



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107075574 A

(43)申请公布日 2017.08.18

(21)申请号 201580043057.2

西蒙·文科

(22)申请日 2015.06.29

(74)专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理
有限责任公司 11204

(30)优先权数据

62/018,382 2014.06.27 US

代理人 王达佐 洪欣

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2017.02.10

(51)Int.Cl.

C12Q 1/68(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2015/038370 2015.06.29

(87)PCT国际申请的公布数据

W02015/200916 EN 2015.12.30

(71)申请人 领导医疗有限公司

地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 格雷戈里·托马斯·伯恩

马克·莱斯利·史密斯

布莱恩·特洛伊·弗莱德里克

权利要求书8页 说明书103页 附图1页

(54)发明名称

铁调素和微型铁调素类似物及其用途

(57)摘要

本发明提供了新的铁调素类似物和使用这些铁调素类似物治疗或预防多种疾病和病症的相关方法,所述疾病和病症包括铁过载疾病如遗传性血色素沉着症、铁负载性贫血和本文描述的其他病况和病症。

1. 具有式I结构的铁调素类似物或其药学上可接受的盐或溶剂化物:

$R^1-X-Y-R^2$ (I) SEQ ID NO:1,

其中 R^1 是氢、C1-C6烷基、C6-C12芳基、C6-C12芳基C1-C6烷基、或C1-C20烷酰基,并且包括任何前述的单独的聚乙二醇化形式或任何前述的作为间隔基的聚乙二醇化形式;

R^2 是OH或NH₂;

X是具有式Ia的肽序列:

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

其中

X1是Asp、Ser、Glu、Ile、pGlu、bhAsp、D-Asp或不存在;

X2是Thr、Ser、Lys、Glu、Pro、Ala或不存在;

X3是His、Ala或Glu;

X4是Phe、Ile或Dpa;

X5是Pro、bhPro、Val、Glu、Sarc或Gly;

X6是Cys或(D)-Cys;

X7不存在,或是除Ile、Cys或(D)-Cys之外的任何氨基酸;

X8不存在,或是除Cys或(D)-Cys之外的任何氨基酸;

X9是Phe、Ala、Ile、Thr、Tyr、Lys、Arg、bhPhe、D-Phe或不存在;和

X10是Lys、Phe或不存在;并且

Y不存在或存在;

条件是如果Y存在,Y是具有式Im的肽:

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

其中

Y1是Gly、PEG3、Sarc、Lys、Glu、Ala、Phe、Pro、Glu、Lys、D-Pro、Val、Ser或不存在;

Y2是Pro、Ala、Cys、Gly或不存在;

Y3是Arg、Lys、Pro、Gly、His、Ala、Trp或不存在;

Y4是Ser、Arg、Gly、Trp、Ala、His、Glu、Tyr或不存在;

Y5是Lys、Met、Ser、Arg、Ala或不存在;

Y6是Gly、Sarc、Glu、Lys、Arg、Ser、Lys、Ile、Ala、Pro、Val或不存在;

Y7是Trp、Lys、Gly、Ala、Ile、Val或不存在;

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

Y9是Val、Asp、Asn、Cys、Tyr或不存在;

Y10是Cys、Met、Lys、Arg、Tyr或不存在;

Y11是Arg、Met、Cys、Lys或不存在;和

Y12是Arg、Lys、Ala或不存在。

2. 如权利要求1所述的铁调素类似物,其中X是具有式Ib的肽序列:

X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10 (Ib) SEQ ID NO:18

其中

X1是Asp、Glu、Ile、pGlu、bhAsp、D-Asp或不存在;

X2是Thr、Ser、Lys、Glu、Pro、Ala或不存在;

X3是His、Ala或Glu;

X4是Phe、Ile或Dpa;

X5是Pro、bhPro、Sarc或Gly;

X6是Cys;

X7不存在,或是除Ile、Cys或(D)-Cys之外的任何氨基酸;

X8不存在,或是除Cys或(D)-Cys之外的任何氨基酸;

X9是Phe、Ile、Tyr、bhPhe或D-Phe或不存在;和

X10是Lys、Phe或不存在;并且

其中Y不存在或存在,条件是如果Y存在,Y是具有式In的肽:

Y1-Y2-Y3-Y4-Y5-Y6-Y7-Y8-Y9-Y10-Y11-Y12 (In) SEQ ID NO:19

其中

Y1是Gly、PEG3、Sarc、Lys、Glu、Ala、Phe、Pro、Glu、Lys、D-Pro、Val、Ser或不存在;

Y2是Pro、Ala、Gly或不存在;

Y3是Arg、Lys、Pro、Gly、His、Ala或不存在;

Y4是Ser、Arg、Glu或不存在;

Y5是Lys、Ser、Met、Arg、Ala或不存在;

Y6是Gly、Sarc、Glu、Leu、Phe、His或不存在;

Y7是Trp、N-甲基Trp、Lys、Thr、His、Gly、Ala、Ile、Val或不存在;

Y8是Val、Trp、Ala、Asn、Glu或不存在;

Y9是Val、Ala、Asn、Asp、Cys或不存在;

Y10是Cys、(D) Cys、Glu或不存在;

Y11是Tyr、Met或不存在;和

Y12是Trp或不存在。

3. 如权利要求1所述的铁调素类似物,其中所述铁调素类似物包含表2中所示的氨基酸序列或结构。

4. 具有式II结构的铁调素类似物或其药学上可接受的盐或溶剂化物:

$R^1-X-Y-R^2$ (II) SEQ ID NO:4,

其中 R^1 是氢、C1-C6烷基、C6-C12芳基、C6-C12芳基C1-C6烷基、或C1-C20烷酰基,并且包括任何前述的单独的聚乙二醇化形式或任何前述的作为间隔基的聚乙二醇化形式;

R^2 是OH或NH₂;

X是具有式IIa的肽序列:

X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10 (IIa) SEQ ID NO:5

其中

X1是Asp、Glu或Ida;

X2是Thr、Ser或不存在;

X3是His;

X4是Phe或Dpa;

X5是Pro、bhPro、Sarc或Gly;

X6是Cys或(D)-Cys;

X7是Arg、Glu、Phe、Gln、Leu、Val、Lys、Ile、Ala、Ser、Dapa或不存在；

X8是Ile、Arg、Lys、Arg、Ala、Gln、Phe、Glu、Asp、Tyr、Ser、Leu、Val、D-Ile、D-Lys、D-Arg、Dapa或不存在；

X9是Phe、Tyr、bhPhe、D-Phe或不存在；和

X10是Lys、Phe或不存在；并且

其中Y不存在或存在，条件是如果Y存在，Y是具有式IIIm的肽：

Y1-Y2-Y3-Y4-Y5-Y6-Y7-Y8-Y9-Y10-Y11-Y12 (IIIm) SEQ ID NO:6

其中

Y1是Gly、Sarc、Lys、Glu或不存在；

Y2是Pro、Ala、Gly或不存在；

Y3是Arg、Lys、Pro、Gly、His、Ala或不存在；

Y4是Ser、Arg、Glu或不存在；

Y5是Lys、Ser、Met、Arg、Ala或不存在；

Y6是Gly、Sarc、Glu、Leu、Phe、His或不存在；

Y7是Trp、NMe-Trp、Lys、Thr、His、Gly、Ala、Ile、Val或不存在；

Y8是Val、Trp、Ala、Asn、Glu或不存在；

Y9是Cys；

Y10不存在；

Y11不存在；和

Y12不存在。

5. 如权利要求4所述的铁调素类似物，其中所述铁调素类似物包含表3中所示的氨基酸序列或结构。

6. 包含两个铁调素类似物的二聚体，每个铁调素类似物具有式I的结构、式II的结构、式III的结构、式IV的结构、式V的结构、式VI的结构、或表2-4和6-8或10-12中任一个中所示的序列或结构，条件是当所述二聚体包含具有式III、式IV、式V、或式VI的结构的铁调素类似物时，所述两个铁调素类似物通过赖氨酸接头连接。

7. 如权利要求6所述的二聚体，其中一个或两个铁调素类似物具有式I的结构。

8. 如权利要求6所述的二聚体，其中一个或两个铁调素类似物具有式II的结构。

9. 如权利要求6所述的二聚体或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其中一个或两个铁调素类似物具有式III的结构：

$R^1-X-Y-R^2$ (III) SEQ ID NO:7，

其中 R^1 是氢、C1-C6烷基、C6-C12芳基、C6-C12芳基C1-C6烷基、或C1-C20烷酰基，并且包括任何前述的单独的聚乙二醇化形式或任何前述的作为间隔基的聚乙二醇化形式；

R^2 是-NH₂或-OH；

X是具有式(IIIa)的肽序列：

X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10 (IIIa) SEQ ID NO:8

其中

X1是Asp、Glu、Ala、Gly、Thr、Ile、pGlu、bhAsp、D-Asp、Tyr、Leu或不存在；

X2是Thr、Ala、Aib、D-Thr、Arg或不存在；

X3是His、Lys、Ala或D-His；
X4是Phe、Ala、Dpa或bhPhe；
X5是Pro、Glu、Ser、Gly、Arg、Lys、Val、Ala、D-Pro、bhPro、Sarc、Abu或不存在；
X6是Ile、Cys、Arg、Leu、Lys、His、Glu、D-Ile、D-Arg、D-Cys、Val、Ser或Ala；
X7是Cys、Ile、Ala、Leu、Val、Ser、Phe、Dapa、D-Ile或D-Cys；
X8是Ile、Lys、Arg、Ala、Gln、Phe、Glu、Asp、Tyr、Ser、Leu、Val、D-Ile、D-Lys、D-Arg或Dapa；

X9是Phe、Ala、Ile、Tyr、Lys、Arg、bhPhe或D-Phe；和

X10是Lys、Phe或不存在；和

Y不存在或存在，并且当存在时，Y是具有式(III_m)的肽：

Y1-Y2-Y3-Y4-Y5-Y6-Y7-Y8-Y9-Y10-Y11-Y12-Y13-Y14-Y15 (III_m) SEQ ID NO:9

其中

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

Y2是Pro、Ala、Cys、Gly或不存在；

Y3是Arg、Lys、Pro、Gly、His、Ala、Trp或不存在；

Y4是Ser、Arg、Gly、Trp、Ala、His、Tyr或不存在；

Y5是Lys、Met、Arg、Ala或不存在；

Y6是Gly、Ser、Lys、Ile、Arg、Ala、Pro、Val或不存在；

Y7是Trp、Lys、Gly、Ala、Ile、Val或不存在；

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

Y9是Cys、Tyr或不存在；

Y10是Met、Lys、Arg、Tyr或不存在；

Y11是Arg、Met、Cys、Lys或不存在；

Y12是Arg、Lys、Ala或不存在；

Y13是Arg、Cys、Lys、Val或不存在；

Y14是Arg、Lys、Pro、Cys、Thr或不存在；和

Y15是Thr、Arg或不存在；

其中，如果式(III)的肽中不存在Y，则X7是Ile；并且

其中，所述式(III)的化合物任选地在R¹、X或Y上聚乙二醇化。

10. 如权利要求6所述的二聚体或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其中一个或两个铁调素类似物具有式(IV)的结构：

R¹-X-Y-R² (IV) SEQ ID NO:10，

其中R¹是氢、C1-C6烷基、C6-C12芳基、C6-C12芳基C1-C6烷基、或C1-C20烷酰基，并且包括任何前述的单独的聚乙二醇化形式或任何前述的作为间隔基的聚乙二醇化形式；

R²是-NH₂或-OH；

X是具有式(IVa)的肽序列：

X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10 (IVa) SEQ ID NO:11

其中

X1是Asp、Glu、Ala、Gly、Thr、Ida、pGlu、bhAsp、D-Asp、Tyr、Leu或不存在；

X2是Thr、Ala、Aib、D-Thr、Arg或不存在；
X3是His、Lys、Ala或D-His；
X4是Phe、Ala、Dpa、bhPhe或D-Phe；
X5是Pro、Glu、Ser、Gly、Arg、Lys、Val、Ala、D-Pro、bhPro、Sarc、Abu或不存在；
X6是Ile、Cys、Arg、Leu、Lys、His、Glu、D-Ile、D-Arg、D-Cys、Val、Ser或Ala；
X7是Cys、Ile、Ala、Leu、Val、Ser、Phe、Dapa、D-Ile或D-Cys；
X8是Ile、Lys、Arg、Ala、Gln、Phe、Glu、Asp、Tyr、Ser、Leu、Val、D-Ile、D-Lys、D-Arg或Dapa；

X9是Phe、Ala、Ile、Tyr、Lys、Arg、bhPhe或D-Phe；和

X10是Lys、Phe或不存在；

其中Y存在或不存在，并且条件是如果Y不存在，X7是Ile；和

Y是具有式 (IVm) 的肽：

Y1-Y2-Y3-Y4-Y5-Y6-Y7-Y8-Y9-Y10-Y11-Y12-Y13-Y14-Y15 (IVm) SEQ ID NO:12

其中

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

Y2是Pro、Ala、Cys、Gly或不存在；

Y3是Arg、Lys、Pro、Gly、His、Ala、Trp或不存在；

Y4是Ser、Arg、Gly、Trp、Ala、His、Tyr或不存在；

Y5是Lys、Met、Arg、Ala或不存在；

Y6是Gly、Ser、Lys、Ile、Arg、Ala、Pro、Val或不存在；

Y7是Trp、Lys、Gly、Ala、Ile、Val或不存在；

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

Y9是Cys、Tyr或不存在；

Y10是Met、Lys、Arg、Tyr或不存在；

Y11是Arg、Met、Cys、Lys或不存在；

Y12是Arg、Lys、Ala或不存在；

Y13是Arg、Cys、Lys、Val或不存在；

Y14是Arg、Lys、Pro、Cys、Thr或不存在；和

Y15是Thr、Arg或不存在；

其中，所述式 (IV) 的化合物任选地在R¹、X或Y上聚乙二醇化；并且

其中，当所述式 (IV) 的化合物包含两个或更多个半胱氨酸残基时，所述半胱氨酸残基中的至少两个通过二硫键连接。

11. 如权利要求6所述的二聚体或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其中一个或两个铁调素类似物具有式V的结构：

R¹-X-Y-R² (V) SEQ ID NO:13

其中R¹是氢、C1-C6烷基、C6-C12芳基、C6-C12芳基C1-C6烷基、或C1-C20烷酰基，并且包括任何前述的单独的聚乙二醇化形式或任何前述的作为间隔基的聚乙二醇化形式；

R²是-NH₂或-OH；

X是具有式 (Va) 的肽序列：

X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10 (Va) SEQ ID NO:14

其中

X1是Asp、Glu、Ala、Gly、Thr、Ile、pGlu、bhAsp、D-Asp、Tyr、Leu或不存在；

X2是Thr、Ala、Aib、D-Thr、Arg或不存在；

X3是His、Lys、Ala、D-His或Lys；

X4是Phe、Ala、Dpa、bhPhe或D-Phe；

X5是Pro、Glu、Ser、Gly、Arg、Lys、Val、Ala、D-Pro、bhPro、Sarc、Abu或不存在；

X6是Ile、Cys、Arg、Leu、Lys、His、Glu、D-Ile、D-Arg、D-Cys、Val、Ser或Ala；

X7是Cys、Ile、Ala、Leu、Val、Ser、Phe、Dapa、D-Ile或D-Cys；

X8是Ile、Lys、Arg、Ala、Gln、Phe、Glu、Asp、Tyr、Ser、Leu、Val、D-Ile、D-Lys、D-Arg或Dapa；

X9是Phe、Ala、Ile、Tyr、Lys、Arg、bhPhe或D-Phe；和

X10是Lys、Phe或不存在；

其中，Y存在或不存在，并且条件是如果Y不存在，X7是Ile；

其中，所述式V的化合物任选地在R¹、X或Y上聚乙二醇化；并且

其中，当所述式V的化合物包含两个或更多个半胱氨酸残基时，所述半胱氨酸残基中的至少两个通过二硫键连接。

12. 如权利要求6所述的二聚体或其药学上可接受的盐或溶剂化物，其中一个或两个铁调素类似物具有式VI的结构：

R¹-X-Y-R² (VI) SEQ ID NO:15，

其中R¹是氢、C1-C6烷基、C6-C12芳基、C6-C12芳基C1-C6烷基、或C1-C20烷酰基，并且包括任何前述的单独的聚乙二醇化形式或任何前述的作为间隔基的聚乙二醇化形式；

R²是-NH₂或-OH；

X是具有式(VIa)的肽序列：

X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10 (VIa) SEQ ID NO:16

其中

X1是Asp、Glu、Ile或不存在；

X2是Thr、Ser、Pro、Ala或不存在；

X3是His、Ala或Glu；

X4是Phe或Dpa；

X5是Pro、bhPro、Sarc或Gly；

X6是Cys、(D)-Cys、Arg、Glu、Phe、Gln、Leu、Val、Lys、Ala、Ser、Dapa或不存在；

X7是Cys、(D)-Cys、Arg、Glu、Phe、Gln、Leu、Val、Lys、Ala、Ser、Dapa或不存在；

X8是Ile、Arg、Lys、Ala、Gln、Phe、Glu、Asp、Tyr、Ser、Leu、Val、D-Ile、D-Lys、D-Arg、Dapa或不存在；

X9是Phe、Ala、Ile、Thr、Tyr、Lys、Arg、bhPhe、D-Phe或不存在；和

X10是Lys、Phe或不存在；

Y不存在或存在，条件是如果Y存在，Y是具有式(VIm)的肽：

Y1-Y2-Y3 (VIm) SEQ ID NO:17

其中

Y1是Ile、Arg、Lys、Ala、Gln、Phe、Glu、Asp、Tyr、Ser、Leu、Val、D-Ile、D-Lys、D-Arg、Dapa或不存在；

Y2是Phe、Ala、Ile、Thr、Tyr、Lys、Arg、bhPhe、或D-Phe或不存在；和

Y3是Lys、Phe或不存在。

13. 如权利要求6所述的二聚体，其中一个或两个铁调素类似物具有表4中所示的序列或结构。

14. 如权利要求6所述的二聚体，其具有表6、7和8中任一个所示的序列或结构。

15. 如权利要求6所述的二聚体，其包含表12的化合物1-361中任一个所示的序列或结构。

16. 如权利要求6所述的二聚体，其包含表10或表12中所示的序列或结构。

17. 如权利要求6-16中任一项所述的二聚体，其中所述二聚体是同源二聚体。

18. 如权利要求6-16中任一项所述的二聚体，其中所述二聚体是异源二聚体。

19. 如权利要求1-5中任一项所述的铁调素类似物或权利要求6-16中任一项所述的二聚体，其中一种或多种铁调素类似物的两个半胱氨酸残基通过分子内二硫桥连接。

20. 如权利要求6-16中任一项所述的二聚体，其中所述两个铁调素类似物通过选自以下的接头部分来连接：二甘醇接头、亚氨基二乙酸 (IDA) 接头、 β -Ala-亚氨基二乙酸 (β -Ala-IDA) 接头、或PEG接头，并且其中所述二聚体不包括具有式III、IV、V或VI结构的肽类似物，或表12的化合物1-361中任一个所示的序列或表10中所示的序列。

21. 多核苷酸，其包含编码权利要求1-5中任一项所述的铁调素类似物或权利要求6-20中任一项所述的二聚体的铁调素类似物的序列。

22. 载体，其包含权利要求21所述的多核苷酸。

23. 药物组合物，其包含权利要求1-5中任一项所述的铁调素类似物或权利要求6-20中任一项所述的二聚体以及药学上可接受的载体、赋形剂或媒介物。

24. 结合膜铁转运蛋白或诱导膜铁转运蛋白内化和降解的方法，其包括将所述膜铁转运蛋白与至少一种权利要求1-5中任一项所述的铁调素类似物、权利要求6-20中任一项所述的二聚体、或权利要求23所述的组合物接触。

25. 用于治疗对象中铁代谢疾病的方法，其包括向所述对象提供有效量的至少一种权利要求1-5中任一项所述的铁调素类似物、权利要求6-20中任一项所述的二聚体、或权利要求23所述的组合物。

26. 如权利要求25所述的方法，其中通过以下给药途径向所述对象提供所述药物组合物：口服、静脉内、腹膜、皮内、皮下、肌肉、鞘内、吸入、汽化、雾化、舌下、口腔、肠胃外、直肠、阴道、或局部给药途径。

27. 如权利要求25所述的方法，其中所述铁代谢疾病是铁过载疾病。

28. 装置，其包含权利要求1-5中任一项所述的铁调素类似物、权利要求6-20中任一项所述的二聚体、或权利要求23所述的组合物，其用于将所述铁调素类似物、二聚体或组合物递送至对象。

29. 试剂盒，其包含与试剂、装置或说明材料、或其组合一起包装的至少一种权利要求1-5中任一项所述的铁调素类似物、权利要求6-20中任一项所述的二聚体、或权利要求23所

述的组合物。

30. 如权利要求4所述的铁调素类似物,其中X6是Cys。

31. 如权利要求4所述的铁调素类似物,其中X7是Arg、Glu、Phe、Gln、Leu、Val、Lys、Ala、Ser、Dapa或不存在。

32. 如权利要求6所述的二聚体,其包含具有表14或15中所示的序列或结构的单体肽。

铁调素和微型铁调素类似物及其用途

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2014年6月27日提交的美国临时申请第62/018,382号的优先权,其全部内容通过引用并入本文。

发明领域

[0003] 本发明尤其涉及某些铁调素肽类似物,包括肽单体和肽二聚体及其缀合物和衍生物,以及包含所述肽类似物的组合物;和涉及所述肽类似物在治疗和/或预防各种疾病、病况或病症中的用途,包括治疗和/或预防铁过载疾病,如遗传性血色素沉着症、铁负载性贫血和本文所述的其它病况和病症。

背景技术

[0004] 铁调素(也称为LEAP-1),由肝脏产生的肽激素,是人和其他哺乳动物中铁稳态的调节剂。铁调素通过与其受体(铁输出通道膜铁转运蛋白)结合而起作用,引起其内化和降解。人铁调素是25个氨基酸的肽(Hep25)。参见Krause等人(2000)FEBS Lett 480:147-150和Park等人(2001)J Biol Chem 276:7806-7810。铁调素的具有生物活性的25个氨基酸形式的结构是具有形成4个二硫键的8个半胱氨酸的简单发夹,描述于Jordan等人,J Biol Chem 284:24155-67。N末端区域是铁调节功能所需的,并且5个N-末端氨基酸残基的缺失导致铁调节功能的丧失。参见Nemeth等人(2006)Blood 107:328-33。

[0005] 异常铁调素活性与铁过载疾病相关,包括遗传性血色素沉着症(HH)和铁负载性贫血。遗传性血色素沉着症是一种遗传性铁过载疾病,主要由铁调素缺乏或在某些情况下由铁调素抵抗引起。这允许从饮食中过多吸收铁并导致铁过载的发展。HH的临床表现可包括肝脏疾病(例如,肝硬化和肝细胞癌)、糖尿病和心力衰竭。目前,HH的唯一治疗是常规放血,这对于患者是非常难以承受的。铁负载性贫血是具有无效红细胞生成的遗传性贫血(例如 β -地中海贫血),其伴随有严重的铁过载。铁过载引起的并发症是这些患者发病率和死亡率的主要原因。铁调素缺乏是非输血患者铁过载的主要原因,并且导致输血患者的铁过载。在这些患者中目前对铁过载的治疗是铁螯合,其非常难以承受,有时无效,并伴有频繁的副作用。

[0006] 铁调素具有许多限制其用作药物的局限性,包括部分由于在折叠期间蛋白质的聚集和沉淀而导致困难的合成过程,其反过来导致商品的高成本。本领域需要的是,具有铁调素活性并且还具有其它有益的物理性质(例如改善的溶解性、稳定性和/或效价)的化合物,使得可以经济地生产铁调素样生物制剂,并用于治疗例如本文所述的那些铁调节素相关的疾病和病症。

[0007] 本发明解决了这些需要,提供了具有铁调素活性并且还具有使本发明的肽适合作为铁调素替代物的其它有益性质的新型肽类似物,包括肽单体类似物和肽二聚体类似物。

[0008] 发明简述

[0009] 本发明总体涉及表现出铁调素活性的肽类似物(包括单体和二聚体)及其使用方

法。

[0010] 在一些实施方案中,本发明提供了可以被分离和/或纯化的肽或其药学上可接受的盐或溶剂化物,所述肽包含下述结构式I、基本上由下述结构式I组成、或由下述结构式I组成:

[0011] $R^1-X-Y-R^2$ (I) (SEQ ID NO:1),

[0012] 其中 R^1 是氢、C1-C6烷基、C6-C12芳基、C6-C12芳基C1-C6烷基、或C1-C20烷酰基,并且包括任何前述的单独的聚乙二醇化形式或任何前述的作为间隔基的聚乙二醇化形式;

[0013] R^2 是OH或 NH_2 ;

[0014] X是具有式Ia的肽序列:

[0015] $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}$ (Ia) (SEQ ID NO:2)

[0016] 其中

[0017] X_1 是Asp、Ser、Glu、Ile、pGlu、bhAsp、D-Asp或不存在;

[0018] X_2 是Thr、Ser、Lys、Glu、Pro、Ala或不存在;

[0019] X_3 是His、Ala或Glu;

[0020] X_4 是Phe、Ile或Dpa;

[0021] X_5 是Pro、bhPro、Val、Glu、Sarc或Gly;

[0022] X_6 是Cys或(D)-Cys;

[0023] X_7 不存在,或是除Ile、Cys或(D)-Cys之外的任何氨基酸;

[0024] X_8 不存在,或是除Cys或(D)-Cys之外的任何氨基酸;

[0025] X_9 是Phe、Ala、Ile、Thr、Tyr、Lys、Arg、bhPhe、D-Phe或不存在;和

[0026] X_{10} 是Lys、Phe或不存在;和

[0027] Y不存在或存在;

[0028] 条件是如果Y存在,Y是具有式Im的肽:

[0029] $Y_1-Y_2-Y_3-Y_4-Y_5-Y_6-Y_7-Y_8-Y_9-Y_{10}-Y_{11}-Y_{12}$ (Im) (SEQ ID NO:3)

[0030] 其中

[0031] Y_1 是Gly、PEG3、Sarc、Lys、Glu、Ala、Phe、Pro、Glu、Lys、D-Pro、Val、Ser或不存在;

[0032] Y_2 是Pro、Ala、Cys、Gly或不存在;

[0033] Y_3 是Arg、Lys、Pro、Gly、His、Ala、Trp或不存在;

[0034] Y_4 是Ser、Arg、Gly、Trp、Ala、His、Glu、Tyr或不存在;

[0035] Y_5 是Lys、Met、Ser、Arg、Ala或不存在;

[0036] Y_6 是Gly、Sarc、Glu、Lys、Arg、Ser、Lys、Ile、Ala、Pro、Val或不存在;

[0037] Y_7 是Trp、Lys、Gly、Ala、Ile、Val或不存在;

[0038] Y_8 是Val、Trp、His、Thr、Gly、Cys、Met、Tyr、Ala、Glu、Lys、Asp、Arg或不存在;

[0039] Y_9 是Val、Asp、Asn、Cys、Tyr或不存在;

[0040] Y_{10} 是Cys、Met、Lys、Arg、Tyr或不存在;

[0041] Y_{11} 是Arg、Met、Cys、Lys或不存在;和

[0042] Y_{12} 是Arg、Lys、Ala或不存在。

[0043] 在一替代性实施方案中,本发明提供式Ia的铁调素类似物肽,其中 X_5 是Pro、bhPro、Val、Glu、Sarc、Gly或任何N-甲基化氨基酸。

[0044] 在一实施方案中,本发明提供了可以被分离和/或纯化的肽,其包含式I、基本上由式I组成、或由式I组成,其中X是具有式Ib的肽序列:

[0045] X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10 (Ib) SEQ ID NO:18

[0046] 其中

[0047] X1是Asp、Glu、Ile、pGlu、bhAsp、D-Asp或不存在;

[0048] X2是Thr、Ser、Lys、Glu、Pro、Ala或不存在;

[0049] X3是His、Ala或Glu;

[0050] X4是Phe、Ile或Dpa;

[0051] X5是Pro、bhPro、Sarc或Gly;

[0052] X6是Cys;

[0053] X7不存在,或是除Ile、Cys或(D)-Cys之外的任何氨基酸;

[0054] X8不存在,或是除Cys或(D)-Cys之外的任何氨基酸;

[0055] X9是Phe、Ile、Tyr、bhPhe或D-Phe或不存在;和

[0056] X10是Lys、Phe或不存在;和

[0057] 其中Y不存在或存在,条件是如果Y存在,Y是具有式In的肽:

[0058] Y1-Y2-Y3-Y4-Y5-Y6-Y7-Y8-Y9-Y10-Y11-Y12 (In) SEQ ID NO:19

[0059] 其中

[0060] Y1是Gly、PEG3、Sarc、Lys、Glu、Ala、Phe、Pro、Glu、Lys、D-Pro、Val、Ser或不存在;

[0061] Y2是Pro、Ala、Gly或不存在;

[0062] Y3是Arg、Lys、Pro、Gly、His、Ala或不存在;

[0063] Y4是Ser、Arg、Glu或不存在;

[0064] Y5是Lys、Ser、Met、Arg、Ala或不存在;

[0065] Y6是Gly、Sarc、Glu、Leu、Phe、His或不存在;

[0066] Y7是Trp、N-甲基Trp、Lys、Thr、His、Gly、Ala、Ile、Val或不存在;

[0067] Y8是Val、Trp、Ala、Asn、Glu或不存在;

[0068] Y9是Val、Ala、Asn、Asp、Cys或不存在;

[0069] Y10是Cys、(D) Cys、Glu或不存在;

[0070] Y11是Tyr、Met或不存在;和

[0071] Y12是Trp或不存在。

[0072] 在相关实施方案中,本发明提供了可以被分离和/或纯化的肽或其药学上可接受的盐或溶剂化物,所述肽包含下述结构式II、基本上由下述结构式II组成、或由下述结构式II组成:

[0073] $R^1-X-Y-R^2$ (II) (SEQ ID NO:4),

[0074] 其中 R^1 是氢、C1-C6烷基、C6-C12芳基、C6-C12芳基C1-C6烷基、或C1-C20烷酰基,并且包括任何前述的单独的聚乙二醇化形式或任何前述的作为间隔基的聚乙二醇化形式;

[0075] R^2 是OH或 NH_2 ;

[0076] X是具有式IIa的肽序列:

[0077] X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10 (IIa) (SEQ ID NO:5)

[0078] 其中

- [0079] X1是Asp、Glu或Ida；
- [0080] X2是Thr、Ser或不存在；
- [0081] X3是His；
- [0082] X4是Phe或Dpa；
- [0083] X5是Pro、bhPro、Sarc或Gly；
- [0084] X6是Cys或(D)-Cys；
- [0085] X7是Arg、Glu、Phe、Gln、Leu、Val、Lys、Ile、Ala、Ser、Dapa或不存在；
- [0086] X8是Ile、Arg、Lys、Arg、Ala、Gln、Phe、Glu、Asp、Tyr、Ser、Leu、Val、D-Ile、D-Lys、D-Arg、Dapa或不存在；
- [0087] X9是Phe、Tyr、bhPhe、D-Phe或不存在；和
- [0088] X10是Lys、Phe或不存在；和
- [0089] 其中Y不存在或存在，条件是如果Y存在，Y是具有式IIIm的肽：
- [0090] Y1-Y2-Y3-Y4-Y5-Y6-Y7-Y8-Y9-Y10-Y11-Y12 (IIIm) (SEQ ID NO:6)
- [0091] 其中
- [0092] Y1是Gly、Sarc、Lys、Glu或不存在；
- [0093] Y2是Pro、Ala、Gly或不存在；
- [0094] Y3是Arg、Lys、Pro、Gly、His、Ala或不存在；
- [0095] Y4是Ser、Arg、Glu或不存在；
- [0096] Y5是Lys、Ser、Met、Arg、Ala或不存在；
- [0097] Y6是Gly、Sarc、Glu、Leu、Phe、His或不存在；
- [0098] Y7是Trp、N-甲基Trp、Lys、Thr、His、Gly、Ala、Ile、Val或不存在；
- [0099] Y8是Val、Trp、Ala、Asn、Glu或不存在；
- [0100] Y9是Cys；
- [0101] Y10是Met或不存在；
- [0102] Y11是Tyr、Met或不存在；和
- [0103] Y12是Trp或不存在。
- [0104] 在某些实施方案中，式IIa中的X6是Cys。
- [0105] 在某些替代性实施方案中，式IIa中的X7是Arg、Glu、Phe、Gln、Leu、Val、Lys、Ala、Ser、Dapa或不存在。
- [0106] 在某些实施方案中，Y10不存在。
- [0107] 在某些实施方案中，Y11不存在。
- [0108] 在某些实施方案中，Y12不存在。
- [0109] 在其它相关实施方案中，本发明提供了可以被分离和/或纯化的肽同源二聚体或肽异源二聚体，其包含两个铁调素类似物，每个铁调素类似物包含下述结构、基本上由下述结构组成、或由下述结构组成：式I的结构、式II的结构、式III的结构、式IV的结构、式V的结构、式VI的结构、式VII的结构、式VIII的结构、式IX的结构、式X的结构，或表2-4、6-10、12、14或15中任一个中所示的序列或结构组成，条件是当二聚体包含具有式III结构、式IV结构、式V结构、或式VI结构的铁调素类似物时，两个铁调素类似物通过赖氨酸接头连接。
- [0110] 在某些实施方案中，通过不止一种方法将本发明的铁调素类似物二聚体二聚化。

在具体的实施方案中,通过至少一个分子间二硫键和至少一个接头部分(例如IDA接头,如IDA-Palm),将本发明的铁调素类似物二聚体二聚化。在具体的实施方案中,通过至少一个分子间二硫键和至少一个接头部分(例如IDA接头,如IDA-Palm),将本发明的铁调素类似物二聚体二聚化,其中将接头部分连接到每个肽单体的赖氨酸残基。

[0111] 在某些实施方案中,一个或两个铁调素类似物具有式III的结构:

[0112] $R^1-X-Y-R^2$ (III) (SEQ ID NO:7),

[0113] 或其药学上可接受的盐或溶剂化物,

[0114] 其中 R^1 是氢、C1-C6烷基、C6-C12芳基、C6-C12芳基C1-C6烷基、或C1-C20烷酰基,并且包括任何前述的单独的聚乙二醇化形式或任何前述的作为间隔基的聚乙二醇化形式;

[0115] R^2 是 $-NH_2$ 或 $-OH$;

[0116] X是具有式(IIIa)的肽序列:

[0117] $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}$ (IIIa) (SEQ ID NO:8)

[0118] 其中

[0119] X_1 是Asp、Glu、Ala、Gly、Thr、Ile、pGlu、bhAsp、D-Asp、Tyr、Leu或不存在;

[0120] X_2 是Thr、Ala、Aib、D-Thr、Arg或不存在;

[0121] X_3 是His、Lys、Ala或D-His;

[0122] X_4 是Phe、Ala、Dpa或bhPhe;

[0123] X_5 是Pro、Glu、Ser、Gly、Arg、Lys、Val、Ala、D-Pro、bhPro、Sarc、Abu或不存在;

[0124] X_6 是Ile、Cys、Arg、Leu、Lys、His、Glu、D-Ile、D-Arg、D-Cys、Val、Ser或Ala;

[0125] X_7 是Cys、Ile、Ala、Leu、Val、Ser、Phe、Dapa、D-Ile或D-Cys;

[0126] X_8 是Ile、Lys、Arg、Ala、Gln、Phe、Glu、Asp、Tyr、Ser、Leu、Val、D-Ile、D-Lys、D-Arg或Dapa;

[0127] X_9 是Phe、Ala、Ile、Tyr、Lys、Arg、bhPhe或D-Phe;和

[0128] X_{10} 是Lys、Phe或不存在;和

[0129] Y不存在或存在,并且当存在时Y是具有式(IIIb)的肽:

[0130] $Y_1-Y_2-Y_3-Y_4-Y_5-Y_6-Y_7-Y_8-Y_9-Y_{10}-Y_{11}-Y_{12}-Y_{13}-Y_{14}-Y_{15}$ (IIIb) (SEQ ID NO:9)

[0131] 其中

[0132] Y_1 是Gly、Cys、Ala、Phe、Pro、Glu、Lys、D-Pro、Val、Ser或不存在;

[0133] Y_2 是Pro、Ala、Cys、Gly或不存在;

[0134] Y_3 是Arg、Lys、Pro、Gly、His、Ala、Trp或不存在;

[0135] Y_4 是Ser、Arg、Gly、Trp、Ala、His、Tyr或不存在;

[0136] Y_5 是Lys、Met、Arg、Ala或不存在;

[0137] Y_6 是Gly、Ser、Lys、Ile、Arg、Ala、Pro、Val或不存在;

[0138] Y_7 是Trp、Lys、Gly、Ala、Ile、Val或不存在;

[0139] Y_8 是Val、Thr、Gly、Cys、Met、Tyr、Ala、Glu、Lys、Asp、Arg或不存在;

[0140] Y_9 是Cys、Tyr或不存在;

[0141] Y_{10} 是Met、Lys、Arg、Tyr或不存在;

[0142] Y_{11} 是Arg、Met、Cys、Lys或不存在;

[0143] Y_{12} 是Arg、Lys、Ala或不存在;

- [0144] Y13是Arg、Cys、Lys、Val或不存在；
- [0145] Y14是Arg、Lys、Pro、Cys、Thr或不存在；和
- [0146] Y15是Thr、Arg或不存在；
- [0147] 其中，如果式(III)的肽中不存在Y，则X7是Ile；和
- [0148] 其中，所述式(III)的化合物任选地在R¹、X或Y上聚乙二醇化。
- [0149] 在某些实施方案中，一个或两个铁调素类似物具有式(IV)的结构：
- [0150] R¹-X-Y-R² (IV) (SEQ ID NO:10)，
- [0151] 或其药学上可接受的盐或溶剂化物，
- [0152] 其中R¹是氢、C1-C6烷基、C6-C12芳基、C6-C12芳基C1-C6烷基、或C1-C20烷酰基，并且包括任何前述的单独的聚乙二醇化形式或任何前述的作为间隔基的聚乙二醇化形式；
- [0153] R²是-NH₂或-OH；
- [0154] X是具有式(IVa)的肽序列：
- [0155] X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10 (IVa) (SEQ ID NO:11)
- [0156] 其中
- [0157] X1是Asp、Glu、Ala、Gly、Thr、Ile、pGlu、bhAsp、D-Asp、Tyr、Leu或不存在；
- [0158] X2是Thr、Ala、Aib、D-Thr、Arg或不存在；
- [0159] X3是His、Lys、Ala或D-His；
- [0160] X4是Phe、Ala、Dpa、bhPhe或D-Phe；
- [0161] X5是Pro、Glu、Ser、Gly、Arg、Lys、Val、Ala、D-Pro、bhPro、Sarc、Abu或不存在；
- [0162] X6是Ile、Cys、Arg、Leu、Lys、His、Glu、D-Ile、D-Arg、D-Cys、Val、Ser或Ala；
- [0163] X7是Cys、Ile、Ala、Leu、Val、Ser、Phe、Dapa、D-Ile或D-Cys；
- [0164] X8是Ile、Lys、Arg、Ala、Gln、Phe、Glu、Asp、Tyr、Ser、Leu、Val、D-Ile、D-Lys、D-Arg或Dapa；
- [0165] X9是Phe、Ala、Ile、Tyr、Lys、Arg、bhPhe或D-Phe；和
- [0166] X10是Lys、Phe或不存在；
- [0167] 其中Y存在或不存在，并且条件是如果Y不存在，X7是Ile；和
- [0168] Y是具有式(IVm)的肽：
- [0169] Y1-Y2-Y3-Y4-Y5-Y6-Y7-Y8-Y9-Y10-Y11-Y12-Y13-Y14-Y15 (IVm) (SEQ ID NO:12)
- [0170] 其中
- [0171] Y1是Gly、Cys、Ala、Phe、Pro、Glu、Lys、D-Pro、Val、Ser或不存在；
- [0172] Y2是Pro、Ala、Cys、Gly或不存在；
- [0173] Y3是Arg、Lys、Pro、Gly、His、Ala、Trp或不存在；
- [0174] Y4是Ser、Arg、Gly、Trp、Ala、His、Tyr或不存在；
- [0175] Y5是Lys、Met、Arg、Ala或不存在；
- [0176] Y6是Gly、Ser、Lys、Ile、Arg、Ala、Pro、Val或不存在；
- [0177] Y7是Trp、Lys、Gly、Ala、Ile、Val或不存在；
- [0178] Y8是Val、Thr、Gly、Cys、Met、Tyr、Ala、Glu、Lys、Asp、Arg或不存在；
- [0179] Y9是Cys、Tyr或不存在；
- [0180] Y10是Met、Lys、Arg、Tyr或不存在；

- [0181] Y11是Arg、Met、Cys、Lys或不存在；
- [0182] Y12是Arg、Lys、Ala或不存在；
- [0183] Y13是Arg、Cys、Lys、Val或不存在；
- [0184] Y14是Arg、Lys、Pro、Cys、Thr或不存在；和
- [0185] Y15是Thr、Arg或不存在；
- [0186] 其中，所述式(IV)的化合物任选地在R¹、X或Y上聚乙二醇化；并且
- [0187] 其中，当所述式(IV)的化合物包含两个或更多个半胱氨酸残基时，所述半胱氨酸残基中的至少两个通过二硫键连接。
- [0188] 在某些实施方案中，一个或两个铁调素类似物具有式V的结构：
- [0189] R¹-X-Y-R² (V) (SEQ ID NO:13)
- [0190] 或其药学上可接受的盐或溶剂化物，
- [0191] 其中R¹是氢、C1-C6烷基、C6-C12芳基、C6-C12芳基C1-C6烷基、或C1-C20烷酰基，并且包括任何前述的单独的聚乙二醇化形式或任何前述的作为间隔基的聚乙二醇化形式；
- [0192] R²是-NH₂或-OH；
- [0193] X是具有式(Va)的肽序列：
- [0194] X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10 (Va) (SEQ ID NO:14)
- [0195] 其中
- [0196] X1是Asp、Glu、Ala、Gly、Thr、Ile、pGlu、bhAsp、D-Asp、Tyr、Leu或不存在；
- [0197] X2是Thr、Ala、Aib、D-Thr、Arg或不存在；
- [0198] X3是His、Lys、Ala、D-His或Lys；
- [0199] X4是Phe、Ala、Dpa、bhPhe或D-Phe；
- [0200] X5是Pro、Glu、Ser、Gly、Arg、Lys、Val、Ala、D-Pro、bhPro、Sarc、Abu或不存在；
- [0201] X6是Ile、Cys、Arg、Leu、Lys、His、Glu、D-Ile、D-Arg、D-Cys、Val、Ser或Ala；
- [0202] X7是Cys、Ile、Ala、Leu、Val、Ser、Phe、Dapa、D-Ile或D-Cys；
- [0203] X8是Ile、Lys、Arg、Ala、Gln、Phe、Glu、Asp、Tyr、Ser、Leu、Val、D-Ile、D-Lys、D-Arg或Dapa；
- [0204] X9是Phe、Ala、Ile、Tyr、Lys、Arg、bhPhe或D-Phe；和
- [0205] X10是Lys、Phe或不存在；
- [0206] 其中，Y存在或不存在，并且条件是如果Y不存在，X7是Ile；
- [0207] 其中，所述式V的化合物任选地在R¹、X或Y上聚乙二醇化；并且
- [0208] 其中，当所述式V的化合物包含两个或更多个半胱氨酸残基时，所述半胱氨酸残基中的至少两个通过二硫键连接。
- [0209] 在某些实施方案中，一个或两个铁调素类似物具有式VI的结构：
- [0210] R¹-X-Y-R² (VI) (SEQ ID NO:15)
- [0211] 或其药学上可接受的盐或溶剂化物，
- [0212] 其中R¹是氢、C1-C6烷基、C6-C12芳基、C6-C12芳基C1-C6烷基、或C1-C20烷酰基，并且包括任何前述的单独的聚乙二醇化形式或任何前述的作为间隔基的聚乙二醇化形式；
- [0213] R²是-NH₂或-OH；
- [0214] X是具有式(VIa)的肽序列：

- [0215] X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10 (VIa) (SEQ ID NO:16)
- [0216] 其中
- [0217] X1是Asp、Glu、Ile或不存在；
- [0218] X2是Thr、Ser、Pro、Ala或不存在；
- [0219] X3是His、Ala或Glu；
- [0220] X4是Phe或Dpa；
- [0221] X5是Pro、bhPro、Sarc或Gly；
- [0222] X6是Cys、(D)-Cys、Arg、Glu、Phe、Gln、Leu、Val、Lys、Ala、Ser、Dapa或不存在；
- [0223] X7是Cys、(D)-Cys、Arg、Glu、Phe、Gln、Leu、Val、Lys、Ala、Ser、Dapa或不存在；
- [0224] X8是Ile、Arg、Lys、Ala、Gln、Phe、Glu、Asp、Tyr、Ser、Leu、Val、D-Ile、D-Lys、D-Arg、Dapa或不存在；
- [0225] X9是Phe、Ala、Ile、Thr、Tyr、Lys、Arg、bhPhe、D-Phe或不存在；和
- [0226] X10是Lys、Phe或不存在；
- [0227] Y不存在或存在，条件是如果Y存在，Y是具有式(VIm)的肽：
- [0228] Y1-Y2-Y3 (VIm) (SEQ ID NO:17)
- [0229] 其中
- [0230] Y1是Ile、Arg、Lys、Ala、Gln、Phe、Glu、Asp、Tyr、Ser、Leu、Val、D-Ile、D-Lys、D-Arg、Dapa或不存在；
- [0231] Y2是Phe、Ala、Ile、Thr、Tyr、Lys、Arg、bhPhe或D-Phe或不存在；和
- [0232] Y3是Lys、Phe或不存在。
- [0233] 在一个实施方案中，本发明提供了可以被分离和/或纯化的肽同源二聚体或肽异源二聚体，其包含两个铁调素类似物，每个铁调素类似物包含下述结构、基本上由下述结构组成、或由下述结构组成：式I的结构或式II的结构，其中两个铁调素类似物通过Ida接头（例如，IDA-Palm接头）连接，其中Ida接头被连接到两个铁调素类似物中每个的赖氨酸（例如通过赖氨酸侧链）。在一这样的实施方案中，二聚体是同源二聚体，在另一实施方案中，二聚体是异源二聚体。
- [0234] 在其它实施方案中，本发明包括包含编码本文所述的铁调素类似物的序列的多核苷酸。
- [0235] 在另外的实施方案中，本发明包括载体，其包含含有编码本文所述的铁调素类似物的序列的多核苷酸。
- [0236] 在另外的实施方案中，本发明包括药物组合物，其包含本文所述的肽或铁调素类似物以及药学上可接受的载体、赋形剂或媒介物。
- [0237] 在相关的实施方案中，本发明包括结合膜铁转运蛋白或诱导膜铁转运蛋白内化和降解的方法，其包括将膜铁转运蛋白与至少一种本文所述的肽或铁调素类似物接触。
- [0238] 在进一步的相关实施方案中，本发明包括治疗对象中铁代谢疾病的方法，其包括向对象提供有效量的至少一种本文所述的肽或铁调素类似物。
- [0239] 在另一实施方案中，本发明包括装置，其包含本文所述的肽或铁调素类似物，用于将铁调素类似物、二聚体或组合物递送至对象。
- [0240] 在另一相关实施方案中，本发明包括试剂盒，其包含与试剂、装置或说明材料、或

其组合一起包装的至少一种本文所述的肽或铁调素类似物。

附图说明

[0241] 图1显示在C-57 (小鼠) 中以血清铁水平 ($n=4$) 表示的在两种浓度 (300nmol/kg 和 1000nmol/kg (皮下或“sc”; 2小时)) 下示例性铁调素类似物的体内剂量响应。本实验中使用的铁调素类似物单体肽的序列如表14所示。

[0242] 发明详述

[0243] 本发明总体涉及铁调素类似物肽及其制备和使用方法。在某些实施方案中, 铁调素类似物表现出一种或多种铁调素活性。在某些实施方案中, 本发明涉及铁调素肽类似物, 其包含通过分子内键 (例如分子内二硫键) 形成环化结构的一个或多个肽亚基。在具体的实施方案中, 与非环化铁调节肽及其类似物相比, 环化结构具有增加的效价和选择性。

[0244] 定义和术语

[0245] 除非本文另有定义, 本申请中使用的科学和技术术语应具有本领域普通技术人员通常理解的含义。通常, 与本文所述的化学、分子生物学、细胞和癌症生物学、免疫学、微生物学、药理学以及蛋白质和核酸化学有关使用的术语以及技术是本领域公知和常用的。

[0246] 如本文所用, 除非另有说明, 以下术语具有归于它们的含义。

[0247] 在整个说明书中, 词语“包含/包括” (“comprise”) 或其变化如“包含/包括” (“comprises/comprising”) 将理解成意味着包含所述的整数 (或组分) 或整数 (或组分) 的组, 但不排除任何其他的整数 (或组分) 或整数 (或组分) 的组。

[0248] 除非上下文另有明确规定, 单数形式“一个/一种 (a/an)” 和“所述 (the)” 包括复数形式。

[0249] 术语“包括” 用于表示“包括但不限于”。“包括” 和“包括但不限于” 可互换使用。

[0250] 术语“患者”、“对象” 和“个体” 可以互换使用, 并且是指人或非人动物。这些术语包括哺乳动物如人、灵长类动物、家畜动物 (例如牛、猪)、伴侣动物 (例如犬、猫科动物) 和啮齿动物 (例如小鼠和大鼠)。术语“哺乳动物” 是指任何哺乳动物物种, 例如人、小鼠、大鼠、狗、猫、仓鼠、豚鼠、兔、家畜等。

[0251] 如本文所用, 术语“肽” 广义上是指通过肽键连接在一起的两个或多个氨基酸的序列。应当理解, 该术语不意味着氨基酸聚合物的特定长度, 也不意味着暗示或区分是否多肽是使用重组技术、化学还是酶促合成产生的, 或是天然存在的。

[0252] 如本文所用, 术语“肽类似物” 广义上是指包含与铁调素或其功能区相同的一个或多个结构特征和/或功能活性的肽单体和肽二聚体。在某些实施方案中, 肽类似物包括与铁调素具有实质性氨基酸序列同一性的肽, 例如与野生型铁调素 (例如人铁调素) 的氨基酸序列相比, 包含一个或多个氨基酸插入、缺失或取代的肽。在某些实施方案中, 肽类似物包括一种或多种另外的修饰, 例如与另一种化合物缀合。术语“肽类似物” 包括本发明的任何肽单体或肽二聚体。在某些情况下, “肽类似物” 还可以或可选地在本文中称为“铁调素类似物”、“铁调素肽类似物” 或“铁调素类似物肽”。

[0253] 如本文所用, 表述“序列同一性”、“同一性百分比”、“同源性百分比” 或例如包含“与...具有50%同一性的序列” 是指在比较窗口上, 序列在核苷酸-核苷酸基础上或在氨基酸-氨基酸上相同的程度。因此, 可以通过以下来计算“序列同一性百分比”: 在比较窗上比

对两个最佳对齐的序列,确定在两个序列中出现相同核酸碱基(例如A、T、C、G、I)或相同氨基酸残基(例如Ala、Pro、Ser、Thr、Gly、Val、Leu、Ile、Phe、Tyr、Trp、Lys、Arg、His、Asp、Glu、Asn、Gln、Cys和Met)的位置数目以产生匹配位置的数目,将匹配位置的数目除以比较窗口中的位置总数(即,窗口大小),并将结果乘以100以产生序列同一性的百分比。

[0254] 可以按如下来计算序列之间的序列相似性或序列同一性(在本文中这些术语可互换使用)。为了确定两个氨基酸序列或两个核酸序列的百分比同一性,为了最佳比较目的可以比对序列(例如,为了最佳比对,可以在第一氨基酸序列或核酸序列和第二氨基酸序列或核酸序列的一个或两个中引入空位,以及为了比较的目的可以忽略非同源序列)。在某些实施方案中,为比较目的而比对的参考序列长度为:至少30%,优选至少40%,更优选至少50%、60%,甚至更优选至少70%、80%、90%、100%的参考序列长度。然后,比较相应氨基酸位置或核苷酸位置处的氨基酸残基或核苷酸。当第一序列中的一个位置被与第二序列中相应位置的相同氨基酸残基或核苷酸占据时,则分子在该位置是相同的。

[0255] 考虑到为了两个序列的最佳比对而需要被引入的空位数目和每个空位的长度,两个序列之间的百分比同一性与由序列共有的相同位置的数目呈函数关系。

[0256] 可以使用数学算法完成序列的比较和两个序列之间百分比同一性的测定。在一些实施方案中,使用已经并入GCG软件包中的GAP程序的Needleman和Wunsch,(1970, J.Mol.Biol.48:444-453)算法,采用Blossum 62矩阵或PAM250矩阵,以及空位权重为16、14、12、10、8、6或4并且长度权重为1、2、3、4、5或6,测定两个氨基酸序列之间的百分比同一性。在另一个优选的实施方案中,使用GCG软件包中的GAP程序,采用NWSgapdna.CMP矩阵,以及空位权重为40、50、60、70或80并且长度权重为1、2、3、4、5或6,测定两个核苷酸序列之间的百分比同一性。另一示例性参数组包括:具有空位罚分为12、空位延伸罚分为4和移码空位罚分为5的Blossum 62评分矩阵。也可以使用已经并入ALIGN程序(2.0版本)中的E.Meyers和W.Miller(1989,Cabios,4:11-17)的算法,采用PAM120权重残基表、空位长度罚分为12并且空位罚分为4,测定两个氨基酸序列或两个核苷酸序列之间的百分比同一性。

[0257] 可以将本文所述的肽序列用作“查询序列”,以针对公共数据库进行搜索,以例如鉴定其他家族成员或相关序列。可以使用Altschul等人(1990,J.Mol.Biol,215:403-10)的NBLAST和XBLAST程序(版本2.0)进行这样的搜索。可以用NBLAST程序(得分=100,字长=12)进行BLAST核苷酸搜索,以获得与本发明的核酸分子同源的核苷酸序列。可以用XBLAST程序(得分=50,字长=3)进行BLAST蛋白搜索,以获得与本发明的蛋白分子同源的氨基酸序列。为了获得用于比较目的的空位比对,可以利用Gapped BLAST,其描述于Altschul等人(Nucleic Acids Res.25:3389-3402,1997)。当利用BLAST和Gapped BLAST程序时,可以使用各自程序(例如,XBLAST和NBLAST)的默认参数。

[0258] 如本文所用,术语“保守取代”表示一个或多个氨基酸被另一个生物学相似的残基替代。实例包括具有相似特征的氨基酸残基的取代,例如小氨基酸、酸性氨基酸、极性氨基酸、碱性氨基酸、疏水性氨基酸和芳香族氨基酸。参见,例如,下表。在本发明的一些实施方案中,一个或多个Met残基被正亮氨酸(Nle)取代,正亮氨酸是Met的生物电子等排体,但是与Met相反,其不容易氧化。用通常不存在于内源性哺乳动物肽和蛋白中的残基进行保守取代的另一实例,是用例如鸟氨酸、刀豆氨酸、氨基乙基半胱氨酸或另一种碱性氨基酸来保守取代Arg或Lys。在一些实施方案中,本发明的肽类似物的一个或多个半胱氨酸可以被另一

个残基如丝氨酸取代。关于肽和蛋白质中的表型沉默取代的进一步信息,参见例如Bowie等人,Science 247,1306-1310,1990。在下面的图解中,根据物理化学性质将氨基酸的保守取代分组。I:中性、亲水性,II:酸和酰胺,III:碱性,IV:疏水性,V:芳香族、大体积氨基酸。

[0259]

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

[0260] 在下面的图解中,根据物理化学性质将氨基酸的保守取代分组。VI:中性或疏水性,VII:酸性,VIII:碱性,IX:极性,X:芳香族。

[0261]

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

[0262]

V			Q	
---	--	--	---	--

[0263] 如本文所用,术语“氨基酸”或“任何氨基酸”是指任何和所有氨基酸,包括天然存在的氨基酸(例如 α -氨基酸)、非天然氨基酸、修饰的氨基酸和非天然氨基酸。它包括D-氨基酸和L-氨基酸。天然氨基酸包括天然存在的那些,例如,结合成肽链以形成大量蛋白质的结构单元的23个氨基酸。这些主要是L立体异构体,尽管少数D-氨基酸存在于细菌包膜和一些抗生素中。20种“标准”天然氨基酸列于上表中。“非标准”天然氨基酸是吡咯赖氨酸(存在于产甲烷生物体和其他真核生物中)、硒代半胱氨酸(存在于许多非真核生物以及大多数真核生物中)和N-乙酰甲硫氨酸(由细菌、线粒体和叶绿体中的起始密码子AUG编码)。“非天然”(“Unnatural/non-natural”)氨基酸是天然存在或化学合成的非蛋白原性氨基酸(即,不是天然编码的或不是在遗传密码中发现的氨基酸)。已知超过140种天然氨基酸,成千上万种组合是可能的。“非天然”氨基酸的实例包括 β -氨基酸(β^3 和 β^2)、高氨基酸、脯氨酸和丙酮酸衍生物、3-取代的丙氨酸衍生物、甘氨酸衍生物、环取代的苯丙氨酸和酪氨酸衍生物、直链核心氨基酸、二氨基酸、D-氨基酸和N-甲基氨基酸。“非天然”(“Unnatural/non-natural”)氨基酸还包括修饰的氨基酸。“修饰的”氨基酸包括经化学修饰以包括非天然存在于氨基酸上的基团(a group/groups)或化学部分的氨基酸(例如,天然氨基酸)。

[0264] 如本领域技术人员所清楚的,本文公开的肽序列从左到右显示,其中序列的左端是肽的N-末端,序列的右端是肽的C-末端。本文所公开的序列是在序列的氨基末端(N-末端)引入“Hy-”部分,并且在序列的羧基末端(C-末端)引入“-OH”部分或“-NH₂”部分的序列。

在这种情况下,除非另有说明,在所述序列的N-末端的“Hy-”部分表示氢原子,对应于在N-末端存在游离的伯氨基或仲氨基,而在该序列的C-末端的“-OH”部分或“-NH₂”部分表示羟基或氨基,分别对应于在C-末端存在酰胺基(CONH₂)基团。在本发明的每个序列中,C-末端“-OH”部分可以被取代为C-末端“-NH₂”部分,反之亦然。还应理解,在氨基末端或羧基末端的部分可以是键,例如共价键,特别是在氨基末端或羧基末端与接头或另一化学部分(例如PEG部分)结合的情况下。

[0265] 如本文所用,术语“NH₂”是指存在于多肽的氨基末端的游离氨基。如本文所用,术语“OH”是指存在于肽羧基末端的游离羧基。此外,如本文所用,术语“Ac”是指通过多肽的C-末端或N-末端的酰化作用进行的乙酰保护。

[0266] 如本文所用,术语“羧基”是指-CO₂H。

[0267] 在大多数情况下,本文中使用的天然存在和非天然存在的氨酰基残基的名称遵循IUPAC委员会有机化学命名法和IUPAC-IUB委员会关于生物化学命名法建议的命名惯例,如“ α -氨基酸命名法(Recommendations,1974)”Biochemistry,14(2), (1975)所列。在本说明书和所附权利要求中使用的氨基酸和氨酰基残基的名称和缩写与那些建议不同的程度上,将向读者进行阐明。用于描述本发明的一些缩写,在下面表1中定义。

[0268] 表1. 非天然氨基酸和化学部分的缩写词

[0269]

缩写词	定义
DIG	二甘醇酸
Dapa	二氨基丙酸
Daba	二氨基丁酸
Pen	青霉胺
Sarc	肌氨酸
Cit	瓜氨酸
Cav	刀豆氨酸
NMe-Arg	N-甲基-精氨酸
NMe-Trp	N-甲基-色氨酸
NMe-Phe	N-甲基-苯丙氨酸
Ac-	乙酰基
2-Nal	2-萘基丙氨酸
1-Nal	1-萘基丙氨酸

[0270]

Bip	联苯丙氨酸
β -Ala	β -丙氨酸
Aib	2-氨基异丁酸
Azt	氮杂环丁烷-2-羧酸
Tic	(3S)-1,2,3,4-四氢异喹啉-羟基-3-羧酸
Phe(OMe)	酪氨酸(4-甲基)
N-MeLys	N-甲基-赖氨酸
N-MeLys(Ac)	N-e-乙酰基-D-赖氨酸
Dpa	β,β -二苯基丙氨酸
NH ₂	游离胺
CONH ₂	酰胺
COOH	酸
Phe(4-F)	4-氟-苯基丙氨酸
PEG3	$\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$
m-PEG3	$\text{CH}_3\text{OCH}_2\text{CH}_2(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$
m-PEG4	$\text{CH}_3\text{OCH}_2\text{CH}_2(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$
m-PEG8	$\text{CH}_3\text{OCH}_2\text{CH}_2(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_7\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$
PEG11	O-(2-氨基乙基)-O'-(2-羧乙基)-十一乙二醇 $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_{11}\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$
PEG13	具有 13 个聚乙二醇单元的双功能 PEG 接头
PEG25	具有 25 个聚乙二醇单元的双功能 PEG 接头
PEG1K	具有 1000Da 分子量聚乙二醇的双功能 PEG 接头
PEG2K	具有 2000Da 分子量聚乙二醇的双功能 PEG 接头
PEG3.4K	具有 3400Da 分子量聚乙二醇的双功能 PEG 接头
PEG5K	具有 5000Da 分子量聚乙二醇的双功能 PEG 接头

[0271]

IDA 或 Ida	亚氨基二乙酸
IDA-Palm	(棕榈基)-亚氨基二乙酸
hPhe	高苯丙氨酸
Ahx	氨基己酸
DIG-OH	乙醇酸
三嗪	氨基丙基三嗪二酸
Boc-三嗪	Boc-三嗪二酸
三氟丁酸	4,4,4-三氟丁酸
2-甲基三氟丁酸	2-甲基-4,4,4-丁酸
三氟戊酸	5,5,5-三氟戊酸
1,4-亚苯基二乙酸	对-亚苯基二乙酸
1,3-亚苯基二乙酸	间-亚苯基二乙酸
DTT	二硫苏糖醇
Nle	正亮氨酸
β hTrp 或 bhTrp	β -高色氨酸
β hPhe 或 bhPhe	β -高苯丙氨酸
Phe(4-CF ₃)	4-三氟甲基苯丙氨酸
β Glu 或 bGlu	β -谷氨酸
β hGlu 或 bhGlu	β -高谷氨酸
2-2-二氢化茛	2-氨基茛满-2-羧酸
1-1-二氢化茛	1-氨基茛满-1-羧酸
hCha	环己基高丙氨酸
环丁基	环丁基丙氨酸
hLeu	高亮氨酸
Gla	γ -羧基谷氨酸

[0272]

Aep	3-(2-氨基乙氧基)丙酸
Aea	(2-氨基乙氧基)乙酸
异 Glu-辛酸	辛酰基- γ -Glu
K-辛酸	辛酰基- γ -Lys
Dapa(棕榈基)	十六烷酰基- β -二氨基丙酸
异 Glu-棕榈基	十六烷酰基- γ -Glu
C-StBu	S-叔丁硫基半胱氨酸
C-tBu	S-叔丁基半胱氨酸
Dapa(AcBr)	NY-(溴乙酰基)-2,3-二氨基丙酸
Tle	叔亮氨酸
Phg	苯基甘氨酸
Oic	八氢吡啶-2-羧酸
Chg	α -环几基甘氨酸
GP-(Hyp)	Gly-Pro-羟基 Pro
Inp	异吡啶甲酸
Amc	4-(氨基甲基)环己烷羧酸
甜菜碱	$(\text{CH}_3)_3\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$

[0273] 在整个本说明书中,除非天然存在的氨基酸以其全称(例如丙氨酸、精氨酸等)被提及,否则它们由其常规的三字母或单字母缩写指定(例如Ala或A代表丙氨酸,Arg或R代表精氨酸等)。在不常见或非天然存在的氨基酸的情况下,除非它们以其全称(例如肌氨酸、鸟氨酸等)被提及,常用的三字符代码或四字符代码用于代表其残基,包括Sar或Sarc(肌氨酸,即N-甲基甘氨酸)、Aib(α -氨基异丁酸)、Daba(2,4-二氨基丁酸)、Dapa(2,3-二氨基丙酸)、 γ -Glu(γ -谷氨酸)、pGlu(焦谷氨酸)、Gaba(γ -氨基丁酸)、 β -Pro(吡咯烷-3-羧酸)、8Ado(8-氨基-3,6-二氧杂辛酸)、Abu(4-氨基丁酸)、bhPro(β -高脯氨酸)、bhPhe(β -高-L-苯丙氨酸)、bhAsp(β -高天冬氨酸)、Dpa(β , β -二苯丙氨酸)、Ida(亚氨基二乙酸)、hCys(高半胱氨酸)、bhDpa(β -高- β , β -二苯丙氨酸)。

[0274] 此外, R^1 可以在所有序列中被异戊酸或等同物取代。在一些实施方案中,其中本发明的肽与酸性化合物(例如异戊酸、异丁酸、戊酸等)缀合,这种缀合物的存在是以酸的形式提及。因此,例如但不以任何方式限制,不是通过提及异戊酰基来指示异戊酸与肽的缀合物,在一些实施方案中,本申请可以作为异戊酸来提及这样的缀合物。

[0275] 如本文所使用的术语“L-氨基酸”是指肽的“L”异构体形式,相反地,术语“D-氨基

酸”是指肽的“D”异构体形式。在某些实施方案中,本文所述的氨基酸残基为“L”异构体形式,然而,“D”异构体形式的残基可以取代任何L-氨基酸残基,只要所述肽保留所需的功能。

[0276] 除非另有说明,提及的是所讨论的具有手性中心的所述天然氨基酸和非天然氨基酸的L异构体形式。如合适,以前缀“D”在常规三字母代码之前的常规方式,表示氨基酸的D异构体形式(例如,Dasp、(D) Asp或D-Asp;Dphe、(D) Phe或D-Phe)。

[0277] 如本文所使用的术语“DRP”是指富含二硫键的肽。

[0278] 如本文所使用的术语“二聚体”,广义上是指包含两个或更多个单体亚基的肽。某些二聚体包括两个DRP。本发明的二聚体包括同源二聚体和异源二聚体。二聚体的单体亚基可以在其C末端或N末端连接,或者其可以通过内部氨基酸残基连接。二聚体的每个单体亚基可以通过相同的位点连接,或者每个单体亚基可以通过不同的位点(例如,C末端、N末端或内部位点)连接。

[0279] 如本文所使用的,在某些公开的肽序列(例如表2-4、表6-15中所示的那些)的上下文中,圆括号例如()代表侧链缀合物,而方括号例如[]代表非天然氨基酸取代。通常,当接头显示在肽序列的N末端时,其表明该肽与另一肽二聚化,其中所述接头连接到两条肽的N末端。通常,当接头显示在肽序列的C末端时,其表明该肽与另一肽二聚化,其中所述接头连接到两条肽的C末端。

[0280] 术语“等排体置换”或“等排体取代”在本文中可互换使用,是指与指定的氨基酸具有类似化学和/或结构性质的任何氨基酸或其他类似物部分。在某些实施方案中,等排体置换是具有天然氨基酸或非天然氨基酸的保守取代。

[0281] 如本文所使用的术语“环化”是指其中多肽分子的一部分与该多肽分子的另一部分连接以形成闭环(如通过形成二硫桥或其它类似键)的反应。

[0282] 如本文所使用的术语“亚基”是指连接形成二聚体肽组合物的一对多肽单体之一。

[0283] 如本文所使用的术语“接头部分”,广义上是指能够将两个肽单体亚基连接(linking/joining)在一起以形成二聚体的化学结构。

[0284] 在本发明的上下文中,术语“溶剂化物”是指在溶质(例如根据本发明的铁调素类似物或其药学上可接受的盐)和溶剂之间形成的限定化学计量的复合物。在这方面,溶剂可以是例如水、乙醇或另一药学上可接受的,通常是小分子有机物,例如但不限于乙酸或乳酸。当所述溶剂是水时,这种溶剂化物通常被称为水合物。

[0285] 如本文所使用的“铁代谢疾病”包括这样的疾病,其中异常铁代谢直接引起该疾病,或其中铁血液水平失调引起该疾病,或其中铁失调是另一种疾病的结果,或其中可以通过调节铁水平治疗疾病等。更具体地,根据本公开的铁代谢疾病包括:铁过载疾病、铁缺乏症病症、铁生物分布病症、铁代谢的其它病症和潜在地与铁代谢有关的其它病症等。铁代谢疾病包括:血色病、HFE突变血色病、膜铁转运蛋白突变血色病、转铁蛋白受体2突变血色病、血幼素突变血色病、铁调素突变血色病、青少年型血色病、新生儿血色病、铁调素缺乏症、输血性铁过载、地中海贫血、中间型地中海贫血、 α -地中海贫血、铁粒幼红细胞性贫血、卟啉症、迟发性皮肤卟啉症、非洲铁过载、高铁蛋白血症(hyperferritinemia)、血浆铜蓝蛋白缺乏症、无转铁蛋白血症、先天性红细胞生成异常性贫血、慢性疾病贫血、炎症性贫血、感染性贫血、低色小红细胞性贫血、缺铁性贫血、铁难治性缺铁性贫血、慢性肾脏疾病贫血、促红细胞生成素抵抗、肥胖的铁缺乏症、其他贫血、过度产生铁调素或诱导其过量产生的良性或恶

性肿瘤、铁调素过量的病症、弗里德赖希共济失调、Gracile综合征、哈勒沃登-施帕茨病、威尔逊氏病、肺含铁血黄素沉积症、肝细胞癌、癌症、肝炎、肝硬化、异食癖、慢性肾功能衰竭、胰岛素抵抗、糖尿病、动脉粥样硬化、神经退行性疾病、多发性硬化、帕金森病、亨廷顿舞蹈病和阿尔茨海默病。

[0286] 在一些实施方案中,所述疾病和病症与铁过载疾病相关,诸如血色病、HFE突变血色病、膜铁转运蛋白突变血色病、转铁蛋白受体2突变血色病、血幼素突变血色病、铁调素突变血色病、青少年型血色病、新生儿血色病、铁调素缺乏症、输血性铁过载、地中海贫血、中间型地中海贫血、 α -地中海贫血。

[0287] 在一些实施方案中,本发明的铁调素类似物用于治疗通常不被鉴定为与铁相关的疾病和病症。例如,铁调素在小鼠胰腺中高度表达,提示糖尿病(I型或II型)、胰岛素抵抗、葡萄糖耐受不良和可通过治疗潜在的铁代谢病症而改善的其它病症。参见Ilyin,G.等人(2003)FEBS Lett.542 22-26,其通过引用并入本文。因此,本发明的肽可用于治疗这些疾病和病症。本领域技术人员能够容易地使用本领域已知的方法确定是否可用本发明的肽治疗给定疾病,其包括WO 2004092405的分析(其通过引用并入本文),以及本领域已知的监测铁调素、血幼素或铁的水平和分析(例如在美国专利第7,534,764号中描述的那些,其通过引用并入本文)。

[0288] 在本发明的某些实施方案中,铁代谢疾病是铁过载疾病,包括遗传性血色病、铁负载贫血、酒精性肝病和慢性丙型肝炎。

[0289] 如本文所使用的术语“药学上可接受的盐”代表本发明的肽或化合物的盐或两性离子形式,其是水或油溶性或可分散的,其适用于治疗疾病而没有不适当的毒性、刺激和过敏反应;其与合理的效益/风险比相称,并且对于它们的预期用途是有效的。可以在化合物的最终分离和纯化期间制备盐,或者通过氨基与合适的酸反应单独地制备盐。代表性的酸加成盐包括:乙酸盐、己二酸盐、藻酸盐、柠檬酸盐、天冬氨酸盐、苯甲酸盐、苯磺酸盐、硫酸氢盐、丁酸盐、樟脑酸盐、樟脑磺酸盐、二葡萄糖酸盐、甘油磷酸盐、半硫酸盐、庚酸盐、己酸盐、甲酸盐、延胡索酸盐、盐酸盐、氢溴酸盐、氢碘酸盐、2-羟基乙磺酸盐(羟乙基磺酸盐)、乳酸盐、马来酸盐、均三甲苯磺酸盐、甲磺酸盐、萘磺酸盐、烟酸盐、2-萘磺酸盐、草酸盐、双羟萘酸盐、果胶酸盐、过硫酸盐、3-苯基丙酸盐、苦味酸盐、新戊酸盐、丙酸盐、琥珀酸盐、酒石酸盐、三氯乙酸盐、三氟乙酸盐、磷酸盐、谷氨酸盐、碳酸氢盐、对甲苯磺酸盐和十一烷酸盐。此外,本发明化合物中的氨基可以用下述物质来季铵化:甲基、乙基、丙基和丁基的氯化物、溴化物和碘化物;二甲基、二乙基、二丁基和二戊基的硫酸盐;癸基、十二烷基、肉豆蔻基和甾醇基的氯化物、溴化物和碘化物;以及苄基溴化物和苯乙基溴化物。可用于形成治疗上可接受的加成盐的酸的实例包括无机酸(如盐酸、氢溴酸、硫酸和磷酸)以及有机酸(如草酸、马来酸、琥珀酸和柠檬酸)。药学上可接受的盐可以适当地选自例如酸加成盐和碱式盐的盐。酸加成盐的实例包括氯化物盐、柠檬酸盐和乙酸盐。碱式盐的实例包括这样的盐:其中阳离子选自碱金属阳离子(如钠离子或钾离子)、碱土金属阳离子(如钙离子或镁离子)以及取代的铵离子(如N(R1)(R2)(R3)(R4)+型离子,其中R1、R2、R3和R4通常独立地表示氢),任选取代的C1-6-烷基或任选取代的C2-6-烯基。相关的C1-6-烷基的实例包括甲基、乙基、1-丙基和2-丙基。可能相关的C2-6-烯基的实例包括乙烯基、1-丙烯基和2-丙烯基。药学上可接受的盐的其它实例描述于“Remington's Pharmaceutical Sciences”,第17版,Alfonso

R.Gennaro (编辑), Mark Publishing Company, Easton, PA, USA, 1985 (及其更新的版本), “Encyclopaedia of Pharmaceutical Technology”, 第3版, James Swarbrick (编辑), Informa Healthcare USA (Inc.), NY, USA, 2007 和 J.Pharm.Sci. 66:2 (1977)。此外, 对于合适的盐的综述, 参见 Stahl 和 Wermuth 的 Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use (Wiley-VCH, 2002)。其它合适的碱盐由形成无毒盐的碱形成。代表性实例包括: 铝盐、精氨酸盐、苄星青霉素盐、钙盐、胆碱盐、二乙胺盐、二乙醇铵盐、甘氨酸盐、赖氨酸盐、镁盐、葡甲胺盐、乙醇胺盐、钾盐、钠盐、氨丁三醇盐和锌盐。也可以形成酸和碱的半盐, 例如半硫酸盐和半钙盐。

[0290] 如本文所使用的术语“N(α) 甲基化”描述了氨基酸的 α 胺的甲基化, 通常也称为N-甲基化。

[0291] 如本文所使用的术语“对称(sym) 甲基化”或“Arg-Me-对称”描述精氨酸的胍基的两个氮的对称甲基化。此外, 术语“对称甲基化”或“Arg-Me-对称”描述精氨酸的胍基的单个氮的甲基化。

[0292] 如本文所使用的术语“酰化有机化合物”是指具有羧酸官能团的各种化合物, 其用于在形成C末端二聚体之前酰化氨基酸亚基的N末端。酰化有机化合物的非限制性实例包括: 环丙基乙酸、4-氟苯甲酸、4-氟苯基乙酸、3-苯基丙酸、琥珀酸、戊二酸、环戊烷羧酸、3, 3, 3-三氟丙酸、3-氟甲基丁酸、四氢-2H-吡喃-4-羧酸。

[0293] 术语“烷基”包括含有1至24个碳原子的直链或支链、非环状或环状的饱和脂族烃。代表性的饱和直链烷基包括但不限于: 甲基、乙基、正丙基、正丁基、正戊基、正己基等, 而饱和支链烷基包括但不限于: 异丙基、仲丁基、异丁基、叔丁基、异戊基等。代表性的饱和环烷基包括但不限于: 环丙基、环丁基、环戊基、环己基等, 而不饱和环烷基包括但不限于环戊烯基、环己烯基等。

[0294] 如本文所用, 本发明肽激动剂的“治疗有效量”意在描述足够量的肽激动剂以治疗铁调素相关疾病, 包括但不限于本文所述的任何疾病和病症(例如, 铁代谢疾病)。在具体的实施方案中, 治疗有效量将实现适用于任何医学治疗的期望的效益/风险比。

[0295] 铁调素的肽类似物

[0296] 本发明提供了铁调素的肽类似物, 其可以是单体或二聚体(统称为“铁调素类似物”)。

[0297] 在一些实施方案中, 本发明的铁调素类似物结合膜铁转运蛋白(例如人膜铁转运蛋白)。在某些实施方案中, 本发明的铁调素类似物特异性结合人膜铁转运蛋白。如本文所使用的, “特异性结合”是指相比样本中的其它试剂, 特异性结合剂优先与给定的配体相互作用。例如, 特异性结合给定配体的特异性结合剂, 在合适条件下相比与样本中与其它组分的任何非特异性相互作用, 其结合给定配体的量或程度是可观察到的。合适的条件是允许在给定的特异性结合剂和给定配体之间相互作用的条件下。这些条件包括pH、温度、浓度、溶剂、孵育时间等, 并且在给定的特异性结合剂和配体对之间可以不同, 但是可以由本领域技术人员容易地确定。在一些实施方案中, 本发明的铁调素类似物以比铁调素参考化合物(例如, 本文提供的任何一种铁调素参考化合物)更高的特异性结合膜铁转运蛋白。在一些实施方案中, 本发明的铁调素类似物显示出比铁调素参考化合物(例如, 本文提供的任何一种铁调素参考化合物)高至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、

200%、300%、400%、500%、700%、1000%或10,000%的膜铁转运蛋白特异性。在一些实施方案中,本发明的铁调素类似物显示的膜铁转运蛋白特异性,比铁调素参考化合物(例如,本文提供的任何一种铁调素参考化合物)高至少约5倍、或至少约10、20、50或100倍。

[0298] 在某些实施方案中,本发明的铁调素类似物显示铁调素活性。在一些实施方案中,活性是体外活性或体内活性,例如本文所述的体内活性或体外活性。在一些实施方案中,本发明的铁调素类似物显示出至少约50%、60%、70%、80%、90%、95%、97%、98%、99%或大于99%的由铁调素参考化合物(例如,本文提供的任何一种铁调素参考化合物)显示的活性。

[0299] 在一些实施方案中,本发明的铁调素类似物显示出至少约50%、60%、70%、80%、90%、95%、97%、98%、99%或大于99%的由参考铁调素显示的膜铁转运蛋白结合能力。在一些实施方案中,相比参考铁调素,本发明的铁调素类似物针对结合于膜铁转运蛋白(例如,人膜铁转运蛋白)具有较低的IC₅₀(即较高的结合亲和力)。在一些实施方案中,在膜铁转运蛋白竞争性结合分析中,本发明的铁调素类似物具有比参考铁调素低至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200%、300%、400%、500%、700%或1000%的IC₅₀。

[0300] 在某些实施方案中,与铁调素参考肽相比,本发明的铁调素类似物显示出增加的铁调素活性。在一些实施方案中,活性是体外活性或体内活性,例如本文所述的体内活性或体外活性。在某些实施方案中,本发明的铁调素类似物显示出比参考铁调素高1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、30、40、50、60、70、80、90、100、120、140、160、180或200倍的铁调素活性。在某些实施方案中,本发明的铁调素类似物显示出比参考铁调素高至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、97%、98%、99%或大于99%、100%、200%、300%、400%、500%、700%或1000%的活性。

[0301] 在一些实施方案中,本发明的肽类似物显示出比参考铁调素高至少约50%、60%、70%、80%、90%、95%、97%、98%、99%或大于99%、100%、200%、300%、400%、500%、700%或1000%的诱导人膜铁转运蛋白降解的体外活性,其中活性是根据本文所述方法测量的。

[0302] 在一些实施方案中,本发明的肽或肽二聚体显示出比如参考铁调素的高至少约50%、60%、70%、80%、90%、95%、97%、98%、99%或大于99%、100%、200%、300%、400%、500%、700%或1000%的诱导个体中游离血浆铁减少的体内活性,其中活性是根据本文所述方法测量的。

[0303] 在一些实施方案中,活性是体外活性或体内活性,例如本文所述的体内活性或体外活性。在某些实施方案中,本发明的铁调素类似物显示出比参考铁调素高1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、30、40、50、60、70、80、90、100、120、140、160、180或200倍,或至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200%、300%、400%、500%、700%或1000%的活性,其中所述活性是诱导膜铁转运蛋白降解的体外活性,例如,根据本文实施例测量的;或其中所述活性是用于减少游离血浆铁的体内活性,例如根据本文实施例测量的。

[0304] 在一些实施方案中,本发明的铁调素类似物模拟Hep25(具有生物活性的人25-氨基酸形式)的铁调素活性,在本文中称为“微型铁调素”。如本文所使用的,在某些实施方案

中,具有“铁调素活性”的化合物(例如,铁调素类似物)是指,当施用(例如胃肠外注射或口服施用)该化合物时,其以剂量依赖性和时间依赖性方式具有降低对象(例如小鼠或人)中血浆铁浓度的能力的化合物。参见,例如,如Rivera等人(2005),Blood 106:2196-9中所示。在一些实施方案中,本发明的肽将对象中的血浆铁浓度降低至少约1.2、1.5、2、3、4、5、6、7、8、9或10倍,或至少约5%、10%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或约99%。

[0305] 在一些实施方案中,本发明的铁调素类似物具有如通过在膜铁转运蛋白表达细胞系中引起膜铁转运蛋白内化和降解的能力所测定的体外活性,如在Nemeth等人(2006)Blood 107:328-33中所教导。在一些实施方案中,通过被工程化改造为展示与绿色荧光蛋白融合的膜铁转运蛋白的细胞的荧光的剂量依赖性丧失来测量体外活性,如在Nemeth等人(2006)Blood 107:328-33中所述。将等分试样的细胞与分级浓度的Hep25或微型铁调素的参考制剂孵育24小时。如本文所提供的,EC₅₀值提供为引起参考化合物产生50%最大荧光损失的给定化合物(例如本发明的铁调素类似物肽或肽二聚体)的浓度。在本试验中Hep25制剂的EC₅₀范围为5至15nM,并且在某些实施方案中,本发明的优选铁调素类似物在体外活性试验中具有约1,000nM或更低的EC₅₀值。在某些实施方案中,本发明的铁调素类似物在体外活性试验(例如,如Nemeth等人(2006)Blood 107:328-33或本文实施例中所述)具有小于约以下任一项的EC₅₀:0.01、0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、40、50、60、70、80、90、100、200或500nM。在一些实施方案中,铁调素类似物或生物治疗组合物(例如,本文所述的药物组合物中的任一种)具有约1nM或更小的EC₅₀值。

[0306] 可以使用本领域已知的用于计算根据本发明的铁调素类似物的铁调素活性和体外活性的其它方法。例如,在某些实施方案中,铁调素类似物或参考肽的体外活性,通过其内化细胞的膜铁转运蛋白的能力来测量,其通过免疫组织化学或流式细胞术使用识别膜铁转运蛋白的细胞外表位的抗体来测定。可选择地,在某些实施方案中,铁调素类似物或参考肽的体外活性,通过它们抑制铁从表达膜铁转运蛋白的细胞外流的剂量依赖性能力来测量,所述细胞预装有放射性同位素或稳定的铁同位素,如Nemeth等人(2006)Blood 107:328-33中所述。

[0307] 在一些实施方案中,与参考铁调素相比,本发明的铁调素类似物显示出增加的稳定性(例如,通过半衰期、蛋白质降解速率测量的)。在某些实施方案中,本发明的铁调素类似物的稳定性比参考铁调素增加至少约1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、30、40、50、60、70、80、90、100、120、140、160、180或200倍,或至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200%、300%、400%或500%。在一些实施方案中,稳定性是本文所述的稳定性。在一些实施方案中,稳定性是血浆稳定性,例如,如任选地根据本文所述的方法测量的。

[0308] 在具体的实施方案中,本发明的铁调素类似物显示比参考铁调素更长的半衰期。在具体的实施方案中,在给定的一组条件(例如温度、pH)下,本发明的铁调素类似物具有至少约5分钟、至少约10分钟、至少约20分钟、至少约30分钟、至少约45分钟、至少约1小时、至少约2小时、至少约3小时、至少约4小时、至少约5小时、至少约6小时、至少约12小时、至少约18小时、至少约1天、至少约2天、至少约4天、至少约7天、至少约10天、至少约2周、至少约3

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

[0309] 在一些实施方案中,半衰期是使用本领域已知的任何合适的方法在体外测量的,例如在一些实施方案中,通过在37℃将铁调素类似物与预热的人血清(Sigma)孵育来测定本发明的铁调素类似物的稳定性。在不同的时间点取样,通常长达24小时,并且通过将血清蛋白中与铁调素类似物分离,然后使用LC-MS分析感兴趣的铁调素类似物的存在来分析样本的稳定性。

[0310] 在一些实施方案中,使用本领域已知的任何合适的方法在体内测量铁调素类似物的稳定性,例如在一些实施方案中,通过将肽或肽二聚体给予对象如人或任何哺乳动物(例如小鼠),然后在不同时间点,通常长达24小时通过抽血从对象获取样本在体内测定铁调素类似物的稳定性。然后按如上所述关于测量半衰期的体外方法来分析样本。在一些实施方案中,通过本文实施例中公开的方法来测定本发明的铁调素类似物的体内稳定性。

[0311] 在一些实施方案中,本发明提供了如本文所述的铁调素类似物,其中与参考铁调素相比,铁调素类似物显示出改善的溶解性或改善的聚集特性。可以通过本领域已知的任何合适的方法来测定溶解度。在一些实施方案中,用于测定溶解度的本领域已知的合适方法包括将肽(例如本发明的铁调素类似物)在各种缓冲液(乙酸盐pH4.0、乙酸盐pH5.0、磷酸盐/柠檬酸盐pH5、磷酸盐柠檬酸盐pH6.0、磷酸盐pH6.0、磷酸盐pH7.0、磷酸盐pH7.5、强PBS pH7.5、Tris pH7.5、Tris pH8.0、甘氨酸pH9.0、水、乙酸pH5.0和本领域其它已知的)中孵育,并使用标准技术测试聚集或溶解度。这些包括但不限于,例如可见沉淀、动态光散射、圆二色性和荧光染料以测量表面疏水性,以及检测聚集或原纤维化。在一些实施方案中,改善的溶解度意味着肽(例如本发明的铁调素类似物)比参考铁调素在给定液体中更可溶。

[0312] 在某些实施方案中,本发明提供了如本文所述的铁调素类似物,在特定溶液或缓冲液(例如在水或本领域已知或本文公开的缓冲液)中,其中比参考铁调素,铁调素类似物显示溶解度增加至少约1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、30、40、50、60、70、80、90、100、120、140、160、180或200倍,或增加至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200%、300%、400%或500%。

[0313] 在某些实施方案中,本发明提供了如本文所述的铁调素类似物,其中铁调素类似物显示出降低的聚集,其中在特定溶液或缓冲液(例如在水中或本领域已知或本文公开的缓冲液)中,肽在溶液中的聚集比参考铁调素低至少约1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、30、40、50、60、70、80、90、100、120、140、160、180或200倍,或低至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200%、300%、400%或500%。

[0314] 在一些实施方案中,本发明提供如本文所述的铁调素类似物,其中相比参考铁调素,铁调素类似物显示减少的降解(即,更多的降解稳定性),例如大于或约10%的减少、大于或约20%的减少、大于或约30%的减少、大于或约40%的减少、或大于或约50%的减少。在一些实施方案中,通过本领域已知的任何合适的方法来测定降解稳定性。在一些实施方案中,用于测定降解稳定性的本领域已知的合适方法包括描述于Hawe等人J Pharm Sci, 101, NO.3, 2012, p895-913的方法,其全部内容并入本文。这样的方法在一些实施方案中用于选择具有增强的保存期限的有效序列。

[0315] 在一些实施方案中,本发明的铁调素类似物是合成制备的。在其它实施方案中,本发明的铁调素类似物是重组制备的。

[0316] 本发明的各种铁调素类似物单体和二聚体肽可以仅由天然氨基酸构成。可选择地,这些铁调素类似物可包括非天然(unnatural/non-natural)氨基酸,包括但不限于修饰的氨基酸。在某些实施方案中,修饰的氨基酸包括经化学修饰以包括非天然存在于氨基酸上的基团(a group/groups)或化学部分的天然氨基酸。本发明的铁调素类似物可另外包括D-氨基酸。此外,本发明的铁调素类似物肽单体和二聚体可以包括氨基酸类似物。在具体的实施方案中,本发明的肽类似物包括本文所述的任何肽类似物,其中所述肽类似物的一个或多个天然氨基酸残基被非天然(unnatural/non-natural)氨基酸或D-氨基酸取代。

[0317] 在某些实施方案中,本发明的铁调素类似物包括一个或多个修饰的或非天然的氨基酸。例如,在某些实施方案中,铁调素类似物包括以下一个或多个:Daba、Dapa、Pen、Sar、Cit、Cav、HLeu、2-Nal、1-Nal、d-1-Nal、d-2-Nal、Bip、Phe(4-OMe)、Tyr(4-OMe)、BhTrp、βhPhe、Phe(4-CF₃)、2-2-二氢化茛、1-1-二氢化茛、环丁基、βhPhe、hLeu、Gla、Phe(4-NH₂)、hPhe、1-Nal、Nle、3-3-二Phe、环丁基-Ala、Cha、Bip、β-Glu、Phe(4-Guan)、高氨基酸、D-氨基酸和各种N-甲基化氨基酸。本领域技术人员将理解,可以产生其它修饰的或非天然的氨基酸,以及具有修饰的或非天然氨基酸的天然氨基酸的各种其他取代以获得相似的期望结果,并且这种取代在本发明的教导和精神内。

[0318] 本发明包括本文所述的任何铁调素类似物,例如游离形式或盐形式。

[0319] 本发明的铁调素类似物包括连接到接头部分(包括本文所述的任何特定接头部分)的本文所述的任何肽单体或二聚体。

[0320] 本发明的铁调素类似物包括这样的肽(例如单体或二聚体),其包含与本文所述的铁调素类似物肽序列(例如,表1-4或表6-15中公开的任一种肽)具有至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%氨基酸序列同一性的肽单体亚基。

[0321] 在某些实施方案中,本发明的肽类似物或本发明的二聚体肽类似物的单体亚基,包含下述部分或由下述部分组成:7至35个氨基酸残基、8至35个氨基酸残基、9至35个氨基酸残基、10至35个氨基酸残基、7至25个氨基酸残基、8至25个氨基酸残基、9至25个氨基酸残基、10至25个氨基酸残基、7至18个氨基酸残基、8至18个氨基酸残基、9至18个氨基酸残基、或10至18个氨基酸残基,以及任选地一个或多个另外的非氨基酸部分,如缀合的化学部分(例如PEG或接头部分)。在具体的实施方案中,铁调素类似物的单体亚基包含下述个数的氨基酸残基或由下述个数的氨基酸残基组成:7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34或35个氨基酸残基。在具体的实施方案中,本发明的铁调素类似物的单体亚基,包含10至18个氨基酸残基,或由10至18个氨基酸残基

组成,并且任选地包含一个或多个另外的非氨基酸部分,如缀合的化学部分(例如PEG或接头部分)。在不同的实施方案中,单体亚基包括下述个数的氨基酸残基,或由下述个数的氨基酸残基组成:7至35个氨基酸残基、9至18个氨基酸残基、或10至18个氨基酸残基。在本文所述的各种化学式的任何具体实施方案中,X包括下述个数的氨基酸残基,或由下述个数的氨基酸残基组成:7至35个氨基酸残基、8至35个氨基酸残基、9至35个氨基酸残基、10至35个氨基酸残基、7至25个氨基酸残基、8至25个氨基酸残基、9至25个氨基酸残基、10至25个氨基酸残基、7至18个氨基酸残基、8至18个氨基酸残基、9至18个氨基酸残基、或10至18个氨基酸残基。

[0322] 肽单体铁调素类似物

[0323] 在某些实施方案中,本发明的铁调素类似物包含单个肽亚基。在某些实施方案中,这些铁调素类似物通过分子内二硫键或其他键形成环化结构。在一个实施方案中,本发明提供了表2-4或表12-15中列出的任一种铁调素类似物的环化形式,条件是类似物具有两个或更多个Cys残基。

[0324] 在某些实施方案中,本发明包括肽类似物,其中肽类似物具有式I的结构:

[0325] $R^1-X-Y-R^2$ (I) (SEQ ID NO:1)

[0326] 或其药学上可接受的盐或溶剂化物,

[0327] 其中 R^1 是氢、C1-C6烷基、C6-C12芳基、C6-C12芳基C1-C6烷基、或C1-C20烷酰基,并且包括任何前述的单独的聚乙二醇化形式或任何前述的作为间隔基的聚乙二醇化形式;

[0328] R^2 是OH或 NH_2 ;和

[0329] X是具有式Ia的肽序列:

[0330] $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}$ (Ia) (SEQ ID NO:2)

[0331] 其中

[0332] X_1 是Asp、Ser、Glu、Ile、pGlu、bhAsp、D-Asp或不存在;

[0333] X_2 是Thr、Ser、Lys、Glu、Pro、Ala或不存在;

[0334] X_3 是His、Ala或Glu;

[0335] X_4 是Phe、Ile或Dpa;

[0336] X_5 是Pro、bhPro、Val、Glu、Sarc或Gly;

[0337] X_6 是Cys或(D)-Cys;

[0338] X_7 不存在,或是除Ile、Cys或(D)-Cys之外的任何氨基酸;

[0339] X_8 不存在,或是除Cys或(D)-Cys之外的任何氨基酸;

[0340] X_9 是Phe、Ala、Ile、Thr、Tyr、Lys、Arg、bhPhe、D-Phe或不存在;和

[0341] X_{10} 是Lys、Phe或不存在;

[0342] Y不存在或存在;且

[0343] 条件是如果Y存在,Y是具有式Im的肽:

[0344] $Y_1-Y_2-Y_3-Y_4-Y_5-Y_6-Y_7-Y_8-Y_9-Y_{10}-Y_{11}-Y_{12}$ (Im) (SEQ ID NO:3)

[0345] 其中

[0346] Y_1 是Gly、PEG3、Sarc、Lys、Glu、Ala、Phe、Pro、Glu、Lys、D-Pro、Val、Ser或不存在;

[0347] Y_2 是Pro、Ala、Cys、Gly或不存在;

[0348] Y_3 是Arg、Lys、Pro、Gly、His、Ala、Trp或不存在;

- [0349] Y4是Ser、Arg、Gly、Trp、Ala、His、Glu、Tyr或不存在；
- [0350] Y5是Lys、Met、Ser、Arg、Ala或不存在；
- [0351] Y6是Gly、Sarc、Glu、Lys、Arg、Ser、Lys、Ile、Ala、Pro、Val或不存在；
- [0352] Y7是Trp、Lys、Gly、Ala、Ile、Val或不存在；
- [0353] Y8是Val、Trp、His、Thr、Gly、Cys、Met、Tyr、Ala、Glu、Lys、Asp、Arg或不存在；
- [0354] Y9是Val、Asp、Asn、Cys、Tyr或不存在；
- [0355] Y10是Cys、Met、Lys、Arg、Tyr或不存在；
- [0356] Y11是Arg、Met、Cys、Lys或不存在；和
- [0357] Y12是Arg、Lys、Ala或不存在。
- [0358] 在某些可选择的实施方案中，X7不存在，或是除Cys或(D)-Cys之外的任何氨基酸。
- [0359] 在某些实施方案中，X7是Arg、Glu、Phe、Gln、Leu、Val、Lys、Ala、Ser、Dapa或不存在。
- [0360] 在某些实施方案中，X8是Ile、Arg、Lys、Ala、Gln、Phe、Glu、Asp、Tyr、Ser、Leu、Val、D-Ile、D-Lys、D-Arg、Dapa或不存在。
- [0361] 在具有本文所列的任何各种化学式的任何肽类似物的某些实施方案中，R¹选自：甲基、乙酰基、甲酰基、苯甲酰基、三氟乙酰基、异戊酰基、异丁酰基、辛烷基，以及月桂酸、十六烷酸和γ-Glu-十六烷酸的缀合的酰胺。
- [0362] 在本文所列的任何化学式的某些实施方案中，其中紧邻羧基至X6的氨基酸残基不是Ile。在具体的实施方案中，其中X6是Cys或(D)-Cys，紧接羧基至X6的氨基酸残基不是Ile。例如，在某些实施方案中，其中X7不存在，X8存在，X8不是Ile，或者其中X7和X8不存在，X9不是Ile。
- [0363] 在本文所列的任何化学式的某些实施方案中，X之一或两者不包含美国专利第8,435,941号中所列的氨基酸序列，或不由美国专利第8,435,941号中所列的氨基酸序列组成。
- [0364] 在式I的肽类似物的某些实施方案中，
- [0365] X是具有式Ib的肽序列：
- [0366] X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10 (Ib) (SEQ ID NO:18)
- [0367] 其中
- [0368] X1是Asp、Glu、Ile、pGlu、bhAsp、D-Asp或不存在；
- [0369] X2是Thr、Ser、Lys、Glu、Pro、Ala或不存在；
- [0370] X3是His、Ala、Glu或Ala；
- [0371] X4是Phe、Ile或Dpa；
- [0372] X5是Pro、bhPro、Sarc或Gly；
- [0373] X6是Cys；
- [0374] X7不存在，或是除Ile、Cys或(D)-Cys之外的任何氨基酸；
- [0375] X8不存在，或是除Cys或(D)-Cys之外的任何氨基酸；
- [0376] X9是Phe、Ile、Tyr、bhPhe或D-Phe或不存在；和
- [0377] X10是Lys、Phe或不存在；
- [0378] 其中Y不存在或存在，条件是如果Y存在，则Y是具有式In的肽：

- [0379] Y1-Y2-Y3-Y4-Y5-Y6-Y7-Y8-Y9-Y10-Y11-Y12 (In) (SEQ ID NO:19)
- [0380] 其中
- [0381] Y1是Gly、PEG3、Sarc、Lys、Glu、Ala、Phe、Pro、Glu、Lys、D-Pro、Val、Ser或不存在；
- [0382] Y2是Pro、Ala、Gly或不存在；
- [0383] Y3是Arg、Lys、Pro、Gly、His、Ala或不存在；
- [0384] Y4是Ser、Arg、Glu或不存在；
- [0385] Y5是Lys、Ser、Met、Arg、Ala或不存在；
- [0386] Y6是Gly、Sarc、Glu、Leu、Phe、His或不存在；
- [0387] Y7是Trp、NMe-Trp、Lys、Thr、His、Gly、Ala、Ile、Val或不存在；
- [0388] Y8是Val、Trp、Ala、Asn、Glu或不存在；
- [0389] Y9是Val、Ala、Asn、Asp、Cys或不存在；
- [0390] Y10是Cys、(D) Cys、Glu或不存在；
- [0391] Y11是Tyr、Met或不存在；和
- [0392] Y12是Trp或不存在。
- [0393] 在某些实施方案中，X7是Arg、Glu、Phe、Gln、Leu、Val、Lys、Ala、Ser、Dapa或不存在。
- [0394] 在某些实施方案中，X7是Arg、Glu、Phe、Gln、Leu、Ile、Val、Lys、Ala、Ser、Dapa或不存在。
- [0395] 在某些可选的实施方案中，X7不存在，或是除Cys或(D)-Cys之外的任何氨基酸。
- [0396] 在某些实施方案中，X8是Ile、Arg、Lys、Ala、Gln、Phe、Glu、Asp、Tyr、Ser、Leu、Val、D-Ile、D-Lys、D-Arg、Dapa或不存在。
- [0397] 在一些实施方案中，式(I)的肽包含至少三个、至少四个、至少五个、至少六个、至少七个、至少八个、至少九个、至少十个、至少十一个、或至少十二个Y中的氨基酸残基。
- [0398] 在一些实施方案中，Y1至Y3存在，且Y4至Y12不存在。
- [0399] 在一些实施方案中，Y1至Y11存在，且Y12不存在。
- [0400] 在一些实施方案中，Y1至Y10存在，且Y11至Y12不存在。
- [0401] 在表2中提供了式I的肽类似物的示例性实施方案。在具体的实施方案中，本发明的肽类似物包含表2中所列的氨基酸序列，或由表2中所示的氨基酸序列组成，或具有表2中所示的结构。表2还提供了示例性肽类似物的EC₅₀值，其通过所附实施例中描述的膜铁转运蛋白内化/降解试验测定。
- [0402] 表2. 示例性肽单体铁调素类似物

SEQ ID No.	序列	EC ₅₀ (nM)
440	Hy-DTHFPCAIF-NH ₂	>1000
441	Hy-DTHFPCRRF-NH ₂	> 10 μM
442	[IDA]-TH-[Dpa]-[bhPro]CRR-[bhPhe]-NH ₂	206
443	Hy-DTHFPCEIF-NH ₂	>1000

[0404]

444	Hy-DTHFPCFIF-NH ₂	1191.8
445	Hy-DTHFPCQIF-NH ₂	>1000
446	Hy-DTHFPCRIF-NH ₂	>1000
447	Hy-[pGlu]-THFPCRKF-NH ₂	>1000
448	Hy-DTHFPCLIIF-NH ₂	> 10 μM
449	Hy-DTHFPCVIF-NH ₂	在 10μM 81%
450	Hy-DTHFPCEIF-NH ₂	在 10μM 19%
451	Hy-DTHFPCRIF-NH ₂	在 10μM 31%
452	Hy-DTHFPCKIF-NH ₂	在 10μM 9%
453	Hy-DTHFPCLF-NH ₂	在 1μM 39%
454	Hy-DTHFPCEF-NH ₂	在 10μM 17%
455	Hy-DTHFPCRIF-NH ₂	在 10μM 31%
456	Hy-DTHFPRRFGPRSKGWVC-NH ₂	>1000
457	[IDA]-THF-[bhPro]-CRR-[bhPhe]GPRSKGWVC-NH ₂	>1000
458	Hy-DTHFPCIFGPRSKGWVC-NH ₂	>1000
459	Hy-DTHFPCRIFGPRSRGWVCK-NH ₂	>1000
460	异戊酸-DTHFPCLIIFGPRSKGWVCK-NH ₂	19.2
461	异戊酸-DTHFPCVIFGPRSKGWVCK-NH ₂	41
462	异戊酸-DTHFPCSIFGPRSKGWVCK-NH ₂	78
463	异戊酸-DTHFPCQIFGPRSKGWVCK-NH ₂	157
464	异戊酸-DTHFPCKIFGPRSKGWVCK-NH ₂	86
465	异戊酸-DTHFPC-[Dapa]-IFGPRSKGWDCK-NH ₂	65
466	异戊酸-DTHFPC-[Dapa]-IFGPRSKGWECK-NH ₂	151
467	异戊酸-DTHFPCKIFGPRSKGWECK-NH ₂	163
468	异戊酸-DTHFPCRRFGPRSKGWVCK-NH ₂	>1000
469	异戊酸-DTHFPCTIFGPRSKGWVCK-NH ₂	未测试

[0405] 在某些实施方案中,本发明包括肽类似物或其药学上可接受的盐或溶剂化物,其中肽类似物具有式II的结构:

[0406] $R^1-X-Y-R^2$ (II) (SEQ ID NO:4),

[0407] 其中R¹是氢、C1-C6烷基、C6-C12芳基、C6-C12芳基C1-C6烷基、或C1-C20烷酰基,并且包括任何前述的单独的聚乙二醇化形式或作为任何前述的间隔基的聚乙二醇化形式;

[0408] R²是OH或NH₂;和

- [0409] X是具有式IIa的肽序列：
- [0410] X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10 (IIa) (SEQ ID NO:5)
- [0411] 其中
- [0412] X1是Asp、Glu或Ile；
- [0413] X2是Thr、Ser或不存在；
- [0414] X3是His；
- [0415] X4是Phe或Dpa；
- [0416] X5是Pro、bhPro、Sarc或Gly；
- [0417] X6是Cys或(D)-Cys；
- [0418] X7是Arg、Glu、Phe、Gln、Leu、Val、Lys、Ile、Ala、Ser、Dapa或不存在；
- [0419] X8是Ile、Arg、Lys、Arg、Ala、Gln、Phe、Glu、Asp、Tyr、Ser、Leu、Val、D-Ile、D-Lys、D-Arg、Dapa或不存在；
- [0420] X9是Phe、Tyr、bhPhe、D-Phe或不存在；和
- [0421] X10是Lys、Phe或不存在；且
- [0422] 其中Y不存在或存在，条件是如果Y存在，则Y是具有式IIIm的肽：
- [0423] Y1-Y2-Y3-Y4-Y5-Y6-Y7-Y8-Y9-Y10-Y11-Y12 (IIIm) (SEQ ID NO:6)
- [0424] 其中
- [0425] Y1是Gly、Sarc、Lys、Glu或不存在；
- [0426] Y2是Pro、Ala、Gly或不存在；
- [0427] Y3是Arg、Lys、Pro、Gly、His、Ala或不存在；
- [0428] Y4是Ser、Arg、Glu或不存在；
- [0429] Y5是Lys、Ser、Met、Arg、Ala或不存在；
- [0430] Y6是Gly、Sarc、Glu、Leu、Phe、His或不存在；
- [0431] Y7是Trp、NMe-Trp、Lys、Thr、His、Gly、Ala、Ile、Val或不存在；
- [0432] Y8是Val、Trp、Ala、Asn、Glu或不存在；
- [0433] Y9是Cys；
- [0434] Y10是Met或不存在；
- [0435] Y11是Tyr、Met或不存在；和
- [0436] Y12是Trp或不存在。
- [0437] 在某些实施方案中，X6是Cys。
- [0438] 在某些实施方案中，X7是Arg、Glu、Phe、Gln、Leu、Val、Lys、Ala、Ser、Dapa或不存在。
- [0439] 在某些实施方案中，Y10不存在。
- [0440] 在某些实施方案中，Y11是Tyr。
- [0441] 在某些实施方案中，Y11不存在。
- [0442] 在某些实施方案中，Y12不存在。
- [0443] 在某些实施方案中，Y11和Y12，或者Y10、Y11和Y12不存在。
- [0444] 在具有本文所列的任何各种化学式的任何肽类似物的某些实施方案中，R¹选自：甲基、乙酰基、甲酰基、苯甲酰基、三氟乙酰基、异戊酰基、异丁酰基、辛烷基，以及月桂酸、十

六烷酸和 γ -Glu-十六烷酸的缀合的酰胺。

[0445] 在本文所列的任何化学式的某些实施方案中,X之一或两者不包含美国专利第8,435,941号中所述的氨基酸序列,或不由美国专利第8,435,941号中所述的氨基酸序列组成。

[0446] 在一些实施方案中,式(II)的肽在Y中包含至少三个、至少四个、至少五个、至少六个、至少七个、至少八个、至少九个、至少十个、至少十一个、或至少十二个氨基酸残基。

[0447] 在一些实施方案中,Y1至Y3存在,且Y4至Y12不存在。

[0448] 在一些实施方案中,Y1至Y11存在,且Y12不存在。

[0449] 在一些实施方案中,Y1至Y10存在,且Y11至Y12不存在。

[0450] 在表3中提供了式II的肽类似物的示例性实施方案。在具体的实施方案中,本发明的肽类似物包含表3中所示的氨基酸序列,或由表3中所示的氨基酸序列组成,或具有表3中所示的结构。表3还提供了示例性肽类似物的EC₅₀值,其通过本文所述的膜铁转运蛋白内化/降解试验测定。

[0451] 表3. 示例性肽单体铁调素类似物

[0452]

SEQ ID No.	序列	膜铁转运蛋白 内化试验 EC ₅₀ (nM)
470	Hy-DTHFPICICI-NH ₂	无活性
471	Hy-DTHFPIICI-NH ₂	无活性
472	Hy-DTHICIAIF-NH ₂	无活性
473	Hy-DTHCPIAIF-NH ₂	无活性
474	Hy-ATHFPCIIIF-NH ₂	>1000
475	Hy-ADHFPCIIIF-NH ₂	>1000
476	Hy-DTHFPCIIIFKC-NH ₂	6398.0
477	Hy-DTHFPCIIIFAC-NH ₂	>1000
478	Hy-DTHFPCIIIFAA-NH ₂	在 1μM 59%
479	Hy-DEHFPCIIIF-NH ₂	在 10μM 34%
480	Hy-DPHFPCIIIF-NH ₂	在 10μM 64%
481	Hy-DTHKPCIIIF-NH ₂	在 10μM 45 %
482	Hy-DTHVPCIIIF-NH ₂	在 10μM 34%
483	Hy-DTHFVCIIIF-NH ₂	在 10μM 50%
484	Hy-DTHFPCIIY-NH ₂	在 10μM 75%
485	Hy-DTHFPCIIT-NH ₂	在 1μM 23%
486	Hy-DTHFPCILY-NH ₂	在 1μM 85%
487	Hy-DTHFPCIEY-NH ₂	在 1μM 8%
488	异戊酸-DTHFPCIIIFGPRSKG-[N-MeTrp]-VC-NH ₂	32
489	异戊酸-DTHFPCIIIF-[Sarc]-PRSKG-[N-MeTrp]-VC-NH ₂	10
490	异戊酸-DTHFPCIIIF-[Sarc]-PHSKG-[N-MeTrp]-VC-NH ₂	9
491	异戊酸-DTHFPCIIIFEPRSKHVVCK-NH ₂	15
492	异戊酸-DTHFPCIIIFEPRSKEVVCK-NH ₂	19
493	异戊酸-DTHFPCIIIFEPRSKLWVCK-NH ₂	7
494	异戊酸-DTHFPCIIIFEPRSKFWVCK-NH ₂	10
495	异戊酸-DTHFPCIKFEPHSK-[Sarc]-CK-NH ₂	28

[0453]

496	异戊酸-DTHFPCIKFKPHSKEWVCE-NH ₂	46
497	异戊酸-DTHFPCIKFEPRSKEWVCK-NH ₂	20
498	异戊酸-DTHFPCIKFEPRSKLWVCK-NH ₂	9
499	异戊酸-DTHFPCIKFEPRSKEWVCK-OH	46
500	异戊酸-DTHFPCIKFEPRS-K(异 Glu-辛酸)-ECK-NH ₂	48
501	Hy-DTHFPCIIFGPRSKGWAVCYW-NH ₂	197
502	Hy-DTHFPICIFGPHRSKGWVCM-NH ₂	149
503	Hy-DTHFPCIIFGPRSKGWVAC-NH ₂	281
504	Hy-DTHFP-[(D)Cys]-IIFGPRSKGWVA-[(D)Cys]-NH ₂	无活性
505	Hy-DTHFPCIIFGPRSKGWVACY-NH ₂	无活性
506	Hy-DTHFPCIIFGPRSRGHVCK-NH ₂	>1000
507	Hy-DTHFPCIIFGPRSKGWNCK-NH ₂	>1000
508	Hy-DTHFPCINFGPRSKGWVCK-NH ₂	>1000
509	Hy-DTHFPCIDFGPRSKGWVCK-NH ₂	>1000
510	异戊酸-DTHFECHFGPRSKGWVCK-NH ₂	>1000
511	Hy-DTHFPCIIFGGPRSRGWVCK-NH ₂	520
512	Hy-DTHFPCIIFGGPRSKGWNCK-NH ₂	404
513	Hy-DTHFPCIIFGGPRSKGWDCK-NH ₂	679
514	异戊酸-DTHFPCIFEPRSKGTCK-NH ₂	57
515	异戊酸-DTHFPCIIF-[PEG3]-C-NH ₂	157
516	异戊酸-DTHAPCIKF-[Sarc]-PRSKGWECK-NH ₂	无活性
517	异戊酸-DTHAPCIKFEPRSK-[Sarc]-WECK-NH ₂	无活性
518	异戊酸-DTHAPCIKFEPRSKEWECK-NH ₂	无活性
519	异戊酸-STHAPCIKFEPRSKGWECK-NH ₂	无活性
520	异戊酸-SKHAPCIKFEPRSKGWECK-NH ₂	无活性
521	异戊酸-DTHFPCIKFEPHSKEWVCK-NH ₂	80
522	异戊酸-DTAFPCIKFEPRSKEC-NH ₂	无活性
523	异戊酸-DTHFGCIKFEPRSKEWVCK-NH ₂	>1000
524	异戊酸-DTEFPCIKFEPRSKEWVCK-NH ₂	>1000
525	异戊酸-DTHFPCIKFEPRS-K(辛酸)-EWVCK-NH ₂	62

[0454]

526	异戊酸-ETHFPICIKFEPRSKIEWVCK-NH ₂	181
-----	---	-----

[0455] 肽二聚体铁调素类似物

[0456] 在某些实施方案中,本发明包括本文所述的单体铁调素类似物的二聚体,包括包含表2-4中所列的任何单体肽序列或结构的二聚体,以及表6-10、表12、表14和表15中所列的序列或结构的某些二聚体。在具体的实施方案中,本发明包括表11或表13中所列的任何单体肽序列或结构的二聚体。这些二聚体落入本文所使用的通用术语“铁调素类似物”的范围内。术语“二聚体”,如在肽二聚体中,是指其中两个肽单体亚基被连接的化合物。本发明的肽二聚体可以包含两个相同的单体亚基产生的同源二聚体,或两个不同的单体亚基产生的异源二聚体。半胱氨酸二聚体包含通过在一个单体亚基的半胱氨酸残基与另一个单体亚基的半胱氨酸残基之间的二硫键所连接的两个肽单体亚基。

[0457] 在具体的实施方案中,肽二聚体铁调素类似物包含一个或多个,例如两个如表4所示或描述于美国专利第8,435,941号(其全部内容通过引用并入本文)中的肽单体亚基。

[0458] 表4. 示例性肽单体亚基

[0459]

SEQ ID NO	序列
376	DTHFPICIFC
377	FPIC
378	HFPIC
379	HFPICI
380	HFPICIF
381	DTHFPIC
381	DTHFPICI
382	DTHFPICIF
383	DTHFPPIAIFC
384	DTHAPICIF
385	DTHAPI-[C-StBu]-IF
386	DTHAPI-[C-tBu]-IF

[0460]

387	DTHFPPIAIF
388	DTHFPISIF
389	DTHFPI-[(D)-Cys]-IF
390	DTHFPI-[高 Cys]-IF
391	DTHFPI-[Pen]-IF
392	DTHFPI-[(D)-Pen]-IF
393	DTHFPI-[Dapa(AcBr)]-IF
394	CDTHFPICIF
395	DTHFPICIF-NHCH ₂ CH ₂ S
396	CHFPICIF
397	HFPICIF-NHCH ₂ CH ₂ S
398	D-[Tle]-H-[Phg]-[Oic]-[Chg]-C-[Chg]-F
399	D-[Tle]-HP-[Oic]-[Chg]-C-[Chg]-F
400	[(D)Phe]-[(D)Ile]-[(D)Cys]-[(D)Ile]-[(D)pro]-[(D)Phe]-[(D)His]-[(D)Thr]-[(D)Asp]
401	[(D)Phe]-[(D)Ile]-[(D)Cys]-[(D)Ile]-[(D)Pro]-[(D)Phe]-[(D)His]
402	鹅去氧胆酸盐 -(PEG11)-[(D)Phe]-[(D)Ile]-[(D)Cys]-[(D)Ile]-[(D)Pro]-[(D)Phe]-[(D)His]-[(D)Thr]-[(D)Asp]
403	熊去氧胆酸盐 -(PEG11)-[(D)Phe]-[(D)Ile]-[(D)Cys]-[(D)Ile]-[(D)Pro]-[(D)Phe]-[(D)His]-[(D)Thr]-[(D)Asp]
404	F-[(D)Ile]-[(D)Cys]-[(D)Ile]-[(D)Pro]-[(D)Phe]-[(D)His]-[(D)Thr]-[(D)Asp]-(Peg11)-GYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFL
405	F-[(D)Ile]-[(D)Cys]-[(D)Ile]-[(D)pro]-[(D)Phe]-[(D)His]-[(D)Thr]-[(D)Asp]-[GP-(Hyp)] ₁₀
406	棕榈酰基 -(PEG11)-[(D)Phe]-[(D)Ile]-[(D)Cys]-[(D)Ile]-[(D)Pro]-[(D)Phe]-[(D)His]-[(D)Thr]-[(D)Asp]
407	2(棕榈酰基

[0461]

	基)-[Dapa]-(Peg11)-[(D)Phe]-[(D)Ile]-[(D)Cys]-[(D)Ile]-[(D)Pro]-[(D)Phe]-[(D)His]-[(D)Thr]-[(D)Asp]
408	DTH-[bhPhe]-PIICIF
409	DTH-[Dpa]-PICI
410	DTH-[Bip]-PICIF
411	DTH[1-Nal]-PICIF
412	DTH-[bhDpa]-PICIF
413	DTHFP-ICI-bhPhe
414	DTHFPICI-[Dpa]
415	DTHFPICI-[Bip]
416	DTHFPICI-[1-Nal]
417	DTHFPICI-[bhDpa]
418	DTH-[Dpa]-PICI-[Dpa]
419	D-[Dpa]-PICIF
420	D-[Dpa]-PICI-[Dpa]
421	DTH-[Dpa]-P-[(D)Arg]-CR-[Dpa]
422	DTH-[Dpa]-P-[(D)Arg]-C-[(D)Arg]-[Dpa]
423	DTH-[Dpa]-[Oic]-ICIF
424	DTH-[Dpa]-[Oic]-ICI-[Dpa]
425	DTH-[Dpa]-PCCC-[Dpa]
426	DTHFPICIF-[(D)Pro]-PK
427	DTHFPICIF-[(D)Pro]-PR
428	DTHFPICIF-[bhPro]-PK
429	DTHFPICIF-[bhPro]-PR
430	DTHFPICIF-[(D)Pro]-[bhPro]-K
431	DTHFPICIF-[(D)-Pro]-[bhPro]-R
432	DTHFPICI-[bhPhe]-[(D)Pro]-PK
433	DTHFPICI-[bhPhe]-[(D)Pro]-PR
434	DTHFPICI-[bhPhe]-[(D)Pro]-[bhPro]-K
435	DTHFPICI-[bhPhe]-[(D)Pro]-[bhPro]-R

[0462]	436	C-[Inp]-[(D)Dpa]-[Amc]-R-[Amc]-[Inp]-[Dpa]-半胱胺
	437	CP-[(D)Dpa]-[Amc]-R-[Amc]-[Inp]-[Dpa]-半胱胺
	438	C-[(D)Pro]-[(D)Dpa]-[Amc]-R-[Amc]-[Inp]-[Dpa]-半胱胺
	439	CG-[(D)Dpa]-[Amc]-R-[Amc]-[Inp]-[Dpa]-半胱胺

[0463] 在一些实施方案中,本发明的铁调素类似物在二聚体构象中是有活性的,特别是当所述肽中存在游离的半胱氨酸残基时。在某些实施方案中,这作为合成的二聚体发生,或特别是当游离半胱氨酸单体肽存在并且在氧化条件下时发生二聚化。在一些实施方案中,二聚体是同源二聚体。在其他实施方案中,二聚体是异源二聚体。

[0464] 在某些实施方案中,本发明的铁调素类似物二聚体是包含本发明的两种铁调素类似物肽单体的肽二聚体。

[0465] 在不同的实施方案中,使用氨基酸的一个字母代码显示表2-4和表6-15中列出的氨基酸序列。其中仅显示铁调素类似单体肽序列,应理解的是根据本教导,在某些实施方案中,将这些铁调素类似单体肽(即单体亚基)二聚化以形成肽二聚体铁调素类似物。因此,在一实施方案中,本发明提供了表2-4、表6-10、表12、表14或表15中任一个所示的肽单体的二聚体。

[0466] 可以通过两个半胱氨酸残基(每个肽单体亚基中一个)之间的二硫键将单体亚基二聚化,或者可以通过如本文定义的另一合适的接头部分将它们二聚化。一些单体亚基显示具有C末端和N末端,二者都包含游离胺。因此,为了产生肽二聚体抑制剂,可以将单体亚基修饰以消除C末端或N末端的游离胺,从而允许在剩下的游离胺处二聚化。此外,在一些情况下,将一个或多个单体亚基的末端用选自下述基团的酰化有机化合物酰化:2-Me-三氟丁基、三氟戊基、乙酰基、辛酮基、丁基、戊基、己基、棕榈基、三氟甲基丁酸、环戊烷羧酸、环丙基乙酸、4-氟苯甲酸、4-氟苯基乙酸、3-苯基丙酸、四氢-2H-吡喃-4-羧酸、琥珀酸和戊二酸。在一些情况下,单体亚基包含游离羧基末端和游离氨基末端,由此使用者可以选择性修饰该亚基以在期望的末端实现二聚化。因此,本领域技术人员将理解,可以选择性修饰本发明的单体亚基以获得用于所需二聚化的单一特异性。

[0467] 还应理解,除非另有说明,本文公开的单体亚基的C末端残基是酰胺。此外,如本领域中通常理解的,应当理解,在某些实施方案中,通过使用具有有胺官能团的侧链的合适的氨基酸促进了在C末端的二聚化。如本领域通常所理解的,关于N-末端残基,通常理解,可以通过末端残基的游离胺实现二聚化,或者可以通过使用具有游离胺的合适的氨基酸侧链来实现二聚化。

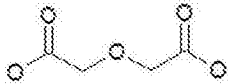
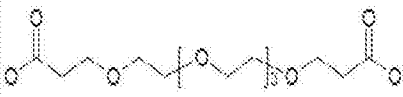
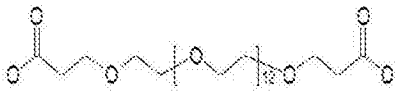
[0468] 此外,应理解,可以将包含在本发明的铁调素类似物肽单体中的一个或多个内部残基的侧链用于二聚化的目的。在这样的实施方案中,如本文所定义的,在一些实施方案中侧链是合适的天然氨基酸(例如Lys),或者可选择地,其是包含适合于缀合的侧链的非天然氨基酸(例如,合适的接头部分)。

[0469] 连接单体亚基的接头部分可以包括与本文的教导相容的任何结构、长度和/或大小。在至少一个实施方案中,接头部分选自由以下物质组成的非限制性组:半胱氨酸、赖氨酸、DIG、PEG4、PEG4-生物素、PEG13、PEG25、PEG1K、PEG2K、PEG3.4K、PEG4K、PEG5K、IDA、IDA-Palm、ADA、Boc-IDA、戊二酸、间苯二甲酸、1,3-苯二乙酸、1,4-苯二乙酸、1,2-苯二乙酸、三

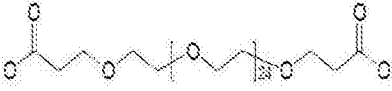
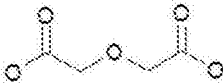
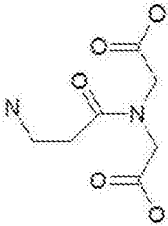
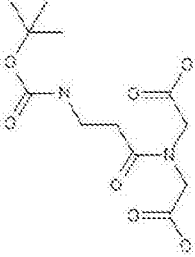
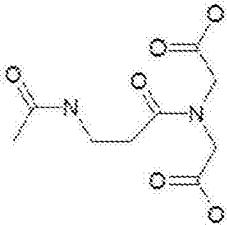
嗪、Boc-三嗪、IDA-生物素、PEG4-生物素、AADA,具有约400Da至约40,000Da分子量的基于合适的脂肪族化合物、芳族化合物、杂芳族化合物和聚乙二醇的接头。表5中提供了合适的接头部分的非限制性实例。

[0470] 表5. 示例性接头部分

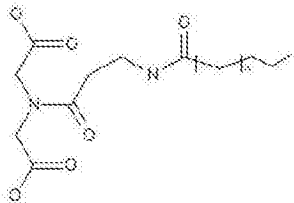
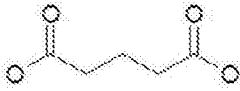
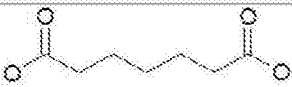
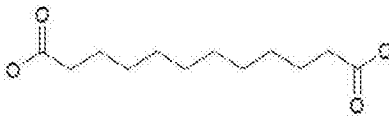
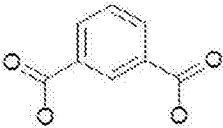
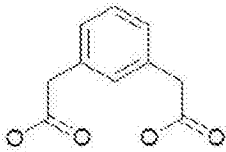
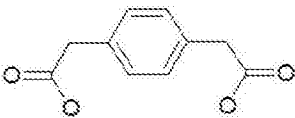
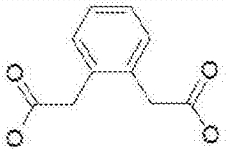
[0471]

缩写词	描述	结构
DIG	二甘醇酸	
PEG4	具有 4 个聚乙二醇单元的双功能 PEG 接头	
PEG13	具有 13 个聚乙二醇单元的双功能 PEG 接头	

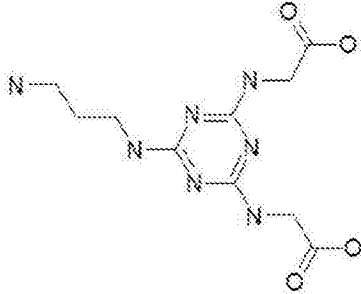
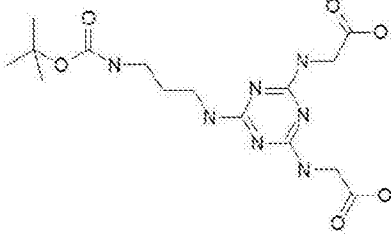
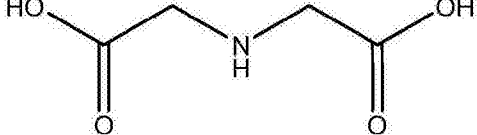
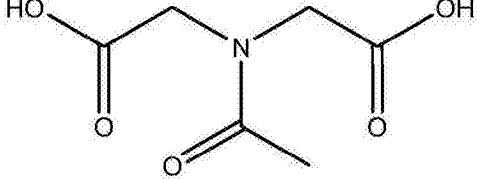
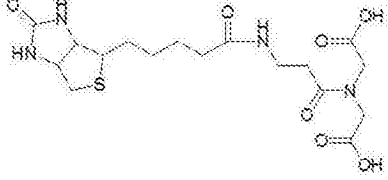
[0472]

PEG25	具有 25 个聚乙二醇单元的双功能 PEG 接头	
PEG1K	具有 1000Da 分子量的聚乙二醇的双功能 PEG 接头	
PEG2K	具有 2000Da 分子量的聚乙二醇的双功能 PEG 接头	
PEG3.4K	具有 3400Da 分子量的聚乙二醇的双功能 PEG 接头	
PEG5K	具有 5000Da 分子量的聚乙二醇的双功能 PEG 接头	
DIG	二甘醇酸	
β -Ala-IDA	β -Ala-亚氨基二乙酸	
Boc- β -Ala-IDA	Boc- β -Ala-亚氨基二乙酸	
Ac- β -Ala-IDA	Ac- β -Ala-亚氨基二乙酸	

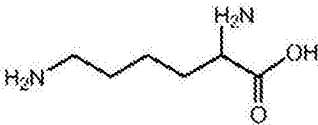
[0473]

棕榈基 -β-Ala-IDA-	棕榈基-β-Ala-亚氨基二乙酸	
GTA	戊二酸	
PMA	庚二酸	
AZA	壬二酸	
DDA	十二烷二酸	
IPA	间苯二甲酸	
1,3-PDA	1,3-苯二乙酸	
1,4-PDA	1,4-苯二乙酸	
1,2-PDA	1,2-苯二乙酸	

[0474]

三嗪	氨基丙基三嗪二酸	
Boc-三嗪	Boc-三嗪二酸	
IDA	亚氨基二乙酸	
AIDA	正乙酰亚氨基乙酸	
生物素-β-Ala-IDA-	N-生物素-β-Ala-亚氨基二乙酸	

[0475]

Lys	赖氨酸	
-----	-----	--

[0476] 本领域技术人员将理解,本文公开的C末端接头部分和N末端接头部分以及内部接头部分是合适的接头部分的非限制性实例,并且本发明可以包括任何合适的接头部分。因此,本发明的一些实施方案包括由两个单体亚基组成的同源二聚体铁调素类似物或异源二聚体铁调素类似物,所述两个单体亚基选自本文(例如表2-4和表11-15)所示的肽,或包含本文所呈现的序列(例如在表2-4和表11-15中),或由本文所呈现的序列(例如在表2-4和表11-15中)组成,其中通过任何合适的接头部分将各个单体亚基的C末端或N末端连接,以提供具有铁调素活性的铁调素类似物二聚体肽。在一些实施方案中,本发明包括由本文所述的两个单体亚基组成的同源二聚体铁调素类似物或异源二聚体铁调素类似物,例如所述两个单体亚基选自表2-4和表11-15中所示的肽,或包含表2-4或表10-15中所呈现的序列,或由表2-4或表10-15中所呈现的序列组成,其中通过与一个或多个内部氨基酸的侧链缀合的任何合适的接头部分将各个单体亚基内部连接,以提供具有铁调素活性的铁调素类似物二聚体肽。

[0477] 在具体的实施方案中,本发明的铁调素类似物包含本文所述的单体铁调素类似物的两种或更多种多肽序列。

[0478] 在一实施方案中,本发明的肽二聚体铁调素类似物包含通过一个或多个接头部分或分子间连接(例如,半胱氨酸二硫桥)连接的两个肽单体亚基,其中每个肽单体亚基是式I的化合物,其中X是;本发明的铁调素类似物包含通过一个或多个接头部分或分子间连接(例如,半胱氨酸二硫桥)来连接的两个肽单体亚基,或其中每个肽单体亚基是式II的化合物,例如,其中X是IIa,且Y是IIm。在某些实施方案中,本发明的肽二聚体铁调素类似物包含通过一个或多个接头部分或分子间连接(例如,半胱氨酸二硫桥)来连接的两个肽单体亚基,其中每个肽单体亚基是式I的化合物,其中X是Ia,且Y是Im,或者其中X是Ib,且Y是In,或每个肽单体亚基是式II的化合物,其中X是IIa,且Y是IIm。在某些实施方案中,肽二聚体是同源二聚体,以及在其他实施方案中,肽二聚体是异源二聚体。

[0479] 在某些实施方案中,肽二聚体抑制剂具有式VII的结构:

[0480] $(R^1-X-Y-R^2)_2-L$ (VII) SEQ ID NO:20

[0481] 或其药学上可接受的盐或溶剂化物,

[0482] 其中每个 R^1 独立地选自:键(例如共价键)、氢、C1-C6烷基、C6-C12芳基、C6-C12芳基C1-C6烷基、C1-C20烷酰基,并且包括任何前述的单独的聚乙二醇化形式或任何前述的作为间隔基的聚乙二醇化形式;

[0483] 每个 R^2 独立地不存在、是键(例如,共价键),或选自OH或 NH_2 ;

[0484] L是接头部分;和

[0485] 其中每个X和Y的组合独立地选自存在于本文所述的任何化学式(如式I、II、III、IV、V或VI)中的那些。在某些实施方案中,每个X和Y组合独立地选自:

[0486] Ia和Im;

[0487] Ib和In;

[0488] IIa和IIIm;

[0489] IIIa-IIIId和IIIIm-IIIs;

[0490] IVa-IVd和IVm-Ivs;

[0491] Va-Vd和Vm-Vn;以及

[0492] Via和Vim。

[0493] 在式VII的肽二聚体的一实施方案中,

[0494] 每个X是独立选择的具有式VIIa的肽序列:

[0495] X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10 (VIIa) SEQ ID NO:21

[0496] 其中

[0497] X1是Asp、Glu、Ile、Lys或不存在;

[0498] X2是Thr、Ser、Lys或不存在;

[0499] X3是His、Ala或Lys;

[0500] X4是Phe、Dpa或Lys;

[0501] X5是Pro、bhPro、Gly或Lys;

[0502] X6是Cys;

[0503] X7是Arg、Glu、Phe、Gln、Leu、Val、Lys、Ala、Ser、Dapa、Thr或不存在;

[0504] X8是Ile、Arg、Lys、Glu、Asn、Asp、Ala、Gln、Phe、Glu、Tyr、Ser、Leu、Val、D-Ile、D-Lys、D-Arg、或Dapa、或不存在;

[0505] X9是Phe、Tyr、bhPhe、Lys或不存在;和

[0506] X10是Lys、Phe或不存在;且

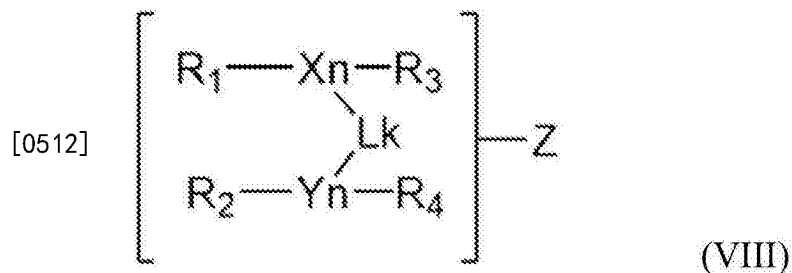
[0507] 每个Y不存在。

[0508] 在式VII的某些可选择实施方案中,X7是Arg、Glu、Phe、Gln、Leu、Val、Ile、Lys、Ala、Ser、Dapa、Thr或不存在。

[0509] 在式VII的某些实施方案中,接头是Lys或Phe。在具体的实施方案中,接头是Lys。

[0510] 在式VII的某些实施方案中,两条X肽通过二硫键连接。

[0511] 在一些实施方案中,本发明提供了可以被分离和/或纯化的肽,其包含下述结构式VIII,基本上由下述结构式VIII组成,或由下述结构式VIII组成:



[0513] 或其药学上可接受的盐或溶剂化物,

[0514] 其中

[0515] R_1 和 R_2 各自独立地选自：键、氢、C1-C6烷基、C6-C12芳基、C6-C12芳基C1-C6烷基和C1-C20烷酰基，并且包括聚乙二醇化形式（例如PEG3至PEG11），单独的或作为任何前述的间隔基；

[0516] R_3 和 R_4 各自独立地选自键、 $-NH_2$ 和 $-OH$ ；

[0517] X_n 和 Y_n 各自独立地选自具有式VIIIa的肽序列：

[0518] $X_1-X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10}$ (VIIIa) SEQ ID NO:22

[0519] 其中

[0520] X_1 是Asp、Glu、Ile、Lys或不存在；

[0521] X_2 是Thr、Ser、Lys或不存在；

[0522] X_3 是His、Ala、Lys；

[0523] X_4 是Phe、Dpa或Lys；

[0524] X_5 是Pro、bhPro、Gly或Lys；

[0525] X_6 是Cys；

[0526] X_7 是Arg、Glu、Phe、Gln、Leu、Val、Lys、Ala、Ser、Dapa、Thr或不存在；

[0527] X_8 是Ile、Arg、Lys、Glu、Asn、Asp、Ala、Gln、Phe、Glu、Tyr、Ser、Leu、Val、D-Ile、D-Lys、D-Arg、或Dapa、或不存在；

[0528] X_9 是Phe、Tyr、bhPhe、Lys或不存在；和

[0529] X_{10} 是Lys、Phe或不存在；

[0530] Lk是接头或不存在；

[0531] X_n 和 Y_n 任选地通过二硫键连接；且

[0532] 其中Z不存在，或者是如本文所述的缀合物（例如，增强铁调素类似物的药物样特性的缀合物，例如延长体内半衰期溶解度等），其中如果Z存在时，其任选地与 X_n 肽（例如，在其N末端、C末端或内部通过侧链如赖氨酸侧链）、 Y_n 肽（例如，在其N末端、C末端或内部经侧链如赖氨酸侧链）或Lk接头连接。

[0533] 在某些实施方案中，Z是棕榈基部分，PEG部分或脂质部分。

[0534] 在某些实施方案中，Lk通过 X_n 中的氨基酸残基和/或 Y_n 中的氨基酸残基连接两个单体亚基。

[0535] 在某些可选择实施方案中， R_1 、 R_2 、 R_3 和 R_4 选自键、 $-NH_2$ 和 $-OH$ 、氢、C1-C6烷基、C6-C12芳基、C6-C12芳基C1-C6烷基和C1-C20烷酰基，并且包括聚乙二醇化形式（例如PEG3至PEG11），单独的或作为任何前述的间隔基；

[0536] 在某些实施方案中，Lk通过 R_3 和/或 R_4 连接两个单体亚基。

[0537] 在某些实施方案中，Lk通过 R_1 和/或 R_2 连接所述单体亚基。

[0538] 在某些实施方案中，Lk通过 R_1 、 X_n 或 R_3 中任一个和 R_2 、 Y_n 和 R_4 中任一个来连接所述单体亚基。

[0539] 在式VIII的某些实施方案中，接头是Lys或Phe。在具体的实施方案中，接头是Lys。

[0540] 在式VIII的某些实施方案中，两个X肽通过二硫键连接。

[0541] 在一些实施方案中，本发明提供了铁调素类似物单体、或者其同源二聚体或异源二聚体，其包括包含序列DTX₁FPC的肽，由序列DTX₁FPC组成的肽，或基本上由序列DTX₁FPC组成的肽，其中 X_1 是任何氨基酸。在一实施方案中，本发明提供了包含序列DTX₁FPCX₂X₃F的肽，

由序列DTX₁FPX₂X₃F组成的肽,或基本上由序列DTX₁FPX₂X₃F组成的肽,其中X₁是任何氨基酸,X₂是任何氨基酸,X₃是任何氨基酸或不存在。在一个这样的实施方案中,X₂是除Cys外的任何氨基酸。在一实施方案中,X₁、X₂和/或X₃是非天然氨基酸。在一些实施方案中,包含这种铁调素类单体的二聚体包含接头(例如,赖氨酸接头)。在一些实施方案中,这样的二聚体包含第一铁调素类似单体和第二单体(这些单体任选地在序列上相同),并且二聚体还包含连接第一单体中的Cys(例如,上述任一化学式中所示的Cys)与第二单体中的Cys的至少一个分子间二硫键桥。

[0542] 在一些实施方案中,本发明提供了铁调素类似物单体、或者其同源二聚体或异源二聚体,其包括包含序列X₁X₂X₃FX₄CY₁X₅F的肽,由序列X₁X₂X₃FX₄CY₁X₅F组成的肽,或基本上由序列X₁X₂X₃FX₄CY₁X₅F组成的肽,其中X₁、X₂和X₃中任一个不存在或是任何氨基酸,X₄和X₅是任何氨基酸,以及Y₁是除D-Cys、D-Ser、D-Ala、Cys(S-tBut)、高C、Pen、(D)Pen、Dap(AcBr)、Inp或D-His之外的任何氨基酸。在一个这样的实施方案中,Y₁是任何脂质氨基酸。在具体的实施方案中,Y₁选自Val、Ile和Leu。在一个实施方案中,Y₁是Ile。在一个实施方案中,X₅是Lys。在一个实施方案中,X₁、X₂、X₃、X₄、X₅和/或Y₁中任一个是非天然氨基酸。在一些实施方案中,包含这种铁调素类单体的二聚体包含接头(例如,赖氨酸接头)。在一些实施方案中,这样的二聚体包含第一铁调素类似单体和第二单体(这些单体任选地在序列上相同),并且二聚体还包含连接第一单体中的Cys(例如,在上述任一化学式中所示的Cys)与第二单体中的Cys的至少一个分子间二硫桥。

[0543] 在一些实施方案中,本发明提供了铁调素类似物单体、或者其同源二聚体或异源二聚体,其包括包含序列DTX₁FX₂CY₁X₃F的肽,由序列DTX₁FX₂CY₁X₃F组成的肽,或基本上由序列DTX₁FX₂CY₁X₃F组成的肽,其中X₁是任何氨基酸,Y₁是除D-Cys、D-Ser、D-Ala、Cys(S-tBut)、高C、Pen、(D)Pen、Dap(AcBr)、Inp或D-His之外的任何氨基酸,并且X₂是任何氨基酸或其不存在。在一个这样的实施方案中,Y₁是除Cys之外的任何氨基酸。在一个这样的实施方案中,Y₁是任何脂质氨基酸。在具体的实施方案中,Y₁选自Val、Ile和Leu。在一个实施方案中,Y₁是Ile。在一个实施方案中,X₁、X₂(如果存在)和/或Y₁是非天然氨基酸。在一些实施方案中,包含这种铁调素类单体的二聚体包含接头(例如,赖氨酸接头)。在一些实施方案中,这样的二聚体包含第一铁调素类似单体和第二单体(这些单体任选地在序列上相同),并且二聚体还包含连接第一单体中的Cys(例如,在上述任一化学式中所示的Cys)与第二单体中的Cys的至少一个分子间二硫桥。

[0544] 在一些实施方案中,本发明提供了包含铁调素类似单体肽的铁调素类似物同源二聚体或异源二聚体,所述肽包含序列DTX₁FPX₂C,由序列DTX₁FPX₂C组成,或基本上由序列DTX₁FPX₂C组成,其中X₁为任何氨基酸。在一个实施方案中,本发明提供了包含铁调素类似单体肽的铁调素类似物同源二聚体或异源二聚体,所述肽包含序列DTX₁FPX₂CX₃F,由序列DTX₁FPX₂CX₃F组成,或基本上由序列DTX₁FPX₂CX₃F组成,其中X₁为任何氨基酸,X₂为任何氨基酸,以及X₃是任何氨基酸或其不存在。在一个这样的实施方案中,X₂是除Cys之外的任何氨基酸。在一个实施方案中,X₁、X₂和/或X₃是非天然氨基酸。在一些实施方案中,包含这种铁调素类单体的二聚体包含接头(例如,赖氨酸接头)。在一些实施方案中,这样的二聚体包含第一铁调素类似单体和第二单体(这些单体任选地在序列上相同),并且所述二聚体还包含连接第一单体中的Cys(例如,在上述任一化学式中所示的Cys)与第二单体中的Cys的至少一个

分子间二硫桥。

[0545] 在一些实施方案中,本发明提供了铁调素类似物单体、或者其同源二聚体或异源二聚体,其包括包含序列 $X_1X_1X_1FX_2X_2CY_1F$ 的肽,由序列 $X_1X_1X_1FX_2X_2CY_1F$ 组成的肽,或基本上由序列 $X_1X_1X_1FX_2X_2CY_1F$ 组成的肽,其中 X_1 不存在或是任何氨基酸, X_2 是任何氨基酸,以及 Y_1 是任何氨基酸。在一个这样的实施方案中, Y_1 是任何天然氨基酸。在具体的实施方案中, Y_1 选自Arg、Val、Ile和Leu。在一个实施方案中, Y_1 是Ile。在一个实施方案中, X_1 、 X_2 和/或 Y_1 是非天然氨基酸。在一些实施方案中,包含这种铁调素类单体的二聚体包含接头(例如,赖氨酸接头)。在一些实施方案中,这样的二聚体包含第一铁调素类似单体和第二单体(这些单体任选地在序列上相同),并且所述二聚体还包含连接第一单体中的Cys(例如,在上述任一化学式中所示的Cys)与第二单体中的Cys的至少一个分子间二硫桥。

[0546] 在一些实施方案中,本发明提供了铁调素类似物单体、或者其同源二聚体或异源二聚体,其包括包含序列 $DTX_1FX_2X_3CY_1F$ 的肽,由序列 $DTX_1FX_2X_3CY_1F$ 组成的肽,或基本上由序列 $DTX_1FX_2X_3CY_1F$ 组成的肽,其中 X_1 是任何氨基酸, X_2 是任何氨基酸或其不存在, X_3 是任何氨基酸,以及 Y_1 是任何氨基酸。在一个这样的实施方案中, Y_1 是任何脂质氨基酸。在具体的实施方案中, Y_1 选自Val、Ile和Leu。在一个实施方案中, Y_1 是Ile。在一个实施方案中, X_1 、 X_2 (如果存在)和/或 Y_1 是非天然氨基酸。在一些实施方案中,包含这种铁调素类单体的二聚体包含接头(例如,赖氨酸接头)。在一些实施方案中,这样的二聚体包含第一铁调素类似单体和第二单体(这些单体任选地在序列上相同),并且所述二聚体还包含连接第一单体中的Cys(例如,在上述任一化学式中所示的Cys)与第二单体中的Cys的至少一个分子间二硫桥。

[0547] 在一些实施方案中,本发明提供一种或多种铁调素类似物单体的同源二聚体或异源二聚体,所述单体包含序列 $X_1X_1X_1FX_2X_2CX_3F$,由序列 $X_1X_1X_1FX_2X_2CX_3F$ 组成,或基本上由序列 $X_1X_1X_1FX_2X_2CX_3F$ 组成,其中 X_1 不存在或是任何氨基酸, X_2 是任何氨基酸,以及 X_3 是任何氨基酸。在一个这样的实施方案中, X_3 是任何天然氨基酸。在具体的实施方案中, X_3 选自Arg、Val、Ile和Leu。在一个实施方案中, X_3 是Ile。在一个实施方案中, X_1 、 X_2 和/或 X_3 是非天然氨基酸。在一些实施方案中,包含这种铁调素类单体的二聚体包含接头(例如,赖氨酸接头)。在一些实施方案中,这样的二聚体包含第一铁调素类似单体和第二单体(这些单体任选地在序列上相同),并且所述二聚体还包含连接第一单体中的Cys(例如,在上述任一化学式中所示的Cys)与第二单体中的Cys的至少一个分子间二硫桥。

[0548] 在一些实施方案中,本发明提供一种或多种铁调素类似物单体的同源二聚体或异源二聚体,所述单体包含序列 $DTX_1FX_2X_3CX_4F$,由序列 $DTX_1FX_2X_3CX_4F$ 组成,或基本上由序列 $DTX_1FX_2X_3CX_4F$ 组成,其中 X_1 是任何氨基酸, X_2 是任何氨基酸或不不存在, X_3 是任何氨基酸,以及 X_4 是任何氨基酸。在一个这样的实施方案中, X_4 是除Cys之外的任何氨基酸。在一个这样的实施方案中, X_4 是任何脂质氨基酸。在具体的实施方案中, X_4 选自Val、Ile和Leu。在一实施方案中, X_4 是Ile。在一个实施方案中, X_1 、 X_2 (如果存在)和/或 X_4 是非天然氨基酸。在一个实施方案中,Cys通过形成二聚体的二硫键连接。在一些实施方案中,包含这种铁调素类单体的二聚体包含接头(例如,赖氨酸接头)。在一些实施方案中,这样的二聚体包含第一铁调素类似单体和第二单体(这些单体任选地在序列上相同),并且所述二聚体还包含连接第一单体中的Cys(例如,在上述任一化学式中所示的Cys)与第二单体中的Cys的至少一个分子间二硫桥。

[0549] 在某些实施方案中,本发明的肽二聚体(例如,铁调素类似物或抑制剂)包含通过一个或多个接头部分或分子间连接(例如半胱氨酸二硫桥)来连接的两个肽单体亚基,其中每个肽单体亚基包含在表2-4或表11-15中任一个中所示的序列。在某些实施方案中,肽二聚体是同源二聚体,并且在其他实施方案中,肽二聚体是异源二聚体。在一些实施方案中,使两个单体二聚化的接头部分或分子间连接被结合至一个或多个单体肽的任何N末端、C末端或内部氨基酸(例如,赖氨酸侧链)。

[0550] 在某些实施方案中,本发明的肽二聚体(例如,铁调素类似物或抑制剂)包含通过一个或多个接头部分或分子间连接(例如半胱氨酸二硫键)来连接的两个肽单体亚基,其中每个肽单体亚基是:式I的化合物,其中X是Ia且Y是Im,或其中X是Ib且Y是In;式II化合物,其中X是IIa且Y为IIIm;或具有在表2-4、表10、表12、表14和表15中任一个所示序列的化合物。在某些实施方案中,肽二聚体是同源二聚体,并且在其他实施方案中,肽二聚体是异源二聚体。在具体的实施方案中,肽二聚体是表6-10和表15中任一项所示的肽二聚体。

[0551] 在某些实施方案中,通过二硫键来连接铁调素类似物肽二聚体的至少两个半胱氨酸残基。

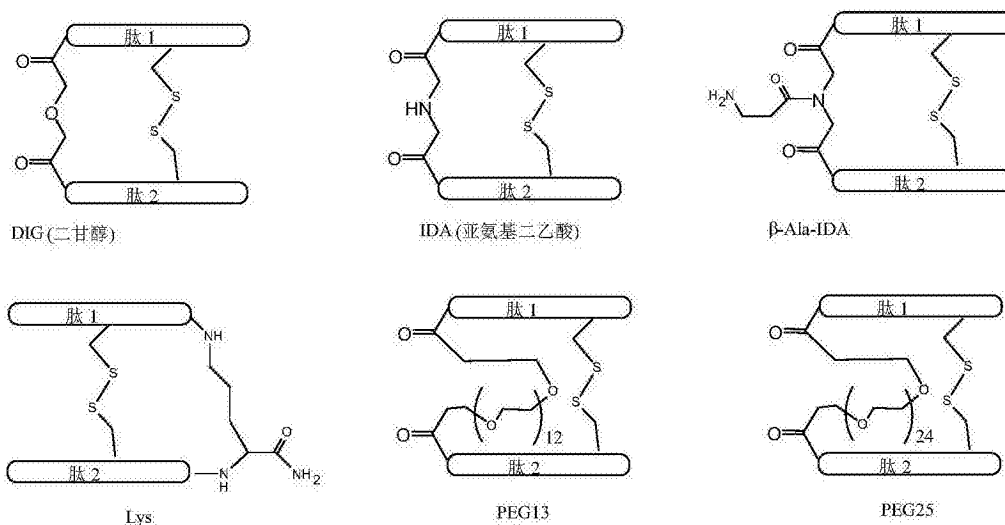
[0552] 在本发明的铁调素类似物肽二聚体的具体实施方案中,接头部分(L)是表5中所示的任何接头。在某些实施方案中,接头是赖氨酸接头、二甘醇接头、亚氨基二乙酸(IDA)接头、 β -Ala-亚氨基二乙酸(β -Ala-IDA)接头、或PEG接头。

[0553] 在任何铁调素类似物肽二聚体的某些实施方案中,通过接头部分连接每个肽单体亚基的N末端。

[0554] 在任何铁调素类似物肽二聚体的某些实施方案中,通过接头部分连接每个肽单体亚基的C末端。

[0555] 在某些实施方案中,通过接头部分连接铁调素类似物肽二聚体的每个肽单体亚单位中包含的一个或多个内部氨基酸残基(例如Lys残基)的侧链。

[0556] 在任何铁调素类似物肽二聚体的某些实施方案中,通过接头部分连接每个肽单体亚基的C末端、N末端或内部氨基酸(例如,赖氨酸侧链),以及通过二硫桥来连接铁调素类似物肽二聚体的至少两个半胱氨酸残基。在一些实施方案中,肽二聚体具有如下所示的一般结构。这些铁调素类似物的非限制性示意性实例显示于下图中:



[0558] 在表6-8中提供了本发明的肽二聚体铁调素类似物的示例性实施例,其具有在所

附实施例中描述的在膜铁转运蛋白内化/降解试验中的体外活性数据。

[0559] 表6. 示例性肽二聚体铁调素类似物

SEQ ID NO	序列	效价
		EC ₅₀ (nM)
527	([pGlu]-THFPCRKF-NH ₂) ₂	在 10 μM 31%
528	(Hy-DTHFPCLF-NH ₂) ₂	297

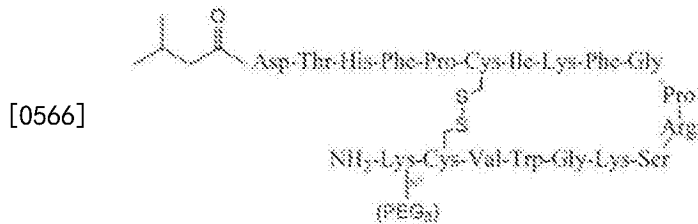
[0561] 表7. 示例性肽二聚体铁调素类似物

SEQ ID NO	序列	效价
		EC ₅₀ (nM)
529	(异戊酸-DTHFPICIFK(棕榈基)-NH ₂) ₂	580
530	(异戊酸-DTHFPCIK(棕榈基)-F-NH ₂) ₂	294
531	(异戊酸-DTHFPCIKFAA-NH ₂) ₂	47

[0563] 表8. 示例性肽二聚体铁调素类似物

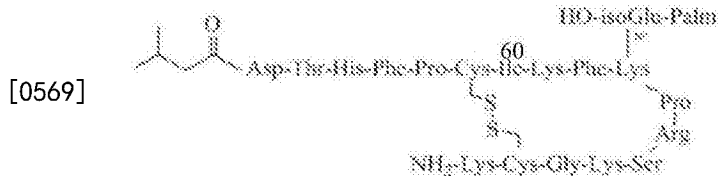
SEQ ID NO	序列	效价
		EC ₅₀ (nM)
532	([(D)Phe]-[(D)Ile]-[(D)Cys]-[(D)Ile]-[(D)Pro]-[(D)Phe]-[(D)His]-[(D)Thr]-[(D)Asp]) ₂	在 10μM 无活性
533	(Hy-DTHFPICIF-NH ₂) ₂	146
534	(Ida-TH-Dpa-bhPro-RCR-bhPhe-PEG3-棕榈基) ₂	31

[0565] 在一实施方案中, 本发明的肽单体具有以下结构:



[0567] SEQ ID NO: 535

[0568] 在一实施方案中, 本发明的肽单体具有以下结构:



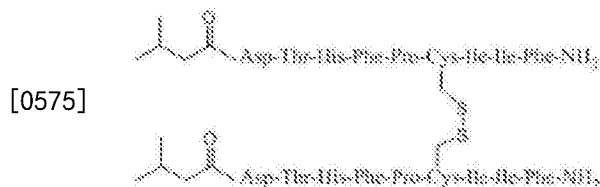
[0570] SEQ ID NO: 536

[0571] 在一实施方案中,本发明的肽二聚体具有以下结构:



[0573] SEQ ID NO:537

[0574] 在一实施方案中,本发明的肽二聚体具有以下结构:



[0576] SEQ ID NO:538

[0577] 在某些实施方案中,肽二聚体抑制剂具有式X的结构:

[0578] $(R^1-X-R^2)_2-L(X)$ SEQ ID NO:23

[0579] 或其药学上可接受的盐或溶剂化物,

[0580] 其中每个 R^1 独立地不存在、是键(例如,共价键),或选自:氢、C1-C6烷基、C6-C12芳基、C6-C12芳基C1-C6烷基、C1-C20烷酰基,并且包括任何前述的单独的聚乙二醇化形式或任何前述的作为间隔基的聚乙二醇化形式;

[0581] 每个 R^2 独立地不存在、是键(例如,共价键),或选自OH或 NH_2 ;

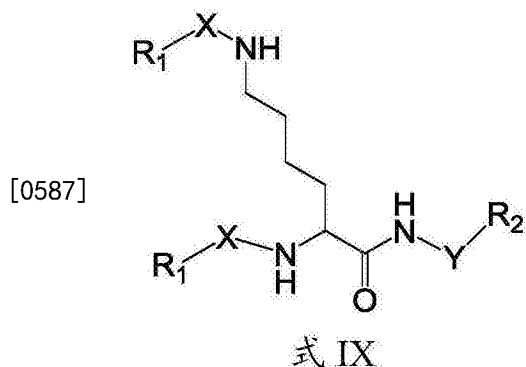
[0582] L是接头部分;和

[0583] 每个X是独立选择的肽单体亚基,其包含下述长度的氨基酸或由下述长度的氨基酸组成:7至35个氨基酸残基度、8至35个氨基酸残基、9至35个氨基酸残基、10至35个氨基酸残基、7至25个氨基酸残基、8至25个氨基酸残基、9至25个氨基酸残基、10至25个氨基酸残基、7至18个氨基酸残基、8至18个氨基酸残基、9至18个氨基酸残基、或10至18个氨基酸残基,各自包含下述序列或由下述序列组成:式I或式II的序列,或表2-4、表12-14中所列的序列,或表15中所列的单体序列。

[0584] 赖氨酸二聚体铁调素类似物

[0585] 在某些实施方案中,本发明的肽二聚体铁调素类似物包含通过赖氨酸接头连接的两个肽单体亚基。

[0586] 在一些实施方案中,本发明的肽二聚体铁调素类似物具有式IX的结构:



- [0588] (SEQ ID NO:24)
- [0589] 或其药学上可接受的盐或溶剂化物,
- [0590] 其中每个X是独立选择的具有式IXa的肽序列:
- [0591] X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10 (IXa) SEQ ID NO:25
- [0592] 其中
- [0593] X1是Asp、Glu、Ile或不存在;
- [0594] X2是Thr、Ser、Pro、Ala或不存在;
- [0595] X3是His、Ala、Glu或Ala;
- [0596] X4是Phe或Dpa;
- [0597] X5是Pro、bhPro、Sarc或Gly;
- [0598] X6是Cys、(D)-Cys、Arg、Glu、Phe、Gln、Leu、Val、Lys、Ala、Ser、Dapa或不存在;
- [0599] X7是Cys、(D)-Cys、Arg、Glu、Phe、Gln、Leu、Val、Lys、Ala、Ser、Dapa或不存在;
- [0600] X8是Ile、Arg、Lys、Ala、Gln、Phe、Glu、Asp、Tyr、Ser、Leu、Val、D-Ile、D-Lys、D-Arg、Dapa或不存在;
- [0601] X9是Phe、Ala、Ile、Thr、Tyr、Lys、Arg、bhPhe、D-Phe或不存在;和
- [0602] X10是Lys、Phe或不存在;
- [0603] 其中每个R¹独立地不存在、是键(例如,共价键),或选自:氢、C1-C6烷基、C6-C12芳基、C6-C12芳基C1-C6烷基、C1-C20烷酰基,并且包括任何前述的单独的聚乙二醇化形式或任何前述的作为间隔基的聚乙二醇化形式;
- [0604] 每个R²独立地不存在、是键(例如,共价键),或选自OH或NH₂;
- [0605] Y不存在或存在,并且条件是如果Y存在,Y是具有式IXm的肽:
- [0606] Y1-Y2-Y3 (IXm) SEQ ID NO:26
- [0607] 其中
- [0608] Y1是Ile、Arg、Lys、Ala、Gln、Phe、Glu、Asp、Tyr、Ser、Leu、Val、D-Ile、D-Lys、D-Arg、Dapa或不存在;
- [0609] Y2是Phe、Ala、Ile、Thr、Tyr、Lys、Arg、bhPhe、D-Phe或不存在;和
- [0610] Y3是Lys、Phe或不存在。
- [0611] 在某些实施方案中,Y1、Y2和Y3中一个或多个是存在。
- [0612] 在某些实施方案中,Y与一个或多个化学取代基缀合,包括但不限于本文所述的任何化学取代基。
- [0613] 在一些实施方案中,通过二硫键将一个或两个X环化。
- [0614] 在一些实施方案中,通过二硫键将两条X肽连接。
- [0615] 在某些实施方案中,本发明的赖氨酸连接的肽二聚体铁调素类似物具有表9中所列的结构。
- [0616] 表9. 示例性赖氨酸连接的二聚体铁调素类似物

[0617]

SEQ ID NO	序列	EC ₅₀ (nM) (n>3)
539	(异丁酸-DTHFPCIKF) ₂ [Lys]K(异-Glu-棕榈基)-NH ₂	24
540	(异戊酸-DTHFPCIKF) ₂ [Lys]K(异-Glu-棕榈基)-NH ₂	14
541	(环己酸-DTHFPCIKF) ₂ [Lys]K(异-Glu-棕榈基)-NH ₂	17
542	(异戊酸-DTHFPCIRF) ₂ [Lys]-K(异-Glu-棕榈基)-NH ₂	4
543	(异戊酸-DTHFPCIKF) ₂ [Lys]-NH ₂	30

[0618]

544	(异戊酸-DTHFPCIKF) ₂ [Lys]-Lys(棕榈基)-NH ₂	17
-----	---	----

[0619] 在某些实施方案中,本发明的赖氨酸连接的肽二聚体铁调素类似物的每个肽单体亚基包含式III的结构或其药学上可接受的盐或溶剂化物,或者由式III的结构或其药学上可接受的盐或溶剂化物组成:

[0620] $R^1-X-Y-R^2$ (III) SEQ ID NO:7,

[0621] 其中 R^1 是氢、C1-C6烷基、C6-C12芳基、C6-C12芳基C1-C6烷基、或C1-C20烷酰基,并且包括任何前述的单独的聚乙二醇化形式或任何前述的作为间隔基的聚乙二醇化形式;

[0622] R^2 是-NH₂或-OH;

[0623] X是具有式(IIIa)的肽序列:

[0624] X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10 (IIIa) SEQ ID NO:8

[0625] 其中

[0626] X1是Asp、Glu、Ala、Gly、Thr、Ile、pGlu、bhAsp、D-Asp、Tyr、Leu或不存在;

[0627] X2是Thr、Ala、Aib、D-Thr、Arg或不存在;

[0628] X3是His、Lys、Ala或D-His;

[0629] X4是Phe、Ala、Dpa或bhPhe;

[0630] X5是Pro、Glu、Ser、Gly、Arg、Lys、Val、Ala、D-Pro、bhPro、Sarc、Abu或不存在;

[0631] X6是Ile、Cys、Arg、Leu、Lys、His、Glu、D-Ile、D-Arg、D-Cys、Val、Ser或Ala;

[0632] X7是Cys、Ile、Ala、Leu、Val、Ser、Phe、Dapa、D-Ile或D-Cys;

[0633] X8是Ile、Lys、Arg、Ala、Gln、Phe、Glu、Asp、Tyr、Ser、Leu、Val、D-Ile、D-Lys、D-Arg或Dapa;

[0634] X9是Phe、Ala、Ile、Tyr、Lys、Arg、bhPhe或D-Phe; 和

[0635] X10是Lys、Phe或不存在;

[0636] Y不存在或存在,并且当存在时,Y是具有式(IIIIm)的肽:

[0637] Y1-Y2-Y3-Y4-Y5-Y6-Y7-Y8-Y9-Y10-Y11-Y12-Y13-Y14-Y15 (IIIIm)

[0638] SEQ ID NO:9

[0639] 其中

- [0640] Y1是Gly、Cys、Ala、Phe、Pro、Glu、Lys、D-Pro、Val、Ser或不存在；
- [0641] Y2是Pro、Ala、Cys、Gly或不存在；
- [0642] Y3是Arg、Lys、Pro、Gly、His、Ala、Trp或不存在；
- [0643] Y4是Ser、Arg、Gly、Trp、Ala、His、Tyr或不存在；
- [0644] Y5是Lys、Met、Arg、Ala或不存在；
- [0645] Y6是Gly、Ser、Lys、Ile、Arg、Ala、Pro、Val或不存在；
- [0646] Y7是Trp、Lys、Gly、Ala、Ile、Val或不存在；
- [0647] Y8是Val、Thr、Gly、Cys、Met、Tyr、Ala、Glu、Lys、Asp、Arg或不存在；
- [0648] Y9是Cys、Tyr或不存在；
- [0649] Y10是Met、Lys、Arg、Tyr或不存在；
- [0650] Y11是Arg、Met、Cys、Lys或不存在；
- [0651] Y12是Arg、Lys、Ala或不存在；
- [0652] Y13是Arg、Cys、Lys、Val或不存在；
- [0653] Y14是Arg、Lys、Pro、Cys、Thr或不存在；和
- [0654] Y15是Thr、Arg或不存在；
- [0655] 其中如果式(III)的肽中不存在Y，则X7是Ile；和
- [0656] 其中所述式(III)化合物任选地在R¹、X或Y上聚乙二醇化。
- [0657] 在某些实施方案中，R¹选自：甲基、乙酰基、甲酰基、苯甲酰基、三氟乙酰基、异戊酰基、异丁酰基、辛烷基，以及月桂酸、十六烷酸和γ-Glu-十六烷酸的缀合的酰胺。
- [0658] 在某些实施方案中，X不包含美国专利第8,435,941号中所列的氨基酸序列，和/或不由美国专利第8,435,941号中所列的氨基酸序列组成。
- [0659] 在一些实施方案中，式(III)的化合物或肽包含两个或更多个半胱氨酸残基，其中通过二硫键将至少两个所述半胱氨酸残基连接。
- [0660] 在一些实施方案中，X是本文所述的式(IIIa)的肽序列，其中
- [0661] X1是Asp、Ala、Ile、pGlu、bhAsp、Leu、D-Asp或不存在；
- [0662] X2是Thr、Ala或D-Thr；
- [0663] X3是His、Lys或D-His；
- [0664] X4是Phe、Ala或Dpa；
- [0665] X5是Pro、Gly、Arg、Lys、Ala、D-Pro或bhPro；
- [0666] X6是Ile、Cys、Arg、Lys、D-Ile或D-Cys；
- [0667] X7是Cys、Ile、Leu、Val、Phe、D-Ile或D-Cys；
- [0668] X8是Ile、Arg、Phe、Gln、Lys、Glu、Val、Leu或D-Ile；
- [0669] X9是Phe或bhPhe；和
- [0670] X10是Lys、Phe或不存在。
- [0671] 在一些实施方案中，X是具有式(IIIb)的肽序列：
- [0672] X1-Thr-His-X4-X5-X6-X7-X8-Phe-X10(IIIb) SEQ ID NO:27
- [0673] 其中
- [0674] X1是Asp、Ile、pGlu、bhAsp或不存在；
- [0675] X4是Phe或Dpa；

- [0676] X5是Pro或bhPro;
- [0677] X6是Ile、Cys或Arg;
- [0678] X7是Cys、Ile、Leu或Val;
- [0679] X8是Ile、Lys、Glu、Phe、Gln或Arg;和
- [0680] X10是Lys、Phe或不存在;
- [0681] 在一些实施方案中,X是如本文所述的式(IIIb)的肽序列,其中
- [0682] X1是Asp、Glu、Ile、pGlu、bhAsp或不存在;
- [0683] X4是Phe或Dpa;
- [0684] X5是Pro或bhPro;
- [0685] X6是Ile、Cys或Arg;
- [0686] X7是Cys、Ile、Leu或Val;
- [0687] X8是Ile、Lys、Glu、Phe、Gln或Arg;和
- [0688] X10是Lys或不存在。
- [0689] 在一些实施方案中,X是具有式(IIIc)的肽序列:
- [0690] X1-Thr-His-X4-X5-Cys-Ile-X8-Phe-X10(IIIc) SEQ ID NO:571
- [0691] 其中
- [0692] X1是Asp、Glu、Ile、pGlu、bhAsp或不存在;
- [0693] X4是Phe或Dpa;
- [0694] X5是Pro或bhPro;
- [0695] X8是Ile、Lys、Glu、Phe、Gln或Arg;和
- [0696] X10是Lys或不存在。
- [0697] 在一些实施方案中,X是具有式(IIId)的肽序列:
- [0698] X1-Thr-His-Phe-X5-Cys-Ile-X8-Phe-X10(IIId) SEQ ID NO:572
- [0699] 其中
- [0700] X1是Asp、Glu或Ile;
- [0701] X4是Phe;
- [0702] X5是Pro或bhPro;
- [0703] X8是Ile、Lys或Phe;和
- [0704] X10不存在。
- [0705] 在一些实施方案中,Y是具有式IIIn的肽序列:
- [0706] Y1-Y2-Y3-Y4-Y5-Y6-Y7-Y8-Cys-Y10(IIIn) SEQ ID NO:573
- [0707] 其中
- [0708] Y1是Gly、Ala、Lys、Pro或D-Pro;
- [0709] Y2是Pro、Ala或Gly;
- [0710] Y3是Arg、Ala、Lys或Trp;
- [0711] Y4是Ser、Gly或Ala;
- [0712] Y5是Lys、Met、Arg或Ala;
- [0713] Y6是Gly、Arg或Ala;
- [0714] Y7是Trp、Ala或不存在;

- [0715] Y8是Val、Thr、Lys、Ala、Glu或不存在;和
- [0716] Y10是Met、Lys或不存在。
- [0717] 在一些实施方案中,Y是如本文所述的式(III_n)的肽序列,,其中
- [0718] Y1是Gly、Ala、Lys、Pro或D-Pro;
- [0719] Y2是Pro、Ala或Gly;
- [0720] Y3是Arg、Ala、Lys或Trp;
- [0721] Y4是Ser、Gly或Ala;
- [0722] Y5是Lys、Met、Arg或Ala;
- [0723] Y6是Gly、Arg或Ala;
- [0724] Y7是Trp或Ala;
- [0725] Y8是Val、Thr、Ala或Glu;和
- [0726] Y10是Met、Lys或不存在。
- [0727] 在一些实施方案中,Y是具有式(III_o)的肽序列:
- [0728] Y1-Y2-Y3-Ser-Lys-Gly-Trp-Y8-Cys-Y10(III_o) SEQ ID NO:574
- [0729] 其中
- [0730] Y1是Gly、Pro或D-Pro;
- [0731] Y2是Pro或Gly;
- [0732] Y3是Arg或Lys;
- [0733] Y8是Val或Thr;和
- [0734] Y10是Met、Lys或不存在。
- [0735] 在一些实施方案中,Y是具有式(III_p)的肽序列:
- [0736] Y1-Cys-Y3-Y4-Arg-Y6-Y7-Y8-Cys-Y10-Y11-Y12-Y13-Y14-Y15(III_p)
- [0737] SEQ ID NO:575
- [0738] 其中
- [0739] Y1是Val、Ala或不存在;
- [0740] Y3是Gly、Pro或不存在;
- [0741] Y4是His、Trp或Tyr;
- [0742] Y6是Ser、Gly或Pro;
- [0743] Y7是Ile、Gly或Lys;
- [0744] Y8是Gly、Met或不存在;
- [0745] Y10是Tyr或Cys;
- [0746] Y11是Arg、Lys、Met或Ala;
- [0747] Y12是Arg或Ala;
- [0748] Y13是Cys或Val或不存在;
- [0749] Y14是Cys、Lys、Pro、Arg、Thr或不存在;和
- [0750] Y15是Arg、Thr或不存在。
- [0751] 在一些实施方案中,Y是具有式(III_q)的肽序列:
- [0752] Val-Cys-Y3-His-Arg-Y6-Y7-Y8-Cys-Tyr-Arg-Y12-Y13-Y14-Y15(III_q)
- [0753] SEQ ID NO

- [0754] 其中
- [0755] Y3是Gly或不存在；
- [0756] Y6是Ser或Pro；
- [0757] Y7是Ile或Lys；
- [0758] Y8是Gly或不存在；
- [0759] Y12是Arg或Ala；
- [0760] Y13是Cys、Val或不存在；
- [0761] Y14是Cys、Arg、Thr或不存在；和
- [0762] Y15是Arg或不存在。
- [0763] 在一些实施方案中，Y是具有式(IIIr)的肽序列：
- [0764] Y1-Pro-Y3-Ser-Y5-Y6-Y7-Y8-Cys-Y10(IIIr) SEQ ID NO:576
- [0765] 其中
- [0766] Y1是Gly、Glu、Val或Lys；
- [0767] Y3是Arg或Lys；
- [0768] Y5是Arg或Lys；
- [0769] Y6是Gly、Ser、Lys、Ile或Arg；
- [0770] Y7是Trp或不存在；
- [0771] Y8是Val、Thr、Asp、Glu或不存在；和
- [0772] Y10是Lys或不存在。
- [0773] 在一些实施方案中，Y是具有式(IIIIs)的肽序列：
- [0774] Y1-Pro-Y3-Ser-Y5-Y6-Y7-Y8-Cys-Y10(IIIIs) SEQ ID NO:577
- [0775] 其中
- [0776] Y1是Glu或Lys；
- [0777] Y3是Arg或Lys；
- [0778] Y5是Arg或Lys；
- [0779] Y6是Gly、Ser、Lys、Ile或Arg；
- [0780] Y7是Trp或不存在；
- [0781] Y8是Val或不存在；和
- [0782] Y10是Lys或不存在。
- [0783] 在一些实施方案中，式(III)的肽包含至少三个、至少四个、至少五个、至少六个、至少七个、至少八个、至少九个、至少十个、至少十一个、至少十二个、至少十三个、至少十四个、或至少十五个Y中的Y残基。
- [0784] 在一些实施方案中，Y1至Y3存在，且Y4至Y15不存在。
- [0785] 在一些实施方案中，Y1至Y11存在，且Y12至Y15不存在。
- [0786] 在一些实施方案中，Y1至Y10存在，且Y11至Y15不存在。
- [0787] 在一些实施方案中，Y8和Y15不存在。
- [0788] 在一些实施方案中，Y3和Y15不存在。
- [0789] 在一些实施方案中，Y3、Y14和Y15不存在。
- [0790] 在一些实施方案中，Y 5不存在。

[0791] 在一些实施方案中,Y1、Y5、Y7、Y12、Y13、Y14和Y15不存在。

[0792] 在一些实施方案中,Y1、Y5和Y7不存在。在一些实施方案中,Y8不存在。在一些实施方案中,Y3不存在。在一些实施方案中,Y1、Y5、Y7和Y11-Y15不存在。在一些实施方案中,Y8和Y11-Y15不存在。在一些实施方案中,Y3和Y11-Y15不存在。

[0793] 在某些实施方案中,本发明的肽二聚体铁调素类似物包含通过赖氨酸接头连接的两个肽单体亚基,所述肽单体亚基包含以下结构式或其药学上可接受的盐或溶剂化物,基本上由以下结构式或其药学上可接受的盐或溶剂化物组成,或由以下结构式或其药学上可接受的盐或溶剂化物组成:

[0794] $R^1-X-Y-R^2$ (IV) SEQ ID NO:10,

[0795] 其中 R^1 是氢、C1-C6烷基、C6-C12芳基、C6-C12芳基C1-C6烷基、或C1-C20烷酰基,并且包括任何前述的单独的聚乙二醇化形式或任何前述的作为间隔基的聚乙二醇化形式;

[0796] R^2 是 $-NH_2$ 或 $-OH$;

[0797] X是具有式(IVa)的肽序列:

[0798] X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10 (IVa) SEQ ID NO:11

[0799] 其中

[0800] X1是Asp、Glu、Ala、Gly、Thr、Ile、pGlu、bhAsp、D-Asp、Tyr、Leu或不存在;

[0801] X2是Thr、Ala、Aib、D-Thr、Arg或不存在;

[0802] X3是His、Lys、Ala或D-His;

[0803] X4是Phe、Ala、Dpa、bhPhe或D-Phe;

[0804] X5是Pro、Glu、Ser、Gly、Arg、Lys、Val、Ala、D-Pro、bhPro、Sarc、Abu或不存在;

[0805] X6是Ile、Cys、Arg、Leu、Lys、His、Glu、D-Ile、D-Arg、D-Cys、Val、Ser或Ala;

[0806] X7是Cys、Ile、Ala、Leu、Val、Ser、Phe、Dapa、D-Ile或D-Cys;

[0807] X8是Ile、Lys、Arg、Ala、Gln、Phe、Glu、Asp、Tyr、Ser、Leu、Val、D-Ile、D-Lys、D-Arg或Dapa;

[0808] X9是Phe、Ala、Ile、Tyr、Lys、Arg、bhPhe或D-Phe;和

[0809] X10是Lys、Phe或不存在;

[0810] 并且条件是,如果Y'不存在,则X7是Ile;和

[0811] Y不存在或是具有式(IVm)的肽:

[0812] Y1-Y2-Y3-Y4-Y5-Y6-Y7-Y8-Y9-Y10-Y11-Y12-Y13-Y14-Y15 (IVm)

[0813] SEQ ID NO:12

[0814] 其中

[0815] Y1是Gly、Cys、Ala、Phe、Pro、Glu、Lys、D-Pro、Val、Ser或不存在;

[0816] Y2是Pro、Ala、Cys、Gly或不存在;

[0817] Y3是Arg、Lys、Pro、Gly、His、Ala、Trp或不存在;

[0818] Y4是Ser、Arg、Gly、Trp、Ala、His、Tyr或不存在;

[0819] Y5是Lys、Met、Arg、Ala或不存在;

[0820] Y6是Gly、Ser、Lys、Ile、Arg、Ala、Pro、Val或不存在;

[0821] Y7是Trp、Lys、Gly、Ala、Ile、Val或不存在;

[0822] Y8是Val、Thr、Gly、Cys、Met、Tyr、Ala、Glu、Lys、Asp、Arg或不存在;

- [0823] Y9是Cys、Tyr或不存在；
- [0824] Y10是Met、Lys、Arg、Tyr或不存在；
- [0825] Y11是Arg、Met、Cys、Lys或不存在；
- [0826] Y12是Arg、Lys、Ala或不存在；
- [0827] Y13是Arg、Cys、Lys、Val或不存在；
- [0828] Y14是Arg、Lys、Pro、Cys、Thr或不存在；和
- [0829] Y15是Thr、Arg或不存在；
- [0830] 其中所述式(IV)化合物任选地在R¹、X或Y上聚乙二醇化；和
- [0831] 其中当所述式(IV)化合物包含两个或更多个半胱氨酸残基时，至少两个所述半胱氨酸残基通过二硫键连接。
- [0832] 在某些实施方案中，R¹选自：甲基、乙酰基、甲酰基、苯甲酰基、三氟乙酰基、异戊酰基、异丁酰基、辛烷基，以及月桂酸、十六烷酸和 γ -Glu-十六烷酸的缀合的酰胺。
- [0833] 在一些实施方案中，R¹是氢、异戊酸、异丁酸或乙酰基。
- [0834] 在某些实施方案中，X之一或两者不包含美国专利第8,435,941号中所列的氨基酸序列，或不由美国专利第8,435,941号中所列的氨基酸序列组成。
- [0835] 在式(IV)的肽化合物的一些实施方案中，X是根据式(IVa)的肽序列，其中
- [0836] X1是Asp、Ala、Ile、pGlu、bhAsp、Leu、D-Asp或不存在；
- [0837] X2是Thr、Ala或D-Thr；
- [0838] X3是His、Lys、D-His或Lys；
- [0839] X4是Phe、Ala、Dpa或D-Phe；
- [0840] X5是Pro、Gly、Arg、Lys、Ala、D-Pro或bhPro；
- [0841] X6是Ile、Cys、Arg、Lys、D-Ile或D-Cys；
- [0842] X7是Cys、Ile、Leu、Val、Phe、D-Ile或D-Cys；
- [0843] X8是Ile、Arg、Phe、Gln、Lys、Glu、Val、Leu或D-Ile；
- [0844] X9是Phe或bhPhe；和
- [0845] X10是Lys、Phe或不存在。
- [0846] 在式IV的肽化合物的一些实施方案中，X是具有式(IVb)的肽序列：
- [0847] X1-Thr-His-X4-X5-X6-X7-X8-Phe-X10(IVb) SEQ ID NO:578
- [0848] 其中
- [0849] X1是Asp、Ile、pGlu、bhAsp或不存在；
- [0850] X4是Phe或Dpa；
- [0851] X5是Pro或bhPro；
- [0852] X6是Ile、Cys或Arg；
- [0853] X7是Cys、Ile、Leu或Val；
- [0854] X8是Ile、Lys、Glu、Phe、Gln或Arg；和
- [0855] X10是Lys或不存在。
- [0856] 在式IV的肽化合物的一些实施方案中，X是具有式(IVc)的肽序列：
- [0857] X1-Thr-His-X4-X5-Cys-Ile-X8-Phe-X10(IVc) SEQ ID NO:579
- [0858] 其中

- [0859] X1是Asp、Ida、pGlu、bhAsp或不存在；
- [0860] X4是Phe或Dpa；
- [0861] X5是Pro或bhPro；
- [0862] X8是Ile、Lys、Glu、Phe、Gln或Arg；和
- [0863] X10是Lys或不存在；
- [0864] 在式IV的肽化合物的一些实施方案中，X是具有式(IVd)的肽序列：
- [0865] X1-Thr-His-Phe-X5-Cys-Ile-X8-Phe-X10(IVd) SEQ ID NO:580
- [0866] 其中
- [0867] X1是Asp、Glu或Ida；
- [0868] X4是Phe；
- [0869] X5是Pro或bhPro；
- [0870] X8是Ile、Lys或Phe；和
- [0871] X10不存在；
- [0872] 在式IV的肽化合物的一些实施方案中，Y是具有式(IVn)的肽序列：
- [0873] Y1-Y2-Y3-Y4-Y5-Y6-Y7-Y8-Cys-Y10(IVn) SEQ ID NO:581
- [0874] 其中
- [0875] Y1是Gly、Ala、Lys、Pro或D-Pro；
- [0876] Y2是Pro、Ala或Gly；
- [0877] Y3是Arg、Ala、Lys或Trp；
- [0878] Y4是Ser、Gly或Ala；
- [0879] Y5是Lys、Met、Arg或Ala；
- [0880] Y6是Gly、Arg或Ala；
- [0881] Y7是Trp或Ala；
- [0882] Y8是Val、Thr、Ala或Glu；和
- [0883] Y10是Met、Lys或不存在。
- [0884] 在式IV的肽化合物的一些实施方案中，Y是具有式(IVo)的肽序列：
- [0885] Y1-Y2-Y3-Ser-Lys-Gly-Trp-Y8-Cys-Y10(IVo) SEQ ID NO:582
- [0886] 其中
- [0887] Y1是Gly、Pro或D-Pro；
- [0888] Y2是Pro或Gly；
- [0889] Y3是Arg或Lys；
- [0890] Y8是Val或Thr；和
- [0891] Y10是Met、Lys或不存在。
- [0892] 在式IV的肽化合物的一些实施方案中，Y是具有式(IVp)的肽序列：
- [0893] Y1-Cys-Y3-Y4-Arg-Y6-Y7-Y8-Cys-Y10-Y11-Y12-Y13-Y14-Y15(IVp)
- [0894] SEQ ID NO:583
- [0895] 其中
- [0896] Y1是Val或Ala或不存在；
- [0897] Y3是Gly、Pro或不存在；

- [0898] Y4是His、Trp或Tyr；
- [0899] Y6是Ser、Gly或Pro；
- [0900] Y7是Ile、Gly或Lys；
- [0901] Y8是Gly、Met或不存在；
- [0902] Y10是Tyr或Cys；
- [0903] Y11是Arg、Lys、Met或Ala；
- [0904] Y12是Arg或Ala；
- [0905] Y13是Cys或Val或不存在；
- [0906] Y14是Cys、Lys、Pro、Arg、Thr或不存在；和
- [0907] Y15是Arg、Thr或不存在。
- [0908] 在式IV的肽化合物的一些实施方案中，Y是具有式(IVq)的肽序列：
- [0909] Val-Cys-Y3-His-Arg-Y6-Y7-Y8-Cys-Tyr-Arg-Y12-Y13-Y14-Y15 (IVq)
- [0910] SEQ ID NO
- [0911] 其中
- [0912] Y3是Gly或不存在；
- [0913] Y6是Ser或Pro；
- [0914] Y7是Ile或Lys；
- [0915] Y8是Gly或不存在；
- [0916] Y12是Arg或Ala；
- [0917] Y13是Cys、Val或不存在；
- [0918] Y14是Cys、Arg、Thr或不存在；和
- [0919] Y15是Arg或不存在。
- [0920] 在式IV的肽化合物的一些实施方案中，Y是具有式(IVr)的肽序列：
- [0921] Y1-Pro-Y3-Ser-Y5-Y6-Y7-Y8-Cys-Y10 (IVr) SEQ ID NO
- [0922] 其中
- [0923] Y1是Gly、Glu、Val或Lys；
- [0924] Y3是Arg或Lys；
- [0925] Y5是Arg或Lys；
- [0926] Y6是Gly、Ser、Lys、Ile或Arg；
- [0927] Y7是Trp或不存在；
- [0928] Y8是Val、Thr、Asp、Glu或不存在；和
- [0929] Y10是Lys或不存在。
- [0930] 在式IV的肽化合物的一些实施方案中，Y是具有式(IVs)的肽序列：
- [0931] Y1-Pro-Y3-Ser-Y5-Y6-Y7-Y8-Cys-Y10 (IVs) SEQ ID NO
- [0932] 其中
- [0933] Y1是Glu或Lys；
- [0934] Y3是Arg或Lys；
- [0935] Y5是Arg或Lys；
- [0936] Y6是Gly、Ser、Lys、Ile或Arg；

- [0937] Y7是Trp或不存在；
- [0938] Y8是Val或不存在；和
- [0939] Y10是Lys或不存在。
- [0940] 在一些实施方案中，式(IV)的肽包含至少三个、至少四个、至少五个、至少六个、至少七个、至少八个、至少九个、至少十个、至少十一个、至少十二个、至少十三个、至少十四个、或至少十五个Y中的Y残基。
- [0941] 在一些实施方案中，Y1至Y3存在，且Y4至Y15不存在。
- [0942] 在一些实施方案中，Y1至Y11存在，且Y12至Y15不存在。
- [0943] 在一些实施方案中，Y1至Y10存在，且Y11至Y15不存在。
- [0944] 在一些实施方案中，Y8和Y15不存在。
- [0945] 在一些实施方案中，Y3和Y15不存在。
- [0946] 在一些实施方案中，Y3、Y14和Y15不存在。
- [0947] 在一些实施方案中，Y 5不存在。
- [0948] 在一些实施方案中，Y1、Y5、Y7、Y12、Y13、Y14和Y15不存在。
- [0949] 在某些实施方案中，本发明的肽二聚体铁调素类似物包含通过赖氨酸接头连接的两个肽单体亚基，所述肽单体亚基包含以下结构式或其药学上可接受的盐或溶剂化物，基本上由以下结构式或其药学上可接受的盐或溶剂化物组成，或由以下结构式或其药学上可接受的盐或溶剂化物组成：
- [0950] $R^1-X-Y-R^2$ (V) SEQ ID NO:13,
- [0951] 其中 R^1 是氢、C1-C6烷基、C6-C12芳基、C6-C12芳基C1-C6烷基、或C1-C20烷酰基，并且包括任何前述的单独的聚乙二醇化形式或任何前述的作为间隔基的聚乙二醇化形式；
- [0952] R^2 是-NH₂或-OH；
- [0953] X是具有式(Va)的肽序列：
- [0954] X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10 (Va) SEQ ID NO:14
- [0955] 其中
- [0956] X1是Asp、Glu、Ala、Gly、Thr、Ile、pGlu、bhAsp、D-Asp、Tyr、Leu或不存在；
- [0957] X2是Thr、Ala、Aib、D-Thr、Arg或不存在；
- [0958] X3是His、Lys、Ala、D-His或Lys；
- [0959] X4是Phe、Ala、Dpa、bhPhe或D-Phe；
- [0960] X5是Pro、Glu、Ser、Gly、Arg、Lys、Val、Ala、D-Pro、bhPro、Sarc、Abu或不存在；
- [0961] X6是Ile、Cys、Arg、Leu、Lys、His、Glu、D-Ile、D-Arg、D-Cys、Val、Ser或Ala；
- [0962] X7是Cys、Ile、Ala、Leu、Val、Ser、Phe、Dapa、D-Ile或D-Cys；
- [0963] X8是Ile、Lys、Arg、Ala、Gln、Phe、Glu、Asp、Tyr、Ser、Leu、Val、D-Ile、D-Lys、D-Arg或Dapa；
- [0964] X9是Phe、Ala、Ile、Tyr、Lys、Arg、bhPhe或D-Phe；和
- [0965] X10是Lys、Phe或不存在；
- [0966] 其中Y存在或不存在，并且条件是，如果Y不存在，则X 7是Ile；
- [0967] 其中所述式V化合物任选地在 R^1 、X或Y上聚乙二醇化；和
- [0968] 其中当所述式V化合物包含两个或更多个半胱氨酸残基时，至少两个所述半胱氨酸

酸残基通过二硫键连接。

[0969] 在某些实施方案中, R^1 选自: 甲基、乙酰基、甲酰基、苯甲酰基、三氟乙酰基、异戊酰基、异丁酰基、辛烷基, 以及月桂酸、十六烷酸和 γ -Glu-十六烷酸的缀合的酰胺。

[0970] 在一些实施方案中, R^1 是氢、异戊酸、异丁酸或乙酰基。

[0971] 在某些实施方案中, X之一或两者不包含美国专利第8,435,941号中所列的氨基酸序列, 或不由美国专利第8,435,941号中所列的氨基酸序列组成。

[0972] 在式(V)化合物的一些实施方案中, X是根据式(Va)的肽序列, 其中

[0973] X1是Asp、Ala、Ile、pGlu、bhAsp、Leu、D-Asp或不存在;

[0974] X2是Thr、Ala或D-Thr;

[0975] X3是His、Lys或D-His;

[0976] X4是Phe、Ala或Dpa;

[0977] X5是Pro、Gly、Arg、Lys、Ala、D-Pro或bhPro;

[0978] X6是Ile、Cys、Arg、Lys、D-Ile或D-Cys;

[0979] X7是Cys、Ile、Leu、Val、Phe、D-Ile或D-Cys;

[0980] X8是Ile、Arg、Phe、Gln、Lys、Glu、Val、Leu或D-Ile;

[0981] X9是Phe或bhPhe; 和

[0982] X10是Lys或不存在。

[0983] 在式(V)化合物的一些实施方案中, X是具有式(Vb)的肽序列:

[0984] X1-Thr-His-X4-X5-X6-X7-X8-Phe-X10 (Vb) SEQ ID NO:584

[0985] 其中

[0986] X1是Asp、Ile、pGlu、bhAsp或不存在;

[0987] X4是Phe或Dpa;

[0988] X5是Pro或bhPro;

[0989] X6是Ile、Cys或Arg;

[0990] X7是Cys、Ile、Leu或Val;

[0991] X8是Ile、Lys、Glu、Phe、Gln或Arg; 和

[0992] X10是Lys、Phe或不存在。

[0993] 在式(V)化合物的一些实施方案中, X是具有式(Ic")的肽序列:

[0994] X1-Thr-His-X4-X5-Cys-Ile-X8-Phe-X10 (Vc) SEQ ID NO:585

[0995] 其中

[0996] X1是Asp、Ile、pGlu、bhAsp或不存在;

[0997] X4是Phe或Dpa;

[0998] X5是Pro或bhPro;

[0999] X8是Ile、Lys、Glu、Phe、Gln或Arg; 和

[1000] X10是Lys或不存在。

[1001] 在式(V)化合物的一些实施方案中, X是具有式(Vd)的肽序列:

[1002] X1-Thr-His-Phe-X5-Cys-Ile-X8-Phe-X10 (Vd) SEQ ID NO:586

[1003] 其中

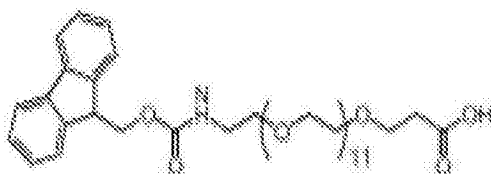
[1004] X1是Asp、Glu或Ile;

- [1005] X4是Phe；
- [1006] X5是Pro或bhPro；
- [1007] X8是Ile、Lys或Phe；和
- [1008] X10不存在。
- [1009] 在式(V)化合物中存在Y的实施方案中，Y是具有式(V_m)的肽：
- [1010] Y1-Y2-Y3-Y4-Y5-Y6-Y7-Y8-Cys-Y10 (V_m) SEQ ID NO:587
- [1011] 其中
- [1012] Y1是Gly、Ala、Lys、Pro或D-Pro；
- [1013] Y2是Pro、Ala或Gly；
- [1014] Y3是Arg、Ala、Lys或Trp；
- [1015] Y4是Ser、Gly或Ala；
- [1016] Y5是Lys、Met、Arg或Ala；
- [1017] Y6是Gly、Arg或Ala；
- [1018] Y7是Trp、Ala或不存在；
- [1019] Y8是Val、Thr、Lys、Ala、Glu或不存在；和
- [1020] Y10是Met、Lys或不存在。
- [1021] 在式(V)化合物的一些实施方案中，Y是根据式(V_m)的肽序列，其中
- [1022] Y1是Gly、Glu、Val或Lys；
- [1023] Y2是Pro；
- [1024] Y3是Arg或Lys；
- [1025] Y4是Ser；
- [1026] Y5是Arg或Lys；
- [1027] Y6是Gly、Ser、Lys、Ile或Arg；
- [1028] Y7是Trp或不存在；
- [1029] Y8是Val、Thr、Asp、Glu或不存在；和
- [1030] Y10是Lys或不存在。
- [1031] 在式(V)化合物的一些实施方案中，Y是根据式(V_m)的肽序列，其中
- [1032] Y1是Glu或Lys；
- [1033] Y2是Pro；
- [1034] Y3是Arg或Lys；
- [1035] Y4是Ser；
- [1036] Y5是Arg或Lys；
- [1037] Y6是Gly、Ser、Lys、Ile或Arg；
- [1038] Y7是Trp或不存在；
- [1039] Y8是Val或不存在；和
- [1040] Y10是Lys或不存在。
- [1041] 在式(V)化合物的一些实施方案中，Y是根据式(V_m)的肽序列，其中
- [1042] Y1是Gly、Pro或D-Pro；
- [1043] Y2是Pro或Gly；

- [1044] Y3是Arg或Lys;
- [1045] Y4是Ser;
- [1046] Y5是Lys;
- [1047] Y6是Gly;
- [1048] Y7是Trp;
- [1049] Y8是Val或Thr;和
- [1050] Y10是Met、Lys或不存在。
- [1051] 在式(V)化合物的一些实施方案中,Y是具有式(Vn)的肽序列:
- [1052] Y1-Y2-Y3-Ser-Lys-Gly-Trp-Y8-Cys-Y10 (Vn) SEQ ID NO:588
- [1053] 其中
- [1054] Y1是Gly、Pro或D-Pro;
- [1055] Y2是Pro或Gly;
- [1056] Y3是Arg或Lys;
- [1057] Y8是Val或Thr;和
- [1058] Y10是Met、Lys或不存在。
- [1059] 在一些实施方案中,式(V)的肽包含至少三个、至少四个、至少五个、至少六个、至少七个、至少八个、至少九个、或至少十个Y中的氨基酸残基。在一些实施方案中,Y1至Y3存在,且Y4至Y10不存在。在一些实施方案中,Y5不存在。在一些实施方案中,Y1、Y5和Y7不存在。在一些实施方案中,Y8不存在。在一些实施方案中,Y3不存在。
- [1060] 在某些实施方案中,本发明的肽二聚体铁调素类似物包含通过赖氨酸接头连接的两个肽单体亚基,所述肽单体亚基包含以下结构式VI或其药学上可接受的盐或溶剂化物,基本上由以下结构式VI或其药学上可接受的盐或溶剂化物组成,或由以下结构式VI或其药学上可接受的盐或溶剂化物组成:
- [1061] $R^1-X-Y-R^2$ (VI) SEQ ID NO:15,
- [1062] 其中 R^1 是氢、C1-C6烷基、C6-C12芳基、C6-C12芳基C1-C6烷基、或C1-C20烷酰基,并且包括任何前述的单独的聚乙二醇化形式或任何前述的作为间隔基的聚乙二醇化形式;
- [1063] R^2 是 $-NH_2$ 或 $-OH$;
- [1064] X是具有式(VIa)的肽序列:
- [1065] X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10 (VIa) SEQ ID NO:16
- [1066] 其中
- [1067] X1是Asp、Glu、Ile或不存在;
- [1068] X2是Thr、Ser、Pro、Ala或不存在;
- [1069] X3是His、Ala或Glu;
- [1070] X4是Phe或Dpa;
- [1071] X5是Pro、bhPro、Sarc或Gly;
- [1072] X6是Cys、(D)-Cys、Arg、Glu、Phe、Gln、Leu、Val、Lys、Ala、Ser、Dapa或不存在;
- [1073] X7是Cys、(D)-Cys、Arg、Glu、Phe、Gln、Leu、Val、Lys、Ala、Ser、Dapa或不存在;
- [1074] X8是Ile、Arg、Lys、Ala、Gln、Phe、Glu、Asp、Tyr、Ser、Leu、Val、D-Ile、D-Lys、D-Arg、Dapa或不存在;

- [1075] X9是Phe、Ala、Ile、Thr、Tyr、Lys、Arg、bhPhe、D-Phe或不存在；和
- [1076] X10是Lys、Phe或不存在；
- [1077] Y不存在或存在，条件是如果Y存在，则Y是具有式(VIm)的肽：
- [1078] Y1-Y2-Y3(VIm) SEQ ID NO:17
- [1079] 其中
- [1080] Y1是Ile、Arg、Lys、Ala、Gln、Phe、Glu、Asp、Tyr、Ser、Leu、Val、D-Ile、D-Lys、D-Arg、Dapa或不存在；
- [1081] Y2是Phe、Ala、Ile、Thr、Tyr、Lys、Arg、bhPhe或D-Phe或不存在；和
- [1082] Y3是Lys、Phe或不存在；
- [1083] 且其中所述式VI的化合物任选地在R¹、X或Y上聚乙二醇化。
- [1084] 如本文所用，术语“具有”是指“包含”、“由...组成”或“基本上由...组成”，并且在每种情况下包括这些各种实施方案中的每一种。
- [1085] 在某些实施方案中，式VI的肽类似物包含两个或更多个半胱氨酸残基，通过二硫键连接至少两个所述半胱氨酸残基。
- [1086] 在某些实施方案中，R¹选自：甲基、乙酰基、甲酰基、苯甲酰基、三氟乙酰基、异戊酰基、异丁酰基、辛烷基，以及月桂酸、十六烷酸和γ-Glu-十六烷酸的缀合的酰胺。
- [1087] 在一些实施方案中，R¹是氢、异戊酸、异丁酸或乙酰基。
- [1088] 在某些实施方案中，X之一或两者不包含美国专利第8,435,941号中所列的氨基酸序列，或不由美国专利第8,435,941号中所列的氨基酸序列组成。
- [1089] 在某些实施方案中，本发明的二聚体铁调素类似物(例如本发明的赖氨酸二聚体铁调素类似物)包含具有如表12中化合物编号1-361中任一个所示的氨基酸序列的一个或两个肽单体，其具有膜铁转运蛋白内化/降解试验的EC₅₀值。
- [1090] 对于包含N-末端PEG11部分的某些化合物，在其合成中使用以下物质：
- [1091] Fmoc-氨基-PEG-丙酸

[1092]



- [1093] 在某些实施方案中，本发明的赖氨酸二聚体类似物具有表10中所示的结构，或包含表10中所示的肽序列，其具有膜铁转运蛋白内化/降解试验的EC₅₀值。
- [1094] 表10. 示例性赖氨酸二聚体肽类似物
- [1095]

SEQ ID NO	序列	EC ₅₀ (nM) (n>3)
539	(异丁酸-DTHFPCIKF) ₂ [Lys]K(异-Glu-棕榈基)-NH ₂	24
540	(异戊酸-DTHFPCIKF) ₂ [Lys]K(异-Glu-棕榈基)-NH ₂	14

[1096]

541	(环己酸-DTHFPCIKF) ₂ [Lys]K(异-Glu-棕榈基)-NH ₂	17
542	(异戊酸-DTHFPCIRF) ₂ [Lys]-K(异-Glu-棕榈基)-NH ₂	4
543	(异戊酸-DTHFPCIKF) ₂ [Lys]-NH ₂	30
544	(异戊酸-DTHFPCIKF) ₂ [Lys]-Lys(棕榈基)-NH ₂	16
570	(异戊酸-DTHFPCIKF) ₂ [Lys]-Lys[(异 Glu(辛酸))-NH ₂	17

[1097] 肽类似物缀合物和类似物

[1098] 在某些实施方案中,本发明的铁调素类似物(包括单体和二聚体),包含一个或多个缀合的化学取代基,例如亲脂性取代基和聚合物部分。不希望受任何特定理论的束缚,据认为亲脂性取代基与血流中的白蛋白结合,从而保护铁调素类似物质免于酶降解,并因此增强其半衰期。此外,据认为聚合物部分增加半衰期并减少血流中的清除,并且在一些情况下增强通过上皮的通透性和在固有层中的保留。此外,还推测这些取代基在一些情况下可以增强通过上皮的通透性和在固有层中的保留。本领域技术人员将很清楚地知道用于制备在本发明的上下文中使用的化合物的合适技术。非限制性合适化学的实例,参见例如W098/08871、W000/55184、W000/55119、Madsen等人(J. Med. Chem. 2007, 50, 6126-32)和Knudsen等人2000(J. Med. Chem. 43, 1664-1669)。

[1099] 在一实施方案中,本发明的铁调素类似物中的一个或多个氨基酸残基(例如Lys残基)的侧链进一步与亲脂性取代基缀合(例如共价连接)。亲脂性取代基可以与氨基酸侧链中的原子共价键合,或者可选择地可以通过一个或多个间隔基与氨基酸侧链缀合。当存在时,间隔基可以提供铁调素类似物和亲脂性取代基之间的间隔。

[1100] 在某些实施方案中,亲脂取代基包含具有4至30个C原子(例如至少8或12个C原子,优选24个C原子或更少,或20个C原子或更少)的烃链。烃链可以是直链或支链的,并且可以是饱和的或不饱和的。在某些实施方案中,烃链被形成与氨基酸侧链或间隔基连接的部分(例如酰基、磺酰基、N原子、O原子或S原子)取代。在一些实施方案中,烃链被酰基取代,因此烃链可以形成烷酰基的一部分,例如棕榈酰基、己酰基、月桂酰基、肉豆蔻酰基或硬脂酰基。

[1101] 亲脂性取代基可以与本发明的铁调素类似物中的任何氨基酸侧链缀合。在某些实施方案中,氨基酸侧链包括羧基、羟基、硫醇基、酰胺基或胺基,用于与间隔基或亲脂取代基形成酯、磺酰酯、硫酯、酰胺或磺酰胺。例如,亲脂性取代基可以与Asn、Asp、Glu、Gln、His、Lys、Arg、Ser、Thr、Tyr、Trp、Cys或Dbu、Dpr或Orn缀合。在某些实施方案中,亲脂性取代基与Lys缀合。本文提供的任何化学式中显示为Lys的氨基酸可以被例如Dbu、Dpr或Orn取代,其中添加亲脂性取代基。

[1102] 在本发明的另外的实施方案中,可选择地或另外地,本发明的铁调素类似物中一个或多个氨基酸残基的侧链可以与聚合物部分缀合,例如为了增加体内溶解度和/或半衰期(例如在血浆中)和/或生物利用度。还已知这种修饰减少治疗性蛋白质和肽的清除(例如肾清除)。

[1103] 如本文所使用的,“聚乙二醇”或“PEG”是通式H-(O-CH₂-CH₂)_n-OH的聚醚化合物。

PEG也称为聚环氧乙烷(PEO)或聚氧乙烯(POE),如本文所使用的,根据它们的分子量PEO、PEE或POG是指环氧乙烷的低聚物或聚合物。这三个名称在化学上是同义的,但是PEG倾向于指分子量低于20,000g/mol的低聚物和聚合物,PEO倾向于指分子量高于20,000g/mol的聚合物,而POE倾向于指任何分子量的聚合物。PEG和PEO是液体或低熔点固体,这取决于它们的分子量。在本公开中,3个名称使用上无差别。PEG通过环氧乙烷的聚合制备,并且可以在300g/mol至10,000,000g/mol的宽分子量范围内商购。尽管具有不同分子量的PEG和PEO可用于不同的应用中,并且由于链长效应具有不同的物理性质(例如粘度),它们的化学性质几乎相同。聚合物部分优选是水溶性(两亲性或亲水性)、无毒的并且是药惰性的。合适的聚合物部分包括聚乙二醇(PEG)、PEG的均聚物或共聚物、PEG的单甲基取代的聚合物(mPEG)或聚氧乙烯甘油(POG)。参见,例如,Int.J.Hematology 68:1(1998);Bioconjugate Chem.6:150(1995);和Crit.Rev.Therap.Drug Carrier Sys.9:249(1992)。还包括为了半衰期延长目的而制备的PEG,例如单活化的、烷氧基封端的聚环氧乙烷(POA's),如单甲氧基封端的聚乙二醇(mPEG's);也考虑了双活性聚氧化乙烯(二醇)或其它PEG衍生物。为了本发明的目的,通常选择合适的聚合物,其重量范围从约200至约40,000将明显变化。在某些实施方案中,使用具有分子量为200至2,000、或200至500的PEG。也可以使用不同形式的PEG,这取决于聚合过程所用的引发剂,例如,普通引发剂是单功能的甲基醚PEG或甲氧基聚(乙二醇),缩写为mPEG。其它合适的引发剂是本领域已知的,并且适合用于本发明。

[1104] 较低分子量PEG也可作为纯低聚物获得,称为单分散、均匀或离散的。这些在本发明的某些实施方案中使用。

[1105] PEG也可以具有不同的几何形状:分支PEG具有从中心核心基团发出的3-10个PEG链;星形PEG具有从中心核心基团发出的10-100个PEG链;并且梳形PEG具有通常接枝到聚合物主链上的多个PEG链。PEG也可以是线性的。通常包括在PEG名称中的数字表示它们的平均分子量(例如,具有 $n=9$ 的PEG将具有约400道尔顿的平均分子量,并且将被标记为PEG 400)。

[1106] 如本文所用,“PEG化”是将PEG结构偶联(例如,共价地)至本发明的铁调素类似物,其在某些实施方案中称为“聚乙二醇化铁调素类似物”。在某些实施方案中,聚乙二醇化侧链的PEG是具有分子量为约200至约40,000的PEG。在一些实施方案中,式I、式I'或式I''的肽的间隔基是PEG化的。在某些实施方案中,PEG化间隔基的PEG是PEG3、PEG4、PEG5、PEG6、PEG7、PEG8、PEG9、PEG10或PEG11。在某些实施方案中,PEG化间隔基的PEG是PEG3或PEG8。

[1107] 在一些实施方案中,本发明包括与PEG缀合的铁调素类似物肽(或其二聚体),PEG通过点击化学或通过本领域已知的任何其它合适的方式例如通过酰胺、硫醇共价连接。在具体的实施方案中,PEG通过酰胺键连接,因此,所用的某些PEG衍生物将被适当地功能化。例如,在某些实施方案中,作为O-(2-氨基乙基)-O'-(2-羧乙基)-十一乙二醇的PEG11,具有用于与本发明的肽连接的胺和羧酸。在某些实施方案中,PEG25含有二酸和25个二醇部分。

[1108] 其它合适的聚合物部分包括聚氨基酸,诸如聚赖氨酸、聚天冬氨酸和聚谷氨酸(参见例如Gombotz等人(1995),Bioconjugate Chem.,vol.6:332-351;Hudecz等人(1992),Bioconjugate Chem.,vol.3,49-57,和Tsukada等人(1984),J.Natl.Cancer Inst.,vol.73,:721-729)。聚合物部分可以是直链或支链的。在一些实施方案中,其具有500-40,000Da(例如500-10,000Da、1000-5000Da、10,000-20,000Da、或20,000-40,000Da)的分子

量。

[1109] 在一些实施方案中,本发明的铁调素类似物可以包含两个或更多个这样的聚合物部分,在这种情况下,所有这些部分的总分子量通常落在上面提供的范围内。

[1110] 在一些实施方案中,聚合物部分可以偶联(通过共价连接)到氨基酸侧链的氨基、羧基或硫醇基。某些实例是Cys残基的硫醇基和Lys残基的 ϵ 氨基,还可以涉及Asp残基和Glu残基的羧基。

[1111] 本领域技术人员将很清楚地知道,可以用于进行偶联反应的合适技术。例如,具有甲氧基的PEG部分可以使用可从Nektar Therapeutics AL购得的试剂通过马来酰亚胺连接与Cys硫醇基偶联。也参见,WO 2008/101017和上文引用的参考文献,以了解合适的化学的细节。马来酰亚胺官能化的PEG也可以与Cys残基的侧链巯基缀合。

[1112] 如本文所使用的,二硫键氧化可以在单个步骤或者是两步方法中发生。如本文所使用的,对于单个氧化步骤,在组装期间通常使用三苯甲基保护基团,允许在断裂期间去保护,随后进行溶液氧化。当需要第二个二硫键时,可以选择天然或选择性氧化。对于需要正交保护基的选择性氧化,使用Acm和三苯甲基(Trityl)作为半胱氨酸的保护基。切割导致去除一个半胱氨酸保护对,允许该对的氧化。然后进行半胱氨酸保护的Acm基团的第二氧化脱保护步骤。对于天然氧化,三苯甲基保护基用于所有半胱氨酸,允许肽的天然折叠。

[1113] 本领域技术人员将清楚地知道可以用于进行氧化步骤的合适技术。

[1114] 示例性铁调素类似物肽单体和铁调素类似物肽二聚体

[1115] 在表2-4、表6-10、表12、表14和表15中显示了本发明的示例性铁调素类似物和铁调素类似物肽二聚体。这些表提供了所选单体铁调素类似物和铁调素类似物肽二聚体的氨基酸序列,并且在一些情况下指示存在于铁调素类似物肽二聚体中的接头部分。根据本文所讨论的方案,合成了所示的多种铁调素类似物单体肽和铁调素类似物肽二聚体。提供了选择的单体铁调素类似物和铁调素类似物肽二聚体在体外诱导人膜铁转运蛋白内化/降解的IC₅₀值。

[1116] 因此,本发明提供了结合或缔合膜铁转运蛋白(例如,人膜铁转运蛋白)的各种铁调素类似物,诱导转运蛋白的内化。

[1117] 在一些实施方案中,本发明提供了本文公开的任一种肽单体的二聚体。在一个实施方案中,本发明提供了铁调素类似物二聚体,其是本文公开的任一单体肽序列的同源二聚体。在一个实施方案中,本发明提供了铁调素类似物二聚体,其是本文公开的任何两种不同单体肽序列的异源二聚体。在一个实施方案中,本发明提供了铁调素类似物二聚体,其是本文公开的任何一种单体肽序列和本领域已知的具有铁调素活性的任何其他肽序列(包括野生型铁调素肽或铁调素类似物)的异源二聚体。在各种实施方案中,本发明提供通过二硫键来二聚化的铁调素同源二聚体和异源二聚体。在各种实施方案中,本发明提供通过接头(例如本文公开的或本领域已知的任何一种或多种接头)来二聚化的铁调素同源二聚体和异源二聚体。在另外的实施方案中,本发明提供通过一个或多个二硫键和一个或多个接头(例如本文公开的或本领域已知的接头中的任一个或多个)来二聚化的铁调素同源二聚体和异源二聚体。

[1118] 本发明的铁调素类似物可以通过本领域技术人员已知的许多技术合成。在某些实施方案中,使用所附实施例中描述的技术来合成、纯化和二聚单体亚基。

[1119] 在相关的实施方案中,本发明包括编码具有式I-IX中任一个所示序列或如在表2-4、表6-10、表12、表14或表15中任一个中所示序列的多肽的多核苷酸。

[1120] 此外,本发明包括包含本发明的多核苷酸的载体,例如表达载体。

[1121] 在某些实施方案中,本发明提供了根据本文公开的任何一个化学式的铁调素类似物单体,或包含这种单体的同源二聚体或异源二聚体,其中所述单体包含在位置6或位置7的Cys,并且其中这种Cys的直接C末端的氨基酸是除了Ile之外的任何天然氨基酸或非天然氨基酸。

[1122] 治疗方法

[1123] 在一些实施方案中,本发明提供治疗患有与铁调素信号失调相关的疾病或病症的对象的方法,其中该方法包括向对象施用本发明的铁调素类似物。在一些实施方案中,施用于对象的铁调素类似物存在于组合物(例如药物组合物)中。在一实施方案中,提供了治疗患有以增加膜铁转运蛋白的活性或表达为特征的疾病或病症的对象的方法,其中该方法包括给个体施用足够量本发明的铁调素类似物或组合物以(部分或完全)结合和刺激对象中的膜铁转运蛋白。在一个实施方案中,提供了治疗患有以铁代谢紊乱为特征的疾病或病症的对象的方法,其中该方法包括向对象施用本发明的铁调素类似物或组合物。

[1124] 在一些实施方案中,本发明的方法包括向有需要的对象提供本发明的铁调素类似物或组合物。在具体的实施方案中,有需要的对象已被诊断为患有或已确定有发生以铁水平失调为特征的疾病或病症的风险(例如,铁代谢的疾病或病症;与铁过载相关的疾病或病症;和与异常铁调素活性或表达相关的疾病或病症)。在具体的实施方案中,对象是哺乳动物(例如,人)。

[1125] 在某些实施方案中,所述疾病或病症是铁代谢疾病,诸如铁过载疾病、铁缺乏病症、铁生物分布障碍或铁代谢的另一障碍和潜在地与铁代谢有关的其它障碍等。在具体的实施方案中,铁代谢疾病是:血色病、HFE突变血色病、膜铁转运蛋白突变血色病、转铁蛋白受体2突变血色病、血幼素突变血色病、铁调素突变血色病、青少年型血色病、新生儿血色病、铁调素缺乏症、输血性铁过载、地中海贫血、中间型地中海贫血、 α -地中海贫血、 β -地中海贫血、铁粒幼红细胞性贫血、卟啉症、迟发性皮肤卟啉症、非洲铁过载、高铁蛋白血症、血浆铜蓝蛋白缺乏症、无转铁蛋白血症、先天性红细胞生成异常性贫血、慢性疾病贫血、炎症性贫血、感染性贫血、低色小红细胞性贫血、缺铁性贫血、铁难治性缺铁性贫血、慢性肾脏疾病贫血、输血依赖性贫血、溶血性贫血、促红细胞生成素抵抗、肥胖的铁缺乏症、其他贫血、过度产生铁调素或诱导其过量产生的良性或恶性肿瘤、铁调素过量的病症、弗里德赖希共济失调、Gracile综合征、哈勒沃登-施帕茨病、威尔逊氏病、肺含铁血黄素沉积症、肝细胞癌、癌症(例如,肝癌)、肝炎、肝硬化、异食癖、慢性肾功能衰竭、胰岛素抵抗、糖尿病、动脉粥样硬化、神经退行性疾病、痴呆、多发性硬化、帕金森病、亨廷顿舞蹈病和阿尔茨海默病。

[1126] 在某些实施方案中,该疾病或病症与铁过载疾病有关,诸如铁血色病、HFE突变血色病、膜铁转运蛋白突变血色病、转铁蛋白受体2突变血色病、血幼素突变血色病、铁调素突变血色病、青少年型血色病、新生儿血色病、铁调素缺乏症、输血性铁过载、地中海贫血、中间型地中海贫血、 α -地中海贫血。

[1127] 在某些实施方案中,所述疾病或病症是通常不被鉴定为与铁相关的疾病或病症。例如,铁调素在小鼠胰腺中高度表达,提示糖尿病(I型或II型)、胰岛素抵抗、葡萄糖耐受不

良和其它病症,可通过治疗潜在的铁代谢紊乱而改善。参见Ilyin,G等人(2003)FEBS Lett.542 22-26,其通过引用并入本文。因此,本发明的肽可用于治疗这些疾病和病症。本领域技术人员能够容易地使用本领域已知的方法确定是否可用本发明的肽治疗给定疾病,这些方法包括WO 2004092405的分析(其通过引用并入本文),以及监测铁调素、血幼素或铁的水平和分析的表达(其是本领域已知的,如在美国专利第7,534,764号中描述的那些,其通过引用并入本文)。

[1128] 在某些实施方案中,所述疾病或病症是绝经后骨质疏松症。

[1129] 在本发明的某些实施方案中,铁代谢疾病是铁过载疾病,其包括遗传性血色病、铁负载贫血、酒精肝疾病、心脏病和/或衰竭、心肌病和慢性丙型肝炎。

[1130] 在具体的实施方案中,这些疾病、病症或适应证中的任何一种由铁调素缺乏或铁过载引起或与其相关。

[1131] 在一些实施方案中,本发明的方法包括向有需要的对象提供本发明的铁调素类似物(即第一治疗剂)与第二治疗剂组合。在某些实施方案中,在将药物组合物施用于对象之前和/或同时和/或之后,将第二治疗剂提供给对象。在具体的实施方案中,第二治疗剂是铁螯合剂。在某些实施方案中,第二治疗剂选自铁螯合剂去铁胺和去铁斯诺(Exjade™)。在另一实施方案中,所述方法包括向对象施用第三治疗剂。

[1132] 本发明提供了包含一种或多种本发明的铁调素类似物的组合物(例如药物组合物)。

[1133] 在某些实施方案中,组合物包含本文公开的两种或多种铁调素类似物。在某些实施方案中,组合选自下述之一:(i)任何两种或多种铁调素类似物肽单体,例如在表2-4、表6-10、表12、表14或表15中公开的那些中的任一种,或其中所示任何单体的二聚体;(ii)表2-4或表6-10、表12、表14或表15中公开的任何两种或多种铁调素类似物肽二聚体;(iii)本文公开的任何一种或多种铁调素类似物肽单体以及本文公开的任何一种或多种铁调素类似物肽二聚体。

[1134] 在某些实施方案中,本发明包括含有一种或多种本发明的铁调素类似物和药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂的药物组合物。药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂是指任何类型无毒的固体、半固体或液体填充剂、稀释剂、封装材料或制剂助剂。可以通过包含各种抗菌剂和抗真菌剂(例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚山梨酸等)来确保防止微生物的作用。还可能包括等渗剂如糖、氯化钠等。

[1135] 术语“药学上可接受的载体”包括任何标准的药物载体。用于治疗用途的药学上可接受的载体在制药领域中是众所周知的,并且描述于例如“Remington's Pharmaceutical Sciences”,第17版,Alfonso R.Gennaro(Ed.),Mark Publishing Company,Easton,PA,USA,1985。例如,可以使用微酸性或生理pH的无菌盐水和磷酸盐缓冲盐水。合适的pH缓冲剂可以是例如磷酸盐、柠檬酸盐、乙酸盐、三(羟甲基)氨基甲烷(TRIS)、N-三(羟甲基)甲基-3-氨基丙磺酸(TAPS)、碳酸氢铵、二乙醇胺、组氨酸、精氨酸、赖氨酸或乙酸盐(例如作为乙酸钠)或其混合物。该术语还包括在美国药典中列出的用于动物(包括人)的任何载体试剂。

[1136] 应当理解,在药物组合物中包含本发明的铁调素类似物(即本发明的一种或多种铁调素类似物肽单体或本发明的一种或多种铁调素类似物肽二聚体)还包括包含本发明铁调素类似物的药学上可接受的盐或溶剂化物。在具体的实施方案中,药物组合物还包含一

种或多种药学上可接受的载体、赋形剂或媒介物。

[1137] 在某些实施方案中,本发明提供了用于治疗本文或其他地方(参见,例如,本文的“治疗方法”部分)公开的多种病症、疾病或障碍的药物组合物,所述组合物包含铁调素类似物或其药学上可接受的盐或溶剂化物。在具体的实施方案中,本发明提供了用于治疗本文或其他地方(参见,例如,本文的“治疗方法”部分)公开的多种病症、疾病或障碍的药物组合物,所述组合物包含铁调素类似物肽单体或其药学上可接受的盐或溶剂化物。在具体的实施方案中,本发明提供了用于治疗本文或其他地方(参见,例如,本文的“治疗方法”部分)公开的多种病症、疾病或障碍的药物组合物,所述组合物包含铁调素类似物肽二聚体或其药学上可接受的盐或溶剂化物。

[1138] 本发明的铁调素类似物可以配制成适于在储存或不储存的情况下施用的药物组合物,其通常包含治疗有效量至少一种本发明的铁调素类似物以及药学上可接受的载体、赋形剂或媒介物。

[1139] 在一些实施方案中,本发明的铁调素类似物药物组合物是单位剂型。在这种形式中,将组合物分成含有适当量的活性组分(component(s))的单位剂量。单位剂型可以作为包装制剂提供,包装含有离散量的制剂,例如小瓶或安瓿中包装的片剂、胶囊或粉末。单位剂型本身也可以是例如胶囊、扁囊剂或片剂,或者它可以是适当数量的任何这些包装形式。单位剂型也可以以单剂量可注射形式提供,例如以包含液相(通常为水性)组合物的笔装置的形式提供。可以将组合物配制成用于任何合适的给药途径和方式,例如本文公开的任何一种途径和给药方式。

[1140] 在具体的实施方案中,将铁调素类似物或包含铁调素类似物的药物组合物悬浮在缓释基质中。本文所用的缓释基质是由通过酶促水解或酸碱水解或通过溶解可降解的材料(通常是聚合物)制成的基质。一旦嵌入体内,基质就受到酶和体液的作用。缓释基质理想地选自生物相容性材料,诸如脂质体、聚交酯(聚乳酸)、聚乙交酯(乙醇酸的聚合物)、聚丙交酯-乙交酯共聚物(乳酸和乙醇酸的共聚物)聚酐、聚(原酸)酯、聚多肽、透明质酸、胶原、硫酸软骨素、羧酸、脂肪酸、磷脂、多糖、核酸、聚氨基酸、氨基酸(如苯丙氨酸、酪氨酸、异亮氨酸)、多核苷酸、聚乙烯丙烯,聚乙烯吡咯烷酮和硅酮。可生物降解基质的一实施方案是聚丙交酯、聚乙交酯或聚丙交酯-乙交酯共聚物(乳酸和乙醇酸的共聚物)之一的基质。

[1141] 在某些实施方案中,组合物经肠内或胃肠外给药。在具体的实施方案中,通过口服、脑池内、阴道内、腹膜内、直肠内、局部(通过粉末、软膏、滴剂、栓剂或透皮贴剂,包括玻璃体内递送、鼻内递送和通过吸入递送)或口腔施用组合物。本文所使用的术语“肠胃外”是指包括静脉内、肌内、腹膜内、胸骨内、皮下、皮内和关节内注射和输注的给药模式。因此,在某些实施方案中,将组合物配制成用于通过这些给药途径中的任一种递送。

[1142] 在某些实施方案中,用于胃肠外注射的药物组合物包含药学上可接受的无菌水性或非水性溶液、分散液、悬浮液或乳液,或用于在即将使用前重构成无菌可注射溶液或分散液的无菌粉末。合适的水性和非水性载体、稀释剂、溶剂或媒介物的实例包括水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇、聚乙二醇等)、羧甲基纤维素及其合适的混合物、 β -环糊精、植物油(如橄榄油)和可注射的有机酯(如油酸乙酯)。可以例如通过使用包衣材料(如卵磷脂),通过在分散体的情况下维持所需的粒度,以及通过使用表面活性剂来维持适当的流动性。这些组合物还可以含有佐剂如防腐剂、润湿剂、乳化剂和分散剂。可注射药物形式的延长吸

收,可以通过包含延迟吸收的试剂(例如单硬脂酸铝和明胶)来实现。

[1143] 可注射的储库形式包括通过在一种或多种可生物降解的聚合物(如聚丙交酯-聚乙交酯、聚(原酸酯)、聚(酸酐)和(聚)二醇如PEG)中形成铁调素类似物的微胶囊基质来制备的那些。根据肽与聚合物的比例和所用特定聚合物的性质,可以控制铁调素类似物的释放速率。储库注射制剂也通过将铁调素类似物包埋在与身体组织相容的脂质体或微乳液中来制备。

[1144] 可注射制剂可以通过例如通过细菌截留过滤器进行过滤,或通过掺入无菌固体组合物形式的灭菌剂来灭菌,所述无菌固体组合物可以在使用前溶解或分散在无菌水或其它无菌可注射介质中。

[1145] 局部给药包括施用于皮肤或粘膜(包括肺和眼睛的表面)。用于局部肺施用的组合物(包括用于吸入和鼻内施用的那些)可以包括水性和非水性制剂中的溶液和悬浮液,并且可以制备为可以加压或不加压的干粉。在非加压粉末组合物中,活性成分可以是细碎形式,可以与较大尺寸的药学上可接受的惰性载体混合使用,所述惰性载体包含具有例如直径达到100微米尺寸的颗粒。合适的惰性载体包括糖如乳糖。

[1146] 可选择地,组合物可以加压并含有压缩气体,诸如氮气或液化气体推进剂。液化的推进剂介质和实际上总组合物可以是使得活性成分在其中不溶解到任何显著的程度。加压组合物还可以含有表面活性剂如液体或固体非离子表面活性剂,或可以是固体阴离子表面活性剂。优选使用钠盐形式的固体阴离子表面活性剂。

[1147] 局部给药的另一种形式是施用于眼睛。本发明的铁调素类似物可以在药学上可接受的眼科媒介物中递送,使得铁调素类似物与眼表保持接触足够的时间段,以使铁调素类似物穿透眼睛的角膜和内部区域(如前房、后房、玻璃体、房水、玻璃体液、角膜、虹膜/睫状体、晶状体、脉络膜/视网膜和巩膜)。药学上可接受的眼科媒介物可以是例如软膏、植物油或封装材料。可选择地,本发明的铁调素类似物可以直接注射到玻璃体和房水中。

[1148] 用于直肠或阴道给药的组合物包括栓剂,其可以通过将本发明的铁调素类似物与合适的非刺激性赋形剂或载体(如可可脂、聚乙二醇或栓剂蜡)混合来制备,所述赋形剂或载体在室温下是固体,但在体温下是液体,并因此在直肠或阴道腔中熔化并释放活性化合物。

[1149] 本发明的铁调素类似物也可以在脂质体或其它基于脂质的载体中施用。如本领域已知的,脂质体通常衍生自磷脂或其他脂质物质。脂质体由分散在水性介质中的单层或多层水合液晶形成。可以使用能够形成脂质体的任何无毒的、生理上可接受的和可代谢的脂质。本发明的脂质体形式的组合物除了本发明的铁调素类似物外,还可以含有稳定剂、防腐剂、赋形剂等。在某些实施方案中,脂质包含磷脂,其包括天然和合成的磷脂酰胆碱(卵磷脂)和丝氨酸。形成脂质体的方法是本领域已知的。

[1150] 适用于肠胃外给药的本发明中使用的药物组合物,可以包含与接受者的血液等渗的肽抑制剂的无菌水溶液和/或悬浮液,通常使用氯化钠、甘油、葡萄糖、甘露醇、山梨醇等。

[1151] 在一些方面,本发明提供了用于口服递送的药物组合物。本发明的组合物和铁调素类似物可以根据本文所述的任何方法、技术和/或递送媒介物来制备以用于口服给药。此外,本领域技术人员将理解,本发明的铁调素类似物可以被修饰或整合到本文中未公开但是本领域熟知的并且相容于采用口服递送肽的系统或递送媒介物中。

[1152] 在某些实施方案中,用于口服给药的制剂可包含人工增加肠壁渗透性的佐剂(例如间苯二酚和/或非离子表面活性剂,诸如聚氧乙烯油基醚和正十六烷基聚乙醚),和/或抑制酶促降解的酶抑制剂(例如,胰腺胰蛋白酶抑制剂、二异丙基氟代磷酸盐(DFF)或抑肽酶)。在某些实施方案中,用于口服给药的固体剂型铁调素类似物可以与至少一种添加剂混合,诸如蔗糖、乳糖、纤维素、甘露醇、海藻糖、棉子糖、麦芽糖醇、葡聚糖、淀粉、琼脂、藻酸盐、壳多糖、壳聚糖、果胶、黄蓍胶、阿拉伯胶、明胶、胶原、酪蛋白、白蛋白、合成或半合成聚合物或甘油酯。这些剂型还可以含有其它类型的添加剂,例如惰性稀释剂、润滑剂(如硬脂酸镁、对羟基苯甲酸酯)、防腐剂(如山梨酸、抗坏血酸、 α -生育酚)、抗氧化剂(如半胱氨酸)、崩解剂、粘合剂、增稠剂、缓冲剂、pH调节剂、甜味剂、调味剂或芳香剂。

[1153] 在具体的实施方案中,与本发明的铁调素类似物相容使用的口服剂型或单位剂量,可包括铁调素类似物和非药物成分或赋形剂的混合物,以及可以被认为是一种成分或包装的其它不可重复使用的材料。口服组合物可以包括液体剂型、固体剂型和半固体剂型中的至少一种。在一些实施方案中,提供了包含有效量的铁调素类似物的口服剂型,其中所述剂型包含丸剂、片剂、胶囊、凝胶、糊剂、饮料、糖浆、软膏和栓剂中的至少一种。在一些情况下,提供了设计和配置为实现铁调素类似物在对象的小肠和/或结肠中延迟释放的口服剂型。

[1154] 在一实施方案中,包含本发明的铁调素类似物的口服药物组合物,包含被设计为用于延缓铁调素类似物在小肠中释放的肠溶包衣。在至少一些实施方案中,提供了药物组合物,其在延迟释放药物制剂中包含本发明的铁调素类似物和蛋白酶抑制剂(如抑肽酶)。在一些情况下,本发明的药物组合物包含在约5.0或更高的pH下可溶于胃液的肠溶衣。在至少一个实施方案中,提供了包含肠溶衣的药物组合物,所述肠溶衣包含具有可解离羧基的聚合物如纤维素衍生物,包括羟丙基甲基纤维素邻苯二甲酸酯、乙酸邻苯二甲酸纤维素和乙酸偏苯三酸纤维素以及纤维素和其它碳水化合物聚合物的类似衍生物。

[1155] 在一实施方案中,在肠溶衣中提供了包含本发明的铁调素类似物的药物组合物,所述肠溶衣被设计为在对象的下胃肠道系统内以受控的方式保护和释放药物组合物并避免全身副作用。除肠溶包衣外,本发明的铁调素类似物可以被包封、包被、接合或以其它方式与任何相容的口服药物递送系统或组分结合。例如,在一些实施方案中,将本发明的铁调素类似物提供在包含聚合物水凝胶、纳米颗粒、微球、胶束和其它脂质系统的至少一种的脂质载体系统中。

[1156] 为了克服小肠中的肽降解,本发明的一些实施方案包含水凝胶聚合物载体系统,其中含有本发明的铁调素类似物,由此水凝胶聚合物保护铁调素类似物在小肠和/或结肠中免于蛋白水解作用。本发明的铁调素类似物可以进一步配制为用于与设计为增加肽的溶解动力学和增强肽的肠吸收的载体系统相容使用。这些方法包括使用脂质体、胶束和纳米颗粒,以增加肽的胃肠道渗透。

[1157] 各种生物响应系统也可以与本发明的一种或多种铁调素类似物混合以提供用于口服递送的药剂。在一些实施方案中,本发明的铁调素类似物与生物反应系统如水凝胶和具有氢键基团的粘膜粘附聚合物(例如PEG、聚(甲基丙酸烯)酸[PMAA]、纤维素、Eudragit[®]、壳聚糖和藻酸盐)组合使用,以提供用于口服给药的治疗剂。其它实施方案包括用于优化或延长本文公开的铁调素类似物的药物停留时间的方法,其中铁调素类似物表面的表面被修

饰以包含通过氢键、具有连接的粘蛋白或/和疏水相互作用的聚合物的粘膜粘附性质。根据本发明的期望特征,这些修饰的肽分子可以在对象内表现出增加的药物停留时间。此外,靶向的粘膜粘附系统可以特异性结合在肠细胞和M细胞表面的受体,从而进一步增加含有铁调素类似物的颗粒的吸收。

[1158] 其它实施方案包括口服递送本发明的铁调素类似物的方法,其中将铁调素类似物与渗透促进剂组合提供给对象,所述渗透促进剂通过增加细胞旁或跨细胞渗透来促进肽跨过肠粘膜的转运。例如,在一实施方案中,渗透促进剂与铁调素类似物组合,其中渗透促进剂包含长链脂肪酸、胆汁盐、两亲性表面活性剂和螯合剂中的至少一种。在一实施方案中,将包含N-[羟基苯甲酰基)氨基]辛酸钠的渗透促进剂用于与本发明的铁调素类似物形成弱的非共价缔合,其中渗透增强剂有利于膜转运,并且一旦到达血液循环就进一步解离。在另一实施方案中,本发明的铁调素类似物与寡精氨酸缀合,从而增加肽对各种细胞类型的细胞渗透。此外,在至少一实施方案中,在本发明的肽抑制剂和选自环糊精(CD)和树枝状聚合物的渗透增强剂之间提供非共价键,其中渗透增强剂降低肽聚集并增加铁调素类似物分子的稳定性和溶解度。

[1159] 本发明的其它实施方案提供了用本发明的具有增加的半衰期的铁调素类似物治疗对象的方法。在一个方面,本发明提供了铁调素类似物,其在体外或体内(例如当施用于人类对象时)具有至少几小时至一天的半衰期,足以每日一次(q.d.)或每日两次(b.i.d.)施用治疗有效量。在另一实施方案中,铁调素类似物具有三天或更长的半衰期,足以每周(q.w.)施用治疗有效量。此外,在另一实施方案中,铁调素类似物具有8天或更长的半衰期,足以每两周(b.i.w.)或每月施用治疗有效量。在另一实施方案中,铁调素类似物被衍生化或被修饰,使得其与未衍生或未修饰的铁调素类似物相比具有更长的半衰期。在另一实施方案中,铁调素类似物含有一种或多种化学修饰以增加血清半衰期。

[1160] 当在本文所述的治疗或递送系统的至少一种中使用时,本发明的铁调素类似物可以以纯形式使用,或者(当这种形式存在时)以药学上可接受的盐形式使用。

[1161] 剂量

[1162] 本发明的铁调素类似物和组合物的总每日使用量,可以由主治医师在合理的医学判断范围内决定。任何具体对象的特定治疗有效剂量水平将取决于多种因素,包括:a)所治疗的病症和病症的严重程度;b)所使用的特定化合物的活性;c)所用的特定组合物,患者的年龄、体重、一般健康状况、性别和饮食;d)所用的特定铁调素类似物的给药时间、给药途径和排泄速率;e)治疗的持续时间;f)与所用的特定铁调素类似物联用或同时使用的药物以及医学领域熟知的类似因素。

[1163] 在具体的实施方案中,以单剂量或分次剂量施用于人或其它哺乳动物宿主的本发明铁调素类似物的总每日剂量,可以是总计例如每日0.0001至300mg/kg体重,或每日1至300mg/kg体重。在某些实施方案中,本发明的铁调素类似物的剂量为:约0.0001至约100mg/kg体重/天,例如每日约0.0005至约50mg/kg体重,例如每日约0.001至约10mg/kg体重,例如每日约0.01至约1mg/kg体重,以一个或多个剂量(如一至三个剂量)施用。

[1164] 在不同的实施方案中,本发明的铁调素类似物可以连续施用(例如通过静脉内施用,或另一种连续药物施用方法),或者可以间隔地,通常以规则的时间间隔施用于对象,这取决于所需的剂量和本领域技术人员针对具体对象选择的药物组合物。定期给药的给药间

隔包括,例如每天一次,每天两次,每两天、三天、四天、五天或六天一次,每周一次或两次,每月一次或两次等。

[1165] 本发明的这种常规的铁调素类似物给药方案在某些情况下,例如在慢性长期给药期间,可以有利地中断一段时间,使得用药对象降低水平或停止服用药物,通常被称为“休药期”。休药期可用于例如维持或恢复对药物的敏感性,特别是在长期慢性治疗期间,或减少药物对长期慢性治疗对象的不良副作用。休药期的时间取决于常规给药方案的时间和采取休药期的目的(例如,恢复药物敏感性和/或减少连续的、长期给药的不良副作用)。在一些实施方案中,休药期可以是药物剂量的减少(例如在一段时间内降低到治疗有效量以下)。在其它实施方案中,在采用相同或不同给药方案(例如以更低或更高的剂量和/或给药频率)再次开始给药之前,停止药物施用一段时间。因此,本发明的休药期可以从众多的时间段和剂量方案中选择。示例性的休药期是两天或更多天、一周或多周、或者一个月或多个月直到约24个月的休药期。因此,例如,本发明的肽、肽类似物或二聚体的常规每日给药方案,可以例如被一周、或两周、或四周的休药期打断,在该时间之后,恢复之前的常规剂量方案(例如每日或每周给药方案)。预期各种其他休药期方案可用于施用本发明的铁调素类似物。

[1166] 因此,铁调素类似物可以通过这样的给药方案递送,所述给药方案包括由分别的休药期分开的两个或多个给药阶段。

[1167] 在每个施用阶段期间,根据预定的施用模式,以治疗有效量向接受对象施用铁调素类似物。给药模式可以包含在给药阶段的持续时间内将药物连续施用至接受对象。可选择地,施用模式可以包含向接受对象施用多个剂量的铁调素类似物,其中所述剂量通过给药间隔间隔开。

[1168] 给药模式可以包含每个给药阶段至少两个剂量、每个给药阶段至少五个剂量、每个给药阶段至少10个剂量、每个给药阶段至少20个剂量、每个给药阶段至少30个或更多个剂量。

[1169] 所述给药间隔可以是规则的给药间隔,其可以如上所述,包括每天一次,每天两次,每两天、三天、四天、五天或六天一次,每周一次或两次,每月一次或两次,或定期和甚至更低频率的给药间隔,这取决于本发明铁调素类似物的具体剂量制剂、生物利用度和药代动力学特征。

[1170] 给药阶段可以具有至少两天、至少一周、至少2周、至少4周、至少一个月、至少2个月、至少3个月、至少6个月或更长的持续时间。

[1171] 在给药模式包含多个剂量的情况下,休药期后续阶段的持续时间比在该给药模式中使用的给药间隔更长。在给药间隔不规则的情况下,休药期阶段的持续时间可以大于在给药阶段过程中剂量之间的平均间隔。可选择地,休药期的持续时间可以比给药阶段期间连续给药之间的最长间隔更长。

[1172] 休药期阶段的持续时间可以是相关给药间隔(或其平均值)的至少两倍,是相关给药间隔或其平均值的至少3倍、至少4倍、至少5倍、至少10倍、或至少20倍。

[1173] 在这些约束下,休药期阶段可以具有至少两天、至少一周、至少2周、至少4周、至少一个月、至少2个月、至少3个月、至少6个月或更长的持续时间,这取决于在先前施用阶段期间的施用模式。

[1174] 给药方案包含至少2个给药阶段。连续给药阶段由分别的休药期阶段隔开。因此，给药方案可以包含至少3个、至少4个、至少5个、至少10个、至少15个、至少20个、至少25个或至少30个或更多个给药阶段，每个由分别的休药期阶段隔开。

[1175] 连续给药阶段可以利用相同的给药模式，尽管这可能不总是期望的或必需的。然而，如果其它药物或活性剂与本发明的铁调素类似物联合施用，则通常在连续施用阶段给予相同的药物或活性剂组合。在某些实施方案中，接受对象是人。

[1176] 在一些实施方案中，本发明提供了包含至少一种本文公开的铁调素类似物的组合物和药物。在一些实施方案中，本发明提供了制备包含至少一种本文公开的铁调素类似物的药物的方法，所述药物用于治疗铁代谢疾病如铁过载疾病。在一些实施方案中，本发明提供了制备包含至少一种如本文公开的铁调素类似物方法，所述药物用于治疗糖尿病(I型或II型)、胰岛素抵抗或葡萄糖耐受不良。还提供了治疗对象(如哺乳动物对象，且优选人类对象)中铁代谢疾病的方法，包括给对象施用至少一种本文公开的铁调素类似物或组合物。在一些实施方案中，以治疗有效量施用铁调素类似物或组合物。还提供了治疗对象(如哺乳动物对象，且优选人类对象)中糖尿病(I型或II型)、胰岛素抵抗或葡萄糖耐受不良的方法，包括给对象施用至少一种本文所公开的铁调素类似物或组合物。在一些实施方案中，以治疗有效量施用铁调素类似物或组合物。

[1177] 在一些实施方案中，本发明提供了如本文所公开的用于制造铁调素类似物或铁调素类似物组合物(例如药物组合物)的方法。

[1178] 在一些实施方案中，本发明提供了包含至少一种本发明的铁调素类似物或其药学上可接受的盐或溶剂化物的装置，用于将铁调素类似物递送至对象。

[1179] 在一些实施方案中，本发明提供了结合膜铁转运蛋白或诱导膜铁转运蛋白内化和降解的方法，其包括将膜铁转运蛋白与至少一种本文公开的铁调素类似物或铁调素类似物组合物接触。

[1180] 在一些实施方案中，本发明提供了试剂盒，其包含与试剂、装置、说明材料或其组合一起包装的本文公开的至少一种铁调素类似物或铁调素类似物组合物(例如药物组合物)。

[1181] 在一些实施方案中，本发明提供了通过植入物或渗透泵、通过药筒或微型泵、或通过本领域技术人员所熟知的其它方式将本发明的铁调素类似物或铁调素类似物组合物(例如药物组合物)施用于对象的方法。

[1182] 在一些实施方案中，本发明提供了包含至少一种本文公开的铁调素类似物的复合物，所述铁调素类似物结合至膜铁转运蛋白(优选地人膜铁转运蛋白)或抗体(如特异性结合本文公开的铁调素类似物的抗体)、Hep25或其组合。

[1183] 在一些实施方案中，本发明的铁调素类似物在Fpn内化试验中具有小于500nM的测量值(例如，EC₅₀)。如技术人员将认识到的，铁调素类似物的功能取决于铁调素类似物的三级结构和所呈现的结合表面。因此，可以对编码铁调素类似物的序列进行不影响折叠或不在结合表面上并保持功能的微小改变。在其他实施方案中，本发明提供了与本文所述显示出活性(例如，铁调素活性)或减轻涉及铁调素的疾病或适应证的症状的任何铁调素类似物的氨基酸序列具有85%或更高(例如85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或99.5%)同一性或同源性的铁调素类似物。

[1184] 在其它实施方案中,本发明提供了与本文呈现的任何铁调素类似物的氨基酸序列(例如,在表2-4或表6-10、表12、表14或表15的任一个中)或根据本文所述的任一化学式(例如式I、式II、式III、式IV、式V和式VI)的肽具有85%或更高(例如85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或99.5%)同一性或同源性的铁调素类似物。

[1185] 在一些实施方案中,与一个或多个本文所述的特定肽类似物序列相比,本发明的铁调素类似物可以包含具有至多10个、9个、8个、7个、6个、5个、4个、3个、2个或1个氨基酸取代的功能片段或其变体。

[1186] 除了本文实施例中描述的方法,本发明的铁调素类似物肽和肽二聚体可以使用本领域已知的方法产生,包括使用重组DNA的化学合成、生物合成或体外合成方法和固相合成。参见例如Kelly&Winkler(1990)Genetic Engineering Principles and Methods, vol.12, J.K.Setlow ed., Plenum Press, NY, pp.1-19; Merrifield(1964) J Amer Chem Soc 85:2149; Houghten(1985) PNAS USA 82:5131-5135和Stewart&Young(1984) Solid Phase Peptide Synthesis, 第二版, Pierce, Rockford, IL, 其通过引用并入本文。可以使用本领域已知的蛋白质纯化技术如反相高效液相色谱(HPLC)、离子交换或免疫亲和色谱、过滤或尺寸排阻、或电泳来纯化本发明的铁调素类似物。参见Olson, S. 和A.Pihl(1973) Biochem.12(16):3121-3126和Scopes(1982) Protein Purification, Springer-Verlag, NY, 其通过引用并入本文。可选择地,可以通过本领域已知的重组DNA技术来制备本发明的铁调素类似物。因此,本文涵盖编码本发明的多肽的多核苷酸。在某些优选的实施方案中,所述多核苷酸被分离。如本文所使用的,“分离的多核苷酸”是指在与多核苷酸天然存在的环境不同的环境中的多核苷酸。

实施例

[1187] 以下实施例说明本发明的某些具体实施方案。除非另外详细描述,使用本领域技术人员熟知和常规的标准技术进行以下实施例。应当理解,这些实施例仅用于示例性目的,并且不旨在对本发明的条件或范围进行完全的限定。因此,它们不应以任何方式解释为限制本发明的范围。

[1188] 缩写词:

[1189] DCM:二氯甲烷

[1190] DMF:N,N-二甲基甲酰胺

[1191] NMP:N-甲基吡咯烷酮

[1192] HBTU:O-(苯并三唑-1-基)-N,N',N'-四甲基脲鎓六氟磷酸盐

[1193] HATU:2-(7-氮杂-1H-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脲鎓六氟磷酸盐

[1194] DCC:二环己基碳二亚胺

[1195] NHS:N-羟基琥珀酰亚胺

[1196] DIPEA:二异丙基乙胺

[1197] EtOH:乙醇

[1198] Et₂O:乙醚

[1199] H₂:氢

[1200] TFA:三氟乙酸

[1201] TIS:三异丙基硅烷

[1202] ACN:乙腈

[1203] HPLC:高效液相色谱

[1204] ESI-MS:电喷雾电离质谱

[1205] PBS:磷酸盐缓冲盐水

[1206] Boc:叔丁氧基羰基

[1207] Fmoc:苄基甲氧基羰基

[1208] AcM:乙酰胺基甲基

[1209] IVA:异戊酸(或异戊酰基)

[1210] K():在本文提供的肽序列中,其中化合物或化学基团直接在赖氨酸残基后面的括号中给出,应当理解,括号中的化合物或化学基团是与赖氨酸残基缀合的侧链。因此,例如但不以任何方式限制,K-[(PEG 8)]-表示PEG 8部分与该赖氨酸的侧链缀合。对于这种缀合的赖氨酸的一些非限制性实例,请参见例如化合物54和90。

[1211] Palm(棕榈基):表示棕榈酸(棕榈酰基)的缀合。

[1212] 如本文所使用的“C()”是指涉及具体二硫桥的半胱氨酸残基。例如,在铁调素中,有四个二硫桥:第一个在两个C(1)残基之间;第二个在两个C(2)残基之间;第三个在两个C(3)残基之间;以及第四个在两个C(4)残基之间。因此,在一些实施方案中,铁调素的序列编写如下:

[1213] Hy-DTHFPIC(1) IFC(2) C(3) GC(2) C(4) HRSKC(3) GMC(4) C(1) KT-OH

[1214] (SEQ ID NO:335);

[1215] 并且其它肽的序列也可以任选地以相同的方式编写。

[1216] 实施例1

[1217] 合成肽类似物

[1218] 除非另有说明,以下使用的试剂和溶剂可以是商购的标准实验室试剂或分析级,并且不经进一步纯化使用。

[1219] 肽的固相合成工艺

[1220] 使用优化的9-苄基甲氧基羰基(Fmoc)固相肽合成方案来化学合成本发明的肽类似物。对于C末端酰胺,使用Rink-酰胺树脂,尽管也使用Wang和三苯甲基树脂来产生C末端酸。侧链保护基团如下:Glu、Thr和Tyr:0-叔丁基;Trp和Lys:t-Boc(叔丁氧基羰基);Arg:N- γ -2,2,4,6,7-五甲基二氢苯并呋喃-5-磺酰基;His、Gln、Asn、Cys:三苯甲基(Trityl)。对于选择性二硫桥形成,AcM(乙酰胺基甲基)也用作Cys保护基。为了偶联,将4至10倍过量的在DMF中含有Fmoc氨基酸、HBTU和DIPEA(1:1:1.1)的溶液,加入到溶胀的树脂[HBTU:0-(苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲鎓六氟磷酸盐;DIPEA:二异丙基乙胺;DMF:二甲基甲酰胺]中。使用HATU(0-(7-氮杂苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脲鎓六氟磷酸盐)代替HBTU,以提高困难区域中的偶联效率。通过用DMF、哌啶(2:1)溶液处理来实现Fmoc保护基的除去。

[1221] 从树脂上切割肽的工艺

[1222] 通过在含有三氟乙酸、水、乙二硫醇和三异丙基硅烷(90:5:2.5:2.5)的溶液中搅拌干燥的树脂2~4小时,实现本发明的肽类似物(例如化合物No.2)的侧链脱保护和切割。除去TFA后,使用冰冷的乙醚沉淀肽。将溶液离心,轻轻倒出乙醚,然后进行第二次乙醚洗

涤。将肽溶解在含有0.1%TFA(三氟乙酸)的乙腈、水溶液(1:1)中,并将所得溶液过滤。使用电喷雾电离质谱(ESI-MS)评估线性肽质量。

[1223] 肽纯化的工艺

[1224] 使用反相高效液相色谱(RP-HPLC),实现本发明的肽(例如,化合物No.2)的纯化。使用流速为1mL/min的C18柱(3 μ m, 50 $\times$ 2mm)进行分析。使用具有流速为20mL/min的C18柱(5 μ m, 250 $\times$ 21.2mm)的制备型RP-HPLC,来实现线性肽的纯化。使用缓冲液B在A(缓冲液A:0.05%TFA水溶液;缓冲液B:0.043%TFA,90%乙腈水溶液)中的线性梯度实现分离。

[1225] 肽的氧化工艺

[1226] 方法A(单独二硫化物的氧化)通过向溶液(ACN:H₂O,7:3,0.5%TFA)中的肽逐滴加入在MeOH中的碘(1mg/mL),来实现本发明的未保护肽的氧化。搅拌2分钟后,分批加入抗坏血酸直至溶液澄清,并立即将样品加载到HPLC上进行纯化。

[1227] 方法B(两种二硫化物的选择性氧化)当存在多于一种二硫化物时,经常进行选择性氧化。在pH7.6的NH₄CO₃溶液以1mg/10mL的肽来实现游离半胱氨酸的氧化。搅拌24小时后和纯化前,用TFA将溶液酸化至pH3,然后冻干。然后使用碘溶液氧化/选择性去保护所得的单一氧化肽(具有ACM保护的半胱氨酸)。将肽(1mg/2mL)溶解于MeOH/H₂O中,在室温下向反应中加入溶解在反应溶剂中的80:20的碘(终浓度:5mg/mL)。将溶液搅拌7分钟,然后分批加入抗坏血酸直至溶液澄清。然后将溶液直接加载到HPLC上。

[1228] 方法C(天然氧化)当存在多于一种二硫化物时,当不进行选择性氧化时,进行天然氧化。在(肽:GSSG:GSH,1:10,100)氧化和还原的谷胱甘肽(肽/GSH/GSSG,1:100:10的摩尔比)存在下,用100mM的NH₄CO₃(pH7.4)溶液实现天然氧化。搅拌24小时后,在RP-HPLC纯化前,将溶液用TFA酸化至pH3,随后冻干。

[1229] 半胱氨酸氧化以产生二聚体的工艺

[1230] 通过向溶液(ACN:H₂O,7:3,0.5%TFA)的肽中逐滴加入在MeOH中的碘(1mg/mL),来实现本发明的未保护肽的氧化。搅拌2分钟后,分批加入抗坏血酸直到溶液澄清,并立即将样品加载到HPLC上进行纯化。

[1231] 二聚化工艺

[1232] 通过用在终浓度为0.1M的NMP(N-甲基吡咯烷酮)中的2.2当量的N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)和二环己基碳二亚胺(DCC)处理1当量(缩写为“eq”)的酸,将乙醛酸(DIG)、IDA或Fmoc- β -Ala-IDA预活化为N-羟基琥珀酰亚胺酯(NHS)。对于PEG13和PEG25接头,购买这些化学实体预形成成为活化的琥珀酰亚胺酯。将活化的酯 $\sim$ 0.4当量分批地缓慢加入到在NMP(1mg/mL)中的肽中。将溶液搅拌10分钟,然后缓慢加入2-3个另外等分的接头 $\sim$ 0.05当量。将溶液搅拌另外3小时,然后真空除去溶剂,并通过反相HPLC纯化残余物。在DMF中的20%哌啶中进行搅拌肽的另外步骤(2 $\times$ 10分钟),然后进行另外的反相HPLC纯化。

[1233] 本领域技术人员将理解,肽合成的标准方法可用于产生本发明的化合物。

[1234] 接头活化和二聚化

[1235] 连接肽单体亚单位以形成如下所述的铁调素类似物肽二聚体。

[1236] 小规模DIG接头活化工艺:将5mL的NMP加入到含有IDA二酸(304.2mg,1mmol)、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS,253.2mg,2.2当量,2.2mmol)和搅拌棒的玻璃小瓶中。将混合物在室温下搅拌以完全溶解固体原料。然后向混合物中加入N,N'-二环己基碳二亚胺(DCC,453.9mg,

2.2当量, 2.2mmol)。在10分钟内出现沉淀, 并将反应混合物在室温下再搅拌过夜。然后过滤反应混合物以除去沉淀的二环己基脲(DCU)。在用于二聚化之前, 将活化的接头保存在封闭的小瓶中。活化接头的标称浓度为约0.20M。

[1237] 对于使用PEG接头的二聚化, 没有涉及预活化步骤。使用市售的预活化的双功能PEG接头。

[1238] 二聚化工艺: 将2mL无水DMF加入到含有肽单体(0.1mmol)的小瓶中。用DIEA将肽的pH调节至8~9。然后将活化接头(IDA或PEG13、PEG 25)(相对于单体为0.48当量, 0.048mmol)加入到单体溶液中。将反应混合物在室温下搅拌1小时。使用分析型HPLC监测二聚化反应的完成。二聚化反应完成的时间根据接头而变化。反应完成后, 将肽在冷乙醚中沉淀并离心。弃去上清液醚层。重复两次沉淀步骤。然后使用反相HPLC(Luna C18支撑物, 10u, 100A, 流动相A: 含有0.1%TFA的水, 流动相B: 含有0.1%TFA的乙腈(ACN), 15%B的梯度并在60分钟内变为45%B的梯度, 流速15ml/min)纯化粗二聚体。然后将含有纯产物的级分在冷冻干燥器上冷冻干燥。

[1239] 实施例2

[1240] 肽类似物的活性

[1241] 在体外测试肽类似物以诱导人膜铁转运蛋白蛋白质的内化。在内化后, 肽被降解。该试验测量受体的荧光减少。

[1242] 编码人膜铁转运蛋白(SLC40A1)的cDNA, 来自Origene的cDNA克隆(NM_014585)克隆。使用也编码用于亚克隆但没有终止密码子的末端限制性位点的引物, 通过PCR扩增编码膜铁转运蛋白的DNA。将膜铁转运蛋白受体亚克隆到含有新霉素(G418)抗性标记的哺乳动物GFP表达载体中, 使得膜铁转运蛋白的阅读框与GFP蛋白融合到框内。通过DNA测序证实编码蛋白质的DNA的保真度。将HEK293细胞用于转染膜铁转运蛋白-GFP受体表达质粒。所述细胞根据标准方案在生长培养基中生长, 并使用Lipofectamine试剂(制造商的方案, Invitrogen)用质粒转染。使用G418在生长培养基(只有已经吸收并整合cDNA表达质粒的细胞在其中存活)中选择稳定表达膜铁转运蛋白-GFP的细胞, 并在Cytomation MoFlo™细胞分选仪上分选几次, 以获得GFP阳性细胞(488nm/530nm)。将细胞繁殖并以等分试样冷冻。

[1243] 为了测定铁调素类似物(化合物)对人膜铁转运蛋白的活性, 将细胞在96孔板中于没有酚红的标准培养基中孵育。在培养箱中将化合物加至所需的最终浓度持续至少18小时。孵育后, 通过全细胞GFP荧光(Envision板读数器, 485/535滤器对)或通过Beckman Coulter Quanta™流式细胞仪(表示为在485nm/525nm处荧光强度的几何平均值), 测定剩余的GFP荧光。在培养箱中加入化合物至所需的最终浓度持续至少18小时, 但不超过24小时。

[1244] 参考化合物包括天然铁调素、微型铁调素和RI-微型铁调素(其是微型铁调素的类似物)。RI-微型铁调素中的“RI”指逆反向。逆反肽是在所有D氨基酸中具有反向序列的肽。一个实例是, Hy-Glu-Thr-His-NH₂变成Hy-DHis-DThr-DGlu-NH₂。根据上述活性分析确定这些参考化合物对于膜铁转运蛋白降解的EC₅₀。这些肽作为许多子序列研究的对照标准。

[1245] 表11. 参考化合物

[1246]

名称	序列	效价 EC ₅₀ (nM)
铁调素	Hy-DTHFPIC(1)IFC(2)C(3)GC(2)C(4)HRSKC(3)- GMC(4)C(1)KT-OH (SEQ ID NO: 335)	34
微型铁调素 1-9	Hy-DTHFPICIF-NH ₂ (SEQ ID NO: 545)	712
RI-微型铁调素	Hy-DPhc-Dlle-DCys-Dlle-DPro-DPhc-DHis-DThr- DAsp-NH ₂ (SEQ ID NO: 546)	>10 μM

[1247] 在下文和本文的其它表中提供了为本发明的各种肽类似物确定的EC₅₀值。

[1248] 表12. 示例性肽类似物的活性

[1249]

化合物 No.	SEQ ID No.	序列	效价 EC ₅₀ (nM)
1	28	Hy-DTHFPICIF-NH ₂	133
2	29	异戊酸-DTHFPICIFGPRSKGWVC-NH ₂	5
3	30	异戊酸-DTHFPICIFGPRSRGWVCK-NH ₂	15
4	31	异戊酸-DTHFPICIFGPRSKGWVC-NH ₂	19
5	32	[Ida]-TH-[Dpa]-[bhPro]-ICIFGPRSKGWVCM-NH ₂	17
6	33	异戊酸-DTHFPICIFGPRSKGWVCK-NH ₂	23
7	34	异戊酸-DTHFPICIFGPRSKGWTCK-NH ₂	24
8	35	[Ida]-TH-[Dpa]-[bhPro]-CIIFGPRSRGWVCK-NH ₂	29
9	36	异戊酸-DTHFPICIFGPRSKGWVCK-NH ₂	32
10	37	异戊酸-DTHFPICIQFGPRSKGWVCK-NH ₂	35
11	38	异戊酸-DTHFPICIFGPRSKGWVCK-NH ₂	9
12	39	Hy-DTHFPIC ₁ IFVC ₂ GHRSC ₂ YRRC ₁ R-NH ₂	77
13	40	异丁酸-DTHFPIC ₁ IFVC ₂ HRSGC ₂ YRRC ₁ R-NH ₂	63
14	41	Hy-DTHFPIC ₁ IFVC ₂ HRSGC ₂ YRAC ₁ -NH ₂	69
15	42	异戊酸-DTHFPICIFGPRSKGWVCK-NH ₂	79
16	43	Hy-DTHFPICIFGPRAKGWVCM-NH ₂	88
17	44	异丁酸-DTHFPIC ₁ IFVC ₂ HRSGC ₂ YRRC ₁ R-NH ₂	93
18	45	Hy-DTHFPICIFGPRSKGWVCM-NH ₂	125
19	46	Hy-DTHFPIC ₁ IFVC ₂ HRSGC ₂ YRRC ₁ R-NH ₂	140
20	47	Hy-DTHFPICIFGPRSRGWVCK-NH ₂	101

[1250]

21	48	Hy-DTHFPCIIFGPRSKGWVCM-NH ₂	46
22	49	Hy-DTHFPICIFAPRSKGWVCM-NH ₂	9430
23	50	Hy-DTHFPICIFGPRSKGWVCM-OH	131
24	51	Hy-DTHFPCIQF-NH ₂	138
25	52	Hy-DTHFPIC ₁ IFVC ₂ GHRSGC ₂ YRRC ₁ R-NH ₂	144
26	53	Hy-DTHFAICIFGPRSKGWVCM-NH ₂	147
27	54	Hy-DTHFPICIFGPHRSKGWVCM-NH ₂	149
28	55	Hy-DTHFPICIFGPRAKGWVCM-NH ₂	88
29	56	Hy-DTHFPACIFGPRSKGWVCM-NH ₂	157
30	57	Hy-DTHFPC ₁ IIFVC ₂ HRPKGC ₂ YRRVC ₁ R-NH ₂	173
31	58	Hy-DTHFPICIFGPRSKAWVCM-NH ₂	175
32	59	Hy-DTHFPIC ₁ IFVC ₂ GHRGKGC ₂ YRRC ₁ R-NH ₂	182
33	60	Hy-ATHFPICIFGPRSKGWVCM-NH ₂	184
34	61	Hy-DTHFPICIFGPASKGWVCM-NH ₂	206
35	62	Hy-DTHFPIC ₁ IFVC ₂ HRSKGC ₂ YARC ₁ -NH ₂	214
36	63	Ac-DTHFPICIFGPRSKGWVCM-NH ₂	239
37	64	Hy-DTHFPICIFGPRSAGWVCM-NH ₂	239
38	65	Hy-DTHAPICIFGPRSKGWVCM-NH ₂	254
39	66	Hy-DTHFPIC ₁ IFVC ₂ HRSKGC ₂ YRRC ₁ -NH ₂	256
40	67	pGlu-THFPIC ₁ IFVC ₂ HRSKGC ₂ YRRC ₁ R-NH ₂	260
41	68	Ac-DTHFPICIFKPRSKGWVCM-NH ₂	262
42	69	Hy-DTHFPIC ₁ IFVC ₂ GHRSGC ₂ YMRC ₁ KT-NH ₂	265
43	70	Hy-DAHFPICIFGPRSKGWVCM-NH ₂	265

[1251]

44	71	Hy-DTHFPIC ₁ IFVC ₂ YRGIC ₂ YRRC ₁ R-NH ₂	269
45	72	Ac-DTHFPICIFGPRSKGWVCM-NH ₂	272
46	73	Hy-[bhAsp]-THFPICIFGPRSKGWVC-NH ₂	274
47	74	Hy-DTHFPICIFGPRSKGWACM-NH ₂	313
48	75	[Ida]-TH-[Dpa]-[bhPro]-RCR-[bhPhe]- GPRSKGWVCM-NH ₂	331
49	76	Hy-DTHFPCIRF-NH ₂	334
50	77	异戊酸-THFPICIFGPRSKGWVCM-NH ₂	345
51	78	Hy-DTHFPCIAF-NH ₂	382
52	79	Hy-DAHFPICIF-NH ₂	388
53	80	Hy-DTHFPIC ₁ IFVC ₂ HRPKGC ₂ YRRC ₁ P-NH ₂	393
54	81	Ac-DTHFPICIFKPRS-K(m-PEG8)-GWVCM-NH ₂	479
55	82	Hy-DTHFPICIFK-NH ₂	419
56	83	Hy-DTHFPICIFF-NH ₂	441
57	84	Hy-DTHFPICIFGPRSK-K(m-PEG8)-WVCM-NH ₂	462
58	85	Ac-DTHFPICIFGPRSKKWVCM-NH ₂	472
59	86	Hy-DTHFPIC ₁ IFC ₂ PWGMC ₂ C ₁ K-NH ₂	495
60	87	Hy-DTAFPICIFGPRSKGWVCM-NH ₂	498
65	88	Hy-DTHFPIC ₁ IFVC ₂ YRGIC ₁ YMRC ₂ KT-NH ₂	763
66	89	Hy-DTHFPICIFGPRSKGAVCM-NH ₂	520
67	90	Hy-DTHFPICIAAGPRSKGWVCM-NH ₂	2466
68	91	Hy-DTHFPICAFGPRSKGWVCM-NH ₂	>10 μM
69	92	Hy-DTHFPILAFGPRSKGWVAM-NH ₂	>10 μM

[1252]

70	93	Hy-DTHFPCRRFGPRSKGWVC-NH ₂	>10 μM
71	94	[Ida]-THF-[bhPro]-CRR-[bhPhc]-GPRSKGWVC-NH ₂	N/A
73	96	Hy-DTHFPC ₁ IIFVC ₂ HRSKGC ₂ YWAVC ₁ -NH ₂	2640
74	97	Hy-DTHFP-(D)Cys ₁ -IIFVC ₂ HRSKGC ₂ YWAV- (D)Cys ₁ -F-NH ₂	356
75	98	Hy-DTHFPC ₁ IIFVC ₂ HRSKGC ₂ YWAVC ₁ FW-NH ₂	>10 μM
76	99	Ac-DTHFPICIF-K-[(m-PEG8)]--PRSKGWVCM-NH ₂	610
78	101	Hy-DTH-[Dpa]-PCIIFGPRSRGWVCK-NH ₂	>1 μM
79	102	Hy-DTHF-[bhPro]-CIIFGPRSRGWVCK-NH ₂	>1 μM
80	103	Hy-DTHFPCIIFGPRSRGWRCK-NH ₂	>1 μM
81	104	Hy-DTHFPCIRFGPRSRGWVCK-NH ₂	>1 μM
82	105	Hy-DTHFPCIRFGPRSRGWRCK-NH ₂	>1 μM
83	106	Hy-DTHFPCIIFGPRSRGWVCK-NH ₂	>1 μM
84	107	Hy-DTHFPCIIFGPRSRGVCK-NH ₂	>1 μM
85	108	Hy-DTHFPCIYFGPRSKGWVCK-NH ₂	705
86	109	Hy-DTHFPCIIFGPRSKGWVCK-NH ₂	>1 μM
87	110	Hy-DTHFPCIIFGPRARGWVCK-NH ₂	>1 μM
88	111	辛酸-DTHFPCIIFGPRSRGWVCK-NH ₂	>1 μM
89	112	棕榈基-PEG11-DTHFPCIIFGPRSRGWVCK-NH ₂	>1 μM
90	113	Ac-DTHFPICIF-K(2K PEG)-PRSKGWVCK-NH ₂	107
91	114	Hy-DTHFPCIIFGPRSKGWKCK-NH ₂	未测试
92	115	Hy-DTHFPCIKFGPRSKGWKCK-NH ₂	未测试
93	116	异戊酸-DTHFPCLIFGPRSKGWVCK-NH ₂	19

[1253]

94	117	异戊酸-DTHFPCVIFGPRSKGWVCK-NH ₂	41
95	118	异戊酸-DTHFPCSIFGPRSKGWVCK-NH ₂	78
96	119	异戊酸-DTHFPCQIFGPRSKGWVCK-NH ₂	157
97	120	Hy-THFPCIIFGPRSKGWVCK-NH ₂	>10 μM
98	121	异戊酸-THFPCIIFGPRSKGWVCK-NH ₂	>10 μM
99	122	Hy-HFPCIIFGPRSKGWVCK-NH ₂	>10 μM
100	123	异戊酸-HFPCIIFGPRSKGWVCK-NH ₂	>10 μM
101	124	Hy-DTHFPCISFGPRSKGWVCK-NH ₂	> 1 μM
102	125	Hy-DTHFPCIKFGPRSKGWVCK-NH ₂	> 1 μM
103	126	Hy-EDTHFPCIIFGPRSKGWVCK-NH ₂	> 1 μM
105	128	异戊酸-DTHFPCIIFEPRSKGWVCK-NH ₂	10
106	129	异戊酸-DTHFPCIIFSPRSKGWVCK-NH ₂	44
107	130	异戊酸-DTHFSCIIFGPRSKGWVCK-NH ₂	50
108	131	辛酸-PEG11-DTHFPCIIFGPRSRGWVCK-NH ₂	> 1 μM
109	132	异丁酸-PEG11-DTHFPCIIFGPRSRGWVCK-NH ₂	> 1 μM
110	133	[Ida]-THFPCIIFGPRSRGWVCK-NH ₂	>300 nM
111	134	异戊酸-DTHFPCIIFGPKSKGWVCK-NH ₂	12
112	135	异戊酸-DTHFPCIKFGPKSKGWVCK-NH ₂	15
113	136	异戊酸-DTHFPCIIFGPRSKGWCK-NH ₂	15
114	137	异戊酸-DTHFPCIIFGPRSKGVC-NH ₂	18
115	138	异戊酸-DTHFPCIIFGPRSKGCK-NH ₂	21
117	140	异戊酸-DTHFPC-[Dapa]-IFGPRSKGWDCK-NH ₂	65
118	141	异戊酸-DTHFPCI-[Dapa]-FGPRSKGWDCK-NH ₂	17

[1254]

119	142	异戊酸-DTHFPC-[Dapa]-IFGPRSKGWECK-NH ₂	151
120	143	异戊酸-DTHFPCI-[Dapa]-FGPRSKGWECK-NH ₂	15
121	144	异戊酸-DTHFPCIKFGPRSKGWECK-NH ₂	14
122	145	异戊酸-DTHFGCIIFGPRSKGWVCK-NH ₂	57
123	146	Hy-DTHFGCIIFGPRSKGWVCK-NH ₂	>10 μM
124	147	异戊酸-DTHFRCIIFGPRSKGWVCK-NH ₂	106
125	148	Hy-DTHFRCIIFGPRSKGWVCK-NH ₂	>10 μM
126	149	异戊酸-DTHF-[Sarc]-CIIFGPRSKGWVCK-NH ₂	31
127	150	Hy-DTHF-[Sarc]-CIIFGPRSKGWVCK-NH ₂	>10 μM
128	151	异戊酸-DTHF-[β-Ala]-CIIFGPRSKGWVCK-NH ₂	264
129	152	Hy-DTHF-[β-Ala]-CIIFGPRSKGWVCK-NH ₂	>10 μM
130	153	异戊酸-DTHFKCIIFGPRSKGWVCK-NH ₂	150
131	154	Hy-DTHFKCIIFGPRSKGWVCK-NH ₂	>10 μM
132	155	Hy-THFPCIIFGPRSKGWVCM-NH ₂	>1 μM
133	156	Hy-HFPCIIFGPRSKGWVCM-NH ₂	>1 μM
134	157	异戊酸-HFPCIIFGPRSKGWVCM-NH ₂	>1 μM
135	158	Hy-DTHFPCISFGPRSKGWVCM-NH ₂	545
136	159	Hy-DTHFPCIKFGPRSKGWVCM-NH ₂	669
137	160	Hy-EDTHFPCIIFGPRSKGWVCM-NH ₂	873
139	162	Hy-DTHFPCIIFEPRSKGWVCM-NH ₂	N/A
140	163	异戊酸-DTHFKCIEFGPRSKGWVCK-NH ₂	>1 μM
141	164	异戊酸-DTHFPCIIFGPRSKGWACK-NH ₂	11
142	165	异戊酸-DTHFPCIIFEPRSKGWVCK-NH ₂	9

[1255]

143	166	异戊酸-DTHFPCIIFGPRSKGWVCKKKK-NH ₂	24
144	167	异戊酸-DTHFPCIIFEPRSKGWVCKKKK-NH ₂	15
145	168	异戊酸-DTHFPCIIFGPRSKGWVCKK-NH ₂	9
146	169	异戊酸-DTAFPCIIFGPRSKGWVCK-NH ₂	24
147	170	异戊酸-DTKFPCIIFGPRSKGWVCK-NH ₂	20
148	171	异戊酸-DTHFPC ₁ IIFVC ₂ HRPKGC ₂ YRRVC ₁ R-NH ₂	2.2
149	172	异戊酸-DTHFPCI-K(m-PEG8)-FGPRSKGWVCK-NH ₂	9
150	173	异戊酸-DTHFPCIKF-K(m-PEG8)-PRSKGWVCK-NH ₂	7
151	174	异戊酸-DTHFPCIKFGP-K(m-PEG8)-SKGWVCK-NH ₂	13
152	175	异戊酸-DTHFPCIKFGPRS-K(m-PEG8)-GWVCK-NH ₂	16
153	176	异戊酸-DTHFPCIKFGPRSKGWVC-K(m-PEG8)-NH ₂	18
154	177	异戊酸-DTHFPCIKFGPRSKGWTCK-NH ₂	18
155	178	异戊酸-DTHFPCIEFGPRSKGWTCK-NH ₂	38
156	179	异戊酸-DTHFPICIFGPRS-K(甜菜碱)-GWVC-NH ₂	未测试
157	180	异戊酸-DTHFPCIKFGPRS-K(甜菜碱)-GWVCK-NH ₂	18
158	181	异戊酸-DTHFPCI-K(甜菜碱)-FGPRSKGWVCK-NH ₂	16
159	182	异戊酸-DTHFPCIKFGPRSKGWVC-K(甜菜碱)-NH ₂	17
160	183	Ac-DTHFPCIKFGPRSKGWVCK-NH ₂	464
161	184	异戊酸-PEG3-DTHFPCIKFGPRSKGWVCK-NH ₂	666
162	185	异丁酸-DTHFPCIKFGPRSKGWVCK-NH ₂	41
163	186	戊酸-DTHFPCIKFGPRSKGWVCK-NH ₂	64
164	187	Hy-VDTHFPCIKFGPRSKGWVCK-NH ₂	146
165	188	Hy-LDTHFPCIKFGPRSKGWVCK-NH ₂	107

[1256]

166	189	己酸-DTHFPCIKFGPRSKGWVCK-NH ₂	36
167	190	5-甲基戊酸-DTHFPCIKFGPRSKGWVCK-NH ₂	99
168	191	环己酸-DTHFPCIKFGPRSKGWVCK-NH ₂	30
169	192	庚酸-DTHFPCIKFGPRSKGWVCK-NH ₂	91
170	193	辛酸-DTHFPCIKFGPRSKGWVCK-NH ₂	183
171	194	异戊酸-DTHFPCIIFGPRSKGWCK-NH ₂	48
172	195	异戊酸-DTHFPCIIFGPRSKGWECK-NH ₂	15
173	196	异戊酸-DTHFPCRRFGPRSKGWVCK-NH ₂	未测试
176	199	异戊酸-DTHFPICIFGPRS-K(m-PEG8)-GWVC-NH ₂	6
177	200	异戊酸-DTHFPICIFGPRS-K-[(m-PEG4)]-GWVC-NH ₂	6
178	201	异戊酸-DTHFPCIIFGPRSRGWVC-K(m-PEG8)-NH ₂	3
179	202	异戊酸-DTHFPCIIFGPRSRGWVC-K-[(m-PEG4)]-NH ₂	4
180	203	异戊酸-DTHFPCIIFGPRSRGWVC-K(PEG2)-NH ₂	9
181	204	异戊酸-DTHFPCIKFEPRSKGWVCK-NH ₂	15
182	205	异戊酸-DTHFPCIKFEPRSKGWTCCK-NH ₂	13
183	206	异戊酸-DTHFPCIKFEPRSKGWCK-NH ₂	17
184	207	异戊酸-DTHFPCIKFEPRSKGCK-NH ₂	23
185	208	异戊酸-DTHFPCIFEPRSKGCK-NH ₂	54
186	209	异戊酸-DTHFPCIFEPRSKGWCK-NH ₂	12
187	210	异戊酸-DTHFPCIKFGPRSKCK-NH ₂	21
188	211	异戊酸-DTHFPCIKFGPRSCK-NH ₂	30
189	212	异戊酸-DTHFPCIKFGPRCK-NH ₂	36
190	213	异戊酸-DTHFPCIKFGPCK-NH ₂	55

[1257]

191	214	异戊酸-DTHFPCIKFGCK-NH ₂	97
192	215	异戊酸-DTHFPCIKFCK-NH ₂	48
193	216	异戊酸-DTHFPCIKFC-NH ₂	80
194	217	异戊酸-DTHFPCI-K(棕榈基)-FGPRSKGWVCK-NH ₂	4
195	218	异戊酸-DTHFPCIKF-K(棕榈基)-PRSKGWVCK-NH ₂	9
196	219	异戊酸-DTHFPCIKFGP-K(棕榈基)-SKGWVCK-NH ₂	2
197	220	异戊酸-DTHFPCIKFGPRS-K(棕榈基)-GWVCK-NH ₂	1
198	221	异戊酸-DTHFPCIKFGPRSKGWVC-K(棕榈基)-NH ₂	7
199	222	异戊酸-DTHFPCI-K(PEG3-棕榈基)- FGPRSKGWVCK-NH ₂	7
200	223	异戊酸-DTHFPCIKF-K(PEG3-棕榈基)- PRSKGWVCK-NH ₂	6
201	224	异戊酸-DTHFPCIKFGP-K(PEG3-棕榈基)- SKGWVCK-NH ₂	4
202	225	异戊酸-DTHFPCIKFGPRS-K(PEG3-棕榈基)- GWVCK-NH ₂	3
203	226	异戊酸-DTHFPCIKFGPRSKGWVC-K(PEG3- 棕榈基)-NH ₂	4
204	227	Hy-DTHFPCI-K(IVA)-FGPRSKGWVCK-NH ₂	>300 nM
205	228	Hy-DTHFPCIKF-K(IVA)-PRSKGWVCK-NH ₂	>300 nM
206	229	Hy-DTHFPCIKFGP-K(IVA)-SKGWVCK-NH ₂	624
207	230	Hy-DTHFPCIKFGPRS-K(IVA)-GWVCK-NH ₂	318
208	231	Hy-DTHFPCIKFGPRSKGWVC-K(IVA)-NH ₂	109
209	232	Hy-DTHFPCI-K(PEG3-IVA)-FGPRSKGWVCK-NH ₂	342
210	233	Hy-DTHFPCIKF-K(PEG3-IVA)-PRSKGWVCK-NH ₂	457

[1258]

211	234	Hy-DTHFPCIKFGP-K(PEG3-IVA)-SKGWVCK-NH ₂	>300 nM
212	235	Hy-DTHFPCIKFGPRS-K(PEG3-IVA)-GWVCK-NH ₂	>300 nM
213	236	Hy-DTHFPCIKFGPRSKGWVC-K(PEG3-IVA)-NH ₂	233
214	237	异戊酸-DTHFPCIKFEPRSKKWVCK-NH ₂	15
215	238	Hy-DTHFPCIKFGPRSKGWVCK-NH ₂	>1 μM
216	239	棕榈基-DTHFPCIKFGPRSKGWVCK-NH ₂	>1 μM
217	240	棕榈基-PEG3-DTHFPCIKFGPRSKGWVCK-NH ₂	>1 μM
218	241	异戊酸-DTHFPCI-K(异 glu-棕榈基)-FEPRSKGCK-NH ₂	10
219	242	异戊酸-DTHFPCIKF-K(异 glu-棕榈基)- PRSKGCK-NH ₂	9
220	243	异戊酸-DTHFPCIKFEP-K(异 glu-棕榈基)- SKGCK-NH ₂	5
221	244	异戊酸-DTHFPCIKFEPRS-K(异 glu-棕榈基)-GCK-NH ₂	4
222	245	异戊酸-DTHFPCIKFEPRSK-K(异 glu-棕榈基)-CK-NH ₂	4
223	246	异戊酸-DTHFPCIKFEPRSKGC-K(异 glu-棕榈基)-NH ₂	5
224	247	异戊酸-DTHFPCIKFEPRSKGCK-K(异 glu-棕榈 基)-NH ₂	4
225	248	异戊酸-DTHFPCI-K(dapa-棕榈基)-FEPRSKGCK-NH ₂	17
226	249	异戊酸-DTHFPCIKF-K(dapa-棕榈基)-PRSKGCK-NH ₂	14
227	250	异戊酸-DTHFPCIKFEP-K(dapa-棕榈基)-SKGCK-NH ₂	10
228	251	异戊酸-DTHFPCIKFEPRS-K(dapa-棕榈基)-GCK-NH ₂	7
229	252	异戊酸-DTHFPCIKFEPRSK-K(dapa-棕榈基)-CK-NH ₂	13
230	253	异戊酸-DTHFPCIKFEPRSKGC-K(dapa-棕榈 基)-K-NH ₂	10

[1259]

231	254	异戊酸-DTHFPCIKFEPRSKGCK-K(dapa-棕榈基)-NH ₂	11
232	255	异戊酸-DTHFPCIKFGPRSKGWVCK-NH ₂	未测试
233	256	异戊酸-AAHFPCIKFGPRSKGWVCK-NH ₂	320
234	257	异戊酸-ATHFPCIKFGPRSKGWVCK-NH ₂	60
235	258	异戊酸-DAHFPCIKFGPRSKGWVCK-NH ₂	203
236	259	异戊酸-DTHAPCIKFGPRSKGWVCK-NH ₂	>500 nM
237	260	异戊酸-DTHFPCIKAGPRSKGWVCK-NH ₂	50
238	261	异戊酸-DTHFPCIKFEPRSKGWVCK-OH	47
239	262	异戊酸-DTHFPCIKFEPRSKGWECK-OH	101
240	263	异戊酸-DTHFPCIHFEPRSKGWEC-OH	139
241	264	异戊酸-DTHFPCIKFK(异 Glu-棕榈基)- PRSKGWECK-NH ₂	6
242	265	异戊酸-DTHFPCIKFEPK(异 Glu-棕榈基)- SKGWECK-NH ₂	8
243	266	异戊酸-DTHAPCIKFEPRSKGWECK-NH ₂	>10 μM
244	267	Ida-THFPCIKFEPRSK-K(异 Glu-棕榈基)CK-NH ₂	25
245	268	异戊酸-DTHFPCI-K(异 Glu-棕榈基)- FEPRSKGWEC-OH	131
246	269	4,4-5,5-6,6,6-七氟己酸- DTHFPCIKFGPRSKGWVCK-NH ₂	480
247	270	异戊酸-DTHFPCIKF-K(肉豆蔻酸)-PRSKGWVC-NH ₂	7
248	271	异戊酸-DTHFPCIKF-K(月桂酸)-PRSKGWVC-NH ₂	10
249	272	异戊酸-DTHFPCIKF-K(癸酸)-PRSKGWVC-NH ₂	22
250	273	异戊酸-DTHFPCIKF-K(辛酸)-PRSKGWVC-NH ₂	30

[1260]

251	274	异戊酸-DTHFPCIKF-K(己酸)-PRSKGWVC-NH ₂	21
252	275	异戊酸-DTHFPCIKF-K(丁酸)-PRSKGWVC-NH ₂	37
253	276	异戊酸-DTHFPCIKF-K(Ac)-PRSKGWVC-NH ₂	29
254	277	Ida-THFPCIKFEPRSKGWVC-K(肉豆蔻酸)-NH ₂	20
255	278	[Ida]-THFPCIKFEPRSKGWVC-K(月桂酸)-NH ₂	52
256	279	[Ida]-THFPCIKFEPRSKGWVC-K(癸酸)-NH ₂	116
257	280	[Ida]-THFPCIKFEPRSKGWVC-K(辛酸)-NH ₂	129
258	281	[Ida]-THFPCIKFEPRSKGWVC-K(己酸)-NH ₂	191
259	282	[Ida]-THFPCIKFEPRSKGWVC-K(丁酸)-NH ₂	355
260	283	[Ida]-THFPCIKFEPRSKGWVC-K(Ac)-NH ₂	502
261	284	异戊酸-HFPCIKFEPRSKGWVC-K(辛酸)-NH ₂	>300 nM
262	285	异戊酸-HFPCIKFEPRSKGWVC-K(月桂酸)-NH ₂	77
263	286	异戊酸-DTHFPCIKFEPHSGCK-NH ₂	62
264	287	异戊酸-DTHFPCIHFEPHSGC-NH ₂	118
265	288	异戊酸-DTHFPCIKFEPHS-K(Albu)-GCK-NH ₂	6
266	289	异戊酸-DTHFPCIKFEPREKEC-NH ₂	183
267	290	异戊酸-DTAFPCIKFEPRSKEC-NH ₂	>1 μM
268	291	异戊酸-DTHFPCIKFECK-NH ₂	107
269	292	Hy-DTHFPFAIFAAGICI-NH ₂	>10 μM
270	293	Hy-DTHFPFAIFAICI-NH ₂	>10 μM
271	294	Hy-DTHFPFAIFAICI-NH ₂	>10 μM
272	295	Hy-DTHFPFAIFICI-NH ₂	>10 μM
273	296	Hy-DTHFPFAIICI-NH ₂	>10 μM

[1261]

274	297	Hy-DTHFPPIAICI-NH ₂	>10 μM
275	298	Hy-DTHFPPIICI-NH ₂	>10 μM
276	299	Hy-DTHICIAIF-NH ₂	>10 μM
277	300	Hy-DTHCPAIF-NH ₂	>10 μM
278	301	Hy-DTHFPCIIA-NH ₂	>1 μM
279	302	Hy-DTHFPCAIF-NH ₂	>1 μM
280	303	Hy-DTHFACIIF-NH ₂	>1 μM
281	304	Hy-DTHF-(D)-Ala-CIIF-NH ₂	>10 μM
282	305	Hy-DTHAPCIIF-NH ₂	>10 μM
283	306	Hy-DTAFPCIIF-NH ₂	739 nM
284	307	Hy-ATHFPCIIF-NH ₂	>1 μM
285	308	[Ida]-THF-[bhPro]-CIIF-NH ₂	>1 μM
286	310	Hy-DTHFPCIEF-NH ₂	>1 μM
287	298	Hy-DTHFPCIEF-NH ₂	>1 μM
288	311	异戊酸-DTHFPCIIF-NH ₂	16 nM
289	312	异戊酸-DTHFPAIIF-NH ₂	无活性
290	313	异戊酸-DTHFPSIIF-NH ₂	无活性
291	314	异戊酸-DTHFPCIKF-NH ₂	7 nM
293	316	Hy-DTHFPCIF-NH ₂	在 1 μM 52%
297	320	Hy-DTHFPCIKFF-NH ₂	在 1 μM 64%
298	321	Hy-YTHFPCIIF-NH ₂	未测试
299	322	Hy-LTHFPCIIF-NH ₂	在 1 μM

[1262]

			64%
300	323	Hy-ETHFPCIIF-NH ₂	在 1 μM 77%
301	324	Hy-DRHFPCIIF-NH ₂	未测试
302	325	Hy-DTKFPCIIF-NH ₂	在 1 μM 60%
303	326	Hy-DTHFECIIF-NH ₂	未测试
304	327	Hy-DTHFPCIIK-NH ₂	在 1 μM 55%
305	328	Hy-DTHFPCIIR-NH ₂	在 1 μM 62%
306	329	Hy-DTHFPCIEF-NH ₂	未测试
307	330	Hy-DTHFPCIVF-NH ₂	在 1 μM 75%
308	331	Hy-DTHFPCILF-NH ₂	在 1 μM 89%
309	332	Hy-DTHFPCILK-NH ₂	在 1 μM 55%
310	333	Hy-DTHFPCIEK-NH ₂	在 1 μM 0%
355	369	异戊酸-DTHFPCIKFEPRSKECK-NH ₂	48
356	370	异戊酸-DTHFPCIKFEPHSKECK-NH ₂	181
357	371	异戊酸-DTHFPCIKKEPHSKECK-NH ₂	>1 μM
358	372	异戊酸-DTHFPCIKF-K(异 glu-棕榈基)-PHSKECK-NH ₂	6
359	373	异戊酸-DTHFPCIKFEPRECK-NH ₂	64
360	374	异戊酸-DTHFPCIKFEPHECK-NH ₂	138
361	375	异戊酸-DTHFPCIKFEPACK-NH ₂	29

[1263]

	376	DTHFPICIFC	
	377	FPIC	
	378	HFPIC	
	379	HFPICI	
	380	HFPICIF	
	381	DTHFPIC	
	381	DTHFPICI	
	382	DTHFPICIF	
	383	DTHFPICIFC	
	384	DTHAPICIF	
	385	DTHAPI-[C-StBu]-IF	
	386	DTHAPI-[C-tBu]-IF	
	387	DTHFPICIF	
	388	DTHFPISIF	
	389	DTHFPI-[(D)-Cys]-IF	
	390	DTHFPI-[高 Cys]-IF	
	391	DTHFPI-[Pen]-IF	
	392	DTHFPI-[(D)-Pen]-IF	
	393	DTHFPI-[Dapa(AcBr)]-IF	
	394	CDTHFPICIF	
	395	DTHFPICIF-NHCH ₂ CH ₂ S	
	396	CHFPCIF	
	397	HFPICIF-NHCH ₂ CH ₂ S	

[1264]

	398	D-[Tle]-H-[Phg]-[Oic]-[Chg]-C-[Chg]-F	
	399	D-[Tle]-HP-[Oic]-[Chg]-C-[Chg]-F	
	400	[(D)Phe]-[(D)Ile]-[(D)Cys]-[(D)Ile]-[(D)Pro]-[(D)Phe]-[(D)His]-[(D)Thr]-[(D)Asp]	
	401	[(D)Phe]-[(D)Ile]-[(D)Cys]-[(D)Ile]-[(D)Pro]-[(D)Phe]-[(D)His]	
	402	鹅去氧胆酸盐 -(Peg11)-[(D)Phe]-[(D)Ile]-[(D)Cys]-[(D)Ile]-[(D)Pro]-[(D)Phe]-[(D)His]-[(D)Thr]-[(D)Asp]	
	403	熊去氧胆酸盐 -(Peg11)-[(D)Phe]-[(D)Ile]-[(D)Cys]-[(D)Ile]-[(D)Pro]-[(D)Phe]-[(D)His]-[(D)Thr]-[(D)Asp]	
	404	F-[(D)Ile]-[(D)Cys]-[(D)Ile]-[(D)Pro]-[(D)Phe]-[(D)His]-[(D)Thr]-[(D)Asp]-(Peg11)-GYIPEAPRDGQAYVRKDG EWVLLSTFL	
	405	F-[(D)Ile]-[(D)Cys]-[(D)Ile]-[(D)Pro]-[(D)Phe]-[(D)His]-[(D)Thr]-[(D)Asp]-[(GP-(Hyp)) ₁₀	
	406	棕榈酰基 -(Peg11)-[(D)Phe]-[(D)Ile]-[(D)Cys]-[(D)Ile]-[(D)Pro]-[(D)Phe]-[(D)His]-[(D)Thr]-[(D)Asp]	
	407	2(棕榈酰基)-[Dapa]-(Peg11)-[(D)Phe]-[(D)Ile]-[(D)Cys]-[(D)Ile]-[(D)Pro]-[(D)Phe]-[(D)His]-[(D)Thr]-[(D)Asp]	
	408	DTH-[bhPhe]-PIICIF	
	409	DTH-[Dpa]-PICL	
	410	DTH-[Bip]-PICIF	
	411	DTH-[1-Nal]-PICIF	
	412	DTH-[bhDpa]-PICIF	
	413	DTHFP-ICI-bhPhe	
	414	DTHFPICI-[Dpa]	

[1265]

	415	DTHFPICI-[Bip]	
	416	DTHFPICI-[1-Nal]	
	417	DTHFPICI-[bhDpa]	
	418	DTH-[Dpa]-PICI-[Dpa]	
	419	D-[Dpa]-PICIF	
	420	D-[Dpa]-PICI-[Dpa]	
	421	DTH-[Dpa]-P-[(D)Arg]-CR-[Dpa]	
	422	DTH-[Dpa]-P-[(D)Arg]-C-[(D)Arg]-[Dpa]	
	423	DTH-[Dpa]-[Oic]-ICIF	
	424	DTH-[Dpa]-[Oic]-ICI-[Dpa]	
	425	DTH-[Dpa]-PCCC-[Dpa]	
	426	DTHFPICIF-[(D)Pro]-PK	
	427	DTHFPICIF-[(D)Pro]-PR	
	428	DTHFPICIF-[bhPro]-PK	
	429	DTHFPICIF-[bhPro]-PR	
	430	DTHFPICIF-[(D)Pro]-[bhPro]-K	
	431	DTHFPICIF-[(D)-Pro]-[bhPro]-R	
	432	DTHFPICI-[bhPhe]-[(D)Pro]-PK	
	433	DTHFPICI-[bhPhe]-[(D)Pro]-PR	
	434	DTHFPICI-[bhPhe]-[(D)Pro]-[bhPro]-K	
	435	DTHFPICI-[bhPhe]-[(D)Pro]-[bhPro]-R	
	436	C-[Inp]-[(D)Dpa]-[Amc]-R-[Amc]-[Inp]-[Dpa]-半胱胺	
	437	CP-[(D)Dpa]-[Amc]-R-[Amc]-[Inp]-[Dpa]-半胱胺	

[1266]

438	C-[(D)Pro]-[(D)Dpa]-[Amc]-R-[Amc]-[Inp]-[Dpa]-半胱 胺	
439	CG-[(D)Dpa]-[Amc]-R-[Amc]-[Inp]-[Dpa]-半胱胺	
440	Hy-DTHFPCAIF-NH ₂	>1000
441	Hy-DTHFPCRRF-NH ₂	无活性
442	[IDA]-TH-[Dpa]-[bhPro]CRR-[bhPhe]-NH ₂	206
443	Hy-DTHFPCEIF-NH ₂	>1000
444	Hy-DTHFPCFIF-NH ₂	1191.8
445	Hy-DTHFPCQIF-NH ₂	>1000
446	Hy-DTHFPCRIF-NH ₂	>1000
447	Hy-[pGlu]-THFPCRKF-NH ₂	>1000
448	Hy-DTHFPCLIF-NH ₂	> 10 μM
449	Hy-DTHFPCVIF-NH ₂	在 10 μM 81%
450	Hy-DTHFPCEIF-NH ₂	在 10 μM 19%
451	Hy-DTHFPCRIF-NH ₂	在 10 μM 31%
452	Hy-DTHFPCKIF-NH ₂	在 10 μM 9%
453	Hy-DTHFPCLF-NH ₂	在 1 μM 39%
454	Hy-DTHFPCEF-NH ₂	在 10 μM 17%
455	Hy-DTHFPCRf-NH ₂	在 10 μM 31%

[1267]

	456	Hy-DTHFPRRFGPRSKGWVC-NH ₂	>1000
	457	[IDA]-THF-[bhPro]-CRR-[bhPhe]GPRSKGWVC-NH ₂	>1000
	458	Hy-DTHFPCIFGPRSKGWVC-NH ₂	>1000
	459	Hy-DTHFPCRIFGPRSRGWVCK-NH ₂	>1000
	460	异戊酸-DTHFPCLIFGPRSKGWVCK-NH ₂	19.2
	461	异戊酸-DTHFPCVIFGPRSKGWVCK-NH ₂	41
	462	异戊酸-DTHFPCSIFGPRSKGWVCK-NH ₂	78
	463	异戊酸-DTHFPCQIFGPRSKGWVCK-NH ₂	157
	464	异戊酸-DTHFPCKIFGPRSKGWVCK-NH ₂	86
	465	异戊酸-DTHFPC-[Dapa]-IFGPRSKGWDCK-NH ₂	65
	466	异戊酸-DTHFPC-[Dapa]-IFGPRSKGWECK-NH ₂	151
	467	异戊酸-DTHFPCKIFGPRSKGWECK-NH ₂	163
	468	异戊酸-DTHFPCRRFGPRSKGWVCK-NH ₂	>1000
	469	异戊酸-DTHFPCTIFGPRSKGWVCK-NH ₂	未测试
	470	Hy-DTHFPPIAICI-NH ₂	>10 μM
	471	Hy-DTHFPPIICI-NH ₂	>10 μM
	472	Hy-DTHICIAIF-NH ₂	>10 μM
	473	Hy-DTHCPIAIF-NH ₂	>10 μM
	474	Hy-ATHFPCIIF-NH ₂	>1000
	475	Hy-ADHFPCIIF-NH ₂	>1000
	476	Hy-DTHFPCIIFKC-NH ₂	6398.0
	477	Hy-DTHFPCIIFAC-NH ₂	>1000
	478	Hy-DTHFPCIIFAA-NH ₂	在 1 μM

[1268]

			59%
	479	Hy-DEHFPCIIF-NH ₂	在 10 μM 34%
	480	Hy-DPHFPCIIF-NH ₂	在 10 μM 64%
	481	Hy-DTHKPCIIF-NH ₂	在 10 μM 45 %
	482	Hy-DTHVPCIIF-NH ₂	在 10 μM 34%
	483	Hy-DTHFVCIIF-NH ₂	在 10 μM 50%
	484	Hy-DTHFPCIIF-NH ₂	在 10 μM 75%
	485	Hy-DTHFPCIIT-NH ₂	在 1 μM 23%
	486	Hy-DTHFPCILY-NH ₂	在 1 μM 85%
	487	Hy-DTHFPCIEY-NH ₂	在 1 μM 8%
	488	异戊酸-DTHFPCIIFGPRSKG-[N-MeTrp]-VC-NH ₂	32
	489	异戊酸 -DTHFPCIIF-[Sarc]-PRSKG-[N-MeTrp]-VC-NH ₂	10
	490	异戊酸 -DTHFPCIIF-[Sarc]-PHSKG-[N-MeTrp]-VC-NH ₂	9
	491	异戊酸-DTHFPCIIFEPRSKHWVCK-NH ₂	15
	492	异戊酸-DTHFPCIIFEPRSKEWVCK-NH ₂	19
	493	异戊酸-DTHFPCIIFEPRSKLWVCK-NH ₂	7
	494	异戊酸-DTHFPCIIFEPRSKFWVCK-NH ₂	10

[1269]

	495	异戊酸-DTHFPCIKFEPHSK-[Sarc]-CK-NH ₂	28
	496	异戊酸-DTHFPCIKFKPHSKEWVCE-NH ₂	46
	497	异戊酸-DTHFPCIKFEPRSKIEWVCK-NH ₂	20
	498	异戊酸-DTHFPCIKFEPRSKLWVCK-NH ₂	9
	499	异戊酸-DTHFPCIKFEPRSKIEWVCK-OH	46
	500	异戊酸-DTHFPCIKFEPRS-K(异 Glu-辛酸)-ECK-NH ₂	48
	501	Hy-DTHFPCIIFGPRSKGWAVCYW-NH ₂	197
	502	Hy-DTHFPICIFGPHRSKGWVCM-NH ₂	149
	503	Hy-DTHFPCIIFGPRSKGWVAC-NH ₂	281
	504	Hy-DTHFP-[(D)Cys]-IIFGPRSKGWVA-[(D)Cys]-NH ₂	>10 μM
	505	Hy-DTHFPCIIFGPRSKGWVACY-NH ₂	>10 μM
	506	Hy-DTHFPCIIFGPRSRGHVCK-NH ₂	>1000
	507	Hy-DTHFPCIIFGPRSKGWNCK-NH ₂	>1000
	508	Hy-DTHFPCINFGPRSKGWVCK-NH ₂	>1000
	509	Hy-DTHFPCIDFGPRSKGWVCK-NH ₂	>1000
	510	异戊酸-DTHFECIIFGPRSKGWVCK-NH ₂	>1000
	511	Hy-DTHFPCIIFGGPRSRGWVCK-NH ₂	520
	512	Hy-DTHFPCIIFGGPRSKGWNCK-NH ₂	404
	513	Hy-DTHFPCIIFGGPRSKGWDCK-NH ₂	679
	514	异戊酸-DTHFPCIFEPRSKGTCK-NH ₂	57
	515	异戊酸-DTHFPCIIF-[PEG3]-C-NH ₂	157
	516	异戊酸-DTHAPCIKF-[Sarc]-PRSKGWECK-NH ₂	>10 μM
	517	异戊酸-DTHAPCIKFEPRSK-[Sarc]-WECK-NH ₂	>10 μM

[1270]

	518	异戊酸-DTHAPCIKFEPRSKEWECK-NH ₂	>10 μ M
	519	异戊酸-STHAPCIKFEPRSKGWECK-NH ₂	>10 μ M
	520	异戊酸-SKHAPCIKFEPRSKGWECK-NH ₂	>10 μ M
	521	异戊酸-DTHFPCIKFEPHSKEWVCK-NH ₂	80
	522	异戊酸-DTAFPCIKFEPRSKEC-NH ₂	>10 μ M
	523	异戊酸-DTHFGCIKFEPRSKEWVCK-NH ₂	>1000
	524	异戊酸-DTEFPCIKFEPRSKEWVCK-NH ₂	>1000
	525	异戊酸-DTHFPCIKFEPRS-K(辛酸)-EWVCK-NH ₂	62
	526	异戊酸-ETHFPCIKFEPRSKEWVCK-NH ₂	181

[1271] 为了确定给定的肽是否修饰内源膜铁转运蛋白的内化和降解,可以使用本领域已知的蛋白质印迹、免疫组织化学和膜铁转运蛋白抗体来分析用肽处理的肝细胞和巨噬细胞中膜铁转运蛋白的蛋白水平和细胞分布。

[1272] 实施例3

[1273] 血清稳定性分析

[1274] 进行血清稳定性实验以补充体内结果并辅助有效、稳定的膜铁转运蛋白激动剂的设计。将关键肽 (10 μ M) 与预热的人血清 (Sigma)、新鲜大鼠血清或血浆在37度下孵育。在多达24小时的不同时间点取样。将样本与血清蛋白分离,并使用LC-MS分析目标肽的存在。使用相对于零时间点的分析物峰面积计算每个样品中完整肽的量。基于测试对化合物与内标的峰面积响应比,计算每个时间点的剩余百分比。将时间0设置为100%,并且相对于时间0计算所有后来的时间点。通过使用Graphpad拟合到一阶指数衰减方程来计算半衰期。在表15中显示了人和大鼠的离体稳定性完整列表。

[1275] 表15. 具有血清/血浆半衰期的类似物的实例

[1276]

SEQ ID NO	序列	大鼠 血清 t _{1/2} (h)	大鼠 血浆 t _{1/2} (h)	人血清 t _{1/2} (h)
547	Hy-DTHFPICIFCCGCCHRSKCGMCCCKT-OH (铁调素)			2.76(可变的)
545	Hy-DTHFPICIF-NH ₂	-	-	0.1
548	棕榈基-PEG11-ficipfhtd-NH ₂	-	-	0.06
28	Hy-DTHFPCIIF-NH ₂	-	-	0.18
549	DTHFPICIFGPRSKGWVCM-NH ₂	0.18	-	2.32
533	(Hy-DTHFPICIF-NH ₂) ₂	-	-	0.67
93	Hy-DTHFPCRRFGPRSKGWVC-NH ₂	-	-	0.46
550	Ida-THF-[bhPro]-CRR-[bhPhe]-GPRSKGWVC-NH ₂	-	-	1.14
551	Hy-[bhAsp]-THFPICIFGPRSKGWVC-NH ₂	-	-	2.1
552	Hy-[bhAsp]-TH-[NMePhe]-PICIFGPRSKGWVC-NH ₂	0.16	4	1.93
29	异戊酸-DTHFPICIFGPRSKGWVC-NH ₂	0.15	4	1.99
68	Ac-DTHFPICIFKPRSKGWVCM-NH ₂	0.31	5.9	-
553	Ac-DTHFPICIF-K(m-PEG8)-PRSKGWVCM-NH ₂	1.81	19.5	40
554	Ac-DTHFPICIFGPRS-K(m-PEG8)-GWVCM-NH ₂	1.82	6	40
555	Ida-TH-Dpa-bhPro-CIIFGPRSRGW VCK-NH ₂	-	-	0.51
556	Hy-IPFIDTCFHGPRSRGWVCK-NH ₂	-	-	0.18
30	异戊酸-DTHFPCIIFGPRSRGWVC K-NH ₂	0.08	0.43	0.51
63	Ac-DTHFPICIFGPRSKGWVCM-NH ₂	0.38	6	-
128	异戊酸-DTHFPCIIFEPRSKGWVCK-NH ₂	0.68	-	2.22
31	异戊酸-DTHFPCIIFGPRSKGWVC-NH ₂	0.13	4	0.94
557	异戊酸-DTHFPCIIFGPRSKGVCK-NH ₂	0.27	-	1.17
138	异戊酸-DTHFPCIIFGPRSKGCK-NH ₂	0.19	-	1.33
558	异戊酸-DTHFPCIFGPRSKGWCK-NH ₂	0.21	-	0.99
144	异戊酸-DTHFPCIKFGPRSKGWECK-NH ₂	0.38	-	1.19
38	异戊酸-DTHFPCIIFGPRSKGWVCK-NH ₂	0.14	-	-
36	异戊酸-DTHFPCIKFGPRSKGWVCK-NH ₂	0.14	-	0.57

[1277]

37	异戊酸-DTHFPCIQFGPRSKGWVCK-NH ₂	0.12	-	0.61
42	异戊酸-DTHFPCIEFGPRSKGWVCK-NH ₂	0.15	-	0.74
172	异戊酸-DTHFPCI-K(m-PEG8)- FGP RSKGWVCK-NH ₂	0.32	-	1.13
173	异戊酸-DTHFPCIKF-K(m-PEG8)- PRSKGWVCK-NH ₂	0.42	-	1.35
175	异戊酸-DTHFPCIKFGPRS-K(m-PEG8)- GWVCK-NH ₂	1.16	-	11.09
176	异戊酸-DTHFPCIKFGPRSKGWVC- K(m-PEG8)-NH ₂	0.41	-	3.36
181	异戊酸-DTHFPCI-K(甜菜碱)- FGPRSKGWVCK-NH ₂	0.14	-	1.22
559	(异戊酸-DTHFPCIIF-NH ₂) ₂	18	-	>24
560	异戊酸-DTHFPICIFGPRS-K(m-PEG8)-GWVC-NH ₂	1.62	-	15
561	异戊酸-DTHFPICIFGPRS-K(m-PEG4)-GWVC-NH ₂	1.1	-	12
562	(异戊酸-DTHFPCIIFGPRSRGWVC K) ₂ -DIG-NH ₂	0.59	-	9
563	异戊酸-DTHFPICIFGPRSKG-[NMeTrp]-VC-NH ₂	0.07	-	0.4
564	异戊酸-DTHFPICIF-[Sar]-PRSKG- [NMeTrp]-VC-NH ₂	0.24	-	1.36
565	异戊酸-DTHFPICIF-[Sar]-PHSKG- [NMeTrp]-VC-NH ₂	11.3	-	>24
207	异戊酸-DTHFPCIKFEPRSKGCK-NH ₂	2.12	-	8.06
218	异戊酸-DTHFPCIKF-K(棕榈基)- PRSKGWVCK-NH ₂	24	-	>24
220	异戊酸-DTHFPCIKFGPRS-K(棕榈基)- GWVCK-NH ₂	>24	-	>>24
223	异戊酸-DTHFPCIKF-K(PEG3-棕榈基)- PRSKGWVCK-NH ₂	3.95	-	22.2
228	DTHFPCIKF-K(IVA)-PRSKGWVCK-NH ₂	0.19	-	0.31
233	DTHFPCIKF-K(PEG3-IVA)-PRSKGWVCK-NH ₂	0.35	-	0.58
491	异戊酸-DTHFPCIIFEPRSKHWVCK-NH ₂	1.29	-	4.71

[1278]

492	异戊酸-DTHFPCIIFEPRSKWVCK-NH ₂	7.7	-	>24
493	异戊酸-DTHFPCIIFEPRSKLWVCK-NH ₂	3.7	-	>24
566	异戊酸-DTHFPCIIFEPRSKKWVCK-NH ₂	0.89	-	5.06
494	异戊酸-DTHFPCIIFEPRSKFWVCK-NH ₂	2.69	-	20
567	异戊酸-DTHFPCIIF-PEG3-C-NH ₂	>24	-	>>24
568	DIG-(DTHFPCIIF-NH ₂) ₂	>24	-	>>24
242	异戊酸-DTHFPCIKF-K(异glu-棕榈基)- PRSKGCK-NH ₂	16	-	>>24
569	异戊酸-DTHFPCIKFK(dapa-棕榈基)PRSKGCK-NH ₂	14	-	24

[1279] 实施例4

[1280] 减少大鼠中游离血浆铁

[1281] 为了研究肽类似物是否有效降低血清中的游离Fe²⁺,使用逆反向微型铁调素作为参考肽。虽然RI微型Hep在体外具有非常低的效价,但是它在体内是高度活性的,如Presza等人J Clin Invest.2011年中报道。

[1282] 在第1天,监测动物血清中的游离Fe²⁺。为了达到均匀的血清水平,分析Fe²⁺并且将7或8只动物的同质群体随机分配到每个治疗组。在第2天,进行急性实验,其中对动物进行腹膜内(i.p.)给予测试化合物和随后的尾静脉血样。在给药前,将动物置于加热灯下3-5分钟。从所有动物的尾静脉抽取血液样品,以便在给予赋形剂或化合物之前测定血清铁水平。经腹膜内向动物给予1ml在媒介物中的测试物质或仅仅是媒介物,在参考化合物的研究中于t=0分钟、60分钟、120分钟、240分钟、360分钟和24小时从每只动物抽取250μl的血液样本。将用逆反向(RI)微型铁调素(参考化合物)进行的剂量反应研究和用测试化合物进行的功效研究作为单独的实验进行。

[1283] 来自第0天和第1天的Fe²⁺分析在不晚于10天后的稍后时间点进行。所用的化学品和设备如下表13所示。

[1284] 表13.所用化学品和设备

[1285]

药物名称	化合物 No.	SEQ ID No.	MW (g/mol)	计算的 肽含 量%	测定的 肽含 量%	纯度 %	溶剂
异戊酸 -DTHFPIIFG PRSKGWVC- NH ₂	2	29	2144.52	86.2	86.2	90	乙酸钠 缓冲液
RI-铁调素 1-9		546	1091.3	82.7	82.7	94.2	强 PBS

[1286] 最初,将所有化合物(包括肽类似物)溶解在pH=2.5的酸性H₂O中,并溶解至3mg/

mI API的浓度。然后将化合物溶解在乙酸钠缓冲液 (50mM乙酸, 125mM NaCl, pH 5.0) 或强PBS (25mM磷酸钠, 125mM NaCl, pH7.4) 中。

[1287] 在研究中使用体重200-250g的雄性Sprague-Dawley大鼠。它们在光照、温度和湿度受控的房间 (12小时光照:12小时黑暗循环, 在0600/1800小时开灯/关灯; 23℃; 50%相对湿度)。根据OECD的“动物研究方案中的终点指南 (Guidelines for Endpoints in Animal Study Proposals)”应用人道终点。每天监测动物。在显著受影响的情况下 (基于迹象如体重减轻>30% (肥胖动物); 异常姿势; 粗糙的毛被; 眼睛和/或鼻子周围的分泌物; 皮肤损伤; 异常呼吸; 移动困难; 异常食物或水的摄入或自残) 或引起显著疼痛或痛苦的其他病症, 立即对动物实施安乐死。

[1288] 使用根据来自分析的制造商说明 (分析: IRON2: ACN 661) 在Cobas c 111上进行比色测定法测量血浆/血清中的铁含量, 测定铁含量。

[1289] 从Cobas Iron2分析获得的数据表示为平均值+/-SEM。

[1290] 预期给予本发明的肽类似物导致血清铁水平的降低, 其与注射阳性对照逆反向微型调素 (RI-微型铁调素) 后观察到的水平相当。

[1291] 实施例5

[1292] 肽类似物的体内检验

[1293] 如前述实施例所述测试本发明的肽类似物的体内活性, 具有以下变化。代替大鼠, 测试小鼠 (C57-BL6)。用以3000nmol/kg给药的本发明化合物和以1000nmol/kg皮下注射施用的铁调素对照, 向小鼠 (n=8/组) 施用肽或载体对照。在表14中显示了所测试的肽, 其具有内化/降解试验效价值。

[1294] 表14. 示例性铁调素类似物的效价

[1295]

化合物 编号	SEQ ID NO:	序列	效价 EC ₅₀ (nM)
铁调素	335	DTHFPICIFCCGCCHRSKCGMCKKT-OH	34
化合物 1	207	异戊酸-DTHFPCIKFEPRSKG__CK-NH ₂	23
化合物 2	36	异戊酸-DTHFPCIKFGPRSKGWVCK-NH ₂	35
化合物 3	76	异戊酸-DTHFPCIKFGPRSKGWVCK-[(m-PEG8)]-NH ₂	17
化合物 4	199	异戊酸-DTHFPICIFGPRSK-[(m-PEG8)]-GWVC-NH ₂	6.4
化合物 5	492	异戊酸-DTHFPCIIFEPRSKIEWVCK-NH ₂	19
化合物 6	490	异戊酸-DTHFPCIIF-[Sarc]-PHSKG-[N-MeTrp]-VC-NH ₂	9

[1296] 本实验的主要目的是在小鼠模型中验证本发明的肽类似物的活性。在肽或媒介物施用后2小时, 如前述实施例中那样评估血清铁水平。与媒介物对照相比, 在化合物处理的

动物中观察到血清铁的显著减少。此外,本发明化合物的最大剂量反应,预期类似于用铁调素实现的最大剂量反应。

[1297] 用较低剂量进行类似的实验,以评估这些化合物诱导血清铁降低的剂量反应。除了以下参数之外: $n=4$ 只小鼠/组,然而对于载体, $n=8$,因为合并了两组,方法如在本实施例中上文所述。通过皮下注射以两个不同剂量(300nmol/kg 或 1000nmol/kg)给小鼠施用测试化合物。肽或媒介物注射后2小时,如前述实施例中那样评估血清铁水平。这些肽在体内诱导与天然铁调素相似的铁减少。该实验的结果示于图1中,其提供了在C-57(小鼠)中以血清铁水平($n=4$)表示的在两种浓度(300nmol/kg 和 1000nmol/kg ,皮下或“sc”;2小时)下,示例性铁调素类似物的体内剂量响应。

[1298] 其他肽类似地在前述实施例中所述的大鼠中,或在本实施例中如上所述的小鼠中进行测试。肽施用的途径是通过皮下注射,除非另有说明是通过腹膜内注射。

[1299] 还使用本领域技术人员通常已知的方法,测试肽的其它药代动力学/药效学(PK/PD)参数。这些参数包括关于稳定性(在指示的人或大鼠对象血浆中稳定的小时)、小鼠半衰期和体外活性(EC_{50})的测定。将本发明的肽类似物的PK/PD性质与铁调素进行比较,以确定其在C57BL6小鼠中的PK/PD效果。预期肽类似物导致血清铁的减少,其可以是短暂的或持续的。

[1300] 在本说明书中引用和/或在申请数据表中列出的所有上述美国专利、美国专利申请出版物、美国专利申请、外国专利、外国专利申请和非专利出版物,通过引用整体并入本文。

[1301] 从上述内容可以理解,虽然为了说明目的在此描述了本发明的具体实施例,但是在不脱离本发明的精神和范围的情况下可以进行各种修改。

两种浓度（皮下注射；2h）的选定的一系列铁调素类似物在体内的剂量响应，
C-57(小鼠)，血清铁水平（n=4）

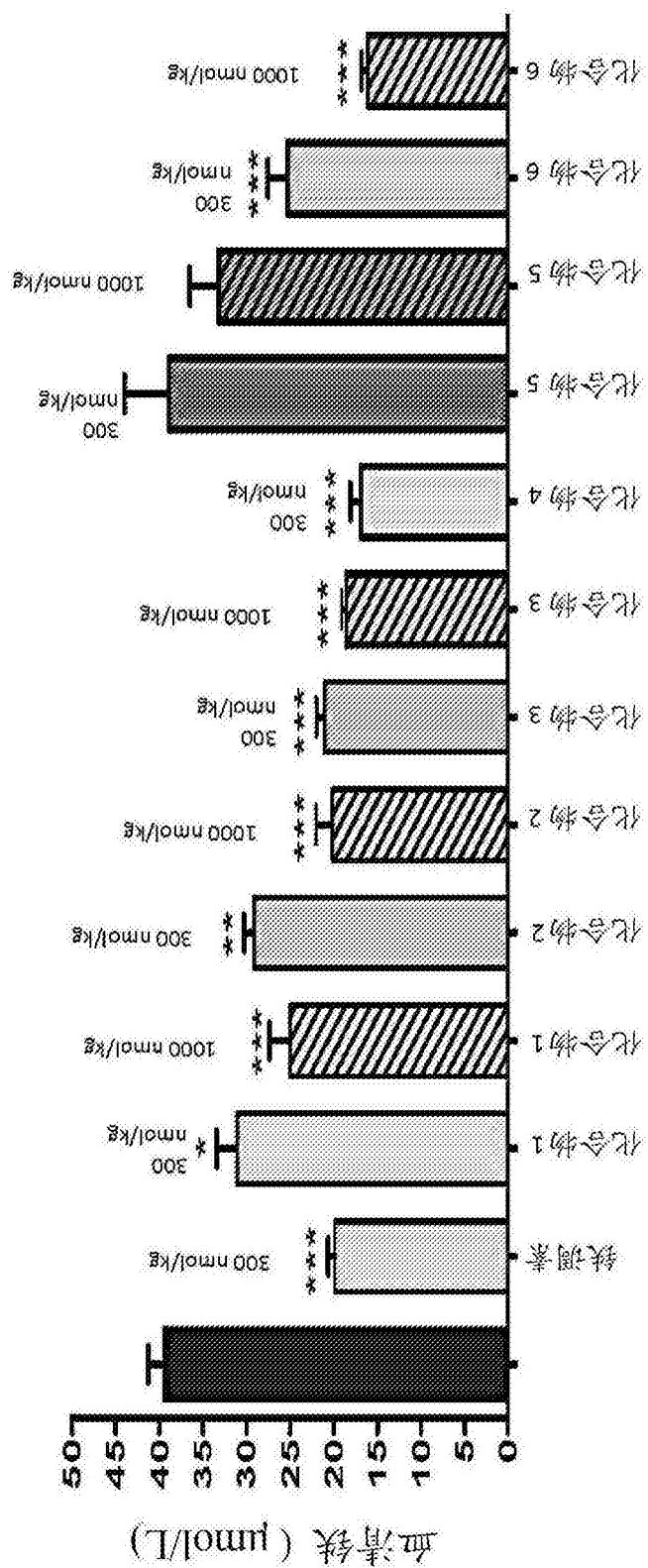


图1