(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 102216322 A
(43)申请公布日 2011.10.12

(21)申请号 200980146121.4

(22)申请日 2009.09.18

(30)优先权数据
61/098,193 2008.09.18 US

(85)PCT申请进入国家阶段日
2011.05.18

(86)PCT申请的申请数据
PCT/US2009/057592 2009.09.18

(87)PCT申请的公布数据
WO2010/033879 EN 2010.03.25

(71)申请人 纽约大学
地址 美国纽约州
申请人 亚利桑那董事会代表亚利桑那大学

(72)发明人 P·阿罗拉 B·奥伦宇克
R·N·查普曼 L·亨切
K·M·布洛克

(74)专利代理机构 北京市金杜律师事务所 11256
代理人 陈文平 徐志明

(51)Int.Cl.
*C07K 7/06*(2006.01)
*A61K 38/08*(2006.01)

权利要求书 3 页 说明书 28 页 附图 5 页

(54)发明名称

用基于氢键替代的螺旋抑制HIF-1α和p300/CBP之间的相互作用

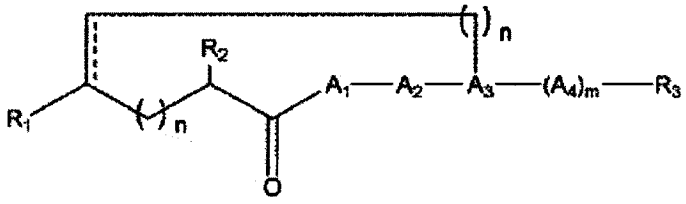
(57)摘要

本发明涉及具有一个或多个稳定、内部约束的α-螺旋的肽，并且该肽包含模拟HIF-1α的C-端反式激活结构域的至少一部分的序列。本发明还公开了含有这些肽的药物组合物和使用这些肽的方法，例如减少基因转录、治疗或预防由HIF-1α和CREB-结合蛋白和/或p300的反应介导的病症、减少或防止组织内血管生成、诱导细胞凋亡、降低细胞存活率和/或增殖以及识别CREB-结合蛋白和/或p300的潜在配体。

CN 102216322 A

1. 具有一个或多个稳定、内部约束的 α - 螺旋的肽，其中所述肽包含模拟低氧诱导因子 1α 的 C- 端反式激活结构域的螺旋 αA 或螺旋 αB 的序列。

2. 根据权利要求 1 所述的肽，其中所述肽是式 I 的肽：



(I)

其中

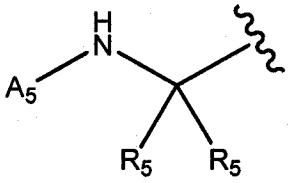
------是碳 - 碳单键或双键，其中所述碳 - 碳双键是顺式或反式；

各个 n 独立地为 1 或 2；

m 是零或任何正整数；

$R_1$ 是氨基酸、肽、$-OR_4$、$-CH_2NH_2$、烷基、芳基或氢，其中 $R_4$ 是烷基或芳基；

或 $R_1$ 具有下式：



，

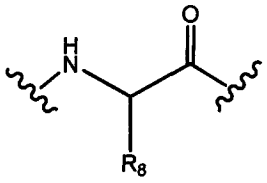
其中 $A_5$ 是肽、氨基酸残基、酰基或氢；以及

各个 $R_5$ 独立地为氨基酸侧链、氢或芳基；

$R_2$ 为氢、氨基酸侧链、烷基或芳基；

$R_3$ 为氨基酸、肽、$-OR_6$、$-N(R_7)_2$、烷基、芳基或氢，其中 $R_6$ 为烷基或芳基，并且各个 $R_7$ 独立地为氨基酸侧链、氢或烷基或芳基。

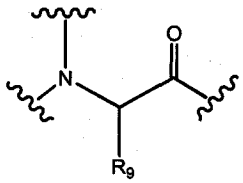
$A_1$、$A_2$ 和 $A_4$ 各独立地为：



其中各个 $R_8$ 为氢、氨基酸侧链、烷基或芳基；以及

，

$A_3$ 是



其中各个 $R_9$ 为氢、氨基酸侧链、烷基或芳基。

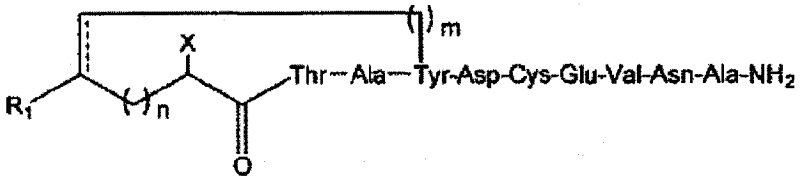
，

3. 根据权利要求 2 所述的肽，其中

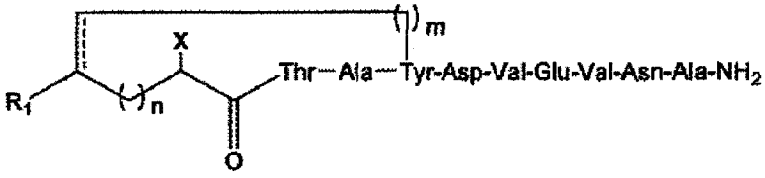
(i) $A_1$ 是 Thr；$A_2$ 是 Ser 或 Ala；$A_3$ 是 Tyr 或 Ala；并且 $A_4$ 包含式：$X^1X^2X^3X^4X^5X^6X^7$，其中 $X^1$ 是 Asp 或 Asn；$X^2$ 是 Val、Cys 或 Ala；$X^3$ 是 Glu 或 Gln；$X^4$ 是 Val 或 Tyr；$X^5$ 是 Asn 或 Arg；$X^6$ 是 Ala；并且 $X^7$ 是 Arg 或不存在；或者

(ii) $A_1$ 和 $A_2$ 独立地为 Glu 或 Gln；$A_3$ 是 Leu；并且 $A_4$ 包含式：$LRX^8LX^9$，其中 L 是 Leu；R 是 Arg；$X^8$ 是 Ala 或 Tyr；并且 $X^9$ 是 Asp 或 Asn。

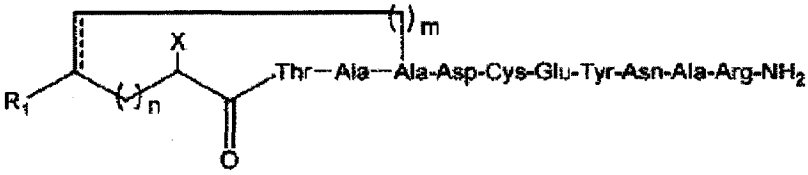
4. 根据权利要求 2 所述的肽，其中所述肽选自：



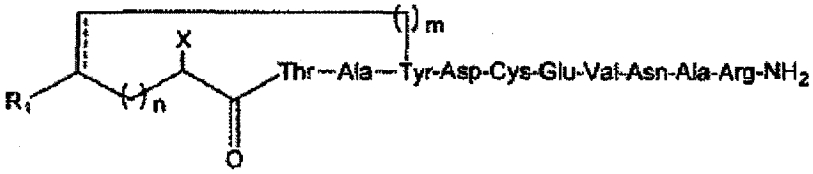

，



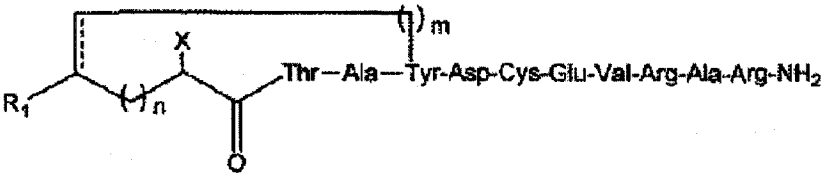

，



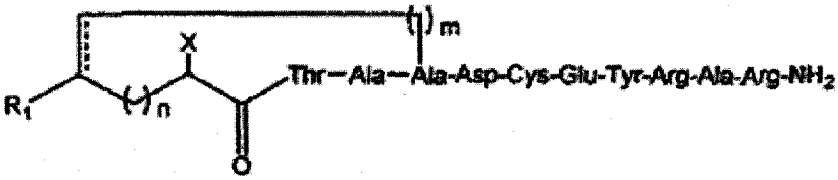

，



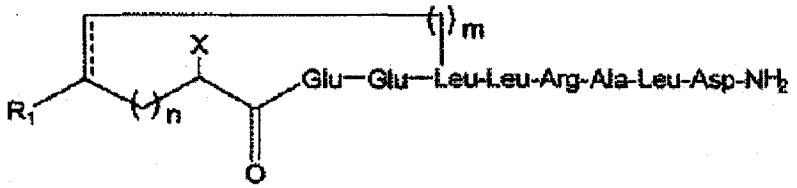

，




，




，以及




其中 m 和 n 独立地为 1 或 2；以及

X 为氢、氨基酸侧链、烷基或芳基。

5. 根据权利要求 1 所述的肽，其中所述肽模拟低氧诱导因子 1α 的 C- 端反式激活结构域的至少残基 796-804 或残基 816-823。

6. 一种药物组合物，其包含根据权利要求 1、2、3、4 或 5 的肽和可药用载体。

7. 一种减少细胞中基因转录的方法，其中所述基因的转录是通过低氧诱导因子 1α 和 CREB- 结合蛋白和 / 或 p300 的反应介导的，所述方法包括使所述细胞在有效减少所述基因转录的条件下与根据权利要求 1 的肽接触。

8. 根据权利要求 7 所述的方法，其中所述基因选自 ：腺苷酸激酶 3、醛缩酶 A、醛缩酶 C、烯醇酶 1、葡萄糖转运蛋白 1、葡萄糖转运蛋白 3、甘油醛 -3- 磷酸脱氢酶、己糖激酶 1、己糖激酶 2、胰岛素样生长因子 2、IGF 结合蛋白 1、IGF 结合蛋白 3、乳酸脱氢酶 A、磷酸甘油酸酯激酶 1、丙酮酸激酶 M、p21、转化生长因子 β3、血浆铜蓝蛋白、促红细胞生成素、铁传递蛋白、铁传递蛋白受体、α 1B- 肾上腺素能受体、肾上腺髓质素、内皮素 -1、血红素加氧酶 1、一氧化氮合酶 2、纤溶酶原激活物抑制剂 1、血管内皮生长因子、血管内皮生长因子受体 FLT-1、血管内皮生长因子受体 KDR/Flk-1 和 $p35^{srg}$。

9. 一种方法，在需要该方法的受试者中治疗或预防由低氧诱导因子 1α 和 CREB- 结合蛋白和 / 或 p300 的反应介导的病症，所述方法包括在有效治疗或预防所述病症的条件下给予受试者根据权利要求 1、2、3、4 或 5 的肽。

10. 根据权利要求 9 所述的方法，其中所述病症选自 ：视网膜缺血、肺动脉高压、宫内胎儿生长迟缓、糖尿病性视网膜病、年龄相关性黄斑变性、糖尿病性黄斑水肿和癌症。

11. 一种减少或防止组织中血管生成的方法，所述方法包括使所述组织在有效减少或防止组织中血管生成的条件下与权利要求 1、2、3、4 或 5 的肽接触。

12. 根据权利要求 11 所述的方法，其中所述方法在体内实施。

13. 根据权利要求 11 所述的方法，其中所述组织是肿瘤。

14. 一种诱导细胞中细胞凋亡的方法，所述方法包括使所述细胞在有效诱导所述细胞的细胞凋亡的条件下与权利要求 1、2、3、4 或 5 的肽接触。

15. 一种降低细胞存活率和 / 或增殖的方法，所述方法包括使所述细胞在有效降低所述细胞存活率和 / 或增殖的条件下与权利要求 1、2、3、4 或 5 的肽接触。

16. 根据权利要求 15 所述的方法，其中所述细胞是癌细胞或者包含在含有癌细胞的组织的血管内皮中。

17. 一种识别 CREB- 结合蛋白和 / 或 p300 的潜在配体的方法，所述方法包括 ：

提供根据权利要求 1、2、3、4 或 5 的肽 ；

用测试试剂与所述肽接触 ；以及

检测所述测试试剂是否选择性地与所述肽结合，其中选择性地与所述肽结合的测试试剂被识别为 CREB- 结合蛋白和 / 或 p300 的潜在配体。

18. 根据权利要求 1、2、3、4 或 5 所述的肽，其中 m 和 n 为 1 ；或 m 为 1 和 n 为 2 ；或 m 为 2 和 n 为 1 ；或 m 和 n 均为 2。

# 用基于氢键替代的螺旋抑制 HIF-1α 和 p300/CBP 之间的相互作用

[0001] 交叉引用

[0002] 本申请要求于 2008 年 9 月 18 日提交的美国临时专利申请第 61/098,19 号的优先权，该专利申请以引入的方式并入本文。

[0003] 关于联邦政府资助研究的申明

[0004] 本发明在政府支持下完成，授权号 GM073943，其由国立卫生研究院 (National Institutes of Health) 授予。政府在本发明中享有某些权利。

## 背景技术

[0005] HIF-1α - 共活化因子反应物在调节 VEGF 转录中的作用

[0006] 共活化因子蛋白 (coactivator protein)p300（或同源 CREB 结合蛋白，CBP) 的半胱氨酸 - 组氨酸富 1 结构域 (" CH1" ) 与缺氧诱导因子 1α (" HIF-1α " )(Freedman 等， " Structural Basis for Recruitment of CBP/p300by Hypoxia-inducible Factor-1α，" Proc.Nat′ l Acad.Sci.USA 99 :5367-72(2002) ;Dames 等，" Structural Basis for HIF-1α /CBP Recognition in the Cellular Hypoxic Response，" Proc.Nat′ l Acad.Sci.USA 99 :5271-6(2002)) 的相互作用介导了缺氧诱导基因的反式激活 (Hirota & Semenza， " Regulation of Angiogenesis by Hypoxia-inducible Factor 1， " Crit.Rev.Oncol.Hematol.59 :15-26(2006) ;Semenza， " Targeting HIF-1 for Cancer Therapy，" Nat.Rev.Cancer 3 :721-32(2003))。如图 1A-C 所示，缺氧诱导基因是血管生成和癌症转移的重要的促成因素 (Orourke 等" Identification of Hypoxically Inducible mRNAs in HeLa Cells Using Differential-display PCR，" Eu.J Biochem.241 :403-10(1996) ;Ivan 等，" HIFα Targeted for VHL-mediated Destruction by Proline Hydroxylation :Implications for $O_2$ Sensing，" Science 292 :464-8(2001))。如图 2 所示，在含氧量正常的情况下，HIF-1 的 α - 亚基在脯氨酸残基 302 和 564 处由脯氨酸羟化酶相继羟化，之后泛素化，再通过泛素 - 蛋白体系统降解。该过程由 Von Hippel-Lindau 肿瘤抑制蛋白介导 (Kaelin， " Molecular Basis of the VHL Hereditary Cancer Syndrome，" Nat.Rev.Cancer 2 :673-82(2002))，负责控制 HIF-1α 的水平，从而控制对缺氧的转录反应 (Maxwell 等，" The Tumour Suppressor Protein VHL Targets Hypoxia-inducible Factors for Oxygen-dependent Proteolysis，" Nature 399 :271-5(1999))。在缺氧条件下，HIF-1α 不再发生破坏，并从而累积。HIF-1α 与其组成性表达的结合配偶体，即芳香烃受体核转位蛋白 (" ARNT" ) 发生异源二聚化，导致与同源缺氧反应元件 (" HRE" ) 的结合 (Forsythe 等，" Activation of Vascular Endothelial Growth Factor Gene Transcription by Hypoxia-inducible Factor 1，" Mol.Cell.Biol.16 :4604-13(1996))。如图 2 所示，在缺氧条件下，天门冬酰胺 803 上的第三个羟化调节位点也受到了抑制 (Lando 等，" FIH-I is an Asparaginyl Hydroxylase Enzyme That Regulates the Transcriptional Activity of Hypoxia-inducible Factor，" Genes &

Develop.16:1466-71(2002)),使得与引发缺氧诱导基因过度表达的 p300/CBP 共活化因子结合。其中这些基因是编码生成血管的肽的基因,例如血管内皮生长因子(" VEGF")和 VEGF 受体 VEGFR-I(Flt-1) 和 VEGFR-2(KDR/Flk-1) 以及能量代谢变化中所涉及的蛋白,例如葡萄糖转运蛋白 GLUT1 和 GLUT3、以及己糖激酶 1 和 2(Forsythe 等," Activation of Vascular Endothelial Growth Factor Gene Transcription by Hypoxia-inducible Factor 1," Mol.Cell.Biol.16:4604-13(1996);Okino 等," Hypoxia-inducible Mammalian Gene Expression Analyzed in Vivo at a TATA-driven Promoter and at an Initiator-driven Promoter," J Biol.Chem.273:23837-43(1998))。

[0007] 用于调节缺氧诱导转录的环二硫二酮哌嗪 (Epidithiodiketopiperazine) 真菌代谢物

[0008] 由于 HIF-1α C-TAD 与转录共活化因子 p300/CBP 的相互作用是转录反应中显著扩增的一个步骤,设计蛋白配体对该步骤进行干扰是一种有效的抑制肿瘤有氧酵解和血管生成(即形成新的血管)的方法(Hirota & Semenza," Regulation of Angiogenesis by Hypoxia-inducible Factor 1," Crit.Rev.Oncol.Hematol.59:15-26(2006);Ramanathan 等," Perturbational Profiling of a Cell-line Model of Tumorigenesis by Using Metabolic Measurements," Proc.Nat' l Acad.Sci.USA 102:5992-7(2005);Underiner 等," Development of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor(VEGFR)Kinase Inhibitors as Anti-angiogenic Agents in Cancer Therapy," Curr.Med.Chem.11:73145(2004))。尽管 HIF-1α C-TAD 与 p300/CBP 的接触表面很大(3393 $Å^2$),对该蛋白-蛋白相互作用的抑制并不需要直接进行干扰。作为替代,诱导结合配偶体 (p300/CBP) 中的一个发生结构变化足以干扰复合 (Kung 等," Small Molecule Blockade of Transcriptional Coactivation of the Hypoxia-inducible Factor Pathway," Cancer Cell 6:33-43(2004))。

[0009] 在过去,尽管已经证明了使用小分子抑制核蛋白-蛋白相互作用是困难的(Arkin & Wells," Small-molecule Inhibitors of Protein-Protein Interactions: Progressing Towards the Dream," Nat.Rev.Drug Discov.3:301-17(2004)),最近筛选的高亲和力蛋白配体已经获得了一些显著的成就(Kung 等," Small Molecule Blockade of Transcriptional Coactivation of the Hypoxia-inducible Factor Pathway," Cancer Cell 6:33-43(2004);Issaeva 等," Small Molecule RITA Binds to p53,Blocks p53-HDM-2 Interaction and Activates p53 Function in Tumors," Nat.Med.10:1321-8(2004);Lepourcelet 等," Small-molecule Antagonists of the Oncogenic Tcf/β-Catenin Protein Complex," Cancer Cell 5:91-102(2004);Vassilev 等," In Vivo Activation of the p53 Pathway by Small-molecule Antagonists of MDM2," Science 303:844-8(2004);Grasberger 等," Discovery and Cocrystal Structure of Benzodiazepinedione HDM2 Antagonists That Activate p53 in Cells," J Med.Chem.48:909-12(2005);Ding 等," Structure-based Design of Potent Non-peptide MDM2 Inhibitors," J Am.Chem.Soc.127:10130-1(2005);Berg 等," Small-molecule Antagonists of Myc/Max Dimerization Inhibit Myc-induced Transformation of Chicken Embryo Fibroblasts," Proc.Nat' l Acad.Sci.USA 99:

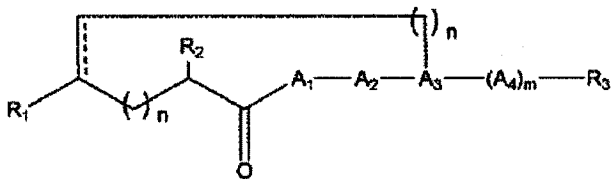
3830-5(2002) ;De Munari 等的国际专利公开 No.WO 2006/066775)。毛壳素 1(Hauser 等, " Isolation and Structure Elucidation of Chaetocin, " Helv.Chirm.Acta 53(5) :1061-73(1970))(如图 3A 所示)和毛壳菌素 2(Waksman & Bugie, " Chaetomin, a New Antibiotic Substance Produced by Chaetomium Cochliodes I.Formation and Properties, " J.Bacteriol.48 :527-30(1944))(如图 3B 所示)这两种小分子已经被证明可以抑制 HIF-1α C-TAD 和 p300/CBP 的相互作用,以及降低缺氧诱导的转录,尽管对该抑制的精确的机理仍然不清楚 (Kung 等," Small Molecule Blockade of Transcriptional Coactivation of the Hypoxia-inducible Factor Pathway, " Cancer Cell 6 : 33-43(2004))。尽管已经得到了令人鼓舞的最初的报道,但是由于 1 和 2 在引起了试验动物的凝固性坏死、贫血和白细胞增多,因此仍然需要设计 HIF-1 通路的抑制剂。识别其它无副作用或较低副作用的 HIF-1 通路抑制剂将是期望的。

[0010] 本发明旨在克服了本领域的这些和其它缺陷。

[0011] 发明概述

[0012] 在一方面,本发明提供了一种具有一个或多个稳定、内部约束的 α-螺旋的肽,其中所述肽包含模拟低氧诱导因子 1α 的 C- 端反式激活结构域的螺旋 αA 或螺旋 αB 的序列。在一个实施方式中,所述肽为式 I 的肽 :

[0013]



(I)

[0014] 其中

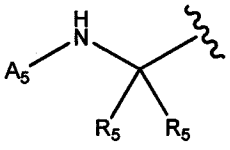
[0015] ------是碳 - 碳单键或双键,其中所述碳 - 碳双键是顺式或反式 ;

[0016] 各个 n 独立地为 1 或 2 ;

[0017] m 是零或任何正整数 ;

[0018] $R_1$ 是氨基酸、肽、$-OR_4$、$-CH_2NH_2$、烷基、芳基或氢,其中 $R_4$ 是烷基或芳基 ;

[0019] 或 $R_1$ 具有下式 :

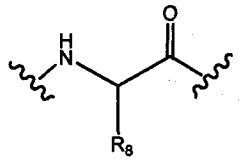
[0020]  其中 $A_5$ 是肽、氨基酸残基、酰基或氢 ;以及

[0021] 各个 $R_5$ 独立地为氨基酸侧链、氢、烷基或芳基 ;

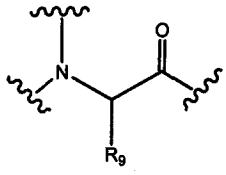
[0022] $R_2$ 为氢、氨基酸侧链、烷基或芳基 ;

[0023] $R_3$ 为氨基酸、肽、$-OR_6$、$-N(R_7)_2$、烷基、芳基或氢,其中 $R_6$ 为烷基或芳基,并且各个 $R_7$ 独立地为氨基酸侧链、氢或烷基或芳基 ;

[0024] $A_1$、$A_2$ 和 $A_4$ 各独立地为 :

[0025]  其中各个 $R_8$ 为氢、氨基酸侧链、烷基或芳基；以及

[0026] $A_3$ 是

[0027]  其中各个 $R_9$ 为氢、氨基酸侧链、烷基或芳基。

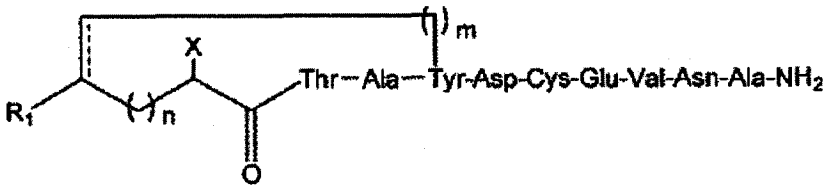
[0028] 根据权利要求 2 所述的肽，其中

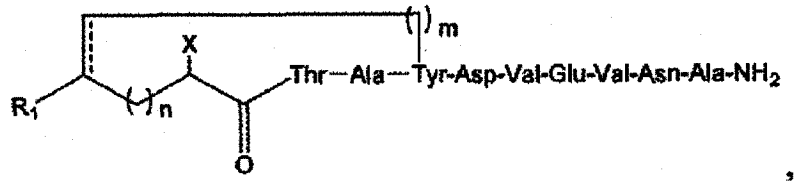
[0029] (i) $A_1$ 是 Thr；$A_2$ 是 Ser 或 Ala；$A_3$ 是 Tyr 或 Ala；并且 $A_4$ 包含式：$X^1X^2X^3X^4X^5X^6X^7$，其中 $X^1$ 是 Asp 或 Asn；$X^2$ 是 Val、Cys 或 Ala；$X^3$ 是 Glu 或 Gln；$X^4$ 是 Val 或 Tyr；$X^5$ 是 Asn 或 Arg；$X^6$ 是 Ala；$X^7$ 是 Arg 或不存在；或者

[0030] (ii) $A_1$ 和 $A_2$ 独立地为 Glu 或 Gln；$A_3$ 是 Leu；并且 $A_4$ 包含式：$LRX^8LX^9$，其中 L 是 Leu；R 是 Arg；$X^8$ 是 Ala 或 Tyr；并且 $X^9$ 是 Asp 或 Asn。

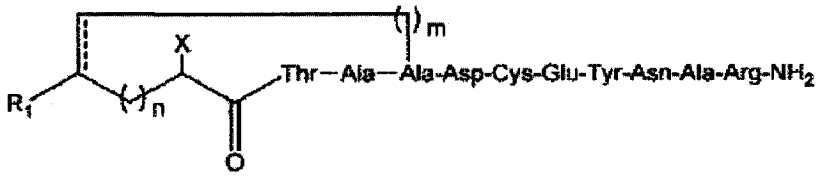
[0031] 在另一实施方式中，所述肽选自：

[0032]

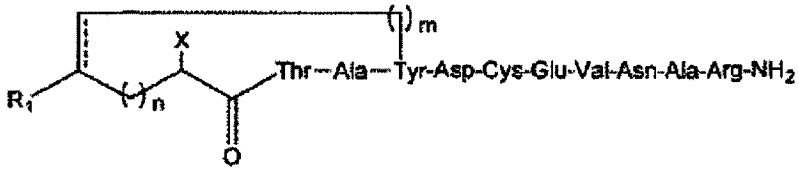


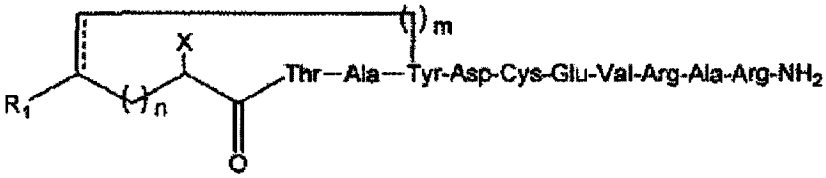

[0033]



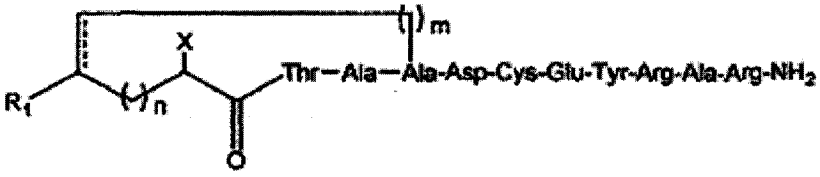

，



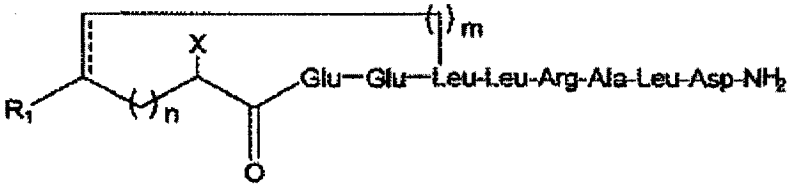

，




，




，以及




[0034] 其中 m 和 n 独立地为 1 或 2 ;以及

[0035] X 为氢、氨基酸侧链、烷基或芳基。

[0036] 在一个实施方式中，m 和 n 为 1。在另一实施方式中，m 为 1 和 n 为 2。在另一实施方式中，m 为 2 和 n 为 1。在另一实施方式中，m 和 n 均为 2。

[0037] 在一些实施方式中，本发明中的肽模拟低氧诱导因子 1α 的 C- 端反式激活结构域的至少残基 796-804 或残基 816-823。

[0038] 在另一方面，本发明还提供了含有本发明的肽和可药用载体的药物组合物。

[0039] 在另一方面，本发明提供了一种减少细胞中基因转录的方法，其中所述基因的转录是通过低氧诱导因子 1α 和 CREB- 结合蛋白和 / 或 p300 的反应介导的，所述方法包括使细胞在有效减少基因转录的条件下与根据权利要求 1 的肽接触。在一些实施方式中，所述基因选自 :腺苷酸激酶 3、醛缩酶 A、醛缩酶 C、烯醇酶 1、葡萄糖转运蛋白 1、葡萄糖转运蛋白 3、甘油醛 -3- 磷酸脱氢酶、己糖激酶 1、己糖激酶 2、胰岛素样生长因子 2、IGF 结合蛋白 1、IGF 结合蛋白 3、乳酸脱氢酶 A、磷酸甘油酸酯激酶 1、丙酮酸激酶 M、p21、转化生长因子 $\beta_3$、血浆铜蓝蛋白、促红细胞生成素、铁传递蛋白、铁传递蛋白受体、$\alpha_{1B}$- 肾上腺素能受体、肾上腺髓质素、内皮素 1、血红素加氧酶 1、一氧化氮合酶 2、纤溶酶原激活物抑制剂 1、血管内皮

生长因子、血管内皮生长因子受体 FLT-1、血管内皮生长因子受体 KDR/Flk-1 和 $p35^{srg}$。

[0040] 本发明还提供了一种方法，在需要该方法的受试者中治疗或预防由低氧诱导因子 1α 和 CREB- 结合蛋白和 / 或 p300 的反应介导的病症，所述方法包括在有效治疗或预防所述病症的条件下给予受试者本发明的肽。在一些实施方式中，其中所述病症选自：视网膜缺血、肺动脉高压、宫内胎儿生长迟缓、糖尿病性视网膜病、年龄相关性黄斑变性、糖尿病性黄斑水肿和癌症。

[0041] 在另一方面，本发明涉及减少或防止组织中血管生成的方法，所述方法包括使所述组织在有效减少或防止组织中血管生成的条件下与本发明的肽接触。在一些实施方式中，所述方法在体内实施。在另一实施方式中，所述组织是肿瘤。

[0042] 本发明还提供了诱导细胞中细胞凋亡的方法，所述方法包括使细胞在有效诱导细胞的细胞凋亡的条件下与本发明的肽接触。本发明还提供了降低细胞存活率和 / 或增殖的方法，所述方法包括使细胞在有效降低细胞存活率和 / 或增殖的条件下与本发明的肽接触。在一些实施方式中，所述细胞是癌细胞或者包含在含有癌细胞的组织的血管内皮中。在另一方面，本发明涉及一种识别 CREB- 结合蛋白和 / 或 p300 的潜在配体的方法，所述方法包括：提供本发明的肽；用测试试剂与所述肽接触；以及检测测试试剂是否选择性地与肽结合，其中选择性地与所述肽结合的测试试剂被识别为 CREB- 结合蛋白和 / 或 p300 的潜在配体。

[0043] 文献的引入

[0044] 在本说明书中提及的所有公开、专利、和专利申请均以引用的方式并入本文，如同各个单独的公开、专利、或专利申请专门地和单独地指明并以引用的方式并入一样。

[0045] 附图简述

[0046] 本发明的创新点在权利要求中进行了详细说明。参考以下对示例性实施方式的详细说明可以更好地理解本发明特征和优点，在这些实施方式中采用了本发明的原理。以下是附图说明：

[0047] 图 1A 的示意图说明了缺氧诱导因子 1α（" HIF-1α "）的 C- 端反式激活结构域（" C-TAD "）与共活化因子蛋白 p300（或同源 CREB 结合蛋白，CBP）的半胱氨酸 - 组氨酸富 1 结构域（" CH1 "）的复合结构 (Lepourcelet 等，" Small-molecule Antagonists of the Oncogenic Tcf/β-Catenin Protein Complex，" Cancer Cell 5：91-102(2004)；Vassilev 等，" In Vivo Activation of the p53 Pathway by Small-molecule Antagonists of MDM2，" Science 303：844-8(2004)，图 1B 描述了 HIF-1α 的结构域图，显示了碱性螺旋 - 环 - 螺旋区域（" bHLH "）、PAS、N- 端反式激活结构域（" N-TAD "）和 C-TAD。图 1C 中显示了人 HIF-1α C-TAD 序列 (SEQ ID NO：1)，以及 αA 和 αB 螺旋的位置。

[0048] 图 2 是说明 HIF-1α 通路的示意图。ARNT 代表芳香烃受体核转位蛋白；VHL 代表 von Hippel-Lindau 肿瘤抑制蛋白；HRE 代表缺氧反应元件；VEGF 代表血管内皮生长因子。

[0049] 图 3A-B 的示意图显示了毛壳素 1（分离自球毛壳霉菌）（图 3A）和毛壳菌素 2（分离自 codiode 毛壳霉菌）（图 3B）的结构。

[0050] 图 4 的示意图说明了通过以共价键连接 (C ＝ X-Y-N) 代替 N- 端 i 和 i+4 氢键 (C ＝ O--H-N) 来核化短 α - 螺旋。这些基于氢键替代（" HBS "）α - 螺旋含有来自闭环复分解反应（" RCM "）的碳 - 碳键。

[0051] 图 5A-C 是 HBS α - 螺旋结构的示意图。图 5A 显示了得自 NMR 的 HBS α - 螺旋的结构。图 5B 显示了得自 X- 射线晶体学的 HBS α - 螺旋的电子密度图（分辨率为 1.1 Å），HBS α - 螺旋具有精细的分子模型。图 5C 显示了从结晶数据得出的 HBS α - 螺旋的分子模型。虚线表示假定的 i 和 i+4 氢键。

[0052] 图 6A-B 涉及 HBS 螺旋 22。图 6A 说明了其化学结构。图 6B 显示了 HBS 螺旋 22 和对照肽 25 在 10mM 磷酸盐缓冲液 (pH 7.4) 中的圆二色谱。

[0053] 图 7 显示了通过实时 qRT-PCR 测量的各种肽对 VEGF 基因水平的时间依赖的抑制。

[0054] 图 8 显示了以下物质处理的培养物的细胞密度：仅细胞培养基（“对照”）、0.1％的介质（“载体”）、毛壳菌素 2、HBS 螺旋 22 或线性对照肽 25。

[0055] 发明详述

[0056] 本发明 α - 螺旋化合物的设计

[0057] 在一方面，本发明涉及调节 HIF-1α C-TAD 与 p300/CBP CH1 结构域相互作用的氢键替代（“HBS”）α - 螺旋。

[0058] 由不到 15 个氨基酸残基组成的肽在生理状态下一旦离开了蛋白质环境，通常不形成 α - 螺旋结构，并且需要人为限制以形成 α - 螺旋结构。HIF-1α 特征在于两个由 8 个氨基酸残基组成的短 α - 螺旋。如图 4 所示，以氢键替代（“HBS”）得到的 α - 螺旋靶向 HIF-Iα / 共活化因子界面，以可再生地从短肽序列形成稳定的螺旋结构 (Wang 等，″ Evaluation of Biologically Relevant Short α-Helices Stabilized by a Main-chain Hydrogen-bond Surrogate，″ J. Am. Chem. Soc. 128 :9248-56(2006)，将其全部内容引入本文作为参考）。尽管在文献中已经记载了螺旋模拟物的设计方法，但是这些方法需要“带子和支撑”（“belts and braces”）来稳定构象。HBS 方法由于没有利用侧链官能团锁住构象，因此可以合成各个面都可用于分子识别的 α - 螺旋。

[0059] HBS 螺旋设计方法围绕螺旋 - 卷曲转化理论，该理论认为三个连续的氨基酸组建成螺旋取向需要能量，这固有地限制了短 α - 螺旋的稳定性 (Lifson & Roig，″ On the Theory of Helix-Coil Transitions in Polypeptides，″ J. Chem. Phys. 34 : 1963-74(1961) ;Zimm & Bragg，″ Theory of the Phase Transition Between Helix and Random Coil in Polypeptide Chains，″ J. Chem. Phys. 31 :526-35(1959)，将其全部内容引入本文作为参考）。根据该理论，由 10 个或更少的氨基酸组成的 α - 螺旋由于其成核几率低，预期基本上不稳定。HBS 方法提供了预组织的 α - 转角，克服了固有的成核障碍，启动了螺旋的形成。如图 4 所示，在 α - 螺旋中，第 i 个氨基酸残基的 C ＝ O 与第 i+4 个氨基酸残基间的氢键稳定了螺旋结构，并使螺旋结构成核。为尽量接近地模拟 C ＝ O--H-N 氢键，和预组织 α - 转角，利用了 C ＝ X-Y-N 类型的共价键，其中 X 和 Y 分别是 i 和 i+4 残基的一部分。该方法被设想为广泛地应用于制备任何结构上 c 限制的 α 螺旋。相似的方法可用之制备结构上限制的。

[0060] 在一个实施方式中，i 和 i+4 残基之间的共价键是得自闭环复分解反应的碳 - 碳 键 (Chapman 等，″ A Highly Stable Short α-Helix Constrained by a Main-chain Hydrogen-bond Surrogate，″ J. Am. Chem. Soc. 126 :12252-3(2004) ; Dimartino 等，″ Solid-phase Synthesis of Hydrogen-bond Surrogate-derived α-Helices，″ Org. Lett. 7 :2389-92(2005)，将其全部内容引入本文作为参考）。

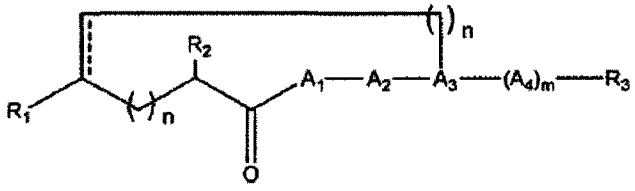
[0061] 如图 5 所示，HBS α - 螺旋的得自 NMR 的溶液结构和高分辨率晶体结构明确地说明了该方法的可能性 (Wang 等，″ Evaluation of Biologically Relevant Short α-Helices Stabilized by a Main-chain Hydrogen-bond Surrogate，″ J. Am. Chem. Soc. 128 :9248-56(2006) ;Liu 等，″ Atomic Structure of a Short Alpha-helix Stabilized by a Main Chain Hydrogen Bond Surrogate，″ J. Am. Chem. Soc. 130 : 4334-7(2008)，将其全部内容引入本文作为参考 )。HBS 的两个特征使其对变构转录调节剂的设计特别有吸引力 :(1) 交联的内部配置，使得在设计 α - 螺旋时无需阻断暴露于溶剂的表面，从而保留了用于

[0062] 分子识别的侧链，以及 (2) 将少于 10 个氨基酸的非常短的肽限制成高度稳定的 α - 螺旋的能力 (Wang 等，″ Evaluation of Biologically Relevant Short α-Helices Stabilized by a Main-chain Hydrogen-bond Surrogate，″ J. Am. Chem. Soc. 128 :9248-56(2006) ;Wang 等，″ Nucleation and Stability of Hydrogen-bond Surrogate-based α-Helices，″ Org. Biomol. Chem. 4 :4074-81(2006)，将其全部内容引入本文作为参考 )。

[0063] 本发明第一个方面涉及具有一个或多个稳定、内部约束的 α - 螺旋的肽，其中该肽包含模拟 HIF-1α 螺旋结构域的序列。在一个实施方式中，HIF-1α 螺旋结构域是 HIF-1α C- 端反式激活结构域的 α A 螺旋或 α B 螺旋。例如，该肽至少模拟 HIF-1α C- 端反式激活结构域的 796-804 残基或 816-823 残基。

[0064] 本发明合适的肽包括式 I 的肽 :

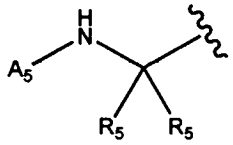
[0065]



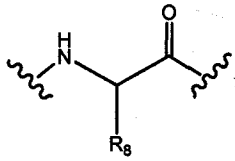

(I)

[0066] 其中------是碳 - 碳单键或双键，其中碳 - 碳双键是顺式或反式 ;各个 n 独立地为 1 或 2 ;m 是零或任何正整数。例如，m 可以是从 3 至 16、或 3 至 40 的任何整数。$R_1$ 可以是氨基酸、肽、$-OR_4$、$-CH_2NH_2$、烷基、芳基、氢，其中 $R_4$ 是烷基或芳基。或者，$R_1$ 是下式的部分 :

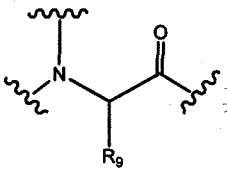
[0067]




[0068] 其中 $A_5$ 是氨基酸残基、酰基或氢 ;且各个 $R_5$ 独立地是氨基酸侧链、氢、烷基或芳基。$R_2$ 可以为氢、氨基酸侧链、烷基或芳基 ;$R_3$ 可以是氨基酸、肽、$-OR_6$、$-N(R_7)_2$、烷基、芳基或氢，其中 $R_6$ 是烷基或芳基，且各个 $R_7$ 独立地为氨基酸侧链、氢、烷基或芳基。$A_1$、$A_2$ 和 $A_4$ 各独立地为 :

[0069] 

其中各个 $R_8$ 为氢、氨基酸侧链、烷基或芳基 ;以及 $A_3$ 是 :

[0070]  其中各个 $R_9$ 为氢、氨基酸侧链、烷基或芳基。

[0071] 用于实施本发明的氨基酸包括天然的和非天然的氨基酸、二取代的氨基酸、β-氨基酸、γ-氨基酸等，本文中的残基包括从这些氨基酸获得的残基。在一个实施方式中，在本发明化合物中，例如式 I 的化合物中提及的氨基酸侧链是天然氨基酸侧链。

[0072] 当用于本文时，“烷基”是直链或支链的烷基。杂烷基也被包括在烷基的定义之内，其中杂原子可以是氮、氧、磷、硫或硅。烷基包括，但不限于甲基、乙基、丙基、异丙基和丁基。烷基包括，例如 C1-C6 烷基。

[0073] 当用于本文时，“酰基”包括直链或支链的酰基，例如甲酰基、乙酰基、丙酰基、苯甲酰基和丙烯酰基。

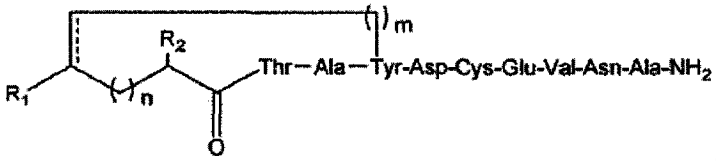
[0074] 当用于本文时，“芳基”包括芳香性芳环和含有氮、氧、硫或磷的杂环，所述芳香性芳环例如苯基、杂环芳香环，例如吡啶、呋喃、噻吩、吡咯、吲哚和噁唑。

[0075] 酰基和芳基被烷基、酰基和芳基取代，也包括在烷基的定义内。合适的取代基包括但不限于：卤素、胺基、羟基、羧基、硝基、羰基和其它烷基、酰基和芳基。

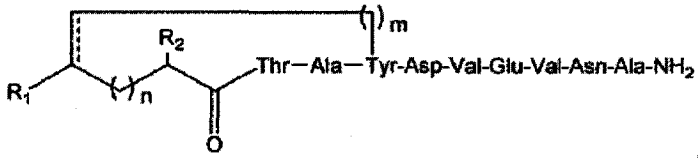
[0076] 模拟HIF-1αC-端反式激活结构域的αA螺旋的肽包括但不限于式I的肽，其中 $A_1$ 是 Thr；$A_2$ 是 Ser 或 Ala；$A_3$ 是 Tyr 或 Ala；$A_4$ 包含式：$X^1X^2X^3X^4X^5X^6X^7$，其中 $X^1$ 是 Asp 或 Asn；$X^2$ 是 Val、Cys 或 Ala；$X^3$ 是 Glu 或 Gln；$X^4$ 是 Val 或 Tyr；$X^5$ 是 Asn 或 Arg；$X^6$ 是 Ala；且 $X^7$ 是 Arg 或不存在。本领域技术人员可以理解的是 $A_4$ 可选自：Asn-Ala-Gln-Tyr-Arg-Ala(SEQ ID NO:2)、Asn-Ala-Gln-Tyr-Arg-Ala-Arg(SEQ ID NO:3)、Asn-Ala-Gln-Tyr-Asn-Ala(SEQ ID NO:4)、Asn-Ala-Gln-Tyr-Asn-Ala-Arg(SEQ ID NO:5)、Asn-Ala-Gln-Val-Arg-Ala(SEQ ID NO:6)、Asn-Ala-Gln-Val-Arg-Ala-Arg(SEQ ID NO:7)、Asn-Ala-Gln-Val-Asn-Ala(SEQ ID NO:8)、Asn-Ala-Gln-Val-Asn-Ala-Arg(SEQ ID NO:9)、Asn-Ala-Glu-Tyr-Arg-Ala(SEQ ID NO:10)、Asn-Ala-Glu-Tyr-Arg-Ala-Arg(SEQ ID NO:11)、Asn-Ala-Glu-Tyr-Asn-Ala(SEQ ID NO:12)、Asn-Ala-Glu-Tyr-Asn-Ala-Arg(SEQ ID NO:13)、Asn-Ala-Glu-Val-Arg-Ala(SEQ ID NO:14)、Asn-Ala-Glu-Val-Arg-Ala-Arg(SEQ ID NO:15)、Asn-Ala-Glu-Val-Asn-Ala(SEQ ID NO:16)、Asn-Ala-Glu-Val-Asn-Ala-Arg(SEQ ID NO:17)、Asn-Cys-Gln-Tyr-Arg-Ala(SEQ ID NO:18)、Asn-Cys-Gln-Tyr-Arg-Ala-Arg(SEQ ID NO:19)、Asn-Cys-Glu-Tyr-Asn-Ala(SEQ ID NO:20)、Asn-Cys-Gln-Tyr-Asn-Ala-Arg(SEQ ID NO:21)、Asn-Cys-Gln-Val-Arg-Ala(SEQ ID NO:22)、Asn-Cys-Gln-Val-Arg-Ala-Arg(SEQ ID NO:23)、Asn-Cys-Gln-Val-Asn-Ala(SEQ ID NO:24)、Asn-Cys-Gln-Val-Asn-Ala-Arg(SEQ ID NO:25)、Asn-Cys-Glu-Tyr-Arg-Ala(SEQ ID NO:26)、Asn-Cys-Glu-Tyr-Arg-Ala-Arg(SEQ ID NO:27)、Asn-Cys-Glu-Tyr-Asn-Ala(SEQ ID NO:28)、Asn-Cys-Glu-Tyr-Asn-Ala-Arg(SEQ ID NO:29)、Asn-Cys-Glu-Val-Arg-Ala(SEQ ID NO:30)、Asn-Cys-Glu-Val-Arg-Ala-Arg(SEQ ID NO:31)、Asn-Cys-Glu-Val-Asn-Ala(SEQ ID NO:32)、Asn-Cys-Glu-Val-Asn-Ala-Arg(SEQ ID NO:33)、Asn-Val-Gln-Tyr-Arg-Ala(SEQ ID NO:34)、Asn-Val-Gln-Tyr-Arg-Ala-Arg(SEQ ID NO:35)、Asn-Val-Gln-Tyr-Asn-Ala(SEQ ID NO:

36)、Asn-Val-Gln-Tyr-Asn-Ala-Arg(SEQ ID NO:37)、Asn-Val-Gln-Val-Arg-Ala(SEQ ID NO:38)、Asn-Val-Gln-Val-Arg-Ala-Arg(SEQ ID NO:39)、Asn-Val-Gln-Val-Asn-Ala(SEQ ID NO:40)、Asn-Val-Gln-Val-Asn-Ala-Arg(SEQ ID NO:41)、Asn-Val-Glu-Tyr-Arg-Ala(SEQ ID NO:42)、Asn-Val-Glu-Tyr-Arg-Ala-Arg(SEQ ID NO:43)、Asn-Val-Glu-Tyr-Asn-Ala(SEQ ID NO:44)、Asn-Val-Glu-Tyr-Asn-Ala-Arg(SEQ ID NO:45)、Asn-Val-Glu-Val-Arg-Ala(SEQ ID NO:46)、Asn-Val-Glu-Val-Arg-Ala-Arg(SEQ ID NO:47)、Asn-Val-Glu-Val-Asn-Ala(SEQ ID NO:48)、Asn-Val-Glu-Val-Asn-Ala-Arg(SEQ ID NO:49)、Asp-Ala-Gln-Tyr-Arg-Ala(SEQ ID NO:50)、Asp-Ala-Gln-Tyr-Arg-Ala-Arg(SEQ ID NO:51)、Asp-Ala-Gln-Tyr-Asn-Ala(SEQ ID NO:52)、Asp-Ala-Gln-Tyr-Asn-Ala-Arg(SEQ ID NO:53)、Asp-Ala-Gln-Val-Arg-Ala(SEQ ID NO:54)、Asp-Ala-Gln-Val-Arg-Ala-Arg(SEQ ID NO:55)、Asp-Ala-Gln-Val-Asn-Ala(SEQ ID NO:56)、Asp-Ala-Gln-Val-Asn-Ala-Arg(SEQ ID NO:57)、Asp-Ala-Glu-Tyr-Arg-Ala(SEQ ID NO:58)、Asp-Ala-Glu-Tyr-Arg-Ala-Arg (SEQ 10 NO:59)、Asp-Ala-Glu-Tyr-Asn-Ala(SEQ ID NO:60)、Asp-Ala-Glu-Tyr-Asn-Ala-Arg(SEQ ID NO:61)、Asp-Ala-Glu-Val-Arg-Ala(SEQ ID NO:62)、Asp-Ala-Glu-Val-Arg-Ala-Arg(SEQ ID NO:63)、Asp-Ala-Glu-Val-Asn-Ala(SEQ ID NO:64)、Asp-Ala-Glu-Val-Asn-Ala-Arg(SEQ ID NO:65)、Asp-Cys-Gln-Tyr-Arg-Ala(SEQ ID NO:66)、Asp-Cys-Gln-Tyr-Arg-Ala-Arg(SEQ ID NO:67)、Asp-Cys-Gln-Tyr-Asn-Ala(SEQ ID NO:68)、Asp-Cys-Gln-Tyr-Asn-Ala-Arg(SEQ ID NO:69)、Asp-Cys-Gln-Val-Arg-Ala(SEQ ID NO:70)、Asp-Cys-Gln-Val-Arg-Ala-Arg(SEQ ID NO:71)、Asp-Cys-Gln-Val-Asn-Ala(SEQ ID NO:72)、Asp-Cys-Gln-Val-Asn-Ala-Arg(SEQ ID NO:73)、Asp-Cys-Glu-Tyr-Arg-Ala(SEQ ID NO:74)、Asp-Cys-Glu-Tyr-Arg-Ala-Arg(SEQ ID NO:75)、Asp-Cys-Glu-Tyr-Asn-Ala(SEQ ID NO:76)、Asp-Cys-Glu-Tyr-Asn-Ala-Arg(SEQ ID NO:77)、Asp-Cys-Glu-Val-Arg-Ala(SEQ ID NO:78)、Asp-Cys-Glu-Val-Arg-Ala-Arg(SEQ ID NO:79)、Asp-Cys-Glu-Val-Asn-Ala(SEQ ID NO:80)、Asp-Cys-Glu-Val-Asn-Ala-Arg(SEQ ID NO:81)、Asp-Val-Gln-Tyr-Arg-Ala(SEQ ID NO:82)、Asp-Val-Gln-Tyr-Arg-Ala-Arg(SEQ ID NO:83)、Asp-Val-Gln-Tyr-Asn-Ala(SEQ ID NO:84)、Asp-Val-Gln-Tyr-Asn-Ala-Arg(SEQ ID NO:85)、Asp-Val-Gln-Val-Arg-Ala(SEQ ID NO:86)、Asp-Val-Gln-Val-Arg-Ala-Arg(SEQ ID NO:87)、Asp-Val-Gln-Val-Asn-Ala(SEQ ID NO:88)、Asp-Val-Gln-Val-Asn-Ala-Arg(SEQ ID NO:89)、Asp-Val-Glu-Tyr-Arg-Ala(SEQ ID NO:90)、Asp-Val-Glu-Tyr-Arg-Ala-Arg(SEQ ID NO:91)、Asp-Val-Glu-Tyr-Asn-Ala(SEQ ID NO:92)、Asp-Val-Glu-Tyr-Asn-Ala-Arg(SEQ ID NO:93)、Asp-Val-Glu-Val-Arg-Ala(SEQ ID NO:94)、Asp-Val-Glu-Val-Arg-Ala-Arg(SEQ ID NO:95)、Asp-Val-Glu-Val-Asn-Ala(SEQ ID NO:96) 以及 Asp-Val-Glu-Val-Asn-Ala-Arg(SEQ ID NO:97)。示例性的肽包括：

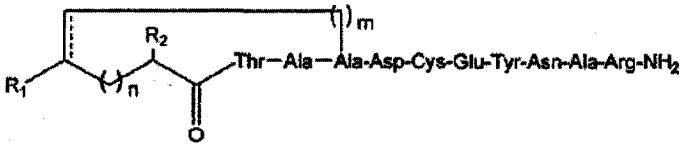
[0077]



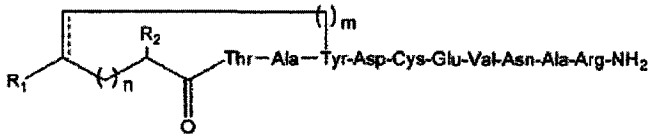

，



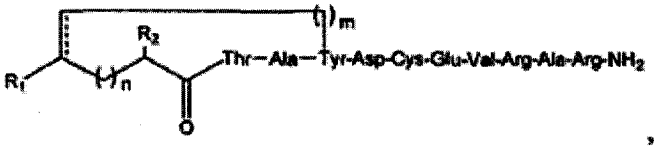

，



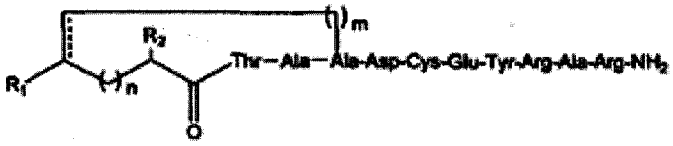

，




，




，以及

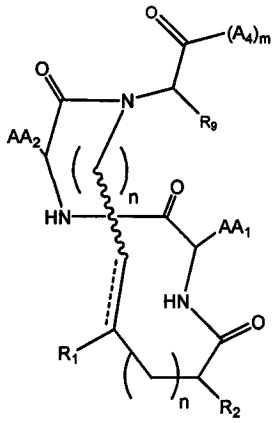



。

[0078] 在上述的肽中，m 和 n 独立地为 1 或 2。例如各个 m 和 n 均为 1。或者 m 为 1，n 为 2。在另一实施方式中，m 为 2，n 为 1。在另一实施方式中，m 和 n 均为 2。

[0079] 一般而言，本发明合适的肽包括下式所包括的肽：

[0080]



，

[0081] 其中

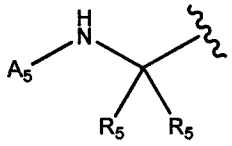
[0082] ------是碳－碳单键或双键；

[0083] ～～～～是单键，当------是双键时为顺式或反式；

[0084] 各个 n 独立地为 1 或 2；m 是任何整数；

[0085] $R_1$ 是氨基酸、肽、$-OR_4$、$-CH_2NH_2$、烷基、芳基、氢或具有下式的基团：

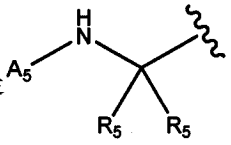
[0086]



[0087] 其中 $A_5$ 是肽、氨基酸残基、酰基或氢；且各个 $R_5$ 独立地是氨基酸侧链、氢、烷基或芳基。

[0088] $R_2$ 为氢、氨基酸侧链、烷基或芳基；

[0089] $AA_1$ 和 $AA_2$ 独立地为氨基酸侧链、烷基或芳基；且 $A_4$ 如上述式 I 的定义。

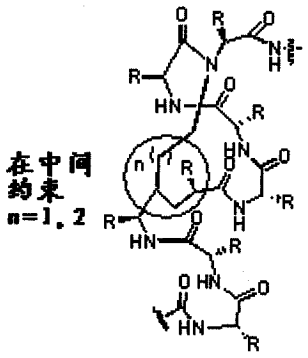
[0090] 在一个实施方式中，$R_1$ 是氢。在另一实施方式中，$R_1$ 是其中 $A_5$ 是通过肽键连接的肽。

，

[0091] 在一个实施方式中，由------表示的键是单键。在另一实施方式中，由------表示的键是双键。

[0092] 在其它实施方式中，本发明的方法可用于制备具有高稳定性的、内部约束的 α－螺旋的肽。该约束可以位于肽中的任何位置，不仅仅在 N 端。例如，根据本发明的方法制备的化合物可具有下式：

[0093]



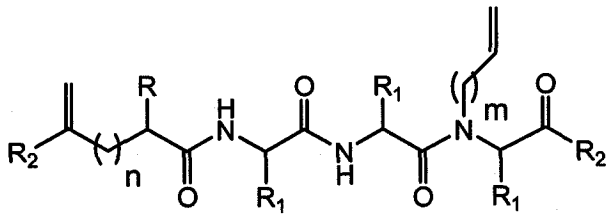

[0094] 在上式中，各个 R 独立地为氨基酸侧链。

[0095] 根据本发明方法制备的肽可例如少于 50、45、40、35、30、25、20、15 或 10 个氨基酸残基。在一个实施方式中，本发明的肽少于 50 个氨基酸长度。

[0096] 如图 2 所示，本发明的 HBS α - 螺旋例如可通过闭环复分解反应以碳 - 碳键代替 N 端主链 i 和 i+4 氢键制备，(Arora 等的美国专利 No. 7,202,332 ;Chapman & Arora, "Optimized Synthesis of Hydrogen-bond Surrogate Helices :Surprising Effects of Microwave Heating on the Activity of Grubbs Catalysts," Org. Lett. 8 : 5825-8(2006) ;Chapman 等，"A Highly Stable Short α-Helix Constrained by a Main-chain Hydrogen-bond Surrogate," J. Am. Chem. Soc. 126 :12252-3(2004) ;Dimartino 等，"Solid-phase Synthesis of Hydrogen-bond Surrogate-derived α-Helices," Org. Lett. 7 :2389-92(2005)，将这些专利全部内容引入本文作为参考 )。氢键替代预组织了 α - 转角，将肽序列稳定为 α - 螺旋构象。已经显示 HBS α - 螺旋从多种短肽序列采取稳定的 α - 螺旋构象 (Wang 等，"Evaluation of Biologically Relevant Short α-Helices Stabilized by a Main-chain Hydrogen-bond Surrogate," J. Am. Chem. Soc. 128 :9248-56(2006)，将其全部内容引入本文作为参考 )。这些人工 α - 螺旋已经显示可靶向其预定的蛋白受体，并且具有高亲和力 (Wang 等，"Enhanced Metabolic Stability and Protein-binding Properties of Artificial α Helices Derived from a Hydrogen-bond Surrogate :Application to Bcl-xL," Angew. Chem. Int'l Ed. Engl. 44 : 6525-9(2005)，originally published at Angew. Chem. 117 :6683-7(2005)，将其全部内容引入本文作为参考 )。例如，制备本发明的化合物包括，提供肽前体化合物，促进碳 - 碳键的形成，从而得到稳定、内部约束的 α - 螺旋。

[0097] 在一个实施方式中，前体具有下式 :

[0098]

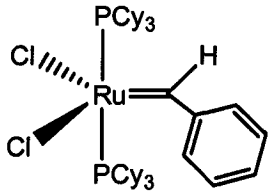


[0099] 上式的化合物可在有效促进碳 - 碳键形成的条件下反应。所述反应可以是例如复分解反应。如方案 2 所示，对于在制备肽模拟物中方便地引入非原生的碳 - 碳约束，烯烃复

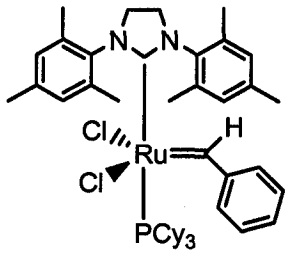
分解催化剂所显示出的优越的官能团耐受性表明 X 和 Y 可以是两个通过烯烃复分解反应连接的碳原子 (Hoveyda 等,“Ru Complexes Bearing Bidentate Carbenes :From Innocent Curiosity to Uniquely Effective Catalysts for Olefin Metathesis,”Org. Biomolec. Chem. 2 :8-23(2004) ;Trnka 等,“The Development of L2X2Tu = CHR Olefin Metathesis Catalysts :An Organometallic Success Story,”Accounts Chem. Res. 34 :18-29(2001),将其全部内容引入本文作为参考 )。

[0100] 本发明该方面可例如包括闭环烯烃复分解反应。烯烃复分解反应偶联两个双键 ( 烯烃 ),从而提供两个新的双键 ( 其中之一通常是乙烯气体 )。闭环烯烃复分解反应利用烯烃复分解反应形成大环。在该反应中,连接了链中的两个双键。该反应可使用复分解催化剂,例如下式的催化剂 :

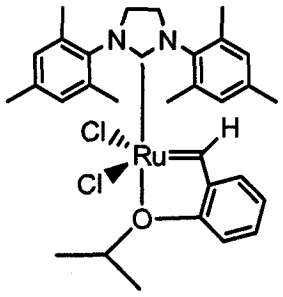
[0101]




,



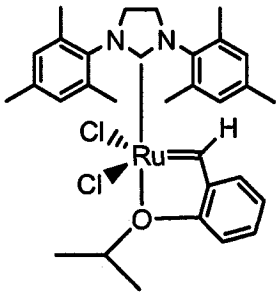

或




。

[0102] 在其它实施方式中,复分解催化剂具有下式 :

[0103]




。

[0104] 复分解反应可在例如约 25℃～ 110℃的温度下进行,更优选地在约 50℃的温度下进行。

[0105] 复分解反应可以使用有机溶剂,例如二氯甲烷、二氯乙烷、三氯乙烷或甲苯。

[0106] 本文公开的反应可例如在固体载体上进行。合适的固体载体包括颗粒、线、沉淀物、凝胶、纸片 (sheet)、管、球、容器、毛细管、垫、片、薄膜 (film)、板、载波片、盘、膜 (membrane) 等。这些固体载体可由各种各样的材料制备,包括 :聚合物、塑料、陶瓷、多糖、硅或硅基材料、碳、金属、无机玻璃、膜或其复合物。基底优选是平的,但是可采用各种其它的表面结构。例如,基底可含有合成发生于其上的上升的或下降的区域。基底及其表面优选形成刚性的支撑,本文所述的反应在其上进行。其它材料对考虑本公开的本领域普通技术人员是显而易见的。

[0107] 实施的复分解反应可先得到其中新形成的碳 - 碳键是双键的化合物。该双键随后可通过本领域已知的氢化方法转变成单键。

[0108] 本发明也包括药物组合物,该药物组合物包含本发明的肽和可药用载体。

[0109] 对于本领域普通技术人员显而易见的是可使用常规的已知的方法给药。给药可经全身给药至受试者或经靶向给药给予至受影响的细胞。示例性的给药途径包括但不限于：气管内接种、吸入、气道滴入、烟雾化、喷雾、滴鼻、口服或鼻胃管滴注、腹膜内注射、血管内注射、局部、透皮、肠胃外、皮下、静脉注射、动脉注射（例如经肺动脉）、肌肉注射、胸膜内滴注、心室内、病灶内、应用至粘膜（例如鼻、喉、支气管、生殖器和/或肛门）、或植入缓释载体。

[0110] 本发明的肽可以以药物制剂的形式给予至哺乳动物，所述药物制剂包含治疗试剂盒任何可药用辅料、载体、赋形剂和/或稳定剂，并且可以是固体或液体形式，例如片剂、胶囊、粉末、溶液、混悬液或乳剂。该组合物优选含有约 0.01 至约 99 重量%，更优选约 2 重量%至约 60 重量%的治疗试剂，以及辅料、载体和/或赋形剂。在所述的治疗有用的组合物中的活性化合物的量可获得合适的剂量单位。

[0111] 试剂可经口服给予，例如与惰性稀释剂一起或与可同化可食用载体一起，或其可以包封在硬或软壳胶囊中，或其可以被压制成片，或其可以直接掺入饮食的食物中。对于口服治疗给药，这些活性化合物可以与赋形剂一起掺入并以片剂、胶囊、酊剂、混悬剂、糖浆等形式使用。所述组合物和制剂应含有至少 0.1%的试剂。这些组合物中的试剂的百分比当然可以不同，并且可方便地为约 2%至约 60%重量单位。在所述的治疗有用的组合物中的试剂的量可获得合适的制剂。

[0112] 片剂、胶囊剂等也可以含有粘结剂，例如黄蓍胶、阿拉伯树胶、玉米淀粉或明胶；赋形剂，例如磷酸二钙；崩解剂，例如玉米淀粉、马铃薯淀粉或海藻酸；润滑剂，例如硬脂酸镁；和甜味剂，例如蔗糖、乳糖或糖精。当单位剂量形式是胶囊时，除上述类型的物质外，其可含有液体载体，例如脂肪油。

[0113] 各种其它的材料也可以以涂层的形式存在或用于改变剂量单元的外形。例如，片剂可包覆以虫胶、糖或两者。除活性成分外，糖浆可包含用作甜味剂的蔗糖、用作防腐剂的对羟苯甲酸甲酯和丙酯、染料和例如樱桃香精和橙味香精的调味剂。

[0114] 本发明的肽也可肠胃外给予。肽的溶液或混悬液可以以水制备，并合适地混合以表面活性剂，例如羟丙基纤维素。分散剂也可以以甘油、液态聚乙二醇以及它们在油中的混合物中制备。示例性的油是石油、动物油、植物油或合成来源的油，例如花生油、大豆油或矿物油。一般而言，水、盐水、葡萄糖溶液和相关的糖溶液以及例如聚乙二醇或聚丙二醇的二醇是优选的液态载体，特别是对于注射溶液。在正常的存储和使用条件下，这些制剂可含有防止微生物生长的防腐剂。

[0115] 适合于注射用途的药物形式包括灭菌水溶液或分散液以及用于临时配制灭菌注射液或分散液的灭菌粉末。在所有的情况下，剂型必须是无菌的，并且必须具有一定流动性以易于注射。在生产和储存条件下必须稳定，并且必须防腐处理防止被微生物的污染，例如细菌和真菌。载体可为溶剂或含有例如水、乙醇、多元醇（例如甘油、丙二醇、和液体聚乙二醇）、及其合适的混合物、和植物油的分散介质。

[0116] 根据本发明该方面的肽也可以喷雾剂形式直接给药到气道。以喷雾剂形式使用时，本发明的化合物的溶液或混悬液可包装在使用了合适的推进剂和常规辅料的压力气雾剂容器中，合适推进剂例如烃类推进剂，如丙烷、丁烷、或异丁烷。本发明的物质也可以非加压形式例如在喷雾器或雾化器中给药。

[0117] 本发明的肽可直接给药到靶组织，例如，容易受病毒感染的组织。另外的和/或供选的，该试剂可与一种或多种促进试剂迁移到（和/或吸收）靶组织、器官或细胞的试剂一起给药到非目标区域。靶组织可为任何被病毒感染的组织，在抑制 HIV-1 感染的情况下优选的靶组织包括口腔、生殖器和直肠粘膜。对本领域普通技术人员显而易见的是，治疗试剂本身可以被修饰以促进其输送（和吸收）到所需的组织、器官或细胞。

[0118] 示例性的输送设备包括，但不限于，雾化器、喷雾器、脂质体、透皮贴剂、植入剂、可移植或可注射的蛋白质存储组合物和注射器。本领域技术人员已知的其它输送系统也可用于实现将治疗试剂期望地输送到所需的体内器官、组织或细胞以实现本发明该方面。

[0119] 任何合适的输送肽的方法可用于实现本发明的该方面。通常，肽在载体中被给药至患者，载体输送肽到靶细胞、组织或器官。

[0120] 输送肽到细胞的一个方法包括使用脂质体。一般而言，这包括提供包含待输送的药物的脂质体，然后在有效输送药物到细胞、组织或器官的条件下使脂质体与靶细胞、组织或器官接触。

[0121] 脂质体为由一种或多种同心排列的脂质双层膜组成的小囊泡，该双层膜封装水相。它们通常不漏，但是如果膜上存在洞或孔时、如果膜溶解或降解，或如果膜的温度增加到相转变温度时会漏。该经脂质体输送药物的方法需要脂质体载体最终变成可渗透的，并且在靶位置释放包封的药物。这可例如以被动的方式实现，在该被动的方式中脂质体双层通过体内的各种试剂的作用随着时间降解。每个脂质体组合物在循环中或在体内其它位置具有特有的半衰期，因此通过控制脂质体组合物的半衰期，可在一定程度调节脂质体双层的降解速率。

[0122] 相对于被动药物释放，主动药物释放包括使用试剂诱导脂质体囊泡，使其渗透率改变。脂质体膜如此构建：当脂质体膜附近环境变成为酸性时它们变得不稳定（见例如，Wang & Huang，“pH-Sensitive Immunoliposomes Mediate Target-cell-specific Delivery and Controlled Expression of a Foreign Gene in Mouse，”Proc.Nat'l Acad. Sci.USA 84：7851-5(1987)，将其全部内容并入本文作为参考）。当脂质体被靶细胞吞噬时，例如，其被输送到使脂质体不稳定和导致药物释放的酸性核内体。

[0123] 供选的，脂质体膜能被化学修饰使得酶被作为包衣放置在膜上，该酶缓慢使脂质体变得不稳定。由于药物释放的控制取决于起始放置在膜上的酶的浓度，因此没有实际有效的方法来调节或改变药物释放以获得“有求必应”的药物输送。pH 敏感的脂质体也存在着相同的问题，这是由于当该脂质体囊泡与靶细胞接触时，脂质体会被细胞吞噬，pH 的降低将导致药物释放。

[0124] 该脂质体输送系统也可经主动靶向（例如通过在脂质体囊泡表面掺入抗体或激素）在靶器官、组织或细胞处积聚。这可通过已知的方法实现。

[0125] 不同类型的脂质体可根据如下方法制备：Bangham 等，“Diffusion of Univalent Ions Across the Lamellae of Swollen Phospholipids，”J.Mol.Biol.13：238-52(1965)；Hsu 的美国专利 No.5,653,996；Lee 等人的美国专利 No.5,643,599；Holland 等人的美国专利 No.5,885,613；Dzau & Kaneda 的美国专利 No.5,631,237；以及 Loughrey 等人的美国专利 No.5,059,421，将各文献的全部内容引入本文作为参考。

[0126] 这些脂质体也可如此制备：除含有本发明的治疗试剂外，还含有其它将在靶位置

释放的治疗试剂，例如抗炎试剂（例如Wolff等，“The Use of Monoclonal Anti-Thy1 IgG1 for the targeting of Liposomes to AKR-A Cells in Vitro and in Vivo，”Biochim. Biophys. Acta 802：259-73(1984)，将其全部内容引入本文作为参考）。

[0127] 用于输送蛋白质或多肽试剂（如本发明的肽）的另一种方法涉及将所需的蛋白质或多肽缀合至聚合物，从而稳定了的蛋白质或多肽以避免缀合的蛋白质或多肽的酶降解。在Ekwuribe的美国专利No. 5,681,811中说明了这种类型的缀合的蛋白质或多肽，将其全部内容引入本文作为参考。

[0128] 另一种用于输送蛋白质或多肽的方法涉及根据Heartlein等的美国专利No. 5,817,789制备嵌合蛋白质，将其全部内容引入本文作为参考。嵌合蛋白质可包括配体结构域和多肽试剂（例如本发明的人工 α-螺旋）。配体结构域专门针对位于靶细胞上的受体。因此，当嵌合蛋白质经静脉输送或其它方式引入血液或淋巴中时，嵌合蛋白质会被靶细胞吸附，并且靶细胞会纳入该嵌合蛋白质。

[0129] 给药可以视需要以一定的频率进行，并持续一段时间以适合提供有效的病毒感染治疗。例如，给药可以以单缓释剂型或多日剂量进行。给药可在受试者暴露于病毒之前、同时和/或之后进行。

[0130] 取决于治疗方案，给药量当然可以不同。一般来说，给予试剂至达到有效降低病毒感染的量（即治疗有效量）。因此，治疗有效量可以是至少部分防止病毒传播至受试者的量，或防止病毒在受试者中扩散的量。依据试剂、剂型、病毒和试剂给予的个体，获得有效量所需的剂量会有所不同。

[0131] 测定有效量也涉及体外测试，其中不同剂量的试剂给予至培养物中的细胞，测定有效抑制感染的试剂的浓度以计算体内所需的浓度。有效量也可基于体内动物实验。治疗有效量可以由本领域技术人员通过经验确定。

[0132] 本发明第二个方面涉及使用本发明的肽抑制HIF 1α-p300/CBP相互作用。本发明该方面的一个实施方式涉及减少细胞中的基因转录的方法，其中基因转录通过HIF-1α与CREB结合蛋白和/或p300间的相互作用介导。该方法涉及在有效引起肽的核摄入的条件下，使本发明的肽与细胞接触，其中所述肽干扰HIF-1α与p300/CBP的相互作用，从而减少了基因转录。转录由HIF-1α与CBP和/或p300相互作用介导的基因包括：腺苷酸激酶3、醛缩酶A、醛缩酶C、烯醇酶1、葡萄糖转运蛋白1、葡萄糖转运蛋白3、甘油醛-3-磷酸脱氢酶、己糖激酶1、己糖激酶2、胰岛素样生长因子2、IGF结合蛋白1、IGF结合蛋白3、乳酸脱氢酶A、磷酸甘油酸酯激酶1、丙酮酸激酶M、p21、转化生长因子 $\beta_3$、血浆铜蓝蛋白、促红细胞生成素、铁传递蛋白、铁传递蛋白受体、$\alpha_{1B}$-肾上腺素能受体、肾上腺髓质素、内皮素-1、血红素加氧酶1、一氧化氮合酶2、纤溶酶原激活物抑制剂1、血管内皮生长因子、血管内皮生长因子受体FLT-1、血管内皮生长因子受体KDR/Flk-1和 $p35^{srg}$。在表1中显示了抑制这些基因转录的一些用途。

[0133] 表1：病症实例。

[0134]

| 基因 | 待治疗/预防的疾病 |
|---|---|
| 烯醇酶 1 | 桥本脑病、严重的哮喘 |
| 葡萄糖转运蛋白 1 | 有氧酵解（瓦伯格效应） |
| 葡萄糖转运蛋白 3 | 有氧酵解（瓦伯格效应） |
| 己糖激酶 1 | 有氧酵解（瓦伯格效应） |
| 己糖激酶 2 | 有氧酵解（瓦伯格效应） |
| 胰岛素样生长因子 2 | 器官（脑、肝）的异常发育和功能 |
| IGF 结合蛋白 1 | 器官（脑、肝）的异常发育和功能 |
| IGF 结合蛋白 3 | 器官（脑、肝）的异常发育和功能 |
| 乳酸脱氢酶 A | 心肌梗塞 |
| 血浆铜蓝蛋白 | 淋巴瘤、急性和慢性炎症、类风湿性关节炎 |
| 促红细胞生成素 | 氧运输异常 |
| 铁传递蛋白 | 铁摄入/代谢异常 |
| 铁传递蛋白受体 | 铁摄入/代谢异常 |
| 肾上腺髓质素 | 嗜铬细胞瘤 |
| 内皮素-1 | 血管收缩异常 |
| 血红素加氧酶 1 | 氧运输异常 |
| 一氧化氮合酶 2 | 血管紧张度异常 |
| 血管内皮生长因子 | 血管生成（肿瘤，包括癌症） |
| 血管内皮生长因子受体 FLT-1 | 血管生成（肿瘤，包括癌症） |
| 血管内皮生长因子受体 KDR/Flk-1 | 血管生成（肿瘤，包括癌症） |

[0135]

[0136] 本发明该方面的另一实施方式涉及一种方法，在需要该方法的受试者中治疗或预防由 HIF-1α 与 CBP 和 / 或 p300 相互作用介导的病症。该方法涉及将本发明的肽在有效治疗或预防病症的条件下给予至受试者。

[0137] 可以治疗或预防的病症包括：例如视网膜缺血 (Zhu 等，″ Long-term Tolerance to Retinal Ischemia by Repetitive Hypoxic Preconditioning：Role of HIF-1α and Heme Oxygenase-1， ″ Invest.Ophthalmol.Vis.Sci.48：1735-43(2007)；Ding

等，″ Retinal Disease in Mice.Lacking Hypoxia-inducible Transcription Factor-2a，″ Invest.Ophthalmol.Vis.Sci.46:1010-6(2005)，将各文献的全部内容引入本文作为参考）、肺动脉高压(Simon等，″ Hypoxia-induced Signaling in the Cardiovascular System，″ Annu.Rev.Physiol.70:51-71(2008);Eul等，″ Impact of HIF-1α and HIF-2α on Proliferatiou and Migration of Human Pulmonary Artery Fibroblasts in Hypoxia，″ FASEB J.20:163-5(2006)，将各文献的全部内容引入本文作为参考）、胎儿宫内生长迟缓(Caramelo等，″ Respuesta a la Hipoxia.Un Mecanismo Sistemico Basado en el Control de la Expresion Genica[Response to Hypoxia. A Systemic Mechanism Based on the Control of Gene Expression]，″ Medicina B.Aires 66:155-{54(2006);Tazuke等，″ Hypoxia Stimulates Insulin-like Growth Factor Binding Protein I(IGFBP-1)Gene Expression in HepG2 Cells:A Possible Model for IGFBP-1 Expression in Fetal Hypoxia，″ Proc.Nat′l Acad Sci. USA 95:10188-93(1998)，将各文献的全部内容引入本文作为参考）、糖尿病性视网膜病(Ritter等，″ Myeloid Progenitors Differentiate into Microglia and Promote Vascular Repair in a Model of Ischemic Retinopathy，″ J.Clin Invest.116:3266-76(2006);Wilkinson-Berka等，″ The Role of Growth Hormone,Insulin-like Growth Factor and Somatostatin in Diabetic Retinopathy，″ Curr.Med Chem.13:3307-17(2006);Vinores等，″ Implication of the Hypoxia Response Element of the Vegf Promoterin Mouse Models of Retinal and Choroidal Neovascularization, but Not Retinal Vascular Development，″ J.Cell.Physiol.206:749-58(2006);Caldwell等，″ Vascular Endothelial Growth Factor and Diabetic Retinopathy:Role of Oxidative Stress，″ Curr.Drug Targets 6:511-24(2005)，将各文献的全部内容引入本文作为参考）、年龄相关性黄斑变性(Inoue等，″ Expression of Hypoxia-inducible Factor 1a and 2a in Choroidal Neovascular Membranes Associated with Age-related Macular Degeneration，″ Br.J Ophthalmol.91:1720-1(2007);Zuluaga等，″ Synergies ofVEGF Inhibition and Photodynamic Therapy in the Treatment of Age-related Macular Degeneration，″ Invest. Ophthalmol.Vis.Sci 48:1767-72(2007);Provis，″ Development of the Primate Retinal Vasculature，″ Prog.Retin Eye Res.20:799-821(2001)，将各文献的全部内容引入本文作为参考）、糖尿病性黄斑水肿(Vinores等，″ Implication of the Hypoxia Response Element of the Vegf Promoter in Mouse Models of Retinal and Choroidal Neovascularization,but Not Retinal Vascular Development，″ J Cell. Physiol.206:749-58(2006);Forooghian & Das，″ Anti-angiogenic Effects of Ribonucleic Acid Interference Targeting Vascular Endothelial Growth Factor and Hypoxia-inducible Factor-1α，″ Am.J Ophthalmol.144:761-8(2007)，将各文献的全部内容引入本文作为参考）和癌症(Marignol等，″ Hypoxia in Prostate Cancer:A Powerful Shield Against Tumour Destruction？″ Cancer Treat.Rev.34:313-27(2008);Galanis等，″ Reactive Oxygen Species and HIF-1 Signalling in Cancer,″ Cancer Lett.266:12-20(2008);Ushio-Fukai & Nakamura,″ Reactive Oxygen

Species and Angiogenesis :NADPH Oxidase as Target for Cancer Therapy, " Cancer Lett.266 :37-52(2008) ;Adamski等," The Cellular Adaptations to Hypoxia as Novel Therapeutic Targets in Childhood Cancer, " Cancer Treat.Rev.34 :231-46(2008) ; Toffoli & Michiels, " Intermittent Hypoxia Is a Key Regulator of Cancer Cell and Endothelial Cell Interplay in Tumours, " FEBS J.275 :2991-3002(2008),将各文献的全部内容引入本文作为参考)。

[0138] 本发明该方面另一实施方式涉及减少或防止组织中血管生成的方法。该方法涉及在有效减少或防止组织中血管生成的条件下使本发明的肽与组织接触。本发明该方面的另一实施方式涉及诱导细胞的细胞凋亡的方法。该方法涉及在有效诱导细胞的细胞凋亡的条件下使本发明的肽与细胞接触。本发明该方面另一实施方式涉及降低细胞生存率和/或增殖的方法。该方法涉及在有效降低细胞生存率和/或增殖的条件下使本发明的肽与细胞接触。根据本发明该方面的接触(包括给药)可以使用上述对本领域技术人员显而易见的方法实行,并且可在体外或体内完成。

[0139] 在表2中示出了上述实施方式的一些示例性的靶细胞、组织和/或器官。

[0140]

| 期望的效果 | 示例性的靶 |
|---|---|
| *抑制以下的转录:* | |
| 烯醇酶 1 | 肝、脑、肾、脾、脂肪、肺 |
| 葡萄糖转运蛋白 1 | 肿瘤，包括癌症 |
| 葡萄糖转运蛋白 3 | 肿瘤，包括癌症 |
| 己糖激酶 1 | 肿瘤，包括癌症 |
| 己糖激酶 2 | 肿瘤，包括癌症 |
| 胰岛素样生长因子 2 | 脑、肝 |
| IGF 结合蛋白 1 | 脑、肝 |
| IGF 结合蛋白 3 | 脑、肝 |
| 乳酸脱氢酶 A | 心脏 |
| 血浆铜蓝蛋白 | 淋巴细胞/淋巴组织、发炎的组织、类风湿性关节组织 |
| 促红细胞生成素 | 肝、肾 |
| 铁传递蛋白 | 肝 |
| 肾上腺髓质素 | 嗜铬细胞瘤 |
| 内皮素 1 | 内皮细胞 |
| 一氧化氮合酶 2 | 脉管、心血管细胞/组织 |
| 血管内皮生长因子 | 肿瘤细胞/组织，包括癌症 |
| 血管内皮生长因子受体 FLT-1 | 肿瘤细胞/组织，包括癌症 |
| 血管内皮生长因子受体 | 肿瘤细胞/组织，包括癌症 |

[0141]

| | |
|---|---|
| KDR/Flk-1 | |
| *治疗或预防:* | |
| 视网膜缺血 | 视网膜（眼） |
| 肺动脉高压 | 肺 |
| 宫内胎儿生长迟缓 | 子宫 |
| 糖尿病性视网膜病 | 视网膜（眼） |
| 年龄相关性黄斑变性 | 视网膜（眼） |
| 糖尿病性黄斑水肿 | 视网膜（眼） |
| 血管生成 | 肿瘤细胞/组织，包括癌症 |
| 降低细胞存活率和/或增殖 | 癌细胞、包含在含有癌细胞的血管内皮组织中的细胞 |

[0142] 本发明另一方面涉及识别潜在抑制 HIF-1α 与 CBP 和 / 或 p300 相互作用的试剂的方法。该方法涉及提供本发明的肽，用测试试剂与所述的肽接触，检测测试试剂是否选择性地与肽结合，其中选择性地与肽结合的测试试剂被识别为 HIF-1α 与 CBP 和 / 或 p300 相互作用的潜在抑制剂。

[0143] 本发明该方面可使用对本领域技术人员显而易见的多种方法实施。例如，测试试剂与本发明肽的亲和力可使用等温滴定量热分析方法进行测量，如在实施例 4 中所述 (Wiseman 等，″ Rapid Measurement of Binding Constants and Heats of Binding Using a New Titration Calorimeter，″ Anal.Biochem.179 :131-7(1989) ;Freire 等，″ Isothermal Titration Calorimetry，″ Anal.Chem.62 :A950-A959(1990) ; Chervenak & Toone，″ Calorimetric Analysis ofthe Binding of Lectins with Overlapping Carbohydrate-binding Ligand Specificities，″ Biochemistry 34 :5685-95(1995) ;Aki 等，″ Competitive Binding of Drugs to the Multiple Binding Sites on Human Serum Albumin.A Calorimetric Study，″ J Thermal Anal.Calorim.57 :361-70(1999) ;Graziano 等，″ Linkage of Proton Binding to the Thermal Unfolding of Sso7d from the Hyperthermophilic Archaebacterium Sulfolobus solfataricus，″ Int ′ l J Biol.Macromolecules 26 :45-53(1999) ; Pluschke & Mutz,″ Use of Isothennal Titration Calorimetry in the Development of Molecularly Defined Vaccines,″ J.Thermal Anal.Calorim.57 :377-88(1999) ;Corbell 等，″ A Comparison of Biological and Calorimetric Analyses of Multivalent Glycodendrimer Ligands for Concanavalin A，″ Tetrahedron-Asymmetry 11 : 95-111(2000)，将这些文献的全部内容引入本文作为参考 )。在一个实施方式中，如果测试试剂与本发明肽的解离常数 (Kd) 为 50μM 或更低，则该测试试剂被识别为 HIF-1α 与 CBP

和 / 或 p300 相互作用的潜在抑制剂。在另一实施方式中，Kd 是 200nM 或更低。在另一实施方式中，Kd 是 100nM 或更低。

[0144] 被识别为 HIF-1α-p300/CREB 相互作用的潜在抑制剂的测试试剂可进一测试，以确定其抑制 HIF-1α 与 CBP 和 / 或 p300 相互作用的能力。

[0145] 本发明可参照下述实施例进一步说明。

## 实施例

[0146] 实施例 1- 以荧光素酶测试分析启动子活性。

[0147] 在高糖达尔伯克改良伊格尔培养基 (Dulbecco′ s Modified Eagle′ s Medium，″ DMEM″ ) 中维持 MDA-MB-231-HRE-Luc 细胞，培养基中补充了 10％的胎牛血清和 0.4g/L 的遗传霉素 (G418 硫酸盐，RPI Corporation)。使用 $6.5x10^4$ 细胞 /mL 的混悬液将细胞置于 24 孔板 (BD Falcon) 中，密度为 $6x10^4$ 细胞 / 孔。在附着后，以 1mL 含有浓度为 10nM 至 1μM 的 HBS 螺旋或毛壳菌素的新鲜培养基处理细胞。将细胞在潮湿的含有 5％的 $CO_2$ 氛围中在 37℃下孵育 6 小时。加入甲磺酸去铁胺 (DFO，Sigma) 至最终浓度为 300μM，造成缺氧，将细胞另外孵育 18 小时。以冰冷的 PBS 洗涤细胞两次，然后加入 150μL 细胞培养裂解试剂 (″ CCLR，″ Promega)，分离全细胞裂解液。收集裂解液，在 4℃下在 13000rpm 下离心，分装，在 -80℃下保存。根据制造商的指导 (Promega) 使用 Turner TD-20e 照度计进行荧光素酶测试。通过 Bradford 测试确定荧光素酶测试中所用的裂解液的蛋白质含量，由此标准化相对光强度测量。简言之，将 50μL 的细胞裂解液 / 荧光素酶测试试剂混合物加入 1.5mL 的比色杯中，比色杯中有 200μL 的 Bradford 试剂和 750μL 的 Millipore 水。以合适量的 1mg/mL 的 BSA 溶液形成在 1μg/mL 至 10μg/mL 范围内的蛋白质标准液。使用 DU-800 分光光度计测量在 595nm 下的吸光度。试验重复进行三次，误差线 (error bar) 计算为平均值的标准误差。

[0148] 实施例 2- 通过 qRT-PCR 分析基因表达

[0149] 实时 qRT-PCR 用于测定 HBS 螺旋在 HeLa 和 MCF-7 细胞中对 VEGF 和 GLUT1 基因表达水平的作用，两者均在常氧和缺氧的条件下进行。对于 VEGF 分析，正向引物 5′ AGG CCA GCA CAT AGG AGA GA-3′ (SEQ ID NO：114) 和反向引物 5′ TTT CCC TTT CCT CGA ACT GA-3′ (SEQ ID NO：115) 用于从基因的 3′ -翻译区扩增 104-bp 片段。对于 GLUT1(SLC2A1) 分析，下述序列用于得到 179bp 产物：正向序列 5′ -TAG AAA CAT GGT TTT GAA ATG C-3′ (SEQ ID NO：116)，反向序列 5′ -GGT AAC AGG GAT CAA ACA GAT T-3′ (SEQ ID NO：117)。因为其在实验条件下保持不变，β- 葡糖苷酸酶的表达水平用于内源性控制。正向引物 5′ -CTC ATT TGG AAT TTT GCC GAT T-3′ (SEQ ID NO：118) 和反向引物 5′ -CCG AGT GAA GAT CCC CTT TTT A-3′ (SEQ ID NO：119) 用于该基因。以 ABI 7300 实时 PCR 仪器进行温度循环和 SYBR 绿色发射检测。使用 ABI 系列检测系统 ( 版本号 1.2) 进行数据分析。以 6 次独立的实验获得的数据进行统计和分析。使用 Applied Biosystems 的 SYBR Green RT-PCR 预混合液进行实验。

[0150] 实施例 3- 使用 ELISA 检测蛋白质水平

[0151] 使用 1mL 的 $1.1x10^5$ 细胞 /mL 悬浮液，将 MCF-7 细胞置入 24 孔板 (BD Falcon) 中，密度为 $1.1x10^5$ 细胞 / 孔。吸附后，吸出细胞，如实施例 1 中所述，用 1mL 含有浓度在 10nM

到 1μM 的葚孢菌素或毛壳菌素的培养基处理。在 37℃孵育 6 小时后，通过掺入 300nM DFO 诱导 5% $CO_2$ 低氧并孵育 18 小时。收集细胞培养物上清液，在 10000rpm 和 4℃下离心，等分成 200μL 置于 96 孔板进行 ELISA 分析，分析根据制造商方案进行 (R&D Systems)。使用 Bio-Tek μQuant 酶标仪测量在 450nM 下的吸光度。以冰冷的 PBS 洗涤处理后的细胞两次，然后每孔加入 150μL 细胞培养裂解试剂 (Promega)，分离全细胞裂解液。收集细胞裂解液，在 13000rpm 和 4℃下离心，并存储于 -80℃下。与 ELISA 同时进行，通过 Bradford 测试确定全细胞裂解液的总蛋白水平以标准化测量的上清液中的 VEGF 浓度。该方法旨在确定对 VEGF 的抑制是阻断 HIF-1α 介导的转录的特殊的效果，而不是对转录机制的全局干扰的结果。用 40μL Bradford 试剂 (Bio-Rad) 和 160μL 蛋白质 / 水混合物配制样品和标准品，使用 Bio-Tek μQuant 酶标仪测量在 595nm 下的吸光度。

[0152] 实施例 4- 在细胞培养物中调节 VEGF 转录的 HBS 螺旋的设计、合成和评价

[0153] 如图 1A 所示，p300/CBP 的 CH1 结构域具有三角结构，在 HIF-1αC-TAD 折叠中作为支架。如图 1A 和 1C 所示，HIF-1αC-TAD 的螺旋 αA 是 CH1 结构域和 HIF-1α 的相互作用的关键，因为已知其残基的突变或 Asn803 的羟化会干扰该复合物，并抑制 HIF-1α 介导的转录 (Freedman 等，″ Structural Basis for Recruitment of CBP/p300 by Hypoxia-inducible Factor-1α，″ Proc.Nat′ l Acad.Sci.USA 99 :5367-72(2002) ; Dames 等，″ Structural Basis for Hif-1α/CBP Recognition in the Cellular Hypoxic Response，″ Proc.Nat′ l Acad.Sci.USA 99 :5271-6(2002))。开发作为 VEGF 转录的潜在抑制剂的 HBS 螺旋始于对 HIF-1 的 aA 螺旋区域的模拟。该螺旋由 8 个残基组成，SYDCEVNAP(SEQ ID NO :120)，特征在于三个残基 Asp-Cys-Glu，这三个残基是与 p300/CBP 结合的关键。设计了一些线性肽和其 HBSα- 螺旋类似物来判断这些分子在细胞培养物抑制 VEGF 转录的潜力。表 3 中列举了部分这些实验设计和测试的代表性的化合物。使用 (Dimartino 等，″ Solid-phase Synthesis of Hydrogen-bond Surrogate-derived α-Helices，″ Org.Lett.7 :2389-92(2005) ;Chapman & Arora，″ Optimized Synthesis of Hydrogen-bond Surrogate Helices :Surprising Effects of Microwave Heating on the Activity of Grubbs Catalysts，″ Org.Lett.8 :5825-8(2006)) 中描述的过程合成各种非约束的肽和 HBS 螺旋。如在 (Wang 等，″ Evaluation of Biologically Relevant Short α-Helices Stabilized by a Main-chain Hydrogen-bond Surrogate，″ J.Am.Chem.Soc.128 :9248-56(2006)) 中描述的，通过圆二色谱在 10mM 磷酸盐缓冲生理盐水中测定各种肽的螺旋度百分比。通过等温滴定量热分析法测量各种肽对 p300 的亲和力 (Wiseman 等，″ Rapid Measurement of Binding Constants and Heats of Binding Using a New Titration Calorimeter，″ Anal.Biochem.179 :131-7(1989) ;Freire 等，″ Isothermal Titration Calorimetry，″ Anal.Chem.62 :A950-A959(1990) ;Chervenak & Toone，″ Calorimetric Analysis of the Binding of Lectins with Overlapping Carhohydrate-binding Ligand Specificities，″ Biochemistry 34 :5685-95(1995) ;Aki 等，″ Competitive Binding of Drugs to the Multiple Binding Sites on Human Serum Albumin.A Calorimetric Study，″ J Thermal Anal.Calorim.57 :36170(1999) ;Graziano 等，″ Linkage of Proton Binding to the Thermal Unfolding of Sso7d from the Hyperthermophilic Archaebacterium Sulfolobus solfataricus，″ Int′ l J.Biol.

Macromolecules 26 :45-53(1999) ;Pluschke & Mutz, " Use of Isothermal Titration Calorimetry in the Development of Molecularly Defined Vaccines, " J Thermal Anal.Calorim.57 :377-88(1999) ;Corbell 等, " A Comparison of Biological and Calorimetric Analyses of Multivalent Glycodendrimer Ligands for Concanavalin A," Tetrahedron-Asymmetry 11 :95-111(2000))。如上所述,通过等温量热和定量 RT-PCR 评价各种肽下调细胞培养物中 VEGF 转录的能力。通过监测在存在 1 μ M 浓度的单独的肽时,细胞生长和种群倍增数确定各肽的细胞毒性。表 3 概述了从第一代 HBS 螺旋和肽衍生物所获得的结果,并将将这些值与毛壳菌素 2 观察到值进行比较。

[0154] 表 3 第一代肽

[0155]

| 化合物 | 序列[a] | 螺旋性[b] % | $K_d$, nM[c] (ITC) | 细胞培养物中的转录抑制[d] % | 对细胞的细胞毒性 |
|---|---|---|---|---|---|
| 20 | XTAYDCEVNA-$NH_2$ (SEQ ID NO:121) | 44% | 540 ± 40 | 0 ± 5 (Luc) | 未测定 |
| 21 | XTAYDVEVNA-$NH_2$ (SEQ ID NO:122) | 16% | 690 ±60 | 0 ± 5 (Luc) | 未测定 |
| 22 | XTAADCEYNAR-$NH_2$ (SEQ ID NO:123) | 53% | 420 ± 35 | 45 ± 8 (Luc & RT-PCR) | 无 |
| 23 | AcTSYDCEVNA-$NH_2$ (SEQ ID NO:124) | 14% | 1350 ±50 | 10 ±5 (Luc) | 未测定 |
| 24 | AcTAYDCEVNA-$NH_2$ (SEQ ID NO:125) | 15% | 1220 ± 80 | 15 ±5 (Luc) | 未测定 |
| 25 | AcGTAADCEYNAR-$NH_2$ (SEQ ID NO:126) | 15% | 825 ± 50 | 8 ± 3 (Luc & RT-PCR) | 无 |
| 2 | —— | —— | 120 nM | 50 ± 5 | 有 |

[0156] [a]X 表示 HBS 大环中的戊烯酸残基。

[0157] [b] 从圆二色谱分析获得。

[0158] [c] 自等温滴定量热分析法。

[0159] [d] 如实施例 1 和 2 所详述,用 1 μ M 肽或 20nM 毛壳菌素通过 Qrt-PCR 分析或荧光素酶测试评价%。

[0160] HBS 肽 20 是 HIF-1αA 螺旋的直接模拟物,除丝氨酸 -797 残基被丙氨酸取代外。由于对 HIF-1/p300 结构研究表明丝氨酸 -797 在界面中不起重要作用,所以引入该突变以简化合成方法 (Freedman 等, " Structural Basis for Recruitment of CBP/p300 by Hypoxia-inducible Factor-1α," Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 99 :5367-72(2002) ;Dames 等, " Structural Basis for Hif-1α CBP Recognition in the Cellular Hypoxic Response, " Proc.Nat' l Acad.Sci.USA 99 :5271-6(2002),将其全部内容引入作为参考)。

[0161] 通过合成和表征线性肽 23 和 24(表 3),证实该取代不会干扰与 p300 的结合。HBS 肽 20 明显比其相应的未受约束的类似物 - 肽 24 螺旋程度更高,其与 p300 以 540nM 的亲和力结合。HBS 肽 21 包括代替半胱氨酸 -800 的缬氨酸残基。基于这样的假设 :半胱氨酸 -800 靶向 p300 的疏水口袋,以疏水性更强的残基取代该残基将会导致更强的结合,引入缬氨酸 (Gu 等, ″ Molecular Mechanism of Hypoxia-inducible Factor 1α-p300 Interaction, ″ J.Biol.Chem.276 :3550-4(2001),本发明将该文全部内容引入作为参考 )。与母体化合物 HBS 肽 20 相比,HBS 肽 21 与 p300 以稍低的亲和力结合,这表明通常由半胱氨酸占据的位置上,缬氨酸并不是最优选的残基。尽管 HBS 螺旋 20 和 21 和未受约束的肽 23 和 24 与 p300 以较大的亲和力结合,这些肽中的每一种均不能在细胞培养物中抑制 VEGF 转录。

[0162] 据推测,肽不能抑制 VEGF 转录反映了其不能跨过细胞膜,由于所有的这些肽在生理 pH 下整体都带负电,而透过细胞膜的肽通常富含阳离子的残基 (Joliot & Prochiantz, ″ Transduction Peptides :From Technology to Physiology, ″ Nat. Cell Biol.6 :189-96(2004),将其全部内容引入作为参考 )。Verdine 及其同事最近证明通过中和负电荷和引入有限的阳离子残基后,观察到侧链交联的螺旋的细胞摄入显著增加 (Bernal 等,″ Reactivation of the p53 Tumor Suppressor Pathway by a Stapled p53 Peptide, ″ J.Am.Chem.Soc.129 :5298(2007),将其全部内容引入作为参考 )。因此,设计和研究衍生自母体序列但含有 C- 端精氨酸残基的 HBS 螺旋 22,对其进行测试以确定加入精氨酸残基是否可以通过稳定螺旋巨偶极子和可能形成精氨酸和谷氨酸残基侧链间的 i 和 i+4 离子相互作用,增加了螺旋含量 (Shi 等, ″ Stabilization of α-Helix Structure by Polar Side-chain Interactions :Complex Salt Bridges, Cation-π Interactions, and C-H...OH-bonds, ″ Peptide Sci.60 :366-80(2002),将其全部内容引入作为参考 )。为了简化这些人工螺旋的合成,以丙氨酸 ( 不需要侧链保护的残基 ) 取代大环中的酪氨酸残基。酪氨酸残基在 802 位被取代引入,该位置在野生型序列中由缬氨酸占据,并且预期不会参与结合相互作用。纳入酪氨酸和色氨酸残基以测定肽浓度。肽 25 设计为 HBS 螺旋 22 的未受约束的类似物。

[0163] HBS 螺旋 22 与 p300 的结合的亲和力高于 HBS 螺旋 22 和 21 以及肽 25、其相应的未受约束的肽,这可能是因为其由圆二色谱测定的螺旋含量更高 ( 见表 3 和图 6)。HBS 螺旋的 CD 光谱在 204nm 和 222nm 处显示了双最小值,这是 α- 螺旋的特征,并且在 222nm 处的值表示约束的肽 22 为约 55%的螺旋 (Wang 等, ″ Evaluation of Biologically Relevant Short a-Helices Stabilized by a Main-chain Hydrogen-bond Surrogate, ″ J. Am.Chem.Soc.128 :9248-56(2006),将其全部内容引入作为参考 )。与预期相同,对照肽 25 似乎是非结构化的。

[0164] 如表 3 和图 7 所示,HBS 螺旋 22 可抑制 HeLa 细胞中的 VEGF 转录,抑制水平与毛壳菌素 2 相当,而线性对照肽 25 作用很小。该结果潜在地反映了未受约束肽的蛋白水解不稳定性,而预期 α- 螺旋构象的肽稳定性提高了对蛋白酶的耐受性 (Tyndall 等,″ Proteases Universally Recognize Beta Strands in their Active Sites, ″ Chem.Rev.105 : 973-99(2005),将其全部内容引入作为参考 )。在 (Wang 等, ″ Enhanced Metabolic Stability and Protein-binding Properties of Artificial α Helices Derived

from a Hydrogen-bond Surrogate :Application to Bcl-xL, " Angew. Chem. Int ' l Ed. 44 :65259(2005),将其全部内容引入作为参考）中报道了与其未受约束的对应物相比，HBS α - 螺旋的蛋白水解稳定性提高。HBS 螺旋 22 设计用来改变肽的整体电荷和稳定螺旋构象。

[0165] 毛壳菌素比 HBS 螺旋 22 具有更强的 VEGF 转录抑制作用，200nM 的毛菌壳素与 1 μ M 的 HBS 螺旋 22 的抑制水平大致相似。但是如图 8 所示，已知毛壳菌素是一种有毒性的试剂，而 HBS 螺旋 22 在细胞生长测试中未表现出明显的细胞毒性。因此，HBS 螺旋 22 看来表现出较强的 VEGF 转录抑制作用，同时不具有与毛壳菌素相关的明显的毒性。

[0166] 实施例 5- 合成和表征靶向 p300/CBP CH1 结构域的第二代 HBS 螺旋

[0167] 实施例 4 所述的结果表明 HBS 螺旋 22 可有效地抑制在细胞培养物中的 HIF-1/p300 的相互作用。这些研究表明 HBS 螺旋 22 中存在的末端精氨酸对于提高在细胞培养物研究中的作用是重要的，虽然对肽 20 进行序列取代会得到相似的效果。如表 4 所示，设想了其它的试验，其中评价衍生自肽 20 和 22 的类似物，以开发出优化的 HBSHIF-1 模拟物。制备了一些化合物以评价电荷对在细胞培养物中的这些化合物的活性的作用。HBS 肽 44 是肽 20 的类似物，其末端精氨酸能与谷氨酸残基形成 i 和 i+4 盐桥。类似物 45 有两个带正电的残基组成。在肽 44 中以精氨酸残基取代天冬酰胺可提供另外的 i 和 i+4 盐桥（与天冬氨酸残基），并且可能进一步稳定螺旋构象 (Shi 等，" Stabilization of α Helix Structure by Polar Side-chain Interactions :Complex Salt Bridges, Cation- π Interactions, and C-H...OH-bonds, " Peptide Sci. 60 :366-80(2002)，将其全部内容引入作为参考）。HBS 螺旋 46 是肽 22 的二精氨酸类似物，被设计用于构建最具活性的 HBS 螺旋。制备荧光素标记的衍生物 47 以评价肽 22 的细胞分布。根据需要可制备其它荧光素类似物。

[0168] 表 4 推荐的 HBS 肽和对照肽

[0169]

| 化合物 | 序列 | 整体电荷 | 注释 |
|---|---|---|---|
| 20 | XTAYDCEVNA-$NH_2$ | -2 | 野生型序列；在细胞培养物中无活性 |
| 22 | XTAADCEYNAR-$NH_2$ | -1 | 修改的序列；在细胞培养物中有活性 |
| 44 | XTAYDCEVNAR-$NH_2$ (SEQ ID NO:127) | -1 | 具有末端精氨酸的肽20的类似物 |
| 45 | XTAYDCEVRAR-$NH_2$ (SEQ ID NO:128) | 0 | 具有N至R取代的肽44的类似物 |
| 46 | XTAADCEYRAR-$NH_2$ (SEQ ID NO:129) | 0 | 具有N至R取代的肽22的类似物 |
| 47 | XTAADCEYNARK(Flu)-$NH_2$ | --- | 荧光素标记的肽22用于细胞摄入研究 |
| 48 | XEELLRALD-$NH_2$ (SEQ ID NO:130) | -2 | HIF-1 αB螺旋的模拟物 |
| 49-53 | 对照肽 | | 肽44-48的未受约束的肽模拟物 |

[0170] 这些 HBS 螺旋模拟了 HIF-1 的 α A 螺旋。也可评价 HIF-1 中的第二螺旋（α B）的

模拟物。例如，HBS 螺旋 48 代表了 α B 螺旋的直接模拟物。任何 HBS 螺旋未受约束的肽类似物可与 HBS 螺旋一起常规地制备和评价。

[0171] 虽然在本文中已经示出和描述了本发明的优选实施方式，但是对本领域技术人员显而易见的是这些实施方式仅仅是示意性的。在不脱离本发明范围的情况下，本领域技术人员能够想到各种变化、修改和替代。应当理解的是在本文中说明的各种本发明实施方式的替代可用于实施本发明。以下权利要求旨在定义本发明的范围，从而也覆盖在这些权利要求范围内的方法、结构及其等价物。

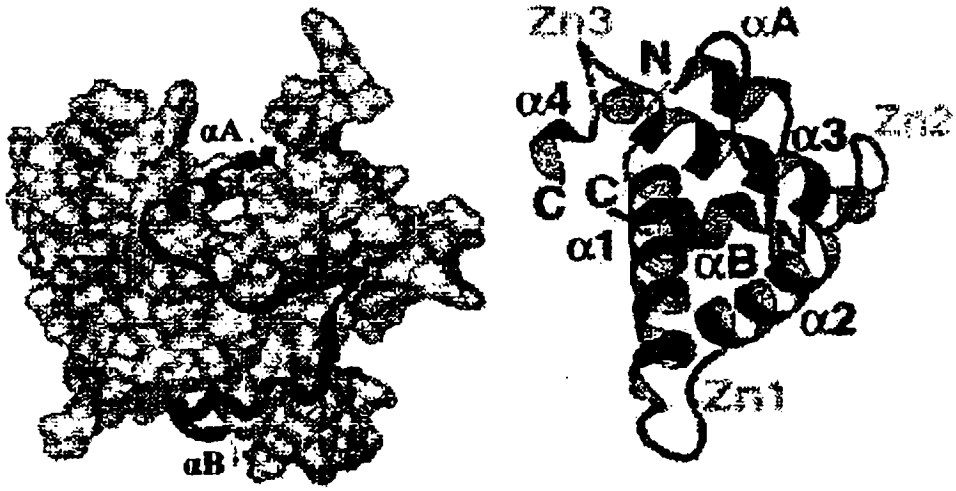

αA
αB
Zn3
N
αA
α4
α3
Zn2
C
C
α1
αB
α2
Zn1

图 1A


HIF-1α
bHLH
PAS
N-TAD
C-TAD

图 1B

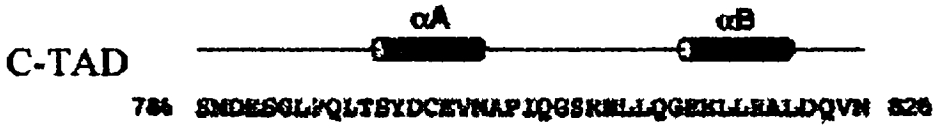

αA
αB
C-TAD
786 SMDEGGLPQLTSYDCEVNAPIQGSRNLLQGEELLRALDQVN 826

图 1C

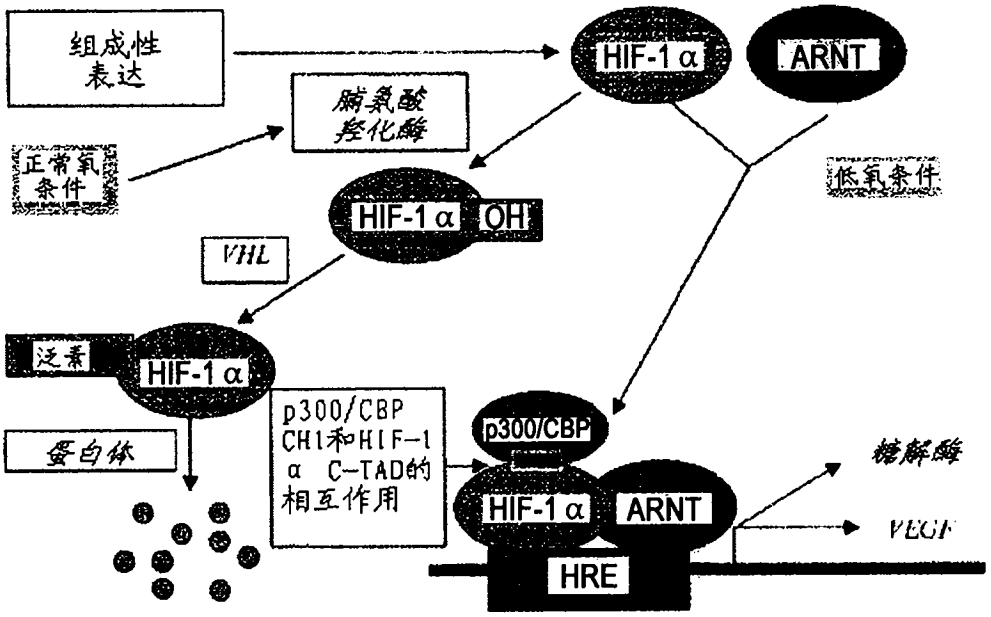

组成性
表达
脯氨酸
羟化酶
正常氧
条件
HIF-1 α
ARNT
HIF-1 α OH
VHL
泛素
HIF-1 α
蛋白体
p300/CBP
CH1和HIF-1
α C-TAD的
相互作用
p300/CBP
HIF-1 α
ARNT
HRE
低氧条件
糖解酶
VEGF

图 2

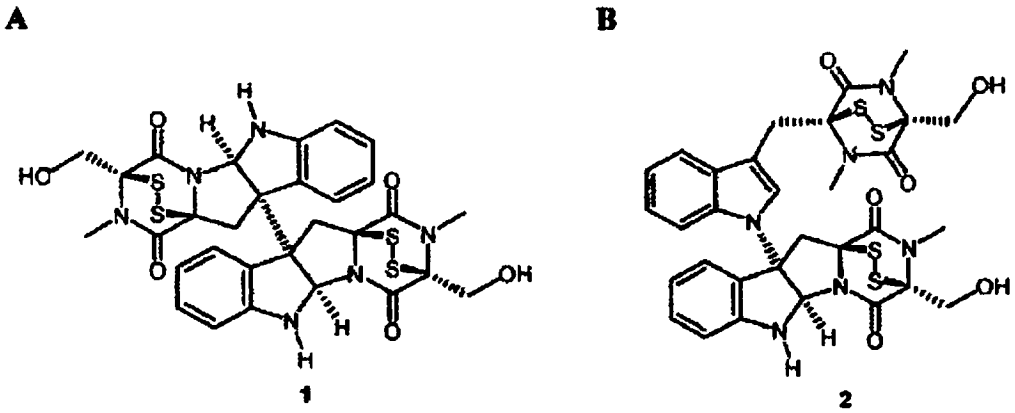

A
B
1
2

图 3A-B

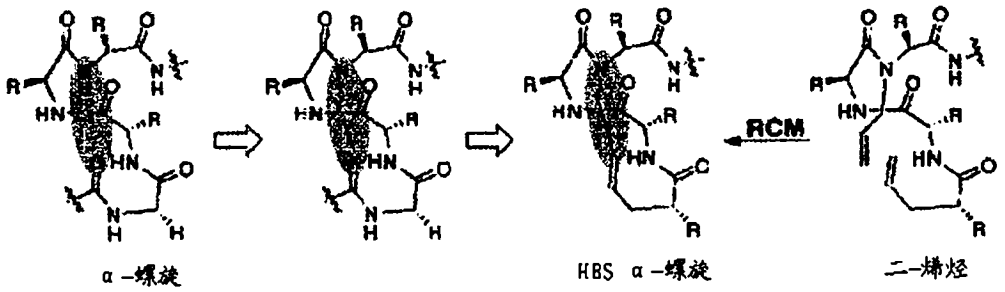



图 4

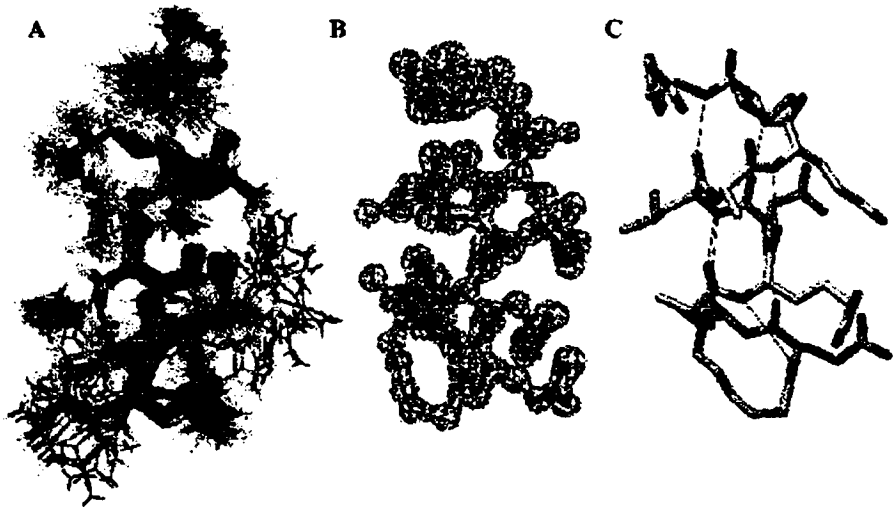



图 5A-C

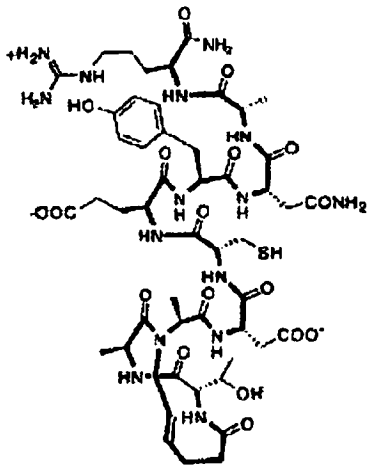



图 6A

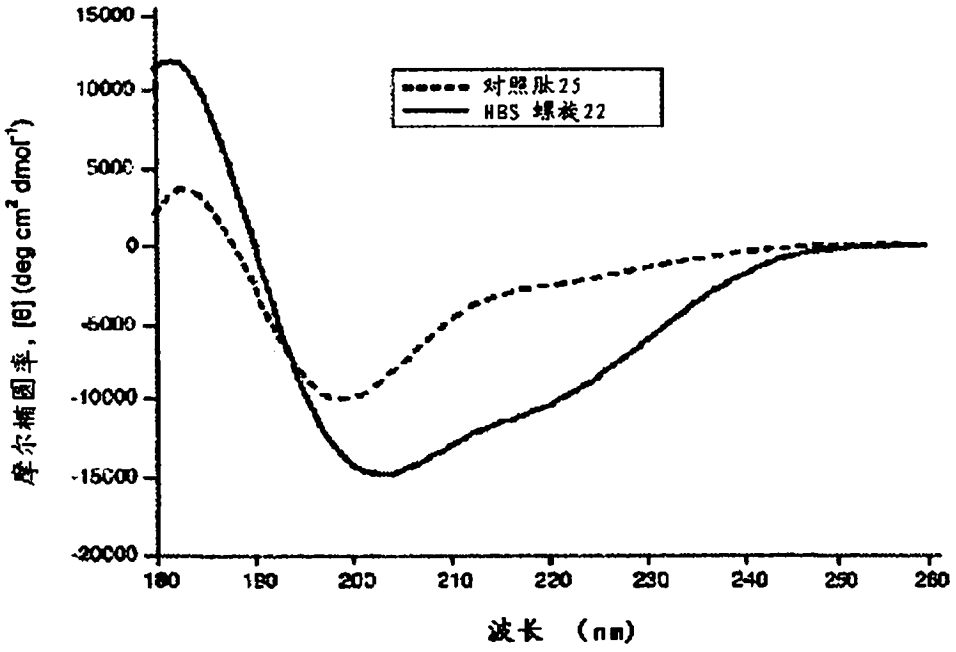

15000
10000
5000
0
-5000
-10000
-15000
-20000
对照肽25
HBS 螺旋22
摩尔椭圆率，[θ] (deg cm² dmol⁻¹)
180
190
200
210
220
230
240
250
260
波长 (nm)

图 6B

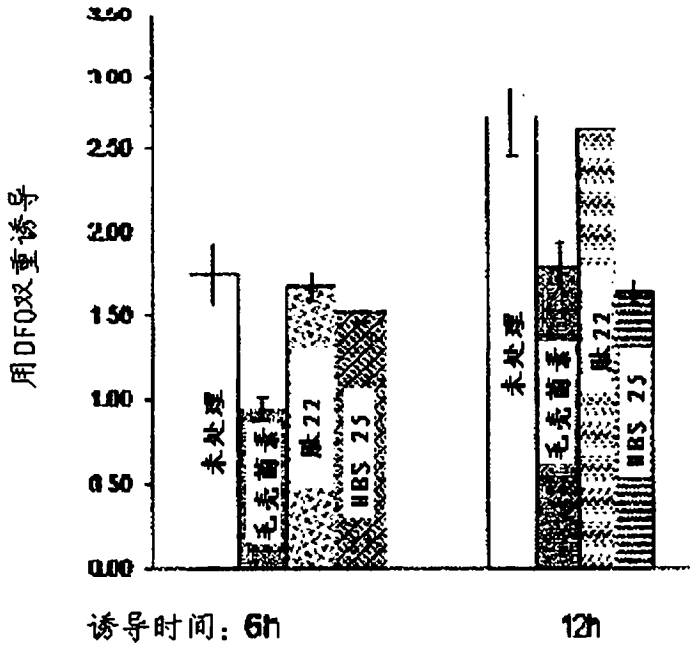

用DFO双重诱导
2.50
2.00
1.50
1.00
0.50
0.00
未处理
毛壳菌素H
肽22
HBS 25
诱导时间：6h
12h

图 7

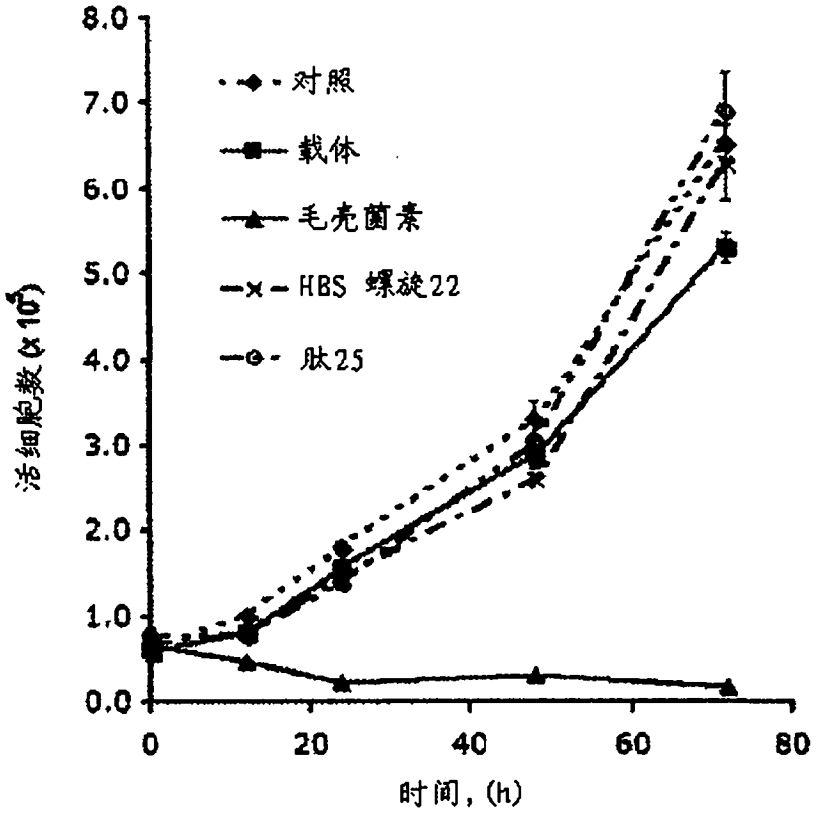

8.0
7.0
6.0
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
0
20
40
60
80
对照
载体
毛壳菌素
HBS 螺旋22
肽25
活细胞数(x10⁵)
时间，(h)

图 8