



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103687608 B

(45)授权公告日 2018.06.26

(21)申请号 201280035051.7

(22)申请日 2012.06.05

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 103687608 A

(43)申请公布日 2014.03.26

(30)优先权数据  
61/493,868 2011.06.06 US  
61/625,578 2012.04.17 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日  
2014.01.15

(86)PCT国际申请的申请数据  
PCT/US2012/040857 2012.06.05

(87)PCT国际申请的公布数据  
W02012/170392 EN 2012.12.13

(73)专利权人 奇尼塔一有限责任公司  
地址 美国华盛顿州

(72)发明人 肖恩·P·艾度纳托  
埃里克·J·塔查

(74)专利代理机构 北京律盟知识产权代理有限  
责任公司 11287

代理人 张世俊

(51)Int.Cl.  
A61K 38/16(2006.01)  
A61K 38/17(2006.01)  
A61P 17/00(2006.01)

(56)对比文件  
US 2008/0221024 A1,2008.09.11,  
WO 2009/021289 A1,2009.02.19,  
Kelly Davis Orcutt et al..Engineering  
an antibody with picomolar affinity to  
DOTA chelates of multiple radionuclides  
for pretargeted radioimmunotherapy and  
imaging.《Nuclear Medicine and Biology》  
.2010,第38卷(第2期),223-233.

审查员 王斌

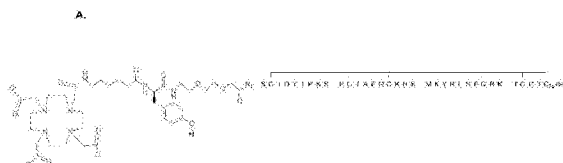
权利要求书2页 说明书19页  
序列表7页 附图7页

(54)发明名称

基于SHK的医药组合物及其制备和使用方  
法

(57)摘要

本发明揭示具有序列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)的医药组合物。所揭示的组  
合物可以在SEQ ID NO:1的C端包括酸或酰胺,且多  
肽可以连接到带阴离子电荷的有机或无机化学  
实体。所述多肽可以可检测的方式加以标记以用  
于诊断目的。本发明还揭示了制备和使用所述医  
药化合物的方法。



1. 一种医药组合物,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)的ShK多肽的医药上可接受的盐,其中所述ShK多肽连接到带阴离子电荷的有机或无机化学实体,且C端为酸或酰胺,其中所述医药组合物的pH为6且所述医药组合物进一步包含在水性载剂中有效溶解所述ShK多肽的量的表面活性剂,其中所述表面活性剂为0.05% (w/v)的聚山梨醇酯20。

2. 根据权利要求1所述的医药组合物,其中Xaa是Met或Nle。

3. 根据权利要求1所述的医药组合物,其中所述ShK多肽具有以下序列:

a) 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-NH<sub>2</sub> (ShK-198);

b) 对磷酸基-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-NH<sub>2</sub>;或

c) 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-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:1,其中Xaa是Met)。

4. 根据权利要求1所述的医药组合物,其中所述化学实体是选自由以下组成的群组: AEEAc-L-Pmp (OH<sub>2</sub>); AEEAc-D-Pmp (OH<sub>2</sub>); AEEAc-D-Pmp (OH, Et); AEEAc-L-Pmp (Et<sub>2</sub>); AEEAc-D-Pmp (Et<sub>2</sub>); AEEAc-L-Tyr; AEEAc-L-Tyr (PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>); AEEAc-L-Phe (p-NH<sub>2</sub>); AEEAc-L-Phe (p-CO<sub>2</sub>H); AEEAc-L-天冬氨酸盐; AEEAc-D-天冬氨酸盐; AEEAc-L-谷氨酸盐; 以及AEEAc-D-谷氨酸盐。

5. 根据权利要求1所述的医药组合物,其中所述医药组合物包含在无菌玻璃小瓶中且在-70°C下存储。

6. 根据权利要求1所述的医药组合物,其经调配以供皮下投药。

7. 根据权利要求1所述的医药组合物,其中所述组合物包含在无菌注射器中。

8. 一种用于医药用途的制造单元,其包含具有序列SEQ ID NO:1的ShK多肽的医药上可接受的盐,其中所述ShK多肽连接到带阴离子电荷的有机或无机化学实体,且C端为酸或酰胺,且包含用于稀释和制备所述医药组合物以向人类投药的说明书,其中所述医药组合物的pH为6且所述医药组合物进一步包含在水性载剂中有效溶解所述ShK多肽的量的表面活性剂,其中所述表面活性剂为0.05% (w/v)的聚山梨醇酯20,以及其中所述医药组合物包含于在无菌条件下制备的至少一个玻璃小瓶中,使得所述至少一个玻璃小瓶内的所述医药组合物在-70°C保持稳定达至少6个月。

9. 根据权利要求8所述的制造单元,其中Xaa是Met或Nle。

10. 根据权利要求8所述的制造单元,其中所述ShK多肽具有以下序列:

a) 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-NH<sub>2</sub> (ShK-198);

b) 对磷酸基-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-NH<sub>2</sub>;或

c) 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-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:1,其中Xaa是Met)。

11. 根据权利要求8所述的制造单元,其中所述化学实体是选自由以下组成的群组: AEEAc-L-Pmp (OH<sub>2</sub>); AEEAc-D-Pmp (OH<sub>2</sub>); AEEAc-D-Pmp (OH,Et); AEEAc-L-Pmp (Et<sub>2</sub>); AEEAc-D-Pmp (Et<sub>2</sub>); AEEAc-L-Tyr; AEEAc-L-Tyr (PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>); AEEAc-L-Phe (p-NH<sub>2</sub>); AEEAc-L-Phe (p-CO<sub>2</sub>H); AEEAc-L-天冬氨酸盐; AEEAc-D-天冬氨酸盐; AEEAc-L-谷氨酸盐; 以及AEEAc-D-谷氨酸盐。

12. 一种用于医药用途的制造单元,其包含具有序列SEQ ID NO:1的ShK多肽的医药上可接受的盐,其中所述ShK多肽连接到带阴离子电荷的有机或无机化学实体,且C端为酸或酰胺,且包含用于向人类授予所述医药组合物的说明书,其中所述医药组合物的pH为6且所述医药组合物进一步包含在水性载体中有效溶解所述ShK多肽的量的表面活性剂,其中所述表面活性剂为0.05% (w/v)的聚山梨醇酯20,以及其中所述医药组合物包含于至少一个无菌注射器中。

13. 根据权利要求12所述的制造单元,其中Xaa是Met或Nle。

14. 根据权利要求12所述的制造单元,其中所述ShK多肽具有以下序列:

a) 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-NH<sub>2</sub> (ShK-198);

b) 对磷酸基-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-NH<sub>2</sub>;或

c) 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-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:1,其中Xaa是Met)。

15. 根据权利要求12所述的制造单元,其中所述化学实体是选自由以下组成的群组: AEEAc-L-Pmp (OH<sub>2</sub>); AEEAc-D-Pmp (OH<sub>2</sub>); AEEAc-D-Pmp (OH,Et); AEEAc-L-Pmp (Et<sub>2</sub>); AEEAc-D-Pmp (Et<sub>2</sub>); AEEAc-L-Tyr; AEEAc-L-Tyr (PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>); AEEAc-L-Phe (p-NH<sub>2</sub>); AEEAc-L-Phe (p-CO<sub>2</sub>H); AEEAc-L-天冬氨酸盐; AEEAc-D-天冬氨酸盐; AEEAc-L-谷氨酸盐; 以及AEEAc-D-谷氨酸盐。

## 基于SHK的医药组合物及其制备和使用方法

### [0001] 相关申请案的交叉参考

[0002] 本申请案主张在2011年6月6日申请的美国临时申请案第61/493,868号及在2012年4月17日申请的美国临时申请案第61/625,578号的优先权,所述两篇申请案均以全文引用的方式并入本文中。

### 技术领域

[0003] 文中揭示的组合物及方法大体上是关于以ShK为主的医药组合物治疗、预防和/或缓解与其中记忆T细胞发挥作用的疾病和失调(包括自身免疫疾病及代谢失调)有关的症状的用途。

### [0004] 政府权益的声明

[0005] 依据过敏及传染病健康国家研究所(National Institutes of Health National Institute of Allergy and Infectious Diseases)授权R43AI085691及NIH R01NS48252,美国政府拥有本发明中的权利。

### 背景技术

### 发明内容

[0006] 许多免疫相关的人类疾病及代谢失调是由记忆T细胞的作用所引起的。此类免疫相关疾病包括自身免疫疾病,例如多发性硬化、1型糖尿病、类风湿性关节炎以及牛皮癣等。代谢失调的实例包括肥胖、2型糖尿病、高胆固醇血症、冠状动脉病、代谢综合症、代谢综合症X、胰岛素抗性、高脂血症、脂质营养不良、血脂异常、高三酸甘油酯血症、葡萄糖耐受不良以及高血压。

[0007] 已知两类记忆T细胞:中枢记忆T细胞( $T_{CM}$ )和效应记忆T细胞( $T_{EM}$ )。一经活化, $T_{EM}$ 细胞向上调节Kv1.3 $K^+$ 离子通道。抗原驱动的 $T_{EM}$ 细胞增殖对Kv1.3 $K^+$ 离子通道阻断剂敏感(伍尔夫(Wulff)等人,《临床研究杂志(J.Clin.Invest.)》111:1703-1713,2003),且最初从加勒比海海葵(*Stichodactyla helianthus*)分离的多肽ShK可以充当此类阻断剂。通过阻断Kv1.3通道,ShK在皮莫耳浓度下抑制 $T_{EM}$ 细胞的增殖。

[0008] 文中揭示的一个实施例包括一种医药组合物,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,其中Xaa为Met或Nle)的ShK多肽。

[0009] 另一个实施例包括一种医药组合物,其包含具有式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-NH<sub>2</sub>的ShK多肽。

[0010] 另一个实施例包括一种医药组合物,其包含具有式对磷酸基-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-NH<sub>2</sub> (ShK-186) 的ShK多肽。

[0011] 另一个实施例包括一种医药组合物,其包含具有式L-半胱氨酰胺、4-磷酸基-L-苯基丙氨酰基-2-[2-(2-氨基乙氧基)乙氧基]乙酰基-L-精氨酰基-L-丝氨酰基-L-半胱氨酰基-L-异亮氨酰基-L-α-天冬氨酰基-L-苏氨酰基-L-异亮氨酰基-L-脯氨酰基-L-离氨酰基-L-丝氨酰基-L-精氨酰基-L-半胱氨酰基-L-苏氨酰基-L-丙氨酰基-L-苯基丙氨酰基-L-谷氨酰基-L-半胱氨酰基-L-离氨酰基-L-组氨酰基-L-丝氨酰基-L-正亮氨酰基-L-离氨酰基-L-酪氨酰基-L-精氨酰基-L-亮氨酰基-L-丝氨酰基-L-苯基丙氨酰基-L-半胱氨酰基-L-精氨酰基-L-离氨酰基-L-苏氨酰基-L-半胱氨酰基甘氨酰基-L-苏氨酰基-,环状(5→37), (14→30), (19→34)-三(二硫化物)(文中称为ShK-192,CAS登记号1159528-26-3)的ShK多肽,其中所述ShK-192多肽连接到带阴离子电荷的有机或无机化学实体,且C端为酸或酰胺。

[0012] 另一个实施例包括一种医药组合物,其包含具有式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-NH<sub>2</sub> (ShK-198) 的ShK多肽。

[0013] 在另一个实施例中,ShK多肽连接到带阴离子电荷的有机或无机化学实体。在另一个实施例中,C端为酸或酰胺。在另一个实施例中,ShK多肽连接到带阴离子电荷的有机或无机化学实体,且C端为酸或酰胺。

[0014] 在另一个实施例中,一种或一种以上化学实体连接到ShK多肽的N端。在另一个实施例中,所述化学实体可以通过连接分子或连接基团连接到ShK多肽的N端。在另一个实施例中,所述化学实体是通过氨基乙氧基乙氧基-乙酰基连接子连接到ShK多肽的N端。

[0015] 在另一个实施例中,化学实体是选自由以下组成的群组:L-Pmp(OH<sub>2</sub>);D-Pmp(OH<sub>2</sub>);D-Pmp(OHEt);L-Pmp(Et<sub>2</sub>);D-Pmp(Et<sub>2</sub>);L-Tyr;L-Tyr(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>);L-Phe(p-NH<sub>2</sub>);L-Phe(p-CO<sub>2</sub>H);L-天冬氨酸盐;D-天冬氨酸盐;L-谷氨酸盐以及D-谷氨酸盐。

[0016] 在另一个实施例中,化学实体/连接子组合是选自由以下组成的群组:AEEAc-L-Pmp(OH<sub>2</sub>);AEEAc-D-Pmp(OH<sub>2</sub>);AEEAc-D-Pmp(OHEt);AEEAc-L-Pmp(Et<sub>2</sub>);AEEAc-D-Pmp(Et<sub>2</sub>);AEEAc-L-Tyr;AEEAc-L-Tyr(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>);AEEAc-L-Phe(p-NH<sub>2</sub>);AEEAc-L-Phe(p-CO<sub>2</sub>H);AEEAc-L-天冬氨酸盐;AEEAc-D-天冬氨酸盐;AEEAc-L-谷氨酸盐以及AEEAc-D-谷氨酸盐。

[0017] 在另一个实施例中,所述ShK多肽在医药组合物中以其医药上可接受的盐提供。在另一个实施例中,所述医药上可接受的盐为乙酸盐。在另一个实施例中,所述医药上可接受的盐为乙酸钾或乙酸钠。

[0018] 在另一个实施例中,所述医药组合物提供在水性载剂中。

[0019] 在另一个实施例中,所述医药组合物的pH介于5与7之间。在另一个实施例中,所述医药组合物的pH为6.0。

[0020] 在另一个实施例中,所述医药组合物进一步包含在水性载剂中有效溶解ShK多肽的量的表面活性剂。在另一个实施例中,所述表面活性剂为聚山梨醇酯20。在另一个实施例中,所述表面活性剂为0.05w/v%的聚山梨醇酯20。

[0021] 在另一个实施例中,所述医药组合物进一步包含10mM磷酸钠。在另一个实施例中,所述医药组合物进一步包含150mM NaCl。

[0022] 在另一个实施例中,所述ShK多肽以0.01mg/ml到500mg/ml的量存在。在其它实施

例中,所述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500mg/ml的量提供。

[0023] 在另一个实施例中,所述ShK多肽是从天然来源获得的。在另一个实施例中,所述ShK多肽是合成的。在另一个实施例中,所述ShK多肽包括天然与合成ShK多肽的混合物。

[0024] 文中描述的实施例还包括以文中所述组合物开始制造的冻干医药组合物。在一个实施例中,所述冻干医药组合物包含8重量%到12重量%的乙酸盐含量。在另一个实施例中,所述冻干医药组合物包含10重量%到11重量%的乙酸盐含量。

[0025] 在冻干医药组合物的另一个实施例中,所述医药组合物的含水量小于5%。在冻干医药组合物的另一个实施例中,含水量小于4.0%。在冻干医药组合物的另一个实施例中,含水量小于3.5%。

[0026] 在另一个实施例中,所述医药组合物提供于包装材料中。在另一个实施例中,所述医药组合物经调配以供长期存储。在另一个实施例中,所述医药组合物包含在无菌玻璃小瓶中且按指示在-70℃下存储。

[0027] 在另一个实施例中,所述医药组合物经调配以供皮下投药。在另一个实施例中,所述医药组合物包含在无菌注射器中。

[0028] 一个实施例包括一种医药组合物,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为Met或Nle)的ShK多肽的医药上可接受的盐、10mM磷酸钠、150mM NaCl以及0.05w/v%的聚山梨醇酯20,其中所述ShK多肽连接到带阴离子电荷的有机或无机化学实体,C端为酸或酰胺并且所述组合物的pH为6.0。

[0029] 另一个实施例包括一种医药组合物,其包含具有式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-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:1,其中Xaa为Met)的ShK多肽的医药上可接受的盐、10mM磷酸钠、150mM NaCl以及0.05w/v%的聚山梨醇酯20,其中所述ShK多肽连接到带阴离子电荷的有机或无机化学实体并且所述组合物的pH为6.0。

[0030] 另一个实施例包括一种医药组合物,其包含具有式对磷酸基-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-NH<sub>2</sub> (ShK-186)的ShK多肽的医药上可接受的盐、10mM磷酸钠、150mM NaCl以及0.05w/v%的聚山梨醇酯20,其中所述组合物的pH为6.0。

[0031] 另一个实施例包括一种医药组合物,其包含具有式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-NH<sub>2</sub> (ShK-198)的ShK多肽、10mM磷酸钠、150mM NaCl以及0.05w/v%的聚山梨醇酯20,其中所述组合物的pH为6.0。

[0032] 文中揭示的实施例还包括用于医药用途的制造单元。所述制造单元的一个实施例包含至少一个在无菌条件下制备的包含文中所述的医药组合物的玻璃小瓶。在另一个实施例中,所述玻璃小瓶内的医药组合物在-70℃下保持稳定达至少6个月。在另一个实施例中,

所述制造单元进一步包含稀释和制备医药组合物以向人类投药的说明书。

[0033] 在另一个实施例中,用于医药用途的制造单元包含至少一个含有文中所述医药组合物的无菌注射器。在另一个实施例中,所述制造单元进一步包含将医药组合物向人类投药的说明书。

[0034] 文中揭示的实施例还包括制造所述医药组合物的方法。一个此类实施例包括一种制造医药组合物的工艺,包含:(a)以预定浓度制备0.05%聚山梨醇酯20含于水性载剂中的溶液;(b)将预定含量的具有SEQ ID NO:1的多肽或其医药上可接受的盐加入到步骤(a)的溶液中,其中C端为酸或酰胺,且其中所述多肽连接到带阴离子电荷的有机或无机化学实体;(c)调整步骤(b)的溶液的pH直到多肽溶于所述溶液中;及(d)如果有需要,调整步骤(c)的溶液的pH到5到7的pH,从而制备所述医药组合物。

[0035] 文中揭示的实施例还包括预防、治疗或缓解自身免疫或代谢失调的症状的方法。一个实施例包括以有效预防、治疗或缓解症状的量将文中所述医药组合物投向需要此类预防、治疗或缓解自身免疫或代谢失调的人。

[0036] 在另一个实施例中,所述失调是选自由以下组成的群组的自身免疫失调:多发性硬化、1型糖尿病、类风湿性关节炎、牛皮癣、炎性肠病、接触介导性皮炎、牛皮癣关节炎、哮喘、过敏、再狭窄、全身性硬化、纤维化、硬皮病、血管球性肾炎、舍格伦综合症(Sjogren syndrome)、炎性骨吸收、移植排斥反应、移植物抗宿主病以及红斑性狼疮。

[0037] 在另一个实施例中,所述失调是选自由以下组成的群组的代谢失调:肥胖、2型糖尿病、高胆固醇血症、冠状动脉病、代谢综合症、代谢综合症X、胰岛素抗性、高脂血症、脂质营养不良、血脂异常、高三酸甘油酯血症、葡萄糖耐受不良、高血压、超重以及能量代谢失调。

[0038] 在另一个实施例中,所述医药组合物每天、每周、每月、每两个月、每三个月或每六个月投药一次。

[0039] 在另一个实施例中,所述医药组合物经皮下投药。

[0040] 在另一个实施例中,所述ShK多肽经放射性标记。

[0041] 在一个实施例中,所述ShK多肽以<sup>111</sup>In标记。

[0042] 在另一个实施例中,所述ShK多肽是经<sup>111</sup>In标记的ShK-221。

## 附图说明

[0043] 图1说明经放射性标记的ShK在大鼠及松鼠猴中的生物分布研究。将经<sup>111</sup>In标记的ShK-221通过到每一只动物的肩胛区的单次皮下注射的形式投与史泊格多利(SpragueDawley)大鼠(100μg/kg;0.7mCi)和松鼠猴(35μg/kg;0.84mCi)。在第1个小时期间(4×15m间隔)以及在给药后第4、8、24、48、72、120及160小时持续收集SPECT和CT扫描。针对猴子(A)在第4、24、72及160小时的时间点以及针对大鼠(C)在第1、8及24小时的时间点显示3D重构的平面化2D图。两种动物均显示药物从注射部位的缓慢吸收以及到肾脏和较小程度的到肝脏的明显早期且持续分布。大鼠图像显示在第1小时在膀胱中、在第4和8小时在十二指肠和小肠中以及在第8和24小时在肾上腺中具有明显的放射性。两种动物中与肾脏相关的放射性主要在皮质中识别(B及D)。在猴子(顶部)和大鼠(底部)中注射部位处<sup>111</sup>In-ShK-221的定量显示双相性衰退,其中初始半衰期为约1到1.5小时且最终半衰期>48小时(E)。

在猴子(顶部)和大鼠(底部)全血中的药物浓度遵循类似的双相性衰退,其中初始半衰期为约1.5小时且最终半衰期>64小时(F)。在整个研究期间,Kv1.3的血浓度保持超过 $K_d$ 且在最开始的120小时内超过80%的饱和浓度(233pM),这与在整个研究期间从注射部位的缓慢、持续分布相一致。

[0044] 图2说明经放射性标记的ShK-186类似物的形成。通过经由连接子将DOTA固相偶联到ShK-198的氨基端以形成ShK-221(A)来进行ShK-186的放射性标记。通过在95°C下、pH5的乙酸钠中培养来将铟并入到DOTA环中。通过离子交换色谱法,经铟标记的ShK-221产生独特的迁移图,其中所产生的螯合物具有预期的质量(C)。

[0045] 图3显示ShK-186和两种经标记的类似物(ShK-221-钆(ShK-221-Gd)和ShK-221-铟(ShK-221-In))的Kv1.3通道阻断效力的比较:(A)在不存在和存在ShK-221-Gd下的代表性全细胞Kv1.3电流,(B)显示ShK-186、ShK-221-Gd以及ShK-221-In对Kv1.3电流的影响的剂量-反应曲线。所述研究使用稳定的Kv1.3-转染细胞系(比顿(Beeton)等人《分子药理学(Mol Pharmacol)》67:1369-1381(2005),以引用的方式将相关传授内容并入本文)。通过如所述的膜片钳技术的全细胞配置进行电生理记录(比顿等人2005和伍尔夫H等人,《美国科学院院刊(Proc.Natl.Acad.Sci.U S A.)》97:8151-6(2000),以引用的方式将相关传授内容并入本文)。外部溶液为林格钠(sodium Ringer),吸管溶液为KF(300mOsm)。通过从-80mV到40mV的钳制电位的200-ms去极化脉冲,引发Kv1.3电流。ShK-186、ShK-221-Gd以及ShK-221-In各自在若干个浓度下进行测试。使用原点(Origin)软件(马萨诸塞州北安普敦的原点软件公司(OriginLab Corp.,Northampton,MA)),使用各个浓度在40mV下峰值电流的减少量来产生剂量-反应曲线。 $IC_{50}$ 值为:ShK-186=68.99±4.01pM(n=5),ShK-221-Gd=58.23±1.38pM(n=5),ShK-221-In=63.80±2.25pM(n=3)。

### 具体实施方式

[0046] 本发明提供了以ShK为主的医药组合物以及其制备和使用方法。文中所用的术语“ShK多肽”是指所有天然和合成ShK多肽以及如文中所涵盖的其衍生物、类似物以及修饰。此类修饰和类似物包括SEQ ID NO:1的多肽,带阴离子电荷的有机或无机化学实体经由氨基乙氧基乙氧基-乙酰基连接子连接到所述多肽。文中所用的“医药组合物”包含至少一种文中所揭示的ShK多肽以及适合于所选投药模式的一种或一种以上医药上可接受的载剂、赋形剂或稀释剂。“至少一种ShK多肽”可以包括天然和合成ShK多肽。

[0047] 如所述,许多与免疫相关的人类疾病和代谢失调是由记忆T细胞的作用所引起的。已知两类记忆T细胞:中枢记忆T细胞( $T_{CM}$ )和效应记忆T细胞( $T_{EM}$ )。一经活化, $T_{EM}$ 细胞向上调节Kv1.3K<sup>+</sup>离子通道。抗原驱动的 $T_{EM}$ 细胞增殖对Kv1.3K<sup>+</sup>离子通道阻断剂敏感(伍尔夫等人,《临床研究杂志》111:1703-1713,2003),且最初从加勒比海海葵分离的多肽ShK可以充当此类阻断剂。通过阻断Kv1.3通道,ShK在皮莫耳浓度下抑制 $T_{EM}$ 细胞的增殖。

[0048] MS患者中的髓鞘特异性自身反应性T细胞为主要被活化的 $T_{EM}$ 细胞(伍尔夫等人,《临床研究杂志》111:1703-1713,2003),因此尽管文中所揭示的组合物不受具体机制的限制,但是存在合理的依据将Kv1.3阻断剂制备作为医药组合物,以便在治疗、预防或缓解多发性硬化患者的症状时减少或消除 $T_{EM}$ 细胞的活化。

[0049] 天然ShK多肽描述于例如彭宁顿M.w.(Pennington,M.W.)等人,《国际肽蛋白质研

究杂志 (Int. J. Pept. Protein Res.) 》46:354-358 (1995) 中, 所述参考文献以引用的方式将相关传授内容并入本文中。在本发明范围内的示范性ShK结构还在比顿C. 等人, “用Kv1.3通道的选择性多肽抑制剂靶向效应记忆T细胞以进行自身免疫疾病治疗 (Targeting Effector Memory T Cells with a Selective Peptide Inhibitor of Kv1.3 Channels for Therapy of Autoimmune Diseases)”, 《分子药理学》, 第67卷:1369 (2005) 以及美国专利第8,080,523号 (美国专利公开案20080221024) 中公开, 所有文献均以引用的方式将相关传授内容并入本文中。

[0050] SEQ ID NO:1展示形成文中所用组合物中的多肽的基础的示范性多肽。在特定实施例中, C端为酸 (例如COOH) 或酰胺 (例如CONH<sub>2</sub>), 且所述多肽连接到带阴离子电荷的有机或无机化学实体。“酰胺”表示酸的C端羟基 (OH) 被NH<sub>2</sub>取代。所述取代在文中使用术语“酰胺”来指示或指示为C端氨基酸-NH<sub>2</sub>, 如在“-Cys-NH<sub>2</sub>”中。

[0051] 已经研究ShK的安全性、效用以及特异性且已经显示将多肽连接到带阴离子电荷的有机或无机化学实体可以改善ShK在医药组合物中使用的适用性。

[0052] 所属领域的技术人员了解设计具有增强性质的ShK多肽的技术, 例如丙氨酸扫描, 利用已知ShK多肽序列和/或分子建模进行的基于比介导的突变诱发的合理设计。举例来说, 可以设计ShK多肽以去除含ShK多肽组合物中的蛋白酶裂解位点 (例如, 在K或R残基处的胰蛋白酶裂解位点和/或在F、Y或W残基处的胰凝乳蛋白酶裂解位点)。

[0053] SEQ ID NO:1多肽的各种修饰为适合的。一种多肽可以具有文中揭示的修饰的任何组合。为了改善ShK结构的药物动力学和药效动力学 (PK/PD) 特性, 可以置换或取代对降解性敏感的残基。举例来说, 可以取代21位的Met残基以赋予抵抗氧化的稳定化作用。在一个实施例中, 21位的Met被Nle取代。用酰胺取代C端酸官能团也可以赋予稳定性。所述对ShK的一级结构的两种取代可以与N端阴离子部分结合以产生稳定且具选择性的Kv1.3阻断剂。因此, 文中揭示的一个实施例包括SEQ ID NO:1, 其中21位的甲硫氨酸被Nle取代, 酰胺存在于C端和/或阴离子部分存在于N端。

[0054] 不可水解的磷酸根取代也对磷酸根赋予稳定化作用以及抵抗磷酸酶的稳定性的。

[0055] 如所述, 某些实施例包括有机或无机化学实体的连接。连接位点可以位于N端 (SEQ ID NO:1中的第一个Arg), 但修饰不限于在所述位点连接。示范性化学实体可以通过连接子 (例如氨基乙氧基乙氧基-乙酰基连接子 (在文中可互换地称为Aeea或AEEAc)) 或通过任何其它适当方式连接。

[0056] 适当化学实体的非限制性实例包括L-Pmp (OH<sub>2</sub>); D-Pmp (OH<sub>2</sub>); D-Pmp (OHEt); Pmp (Et<sub>2</sub>); D-Pmp (Et<sub>2</sub>); L-Tyr; L-Tyr (PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>) (对磷酸基酪氨酸); L-Phe (p-NH<sub>2</sub>); L-Phe (p-CO<sub>2</sub>H); L-天冬氨酸盐; D-天冬氨酸盐; L-谷氨酸盐以及D-谷氨酸盐。所用缩写的定义如下: Pmp (对膦酰基甲基-苯基丙氨酸) 和Ppa (对膦酰基-苯基丙氨酸)。Pmp和Ppa的替代项包括但不限于Pfp (对膦酰基 (二氟-甲基)-苯基丙氨酸) (Pfp) 和Pkp (对膦酰基-甲基酮基-苯基丙氨酸)。

[0057] 化学实体/连接子组合的非限制性实例包括AEEAc-L-Pmp (OH<sub>2</sub>); AEEAc-D-Pmp (OH<sub>2</sub>); AEEAc-D-Pmp (OHEt); AEEAc-L-Pmp (Et<sub>2</sub>); AEEAc-D-Pmp (Et<sub>2</sub>); AEEAc-L-Tyr; AEEAc-L-Tyr (PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>); AEEAc-L-Phe (p-NH<sub>2</sub>); AEEAc-L-Phe (p-CO<sub>2</sub>H); AEEAc-L-天冬氨酸盐; AEEAc-D-天冬氨酸盐; AEEAc-L-谷氨酸盐以及AEEAc-D-谷氨酸盐。一般在氨基酸残基具有手性中心

的化学实体中,可以使用氨基酸残基的D和/或L对映异构体。

[0058] 为了在所揭示的医药组合物中使用,ShK多肽可以是天然的或合成的或可以作为天然和合成ShK的混合物提供。

[0059] 可以盐形式制备ShK多肽。在文中的示范性盐中,从RP-HPLC步骤(实例1)获得的再折叠多肽可返回到管柱中并洗提。在干燥前,可以添加50mM的乙酸钠或乙酸钾到蛋白质溶液中。此步骤产生所述蛋白质的盐形式,其在从干燥形式复水时容易溶解。在实例中所用的示范性调配物(ShK-186)中,添加乙酸钠,且通过化学分析,所述调配物中的乙酸盐含量为10.4重量%。ShK-186为海葵毒素的含37个氨基酸的合成肽衍生物。在文献中,ShK-186还被称为SL5且由CAS登记号1081110-69-1标识。

[0060] 为了使含多肽组合物用作医药组合物,其必须在稳定性、溶解度以及pH方面满足若干标准,且优选地仅含有与投与动物(包含但不限于哺乳动物且特定为人)相符的物质。组成可以依据投药模式(例如皮下、静脉内等)而变化。

[0061] 尽管所属领域中已知治疗性ShK多肽的一些调配物(例如以上引用的比顿,C.等人,以及美国专利第7,833,979号),但它们均不具有文中所揭示的基于ShK的医药组合物的稳定性和溶解度。文中揭示的稳定且可溶解的基于ShK的医药组合物经由改变许多因素(包括表面活性剂浓度、pH、去除先前调配物中所用的组分以及下文实例中更充分描述的其它参数)来实现。

[0062] 具有最佳稳定性和溶解度的一种特定调配物包括:

[0063] 表1.P6N调配物的医药组合物

[0064]

组分	浓度	目的
ShK-186 多肽	高达 500 mg/mL	活性剂
磷酸钠	10 mM	缓冲剂
NaCl	150 mM	张力调节剂
聚山梨醇酯 20	0.05% (w/v)	表面活性剂
pH 6.0		

[0065] 考虑各种因素(例如患者年龄、状况、体重、性别以及饮食、正治疗病症的严重性、投药时间以及其它临床因素),主治医师可以确定用于治疗、预防和/或缓解自身免疫失调或代谢失调的症状的所揭示医药组合物的治疗和预防有效量以及给药方案。一般来说,每日用量或方案应当处于1微克( $\mu\text{g}$ )到10,000微克( $\mu\text{g}$ ) ShK多肽/千克(kg)体重的范围内、1微克到5,000微克/千克体重的范围内、1微克到1,000微克/千克体重的范围内或1微克到100微克/千克体重的范围内。

[0066] 文中揭示的医药组合物可以用于治疗与自身免疫相关的失调,例如多发性硬化、1型糖尿病、类风湿性关节炎、牛皮癣、炎性肠病、接触介导性皮炎、牛皮癣关节炎、哮喘、过敏、再狭窄、全身性硬化、纤维化、硬皮病、血管球性肾炎、舍格伦综合症、炎性骨吸收、移植排斥反应、移植物抗宿主病以及红斑性狼疮,以及代谢失调,例如肥胖、2型糖尿病、高胆固醇血症、冠状动脉病、代谢综合症、代谢综合症X、胰岛素抗性、高脂血症、脂质营养不良、血脂异常、高三酸甘油酯血症、葡萄糖耐受不良、高血压、超重以及能量代谢失调。

[0067] 为了长期存储所述医药组合物,以冻干形式存储所述医药组合物可能是有用的。

本发明涵盖此类冻干医药组合物,包括但不限于通过下述工艺制备的那些医药组合物。

[0068] 一种冻干工艺可以包括以下步骤:(a)将所述医药组合物的温度降低到 $-40^{\circ}\text{C}$ ;(b)使温度保持在 $-40^{\circ}\text{C}$ 达一段预定时间;(c)将所述溶液的温度升到 $20^{\circ}\text{C}$ ;(d)使温度保持在 $20^{\circ}\text{C}$ 达一段预定时间;以及(e)将步骤(d)中的压力降到适合冻干的压力并且使温度保持在 $20^{\circ}\text{C}$ 达一段预定时间,从而冻干所述医药组合物。

[0069] 在所述冻干工艺中,步骤(a)可以在2小时内进行;步骤(b)可以在3小时内进行;步骤(c)可以在110微巴的压力下历经13小时进行;步骤(d)可以在110微巴的压力下历经13小时进行;步骤(e)可以历经5小时进行且压力降到10微巴。

[0070] 冻干所述医药组合物的工艺还可以包括以下步骤:(a)将医药组合物的温度降低到 $-45^{\circ}\text{C}$ ;(b)使温度保持在 $-45^{\circ}\text{C}$ 达一段预定时间;(c)将溶液的温度升到 $-20^{\circ}\text{C}$ ;(d)将溶液的温度升到 $25^{\circ}\text{C}$ ;以及(e)使温度保持在 $25^{\circ}\text{C}$ 的达一段预定时间,从而冻干所述医药组合物。

[0071] 在所述工艺中,步骤(a)可以在6小时内进行;步骤(b)可以在3小时内进行;步骤(c)可以在150微巴的压力下历经19小时进行;步骤(d)可以在150微巴的压力下历经13小时进行;步骤(e)可以在150微巴的压力下历经8小时进行。

[0072] 冻干的医药组合物可以包含在包装材料内,且所述包装可以进一步包括使所述医药组合物复水以供医学专业人士、患者或研究人员最终使用的说明书。

[0073] 冻干的医药组合物可能具有小于5%、小于4%或小于3.5%的含水量。

[0074] 如在以下实例中所指示,所述医药组合物可以例如在无菌玻璃小瓶中在 $-70^{\circ}\text{C}$ 、 $-20^{\circ}\text{C}$ 或 $4^{\circ}\text{C}$ 下存储数月。小瓶可以含有1ml组合物P6N(见表1)或文中揭示的另一种医药组合物,使得所述小瓶在物理上将含有50ml ShK多肽(在一个实施例中呈乙酸盐形式)溶于10mM磷酸钠和150mM NaCl中的溶液,并含有0.05% (w/v) 聚山梨醇酯20,且最终pH被调整到6.0。

[0075] 所述小瓶可以进一步制备为医药制造单元,其中在包装中的一个或一个以上小瓶还可以含有或印刷有存储和稀释以及投与所述医药组合物以供医学专业人士、患者或研究人员最终使用的说明书。适宜的稀释模式包括使用注射用水(文中称为WFI)。适当量的稀释剂可以是制造单元的一部分,例如含于其自身的无菌容器中,视情况具有使用说明书。

[0076] 所述医药组合物可以包括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或高达500mg/ml本发明的ShK多肽或其医药上可接受的盐。精确浓度将取决于在制造商和/或最终用户的控制范围内的因素,取决于所需剂量和预期的治疗或研究用途。所述浓度还涵盖在以上范围内的任何和所有中间数,例如1.5mg/ml、2.5mg/ml等。

[0077] 对于所述医药组合物的投药,适当途径为皮下注射。医学工作者将熟悉投药方法,取决于患者和治疗模式,例如皮下、静脉内等。美国专利第7,918,824号揭示了适合患者使用的注射器且以引用的方式将相关传授内容并入本文中。还可考虑静脉内投药。举例来说,可以使用与无针静脉内进入系统使用的预先填充的无针注射器,如玻璃注射器。还可考虑用于定时释放医药组合物的可植入装置。组合物不意欲被限制于任何特定的投药选择。

[0078] 本发明例如涵盖吸取液体形式的医药组合物(例如0.5cc)到注射器(例如配有26G $\times$ 5/8英寸针管(BD件号309597)的贝迪(Becton Dickinson)(BD) Slip-Tip Sub-Q 1 cc注

射器)内。可以将一个或一个以上注射器并入制造单元,包括包装以及任选的供医学专业人士、患者或研究人员最终使用的说明书。

[0079] 所述医药组合物可以配成(但不限于)固体形式(包括颗粒、粉末或栓剂)或液体形式(例如溶液、悬浮液或乳液)。所述医药组合物可以进行常规医药操作,例如灭菌和/或可以包含常规佐剂,例如防腐剂、稳定剂、湿润剂、乳化剂、缓冲剂等。

[0080] 用于经口投药的固体剂型可以包括胶囊、片剂、丸剂、粉末以及颗粒。在此类固体剂型中,活性ShK多肽可以与至少一种惰性稀释剂(例如蔗糖、乳糖或淀粉)混合。此类剂型在一股操作中还可以包含除惰性稀释剂外的其它物质,例如润滑剂(例如硬脂酸镁)。在胶囊、片剂以及丸剂的情形下,所述剂型还可以包含缓冲剂。片剂和丸剂可以另外制备成具有肠溶衣。

[0081] 用于经口投药的液体剂型可以包括含有所属领域中通常使用的惰性稀释剂的医药上可接受的乳液、溶液、悬浮液、糖浆以及酞剂。此类组合物还可以包含佐剂,例如湿润剂、甜味剂、调味剂以及芳香剂。所述医药组合物可以含有本发明的一个以上实施例。可以适当地调配用于经口投药的制剂以控制释放活性ShK多肽。

[0082] 对于颊内投药,所述组合物可以采用片剂或以常规方式调配的锭剂(lozenge)形式。

[0083] ShK多肽可以经调配成通过注射(例如快速注射或输注)非经肠投药。用于注射的调配物可以呈单位剂型存在,例如在玻璃安瓿或多剂量容器,例如玻璃小瓶中。用于注射的组合物可以采用例如以下形式:含于油性或水性媒剂中的悬浮液、溶液或乳液,且可以含有调配剂,例如悬浮剂、稳定剂、防腐剂和/或分散剂。或者,所述活性成分可以呈粉末形式以便在使用前用适当媒剂(例如无菌的无热原水)复水。

[0084] 除上述调配物外,ShK多肽还可以调配成储槽式制剂形式。此类长效调配物可以通过植入或通过肌肉注射投药。

[0085] 对于经鼻或经肺投药或通过吸入的任何其它投药,根据本发明使用的ShK多肽宜呈用于加压包装或喷雾器的气雾剂喷雾呈现形式递送,其中使用适当的推进剂,例如二氯二氟甲烷、三氯氟甲烷、二氯四氟乙烷、二氧化碳或其它适当气体或气体混合物。

[0086] 在一个非限制性实例中,文中揭示的ShK多肽可以利用铟-111( $\text{In}^{111}$ )的1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸(DOTA)-螯合物或与所述多肽上的酪氨酸或磷酸酪氨酸部分结合的其它经放射性标记的金属标记。此类方法描述于例如舒尔茨,M.K. (Schultz, M.K.)等人,“经由无铜点击化学合成DOTA-生物素结合物以供放射性核素螯合(Synthesis of a DOTA-Biotin Conjugate for Radionuclide Chelation via Cu-Free Click Chemistry)”《有机快报(Organic Letters)》12:2398-2401(2010)中,以引用的方式将相关传授内容并入本文。在适合如通过MRI诊断的实例中,文中揭示的ShK多肽可以利用铟(In)、钆(Gd)或其它顺磁性离子的DOTA-螯合物标记。还可以使用其它螯合或结合化学。

[0087] 如在实例6中所述以及图1到3中所说明,使用经放射性标记的ShK类似物(ShK-221)来测量全血中的总药物浓度(未结合加结合部分)。早先研究表明仅有10%的药物可被利用,其在血浆中未结合(希(Chi)等人,《毒素(Toxicon)》59:529-46,2011)。此与以下观察结果一致:在向松鼠猴投与35 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 剂量的经放射性标记的ShK-2211小时后,在全血中测得约15nM的药物,表明通过所述方法的未结合比例为约7%。相较于非人类的灵长类动物,大

鼠中的药物的游离部分实际上更低。大鼠中100 $\mu$ g/kg给药后第1小时,在全血中观察到约14nM的ShK-221。此可能是因为药物结合到其它血液成分(例如血小板),血小板在其表面上表达Kv1.3且已经发现在大鼠全血中以极高数量存在(是人的5-10倍)(麦克洛斯基(McCloskey)等人,《生理学杂志(J. Physiol.)》588:1399-406,2010;乔布瑞奇(Trowbridge)等人,《临床物理生理测量(Clin. Phys. Physiol. Meas.)》5:145-70,1984)。

[0088] 灵敏的放射性标记法允许检测ShK在大鼠和松鼠猴物种中的双相性终末消除概况,其以快速初始期和极长的终末期其特征。利用<sup>111</sup>In-ShK-221计算的在猴子中的终末半衰期大于64小时,并且维持血液水平大于Ka达7天。血液浓度与从注射部位的双相性(先快后慢)吸收相似。概括来说,经放射性标记的ShK-221在大鼠和松鼠猴中的生物分布的特征在于从注射部位的极慢分布、在注射部位周围、肾脏以及肝脏的明显药物浓度以及全血中的较长终末消除期。超过约200pM的血液中的药物水平在猴子中保持约7天,在大鼠中保持3天。实例1中的数据提供使用经放射性标记的ShK多肽来研究活体内药物分布的一个实施例。DOTA在此为示范性的,可以使用其它金属螯合剂,例如DTPA(二伸乙三胺五乙酸)。因此,除治疗用途外,文中揭示的ShK多肽还可以用于诊断或监控以相关受关注蛋白质的功能紊乱为特征的疾病。在一个实施例中,提供一种检测生物样本中的受关注蛋白质(例如会受影响的受体或离子通道)的方法,包括以下步骤:(a)将所述样本与ShK多肽接触;以及(b)检测所述多肽对受关注蛋白质的作用。生物样本包括组织样本、完整细胞或其提取物。文中揭示的组合物可以用作诊断试剂盒的一部分以便检测生物样本中其相关受关注蛋白质的存在。此类试剂盒可以使用文中揭示并贴有允许检测的标签的组合物。多肽可用于识别正常或不正常的受关注蛋白质。

[0089] 以下实例描述文中揭示的方法的最优化。包括以下实例来说明本发明的特定实施例。所属领域的一股技术人员鉴于本发明应认识到在不脱离本发明的实质和范围下可以对文中揭示的具体实施例作出许多改变且仍获得相同或相似的结果。

[0090] 实例

[0091] 实例1 (pTyr)-AEEA-Arg-35-Cys-NH<sub>2</sub> (ShK-186)的合成

[0092] 如下进行线性多肽前驱物的合成。在Rink Amide (MBHA) Rx (sub:0.4mmol/g)上组装线性肽,且针对Fmoc-化学使用下列保护基:Arg (Pbf)、Ser (tBu)、Cys (Trt)、Asp (OtBu)、Thr (tBu)、Lys (Boc)、Arg (Pbf)、Gln (Trt)、His (Trt)、Tyr (tBu)以及Tyr (P(OH)O<sub>2</sub>Bz1)。利用CS536自动合成仪,以2mmol的规模通过DIC/HOBt活化使所有氨基酸偶联。将这些参数按比例放大到200mmol。

[0093] 对于裂解步骤,最终通过在室温下在搅拌下用试剂'K' [TFA/TIS/1,2-乙二硫醇(EDT)/H<sub>2</sub>O/苯酚(89/2/2/2/5)]处理4小时,从树脂裂解DeFmoc肽。(TIS是指三异丙基硅烷。)只要完成裂解,比率可以变化,且可以任选地去除苯酚。在没有苯酚的制法中,TFA/TIS/EDT/H<sub>2</sub>O的比率为(例如)47/1/1/1。通过SPE管过滤从树脂分离粗制肽且用TFA连续冲洗所述树脂,与初始滤液合并。

[0094] 从滤液蒸发TFA溶剂后(到原始裂解混合物的1/5体积),随后通过添加冷乙醚使粗制肽沉淀且真空干燥,以产生线性多肽供进一步氧化。

[0095] 在将线性粗制多肽溶于水达到0.3mg/mL的浓度(根据制造而略有变化)后,接着添加NH<sub>4</sub>OH以在pH8(后一批记录显示较低的pH(7到7.5))下进行氧化30小时。通过ESI质谱

法检查氧化的完成。另外，HPLC分析显示线性肽转化成氧化形式。氧化通过TFA(或乙酸)酸化成为pH(2到)3。空气氧化为一种实现二硫键形成的方法。以下实例2显示一种获得具有二硫键的多肽的替代性方法。

[0096] 对于纯化，将氧化肽直接装载到制备型C-18柱上且通过RP-HPLC，利用乙腈作为流动相进行纯化。将具有足够纯度的馏分合并且任选地冻干以产生白色粉末(ShK-186)，1.5g(TFA盐)。

[0097] 接着进行盐交换步骤。将再次溶解的肽(TFA盐)装载于用磷酸三乙胺(TEAP) 20mM平衡的制备型C-18柱上。在用TEAP进行3次孔隙体积洗涤后，将缓冲剂变为NH<sub>4</sub>OAc(50mM)。在用NH<sub>4</sub>OAc进行3次孔隙体积洗涤及pH检查(pH6到7)后，将缓冲液变为HOAc(0.5%)。在用HOAc(0.5%)进行3次孔隙体积洗涤及pH检查(pH2到3)后，开始陡峭梯度以产生500mg乙酸盐形式的最终多肽。

[0098] 可以进行可选的纯化步骤。可以直接使用乙酸系统纯化多肽以更高产率产生最终多肽。以上工艺中的所有个别步骤可以分批进行以产生更大的总规模。最终产物可以经冻干或保持在溶液中。

[0099] 实例2ShK多肽的制备

[0100] 阴离子性氨基酸残基可以通过连接子(例如氨基乙氧基乙氧基-乙酰基连接子(Aeea))或通过任何其它适当的方式连接到天然或合成ShK多肽的N端。起初，例如通过比顿，C.等人，2005的方法，将Fmoc-Aeea-OH偶联到天然或合成ShK毒素的N端。

[0101] 接着，利用DIC和HOBT偶联Fmoc-Tyr(PO<sub>4</sub>Bzl)-OH、Fmoc-d-Tyr(PO<sub>4</sub>Bzl)-OH、Fmoc-Tyr(PO<sub>4</sub>Me<sub>2</sub>)-OH、Fmoc-Pmp-OH、Fmoc-d-Pmp-OH、Fmoc-Pmp(Et)-OH、Fmoc-Pmp(Et)<sub>2</sub>-OH、Fmoc-Tyr(tBu)-OH或Fmoc-Amp(Boc)-OH。

[0102] 然后使解封的肽树脂裂解且用含有5%三异丙基硅烷的试剂K在RT下脱去保护2小时，如在金，D.S.(King, D.S.)等人，《国际肽蛋白质研究杂志》36:255-266, 1990中所述，以引用的方式将相关传授内容并入本文中。通过在t-15min时添加固体NH<sub>4</sub>I到裂解混合物中使Met(O)还原。(尼古拉斯，E.(Nicolas, E.)等人，《四面体(Tetrahedron)》51:5701-5710, 1995, 以引用的方式将相关传授内容并入本文中)。对于含有Tyr(PO<sub>4</sub>Me<sub>2</sub>)-OH的肽，使用在4℃下达18小时的含有1M TMSBr的TFA溶液(其含有苯甲硫醚作为清除剂)的裂解混合物(田，Z.(Tian, Z.)等人，《国际肽蛋白质研究杂志》42:155-158, 1993, 以引用的方式将相关传授内容并入本文中)。当使用所述方法时，通常会不完全去除甲基保护基且容易通过RP-HPLC纯化两种物质(Tyr(PO<sub>4</sub>)和Tyr(PO<sub>4</sub>Me))。

[0103] 通过标准试剂K，保持两个甲基完整来裂解含Tyr(PO<sub>4</sub>Me<sub>2</sub>)的多肽。在各情形下，过滤裂解混合物且将粗制肽在冰冷乙醚中沉淀。收集沉淀物，从200mg树脂产生约75mg肽。将粗产物溶于20ml的50%AcOH水溶液中且在0.75L H<sub>2</sub>O中稀释。用NH<sub>4</sub>OH调整溶液pH到8.2，且在添加谷胱甘肽(2mM:1mM)(还原:氧化)的情况下使其折叠过夜。

[0104] 使用RP-HPLC纯化所有多肽，如在彭宁顿，M.等人，《国际肽蛋白质研究杂志》546:354-358, 1995; 彭宁顿，M.等人，《生物化学(Biochemistry)》35:16407-16411, 1996a以及彭宁顿，M.等人，《生物化学生物物理通讯(Biochem. Biophys. Commun.)》219:696-701, 1996b中所述，以引用的方式将相关传授内容并入本文中。合并且冻干纯馏分。通过RP-HPLC、氨基酸分析(AAA)以及MALDI-TOF MS证实各样本并加以调整，以在生物分析之前计算肽含量。

[0105] 在以下实例中,制备识别为ShK-186((磷酸基-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-NH<sub>2</sub>,其中在C端具有酰胺且在Cys3-Cys35、Cys12-Cys28以及Cys17-Cys32之间具有二硫键)(SEQ ID NO:2)的ShK多肽,且选择用来确定适当医药组合物的组分;这些组分可以用于制备包含其它ShK多肽(包括但不限于ShK-198和ShK-192(CAS登记号1159528-26-3))的医药组合物。

[0106] 实例3表面活性剂的筛选

[0107] 为了确定可以包括在所述医药组合物中的表面活性剂,将多肽调配于缓冲剂中,向其中个别地添加测试表面活性剂,并与不含表面活性剂的样本对比。所测试的表面活性剂包括浓度以0.01%开始的聚山梨醇酯20、聚山梨醇酯80以及泊洛尼克F68(pluronic F68)。

[0108] 为了测定表面活性剂的效果,搅拌或不搅拌测试样本和对照组。随后通过尺寸排除HPLC(SEC-HPLC或SE-HPLC)分析测试样本和对照组,以监测包括可溶聚集和单体回收损失在内的特征的变化。

[0109] 利用所述方法,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pH5.8下,使ShK-186多肽制剂进行恒定搅拌长达4小时。出人意料地,在含有或不含表面活性剂的情况下,所有样本均显示混浊,混浊度增加。这表明ShK-186对搅拌引起的沉淀敏感。

[0110] 另一项实验表明非典型浓度的表面活性剂保护蛋白质,且对于后续实验,可以使用0.05%浓度的聚山梨醇酯20。除了增加表面活性剂的浓度以外,将pH从5.8降到5.1进一步改善ShK-186的稳定性。通过SEC-HPLC证实不存在可溶聚集。

[0111] 实例4.存储期间的稳定性

[0112] 测试若干参数来选择将保护多肽稳定性的医药组合物的组分。根据所述方法,这些参数为pH(4.0到7.0)、缓冲剂/溶剂(10mM乙酸钠或10mM磷酸钠)、稳定剂/增溶剂(NaCl0.8%;山梨糖醇5.0%;L-精氨酸3.0%)、表面活性剂、存储和应力条件(温度、搅拌、冷冻/融化、强制氧化)。

[0113] 为了研究这些参数,将ShK-186样本溶于乙酸钠或磷酸钠中,且如上所述制备个别调配物。接着,在零时使用反相HPLC(RP-HPLC)、离子交换HPLC(IE或IEX-HPLC)以及尺寸排除HPLC(SE-HPLC)分析肽。在两周、四周以及八周的时间点再进行分析。调配物的评估包括在10mg/mL和25mg/mL下监测药物浓度、目视检查/混浊度以及检查pH随时间的变化。

[0114] 在零时,样本显示相似的SE-HPLC色谱图,在pH7的含有精氨酸的磷酸盐缓冲液中制备的样本除外。

[0115] 在第二周,含有精氨酸的调配物显示带有沉淀的混浊溶液。所述结果是意想不到的,因为已经使用精氨酸来提高其它蛋白质产物的溶解度。在其它温度下观察到相似的溶解度问题,因此不再对含精氨酸的调配物作进一步分析。在第四周,SE-HPLC分析显示所有其余调配物在低于25°C的温度下无可溶聚集或裂解的迹象。

[0116] 在第八周,除一种调配物以外的所有调配物在-70°C存储期间显示优良稳定性。

[0117] 第八周的全面分析的结果使得我们选择在文中被称为“P6N”的调配物,因为通过RP-HPLC、IE-HPLC以及SE-HPLC所观察,在回收率和降解方面提供最佳稳定性。如通过RP-

HPLC所测定,所述调配物在pH6下含有作为缓冲剂的10mM乙酸钠;作为稳定剂/张力调节剂的0.8%NaCl;作为表面活性剂的0.05%聚山梨醇酯20;以及11.2mg/mL的蛋白质浓度。蛋白质浓度可以增加至50mg/mL。

[0118] 如通过RP-HPLC和IEX-HPLC所测定,P6N调配物在5个冻融循环后未显示变化的迹象。在3小时的强力涡旋应力后,如利用RP-HPLC和IE-HPLC所测定,所述调配物保持澄清而无降解的迹象。

[0119] 实例5.临床调配物的稳定性

[0120] 在经设计以复制临床应用的三组条件下,研究在P6N中调配的ShK-186的短期稳定性:在可变温度下存储72小时,以及在无菌塑料注射器中存储24小时。测试在冷藏(例如5℃)和冷冻(例如-70℃、-20℃)温度下存储1、3、6以及12个月的长期稳定性。

[0121] 对于短期研究,用5% (w/v) 右旋糖或0.9% (w/v) 生理盐水或WFI溶液将ShK-186稀释到1mg/ml的最终浓度。一项短期稳定性研究涉及在冷藏温度(例如5℃)以及高温(例如40℃)下在各稀释剂中存储72小时。在WFI中稀释且无防腐剂的ShK-186用作对照组。对于长期研究,以25或50mg/ml在P6N中调配ShK-186,接着使用等分试样来制备具有如所示的以mg/ml为单位的最终浓度的样本。实验参数显示于表2和3中。

[0122] 表2.短期稀释剂稳定性研究

[0123]

最终 ShK-186 浓度, mg/ml	稀释剂	存储温度, 摄氏度	时间点, 小时
1	含于 WFI 中的 5% (w/v) 右旋糖	5、25、40	0、24、72
1	含于 WFI 中的 0.9% (w/v) NaCl		
1	WFI(对照组)		

[0124] 表3.长期稀释剂稳定性研究

[0125]

最终 ShK-186 浓度, mg/ml	pH	缓冲剂, 10 mM	稳定剂, w/v	存储温度, 摄氏度	时间点, 月
25	6.0	磷酸钠	0.8% NaCl	-70、-20、+5	0、1、3、6、12
10	6.0	磷酸钠	0.8% NaCl		

[0126] 如表3所示在6个月时进行的稳定性研究产生下列基于SEC-HPLC和RP-HPLC的结果。相较于更早的时间点,在6个月时的pH或浓度无显著变化。整体结果表明肽浓度对调配物的稳定性未显示任何显著影响。相较于-20℃和-70℃,在5℃下的稳定性显示极小的下降。这些结果与在低温(至少在低于冷冻温度)下存储多肽医药组合物的工业标准一致。

[0127] 对在递送装置(如无菌塑料1cc注射器)中的稳定性进行特征分析。此类装置适合皮下递送。一种示范性、非限制性装置为配有26G×5/8英寸针管(BD件号309597)的贝迪(BD) Slip-Tip Sub-Q1cc注射器。抽取0.5ml含于表2所示的稀释剂中和浓度的ShK-186调配物的等分试样且在室温条件下在注射器中培养。测试随时间(反映临床应用)的稳定性,例如在第4小时。

[0128] 测定在三种浓度(10、25以及50mg/ml)在冷藏和冷冻存储温度下的ShK-186的稳定性。将冻干ShK-186溶于P6N调配物中以达到这些ShK-186的最终浓度。用0.2μm过滤器将各

调配溶液灭菌,且在无菌条件下转移到适当的无菌小瓶中(例如I型硼硅酸玻璃3cc小瓶,每小瓶的填充体积为0.5ml)。将小瓶存储在5℃、-20℃以及-70℃下,在0、3个月以及6个月的时间点进行测试。

[0129] 利用表4所示参数,在指定时间点测试样本。

[0130] 表4. 监测ShK-186稳定性的分析方法

[0131]

分析方法	评估结果
目视检查	外观
pH	pH 值
重量摩尔渗透浓度	重量摩尔渗透浓度值
UV-Vis 分光光度法	浓度(Abs 280 nm) 混浊度(Abs 500 到 700 nm)
尺寸排除 HPLC	纯度、聚集、裂解
反相 HPLC	纯度、化学修饰
生物分析	多肽的效力/强度

[0132] 总结:以上实例提供了用于测定用于制备供治疗用途的包含ShK多肽的医药上可接受的组合物的适当组分和条件。通过成功地制备可提供优良溶解度、长期存储(6个月)以及稳定性的ShK-186调配物证实了所述方法的有效性。

[0133] 实例6-12个月的稳定性研究

[0134] 以10mg/ml和25mg/ml在pH6.0、含有0.8%NaCl和0.05%聚山梨醇酯20的10mM磷酸钠中调配ShK-186,且在5℃、-20℃以及-70℃下培养12个月。SE-HPLC分析表明调配物的浓度对其稳定性不具有任何明显影响。培养温度对两种调配物的稳定性有轻微影响。在5℃下培养的样本显示%HMV小幅增加(1.19%),相较于冷冻样本(0.95%)。两种调配物在所有温度下LMW物质的百分比保持相对不变。基于SE-HPLC结果,两种调配物的总的单体百分比在研究结束时为约98%。

[0135] 样本的RP-HPLC分析还表明调配物的浓度对调配物的稳定性不具有任何明显影响。在5℃下培养的样本显示峰前和峰后降解略有增加(0.8到0.9%),相较于冷冻调配物(0.3到0.7%)。数据表明:相较于峰前降解,较高的培养温度引起较高的峰后降解百分比。基于RP-HPLC结果,两种调配物的总纯度在研究结束时为约99%。

[0136] 表5显示在12个月研究的时间框内收集的pH和浓度数据的汇总。在零时,数值如下:对于10P6N(10mg/mL的ShK-186),pH为6.1,浓度(Conc,mg/mL)为9.9mg/mL,mOsmo中的重量摩尔渗透浓度为317。对于25P6N(25mg/mL的ShK-186),pH为6.0,浓度为25.1mg/mL,重量摩尔渗透浓度为293。基于这些结果,样本的pH和浓度在整个研究中保持相对不变,与培养温度无关。

[0137] 表5.1、3、6以及12个月时的调配物的pH和浓度

[0138]

样本 ID	培养温度	1 个月		3 个月		6 个月		12 个月	
		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

[0139] 实例7-经放射性标记的ShK-221的生物分布

[0140] 引言:为了提高活体内研究的灵敏性,测量ShK-186的生物分布,并评估全血中的总(结合的加上未结合的)药物浓度,制备经放射性标记的ShK-186类似物且在两种活体内动物模型(大鼠和松鼠猴)中进行研究。在所述实例中,术语“ADME”是指吸收、分布、代谢、排泄。

[0141] 方法

[0142] 动物。史泊格多利[CrI:CD@SD]大鼠(6到9周大)购自查尔斯河实验室(Charles River Laboratories)(美国马萨诸塞州威尔明顿(Wilmington,MA,USA)),且圈养在温度(64到79°C)和湿度(30到70%)得到控制的设施内。随意取用食物和水。

[0143] 非原产松鼠猴(亚马逊松鼠猴(Saimiri boliviensis))为2到5岁大,且从MPI研究所(美国密歇根州马塔瓦(Mattawan,MI,USA))储备群体转入。松鼠猴来源于玻利维亚(Bolivian)且由得克萨斯大学的MD安德森癌症中心(University of Texas MD Anderson Cancer Center)(美国得克萨斯州休斯顿(Houston,TX USA))提供。将动物单个圈养在环境得到控制的房间中的不锈钢笼子中。给猴子提供环境强化;每天提供12小时的荧光照明。温度保持在64°C与84°C之间;湿度为30%到70%。每天给动物提供合格的灵长动物饮食(Certified Primate Diet)(美国密苏里州圣路易斯的PMI营养国际公司(PMI Nutrition International, Inc., St. Louis, MO, USA))两次。有规律地提供Primatreats<sup>®</sup>和其它强化食物。可随意饮水。

[0144] ShK-186的DOTA-结合物(ShK-221)。“DOTA”是指1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸。利用Fmoc-tBu固相方法合成ShK-221(MW4442)。简单来说,利用Chem-Matrix酰胺树脂以0.2mmol规模组装所述肽。所有偶联步骤均用6-Cl-HOBt(N-羟基苯并三唑)在二异丙基碳化二亚胺存在下介导。利用20%哌啶的DMF(二甲基甲酰胺)(其含有0.1M HOBt来缓冲哌啶且将在6Cys残基处的潜在外消旋作用减到最小)溶液来加速Fmoc的移除。利用相同的前述偶联方案,将DOTA(tBu)3-OH偶联到N端。组装后,从树脂裂解所述肽且同时利用含有芳香族阳离子性清除剂的TFA(三氟乙酸)裂解混合物试剂K在室温下脱去保护2小时。从使用过的树脂中过滤出粗制肽接着通过在冰冷乙醚中沉淀而分离。将粗制肽溶于50%乙酸中接着在含有0.1mM GSSG和0.2mM GSH的3L H<sub>2</sub>O中稀释。用NH<sub>4</sub>OH将所述肽溶液的pH调整到8.0且使其缓慢地搅拌过夜。ShK自发地折叠成主要的在热力学上有利的异构物,其为所述肽的生物活性形式。将折叠肽装载于制备型RP-HPLC柱上且利用MeCN对含有0.05%TFA的H<sub>2</sub>O的梯度进行纯化。将含有所需肽纯度的馏分收集在一起并且冻干。自0.2mmol合成的最终产率为35mg;基于起始树脂,此代表8%的产率。

[0145] 经放射性标记的ShK-221的SPECT/CT扫描:用2mCi氯化<sup>111</sup>In(美国伊利诺伊州阿林顿山的通用医疗集团(GE Healthcare, Arlington Heights, IL USA)),在含有50mM乙酸钠、pH5.0的300 $\mu$ L反应物中在95 $^{\circ}$ C下放射性标记ShK-221(100 $\mu$ g)30分钟。通过添加EDTA到50mM的最终浓度来中止所述反应,且通过反相HPLC(Luna5 $\mu$ C18(2)100A250 $\times$ 4.6mm柱,Phenomenex,美国加利福尼亚州托兰斯(Torrance, CA USA))在利用IN/US Systems Gamma RAM型号4放射性HPLC检测仪(美国佛罗里达州布兰顿的逻辑系统实验室(LabLogic Systems, Brandon, FL USA))的安捷伦(Agilent)1100系统上评估放射性标记的效率。通过所述方法的标记效率在89%到98%之间变化。在第一个小时内以4个15分钟对麻醉动物进行SPECT/CT扫描(NanoSPECT/CT临床前成像仪, Mediso, 匈牙利布达佩斯(Budapest, Hungary))且在给药后4、8、24、48、72、120以及160小时各进行一次扫描。对于各螺旋SPECT,设定单一投射时间框以使各扫描将持续约15到45分钟(根据时间点而不同以解决同位素衰减),且可在各时间框内收集重要的统计数据。针对<sup>111</sup>In,由光谱检测到的特征峰为245和171keV(分别为主峰和次峰)。在每次扫描后,使用采用销孔形状以达到约2mm的分辨率的反复模型重构所得投射数据。

[0146] 在每次扫描后,收集约10 $\mu$ L血样且利用Wallac Wizard1470闪烁计数器(美国马萨诸塞州沃尔瑟姆的珀金埃尔默公司(Perkin Elmer, Waltham, MA USA))测量样本中的放射性含量。考虑所投剂量的具体活性、<sup>111</sup>In的半衰期(67.3小时)以及仪器的计数效率来计算药物浓度。

[0147] 统计及计算分析。利用成对t-试验进行统计分析。利用R<sup>2</sup>统计法测定模型适合度。如下计算药物动力学:在数据组中观察到C<sub>max</sub>和T<sub>max</sub>。利用线性梯形法计算AUC。利用最佳调整的R<sup>2</sup>值从回归斜率计算终末消除半衰期。通过将最终观察到的药物浓度除以终末消除斜率来计算AUC<sub>t $\rightarrow$  $\infty$</sub> 。

[0148] 经放射性标记的ShK-186类似物的ADME研究结果。ShK-186在23位含有单个可碘化的酪氨酸。然而,碘并入环中,预期其在Kv1.3通道的孔区内互相影响(彭宁顿等人,《生物化学》35:16407-16411,1996),导致药物的通道结合性质被破坏。ShK-198的氨基端因而经通过肽键连接到DOTA螯合物的一个羧酸的六碳连接子修饰(图2A)。命名为ShK-221的DOTA-结合物容易与铟或钆配位(图2B-C)且保留母分子的所有活性(图3)。制备经<sup>111</sup>In标记的ShK-221且通过皮下注射投与到史泊格多利大鼠(1.0mCi,100 $\mu$ g/kg)和松鼠猴(0.83mCi,35 $\mu$ g/kg)。通过HPLC所测定,一系列实验的放射性标记的效率范围为89%到98%。通过SPECT成像持续地在给药后1小时、接着在4、8、24、48、72、120以及160小时评估经放射性标记的ShK-221的生物分布。检测系统的背景水平为约0.1 $\mu$ Ci/m<sup>3</sup>(在初始时间点为约5ng/m<sup>3</sup>ShK-221,在最终时间点为26ng/m<sup>3</sup>)。在每次扫描后收集血样,且通过闪烁计数测量全血中的总放射性。在每个时间点进行计算机断层摄影以便能够共定位放射性标记物与重要解剖学结构。

[0149] 松鼠猴中的<sup>111</sup>In-ShK-221的生物分布主要特征为在整个160小时期间从注射部位缓慢吸收(图1A和1E)。存在于注射部位的药物的数量遵循双相性指数型衰退(R<sup>2</sup>=0.95),其中初始半衰期为约1到1.5小时,终末半衰期>48小时(图1E)。在第一个小时期间,可以在肾脏中观察到明显的放射性,在1小时中强度增加(约1%注射剂量(ID)/g,表1),且48小时内缓慢降低到约基线处。在所有时间点期间,主要在皮质和骨髓区中观察到猴子肾脏的放射性且除在第一个小时以外,在肾盂中相对不存在放射性(图1B)。仅在第一个小时期间观

观察到明显的与膀胱有关的放射性 ( $T_{\max}=0.75$ 到 $1h$ ,  $0.34\%$  ID/g), 随后在膀胱中检测到相对很少的放射性标记物。除肝脏(在投药剂量后 $0.75$ 到 $1$ 小时中达到峰值 ( $0.166\%$  ID/g)) 以外, 其它器官未显示明显的放射性水平。肌肉、心脏以及脑在所有时间点均具有  $<0.1\%$  ID/g (表6)。

[0150] 表6: 在 $35\mu\text{g}/\text{kg}$ 皮下注射后, 松鼠猴的特定组织中的 $^{111}\text{In}$ -ShK-221的最大浓度

[0151]

组织	最大扫描时期 (h)	最大值 (%注射剂量/g)
注射部位	0到0.25	17.3
肾脏	0.75到1.0	0.976
膀胱	0.75到1.0	0.338

[0152]

肝脏	0.75到1.0	0.166
心脏	0.75到1.0	0.093
肌肉	0.5到0.75	0.039
脑	0.75到1.0	0.020

[0153] 大鼠中的 $^{111}\text{In}$ -ShK-221的生物分布与猴子类似且特征为在起初24小时中从注射部位略微较快的吸收且通过尿排泄 (图1C及1E)。在第1个小时期间, 在大鼠膀胱 ( $9.4\%$  ID/g)、肾脏 ( $2.9\%$  ID/g) 以及肝脏 ( $0.4\%$  ID/g) 中观察到明显的放射性标记物 (图1C)。虽然在之后的时间点, 在膀胱中识别出很少的标记物, 但是在肝脏和肾脏中的药物量在起初24小时中保持相对恒定。大鼠肾脏的横截面图显示除第1个小时以外, 放射性主要集中在皮质区中, 此与猴子相似 (图1D)。

[0154] 在各时间点, 在猴子中的与血有关的放射性的评估还显示双相性指数型衰退 ( $R^2=0.99$ ), 其中初始半衰期为约1小时, 终末半衰期  $>64$ 小时 (图1F)。在猴子中, 许多终末消除期由ShK-186的血液浓度低于早先方法的定量水平但远高于 $K_d$ 反映。预期全血中80%的Kv1.3通道在给药后约5天内被药物结合, 且浓度在整个160小时时期中保持高于 $K_d$ 。

[0155] 大鼠中与全血有关的放射性的评估还显示双相性指数型衰退 ( $R^2=0.99$ ), 其中初始半衰期为约1.7小时, 终末半衰期  $>72$ 小时 (图1F)。与猴子类似, 直到给药后5天ShK-186的药物浓度远高于 $K_d$ 。预期全血中80%的Kv1.3通道在给药后约3到5天内被药物结合。

[0156] 数据显示: 经放射性标记的ShK-221在大鼠和松鼠猴中的生物分布特征在于从注射部位的极慢分布、在注射部位周围、肾脏以及肝脏的明显药物浓度以及在全血中的长的终末消除期。血液中大于约 $200\text{pM}$ 的药物浓度在猴子中保持约7天, 在大鼠中保持3天

[0157] 在投药 $^{111}\text{In}$ -ShK-221后, 在最早时间点在大鼠 (约 $17\%$ 注射剂量) 和猴子 (约 $1\%$ 注射剂量) 的膀胱中观察到显著量的放射性, 表明注射后不久, 肾小球过滤为肽的主要消除途径。相较于猴子, 在第1小时中大鼠排泄的大量药物很可能反映出大鼠增强的代谢作用。1小时后在大鼠中, 约4小时后在猴子中, 在膀胱中观察到很少的放射性, 而在肾盂中仍然观察到显著量的放射性。已经针对肽药物 (包括奥曲肽 (octreotide)、蛙皮素 (bombesin)、肠促胰岛素类似物 (exendin) 以及促胃酸激素 (gastrin)) 的多种经放射性标记的型式记录皮质浓度 (戈特哈特 (Gotthardt) 等人, 《核子医学杂志 (J. Nucl. Med.)》48:596-601, 2007)。已经针对奥曲肽最为详尽地描述皮质保留机制。通过巨蛋白 (megalin) (一种在近侧肾小管中表

现的清除剂受体) 调节阳离子性奥曲肽的小管再吸收(德容(de Jong)等人,《核子医学杂志(J.Nucl.Med.)》46:1696-1700,2005)。出现肾特异性的受体扰乱的老鼠缺乏在野生型老鼠中见到的经放射性标记的奥曲肽的皮质保留。奥曲肽的肾吸收部分受电荷介导且可以被带正电荷的氨基酸L-离氨酸和L-精氨酸的联合输注扰乱(伯德(Bodei)等人,《欧洲核子医学分子成像杂志(Eur.J.Nucl.Med.Mol.Imaging)》30:207-216,2003)。ShK-186在生理pH下携带净+6个电荷,因此,其皮质保留可能是通过相似机制介导。

[0158] 总地来说,经放射性标记的ShK的ADME研究显示,药物的单次剂量可以提供治疗上有效的血浓度长达5天(在大鼠中)以及长达7天(在猴子中)。这些观察结果与以ShK为主的肽治疗剂(包括ShK-186)的临床开发有关,因为最优的给药频率将确保治疗效果、改善患者顺应性且在长期投药期间降低药物累积的可能。

[0159] 除非另有说明,否则说明书和权利要求书中用于表示成分数量、性质(例如分子量、反应条件等)的所有数字应理解为在所有情形中由术语“约”修饰。因此,除非相反地指出,否则在说明书和权利要求书中阐明的数字参数为近似值,其可依据本发明希望获得的所需性质而变化。至少不试图限制应用权利要求书的相当项的教义,各数字参数应至少按照所记录的有效数字数且通过应用四舍五入法而理解。

[0160] 尽管阐明本发明的宽泛范围的数字范围和参数为近似值,但是在具体实例中阐明的数值为尽可能精确地记录。然而,任何数值固有地包含必然地来自其各自测试值中发现的标准偏差的特定误差。

[0161] 除非文中另有说明或与情形明显相违背,否则在描述本发明的文中(尤其下列权利要求书中)所用的术语“一”、“所述”及相似引用应理解为涵盖单数及复数。文中描述的数值范围仅欲充当分别指代落于所述范围内的各单一数值的速记方法。除非文中另有说明,否则各单一数值并入所述说明书,如同其个别地在文中描述。除非文中另有说明或与情形明显相违背,否则文中揭示的所有方法可以任何适当顺序进行。文中提供的任何及所有实例或示范性语言的应用仅欲更佳地说明本发明且不对以其它方式主张的本发明范围引起限制。说明书中的语言不应视为指示对本发明的实践为必要的任何非主张元素。

[0162] 文中揭示的本发明的替代性元素或实施例的群组组不视为限制性。各群组组成员可以个别地或与文中存在的其它群组组成员或其它元素的任何组合表示或主张。可以预料,因便利和/或专利性而将一个或一个以上群组组成员并入群组组中或从其中删除。当出现任何此并入或删除时,所述说明书视为包含如所修改的群组组,因此满足在附加权利要求书中使用的所有马库西群组组(Markush groups)的书面描述。

[0163] 文中揭示本发明的某些实施例,其包括发明者已知的用于进行本发明的最佳模式。当然,所属领域的一股技术人员经阅读此前描述应明了这些所述实施例的变化。本发明者期望所属领域的技术人员适当地应用此类变化,且本发明者希望本发明以除文中具体揭示以外的其它方式实践。因此,如适用法律所允许,本发明包括在文中附加权利要求书描述的标的物的所有修改及相当项。而且,除非文中另有说明或与内容明显相违背,否则本发明涵盖所有可能的其变化中的上述元素的任何组合。

[0164] 文中揭示的具体实施例可在利用由…组成或及主要由…组成的语言的权利要求书中得到进一步限制。当用于权利要求书中时,不论如所申请或按照修正添加,过渡术语“由…组成”排除未在权利要求书中说明的任何元素、步骤或成分。过渡术语“主要由…组

成”将权利要求书限制在具体材料或步骤及不会在实质上影响基本及新颖特性的彼等。如此主张的本发明的实施例在此固有地或明确地加以描述及可用。

[0165] 最后,应理解文中揭示的本发明的实施例说明本发明的原理。可应用的其它改善位于本发明的范围内。因此,举例来说,而非限制,可按照文中的传授内容,利用本发明的替代性配置。因此,本发明不限于如精确显示及描述的那些配置。

## 序列表

<110> 奇尼塔一有限责任公司  
 <120> 基于SHK的医药组合物及其制备和使用方法  
  
 <150> PCT/US12/040857  
 <151> 2012-06-05  
  
 <150> US 61/625, 578  
 <151> 2012-04-17  
  
 <150> US 61/493, 868  
 <151> 2011-06-06  
  
 <160> 8  
  
 <170> PatentIn version 3.5  
  
 <210> 1  
 <211> 35  
 [0001] <212> PRT  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> SHK 多肽  
  
  
 <220>  
 <221> 变体  
 <222> (21)..(21)  
 <223> Xaa 为 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

[0002]

M:\BJPUB\Pub.P\专利部文档\Cases\cn\lv13528\2015.2-Re-OAI\lv13528-Cnseq-1409 .txt

<210> 2  
 <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

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa 为 氨基乙氧基乙氧基-乙酰基连接子

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (37)..(37)  
 <223> 酰胺化

&lt;400&gt; 2

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> 3  
 <211> 35  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> ShK 多肽

[0003]

M:\BJPUB\Pub.P\专利部文档\Cases\cn\lv13528\2015.2-Re-OA1\lv13528-Cnseq-1409 .txt

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MOD\_RES

&lt;222&gt; (35).. (35)

&lt;223&gt; 酰胺化

&lt;400&gt; 3

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

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 37

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; ShK 多肽 - ShK-192

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

&lt;222&gt; (1).. (1)

&lt;223&gt; Xaa 为 4-磷酸基-L-苯基丙氨酰基

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

&lt;222&gt; (2).. (2)

&lt;223&gt; Xaa 为 2-[2-(2-氨基乙氧基)乙氧基]乙酰基连接子

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; DISULFID

&lt;222&gt; (5).. (37)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; DISULFID

&lt;222&gt; (14).. (30)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; DISULFID

[0004]

M:\BJPUB\Pub.P\专利部文档\Cases\cn\lv13528\2015.2-Re-OAI\lv13528-Cnseq-1409 .txt

&lt;222&gt; (19).. (34)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MOD\_RES

&lt;222&gt; (23).. (23)

&lt;223&gt; Nle

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MOD\_RES

&lt;222&gt; (37).. (37)

&lt;223&gt; 酰胺化

&lt;400&gt; 4

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

Thr	Cys	Gly	Thr	Cys
				35

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 37

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; ShK 多肽 - ShK-198

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

&lt;222&gt; (2).. (2)

&lt;223&gt; Xaa 为 氨基乙氧基乙氧基-乙酰基连接子

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MOD\_RES

&lt;222&gt; (37).. (37)

&lt;223&gt; 酰胺化

&lt;400&gt; 5

Tyr	Xaa	Arg	Ser	Cys	Ile	Asp	Thr	Ile	Pro	Lys	Ser	Arg	Cys	Thr	Ala
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----



[0006]

M:\BJPUB\Pub.P\专利部文档\Cases\cn\lv13528\2015.2-Re-OAI\lv13528-Cnseq-1409 .txt

Arg Lys Thr Cys Gly Thr Cys  
35

<210> 7  
<211> 35  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> ShK 多肽

<220>  
<221> VARIANT  
<222> (21)..(21)  
<223> Xaa 为 Met 或 Ile

&lt;400&gt; 7

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> 8  
<211> 38  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> ShK 多肽

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(1)  
<223> Xaa 为 对磷脂酰基-苯基丙氨酸

&lt;220&gt;

[0007]

M:\BJPUB\Pub.P\专利部文档\Cases\cn\lv13528\2015.2-Re-OAI\lv13528-Cnseq-1409 .txt

&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

&lt;222&gt; (3)..(3)

&lt;223&gt; Xaa 为 氨基乙氧基乙氧基-乙酰基连接子

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MOD\_RES

&lt;222&gt; (38)..(38)

&lt;223&gt; 酰胺化

&lt;400&gt; 8

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			

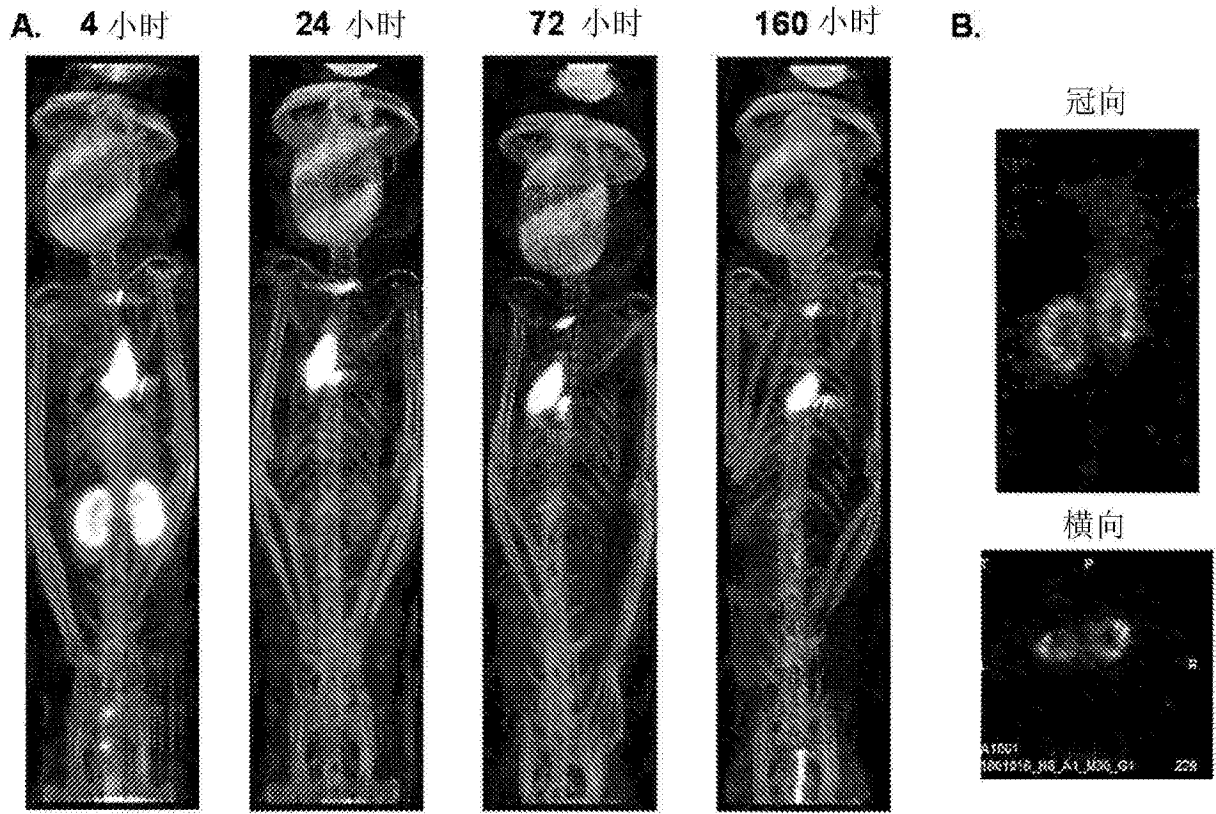


图1

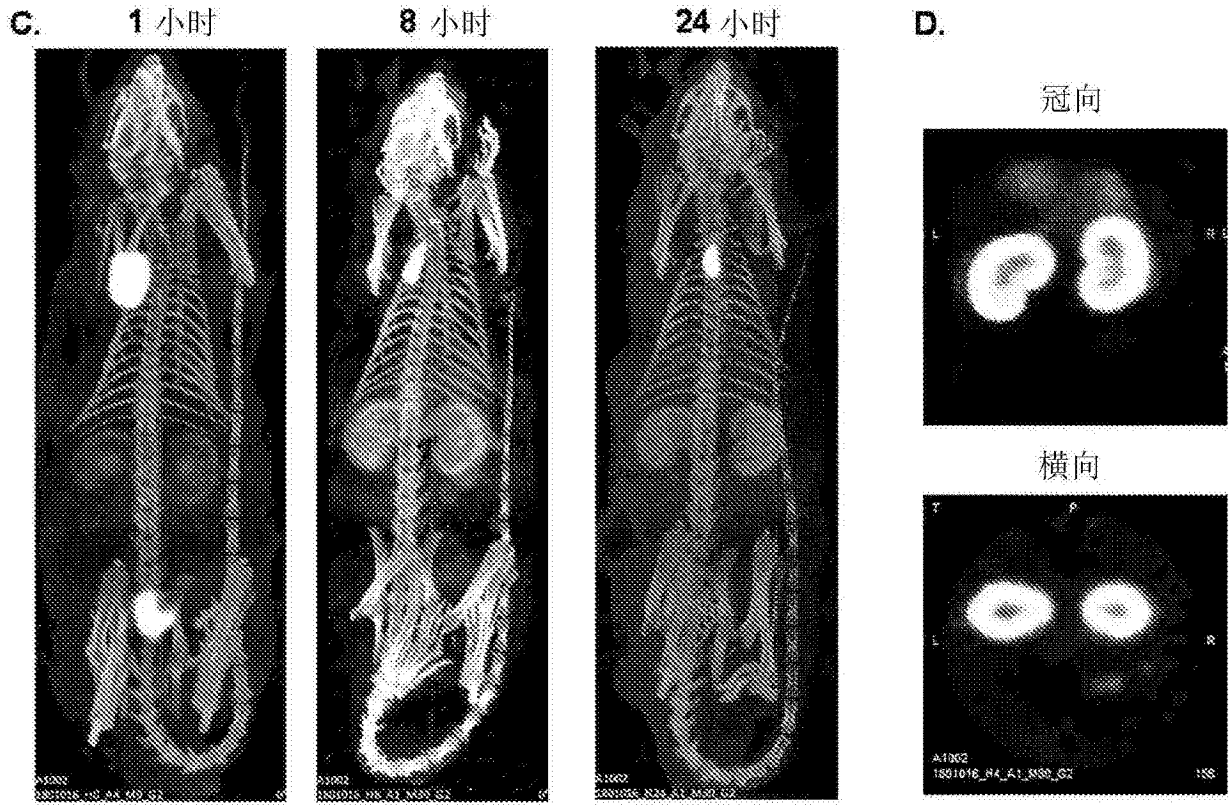


图1(续)

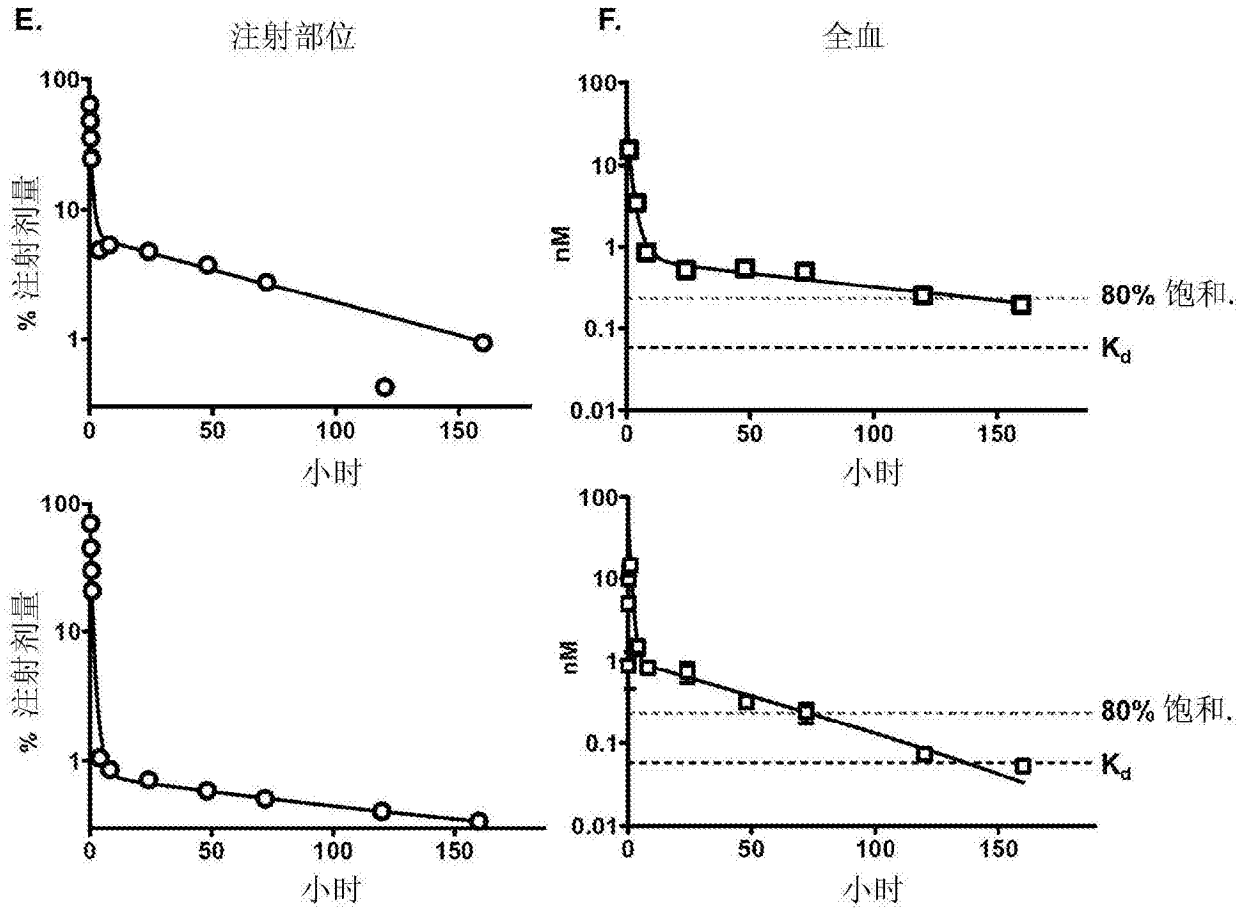


图1 (续)

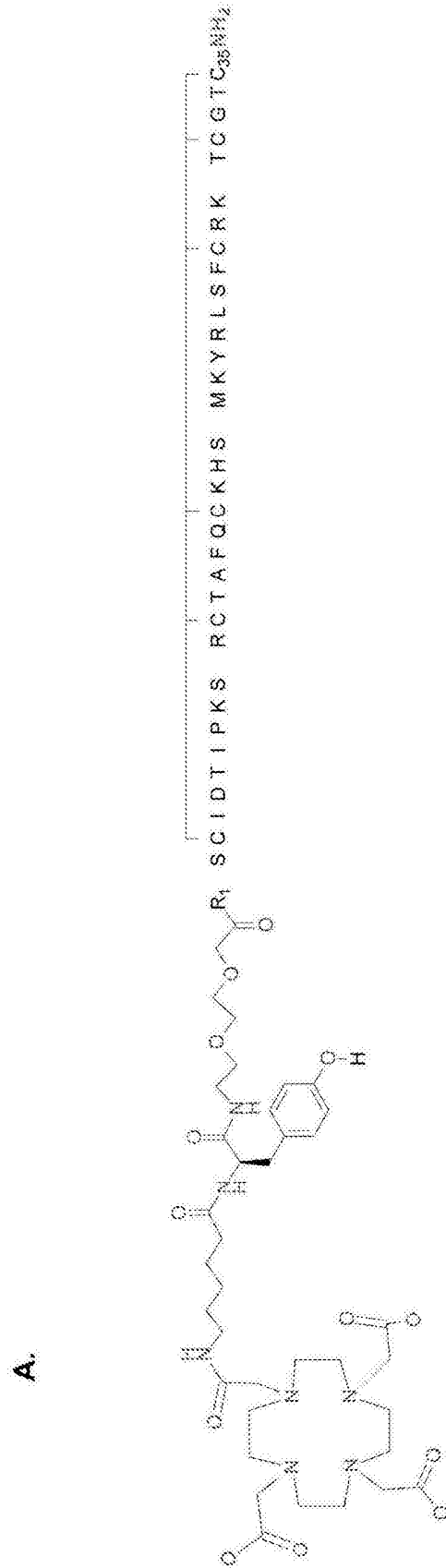


图2

B.

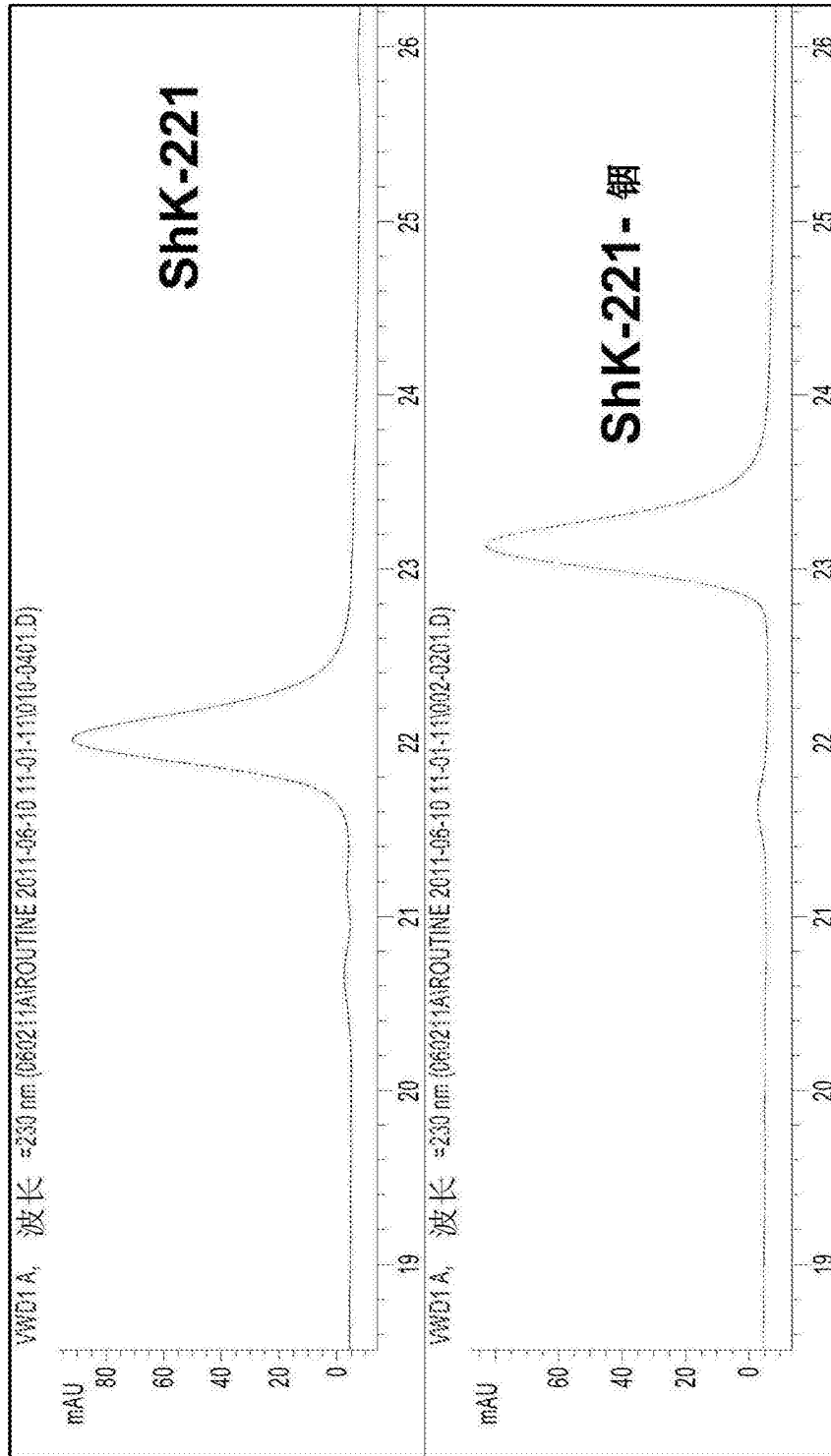
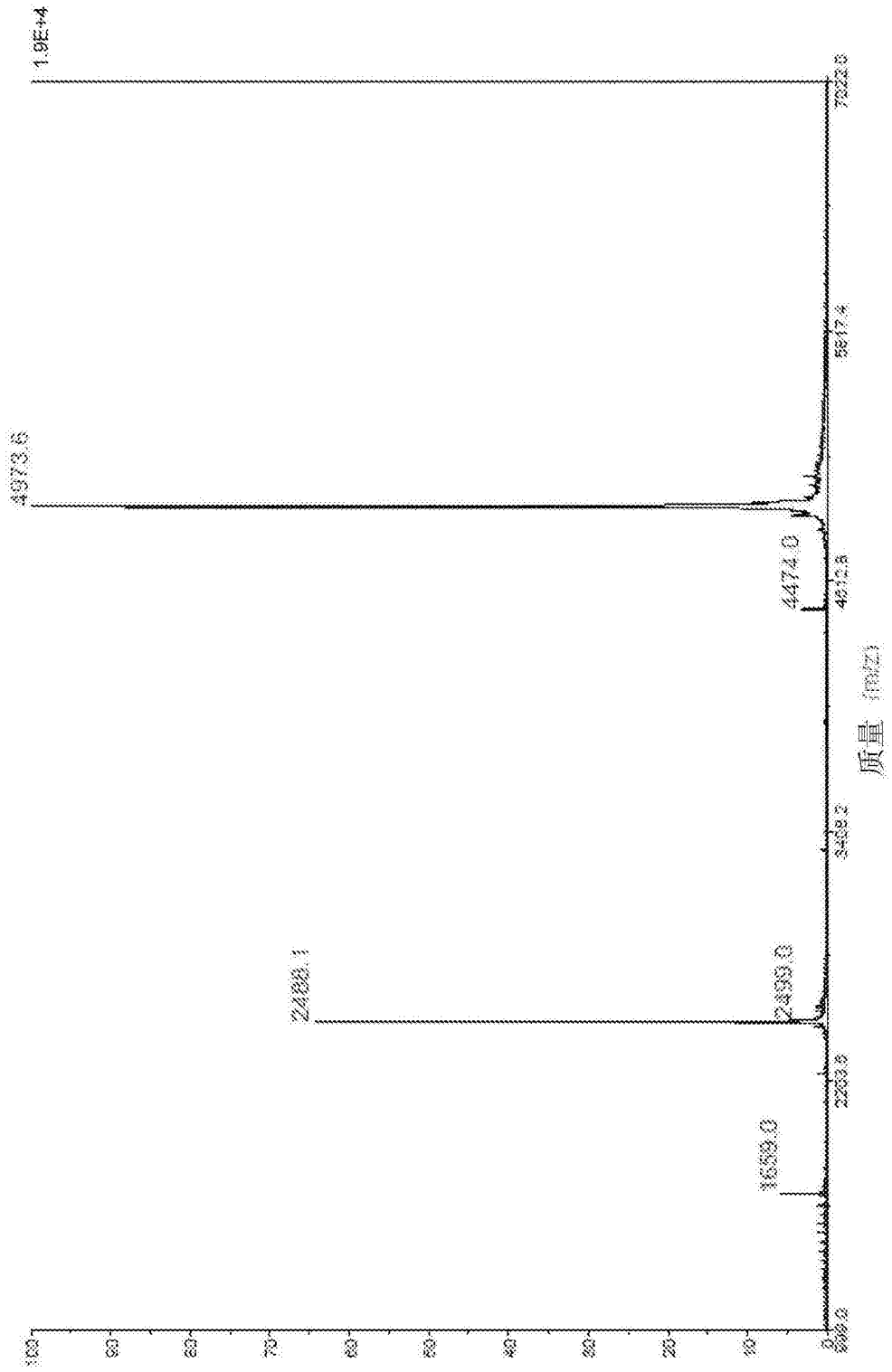


图2(续)

光谱报告



C.

图2(续)

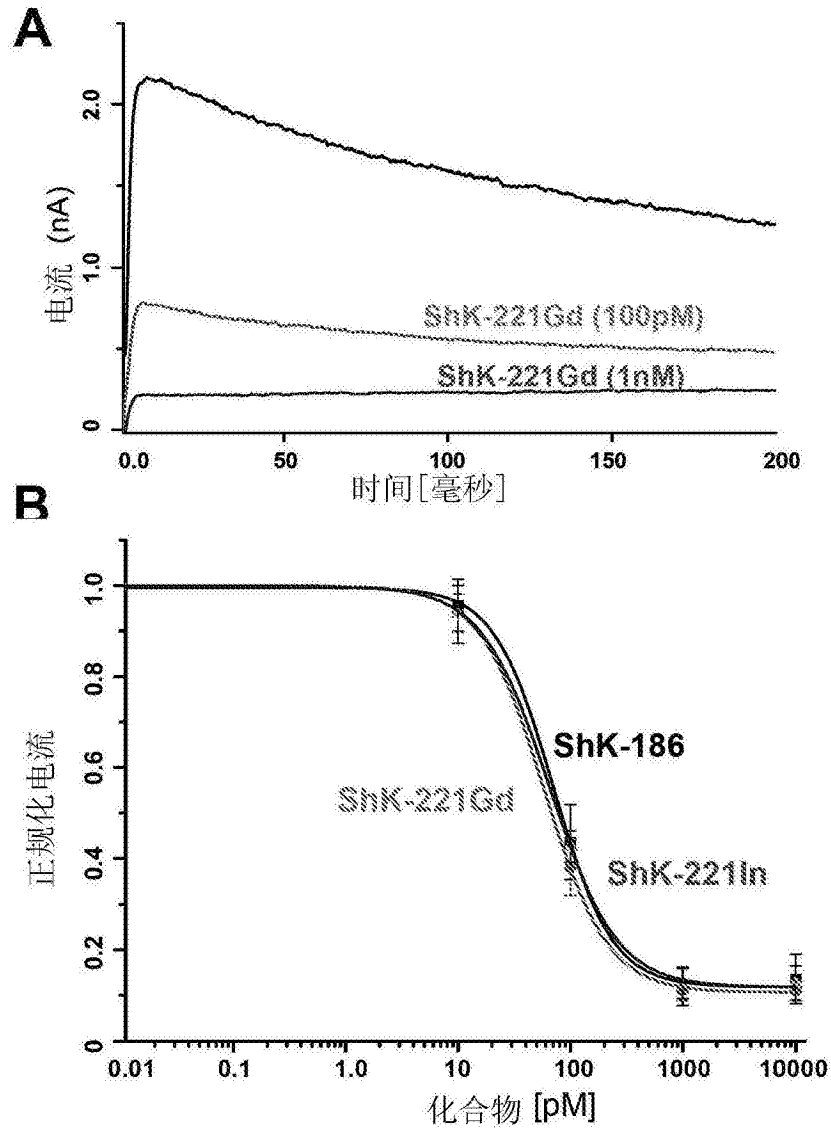


图3