81

<211> 43

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 与分支 E10缀合的P4C

<220>

<221> X

<222> (22) .. (22)

<223> X=马来酰亚胺

<400> 81

Lys Ile Pro Lys Ala Ser Ser Val Pro Thr Glu Leu Ser Ala Ile Ser

1 5 10 15

Thr Leu Tyr Leu Cys Xaa Lys Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu

20 25 30

Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu

35 40



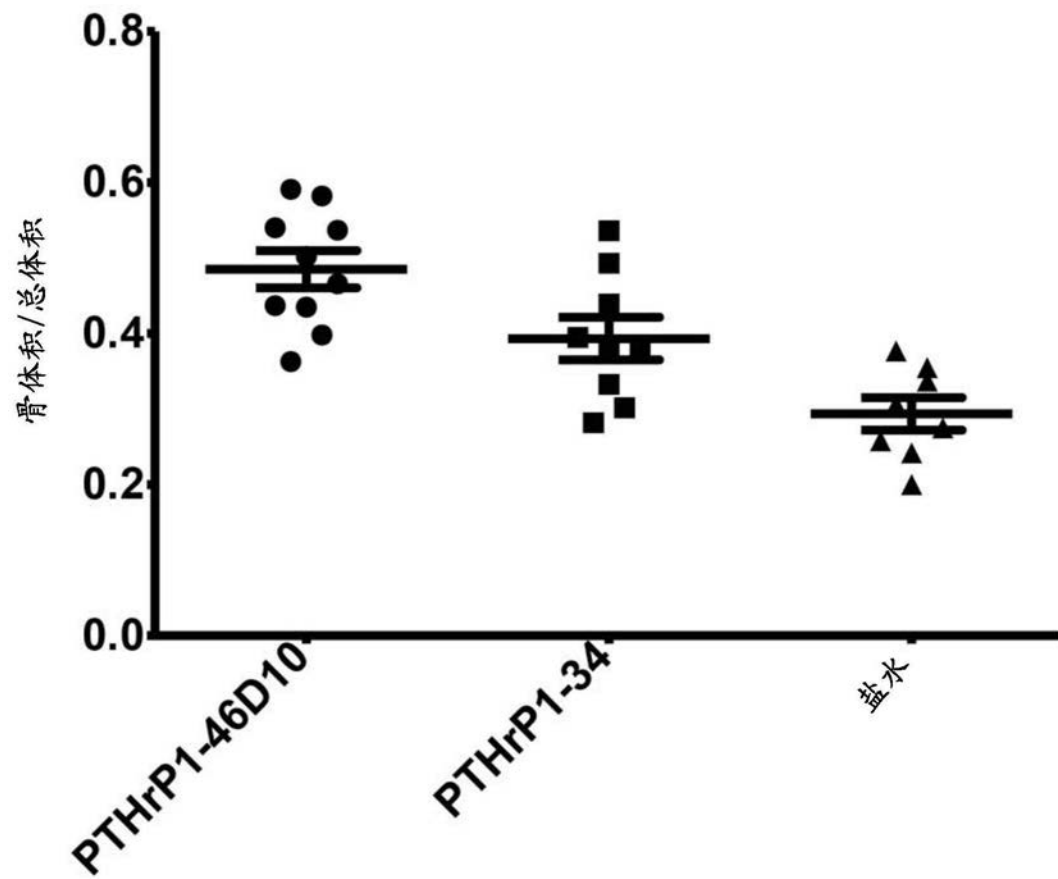


图1

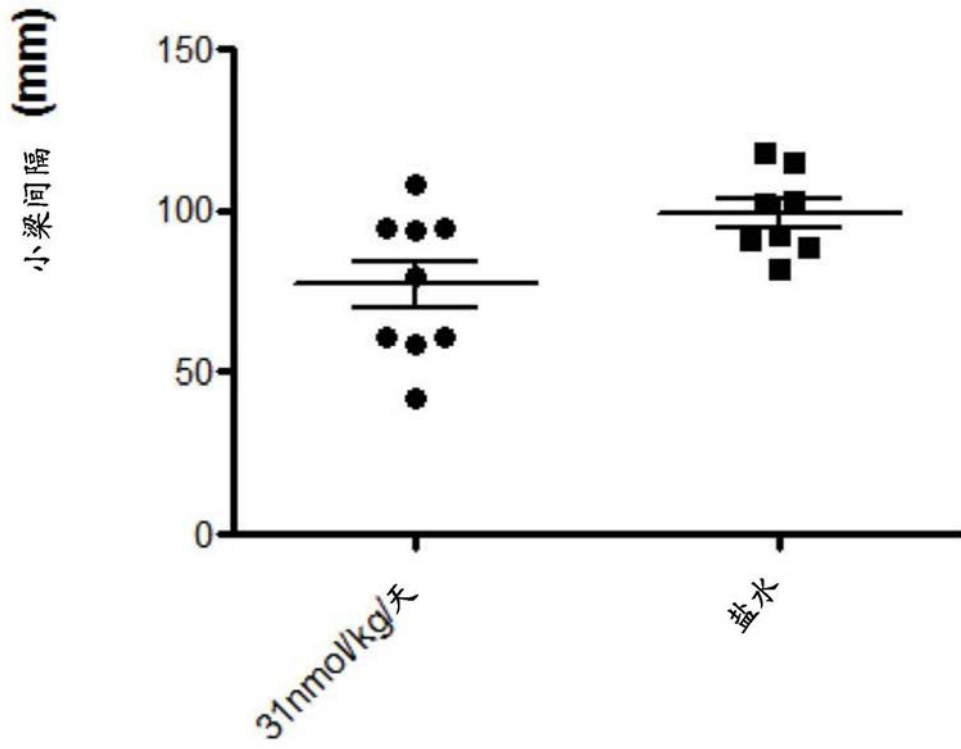
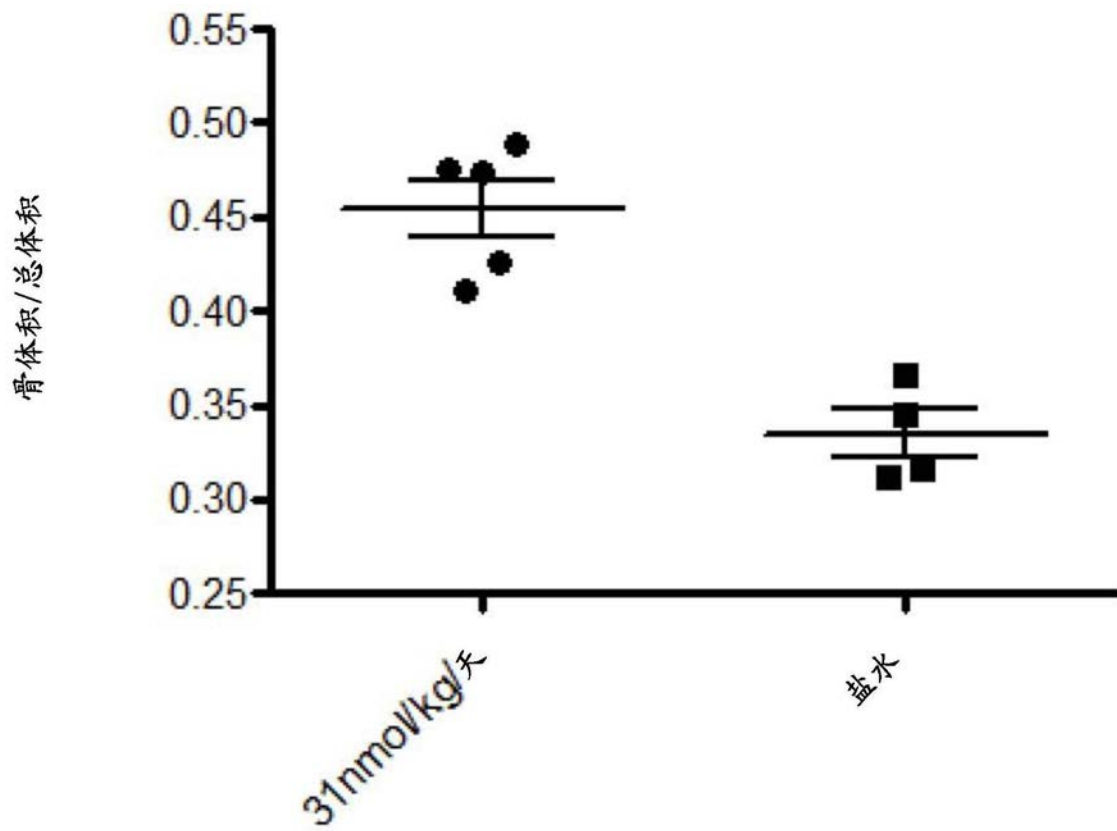


图2



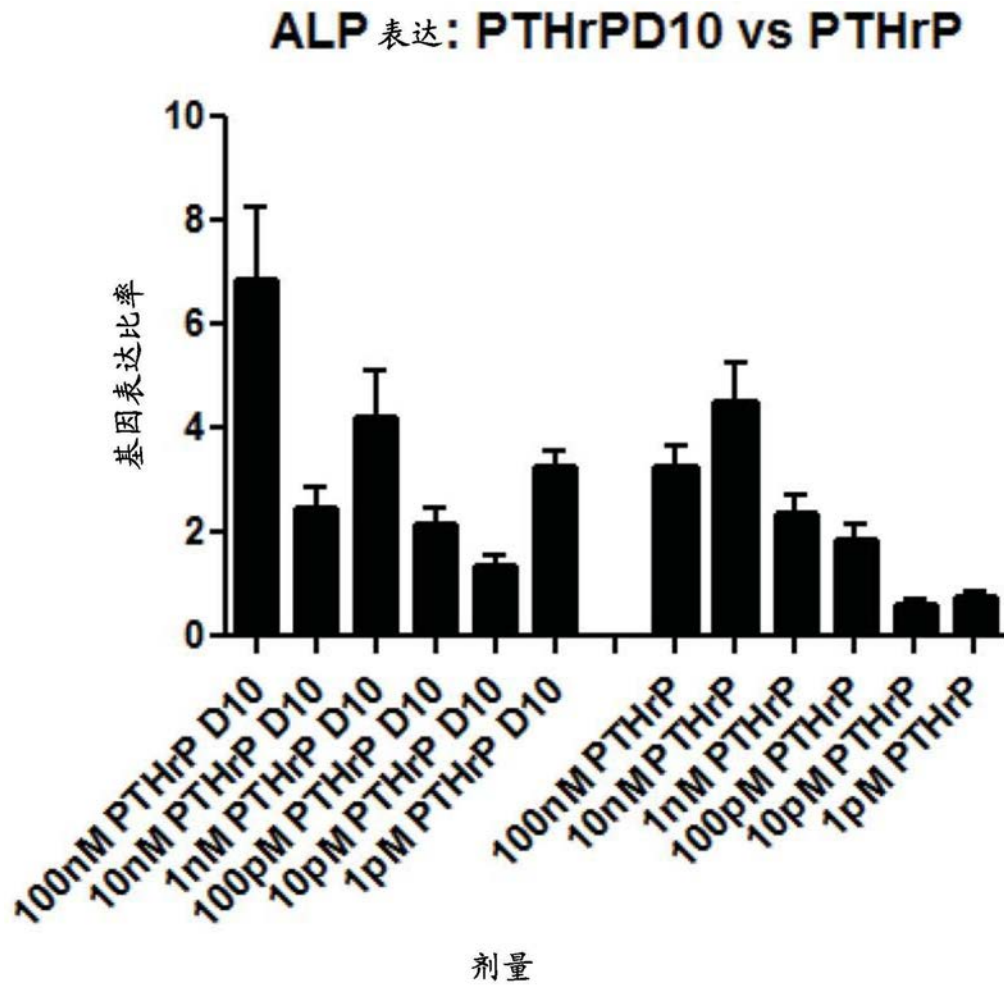


图4

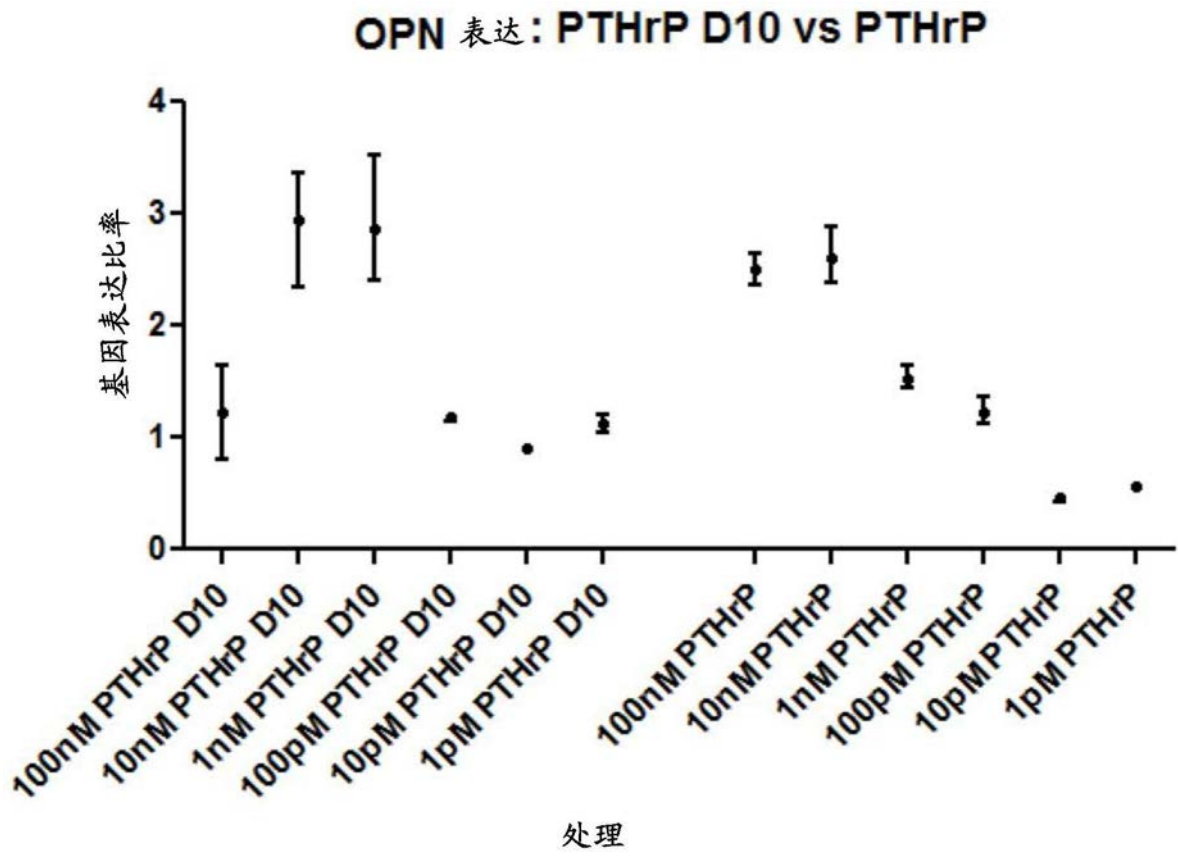


图5

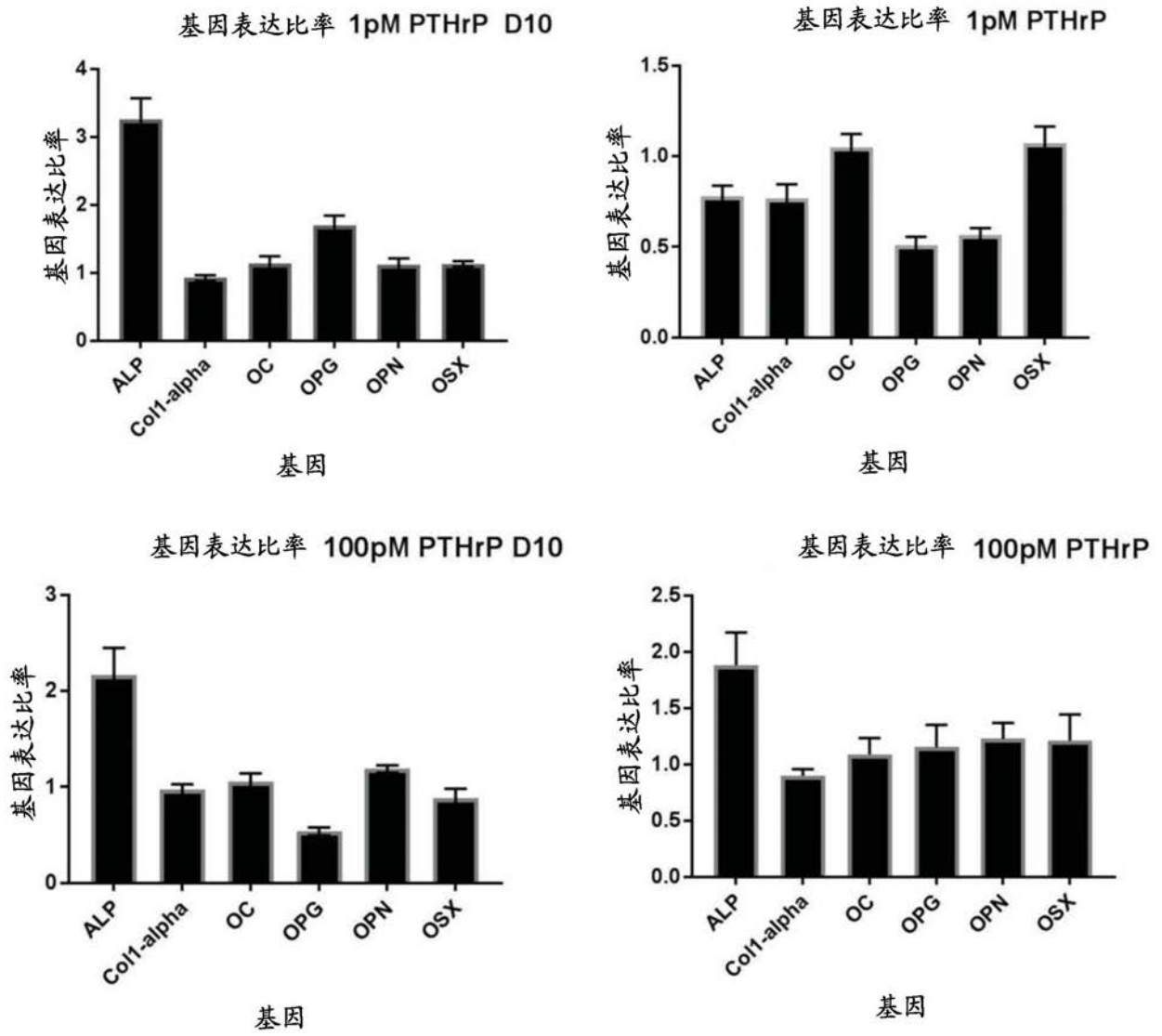


图6

8周内的PTHrp vs PTHrPD10

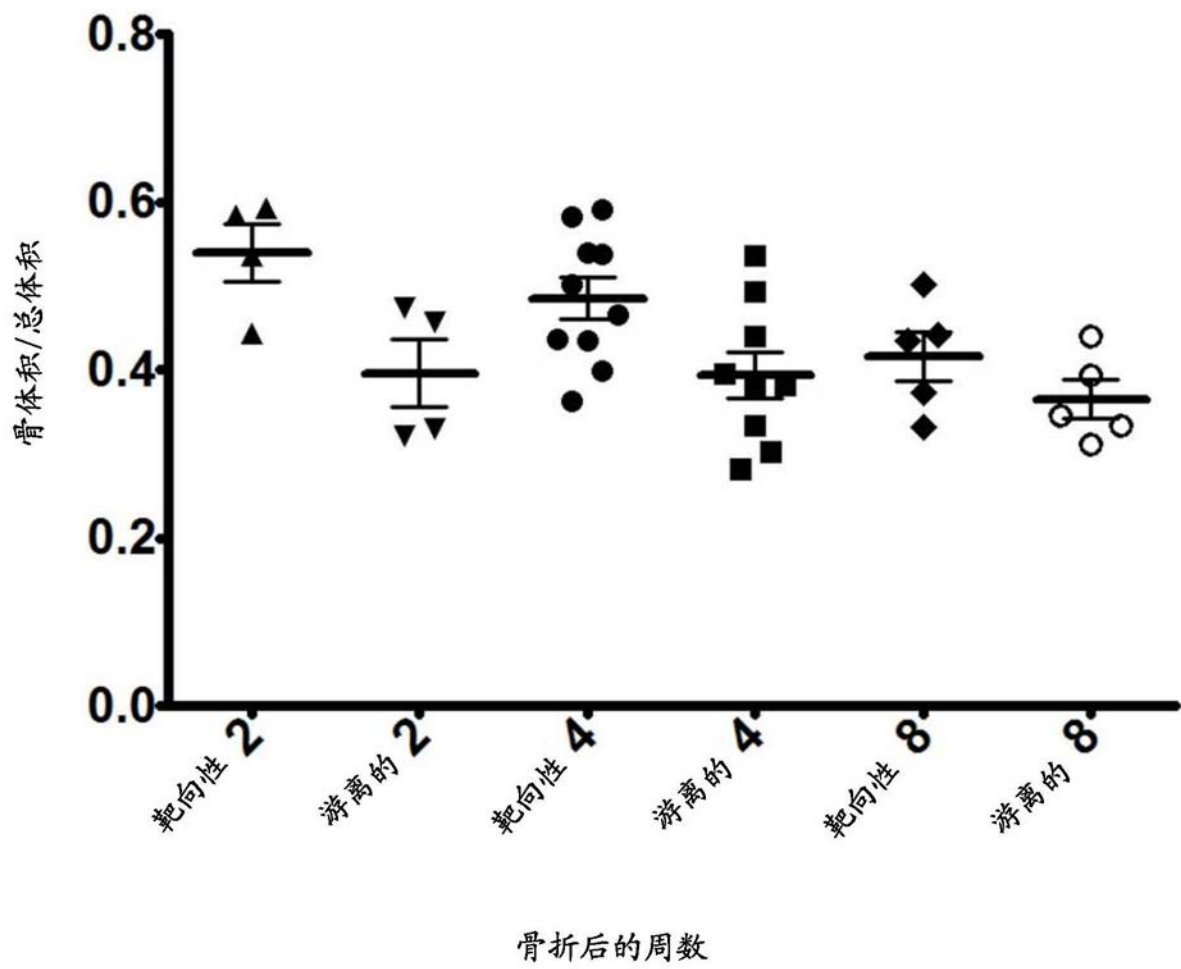


图7

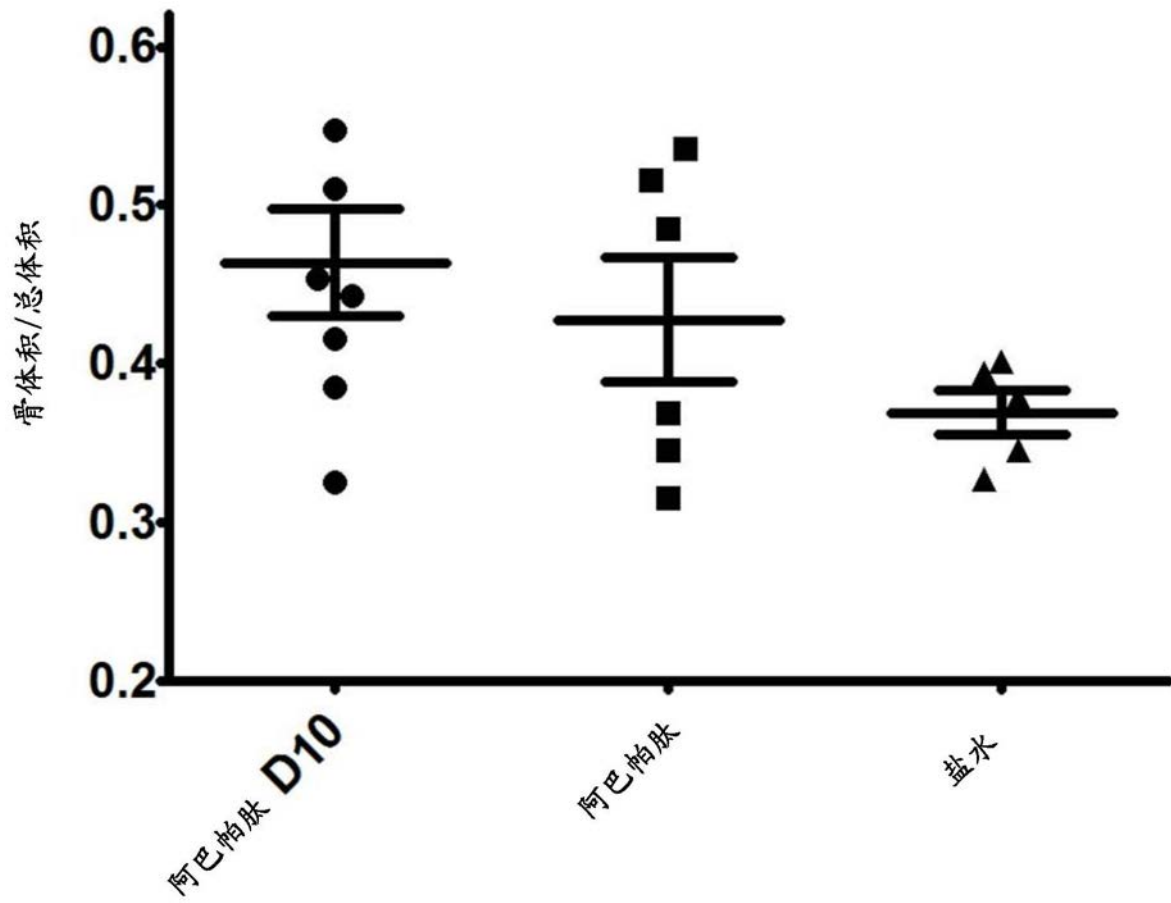


图8

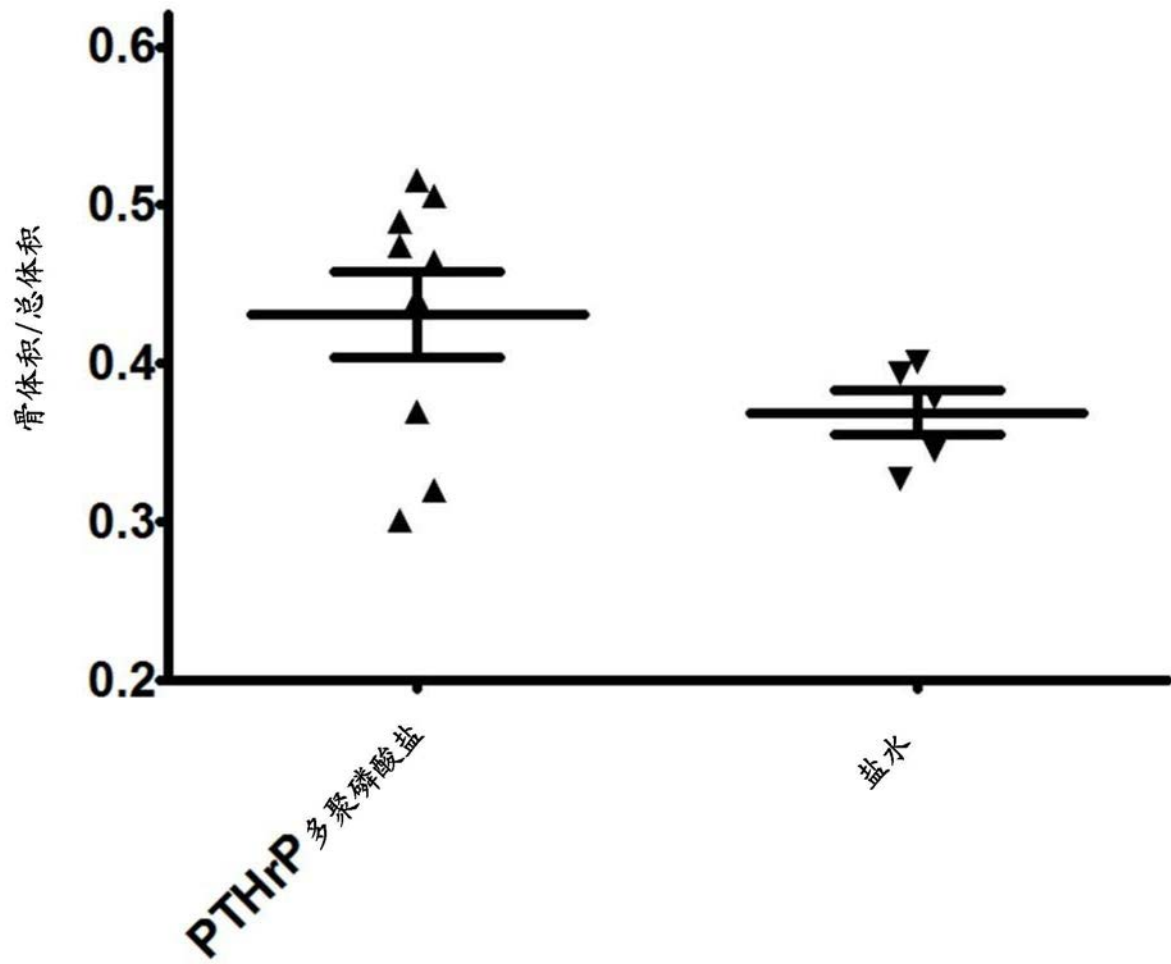


图9



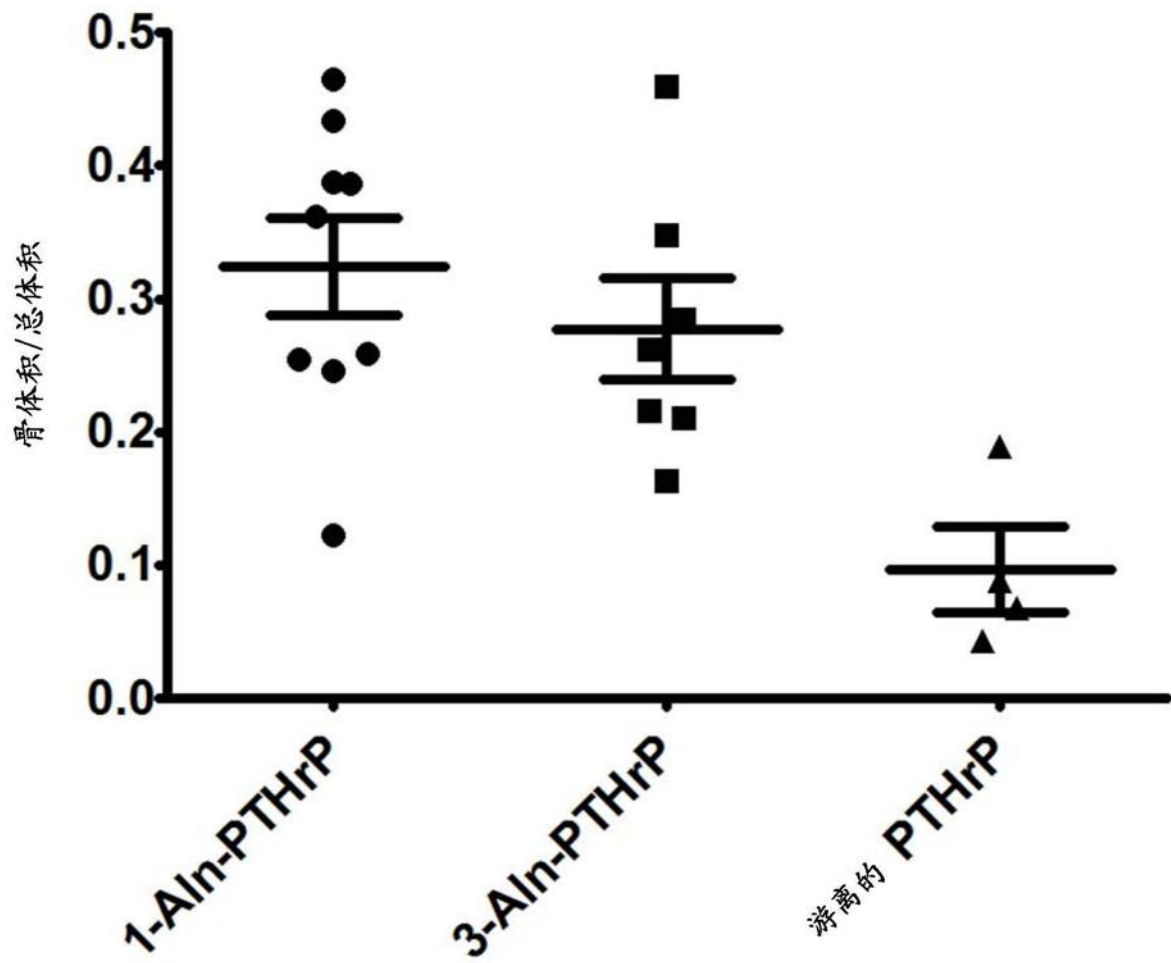


图10

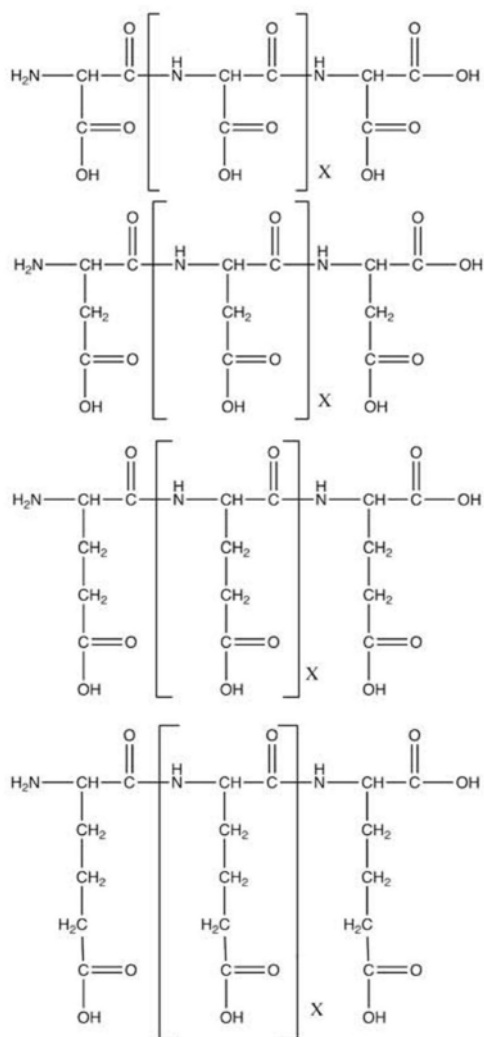


图11

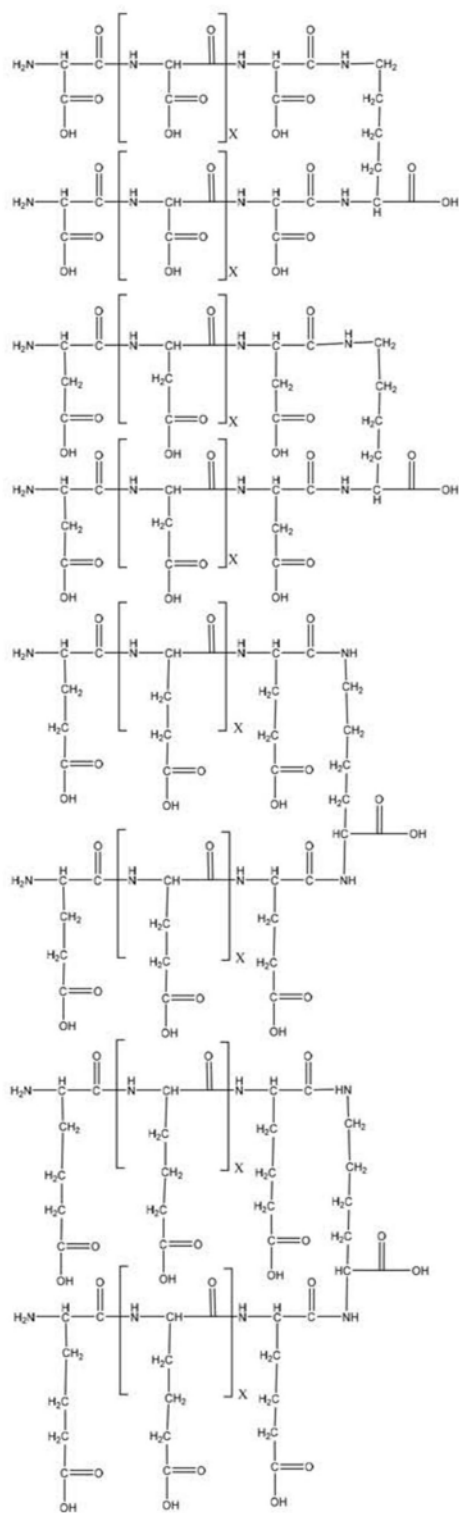
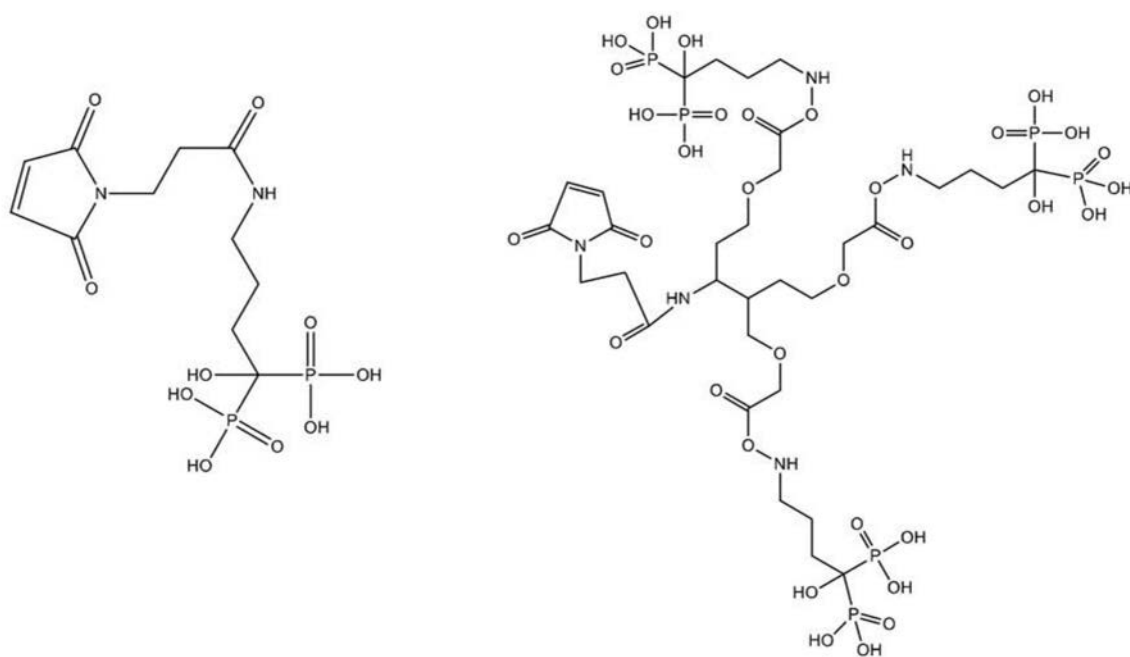


图12

## 二磷酸盐



## 多聚磷酸盐

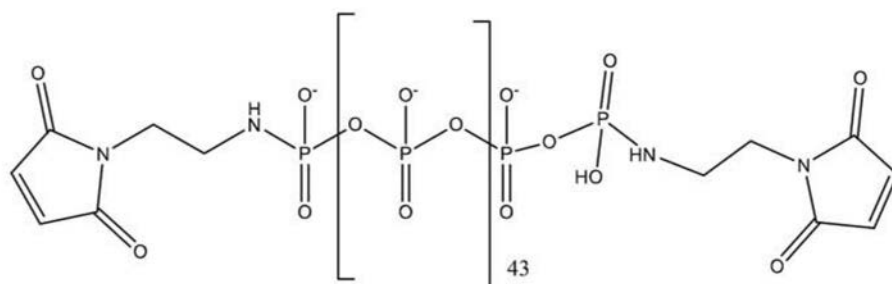
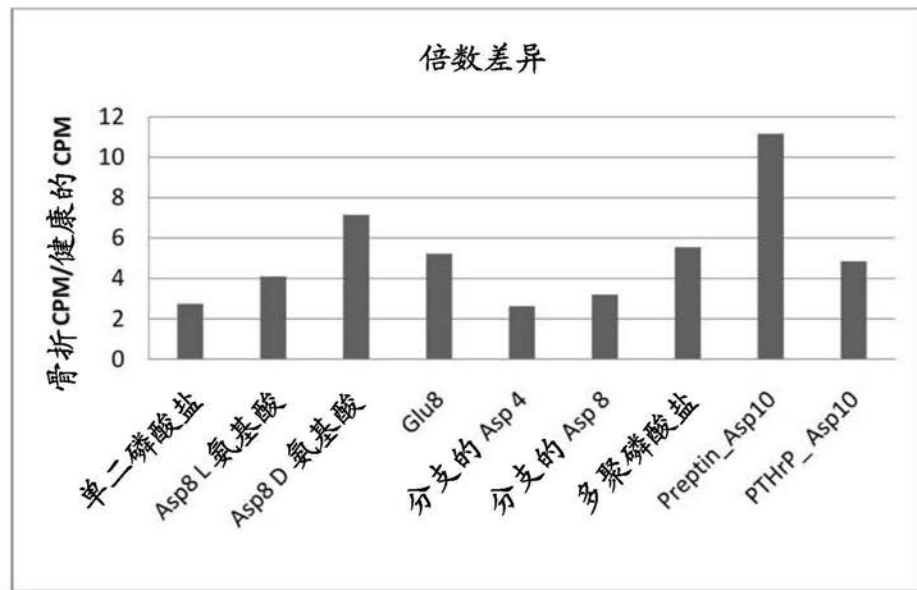


图13

A.



B.

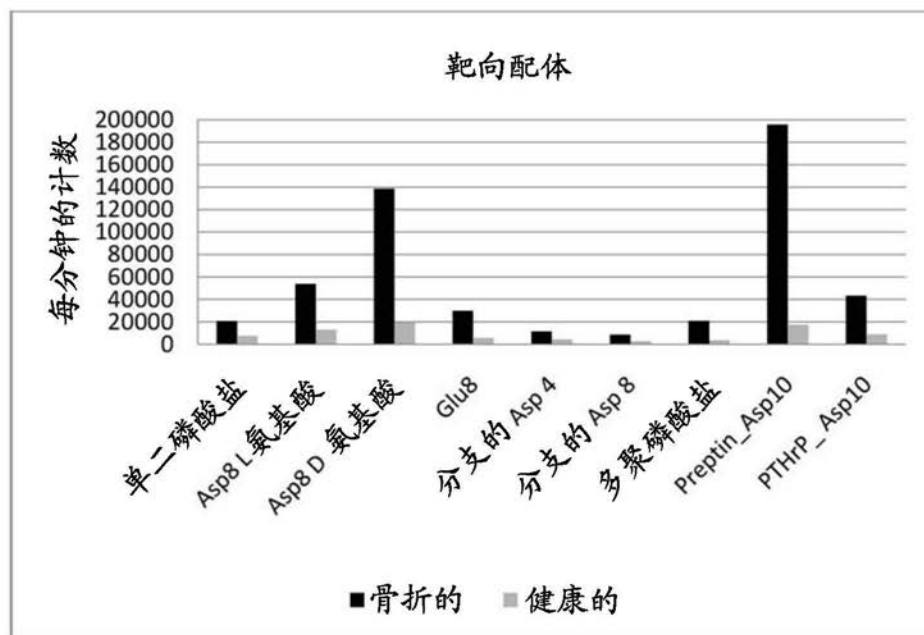


图14

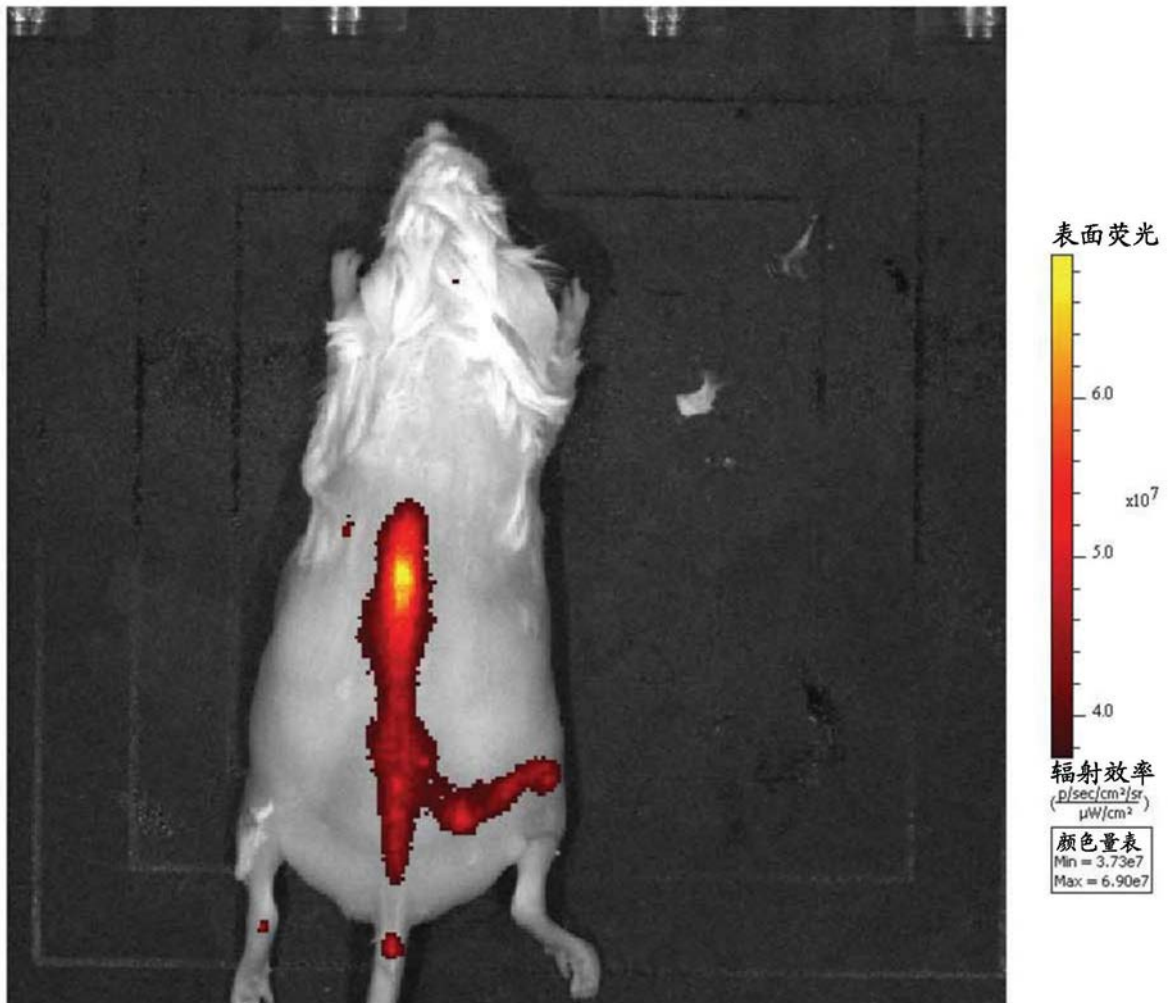


图15

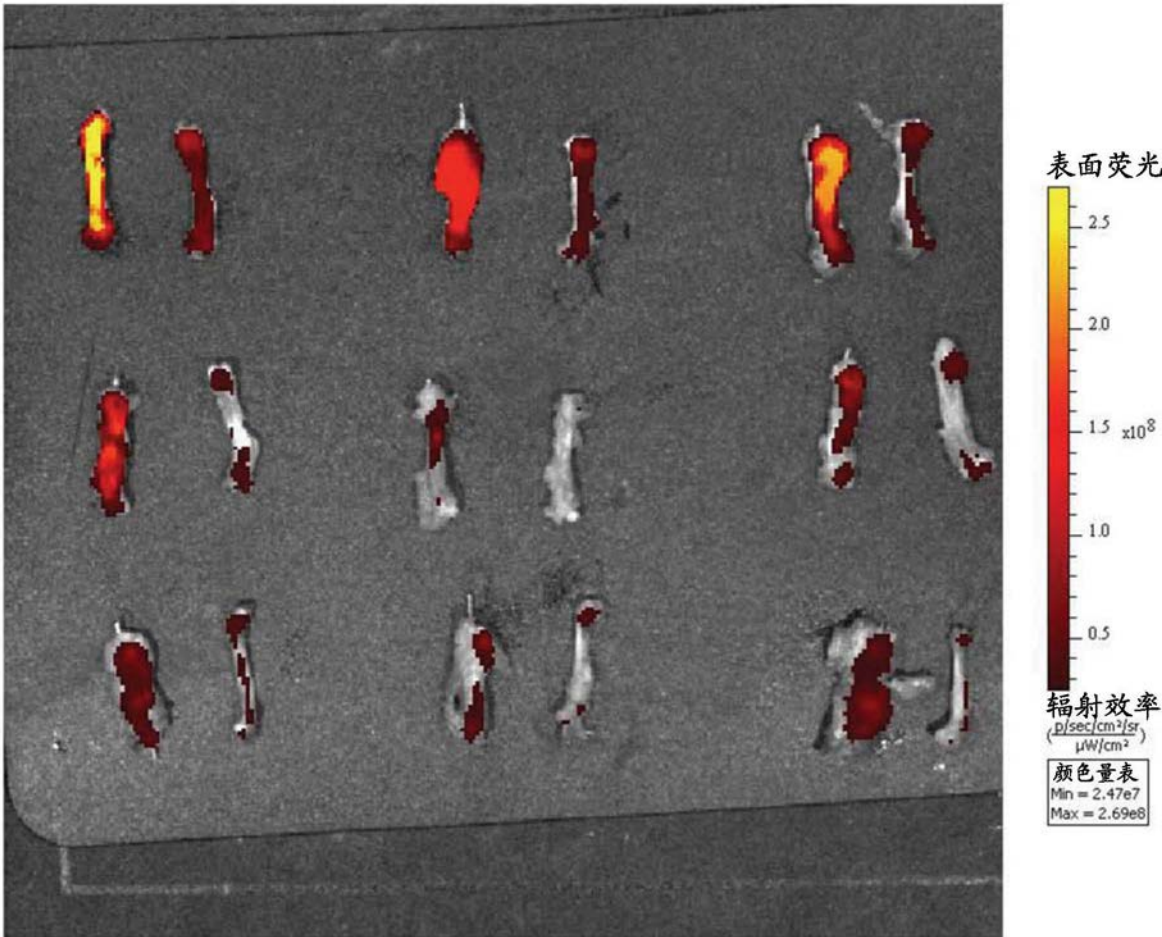


图16

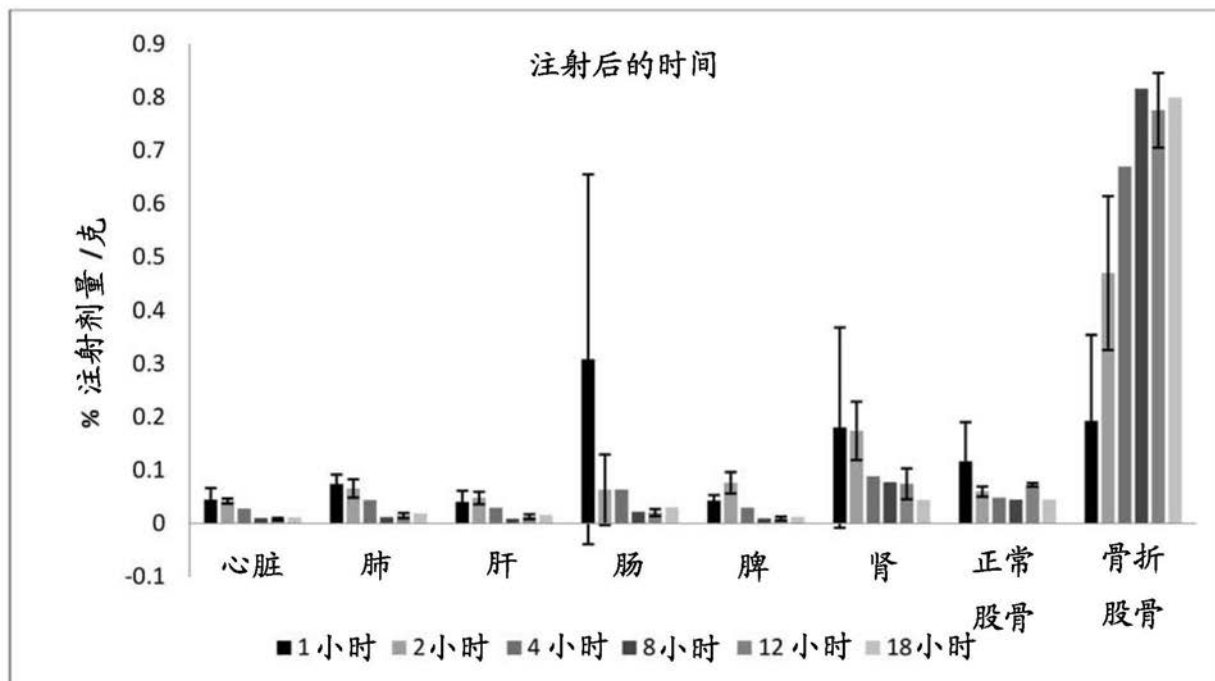
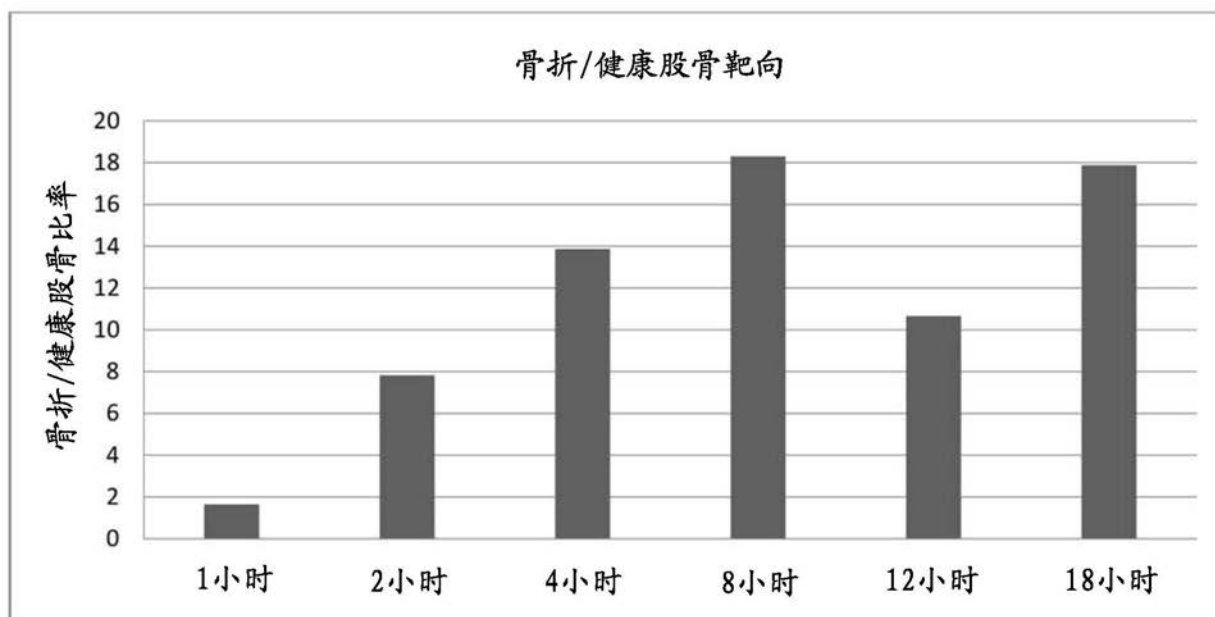
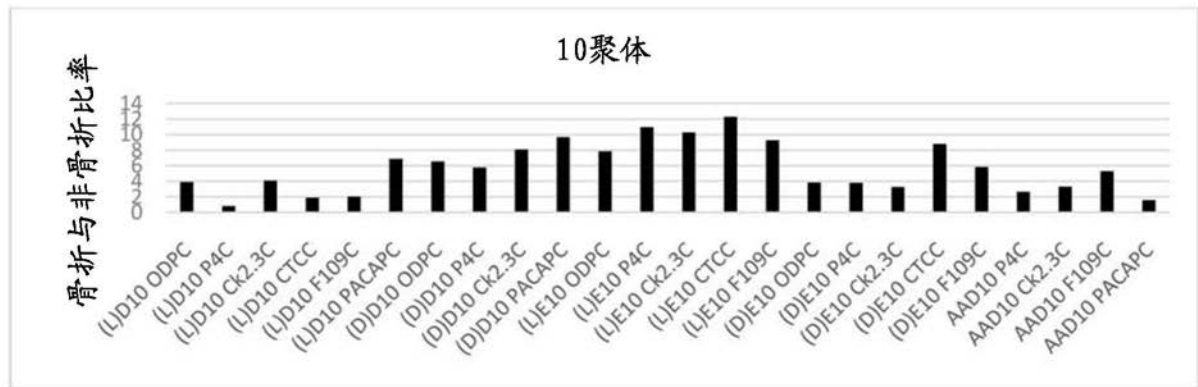
**A.****B.**

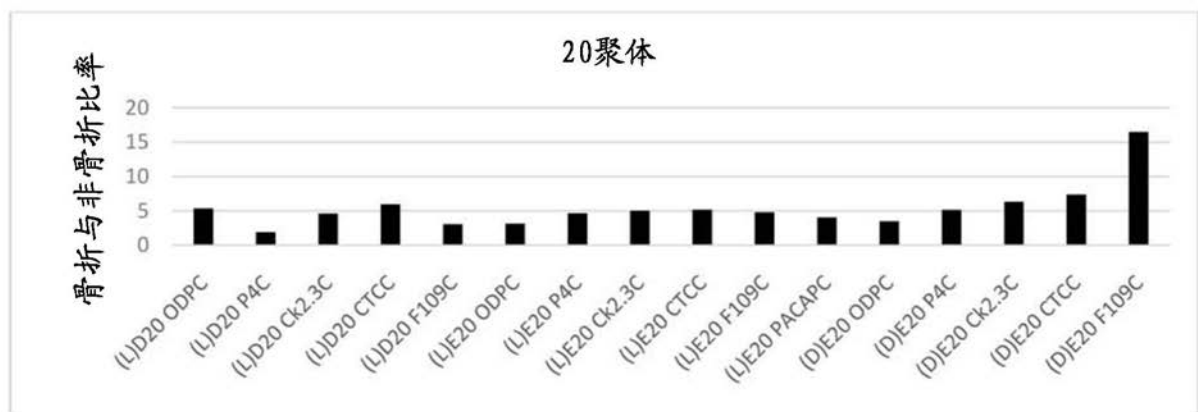
图17



A.



B.



C.

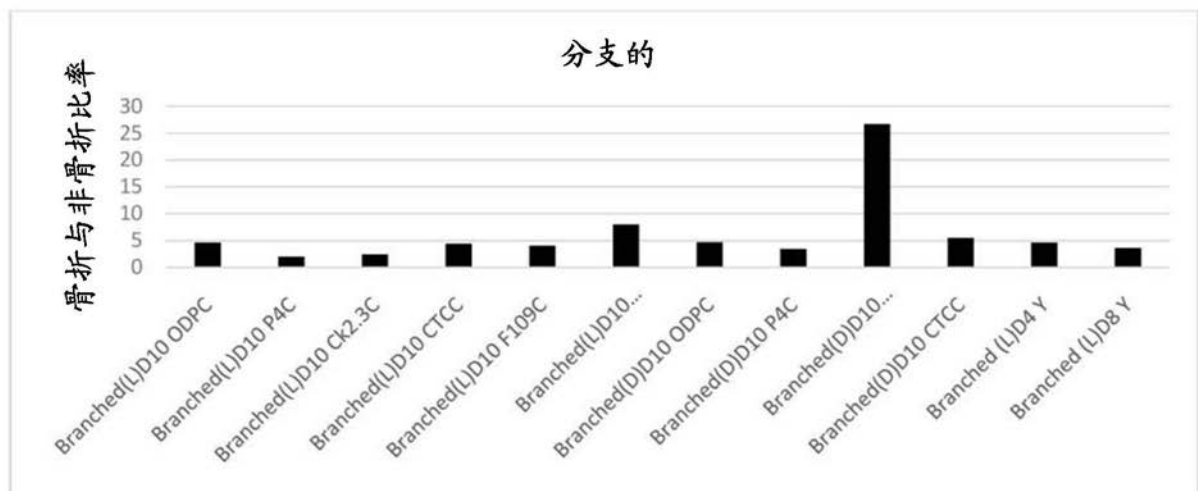
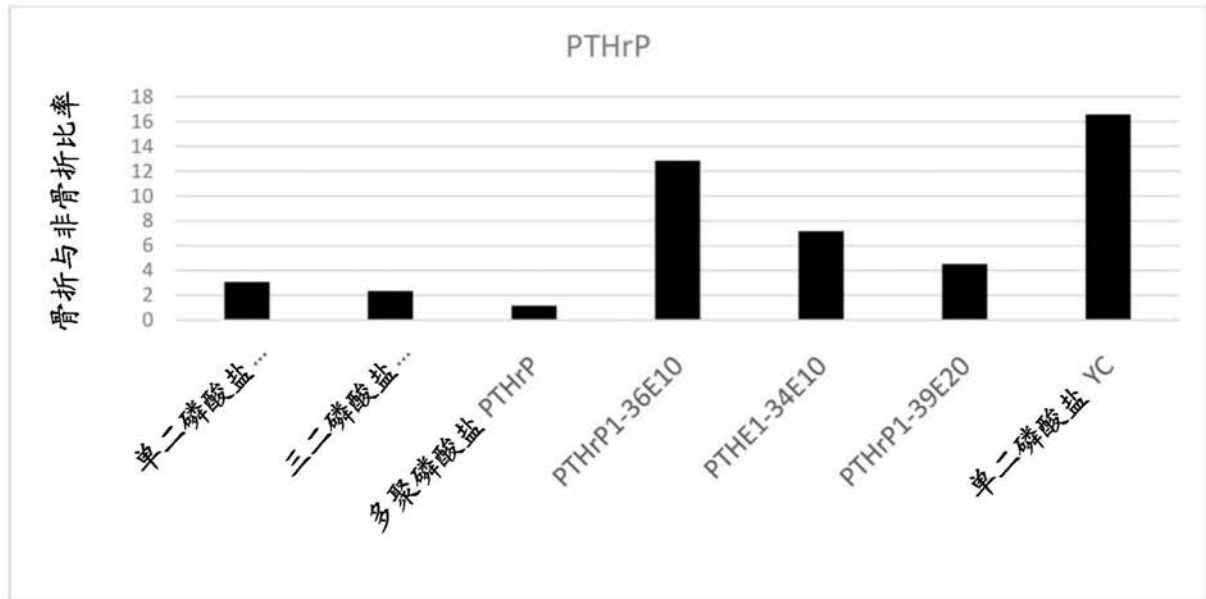


图18

A.



B.

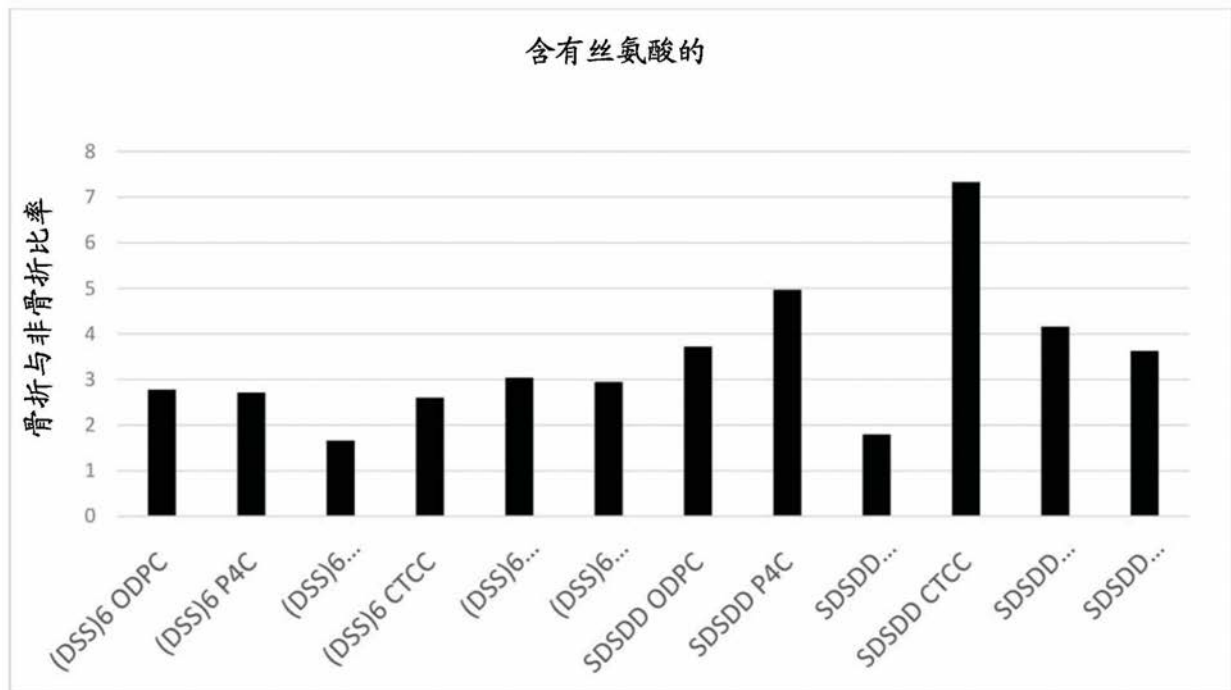
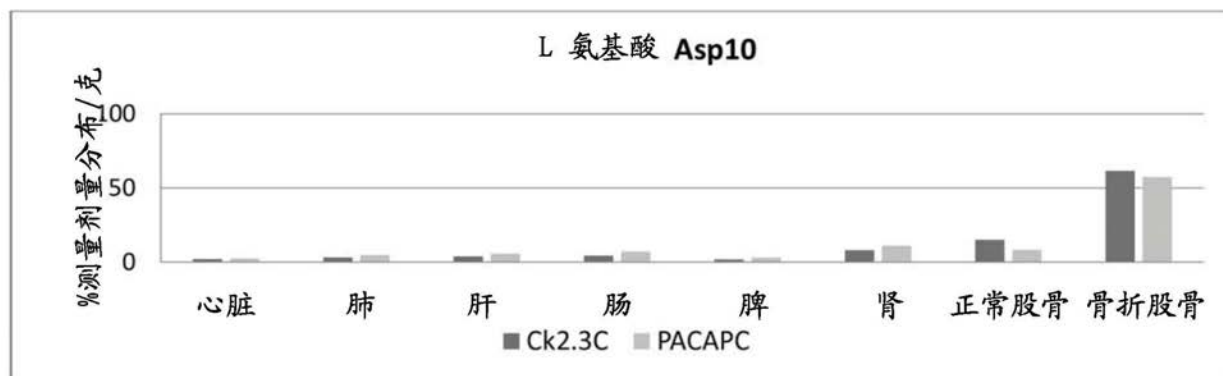
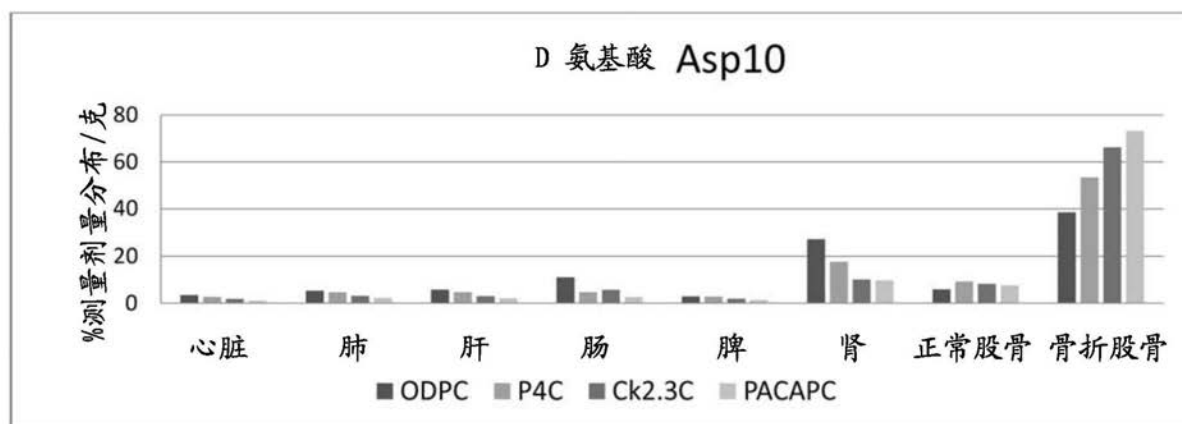


图19

A.



B.



C.

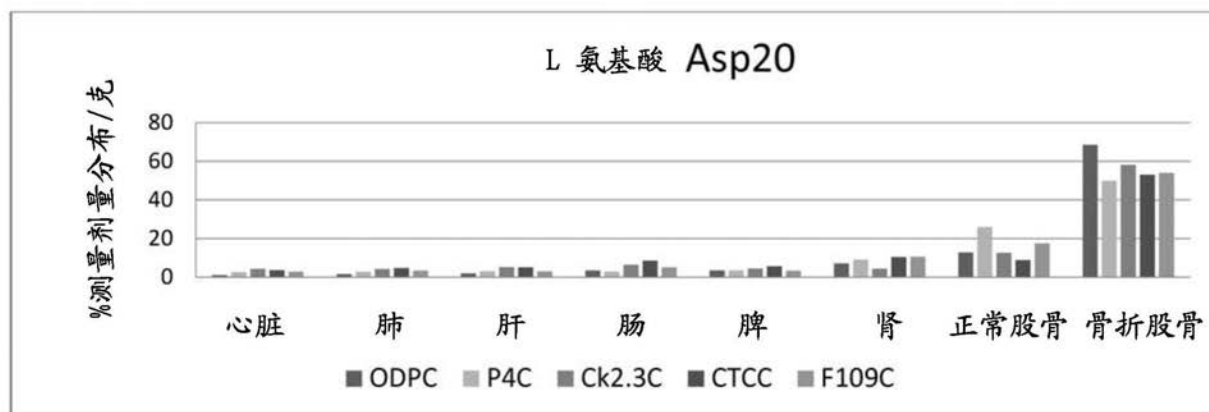
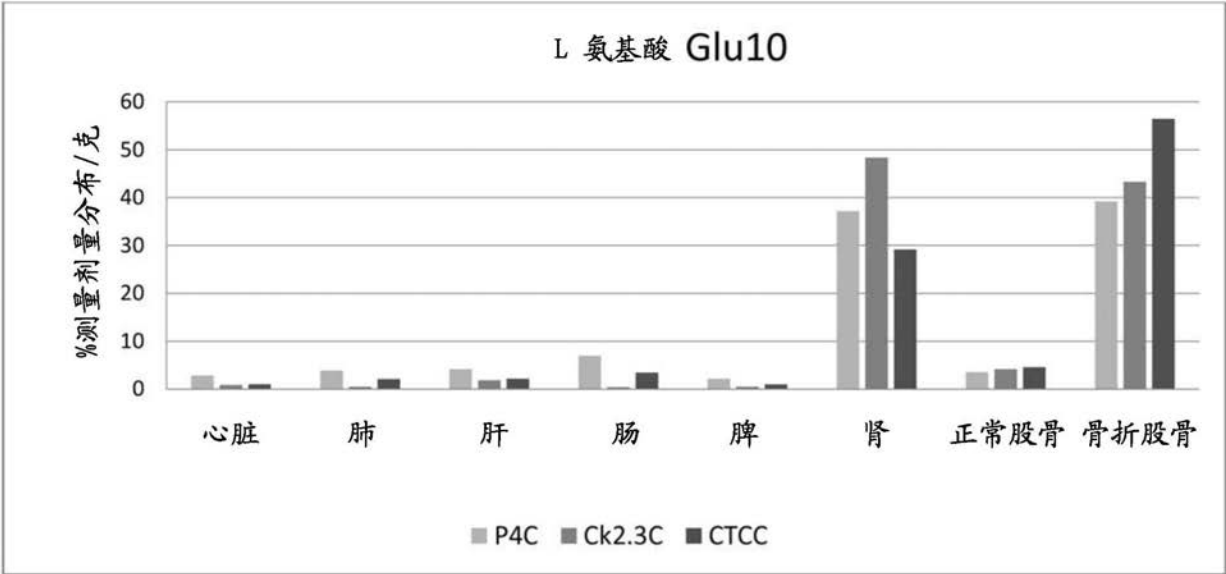


图20

A.



B.

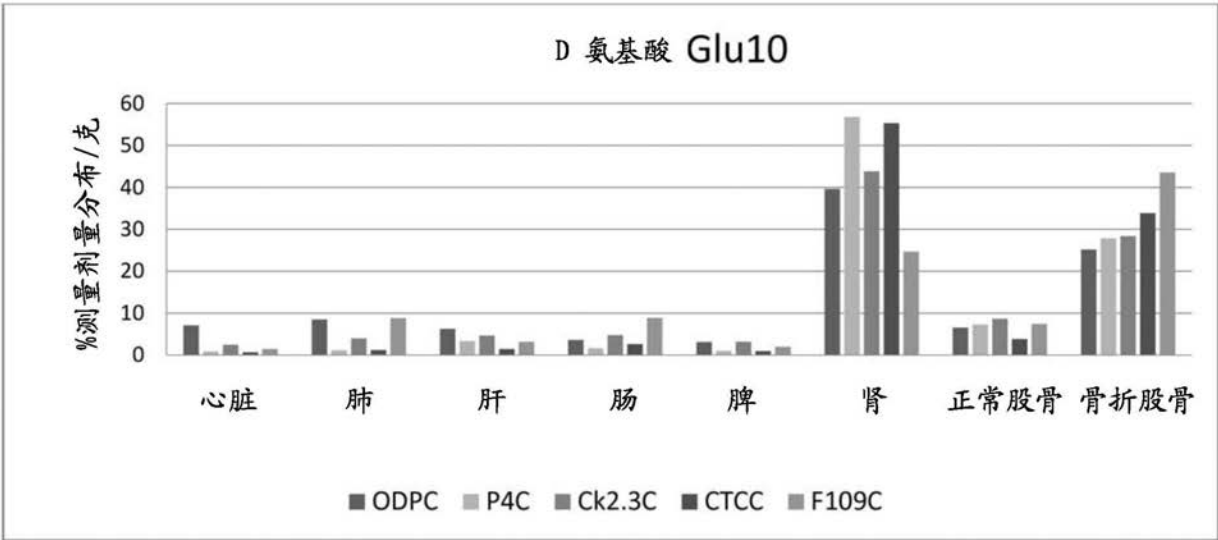
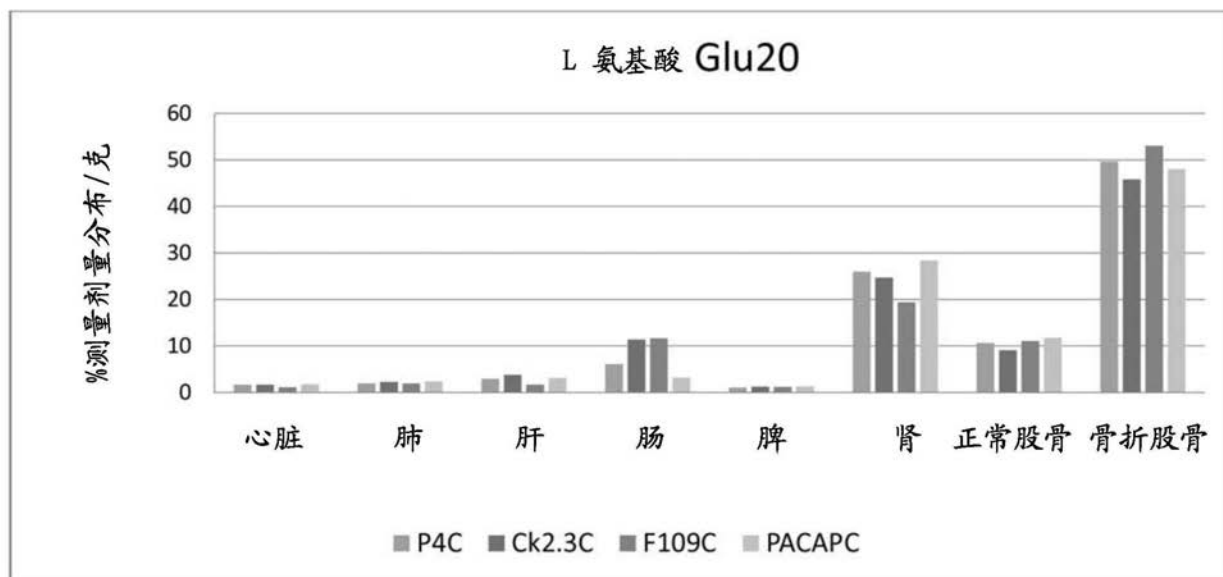


图21

A.



B.

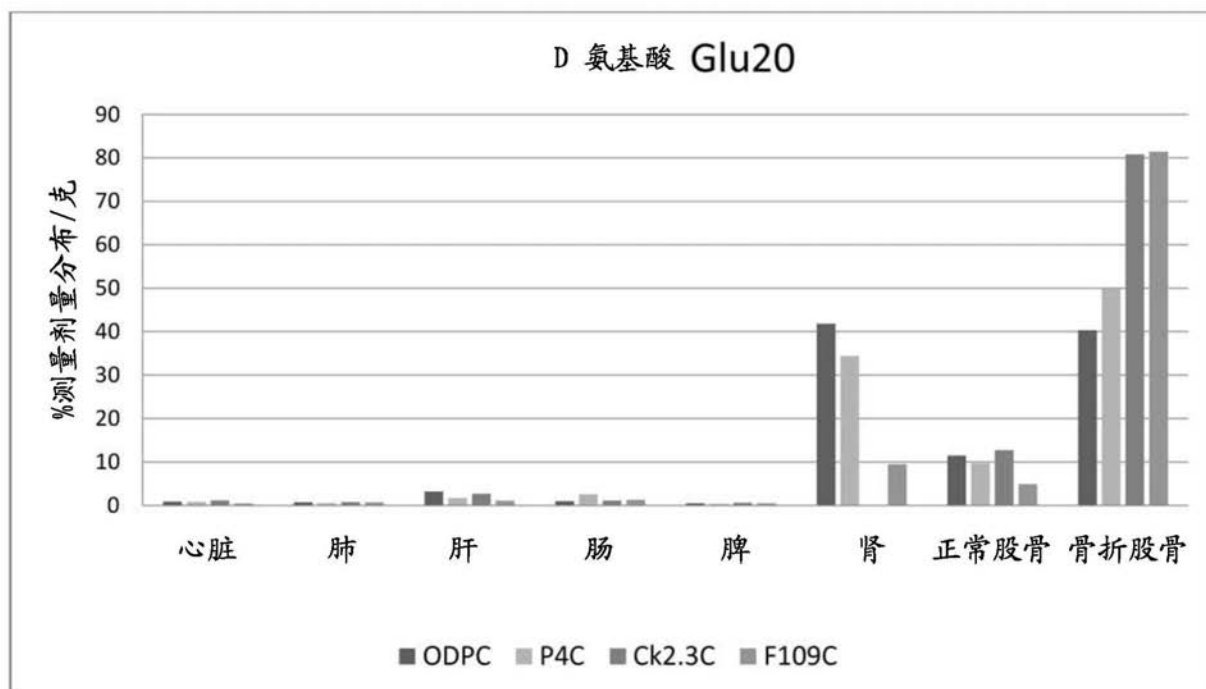
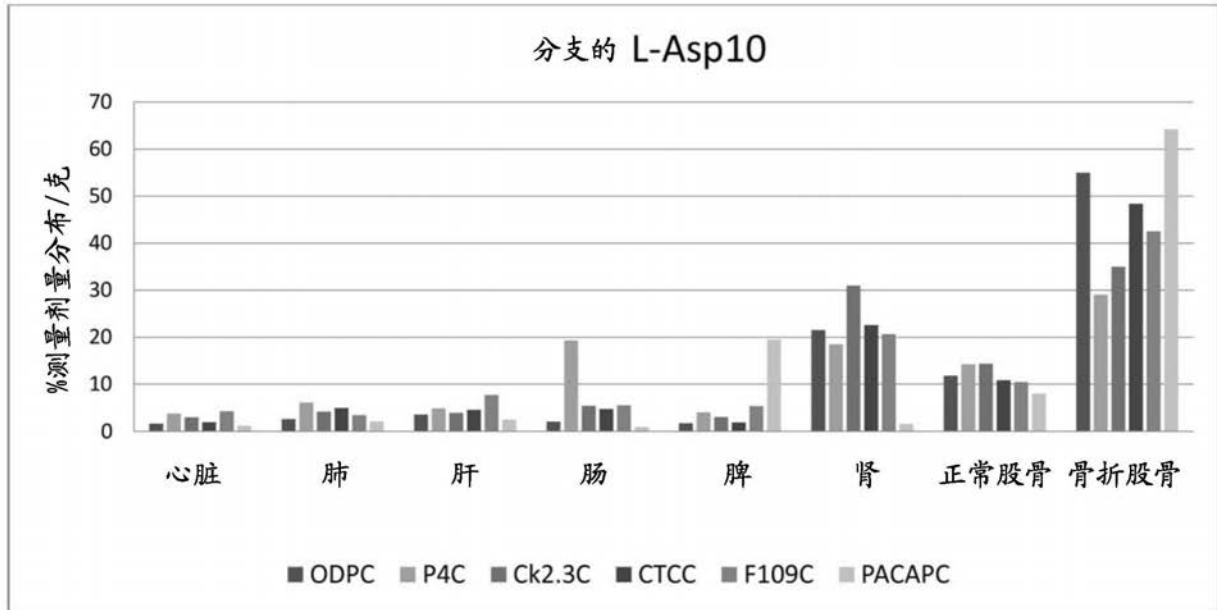


图22

A.



B.

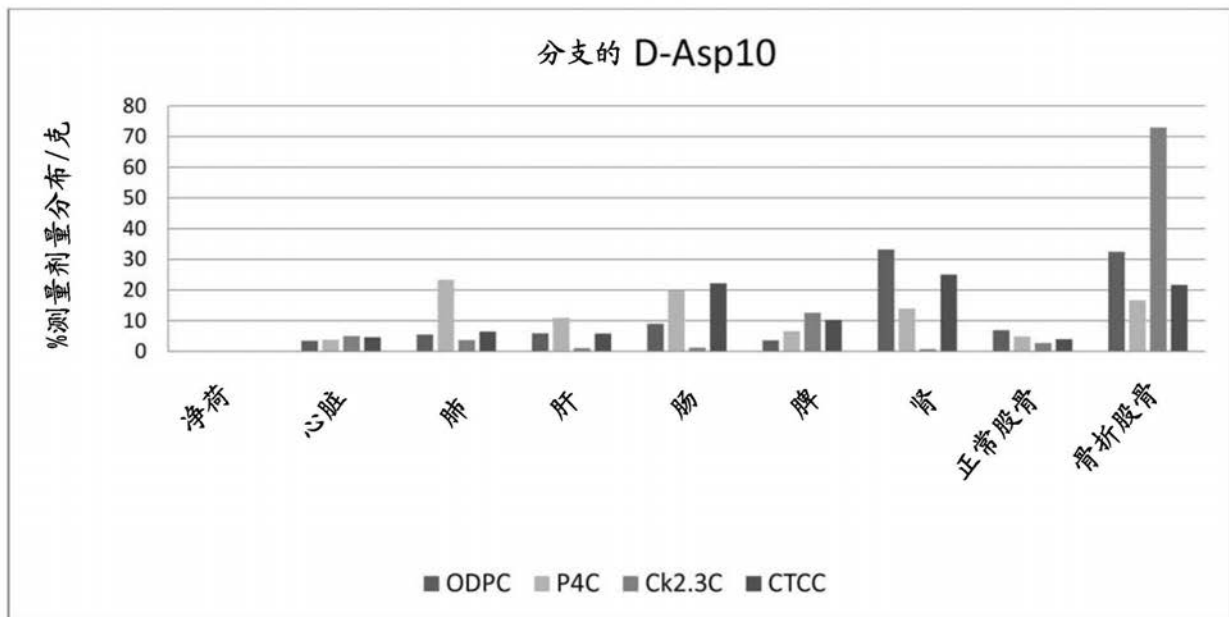
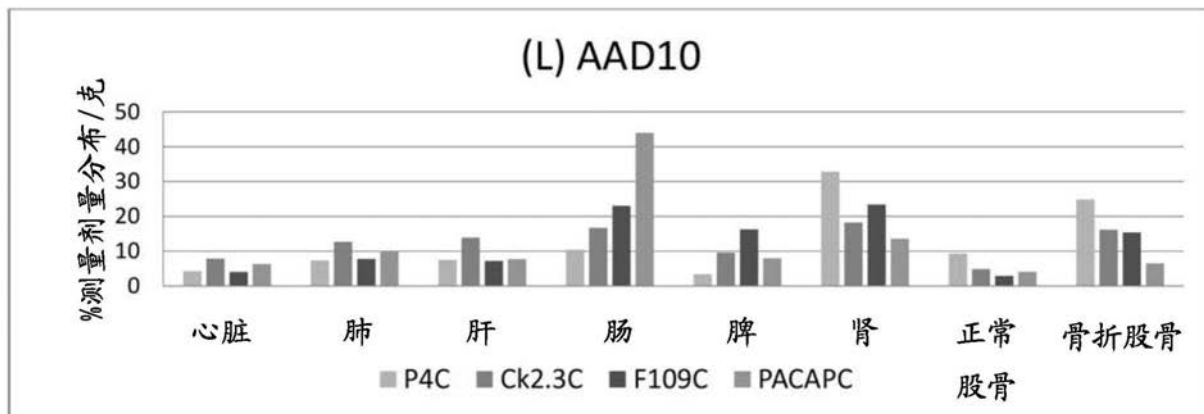
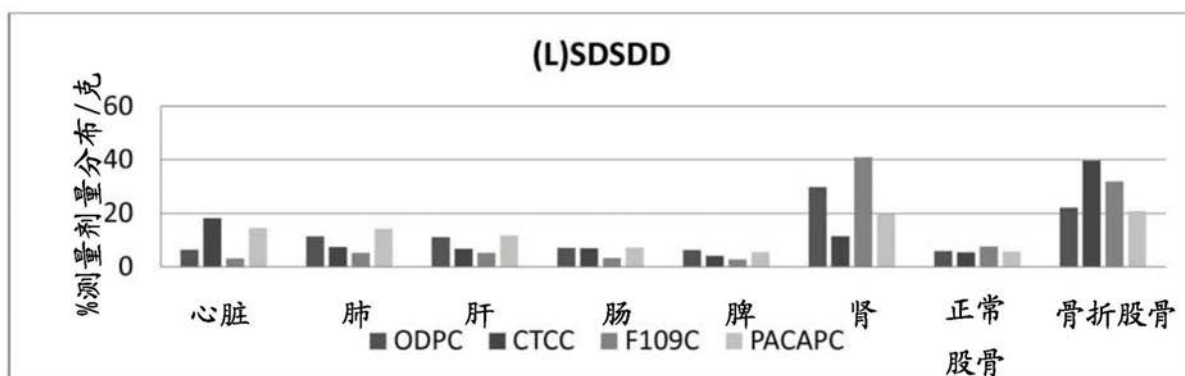


图23

A.



B.



C.

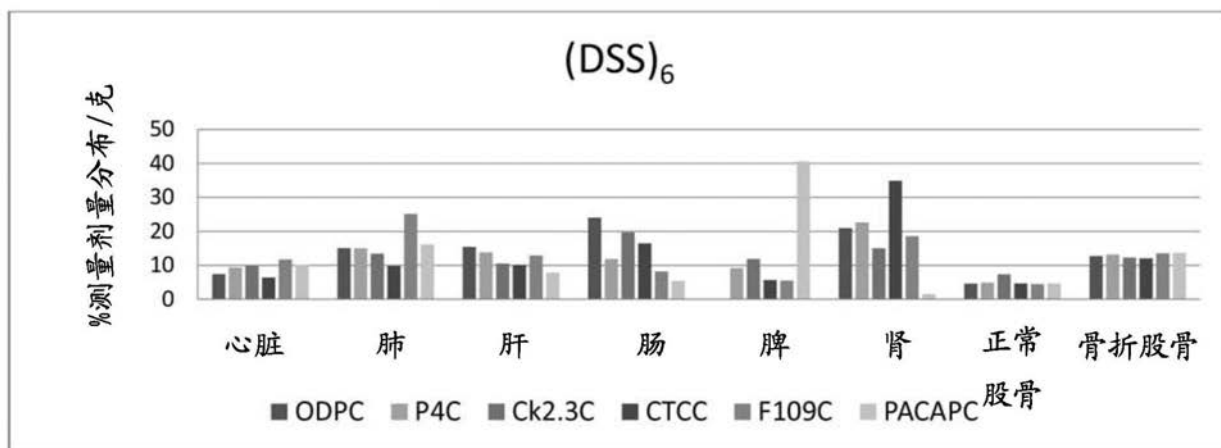
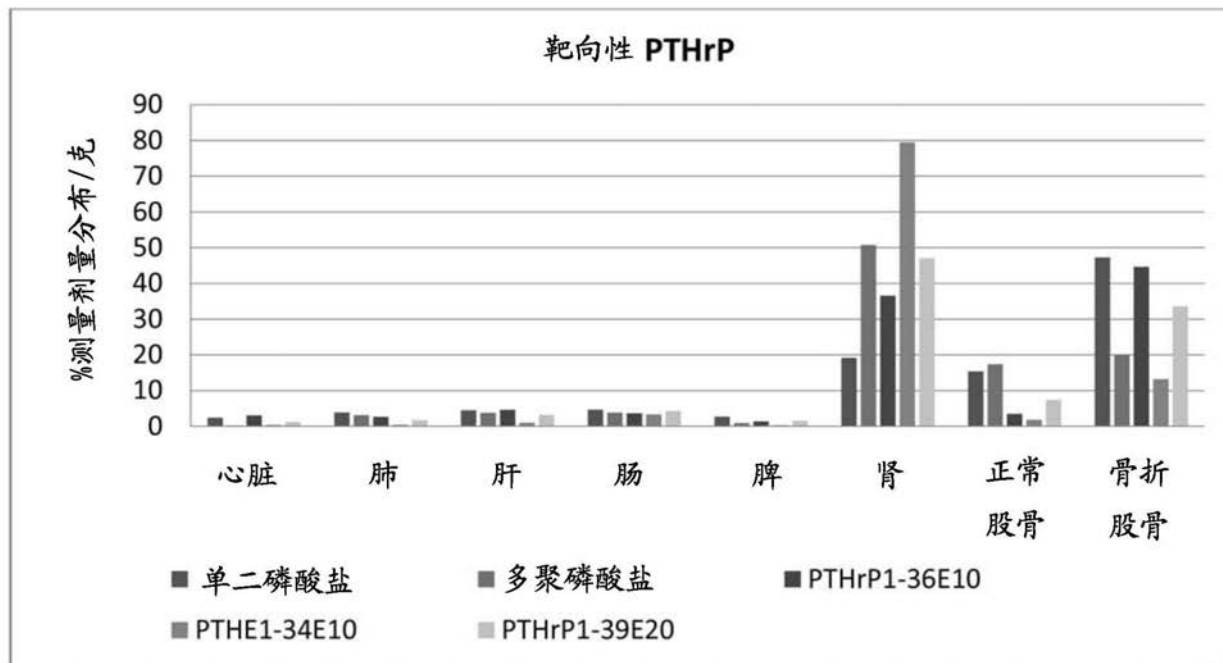


图24

A.



B.

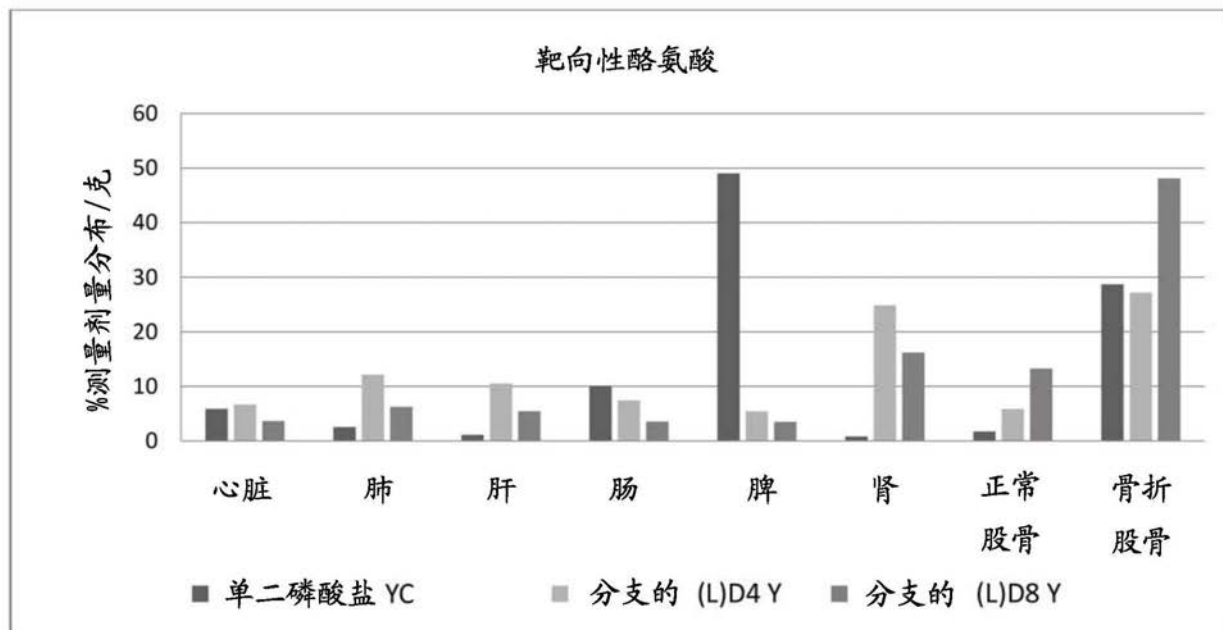


图25



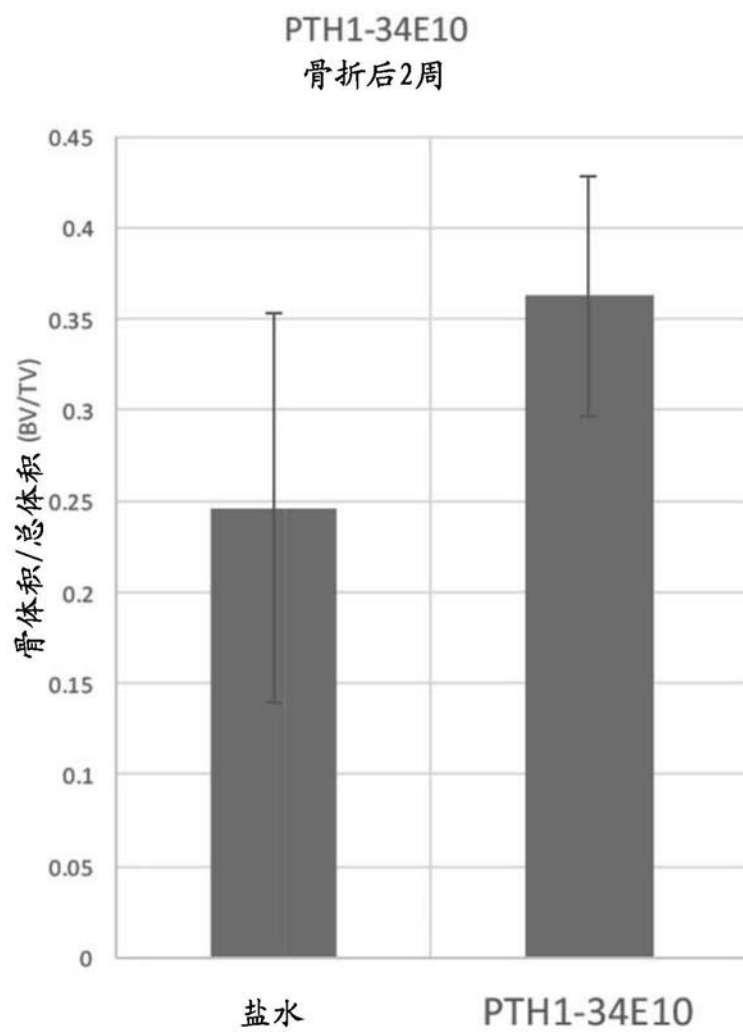


图26

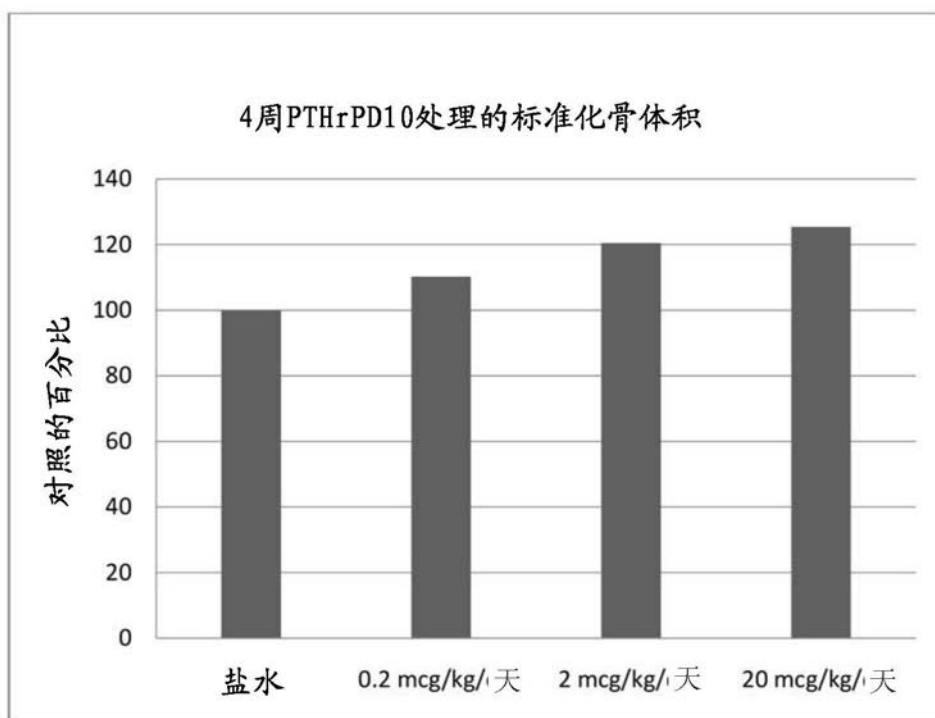


图27