



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115298194 A

(43) 申请公布日 2022. 11. 04

(21) 申请号 202180022969.7

(22) 申请日 2021.03.19

(30) 优先权数据

2020-059721 2020.03.30 JP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.09.20

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2021/011316 2021.03.19

(87) PCT国际申请的公布数据

W02021/200259 JA 2021.10.07

(71) 申请人 一丸自然美健有限公司

地址 日本国岐阜县本巢市浅木318番地1

(72) 发明人 坂元孝太郎 吾乡由希夫

(74) 专利代理机构 北京汇思诚业知识产权代理有限公司 11444

专利代理师 龚敏 王刚

(51) Int.Cl.

C07K 7/00 (2006.01)

A61K 38/12 (2006.01)

A61K 51/08 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

A61P 25/18 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

权利要求书5页 说明书32页

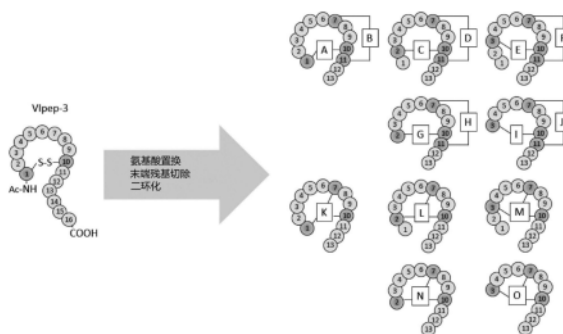
序列表9页 附图9页

(54) 发明名称

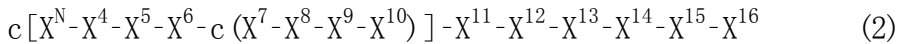
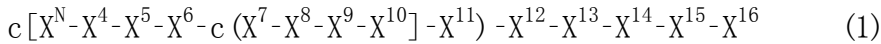
VIPR2拮抗肽

(57) 摘要

本发明提供一种用于作为药品、诊断药和/或研究试剂使用的新型VIPR2拮抗肽。一种由式(1)或式(2)所示的氨基酸序列构成的环状肽或其药学上可接受的盐: c[X<sup>N</sup>-X<sup>4</sup>-X<sup>5</sup>-X<sup>6</sup>-c(X<sup>7</sup>-X<sup>8</sup>-X<sup>9</sup>-X<sup>10</sup>]-X<sup>11</sup>]-X<sup>12</sup>-X<sup>13</sup>-X<sup>14</sup>-X<sup>15</sup>-X<sup>16</sup> (1); c[X<sup>N</sup>-X<sup>4</sup>-X<sup>5</sup>-X<sup>6</sup>-c(X<sup>7</sup>-X<sup>8</sup>-X<sup>9</sup>-X<sup>10</sup>)]-X<sup>11</sup>-X<sup>12</sup>-X<sup>13</sup>-X<sup>14</sup>-X<sup>15</sup>-X<sup>16</sup> (2)。



1. 一种由式(1)或式(2)所示的氨基酸序列构成的环状肽或其药理学上可接受的盐:



式(1)中的 $X^N$ 与 $X^{10}$ 之间、 $X^7$ 与 $X^{11}$ 之间、以及式(2)中的 $X^N$ 与 $X^7$ 与 $X^{10}$ 之间各自独立地形成共价键,由此在分子内形成2个环状结构,这些共价键为或不为主链-侧链之间或侧链-侧链之间的任意键,

$X^N$ 表示 $X^1-X^2-X^3$ ,

$X^1$ 、 $X^2$ 、 $X^3$ 、 $X^7$ 、 $X^{10}$ 和 $X^{11}$ 在参与肽分子内的环化的情况下,各自独立地表示氨基、羧基、硫醇基、烯丙基、炔基、叠氮基、具有卤素原子的氨基酸残基、或它们的衍生物;在不参与肽分子内的环化的情况下, $X^1$ 和 $X^2$ 各自独立地表示任意的氨基酸残基或缺失, $X^3$ 和 $X^{11}$ 各自独立地表示任意的氨基酸残基,

$X^5$ 、 $X^9$ 、 $X^{12}$ 和 $X^{13}$ 各自独立地表示包含具有或不具有取代基的烃基的氨基酸残基、或它们的衍生物,

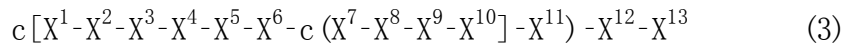
$X^4$ 表示包含具有或不具有取代基的芳香族碳环基的氨基酸残基、或它们的衍生物,

$X^6$ 和 $X^8$ 表示任意的氨基酸残基,

$X^{14}$ 、 $X^{15}$ 和 $X^{16}$ 各自独立地表示任意的氨基酸残基或缺失,

N末端氨基和C末端羧基被修饰或未被修饰,或者缺失或未缺失。

2. 一种由式(3)所示的氨基酸序列构成的环状肽或其药理学上可接受的盐:

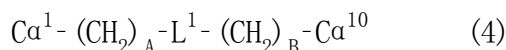


式(3)中, $X^1$ 与 $X^{10}$ 之间、 $X^7$ 与 $X^{11}$ 之间各自独立地形成共价键,由此在分子内具有2个环状结构,其中,该共价键在 $X^1$ 的主链或侧链与 $X^{10}$ 的侧链之间以及 $X^7$ 的侧链与 $X^{11}$ 的侧链之间形成,

$X^1 \sim X^{13}$ 与权利要求1中记载的相同。

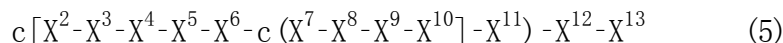
3. 根据权利要求1或2所述的环状肽或其药理学上可接受的盐,其中,

$X^1$ 与 $X^{10}$ 的Ca碳原子之间的键包含下述式(4)所示的结构:



式(4)中,A和B各自独立地表示0~2中的任意整数,A和B的总和为1~4中的任意整数, $L^1$ 表示S、S-S、 $CH_2-CH_2$ 、S- $CH_2$ 、 $CH_2-S$ 、O- $CH_2$ 、 $CH_2-O$ 、CH=CH、NH-C(=O)、N(CH<sub>3</sub>)-C(=O)、NH-C(=S)、N(CH<sub>3</sub>)-C(=S)、O-C(=O)、C(=O)-NH、C(=O)-N(CH<sub>3</sub>)、C(=S)-NH、C(=S)-N(CH<sub>3</sub>)、C(=O)-O、 $CH_2-CH_2-CH_2$ 、S- $CH_2-CH_2$ 、 $CH_2-CH_2-S$ 、 $CH_2-S-CH_2$ 、O- $CH_2-CH_2$ 、 $CH_2-CH_2-O$ 、 $CH_2-O-CH_2$ 、S- $CH_2-S$ 、S-C(=CH<sub>2</sub>)-S、S-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-S、或三唑。

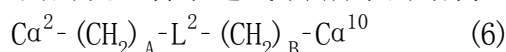
4. 一种由式(5)所示的氨基酸序列构成的环状肽或其药理学上可接受的盐:



式(5)中, $X^2$ 与 $X^{10}$ 之间、 $X^7$ 与 $X^{11}$ 之间各自独立地形成共价键,由此在分子内具有2个环状结构,其中,该共价键形成于 $X^2$ 的主链或侧链与 $X^{10}$ 的侧链之间及 $X^7$ 的侧链与 $X^{11}$ 的侧链之间,

$X^2 \sim X^{13}$ 与权利要求1中记载的相同。

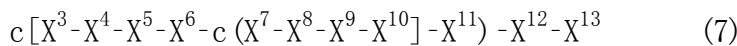
5. 根据权利要求1或4所述的环状肽或其药理学上可接受的盐,其中, $X^2$ 与 $X^{10}$ 的Ca碳原子之间的键包含下述式(6)所示的结构:



式(6)中,A和B各自独立地表示0~6中的任意整数,A和B的总和为4~7中的任意整数, $L^2$ 表示S、S-S、 $CH_2-CH_2$ 、S- $CH_2$ 、 $CH_2-S$ 、O- $CH_2$ 、 $CH_2-O$ 、 $CH=CH$ 、 $NH-C(=O)$ 、 $N(CH_3)-C(=O)$ 、 $NH-C(=S)$ 、 $N(CH_3)-C(=S)$ 、O- $C(=O)$ 、 $C(=O)-NH$ 、 $C(=O)-N(CH_3)$ 、 $C(=S)-NH$ 、 $C(=S)-N(CH_3)$ 、 $C(=O)-O$ 、 $CH_2-CH_2-CH_2$ 、S- $CH_2-CH_2$ 、 $CH_2-CH_2-S$ 、 $CH_2-S-CH_2$ 、O- $CH_2-CH_2$ 、 $CH_2-CH_2-O$ 、 $CH_2-O-CH_2$ 、S- $CH_2-S$ 、S- $C(=CH_2)-S$ 、S- $(CH_2)_2-S$ 、S- $(CH_2)_3-S$ 、S- $(CH_2)_4-S$ 、S- $(CH_2)_5-S$ 、S- $CH_2-CH=CH-CH_2-S$ 、S- $CH_2-C(=O)-NH$ 、 $NH-C(=O)-CH_2-S$ 、S- $CH_2-C_6H_4-CH_2-S$ 、S- $CH_2-C_{10}H_6-CH_2-S$ 、S- $CH_2-C(=O)-CH_2-S$ 、或S- $CH_2-C(=CH_2)-CH_2-S$ 、三唑、或二硫代四氟苯,

其中,S- $CH_2-C_6H_4-CH_2-S$ 中,亚甲基在亚苯基环上的键合部位为邻位、间位和对位中的一种。

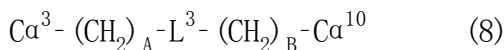
6. 一种由式(7)所示的氨基酸序列构成的环状肽或其药理学上可接受的盐:



式(7)中, $X^3$ 与 $X^{10}$ 之间、 $X^7$ 与 $X^{11}$ 之间各自独立地形成共价键,由此在分子内具有2个环状结构,其中,该共价键形成于 $X^3$ 的主链或侧链与 $X^{10}$ 的侧链之间及 $X^7$ 的侧链与 $X^{11}$ 的侧链之间, $X^3 \sim X^{13}$ 与权利要求1中记载的相同。

7. 根据权利要求1或6所述的环状肽或其药理学上可接受的盐,其中,

$X^3$ 与 $X^{10}$ 的 $C\alpha$ 碳原子之间的键包含下述式(8)所示的结构:

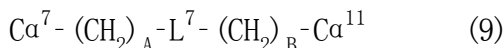


式(8)中,A和B各自独立地表示0~10中的任意整数,A和B的总和为7~10中的任意整数, $L^3$ 表示S、S-S、 $CH_2-CH_2$ 、S- $CH_2$ 、 $CH_2-S$ 、O- $CH_2$ 、 $CH_2-O$ 、 $CH=CH$ 、 $NH-C(=O)$ 、 $N(CH_3)-C(=O)$ 、 $NH-C(=S)$ 、 $N(CH_3)-C(=S)$ 、O- $C(=O)$ 、 $C(=O)-NH$ 、 $C(=O)-N(CH_3)$ 、 $C(=S)-NH$ 、 $C(=S)-N(CH_3)$ 、 $C(=O)-O$ 、 $CH_2-CH_2-CH_2$ 、S- $CH_2-CH_2$ 、 $CH_2-CH_2-S$ 、 $CH_2-S-CH_2$ 、O- $CH_2-CH_2$ 、 $CH_2-CH_2-O$ 、 $CH_2-O-CH_2$ 、S- $CH_2-S$ 、S- $C(=CH_2)-S$ 、S- $(CH_2)_2-S$ 、S- $(CH_2)_3-S$ 、S- $(CH_2)_4-S$ 、S- $(CH_2)_5-S$ 、S- $(CH_2)_6-S$ 、S- $(CH_2)_7-S$ 、S- $(CH_2)_8-S$ 、S- $CH_2-CH=CH-CH_2-S$ 、S- $CH_2-C(=O)-NH$ 、 $NH-C(=O)-CH_2-S$ 、S- $CH_2-C_6H_4-CH_2-S$ 、S- $CH_2-C_6H_4-C_6H_4-CH_2-S$ 、S- $CH_2-C_5NH_3-C_5NH_3-CH_2-S$ 、S- $CH_2-C_{10}H_6-CH_2-S$ 、S- $CH_2-C(=O)-CH_2-S$ 、或S- $CH_2-C(=CH_2)-CH_2-S$ 、三唑、或二硫代四氟苯,

其中,S- $CH_2-C_6H_4-CH_2-S$ 中,亚甲基在亚苯基环上的键合部位为邻位、间位和对位中的一种。

8. 根据权利要求1~7中任一项所述的环状肽或其药理学上可接受的盐,其中,

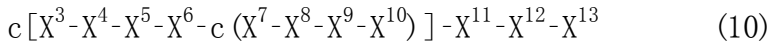
$X^7$ 与 $X^{11}$ 的 $C\alpha$ 碳原子之间的键包含下述式(9)所示的结构:



式(9)中,A和B各自独立地表示0~7中的任意整数,A和B的总和为2~7中的任意整数, $L^7$ 表示S、S-S、 $CH_2-CH_2$ 、S- $CH_2$ 、 $CH_2-S$ 、O- $CH_2$ 、 $CH_2-O$ 、 $CH=CH$ 、 $NH-C(=O)$ 、 $N(CH_3)-C(=O)$ 、 $NH-C(=S)$ 、 $N(CH_3)-C(=S)$ 、O- $C(=O)$ 、 $C(=O)-NH$ 、 $C(=O)-N(CH_3)$ 、 $C(=S)-NH$ 、 $C(=S)-N(CH_3)$ 、 $C(=O)-O$ 、 $CH_2-CH_2-CH_2$ 、S- $CH_2-CH_2$ 、 $CH_2-CH_2-S$ 、 $CH_2-S-CH_2$ 、O- $CH_2-CH_2$ 、 $CH_2-CH_2-O$ 、 $CH_2-O-CH_2$ 、S- $CH_2-S$ 、S- $C(=CH_2)-S$ 、S- $(CH_2)_2-S$ 、S- $(CH_2)_3-S$ 、S- $(CH_2)_4-S$ 、S- $CH_2-CH=CH-CH_2-S$ 、S- $CH_2-C(=O)-NH$ 、 $NH-C(=O)-CH_2-S$ 、S- $CH_2-C_6H_4-CH_2-S$ 、S- $CH_2-C(=O)-CH_2-S$ 、或S- $CH_2-C(=CH_2)-CH_2-S$ 、三唑、或二硫代四氟苯,

其中,S- $CH_2-C_6H_4-CH_2-S$ 中,亚甲基在亚苯基环上的键合部位为邻位、间位和对位中的一种。

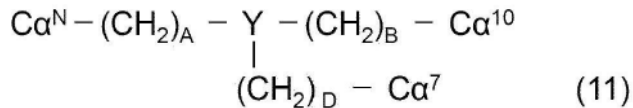
9. 一种由式(10)所示的氨基酸序列构成的环状肽或其药理学上可接受的盐:



式(10)中,通过 $X^3$ 与 $X^7$ 与 $X^{10}$ 之间形成共价键而在分子内具有2个环状结构, $X^3 \sim X^{13}$ 与权利要求1中记载的相同。

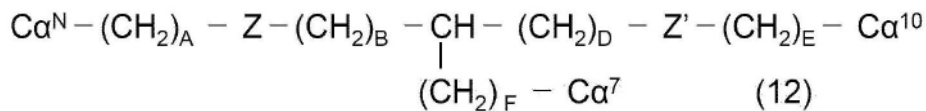
10. 根据权利要求1或9所述的环状肽或其药理学上可接受的盐,其中,

$X^1$ 与 $X^7$ 与 $X^{10}$ 、 $X^2$ 与 $X^7$ 与 $X^{10}$ 、或 $X^3$ 与 $X^7$ 与 $X^{10}$ 的Ca碳原子之间的键包含下述式(11)所示的结构:



式(11)中,N表示1、2或3中的任一者,A、B和D各自独立地表示1或2中的任意整数,Y表示 $[(S-CH_3)_3-C_6H_3]$ 、 $[(S-CH_2-CH_2-C(=O))_3-C_3N_3H_6]$ 、 $[(S-CH_2-C(=O)-NH)_3-C_6H_3]$ 、 $[(NH-C(=O))_3-C_6H_3]$ 、 $[(S-CH_3)_3-C_3N_3H_6]$ 、或 $[(S-CH_2-C(=O))_3-C_3N_3H_6]$ 。

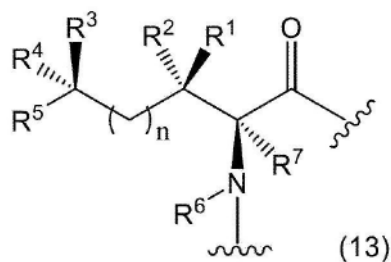
11. 根据权利要求1或9所述的环状肽或其药理学上可接受的盐,其中, $X^1$ 与 $X^7$ 与 $X^{10}$ 、 $X^2$ 与 $X^7$ 与 $X^{10}$ 、或 $X^3$ 与 $X^7$ 与 $X^{10}$ 的Ca碳原子之间的键包含下述式(12)所示的结构:



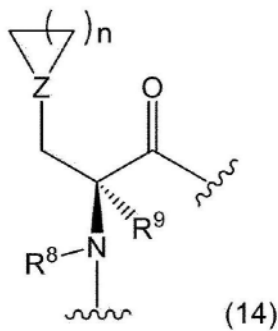
式(12)中,N表示1、2或3中的任一者,A、B、D、E、F各自独立地表示1或2中的任意整数,Z和Z'各自独立地表示S、S-S、S-CH<sub>2</sub>-S、S-C(=CH<sub>2</sub>)-S、S-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-S、S-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-S、S-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-S、S-CH<sub>2</sub>-CH=CH-CH<sub>2</sub>-S、S-CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH、NH-C(=O)-CH<sub>2</sub>-S、S-CH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-CH<sub>2</sub>-S、S-CH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-CH<sub>2</sub>-S、S-CH<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>H<sub>6</sub>-CH<sub>2</sub>-S、S-CH<sub>2</sub>-C(=O)-CH<sub>2</sub>-S、或S-CH<sub>2</sub>-C(=CH<sub>2</sub>)-CH<sub>2</sub>-S、或二硫代四氟苯,

其中,S-CH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-CH<sub>2</sub>-S中,亚甲基在亚苯基环上的键合部位为邻位、间位和对位中的一种。

12. 根据权利要求1~11中任一项所述的环状肽或其药理学上可接受的盐,其中, $X^5$ 、 $X^9$ 、 $X^{12}$ 和 $X^{13}$ 各自独立地为下述式(13)或下述式(14)所示的氨基酸残基、或者它们的衍生物:

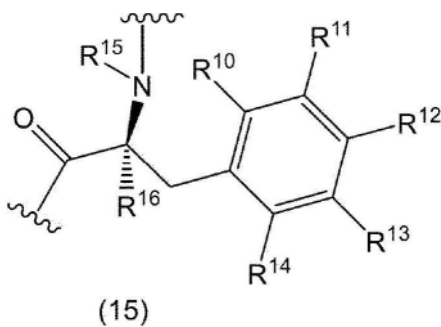


式(13)中,波浪线表示与形成主链的酰胺键的羰基或氮原子的连接点, $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^6$ 和 $R^7$ 各自独立地表示氢原子或甲基, $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 各自独立地表示氢原子、甲基、或卤素原子(F、Cl、Br、I),n表示0~10中的任意整数;



式(14)中,波浪线表示与形成主链的酰胺键的羰基或氮原子的连接点,Z表示C或N, $R^8$ 和 $R^9$ 表示氢原子或甲基,n表示1~6中的任意整数。

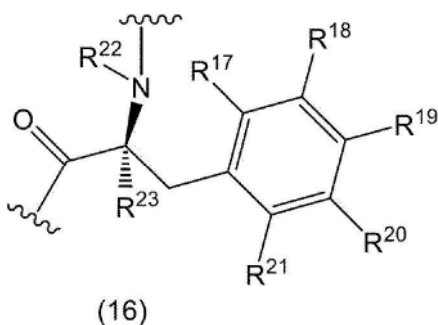
13. 根据权利要求1~12中任一项所述的环状肽或其药理学上可接受的盐,其中, $X^4$ 为下述式(15)所示的氨基酸残基、或者它们的衍生物:



式(15)中,波浪线表示与形成主链的酰胺键的羰基或氮原子的连接点, $R^{10}$ 、 $R^{11}$ 、 $R^{12}$ 、 $R^{13}$ 和 $R^{14}$ 各自独立地表示氢原子、羟基、羟甲基、甲氧基、甲氧基甲基、氨基、氨基甲基、单甲基化氨基、二甲基化氨基、三甲基化氨基、单甲基化氨基甲基、二甲基化氨基甲基、三甲基化氨基甲基、乙酰基、酰胺基、甲基、叔丁基、卤代甲基、或卤素原子(F、Cl、Br、I), $R^{15}$ 和 $R^{16}$ 表示氢原子或甲基。

14. 根据权利要求1~13中任一项所述的环状肽或其药理学上可接受的盐,其中, $X^8$ 表示包含具有或不具有取代基的芳香族碳环基的氨基酸残基、或它们的衍生物。

15. 根据权利要求1~14中任一项所述的环状肽或其药理学上可接受的盐,其中, $X^8$ 为下述式(16)所示的氨基酸残基、具有碱性侧链的氨基酸残基、或它们的衍生物:

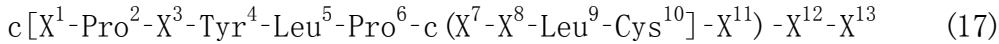


式(16)中,波浪线表示与形成主链的酰胺键的羰基或氮原子的连接点, $R^{17}$ 、 $R^{18}$ 、 $R^{19}$ 、 $R^{20}$ 和 $R^{21}$ 各自独立地表示氢原子、羟基、羟甲基、甲氧基、甲氧基甲基、氨基、氨基甲基、单甲基化氨基、二甲基化氨基、三甲基化氨基、单甲基化氨基甲基、二甲基化氨基甲基、三甲基化氨基甲基、乙酰基、酰胺基、甲基、叔丁基、卤代甲基、或卤素原子(F、Cl、Br、I), $R^{22}$ 和 $R^{23}$ 表示氢原

子或甲基。

16. 根据权利要求1~15中任一项所述的环状肽或其药理学上可接受的盐,其中, $X^6$ 表示甘氨酸、N-甲基化甘氨酸、丙氨酸、N-甲基化丙氨酸、D型丙氨酸、N-甲基化D型丙氨酸、2-氨基异丁酸、N-甲基化2-氨基异丁酸、2-氮杂环丁烷-2-羧酸、D型2-氮杂环丁烷-2-羧酸、脯氨酸、D型脯氨酸、硫代脯氨酸、D型硫代脯氨酸、3,4-脱氢脯氨酸、D型3,4-脱氢脯氨酸、2-哌啶酸、D型2-哌啶酸、或者它们的衍生物。

17. 一种由式(17)所示的氨基酸序列构成的环状肽或药理学上可接受的盐:



式(17)中, $X^1$ 表示半胱氨酸、Mpa(3-巯基丙酸)、或D型半胱氨酸,

$X^3$ 表示N-甲基化甘氨酸、N-甲基化丙氨酸、2-氮杂环丁烷-2-羧酸、脯氨酸、羟脯氨酸、3,4-脱氢脯氨酸、2-哌啶酸、丝氨酸、或赖氨酸,

$X^8$ 表示酪氨酸、脯氨酸或精氨酸,

$X^7$ 和 $X^{11}$ 表示选自赖氨酸与天冬氨酸、鸟氨酸与谷氨酸、天冬氨酸与赖氨酸、谷氨酸与鸟氨酸、赖氨酸与谷氨酸、或谷氨酸与赖氨酸中的任意组合,

$X^{12}$ 和 $X^{13}$ 各自独立地表示亮氨酸、异亮氨酸或正亮氨酸,

$X^1$ 和 $\text{Cys}^{10}$ 在各自的侧链之间形成二硫键, $X^7$ 和 $X^{11}$ 在各自的侧链之间形成酰胺键,由此式(17)的肽在分子内具有2个环状结构;N末端氨基和C末端羧基被修饰或未被修饰,或者缺失或未缺失。

18. 根据权利要求17所述的环状肽或其药理学上可接受的盐,其中,

$X^1$ 表示半胱氨酸,

$X^3$ 表示脯氨酸或丝氨酸,

$X^7$ 表示赖氨酸,

$X^8$ 表示酪氨酸,

$X^{11}$ 表示天冬氨酸,

$X^{12}$ 和 $X^{13}$ 各自独立地表示亮氨酸、异亮氨酸或正亮氨酸,N末端氨基被乙酰化,C末端羧基被酰胺化。

19. 一种具有VIPR2拮抗活性的环状肽或其药理学上可接受的盐,其特征在于,所述环状肽是在权利要求1~18中任一项所述的肽的氨基酸序列中缺失、添加和/或置换1~数个氨基酸而得到的肽、或与上述氨基酸序列具有至少50%以上的序列同源性的肽;和/或是与权利要求1~18中任一项所述的肽具有至少50%以上的构象同源性的肽。

20. 一种环状肽或其药理学上可接受的盐,其特征在于,所述环状肽是具有序列号1~10中任一者所述的氨基酸序列的环状肽;或者是包含在序列号1~10中任一者中记载的氨基酸序列中缺失、添加和/或置换1个或多个氨基酸而得到的氨基酸序列、且具有VIPR2拮抗活性的环状肽。

21. 权利要求1~20中任一项所述的肽的衍生物和/或修饰物。

22. 一种药物、诊断药和/或研究试剂,其包含权利要求1~21中任一项所述的肽。

## VIPR2拮抗肽

### 交叉引用

[0001] 本申请基于在日本于2020年3月30日申请的特愿2020-059721号主张优先权,该申请所记载的内容全部通过参照直接引用于本说明书。另外,本申请中引用的全部的专利、专利申请以及文献所记载的内容全部通过参照直接引用于本说明书。

### 技术领域

[0002] 本发明涉及抑制VIPR2的活性的肽等,详细而言,涉及具有特定的氨基酸序列和环状结构的环状肽等。

### 背景技术

[0003] 血管活性肠肽受体2(Vasoactive intestinal peptide receptor 2,VIPR2)是也被称为VPAC2的B类G蛋白共轭受体(GPCR)。在中枢、末梢神经、感觉器官、消化器官、生殖器等全身中表达,通过与作为其配体的血管活性肠肽(Vasoactive intestinal peptide,VIP)、垂体腺苷酸环化酶激活肽(Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide,PACAP)相互作用而显示多种生理功能。例如,已知经由VIPR2或作为其受体亚型的血管活性肠肽受体1(Vasoactive intestinal peptide receptor 1,VIPR1或VPAC1)或垂体腺苷酸环化酶激活多肽1型受体(Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide type-1receptor,PAC1)的VIP或PACAP的信号具有保护神经作用(非专利文献1及非专利文献2)。另一方面,有趣的是,近年报告了VIPR2的高表达、过度活化可能与精神分裂症、自闭症谱系障碍的发病有关(非专利文献3、非专利文献4、以及非专利文献5)。另外,还报道了VIP的信号阻断可抑制癌症的增殖、激活免疫等(非专利文献6和非专利文献7)。

[0004] 2011年Vacic等人报告了一部分的整合失调症患者与一部分的自闭症谱系障碍患者在编码VIPR2的基因区域具有重复,其淋巴细胞中VIPR2的mRNA表达水平增加,进而对VIP的反应性也过度敏感(非专利文献3)。另外,2015年Ago等人报告了:对新生小鼠给予VIPR2选择性的激动剂Ro25-1553,人工地形成VIPR2过度活化的状态,结果成熟的个体显示认知功能降低(非专利文献4)。进而,2019年Tian等人报告了:制作在编码VIPR2的基因区域具有重复的转基因小鼠,该小鼠显示多巴胺功能异常、认知功能异常、社会行为障碍这样的症状(非专利文献5)。这些见解强烈暗示了经由VIPR2的信号转导的过剩与精神分裂症、自闭症谱系障碍这样的精神疾病的发病有关。

[0005] 据称在全世界有2400万人患有精神分裂症,精神分裂症是一种精神疾病,其通过引起阳性症状(幻觉、妄想等)、阴性症状(欲望降低等)、认知功能障碍,不仅使个人的社会功能降低,而且显示高的自杀率。遗传率高达80%,但是尚未鉴定出在所有患者中共有的特定致病基因,期望开发新的治疗药、治疗方法。据称在全世界中每1000人约1~2人患有自闭症谱系障碍,自闭症谱系障碍会引起社会障碍和与人交流能力的障碍。先天性因素为主,尚未建立起明确的预防法、治疗法。

[0006] 如上所述,报告了一部分的精神分裂症的患者和一部分的自闭症谱系障碍的患者过度表达了VIPR2,暗示了VIPR2的过度活化可能与病情的发病相关。即,在通过基因组分析确认了编码VIPR2的基因区域具有重复的情况下,预期VIPR2抑制剂的给药作为预防和/或治疗精神分裂症、自闭症谱障碍的发病的手段是有效的。

[0007] 2018年,本发明人报道了:发现了一种与VIPR2的细胞外区域的重组蛋白质结合且在细胞试验中抑制VIP和PACAP的经由VIPR2的信号通路的环状拮抗肽VIpep-3:Ac-c (Cys-Pro-Pro-Tyr-Leu-Pro-Arg-Arg-Leu-Cys) -Thr-Leu-Leu-Arg-Ser-OH(序列号11) (非专利文献8)。

现有技术文献

非专利文献

[0008] 非专利文献1:Vaudry D,Falluel-Morel A,Bourgault S,Basille M,Burel D,Wurtz O,Fournier A,Chow BK,Hashimoto H,Galas L,and Vaudry H.Pharmacol Rev.2009,61 (3) :283-357.

非专利文献2:Passemard S,Sokolowska P,Schwendimann L,and Gressens P.Curr Pharm Des.2011,17 (10) :1036-1039.

非专利文献3:Vacic V,McCarthy S,Malhotra D,Murray F,Chou HH,Peoples A,Makarov V,Yoon S,Bhandari A,Corominas R,Iakoucheva LM,Krastoshevsky O,Krause V,Larach-Walters V,Welsh DK,Craig D,Kelsoe JR,Gershon ES,Leal SM,Dell Aquila M,Morris DW,Gill M,Corvin A,Insel PA,McClellan J,King MC,Karayiorgou M,Levy DL,DeLisi LE,and Sebat J.Nature.2011,471 (7339) :499-503.

非专利文献4:Ago Y,Condro MC,Tan YV,Ghiani CA,Colwell CS,Cushman JD,Fanselow MS,Hashimoto H,and Waschek JA.Psychopharmacology (Berl) .2015,232 (12) :2181-2189.

非专利文献5:Tian X,Richard A,EI-Saadi MW,Bhandari A,Latimer B, Van Savage I,Holmes K,Klein RL,Dwyer D,Goeders NE,Yang XW,and Lu XH.Mol Psychiatry 2019,doi:10.1038/s 41380-019-0492-3.

非专利文献6:Moody TW,Chan D,Fahrenkrug J,and Jensen RT.Curr Pharm Des.2003,9 (6) :495-509.

非专利文献7:Li JM,Petersen CT,Li JX,Panjwani R,Chandra DJ,Giver CR,Blazar BR,and Waller EK.Cancer Res.2016,76 (23) :6802-6815.

非专利文献8:Sakamoto K,Koyama R,Kamada Y,Miwa M,and Tani A.Biochem Biophys Res Commun.2018,503:1973-1979.

非专利文献9:Fairlie DP and Dantas de Araujo.Biopolymers 2016,106 (6) :843-852.

非专利文献10:Lau YH,de Andrade P,Wu Y,and Spring DR.Chem Soc Rev.2015,44 (1) 91-102.

非专利文献11:Chen S,Gopalakrishnan R,Schaer T,Marger F,Hovius R,Bertrand D,Pojer F,and Heinis C.Nat Chem 2014,6 (11) 1009-1016.

非专利文献12:Hara Y,Ago Y,Taruta A,Katashiba K,Hasebe S,Takano E,

Onaka Y, Hashimoto H, Matsuda T, and Takuma K. *Autism Res.* 2016, 9 (9) 926-939.

## 发明内容

发明所要解决的技术问题

[0009] 本发明人发现的上述VIpep-3是与人VIPR2的细胞外域牢固地结合、阻断VIP-VIPR2信号通路的环状拮抗肽,但由于仅由天然氨基酸构成,因此担心对蛋白酶水解的抗性低等。

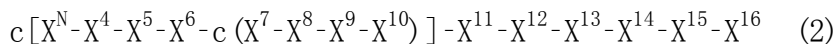
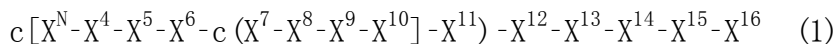
[0010] 本发明是鉴于上述课题而完成的,其目的在于提供适合作为药品、诊断药和/或研究试剂使用的新型VIPR2拮抗肽。

用于解决技术问题的手段

[0011] 本发明人在实施VIpep-3的最优化研究的过程中发现了新的VIPR2拮抗肽组。为了解决上述课题,研究了(1)氨基酸残基的置换、(2)通过使N末端氨基酸残基和/或C末端氨基酸残基缺失而降低分子量、以及(3)导入二环结构,结果发现了具有蛋白酶水解抗性和VIPR2拮抗活性的新型的VIPR2拮抗肽的序列组,从而完成了本发明。

[0012] 即,本发明包括以下的实施方式。

[1]一种由式(1)或式(2)所示的氨基酸序列构成的环状肽或其药理学上可接受的盐。



[0013] 此处,式(1)中的 $X^N$ 与 $X^{10}$ 之间、 $X^7$ 与 $X^{11}$ 之间、以及式(2)中的 $X^N$ 与 $X^7$ 与 $X^{10}$ 之间各自独立地形成共价键,由此在分子内形成2个环状结构。这些共价键可以在主链-侧链之间或侧链-侧链之间形成直接的共价键,或者也可以是借助连接子(Linker)的间接的共价键。

上述式(1)和(2)中, $X^N$ 为 $X^1 \sim X^2 \sim X^3$ , $X^1$ 、 $X^2$ 、 $X^3$ 、 $X^7$ 、 $X^{10}$ 和 $X^{11}$ 在参与肽分子内的环化的情况下,各自独立地表示氨基、羧基、硫醇基、烯丙基、炔基、叠氨基、具有卤素原子的氨基酸残基、或它们的衍生物;在不参与肽分子内的环化的情况下, $X^1$ 和 $X^2$ 各自独立地表示任意的氨基酸残基或缺失, $X^3$ 和 $X^{11}$ 各自独立地为任意的氨基酸残基。另外, $X^5$ 、 $X^9$ 、 $X^{12}$ 和 $X^{13}$ 各自独立地表示包含可具有取代基的烃基的氨基酸残基或它们的衍生物。 $X^4$ 表示包含可具有取代基的芳香族碳环基的氨基酸残基或者它们的衍生物, $X^6$ 和 $X^8$ 表示任意的氨基酸残基, $X^{14}$ 、 $X^{15}$ 和 $X^{16}$ 各自独立地表示任意的氨基酸残基或缺失,N末端氨基和C末端羧基可以被修饰,也可以缺失。

[0014] 以下对本发明的优选或其他实施方式、以及上述环状肽中的 $X^1$ 至 $X^{16}$ 的各氨基酸残基的优选方式进行详细说明,但各优选方式相互独立,各实施方式可以任意组合。

发明效果

[0015] 根据本发明,可提供用于将VIPR2拮抗剂用作药品、诊断药和/或研究试剂的新型环状肽。

## 附图说明

[0016] 图1示出VIpep-3的与VIPR2结合活性(Farmacora)和环状结构限制(S-S键)的功能相关的氨基酸序列。另外,示出对VIpep-3进行改造而成的本发明肽的结构概要。

图2示出VIpep-3的各氨基酸位置的、供于氨基酸残基置换研究的氨基酸的例子和进行了二环化研究的氨基酸残基的位置。

图3示出用于确认置换氨基酸残基而成的肽对VIPR2的结合活性的基于细胞ELISA法的竞争结合试验的概要。图中,SA表示链霉亲和素,B表示生物素,HRP表示辣根过氧化物酶。

图4示出将供于氨基酸残基置换研究的肽序列组和本发明肽的代表例的VIPR2结合活性与母肽VIpep-3的VIPR2结合活性进行比较的结果。

图5示出将本发明肽的代表例和VIP添加到VIPR2表达细胞中,评价作为VIPR2下游的信号之一的细胞内钙浓度的变化的结果。

图6示出将VIpep-3和本发明肽的代表例与大鼠血浆混合并比较蛋白酶降解抗性的结果。

图7示出将本发明肽的代表例和VIP添加到VIPR1表达细胞中并评价作为VIPR1下游的信号之一的细胞内钙浓度的变化的结果、将本发明肽的代表例和VIP添加到VIPR2表达细胞中并评价作为VIPR2下游的信号之一的细胞内钙浓度的变化的结果、以及将本发明肽的代表例和PACAP添加到PAC1表达细胞中并评价作为PAC1下游的信号之一的细胞内钙浓度的变化的结果。

图8示出将作为VIP类似物的VIPR2选择性激动剂Ro25-1553(图中表示为“Vehicle”)、或本发明肽的代表例与Ro25-15532的混合液(图中表示为肽浓度1nmol/g或10nmol/g)皮下给药于ICR小鼠(12日龄)后评价脑的前额皮质的细胞内的循环AMP响应序列结合蛋白(cAMP response element binding protein;CREB)(VIPR2下游信号之一)的磷酸化的结果。

图9的(A)示出给予了作为VIP类似物的VIPR2选择性激动剂Ro25-1553的小鼠对新奇物体的认识功能的评价结果。图9的(B)示出单独给予了Ro25-1553或者给予了本发明肽的代表例与Ro25-15532的混合液的小鼠对新奇物体的认识功能的评价结果。

图10示出实施例中使用的本发明肽的代表例的结构式。

## 具体实施方式

[0017] 下面,参照附图说明本发明的优选实施方式。另外,以下说明的实施方式并不限定权利要求书所涉及的发明,另外,在实施方式中说明的各要素及其组合并非全部是本发明的解决手段所必须的。另外,本说明书中引用的所有专利文献和非专利文献的公开以整体形式通过参照而引入本说明书中。

[0018] (定义)

在本说明书中,肽是指2个以上的氨基酸以酰胺键(肽键)键合而成的物质,例如可以是2~20个氨基酸以酰胺键键合而成的物质。另外,根据肽的表述惯例,左端为N末端(氨基末端),右端为C末端(羧基末端)。将与形成肽键的羰基相邻的第一个碳原子称为C $\alpha$ 碳。

[0019] 本说明书中,“任意的氨基酸或其衍生物”以其最广泛的含义使用,除了天然氨基酸以外,还包括具有非天然结构的人工的氨基酸、具有氨基酸特征性的本领域公知的特性的化学合成的化合物、以及具有官能团的羧酸。作为非天然氨基酸的例子,可以举出D型氨基酸、主链的结构与天然型不同的 $\alpha/\alpha$ -二取代氨基酸(2-氨基异丁酸这样的 $\alpha$ -甲基化氨基

酸等)、N-烷基-氨基酸(N-甲基化氨基酸等)、N-取代甘氨酸(类肽)、主链延伸的氨基酸( $\beta$ 高氨基酸、 $\gamma$ 高氨基酸)、侧链的结构与天然型不同的氨基酸(环己基丙氨酸、烯丙基甘氨酸、2-(2-吡啶基)-甘氨酸、3-(1H-苯并咪唑-2-基)-丙氨酸等)、侧链的一部分被置换的氨基酸(正亮氨酸、二氨基丙酸、3-(2-吡啶基)-丙氨酸等)、侧链具有多余的官能团的氨基酸;侧链具有多余的C、烷基、甲基的氨基酸(高正亮氨酸、 $\gamma$ -甲基亮氨酸等)、侧链具有卤素原子(F、Cl、Br、I)的氨基酸(3-氯-丙氨酸等)、侧链具有卤素原子(F、Cl、Br、I)的羧酸(3-氯丙酸等)、侧链具有官能团的羧酸(3-丁烯酸等)、侧链具有多余的N、氨基的氨基酸( $\beta$ -叠氮丙氨酸、鸟氨酸等)、侧链具有多余的O、甲氧基的氨基酸(O-甲基-丝氨酸、O-甲基-苏氨酸等)、侧链具有多余的羟基的氨基酸(3-羟基-苯丙氨酸等)、侧链具有多余的羧基(-COOH)的氨基酸(3-羧基-苯丙氨酸等)、侧链具有多余的S的氨基酸(乙硫氨酸等)、侧链中的羧酸官能团被酯保护的氨基酸(天冬氨酸-4-甲酯等)、侧链的硫基(-S-)被氧化而变换成亚磺酰基(-S(=O)-)、磺酰基(-S(=O)<sub>2</sub>-)的氨基酸(甲硫氨酸亚砷)等,但不限于这些。

[0020] 在本说明书中,可具有取代基的烃基例如可以举出:甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基、戊基、异戊基、新戊基、1-乙基丙基、己基、异己基、1,1-二甲基丁基、2,2-二甲基丁基、3,3-二甲基丁基、2-乙基丁基等C<sub>1-10</sub>烷基、乙烯基、1-丙烯基、2-丙烯基、2-甲基-1-丙烯基、1-丁烯基、2-丁烯基、3-丁烯基、3-甲基-2-丁烯基、1-戊烯基、2-戊烯基、3-戊烯基、4-戊烯基、4-甲基-3-戊烯基、1-己烯基、3-己烯基、5-己烯基等C<sub>2-10</sub>烯基、乙炔基、1-丙炔基、2-丙炔基、1-丁炔基、2-丁炔基、3-丁炔基、1-戊炔基、2-戊炔基、3-戊炔基、4-戊炔基、1-己炔基、2-己炔基、3-己炔基、4-己炔基、5-己炔基、4-甲基-2-戊炔基等C<sub>2-10</sub>炔基、环丙基、环丁基、环戊基、环己基、环庚基、环辛基、双环[2.2.1]辛基、双环[2.2.2]辛基、双环[3.2.1]辛基、金刚烷基等C<sub>3-10</sub>环烷基、环丙烯基、环丁烯基、环戊烯基、环己烯基、环庚烯基、环辛烯基等C<sub>3-10</sub>环烯基,可具有取代基的芳香族碳环基例如是指苯基、萘基等,可具有取代基的芳香族杂环基例如是指吡啶基、噻吩基、呋喃基、吡咯基、咪唑基、吡唑基、噻唑基、异噻唑基、恶唑基、异恶唑基、吡嗪基、嘧啶基、哒嗪基、1,2,4-恶二唑基、1,3,4-恶二唑基、1,2,4-噻二唑基、1,3,4-噻二唑基、三唑基、四唑基、三嗪基等5至6元单环式芳香族杂环基,进而是指苯并呋喃基、苯并噻吩基、苯并咪唑基、苯并恶唑基、苯并异恶唑基、苯并噻唑基、苯并异噻唑基、苯并三唑基、咪唑并吡啶基、噻吩并吡啶基、呋喃并吡啶基、吡咯并吡啶基、吡唑并吡啶基、恶唑并吡啶基、噻唑并吡啶基、咪唑并吡嗪基、咪唑并嘧啶基、噻吩并嘧啶基、呋喃并嘧啶、吡咯并嘧啶、吡唑并嘧啶基、恶唑并嘧啶基、噻唑并嘧啶基、吡唑并三嗪基、萘并[2,3-b]噻吩基、吩恶噻基、吲哚基、异吲哚基、1H-吲哚基、嘌呤基、异喹啉基、喹啉基、酞嗪基、蔡啶基、喹啉基、喹唑啉基、噌啉基、咔唑基、 $\beta$ -咔啉基、菲基、吡啶基、吩嗪基、吩噻嗪基、吩恶嗪基等8至14元缩合多环式(优选为2或3环式)芳香族杂环基,但并不限于这些。

[0021] 在本说明书中,“VIPR2”是指小鼠、大鼠、狗、猴子、人等哺乳类的蛋白质。

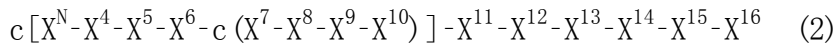
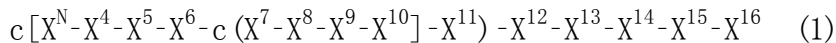
[0022] 在本说明书中,在提及“具有VIPR2拮抗活性”的情况下是指:在体外试验中,本发明肽(1)抑制已报告的VIPR2拮抗肽VI<sub>pep</sub>-3对生物素标记VIPR2重组蛋白的结合;(2)抑制已报告的VIPR2拮抗肽VI<sub>pep</sub>-3对生物素标记VIPR2表达细胞的结合;(3)对VIPR2重组蛋白浓度依赖性地结合;(4)对VIPR2表达细胞浓度依赖性地结合;(5)在VIP之前添加或一起添加的情况下,抑制VIPR2表达细胞内的钙浓度的上升;(6)在VIP之前添加或与VIP一起添加

的情况下,抑制VIPR2表达细胞内的cAMP浓度的上升;(7)在VIP之前添加或与VIP一起添加的情况下,抑制VIPR2表达细胞的β拘留蛋白的募集等,在显示出这些效果中的任意效果的情况下,称为“具有VIPR2拮抗活性”。关于VIPR2拮抗活性的有无,可以参考非专利文献7等,由本领域技术人员按照公知的方法进行确认,但并不限于这些。

#### [0023] (环状肽)

基于图1对本发明的一个实施方式的环状肽的结构进行说明。图1示意性地示出作为环状肽设计基础的VIpep-3的与VIPR2结合活性相关的特征 (Farmacopha) 和与环状结构限制 (S-S结合) 的功能相关的结构、以及与将VIpep-3改造而成的本实施方式的环状肽的关系。VIpep-3的第1~13位氨基酸残基与本实施方式的环状肽的第1~13位氨基酸残基对应,但本实施方式的环状肽中,第1位氨基酸、或第1位和第2位氨基酸残基可缺失。VIpep-3中第1位与第10位半胱氨酸残基间环化,本实施方式的环状肽中形成 (1) 基于第1位与第10位氨基酸残基间的键A以及第7位与第11位氨基酸残基间的键B的2个环状结构, (2) 基于第2位与第10位氨基酸残基间的键C以及第7位与第11位氨基酸残基间的键D的2个环状结构,或基于第2位与第10位氨基酸残基间的键G以及第7位与第11位氨基酸残基间的键H的2个环状结构, (3) 基于第3位与第10位氨基酸残基间的键E以及第7位与第11位氨基酸残基间的键F的2个环状结构,或基于第3位与第10位氨基酸残基间的键I以及第7位与第11位氨基酸残基间的键J的2个环状结构, (4) 基于第1位与第7位与第10位氨基酸残基间的键K的2个环状结构, (5) 基于第2位与第7位与第10位氨基酸残基间的键L或键N的2个环状结构, (6) 基于第3位与第7位与第10位氨基酸残基间的键M或键O的2个环状结构,进一步得以稳定化。而且,将VIpep-3的各氨基酸位置的、供于氨基酸残基置换的氨基酸的例子和进行了二环化研究的氨基酸残基的位置示于图2。

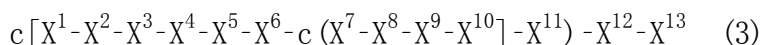
[0024] [1]更具体而言,图1所示的环状肽由下述式 (1) 或下述式 (2) 表示。



[0025] 此处,式 (1) 中的 $X^N$ 与 $X^{10}$ 之间、 $X^7$ 与 $X^{11}$ 之间、以及式 (2) 中的 $X^N$ 与 $X^7$ 与 $X^{10}$ 之间各自独立地形成共价键,由此在分子内形成2个环状结构。这些共价键可以在主链-侧链之间或侧链-侧链之间形成直接的共价键,或者也可以是借助连接子的间接的键。

[0026] 上述式 (1) 和 (2) 中, $X^N$ 为 $X^1-X^2-X^3$ , $X^1$ 、 $X^2$ 、 $X^3$ 、 $X^7$ 、 $X^{10}$ 和 $X^{11}$ 在参与肽分子内的环化的情况下,各自独立地表示氨基、羧基、硫醇基、烯丙基、炔基、叠氮基、具有卤素原子的氨基酸残基、或它们的衍生物;在不参与肽分子内的环化的情况下, $X^1$ 和 $X^2$ 各自独立地表示任意的氨基酸残基或缺失, $X^3$ 和 $X^{11}$ 各自独立地为任意的氨基酸残基。另外, $X^5$ 、 $X^9$ 、 $X^{12}$ 和 $X^{13}$ 各自独立地表示包含可具有取代基的烃基的氨基酸残基或它们的衍生物。 $X^4$ 表示包含可具有取代基的芳香族碳环基的氨基酸残基或者它们的衍生物, $X^6$ 和 $X^8$ 表示任意的氨基酸残基, $X^{14}$ 、 $X^{15}$ 和 $X^{16}$ 各自独立地表示任意的氨基酸残基或缺失,N末端氨基和C末端羧基可被修饰,也可缺失。

[0027] [2]式 (1) 中包含的优选的实施方式为由下述式 (3) 所示的氨基酸序列构成的环状肽或其药理学上可接受的盐。

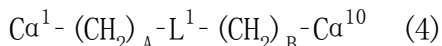


式 (3) 中, $X^1$ 与 $X^{10}$ 之间、 $X^7$ 与 $X^{11}$ 之间各自独立地形成共价键,由此在分子内形成2个环状结构,该共价键在 $X^1$ 的主链或侧链与 $X^{10}$ 的侧链之间以及 $X^7$ 的侧链与 $X^{11}$ 的侧链之间形

成,  $X^1 \sim X^{13}$  如[1]中记载的那样。

[0028] 在一个实施方式中,  $X^1$  表示半胱氨酸、D型半胱氨酸、3-巯基丙酸、2,3-二氨基丙酸、D型2,3-二氨基丙酸、β丙氨酸、天冬氨酸或谷氨酸,  $X^{10}$  表示半胱氨酸、D型半胱氨酸、2,3-二氨基丙酸、D型2,3-二氨基丙酸、天冬氨酸或谷氨酸,  $X^2$  和  $X^3$  各自独立地表示任意的氨基酸残基, 优选表示脯氨酸,  $X^4$  和  $X^8$  各自独立地表示具有芳香族碳环基的氨基酸残基, 优选表示酪氨酸、苯丙氨酸或者它们的衍生物,  $X^5$ 、 $X^9$ 、 $X^{12}$  和  $X^{13}$  各自独立地表示亮氨酸、异亮氨酸或者它们的衍生物,  $X^7$  和  $X^{11}$  各自独立地表示鸟氨酸、鸟氨酸、精氨酸、2,3-二氨基丙酸、2,4-二氨基丁酸、天冬氨酸、谷氨酸、半胱氨酸、高半胱氨酸或者它们的衍生物。

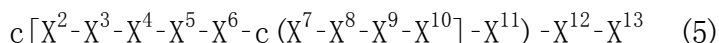
[0029] [3] 其中,  $X^1$  与  $X^{10}$  的  $C\alpha$  碳原子之间的键优选具有下述式 (4) 所示的结构。



式中, A 和 B 各自独立地表示 0~2 中的任意整数。A 与 B 的总和为 1~4 中的任意整数。连接子  $L^1$  表示 S、S-S、 $CH_2-CH_2$ 、 $S-CH_2$ 、 $CH_2-S$ 、 $O-CH_2$ 、 $CH_2-O$ 、 $CH=CH$ 、 $NH-C(=O)$ 、 $N(CH_3)-C(=O)$ 、 $NH-C(=S)$ 、 $N(CH_3)-C(=S)$ 、 $O-C(=O)$ 、 $C(=O)-NH$ 、 $C(=O)-N(CH_3)$ 、 $C(=S)-NH$ 、 $C(=S)-N(CH_3)$ 、 $C(=O)-O$ 、 $CH_2-CH_2-CH_2$ 、 $S-CH_2-CH_2$ 、 $CH_2-CH_2-S$ 、 $CH_2-S-CH_2$ 、 $O-CH_2-CH_2$ 、 $CH_2-CH_2-O$ 、 $CH_2-O-CH_2$ 、 $S-CH_2-S$ 、 $S-C(=CH_2)-S$ 、 $S-(CH_2)_2-S$ 、或三唑。

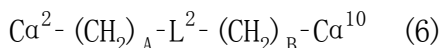
[0030] 其中,  $L^1$  优选表示 S-S、 $NH-C(=O)$ 、 $CH_2-S-CH_2$ 、 $CH=CH$ 、 $CH_2-CH_2$ , 进一步优选  $L^1$  表示 S-S 或  $NH-C(=O)$  的情况。 $L^1$  表示 S~S 的情况是指: 例如  $X^1$  和  $X^{10}$  均为具有硫醇基的氨基酸残基或其衍生物, 在氧化条件下形成二硫键的结构。 $L^1$  表示  $NH-C(=O)$  的情况是指: 例如  $X^1$  为侧链上具有氨基的氨基酸残基、 $X^{10}$  为侧链上具有羧基的氨基酸残基、通过这些的氨基与羧基的脱水缩合而环化的结构。作为侧链具有硫醇基的氨基酸残基, 例如可列举出半胱氨酸、D型半胱氨酸、3-巯基丙酸、高半胱氨酸、及 D型高半胱氨酸等, 作为侧链具有氨基的氨基酸残基, 例如可列举出 2,3-二氨基丙酸、D型 2,3-二氨基丙酸、或 β丙氨酸等, 作为侧链具有羧基的氨基酸残基, 例如可列举出天冬氨酸、谷氨酸等。

[0031] [4] 上述式 (1) 所包含的其他优选的实施方式为: 由式 (5) 所示的氨基酸序列构成的环状肽或其药理学上可接受的盐。



式 (5) 中,  $X^2$  与  $X^{10}$  之间、 $X^7$  与  $X^{11}$  之间各自独立地形成共价键, 由此在分子内形成 2 个环状结构, 该共价键形成于  $X^2$  的主链或侧链与  $X^{10}$  的侧链之间及  $X^7$  的侧链与  $X^{11}$  的侧链间,  $X^2 \sim X^{13}$  如[1]所述。

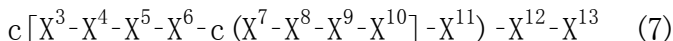
[0032] [5] 其中,  $X^2$  与  $X^{10}$  的  $C\alpha$  碳原子之间的键优选具有下述式 (6) 所示的结构。



式中, A 和 B 各自独立地表示 0~6 中的任意整数, A 和 B 的总和为 4~7 中的任意整数。 $L^2$  表示 S、S-S、 $CH_2-CH_2$ 、 $S-CH_2$ 、 $CH_2-S$ 、 $O-CH_2$ 、 $CH_2-O$ 、 $CH=CH$ 、 $NH-C(=O)$ 、 $N(CH_3)-C(=O)$ 、 $NH-C(=S)$ 、 $N(CH_3)-C(=S)$ 、 $O-C(=O)$ 、 $C(=O)-NH$ 、 $C(=O)-N(CH_3)$ 、 $C(=S)-NH$ 、 $C(=S)-N(CH_3)$ 、 $C(=O)-O$ 、 $CH_2-CH_2-CH_2$ 、 $S-CH_2-CH_2$ 、 $CH_2-CH_2-S$ 、 $CH_2-S-CH_2$ 、 $O-CH_2-CH_2$ 、 $CH_2-CH_2-O$ 、 $CH_2-O-CH_2$ 、 $S-CH_2-S$ 、 $S-C(=CH_2)-S$ 、 $S-(CH_2)_2-S$ 、 $S-(CH_2)_3-S$ 、 $S-(CH_2)_4-S$ 、 $S-(CH_2)_5-S$ 、 $S-CH_2-CH=CH-CH_2-S$ 、 $S-CH_2-C(=O)-NH$ 、 $NH-C(=O)-CH_2-S$ 、 $S-CH_2-C_6H_4-CH_2-S$  (亚甲基在亚苯基环上的键合部位可为邻位、间位和对位中的任一种)、 $S-CH_2-C_{10}H_6-CH_2-S$ 、 $S-CH_2-C(=O)-CH_2-S$ 、或  $S-CH_2-C(=CH_2)-CH_2-S$ 、三唑或二硫代四氟苯。

[0033] 其中,  $L^2$  优选表示  $S-(CH_2)_2-S$ 、 $S-(CH_2)_3-S$ 、 $S-(CH_2)_4-S$ 、 $S-(CH_2)_5-S$ 。例如,  $X^2$  和  $X^{10}$  均为具有硫醇基的氨基酸残基或其衍生物, 可以在这些残基所具有的硫醇基与 1,2-二碘乙烷、1,3-二碘丙烷、1,4-二碘丁烷等卤代烷基连接子之间形成硫醚键。

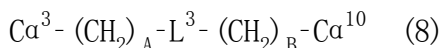
[0034] [6] 上述式 (1) 所含的又一优选实施方式为: 由式 (7) 所示的氨基酸序列构成的环状肽或其药理学上可接受的盐。



式 (7) 中,  $X^3$  与  $X^{10}$  之间、 $X^7$  与  $X^{11}$  之间各自独立地形成共价键, 由此在分子内形成 2 个环状结构, 该共价键形成于  $X^3$  的主链或侧链与  $X^{10}$  的侧链之间及  $X^7$  的侧链与  $X^{11}$  的侧链之间,  $X^3 \sim X^{13}$  如 [1] 所述。

[0035] 在一个实施方式中,  $X^3$  表示半胱氨酸、D 型半胱氨酸、高半胱氨酸、D 型高半胱氨酸、3-巯基丙酸、6-巯基己酸或 8-巯基己酸,  $X^{10}$  表示半胱氨酸、D 型半胱氨酸、高半胱氨酸或 D 型高半胱氨酸,  $X^4$  和  $X^8$  各自独立地表示具有芳香族碳环基的氨基酸残基, 优选酪氨酸、苯丙氨酸或者它们的衍生物,  $X^5$ 、 $X^9$ 、 $X^{12}$  和  $X^{13}$  各自独立地表示亮氨酸、异亮氨酸或者它们的衍生物,  $X^7$  和  $X^{11}$  各自独立地表示赖氨酸、鸟氨酸、精氨酸、2,3-二氨基丙酸、2,4-二氨基丁酸、天冬氨酸、谷氨酸或者它们的衍生物。

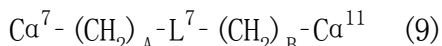
[0036] [7] 其中,  $X^3$  与  $X^{10}$  的 Ca 碳原子之间的键优选具有下述式 (8) 所示的结构。



式中, A 和 B 各自独立地表示 0~10 中的任意整数, A 和 B 的总和为 7~10 中的任意整数,  $L^3$  表示  $S$ 、 $S-S$ 、 $CH_2-CH_2$ 、 $S-CH_2$ 、 $CH_2-S$ 、 $O-CH_2$ 、 $CH_2-O$ 、 $CH=CH$ 、 $NH-C(=O)$ 、 $N(CH_3)-C(=O)$ 、 $NH-C(=S)$ 、 $N(CH_3)-C(=S)$ 、 $O-C(=O)$ 、 $C(=O)-NH$ 、 $C(=O)-N(CH_3)$ 、 $C(=S)-NH$ 、 $C(=S)-N(CH_3)$ 、 $C(=O)-O$ 、 $CH_2-CH_2-CH_2$ 、 $S-CH_2-CH_2$ 、 $CH_2-CH_2-S$ 、 $CH_2-S-CH_2$ 、 $O-CH_2-CH_2$ 、 $CH_2-CH_2-O$ 、 $CH_2-O-CH_2$ 、 $S-CH_2-S$ 、 $S-C(=CH_2)-S$ 、 $S-(CH_2)_2-S$ 、 $S-(CH_2)_3-S$ 、 $S-(CH_2)_4-S$ 、 $S-(CH_2)_5-S$ 、 $S-(CH_2)_6-S$ 、 $S-(CH_2)_7-S$ 、 $S-(CH_2)_8-S$ 、 $S-CH_2-CH=CH-CH_2-S$ 、 $S-CH_2-C(=O)-NH$ 、 $NH-C(=O)-CH_2-S$ 、 $S-CH_2-C_6H_4-CH_2-S$  (亚甲基在亚苯基环上的键合部位可为邻位、间位和对位中的任一种)、 $S-CH_2-C_6H_4-C_6H_4-CH_2-S$ 、 $S-CH_2-C_5NH_3-C_5NH_3-CH_2-S$ 、 $S-CH_2-C_{10}H_6-CH_2-S$ 、 $S-CH_2-C(=O)-CH_2-S$ 、或  $S-CH_2-C(=CH_2)-CH_2-S$ 、三唑或二硫代四氟苯)。

[0037] 其中,  $L^3$  优选表示  $S-(CH_2)_3-S$ 、 $S-(CH_2)_4-S$ 、 $S-(CH_2)_5-S$ 、 $S-(CH_2)_6-S$  或  $S-CH_2-C_6H_4-CH_2-S$  (亚甲基在亚苯基环上的键合部位可为邻位、间位和对位中的任一种)。例如,  $X^3$  和  $X^{10}$  均为具有硫醇基的氨基酸残基或其衍生物, 可以使这些残基所具有的硫醇基与 1,3-二碘丙烷、1,4-二碘丁烷、1,5-二碘戊烷、1,6-二碘己烷、1,2-双溴甲基苯、1,3-双溴甲基苯或 1,4-双溴甲基苯等卤代烷基连接子之间形成硫醚键。

[0038] [8] 作为上述式 (1)、(3)、(5)、(7) 中所含的其他优选的实施方式, 优选  $X^7$  与  $X^{11}$  的 Ca 碳原子之间的键具有下述式 (9) 所示的结构。

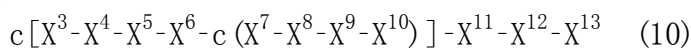


式中, A 和 B 各自独立地表示 0~7 中的任意整数, A 和 B 的总和为 2~7 中的任意整数,  $L^7$  表示  $S$ 、 $S-S$ 、 $CH_2-CH_2$ 、 $S-CH_2$ 、 $CH_2-S$ 、 $O-CH_2$ 、 $CH_2-O$ 、 $CH=CH$ 、 $NH-C(=O)$ 、 $N(CH_3)-C(=O)$ 、 $NH-C(=S)$ 、 $N(CH_3)-C(=S)$ 、 $O-C(=O)$ 、 $C(=O)-NH$ 、 $C(=O)-N(CH_3)$ 、 $C(=S)-NH$ 、 $C(=S)-N(CH_3)$ 、 $C(=O)-O$ 、 $CH_2-CH_2-CH_2$ 、 $S-CH_2-CH_2$ 、 $CH_2-CH_2-S$ 、 $CH_2-S-CH_2$ 、 $O-CH_2-CH_2$ 、 $CH_2-CH_2-O$ 、 $CH_2-O-CH_2$ 、 $S-CH_2-S$ 、 $S-C(=CH_2)-S$ 、 $S-(CH_2)_2-S$ 、 $S-(CH_2)_3-S$ 、 $S-(CH_2)_4-S$ 、 $S-CH_2-CH=CH-CH_2-S$ 、 $S-CH_2-C(=$

O)-NH、NH-C(=O)-CH<sub>2</sub>-S、S-CH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-CH<sub>2</sub>-S(亚甲基在亚苯基环上的键合部位可为邻位、间位和对位中的任一种)、S-CH<sub>2</sub>-C(=O)-CH<sub>2</sub>-S、或S-CH<sub>2</sub>-C(=CH<sub>2</sub>)-CH<sub>2</sub>-S、三唑或二硫代四氟苯。

[0039] 其中, L<sup>7</sup> 优选表示NH-C(=O)、S-S或S-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-S。L<sup>7</sup> 表示NH-C(=O)的情况是指: 例如X<sup>7</sup>为侧链上具有氨基的氨基酸残基, X<sup>11</sup>为侧链上具有羧基的氨基酸残基, 通过这些的氨基与羧基的脱水缩合而环化的结构。L<sup>7</sup> 表示S~S的情况是指: 例如X<sup>7</sup>和X<sup>11</sup>均为具有硫醇基的氨基酸残基或其衍生物, 在氧化条件下形成二硫键的结构。L<sup>7</sup> 表示S-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-S的情况是指: 例如X<sup>7</sup>和X<sup>11</sup>均为具有硫醇基的氨基酸残基或其衍生物, 可以在这些残基所具有的硫醇基与1,3-二碘丙烷等卤代烷基连接子之间形成硫醚键。作为侧链中具有氨基的氨基酸残基, 可列举赖氨酸和鸟氨酸等。作为侧链中具有羧基的氨基酸残基, 例如可列举出天冬氨酸、谷氨酸等。作为侧链具有硫醇基的氨基酸残基, 例如可列举出半胱氨酸、D型半胱氨酸、高半胱氨酸、D型高半胱氨酸等。

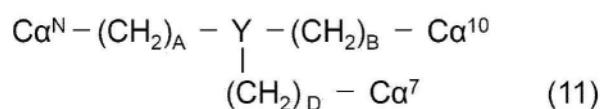
[0040] [9] 上述式(2)所包含的优选实施方式为: 由式(10)所示的氨基酸序列构成的环状肽或其药理学上可接受的盐。



式(10)中, X<sup>3</sup>与X<sup>7</sup>和X<sup>10</sup>之间通过共价键而在分子内形成2个环状结构, X<sup>3</sup>~X<sup>13</sup>如[1]所述。

[0041] 在一个实施方式中, X<sup>3</sup>表示半胱氨酸、D型半胱氨酸、高半胱氨酸、D型高半胱氨酸或3-巯基丙酸, X<sup>7</sup>和X<sup>10</sup>各自独立地表示半胱氨酸、D型半胱氨酸、高半胱氨酸或D型高半胱氨酸, X<sup>4</sup>和X<sup>8</sup>各自独立地表示具有芳香族碳环基的氨基酸残基, 优选酪氨酸、苯丙氨酸或者它们的衍生物, X<sup>5</sup>、X<sup>9</sup>、X<sup>12</sup>和X<sup>13</sup>各自独立地表示亮氨酸、异亮氨酸或者它们的衍生物, X<sup>11</sup>表示丝氨酸、苏氨酸、二氨基丙酸、二氨基丁酸或者它们的衍生物。

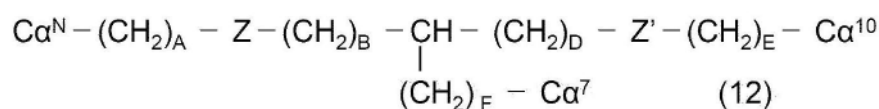
[0042] [10] 其中, 上述式(2)或式(10)所示的环状肽中, X<sup>1</sup>与X<sup>7</sup>与X<sup>10</sup>、X<sup>2</sup>与X<sup>7</sup>与X<sup>10</sup>、或X<sup>3</sup>与X<sup>7</sup>与X<sup>10</sup>的Ca碳原子之间的键优选具有下述式(11)所示的结构。



式中, N表示1、2或3中的任意者, A、B和D各自独立地表示1或2中的任意整数, Y表示[(S-CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>]、[(S-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C(=O))<sub>3</sub>-C<sub>3</sub>N<sub>3</sub>H<sub>6</sub>]、[(S-CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH)<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>]、[(NH-C(=O))<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>]、[(S-CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-C<sub>3</sub>N<sub>3</sub>H<sub>6</sub>]或[(S-CH<sub>2</sub>-C(=O))<sub>3</sub>-C<sub>3</sub>N<sub>3</sub>H<sub>6</sub>]。

[0043] 其中, Y优选表示[(S-CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>]。例如, 在X<sup>3</sup>为3-巯基丙酸(Mpa)、X<sup>7</sup>及X<sup>10</sup>均为半胱氨酸(Cys)等具有硫醇基的氨基酸残基的情况下, 通过这些残基所具有的硫醇基与1,3,5-三(溴甲基)苯等卤代烷基连接子之间的硫醚键, 能够将肽环化。

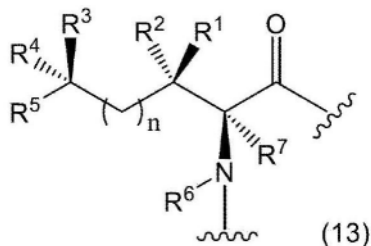
[0044] [11] 另外, 上述式(2)或式(10)所示的环状肽中, X<sup>1</sup>与X<sup>7</sup>与X<sup>10</sup>、X<sup>2</sup>与X<sup>7</sup>与X<sup>10</sup>、或X<sup>3</sup>与X<sup>7</sup>与X<sup>10</sup>的Ca碳原子之间的键优选具有下述式(12)所示的结构。



式中, N表示1、2或3中的任一者, A、B、D、E、F各自独立地表示1或2中的任意整数, Z和Z'各自独立地表示S、S-S、S-CH<sub>2</sub>-S、S-C(=CH<sub>2</sub>)-S、S-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-S、S-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-S、S-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-S、S-

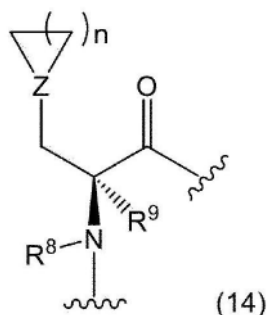
$\text{CH}_2\text{-CH=CH-CH}_2\text{-S-S-CH}_2\text{-C(=O)-NH,NH-C(=O)-CH}_2\text{-S,S-CH}_2\text{-C}_6\text{H}_4\text{-CH}_2\text{-S}$  (亚甲基在亚苯基环上的键合部位可为邻位、间位和对位中的任一种)、 $\text{S-CH}_2\text{-C}_6\text{H}_4\text{-C}_6\text{H}_4\text{-CH}_2\text{-S,S-CH}_2\text{-C}_{10}\text{H}_6\text{-CH}_2\text{-S,S-CH}_2\text{-C(=O)-CH}_2\text{-S}$  或  $\text{S-CH}_2\text{-C(=CH}_2\text{)-CH}_2\text{-S}$ 、或二硫代四氟苯。

[0045] [12] 在上述式 (1) ~ (3)、(5)、(7) 和 (10) 所示的环状肽中,  $X^5$ 、 $X^9$ 、 $X^{12}$  和  $X^{13}$  各自独立地优选为下述式 (13) 所示的氨基酸残基。



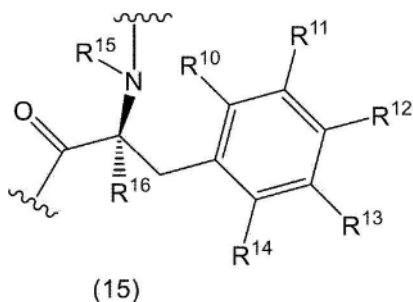
式中, 波浪线表示与形成主链的酰胺键的羰基或氮原子的连接点,  $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^6$  及  $R^7$  各自独立地表示氢原子或甲基,  $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$  各自独立地表示氢原子、甲基、或卤素原子 (F、Cl、Br、I),  $n$  表示 0 ~ 10 中的任意整数。其中, 特别优选的是亮氨酸、N-甲基化亮氨酸、 $\alpha$ -甲基化亮氨酸、异亮氨酸、 $\beta$ -高亮氨酸、正缬氨酸、正亮氨酸、2-氨基庚酸、2-氨基辛酸和 2-氨基壬酸等。

[0046] 或者,  $X^5$ 、 $X^9$ 、 $X^{12}$  及  $X^{13}$  可以是下述式 (14) 所示的氨基酸残基。



式中, 波浪线表示与形成主链的酰胺键的羰基或氮原子的连接点,  $Z$  表示 C 或 N,  $R^8$  及  $R^9$  表示氢原子或甲基,  $n$  表示 1 ~ 6 中的任意整数。其中, 特别优选环丙基丙氨酸和环丁基丙氨酸等。

[0047] [13] 上述式 (1) ~ (3)、(5)、(7) 和 (10) 所示的环状肽中,  $X^4$  优选为下述式 (15) 所示的氨基酸残基。

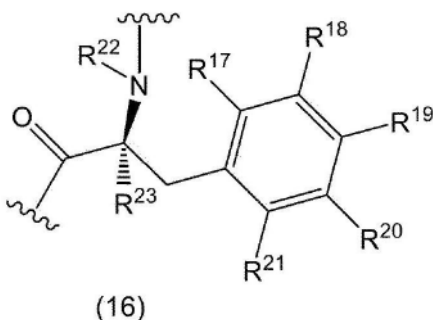


式中, 波浪线表示与形成主链的酰胺键的羰基或氮原子的连接点,  $R^{10}$ 、 $R^{11}$ 、 $R^{12}$ 、 $R^{13}$  及  $R^{14}$  各自独立地表示氢原子、羟基、羟甲基、甲氧基、甲氧基甲基、氨基、氨基甲基、单甲基化氨基、二甲基化氨基、三甲基化氨基、单甲基化氨基甲基、二甲基化氨基甲基、三甲基化氨基甲基、乙酰基、酰胺基、甲基、叔丁基、卤代甲基、或卤素原子 (F、Cl、Br、I),  $R^{15}$  及  $R^{16}$  表示氢原子或甲基。

[0048] 其中,  $X^4$  优选表示酪氨酸、3-羟基苯丙氨酸、4-氟苯丙氨酸、4-氨基苯丙氨酸、4-氨基甲基苯丙氨酸、4-酰胺苯丙氨酸、N-甲基化酪氨酸、 $\alpha$ -甲基化酪氨酸、O-甲基-酪氨酸、3-甲氧基-苯丙氨酸、4-乙酰基-苯丙氨酸。

[0049] [14] 另外, 在上述式 (1) ~ (3)、(5)、(7) 和 (10) 所示的环状肽中,  $X^8$  优选为包含可具有取代基的芳香族碳环基的氨基酸残基或它们的衍生物。

[0050] [15] 作为芳香族碳环基的  $X^8$  的具体的实施方式, 优选为下述式 (16) 所示的氨基酸残基。



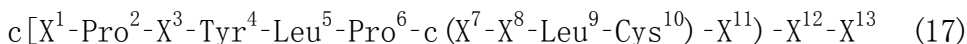
式中, 波浪线表示与形成主链的酰胺键的羰基或氮原子的连接点,  $R^{17}$ 、 $R^{18}$ 、 $R^{19}$ 、 $R^{20}$  及  $R^{21}$  各自独立地表示氢原子、羟基、羟甲基、甲氧基、甲氧基甲基、氨基、氨基甲基、单甲基化氨基、二甲基化氨基、三甲基化氨基、单甲基化氨基甲基、二甲基化氨基甲基、三甲基化氨基甲基、乙酰基、酰胺基、甲基、叔丁基、卤代甲基或卤素原子 (F、Cl、Br、I),  $R^{22}$  及  $R^{23}$  表示氢原子或甲基。

[0051] 其中, 进一步优选  $X^8$  表示酪氨酸、3-羟基苯丙氨酸、4-氟苯丙氨酸、4-氨基苯丙氨酸、4-氨基甲基苯丙氨酸、4-酰胺苯丙氨酸、N-甲基化酪氨酸、 $\alpha$ -甲基化酪氨酸、O-甲基-酪氨酸、3-甲氧基-苯丙氨酸、4-乙酰基-苯丙氨酸。

[0052] [16] 进而, 在上述式 (1) ~ (3)、(5)、(7) 和 (10) 所示的环状肽中,  $X^6$  优选表示甘氨酸、N-甲基化甘氨酸、丙氨酸、N-甲基化丙氨酸、D型丙氨酸、N-甲基化D型丙氨酸、2-氨基异丁酸、N-甲基化2-氨基异丁酸、2-氮杂环丁烷-2-羧酸、D型2-氮杂环丁烷-2-羧酸、脯氨酸、D型脯氨酸、硫代脯氨酸、D型硫代脯氨酸、3,4-脱氢脯氨酸、D型3,4-脱氢脯氨酸、2-哌啶酸、D型2-哌啶酸、或者它们的衍生物。

[0053] 其中, 进一步优选  $X^6$  表示脯氨酸、N-甲基化甘氨酸、N-甲基化丙氨酸、2-氮杂环丁烷-2-羧酸、2-哌啶酸。

[0054] [17] 本发明的一个实施方式中的环状肽由下述式 (17) 所示的氨基酸序列构成。



式 (17) 中,  $X^1$  表示半胱氨酸、Mpa (3-巯基丙酸) 或 D型半胱氨酸,  $X^3$  表示 N-甲基化甘氨酸、N-甲基化丙氨酸、2-氮杂环丁烷-2-羧酸、脯氨酸、羟脯氨酸、3,4-脱氢脯氨酸、2-哌啶酸、丝氨酸或赖氨酸,  $X^8$  表示酪氨酸、脯氨酸或精氨酸,  $X^7$  及  $X^{11}$  表示选自赖氨酸与天冬氨酸、鸟氨酸与谷氨酸、天冬氨酸与赖氨酸、谷氨酸与鸟氨酸、赖氨酸与谷氨酸、或谷氨酸与赖氨酸中的任意组合,  $X^{12}$  及  $X^{13}$  各自独立地表示亮氨酸、异亮氨酸或正亮氨酸,  $X^1$  与  $Cys^{10}$  在各自的侧链之间形成二硫键,  $X^7$  与  $X^{11}$  在各自的侧链之间形成酰胺键, 由此式 (17) 的肽在分子内具有 2 个环状结构, N 末端氨基及 C 末端羧基可被修饰, 也可缺失。

[0055] [18] 进一步优选的实施方式的环状肽中, 上述式 (17) 中,  $X^1$  表示半胱氨酸,  $X^3$  表示

脯氨酸或丝氨酸, X<sup>7</sup>表示赖氨酸, X<sup>8</sup>表示酪氨酸, X<sup>11</sup>表示天冬氨酸, 而且, X<sup>12</sup>和X<sup>13</sup>各自独立地表示亮氨酸、异亮氨酸或正亮氨酸。N末端氨基被乙酰化, C末端羧基被酰胺化。

[0056] 作为上述式 (17) 或式 (18) 中包含的各个环状肽, 例如可以举出以下的例子。

Ac-c[Cys<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Pro<sup>3</sup>-Tyr<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-Pro<sup>6</sup>-c(Lys<sup>7</sup>-Tyr<sup>8</sup>-Leu<sup>9</sup>-Cys<sup>10</sup>)-Asp<sup>11</sup>]-Leu<sup>12</sup>-Ile<sup>13</sup>-NH<sub>2</sub> (序列号10)

Ac-c[Cys<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Ser<sup>3</sup>-Tyr<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-Pro<sup>6</sup>-c(Lys<sup>7</sup>-Tyr<sup>8</sup>-Leu<sup>9</sup>-Cys<sup>10</sup>)-Asp<sup>11</sup>]-Leu<sup>12</sup>-Ile<sup>13</sup>-NH<sub>2</sub>

Ac-c[Cys<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Pro<sup>3</sup>-Tyr<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-Pro<sup>6</sup>-c(Orn<sup>7</sup>-Tyr<sup>8</sup>-Leu<sup>9</sup>-Cys<sup>10</sup>)-Glu<sup>11</sup>]-Leu<sup>12</sup>-Ile<sup>13</sup>-NH<sub>2</sub>

Ac-c[Cys<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Ser<sup>3</sup>-Tyr<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-Pro<sup>6</sup>-c(Orn<sup>7</sup>-Tyr<sup>8</sup>-Leu<sup>9</sup>-Cys<sup>10</sup>)-Glu<sup>11</sup>]-Leu<sup>12</sup>-Ile<sup>13</sup>-NH<sub>2</sub>

Ac-c[Cys<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Pro<sup>3</sup>-Tyr<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-Pro<sup>6</sup>-c(Asp<sup>7</sup>-Tyr<sup>8</sup>-Leu<sup>9</sup>-Cys<sup>10</sup>)-Lys<sup>11</sup>]-Leu<sup>12</sup>-Ile<sup>13</sup>-NH<sub>2</sub>

Ac-c[Cys<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Ser<sup>3</sup>-Tyr<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-Pro<sup>6</sup>-c(Asp<sup>7</sup>-Tyr<sup>8</sup>-Leu<sup>9</sup>-Cys<sup>10</sup>)-Lys<sup>11</sup>]-Leu<sup>12</sup>-Ile<sup>13</sup>-NH<sub>2</sub>

Ac-c[Cys<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Pro<sup>3</sup>-Tyr<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-Pro<sup>6</sup>-c(Glu<sup>7</sup>-Tyr<sup>8</sup>-Leu<sup>9</sup>-Cys<sup>10</sup>)-Orn<sup>11</sup>]-Leu<sup>12</sup>-Ile<sup>13</sup>-NH<sub>2</sub>

Ac-c[Cys<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Ser<sup>3</sup>-Tyr<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-Pro<sup>6</sup>-c(Glu<sup>7</sup>-Tyr<sup>8</sup>-Leu<sup>9</sup>-Cys<sup>10</sup>)-Orn<sup>11</sup>]-Leu<sup>12</sup>-Ile<sup>13</sup>-NH<sub>2</sub>

Ac-c[Cys<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Pro<sup>3</sup>-Tyr<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-Pro<sup>6</sup>-c(Lys<sup>7</sup>-Tyr<sup>8</sup>-Leu<sup>9</sup>-Cys<sup>10</sup>)-Asp<sup>11</sup>]-Leu<sup>12</sup>-Leu<sup>13</sup>-NH<sub>2</sub>

Ac-c[Cys<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Ser<sup>3</sup>-Tyr<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-Pro<sup>6</sup>-c(Lys<sup>7</sup>-Tyr<sup>8</sup>-Leu<sup>9</sup>-Cys<sup>10</sup>)-Asp<sup>11</sup>]-Leu<sup>12</sup>-Leu<sup>13</sup>-NH<sub>2</sub>

Ac-c[Cys<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Pro<sup>3</sup>-Tyr<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-Pro<sup>6</sup>-c(Orn<sup>7</sup>-Tyr<sup>8</sup>-Leu<sup>9</sup>-Cys<sup>10</sup>)-Glu<sup>11</sup>]-Leu<sup>12</sup>-Leu<sup>13</sup>-NH<sub>2</sub>

Ac-c[Cys<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Ser<sup>3</sup>-Tyr<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-Pro<sup>6</sup>-c(Orn<sup>7</sup>-Tyr<sup>8</sup>-Leu<sup>9</sup>-Cys<sup>10</sup>)-Glu<sup>11</sup>]-Leu<sup>12</sup>-Leu<sup>13</sup>-NH<sub>2</sub>

Ac-c[Cys<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Pro<sup>3</sup>-Tyr<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-Pro<sup>6</sup>-c(Asp<sup>7</sup>-Tyr<sup>8</sup>-Leu<sup>9</sup>-Cys<sup>10</sup>)-Lys<sup>11</sup>]-Leu<sup>12</sup>-Leu<sup>13</sup>-NH<sub>2</sub>

Ac-c[Cys<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Ser<sup>3</sup>-Tyr<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-Pro<sup>6</sup>-c(Asp<sup>7</sup>-Tyr<sup>8</sup>-Leu<sup>9</sup>-Cys<sup>10</sup>)-Lys<sup>11</sup>]-Leu<sup>12</sup>-Leu<sup>13</sup>-NH<sub>2</sub>

Ac-c[Cys<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Pro<sup>3</sup>-Tyr<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-Pro<sup>6</sup>-c(Glu<sup>7</sup>-Tyr<sup>8</sup>-Leu<sup>9</sup>-Cys<sup>10</sup>)-Orn<sup>11</sup>]-Leu<sup>12</sup>-Leu<sup>13</sup>-NH<sub>2</sub>

Ac-c[Cys<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Ser<sup>3</sup>-Tyr<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-Pro<sup>6</sup>-c(Glu<sup>7</sup>-Tyr<sup>8</sup>-Leu<sup>9</sup>-Cys<sup>10</sup>)-Orn<sup>11</sup>]-Leu<sup>12</sup>-Leu<sup>13</sup>-NH<sub>2</sub>

Ac-c[Cys<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Pro<sup>3</sup>-Tyr<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-Pro<sup>6</sup>-c(Lys<sup>7</sup>-Tyr<sup>8</sup>-Leu<sup>9</sup>-Cys<sup>10</sup>)-Asp<sup>11</sup>]-Nle<sup>12</sup>-Ile<sup>13</sup>-NH<sub>2</sub>

Ac-c[Cys<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Ser<sup>3</sup>-Tyr<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-Pro<sup>6</sup>-c(Lys<sup>7</sup>-Tyr<sup>8</sup>-Leu<sup>9</sup>-Cys<sup>10</sup>)-Asp<sup>11</sup>]-Nle<sup>12</sup>-Ile<sup>13</sup>-NH<sub>2</sub>

Ac-c[Cys<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Pro<sup>3</sup>-Tyr<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-Pro<sup>6</sup>-c(Orn<sup>7</sup>-Tyr<sup>8</sup>-Leu<sup>9</sup>-Cys<sup>10</sup>)-Glu<sup>11</sup>]-Nle<sup>12</sup>-  
 Ile<sup>13</sup>-NH<sub>2</sub>  
 Ac-c[Cys<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Ser<sup>3</sup>-Tyr<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-Pro<sup>6</sup>-c(Orn<sup>7</sup>-Tyr<sup>8</sup>-Leu<sup>9</sup>-Cys<sup>10</sup>)-Glu<sup>11</sup>]-Nle<sup>12</sup>-  
 Ile<sup>13</sup>-NH<sub>2</sub>  
 Ac-c[Cys<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Pro<sup>3</sup>-Tyr<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-Pro<sup>6</sup>-c(Asp<sup>7</sup>-Tyr<sup>8</sup>-Leu<sup>9</sup>-Cys<sup>10</sup>)-Lys<sup>11</sup>]-Nle<sup>12</sup>-  
 Ile<sup>13</sup>-NH<sub>2</sub>  
 Ac-c[Cys<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Ser<sup>3</sup>-Tyr<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-Pro<sup>6</sup>-c(Asp<sup>7</sup>-Tyr<sup>8</sup>-Leu<sup>9</sup>-Cys<sup>10</sup>)-Lys<sup>11</sup>]-Nle<sup>12</sup>-  
 Ile<sup>13</sup>-NH<sub>2</sub>  
 Ac-c[Cys<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Pro<sup>3</sup>-Tyr<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-Pro<sup>6</sup>-c(Glu<sup>7</sup>-Tyr<sup>8</sup>-Leu<sup>9</sup>-Cys<sup>10</sup>)-Orn<sup>11</sup>]-Nle<sup>12</sup>-  
 Ile<sup>13</sup>-NH<sub>2</sub>  
 Ac-c[Cys<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Ser<sup>3</sup>-Tyr<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-Pro<sup>6</sup>-c(Glu<sup>7</sup>-Tyr<sup>8</sup>-Leu<sup>9</sup>-Cys<sup>10</sup>)-Orn<sup>11</sup>]-Nle<sup>12</sup>-  
 Ile<sup>13</sup>-NH<sub>2</sub>  
 Ac-c[Cys<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Pro<sup>3</sup>-Tyr<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-Pro<sup>6</sup>-c(Lys<sup>7</sup>-Tyr<sup>8</sup>-Leu<sup>9</sup>-Cys<sup>10</sup>)-Asp<sup>11</sup>]-Nle<sup>12</sup>-  
 Leu<sup>13</sup>-NH<sub>2</sub>  
 Ac-c[Cys<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Ser<sup>3</sup>-Tyr<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-Pro<sup>6</sup>-c(Lys<sup>7</sup>-Tyr<sup>8</sup>-Leu<sup>9</sup>-Cys<sup>10</sup>)-Asp<sup>11</sup>]-Nle<sup>12</sup>-  
 Leu<sup>13</sup>-NH<sub>2</sub>  
 Ac-c[Cys<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Pro<sup>3</sup>-Tyr<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-Pro<sup>6</sup>-c(Orn<sup>7</sup>-Tyr<sup>8</sup>-Leu<sup>9</sup>-Cys<sup>10</sup>)-Glu<sup>11</sup>]-Nle<sup>12</sup>-  
 Leu<sup>13</sup>-NH<sub>2</sub>  
 Ac-c[Cys<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Ser<sup>3</sup>-Tyr<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-Pro<sup>6</sup>-c(Orn<sup>7</sup>-Tyr<sup>8</sup>-Leu<sup>9</sup>-Cys<sup>10</sup>)-Glu<sup>11</sup>]-Nle<sup>12</sup>-  
 Leu<sup>13</sup>-NH<sub>2</sub>  
 Ac-c[Cys<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Pro<sup>3</sup>-Tyr<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-Pro<sup>6</sup>-c(Asp<sup>7</sup>-Tyr<sup>8</sup>-Leu<sup>9</sup>-Cys<sup>10</sup>)-Lys<sup>11</sup>]-Nle<sup>12</sup>-  
 Leu<sup>13</sup>-NH<sub>2</sub>  
 Ac-c[Cys<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Ser<sup>3</sup>-Tyr<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-Pro<sup>6</sup>-c(Asp<sup>7</sup>-Tyr<sup>8</sup>-Leu<sup>9</sup>-Cys<sup>10</sup>)-Lys<sup>11</sup>]-Nle<sup>12</sup>-  
 Leu<sup>13</sup>-NH<sub>2</sub>  
 Ac-c[Cys<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Pro<sup>3</sup>-Tyr<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-Pro<sup>6</sup>-c(Glu<sup>7</sup>-Tyr<sup>8</sup>-Leu<sup>9</sup>-Cys<sup>10</sup>)-Orn<sup>11</sup>]-Nle<sup>12</sup>-  
 Leu<sup>13</sup>-NH<sub>2</sub>  
 Ac-c[Cys<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Ser<sup>3</sup>-Tyr<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-Pro<sup>6</sup>-c(Glu<sup>7</sup>-Tyr<sup>8</sup>-Leu<sup>9</sup>-Cys<sup>10</sup>)-Orn<sup>11</sup>]-Nle<sup>12</sup>-  
 Leu<sup>13</sup>-NH<sub>2</sub>  
 [0057] Ac-c[Cys<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Pro<sup>3</sup>-Arg<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-Pro<sup>6</sup>-c(Lys<sup>7</sup>-Arg<sup>8</sup>-Leu<sup>9</sup>-Cys<sup>10</sup>)-Asp<sup>11</sup>]-Leu<sup>12</sup>-  
 Ile<sup>13</sup>-NH<sub>2</sub>  
 Ac-c[Cys<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Ser<sup>3</sup>-Arg<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-Pro<sup>6</sup>-c(Lys<sup>7</sup>-Arg<sup>8</sup>-Leu<sup>9</sup>-Cys<sup>10</sup>)-Asp<sup>11</sup>]-Leu<sup>12</sup>-  
 Ile<sup>13</sup>-NH<sub>2</sub>  
 Ac-c[Cys<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Pro<sup>3</sup>-Arg<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-Pro<sup>6</sup>-c(Orn<sup>7</sup>-Arg<sup>8</sup>-Leu<sup>9</sup>-Cys<sup>10</sup>)-Glu<sup>11</sup>]-Leu<sup>12</sup>-  
 Ile<sup>13</sup>-NH<sub>2</sub>  
 Ac-c[Cys<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Ser<sup>3</sup>-Arg<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-Pro<sup>6</sup>-c(Orn<sup>7</sup>-Arg<sup>8</sup>-Leu<sup>9</sup>-Cys<sup>10</sup>)-Glu<sup>11</sup>]-Leu<sup>12</sup>-  
 Ile<sup>13</sup>-NH<sub>2</sub>  
 Ac-c[Cys<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Pro<sup>3</sup>-Arg<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-Pro<sup>6</sup>-c(Asp<sup>7</sup>-Arg<sup>8</sup>-Leu<sup>9</sup>-Cys<sup>10</sup>)-Lys<sup>11</sup>]-Leu<sup>12</sup>-  
 Ile<sup>13</sup>-NH<sub>2</sub>  
 Ac-c[Cys<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Ser<sup>3</sup>-Arg<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-Pro<sup>6</sup>-c(Asp<sup>7</sup>-Arg<sup>8</sup>-Leu<sup>9</sup>-Cys<sup>10</sup>)-Lys<sup>11</sup>]-Leu<sup>12</sup>-

Ile<sup>13</sup>-NH<sub>2</sub>  
 Ac-c[Cys<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Pro<sup>3</sup>-Arg<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-Pro<sup>6</sup>-c (Glu<sup>7</sup>-Arg<sup>8</sup>-Leu<sup>9</sup>-Cys<sup>10</sup>)-Orn<sup>11</sup>)-Leu<sup>12</sup>-  
 Ile<sup>13</sup>-NH<sub>2</sub>  
 Ac-c[Cys<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Ser<sup>3</sup>-Arg<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-Pro<sup>6</sup>-c (Glu<sup>7</sup>-Arg<sup>8</sup>-Leu<sup>9</sup>-Cys<sup>10</sup>)-Orn<sup>11</sup>)-Leu<sup>12</sup>-  
 Ile<sup>13</sup>-NH<sub>2</sub>  
 Ac-c[Cys<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Pro<sup>3</sup>-Arg<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-Pro<sup>6</sup>-c (Lys<sup>7</sup>-Arg<sup>8</sup>-Leu<sup>9</sup>-Cys<sup>10</sup>)-Asp<sup>11</sup>)-Leu<sup>12</sup>-  
 Leu<sup>13</sup>-NH<sub>2</sub>  
 Ac-c[Cys<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Ser<sup>3</sup>-Arg<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-Pro<sup>6</sup>-c (Lys<sup>7</sup>-Arg<sup>8</sup>-Leu<sup>9</sup>-Cys<sup>10</sup>)-Asp<sup>11</sup>)-Leu<sup>12</sup>-  
 Leu<sup>13</sup>-NH<sub>2</sub>  
 Ac-c[Cys<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Pro<sup>3</sup>-Arg<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-Pro<sup>6</sup>-c (Orn<sup>7</sup>-Arg<sup>8</sup>-Leu<sup>9</sup>-Cys<sup>10</sup>)-Glu<sup>11</sup>)-Leu<sup>12</sup>-  
 Leu<sup>13</sup>-NH<sub>2</sub>  
 Ac-c[Cys<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Ser<sup>3</sup>-Arg<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-Pro<sup>6</sup>-c (Orn<sup>7</sup>-Arg<sup>8</sup>-Leu<sup>9</sup>-Cys<sup>10</sup>)-Glu<sup>11</sup>)-Leu<sup>12</sup>-  
 Leu<sup>13</sup>-NH<sub>2</sub>  
 Ac-c[Cys<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Pro<sup>3</sup>-Arg<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-Pro<sup>6</sup>-c (Asp<sup>7</sup>-Arg<sup>8</sup>-Leu<sup>9</sup>-Cys<sup>10</sup>)-Lys<sup>11</sup>)-Leu<sup>12</sup>-  
 Leu<sup>13</sup>-NH<sub>2</sub>  
 Ac-c[Cys<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Ser<sup>3</sup>-Arg<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-Pro<sup>6</sup>-c (Asp<sup>7</sup>-Arg<sup>8</sup>-Leu<sup>9</sup>-Cys<sup>10</sup>)-Lys<sup>11</sup>)-Leu<sup>12</sup>-  
 Leu<sup>13</sup>-NH<sub>2</sub>  
 Ac-c[Cys<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Pro<sup>3</sup>-Arg<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-Pro<sup>6</sup>-c (Glu<sup>7</sup>-Arg<sup>8</sup>-Leu<sup>9</sup>-Cys<sup>10</sup>)-Orn<sup>11</sup>)-Leu<sup>12</sup>-  
 Leu<sup>13</sup>-NH<sub>2</sub>  
 Ac-c[Cys<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Ser<sup>3</sup>-Arg<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-Pro<sup>6</sup>-c (Glu<sup>7</sup>-Arg<sup>8</sup>-Leu<sup>9</sup>-Cys<sup>10</sup>)-Orn<sup>11</sup>)-Leu<sup>12</sup>-  
 Leu<sup>13</sup>-NH<sub>2</sub>  
 Ac-c[Cys<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Pro<sup>3</sup>-Arg<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-Pro<sup>6</sup>-c (Lys<sup>7</sup>-Arg<sup>8</sup>-Leu<sup>9</sup>-Cys<sup>10</sup>)-Asp<sup>11</sup>)-Nle<sup>12</sup>-  
 Ile<sup>13</sup>-NH<sub>2</sub>  
 Ac-c[Cys<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Ser<sup>3</sup>-Arg<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-Pro<sup>6</sup>-c (Lys<sup>7</sup>-Arg<sup>8</sup>-Leu<sup>9</sup>-Cys<sup>10</sup>)-Asp<sup>11</sup>)-Nle<sup>12</sup>-  
 Ile<sup>13</sup>-NH<sub>2</sub>  
 Ac-c[Cys<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Pro<sup>3</sup>-Arg<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-Pro<sup>6</sup>-c (Orn<sup>7</sup>-Arg<sup>8</sup>-Leu<sup>9</sup>-Cys<sup>10</sup>)-Glu<sup>11</sup>)-Nle<sup>12</sup>-  
 Ile<sup>13</sup>-NH<sub>2</sub>  
 Ac-c[Cys<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Ser<sup>3</sup>-Arg<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-Pro<sup>6</sup>-c (Orn<sup>7</sup>-Arg<sup>8</sup>-Leu<sup>9</sup>-Cys<sup>10</sup>)-Glu<sup>11</sup>)-Nle<sup>12</sup>-  
 Ile<sup>13</sup>-NH<sub>2</sub>  
 Ac-c[Cys<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Pro<sup>3</sup>-Arg<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-Pro<sup>6</sup>-c (Asp<sup>7</sup>-Arg<sup>8</sup>-Leu<sup>9</sup>-Cys<sup>10</sup>)-Lys<sup>11</sup>)-Nle<sup>12</sup>-  
 Ile<sup>13</sup>-NH<sub>2</sub>  
 Ac-c[Cys<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Ser<sup>3</sup>-Arg<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-Pro<sup>6</sup>-c (Asp<sup>7</sup>-Arg<sup>8</sup>-Leu<sup>9</sup>-Cys<sup>10</sup>)-Lys<sup>11</sup>)-Nle<sup>12</sup>-  
 Ile<sup>13</sup>-NH<sub>2</sub>  
 Ac-c[Cys<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Pro<sup>3</sup>-Arg<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-Pro<sup>6</sup>-c (Glu<sup>7</sup>-Arg<sup>8</sup>-Leu<sup>9</sup>-Cys<sup>10</sup>)-Orn<sup>11</sup>)-Nle<sup>12</sup>-  
 Ile<sup>13</sup>-NH<sub>2</sub>  
 Ac-c[Cys<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Ser<sup>3</sup>-Arg<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-Pro<sup>6</sup>-c (Glu<sup>7</sup>-Arg<sup>8</sup>-Leu<sup>9</sup>-Cys<sup>10</sup>)-Orn<sup>11</sup>)-Nle<sup>12</sup>-  
 Ile<sup>13</sup>-NH<sub>2</sub>  
 Ac-c[Cys<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Pro<sup>3</sup>-Arg<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-Pro<sup>6</sup>-c (Lys<sup>7</sup>-Arg<sup>8</sup>-Leu<sup>9</sup>-Cys<sup>10</sup>)-Asp<sup>11</sup>)-Nle<sup>12</sup>-  
 Leu<sup>13</sup>-NH<sub>2</sub>  
 Ac-c[Cys<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Pro<sup>3</sup>-Arg<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-Pro<sup>6</sup>-c (Lys<sup>7</sup>-Arg<sup>8</sup>-Leu<sup>9</sup>-Cys<sup>10</sup>)-Asp<sup>11</sup>)-Nle<sup>12</sup>-

Ac-c[Cys<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Ser<sup>3</sup>-Arg<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-Pro<sup>6</sup>-c(Lys<sup>7</sup>-Arg<sup>8</sup>-Leu<sup>9</sup>-Cys<sup>10</sup>)-Asp<sup>11</sup>]-Nle<sup>12</sup>-  
 Leu<sup>13</sup>-NH<sub>2</sub>  
 Ac-c[Cys<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Pro<sup>3</sup>-Arg<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-Pro<sup>6</sup>-c(Orn<sup>7</sup>-Arg<sup>8</sup>-Leu<sup>9</sup>-Cys<sup>10</sup>)-Glu<sup>11</sup>]-Nle<sup>12</sup>-  
 Leu<sup>13</sup>-NH<sub>2</sub>  
 Ac-c[Cys<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Ser<sup>3</sup>-Arg<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-Pro<sup>6</sup>-c(Orn<sup>7</sup>-Arg<sup>8</sup>-Leu<sup>9</sup>-Cys<sup>10</sup>)-Glu<sup>11</sup>]-Nle<sup>12</sup>-  
 Leu<sup>13</sup>-NH<sub>2</sub>  
 Ac-c[Cys<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Pro<sup>3</sup>-Arg<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-Pro<sup>6</sup>-c(Asp<sup>7</sup>-Arg<sup>8</sup>-Leu<sup>9</sup>-Cys<sup>10</sup>)-Lys<sup>11</sup>]-Nle<sup>12</sup>-  
 Leu<sup>13</sup>-NH<sub>2</sub>  
 Ac-c[Cys<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Ser<sup>3</sup>-Arg<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-Pro<sup>6</sup>-c(Asp<sup>7</sup>-Arg<sup>8</sup>-Leu<sup>9</sup>-Cys<sup>10</sup>)-Lys<sup>11</sup>]-Nle<sup>12</sup>-  
 Leu<sup>13</sup>-NH<sub>2</sub>  
 Ac-c[Cys<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Pro<sup>3</sup>-Arg<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-Pro<sup>6</sup>-c(Glu<sup>7</sup>-Arg<sup>8</sup>-Leu<sup>9</sup>-Cys<sup>10</sup>)-Orn<sup>11</sup>]-Nle<sup>12</sup>-  
 Leu<sup>13</sup>-NH<sub>2</sub>  
 Ac-c[Cys<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Ser<sup>3</sup>-Arg<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-Pro<sup>6</sup>-c(Glu<sup>7</sup>-Arg<sup>8</sup>-Leu<sup>9</sup>-Cys<sup>10</sup>)-Orn<sup>11</sup>]-Nle<sup>12</sup>-  
 Leu<sup>13</sup>-NH<sub>2</sub>  
 [0058] Ac-c[Cys<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Pro<sup>3</sup>-Arg<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-Pro<sup>6</sup>-c(Lys<sup>7</sup>-Pro<sup>8</sup>-Leu<sup>9</sup>-Cys<sup>10</sup>)-Asp<sup>11</sup>]-Leu<sup>12</sup>-  
 Ile<sup>13</sup>-NH<sub>2</sub>  
 Ac-c[Cys<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Ser<sup>3</sup>-Arg<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-Pro<sup>6</sup>-c(Lys<sup>7</sup>-Pro<sup>8</sup>-Leu<sup>9</sup>-Cys<sup>10</sup>)-Asp<sup>11</sup>]-Leu<sup>12</sup>-  
 Ile<sup>13</sup>-NH<sub>2</sub>  
 Ac-c[Cys<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Pro<sup>3</sup>-Arg<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-Pro<sup>6</sup>-c(Orn<sup>7</sup>-Pro<sup>8</sup>-Leu<sup>9</sup>-Cys<sup>10</sup>)-Glu<sup>11</sup>]-Leu<sup>12</sup>-  
 Ile<sup>13</sup>-NH<sub>2</sub>  
 Ac-c[Cys<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Ser<sup>3</sup>-Arg<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-Pro<sup>6</sup>-c(Orn<sup>7</sup>-Pro<sup>8</sup>-Leu<sup>9</sup>-Cys<sup>10</sup>)-Glu<sup>11</sup>]-Leu<sup>12</sup>-  
 Ile<sup>13</sup>-NH<sub>2</sub>  
 Ac-c[Cys<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Pro<sup>3</sup>-Arg<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-Pro<sup>6</sup>-c(Asp<sup>7</sup>-Pro<sup>8</sup>-Leu<sup>9</sup>-Cys<sup>10</sup>)-Lys<sup>11</sup>]-Leu<sup>12</sup>-  
 Ile<sup>13</sup>-NH<sub>2</sub>  
 Ac-c[Cys<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Ser<sup>3</sup>-Arg<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-Pro<sup>6</sup>-c(Asp<sup>7</sup>-Pro<sup>8</sup>-Leu<sup>9</sup>-Cys<sup>10</sup>)-Lys<sup>11</sup>]-Leu<sup>12</sup>-  
 Ile<sup>13</sup>-NH<sub>2</sub>  
 Ac-c[Cys<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Pro<sup>3</sup>-Arg<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-Pro<sup>6</sup>-c(Glu<sup>7</sup>-Pro<sup>8</sup>-Leu<sup>9</sup>-Cys<sup>10</sup>)-Orn<sup>11</sup>]-Leu<sup>12</sup>-  
 Ile<sup>13</sup>-NH<sub>2</sub>  
 Ac-c[Cys<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Ser<sup>3</sup>-Arg<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-Pro<sup>6</sup>-c(Glu<sup>7</sup>-Pro<sup>8</sup>-Leu<sup>9</sup>-Cys<sup>10</sup>)-Orn<sup>11</sup>]-Leu<sup>12</sup>-  
 Ile<sup>13</sup>-NH<sub>2</sub>  
 Ac-c[Cys<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Pro<sup>3</sup>-Arg<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-Pro<sup>6</sup>-c(Lys<sup>7</sup>-Pro<sup>8</sup>-Leu<sup>9</sup>-Cys<sup>10</sup>)-Asp<sup>11</sup>]-Leu<sup>12</sup>-  
 Leu<sup>13</sup>-NH<sub>2</sub>  
 Ac-c[Cys<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Ser<sup>3</sup>-Arg<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-Pro<sup>6</sup>-c(Lys<sup>7</sup>-Pro<sup>8</sup>-Leu<sup>9</sup>-Cys<sup>10</sup>)-Asp<sup>11</sup>]-Leu<sup>12</sup>-  
 Leu<sup>13</sup>-NH<sub>2</sub>  
 Ac-c[Cys<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Pro<sup>3</sup>-Arg<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-Pro<sup>6</sup>-c(Orn<sup>7</sup>-Pro<sup>8</sup>-Leu<sup>9</sup>-Cys<sup>10</sup>)-Glu<sup>11</sup>]-Leu<sup>12</sup>-  
 Leu<sup>13</sup>-NH<sub>2</sub>  
 Ac-c[Cys<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Ser<sup>3</sup>-Arg<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-Pro<sup>6</sup>-c(Orn<sup>7</sup>-Pro<sup>8</sup>-Leu<sup>9</sup>-Cys<sup>10</sup>)-Glu<sup>11</sup>]-Leu<sup>12</sup>-  
 Leu<sup>13</sup>-NH<sub>2</sub>  
 Ac-c[Cys<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Pro<sup>3</sup>-Arg<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-Pro<sup>6</sup>-c(Asp<sup>7</sup>-Pro<sup>8</sup>-Leu<sup>9</sup>-Cys<sup>10</sup>)-Lys<sup>11</sup>]-Leu<sup>12</sup>-  
 Leu<sup>13</sup>-NH<sub>2</sub>



[0001] Ac-c[Cys<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Pro<sup>3</sup>-Tyr<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-Pro<sup>6</sup>-c(Lys<sup>7</sup>-Tyr<sup>8</sup>-Leu<sup>9</sup>-Cys<sup>10</sup>)-Glu<sup>11</sup>]-Leu<sup>12</sup>-Ile<sup>13</sup>-NH<sub>2</sub>  
 Ac-c[Cys<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Pro<sup>3</sup>-Tyr<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-Pro<sup>6</sup>-c(Lys<sup>7</sup>-Tyr<sup>8</sup>-Leu<sup>9</sup>-Cys<sup>10</sup>)-Glu<sup>11</sup>]-Leu<sup>12</sup>-Leu<sup>13</sup>-NH<sub>2</sub>  
 Ac-c[Cys<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Pro<sup>3</sup>-Tyr<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-Pro<sup>6</sup>-c(Lys<sup>7</sup>-Tyr<sup>8</sup>-Leu<sup>9</sup>-Cys<sup>10</sup>)-Glu<sup>11</sup>]-Nle<sup>12</sup>-Ile<sup>13</sup>-NH<sub>2</sub>  
 Ac-c[Cys<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Pro<sup>3</sup>-Tyr<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-Pro<sup>6</sup>-c(Lys<sup>7</sup>-Tyr<sup>8</sup>-Leu<sup>9</sup>-Cys<sup>10</sup>)-Glu<sup>11</sup>]-Nle<sup>12</sup>-Leu<sup>13</sup>-NH<sub>2</sub>  
 Ac-c[Cys<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Ser<sup>3</sup>-Tyr<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-Pro<sup>6</sup>-c(Lys<sup>7</sup>-Tyr<sup>8</sup>-Leu<sup>9</sup>-Cys<sup>10</sup>)-Glu<sup>11</sup>]-Leu<sup>12</sup>-Ile<sup>13</sup>-NH<sub>2</sub>  
 Ac-c[Cys<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Ser<sup>3</sup>-Tyr<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-Pro<sup>6</sup>-c(Lys<sup>7</sup>-Tyr<sup>8</sup>-Leu<sup>9</sup>-Cys<sup>10</sup>)-Glu<sup>11</sup>]-Leu<sup>12</sup>-Leu<sup>13</sup>-NH<sub>2</sub>  
 Ac-c[Cys<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Ser<sup>3</sup>-Tyr<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-Pro<sup>6</sup>-c(Lys<sup>7</sup>-Tyr<sup>8</sup>-Leu<sup>9</sup>-Cys<sup>10</sup>)-Glu<sup>11</sup>]-Nle<sup>12</sup>-Ile<sup>13</sup>-NH<sub>2</sub>  
 Ac-c[Cys<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Ser<sup>3</sup>-Tyr<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-Pro<sup>6</sup>-c(Lys<sup>7</sup>-Tyr<sup>8</sup>-Leu<sup>9</sup>-Cys<sup>10</sup>)-Glu<sup>11</sup>]-Nle<sup>12</sup>-Leu<sup>13</sup>-NH<sub>2</sub>  
 Ac-c[Cys<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Pro<sup>3</sup>-Tyr<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-Pro<sup>6</sup>-c(Lys<sup>7</sup>-Arg<sup>8</sup>-Leu<sup>9</sup>-Cys<sup>10</sup>)-Glu<sup>11</sup>]-Leu<sup>12</sup>-Ile<sup>13</sup>-NH<sub>2</sub>  
 Ac-c[Cys<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Pro<sup>3</sup>-Tyr<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-Pro<sup>6</sup>-c(Lys<sup>7</sup>-Arg<sup>8</sup>-Leu<sup>9</sup>-Cys<sup>10</sup>)-Glu<sup>11</sup>]-Leu<sup>12</sup>-Leu<sup>13</sup>-NH<sub>2</sub>  
 Ac-c[Cys<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Pro<sup>3</sup>-Tyr<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-Pro<sup>6</sup>-c(Lys<sup>7</sup>-Arg<sup>8</sup>-Leu<sup>9</sup>-Cys<sup>10</sup>)-Glu<sup>11</sup>]-Nle<sup>12</sup>-Ile<sup>13</sup>-NH<sub>2</sub>  
 Ac-c[Cys<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Pro<sup>3</sup>-Tyr<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-Pro<sup>6</sup>-c(Lys<sup>7</sup>-Arg<sup>8</sup>-Leu<sup>9</sup>-Cys<sup>10</sup>)-Glu<sup>11</sup>]-Nle<sup>12</sup>-Leu<sup>13</sup>-NH<sub>2</sub>  
 Ac-c[Cys<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Ser<sup>3</sup>-Tyr<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-Pro<sup>6</sup>-c(Lys<sup>7</sup>-Arg<sup>8</sup>-Leu<sup>9</sup>-Cys<sup>10</sup>)-Glu<sup>11</sup>]-Leu<sup>12</sup>-Ile<sup>13</sup>-NH<sub>2</sub>  
 Ac-c[Cys<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Ser<sup>3</sup>-Tyr<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-Pro<sup>6</sup>-c(Lys<sup>7</sup>-Arg<sup>8</sup>-Leu<sup>9</sup>-Cys<sup>10</sup>)-Glu<sup>11</sup>]-Leu<sup>12</sup>-Leu<sup>13</sup>-NH<sub>2</sub>  
 Ac-c[Cys<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Ser<sup>3</sup>-Tyr<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-Pro<sup>6</sup>-c(Lys<sup>7</sup>-Arg<sup>8</sup>-Leu<sup>9</sup>-Cys<sup>10</sup>)-Glu<sup>11</sup>]-Nle<sup>12</sup>-Ile<sup>13</sup>-NH<sub>2</sub>  
 Ac-c[Cys<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Ser<sup>3</sup>-Tyr<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-Pro<sup>6</sup>-c(Lys<sup>7</sup>-Arg<sup>8</sup>-Leu<sup>9</sup>-Cys<sup>10</sup>)-Glu<sup>11</sup>]-Nle<sup>12</sup>-Leu<sup>13</sup>-NH<sub>2</sub>  
 Ac-c[Cys<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Pro<sup>3</sup>-Tyr<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-Pro<sup>6</sup>-c(Lys<sup>7</sup>-Pro<sup>8</sup>-Leu<sup>9</sup>-Cys<sup>10</sup>)-Glu<sup>11</sup>]-Leu<sup>12</sup>-Ile<sup>13</sup>-NH<sub>2</sub>  
 Ac-c[Cys<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Pro<sup>3</sup>-Tyr<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-Pro<sup>6</sup>-c(Lys<sup>7</sup>-Pro<sup>8</sup>-Leu<sup>9</sup>-Cys<sup>10</sup>)-Glu<sup>11</sup>]-Leu<sup>12</sup>-Leu<sup>13</sup>-NH<sub>2</sub>  
 Ac-c[Cys<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Pro<sup>3</sup>-Tyr<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-Pro<sup>6</sup>-c(Lys<sup>7</sup>-Pro<sup>8</sup>-Leu<sup>9</sup>-Cys<sup>10</sup>)-Glu<sup>11</sup>]-Nle<sup>12</sup>-Ile<sup>13</sup>-NH<sub>2</sub>  
 Ac-c[Cys<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Pro<sup>3</sup>-Tyr<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-Pro<sup>6</sup>-c(Lys<sup>7</sup>-Pro<sup>8</sup>-Leu<sup>9</sup>-Cys<sup>10</sup>)-Glu<sup>11</sup>]-Nle<sup>12</sup>-Leu<sup>13</sup>-NH<sub>2</sub>



Ac-c[Cys<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Ser<sup>3</sup>-Tyr<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-Pro<sup>6</sup>-c(Glu<sup>7</sup>-Arg<sup>8</sup>-Leu<sup>9</sup>-Cys<sup>10</sup>)-Lys<sup>11</sup>)-Nle<sup>12</sup>-Leu<sup>13</sup>-NH<sub>2</sub>

Ac-c[Cys<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Pro<sup>3</sup>-Tyr<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-Pro<sup>6</sup>-c(Glu<sup>7</sup>-Pro<sup>8</sup>-Leu<sup>9</sup>-Cys<sup>10</sup>)-Lys<sup>11</sup>)-Leu<sup>12</sup>-Ile<sup>13</sup>-NH<sub>2</sub>

Ac-c[Cys<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Pro<sup>3</sup>-Tyr<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-Pro<sup>6</sup>-c(Glu<sup>7</sup>-Pro<sup>8</sup>-Leu<sup>9</sup>-Cys<sup>10</sup>)-Lys<sup>11</sup>)-Leu<sup>12</sup>-Leu<sup>13</sup>-NH<sub>2</sub>

Ac-c[Cys<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Pro<sup>3</sup>-Tyr<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-Pro<sup>6</sup>-c(Glu<sup>7</sup>-Pro<sup>8</sup>-Leu<sup>9</sup>-Cys<sup>10</sup>)-Lys<sup>11</sup>)-Nle<sup>12</sup>-Ile<sup>13</sup>-NH<sub>2</sub>

Ac-c[Cys<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Pro<sup>3</sup>-Tyr<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-Pro<sup>6</sup>-c(Glu<sup>7</sup>-Pro<sup>8</sup>-Leu<sup>9</sup>-Cys<sup>10</sup>)-Lys<sup>11</sup>)-Nle<sup>12</sup>-Leu<sup>13</sup>-NH<sub>2</sub>

Ac-c[Cys<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Ser<sup>3</sup>-Tyr<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-Pro<sup>6</sup>-c(Glu<sup>7</sup>-Pro<sup>8</sup>-Leu<sup>9</sup>-Cys<sup>10</sup>)-Lys<sup>11</sup>)-Leu<sup>12</sup>-Ile<sup>13</sup>-NH<sub>2</sub>

Ac-c[Cys<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Ser<sup>3</sup>-Tyr<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-Pro<sup>6</sup>-c(Glu<sup>7</sup>-Pro<sup>8</sup>-Leu<sup>9</sup>-Cys<sup>10</sup>)-Lys<sup>11</sup>)-Leu<sup>12</sup>-Leu<sup>13</sup>-NH<sub>2</sub>

Ac-c[Cys<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Ser<sup>3</sup>-Tyr<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-Pro<sup>6</sup>-c(Glu<sup>7</sup>-Pro<sup>8</sup>-Leu<sup>9</sup>-Cys<sup>10</sup>)-Lys<sup>11</sup>)-Nle<sup>12</sup>-Ile<sup>13</sup>-NH<sub>2</sub>

Ac-c[Cys<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Ser<sup>3</sup>-Tyr<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-Pro<sup>6</sup>-c(Glu<sup>7</sup>-Pro<sup>8</sup>-Leu<sup>9</sup>-Cys<sup>10</sup>)-Lys<sup>11</sup>)-Nle<sup>12</sup>-Leu<sup>13</sup>-NH<sub>2</sub>

[0060] 本发明的肽包括：在上述[1]～[17]所示的氨基酸序列中缺失、添加和/或置换1～数个氨基酸的具有同源性且具有对VIPR2的结合活性的肽。本说明书中，言及“缺失、添加和/或置换1～数个氨基酸的肽”时，这些氨基酸的个数只要该肽具有VIPR2结合活性就没有特别限定，优选为1～5个，进一步优选为1个或2个。缺失、添加和/或置换的位置可以是肽的末端也可以是中间，可以是1处也可以是2处以上。

[0061] 作为这样的在上述氨基酸序列中缺失、添加和/或置换1～数个氨基酸的氨基酸序列，可以举出在使用BLAST(Basic Local Alignment Search Tool at the National Center for Biological Information(美国国立生物学信息中心的基本局部比对检索工具))等(例如，默使用认即初始设定的参数)与上述氨基酸序列进行计算时，具有至少50%以上、优选70%以上、进一步优选80%以上、特别优选90%以上的同源性的氨基酸序列。

[0062] 另外，已知也存在一级结构上的同源性低但构象高度类似的肽、蛋白质结构域。因此，与上述氨基酸序列具有至少50%以上、优选70%以上、进一步优选80%以上、特别优选90%以上的构象同源性且具有VIPR2结合活性的肽也包含在本实施方式中。关于这样的肽彼此的构象的同源性，可以使用同源建模法等由构象未知的肽的氨基酸序列如下预测其构象来进行。例如，在给出与本实施方式的环状肽(参照肽)具有类似的序列的任意的氨基酸序列(目标序列)时，给出目标序列与参照序列之间的比对(将序列并列设置)。如果使用通过FASTA、PSI-BLAST、LIBRA等计算出的比对，则确定目标序列与参照序列间的每个氨基酸的对应关系，因此基于该关系，由参照肽的3维坐标制作目标序列上的每个氨基酸的3维坐标。在3维坐标的构建中，有时在氨基酸残基间产生结构上不适当的间隙、冲突、变形，因此通过能量极小化计算来消除这些结构上的变形。根据建模软件，为了顺利地消除该结构性的变形，也有不是对肽的全部原子同时进行而是阶段性地进行的情况。即，首先对形成肽的

骨架的 $\alpha$ 碳原子进行,接着对包含 $\alpha$ 碳原子的主链原子进行,最后对包含侧链原子的肽整体进行。如果以这种方式获得针对目标阵列的比对,则可以预测构建其构象。可以使用最佳叠加时的XYZ坐标之差即RMSD(Root Mean Square Deviation)等来比较构象同源性的指标。

[0063] 只要能解决本发明的课题,则本发明肽也包含其各种衍生物和/或修饰物。作为该衍生物,可以举出肽的饱和脂肪链被不饱和脂肪链置换的物质、肽的原子的一部分被包含放射性或非放射性的同位素原子在内的其他原子置换的物质、肽的酰胺键被硫代酰胺键(-NH-C(=S)-)置换的物质、肽的酰胺键被烯炔(-C=C-)置换的物质、肽的酰胺键被烷基(-C-C-)置换的物质、肽的酰胺键被羟基亚乙基(-C(-OH)-C-)置换的物质、肽的酰胺键被酯(-O-C(=O)-)置换的物质、肽的酰胺键被烯炔(-C=C-)置换的物质、肽的酰胺键被(-C-NH-)置换的物质、或肽的酰胺键被(-C(=O)-C-)置换的物质等,作为该修饰物,可以举出肽的 $\alpha$ 位碳被二置换的物质、肽的酰胺键被N-烷基化的物质、肽的官能团的一部分接受卤化、氰基化、硝基化、氧化化、羟基化、氨基化、去氨基化、脱氢化、酰胺化、乙酰化、甲氧基化、异戊二烯化、烷基化等。可举出接受烷基化等修饰的物质(例如,肽的氨基的一部分被乙酰化、甲酰化、肉豆蔻酰化、棕榈酰化、焦谷氨酸化、烷基化或去氨基化的物质、肽的羧基的一部分被N-吡咯烷基化或N-哌啶基化、或成为酰胺(酰胺、甲基酰胺、乙基酰胺、对硝基苯胺、 $\beta$ -萘基酰胺等)或酯(甲酯、乙酯、硫酸酯等)的物质等)、肽的S成为亚砷S(=O)或砷S(=O)<sub>2</sub>的物质、肽经由化学连接子被多聚体化的多聚体化的物质、肽被生物素标记的物质、肽被荧光标记的物质、肽被发光标记的物质、进而烷基链、聚乙二醇、抗体、凝集素类、糖链、酶、膜透过性肽、低分子化合物、或诱导蛋白质的泛素化的分子等与肽融合而成的物质等,但并不限于这些。

[0064] 本发明肽也包含肽的盐。作为肽的盐,可以使用与生理学上可接受的碱、酸的盐,例如可以举出无机酸(盐酸、氢溴酸、氢碘酸、硫酸、磷酸等)的加成盐、有机酸(对甲苯磺酸、甲磺酸、草酸、对溴苯基磺酸、羧酸、琥珀酸、柠檬酸、苯甲酸、乙酸等)的加成盐、无机碱(氢氧化铵、或碱、或碱土金属氢氧化物、碳酸盐、碳酸氢盐等)、氨基酸的加成盐等。

[0065] 本发明肽可以是前药。前药是指在生物体内的生理条件下通过酶、胃酸等的反应而转化为本发明肽的化合物,即发生酶促的氧化、还原、水解等而转化为本发明肽的化合物、因胃酸等而发生水解等而转化为本发明肽的化合物。

[0066] 作为本发明肽的前药,可以举出本发明肽的氨基被酰化、烷基化或磷酸化的化合物(例如,本发明肽的氨基被二十酰基化、丙氨酰基化、戊基氨基羰基化、(5-甲基-2-氧代-1,3-二氧戊环-4-基)甲氧基羰基化、四氢呋喃基化、吡咯烷基甲基化、新戊酰氧基甲基化、或叔丁基化的化合物)、本发明肽的羟基被酰化、烷基化、磷酸化、或硼酸化的化合物(例如,本发明肽的羟基被乙酰化、棕榈酰基化、丙酰基化、新戊酰基化、琥珀酰化、富马酰基化、丙酰基化、或二甲氨基甲基羰基化的化合物)、本发明肽的羟基、羧基被酯化或酰胺化的化合物(例如,本发明肽的羟基、羧基被C<sub>1-6</sub>烷基酯化、苯基酯化、羧基甲酯化、二甲氨基甲酯化、新戊酰氧基甲酯化、乙氧基羰基氧基乙酯化、酞基酯化、(5-甲基-2-氧代-1,3-二氧戊环-4-基)甲酯化、环己氧基羰基乙酯化、或甲基酰胺化的化合物)等。并不限于这些。这些化合物可以通过本身公知的方法由本发明肽制造。

[0067] 本发明肽的前药可以在广川书店1990年刊行的“药品的开发”第七卷分子设计163~198页中记载的生理条件下转化为本发明肽。

[0068] 在本说明书中,前药可以形成盐,作为该盐,可以举出作为本发明肽的盐而例示的盐。

[0069] 本发明肽可以是晶体,无论是单晶还是晶体混合物都包含在本发明肽中。晶体可以通过应用本身公知的结晶法进行结晶来制造。

[0070] 本发明肽可以是药学上可接受的共晶或共晶盐。在此,所谓共晶或共晶盐,是指具有各自不同的物理特性(例如,结构、熔点、熔解热、吸湿性、溶解性及稳定性等)的、室温下两种或其以上的独特的固体所构成的结晶性物质。共晶或共晶盐可以按照本身公知的共晶化法来制造。

[0071] (环状肽的作用效果)

如后述的实施例所示,作为本实施方式所示的氨基酸序列组的代表例的Seq-1~10显示对VIPR2表达细胞的结合活性,Seq-1、6、9和10具有对VIPR2表达细胞的拮抗活性、以及蛋白酶水解抗性。本实施方式所示的氨基酸序列组具有与Seq-1~10类似的氨基酸序列和构象特征,因此认为它们也具有蛋白酶水解抗性、VIPR2结合活性和VIPR2拮抗活性的可能性极高。

[0072] 后述的实施例所示的肽的VIPR2结合活性表示如下。(1) VI<sub>1</sub>pep-3的C末端3个残基(第14~16位氨基酸残基:Leu-Arg-Ser)即使缺失也不会失去对VIPR2的结合活性。(2)若第7位与第11位交联,则VIPR2结合活性提高。(3) VI<sub>1</sub>pep-3通过在第1位和第10位的半胱氨酸残基间形成的S-S键而环化,但用于VIPR2结合活性的环化并不限定于第1位和第10位间,只要在第2位、第3位导入具有长侧链的氨基酸残基而直接与第10位交联,或者使用长度、结构不同的连接子间接地交联,从而使第2位和第10位间的原子间距离、以及第3位和第10位间的原子间距离接近第1位和第10位间的原子间距离,就可以用第2位和第10位间、以及第3位和第10位间的交联代替。(4)在3个氨基酸残基之间二环化的肽也显示VIPR2结合活性,认为第1位-第7位-第10位间、第2位-第7位-第10位间、及第3位-第7位-第10位间的组合的交联模式均允许。对上述的(3)和(4)进行更具体的说明。如后述的实施例所示,VI<sub>1</sub>pep-3的第1~3位氨基酸残基与第10位氨基酸残基间形成的环状结构: $\text{Ca}^3\text{-NH-C(=O)-Ca}^2\text{-NH-C(=O)-C}\alpha^1\text{-CH}_2\text{-S-S-CH}_2\text{-Ca}^{10}$ ,例如可以被具有非天然结构的侧链的第3位氨基酸残基与第10位氨基酸残基间形成的环状结构: $\text{Ca}^3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-S-S-CH}_2\text{-CH}_2\text{-Ca}^{10}$ 代替。即,VI<sub>1</sub>pep-3的第1~3位氨基酸残基与VIPR2结合活性没有大的关系,暗示了肽的环状尺寸限制对VIPR2结合活性重要,本发明肽不仅在第1~10位间,而且在第2~10位间和第3~10位间也能够环化,认为只要肽的环状尺寸收敛于一定范围则可接受酰胺键、二硫键、硫醚键、C=C键、C-C键、经由三唑的结合、经由二硫代四氟苯的结合等广泛形状的化学结构。认为在经由第7位的情况下(第1位-第7位-第10位间、第2位-第7位-第10位间、及第3位-第7位-第10位间)该特性也得到保持。

[0073] 上述[1]~[16]所示的氨基酸序列组具有与对人、小鼠、大鼠的VIPR2有拮抗活性的VI<sub>1</sub>pep-3类似的氨基酸序列和构象特征,因此认为与小鼠、大鼠这样的人以外的哺乳类的VIPR2结合而阻断其功能的可能性极高。

[0074] (环状肽的制备方法)

本实施方式的肽可以通过液相法、固相法、或将液相法和固相法组合的混合法等化学合成法等公知的肽的制造方法来制造。

[0075] 固相法可以使用市售的自动合成机。例如,使具有羟基的树脂的羟基与 $\alpha$ 位氨基被Fmoc基之类的保护基保护的第一氨基酸(通常为肽的C末端氨基酸)的羧基进行酯化反应。作为酯化催化剂,可以使用1-均三甲苯磺酰基-3-硝基-1,2,4-三唑(MSNT)、二环己基碳二亚胺(DCC)、二异丙基碳二亚胺(DIPCDI)等公知的脱水缩合剂。接着,使第一氨基酸的 $\alpha$ 位氨基的保护基脱离,并且加入主链的羧基以外的全部官能团被保护的第二个氨基酸,使该羧基活化,使第一和第二个氨基酸键合。进而,将第二个氨基酸的 $\alpha$ 位氨基脱保护,加入主链的羧基以外的全部官能团被保护的第三个氨基酸,使该羧基活化,使第二和第三个氨基酸键合。重复该操作,合成目标长度的肽。将直链肽从树脂中切断,纯化后,对用于将肽环化的官能团进行脱保护,按照常规方法将肽环化。

[0076] 作为固相合成的树脂,可以举出Merrifield resin、MBHA resin、Cl-Trt resin、SASRIN resin、Wang resin、Rink amide resin、HMFS resin、Amino-PEGA resin(Merck公司)、HMPA-PEGA resin(Merck公司)等。这些树脂可以在用溶剂(二甲基甲酰胺(DMF)、2-丙醇、二氯甲烷等)清洗后使用。作为 $\alpha$ 位氨基的保护基,可举出苄氧基羰基(Cbz)基、叔丁氧基羰基(Boc)基、苄基甲氧基羰基(Fmoc)基、苄基、烯丙基、烯丙氧基羰基(Alloc)基等。Cbz基可以通过氢氟酸、氢化等进行脱保护,Boc基可以通过三氟乙酸(TFA)进行脱保护,Fmoc基可以通过利用哌啶的处理进行脱保护。 $\alpha$ 位羧基的保护可以使用甲酯、乙酯、苄酯、叔丁酯、环己酯等。作为氨基酸的其他官能团,丝氨酸、苏氨酸等的羟基可以用苄基、叔丁基保护,酪氨酸等的羟基可以用2-溴苄氧基羰基、叔丁基保护。赖氨酸等的侧链的氨基、谷氨酸和天冬氨酸等的羧基可以与 $\alpha$ 位氨基、 $\alpha$ 位羧基同样地保护。

[0077] 羧基的活化可以使用缩合剂来进行。作为缩合剂,例如可列举出:二环己基碳二亚胺(DCC)、二异丙基碳二亚胺(DIPCDI)、1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺(EDC或WSC)、(1H-苯并三唑-1-基氧基)三(二甲氨基)磷六氟磷酸盐(BOP)、1-[双(二甲氨基)甲基]-1H-苯并三唑鎓-3-氧化物六氟磷酸盐等。肽链从树脂的切断可以通过用TFA、氟化氢(HF)等酸进行处理来进行。

[0078] 作为一个方式,本实施方式的肽进行了环化。在本说明书中,所谓环化是指:在1个肽内,隔着1个以上氨基酸的2个以上氨基酸直接地或经由连接子间接地形成共价键而在分子内形成了1个以上的环状结构。环化可以按照非专利文献9、非专利文献10、非专利文献11中记载的方法来实现。例如,可以利用氨基与羧基间的酰胺键、硫醇基与硫醇基间的二硫键、硫醇基与卤素基间的硫醚键、基于硫醇基与烯丙基间的硫醇-烯反应的硫醚键、基于烯丙基与烯丙基间的烯炔复分解反应的C=C键(该C=C键可以通过还原反应而转换为C-C键)、经由基于炔基与叠氮基间的点击反应的三唑的键、具有卤素基的连接子与两个硫醇基间的硫醚键等,但并不限于这些。用于环化的直接的或经由连接子的间接的共价键可以是主链-主链间、主链-侧链间、侧链-主链间、侧链-侧链间中的任一种。

[0079] 在本发明肽的环化中,例如,(1)可以将具有硫醇基的半胱氨酸、D型半胱氨酸、高半胱氨酸、D型高半胱氨酸各自独立地设为氨基酸1和氨基酸2,使用在这些硫醇基间形成的二硫键;(2)可以将具有作为亲核基团的卤素原子(氯、溴、或碘)的氨基酸(例如3-氯丙氨酸)或具有卤素原子(氯、溴、或碘)的羧酸(例如3-氯丙酸)设为氨基酸1,使用在与具有硫醇基的氨基酸2之间形成的硫醚键;(3)可以使用在具有硫醇基的氨基酸1和氨基酸2、以及具有作为亲核基团的卤素原子(氯、溴、或碘)的连接子(例如1,3-二碘丙烷、1,4-二碘丁烷、1,

5-二碘戊烷、1,6-二碘己烷、1,2-双(溴甲基)苯、1,3-双(溴甲基)苯、1,4-双(溴甲基)苯等)之间形成的硫醚键；(4)可以将具有叠氮基的 $\beta$ 叠氮基丙氨酸设为氨基酸1,将具有炔基的2-氨基-5-己炔酸设为氨基酸2,使用经由通过这两者间的点击反应形成的三唑的共价键。(5)可以使用具有烯丙基的氨基酸(例如烯丙基甘氨酸、D型烯丙基甘氨酸、均烯丙基甘氨酸、D型均烯丙基甘氨酸等)或具有烯丙基的羧酸(例如3-丁烯酸)作为氨基酸1,使用通过与具有硫醇基的氨基酸2之间的硫醇-烯反应而形成的硫醚键；(6)可以将具有烯丙基的氨基酸或具有烯丙基的羧酸各自独立地作为氨基酸1和氨基酸2,使用通过这些烯丙基间的烯炔复分解反应而形成的C=C键；(7)可以使用通过将烯炔复分解反应而形成的C=C键还原而形成的C-C键；(8)可以使用具有氨基的氨基酸1(例如2,3-二氨基丙酸、2,4-二氨基丁酸、鸟氨酸、赖氨酸、它们的D型氨基酸等)与具有羧基的氨基酸2(天冬氨酸、谷氨酸、它们的D型氨基酸等)之间的酰胺键；(9)可以使用N末端氨基( $\beta$ 丙氨酸、 $\gamma$ 氨基丁酸等)与具有羧基的氨基酸之间的酰胺键。这些氨基酸1和氨基酸2中的任一个可以位于N末端侧。进而,可以使用(10)在具有硫醇基的氨基酸1、氨基酸2和氨基酸3、以及具有作为亲核基团的卤素原子(氯、溴或碘)的连接子(例如1,3,5-三(溴甲基)苯)之间形成的硫醚键。氨基酸1、氨基酸2和氨基酸3均可以位于N末端侧。

[0080] (含环状肽的药物、诊断药、研究用试剂)

本发明的医药组合物含有上述氨基酸序列作为有效成分,通过肽与VIPR2结合,能够阻断天然配体与VIPR2的结合,抑制经由VIPR2的信号传递。上述组合物的给药方式没有特别限定,可以是经口给药,也可以是非经口给药。作为非口服给药,例如可列举出经粘膜给药(经鼻、经口腔、经眼、经肺、经阴道、或经直肠给药)、注射给药(静脉注射、皮下注射、肌肉内注射等)、经皮给药等。药物组合物中的肽鉴于容易代谢和排泄的性质,可以进行各种修饰。例如,通过在肽中附加烷基链、聚乙二醇或糖链等,能够延长血液中滞留时间,降低抗原性。另外,也可以使用聚乳酸·二醇(PLGA)等生物体内分解性的高分子化合物、多孔性羟基磷灰石、脂质体、表面修饰脂质体、由不饱和脂肪酸制备的乳液、纳米颗粒、纳米球等作为缓释剂,使肽内包于其中。在经皮给药的情况下,也可以使较弱的电流流过皮肤表面而使其透过角质层(离子电渗法)。

[0081] 上述药物组合物可以直接使用有效成分,也可以加入药学上可接受的载体、赋形剂、添加剂等进行制剂化。作为剂型,可以列举例如:液剂(注射剂等)、分散剂、悬浮剂、片剂、丸剂、粉末剂、栓剂、散剂、细粒剂、颗粒剂、胶囊剂、糖浆剂、含片剂、吸入剂、软膏剂、滴眼剂、滴鼻剂、滴耳剂、巴布剂等。这些制剂可以是速释性制剂或缓释性制剂等控释制剂(缓释性微囊等)。制剂化例如可以适当使用赋形剂、粘合剂、崩解剂、润滑剂、溶解剂、助溶剂、着色剂、矫味矫臭剂、稳定剂、乳化剂、吸收促进剂、表面活性剂、pH调节剂、防腐剂、抗氧化剂等,通过常规方法进行。作为用于制剂化的成分的例子,可列举出纯化水、食盐水、磷酸缓冲液、葡萄糖、甘油、乙醇等药学上可接受的有机溶剂、动植物油、乳糖、甘露醇、葡萄糖、山梨糖醇、结晶纤维素、羟丙基纤维素、淀粉、玉米淀粉、无水硅酸、硅酸铝镁、胶原蛋白、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、羧基乙烯基聚合物、羧甲基纤维素钠、聚丙烯酸钠、海藻酸钠、水溶性葡聚糖、羧甲基淀粉钠、凝集素、甲基纤维素、乙基纤维素、黄原胶、阿拉伯胶、黄蓍胶、酪蛋白、琼脂、聚乙二醇、二甘油、甘油、丙二醇、凡士林、石蜡、肉豆蔻酸辛基十二烷基酯、肉豆蔻酸异丙酯、高级醇、硬脂醇、硬脂酸、人血清白蛋白等,但不限于于这些。在肽难以经粘膜

吸收的情况下,作为改善难吸收性药物的吸收的吸收促进剂,可以使用聚氧乙烯月桂基醚类、月桂基硫酸钠、皂苷等表面活性剂;甘氨酸、脱氧胆酸、牛磺胆酸等胆汁酸盐;EDTA、水杨酸类等螯合剂;己酸、癸酸、月桂酸、油酸、亚油酸、混合胶束等脂肪酸类;烯胺衍生物、N-酰基胶原蛋白肽、N-酰基氨基酸、环糊精类、壳聚糖类、一氧化氮供体等。

[0082] 丸剂或片剂也可以用糖衣、胃溶性、肠溶性物质包覆。注射剂可以包含注射用蒸馏水、生理盐水、丙二醇、聚乙二醇、植物油、醇类等。进而,可以添加润湿剂、乳化剂、分散剂、稳定剂、溶解剂、溶解助剂、防腐剂等。根据需要,也可以适当适量使用通常的防腐剂、抗氧化剂、着色剂、甜味剂、吸附剂、润湿剂等添加物。

[0083] 本发明的药物组合物用于预防或治疗与VIPR2的活化相关的下述疾病:中枢神经疾病,例如精神障碍(精神分裂症、分裂情感障碍、类精神分裂症、妄想障碍等)、小儿精神障碍(注意力缺陷障碍、注意缺陷/多动障碍、行为障碍、自闭症等)、神经变性障碍、神经干细胞障碍、神经前体障碍、缺血性障碍、神经外伤性障碍、情绪障碍、精神运动障碍、睡眠障碍(过眠症、昼夜节律睡眠障碍、失眠症、睡眠时异常行为、睡眠阻断等)、焦虑这样的精神障碍(急性应激障碍、广泛性焦虑障碍、社交焦虑障碍、恐慌障碍、创伤后应激障碍、广场恐惧症、强迫症等)、假性精神障碍(急性幻觉性狂躁等)、冲动控制障碍(强迫性赌博、间歇性爆发障碍等)、情绪障碍(双极I型障碍、双极II型障碍、躁狂症、混合情绪状态等)、重度抑郁症、慢性抑郁症、季节性抑郁症、精神性抑郁症、季节性抑郁症、痴呆症(健忘症、老年痴呆症、HIV相关痴呆症、阿尔茨症、亨廷顿症、路易体痴呆、血管性痴呆、药物相关性痴呆、迟发性运动障碍、阵挛性肌肉痉挛、肌张力障碍、谵妄、皮克氏病、克雅氏病、艾滋病、吉尔斯·德拉痴呆图雷特氏综合征、癫痫、肌肉痉挛、轻度认知障碍等)、智力低下(痉挛、唐氏综合症、脆性X综合症等);经前综合征(PMS)、月经前不愉快心情障碍(PDD)、产后抑郁症、神经元损伤障碍(眼损伤、眼的视网膜病或黄斑变性、耳鸣、听觉障碍、脑水肿等)、帕金森病、帕金森病样障碍、偏头痛、癫痫、阿尔茨海默病、脑损伤、脑中风、脑血管疾病(脑动脉硬化症、脑淀粉样血管症、遗传性脑出血、脑缺氧症-缺血等)、药物依赖症(麻醉剂依赖、酗酒、安非他明依赖、可卡因成瘾、尼古丁依赖、药物戒断综合征等)、饮食失调(厌食、暴饮暴食、娱乐性饮食失调、贪食、肥胖、强迫性进食、食冰癖等)等,但并不限于这些。作为追加的疾病,没有特别限定,例如可举出用于表达VIPR2的癌的增殖抑制、通过阻断VIPR2的功能而激活免疫等。

[0084] 本发明的药物组合物可以与对上述疾病有用的各种化学疗法、手术治疗、放射线疗法等其它药物或治疗法组合使用。

[0085] 将本发明的药物组合物给予哺乳类(例如人、小鼠、大鼠、豚鼠、兔、狗、马、猴子、猪等)、特别是人的情况下的给药量根据症状、患者的年龄、性别、体重、敏感性差异、给药方法、给药间隔、有效成分的种类、制剂的种类而不同,没有特别限定,例如可以将30 $\mu$ g~1000mg、100 $\mu$ g~500mg、100 $\mu$ g~100mg 1次性或分数次进行给药。

[0086] 以下所示的实施例是单纯的例示,意图仅与上述的实施方式一起详细地说明本发明,并不限定本发明。本领域技术人员能够在不脱离本发明的意义的情况下将本发明变更为各种方式,该变更也包含在本发明的范围内。

#### 实施例

[0087] 本说明书中使用的缩写表示下述含义。

VIPR2:血管活性肠肽受体2

VIP: 血管活性肠肽  
BSA: 牛血清白蛋白  
RP-HPLC: 反相高效液相色谱  
HRP: 辣根过氧化物酶  
SA: 链霉亲和素  
HBSS: 汉克氏平衡盐溶液  
ELISA: 酶联免疫吸附试验  
Ac: 乙酰基  
Cys: L-半胱氨酸  
hmC: L-高半胱氨酸  
Mpa: 3-巯基丙酸  
Pro: L-脯氨酸  
Try: L-酪氨酸  
Leu: L-亮氨酸  
Ile: L-异亮氨酸  
Arg: L-精氨酸  
Asp: L-天冬氨酸  
Glu: L-谷氨酸  
Dap: (S)-2,3-二氨基丙酸  
Dab: (S)-2,4-二氨基丁酸  
Tyr (Ome): 0-甲基-L-酪氨酸  
4aF: 4-氨基-L-苯丙氨酸  
4AcF: 4-乙酰基-L-苯丙氨酸  
4amdF: 4-酰胺-L-苯丙氨酸  
3hF: 3-羟基-L-苯丙氨酸  
3(Ome)F: 3-甲氧基-L-苯丙氨酸  
4amF: 4-氨基甲基-L-苯丙氨酸  
4fF: 4-氟-L-苯丙氨酸  
Gly: 甘氨酸  
Ala: L-丙氨酸  
Aze: L-氮杂环丁烷羧酸  
thioP: L-硫代脯氨酸  
Dhp: 3,4-脱氢-L-脯氨酸  
Pip: L-哌啶酸  
Val: L-缬氨酸  
Nle: L-正亮氨酸  
Ahep: (S)-2-氨基庚酸  
Aoc: (S)-2-氨基辛酸  
Anon: (S)-2-氨基壬酸

CprA:L-环丙基丙氨酸  
 CbuA:L-环丁基丙氨酸  
 $\beta$ hmLeu: $\beta$ -高-L-亮氨酸  
 M6a:6-巯基己酸  
 M8a:8-巯基辛酸  
 DIBut:1,4-二碘丁烷  
 DIPen:1,5-二碘戊烷  
 DIHex:1,6-二碘己烷  
 DBoXy:1,2-双(溴甲基)苯  
 DBmXy:1,3-双(溴甲基)苯  
 DBpXy:1,4-双(溴甲基)苯  
 TBMB:1,3,5-三(溴甲基)苯  
 Nme-X:N-甲基化氨基酸X  
 aMe-X: $\alpha$ -甲基化氨基酸X  
<sup>D</sup>X:D-氨基酸X  
 c[XY],c(XY):氨基酸X到氨基酸Y之间的环化

[0088] (肽合成)

本实施例中使用的全部肽的化学合成委托株式会社SCRUM(日本东京),用自动合成机SyroII(Biotage公司制)实施使用9-芴基甲氧基羰基(Fmoc基)作为 $\alpha$ 氨基的保护基的标准的固相合成法。将位于C末端的侧链保护氨基酸-树脂放入合成柱,设置装置。接着,作为用Fmoc基保护的下一氨基酸,加入1-[双(二甲基氨基)亚甲基]-1H-1,2,3-三唑并[4,5-b]吡啶鎓3-氧化物六氟磷酸盐(HATU)/二异丙基乙胺(DIEA)进行活化,放入柱中使其反应。反应结束后进行清洗,使用20%哌啶对Fmoc基进行脱保护。通过反复进行本工序,使肽链延伸,对最终氨基酸的Fmoc基进行脱保护后,从装置中取出肽树脂。

[0089] 肽的环化参考非专利文献8、非专利文献9、非专利文献10、非专利文献11中记载的方法。作为例子,以下示出Seq-1、6、9的环化。对于Seq-1和Seq-6,用二甲基甲酰胺(DMF)使直链的侧链保护肽树脂溶胀,在2%胍溶液中反应5~10分钟,由此将赖氨酸的侧链的保护基(Dde)和天冬氨酸的侧链的保护基(ODmab)脱保护后,加入作为偶联试剂的Oxima Pure和二异丙基碳二亚胺(DIC),在50℃下反应3小时。洗涤树脂后,加入TFA,将硫醇基的保护基脱保护,同时从树脂中切出单环肽。通过使用SunFire C18柱(10×150mm)(Waters公司制)的RT-HPLC,将单环肽纯化后,进行冷冻干燥。

[0090] 关于Seq-1,将单环肽溶解于Tris-HCl缓冲液(pH8.5)与乙腈的混合液后,添加DMSO,在室温下搅拌36小时,由此通过二硫键将肽环化。关于Seq-6,将单环肽溶解于二甲基亚砷(DMSO),加入溶解于DMF的3当量的1,3-双溴甲基苯,并且加入含有10mM三(2-羧基乙基)膦(TCEP)的0.1M的NaHCO<sub>3</sub>以及乙腈,在室温下反应一晚,由此通过硫醇基与卤代烷基连接子之间的硫醚键将肽环化。通过使用SunFire C18柱(10×150mm)(Waters公司制)的RT-HPLC,将作为二环肽的Seq-1和6纯化后,进行冷冻干燥。最终得到的肽的分子量使用microflex(Bruker公司)进行测定,鉴定目标物。

[0091] 关于Seq-9,洗涤树脂后,加入TFA,将硫醇基的保护基脱保护,同时从树脂中切出

直链肽,通过使用SunFire C18柱(10×150mm)(Waters公司制)的RT-HPLC进行纯化后,冷冻干燥。将直链肽溶解于二甲基亚砜(DMSO)中,加入溶解于DMF中的3当量的1,3,5-三(溴甲基)苯(TBMB)、包含10mM三(2-羧基乙基)膦(TCEP)的0.1M的NaHCO<sub>3</sub>、以及乙腈,在80℃下使其反应3小时,由此通过硫醇基与卤代烷基连接子之间的硫醚键使肽环化。通过使用SunFire C18柱(10×150mm)(Waters公司制)的RT-HPLC,纯化二环肽后,进行冷冻干燥。最终得到的肽的分子量使用microflex(Bruker公司)进行测定,鉴定目标物。将本实施例中合成的肽的理论分子量、实测分子量、纯度、环化类型、序列示于表1。另外,这些中,Seq-1~9的氨基酸序列示于以下,其结构式示于图7。需要说明的是,在表1和以下的氨基酸序列中,没有D型符号的氨基酸表示L体。

[0092] [表1-1]

名称	理论MW	实测MW	电压极性	纯度	环化类型	序列
Biotin-Vipep-3	2125.7	2125.456	POS	98.11	S-S(1-10)	Biotin- c(Cys-Pro-Pro-Tyr-Leu-Pro-Arg-Arg-Leu-Cys)-Thr-Leu-Leu-Leu-Arg-Ser-OH
Vipep-3(序列号11)	1941.4	1941.954	POS	97.52	S-S(1-10)	Ac-c(Cys-Pro-Pro-Tyr-Leu-Pro-Arg-Arg-Leu-Cys)-Thr-Leu-Leu-Leu-Arg-Ser-OH
3d-COOH	1506.8	1506.582	POS	100	S-S(1-10)	Ac-c(Cys-Pro-Pro-Tyr-Leu-Pro-Dap-Tyr-Leu-Cys)-Dap-Leu-Ile-OH
3d-NH <sub>2</sub>	1505.8	1505.422	POS	100	S-S(1-10)	Ac-c(Cys-Pro-Pro-Tyr-Leu-Pro-Dap-Tyr-Leu-Cys)-Dap-Leu-Ile-NH <sub>2</sub>
3d-7- <sup>0</sup> Dap	1505.8	1505.361	POS	100	S-S(1-10)	Ac-c(Cys-Pro-Pro-Tyr-Leu-Pro- <sup>0</sup> Dap-Tyr-Leu-Cys)-Dap-Leu-Ile-NH <sub>2</sub>
3d-11- <sup>0</sup> Dap	1505.8	1505.361	POS	100	S-S(1-10)	Ac-c(Cys-Pro-Pro-Tyr-Leu-Pro-Dap-Tyr-Leu-Cys)- <sup>0</sup> Dap-Leu-Ile-NH <sub>2</sub>
3d-7/11- <sup>0</sup> Dap/ <sup>0</sup> Dap	1505.8	1505.254	NEG	100	S-S(1-10)	Ac-c(Cys-Pro-Pro-Tyr-Leu-Pro- <sup>0</sup> Dap-Tyr-Leu-Cys)- <sup>0</sup> Dap-Leu-Ile-NH <sub>2</sub>
3d-7/11- <sup>0</sup> Dap/Dab	1519.9	1519.738	POS	100	S-S(1-10)	Ac-c(Cys-Pro-Pro-Tyr-Leu-Pro- <sup>0</sup> Dap-Tyr-Leu-Cys)- <sup>0</sup> Dab-Leu-Ile-NH <sub>2</sub>
3d-11- <sup>0</sup> Dap	1519.9	1519.056	NEG	100	S-S(1-10)	Ac-c(Cys-Pro-Pro-Tyr-Leu-Pro-Dap-Tyr-Leu-Cys)- <sup>0</sup> Dab-Leu-Ile-NH <sub>2</sub>
3d-7/11- <sup>0</sup> Dap/ <sup>0</sup> Dap	1519.9	1519.591	NEG	98.28	S-S(1-10)	Ac-c(Cys-Pro-Pro-Tyr-Leu-Pro- <sup>0</sup> Dap-Tyr-Leu-Cys)- <sup>0</sup> Dab-Leu-Ile-NH <sub>2</sub>
3d-7-Dab	1519.9	1518.876	NEG	100	S-S(1-10)	Ac-c(Cys-Pro-Pro-Tyr-Leu-Pro-Dab-Tyr-Leu-Cys)-Dap-Leu-Ile-NH <sub>2</sub>
3d-7/11-Dab/ <sup>0</sup> Dap	1519.9	1519.841	NEG	100	S-S(1-10)	Ac-c(Cys-Pro-Pro-Tyr-Leu-Pro-Dab-Tyr-Leu-Cys)- <sup>0</sup> Dap-Leu-Ile-NH <sub>2</sub>
3d-7- <sup>0</sup> Dab	1519.9	1519.907	POS	100	S-S(1-10)	Ac-c(Cys-Pro-Pro-Tyr-Leu-Pro- <sup>0</sup> Dab-Tyr-Leu-Cys)- <sup>0</sup> Dap-Leu-Ile-NH <sub>2</sub>
3d-7/11- <sup>0</sup> Dap/ <sup>0</sup> Dap	1519.9	1519.802	POS	100	S-S(1-10)	Ac-c(Cys-Pro-Pro-Tyr-Leu-Pro- <sup>0</sup> Dab-Tyr-Leu-Cys)- <sup>0</sup> Dap-Leu-Ile-NH <sub>2</sub>
3d-7/11-Dab/Dab	1533.9	1533.096	NEG	100	S-S(1-10)	Ac-c(Cys-Pro-Pro-Tyr-Leu-Pro- <sup>0</sup> Dab-Tyr-Leu-Cys)- <sup>0</sup> Dab-Leu-Ile-NH <sub>2</sub>
3d-7/11-Dab/ <sup>0</sup> Dap	1533.9	1533.087	NEG	100	S-S(1-10)	Ac-c(Cys-Pro-Pro-Tyr-Leu-Pro-Dab-Tyr-Leu-Cys)-Dab-Leu-Ile-NH <sub>2</sub>
3d-7/11- <sup>0</sup> Dap/Dab	1533.9	1533.611	POS	100	S-S(1-10)	Ac-c(Cys-Pro-Pro-Tyr-Leu-Pro- <sup>0</sup> Dab-Tyr-Leu-Cys)- <sup>0</sup> Dab-Leu-Ile-NH <sub>2</sub>
3d-7/11- <sup>0</sup> Dap/ <sup>0</sup> Dap	1533.9	1533.817	POS	95.86	S-S(1-10)	Ac-c(Cys-Pro-Pro-Tyr-Leu-Pro- <sup>0</sup> Dab-Tyr-Leu-Cys)- <sup>0</sup> Dab-Leu-Ile-NH <sub>2</sub>
3d-7/11-Lys/Asp	1576.9	1576.047	POS	100	S-S(1-10)	Ac-c(Cys-Pro-Pro-Tyr-Leu-Pro-Lys-Tyr-Leu-Cys)-Asp-Leu-Ile-NH <sub>2</sub>
3d-4-NmeTyr	1519.9	1519.586	POS	100	S-S(1-10)	Ac-c(Cys-Pro-Pro-NmeTyr-Leu-Pro-Dap-Tyr-Leu-Cys)-Dap-Leu-Ile-NH <sub>2</sub>
3d-4-Tyr(Ome)	1519.9	1519.748	POS	100	S-S(1-10)	Ac-c(Cys-Pro-Pro-Tyr(Ome)-Leu-Pro-Dap-Tyr-Leu-Cys)-Dap-Leu-Ile-NH <sub>2</sub>
3d-4-4aF	1504.9	1504.568	NEG	100	S-S(1-10)	Ac-c(Cys-Pro-Pro-4aF-Leu-Pro-Dap-Tyr-Leu-Cys)-Dap-Leu-Ile-NH <sub>2</sub>
3d-4-4AcF	1531.9	1531.271	POS	100	S-S(1-10)	Ac-c(Cys-Pro-Pro-4AcF-Leu-Pro-Dap-Tyr-Leu-Cys)-Dap-Leu-Ile-NH <sub>2</sub>
3d-4-4amideF	1532.9	1532.892	POS	99.07	S-S(1-10)	Ac-c(Cys-Pro-Pro-4amideF-Leu-Pro-Dap-Tyr-Leu-Cys)-Dap-Leu-Ile-NH <sub>2</sub>
3d-4-3hF	1505.8	1506.663	POS	100	S-S(1-10)	Ac-c(Cys-Pro-Pro-3hF-Leu-Pro-Dap-Tyr-Leu-Cys)-Dap-Leu-Ile-NH <sub>2</sub>
3d-4-3(Ome)F	1519.9	1519.737	POS	100	S-S(1-10)	Ac-c(Cys-Pro-Pro-3(Ome)F-Leu-Pro-Dap-Tyr-Leu-Cys)-Dap-Leu-Ile-NH <sub>2</sub>
3d-4-4amF	1518.9	1518.458	NEG	95.32	S-S(1-10)	Ac-c(Cys-Pro-Pro-4amF-Leu-Pro-Dap-Tyr-Leu-Cys)-Dap-Leu-Ile-NH <sub>2</sub>
3d-4-4fF	1507.8	1507.071	NEG	98.74	S-S(1-10)	Ac-c(Cys-Pro-Pro-4fF-Leu-Pro-Dap-Tyr-Leu-Cys)-Dap-Leu-Ile-NH <sub>2</sub>
3d-4-aMeTyr	1519.8	1520.386	POS	100	S-S(1-10)	Ac-c(Cys-Pro-Pro-aMeTyr-Leu-Pro-Dap-Tyr-Leu-Cys)-Dap-Leu-Ile-NH <sub>2</sub>
3d-5-NmeLeu	1519.9	1519.611	POS	97.04	S-S(1-10)	Ac-c(Cys-Pro-Pro-Tyr-NmeLeu-Pro-Dap-Tyr-Leu-Cys)-Dap-Leu-Ile-NH <sub>2</sub>
3d-5-aMeLeu	1519.9	1520.669	POS	100	S-S(1-10)	Ac-c(Cys-Pro-Pro-Tyr-aMeLeu-Pro-Dap-Tyr-Leu-Cys)-Dap-Leu-Ile-NH <sub>2</sub>
3d-6-Aze	1491.8	1491.034	POS	100	S-S(1-10)	Ac-c(Cys-Pro-Pro-Tyr-Leu-Aze-Dap-Tyr-Leu-Cys)-Dap-Leu-Ile-NH <sub>2</sub>
3d-6-Pip	1519.9	1519.756	POS	100	S-S(1-10)	Ac-c(Cys-Pro-Pro-Tyr-Leu-Pip-Dap-Tyr-Leu-Cys)-Dap-Leu-Ile-NH <sub>2</sub>
3d-6-NmeAla	1493.8	1493.784	POS	100	S-S(1-11)	Ac-c(Cys-Pro-Pro-Tyr-Leu-NmeAla-Dap-Tyr-Leu-Cys)-Dap-Leu-Ile-NH <sub>2</sub>

[0093]

[表1-2]

名称	理论MW	实测MW	电压极性	纯度	环化类型	序列
3d-6-Nme <sup>o</sup> Ala	1493.8	1493.628	POS	100	S-S(1-11)	Ac-c(Cys-Pro-Pro-Tyr-Leu-Nme <sup>o</sup> Ala-Dap-Tyr-Leu-Cys)-Dap-Leu-Ile-NH <sub>2</sub>
3d-6-NmeGly	1479.8	1479.987	POS	100	S-S(1-10)	Ac-c(Cys-Pro-Pro-Tyr-Leu-NmeGly-Dap-Tyr-Leu-Cys)-Dap-Leu-Ile-NH <sub>2</sub>
3d-8-Tyr(OMe)	1519.9	1519.827	POS	100	S-S(1-10)	Ac-c(Cys-Pro-Pro-Tyr-Leu-Pro-Dap-Tyr(OMe)-Leu-Cys)-Dap-Leu-Ile-NH <sub>2</sub>
3d-8-4aF	1504.9	1504.578	POS	100	S-S(1-10)	Ac-c(Cys-Pro-Pro-Tyr-Leu-Pro-Dap-4aF-Leu-Cys)-Dap-Leu-Ile-NH <sub>2</sub>
3d-8-4AcF	1531.9	1531.715	POS	97.44	S-S(1-10)	Ac-c(Cys-Pro-Pro-Tyr-Leu-Pro-Dap-4AcF-Leu-Cys)-Dap-Leu-Ile-NH <sub>2</sub>
3d-8-4amideF	1532.9	1532.592	POS	99.22	S-S(1-10)	Ac-c(Cys-Pro-Pro-Tyr-Leu-Pro-Dap-4amideF-Leu-Cys)-Dap-Leu-Ile-NH <sub>2</sub>
3d-8-3hF	1505.8	1505.396	POS	100	S-S(1-10)	Ac-c(Cys-Pro-Pro-Tyr-Leu-Pro-Dap-3hF-Leu-Cys)-Dap-Leu-Ile-NH <sub>2</sub>
3d-8-3(Ome)F	1519.9	1519.651	POS	100	S-S(1-10)	Ac-c(Cys-Pro-Pro-Tyr-Leu-Pro-Dap-3(Ome)F-Leu-Cys)-Dap-Leu-Ile-NH <sub>2</sub>
3d-8-4amF	1518.9	1518.436	POS	100	S-S(1-10)	Ac-c(Cys-Pro-Pro-Tyr-Leu-Pro-Dap-4amF-Leu-Cys)-Dap-Leu-Ile-NH <sub>2</sub>
3d-8-4fF	1507.8	1507.222	POS	100	S-S(1-10)	Ac-c(Cys-Pro-Pro-Tyr-Leu-Pro-Dap-4fF-Leu-Cys)-Dap-Leu-Ile-NH <sub>2</sub>
3d-8-aMeTyr	1519.8	1520.992	POS	100	S-S(1-10)	Ac-c(Cys-Pro-Pro-Tyr-Leu-Pro-Dap-aMeTyr-Leu-Cys)-Dap-Leu-Ile-NH <sub>2</sub>
3d-9-aMeLeu	1519.9	1520.624	POS	100	S-S(1-10)	Ac-c(Cys-Pro-Pro-Tyr-Leu-Pro-Dap-Tyr-aMeLeu-Cys)-Dap-Leu-Ile-NH <sub>2</sub>
3d-12-Nle	1505.8	1505.361	POS	99.91	S-S(1-10)	Ac-c(Cys-Pro-Pro-Tyr-Leu-Pro-Dap-Tyr-Leu-Cys)-Dap-Nle-Ile-NH <sub>2</sub>
3d-12-Ahep	1519.9	1519.178	NEG	100	S-S(1-10)	Ac-c(Cys-Pro-Pro-Tyr-Leu-Pro-Dap-Tyr-Leu-Cys)-Dap-Ahep-Ile-NH <sub>2</sub>
3d-12-Aoc	1533.9	1533.526	POS	100	S-S(1-10)	Ac-c(Cys-Pro-Pro-Tyr-Leu-Pro-Dap-Tyr-Leu-Cys)-Dap-Aoc-Ile-NH <sub>2</sub>
3d-12-Anon	1547.9	1547.484	POS	98.54	S-S(1-10)	Ac-c(Cys-Pro-Pro-Tyr-Leu-Pro-Dap-Tyr-Leu-Cys)-Dap-Anon-Ile-NH <sub>2</sub>
3d-12-CprA	1503.8	1503.131	NEG	100	S-S(1-10)	Ac-c(Cys-Pro-Pro-Tyr-Leu-Pro-Dap-Tyr-Leu-Cys)-Dap-CprA-Ile-NH <sub>2</sub>
3d-12-CbuA	1517.9	1518.632	POS	99.79	S-S(1-10)	Ac-c(Cys-Pro-Pro-Tyr-Leu-Pro-Dap-Tyr-Leu-Cys)-Dap-CbuA-Ile-NH <sub>2</sub>
3d-12-aMeLeu	1519.9	1519.697	POS	98.8	S-S(1-10)	Ac-c(Cys-Pro-Pro-Tyr-Leu-Pro-Dap-Tyr-Leu-Cys)-Dap-aMeLeu-Ile-NH <sub>2</sub>
3d-13-Leu	1505.8	1505.379	POS	100	S-S(1-10)	Ac-c(Cys-Pro-Pro-Tyr-Leu-Pro-Dap-Tyr-Leu-Cys)-Dap-Leu-NH <sub>2</sub>
3d-13-aMeLeu	1519.9	1520.279	POS	95.46	S-S(1-10)	Ac-c(Cys-Pro-Pro-Tyr-Leu-Pro-Dap-Tyr-Leu-Cys)-Dap-Leu-aMeLeu-NH <sub>2</sub>
3d-13-βhmLeu	1519.9	1519.758	POS	100	S-S(1-10)	Ac-c(Cys-Pro-Pro-Tyr-Leu-Pro-Dap-Tyr-Leu-Cys)-Dap-Leu-βhmLeu-NH <sub>2</sub>
3d-M6a/Cys	1296.4	1296.596	POS	100	S-S(1-8)	c(M6a-Tyr-Leu-Pro-Dap-Tyr-Leu-Cys)-Dap-Leu-Ile-NH <sub>2</sub>
3d-M6a/hmC	1310.4	1310.348	POS	97.95	S-S(1-8)	c(M6a-Tyr-Leu-Pro-Dap-Tyr-Leu-hmC)-Dap-Leu-Ile-NH <sub>2</sub>
3d-M8a/Cys	1324.4	1324.458	POS	100	S-S(1-8)	c(M8a-Tyr-Leu-Pro-Dap-Tyr-Leu-Cys)-Dap-Leu-Ile-NH <sub>2</sub>
3d-M8a/hmC	1338.4	1338.621	POS	100	S-S(1-8)	c(M8a-Tyr-Leu-Pro-Dap-Tyr-Leu-hmC)-Dap-Leu-Ile-NH <sub>2</sub>
Seq-1(序列号1)	1508.8	1508.781	NEG	95.85	S-S(1-10)/amide(7-11)	c(Mpa-Pro-Pro-Tyr-Leu-Pro-c[Lys-Tyr-Leu-Cys]-Asp]-Leu-Ile-NH <sub>2</sub>
Seq-2(序列号2)	1377.7	1377.767	POS	100	DiBut(1-8)/amide(5-9)	c(Mpa-NmeTyr-Leu-Pro-c[Lys-Tyr-Leu-Cys]-Asp]-Leu-Ile-NH <sub>2</sub>
Seq-3(序列号3)	1391.7	1391.884	POS	100	DiPen(1-8)/amide(5-9)	c(Mpa-NmeTyr-Leu-Pro-c[Lys-Tyr-Leu-Cys]-Asp]-Leu-Ile-NH <sub>2</sub>
Seq-4(序列号4)	1405.7	1405.871	POS	98.23	DiHex(1-8)/amide(5-9)	c(Mpa-NmeTyr-Leu-Pro-c[Lys-Tyr-Leu-Cys]-Asp]-Leu-Ile-NH <sub>2</sub>
Seq-5(序列号5)	1425.7	1425.499	POS	98.04	DBoXy(1-8)/amide(5-9)	c(Mpa-NmeTyr-Leu-Pro-c[Lys-Tyr-Leu-Cys]-Asp]-Leu-Ile-NH <sub>2</sub>
Seq-6(序列号6)	1425.7	1425.975	POS	100	DBmXy(1-8)/amide(5-9)	c(Mpa-NmeTyr-Leu-Pro-c[Lys-Tyr-Leu-Cys]-Asp]-Leu-Ile-NH <sub>2</sub>
Seq-7(序列号7)	1425.7	1425.712	POS	98.18	DBpXy(1-8)/amide(5-9)	c(Mpa-NmeTyr-Leu-Pro-c[Lys-Tyr-Leu-Cys]-Asp]-Leu-Ile-NH <sub>2</sub>
Seq-8(序列号8)	1376.7	1376.482	NEG	96.87	TBMB(1-5-8)	c(Mpa-NmeTyr-Leu-NmeGly-c(Cys)-Tyr-Leu-Cys)-Ser-Leu-Ile-NH <sub>2</sub>
Seq-9(序列号9)	1374.7	1374.703	POS	95.3	TBMB(1-5-8)	c(Mpa-NmeTyr-Leu-NmeGly-c(Cys)-Tyr-Leu-Cys)-Dap-Leu-Ile-NH <sub>2</sub>
Seq-10(序列号10)	1558.8	1558.705	NEG	100	S-S(1-10)/amide(7-11)	Ac-c(Cys-Pro-Pro-Tyr-Leu-Pro-c[Lys-Tyr-Leu-Cys]-Asp]-Leu-Ile-NH <sub>2</sub>

[0094] Seq-1:c(Mpa-Pro-Pro-Tyr-Leu-Pro-c[Lys-Tyr-Leu-Cys]-Asp]-Leu-Ile-NH<sub>2</sub>(序列号1)

Seq-2:c (Mpa-NmeTyr-Leu-Pro-c [Lys-Tyr-Leu-Cys) -Asp]-Leu-Ile-NH<sub>2</sub> (序列号2)

Seq-3:c (Mpa-NmeTyr-Leu-Pro-c [Lys-Tyr-Leu-Cys) -Asp]-Leu-Ile-NH<sub>2</sub> (序列号3)

Seq-4:c (Mpa-NmeTyr-Leu-Pro-c [Lys-Tyr-Leu-Cys) -Asp]-Leu-Ile-NH<sub>2</sub> (序列号4)

Seq-5:c (Mpa-NmeTyr-Leu-Pro-c [Lys-Tyr-Leu-Cys) -Asp]-Leu-Ile-NH<sub>2</sub> (序列号5)

Seq-6:c (Mpa-NmeTyr-Leu-Pro-c [Lys-Tyr-Leu-Cys) -Asp]-Leu-Ile-NH<sub>2</sub> (序列号6)

Seq-7:c (Mpa-NmeTyr-Leu-Pro-c [Lys-Tyr-Leu-Cys) -Asp]-Leu-Ile-NH<sub>2</sub> (序列号7)

Seq-8:c (Mpa-NmeTyr-Leu-NmeGly-c (Cys) -Tyr-Leu-Cys) -Ser-Leu-Ile-NH<sub>2</sub> (序列号8)

Seq-9:c (Mpa-NmeTyr-Leu-NmeGly-c (Cys) -Tyr-Leu-Cys) -Dap-Leu-Ile-NH<sub>2</sub> (序列号9)

Seq-10:Ac-c [Cys<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Pro<sup>3</sup>-Tyr<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-Pro<sup>6</sup>-c (Lys<sup>7</sup>-Tyr<sup>8</sup>-Leu<sup>9</sup>-Cys<sup>10</sup>]-Asp<sup>11</sup>)-Leu<sup>12</sup>-Ile<sup>13</sup>-NH<sub>2</sub> (序列号10)

[0095] Seq-1和Seq-10是除去VIpep-3的C末端3残基 (Leu-Arg-Ser), 通过1位-10位间的S-S键和7位-11位间的酰胺键进行了二环化的肽, (Seq-2~7) 是除去VIpep-3的N末端2残基 (Cys-Pro) 和C末端3残基 (Leu-Arg-Ser), 通过3位-10位间的经由化学连接子的硫醚键和7位-11位间的酰胺键进行了二环化的肽, (Seq-8~9) 是除去VIpep-3的N末端2残基 (Cys-Pro) 和C末端3残基 (Leu-Arg-Ser), 通过3位-7位-10位间的经由TBMB连接子的硫醚键进行了二环化的肽。

[0096] (利用细胞ELISA法构建竞争结合试验)

为了确认氨基酸置换后的肽对VIPR2的结合活性, 构建了图3所示的基于细胞ELISA法的竞争结合试验。以下, 简单地说明本细胞ELISA法。将人VIPR2表达细胞株 (商品目录No. HTS079RTA、eurofins公司制) 撒入使用制造商提供的培养基的96孔板中, 在CO<sub>2</sub>培养箱内在37℃下培养一晚。用含有0.1% BSA的HBSS洗涤板后, 制备用含有0.1% BSA的HBSS稀释的Biotin-VIpep-3 (1000nM) 与任意浓度的氨基酸置换肽或VIpep-3的混合液, 以50μL/孔添加。在冰上反应60分钟后, 用含有0.1% BSA的HBSS洗涤板。用SA-HRP (商品目录No. ab7403、Avecam公司制) 检测与粘附于平板的VIPR2表达细胞结合的Biotin-VIpep-3。在HRP的定量中, 使用SuperSignal ELISA Pico Chemiluminescent Substrate (目录No. 37070、ThermoFischer公司制), 测定化学发光值。Biotin-VIpep-3对细胞表面VIPR2的结合与溶液中共存的氨基酸置换肽、VIpep-3对VIPR2的结合竞争, 因此氨基酸置换肽、VIpep-3的浓度依赖性地受到阻断。即, 以对Biotin-VIpep-3结合的竞争抑制活性形式检测氨基酸置换肽或VIpep-3对VIPR2的结合活性。将未添加Biotin-VIpep-3的孔的发光值设为抑制活性100%, 将未添加氨基酸置换肽或VIpep-3的孔的发光值设为抑制活性0%, 算出氨基酸置换肽及VIpep-3的50%抑制活性值。接着, 将VIpep-3的50%抑制活性值设为1, 算出

氨基酸置换肽的抑制活性值的相对值。

[0097] (氨基酸置换肽对VIPR2的结合活性的评价)

将在N=4下实施对VIPR2表达细胞的竞争结合试验的结果示于图4。本发明肽的代表例(Seq-1~9)均与Biotin-VIpep-3竞争。由这些结果显示,导入了氨基酸置换和二环化的本发明肽具有VIPR2结合活性。特别是,Seq-1~4和Seq-6的结合活性与VIpep-3同等或在其以上。

[0098] (本发明肽对VIPR2的拮抗活性的评价)

已知细胞内钙浓度的变化为VIPR2的下游信号之一。对于人VIPR2表达细胞株(目录No.HTS079RTA、eurofins公司制),使用Scree Quest™ Fluo-8 No Wash Calcium Assay Kit(目录No.36315、AAT Bioquest公司制),导入用于用荧光测定细胞内钙浓度的变化的指示试剂Fluo-8。一起添加作为天然配体的VIP(终浓度150nM)和VIpep-3(终浓度750nM)或本发明肽的代表例(Seq-1、5~9)(终浓度750nM),用荧光显微镜经时观察荧光强度的变化。将添加VIP前的荧光强度与添加VIP后的最强荧光强度之差设为100%,与一起添加VIpep-3或本发明肽时的荧光强度之差进行比较。

[0099] 如图5所示,VIpep-3、本发明肽的代表例(Seq-1、5~9)阻断了VIP对VIPR2的受体激动活性。特别地,Seq-1和Seq-6的抑制活性等于或大于VIpep-3的抑制活性。

[0100] (本发明肽的蛋白酶降解抗性的评价)

为了确认本发明肽与VIpep-3相比具有蛋白酶降解抗性,在大鼠血浆中混合VIpep-3或本发明的代表性肽(Seq-1、6、9、10),在一定时间的培养后通过RP-HPLC的峰有无来评价肽的残留。相对于各10mM的肽1 $\mu$ L,添加大鼠血浆20 $\mu$ L,在37 $^{\circ}$ C下培养任意时间(0或24小时)。然后,相对于VIpep-3添加80%乙腈,相对于除此以外的肽添加乙腈各200 $\mu$ L,充分混合后,在冰上静置10分钟,在4 $^{\circ}$ C下以15000rpm的速度离心10分钟,由此除去血浆蛋白质。回收上清液,用使用SunFire C18柱(5 $\mu$ m 4.6 $\times$ 150mm)的RP-HPLC(A液:0.1%TFA/水、B液:0.1%TFA/乙腈、1mL/min下80%A液 $\rightarrow$ 10%A液的梯度20min)检测肽的残留量。如图6所示,来源于VIpep-3的峰在培养24小时后大幅减少,暗示了序列中的任意部分受到蛋白酶水解。另一方面,来自本发明的代表性肽(Seq-1、6、9、10)的峰即使在24小时后与培养时间0小时相比也维持大致同等。由这些结果显示,导入了氨基酸置换和二环化的本发明肽具有蛋白酶水解抗性。

[0101] (本发明肽对VIPR2的选择性拮抗活性的评价)

将任意浓度的本发明肽的代表例(Seq-10)添加到已导入细胞内钙浓度指示剂的VIPR1表达细胞、已导入细胞内钙浓度指示剂的VIPR2表达细胞、或已导入细胞内钙浓度指示剂的PAC1表达细胞中,培养30分钟。接着,用FLIPRTetra测定在VIPR1细胞和VIPR2细胞中添加VIP(25nM和150nM)、在PAC1细胞中添加PACAP(35nM)之后2分钟的细胞内钙浓度的变化。将仅添加VIP或PACAP的配体时的细胞内钙浓度的变化设为抑制率0%,将未同时添加拮抗肽和配体时的细胞内钙浓度的变化设为抑制率100%,计算拮抗肽的抑制率。

[0102] 如图7所示,本发明肽的代表例(Seq-10)的拮抗活性中,针对VIP-VIPR2相互作用的拮抗活性显著强于针对VIP-VIPR1相互作用、PACAP-PAC1相互作用的拮抗活性。

[0103] (本发明肽在体内的VIPR2拮抗活性的评价)

将作为VIP类似物的、VIPR2选择性激动剂Ro25-1553(株式会社肽研究所)

(0.4nmol/g体重) 溶解于PBS后,与溶解于DMSO的本发明肽的代表例(Seq-10) (1nmol/g体重或10nmol/g体重) 或DMSO (vehicle组) 以9:1混合(DMSO的终浓度10%)。将这些溶液对ICR小鼠(12日龄、雄性) 进行皮下给药。1小时后,摘除脑,取前额皮质,用蛋白质印迹评价细胞内的循环AMP响应序列结合蛋白(CREB) (VIPR2下游信号之一) 的磷酸化。需要说明的是,蛋白质印迹中使用的抗体为从Cell Signaling Technology公司购入的抗磷酸化CREB抗体(#9198) 和抗CREB抗体(#9197)。

[0104] 如图8所示,在Seq-10的存在下,明确地抑制了CREB的磷酸化,因此显示出本发明肽的代表例在体内具有对VIPR2的拮抗活性。

[0105] (通过施用本发明肽来改善小鼠对新奇物体的认识功能的评价)

如非专利文献12所报告的那样,将Ro25-1553对出生第一天的鼠进行14天1天1次皮下给药后,继续饲养而生长的小鼠(8周龄) 对新奇物体的认识功能明显降低(图9(A))。评价本发明肽是否能够改善因VIPR2的活化而降低的对新奇物体的认识功能。将作为VIP类似物的VIPR2选择性激动剂Ro25-1553(株式会社肽研究所(PEPTIDE INSTITUTE, INC.)) (0.07nmol/g体重) 溶解于PBS后,与溶解于DMSO的本发明肽的代表例(Seq-10) (1nmol/g体重) 或DMSO (vehicle组) 以99:1混合(DMSO的终浓度1%)。将这些溶液对出生第一天的ICR小鼠(雄性) 进行14天的1天1次皮下给药后,继续饲养,在8周龄时供于对新奇物体的识别试验。新奇物体识别试验依据非专利文献12,在光照期(8:00-20:00) 进行。首先,在设定为30勒克司的照度的隔音实验室内,在仅铺设有木制的灭菌后的软片(SANKYO LABO SERVICE株式会社) 的丙烯酸改性聚氯乙烯制的试验笼(30cm×30cm×35cm) 中,将受试小鼠1天驯化10分钟并驯化3天。第4天在距墙壁8cm的位置放置不同的2个物体(object a、b从高尔夫球、乐观积木块、塑料的圆柱和插座中随机选择2个),自由探索10分钟(训练试验)。在该24小时后,在将物体b替换为作为新奇物体的物体c的试验笼内自由地探索5分钟(训练试验)。对训练试验和训练试验中的动物的行动进行视频录像,测量针对2个物体的各自的探索时间。将训练试验中的物体c与物体a的探索时间差相对于总探索时间的比例(%) 作为识别指数算出。

[0106] 如图9(B) 所示,给予了Ro25-1553的小鼠对新奇物体的认识功能明显降低。另一方面,在与本发明肽的代表例(Seq-10) 混合给药的小鼠中,显著改善了对新奇物体的认识功能的降低(通过学生t检验得到的p值为0.001以下)。而且,该认识功能与正常小鼠大致相同。该结果表明,通过施用本发明肽,能够显著地预防、改善由VIPR2的活化引起的小鼠对新奇物体的识别功能的降低。

#### 产业上的可利用性

[0107] 本发明的肽具有蛋白酶水解抗性,通过肽与VIPR2结合,从而阻断经由天然配体的VIPR2的信号传递。因此,认为本发明的肽对于与VIPR2的活化相关的疾病、例如精神分裂症、自闭症谱系障碍等的预防、治疗是有用的。

[0108] 本发明的肽不仅可以将其本身作为药剂使用,还可以作为向表达VIPR2的组织的递送分子、或作为检测VIPR2的表达的分子使用。

[0109] 进而,通过将本发明的肽与具有其他作用机理的药品或疗法并用,可期待发挥进一步的预防或治疗精神分裂症或自闭症谱系障碍等的效果。

## 序列表

<110> 一丸自然美健有限公司 (ICHIMARU PHARCOS Co., Ltd.)

<120> VIPR2 拮抗肽

<130> FP222612JP

<150> JP 2020-059721

<151> 2020-03-30

<160> 11

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> VIPR2 拮抗二环肽 1

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (1) ... (1)

<223> 3-巯基丙酸 (Mpa)

<220>

<221> DISULFID

<222> (1) ... (10)

<223> S-S (1-10)

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (7) ... (11)

<223> 经由酰胺键 (7-11) 的环化

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (13) ... (13)

<223> 酰胺化

<400> 1

Xaa Pro Pro Tyr Leu Pro Lys Tyr Leu Cys Asp Leu Ile

1

5

10

<210> 2

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

- <223> VIPR2 拮抗二环肽 2  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1) ... (1)  
 <223> 3-巯基丙酸 (Mpa)  
 <220>  
 <221> THIOETH  
 <222> (1) ... (8)  
 <223> 通过与1,4-二碘丁烷 (DIBut) 的反应进行的环化 (1-8)  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2) ... (2)  
 <223> N-甲基酪氨酸 (NmeTyr)  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (5) ... (9)  
 <223> 经由酰胺键 (5-9) 的环化  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (11) ... (11)  
 <223> 酰胺化  
 <400> 2  
 Xaa Tyr Leu Pro Lys Tyr Leu Cys Asp Leu Ile  
 1                    5                    10  
 <210> 3  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> VIPR2 拮抗二环肽 3  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1) ... (1)  
 <223> 3-巯基丙酸 (Mpa)  
 <220>  
 <221> THIOETH  
 <222> (1) ... (8)  
 <223> 通过与1,5-二碘戊烷 (DIPen) 的反应进行的环化 (1-8)  
 <220>













<223> 乙酰化

<220>

<221> DISULFID

<222> (1) ... (10)

<400> 11

Cys Pro Pro Tyr Leu Pro Arg Arg Leu Cys Thr Leu Leu Leu Arg Ser

1

5

10

15

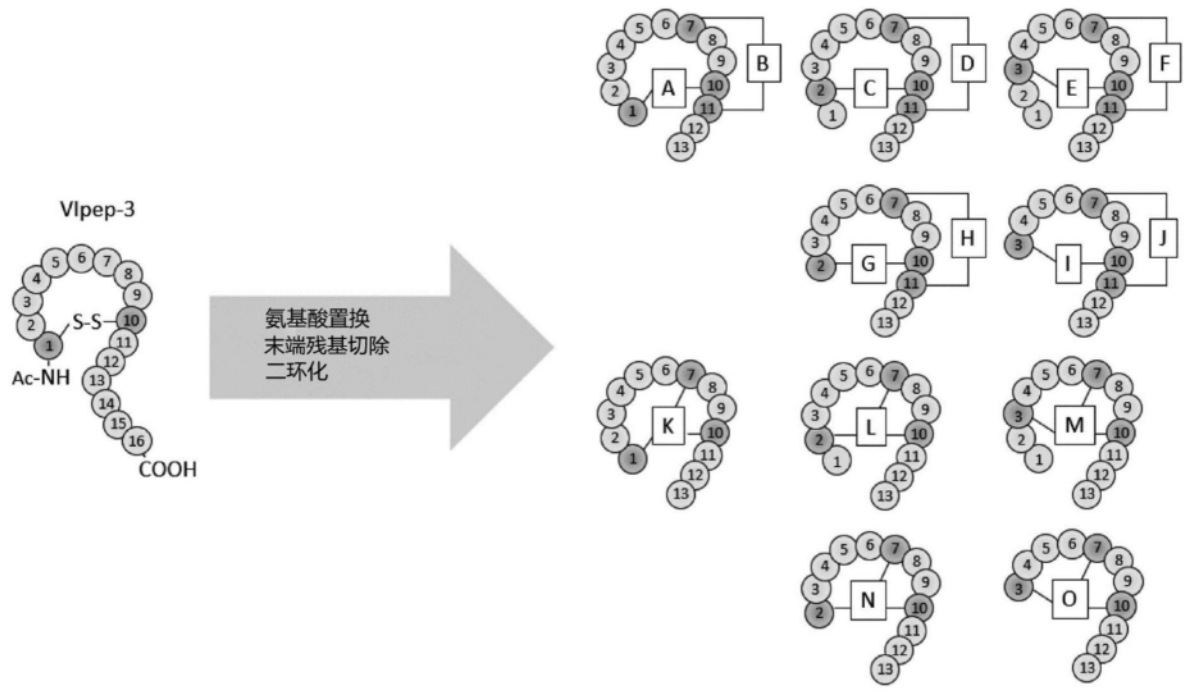


图1

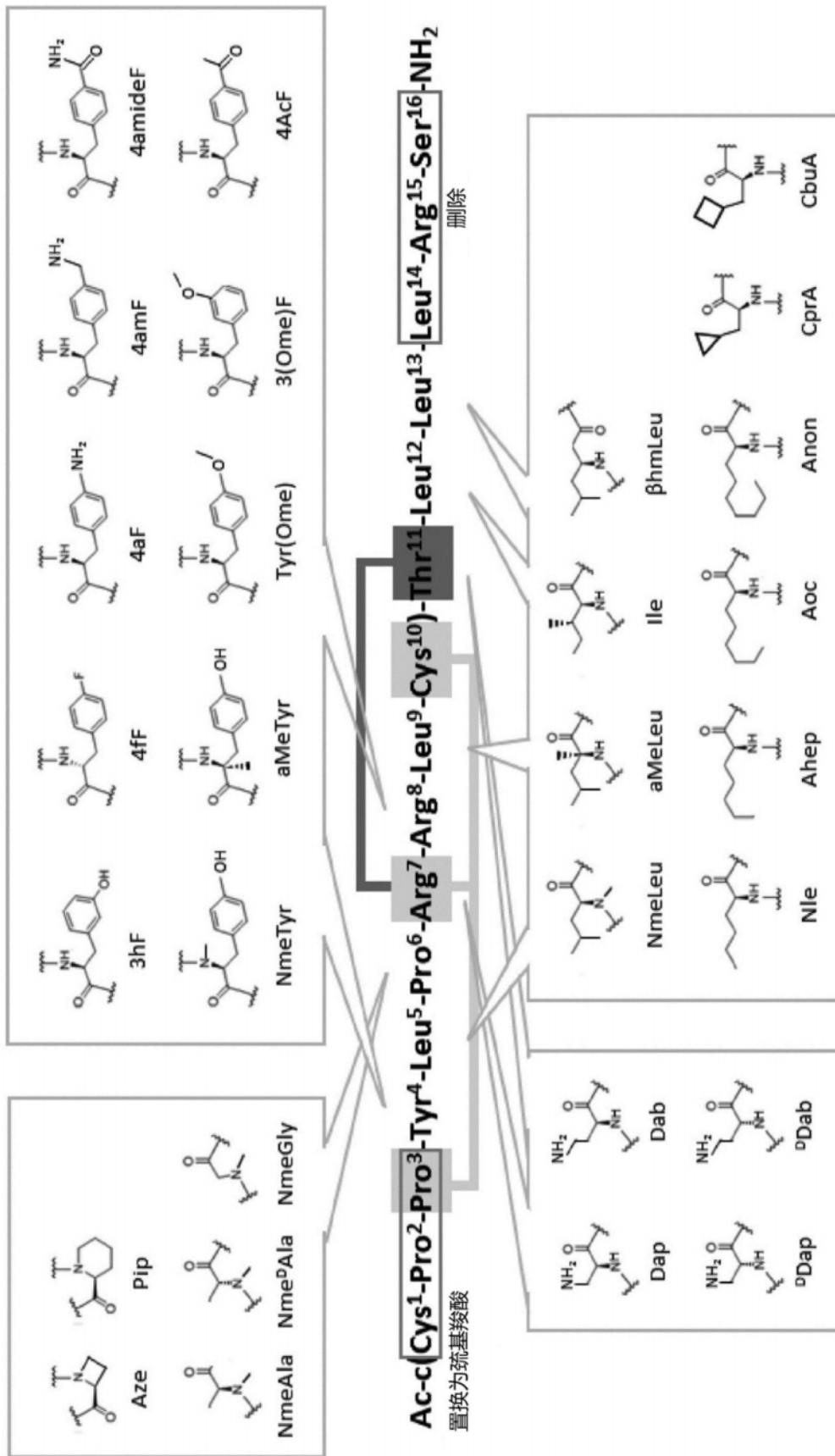


图2

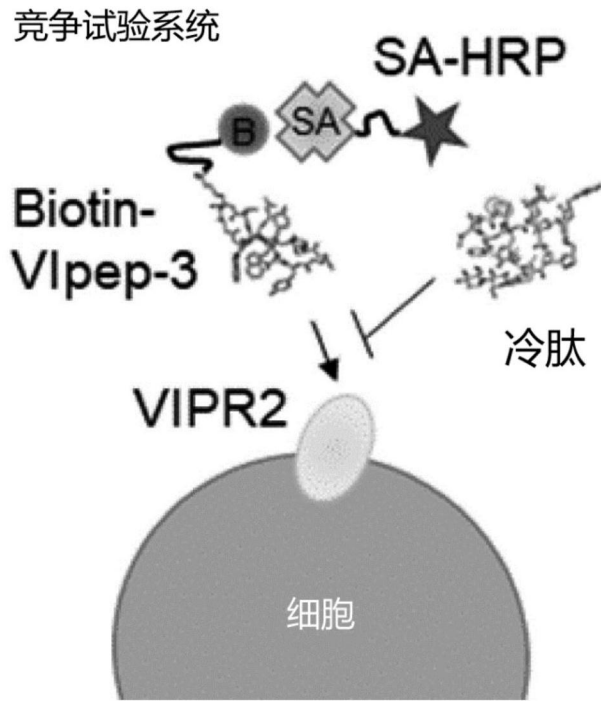


图3

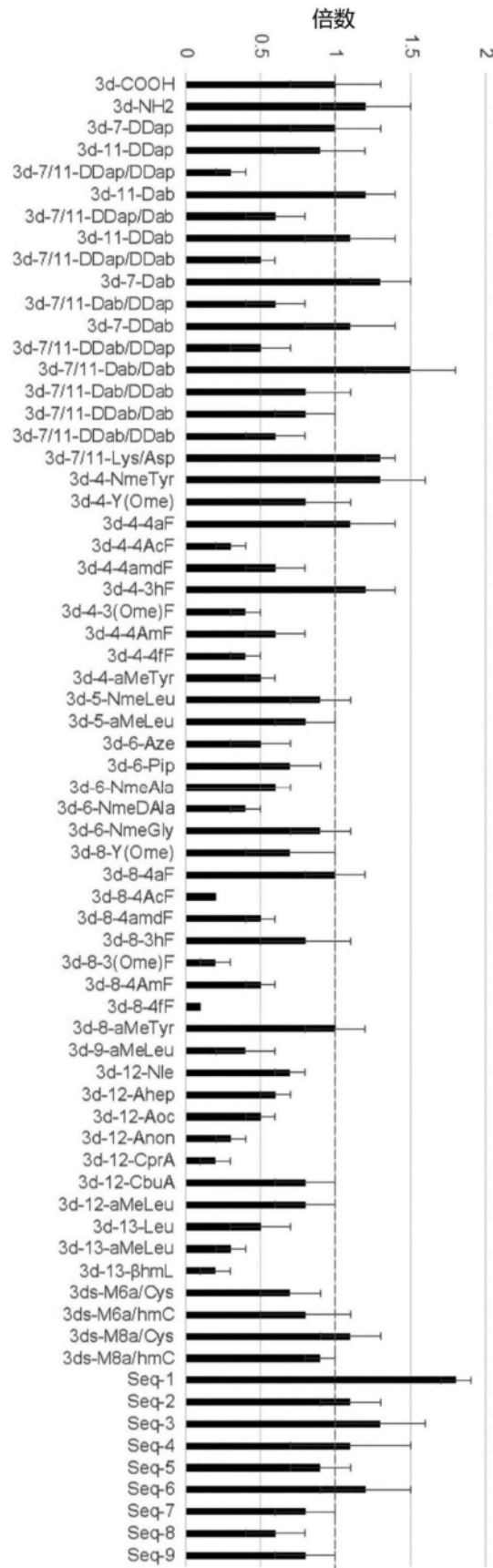


图4

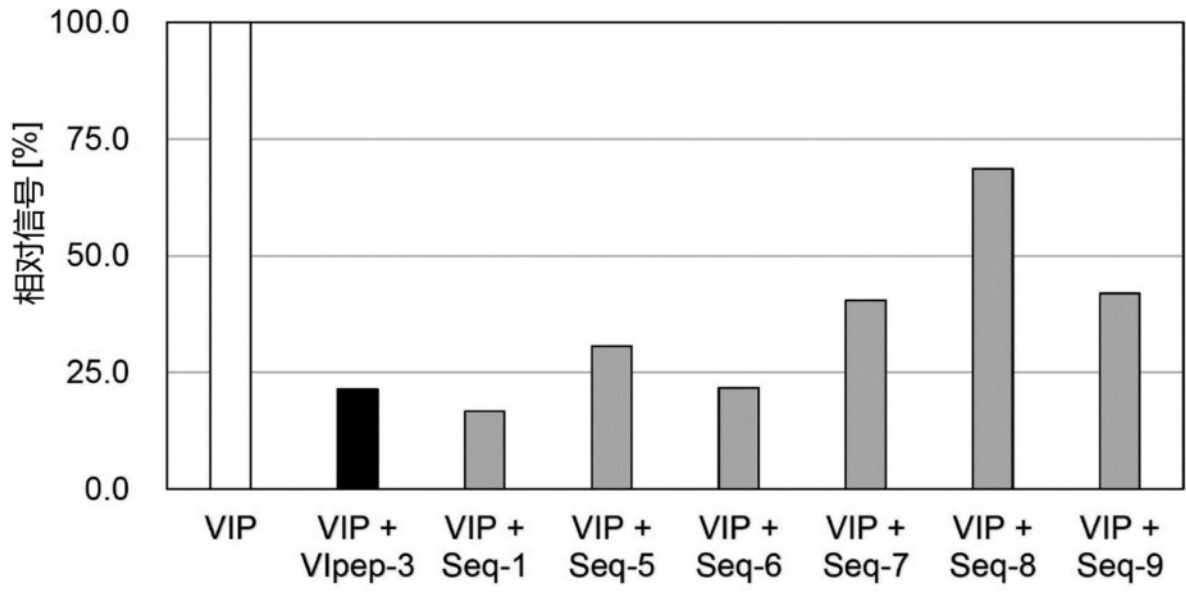


图5

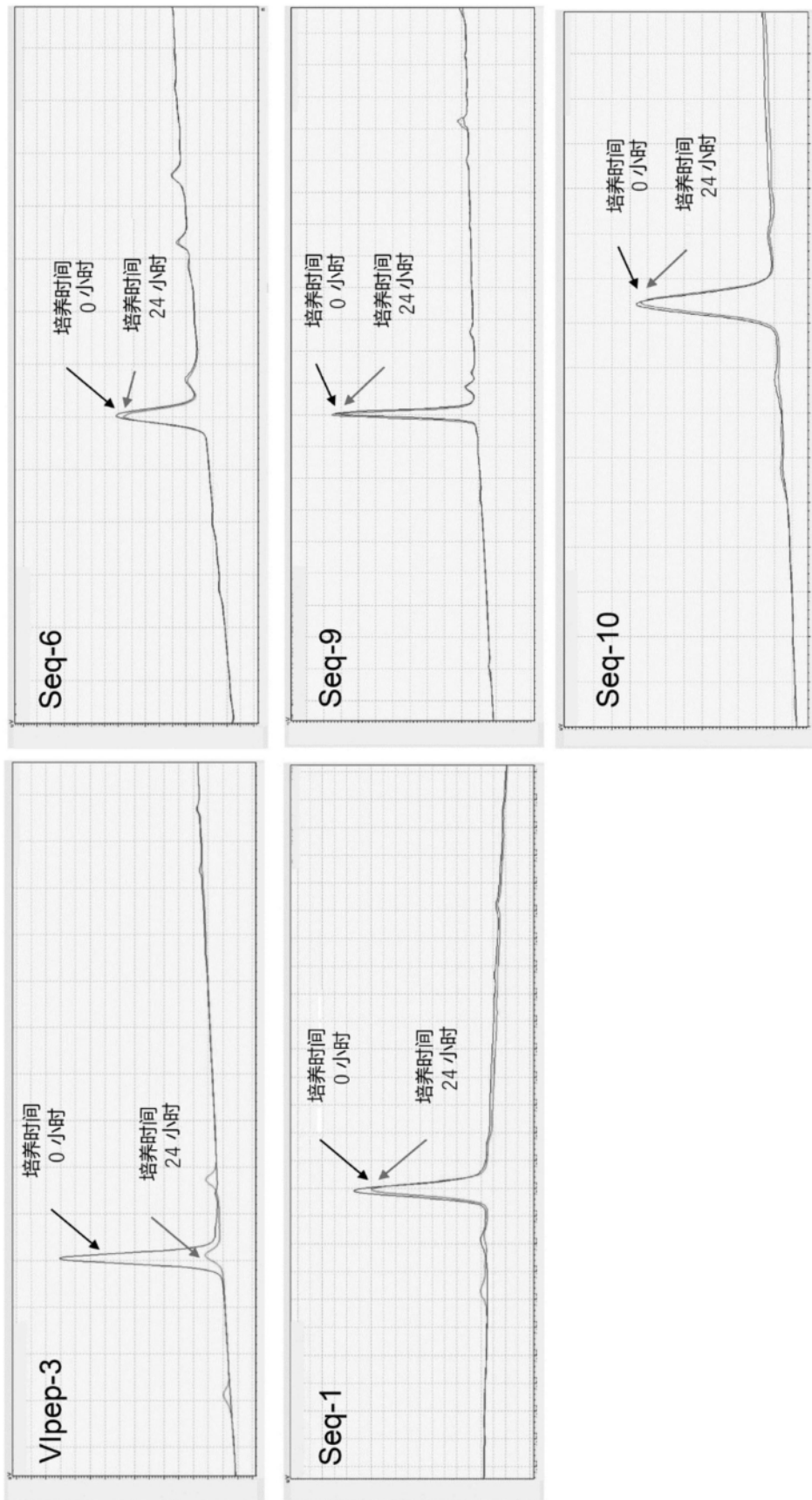


图6

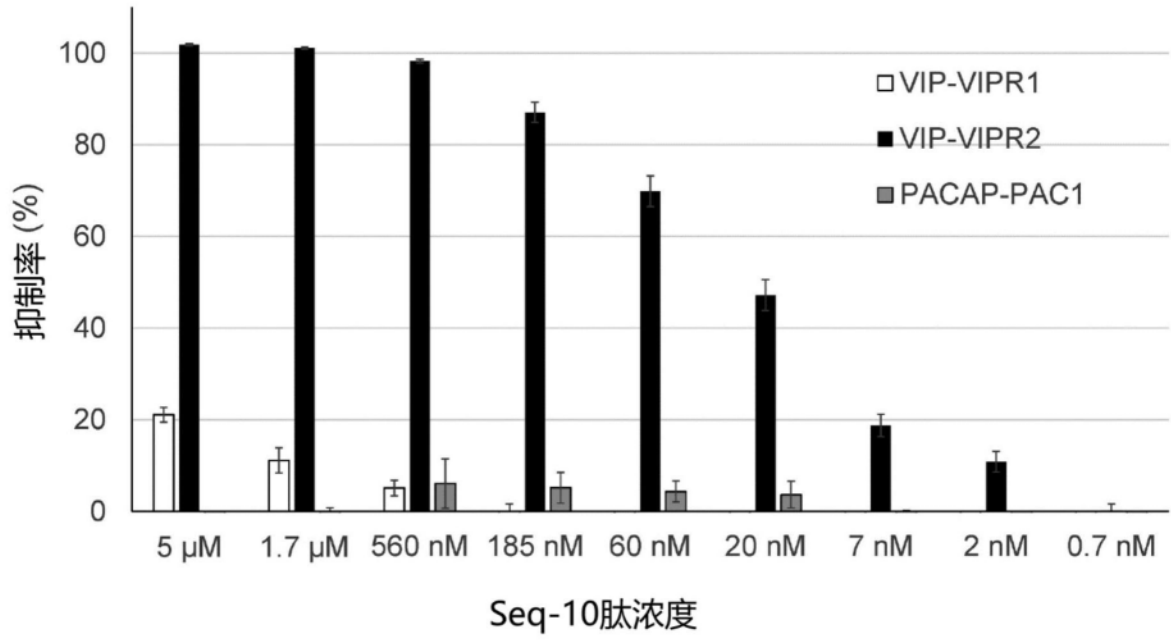


图7

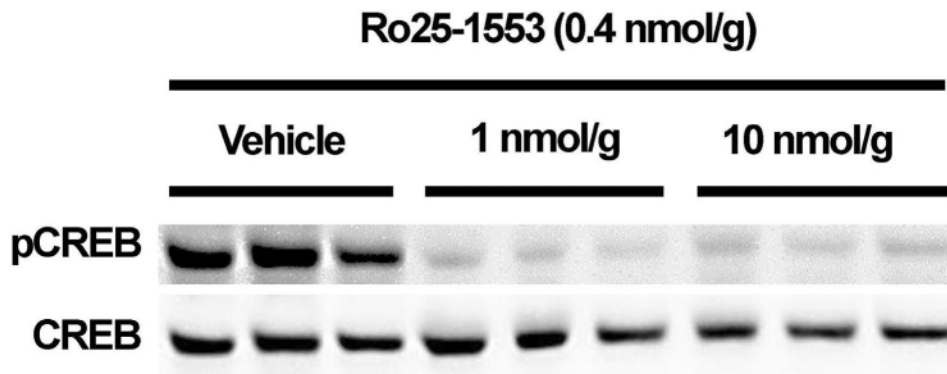


图8

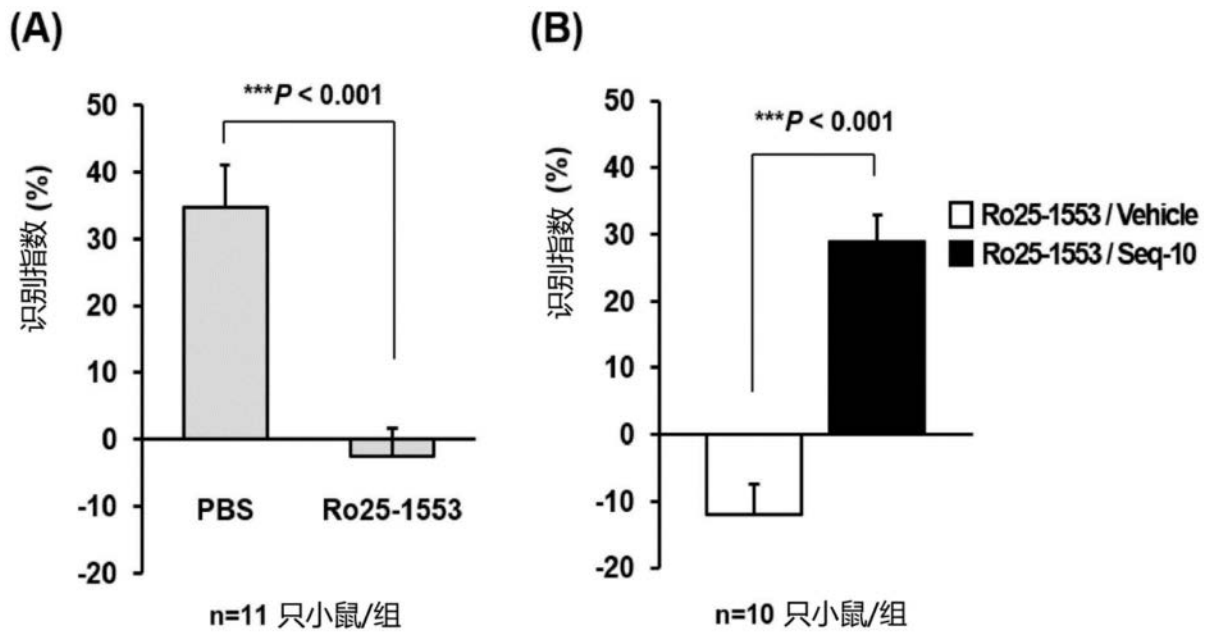


图9

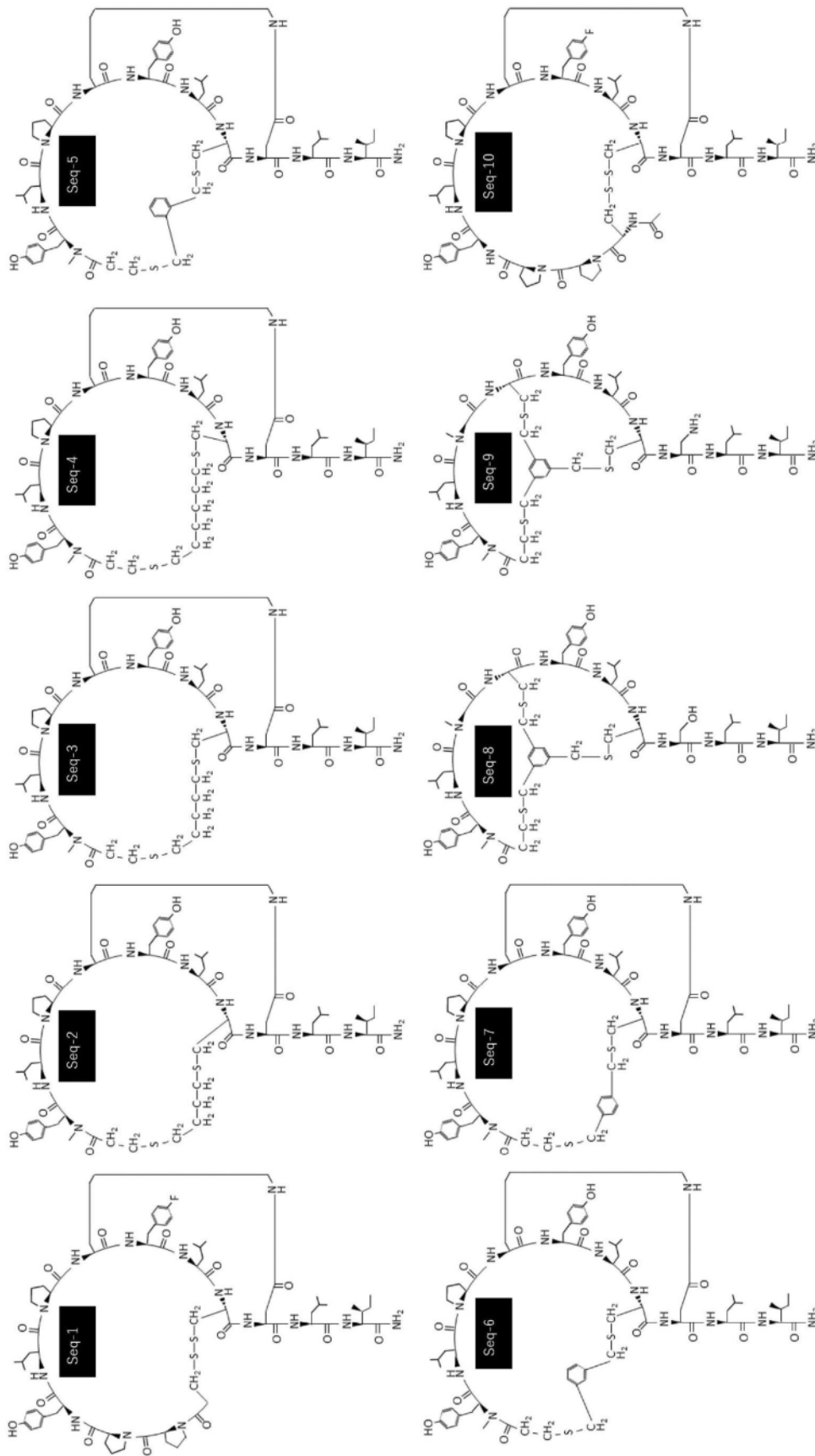


图10