



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102458438 A

(43) 申请公布日 2012. 05. 16

(21) 申请号 201080026293. 0

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2010. 05. 03

A61K 38/04 (2006. 01)

C07K 7/64 (2006. 01)

(30) 优先权数据

61/174, 575 2009. 05. 01 US

61/339, 458 2010. 03. 04 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2011. 12. 14

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2010/033345 2010. 05. 03

(87) PCT申请的公布数据

W02010/127336 EN 2010. 11. 04

(71) 申请人 宾夕法尼亚州大学理事会

地址 美国宾夕法尼亚

(72) 发明人 J·D·兰姆布里斯 H·曲

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专
利商标事务所 11038

代理人 刘晓东

权利要求书 2 页 说明书 20 页

序列表 6 页

(54) 发明名称

具有肽骨架和 C- 末端修饰的经修饰补体抑
素

(57) 摘要

本发明公开了包含能结合 C3 蛋白并抑制补体激活的肽的化合物。这些化合物与目前可获得的化合物相比展示了大大提高的补体激活抑制活性。所述化合物包含在第 8 位 (甘氨酸) 处具有受约束的骨架并且任选的在第 13 位对苏氨酸的特异取代的补体抑素类似物。

1. 包含经修饰的补体抑素肽 (ICVVQDWGHHRCT (环状 C2-C12); SEQ ID NO:1) 或其类似物的化合物, 其中第 8 位的 Gly 被修饰以约束所述肽在该位置处的骨架构象。

2. 权利要求 1 的化合物, 其中通过用 N- 甲基 Gly 取代所述 Gly 而约束所述骨架。

3. 权利要求 2 的化合物, 进一步包含第 9 位的 His 被 Ala 取代。

4. 权利要求 3 的化合物, 进一步包含第 4 位的 Val 被 Trp 或 Trp 类似物取代。

5. 权利要求 4 的化合物, 其中在第 4 位的 Trp 类似物是 1- 甲基 Trp 或 1- 甲酰基 Trp。

6. 权利要求 4 的化合物, 进一步包含第 7 位的 Trp 被 Trp 类似物取代。

7. 权利要求 6 的化合物, 其中第 7 位的 Trp 类似物是卤代 Trp。

8. 权利要求 3 的化合物, 进一步包含 N- 末端残基的乙酰化。

9. 权利要求 1 的化合物, 进一步包含第 13 位的 Thr 被 Ile, Leu, Nle, N- 甲基 Thr 或 N- 甲基 Ile 取代。

10. 权利要求 1 的化合物, 它是包含具有序列 SEQ ID NO:2 的肽的补体抑素类似物, 它是:

Xaa1-Cys-Val-Xaa2-Gln-Asp-Xaa3-Gly-Xaa4-His-Arg-Cys-Xaa5 (环状 C2-C12), 其中第 8 位的 Gly 被修饰以约束该位置处的骨架构象;

其中:

Xaa1 是 Ile, Val, Leu, Ac-Ile, Ac-Val, Ac-Leu 或含 Gly-Ile 的二肽;

Xaa2 是 Trp 或 Trp 类似物, 其中 Trp 类似物与 Trp 相比具有增加的疏水特性;

Xaa3 是 Trp 或包含对其吡啶环之化学修饰的 Trp 类似物, 其中所述化学修饰提高了吡啶环的氢键潜能;

Xaa4 是 His, Ala, Phe 或 Trp; 而

Xaa5 是 Thr, Ile, Leu, Nle, N- 甲基 Thr 或 N- 甲基 Ile, 其中 Thr, Ile, Leu, Nle, N- 甲基 Thr 或 N- 甲基 Ile 中任一个的羧基末端 -OH 任选的被 -NH₂ 取代。

11. 权利要求 10 的化合物, 其中第 8 位的 Gly 被 N- 甲基化, 且 Xaa1 是 Ac-Ile, Xaa2 是 1- 甲基 -Trp 或 1- 甲酰基 -Trp, Xaa3 是 Trp, Xaa4 是 Ala, 而 Xaa5 是 Thr, Ile, Leu, Nle, N- 甲基 Thr 或 N- 甲基 Ile。

12. 权利要求 11 的化合物, 其中 Xaa5 是 Ile, N- 甲基 Thr 或 N- 甲基 Ile。

13. 权利要求 11 的化合物, 其中包含 SEQ ID NO:5, 7, 8, 9, 10 或 11 中任意序列。

14. 前述权利要求中任意项的化合物, 进一步包含延长所述化合物的体内停留的额外组分。

15. 权利要求 14 的化合物, 其中所述额外组分是聚乙二醇 (PEG)。

16. 权利要求 14 的化合物, 其中所述额外组分是白蛋白结合小分子。

17. 权利要求 14 的化合物, 其中所述额外组分是白蛋白结合肽。

18. 权利要求 15 的化合物, 其中所述白蛋白结合肽包含序列 RLIEDICLPWGCLWEDD (SEQ ID NO:14)。

19. 权利要求 15 的化合物, 其中包含与白蛋白结合肽连接的 SEQ ID NOS:5, 7, 8, 9, 10 或 11 中任一所示序列。

18. 权利要求 15 的化合物, 其中所述化合物和所述白蛋白结合肽被间隔物隔开。

19. 权利要求 18 的化合物, 其中所述间隔物是聚乙二醇分子。

20. 一种药物组合物,其中包含前述权利要求中任意项所述的化合物及药用可接受载体。

21. 前述权利要求中任意项所述的化合物在制备用于抑制补体激活的药物中的用途。

22. 抑制补体激活的化合物,其中包含 SEQ ID NO :5,7,8,9,10 或 11 中任一序列的非肽或者部分肽模拟物,其中所述化合物与 C3 结合,并且在同等测定条件下时其抑制补体激活的活性比含 SEQ ID NO :1 的肽高至少 500 倍。

具有肽骨架和 C- 末端修饰的经修饰补体抑素

[0001] 政府支持

[0002] 依照 35U. S. C. § 202(c), 承认美国联邦政府可以拥有本文所述发明中的某些权利, 它们部分是用来自国立卫生研究院 (National Institutes of Health) 基金号为 GM 62134 的资金完成的。

发明领域

[0003] 本发明涉及机体内补体级联的激活。特别是, 本发明提供了能结合 C3 蛋白并抑制补体激活的肽和拟肽。

[0004] 发明背景

[0005] 在整篇说明书中引用了各种各样的出版物, 包括专利、已公布的申请、技术文章和学术文章。这些被引用出版物中的每一个均在此全文收编作为参考。

[0006] 人补体系统是防御病原生物和介导免疫应答中的有效成份。补体可通过三个不同的途径被活化: 经典途径、外源凝集素途径和旁路途径。全部三种途径所共有的主要活化事件是补系统的首要蛋白质 C3 经由 C3 转化酶被蛋白水解成它的活化产物 C3a 和 C3b。这些片段的产生引起了经由 C3b 和 iC3b 对病原细胞的调理作用, 一种使得它们易于被吞噬或清除的过程, 并经由与补体受体的相互作用引起免疫细胞的活化 (Markiewski & Lambris, 2007, Am J Pathol 171:715-727)。C3b 在靶细胞上的沉积还诱导了新的转化酶复合物的形成并由此引发自我扩增环。

[0007] 血浆和细胞表面结合蛋白质的全体小心调节补体激活以防止宿主细胞被补体级联自我攻击。不过, 补体的过度活化或不适当调节可导致许多病理情况, 范围从自身免疫到炎症性疾病 (Holers, 2003, Clin Immunol 107:140-51; Markiewski & Lambris, 2007, 见前文; Ricklin & Lambris, 2007, Nat Biotechnol 25:1265-75; Sahu et al., 2000, J Immunol 165:2491-9)。因此开发治疗性的补体抑制剂是非常合乎需要的。在此背景下, C3 和 C3b 由于其在级联中的中心作用允许同时抑制补体起始、扩增和下游活化而成为了有希望的靶标 (Ricklin & Lambris, 2007, 见前文)。

[0008] 补体抑素 (compstatin) 是据显示能阻断全部三条激活途径的第一种非宿主来源的补体抑制剂 (Sahu et al., 1996, J Immunol 157:884-91; U. S. Patent 6, 319, 897)。此环式十三肽结合 C3 和 C3b 二者, 并阻止天然 C3 被 C3 转化酶所裂解。通过利用实验模型进行的一系列研究证实了它的高抑制效力, 表明了其作为治疗剂的潜力 (Fiane et al., 1999a, Xenotransplantation 6:52-65; Fiane et al., 1999b, Transplant Proc 31:934-935; Nilsson et al., 1998 Blood 92:1661-1667; Ricklin & Lambris, 2008, AdvExp Med Biol 632:273-292; Schmidt et al., 2003, J Biomed Mater Res A 66:491-499; Soulika et al., 2000, Clin Immunol 96:212-221)。对补体抑素的逐渐优化已得到了具有改善活性的类似物 (Ricklin & Lambris, 2008, 见前文; W02004/026328; W02007/062249)。这些类似物之一目前正在为治疗年龄相关黄斑变性 (AMD) 所进行的临床试验中进行测试, 黄斑变性是工业化国家中老年患者失明的主要原因 (Coleman et al., 2008, Lancet 372:1835-1845;

Ricklin & Lambris, 2008, 见前文)。鉴于其在 AMD 和其它疾病中的治疗潜力, 进一步优化补体抑素以获得更高效力是相当重要的。

[0009] 早先的结构-活性研究已确定了补体抑素肽的环状特性以及 β -转角和疏水簇二者的存在是该分子的关键特征 (Morikis et al., 1998, Protein Sci 7:619-627; W099/13899; Morikis et al., 2002, J Biol Chem 277:14942-14953; Rieklin & Lambris, 2008, 见前文)。已发现第 4 和第 7 位的疏水残基尤其重要, 用非天然氨基酸对它们进行修饰产生了活性比原始补体抑素肽高 264 倍的类似物 (Katragadda et al., 2006, J Med Chem 49:4616-4622; W02007/062249)。

[0010] 尽管先前的优化步骤已基于联合筛选试验、溶液结构和计算模型 (Chiu et al., 2008, Chem Biol Drug Des 72:249-256; Mulakala et al., 2007, Bioorg Med Chem 15:1638-1644; Ricklin & Lambris, 2008, 见前文), 但最近公布的补体抑素与补体片段 C3c 复合的共结晶结构 (Janssen et al., 2007, J Biol Chem 282:29241-29247; W02008/153963) 代表了开始合理优化的重要里程碑。晶体结构揭示了 C3c 之巨球蛋白 (MG) 结构域 4 和 5 界面处的浅表结合位点并显示了这 13 个氨基酸中有 9 个是直接涉及结合的, 这种结合或者经由氢键或者经由疏水作用。当与溶液中的补体抑素肽结构相比时 (Morikis et al., 1998, 见前文), 结合形式的补体抑素经历了构象改变, β -转角的位置从残基 5-8 转换到残基 8-11 (Janssen et al., 2007, 见前文; W02008/153963)。

[0011] 鉴于上述, 很显然开发具有更高活性的经修饰补体抑素肽或模拟物会在本领域内构成重要的进展。

[0012] 发明简述

[0013] 本发明提供了补体抑制肽——补体抑素 (ICVVQDWGHRCT (环状 C2-C12) SEQ ID NO:1) 的类似物和模拟物, 它们的补体抑制活性较补体抑素而言有所改善。

[0014] 本发明一方面的特征在于包含修饰的补体抑素肽 (ICVVQDWGHRCT (环状 C2-C12); SEQ ID NO:1) 或其类似物的化合物, 其中第 8 位的 Gly 被修饰以限制所述肽在该位置处的骨架构象。在某一实施方案中, 通过用 N-甲基甘氨酸取代甘氨酸而对骨架加以约束。所述肽可能经由一种或更多种所述方式被进一步修饰: 用丙氨酸取代第 9 位的组氨酸; 用色氨酸或色氨酸类似物取代第 4 位的缬氨酸; 用色氨酸类似物取代第 7 位的色氨酸; N 末端残基乙酰化; 以及用异亮氨酸、亮氨酸、Nle、N-甲基苏氨酸或 N-甲基异亮氨酸取代第 13 位的苏氨酸。在一些具体的实施方案中, 第 4 位的色氨酸类似物是 1-甲基色氨酸或 1-甲酰基色氨酸, 并且第 7 位的色氨酸类似物若存在的话则是卤代色氨酸。

[0015] 某些实施方案的特征在于包含具有序列 SEQ ID NO:2 的肽的补体抑素类似物, 其是:

[0016] Xaa1-Cys-Val-Xaa2-Gln-Asp-Xaa3-Gly-Xaa4-His-Arg-Cys-Xaa5 (环状 C2-C12), 其中第 8 位的甘氨酸被修饰以约束所述肽在该位置处的骨架构象, 并且其中: Xaa1 是 Ile, Val, Leu, Ac-Ile, Ac-Val, Ac-Leu 或含 Gly-Ile 的二肽; Xaa2 是 Trp 或 Trp 的类似物, 其中所述 Trp 类似物具有较 Trp 而言提高的疏水特性; Xaa3 是 Trp 或含有对其吡啶环之化学修饰的 Trp 类似物, 其中所述化学修饰提高了吡啶环的氢键潜能; Xaa4 是 His, Ala, Phe 或 Trp; 而 Xaa5 是 Thr, Ile, Leu, Nle, N-甲基 Thr 或 N-甲基 Ile, 其中 Thr, Ile, Leu, Nle, N-甲基 Thr 或 N-甲基 Ile 中任意残基的羧基末端 -OH 任选的被 -NH₂ 所取代。

[0017] 在某些实施方案中, Xaa2 参与与 C3 的非极性相互作用。在其它实施方案中, Xaa3 参与与 C3 的氢键。在多种实施方案中, Xaa2 的 Trp 类似物是卤代色氨酸, 诸如 5- 氟 -1- 色氨酸或 6- 氟 -1- 色氨酸。在其它的实施方案中, Xaa2 处的 Trp 类似物在第 5 号位置处包含低级烷氧基或低级烷基取代基, 例如 5- 甲氧基色氨酸或 5- 甲基色氨酸。在其它实施方案中, Xaa2 处的 Trp 类似物包含在第 1 位的低级烷基或低级烯酰基取代, 代表性的实施方案是 1- 甲基色氨酸或 1- 甲酰基色氨酸。在其它实施方案中, Xaa3 的 Trp 类似物是卤代色氨酸诸如 5- 氟 -1- 色氨酸或 6- 氟 -1- 色氨酸。在具体的实施方案中, Xaa2 是 1- 甲基色氨酸或 1- 甲酰基色氨酸, 而 Xaa3 任选地包含 5- 氟 -1- 色氨酸。

[0018] 在某些实施方案中, 第 8 位的 Gly 被 N- 甲基化, 而 Xaa1 是 Ac-Ile, Xaa2 是 1- 甲基 -Trp 或 1- 甲酰基 -Trp, Xaa3 是 Trp, Xaa4 是 Ala, 而 Xaa5 是 Thr, Ile, Leu, Nle, N- 甲基 Thr 或 N- 甲基 Ile。特别是, Xaa5 可能是 Ile, N- 甲基 Thr 或 N- 甲基 Ile。特别是, 补体抑素类似物包含 SEQ ID NOS :5,7,8,9,10 或 11 中的任一个。

[0019] 在有些实施方案中, 所述化合物包含由编码所述肽之多核苷酸表达所产生的肽。在其它实施方案中, 所述化合物至少部分是经由肽合成产生的。也可使用合成方法的组合。

[0020] 本发明另一方面的特征 is 任何前述权利要求的化合物, 其中进一步包含延长所述化合物的体内停留的额外组分。在某一实施方案中, 所述额外组分是聚乙二醇 (PEG)。在另一实施方案中, 所述额外组分是白蛋白结合小分子。在另一实施方案中, 所述额外组分是白蛋白结合肽。所述白蛋白结合肽可能包含序列 RLIEDICLPWGCLWEDD (SEQ ID NO :14)。一些具体的实施方案包含与白蛋白结合肽连接之 SEQ ID NOS :5,7,8,9,10 或 11 中任一所示序列。任选的, 所述化合物和白蛋白结合肽被间隔基隔开。所述间隔基可以是聚乙二醇 (PEG) 分子, 诸如小型 -PEG 或小型 -PEG3。

[0021] 本发明另一方面的特征是抑制补体激活的化合物, 其中包含 SEQ ID NO :5,7,8,9,10 或 11 中任一序列的非肽或者部分肽模拟物, 其中所述化合物与 C3 结合, 并且在同等测定条件下时其抑制补体激活的活性比含 SEQ ID NO :1 的肽高至少 500 倍。

[0022] 正如本领域已知以及本文以更多细节所描述的, 对于采用补体抑素本身的任何目的而言, 本发明的补体抑素类似物、缀合物和模拟物是有实际效用的。这些用途中的一些包括将所述化合物配制成药物组合物用于施用于患者。这样的制剂可能包含所述化合物的制药学可接受盐, 以及一种或多种制药学可接受稀释剂、载体赋形剂等等, 这些均在技术熟练人员的能力范围内。

[0023] 本发明的各种特征和优势可参考以下详述、附图和实施例进行理解。

[0024] 例证性实施方案的详述

[0025] 定义 :

[0026] 整篇说明书和权利要求使用了涉及本发明方法和其它方面的各种术语。除非另外指出, 否则这些术语具有其在本领域内的常规含义。其它特别定义的术语以与本文所提供的定义一致的方式进行理解。

[0027] 术语“大约”在本文中针对可测量的数值诸如用量、持续时间段等等时, 意味着包括距给定值 $\pm 20\%$ 或 $\pm 10\%$ 、在某些实施方案中为 $\pm 5\%$ 、在某些实施方案中为 $\pm 1\%$ 、以及在某些实施方案中为 $\pm 0.1\%$ 的变化, 因为这样的变化对于制造和使用所述公开化合物和组合物而言是适当的。

[0028] 术语“补体抑素”用于此处指包含 SEQ ID NO:1 即 ICVVQDWGHRCT (环状 C2-C12) 的肽。术语“补体抑素类似物”指包含如本文所进一步详述以及如本领域所已知的天然和非天然氨基酸或氨基酸类似物取代以及在各个氨基酸之中或之间的修饰的经修饰补体抑素。当提及补体抑素或补体抑素类似物内具体氨基酸或类似物定位时,那些定位有时被称为肽内的“位置”,这些位置编号为从 1 (补体抑素内的 Ile) 至 13 (补体抑素内的 Thr)。例如, Gly 残基占据了“第 8 位”。

[0029] 术语“药用活性”和“生物学活性”指本发明化合物结合 C3 或其片段并抑制补体激活的能力。如本文所进一步详述的,此生物学活性可通过数个本领域所公认的检验中的一种或多种进行测量。

[0030] 用于此处时,“烷基”指具有大约 1 至大约 10 个碳原子的任选取代的饱和直链、分支的或环状的烃类 (以及其中碳原子范围和具体数目的所有组合和亚组合),优选具有大约 1 个至大约 7 个碳原子。烷基包括但不限于甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、叔丁基、正戊基、环戊基、异戊基、新戊基、正己基、异己基、环己基、环辛基、金刚烷基、3-甲基戊基、2,2-二甲基丁基和 2,3-二甲基丁基。术语“低级烷基”指具有大约 1 至大约 5 个碳原子的任选取代的饱和直链、分支的或环状的烃类 (以及其中碳原子范围和具体数目的所有组合和亚组合)。低级烷基包括但不限于甲基、乙基,正丙基,异丙基,正丁基,异丁基,叔丁基,正戊基,环戊基,异戊基和新戊基。

[0031] 用于此处时,“卤素”指 F, Cl, Br 或 I。

[0032] 用于此处时,“烷酰基”可与“酰基”互换使用,指具有大约 1 至大约 10 个碳原子的任选取代的直链或分支的脂肪族无环残基 (以及其中碳原子范围和具体数目的所有组合和亚组合),优选大约 1 个至大约 7 个碳原子。烷酰基包括但不限于甲酰基,乙酰基,丙酰基,丁酰基,异丁酰基,戊酰基,异戊酰基,2-甲基-丁酰基,2,2-二甲基丙酰基,己酰基,庚酰基,辛酰基等等。术语“低级烷酰基”指具有大约 1 至大约 5 个碳原子的任选取代的直链或分支的脂肪族无环残基 (以及其中碳原子范围和具体数目的所有组合和亚组合)。低级烷酰基包括但不限于甲酰基,乙酰基,正丙酰基,异丙酰基,丁酰基,异丁酰基,戊酰基,异戊酰基等等。

[0033] 用于此处时,“芳基”指具有大约 5 至大约 14 个碳原子的任选取代的单环或双环芳香族环系 (以及其中碳原子范围和具体数目的所有组合和亚组合),优选大约 6 个至大约 10 个碳原子。非限制性的例子包括例如苯基和萘基。

[0034] 用于此处时,“芳烷基”指含芳基取代基并且具有约 6 个至约 20 个碳原子的烷基 (以及其中碳原子范围和特定数目的所有组合和亚组合),优选大约 6 个至大约 12 个碳原子。芳烷基可被任选的取代。非限制性例子包括例如苯甲基,萘基甲基,二苯甲基,三苯甲基,苯乙基和二苯乙基。

[0035] 用于此处时,术语“烷氧 (alkoxy)”和“烷氧基 (alkoxy)”指任选取代的烷基-O-基团,其中烷基如先前所定义的。代表性的烷氧和烷氧基基团包括甲氧基,乙氧基,正丙氧基,异丙氧基,正丁氧基和庚氧基等等。

[0036] 用于此处时,“羧基”指 $-C(=O)OH$ 基团。

[0037] 用于此处时,“烷氧羰基”指 $-C(=O)O-$ 烷基,其中烷基如先前所定义的。

[0038] 用于此处时,“芳酰基”指 $-C(=O)-$ 芳基,其中芳基如先前所定义的。代表性的芳

酰基包括苯甲酰基和萘甲酰基。

[0039] 通常,被取代的化学部分包括在分子上选定位置处替代氢的一个或多个取代基。代表性的取代基包括例如卤素、烷基、环烷基、芳烷基、芳基、巯基、羟基(-OH)、烷氧基、氰基(-CN)、羧基(-COOH)、酰基(烷酰基: $-C(=O)R$); $-C(=O)O-$ 烷基,氨基羰基($-C(=O)NH_2$), $-N-$ 取代的氨基羰基($-C(=O)NHR$ ”), CF_3 , CF_2CF_3 等等。关于前述取代基,每一部分 R'’ 可以独立的是例如 H、烷基、环烷基、芳基或芳烷基中的任一个。

[0040] 用于此处时,“L-氨基酸”指通常存在于蛋白质中的任何天然左旋 α -氨基酸或那些 α -氨基酸的烷基酯。术语“D-氨基酸”指右旋 α -氨基酸。除非另外指定,否则本文所提及的所有氨基酸均为 L-氨基酸。

[0041] “疏水”或“非极性”在此同义使用,指不以偶极为特征的任何分子间或分子内相互作用。

[0042] “PEG 化”指其中至少一个聚乙二醇(PEG)部分(无论其大小如何)性地化学附着于蛋白质或肽上而形成 PEG-肽缀合物的反应。“PEG 化”意味着至少一个 PEG 部分无论其大小如何被化学性地附着于肽或蛋白质上。术语 PEG 通常伴随着指示该 PEG 聚合物的近似平均分子量的数字后缀;例如,PEG-8,000 指具有平均分子量约 8,000 的聚乙二醇。

[0043] 用于此处时,“药用可接受盐”指所述已公开化合物的衍生物,其中通过制造其酸或碱盐而修饰母体化合物。药用可接受盐的例子包括但不限于碱性残基诸如胺之无机物或有机酸盐;酸性残基诸如羧酸的碱性盐或有机盐;等等。因此,术语“酸加成盐”指已通过添加酸而制备的母体化合物之相应盐衍生物。药用可接受盐包括自例如无机酸或有机酸形成的母体化合物之常规盐或季铵盐。例如,这样的常规盐包括但不限于衍生自无机酸的那些盐,所述无机酸诸如盐酸,氢溴酸,硫酸,氨基磺酸,磷酸,硝酸等等;以及制备自有机酸的盐,所述有机酸诸如乙酸,丙酸,琥珀酸,乙醇酸,硬脂酸,乳酸,苹果酸,酒石酸,柠檬酸,抗坏血酸,扑酸(pamoic),马来酸,羟基马来酸,苯基乙酸,谷氨酸,苯甲酸,水杨酸,磺胺酸,2-乙酰氧基苯甲酸,延胡索酸,甲苯磺酸(toluenesulfonic),甲磺酸,乙烷二磺酸,草酸,羟乙磺酸等等。本发明的某些酸性或碱性化合物可作为两性离子存在。所述化合物的所有形式,包括游离酸、游离碱和两性离子形式,均涵盖在本发明的范围内。具体描述:

[0044] 依照本发明,已将补体抑素结合 C3 之生物学和物理化学特性的有关信息应用于设计较母体补体抑素肽而言具有显著提高活性的经修饰补体抑素肽。在有些实施方案中,所述类似物具有比补体抑素至少高 300 倍的活性。在其它实施方案中,当利用实施例中所述检验进行比较时,所述类似物具有比补体抑素高 350-,400-,450-,500-,550-,600- 倍或更多倍的活性。

[0045] 依照先前方法合成的补体抑素类似物已显示出具有较母体肽而言提高的活性,即高达约 99 倍(Mallik, B. et al, 2005, 见前文;W02004/026328),以及高达约 264- 倍(Katragadda et al., 2006, 见前文;W02007/062249)。依照本发明生产的类似物经由在以前未利用过的补体抑素位置处的修饰显示有提高的活性,并且可使补体抑素或任何当前所述的类似物具有提高的活性。正如附图及本文实施例中所显示的体外检验所证实的,本发明的类似物由此具有比母本肽或迄今为止已生产的其类似物更高的活性。

[0046] 下表显示了具有较补体抑素(Ic[CVVQDWGHHRC]T;SEQ ID NO:1)显著提高之活性的选定代表性类似物的氨基酸序列和补体抑制活性。所述选定类似物依照相比于

WO2007/062249 中所述的有效补体抑素类似物之 (Ac-Ic[CV(^{1-Me}W)QDWGAHRC]T-NH₂, SEQ ID NO:4, 在实施例 1 中又称为肽 14) 在指定位置 (1-13) 处的特定修饰来表示。SEQ ID NOS: 5 和 7-11 的肽 (在实施例 1 中又称为肽 15 和 17-21) 是依照本发明进行修饰的代表, 产生了显著更有效的补体抑素类似物。

[0047] 代表性补体抑素类似物, IC₅₀, 以及相对于 SEQ ID NO:4(Ac-Ic[CV(^{1-Me}W)QDWGAHRC]T-NH₂), IC₅₀ 为 206nM) 的活性倍数改变:

[0048]

序列 编号	肽 号	序列		IC ₅₀ (nM)	改变倍数
		Xaa ⁸	Xaa ¹³		
5	15	Sar*	Thr	Ac-Ic[CV(^{1-Me} W)QDW(^{N-Me} G)AHRC]T-NH ₂	159 1.30
7	17	Sar	Ile	Ac-Ic[CV(^{1-Me} W)QDW(^{N-Me} G)AHRC]I-NH ₂	92 2.24
8	18	Sar	Leu	Ac-Ic[CV(^{1-Me} W)QDW(^{N-Me} G)AHRC]L-NH ₂	108 1.91
9	19	Sar	Nle	Ac-Ic[CV(^{1-Me} W)QDW(^{N-Me} G)AHRC](Nle)-NH ₂	109 1.90
10	20	Sar	(^{NMe})Thr	Ac-Ic[CV(^{1-Me} W)QDW(^{N-Me} G)AHRC](^{N-Me} T)-NH ₂	86 2.40
11	21	Sar	(^{NMe})Ile	Ac-Ic[CV(^{1-Me} W)QDW(^{N-Me} G)AHRC](^{N-Me} I)-NH ₂	62 3.32

[0049] *Sar = N-Me Gly

[0050] 依照本发明的一个改进包括约束肽的第 8 位处的肽骨架。在一个具体的实施方案中, 通过用 N-甲基甘氨酸取代第 8 位上的甘氨酸 (Gly⁸) 来约束所述骨架。可参考实施例 1 中所述的代表性肽 8 和 15。

[0051] 并不打算受理论所束缚或限制, 应当注意到 N-甲基化可以若干方式影响肽。首先, 潜在的氢键供体被甲基所替代, 其不能形成氢键。其次, N-甲基是微弱提供电子的, 这意味着它可轻微增加邻近羰基的碱性。第三, N-甲基的大小可能引起空间约束。最后, N-甲基化可改变酰胺键的反式/顺式群, 由此以类似于脯氨酸的方式改变局部肽构象。

[0052] [Trp(Me)⁴Gly(N-Me)⁸Ala⁹]-Ac- 补体抑素 (SEQ ID NO:5; 肽 15) 的活性增加相较于先前最具活性的类似物, 即 [Trp(Me)⁴Gly⁸Ala⁹]-Ac- 补体抑素 (SEQ ID NO:4; 肽 14) 而言有显著改进。Gly⁸ 的 N-甲基化有可能通过加强的, 类似结合的 β-转角、部分骨架约束增加以及包括 Trp⁷ 侧链的疏水相互作用提高而改善靶标识别和复合物稳定性。

[0053] 在一些具体的实施方案中, 除第 8 位的修饰外还补充了另外的修饰, 包括用 Ile, Leu, Nle (正亮氨酸), N-甲基 Thr 或 N-甲基 Ile 取代第 13 位的 Thr。可参考实施例 1 中所述的代表性肽 16, 17, 18, 19, 20 和 21 (SEQ ID NOS:6, 7, 8, 9, 10 和 11)。此外, 不受理论限制或束缚, 发现用疏水 Ile 取代 Thr 是有利的。对 Ile 的两个异构体 (即, Leu 和 Nle) 所观察到的相似效果显示了可能是物理化学和空间特性而非特定的接触造成了此提高。不过, 对于 Thr¹³ 和 Ile¹³ 二者之骨架 N-甲基化则观察到更独特的亲和力和活性提高。虽然所观察到的提高可能是因骨架约束增加以及相应地结合时有较低构象熵损失所造成的, 但还有情况是第 13 位的残基的特性可进一步影响活性构象的形成和稳定, 这或者是从空间上或者通过分子内疏水性接触的形成而实现。

[0054] 上述第 8 位和第 13 位的修饰可与先前显示提高活性的其它补体抑素修饰相结合,

以便产生具有显著提高之补体抑制活性的肽。例如, N- 末端乙酰化通常可增加补体抑素及其类似物的补体抑制活性。因此, 在肽的氨基末端添加酰基, 包括但不限于 N- 乙酰化, 是本发明的一个优选实施方案, 当肽是合成制备时尤其有用。不过, 有时候通过在原核或真核表达系统中表达编码肽之核酸分子或通过体外转录和翻译来制备肽是有利的。针对这些实施方案, 可使用天然存在的 N- 末端。

[0055] 作为另一实施例, 已知用 Ala 取代第 9 位的 His 提高了补体抑素的活性并且还是本发明肽的优选修饰。此外还确定了用 Tyr 取代第 4 位的 Val 可导致活性适度提高 (Klepeis et al., 2003, J Am Chem Soc 125 :8422-8423)。

[0056] W02004/026328 和 W02007/0622249 中公开了第 4 位的 Trp 和某些 Trp 类似物, 以及第 7 位的某些 Trp 类似物, 尤其是与第 9 位的 Ala 组合时, 可导致活性比补体抑素高许多倍。这些修饰用于本发明时同样有优势。

[0057] 特别是, 在第 4 位含 5- 氟 -1- 色氨酸或者 5- 甲氧基 -, 5- 甲基 - 或 1- 甲基 - 色氨酸或 1- 甲酰基 - 色氨酸的肽已显示出具有较补体抑素高 31-264 倍的活性。尤其优选的是 1- 甲基和 1- 甲酰基色氨酸。现认为吡啶 'N' - 介导的氢键在第 4 位不是补体抑素之结合和活性所必需的。在第 4 位用低级烷基、烷酰基或吡啶氮取代氢造成此氢键缺失或极性特征减少增强了补体抑素的结合和活性。不局限于任何特殊的理论或作用机制, 我们认为在第 4 位的疏水相互作用或效应增强了补体抑素与 C3 的相互作用。因此, 本发明中考虑将保持或增强前述疏水相互作用的第 4 位的 Trp 修饰 (例如, 依照本领域众所周知的方法改变侧链的结构) 或第 4 位或第 7 位的 Trp 类似物取代是与上述第 8 位和第 13 位修饰相结合的有利修饰。这样的类似物是本领域众所周知的, 但不局限于本文所例举的类似物及其未取代的或其它取代的衍生物。合适的类似物的例子可参阅以下出版物和许多其它文献: Beene, et al., 2002, Biochemistry 41 :10262-10269 (其中描述了单卤代和多卤代 Trp 类似物); Babitzky & Yanofsky, 1995, J. Biol. Chem. 270 :12452-12456 (其中描述了甲基化的和卤代的 Trp 及其它 Trp 和吡啶类似物); 以及美国专利 6, 214, 790, 6, 169, 057, 5, 776, 970, 4, 870, 097, 4, 576, 750 和 4, 299, 838。如本领域所知, 通过体外或体内表达或者通过肽合成可将 Trp 类似物引入补体抑素肽中。

[0058] 在某些实施方案中, 用含 1- 烷基取代基, 尤其是如上所定义之低级烷基 (例如 C₁-C₅) 取代基的类似物替代补体抑素之第 4 位的 Trp。这些包括但不限于 N(α) 甲基色氨酸, N(α) 甲酰基色氨酸和 5- 甲基色氨酸。在其它实施方案中, 用含 1- 烷酰基取代基, 尤其是如上所定义之低级烷酰基 (例如 C₁-C₅) 取代基的类似物替代补体抑素之第 4 位的 Trp。除了例举的类似物之外, 这些包括但不限于 1- 乙酰基 -L- 色氨酸和 L-β - 高色氨酸。

[0059] W02007/0622249 中披露了相对于野生型补体抑素而言在补体抑素中第 7 位掺入 5- 氟 -1- 色氨酸增加了补体抑素和 C3 之间相互作用的焓, 而在补体抑素中第 4 位掺入 5- 氟 - 色氨酸则降低了此相互作用的焓。因此, 如 W02007/0622249 中所述, 预计第 7 位的 Trp 修饰是与上述第 8 位和第 13 位修饰相结合的有效修饰。

[0060] 可依照常规模肽合成方法, 通过肽合成之各种合成方法, 经由一个或多个氨基酸残基的缩合制备本发明的经修饰补体抑素肽。例如, 依照标准固相方法合成肽, 例如可依制造商说明书在 Applied Biosystems Model 431A 肽合成仪 (Applied Biosystems, Foster City, Calif.) 上进行。或者通过固相方法或者在液相中合成肽或拟肽的其它方法均是本

领域技术人员众所周知的。在肽合成过程中,可根据需要用通常已知的保护基团对支链氨基和羧基进行保护/去保护。实施例1中阐述了合适的肽合成方法实例。利用供选择的保护基团对肽和肽衍生物进行的修饰对本领域技术人员而言是显而易见的。

[0061] 或者,本发明的某些肽可通过在适当的原核或真核系统中表达产生。例如,可将DNA构建体插入适合于在细菌细胞(诸如大肠杆菌)或酵母细胞(诸如酿酒酵母)中表达的质粒载体中,或者插入适合于昆虫细胞中表达的杆状病毒载体或适合于哺乳动物细胞中表达的病毒载体中。所述载体包含在宿主细胞中表达DNA所必需的调控元件,以允许DNA在宿主细胞内表达的方式定位。表达需要的这类调控元件包括启动子序列、转录起始序列以及任选地增强子序列。

[0062] 还可通过在体外或体内表达核酸分子而产生肽。可将编码肽串联体的DNA构建体引入体内表达系统中,串联体的上限取决于所利用的表达系统。串联体产生后,通过将多肽暴露于胍中而完成C-末端Asn及随后的N-末端G之间的裂解。

[0063] 重组原核或真核系统中基因表达所产生的肽可依照本领域已知方法进行纯化。也可将基因表达和合成方法结合使用以产生补体抑素类似物。例如,可通过基因表达产生类似物,此后进行一种或多种翻译后合成过程,以例如修饰N-或C-末端或者使分子环化。

[0064] 有利地,可通过在适当的原核或真核系统中的体内表达产生掺入非天然氨基酸例如甲基化氨基酸的肽。例如,可利用诸如Katragadda & Lambris中所述经由在大肠杆菌营养缺陷型中表达将非天然Trp类似物引入补体抑素的方法(2006, Protein Expression and Purification 47:289295)来在补体抑素的选定位置引入N-甲基化的或其它的非天然氨基酸。

[0065] 补体抑素的结构是本领域所已知的,而前述类似物的结构则以相似的方式确定。一旦已确认特别理想的短肽构象,用于设计肽或拟肽以拟合该构象的方法是本领域众所周知的。特别是有关本发明,通过考虑到如上所述氨基酸残基的不同侧链的贡献,可进一步改善肽类似物的设计(即,适于功能基团的作用或者关于空间结构的考虑)。

[0066] 本领域技术人员应当理解,肽模拟物可同等的用作肽以便提供结合C3和抑制补体激活所需的特定骨架构象和侧链功能。因此,通过利用可被连接而形成适当骨架构象之天然存在氨基酸、氨基酸衍生物、类似物或非氨基酸分子产生结合C3、抑制补体的化合物是在本发明预期范围内的。非肽类似物或者含肽和非肽组分的类似物在此有时被称为“拟肽”或“等排性模拟物”,以标示本发明肽的取代分子或衍生物,它们具有相同的骨架构象特征和/或其它功能性,从而与例举的肽足够相似而抑制补体激活。

[0067] 利用拟肽来开发高亲和力肽类似物是本领域众所周知的(参阅例如Vagner et al., 2008, Curr. Opin. Chem. Biol. 12:292-296; Robinson et al., 2008, Drug Disc. Today 13:944-951)。假定旋转约束与肽内的氨基酸残基相似,可通过本领域众所周知的任何种类计算技术分析含有非氨基酸部分的类似物并证实它们的构象基序。

[0068] 本发明的经修饰补体抑素肽可通过对该肽添加聚乙二醇(PEG)组分进行修饰。如本领域众所周知的,PEG化可增加治疗用肽和蛋白质在体内的半寿期。在某一实施方案中,PEG具有大约1,000至大约50,000的平均分子量。在另一实施方案中,PEG具有大约1,000至大约20,000的平均分子量。在另一实施方案中,PEG具有大约1,000至大约10,000的平均分子量。在一个例举的实施方案中,PEG具有大约5,000的平均分子量。聚乙二醇可

以是支链或直链的,优选直链的。

[0069] 本发明的补体抑素类似物可经由连接基团与 PEG 共价键合。这样的方法是本领域众所周知的。(综述于 Kozlowski A. et al. 2001, *BioDrugs* 15:419-29 中;也可参阅 Harris JM and Zalipsky S, eds. *Poly(ethylene glycol), Chemistry and Biological Applications*, ACS Symposium Series 680 (1997))。可接受的连接基团的非限制性例子包括酯基、酰胺基、酰亚胺基、氨基甲酸酯基、羧基、羟基、碳水化合物、琥珀酰亚胺基(包括但不限于琥珀酰亚胺琥珀酸酯(SS),琥珀酰亚胺基丙酸酯(SPA),琥珀酰亚胺羧甲酯(SCM),琥珀酰亚胺琥珀酰胺(succinimidyl succinamide, SSA)和 N-羟基琥珀酰亚胺(NHS))、环氧基、氧羰基咪唑基(包括但不限于羰基二咪唑(CDI))、硝基苯基(包括但不限于硝基苯基碳酸酯(NPC)或三氯苯基碳酸酯(TPC))、trysylate 基、醛基、异氰酸酯基、乙烯砜基、酪氨酸基、半胱氨酸基、组氨酸基或伯胺。在某些实施方案中,连接基团是琥珀酰亚胺基。在某一实施方案中,连接基团是 NHS。

[0070] 本发明的补体抑素类似物可选择地经由氨基、巯基、羟基或羧基与 PEG 直接偶联(即没有连接基团)。在某一实施方案中,PEG 被偶联于添加在补体抑素 C 末端的赖氨酸残基上。

[0071] 作为 PEG 化的替代办法,也可通过将肽与某些其它分子或肽连接来减少肽的体内清除。例如,某些白蛋白结合肽在通过静脉内大药丸注射入兔子时展现出 2.3 小时长的罕见长度半寿期(Dennis et al., 2002, *JBiol Chem.* 277:35035-35043)。此类型的肽与 D3H44 之抗组织因子 Fab 融合能使 Fab 结合白蛋白,同时保持 Fab 结合组织因子的能力(Nguyen et al., 2006, *Protein Eng Des Sel.* 19:291-297.)。当与野生型 D3H44Fab 相比较时,与白蛋白的这一相互作用导致体内清除显著减少并延长了在小鼠和兔子中的半寿期,与针对 PEG 化 Fab 分子、免疫粘附素和白蛋白融合体所观察到的结果相当。W02007/062249 描述了与白蛋白结合肽(ABP)融合的补体抑素类似物,并报道了该融合蛋白在抑制补体激活方面是有活性的。不过,合成比较费时,并且融合产物的产量较理想的要低。实施例 2 在此阐述了利用 ABP 以及白蛋白结合小分子(ABM)以及任选的在组分之间使用间隔子的改进合成策略。那些措施导致产生了能抑制补体激活并且还呈现出延长的体内存活的 ABP- 和 ABM- 补体抑素类似物缀合物。实际上,ABP 能将补体抑素类似物的半寿期提高 21 倍而不会明显损害其抑制活性。因此,这样的缀合物使得能够无需输注即可系统性施加抑制剂。

[0072] 可通过本领域已知的各种检验测试补体抑素类似物、拟肽和缀合物的补体激活抑制活性。在某一实施方案中,使用了实施例 1 中所述检验。美国专利 6,319,897, W099/13899, W02004/026328 和 W02007/062249 中阐述了非穷举性列举的其它检验,包括但不限于,(1) 与 C3 和 C3 片段结合的肽;(2) 多种溶血试验;(3) 测量 C3 转化酶-介导的 C3 裂解;以及(4) 测量用因子 D 对因子 B 进行的裂解。

[0073] 依照本领域所已知的,本文所述的肽和拟肽就利用补体抑素的任何目的而言是有实际效用的。这样的用途包括但不限于:(1) 抑制患者(人或动物)血清、组织或器官中的补体激活,这可促进某些疾病或病症的治疗,包括但不限于年龄相关的黄斑变性、类风湿性关节炎、脊髓损伤、帕金森氏病、阿耳茨海默氏病、癌症和呼吸障碍诸如哮喘、慢性阻塞性肺疾病(COPD)、变态反应性炎症、肺气肿、支气管炎、支气管炎扩张症(bronchiectasis)、囊性纤维变性(cystic fibrosis)、结核病、肺炎、呼吸窘迫综合症

(RDS- 新生儿的和成人的)、鼻炎和鼻窦炎;(2) 抑制在细胞或器官移植中或在使用人造器官或植入物期间出现的补体激活(例如,通过用本发明的肽包裹或以其它方式处理细胞、器官、人造器官或植入物);(3) 抑制在生理液(血、尿)体外分流期间出现的补体激活(例如,通过用本发明的肽包被液体分流经过的管道);以及(4) 用于筛选小分子文库以鉴别其它的补体抑素活化抑制剂(例如,为测量待测化合物与补体抑素类似物竞争结合 C3 或 C3 片段之能力而设计的液相或固相高通量测定法)。

[0074] 为了实现上述的一种或多种功用,本发明的另一方面涉及含本文所述及例举的补体抑素类似物或缀合物的药物组合物。这样的药物组合物可能单独由活性成分以适于施用于受试者的形式组成,或者所述药物组合物可包含活性成分和一种或多种药用可接受载体、一种或多种另外的成分、或者这些成分的某些组合。正如本领域众所周知的,活性成分可以生理学可接受酯或盐的形式例如与药用可接受阳离子或阴离子结合的形式存在于药物组合物中。

[0075] 药物组合物的剂型可通过药理学领域已知的或此后研发的任何方法制备。通常,这样的制备方法包括使活性成分与载体或一种或多种其它附属成分相缔合的步骤,然后如果需要或期望,将产物整形或包装成期望的单剂量或多剂量单位。

[0076] 用于此处时,术语“药用可接受载体”意味着补体抑制剂可与之组合并且在组合后它能用于将补体抑制剂施用于哺乳动物的化学组合物。

[0077] 提供以下实施例以更详细的描述本发明。它们意图用于举例说明,而非对本发明的限制。

[0078] 实施例 1

[0079] 对 [Tyr⁴Ala⁹]-Ac- 补体抑素 (Ac-Ic[CVYQDWGAHRC]T-NH₂; SEQ IDNO:3) 进行单 N^α- 甲基化扫描。基于这些类似物的检验结果,对 [Trp(Me)⁴Ala⁹]-Ac- 补体抑素 (Ac-Ic[CV(1-MeW)QDWGAHRC]T-NH₂; SEQ IDNO:4) 进行第 13 位的选择性 N- 甲基化和取代。用表面等离子体共振 (SPR) 和等温滴定量热法 (ITC) 对选定的类似物进行进一步的表征。此外还进行分子动力学 (MD) 模拟来探究所观察到的亲和力增高的可能机制。

[0080] 材料和方法:

[0081] 缩写词。Ac, 乙酰基;Acm, 乙酰氨基甲基;Boc, 叔丁氧羰基;CHARMM, 哈佛高分子化学力学 (Chemistry at Harvard Macromolecular Mechanics);DCM, 二氯甲烷;DIC, 1,3- 二异丙基碳二亚胺;DIPEA, N, N- 二异丙基乙胺;DMF, N, N- 二甲基 - 甲酰胺;ELISA, 酶联免疫吸附测试;ESI, 电喷射离子化;Fmoc, 9- 芴甲氧羰基;HOAt, 1- 羟基 -7- 氮杂苯并三唑;ITC, 等温滴定量热法;MALDI, 基质辅助的激光解吸电离;MBHA, 4- 甲基二苯甲胺;MOE, 分子运行环境;NAMD, 纳米分子动力学;Nle, L- 正亮氨酸;NMP, N- 甲基吡咯烷酮;RMSD, 均方根偏差;SPR, 表面等离子体共振;TIPS, 三异丙基硅烷;Trt, 三苯甲基。

[0082] 化学品。低负载场酰胺 (Low-loading Rink amide) MBHA 树脂及以下 Fmoc- 氨基酸获自 Novabiochem (San Diego, CA): Ile, Cys (Acm), Val, Tyr (tBu), Gln (Trt), Asp (OtBu), Trp (Boc), Gly, Sar, Ala, MeAla, His (Trt), Arg (Pmc), MeIle, Nle, Phe 和 Thr (tBu)。DIC 和 Fmoc-Trp (Me)-OH 购自 AnaSpec (San Jose, CA)。HOAt 购自 Advanced ChemTech (Louisville, KY)。NMP 和 DCM 获自 Fisher Scientific (Pittsburgh, PA)。用于合成的所有其它化学试剂均购自 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) 并且未经进一步纯化即使

用。

[0083] 肽合成和纯化。所有肽均是用 DIC 和 HOAt 作为偶联试剂通过 Fmoc 固相方法手工合成的。在 N-甲基化氨基酸没有市售的时候,用 Biron 等 (2006, J Peptide Sci 12: 213-219) 报告的优化方法进行 N-甲基化。以下步骤用于合成线性肽:将 Rink amide MBHA 树脂 (294mg, 0.34mmol/g) 放入底部有玻璃质的 10mL HSW 聚丙烯注射器 (Torviq, Niles, MI) 中并在 DCM (5mL) 中溶胀 30 分钟。在去除 Fmoc 保护基 (NMP 中的 25% 吡啶, 5mL, 5 和 10 分钟) 之后,将树脂用 NMP (每次 5mL) 和 DCM (每次 5mL) 洗 4 次,然后将各氨基酸偶联到树脂上。对于每个偶联,用 3 当量 (3mmol) 的氨基酸、HOAt 和 DIC,在 NMP 中预活化 10 分钟。所有的偶联均进行 1 小时并用 Kaiser 检测或四氯对醌检测进行监测。倘若是阳性结果,则重复偶联直至观察到阴性检测结果。

[0084] 用 20 当量的乙酸酐和 2 当量的 DIPEA 在 5mL DCM 中将 N-末端氨基乙酰化 30 分钟。用醋酸亚砷在 DMF/茴香醚 (19:1) 中将含 Cys (Acm) 残基的线性肽室温于树脂上环化 3 小时。将树脂用 DMF, DCM 和 DCM/二乙醚 (1:1) 洗 4 次 (每次洗涤各 5mL), 然后真空干燥 4 小时。用 95% TFA, 2.5% 水和 2.5% TIPS 的混合物将肽从树脂上裂解下来 3 小时。待 TFA 在真空中挥发后,将肽沉淀并用 30mL 冷二乙醚 / 次洗 3 次。通过离心将液体与固体分离并轻轻倒出。将粗制的肽在空气中干燥并溶于乙腈和含 0.1% TFA 的水 (1:3) 中,然后通过制备型 RP-HPLC (Vydac C₁₈218TP152022 柱, Western Analytical Products, Murrieta, CA) 进行纯化并用在 0.1% TFA 水溶液中线性梯度 15-50% 的乙腈以流速 15mL/分钟洗脱 35 分钟。将含预期产物的级分收集、浓缩并冻干。纯化肽以 10-15% 总产率分离,且经分析型 RP-HPLC (Phenomenex 00G-4041-E0 Luna 5 μ C₁₈100A column, 250x4.60mm; Phenomenex, Torrance, CA) 测定其纯度大于 95%。用 ThermoQuest Finnigan LCQ Duo 和 Waters MALDI micro MX 设备证实各个肽的质量。

[0085] C3 的纯化。从获自宾夕法尼亚大学 (University of Pennsylvania) 医院血库的新鲜人血浆中纯化 C3。简而言之,用 15% (w/v) 的 PEG 3350 将血浆分级分离,然后将沉淀重悬于 20mM 磷酸盐缓冲液 pH 7.8 中,然后用相同的缓冲液在 DEAE-HR 40 柱 (50x5cm; Millipore Inc., Billerica, MA) 上进行阴离子交换层析。用 6L 线性梯度 (15-70%) 的含 500mM NaCl 的 20mM 磷酸盐缓冲液 pH 7.8 洗脱蛋白质。进一步用分子排阻 Superdex 20026/60 柱 (Amersham Biosciences) 和 Mono S 柱 (Amersham Biosciences) 纯化 C3 以便将 C3 从 C3(H₂O) 中分离。

[0086] 补体激活的抑制。通过 ELISA 评估补体抑素类似物抑制补体经典途径激活的能力 (Mallik et al., 2005, J Med Chem 48:274-86)。简而言之,在存在或缺乏补体抑素类似物的情况下用抗原-抗体复合物在人血清中激活补体,然后用 HRP-缀合的多克隆抗-C3 抗体检测 C3 片段在平板表面上的沉积。基于相应于 100% 补体激活的吸收值,将 405nm 处的吸收值数据转换成百分比抑制。用百分比抑制对肽浓度作图,将产生的数据组用 Origin 7.0 软件拟合成对数剂量-应答函数。从产生最低 χ^2 值的拟合参数获取 IC₅₀ 值。对每个类似物测定至少 3 至 7 次。标准偏差在平均值的 30% 内。

[0087] ITC 分析。所有 ITC 实验均经由 Microcal VP-ITC 量热器 (Microcal Inc., Northampton, MA) 进行,在小室内使用 1.8-5 μ M 的 C3 浓度,在注射器内使用 40-100 μ M 各补体抑素类似物的肽浓度。所有滴定均用每次 2-7 μ L 的多次肽注射在 PBS (10mM 磷酸盐缓冲

液,含 150mM NaCl, pH 7.4) 中于 25℃进行。通过扣除代表肽注射剂缓冲液中的等温线对原始等温线校正稀释热。用 Origin 7.0 软件将产生的等温线拟合成位点模型的单一位点,产生最低 x^2 值的模型被认为适合于相应的数据组。按照 $\Delta G = \Delta H - T \Delta S$ 计算 Gibbs 自由能。每个实验重复至少两次。误差在平均值的 20% 以内。

[0088] SPR 分析。如上所述,经由 SPR 在 Biacore 3000 仪器 (GE Healthcare Corp., Piscataway, NJ) 上于 25℃用 PBS-T(10mM 磷酸钠,150mM NaCl,0.005% Tween-20, pH 7.4) 作为运行缓冲液分析 C3b 和各个补体抑素类似物之间相互作用的动力学。简而言之,将生物素化的 C3b (30 μ g/mL) 固定在链霉亲和素包被的传感器芯片上,然后将各个类似物的两倍系列稀释液 (1 μ M–500pM) 以 30 μ L/分钟注射 2 分钟,伴随着 5–10 分钟的解离期。在每个实验系列中均包括肽 [Trp(Me)⁴]-Ac- 补体抑素作为内部对照和参考。用 Scrubber (BioLogic Software, Campbell, Australia) 进行数据分析。扣除来自未处理流动室和缓冲液空白注射系的信号以校正缓冲液影响和注射的人为现象。处理过的生物传感器数据全面拟合 1 : 1 的 Langmuir 结合模型,然后从方程式 $K_D = k_d/k_a$ 计算平衡解离常数 (K_D)。在每个实验中均一式两份注射肽溶液,每个筛选检验进行至少两遍。 k_a 和 k_d 的误差在平均值的 10% 以内。

[0089] 分子动力学模拟。所有的 MD 模拟均通过程序 NAMD (Phillips, et al., 2005, J. Comput. Chem. 26 :1781–1802) 使用 CHARMM27 力场进行。对于游离的补体抑素类似物,采用 NMR 结构 (Morikis & Lambris, 2002, Biochem. Soc. Trans. 30 :1026–1036) (PDB code : 1A1P) 来建立起始结构。用程序分子运行环境 (MOE, Chemical Computing Group, 2005) 引入点突变。用 CHARMM (Brooks et al., 1983, J. Comput. Chem. 4 :187–217) 版本 c33b1 以 CHARMM27 (MacKerell et al., 1998, J. Phys. Chem. B102 :3586–3616) 参数设置将补体抑素类似物的突变残基最少化,而调和约束则置于骨架原子上。用同源建模添加在晶体结构中缺失的补体 C3c 残基并同样用 CHARMM 进行最少化。

[0090] 维持 PDB 卷宗中的结晶水分子,将结构在 TIP3P (Jorgensen et al., 1983, J. Chem. Phys. 79 :926–935) 水分子的立体周期盒中溶剂化。水模拟盒边缘与溶质最近原子之间的距离是至少 **10 Å**。然后用 VMD 程序 (Humphrey et al., 1996, J. Mol. Graphics 14 :33–38, 27–28) 加入钠和氯抗衡离子以维持系统的电中性。

[0091] 首先以三个连续步骤使系统最小化,此期间使蛋白质最初保持固定而水分子可允许移动 10,000 个共轭梯度步骤;然后,只有蛋白质骨架保持固定进行 100,000 步;最后,所有的原子均被允许移动又 10,000 步。用颗粒网筛埃瓦尔德方法 (particle mesh Ewald method) (Darden et al., 1993, J. Chem. Phys. 98 :10089–10092) 处理在具有约一个点每 **Å** 之格栅的周期性边界条件下的长程静电相互作用。非键合的范德华相互作用在 9 和 **12 Å** 之间进行跨越 **3 Å** 的平稳转换。用 SHAKE 约束与氢原子结合所涉及的键长 (Ryckaert et al., 1977, J. Comput. Phys. 23 :327–341)。所有 MD 模拟有关的时间步长均为 2fs。用 Nosé-Hoover Langevin 活塞 (Feller et al., 1995, J. Chem. Phys. 103 :4613–4621; Martyna et al., 1994, J. Chem. Phys. 101 :4177–4189) 进行压力控制,活塞期设定为 200fs 而活塞衰减为 100fs。以恒定体积进行 100ps 的 MD 模拟,此期间系统以 30K 的增量加热至 310K;随后在对游离补体抑素类似物和复合物之所有溶质原子无任何约束的条件下进行等温等压 MD 模拟 20ns 和 5ns 以调节溶剂密度。最后,从 MD- 平衡轨迹文件获取最低能量结构并随后用

于结构和熵贡献分析中。

[0092] 结果：

[0093] 补体激活的抑制。在 [Tyr⁴Ala⁹]-Ac- 补体抑素模板（肽 1；SEQ IDNO：3）上进行骨架 N- 甲基化扫描以产生类似物 2-13（表 1-1）。尽管肽 1 不如目前的引导化合物 [Trp(Me)⁴Ala⁹]-Ac- 补体抑素（肽 14，SEQ IDNO：4）有效，但因其合成成本较低而被选择用于初始扫描。然后用 ELISA 对各肽抑制补体激活的能力进行评估，并与肽 1 的活性进行比较（表 1-1）。对于 Val³，Tyr⁴ 和 Ala⁹ 的 N- 甲基化观察到了最负面的效应，它们使得肽 3,4 和 9 完全失活。相反，Gly⁸ 和 Thr¹³ 的 N- 甲基化产生了效力轻微提高的肽 8 和 13（分别是 1.7- 和 1.3- 倍）。在所有其它位置的 N- 甲基化均导致了可检测的、但显著降低的抑制活性（表 1-1）。

[0094] 表 1-1. [Tyr⁴Ala⁹]-Ac- 补体抑素（肽 1；SEQ ID NO：3）的 N^a- 甲基化类似物对补体经典激活途径的抑制

肽	序列	IC ₅₀	IC ₅₀	变化倍
		(CP, μ M)	数 ^a	
1 ^b	Ac-I [CVYQDWGAHRC] T-NH ₂ (SID 3)	2.4	1	
2	Ac-I [(NMe) CVYQDWGAHRC] T-NH ₂	7.5	0.3	
3	Ac-I [C (NMe) VYQDWGAHRC] T-NH ₂	NA	NA	
4	Ac-I [CV (NMe) YQDWGAHRC] T-NH ₂	NA	NA	
5	Ac-I [CVY (NMe) QDWGAHRC] T-NH ₂	33	0.07	
[0095] 6	Ac-I [CVYQ (NMe) DWGAHRC] T-NH ₂	44	0.06	
7	Ac-I [CVYQD (NMe) WGAHRC] T-NH ₂	25	0.1	
8	Ac-I [CVYQDW (NMe) GAHRC] T-NH ₂	1.43	1.7	
9	Ac-I [CVYQDWG (NMe) AHRC] T-NH ₂	NA	NA	
10	Ac-I [CVYQDWGA (NMe) HRC] T-NH ₂	94	0.03	
11	Ac-I [CVYQDWGAH (NMe) RC] T-NH ₂	32	0.08	
12	Ac-I [CVYQDWGAHR (NMe) C] T-NH ₂	154	0.02	
13	Ac-I [CVYQDWGAHRC] (NMe) T-NH ₂	1.89	1.3	

[0096] 注释：^a 有关肽 1. NA：无活性，^b 数据来自 Sahu et al., 1996, J. Immunol. 157：884-891.

[0097] 然后我们将来自 N- 甲基化扫描的发现应用于目前的有效类似物，即 Ac-I [CV (1-MeW) QDWGAHRC] T-NH₂ (SEQ ID NO：4；在此又称为 [Trp(Me)⁴Ala⁹]-Ac- 补体抑素，肽 14) 以及在第 8 和 13 位具有选择性 N- 甲基化和氨基酸取代的合成类似物（肽 15-23；表 1-2）。既然先前的研究已指示取代第 8 位侧链的限制 (Morikis et al., 1998, Protein Sci. 7：619-627；Furlong et al., 2000, Immuno Pharmacology 48：199-212)，所以修饰被限于 N- 甲基化的缺失 (Gly⁸) 或存在 (NMeGly⁸，即 Sar⁸)。相反，先前的工作显示 C 末端第 13 位允许对取代有更多的灵活性，甚至暗示优选 Ile 而非 Thr (Morikis & Lambris, 2002, Biochem. Soc. Trans. 30：1026-1036)。因此我们进一步研究第 13 位的重要性并设计了一系列 Sar⁸ 类似物以包括在此位置的各种 N- 甲基化，疏水或芳香族残基。与来自 N- 甲基化

扫描的结果一致,在第 8 位引入单一 N- 甲基 (Sar⁸; 肽 15) 将抑制效力提高了 1.3 倍 (表 1-3)。此外,在第 13 位用 Ile 取代 Thr 导致了针对 Gly⁸ 和 Sar⁸ 肽二者的显著增加。不过,无论是用 Leu 或 Nle 取代 Ile,还是引入 His 或 Phe,均未产生超过 Ile¹³ 类似物的任何提高。相反,Thr¹³ 和 Ile¹³ 二者的 N- 甲基化均导致抑制活性的显著增加 (分别是 IC₅₀ = 86 和 62nM),产生了迄今所述最有效的补体抑素类似物。

[0098] 表 1-2 :在第 8 和 13 位有修饰的一系列补体抑素类似物 (Ac-Ile-c[Cys-Val-Trp(1-Me)-Gln-Asp-Trp-Gly-Ala-His-Arg-Cys]-Thr-NH₂) (肽 14, SEQ ID NO:4) 的抑制效力、动力学和热力学参数的评估。(括号内肽编号之后的数字是 SEQ ID NOs)。

[0099]

No.	Xaa ⁸	Xaa ¹³	IC ₅₀ (nM)	k _a (10 ⁶ /Ms)	k _d (10 ⁻³ /s)	K _{D SPR} (nM)	K _{D ITC} (nM)	ΔH (kcal/mol)	-TΔS (kcal/mol)	ΔG (kcal/mol)
14 (4)	Gly	Thr	206	1.0	11.3	11.9	15.0	-17.6	6.9	-10.7
15 (5)	Sar	Thr	159	1.3	7.2	5.5	8.5	-11.7	0.6	-11.1
16 (6)	Gly	Ile	154	1.0	11.0	11.0	12.1	-16.6	5.7	-10.9
17 (7)	Sar	Ile	92	1.5	6.6	4.4	6.3	-14.1	2.9	-11.2
18 (8)	Sar	Leu	108	1.3	6.0	4.6	N/D	N/D	N/D	N/D
19 (9)	Sar	Nle	109	1.5	6.6	4.4	N/D	N/D	N/D	N/D
20 (10)	Sar	(NMe) Thr	86	1.3	5.1	3.9	7.2	-17.5	6.4	-11.1
21 (11)	Sar	(NMe) Ile	62	1.5	3.5	2.3	4.5	-17.1	5.7	-11.4
22 (12)	Sar	His	160	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
23 (13)	Sar	Phe	257	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D

[0100] 结合动力学特性。用 SPR 对肽 15-21 进行进一步表征以评估各个取代对动力学图谱和对 C3b 之结合亲和力的影响 (表 1-2)。大体上,相对 K_D 值显示与 ELISA 结果具有良好的一致性 (R² = 0.79 ;表 1-3)。Gly⁸ 之 N- 甲基化 (肽 14 至 15, 16 至 17) 明显改善了结合动力学和亲和力,对两者的动力学速率常数都具有显著的效果。相反,用 Ile 取代 Thr (肽 14 至 16, 15 至 17) 则对 SPR 图谱只有轻微的、但依然有益的影响。此外,与 Sar⁸ 和 Ile¹³ 修饰单独的影响 (分别是 2.2- 和 1.1 倍) 相比,两种取代的结合 (肽 17) 具有协同效应,其亲和力比肽 14 强 2.7 倍。单独在第 13 位的取代似乎主要影响解离速率 (k_d = 3.4-7.2×10⁻³s⁻¹) ; 对于所有的 Sar⁸ 类似物,缔合速率基本上保持恒定 (k_a = 1.3-1.7×10⁶M⁻¹s⁻¹)。在此系列中, Thr¹³ (肽 20) 和 Ile¹³ (肽 21) 的 N- 甲基化再次对解离速率具有最强的影响,使得类似物 21 成为最强的结合物,具有比肽 14 高 5 倍以上的亲和力。经评估的 Ile¹³ 异构体 (Leu, Nle ;肽 18 和 19) 对动力学图谱和亲和力具有微不足道的影响,显示了此支架的常见结合模式。

[0101] 结合热力学表征。对肽 15-17 和 20-21 进行 ITC 实验以便将观察到的对亲和力和效力的影响与它们的热力学图谱关连起来 (表 1-2 和 1-3)。尽管 ITC 中的绝对 K_D 值趋向于稍微高于来自 SPR 的值,它们与 ELISA 和 SPR 结果高度相关 (分别是 R² = 0.89 和 0.96)。先前的引导化合物 (肽 14) 的非常有利的焓值 (ΔH = -17.6kcal/mol) 未被任何新设计的类似物超越。相反,当与肽 14 (-TΔS = 6.9kcal/mol) 相比时,全部设计均具有显著提高的

熵值 ($-T\Delta S = 0.6-5.7\text{kcal/mol}$)。

[0102] 表 1-3 :与 $[\text{Trp}(\text{Me})^4\text{Ala}^9]-\text{Ac}-$ 补体抑素 (肽 14) 相比新设计的补体抑素类似物在效力和结合参数上的相对改善

[0103]

No.	Xaa ⁸	Xaa ¹³	rP	rK _a	rK _d	rK _{D SPR}	rK _{D ITC}	$\Delta\Delta H$ (kcal/mol)	$-T\Delta\Delta S$ (kcal/mol)	$\Delta\Delta G$ (kcal/mol)
14	Gly	Thr	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	0	0	0
15	Sar	Thr	1.3	1.3	1.6	2.2	1.8	5.9	-6.3	-0.4
16	Gly	Ile	1.3	1.0	1.0	1.1	1.2	1.0	-1.3	-0.2
17	Sar	Ile	2.2	1.5	1.7	2.7	2.4	3.5	-4.1	-0.5
18	Sar	Leu	1.9	1.3	1.9	2.6	N/D	N/D	N/D	N/D
19	Sar	Nle	1.9	1.5	1.7	2.7	N/D	N/D	N/D	N/D
20	Sar	(NMe)Thr	2.4	1.3	2.2	3.1	2.4	0.1	-0.5	-0.4
21	Sar	(NMe)Ile	3.3	1.5	3.2	5.2	3.3	0.5	-1.3	-0.7
22	Sar	His	1.3	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
23	Sar	Phe	0.8	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D

[0104] 在所有已报道的补体抑素类似物中,肽 15 ($\text{Sar}^8\text{Thr}^{13}$; $-T\Delta S = 0.6\text{kcal/mol}$) 展示了最低的熵损失。不过,此巨大熵增量的大半被有利的焓的损失 ($\Delta\Delta H = 5.9\text{kcal/mol}$) 所抵销。对于全部设计均观察到相似的趋势,显示了焓-熵补偿的影响。额外的用 Ile^{13} 取代 Thr^{13} 在例如肽 17 中是收复了一些损失的焓 ($\Delta H = -14.1\text{kcal/mol}$),而在肽 15 中则产生了一些熵增加 ($-T\Delta S = 2.9\text{kcal/mol}$)。在位置 13 中的 N-甲基化,例如在肽 20-21 中,使它们的焓值更接近肽 14 的焓值。总而言之,对于这些肽而言增加的结合亲和力似乎主要是通过熵损失的减少达到的。此外,ITC 数据证实了 SPR 结果,显示是 Sar^8 而非 Ile^{13} 取代最大程度促成了肽 17 的亲和力大大提高。

[0105] MD 模拟。利用 MD 模拟基于补体抑素的 NMR 结构和 $[\text{Trp}^4]-\text{Ac}-$ 补体抑素与 C3c 的晶体结构 (Morikis et al., 1998, 见前文; Janssen et al., 2007, J. Biol. Chem. 282 : 29241-29247) 针对更小的肽修饰对类似物的热力学图谱的巨大影响进行进一步的研究。在第 8 位被 N-甲基化的情形下 (肽 17),我们怀疑此修饰影响了关键残基 Trp^7 的侧链,它与甲基化 Gly^8 氮直接相连并且占据了紧密的口袋。因此进行 MD 模拟来比较水分子在肽 14 和 17 之 Trp^7 结合口袋中的分布状态。我们发现,尽管对于肽 14 可观察到 4 个水分子,在重复对肽 17 进行模拟后未发现任何水分子。此结果表明在第 8 位的 N-甲基化允许 Trp^7 的侧链更好的适应 C3c 结合口袋。

[0106] 先前基于溶液的和结合蛋白质的结构之间的比较显示了显著的构象重排,包括在重要的 β -转角内的移动 (Janssen et al., 2007, 见前文)。由于已报道 N-甲基化影响了肽骨架的部分构象,我们在缺乏和存在 C3c 的情况下对肽 14 和 17 进行了 MD 模拟,然后比较了游离的和结合的肽的最低能量构象异构体 (Chatterjee et al., 2008, Acc. Chem. Res. 41 : 1331-1342)。结果显示,在两种肽的游离结构中,包含残基 5-8 的 β -转角打开了,而残基 8 和 11 之间形成了新的转角。此外,这些 β -转角与结合结构中的 β -转角很好地

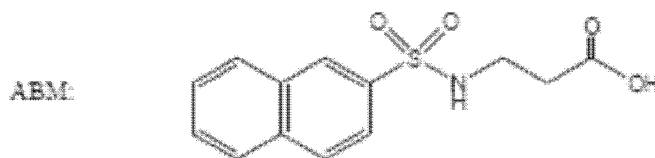
重叠。不过,只在肽 17 的情形下形成了 Trp⁷ 和 Arg¹¹ 之间距离 **2.9 Å** 的分子内氢键,这可能限制了游离 17 的构象并使其更具刚性。

[0107] 实施例 2

[0108] 此实施例描述了显示如下与白蛋白结合肽 (ABP) 或白蛋白结合小分子 (ABM) 缀合的补体抑素类似物 (实施例 1 所述的肽 17 :Ac-Ile-c[Cys-Val-Trp(Me)-Gln-Asp-Trp-Sar-Ala-His-Arg-Cys]-Ile-NH₂;SEQ ID NO:7) 的改良合成及血浆半寿期测定。

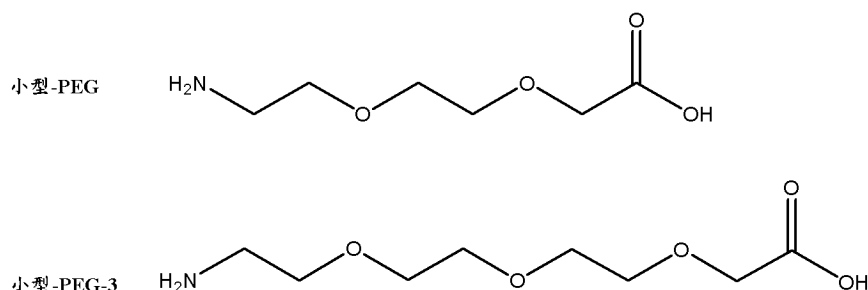
[0109] ABP :Ac-RLIEDICLPRWGCLWEDD-NH₂ (C-C 二硫键) (SEQ ID NO:14)

[0110]



[0111] 将两个小型 -PEG-3 分子用作间隔物并与肽 17 的 C-末端偶联。

[0112]



[0113] 为了进行比较,也测定了未缀合肽 17 的血浆半寿期。

[0114] 材料和方法:

[0115] 缩写词。Ac, 乙酰基;Acm, 乙酰氨基甲基;DCM, 二氯甲烷;DIC, 1, 3-二异丙基碳二亚胺;DIPEA, N,N-二异丙基乙胺;DMF, N,N-二甲基-甲酰胺;ELISA, 酶联免疫吸附测定;ESI, 电喷射离子化;Fmoc, 9-芴甲氧羰基;HLB, 亲水亲油平衡;HOAt, 1-羟基-7-氮杂苯并三唑;HSW, Henke Sass Wolf;ITC, 等温滴定量热法;MALDI, 基质辅助的激光解吸电离;MBHA, 4-甲基二苯甲胺;Mmt, 单甲氧基三苯甲基;NanoESI, 纳米电喷雾离子化;NMP, N-甲基吡咯烷酮;PyBOP, 苯并三唑-1-基-氧基三吡咯烷基磷六氟磷酸盐;SPR, 表面等离子体共振;TBTA, 三(苯基三唑基甲基)胺;TEA, 三乙胺;TFA, 三氟乙酸;TIPS, 三异丙基硅烷;Trt, 三苯甲基。

[0116] 材料。DIC 和 Fmoc-Trp(Me)-OH 购自 AnaSpec (San Jose, CA)。低负载 NovaSyn® TGR 树脂和其它 Fmoc-氨基酸 获自 Novabiochem (San Diego, CA)。小型 -PEG 和小型 -PEG-3 购自 Peptide International (Louisville, Kentucky)。HOAt 购自 Advanced ChemTech (Louisville, KY)。ABM 获自 Enamine Ltd. (Kiev, Ukraine)。NMP 和 DCM 获自 Fisher Scientific (Pittsburgh, PA)。水是用 Milli-Q 水纯化系统 (Millipore Corporate, Billerica, MA) 纯化的。所有其它用于合成的化学试剂均购自 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) 且未经进一步纯化即使用。

[0117] 线性肽 (肽 17-小型 (PEG-3)₂-Lys(Mmt)-NH₂ 和 ABP) 的合成。所有肽均是用 DIC 和 HOAt 作为偶联试剂通过 Fmoc 固相方法手工合成的。简而言之,将树脂 (294mg, 0.34mmol/

g) 放入底部有玻璃质的 10mL HSW 聚丙烯注射器 (Torviiq, Niles, MI) 中并在 DCM(5mL) 中溶胀 30 分钟。在去除 Fmoc 保护基 (NMP 中含 25% 吡啶, 5mL, 5 和 10 分钟) 之后, 将树脂用 NMP (每次 5mL) 和 DCM (每次 5mL) 洗 4 次, 然后将各个氨基酸偶联到树脂上。对于每个偶联, 使用 3 当量 (0.3mmol) 的氨基酸、HOAt 和 DIC, 在 NMP 中预活化 10 分钟。所有的偶联均进行 1 小时并用 Kaiser 检测或四氯对醌检测进行监测至完成。倘若需要, 用 20 当量的乙酸酐和 2 当量的 DIPEA 在 5mL DCM 中将 N- 末端氨基乙酰化 30 分钟。

[0118] 肽环化、修饰和裂解。用三氟醋酸亚铊 (thallium trifluoroacetate) 在 DMF/ 茴香醚 (19 : 1) 中将含 Cys (Acm) 残基的线性肽室温于树脂上环化 3 小时。为了合成叠氮-肽 17, 用配制于含 5% TIPS 之 DCM 中的 1% TFA 去除肽 17 衍生物 C 末端 Lys 的侧链 Mmt 保护基。然后, 用配制于 NMP 中的 PyBOP/HOAt/DIPEA 将 2- 叠氮乙酸偶联至侧链上。以相似方式合成肽 17-ABM。为了合成炔基-ABP, 用配制于 NMP/DCM (1 : 1) 中的 DIC/HOAt 将丙炔酸偶联至 ABP 的 N 末端。将树脂用 DCM 和 DCM/ 二乙醚 (1 : 1) 彻底清洗, 并且高真空干燥 4 小时, 然后用 95% TFA, 2.5% 水和 2.5% TIPS 的混合物裂解 2 小时。待在真空中挥发 TFA 后, 将肽沉淀并用 30mL 冷二乙醚 / 次洗 3 次。通过离心将液体与固体分离并轻轻倒出。将粗制的肽在空气中干燥并溶于乙腈和含 0.1% TFA 的水 (1 : 3) 中供 HPLC 纯化。

[0119] 用于肽 17-ABP 合成的 Cupper(I) 介导的叠氮-炔烃 Huisgen 环加成反应。将 50mg (22 μ mol) 的各个已纯化叠氮和炔烃肽溶于 5mL t-BuOH/H₂O (2 : 1) 中。加入 10 当量 (220 μ mol) 的 TEA 使溶液变碱性。然后将 5% (1.1 μ mol) 的 CuSO₄, 25% 的抗坏血酸钠和 1% 的 TBTA 加入混合物中。将混合物搅拌过夜, 通过 HPLC-MS 进行监测。然后真空浓缩并用反相 HPLC 进行纯化。

[0120] 肽纯化。将肽注射入制备型 RP-HPLC 柱 (Xbridge BEH130Prep C185um 19x150mm, PN#186003945, Waters, Milford, MA) 中, 并用含 0.1% TFA 中线性梯度 15-50% 的乙腈以流速 20mL/ 分钟洗脱 15 分钟。基于质量收集含预期产物的级分并冻干。经分析型 RP-HPLC (Xbridge BEH130C185um, 4.6x150mm, PN#186003580, Waters, Milford, MA) 测定纯化肽纯度大于 95%。用 Waters MALDI micro MX 设备或 SYNAPT HDMS 证实各个肽的质量。

[0121] 补体激活的抑制。如实施例 1 所述通过 ELISA 评估补体抑素类似物抑制补体经典途径激活的能力。每个缀合物检测至少 3 次。

[0122] SPR 分析。如实施例 1 中所述, 经由 SPR 在 Biacore 3000 仪器 (GEHealthcare Corp., Piscataway, NJ) 上于 25°C 用 PBS-T (10mM 磷酸钠, 150mM NaCl, 0.005% Tween-20, pH 7.4) 作为运行缓冲液分析 C3b 和各个补体抑素类似物之间的相互作用动力学。简而言之, 将生物素化的 C3b (30 μ g/mL) 固定在链霉亲和素包被的传感器芯片上, 然后将两倍系列稀释度 (1 μ M-500pM) 的各个类似物以 30 μ L/ 分钟注射 2 分钟, 伴随着 5-10 分钟的解离期。在每个实验系列中均包括肽 17 (未缀合的) 作为内部对照和参考。用 Scrubber (BioLogic Software, Campbell, Australia) 进行数据分析。扣除来自未处理流动室胞和缓冲液空白注射系列的信号以校正缓冲液影响和注射的人为现象。处理过的生物传感器数据全面符合 1 : 1 的 Langmuir 结合模型, 然后从方程式 $K_D = k_d/k_a$ 计算平衡解离常数 (K_D)。在每个实验中式两份注射肽溶液, 每个筛选检验进行至少两遍。

[0123] 通过 SPE 从血浆样品中提取补体抑素类似物。将 96-孔板 HLB Oasis10mg (Waters, Milford, MA) 用于提取。通过加入 500 μ L 的甲醇、随后加入 500 μ L 的 milli-Q 水使 SPE 材

料调理化。通过加入内部标准并随后用 4% H_3PO_4 进行 1 : 1 稀释来制备样品。加载样品后,用 500 μL 含 5% 甲醇的 0.1% 甲酸进行清洗。用 150 μL 含 65% 甲醇的 0.1% 甲酸洗脱样品并收集于收集板中。在加速真空浓缩仪中将溶剂挥发干并在含 5% 乙腈的 0.1% 甲酸中重构。样品在 -20°C 中保存直至分析。

[0124] 通过消化从血浆样品中分离肽 17-ABP 和肽 17-ABM。将狒狒血浆样品 40 μL 与内部标准混合并用 40mM 碳酸铵缓冲液 1 : 1 溶解。加入 Rapigest 去垢剂至终浓度 0.1%。将二硫桥在 5mM DTT 中于 60°C 还原 30 分钟。添加碘乙酰胺至终浓度 15mM 并在黑暗中孵育 30 分钟完成半胱氨酸的烷基化。通过加入 16 μL 的 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 胰蛋白酶溶液并在 37°C 孵育过夜来酶促消化样品。此后,用 5% TFA 降低样品 pH 以便引起去垢剂降解。为了避免极其疏水的肽的非特异性吸附,将乙腈加至 20%。将样品在 6°C 以 14000rpm 离心 30 分钟,并用 0.1% 甲酸稀释上清液以降低乙腈浓度至 10%,然后用 10kDa 截留值的 microcon 离心过滤器 (Millipore, Billerica, MA) 过滤。用 50 μL 含 10% ACN 的 0.1% 甲酸清洗过滤器并将收集的样品蒸发至干燥,然后重溶于含 10% ACN 的 0.1% 甲酸中。

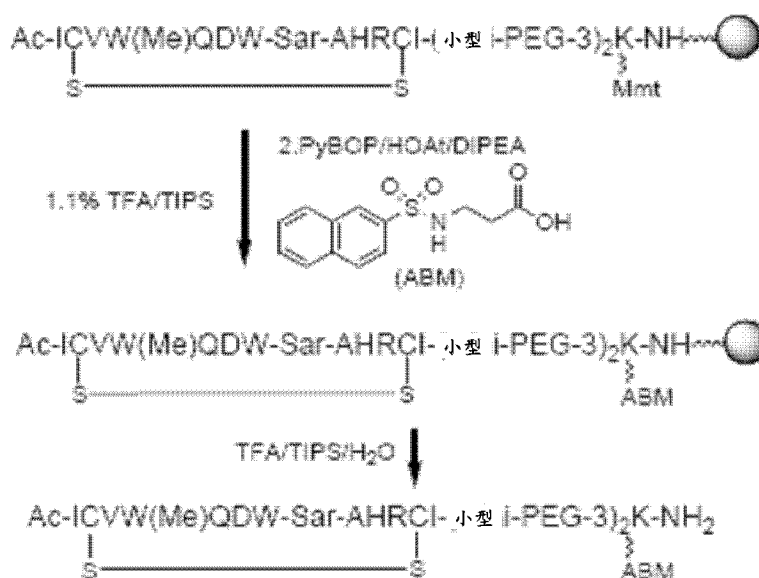
[0125] LC-MS/MS 分析。在用 MassLynx 4.1 软件 (Waters) 控制并配备了 nanoESI 源的 SYNAPT HDMS (Waters, Milford, MA) 上进行 LC-MS/MS 分析。每个样品一式三份注入。利用 nanoACQUITY UPLC (Waters) 系统通过反相液相色谱进行肽分离。注入后,用 3% 流动相 A (0.1% 甲酸水溶液) 以 5 $\mu\text{L}/\text{分钟}$ 的流速在 5 μm Symmetry C18 柱 (180 $\mu\text{m} \times 20\text{mm}$, Waters) 上捕获分析物 3 分钟,然后进一步在 1.7 μm BEH130C18 柱 (75 $\mu\text{m} \times 150\text{mm}$, Waters) 上分离。分析柱温度保持在 35°C 。以流速 0.3 $\mu\text{L}/\text{分钟}$ 将肽分开。梯度是线性 3-40% B (含 0.1% 甲酸的乙腈),针对被消化的样品或者 50 分钟长,或者 60 分钟。毛细管电压是 3.2kV,锥孔电压是 35V,而喷射源的温度是 100°C 。以 30 秒的取样速率将 [Glu1]- 纤维蛋白原肽用于锁定质量校正。以阳性模式跨越 m/z 范围 400-2000Da 以 0.6s 的扫描速率获取质谱。用于 MS/MS 函数的时间窗口是选定肽的停留时间的 ± 3 分钟。通过 MS/MS 证实分析物的存在。通过分析空白样品以确定与分析物一起共洗脱的任何干扰物的存在来研究选择性。

[0126] 体内停留。使用了体重 5-8kg 的 Juvenile 狒狒 (P. Anubis, Baboon Research Resources, University of Oklahoma)。用了 3 只狒狒进行研究;针对每种化合物用一只。所有动物均通过外周静脉注射接受推注剂量的肽 (10mg)。将用于 LC-MS/MS 测定的血液样品收集在含 50 μg lepirudin 的 1-ml 塑料管中并以 2000g 于 4°C 离心 20 分钟进行血浆分离。血浆样品贮存于 -70°C 。在注射肽 17 后于 20, 40, 60, 90, 120 分钟以及在注射肽 17-ABP 和肽 17-ABM 后 1 分钟、30 分钟然后 1, 6, 24 和 48 小时收集血液样品。

[0127] 结果:

[0128] 肽 17-ABM 的合成。如以下反应示意图所总结的,在固相肽合成和 HPLC 纯化后获得肽 17-ABM。经各个氨基酸的单一偶联合成线性肽。用三氟醋酸亚铊 (thallium trifluoroacetate) 和碘评估二硫键形成。前者产生更清洁的反应,并在此后用于所有的环化反应。通过 HPLC-MS 和 ESI-TOF 证实肽 17-ABM 的质量 ($[\text{MH}]^{2+}$ 计算值 1211.06,实测值 1211.05)。

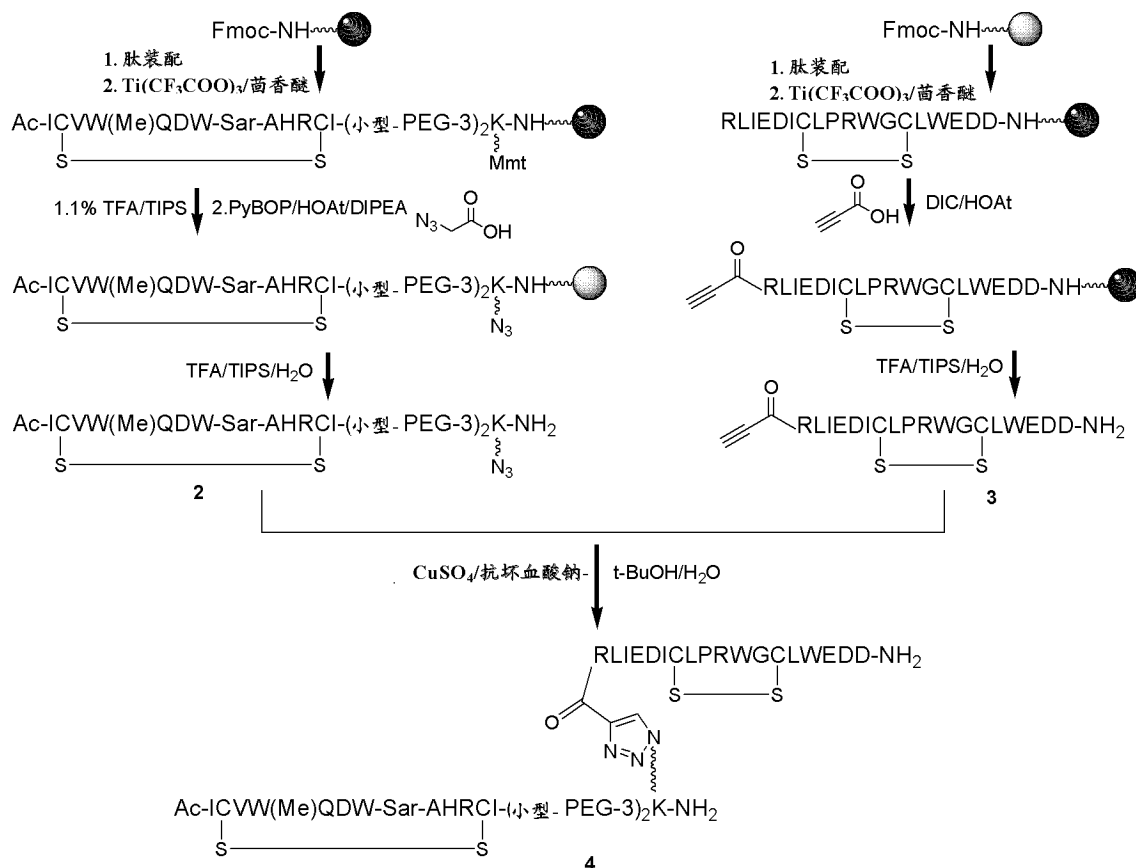
[0129]



肽 17-ABM

[0130] 肽 17-ABP 的合成。依照以下反应示意图,将溶液中的叠氮-炔烃 Huisgen 环加成反应用于缀合。从 2- 溴乙酸和叠氮化钠合成 2- 叠氮基乙酸。然后在于树脂上形成二硫键后将其与 C- 末端 Lys 侧链偶联。在裂解和 HPLC 纯化后分别以 12.7% 和 12.3% 的回收率获得中间产物 2 和 3。

[0131]



肽 17-ABP (以上示意图中的“4”)

[0132] 针对叠氮-炔烃 Huisgen 环加成反应比较了三种不同的溶剂体系。用 t-BuOH/H₂O

体系观察到了最佳结果,随后是 ACN/H₂O 体系。当单独使用 DMF 作为溶剂时没有观察到产物。此外还评估了叔碱基的重要性。在没有添加过量 TEA 情况下 2 小时后未检测到产物。在优化条件下,反应干净,并且肽 17-ABP 在 HPLC 纯化后以 50%回收率分离。通过 ESI-TOF 进一步证实了产物的质量 ($[MH]^{4+}$ 计算值 1131.78,实测值 1131.52)。

[0133] 补体激活的抑制。用人血清通过 ELISA 评估肽 17-ABM 和肽 17-ABP 抑制补体激活经典途径的能力。结果如表 2-1 中所示。

[0134] 表 2-1. 肽 17 与 ABP 或 ABM 缀合物的 ELISA 和 SPR 分析结果

[0135]

肽	IC ₅₀ (nM, CP)	IC ₅₀ (变化倍数*)	K _{on} (10 ⁶ , M ⁻¹ · s ⁻¹)	K _{off} (10 ⁻³ , s ⁻¹)	K _D (nM)
肽 17	92	1	1.0	6.6	4.4
肽 17-ABM	137	0.67	1.2	5.6	4.7
肽 17-ABP	242	0.38	0.1	3.6	32

[0136] * 相对于肽 17 的倍数变化

[0137] 狒狒中的血浆浓度。在经静脉内推注入狒狒后用 LC-MS/MS 测定肽 17 和 ABP 与 ABM 之缀合物的血浆浓度。肽 17 显示了 60 分钟左右的半寿期。肽 17-ABM 展示了 5 倍的提高,具有 5 小时的半寿期。对肽 17-ABP 观察到最长的半寿期 21 小时,它是未缀合肽 17 的半寿期的 21 倍。

[0138] 本发明不局限于以上叙述和例举的实施方案,而是可以在所附的权利要求的范围内进行变化和改进。

<220>
<221> VARIANT
<222> (10).. (10)
<223> Xaa是His, Ala, Phe或Trp

<220>
<221> VARIANT
<222> (14).. (14)
<223> Xaa是L-Thr, D-Thr, Ile, Val或Gly

<220>
<221> VARIANT
<222> (15).. (15)
<223> Xaa是Asn或Ala, 或缺少

<220>
<221> VARIANT
<222> (16).. (16)
<223> Xaa是Asn或缺少

<400> 2

Xaa Xaa Cys Val Xaa Gln Asp Xaa Gly Xaa His Arg Cys Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

<210> 3
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成序列

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1).. (1)
<223> 乙酰化

<220>
<221> 二硫桥
<222> (2).. (12)

<400> 3

Ile Cys Val Tyr Gln Asp Trp Gly Ala His Arg Cys Thr
1 5 10

<210> 4
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成序列

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1).. (1)
<223> 乙酰化

<220>
<221> 二硫桥
<222> (2).. (12)

<220>
<221> MOD_RES
<222> (4).. (4)
<223> 甲基化

<400> 4

Ile Cys Val Trp Gln Asp Trp Gly Ala His Arg Cys Thr
1 5 10

[0003]

<210> 5
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成序列

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> 乙酰化

<220>
<221> 二硫桥
<222> (2)..(12)

<220>
<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> 甲基化

<220>
<221> MOD_RES
<222> (8)..(8)
<223> 甲基化

<400> 5

Ile Cys Val Trp Gln Asp Trp Gly Ala His Arg Cys Thr
1 5 10

<210> 6
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成序列

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> 乙酰化

<220>
<221> 二硫桥
<222> (2)..(12)

<220>
<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> 甲基化

<400> 6

Ile Cys Val Trp Gln Asp Trp Gly Ala His Arg Cys Ile
1 5 10

<210> 7
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成序列

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> 乙酰化

<220>

[0004]

<221> 二硫桥
<222> (2)..(12)

<220>
<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> 甲基化

<220>
<221> MOD_RES
<222> (8)..(8)
<223> 甲基化

<400> 7
Ile Cys Val Trp Gln Asp Trp Gly Ala His Arg Cys Ile
1 5 10

<210> 8
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成序列

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> 乙酰化

<220>
<221> 二硫桥
<222> (2)..(12)

<220>
<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> 甲基化

<220>
<221> MOD_RES
<222> (8)..(8)
<223> 甲基化

<400> 8
Ile Cys Val Trp Gln Asp Trp Gly Ala His Arg Cys Leu
1 5 10

<210> 9
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成序列

<220>
<221> 二硫桥
<222> (2)..(12)

<220>
<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> 甲基化

<220>
<221> MOD_RES
<222> (8)..(8)
<223> 甲基化

<220>
<221> VARIANT

[0005]

<222> (13).. (13)
<223> Xaa是正亮氨酸

<400> 9

Ile Cys Val Trp Gln Asp Trp Gly Ala His Arg Cys Xaa
1 5 10

<210> 10
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成序列

<220>
<221> 二硫桥
<222> (2).. (12)

<220>
<221> MOD_RES
<222> (4).. (4)
<223> 甲基化

<220>
<221> MOD_RES
<222> (8).. (8)
<223> 甲基化

<220>
<221> MOD_RES
<222> (13).. (13)
<223> 甲基化

<400> 10

Ile Cys Val Trp Gln Asp Trp Gly Ala His Arg Cys Thr
1 5 10

<210> 11
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成序列

<220>
<221> 二硫桥
<222> (2).. (12)

<220>
<221> MOD_RES
<222> (4).. (4)
<223> 甲基化

<220>
<221> MOD_RES
<222> (8).. (8)
<223> 甲基化

<220>
<221> MOD_RES
<222> (13).. (13)
<223> 甲基化

<400> 11

Ile Cys Val Trp Gln Asp Trp Gly Ala His Arg Cys Ile
1 5 10

<210> 12

[0006]

<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成序列

<220>
<221> 二硫桥
<222> (2)..(12)

<220>
<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> 甲基化

<220>
<221> MOD_RES
<222> (8)..(8)
<223> 甲基化

<400> 12

Ile Cys Val Trp Gln Asp Trp Gly Ala His Arg Cys His
1 5 10

<210> 13
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成序列

<220>
<221> 二硫桥
<222> (2)..(12)

<220>
<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> 甲基化

<220>
<221> MOD_RES
<222> (8)..(8)
<223> 甲基化

<400> 13

Ile Cys Val Trp Gln Asp Trp Gly Ala His Arg Cys Phe
1 5 10

<210> 14
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成序列

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> 乙酰化

<400> 38

Arg Leu Ile Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp Glu
1 5 10 15

Asp Asp