



(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公告本

(11) 證書號數：TW I535455 B

(45) 公告日：中華民國 105 (2016) 年 06 月 01 日

(21) 申請案號：101120237 (22) 申請日：中華民國 101 (2012) 年 06 月 05 日

(51) Int. Cl. : *A61K51/08 (2006.01)* *A61K103/20 (2006.01)*
A61K103/34 (2006.01)

(30) 優先權：2011/06/06 美國 61/493,868
 2012/04/17 美國 61/625,578

(71) 申請人：奇尼塔一有限責任公司 (美國) KINETA ONE, LLC (US)
 美國

(72) 發明人：怡艾多奈托 尚恩 P IADONATO, SHAWN P. (US)；塔恰 艾瑞克 J TARCHA,
 ERIC J. (US)

(74) 代理人：陳長文

(56) 參考文獻：
 CN 101072577A

審查人員：張子威

申請專利範圍項數：7 項 圖式數：3 共 63 頁

(54) 名稱

以 SHK 為主之醫藥組合物及其製備方法及用途

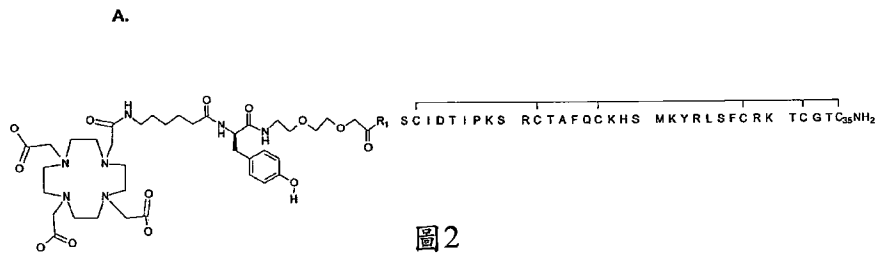
SHK-BASED PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS AND METHODS OF MANUFACTURING AND USING THE SAME

(57) 摘要

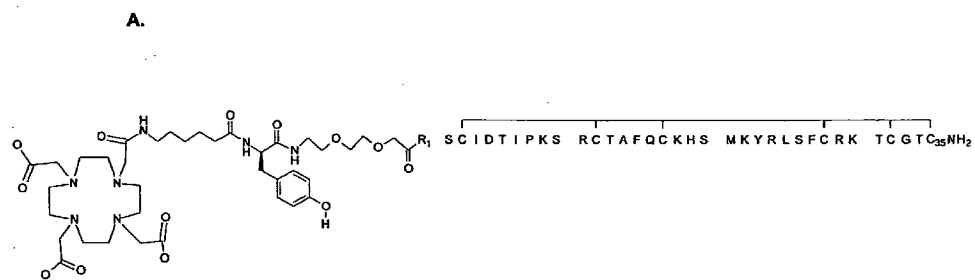
本發明揭示一種具有序列 Arg-Ser-Cys-Ile-Asp-Thr-Ile-Pro-Lys-Ser-Arg-Cys-Thr-Ala-Phe-Gln-Cys-Lys-His-Ser-Xaa-Lys-Tyr-Arg-Leu-Ser-Phe-Cys-Arg-Lys-Thr-Cys-Gly-Thr-Cys (SEQ ID NO: 1) 的醫藥組合物。所揭示之組合物在 SEQ ID NO: 1 之 C 端可包括酸或醯胺，且該多肽可鍵連至帶負電荷離子的有機或無機化學實體。該多肽可標記可檢測之標記，以用於診斷之目的。本發明亦揭示製造及利用該等醫藥化合物之方法。

Disclosed herein are pharmaceutical compositions having the sequence Arg-Ser-Cys-Ile-Asp-Thr-Ile-Pro-Lys-Ser-Arg-Cys-Thr-Ala-Phe-Gln-Cys-Lys-His-Ser-Xaa-Lys-Tyr-Arg-Leu-Ser-Phe-Cys-Arg-Lys-Thr-Cys-Gly-Thr-Cys (SEQ ID NO:1). The disclosed compositions can include an acid or amide at the C-terminus of SEQ ID NO: 1 and the polypeptide can be attached to an organic or inorganic chemical entity that has an anionic charge. The polypeptide can be detectably labeled for diagnostic purposes. Methods of manufacturing and using the pharmaceutical compounds are also disclosed.

指定代表圖：



特徵化學式：



發明專利說明書

公告本

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號：101120237

A61K51/08 (2006.01)

※ 申請日：101.6.5

※IPC 分類：A61K103/20

(2006.01)

A61K103/34 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

以SHK為主之醫藥組合物及其製備方法及用途

SHK-BASED PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS AND METHODS
OF MANUFACTURING AND USING THE SAME

二、中文發明摘要：

本發明揭示一種具有序列 Arg-Ser-Cys-Ile-Asp-Thr-Ile-Pro-Lys-Ser-Arg-Cys-Thr-Ala-Phe-Gln-Cys-Lys-His-Ser-Xaa-Lys-Tyr-Arg-Leu-Ser-Phe-Cys-Arg-Lys-Thr-Cys-Gly-Thr-Cys (SEQ ID NO:1) 的醫藥組合物。所揭示之組合物在 SEQ ID NO:1 之 C 端可包括酸或醯胺，且該多肽可鍵連至帶負電荷離子的有機或無機化學實體。該多肽可標記可檢測之標記，以用於診斷之目的。本發明亦揭示製造及利用該等醫藥化合物之方法。

三、英文發明摘要：

Disclosed herein are pharmaceutical compositions having the sequence Arg-Ser-Cys-Ile-Asp-Thr-Ile-Pro-Lys-Ser-Arg-Cys-Thr-Ala-Phe-Gln-Cys-Lys-His-Ser-Xaa-Lys-Tyr-Arg-Leu-Ser-Phe-Cys-Arg-Lys-Thr-Cys-Gly-Thr-Cys (SEQ ID NO:1). The disclosed compositions can include an acid or amide at the C-terminus of SEQ ID NO: 1 and the polypeptide can be attached to an organic or inorganic chemical entity that has an anionic charge. The polypeptide can be detectably labeled for diagnostic purposes. Methods of manufacturing and using the pharmaceutical compounds are also disclosed.

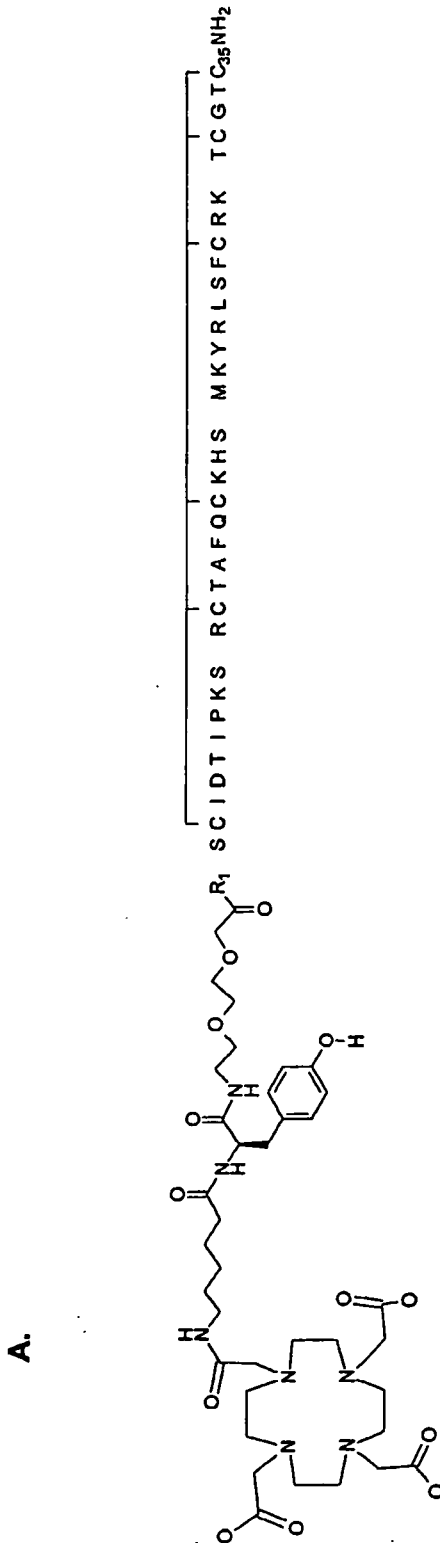
四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第(2A)圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無元件符號說明)

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：



六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

文中揭示之組合物及方法一般係關於以 ShK 為主之醫藥組合物於治療、預防及/或緩解與其中記憶 T 細胞發揮作用之疾病及異常(包括自體免疫疾病及代謝異常)有關之症狀之用途。

相關申請案之交叉參考

本申請案主張在 2011 年 6 月 6 日申請之美國臨時申請案第 61/493,868 號及在 2012 年 4 月 17 日申請之 61/625,578 之優先權，其均以引用之方式全文併入本文。

政府權益之聲明

依據過敏及傳染病健康國立研究所(National Institutes of Health National Institute of Allergy and Infectious Diseases)補助金 R43AI085691 及 NIH R01NS48252，美國政府擁有本發明中之權利。

【發明內容】

許多免疫相關的人類疾病及代謝異常係因記憶 T 細胞之作用而引起。該免疫相關疾病包括自體免疫疾病諸如多發性硬化、1 型糖尿病、風濕性關節炎及牛皮癬等。代謝異常的實例包括肥胖、2 型糖尿病、高膽固醇血症、冠狀動脈病、新陳代謝症候群、新陳代謝症候群 X、胰島素抗性、高脂血症、脂質營養不良、血脂異常、高三酸甘油酯血症、葡萄糖耐受不良及高血壓。

已知兩類記憶 T 細胞：中央記憶 T 細胞(T_{CM})及效應物記

憶T細胞(T_{EM})。一經活化， T_{EM} 細胞可向上調控Kv1.3 K^+ 離子通道。 T_{EM} 細胞之抗原驅動增殖對Kv1.3 K^+ 離子通道阻斷劑敏感(Wulff等人，J. Clin. Invest. 111:1703-1713, 2003)，且最初從加勒比海海葵單離之多肽ShK可充當該阻斷劑。藉由阻斷Kv1.3通道，在皮莫耳濃度下之ShK抑制 T_{EM} 細胞的增殖。

文中揭示之一個實施例包括一種醫藥組合物，其包括具有序列 Arg-Ser-Cys-Ile-Asp-Thr-Ile-Pro-Lys-Ser-Arg-Cys-Thr-Ala-Phe-Gln-Cys-Lys-His-Ser-Xaa-Lys-Tyr-Arg-Leu-Ser-Phe-Cys-Arg-Lys-Thr-Cys-Gly-Thr-Cys(SEQ ID NO:1，其中Xaa為Met或Nle)的ShK多肽。

另一實施例包括一種醫藥組合物，其包括具有式 Arg-Ser-Cys-Ile-Asp-Thr-Ile-Pro-Lys-Ser-Arg-Cys-Thr-Ala-Phe-Gln-Cys-Lys-His-Ser-Met-Lys-Tyr-Arg-Leu-Ser-Phe-Cys-Arg-Lys-Thr-Cys-Gly-Thr-Cys-NH₂(SEQ ID NO:2)之ShK多肽。

另一實施例包括一種醫藥組合物，其包括具有式對磷酸 -Tyr-AEEA-Arg-Ser-Cys-Ile-Asp-Thr-Ile-Pro-Lys-Ser-Arg-Cys-Thr-Ala-Phe-Gln-Cys-Lys-His-Ser-Met-Lys-Tyr-Arg-Leu-Ser-Phe-Cys-Arg-Lys-Thr-Cys-Gly-Thr-Cys-NH₂(SEQ ID NO:3；ShK-186)之ShK多肽。

另一實施例包括一種醫藥組合物，其包括具有式L-半胱胺醯胺、4-磷醯基-L-苯基丙胺醯基-2-[2-(2-胺基乙氧基)乙氧基]乙醯基-L-精胺醯基-L-絲胺醯基-L-半胱胺醯基-L-異

白胺醯基-L- α -天冬胺醯基-L-蘇胺醯基-L-異白胺醯基-L-脯
 胺醯基-L-離胺醯基-L-絲胺醯基-L-精胺醯基-L-半胱胺醯
 基-L-蘇胺醯基-L-丙胺醯基-L-苯基丙胺醯基-L-麩醯胺醯
 基-L-半胱胺醯基-L-離胺醯基-L-組胺醯基-L-絲胺醯基-L-
 正白胺醯基-L-離胺醯基-L-酪胺醯基-L-精胺醯基-L-白胺
 醯基-L-絲胺醯基-L-苯基丙胺醯基-L-半胱胺醯基-L-精胺
 醯基-L-離胺醯基-L-蘇胺醯基-L-半胱胺醯基甘胺醯基-L-
 蘇胺醯基-，環狀(5 \rightarrow 37),(14 \rightarrow 30),(19 \rightarrow 34)-叁(二硫化
 物)(在此稱為 ShK-192(SEQ ID NO: 4)，CAS 註冊號
 1159528-26-3)之 ShK 多肽，其中該 ShK-192 多肽鍵連至帶
 負電荷離子的有機或無機化學實體，且該 C 端為酸或醯
 胺。

另一實施例包括一種醫藥組合物，其包括具有式 Tyr-
 AEEA-Arg-Ser-Cys-Ile-Asp-Thr-Ile-Pro-Lys-Ser-Arg-Cys-
 Thr-Ala-Phe-Gln-Cys-Lys-His-Ser-Met-Lys-Tyr-Arg-Leu-
 Ser-Phe-Cys-Arg-Lys-Thr-Cys-Gly-Thr-Cys-NH₂(SEQ ID
 NO: 5' ShK-198)之 ShK 多肽。

在另一實施例中，ShK 多肽鍵連至帶負電荷離子的有機
 或無機化學實體。在另一實施例中，該 C 端為酸或醯胺。
 在另一實施例中，ShK 多肽鍵連至帶負電荷離子的有機或
 無機化學實體，且該 C 端為酸或醯胺。

在另一實施例中，一或多種化學實體鍵連至 ShK 多肽的
 N 端。在另一實施例中，該化學實體可以經由連接分子或
 連接基團鍵連至 ShK 多肽的 N 端。在另一實施例中，該化

學實體可以藉由胺基乙氧基乙氧基-乙醯基連接子鍵連至 ShK 多肽的 N 端。

在另一實施例中，該化學實體係選自由以下組成之群：
L-Pmp(OH₂)； D-Pmp(OH₂)； D-Pmp(OHEt)； L-Pmp(Et₂)；
D-Pmp(Et₂)； L-Tyr； L-Tyr(PO₃H₂)； L-Phe(p-NH₂)； L-Phe
(p-CO₂H)； L-天冬胺酸； D-天冬胺酸； L-麩胺酸及 D-麩胺
酸。

在另一實施例中，化學實體/連接子係選自由以下組成
之群： AEEAc-L-Pmp(OH₂)； AEEAc-D-Pmp(OH₂)；
AEEAc-D-Pmp(OHEt)； AEEAc-L-Pmp(Et₂)； AEEAc-D-
Pmp(Et₂)； AEEAc-L-Tyr； AEEAc-L-Tyr(PO₃H₂)； AEEAc-
L-Phe(p-NH₂)； AEEAc-L-Phe(p-CO₂H)； AEEAc-L-天冬胺
酸； AEEAc-D-天冬胺酸； AEEAc-L-麩胺酸及 AEEAc-D-麩
胺酸。

在另一實施例中，該 ShK 多肽在醫藥組合物中係以其醫
藥上可接受的鹽提供。在另一實施例中，該醫藥上可接受
的鹽為乙酸鹽。在另一實施例中，該醫藥上可接受的鹽為
乙酸鉀或乙酸鈉。

在另一實施例中，該醫藥組合物係提供於水性載體中。

在另一實施例中，該醫藥組合物之 pH 係介於 5 與 7 之間。
在另一實施例中，該醫藥組合物之 pH 為 6.0。

在另一實施例中，該醫藥組合物進一步包括在水性載體
中有效溶解 ShK 多肽之含量的界面活性劑。在另一實施例
中，該界面活性劑為聚山梨醇酯 20。在另一實施例中，該

界面活性劑為0.05 w/v%之聚山梨醇酯20。

在另一實施例中，該醫藥組合物進一步包括10 mM磷酸鈉。在另一實施例中，該醫藥組合物進一步包括150 mM NaCl。

在另一實施例中，該ShK多肽係以0.01 mg/ml至500 mg/ml之含量存在。在其他實施例中，該ShK多肽可以0.01、0.1、0.5、0.75、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、150、200、250、300、350、400、450或500 mg/ml之含量提供。

在另一實施例中，該ShK多肽係獲自天然來源。在另一實施例中，該ShK多肽為合成的。在另一實施例中，該ShK多肽包括天然及合成ShK多肽的混合物。

文中敘述之實施例亦包括以文中所述組合物開始製造之凍乾醫藥組合物。在一個實施例中，該凍乾醫藥組合物包括8至12重量%之乙酸鹽含量。在另一實施例中，該凍乾醫藥組合物包括10至11重量%之乙酸鹽含量。

在該等凍乾醫藥組合物之另一實施例中，該醫藥組合物之含水量小於5%。在該等凍乾醫藥組合物之另一實施例中，該醫藥組合物之含水量小於4.0%。在該等凍乾醫藥組合物之另一實施例中，該醫藥組合物之含水量小於3.5%。

在另一實施例中，該等醫藥組合物係提供於包裝材料

中。在另一實施例中，該等醫藥組合物經調配以長期儲存。在另一實施例中，該等醫藥組合物係含於無菌玻璃小瓶中及按照指示儲存在 -70°C 。

在另一實施例中，該等醫藥組合物經調配以供皮下投與。在另一實施例中，該等醫藥組合物係含於無菌注射器中。

一個實施例包括一種醫藥組合物，其包括具有序列 Arg-Ser-Cys-Ile-Asp-Thr-Ile-Pro-Lys-Ser-Arg-Cys-Thr-Ala-Phe-Gln-Cys-Lys-His-Ser-Xaa-Lys-Tyr-Arg-Leu-Ser-Phe-Cys-Arg-Lys-Thr-Cys-Gly-Thr-Cys (SEQ ID NO:1 其中 Xaa 為 Met 或 Nle) 之 ShK 多肽之醫藥上可接受的鹽、10 mM 磷酸鈉、150 mM NaCl 及 0.05 w/v% 之聚山梨醇酯 20，其中該 ShK 多肽鍵連至帶負電荷離子的有機或無機化學實體，及該 C 端為酸或醯胺且該組合物之 pH 為 6.0。

另一實施例包括一種醫藥組合物，其包括具有式 Arg-Ser-Cys-Ile-Asp-Thr-Ile-Pro-Lys-Ser-Arg-Cys-Thr-Ala-Phe-Gln-Cys-Lys-His-Ser-Met-Lys-Tyr-Arg-Leu-Ser-Phe-Cys-Arg-Lys-Thr-Cys-Gly-Thr-Cys-NH₂ (SEQ ID NO:1 其中 Xaa 為 Met) 之 ShK 多肽的醫藥上可接受的鹽、10 mM 磷酸鈉、150 mM NaCl 及 0.05 w/v% 之聚山梨醇酯 20，其中該 ShK 多肽鍵連至帶負電荷離子的有機或無機化學實體且該組合物之 pH 為 6.0。

另一實施例包括一種醫藥組合物，其包括具有式對磷酸 -Tyr-AEEA-Arg-Ser-Cys-Ile-Asp-Thr-Ile-Pro-Lys-Ser-Arg-

Cys-Thr-Ala-Phe-Gln-Cys-Lys-His-Ser-Met-Lys-Tyr-Arg-Leu-Ser-Phe-Cys-Arg-Lys-Thr-Cys-Gly-Thr-Cys-NH₂(ShK-186)之ShK多肽的醫藥上可接受的鹽、10 mM磷酸鈉、150 mM NaCl及0.05 w/v%之聚山梨醇酯20，其中該組合物之pH為6.0。

另一實施例包括一種醫藥組合物，其包括具有式Tyr-AEEA-Arg-Ser-Cys-Ile-Asp-Thr-Ile-Pro-Lys-Ser-Arg-Cys-Thr-Ala-Phe-Gln-Cys-Lys-His-Ser-Met-Lys-Tyr-Arg-Leu-Ser-Phe-Cys-Arg-Lys-Thr-Cys-Gly-Thr-Cys-NH₂(ShK-198)之ShK多肽、10 mM磷酸鈉、150 mM NaCl及0.05 w/v%之聚山梨醇酯20，其中該組合物之pH為6.0。

文中揭示之實施例還包括用於醫藥用途之製造單元。該製造單元之一個實施例包括至少一個在無菌條件下製造之包含文中所述醫藥組合物之玻璃小瓶。在另一實施例中，該玻璃小瓶內的醫藥組合物可在-70°C下至少保持安定達6個月。在另一實施例中，該製造單元進一步包括指示稀釋及製備投與人類的醫藥組合物的說明書。

在另一實施例中，用於醫藥用途之製造單元包括至少一個含有文中所述醫藥組合物之無菌注射器。在另一實施例中，該製造單元進一步包括指示將醫藥組合物投與人類的說明書。

文中揭示之實施例還包括製造所述醫藥組合物之方法。一種該實施例包括一種製造包括如下之醫藥組合物的方法：(a)以預定濃度製備0.05%聚山梨醇酯20含於水性載體

中之溶液；(b)將預定含量之具有SEQ ID NO:1之多肽或其醫藥上可接受的鹽添加至步驟(a)之溶液中，其中該C端為酸或醯胺，且其中該多肽鍵連至帶負電荷離子的有機或無機化學實體；(c)調整步驟(b)之溶液之pH直到多肽溶於該溶液中；及(d)若需要，調整步驟(c)之溶液之pH至pH為5至7，因而產生該醫藥組合物。

文中揭示之實施例還包括預防、治療或緩解自體免疫或代謝異常的症狀的方法。一個實施例包括以有效預防、治療或緩解症狀之含量投與文中所述醫藥組合物至需要該預防、治療或緩解自體免疫或代謝異常的人。

在另一實施例中，該異常為選自由以下組成之群的自體免疫異常：多發性硬化、1型糖尿病、風濕性關節炎、牛皮癬、炎性腸病、接觸介導性皮炎、牛皮癬關節炎、哮喘、過敏、索狀病、系統性硬化、纖維化、硬皮病、血管球性腎炎、乾燥症候群、炎性骨吸收、移植排斥反應、移植植物抗宿主病及紅斑性狼瘡。

在另一實施例中，該異常為選自由以下組成之群的代謝異常：肥胖、2型糖尿病、高膽固醇血症、冠狀動脈病、新陳代謝症候群、新陳代謝症候群X、胰島素抗性、高脂血症、脂質營養不良、血脂異常、高三酸甘油酯血症、葡萄糖耐受不良、高血壓、超重及能量代謝異常。

在另一實施例中，該醫藥組合物可每日、每週、每月、每兩月、每三月或每六月投與一次。

在另一實施例中，該醫藥組合物係皮下投與。

在另一實施例中，該ShK多肽係經放射性標記。

在一個實施例中，該ShK多肽係以¹¹¹In標記。

在另一實施例中，該ShK多肽為經¹¹¹In標記之ShK-221。

【實施方式】

本發明提供以ShK為主之醫藥組合物及其製備方法及用途。文中所用之術語「ShK多肽」表示所有天然及合成ShK多肽及如文中所預期之其衍生物、類似物及變形。該類變形及類似物包括SEQ ID NO:1之多肽，帶負電荷離子的有機或無機化學實體經由胺基乙氧基乙氧基-乙醯基連接子鍵連至其。文中所用之「醫藥組合物」包括至少一種文中所揭示之ShK多肽以及適合所選投與模式之一或多種醫藥上可接受的載體、賦形劑或稀釋劑。「至少一種ShK多肽」可包括天然及合成ShK多肽。

如所述，許多與免疫相關的人類疾病及代謝異常係由記憶T細胞的作用所引起。已知兩類記憶T細胞：中央記憶T細胞(T_{CM})及效應物記憶T細胞(T_{EM})。一經活化，T_{EM}細胞向上調控Kv1.3 K⁺離子通道。T_{EM}細胞之抗原驅動增殖對Kv1.3 K⁺離子通道阻斷劑敏感(Wulff等人，J. Clin. Invest. 111:1703-1713, 2003)，且最初從加勒比海之海葵單離之多肽ShK可充當阻斷劑。藉由阻斷Kv1.3通道，在皮莫耳濃度下之ShK抑制T_{EM}細胞的增殖。

MS患者中之髓鞘特異性自體反應性T細胞係主要被活化的TEM細胞(Wulff等人，J. Clin. Invest. 111:1703-1713, 2003)，因此儘管文中所揭示之組合物未受具體機制限

制，但是作為醫藥組合物製備Kv1.3阻斷劑較為合理，以在治療、預防或緩解多發性硬化患者之症狀時減少或消除TEM細胞之活化。

天然ShK多肽敘述於例如Pennington, M.W.等人，Int. J. Pept. Protein Res. 46:354-358(1995)中，以引用之方式將關於相同內容之其教示併入本文中。在本發明範圍內之示例性ShK結構亦公開於Beeton, C.等人，Targeting Effector Memory T Cells with a Selective Peptide Inhibitor of Kv1.3 Channels for Therapy of Autoimmune Diseases, Molecular Pharmacology, 第67卷:1369(2005)及美國專利第8,080,523號(美國專利公開案20080221024)中，所有均以引用之方式將關於相同內容之其教示併入本文中。

一種形成用於文中組合物中之多肽之基礎的示例性多肽顯示於SEQ ID NO:1中。在特定實施例中，該C端為酸(例如COOH)或醯胺(例如CONH₂)，且該多肽鍵連至帶負電荷離子的有機或無機化學實體。「醯胺」表示酸之C端羥基(OH)被NH₂取代。該取代在此命名為術語「醯胺」或C端胺基酸-NH₂，如在「-Cys-NH₂」中。

已經研究ShK之安全性、效用及特異性且已經顯示將多肽鍵連至帶負電荷離子的有機或無機化學實體可以改良ShK用於醫藥組合物中之適用性。

熟習此項技術者瞭解設計具有改善性質之ShK多肽的技術，諸如丙胺酸掃描，利用已知ShK多肽序列及/或分子建模，基於比對介導之突變之合理設計。例如，可設計ShK

多肽以除去含 ShK 多肽組合物中之蛋白酶裂解位點(例如，在 K 或 R 殘基處之胰蛋白酶裂解位點及/或在 F、Y 或 W 殘基處之胰凝乳蛋白酶裂解位點)。

各種 SEQ ID NO:1 多肽之變形為適合的。一種多肽可具有文中揭示之變形的任何組合。為改良 ShK 結構之藥物動力學及藥效動力學 (PK/PD) 性，可取代或替代對降解性敏感的殘基。例如，可取代在 21 位置的 Met 殘基以賦予抗氧化作用的安定化效果。在一個實施例中，在 21 位置的 Met 係被 Nle 所取代。利用醯胺取代 C 端酸官能團亦可賦予安定性。該等對 ShK 之主要結構的兩種取代可與 N 端陰離子部分結合以產生安定及選擇性 Kv1.3 阻斷劑。因此，文中揭示之一個實施例包括 SEQ ID NO: 1，其中在 21 位置的甲硫胺酸係被 Nle 取代，醯胺存在於 C 端及/或陰離子部分存在於 N 端。

非水解磷酸根取代基亦對磷酸根賦予安定性以及抗磷酸酶之安定性。

如所述，某些實施例包括有機或無機化學實體之鍵連。鍵連位點可位於 N 端 (SEQ ID NO:1 中之第一個 Arg)，但變形不限於在該位點的鍵連。示例性化學實體可以藉由連接子諸如胺基乙氧基乙氧基-乙醯基連接子(在此可互換地稱為 Aeea 或 AEEAc) 或藉由任何其他適當方式而鍵連。

適當化學實體之非限制性實例包括 L-Pmp(OH₂)； D-Pmp(OH₂)； D-Pmp(OHEt)； Pmp(Et₂)； D-Pmp(Et₂)； L-Tyr； L-Tyr(PO₃H₂)(對磷酸酪胺酸)； L-Phe(p-NH₂)； L-

Phe(p-CO₂H)；L-天冬胺酸；D-天冬胺酸；L-麩胺酸及D-麩胺酸。所用縮寫之定義如下：Pmp(對膦醯基甲基-苯基丙胺酸)及Ppa(對磷脂醯基-苯基丙胺酸)。PmP及Ppa之替代項包括但不限於Pfp(對膦醯基(二氟-甲基)-苯基丙胺酸)(Pfp)及Pkp(對膦醯基-甲基酮基-苯基丙胺酸)。

化學實體/連接子組合之非限制性實例包括：AEEAc-L-Pmp(OH₂)；AEEAc-D-Pmp(OH₂)；AEEAc-D-Pmp(OHEt)；AEEAc-L-Pmp(Et₂)；AEEAc-D-Pmp(Et₂)；AEEAc-L-Tyr；AEEAc-L-Tyr(PO₃H₂)；AEEAc-L-Phe(p-NH₂)；AEEAc-L-Phe(p-CO₂H)；AEEAc-L-天冬胺酸；AEEAc-D-天冬胺酸；AEEAc-L-麩胺酸及AEEAc-D-麩胺酸。一般在胺基酸殘基具有對掌性中心之化學實體中，可使用胺基酸殘基之D及或L對映異構體。

為用於所揭示之醫藥組合物中，ShK多肽可為天然或合成的或可作為天然及合成ShK之混合物而提供。

可呈鹽形式製備ShK多肽。在文中之示例性鹽中，獲自RP-HPLC步驟(實例1)之再摺疊多肽可以返回至管柱中並洗提。在乾燥前，可以添加50 mM之乙酸钠或乙酸鉀至蛋白質溶液中。該步驟產生鹽形式的蛋白質，其在復水時容易從乾燥形式溶解。在實例中所用之示例性調配物(ShK-186)中，添加乙酸钠，且藉由化學分析，該調配物中之乙酸鹽含量為10.4重量%。ShK-186為海葵毒素之37個胺基酸合成之肽衍生物。在文獻中，ShK-186還被稱為SL5及由CAS註冊號1081110-69-1而標識。

對於發現可用作醫藥組合物之含多肽組合物而言，其在安定性、溶解度及pH方面必須滿足若干標準，及較佳地僅含有與投與至動物(包括但不限於哺乳動物，及特定言之人)一致的物質。組成可依據投與模式(諸如皮下、靜脈內等)而變化。

儘管相關技術中已知某些治療性ShK多肽之調配物(例如以上引用之Beeton, C.等人，及美國專利案第7,833,979號)，但均不具有文中所揭示之以ShK為主之醫藥組合物的安定性及溶解度。文中揭示之安定及可溶之以ShK為主的醫藥組合物係經由改變諸多因素(包括界面活性劑濃度、pH、在先前調配物中所用組分之移除及下列實例中更充分敘述之其他參數)而達成。

具有最佳安定性及溶解度之一種特定調配物包括：

表1 P6N調配物之醫藥組合物

組分	濃度	目的
ShK-186多肽	多至500 mg/mL	活性劑
磷酸鈉	10 mM	緩衝劑
NaCl	150 mM	滲透調節劑
聚山梨醇酯20	0.05% (w/v)	界面活性劑
6.0之pH		

考慮各種因素諸如患者年齡、病症、體重、性別及飲食、正治療病症之嚴重性、投與時間及其他臨床因素，主治醫師可以確定所揭示之醫藥組合物用於治療、預防及/或緩解自體免疫異常或代謝異常之症狀之治療及預防有效量以及給藥方案。一般而言，方案之日用量應當位於1至10,000微克(μg) ShK多肽/千克(kg)體重、1至5,000 μg /千克

體重、1至1,000 μg /千克體重或1至100 μg /千克體重之範圍內。

文中揭示之醫藥組合物可用於治療與自體免疫相關之異常諸如多發性硬化、1型糖尿病、風濕性關節炎、牛皮癬、炎性腸病、接觸介導性皮炎、牛皮癬關節炎、哮喘、過敏、索狀病、系統性硬化、纖維化、硬皮病、血管球性腎炎、乾燥症候群、炎性骨吸收、移植排斥反應、移植物抗宿主病及紅斑性狼瘡及代謝異常諸如肥胖、2型糖尿病、高膽固醇血症、冠狀動脈病、新陳代謝症候群、新陳代謝症候群X、胰島素抗性、高脂血症、脂質營養不良、血脂異常、高三酸甘油酯血症、葡萄糖耐受不良、高血壓、超重及能量代謝異常。

爲了長期儲存該等醫藥組合物，以凍乾形式儲存之為適用的。本發明涵蓋此等凍乾醫藥組合物，包括但不限於藉由下述方法製備之彼等。

一種凍乾法可包括以下步驟：(a)將該醫藥組合物之溫度降低至 -40°C ；(b)保持在 -40°C 之溫度達一段預定時間；(c)將該溶液之溫度升至 20°C ；(d)保持在 20°C 之溫度達一段預定時間；及(e)將步驟(d)中之壓力降至適合凍乾的壓力及保持在 20°C 之溫度達一段預定時間，因而凍乾該醫藥組合物。

在該凍乾法中，步驟(a)可在2小時內進行；步驟(b)可在3小時內進行；步驟(c)可在110微巴之壓力下歷時13小時進行；步驟(d)可在110微巴之壓力下歷時13小時進行；及步

驟(e)可歷時5小時進行及壓力降至10微巴。

凍乾該醫藥組合物之方法亦可包括以下步驟：(a)將醫藥組合物之溫度降低至 -45°C ；(b)保持在 -45°C 之溫度達一段預定時間；(c)將溶液之溫度升至 -20°C ；(d)將溶液之溫度升至 25°C ；及(e)保持在 25°C 之溫度達一段預定時間，因而凍乾該醫藥組合物。

在該凍乾法中，步驟(a)可在6小時內進行；步驟(b)可在3小時內進行；步驟(c)可在150微巴之壓力下歷時19小時進行；步驟(d)可在150微巴之壓力下歷時13小時進行；及步驟(e)可在150微巴之壓力下歷時8小時進行。

凍乾之醫藥組合物可包含於包裝材料內，且該包裝可進一步包括指示醫藥專業人士、患者或研究人員復水該醫藥組合物以進行最終使用的說明書。

凍乾之醫藥組合物可具有小於5%、小於4%或小於3.5%之含水量。

如在以下實例中所說明，該等醫藥組合物可在例如無菌玻璃小瓶中在 -70°C 、 -20°C 或 4°C 下儲存數月。小瓶可含有1 ml組合物P6N(見表1)或文中揭示之另一醫藥組合物，如此該小瓶物理上將包含50 ml ShK多肽(在一個實施例中，呈乙酸鹽形式)溶於10 mM磷酸鈉及150 mM NaCl中之溶液，並含有0.05% (w/v)聚山梨醇酯20，且最終pH調整至6.0。

該小瓶可進一步作為醫藥製造單元而製備，其中在包裝中之一或多個小瓶亦可含有或印刷有指示儲存及指示稀釋

及投與該醫藥組合物供醫藥專業人士、患者或研究人員進行最終使用之說明書。適宜的稀釋模式包括使用注射用水(在此稱為WFI)。適當含量的稀釋劑可為製造單元的一部分，例如含於具有可選使用說明書之其自身的無菌容器中。

根據本發明，該醫藥組合物可包括0.1、0.5、0.75、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54或55或多至500 mg/ml之ShK多肽或其醫藥上可接受的鹽。精確濃度將取決於在製造商及或最終使用者之控制範圍內之因素，其取決於所需劑量及預期之治療或研究用途。該濃度亦涵蓋以上範圍內之任何及所有中間產物的含量，諸如1.5 mg/ml、2.5 mg/ml等。

對於該醫藥組合物之投與而言，適當途徑為皮下注射。依據患者及治療模式(諸如皮下、靜脈內等)，醫師熟悉投與方法。美國專利第7,918,824號揭示適合患者使用的注射器且以引用之方式將關於相同內容之其教示併入本文中。亦可考慮靜脈內投與。例如，可使用與無針靜脈內接入系統使用之預先填充之無針注射器，如玻璃注射器。亦可考慮用於定時釋放醫藥組合物之可植入裝置。不欲特定限制組合物於任何特定投與選擇。

本發明例如涵蓋吸取例如0.5 cc液態醫藥組合物至注射

器(諸如配有26G×5/8英寸針管(BD Part # 309597)之Becton Dickinson(BD) Slip-Tip Sub-Q 1 cc注射器)內。製造單元可包括一或多個注射器，其包括包裝及可視需要供醫藥專業人士、患者或研究人員最終使用者選用之說明書。

該等醫藥組合物可以配成(但不限於)固態(包括顆粒、粉末或栓劑)或液態(例如溶液、懸浮液或乳液)。該等醫藥組合物可進行習知醫藥操作，諸如滅菌及/或可包含習知佐劑，諸如防腐劑、安定劑、濕化劑、乳化劑、緩衝劑等。

用於經口投與之固體劑型可包括膠囊、錠劑、丸劑、粉末及顆粒。在此等固體劑型中，活性ShK多肽可與至少一種惰性稀釋劑諸如蔗糖、乳糖或澱粉混合。此等劑型在一般操作中還可包括除惰性稀釋劑外的其他物質，例如潤滑劑(諸如硬脂酸鎂)。在膠囊、錠劑及丸劑的情形下，該等劑型還可包括緩衝劑。錠劑及丸劑可另外利用腸溶性包衣製備。

用於經口投與之液體劑型可包括包含相關技術中常用惰性稀釋劑之醫藥上可接受的乳液、溶液、懸浮液、糖漿及醃劑。該類組合物亦可包括佐劑，諸如潤濕劑、增甜劑、調味劑及芳香劑。該醫藥組合物可包含一種以上本發明明具體實施例。可適當地調配用於經口投與之製劑，以控制釋放活性ShK多肽。

對於頰內投藥時，該等組合物可採用錠劑或以習知方式調配之口含錠。

ShK多肽可調配成藉由注射(例如快速注射或輸注)之非

經腸式投藥。用於注射之調配物可呈單位劑型存在，例如在玻璃安瓿或多劑量容器，例如玻璃小瓶中。用於注射之組合物可採用此等形式諸如含於油性或水性介質中之懸浮液、溶液或乳液形式，及可包含調配用劑，如懸浮劑、安定劑、防腐劑及/或分散劑。或者，該活性成分可呈在使用前與適當介質(例如無菌不含熱原水)復水的粉末形式。

除上述調配物外，ShK多肽還可呈儲存製劑形式調配。此等長效調配物可以藉由植入或藉由肌內注射投藥。

對於經鼻或肺部投藥或藉由吸入之任何其他投藥而言，根據本發明所使用之ShK多肽便利地呈用於加壓包裝或噴霧器之噴霧劑噴霧呈現形式釋放，並使用適當的推進劑，例如二氯二氟甲烷、三氯氟甲烷、二氯四氟乙烷、二氧化碳或其他適當氣體或氣體混合物。

在一個非限制性實例中，文中揭示之ShK多肽可利用銥-111(In^{111})之1,4,7,10-四氮雜環十二烷-1,4,7,10-四乙酸(DOTA)-螯合物或與該多肽上之酪胺酸或磷酸酪胺酸部分共軛之其他經放射性標記之金屬標記。此等方法敘述於例如Schultz, M.K.等人，「Synthesis of a DOTA-Biotin Conjugate for Radionuclide Chelation via Cu-Free Click Chemistry」Organic Letters 12:2398-2401(2010)中，以引用之方式將關於相同內容之其教示併入本文。在適合如藉由MRI診斷的實例中，文中揭示之ShK多肽可利用銥(In)、釷(Gd)之DOTA-螯合物或其他順磁性離子標記。亦可使用其他螯合或共軛化學物。

如在實例6中所述及圖1至3中所說明，使用經放射性標記之ShK(ShK-221)類似物以測量全血中之總藥物濃度(未結合及結合部分)。先前研究表明僅10%的藥物可被利用，其在血漿中未結合(Chi等人，Toxicol. 59:529-46, 2011)。此與該觀察一致：在投與35 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 劑量之經放射性標記之ShK-221至松鼠猴1小時後，在全血中測得約15 nM之藥物，表明藉由該方法之~7%之未結合比例。相較於非人類的靈長類動物，在大鼠中之藥物的游離部分實際上更低。在大鼠中之100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 之給藥後第1小時，在全血中觀察到約14 nM 之ShK-221。此可能係因為藥物結合至其它血液成分諸如血小板，其在其表面上表現Kv1.3且已經發現在大鼠全血中以極高數量存在(5-10 \times 人)(McCloskey等人，J. Physiol. 588:1399-406, 2010; Trowbridge等人，Clin. Phys. Physiol. Meas. 5:145-70, 1984)。

靈敏的放射性標記法容許檢測ShK在大鼠及松鼠猴物種中之雙相性末端消除分佈，其特徵在於快速初期及極長的末端期。利用 ^{111}In -ShK-221計算之末端半衰期在猴子中>64小時，並且維持大於 K_d 之血濃度達7天。血濃度係與從注射部位之雙相性(先快後慢)吸收相似。總之，在大鼠及松鼠猴中經放射性標記之ShK-221之生物分佈特徵在於從注射部份之極慢分佈、在注射部位、腎臟及肝臟等處周圍之明顯藥物濃度及全血中之長的末端消除期。大於~200 pM之血液中之藥物濃度在猴子中保持約7天及在大鼠中保持3天。實例1中之數據提供一個應用經放射性標記之ShK

多肽以研究活體內藥物分佈之實施例。DOTA在此為示例性的，但是可使用其他金屬螯合物諸如DTPA(二伸乙三胺五乙酸)。因此，除治療應用外，文中揭示之ShK多肽還可用於診斷或監控特徵為使其相關受關注蛋白質失去功能之疾病中。在一個實施例中，提供一種檢測生物樣本中之受關注蛋白質諸如可被影響之受體或離子通道的方法，其包括以下步驟：(a)將該樣本與ShK多肽接觸；及(b)檢測該多肽對受關注蛋白質的作用。生物樣本包括組織樣本、完整細胞或其提取物。文中揭示之組合物可用作診斷套組的一部分以檢測生物樣本中其相關受關注蛋白質的存在。此等套組可使用文中揭示及具有黏附標籤以容許檢測之組合物。多肽可用於識別正常或不正常的受關注蛋白質。

以下實例敘述文中揭示之方法之最優化。併入以下實例以說明本發明之特定實施例。一般技術者鑑於本發明應認識到在不脫離本發明之實質及範圍下可以對文中揭示之具體實施例做出許多改變且仍可獲得相似的結果。

實例

實例 1 (pTyr)-AEEA-Arg-35-Cys-NH₂(ShK-186)之合成法

按照如下進行直鏈多肽前驅物之合成。在Rink Amide(MBHA) Rx(sub: 0.4 mmol/g)上組配直鏈鈦及針對Fmoc-化學物，使用下列保護基團：Arg(Pbf)、Ser(tBu)、Cys(Trt)、Asp(OtBu)、Thr(tBu)、Lys(Boc)、Arg(Pbf)、Gln(Trt)、His(Trt)、Tyr(tBu)及Tyr(P(OH)O₂Bzl)。利用

CS536自動合成儀，以2 mmol之規模藉由DIC/HOBt活化偶聯所有胺基酸。此等參數規模可多至200 mmol。

對於裂解步驟，在室溫、攪拌下，最終藉由試劑「K」[TFA/三異丙基矽烷(TIS)/1,2-乙二硫醇(EDT)/H₂O/苯酚(89/2/2/2/5)]之4小時處理，從樹脂裂解DeFmoc肽。只要可以完成裂解，則比例可以變化，且可選擇性地去除苯酚。在沒有苯酚的製法中，TFA/TIS/EDT/H₂O的比例為例如47/1/1/1。藉由SPE管過濾從樹脂分離粗製肽且該樹脂利用與初始過濾物組合之TFA連續沖洗。

從過濾物蒸發TFA溶劑後(至原有裂解混合物的1/5體積)，隨後，藉由添加冷乙醚沉澱粗製肽及真空乾燥，以產生用於進一步氧化作用之直鏈多肽。

在將直鏈粗製多肽溶於水中至0.3 mg/mL之濃度(因製造而略有變化)後，接著添加NH₄OH以在pH 8(後一批次記錄顯示更低的pH(7至7.5))下進行氧化30小時。藉由ESI質譜法核查氧化作用之完成。另外，HPLC分析顯示直鏈肽轉換成氧化態。氧化作用係藉由TFA(或乙酸)酸化(pH(2至)3)。空氣氧化為一種達成二硫鍵結構的方法。以下實例2顯示一種獲得具有二硫鍵之多肽的替代性方法。

對於純化，可直接裝填氧化鈦及藉由利用乙腈作為流動相在製備性C-18柱上之RP-HPLC而純化。將具有足夠純度之餾分合併及視需要凍乾以產生白色粉末(ShK-186)，1.5 g(TFA鹽)。

接著進行鹽交換步驟。將再次溶解之鈦(TFA鹽)裝填於

藉由磷酸三乙胺(TEAP) 20 mM平衡之製備性C-18柱上。在利用TEAP進行3x孔隙體積洗滌後，將緩衝劑變為NH₄OAc(50 mM)。在利用NH₄OAc進行3x孔隙體積洗滌及pH檢查(pH 6至7)後，將緩衝劑變為HOAc(0.5%)。在利用HOAc(0.5%)進行3x孔隙體積洗滌及pH檢查(pH 2至3)後，開始陡峭梯度以產生500 mg乙酸鹽形式的最終多肽。

可進行可選的純化步驟。可以直接利用乙酸系統純化多肽以產生具有更高產率的最終多肽。以上製程中之所有單個步驟可以分批進行以產生更大的總體規模。最終產物可經凍乾或保持在溶液中。

實例2 ShK多肽之製法

可以藉由連接子(諸如胺基乙氧基乙氧基-乙醯基連接子(Aeea))或藉由任何其他適當的方式，將陰離子性胺基酸殘基鍵連至天然或合成ShK多肽之N端。起初，藉由例如Beeton, C.等人，2005之方法，將Fmoc-Aeea-OH偶聯至天然或合成ShK毒素之N端。

接著，利用DIC及HOBT偶聯Fmoc-Tyr(PO₄Bzl)-OH、Fmoc-d-Tyr(PO₄Bzl)-OH、Fmoc-Tyr(PO₄Me₂)-OH、Fmoc-Pmp-OH、Fmoc-d-Pmp-OH、Fmoc-Pmp(Et)-OH、Fmoc-Pmp(Et)₂-OH、Fmoc-Tyr(tBu)-OH或Fmoc-Amp(Boc)-OH。

然後裂解解封端肽樹脂及利用包含5%三異丙基矽烷之試劑K在RT下去保護2小時，如在King, D.S.等人，Int. J. Peptide Protein Res. 36, 255-266, 1990中所述，以引用之方式將關於相同內容之其教示併入本文中。藉由在t-15

min時添加固體 NH_4I 至裂解混合物，還原 $\text{Met}(\text{O})$ 。(Nicolas, E.等人, *Tetrahedron* 51:5701-5710, 1995, 以引用之方式將關於相同內容之其教示併入本文)。對於含有 $\text{Tyr}(\text{PO}_4\text{Me}_2)\text{-OH}$ 之肽，使用在 4°C 下達18小時之包含1 M TMSBr 之 TFA 溶液(其含有苯硫基甲烷作為清除劑)之裂解混合物(Tian, Z.等人, *Int. J. Peptide Protein Res.* 42:155-158, 1993, 以引用之方式將關於相同內容之其教示併入本文)。當利用該方法時，通常不完全除去甲基保護基團且容易藉由 RP-HPLC 純化該兩種物質 ($\text{Tyr}(\text{PO}_4)$ 及 $\text{Tyr}(\text{PO}_4\text{Me})$)。

經由保持兩個甲基完整的標準試劑 K，裂解含 $\text{Tyr}(\text{PO}_4\text{Me}_2)$ 之多肽。在各情形下，過濾裂解混合物及粗製肽在冰冷乙醚中沉澱。收集沉澱物，從200 mg樹脂中產生約75 mg肽。粗產物溶於20 ml之50% AcOH 水溶液及在0.75 L H_2O 中稀釋。利用 NH_4OH 調整溶液 pH 至 8.2，及可利用添加穀胱甘肽 (2 mM:1 mM)(還原態:氧化態)摺疊過夜。

利用如在 Pennington, M.等人, *Int. J. Peptide Protein Res.* 546:354-358, 1995 ; Pennington, M. 等人, *Biochemistry* 35: 16407-16411, 1996a及 Pennington, M. 等人, *Biochem. Biophys. Commun.* 219:696-701, 1996b 中所述之 RP-HPLC 純化所有多肽，以引用之方式將關於相同內容之其教示併入本文中。合併並且凍乾純餾分。藉由 RP-HPLC 、胺基酸分析(AAA)及 MALDI-TOF MS 證實各樣本並經調整，以在生物分析之前說明肽含量。

在以下實例中，製備確定為ShK-186((磷酸-Tyr)-AEEA-Arg-Ser-Cys-Ile-Asp-Thr-Ile-Pro-Lys-Ser-Arg-Cys-Thr-Ala-Phe-Gln-Cys-Lys-His-Ser-Met-Lys-Tyr-Arg-Leu-Ser-Phe-Cys-Arg-Lys-Thr-Cys-Gly-Thr-Cys-NH₂，其中在C端具有醯胺及在Cys3-Cys35、Cys12-Cys28及Cys17-Cys32之間具有二硫鍵)(SEQ ID NO:2)之ShK多肽及選用其確定適當醫藥組合物的組分；此等組分可用於製備包括其他ShK多肽(包括但不限於ShK-198及ShK-192(CAS註冊號1159528-26-3)之ShK多肽)的醫藥組合物。

實例3 界面活性劑之篩選

為了確定可能併入該等醫藥組合物中之界面活性劑，在緩衝劑中調配多肽，其中個別地添加測試界面活性劑至緩衝劑，並與不含界面活性劑之樣本對比。所測試之界面活性劑包括以0.01%開始之濃度的聚山梨醇酯20、聚山梨醇酯80及泊洛尼克F68(pluronic F68)。

為了測定界面活性劑的效果，攪拌或不攪拌測試樣本及對照組。隨後藉由尺寸排除HPLC(SEC-HPLC或SE-HPLC)分析測試樣本及對照組，以監測包括可溶聚集及單體恢復之損失之特徵的變化。

利用該方法，在聚山梨醇酯20(0.01%)、聚山梨醇酯80(0.01%)或泊洛尼克F68(0.10%)(Sigma-Aldrich)存在下，在pH 5.8下，使ShK-186多肽製劑進行恆定攪拌多達4小時。出人意料地，含有或不含界面活性劑之所有樣本顯示增加混濁度之霧度。此表明ShK-186對攪拌引起之沉澱敏

感。

另一實驗表明非典型濃度的界面活性劑保護蛋白質，及對於後續實驗，可使用0.05%之濃度之聚山梨醇酯20。除了增加界面活性劑之濃度以外，將pH從5.8降至5.1進一步改善ShK-186之安定性。藉由SEC-HPLC證實不存在可溶聚集。

實例4 儲存期間之安定性

測試若干參數以選擇可保護多肽安定性之醫藥組合物的組分。根據該方法，此等參數為pH(4.0至7.0)、緩衝劑/溶劑(10 mM乙酸鈉或10 mM磷酸鈉)、安定劑/增溶劑(NaCl 0.8%；山梨糖醇5.0%；L-精胺酸3.0%)、界面活性劑、儲存及應力條件(溫度、攪拌、冷凍/融化、強制氧化作用)。

為了研究此等參數，將ShK-186樣本溶於乙酸鈉或磷酸鈉中，及如上所述製備個別調配物。接著，在零時利用反相HPLC(RP-HPLC)、離子交換HPLC(IE或IEX-HPLC)及尺寸排除HPLC(SE-HPLC)分析肽。在兩週、四週及八週的時間點進行再一次分析。調配物之評估包括在10及25 mg/mL下監控藥物濃度、目視檢查/混濁度及檢查隨時間變化之pH。

在零時，該等樣本顯示相似的SE-HPLC層析圖，除了在pH 7之含有精胺酸之磷酸鹽緩衝劑中製備之樣本外。

在第二週，包含精胺酸之調配物顯示帶有沉澱之渾濁溶液。該結果為出人意料的，因為已經使用精胺酸以提高其他蛋白質產物的溶解度。在其他溫度觀察到相似的溶解度

問題，因此不再對含有精胺酸之調配物進行其他分析。在第四週，SE-HPLC分析顯示所有剩餘調配物在低於25°C之溫度下無可溶聚集或裂解之跡象。

在第八週，除一種調配物以外之所有調配物顯示在-70°C儲存期間之優良安定性。

來自第八週之全面分析的結果導致選擇在文中被稱為「P6N」之調配物，因為在藉由RP-HPLC、IE-HPLC及SE-HPLC所觀察到之恢復及降解方面提供最佳安定性。該調配物在pH 6下包含藉由RP-HPLC所測定之作為緩衝劑之10 mM乙酸鈉；作為安定劑/滲透性調節劑之0.8% NaCl；作為界面活性劑之0.05%聚山梨醇酯20；及11.2 mg/mL之蛋白質濃度。蛋白質濃度可以增加至50 mg/mL。

如藉由RP-HPLC及IEX-HPLC所測定，P6N調配物在5個凍融週期後未顯示變化。在3小時之強力渦流應力後，如利用RP-HPLC及IE-HPLC所測定，該調配物保持澄清而無降解。

實例5 臨床調配物的安定性

在設計為重複臨床應用之三組條件下，研究在P6N中調配之ShK-186之短期安定性：在可變化溫度下儲存72小時，及在無菌塑料注射器中儲存24小時。在冰凍(諸如5°C)及冷凍(諸如-70°C、-20°C)溫度下，研究歷時1、3、6及12個月之儲存之長期安定性。

對於短期研究，利用5% (w/v)右旋糖或0.9% (w/v)生理鹽水或WFI溶液將ShK-186稀釋成1 mg/ml之最終濃度。一

項短期安定性研究橫跨在冰凍(諸如5°C)及升高(諸如40°C)溫度下在各稀釋劑中儲存之72小時。在WFI中稀釋及無防腐劑之ShK-186用作對照組。對於長期研究，以25或50 mg/ml在P6N中調配ShK-186，接著使用等分液以製備具有如所示之以mg/ml表示之最終濃度的樣本。實驗參數顯示於表2及3中。

表2 短期稀釋劑安定性研究

最終ShK-186濃度， mg/ml	稀釋劑	儲存溫度，攝 氏度	時間點， 小時
1	含於WFI中之5% (w/v)右旋糖	5、25、40	0、24、 72
1	含於WFI中之0.9% (w/v) NaCl		
1	WFI(對照組)		

表3 長期稀釋劑安定性研究

最終ShK-186 濃度，mg/ml	pH	緩衝劑， 10 mM	安定劑， w/v	儲存溫度，攝氏度	時間點，月
25	6.0	磷酸鈉	0.8% NaCl	-70、-20、+5	0、1、3、 6、12
10	6.0	磷酸鈉	0.8% NaCl		

如表3所示在第6個月進行之安定性研究產生下列基於SEC-HPLC及RP-HPLC的結果。相較於更早的時間點，在第6個月之pH或濃度無顯著變化。整體結果表明肽濃度對調配物之安定性未顯示任何顯著影響。相較於-20°C及-70°C，在5°C之安定性顯示極小的下降。此等結果係與在低溫(至少低於冷凍溫度)下儲存多肽醫藥組合物之工業標準一致。

對在釋放裝置(如無菌塑料1 cc注射器)中之安定性進行特徵分析。此裝置適合皮下釋放。一種示例性、非限制性

裝置為配有 26G×5/8 英寸針管 (BD Part # 309597) 之 Becton Dickinson (BD) Slip-Tip Sub-Q 1 cc 注射器。抽取 0.5 ml 含於稀釋劑中之 ShK-186 調配物及表 2 所示之濃度之分液及在室溫條件下培養在注射器中。隨時間測試安定性以反映臨床應用，例如在第 4 小時。

測定在三種濃度 (10、25 及 50 mg/ml)、在冰凍及冷凍儲存溫度下之 ShK-186 之安定性。將凍乾 ShK-186 溶於 P6N 調配物中以達到此等 ShK-186 之最終濃度。利用 0.2 μm 過濾器將各調配溶液滅菌，及在無菌條件下轉移至適當的無菌小瓶中 (諸如 I 型硼矽酸玻璃 3 cc 小瓶，每小瓶具有 0.5 ml 填充體積)。將小瓶儲存在 5°C、-20°C 及 -70°C 下，在第 0、3 個月及 6 個月之時間點測試。

利用表 4 所示參數，在指定時間點測試樣本。

表 4 監測 ShK-186 安定性之分析方法

分析方法	評估結果
目視檢查	外觀
pH	pH 值
滲透濃度	滲透濃度值
UV-Vis 分光光度測定法	濃度 (Abs 280 nm) 混濁度 (Abs 500 至 700 nm)
尺寸排除 HPLC	純度、聚集、裂解
反相 HPLC	純度、化學變形
生物分析	多肽之效力/強度

總結：以上實例提供用於測定用於製備供治療應用之包括 ShK 多肽之醫藥上可接受的組合物的適當組分及條件。藉由成功地製備可提供優良溶解度、長期儲存 (6 個月) 及安定性之 ShK-186 調配物，證實該方法之有效性。

實例 6- 12個月之安定性研究

以 10 mg/ml 及 25 mg/ml 在 pH 6.0、包含 0.8% NaCl 及 0.05% 聚山梨醇酯 20 之 10 mM 磷酸鈉中調配 ShK-186，及在 5°C、-20°C 及 -70°C 下培養 12 個月。SE-HPLC 分析表明調配物之濃度對其安定性不具有任何明顯影響。培養溫度對兩種調配物之安定性具有輕微影響。在 5°C 培養之樣本相較於冷凍樣本 (0.95%) 顯示以 % HMV (1.19%) 計之小幅度增加。兩種調配物在所有溫度下之 LMW 物質之百分比保持相對不變。基於 SE-HPLC 結果，兩種調配物之總的單體百分比在研究結束時為約 98%。

樣本之 RP-HPLC 分析還表明調配物之濃度對調配物之安定性不具有任何明顯影響。在 5°C 培養之樣本相較於冷凍調配物 (0.3 至 0.7%) 顯示峰前及峰後降解 (0.8 至 0.9%) 略有增加。數據表明：相較於峰前降解，更高的培養溫度導致更高的峰後降解百分比。基於 RP-HPLC 結果，兩種調配物之總純度在研究結束時為約 99%。

表 5 顯示在 12 個月研究之時間框架中收集之 pH 及濃度數據的匯總。在零時，數值如下：對於 10P6N (10 mg/mL 之 ShK-186)，pH 為 6.1，濃度 (Conc, mg/mL) 為 9.9 mg/mL，及 mOsmo 中之滲透濃度為 317。對於 25P6N (25 mg/mL 之 ShK-186)，pH 為 6.0，濃度為 25.1 mg/mL 及滲透濃度為 293。基於此等結果，樣本之 pH 及濃度在整個研究中保持相對不變，與培養溫度無關。

表 5 在第 1、3、6 及 12 個月之調配物的 pH 值及濃度

樣本ID	培養溫度	第1個月		第3個月		第6個月		第12個月	
		pH	Conc	pH	Conc	pH	Conc	pH	Conc
10P6N	5°C	6.03	9.63	6.03	9.63	6.06	9.85	6.07	10.2
10P6N	-20°C	6.03	9.54	6.03	9.54	6.07	9.94	6.10	9.96
10P6N	-70°C	6.05	9.85	6.05	9.85	6.09	9.77	6.09	10.1
25P6N	5°C	6.00	24.72	6.00	25.78	6.04	25.08	6.06	25.8
25P6N	-20°C	6.00	24.76	6.00	25.31	6.05	24.34	6.05	24.97
25P6N	-70°C	5.98	24.35	5.98	25.53	6.05	24.85	6.09	23.71

實例 7-經放射性標記之 ShK-221 之生物分佈

引言：為了提高活體內研究之靈敏性，測量 ShK-186 之生物分佈及評估全血中之總(結合的加上未結合的)藥物濃度，製備經放射性標記之 ShK-186 類似物且在兩種活體內動物模型(大鼠及松鼠猴)中研究。在該實例中，術語「ADME」表示吸收、分佈、代謝、排泄。

方法

動物。Sprague Dawley [CrI:CD®SD] 大鼠(6至9週大)購自 Charles River 實驗室(Wilmington, MA, USA)及圈養在控制溫度(64至79°C)及濕度(30至70%)之設施內。隨意取用食物及水。

非原產松鼠猴(亞馬遜松鼠猴(*Saimiri boliviensis*))係2與5歲大及從MPI研究所(Mattawan, MI, USA)儲備群轉入。松鼠猴來源於玻利維亞及由德州大學的MD安德森癌症中心(University of Texas MD Anderson Cancer Center) (Houston, TX USA)提供。將動物單個圈養在控制環境之房間中的不鏽鋼籠子中。給猴子提供充裕的環境；每天提供12小時的螢光照明。溫度保持在64與84°C之間；濕度為30至70%。每天給動物提供合格靈長動物飲食(Certified Primate Diet)(PMI Nutrition International, Inc., St. Louis, MO, 5

USA)兩次。有規律地提供Primatreats®及其他強化食物。可隨意飲水。

ShK-186之DOTA-共軛物(ShK-221)。「DOTA」表示1,4,7,10-四氮雜環十二烷-1,4,7,10-四乙酸。利用Fmoc-tBu固相方法合成ShK-221(MW 4442)。簡言之，利用Chem-Matrix醯胺樹脂以0.2 mmol規模組配該肽。利用6-Cl-HOBt(N-羥基苯并三唑)在二異丙基碳二亞胺存在下，調節所有偶聯步驟。利用含於DMF(二甲基甲醯胺)中之20%哌啶(其包含0.1 M HOBt以緩衝哌啶及將在6 Cys殘基處之潛在外消旋作用減至最小)，加速Fmoc之移除。利用相同的前述偶聯方案，將DOTA(tBu)₃-OH偶聯至N端。組配後，從樹脂中裂解該肽及同時利用包含芳族陽離子性清除劑之TFA(三氟乙酸)裂解混合物試劑K，在室溫下去保護2小時。將粗製肽從使用之樹脂中過濾及接著藉由在冰冷乙醚中沉澱而單離。將粗製肽溶於50%乙酸中及接著在包含0.1 mM GSSG及0.2 mM GSH之3 L H₂O中稀釋。利用NH₄OH將該肽溶液之pH調整至8.0及容許緩慢地攪拌過夜。ShK自發地摺疊成一種主要的熱動力上有利的異構物，其為該肽之生物活性形式。將摺疊肽裝填於製備性RP-HPLC柱上及利用MeCN相對於含有0.05% TFA之H₂O之梯度而純化。一起收集並且凍乾包含所需肽純度之餾分。來自0.2 mmol之合成的最終產率為35 mg；基於起始樹脂，此代表8%的產率。

經放射性標記之ShK-221之SPECT/CT掃描：利用2 mCi

氯化¹¹¹銦(GE Healthcare, Arlington Heights, IL USA), 以包含50 mM乙酸鈉、pH 5.0之300 µL反應, 在95°C下放射性標記ShK-221(100 µg)30分鐘。藉由添加EDTA中止該反應至50 mM之最終濃度, 及藉由在利用IN/US Systems Gamma RAM型號4放射性HPLC檢測儀(LabLogic Systems, Brandon, FL USA)之Agilent 1100系統上之反相HPLC(Luna 5µ C18(2) 100A 250×4.6 mm柱, Phenomenex, Torrance, CA USA), 評估放射性標記的效率。藉由該方法之標記效率在89至98%之間變化。在第一個小時期間以4個15分鐘對麻醉動物進行SPECT/CT掃描(NanoSPECT/CT臨床前成像儀, Mediso, Budapest, Hungary)及在給藥後第4、8、24、48、72、120及160小時各進行一次掃描。對於各螺旋SPECT, 設定單一投射時間框架以使各掃描持續約15至45分鐘(不同時間點以說明同位素衰減)及可在各時間框架內收集重要的統計數據。針對¹¹¹In, 由光譜檢測之特徵峰為245及171 keV(分別為主峰及次峰)。在每次掃描後, 使用採用銷孔形狀之優勢以達到約2 mm之解析度的迭代模型重構所得投射數據。

在每次掃描後, 收集約10 µL血樣及利用Wallac Wizard 1470閃爍計數器(Perkin Elmer, Waltham, MA USA)測量樣本中之放射性含量。考慮所投與劑量之具體活性、¹¹¹In之半衰期(67.3小時)及儀器的計數有效性, 計算藥物濃度。

統計及計算分析。利用成對t-試驗進行統計分析。利用R²統計法測定模型適合度。藥物動力學計算如下: 在數據

組中可觀察到 C_{max} 及 T_{max} 。利用線性梯形法計算 AUC。利用最佳調整之 R^2 值從回歸斜率，計算末端消除半衰期。藉由最終觀察之藥物濃度除以末端消除斜率，計算 $AUC_{t-\infty}$ 。

利用經放射性標記之 ShK-186 類似物之 ADME 研究的結果。ShK-186 在 23 位置包含單個可碘化酪胺酸。然而，將碘併入環中，預期其在 Kv1.3 通道之孔區內互相影響 (Pennington 等人, *Biochemistry* 35:16407-16411, 1996)，導致擾亂藥物之通道結合性質。ShK-198 之胺基端因而經由肽鍵鍵連至 DOTA 螯合物之一個羧酸之六碳連接子修飾 (圖 2A)。命名為 ShK-221 之 DOTA-共軛物容易與鈾或釷配位 (圖 2B-C) 及保留母分子的所有活性 (圖 3)。製備經 ^{111}In 標記之 ShK-221 及藉由皮下注射投與至 Sprague Dawley 大鼠 (1.0 mCi, 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 及松鼠猴 (0.83 mCi, 35 $\mu\text{g}/\text{kg}$)。藉由 HPLC 所測定之放射性標記的效率在一系列實驗中範圍為 89 至 98%。藉由 SPECT 成像持續在給藥後第 1 小時、接著在第 4、8、24、48、72、120 及 160 小時評估經放射性標記之 ShK-221 之生物分佈。檢測系統之背景位準為約 0.1 $\mu\text{Ci}/\text{m}^3$ (在初始時間點為 $\sim 5 \text{ ng}/\text{m}^3$ ShK-221 及在最終時間點為 26 ng/m^3)。在每次掃描後收集血樣，及藉由閃爍計數測量全血中之總放射性。在每個時間點進行電腦斷層攝影以能夠共定位放射性標記物與重要解剖學結構。

松鼠猴中之 ^{111}In -ShK-221 之生物分佈主要特徵為在整個 160 小時時期中從注射部位之緩慢吸收 (圖 1A 及 1E)。在注射部位存在之藥物的數量遵循雙相性指數型衰退

($R^2=0.95$)，其中初始半衰期為約1至1.5小時及最終半衰期 >48 小時(圖1E)。在第一個小時期間，可在腎臟中觀察到明顯的放射性，在1小時中強度增加($\sim 1\%$ 注射劑量(ID)/g，表1)及48小時內緩慢降低至約基線處。在所有時間點期間，在皮質及骨髓區中主要觀察到猴子腎臟之放射性且除在第一個小時以外，在腎盂中相對不存在放射性(圖1B)。僅在第一個小時期間觀察到明顯的與膀胱有關之放射性($T_{max}=0.75$ 至1 h, 0.34% ID/g)，隨後在膀胱中檢測到相對很少的放射性標記物。除肝臟(在投與劑量後第0.75至1小時中達到峰值)以外，其他器官未顯示明顯的放射性程度。肌肉、心臟及腦在所有時間點均具有 $<0.1\%$ ID/g(表6)。

表6：在35 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 皮下注射後，松鼠猴之具體組織中之 ^{111}In -ShK-221之最大濃度

組織	最大掃描時期(h)	最大值(%注射劑量/g)
注射部位	0至0.25	17.3
腎臟	0.75至1.0	0.976
膀胱	0.75至1.0	0.338
肝臟	0.75至1.0	0.166
心臟	0.75至1.0	0.093
肌肉	0.5至0.75	0.039
腦	0.75至1.0	0.020

大鼠中之 ^{111}In -ShK-221之生物分佈係與猴子類似且特徵為在起初24小時中從注射部位之略微更快的吸收及排尿(圖1C及1E)。在第1個小時期間，在大鼠膀胱(9.4% ID/g)、腎臟(2.9% ID/g)及肝臟(0.4% ID/g)中觀察到明顯的放射性標記物。雖然在之後的時間點，在膀胱中識別出很

少的標記物，但是在肝臟及腎臟中之藥物含量在起初24小時中保持相對恆定。大鼠腎臟之橫截面圖顯示除第1個小時以外，放射性主要在皮質區中集中，此與猴子相似(圖1D)。

在各時間點，在猴子中之與血有關之放射性的評估亦顯示雙相性指數型衰退($R^2=0.99$)，其中初始半衰期為約1小時及最終半衰期 >64 小時(圖1F)。在猴子中，許多末端消除期係反映在低於先前方法之定量程度但遠高於針對ShK-186之 K_d 的血濃度。預期全血中80%之Kv1.3通道在給藥後約5天內被藥物結合，且濃度在整個160小時時期中保持高於 K_d 。

大鼠中與全血有關之放射性的評估亦顯示雙相性指數型衰退($R^2=0.99$)，其中初始半衰期為約1.7小時及最終半衰期 >72 小時(圖1F)。與猴子類似，藥物濃度遠高於ShK-186之 K_d 直到給藥後第5天。預期全血中80%之Kv1.3通道在給藥後約3至5天內被藥物結合。

數據顯示：經放射性標記之ShK-221在大鼠及松鼠猴中之生物分佈特徵在於從注射部位之極慢分佈、在注射部位、腎臟及肝臟等處周圍之明顯藥物濃度及在全血中之長的末端消除期。血液中大於 ~ 200 pM之藥物濃度在猴子中保持約7天及在大鼠中保持3天

在投與 ^{111}In -ShK-221後，最早在大鼠($\sim 17\%$ 注射劑量)及猴子($\sim 1\%$ 注射劑量)之膀胱中觀察到顯著量的放射性，此表示注射後不久，腎小球過濾為肽的主要消除途徑。相較

於猴子，在第1小時中大鼠排泄之大量藥物很可能反映出大鼠增強之代謝作用。1小時後在大鼠中及約4小時後在猴子中，在膀胱中觀察到很少的放射性，而在腎盂中仍然觀察到顯著量的放射性。已經針對肽藥物(包括奧曲肽(octreotide)、蛙皮素(bombesin)、腸促胰島素類似物(exendin)及促胃酸激素(gastrin))之多種經放射性標記之種類，記錄皮質濃度(Gotthardt等人，J. Nucl. Med. 48:596-601, 2007)。已經針對奧曲肽最為詳盡地敘述皮質保留機制。藉由巨蛋白(megalin)(一種在近側腎小管中表現之清除劑受體)調節陽離子性奧曲肽之小管再吸收(de Jong等人，J. Nucl. Med. 46:1696-1700, 2005)。出現腎特異性之受體擾亂之老鼠缺乏在野生型老鼠中可見之皮質保留經放射性標記之奧曲肽。奧曲肽之腎吸收係受到電荷部分調節且可以被帶正電荷離子之胺基酸L-離胺酸及L-精胺酸之聯合輸注擾亂(Bodei等人，Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging 30:207-216, 2003)。ShK-186在生理pH下淨攜帶+6個電荷，因此，可藉由相似機制調節其皮質保留。

總之，利用經放射性標記之ShK之ADME研究顯示，單次劑量藥物可提供治療上有效之血濃度至多5天(在大鼠中)及至多7天(在猴子中)。此類觀察結果係與以ShK為主之肽治療劑(包括ShK-186)之臨床開發有關，因為最優的劑量頻率會確保治療效果、改良患者順服性及在慢性投藥期間降低藥物累積的潛勢。

除非另有說明，否則用於說明書及申請專利範圍中表示

成分數量、性質諸如分子量、反應條件等之所有數字應理解為在所有情形中由術語「約」修飾。因此，除非相反地表明，否則在說明書及附加申請專利範圍中闡明之數字參數為近似值，其可依據本發明希望獲得之所需性質而變化。至少不試圖限制應用申請專利範圍之相當項之教義，各數字參數應至少按照所記錄之有效數字數且藉由應用四捨五入法而理解。

儘管闡明本發明之大範圍的數字範圍及參數為近似值，但是在具體實例中闡明之數值係盡可能精確地記錄。然而，任何數值固有地包含必然地來自其各自測試值中發現的標準偏差之特定誤差。

除非文中另有說明或與情形明顯相違背，否則在敘述本發明之文中(尤其下列申請專利範圍中)所用之術語「一」、「該」及相似引用應理解為涵蓋單數及複數。文中敘述之數值範圍僅欲充當分別指代落於該範圍內之各單一數值的速記方法。除非文中另有說明，否則各單一數值併入該說明書，如同其個別地在文中敘述般。除非文中另有說明或與情形明顯相違背，否則文中揭示之所有方法可以任何適當順序進行。文中提供之任何及所有實例或示例性語言之應用僅欲更佳地說明本發明且不對以其他方式主張之本發明範圍引起限制。說明書中之語言不應視為指示對本發明之實踐為必要的任何非主張元素。

文中揭示之本發明之替代性元素或實施例的群組不視為限制性。各群組成員可以個別地或與文中存在之其他群組

成員或其他元素之任何組合表示或主張。可以預料，因便利及/或專利性而將一或多個群組成員併入群組中或從其中刪除。當出現任何此併入或刪除時，該說明書視為包含如所修改之群組，因此滿足在附加申請專利範圍中使用之所有馬庫西群組(Markush groups)的書面敘述。

文中揭示本發明之某些實施例，其包括發明者已知的用於進行本發明之最佳模式。當然，一般技術者經閱讀此前敘述應明瞭此等所述實施例的變化。本發明者期望熟習此項技術者適當地應用此等變化，且本發明者希望本發明以除文中具體揭示以外的其他方式實踐。因此，如適用法律所允許，本發明包括在文中附加申請專利範圍敘述之標的物之所有修改及相當項。而且，除非文中另有說明或與內容明顯相違背，否則本發明涵蓋所有可能的其變化中之上述元素的任何組合。

文中揭示之具體實施例可在利用由...組成或及主要由...組成之語言的申請專利範圍中得到進一步限制。當用於申請專利範圍中時，不論如所申請或按照修正添加，過渡術語「由...組成」排除未在申請專利範圍中說明之任何元素、步驟或成分。過渡術語「主要由...組成」將申請專利範圍限制在具體材料或步驟及不會在實質上影響基本及新穎特性之彼等。如此主張之本發明之實施例在此固有地或明確地加以敘述及可用。

最後，應理解文中揭示之本發明之實施例說明本發明之原理。可應用之其他改良位於本發明之範圍內。因此，舉

例而言，而非限制，可按照文中之教示，利用本發明之替代性組態。因此，本發明不限於如精確顯示及敘述之彼等。

本發明之實施例

實施例 1. 一種適用於活體內診斷應用之包括具有序列 Arg-Ser-Cys-Ile-Asp-Thr-Ile-Pro-Lys-Ser-Arg-Cys-Thr-Ala-Phe-Gln-Cys-Lys-His-Ser-Xaa-Lys-Tyr-Arg-Leu-Ser-Phe-Cys-Arg-Lys-Thr-Cys-Gly-Thr-Cys(SEQ ID NO:1)之 ShK 多肽的醫藥上可接受的鹽的醫藥組合物，其中該 ShK 多肽鍵連至可檢測之標記及帶負電荷離子的有機或無機化學實體，及其中該 C 端為酸或醯胺。

實施例 2. 如實施例 1 之組合物，其中該可檢測之標記為銦-111(In^{111})之螯合物。

實施例 3. 如實施例 2 之組合物，其中該可檢測之標記為銦-111(In^{111})之 1,4,7,10-四氮雜環十二烷-1,4,7,10-四乙酸 (DOTA)-螯合物。

實施例 4. 如實施例 1 之組合物，其中該可檢測之標記為釷 (Gd)之螯合物。

實施例 5. 如實施例 4 之組合物，其中該可檢測的標記為釷 (Gd)之 DOTA-螯合物。

實施例 6. 如實施例 1 之組合物，其中該 ShK 多肽具有序列 Tyr-AEEA-Arg-Ser-Cys-Ile-Asp-Thr-Ile-Pro-Lys-Ser-Arg-Cys-Thr-Ala-Phe-Gln-Cys-Lys-His-Ser-Met-Lys-Tyr-Arg-Leu-Ser-Phe-Cys-Arg-Lys-Thr-Cys-Gly-Thr-Cys-NH₂(ShK-

198)且該可檢測之標記位於胺基端。

實施例 7. 如實施例 6 之組合物，其中該可檢測之標記為銻-111(In^{111})之 1,4,7,10-四氮雜環十二烷-1,4,7,10-四乙酸(DOTA)-螯合物。

實施例 8. 一種包括具有序列 Arg-Ser-Cys-Ile-Asp-Thr-Ile-Pro-Lys-Ser-Arg-Cys-Thr-Ala-Phe-Gln-Cys-Lys-His-Ser-Xaa-Lys-Tyr-Arg-Leu-Ser-Phe-Cys-Arg-Lys-Thr-Cys-Gly-Thr-Cys(SEQ ID NO:1)之 ShK 多肽之醫藥上可接受的鹽的醫藥組合物，其中該 ShK 多肽鍵連至帶負電荷離子的有機或無機化學實體，且其中該 C 端為酸或醯胺。

實施例 9. 如實施例 8 之醫藥組合物，其含於水性載體中。

實施例 10. 如實施例 9 之醫藥組合物，其具有介於 5 與 7 之間的 pH 值。

實施例 11. 如實施例 9 之醫藥組合物，其進一步包括在含水載體中有效溶解 ShK 多肽之含量的界面活性劑。

實施例 12. 如實施例 9 之醫藥組合物，其中該 ShK 多肽係以 0.01 mg/ml 至 500 mg/ml 之含量存在。

實施例 13. 如實施例 11 之醫藥組合物，其中該界面活性劑為聚山梨醇酯 20。

實施例 14. 如實施例 13 之醫藥組合物，其中該界面活性劑為 0.05 w/v% 之聚山梨醇酯 20。

實施例 15. 如實施例 10 之醫藥組合物，其中該 pH 值為 6.0。

實施例 16. 如實施例 12 之醫藥組合物，其包括 0.01、0.1、

0.5、0.75、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50或500 mg/ml之該ShK多肽。

實施例17. 如實施例8之醫藥組合物，其中該ShK多肽獲自天然來源。

實施例18. 如實施例8之醫藥組合物，其中該ShK多肽為合成的。

實施例19. 如實施例8之醫藥組合物，其中該化學實體係鍵連至ShK多肽的N端。

實施例20. 如實施例19之醫藥組合物，其中該化學實體係經由連接分子或連接基團鍵連至ShK多肽的N端。

實施例21. 如實施例20之醫藥組合物，其中該化學實體係藉由胺基乙氧基乙氧基-乙醯基連接子鍵連至ShK多肽的N端。

實施例22. 如實施例11之醫藥組合物，其中該化學實體係選自由以下組成之群：AEEAc-L-Pmp(OH₂)；AEEAc-D-Pmp(OH₂)；AEEAc-D-Pmp(OH, Et)；AEEAc-L-Pmp(Et₂)；AEEAc-D-Pmp(Et₂)；AEEAc-L-Tyr；AEEAc-L-Tyr(PO₃H₂)；AEEAc-L-Phe(p-NH₂)；AEEAc-L-Phe(p-CO₂H)；AEEAc-L-天冬胺酸；AEEAc-D-天冬胺酸；AEEAc-L-麩胺酸；及AEEAc-D-麩胺酸。

實施例23. 一種醫藥組合物，其包括具有式對磷酸-Tyr-

AEEA-Arg-Ser-Cys-Ile-Asp-Thr-Ile-Pro-Lys-Ser-Arg-Cys-Thr-Ala-Phe-Gln-Cys-Lys-His-Ser-Met-Lys-Tyr-Arg-Leu-Ser-Phe-Cys-Arg-Lys-Thr-Cys-Gly-Thr-Cys-NH₂之ShK多肽之醫藥上可接受的鹽。

實施例24. 如實施例23之醫藥組合物，其含於水性載體中且進一步包括0.05 w/v%之聚山梨醇酯20，其中該組合物具有介於5與7之間的pH值。

實施例25. 如實施例24之醫藥組合物，其進一步包括10 mM磷酸鈉、150 mM NaCl及0.5 mg/ml至50 mg/ml ShK-186，其中該組合物之pH為6.0。

實施例26. 一種醫藥組合物，其包括具有式Tyr-AEEA-Arg-Ser-Cys-Ile-Asp-Thr-Ile-Pro-Lys-Ser-Arg-Cys-Thr-Ala-Phe-Gln-Cys-Lys-His-Ser-Met-Lys-Tyr-Arg-Leu-Ser-Phe-Cys-Arg-Lys-Thr-Cys-Gly-Thr-Cys-NH₂之ShK多肽之醫藥上可接受的鹽。

實施例27. 如實施例26之醫藥組合物，其含於水性載體中且進一步包括0.05 w/v%之聚山梨醇酯20，及0.5 mg/ml至50 mg/ml之ShK-198其中該組合物具有介於5與7之間的pH值。

實施例28. 如實施例27之醫藥組合物，其進一步包括10 mM磷酸鈉、150 mM NaCl及0.5 mg/ml至50 mg/ml ShK-198，其中該組合物之pH為6.0。

實施例29. 一種包括10 mM磷酸鈉、150 mM NaCl、0.5 mg/ml至50 mg/ml之具有式Arg-Ser-Cys-Ile-Asp-Thr-Ile-Pro-Lys-Ser-Arg-Cys-Thr-Ala-Phe-Gln-Cys-Lys-His-Ser-

Met-Lys-Tyr-Arg-Leu-Ser-Phe-Cys-Arg-Lys-Thr-Cys-Gly-Thr-Cys-NH₂(SEQ ID NO:1 其中 Xaa 為 Met)之鍵連至對磷酸-Tyr-AEEA之多肽的醫藥上可接受的鹽及0.05 w/v%之聚山梨醇酯20的醫藥組合物，其中該組合物之pH為6.0。

實施例30. 如實施例8之醫藥組合物，其中該醫藥上可接受的鹽為乙酸鉀或乙酸鈉。

實施例31. 一種製備醫藥組合物的方法，其包括(a)以預定濃度製備0.05%聚山梨醇酯20含於水性載體中之溶液；(b)將預定含量之具有SEQ ID NO:1之多肽之醫藥上可接受的鹽添加至步驟(a)之溶液中，其中該C端為酸或醯胺，且其中該多肽鍵連至帶負電荷離子的有機或無機化學實體；(c)調整步驟(b)之溶液之pH直到多肽溶於該溶液中；及(d)若需要，調整步驟(c)之溶液之pH至pH為5至7，因而製造該醫藥組合物。

實施例32. 一種藉由如實施例31之方法製備之醫藥組合物。

實施例33. 一種包括SEQ ID NO:1之多肽之醫藥上可接受的鹽的凍乾醫藥組合物，其中該C端為酸或醯胺，及其中該多肽鍵連至帶負電荷離子的有機或無機化學實體。

實施例34. 如實施例33之凍乾醫藥組合物，其中該醫藥上可接受的鹽為乙酸鉀或乙酸鈉。

實施例35. 如實施例33之凍乾醫藥組合物，其中該醫藥上可接受的鹽為乙酸鈉。

實施例36. 如實施例33之凍乾醫藥組合物，其包括8至12

重量%之乙酸鹽含量。

實施例37. 如實施例36之凍乾醫藥組合物，其包括10至11重量%之乙酸鹽含量。

實施例38. 如實施例33之凍乾醫藥組合物，其提供於包裝材料中。

實施例39. 如實施例33之凍乾醫藥組合物，其中該醫藥組合物之含水量小於5%。

實施例40. 如實施例33之凍乾醫藥組合物，其中該醫藥組合物之含水量小於4.0%。

實施例41 如實施例33之凍乾醫藥組合物，其中該醫藥組合物之含水量小於3.5%。

實施例42. 如實施例1之醫藥組合物，其經調配以供長期儲存。

實施例43. 如實施例42之醫藥組合物，其中該組合物係含於無菌玻璃小瓶中及按指示儲存在 -70°C 。

實施例44. 如實施例8之醫藥組合物，其經調配以供皮下投與。

實施例45. 如實施例44之醫藥組合物，其中該組合物係含於無菌注射器中。

實施例46. 一種用於醫藥用途的製造單元，其包括至少一個在無菌條件下製造並且包含如實施例1、16、19或22中任一項之醫藥組合物之玻璃小瓶，其中該玻璃小瓶內之醫藥組合物可在 -70°C 下保持安定達至少6個月，且進一步包括指示稀釋及製備醫藥組合物以投與人類的說明書。

實施例47. 一種用於醫藥用途的製造單元，其包括至少一個包含如實施例1、16、19或22中任一項之醫藥組合物之無菌注射器，其中該製造單元進一步包括指示將醫藥組合物投與人類的說明書。

實施例48. 一種如實施例8、23、26或29中任一項之醫藥組合物於製造用於預防、治療或緩解自體免疫異常之症狀的藥物的用途。

實施例49. 如實施例48之用途，其中該異常係選自由以下組成之群：多發性硬化、1型糖尿病、風濕性關節炎、牛皮癬、炎性腸病、接觸介導性皮炎、牛皮癬關節炎、哮喘、過敏、索狀病、系統性硬化、纖維化、硬皮病、血管球性腎炎、乾燥症候群、炎性骨吸收、移植排斥反應、移植抗宿主病及紅斑性狼瘡。

實施例50. 如實施例48之用途，其中該異常為多發性硬化，且該藥物包括如實施例16之組合物。

實施例51. 如實施例48之用途，其中該藥物係每日、每週、每月、每兩月、每三月或每六月投與一次。

實施例52. 如實施例48之用途，其中該藥物係皮下投與。

實施例53. 一種如實施例8、23、26或29中任一項之醫藥組合物於製造用於預防、治療或緩解代謝異常之藥物的用途。

實施例54. 如實施例53之用途，其中該代謝異常為肥胖、2型糖尿病、高膽固醇血症、冠狀動脈病、新陳代謝症候群、新陳代謝症候群X、胰島素抗性、高脂血症、脂質營

養不良、血脂異常、高三酸甘油酯血症、葡萄糖耐受不良、高血壓、超重及能量代謝異常中之一或多者。

實施例 55. 如實施例 53 之用途，其中該藥物係每日、每週、每月、每兩月、每三月或每六月投與一次。

實施例 56. 如實施例 53 之用途，其中該藥物係皮下或靜脈內投與。

實施例 57. 一種包括具有序列 Arg-Ser-Cys-Ile-Asp-Thr-Ile-Pro-Lys-Ser-Arg-Cys-Thr-Ala-Phe-Gln-Cys-Lys-His-Ser-Xaa-Lys-Tyr-Arg-Leu-Ser-Phe-Cys-Arg-Lys-Thr-Cys-Gly-Thr-Cys (SEQ ID NO:1 其中 Xaa 為 Met 或 Ile) 之 ShK 多肽之醫藥上可接受的鹽、10 mM 磷酸鈉、150 mM NaCl 及 0.05 w/v% 之聚山梨醇酯 20 的醫藥組合物，其中該 ShK 多肽鍵連至帶負電荷離子的有機或無機化學實體，該 C 端為酸或醯胺及該組合物之 pH 為 6.0。

實施例 58. 一種包括具有式 Arg-Ser-Cys-Ile-Asp-Thr-Ile-Pro-Lys-Ser-Arg-Cys-Thr-Ala-Phe-Gln-Cys-Lys-His-Ser-Met-Lys-Tyr-Arg-Leu-Ser-Phe-Cys-Arg-Lys-Thr-Cys-Gly-Thr-Cys-NH₂ (SEQ ID NO:1 其中 Xaa 為 Met) 之 ShK 多肽之醫藥上可接受的鹽、10 mM 磷酸鈉、150 mM NaCl 及 0.05 w/v% 之聚山梨醇酯 20 的醫藥組合物，其中該 ShK 多肽鍵連至帶負電荷離子的有機或無機化學實體，該 C 端為酸或醯胺及該組合物之 pH 為 6.0。

實施例 59. 一種包括具有式對磷酸-Tyr-AEEA-Arg-Ser-Cys-Ile-Asp-Thr-Ile-Pro-Lys-Ser-Arg-Cys-Thr-Ala-Phe-Gln-

Cys-Lys-His-Ser-Met-Lys-Tyr-Arg-Leu-Ser-Phe-Cys-Arg-Lys-Thr-Cys-Gly-Thr-Cys-NH₂之 ShK 多肽之醫藥上可接受的鹽、0 mM 磷酸鈉、150 mM NaCl 及 0.05 w/v% 之聚山梨醇酯 20 的醫藥組合物，且其中該組合物之 pH 為 6.0。

實施例 60. 一種包括具有式 Tyr-AEEA-Arg-Ser-Cys-Ile-Asp-Thr-Ile-Pro-Lys-Ser-Arg-Cys-Thr-Ala-Phe-Gln-Cys-Lys-His-Ser-Met-Lys-Tyr-Arg-Leu-Ser-Phe-Cys-Arg-Lys-Thr-Cys-Gly-Thr-Cys-NH₂ 之 ShK 多肽、10 mM 磷酸鈉、150 mM NaCl 及 0.05 w/v% 之聚山梨醇酯 20 的醫藥組合物，其中該組合物之 pH 為 6.0。

【圖式簡單說明】

圖 1 說明在大鼠及松鼠猴中利用經放射性標記之 ShK 的生物分佈研究。將經 ¹¹¹In 標記之 ShK-221 以至各動物之肩胛區之單次皮下注射投與至 Sprague Dawley 大鼠 (100 µg/kg; 0.7 mCi) 及松鼠猴 (35 µg/kg; 0.84 mCi)。在第 1 個小時期間 (4×15 m 間隔) 及在給藥後第 4、8、24、48、72、120 及 160 小時持續收集 SPECT 及 CT 掃描。針對猴子 (A) 在第 4、24、72 及 160 小時之時間點及針對大鼠 (C) 在第 1、8 及 24 小時之時間點顯示 3D 重構之平面化 2D 圖。兩種動物均顯示注射部位之藥物之緩慢吸收及至腎臟及更小程度的肝臟之明顯早期及持續分佈。大鼠圖像顯示在第 1 小時在膀胱中、在第 4 及 8 小時在十二指腸及小腸中及在第 8 及 24 小時在腎上腺中具有明顯的放射性。兩種動物中與腎臟相關的放射性主要在皮質中識別 (B 及 D)。在猴子 (頂部) 及大

鼠(底部)中之注射部位之 ^{111}In -ShK-221的定量顯示雙相性衰退，其中初始半衰期為約1至1.5小時及最終半衰期 >48 小時(E)。在猴子(頂部)及大鼠(底部)全血中之藥物濃度遵循相似的雙相性衰退，其中初始半衰期為約1至1.5小時及最終半衰期 >64 小時(F)。在整個研究時期，血濃度保持大於Kv1.3之 K_d 及在起初120小時中大於80%的飽和濃度(233 pM)，其係與在研究時期中注射部位之緩慢、持續分佈相一致。

圖2說明經放射性標記之ShK-186類似物的形成。經由連接子將DOTA固相偶聯至ShK-198之胺基端以形成ShK-221(A)，進行ShK-186之放射性標記。藉由在 95°C 、pH 5之乙酸鈉中培養，將銥併入DOTA環。經銥標記之ShK-221藉由離子交換層析法產生不同的遷移圖，其中所得螯合物具有預期的質量(C)。

圖3顯示ShK-186及兩種經標記之類似物(ShK-221-釷(ShK-221-Gd)及ShK-221-銥(ShK-221-In))的Kv1.3通道阻斷效力的比較：(A)在不存在及存在ShK-221-Gd下之代表性全細胞Kv1.3電流，(B)顯示ShK-186、ShK-221-Gd及ShK-221-In對Kv1.3電流之影響的劑量-反應曲線。該研究使用安定的Kv1.3-轉染細胞系(Beeton等人 Mol Pharmacol 67:1369-1381(2005)，以引用之方式將關於相同內容之其教示併入本文)。在如所述之膜片鉗技術之全細胞組態中進行電生理記錄(Beeton等人 2005及Wolff, H等人, Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 97:8151-6(2000)，以引用之方式將

關於相同內容之其教示併入本文)。外部溶液為林格鈉 (sodium Ringer)及吸管溶液為KF(300 mOsm)。藉由從 -80 至 40 mV之保持電位之 200-ms去極化脈衝，引發Kv1.3電流。針對各濃度，使用在 40 mV下之峰值電流之減少量，以使用 Origin軟體(OriginLab Corp., Northampton, MA)產生劑量-反應曲線。IC₅₀值為：ShK-186=68.99±4.01 pM (n=5)，ShK-221-Gd=58.23±1.38 pM(n=5) 及 ShK-221-In=63.80±2.25 pM(n=3)。

序列表

<110> 美商奇尼塔一有限公司
 <120> 以 SHK 為主之醫藥組合物及其製備方法及用途
 <130> 2068061-00005
 <140> 101120237
 <141> 2012/06/05
 <150> 61/493,868; 61/625,578
 <151> 2011/06/06; 2012/04/17
 <160> 5
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> SHK 多肽
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (21)..(21)
 <223> Xaa為Met或Nle
 <400> 1
 Arg Ser Cys Ile Asp Thr Ile Pro Lys Ser Arg Cys Thr Ala Phe Gln
 1 5 10 15
 Cys Lys His Ser Xaa Lys Tyr Arg Leu Ser Phe Cys Arg Lys Thr Cys
 20 25 30
 Gly Thr Cys
 35
 <210> 2
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> SHK 多肽
 <400> 2
 Arg Ser Cys Ile Asp Thr Ile Pro Lys Ser Arg Cys Thr Ala Phe Gln
 1 5 10 15
 Cys Lys His Ser Met Lys Tyr Arg Leu Ser Phe Cys Arg Lys Thr Cys
 20 25 30
 Gly Thr Cys
 35
 <210> 3
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> SHK 多肽 ShK-186
 <220>

<221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> 磷酸化作用

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa為2-氨基乙氧基-2-乙氧基乙酸

<400> 3

Tyr Xaa Arg Ser Cys Ile Asp Thr Ile Pro Lys Ser Arg Cys Thr Ala
 1 5 10 15

Phe Gln Cys Lys His Ser Met Lys Tyr Arg Leu Ser Phe Cys Arg Lys
 20 25 30

Thr Cys Gly Thr Cys
 35

<210> 4
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> SHK多肽ShK-192

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa為4-磷醯基-L-苯基丙胺酸

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa為2-氨基乙氧基-2-乙氧基乙酸

<220>
 <221> DISULFID
 <222> (5)..(37)

<220>
 <221> DISULFID
 <222> (14)..(30)

<220>
 <221> DISULFID
 <222> (19)..(34)

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (23)..(23)
 <223> Xaa為Nle

<400> 4

Xaa Xaa Arg Ser Cys Ile Asp Thr Ile Pro Lys Ser Arg Cys Thr Ala
 1 5 10 15

Phe Glu Cys Lys His Ser Xaa Lys Tyr Arg Leu Ser Phe Cys Arg Lys
 20 25 30

Thr Cys Gly Thr Cys
 35

<210> 5
 <211> 38

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> SHK多肽ShK-198

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> 對膦醯基苯基丙胺酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> 2-氨基乙氧基-2-乙氧基乙酸

<400> 5

Xaa Phe Xaa Arg Ser Cys Ile Asp Thr Ile Pro Lys Ser Arg Cys Thr
1 5 10 15

Ala Phe Gln Cys Lys His Ser Met Lys Tyr Arg Leu Ser Phe Cys Arg
20 25 30

Lys Thr Cys Gly Thr Cys
35

七、申請專利範圍：

1. 一種醫藥組合物，其包含具有序列 Arg-Ser-Cys-Ile-Asp-Thr-Ile-Pro-Lys-Ser-Arg-Cys-Thr-Ala-Phe-Gln-Cys-Lys-His-Ser-Xaa-Lys-Tyr-Arg-Leu-Ser-Phe-Cys-Arg-Lys-Thr-Cys-Gly-Thr-Cys(SEQ ID NO:1)之 ShK 多肽的醫藥上可接受的鹽，其中該 ShK 多肽鍵連至帶負電荷離子的有機或無機化學實體，且其中該 C 端為酸或醯胺，其中該醫藥組合物經調配以供長期儲存於水性載體中且包含在水性載體中有效溶解 ShK 多肽之含量的界面活性劑，其中該界面活性劑為聚山梨醇酯 20。
2. 如請求項 1 之醫藥組合物，其中該組合物係含於無菌玻璃小瓶中，並按指示儲存在 -70°C 。
3. 如請求項 1 之醫藥組合物，其中該 ShK 多肽係以 0.01 mg/ml 至 500 mg/ml 之含量存在。
4. 如請求項 1 之醫藥組合物，其進一步包含 10 mM 磷酸鈉、150 mM NaCl、0.05 w/v% 之聚山梨醇酯 20 及 0.5 mg/ml 至 500 mg/ml 之 ShK-186，其中該組合物之 pH 為 6.0。
5. 如請求項 1 之醫藥組合物，其 pH 係介於 5 與 7 之間。
6. 一種用於醫藥用途的製造單元，其包括至少一個在無菌條件下製造並且包含如請求項 1 之醫藥組合物之玻璃小瓶，其中該玻璃小瓶內之醫藥組合物可在 -70°C 下保持安定達至少 6 個月，且進一步包括指示稀釋及製備該醫藥組合物以投與人類的說明書。
7. 一種用於醫藥用途的製造單元，其包括至少一個包含如

請求項 1 之醫藥組合物之無菌注射器，其中該製造單元
進一步包括指示該醫藥組合物投與人類的說明書。

八、圖式：

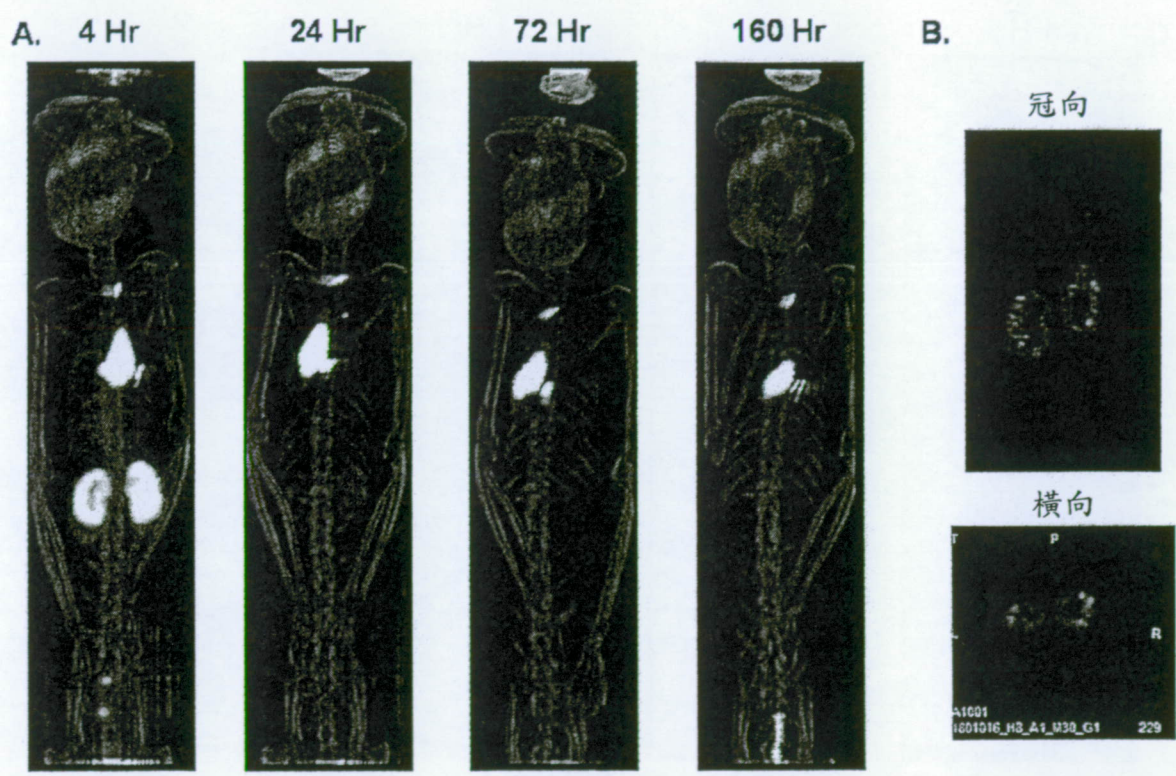
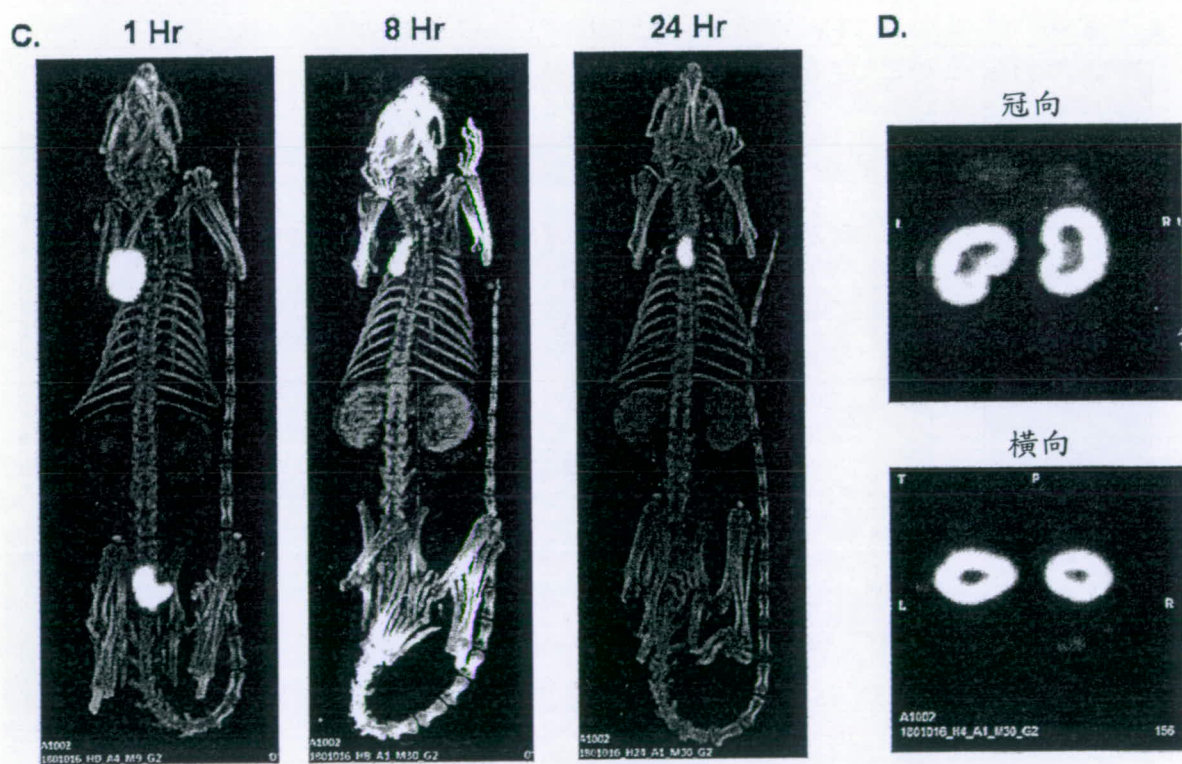
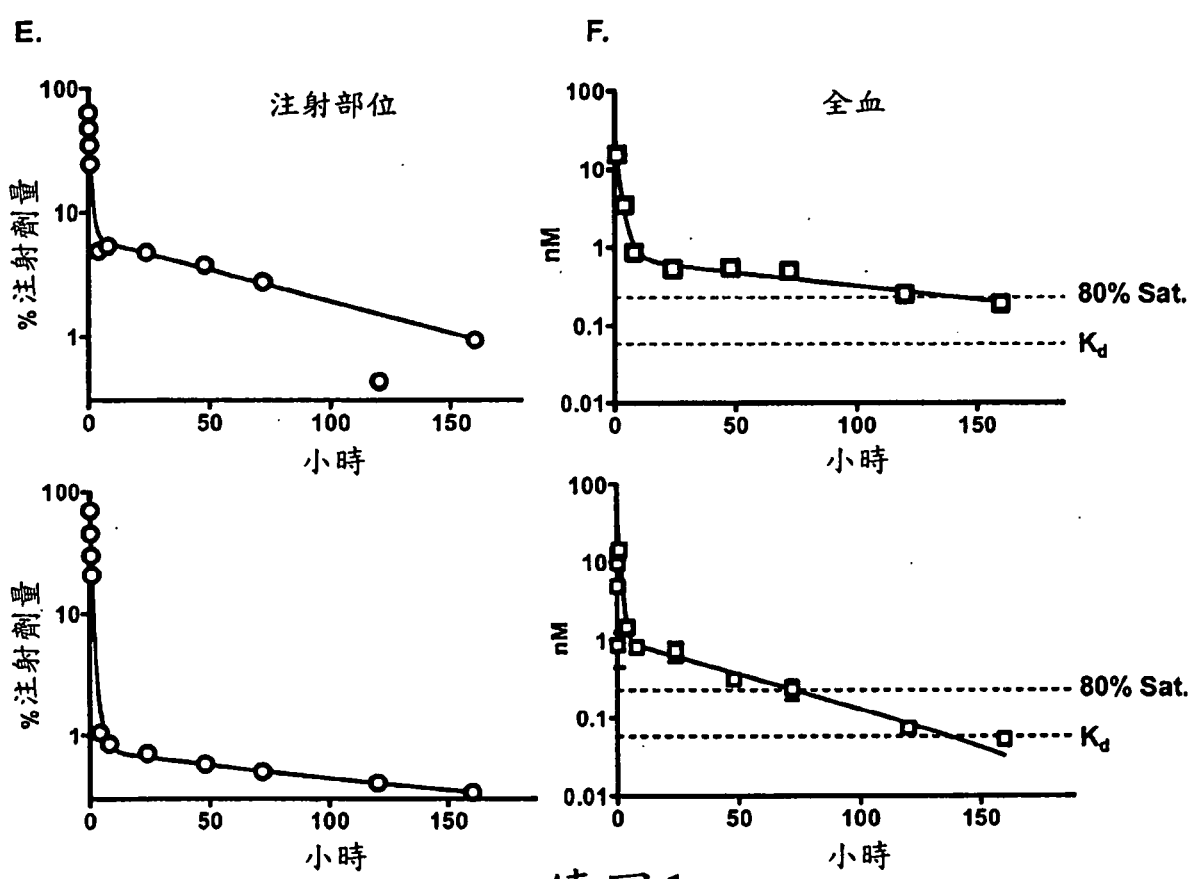


圖 1



續圖1



續圖 1

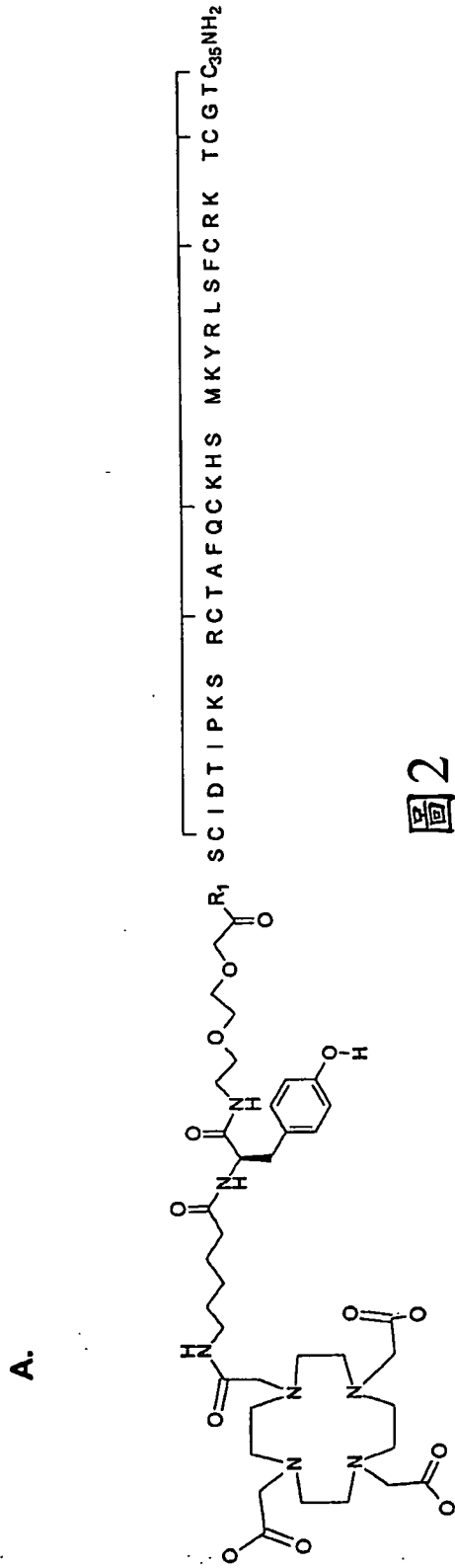
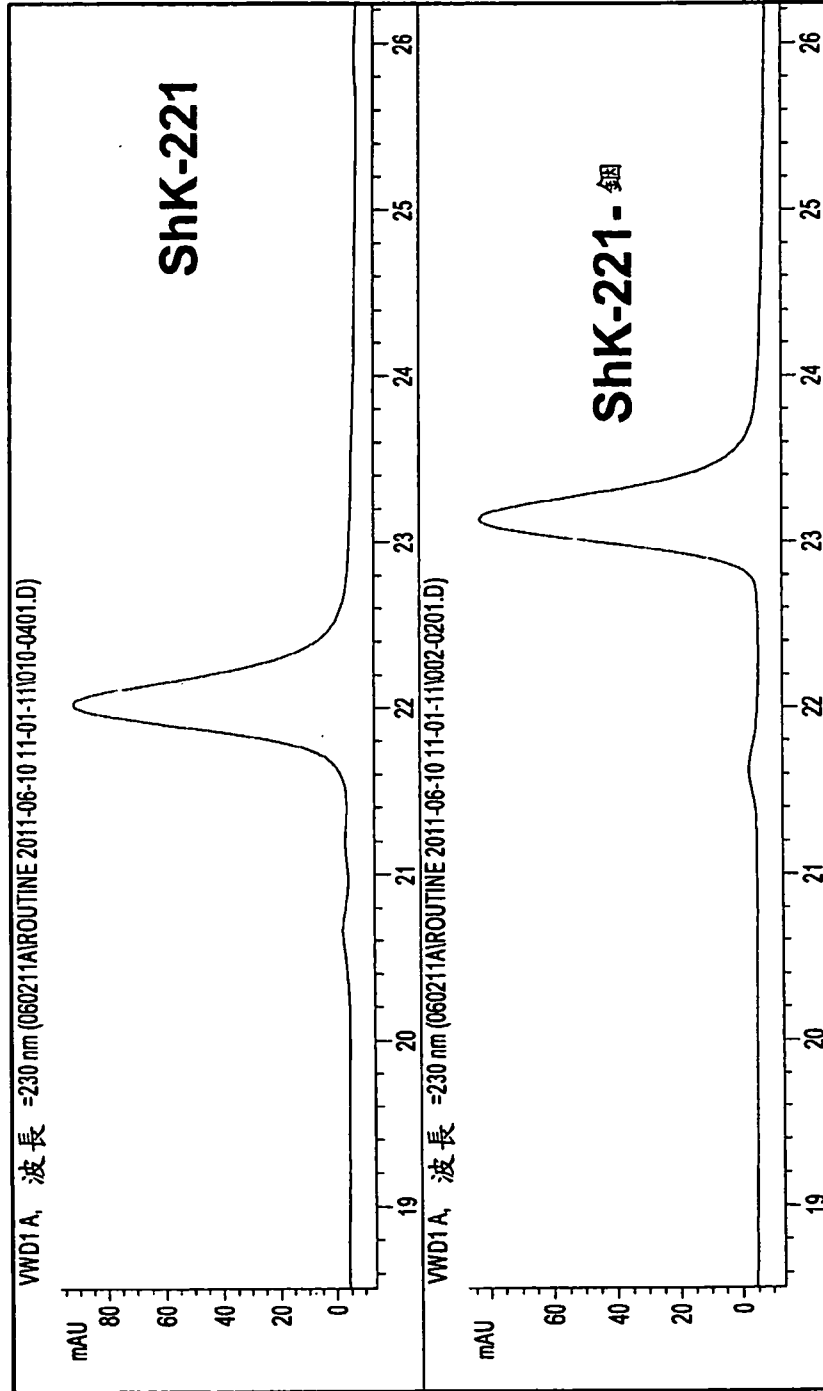


圖2

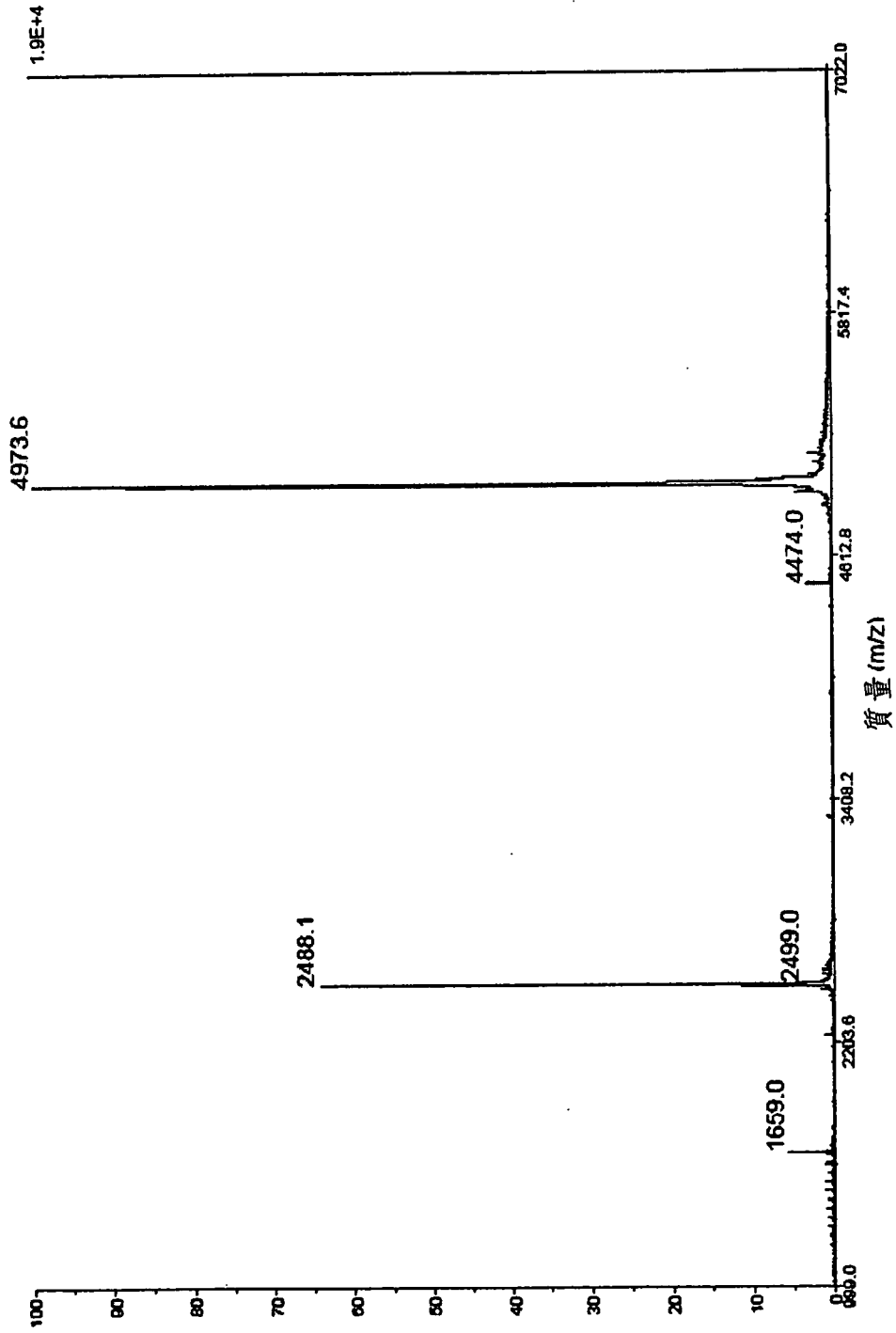
B.



續圖2

C.

光譜記錄



續圖2

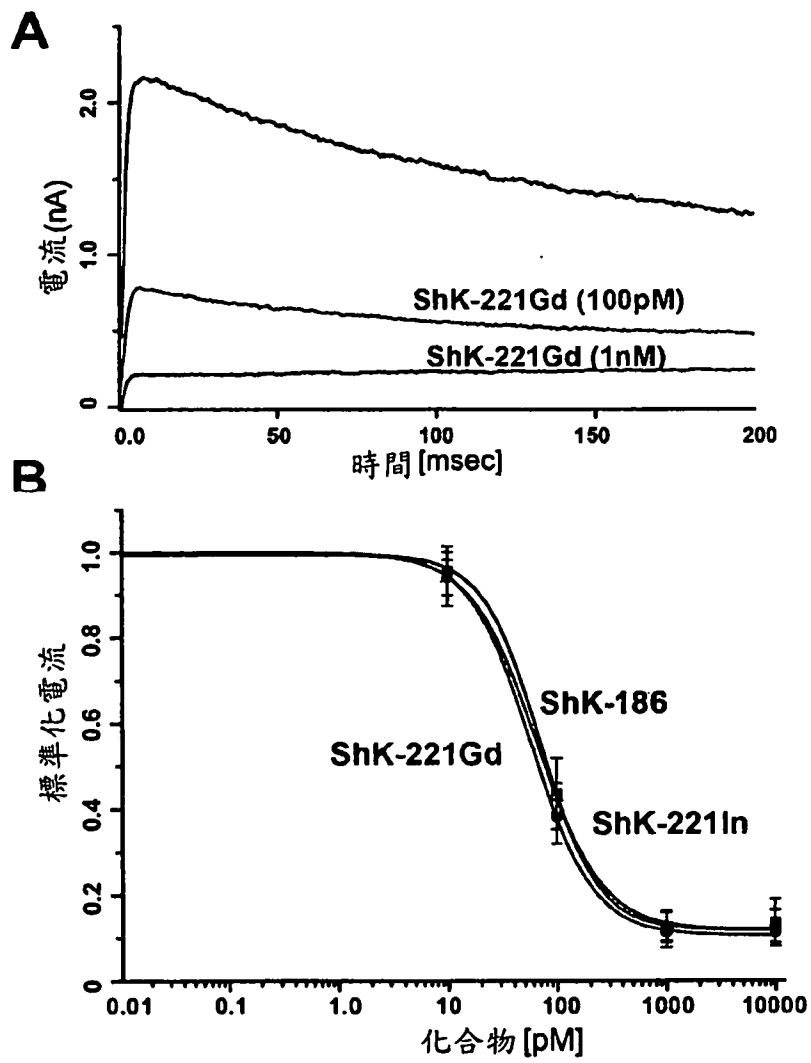


圖3