

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷
C07K 14/605
C07K 14/00 C07K 14/47
A61K 38/04 C07K 14/635
C07K 14/655



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01813865.9

[43] 公开日 2003 年 11 月 5 日

[11] 公开号 CN 1454214A

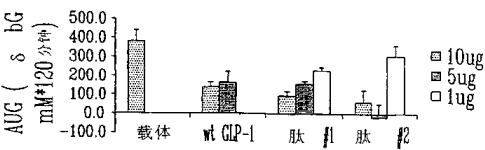
[22] 申请日 2001.8.2 [21] 申请号 01813865.9
[30] 优先权
[32] 2000. 8. 2 [33] US [31] 60/222,619
[86] 国际申请 PCT/CA01/01119 2001.8.2
[87] 国际公布 WO02/10195 英 2002.2.7
[85] 进入国家阶段日期 2003.2.8
[71] 申请人 赛莱技术公司
地址 加拿大魁北克
[72] 发明人 丹尼斯·格拉弗尔
阿卜代尔克里姆·哈比
梯也尔里·阿布里巴特

[74] 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限责
任公司
代理人 丁业平 王维玉

权利要求书 19 页 说明书 36 页 附图 1 页

[54] 发明名称 具有增高功效的修饰生物肽
[57] 摘要

本发明涉及具有高效价、长效活性和/或长半寿期的修饰生物肽。经偶联通过酰胺键用至少一个刚性构象取代基在肽的 N 端上、在肽的 C 端上、在沿肽链的游离氨基或羧基上，或者在多个这些位点进行修饰。那些肽在例如与病变如 II 型糖尿病有关的胰岛素耐受性的治疗中表现出临床效果。



I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 式 X_n-R_1 的肽, 其中:
- R_1 是肽序列、其官能类似物或其片段 ;
- 5 各 X 可以相同或彼此独立并选自下列刚性构象部分:
- i) 直链、被取代的 C_1-C_{10} 烷基;
- ii) 支链、被取代的 C_1-C_{10} 烷基;
- iii) 直链或支链、未被取代或被取代的 C_1-C_{10} 链烯;
- iv) 直链或支链、未被取代或被取代的 C_1-C_{10} 链炔;
- 10 v) 未被取代或被取代的、饱和或不饱和 C_3-C_{10} 环烷基或杂环烷基
- 其中所述的杂原子是 O、S 或 N;
- vi) 未被取代或被取代的 C_5-C_{14} 芳基或杂芳基其中所述的杂原子是 O、S 或 N;
- 其中在定义 i) - vi) 中的取代基含有一个或多个
- 15 a) 直链或支链 C_1-C_6 烷基;
- b) 直链或支链 C_1-C_6 链烯;
- c) 直链或支链 C_1-C_6 链炔;
- d) C_3-C_{10} 环烷基或杂环烷基其中至少 2 个碳原子任选地与 C_1-C_{10} 烷基、 C_1-C_{10} 链烯、 C_1-C_{10} 链炔、 C_3-C_{10} 环烷基或杂环烷基、和 C_5-C_{14} 芳基或杂芳基连接; 或
- 20 e) C_5-C_{14} 芳基或杂芳基, 其中所述芳基或杂芳基的至少 2 个碳原子任选地与 C_1-C_{10} 烷基、 C_1-C_{10} 链烯、 C_1-C_{10} 链炔、 C_3-C_{10} 环烷基或杂环烷基、和 C_5-C_{14} 芳基或杂芳基连接; 所述基团 X 也含有至少一个选自下列的基团:
- 25 α) 经酰胺键在肽序列的 N 端、肽序列的 C 端、肽序列链的可利用羧基或氨基位点及其组合用于与肽序列偶联的羧基或氨基; 和
- β) 经酯键在该肽序列链上的可利用羟基位点及其组合用于与肽序列偶联的羧基;;
- 其中,
- 30 n 是介于 1-5 的整数;

和其任何异构体, 包括顺式和反式构象、差向异构体、对映异构体、非对映异构体和消旋混合物。

不包括美国专利号 6,020,311 的权利要求 1 所述的肽。

5 2. 权利要求 1 所述的肽, 其中所述肽序列选自生长激素释放因子(GRF)、促生长素抑制素、胰高血糖素样肽 1 (7-37)、酰胺人(GLP-1) hGLP-1 (7-36)NH₂、甲状旁腺素片段(PTH 1-34)、促肾上腺皮质激素 (ACTH)、骨钙蛋白、降钙素、促肾上腺皮质激素释放因子、强啡肽 A、
10 β-内啡肽、巨胃泌素-1、GLP-2、黄体激素释放激素、促黑激素(MSH)、心房肽、神经调节肽 B、人神经肽 Y、人 OrexinA、人肽 YY、人促胰液素、血管活性肠肽(VIP)、抗菌肽(爪蟾抗菌肽 1, 爪蟾抗菌肽 2, 杀菌肽 A, 和杀菌肽 B)、P 物质(SP)、β Casomorphin-5、内啡素-2、
15 Procolipase、Enterostatin、肠抑肽、嗜铬粒蛋白 A、Vasostatin I & II, 降钙素原、ProNCT、CGRP (降钙素基因相关肽)、IL8(单核细胞衍化的)、GCP-2、PF4、IP-10、MIG、SDF-1、GRO-α、I-TAC、RANTES、LD78、MIP-1α、MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、Eotaxin、MDC, 和它们的官能类似物和其衍生物或片段。

20 3. 权利要求 1 和 2 所述的肽, 其中所述刚性构象部分至少含有双键、叁键或饱和或不饱和环。

4. 权利要求 1-3 任一项所述的肽, 其中所述刚性构象部分含有一个或多个说明书中式 1-63 定义的结构。

25 5. 权利要求 1-4 任一项所述的肽, 其中所述肽序列选自下面成负组成的组:

生长激素释放因子 (GRF):

30 Xaa₁-Xaa₂-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Xaa₈-Ser-Tyr-Arg-Lys-Xaa₁₃-Leu-Xaa₁₅-Gln-Leu-Xaa₁₈-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-Xaa₂₄-Xaa₂₅-Ile-Xaa₂₇-Xaa₂₈-Arg-Gln-Gln-Gly-Glu-Ser-Asn-Gln-Glu-Arg-Gly-Ala-Arg-Ala-Arg-Leu-

NH₂

其中,

Xaa₁ 是 Tyr 或 His;

Xaa₂ 是 Val 或 Ala;

5 Xaa₈ 是 Asn 或 Ser;

Xaa₁₃ 是 Val 或 Ile;

Xaa₁₅ 是 Ala 或 Gly;

Xaa₁₈ 是 Ser 或 Tyr;

Xaa₂₄ 是 Gln 或 His;

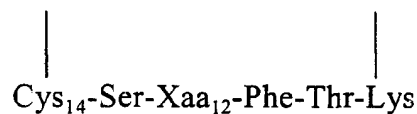
10 Xaa₂₅ 是 Asp 或 Glu;

Xaa₂₇ 是 Met、Ile 或 Nle; 和

Xaa₂₈ 是 Ser 或 Asn;

促生长素抑制素:

15 Ala₁-Gly-Cys-Lys-Asn-Phe-Phe-Trp



其中,

20 Xaa₁₂ 是 Tyr 或 Ser;

胰高血糖素样肽 1(7-37), (酰胺人(hGLP-1)):

His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-

Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-Gly-

25 OH(NH₂)

甲状旁腺素片段(PTH 1-34):

Xaa₁-Val-Ser-Glu-Xaa₅-Gln-Xaa₇-Met-His-Asn-Leu-Gly-Xaa₁₃-His-

Xaa₁₅-Xaa₁₆-Xaa₁₇-Xaa₁₈-Glu-Arg-Xaa₂₁-Xaa₂₂-Trp-Leu-Xaa₂₅-Xaa₂₆-Lys-

30 Leu-Gln-Asp-Val-His-Xaa₃₃-Xaa₃₄-NH₂

其中,

- 5 Xaa₁ 是 Ser 或 Ala;
Xaa₅ 是 Ile 或 Met;
Xaa₇ 是 Leu 或 Phe;
Xaa₁₃ 是 Lys 或 Glu;
Xaa₁₅ 是 Leu 或 Arg;
Xaa₁₆ 是 Asn 或 Ala 或 Ser 或 His;
Xaa₁₇ 是 Thr 的 Ser;
Xaa₁₈ 是 Met 或 Val 或 Leu;
10 Xaa₂₁ 是 Val 或 met 或 Gln;
Xaa₂₂ 是 Glu 或 Gln 或 Asp;
Xaa₂₅ 是 Arg 或 Gln;
Xaa₂₆ 是 Lys 或 Met;
Xaa₃₃ 是 Asn 或 Ser; 和
15 Xaa₃₄ 是 Phe 或 Ala;

促肾上腺皮质激素 (ACTH):

- Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Xaa₁₃-Gly-
Xaa₁₅-Lys-Arg-Arg-Pro-Xaa₂₀-Lys-Val-Tyr-Pro-Asn-Xaa₂₆-Xaa₂₇-Xaa₂₈-
20 Xaa₂₉-Glu-Xaa₃₁-Xaa₃₂-Glu-Xaa₃₄-Xaa₃₅-Xaa₃₆-Xaa₃₇-Glu-Xaa₃₉-NH₂

其中,

- Xaa₁₃ 是 Val 或 Met;
Xaa₁₅ 是 Lys 或 Arg;
Xaa₂₀ 是 Val 或 Ile;
25 Xaa₂₆ 是 Gly 或 Ser;
Xaa₂₇ 是 Ala 或 Phe 或 Val;
Xaa₂₈ 是 Glu 或 Gln;
Xaa₂₉ 是 Asp 或 Asn 或 Glu;
Xaa₃₁ 是 Ser 或 Thr;
30 Xaa₃₂ 是 Ala 或 Val 或 Ser;

- 5 Xaa₃₄ 是 Ala 或 Asn 或 Gly;
Xaa₃₅ 是 Phe 或 Met;
Xaa₃₆ 是 Pro 或 Gly;
Xaa₃₇ 是 Leu 或 Val 或 Pro; 和
Xaa₃₉ 是 Phe 或 Val 或 Leu;

骨钙蛋白:

- 10 Tyr-Leu-Xaa₅₂-Xaa₅₃-Xaa₅₄-Leu-Gly-Ala-Pro-Xaa₅₉-Pro-Tyr-Pro-
Asp-Pro-Leu-Glu-Pro-Xaa₆₈-Arg-Glu-Val-Cys-Glu-Leu-Asn-Pro-Xaa₇₇-
Cys-Asp-Glu-Leu-Ala-Asp-His-Ile-Gly-Phe-Gln-Xaa₈₉-Ala-Tyr-Xaa₉₂-
Arg-Xaa₉₄-Tyr-Gly-Xaa₉₇-Val-NH₂

其中,

- 15 Xaa₅₂ 是 Tyr 或 Asp 或 Asn;
Xaa₅₃ 是 Gln 或 His 或 Asn;
Xaa₅₄ 是 Trp 或 Gly;
Xaa₅₉ 是 Val 或 Ala;
Xaa₆₈ 是 Arg 或 Lys 或 His;
Xaa₇₇ 是 Asp 或 Asn;
Xaa₈₉ 是 Glu 或 Asp;
20 Xaa₉₂ 是 Arg 或 Lys;
Xaa₉₄ 是 Phe 或 Ile; 和
Xaa₉₇ 是 Pro 或 Thr;

降钙素:

- 25 Cys-Xaa₈₆-Xaa₈₇-Leu-Ser-Thr-Cys-Xaa₉₂-Leu-Gly-Xaa₉₅-Xaa₉₆-
Xaa₉₇-Xaa₉₈-Xaa₉₉-Xaa₁₀₀-Xaa₁₀₁-Xaa₁₀₂-Xaa₁₀₃-Xaa₁₀₄-Thr-Xaa₁₀₆-Xaa₁₀₇-
Xaa₁₀₈-Xaa₁₀₉-Xaa₁₁₀-Xaa₁₁₁-Gly-Xaa₁₁₃-Xaa₁₁₄-Xaa₁₁₅-Pro-NH₂

其中,

- 30 Xaa₈₆ 是 Gly 或 Ser 或 Ala;
Xaa₈₇ 是 Asn 或 Ser;

- 5 Xaa₉₂ 是 Met 或 Val;
Xaa₉₅ 是 Thr 或 Lys;
Xaa₉₆ 是 Tyr 或 Leu;
Xaa₉₇ 是 Thr 或 Ser;
Xaa₉₈ 是 Gln 或 Lys;
Xaa₉₉ 是 Asp 或 Glu;
Xaa₁₀₀ 是 Phe 或 Leu;
Xaa₁₀₁ 是 Asn 或 His;
Xaa₁₀₂ 是 Lys 或 Asn;
10 Xaa₁₀₃ 是 Phe 或 Leu;
Xaa₁₀₄ 是 His 或 Gln;
Xaa₁₀₆ 是 Phe 或 Tyr;
Xaa₁₀₇ 是 Pro 或 Ser;
Xaa₁₀₈ 是 Gln 或 Gly 或 Arg;
15 Xaa₁₀₉ 是 Thr 或 Ile;
Xaa₁₁₀ 是 Ala 或 Gly 或 Ser 或 Asp 或 Asn;
Xaa₁₁₁ 是 Ile 或 Phe 或 Val 或 Thr;
Xaa₁₁₃ 是 Val 或 Ala 或 Ser;
Xaa₁₁₄ 是 Gly 或 Glu; 和
20 Xaa₁₁₅ 是 Ala 或 Thr;

促肾上腺皮质激素释放因子:

- Ser-Glu-Glu-Pro-Pro-Ile-Ser-Leu-Asp-Leu-thr-Phe-His-Leu-Leu-
Arg-Glu-Val-Leu-Glu-Met-Xaa₁₀₁-Xaa₁₀₂-Ala-Glu-Gln-Leu-Ala-Gln-Gln-
25 Ala-His-Ser-Asn-Arg-Lys-Leu-Met-Glu-Ile-Ile-NH₂

其中,

- Xaa₁₀₁ 是 Ala 或 Pro; 和
Xaa₁₀₂ 是 Arg 或 Gly;

- 30 强啡肽 A:

H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Ile-Arg-Pro-Lys-Leu-Lys-Trp-
Asp-Asn-Gln-OH

β-内啡肽:

5 H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Thr-Xaa₂₄₃-Glu-Xaa₂₄₅-Ser-Gln-Thr-Pro-
Leu-Xaa₂₅₁-Thr-Leu-Phe-Lys-Asn-Ala-Ile-Xaa₂₅₉-Lys-Asn-Xaa₂₆₂-Xaa₂₆₃-
Lys-Lys-Gly-Xaa₂₆₇-OH

其中,

Xaa₂₄₃ 是 Ser 或 Pro;
10 Xaa₂₄₅ 是 Lys 或 Arg;
Xaa₂₅₁ 是 Val 或 Met;
Xaa₂₅₉ 是 Ile 或 Val;
Xaa₂₆₂ 是 Ala 或 Thr 或 Ser 或 Val;
Xaa₂₆₃ 是 Tyr 或 His; 和
15 Xaa₂₆₇ 是 Glu 或 Leu 或 Gln 或 His;

巨胃泌素-1:

pXaa₅₉-Leu-Gly-Xaa₆₂-Gln-Xaa₆₄-Xaa₆₅-Xaa₆₆-Xaa₆₇-Xaa₆₈-Xaa₆₉-
Ala-Asp-Xaa₇₂-Xaa₇₃-Lys-Lys-Xaa₇₆-Xaa₇₇-Pro-Xaa₇₉-Xaa₈₀-Glu-Xaa₈₂-
20 Glu-Glu-Xaa₈₅-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂

其中,

Xaa₅₉ 是 Glu 或 Gln;
Xaa₆₂ 是 Pro 或 Leu;
Xaa₆₄ 是 Gly 或 Asp;
25 Xaa₆₅ 是 Pro 或 Ser;
Xaa₆₆ 是 Pro 或 Gln;
Xaa₆₇ 是 His 或 Gln;
Xaa₆₈ 是 Leu 或 Met 或 Phe 或 Gln;
Xaa₆₉ 是 Val 或 Ile;
30 Xaa₇₂ 是 Pro 或 Leu;

- Xaa₇₃ 是 Ser 或 Ala;
Xaa₇₆ 是 Gln 或 Glu;
Xaa₇₇ 是 Gly 或 Arg;
Xaa₇₉ 是 Trp 或 Pro 或 Arg;
5 Xaa₈₀ 是 Leu 或 Val 或 Met;
Xaa₈₂ 是 Glu 或 Lys; 和
Xaa₈₅ 是 Glu 或 Ala;
- GLP-2:
- 10 His-Ala-Asp-Gly-Ser-Phe-Xaa₁₅₂-Xaa₁₅₃-Xaa₁₅₄-Xaa₁₅₅-Xaa₁₅₆-Xaa₁₅₇-
Xaa₁₅₈-Leu-Asp-Xaa₁₆₁-Xaa₁₆₂-Ala-Xaa₁₆₄-Xaa₁₆₅-Xaa₁₆₆-Phe-Xaa₁₆₈-
Xaa₁₆₉-Trp-Xaa₁₇₁-Xaa₁₇₂-Xaa₁₇₃-Thr-Xaa₁₇₅-Xaa₁₇₆-Xaa₁₇₇-Xaa₁₇₈;
其中,
Xaa₁₅₂ 是 Ser 或 Thr;
15 Xaa₁₅₃ 是 Asp 或 Ser;
Xaa₁₅₄ 是 Glu 或 Asp;
Xaa₁₅₅ 是 Met 或 Phe;
Xaa₁₅₆ 是 Asn 或 Ser;
Xaa₁₅₇ 是 Thr 或 Lys;
20 Xaa₁₅₈ 是 Ile 或 Val 或 Ala;
Xaa₁₆₁ 是 Asn 或 Ile 或 His 或 Ser;
Xaa₁₆₂ 是 Leu 或 Lys;
Xaa₁₆₄ 是 Ala 或 Thr;
Xaa₁₆₅ 是 Arg 或 Gln 或 Lys;
25 Xaa₁₆₆ 是 Asp 或 Glu;
Xaa₁₆₈ 是 Ile 或 Leu;
Xaa₁₆₉ 是 Asn 或 Asp;
Xaa₁₇₁ 是 Leu 或 Ile;
Xaa₁₇₂ 是 Ile 或 Leu;
30 Xaa₁₇₃ 是 Gln 或 Asn 或 His;

Xaa₁₇₅ 是 Lys 或 Pro;
Xaa₁₇₆ 是 Ile 或 Val;
Xaa₁₇₇ 是 Thr 或 Lys; 和
Xaa₁₇₈ 是 Asp 或 Glu;

5

黄体激素释放激素:

Xaa₁-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-OH

其中,

Xaa₁ 是 pGlu、5-氧代脯氨酸或 Gln,

10

促黑激素 (MSH):

Ac-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val-NH₂

心房肽:

15 H-Ser-Leu-Arg-Arg-Ser-Ser-Cys-Phe-Gly-Gly-Arg-Xaa₁₃₅-Asp-Arg-

Ile-Gly-Ala-Gln-Ser-Xaa₁₄₂-Leu-Gly-Cys-Asn-Ser-Phe-Arg-Tyr-OH

其中,

Xaa₁₃₅ 是 Met 或 Ile; 和

Xaa₁₄₂ 是 Gly 或 Ser;

20

神经调节肽 B:

H-Gly-Asn-Leu-Trp-Ala-Thr-Gly-His-Phe-Met-NH₂

人神经肽 Y:

25 H-Tyr-Pro-Ser-Lys-Pro-Asp-Asn-Pro-Gly-Glu-Asp-Ala-Pro-Ala-Glu-

asp-Met-Ala-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ala-Leu-Arg-His-Tyr-Ile-Asn-Leu-Ile-Thr-

Arg-Gln-Arg-Tyr-NH₂

人 Orexin A:

30 pGlu-Pro-Leu-Pro-Asp-Cys-Cys-Arg-Gln-Lys-Thr-Cys-Ser-Cys-Arg-

Leu-Tyr-Glu-Leu-Leu-His-Gly-Ala-Gly-Asn-His-Ala-Ala-Gly-Ile-Leu-
Thr-Leu-NH₂

人肽 YY:

5 H-Tyr-Pro-Ile-Lys-Pro-Glu-Ala-Pro-Gly-Glu-Asp-Ala-Ser-Pro-Glu-
Glu-Leu-Asn-Arg-Tyr-Tyr-Ala-Ser-Leu-Arg-His-Tyr-Leu-Asn-Leu-Val-
Thr-Arg-Gln-Arg-Tyr-NH₂

人促胰液素:

10 H-His-Ser-Asp-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Glu-Leu-Ser-Arg-Leu-Arg-
Glu-Gly-Ala-Arg-Leu-Gln-Arg-Leu-Leu-Gln-Gly-Leu-Val-NH₂

血管活性肠肽 (VIP):

15 H-His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-
Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn-NH₂

抗菌肽例如:

爪蟾抗菌肽 1:

20 Gly-Ile-Gly-Lys-Phe-Leu-His-Ser-Ala-Gly-Lys-Phe-Gly-Lys-Ala-
Phe-Val-Gly-Glu-Ile-Met-Lys-Ser

爪蟾抗菌肽 2:

Gly-Ile-Gly-Lys-Phe-Leu-His-Ser-Ala-Lys-Lys-Phe-Gly-Lys-Ala-
Phe-Val-Gly-Glu-Ile-Met-Asn-Ser

杀菌肽 A:

25 Lys-Trp-Lys-Val-Phe-Lys-Lys-Ile-Glu-Lys-Val-Gly-Gln-Ala-Thr-
Gln-Ile-Ala-Lys

杀菌肽 B:

30 Lys-Trp-Lys-Val-Phe-Lys-Lys-Ile-Glu-Lys-Met-Gly-Arg-Asn-Ile-
Arg-Asn-Gly-Ile-Val-Lys-Ala-Gly-Pro-Ala-Ile-Ala-Val-Leu-Gly-Glu-Ala-
Lys-Ala-Leu

- P 物质 (SP):
Arg-Pro-Leu-Pro-Gln-Glu-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-酰胺
β Casomorphin-5:
Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly
5 内啡素-2:
Tyr-Pro-Phe-Phe-NH₂
Procolipase:
100 氨基酸肽 (X1-Pro-X2-Pro-Arg....)
Enterostatin:
10 Val-Pro-Asp-Pro-Arg
胃泌素抑制肽:
Tyr-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Ile-Ser-Asp-Tyr-Ser-Ile-Ala- Met-Asp-
Lys-Ile-His-Gln-Gln-Asp-Phe- Val-Asn-Trp-Leu- Leu-Ala-Gln-Lys-Gly-
Lys-Lys-Asn-Asp-Trp-Lys-His-Asn- Ile-Thr-Gln
15 嗜铬粒蛋白 A
Vasostatin I
Vasostatin II:
Leu Pro Val Asn Ser Pro Met Asn Lys Gly Asp Thr Glu Val Met
Lys Cys Ile Val Glu Val Ile Ser Asp Thr Leu Ser Lys Pro Ser Pro Met
20 Pro Val Ser Gln Glu Cys Phe Glu Thr Leu Arg Gly Asp Glu Arg Ile Leu
Ser Ile Leu Arg His Gln Asn Leu Leu Lys Glu Leu Gln Asp Leu Ala Leu
Gln Gly Ala Lys Glu Arg Ala His Gln Gln Lys Lys His Ser Gly Phe Glu
Asp Glu Leu Ser Glu Val Leu Glu Asn Gln Ser Ser Gln Ala Glu Leu Lys
Glu Ala Val Glu Glu Pro Ser Ser Lys Asp Val Met Glu
25 Pro 降钙素
ProNCT
ProCGRP
趋化因子家族:
30 CXC-组:

- IL8(单核细胞衍化的):
SerAlaLysGluLeuArgCysGlnCys...
GCP-2:
GlyProValSerAlaValLeuThrGluLeuArgCysThrCys...
5 PF4:
GluAlaGluGluAspGlyAspLeuGlnCysLeuCys...
IP-10:
ValProLeuSerArgThrValArgCCysThrCys...
MIG:
10 ThrProValValArgLysGlyArgCysSerCys...
SDF-1:
LysProValSerLeuSerTyrArgCysProCys...
GRO- α :
AlaProLeuAlaThrGluLeuArgCysGlnCys...
15 I-TAC:
PheProMetPheLysLysGlyArgCysLeuCys...

CC-组:
RANTES:
20 SerProTyrSerSerAspThrThrProCys...
LD78:
AlaProLeuAlaAlaAspThrProThrAlaCys...
MIP-1 α
AlaProMetGlySerAspProProThrAlaCys...
25 MCP-1:
GlnProAspAlaIleAsnAlaProValThrCys...
MCP-2:
GlnProSerAspValSerIleProIleThrCys...
MCP-3:
30 GlnProValGlyIleTAsnSeerThrThrCys...

MCP-4:

GlnProAspAlaLeuAspValProSerThrCys...

Eotaxin:

GlyProAlaSerValProThrThrCys...

5

MDC:

GlyProTyrGlyAlaAsnMetGluAspSerValCys...

和它们的官能类似物和其衍生物或片段。

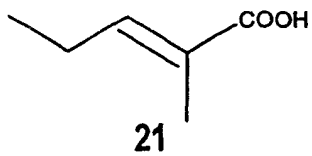
10

6. 按照权利要求 5 所述的肽，其中所述肽序列是天然肽的序列和其官能类似物或片段或其临床安全且可接受的衍生物或类似物。

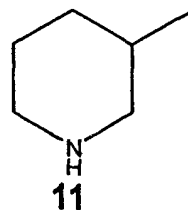
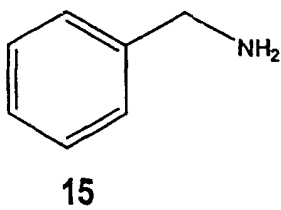
7. 权利要求 1 所述的肽，其中所述肽序列是促生长素抑制素且至少一个刚性构象部分与该促生长素抑制素肽序列经酰胺键在下列不同位置偶联：

位置 刚性构象部分

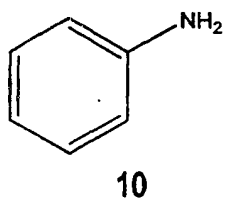
Ala₁



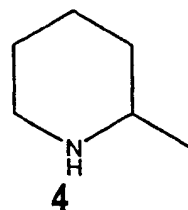
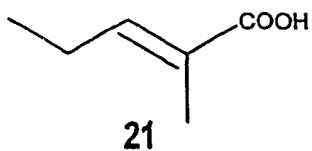
Asp₅



Cys₁₄



Ala₁+Cys₁₄

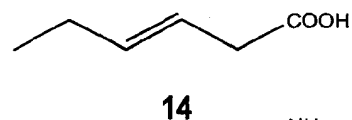
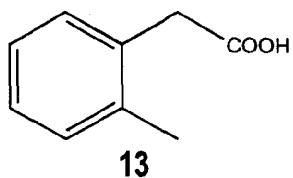


8. 权利要求 1 所述的肽，其中所述肽序列是 PTH 1-34 且至少一个刚性构象部分与该 PTH 1-34 肽序列经酰胺键在下列不同位置偶联：

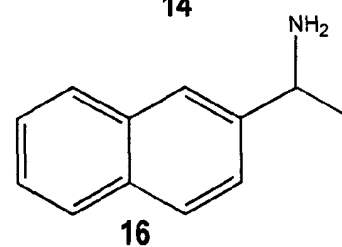
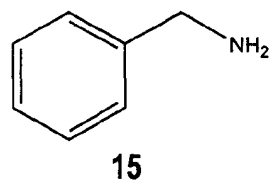
位置

刚性构象部分

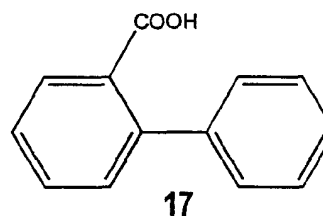
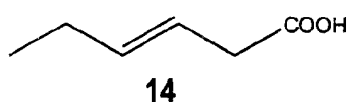
Ser₁



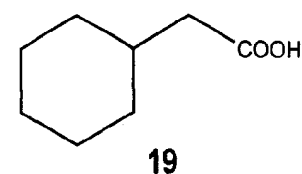
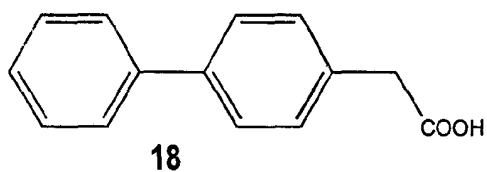
Glu₄



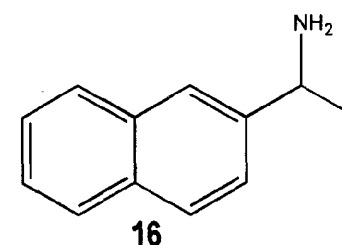
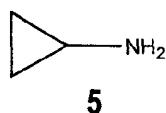
Lys₂₆



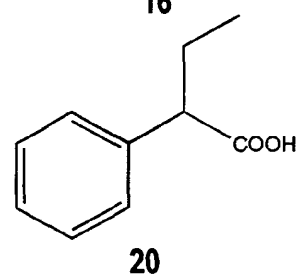
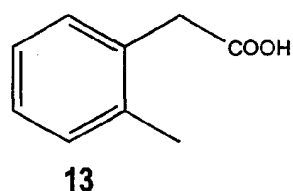
Lys₂₇



Asp₃₀



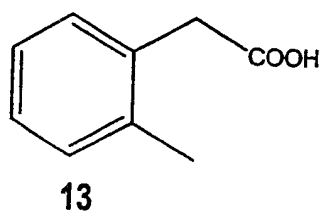
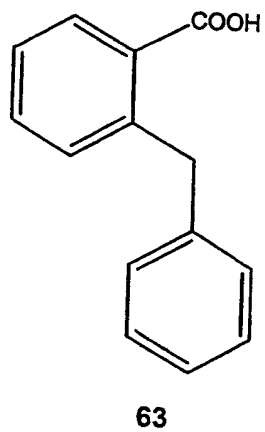
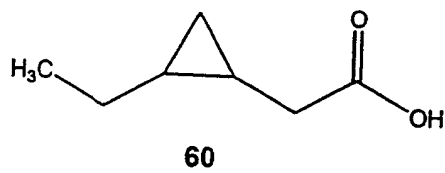
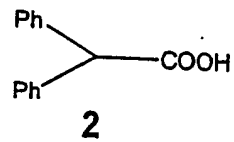
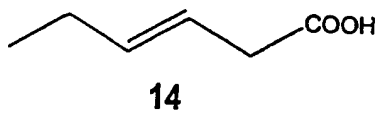
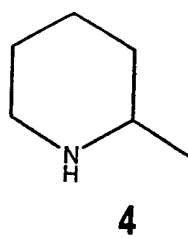
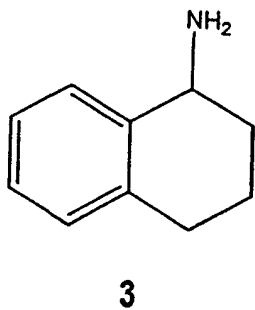
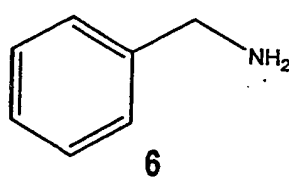
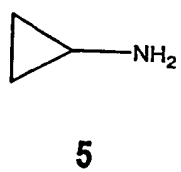
Ser₁+Lys₂₇

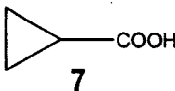
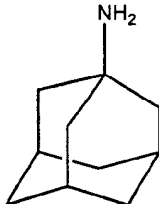
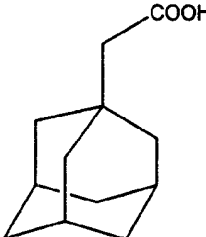
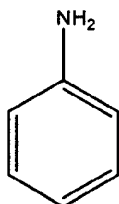
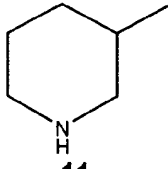
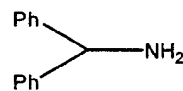


9. 权利要求 1 所述的肽，其中该肽序列是 GLP-1 且至少一个刚性构象部分与该 GLP-1 肽序列经酰胺键在下列不同位置偶联：

位置

刚性构象部分

His₁**Glu₃****Asp₉**

位置	刚性构象部分		
5	His ₁ + Glu ₃	 7	 8
10	His ₁ + Asp ₉	 9	 10
15	Glu ₃ + Asp ₉	 11	 12

10. 权利要求 1 所述的肽，其中该肽序列是 GLP-2 且至少一个刚性构象部分与该 GLP-2 肽序列经酰胺或酯键在该肽序列的不同位置偶联。

11. 权利要求 1 所述的肽，其中该肽序列是 Enterostatin 且至少一个刚性构象部分与该 Enterostatin 肽序列经酰胺键在该肽序列的不同位置偶联。

12. 权利要求 1 所述的肽，其中该肽序列是 NPY 且至少一个刚性构象部分与该 NPY 肽序列经酰胺或酯键在该肽序列的不同位置偶联。

13. 权利要求 1 所述的肽，其中该肽序列是 NPYY 且至少一个刚性构象部分与该 NPYY 肽序列经酰胺或酯键在该肽序列的不同位置偶联。

14. 权利要求 1 所述的肽，其中所述肽序列是促胰液素且至少一个 刚性构象部分与该促胰液素肽序列经酰胺或酯键在该肽序列的不同位置偶联。

5

15. 权利要求 1 所述的肽，其中所述肽序列是血管活性肠肽且至少一个刚性构象部分与该血管活性肠肽序列经酰胺或酯键在该肽序列的不同位置偶联。

10

16. 权利要求 1 所述的肽，其中所述肽序列是胃泌素抑制肽且至少一个刚性构象部分与该胃泌素抑制肽序列经酰胺或酯键在该肽序列的不同位置偶联。

15

17. 权利要求 1 所述的肽，其中所述肽序列是 Vasostatin II 且至少一个 刚性构象部分与该 Vasostatin II 肽序列经酰胺或酯键在该肽序列的不同位置偶联。

20

18. 权利要求 1 所述的肽，其中所述肽序列是 RANTES 且至少一个刚性构象部分与该 RANTES 肽序列经酰胺或酯键在该肽序列的不同位置上偶联。

25

19. 权利要求 1 所述的肽，其中所述肽序列是 Eotaxin 且至少一个 刚性构象部分与该 Eotaxin 肽序列经酰胺或酯键在该肽序列的不同位置偶联。

20. 权利要求 1—18 任一项所述的肽，其中所述刚性构象部分与该肽序列经酰胺或酯键在 N 端偶联。

30

21. 权利要求 8-19 任一项所述的肽，其中刚性构象部分具有说明书中所述的式 60 所示的结构。

22. 按照权利要求 20 的肽，其中所述肽序列是 GLP-1。

5 23. 权利要求 22 所述的肽在与胰岛素耐受性病变有关或无关的
葡萄糖不耐受的治疗中的应用。

24. 权利要求 23 所述的在 II 型糖尿病中的应用。

10 25. 权利要求 1 所述的肽，其中所述肽序列是 CGRP 且至少一个
刚性构象部分与该 CGRP 肽序列经酰胺或酯键在该肽序列的不同位置
偶联。

具有增高功效的修饰生物肽

5 发明领域

本发明涉及具有增高的生物功效、长效活性和/或增长的半寿期的修饰肽。通过酰胺键与至少一个位于肽的 N 端、肽的 C 端或沿肽链的游离氨基或羧基或位于多个这些位点的刚性构象取代基偶联来完成修饰。

10

发明背景

15

大多数肽在血清培养基中迅速降解，因此其代谢物有时以没有剩余生物活性或剩余生物学活性很低而告终。为了提高肽的活性，人们已经提出了许多技术。其中一种是在肽序列的 N 端或 C 端或在沿肽链的其他残基固着一个疏水性链。然而这种技术也存在局限性。譬如，如果肽具有长肽链，事实上固着在 N 端或 C 端的小疏水性基团不一定使如此修饰的肽产生增高的活性。

20

譬如，已知用更加疏水的基团如- Net_2 取代肽序列的 C 端的 OH 可以使比活性明显增高。然而，这些结论却遭到许多文章的反驳，例如 Muranichi 等在 Pharm. Res., 1991, 8, 649-652 中，他们强调月桂酰基作为疏水性基团在 N 端无法提高活性。所以，目前似乎没有任何有关生物功效、作用时间和/或半寿期的普遍规则，是在 N 端还是 C 端上或在沿肽链的某些残基上，可以从肽链上的取代基的添加获得结果。

25

US 6,020,311 公开一种疏水性生长激素释放因子(GRF)类似物，其中刚性疏水性部分经酰胺键偶联在 GRF 肽的 N 端。这样的类似物据称具有增高的合成代谢效价、降低的剂量，并且延长的活性。所以按照该专利的教导，刚性疏水性部分总是在一个末端含有一个羰基，

30

这意味着与 GRF 的酰胺偶联只发生在氨基位点以生成所需的酰胺键。
该专利没有提及、建议或暗示如果酰胺偶联是在 C 端进行通过用氨基
置换刚性疏水性部分的羰基可以获得类似的结果。该专利没有进一步
提及、建议或暗示酰胺偶联也可以在肽链上发生。

5

Biochemistry 2001, 40, 2860-2869 页公开了一种疏水性胰高血糖
素样肽-1(GLP-1)类似物, 其中己烯酸——一种刚性疏水性部分偶联在
GLP-1 肽的 N 端。结果证明这种类似物对 GLP-1 受体具有低亲和力,
但体内生物活性类似于或略好于野生型 GLP-1, 推断这归因于对血清
降解的耐受性增高。根据这个研究, 酰基链与 His¹ 的连接、Ala² 的氨
基酸取代, 以及在分子的 N 端氨基酸序列的添加将是比固着刚性疏水
链更好的提高体内生物活性的战略。然而, 大多数的这些战略涉及天
然分子的氨基酸组成的修饰, 这可能会对临床应用产生负面的安全后
果, 包括免疫原性的危险和副作用。

15

所以非常需要开发出以提高其活性方式修改的肽, 由此提高其功
效, 即对血清降解作用和/或高激动活性的对抗性更高, 和/或延长其
半寿期但不改变氨基酸序列, 这在临床上安全且可接受。

20 发明概述

根据本发明, 现在提供了式 X_n-R₁ 的肽, 其中 :

-R₁ 是肽序列, 当 X 表示连接在肽序列的 N 端的反式-3-己烯酰基
时它不是 GRF 序列;

-各 X 可以相同或彼此独立并且选自下列具有下面组成的刚性构
象部分:

25

a)经酰胺键可以与肽序列在肽序列的 N 端、肽序列的 C 端、肽序
列链的可利用羧基或氨基位点上及其组合偶联的羧基或氨基; 和

b)与肽序列经酯键在该肽序列链上的可利用羟基位点及其组合偶
联的羧基;

30 其中,

n 是介于 1—5 的任意数；

X 被定义为：

i)直链、被取代的 C_1-C_{10} 烷基；

ii)支链、被取代的 C_1-C_{10} 烷基；

5 iii)直链或支链、未被取代的和被取代的 C_1-C_{10} 链烯；

iv)直链或支链、未被取代的和被取代的 C_1-C_{10} 链炔；

v)未被取代的和被取代的、饱和或不饱和 C_3-C_{10} 环烷基或杂环烷基，其中所述的杂原子是 O、S 或 N；

10 vi)未被取代的和被取代的 C_5-C_{14} 芳基或杂芳基，其中所述的杂原子 O、S 或 N；

其中定义 i)–vi)中的取代基包括一个或多个

a)直链或支链 C_1-C_6 烷基；

b)直链或支链 C_1-C_6 链烯；

c)直链或支链 C_1-C_6 链炔；

15 d) C_3-C_{10} 环烷基或杂环烷基，其中至少 2 个碳原子任选地与 C_1-C_{10} 烷基、 C_1-C_{10} 链烯、 C_1-C_{10} 链炔、 C_3-C_{10} 环烷基或杂环烷基、和 C_5-C_{14} 芳基或杂芳基连接；和

20 e) C_5-C_{14} 芳基或杂芳基，其中所述芳基或杂芳基的至少 2 个碳原子任选地与 C_1-C_{10} 烷基、 C_1-C_{10} 链烯、 C_1-C_{10} 链炔、 C_3-C_{10} 环烷基或杂环烷基、和 C_5-C_{14} 芳基或杂芳基连接；

及其任何异构体，包括顺式和反式构型、差向异构体、对映异构体、非对映异构体和消旋混合物。

25 术语"芳基"包括苯基、萘基等；术语"杂环烷基"包括四氢呋喃基、四氢噻吩基、四氢噻喃基、四氢吡喃基及其部分脱氢衍生物，氮杂环丁烷基、哌啶基、吡咯烷基等；术语"杂芳基"包括吡啶基、吡咯基、呋喃基、咪唑基、四氢噻吩基、吡咯基、喹啉基、异喹啉基、嘧啶基、噁唑基、噻唑基、异噻唑基、异噁唑基、吡唑基等。

30 术语"刚性构象部分"是指具有受限制构象，即围绕其单键旋转移

动的实体。这种运动受到限制，例如，由于双键、叁键或饱和或不饱和和环的存在，其具有很小的或没有构象移动性。所以，当与例如相应的直链、未取代和饱和脂肪链比较时，构象异构体或内旋异构体的数量有所减少。刚性构象部分可以是疏水性的，尽管这不是先决条件。

5

根据本发明的一个优选实施方式，肽序列选自生长激素释放因子 (GRF)、促生长素抑制素、胰高血糖素样肽 1(7-37)、酰胺人(GLP-1)、hGLP-1(7-36)NH₂ 甲状旁腺素片段如(PTH 1-34)、促肾上腺皮质激素 (ACTH)、骨钙蛋白、降钙素、促肾上腺皮质激素释放因子、强啡肽 A、
10 β-内啡肽、巨胃泌素-1、GLP-2、黄体激素释放激素、促黑激素 (MSH)、心房肽、神经调节肽 B、人神经肽 Y、人 OrexinA、人肽 YY、人促胰液素、血管活性肠肽 (VIP)、抗菌肽(爪蟾抗菌肽 1、爪蟾抗菌肽 2、杀菌肽 A 和杀菌肽 B)、P 物质(SP)、β Casomorphin-5、内啡素-2、Procolipase、Enterostatin、肠抑肽、嗜铬粒蛋白 A、Vasostatin I & II、
15 降钙素原、ProNCT、ProCGRP、IL8(单核细胞衍化的)、GCP-2、PF4、IP-10、MIG、SDF-1α、GRO-α、I-TAC、RANTES、LD78、MIP-1α、MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、Eotaxin、MDC, 和它们的官能衍生物或片段。

20 发明详述

在本申请中氨基酸用下列常规的三字母缩写来表示，其通过 IUPAC-IUB 协会按生物化学命名法推荐被肽领域普遍接受：

丙氨酸	Ala	亮氨酸	Leu
精氨酸	Arg	赖氨酸	Lys
天门冬酰胺	Asn	蛋氨酸	Met
天门冬氨酸	Asp	苯丙氨酸	Phe
半胱氨酸	Cys	脯氨酸	Pro
谷氨酸	Glu	丝氨酸	Ser
谷氨酰胺	Gln	苏氨酸	Thr
甘氨酸	Gly	色氨酸	Trp
组氨酸	His	酪氨酸	Tyr
异亮氨酸	Ile	缬氨酸	Val

所有在此给出的肽序列按照一般可接受的常规方式按照 N 端氨基酸位于左方且 C 端氨基酸位于右方来撰写。

5

本发明涉及至少一种刚性构象部分在制备一类新的具有增强的药理学特性的肽家族中的应用。

10

本发明的修饰肽是按照下面固相合成领域中熟知的通用方法来制备。

15

含有羧基的刚性构象部分可以用于固着氨基例如存在于赖氨酸侧链上及肽的 N 端上的那些。含有氨基酸的那些用于固着羧基例如在天门冬氨酸或谷氨酸侧链或肽的 C 端上发现的那些。对于这样的情况，固着反应适宜在固相载体上 (Merrifield R.B. 1963, J. Am. Chem. Soc., 1963, 85, 2149 和 J. Am. Chem. Soc., 1964, 86, 304) 用苯并三唑-1-基-氧基-三(二甲基氨基)六氟磷酸磷通过 Castro 在文章 (B. Castro 等, 1975, Tetrahedron letters, Vol. 14 :1219) 中所述的方法制备。

20

对于固着动态，优选的工作温度是 20°C—60°C。在更加疏水部分的情况中固着反应时间随反应温度而变化，并且在 0.1—24 小时。

合成步骤是通过固相法在手动肽合成仪上用采用 Fmoc 策略进

行。Fmoc 氨基酸是由位于芝加哥的 Chem Impex International Inc.和其他化学品来源提供。使用 BOP 作为偶联剂的连续 Fmoc 化学应用于 PL-Wang 树脂(Polymer Laboratories, 目录号: 1463-4799)来制备 C 端羧酸。

5

Fmoc 脱保护是用哌啶 20%的 DMF 溶液在三个连续步骤中完成。通常在氮气冲洗下, 使用 1 分钟 20%的哌啶第一溶液以除去大部分的 Fmoc 保护基。随后, 排出该溶液, 并且引入另一新制的哌啶 20%溶液, 共 3 分钟, 再排出该溶液且最后引入另一 20%哌啶溶液, 共 10 分钟。进而肽-树脂连续用 50mL 的 DMF 在氮气冲洗下洗涤 4 次。合成完成之后, 树脂用 DMF 和 DCM 充分洗涤, 随后干燥。

10

侧链保护基和肽-树脂键的最终裂解是用下列混合物进行: TFA、乙二硫醇、三异丙基硅烷、苯硫基甲烷、苯酚、水 (92:1.66:1.66:1.66:1:2)。用 20mL 裂解混合物/克干燥肽-树脂的终浓度裂解下树脂上的肽。该裂解反应是在室温下进行 2 小时。将现存于 TFA 混合物中的游离肽在粗玻璃圆盘漏斗上过滤。该树脂随后用纯净 TFA 洗涤 3 次。所述的肽/TFA 混合物在真空下在旋转蒸发器上蒸发, 沉淀并用醚洗涤, 随后将其溶解在水中并冷冻干燥以消除残留的溶剂和清除剂。

15

20

第一 Fmoc-氨基酸偶联于 Wang 树脂

25

30

我们使用 4-烷氧基苄醇聚苯乙烯(Wang 树脂)和 2 当量存在于 DMF 中的预定 Fmoc-氨基酸并且在氮气冲洗下使这两者产品在室温下混和 15 分钟。随后连续加入 3.3 当量的吡啶和 2 当量的 2,6-二氯苯甲酰氯, 该反应在氮气冲洗下进行 15-20 小时。(Seiber P., 1987, Tetrahedron Letters, Vol. 28, No. 49, pp 6147-6150)。该反应之后, 取出反应容器并连续用 DMF 在氮气冲洗下洗涤该树脂 4 次。树脂的所有残留羟基用 3 当量的苯甲酰氯和吡啶在 DCE(二氯乙烷)中苯甲酰化 2 小时。

在伸长的肽上各种残余氨基酸的偶联

对于下列各种 Fmoc-氨基酸, 我们将 3 当量的 Fmoc-氨基酸溶解在 3 当量存在于 DMF 中的 BOP(苯并三唑-1-基-氧基-三(二甲基氨基)六氟磷酸磷)(B. Castro 等, 1975, Tetrahedron letters, Vol. 14 :1219), 将所得溶液加入到反应容器中的树脂上, 开始氮气冲洗并加入 6 当量的 DIPEA(二异丙基乙胺)以开始该偶联反应。反应容器中偶联混合物在氮气下冲洗 60 分钟; 随后从容器中取出, 该树脂连续用 DMF 洗涤 3 次并进行定量茚三酮试验以检验反应是否完全。

10

Fmoc-L-Lys(Aloc)-OH (PerSeptive Biosystems, 目录号 : GEN911209)、Fmoc-L-Glu(OAl)-OH (PerSeptive Biosystems, 目录号 : GEN911207)和 Fmoc-L-Asp(OAl)-OH (PerSeptive Biosystems, 目录号 : GEN911205)的偶联是按照与上述 Fmoc-氨基酸相同的方式进行。

15

烯丙基的脱保护

将肽-树脂(X mmol)随后引入氮气冲洗下的 DCM 中并在 10 分钟之后向该混合物中加入 $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ (X mmol x 0.05 / 0.05 当量)(钯 (II) 双-三苯基膦)(Bürger H., Kilian W., J. Organometallics, 1969, 18:299)。此后使 $(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2)_3\text{SnH}$ (X mmol x 6 / 6 当量) (tributyltinhydride)在 DCM 中稀释并用滴液漏斗在 30 分钟内滴加到肽-树脂混悬液。该反应继续进行 10 分钟, 此后从容器取出裂解混合物且随后肽-树脂用 DCM 洗涤 4 次并 DMF 洗涤 4 次(Dangles O., Guibé F., Balavoine G., Lavielle S., Marquet A., 1987, J. Org. Chem., 52: 4984)。

25

刚性构象酸和烷基胺的偶联

刚性构象酸和胺与肽-树脂的侧链的偶联是在 如同 Fmoc-氨基酸的那些条件下进行, 但对于这些侧链修饰我们使用 10 当量的刚性部分和偶联剂, 而不是 3 当量。

30

本发明不限于任何具体肽序列。优选的肽序列 R^1 包含具有治疗性质的那些，以及它们的官能衍生物或片段。本发明可以使用的这些肽的治疗性质包括但不限于：骨疾病的治疗，包括骨质疏松症、绝经后骨质疏松症和骨沉积，癌治疗，血糖调控，II 型糖尿病，增强肠道疾病患者中粘膜再生的治疗，与炎症反应有关的疾病的治疗，肥胖治疗，孤独癖和 倒错恶化症(pervasive development disorder)的治疗，过度增生性皮肤病症，衰老，改变外周血单核细胞的增殖，子宫肌收缩性和前列腺素释放的调节，ACTH 释放的刺激，白介素-8 生成的抑制，酸释放的刺激，患有肠道疾病的患者中粘膜再生的促进，激素依赖性疾病和涉及激素药理学癌的病症的治疗，黑素细胞信息传递过程的调节，参与压力和容积的内环境稳定，外分泌物和内分泌物分泌、平滑肌收缩、饮食、血压血糖、体温和细胞生长的调控，食物摄取和能力平衡的调节，癌细胞生长的抑制，胰腺分泌的刺激，和促进细胞生长。

生长激素释放因子(GRF):

Xaa₁-Xaa₂-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Xaa₈-Ser-Tyr-Arg-Lys-Xaa₁₃-Leu-Xaa₁₅-Gln-Leu-Xaa₁₈-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-Xaa₂₄-Xaa₂₅-Ile-Xaa₂₇-Xaa₂₈-Arg-Gln-Gln-Gly-Glu-Ser-Asn-Gln-Glu-Arg-Gly-Ala-Arg-Ala-Arg-Leu-NH₂

其中，

Xaa₁ 是 Tyr 或 His;

Xaa₂ 是 Val 或 Ala;

Xaa₈ 是 Asn 或 Ser;

Xaa₁₃ 是 Val 或 Ile;

Xaa₁₅ 是 Ala 或 Gly;

Xaa₁₈ 是 Ser 或 Tyr;

Xaa₂₄ 是 Gln 或 His;

Xaa₂₅ 是 Asp 或 Glu;

Xaa₂₇ 是 Met、Ile 或 Nle; 和

Xaa₇₈ 是 Ser 或 Asn。

促生长素抑制素:

Ala₁-Gly-Cys-Lys-Asn-Phe-Phe-Trp

5

Cys₁₄-Ser-Xaa₁₂-Phe-Thr-Lys

其中,

Xaa₁₂ 是 Tyr 或 Ser.

10

胰高血糖素样肽 1(7-37), (酰胺人(hGLP-1)):

His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-
Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-Gly-
OH(NH₂)

15

甲状旁腺素片段(PTH 1-34):

Xaa₁-Val-Ser-Glu-Xaa₅-Gln-Xaa₇-Met-His-Asn-Leu-Gly-Xaa₁₃-His-Xaa₁₅-Xaa₁₆-Xaa₁₇-Xaa₁₈-Glu-Arg-Xaa₂₁-Xaa₂₂-Trp-Leu-Xaa₂₅-Xaa₂₆-Lys-Leu-Gln-Asp-Val-His-Xaa₃₃-Xaa₃₄-NH₂

其中,

20

Xaa₁ 是 Ser 或 Ala;

Xaa₅ 是 Ile 或 Met;

Xaa₇ 是 Leu 或 Phe;

Xaa₁₃ 是 Lys 或 Glu;

Xaa₁₅ 是 Leu 或 Arg;

25

Xaa₁₆ 是 Asn 或 Ala 或 Ser 或 His;

Xaa₁₇ 是 Ser or Thr;

Xaa₁₈ 是 Met 或 Val 或 Leu;

Xaa₂₁ 是 Val 或 met 或 Gln;

Xaa₂₂ 是 Glu 或 Gln 或 Asp;

30

Xaa₂₅ 是 Arg 或 Gln;

Xaa₂₆ 是 Lys 或 Met;
Xaa₃₃ 是 Asn 或 Ser; 和
Xaa₃₄ 是 Phe 或 Ala.

5 促肾上腺皮质激素 (ACTH):

Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Xaa₁₃-Gly-
Xaa₁₅-Lys-Arg-Arg-Pro-Xaa₂₀-Lys-Val-Tyr-Pro-Asn-Xaa₂₆-Xaa₂₇-Xaa₂₈-
Xaa₂₉-Glu-Xaa₃₁-Xaa₃₂-Glu-Xaa₃₄-Xaa₃₅-Xaa₃₆-Xaa₃₇-Glu-Xaa₃₉-NH₂

其中,

- 10 Xaa₁₃ 是 Val 或 Met;
 Xaa₁₅ 是 Lys 或 Arg;
 Xaa₂₀ 是 Val 或 Ile;
 Xaa₂₆ 是 Gly 或 Ser;
 Xaa₂₇ 是 Ala 或 Phe 或 Val;
15 Xaa₂₈ 是 Glu 或 Gln;
 Xaa₂₉ 是 Asp 或 Asn 或 Glu;
 Xaa₃₁ 是 Ser 或 Thr;
 Xaa₃₂ 是 Ala 或 Val 或 Ser;
 Xaa₃₄ 是 Ala 或 Asn 或 Gly;
20 Xaa₃₅ 是 Phe 或 Met;
 Xaa₃₆ 是 Pro 或 Gly;
 Xaa₃₇ 是 Leu 或 Val 或 Pro; 和
 Xaa₃₉ 是 Phe 或 Val 或 Leu.

25 骨钙蛋白:

Tyr-Leu-Xaa₅₂-Xaa₅₃-Xaa₅₄-Leu-Gly-Ala-Pro-Xaa₅₉-Pro-Tyr-Pro-
Asp-Pro-Leu-Glu-Pro-Xaa₆₈-Arg-Glu-Val-Cys-Glu-Leu-Asn-Pro-Xaa₇₇-
Cys-Asp-Glu-Leu-Ala-Asp-His-Ile-Gly-Phe-Gln-Xaa₈₉-Ala-Tyr-Xaa₉₂-
Arg-Xaa₉₄-Tyr-Gly-Xaa₉₇-Val-NH₂

- 30 其中,

Xaa₅₂ 是 Tyr 或 Asp 或 Asn;
 Xaa₅₃ 是 Gln 或 His 或 Asn;
 Xaa₅₄ 是 Trp 或 Gly;
 Xaa₅₉ 是 Val 或 Ala;
 5 Xaa₆₈ 是 Arg 或 Lys 或 His;
 Xaa₇₇ 是 Asp 或 Asn;
 Xaa₈₉ 是 Glu 或 Asp;
 Xaa₉₂ 是 Arg 或 Lys;
 Xaa₉₄ 是 Phe 或 Ile; 和
 10 Xaa₉₇ 是 Pro 或 Thr.

降钙素:

Cys-Xaa₈₆-Xaa₈₇-Leu-Ser-Thr-Cys-Xaa₉₂-Leu-Gly-Xaa₉₅-Xaa₉₆-
 Xaa₉₇-Xaa₉₈-Xaa₉₉-Xaa₁₀₀-Xaa₁₀₁-Xaa₁₀₂-Xaa₁₀₃-Xaa₁₀₄-Thr-Xaa₁₀₆-Xaa₁₀₇-
 15 Xaa₁₀₈-Xaa₁₀₉-Xaa₁₁₀-Xaa₁₁₁-Gly-Xaa₁₁₃-Xaa₁₁₄-Xaa₁₁₅-Pro-NH₂

其中,

Xaa₈₆ 是 Gly 或 Ser 或 Ala;
 Xaa₈₇ 是 Asn 或 Ser;
 Xaa₉₂ 是 Met 或 Val;
 20 Xaa₉₅ 是 Thr 或 Lys;
 Xaa₉₆ 是 Tyr 或 Leu;
 Xaa₉₇ 是 Thr 或 Ser;
 Xaa₉₈ 是 Gln 或 Lys;
 Xaa₉₉ 是 Asp 或 Glu;
 25 Xaa₁₀₀ 是 Phe 或 Leu;
 Xaa₁₀₁ 是 Asn 或 His;
 Xaa₁₀₂ 是 Lys 或 Asn;
 Xaa₁₀₃ 是 Phe 或 Leu;
 Xaa₁₀₄ 是 His 或 Gln;
 30 Xaa₁₀₆ 是 Phe 或 Tyr;

- 5 Xaa₁₀₇ 是 Pro 或 Ser;
Xaa₁₀₈ 是 Gln 或 Gly 或 Arg;
Xaa₁₀₉ 是 Thr 或 Ile;
Xaa₁₁₀ 是 Ala 或 Gly 或 Ser 或 Asp 或 Asn;
Xaa₁₁₁ 是 Ile 或 Phe 或 Val 或 Thr;
Xaa₁₁₃ 是 Val 或 Ala 或 Ser;
Xaa₁₁₄ 是 Gly 或 Glu; 和
Xaa₁₁₅ 是 Ala 或 Thr.

10 促肾上腺皮质激素释放因子:

Ser-Glu-Glu-Pro-Pro-Ile-Ser-Leu-Asp-Leu-thr-Phe-His-Leu-Leu-
Arg-Glu-Val-Leu-Glu-Met-Xaa₁₀₁-Xaa₁₀₂-Ala-Glu-Gln-Leu-Ala-Gln-Gln-
Ala-His-Ser-Asn-Arg-Lys-Leu-Met-Glu-Ile-Ile-NH₂

其中,

- 15 Xaa₁₀₁ 是 Ala 或 Pro; 和
Xaa₁₀₂ 是 Arg 或 Gly.

强啡肽 A:

- 20 H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Ile-Arg-Pro-Lys-Leu-Lys-Trp-
Asp-Asn-Gln-OH

β -内啡肽:

- 25 H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Thr-Xaa₂₄₃-Glu-Xaa₂₄₅-Ser-Gln-Thr-Pro-
Leu-Xaa₂₅₁-Thr-Leu-Phe-Lys-Asn-Ala-Ile-Xaa₂₅₉-Lys-Asn-Xaa₂₆₂-Xaa₂₆₃-
Lys-Lys-Gly-Xaa₂₆₇-OH

其中,

- 30 Xaa₂₄₃ 是 Ser 或 Pro;
Xaa₂₄₅ 是 Lys 或 Arg;
Xaa₂₅₁ 是 Val 或 Met;
Xaa₂₅₉ 是 Ile 或 Val;

Xaa₂₆₂ 是 Ala 或 Thr 或 Ser 或 Val;

Xaa₂₆₃ 是 Tyr 或 His; 和

Xaa₂₆₇ 是 Glu 或 Leu 或 Gln 或 His.

5 巨胃泌素-1:

pXaa₅₉-Leu-Gly-Xaa₆₂-Gln-Xaa₆₄-Xaa₆₅-Xaa₆₆-Xaa₆₇-Xaa₆₈-Xaa₆₉-
Ala-Asp-Xaa₇₂-Xaa₇₃-Lys-Lys-Xaa₇₆-Xaa₇₇-Pro-Xaa₇₉-Xaa₈₀-Glu-Xaa₈₂-
Glu-Glu-Xaa₈₅-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂

其中,

10 Xaa₅₉ 是 Glu 或 Gln;

Xaa₆₂ 是 Pro 或 Leu;

Xaa₆₄ 是 Gly 或 Asp;

Xaa₆₅ 是 Pro 或 Ser;

Xaa₆₆ 是 Pro 或 Gln;

15 Xaa₆₇ 是 His 或 Gln;

Xaa₆₈ 是 Leu 或 Met 或 Phe 或 Gln;

Xaa₆₉ 是 Val 或 Ile;

Xaa₇₂ 是 Pro 或 Leu;

Xaa₇₃ 是 Ser 或 Ala;

20 Xaa₇₆ 是 Gln 或 Glu;

Xaa₇₇ 是 Gly 或 Arg;

Xaa₇₉ 是 Trp 或 Pro 或 Arg;

Xaa₈₀ 是 Leu 或 Val 或 Met;

Xaa₈₂ 是 Glu 或 Lys; 和

25 Xaa₈₅ 是 Glu 或 Ala.

GLP-2:

His-Ala-Asp-Gly-Ser-Phe-Xaa₁₅₂-Xaa₁₅₃-Xaa₁₅₄-Xaa₁₅₅-Xaa₁₅₆-Xaa₁₅₇-
Xaa₁₅₈-Leu-Asp-Xaa₁₆₁-Xaa₁₆₂-Ala-Xaa₁₆₄-Xaa₁₆₅-Xaa₁₆₆-Phe-Xaa₁₆₈-
30 Xaa₁₆₉-Trp-Xaa₁₇₁-Xaa₁₇₂-Xaa₁₇₃-Thr-Xaa₁₇₅-Xaa₁₇₆-Xaa₁₇₇-Xaa₁₇₈;

其中,

- 5 Xaa₁₅₂ 是 Ser 或 Thr;
Xaa₁₅₃ 是 Asp 或 Ser;
Xaa₁₅₄ 是 Glu 或 Asp;
Xaa₁₅₅ 是 Met 或 Phe;
Xaa₁₅₆ 是 Asn 或 Ser;
Xaa₁₅₇ 是 Thr 或 Lys;
Xaa₁₅₈ 是 Ile 或 Val 或 Ala;
Xaa₁₆₁ 是 Asn 或 Ile 或 His 或 Ser;
10 Xaa₁₆₂ 是 Leu 或 Lys;
Xaa₁₆₄ 是 Ala 或 Thr;
Xaa₁₆₅ 是 Arg 或 Gln 或 Lys;
Xaa₁₆₆ 是 Asp 或 Glu;
Xaa₁₆₈ 是 Ile 或 Leu;
15 Xaa₁₆₉ 是 Asn 或 Asp;
Xaa₁₇₁ 是 Leu 或 Ile;
Xaa₁₇₂ 是 Ile 或 Leu;
Xaa₁₇₃ 是 Gln 或 Asn 或 His;
Xaa₁₇₅ 是 Lys 或 Pro;
20 Xaa₁₇₆ 是 Ile 或 Val;
Xaa₁₇₇ 是 Thr 或 Lys; 和
Xaa₁₇₈ 是 Asp 或 Glu.

黄体激素释放素:

- 25 Xaa₁-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-OH

其中,

Xaa₁ 是 pGlu、5-氧代 Pro 或 Gln.

促黑激素 (MSH):

- 30 Ac-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val-NH₂

心房肽:

H-Ser-Leu-Arg-Arg-Ser-Ser-Cys-Phe-Gly-Gly-Arg-Xaa₁₃₅-Asp-Arg-Ile-Gly-Ala-Gln-Ser-Xaa₁₄₂-Leu-Gly-Cys-Asn-Ser-Phe-Arg-Tyr-OH

5 其中,

Xaa₁₃₅ 是 Met 或 Ile; 和

Xaa₁₄₂ 是 Gly 或 Ser.

神经调节肽 B:

10 H-Gly-Asn-Leu-Trp-Ala-Thr-Gly-His-Phe-Met-NH₂

人神经肽 Y:

15 H-Tyr-Pro-Ser-Lys-Pro-Asp-Asn-Pro-Gly-Glu-Asp-Ala-Pro-Ala-Glu-asp-Met-Ala-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ala-Leu-Arg-His-Tyr-Ile-Asn-Leu-Ile-Thr-Arg-Gln-Arg-Tyr-NH₂

人 Orexin A:

20 pGlu-Pro-Leu-Pro-Asp-Cys-Cys-Arg-Gln-Lys-Thr-Cys-Ser-Cys-Arg-Leu-Tyr-Glu-Leu-Leu-His-Gly-Ala-Gly-Asn-His-Ala-Ala-Gly-Ile-Leu-Thr-Leu-NH₂

人肽 YY:

25 H-Tyr-Pro-Ile-Lys-Pro-Glu-Ala-Pro-Gly-Glu-Asp-Ala-Ser-Pro-Glu-Glu-Leu-Asn-Arg-Tyr-Tyr-Ala-Ser-Leu-Arg-His-Tyr-Leu-Asn-Leu-Val-Thr-Arg-Gln-Arg-Tyr-NH₂

人促胰液素:

30 H-His-Ser-Asp-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Glu-Leu-Ser-Arg-Leu-Arg-Glu-Gly-Ala-Arg-Leu-Gln-Arg-Leu-Leu-Gln-Gly-Leu-Val-NH₂

血管活性肠肽 (VIP):

H-His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-
Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn-NH₂

5 抗菌肽例如:

爪蟾抗菌肽 1:

Gly-Ile-Gly-Lys-Phe-Leu-His-Ser-Ala-Gly-Lys-Phe-Gly-Lys-Ala-
Phe-Val-Gly-Glu-Ile-Met-Lys-Ser

10 爪蟾抗菌肽 2:

Gly-Ile-Gly-Lys-Phe-Leu-His-Ser-Ala-Lys-Lys-Phe-Gly-Lys-Ala-
Phe-Val-Gly-Glu-Ile-Met-Asn-Ser

杀菌肽 A:

15 Lys-Trp-Lys-Val-Phe-Lys-Lys-Ile-Glu-Lys-Val-Gly-Gln-Ala-Thr-
Gln-Ile-Ala-Lys

杀菌肽 B:

20 Lys-Trp-Lys-Val-Phe-Lys-Lys-Ile-Glu-Lys-Met-Gly-Arg-Asn-Ile-
Arg-Asn-Gly-Ile-Val-Lys-Ala-Gly-Pro-Ala-Ile-Ala-Val-Leu-Gly-Glu-Ala-
Lys-Ala-Leu.

P 物质 (SP):

Arg-Pro-Leu-Pro-Gln-Glu-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-amide

25 β Casomorphin-5:

Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly

内啡素-2:

Tyr-Pro-Phe-Phe-NH₂

30 Procolipase:

- 100 氨基酸肽 (X1-Pro-X2-Pro-Arg....)
 Enterostatin:
 Val-Pro-Asp-Pro-Arg
- 5 胃泌素抑制肽:
 Tyr-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Ile-Ser-Asp-Tyr-Ser-Ile-Ala- Met-Asp-
 Lys-Ile-His-Gln-Gln-Asp-Phe- Val-Asn-Trp-Leu- Leu-Ala-Gln-Lys-Gly-
 Lys-Lys-Asn-Asp-Trp-Lys-His-Asn- Ile-Thr-Gln
- 10 嗜铬粒蛋白 A
 Vasostatin I
 Vasostatin II:
 Leu Pro Val Asn Ser Pro Met Asn Lys Gly Asp Thr Glu Val Met
 Lys Cys Ile Val Glu Val Ile Ser Asp Thr Leu Ser Lys Pro Ser Pro Met
 15 Pro Val Ser Gln Glu Cys Phe Glu Thr Leu Arg Gly Asp Glu Arg Ile Leu
 Ser Ile Leu Arg His Gln Asn Leu Leu Lys Glu Leu Gln Asp Leu Ala Leu
 Gln Gly Ala Lys Glu Arg Ala His Gln Gln Lys Lys His Ser Gly Phe Glu
 Asp Glu Leu Ser Glu Val Leu Glu Asn Gln Ser Ser Gln Ala Glu Leu Lys
 Glu Ala Val Glu Glu Pro Ser Ser Lys Asp Val Met Glu
- 20 Pro 降钙素
 ProNCT
 ProCGRP
- 趋化因子家族:
 25 CXC 组:
 IL8(单核细胞衍化的):
 SerAlaLysGluLeuArgCysGlnCys...
 GCP-2:
 GlyProValSerAlaValLeuThrGluLeuArgCysThrCys...
 30 PF4:

GluAlaGluGluAspGlyAspLeuGlnCysLeuCys...
 IP-10:
 ValProLeuSerArgThrValArgCCysThrCys...
 MIG:
 5 ThrProValValArgLysGlyArgCysSerCys...
 SDF-1 α
 LysProValSerLeuSerTyrArgCysProCys...
 GRO- α
 AlaProLeuAlaThrGluLeuArgCysGlnCys...
 10 I-TAC:
 PheProMetPheLysLysGlyArgCysLeuCys...

CC-组:
 RANTES:
 15 SerProTyrSerSerAspThrThrProCys...
 LD78:
 AlaProLeuAlaAlaAspThrProThrAlaCys...
 MIP-1 α
 AlaProMetGlySerAspProProThrAlaCys...
 20 MCP-1:
 GlnProAspAlaIleAsnAlaProValThrCys...
 MCP-2:
 GlnProSerAspValSerIleProIleThrCys...
 MCP-3:
 25 GlnProValGlyIleTAsnSeerThrThrCys...
 MCP-4:
 GlnProAspAlaLeuAspValProSerThrCys...
 Eotaxin:
 GlyProAlaSerValProThrThrCys...
 30 MDC:

GlyProTyrGlyAlaAsnMetGluAspSerValCys...

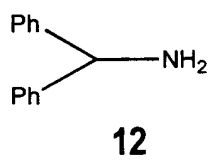
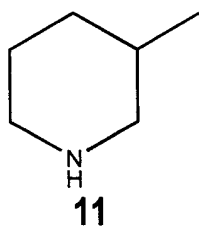
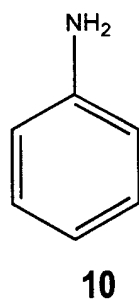
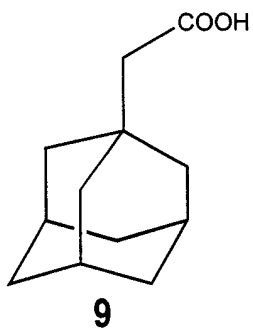
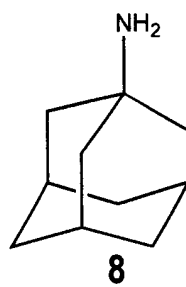
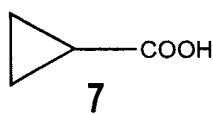
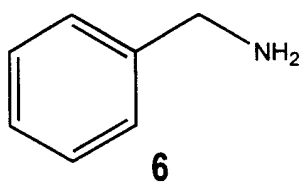
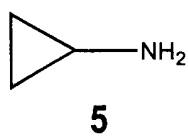
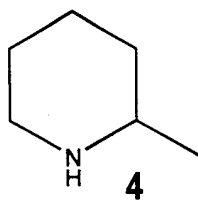
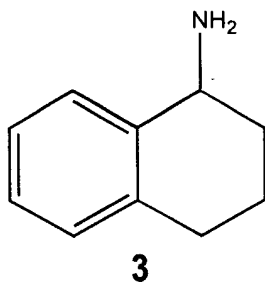
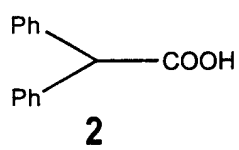
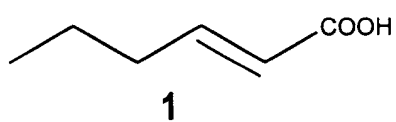
和它们的官能衍生物或片段。

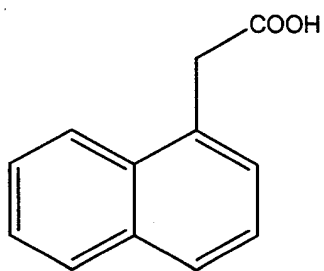
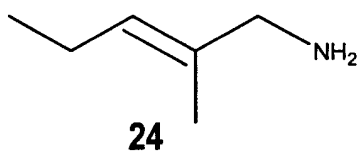
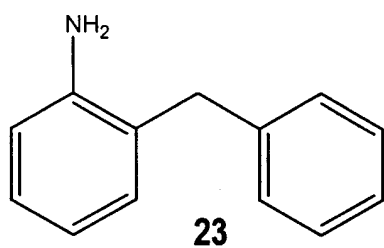
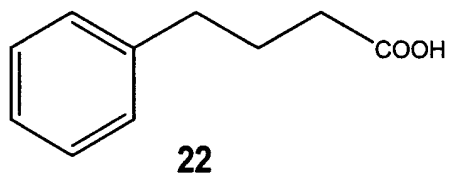
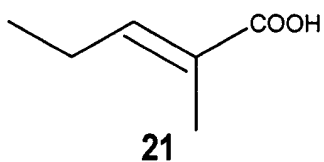
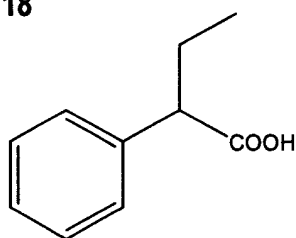
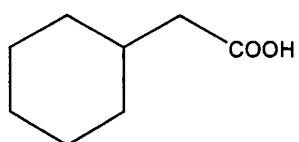
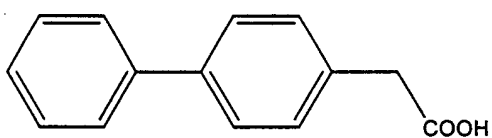
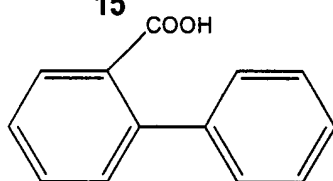
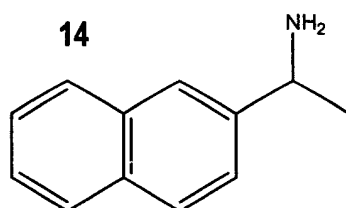
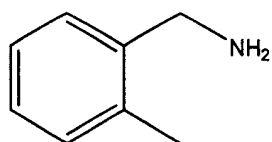
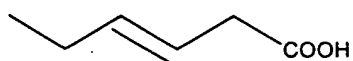
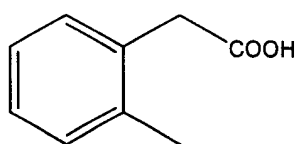
5 上述序列的完全定义具体参见 Mentlein, R (1999) Regul. Pept. 85:9-24 和 De Meester, I.等(2000) Adv ExpMed Biol. 477:67-87。那些文献在此以引用方式并入本专利申请。

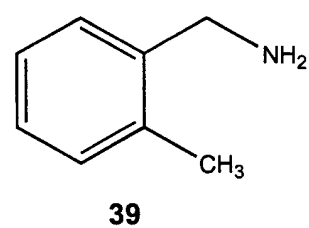
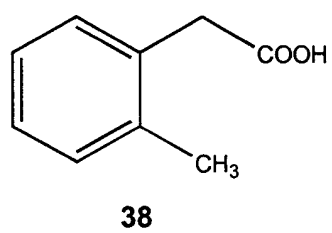
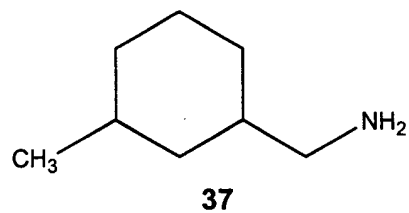
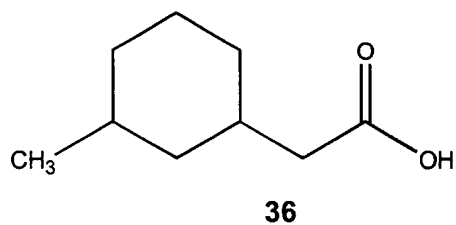
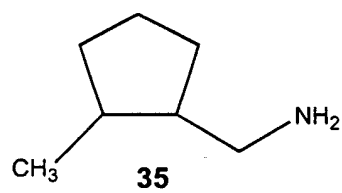
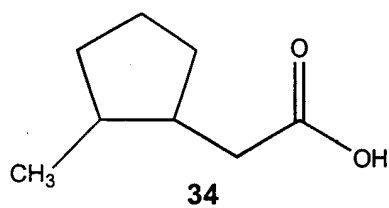
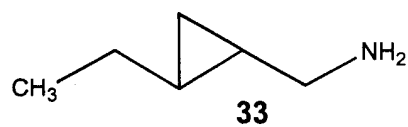
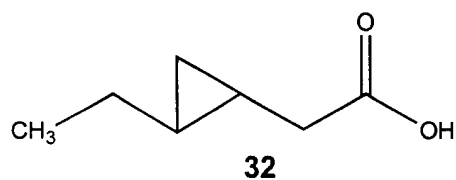
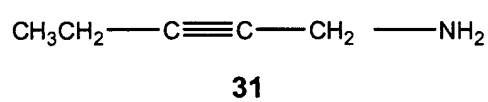
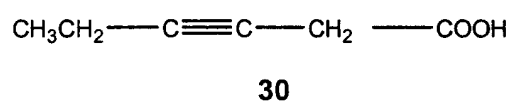
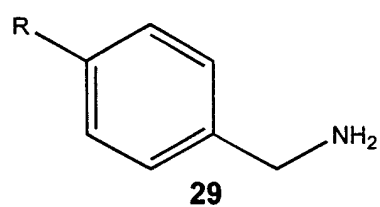
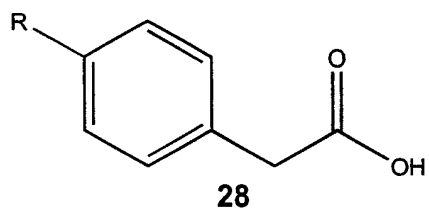
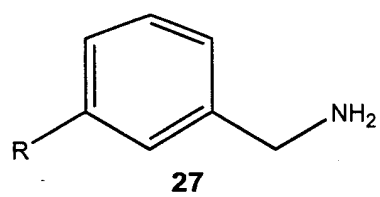
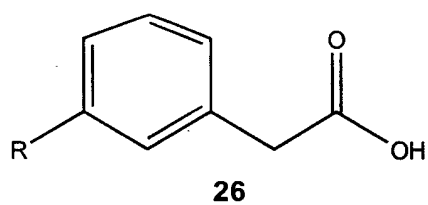
10 在更加优选的一个实施方式中，肽被一个或多个刚性构象部分取代。刚性构象部分的优选结构是含有双键、叁键或饱和或不饱和环的那些结构。

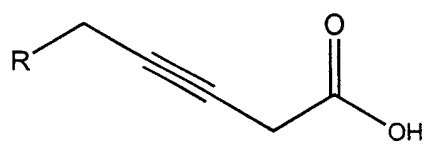
下面是优选刚性构象部分的结构式的简单目录，称作式 1—63，它们适合于本发明的目的。

15 在本发明的优选修饰肽中，其中所述的肽序列是天然肽的序列。





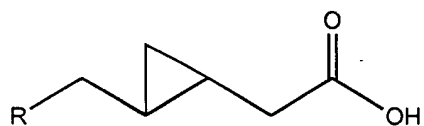




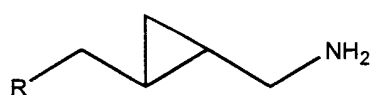
40



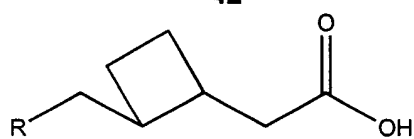
41



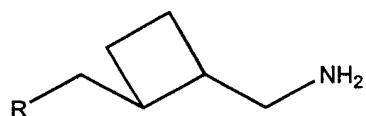
42



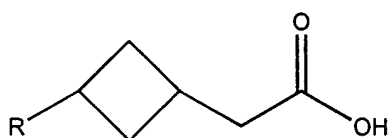
43



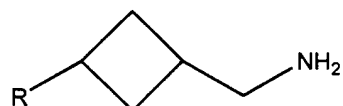
44



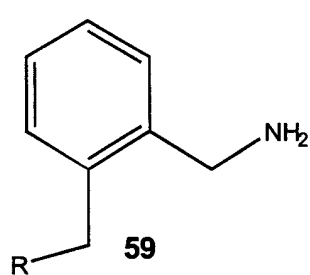
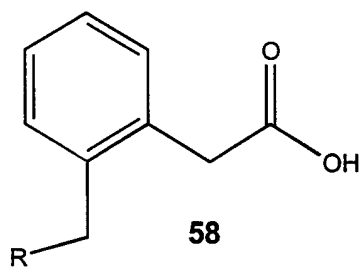
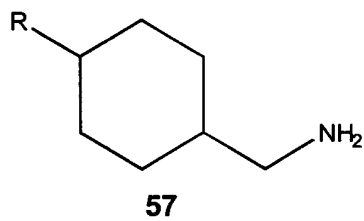
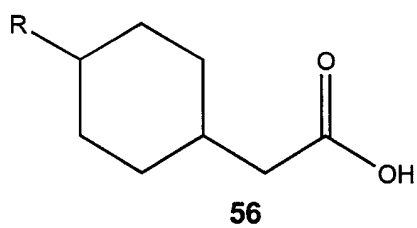
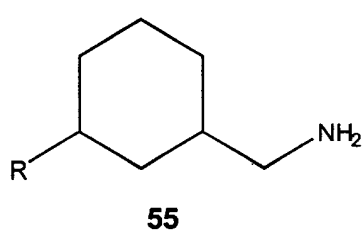
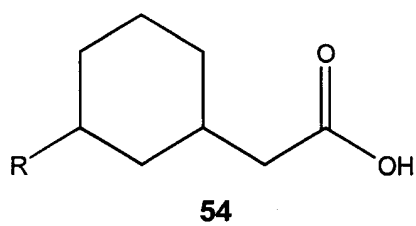
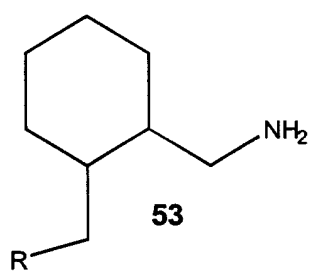
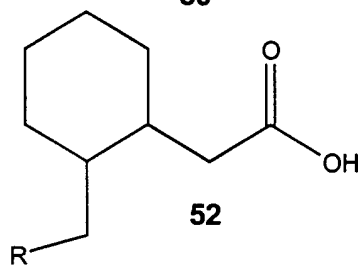
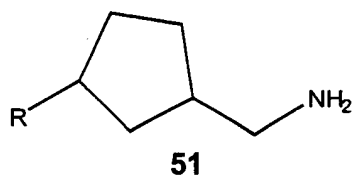
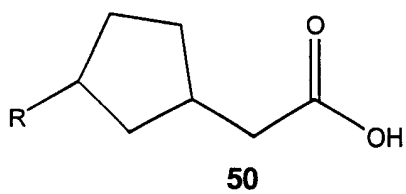
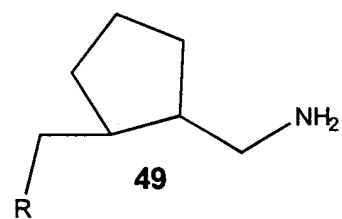
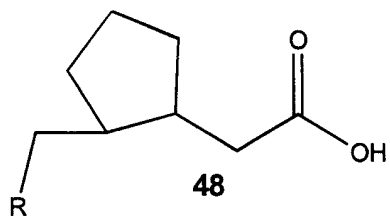
45

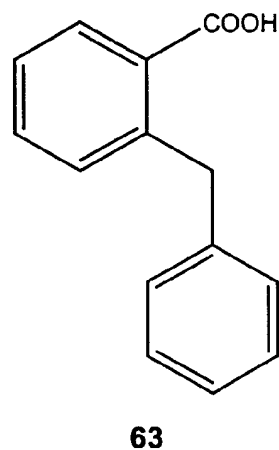
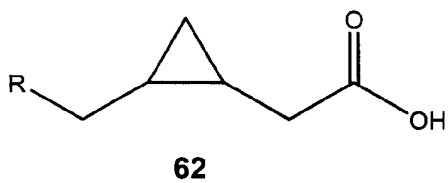
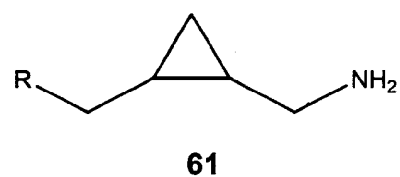
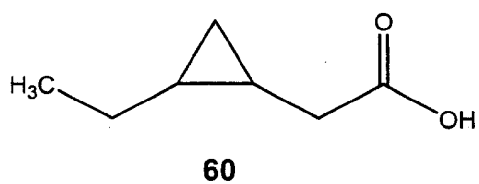


46



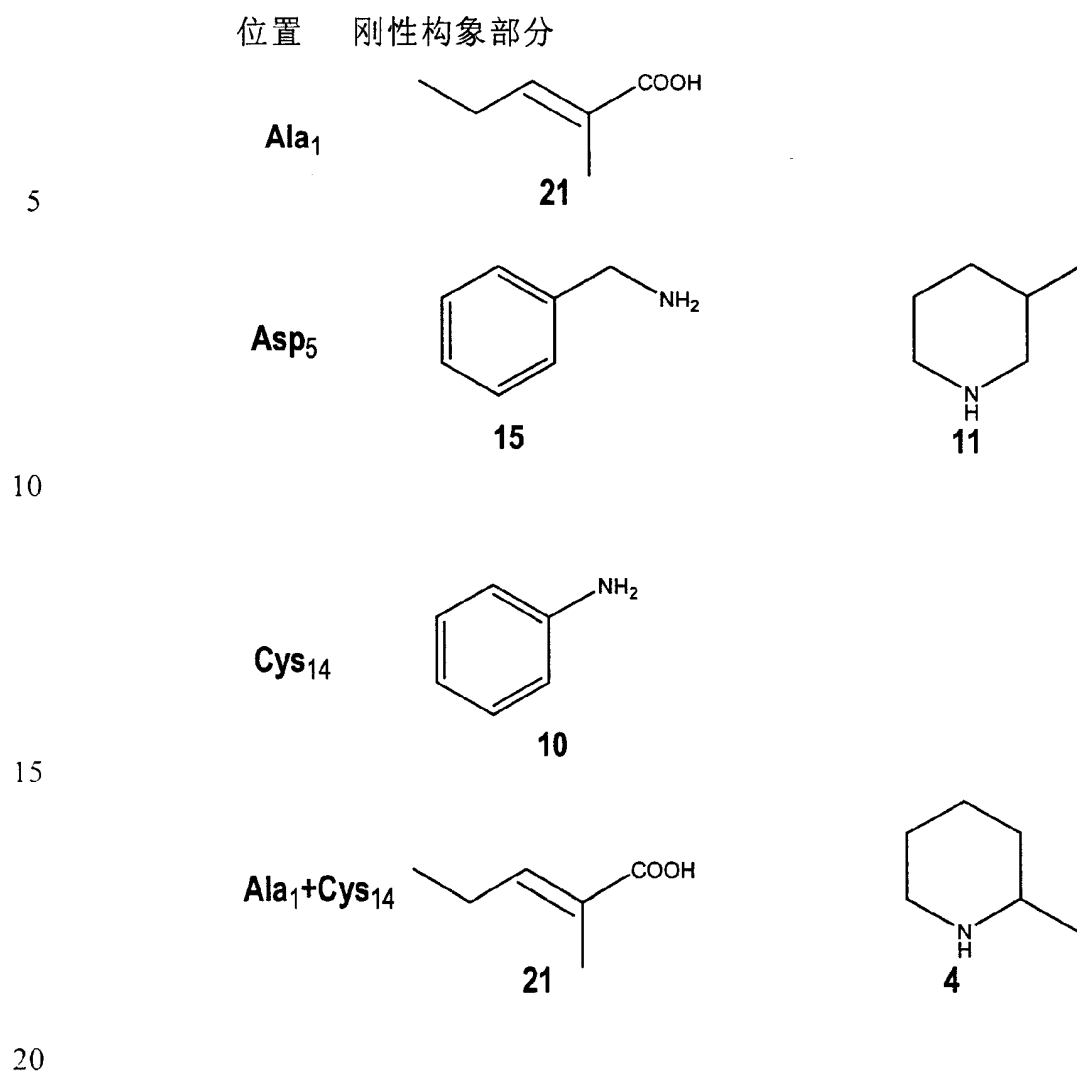
47



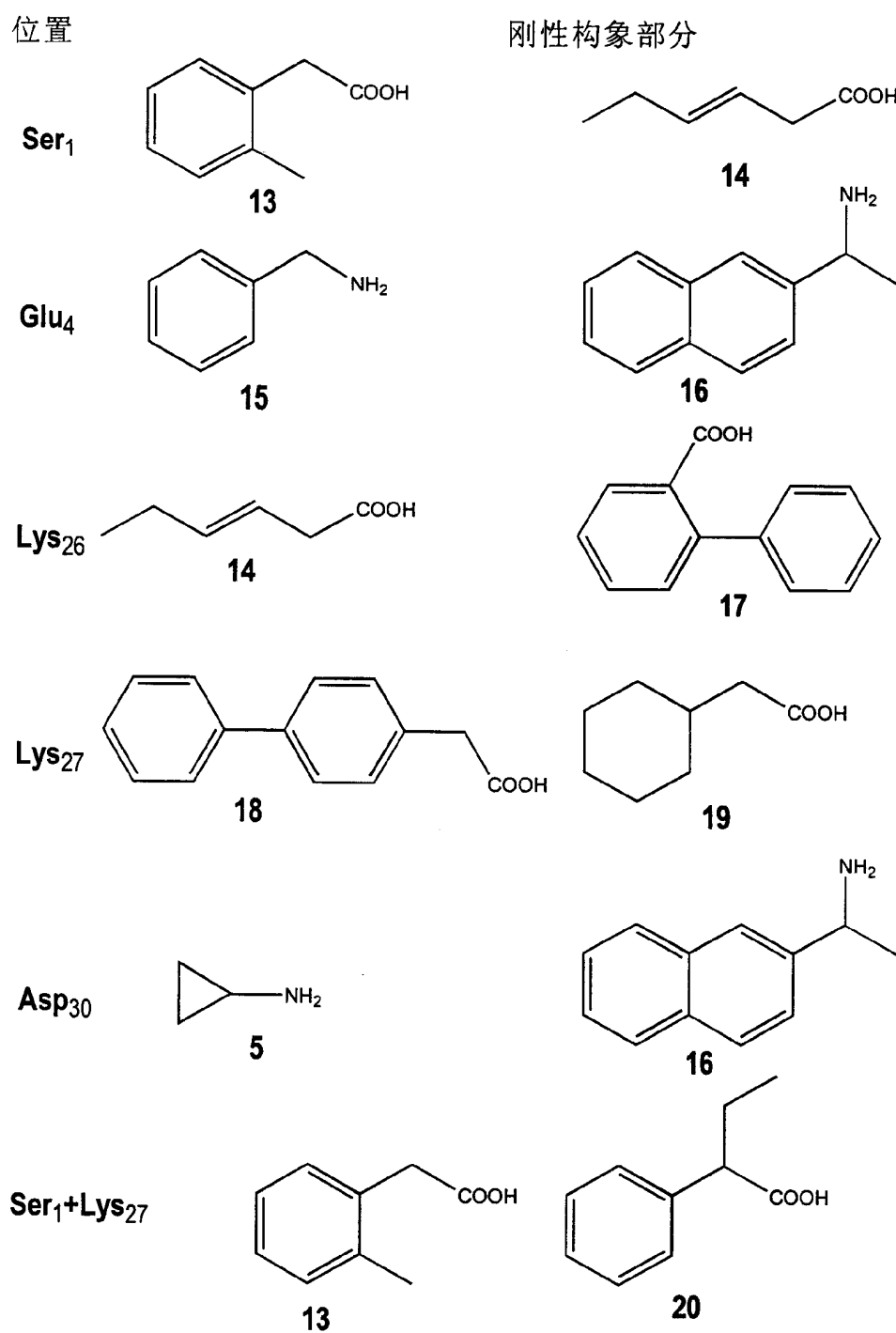


其中, R 是 H、CH₃ 或 CH₂CH₃.

5 本发明的一个优选实施方式是由其中肽序列是促生长素抑制素且至少一个刚性构象部分与该促生长素抑制素肽序列经酰胺键在下面不同的位置偶联的那些肽组成:



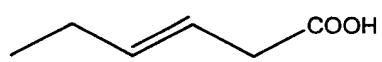
本发明的 另一个优选实施方式是由其中所述肽序列是 PTH 1-34 且至少一个刚性构象部分经酰胺键与该 PTH 1-34 肽序列在下列不同位置偶联的那些肽组成:



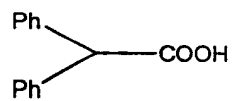
5

本发明的另一优选实施方式是由其中所述肽序列是 GLP-1 且至少一个刚性构象部分与该 GLP-1 肽序列经酰胺键在下列不同位置偶联的那些肽组成:

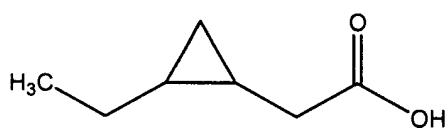
位置 刚性构象部分

His₁

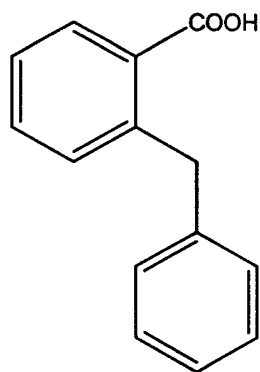
14



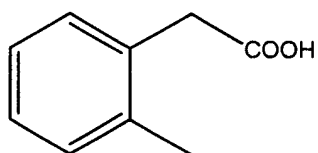
2



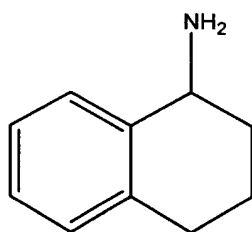
60



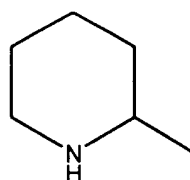
63



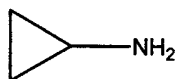
13

Glu₃

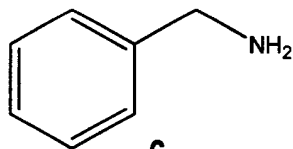
3



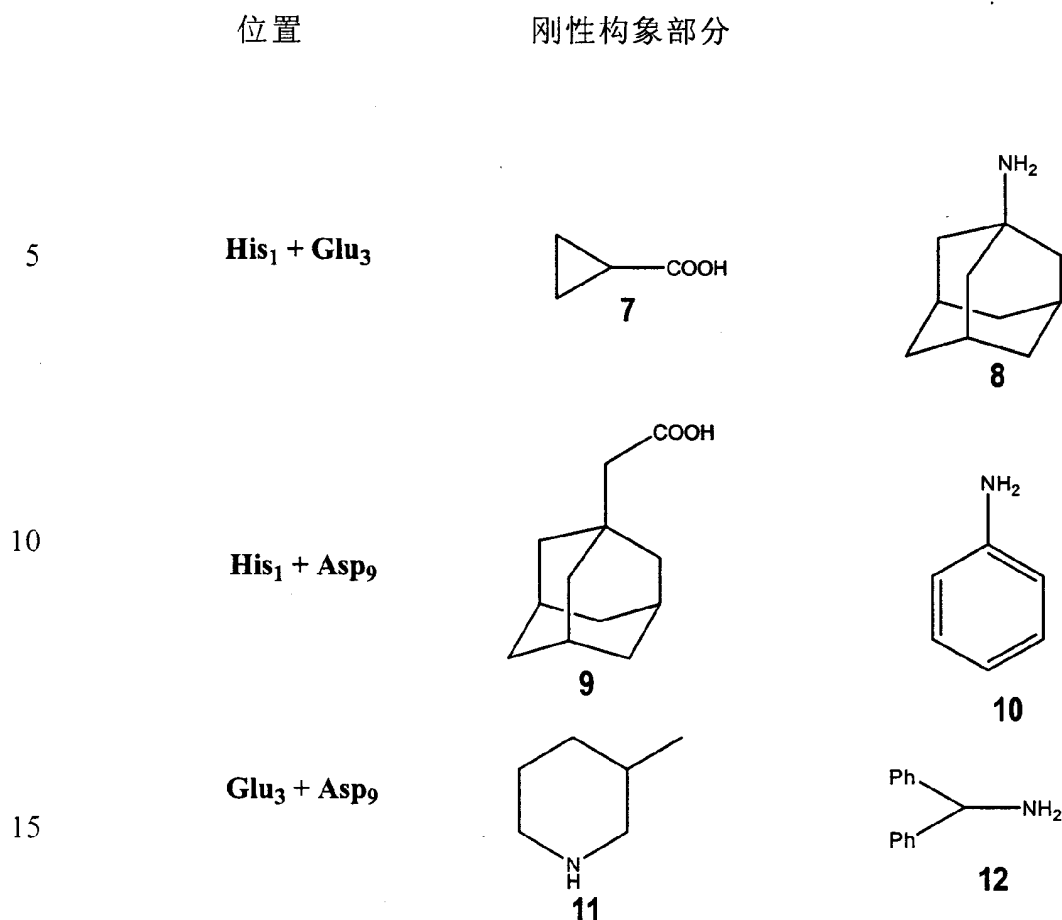
4

Asp₉

5



6



本发明的另外优选的修饰肽是那些肽，其中：

- 20 - 所述肽序列是 GLP-2 且至少一个刚性构象部分与该 GLP-2 肽序列经酰胺或酯键在该肽序列的不同位置偶联；
- 所述肽序列是 Enterostatin 且至少一个刚性构象部分与该 Enterostatin 肽序列经酰胺键在该肽序列的不同位置偶联；
- 25 - 所述肽序列是 NPY 且至少一个刚性构象部分与该 NPY 肽序列经酰胺或酯键在该肽序列的不同位置偶联；
- 所述肽序列是 NPY_Y 且至少一个 刚性构象部分与该 NPY_Y 肽序列经酰胺或酯键在该肽序列的不同位置偶联；
- 所述肽序列是促胰液素且至少一个刚性构象部分与该促胰液素肽序列经酰胺或酯键在该肽序列的不同位置偶联；
- 30 - 所述肽序列是血管活性肠肽且至少一个 刚性构象部分与该

血管活性肠肽序列经酰胺或酯键在该肽序列的不同位置偶联;

所述肽序列是胃泌素抑制肽且至少一个 刚性构象部分与该胃泌素抑制肽序列经酰胺或酯键在该肽序列的不同位置偶联;

5 所述肽序列是 Vasostatin II 和至少一个 刚性构象部分与该 Vasostatin II 肽序列经酰胺或酯键在该肽序列的不同位置偶联;

- 所述肽序列是 RANTES 且至少一个刚性构象部分与该 RANTES 肽序列经酰胺或酯键在该肽序列的不同位置偶联;

- 所述肽序列是 Eotaxin 且至少一个 刚性构象部分与该 Eotaxin 肽序列经酰胺或酯键在该肽序列的不同位置偶联。

10

在本发明的修饰肽中, 刚性构象部分优选与所述肽序列经酰胺键在 N 端偶联。

15 特别优选本发明的修饰肽, 其中刚性构象部分是说明书中的式 60。

20 本发明的修饰肽可以以多种途径给药, 例如静脉内、皮下、真皮内、经皮、腹膜内、口服和局部给药。当是粉末形式或气雾剂形式时, 本发明的修饰肽还可以通过吸入给药。此外, 运载本发明的修饰肽的药学可接受载体包括但不限于, 脂质体、纳米体、贴剂、植入物和任何给药装置。

25 除了肽的 C 端和 N 端上各自存在的羧基和氨基以外, 可以在肽链上获得其他羧基和氨基位点。譬如, 如果所述肽链含有提供羧酸侧链的氨基酸如天门冬氨酸和谷氨酸, 可以在链上获得用于酰胺化的附加羧酸位点。如果肽链含有具有羧酰胺侧链的氨基酸如天门冬酰胺和谷酰胺, 这些也为刚性构象部分酰胺化提供附加的羧基, 条件是它们在合成上是经过相应天门冬氨酸和谷氨酸实现的。此外, 如果肽含有提供碱性侧链的氨基酸如精氨酸、组氨酸或赖氨酸, 则可以在链上获得用于刚性构象部分酰胺化的附加氨基位点。肽链还可以同时含有酸

30

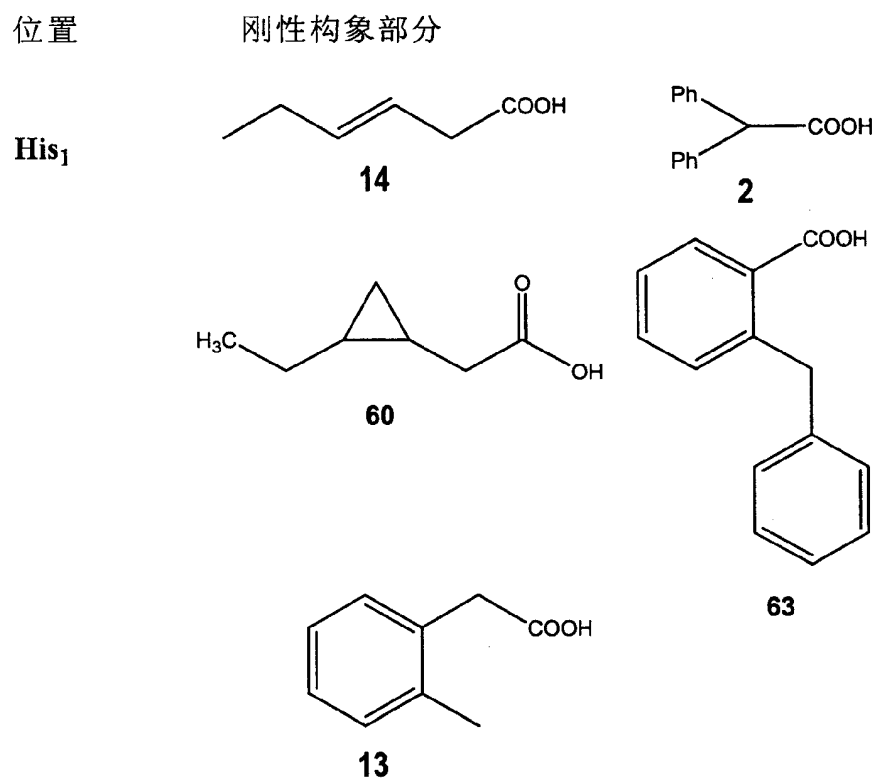
性和碱性氨基酸，是指刚性构象取代基可以经 N 端、C 端、肽链上的羧基位点、肽链上的氨基位点或多个此类位点与肽偶联。

5 本发明参考下列实施例将更容易理解，这些实施例举例说明而不是限制本发明的范围。

实施例 1

GLP-1 类似物的合成

10 按照本发明，下列刚性构象部分的至少一个与 GLP-1 肽序列经酰胺键在下列不同位置偶联。



15 hGLP-1 (7-37)类似物的合成

在氨基末端用刚性疏水性部分修饰的 hGLP-1 (7-37)衍生物是采用 Fmoc 化学法(1)、在 Symphony 仪(Rainin Instrument Co., Inc.)上合成。使用 Fmoc-Gly-Wang 树脂(0.70mmole/g)和 5 当量的试剂(100μm

规模, 氨基酸浓度为 200mM)且偶联时间为 30 分钟。通过 Kaiser 试验监测该反应。引入到 hGLP-1 (7-37)的 N 端的三个刚性构象部分是:

肽 # 1 = (O-甲苯乙酸-His⁷)-hGLP-1 (7-37) [O-甲苯乙酸 (13) (10 当量/次偶联; 偶联时间 45 分钟)]

5 肽 # 2 = ((+,-)-顺式-2-乙基环丙基乙酸 -His⁷)-hGLP-1 (7-37) [(+,-)-顺式-2-乙基环丙基乙酸(60) (7.5 当量/次偶联: 偶联时间 60 分钟)]。

10 所述的肽用 TFA 多层混合物(92%TFA, 2%乙二硫醇, 2%苯硫基甲烷, 2%三异丙基硅烷, 2%水, 2%(w/v)苯酚)裂解 2 小时。全部类似物已经通过反相 HPLC 纯化。通过分析 HPLC 和通过 MS (MALDI-TOF)分析它们。

15 GLP-1 类似物的合成是本发明所属领域技术人员熟知的并且在通用参考文献《Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis. A Practical Approach (2000)》Chan, W.C.和 White, P.D., Oxford University Press, New York, USA, 346p 中有详细的描述, 其在此以引用方式并入本文。

GLP-1 类似物的生物学评估

20 材料和方法

口服葡萄糖耐受试验(OGTT)

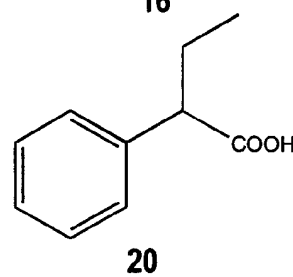
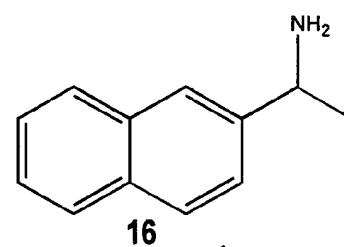
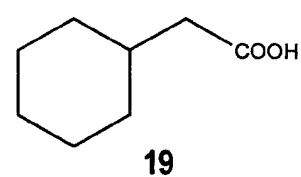
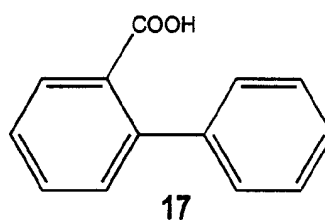
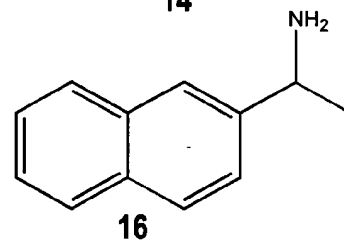
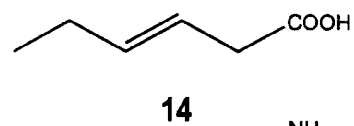
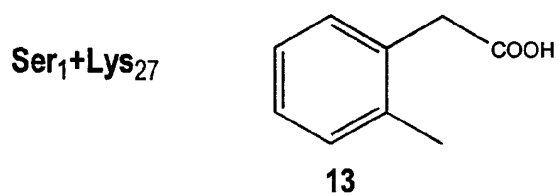
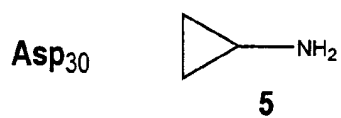
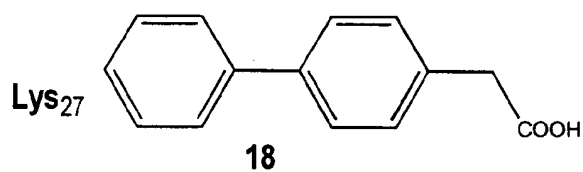
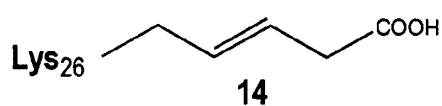
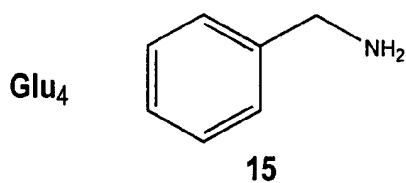
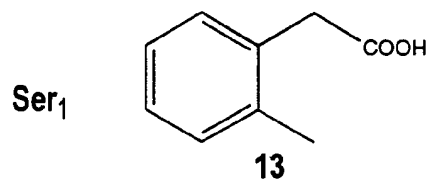
25 使 6 周龄 CD1 小鼠(Charles River)禁食至少 16 小时。经胃口饲管在 t = 0 时刻口服给予存在于水中的 1.5mg 葡萄糖/g 体重并且在 t = 0, 10, 20, 30, 60, 90 分钟和 120 分钟从尾静脉取血, 用葡萄糖计(Lifescan)测定血糖。在给予葡萄糖之前 5 分钟皮下注射所述的肽或载体。数据表示为曲线下面积, 由各时刻的血糖的变化(δ)按照梯形规则计算。所以, 数据代表在给予葡萄糖之后 120 分钟内血糖的整合增量。数据表示为每组 4—11 只动物的平均值±SEM。

30 试验项目

经酰胺键在下列不同位置偶联

位置

刚性构象部分



实施例 3

所有的肽，包括野生型 GLP-1(7-37)在 OGTT 试验中在 3 个不同浓度下测试：1, 5 和 10ug/小鼠。在第一组的试验(研究 A)中，肽 3 与载体和 hGLP-1 (7-37)比较试验。在第二组的试验(研究 B)中，肽 1 和 2 与载体和 hGLP-1 (7-37)比较试验。

5

wt GLP1: hGLP(7-37)

肽 #1: (O-甲苯乙酸-His⁷)-hGLP-1 (7-37)

肽 #2: ((+,-)-顺式-2-乙基环丙基乙酸-His⁷)-hGLP-1 (7-37)

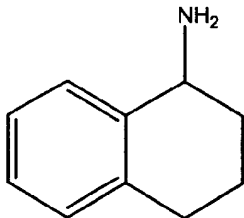
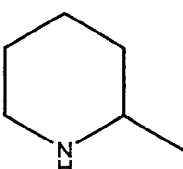
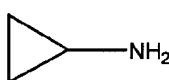
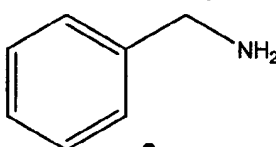
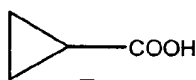
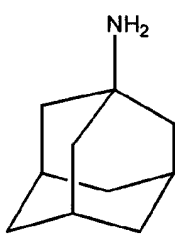
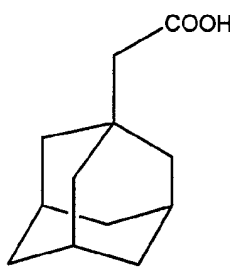
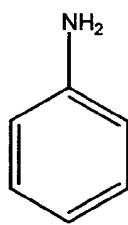
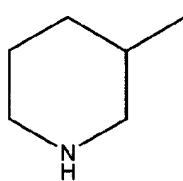
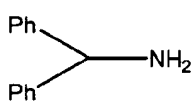
肽 #3: (己烯酰基-反式-3-His⁷)-hGLP-1 (7-37)

10

结果和结论

结果如图 I(研究 A)和图 II (研究 B)。

研究 A 和 B 中，载体的给予在葡萄糖水平中得到相似的整合反应 (研究 A: 380 ± 57 对研究 B: 309 ± 68 mMx120 分钟)，说明该方法的有效性和再现性。虽然 wt GLP-1 引起葡糖反应的剂量相关性降低，这种肽不能在任何剂量下完全抑制葡糖反应，这可能解释为其潜在临床有效性的局限性。与此形成对照，肽 3(研究 A, 图 1)能够完全消除葡萄糖反应，但只在 10ug 的剂量(9 ± 26 mM x 120 分钟)下。令人惊奇地，肽 2(研究 B, 图 2)比肽 3 更加有效，能够在 5ug 和 10ug 剂量下完全阻止葡糖反应(5ug: -17 ± 67 mMx120 分钟; 10 ug: 61 ± 64 mMx120 分钟)。所以，相当于肽 2 的 GLP-1 类似物被鉴定为具有比野生型 GLP-1 (7-37)明显增高的生物学效价，由于这种增高的效价，这种肽可以在与病变如 II 型糖尿病有关的胰岛素耐受性的治疗中具有临床效果。

位置	刚性构象部分	
5		
Glu₃	 3	 4
10	 5	 6
15	 7	 8
20	 9	 10
25	 11	 12

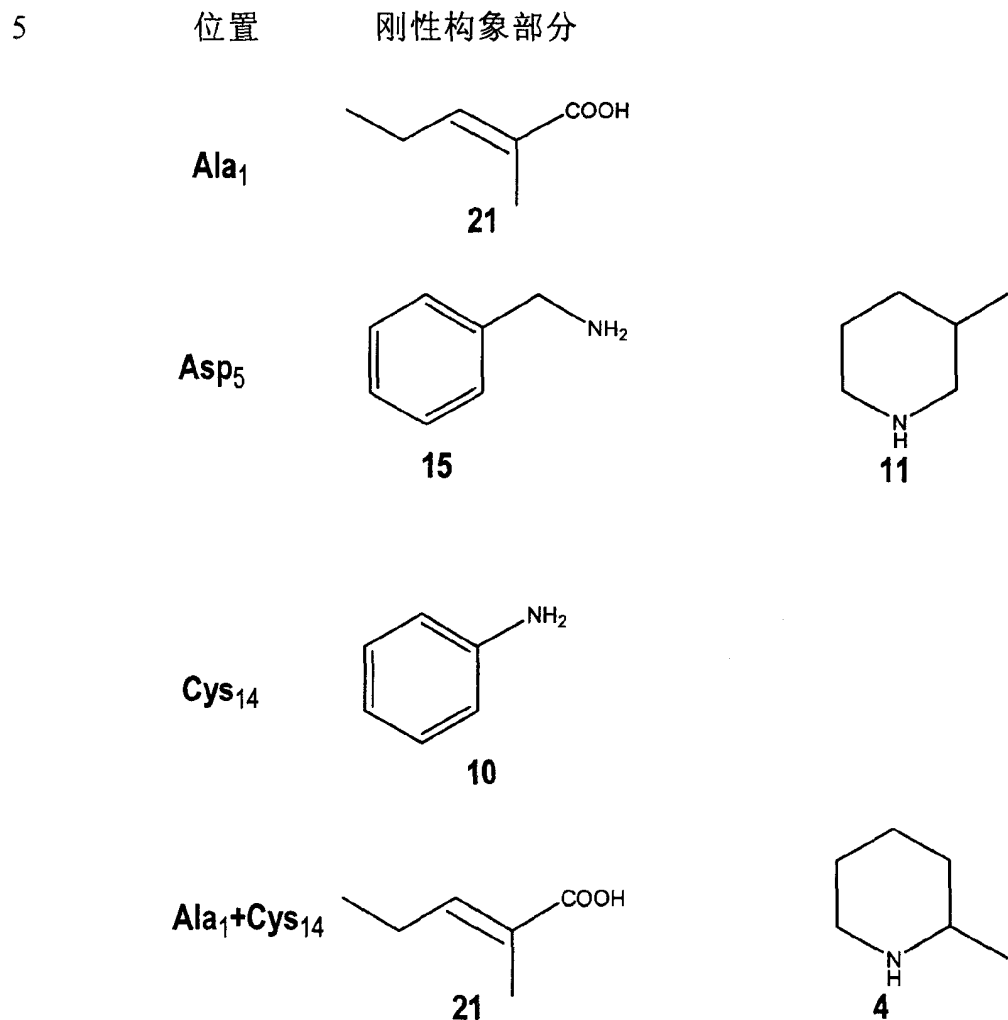
实施例 2

PTH 1-34 类似物

按照本发明，下列刚性构象部分的至少一个与 PTH 1-34 肽序列

促生长素抑制素类似物

按照本发明，下列刚性构象部分与促生长素抑制素肽序列经酰胺键在下列不同位置偶联。



虽然本发明结合具体实施方式进行描述，但应理解其能够进行进一步的改进，并且本申请概括了根据本发明的一般性原理所做的任何本发明的改变方案、应用和调整，而且包括根据本发明所涉及领域的已知或常规实践由本发明的说明、并且可利用上述必要特征、并且按照所附权利要求书的范围做出的偏离。

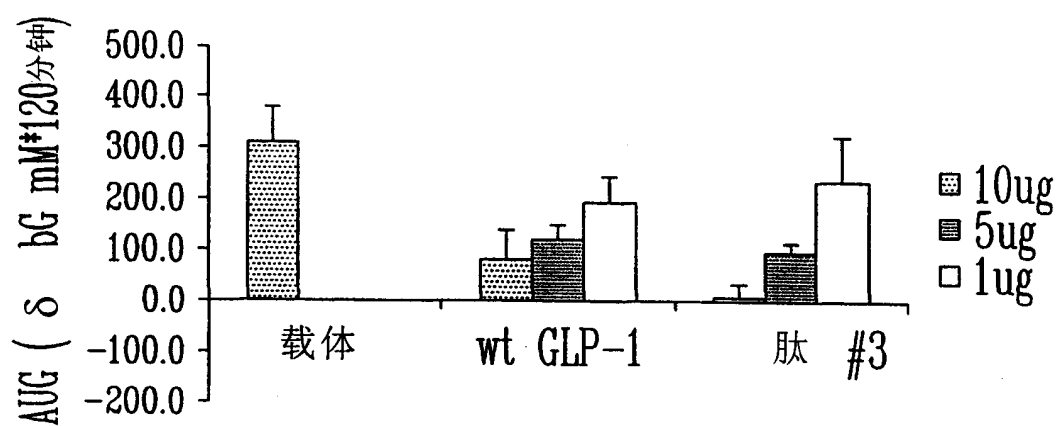


图 1

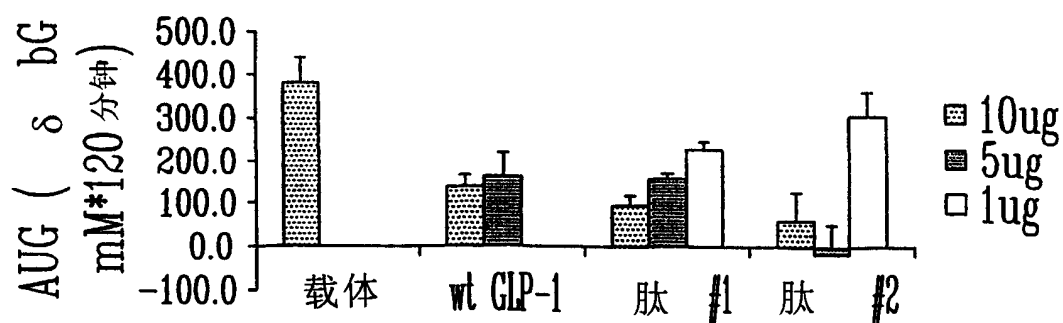


图 2