



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 119156395 A

(43) 申请公布日 2024.12.17

(21) 申请号 202380034351.1

(22) 申请日 2023.04.21

(30) 优先权数据

63/363,450 2022.04.22 US

63/354,471 2022.06.22 US

63/377,754 2022.09.30 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.10.16

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2023/019452 2023.04.21

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/205451 EN 2023.10.26

(71) 申请人 恩特拉达治疗学股份有限公司

地址 美国

(72) 发明人 帕特里克·多尔蒂

凯尔·A·托塔罗

阿曼达·东布罗斯基

赖利·吉斯勒 周明

马修·斯特里特 亚历克·戈菲

钱自清

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司

11227

专利代理师 张福誉 陈九洲

(51) Int.Cl.

G07K 7/64 (2006.01)

A61K 47/64 (2006.01)

(54) 发明名称

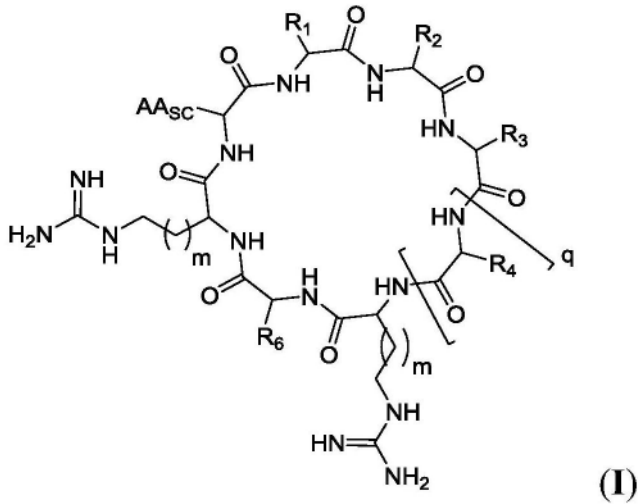
用于递送治疗剂的环肽

(57) 摘要

本公开涉及环肽的合成,所述环肽能够有效地将货物例如治疗部分(TM)递送到细胞内部以治疗多种疾患和疾病。

权利要求书18页 说明书129页 附图12页

1. 一种制备式 (I) 的环肽的方法



或其质子化形式,

其中:

R_1 、 R_2 和 R_3 各自独立地是H或酪氨酸、苯丙氨酸或色氨酸的残基;

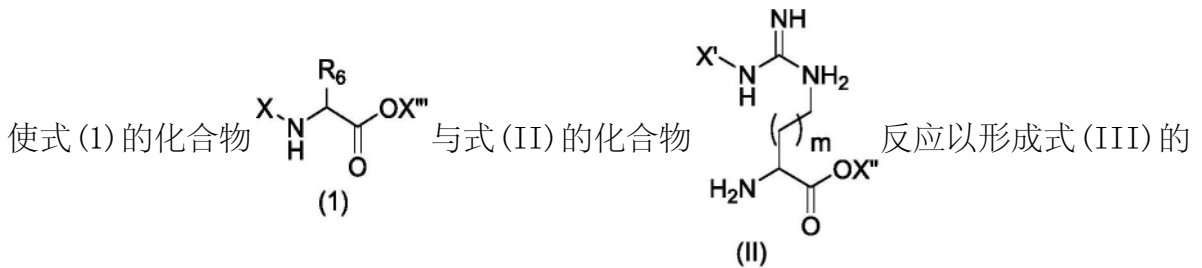
R_4 和 R_6 独立地是H或氨基酸侧链;

AA_{sc} 是氨基酸侧链;

q 是1、2、3或4;并且

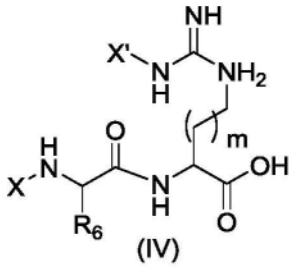
每个 m 独立地是0-3的整数,

所述方法包括:

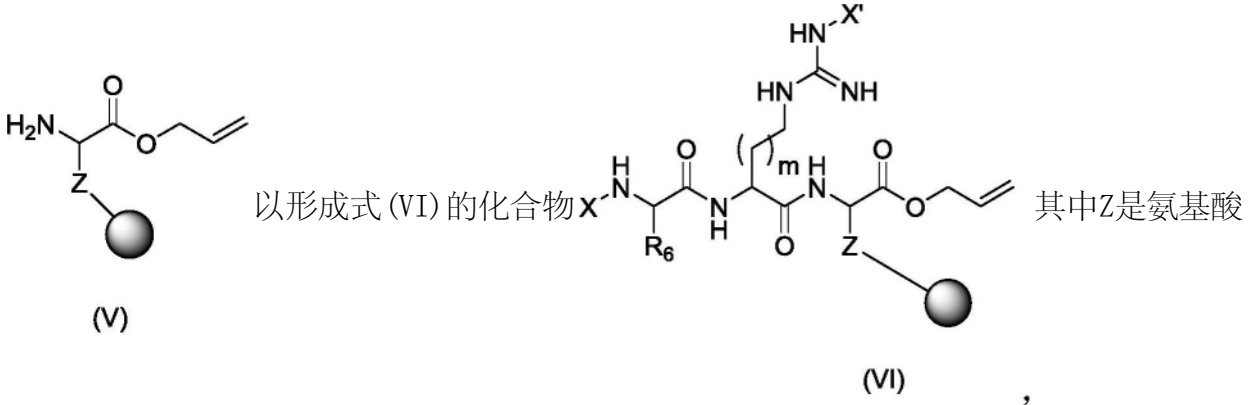



活化基团并且 m 是0-3。

2. 如权利要求1所述的方法,其还包括将式 (III) 的化合物转化为式 (IV) 的化合物

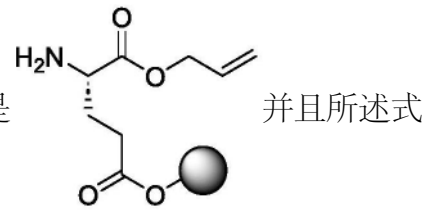


3. 如权利要求2所述的方法, 其还包括使式 (IV) 的化合物与式 (V) 的化合物反应

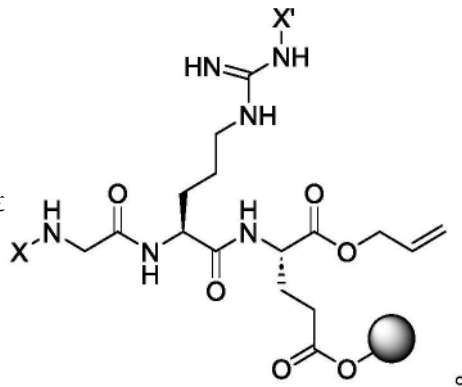


侧链的基团并且  是固体支持物。

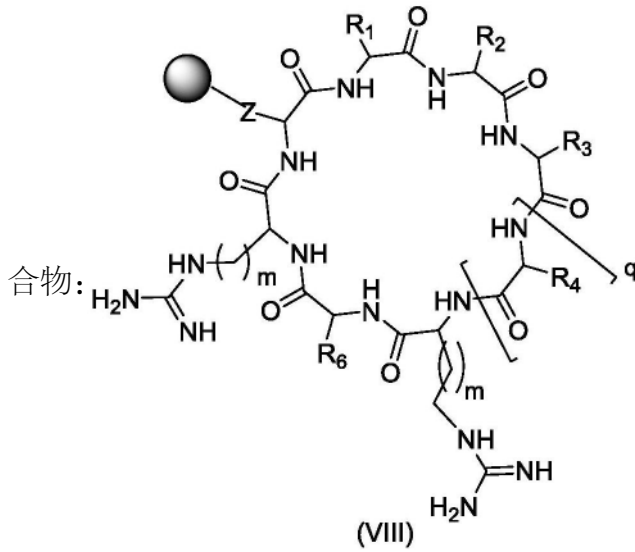
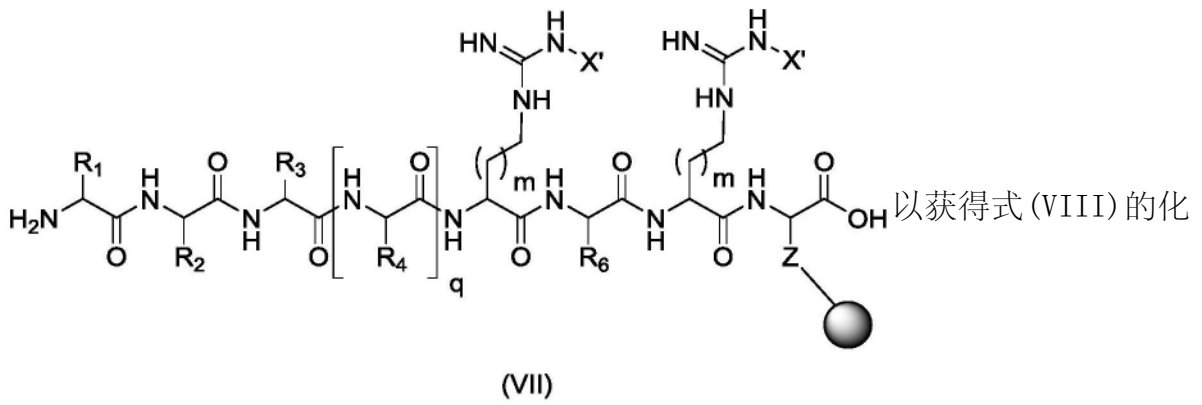
4. 如权利要求3所述的方法, 其中所述式 (IV) 的化合物是



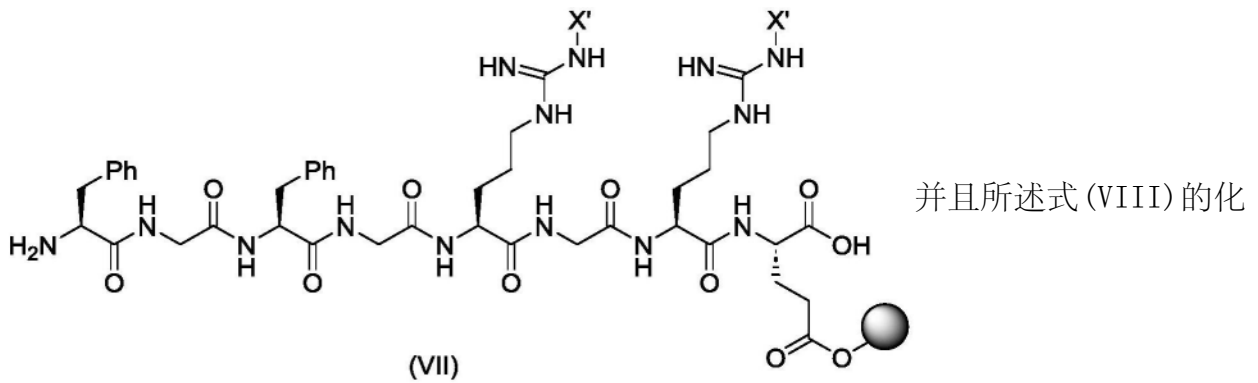
(VI) 的化合物是

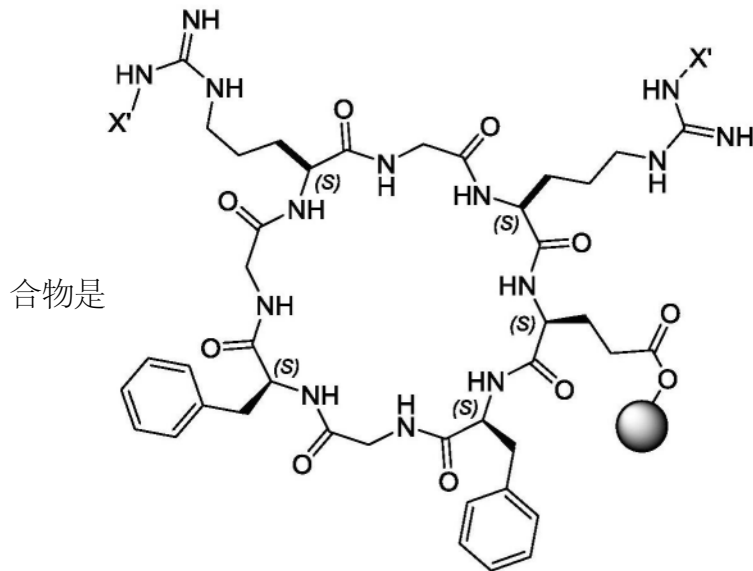


5. 如权利要求1所述的方法, 其还包括用PyOxim/Oxyma和碱处理式 (VII) 的化合物



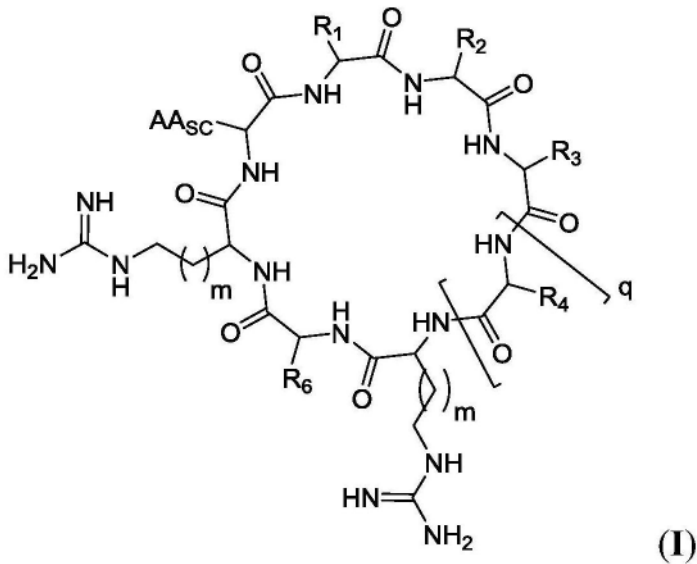
6. 如权利要求5所述的方法,其中所述式 (VII) 的化合物是





7. 如权利要求5或6所述的方法,其中所述碱是DIPEA。

8. 一种制备环肽的方法



或其质子化形式,

其中:

R_1 、 R_2 和 R_3 各自独立地是H或酪氨酸、苯丙氨酸或色氨酸的侧链;

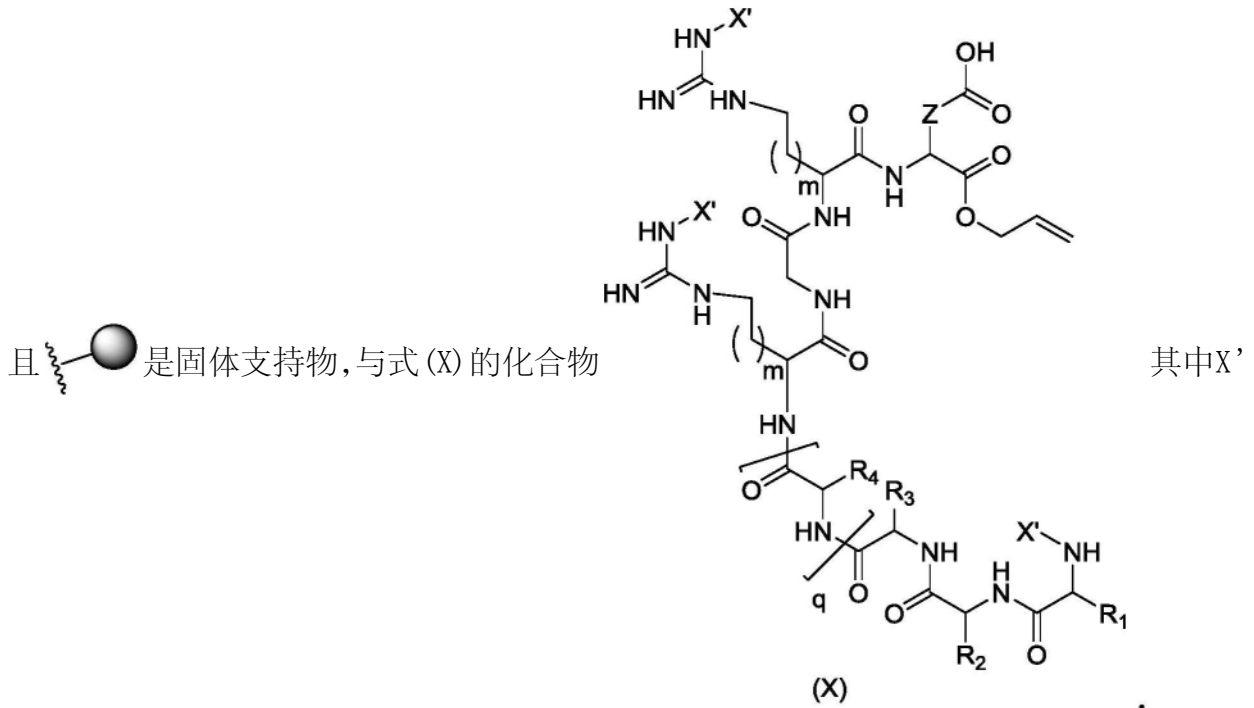
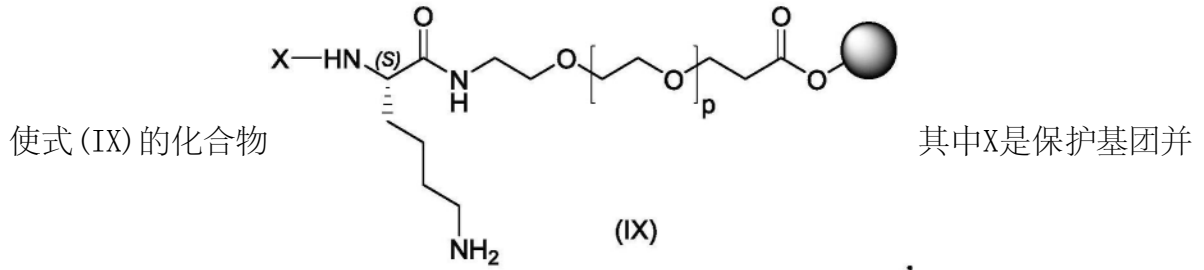
R_4 和 R_6 独立地是H或氨基酸侧链;

AA_{sc} 是氨基酸侧链;

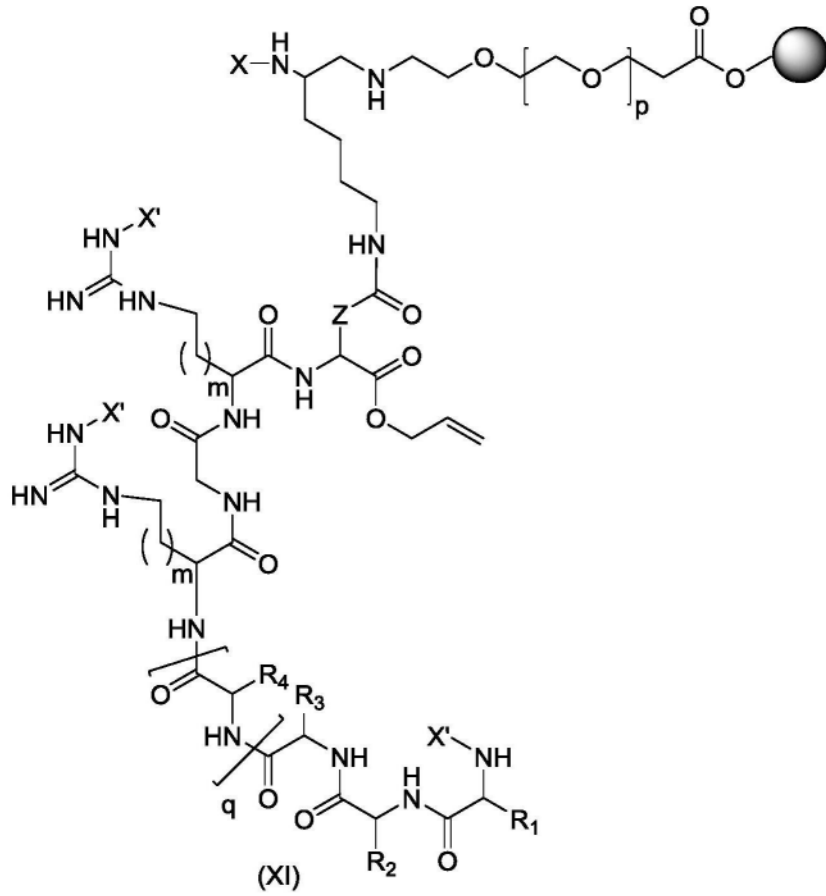
q 是1、2、3或4;并且

每个 m 独立地是0-3的整数,

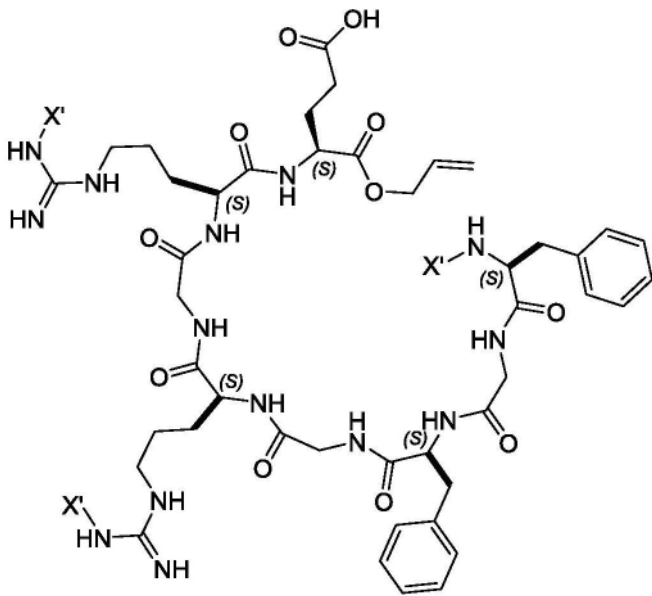
所述方法包括:



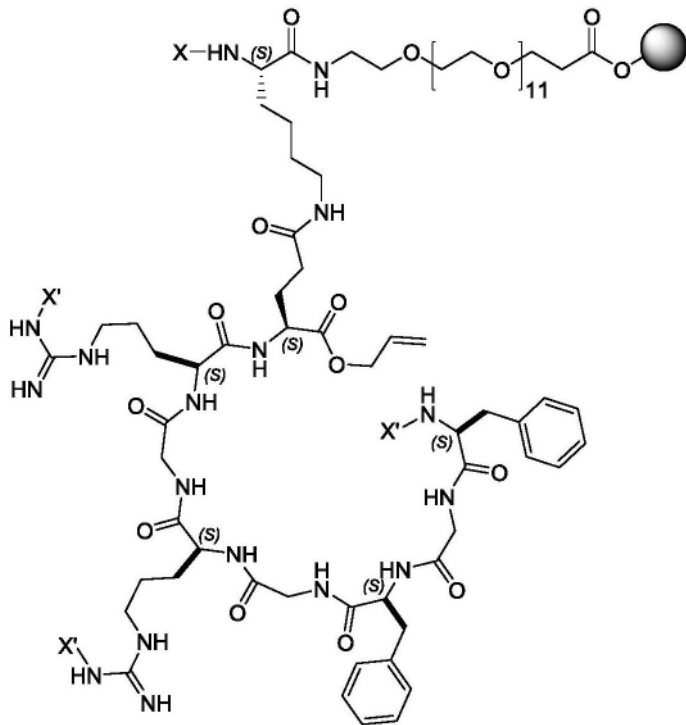
是保护基团并且Z是氨基酸侧链的基团, 反应以形成式 (XI) 的化合物



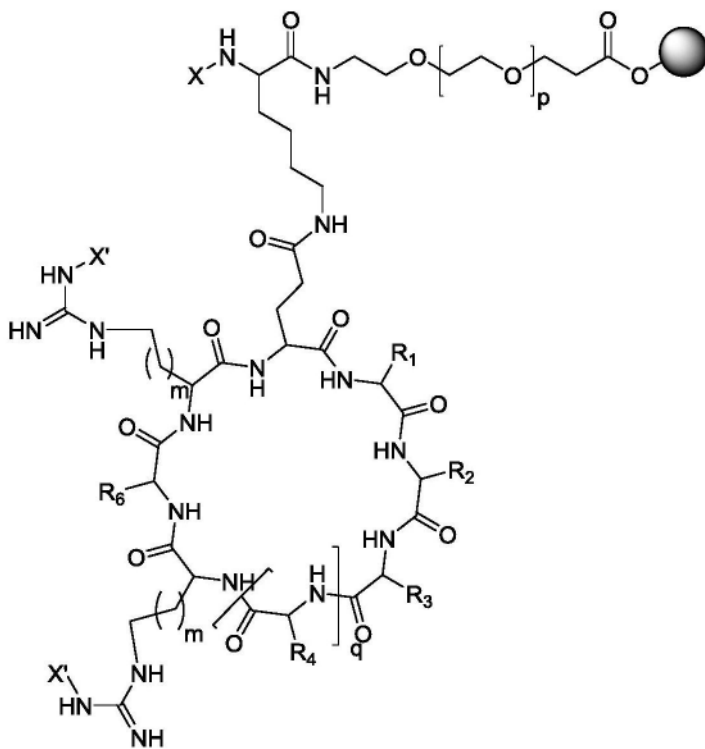
9. 如权利要求8所述的方法,其中所述式(X)的化合物是



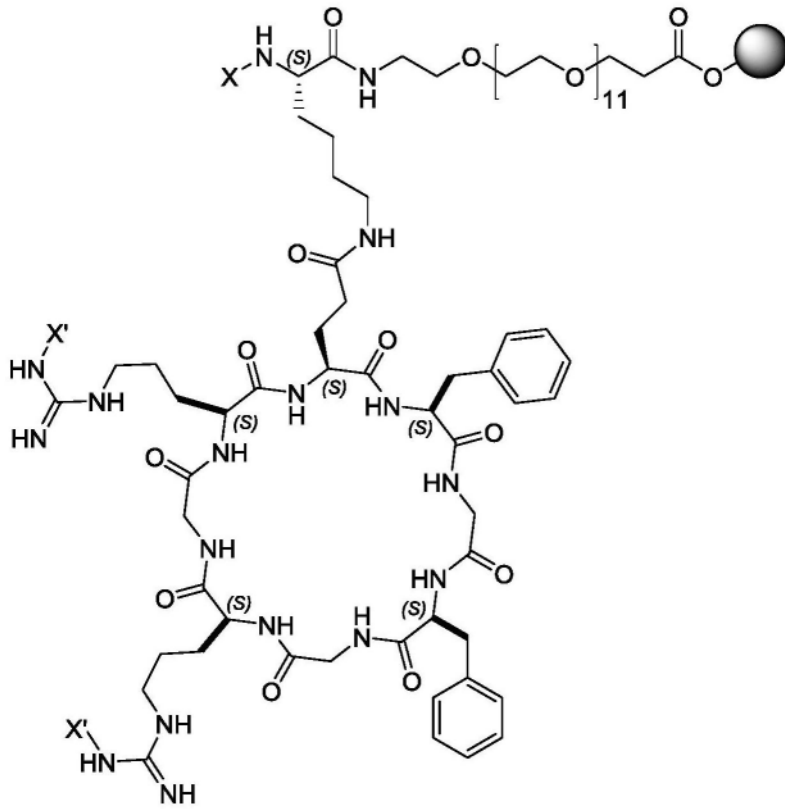
并且所述式(XI)的化合物是



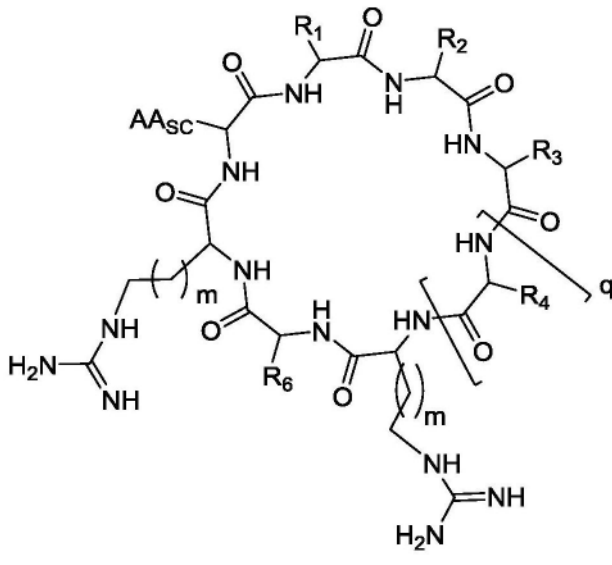
10. 如权利要求8所述的方法,其还包括处理所述式(XI)的化合物以形成式(XII)的化合物



11. 如权利要求10所述的方法,其中所述式(XII)的化合物是



12. 一种制备环肽的方法



或其质子化形式，

其中：

R₁、R₂和R₃各自独立地是H或酪氨酸、苯丙氨酸或色氨酸的侧链；

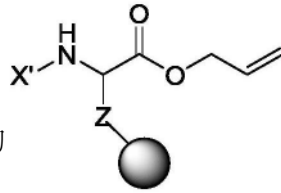
R₄和R₆独立地是H或氨基酸侧链；

AA_{sc}是氨基酸侧链；

q是1、2、3或4；并且

每个m独立地是0-3的整数，

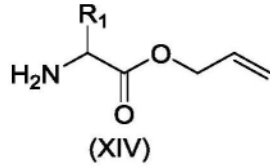
所述方法包括：使式 (XIII) 的化合物



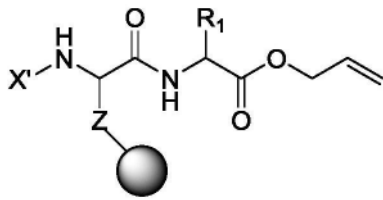
其中  是固体支持物，

(XIII)

与式 (XIV) 的化合物

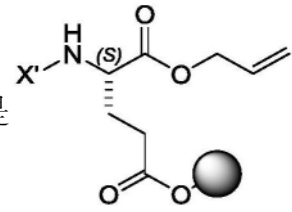


反应以得到式 (XV) 的化合物



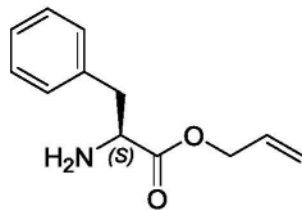
(XV)

13. 如权利要求12所述的方法,其中所述式 (XIII) 的化合物是

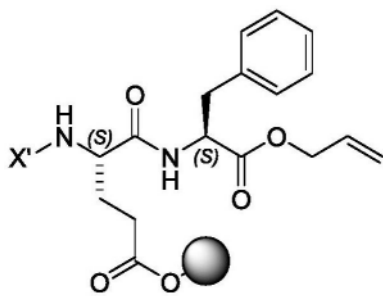


所

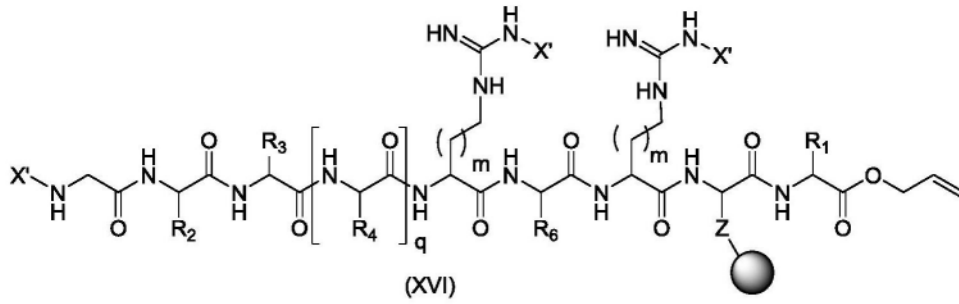
述式 (XIV) 的化合物是



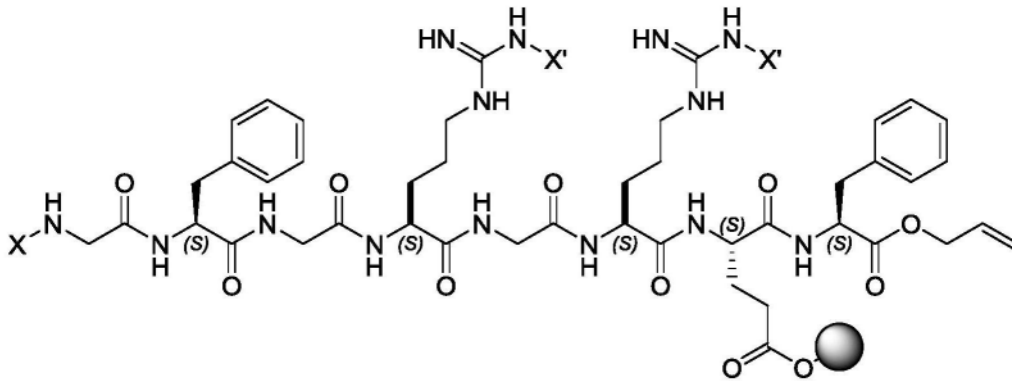
并且所述式 (XV) 的化合物是



14. 如权利要求12所述的方法,其还包括处理所述式 (XV) 的化合物以获得式 (XVI) 的化合物:



15. 如权利要求 14 所述的方法, 其中所述式 (XVI) 的化合物是



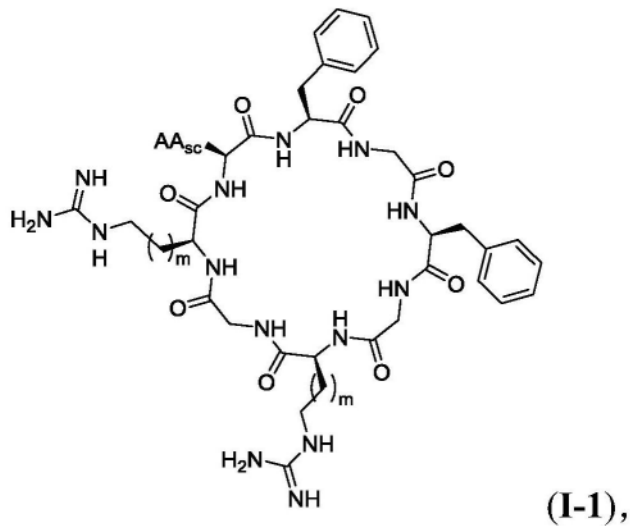
16. 如权利要求 1-15 中任一项所述的方法, 其中 R_4 是 H 或者酪氨酸、苯丙氨酸或色氨酸的侧链。

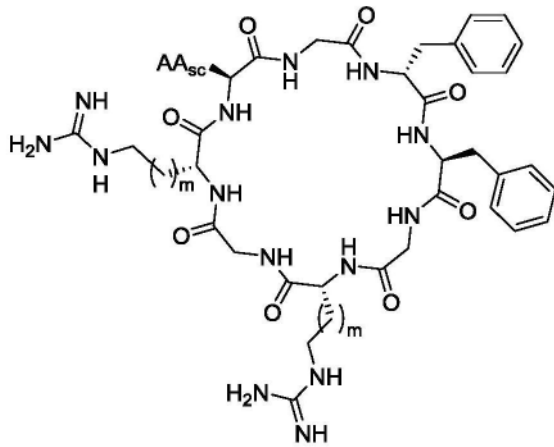
17. 如权利要求 1-16 中任一项所述的方法, 其中 R_4 是苯丙氨酸的侧链。

18. 如权利要求 1-17 中任一项所述的方法, 其中 R_1 、 R_2 、 R_3 和 R_4 中的两者是苯丙氨酸侧链。

19. 如权利要求 1-18 中任一项所述的方法, 其中 R_1 、 R_2 、 R_3 和 R_4 中的两者是 H。

20. 如权利要求 1-19 中任一项所述的方法, 其包括式 (I-1) 或 (I-2) 的结构:





(I-2),

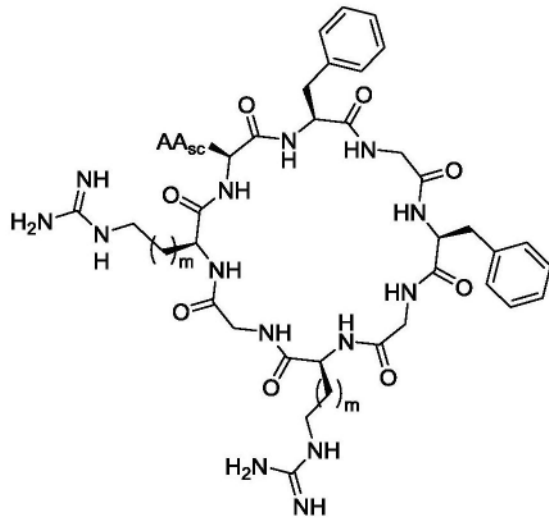
或其质子化形式,

其中:

AA_{sc} 是氨基酸侧链;并且

每个 m 独立地是0-3的整数。

21. 如权利要求1-20中任一项所述的方法,其中式(A)的化合物具有以下结构:



(I-1)

或其质子化形式,

其中:

AA_{sc} 是氨基酸侧链;并且

每个 m 独立地是0-3的整数。

22. 如权利要求1-21中任一项所述的方法,其中 AA_{sc} 是天冬酰胺侧链、天冬氨酸侧链、谷氨酰胺侧链、谷氨酸侧链、高谷氨酰胺残基或高谷氨酸侧链的侧链。

23. 如权利要求1-21中任一项所述的方法,其中 AA_{sc} 是谷氨酰胺侧链的侧链。

24. 如权利要求1-23中任一项所述的方法,其中所述 AA_{sc} 缀合至接头。

25. 如权利要求24所述的方法,其中所述接头包含:

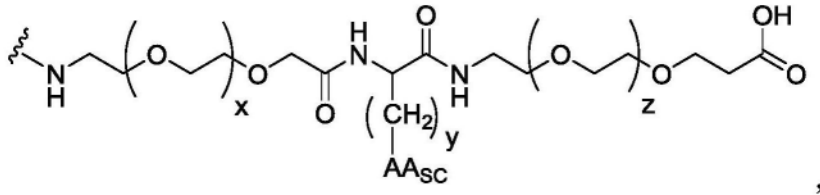
(i) $-(OCH_2CH_2)_z-$ 亚基,其中 z 是2至20的整数

(ii) 一个或多个氨基酸侧链,诸如甘氨酸、 β -丙氨酸、4-氨基丁酸、5-氨基戊酸或6-氨基戊酸的残基或它们的组合;或者

(iii) (i) 和(ii) 的组合。

26. 如权利要求24或25所述的方法,其中所述接头包含 $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_x-$ 亚基,其中 x 是2至20的整数。

27. 如权利要求24-26中任一项所述的方法,其中所述接头具有以下结构:



其中:

x 是2-20的整数;

y 是1-5的整数;并且

z 是2-20的整数。

28. 如权利要求25或27所述的方法,其中 z 是11。

29. 如权利要求26-28中任一项所述的方法,其中 x 是1。

30. 如权利要求24-29中任一项所述的方法,其包括在氨基基团处与所述接头缀合的环外肽。

31. 如权利要求30所述的方法,其中所述环外肽包含2至10个氨基酸侧链。

32. 如权利要求30或31所述的方法,其中所述环外肽包含4至8个氨基酸侧链。

33. 如权利要求30-32中任一项所述的方法,其中所述环外肽包含1或2个氨基酸侧链,所述氨基酸侧链包含有包含胍基基团或其质子化形式的侧链。

34. 如权利要求30-33中任一项所述的方法,其中所述环外肽包含2、3或4个赖氨酸侧链。

35. 如权利要求34所述的方法,其中每个赖氨酸侧链的所述侧链上的氨基基团被三氟乙酰基 $(-\text{COCF}_3)$ 、烯丙氧基羰基(Alloc)、1-(4,4-二甲基-2,6-二氧代亚环己基)乙基(Dde)或(4,4-二甲基-2,6-二氧代环己-1-亚基-3)-甲基丁基(ivDde)基团取代。

36. 如权利要求30-35中任一项所述的方法,其中所述环外肽包含至少2个具有疏水侧链的氨基酸侧链。

37. 如权利要求36所述的方法,其中所述具有疏水侧链的氨基酸侧链选自缬氨酸、脯氨酸、丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸和甲硫氨酸。

38. 如权利要求30-37中任一项所述的方法,其中所述环外肽包含以下序列中的一者:

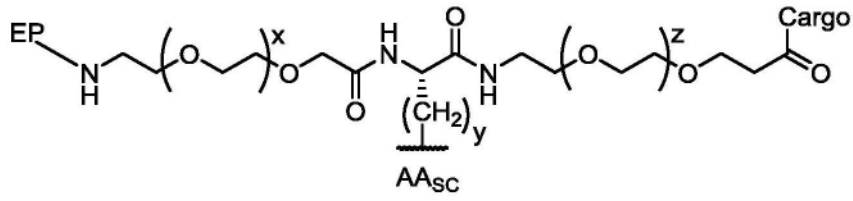
PKKKRKV; KR; RR; KKK; KGK; KBK; KBR; KRK; KRR; RKK; RRR; KKKK; KKRK; KRKK; KRRK; RKKR; RRRR; KGKK; KKGK; KKKKK; KKKRK; KBKBK; KKKRKV; PGKKRKV; PKGKRKV; PKKGRKV; PKKKGKV; PKKKRGV; 或PKKKRKG。

39. 如权利要求30-38中任一项所述的方法,其中所述环外肽具有以下结构:Ac-P-K-K-K-R-K-V-。

40. 如权利要求24-39中任一项所述的方法,与货物部分缀合,其中末端羧酸基团的-OH由所述货物部分替换。

41. 如权利要求40所述的方法,其中所述货物部分包含治疗分子,所述治疗分子包括寡核苷酸、肽或小分子。

42. 如权利要求24-41中任一项所述的方法,与接头缀合,其中所述接头具有以下结构:



其中:

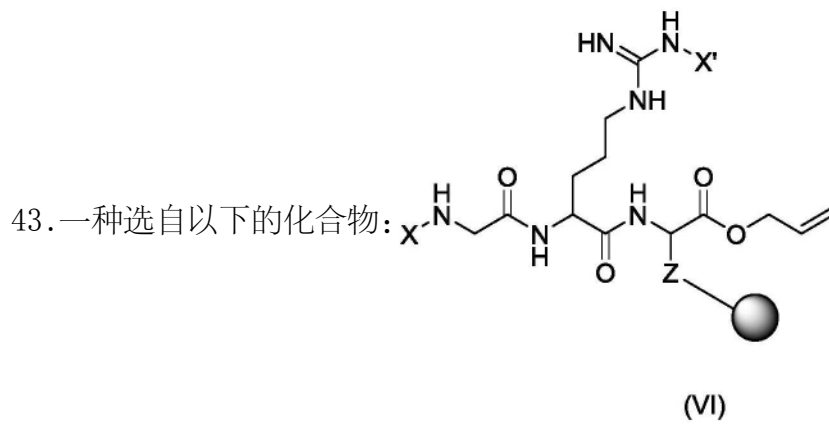
EP是环外肽;

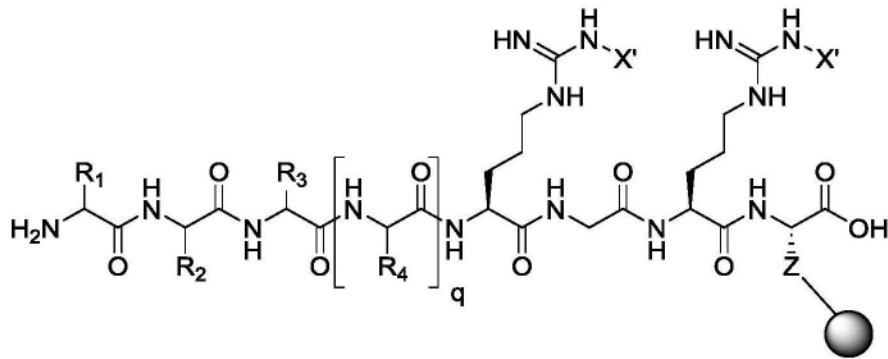
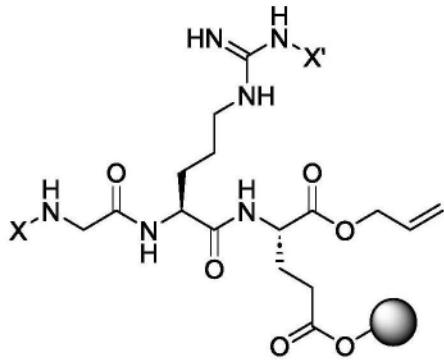
AA_{sc}是氨基酸侧链;

x是2-20的整数;

y是1-5的整数;并且

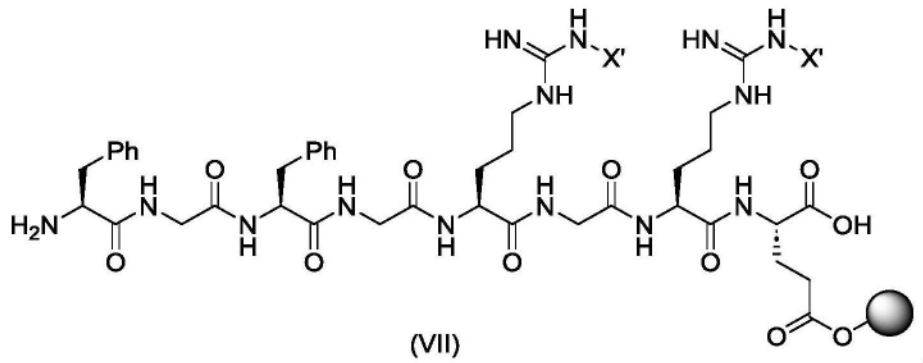
z是2-20的整数。





(VII)

和



(VII)

其中：


R₁、R₂和R₃各自独立地是H或酪氨酸、苯丙氨酸或色氨酸的侧链；

R₄是H或氨基酸侧链；

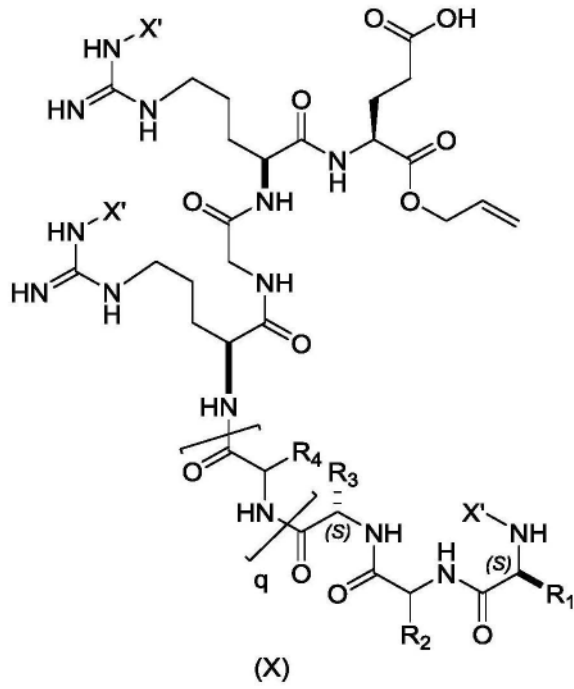
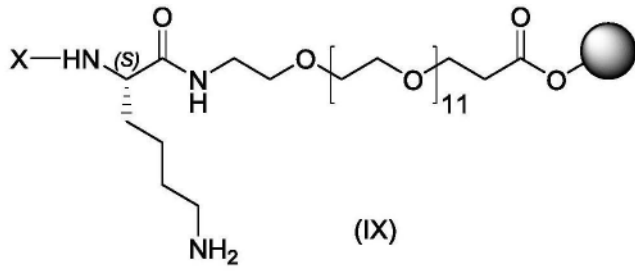
AA_{SC}是氨基酸侧链；

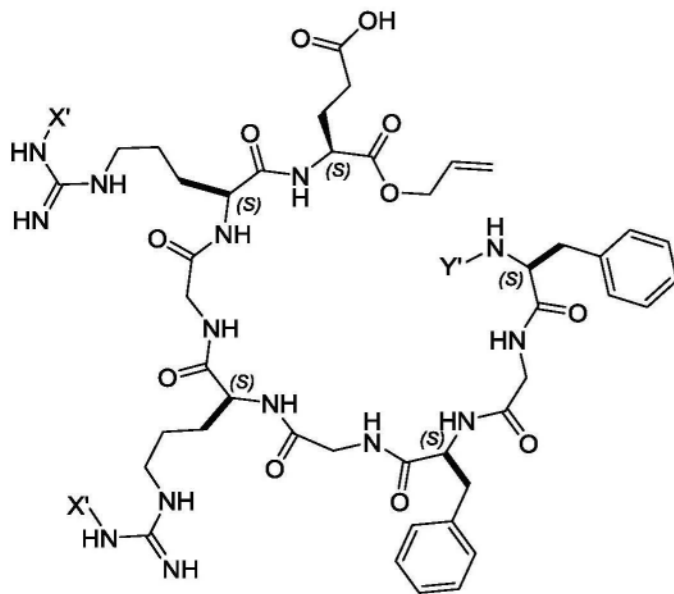
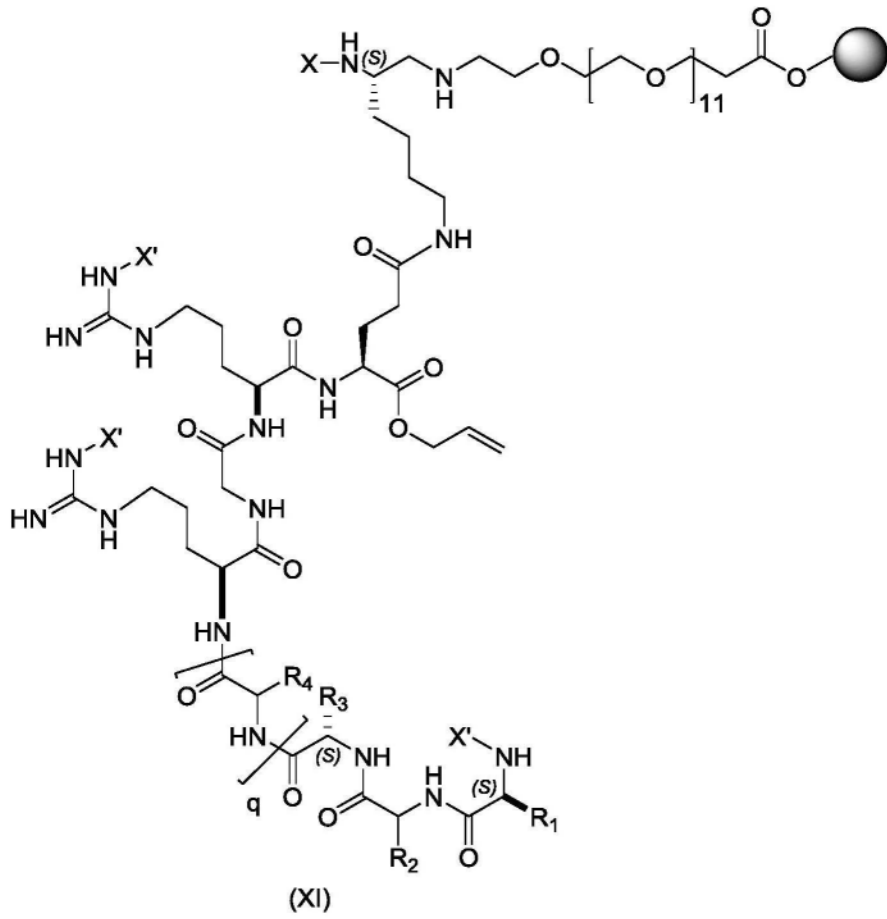
q是1、2、3或4；

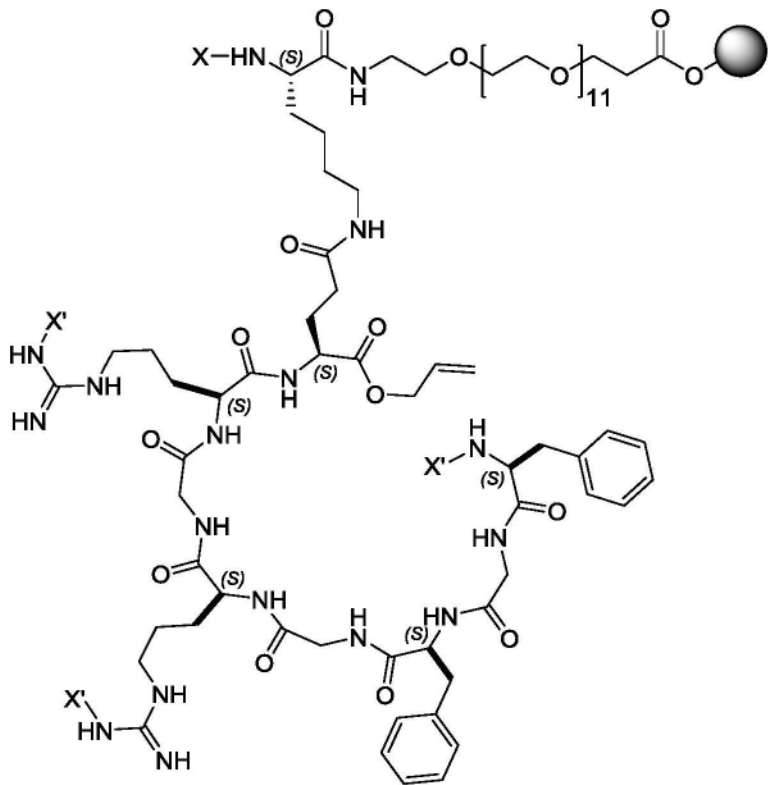
X、X'和X''各自独立地是保护基团；

每个m独立地是0-3的整数；并且是固体支持物。

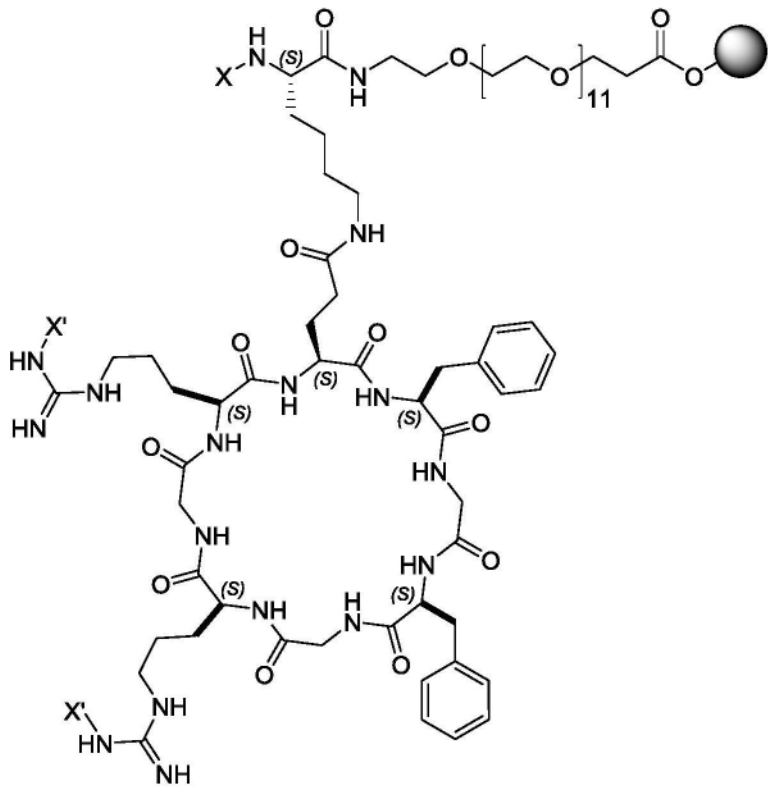
44. 一种选自以下的化合物：







和



其中：

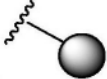
R_1 、 R_2 和 R_3 各自独立地是H或酪氨酸、苯丙氨酸或色氨酸的侧链；

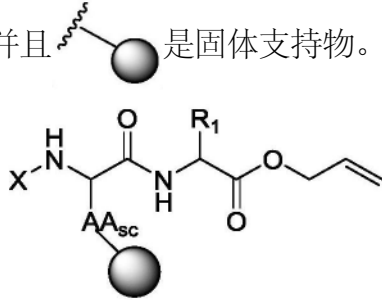
R_4 是H或氨基酸侧链；

AA_{SC} 是氨基酸侧链；

q 是1、2、3或4

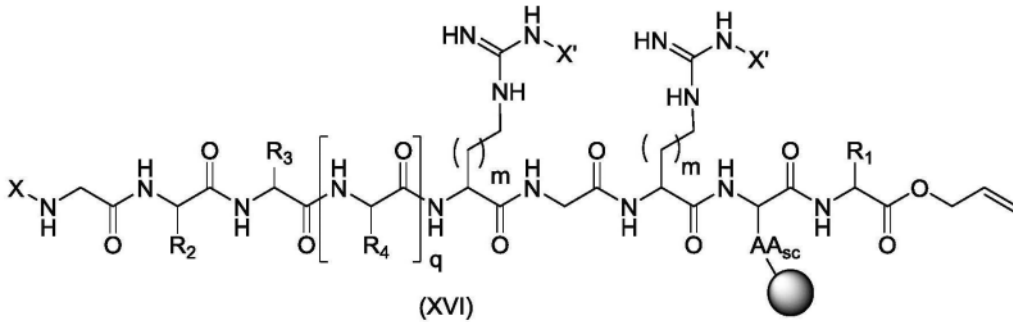
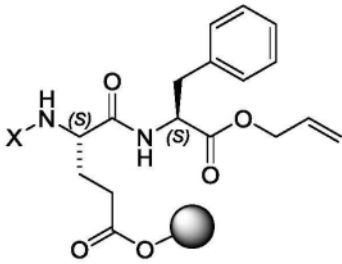
X和X'各自独立地是保护基团；

每个m独立地是0-3的整数；并且是固体支持物。



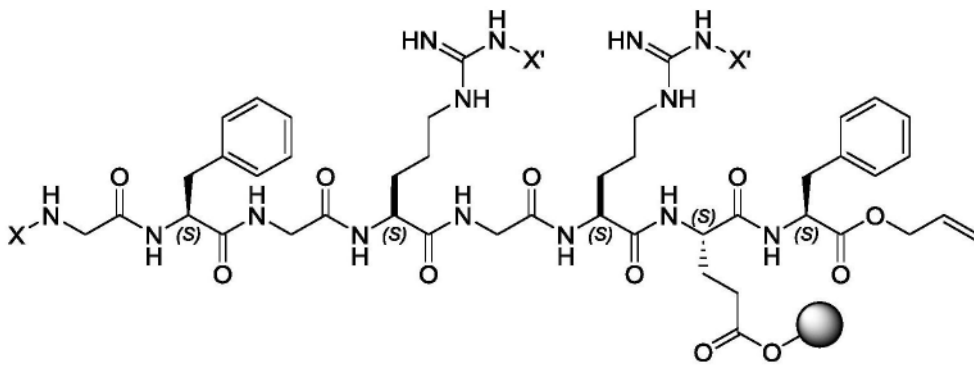
45. 一种选自以下的化合物：

(XV)



(XVI)

和



其中：

R₁、R₂和R₃各自独立地是H或酪氨酸、苯丙氨酸或色氨酸的侧链；

R₄是H或氨基酸侧链；

AA_{sc}是氨基酸侧链；

q是1、2、3或4

X和X'各自独立地是保护基团；

每个m独立地是0-3的整数；并且是固体支持物。

用于递送治疗剂的环肽

[0001] 本申请要求2022年4月22日提交的美国临时申请序列号63/363,450、2022年6月22日提交的美国临时申请序列号63/354,471和2022年9月30日提交的美国临时申请序列号63/377,754的提交日的优先权权益,所述申请的内容具体地通过引用整体并入本文

背景技术

[0002] 核酸及其合成类似物作为治疗剂具有巨大的潜力,特别是针对对于传统药物方式而言具有挑战性的靶标(例如,由遗传突变导致的缺失/缺陷型蛋白)。

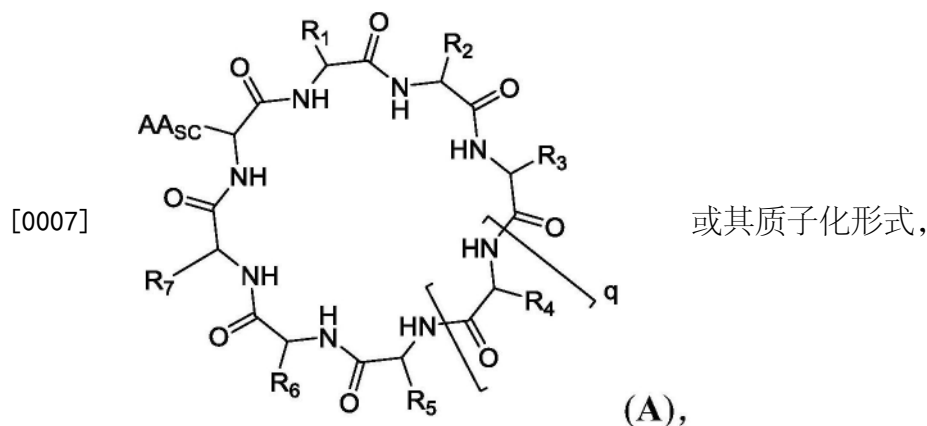
[0003] 然而,将此类疗法的潜力转化到临床的一个挑战是,当全身给药时核酸及其合成类似物进入细胞内区室的能力有限。载剂系统诸如聚合物、阳离子脂质体或化学修饰(例如通过胆固醇分子的共价附接)已用于促进细胞内递送。然而,这些方法的细胞内递送效率通常较低,并且仍然难以找到提高细胞内递送功效的改进递送系统。

[0004] 需要有效的组合物将治疗分子递送至细胞内区室以治疗疾病,并且最近已报道了一些这样的组合物。然而,仍然需要有效合成此类化合物。

[0005] 本公开解决了这些问题和其他问题。

发明内容

[0006] 本公开涉及一种制备式(A)的环肽的方法:



[0008] 其中:

[0009] R_1 、 R_2 和 R_3 各自独立地是H或氨基酸的芳族或杂芳族侧链;

[0010] R_1 、 R_2 和 R_3 中的至少一者是氨基酸的芳族或杂芳族侧链;

[0011] R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 独立地是H或氨基酸侧链;

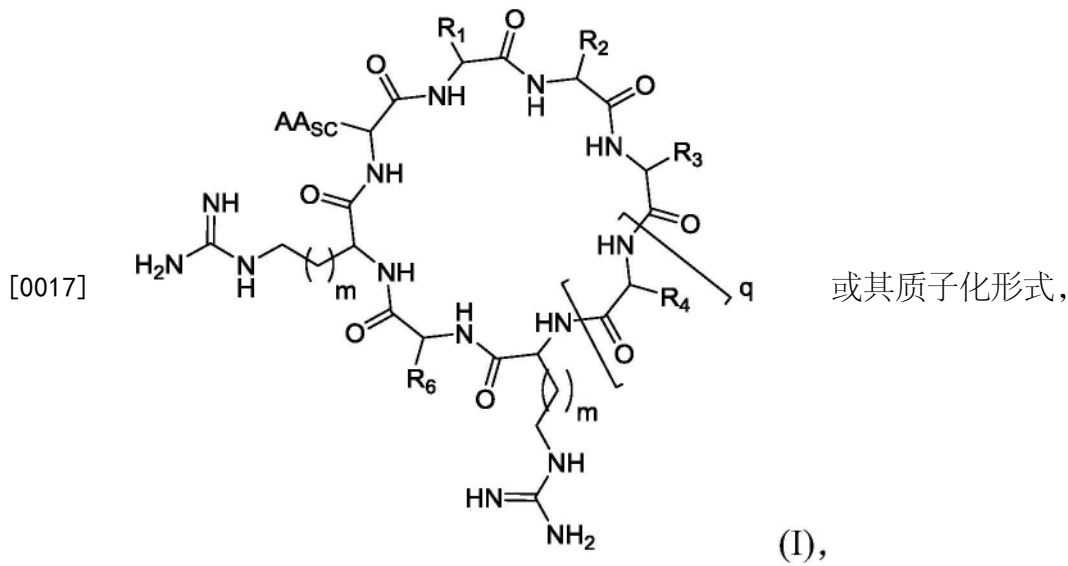
[0012] R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 中的至少一者是3-胍基-2-氨基丙酸、4-胍基-2-氨基丁酸、精氨酸、高精氨酸、N-甲基精氨酸、N,N-二甲基精氨酸、2,3-二氨基丙酸、2,4-二氨基丁酸、赖氨酸、N-甲基赖氨酸、N,N-二甲基赖氨酸、N-乙基赖氨酸、N,N,N-三甲基赖氨酸、4-胍基苯丙氨酸、瓜氨酸、N,N-二甲基赖氨酸、 β -高精氨酸、3-(1-哌啶基)丙氨酸的侧链;

[0013] AA_{sc} 是氨基酸侧链;并且

[0014] q 是1、2、3或4;

[0015] 其中所述方法是本文针对式(I)的化合物所描述的方法中的任一种。

[0016] 本公开涉及一种制备式(I)的环肽的方法：



[0018] 其中：

[0019] R_1 、 R_2 和 R_3 可各自独立地是H或具有包含芳族基团的侧链的氨基酸残基；

[0020] R_1 、 R_2 和 R_3 中的至少一者是氨基酸的芳族或杂芳族侧链；

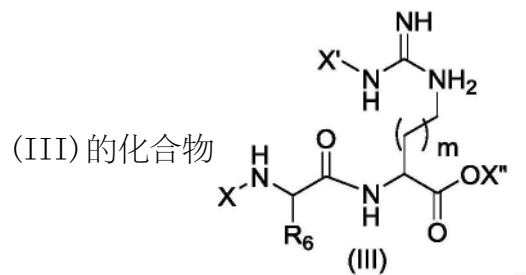
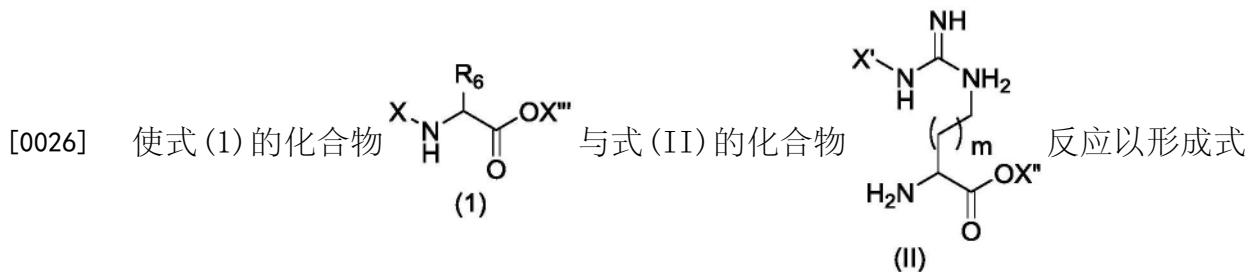
[0021] R_4 和 R_6 独立地是H或氨基酸侧链；

[0022] AA_{Sc} 是氨基酸侧链；

[0023] q是1、2、3或4；并且

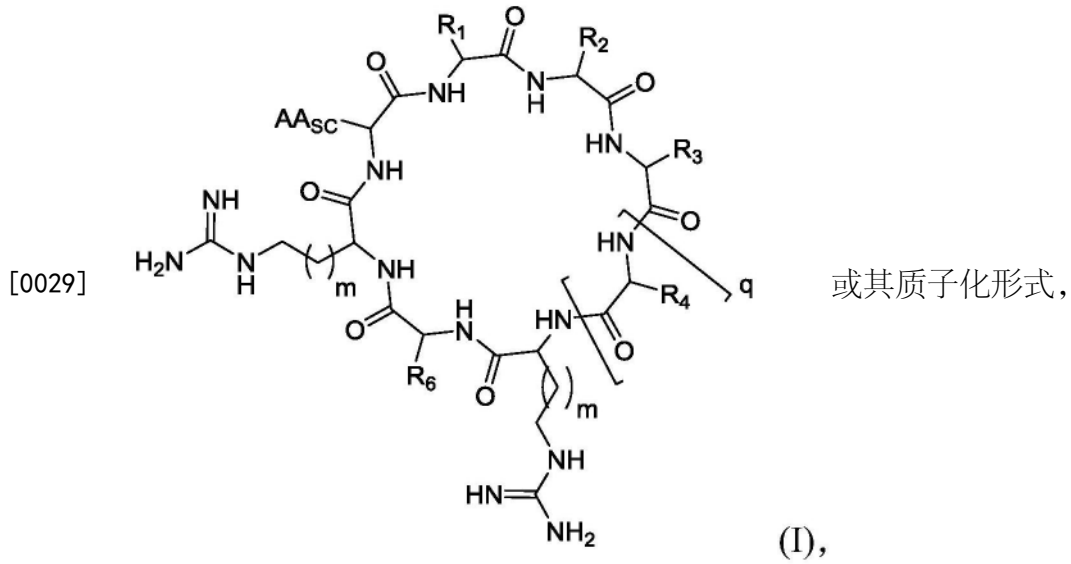
[0024] 每个m独立地是整数0、1、2或3；

[0025] 所述方法包括：



[0027] 其中X和X' 独立地是保护基团，X'' 是H或保护基团，并且X''' 是H或活化基团(例如，NHS酯)且m是0-3。

[0028] 本公开还涉及一种制备式(I)的环肽的方法：



[0030] 其中:

[0031] R_1 、 R_2 和 R_3 可各自独立地是H或具有包含芳族基团的侧链的氨基酸残基;

[0032] R_1 、 R_2 和 R_3 中的至少一者是氨基酸的芳族或杂芳族侧链;

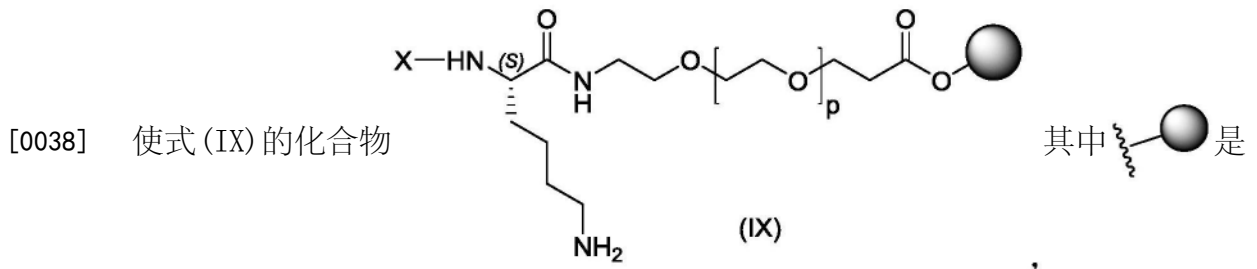
[0033] R_4 和 R_6 独立地是H或氨基酸侧链;

[0034] AA_{sc} 是氨基酸侧链;

[0035] q 是1、2、3或4;并且

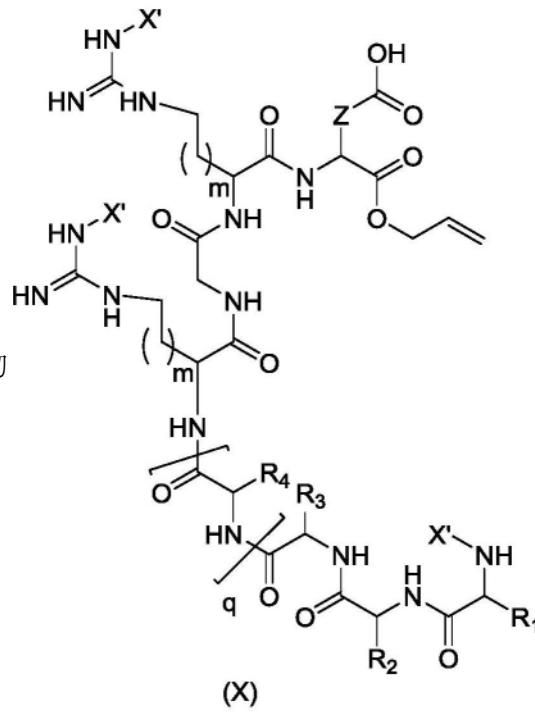
[0036] 每个 m 独立地是整数0、1、2或3,

[0037] 所述方法包括:

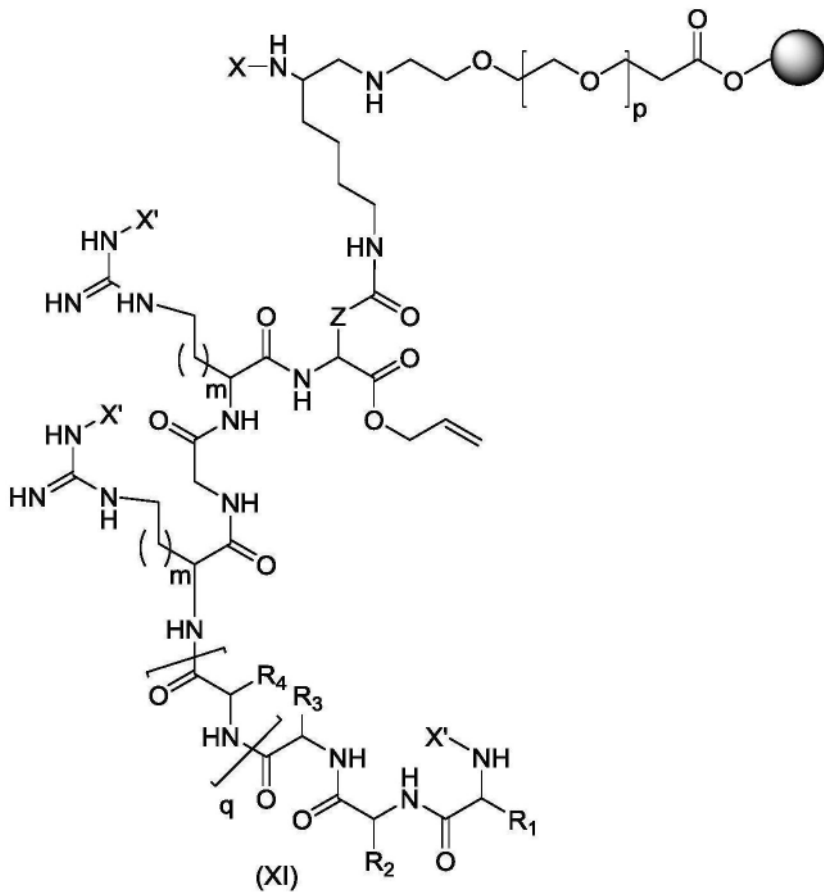


固体支持物,与式(X)的化合物

其中X和X'独立地

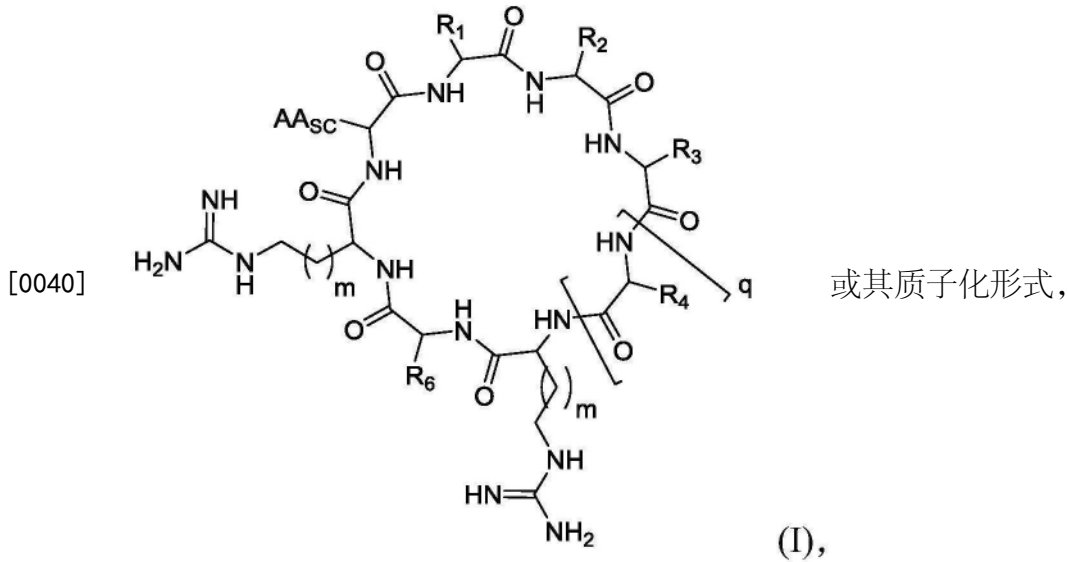


是保护基团并且Z是氨基酸侧链的基团,反应以形成式(XI)的化合物



其中p是1-30的整数。

[0039] 本公开涉及一种制备式(I)的环肽的方法:



[0041] 其中：

[0042] R_1 、 R_2 和 R_3 可各自独立地是H或具有包含芳族基团的侧链的氨基酸残基；

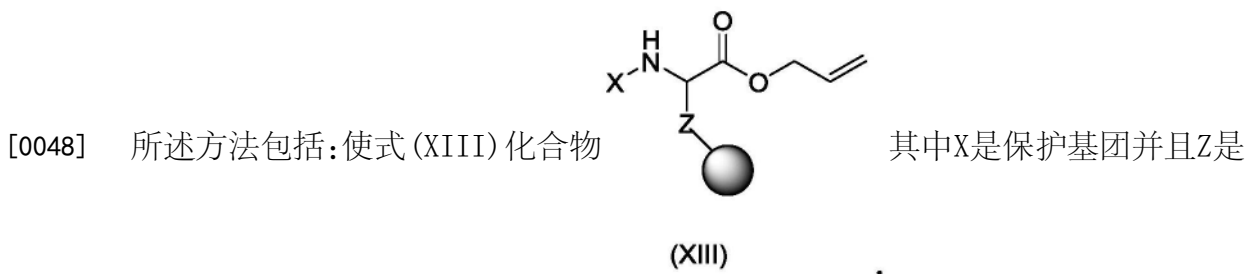
[0043] R_1 、 R_2 和 R_3 中的至少一者是氨基酸的芳族或杂芳族侧链；


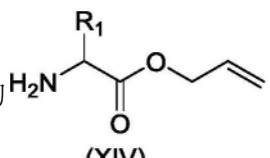
[0044] R_4 和 R_6 独立地是H或氨基酸侧链；

[0045] AA_{sc} 是氨基酸侧链；

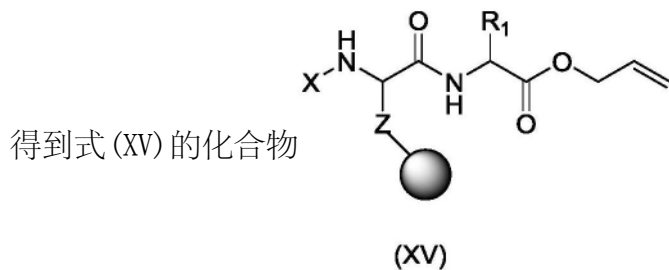
[0046] q 是1、2、3或4；并且

[0047] 每个 m 独立地是整数0、1、2或3，

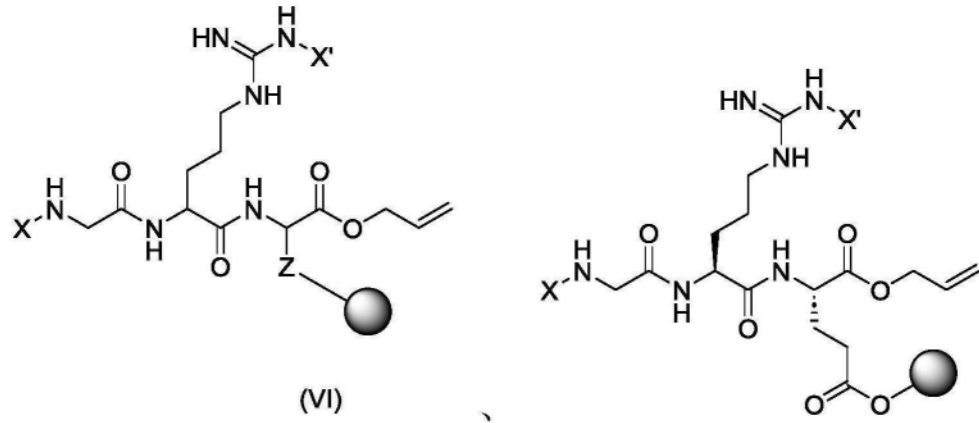


氨基酸侧链的基团且  是固体支持物，与式 (XIV) 的化合物  反应以

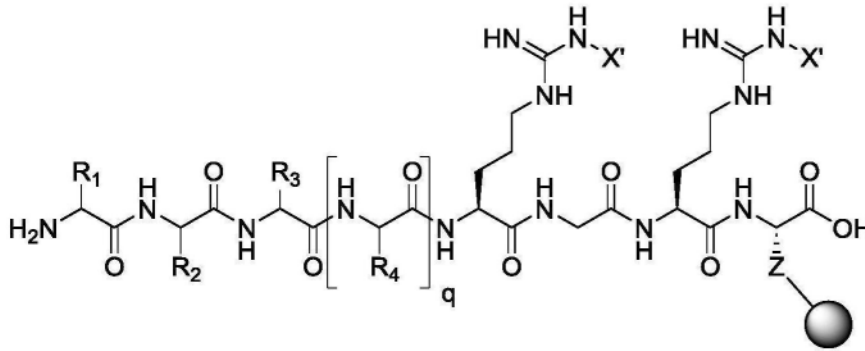
(XIV)



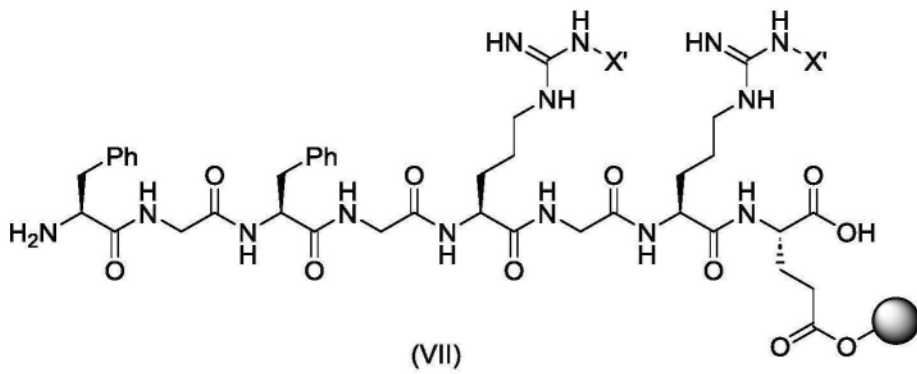
[0049] 本公开涉及一种选自以下的化合物：



[0050]



和




[0051] 其中：

[0052] R_1 、 R_2 和 R_3 各自独立地是H或酪氨酸、苯丙氨酸或色氨酸的侧链；

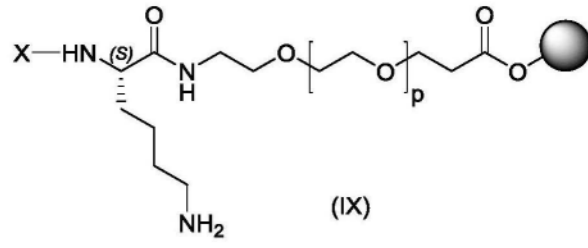
[0053] R_4 是H或氨基酸侧链；

[0054] Z是氨基酸侧链的基团；

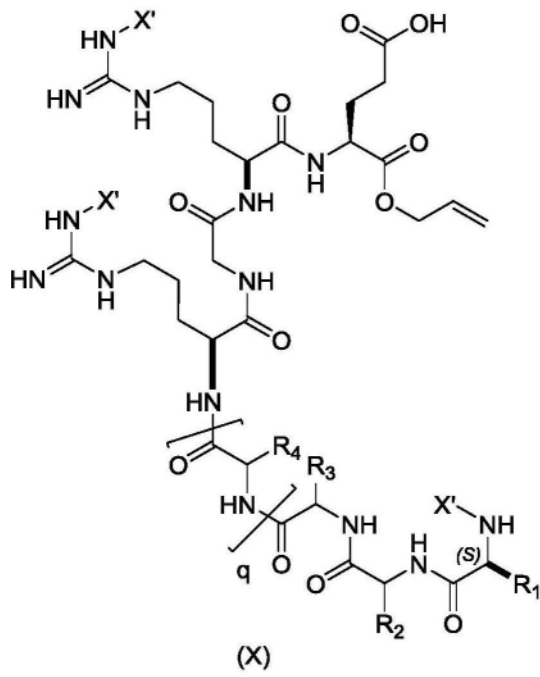
[0055] q是1、2、3或4；

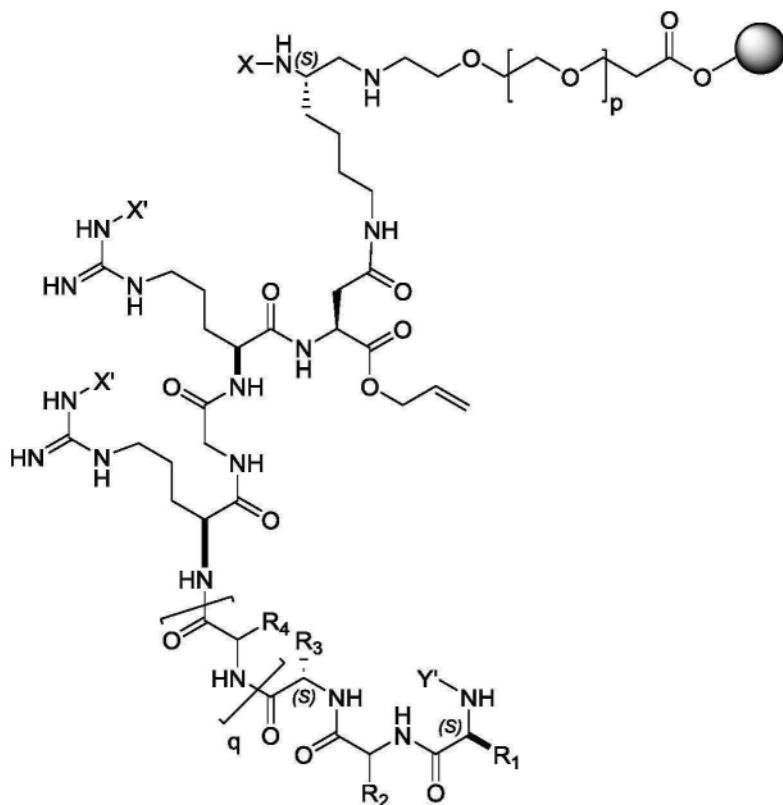
[0056] X、X'和X''各自独立地是保护基团；每个m独立地是0-3的整数；并且是固体支持物。

[0057] 本公开涉及选自以下的化合物：



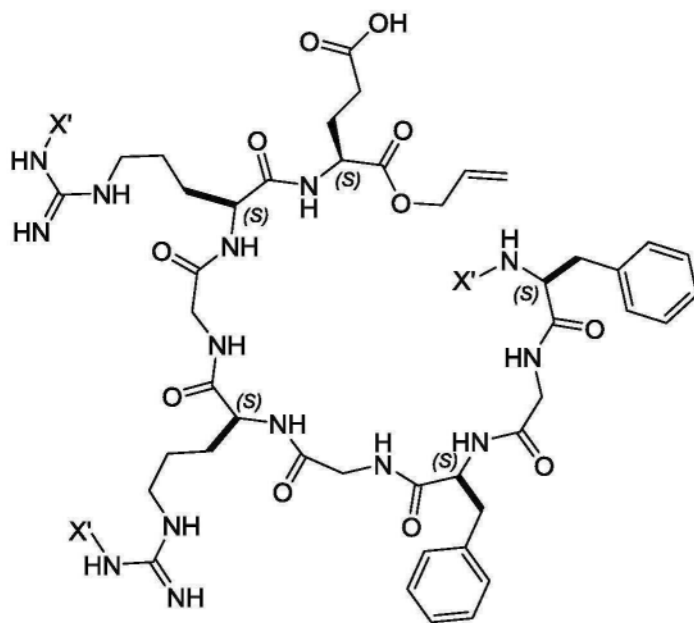
[0058]

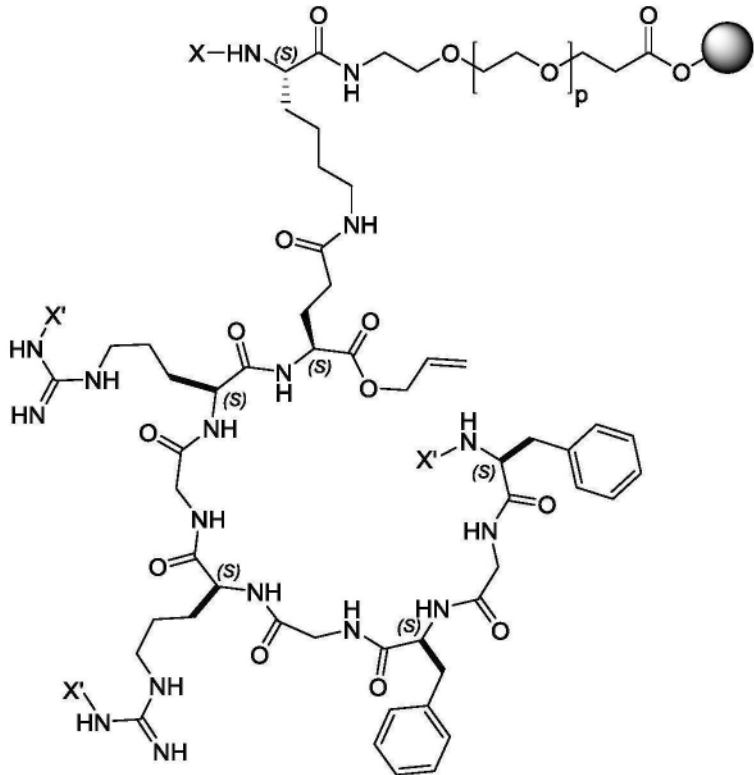




[0059]

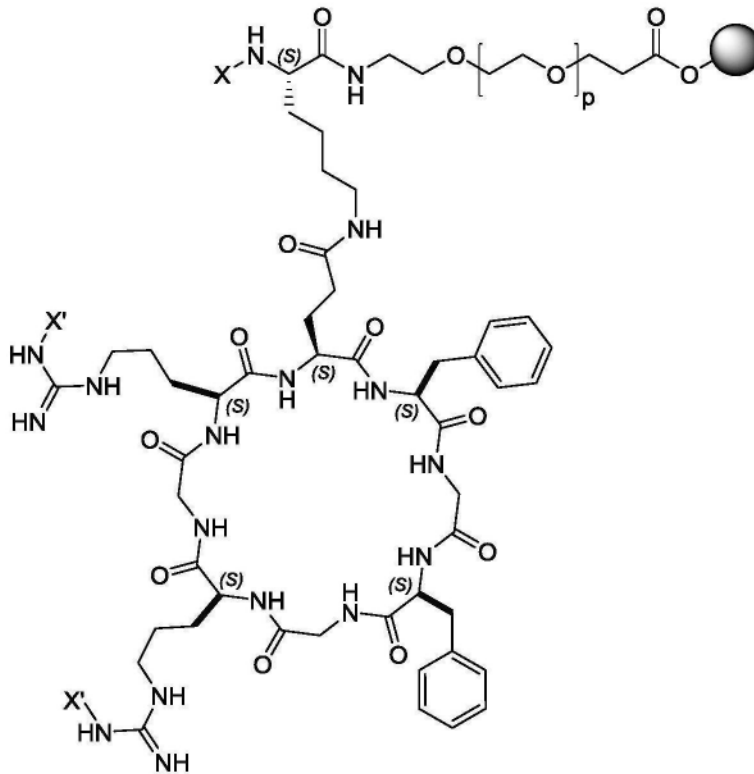
(XI)






[0060]

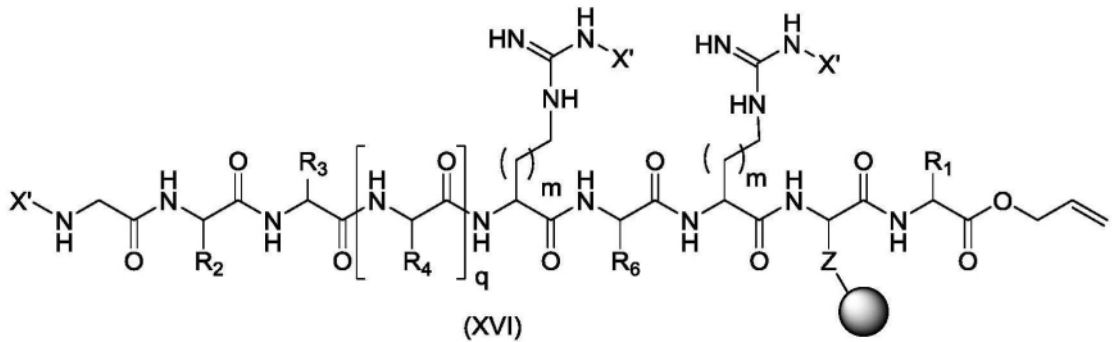
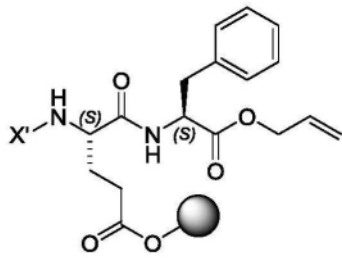
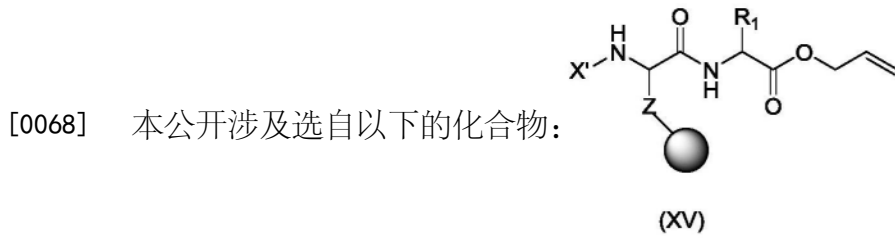
和



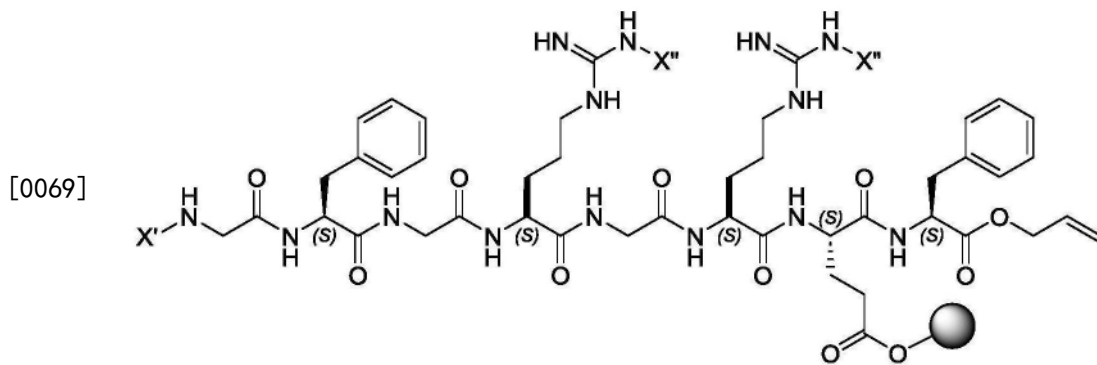
[0061] 其中：

[0062] R_1 、 R_2 和 R_3 各自独立地是H或酪氨酸、苯丙氨酸或色氨酸的侧链；[0063] R_4 是H或氨基酸侧链；[0064] p 是1-30的整数；[0065] q 是1、2、3或4[0066] X 和 X' 各自独立地是保护基团；

[0067] 每个m独立地是0-3的整数;并且是固体支持物。



和



[0070] 其中:

[0071] R_1 、 R_2 和 R_3 各自独立地是H或酪氨酸、苯丙氨酸或色氨酸的侧链;

[0072] R_4 是H或氨基酸侧链;

[0073] Z是氨基酸侧链的基团;

[0074] q是1、2、3或4;

[0075] X' 和 X'' 各自独立地是保护基团;

[0076] 每个m独立地是0-3的整数;并且

[0077] 是固体支持物。

附图说明

- [0078] 图1A和1B示出了制备EEV的合成路线。
- [0079] 图2示出了制备环肽的合成路线。
- [0080] 图3示出了制备环肽的合成路线。
- [0081] 图4示出了制备环肽的合成路线。
- [0082] 图5示出了制备EEV的合成路线。
- [0083] 图6示出了制备EEV的合成路线。
- [0084] 图7示出了制备环肽的合成路线。
- [0085] 图8示出了制备EEV的合成路线。
- [0086] 图9示出了第1代EEV-PMO合成,其中PMO是二氨基磷酸酯吗啉代寡聚物。
- [0087] 图10示出了第2代EEV-PMO合成。

具体实施方式

- [0088] 本公开涉及一种制备内体逃逸载体 (EEV) 的方法。
- [0089] 内体逃逸载体 (EEV)
- [0090] 本文提供了内体逃逸载体 (EEV), 其可用于转运货物穿过细胞膜, 例如, 将货物递送至细胞的胞质或细胞核。货物可包括大分子, 例如肽或寡核苷酸, 或小分子。EEV可包含细胞穿透肽 (CPP), 例如, 与环外肽 (EP) 缀合的环状细胞穿透肽 (cCPP)。EP可包含核定位信号 (NLS) 的序列。EP可与货物偶联。EP可与cCPP偶联。EP可与货物和cCPP偶联。EP、货物、cCPP或它们的组合之间的偶联可以是非共价的或共价的。EP可通过肽键附接到cCPP的N-末端。EP可通过肽键附接到cCPP的C-末端。EP可通过cCPP中氨基酸的侧链附接到cCPP。EP可通过赖氨酸的侧链附接到cCPP, 赖氨酸可与cCPP中的谷氨酰胺的侧链缀合。EP可与寡核苷酸货物的5'或3'端缀合。EP可与接头偶联。环外肽可与接头的氨基基团缀合。EP可经由EP和cCPP的C-末端通过cCPP和/或EP上的侧链与接头偶联。例如, EP可包含末端赖氨酸, 其然后可通过酰胺键与含有谷氨酰胺的cCPP偶联。当EP含有末端赖氨酸并且赖氨酸的侧链可用于附接cCPP时, C-末端或N-末端可附接到货物上的接头。
- [0091] 环外肽
- [0092] 环外肽 (EP) 可包含2至10个氨基酸残基, 例如2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸残基, 包括其间的所有范围和值。EP可包含6至9个氨基酸残基。EP可包含4至8个氨基酸残基。
- [0093] 环外肽中的每个氨基酸可以是天然的或非天然的氨基酸。术语“非天然氨基酸”是指一种有机化合物, 它是天然氨基酸的同源物, 因为它具有与天然氨基酸类似的结构, 从而模拟天然氨基酸的结构和反应性。非天然氨基酸可以是修饰的氨基酸和/或氨基酸类似物, 其不是20种常见天然存在的氨基酸中的一种, 也不是稀有天然氨基酸硒代半胱氨酸或吡咯赖氨酸。非天然氨基酸也可以是天然氨基酸的D-异构体。合适的氨基酸的实例包括但不限于丙氨酸、别亮氨酸 (allosoleucine)、精氨酸、瓜氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸、甘氨酸、组氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、萘基丙氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、焦谷氨酸、丝氨酸、苏氨酸、色氨酸、酪氨酸、缬氨酸、它们的衍生物或它们的组合。这些和其他氨基酸连同它们在本文中使用的缩写列于表1中。例如, 氨基酸可以是A、G、P、K、R、V、F、H、NaI或瓜氨酸。

[0094] EP可包含至少一个带正电荷的氨基酸残基,例如至少一个赖氨酸残基和/或至少一个包含含有胍基或其质子化形式的侧链的胺酸残基。EP可包含1或2个氨基酸残基,其包含含有胍基或其质子化形式的侧链。包含含有胍基的侧链的氨基酸残基可以是精氨酸残基。质子化形式在整个公开内容中可意指其盐。

[0095] EP可包含至少两个、至少三个或至少四个或更多个赖氨酸残基。EP可包含2、3或4个赖氨酸残基。每个赖氨酸残基的侧链上的氨基基团可被保护基团取代,所述保护基团包括例如三氟乙酰基(-COCF₃)、烯丙氧基羰基(Alloc)、4-甲基三苯甲基(Mtt)、1-(4,4-二甲基-2,6-二氧代亚环己基)乙基(Dde)或(4,4-二甲基-2,6-二氧代环己-1-亚基-3)-甲基丁基(ivDde)基团。每个赖氨酸残基的侧链上的氨基基团可被三氟乙酰基(-COCF₃)取代。可包含保护基团以实现酰胺缀合。可在EP与cCPP缀合后去除保护基团。

[0096] EP可包含至少2个具有疏水侧链的氨基酸残基。具有疏水侧链的氨基酸残基可选自缬氨酸、脯氨酸、丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸和甲硫氨酸。具有疏水侧链的氨基酸残基可以是缬氨酸或脯氨酸。

[0097] EP可包含至少一个带正电荷的氨基酸残基,例如至少一个赖氨酸残基和/或至少一个精氨酸残基。EP可包含至少两个、至少三个或至少四个或更多个赖氨酸残基和/或精氨酸残基。

[0098] EP可包含KK、KR、RR、HH、HK、HR、RH、KKK、KGK、KBK、KBR、KRK、KRR、RKK、RRR、KKH、KHK、HKK、HRR、HRH、HHR、HBH、HHH、HHHH、KHKK、KKHK、KKKH、KHKH、HKHK、KKKK、KKRK、KRKK、KRRK、RKKR、RRRR、KGKK、KKGK、HBHBH、HBKBH、RRRRR、KKKKK、KKRK、RKKK、KRKK、KKKKR、KBKBK、RKKKKG、KRKKG、KKRKG、KKKRG、RKKKB、KRKKB、KKRKB、KKKRB、KKRKV、RRRRR、HHHHH、RHRHRH、HRHRH、KRKRK、RKRKR、RBRBR、KBKBK、PKKRKV、PGKRKV、PKGKRKV、PKKGRKV、PKKKGKV、PKKRGV或PKKRRG,其中B是β-丙氨酸。EP中的氨基酸可具有D或L立体化学。

[0099] EP可包含KK、KR、RR、KKK、KGK、KBK、KBR、KRK、KRR、RKK、RRR、KKKK、KKRK、KRKK、KRRK、RKKR、RRRR、KGKK、KKGK、KKKKK、KKRK、KBKBK、KKRKV、PKKRKV、PGKRKV、PKGKRKV、PKKGRKV、PKKKGKV、PKKRGV或PKKRRG。EP可包含PKKRKV、RR、RRR、RHR、RBR、RBRBR、RBHBR或HBRBH,其中B是β-丙氨酸。EP中的氨基酸可具有D或L立体化学。

[0100] EP可由KK、KR、RR、KKK、KGK、KBK、KBR、KRK、KRR、RKK、RRR、KKKK、KKRK、KRKK、KRRK、RKKR、RRRR、KGKK、KKGK、KKKKK、KKRK、KBKBK、KKRKV、PKKRKV、PGKRKV、PKGKRKV、PKKGRKV、PKKKGKV、PKKRGV或PKKRRG组成。EP可由PKKRKV、RR、RRR、RHR、RBR、RBRBR、RBHBR或HBRBH组成,其中B是β-丙氨酸。EP中的氨基酸可具有D或L立体化学。

[0101] EP可包含本领域中鉴定为核定位序列(NLS)的氨基酸序列。EP可由本领域中鉴定为核定位序列(NLS)的氨基酸序列组成。EP可包含含有氨基酸序列PKKRKV的NLS。EP可由包含氨基酸序列PKK RKV的NLS组成。EP可包含含有选自NLSKRPAAIKKAGQAKK K、PAAKRVKLD、RQRRNELKRSF、RMRKFKNGKDTAELRRR RVEVSVELR、KAKKDEQILKRRNV、VSRKRPRP、PPKARED、PQP KKKPL、SALIKKKKMAP、DRLRR、PKQKRRK、RKLKKKI KKL、REKKKFLKRR、KRKGDEVDGVDEVAKKSKK和RKCLQ AGMNLEARKTKK的氨基酸序列的NLS。EP可由包含选自NLSKRPAAIKKAGQAKK K、PAAKRVKLD、RQRRNELKRSF、RMRKFKNGKDTAELRRRRVEVSVELR、KAKKDEQILKRRNV、VSRKR PRP、PPKARED、PQP KKKPL、SALIKKKKMAP、DRLRR、PK QKRRK、

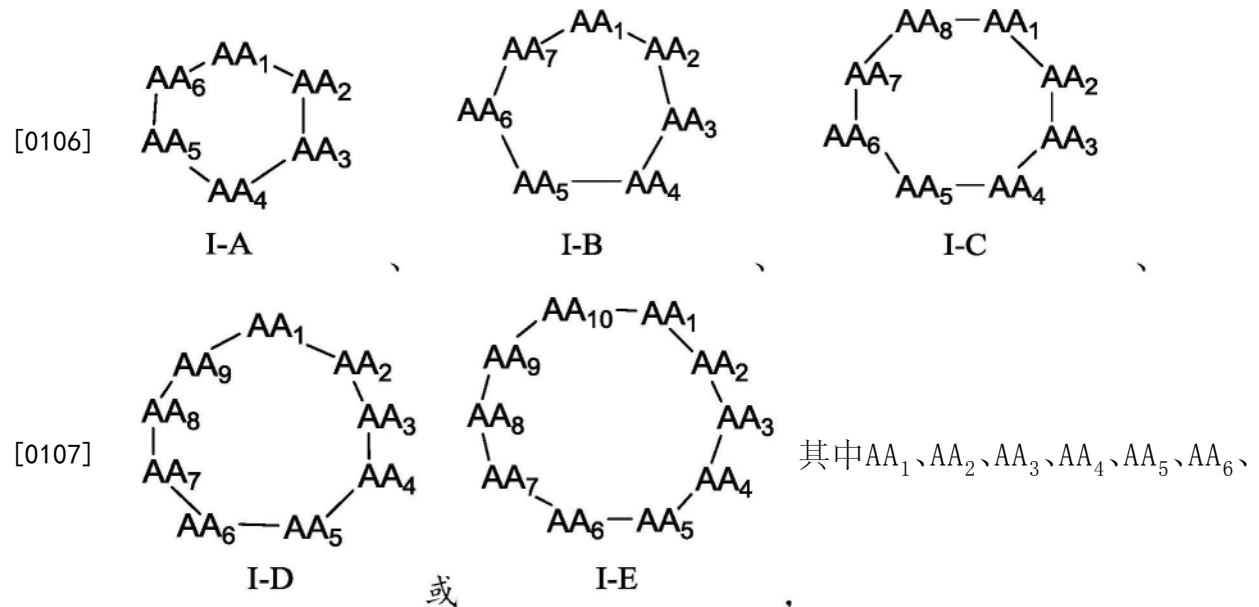
RKLRKKIKKL、REKKKFLKRR、KRKGDEVDGVDEVA KKKSKK和RKCLQAGMNLEARKTKK的氨基酸序列的NLS组成

[0102] 所有环外序列还可含有N-末端乙酰基基团。因此,例如,EP可具有以下结构:Ac-PKKRKRK。

[0103] 细胞穿透肽(CPP)

[0104] 细胞穿透肽(CPP)可包含6至20个氨基酸残基。细胞穿透肽可以是环状细胞穿透肽(cCPP)。cCPP能够穿透细胞膜。环外肽(EP)可与cCPP缀合,并且所得构建体可称为内体逃逸载体(EEV)。cCPP可以引导货物(例如,治疗部分(TM),诸如寡核苷酸、肽或小分子)穿透细胞膜。cCPP可将货物递送至细胞的胞质。cCPP可将货物递送至靶(例如,前mRNA)所在的细胞位置。为了将cCPP与货物(例如,肽、寡核苷酸或小分子)缀合,可替换cCPP上的至少一个键或孤对电子。

[0105] cCPP中氨基酸残基的总数在6至20个氨基酸残基的范围内,例如6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个氨基酸残基,包括其间的所有范围和子范围。cCPP可包含6至13个氨基酸残基。本文公开的cCPP可包含6至10个氨基酸。以举例的方式,包含6-10个氨基酸残基的cCPP可具有根据式I-A至I-E中任一种的结构:



AA₇、AA₈、AA₉和AA₁₀是氨基酸残基。

[0108] cCPP可包含6至8个氨基酸。cCPP可包含8个氨基酸。

[0109] cCPP中的每个氨基酸可以是天然的或非天然的氨基酸。术语“非天然氨基酸”是指一种有机化合物,它是天然氨基酸的同源物,因为它具有与天然氨基酸类似的结构,从而模拟天然氨基酸的结构和反应性。非天然氨基酸可以是修饰的氨基酸和/或氨基酸类似物,其不是20种常见天然存在的氨基酸中的一种,也不是稀有天然氨基酸硒代半胱氨酸或吡咯赖氨酸。非天然氨基酸也可以是天然氨基酸的D-异构体。合适的氨基酸的实例包括但不限于丙氨酸、别亮氨酸、精氨酸、瓜氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸、甘氨酸、组氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、萘基丙氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、焦谷氨酸、丝氨酸、苏氨酸、色氨酸、酪氨酸、缬氨酸、它们的衍生物或它们的组合。这些和其他氨基酸连同它们在本文中使用的缩写列于表1中。

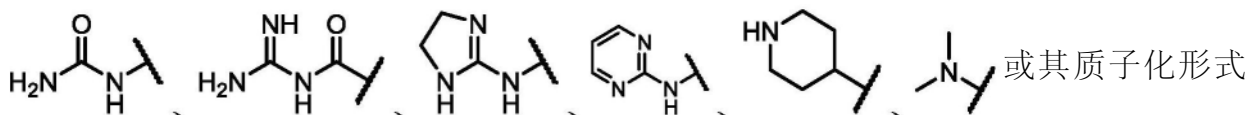
[0110] 表1.氨基酸缩写

氨基酸	缩写* L-氨基酸	缩写* D-氨基酸
丙氨酸	Ala (A)	ala (a)
别异亮氨酸	Aile	Aile
精氨酸	Arg (R)	arg (r)
天冬酰胺	Asn (N)	asn (n)
天冬氨酸	Asp (D)	asp (d)
半胱氨酸	Cys (C)	cys (c)
瓜氨酸	Cit	Cit
环己基丙氨酸	Cha	cha
2,3-二氨基丙酸	Dap	dap
4-氟苯丙氨酸	Fpa (Σ)	pfa
谷氨酸	Glu (E)	glu (e)
谷氨酰胺	Gln (Q)	gln (q)
甘氨酸	Gly (G)	gly (g)
[0111] 组氨酸	His (H)	his (h)
高脯氨酸(又名哌可酸)	Pip (Θ)	pip (θ)
异亮氨酸	Ile (I)	ile (i)
亮氨酸	Leu (L)	leu (l)
赖氨酸	Lys (K)	lys (k)
甲硫氨酸	Met (M)	met (m)
3-(2-萘基)-丙氨酸	Nal (Φ)	nal (ϕ)
3-(1-萘基)-丙氨酸	1-Nal	1-nal
正亮氨酸	Nle (Ω)	nle
苯丙氨酸	Phe (F)	phe (f)
苯基甘氨酸	Phg (Ψ)	phg
4-(磷酸基二氟甲基)苯丙氨酸	F ₂ Pmp (Λ)	f ₂ pmp
脯氨酸	Pro (P)	pro (p)
肌氨酸	Sar (Ξ)	sar
硒代半胱氨酸	Sec (U)	sec (u)
丝氨酸	Ser (S)	ser (s)

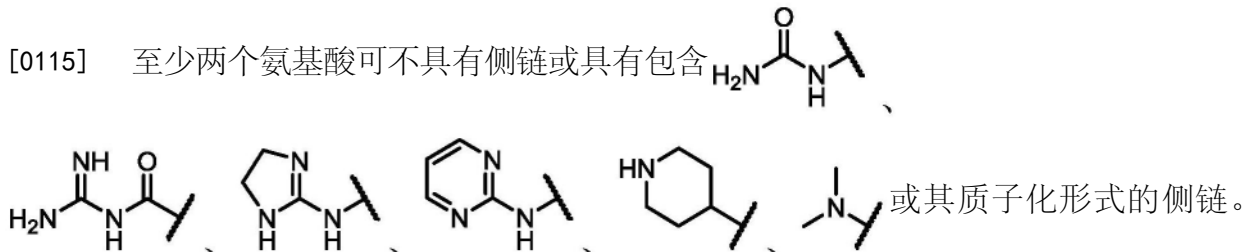
氨基酸	缩写*	缩写*
	L-氨基酸	D-氨基酸
苏氨酸	Thr (T)	thr (y)
酪氨酸	Tyr (Y)	tyr (y)
色氨酸	Trp (W)	trp (w)
缬氨酸	Val (V)	val (v)
[0112] 叔丁基-丙氨酸	Tle	tle
青霉胺	Pen	Pen
高精氨酸	HomoArg	homoarg
烟酰基-赖氨酸	Lys(NIC)	lys(NIC)
三氟乙酰基-赖氨酸	Lys(TFA)	lys(TFA)
甲基-亮氨酸	MeLeu	meLeu
3-(3-苯并噻吩基)-丙氨酸	Bta	bta

[0113] *单字母缩写: 当在本文中以大写字母示出时, 其表示L-氨基酸形式, 当在本文中以小写字母示出时, 其表示D-氨基酸形式。

[0114] cCPP可包含4至20个氨基酸, 其中: (i) 至少一个氨基酸具有包含胍基或其质子化形式的侧链; (ii) 至少一个氨基酸不具有侧链或具有包含



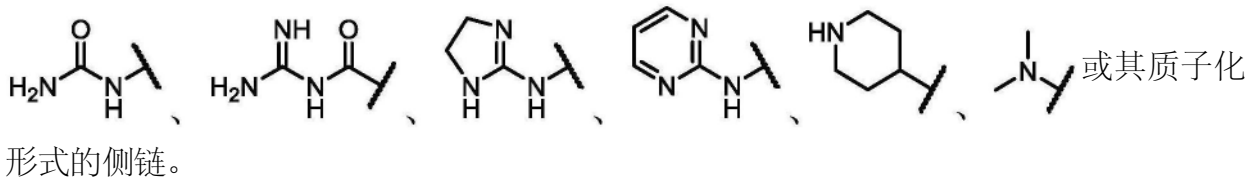
的侧链; 并且 (iii) 至少两个氨基酸独立地具有包含芳族或杂芳族基团的侧链。



如本文所用, 当不存在侧链时, 氨基酸在连接胺和羧酸的碳原子上具有两个氢原子 (例如, -CH₂-)。

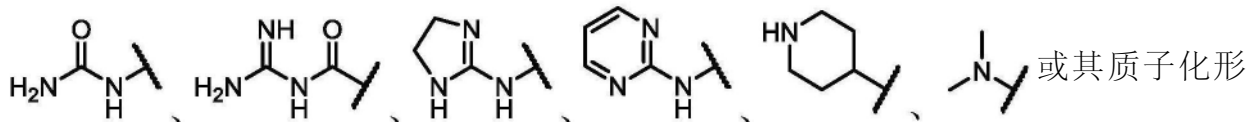
[0116] 不具有侧链的氨基酸可以是甘氨酸或β-丙氨酸。

[0117] cCPP可包含形成cCPP的6至20个氨基酸残基, 其中: (i) 至少一个氨基酸可以是甘氨酸、β-丙氨酸或4-氨基丁酸残基; (ii) 至少一个氨基酸可具有包含芳基或杂芳基基团的侧链; 并且 (iii) 至少一个氨基酸具有包含胍基、



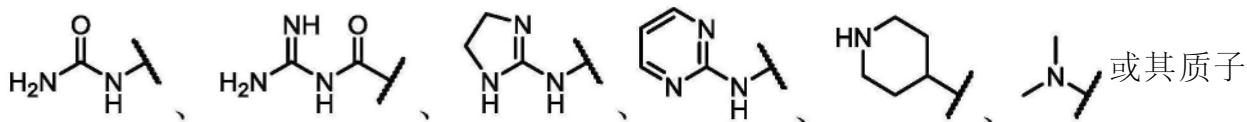
[0118] cCPP可包含形成cCPP的6至20个氨基酸残基, 其中: (i) 至少两个氨基酸可独立地是甘氨酸、β-丙氨酸或4-氨基丁酸残基; (ii) 至少一个氨基酸可具有包含芳基或杂芳基基

团的侧链;并且 (iii) 至少一个氨基酸具有包含胍基、



式的侧链。

[0119] cCPP可包含形成cCPP的6至20个氨基酸残基,其中:(i)至少三个氨基酸可独立地是甘氨酸、 β -丙氨酸或4-氨基丁酸残基;(ii)至少一个氨基酸可具有包含芳族或杂芳族基团的侧链;并且 (iii) 至少一个氨基酸可具有包含胍基、



化形式的侧链。

[0120] 甘氨酸和相关的氨基酸残基

[0121] cCPP可包含 (i) 1、2、3、4、5或6个甘氨酸、 β -丙氨酸、4-氨基丁酸残基或它们的组合。cCPP可包含 (i) 2个甘氨酸、 β -丙氨酸、4-氨基丁酸残基或它们的组合。cCPP可包含 (i) 3个甘氨酸、 β -丙氨酸、4-氨基丁酸残基或它们的组合。cCPP可包含 (i) 4个甘氨酸、 β -丙氨酸、4-氨基丁酸残基或它们的组合。cCPP可包含 (i) 5个甘氨酸、 β -丙氨酸、4-氨基丁酸残基或它们的组合。cCPP可包含 (i) 6个甘氨酸、 β -丙氨酸、4-氨基丁酸残基或它们的组合。cCPP可包含 (i) 3、4或5个甘氨酸、 β -丙氨酸、4-氨基丁酸残基或它们的组合。cCPP可包含 (i) 3或4个甘氨酸、 β -丙氨酸、4-氨基丁酸残基或它们的组合。

[0122] cCPP可包含 (i) 1、2、3、4、5或6个甘氨酸残基。cCPP可包含 (i) 2个甘氨酸残基。cCPP可包含 (i) 3个甘氨酸残基。cCPP可包含 (i) 4个甘氨酸残基。cCPP可包含 (i) 5个甘氨酸残基。cCPP可包含 (i) 6个甘氨酸残基。cCPP可包含 (i) 3、4或5个甘氨酸残基。cCPP可包含 (i) 3或4个甘氨酸残基。cCPP可包含 (i) 2或3个甘氨酸残基。cCPP可包含 (i) 1或2个甘氨酸残基。

[0123] cCPP可包含 (i) 3、4、5或6个甘氨酸、 β -丙氨酸、4-氨基丁酸残基或它们的组合。cCPP可包含 (i) 3个甘氨酸、 β -丙氨酸、4-氨基丁酸残基或它们的组合。cCPP可包含 (i) 4个甘氨酸、 β -丙氨酸、4-氨基丁酸残基或它们的组合。cCPP可包含 (i) 5个甘氨酸、 β -丙氨酸、4-氨基丁酸残基或它们的组合。cCPP可包含 (i) 6个甘氨酸、 β -丙氨酸、4-氨基丁酸残基或它们的组合。cCPP可包含 (i) 3、4或5个甘氨酸、 β -丙氨酸、4-氨基丁酸残基或它们的组合。cCPP可包含 (i) 3或4个甘氨酸、 β -丙氨酸、4-氨基丁酸残基或它们的组合。

[0124] cCPP可包含至少三个甘氨酸残基。cCPP可包含 (i) 3、4、5或6个甘氨酸残基。cCPP可包含 (i) 3个甘氨酸残基。cCPP可包含 (i) 4个甘氨酸残基。cCPP可包含 (i) 5个甘氨酸残基。cCPP可包含 (i) 6个甘氨酸残基。cCPP可包含 (i) 3、4或5个甘氨酸残基。cCPP可包含 (i) 3或4个甘氨酸残基。

[0125] 在实施方案中,cCPP中的甘氨酸、 β -丙氨酸或4-氨基丁酸残基都不是邻接的。两个或三个甘氨酸、 β -丙氨酸或4-氨基丁酸残基可以是邻接的。两个甘氨酸、 β -丙氨酸或4-氨基丁酸残基可以是邻接的。

[0126] 在实施方案中,cCPP中没有一个甘氨酸残基是邻接的。cCPP中的每个甘氨酸残基可被不能是甘氨酸的氨基酸残基分开。两个或三个甘氨酸残基可以是邻接的。两个甘氨酸

残基可以是邻接的。

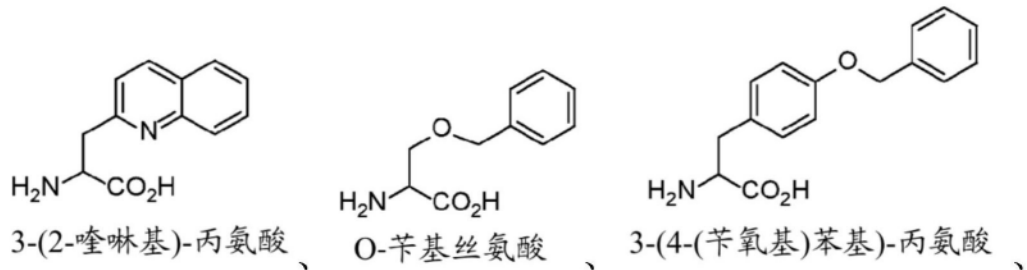
[0127] 具有芳族或杂芳族基团的氨基酸侧链

[0128] cCPP可包含(ii)2、3、4、5或6个独立地具有包含芳族或杂芳族基团的侧链的氨基酸残基。cCPP可包含(ii)2个独立地具有包含芳族或杂芳族基团的侧链的氨基酸残基。cCPP可包含(ii)3个独立地具有包含芳族或杂芳族基团的侧链的氨基酸残基。cCPP可包含(ii)4个独立地具有包含芳族或杂芳族基团的侧链的氨基酸残基。cCPP可包含(ii)5个独立地具有包含芳族或杂芳族基团的侧链的氨基酸残基。cCPP可包含(ii)6个独立地具有包含芳族或杂芳族基团的侧链的氨基酸残基。cCPP可包含(ii)2、3或4个独立地具有包含芳族或杂芳族基团的侧链的氨基酸残基。cCPP可包含(ii)2或3个独立地具有包含芳族或杂芳族基团的侧链的氨基酸残基。

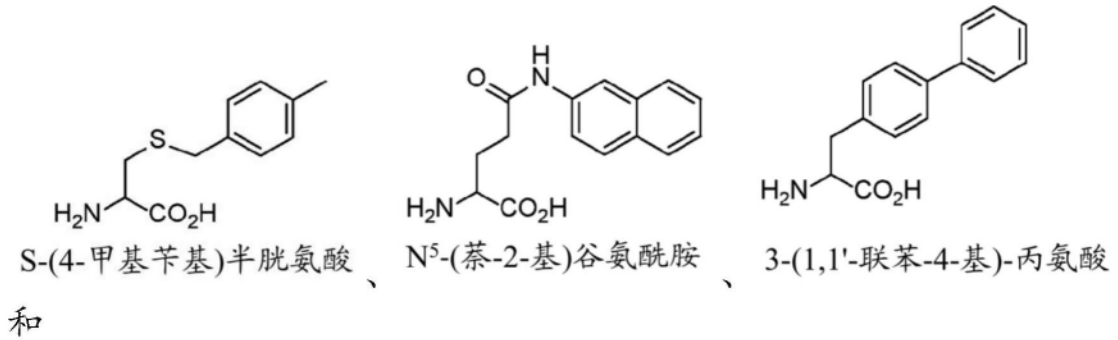
[0129] cCPP可包含(ii)2、3、4、5或6个独立地具有包含芳族基团的侧链的氨基酸残基。cCPP可包含(ii)2个独立地具有包含芳族基团的侧链的氨基酸残基。cCPP可包含(ii)3个独立地具有包含芳族基团的侧链的氨基酸残基。cCPP可包含(ii)4个独立地具有包含芳族基团的侧链的氨基酸残基。cCPP可包含(ii)5个独立地具有包含芳族基团的侧链的氨基酸残基。cCPP可包含(ii)6个独立地具有包含芳族基团的侧链的氨基酸残基。cCPP可包含(ii)2、3或4个独立地具有包含芳族基团的侧链的氨基酸残基。cCPP可包含(ii)2或3个独立地具有包含芳族基团的侧链的氨基酸残基。

[0130] 芳族基团可以是6至14元芳基。芳基可以是苯基、萘基或蒽基,它们各自任选地被取代。芳基可以是苯基或萘基,它们各自任选地被取代。杂芳族基团可以是具有1、2或3个选自N、O和S的杂原子的6至14元杂芳基。杂芳基可以是吡啶基、喹啉基或异喹啉基。

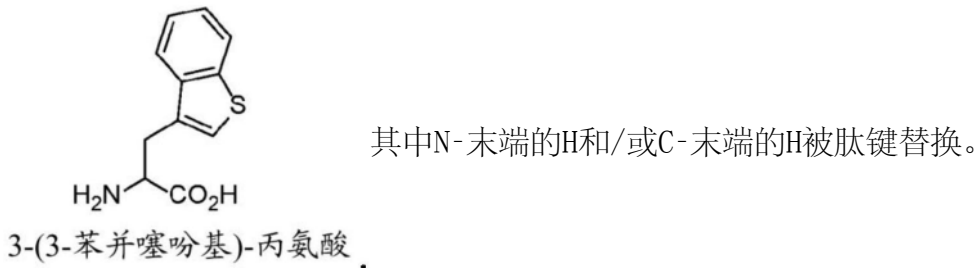
[0131] 具有包含芳族或杂芳族基团的侧链的氨基酸残基可各自独立地是双(高萘基丙氨酸)、高萘基丙氨酸、萘基丙氨酸、苯基甘氨酸、双(高苯丙氨酸)、高苯丙氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、3-(3-苯并噻吩基)-丙氨酸、3-(2-喹啉基)-丙氨酸、0-苄基丝氨酸、3-(4-(苄氧基)苯基)-丙氨酸、S-(4-甲基苄基)半胱氨酸、N-(萘-2-基)谷氨酰胺、3-(1,1'-联苯-4-基)-丙氨酸、3-(3-苯并噻吩基)-丙氨酸或酪氨酸,它们各自任选地被一个或多个取代基取代。具有包含芳族或杂芳族基团的侧链的氨基酸可各自独立地选自:



[0132]



[0133]



[0134] 具有包含芳族或杂芳族基团的侧链的氨基酸残基可各自独立地是苯丙氨酸、萘基丙氨酸、苯基甘氨酸、高苯丙氨酸、高萘基丙氨酸、双(高苯丙氨酸)、双-(高萘基丙氨酸)、色氨酸或酪氨酸的残基,它们各自任选地被一个或多个取代基取代。具有包含芳族基团的侧链的氨基酸残基可各自独立地是酪氨酸、苯丙氨酸、1-萘基丙氨酸、2-萘基丙氨酸、色氨酸、3-苯并噻吩基丙氨酸、4-苯基苯丙氨酸、3,4-二氟苯丙氨酸、4-三氟甲基苯丙氨酸、2,3,4,5,6-五氟苯丙氨酸、高苯丙氨酸、 β -高苯丙氨酸、4-叔丁基-苯丙氨酸、4-吡啶基丙氨酸、3-吡啶基丙氨酸、4-甲基苯丙氨酸、4-氟苯丙氨酸、4-氯苯丙氨酸、3-(9-蒎基)-丙氨酸的残基。具有包含芳族基团的侧链的氨基酸残基可各自独立地是苯丙氨酸、萘基丙氨酸、苯基甘氨酸、高苯丙氨酸或高萘基丙氨酸的残基,它们各自任选地被一个或多个取代基取代。具有包含芳族基团的侧链的氨基酸残基可各自独立地是苯丙氨酸、萘基丙氨酸、高苯丙氨酸、高萘基丙氨酸、双(高萘基丙氨酸)或双(高萘基丙氨酸)的残基,它们各自任选地被一个或多个取代基取代。具有包含芳族基团的侧链的氨基酸残基可各自独立地是苯丙氨酸或萘基丙氨酸的残基,它们各自任选地被一个或多个取代基取代。至少一个具有包含芳族基团的侧链的氨基酸残基可以是苯丙氨酸的残基。至少两个具有包含芳族基团的侧链的氨基酸残基可以是苯丙氨酸的残基。每个具有包含芳族基团的侧链的氨基酸残基可以是苯丙氨酸的残基。

[0135] 在实施方案中,具有包含芳族或杂芳族基团的侧链的氨基酸没有一个是邻接的。两个具有包含芳族或杂芳族基团的侧链的氨基酸可以是邻接的。两个邻接的氨基酸可具有相反的立体化学。两个邻接的氨基酸可具有相同的立体化学。三个具有包含芳族或杂芳族

基团的侧链的氨基酸可以是邻接的。三个邻接的氨基酸可具有相同的立体化学。三个邻接的氨基酸可具有交替的立体化学。

[0136] 包含芳族或杂芳族基团的氨基酸残基可以是L-氨基酸。包含芳族或杂芳族基团的氨基酸残基可以是D-氨基酸。包含芳族或杂芳族基团的氨基酸残基可以是D-氨基酸和L-氨基酸的混合物。

[0137] 任选的取代基可以是任何不显著降低(例如超过50%) cCPP的胞质递送效率的原子或基团,例如与不具有所述取代基的其他相同序列相比。任选的取代基可以是疏水取代基或亲水取代基。任选的取代基可以是疏水取代基。取代基可增加疏水氨基酸的溶剂可及表面积(如本文所定义)。取代基可以是卤素、烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、杂环基、芳基、杂芳基、烷氧基、芳氧基、酰基、烷基氨基甲酰基、烷基羧酰胺基(alkylcarboxamidyl)、烷氧羰基、烷硫基或芳硫基。取代基可以是卤素。

[0138] 尽管不希望受理论束缚,但据信相对于具有较低疏水性值的氨基酸,有具有较高疏水性值的芳族或杂芳族基团的氨基酸(即具有包含芳族或杂芳族基团的侧链的氨基酸)可改善cCPP的胞质递送效率。每个疏水氨基酸可独立地具有大于甘氨酸的疏水性值。每个疏水氨基酸可独立地是疏水性值大于丙氨酸的疏水氨基酸。每个疏水氨基酸可独立地具有大于或等于苯丙氨酸的疏水性值。疏水性可使用本领域已知的疏水性标度来测量。表2列出了由Eisenberg和Weiss(Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.1984;81(1):140--144)、Engleman等人(Ann.Rev.of Biophys.Biophys.Chem.1986;1986(15):321--53)、Kyte和Doolittle(J.Mol.Biol.1982;157(1):105--132)、Hoop和Woods(Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.1981;78(6):3824--3828)以及Janin(Nature.1979;277(5696):491--492)报道的各种氨基酸的疏水性值,其各自的全部内容以引用方式并入本文。疏水性可使用Engleman等人报道的疏水性标度来测量。

[0139] 表2.氨基酸疏水性

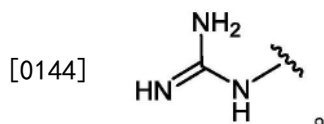
氨基酸	组	Eisenberg 和 Weiss	Engleman 等人	Kyrie 和 Doolittle	Hoop 和 Woods	Janin
Ile	非极性	0.73	3.1	4.5	-1.8	0.7
Phe	非极性	0.61	3.7	2.8	-2.5	0.5
Val	非极性	0.54	2.6	4.2	-1.5	0.6
Leu	非极性	0.53	2.8	3.8	-1.8	0.5
Trp	非极性	0.37	1.9	-0.9	-3.4	0.3
Met	非极性	0.26	3.4	1.9	-1.3	0.4
Ala	非极性	0.25	1.6	1.8	-0.5	0.3
Gly	非极性	0.16	1.0	-0.4	0.0	0.3
Cys	不带电 荷/极性	0.04	2.0	2.5	-1.0	0.9
Tyr	不带电 荷/极性	0.02	-0.7	-1.3	-2.3	-0.4
Pro	非极性	-0.07	-0.2	-1.6	0.0	-0.3
Thr	不带电 荷/极性	-0.18	1.2	-0.7	-0.4	-0.2
Ser	不带电 荷/极性	-0.26	0.6	-0.8	0.3	-0.1
His	带电荷	-0.40	-3.0	-3.2	-0.5	-0.1

[0141]

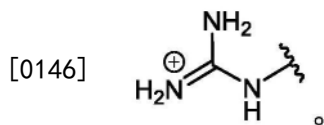
氨基酸	组	Eisenberg 和 Weiss	Engleman 等人	Kyrie 和 Doolittle	Hoop 和 Woods	Janin
Glu	带电荷	-0.62	-8.2	-3.5	3.0	-0.7
Asn	不带电 荷/极性	-0.64	-4.8	-3.5	0.2	-0.5
Gln	不带电 荷/极性	-0.69	-4.1	-3.5	0.2	-0.7
Asp	带电荷	-0.72	-9.2	-3.5	3.0	-0.6
Lys	带电荷	-1.10	-8.8	-3.9	3.0	-1.8
Arg	带电荷	-1.80	-12.3	-4.5	3.0	-1.4

[0142] 具有包含胍基、胍置换基团或其质子化形式的侧链的氨基酸残基

[0143] 如本文所用,胍是指以下结构:



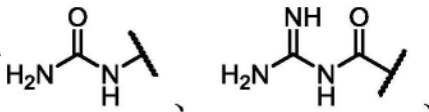
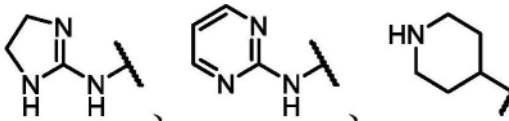
[0145] 如本文所用,质子化形式的胍是指以下结构:



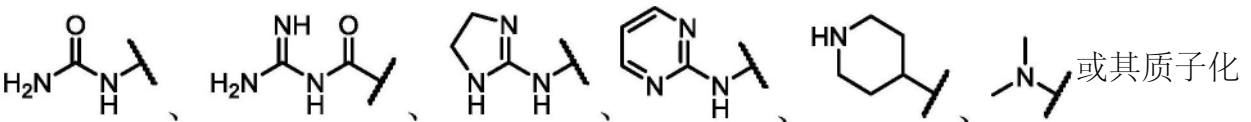
[0147] 胍置换基团是指氨基酸侧链上的官能团,其在生理pH或高于生理pH时将带正电荷,或者可再现胍鎓(guanidinium)基团的氢键给予和接受活性。

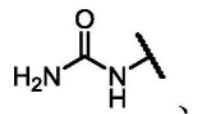
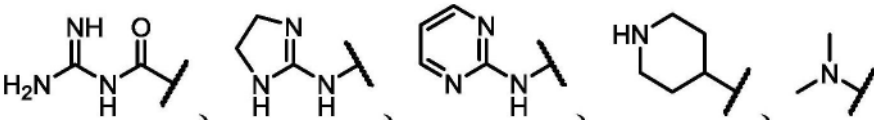
[0148] 胍置换基团促进细胞渗透和治疗剂的递送,同时降低与胍基或其质子化形式相关的毒性。cCPP可包含至少一个具有包含胍或胍鎗置换基团的侧链的氨基酸。cCPP可包含至少两个具有包含胍或胍鎗置换基团的侧链的氨基酸。cCPP可包含至少三个具有包含胍或胍鎗置换基团的侧链的氨基酸

[0149] 胍或胍鎗基团可以是胍或胍鎗的电子等排体。胍或胍鎗置换基团的碱性可低于胍。

[0150] 如本文所用,胍置换基团是指 、 或其质子化形式。

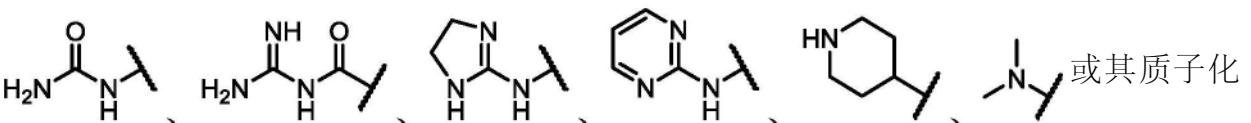
[0151] 本公开涉及包含4至20个氨基酸残基的cCPP,其中:(i)至少一个氨基酸具有包含胍基或其质子化形式的侧链;(ii)至少一个氨基酸残基不具有侧链或具有包含

 形式的侧链;并且(iii)至少两个氨基酸残基独立地具有包含芳族或杂芳族基团的侧链。

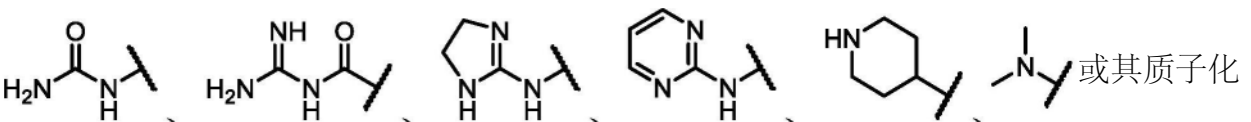
[0152] 至少两个氨基酸残基可不具有侧链或具有包含 、 或其质子化形式的侧链。

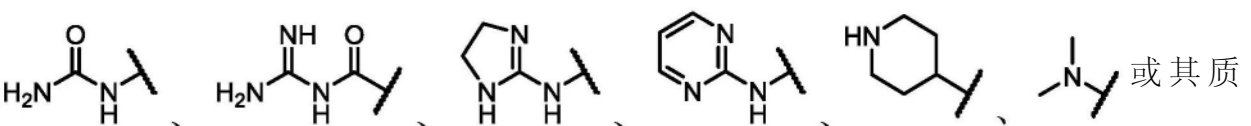
如本文所用,当不存在侧链时,氨基酸残基在连接胺和羧酸的碳原子上具有两个氢原子(例如,-CH₂-)。

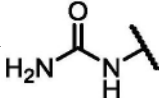
[0153] cCPP可包含至少一个具有包含以下部分之一的侧链的氨基酸:

 形式。

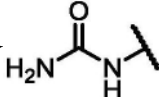
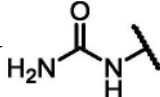
[0154] cCPP可包含至少两个氨基酸,每个氨基酸独立地具有以下部分之一:

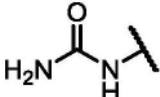
 形式。至少两个氨基酸可具有包含选自以下的相同部分的侧链:

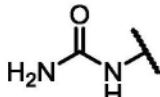
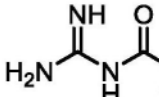
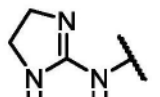
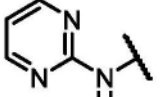
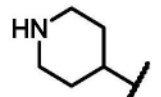

 或其质

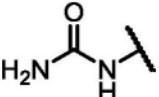
子化形式。至少一个氨基酸可具有包含  或其质子化形式的侧链。至少两个氨基

酸可具有包含  或其质子化形式的侧链。一个、两个、三个或四个氨基酸可具有包

含  或其质子化形式的侧链。一个氨基酸可具有包含  或其质子化形式

的侧链。两个氨基酸可具有包含  或其质子化形式的侧链。

、、、、、 或其质子

化形式可附接到氨基酸侧链的末端。 可附接到氨基酸侧链的末端。

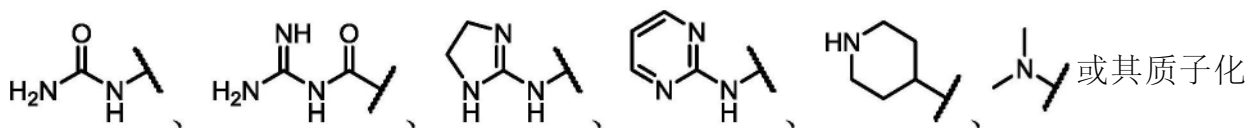
[0155] cCPP可包含 (iii) 2、3、4、5或6个独立地具有包含胍基、胍置换基团或其质子化形式的侧链的氨基酸残基。cCPP可包含 (iii) 2个独立地具有包含胍基、胍置换基团或其质子化形式的侧链的氨基酸残基。cCPP可包含 (iii) 3个独立地具有包含胍基、胍置换基团或其质子化形式的侧链的氨基酸残基。cCPP可包含 (iii) 4个独立地具有包含胍基、胍置换基团或其质子化形式的侧链的氨基酸残基。cCPP可包含 (iii) 5个独立地具有包含胍基、胍置换基团或其质子化形式的侧链的氨基酸残基。cCPP可包含 (iii) 6个独立地具有包含胍基、胍置换基团或其质子化形式的侧链的氨基酸残基。cCPP可包含 (iii) 2、3、4或5个独立地具有包含胍基、胍置换基团或其质子化形式的侧链的氨基酸残基。cCPP可包含 (iii) 2、3或4个独立地具有包含胍基、胍置换基团或其质子化形式的侧链的氨基酸残基。cCPP可包含 (iii) 2或3个独立地具有包含胍基、胍置换基团或其质子化形式的侧链的氨基酸残基。cCPP可包含 (iii) 至少一个具有包含胍基或其质子化形式的侧链的氨基酸残基。cCPP可包含 (iii) 两个具有包含胍基或其质子化形式的侧链的氨基酸残基。cCPP可包含 (iii) 三个具有包含胍基或其质子化形式的侧链的氨基酸残基。

[0156] 氨基酸残基可独立地具有包含不邻接的胍基、胍置换基团或其质子化形式的侧链。两个氨基酸残基可独立地具有包含可以是邻接的胍基、胍置换基团或其质子化形式的侧链。三个氨基酸残基可独立地具有包含可以是邻接的胍基、胍置换基团或其质子化形式的侧链。四个氨基酸残基可独立地具有包含可以是邻接的胍基、胍置换基团或其质子化形式的侧链。邻接的氨基酸残基可具有相同的立体化学。邻接的氨基酸可具有交替的立体化学。

[0157] 独立地具有包含胍基、胍置换基团或其质子化形式的侧链的氨基酸残基可以是L-氨基酸。独立地具有包含胍基、胍置换基团或其质子化形式的侧链的氨基酸残基可以是D-氨基酸。独立地具有包含胍基、胍置换基团或其质子化形式的侧链的氨基酸残基可以是L-氨基酸或D-氨基酸的混合物。

[0158] 每个具有包含胍基或其质子化形式的侧链的氨基酸残基可独立地是精氨酸、高精氨酸、2-氨基-3-丙酸、2-氨基-4-胍基丁酸或其质子化形式的残基。每个具有包含胍基或其质子化形式的侧链的氨基酸残基可独立地是精氨酸残基或其质子化形式的残基。

[0159] 每个具有包含胍置换基团或其质子化形式的侧链的氨基酸可独立地是



形式。

[0160] 不受理论的束缚,假设胍置换基团相对于精氨酸具有降低的碱度,并且在一些情况下在生理pH下不带电荷(例如, $-N(H)C(O)$),并且能够维持与质膜上的磷脂的双齿氢键相互作用,这被认为促进有效的膜结合和随后的内化。正电荷的去除也被认为降低了cCPP的毒性。

[0161] 本领域技术人员将理解,上述非天然芳族疏水氨基酸的N-末端/或C-末端在掺入本文公开的肽中后形成酰胺键。

[0162] cCPP可包含具有包含芳族或杂芳族基团的侧链的第一氨基酸和具有包含芳族或杂芳族基团的侧链的第二氨基酸,其中第一甘氨酸的N-末端与具有包含芳族或杂芳族基团的侧链的第一氨基酸形成肽键,并且第一甘氨酸的C-末端与具有包含芳族或杂芳族基团的侧链的第二氨基酸形成肽键。尽管按照惯例,术语“第一氨基酸”通常是指肽序列的N-末端氨基酸,但如本文所用,“第一氨基酸”用于将所指氨基酸与cCPP中的另一氨基酸(例如,“第二氨基酸”)区分开,使得术语“第一氨基酸”可以是或可指位于肽序列的N-末端的氨基酸。

[0163] cCPP可包含:第二甘氨酸的N-末端与具有包含芳族或杂芳族基团的侧链的氨基酸形成肽键,并且第二甘氨酸的C-末端与具有包含胍基或其质子化形式的侧链的氨基酸形成肽键。

[0164] cCPP可包含具有包含胍基或其质子化形式的侧链的第一氨基酸,和具有包含胍基或其质子化形式的侧链的第二氨基酸,其中第三甘氨酸的N-末端与具有包含胍基或其质子化形式的侧链的第一氨基酸形成肽键,并且第三甘氨酸的C-末端与具有包含胍基或其质子化形式的侧链的第二氨基酸形成肽键。

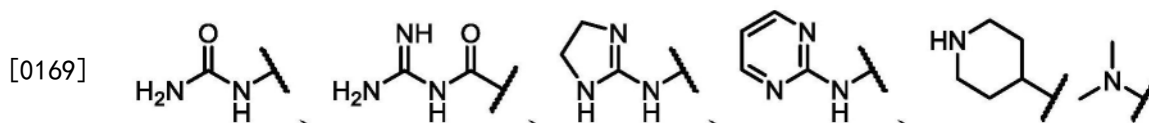
[0165] cCPP可包含天冬酰胺、天冬氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸或高谷氨酰胺的残基。cCPP可包含天冬酰胺的残基。cCPP可包含谷氨酰胺的残基。

[0166] cCPP可包含酪氨酸、苯丙氨酸、1-萘基丙氨酸、2-萘基丙氨酸、色氨酸、3-苯并噻吩基丙氨酸、4-苯基苯丙氨酸、3,4-二氟苯丙氨酸、4-三氟甲基苯丙氨酸、2,3,4,5,6-五氟苯丙氨酸、高苯丙氨酸、 β -高苯丙氨酸、4-叔丁基-苯丙氨酸、4-吡啶基丙氨酸、3-吡啶基丙氨酸、4-甲基苯丙氨酸、4-氟苯丙氨酸、4-氯苯丙氨酸、3-(9-蒎基)-丙氨酸的残基。

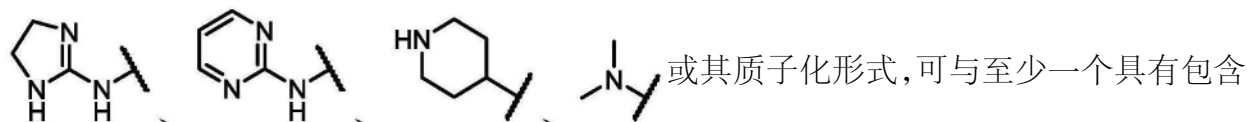
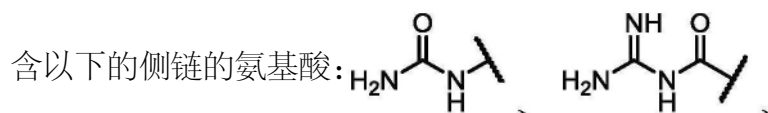
[0167] 尽管不希望受理论束缚,但据信cCPP中氨基酸的手性可影响胞质摄取效率。cCPP可包含至少一个D氨基酸。cCPP可包含一至十五个D氨基酸。cCPP可包含一至十个D氨基酸。cCPP可包含1、2、3或4个D氨基酸。cCPP可包含具有交替的D和L手性的2、3、4、5、6、7或8个邻接的氨基酸。cCPP可包含具有相同手性的三个邻接的氨基酸。cCPP可包含具有相同手性的两个邻接的氨基酸。至少两个氨基酸可具有相反的手性。具有相反手性的至少两个氨基酸可彼此相邻。至少三个氨基酸可相对于彼此具有交替的立体化学。相对于彼此具有交替手

性的至少三个氨基酸可彼此相邻。至少四个氨基酸相对于彼此具有交替的立体化学。相对于彼此具有交替手性的至少四个氨基酸可彼此相邻。至少两个氨基酸可具有相同的手性。具有相同手性的至少两个氨基酸可彼此相邻。至少两个氨基酸具有相同的手性并且至少两个氨基酸具有相反的手性。具有相反手性的至少两个氨基酸可与具有相同手性的至少两个氨基酸相邻。因此，cCPP中相邻的氨基酸可具有以下序列中的任一者：D-L；L-D；D-L-L-D；L-D-D-L；L-D-L-L-D；D-L-D-D-L；D-L-L-D-L；或L-D-D-L-D。氨基酸cCPP可包含以下序列：D/L-X-D/L；D/L-X-D/L-X；D/L-X-D/L-X-D/L；D-X-D；D-X-D-X；D-X-D-X-D；L-X-L；L-X-L-X；或L-X-L-X-L，其中D/L意指氨基酸可具有D或L立体化学且X是非手性氨基酸。非手性氨基酸可以是甘氨酸。

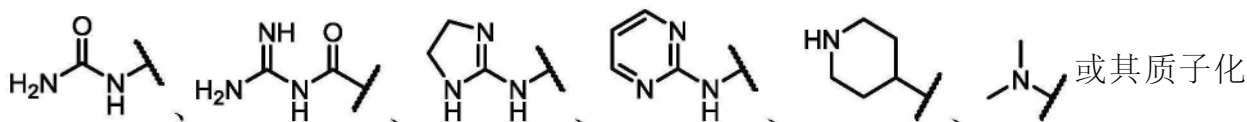
[0168] 具有包含以下的侧链的氨基酸：



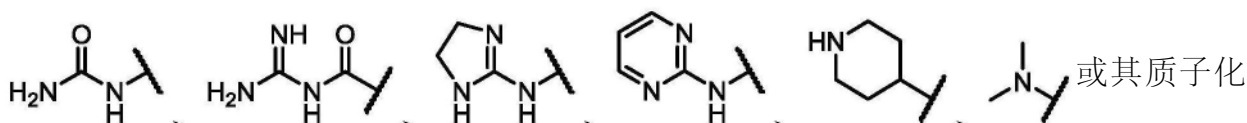
[0170] 或其质子化形式，可与具有包含芳族或杂芳族基团的侧链的氨基酸相邻。具有包



或其质子化形式的侧链的氨基酸相邻。具有包含胍或其质子化形式的侧链的氨基酸可与具有包含芳族或杂芳族基团的侧链的氨基酸相邻。两个具有包含以下的侧链的氨基酸：



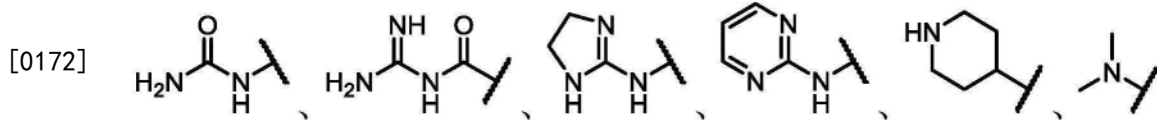
形式，可彼此相邻。两个具有包含胍或其质子化形式的侧链的氨基酸彼此相邻。cCPP可包含至少两个具有可包含芳族或杂芳族基团的侧链的邻接氨基酸，和至少两个具有包含以下的侧链的不相邻氨基酸：



形式。cCPP可包含至少两个具有包含芳族或杂芳族基团的侧链的邻接氨基酸和至少两个具有包含 或其质子化形式的侧链的不相邻氨基酸。相邻氨基酸可具有相同的手

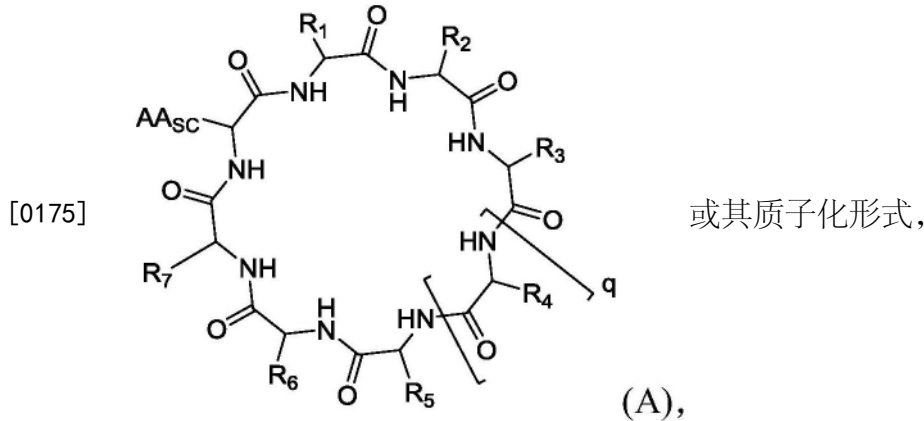
性。相邻氨基酸可具有相反的手性。氨基酸的其他组合可具有D和L氨基酸的任何排列，例如，在前述段落中描述的任何序列。

[0171] 至少两个具有包含以下的侧链的氨基酸：



[0173] 或其质子化形式,与至少两个具有包含胍基或其质子化形式的侧链的氨基酸交替。

[0174] cCPP可包含式(A)的结构:



[0176] 其中:

[0177] R_1 、 R_2 和 R_3 各自独立地是H或氨基酸的芳族或杂芳族侧链;

[0178] R_1 、 R_2 和 R_3 中的至少一者是氨基酸的芳族或杂芳族侧链;

[0179] R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 独立地是H或氨基酸侧链;

[0180] R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 中的至少一者是3-胍基-2-氨基丙酸、4-胍基-2-氨基丁酸、精氨酸、高精氨酸、N-甲基精氨酸、N,N-二甲基精氨酸、2,3-二氨基丙酸、2,4-二氨基丁酸、赖氨酸、N-甲基赖氨酸、N,N-二甲基赖氨酸、N-乙基赖氨酸、N,N,N-三甲基赖氨酸、4-胍基苯丙氨酸、瓜氨酸、N,N-二甲基赖氨酸、 β -高精氨酸、3-(1-哌啶基)丙氨酸的侧链;

[0181] AA_{sc} 是氨基酸侧链;并且

[0182] q 是1、2、3或4。

[0183] 在实施方案中, R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 中的至少一者独立地是氨基酸的不带电荷的非芳族侧链。在实施方案中, R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 中的至少一者独立地是H或瓜氨酸的侧链。

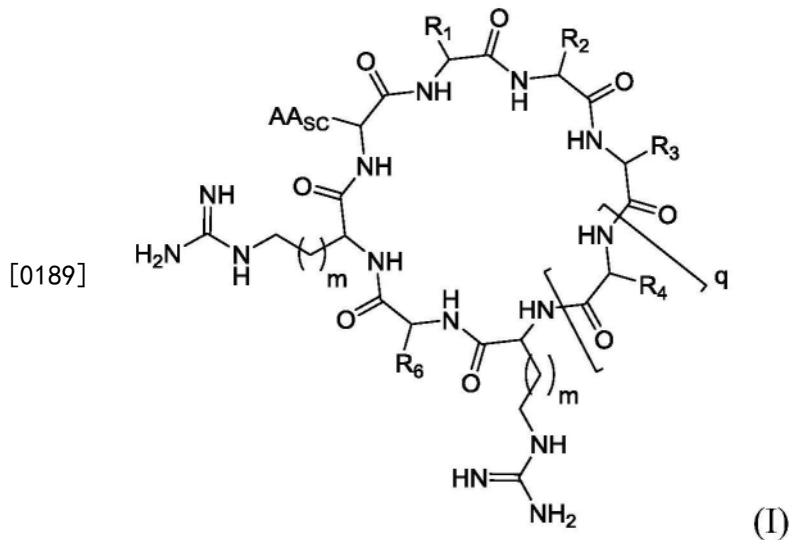
[0184] 在实施方案中,提供了包含具有6至12个氨基酸的环肽的化合物,其中环肽的至少两个氨基酸是带电荷的氨基酸,环肽的至少两个氨基酸是芳族疏水氨基酸,并且环肽的至少两个氨基酸是不带电荷的非芳族氨基酸。在实施方案中,环肽的至少两个带电荷的氨基酸是精氨酸。在实施方案中,环肽的至少两个芳族疏水氨基酸是苯丙氨酸、萘丙氨酸(3-萘-2-基-丙氨酸)或它们的组合。在实施方案中,环肽的至少两个不带电荷的非芳族氨基酸是瓜氨酸、甘氨酸或它们的组合。在实施方案中,化合物是具有6至12个氨基酸的环肽,其中环肽的两个氨基酸是精氨酸,至少两个氨基酸是选自苯丙氨酸、萘丙氨酸和它们的组合的芳族疏水氨基酸,并且至少两个氨基酸是选自瓜氨酸、甘氨酸及它们的组合的不带电荷的非芳族氨基酸。

[0185] 在实施方案中,式(A)的环肽不是具有以下序列的环肽:

CPP 序列		
FΦRRRQ	RRFRΦRQ	FΦRRRRQK
FΦRRRC	FRRRRΦQ	FΦRRRRQC
FΦRRRU	rRFRΦRQ	fΦRrRrRQ
RRRΦFQ	RRΦFRRQ	FΦRRRRRQ
RRRRΦF	CRRRRFWQ	RRRRΦFDΩC
FΦRRRR	FfΦRrRrQ	FΦRRR
FφrRrRq	FFΦRRRRQ	FWRRR
FφrRrRQ	RFRFRΦRQ	RRRΦF
FΦRRRRQ	URRRRFWQ	RRRWF
fΦRrRrQ	CRRRRFWQ	

[0187] 其中F是L-苯丙氨酸, f是D-苯丙氨酸, Φ是L-3-(2-萘基)-丙氨酸, Φ是D-3-(2-萘基)-丙氨酸, R是L-精氨酸, r是D-精氨酸, Q是L-谷氨酰胺, q是D-谷氨酰胺, C是L-半胱氨酸, U是L-硒代半胱氨酸, W是L-色氨酸, K是L-赖氨酸, D是L-天冬氨酸, 并且Ω是L-正亮氨酸。

[0188] cCPP可包含式(I)的结构:



[0190] 或其质子化形式,

[0191] 其中:

[0192] R_1 、 R_2 和 R_3 可各自独立地是H或具有包含芳族基团的侧链的氨基酸残基;

[0193] R_1 、 R_2 和 R_3 中的至少一者是氨基酸的芳族或杂芳族侧链;

[0194] R_4 和 R_6 独立地是H或氨基酸侧链;

[0195] AA_{sc} 是氨基酸侧链;

[0196] q是1、2、3或4; 并且

[0197] 每个m独立地是整数0、1、2或3。

[0198] R_1 、 R_2 和 R_3 可各自独立地是H、-亚烷基-芳基或-亚烷基-杂芳基。 R_1 、 R_2 和 R_3 可各自独立地是H、- C_{1-3} 亚烷基-芳基或- C_{1-3} 亚烷基-杂芳基。 R_1 、 R_2 和 R_3 可各自独立地是H或-亚烷基-芳基。 R_1 、 R_2 和 R_3 可各自独立地是H或- C_{1-3} 亚烷基-芳基。 C_{1-3} 亚烷基可以是亚甲基。芳基可以是6至14元芳基。杂芳基是具有一个或多个选自N、O和S的杂原子的6至14元杂芳基。芳基可自选苯基、萘基或蒽基。芳基可以是苯基或萘基。芳基可以是苯基。杂芳基可以是吡啶基、喹啉基和异喹啉基。 R_1 、 R_2 和 R_3 可各自独立地是H、- C_{1-3} 亚烷基-Ph或- C_{1-3} 亚烷基-萘基。

R1、R2和R3可各自独立地是H、-CH₂Ph或-CH₂萘基。R1、R2和R3可各自独立地是H或-CH₂Ph。

[0199] R1、R2和R3可各自独立地是酪氨酸、苯丙氨酸、1-萘基丙氨酸、2-萘基丙氨酸、色氨酸、3-苯并噻吩基丙氨酸、4-苯基苯丙氨酸、3,4-二氟苯丙氨酸、4-三氟甲基苯丙氨酸、2,3,4,5,6-五氟苯丙氨酸、高苯丙氨酸、β-高苯丙氨酸、4-叔丁基-苯丙氨酸、4-吡啶基丙氨酸、3-吡啶基丙氨酸、4-甲基苯丙氨酸、4-氟苯丙氨酸、4-氯苯丙氨酸、3-(9-蒎基)-丙氨酸的侧链。

[0200] R₁可以是酪氨酸的侧链。R₁可以是苯丙氨酸的侧链。R₁可以是1-萘基丙氨酸的侧链。R₁可以是2-萘基丙氨酸的侧链。R₁可以是色氨酸的侧链。R₁可以是3-苯并噻吩基丙氨酸的侧链。R₁可以是4-苯基苯丙氨酸的侧链。R₁可以是3,4-二氟苯丙氨酸的侧链。R₁可以是4-三氟甲基苯丙氨酸的侧链。R₁可以是2,3,4,5,6-五氟苯丙氨酸的侧链。R₁可以是高苯丙氨酸的侧链。R₁可以是β-高苯丙氨酸的侧链。R₁可以是4-叔丁基-苯丙氨酸的侧链。R₁可以是4-吡啶基丙氨酸的侧链。R₁可以是3-吡啶基丙氨酸的侧链。R₁可以是4-甲基苯丙氨酸的侧链。R₁可以是4-氟苯丙氨酸的侧链。R₁可以是4-氯苯丙氨酸的侧链。R₁可以是3-(9-蒎基)-丙氨酸的侧链。

[0201] R₂可以是酪氨酸的侧链。R₂可以是苯丙氨酸的侧链。R₂可以是1-萘基丙氨酸的侧链。R₂可以是2-萘基丙氨酸的侧链。R₂可以是色氨酸的侧链。R₂可以是3-苯并噻吩基丙氨酸的侧链。R₂可以是4-苯基苯丙氨酸的侧链。R₂可以是3,4-二氟苯丙氨酸的侧链。R₂可以是4-三氟甲基苯丙氨酸的侧链。R₂可以是2,3,4,5,6-五氟苯丙氨酸的侧链。R₂可以是高苯丙氨酸的侧链。R₂可以是β-高苯丙氨酸的侧链。R₂可以是4-叔丁基-苯丙氨酸的侧链。R₂可以是4-吡啶基丙氨酸的侧链。R₂可以是3-吡啶基丙氨酸的侧链。R₂可以是4-甲基苯丙氨酸的侧链。R₂可以是4-氟苯丙氨酸的侧链。R₂可以是4-氯苯丙氨酸的侧链。R₂可以是3-(9-蒎基)-丙氨酸的侧链。

[0202] R₃可以是酪氨酸的侧链。R₃可以是苯丙氨酸的侧链。R₃可以是1-萘基丙氨酸的侧链。R₃可以是2-萘基丙氨酸的侧链。R₃可以是色氨酸的侧链。R₃可以是3-苯并噻吩基丙氨酸的侧链。R₃可以是4-苯基苯丙氨酸的侧链。R₃可以是3,4-二氟苯丙氨酸的侧链。R₃可以是4-三氟甲基苯丙氨酸的侧链。R₃可以是2,3,4,5,6-五氟苯丙氨酸的侧链。R₃可以是高苯丙氨酸的侧链。R₃可以是β-高苯丙氨酸的侧链。R₃可以是4-叔丁基-苯丙氨酸的侧链。R₃可以是4-吡啶基丙氨酸的侧链。R₃可以是3-吡啶基丙氨酸的侧链。R₃可以是4-甲基苯丙氨酸的侧链。R₃可以是4-氟苯丙氨酸的侧链。R₃可以是4-氯苯丙氨酸的侧链。R₃可以是3-(9-蒎基)-丙氨酸的侧链。

[0203] R₄可以是H、-亚烷基-芳基、-亚烷基-杂芳基。R₄可以是H、-C₁₋₃亚烷基-芳基或-C₁₋₃亚烷基-杂芳基。R₄可以是H或-亚烷基-芳基。R₄可以是H或-C₁₋₃亚烷基-芳基。C₁₋₃亚烷基可以是亚甲基。芳基可以是6至14元芳基。杂芳基可以是具有一个或多个选自N、O和S的杂原子的6至14元杂芳基。芳基可选自苯基、萘基或蒎基。芳基可以是苯基或萘基。芳基可以是苯基。杂芳基可以是吡啶基、喹啉基和异喹啉基。R₄可以是H、-C₁₋₃亚烷基-Ph或-C₁₋₃亚烷基-萘基。R₄可以是H或表1中氨基酸的侧链。R₄可以是H或具有包含芳族基团的侧链的氨基酸残基。R₄可以是H、-CH₂Ph或-CH₂萘基。R₄可以是H或-CH₂Ph。

[0204] R₅可以是H、-亚烷基-芳基、-亚烷基-杂芳基。R₅可以是H、-C₁₋₃亚烷基-芳基或-C₁₋₃亚烷基-杂芳基。R₅可以是H或-亚烷基-芳基。R₅可以是H或-C₁₋₃亚烷基-芳基。C₁₋₃亚烷基可以

是亚甲基。芳基可以是6至14元芳基。杂芳基可以是具有一个或多个选自N、O和S的杂原子的6至14元杂芳基。芳基可选自苯基、萘基或蒽基。芳基可以是苯基或萘基。芳基可以是苯基。杂芳基可以是吡啶基、喹啉基和异喹啉基。 R_5 可以是H、 $-C_{1-3}$ 亚烷基-Ph或 $-C_{1-3}$ 亚烷基-萘基。 R_5 可以是H或表1中氨基酸的侧链。 R_4 可以是H或具有包含芳族基团的侧链的氨基酸残基。 R_5 可以是H、 $-CH_2Ph$ 或 $-CH_2$ 萘基。 R_4 可以是H或 $-CH_2Ph$ 。

[0205] R_6 可以是H、-亚烷基-芳基、-亚烷基-杂芳基。 R_6 可以是H、 $-C_{1-3}$ 亚烷基-芳基或 $-C_{1-3}$ 亚烷基-杂芳基。 R_6 可以是H或-亚烷基-芳基。 R_6 可以是H或 $-C_{1-3}$ 亚烷基-芳基。 C_{1-3} 亚烷基可以是亚甲基。芳基可以是6至14元芳基。杂芳基可以是具有一个或多个选自N、O和S的杂原子的6至14元杂芳基。芳基可选自苯基、萘基或蒽基。芳基可以是苯基或萘基。芳基可以是苯基。杂芳基可以是吡啶基、喹啉基和异喹啉基。 R_6 可以是H、 $-C_{1-3}$ 亚烷基-Ph或 $-C_{1-3}$ 亚烷基-萘基。 R_6 可以是H或表1中氨基酸的侧链。 R_6 可以是H或具有包含芳族基团的侧链的氨基酸残基。 R_6 可以是H、 $-CH_2Ph$ 或 $-CH_2$ 萘基。 R_6 可以是H或 $-CH_2Ph$ 。

[0206] R_7 可以是H、-亚烷基-芳基、-亚烷基-杂芳基。 R_7 可以是H、 $-C_{1-3}$ 亚烷基-芳基或 $-C_{1-3}$ 亚烷基-杂芳基。 R_7 可以是H或-亚烷基-芳基。 R_7 可以是H或 $-C_{1-3}$ 亚烷基-芳基。 C_{1-3} 亚烷基可以是亚甲基。芳基可以是6至14元芳基。杂芳基可以是具有一个或多个选自N、O和S的杂原子的6至14元杂芳基。芳基可选自苯基、萘基或蒽基。芳基可以是苯基或萘基。芳基可以是苯基。杂芳基可以是吡啶基、喹啉基和异喹啉基。 R_7 可以是H、 $-C_{1-3}$ 亚烷基-Ph或 $-C_{1-3}$ 亚烷基-萘基。 R_7 可以是H或表1中氨基酸的侧链。 R_7 可以是H或具有包含芳族基团的侧链的氨基酸残基。 R_7 可以是H、 $-CH_2Ph$ 或 $-CH_2$ 萘基。 R_7 可以是H或 $-CH_2Ph$ 。

[0207] R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_7 中的一者、两者或三者可以是 $-CH_2Ph$ 。 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_7 中的一者可以是 $-CH_2Ph$ 。 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_7 中的两者可以是 $-CH_2Ph$ 。 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_7 中的三者可以是 $-CH_2Ph$ 。 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_7 中的至少一者可以是 $-CH_2Ph$ 。 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_7 中不超过四者可以是 $-CH_2Ph$ 。

[0208] R_1 、 R_2 、 R_3 和 R_4 中的一者、两者或三者是 $-CH_2Ph$ 。 R_1 、 R_2 、 R_3 和 R_4 中的一者是 $-CH_2Ph$ 。 R_1 、 R_2 、 R_3 和 R_4 中的两者是 $-CH_2Ph$ 。 R_1 、 R_2 、 R_3 和 R_4 中的三者是 $-CH_2Ph$ 。 R_1 、 R_2 、 R_3 和 R_4 中的至少一者是 $-CH_2Ph$ 。

[0209] R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_7 中的一者、两者或三者可以是H。 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_7 中的一者可以是H。 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_7 中的两者可以是H。 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_7 中的三者可以是H。 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_7 中的至少一者可以是H。 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_7 中不超过三者可以是 $-CH_2Ph$ 。

[0210] R_1 、 R_2 、 R_3 和 R_4 中的一者、两者或三者是H。 R_1 、 R_2 、 R_3 和 R_4 中的一者是H。 R_1 、 R_2 、 R_3 和 R_4 中的两者是H。 R_1 、 R_2 、 R_3 和 R_4 中的三者是H。 R_1 、 R_2 、 R_3 和 R_4 中的至少一者是H。

[0211] R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_7 中的至少一者可以是3-胍基-2-氨基丙酸的侧链。 R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_7 中的至少一者可以是4-胍基-2-氨基丙酸的侧链。 R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_7 中的至少一者可以是精氨酸的侧链。 R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_7 中的至少一者可以是高精氨酸的侧链。 R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_7 中的至少一者可以是N-甲基精氨酸的侧链。 R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_7 中的至少一者可以是N,N-二甲基精氨酸的侧链。 R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_7 中的至少一者可以是2,3-二氨基丙酸的侧链。 R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_7 中的至少一者可以是2,4-二氨基丁酸、赖氨酸的侧链。 R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_7 中的至少一者可以是N-甲基赖氨酸的侧链。 R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_7 中的至少一者可以是N,N-二甲基赖氨酸的侧链。 R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_7 中的至少一者可以

是N-乙基赖氨酸的侧链。 R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_7 中的至少一者可以是N,N,N-三甲基赖氨酸、4-胍基苯丙氨酸的侧链。 R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_7 中的至少一者可以是瓜氨酸的侧链。 R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_7 中的至少一者可以是N,N-二甲基赖氨酸、 β -高精氨酸的侧链。 R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_7 中的至少一者可以是3-(1-哌啶基)丙氨酸的侧链。

[0212] R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_7 中的至少两者可以是3-胍基-2-氨基丙酸的侧链。 R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_7 中的至少两者可以是4-胍基-2-氨基丁酸的侧链。 R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_7 中的至少两者可以是精氨酸的侧链。 R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_7 中的至少两者可以是高精氨酸的侧链。 R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_7 中的至少两者可以是N-甲基精氨酸的侧链。 R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_7 中的至少两者可以是N,N-二甲基精氨酸的侧链。 R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_7 中的至少两者可以是2,3-二氨基丙酸的侧链。 R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_7 中的至少两者可以是2,4-二氨基丁酸、赖氨酸的侧链。 R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_7 中的至少两者可以是N-甲基赖氨酸的侧链。 R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_7 中的至少两者可以是N,N-二甲基赖氨酸的侧链。 R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_7 中的至少两者可以是N-乙基赖氨酸的侧链。 R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_7 中的至少两者可以是N,N,N-三甲基赖氨酸、4-胍基苯丙氨酸的侧链。 R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_7 中的至少两者可以是瓜氨酸的侧链。 R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_7 中的至少两者可以是N,N-二甲基赖氨酸、 β -高精氨酸的侧链。 R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_7 中的至少两者可以是3-(1-哌啶基)丙氨酸的侧链。

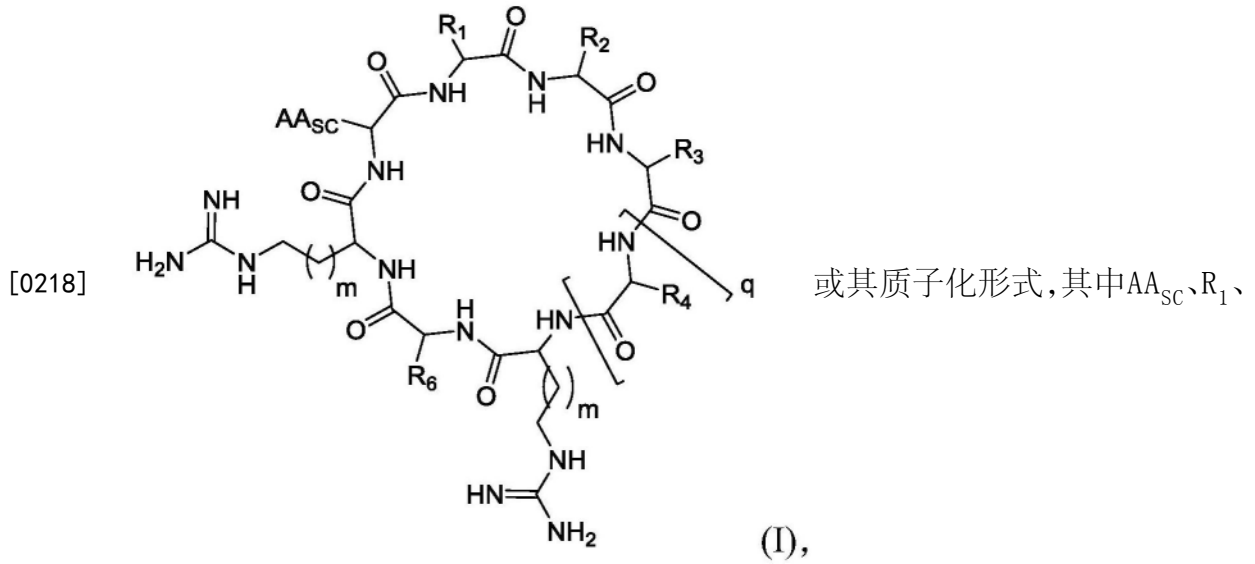
[0213] R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_7 中的至少三者可以是3-胍基-2-氨基丙酸的侧链。 R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_7 中的至少三者可以是4-胍基-2-氨基丁酸的侧链。 R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_7 中的至少三者可以是精氨酸的侧链。 R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_7 中的至少三者可以是高精氨酸的侧链。 R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_7 中的至少三者可以是N-甲基精氨酸的侧链。 R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_7 中的至少三者可以是N,N-二甲基精氨酸的侧链。 R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_7 中的至少三者可以是2,3-二氨基丙酸的侧链。 R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_7 中的至少三者可以是2,4-二氨基丁酸、赖氨酸的侧链。 R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_7 中的至少三者可以是N-甲基赖氨酸的侧链。 R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_7 中的至少三者可以是N,N-二甲基赖氨酸的侧链。 R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_7 中的至少三者可以是N-乙基赖氨酸的侧链。 R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_7 中的至少三者可以是N,N,N-三甲基赖氨酸、4-胍基苯丙氨酸的侧链。 R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_7 中的至少三者可以是瓜氨酸的侧链。 R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_7 中的至少三者可以是N,N-二甲基赖氨酸、 β -高精氨酸的侧链。 R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_7 中的至少三者可以是3-(1-哌啶基)丙氨酸的侧链。

[0214] AA_{SC} 可以是天冬酰胺、谷氨酰胺或高谷氨酰胺残基的侧链。 AA_{SC} 可以是谷氨酰胺残基的侧链。cCPP还可包含与 AA_{SC} (例如,天冬酰胺、谷氨酰胺或高谷氨酰胺的残基)缀合的接头。因此,cCPP还可包含与天冬酰胺、谷氨酰胺或高谷氨酰胺残基缀合的接头。cCPP还可包含与谷氨酰胺残基缀合的接头。

[0215] q 可以是1、2或3。 q 可以是1或2。 q 可以是1。 q 可以是2。 q 可以是3。 q 可以是4。

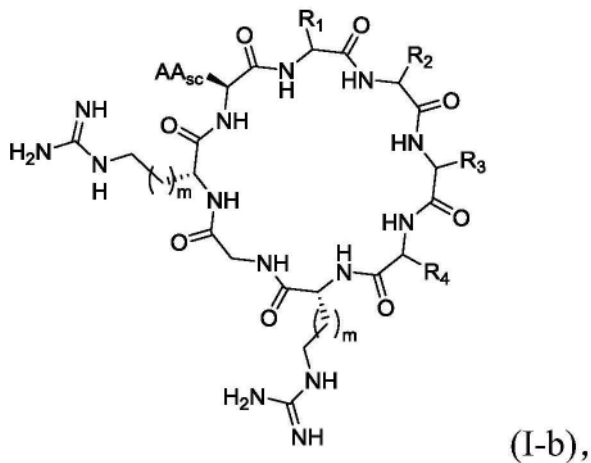
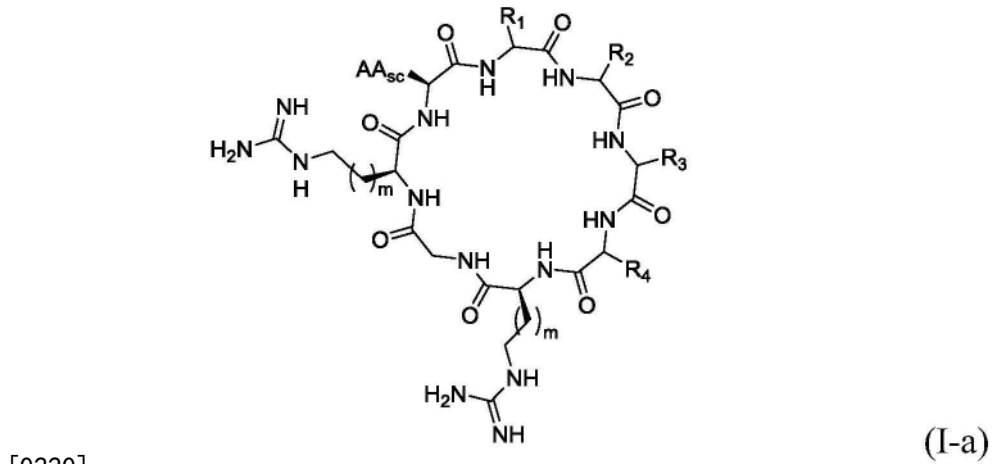
[0216] m 可以是1-3。 m 可以是1或2。 m 可以是0, m 可以是1。 m 可以是2。 m 可以是3。

[0217] 式(A)的cCPP可包含式(I)的结构:



R₂、R₃、R₄、R₆、m和q如本文所定义。

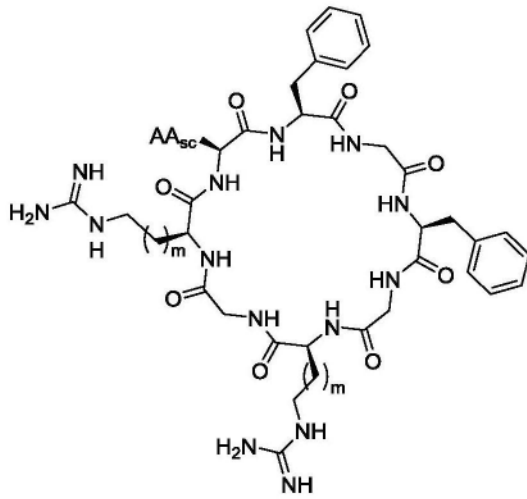
[0219] 式(A)的cCPP可包含式(I-a)或式(I-b)的结构:



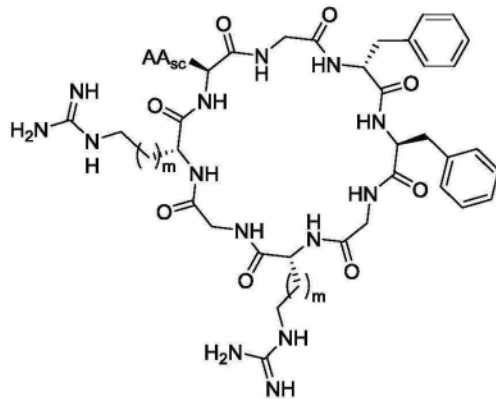
或其质子化形式,其中AA_{sc}、R₁、R₂、R₃、R₄和m如本文所定义。

[0222] 式(A)的cCPP可包含式(I-1)、(I-2)、(I-3)或(I-4)的结构:

[0223]

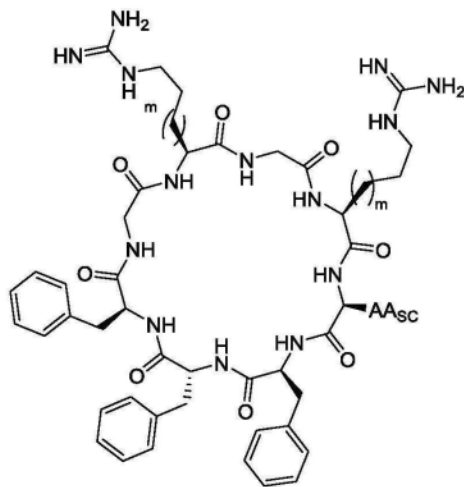


(I-1)

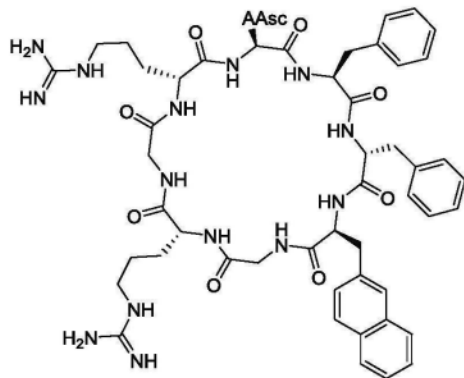


(I-2)

[0224]



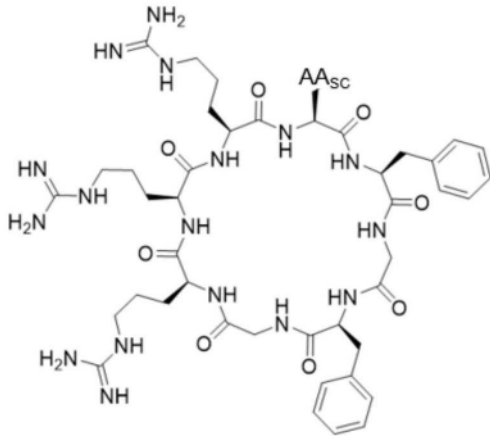
(I-3)



(I-4),

[0225] 或其质子化形式,其中AA_{sc}和m如本文所定义。式(A)的cCPP可包含式(I-5)或(I-6)的结构:

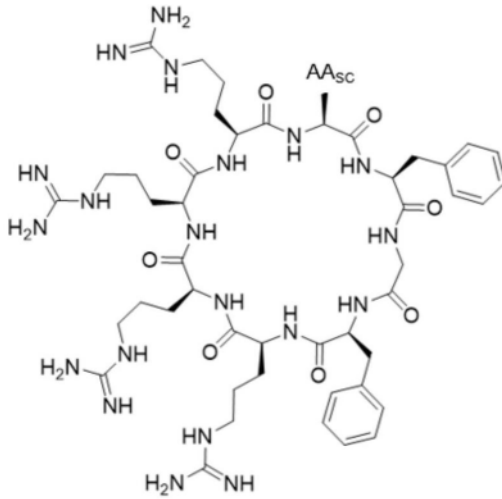
[0226]



(I-5)

或

[0227]



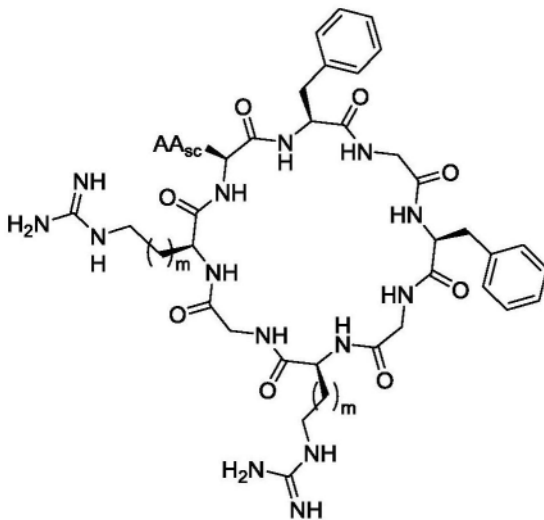
(I-6),

或其质子化形式,其中AA_{sc}如本文所

定义。

[0228] 式(A)的cCPP可包含式(I-1)的结构:

[0229]

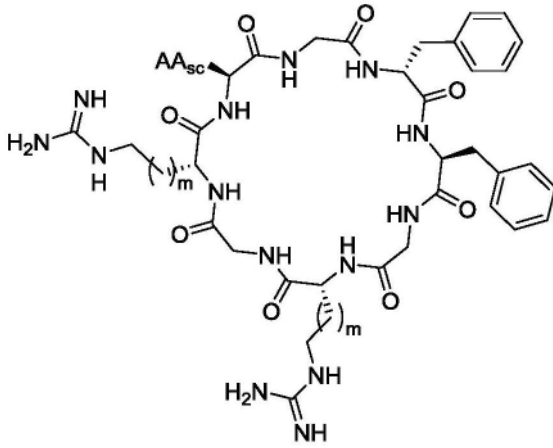


(I-1),

或其质子化形式,其中AA_{sc}和m如

本文所定义。

[0230] 式(A)的cCPP可包含式(I-2)的结构:



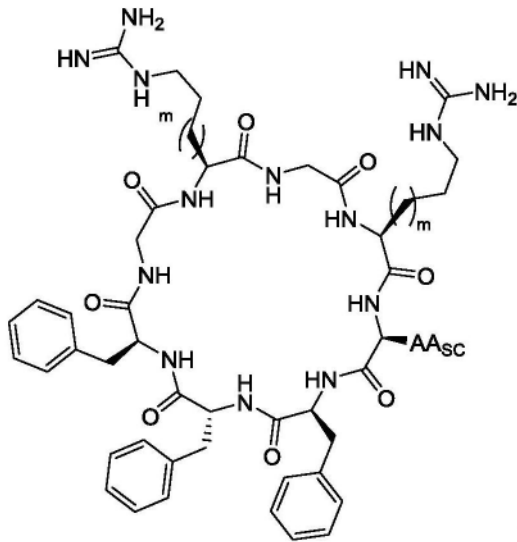
[0231]

或其质子化形式,其中AA_{sc}和m如本

(I-2),

文所定义。

[0232] 式(A)的cCPP可包含式(I-3)的结构:



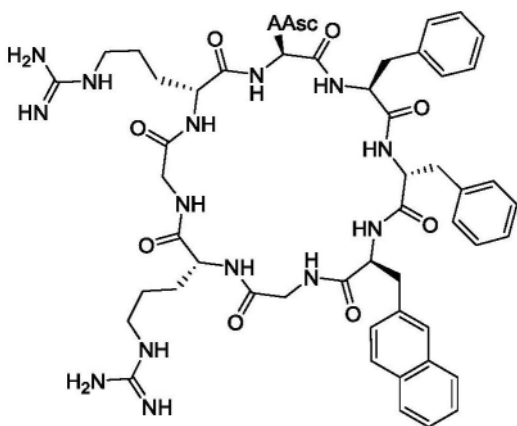
[0233]

或其质子化形式,其中AA_{sc}和m如本文

(I-3),

所定义。

[0234] 式(A)的cCPP可包含式(I-4)的结构:



[0235]

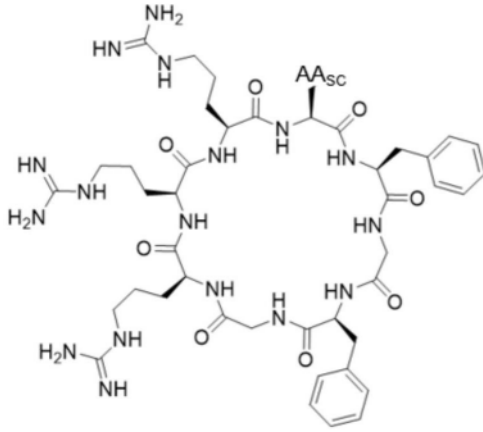
或其质子化形式,其中AA_{sc}和m如本文

(I-4),

所定义。

[0236] 式(A)的cCPP可包含式(I-5)的结构:

[0237]

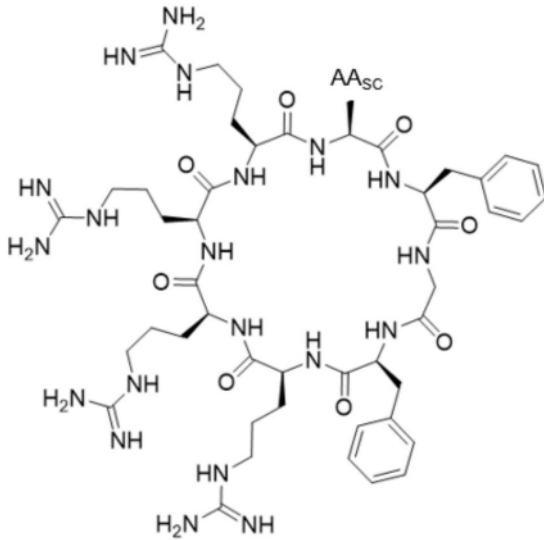
或其质子化形式,其中AA_{Sc}和m如本文

(I-5),

所定义。

[0238] 式(A)的cCPP可包含式(I-6)的结构:

[0239]

或其质子化形式,其中AA_{Sc}和m如

(I-6),

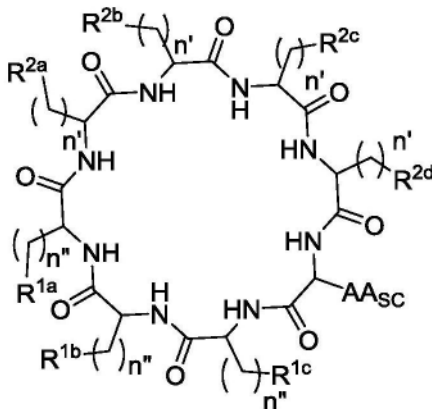
本文所定义。

[0240] cCPP可包含以下序列之一:FGFGRGR;GfFGrGr;Ff ΦGRGR;FfFGRGR;或Ff ΦGrGr。

cCPP可具有以下序列之一:FGFGRGRQ;GfFGrGrQ;Ff ΦGRGRQ;FfFGRGRQ;或Ff ΦGrGrQ。

[0241] 本公开还涉及具有式(II)的结构的cCPP:

[0242]



或其质子化形式,

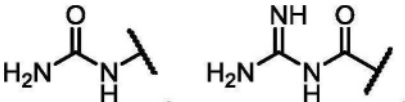
(II),

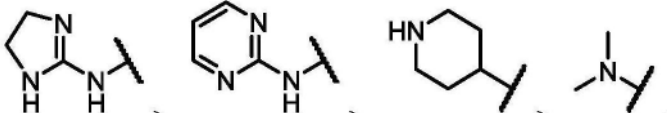
[0243] 其中:

[0244] AA_{Sc} 是氨基酸侧链;

[0245] R^{1a} 、 R^{1b} 和 R^{1c} 各自独立地是6至14元芳基或6至14元杂芳基;

[0246] R^{2a} 、 R^{2b} 、 R^{2c} 和 R^{2d} 独立地是氨基酸侧链;

[0247] R^{2a} 、 R^{2b} 、 R^{2c} 和 R^{2d} 中的至少一者是  ,

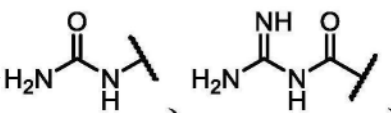
 , 或其质子化形式;

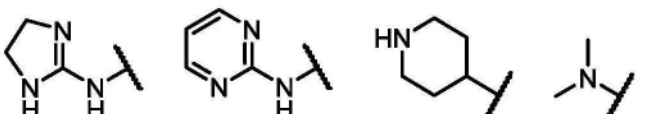
[0248] R^{2a} 、 R^{2b} 、 R^{2c} 和 R^{2d} 中的至少一者是胍或其质子化形式;

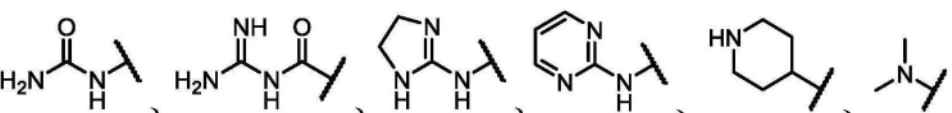
[0249] 每个n”独立地是整数0、1、2、3、4或5;

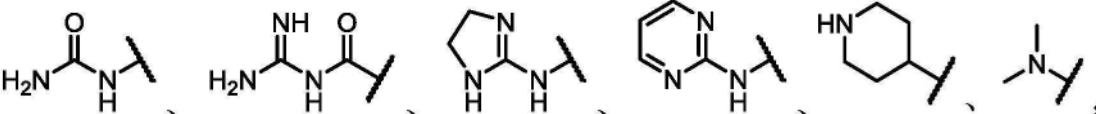
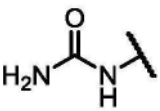
[0250] 每个n’独立地是0、1、2或3的整数;并且

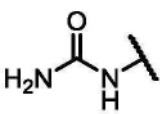
[0251] 如果n’是0,则 R^{2a} 、 R^{2b} 、 R^{2c} 或 R^{2d} 不存在。

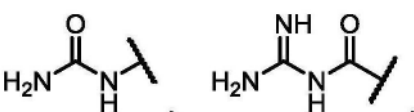
[0252] R^{2a} 、 R^{2b} 、 R^{2c} 和 R^{2d} 中的至少两者可以是  ,

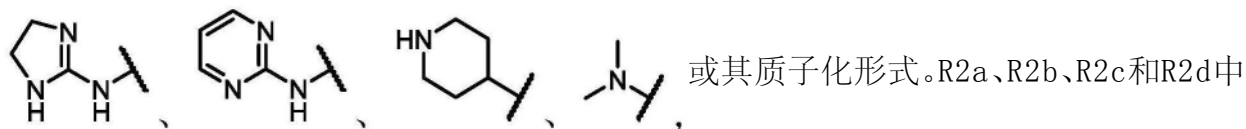
 , 或其质子化形式。 R^{2a} 、 R^{2b} 、 R^{2c} 和 R^{2d} 中的两者

或三者可以是  , 或其质子化形式。 R^{2a} 、 R^{2b} 、 R^{2c} 和 R^{2d} 中的一者可以是

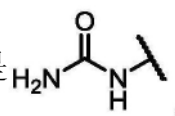
 , 或其质子化形式。 R^{2a} 、 R^{2b} 、 R^{2c} 和 R^{2d} 中的至少一者可以是  , 或其质子化形式,并且 R^{2a} 、 R^{2b} 、 R^{2c} 和 R^{2d} 的其余部分可以是胍或其质子化形式。 R^{2a} 、 R^{2b} 、 R^{2c} 和 R^{2d} 中的至少两者可以是

是  , 或其质子化形式,并且 R^{2a} 、 R^{2b} 、 R^{2c} 和 R^{2d} 的其余部分可以是胍或其质子化形式。

[0253] 所有 R^{2a} 、 R^{2b} 、 R^{2c} 和 R^{2d} 可以是  ,

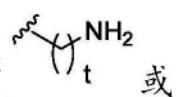
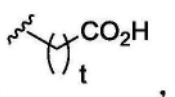


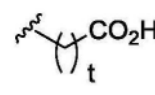
的至少一者可以是  或其质子化形式, 并且R2a、R2b、R2c和R2d的其余部分可以

是胍或其质子化形式。R2a、R2b、R2c和R2d中的至少两者可以是  或其质子化形

式, 并且R2a、R2b、R2c和R2d的其余部分可以是胍或其质子化形式。

[0254] R2a、R2b、R2c和R2d中的每一者可独立地是2,3-二氨基丙酸、2,4-二氨基丁酸、以下酸的侧链: 鸟氨酸、赖氨酸、甲基赖氨酸、二甲基赖氨酸、三甲基赖氨酸、高赖氨酸、丝氨酸、高丝氨酸、苏氨酸、别苏氨酸、组氨酸、1-甲基组氨酸、2-氨基丁酸、天冬氨酸、谷氨酸或高谷氨酸。

[0255] AA_{Sc} 可以是  或  , 其中t可以是0至5的整数。AA_{Sc} 可以是

 , 其中t可以是0至5的整数。t可以是1至5。t是2或3。t可以是2。t可以是3。

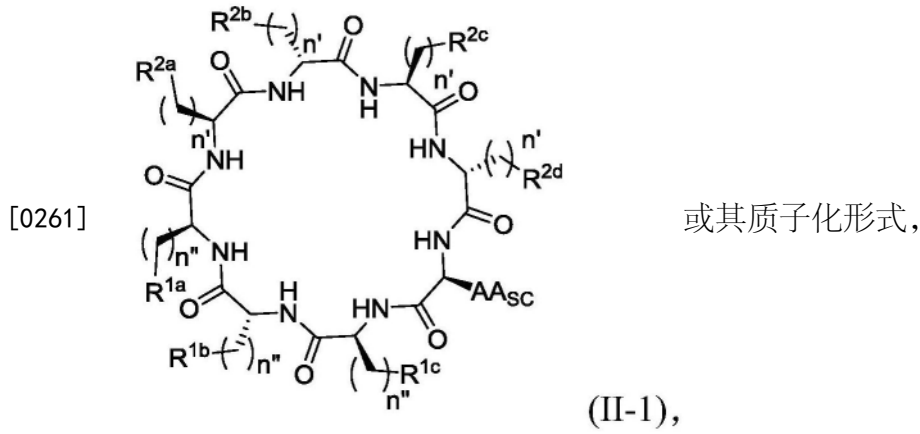
[0256] R^{1a}、R^{1b}和R^{1c}可各自独立地是6至14元芳基。R1a、R1b和R1c可各自独立地是具有一个或多个选自N、O或S的杂原子的6至14元杂芳基。R1a、R1b和R1c可各自独立地选自苯基、萘基、蒽基、吡啶基、喹啉基或异喹啉基。R^{1a}、R^{1b}和R^{1c}可各自独立地选自苯基、萘基或蒽基。R^{1a}、R^{1b}和R^{1c}可各自独立地是苯基或萘基。R^{1a}、R^{1b}和R^{1c}可以是各自独立选择的吡啶基、喹啉基或异喹啉基。

[0257] 每个n'可独立地是1或2。每个n'可以是1。每个n'可以是2。至少一个n'可以是0。至少一个n'可以是1。至少一个n'可以是2。至少一个n'可以是3。至少一个n'可以是4。至少一个n'可以是5。

[0258] 每个n''可独立地是1至3的整数。每个n''可独立地是2或3。每个n''可以是2。每个n''可以是3。至少一个n''可以是0。至少一个n''可以是1。至少一个n''可以是2。至少一个n''可以是3。

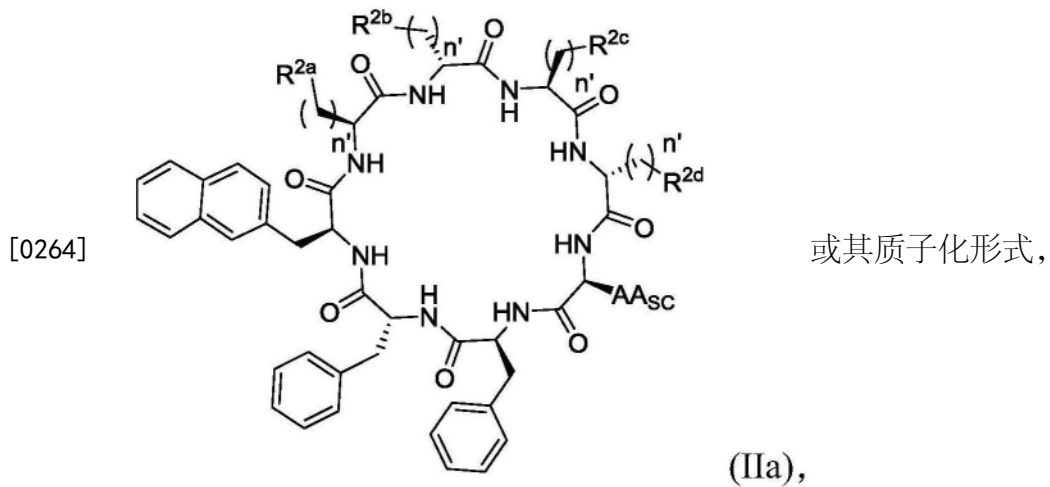
[0259] 每个n''可独立地是1或2, 并且每个n'可独立地是2或3。每个n''可以是1并且每个n'可独立地是2或3。每个n''可以是1并且每个n'可以是2。每个n''是1并且每个n'是3。

[0260] 式(II)的cCPP可具有式(II-1)的结构:



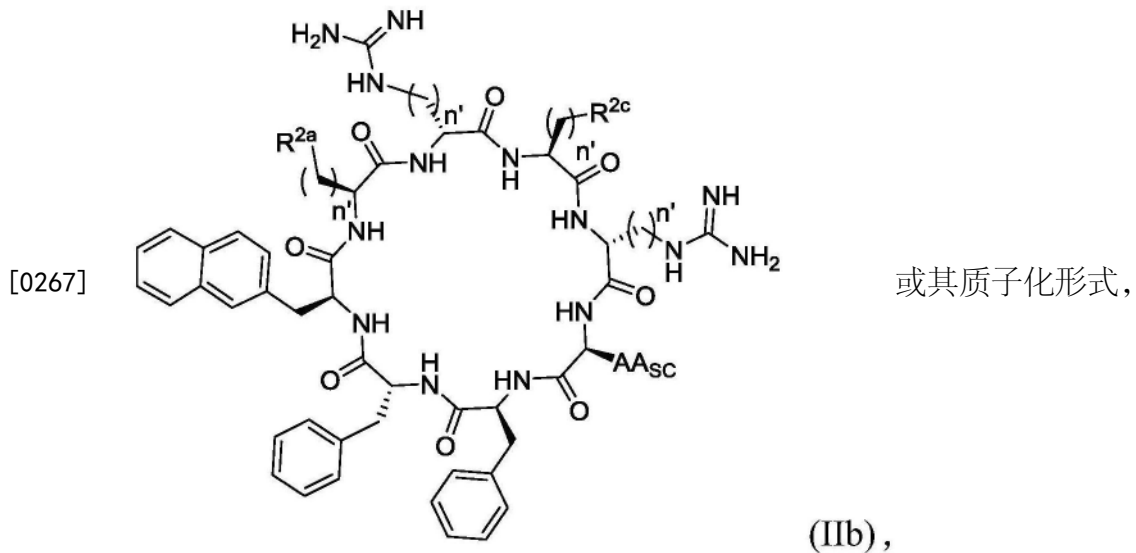
[0262] 其中 R^{1a} 、 R^{1b} 、 R^{1c} 、 R^{2a} 、 R^{2b} 、 R^{2c} 、 R^{2d} 、 AA_{sc} 、 n' 和 n'' 如本文所定义。

[0263] 式(II)的cCPP可具有式(IIa)的结构:



[0265] 其中 R^{1a} 、 R^{1b} 、 R^{1c} 、 R^{2a} 、 R^{2b} 、 R^{2c} 、 R^{2d} 、 AA_{sc} 和 n' 如本文所定义。

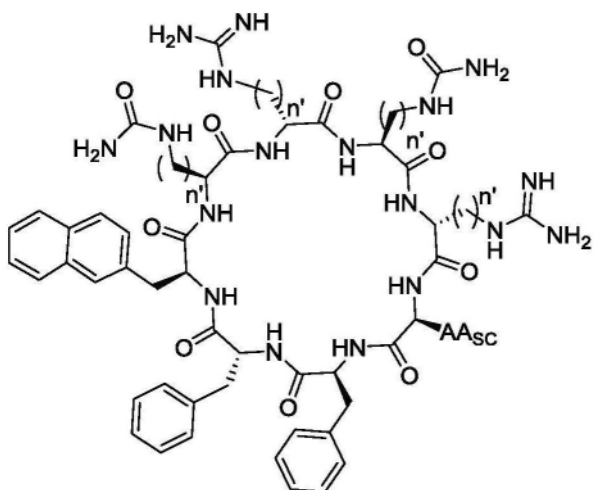
[0266] 式(II)的cCPP可具有式(IIb)的结构:



[0268] 其中 R^{2a} 、 R^{2b} 、 AA_{sc} 和 n' 如本文所定义。

[0269] cCPP可具有式(IIb)的结构:

[0270]

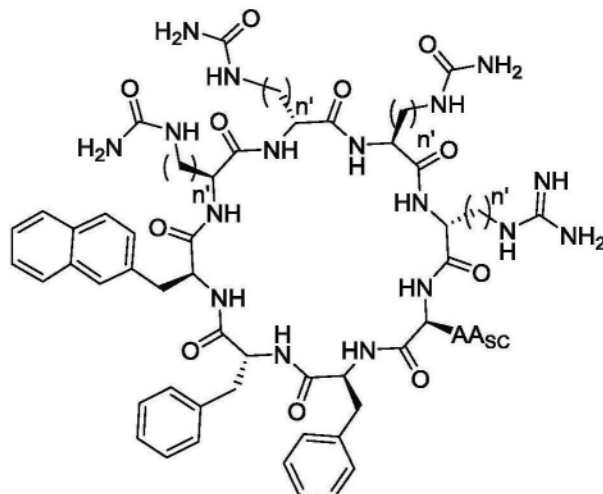


或其质子化形式,其中:

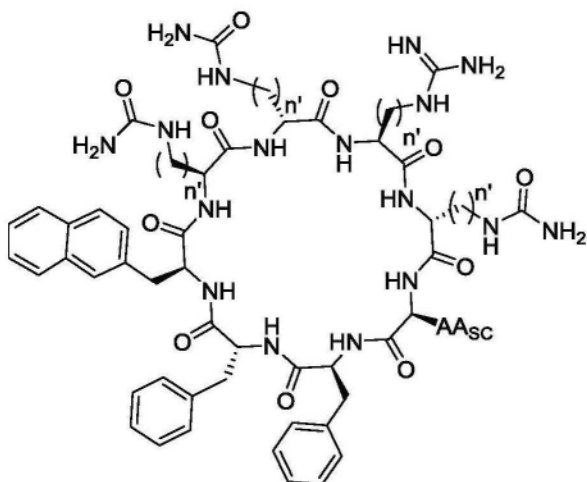
(IIc),

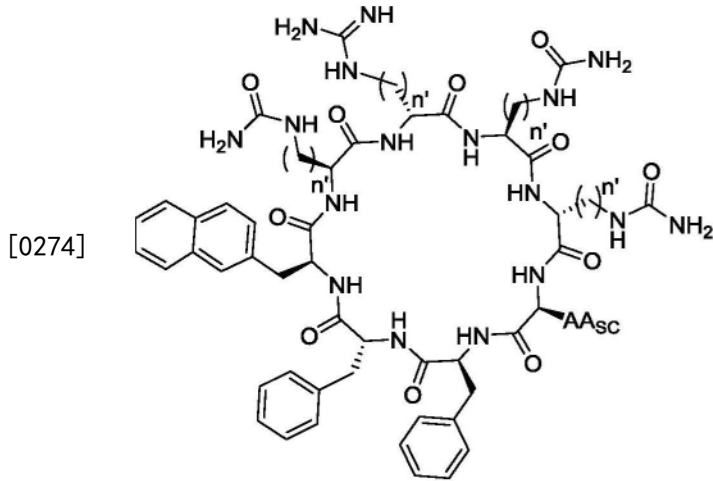
[0271] AA_{sc}和n' 如本文所定义。

[0272] 式(IIa)的cCPP具有以下结构之一:

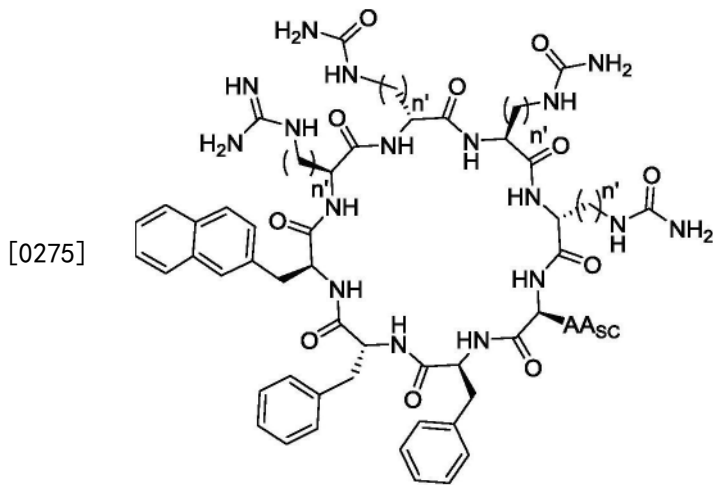


[0273]



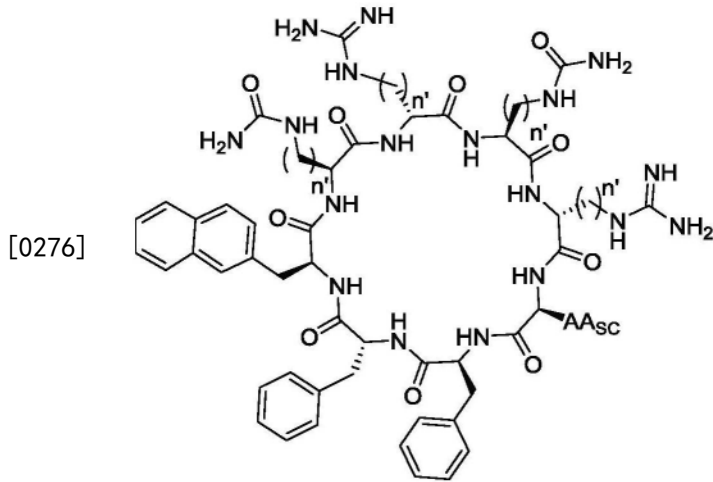


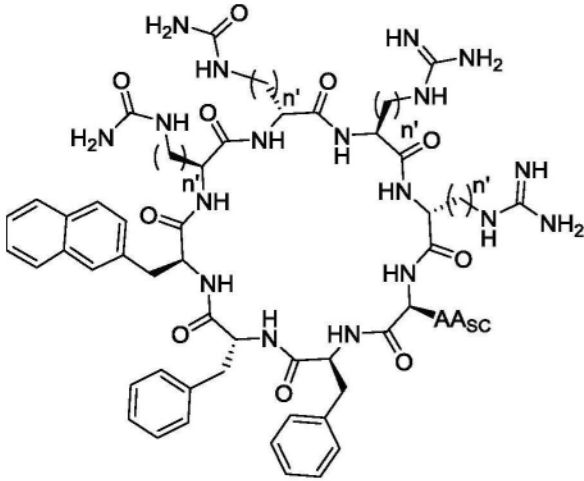
或



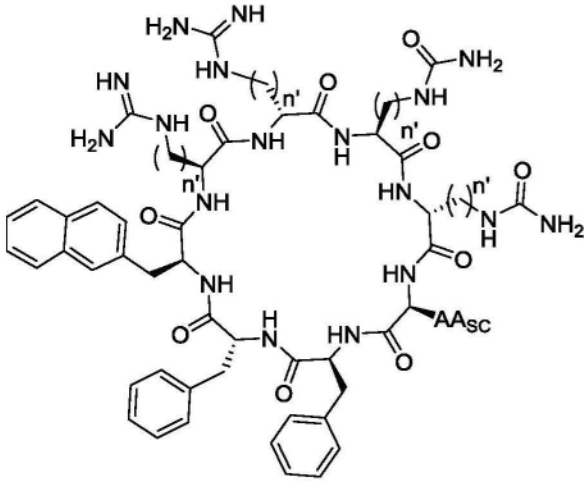
其中AA_{Sc}和n如本文所定义。式(IIa)

的cCPP具有以下结构之一：

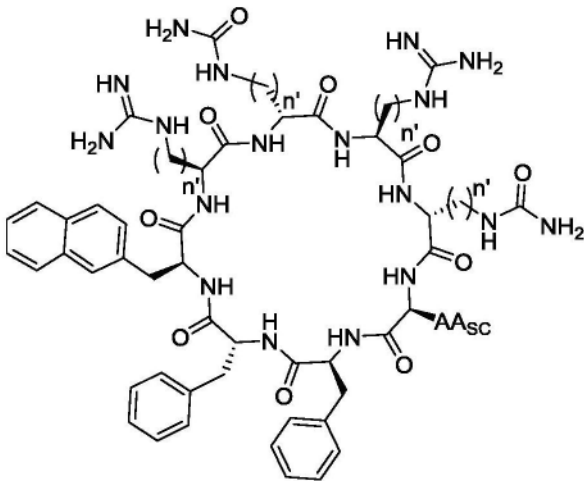




[0277]



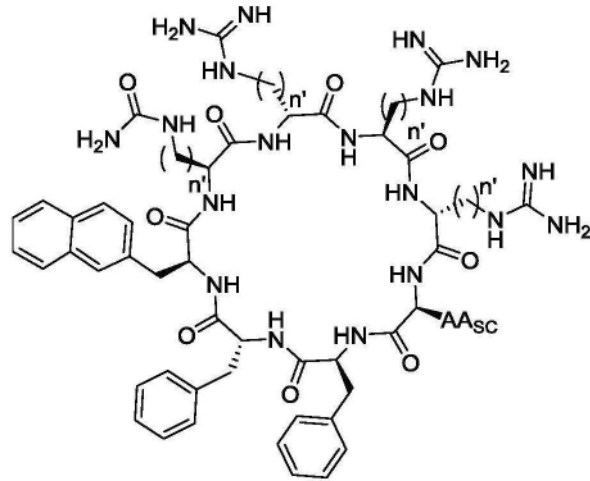
[0278]



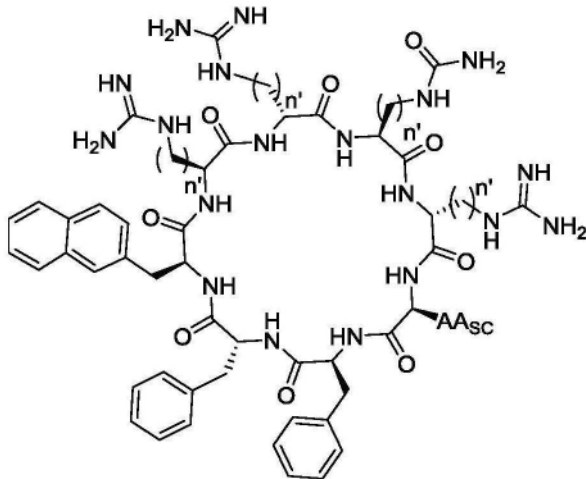
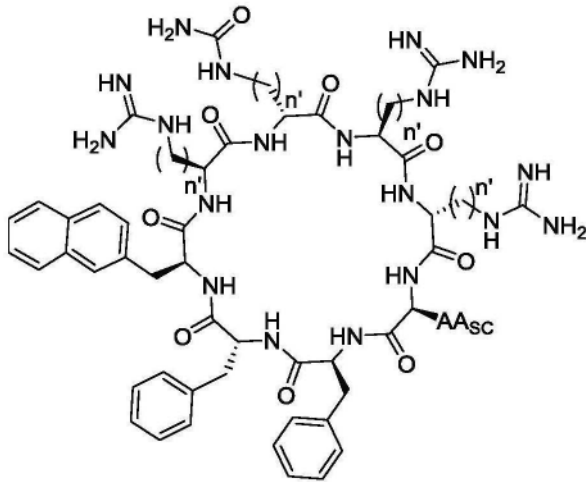
其中AA_{Sc}和n如本文所定义。式(IIa)

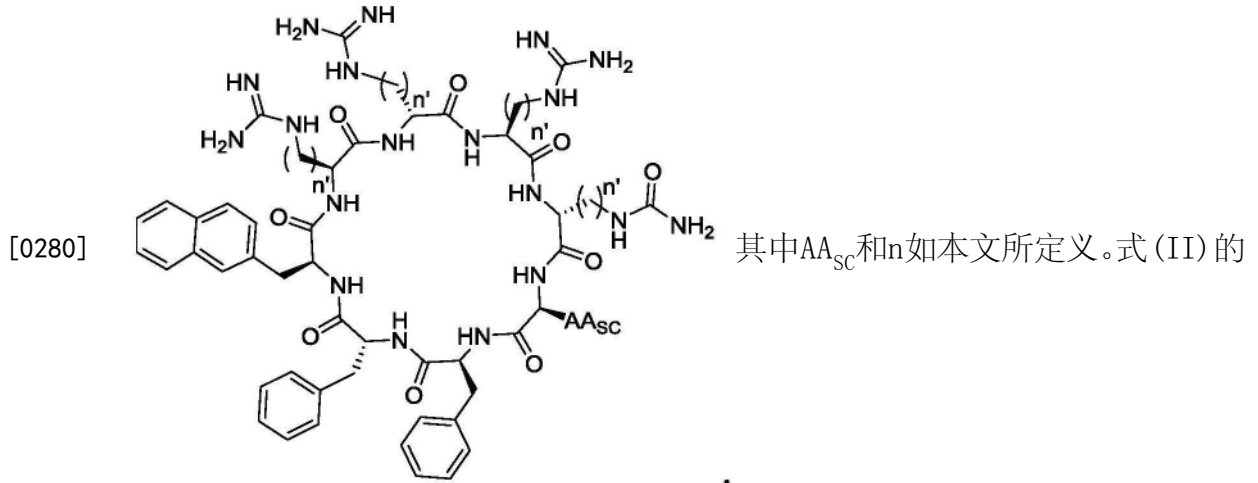
或

的cCPP具有以下结构之一：

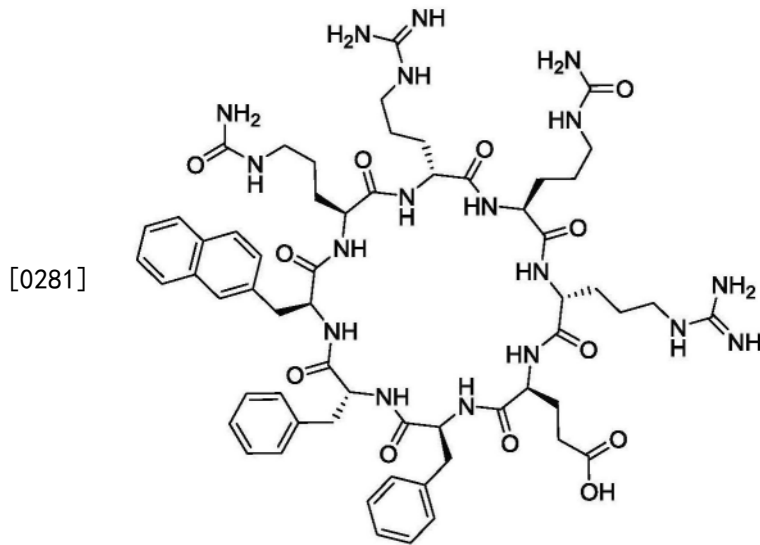


[0279]

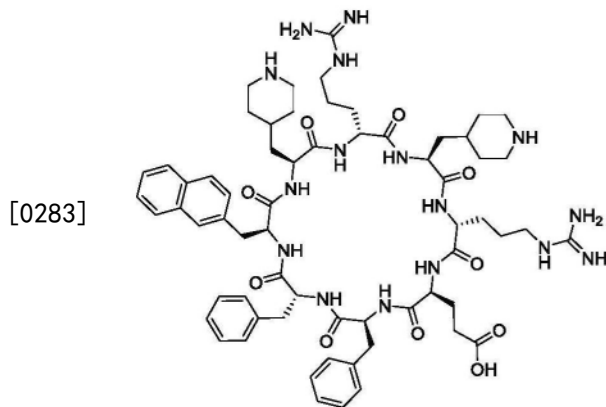




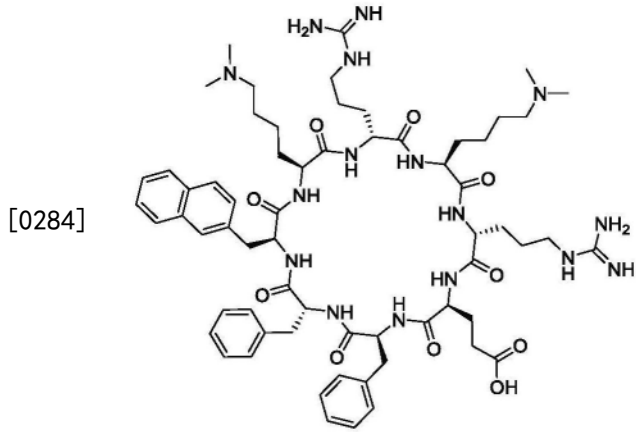
cCPP可具有以下结构:



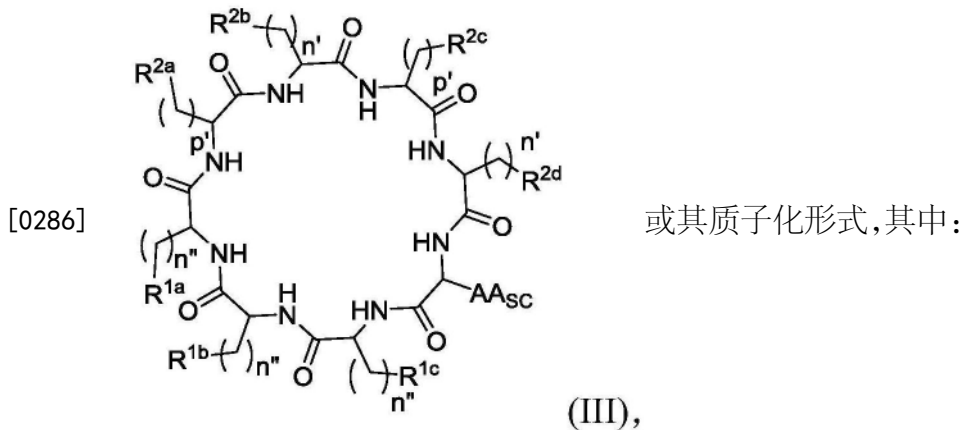
[0282] 式(II)的cCPP可具有以下结构:



或



[0285] cCPP可具有式(III)的结构:



[0287] AA_{Sc}是氨基酸侧链;

[0288] R^{1a}、R^{1b}和R^{1c}各自独立地是6至14元芳基或6至14元杂芳基;

[0289] R^{2a}和R^{2c}各自独立地是H、、、、、

、、 或其质子化形式;

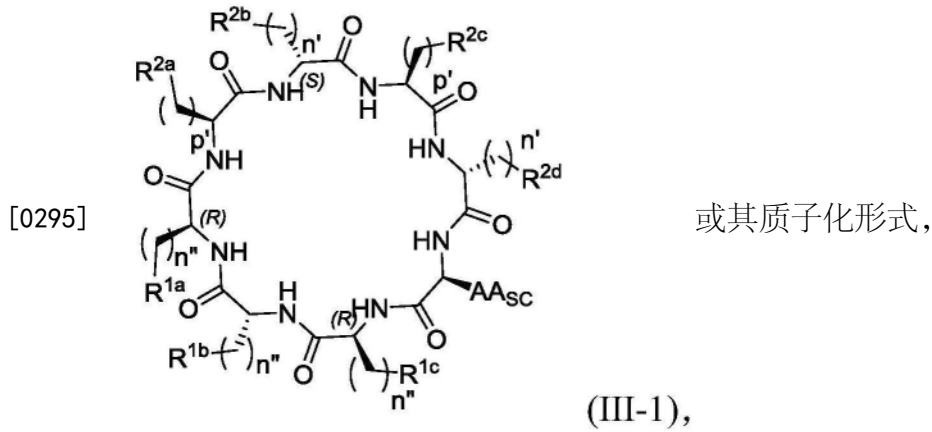
[0290] R^{2b}和R^{2d}各自独立地是胍或其质子化形式;

[0291] 每个n''独立地是1至3的整数;

[0292] 每个n'独立地是1至5的整数;并且

[0293] 每个p'独立地是0至5的整数。

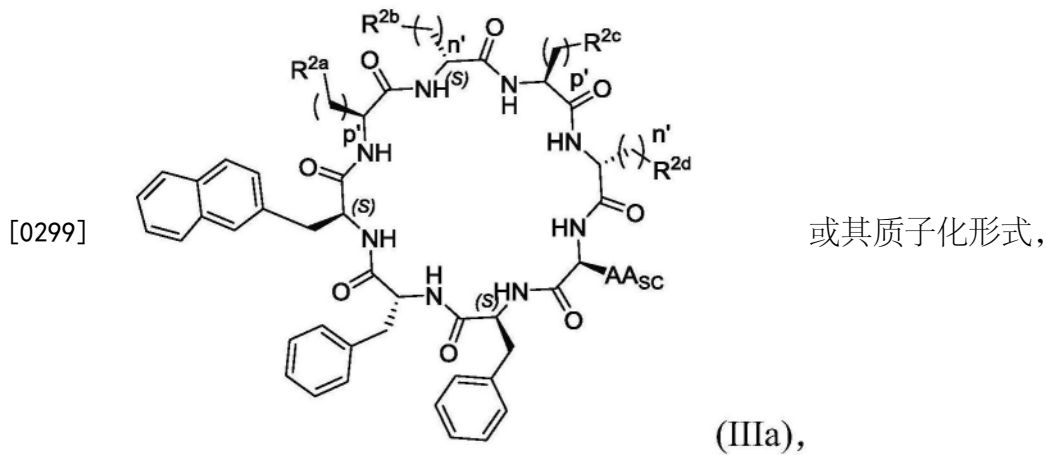
[0294] 式(III)的cCPP可具有式(III-1)的结构:



[0296] 其中:

[0297] AA_{Sc}、R^{1a}、R^{1b}、R^{1c}、R^{2a}、R^{2c}、R^{2b}、R^{2d}、n'、n''和p' 如本文所定义。

[0298] 式(III)的cCPP可具有式(IIIa)的结构:



[0300] 其中:

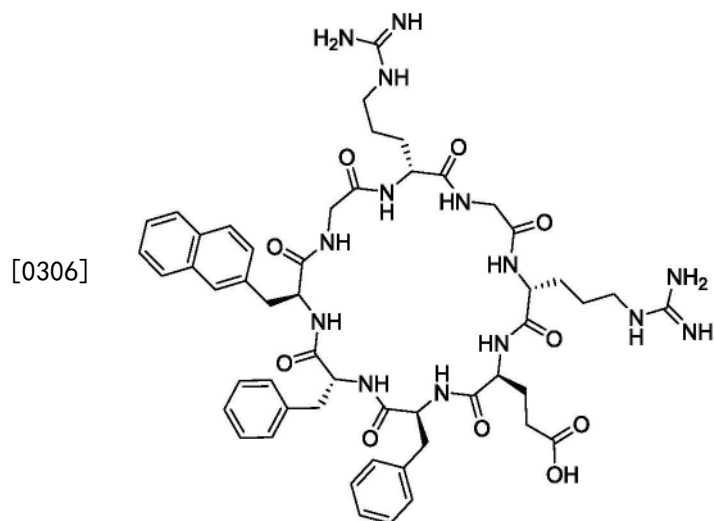
[0301] AA_{Sc}、R^{2a}、R^{2c}、R^{2b}、R^{2d}、n'、n''和p' 如本文所定义。

[0302] 在式(III)、(III-1)和(IIIa)中,R^a和R^c可以是H。R^a和R^c可以是H并且R^b和R^d可各自独立地是胍或其质子化形式。R^a可以是H。R^b可以是H。p' 可以是0。R^a和R^c可以是H并且每个p' 可以是0。

[0303] 在式(III)、(III-1)和(IIIa)中,R^a和R^c可以是H,R^b和R^d可各自独立地是胍或其质子化形式,n''可以是2或3,并且每个p' 可以是0。

[0304] p' 可以是0。p' 可以是1。p' 可以是2。p' 可以是3。p' 可以是4。p' 可以是5

[0305] cCPP可具有以下结构:



[0307] 式(A)的cCPP可选自:

CPP 序列
(FfΦRrRrQ)
(FfΦCit-r-Cit-rQ)
(FfΦGrGrQ)
[0308] (FfFGRGRQ)
(FGFGRGRQ)
(GfFGrGrQ)
(FGFGRRRQ)
(FGFRRRRQ)

[0309] 式(A)的cCPP可选自:

CPP 序列
FΦRRRRQ
fΦRrRrQ
FfΦRrRrQ
FfΦCit-r-Cit-rQ
[0310] FfΦGrGrQ
FfΦRGRGQ
FfFGRGRQ
FGFGRGRQ
GfFGrGrQ
FGFGRRRQ
FGFRRRRQ

[0311] 在实施方案中,cCPP选自:

CPP 序列		
FΦRRRQ	RRFRΦRQ	FΦRRRRQK
FΦRRRC	FRRRRΦQ	FΦRRRRQC
FΦRRRU	rRFRΦRQ	FΦRrRrRQ
RRRΦFQ	RRΦFRRQ	FΦRRRRRQ
[0312] RRRRΦF	CRRRRFWQ	RRRRΦFDΩC
FΦRRRR	FfΦRrRrQ	FΦRRR
FφrRrRq	FFΦRRRRQ	FWRRR
FφrRrRQ	RFRFRΦRQ	RRRΦF
FΦRRRRQ	URRRRFWQ	RRRWF
fΦRrRrQ	CRRRRFWQ	

[0313] Φ = L-萘基丙氨酸; φ = D-萘基丙氨酸; Ω = L-正亮氨酸

[0314] AA_{sc}可与接头缀合。

[0315] 接头

[0316] 本公开的cCPP可与接头缀合。接头可将货物连接到cCPP。接头可附接到cCPP的氨基酸的侧链,并且货物可附接在接头上的合适位置处。

[0317] 接头可以是任何合适的部分,其可将cCPP与一个或多个附加部分(例如环外肽(EP)和/或货物)缀合。在与cCPP和一个或多个附加部分缀合之前,接头具有两个或更多个官能团,它们各自能够独立地与cCPP和一个或多个附加部分形成共价键。如果货物是寡核苷酸,则接头可共价结合到货物的5'端或货物的3'端。接头可共价结合到货物的5'端。接头可共价结合到货物的3'端。如果货物是肽,则接头可共价结合到货物的N-末端或C-末端。接头可共价结合到寡核苷酸或肽货物的主链。接头可以是本文所述的cCPP缀合至货物(诸如,寡核苷酸、肽或小分子)的任何适当部分。

[0318] 接头可包括烃接头。

[0319] 接头可包含切割位点。切割位点可以是二硫化物或胱天蛋白酶切割位点(例如, Val-Cit-PABC)。

[0320] 接头可包含:(i)一个或多个D或L氨基酸,它们各自任选地被取代;(ii)任选取代的亚烷基;(iii)任选取代的亚烯基;(iv)任选取代的亚炔基;(v)任选取代的碳环基;(vi)任选取代的杂环基;(vii)一个或多个 $-(R^1-J-R^2)z^-$ 亚基,其中 R^1 和 R^2 在每种情况下各自独立地选自亚烷基、亚烯基、亚炔基、碳环基和杂环基,每个J独立地是C、 NR^3 、 $-NR^3C(O)-$ 、S和O,其中 R^3 独立地选自H、烷基、烯基、炔基、碳环基和杂环基,它们各自任选地被取代,并且 z^- 是1至50的整数;(viii) $-(R^1-J)z^-$ 或 $-(J-R^1)z^-$,其中 R^1 在每种情况下各自独立地是亚烷基、亚烯基、亚炔基、碳环基或杂环基,每个J独立地是C、 NR^3 、 $-NR^3C(O)-$ 、S或O,其中 R^3 是H、烷基、烯基、炔基、碳环基或杂环基,它们各自任选地被取代,并且 z^- 是1至50的整数;或(ix)接头可包含(i)至(x)中的一者或多者。

[0321] 接头可包含一个或多个D或L氨基酸和/或 $-(R^1-J-R^2)z^-$,其中 R^1 和 R^2 在每种情况下各自独立地是亚烷基,每个J独立地是C、 NR^3 、 $-NR^3C(O)-$ 、S和O,其中 R^4 独立地选自H和烷基,并且 z^- 是1至50的整数;或它们的组合。

[0322] 接头可包含 $-(OCH_2CH_2)_z-$ (例如,作为间隔区),其中 z' 是1至23的整数,例如2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22或23。“ $-(OCH_2CH_2)z'$ ”也可称为

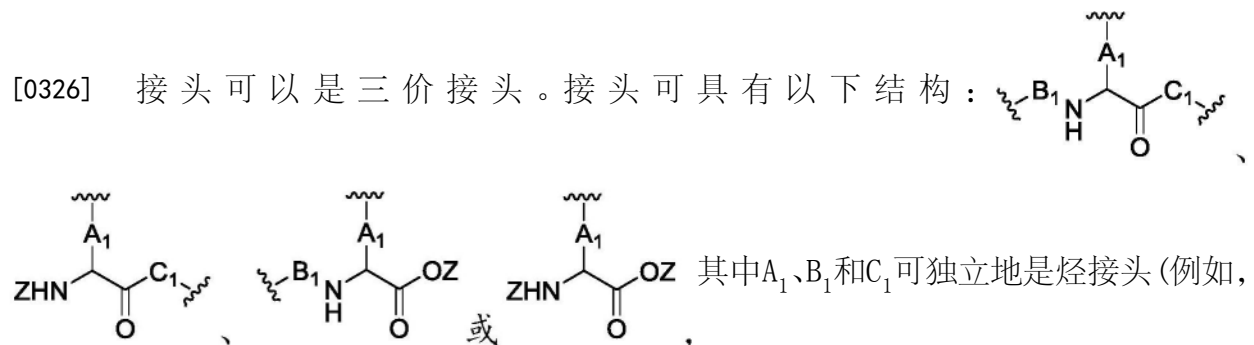
聚乙二醇 (PEG)。

[0323] 接头可包含一个或多个氨基酸。接头可包含肽。接头可包含 $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_z-$ 和肽, 其中 z' 是 1 至 23 的整数。肽可包含 2 至 10 个氨基酸。接头还可包含能够通过点击化学反应的官能团 (FG)。FG 可以是叠氮化物或炔, 并且当货物与接头缀合时形成三唑。

[0324] 接头可包含 (i) β -丙氨酸残基和赖氨酸残基; (ii) $-(\text{J}-\text{R}^1)_z$; 或 (iii) 它们的组合。每个 R^1 可独立地是亚烷基、亚烯基、亚炔基、碳环基或杂环基, 每个 J 独立地是 C、 NR^3 、 $-\text{NR}^3\text{C}(\text{O})-$ 、S 或 O, 其中 R^3 是 H、烷基、烯基、炔基、碳环基或杂环基, 它们各自任选地被取代, 并且 z 可以是 1 至 50 的整数。每个 R^1 可以是亚烷基并且每个 J 可以是 O。

[0325] 接头可包含 (i) β -丙氨酸、甘氨酸、赖氨酸、4-氨基丁酸、5-氨基戊酸、6-氨基己酸或它们的组合的残基; 和 (ii) $-(\text{R}^1-\text{J})_z$ 或 $-(\text{J}-\text{R}^1)_z$ 。每个 R^1 可独立地是亚烷基、亚烯基、亚炔基、碳环基或杂环基, 每个 J 独立地是 C、 NR^3 、 $-\text{NR}^3\text{C}(\text{O})-$ 、S 或 O, 其中 R^3 是 H、烷基、烯基、炔基、碳环基或杂环基, 它们各自任选地被取代, 并且 z 可以是 1 至 50 的整数。每个 R^1 可以是亚烷基并且每个 J 可以是 O。接头可包含甘氨酸、 β -丙氨酸、4-氨基丁酸、5-氨基戊酸、6-氨基己酸或它们的组合。

[0326] 接头可以是三价接头。接头可具有以下结构:



$\text{NRH}-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$)、PEG 接头 (例如, $\text{NRH}-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$, 其中 R 是 H、甲基或乙基) 或一个或多个氨基酸残基, 并且 Z 独立地是保护基团。接头还可掺入切割位点, 包括二硫化物 [$\text{NH}_2-(\text{CH}_2\text{O})_n-\text{S}-\text{S}-(\text{CH}_2\text{O})_n-\text{COOH}$] 或胰凝乳蛋白酶切割位点 (Val-Cit-PABC)。

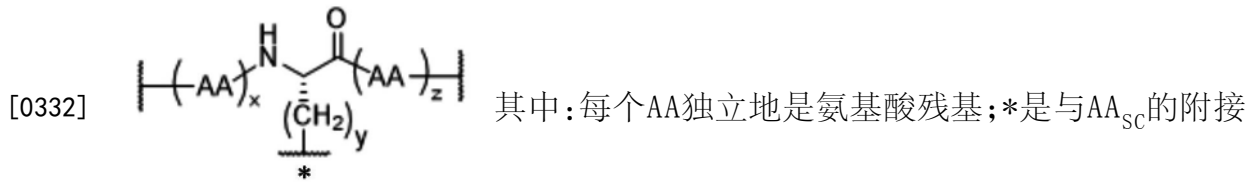
[0327] 烃可以是甘氨酸或 β -丙氨酸的残基。

[0328] 接头可以是二价的并且将 cCPP 连接到货物。接头可以是二价的并且将 cCPP 连接到环外肽 (EP)。

[0329] 接头可以是三价的并且将 cCPP 连接到货物和 EP。

[0330] 接头可以是二价或三价 C_1-C_{50} 亚烷基, 其中 1-25 个亚甲基基团任选地且独立地被 $-\text{N}(\text{H})-$ 、 $-\text{N}(\text{C}_1-\text{C}_4\text{烷基})-$ 、 $-\text{N}(\text{环烷基})-$ 、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{C}(\text{O})-$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{S}(\text{O})-$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2-$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2\text{N}(\text{C}_1-\text{C}_4\text{烷基})-$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2\text{N}(\text{环烷基})-$ 、 $-\text{N}(\text{H})\text{C}(\text{O})-$ 、 $-\text{N}(\text{C}_1-\text{C}_4\text{烷基})\text{C}(\text{O})-$ 、 $-\text{N}(\text{环烷基})\text{C}(\text{O})-$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{H})-$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{C}_1-\text{C}_4\text{烷基})-$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{环烷基})-$ 、芳基、杂环基、杂芳基、环烷基或环烯基替换。接头可以是二价或三价 C_1-C_{50} 亚烷基, 其中 1-25 个亚甲基基团任选地且独立地被 $-\text{N}(\text{H})-$ 、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{H})-$ 或它们的组合替换。

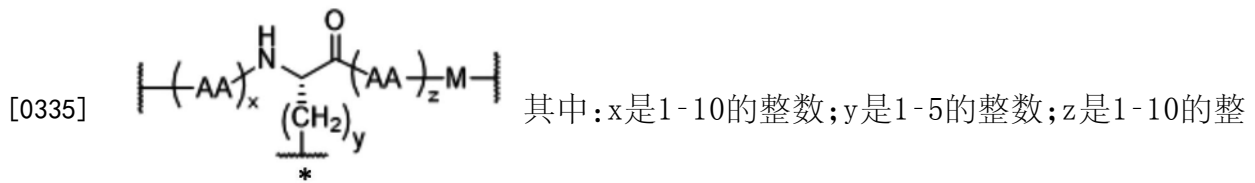
[0331] 接头可具有以下结构:



点,并且AA_{sc}是cCPP的氨基酸残基的侧链;x是1-10的整数;y是1-5的整数;并且z是1-10的整数。x可以是1-5的整数。x可以是1-3的整数。x可以是1。y可以是2-4的整数。y可以是4。z可以是1-5的整数。z可以是1-3的整数。z可以是1。每个AA可独立地选自甘氨酸、β-丙氨酸、4-氨基丁酸、5-氨基戊酸和6-氨基己酸。

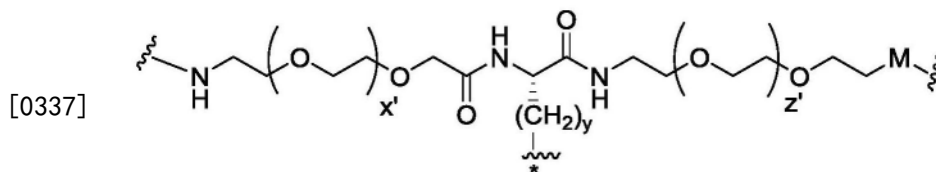
[0333] cCPP可通过接头(“L”)附接到货物。接头可通过结合基团(“M”)与货物缀合。

[0334] 接头可具有以下结构:



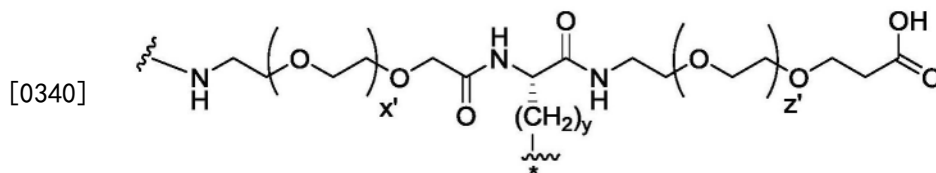
数;每个AA独立地是氨基酸残基;*是与AA_{sc}的附接点,并且AA_{sc}是cCPP的氨基酸残基的侧链;并且M是本文所定义的结合基团。

[0336] 接头可具有以下结构:



[0338] 其中:x'是1-23的整数;y是1-5的整数;z'是1-23的整数;*是与AA_{sc}的附接点,并且AA_{sc}是cCPP的氨基酸残基的侧链;并且M是本文所定义的结合基团。

[0339] 接头可具有以下结构:



[0341] 其中:x'是1-23的整数;y是1-5的整数;并且z'是1-23的整数;*是与AA_{sc}的附接点,并且AA_{sc}是cCPP的氨基酸残基的侧链。

[0342] x可以是1-10的整数,例如1、2、3、4、5、6、7、8、9或10,包括其间的所有范围和子范围。

[0343] x'可以是1-23的整数,例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22或23,包括其间的所有范围和子范围。x'可以是5-15的整数。x'可以是9-13的整数。x'可以是1-5的整数。x'可以是1。

[0344] y可以是1-5的整数,例如1、2、3、4或5,包括其间的所有范围和子范围。y可以是2-5的整数。y可以是3-5的整数。y可以是3或4。y可以是4或5。y可以是3。y可以是4。y可以是5。

[0345] z可以是1-10的整数,例如1、2、3、4、5、6、7、8、9或10,包括其间的所有范围和子范围。

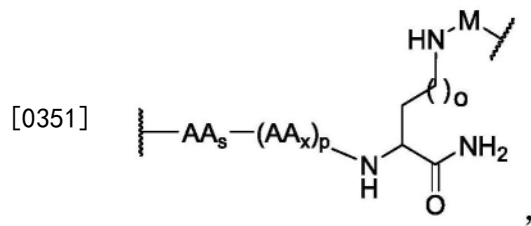
[0346] z'可以是1-23的整数,例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22或23,包括其间的所有范围和子范围。z'可以是5-15的整数。z'可以是9-13的整数。z'可以是11。

[0347] 如上所讨论,接头或M(其中M是接头的一部分)可共价结合到货物(货物上的任何合适的位置)。接头或M(其中M是接头的一部分)可共价结合到寡核苷酸货物的3'端或寡核苷酸货物的5'端。接头或M(其中M是接头的一部分)可共价结合到肽货物的N-末端或C-末端。接头或M(其中M是接头的一部分)可共价结合到寡核苷酸或肽货物的主链。

[0348] 接头可结合到cCPP上的天冬氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺或赖氨酸的侧链,或者谷氨酰胺或天冬酰胺的修饰侧链(例如,具有氨基基团的还原侧链)。接头可结合到cCPP上的赖氨酸的侧链。

[0349] 接头可结合到肽货物上的天冬氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺或赖氨酸的侧链,或者谷氨酰胺或天冬酰胺的修饰侧链(例如,具有氨基基团的还原侧链)。接头可结合到肽货物上的赖氨酸的侧链。

[0350] 接头可具有以下结构:



[0352] 其中

[0353] M是将L缀合到货物例如寡核苷酸的基团;

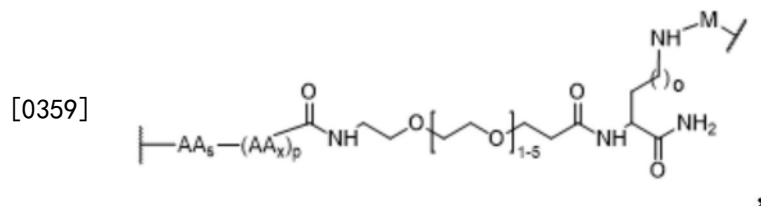
[0354] AA_s是cCPP上的氨基酸的侧链或末端;

[0355] 每个AA_x独立地是氨基酸残基;

[0356] o是0至10的整数;并且

[0357] p是0至5的整数。

[0358] 接头可具有以下结构:



[0360] 其中

[0361] M是将L缀合到货物例如寡核苷酸的基团;

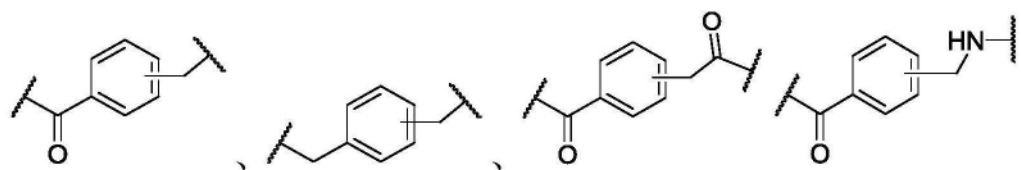
[0362] AA_s是cCPP上的氨基酸的侧链或末端;

[0363] 每个AA_x独立地是氨基酸残基;

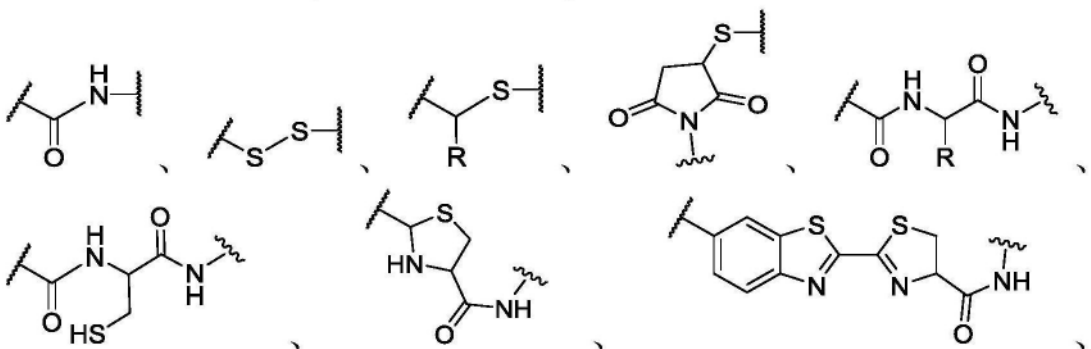
[0364] o是0至10的整数;并且

[0365] p是0至5的整数。

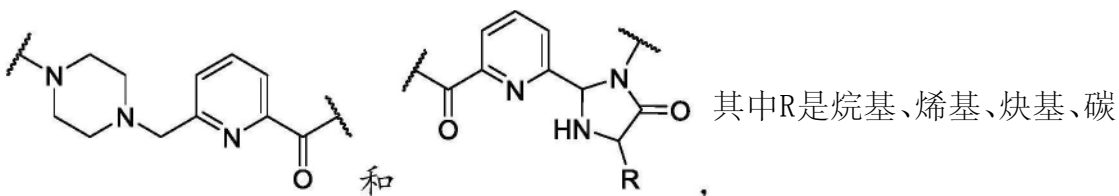
[0366] M可包括亚烷基、亚烯基、亚炔基、碳环基或杂环基,它们各自任选地被取代。M选自:



[0367]

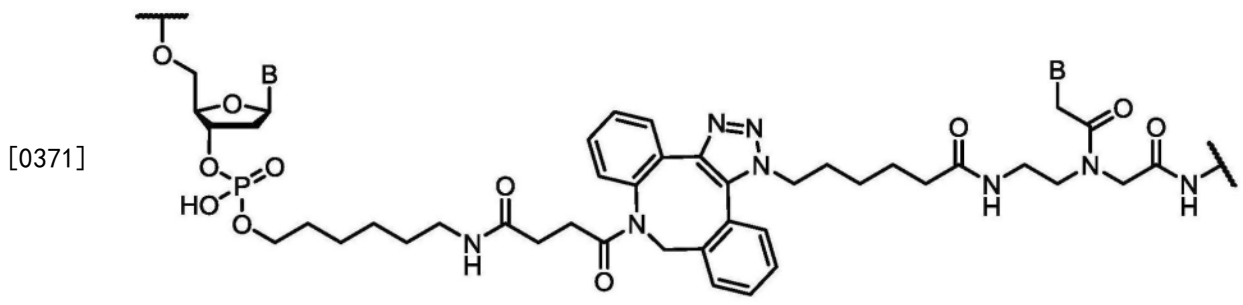
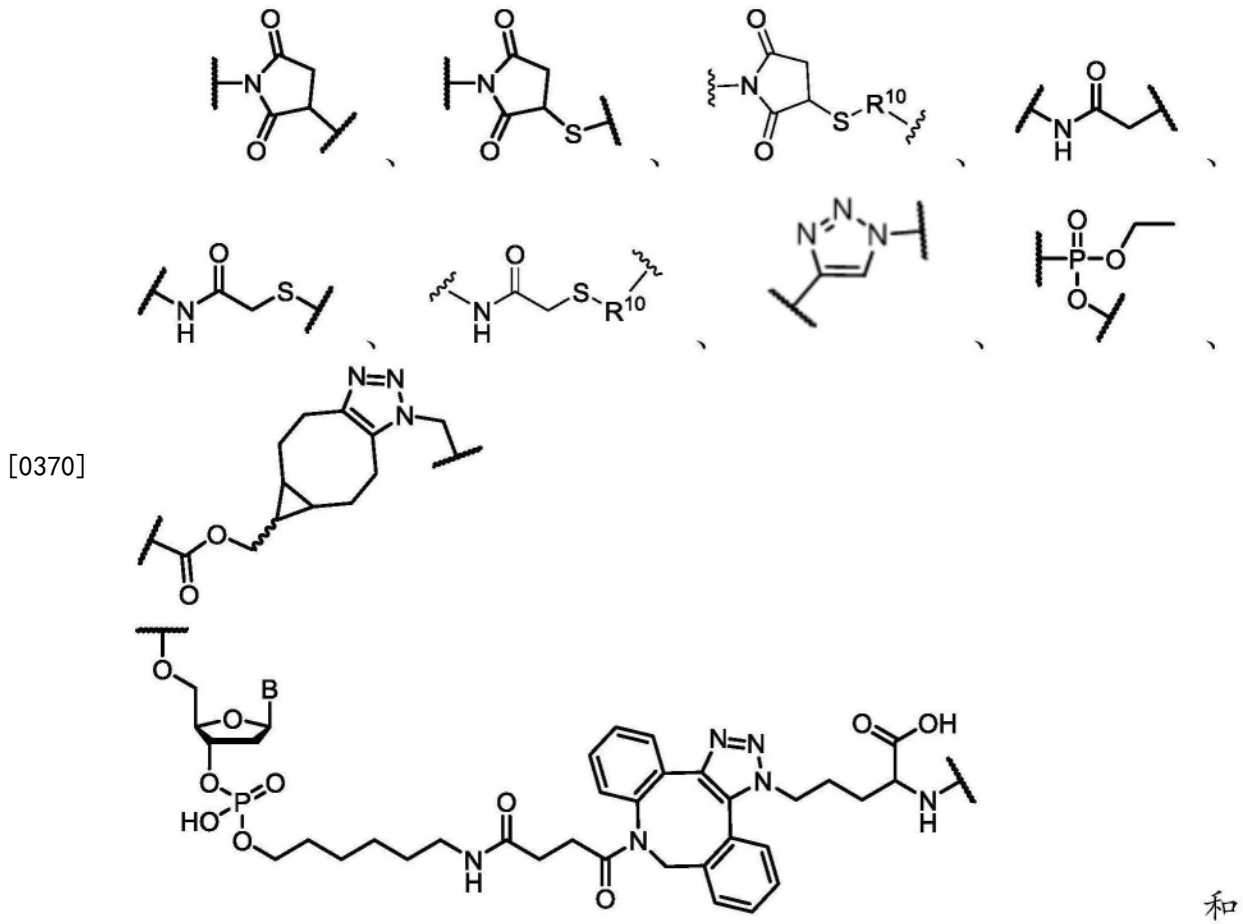


[0368]



环基或杂环基。

[0369] M选自:



[0372] 其中:R¹⁰是亚烷基、环烷基或 其中a是0至10。

[0373] M可以是 R¹⁰可以是 并且a是0至10。M可以是 。

[0374] M可以是异双官能交联剂,例如 其公开于Williams等人

Curr.Protoc Nucleic Acid Chem.2010,42,4.41.1-4.41.20中,所述文献的全文以引用方式并入本文。

[0375] M可以是-C(O)-。

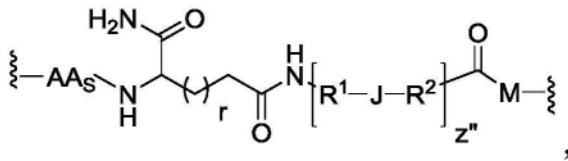
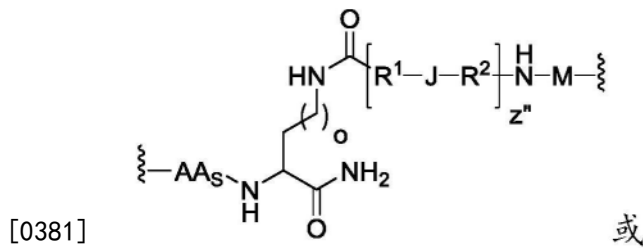
[0376] AA_s可以是cCPP上的氨基酸的侧链或末端。AA_s的非限制性实例包括天冬氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺或赖氨酸,或谷氨酰胺或天冬酰胺的修饰侧链(例如,具有氨基基团的还原侧链)。AA_s可以是如本文所定义的AA_{SC}。

[0377] 每个AA_x独立地是天然或非天然氨基酸。一个或多个AAX可以是天然氨基酸。一个或多个AAX可以是非天然氨基酸。一个或多个AAX可以是β-氨基酸。β-氨基酸可以是β-丙氨酸。

[0378] o可以是0至10的整数,例如0、1、2、3、4、5、6、7、8、9和10。o可以是0、1、2或3。o可以是0。o可以是1。o可以是2。o可以是3。

[0379] p可以是0至5,例如0、1、2、3、4或5。p可以是0。p可以是1。p可以是2。p可以是3。p可以是4。p可以是5。

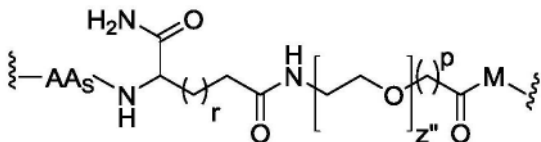
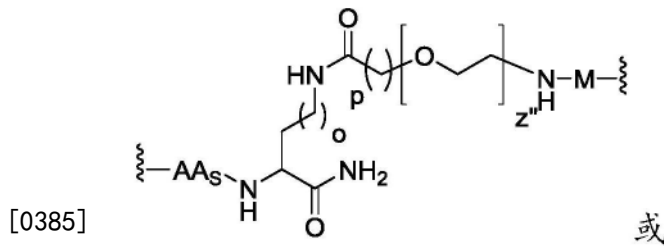
[0380] 接头可具有以下结构:



[0382] 其中M、AA_s、每个-(R¹-J-R²)z''、o和z''如本文所定义;r可以是0或1。

[0383] r可以是0。r可以是1。

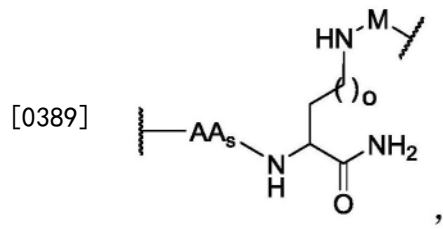
[0384] 接头可具有以下结构:



[0386] 其中M、AA_s、o、p、q、r和z''各自可如本文所定义。

[0387] z''可以是1至50的整数,例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49和50,包括其间的所有范围和值。z''可以是5-20的整数。z''可以是10-15的整数。

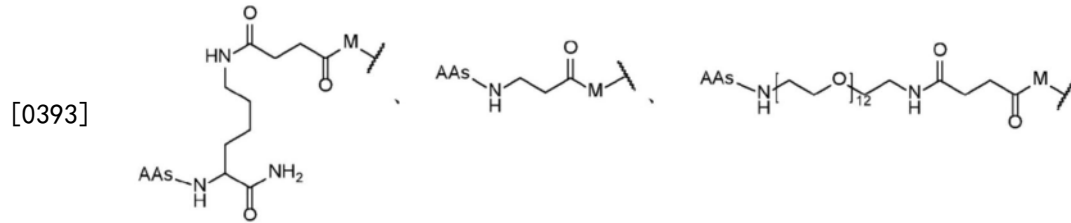
[0388] 接头可具有以下结构：

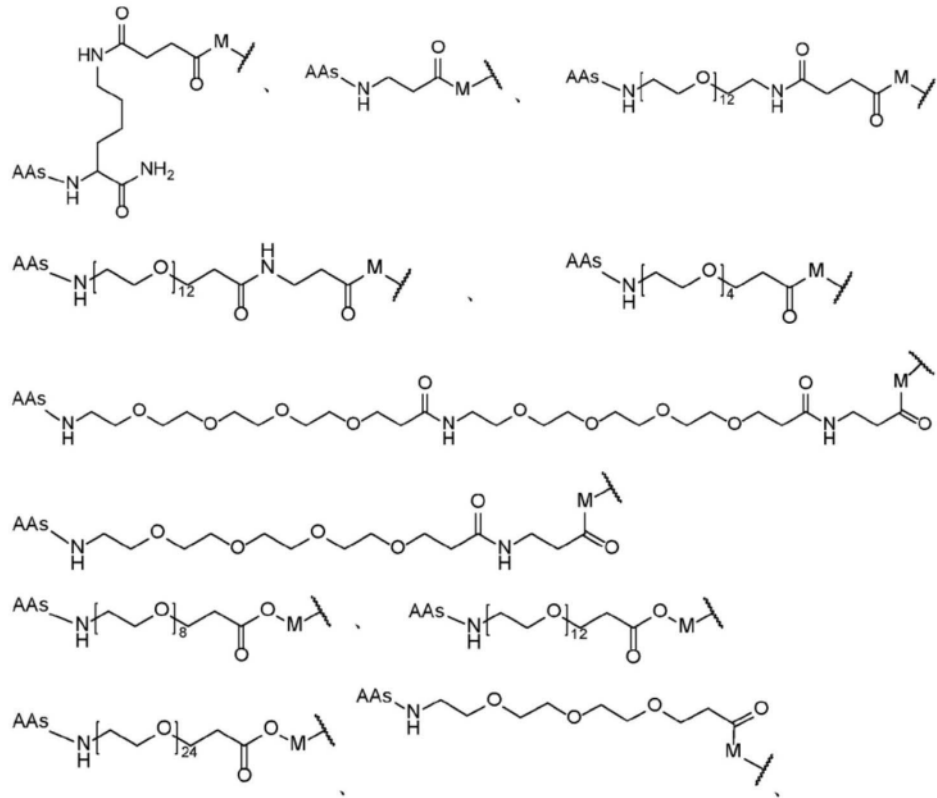


[0390] 其中：

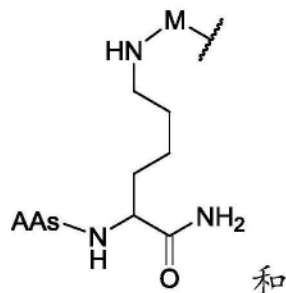
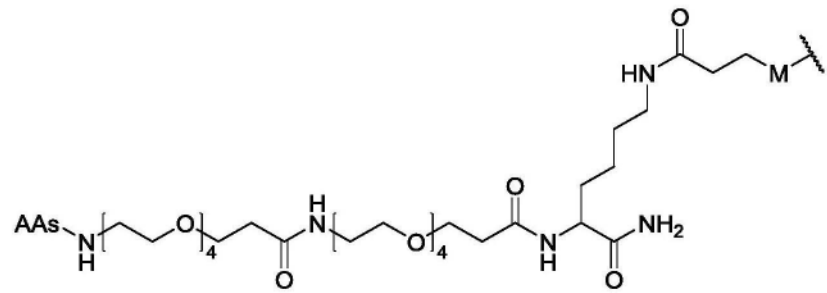
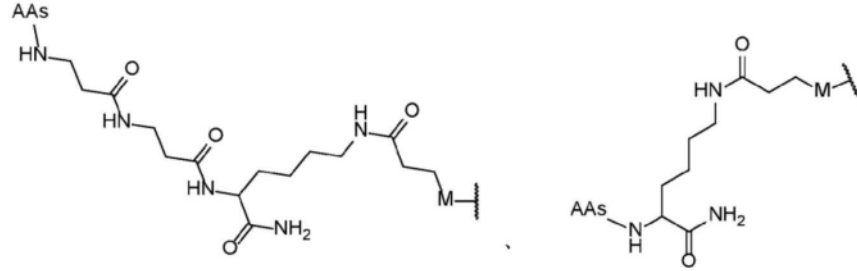
[0391] M、AA_s和o如本文所定义。

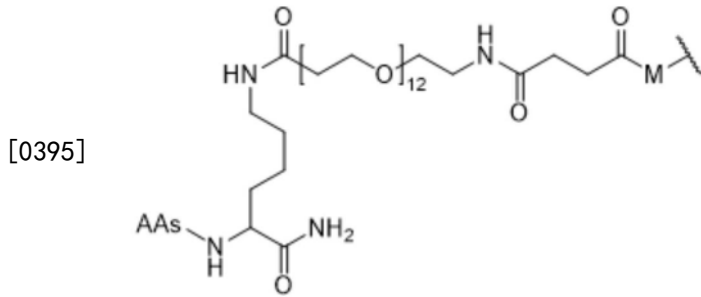
[0392] 合适接头的其他非限制性实例包括：





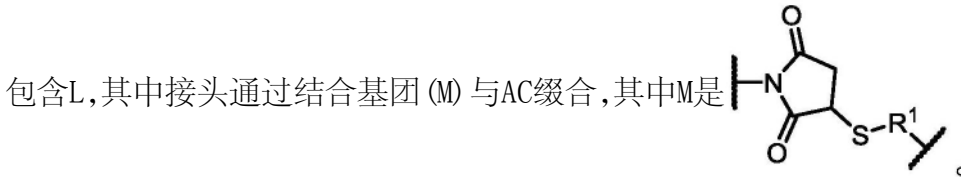
[0394]



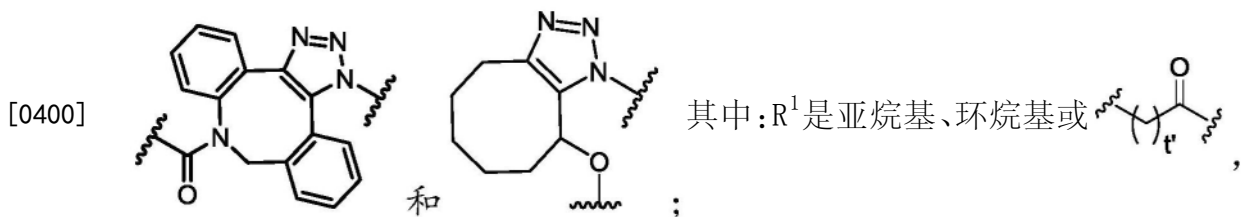
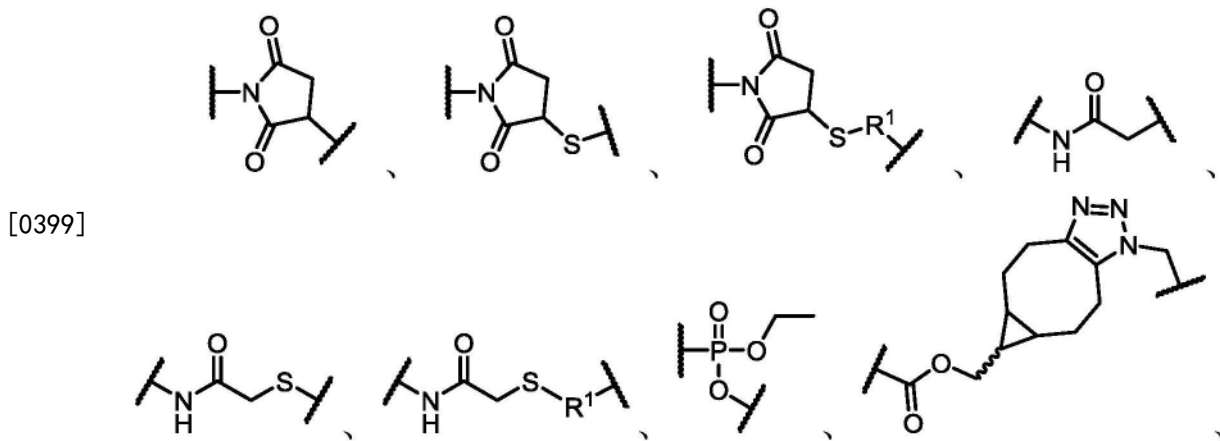


[0396] 其中M和AA_s如本文所定义。

[0397] 本文提供了包含cCPP和与前一mRNA序列中的靶标互补的AC的化合物,所述化合物还



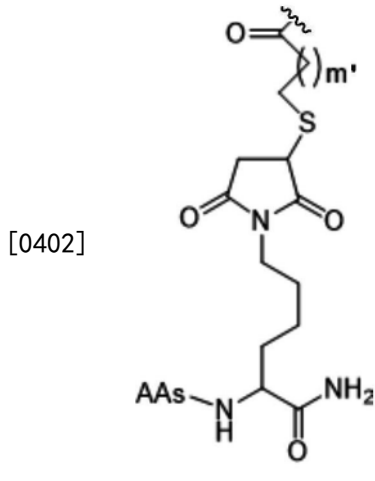
[0398] 本文提供了包含cCPP和货物的化合物,所述货物包含反义化合物(AC)例如反义寡核苷酸,所述反义化合物与前一mRNA序列中的靶标互补,其中所述化合物还包含L,其中接头通过结合基团(M)与AC缀合,其中M选自:



其中t' 是0至10,其中每个R独立地是烷基、烯基、炔基、碳环基或杂环基,其中R¹是

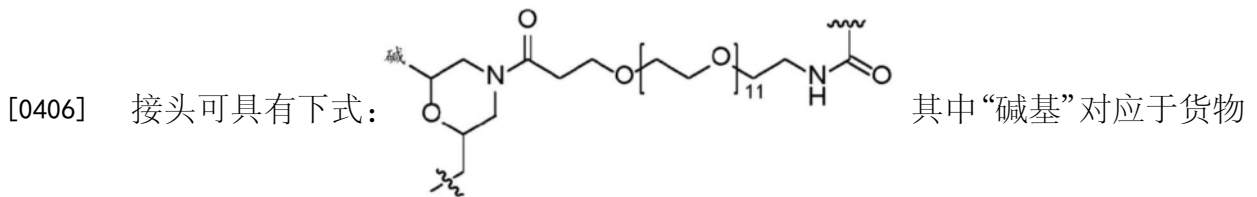
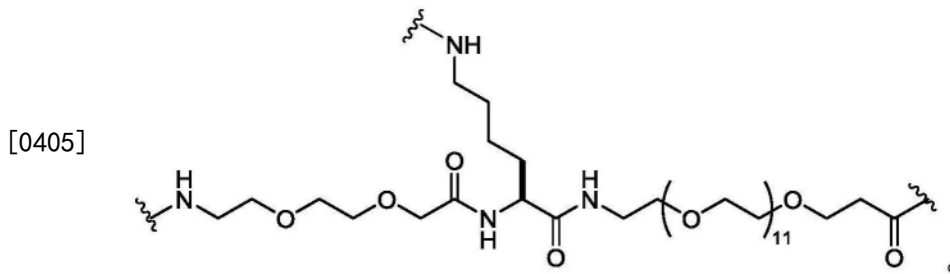


[0401] 接头可具有以下结构:



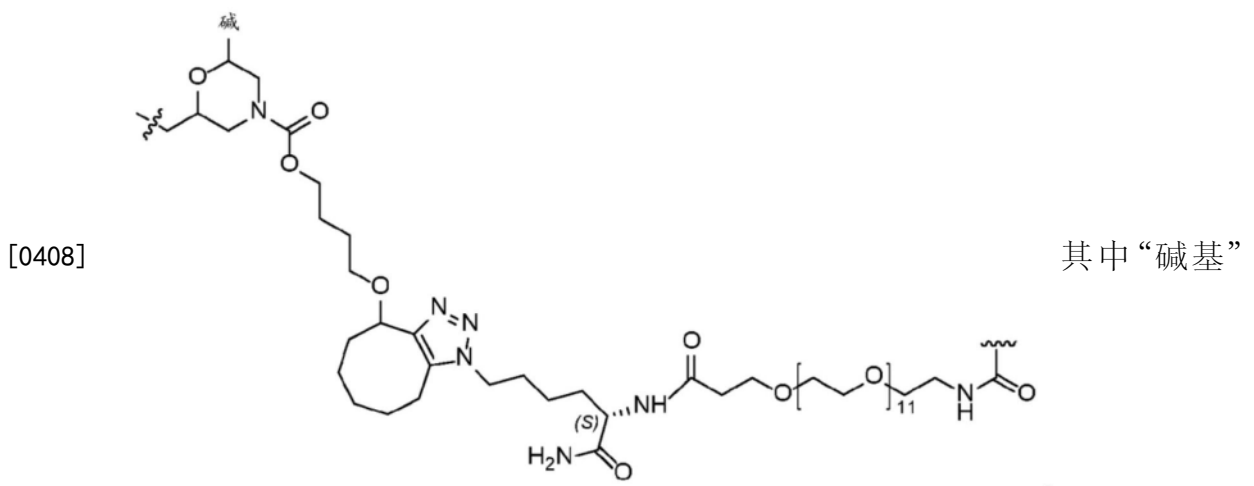
[0403] 其中AA_s如本文所定义,并且m'是0-10。

[0404] 接头可具有下式:



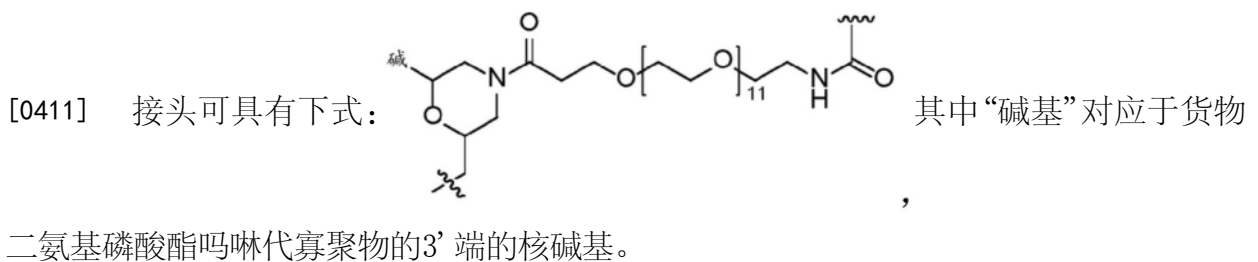
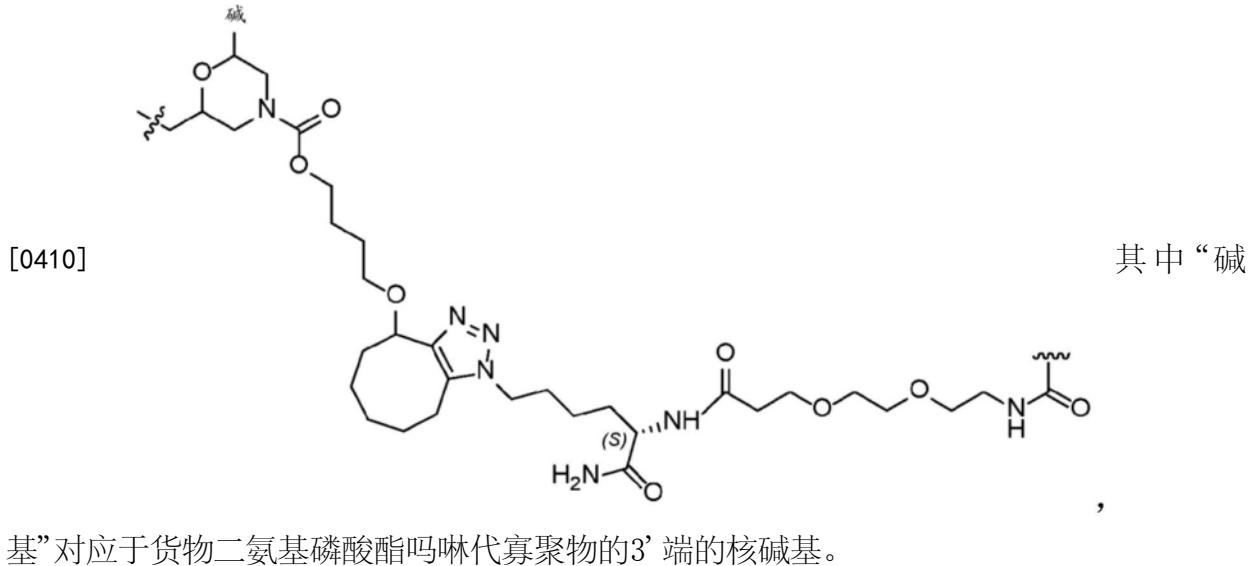
二氨基磷酸酯吗啉代寡聚物的3'端的核碱基。

[0407] 接头可具有下式:

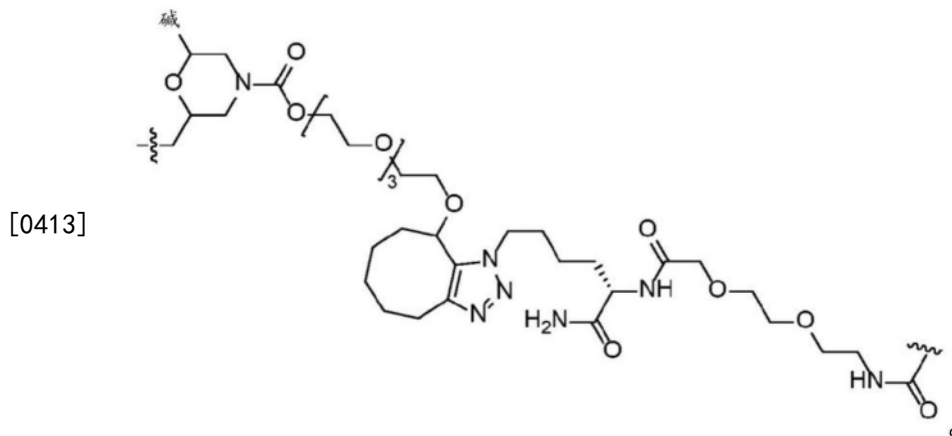


对应于货物二氨基磷酸酯吗啉代寡聚物的3'端的核碱基。

[0409] 接头可具有下式:



[0412] 接头可具有下式:



[0414] 接头可在货物上的任何合适的位置共价结合到货物。接头可共价结合到货物的3'端或寡核苷酸货物的5'端。接头可共价结合到货物的主链。

[0415] 接头可结合到cCPP上的天冬氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺或赖氨酸的侧链,或者谷氨酰胺或天冬酰胺的修饰侧链(例如,具有氨基基团的还原侧链)。接头可结合到cCPP上的赖氨酸的侧链。

[0416] cCPP-接头缀合物

[0417] cCPP可与本文所定义的接头缀合。接头可与如本文所定义的cCPP的AA_{SC}缀合。

[0418] 接头可包含-(OCH₂CH₂)_z-亚基(例如作为间隔区),其中z'是1至23的整数,例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22或23。“-(OCH₂CH₂)_z”也称为PEG。cCPP-接头缀合物可具有选自表3的结构:

[0419] 表3:cCPP-接头缀合物

[0420]	环(FfΦ-4gp-r-4gp-rQ)-PEG ₄ -K-NH ₂
	环(FfΦ-Cit-r-Cit-rQ)-PEG ₄ -K-NH ₂
	环(FfΦ-Pia-r-Pia-rQ)-PEG ₄ -K-NH ₂
	环(FfΦ-Dml-r-Dml-rQ)-PEG ₄ -K-NH ₂
	环(FfΦ-Cit-r-Cit-rQ)-PEG ₁₂ -OH
	环(fΦR-Cit-R-Cit-Q)-PEG ₁₂ -OH

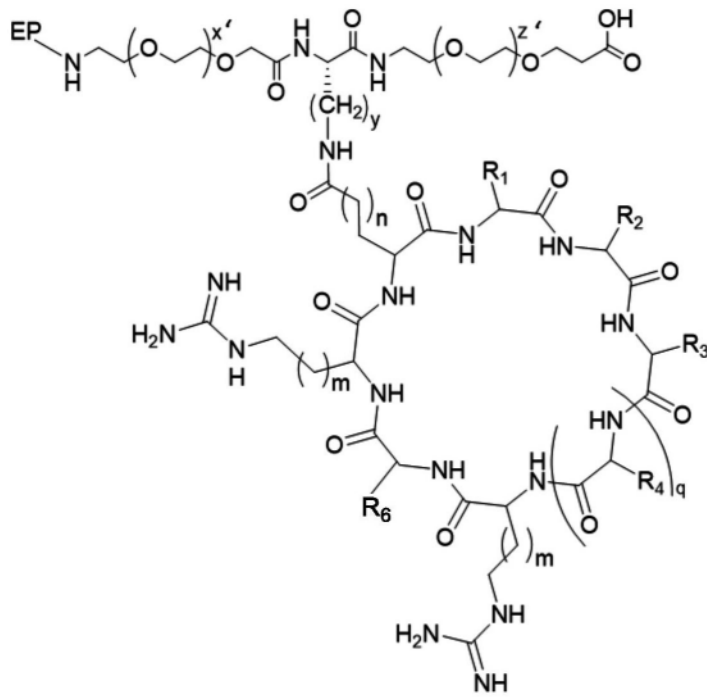
[0421] 接头可包含-(OCH₂CH₂)_z-亚基和肽亚基,其中z'是1至23的整数。肽亚基可包含2至10个氨基酸。cCPP-接头缀合物可具有选自表4的结构:

[0422] 表4:cCPP-接头缀合物

[0423]	Ac-PKKKRKV-Lys(环[FfΦ-R-r-Cit-rQ])-PEG ₁₂ -K(N ₃)-NH ₂
	Ac-PKKKRKV-Lys(环[FfΦ-Cit-r-R-rQ])-PEG ₁₂ -K(N ₃)-NH ₂
	Ac-PKKKRKV-K(环(FfΦR-cit-R-cit-Q))-PEG ₁₂ -K(N ₃)-NH ₂
	Ac-PKKKRKV-PEG2-Lys(环[FfΦ-Cit-r-Cit-rQ])-B-k(N ₃)-NH ₂
	Ac-PKKKRKV-PEG2-Lys(环[FfΦ-Cit-r-Cit-rQ])-PEG2-k(N ₃)-NH ₂
	Ac-PKKKRKV-PEG2-Lys(环[FfΦ-Cit-r-Cit-rQ])-PEG4-k(N ₃)-NH ₂
	Ac-PKKKRKV-Lys(环[FfΦ-Cit-r-Cit-rQ])-PEG12-k(N ₃)-NH ₂
	Ac-pkkkrkv-PEG2-Lys(环[FfΦ-Cit-r-Cit-rQ])-PEG12-k(N ₃)-NH ₂
	Ac-rrv-PEG2-Lys(环[FfΦ-Cit-r-Cit-rQ])-PEG12-OH
	Ac-PKKKRKV-PEG2-Lys(环[FfΦ-Cit-r-Cit-r-Q])-PEG12-k(N ₃)-NH ₂
	Ac-PKKK-Cit-KV-PEG2-Lys(环[FfΦ-Cit-r-Cit-r-Q])-PEG12-k(N ₃)-NH ₂
	Ac-PKKKRKV-PEG2-Lys(环[FfΦ-Cit-r-Cit-r-Q])-PEG12-K(N ₃)-NH ₂

[0424] 提供了包含环状细胞穿透肽(cCPP)、接头和环外肽(EP)的EEV。EEV可包含式(B)的结构:

[0425]



或其质子化形式,

(B),

[0426] 其中:

[0427] R_1 、 R_2 和 R_3 各自独立地是H或氨基酸的芳族或杂芳族侧链;[0428] R_4 和 R_6 独立地是H或氨基酸侧链;

[0429] EP是如本文定义的环外肽;

[0430] 每个m独立地是0-3的整数;

[0431] n是0-2的整数;

[0432] x' 是1-20的整数;

[0433] y是1-5的整数;

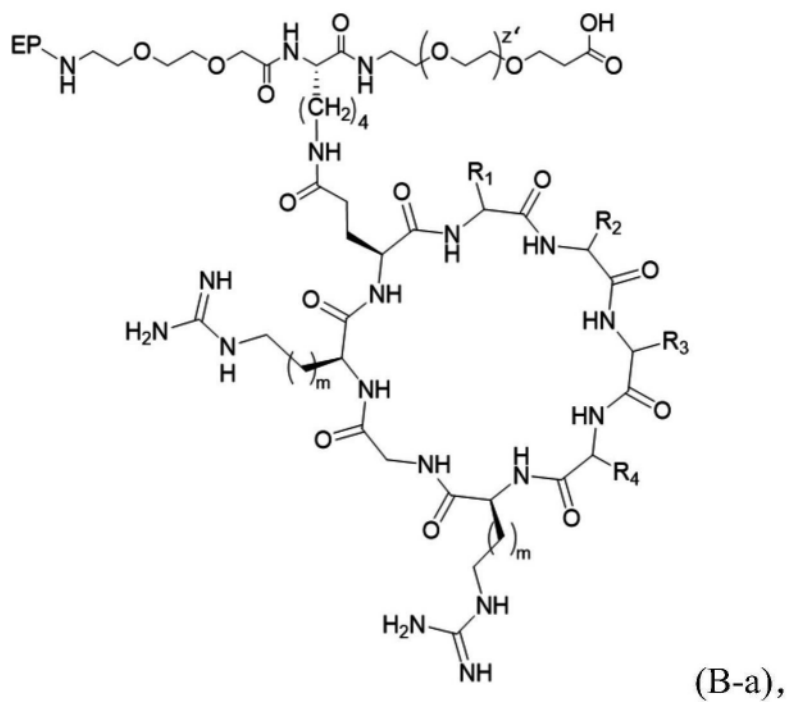
[0434] q是1-4;并且

[0435] z' 是1-23的整数。[0436] R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_6 、EP、m、q、y、 x' 、 z' 如本文所述。

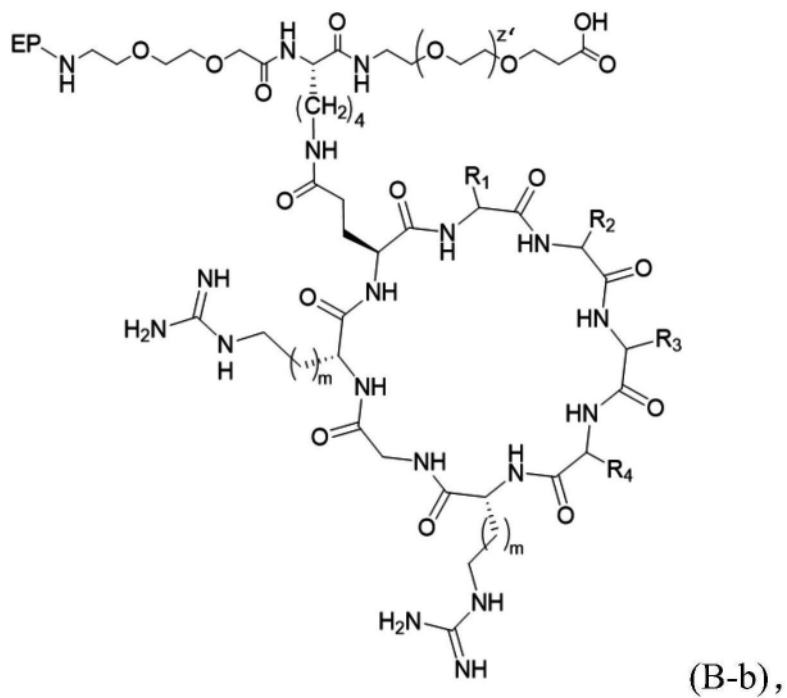
[0437] n可以是0。n可以是1。n可以是2。

[0438] EEV可包含式(B-a)或(B-b)的结构:

[0439]

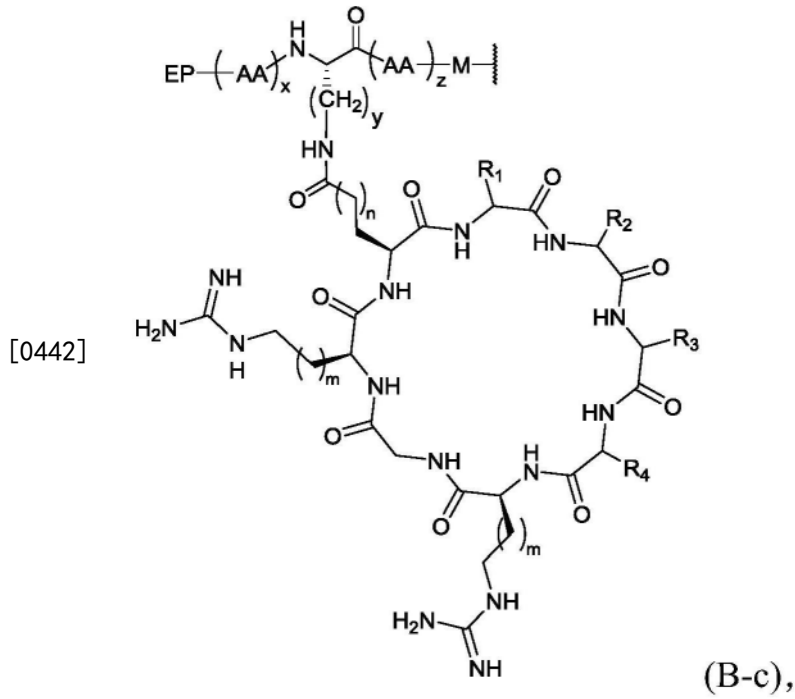


[0440]



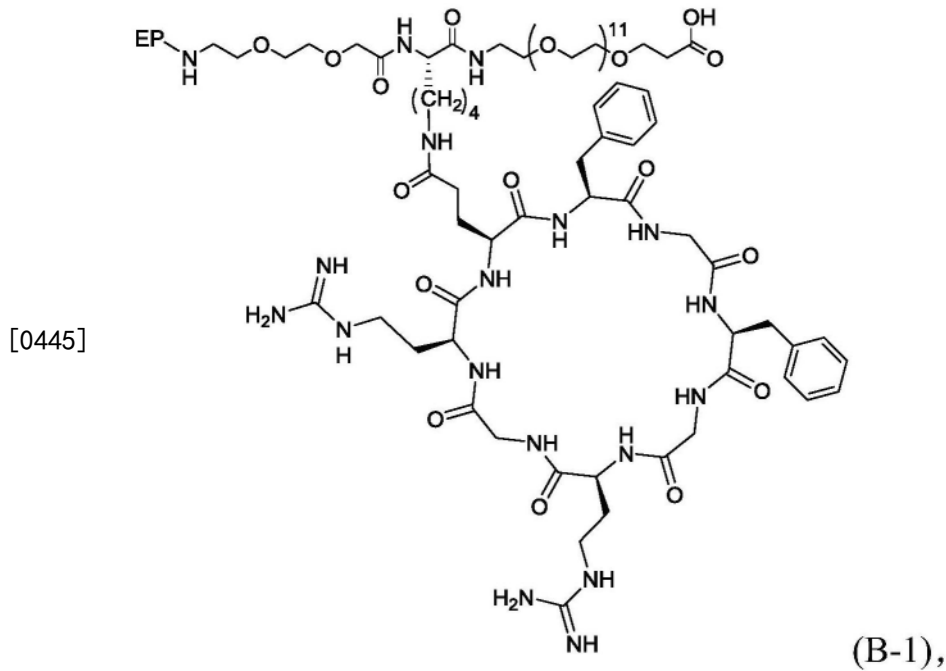
或其质子化形式,其中EP、R¹、R²、R³、R⁴、m和z'如上文在式(B)中所定义。

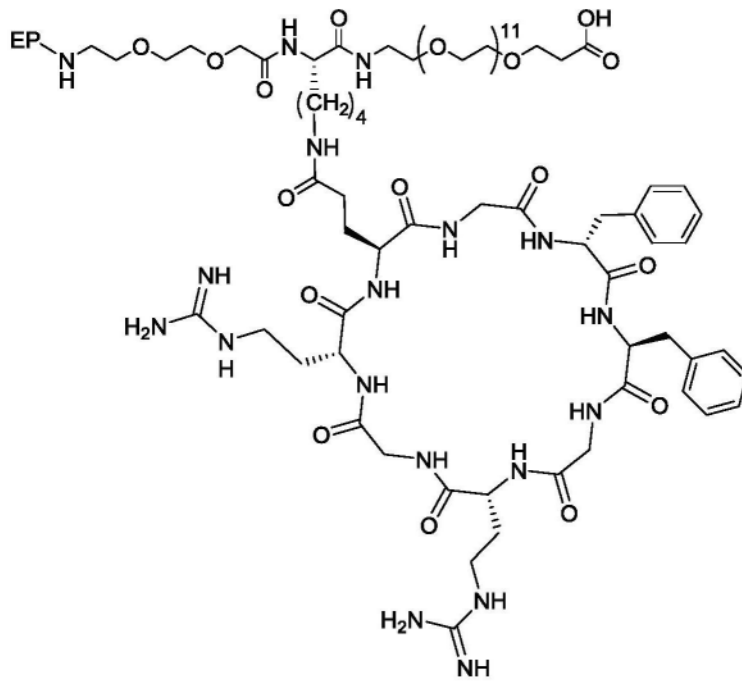
[0441] EEV可包含式(B-c)的结构:



[0443] 或其质子化形式,其中EP、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 和m如上文在式(B)中所定义;AA是如本文所定义的氨基酸;M如本文所定义;n是0-2的整数;x是1-10的整数;y是1-5的整数;并且z是1-10的整数。

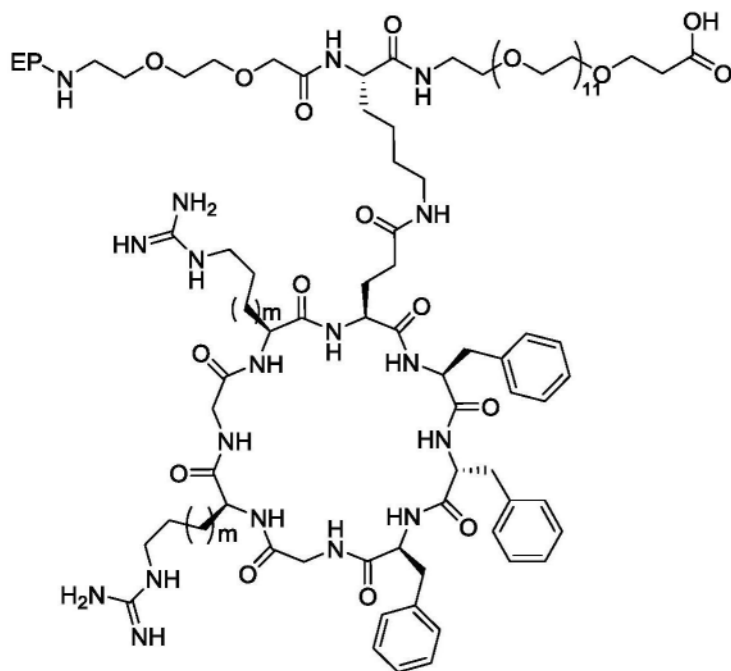
[0444] EEV可具有式(B-1)、(B-2)、(B-3)或(B-4)的结构:



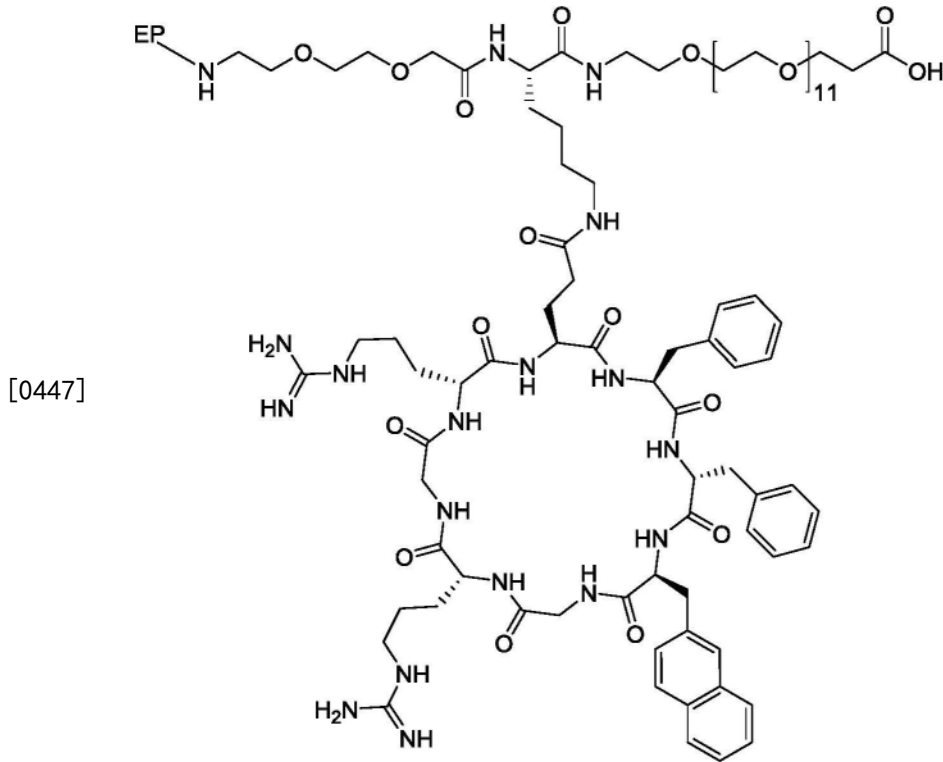


(B-2),

[0446]



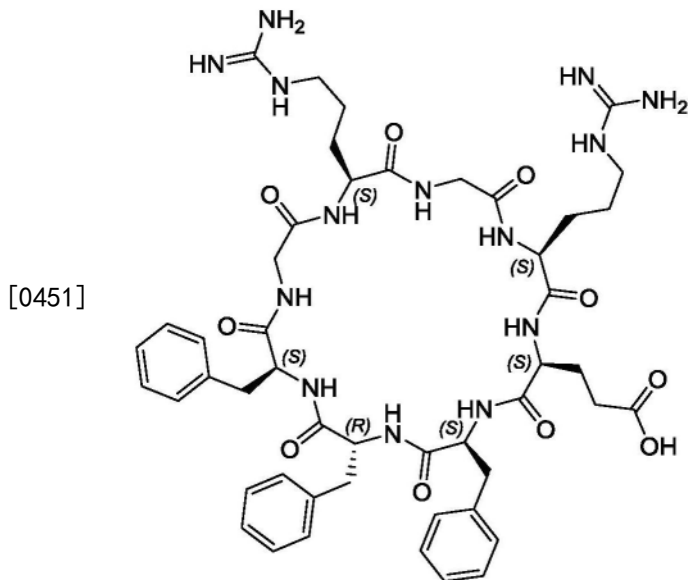
(B-3),



[0448] 或其质子化形式,其中EP如上文在式(B)中所定义。

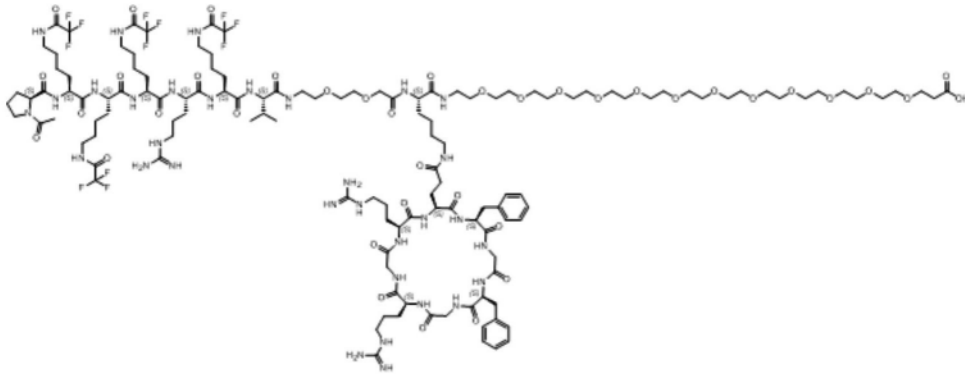
[0449] EEV可包含式(B)并且可具有以下结构:Ac-PKKKRKVAEEA-K(环[FGFGRGRQ])-PEG₁₂-OH或Ac-PKKKRKVAEEA-K(环[GfFGrGr Q])-PEG₁₂-OH。

[0450] EEV可包含下式的cCPP:



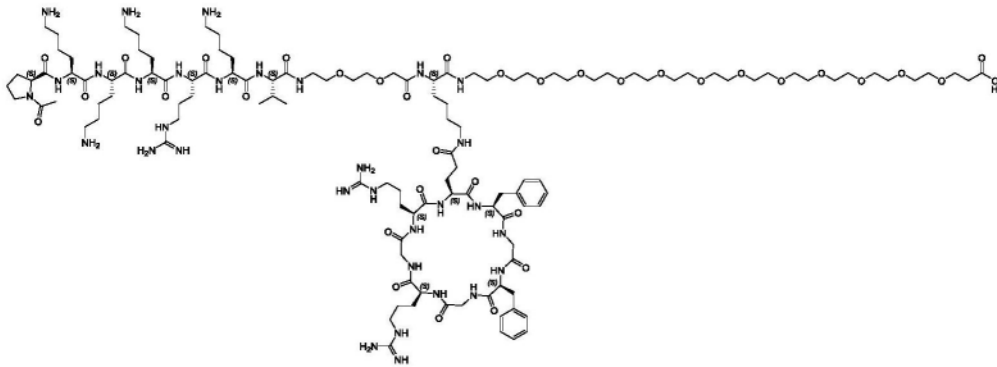
[0452] EEV可包含下式:Ac-PKKKRKV-miniPEG2-Lys(环[FfFGRGRQ])-miniPEG2-K(N3)。

[0453] EEV可以是Ac-P-K(Tfa)-K(Tfa)-K(Tfa)-R-K(Tfa)-V-AEEA-K-(环[FGFGRGRQ])-PEG₁₂-OH。EEV可以是:



[0454]

[0455] EEV可以是Ac-PKKKRKV-AEEA-Lys-(环[FGFGRGRQ])-PEG12-OH.EEV可以是:



[0456]

[0457] EEV可选自

[0458] Ac-rr-miniPEG2-Dap[环(Ff Φ-Cit-r-Cit-rQ)]-PEG₁₂-OH

[0459] Ac-frr-PEG2-Dap(环(Ff Φ-Cit-r-Cit-rQ))-PEG₁₂-OH

[0460] Ac-rfr-PEG2-Dap(环(Ff Φ-Cit-r-Cit-rQ))-PEG₁₂-OH

[0461] Ac-rfbfr-PEG2-Dap(环(Ff Φ-Cit-r-Cit-rQ))-PEG₁₂-OH

[0462] Ac-rrr-PEG2-Dap(环(Ff Φ-Cit-r-Cit-rQ))-PEG₁₂-OH

[0463] Ac-rbr-PEG2-Dap(环(Ff Φ-Cit-r-Cit-rQ))-PEG₁₂-OH

[0464] Ac-rbrbr-PEG2-Dap(环(Ff Φ-Cit-r-Cit-rQ))-PEG₁₂-OH

[0465] Ac-hh-PEG2-Dap(环(Ff Φ-Cit-r-Cit-rQ))-PEG₁₂-OH

[0466] Ac-hbh-PEG2-Dap(环(Ff Φ-Cit-r-Cit-rQ))-PEG₁₂-OH

[0467] Ac-hhbhb-PEG2-Dap(环(Ff Φ-Cit-r-Cit-rQ))-PEG₁₂-OH

[0468] Ac-rbhbh-PEG2-Dap(环(Ff Φ-Cit-r-Cit-rQ))-PEG₁₂-OH

[0469] Ac-hbrbh-PEG2-Dap(环(Ff Φ-Cit-r-Cit-rQ))-PEG₁₂-OH

[0470] Ac-rr-Dap(环(Ff Φ-Cit-r-Cit-rQ))-b-OH

[0471] Ac-frr-Dap(环(Ff Φ-Cit-r-Cit-rQ))-b-OH

[0472] Ac-rfr-Dap(环(Ff Φ-Cit-r-Cit-rQ))-b-OH

[0473] Ac-rfbfr-Dap(环(Ff Φ-Cit-r-Cit-rQ))-b-OH

[0474] Ac-rrr-Dap(环(Ff Φ-Cit-r-Cit-rQ))-b-OH

[0475] Ac-rbr-Dap(环(Ff Φ-Cit-r-Cit-rQ))-b-OH

[0476] Ac-rbrbr-Dap(环(Ff Φ-Cit-r-Cit-rQ))-b-OH

[0477] Ac-hh-Dap(环(Ff Φ-Cit-r-Cit-rQ))-b-OH

[0478] Ac-hbh-Dap(环(Ff Φ-Cit-r-Cit-rQ))-b-OH

- [0479] Ac-hbhbh-Dap (环 (Ff Φ -Cit-r-Cit-rQ)) -b-OH
- [0480] Ac-rbhbh-Dap (环 (Ff Φ -Cit-r-Cit-rQ)) -b-OH
- [0481] Ac-hbrbh-Dap (环 (Ff Φ -Cit-r-Cit-rQ)) -b-OH
- [0482] Ac-KKKK-miniPEG₂-Lys (环 (Ff-Nal-GrGrQ)) -miniPEG₂-K (N₃) -NH₂
- [0483] Ac-KGKK-miniPEG₂-Lys (环 (Ff-Nal-GrGrQ)) -miniPEG₂-K (N₃) -NH₂
- [0484] Ac-KK GK-miniPEG₂-Lys (环 (Ff-Nal-GrGrQ)) -miniPEG₂-K (N₃) -NH₂
- [0485] Ac-KKK-miniPEG₂-Lys (环 (Ff-Nal-GrGrQ)) -miniPEG₂-K (N₃) -NH₂
- [0486] Ac-KK-miniPEG₂-Lys (环 (Ff-Nal-GrGrQ)) -miniPEG₂-K (N₃) -NH₂
- [0487] Ac-KGK-miniPEG₂-Lys (环 (Ff-Nal-GrGrQ)) -miniPEG₂-K (N₃) -NH₂
- [0488] Ac-KBK-miniPEG₂-Lys (环 (Ff-Nal-GrGrQ)) -miniPEG₂-K (N₃) -NH₂
- [0489] Ac-KBK BK-miniPEG₂-Lys (环 (Ff-Nal-GrGrQ)) -miniPEG₂-K (N₃) -NH₂
- [0490] Ac-KR-miniPEG₂-Lys (环 (Ff-Nal-GrGrQ)) -miniPEG₂-K (N₃) -NH₂
- [0491] Ac-KBR-miniPEG₂-Lys (环 (Ff-Nal-GrGrQ)) -miniPEG₂-K (N₃) -NH₂
- [0492] Ac-PKKKRKV-miniPEG₂-Lys (环 (Ff-Nal-GrGrQ)) -miniPEG₂-K (N₃) -NH₂
- [0493] Ac-PKKKRKV-miniPEG₂-Lys (环 (Ff-Nal-GrGrQ)) -miniPEG₂-K (N₃) -NH₂
- [0494] Ac-PGKKR KV-miniPEG₂-Lys (环 (Ff-Nal-GrGrQ)) -miniPEG₂-K (N₃) -NH₂Ac-PKGKRKV-miniPEG₂-Lys (环 (Ff-Nal-GrGrQ)) -miniPEG₂-K (N₃) -NH₂
- [0495] Ac-PKKGRKV-miniPEG₂-Lys (环 (Ff-Nal-GrGrQ)) -miniPEG₂-K (N₃) -NH₂
- [0496] Ac-PKKKGKV-miniPEG₂-Lys (环 (Ff-Nal-GrGrQ)) -miniPEG₂-K (N₃) -NH₂
- [0497] Ac-PKKKRGV-miniPEG₂-Lys (环 (Ff-Nal-GrGrQ)) -miniPEG₂-K (N₃) -NH₂
- [0498] Ac-PKKKRKG-miniPEG₂-Lys (环 (Ff-Nal-GrGrQ)) -miniPEG₂-K (N₃) -NH₂
- [0499] Ac-KKKRK-miniPEG₂-Lys (环 (Ff-Nal-GrGrQ)) -miniPEG₂-K (N₃) -NH₂
- [0500] Ac-KKRK-miniPEG₂-Lys (环 (Ff-Nal-GrGrQ)) -miniPEG₂-K (N₃) -NH₂和
- [0501] Ac-KRK-miniPEG₂-Lys (环 (Ff-Nal-GrGrQ)) -miniPEG₂-K (N₃) -NH₂。
- [0502] EEV可选自:
- [0503] Ac-PKKKRKV-Lys (环 [Ff Φ GrGrQ]) -PEG₁₂-K (N₃) -NH₂
- [0504] Ac-PKKKRKV-miniPEG₂-Lys (环 [Ff Φ GrGrQ]) -miniPEG₂-K (N₃) -NH₂
- [0505] Ac-PKKKRKV-miniPEG₂-Lys (环 [FGFGRGRQ]) -miniPEG₂-K (N₃) -NH₂
- [0506] Ac-KR-PEG₂-K (环 [FGFGRGRQ]) -PEG₂-K (N₃) -NH₂
- [0507] Ac-PKKKGKV-PEG₂-K (环 [FGFGRGRQ]) -PEG₂-K (N₃) -NH₂
- [0508] Ac-PKKKRKG-PEG₂-K (环 [FGFGRGRQ]) -PEG₂-K (N₃) -NH₂
- [0509] Ac-KKKRK-PEG₂-K (环 [FGFGRGRQ]) -PEG₂-K (N₃) -NH₂
- [0510] Ac-PKKKRKV-miniPEG₂-Lys (环 [FF Φ GRGRQ]) -miniPEG₂-K (N₃) -NH₂
- [0511] Ac-PKKKRKV-miniPEG₂-Lys (环 [β hFf Φ GrGrQ]) -miniPEG₂-K (N₃) -NH₂和
- [0512] Ac-PKKKRKV-miniPEG₂-Lys (环 [Ff Φ SrSrQ]) -miniPEG₂-K (N₃) -NH₂。
- [0513] EEV可选自:
- [0514] Ac-PKKKRKV-miniPEG₂-Lys (环 (GfFGrGrQ)) -PEG₁₂-OH
- [0515] Ac-PKKKRKV-miniPEG₂-Lys (环 [FGFKRKRQ]) -PEG₁₂-OH
- [0516] Ac-PKKKRKV-miniPEG₂-Lys (环 [FGFRGRGQ]) -PEG₁₂-OH

- [0517] Ac-PKKKRKV-miniPEG₂-Lys(环[FGFGRGRQ]) -PEG₁₂-OHAc-PKKKRKV-miniPEG₂-Lys(环[FGFGRrRQ]) -PEG₁₂-OH
- [0518] Ac-PKKKRKV-miniPEG₂-Lys(环[FGFGRRRQ]) -PEG₁₂-OH和Ac-PKKKRKV-miniPEG₂-Lys(环[FGFRRRRQ]) -PEG₁₂-OH。
- [0519] EEV可选自：
- [0520] Ac-KKKRKG-miniPEG₂-K(环[FGFGRGRQ]) -PEG₁₂-OH
- [0521] Ac-KKKRK-miniPEG₂-K(环[FGFGRGRQ]) -PEG₁₂-OH
- [0522] Ac-KKKKK-PEG₄-K(环[FGFGRGRQ]) -PEG₁₂-OH
- [0523] Ac-KRKKK-PEG₄-K(环[FGFGRGRQ]) -PEG₁₂-OH
- [0524] Ac-KKKKR-PEG₄-K(环[FGFGRGRQ]) -PEG₁₂-OH
- [0525] Ac-RKKKK-PEG₄-K(环[FGFGRGRQ]) -PEG₁₂-OH和
- [0526] Ac-KKKRK-PEG₄-K(环[FGFGRGRQ]) -PEG₁₂-OH。
- [0527] EEV可选自：
- [0528] Ac-PKKKRKV-PEG₂-K(环[FGFGRGRQ]) -PEG₂-K(N₃)-NH₂
- [0529] Ac-PKKKRKV-PEG₂-K(环[FGFGRGRQ]) -PEG₁₂-OH
- [0530] Ac-PKKKRKV-PEG₂-K(环[GfFGrGrQ]) -PEG₂-K(N₃)-NH₂和
- [0531] Ac-PKKKRKV-PEG₂-K(环[GfFGrGrQ]) -PEG₁₂-OH。
- [0532] 货物可以是AC并且EEV可选自：
- [0533] Ac-PKKKRKV-PEG₂-K(环[Ff ΦGrGrQ]) -PEG₁₂-OH
- [0534] Ac-PKKKRKV-PEG₂-K(环[Ff ΦCit-r-Cit-rQ]) -PEG₁₂-OH
- [0535] Ac-PKKKRKV-PEG₂-K(环[FfFGRGRQ]) -PEG₁₂-OH
- [0536] Ac-PKKKRKV-PEG₂-K(环[FGFGRGRQ]) -PEG₁₂-OH
- [0537] Ac-PKKKRKV-PEG₂-K(环[GfFGrGrQ]) -PEG₁₂-OH
- [0538] Ac-PKKKRKV-PEG₂-K(环[FGFGRRRQ]) -PEG₁₂-OH
- [0539] Ac-PKKKRKV-PEG₂-K(环[FGFRRRRQ]) -PEG₁₂-OH
- [0540] Ac-rr-PEG₂-K(环[Ff ΦGrGrQ]) -PEG₁₂-OH
- [0541] Ac-rr-PEG₂-K(环[Ff ΦCit-r-Cit-rQ]) -PEG₁₂-OH
- [0542] Ac-rr-PEG₂-K(环[FfF-GRGRQ]) -PEG₁₂-OH
- [0543] Ac-rr-PEG₂-K(环[FGFGRGRQ]) -PEG₁₂-OH
- [0544] Ac-rr-PEG₂-K(环[GfFGrGrQ]) -PEG₁₂-OH
- [0545] Ac-rr-PEG₂-K(环[FGFGRRRQ]) -PEG₁₂-OH
- [0546] Ac-rr-PEG₂-K(环[FGFRRRRQ]) -PEG₁₂-OH
- [0547] Ac-rrr-PEG₂-K(环[Ff ΦGrGrQ]) -PEG₁₂-OH
- [0548] Ac-rrr-PEG₂-K(环[Ff ΦCit-r-Cit-rQ]) -PEG₁₂-OH
- [0549] Ac-rrr-PEG₂-K(环[FfFGRGRQ]) -PEG₁₂-OH
- [0550] Ac-rrr-PEG₂-K(环[FGFGRGRQ]) -PEG₁₂-OH
- [0551] Ac-rrr-PEG₂-K(环[GfFGrGrQ]) -PEG₁₂-OH
- [0552] Ac-rrr-PEG₂-K(环[FGFGRRRQ]) -PEG₁₂-OH
- [0553] Ac-rrr-PEG₂-K(环[FGFRRRRQ]) -PEG₁₂-OH

- [0554] Ac-rhr-PEG₂-K (环[Ff Φ GrGrQ]) -PEG₁₂-OH
- [0555] Ac-rhr-PEG₂-K (环[Ff Φ Cit-r-Cit-rQ]) -PEG₁₂-OH
- [0556] Ac-rhr-PEG₂-K (环[FfFGGRGRQ]) -PEG₁₂-OH
- [0557] Ac-rhr-PEG₂-K (环[FGFGRGRQ]) -PEG₁₂-OH
- [0558] Ac-rhr-PEG₂-K (环[GfFGGrGrQ]) -PEG₁₂-OH
- [0559] Ac-rhr-PEG₂-K (环[FGFGRRRQ]) -PEG₁₂-OH
- [0560] Ac-rhr-PEG₂-K (环[FGFRRRRQ]) -PEG₁₂-OH
- [0561] Ac-rbr-PEG₂-K (环[Ff Φ GrGrQ]) -PEG₁₂-OH
- [0562] Ac-rbr-PEG₂-K (环[Ff Φ Cit-r-Cit-rQ]) -PEG₁₂-OH
- [0563] Ac-rbr-PEG₂-K (环[FfFGGRGRQ]) -PEG₁₂-OH
- [0564] Ac-rbr-PEG₂-K (环[FGFGRGRQ]) -PEG₁₂-OH
- [0565] Ac-rbr-PEG₂-K (环[GfFGGrGrQ]) -PEG₁₂-OH
- [0566] Ac-rbr-PEG₂-K (环[FGFGRRRQ]) -PEG₁₂-OH
- [0567] Ac-rbr-PEG₂-K (环[FGFRRRRQ]) -PEG₁₂-OH
- [0568] Ac-rbrbr-PEG₂-K (环[Ff Φ GrGrQ]) -PEG₁₂-OH
- [0569] Ac-rbrbr-PEG₂-K (环[Ff Φ Cit-r-Cit-rQ]) -PEG₁₂-OH
- [0570] Ac-rbrbr-PEG₂-K (环[FfFGGRGRQ]) -PEG₁₂-OH
- [0571] Ac-rbrbr-PEG₂-K (环[FGFGRGRQ]) -PEG₁₂-OH
- [0572] Ac-rbrbr-PEG₂-K (环[GfFGGrGrQ]) -PEG₁₂-OH
- [0573] Ac-rbrbr-PEG₂-K (环[FGFGRRRQ]) -PEG₁₂-OH
- [0574] Ac-rbrbr-PEG₂-K (环[FGFRRRRQ]) -PEG₁₂-OH
- [0575] Ac-rbhbr-PEG₂-K (环[Ff Φ GrGrQ]) -PEG₁₂-OH
- [0576] Ac-rbhbr-PEG₂-K (环[Ff Φ Cit-r-Cit-rQ]) -PEG₁₂-OH
- [0577] Ac-rbhbr-PEG₂-K (环[FfFGGRGRQ]) -PEG₁₂-OH
- [0578] Ac-rbhbr-PEG₂-K (环[FGFGRGRQ]) -PEG₁₂-OH
- [0579] Ac-rbhbr-PEG₂-K (环[GfFGGrGrQ]) -PEG₁₂-OH
- [0580] Ac-rbhbr-PEG₂-K (环[FGFGRRRQ]) -PEG₁₂-OH
- [0581] Ac-rbhbr-PEG₂-K (环[FGFRRRRQ]) -PEG₁₂-OH
- [0582] Ac-hbrbh-PEG₂-K (环[Ff Φ GrGrQ]) -PEG₁₂-OH
- [0583] Ac-hbrbh-PEG₂-K (环[Ff Φ Cit-r-Cit-rQ]) -PEG₁₂-OH
- [0584] Ac-hbrbh-PEG₂-K (环[FfFGGRGRQ]) -PEG₁₂-OH
- [0585] Ac-hbrbh-PEG₂-K (环[FGFGRGRQ]) -PEG₁₂-OH
- [0586] Ac-hbrbh-PEG₂-K (环[GfFGGrGrQ]) -PEG₁₂-OH
- [0587] Ac-hbrbh-PEG₂-K (环[FGFGRRRQ]) -PEG₁₂-OH和
- [0588] Ac-hbrbh-PEG₂-K (环[FGFRRRRQ]) -PEG₁₂-OH,
- [0589] 其中b是β-丙氨酸,并且环外序列可以是D或L立体化学。
- [0590] 在实施方案中,cCPP可是:

[0591]

结构		
环(fΦRrRQ)	环(FΦFRRRQ)	环(hF-fΦRrRrQ)
环(fΦrRrQ)	环(fFfrRrQ)	环(Sta-fΦRrRrQ)
环(FΦrRrQ)	环(fFfRrRQ)	环(Tba-fΦRrRrQ)
环(FΦRrRQ)	环(fFφrRrQ)	环(Ff-1Nal-RrRrQ)
环(FφRrRQ)	环(fΦfrRrQ)	环(Ff-Bpa-RrRrQ)
环(FφrRrQ)	环(φFfrRrQ)	环(Ff-3aa-RrRrQ)
环(f-G[癸基]rRrQ)	环(FFFRRRRQ)	环(Ff-1aa-RrRrQ)
环(f-G[十二烷基]rRrQ)	环(RFRFRFRQ)	环(FfΦ-Agp-r-Agp-rQ)
环(f-D[十二烯酰胺]rRrQ)	环(FfRrRrQ)	环(FfΦ-Agb-r-Agb-rQ)
环(f-D[十四烷酰胺]rRrQ)	环(fFfrRrRQ)	环(FfΦ-hR-r-hR-rQ)
环(f-D[十六烷酰胺]rRrQ)	环(fffrrrrQ)	环(FfΦ-4gp-r-4gp-rQ)
环(f-Dbg-rRrQ)	环(FfΦRrRaQ)	环(FfΦ-Cit-r-Cit-rQ)
环(f-Bta-rRrQ)	环(FfΦRrArQ)	环(Tic-fΦRrRrQ)
环(f-Bpa-rRrQ)	环(FfΦRaRrQ)	环(F-tic-ΦRrRrQ)
环(fFrRrQ)	环(FfΦArRrQ)	环(NMeF-FΦ-NMeR-R-NMeR-RQ)
环(fΦrRrQ)-F	环(FfARrRrQ)	环(FfΦRrRrQ)-F
环(fΦrRrQ)-f	环(FaΦRrRrQ)	环(FfΦRrRrQ)-f
环(fΦrRrQ)-Φ	环(AfΦRrRrQ)	环(FfΦRrRrQ)-Φ
环(fΦrRrQ)-φ	环(Cpa-fΦRrRrQ)	环(FfΦRrRrQ)-φ
环(fΦrRrQ)-R	环(Cha-fΦRrRrQ)	环(FfΦRrRrQ)-R
环(fΦrRrQ)-r	环(3,4DiF-fΦRrRrQ)	环(FfΦRrRrQ)-r
环(FFFRRRQ)	环(Tfm-fΦRrRrQ)	环(FfΦRrRrN)-F
环(FRFRFRQ)	环(Pfp-fΦRrRrQ)	环(FfΦRrRr-hQ)-F
环(FFΦRRRQ)	环(tBuF-fΦRrRrQ)	环(FfΦRrRrQ)-F

[0592] 货物可是蛋白质并且EEV可选自：

[0593] Ac-PKKKRKV-PEG₂-K (环[Ff-Nal-GrGrQ]) -PEG₁₂-OH

[0594] Ac-PKKKRKV-PEG₂-K (环[Ff-Nal-Cit-r-Cit-rQ]) -PEG₁₂-OH

[0595] Ac-PKKKRKV-PEG₂-K (环[FfF-GRGRQ]) -PEG₁₂-OH

[0596] Ac-PKKKRKV-PEG₂-K (环[FGFGRGRQ]) -PEG₁₂-OH

[0597] Ac-PKKKRKV-PEG₂-K (环[GfFGrGrQ]) -PEG₁₂-OH

[0598] Ac-PKKKRKV-PEG₂-K (环[FGFGRRRQ]) -PEG₁₂-OH

[0599] Ac-PKKKRKV-PEG₂-K (环[FGFRRRRQ]) -PEG₁₂-OH

[0600] Ac-rr-PEG₂-K (环[Ff-Nal-GrGrQ]) -PEG₁₂-OH

[0601] Ac-rr-PEG₂-K (环[Ff-Nal-Cit-r-Cit-rQ]) -PEG₁₂-OH

- [0602] Ac-rr-PEG₂-K(环[FfF-GRGRQ])-PEG₁₂-OH
- [0603] Ac-rr-PEG₂-K(环[FGFGRGRQ])-PEG₁₂-OH
- [0604] Ac-rr-PEG₂-K(环[GfFGrGrQ])-PEG₁₂-OH
- [0605] Ac-rr-PEG₂-K(环[FGFRRRQ])-PEG₁₂-OH
- [0606] Ac-rr-PEG₂-K(环[FGFRRRRQ])-PEG₁₂-OH
- [0607] Ac-rrr-PEG₂-K(环[Ff-Nal-GrGrQ])-PEG₁₂-OH
- [0608] Ac-rrr-PEG₂-K(环[Ff-Nal-Cit-r-Cit-rQ])-PEG₁₂-OH
- [0609] Ac-rrr-PEG₂-K(环[FfF-GRGRQ])-PEG₁₂-OH
- [0610] Ac-rrr-PEG₂-K(环[FGFGRGRQ])-PEG₁₂-OH
- [0611] Ac-rrr-PEG₂-K(环[GfFGrGrQ])-PEG₁₂-OH
- [0612] Ac-rrr-PEG₂-K(环[FGFRRRQ])-PEG₁₂-OH
- [0613] Ac-rrr-PEG₂-K(环[FGFRRRRQ])-PEG₁₂-OH
- [0614] Ac-rhr-PEG₂-K(环[Ff-Nal-GrGrQ])-PEG₁₂-OH
- [0615] Ac-rhr-PEG₂-K(环[Ff-Nal-Cit-r-Cit-rQ])-PEG₁₂-OH
- [0616] Ac-rhr-PEG₂-K(环[FfF-GRGRQ])-PEG₁₂-OH
- [0617] Ac-rhr-PEG₂-K(环[FGFGRGRQ])-PEG₁₂-OH
- [0618] Ac-rhr-PEG₂-K(环[GfFGrGrQ])-PEG₁₂-OH
- [0619] Ac-rhr-PEG₂-K(环[FGFRRRQ])-PEG₁₂-OH
- [0620] Ac-rhr-PEG₂-K(环[FGFRRRRQ])-PEG₁₂-OH
- [0621] Ac-rbr-PEG₂-K(环[Ff-Nal-GrGrQ])-PEG₁₂-OH
- [0622] Ac-rbr-PEG₂-K(环[Ff-Nal-Cit-r-Cit-rQ])-PEG₁₂-OH
- [0623] Ac-rbr-PEG₂-K(环[FfF-GRGRQ])-PEG₁₂-OH
- [0624] Ac-rbr-PEG₂-K(环[FGFGRGRQ])-PEG₁₂-OH
- [0625] Ac-rbr-PEG₂-K(环[GfFGrGrQ])-PEG₁₂-OH
- [0626] Ac-rbr-PEG₂-K(环[FGFRRRQ])-PEG₁₂-OH
- [0627] Ac-rbr-PEG₂-K(环[FGFRRRRQ])-PEG₁₂-OH
- [0628] Ac-rbrbr-PEG₂-K(环[Ff-Nal-GrGrQ])-PEG₁₂-OH
- [0629] Ac-rbrbr-PEG₂-K(环[Ff-Nal-Cit-r-Cit-rQ])-PEG₁₂-OH
- [0630] Ac-rbrbr-PEG₂-K(环[FfF-GRGRQ])-PEG₁₂-OH
- [0631] Ac-rbrbr-PEG₂-K(环[FGFGRGRQ])-PEG₁₂-OH
- [0632] Ac-rbrbr-PEG₂-K(环[GfFGrGrQ])-PEG₁₂-OH
- [0633] Ac-rbrbr-PEG₂-K(环[FGFRRRQ])-PEG₁₂-OH
- [0634] Ac-rbrbr-PEG₂-K(环[FGFRRRRQ])-PEG₁₂-OH
- [0635] Ac-rbhbr-PEG₂-K(环[Ff-Nal-GrGrQ])-PEG₁₂-OH
- [0636] Ac-rbhbr-PEG₂-K(环[Ff-Nal-Cit-r-Cit-rQ])-PEG₁₂-OH
- [0637] Ac-rbhbr-PEG₂-K(环[FfF-GRGRQ])-PEG₁₂-OH
- [0638] Ac-rbhbr-PEG₂-K(环[FGFGRGRQ])-PEG₁₂-OH
- [0639] Ac-rbhbr-PEG₂-K(环[GfFGrGrQ])-PEG₁₂-OH
- [0640] Ac-rbhbr-PEG₂-K(环[FGFRRRQ])-PEG₁₂-OH

- [0641] Ac-rbhbr-PEG₂-K (环[FGFRRRRQ]) -PEG₁₂-OH
 [0642] Ac-hbrbh-PEG₂-K (环[Ff-Nal-GrGrQ]) -PEG₁₂-OH
 [0643] Ac-hbrbh-PEG₂-K (环[Ff-Nal-Cit-r-Cit-rQ]) -PEG₁₂-OH
 [0644] Ac-hbrbh-PEG₂-K (环[FfF-GRGRQ]) -PEG₁₂-OH
 [0645] Ac-hbrbh-PEG₂-K (环[FGFGRGRQ]) -PEG₁₂-OH
 [0646] Ac-hbrbh-PEG₂-K (环[GfFGrGrQ]) -PEG₁₂-OH
 [0647] Ac-hbrbh-PEG₂-K (环[FGFRRRRQ]) -PEG₁₂-OH
 [0648] Ac-hbrbh-PEG₂-K (环[FGFRRRRQ]) -PEG₁₂-OH
 [0649] 其中b是β-丙氨酸,并且环外序列可以是D或L立体化学。

[0650] 货物

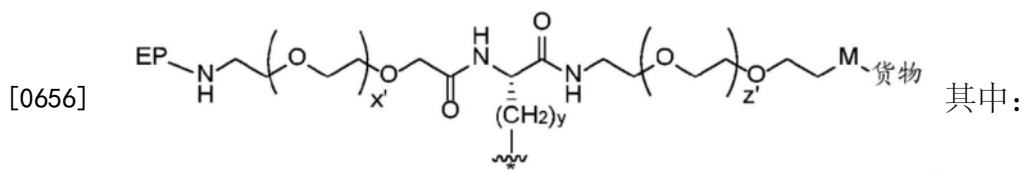
[0651] 细胞穿透肽(CPP),诸如环状细胞穿透肽(例如,cCPP),可以与货物缀合。货物可以是治疗部分。货物可以与接头的末端羰基基团缀合。环肽的至少一个原子可以被货物替换,或者至少一对孤对可以与货物形成键。货物可通过接头与cCPP缀合。货物可通过接头与AA_{SC}缀合。cCPP中的至少一个原子可以被治疗部分替换,或者cCPP中的至少一对孤对与治疗部分形成键。cCPP氨基酸侧链上的羟基基团可以由与货物的键替换。cCPP的谷氨酰胺侧链上的羟基基团可以由与货物的键替换。货物可通过接头与cCPP缀合。货物可通过接头与AA_{SC}缀合。

[0652] 货物可以包含一个或多个可检测部分、一个或多个治疗部分、一个或多个靶向部分,或它们的任何组合。货物可以是肽、寡核苷酸或小分子。货物可以是肽序列或非肽基治疗剂。货物可以是抗体或其抗原结合片段,包括但不限于scFv或纳米抗体。

[0653] 与货物部分缀合的环状细胞穿透肽(cCPP)

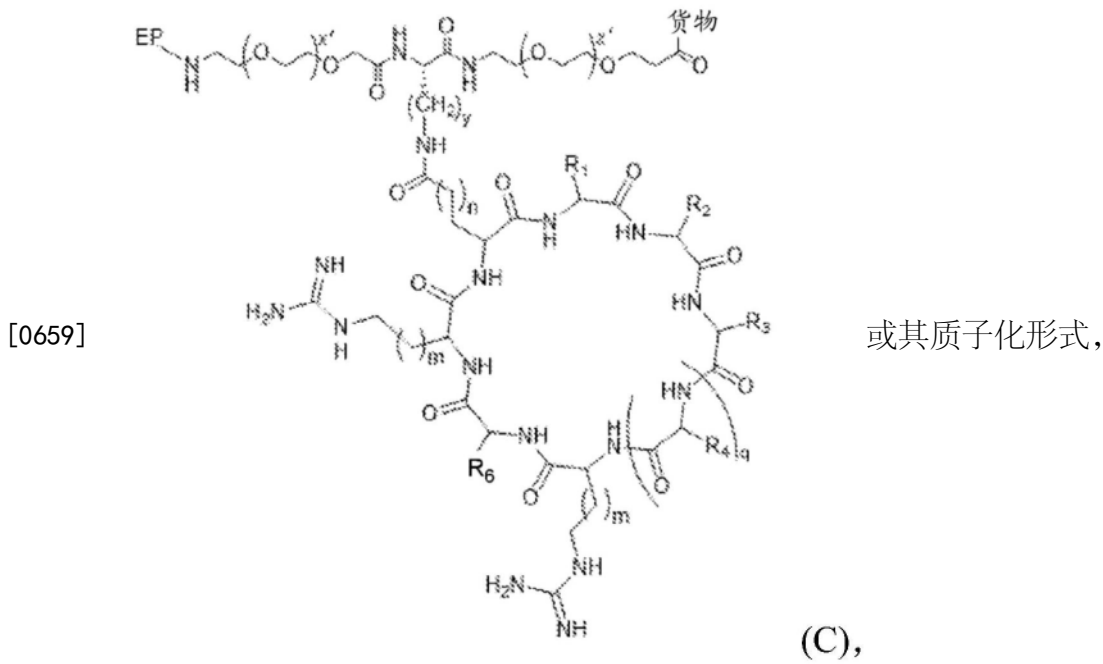
[0654] 环状细胞穿透肽(cCPP)可与货物部分缀合。

[0655] 货物部分可通过接头与cCPP缀合。货物部分可以包含治疗部分。治疗部分可以包含寡核苷酸、肽或小分子。寡核苷酸可以包括反义寡核苷酸。货物部分可在末端羰基处与接头缀合以提供以下结构:



[0657] EP是环外肽,并且M、AA_{SC}、货物、x'、y和z'如上文所定义,*是与AA_{SC}的附接点。x'可以是1。y可以是4。z'可以是11。-(OCH₂CH₂)_{x'}-和/或-(OCH₂CH₂)_{z'}-可独立地被一个或多个氨基酸替换,包括例如甘氨酸、β-丙氨酸、4-氨基丁酸、5-氨基戊酸、6-氨基己酸或它们的组合。

[0658] 内体逃逸载体(EEV)可包含环状细胞穿透肽(cCPP)、环外肽(EP)和接头,并且可与货物缀合以形成包含式(C)的结构EEV-缀合物:



[0660] 其中:

[0661] R_1 、 R_2 和 R_3 可各自独立地是H或具有包含芳族基团的侧链的氨基酸残基;

[0662] R_4 是H或氨基酸侧链;

[0663] EP是如本文定义的环外肽;

[0664] 货物是如本文定义的部分;

[0665] 每个m独立地是0-3的整数;

[0666] n是0-2的整数;

[0667] x' 是2-20的整数;

[0668] y是1-5的整数;

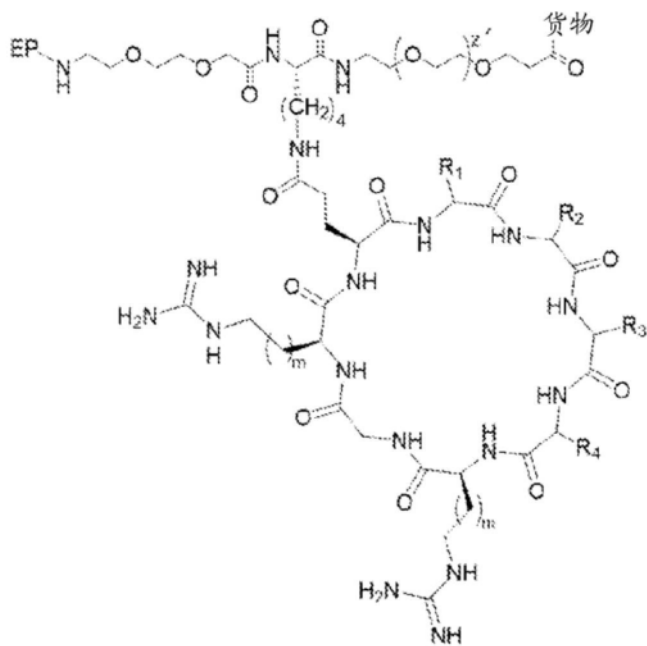
[0669] q是1-4的整数;并且

[0670] z' 是2-20的整数。

[0671] R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、EP、货物、m、n、 x' 、y、q和 z' 如本文所定义。

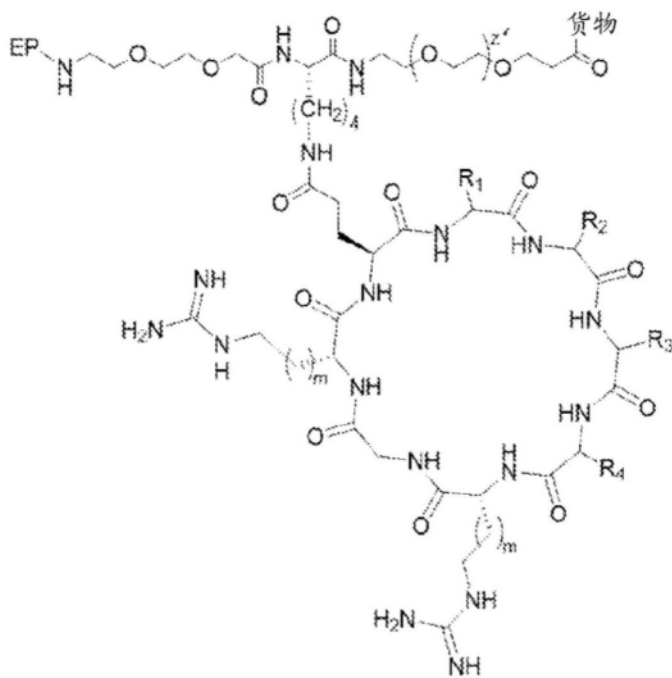
[0672] EEV可与货物缀合,并且EEV-缀合物可包含式(C-a)或(C-b)的结构:

[0673]



(C-a),

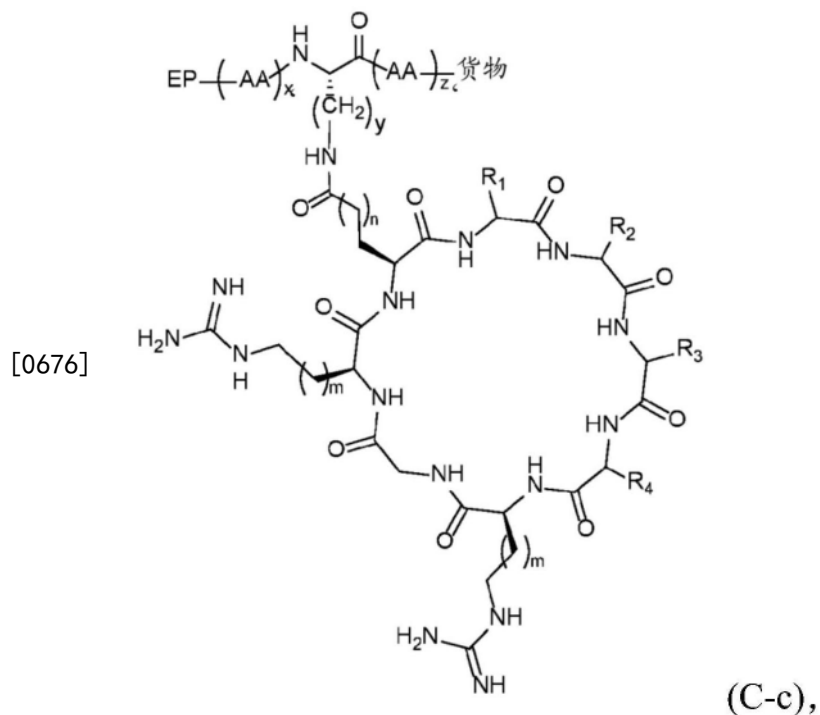
[0674]



(C-b),

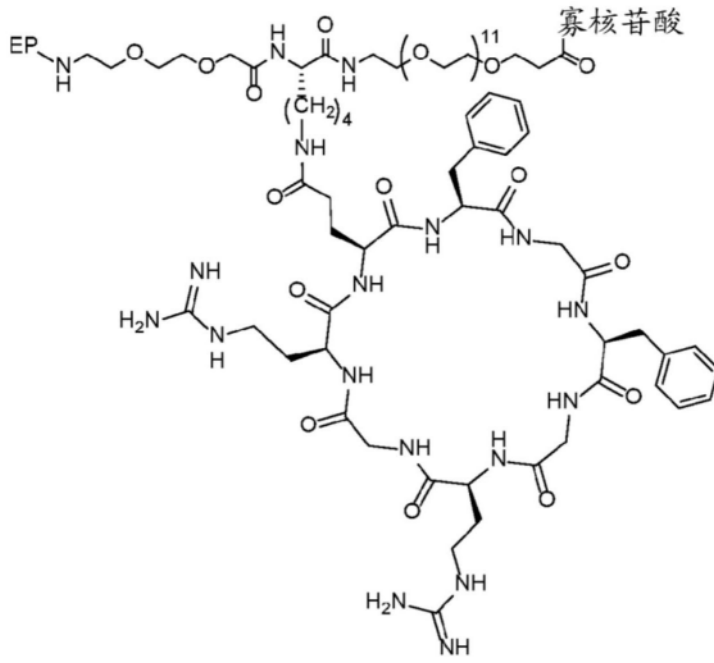
或其质子化形式,其中EP、m和z如上文在式(C)中所定义。

[0675] EEV可与货物缀合,并且EEV-缀合物可包含式(C-c)的结构:

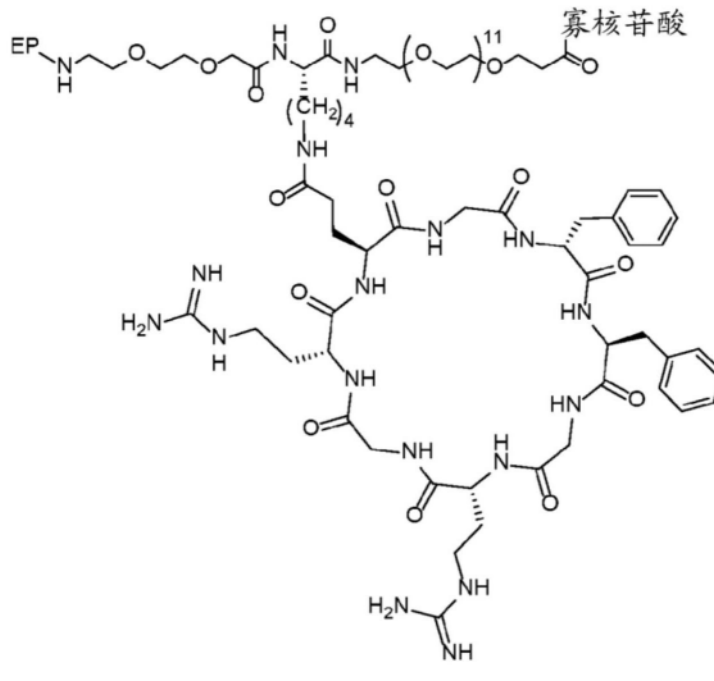


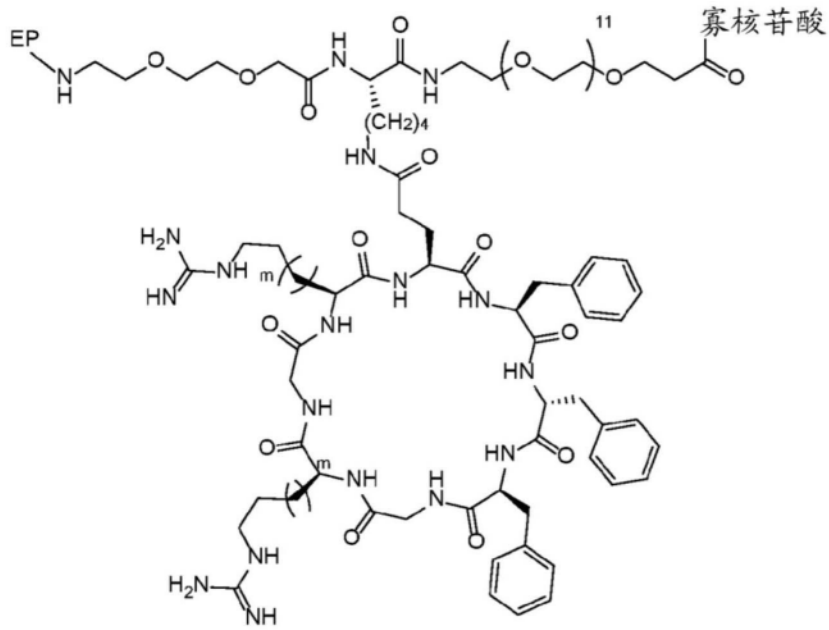
[0677] 或其质子化形式,其中EP、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 和m如上文在式(III)中所定义;AA可以是如本文所定义的氨基酸;n可以是0-2的整数;x可以是1-10的整数;y可以是1-5的整数;并且z可以是1-10的整数。

[0678] EEV可与寡核苷酸货物缀合,并且EEV-寡核苷酸缀合物可包含式(C-1)、(C-2)、(C-3)或(C-4)的结构:

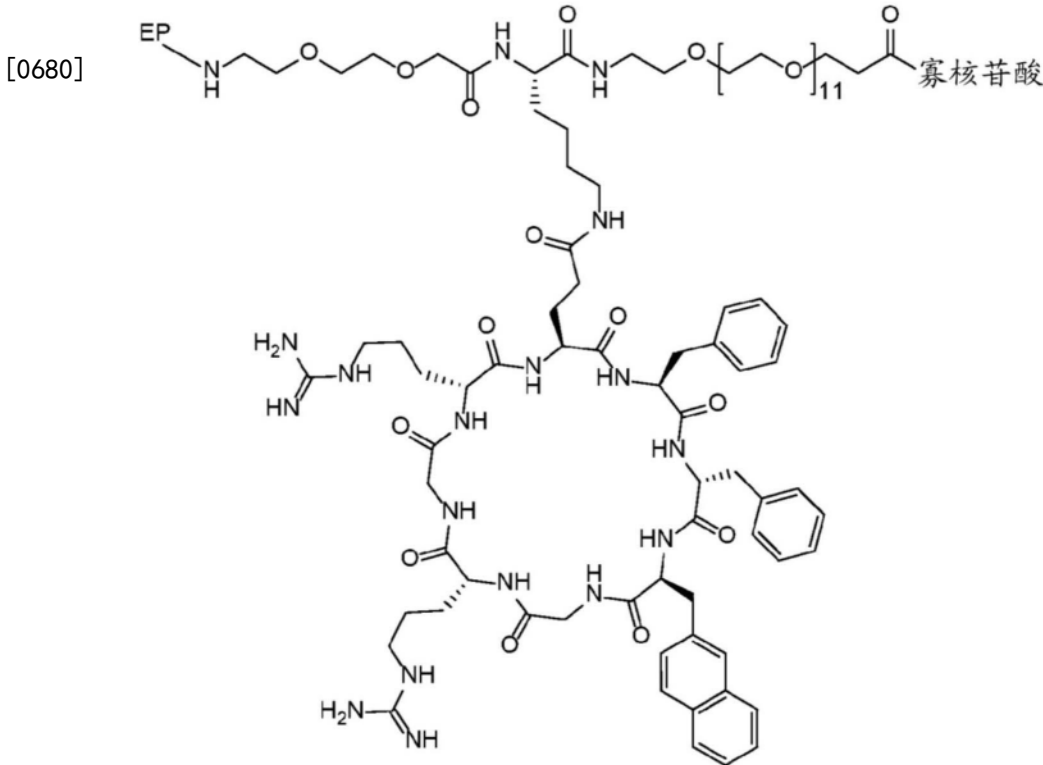


[0679]



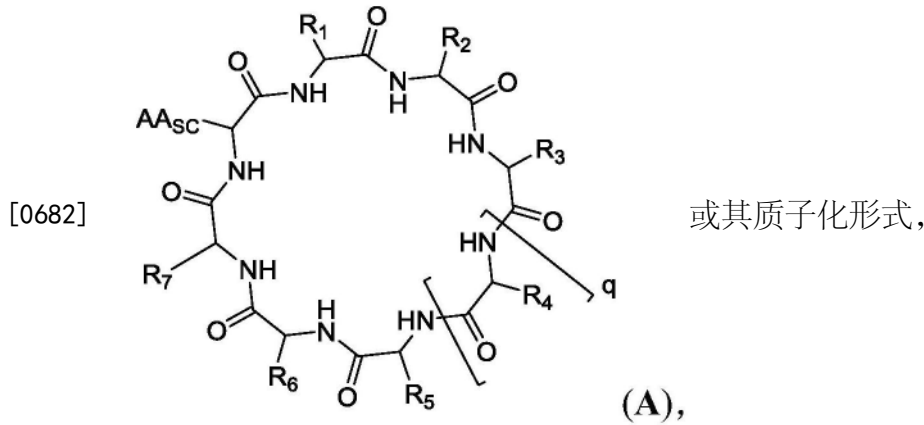


(C-3),



(C-4)。

[0681] 制备环肽的方法本公开涉及一种制备式(A)的环肽的方法:



[0683] 其中:

[0684] R_1 、 R_2 和 R_3 各自独立地是H或氨基酸的芳族或杂芳族侧链;

[0685] R_1 、 R_2 和 R_3 中的至少一者是氨基酸的芳族或杂芳族侧链;

[0686] R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 独立地是H或氨基酸侧链;

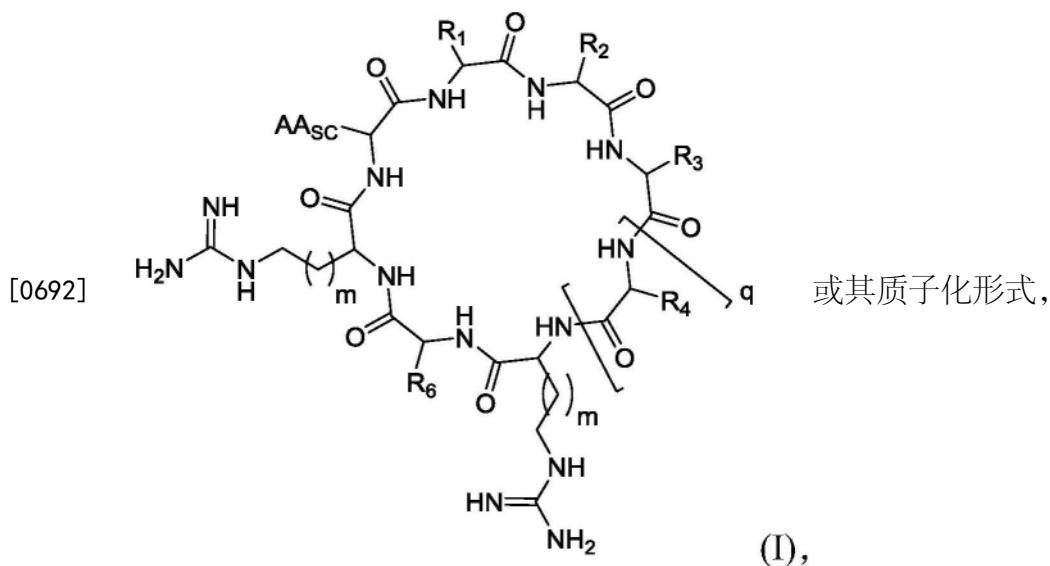
[0687] R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 中的至少一者是3-胍基-2-氨基丙酸、4-胍基-2-氨基丁酸、精氨酸、高精氨酸、N-甲基精氨酸、N,N-二甲基精氨酸、2,3-二氨基丙酸、2,4-二氨基丁酸、赖氨酸、N-甲基赖氨酸、N,N-二甲基赖氨酸、N-乙基赖氨酸、N,N,N-三甲基赖氨酸、4-胍基苯丙氨酸、瓜氨酸、N,N-二甲基赖氨酸、 β -高精氨酸、3-(1-哌啶基)丙氨酸的侧链;

[0688] AA_{sc} 是氨基酸侧链;并且

[0689] q 是1、2、3或4;

[0690] 其中所述方法是本文针对式(I)的化合物所描述的方法中的任一种。

[0691] 本公开涉及一种制备式(I)的环肽的方法:



[0693] 其中:

[0694] R_1 、 R_2 和 R_3 可各自独立地是H或具有包含芳族基团的侧链的氨基酸残基;

[0695] R_1 、 R_2 和 R_3 中的至少一者是氨基酸的芳族或杂芳族侧链;

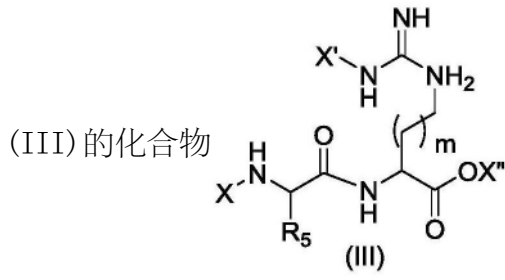
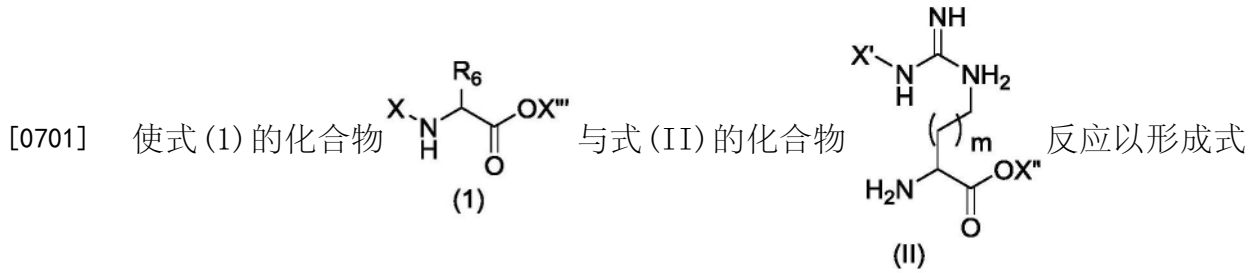
[0696] R_4 和 R_6 独立地是H或氨基酸侧链;

[0697] AA_{sc} 是氨基酸侧链;

[0698] q是1、2、3或4;并且

[0699] 每个m独立地是整数0、1、2或3;

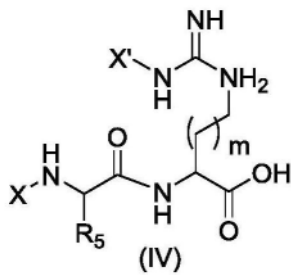
[0700] 所述方法包括:



[0702] 其中X和X' 独立地是保护基团,X''是H或保护基团,X'''是H或活化基团(例如,NHS酯),并且m是0-3。在一些实施方案中,X'''是甲基或叔丁基。

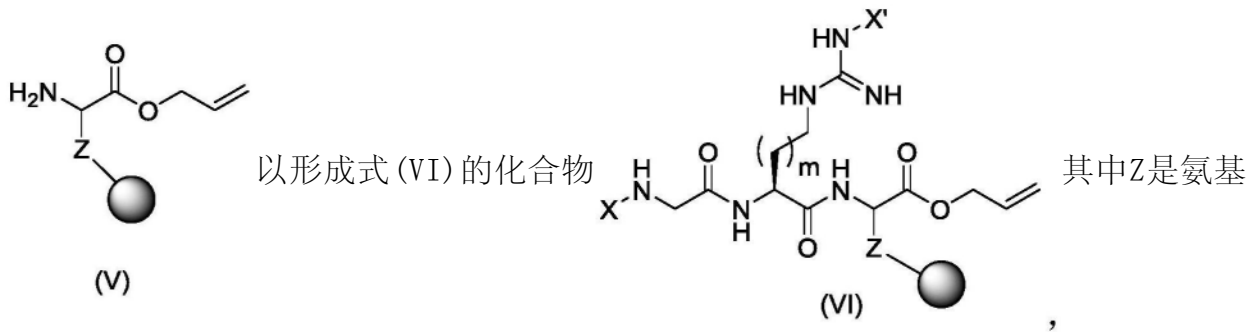
[0703] 所述方法可以包括在偶联试剂诸如N,N'-二环己基碳二亚胺(DCC)的存在下,使式(I)的化合物与式(II)的化合物偶联或反应。所述方法还可以包括用活化剂诸如N-羟基琥珀酰亚胺处理。所述方法还可以包括用碱处理。碱可以是NMM。在实施方案中,试剂和/或溶剂的组合可以是DCC/N-羟基琥珀酰亚胺/THF。在实施方案中,试剂和/或溶剂的组合可以是NMM/DMF。


[0704] 所述方法还可以包括将式(III)的化合物转化为式(IV)的化合物



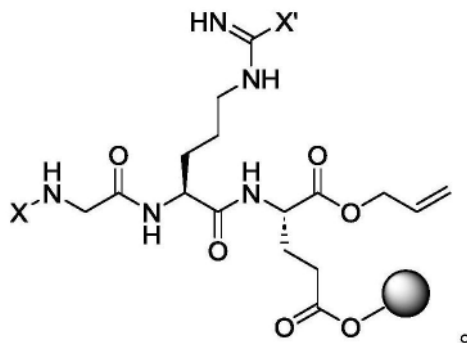
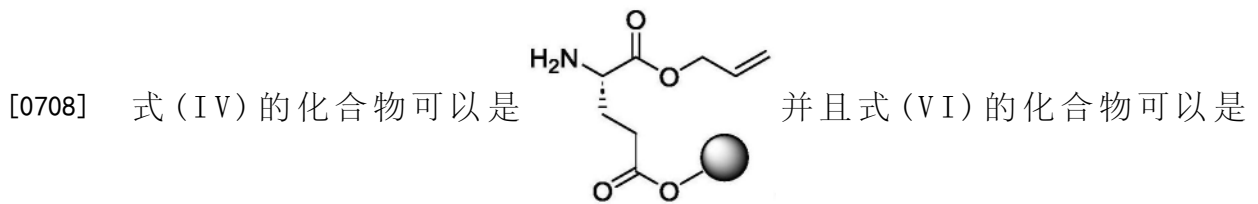
[0705] 所述方法可以包括在碱或弱酸的存在下,使式(III)的化合物脱保护或使其转化为式(IV)的化合物。

[0706] 所述方法还可以另外包括使式(IV)的化合物与式(V)的化合物反应

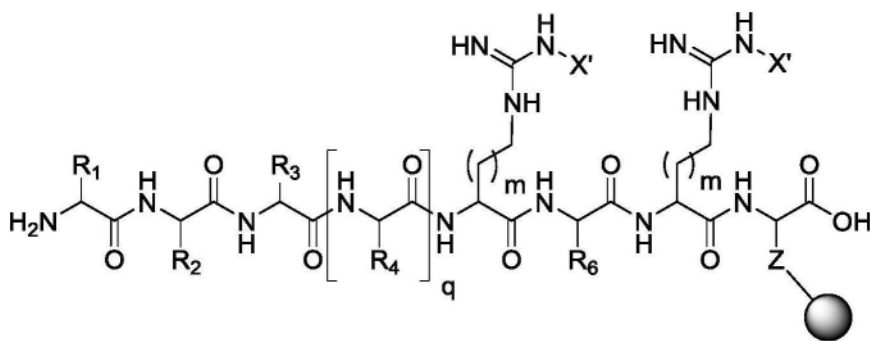


酸侧链的基团并且  是固体支持物。

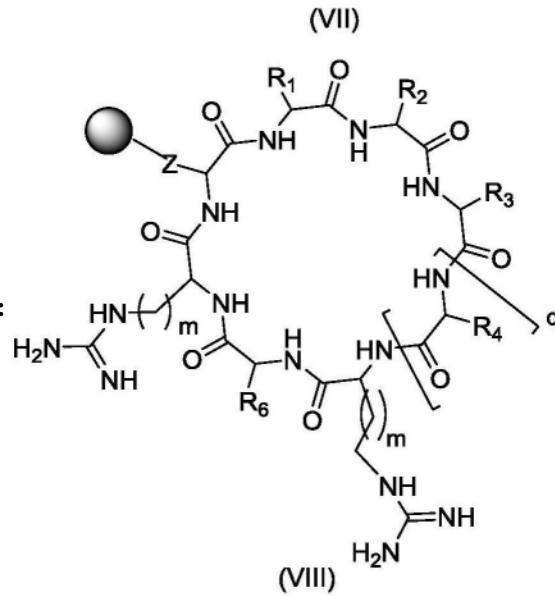
[0707] 所述方法可以包括在偶联试剂 (诸如DIC、HATU、DEPBT)、添加剂 (诸如HOAt/Oxyma/K-Oxyma、Oxyma-B) 和碱 (诸如DIPEA/NMM) 的存在下,使式 (VI) 的化合物与式 (IV) 的化合物偶联或反应。在实施方案中,试剂和/或溶剂的组合可以是DIC/Oxyma。在实施方案中,试剂和/或溶剂的组合可以是DIC/HOAt。在实施方案中,试剂和/或溶剂的组合可以是DEPBT/DIPEA。在实施方案中,试剂和/或溶剂的组合可以是DEPBT/NMM。在实施方案中,试剂和/或溶剂的组合可以是HATU/NMM。在实施方案中,试剂和/或溶剂的组合可以是DIC/K-Oxyma。在实施方案中,试剂和/或溶剂的组合可以是DIC/Oxyma-B。在实施方案中,溶剂包括DMF。



[0709] 所述方法还可以包括用偶联剂、添加剂和碱处理式 (VII) 的化合物



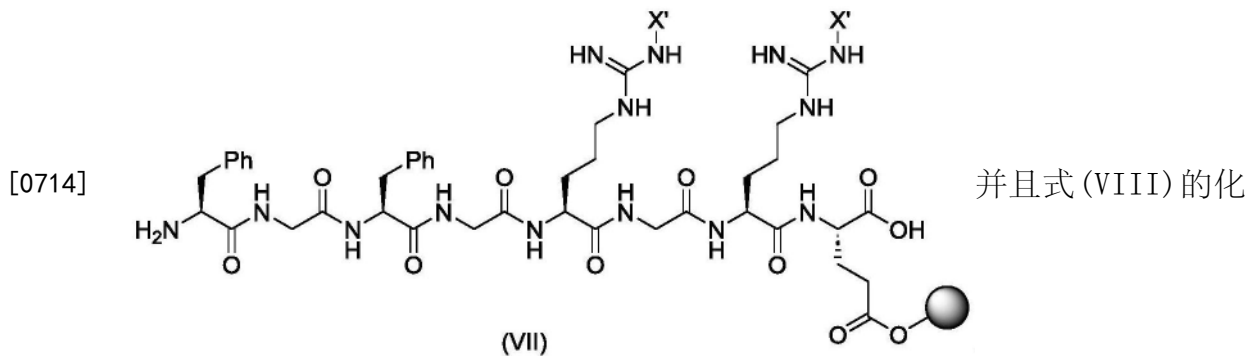
[0710] 以获得式 (VIII) 的化合物:



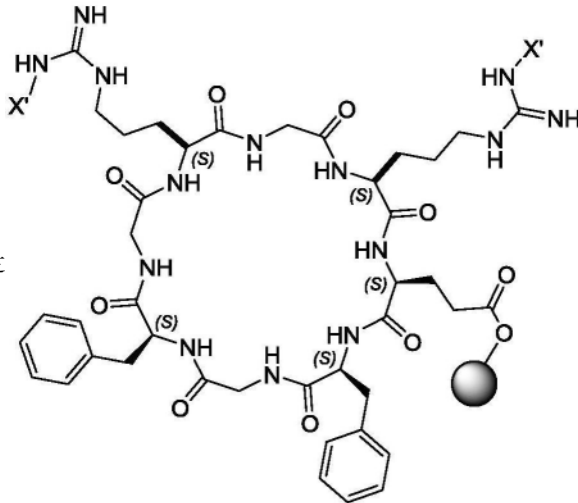
[0711] 在一些实施方案中, 偶联剂可以是PyOxim、PyAOP、PyBOP、PyBrOP、HATU、DIC、HBTU、TBTU、COMU或DEPBT。在一些实施方案中, 添加剂可以是Oxyma、HOAt或HOBt。在一些实施方案中, 碱可以是DIPEA或NMM。

[0712] 在实施方案中, 试剂和/或溶剂的组合可以是HATU/HOAt/DIPEA。在实施方案中, 试剂和/或溶剂的组合可以是PyAOP/HOAt/DIPEA。在实施方案中, 试剂和/或溶剂的组合可以是PyAOP/HOAt/NMM。在实施方案中, 试剂和/或溶剂的组合可以是PyBOP/HOBt/DIPEA。在实施方案中, 试剂和/或溶剂的组合可以是PyBrop/DIPEA。在实施方案中, 试剂和/或溶剂的组合可以是PyOxim/Oxyma/DIPEA。在实施方案中, 试剂和/或溶剂的组合可以是DIC/HOBt/DIPEA。在实施方案中, 试剂和/或溶剂的组合可以是HBTU/HOBt/DIPEA。在实施方案中, 试剂和/或溶剂的组合可以是TBTU/HOBt/DIPEA。在实施方案中, 试剂和/或溶剂的组合可以是COMU/Oxyma/DIPEA。在实施方案中, 试剂和/或溶剂的组合可以是DEPBT/DIPEA。在实施方案中, 溶剂包括DMF。

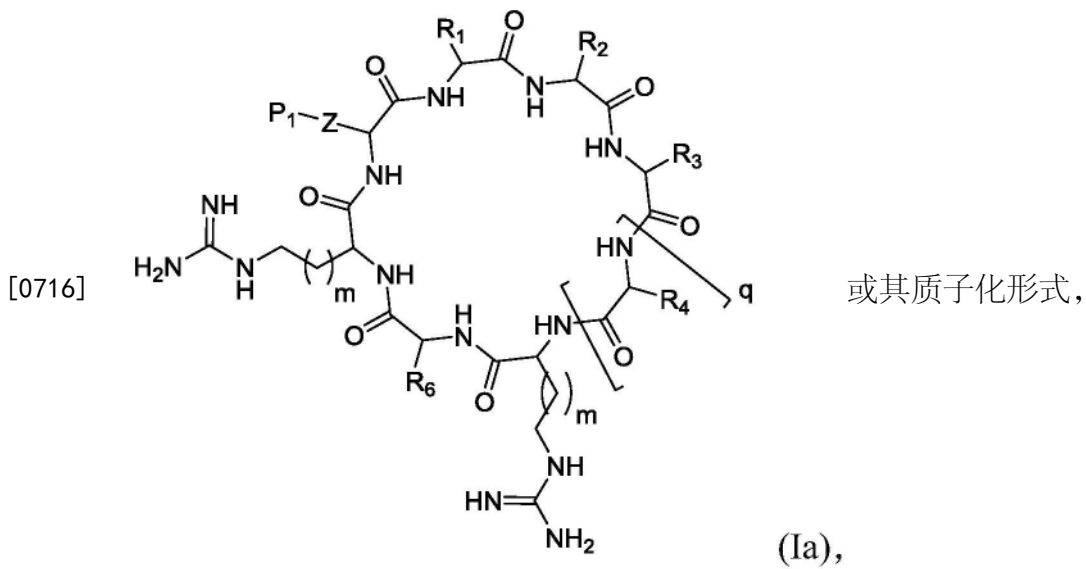
[0713] 式 (VII) 的化合物可以是



合物可以是



[0715] 本公开还涉及一种制备式 (Ia) 的环肽的方法：



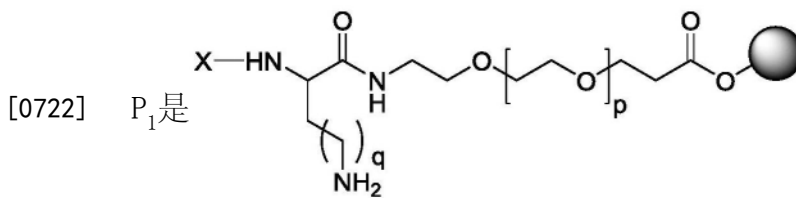
[0717] 其中：

[0718] R_1 、 R_2 和 R_3 可各自独立地是H或具有包含芳族基团的侧链的氨基酸残基；

[0719] R_1 、 R_2 和 R_3 中的至少一者是氨基酸的芳族或杂芳族侧链；

[0720] R_4 和 R_6 独立地是H或氨基酸侧链；

[0721] Z是氨基酸侧链的基团；

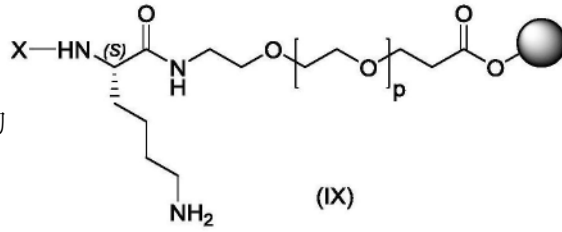


[0723] q是1、2、3或4；并且

[0724] 每个m独立地是整数0、1、2或3，

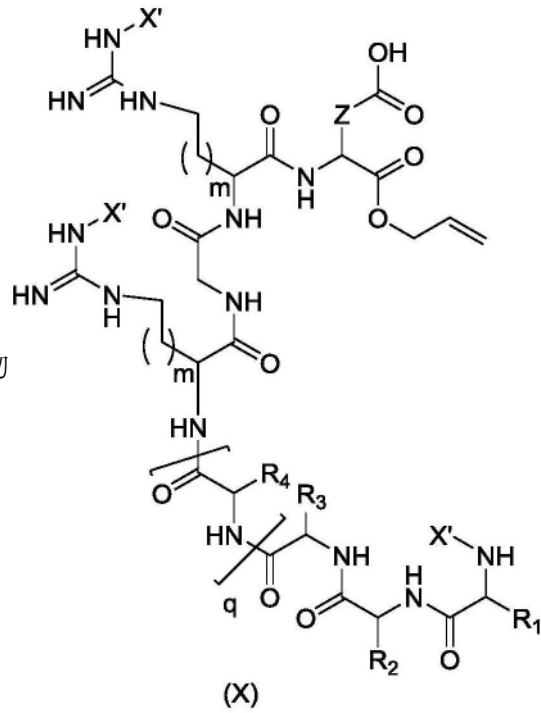
[0725] 所述方法包括：

[0726] 使式 (IX) 的化合物



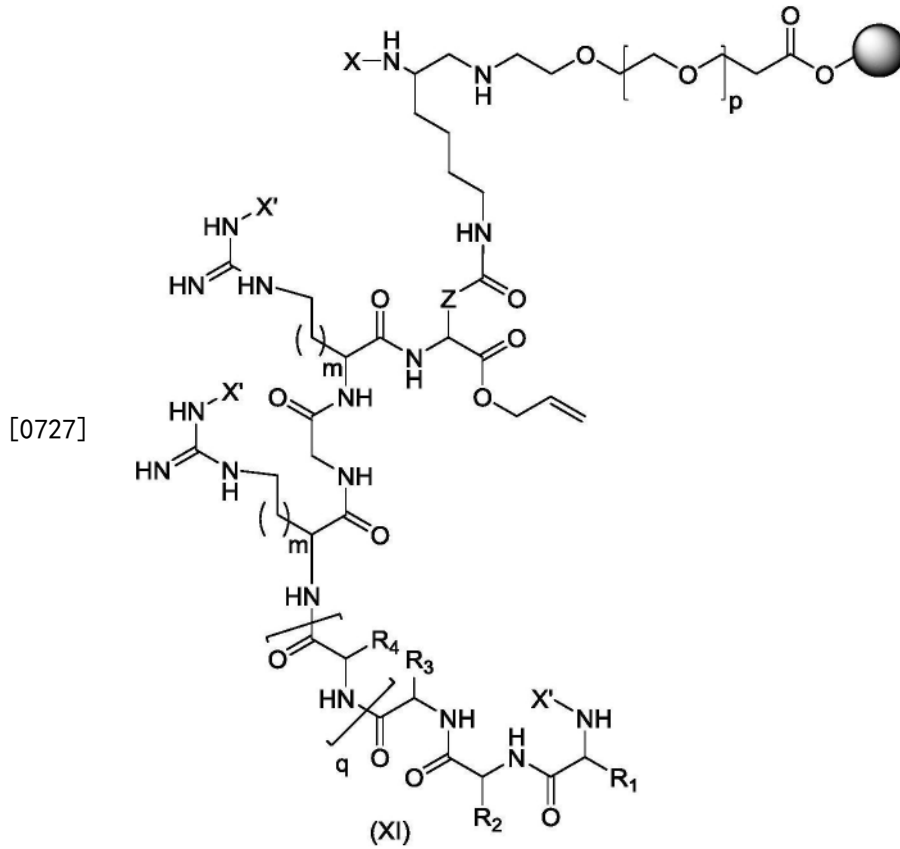
其中X是保护基团并

且 是固体支持物, 与式 (X) 的化合物

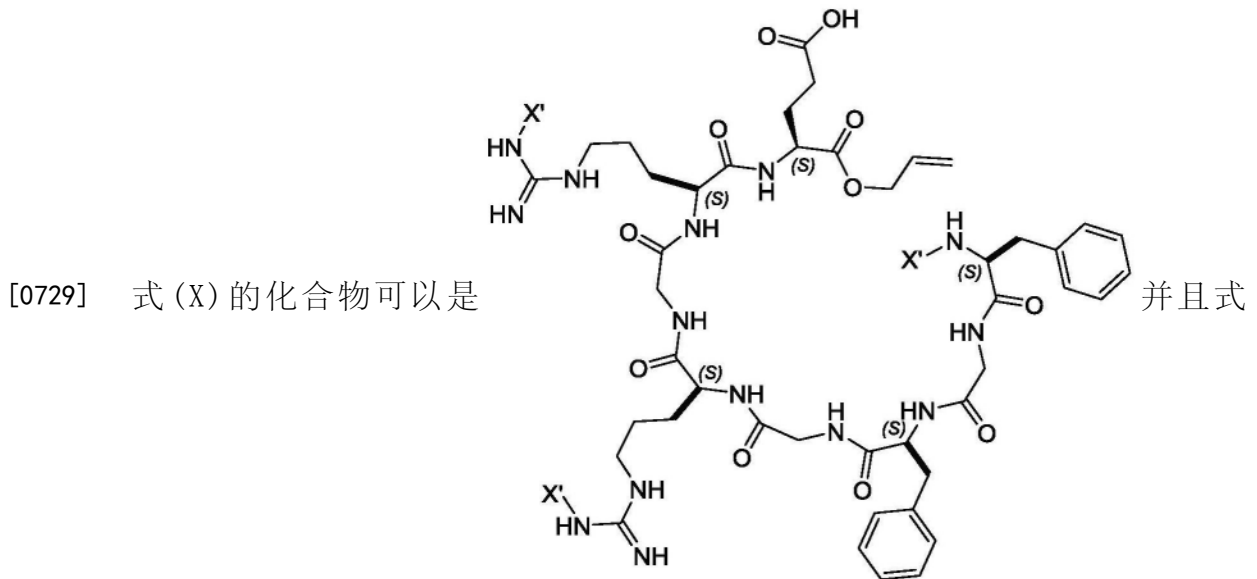


其中X'

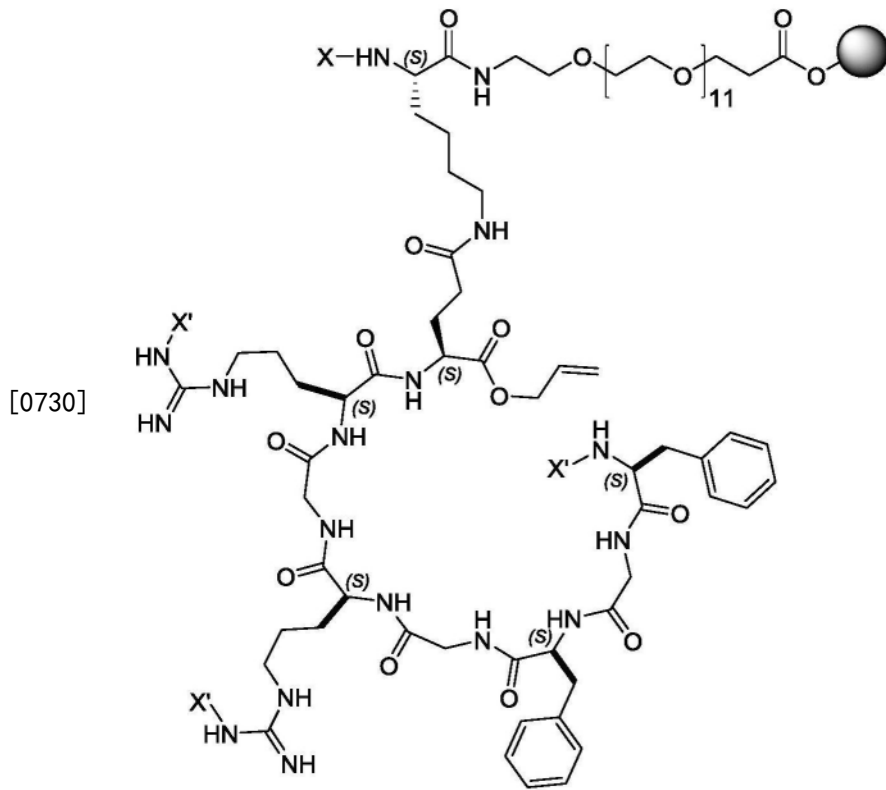
各自独立地是保护基团并且Z是氨基酸侧链的基团, 反应以形成式 (XI) 的化合物



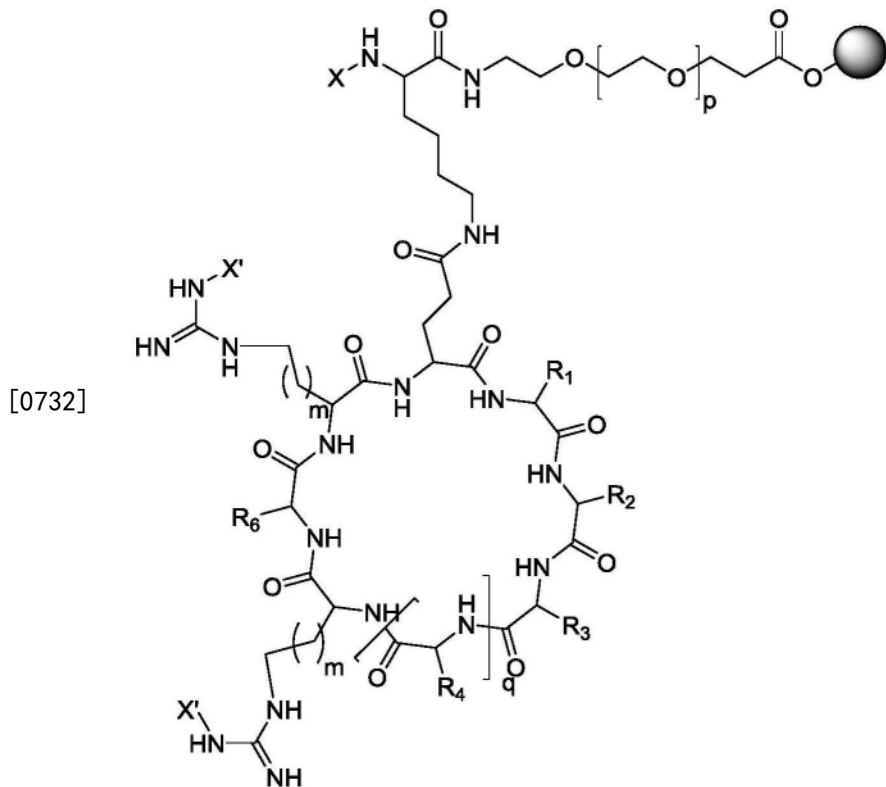
[0728] 所述方法可以包括在标准固相肽条件的存在下使式 (IX) 的化合物与式 (X) 的化合物偶联或反应[Chan,W.C.,White P.D.,编Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis:A Practical Approach,Oxford University Press,2000]。



(XI) 的化合物可以是



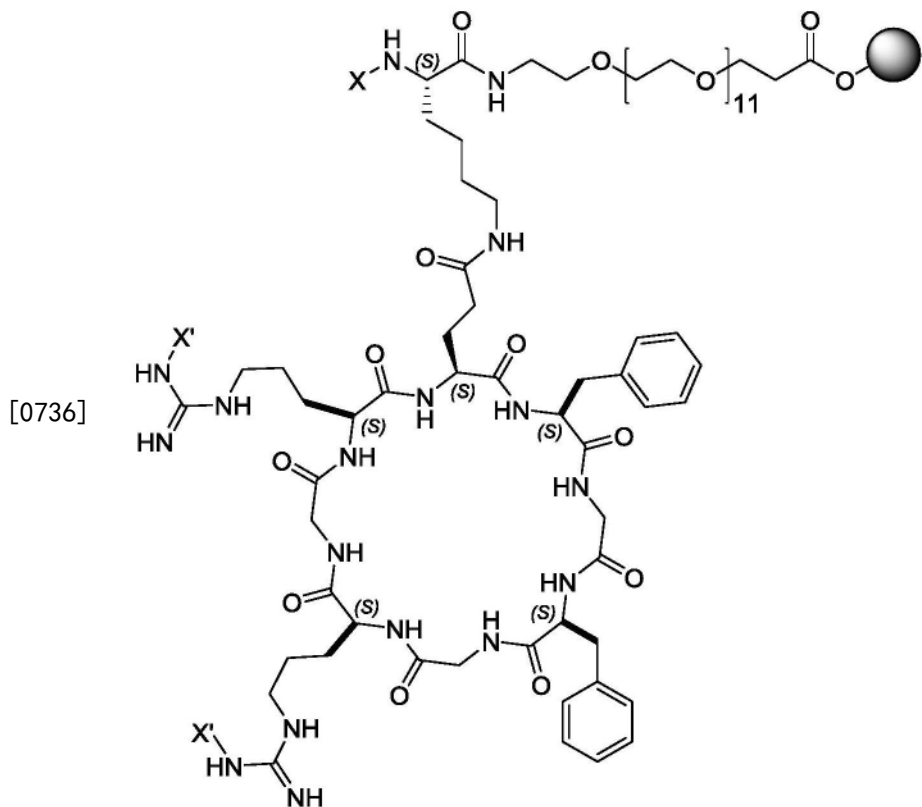
[0731] 所述方法还可以包括处理式 (XI) 的化合物以形成式 (XII) 的化合物



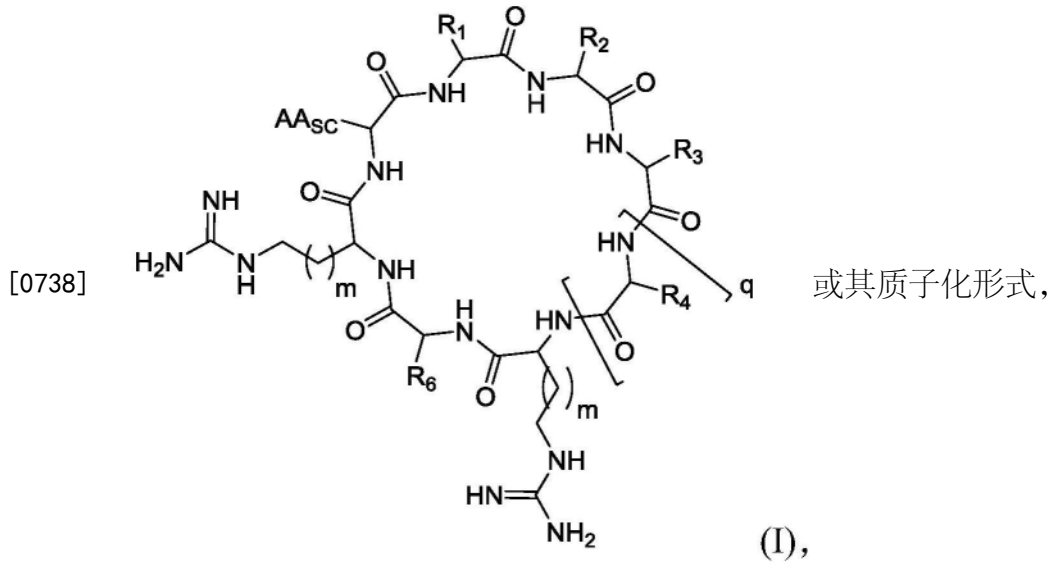
[0733] 所述方法可以包括在碱诸如哌啶/胍/DBU/氢氧化钠/吡咯烷/吗啉/二乙胺/叔丁胺的存在下,用式 (XII) 的化合物处理式 (XI) 的化合物。所述方法还可以包括添加 $Pd(PPh_3)_4/PhSiH_3/DCM$ 。所述方法还可以包括添加偶联试剂(诸如PyOxim)、添加剂(诸如Oxyma)和碱(诸如DIPEA)。

[0734] 在实施方案中,试剂和/或溶剂的组合可以是哌啶。在实施方案中,试剂和/或溶剂的组合可以是哌啶/甲酸。在实施方案中,试剂和/或溶剂的组合可以是哌啶/Oxyma。在实施方案中,试剂和/或溶剂的组合可以是DBU。在实施方案中,试剂和/或溶剂的组合可以是DBU/哌啶。在实施方案中,试剂和/或溶剂的组合可以是DBU/哌啶/Oxyma。在实施方案中,试剂和/或溶剂的组合可以是DBU/哌啶/HOBt。在实施方案中,试剂和/或溶剂的组合可以是DBU/哌啶/甲酸。在实施方案中,试剂和/或溶剂的组合可以是叔丁胺、吡咯烷。在实施方案中,试剂和/或溶剂的组合可以是吗啉。在实施方案中,试剂和/或溶剂的组合可以是二乙胺。在实施方案中,试剂和/或溶剂的组合可以是氢氧化钠。在实施方案中,试剂和/或溶剂的组合可以是Pd(PPh₃)₄/PhSiH₃/DCM,用于去除烯丙基酯。在实施方案中,用于环化的试剂和/或溶剂的组合可以是PyOxim/Oxyma/DIPEA/DMF/DCM。

[0735] 式(XII)的化合物可以是



[0737] 本公开涉及一种制备式(I)的环肽的方法:



[0739] 其中：

[0740] R_1 、 R_2 和 R_3 可各自独立地是H或具有包含芳族基团的侧链的氨基酸残基；

[0741] R_1 、 R_2 和 R_3 中的至少一者是氨基酸的芳族或杂芳族侧链；

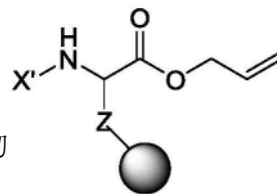
[0742] R_4 和 R_6 独立地是H或氨基酸侧链；

[0743] AA_{Sc} 是氨基酸侧链；

[0744] q 是1、2、3或4；并且


[0745] 每个 m 独立地是整数0、1、2或3；

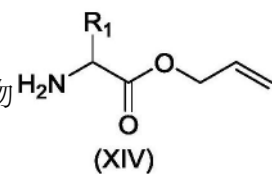
[0746] 所述方法包括：使式 (XIII) 的化合物



其中 X' 是保护基团， Z 是

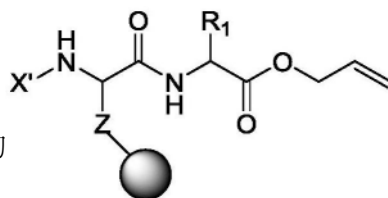
(XIII)

氨基酸侧链的基团并且  是固体支持物，与式 (XIV) 的化合物



(XIV)

以得到式 (XV) 的化合物

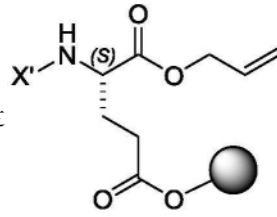


(XV)

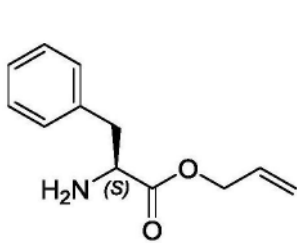
[0747] 所述方法可以包括在 $Pd(PPh_3)_4/PhSiH_3/DCM$ 的存在下使式 (XIII) 的化合物与式 (XIV) 的化合物偶联或反应以去除烯丙基酯，并且随后按照标准固相肽合成条件进行组装，以供氨基酸的脱保护和偶联 [Chan, W.C., White P.D., 编 Fmoc Solid Phase Peptide

Synthesis: A Practical Approach, Oxford University Press, 2000]。

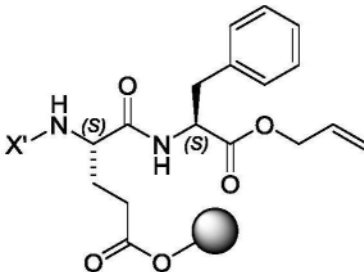
[0748] 所述方法,其中式 (XIII) 的化合物是



式 (XIV) 的化合物是

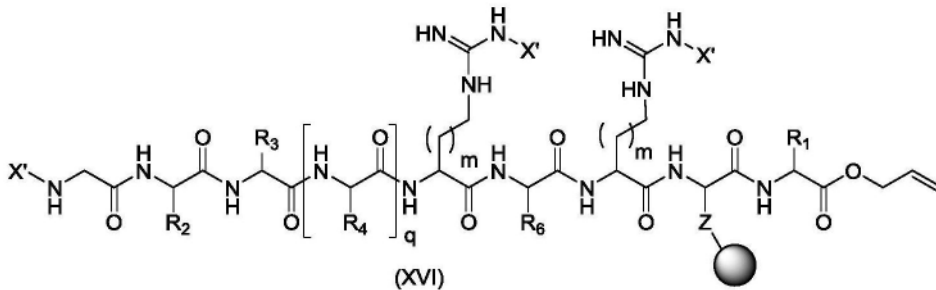


并且式 (XV) 的化合物是



[0749] 所述方法还可以包括处理式 (XV) 的化合物以获得式 (XVI) 的化合物:

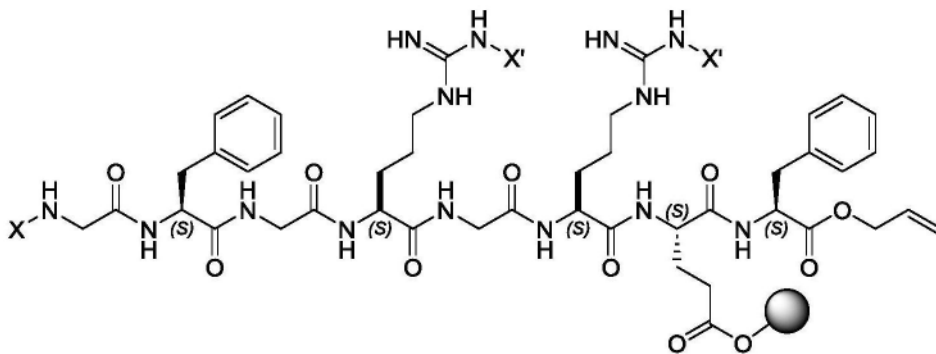
[0750]



[0751] 所述方法可以包括在标准固相肽合成条件的存在下处理式 (XV) 的化合物以进行氨基酸的脱保护和偶联 [Chan, W.C., White P.D., 编 Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach, Oxford University Press, 2000]。

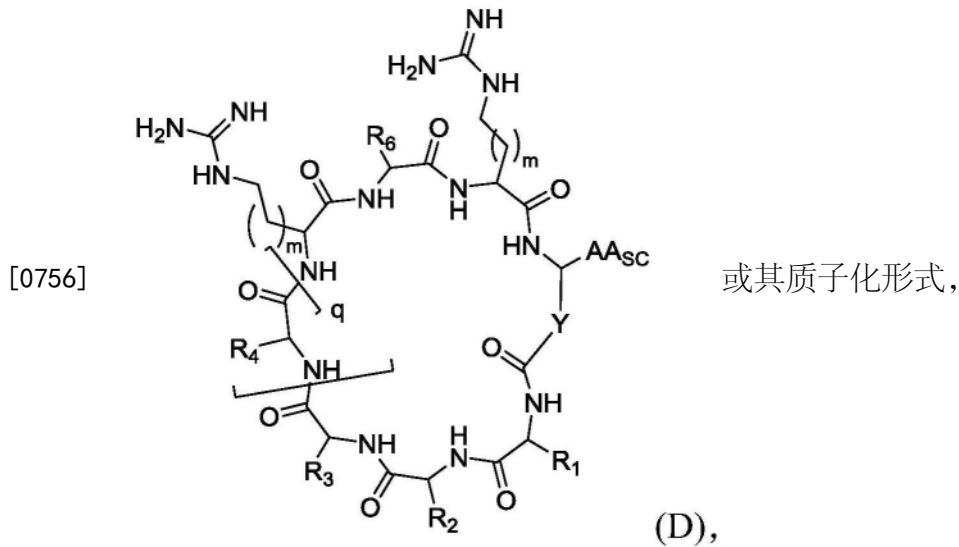
[0752] 式 (XVI) 的化合物可以是

[0753]



[0754] 替代环肽形成

[0755] 本公开还涉及制备式 (D) 的化合物



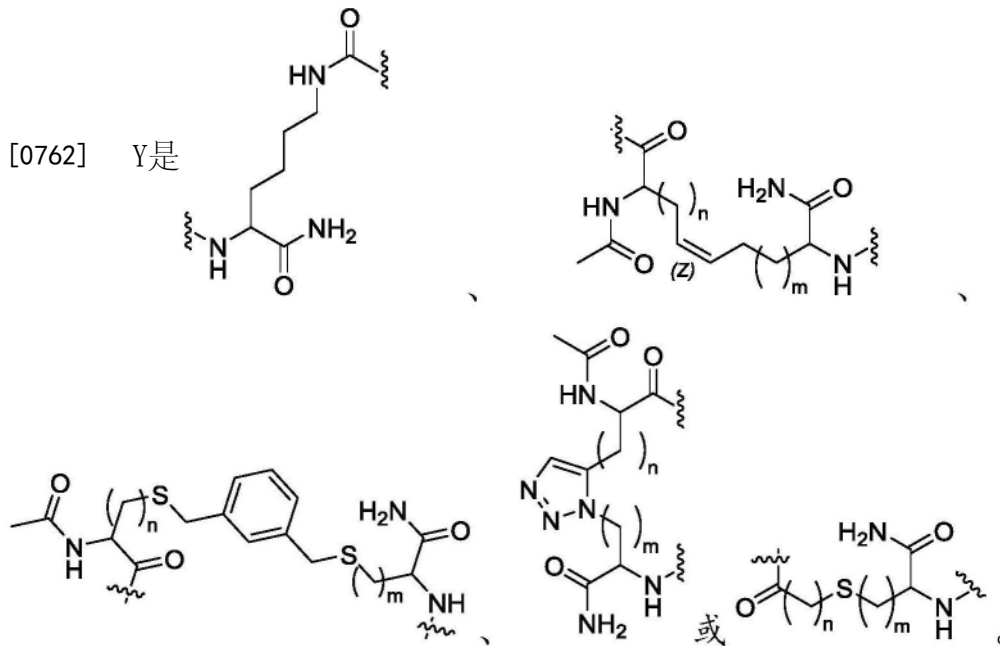
[0757] 其中：

[0758] R_1 、 R_2 和 R_3 可各自独立地是H或具有包含芳族基团的侧链的氨基酸残基；

[0759] R_1 、 R_2 和 R_3 中的至少一者是氨基酸的芳族或杂芳族侧链；

[0760] R_4 和 R_6 独立地是H或氨基酸侧链；

[0761] AA_{Sc} 是氨基酸侧链；



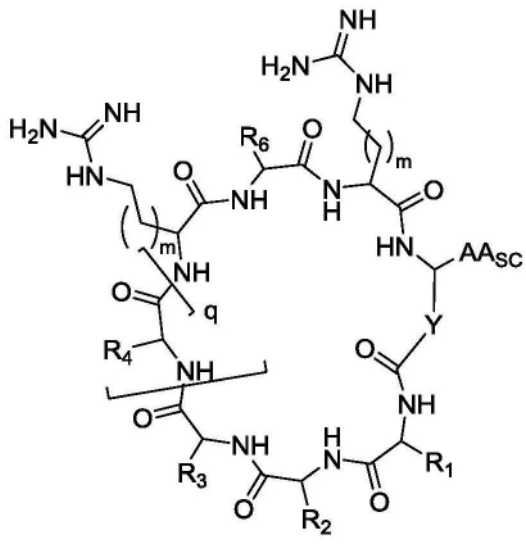
[0763] q是1、2、3或4；

[0764] 每个m独立地是整数0、1、2或3，并且

[0765] 每个n独立地是整数0、1、2或3。

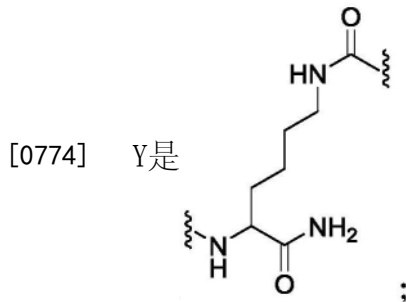
[0766] 大环内酰胺化

[0767] 本公开还涉及一种制备式(D-I)的环肽的方法：

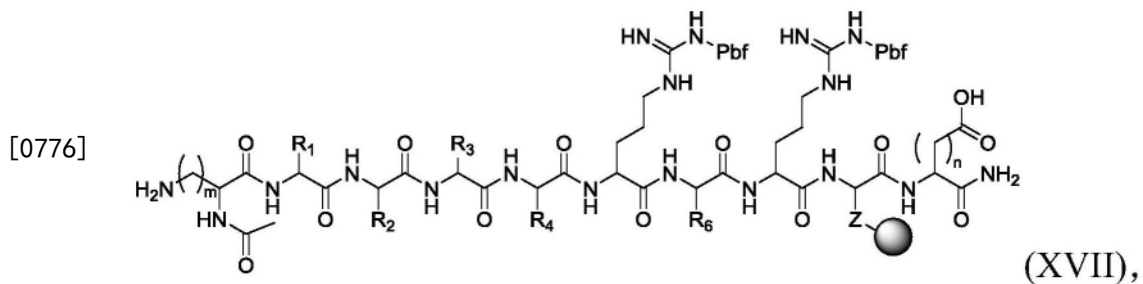



或其质子化形式,其中:

- [0768] R_1 、 R_2 和 R_3 可各自独立地是H或具有包含芳族基团的侧链的氨基酸残基;
 [0769] R_1 、 R_2 和 R_3 中的至少一者是氨基酸的芳族或杂芳族侧链;
 [0770] R_4 和 R_6 独立地是H或氨基酸侧链;
 [0771] AA_{sc} 是氨基酸侧链;
 [0772] q 是1、2、3或4;
 [0773] 每个 m 独立地是整数0、1、2或3,并且



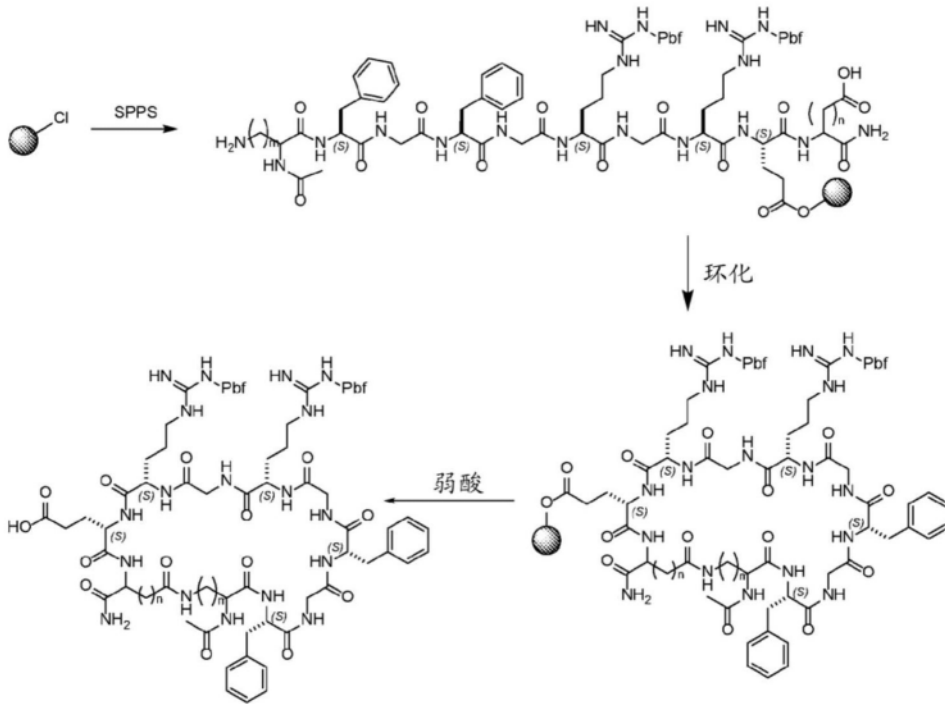
[0775] 所述方法包括:使式 (XVII) 的化合物环化



[0777] 其中Z是氨基酸侧链的基团并且是固体支持物。

[0778] 方案1中例示了合成方案的一个实例。

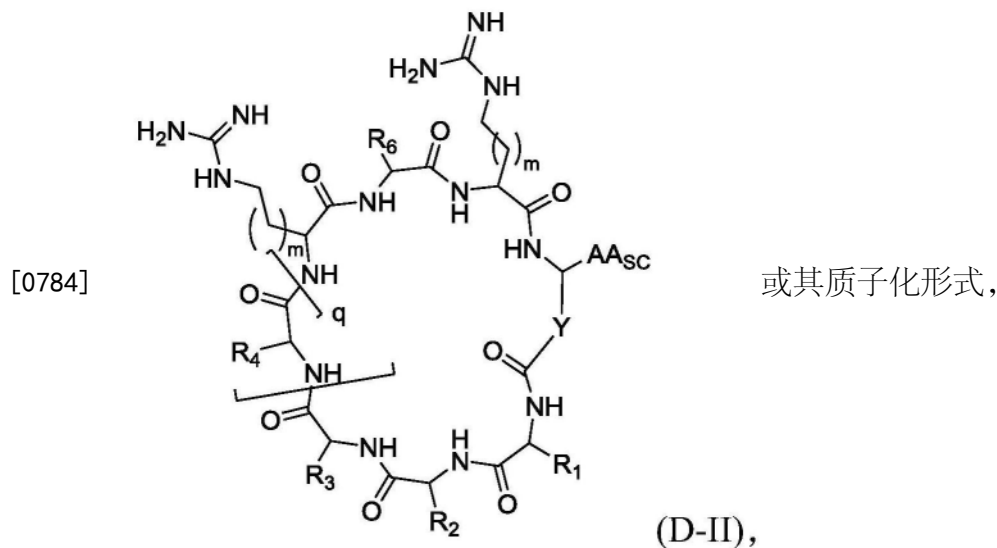
[0779] 方案1



[0781] 所述方法可以包括用于氨基酸的脱保护和偶联的标准固相肽合成条件 [Chan, W.C., White P.D., 编 Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach, Oxford University Press, 2000]。例如, 使用偶联试剂 (诸如 PyOxim)、添加剂 (诸如 Oxyma) 和碱 (诸如 DIPEA) 进行环化, 以及用例如 HFIP 或 TFA 处理以从固体裂解。

[0782] 环闭合复分解 (RCM)

[0783] 本公开还涉及一种制备式 (D-II) 的环肽的方法:



[0785] 其中:

[0786] R_1 、 R_2 和 R_3 可各自独立地是 H 或具有包含芳族基团的侧链的氨基酸残基;

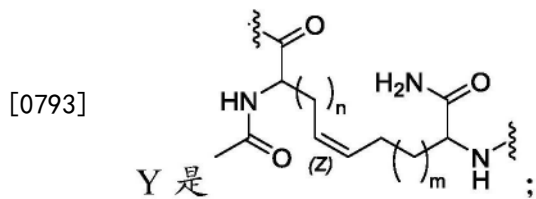
[0787] R_1 、 R_2 和 R_3 中的至少一者是氨基酸的芳族或杂芳族侧链;

[0788] R_4 和 R_6 独立地是 H 或氨基酸侧链;

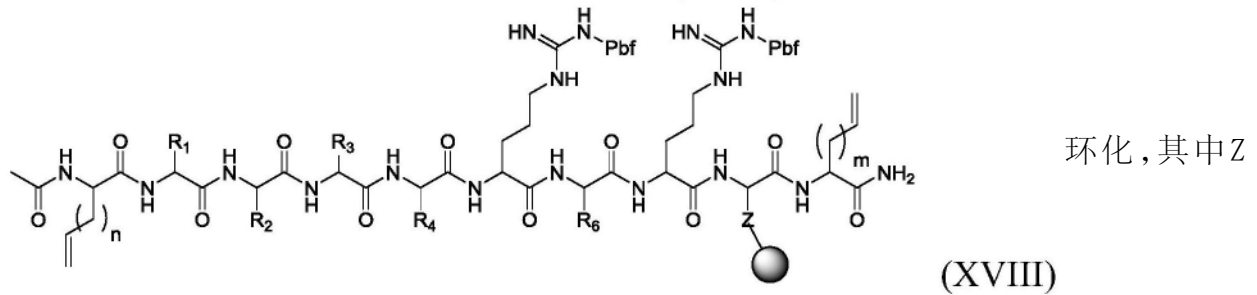
[0789] AA_{sc} 是氨基酸侧链;

[0790] q 是 1、2、3 或 4;

- [0791] 每个m独立地是整数0、1、2或3，
 [0792] 每个n独立地是整数0、1、2或3，并且

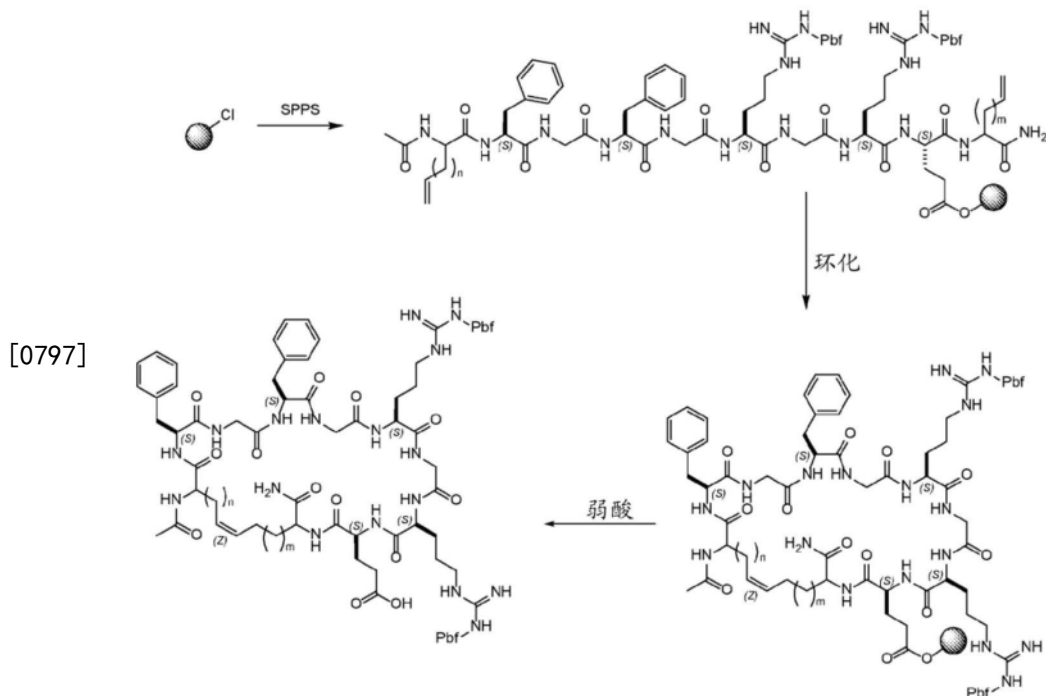


- [0794] 所述方法包括：使式 (XVIII) 的化合物：



是氨基酸侧链的基团并且  是固体支持物。

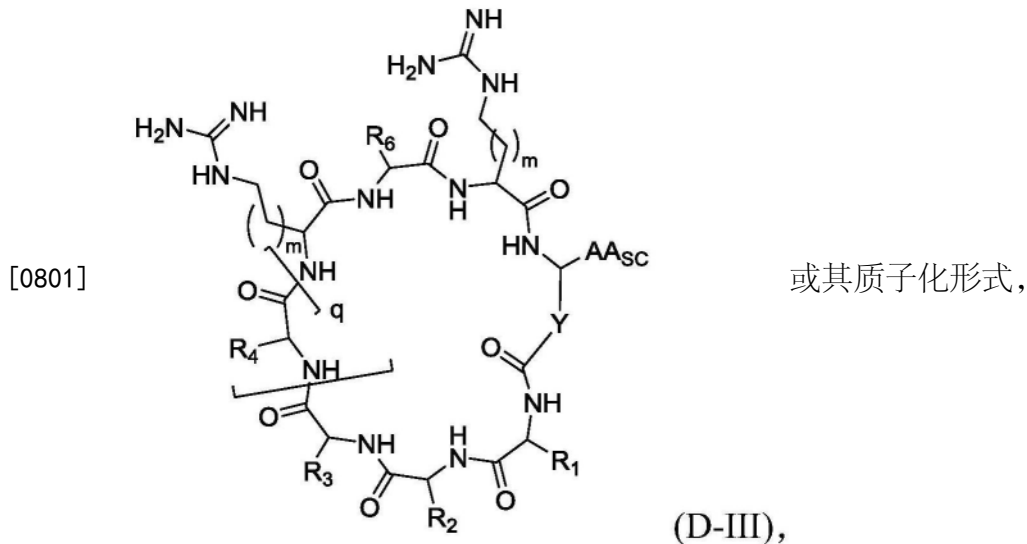
- [0795] 方案2中例示了合成方案的一个实例。
 [0796] 方案2



- [0797] 所述方法可以包括用于氨基酸的脱保护和偶联的标准固相肽合成条件 [Chan, W.C., White P.D., 编 Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach, Oxford University Press, 2000]。例如, 使用偶联试剂 (诸如 PyOxim)、添加剂 (诸如 Oxyma) 和碱 (诸如 DIPEA) 进行环化, 以及用例如 HFIP 或 TFA 处理以从固体裂解。

[0799] 硫酯钉合 (Thioester stapling)

[0800] 本公开还涉及一种制备式 (D-III) 的环肽的方法：



[0802] 其中:

[0803] R_1 、 R_2 和 R_3 可各自独立地是H或具有包含芳族基团的侧链的氨基酸残基;

[0804] R_1 、 R_2 和 R_3 中的至少一者是氨基酸的芳族或杂芳族侧链;

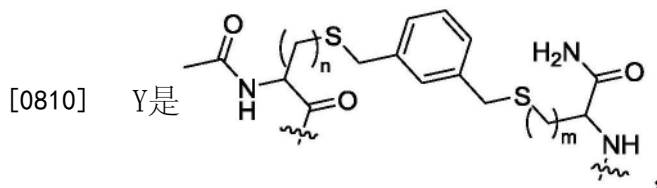
[0805] R_4 和 R_6 独立地是H或氨基酸侧链;

[0806] AA_{sc} 是氨基酸侧链;

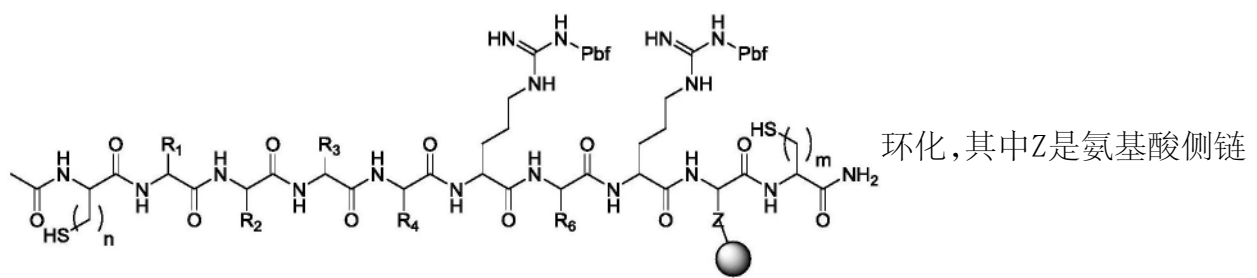
[0807] q 是1、2、3或4;

[0808] 每个 m 独立地是整数0、1、2或3,

[0809] 每个 n 独立地是整数0、1、2或3,并且



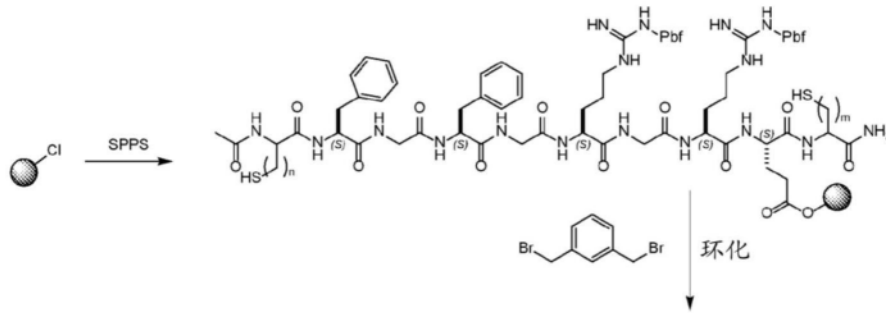
[0811] 所述方法包括:使式 (XIX) 的化合物:



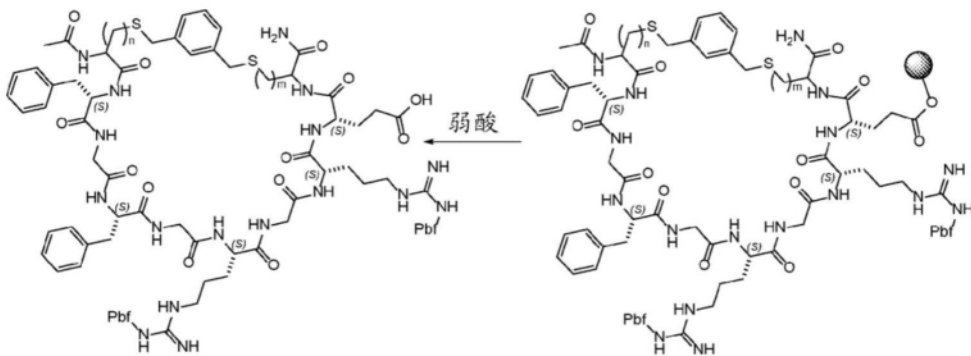
的基团并且  是固体支持物。

[0812] 方案3中例示了合成方案的一个实例。

[0813] 方案3



[0814]

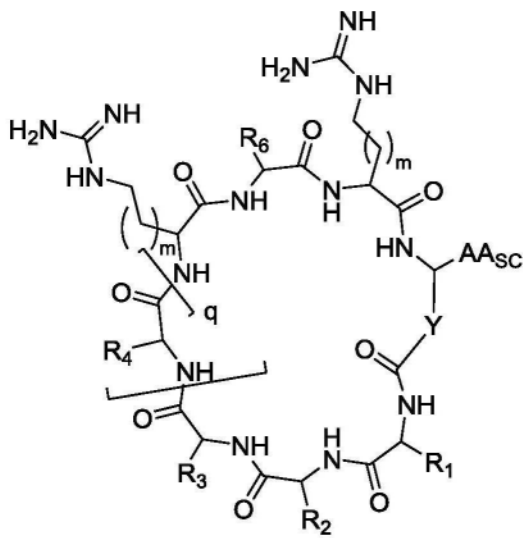


[0815] 所述方法可以包括用于氨基酸的脱保护和偶联的标准固相肽合成条件 [Chan, W.C., White P.D., 编 Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach, Oxford University Press, 2000]。例如, 使用偶联试剂 (诸如 PyOxim)、添加剂 (诸如 Oxyma) 和碱 (诸如 DIPEA) 进行环化, 以及用例如 HFIP 或 TFA 处理以从固体裂解。

[0816] Cu(I) 催化叠氮化物-炔烃环加成 (CuAAC)

[0817] 本公开还涉及一种制备式 (D-IV) 的环肽的方法:

[0818]



或其质子化形式,

(D-IV),

[0819] 其中:

[0820] R_1 、 R_2 和 R_3 可各自独立地是 H 或具有包含芳族基团的侧链的氨基酸残基;

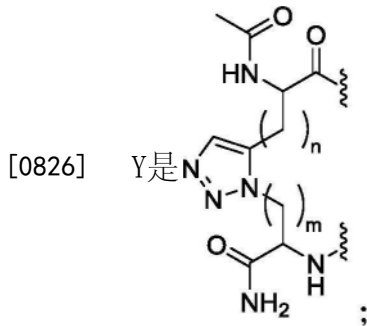
[0821] R_1 、 R_2 和 R_3 中的至少一者是氨基酸的芳族或杂芳族侧链;

[0822] R_4 和 R_6 独立地是 H 或氨基酸侧链;

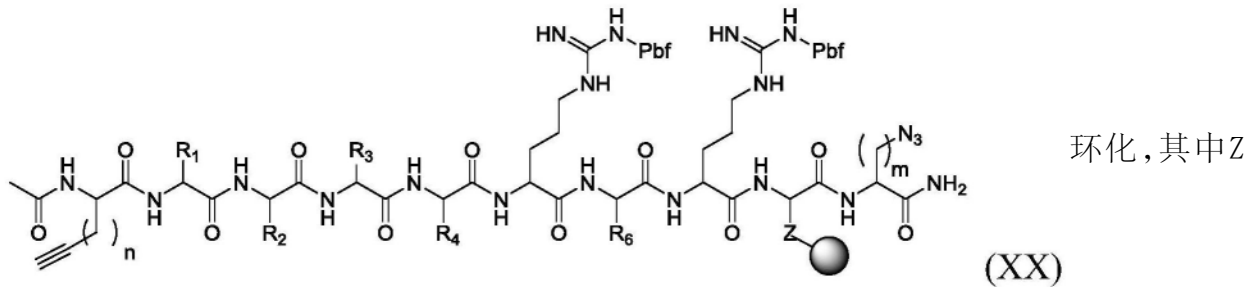
[0823] AA_{SC} 是氨基酸侧链;

[0824] q 是 1、2、3 或 4;

[0825] 每个m独立地是整数0、1、2或3,并且



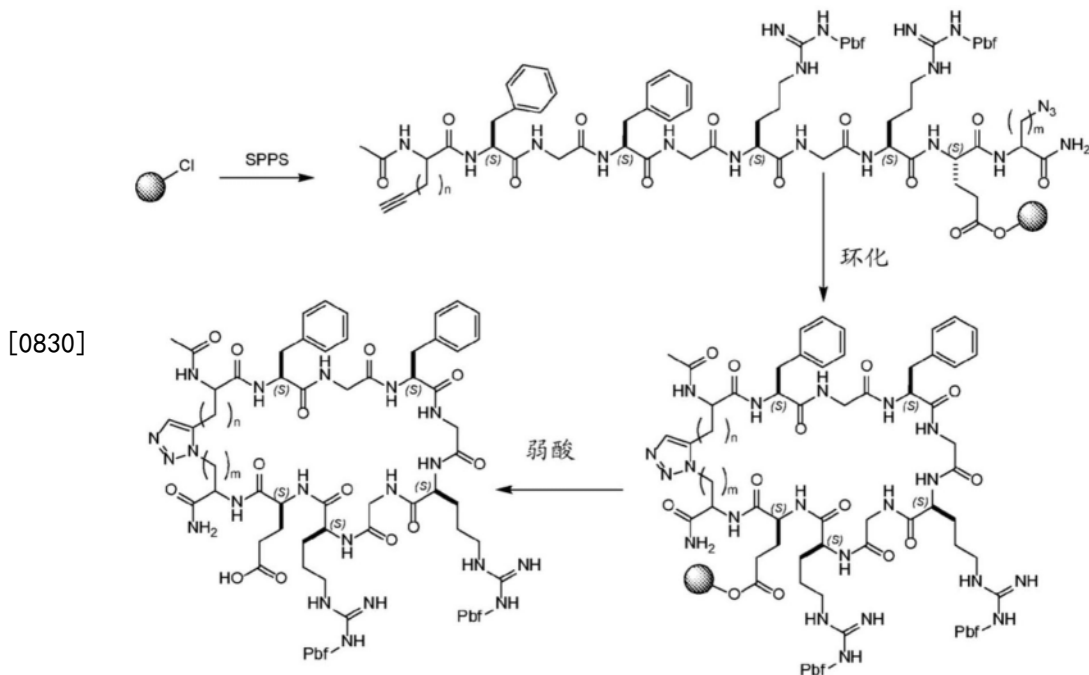
[0827] 所述方法包括:使式 (XX) 的化合物:



是氨基酸侧链的基团并且 是固体支持物。

[0828] 方案4中例示了合成方案的一个实例。

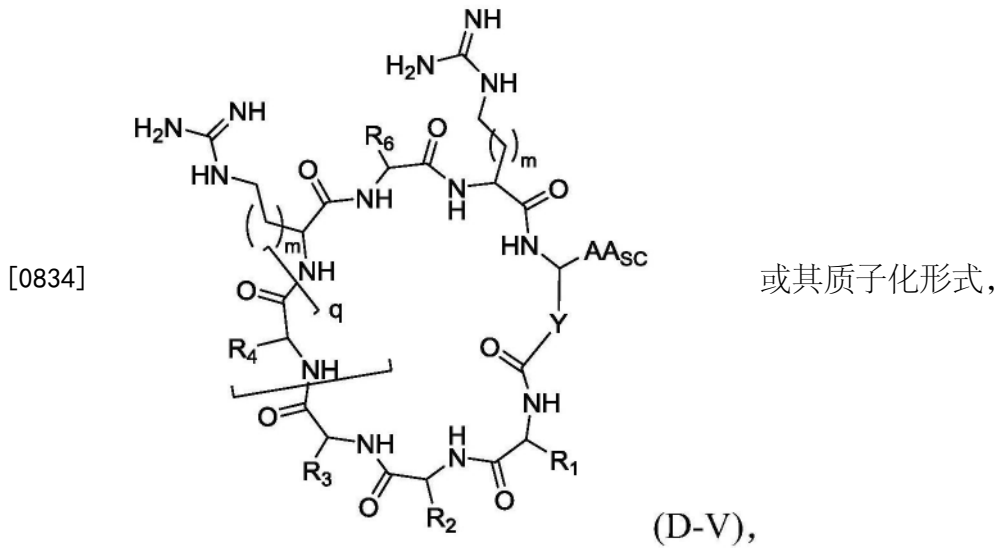
[0829] 方案4



[0831] 所述方法可以包括用于氨基酸的脱保护和偶联的标准固相肽合成条件 [Chan, W.C., White P.D., 编 Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach, Oxford University Press, 2000]。例如, 使用偶联试剂 (诸如 PyOxim)、添加剂 (诸如 Oxyma) 和碱 (诸如 DIPEA) 进行环化, 以及用例如 HFIP 或 TFA 处理以从固体裂解。

[0832] 硫醚环化

[0833] 本公开还涉及一种制备式 (D-V) 的环肽的方法:



[0835] 其中:

[0836] R_1 、 R_2 和 R_3 可各自独立地是H或具有包含芳族基团的侧链的氨基酸残基;

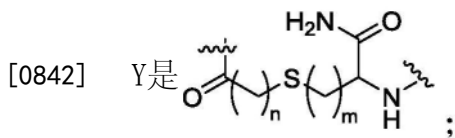
[0837] R_1 、 R_2 和 R_3 中的至少一者是氨基酸的芳族或杂芳族侧链;

[0838] R_4 和 R_6 独立地是H或氨基酸侧链;

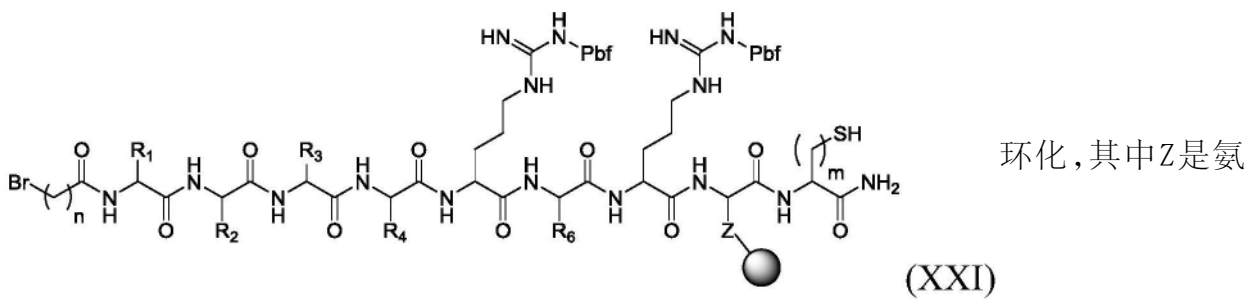
[0839] AA_{sc} 是氨基酸侧链;

[0840] q 是1、2、3或4;

[0841] 每个 m 独立地是整数0、1、2或3,并且



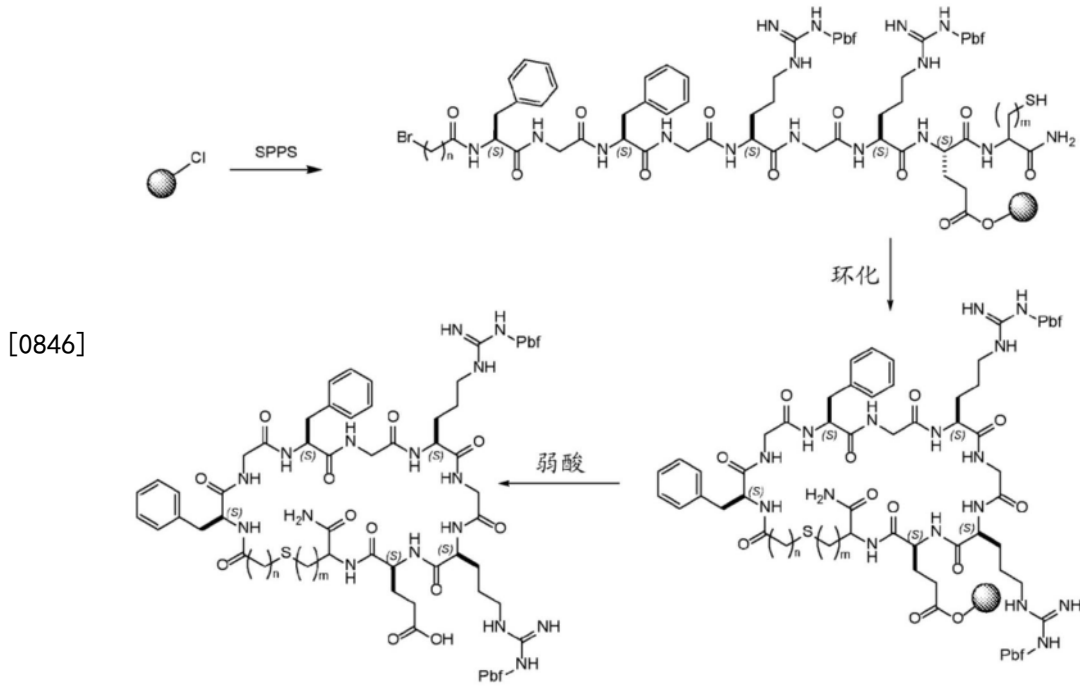
[0843] 所述方法包括:使式 (XXI) 的化合物



基侧链的基团并且  是固体支持物。

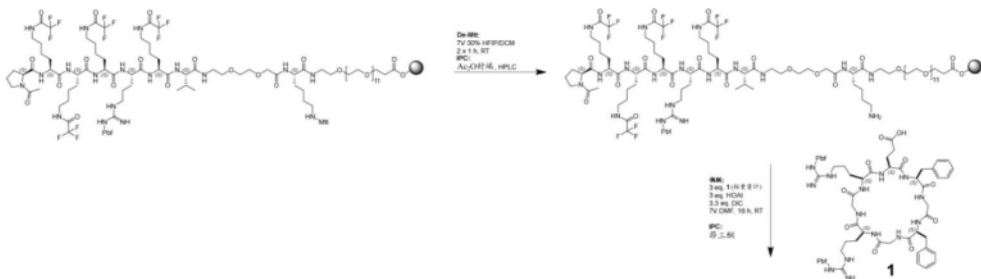
[0844] 方案5中例示了合成方案的一个实例。

[0845] 方案5

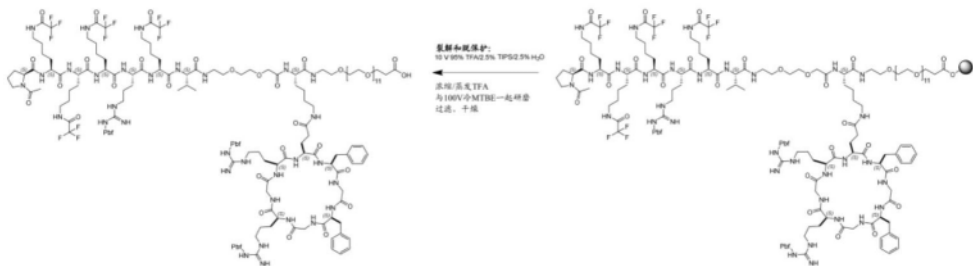


[0847] 所述方法可以包括用于氨基酸的脱保护和偶联的标准固相肽合成条件 [Chan, W.C., White P.D., 编 Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach, Oxford University Press, 2000]。例如, 使用偶联试剂 (诸如 PyOxim)、添加剂 (诸如 Oxyma) 和碱 (诸如 DIPEA) 进行环化, 以及用例如 HFIP 或 TFA 处理以从固体裂解。

[0848] 环肽偶联到线性肽



[0849]

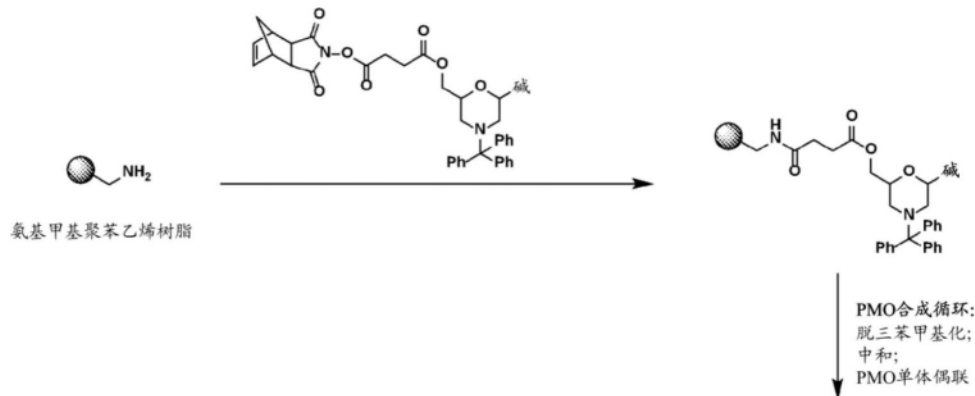


[0850] 制备二氨基磷酸酯吗啉代寡聚物 (PMO) 的方法

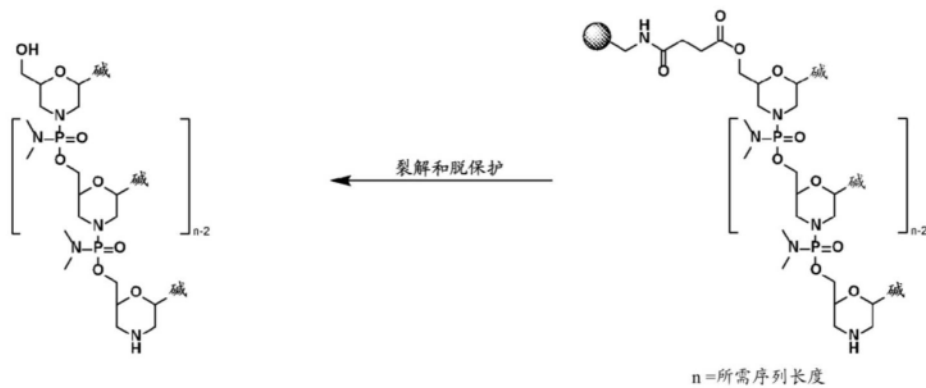
[0851] PMO可以根据本领域已知的任何方法来制备, 诸如在以下中所例示: Summerton等人 US Patent 5,166,315, 1992年11月24日; Summerton等人 US Patent 5,185,444, 1993年2月9日; Summerton等人 US Patent 5,217,866, 1993年6月8日; Summerton等人 US Patent 5,235,033, 1993年8月10日; Summerton等人 US Patent 5,506,337, 1996年4月9日; Summerton等人 US Patent 5,521,063, 1996年5月28日; Summerton等人 Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 1997, 7:187-195; Iversen, P. International Patent WO 02/092617A1, 2002年

11月21日;Stein等人US Patent 6,828,105B2,2004年12月7日;Iversen等人US Patent Application 2005/0261249A1,2005年11月24日;Mourich等人US Patent Application 2006/0276425A1,2006年12月7日;Stein等人US Patent Application 2007/0004661A1,2007年1月4日;Stein等人US Patent Application 2007/0129323A1,2007年6月7日;Moulton等人International Patent WO 2009/005793 A2,2009年1月8日;Moulton等人US Patent Application 2010/0016215 A1,2010年1月21日;Sazani等人US Patent Application,2010/0130591,2010年5月27日;Weller等人US Patent Application 2010/0234281A1,2010年9月16日;Weller等人US Patent 7,943,762,B2,2011年5月17日;Weller等人US Patent 8,067,571B2,2011年11月29日;Reeves等人United States Patent 8,076,476B2,2011年12月13日;Fox等人United States Patent 8,299,206B2,2012年10月30日;Linsley等人United States Patent Application 2014/030238,2014年10月9日;Linsley等人United States Patent Application 2014/0329772,2014年11月6日;Ueda,T.US Patent 8,969,551B2,2015年3月3日;Hanson,G.US Patent9,161,948,2015年10月20日;Bhadra等人Nucleic Acid Chem.2015,62:4.65.1-6.65.26;Totaro等人International Patent WO 2019/0-60862A1,2019年3月28日;Torii等人US Patent 10,415,036B2,2019年9月17日;Cai等人US Patent Application 2019/0292208A1,2019年9月26日;Bestwick等人US Patent Application 2019/0365918A1,2019年12月5日;Passini等人US Patent Application 2020/0377886A1,2020年12月3日;Sinha等人US Patent Application 2021/0130379,2021年5月6日;Fang等人International Patent WO 2022/125987 A1,以及方案6。

[0852] 方案6



[0853]



[0854] 所述方法可以包括例如用4-氰基吡啶和TFA处理以脱三苯甲基化,用DIPEA处理以

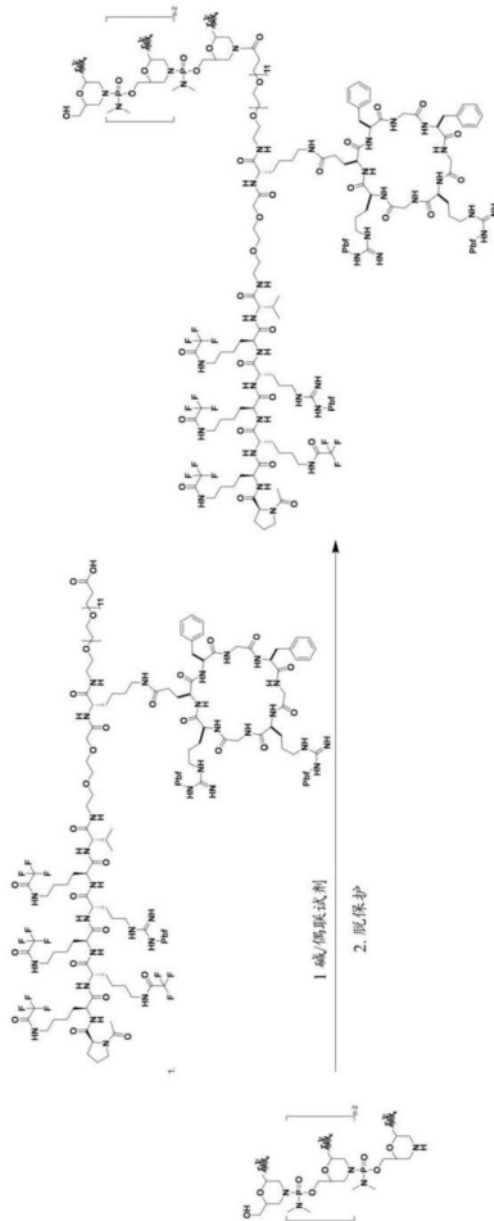
中和,并在碱诸如NEM的存在下添加PMO单体以偶联。所述方法可以包括例如进一步在碱诸如DBU的存在下用DTT处理以进行裂解,并进一步用碱诸如氢氧化铵处理以脱保护。

[0855] 缀合肽+PMO的方法

[0856] 环肽可以根据本领域已知的任何方法与PMO缀合,诸如在以下中所例示:[Hanson, G.Peptide Oligonucleotide Conjugates.US Patent9,161,948B2,2015年10月20日]和方案7。实施例4还例示了示出通过用碱和“偶联试剂”处理,随后添加PMO来活化N3末端肽的各种反应条件。

[0857]

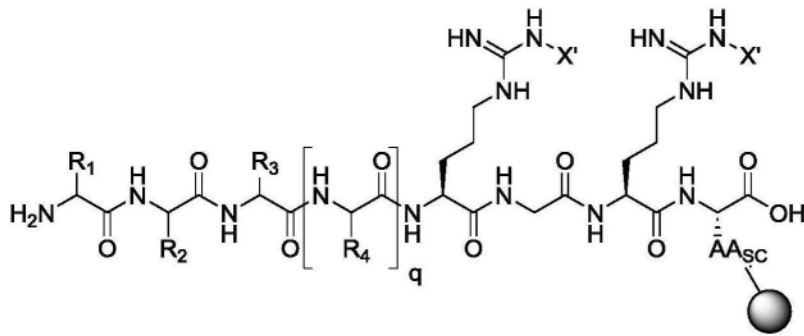
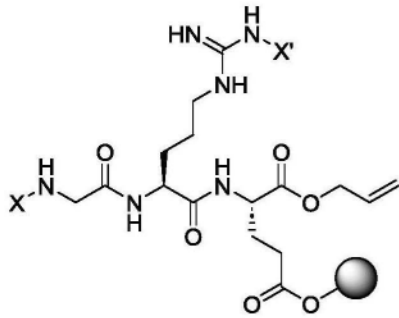
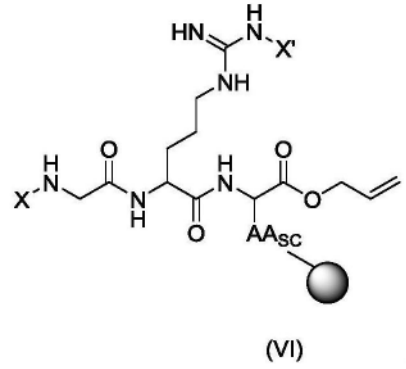
方案 7



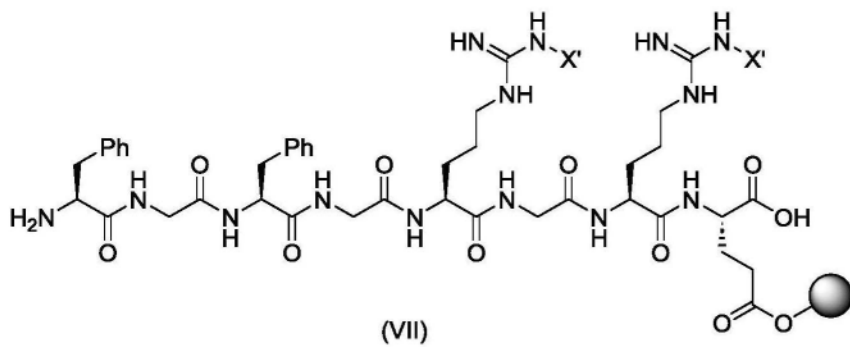
所述方法可以包括用偶联试剂(诸如 DIC/HATU/PyAOP)、添加剂(诸如 Oxyma)和碱(诸如 DIPEA)处理。所述方法可以包括用碱诸如氢氧化钠/氢氧化锂/氢氧化钾/氯化钾/碳酸钾/氯化钾/氯化钾处理以脱保护。

[0858] 化合物

[0859] 本公开还涉及一种选自以下的化合物：

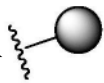


和

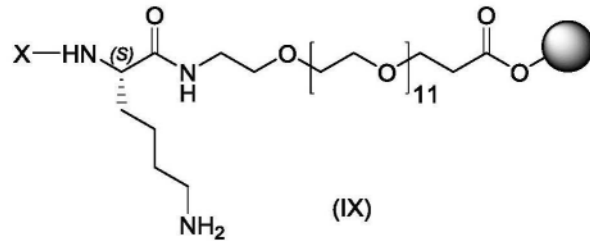


[0860] 其中：

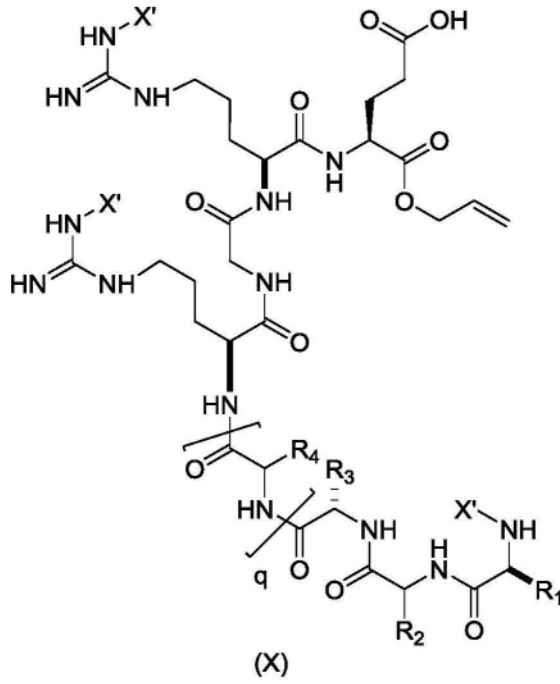
[0861] R_1 、 R_2 和 R_3 各自独立地是H或酪氨酸、苯丙氨酸或色氨酸的侧链；[0862] R_4 是H或氨基酸侧链；[0863] AA_{sc} 是氨基酸侧链；[0864] q 是1、2、3或4；[0865] X 、 X' 和 X'' 各自独立地是保护基团；

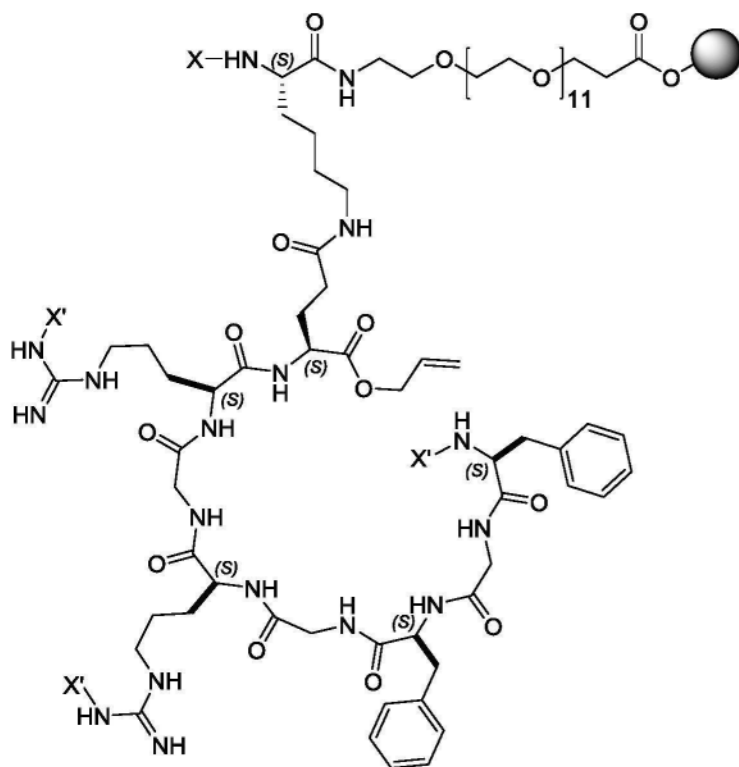
[0866] 每个m独立地是0-3的整数;并且是固体支持物。

[0867] 本公开还涉及一种选自以下的化合物:



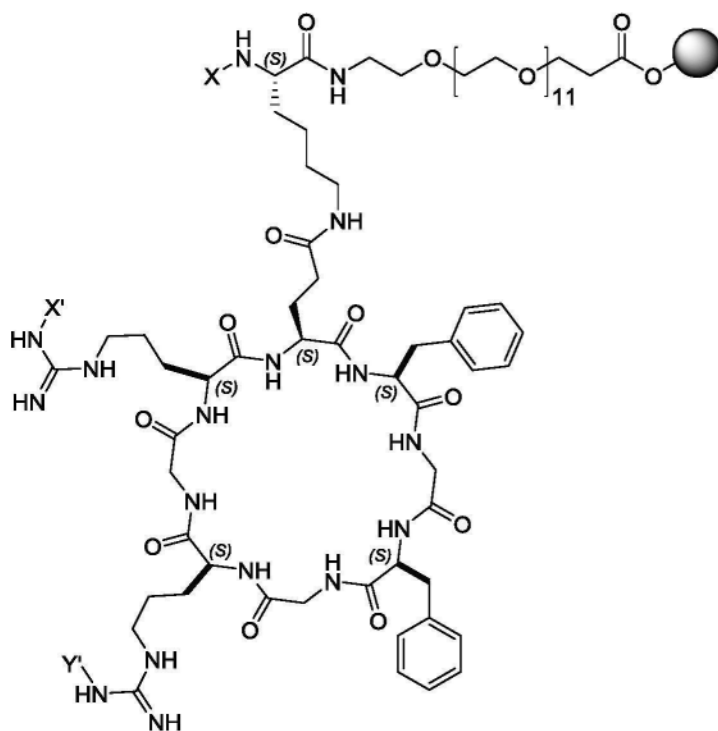
[0868]






[0870]

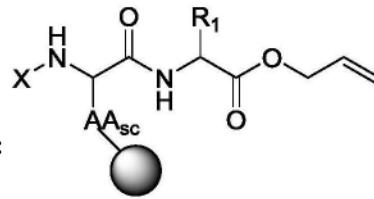
和



[0871] 其中:

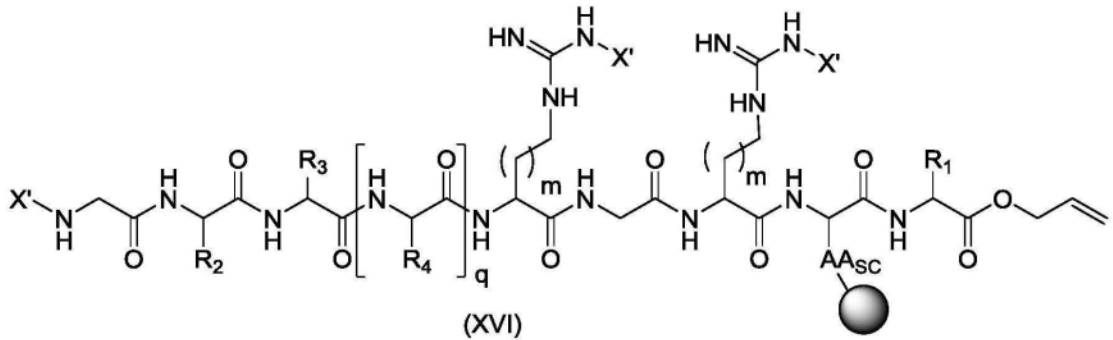
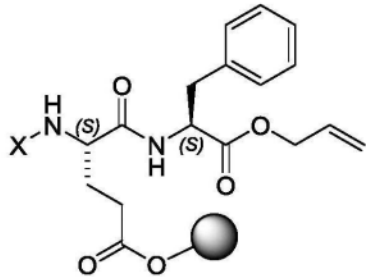
[0872] R_1 、 R_2 和 R_3 各自独立地是H或酪氨酸、苯丙氨酸或色氨酸的侧链;[0873] R_4 是H或氨基酸侧链;[0874] AA_{SC} 是氨基酸侧链;[0875] q 是1、2、3或4[0876] X 和 X' 各自独立地是保护基团;

[0877] 每个m独立地是0-3的整数;并且是固体支持物。



[0878] 本公开还涉及一种选自以下的化合物:

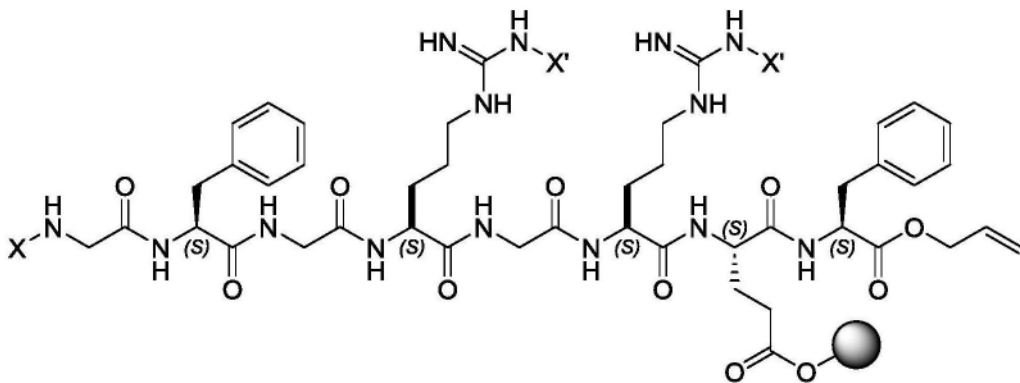
(XV)



(XVI)

和

[0879]



[0880] 其中:


[0881] R_1 、 R_2 和 R_3 各自独立地是H或酪氨酸、苯丙氨酸或色氨酸的侧链;

[0882] R_4 是H或氨基酸侧链;

[0883] AA_{Sc} 是氨基酸侧链;

[0884] q是1、2、3或4

[0885] X和X'各自独立地是保护基团;

[0886] 每个m独立地是0-3的整数;并且是固体支持物。

[0887] 合成可以手动进行,也可以自动进行,或者是两者的组合。

[0888] 树脂负载水平可以是~0.1-1.0mmol/g。树脂负载水平可以是~0.30-0.50mmol/g。树脂负载水平可以是~0.20-0.30mmol/g。树脂负载水平可以是~0.20-0.25mmol/g。树脂负载水平可以是~0.2-0.50mmol/g。树脂负载水平可以是~0.2-0.60mmol/g。树脂负载水平可以是~0.2-0.70mmol/g。树脂负载水平可以是~0.2-0.80mmol/g。树脂负载水平可以是~0.2-0.90mmol/g。树脂负载水平可以是~0.22-0.92mmol/g。树脂负载水平可以是~0.22mmol/g。树脂负载水平可以是~0.39mmol/g。树脂负载水平可以是~0.46mmol/g。树脂负载水平可以是~0.64mmol/g。树脂负载水平可以是~0.77mmol/g。树脂负载水平可以是~0.92mmol/g。

[0889] 某些定义

[0890] 如在说明书和所附权利要求书中所使用,单数形式“一个/种(a/an)”和“所述”包括多个指示物,除非上下文另外明确指出。因此,例如,提及“一种组合物”包括两种或更多种此类组合物的混合物,提及“一种剂”包括两种或更多种此类剂的混合物,提及“所述组分”包括两种或更多种此类组分的混合物等。

[0891] 术语“约”(也写为“~”)当紧接在数值之前时意指范围(例如,所述值的加或减10%)。例如,“约50”可意指45至55,“约25,000”可意指22,500至27,500等,除非本公开的上下文另外指出,或者与此类解释不一致。例如,在诸如“约49、约50、约55、…”的数值列表中,“约50”意指延伸至小于前后值之间一半间隔的范围,例如,大于49.5至小于52.5。此外,短语“小于约”值或“大于约”值应当根据本文提供的术语“约”的定义来理解。类似地,术语“约”当在一系列数值或数值范围(例如,“约10、20、30”或“约10-30”)之前时分别指所述系列中的所有值或所述范围的端点。

[0892] “2-[2-[2-氨基乙氧基]乙氧基]乙酸”也称为AEEA或miniPEG。

[0893] 如本文所用,术语“环状细胞穿透肽”或“CPP”是指促进递送货物例如治疗部分到细胞中的肽。

[0894] 如本文所用,术语“内体逃逸载体”(EEV)是指通过化学键联(即,共价键或非共价相互作用)与如本文所定义的接头和/或如本文所定义的环外肽缀合的CPP。本公开的EEV是式(B)的EEV。

[0895] 如本文所用,术语“EEV-缀合物”是指通过化学键联(即,共价键或非共价相互作用)与货物缀合的本文所定义的内体逃逸载体。货物可以是可通过EEV递送到细胞中的治疗部分(例如,寡核苷酸)。本公开的EEV-缀合物可以是式(C)的EEV-缀合物。

[0896] 如本文所用,术语“环外肽”(EP)和“调节肽”(MP)可互换使用,是指通过肽键连接的两个或更多个氨基酸残基,其可与本文所公开的环肽缀合。当与本文所公开的环肽缀合时,EP改变化合物的组织分布和/或保留。典型地,EP可包含至少一个带正电荷的氨基酸残基,例如至少一个赖氨酸残基和/或至少一个精氨酸残基。本文描述了EP的非限制性实例。EP可以是在本领域中被鉴定为“核定位序列”(NLS)的肽。核定位序列的非限制性实例包括SV40病毒大T抗原的核定位序列,其最小功能单元是七个氨基酸序列PKKKRKV、具有序列NLSKRPAAIKKAGQAKKKK的双分型核质蛋白NLS、具有氨基酸序列PAAKRVKLD或RQRRNELKRSF的c-myc核定位序列、来自输入蛋白- α 的IBB结构域的序列RMRKFKNKGKDTAELRRRRVEVSVELRKAKKDEQILKRRNV、肌瘤T蛋白的序列VSRKRPRP和PPKKARE D、人p53的序列PQPKKKPL、小鼠c-

ab1 IV的序列SALIKKKK MAP、流感病毒NS1的序列DRLRR和PKQKKRK、肝炎病毒 δ 抗原的序列RKLKKKIKKL和小鼠Mx1蛋白的序列REKKKFLKRR、人聚(ADP-核糖)聚合酶的序列KRKGDEVDGVDEVAKKSKK和类固醇激素受体(人)糖皮质激素的序列RKCLQAGMNLEARKTKK。国际公开号2001/038547描述了NLS的附加实例并且全文以引用方式并入本文。

[0897] 如本文所用,“接头”或“L”是指将一个或多个部分(例如,环外肽(EP)和货物例如寡核苷酸、肽或小分子)与环肽共价键合的部分。接头可包含天然或非天然氨基酸或多肽。接头可以是含有两个或更多个适于将环肽结合到货物部分从而形成本文所公开的化合物的适当官能团的合成化合物。接头可包含聚乙二醇(PEG)部分。接头可包含一个或多个氨基酸。例如,环肽可经由接头与货物共价结合。

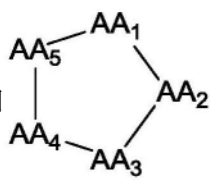
[0898] 如本文所用,术语“寡核苷酸”是指包含多个连接的核苷酸或核苷的寡聚化合物。寡核苷酸的一个或多个核苷酸可被修饰。寡核苷酸可包括核糖核酸(RNA)或脱氧核糖核酸(DNA)。寡核苷酸可由天然和/或修饰的核碱基、糖和共价核苷间键联构成,并且可进一步包括非核酸缀合物。

[0899] 术语“肽”、“蛋白质”和“多肽”可互换使用,是指包含通过一个氨基酸的羧基基团与另一个氨基酸的 α 氨基基团连接的两个或更多个氨基酸的天然或合成分子。两个或更多个氨基酸残基可通过一个氨基酸的羧基基团与 α 氨基基团连接。多肽的两个或更多个氨基酸可通过肽键接合。多肽可包括肽主链修饰,其中两个或更多个氨基酸通过除肽键以外的键共价附接。多肽可包括一种或多种非天然氨基酸、氨基酸类似物或能够整合到多肽中的其他合成分子。术语多肽包括天然存在的和人工存在的氨基酸。术语多肽包括例如包含约2至约100个氨基酸残基的肽以及包含超过约100个氨基酸残基或超过约1000个氨基酸残基的蛋白质,包括但不限于治疗性蛋白质,诸如抗体、酶、受体、可溶性蛋白质等。

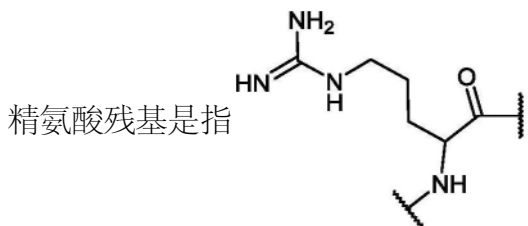
[0900] 术语“治疗性多肽”指具有治疗、预防或其他生物活性的多肽。治疗性多肽可以任何合适的方式产生。例如,治疗性多肽可从天然存在的环境中分离或纯化,可化学合成,可重组产生,或它们的组合。

[0901] 术语“小分子”是指具有药理学活性且分子量小于约2000道尔顿、或小于约1000道尔顿、或小于约500道尔顿的有机化合物。小分子治疗剂典型地通过化学合成来制造。

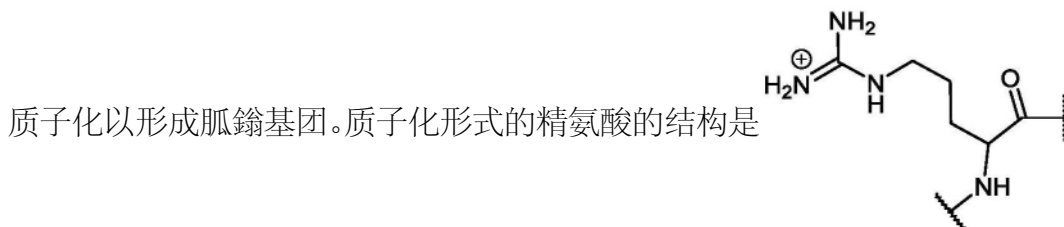
[0902] 如本文所用,术语“邻接”是指通过共价键连接的两个氨基酸。例如,在代表性环肽

诸如  AA_1/AA_2 、 AA_2/AA_3 、 AA_3/AA_4 , 和 AA_5/AA_1 的情况下举例说明了邻接氨基酸对。

[0903] 如本文所用,化学物质的残基是指存在于特定产物中的化学物质的衍生物。为了形成产物,所述物质的至少一个原子被与另一部分的键替换,使得产物含有所述化学物质的衍生物或残基。例如,本文所述的环肽具有通过形成一个或多个肽键而掺入其中的氨基酸(例如,精氨酸)。掺入环肽中的氨基酸可称为残基,或简单地称为氨基酸。因此,精氨酸或



[0904] 术语“其质子化形式”是指氨基酸的质子化形式。例如，精氨酸侧链上的胍基可被



[0905] 如本文所用的术语“手性”是指氨基酸或氨基酸残基的“D”和“L”异构体。

[0906] 如本文所用，术语“疏水的”是指不溶于水或在水中溶解度极小的部分。通常，中性部分和/或非极性部分，或者主要是中性和/或非极性的部分是疏水的。疏水性可通过本文以下公开的方法之一来测量。

[0907] 如本文所用，“芳族”是指具有 $4n+2$ 个 π 电子的不饱和环分子，其中 n 是任何整数。术语“非芳族”是指不属于芳族定义的任何不饱和环分子。

[0908] “烷基”、“烷基链”或“烷基基团”是指具有一至四十个碳原子并且通过单键与分子的其余部分附接的完全饱和的直链或支链烃链基团。包括包含1至40的任何数量的碳原子的烷基。包含至多40个碳原子的烷基是 C_1-C_{40} 烷基，包含至多10个碳原子的烷基是 C_1-C_{10} 烷基，包含至多6个碳原子的烷基是 C_1-C_6 烷基，并且包含至多5个碳原子的烷基是 C_1-C_5 烷基。 C_1-C_5 烷基包括 C_5 烷基、 C_4 烷基、 C_3 烷基、 C_2 烷基和 C_1 烷基（即，甲基）。 C_1-C_6 烷基包括上文对于 C_1-C_5 烷基所述的所有部分，但还包括 C_6 烷基。 C_1-C_{10} 烷基包括上文对于 C_1-C_5 烷基和 C_1-C_6 烷基所述的所有部分，但还包括 C_7 、 C_8 、 C_9 和 C_{10} 烷基。类似地， C_1-C_{12} 烷基包括所有前述部分，但还包括 C_{11} 和 C_{12} 烷基。 C_1-C_{12} 烷基的非限制性实例包括甲基、乙基、正丙基、异丙基、仲丙基、正丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基、正戊基、叔戊基、正己基、正庚基、正辛基、正壬基、正癸基、正十一烷基和正十二烷基。除非在说明书中另有具体说明，否则烷基基团可任选地被取代。

[0909] “亚烷基”、“亚烷基链”或“亚烷基基团”是指具有一至四十个碳原子的完全饱和的直链或支链二价烃链基团。 C_2-C_{40} 亚烷基的非限制性实例包括亚乙基、亚丙基、正亚丁基、亚乙烯基、亚丙烯基、正亚丁烯基、亚丙炔基、正亚丁炔基等。除非在说明书中另有具体说明，否则亚烷基链可任选地被取代。

[0910] “烯基”、“烯基链”或“烯基基团”是指具有二至四十个碳原子并具有一个或多个碳-碳双键的直链或支链烃链基团。每个烯基基团通过单键与分子的其余部分附接。包括包含2至40的任何数量的碳原子的烯基基团。包含至多40个碳原子的烯基是 C_2-C_{40} 烯基，包含至多10个碳原子的烯基是 C_2-C_{10} 烯基，包含至多6个碳原子的烯基是 C_2-C_6 烯基，并且包含至多5个碳原子的烯基是 C_2-C_5 烯基。 C_2-C_5 烯基包括 C_5 烯基、 C_4 烯基、 C_3 烯基和 C_2 烯基。 C_2-C_6 烯基包括上文关于 C_2-C_5 烯基所述的所有部分，但还包括 C_6 烯基。 C_2-C_{10} 烯基包括上文对于 C_2-C_5 烯基和 C_2-C_6 烯基所述的所有部分，但还包括 C_7 、 C_8 、 C_9 和 C_{10} 烯基。类似地， C_2-C_{12} 烯基包括所有前述部分，但还包括 C_{11} 和 C_{12} 烯基。 C_2-C_{12} 烯基的非限制性实例包括乙烯基（ethenyl/

vinyl)、1-丙烯基、2-丙烯基(烯丙基)、异丙烯基、2-甲基-1-丙烯基、1-丁烯基、2-丁烯基、3-丁烯基、1-戊烯基、2-戊烯基、3-戊烯基、4-戊烯基、1-己烯基、2-己烯基、3-己烯基、4-己烯基、5-己烯基、1-庚烯基、2-庚烯基、3-庚烯基、4-庚烯基、5-庚烯基、6-庚烯基、1-辛烯基、2-辛烯基、3-辛烯基、4-辛烯基、5-辛烯基、6-辛烯基、7-辛烯基、1-壬烯基、2-壬烯基、3-壬烯基、4-壬烯基、5-壬烯基、6-壬烯基、7-壬烯基、8-壬烯基、1-癸烯基、2-癸烯基、3-癸烯基、4-癸烯基、5-癸烯基、6-癸烯基、7-癸烯基、8-癸烯基、9-癸烯基、1-十一烯基、2-十一烯基、3-十一烯基、4-十一烯基、5-十一烯基、6-十一烯基、7-十一烯基、8-十一烯基、9-十一烯基、10-十一烯基、1-十二烯基、2-十二烯基、3-十二烯基、4-十二烯基、5-十二烯基、6-十二烯基、7-十二烯基、8-十二烯基、9-十二烯基、10-十二烯基和11-十二烯基。除非在说明书中另有具体说明,否则烷基基团可任选地被取代。

[0911] “亚烯基”、“亚烯基链”或“亚烯基基团”是指具有二至四十个碳原子并且具有一个或多个碳-碳双键的直链或支链二价烃链基团。 C_2-C_{40} 亚烯基的非限制性实例包括乙烯、丙烯、丁烯等。除非在说明书中另有具体说明,否则亚烯基链可以是任选的。

[0912] “烷氧基”或“烷氧基基团”是指基团-OR,其中R是如本文所定义的烷基、烯基、炔基、环烷基或杂环基。除非在说明书中另有具体说明,否则烷氧基基团可任选地被取代。

[0913] “酰基”或“酰基基团”是指基团-C(O)R,其中R是氢、烷基、烯基、炔基、碳环基或杂环基,如本文所定义。除非在说明书中另有具体说明,否则酰基可任选地被取代。

[0914] “烷基氨基甲酰基”或“烷基氨基甲酰基基团”是指基团-O-C(O)-NR_aR_b,其中R_a和R_b相同或不同并且独立地是如本文所定义的烷基、烯基、炔基、芳基、杂芳基,或R_aR_b可合一起形成如本文所定义的环境基基团或杂环基基团。除非在说明书中另有具体说明,否则烷基氨基甲酰基基团可任选地被取代。

[0915] “烷基羧酰胺基”或“烷基羧酰胺基基团”是指基团-C(O)-NR_aR_b,其中R_a和R_b相同或不同并且独立地是如本文所定义的烷基、烯基、炔基、芳基、杂芳基、环烷基、环烯基、环炔基或杂环基基团,或R_aR_b可合一起形成如本文所定义的环境基基团。除非在说明书中另有具体说明,否则烷基羧酰胺基基团可任选地被取代。

[0916] “芳基”是指包含氢、6至18个碳原子和至少一个芳环的烃环体系基团。为了本发明的目的,芳基基团可以是单环、双环、三环或四环环体系,其可包括稠环或桥环体系。芳基基团包括但不限于衍生自醋蒎烯(aceanthrylene)、萘烯(acenaphthylene)、醋菲烯(acephenanthrylene)、蒽、蒹(azulene)、苯、屈(chrysene)、荧蒽(fluoranthene)、茛、不对称引达省(as-indacene)、对称引达省(s-indacene)、茛满、茛、蔡、非那烯(phenalene)、菲、七曜烯(pleiadene)、茛和苯并菲的芳基基团。除非在说明书中另有具体说明,否则术语“芳基”意在包括任选取代的芳基基团。

[0917] “杂芳基”是指包含氢原子、一至十三个碳原子、一至六个选自氮、氧和硫的杂原子和至少一个芳环的5至20元环体系基团。为了本发明的目的,杂芳基基团可以是单环、双环、三环或四环环体系,其可包括稠环或桥环体系;并且杂芳基基团中的氮、碳或硫原子可任选地被氧化;氮原子可任选地被季铵化。实例包括但不限于氮杂环庚烯基、吡啶基、苯并咪唑基、苯并噻唑基、苯并吡啶基、苯并二氧杂环戊烯基、苯并呋喃基、苯并噁唑基、苯并噻唑基、苯并噻二唑基、苯并[b][1,4]二氧杂环庚烯基、1,4-苯并二噁烷基、苯并蔡并呋喃基、苯并噁唑基、苯并二氧杂环戊烯基、苯并二氧杂环己烯基、苯并吡喃基、苯并吡喃酮基、苯并呋喃

应、疾患或疾病减少10%。因此,减少可以是与天然或对照水平相比10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%或其间的任何减少量的减少。

[0922] “减少(reduce)”或所述词的其他形式,诸如“减少(reducing/reduction)”,意指事件或特征(例如,肿瘤生长)的降低。应当理解,这典型地与一些标准或预期值有关,换句话说讲,它是相对的,但并不总是需要参考标准或相对值。例如,“减少肿瘤生长”意指相对于标准或对照(例如,未治疗的肿瘤)减少肿瘤的生长速率。

[0923] 术语“治疗”是指旨在治愈、改善、稳定或预防疾病、病理状况或病症而对患者进行的医学管理。所述术语包括积极治疗,即专门针对改善疾病、病理状况或病症的治疗,并且还包含病因治疗,即针对消除相关疾病、病理状况或病症的病因的治疗。另外,所述术语包括姑息治疗,即旨在缓解症状而非治愈疾病、病理状况或病症的治疗;预防性治疗,即旨在最小化或部分或完全抑制相关疾病、病理状况或病症的发展的治疗;和支持性治疗,即用于补充另一种旨在改善相关疾病、病理状况或病症的特定疗法的治疗。

[0924] 术语“治疗有效”是指所用组合物的量足以改善疾病或病症的一种或多种病因或症状。此类改善仅需要减少或改变,而不必消除。

[0925] 术语“药学上可接受的”是指在合理的医学判断范围内适用于与人和动物的组织接触而没有过度的毒性、刺激、过敏反应或其他问题或并发症的与合理的效益/风险比相称的那些化合物、材料、组合物和/或剂型。

[0926] 术语“载剂”意指化合物、组合物、物质或结构,当与化合物或组合物组合时,其有助于或促进化合物或组合物的制备、储存、施用、递送、有效性、选择性或用于其预期用途或目的的任何其他特征。例如,可选择载剂以使活性成分的任何降解最小化并使受试者中的任何不良副作用最小化。

[0927] 如本文所用,术语“药学上可接受的载剂”是指无菌水性或非水性溶液、分散体、悬浮液或乳液,以及用于在临近使用前复溶成无菌可注射溶液或分散体的无菌粉末。合适的水性和非水性载剂、稀释剂、溶剂或媒介物的实例包括水、乙醇、多元醇(诸如甘油、丙二醇、聚乙二醇等)、羧甲基纤维素及其合适的混合物、植物油(诸如橄榄油)和可注射有机酯诸如油酸乙酯。适当的流动性可例如通过使用包衣材料诸如卵磷脂、在分散体的情况下通过维持所需的粒度以及通过使用表面活性剂来维持。这些组合物还可含有佐剂,诸如防腐剂、润湿剂、乳化剂和分散剂。可通过包含各种抗细菌剂和抗真菌剂诸如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸等来确保防止微生物的作用。还可期望包括等渗剂,诸如糖、氯化钠等。可注射制剂可例如通过经细菌截留过滤器过滤或通过掺入无菌固体组合物形式的灭菌剂来灭菌,所述无菌固体组合物可在临近使用前溶解或分散在无菌水或其他无菌可注射介质中。合适的惰性载剂可包括糖诸如乳糖。

缩写	IUPAC 名称
[0928] HATU	1-[双(二甲氨基)亚甲基]-1H-1,2,3-三唑并[4,5-b]吡啶鎓 3-氧化物

[0929]

	六氟磷酸盐
HOAt	3H-[1,2,3]三唑并[4,5-b]吡啶-3-醇
HOBt	1H-1,2,3-苯并三唑-1-醇
PyAOP	(7-氮杂苯并三唑-1-基氧基)三吡咯烷基膦六氟磷酸盐
PyOxim	[(E)-(1-氟基-2-乙氧基-2-氧代亚乙基)氨基]氧基-三吡咯烷-1-基膦; 六氟磷酸盐
Oxyrna	(2Z)-2-氟基-2-(羟基亚氨基)乙酸乙酯
Oxyrna-B	5-(羟基亚氨基)-1,3-二甲基咪啉-2,4,6(1H,3H,5H)-三酮
K-Oxyrna	(羟基亚氨基)氟基乙酸 Z-乙酯钾盐
HBTU	3-[双(二甲基氨基)甲基鎓基(methyliumyl)]-3H-苯并三唑-1-氧化物六氟磷酸盐
TBTU	2-(1H-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脲四氟硼酸盐
COMU	(1-氟基-2-乙氧基-2-氧代亚乙基氨基氧基)二甲基氨基-吗啉代-碳鎓六氟磷酸盐
DEPBT	磷酸二乙基 4-氧代-1,2,3-苯并三嗪-3(4H)-基酯 (Diethyl 4-oxo-1,2,3-benzotriazin-3(4H)-yl phosphate)
DCC	N,N'-二环己基甲烷二亚胺
NMM	4-甲基吗啉
NEM	4-乙基吗啉
DIPEA	N-乙基-N-丙-2-基丙-2-胺
DTT	(2S,3S)-1,4-双硫烷基丁烷-2,3-二醇
DBU	2,3,4,6,7,8,9,10-八氢咪啉并[1,2-a]氮杂卓
DMF	N,N-二甲基甲酰胺
DCM	二氯甲烷
HFIP	1,1,1,3,3,3-六氟丙-2-醇
NMP	1-甲基吡咯烷-2-酮
DMI	1,3-二甲基咪唑烷-2-酮
IPA	丙-2-醇
TFE	2,2,2-三氟乙-1-醇
THF	氮杂环戊烷

	TIPS	三(丙-2-基)硅烷
	TFA	三氟乙酸
[0930]	MBTE	2-甲氧基-2-甲基丙烷
	DCBC	1,3-二氯-2-(氯甲基)苯
	PYR	吡啶

[0931] 实施例

[0932] 制备方法

[0933] 本文所述的化合物可以有有机合成领域技术人员已知的多种方式或本领域技术人员所理解的其变化形式制备。本文所述的化合物可由容易获得的起始材料制备。最佳反应条件可随所用的特定反应物或溶剂而变化,但此类条件可由本领域技术人员确定。所有反应都可以在溶液中进行(使用溶剂或溶剂的混合物)或纯净进行(不需要溶剂)。

[0934] 本文所述化合物的变化形式包括如针对每种化合物所述的各种成分的添加、减去或移动。类似地,当分子中存在一个或多个手性中心时,分子的手性可改变。另外,化合物合成可涉及各种化学基团的保护和脱保护。保护和脱保护的使用以及适当的保护基团的选择可由本领域技术人员确定。保护基团的化学性质可见于例如Wuts和Greene, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 第4版, Wiley&Sons, 2006, 其全文以引用方式并入本文。

[0935] 用于制备所公开的化合物和组合物的起始材料和试剂可购自商业供应商诸如 Aldrich Chemical Co., (Milwaukee, WI)、Acros Organics (Morris Plains, NJ)、Fisher Scientific (Pittsburgh, PA)、Sigma (St. Louis, MO)、Pfizer (New York, NY)、GlaxoSmithKline (Raleigh, NC)、Merck (Whitehouse Station, NJ)、Johnson&Johnson (New Brunswick, NJ)、Aventis (Bridgewater, NJ)、AstraZeneca (Wilmington, DE)、Novartis (Basel, Switzerland)、Wyeth (Madison, NJ)、Bristol-Myers-Squibb (New York, NY)、Roche (Basel, Switzerland)、Lilly (Indianapolis, IN)、Abbott (Abbott Park, IL)、Schering Plough (Kenilworth, NJ) 或 Boehringer Ingelheim (Ingelheim, Germany), 或者通过本领域技术人员已知的方法按照参考文献中所阐述的程序制备, 所述参考文献诸如 Fieser and Fieser's *Reagents for Organic Synthesis*, 第1-17卷 (John Wiley and Sons, 1991); Rodd's *Chemistry of Carbon Compounds*, 第1-5卷和补充版 (Elsevier Science Publishers, 1989); *Organic Reactions*, 第1-40卷 (John Wiley and Sons, 1991); *March's Advanced Organic Chemistry*, (John Wiley and Sons, 第4版); 以及 Larock's *Comprehensive Organic Transformations* (VCH Publishers Inc., 1989)。其他材料, 诸如本文所公开的载体可从商业来源获得。

[0936] 产生本文所述化合物的反应可在溶剂中进行, 所述溶剂可由有机合成领域的技术人员选择。在进行反应的条件(即, 温度和压力)下, 溶剂可基本上不与起始材料(反应物)、中间体或产物反应。反应可在一种溶剂或多于一种溶剂的混合物中进行。产物或中间体形成可根据本领域已知的任何合适的方法进行监测。例如, 产物形成可通过光谱手段诸如核磁共振光谱法(例如, ^1H 或 ^{13}C)、红外光谱法、分光光度测定法(例如, UV-可见光)或质谱法, 或通过色谱法诸如高效液相色谱法(HPLC)或薄层色谱法来监测。

[0937] 实施例1:线性肽合成(接头合成)

[0938] 线性肽合成-将Fmoc-PEG₁₂-CH₂CH₂COOH加载到王树脂上

[0939] 向含有王树脂的玻璃肽合成容器中添加DCM,使树脂溶胀并排干溶剂。将DCM添加到树脂中。称量所需量Fmoc-PEG₁₂-CH₂CH₂COOH放入容器中,溶解于最少量的DMF中,将所得溶液转移到树脂容器中并添加吡啶。添加2,6-二氯苯甲酰氯,并搅拌树脂悬浮液直至确定反应完成。

[0940] Fmoc脱保护

[0941] 将DMF添加到含有树脂结合肽的玻璃肽合成容器中,使其溶胀并排干。添加20%吡啶的DMF溶液,完全覆盖树脂并反应。排干,并且依次用DMF、DCM以及又DMF洗涤。

[0942] 各个氨基酸(AA)的偶联

[0943] 称量Fmoc-AA放入容器中并添加添加剂(例如,Oxyma。将Fmoc-AA和添加剂溶解在DMF中,到完全溶解。添加DIC,混合,并在室温下静置。将预活化的Fmoc-AA溶液添加到树脂上并混合。

[0944] 实施例2:环肽合成

[0945] 将第一Fmoc-AA加载到2-氯三甲苯基氯(CTC)树脂上

[0946] 向含有CTC树脂的玻璃肽合成容器中添加DMF,使树脂溶胀并排干溶剂。称量所需的Fmoc-AA并溶解于DMF。将AA溶液添加到树脂中。添加DIPEA并混合。一旦确定反应完成,用甲醇淬灭并洗涤树脂。

[0947] Fmoc脱保护:如实施例1所述

[0948] 环外肽的甲基三苯甲基(Mtt)脱保护

[0949] 在DCM中制备六氟异丙醇(HFIP)溶液。将其添加到含有树脂结合肽的容器中。在室温下混合内容物。排干并用DCM洗涤树脂。重复进行直至脱保护完成。

[0950] 各个AA的偶联:如实施例1所述

[0951] 环肽的烯丙基酯脱保护

[0952] 将树脂床体积的DCM添加到玻璃肽合成容器中,所述容器含有N末端受Fmoc保护、C末端受烯丙基保护的环肽线性前体。在室温下使树脂溶胀。称量Pd(PPh₃)₄并将固体溶解于DCM中。排干树脂并添加新鲜的DCM。将PhSiH₃添加到悬浮在DCM中的树脂中。将Pd溶液添加到树脂中,避光,并且在室温下混合。排干树脂并依次用DCM和DMF洗涤。称量SDDC·(H₂O)₃(二乙基二硫代氨基甲酸钠三水合物)并溶解在DMF中。将混合物添加到树脂中并混合。完成后,用DCM和DMF洗涤树脂。

[0953] 从固体支持物上裂解——环肽

[0954] 制备HFIP:DCM混合物,添加到含有树脂结合环肽的肽合成容器中并混合。用最少量的DCM洗涤树脂。将滤液蒸发至最小体积,并与冷MTBE一起研磨。过滤所得悬浮液并用MTBE洗涤滤饼。

[0955] 实施例3:环肽与线性肽的偶联

[0956] 将粗环肽和HOAt溶解于DMF中。添加DIC,混合,并在RT下静置。将预活化的环肽溶液添加到树脂上并混合。在室温下摇动反应混合物。

[0957] 从固体支持物上裂解

[0958] 制备TFA:DCM 95:5(体积/体积)的混合物,并添加到含有树脂结合环肽的玻璃肽

合成容器中。混合内容物并过滤。用最少量的DCM洗涤树脂。将滤液蒸发至最小体积,并与冷MTBE一起研磨。过滤所得悬浮液并用MTBE洗涤滤饼。所得粗肽可以通过制备型RP-HPLC纯化并进一步冻干。

[0959] 实施例4:二氨基磷酸酯吗啉代寡聚物(PMO)合成

[0960] 将PMO单体加载到固体支持物上:

[0961] 将氨基甲基聚苯乙烯树脂悬浮于NMP中,并使树脂溶胀。过滤树脂以去除NMP,并用DCM、DCM中的5% DIPEA溶液和DCM洗涤。将PMO单体溶解,在干NMP中将其功能化为活性琥珀酸酯,并且添加到树脂中。在RT下搅拌反应混合物。过滤树脂并用NMP和DCM洗涤。干燥树脂并通过三苯甲基定量测试负载。制备0.4M苯甲酸酐和NEM在NMP溶液中的溶液。将苯甲酸酐/NEM溶液添加到树脂中并在RT下搅拌。过滤树脂并用NMP洗涤两次、用IPA洗涤两次以及用DCM洗涤两次。干燥树脂。

[0962] 通过三苯甲基定量确定树脂负载

[0963] 将干树脂(50-100mg)放入烧结注射器中,并用DCM溶胀。去除DCM并将脱保护溶液(DCM中3% TFA)添加到树脂中。搅拌溶液5min并收集滤液。再重复此过程四次,直到溶液呈无色。合并所有滤液,用水稀释溶液,并且在404nm处测量样品溶液的吸收值。测试时使用3% TFA的DCM溶液作为空白。使用 $L = OD * N * 12 / \epsilon / W$ 确定树脂负载(L:树脂负载,mmol/g;OD:样品溶液的OD值;N:稀释因子;W:树脂重量,g; ϵ :摩尔吸光系数=32500)

[0964] PMO合成的树脂溶胀

[0965] 在开始PMO合成之前,将用PMO单体功能化的树脂悬浮在NMP中并溶胀2h。

[0966] 三苯甲基脱保护

[0967] 用DCM洗涤树脂。用4-氰基吡啶、TFA的80:20:1DCM/TFE/EtOH(CYTFA)溶液处理树脂

[0968] 中和

[0969] 用含有5% DIPEA的1:3IPA/DCM溶液的中和溶液处理树脂。用DCM和无水(1,3-二甲基-2-咪唑烷酮)DMI洗涤树脂。

[0970] 偶联

[0971] 制备含有0.2M PMO单体和0.4M NEM的无水DMI溶液的溶液。对于第一次偶联,使用5当量的PMO单体和NEM。对于下一个偶联,直到序列的第10个位置,使用3当量的PMO单体和6当量的NEM。对于从第10位直到第20位的偶联,使用4当量的PMO单体和8当量的NEM。对于从第20个位置开始的偶联,使用5当量的PMO单体和10当量的NEM。将偶联溶液添加树脂中,并且在RT下至45°C下进行反应。在45°C下进行的偶联反应效率更高,并且可在更短的时间表内完成(2-4h)。通过氯醌测试监测偶联反应(Pept Res.,8(4):236-7.1995)。用DCM和DCM中的30% TFE洗涤树脂。树脂可以在30% TFE的DCM溶液中储存过夜。如果PMO序列已经完成,则用IPA洗涤树脂四次并干燥树脂。

[0972] 裂解和脱保护

[0973] 用NMP处理干燥的脱三苯甲基的PMO结合树脂,并使其在30°C下溶胀3h。排干树脂,将含有1.0-1.4M DTT、2.0-2.8M DBU的NMP溶液的裂解混合物添加到树脂中,并在40°C下反应2h。将滤液收集到干净的过滤瓶中。用冷的氢氧化铵稀释裂解的PMO溶液,形成均匀的混合物。将PMO溶液放入压力烧瓶中,并且在120rpm下在50°C下孵育18h。如上详述重复此过

程,进行第二轮裂解。收集两份裂解溶液并用水稀释。

[0974] PMO纯化

[0975] 通过切向流过滤(TFF)浓缩稀释的PMO裂解溶液。用水进行渗滤,直到电导率 $<300\mu\text{S}/\text{cm}$ 。将脱盐的PMO浓缩至足够的体积,以进行阴离子交换(AEX)纯化。使用具有以下梯度缓冲液的AEX柱(TOYOPEARL SuperQ-650S)加载并纯化粗PMO:缓冲液A=10-25mM NaOH;缓冲液B=10-25mM NaOH+0.5-1M NaCl。通过离子对反相色谱法(IP-RP)鉴定纯级分,并将其合并,通过TFF进行脱盐。IP-RP方法使用C18柱和以下梯度缓冲液进行:缓冲液A=10mM三乙胺(TEA)、4.3-8.6mM Na_3PO_4 ,10mM十二烷基三甲基溴化铵(DTMA)的55%甲醇溶液;缓冲液B=10mM TEA,4.3 Na_3PO_4 ,10mM DTMA的60%乙腈溶液。进行渗滤,直到纯PMO溶液的电导率 $<350\mu\text{S}/\text{cm}$ 。将脱盐的纯PMO浓缩并冻干,得到白色粉末。通过上述IP-RP方法测定纯PMO的纯度。

[0976] 实施例5:EEV-PMO合成--方法1

[0977] EEV与PMO缀合

[0978] 将PMO溶解于DMSO中。单独制备EEV的DMSO溶液、HATU的DMSO溶液和DIPEA的DMSO溶液。将DIPEA、HATU和EEV溶液添加到溶解的PMO溶液中。通过CEX或RP-HPLC分析反应进程。

[0979] TFA脱保护

[0980] 对于第1代条件,用水稀释缀合反应物并混合。用含有25mM NaOH和0.2M KCl的溶液稀释混合物并混合。通过CEX或RP-HPLC分析反应进程。脱保护完成后,用0.5M NaH_2PO_4 缓冲液稀释反应物,之后纯化。

[0981] 对于第2代条件,用含有320mM NaOH的溶液稀释混合物并混合。通过CEX或RP-HPLC分析反应进程。脱保护完成后,用0.5M NaH_2PO_4 缓冲液稀释反应物,之后纯化。

[0982] EEV-PMO纯化

[0983] 通过切向流过滤(TFF)浓缩稀释的PMO裂解溶液。将脱盐的PMO浓缩至足够的体积,以进行阳离子交换(CEX)纯化。使用具有以下梯度缓冲液的CEX柱加载并纯化粗PMO:缓冲液A=水,或10-25mM NaH_2PO_4 的15-20%乙腈溶液;缓冲液B=0.5-1M NaCl,或10-25mM NaH_2PO_4 、0.5-1M NaCl的15-20%乙腈溶液。通过离子对反相色谱法(IP-RP)鉴定纯级分,并将其合并,通过TFF进行脱盐。将脱盐的纯PMO浓缩并冻干,得到白色粉末。通过CEX方法测定纯PMO的纯度,使用强阳离子交换(SCX)柱和以下梯度缓冲液进行:缓冲液A=24mM H_3PO_4 的80%水和20%乙腈溶液;缓冲液B=24mM H₃PO₄、2.0M LiCl的75%水和25%乙腈溶液。

[0984] 实施例6:反应条件优化

[0985] 线性肽片段合成的优化。

[0986] Ac-Proline替换Fmoc-Proline,减少了制备线性肽片段的合成步骤数。在第1代方案中,Fmoc-Proline偶联为线性肽序列中的最后一个氨基酸。然后进行Fmoc脱保护,然后通过乙酰基基团保护脯氨酸残基的游离胺(经由与乙酸酐反应)。对于较大规模的反应($>1\text{g}$),此方案可以手动进行,而使用较小规模(每个40mL反应器约600mg的0.4mmol/g负载材料),此方案可以自动化方式进行。

[0987] 抑制环肽合成二肽偶联过程中的差向异构化:

[0988] 研究了二肽Gly-Arg(Pbf)的替代非Fmoc保护基团。研究了Pht、Dde和Fmoc/Dmb在环肽合成中的应用,并评估了整个合成过程和最终产物中的差向异构化

[0989] 表5.使用胍与Oxyma以及仅使用胍进行Pht脱保护筛选的汇总表。

	溶液	时间 (min)	受保护 (%)	脱保护 (%)	脱保护+ 胼(%)	开链中间体 (%)	
[0990]	2%胼	30	11.68	51.13	12.99	24.20	
		60	11.03	59.07	11.59	18.31	
		90	9.92	56.27	10.88	22.93	
		120	9.46	61.35	9.17	20.02	
	5%胼	30	22.18	42.88	13.18	21.76	
		60	19.68	48.42	12.50	19.40	
	[0991]		90	17.62	49.36	10.84	22.19
			120	11.74	61.35	6.80	20.10
10%胼		30	15.53	38.52	20.19	21.03	
		60	9.08	31.74	30.45	20.65	
		90	6.29	28.42	32.66	24.47	
		120	4.03	22.36	40.00	26.75	
10% 胼, 1M Oxyrna		30	22.03	44.99	13.50	11.48	
		60	17.25	44.26	19.10	12.13	
		90	9.18	48.45	25.77	9.93	
		120	7.23	40.93	29.45	12.46	
15%胼		30	6.09	24.09	35.35	23.25	
		60	1.94	9.60	54.13	25.65	
		90	1.09	4.47	49.85	26.67	
		120	0.29	2.29	57.02	30.76	
15% 胼, 1M Oxyrna		30	17.36	36.92	21.43	13.92	
		60	5.95	27.07	29.20	12.73	
	90	1.90	19.76	51.47	14.34		
	120	1.09	13.95	61.74	14.01		

[0992] 表6. 使用胼与烯丙醇和甲基胼进行Ph_t脱保护筛选的汇总表。

溶液	时间 (min)	受保护 (%)	脱保护 (%)	脱保护+肼 (%)	开链中间体 (%)
5%肼, 200 当量烯丙醇	30	23.47	40.12	14.13	19.57
	60	21.22	43.50	15.56	19.36
	90	21.98	41.07	14.66	19.72
	120	16.37	42.08	19.04	22.28
15%肼, 200 当量烯丙醇	30	6.09	24.09	35.35	23.25
	60	1.94	9.60	54.13	25.65
	90	1.09	4.47	49.85	26.67
	120	0.29	2.29	57.02	30.76
5%甲基肼	30	22.61	34.45	21.88	8.97
	60	23.36	33.64	19.48	10.21

[0993]

[0994]

	90	22.94	35.91	22.34	7.68
	120	23.19	38.32	21.06	7.94
15%甲基肼	30	20.91	39.35	19.13	12.09
	60	21.99	35.12	19.20	13.31
	90	19.74	43.55	22.48	11.13
	120	22.68	37.29	19.95	9.49
15%甲基肼 (2x 30min)	30	11.54	30.40	21.46	18.30
	60	12.30	31.31	23.14	18.14

[0995] 表7. 用各种Gly保护基团合成的环肽片段纯度的汇总表。(通过UPLC积分得到的纯度)

[0996]

	第1代环肽	环1与Dmb	环1与Dde (0.075 mmol 规模)	环1与Dde (0.322 mmol 规模)
产物峰%	84.69	89.99	74.41	85.26
差向异构体峰%	6.15	2.46	25.59	4.80
杂质峰%	N/A	N/A	N/A	2.92 (Arg(Pbf)加成)
二聚体峰%	9.14	7.54	4.04	7.02

[0997] 二肽偶联筛选以抑制环肽合成过程中的差向异构化

[0998] 在调整方案以包括预制二肽的偶联(最初意在限制DKP副产物)后,评估了替代的

二肽偶联试剂/反应条件。在二肽偶联后评估差向异构化并进行优化的条件。

[0999] 表8. 环肽合成过程中的二肽偶联筛选 (通过UPLC积分得到的纯度)

条件	偶联试剂/添加剂	%差向异构体
1	HOAt/DIC	4%
2	HOAt/DIC*	3%
3	Oxyrna/DIC	8%
4	DIPEA/DEPBT	25%
5	NMM/DEPBT	8%
6	K-Oxyrna/DIC	34%
7	Oxyrna-B/DIC	1%
8	NMM/HATU	33%

[1002] 烯丙基酯脱保护优化 (图1A)

[1003] 表9. 烯丙基酯的脱保护

条件	所需产物	副产物	Fmoc-R-E-Oallyl 起始材料
20%哌啶, 5 min	91.5	0.31	0
2% DBU, 5 min	90.3	2.2	0
20%哌啶, 40 min	79.4	12.8	0
2% DBU, 40 min	88.7	4.9	0
2% DBU/5%哌啶/5% Oxyrna, 40 min	82.8	9.9	0
2% DBU/5%哌啶/0.5M Oxyrna, 40 min	82.9	9.4	0
2% DBU/5%哌啶/1.0M Oxyrna, 40 min	56.5	0	19.7
2% DBU/5%哌啶/1.0M HOBt, 40 min	18.8	0.2	80.1
0.2 M NaOH 在 1:1 2-MeTHF:MeOH 中, 40 min	0	0	0
2% DBU/5%哌啶/1%甲酸, 40 min	41.2	4.1	53.6
0.15 TBAF 的 1:1 DMF/MeOH 溶液, 40 min	3.9	0	93.9
30%叔丁胺的 DMF 溶液, 40 min	96.1	2.9	0
10%哌啶, 40 min	76.5	21	0
20%哌啶, 40 min, 冷却	86.8	11.3	0
2% DBU, 40 min, 冷却	84.7	5.2	0
20%吡咯烷/NMP, 40 min	81.3	16.8	0
20%吗啉/DMF, 40 min	78.8	3.3	16.4
20%二乙胺/DCM, 40 min	79.4	1.6	11
预冷 20%哌啶, 2 min, 两次	89.3	7.8	0
预冷 2% DBU, 2 min, 两次	71.3	19.7	0

[1005] 线性肽合成的Fmoc脱保护筛选

[1006] 发现替代脱保护条件, 可以用20%哌啶/DMF替换脱保护, 而不会影响产物完整性/

纯度。观察到较温和的条件可导致完全的Fmoc去除,以及通常由严酷脱保护引起的杂质诸如desPeg₁₂和desPeg₁₂Lys(Mtt)。

[1007] 表10.Fmoc脱保护

脱保护条件	平均 UV-vis 吸光度*第一次洗涤	平均 UV-vis 吸光度*第二次洗涤	平均 UV-vis 吸光度*第三次洗涤
20%哌啶/DMF	1.78	0.16	N/A
10%哌啶/DMF	1.76	0.20	N/A
5%哌啶/DMF	1.79	0.19	N/A
2%哌啶/DMF	1.79	0.80	0.05
2%哌啶, 2% DBU/DMF	1.76	1.41	0.28
20%哌啶, 1% 甲酸/DMF	1.79	1.60	0.49
20%哌啶, 1M oxyma/DMF	N/A	N/A	N/A

[1009] *替代脱保护条件下304nm处的平均UV-Vis吸光度测量值

[1010] 上表详细说明了替代的Fmoc脱保护条件。通过紫外UV分析脱保护滤液来量化去除的Fmoc。此外,还进行了LCMS来评估脱保护线性肽产物的完整性/质量。DMF中的20%、10%、5%和2%哌啶均产生了相似的结果,表明减少哌啶仍然可以完全脱除Fmoc保护的肽的保护。还使用有机碱(DBU)以及添加酸来调节哌啶的碱度。根据UV和LCMS分析,线性肽产物的完整性与对照相当,因此这些替代方法也可用于Fmoc脱保护。LCMS没有检测到缺失产物。

[1011] 环化优化(图1A)

[1012] 表11.环化条件

条件	环化(%)	未环化(%)	二聚体(%)
HATU/HOAt/DIPEA	84.2	0	15.8
PyAOP/HOAt/DIPEA	71.2	12.1	14.1
PyAOP/HOAt/NMM	87.1	0	14.6
PyBOP/HOBt/DIPEA	86.8	0	13.1
PyOxim/Oxyma/DIPEA	97	0	3
DIC/HOBt/DIPEA	74	0	25.9
HBTU/HOBt/DIPEA	76.4	0	23.5
TBTU/HOBT/DIPEA	75.1	0	24.9
COMU/Oxyma/DIPEA	94.3	0	5.6
DEPBT/DIPEA	86.8	0	13.2

[1015] 在环肽片段的合成过程中筛选了额外的环化试剂。在两种树脂负载水平(高/低)下进行环化筛选,以评估产物、差向异构体和二聚体形成的差异。

[1016] 表12.环化条件

由环肽片段的 UPLC 积分得到的纯度百分比, 0.46 mmol/g				
条件	环肽 (10.13 min)	差向异构 体 (10.33 min)	二聚体 (15.69 min)	未环化 Pdt (6.49 min)
[1017] *PyOxim/Oxyma/DIP EA	88.59	4.82	6.58	-
HATU/HOAt/DIPEA	84.53	4.92	10.53	-
DEPBT/DIPEA	83.92	5.37	10.69	-
PyAOP/HOAt/DIPEA	83.73	5.09	11.16	-
PyBrOP/DIPEA	67.22	6.20	2.11	24.45
CDI/DIPEA	-	2.24	-	91.08

[1018] *对照

[1019] 表13.环化条件

由环肽片段的 UPLC 积分得到的纯度百分比, 0.22 mmol/g				
条件	环肽(10.13 min)	差向异构 体 (10.33 min)	二聚体 (15.69 min)	未环化 Pdt (6.49 min)
[1020] PyOxim/Oxyma/DIP EA*	91.12	4.31	5.56	-
DEPBT/DIPEA	82.85	5.02	12.11	-
HATU/HOAt/DIPE A	82.37	4.46	13.15	-
PyAOP/HOAt/DIPE	80.60	4.50	14.79	-
[1021] A				
CDI/DIPEA	-	1.89	-	95.20

[1022] *对照

[1023] 在大多数条件下,所需产物的形成和环化的完成伴随不同量的差向异构体和二聚体副产物。出乎意料的是,在大多数情况下,较低的树脂负载水平会导致较高量的二聚体形成,但差向异构体的量较低。

[1024] 优化以减少环肽合成过程中的二聚化

[1025] 进行了树脂负载筛选,以评估和最小化线性前体环化过程中二聚体的形成以及评估其在大规模下的可重复性。

[1026] 表14.线性前体环化后检测到的树脂负载水平、目标产物、差向异构体和二聚体的

汇总表。

由环肽片段的 UPLC 积分得到的纯度百分比			
树脂负载 (mmol/g)	环肽 (10.13 min)	差向异构体 (10.33 min)	二聚体 (15.69 min)
0.22	90.12	4.31	5.56
0.39	88.18	5.86	5.81
0.46	88.59	4.82	6.58
0.64	87.75	5.99	6.38
0.77	82.38	9.10	8.36
0.92	81.91	9.25	8.98
第 1 代*	84.69	6.15	9.14

[1028] *第1代树脂负载为0.48-0.51mmol/g

[1029] 酰胺缀合条件筛选

[1030] 所有条件均在室温下以2mM PMO (50mg/mL在DMSO中) 进行评估。所有试剂均在DMSO中制备:

[1031] 1. DIC (300mM DMSO)

[1032] 2. Oxyma (300mM DMSO)

[1033] 3. PyAOP (300mM DMSO)

[1034] 4. HATU (300mM DMSO)

[1035] 5. DIPEA (300mM DMSO)

[1036] 6. EEV (100mM DMSO)

[1037] 用1:1ACN/H₂O+0.1% TFA稀释/淬灭,之后注射

[1038] 表15. 酰胺缀合条件

EEV	偶联试剂	添加剂	碱	溶剂	时间	转换率(%)
2 eq.	2 eq. HATU	1.5 eq. Oxyma	2 eq. DIPEA	DMSO	2 h	67.46
2 eq.	3 eq. HATU	2.5 eq. Oxyma	2 eq. DIPEA	DMSO	2 h	68.85
2 eq.	4 eq. HATU	3.5 eq. Oxyma	2 eq. DIPEA	DMSO	2 h	67.55
2 eq.	5 eq. HATU	4.5 eq. Oxyma	2 eq. DIPEA	DMSO	2 h	67.73
[1039] 2 eq.	2 eq. HATU	1.5 eq. Oxyma	4 eq. DIPEA	DMSO	2 h	68.23
2 eq.	3 eq. HATU	2.5 eq. Oxyma	4 eq. DIPEA	DMSO	2 h	69.85
2 eq.	4 eq. HATU	3.5 eq. Oxyma	4 eq. DIPEA	DMSO	2 h	68.75
2 eq.	5 eq. HATU	4.5 eq. Oxyma	4 eq. DIPEA	DMSO	2 h	77.04
2 eq.	2 eq. HATU	N/A	2 eq. DIPEA	DMSO	2 h	77.23
2 eq.	4 eq. HATU	N/A	2 eq. DIPEA	DMSO	2 h	81.87
2 eq.	2 eq. HATU	N/A	4 eq. DIPEA	DMSO	2 h	78.37

[1040] Tfa脱保护条件筛选

[1041] 表16. EEV-PMO Tfa脱保护

条件	时间	完成
0.2 M NaOH	30 min	+
0.1M NaOH	30 min	+
10%胍	30 min	-
50 mM NaHCO ₃ , pH 10	1 h	-
50 mM NaHCO ₃ , pH 11	1 h	-
0.2M KCl, pH 12	2 h	+

50 mM NH ₃ -NH ₄ Cl, pH 10	1 h	-
50 mM NH ₃ -NH ₄ Cl, pH 11	1 h	-
2%哌啶	1 h	-
5%哌啶	1 h	-
10%哌啶	1 h	-
20%哌啶	1 h	-
1 M EDT	1 h	-
1 M BME	1 h	-

[1044] *(+) 表示完全脱保护, (-) 表示部分脱保护或未脱保护

[1045] 表17. EEV-PMO缀合

EEV	偶联试剂	添加剂	碱	溶剂	时间	转换率(%)
2 eq.	2 eq. PyAOP	1.5 eq. Oxyma	2 eq. DIPEA	DMSO	2 h	36.20
2 eq.	3 eq. PyAOP	2.5 eq. Oxyma	2 eq. DIPEA	DMSO	2 h	37.85
2 eq.	4 eq. PyAOP	3.5 eq. Oxyma	2 eq. DIPEA	DMSO	2 h	36.44
2 eq.	5 eq. PyAOP	4.5 eq. Oxyma	2 eq. DIPEA	DMSO	2 h	33.04
2 eq.	2 eq. PyAOP	1.5 eq. Oxyma	4 eq. DIPEA	DMSO	2 h	40.11
2 eq.	3 eq. PyAOP	2.5 eq. Oxyma	4 eq. DIPEA	DMSO	2 h	41.06
2 eq.	4 eq. PyAOP	3.5 eq. Oxyma	4 eq. DIPEA	DMSO	2 h	38.03
2 eq.	5 eq. PyAOP	4.5 eq. Oxyma	4 eq. DIPEA	DMSO	2 h	30.59
2 eq.	2 eq. PyAOP	N/A	2 eq. DIPEA	DMSO	2 h	39.83
2 eq.	3 eq. PyAOP	N/A	2 eq. DIPEA	DMSO	2 h	40.59
2 eq.	4 eq. PyAOP	N/A	2 eq. DIPEA	DMSO	2 h	34.35
2 eq.	5 eq. PyAOP	N/A	2 eq. DIPEA	DMSO	2 h	34.77
2 eq.	2 eq. PyAOP	N/A	4 eq. DIPEA	DMSO	2 h	50.59
2 eq.	3 eq. PyAOP	N/A	4 eq. DIPEA	DMSO	2 h	41.98
2 eq.	4 eq. PyAOP	N/A	4 eq. DIPEA	DMSO	2 h	37.82
2 eq.	5 eq. PyAOP	N/A	4 eq. DIPEA	DMSO	2 h	28.99

[1047] 表18. EEV-PMO缀合

EEV	偶联试剂	添加剂	碱	溶剂	时间	转换率(%)
1 eq.	1 eq. DIC	1 eq.Oxyrna	N/A	DMSO	2 h	17.46
2 eq.	1 eq.DIC	1 eq.Oxyrna	N/A	DMSO	2 h	16.75
3 eq.	1 eq.DIC	1 eq.Oxyrna	N/A	DMSO	2 h	19.27
5 eq.	1 eq.DIC	1 eq.Oxyrna	N/A	DMSO	2 h	25.06
[1048] 1 eq.	2 eq.DIC	2 eq.Oxyrna	N/A	DMSO	2 h	21.42
2 eq.	2 eq.DIC	2 eq.Oxyrna	N/A	DMSO	2 h	10.00
3 eq.	2 eq.DIC	2 eq.Oxyrna	N/A	DMSO	2 h	21.47
5 eq.	2 eq.DIC	2 eq.Oxyrna	N/A	DMSO	2 h	29.69
1 eq.	3 eq.DIC	3 eq.Oxyrna	N/A	DMSO	2 h	8.19
2 eq.	3 eq.DIC	3 eq.Oxyrna	N/A	DMSO	2 h	11.75
3 eq.	3 eq.DIC	3 eq.Oxyrna	N/A	DMSO	2 h	~12
3 eq.	3 eq.DIC	3 eq.Oxyrna	N/A	DMSO	24 h	44.58
5 eq.	3 eq.DIC	3 eq.Oxyrna	N/A	DMSO	2 h	26.36
5 eq.	3 eq.DIC	3 eq.Oxyrna	N/A	DMSO	24 h	50.02
[1049] 1 eq.	5 eq.DIC	5 eq.Oxyrna	N/A	DMSO	2 h	11.78
2 eq.	5 eq.DIC	5 eq.Oxyrna	N/A	DMSO	2 h	16.09
3 eq.	5 eq.DIC	5 eq.Oxyrna	N/A	DMSO	2 h	19.53
3 eq.	5 eq.DIC	5 eq.Oxyrna	N/A	DMSO	24 h	40.52
5 eq.	5 eq.DIC	5 eq.Oxyrna	N/A	DMSO	2 h	32.38
5 eq.	5 eq.DIC	5 eq.Oxyrna	N/A	DMSO	24 h	51.58

[1050] EEV-PMO Tfa脱保护筛选

[1051] 使用各种水性、有机和两亲性碱对替代EEV-PMO脱保护条件进行了评估,结果发现PMO再生更少且产品纯度更高的温和脱保护条件,并且也筛选了用于执行更快脱保护而不牺牲纯度的更激进的条件

[1052] 表19. Tfa脱保护筛选条件

[1053]

条件	Tfa 完成时间(小时)	完成时的 PMO 再生(小时)	24 h 时的 PMO 再生
1 M K ₂ CO ₃ 在 H ₂ O 中	5-24 hr	1.75%	1.75%
1 M K ₂ CO ₃ , 18 eq.NaOH 在 H ₂ O 中	2 hr	1.90%	3.11%
1 M K ₂ CO ₃ , 20 eq. NaOH	1 hr	1.84-2.08%	3.79-4.18%
1 M NaOMe 在 MeOH 中	N/A	N/A	7.92-30.52%
1:1 哌啶: H ₂ O	N/A	N/A	2.44%
1.5 M K ₂ CO ₃ 在 H ₂ O 中	5-24 hr	2.02%	2.02%
10 eq.NaOH, 0.1 M KCl 在 H ₂ O 中	N/A	N/A	N/A
12.5 mM NaOH, 0.1 M KCl 在 H ₂ O 中	5-24 hr	1.39-1.81%	1.39-1.81%
125 eq.K ₂ CO ₃ 在 H ₂ O 中	5-24 hr	2.62%	2.62%
125 eq.K ₂ CO ₃ 在 H ₂ O 中, 10 eq.NaOH	5-24 hr	3.24%	3.24%
125 eq.K ₂ CO ₃ 在 H ₂ O 中, 15 eq.NaOH	5 hr	2.53%	3.19%
125 eq.K ₂ CO ₃ 在 H ₂ O 中, 20 eq.NaOH	3 hr	2.37%	4.01%
15 eq.LiOH 在 H ₂ O 中	N/A	N/A	1.40%
15 eq.NaOH 在 H ₂ O 中	5-24+ hr	1.8-1.86%	1.8-1.86%

[1054]

15 eq.NaOH, 0.1 M KCl 在 H ₂ O 中	N/A	N/A	N/A
15 eq.NaOH, 0.1 M LiCl 在 H ₂ O 中	N/A	N/A	N/A
15 eq.NaOH, 0.1 M NaCl 在 H ₂ O 中	N/A	N/A	N/A
16 eq.NaOH 在 H ₂ O 中	5-24 hr	2.47%	2.47%
17 eq.NaOH 在 H ₂ O 中	5-24 hr	2.59%	2.59%
18 eq.NaOH 在 H ₂ O 中	5-24 hr	1.69-2.56%	1.69-2.56%
18.75 mM NaOH, 0.1 M KCl 在 H ₂ O 中	1 hr	3.22%	4.96%
188 eq.K ₂ CO ₃ 在 H ₂ O 中	5-24 hr	2.25%	2.25%
2 M K ₂ CO ₃ 在 H ₂ O 中	5-24 hr	1.93%	1.93%
2: 1 吡啶: H ₂ O	N/A	N/A	2.32%
20 eq.KOH 在 H ₂ O 中	5-24 hr	1.87%	1.87%
20 eq.NaOH 在 H ₂ O 中	4 hr	3.05%	N/A
20 eq.NaOH, 0.1 M KCl 在 H ₂ O 中	2 hr	1.88%	2.39%
22.5 % NH ₄ OH 在 H ₂ O 中	5-24 hr	2.01%	2.01%
22.5 eq.NaOH 在 H ₂ O 中	3 hr	1.85%	2.21%
25 eq.KOH 在 H ₂ O 中	2 hr	1.97%	6.29%
25 eq.NaOH 在 H ₂ O 中	1 hr	2.65%	6.30%
250 eq.K ₂ CO ₃ 在 H ₂ O 中 H ₂ O	5-24 hr	2.19%	2.19%
27.5 eq.NaOH 在 H ₂ O 中	1 hr	1.99%	5.05%
30 eq.LiOH 在 H ₂ O 中	2 hr	2.42%	9.10%
30 eq.NaOH 在 H ₂ O 中	1-2 hr	2.27-2.85%	11.14-11.67%
30 eq.NaOH, 0.1 M KCl 在 H ₂ O 中 H ₂ O	1 hr	1.97%	5.79%
40 eq.K ₂ CO ₃ 在 H ₂ O 中	5-24 hr	1.60-2.91%	1.60-2.91%
40 eq.K ₂ CO ₃ 在 H ₂ O 中, 15 eq.NaOH 在 H ₂ O 中	4 hr	2.03%	3.84%
40 eq.KOH 在 H ₂ O 中	1 hr	2.77%	9.82%
40 eq.KOH, 0.1 M KCl 在 H ₂ O 中	1 hr	2.70%	10.87%
40 eq.NaOH 在 H ₂ O 中	1 hr	1.00	14.36%
40 eq.NaOH 在 H ₂ O 中, 0.1 M KCl 在 H ₂ O 中	1 hr	2.79%	14.49%
40 eq.NaOH 在 H ₂ O 中, 0.1 M NaCl 在 H ₂ O 中	1 hr	3.54%	22.57%
40 eq.NaOH 在 H ₂ O 中, 0.1 M LiCl 在 H ₂ O 中	1 hr	2.56%	17.93%

[1055]	40 eq.质子海绵在 ACN 中	N/A	N/A	N/A
	40 eq.质子海绵在 DMF 中	N/A	N/A	N/A
	40 eq.质子海绵在 DMSO 中	N/A	N/A	N/A
	80 eq.K ₂ CO ₃ 在 H ₂ O 中	5-24 hr	1.82-2.13%	1.82-2.13%
	80 eq.K ₂ CO ₃ 在 H ₂ O 中, 10 eq.NaOH 在 H ₂ O 中	4 hr	1.97%	3.16%
	80 eq.K ₂ CO ₃ 在 H ₂ O 中, 15 eq.NaOH 在 H ₂ O 中	3 hr	1.94%	3.57%

[1056] 表20. 加成脱保护条件

条件	Tfa 完成时间 (小时)	完成时的 PMO 再生(小时)	24 h 时的 PMO 再生
22.5% NH ₃ 在 H ₂ O 中	5-24 hr	2.0%	2.0%
20 eq. KOH	5-24 hr	1.9%	1.9%
18 eq. NaOH	5-24 hr	1.7%	1.7%
40 eq. K ₂ CO ₃	5-24 hr	1.6 - 2.9 %	1.6 - 2.9 %
80 eq. K ₂ CO ₃	5-24 hr	2.1%	2.1%
1 M K ₂ CO ₃	5-24 hr	1.8 - 2.6 %	1.8 - 2.6 %
1.5 M K ₂ CO ₃	5-24 hr	2.0 - 2.3 %	2.0 - 2.3 %
2 M K ₂ CO ₃	5-24 hr	1.9 - 2.2 %	1.9 - 2.2 %
1 M K ₂ CO ₃ + 20 eq. NaOH (3.60 mM EEV-PMO)	1 hr	1.8%	3.8 - 4.2 %
125 eq. K ₂ CO ₃ + 18 eq. NaOH (4.64 mM EEV-PMO)	2 hr	1.9%	3.1%
125 eq. K ₂ CO ₃ + 15 eq NaOH (4.64 mM EEV-PMO)	5 hr	2.5%	3.2%
80 eq. K ₂ CO ₃ + 15 eq NaOH (4.64 mM EEV-PMO)	4-5 hr	2.2 - 2.5 %	3.6%

[1058] 线性-环肽偶联反应筛选

[1059] 使用各种条件对线性-环偶联进行筛选。实验在0.6mmol/g负载材料和0.4mmol/g负载材料下进行。

[1060] 表21. 0.6mmol/g负载线性肽片段的偶联反应条件的总结

由 UPLC 积分的纯度百分比确定缀合完成(0.6 mmol/g 负载)					
第 1 天 (20h)	第 2 天(40h)	第 3 天(60h)	体积 (mL)	起始材料 (20.9 min)	所需产物 (21.50 min)
6eq 环肽, 无 HOAt	-	-	10	85.12	2.99
6eq 环肽, 0.6eq DMAP	-	-	10	80.16	4.08
3eq 再循环 环肽(重量)	+3eq HOAt, 3.3eq DIC	-	10	35.16	50.20
6eq 环肽, 6.0eq Oxyrna	-	-	10	15.99	64.83
3 eq 环肽	-	-	10	33.25	66.48
3eq 再循环 环肽(纯度)	+3eq HOAt, 3.3eq DIC	-	10	17.48	71.58
3 eq 环肽	-	-	5	19.70	75.04
3 eq 环肽	+3.3eq DIC	-	10	14.68	83.14
6eq 环肽	+3eq HOAt, 3.3eq DIC	-	10	9.02	88.62
3 eq 环肽	+1eq 环肽, 1eq HOAt, 1.1eq DIC	-	10	9.34	88.84
6 eq 环肽	-	-	10	7.70	90.25
6 eq 环肽	-	-	10	7.70	90.25
3 eq 环肽 (重量)	+3 eq 环肽, 3eq HOAt, 3.3eq DIC	-	10	2.20	96.40
3 eq 环肽	+3eq HOAt, 3.3eq DIC	+3eq 环肽	10	0.86	99.02
3 eq 环肽	+3eq HOAt, 3.3eq DIC	+3eq 环肽, 3eq HOAt, 3.3eq DIC	10	0.41	99.14

[1061] 表22. 0.4 mmol/g负载线性肽片段的偶联反应条件的总结

由 UPLC 积分的纯度百分比确定缀合完成(0.4 mmol/g 负载)					
第 1 天(20h)	第 2 天(40h)	第 3 天(60h)	体积 (mL)	起始材料 (20.9 min)	所需产物 (21.50 min)
3 eq 环肽(重量)	-	-	10	21.20	76.30
3 eq 环肽(纯度)	-	-	10	26.40	71.00
[1063] 3 eq 环肽	+3eq HOAt, 3.3eq DIC	+3eq 环肽, 3eq HOAt, 3.3eq DIC	10	0.29	99.71
3 eq 环肽	+3eq HOAt, 3.3eq DIC	+3eq 再循环环肽, 3eq HOAt, 3.3eq DIC	10	0.00	100.00
3 eq 环肽	+3eq HOAt, 3.3eq DIC	+3eq HOAt, 3.3eq DIC	10	0.00	100.00
3 eq 环肽, 6eq HOAt, 6.6eq DIC	从第一天继续	-	10	0.00	100.00

[1064] 表23. 与较低重量当量环肽2天缀合的分析。

由 UPLC 积分得到的纯度百分比			
重量当量	小时	起始材料	所需产物
3.0 eq	20	1.35	94.02
-	40	0.00	100.00
[1065] 2.0 eq	20	9.01	90.99
-	40	0.00	100.00
1.0 eq	20	37.74	62.26
-	40	26.61	73.39
0.5 eq	20	64.40	35.60
-	40	54.73	45.27

[1066] 表24. 与较低纯度当量环肽2天缀合的分析

由 UPLC 积分得到的纯度百分比			
纯度当量	小时	起始材料	所需产物
3.0 eq	20	0.00	100.00
-	40	0.00	100.00
[1067] 2.0 eq	20	11.33	88.67
-	40	0.00	100.00
1.0 eq	20	22.70	77.30
-	40	17.72	82.28
0.5 eq	20	55.59	44.41
-	40	45.42	54.48

[1068] EEV-PMO缀合及脱保护反应机理研究

[1069] 经由比较第2代和第1代方案的时间过程来评估EEV-PMO缀合/脱保护反应。也研究了使用不同纯度PMO的缀合/脱保护反应以及纯化且受保护的EEV-PMO的脱保护。

[1070] 表25. 基于UPLC积分数据的EEV-PMO产物形成

缀合时间 点 (min)	96.0% PMO	77.43% PMO	72.72% PMO	68.97% PMO	59.15% PMO	42.39% PMO
0	0	0	0	0	0	0
30	93.29	79.31	83.94	70.76	58.32	40.91
60	90.7	87.18	86.24	74.15	58.65	43.09
90	90.9	83.5	81.25	75.12	58.87	44.97
120	90.65	82.79	82.06	73.82	59.29	44.06
150	90.82	84.18	82.22	73.9	59.75	44.43
180	90.52	83.62	82.89	75.34	59.2	45.68

[1071]

[1072]

表26. 基于UPLC积分数据的缀合过程中的PMO消耗 (与表25相同的时间过程)

缀合时间 点(min)	96.0% PMO	77.43% PMO	72.72% PMO	68.97% PMO	59.15% PMO	42.39% PMO
0	96.49	91.82	83.17	80.02	90.1	98.79
30	2.21	10.8	2.75	5.95	16.21	22.85
60	1.83	6.74	2.68	4.69	12.64	22.76
90	1.79	5.02	3.7	4.65	10.86	22.53
120	1.75	9	3.3	5.95	13.08	22.54
150	1.77	9.36	3.59	4.86	13.77	22.38
180	2.05	5.47	3.77	4.79	13.76	22.64

[1073]

[1074]

表27. 使用不同纯度PMO的脱保护反应产物形成时间过程

脱保护时 间点(min)	96.0% PMO	77.43% PMO	72.72% PMO	68.97% PMO	59.15% PMO	42.39% PMO
0	80.88	81.71	71.57	64.42	62.68	23.01
30	85.34	82.49	85.89	77.71	64.73	52.13
60	85.02	79.5	86.58	79.5	62	51.48
90	82.64	77.07	84.78	80.4	60.15	53.16
120	83.1	80.5	79.86	76.59	62.06	51.44
150	80.85	80.13	80.55	75.45	64.05	50.96
180	79.24	76.67	75.04	72.42	63.07	53.03
240	79.16	75.09	69.94	68.7	62.2	50.55
300	77.73	73.8	72.39	69.04	60.22	50.27
1440	69.76	65.25	59.78	57.15	55.38	45.64

[1075]

[1076]

[1077]

表28. 使用不同纯度PMO的脱保护反应PMO再生时间过程

	脱保护时 间点(min)	96.0% PMO	77.43% PMO	72.72% PMO	68.97% PMO	59.15% PMO	42.39% PMO
	0	2.49	1.23	3.21	5.95	9.66	28.43
	30	3.51	5.81	3.35	6.78	11.26	26
	60	3.8	6.43	3.4	7.13	17.94	26.14
[1078]	90	3.75	10.45	4.75	7.79	10.27	24.34
	120	4.41	7.85	5.4	8.16	13.29	26.47
	150	4.95	6.28	4.65	8.84	15.37	26.95
	180	5.95	11.37	5.07	9.6	17.04	24.73
	240	6.18	8.2	5.73	9.29	16.02	28.15
	300	6.02	8.85	5.29	9.47	17.09	28.36
	1440	19.16	25.64	27.66	31.83	30.4	56.77

[1079] 表29. 第1代和第2代条件下的缀合反应产物形成时间过程

	缀合时间 点 (min)	工艺化学(第 2 代)	工艺化学(第 2 代)	CMC (第 1 代)	CMC (第 1 代)
	0	0	0	0	0
	30	93.29	85.31	92.16	91.15
[1080]	60	90.7	86.37	92.22	93.45
	90	90.9	87.47	90.28	92.67
	120	90.65	88.92	88.44	91.59
	150	90.82	90.01	89.29	90.8
	180	90.52	89.91	89.55	91.96

[1081] 表30. 第1代和第2代条件下的缀合反应PMO消耗时间过程

	缀合 时间 点 (min)	工艺化学(第 2 代)	工艺化学(第 2 代)	CMC (第 1 代)	CMC (第 1 代)
	0	96.49	96.38	92.58	95.81
[1082]	30	2.21	2.43	4.8	2.29
	60	1.83	2.92	2.23	0.9
	90	1.79	0.84	2.59	0.89
	120	1.75	0.98	2.95	2.35
	150	1.77	2.62	2.06	2.79
	180	2.05	2.14	2.89	2.43

[1083] 表31. 第1代和第2代条件下的脱保护反应产物形成时间过程

脱保护时间点(min)	工艺化学(第2代)缀合/脱保护	工艺化学(第2代)缀合/CMC(第1代)脱保护	CMC(第1代)缀合/脱保护	纯化的产物脱保护
0	58.68	2.18	1.45	61.05
30	82.78	22.89	9.11	92.01
60	90	28.57	16.42	94.01
90	91.16	44.46	30.16	92.52
120	86.88	47.87	32.3	92.4
150	84.8	61.11	44.51	89.79
180	86.15	63.8	50.4	86.72
240	80.08	69.71	55.57	89.02
300	81.67	75.35	59.8	82.46
1440	72.86	89.81	89.47	57.92

[1085] 表32. 第1代和第2代条件下的脱保护反应PMO再生时间过程

脱保护时间点(min)	工艺化学(第2代)缀合/脱保护	工艺化学(第2代)缀合/CMC(第1代)脱保护	CMC(第1代)缀合/脱保护	纯化的产物脱保护
0	1.86	3.58	2.21	0
30	3.04	3.92	2.26	1.68
60	2.1	3.65	2.6	0.65
90	3.07	3.58	2.44	1.38
120	3.54	3.56	2.41	1.12
150	3.59	3.69	2.4	1.89
180	3.51	3.76	2.38	5.08
240	4.43	3.55	2.33	8.86
300	4.3	3.83	2.32	8.35
1440	18.87	3.78	2.75	10.36

[1087] 进行了实验以研究第2代缀合/脱保护方案(40eq NaOH)、第1代缀合/脱保护方案(缀合化学计量略有不同,而脱保护使用12.5mM NaOH、1M KCl)、使用第2代方法的纯化的且受保护的EEV-PMO的脱保护,以及使用不同纯度PMO(4个纯度水平)的第2代缀合/脱保护。在所有这些实验中,均使用由UPLC积分和LCMS质谱分析得到的纯度监测并比较了缀合反应和脱保护反应两者。

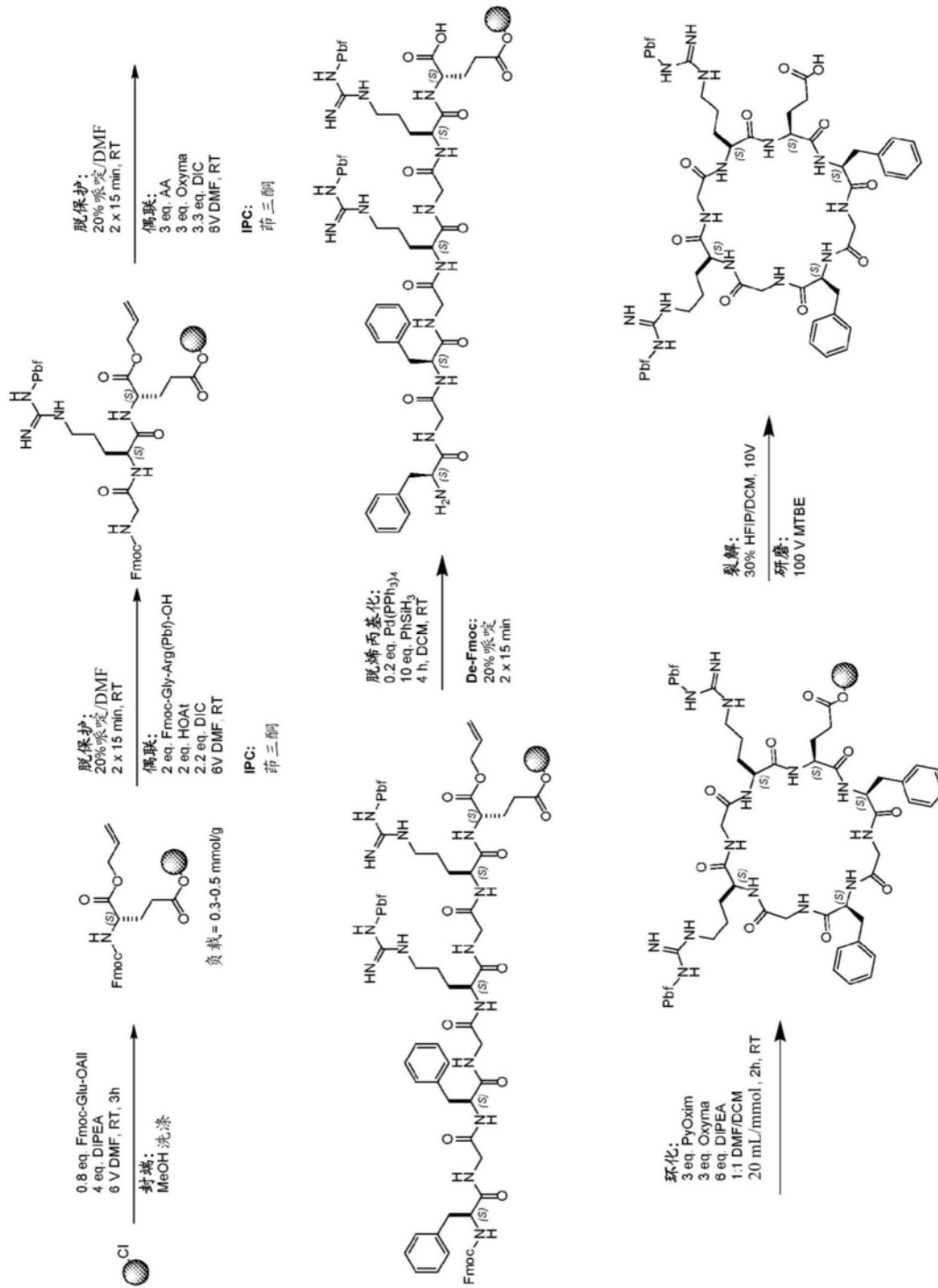


图1A

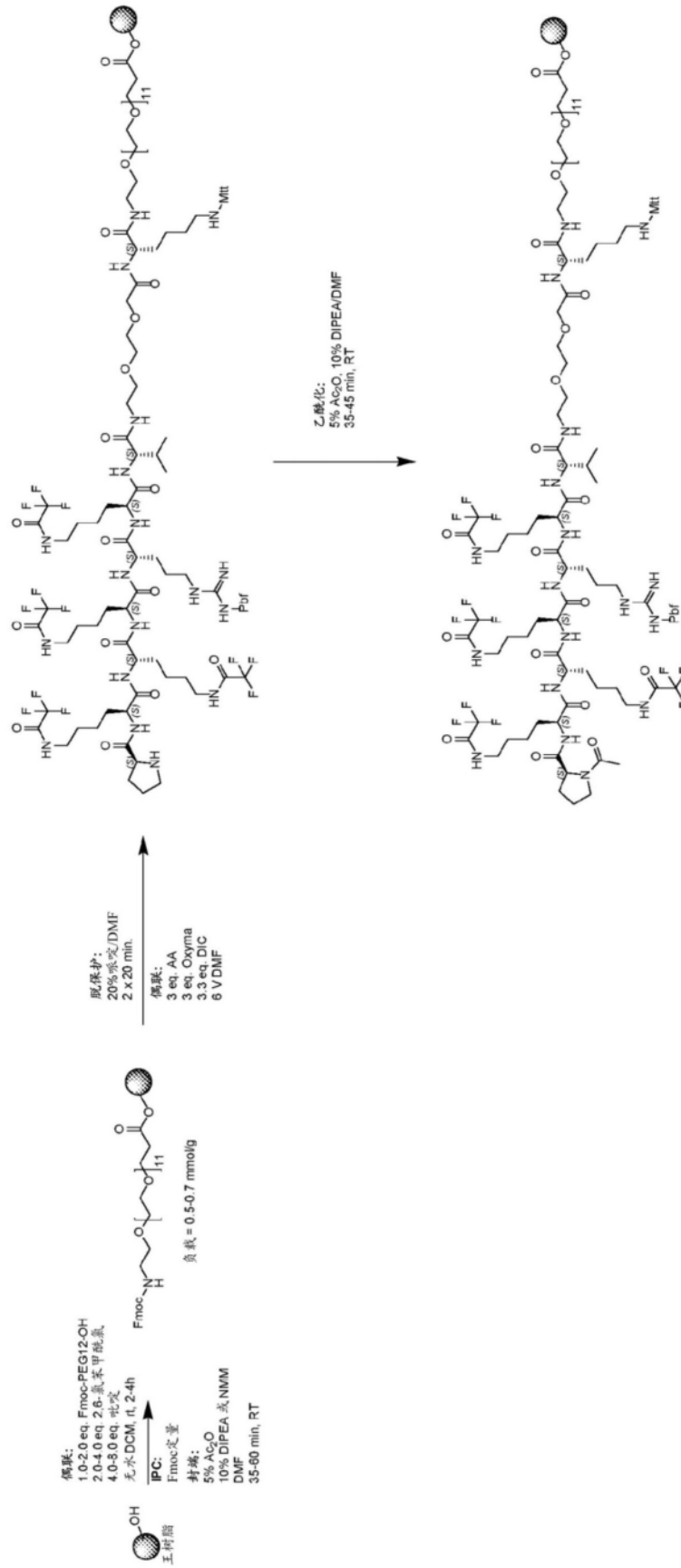


图1B

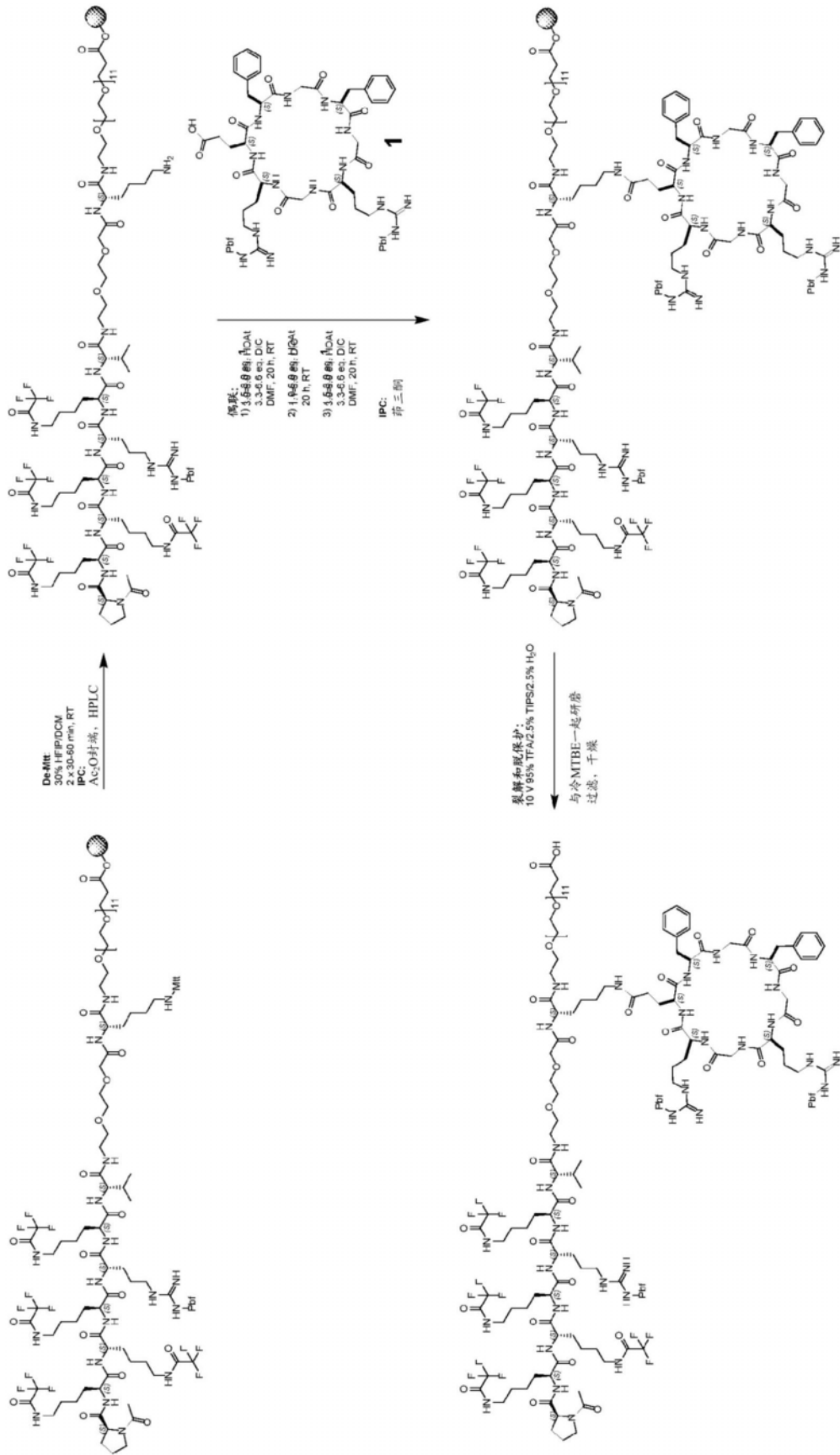


图1B续

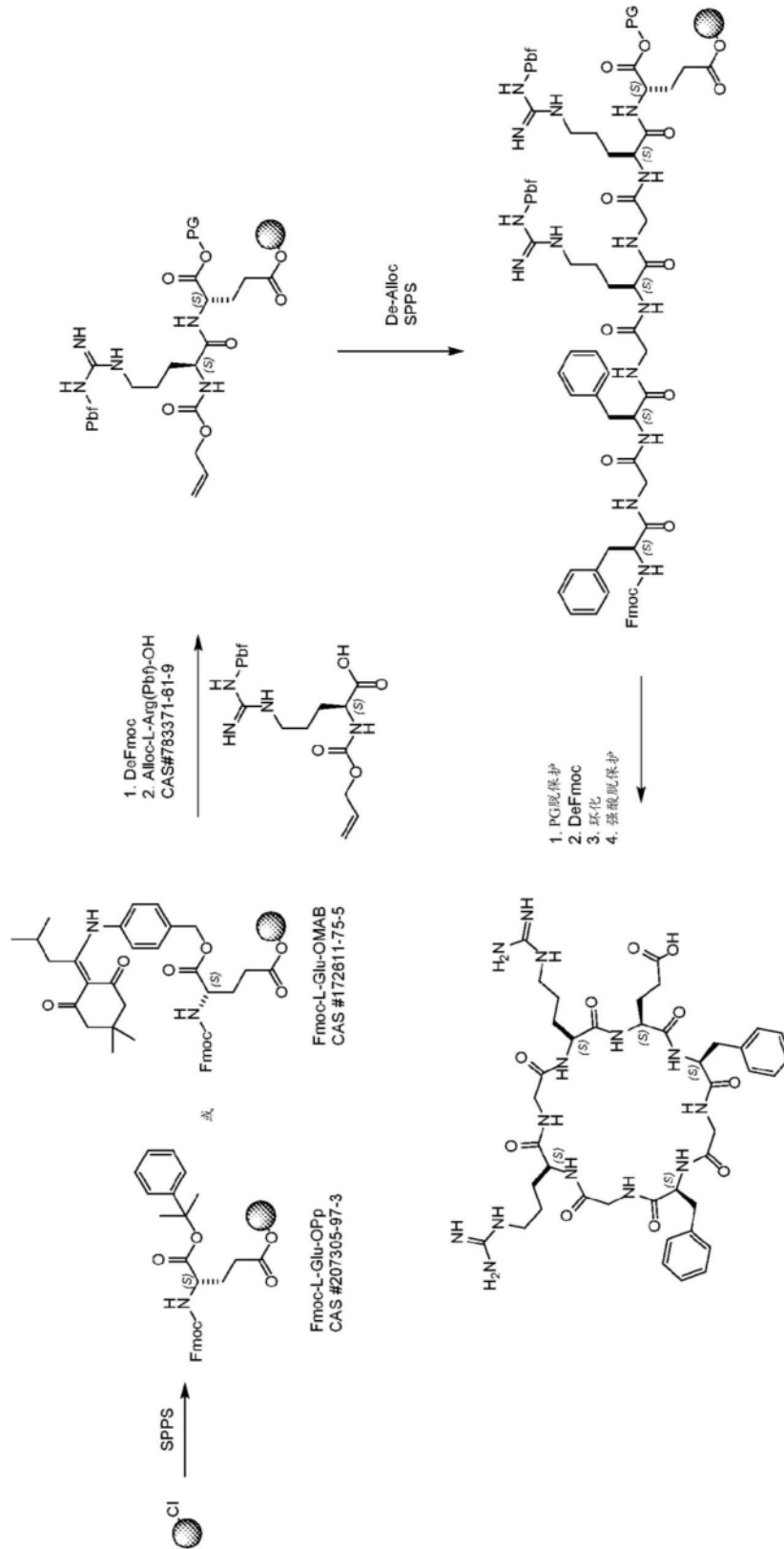


图2

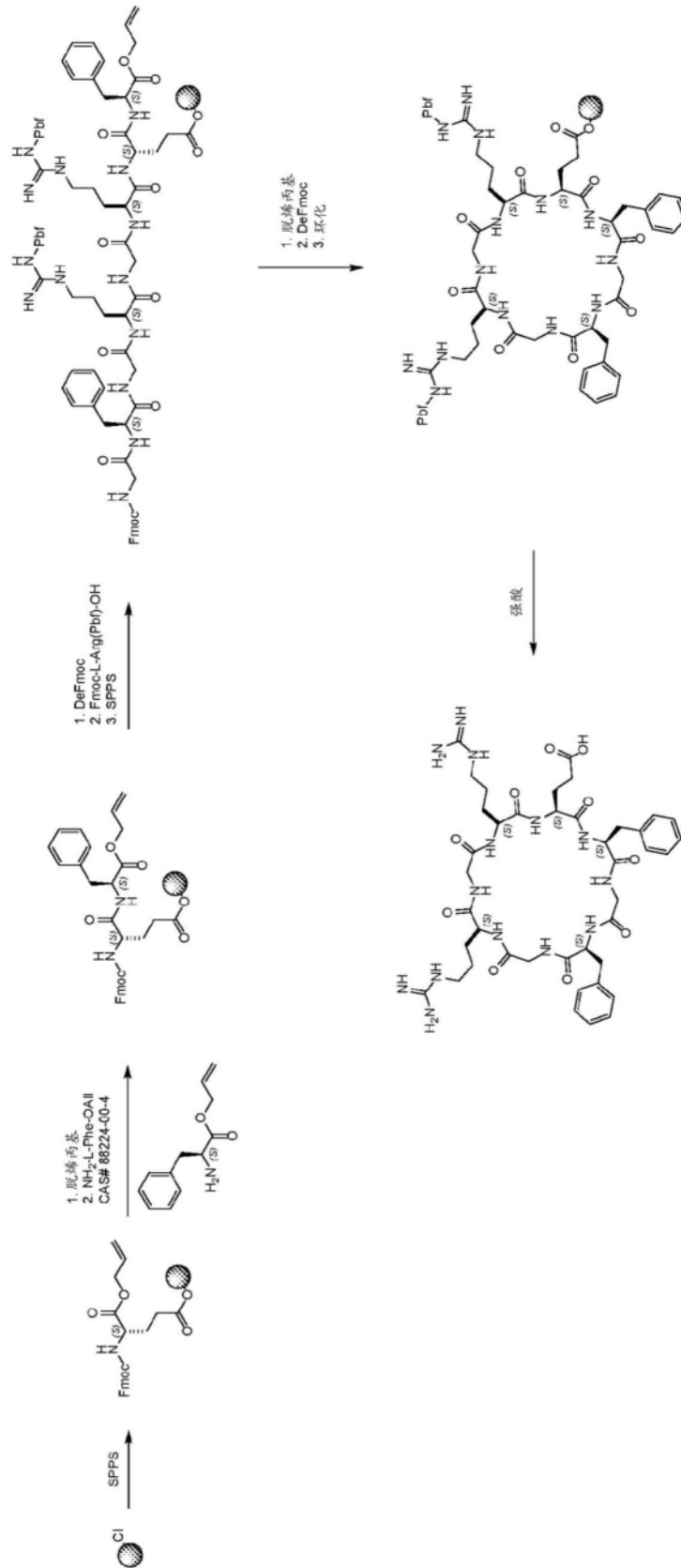


图3

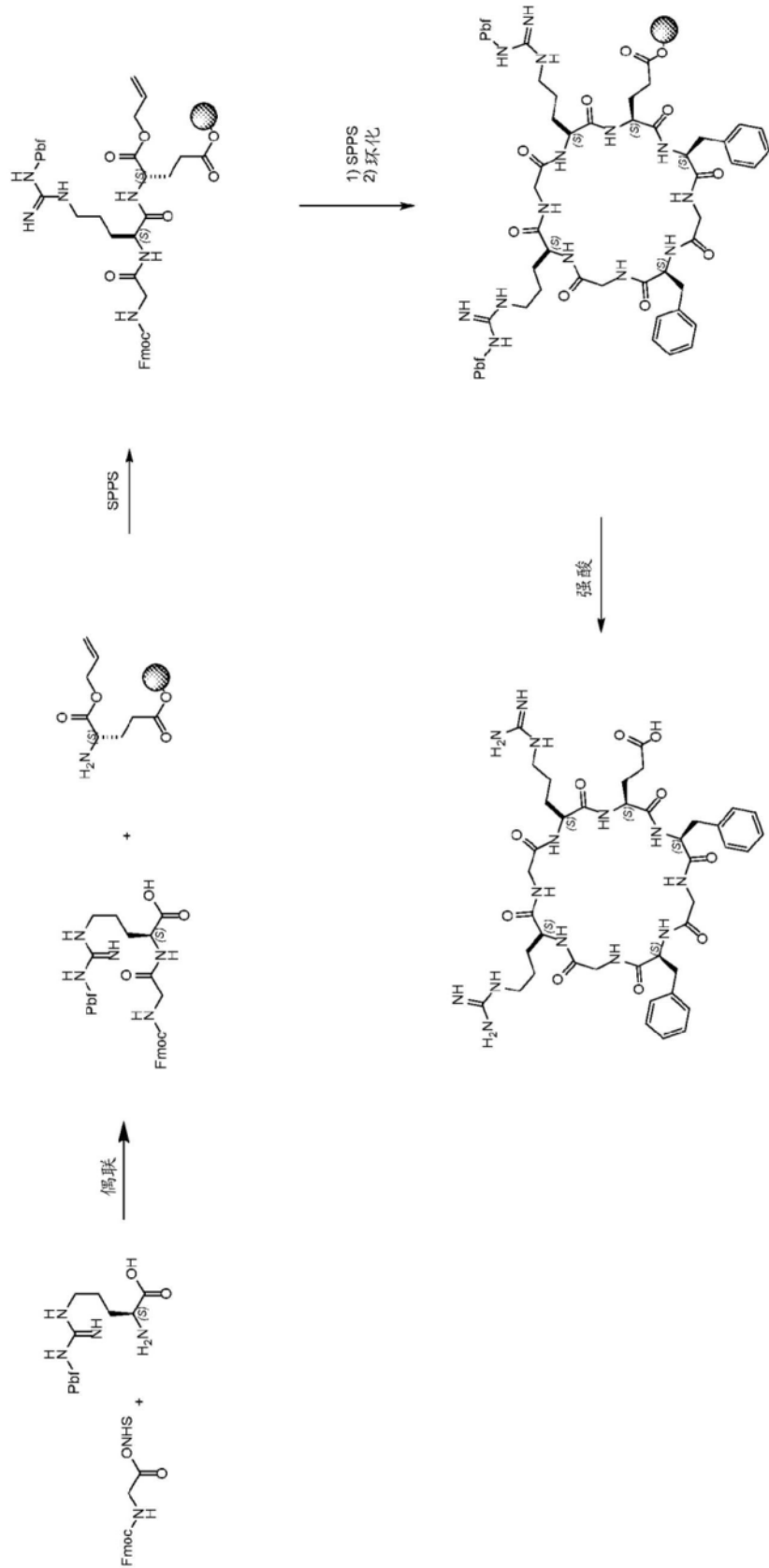


图4

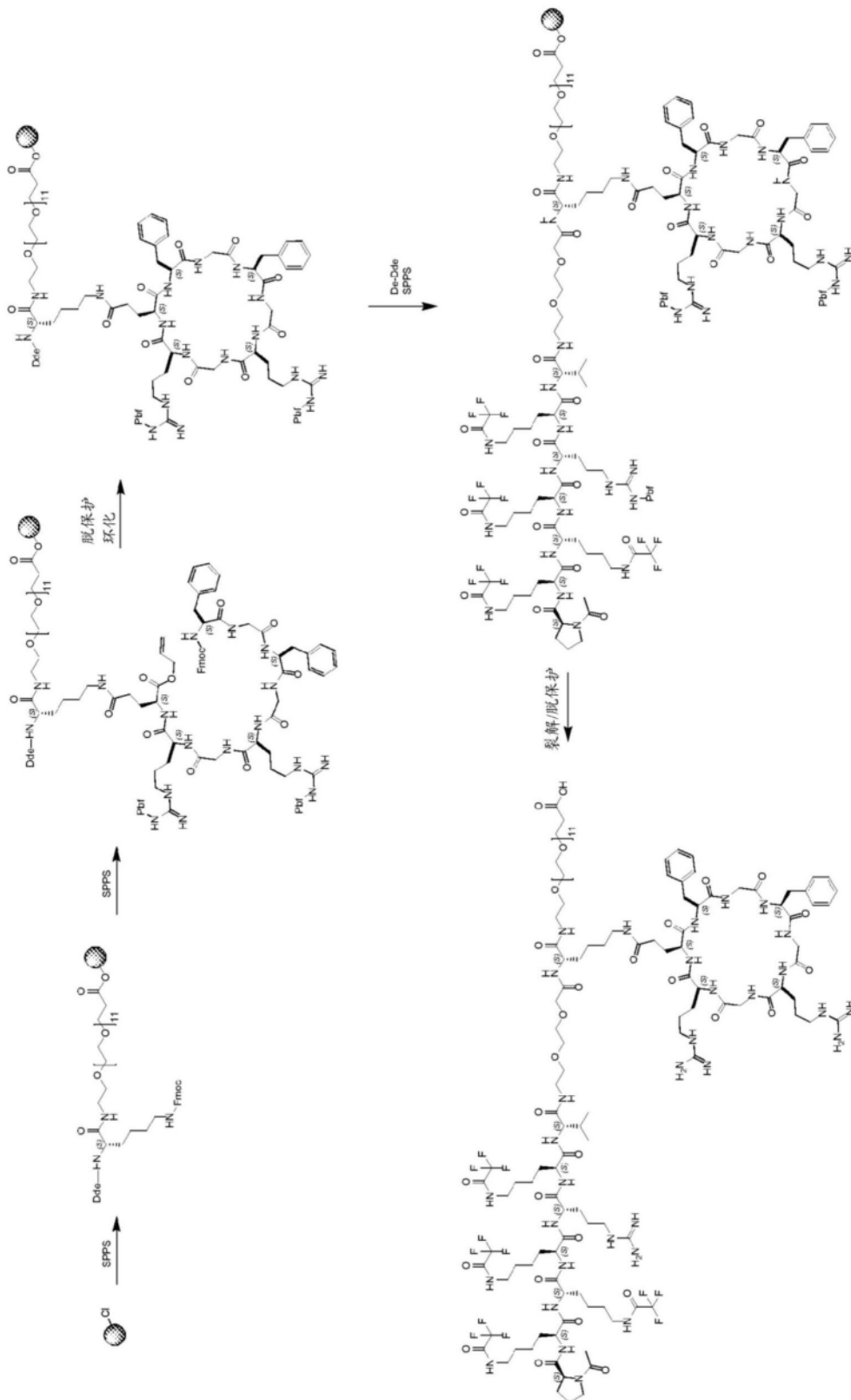


图5

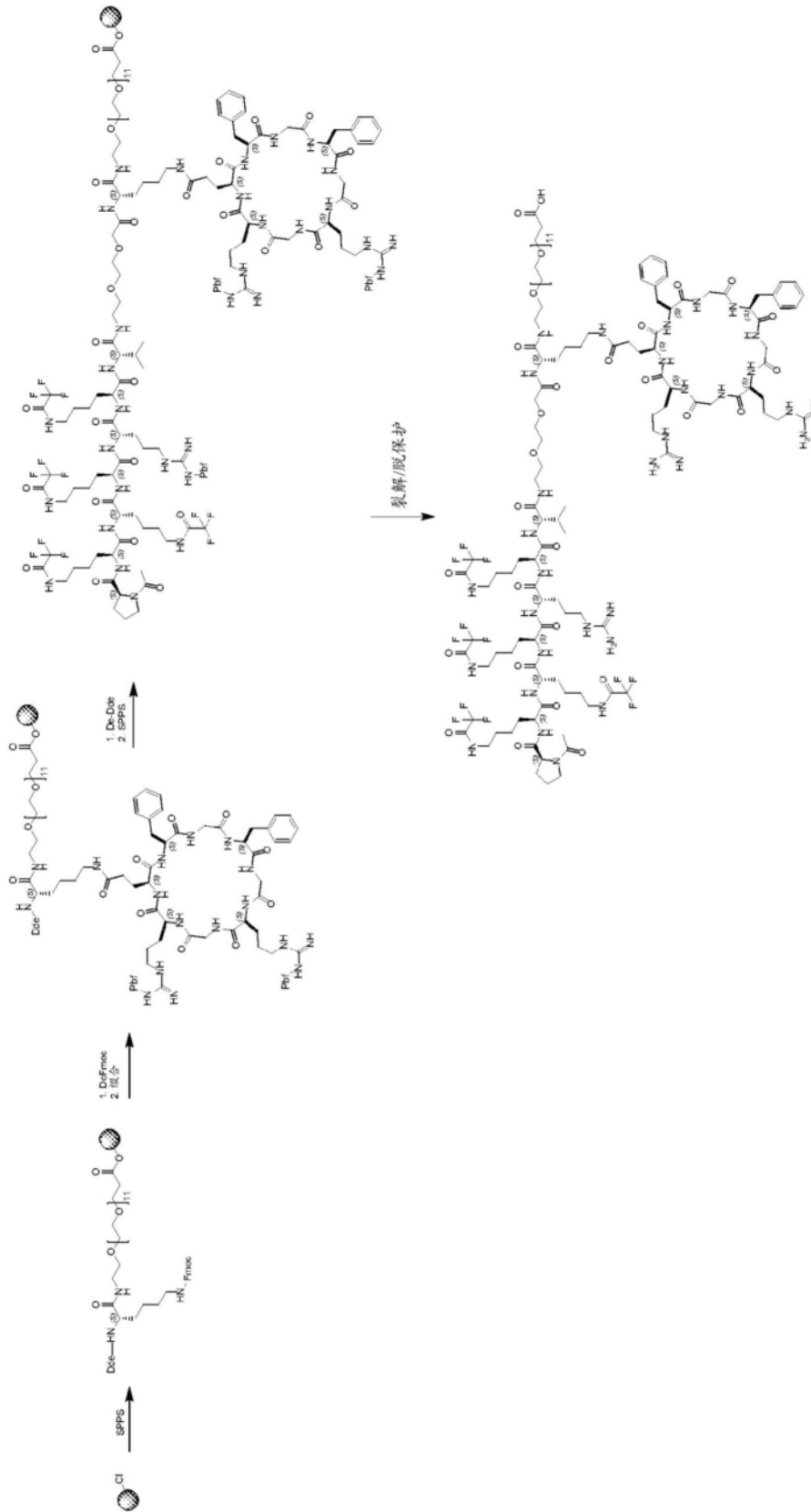


图6

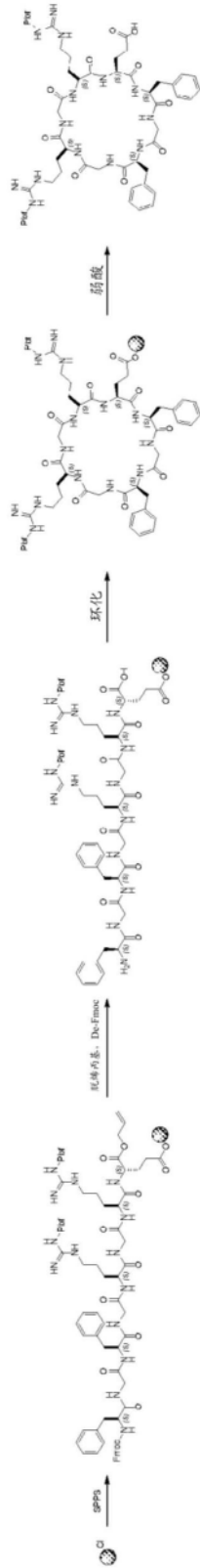


图7

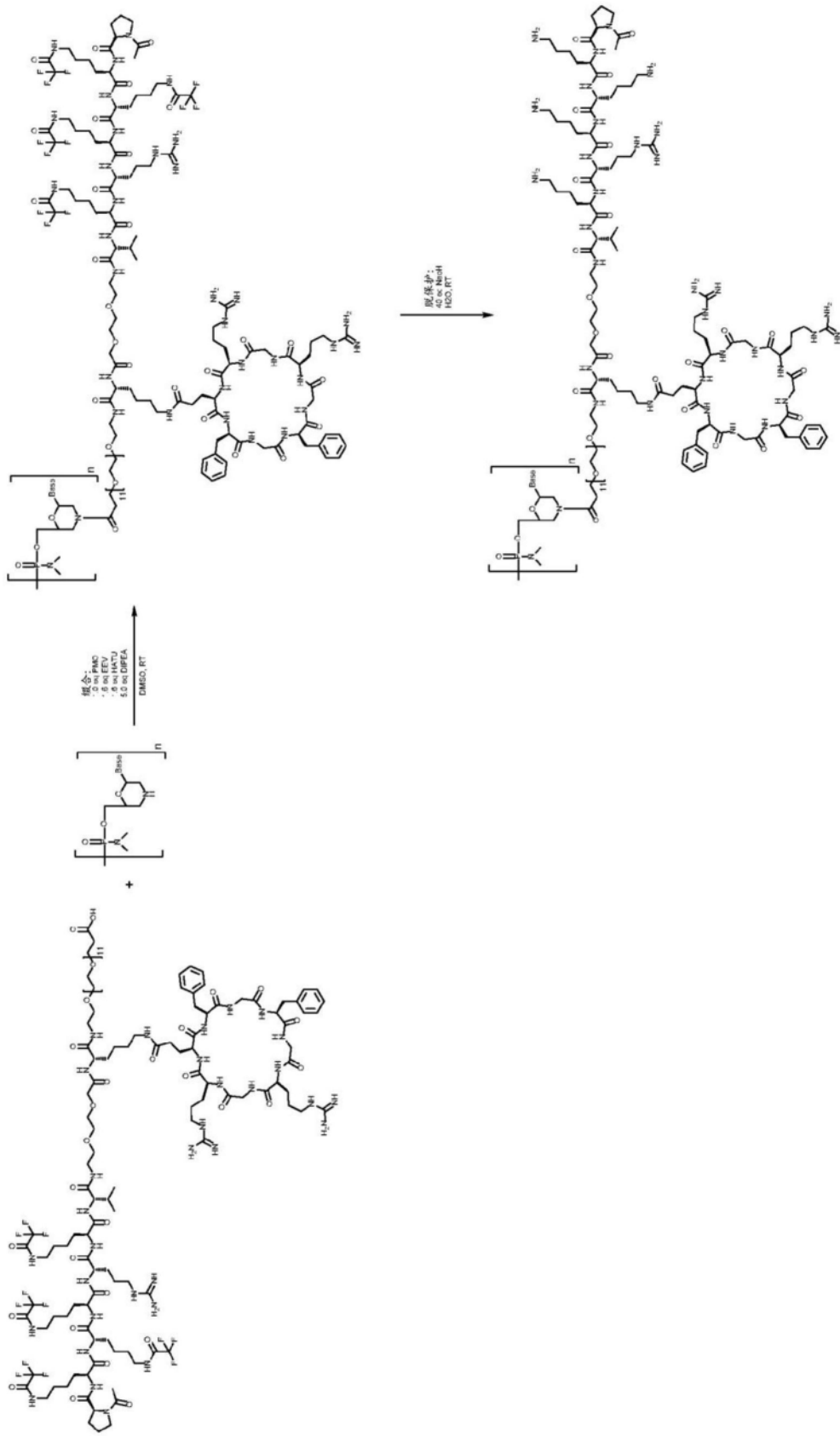


图10