



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104039342 A

(43) 申请公布日 2014. 09. 10

(21) 申请号 201280062579. 3

A61K 38/16 (2006. 01)

(22) 申请日 2012. 10. 18

C07K 14/00 (2006. 01)

(30) 优先权数据

61/548, 690 2011. 10. 18 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 06. 18

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2012/060913 2012. 10. 18

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/059525 EN 2013. 04. 25

(71) 申请人 爱勒让治疗公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 N·卡瓦哈塔 V·格拉维斯

M·萨曼特

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

代理人 陈文平

(51) Int. Cl.

A61K 38/12 (2006. 01)

权利要求书8页 说明书58页 附图12页

(54) 发明名称

拟肽大环化合物

(57) 摘要

本发明提供了能够调节生长激素水平的拟肽大环化合物, 以及使用这类大环化合物治疗疾病的方法。

1. 一种拟肽大环化合物,其包含与 GHRH1-29 至少约 60% 相同的氨基酸序列,进一步包含至少两个大环形成连接体,其中所述两个大环形成连接体中的第一个将第一氨基酸连接至第二氨基酸,并且所述两个大环形成连接体中的第二个将第三氨基酸连接至第四氨基酸。

2. 如权利要求 1 所述的拟肽大环化合物,其包含两个大环形成连接体。

3. 如任一前述权利要求所述的拟肽大环化合物,其中所述大环形成连接体中的每一个连接以下氨基酸对中的一个:4 和 8;5 和 12;8 和 12;8 和 15;9 和 16;12 和 16;12 和 19;15 和 22;18 和 25;21 和 25;21 和 28;22 和 29;25 和 29。

4. 如权利要求 3 所述的拟肽大环化合物,其中所述大环形成连接体中的每一个连接以下氨基酸对:4 和 8;5 和 12;12 和 19;15 和 22;18 和 25;21 和 25;21 和 28。

5. 如权利要求 3 所述的拟肽大环化合物,其中所述第一大环形成连接体连接氨基酸对 4 和 8;5 和 12;8 和 12;8 和 15;9 和 16;12 和 16;或 12 和 19;并且所述第二大环形成连接体连接氨基酸对 15 和 22;18 和 25;21 和 25;21 和 28;22 和 29;或 25 和 29。

6. 如权利要求 3 所述的拟肽大环化合物,其中所述第一大环形成连接体连接氨基酸对 4 和 8;5 和 12;或 12 和 19;并且所述第二大环形成连接体连接氨基酸对 15 和 22;18 和 25;21 和 25;或 21 和 28。

7. 如权利要求 3 所述的拟肽大环化合物,其中所述第一大环形成连接体连接氨基酸对 4 和 8,并且所述第二大环形成连接体连接氨基酸对 21 和 25。

8. 一种拟肽大环化合物,其包含与 GHRH1-29 至少约 60% 相同的氨基酸序列,进一步包含将第一氨基酸连接至第二氨基酸的大环形成连接体,其中所述第一和第二氨基酸选自以下氨基酸对:4 和 8;5 和 12;8 和 12;8 和 15;9 和 16;12 和 16;12 和 19;15 和 22;18 和 25;21 和 25;21 和 28;22 和 29。

9. 如权利要求 8 所述的拟肽大环化合物,其中所述大环形成连接体连接氨基酸 12 和 19。

10. 如任一前述权利要求所述的拟肽大环化合物,其包含与选自表 1、2 或 4 中氨基酸序列的氨基酸序列至少约 60% 相同的氨基酸序列。

11. 如任一前述权利要求所述的拟肽大环化合物,其中所述拟肽大环化合物的氨基酸序列与选自表 1、2 或 4 中氨基酸序列的氨基酸序列至少约 80% 相同。

12. 如任一前述权利要求所述的拟肽大环化合物,其中所述拟肽大环化合物的氨基酸序列与选自表 1、2 或 4 中氨基酸序列的氨基酸序列至少约 90% 相同。

13. 如权利要求 1 所述的拟肽大环化合物,其中所述拟肽大环化合物的氨基酸序列选自表 1、2 或 4 中的氨基酸序列。

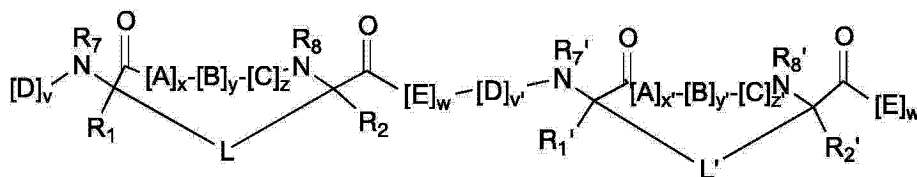
14. 如任一前述权利要求所述的拟肽大环化合物,其中所述拟肽大环化合物包含螺旋。

15. 如任一前述权利要求所述的拟肽大环化合物,其中所述拟肽大环化合物包含 α -螺旋。

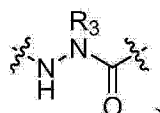
16. 如权利要求 1 所述的拟肽大环化合物,其中所述拟肽大环化合物包含 α , α -二取代的氨基酸。

17. 如权利要求 16 所述的拟肽大环化合物,其中由大环形成连接体连接的各个氨基酸为 α , α -二取代的氨基酸。

20. 如权利要求 19 所述的拟肽大环化合物,其具有下式:



其中 A、C、D 和 E 各自独立地为氨基酸;

B 为氨基酸、 $[-NH-L_3-CO-]$ 、 $[-NH-L_3-SO_2-]$ 或 $[-NH-L_3-]$;

L' 为式 $-L_1'-L_2'-$ 的大环形成连接体;

并且其中 A、B、C、D 和 E,连同通过大环形成连接体 L 和 L' 连接的交联氨基酸一起,形成该拟肽大环化合物的氨基酸序列;

R₁' 和 R₂' 独立地为 -H、烷基、烯基、炔基、芳基烷基、环烷基、环烷基烷基、杂烷基或杂环烷基,它们是未取代的或被卤素 - 取代的;

L₁' 和 L₂' 独立地为亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚杂烷基、亚环烷基、亚杂环烷基、亚环芳基、亚杂环芳基或 $[-R_4-K-R_4-]_n$,它们各自任选地被 R₅ 取代;

各个 K 独立地为 O、S、SO、SO₂、CO、CO₂ 或 CONR₃;

R₇' 为 -H、烷基、烯基、炔基、芳基烷基、环烷基、杂烷基、环烷基烷基、杂环烷基、环芳基或杂环芳基,它们任选地被 R₅ 取代,或是与 D 残基形成的环状结构的一部分;

R₈' 为 -H、烷基、烯基、炔基、芳基烷基、环烷基、杂烷基、环烷基烷基、杂环烷基、环芳基或杂环芳基,它们任选地被 R₅ 取代,或是与 E 残基形成的环状结构的一部分;

v' 和 w' 独立地为 1-100 的整数;

x'、y' 和 z' 独立地为 0-10 的整数;且

n 为 1-5 的整数。

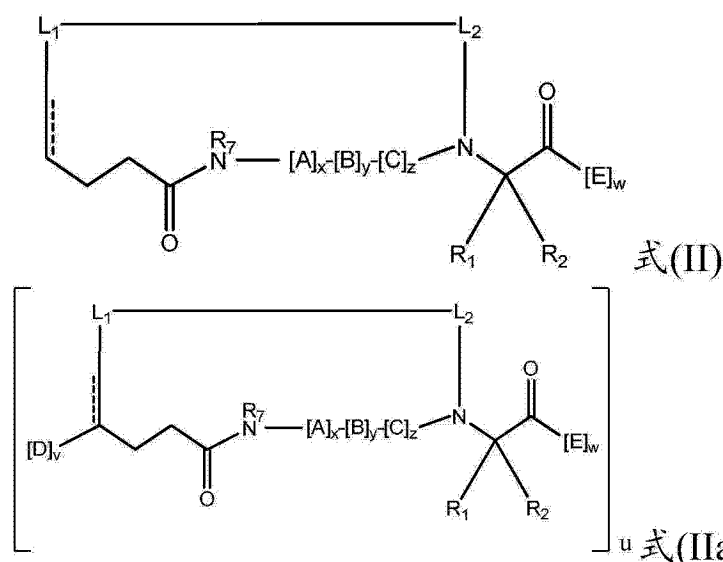
21. 如权利要求 18-20 所述的拟肽大环化合物,其中 x+y+z 的总和为 2、3 或 6,例如 3 或 6。

22. 如权利要求 20 所述的拟肽大环化合物,其中 x' + y' + z' 的总和为 2、3 或 6,例如 3 或 6。

23. 如权利要求 18-21 中的任一项所述的拟肽大环化合物,其中 v 和 w 各自独立地为 1 至 10、1 至 15、1 至 20 或 1 至 25 的整数。

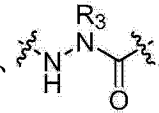
24. 如权利要求 1-16 中的任一项所述的拟肽大环化合物,其中所述拟肽大环化合物包含将所述拟肽大环化合物内的第一氨基酸的骨架氨基连接至第二氨基酸的交联体。

25. 如权利要求 24 所述的拟肽大环化合物,其中所述拟肽大环化合物具有式 (II) 或 (IIa):



其中：

A、C、D和E各自独立地为氨基酸；

B为氨基酸、 $[-NH-L_3-CO-]$ 、 $[-NH-L_3-SO_2-]$ 或 $[-NH-L_3-]$ ；

R_1 和 R_2 独立地为-H、烷基、烯基、炔基、芳基烷基、环烷基、环烷基烷基、杂烷基或杂环烷基，它们是未取代的或被卤素-取代的，或是与E残基形成的环状结构的一部分；

R_3 为氢、烷基、烯基、炔基、芳基烷基、杂烷基、环烷基、杂环烷基、环烷基烷基、环芳基或杂环芳基，它们任选地被 R_5 取代；

L_1 和 L_2 独立地为亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚杂烷基、亚环烷基、亚杂环烷基、亚环芳基、亚杂环芳基或 $[-R_4-K-R_4-]_n$ ，它们各自任选地被 R_5 取代；

并且其中A、B、C、D和E，连同通过大环形成连接体 $-L_1-L_2-$ 连接的交联氨基酸一起，形成所述拟肽大环化合物的氨基酸序列，该氨基酸序列与GHRH1-44、GHRH1-29和/或选自表1、2或4中氨基酸序列的氨基酸序列至少约60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%相同；

各个 R_4 为亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚杂烷基、亚环烷基、亚杂环烷基、亚芳基或亚杂芳基；

各个K为O、S、SO、SO₂、CO、CO₂或CONR₃；

各个 R_5 独立地为卤素、烷基、-OR₆、-N(R₆)₂、-SR₆、-SOR₆、-SO₂R₆、-CO₂R₆、荧光部分、放射性同位素或治疗剂；

各个 R_6 独立地为-H、烷基、烯基、炔基、芳基烷基、环烷基烷基、杂环烷基、荧光部分、放射性同位素或治疗剂；

R_7 为-H、烷基、烯基、炔基、芳基烷基、环烷基、杂烷基、环烷基烷基、杂环烷基、环芳基或杂环芳基，它们任选地被 R_5 取代；

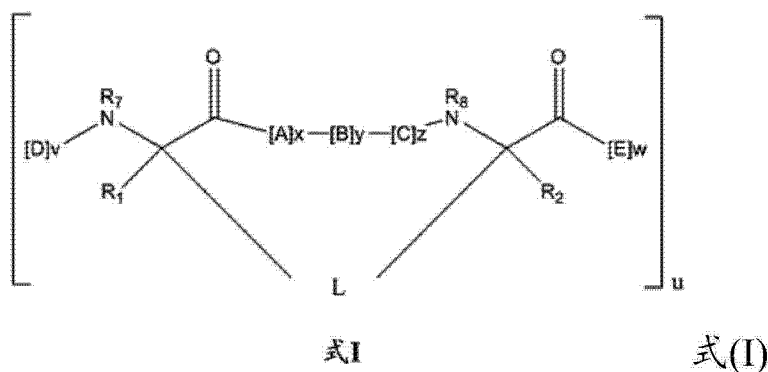
v和w独立地为1-100的整数；

u为1-3的整数；

x、y和z独立地为0-10的整数；且

n 为 1-5 的整数。

26. 如任一前述权利要求所述的拟肽大环化合物,其具有下式:



其中:

A、C、D 和 E 各自独立地为氨基酸;

B 为氨基酸、 $\begin{matrix} R_3 \\ | \\ \text{---} \text{N} \text{---} \\ | \\ \text{H} \end{matrix}$ $[-\text{NH}-\text{L}_3-\text{CO}-]$ 、 $[-\text{NH}-\text{L}_3-\text{SO}_2-]$ 或 $[-\text{NH}-\text{L}_3-]$;

L 为式 $-\text{L}_1-\text{L}_2-$ 的大环形成连接体;

并且其中 A、B、C、D 和 E,连同通过大环形成连接体 L 连接的交联氨基酸一起,形成与 GHRH1-29 至少约 60% 相同的氨基酸序列;

R_1 和 R_2 独立地为 $-\text{H}$ 、烷基、烯基、炔基、芳基烷基、环烷基、环烷基烷基、杂烷基或杂环烷基,它们是未取代的或被卤素 $-\text{X}$ 取代的;

R_3 为氢、烷基、烯基、炔基、芳基烷基、杂烷基、环烷基、杂环烷基、环烷基烷基、环芳基或杂环芳基,它们任选地被 R_5 取代;

L_1 和 L_2 独立地为亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚杂烷基、亚环烷基、亚杂环烷基、亚环芳基、亚杂环芳基或 $[-\text{R}_4-\text{K}-\text{R}_4-]_n$,它们各自任选地被 R_5 取代;

各个 R_4 为亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚杂烷基、亚环烷基、亚杂环烷基、亚芳基或亚杂芳基;

各个 K 为 O、S、SO、SO₂、CO 或 CO₂;

各个 R_5 独立地为卤素、烷基、 $-\text{OR}_6$ 、 $-\text{N}(\text{R}_6)_2$ 、 $-\text{SR}_6$ 、 $-\text{SOR}_6$ 、 $-\text{SO}_2\text{R}_6$ 、 $-\text{CO}_2\text{R}_6$ 、荧光部分、放射性同位素或治疗剂;

各个 R_6 独立地为 $-\text{H}$ 、烷基、烯基、炔基、芳基烷基、环烷基烷基、杂环烷基、荧光部分、放射性同位素或治疗剂;

R_7 为 $-\text{H}$ 、烷基、烯基、炔基、芳基烷基、环烷基、杂烷基、环烷基烷基、杂环烷基、环芳基或杂环芳基,它们任选地被 R_5 取代,或是与 D 残基形成的环状结构的一部分;

R_8 为 $-\text{H}$ 、烷基、烯基、炔基、芳基烷基、环烷基、杂烷基、环烷基烷基、杂环烷基、环芳基或杂环芳基,它们任选地被 R_5 取代,或是与 E 残基形成的环状结构的一部分;

v 和 w 独立地为 1-100 的整数;

u 为 1-3 的整数;

x、y 和 z 独立地为 0-10 的整数;且

n 为 1-5 的整数。

27. 如权利要求 26 所述的拟肽大环化合物,其中 A、B、C、D 和 E 连同通过大环形成连接体 L 连接的交联氨基酸一起形成与表 1、2 或 3 的氨基酸序列至少约 60%、70%、80%、90% 相同的氨基酸序列。

28. 一种拟肽大环化合物,其包含下式的氨基酸序列:

X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13-X14-X15-X16-X17-X18-X19-X20-X21-X22-X23-X24-X25-X26-X27-X28-X29

其中:

X1 为 Tyr 或 His;

X2 为 Ala、D-Ala 或 Val;

X3 为 Asp;

X4 为 Ala 或交联氨基酸;

X5 为 Ile;

X6 为 Phe;

X7 为 Thr;

X8 为 Gln、Asn 或交联氨基酸;

X9 为 Ser 或交联氨基酸;

X10 为 Tyr;

X11 为 Arg、Ala 或 Gln;

X12 为 Lys、Ala、Gln 或交联氨基酸;

X13 为 Val 或 Ile;

X14 为 Leu;

X15 为 Gly、Ala 或交联氨基酸;

X16 为 Gln、Glu 或交联氨基酸;

X17 为 Leu;

X18 为 Ser、Tyr 或交联氨基酸;

X19 为 Ala 或交联氨基酸;

X20 为 Arg 或 Gln;

X21 为 Lys、Gln 或交联氨基酸;

X22 为 Leu、Ala 或交联氨基酸;

X23 为 Leu;

X24 为 Gln、Glu 或 His;

X25 为 Asp、Glu 或交联氨基酸;

X26 为 Ile;

X27 为 Met、Ile、Leu 或 Nle;

X28 为 Ser 或交联氨基酸;

X29 为 Arg、Ala、Gln 或交联氨基酸;

其中所述拟肽大环化合物包含至少一个连接至少一对选自 X1-X29 的氨基酸的大环形成连接体;

L 为式 - L₁ - L₂ - 的大环形成连接体;

L_1 和 L_2 独立地为亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚杂烷基、亚环烷基、亚杂环烷基、亚环芳基、亚杂环芳基或 $[-R_4-K-R_4-]_n$, 它们各自任选地被 R_5 取代;

各个 R_4 为亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚杂烷基、亚环烷基、亚杂环烷基、亚芳基或亚杂芳基;

各个 K 为 O、S、SO、SO₂、CO 或 CO₂;

各个 R_5 独立地为卤素、烷基、-OR₆、-N(R₆)₂、-SR₆、-SOR₆、-SO₂R₆、-CO₂R₆、荧光部分、放射性同位素或治疗剂;且

各个 R_6 独立地为 -H、烷基、烯基、炔基、芳基烷基、环烷基烷基、杂环烷基、荧光部分、放射性同位素或治疗剂。

29. 如权利要求 28 所述的拟肽大环化合物, 其中各个大环形成连接体连接以下氨基酸对中的一个: X4 和 X8; X5 和 X12; X8 和 X12; X8 和 X15; X9 和 X16; X12 和 X16; X12 和 X19; X15 和 X22; X18 和 X25; X21 和 X25; X21 和 X28; X22 和 X29; X25 和 X29。

30. 如权利要求 29 所述的拟肽大环化合物, 其中各个大环形成连接体连接以下氨基酸对中的一个: X4 和 X8; X5 和 X12; X12 和 X19; X15 和 X22; X18 和 X25; X21 和 X25; X21 和 X28。

31. 如权利要求 18-30 中的任一项所述的拟肽大环化合物, 其中 L_1 和 L_2 独立地为亚烷基、亚烯基或亚炔基。

32. 如权利要求 31 所述的拟肽大环化合物, 其中 L_1 和 L_2 独立地为 C₃-C₁₀ 亚烷基或亚烯基。

33. 如权利要求 31 所述的拟肽大环化合物, 其中 L_1 和 L_2 独立地为 C₃-C₆ 亚烷基或亚烯基。

34. 如权利要求 18-30 中的任一项所述的拟肽大环化合物, 其中 R_1 和 R_2 为 H。

35. 如权利要求 18-30 中的任一项所述的拟肽大环化合物, 其中 R_1 和 R_2 独立地为烷基。

36. 如权利要求 18-30 中的任一项所述的拟肽大环化合物, 其中 R_1 和 R_2 为甲基。

37. 一种提高受试者中的生长激素 (GH) 循环水平的方法, 其包括向受试者施用如任一前述权利要求所述的拟肽大环化合物。

38. 一种增加受试者中的瘦肌质量的方法, 其包括向受试者施用如任一前述权利要求所述的拟肽大环化合物。

39. 一种减少受试者中的脂肪组织的方法, 其包括向受试者施用如任一前述权利要求所述的拟肽大环化合物。

40. 如权利要求 39 所述的方法, 其中所述脂肪组织为腹部组织。

41. 如权利要求 39 所述的方法, 其中所述受试者患有肥胖症, 例如腹部肥胖症。

42. 一种治疗受试者中的肌肉萎缩病的方法, 该肌肉萎缩病包括食欲缺乏、恶病质 (如癌症恶病质、慢性心力衰竭恶病质、慢性阻塞性肺疾病恶病质、类风湿性关节炎恶病质) 或少肌症, 该方法包括向受试者施用如任一前述权利要求所述的拟肽大环化合物。

43. 一种治疗受试者中的脂质营养不良的方法, 该脂质营养不良包括 HIV 脂质营养不良, 该方法包括向受试者施用如任一前述权利要求所述的拟肽大环化合物。

44. 一种治疗受试者中的生长激素紊乱的方法, 其包括向受试者施用如任一前述权利要求所述的拟肽大环化合物。

45. 如权利要求 44 所述的方法, 其中所述紊乱是成人生长激素缺乏。

46. 如权利要求 44 所述的方法,其中所述紊乱是儿童生长激素缺乏。

47. 如权利要求 46 所述的方法,其中所述儿童生长激素缺乏与特发性身材矮小症、SGA(小于胎龄儿)、慢性肾病、普拉德-威利综合征、特纳综合征、身材矮小同源框(SHOX)基因缺乏或原发性 IGF-1 缺乏相关。

48. 一种治疗受试者中的胃轻瘫或短肠综合征的方法,其包括向受试者施用如任一前述权利要求所述的拟肽大环化合物。

49. 一种通过施用 GHRH 受体的激动剂来治疗受试者中的肌肉萎缩病、脂质营养不良、生长激素紊乱或胃轻瘫/短肠综合征的方法,其中所述激动剂以不超过每天一次的频率、不超过隔天一次的频率、不超过每周两次的频率、不超过每周一次的频率或不超过隔周一次的频率施用。

50. 一种通过施用 GHRH 类似物来治疗受试者中的肌肉萎缩病、脂质营养不良、生长激素紊乱或胃轻瘫/短肠综合征的方法,其中所述 GHRH 类似物以不超过每天一次的频率、不超过隔天一次的频率、不超过每周两次的频率、不超过每周一次的频率或不超过隔周一次的频率施用。

51. 一种通过施用 GHRH 受体的激动剂来提高受试者中的生长激素(GH)循环水平的方法,其中所述激动剂以不超过每天一次的频率、不超过隔天一次的频率、不超过每周两次的频率、不超过每周一次的频率或不超过隔周一次的频率施用。

52. 一种通过施用 GHRH 类似物来提高受试者中的生长激素(GH)循环水平的方法,其中所述 GHRH 类似物以不超过每天一次的频率、不超过隔天一次的频率、不超过每周两次的频率、不超过每周一次的频率或不超过隔周一次的频率施用。

拟肽大环化合物

交叉引用

[0001] 本申请要求 2011 年 10 月 18 日提交的美国临时申请系列号 61/548,690 的优先权,该临时申请通过引用整体并入本文。

发明背景

[0002] 人 GHRH(生长激素释放激素)是一种 44 个氨基酸的肽,其全部生物活性存在于其前 29 个氨基酸(“GHRH1-29”)中。GHRH 与 GHRH 受体结合,并激活 GH[生长激素]的脉冲式分泌,通过这种作用机制,GHRH 成为具有完整脑垂体的患者中的 GH 疗法的替代疗法,其可最小化与长期 GH 给药相关的副作用。因为由 GHRH 诱导的 GH 释放量受到发挥负反馈效应的 IGF-1 水平的限制,所以采用 GHRH 疗法时与过量 GH 分泌有关的副作用的风险也可能比采用 GH 疗法时更低。此外,用 GHRH 治疗可导致一组更广泛的 GH 蛋白质的垂体分泌,而不只是由重组人 GH 提供的 22-kDa 形式,该形式也可具有有益效果。在临床上,GHRH 已被证明在提高成人和儿童的 GH 水平上是安全而有效的,并且 GHRH 的促生长作用与给药剂量和频率相关联。然而,GHRH 在静脉内注射后的半衰期只有 10-12min,这显著限制了其作为治疗剂的应用。因此,对于具有延长的体内半衰期的 GHRH 类似物存在临床需求,其可以用改进(较不频繁)的给药方案提供更大的治疗益处。

发明内容

[0003] 本发明提供了 GHRH 衍生的拟肽大环化合物,其被设计成具有相对于 GHRH 改善的药学性质。这些改善的性质包括增强的化学稳定性、延长的体内半衰期、增加的药效和降低的免疫原性。这些拟肽大环化合物对提高 GH 的循环水平是有用的,作为针对肌肉萎缩病、脂质营养不良、生长激素紊乱、胃轻瘫/短肠综合征以及 GH 的升高将提供治疗益处的其它状况的治疗。

[0004] 下面描述了由 GHRH 肽衍生的稳定交联的肽。这些交联的肽含有至少两个修饰的氨基酸,这些氨基酸一起形成分子内交联,该分子内交联可帮助稳定被认为对于 GHRH 受体处的激动剂活性至关重要的 GHRH 一部分的 α 螺旋二级结构。相对于野生型肽的氨基酸序列,任何对于该肽的生长激素释放活性而言非必需的氨基酸可被其它任何氨基酸所取代,而对于该肽的生长激素释放活性而言必需的氨基酸只可被基本上不降低所述活性的氨基酸类似物所取代。

[0005] 因此,本文描述的交联多肽可具有相对于对应的非交联多肽改善的生物活性。不受理论所束缚,GHRH 拟肽大环化合物被认为可激活 GHRH 受体,从而刺激生长激素的产生和释放,这可以增加瘦肌质量或减少脂肪组织(如腹部脂肪组织)。例如,可减少患有肥胖症(包括腹部肥胖症)的受试者的脂肪组织。本文描述的 GHRH 拟肽大环化合物可治疗性地使用,例如,用于治疗包括食欲缺乏、恶病质(如癌症恶病质、慢性心力衰竭恶病质、慢性阻塞性肺疾病恶病质、类风湿性关节炎恶病质)和少肌症在内的肌肉萎缩病,治疗包括 HIV 脂质营养不良在内的脂质营养不良,治疗包括成人和儿童生长激素缺乏在内的生长激素紊乱,或者治疗胃轻瘫或短肠综合征。例如,儿童生长激素缺乏可能与特发性身材矮小症、SGA(小

于胎龄儿)、慢性肾病、普拉德-威利综合征 (Prader-Willi syndrome)、特纳综合征、身材矮小同源框 (SHOX) 基因缺乏或原发性 IGF-1 缺乏相联系或相关联。

[0006] 在一个方面,本发明提供一种拟肽大环化合物,其包含与 GHRH1-44、GHRH1-29 和 / 或选自表 1、2 或 4 中氨基酸序列的氨基酸序列至少约 60%、65%、70%、75%、80%、90%、95%、96%、97%、98% 或 99% 相同的氨基酸序列。或者,所述拟肽大环化合物的氨基酸序列选自表 1、2 或 4 中的氨基酸序列。该拟肽大环化合物可包含一个、两个、三个、四个、五个或更多个大环形成连接体,其中各个大环形成连接体将该拟肽大环化合物内的一个氨基酸连接至另一个氨基酸。例如,拟肽大环化合物包含至少两个大环形成连接体,其中所述至少两个大环形成连接体中的第一个将第一氨基酸连接至第二氨基酸,而所述至少两个大环形成连接体中的第二个将第三氨基酸连接至第四氨基酸。在一些实施方案中,该拟肽大环化合物恰好包含两个大环形成连接体。在其它实施方案中,该拟肽大环化合物恰好包含一个大环形成连接体。

[0007] 大环形成连接体连接任意两个可被交联的氨基酸,而不损害拟肽大环化合物的活性。在一些实施方案中,大环形成连接体连接以下氨基酸对(参考与 GHRH1-29 对齐的任何序列编号)之一:4 和 8;5 和 12;8 和 12;8 和 15;9 和 16;12 和 16;12 和 19;15 和 22;18 和 25;21 和 25;21 和 28;22 和 29;25 和 29。例如,大环形成连接体连接以下氨基酸对之一:4 和 8;5 和 12;12 和 19;15 和 22;18 和 25;21 和 25;21 和 28。在一些实施方案中,第一大环形成连接体连接氨基酸对 4 和 8;5 和 12;8 和 12;8 和 15;9 和 16;12 和 16;或 12 和 19;而第二大环形成连接体连接氨基酸对 15 和 22;18 和 25;21 和 25;21 和 28;22 和 29;或 25 和 29。例如,第一大环形成连接体连接氨基酸对 4 和 8;5 和 12;或 12 和 19;而第二大环形成连接体连接氨基酸对 15 和 22;18 和 25;21 和 25;或 21 和 28。在一些实施方案中,第一大环形成连接体连接氨基酸对 4 和 8,而第二大环形成连接体连接氨基酸对 21 和 25。

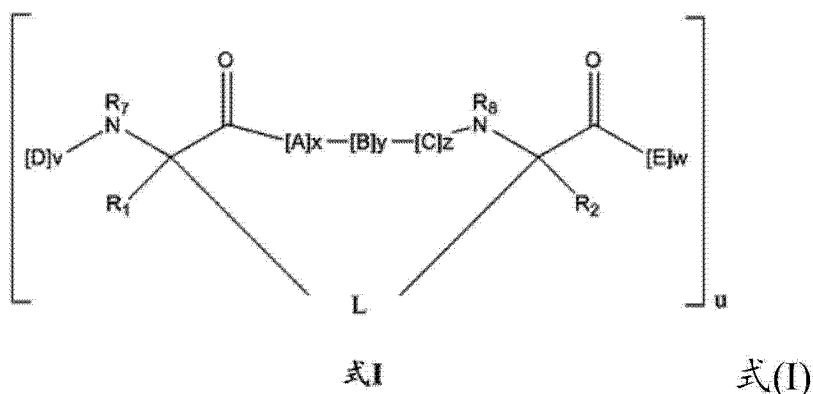
[0008] 在一些实施方案中,拟肽大环化合物包含与 GHRH1-44、GHRH1-29 和 / 或选自表 1、2 或 4 中氨基酸序列的氨基酸序列至少约 60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98% 或 99% 相同的氨基酸序列,并且进一步包含将第一氨基酸连接至第二氨基酸的大环形成连接体,其中该第一和第二氨基酸选自以下氨基酸对:4 和 8;5 和 12;8 和 12;8 和 15;9 和 16;12 和 16;12 和 19;15 和 22;18 和 25;21 和 25;21 和 28;22 和 29。例如,大环形成连接体连接氨基酸 12 和 19。

[0009] 在一些实施方案中,拟肽大环化合物包含选自表 1、2 或 4 中的氨基酸序列的序列,或者该拟肽大环化合物的氨基酸序列选自表 1、2 或 4 中的氨基酸序列。

[0010] 在一些实施方案中,该拟肽大环化合物包含螺旋,如 α -螺旋或 3_{10} 螺旋。在其它实施方案中,该拟肽大环化合物包含 α , α -二取代的氨基酸。例如,通过大环形成连接体连接的至少一个氨基酸或各个氨基酸为 α , α -二取代的氨基酸。

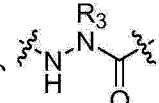
[0011] 在一些实施方案中,本发明的拟肽大环化合物包含连接至少两个氨基酸的 α -位点的交联体 (crosslinker)。

[0012] 在一些实施方案中,所述拟肽大环化合物具有下式:



其中：

A、C、D 和 E 各自独立地为氨基酸；

B 为氨基酸、 $[-NH-L_3-CO-]$ 、 $[-NH-L_3-SO_2-]$ 或 $[-NH-L_3-]$ ；

R_1 和 R_2 独立地为 -H、烷基、烯基、炔基、芳基烷基、环烷基、环烷基烷基、杂烷基或杂环烷基，它们是未取代的或被卤素 - 取代的；

R_3 为氢、烷基、烯基、炔基、芳基烷基、杂烷基、环烷基、杂环烷基、环烷基烷基、环芳基或杂环芳基，它们任选地被 R_5 取代；

L 为式 $-L_1-L_2-$ 的大环形成连接体；

并且其中 A、B、C、D 和 E，连同通过大环形成连接体 L 连接的交联氨基酸一起，形成该拟肽大环化合物的氨基酸序列，该氨基酸序列与 GHRH1-44、GHRH1-29 和 / 或选自表 1、2 或 4 中氨基酸序列的氨基酸序列至少约 60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98% 或 99% 相同；

L_1 和 L_2 独立地为亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚杂烷基、亚环烷基、亚杂环烷基、亚环芳基、亚杂环芳基或 $[-R_4-K-R_4-]_n$ ，它们各自任选地被 R_5 取代；

各个 R_4 为亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚杂烷基、亚环烷基、亚杂环烷基、亚芳基或亚杂芳基；

各个 K 为 O、S、SO、SO₂、CO、CO₂ 或 CONR₃；

各个 R_5 独立地为卤素、烷基、-OR₆、-N(R₆)₂、-SR₆、-SOR₆、-SO₂R₆、-CO₂R₆、荧光部分、放射性同位素或治疗剂；

各个 R_6 独立地为 -H、烷基、烯基、炔基、芳基烷基、环烷基烷基、杂环烷基、荧光部分、放射性同位素或治疗剂；

R_7 为 -H、烷基、烯基、炔基、芳基烷基、环烷基、杂烷基、环烷基烷基、杂环烷基、环芳基或杂环芳基，它们任选地被 R_5 取代，或是与 D 残基形成的环状结构的一部分；

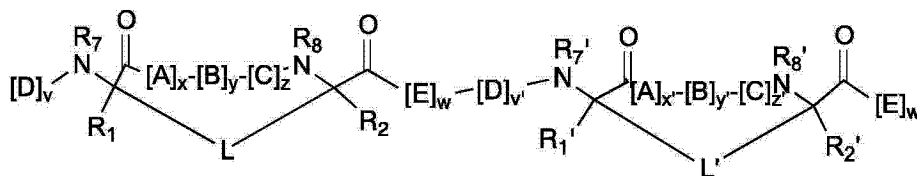
R_8 为 -H、烷基、烯基、炔基、芳基烷基、环烷基、杂烷基、环烷基烷基、杂环烷基、环芳基或杂环芳基，它们任选地被 R_5 取代，或是与 E 残基形成的环状结构的一部分；

v 和 w 独立地为 1-1000 的整数，例如 1-500、1-200、1-100、1-50、1-40、1-25、1-20、1-15 或 1-10；

u、x、y 和 z 独立地为 0-10 的整数，例如 u 为 1、2 或 3；且

n 为 1-5 的整数。例如, u 为 2。在一些实施方案中, $x+y+z$ 的总和为 2、3 或 6, 例如 3 或 6。

[0013] 在一些实施方案中, 式 (I) 的拟肽大环化合物具有下式:



其中 A、C、D 和 E 各自独立地为氨基酸;

B 为氨基酸、 $\begin{matrix} R_3 \\ | \\ \text{---} \text{N} \text{---} \\ | \\ \text{H} \end{matrix}$ $[-\text{NH}-\text{L}_3-\text{CO}-]$ 、 $[-\text{NH}-\text{L}_3-\text{SO}_2-]$ 或 $[-\text{NH}-\text{L}_3-]$;

L' 为式 $-\text{L}_1' - \text{L}_2' -$ 的大环形成连接体;

并且其中 A、B、C、D 和 E, 连同通过大环形成连接体 L 和 L' 连接的交联氨基酸一起, 形成该拟肽大环化合物的氨基酸序列;

R_1' 和 R_2' 独立地为 $-\text{H}$ 、烷基、烯基、炔基、芳基烷基、环烷基、环烷基烷基、杂烷基或杂环烷基, 它们是未取代的或被卤素 $-$ 取代的;

L_1' 和 L_2' 独立地为亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚杂烷基、亚环烷基、亚杂环烷基、亚环芳基、亚杂环芳基或 $[-\text{R}_4-\text{K}-\text{R}_4-]_n$, 它们各自任选地被 R_5 取代;

各个 K 独立地为 O、S、SO、SO₂、CO、CO₂ 或 CONR₃;

R_7' 为 $-\text{H}$ 、烷基、烯基、炔基、芳基烷基、环烷基、杂烷基、环烷基烷基、杂环烷基、环芳基或杂环芳基, 它们任选地被 R_5 取代, 或是与 D 残基形成的环状结构的一部分;

R_8' 为 $-\text{H}$ 、烷基、烯基、炔基、芳基烷基、环烷基、杂烷基、环烷基烷基、杂环烷基、环芳基或杂环芳基, 它们任选地被 R_5 取代, 或是与 E 残基形成的环状结构的一部分;

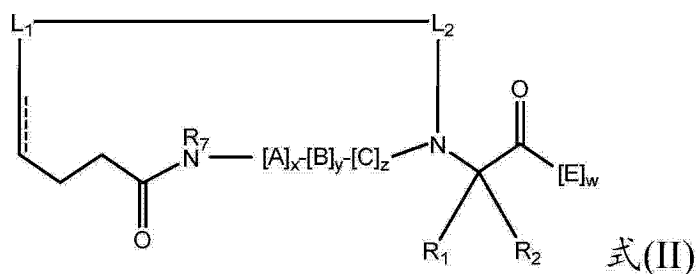
v' 和 w' 独立地为 1-1000 的整数, 例如 1-500、1-200、1-100、1-50、1-40、1-25、1-20、1-15 或 1-10;

x' 、 y' 和 z' 独立地为 0-10 的整数; 且

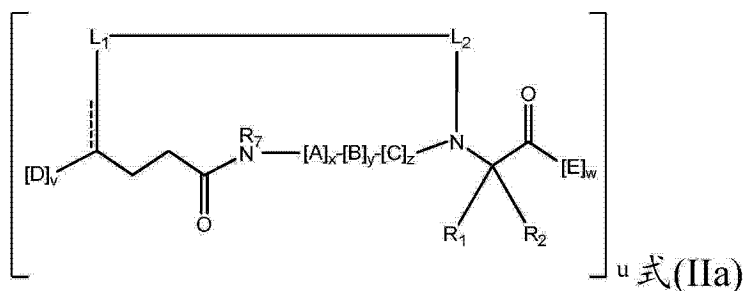
n 为 1-5 的整数。在一些实施方案中, $x' + y' + z'$ 的总和为 2、3 或 6, 例如 3 或 6。

[0014] 在任意本文描述的拟肽大环化合物的一些实施方案中, 各个 K 为 O、S、SO、SO₂、CO 或 CO₂。

[0015] 在其它实施方案中, 所述拟肽大环化合物可包含将该拟肽大环化合物内的第一氨基酸的骨架氨基连接至第二氨基酸的交联体。例如, 本发明提供式 (II) 或 (IIa) 的拟肽大环化合物:



式(II)



其中：

A、C、D 和 E 各自独立地为氨基酸；

B 为氨基酸、 $[-NH-L_3-CO-]$ 、 $[-NH-L_3-SO_2-]$ 或 $[-NH-L_3-]$ ；

R₁ 和 R₂ 独立地为 -H、烷基、烯基、炔基、芳基烷基、环烷基、环烷基烷基、杂烷基或杂环烷基, 它们是未取代的或被卤素 - 取代的, 或是与 E 残基形成的环状结构的一部分;

R₃ 为氢、烷基、烯基、炔基、芳基烷基、杂烷基、环烷基、杂环烷基、环烷基烷基、环芳基或杂环芳基,它们任选地被 R₅ 取代;

L_1 和 L_2 独立地为亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚杂烷基、亚环烷基、亚杂环烷基、亚环芳基、亚杂环芳基或 $[-R_4-K-R_4-]_n$, 它们各自任选地被 R_5 取代;

并且其中 A、B、C、D 和 E, 连同通过大环形成连接体 $-L_1-L_2-$ 连接的交联氨基酸一起, 形成该拟肽大环化合物的氨基酸序列, 该氨基酸序列与 GHRH1-44、GHRH1-29 和 / 或选自表 1、2 或 4 中氨基酸序列的氨基酸序列至少约 60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98% 或 99% 相同;

各个 R₄ 为亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚杂烷基、亚环烷基、亚杂环烷基、亚芳基或亚杂芳基；

各个 K 为 0、S、S0、S0₀、C0、C0₀ 或 CONR₃；

各个 R_5 独立地为卤素、烷基、 $-OR_6$ 、 $-N(R_6)_2$ 、 $-SR_6$ 、 $-SOR_6$ 、 $-SO_2R_6$ 、 $-CO_2R_6$ 、荧光部分、放射性同位素或治疗剂；

各个R₆独立地为-H、烷基、烯基、炔基、芳基烷基、环烷基烷基、杂环烷基、荧光部分、放射性同位素或治疗剂；

R₇ 为 -H、烷基、烯基、炔基、芳基烷基、环烷基、杂烷基、环烷基烷基、杂环烷基、环芳基或杂环芳基,它们任选地被 R₅ 取代;

v 和 w 独立地为 1-1000 的整数, 例如 1-500、1-200、1-100、1-50、1-40、1-25、1-20、1-15 或 1-10 ;

u、x、y 和 z 独立地为 0-10 的整数,例如 u 为 1-3;且

n 为 1-5 的整数。

[0016] 本文还提供了包含下式的氨基酸序列的拟肽大环化合物：

X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13-X14-X15-X16-X17-X18-X19-X20-X21-X22-X23-X24-X25-X26-X27-X28-X29

其中：

X1 为 Tyr 或 His ;

X2 为 Ala、D-Ala 或 Val ;
X3 为 Asp ;
X4 为 Ala 或交联氨基酸 ;
X5 为 Ile ;
X6 为 Phe ;
X7 为 Thr ;
X8 为 Gln、Asn 或交联氨基酸 ;
X9 为 Ser 或交联氨基酸 ;
X10 为 Tyr ;
X11 为 Arg、Ala 或 Gln ;
X12 为 Lys、Ala、Gln 或交联氨基酸 ;
X13 为 Val 或 Ile ;
X14 为 Leu ;
X15 为 Gly、Ala 或交联氨基酸 ;
X16 为 Gln、Glu 或交联氨基酸 ;
X17 为 Leu ;
X18 为 Ser、Tyr 或交联氨基酸 ;
X19 为 Ala 或交联氨基酸 ;
X20 为 Arg 或 Gln ;
X21 为 Lys、Gln 或交联氨基酸 ;
X22 为 Leu、Ala 或交联氨基酸 ;
X23 为 Leu ;
X24 为 Gln、Glu 或 His ;
X25 为 Asp、Glu 或交联氨基酸 ;
X26 为 Ile ;
X27 为 Met、Ile、Leu 或 Nle ;
X28 为 Ser 或交联氨基酸 ;
X29 为 Arg、Ala、Gln 或交联氨基酸 ;

其中该拟肽大环化合物包含至少一个连接至少一对选自 X1-X29 的氨基酸的大环形成连接体 ;

L 为式 $-L_1-L_2-$ 的大环形成连接体 ;

L_1 和 L_2 独立地为亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚杂烷基、亚环烷基、亚杂环烷基、亚环芳基、亚杂环芳基或 $[-R_4-K-R_4-]_n$, 它们各自任选地被 R_5 取代 ;

各个 R_4 为亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚杂烷基、亚环烷基、亚杂环烷基、亚芳基或亚杂芳基 ;

各个 K 为 O、S、SO、SO₂、CO 或 CO₂ ;

各个 R_5 独立地为卤素、烷基、-OR₆、-N(R₆)₂、-SR₆、-SOR₆、-SO₂R₆、-CO₂R₆、荧光部分、放射性同位素或治疗剂 ; 且

各个 R_6 独立地为 -H、烷基、烯基、炔基、芳基烷基、环烷基烷基、杂环烷基、荧光部分、放

射性同位素或治疗剂。

[0017] 例如,所述多肽包含至少一个或至少两个大环形成连接体,该大环形成连接体连接以下氨基酸对之一: X4 和 X8; X5 和 X12; X8 和 X12; X8 和 X15; X9 和 X16; X12 和 X16; X12 和 X19; X15 和 X22; X18 和 X25; X21 和 X25; X21 和 X28; X22 和 X29; X25 和 X29。例如,各个大环形成连接体连接以下氨基酸对之一: X4 和 X8; X5 和 X12; X12 和 X19; X15 和 X22; X18 和 X25; X21 和 X25; X21 和 X28。

[0018] 在一些实施方案中,拟肽大环化合物包含式 $-L_1-L_2-$ 的大环形成连接体,其中 L_1 和 L_2 独立地为亚烷基、亚烯基或亚炔基。例如, L_1 和 L_2 独立地为 C_3-C_{10} 亚烷基或亚烯基或 C_3-C_6 亚烷基或亚烯基。

[0019] 在一些实施方案中, R_1 和 R_2 独立地为 H 或烷基,例如甲基。

[0020] 此外,本发明提供了一种提高受试者中的生长激素 (GH) 循环水平的方法,一种增加受试者中的瘦肌质量的方法,以及一种减少受试者中的脂肪组织 (如腹部脂肪组织) 的方法,该方法包括向受试者施用本发明的拟肽大环化合物。例如,使用本发明的拟肽大环化合物来治疗患有肥胖症 (包括腹部肥胖症) 的患者。本发明还提供了一种治疗包括食欲缺乏、恶病质 (如癌症恶病质、慢性心力衰竭恶病质、慢性阻塞性肺疾病恶病质、类风湿性关节炎恶病质) 和少肌症在内的肌肉萎缩病的方法,一种治疗包括 HIV 脂质营养不良在内的脂质营养不良的方法,一种治疗包括成人和儿童生长激素缺乏在内的生长激素紊乱的方法,或者一种治疗胃轻瘫或短肠综合征的方法。例如,儿童生长激素缺乏可能与特发性身材矮小症、SGA (小于胎龄儿)、慢性肾病、普拉德-威利综合征、特纳综合征、身材矮小同源框 (SHOX) 基因缺乏或原发性 IGF-1 缺乏相联系或相关联。本发明还提供了一种通过施用 GHRH 受体激动剂 (如 GHRH 类似物) 来治疗受试者中的肌肉萎缩病、脂质营养不良、生长激素紊乱或胃轻瘫 / 短肠综合征的方法,其中该激动剂以不超过每天一次的频率、不超过隔天一次的频率、不超过每周两次的频率、不超过每周一次的频率或不超过隔周一次的频率施用。本发明还提供了一种通过施用 GHRH 受体激动剂 (如 GHRH 类似物) 来提高受试者中的生长激素 (GH) 循环水平的方法,其中该激动剂以不超过每天一次的频率、不超过隔天一次的频率、不超过每周两次的频率、不超过每周一次的频率或不超过隔周一次的频率施用。

援引并入

[0021] 本说明书中提及的所有出版物、专利和专利申请均通过引用并入本文,如同明确地和分别地指出各个单独的出版物、专利或专利申请通过引用并入本文。

附图说明

[0022] 在所附的权利要求书中详细地阐述了本发明的新特征。通过参考以下对利用本发明原理的说明性实施方案加以阐述的详细说明和附图,将会获得对本发明的特征和优点的更好的理解,在这些附图中:

[0023] 图 1A 和 1B 显示了本发明的拟肽大环化合物对于胰蛋白酶蛋白水解的提高了的稳定性。

[0024] 图 2 显示了本发明拟肽大环化合物的增强的血清稳定性。

[0025] 图 3 和 3a 显示了通过本发明拟肽大环化合物的 cAMP 释放和胰蛋白酶半衰期测量的 GHRH 受体激动剂活性。对于 cAMP 值,“+”表示大于 50nM 的值;“++”表示 10-50nM 的

值；“+++”表示 1-10nM 的值；“++++”表示低于 1nM 的值。对于胰蛋白酶半衰期，“+”表示低于 50min 的值；“++”表示 50-100min 的值；“+++”表示 100-200min 的值；“++++”表示大于 200min 的值；而“NT”表示“未检测”。

[0026] 图 4 显示了用拟肽大环化合物 SP-1 进行的血浆药代动力学 (PK) 研究的结果。

[0027] 图 5 显示了用拟肽大环化合物 SP-8 进行的血浆药代动力学研究的结果。

[0028] 图 6 显示了用拟肽大环化合物 SP-6 进行的血浆药代动力学研究的结果。

[0029] 图 7 显示了用拟肽大环化合物 SP-21 进行的血浆药代动力学研究的结果。

[0030] 图 8 显示了用拟肽大环化合物 SP-32 进行的血浆药代动力学研究的结果。

[0031] 图 9 显示了用拟肽大环化合物 SP-1、SP-6、SP-8、SP-21 和 SP-32 进行的血浆药代动力学研究的结果。

[0032] 图 10 显示了拟肽大环化合物 SP-8 对生长激素产生的刺激。

[0033] 图 11 显示了与拟肽大环化合物 SP-1、SP-6、SP-8、SP-21 和 SP-32 相比，由舍莫瑞林诱导的生长激素释放 (AUC)。

发明详述

[0034] 如本文所用的，术语“大环化合物”是指这样一种分子，该分子具有包括由至少 9 个共价键合的原子形成的环或环形的化学结构。

[0035] 如本文所用的，术语“拟肽大环化合物”或“交联的多肽”是指包含通过多个肽键连接的多个氨基酸残基和至少一个大环形成连接体的化合物，所述大环形成连接体在第一天然存在的或非天然存在的氨基酸残基（或类似物）与同一分子内的第二天然存在的或非天然存在的氨基酸残基（或类似物）之间形成大环。拟肽大环化合物包括其中大环形成连接体将第一氨基酸残基（或类似物）的 α 碳连接至第二氨基酸残基（或类似物）的 α 碳的实施方案。拟肽大环化合物任选地包含处于一个或多个氨基酸残基和 / 或氨基酸类似物残基之间的一个或多个非肽键，且除了形成大环化合物的任意残基外，任选地还包含一个或多个非天然存在的氨基酸残基或氨基酸类似物残基。当在拟肽大环化合物的背景下提及，相应的非交联多肽”被理解为涉及与该大环化合物长度相同并且包含对应于该大环化合物的野生型序列的等同天然氨基酸的多肽。

[0036] 如本文所用的，术语“稳定性”是指如通过圆二色性、NMR 或另一种生物物理测量法测量的，本发明的拟肽大环化合物在溶液中维持确定的二级结构，或在体外或体内对蛋白水解降解作用的抗性。本发明所预期的二级结构的非限制性例子是 α -螺旋、 3_{10} 螺旋、 β -转角和 β -折叠。

[0037] 如本文所用的，术语“螺旋稳定性”是指如通过圆二色性或 NMR 测量的，本发明的拟肽大环化合物维持 α -螺旋结构。例如，在一些实施方案中，与相应的非交联的大环化合物相比，如通过圆二色性确定的，本发明的拟肽大环化合物在 α -螺旋度上表现出至少 1.25、1.5、1.75 或 2 倍的增加。

[0038] 术语“氨基酸”是指同时含有氨基和羧基的分子。合适的氨基酸包括但不限于天然存在的氨基酸的 D- 和 L- 异构体，以及通过有机合成或其它代谢途径制备的非天然存在的氨基酸。本文所用的术语氨基酸包括但不限于 α -氨基酸、天然氨基酸、非天然氨基酸和氨基酸类似物。

[0039] 术语“ α -氨基酸”是指含有的氨基和羧基都结合到被指定为 α -碳的碳上的分

子。

[0040] 术语“ β -氨基酸”是指含有均为 β 构型的氨基和羧基的分子。

[0041] 术语“天然存在的氨基酸”是指在自然界合成的肽中通常发现的 20 种氨基酸中的任一种, 已知其单字母缩写为 A、R、N、C、D、Q、E、G、H、I、L、K、M、F、P、S、T、W、Y 和 V。

[0042] 下表示出了天然氨基酸的性质一览:

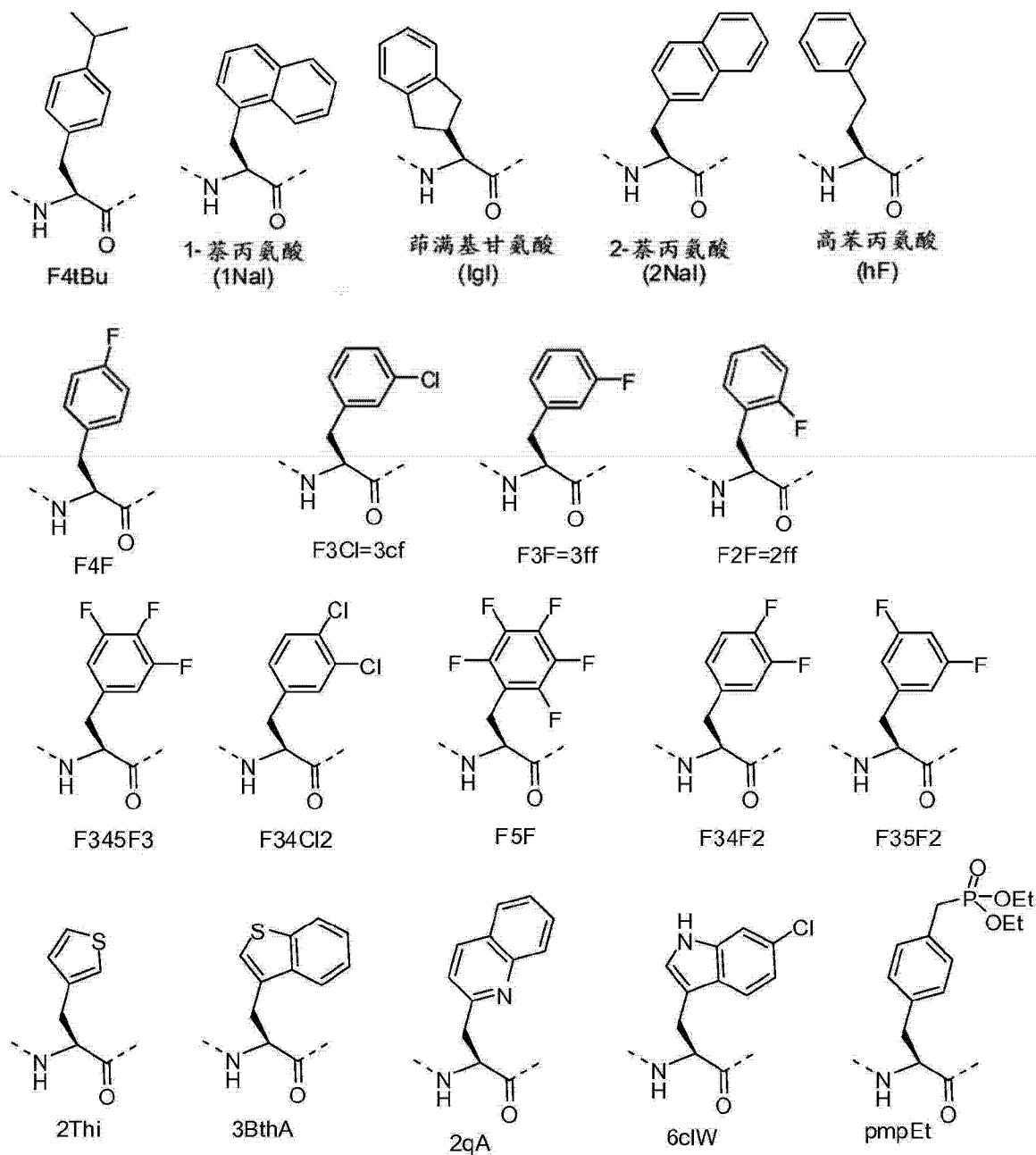
氨基酸	3 字母 代码	1 字母 代码	侧链 极性	侧链电荷 (pH 7.4)	亲水 指数
丙氨酸	Ala	A	非极性	中性	1.8
精氨酸	Arg	R	极性	正	-4.5
天冬酰胺	Asn	N	极性	中性	-3.5
天冬氨酸	Asp	D	极性	负	-3.5
半胱氨酸	Cys	C	极性	中性	2.5
谷氨酸	Glu	E	极性	负	-3.5
谷氨酰胺	Gln	Q	极性	中性	-3.5
甘氨酸	Gly	G	非极性	中性	-0.4
组氨酸	His	H	极性	正(10%) 中性(90%)	-3.2
异亮氨酸	Ile	I	非极性	中性	4.5
亮氨酸	Leu	L	非极性	中性	3.8
赖氨酸	Lys	K	极性	正	-3.9
甲硫氨酸	Met	M	非极性	中性	1.9
苯丙氨酸	Phe	F	非极性	中性	2.8
脯氨酸	Pro	P	非极性	中性	-1.6
丝氨酸	Ser	S	极性	中性	-0.8
苏氨酸	Thr	T	极性	中性	-0.7
色氨酸	Trp	W	非极性	中性	-0.9
酪氨酸	Tyr	Y	极性	中性	-1.3
缬氨酸	Val	V	非极性	中性	4.2

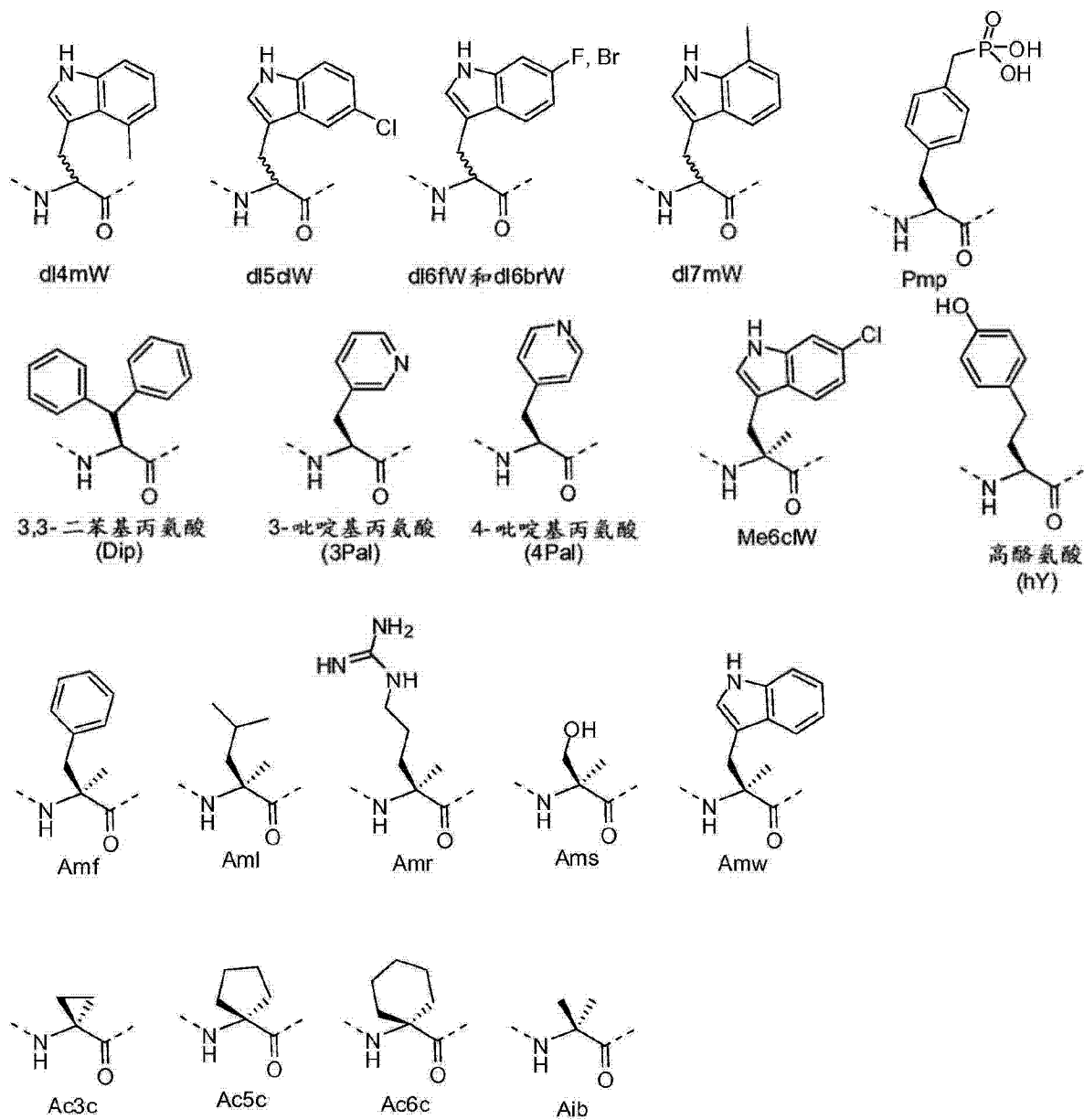
[0043] “疏水性氨基酸”包括小疏水性氨基酸和大疏水性氨基酸。“小疏水性氨基酸”为甘氨酸、丙氨酸、脯氨酸及其类似物。“大疏水性氨基酸”为缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸及其类似物。“极性氨基酸”为丝氨酸、苏氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、半胱氨酸、酪氨酸及其类似物。“带电氨基酸”为赖氨酸、精氨酸、组氨酸、天冬氨酸、谷氨酸及其类似物。

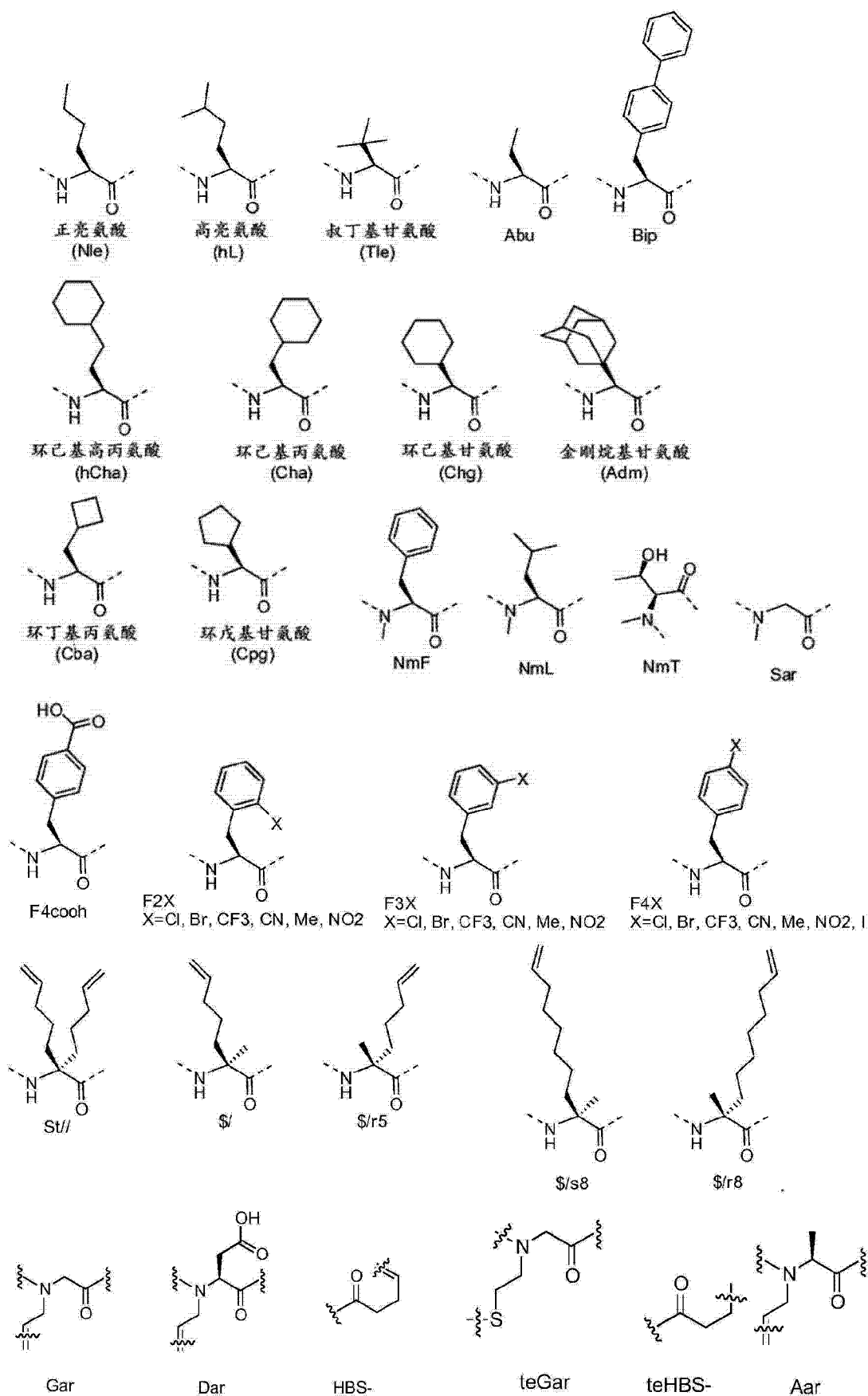
[0044] 术语“氨基酸类似物”是指在结构上类似于氨基酸并且在拟肽大环化合物的形成中可代替氨基酸的分子。氨基酸类似物包括但不限于 β -氨基酸和其中氨基或羧基被相似

反应性的基团取代（例如，用仲胺或叔胺取代伯胺，或用酯取代羧基）的氨基酸。

[0045] 术语“非天然氨基酸”是指并非在自然界合成的肽中通常发现的二十种氨基酸（已知其单字母缩写为 A、R、N、C、D、Q、E、G、H、I、L、K、M、F、P、S、T、W、Y 和 V）之一的氨基酸。非天然氨基酸或氨基酸类似物包括但不限于根据以下的结构：







[0046] 氨基酸类似物包括 β -氨基酸类似物。 β -氨基酸类似物的实例包括但不限于以下：环状 β -氨基酸类似物； β -丙氨酸；(R)- β -苯丙氨酸；(R)-1, 2, 3, 4-四氢-异喹

啉-3-乙酸;(R)-3-氨基-4-(1-萘基)-丁酸;(R)-3-氨基-4-(2,4-二氯苯基)-丁酸;(R)-3-氨基-4-(2-氯苯基)-丁酸;(R)-3-氨基-4-(2-氰基苯基)-丁酸;(R)-3-氨基-4-(2-氟苯基)-丁酸;(R)-3-氨基-4-(2-呋喃基)-丁酸;(R)-3-氨基-4-(2-甲基苯基)-丁酸;(R)-3-氨基-4-(2-萘基)-丁酸;(R)-3-氨基-4-(2-噻吩基)-丁酸;(R)-3-氨基-4-(2-三氟甲基苯基)-丁酸;(R)-3-氨基-4-(3,4-二氯苯基)-丁酸;(R)-3-氨基-4-(3,4-二氟苯基)-丁酸;(R)-3-氨基-4-(3-苯并噻吩基)-丁酸;(R)-3-氨基-4-(3-氯苯基)-丁酸;(R)-3-氨基-4-(3-氰基苯基)-丁酸;(R)-3-氨基-4-(3-氟苯基)-丁酸;(R)-3-氨基-4-(3-甲基苯基)-丁酸;(R)-3-氨基-4-(3-吡啶基)-丁酸;(R)-3-氨基-4-(3-噻吩基)-丁酸;(R)-3-氨基-4-(3-三氟甲基苯基)-丁酸;(R)-3-氨基-4-(4-溴苯基)-丁酸;(R)-3-氨基-4-(4-氯苯基)-丁酸;(R)-3-氨基-4-(4-氰基苯基)-丁酸;(R)-3-氨基-4-(4-氟苯基)-丁酸;(R)-3-氨基-4-(4-碘苯基)-丁酸;(R)-3-氨基-4-(4-甲基苯基)-丁酸;(R)-3-氨基-4-(4-硝基苯基)-丁酸;(R)-3-氨基-4-(4-吡啶基)-丁酸;(R)-3-氨基-4-(4-三氟甲基苯基)-丁酸;(R)-3-氨基-4-五氟-苯基丁酸;(R)-3-氨基-5-己烯酸;(R)-3-氨基-5-己炔酸;(R)-3-氨基-5-苯基戊酸;(R)-3-氨基-6-苯基-5-己烯酸;(S)-1,2,3,4-四氢-异喹啉-3-乙酸;(S)-3-氨基-4-(1-萘基)-丁酸;(S)-3-氨基-4-(2,4-二氯苯基)-丁酸;(S)-3-氨基-4-(2-氯苯基)-丁酸;(S)-3-氨基-4-(2-氰基苯基)-丁酸;(S)-3-氨基-4-(2-氟苯基)-丁酸;(S)-3-氨基-4-(2-呋喃基)-丁酸;(S)-3-氨基-4-(2-甲基苯基)-丁酸;(S)-3-氨基-4-(2-萘基)-丁酸;(S)-3-氨基-4-(2-噻吩基)-丁酸;(S)-3-氨基-4-(2-三氟甲基苯基)-丁酸;

(S)-3-氨基-4-(3,4-二氯苯基)-丁酸;(S)-3-氨基-4-(3,4-二氟苯基)-丁酸;(S)-3-氨基-4-(3-苯并噻吩基)-丁酸;(S)-3-氨基-4-(3-氯苯基)-丁酸;(S)-3-氨基-4-(3-氰基苯基)-丁酸;(S)-3-氨基-4-(3-氟苯基)-丁酸;(S)-3-氨基-4-(3-甲基苯基)-丁酸;(S)-3-氨基-4-(3-吡啶基)-丁酸;(S)-3-氨基-4-(3-噻吩基)-丁酸;(S)-3-氨基-4-(3-三氟甲基苯基)-丁酸;(S)-3-氨基-4-(4-溴苯基)-丁酸;(S)-3-氨基-4-(4-氯苯基)-丁酸;(S)-3-氨基-4-(4-氰基苯基)-丁酸;(S)-3-氨基-4-(4-氟苯基)-丁酸;(S)-3-氨基-4-(4-碘苯基)-丁酸;(S)-3-氨基-4-(4-甲基苯基)-丁酸;(S)-3-氨基-4-(4-硝基苯基)-丁酸;(S)-3-氨基-4-(4-吡啶基)-丁酸;(S)-3-氨基-4-(4-三氟甲基苯基)-丁酸;(S)-3-氨基-4-五氟-苯基丁酸;(S)-3-氨基-5-己烯酸;(S)-3-氨基-5-己炔酸;(S)-3-氨基-5-苯基戊酸;(S)-3-氨基-6-苯基-5-己烯酸;1,2,5,6-四氢吡啶-3-甲酸;1,2,5,6-四氢吡啶-4-甲酸;3-氨基-3-(2-氯苯基)-丙酸;3-氨基-3-(2-噻吩基)-丙酸;3-氨基-3-(3-溴苯基)-丙酸;3-氨基-3-(4-氯苯基)-丙酸;3-氨基-3-(4-甲氧苯基)-丙酸;3-氨基-4,4,4-三氟-丁酸;3-氨基己二酸;D-β-苯丙氨酸;β-亮氨酸;L-β-高丙氨酸;L-β-高天冬氨酸 γ-苄酯;L-β-高谷氨酸 δ-苄酯;L-β-高异亮氨酸;L-β-高亮氨酸;L-β-高甲硫氨酸;L-β-高苯丙氨酸;L-β-高脯氨酸;L-β-高色氨酸;L-β-高缬氨酸;L-Nω-苄氧羰基-β-高赖氨酸;Nω-L-β-高精氨酸;O-苄基-L-β-高羟脯氨酸;O-苄基-L-β-高丝氨酸;O-苄基-L-β-高苏氨酸;O-苄基-L-β-高酪氨酸;γ-三苯甲基-L-β-高天冬酰胺;(R)-β-苯丙氨酸;L-β-高天冬氨酸 γ-叔丁酯;L-β-高谷氨酸 δ-叔丁酯;L-Nω-β-高赖氨酸;Nδ-三苯甲

基-L-β-高谷氨酰胺;Nω-2,2,4,6,7-五甲基-二氢苯并呋喃-5-磺酰基-L-β-高精氨酸;0-叔丁基-L-β-高羟基-脯氨酸;0-叔丁基-L-β-高丝氨酸;0-叔丁基-L-β-高苏氨酸;0-叔丁基-L-β-高酪氨酸;2-氨基环戊烷羧酸;和2-氨基环己烷羧酸。

[0047] 氨基酸类似物包括丙氨酸、缬氨酸、甘氨酸或亮氨酸的类似物。丙氨酸、缬氨酸、甘氨酸或亮氨酸的氨基酸类似物的实例包括但不限于以下:α-甲氧基甘氨酸;α-烯丙基-L-丙氨酸;α-氨基异丁酸;α-甲基-亮氨酸;β-(1-萘基)-D-丙氨酸;β-(1-萘基)-L-丙氨酸;β-(2-萘基)-D-丙氨酸;β-(2-萘基)-L-丙氨酸;β-(2-吡啶基)-D-丙氨酸;β-(2-吡啶基)-L-丙氨酸;β-(2-噻吩基)-D-丙氨酸;β-(2-噻吩基)-L-丙氨酸;β-(3-苯并噻吩基)-D-丙氨酸;β-(3-苯并噻吩基)-L-丙氨酸;β-(3-吡啶基)-D-丙氨酸;β-(3-吡啶基)-L-丙氨酸;β-(4-吡啶基)-D-丙氨酸;β-(4-吡啶基)-L-丙氨酸;β-氯-L-丙氨酸;β-氰基-L-丙氨酸;β-环己基-D-丙氨酸;β-环己基-L-丙氨酸;β-环戊烯-1-基-丙氨酸;β-环戊基-丙氨酸;β-环丙基-L-Ala-OH·二环己基铵盐;β-叔丁基-D-丙氨酸;β-叔丁基-L-丙氨酸;γ-氨基丁酸;L-α,β-二氨基丙酸;2,4-二硝基-苯基甘氨酸;2,5-二氢-D-苯基甘氨酸;2-氨基-4,4,4-三氟丁酸;2-氟-苯基甘氨酸;3-氨基-4,4,4-三氟-丁酸;3-氟-缬氨酸;4,4,4-三氟-缬氨酸;4,5-脱氢-L-leu-OH·二环己基铵盐;4-氟-D-苯基甘氨酸;4-氟-L-苯基甘氨酸;4-羟基-D-苯基甘氨酸;5,5,5-三氟-亮氨酸;6-氨基己酸;环戊基-D-Gly-OH·二环己基铵盐;环戊基-Gly-OH·二环己基铵盐;D-α,β-二氨基丙酸;D-α-氨基丁酸;D-α-叔丁基甘氨酸;D-(2-噻吩基)甘氨酸;D-(3-噻吩基)甘氨酸;D-2-氨基己酸;D-2-茚满基甘氨酸;D-烯丙基甘氨酸·二环己基铵盐;D-环己基甘氨酸;D-正缬氨酸;D-苯基甘氨酸;β-氨基丁酸;β-氨基异丁酸;(2-溴苯基)甘氨酸;(2-甲氧基苯基)甘氨酸;(2-甲苯基)甘氨酸;(2-噻唑基)甘氨酸;(2-噻吩基)甘氨酸;2-氨基-3-(二甲氨基)-丙酸;L-α,β-二氨基丙酸;L-α-氨基丁酸;L-α-叔丁基甘氨酸;L-(3-噻吩基)甘氨酸;L-2-氨基-3-(二甲氨基)-丙酸;L-2-氨基己酸二环己基-铵盐;L-2-茚满基甘氨酸;L-烯丙基甘氨酸·二环己基铵盐;L-环己基甘氨酸;L-苯基甘氨酸;L-炔丙基甘氨酸;L-正缬氨酸;N-α-氨基甲基-L-丙氨酸;D-α,γ-二氨基丁酸;L-α,γ-二氨基丁酸;β-环丙基-L-丙氨酸;(N-β-(2,4-二硝基苯基))-L-α,β-二氨基丙酸;(N-β-1-(4,4-二甲基-2,6-二氧代亚环己-1-基)乙基)-D-α,β-二氨基丙酸;(N-β-1-(4,4-二甲基-2,6-二氧代亚环己-1-亚基)乙基)-L-α,β-二氨基丙酸;(N-β-4-甲基三苯甲基)-L-α,β-二氨基丙酸;(N-β-烯丙氧羰基)-L-α,β-二氨基丙酸;(N-γ-1-(4,4-二甲基-2,6-二氧代亚环己-1-亚基)乙基)-D-α,γ-二氨基丁酸;(N-γ-1-(4,4-二甲基-2,6-二氧代亚环己-1-亚基)乙基)-L-α,γ-二氨基丁酸;(N-γ-4-甲基三苯甲基)-D-α,γ-二氨基丁酸;(N-γ-4-甲基三苯甲基)-L-α,γ-二氨基丁酸;(N-γ-烯丙氧羰基)-L-α,γ-二氨基丁酸;D-α,γ-二氨基丁酸;4,5-脱氢-L-亮氨酸;环戊基-D-Gly-OH;环戊基-Gly-OH;D-烯丙基甘氨酸;D-环己基高丙氨酸;L-1-苄基丙氨酸;L-2-氨基己酸;L-烯丙基甘氨酸;L-环己基高丙氨酸;和N-(2-羟基-4-甲氧基-Bzl)-Gly-OH。

[0048] 氨基酸类似物包括精氨酸或赖氨酸的类似物。精氨酸和赖氨酸的氨基酸类似物的实例包括但不限于以下:瓜氨酸;L-2-氨基-3-胍基丙酸;L-2-氨基-3-脒基丙酸;L-瓜氨酸;Lys(Me)₂-OH;Lys(N₃)-OH;Nδ-苄氧羰基-L-鸟氨酸;Nω-硝基-D-精氨酸;Nω-硝

基-L-精氨酸; α -甲基-鸟氨酸; 2,6-二氨基庚二酸; L-鸟氨酸; (N δ -1-(4,4-二甲基-2,6-二氧代-环己-1-亚基)乙基)-D-鸟氨酸; (N δ -1-(4,4-二甲基-2,6-二氧-环己-1-亚基)乙基)-L-鸟氨酸; (N δ -4-甲基三苯甲基)-D-鸟氨酸; (N δ -4-甲基三苯甲基)-L-鸟氨酸; D-鸟氨酸; L-鸟氨酸; Arg(Me)(Pbf)-OH; Arg(Me)₂-OH(不对称的); Arg(Me)₂-OH(对称的); Lys(ivDde)-OH; Lys(Me)₂-OH·HCl; Lys(Me)₃-OH 氯化物; N ω -硝基-D-精氨酸; 和 N ω -硝基-L-精氨酸。

[0049] 氨基酸类似物包括天冬氨酸或谷氨酸的类似物。天冬氨酸和谷氨酸的氨基酸类似物的实例包括但不限于以下: α -甲基-D-天冬氨酸; α -甲基-谷氨酸; α -甲基-L-天冬氨酸; γ -亚甲基-谷氨酸; (N- γ -乙基)-L-谷氨酰胺; [N- α -(4-氨基苯甲酰基)]-L-谷氨酸; 2,6-二氨基庚二酸; L- α -氨基辛二酸; D-2-氨基己二酸; D- α -氨基辛二酸; α -氨基庚二酸; 亚氨基二乙酸; L-2-氨基己二酸; 苏- β -甲基-天冬氨酸; γ -羧基-D-谷氨酸 γ , γ -二-叔丁酯; γ -羧基-L-谷氨酸 γ , γ -二-叔丁酯; Glu(OA11)-OH; L-Asu(OtBu)-OH; 和焦谷氨酸。

[0050] 氨基酸类似物包括半胱氨酸和甲硫氨酸的类似物。半胱氨酸和甲硫氨酸的氨基酸类似物的实例包括但不限于 Cys(法呢基)-OH, Cys(法呢基)-OMe、 α -甲基-甲硫氨酸、Cys(2-羟乙基)-OH、Cys(3-氨基丙基)-OH、2-氨基-4-(乙硫基)丁酸、丁硫氨酸、丁硫氨酸亚砷胺、乙硫氨酸、甲硫氨酸甲基硫氯化物、硒代甲硫氨酸、磺丙氨酸、[2-(4-吡啶基)乙基]-DL-青霉胺、[2-(4-吡啶基)乙基]-L-半胱氨酸、4-甲氧苄基-D-青霉胺、4-甲氧苄基-L-青霉胺、4-甲基苄基-D-青霉胺、4-甲基苄基-L-青霉胺、苄基-D-半胱氨酸、苄基-L-半胱氨酸、苄基-DL-高半胱氨酸、氨甲酰基-L-半胱氨酸、羧乙基-L-半胱氨酸、羧甲基-L-半胱氨酸、二苯基甲基-L-半胱氨酸、乙基-L-半胱氨酸、甲基-L-半胱氨酸、叔丁基-D-半胱氨酸、三苯基甲基-L-高半胱氨酸、三苯基-D-青霉胺、胱硫醚、高胱氨酸、L-高胱氨酸、(2-氨基乙基)-L-半胱氨酸、硒代-L-胱氨酸、胱硫醚、Cys(StBu)-OH 和乙酰氨基-D-青霉胺。

[0051] 氨基酸类似物包括苯丙氨酸和酪氨酸的类似物。苯丙氨酸和酪氨酸的氨基酸类似物的实例包括 β -甲基-苯丙氨酸、 β -羟基苯丙氨酸、 α -甲基-3-甲氧基-DL-苯丙氨酸、 α -甲基-D-苯丙氨酸、 α -甲基-L-苯丙氨酸、1,2,3,4-四氢异喹啉-3-甲酸、2,4-二氯-苯丙氨酸、2-(三氟甲基)-D-苯丙氨酸、2-(三氟甲基)-L-苯丙氨酸、2-溴-D-苯丙氨酸、2-溴-L-苯丙氨酸、2-氯-D-苯丙氨酸、2-氯-L-苯丙氨酸、2-氰基-D-苯丙氨酸、2-氰基-L-苯丙氨酸、2-氟-D-苯丙氨酸、2-氟-L-苯丙氨酸、2-甲基-D-苯丙氨酸、2-甲基-L-苯丙氨酸、2-硝基-D-苯丙氨酸、2-硝基-L-苯丙氨酸、2,4,5-三羟基-苯丙氨酸、3,4,5-三氟-D-苯丙氨酸、3,4,5-三氟-L-苯丙氨酸、3,4-二氯-D-苯丙氨酸、3,4-二氯-L-苯丙氨酸、3,4-二氟-D-苯丙氨酸、3,4-二氟-L-苯丙氨酸、3,4-二羟基-L-苯丙氨酸、3,4-二甲氧基-L-苯丙氨酸、3,5,3'-三碘-L-甲状腺原氨酸、3,5-二碘-D-酪氨酸、3,5-二碘-L-酪氨酸、3,5-二碘-L-甲状腺原氨酸、3-(三氟甲基)-D-苯丙氨酸、3-(三氟甲基)-L-苯丙氨酸、3-氨基-L-酪氨酸、3-溴-D-苯丙氨酸、3-溴-L-苯丙氨酸、3-氯-D-苯丙氨酸、3-氯-L-苯丙氨酸、3-氯-L-酪氨酸、3-氰基-D-苯丙氨酸、3-氰基-L-苯丙氨酸、3-氟-D-苯丙氨酸、3-氟-L-苯丙氨酸、3-氟-L-酪氨酸、3-碘-D-苯丙氨酸、3-碘-L-苯丙氨酸、3-碘-L-酪氨酸、3-甲氧基-L-酪氨酸、3-甲基-D-苯丙氨酸、

3- 甲基 -L- 苯丙氨酸、3- 硝基 -D- 苯丙氨酸、3- 硝基 -L- 苯丙氨酸、3- 硝基 -L- 酪氨酸、4-(三氟甲基)-D- 苯丙氨酸、4-(三氟甲基)-L- 苯丙氨酸、4- 氨基 -D- 苯丙氨酸、4- 氨基 -L- 苯丙氨酸、4- 苯甲酰基 -D- 苯丙氨酸、4- 苯甲酰基 -L- 苯丙氨酸、4- 双 (2- 氯乙基) 氨基 -L- 苯丙氨酸、4- 溴 -D- 苯丙氨酸、4- 溴 -L- 苯丙氨酸、4- 氯 -D- 苯丙氨酸、4- 氯 -L- 苯丙氨酸、4- 氰基 -D- 苯丙氨酸、4- 氰基 -L- 苯丙氨酸、4- 氟 -D- 苯丙氨酸、4- 氟 -L- 苯丙氨酸、4- 碘 -D- 苯丙氨酸、4- 碘 -L- 苯丙氨酸、高苯丙氨酸、甲状腺氨酸、3, 3- 二苯丙氨酸、甲状腺原氨酸、乙基 - 酪氨酸和甲基 - 酪氨酸。

[0052] 氨基酸类似物包括脯氨酸的类似物。脯氨酸的氨基酸类似物的实例包括但不限于 3, 4- 脱氢 - 脯氨酸、4- 氟 - 脯氨酸、顺 -4- 羟基 - 脯氨酸、噻唑烷 -2- 甲酸和反 -4- 氟 - 脯氨酸。

[0053] 氨基酸类似物包括丝氨酸和苏氨酸的类似物。丝氨酸和苏氨酸的氨基酸类似物的实例包括但不限于 3- 氨基 -2- 羟基 -5- 甲基己酸、2- 氨基 -3- 羟基 -4- 甲基戊酸、2- 氨基 -3- 乙氧丁酸、2- 氨基 -3- 甲氧丁酸、4- 氨基 -3- 羟基 -6- 甲基庚酸、2- 氨基 -3- 苄氧丙酸、2- 氨基 -3- 苄氧丙酸、2- 氨基 -3- 乙氧丙酸、4- 氨基 -3- 羟基丁酸和 α - 甲基丝氨酸。

[0054] 氨基酸类似物包括色氨酸的类似物。色氨酸的氨基酸类似物的实例包括但不限于以下： α - 甲基 - 色氨酸； β - (3- 苯并噻吩基) -D- 丙氨酸； β - (3- 苯并噻吩基) -L- 丙氨酸；1- 甲基 - 色氨酸；4- 甲基 - 色氨酸；5- 苄氧基 - 色氨酸；5- 溴 - 色氨酸；5- 氯 - 色氨酸；5- 氟 - 色氨酸；5- 羟基 - 色氨酸；5- 羟基 -L- 色氨酸；5- 甲氧基 - 色氨酸；5- 甲氧基 -L- 色氨酸；5- 甲基 - 色氨酸；6- 溴 - 色氨酸；6- 氯 -D- 色氨酸；6- 氯 - 色氨酸；6- 氟 - 色氨酸；6- 甲基 - 色氨酸；7- 苄氧基 - 色氨酸；7- 溴 - 色氨酸；7- 甲基 - 色氨酸；D-1, 2, 3, 4- 四氢 - 去甲哈尔满 -3- 甲酸；6- 甲氧基 -1, 2, 3, 4- 四氢去甲哈尔满 -1- 甲酸；7- 氮杂色氨酸；L-1, 2, 3, 4- 四氢 - 去甲哈尔满 -3- 甲酸；5- 甲氧基 -2- 甲基 - 色氨酸；和 6- 氯 -L- 色氨酸。

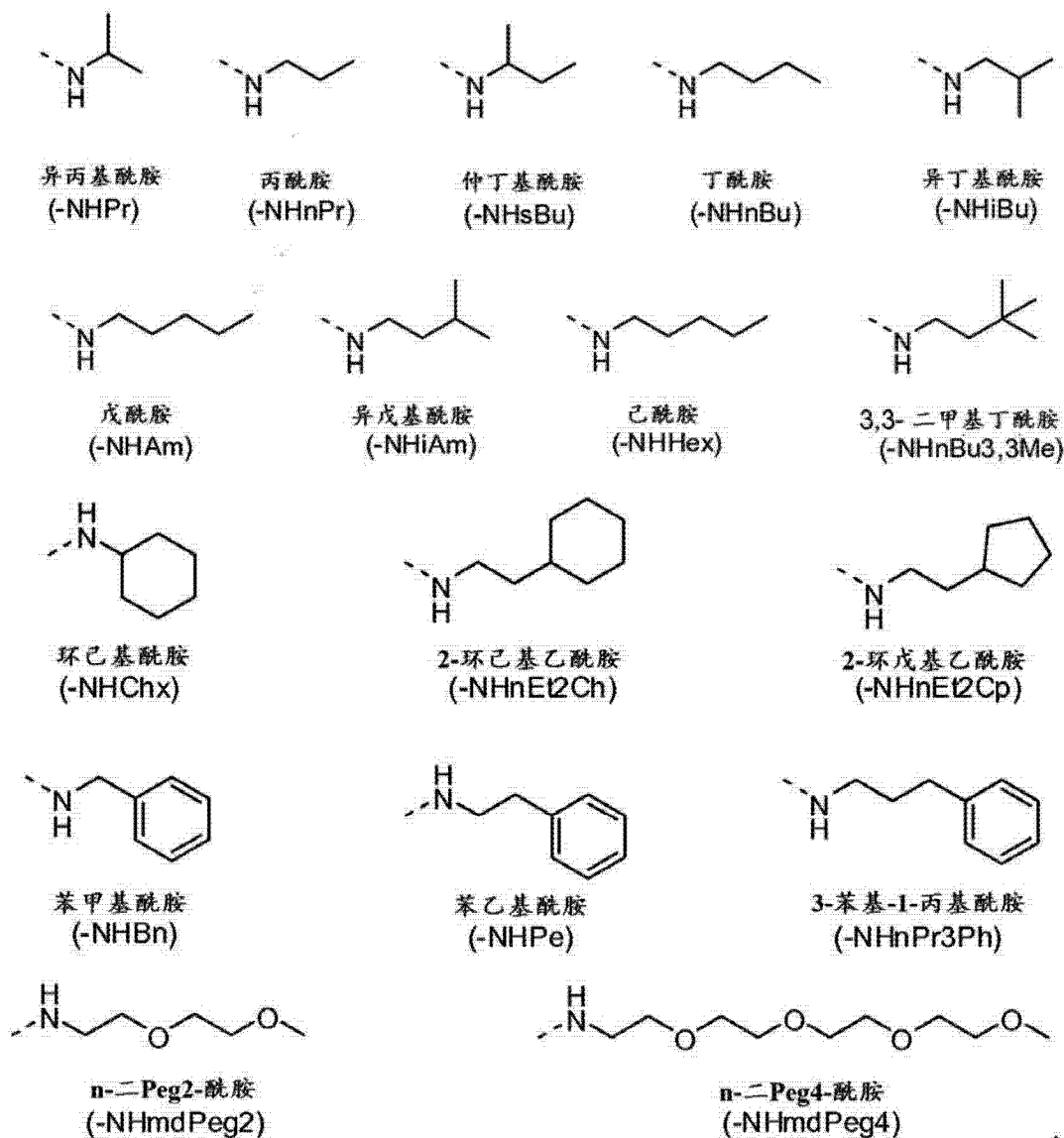
[0055] 在一些实施方案中，氨基酸类似物是外消旋的。在一些实施方案中，使用氨基酸类似物的 D 型异构体。在一些实施方案中，使用氨基酸类似物的 L 型异构体。在其它实施方案中，氨基酸类似物包含为 R 或 S 构型的手性中心。在又一些其它实施方案中， β - 氨基酸类似物的氨基基团被诸如叔丁氧羰基 (BOC 基团)、9- 苄氧羰基 (FMOC)、甲苯磺酰基等保护基团取代。在再一些其它实施方案中， β - 氨基酸类似物的羧酸官能团例如作为其酯衍生物被保护。在一些实施方案中，使用氨基酸类似物的盐。

[0056] “非必需”氨基酸残基是相对于多肽的野生型序列可能发生改变而不消除或基本不消除其基本生物学或生物化学活性（例如，受体结合或激活）的残基。“必需”氨基酸残基是当相对于多肽的野生型序列发生改变时导致多肽的基本生物学或生物化学活性消除或基本消除的残基。

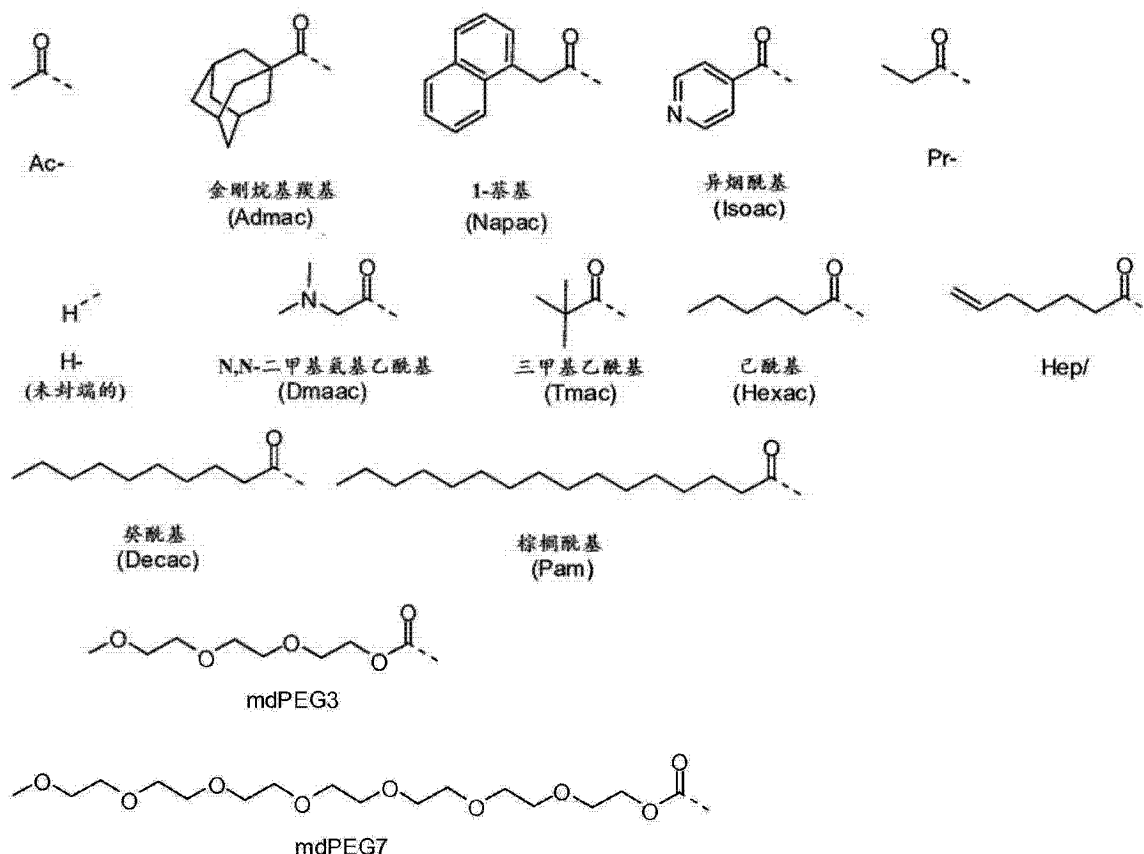
[0057] “保守氨基酸置换”是其中氨基酸残基被具有相似侧链的氨基酸残基所替代的氨基酸置换。本领域中已定义了具有相似侧链的氨基酸残基的家族。这些家族包括具有碱性侧链的氨基酸（例如，K、R、H）、具有酸性侧链的氨基酸（例如，D、E）、具有不带电荷的极性侧链的氨基酸（例如，G、N、Q、S、T、Y、C）、具有非极性侧链的氨基酸（例如，A、V、L、I、P、F、M、W）、具有 β 分支的侧链的氨基酸（例如，T、V、I）和具有芳香族侧链的氨基酸（例如，Y、F、W、H）。因此，多肽中预测的非必需氨基酸残基例如被来自同一侧链家族的另一种氨基酸

残基所替代。可接受的置换的其它例子是基于电子等排考虑（例如，正亮氨酸取代甲硫氨酸）或其它性质（如 2-噻吩丙氨酸取代苯丙氨酸）的置换。

[0058] 术语“封端基团”是指出现在本发明拟肽大环化合物的多肽链的羧基末端或氨基末端的化学部分。羧基末端的封端基团包括未修饰的羧酸（即 $-COOH$ ）或具有取代基的羧酸。例如，羧基末端可被氨基取代，从而在 C 末端产生羧酰胺。各种取代基包括但不限于伯胺和仲胺，仲胺包括聚乙二醇化的仲胺。用于 C 末端的代表性的仲胺封端基团包括：



[0059] 氨基末端的封端基团包括未修饰的胺（即 $-NH_2$ ）或具有取代基的胺。例如，氨基末端可被酰基取代，从而在 N-末端生成羧酰胺。各种取代基包括但不限于取代的酰基，包括 C_1-C_6 羰基、 C_7-C_{30} 羰基和聚乙二醇化的氨基甲酸酯。用于 N-末端的代表性封端基团包括：



[0060] 在本文中与大环化合物或大环形成连接体一起使用的术语“元”是指形成或可以形成大环的原子，并且不包括取代基或侧链原子。以此类推，环癸烷、1, 2-二氟-癸烷和1, 3-二甲基环癸烷都被认为是十元大环化合物，因为氢或氟取代基或甲基侧链都没有参与形成大环。

[0061] 当用作分子结构的一部分时，符号“”是指单键或者反式或顺式双键。

[0062] 术语“氨基酸侧链”是指连接到氨基酸中的 α -碳（或另一个骨架原子）上的部分。例如，丙氨酸的氨基酸侧链是甲基，苯丙氨酸的氨基酸侧链是苯甲基，半胱氨酸的氨基酸侧链是硫甲基，天冬氨酸的氨基酸侧链是羧甲基，酪氨酸的氨基酸侧链是4-羟基苯甲基，等等。也包括其它非天然存在的氨基酸侧链，例如，自然产生的氨基酸侧链（例如，氨基酸代谢物）或合成制备的氨基酸侧链（例如， α, α -二取代的氨基酸）。

[0063] 术语“ α, α -二取代的氨基酸”是指包含的氨基和羧基都结合到碳（ α -碳）上而该碳（ α -碳）连接到两个天然或非天然氨基酸侧链上的分子或部分。

[0064] 术语“多肽”包括通过共价键（例如，酰胺键）连接的两个或更多个天然或非天然存在的氨基酸。本文所述的多肽包括全长蛋白质（例如，完全加工的蛋白质）以及较短的氨基酸序列（例如，天然存在的蛋白质的片段或合成的多肽片段）。

[0065] 本文所用的术语“大环化试剂”或“大环形成试剂”是指任何可以用来通过介导两个反应性基团之间的反应而制备本发明的拟肽大环化合物的试剂。该反应性基团可以是，例如，叠氮和炔，在这种情况下，大环化试剂包括但不限于 Cu 试剂，如提供反应性 Cu(I) 物质的试剂，如 CuBr、CuI 或 CuOTf，以及通过加入诸如抗坏血酸或抗坏血酸钠的还原剂可以原位转化为活性 Cu(I) 试剂的 Cu(II) 盐，如 Cu(CO₂CH₃)₂、CuSO₄ 和 CuCl₂。大环化试剂

另外还可以包括,例如,本领域已知的 Ru 试剂,如 $\text{Cp}^*\text{RuCl}(\text{PPh}_3)_2$ 、 $[\text{Cp}^*\text{RuCl}]_4$,或其它可以提供反应性 Ru(II) 物质的 Ru 试剂。在其它情况下,反应性基团为末端烯烃。在这样的实施方案中,大环化试剂或大环形成试剂为复分解催化剂,包括但不限于稳定的后过渡金属卡宾络合物催化剂,如 VIII 族过渡金属卡宾催化剂。例如,这样的催化剂为具有 +2 氧化态、电子计数为 16 且五配位的 Ru 和 Os 金属中心。在其它实例中,催化剂具有 W 或 Mo 中心。各种催化剂在 Grubbs 等人,“Ring Closing Metathesis and Related Processes in Organic Synthesis”Acc. Chem. Res. 1995, 28, 446-452 和美国专利号 5,811,515;美国专利号 7,932,397;美国申请号 2011/0065915;美国申请号 2011/0245477;Yu 等人,“Synthesis of Macrocyclic Natural Products by Catalyst-Controlled Stereoselective Ring-Closing Metathesis,”Nature 2011, 479, 88;和 Peryshkov 等人,“Z-Selective Olefin Metathesis Reactions Promoted by Tungsten Oxo Alkylidene Complexes,”J. Am. Chem. Soc. 2011, 133, 20754 中公开。在另外其它的情况下,反应性基团为巯基。在这样的实施方案中,大环化试剂为,例如,用两个巯基反应性基团如卤素基团官能化的连接体。

[0066] 术语“卤代”或“卤素”是指氟、氯、溴或碘或其基团。

[0067] 术语“烷基”是指含有指定数目的碳原子的直链或支链烃链。例如, $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ 表示该基团中具有 1-10(含端值)个碳原子。在没有指定任何数值时,“烷基”是其中具有 1-20(含端值)个碳原子的链(直链或支链)。

[0068] 术语“亚烷基”是指二价烷基(即, $-\text{R}-$)。

[0069] 术语“烯基”是指具有一个或多个碳-碳双键的直链或支链烃链。烯基部分含有指定数目的碳原子。例如, $\text{C}_2\text{-C}_{10}$ 表示该基团中具有 2-10(含端值)个碳原子。术语“低级烯基”是指 $\text{C}_2\text{-C}_6$ 烯基链。在没有指定任何数值时,“烯基”是其中具有 2-20(含端值)个碳原子的链(直链或支链)。

[0070] 术语“炔基”是指具有一个或多个碳-碳叁键的直链或支链烃链。炔基部分含有指定数目的碳原子。例如, $\text{C}_2\text{-C}_{10}$ 表示该基团中具有 2-10(含端值)个碳原子。术语“低级炔基”是指 $\text{C}_2\text{-C}_6$ 炔基链。在没有指定任何数值时,“炔基”是其中具有 2-20(含端值)个碳原子的链(直链或支链)。

[0071] 术语“芳基”是指 6 碳单环或 10 碳双环的芳香环体系,其中各环的 0、1、2、3 或 4 个原子被取代基取代。芳基的例子包括苯基、萘基等。术语“芳基烷氧基”是指被芳基取代的烷氧基。

[0072] “烷基芳基(arylalkyl)”是指其中芳基的氢原子中的一个被如上定义的 $\text{C}_1\text{-C}_5$ 烷基取代的如上定义的芳基。烷基芳基的代表性例子包括但不限于:2-甲基苯基、3-甲基苯基、4-甲基苯基、2-乙基苯基、3-乙基苯基、4-乙基苯基、2-丙基苯基、3-丙基苯基、4-丙基苯基、2-丁基苯基、3-丁基苯基、4-丁基苯基、2-戊基苯基、3-戊基苯基、4-戊基苯基、2-异丙基苯基、3-异丙基苯基、4-异丙基苯基、2-异丁基苯基、3-异丁基苯基、4-异丁基苯基、2-仲丁基苯基、3-仲丁基苯基、4-仲丁基苯基、2-叔丁基苯基、3-叔丁基苯基和 4-叔丁基苯基。

[0073] “酰胺基芳基(arylamido)”是指其中芳基的氢原子中的一个被一个或多个 $-\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$ 基团取代的如上定义的芳基。酰胺基芳基的代表性例子包括:2- $\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$ -苯基、3- $\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$ -苯基、4- $\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$ -苯基、2- $\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$ -吡啶基、3- $\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$ -吡啶基和 4- $\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$ -吡啶基。

[0074] “杂环基烷基 (alkylheterocycle)”是指其中 C_1-C_5 烷基的氢原子中的一个被杂环取代的如上定义的 C_1-C_5 烷基。杂环基烷基的代表性例子包括但不限于： $-CH_2CH_2-$ 吗啉、 $-CH_2CH_2-$ 哌啶、 $-CH_2CH_2CH_2-$ 吗啉和 $-CH_2CH_2CH_2-$ 咪唑。

[0075] “酰胺基烷基 (alkylamido)”是指其中 C_1-C_5 烷基的氢原子中的一个被 $-C(O)NH_2$ 基团取代的如上定义的 C_1-C_5 烷基。酰胺基烷基的代表性例子包括但不限于： $-CH_2-C(O)NH_2$ 、 $-CH_2CH_2-C(O)NH_2$ 、 $-CH_2CH_2CH_2C(O)NH_2$ 、 $-CH_2CH_2CH_2CH_2C(O)NH_2$ 、 $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2C(O)NH_2$ 、 $-CH_2CH(C(O)NH_2)CH_3$ 、 $-CH_2CH(C(O)NH_2)CH_2CH_3$ 、 $-CH(C(O)NH_2)CH_2CH_3$ 、 $-C(CH_3)_2CH_2C(O)NH_2$ 、 $-CH_2-CH_2-NH-C(O)-CH_3$ 、 $-CH_2-CH_2-NH-C(O)-CH_3-CH_3$ 和 $-CH_2-CH_2-NH-C(O)-CH=CH_2$ 。

[0076] “羟烷基 (alkanol)”是指其中 C_1-C_5 烷基的氢原子中的一个被羟基取代的如上定义的 C_1-C_5 烷基。羟烷基的代表性例子包括但不限于： $-CH_2OH$ 、 $-CH_2CH_2OH$ 、 $-CH_2CH_2CH_2OH$ 、 $-CH_2CH_2CH_2CH_2OH$ 、 $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2OH$ 、 $-CH_2CH(OH)CH_3$ 、 $-CH_2CH(OH)CH_2CH_3$ 、 $-CH(OH)CH_3$ 和 $-C(CH_3)_2CH_2OH$ 。

[0077] “羧基烷基 (alkylcarboxy)”是指其中 C_1-C_5 烷基的氢原子中的一个被 $-COOH$ 基团取代的如上定义的 C_1-C_5 烷基。羧基烷基的代表性例子包括但不限于： $-CH_2COOH$ 、 $-CH_2CH_2COOH$ 、 $-CH_2CH_2CH_2COOH$ 、 $-CH_2CH_2CH_2CH_2COOH$ 、 $-CH_2CH(COOH)CH_3$ 、 $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2COOH$ 、 $-CH_2CH(COOH)CH_2CH_3$ 、 $-CH(COOH)CH_2CH_3$ 和 $-C(CH_3)_2CH_2COOH$ 。

[0078] 本文使用的术语“环烷基”包括具有 3-12 个碳、优选 3-8 个碳、更优选 3-6 个碳的饱和的和部分不饱和的环烃基团，其中环烷基另外任选地被取代。一些环烷基包括但不限于：环丙基、环丁基、环戊基、环戊烯基、环己基、环己烯基、环庚基和环辛基。

[0079] 术语“杂芳基”是指芳香族的 5-8 元单环、8-12 元双环或 11-14 元三环的环体系，其如果是单环则具有 1-3 个杂原子，如果是双环则具有 1-6 个杂原子，或者如果是三环则具有 1-9 个杂原子，所述杂原子选自 O、N 或 S（例如，如果是单环、双环或三环，分别为碳原子和 1-3、1-6 或 1-9 个 O、N 或 S 杂原子），其中各个环的 0、1、2、3 或 4 个原子被取代基取代。杂芳基的例子包括吡啶基、呋喃基 (furyl 或 furanyl)、咪唑基、苯并咪唑基、噻吩基、噻吩基 (thiophenyl 或 thienyl)、喹啉基 (quinoliny)、吡啶基、噻唑基等。

[0080] 术语“杂芳基烷基”或术语“杂芳烷基”是指被杂芳基取代的烷基。术语“杂芳基烷氧基”是指被杂芳基取代的烷氧基。

[0081] 术语“杂芳基烷基”或术语“杂芳烷基”是指被杂芳基取代的烷基。术语“杂芳基烷氧基”是指被杂芳基取代的烷氧基。

[0082] 术语“杂环基”是指非芳香族的 5-8 元单环、8-12 元双环或 11-14 元三环的环体系，其如果是单环则具有 1-3 个杂原子，如果是双环则具有 1-6 个杂原子，或者如果是三环则具有 1-9 个杂原子，所述杂原子选自 O、N 或 S（例如，如果是单环、双环或三环，分别为碳原子和 1-3、1-6 或 1-9 个 O、N 或 S 杂原子），其中各个环的 0、1、2 或 3 个原子被取代基取代。杂环基的例子包括哌嗪基、吡咯烷基、二氧杂环己基、吗啉基、四氢呋喃基等。

[0083] 术语“取代基”是指取代任何分子、化合物或部分上的第二原子或基团如氢原子的基团。合适的取代基包括但不限于卤素、羟基、巯基、氧代、硝基、卤代烷基、烷基、烷芳基、芳基、芳烷基、烷氧基、硫代烷氧基、芳氧基、氨基、烷氧羰基、酰胺基、羧基、链烷磺酰基、烷基羰基和氰基。

[0084] 在一些实施方案中，本发明的化合物包含一个或多个不对称中心，因而作为外消

旋体或外消旋混合物、单一对映异构体、单独的非对映异构体和非对映体混合物存在。除非另外明确地指出,本发明包括这些化合物的所有这些异构体形式。在一些实施方案中,本发明的化合物也呈现为多种互变异构形式,在这些情况下,本发明包括本文所述化合物的所有互变异构形式(例如,如果环体系的烷基化作用导致在多个位置发生烷基化,那么本发明包括所有这些反应产物)。除非另外明确地指出,本发明包括这些化合物的所有这些异构体形式。除非另外明确地指出,本发明包括本文所述化合物的所有晶形。

[0085] 如本文所用的,术语“增加”和“减少”分别意味着导致至少 5% 的统计学显著的(即, $p < 0.1$) 增加或减少。

[0086] 如本文所用的,提及变量的数值范围旨在表示该变量等于该范围内的任意值。因此,对于本身不连续的变量,该变量等于该数值范围内的任意整数值,包括该范围的端点。类似地,对于本身连续的变量,该变量等于该数值范围内的任意实值,包括该范围的端点。作为例子,而不是限制,如果变量本身是不连续的,描述为具有 0-2 之间的值的变量取 0、1 或 2 的值;而如果变量本身是连续的,则取 0.0、0.1、0.01、0.001 的值或 ≥ 0 且 ≤ 2 的其它任何实值。

[0087] 如本文所用的,除非另外特别指出,单词“或”以“和 / 或”的包含性含义使用,而非“任一 / 或”的排它性的含义。

[0088] 术语“平均”表示对于每个数据点通过进行至少 3 次独立的重复而获得的平均值。

[0089] 术语“生物活性”包括本发明的大环化合物的结构和功能性质。生物活性是,例如,结构稳定性、 α -螺旋性、对靶标的亲和性、对蛋白水解降解的抗性、细胞渗透性、细胞内稳定性、体内稳定性或其任意组合。

[0090] 在下面的附图和描述中阐述了本发明的一个或多个具体实施方案的细节。从说明书、附图和权利要求书可以明显看出本发明的其它特征、目的和优势。

[0091] 在一些实施方案中,所述肽序列来源于 GHRH 肽。例如,该肽序列来源于人 GHRH(1-29) 或人 GHRH(1-44)。

[0092] 用于本发明的合适的 GHRH 肽的非限制性的示例性列表在以下的表 1 和表 2 中给出。在表 1 和表 2 中,所有肽具有游离的氨基末端(显示为 H-),并且所有肽具有羧酰胺末端(显示为 $-\text{NH}_2$)。X 残基与另一个 X 残基形成交联,Z 残基与另一个 Z 残基形成交联,并且 XX 残基与另两个 X 残基形成交联。在表 1 和表 2 中,氨基酸 A2 为 L-Ala 或 D-Ala, A8 为 L-Asn 或 L-Gln, A15 为 L-Ala 或 Gly,并且 A27 为 L-Nle 或 L-Leu。

表 1

H-Y-A2-D-X-IFT-X-SYRKVL-A15-QLSAR-Z-LLQ-Z-I-A27-SR-NH2
H-Y-A2-D-X-IFT-X-SYRKVL-A15-QLSARKLLQ-Z-I-A27-S-Z-NH2
H-Y-A2-DAIFT-X-SYR-X-VL-A15-QLSAR-Z-LLQ-Z-I-A27-SR-NH2
H-Y-A2-DAIFT-X-SYR-X-VL-A15-QLSARKLLQ-Z-I-A27-S-Z-NH2
H-Y-A2-DAIFT-A8-SY-X-KVL-X-QLSAR-Z-LLQ-Z-I-A27-SR-NH2
H-Y-A2-DAIFT-A8-SY-X-KVL-X-QLSARKLLQ-Z-I-A27-S-Z-NH2
H-Y-A2-DAIFT-A8-SYR-X-VL-A15-X-LSAR-Z-LLQ-Z-I-A27-SR-NH2
H-Y-A2-DAIFT-A8-SYR-X-VL-A15-X-LSARKLLQ-Z-I-A27-S-Z-NH2
H-Y-A2-D-X-IFT-A8-SY-X-KVL-A15-QLSARKLLQDI-A27-SR-NH2
H-Y-A2-DA-X-FT-A8-SYR-X-VL-A15-QLSARKLLQDI-A27-SR-NH2
H-Y-A2-DAI-X-T-A8-SYRK-X-L-A15-QLSARKLLQDI-A27-SR-NH2
H-Y-A2-DAIF-X-A8-SYRKV-X-A15-QLSARKLLQDI-A27-SR-NH2
H-Y-A2-DAIFT-X-SYRKVL-X-QLSARKLLQDI-A27-SR-NH2
H-Y-A2-DAIFT-A8-X-YRKVL-A15-X-LSARKLLQDI-A27-SR-NH2
H-Y-A2-DAIFT-A8-S-X-RKVL-A15-Q-X-SARKLLQDI-A27-SR-NH2
H-Y-A2-DAIFT-A8-SY-X-KVL-A15-QL-X-ARKLLQDI-A27-SR-NH2
H-Y-A2-DAIFT-A8-SYR-X-VL-A15-QLS-X-RKLLQDI-A27-SR-NH2
H-Y-A2-DAIFT-A8-SYRK-X-L-A15-QLSA-X-KLLQDI-A27-SR-NH2
H-Y-A2-DAIFT-A8-SYRKV-X-A15-QLSAR-X-LLQDI-A27-SR-NH2
H-Y-A2-DAIFT-A8-SYRKVL-X-QLSARK-X-LQDI-A27-SR-NH2
H-Y-A2-DAIFT-A8-SYRKVL-A15-X-LSARKL-X-QDI-A27-SR-NH2
H-Y-A2-DAIFT-A8-SYRKVL-A15-Q-X-SARKLL-X-DI-A27-SR-NH2
H-Y-A2-DAIFT-A8-SYRKVL-A15-QL-X-ARKLLQ-X-I-A27-SR-NH2
H-Y-A2-DAIFT-A8-SYRKVL-A15-QLS-X-RKLLQD-X-A27-SR-NH2
H-Y-A2-DAIFT-A8-SYRKVL-A15-QLSA-X-KLLQDI-X-SR-NH2
H-Y-A2-DAIFT-A8-SYRKVL-A15-QLSAR-X-LLQDI-A27-X-R-NH2
H-Y-A2-DAIFT-A8-SYRKVL-A15-QLSARK-X-LQDI-A27-S-X-NH2
H-Y-A2-D-X-IFT-A8-SY-X-KVL-A15-QLSAR-Z-LLQ-Z-I-A27-SR-NH2
H-Y-A2-D-X-IFT-A8-SY-X-KVL-A15-QLSARKLLQ-Z-I-A27-S-Z-NH2
H-Y-A2-DA-X-FT-A8-SYR-X-VL-A15-QLSAR-Z-LLQ-Z-I-A27-SR-NH2
H-Y-A2-DA-X-FT-A8-SYR-X-VL-A15-QLSARKLLQ-Z-I-A27-S-Z-NH2
H-Y-A2-DAI-X-T-A8-SYRK-X-L-A15-QLSAR-Z-LLQ-Z-I-A27-SR-NH2
H-Y-A2-DAI-X-T-A8-SYRK-X-L-A15-QLSARKLLQ-Z-I-A27-S-Z-NH2
H-Y-A2-DAIF-X-A8-SYRKV-X-A15-QLSAR-Z-LLQ-Z-I-A27-SR-NH2
H-Y-A2-DAIF-X-A8-SYRKV-X-A15-QLSARKLLQ-Z-I-A27-S-Z-NH2
H-Y-A2-DAIFT-X-SYRKVL-X-QLSAR-Z-LLQ-Z-I-A27-SR-NH2
H-Y-A2-DAIFT-X-SYRKVL-X-QLSARKLLQ-Z-I-A27-S-Z-NH2
H-Y-A2-DAIFT-A8-X-YRKVL-A15-X-LSARKLLQ-Z-I-A27-S-Z-NH2
H-Y-A2-DAIFT-A8-X-YRKVL-A15-X-LSAR-Z-LLQ-Z-I-A27-SR-NH2
H-Y-A2-DAIFT-A8-SYR-X-VL-A15-QLS-X-RKLLQ-Z-I-A27-S-Z-NH2
H-Y-A2-D-X-IFT-X-SYRKVL-Z-QLSARK-Z-LQDI-A27-SR-NH2
H-Y-A2-D-X-IFT-X-SYRKVL-A15-QL-Z-ARKLLQ-Z-I-A27-SR-NH2
H-Y-A2-D-X-IFT-X-SYRKVL-A15-QLSAR-Z-LLQDI-A27-Z-R-NH2
H-Y-A2-D-X-IFT-X-SYRKVL-A15-QLSARK-Z-LQDI-A27-S-Z-NH2
H-Y-A2-DAIFT-X-SYR-X-VL-Z-QLSARK-Z-LQDI-A27-SR-NH2
H-Y-A2-DAIFT-X-SYR-X-VL-A15-QL-Z-ARKLLQ-Z-I-A27-SR-NH2
H-Y-A2-DAIFT-X-SYR-X-VL-A15-QLSAR-Z-LLQDI-A27-Z-R-NH2
H-Y-A2-DAIFT-X-SYR-X-VL-A15-QLSARK-Z-LQDI-A27-S-Z-NH2

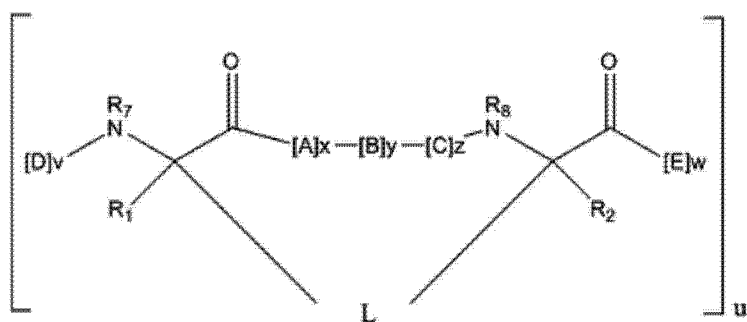
H-Y-A2-DAIFT-A8-SYR-X-VL-A15-X-LSAR-Z-LLQDI-A27-Z-R-NH2
 H-Y-A2-DAIFT-A8-SYR-X-VL-A15-X-LSARK-Z-LQDI-A27-S-Z-NH2
 H-Y-A2-DAIFT-A8-SY-X-KVL-X-QLSAR-Z-LLQDI-A27-Z-R-NH2
 H-Y-A2-DAIFT-A8-SY-X-KVL-X-QLSARK-Z-LQDI-A27-S-Z-NH2
 H-Y-A2-D-X-IFT-XX-SYR-X-VL-A15-QLSARKLLQDI-A27-SR-NH2
 H-Y-A2-DAIFT-X-SYR-XX-VL-A15-X-LSARKLLQDI-A27-SR-NH2
 H-Y-A2-DAIFT-A8-SYR-X-VL-A15-XX-LSA-X-KLLQDI-A27-SR-NH2
 H-Y-A2-DAIFT-A8-SYRKVL-A15-QLSAR-X-LLQ-XX-I-A27-S-X-NH2
 H-Y-A2-D-X-IFT-XX-SYRKVL-X-QLSARKLLQDI-A27-SR-NH2
 H-Y-A2-D-X-IFT-A8-SY-XX-KVL-X-QLSARKLLQDI-A27-SR-NH2
 H-Y-A2-DAIFT-X-SYR-XX-VL-A15-QLS-X-RKLLQDI-A27-SR-NH2
 H-Y-A2-DAIFT-X-SYRKVL-XX-QLS-X-RKLLQDI-A27-SR-NH2
 H-Y-A2-DAIFT-A8-X-YRKVL-A15-XX-LSA-X-KLLQDI-A27-SR-NH2
 H-Y-A2-DAIFT-A8-X-YRK-XX-L-A15-QLSA-X-KLLQDI-A27-SR-NH2
 H-Y-A2-DAIFT-A8-SYR-X-VL-A15-QLS-XX-RKL-X-QDI-A27-SR-NH2
 H-Y-A2-DAIFT-A8-SYR-X-VL-A15-XX-LSARKL-X-QDI-A27-SR-NH2
 H-Y-A2-DAIFT-A8-SYRKVL-A15-X-LSARKL-XX-QDI-X-SR-NH2
 H-Y-A2-DAIFT-A8-SYRKVL-A15-X-LSA-XX-KLLQDI-X-SR-NH2
 H-Y-A2-DAIFT-A8-SYRKVL-A15-QL-X-ARK-XX-LQDI-A27-S-X-NH2
 H-Y-A2-DAIFT-A8-SYRKVL-A15-QL-X-ARKLLQ-XX-I-A27-S-X-NH2
 H-Y-A2-D-X-IFT-A8-SY-XX-KVL-A15-QL-X-ARKLLQDI-A27-SR-NH2
 H-Y-A2-DAIFT-X-SYRKVL-XX-QLSARK-X-LQDI-A27-SR-NH2
 H-Y-A2-DAIFT-A8-X-YRKVL-A15-XX-LSARKL-X-QDI-A27-SR-NH2
 H-Y-A2-DAIFT-A8-SYR-X-VL-A15-QLS-XX-RKLLQD-X-A27-SR-NH2
 H-Y-A2-DAIFT-A8-SYRKVL-X-QLSARK-XX-LQDI-A27-S-X-NH2

表 2

H-Y-A2-D-X-IFT-X-SYRKVL-A15-QLSAR-Z-LLQ-Z-I-A27-SRQQGESNQERGARARL-NH2
 H-Y-A2-D-X-IFT-X-SYRKVL-A15-QLSARKLLQ-Z-I-A27-S-Z-QQGESNQERGARARL-NH2
 H-Y-A2-D-X-IFT-X-SYRKVL-Z-QLSARK-Z-LQDI-A27-SRQQGESNQERGARARL-NH2
 H-Y-A2-D-X-IFT-X-SYRKVL-A15-QL-Z-ARKLLQ\$-I-A27-SRQQGESNQERGARARL-NH2
 H-Y-A2-D-X-IFT-X-SYRKVL-A15-QLSAR-Z-LLQDI-A27--Z-RQQGESNQERGARARL-NH2
 H-Y-A2-D-X-IFT-X-SYRKVL-A15-QLSARK-Z-LQDI-A27-S-Z-QQGESNQERGARARL-NH2
 H-Y-A2-DAIFT-X-SYR-X-VL-A15-QLSAR-Z-LLQ-Z-I-A27-SRQQGESNQERGARARL-NH2
 H-Y-A2-DAIFT-X-SYR-X-VL-A15-QLSARKLLQ-Z-I-A27-S-Z-QQGESNQERGARARL-NH2
 H-Y-A2-DAIFT-A8-SY-X-KVL-X-QLSAR-Z-LLQ-Z-I-A27-SRQQGESNQERGARARL-NH2
 H-Y-A2-DAIFT-A8-SY-X-KVL-X-QLSARKLLQ-Z-I-A27-S-Z-QQGESNQERGARARL-NH2
 H-Y-A2-DAIFT-A8-SYR-X-VL-A15--X-LSAR-Z-LLQ-Z-I-A27-SRQQGESNQERGARARL-NH2
 H-Y-A2-DAIFT-A8-SYR-X-VL-A15--X-LSARKLLQ-Z-I-A27-S-Z-QQGESNQERGARARL-NH2
 H-Y-A2-DAIFT-X-SYRKVL-X-QLSAR-Z-LLQ-Z-I-A27-SRQQGESNQERGARARL-NH2
 H-Y-A2-DAIFT-X-SYRKVL-X-QLSARKLLQ-Z-I-A27-S-Z-QQGESNQERGARARL-NH2

本发명의拟肽大环化合物

[0093] 在一些实施方案中,本发명의拟肽大环化合物具有式(I):

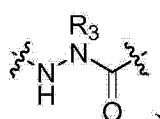


式I

式(I)

其中：

A、C、D 和 E 各自独立地为氨基酸（包括天然或非天然氨基酸和氨基酸类似物），且末端 D 和 E 独立地任选地包括封端基团；

B 为氨基酸（包括天然或非天然氨基酸和氨基酸类似物）、 $[-NH-L_3-CO-]$ 、
 $[-NH-L_3-SO_2-]$ 或 $[-NH-L_3-]$ ；

R_1 和 R_2 独立地为 -H、烷基、烯基、炔基、芳基烷基、环烷基、环烷基烷基、杂烷基或杂环烷基，它们是未取代的或被卤素 - 取代的；

R_3 为氢、烷基、烯基、炔基、芳基烷基、杂烷基、环烷基、杂环烷基、环烷基烷基、环芳基或杂环芳基，它们任选地被 R_5 取代；

L 为式 $-L_1-L_2-$ 的大环形成连接体；

并且其中 A、B、C、D 和 E，连同通过大环形成连接体 L 连接的交联氨基酸一起，形成该拟肽大环化合物的氨基酸序列，该氨基酸序列与 GHRH1-44、GHRH1-29 和 / 或选自表 1、2 或 4 中氨基酸序列的氨基酸序列至少约 60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98% 或 99% 相同；

L_1 和 L_2 独立地为亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚杂烷基、亚环烷基、亚杂环烷基、亚环芳基、亚杂环芳基或 $[-R_4-K-R_4-]_n$ ，它们各自任选地被 R_5 取代；

各个 R_4 为亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚杂烷基、亚环烷基、亚杂环烷基、亚芳基或亚杂芳基；

各个 K 为 O、S、SO、SO₂、CO、CO₂ 或 CONR₃；

各个 R_5 独立地为卤素、烷基、-OR₆、-N(R₆)₂、-SR₆、-SOR₆、-SO₂R₆、-CO₂R₆、荧光部分、放射性同位素或治疗剂；

各个 R_6 独立地为 -H、烷基、烯基、炔基、芳基烷基、环烷基烷基、杂环烷基、荧光部分、放射性同位素或治疗剂；

R_7 为 -H、烷基、烯基、炔基、芳基烷基、环烷基、杂烷基、环烷基烷基、杂环烷基、环芳基或杂环芳基，它们任选地被 R_5 取代，或是与 D 残基形成的环状结构的一部分；

R_8 为 -H、烷基、烯基、炔基、芳基烷基、环烷基、杂烷基、环烷基烷基、杂环烷基、环芳基或杂环芳基，它们任选地被 R_5 取代，或是与 E 残基形成的环状结构的一部分；

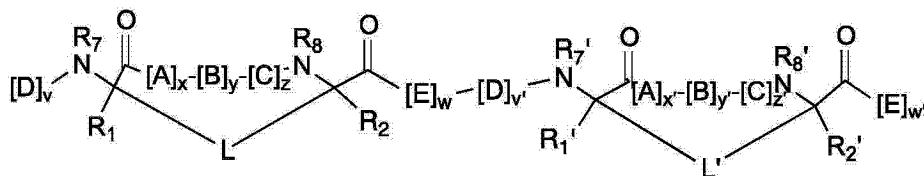
v 和 w 独立地为 1-1000 的整数，例如 1-500、1-200、1-100、1-50、1-40、1-25、1-20、1-15

或 1-10；

u、x、y 和 z 独立地为 0-10 的整数，例如 u 为 1、2 或 3；且

n 为 1-5 的整数，例如 1。例如，u 为 2。在一些实施方案中，x+y+z 的总和为 2、3 或 6，例如 3 或 6。

[0094] 在一些实施方案中，式 (I) 的拟肽大环化合物具有下式：



其中 A、C、D 和 E 各自独立地为氨基酸；

B 为氨基酸、 $[-NH-L_3-CO-]$ 、 $[-NH-L_3-SO_2-]$ 或 $[-NH-L_3-]$ ；

L' 为式 $-L_1' - L_2' -$ 的大环形成连接体；

并且其中 A、B、C、D 和 E，连同通过大环形成连接体 L 和 L' 连接的交联氨基酸一起，形成该拟肽大环化合物的氨基酸序列；

R₁' 和 R₂' 独立地为 -H、烷基、烯基、炔基、芳基烷基、环烷基、环烷基烷基、杂烷基或杂环烷基，它们是未取代的或被卤素 - 取代的；

L₁' 和 L₂' 独立地为亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚杂烷基、亚环烷基、亚杂环烷基、亚环芳基、亚杂环芳基或 $[-R_4-K-R_4-]_n$ ，它们各自任选地被 R₅ 取代；

各个 K 独立地为 O、S、SO、SO₂、CO、CO₂ 或 CONR₃；

R₇' 为 -H、烷基、烯基、炔基、芳基烷基、环烷基、杂烷基、环烷基烷基、杂环烷基、环芳基或杂环芳基，它们任选地被 R₅ 取代，或是与 D 残基形成的环状结构的一部分；

R₈' 为 -H、烷基、烯基、炔基、芳基烷基、环烷基、杂烷基、环烷基烷基、杂环烷基、环芳基或杂环芳基，它们任选地被 R₅ 取代，或是与 E 残基形成的环状结构的一部分；

v' 和 w' 独立地为 1-1000 的整数，例如 1-500、1-200、1-100、1-50、1-40、1-25、1-20、1-15 或 1-10；

x'、y' 和 z' 独立地为 0-10 的整数；且

n 为 1-5 的整数。在一些实施方案中，x' + y' + z' 的总和为 2、3 或 6，例如 3 或 6。

[0095] 在任意本文描述的拟肽大环化合物的一些实施方案中，各个 K 为 O、S、SO、SO₂、CO 或 CO₂。

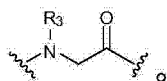
[0096] 在一个实例中，R₁ 和 R₂ 中的至少一个是未取代的或被卤素 - 取代的烷基。在另一个实例中，R₁ 和 R₂ 二者均独立地为未取代的或被卤素 - 取代的烷基。在一些实施方案中，R₁ 和 R₂ 中的至少一个为甲基。在其它实施方案中，R₁ 和 R₂ 为甲基。

[0097] 在本发明的一些实施方案中，x+y+z 的总和至少为 3，和 / 或 x' + y' + z' 的总和至少为 3。在本发明的其它实施方案中，x+y+z 的总和为 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10（例如，2、3 或 6），和 / 或 x' + y' + z' 的总和为 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10（例如，2、3 或 6）。

[0098] 本发明的大环化合物或大环化合物前体中每次出现的 A、B、C、D 或 E 独立地选择。例如，由式 [A]_x 表示的序列，当 x 为 3 时，包括其中氨基酸不相同的实施方案，例如

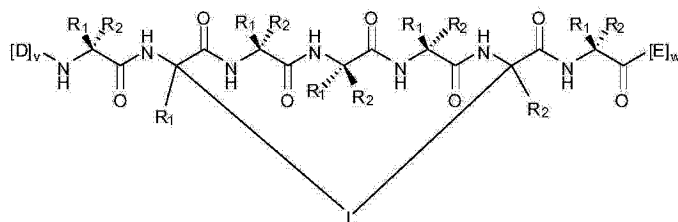
Gln - Asp - Ala, 以及其中氨基酸相同的实施方案, 例如 Gln - Gln - Gln。这适用于 x 、 y 或 z 在指定范围内的任意值。类似地, 当 u 大于 1 时, 本发明的各个化合物可包含相同或不同的拟肽大环化合物。例如, 本发明的化合物可以包含含有不同连接体长度或化学组成的拟肽大环化合物。

[0099] 在一些实施方案中, 本发明的拟肽大环化合物包含为 α -螺旋的二级结构且 R_3 为 $-H$, 从而允许螺旋内氢键键合。在一些实施方案中, A、B、C、D 或 E 中的至少一个为 α , α -二取代的氨基酸。在一个实例中, B 为 α , α -二取代的氨基酸。例如, A、B、C、D 或 E 中的至少一个为 2-氨基异丁酸。在其它实施方案中, A、B、C、D 或 E 中的至少一个为



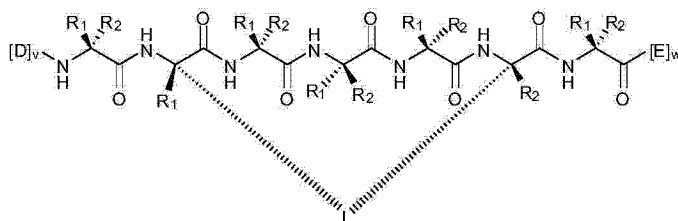
[0100] 在其它实施方案中, 选择从第一 $C\alpha$ 到第二 $C\alpha$ 测量的大环形成连接体 L 的长度, 以稳定希望的二级肽结构, 例如由拟肽大环化合物的残基 (包括但不是必须限于第一 $C\alpha$ 到第二 $C\alpha$ 之间的残基) 形成的 α -螺旋。

[0101] 在一个实施方案中, 式 (I) 的拟肽大环化合物为:

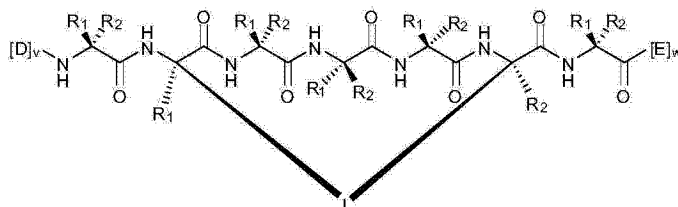


[0102] 其中 R_1 和 R_2 各自独立地为 $-H$ 、烷基、烯基、炔基、芳基烷基、环烷基、环烷基烷基、杂烷基或杂环烷基, 它们是未取代的或被卤素 $-$ 取代的。

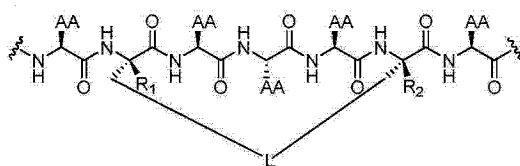
[0103] 在相关的实施方案中, 该拟肽大环化合物包含式 (I) 的结构, 其为:

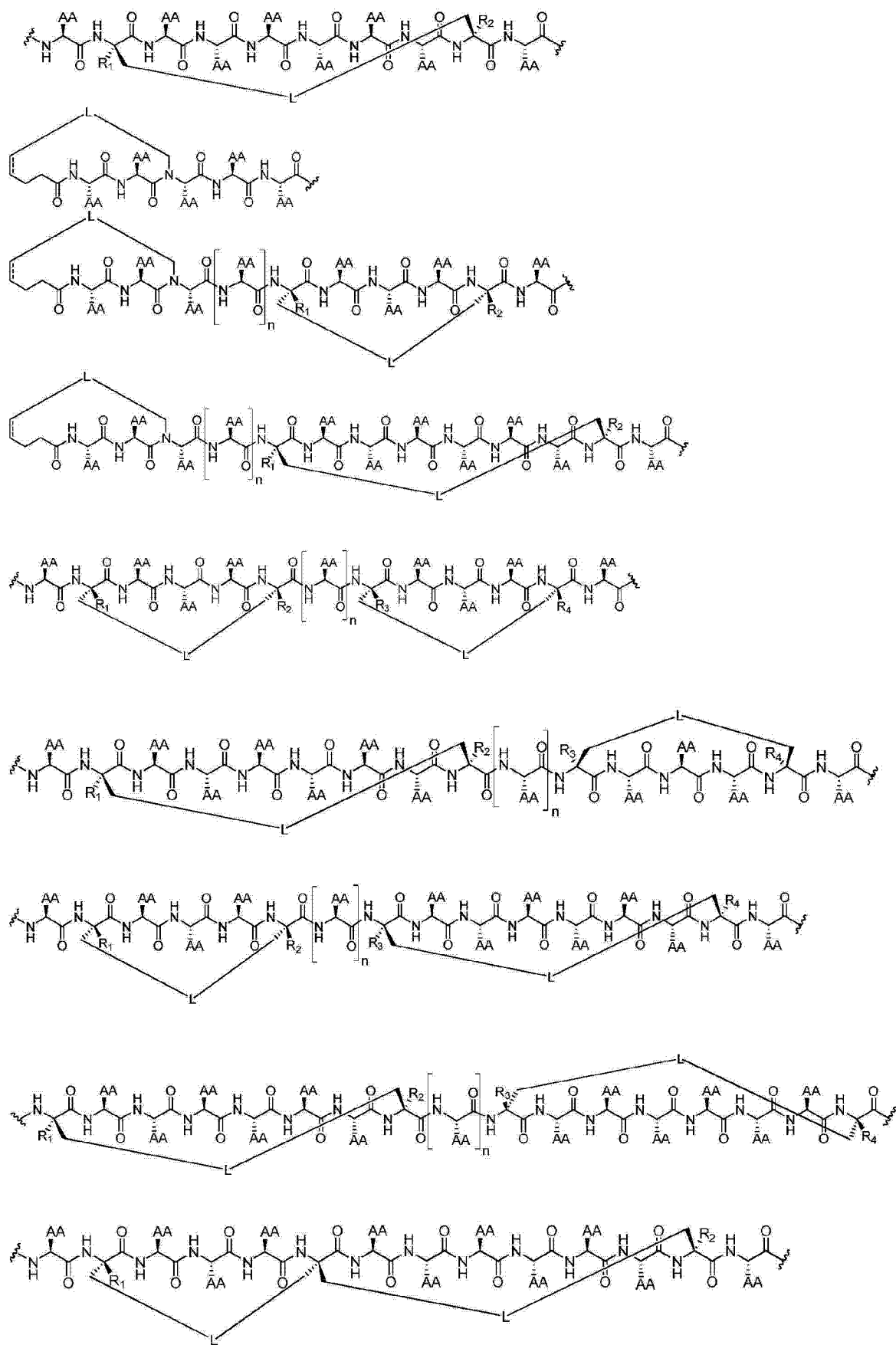


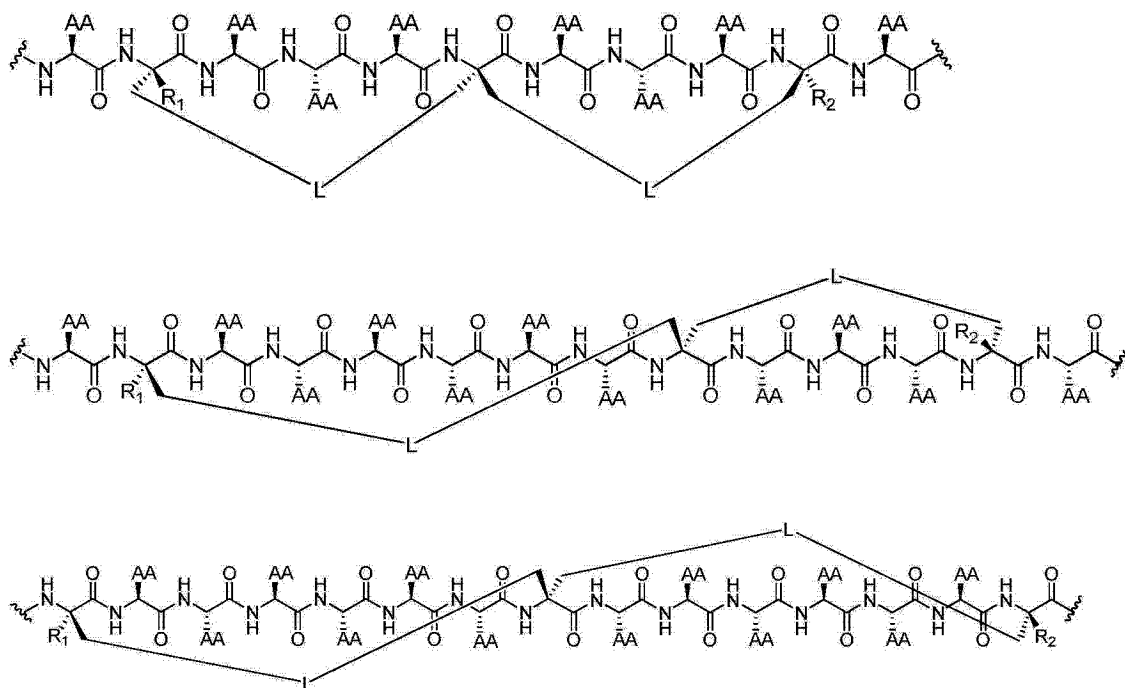
或



[0104] 在其它实施方案中, 式 (I) 的拟肽大环化合物是以下所示通式中的任一个的化合物:

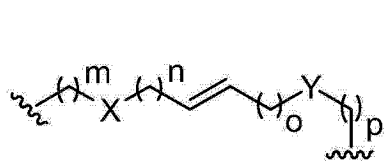




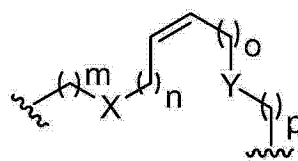


其中“AA”表示任何天然或非天然氨基酸侧链,且“ AA ”为如上定义的 $[\text{D}]_v$, $[\text{E}]_w$, 且 n 为 0 至 20、50、100、200、300、400 或 500 的整数。在一些实施方案中,上一段中所示的取代基“ n ”为 0。在其它实施方案中,上一段中所示的取代基“ n ”小于 50、40、30、20、10 或 5。

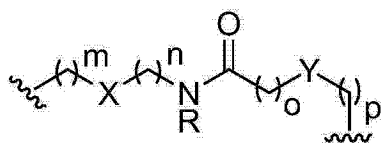
[0105] 大环形成连接体 L 的示例性实施方案如下所示。



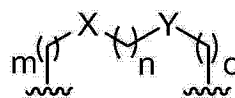
其中 $X, Y = -\text{CH}_2-, \text{O}, \text{S}$ 或 NH
 $m, n, o, p = 0-10$



其中 $X, Y = -\text{CH}_2-, \text{O}, \text{S}$ 或 NH
 $m, n, o, p = 0-10$



其中 $X, Y = -\text{CH}_2-, \text{O}, \text{S}$ 或 NH
 $m, n, o, p = 0-10$
 $R = \text{H}, \text{烷基}, \text{其它取代基}$



其中 $X, Y = -\text{CH}_2-, \text{O}, \text{S}$ 或 NH
 $m, n, o = 0-10$

[0106] 在其它实施方案中,为了促进细胞摄取,进一步修饰式 I 化合物中的 D 和 / 或 E。在一些实施方案中,将拟肽大环化合物脂质化 (lipidating) 或 PEG 化有利于细胞摄取、提高生物利用度、增强血液循环、改变药代动力学、降低免疫原性和 / 或降低所需的给药频率。

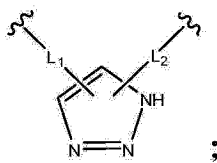
[0107] 在其它实施方案中,式 I 化合物中的 $[\text{D}]$ 和 $[\text{E}]$ 中的至少一个代表包含另外的大环形成连接体的部分,使得该拟肽大环化合物包含至少两个大环形成连接体。在特定实施

方案中,拟肽大环化合物包含两个大环形成连接体。

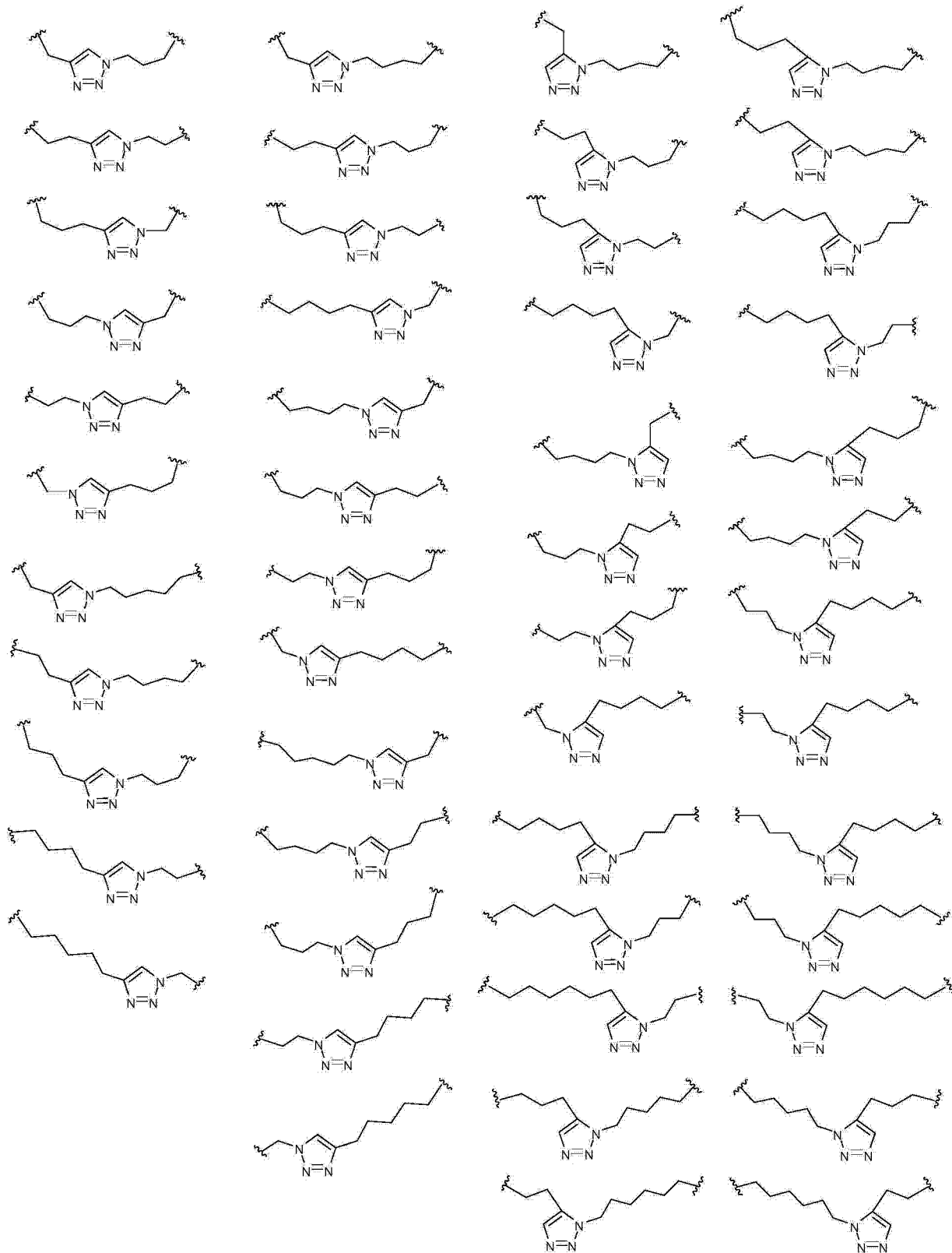
[0108] 在本发明的拟肽大环化合物中,本文所述的任何大环形成连接体可以与表 1-3 中所示的任何序列任意组合使用,也可以与本文所述的任何 R- 取代基任意组合使用。

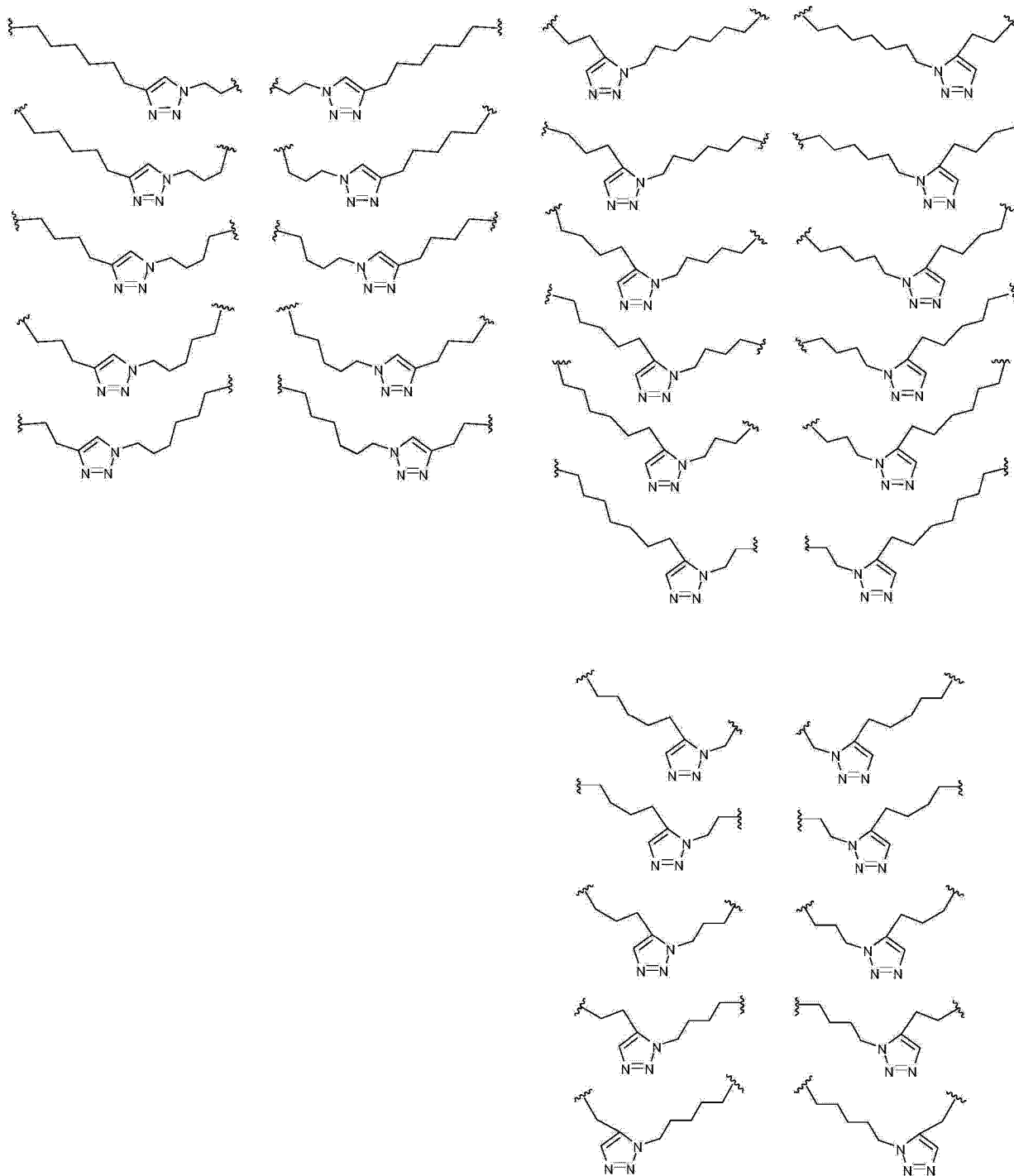
[0109] 在一些实施方案中,拟肽大环化合物包含至少一个 α -螺旋基序。例如,式 I 化合物中的 A、B 和 / 或 C 包含一个或多个 α -螺旋。一般来说, α -螺旋每圈包含 3 至 4 个氨基酸残基。在一些实施方案中,拟肽大环化合物的 α -螺旋包括 1 至 5 圈,因此包含 3 至 20 个氨基酸残基。在特定实施方案中, α -螺旋包括 1 圈、2 圈、3 圈、4 圈或 5 圈。在一些实施方案中,大环形成连接体稳定化在拟肽大环化合物内包含的 α -螺旋基序。因此,在一些实施方案中,选择大环形成连接体 L 从第一 C α 到第二 C α 的长度,以提高 α -螺旋的稳定性。在一些实施方案中,大环形成连接体跨越 α -螺旋的 1 圈至 5 圈。在一些实施方案中,大环形成连接体跨越 α -螺旋的大约 1 圈、2 圈、3 圈、4 圈或 5 圈。在一些实施方案中,大环形成连接体的长度为每圈 α -螺旋大约 5 Å 至 9 Å,或每圈 α -螺旋大约 6 Å 至 8 Å。当大环形成连接体跨越大约 1 圈 α -螺旋时,长度等于大约 5 个碳-碳键至 13 个碳-碳键,大约 7 个碳-碳键至 11 个碳-碳键,或大约 9 个碳-碳键。当大环形成连接体跨越大约 2 圈 α -螺旋时,长度等于大约 8 个碳-碳键至 16 个碳-碳键,大约 10 个碳-碳键至 14 个碳-碳键,或大约 12 个碳-碳键。当大环形成连接体跨越大约 3 圈 α -螺旋时,长度等于大约 14 个碳-碳键至 22 个碳-碳键,大约 16 个碳-碳键至 20 个碳-碳键,或大约 18 个碳-碳键。当大环形成连接体跨越大约 4 圈 α -螺旋时,长度等于大约 20 个碳-碳键至 28 个碳-碳键,大约 22 个碳-碳键至 26 个碳-碳键,或大约 24 个碳-碳键。当大环形成连接体跨越大约 5 圈 α -螺旋时,长度等于大约 26 个碳-碳键至 34 个碳-碳键,大约 28 个碳-碳键至 32 个碳-碳键,或大约 30 个碳-碳键。当大环形成连接体跨越大约 1 圈 α -螺旋时,连接含有大约 4 个原子至 12 个原子,大约 6 个原子至 10 个原子,或大约 8 个原子。当大环形成连接体跨越大约 2 圈 α -螺旋时,连接含有大约 7 个原子至 15 个原子,大约 9 个原子至 13 个原子,或大约 11 个原子。当大环形成连接体跨越大约 3 圈 α -螺旋时,连接含有大约 13 个原子至 21 个原子,大约 15 个原子至 19 个原子,或大约 17 个原子。当大环形成连接体跨越大约 4 圈 α -螺旋时,连接含有大约 19 个原子至 27 个原子,大约 21 个原子至 25 个原子,或大约 23 个原子。当大环形成连接体跨越大约 5 圈 α -螺旋时,连接含有大约 25 个原子至 33 个原子,大约 27 个原子至 31 个原子,或大约 29 个原子。当大环形成连接体跨越大约 1 圈 α -螺旋时,得到的大环形成含有大约 17 元至 25 元、大约 19 元至 23 元或大约 21 元的环。当大环形成连接体跨越大约 2 圈 α -螺旋时,得到的大环形成含有大约 29 元至 37 元、大约 31 元至 35 元或大约 33 元的环。当大环形成连接体跨越大约 3 圈 α -螺旋时,得到的大环形成含有大约 44 元至 52 元、大约 46 元至 50 元或大约 48 元的环。当大环形成连接体跨越大约 4 圈 α -螺旋时,得到的大环形成含有大约 59 元至 67 元、大约 61 元至 65 元或大约 63 元的环。当大环形成连接体跨越大约 5 圈 α -螺旋时,得到的大环形成含有大约 74 元至 82 元、大约 76 元至 80 元或大约 78 元的环。

[0110] 在一些实施方案中,L 为下式的大环形成连接体

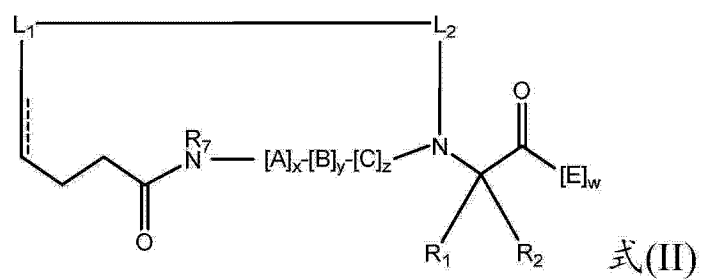


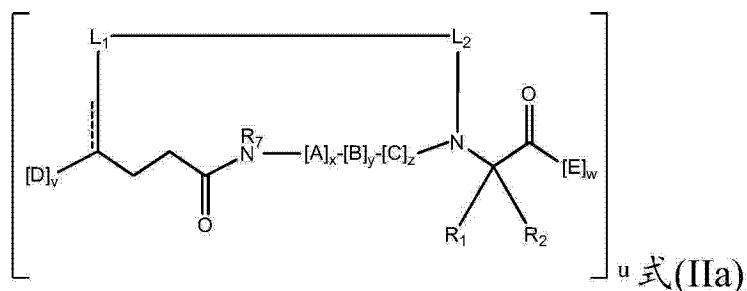
[0111] 此类大环形成连接体 L 的示例性实施方案如下所示。





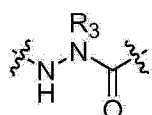
[0112] 在其它实施方案中,本发明提供了式(II)或(IIa)的拟肽大环化合物:





其中：

A、C、D 和 E 各自独立地为氨基酸；

B 为氨基酸、 $[-NH-L_3-CO-]$ 、 $[-NH-L_3-SO_2-]$ 或 $[-NH-L_3-]$ ；

R_1 和 R_2 独立地为 -H、烷基、烯基、炔基、芳基烷基、环烷基、环烷基烷基、杂烷基或杂环烷基，它们是未取代的或被卤素 - 取代的，或是与 E 残基形成的环状结构的一部分；

R_3 为氢、烷基、烯基、炔基、芳基烷基、杂烷基、环烷基、杂环烷基、环烷基烷基、环芳基或杂环芳基，它们任选地被 R_5 取代；

L_1 和 L_2 独立地为亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚杂烷基、亚环烷基、亚杂环烷基、亚环芳基、亚杂环芳基或 $[-R_4-K-R_4-]_n$ ，它们各自任选地被 R_5 取代；

并且其中 A、B、C、D 和 E，连同通过大环形成连接体 $-L_1-L_2-$ 连接的交联氨基酸一起，形成该拟肽大环化合物的氨基酸序列，该氨基酸序列与 GHRH1-44、GHRH1-29 和 / 或选自表 1、2 或 4 中氨基酸序列的氨基酸序列至少约 60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98% 或 99% 相同；

各个 R_4 为亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚杂烷基、亚环烷基、亚杂环烷基、亚芳基或亚杂芳基；

各个 K 为 O、S、SO、SO₂、CO、CO₂ 或 CONR₃；

各个 R_5 独立地为卤素、烷基、-OR₆、-N(R₆)₂、-SR₆、-SOR₆、-SO₂R₆、-CO₂R₆、荧光部分、放射性同位素或治疗剂；

各个 R_6 独立地为 -H、烷基、烯基、炔基、芳基烷基、环烷基烷基、杂环烷基、荧光部分、放射性同位素或治疗剂；

R_7 为 -H、烷基、烯基、炔基、芳基烷基、环烷基、杂烷基、环烷基烷基、杂环烷基、环芳基或杂环芳基，它们任选地被 R_5 取代；

v 和 w 独立地为 1-1000 的整数，例如 1-100；

u、x、y 和 z 独立地为 0-10 的整数，例如 u 为 1-3；和

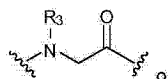
n 为 1-5 的整数。

[0113] 在一个实例中， R_1 和 R_2 中的至少一个是未取代的或被卤素 - 取代的烷基。在另一个实例中， R_1 和 R_2 均独立地为未取代的或被卤素 - 取代的烷基。在一些实施方案中， R_1 和 R_2 中的至少一个为甲基。在其它实施方案中， R_1 和 R_2 为甲基。

[0114] 在本发明的一些实施方案中，x+y+z 的总和至少为 1。在本发明的其它实施方案中，x+y+z 的总和至少为 2。在本发明的其它实施方案中，x+y+z 的总和为 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10。本发明的大环化合物或大环化合物前体中每次出现的 A、B、C、D 或 E 独立地

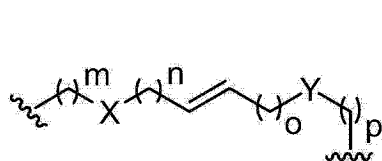
选择。例如,由式 $[A]_x$ 表示的序列,当 x 为 3 时,包括其中氨基酸不相同的实施方案,例如 Gln - Asp - Ala,以及其中氨基酸相同的实施方案,例如 Gln - Gln - Gln。这适用于 x, y 或 z 在指定范围内的任意值。

[0115] 在一些实施方案中,本发明的拟肽大环化合物包含为 α -螺旋的二级结构且 R_8 为 $-H$,从而允许螺旋内氢键键合。在一些实施方案中, A、B、C、D 或 E 中的至少一个为 α , α -二取代的氨基酸。在一个实例中, B 为 α , α -二取代的氨基酸。例如, A、B、C、D 或 E 中的至少一个为 2-氨基异丁酸。在其它实施方案中, A、B、C、D 或 E 中的至少一个为

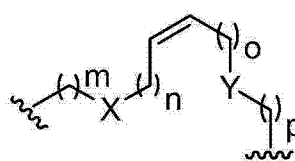


[0116] 在其它实施方案中,选择从第一 $C\alpha$ 到第二 $C\alpha$ 测量的大环形成连接体 $-L_1-L_2-$ 的长度,以稳定希望的二级肽结构,例如由拟肽大环化合物的残基(包括但不是必须限于第一 $C\alpha$ 到第二 $C\alpha$ 之间的残基)形成的 α -螺旋。

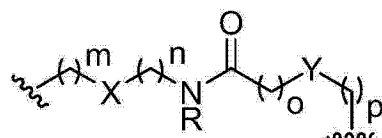
[0117] 大环形成连接体 $-L_1-L_2-$ 的示例性实施方案如下所示。



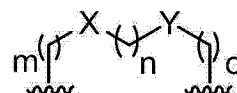
其中 $X, Y = -CH_2-, O, S$ 或 NH
 $m, n, o, p = 0-10$



其中 $X, Y = -CH_2-, O, S$ 或 NH
 $m, n, o, p = 0-10$



其中 $X, Y = -CH_2-, O, S$ 或 NH
 $m, n, o, p = 0-10$
 $R = H, \text{烷基}, \text{其它取代基}$



其中 $X, Y = -CH_2-, O, S$ 或 NH
 $m, n, o = 0-10$

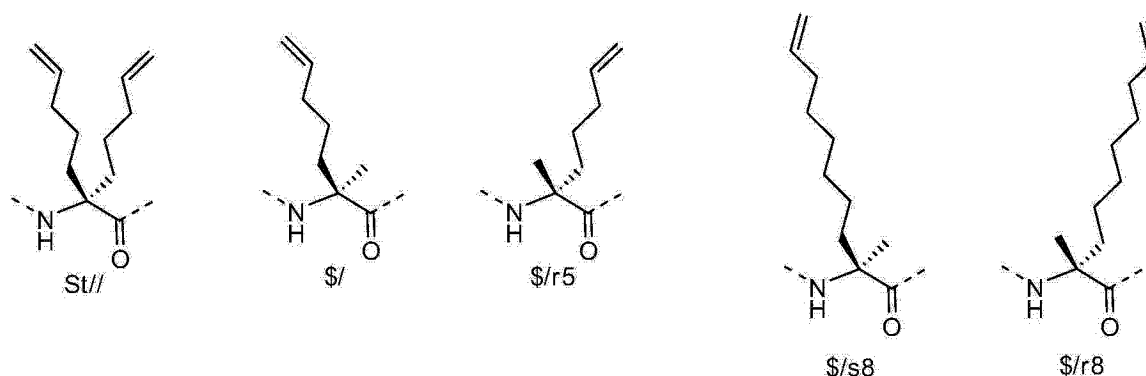
[0118] 式 (II) 的拟肽大环化合物的实例在表 4 中示出,并且包括 SP-85、SP-86、SP-87、SP-88、SP-91 和 SP-92。

拟肽大环化合物的制备

[0119] 本发明的拟肽大环化合物可以通过本领域已知的众多方法中的任意方法来制备。例如,表 1、2 或 4 中由“X”、“Z”或“XX”表示的任何残基可以被替换为能够与同一分子中的第二残基形成交联体的残基或这样的残基的前体。

[0120] 各种实现拟肽大环化合物制备的方法是本领域已知的。例如, Schafmeister 等人, J. Am. Chem. Soc. 122:5891-5892 (2000); Schafmeister 和 Verdine, J. Am. Chem. Soc. 122:5891 (2005); Walensky 等人, Science 305:1466-1470 (2004); 美国专利号 7,192,713 和 PCT 申请 W02008/121767 中描述了式 I 的拟肽大环化合物的制备。在所引用的参考文献中公开的 α , α -二取代的氨基酸和氨基酸前体可以用于拟肽大环化合物前体

多肽的合成。例如,“S5-烯炔氨基酸”是(S)- α -(2'-戊烯基)丙氨酸,且“R8-烯炔氨基酸”是(R)- α -(2'-辛烯基)丙氨酸。在将这样的氨基酸掺入前体多肽中之后,末端烯炔与复分解反应催化剂反应,从而导致拟肽大环化合物的形成。在各种实施方案中,下列氨基酸可用于合成拟肽大环化合物。



[0121] 在一些实施方案中, $x+y+z$ 为 3, 并且 A、B 和 C 独立地是天然或非天然氨基酸。在其它实施方案中, $x+y+z$ 为 6, 且 A、B 和 C 独立地是天然或非天然氨基酸。

[0122] 在一些实施方案中, 接触步骤在选自质子溶剂、水性溶剂、有机溶剂及其混合物的溶剂中进行。例如, 溶剂可以选自 H_2O 、THF、THF/ H_2O 、tBuOH/ H_2O 、DMF、DIPEA、 CH_3CN 或 CH_2Cl_2 、 $ClCH_2CH_2Cl$ 或其混合物。溶剂可以是有利于螺旋形成的溶剂。

[0123] 将备选的但等效的保护基团、离去基团或试剂替换, 并按照替代的序列或顺序进行特定的合成步骤, 以产生希望的化合物。用于合成本文所述的化合物的合成化学转化和保护基团方法(保护和脱保护)包括, 例如, 如以下文献中所述的方法: Larock, Comprehensive Organic Transformations, VCH Publishers(1989); Greene 和 Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, 第 2 版, John Wiley and Sons(1991); Fieser 和 Fieser, Fieser and Fieser's Reagents for Organic Synthesis, John Wiley and Sons(1994); 和 Paquette 编著, Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis, John Wiley and Sons(1995) 及其后续版本。

[0124] 本文公开的拟肽大环化合物例如通过化学合成方法制备, 如 Fields 等人, Synthetic Peptides: A User's Guide 中的第 3 章, Grant, W. H. 编著, Freeman & Co., New York, N. Y., 1992, 第 77 页中所述的方法。因此, 例如, 采用具有被 tBoc 或 Fmoc 化学部分保护的胺的自动化 Merrifield 固相合成技术, 在例如自动化肽合成仪(例如, Applied Biosystems(Foster City, CA), 430A、431 或 433 型)上使用侧链保护的氨基酸合成肽。

[0125] 一种产生本文所述的拟肽前体和拟肽大环化合物的方式使用固相肽合成法(SPPS)。将 C-末端氨基酸经由与连接体分子的酸不稳定的键连接到交联的聚苯乙烯树脂上。这种树脂不溶于用于合成的溶剂, 从而使得洗去过量的试剂和副产物相对简单和快速。N-末端用在酸中稳定、但可用碱去除的 Fmoc 基团保护。必要时, 用碱稳定的、酸不稳定的基团保护侧链官能团。

[0126] 例如, 通过使用天然的化学连接结合单个的合成肽来产生较长的拟肽前体。或者, 通过公知的重组 DNA 和蛋白质表达技术生物合成较长的合成肽。这些技术在公知的标准手册中提供了详细方案。为了构建编码本发明的拟肽前体的基因, 逆向翻译氨基酸序列以获得编码该氨基酸序列的核酸序列, 优选地使用对于将表达该基因的生物体为最佳的密码

子。然后,通常通过合成编码该肽的寡核苷酸和在必要时合成任何调节元件来制备合成的基因。将合成的基因插入合适的克隆载体中,并转染到宿主细胞内。然后在适合选择的表达系统和宿主的合适条件下表达该肽。通过标准方法纯化并表征该肽。

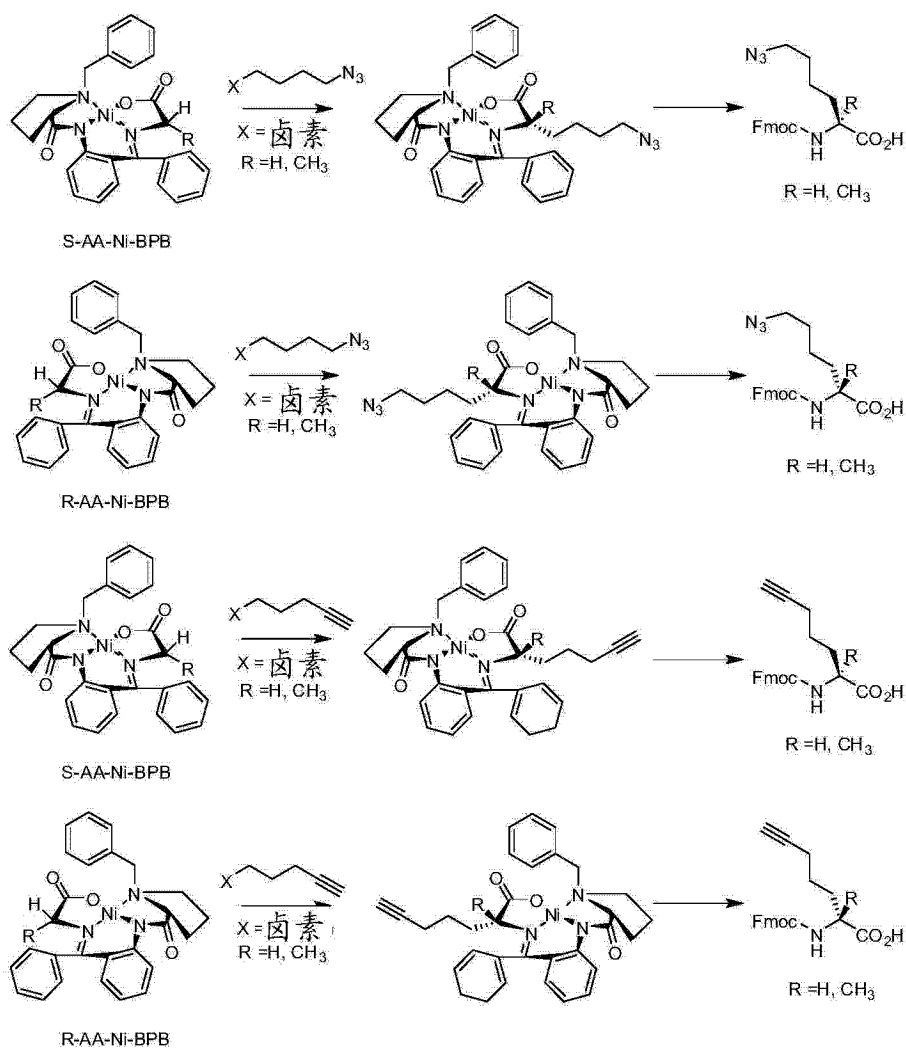
[0127] 例如,使用例如高通量多通道组合合成仪(例如,来自 CreoSalus, Louisville, KY 的 Thuramed TETRAS 多通道肽合成仪或来自 AAPTEC, Inc., Louisville, KY 的 Apex396 型多通道肽合成仪)以高通量的组合方式制备拟肽前体。

[0128] 在一些实施方案中,本发明的拟肽大环化合物包含三唑大环形成连接体。例如,这类拟肽大环化合物的合成包括多步骤的过程,该过程的特征在于:合成含有叠氮部分和炔部分的拟肽前体;然后将该拟肽前体与大环化试剂接触以产生三唑连接的拟肽大环化合物。这样的方法例如在 2008 年 2 月 25 日提交的美国申请 12/037,041 中描述。大环化合物或大环化合物前体例如通过溶液相或固相方法合成,并且可以包含天然存在的和非天然存在的氨基酸两者。参见,例如, Hunt, "The Non-Protein Amino Acids", Chemistry and Biochemistry of the Amino Acids, G. C. Barrett 编著, Chapman and Hall, 1985。

[0129] 在一些实施方案中,叠氮连接到残基的 α -碳上,炔连接到另一个残基的 α -碳上。在一些实施方案中,叠氮部分是氨基酸 L-赖氨酸、D-赖氨酸、 α -甲基-L-赖氨酸、 α -甲基-D-赖氨酸、L-鸟氨酸、D-鸟氨酸、 α -甲基-L-鸟氨酸或 α -甲基-D-鸟氨酸的叠氮基类似物。在另一个实施方案中,炔部分是 L-炔丙基甘氨酸。在另外其它的实施方案中,炔部分是选自下组的氨基酸:L-炔丙基甘氨酸、D-炔丙基甘氨酸、(S)-2-氨基-2-甲基-4-戊炔酸、(R)-2-氨基-2-甲基-4-戊炔酸、(S)-2-氨基-2-甲基-5-己炔酸、(R)-2-氨基-2-甲基-5-己炔酸、(S)-2-氨基-2-甲基-6-庚炔酸、(R)-2-氨基-2-甲基-6-庚炔酸、(S)-2-氨基-2-甲基-7-辛炔酸、(R)-2-氨基-2-甲基-7-辛炔酸、(S)-2-氨基-2-甲基-8-壬炔酸和 (R)-2-氨基-2-甲基-8-壬炔酸。

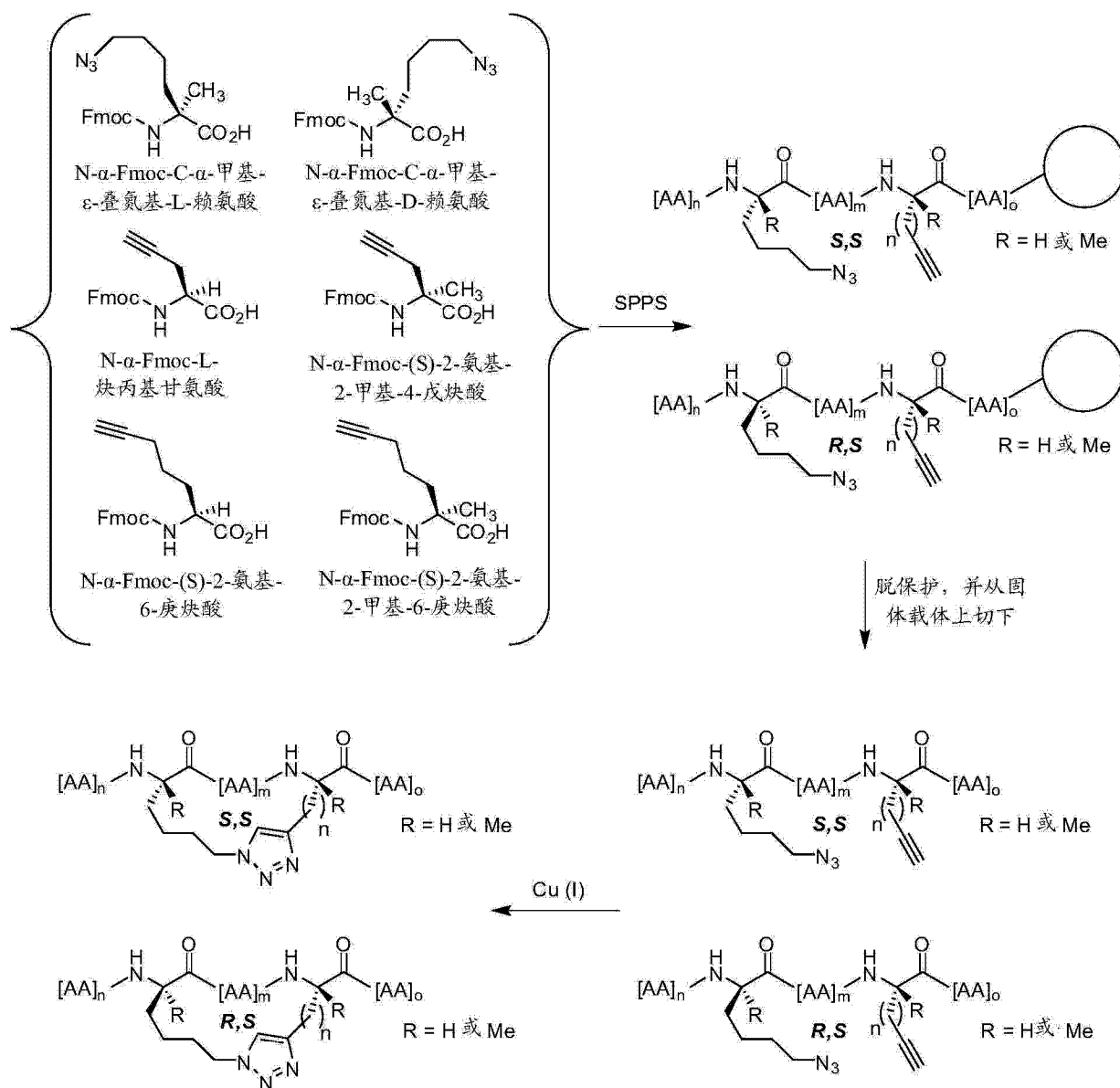
[0130] 提供以下合成方案只是为了说明本发明,而并非意在限制如本文所述的本发明的范围。为了简化图片,说明性的方案显示了叠氮基氨基酸类似物 ϵ -叠氮基- α -甲基-L-赖氨酸和 ϵ -叠氮基- α -甲基-D-赖氨酸,以及炔氨基酸类似物 L-炔丙基甘氨酸、(S)-2-氨基-2-甲基-4-戊炔酸和 (S)-2-氨基-2-甲基-6-庚炔酸。因此,在下面的合成方案中, R_1 、 R_2 、 R_7 和 R_8 各自为 -H;各个 L_1 为 $-(CH_2)_4-$;且各个 L_2 为 $-(CH_2)-$ 。但是,如以上整个发明详述部分所指出的,可以采用许多其它的氨基酸类似物,其中 R_1 、 R_2 、 R_7 、 R_8 、 L_1 和 L_2 可以独立地选自本文公开的各种结构。

[0131] 合成方案 1:



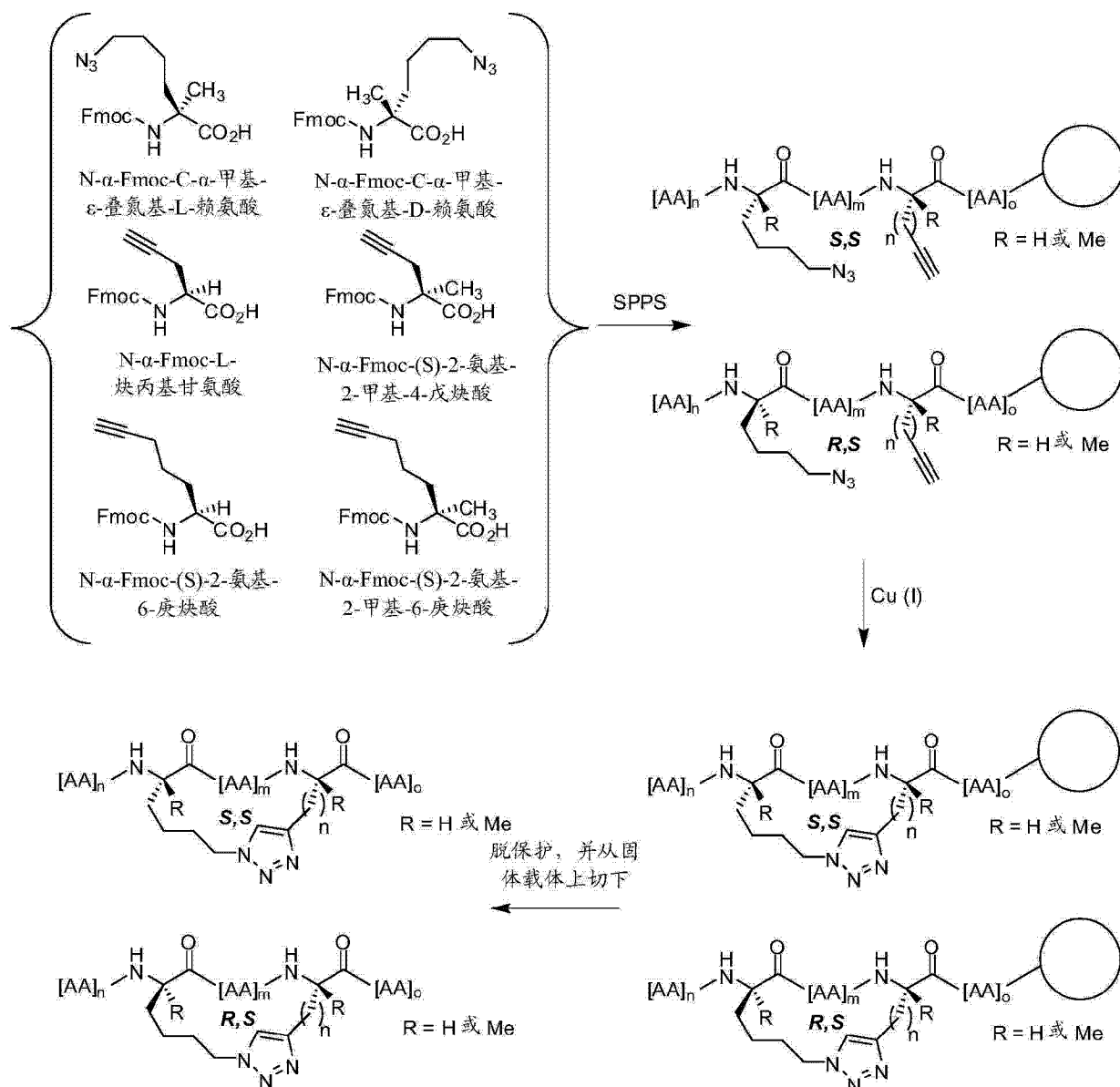
[0132] 合成方案1描述了本发明的几种化合物的制备。如 Belokon 等人 (1998), Tetrahedron Asymm. 9:4249-4252 所述制备由手性辅剂 (S)-2-[N-(N'-苄基脯氨酰) 氨基] 苯甲酮 (BPB) 衍生的席夫碱和诸如甘氨酸或丙氨酸的氨基酸的 Ni(II) 络合物。产生的络合物随后与包含叠氮部分或炔部分的烷基化试剂反应, 以产生对映体富集的本发明的化合物。如需要, 可以对产生的化合物进行保护以用于肽合成。

[0133] 合成方案 2:



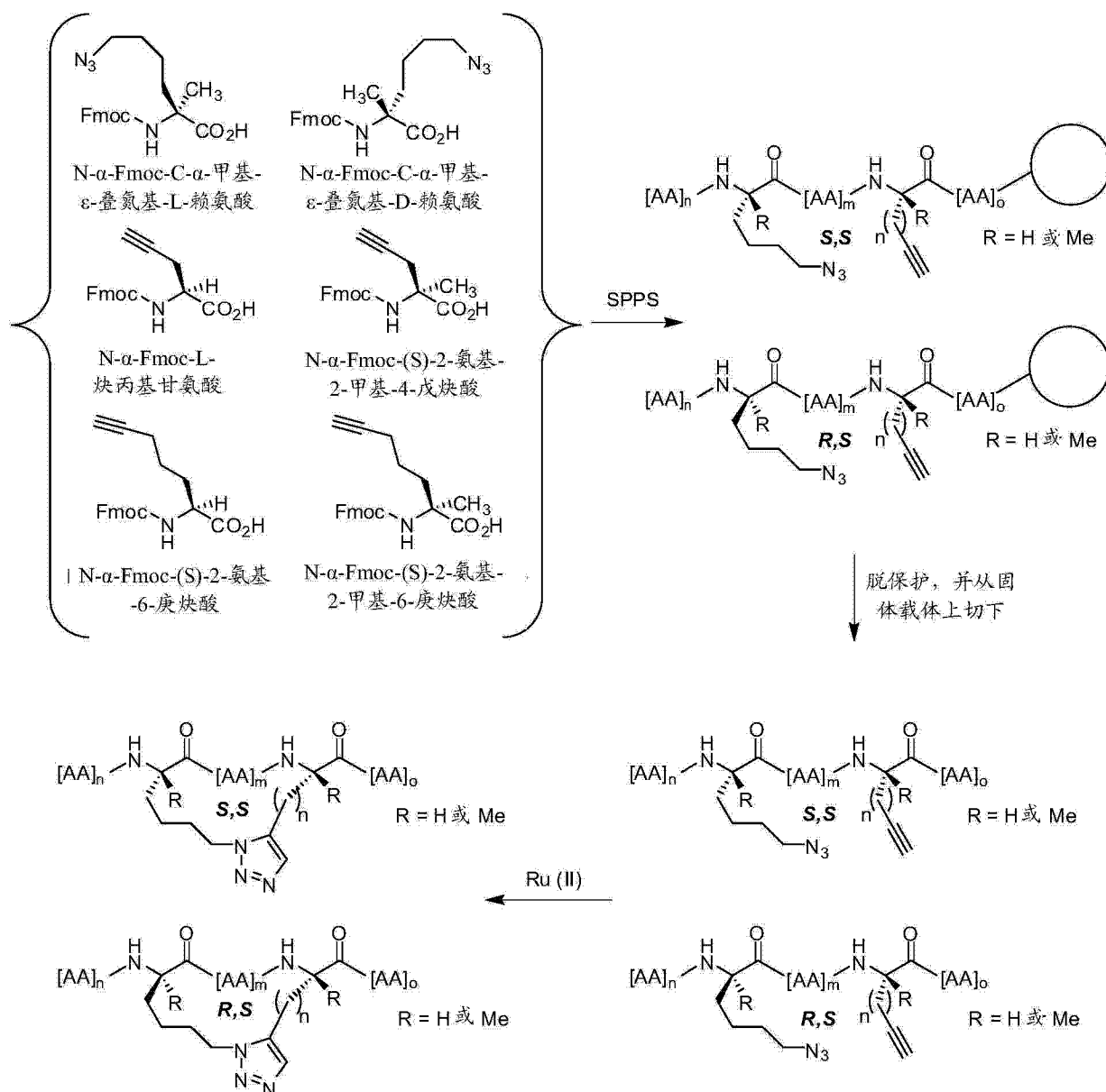
[0134] 在如合成方案 2 所示的用于合成拟肽大环化合物的一般方法中, 拟肽前体包含叠氮部分和炔部分, 并且通过溶液相或固相肽合成法 (SPPS), 使用可商购的氨基酸 $\text{N-}\alpha\text{-Fmoc-L-炔丙基甘氨酸}$ 以及氨基酸 (S)-2-氨基-2-甲基-4-戊炔酸、(S)-2-氨基-6-庚炔酸、(S)-2-氨基-2-甲基-6-庚炔酸、 $\text{N-甲基-}\epsilon\text{-叠氮基-L-赖氨酸}$ 和 $\text{N-甲基-}\epsilon\text{-叠氮基-D-赖氨酸}$ 的 $\text{N-}\alpha\text{-Fmoc}$ 保护的形式合成。然后通过标准条件 (例如, 强酸如 95% TFA) 将拟肽前体脱保护并从固相树脂上切下。拟肽前体作为粗制混合物进行反应, 或者在与大环化试剂如 Cu(I) 在有机溶液或水性溶液中反应之前进行纯化 (Rostovtsev 等人 (2002), Angew. Chem. Int. Ed. 41:2596-2599; Tornøe 等人 (2002), J. Org. Chem. 67:3057-3064; Deiters 等人 (2003), J. Am. Chem. Soc. 125:11782-11783; Punna 等人 (2005), Angew. Chem. Int. Ed. 44:2215-2220)。在一个实施方案中, 在有利于 α -螺旋形成的条件下进行三唑形成反应。在一个实施方案中, 在选自 H_2O 、THF、 CH_3CN 、DMF、DIPEA、tBuOH 或其混合物的溶剂中进行大环化步骤。在另一个实施方案中, 在 DMF 中进行大环化步骤。在一些实施方案中, 在经缓冲的水性溶剂或部分水性溶剂中进行大环化步骤。

[0135] 合成方案 3:



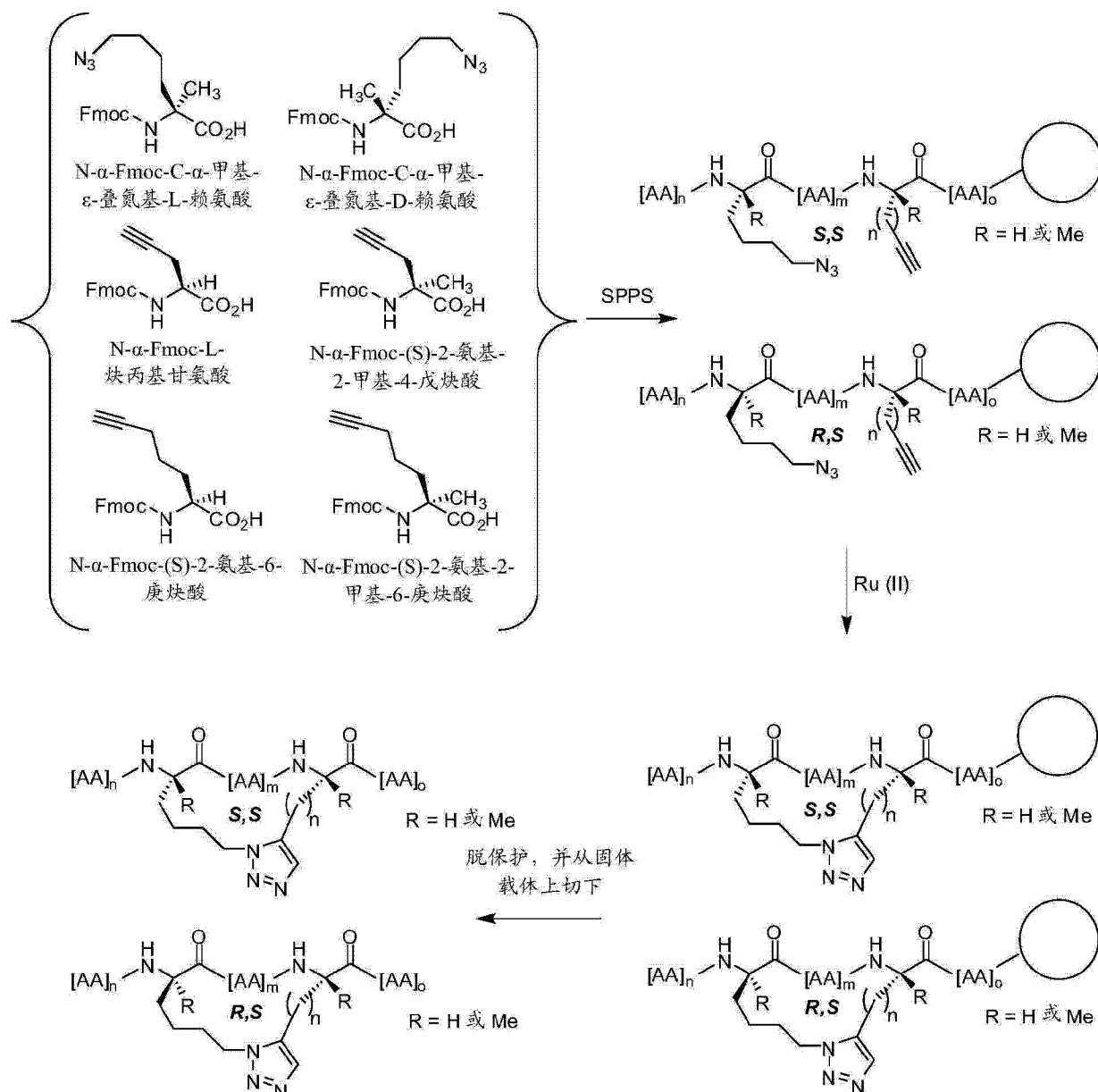
[0136] 在如合成方案 3 所示的用于合成拟肽大环化合物的一般方法中, 拟肽前体包含叠氮部分和炔部分, 并且通过固相肽合成法 (SPPS), 使用可商购的氨基酸 $N\text{-}\alpha\text{-Fmoc-L-炔丙基甘氨酸}$ 以及氨基酸 (S)-2-氨基-2-甲基-4-戊炔酸、(S)-2-氨基-6-庚炔酸、(S)-2-氨基-2-甲基-6-庚炔酸、 $N\text{-甲基-}\epsilon\text{-叠氮基-L-赖氨酸}$ 和 $N\text{-甲基-}\epsilon\text{-叠氮基-D-赖氨酸}$ 的 $N\text{-}\alpha\text{-Fmoc}$ 保护的形式合成。拟肽前体作为粗制混合物与大环化试剂如 $Cu(I)$ 试剂在树脂上反应 (Rostovtsev 等人 (2002), Angew. Chem. Int. Ed. 41:2596-2599; Tornøe 等人 (2002), J. Org. Chem. 67:3057-3064; Deiters 等人 (2003), J. Am. Chem. Soc. 125:11782-11783; Punna 等人 (2005), Angew. Chem. Int. Ed. 44:2215-2220)。然后通过标准条件 (例如, 强酸如 95% TFA) 将得到的含三唑的拟肽大环化合物脱保护并从固相树脂上切下。在某些实施方案中, 在选自 CH_2Cl_2 、 $ClCH_2CH_2Cl$ 、DMF、THF、NMP、DIPEA、2, 6-二甲基吡啶、吡啶、DMSO、 H_2O 或其混合物的溶剂中进行大环化步骤。在一些实施方案中, 在经缓冲的水性溶剂或部分水性溶剂中进行大环化步骤。

[0137] 合成方案 4:



[0138] 在如合成方案 4 所示的用于合成拟肽大环化合物的一般方法中,拟肽前体包含叠氮部分和炔部分,并且通过溶液相或固相肽合成法 (SPPS),使用可商购的氨基酸 N- α -Fmoc-L-炔丙基甘氨酸以及氨基酸 (S)-2-氨基-2-甲基-4-戊炔酸、(S)-2-氨基-6-庚炔酸、(S)-2-氨基-2-甲基-6-庚炔酸、N-甲基- ϵ -叠氮基-L-赖氨酸和 N-甲基- ϵ -叠氮基-D-赖氨酸的 N- α -Fmoc 保护的形式合成。然后通过标准条件 (例如,强酸如 95% TFA) 将拟肽前体脱保护并从固相树脂上切下。拟肽前体作为粗制混合物进行反应,或者在与大环化试剂如 Cu(II) 试剂例如 $\text{Cp}^*\text{RuCl}(\text{PPh}_3)_2$ 或 $[\text{Cp}^*\text{RuCl}]_4$ 反应之前进行纯化 (Rasmussen 等人 (2007), Org. Lett. 9:5337-5339; Zhang 等人 (2005), J. Am. Chem. Soc. 127:15998-15999)。在一些实施方案中,在选自 DMF、 CH_3CN 和 THF 的溶剂中进行大环化步骤。

[0139] 合成方案 5:



[0140] 在如合成方案 5 所示的用于合成拟肽大环化合物的一般方法中，拟肽前体包含叠氮部分和炔部分，并且通过固相肽合成法 (SPPS)，使用可商购的氨基酸 N- α -Fmoc-L-炔丙基甘氨酸以及氨基酸 (S)-2-氨基-2-甲基-4-戊炔酸、(S)-2-氨基-6-庚炔酸、(S)-2-氨基-2-甲基-6-庚炔酸、N-甲基- ϵ -叠氮基-L-赖氨酸和 N-甲基- ϵ -叠氮基-D-赖氨酸的 N- α -Fmoc 保护的形式合成。拟肽前体作为粗制混合物与大环化试剂如 Ru(II) 试剂在树脂上反应。例如，该试剂可以是 $\text{Cp}^*\text{RuCl}(\text{PPh}_3)_2$ 或 $[\text{Cp}^*\text{RuCl}]_4$ (Rasmussen 等人 (2007), Org. Lett. 9:5337-5339; Zhang 等人 (2005), J. Am. Chem. Soc. 127:15998-15999)。在一些实施方案中，在选自 CH_2Cl_2 、 $\text{ClCH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$ 、 CH_3CN 、DMF 和 THF 的溶剂中进行大环化步骤。

[0141] 本发明涉及在本文所述的拟肽大环化合物的合成中使用非天然存在的氨基酸和氨基酸类似物。任何适合于用来合成稳定的含三唑拟肽大环化合物的合成方法的氨基酸或氨基酸类似物都可以用于本发明。例如，预计 L-炔丙基甘氨酸是本发明中有用的氨基酸。但是，含有不同氨基酸侧链的其它含炔的氨基酸也可用于本发明。例如，L-炔丙基甘氨酸在氨基酸的 α -碳和氨基酸侧链的炔之间含有一个亚甲基单元。本发明也涉及使用在 α -碳

和炔之间具有多个亚甲基单元的氨基酸。另外,也预计氨基酸 L- 赖氨酸、D- 赖氨酸、 α - 甲基-L- 赖氨酸和 α - 甲基-D- 赖氨酸的叠氮类似物是本发明的有用的氨基酸。但是,含有不同的氨基酸侧链的其它末端叠氮氨基酸也可以用于本发明。例如,L- 赖氨酸的叠氮类似物在氨基酸的 α - 碳和氨基酸侧链的末端叠氮基之间含有 4 个亚甲基单元。本发明也涉及使用在 α - 碳和末端叠氮基之间具有少于或多于 4 个亚甲基单元的氨基酸。表 3 显示了一些可用于制备本文公开的拟肽大环化合物的氨基酸。

表 3

N- α -Fmoc-L-炔丙基甘氨酸	N- α -Fmoc-D-炔丙基甘氨酸		
N- α -Fmoc-(S)-2-氨基-2-甲基-4-戊炔酸	N- α -Fmoc-(R)-2-氨基-2-甲基-4-戊炔酸	N- α -Fmoc- ϵ -叠氮基-L-赖氨酸	N- α -Fmoc- ϵ -叠氮基-D-赖氨酸
N- α -Fmoc-(S)-2-氨基-2-甲基-5-己炔酸	N- α -Fmoc-(R)-2-氨基-2-甲基-5-己炔酸	N- α -Fmoc- ϵ -叠氮基- α -甲基-L-赖氨酸	N- α -Fmoc- ϵ -叠氮基- α -甲基-D-赖氨酸
N- α -Fmoc-(S)-2-氨基-2-甲基-6-庚炔酸	N- α -Fmoc-(R)-2-氨基-2-甲基-6-庚炔酸	N- α -Fmoc- δ -叠氮基-L-鸟氨酸	N- α -Fmoc- δ -叠氮基-D-鸟氨酸
N- α -Fmoc-(S)-2-氨基-2-甲基-7-辛炔酸	N- α -Fmoc-(R)-2-氨基-2-甲基-7-辛炔酸	N- α -Fmoc- ϵ -叠氮基- α -甲基-L-鸟氨酸	N- α -Fmoc- ϵ -叠氮基- α -甲基-D-鸟氨酸
N- α -Fmoc-(S)-2-氨基-2-甲基-8-壬炔酸	N- α -Fmoc-(R)-2-氨基-2-甲基-8-壬炔酸		

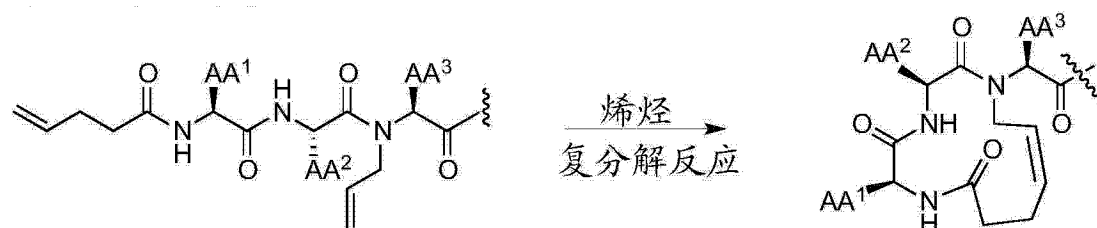
表 3 显示用于制备本文公开的拟肽大环化合物的示例性氨基酸。

[0142] 在一些实施方案中,氨基酸和氨基酸类似物是 D- 构型。在其它实施方案中,它们是 L- 构型。在某些实施方案中,拟肽中包含的某些氨基酸和氨基酸类似物是 D- 构型,而某些氨基酸和氨基酸类似物是 L- 构型。在一些实施方案中,氨基酸类似物是 α , α -二取代的,如 α -甲基-L-炔丙基甘氨酸、 α -甲基-D-炔丙基甘氨酸、 ϵ -叠氮基- α -甲基-L-赖氨酸和 ϵ -叠氮基- α -甲基-D-赖氨酸。在一些实施方案中,氨基酸类似物是 N-烷基化的,例如, N-甲基-L-炔丙基甘氨酸、N-甲基-D-炔丙基甘氨酸、N-甲基- ϵ -叠氮基-L-赖氨酸和 N-甲基- ϵ -叠氮基-D-赖氨酸。

[0143] 在一些实施方案中,使用包括但不限于 -Fmoc 和 -Boc 的保护基团保护氨基酸的 -NH 部分。在其它实施方案中,在合成拟肽大环化合物之前不保护氨基酸。

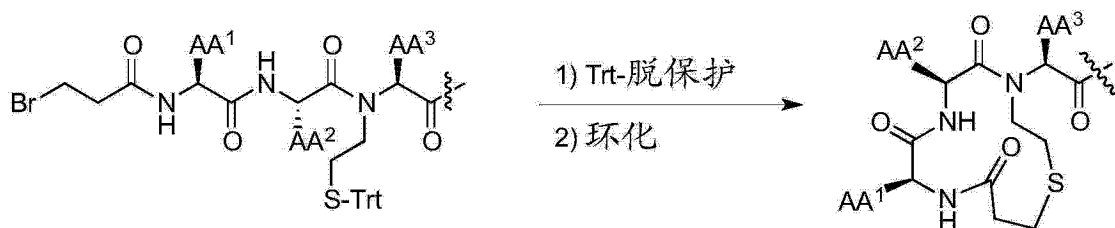
[0144] 预计适用于实施本发明的形成拟肽大环化合物的另外的方法包括以下文献中公开的方法: Mustapa, M. Firouz Mohd 等人, J. Org. Chem(2003), 68, 第 8193-8198 页; Yang, Bin 等人 Bioorg Med. Chem. Lett. (2004), 14, 第 1403-1406 页; 美国专利 5,364,851; 美国专利 5,446,128; 美国专利 5,824,483; 美国专利 6,713,280 和美国专利 7,202,332。在这样的实施方案中,使用在 α -位含有另外的取代基 R- 的氨基酸前体。这样的氨基酸在希望的位置并入大环化合物前体中,其可以处于交联体被取代的位置,或者,备选地,在大环化合物前体序列中的其它位置。然后根据指定的方法进行前体的环化。

[0145] 例如,式 (II) 的拟肽大环化合物如以下所示制备:



其中 AA₁、AA₂、AA₃ 各自独立地为氨基酸侧链。

[0146] 在其它实施方案中,式 (II) 的拟肽大环化合物如下所示制备:



其中 AA₁、AA₂、AA₃ 各自独立地为氨基酸侧链。

[0147] 在一些实施方案中,拟肽大环化合物以超过一种异构体获得,例如这是由于交联体结构中双键的构型 (E 与 Z)。此类异构体能够或不能通过常规的色谱方法分离。在一些实施方案中,一种异构体相对于其它异构体具有改善的生物学性质。在一个实施方案中,拟肽大环化合物的 E 交联体烯烃异构体相对于其 Z 对应物具有更好的溶解性、更好的靶标亲和性、更好的体内或体外功效、更高的螺旋度或提高的细胞渗透性。在一个实施方案中,拟肽大环化合物的 Z 交联体烯烃异构体相对于其 E 对应物具有更好的溶解性、更好的靶标亲和性、更好的体内或体外功效、更高的螺旋度或提高的细胞渗透性。

试验

[0148] 例如,本发明的拟肽大环化合物的性质通过使用下面所述的方法进行分析。在一

些实施方案中,本发明的拟肽大环化合相对于缺乏本文所述的取代基的相应多肽具有改善的生物学性质。

用于测定 α -螺旋度的试验

[0149] 在溶液中,具有 α -螺旋结构域的多肽的二级结构在随机卷曲结构和 α -螺旋结构之间达到动态平衡,这通常被称为“百分螺旋度”。因此,例如, α -螺旋结构域在溶液中主要是随机卷曲, α -螺旋含量通常低于 25%。另一方面,具有优化的连接体的拟肽大环化合物具有例如至少为相应的非交联多肽的 2 倍的 α -螺旋度。在一些实施方案中,本发明的大环化合物具有高于 50% 的 α -螺旋度。为了测定本发明的拟肽大环化合物的螺旋度,将化合物溶解于水溶液(例如,pH7 的 50mM 磷酸钾溶液或蒸馏水,达到 25-50 μ M 的浓度)。使用标准测量参数(例如,温度,20 $^{\circ}$ C;波长,190-260nm;步分辨率(step resolution),0.5nm;速度,20nm/sec;累积,10;响应,1 秒;带宽,1nm;路径长度,0.1cm)在分光偏振计(例如,Jasco J-710)上获得圆二色性(CD)谱。通过将平均残基椭圆率(例如,[Φ]222obs)除以模型螺旋十肽的报道值(Yang 等人(1986),Methods Enzymol. 130:208)来计算各个肽的 α -螺旋含量。

用于测量解链温度(T_m)的试验

[0150] 含有二级结构如 α -螺旋的本发明的拟肽大环化合物显示出例如比相应的非交联多肽更高的解链温度。通常,本发明的拟肽大环化合物显示出 >60 $^{\circ}$ C 的 T_m,表明在水溶液中高度稳定的结构。为了分析大环形成对解链温度的影响,将拟肽大环化合物或未修饰的肽溶于蒸馏水中(例如,以 50 μ M 的终浓度),并且通过使用标准参数(例如,波长,222nm;步分辨率,0.5nm;速度,20nm/sec;累积,10;响应,1 秒;带宽,1nm;温度上升速度,1 $^{\circ}$ C/分钟;路径长度,0.1cm)在分光偏振计(例如,Jasco J-710)上测量椭圆率在一定温度范围(例如,4-95 $^{\circ}$ C)内的变化来确定 T_m。

蛋白酶抗性试验

[0151] 肽骨架的酰胺键易受到蛋白酶的水解,从而致使肽化合物在体内易于快速降解。但是,肽螺旋的形成通常包埋酰胺骨架,因此可以保护其免于蛋白水解裂解。本发明的拟肽大环化合物可以经历体外胰蛋白酶的蛋白水解,以评价与相应的非交联多肽相比其降解速率的任何变化。例如,拟肽大环化合物和相应的非交联多肽与胰蛋白酶琼脂糖一起温育,并在各个时间点通过离心猝灭反应,随后进行 HPLC 注入以根据 280nm 处的紫外吸收对残留的底物进行定量。简单来说,拟肽大环化合物和拟肽前体(5mcg)与胰蛋白酶琼脂糖(Pierce)(S/E ~ 125)温育 0、10、20、90 和 180 分钟。通过台式离心机高速离心猝灭反应;通过基于 HPLC 的在 280nm 处的峰检测对分离的上清液中残余的底物进行定量。蛋白水解反应显示出一级动力学,且速率常数 k 由 $\ln[S]$ 相对于时间的曲线确定($k = -1X$ 斜率)。

体外稳定性试验

[0152] 具有优化的连接体的拟肽大环化合物具有例如至少为相应的非交联多肽的 2 倍的体外半衰期,且具有 12 小时或更长的体外半衰期。对于体外血清稳定性研究,可以使用多种试验。例如,将拟肽大环化合物和相应的非交联多肽(2mcg)与新鲜的小鼠、大鼠和/或人血清(2mL)一起在 37 $^{\circ}$ C 下温育 0、1、2、4、8 和 24 小时。为了测定完整化合物的水平,可以使用下面的程序:通过将 100 μ L 的血清转移到 2mL 离心管中,接着加入 10 μ L 的 50% 甲酸和 500 μ L 乙腈并在 4 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C 下以 14,000RPM 离心 10 分钟来提取样品。然后将上清液

转移到新的 2ml 管中,并在 $N_2 < 10\text{psi}$ 、 37°C 下在 Turbopap 上蒸发。样品在 $100\ \mu\text{L}$ 的 50:50 乙腈:水中重建,并进行 LC-MS/MS 分析。

体外结合试验

[0153] 为了评价拟肽大环化合物和拟肽前体与受体蛋白质的结合和亲和力,例如使用荧光偏振试验 (FPA)。FPA 技术使用偏振光和荧光示踪剂测量分子取向和分子迁移率。当用偏振光激发时,由于附着在具有高表观分子量的分子(例如,与大蛋白质结合的 FITC 标记的肽)上的荧光示踪剂(例如, FITC)与附着在较小分子(例如,在溶液中游离的 FITC 标记的肽)上的荧光示踪剂相比具有较慢的旋转速度,附着在具有高表观分子量的分子上的荧光示踪剂发射较高水平的偏振荧光。

[0154] 例如,荧光标记的 (fluoresceinated) 拟肽大环化合物 (25nM) 与受体蛋白质 (25-1000nM) 在结合缓冲液 (140mM NaCl、50mM Tris-HCL, pH7.4) 中在室温下温育 30 分钟。例如,用发光分光光度计(例如, Perkin-Elmer LS50B) 通过荧光偏振测定结合活性。可以使用例如 Graphpad Prism 软件 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA) 通过非线性回归分析来确定 K_d 值。在某些情况下,本发明的拟肽大环化合物显示出与相应的非交联多肽类类似的或更低的 K_d 。

用于表征肽-蛋白质相互作用的拮抗剂的体外置换试验

[0155] 为了评价拮抗肽与受体蛋白质之间相互作用的化合物的结合和亲和力,例如,使用来源于拟肽前体序列的荧光标记的拟肽大环化合物的荧光偏振试验 (FPA)。FPA 技术使用偏振光和荧光示踪剂测量分子取向和分子迁移率。当用偏振光激发时,由于附着在具有高表观分子量的分子(例如,与大蛋白质结合的 FITC 标记的肽)上的荧光示踪剂(例如, FITC)与附着在较小分子(例如,在溶液中游离的 FITC 标记的肽)上的荧光示踪剂相比具有较低的旋转速度,附着在具有高表观分子量的分子上的荧光示踪剂发射较高水平的偏振荧光。拮抗荧光标记的拟肽大环化合物与受体蛋白质之间相互作用的化合物将在竞争性结合 FPA 实验中进行检测。

[0156] 例如,推定的拮抗剂化合物 (1nM 至 1mM) 和荧光标记的拟肽大环化合物 (25nM) 与受体蛋白质 (50nM) 一起在结合缓冲液 (140mM NaCl、50mM Tris-HCL, pH7.4) 中在室温下温育 30 分钟。例如,用发光分光光度计(例如, Perkin-Elmer LS50B) 通过荧光偏振测定拮抗剂的结合活性。可以使用例如 Graphpad Prism 软件 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA) 通过非线性回归分析来确定 K_d 值。

[0157] 任一类分子,如有机小分子、肽、寡核苷酸或蛋白质,可以在该试验中作为推定的拮抗剂进行检测。

通过亲和选择-质谱法对蛋白质-配体结合的分析

[0158] 为了评估测试化合物对蛋白质的结合和亲和力,例如采用亲和选择-质谱分析试验。按照以下对全系统对照实验概述的代表性程序,使用 $1\ \mu\text{M}$ 拟肽大环化合物加 $5\ \mu\text{M}$ 靶蛋白进行蛋白质-配体结合实验。将 $40\ \mu\text{M}$ 拟肽大环化合物储备溶液的 $1\ \mu\text{L}$ DMSO 等份溶解在 $19\ \mu\text{L}$ PBS (磷酸盐缓冲盐水:含有 150mM NaCl 的 50mM, pH7.5 磷酸盐缓冲液) 中。得到的溶液通过反复吸液进行混合并通过在 $10000g$ 下离心 10 分钟进行澄清。向 $4\ \mu\text{L}$ 等份得到的上清液中加入 $4\ \mu\text{L}$ $10\ \mu\text{M}$ 靶蛋白的 PBS 溶液。每个 $8.0\ \mu\text{L}$ 实验样品因此含有在 PBS 中的浓度为 $5.0\ \mu\text{M}$ 的 40pmol ($1.5\ \mu\text{g}$) 蛋白质,加 $1\ \mu\text{M}$ 拟肽大环化合物和 2.5% DMSO。针对

每个浓度点如此制备的双份样品在室温下温育 60 分钟,然后冷却至 4℃,之后进行 5.0 μL 注入液的大小排阻层析-LC-MS 分析。将含有靶蛋白、蛋白质-配体复合体和未结合的化合物的样品注入到 SEC 柱上,通过快速 SEC 步骤将复合体与未结合的成分在该柱上分离。采用 UV 检测器监测 SEC 柱洗脱液,以证实在 SEC 柱的外水体积中洗脱的早期洗脱的蛋白质级分从保留在柱上的未结合的成分中良好地分离出来。在含有蛋白质和蛋白质-配体复合体的峰从主 UV 检测器洗脱后,它进入样品环路,在其中从 SEC 阶段的流上截下,并通过阀门机构直接转移到 LC-MS。通过 ESI-MS 以预期的 m/z 观察拟肽大环化合物的 $(M+3H)^{3+}$ 离子,证实检测到蛋白质-配体复合体。

用于蛋白质-配体 K_d 滴定实验的分析

[0159] 为了评估测试化合物对蛋白质的结合和亲和力,例如,进行蛋白质-配体 K_d 滴定实验。蛋白质-配体 K_d 滴定实验如下进行:制备连续稀释的滴定剂拟肽大环化合物储备溶液 (5, 2.5, ..., 0.098mM) 的 2 μL DMSO 等份,然后溶解在 38 μL PBS 中。得到的溶液通过反复吸液进行混合并通过在 10000g 下离心 10 分钟进行澄清。向 4.0 μL 等份得到的上清液中加入 4.0 μL 10 μM 靶蛋白的 PBS 溶液。每个 8.0 μL 实验样品因此含有在 PBS 中的浓度为 5.0 μM 的 40pmol (1.5 μg) 蛋白质,不同浓度 (125, 62.5, ..., 0.24 μM) 的滴定肽和 2.5% DMSO。针对每个浓度点如此制备的双份样品在室温下温育 30 分钟,然后冷却至 4℃,之后进行 2.0 μL 注入液的 SEC-LC-MS 分析。通过 ESI-MS 观察 $(M+H)^{1+}$ 、 $(M+2H)^{2+}$ 、 $(M+3H)^{3+}$ 和 / 或 $(M+Na)^{1+}$ 离子;对提取的离子色谱图进行定量,然后与方程拟合,以推导出结合亲和力 K_d ,如以下文献所述:“A General Technique to Rank Protein-Ligand Binding Affinities and Determine Allosteric vs. Direct Binding Site Competition in Compound Mixtures.” Annis, D. A. ;Nazef, N. ;Chuang, C. C. ;Scott, M. P. ;Nash, H. M. J. Am. Chem. Soc. 2004, 126, 15495-15503,以及“ALIS:An Affinity Selection-Mass Spectrometry System for the Discovery and Characterization of Protein-Ligand Interactions”D. A. Annis, C.-C. Chuang, and N. Nazef. In Mass Spectrometry in Medicinal Chemistry. Wanner K, Höfner G:Wiley-VCH 编著;2007:121-184. Mannhold R, Kubinyi H, Folkers G (系列编者):Methods and Principles in Medicinal Chemistry。

通过亲和选择-质谱法进行竞争性结合实验的分析

[0160] 为了确定测试化合物竞争性结合蛋白质的能力,例如,进行亲和选择-质谱分析试验。通过将三种化合物中每一种的 2 μL 等份 400 μM 储备液与 14 μL DMSO 混合制备每种成分 40 μM 的配体混合物。然后,将 1 μL 等份的该每种成分 40 μM 的混合物与滴定剂拟肽大环化合物连续稀释储备溶液 (10, 5, 2.5, ..., 0.078mM) 的 1 μL DMSO 等份混合。将这些 2 μL 样品溶解在 38 μL PBS 中。得到的溶液通过反复吸液进行混合并通过在 10000g 下离心 10 分钟进行澄清。向 4.0 μL 等份得到的上清液中加入 4.0 μL 10 μM 靶蛋白的 PBS 溶液。每个 8.0 μL 实验样品因此含有在 PBS 中的浓度为 5.0 μM 的 40pmol (1.5 μg) 蛋白质,加 0.5 μM 配体、2.5% DMSO 和不同浓度 (125, 62.5, ..., 0.98 μM) 的滴定剂拟肽大环化合物。针对每个浓度点如此制备的双份样品在室温下温育 60 分钟,然后冷却至 4℃,之后进行 2.0 μL 注入液的 SEC-LC-MS 分析。这些和其它方法的另外的细节在以下文献中提供:“A General Technique to Rank Protein-Ligand Binding Affinities and Determine Allosteric vs. Direct Binding Site Competition in Compound Mixtures.” Annis, D. A. ;

Nazef, N. ;Chuang, C. C. ;Scott, M. P. ;Nash, H. M. J. Am. Chem. Soc. 2004, 126, 15495-15503 ;
以及“ALIS:An Affinity Selection-Mass Spectrometry System for the Discovery and
Characterization of Protein-Ligand Interactions”D. A. Annis, C. -C. Chuang, and
N. Nazef. In Mass Spectrometry in Medicinal Chemistry. Wanner K, **Höfner** G:Wiley-VCH
编 著 ;2007:121-184. Mannhold R, Kubinyi H, Folkers G(系 列 编 者):Methods and
Principles in Medicinal Chemistry。

在完整细胞中的结合分析

[0161] 有可能通过免疫沉淀实验测定肽或拟肽大环化合物与其天然受体在完整细胞中的结合。例如,完整的细胞与荧光标记的(FITC- 标记的)化合物在无血清的情况下温育4小时,接着进行血清置换并进一步温育4-18小时。然后使细胞沉淀,并在4℃下在裂解缓冲液(50mM Tris[pH7.6]、150mM NaCl、1%的CHAPS和蛋白酶抑制剂混合物)中温育10分钟。以14,000rpm离心提取物15分钟,收集上清液,并与10μl山羊抗-FITC抗体一起温育2小时,在4℃下旋转,接着进一步在4℃下与蛋白A/G Sepharose(50μl的50%微珠浆)温育2小时。快速离心之后,将沉淀物在含有渐增的盐浓度(例如,150、300、500mM)的裂解缓冲液中洗涤。随后以150mM NaCl再平衡微珠,之后加入含有SDS的样品缓冲液并煮沸。离心之后,任选地使用4%-12%梯度的Bis-Tris凝胶对上清液进行电泳,接着转移到Immobilon-P膜上。封闭后,任选地将印迹与检测FITC的抗体一起温育,也与一种或多种检测与拟肽大环化合物结合的蛋白质的抗体一起温育。

细胞渗透性分析

[0162] 为了测量拟肽大环化合物和相应的非交联大环化合物的细胞渗透性,将完整的细胞与荧光标记的拟肽大环化合物或相应的非交联大环化合物(10μM)一起在不含血清的培养基中37℃温育4小时,用培养基洗涤2次,并与胰蛋白酶(0.25%)在37℃下温育10分钟。再次洗涤细胞并将其重悬浮于PBS中。例如,通过使用FACSCalibur流式细胞仪或Cellomics' **KineticScan**® HCS读数仪分析细胞荧光。

体内稳定性分析

[0163] 为了研究拟肽大环化合物的体内稳定性,例如,向小鼠和/或大鼠通过静脉内、腹膜内、口服或吸入途径以0.1-50mg/kg的浓度施用化合物,并在注射后0'、5'、15'、30'、1小时、4小时、8小时和24小时抽取血样。然后如上所述通过LC-MS/MS测定25μL新鲜血清中的完整化合物的水平。

临床试验

[0164] 为了确定本发明的拟肽大环化合物对于人类治疗的适用性,进行了临床试验。例如,选择出被诊断为患有肌肉萎缩病或脂质营养不良并且需要治疗的患者并将他们分成治疗组和一个或多个对照组,其中,对治疗组施用本发明的拟肽大环化合物,而对照组接受安慰剂或已知的GHRH或GH药物。这样,可以通过对患者组就诸如生存率和生活质量的因素进行比较来评价本发明的拟肽大环化合物的治疗安全性和有效性。在本实施例中,相比于用安慰剂治疗的患者对照组,用拟肽大环化合物治疗的患者组显示出提高的长期生存率。

药物组合物和给药途径

[0165] 本发明的拟肽大环化合物也包括其药学上可接受的衍生物或前药。“药学上可接

受的衍生物”意指本发明的化合物的任何药学上可接受的盐、酯、酯的盐、前药或其它衍生物,其在向接受者施用后能够(直接或间接地)提供本发明的化合物。尤其有利的药学上可接受的衍生物是当向哺乳动物施用时可以提高本发明的化合物的生物利用度(例如,通过提高口服施用的化合物进入血液的吸收),或相对于母体物质增加活性化合物向生物区室(例如,脑或淋巴系统)的递送的那些衍生物。一些药学上可接受的衍生物包含提高水溶性或跨过胃肠粘膜的主动转运的化学基团。

[0166] 在一些实施方案中,本发明的拟肽大环化合物通过共价或非共价地连接的合适的官能团进行修饰,以提高选择性的生物学性质。这样的修饰包括那些提高进入给定生物区室(例如,血液、淋巴系统、中枢神经系统)的生物学渗透性、提高口服利用度、增加溶解性以允许注射施用、改变代谢以及改变排泄率的修饰。

[0167] 本发明的化合物的药学上可接受的盐包括那些由药学上可接受的无机和有机的酸和碱衍生的盐。合适的酸式盐的例子包括乙酸盐、己二酸盐、苯甲酸盐、苯磺酸盐、丁酸盐、柠檬酸盐、二葡萄糖酸盐、十二烷基硫酸盐、甲酸盐、延胡索酸盐、乙醇酸盐、半硫酸盐、庚酸盐、己酸盐、盐酸盐、氢溴酸盐、氢碘酸盐、乳酸盐、马来酸盐、丙二酸盐、甲磺酸盐、2-萘磺酸盐、烟酸盐、硝酸盐、棕榈酸盐(palmoate)、磷酸盐、苦味酸盐、新戊酸盐、丙酸盐、水杨酸盐、琥珀酸盐、硫酸盐、酒石酸盐、甲苯磺酸盐和十一酸盐(undecanoate)。由合适的碱衍生的盐包括碱金属盐(例如,钠盐)、碱土金属盐(例如,镁盐)、铵盐和N-(烷基)₄⁺盐。

[0168] 为了由本发明的化合物制备药物组合物,药学上可接受的载体包括固体或液体载体。固体形式的制剂包括粉剂、片剂、丸剂、胶囊剂、扁囊剂、栓剂和分散颗粒剂。固体载体可以是一种或多种物质,其也可以作为稀释剂、调味剂、粘合剂、防腐剂、片剂崩解剂或包封材料发挥作用。在科学文献和专利文献中详细描述了配制和给药技术的细节,参见,例如,最新版本 of Remington's Pharmaceutical Sciences, Maack Publishing Co, Easton PA。

[0169] 在粉剂中,载体是细碎的固体,其与细碎的活性成分混合。在片剂中,活性成分与具有必要粘合性质的载体按照适当的比例混合,并压制成需要的形状和大小。

[0170] 合适的固体赋形剂是碳水化合物或蛋白质填料,包括但不限于:糖,包括乳糖、蔗糖、甘露醇或山梨醇;来自玉米、小麦、水稻、马铃薯或其它植物的淀粉;纤维素,如甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素或羧甲基纤维素钠;和树胶,包括阿拉伯树胶和黄蓍胶;以及蛋白质,如明胶和胶原蛋白。如果需要的话,加入崩解剂或增溶剂,如交联的聚乙烯吡咯烷酮、琼脂、海藻酸或其盐如海藻酸钠。

[0171] 液体形式的制剂包括溶液、悬浮液和乳液,例如,水或水/丙二醇溶液。对于肠胃外注射,液体制剂可以在聚乙二醇水溶液中配制成溶液。

[0172] 药物制剂优选为单位剂型。在这样的形式中,制剂细分为含有适量活性成分的单位剂量。单位剂型可以是包装制剂,该包装包含不连续量的制剂,如包装的片剂、胶囊和小瓶或安瓿中的粉末。另外,单位剂型也可以是胶囊、片剂、扁囊剂或锭剂本身,或者可以是包装形式的适当数目的这些剂型中的任一种。

[0173] 当本发明的组合物包含拟肽大环化合物和一种或多种另外的治疗剂或预防剂的组合时,该化合物和另外的药剂都应该以通常在单一治疗方案中施用的剂量的大约1-100%的剂量水平,更优选大约5-95%的剂量水平存在。在一些实施方案中,另外的药剂作为多剂量方案的一部分与本发明的化合物分开施用。或者,这些药剂是单一剂型的一部

分,在单一组合物中与本发明的化合物混合在一起。

[0174] 在一些实施方案中,该组合物以单位剂型存在,该单位剂型可递送例如约 0.0001mg 至约 1,000mg 的拟肽大环化合物、其盐、其前药、其衍生物或这些的任意组合。因此,在一些实施方案中,该单位剂型可以递送例如约 1mg 至约 900mg、约 1mg 至约 800mg、约 1mg 至约 700mg、约 1mg 至约 600mg、约 1mg 至约 500mg、约 1mg 至约 400mg、约 1mg 至约 300mg、约 1mg 至约 200mg、约 1mg 至约 100mg、约 1mg 至约 10mg、约 1mg 至约 5mg、约 0.1mg 至约 10mg、约 0.1mg 至约 5mg、约 10mg 至约 1,000mg、约 50mg 至约 1,000mg、约 100mg 至约 1,000mg、约 200mg 至约 1,000mg、约 300mg 至约 1,000mg、约 400mg 至约 1,000mg、约 500mg 至约 1,000mg、约 600mg 至约 1,000mg、约 700mg 至约 1,000mg、约 800mg 至约 1,000mg、约 900mg 至约 1,000mg、约 10mg 至约 900mg、约 100mg 至约 800mg、约 200mg 至约 700mg 或约 300mg 至约 600mg 的拟肽大环化合物、其盐、其前药、其衍生物或这些的任意组合。

[0175] 在一些实施方案中,该组合物以单位剂型存在,该单位剂型可递送例如约 1mg、约 2mg、约 3mg、约 4mg、约 5mg、约 6mg、约 7mg、约 8mg、约 9mg、约 10mg、约 20mg、约 30mg、约 40mg、约 50mg、约 60mg、约 70mg、约 80mg、约 90mg、约 100mg、约 150mg、约 200mg、约 250mg、约 300mg、约 350mg、约 400mg、约 500mg、约 600mg、约 700mg、约 800mg 或约 800mg 的拟肽大环化合物、其盐、其前药、其衍生物或这些的任意组合。

[0176] 合适的给药途径包括但不限于口服、静脉内、经直肠、气雾剂、肠胃外、经眼、经肺、经粘膜、经皮、经阴道、经耳、经鼻和局部给药。此外,仅举例来说,肠胃外递送包括肌肉内、皮下、静脉内、髓内注射,以及鞘内、直接心室内、腹膜内、淋巴管内和鼻内注射。

[0177] 在某些实施方案中,本文所描述的组合物以局部而不是全身的方式施用,例如,通过将化合物直接注入器官中。在具体的实施方案中,通过(例如皮下或肌肉内)植入或通过肌肉注射来施用长效制剂。此外,在其它实施方案中,药物在靶向药物递送系统中递送,例如,在包被有器官特异性抗体的脂质体中。在此类实施方案中,脂质体靶向器官,并被器官选择性地吸收。在再一些其它实施方案中,本文所描述的化合物以快速释放制剂的形式提供,以延长释放制剂的形式提供,或以直接释放制剂的形式提供。在再一些其它实施方案中,局部施用本文所描述的化合物。

[0178] 在另一个实施方案中,本文所描述的组合物被配制成为口服给药。本文所描述的组合物通过将拟肽大环化合物与例如药学上可接受的载体或赋形剂结合而配制。在各种实施方案中,本文所描述的化合物被配制成为口服剂型,其包括,仅举例来说,片剂、粉剂、丸剂、锭剂、胶囊剂、液体剂、凝胶剂、糖浆剂、酏剂、浆剂、悬浮剂等。

[0179] 在某些实施方案中,用于口服的药物制品通过以下步骤获得:将一种或多种固体赋形剂与一种或多种本文描述的拟肽大环化合物混合,任选地研磨所得混合物,并在加入合适的助剂(如果需要的话)后加工该颗粒混合物,从而得到片剂或锭剂芯。合适的赋形剂为,特别是,填料,如糖,包括乳糖、蔗糖、甘露醇或山梨醇;纤维素制品,如:例如,玉米淀粉、小麦淀粉、米淀粉、马铃薯淀粉、明胶、黄蓍胶、甲基纤维素、微晶纤维素、羟丙甲基纤维素、羧甲基纤维素钠;或其它,如:聚乙烯吡咯烷酮(PVP 或聚维酮)或磷酸钙。在具体的实施方案中,任选加入崩解剂。崩解剂包括,仅举例来说,交联羧甲基纤维素钠、聚乙烯吡咯烷酮、琼脂或海藻酸或其盐如海藻酸钠。

[0180] 在一个实施方案中,诸如锭剂芯和片剂的剂型具有一层或多层合适的包衣。在具

体的实施方案中,浓缩的糖溶液用于包覆剂型。该糖溶液任选地含有其它组分,仅举例来说,例如阿拉伯胶、滑石、聚乙烯吡咯烷酮、卡波姆凝胶、聚乙二醇,和 / 或二氧化钛、漆溶液和合适的有机溶剂或溶剂混合物。出于辨识目的,还任选地将染料和 / 或色素加入包衣中。此外,任选地利用染料和 / 或色素来表征活性化合物剂量的不同组合。

[0181] 在某些实施方案中,将治疗有效量的至少一种本文描述的拟肽大环化合物配制成其它口服剂型。口服剂型包括由明胶制成的推入配合式胶囊,以及由明胶和诸如甘油或山梨醇的塑化剂制成的软密封胶囊。在具体的实施方案中,推入配合式胶囊含有与一种或多种填料混合的活性成分。填料包括,仅举例来说,乳糖,粘合剂如淀粉,和 / 或润滑剂如滑石或硬脂酸镁,以及任选的稳定剂。在其它实施方案中,软胶囊含有溶解或悬浮在合适的液体中的一种或多种活性化合物。合适的液体包括,仅举例来说,一种或多种脂肪油、液体石蜡或液体聚乙二醇。此外,任选地加入稳定剂。

[0182] 在其它实施方案中,将治疗有效量的至少一种本文描述的拟肽大环化合物配制成用于颊部或舌下给药。适合于颊部或舌下给药的制剂包括,仅以举例来说,片剂、锭剂或凝胶。在又一些其它实施方案中,将本文描述的拟肽大环化合物配制成用于肠胃外注射,包括适合于快速浓注或连续输注的制剂。在具体的实施方案中,用于注射的制剂以单位剂型(例如,在安瓿中)或在多剂量容器中提供。注射制剂中任选地加入防腐剂。在又一些其它实施方案中,将药物组合物配制成适用于肠胃外注射的形式,作为在油性或水性载体中的无菌悬浮液、溶液或乳液。肠胃外注射制剂任选地含有配制剂,诸如悬浮剂、稳定剂和 / 或分散剂。在具体的实施方案中,用于肠胃外给药的药物制剂包括水溶形式的活性化合物的水溶液。在另外的实施方案中,将活性化合物的悬浮液制备成合适的油性注射悬浮液。在本文描述的药物组合物中所用的合适的亲脂性溶剂或载体包括,仅举例来说,脂肪油,如芝麻油,或合成的脂肪酸酯,如油酸乙酯或甘油三脂,或脂质体。在某些具体的实施方案中,水性注射悬浮液含有增加悬浮液粘度的物质,如羧甲基纤维素钠、山梨糖醇或葡聚糖。任选地,悬浮液含有合适的稳定剂或增加化合物的溶解度、从而允许制备高度浓缩的溶液的试剂。或者,在其它实施方案中,活性成分以粉末形式存在,以供在使用前用合适的载体例如灭菌无热原水重建。

[0183] 本文的药物组合物可以例如每天施用一次或两次或三次或四次或五次或六次,或者每周施用一次或两次或三次或四次或五次或六次,并且可以施用例例如一天、一周、一个月、3个月、六个月、一年、五年或例如十年。

使用方法

[0184] 在一个方面,本发明提供了新的拟肽大环化合物,其可在竞争性结合试验中用于鉴别可与拟肽大环化合物所模拟的蛋白质或肽的天然配体相结合的物质。例如,在 GHRH 系统中,基于 GHRH 的标记的拟肽大环化合物可以与竞争性结合 GHRH 受体的小分子一起在结合试验中使用。竞争结合研究允许在体外快速评价并确定对于 GHRH 系统特异性的候选药物。可以使用本文公开的任何拟肽大环化合物及其结合配偶体进行这类结合研究。

[0185] 本发明进一步提供了抗拟肽大环化合物的抗体的生成。在一些实施方案中,这些抗体特异性地结合拟肽大环化合物和拟肽大环化合物相关的前体肽,如 GHRH。例如,这样的抗体破坏天然的蛋白质-蛋白质相互作用,例如 GHRH 与 GHRH 受体之间的相互作用。

[0186] 另一方面,本发明提供了激活 GHRH 受体、从而刺激生长激素的生成和释放的方

法,该生长激素转而可增加瘦肌质量或减少脂肪组织,例如内脏和 / 或腹部脂肪组织。在一些实施方案中,使用本发明的药物组合物治疗患有肥胖症例如腹部肥胖症的受试者。参见例如 Makimura 等人, J. Clin. Endocrinol. Metab. 2009, 94(12):5131-5138, 其特此通过引用而并入。

[0187] 在再一个方面,本发明提供了用于治疗包括食欲缺乏、恶病质(如癌症恶病质、慢性心力衰竭恶病质、慢性阻塞性肺疾病恶病质、类风湿性关节炎恶病质)和少肌症在内的肌肉萎缩病的方法,用于治疗包括 HIV 脂质营养不良在内的脂质营养不良的方法,用于治疗包括成人和儿童生长激素缺乏在内的生长激素紊乱的方法,或用于治疗胃轻瘫或短肠综合征的方法。这些方法包括向包括人类在内的温血动物施用有效量的本发明的化合物。在一些实施方案中,本文提供的用于肌肉萎缩病治疗的药物组合物以不超过每天一次的频率、不超过隔天一次的频率、不超过每周两次的频率、不超过每周一次的频率或不超过隔周一次的频率施用。

[0188] 在一些实施方案中,本文提供了用于治疗成人生长激素缺乏的方法。此类缺乏可能是由例如垂体或下丘脑受损或受伤导致的。经常地,成人发作型生长激素缺乏是由垂体肿瘤或对此类肿瘤的治疗(例如通过颅脑照射)引起的。成人生长激素缺乏还可由垂体血液供应减少引起。在一些实施方案中,本文提供的用于成人生长激素缺乏治疗的药物组合物以不超过每天一次的频率、不超过隔天一次的频率、不超过每周两次的频率、不超过每周一次的频率或不超过隔周一次的频率施用。

[0189] 在一些实施方案中,本文提供了用于治疗儿童生长激素缺乏的方法。儿童中的生长激素缺乏通常是特发性的。然而,可能的原因包括基因(包括 GHRHR 或 GH1) 突变、涉及垂体的先天畸形(如透明隔-视神经发育不良或垂体后叶异位)、慢性肾病、颅内肿瘤(例如位于或接近蝶鞍,如颅咽管瘤)、(针对诸如白血病或脑瘤的癌症的)颅脑放射治疗引起的垂体损伤、手术、创伤或颅内疾病(例如脑积水)、自身免疫性炎症(垂体炎)、低血压引起的缺血性或出血性梗塞形成(席汉综合征)或出血性垂体卒中。在先天性疾病如普拉德-威利综合征、特纳综合征或身材矮小同源框基因(SHOX) 缺乏、特发性身材矮小症或小于胎龄儿中观察到生长激素缺乏。在一些实施方案中,用于治疗儿童生长激素缺乏的本发明组合物以不超过每天一次的频率、不超过隔天一次的频率、不超过每周两次的频率、不超过每周一次的频率或不超过隔周一次的频率施用。

[0190] 如本文所用的,术语“治疗”被定义为向患者应用或施用治疗剂,或者向从患者分离的组织或细胞系应用或施用治疗剂,所述患者患有疾病、疾病症状或具有患病倾向,其目的是治愈、恢复、减轻、解除、改变、矫正、缓解、改善或影响疾病、疾病症状或患病倾向。

[0191] 在一些实施方案中,本发明提供了如以下各项所述的拟肽大环化合物和使用方法。

项目 1. 一种拟肽大环化合物,其包含与选自表 1、2 或 4 中氨基酸序列的氨基酸序列至少约 60% 相同的氨基酸序列。

项目 2. 如项目 1 所述的拟肽大环化合物,其中所述拟肽大环化合物的氨基酸序列与选自表 1、2 或 4 中氨基酸序列的氨基酸序列至少约 80% 相同。

项目 3. 如项目 1 所述的拟肽大环化合物,其中所述拟肽大环化合物的氨基酸序列与选自表 1、2 或 4 中氨基酸序列的氨基酸序列至少约 90% 相同。

项目 4. 如项目 1 所述的拟肽大环化合物, 其中所述拟肽大环化合物的氨基酸序列选自表 1、2 或 4 中的氨基酸序列。

项目 5. 如项目 1 所述的拟肽大环化合物, 其中该拟肽大环化合物包含螺旋。

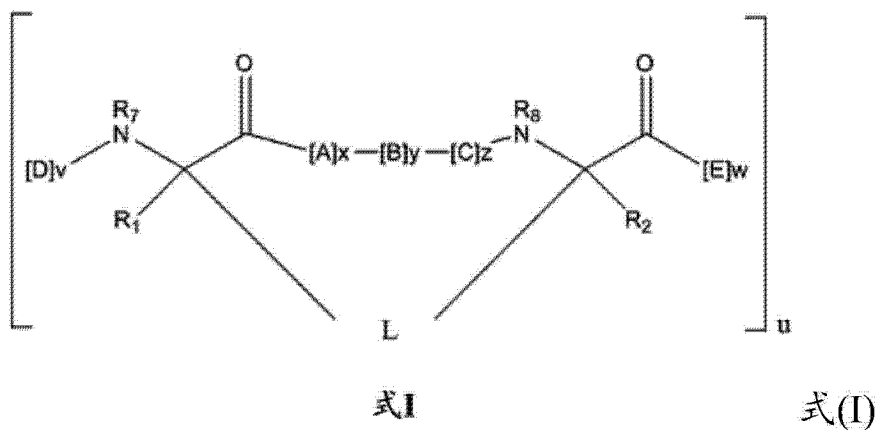
项目 6. 如项目 1 所述的拟肽大环化合物, 其中该拟肽大环化合物包含 α -螺旋。

项目 7. 如项目 1 所述的拟肽大环化合物, 其中该拟肽大环化合物包含 α , α -二取代的氨基酸。

项目 8. 如项目 1 所述的拟肽大环化合物, 其中该拟肽大环化合物包含连接至少两个氨基酸的 α -位点的交联体。

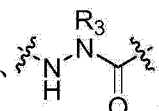
项目 9. 如项目 8 所述的拟肽大环化合物, 其中所述两个氨基酸中的至少一个为 α , α -二取代的氨基酸。

项目 10. 如项目 8 所述的拟肽大环化合物, 其中该拟肽大环化合物具有下式:



其中:

A、C、D 和 E 各自独立地为天然或非天然氨基酸;

B 为天然或非天然氨基酸、氨基酸类似物、 $[-NH-L_3-CO-]$ 、 $[-NH-L_3-SO_2-]$ 或 $[-NH-L_3-]$;

R_1 和 R_2 独立地为 -H、烷基、烯基、炔基、芳基烷基、环烷基、环烷基烷基、杂烷基或杂环烷基, 它们是未取代的或被卤素 - 取代的;

R_3 为氢、烷基、烯基、炔基、芳基烷基、杂烷基、环烷基、杂环烷基、环烷基烷基、环芳基或杂环芳基, 它们任选地被 R_5 取代;

L 为式 $-L_1-L_2-$ 的大环形成连接体;

L_1 和 L_2 独立地为亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚杂烷基、亚环烷基、亚杂环烷基、亚环芳基、亚杂环芳基或 $[-R_4-K-R_4-]_n$, 它们各自任选地被 R_5 取代;

各个 R_4 为亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚杂烷基、亚环烷基、亚杂环烷基、亚芳基或亚杂芳基;

各个 K 为 O、S、SO、SO₂、CO、CO₂ 或 CONR₃;

各个 R_5 独立地为卤素、烷基、-OR₆、-N(R₆)₂、-SR₆、-SOR₆、-SO₂R₆、-CO₂R₆、荧光部分、放射性同位素或治疗剂;

各个 R_6 独立地为 -H、烷基、烯基、炔基、芳基烷基、环烷基烷基、杂环烷基、荧光部分、放

放射性同位素或治疗剂；

R_7 为 -H、烷基、烯基、炔基、芳基烷基、环烷基、杂烷基、环烷基烷基、杂环烷基、环芳基或杂环芳基，它们任选地被 R_5 取代，或是与 D 残基形成的环状结构的一部分；

R_8 为 -H、烷基、烯基、炔基、芳基烷基、环烷基、杂烷基、环烷基烷基、杂环烷基、环芳基或杂环芳基，它们任选地被 R_5 取代，或是与 E 残基形成的环状结构的一部分；

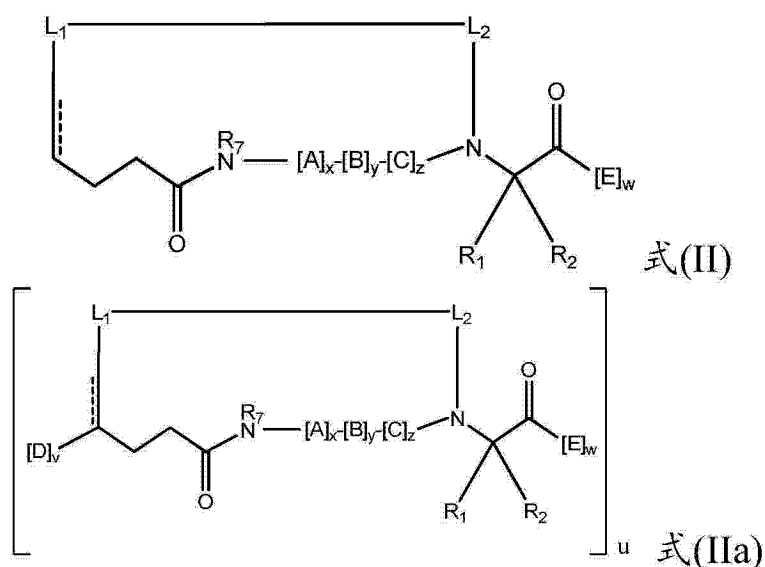
v 和 w 独立地为 1-1000 的整数；

u、x、y 和 z 独立地为 0-10 的整数；且

n 为 1-5 的整数。

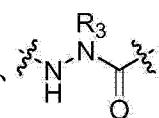
项目 11. 如项目 1 所述的拟肽大环化合物，其中该拟肽大环化合物包含将该拟肽大环化合物内的第一氨基酸的骨架氨基连接至第二氨基酸的交联体。

项目 12. 如项目 11 所述的拟肽大环化合物，其中该拟肽大环化合物具有式 (II) 或 (IIa)：



其中：

A、C、D 和 E 各自独立地为天然或非天然氨基酸；

B 为天然或非天然氨基酸、氨基酸类似物、 $[-NH-L_3-CO-]$ 、 $[-NH-L_3-SO_2-]$ 或

$[-NH-L_3-]$ ；

R_1 和 R_2 独立地为 -H、烷基、烯基、炔基、芳基烷基、环烷基、环烷基烷基、杂烷基或杂环烷基，它们是未取代的或被卤素 - 取代的，或是与 E 残基形成的环状结构的一部分；

R_3 为氢、烷基、烯基、炔基、芳基烷基、杂烷基、环烷基、杂环烷基、环烷基烷基、环芳基或杂环芳基，它们任选地被 R_5 取代；

L_1 和 L_2 独立地为亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚杂烷基、亚环烷基、亚杂环烷基、亚环芳基、亚杂环芳基或 $[-R_4-K-R_4-]_n$ ，它们各自任选地被 R_5 取代；

各个 R_4 为亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚杂烷基、亚环烷基、亚杂环烷基、亚芳基或亚杂芳基；

各个 K 为 O、S、SO、SO₂、CO、CO₂ 或 CONR₃；

各个 R_5 独立地为卤素、烷基、 $-OR_6$ 、 $-N(R_6)_2$ 、 $-SR_6$ 、 $-SOR_6$ 、 $-SO_2R_6$ 、 $-CO_2R_6$ 、荧光部分、放射性同位素或治疗剂；

各个 R_6 独立地为 $-H$ 、烷基、烯基、炔基、芳基烷基、环烷基烷基、杂环烷基、荧光部分、放射性同位素或治疗剂；

R_7 为 $-H$ 、烷基、烯基、炔基、芳基烷基、环烷基、杂烷基、环烷基烷基、杂环烷基、环芳基或杂环芳基，它们任选地被 R_5 取代；

v 和 w 独立地为 1-1000 的整数；

u 、 x 、 y 和 z 独立地为 0-10 的整数；且

n 为 1-5 的整数。

项目 13. 一种提高受试者中的生长激素 (GH) 循环水平的方法，其包括向受试者施用如项目 1 所述的拟肽大环化合物。

项目 14. 一种增加受试者中的瘦肌质量的方法，其包括向受试者施用如项目 1 所述的拟肽大环化合物。

项目 15. 一种减少受试者中的脂肪组织的方法，其包括向受试者施用如项目 1 所述的拟肽大环化合物。

项目 16. 一种治疗受试者中的肌肉萎缩病的方法，该肌肉萎缩病包括食欲缺乏、恶病质（如癌症恶病质、慢性心力衰竭恶病质、慢性阻塞性肺疾病恶病质、类风湿性关节炎恶病质）或少肌症，该方法包括向受试者施用如项目 1 所述的拟肽大环化合物。

项目 17. 一种治疗受试者中的脂质营养不良的方法，该脂质营养不良包括 HIV 脂质营养不良，该方法包括向受试者施用如项目 1 所述的拟肽大环化合物。

项目 18. 一种治疗受试者中的生长激素紊乱的方法，该生长激素紊乱包括成人生长激素缺乏和儿童生长激素缺乏，该方法包括向受试者施用如项目 1 所述的拟肽大环化合物。

项目 19. 一种治疗受试者中的胃轻瘫或短肠综合征的方法，其包括向受试者施用如项目 1 所述的拟肽大环化合物。

项目 20. 一种通过施用 GHRH 受体的激动剂来治疗受试者中的肌肉萎缩病、脂质营养不良、生长激素紊乱或胃轻瘫 / 短肠综合征的方法，其中该激动剂以不超过每天一次的频率、不超过隔天一次的频率、不超过每周两次的频率、不超过每周一次的频率或不超过隔周一次的频率施用。

项目 21. 一种通过施用 GHRH 类似物来治疗受试者中的肌肉萎缩病、脂质营养不良、生长激素紊乱或胃轻瘫 / 短肠综合征的方法，其中该 GHRH 类似物以不超过每天一次的频率、不超过隔天一次的频率、不超过每周两次的频率、不超过每周一次的频率或不超过隔周一次的频率施用。

项目 22. 一种通过施用 GHRH 受体的激动剂来提高受试者中的生长激素 (GH) 循环水平的方法，其中该激动剂以不超过每天一次的频率、不超过隔天一次的频率、不超过每周两次的频率、不超过每周一次的频率或不超过隔周一次的频率施用。

项目 23. 一种通过施用 GHRH 类似物来提高受试者中生长激素 (GH) 循环水平的方法，其中该 GHRH 类似物以不超过每天一次的频率、不超过隔天一次的频率、不超过每周两次的频率、不超过每周一次的频率或不超过隔周一次的频率施用。

项目 24. 如项目 10 所述的拟肽大环化合物，其中 L_1 和 L_2 独立地为亚烷基、亚烯基或亚

炔基。

项目 25. 如项目 24 所述的拟肽大环化合物, 其中 L_1 和 L_2 独立地为 C_3 - C_{10} 亚烷基或亚烯基。

项目 26. 如项目 24 所述的拟肽大环化合物, 其中 L_1 和 L_2 独立地为 C_3 - C_6 亚烷基或亚烯基。

项目 27. 如项目 10 所述的拟肽大环化合物, 其中 R_1 和 R_2 为 H。

项目 28. 如项目 10 所述的拟肽大环化合物, 其中 R_1 和 R_2 独立地为烷基。

项目 29. 如项目 10 所述的拟肽大环化合物, 其中 R_1 和 R_2 为甲基。

[0192] 虽然本文已显示和描述了本发明的优选实施方案, 但是对于本领域的技术人员显而易见的是, 这些实施方案只是以举例的方式提供的。在不背离本发明的情况下, 本领域技术人员将会想到许多变化、改变和替换。应当理解, 在实施本发明时, 可以采用本文所述的本发明的实施方案的各种替代方案。旨在用下列权利要求限定本发明的范围, 并且这些权利要求范围内的方法和结构及其等效物也涵盖在本发明内。

实施例

实施例 1: 本发明的拟肽大环化合物

[0193] 如以前所述以及如下所述合成、纯化和分析拟肽大环化合物 (Schafmeister 等人, J. Am. Chem. Soc. 122:5891-5892 (2000); Schafmeister 和 Verdine, J. Am. Chem. Soc. 122:5891 (2005); Walensky 等人, Science 305:1466-1470 (2004); 和美国专利号 7,192,713)。通过用相对应的合成氨基酸替代两个或多个天然存在的氨基酸来设计拟肽大环化合物。替代发生在 i 和 $i+4$ 以及 i 和 $i+7$ 位。使用固相条件、rink amide AM 树脂 (Novabiochem) 和 Fmoc 主链保护基团化学方法人工地或在自动化肽合成仪 (Applied Biosystems, 433A 型) 上进行肽合成。对于天然 Fmoc 保护的氨基酸 (Novabiochem) 的偶联, 使用 10 当量的氨基酸和 1:1:2 摩尔比的偶联试剂 HBTU/HOBt (Novabiochem)/DIEA。非天然氨基酸 (4 当量) 与 1:1:2 摩尔比的 HATU (Applied Biosystems)/HOBt/DIEA 偶联。合成肽的 N 末端被乙酰化, 而 C 末端被酰胺化。

[0194] 通过高效液相色谱法 (HPLC) (Varian ProStar) 在反相 C18 柱 (Varian) 上完成交联化合物的纯化, 从而获得纯化合物。通过 LC/MS 质谱法 (与 Agilent 1100HPLC 系统接口连接的 Micromass LCT) 和氨基酸分析 (Applied Biosystems, 420A 型) 确认纯产物的化学组成。

[0195] 表 4 显示了制备的本发明拟肽大环化合物的列表。

表 4

SP#	序列																													烯炔异构体	准确质量	计算值 (M+3)/3	观测值 (M+3)/3				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29								
SP-1	H	Y	a	D	\$	I	F	T	\$	S	Y	R	K	V	L	G	Q	L	S	A	R	\$	L	L	Q	\$	I	N	I	S	R	-NH2	3410	1137.67	1137.42		
SP-2	H	Y	a	D	\$	I	F	T	\$	S	Y	R	K	V	L	G	Q	L	S	A	R	K	L	L	Q	\$	I	N	I	S	R	-NH2	3381.99	1128.34	1127.8		
SP-3	H	Y	a	D	\$	I	F	T	\$	S	Y	R	K	V	L	G	Q	L	S	A	R	\$	L	L	Q	\$	I	N	I	S	R	-NH2	3410	1137.67	1137.05		
SP-4	H	Y	a	D	\$	I	F	T	\$	S	Y	R	K	V	L	G	Q	L	S	A	R	K	L	L	Q	\$	I	N	I	S	R	-NH2	3381.99	1128.34	1127.8		
SP-5	H	Y	a	D	\$	I	F	T	\$	S	Y	R	K	V	L	G	Q	L	S	A	R	K	L	L	Q	\$	I	N	I	S	R	-NH2	3396.01	1133.01	1132.86		
SP-6	H	Y	a	D	\$	I	F	T	\$	S	Y	R	K	V	L	G	Q	L	S	A	R	K	\$	L	L	Q	D	I	N	I	S	R	-NH2	3525.06	1176.03	1175.76	
SP-7	H	Y	a	D	\$	I	F	T	\$	S	Y	R	K	V	L	G	Q	L	S	A	R	K	L	L	Q	\$	I	N	I	S	R	-NH2	3493.11	1165.38	1165.02		
SP-8	H	Y	a	D	\$	I	F	T	\$	S	Y	R	K	V	L	G	Q	L	S	A	R	\$	L	L	Q	\$	I	N	I	S	R	-NH2	3480.04	1161.02	1160.66		
SP-9	H	Y	a	D	\$	I	F	T	\$	S	Y	R	K	V	L	G	Q	L	S	A	R	K	\$	L	L	Q	D	I	N	I	S	R	-NH2	3425.98	1143	1142.53	
SP-10	H	Y	a	D	\$	I	F	T	\$	S	Y	R	K	V	L	G	Q	L	S	A	R	K	\$	L	L	Q	D	I	N	I	S	R	-NH2	iso2	3425.98	1143	1142.6
SP-11	H	Y	a	D	A	I	F	T	\$	S	Y	R	\$	V	L	G	Q	L	S	A	R	\$	L	L	Q	\$	I	N	I	S	R	-NH2	3352.94	1118.65	1118.25		
SP-12	H	Y	a	D	A	I	F	T	\$	S	Y	R	\$	V	L	G	Q	L	S	A	R	K	L	L	Q	\$	I	N	I	S	R	-NH2	3324.93	1109.32	1108.93		
SP-13	H	Y	a	D	A	I	F	T	\$	S	Y	R	\$	V	L	G	Q	L	S	A	R	K	L	L	Q	\$	I	N	I	S	R	-NH2	3436.05	1146.36	1146.15		
SP-14	H	Y	a	D	A	I	F	T	\$	S	Y	R	\$	V	L	G	Q	L	S	A	R	K	L	L	Q	\$	I	N	I	S	R	-NH2	iso2	3436.05	1146.36	1146.08	
SP-15	H	Y	a	D	A	I	F	T	\$	S	Y	R	\$	V	L	G	Q	L	S	A	R	\$	L	L	Q	D	I	N	I	S	R	-NH2	3422.98	1142	1141.94		
SP-16	H	Y	a	D	A	I	F	T	\$	S	Y	R	\$	V	L	G	Q	L	S	A	R	\$	L	L	Q	D	I	N	I	S	R	-NH2	iso2	3422.98	1142	1141.79	
SP-17	H	Y	a	D	A	I	F	T	\$	S	Y	R	\$	V	L	G	Q	L	S	A	R	K	\$	L	L	Q	D	I	N	I	S	R	-NH2	3368.92	1123.98	1123.66	
SP-18	H	Y	a	D	A	I	F	T	\$	S	Y	R	\$	V	L	G	Q	L	S	A	R	K	\$	L	L	Q	D	I	N	I	S	R	-NH2	iso2	3368.92	1123.98	1123.73
SP-19	H	Y	a	D	A	I	F	T	\$	S	Y	R	\$	V	L	G	Q	L	S	A	R	\$	L	L	Q	\$	I	N	I	S	R	-NH2	3338.92	1113.98	1113.37		
SP-20	H	Y	a	D	A	I	F	T	\$	S	Y	R	\$	V	L	G	Q	L	S	A	R	K	L	L	Q	\$	I	N	I	S	R	-NH2	3310.92	1104.65	1104.34		
SP-21	H	Y	a	D	A	I	F	T	\$	S	Y	R	\$	V	L	G	Q	L	S	A	R	\$	L	L	Q	\$	I	N	I	S	R	-NH2	3395.95	1132.99	1133.64		
SP-22	H	Y	a	D	A	I	F	T	\$	S	Y	R	\$	V	L	G	Q	L	S	A	R	K	L	L	Q	\$	I	N	I	S	R	-NH2	3367.94	1123.65	1123.36		
SP-23	H	Y	a	D	A	I	F	T	\$	S	Y	R	K	V	L	G	Q	L	S	A	R	\$	L	L	Q	\$	I	N	I	S	R	-NH2	3466.06	1156.36	1156.14		
SP-24	H	Y	a	D	A	I	F	T	\$	S	Y	R	K	V	L	G	Q	L	S	A	R	K	L	L	Q	\$	I	N	I	S	R	-NH2	3438.05	1147.02	1146.75		
SP-25	H	Y	a	D	A	I	F	T	\$	S	Y	R	K	V	L	G	Q	L	S	A	R	K	L	L	Q	\$	I	N	I	S	R	-NH2	3394.03	1132.35	1132.02		
SP-26	H	Y	a	D	A	I	F	T	\$	S	Y	R	K	V	L	G	Q	L	S	A	R	K	L	L	Q	\$	I	N	I	S	R	-NH2	iso2	3394.03	1132.35	1132.09	
SP-27	H	Y	a	D	A	I	F	T	\$	S	Y	R	K	V	L	G	Q	L	S	A	R	\$	L	L	Q	\$	I	N	I	S	R	-NH2	3422.03	1141.68	1141.42		
SP-28	H	Y	a	D	A	I	F	T	\$	S	Y	R	K	V	L	G	Q	L	S	A	R	\$	L	L	Q	\$	I	N	I	S	R	-NH2	iso2	3422.03	1141.68	1141.42	
SP-29	H	Y	a	D	A	I	F	T	\$	S	Y	R	K	V	L	G	Q	L	S	A	R	K	L	L	Q	D	I	N	I	S	R	-NH2	3414.99	1139.34	1139.05		
SP-30	H	Y	a	D	A	I	F	T	\$	S	Y	R	K	V	L	G	Q	L	S	A	R	K	L	L	Q	D	I	N	I	S	R	-NH2	iso2	3414.99	1139.34	1139.05	
SP-31	H	Y	a	D	A	I	F	T	\$	S	Y	R	\$	V	L	G	Q	L	S	A	R	K	L	L	Q	D	I	N	I	S	R	-NH2	3430.95	1144.66	1144.45		
SP-32	H	Y	a	D	A	I	F	T	\$	S	Y	R	\$	V	L	G	Q	L	S	A	R	K	L	L	Q	D	I	N	I	S	R	-NH2	iso2	3430.95	1144.66	1145.3	
SP-33	H	Y	a	D	A	I	F	T	\$	S	Y	R	\$	V	L	G	Q	L	S	A	R	K	L	L	Q	\$	I	N	I	S	R	-NH2	3409.99	1137.67	1137.42		
SP-34	H	Y	a	D	\$	I	F	T	\$	S	Y	R	A	V	L	G	Q	L	S	A	R	\$	L	L	Q	\$	I	N	I	S	R	-NH2	3324.93	1109.32	1110.29		
SP-35	H	Y	a	D	\$	I	F	T	\$	S	Y	R	A	V	L	G	Q	L	S	A	R	\$	L	L	Q	\$	I	N	I	S	R	-NH2	3352.94	1118.65	1119.73		
SP-36	H	Y	a	D	\$	I	F	T	\$	S	Y	R	K	V	L	G	Q	L	S	A	R	\$	L	L	Q	\$	I	N	I	S	R	-NH2	3324.93	1109.32	1110.2		
SP-37	H	Y	a	D	\$	I	F	T	\$	S	Y	R	A	V	L	G	Q	L	S	A	R	\$	L	L	Q	\$	I	N	I	S	R	-NH2	3267.88	1090.3	1091.14		
SP-38	H	Y	a	D	\$	I	F	T	\$	S	Y	R	K	V	L	G	Q	L	S	A	R	\$	L	L	Q	\$	I	N	I	S	R	-NH2	3381.96	1128.33	1129.16		
SP-39	H	Y	a	D	\$	I	F	T	\$	S	Y	R	K	V	L	G	Q	L	S	A	R	\$	L	L	Q	\$	I	N	I	S	R	-NH2	3409.96	1137.66	1138.5		
SP-40	H	Y	a	D	\$	I	F	T	\$	S	Y	R	K	V	L	G	Q	L	S	A	R	\$	L	L	Q	\$	I	N	I	S	R	-NH2	3381.96	1128.33	1129.16		
SP-41	H	Y	a	D	\$	I	F	T	\$	S	Y	R	K	V	L	G	Q	L	S	A	R	\$	L	L	Q	\$	I	N	I	S	R	-NH2	3381.96	1128.33	1129.16		
SP-42	H	Y	a	D	\$	I	F	T	\$	S	Y	R	K	V	L	G	Q	L	S	A	R	\$	L	L	Q	\$	I	N	I	S	R	-NH2	3381.97	1128.33	1129.16		
SP-43	H	Y	a	D	\$	I	F	T	\$	S	Y	R	K	V	L	G	Q	L	S	A	R	\$	L	L	Q	\$	I	N	I	S	R	-NH2	3253.9	1085.64	1086.52		

SP-44	H	Y	a	D	%	I	F	T	%	S	Y	R	K	V	L	G	Q	L	S	A	R	%	L	L	Q	%	I	Nle	S	R	-NH2
SP-45	H	Y	a	D	\$5a5	I	F	T	\$5n3	S	Y	R	K	V	L	G	Q	L	S	A	R	\$5a5	L	L	Q	\$5n3	I	Nle	S	R	-NH2
SP-46	H	Y	a	D	\$5n3	I	F	T	\$5a5	S	Y	R	K	V	L	G	Q	L	S	A	R	\$5n3	L	L	Q	\$5a5	I	Nle	S	R	-NH2
SP-47	H	Y	a	D	\$5a5	I	F	T	\$5n3	S	Y	R	K	V	L	G	Q	L	S	A	R	\$5n3	L	L	Q	\$5a5	I	Nle	S	R	-NH2
SP-48	H	Y	a	D	\$5n3	I	F	T	\$5a5	S	Y	R	K	V	L	G	Q	L	S	A	R	\$5a5	L	L	Q	\$5n3	I	Nle	S	R	-NH2
SP-49	H	Y	a	D	A	I	F	T	N	S	Y	R	\$4m6	V	L	G	Q	L	S	\$4a5	R	K	L	L	Q	D	I	Nle	S	R	-NH2

准确 计算值 观测值
质量 (M+3)/3 (M+3)/3

		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30						
SP-50	H-	Y	a	D	A	I	F	T	N	S	Y	Q	\$	\$	R	V	L	G	Q	L	S	\$	\$	R	K	L	L	Q	N	I	N	I	S	R	-NH2	3401.92	1134.98	1135.64
SP-51	H-	Y	a	D	A	I	F	T	N	S	Y	R	\$	\$	R	V	L	G	Q	L	S	\$	\$	Q	K	L	L	Q	N	I	N	I	S	R	-NH2	3401.92	1134.98	1135.73
SP-52	H-	Y	a	D	A	I	F	T	N	S	Y	R	\$	\$	R	V	L	G	Q	L	S	\$	\$	R	K	L	L	Q	N	I	N	I	S	R	-NH2	3429.93	1144.32	1145.07
SP-53	H-	Y	a	D	A	I	F	T	N	S	Y	R	\$	\$	R	V	L	G	Q	L	S	\$	\$	R	K	L	L	Q	N	I	N	I	S	Q	-NH2	3401.92	1134.98	1136.19
SP-54	H-	Y	a	D	A	I	F	T	N	S	Y	R	\$	\$	R	V	L	G	Q	L	S	\$	\$	R	K	L	L	Q	N	I	N	I	S	R	-NH2	3273.86	1092.29	1093.18
SP-55	H-	Y	a	D	A	I	F	T	A	S	Y	Q	\$	\$	R	V	L	G	Q	L	S	\$	\$	R	K	L	L	Q	N	I	N	I	S	R	-NH2	3358.91	1120.64	1121.76
SP-56	H-	Y	a	D	A	I	F	T	A	S	Y	R	\$	\$	R	V	L	G	Q	L	S	\$	\$	Q	K	L	L	Q	N	I	N	I	S	R	-NH2	3358.91	1120.64	1121.76
SP-57	H-	Y	a	D	A	I	F	T	A	S	Y	R	\$	\$	R	V	L	G	Q	L	S	\$	\$	R	Q	L	L	Q	N	I	N	I	S	R	-NH2	3386.92	1129.98	1131.1
SP-58	H-	Y	a	D	A	I	F	T	A	S	Y	R	\$	\$	R	V	L	G	Q	L	S	\$	\$	R	K	L	L	Q	N	I	N	I	S	Q	-NH2	3358.91	1120.64	1121.76
SP-59	H-	Y	a	D	A	I	F	T	A	S	Y	R	\$	\$	R	V	L	G	Q	L	S	\$	\$	R	K	L	L	Q	N	I	N	I	S	R	-NH2	3230.86	1077.96	1079.12
SP-60	H-	Y	a	D	A	I	F	T	A	S	Y	R	\$	\$	R	V	L	G	Q	L	S	\$	\$	R	Q	L	L	Q	N	I	N	I	S	R	-NH2	3230.82	1077.95	1079.02
SP-61	H-	Y	a	D	A	I	F	T	A	S	Y	R	\$	\$	R	V	L	G	Q	L	S	\$	\$	R	K	L	L	Q	N	I	N	I	S	R	-NH2	3386.96	1129.99	1130.83
SP-62	H-	Y	a	D	A	I	F	T	A	S	Y	R	\$	\$	R	V	L	A	Q	L	S	\$	\$	R	K	A	L	Q	N	I	N	I	S	R	-NH2	3358.93	1120.65	1121.48
SP-63	H-	Y	a	D	\$	I	F	T	\$	S	Y	R	K	V	L	G	Q	L	S	A	R	\$	\$	L	L	Q	\$	I	N	I	S	R	-OH	3410.98	1138	1138.08		
SP-64	H-	Y	a	D	\$	I	F	T	\$	S	Y	R	K	V	L	G	E	L	S	A	R	\$	\$	L	L	E	\$	I	N	I	S	R	-OH	3412.95	1138.66	1138.73		
SP-65	H-	Y	a	D	\$	I	F	T	\$	S	Y	R	K	V	L	G	E	L	S	A	R	\$	\$	L	L	Q	\$	I	N	I	S	R	-OH	3411.97	1138.33	1138.45		
SP-66	H-	Y	a	D	\$	I	F	T	\$	S	Y	R	K	V	L	G	Q	L	S	A	R	\$	\$	L	L	E	\$	I	N	I	S	R	-OH	3411.97	1138.33	1138.36		

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	
SP-67	H-	Y	a	D	\$	I	F	T	\$	S	Y	R	K	V	L	A	Q	L	S	A	R	\$	L	L	Q	\$	I	Nle	S	R	-NH2
SP-68	H-	Y	a	D	\$	I	F	T	\$	S	Y	R	A	V	L	A	Q	L	S	A	R	\$	L	L	Q	\$	I	Nle	S	R	-NH2
SP-69	H-	Y	a	D	\$	I	F	T	\$	S	Y	R	K	V	L	A	Q	L	S	A	A	\$	L	L	Q	\$	I	Nle	S	R	-NH2
SP-70	H-	Y	a	D	\$	I	F	T	\$	S	Y	R	K	V	L	A	Q	L	S	A	R	\$	L	L	Q	\$	I	Nle	S	A	-NH2
SP-71	H-	Y	a	D	A	I	F	T	D	S	Y	R	\$r8	V	L	G	E	L	S	\$	R	K	L	L	E	D	I	Nle	S	R	-NH2
SP-72	H-	Y	a	D	A	I	F	T	D	S	Y	R	\$r8	V	L	G	Q	L	S	\$	R	K	L	L	Q	D	I	Nle	S	R	-NH2
SP-73	H-	Y	a	D	A	I	F	T	N	S	Y	R	\$r8	V	L	G	E	L	S	\$	R	K	L	L	Q	D	I	Nle	S	R	-NH2
SP-74	H-	Y	a	D	A	I	F	T	N	S	Y	R	\$r8	V	L	G	Q	L	S	\$	R	K	L	L	E	D	I	Nle	S	R	-NH2
SP-75	H-	Y	a	D	A	I	F	T	D	S	Y	R	\$r8	V	L	G	E	L	S	\$	R	K	L	L	Q	D	I	Nle	S	R	-NH2
SP-76	H-	Y	a	D	A	I	F	T	N	S	Y	R	\$r8	V	L	G	E	L	S	\$	R	K	L	L	E	D	I	Nle	S	R	-NH2
SP-77	H-	Y	a	D	A	I	F	T	D	S	Y	R	\$r8	V	L	G	Q	L	S	\$	R	K	L	L	E	D	I	Nle	S	R	-NH2
SP-78	H-	Y	a	D	\$	I	F	T	\$	S	Y	R	K	V	L	G	E	L	S	A	R	\$	L	L	E	\$	I	Nle	S	R	-NH2
SP-79	H-	Y	a	D	\$	I	F	T	\$	S	Y	R	K	V	L	G	E	L	S	A	R	\$	L	L	Q	\$	I	Nle	S	R	-NH2
SP-80	H-	Y	a	D	\$	I	F	T	\$	S	Y	R	K	V	L	G	Q	L	S	A	R	\$	L	L	E	\$	I	Nle	S	R	-NH2
SP-81	H-	Y	a	D	A	I	F	T	N	S	Y	Q	\$r8	V	L	G	Q	L	S	\$	R	K	L	L	Q	N	I	Nle	S	R	-NH2
SP-82	H-	Y	a	D	A	I	F	T	N	S	Y	R	\$r8	V	L	G	Q	L	S	\$	Q	K	L	L	Q	N	I	Nle	S	R	-NH2
SP-83	H-	Y	a	D	A	I	F	T	N	S	Y	R	%r8	V	L	G	Q	L	S	%	R	K	L	L	Q	D	I	Nle	S	R	-NH2
SP-84	H-	Y	a	D	\$	I	F	T	\$	S	Y	R	K	V	L	G	Q	L	S	A	R	\$	L	L	Q	\$	I	Nle	S	R	-NH2
SP-85	HBS-	Y	A	Aar	A	I	F	T	N	S	Y	R	K	V	L	G	Q	L	S	A	R	\$	L	L	Q	\$	I	Nle	S	R	-NH2
SP-86	HBS-	Y	A	Dar	A	I	F	T	N	S	Y	R	K	V	L	G	Q	L	S	A	R	\$	L	L	Q	\$	I	Nle	S	R	-NH2
SP-87	HBS-	Y	A	Gar	A	I	F	T	N	S	Y	R	K	V	L	G	Q	L	S	A	R	K	L	L	Q	D	I	Nle	S	R	-NH2
SP-88	HBS-	Y	A	Gar	A	I	F	T	N	S	Y	R	K	V	L	G	Q	L	S	A	R	\$	L	L	Q	\$	I	Nle	S	R	-NH2
SP-89	H-	Y	a	D	\$5a5	I	F	T	\$5n3	S	Y	R	K	V	L	G	Q	L	S	A	R	\$5n3	L	L	Q	\$5a5	I	Nle	S	R	-NH2
SP-90	H-	Y	a	D	\$5n3	I	F	T	\$5a5	S	Y	R	K	V	L	G	Q	L	S	A	R	\$5a5	L	L	Q	\$5n3	I	Nle	S	R	-NH2
SP-91	HBS-	Y	A	Dar	A	I	F	T	N	S	Y	R	K	V	L	G	Q	L	S	A	R	K	L	L	Q	D	I	Nle	S	R	-NH2
SP-92	teHBS-	Y	A	teGar	A	I	F	T	N	S	Y	R	K	V	L	G	Q	L	S	A	R	K	L	L	Q	D	I	Nle	S	R	-NH2

[0196] 在上文和别处显示的序列中,使用了以下缩写:由“\$”表示的氨基酸是通过包含一个双键的全碳 i 至 i+4 交联体连接的 α -Me S5-戊烯基-丙氨酸烯炔氨基酸。“%”是通过不含双键的全碳 i 至 i+4 交联体(完全饱和的烯炔交联体)连接的 α -Me S5-戊烯基-丙氨酸烯炔氨基酸。由“\$r8”表示的氨基酸是通过包含一个双键的全碳 i 至 i+7 交联体连接的 α -Me R8-辛烯基-丙氨酸烯炔氨基酸。由“% r8”表示的氨基酸是通过不含双键的全碳 i 至 i+7 交联体(完全饱和的烯炔交联体)连接的 α -Me R8-辛烯基-丙氨酸烯炔氨基酸。标号“iso1”或“iso2”表明该拟肽大环化合物为单一的异构体。标有下标“a”的氨基酸表示 D-丙氨酸。

[0197] 用于形成三唑交联体的氨基酸根据如下所示的图例表示。除非另有指明,各个氨基酸在 α 位点上的立体化学为 S。对于叠氮氨基酸,所示碳原子的数目是指 α 碳与末端叠氮之间的亚甲基单位的数目。对于炔炔氨基酸,所示碳原子的数目是 α 位点与三唑部分之间的亚甲基单位的数目加上来源于炔炔的三唑基团内的两个碳原子。

\$5a5 α -Me 炔炔 1,5 三唑 (5 碳)

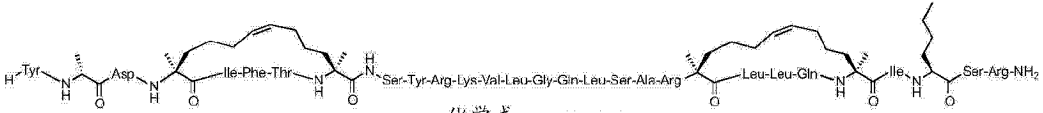
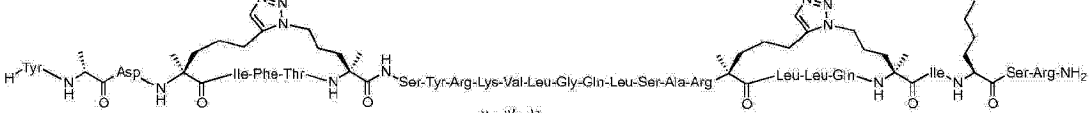
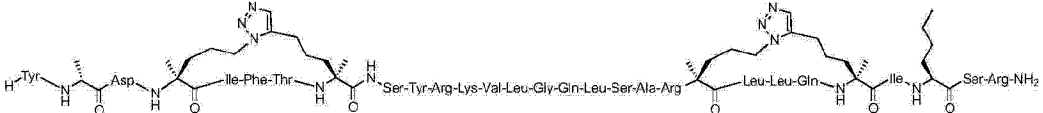
\$5n3 α -Me 叠氮 1,5 三唑 (3 碳)

\$4rn6 α -Me R-叠氮 1,4 三唑 (6 碳)

\$4a5 α -Me 炔炔 1,4 三唑 (5 碳)

[0198] 几种拟肽大环化合物的示例性结构在表 5 中示出。

表 5

SP#	结构
SP-1	 化学式: $C_{181}H_{264}N_{42}O_{39}$ 准确质量: 3410.00 分子量: 3412.08
SP-45	 化学式: $C_{181}H_{268}N_{42}O_{38}$ 准确质量: 3414.03 分子量: 3416.11
SP-46	 化学式: $C_{181}H_{262}N_{48}O_{38}$ 准确质量: 3492.00 分子量: 3494.10
SP-47	 化学式: $C_{181}H_{262}N_{48}O_{39}$ 准确质量: 3492.00 分子量: 3494.10

实施例 2: 被纯化蛋白酶的代谢

[0199] 通过将每种肽以 $10\ \mu\text{M}$ 浓度溶解在 $200\ \mu\text{L}$ 100mM NH_4OAc ($\text{pH} 7.5$) 中, 来检测线性肽和交联拟肽大环化合物对胰蛋白酶 (MPBiomedicals, Solon OH) 蛋白水解的稳定性。通过加入 $3.5\ \mu\text{L}$ 胰蛋白酶 (每 $500\ \mu\text{L}$ 反应 $12.5\ \mu\text{g}$ 蛋白酶) 启动反应, 并且在室温 ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) 下温育的同时在密封小瓶中连续震摇。酶/底物比为 $1:102$ (w/w)。在 $0, 5, 30, 60$ 和 135min 的温育时间之后, 通过加入等体积的 0.2% 三氟乙酸终止反应。然后, 立即通过 LC-MS 在正检测模式下分析该溶液。通过未定标的 MS 响应与酶温育时间的非线性拟合来在 GraphPad Prism 中计算每种肽的反应半衰期。结果在图 1A 和 1B 中示出。

实施例 3: 通过 cAMP 测定的 GHRHR 激动

[0200] 检测 GHRH(1-29) 和交联拟肽大环化合物在不同浓度下在人 GHRH 受体 (hGHRHR) 处的激动。用维尔烯 (Lifetechnologies) 使瞬时或稳定表达 hGHRHR 的人 293 细胞从细胞培养瓶中脱离, 悬浮于无血清培养基中 (50000 个细胞 / 试验点), 并于室温下用 GHRH(1-29) (Bachem) 或交联拟肽大环化合物刺激 30min 。采用基于 HTRF® 的试验 (CisBio) 根据制造商说明书来对 cAMP 进行定量。通过响应与剂量的非线性拟合 (GraphPad Prism) 计算每种激动剂的 $\text{EC}_{50}\%$ 。最大响应通过用 $10\ \mu\text{M}$ MGHRH(1-29) 刺激来确定。结果在图 3 中示出。

实施例 4: 大鼠中的血浆 PK/PD 研究。

[0201] 对五种本发明的拟肽大环化合物 (SP-1、SP-6、SP-8、SP-21、SP-32) 以及舍莫瑞林进行研究, 以确定大鼠中的药代动力学和药效学参数。使用雄性 Sprague-Dawley 大鼠 (300g , 不禁食, 插管)。该研究具有三个组: 静脉内给药、皮下给药和皮下给药 (载体对照)。对于使用舍莫瑞林的实验, 采用 3mg/kg 静脉内 / 皮下快速浓注的剂量水平 (剂量体

积为 3mL/kg 剂量,剂量浓度为 1mg/mL)。使用的载体为:注射用水中的 10wt% N, N- 二甲基乙酰胺、10wt% DMSO、2wt% Solutol HS15,该注射用水中含有 45mg/mL (4.5wt%) 甘露醇和 25mM (0.38wt%) 组氨酸 (pH7.5 ;320mOsm/kg)。肽首先以高浓度溶解在 DMA 和 DMSO 中,然后在 Solutol 载体中第二次稀释。

[0202] 对于使用拟肽大环化合物的实验,用 0.1mL 的 DMA 和 0.1mL 的 DMSO 来与每毫克大环化合物(各个实验中使用~ 4.3-4.5mg 的大环化合物)组合。利用超声处理以确保完全溶解。DMA/DMSO 中每毫克大环化合物使用 0.8mL Solutol 载体。通过吸液或轻轻涡旋来轻柔混合溶液。给药的每一天都使用新的小瓶,并且大环化合物在配制之前于 -20℃ 以固体贮存。

[0203] 对于各研究组,在特定的时间点 (5min、15min、30min、1h、2h、4h、8h、24h 和 48h) 对 2 只大鼠进行放血 (350 μ L),并且就在给药之前进行 150 μ L 的放血。采集后最多 30 分钟内,通过在 4℃ 以 2000G 离心 20 分钟将血浆制备到 K2EDTA 管中。从每 350 μ L 血中转移 120 μ L 到一个试管中用于 PK 研究,转移 50 μ L 到另一个试管中用于 PD 研究,并且立刻冷冻。从 150 μ L 血中转移 70 μ L 到一个试管中用于 PD 研究,并且立刻冷冻。

[0204] 结果在图 4-11 中示出。

胰蛋白酶稳定性

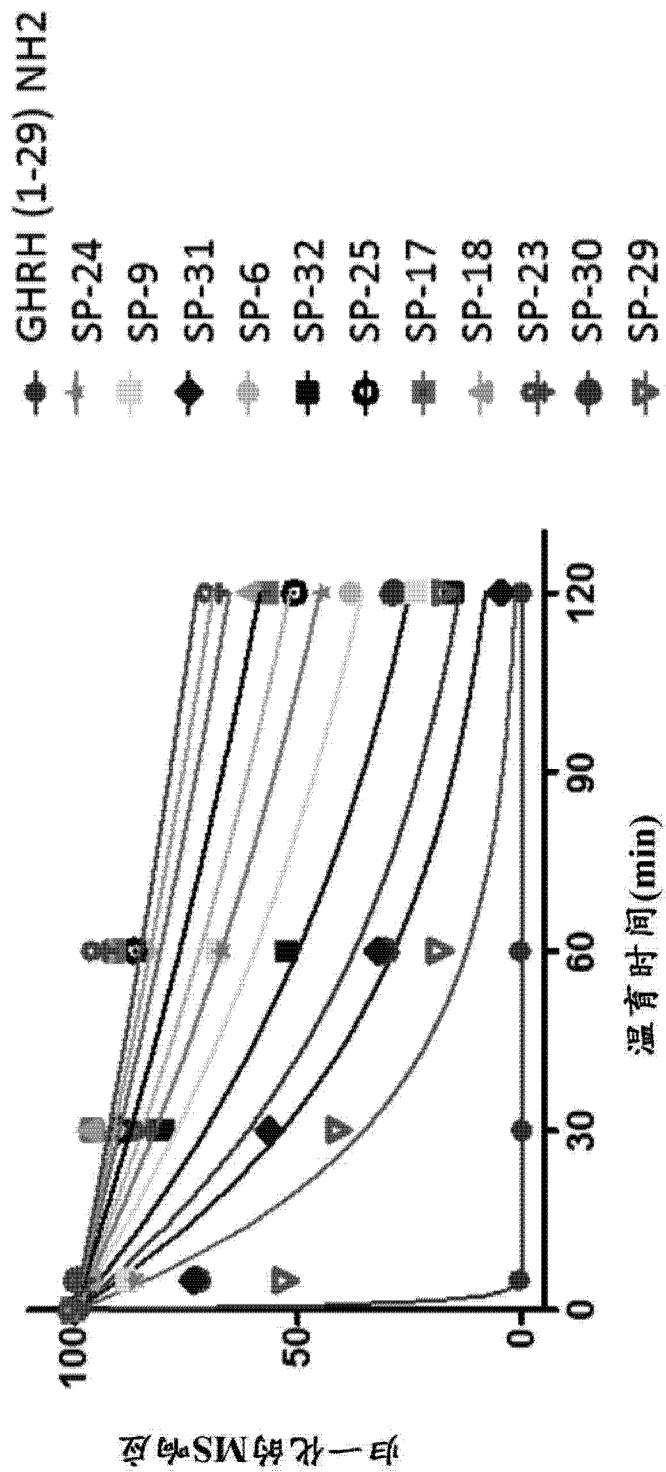


图 1a

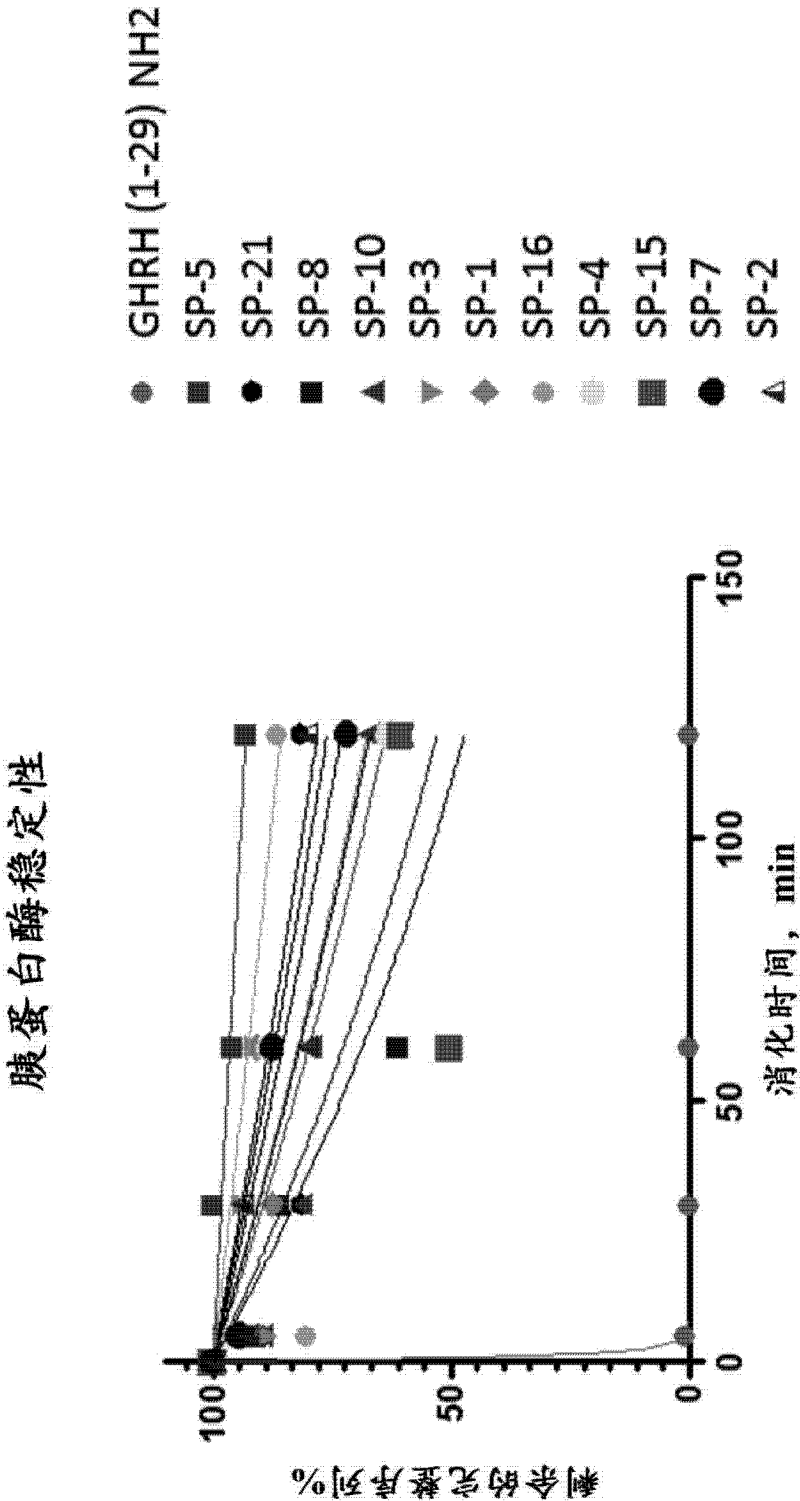


图 1b

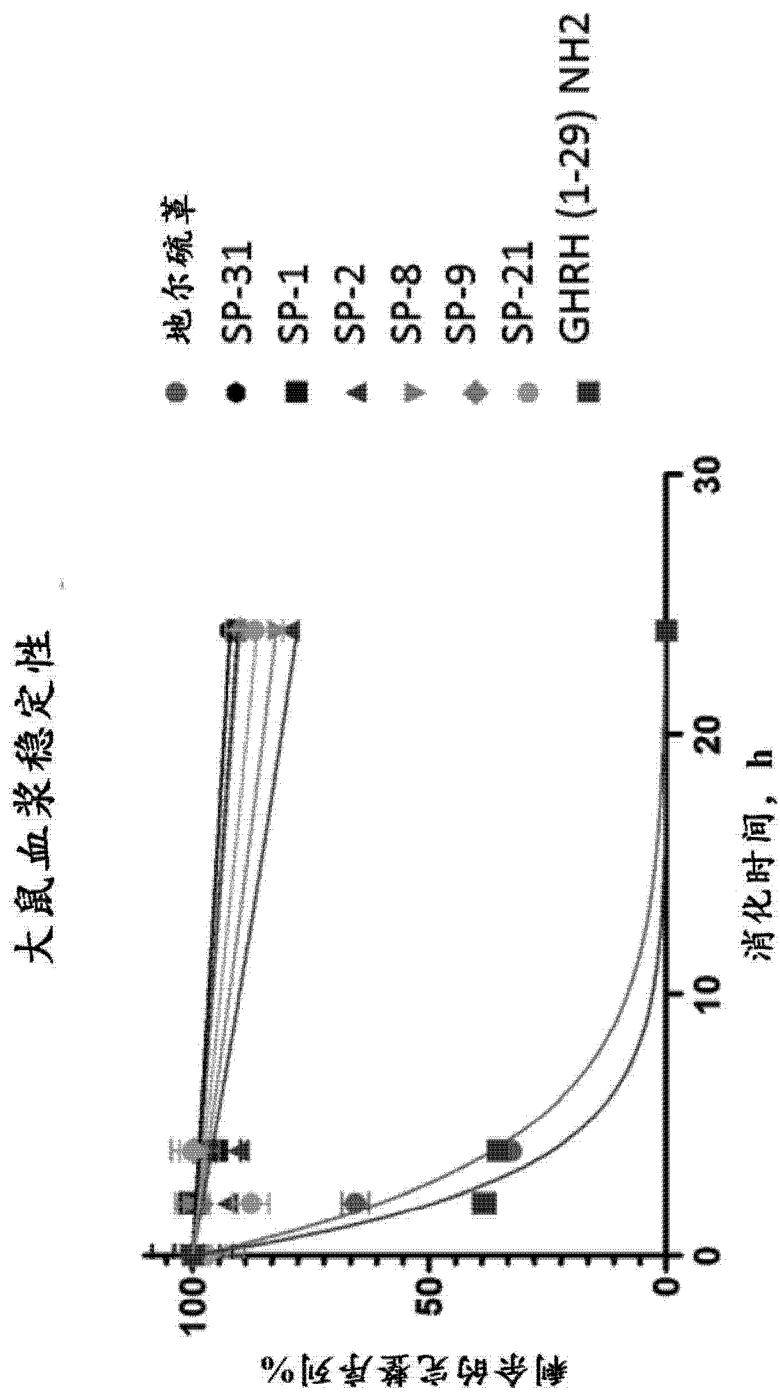


图 2

图 3

SP#	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	GHRH CAMP	EC50
SP-44	H-	Y	a	D	I	F	T	%	S	Y	R	K	V	L	G	Q	L	S	A	R	%	L	L	Q	%	I	Nle	S	R	-NH2	+++
SP-45	H-	Y	a	D	I	F	T	\$5a5	S	Y	R	K	V	L	G	Q	L	S	A	R	\$5a5	L	L	Q	\$5a5	I	Nle	S	R	-NH2	+++
SP-46	H-	Y	a	D	I	F	T	\$5a5	S	Y	R	K	V	L	G	Q	L	S	A	R	\$5a5	L	L	Q	\$5a5	I	Nle	S	R	-NH2	+++
SP-47	H-	Y	a	D	I	F	T	\$5a5	S	Y	R	K	V	L	G	Q	L	S	A	R	\$5a5	L	L	Q	\$5a5	I	Nle	S	R	-NH2	+++
SP-48	H-	Y	a	D	I	F	T	\$5a5	S	Y	R	K	V	L	G	Q	L	S	A	R	\$5a5	L	L	Q	\$5a5	I	Nle	S	R	-NH2	+++
SP-49	H-	Y	a	D	I	F	T	N	S	Y	R	\$4m6	V	L	G	Q	L	S	\$4a5	R	K	L	L	Q	D	I	Nle	S	R	-NH2	+++

替莫瑞林

替莫瑞林

图 3a

S-D大鼠中SP-1的血浆药代动力学，
3.0 mg/kg (5 mL/kg)的单一剂量

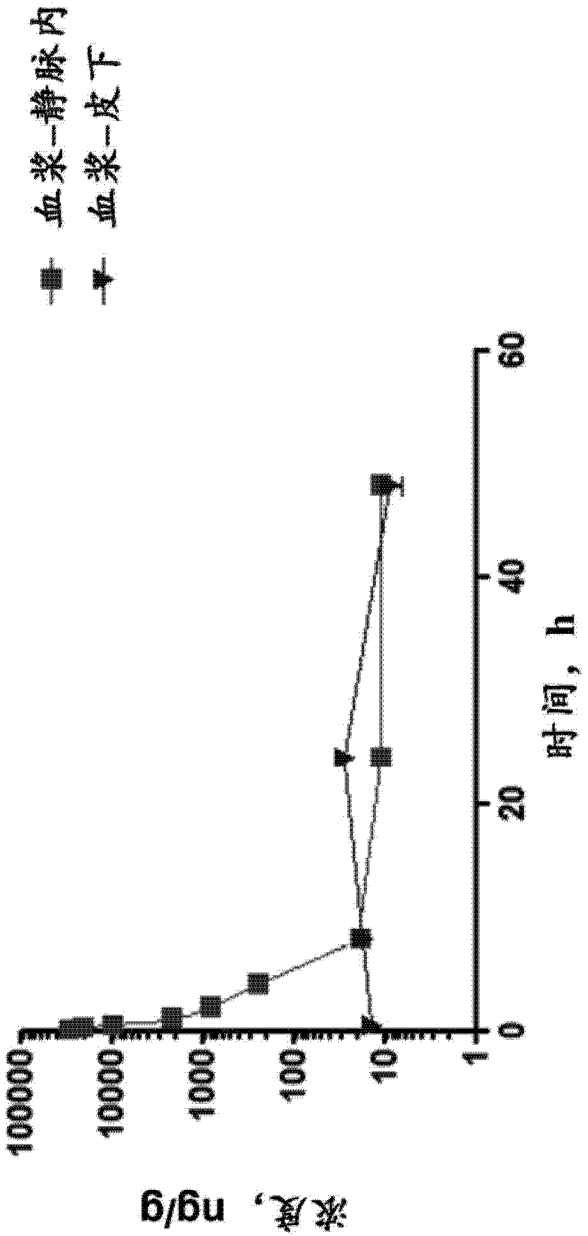


图 4

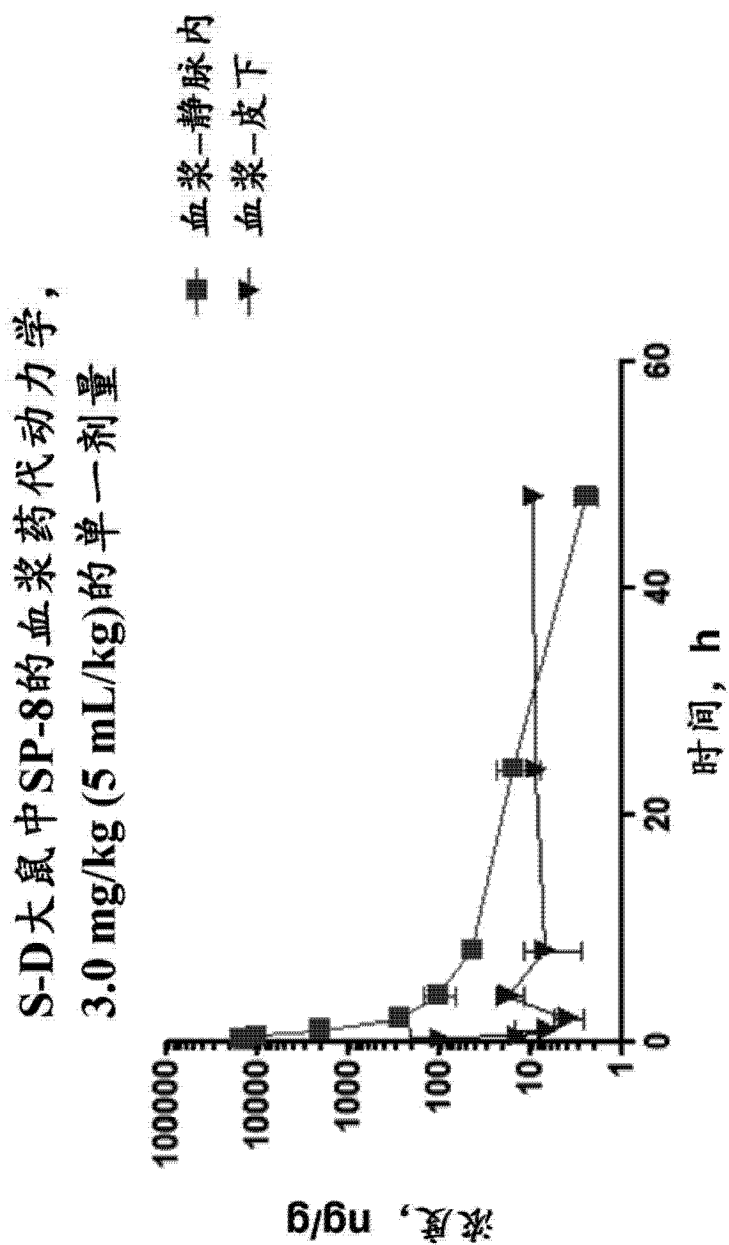


图 5

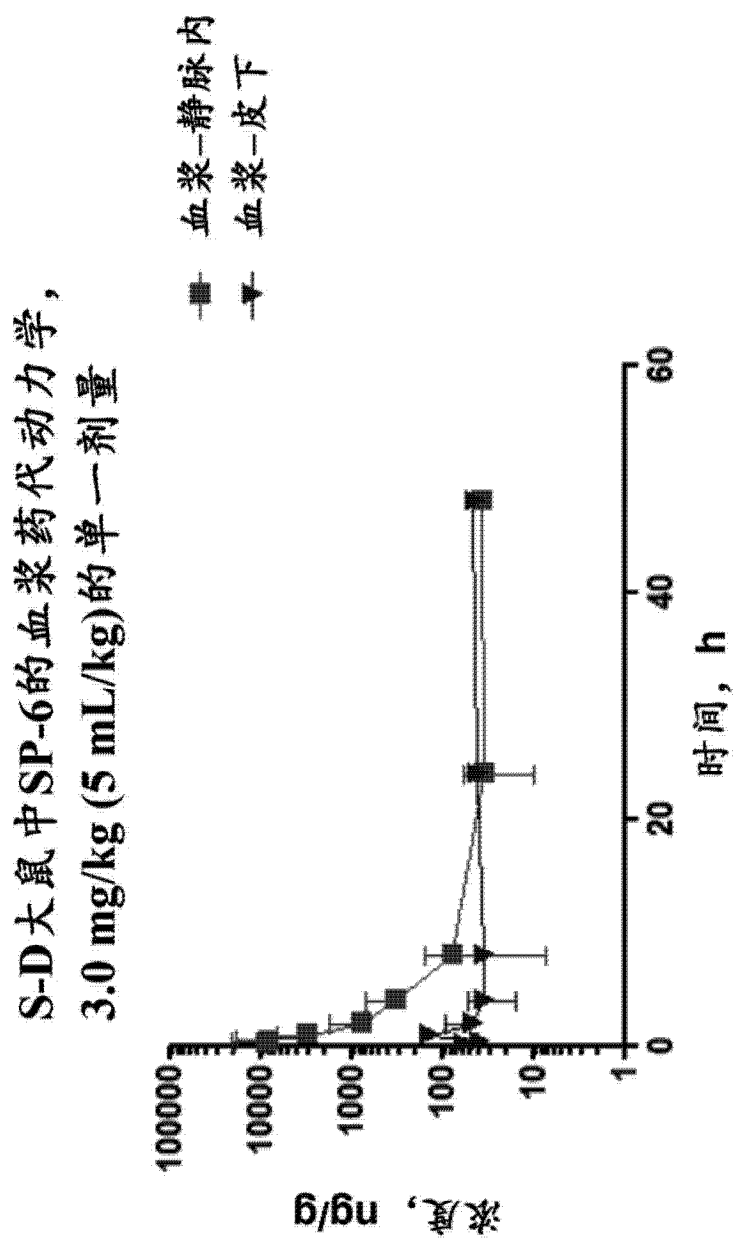


图 6

S-D大鼠中SP-21的血浆药代动力学，
3.0 mg/kg (5 mL/kg)的单一剂量

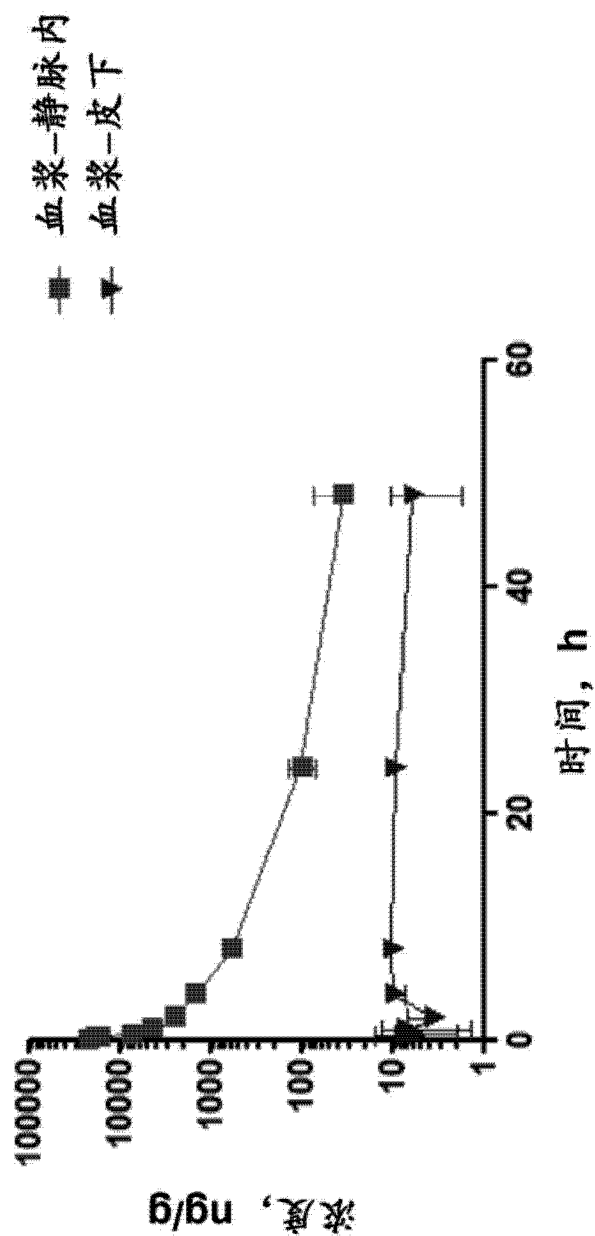


图 7

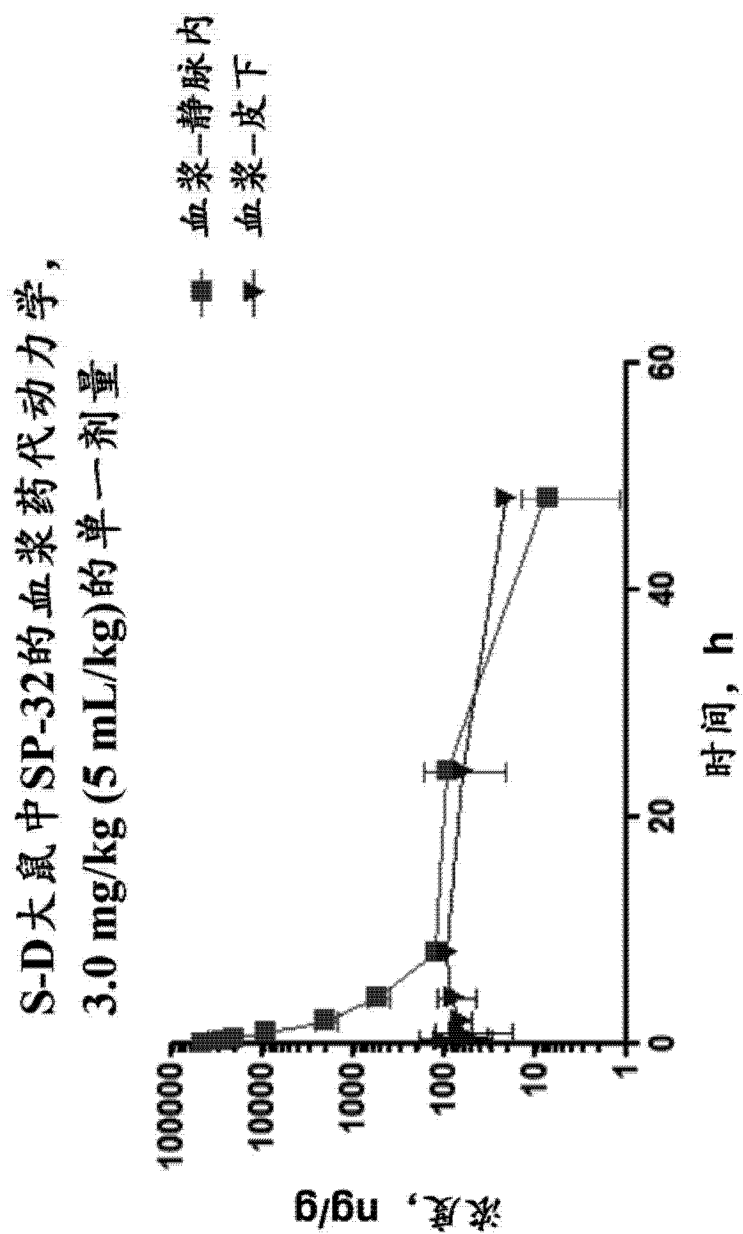


图 8

化合物	AUCinf hr*ng/mL	AUCExt (%) %	t 1/2 hr	MRT hr	Vdss mL/kg	Clp mL/hr/kg
SP-1	17529	13.8	55.1	1.6	267	171
SP-6	23477	16.3	20.6	3.7	474	128
SP-8	12575	4.8	10.2	1.6	390	239
SP-21	30455	9.4	10.1	5.3	524	99
SP-32	36963	3.0	9.7	2.3	190	81
替莫瑞林, 狗0.1 µg/kg, 静脉内**	5301		0.4			
替莫瑞林, 人0.5、1或2 mg, 皮下**			2-5h			
**文献值						

图 9

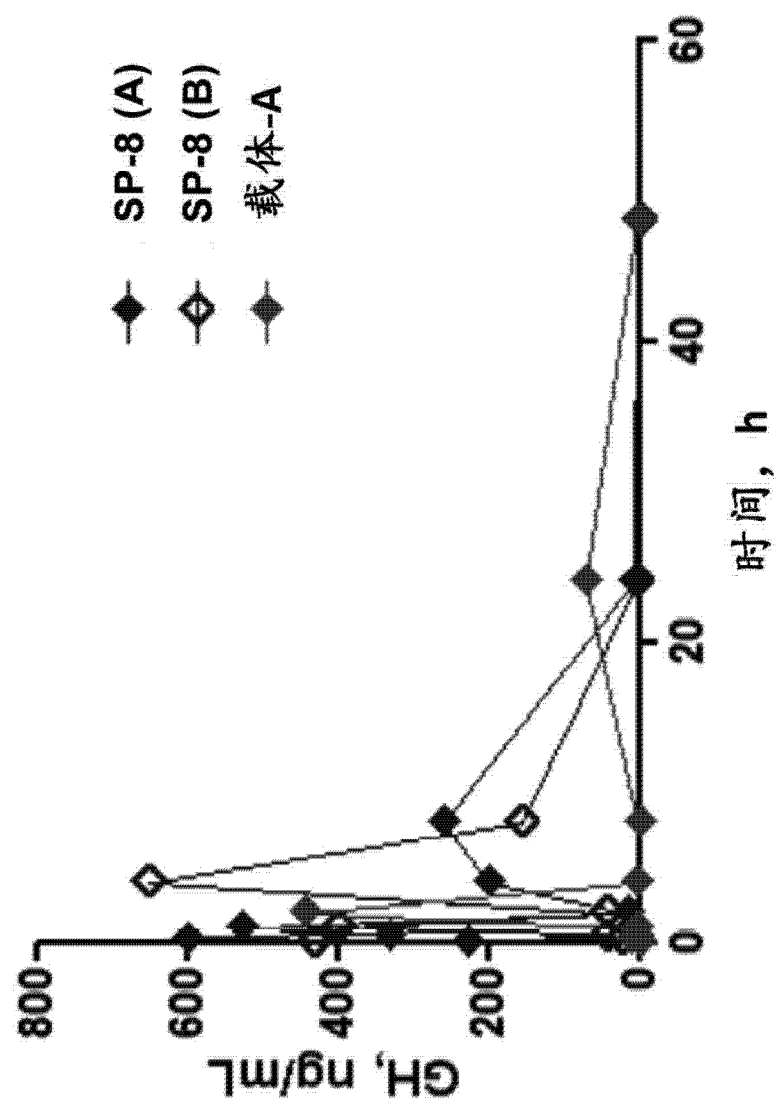


图 10

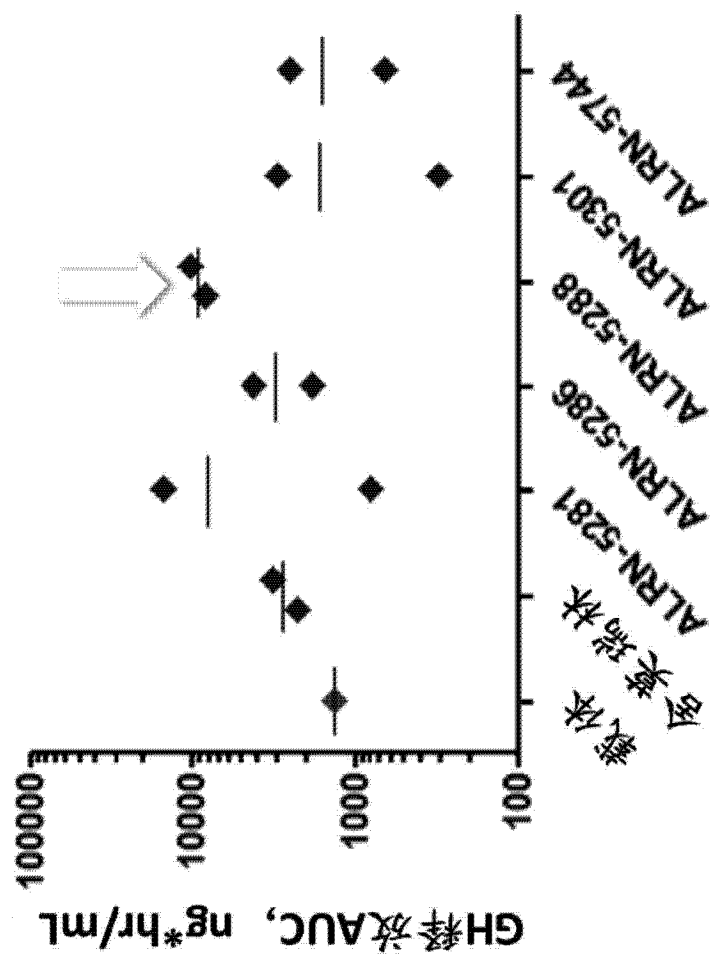


图 11