



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116801896 A

(43) 申请公布日 2023.09.22

(21) 申请号 202180092685.5

(22) 申请日 2021.12.29

(30) 优先权数据

63/131,871 2020.12.30 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.08.02

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/IL2021/051548 2021.12.29

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/144885 EN 2022.07.07

(71) 申请人 百欧林纳克斯有限公司

地址 以色列莫迪因市

申请人 百欧肯治疗有限公司

(72) 发明人 埃夫拉特·哈尔宾格

阿姆农·佩莱德 埃拉·索拉尼

(74) 专利代理机构 上海翼胜专利商标事务所

(普通合伙) 31218

专利代理师 翟羽

(51) Int.Cl.

A61K 38/10 (2006.01)

权利要求书5页 说明书33页

序列表3页

(54) 发明名称

BL-8040的组合物

(57) 摘要

本公开内容公开了一种包含BL-8040 (SEQ ID NO: 1) 的组合物,其可用于治疗可由BL-8040治疗的病况。所述组合物还包括至少一种化合物,其特征在于,在本公开内容所述的条件下相对保留时间为0.86至0.88和/或相对保留时间为0.71至0.73(其中BL-8040的相对保留时间为1)。

1. 一种物质组合物,其特征在于,包括:BL-8040(SEQ ID NO:1)和以一相对保留时间在0.86至0.88范围内为表征的至少一种化合物,

其中所述相对保留时间是使用以下条件而被确定的:一第一流动相,所述第一流动相是pH在约3.0至约3.3范围内的0.017M高氯酸盐的水溶液;一第二流动相,所述第二流动相是乙腈;一梯度,其中所述第二流动相的浓度在约50分钟内从约20%的初始浓度增加约10%;一C18反相柱;在约5至约20微升范围内的一注射体积;以及约每分钟1毫升的一流速,在约40°C的温度下,并且其中所述BL-8040(SEQ ID NO:1)的一相对保留时间被定义为1。

2. 根据权利要求1所述的物质组合物,其特征在于:根据在约226纳米的波长处的吸收所确定的,所述至少一种化合物占所述物质组合物中除了BL-8040(SEQ ID NO:1)以外的所有化合物的至少20%。

3. 根据权利要求1所述的物质组合物,其特征在于:根据在约226纳米的波长处的吸收所确定的,所述至少一种化合物占所述物质组合物中除了BL-8040(SEQ ID NO:1)以外的所有化合物的至少50%。

4. 根据权利要求1至3中的任一项所述的物质组合物,其特征在于:所述至少一种化合物包括具有与BL-8040(SEQ ID NO:1)相同分子量的一化合物和/或具有比BL-8040(SEQ ID NO:1)的分子量高约80Da的分子量的一化合物。

5. 根据权利要求1至4中的任一项所述的物质组合物,其特征在于:所述至少一种化合物相对于所述BL-8040(SEQ ID NO:1)的总浓度比为至少约0.01%。

6. 根据权利要求1至5中的任一项所述的物质组合物,其特征在于:所述至少一种化合物相对于所述BL-8040(SEQ ID NO:1)的总浓度比为不超过约1%。

7. 根据权利要求1至6中的任一项所述的物质组合物,其特征在于:所述至少一种化合物相对于所述BL-8040(SEQ ID NO:1)的总浓度比是在约0.075%至约0.225%的范围内。

8. 根据权利要求1至7中的任一项所述的物质组合物,其特征在于:所述物质组合物还包括以一相对保留时间在0.71至0.73范围内为表征的至少一种化合物。

9. 根据权利要求8所述的物质组合物,其特征在于:根据在约226纳米的波长处的吸收所确定的,所述以一相对保留时间在0.71至0.73范围内为表征的至少一种化合物占所述物质组合物中除了BL-8040(SEQ ID NO:1)以外的所有化合物的至少10%。

10. 根据权利要求8或9所述的物质组合物,其特征在于:所述以一相对保留时间在0.71至0.73范围内为表征的至少一种化合物相对于所述BL-8040(SEQ ID NO:1)的总浓度比为至少约0.01%。

11. 根据权利要求10所述的物质组合物,其特征在于:所述以一相对保留时间在0.71至0.73范围内为表征的至少一种化合物相对于所述BL-8040(SEQ ID NO:1)的所述总浓度比是在约0.03%至约0.15%的范围内。

12. 根据权利要求8至11中的任一项所述的物质组合物,其特征在于:根据在约226纳米的波长处的吸收所确定的,所述以一相对保留时间在0.86至0.88范围内为表征的至少一种化合物和所述以一相对保留时间在0.71至0.73范围内为表征的至少一种化合物的总浓度占所述物质组合物中除了BL-8040(SEQ ID NO:1)以外的所有化合物的至少50%。

13. 根据权利要求1至12中的任一项所述的物质组合物,其特征在于:所述物质组合物中的环状脱酰胺的BL-8040(SEQ ID NO:2)的浓度不超过所述以一相对保留时间在0.86至

0.88范围内为表征的至少一种化合物的总浓度的50%。

14. 根据权利要求1至13中的任一项所述的物质组合物,其特征在于:所述物质组合物中的环状D-Lys(Ac)BL-8040(SEQ ID NO:3)的浓度不超过所述以一相对保留时间在0.86至0.88范围内为表征的至少一种化合物的总浓度的50%。

15. 根据权利要求1至14中的任一项所述的物质组合物,其特征在于:所述物质组合物中的环状脱酰胺的BL-8040(SEQ ID NO:2)和环状D-Lys(Ac)BL-8040(SEQ ID NO:3)的总浓度不超过所述以一相对保留时间在0.86至0.88范围内为表征的至少一种化合物的总浓度的80%。

16. 根据权利要求1至15中的任一项所述的物质组合物,其特征在于:所述反相柱的特征在于具有以下至少一个:长度约为250毫米、内径约为4.6毫米、以及粒径约为5微米。

17. 一种物质组合物,其特征在于,包括:BL-8040(SEQ ID NO:1)和以一相对保留时间在0.86至0.88范围内为表征的至少一种化合物,其中根据在约226纳米的波长处的吸收所确定的,所述至少一种化合物相对于所述BL-8040(SEQ ID NO:1)的总浓度比是在0.075%至0.225%的范围内,

其中所述相对保留时间是使用以下条件而被确定的:一第一流动相,所述第一流动相是pH在约3.0至约3.3范围内的0.017M高氯酸盐的水溶液;一第二流动相,所述第二流动相是乙腈;一梯度,其中所述第二流动相的浓度在约50分钟内从约20%的初始浓度增加约10%;一C18反相柱;在约5至约20微升范围内的一注射体积;以及约每分钟1毫升的一流速,在约40°C的温度下,并且其中所述BL-8040(SEQ ID NO:1)的一相对保留时间被定义为1。

18. 根据权利要求17所述的物质组合物,其特征在于:根据在约226纳米的波长处的吸收所确定的,所述至少一种化合物占所述物质组合物中除了BL-8040(SEQ ID NO:1)以外的所有化合物的至少20%。

19. 根据权利要求17或18所述的物质组合物,其特征在于:所述以一相对保留时间在0.86至0.88范围内为表征的至少一种化合物包括具有与BL-8040(SEQ ID NO:1)相同分子量的一化合物和/或具有比BL-8040(SEQ ID NO:1)的分子量高约80Da的分子量的一化合物。

20. 根据权利要求17至19中的任一项所述的物质组合物,其特征在于:所述至少一种化合物相对于所述BL-8040(SEQ ID NO:1)的总浓度比是在约0.1%至约0.2%的范围内。

21. 根据权利要求17至20中的任一项所述的物质组合物,其特征在于:所述物质组合物还包括以一相对保留时间在0.71至0.73范围内为表征的至少一种化合物。

22. 根据权利要求21所述的物质组合物,其特征在于:根据在约226纳米的波长处的吸收所确定的,所述以一相对保留时间在0.71至0.73范围内为表征的至少一种化合物占所述物质组合物中除了BL-8040(SEQ ID NO:1)以外的所有化合物的至少10%。

23. 根据权利要求21或22所述的物质组合物,其特征在于:所述以一相对保留时间在0.71至0.73范围内为表征的至少一种化合物相对于所述BL-8040(SEQ ID NO:1)的总浓度比为至少约0.01%。

24. 根据权利要求23所述的物质组合物,其特征在于:所述以一相对保留时间在0.71至0.73范围内为表征的至少一种化合物相对于所述BL-8040(SEQ ID NO:1)的所述总浓度比是在约0.03%至约0.15%的范围内。

25. 根据权利要求21至24中的任一项所述的物质组合物,其特征在於:根据在约226纳米的波长处的吸收所确定的,所述以一相对保留时间在0.86至0.88范围内为表征的至少一种化合物和所述以一相对保留时间在0.71至0.73范围内为表征的至少一种化合物的总浓度占所述物质组合物中除了BL-8040(SEQ ID NO:1)以外的所有化合物的至少50%。

26. 根据权利要求17至25中的任一项所述的物质组合物,其特征在於:所述物质组合物中的环状脱酰胺的BL-8040(SEQ ID NO:2)的浓度不超过所述以一相对保留时间在0.86至0.88范围内为表征的至少一种化合物的总浓度的50%。

27. 根据权利要求17至26中的任一项所述的物质组合物,其特征在於:所述物质组合物中的环状D-Lys(Ac)BL-8040(SEQ ID NO:3)的浓度不超过所述以一相对保留时间在0.86至0.88范围内为表征的至少一种化合物的总浓度的50%。

28. 根据权利要求17至27中的任一项所述的物质组合物,其特征在於:所述物质组合物中的环状脱酰胺的BL-8040(SEQ ID NO:2)和环状D-Lys(Ac)BL-8040(SEQ ID NO:3)的总浓度不超过所述以一相对保留时间在0.86至0.88范围内为表征的至少一种化合物的总浓度的80%。

29. 根据权利要求17至28中的任一项所述的物质组合物,其特征在於:所述反相柱的特征在於具有以下的至少一个:长度约为250毫米、内径约为4.6毫米、以及粒径约为5微米。

30. 一种物质组合物,其特征在於,包括:BL-8040(SEQ ID NO:1)和以一相对保留时间在0.71至0.73范围内为表征的至少一种化合物,根据在约226纳米的波长处的吸收所确定的,所述至少一种化合物占所述物质组合物中除了BL-8040(SEQ ID NO:1)以外的所有化合物的至少10%,

其中所述相对保留时间是使用以下条件而被确定的:一第一流动相,所述第一流动相是pH在约3.0至约3.3范围内的0.017M高氯酸盐的水溶液;一第二流动相,所述第二流动相是乙腈;一梯度,其中所述第二流动相的浓度在约50分钟内从约20%的初始浓度增加约10%;一C18反相柱;在约5至约20微升范围内的一注射体积;以及约每分钟1毫升的一流速,在约40°C的温度下,并且其中所述BL-8040(SEQ ID NO:1)的一相对保留时间被定义为1。

31. 根据权利要求30所述的物质组合物,其特征在於:所述至少一种化合物相对于所述BL-8040(SEQ ID NO:1)的总浓度比为至少约0.01%。

32. 根据权利要求30或31所述的物质组合物,其特征在於:所述至少一种化合物相对于所述BL-8040(SEQ ID NO:1)的总浓度比为不超过约0.5%。

33. 根据权利要求30至32中的任一项所述的物质组合物,其特征在於:所述至少一种化合物相对于所述BL-8040(SEQ ID NO:1)的总浓度比是在约0.03%至约0.15%的范围内。

34. 根据权利要求30至33中的任一项所述的物质组合物,其特征在於:所述物质组合物还包括以一相对保留时间在0.86至0.88范围内为表征的至少一种化合物。

35. 根据权利要求34所述的物质组合物,其特征在於:根据在约226纳米的波长处的吸收所确定的,所述以一相对保留时间在0.86至0.88范围内为表征的至少一种化合物占所述物质组合物中除了BL-8040(SEQ ID NO:1)以外的所有化合物的至少20%。

36. 根据权利要求34或35所述的物质组合物,其特征在於:所述以一相对保留时间在0.86至0.88范围内为表征的至少一种化合物包括具有与BL-8040(SEQ ID NO:1)相同分子量的一化合物和/或具有比BL-8040(SEQ ID NO:1)的分子量高约80Da的分子量的一化合

物。

37. 根据权利要求34至36中的任一项所述的物质组合物,其特征在于:所述以一相对保留时间在0.86至0.88范围内为表征的至少一种化合物相对于所述BL-8040 (SEQ ID NO:1)的总浓度比为至少约0.01%。

38. 根据权利要求37所述的物质组合物,其特征在于:所述以一相对保留时间在0.86至0.88范围内为表征的至少一种化合物相对于所述BL-8040 (SEQ ID NO:1)的所述总浓度比是在约0.075%至约0.225%的范围内。

39. 根据权利要求35至38中的任一项所述的物质组合物,其特征在于:根据在约226纳米的波长处的吸收所确定的,所述以一相对保留时间在0.86至0.88范围内为表征的至少一种化合物和所述以一相对保留时间在0.71至0.73范围内为表征的至少一种化合物的总浓度占所述物质组合物中除了BL-8040 (SEQ ID NO:1)以外的所有化合物的至少50%。

40. 根据权利要求30至39中的任一项所述的物质组合物,其特征在于:所述物质组合物中的环状脱酰胺的BL-8040 (SEQ ID NO:2)的浓度不超过所述以一相对保留时间在0.71至0.73范围内为表征的至少一种化合物的总浓度。

41. 根据权利要求30至40中的任一项所述的物质组合物,其特征在于:所述物质组合物中的环状D-Lys (Ac)BL-8040 (SEQ ID NO:3)的浓度不超过所述以一相对保留时间在0.71至0.73范围内为表征的至少一种化合物的总浓度。

42. 根据权利要求30至41中的任一项所述的物质组合物,其特征在于:所述物质组合物中的环状脱酰胺的BL-8040 (SEQ ID NO:2)和环状D-Lys (Ac)BL-8040 (SEQ ID NO:3)的总浓度不超过所述以一相对保留时间在0.71至0.73范围内为表征的至少一种化合物的总浓度的150%。

43. 根据权利要求30至42中的任一项所述的物质组合物,其特征在于:所述反相柱的特征在于具有以下至少一个:长度约为250毫米、内径约为4.6毫米、以及粒径约为5微米。

44. 根据权利要求1至43中的任一项所述的物质组合物,其特征在于:所述物质组合物可通过包括以下步骤的方法来获得:

(a) 通过固相多肽合成将多个氨基酸和4-氟苯甲酸顺序耦合到一树脂上,从而获得耦合至所述树脂的一线性肽;

(b) 从所述树脂上裂解所述线性肽,从而获得一游离的线性肽;

(c) 氧化所述线性肽的多个半胱氨酸残基以形成一分子内二硫键,从而在溶液中获得具有SEQ ID NO:1的环状肽;以及

(d) 分离具有SEQ ID NO:1的所述环状肽,或其药学上可接受的盐,其中:

(i) 所述耦合步骤是使用二异丙基碳二亚胺与氰基羟基亚胺基乙酸乙酯和/或N-羟基苯并三唑的组合来实现;

(ii) 所述裂解步骤是通过将耦合至所述树脂的所述线性肽与包含三氟乙酸和一清除剂的溶液接触来实现,所述清除剂是选自由二硫赤藓糖醇和二硫苏糖醇所组成的群组;

(iii) 所述方法还包括在所述裂解步骤之后沉淀所述游离的线性肽,而不在所述沉淀之前通过蒸发浓缩所述游离的线性肽;

(iv) 所述接触是通过将包含浓度为至少5毫克/毫升的所述线性肽的一水溶液与过氧化氢接触来实现;

(v) 所述分离步骤包括以每公斤所述柱不超过40克环状肽的浓度将所述环状肽加载到一反相色谱柱上,并从所述柱洗脱所述环状肽;

(vi) 所述分离步骤具有SEQ ID NO:1的所述环状肽包括冷冻干燥,并且所述方法还包括在所述冷冻干燥之后研磨所述环状肽;和/或

(vii) 所述树脂的取代度为每克至少0.3毫当量,和/或所述树脂是一Rink氨基甲基苯乙烯树脂。

45. 根据权利要求1至44中的任一项所述的物质组合物,其特征在于:相对于不含有以一相对保留时间在0.71至0.73范围内为表征的一化合物和以一相对保留时间在0.86至0.88范围内为表征的一化合物的一相应物质组合物,对体内中性粒细胞迁移至外周血具有增强的促进作用。

46. 根据权利要求1至45中的任一项所述的物质组合物,其特征在于:所述物质组合物具有以下至少两个:

(i) 对体内中性粒细胞迁移至外周血具有增强的促进作用;

(ii) 对乳腺癌细胞的体外CXCL12诱导的迁移具有增强的抑制作用;

(iii) 对T细胞衍生的白血病细胞的体外CXCL12诱导的迁移具有增强的抑制作用;

(iv) 对一动物模型中的转移性乳腺癌细胞迁移至肺部具有增强的抑制作用;

(v) 对一动物模型中的迟发型超敏反应具有增强的抑制作用;

(vi) 对一动物模型中的胶原诱导的关节炎具有增强的抑制作用;以及

(vii) 对体外细胞中CXCL12至CXCR4的结合具有增强的抑制作用,相对于不含有以一相对保留时间在0.71至0.73范围内为表征的一化合物和以一相对保留时间在0.86至0.88范围内为表征的一化合物的一相应物质组合物。

47. 一种药物组合物,其特征在于,包括:根据权利要求1至46中的任一项所述的物质组合物,以及一药学上可接受的载体。

48. 根据权利要求1至46中的任一项所述的物质组合物,或根据权利要求47所述的药物组合物,其特征在于:其用于治疗一病况,所述病况可通过BL-8040 (SEQ ID NO:1) 来治疗。

49. 根据权利要求1至46中的任一项所述的物质组合物,或根据权利要求47所述的药物组合物,其特征在于:其用于治疗抑制CXCR4是有利的一病况。

50. 根据权利要求1至46中的任一项所述的物质组合物,或根据权利要求47所述的药物组合物,其特征在于:其用于治疗一病况,所述病况是选自由视网膜母细胞瘤、神经外胚层源性肿瘤、大细胞肺癌、多发性骨髓瘤、小神经胶质细胞瘤、神经胶质瘤、乳腺癌、胰腺癌、血小板减少症、骨髓抑制风险和人类免疫缺陷病毒感染所组成的群组。

BL-8040的组合物

[0001] 相关申请

[0002] 本申请案主张2020年12月30日提交的美国临时专利申请第63/131,871号的优先权,其内容通过引用完整并入本文中。

[0003] 序列表声明

[0004] 2021年12月27日创建的名为90159SequenceListing.txt的ASCII文件包括2,115个字节,与本申请的提交同时提交,通过引用并入本文中。

[0005] 发明领域和背景技术

[0006] 在本发明的一些实施例中,本发明涉及医药产品,更具体地说,但不限于包含肽(例如BL-8040)的新型物质组合物,其可用于治疗诸如癌症和/或关节炎等病症,以及涉及其制备方法。

[0007] BL-8040是一种也称为4F-苯甲酰基-TN14003 (4F-benzoyl-TN14003) (4-氟-苯甲酰基-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DLys-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂ (4-fluorobenzoyl-Arg-Arg-Nal-Cys-Tyr-Cit-Lys-DLys-Pro-Tyr-Arg-Cit-Cys-Arg-NH₂), SEQ ID NO:1)的肽,并且在两个Cys残基之间形成二硫键时是环状的。

[0008] 美国专利号7,423,007描述了具有CXC4拮抗作用的肽;包括4F-苯甲酰基-TN14003 (4F-benzoyl-TN14003)。根据美国专利号7,423,007的教导,4F-苯甲酰基-TN14003是通过以下来制备的:通过使用DIPCDI-HOBt作为一偶联剂在DMF (以2.5当量添加氨基酸)中的固相合成,然后通过使用1MTMSBr-硫代苯甲醚/TFA (TMSBr-thioanisole/TFA) 与间甲酚(m-cresol)和乙二硫醇(ethanedithiol)的脱保护(deprotection)和裂解,以及通过空气氧化的环化作用。

[0009] 额外的背景技术包括美国专利号7,138,488和8,435,939,以及国际专利申请公开WO 2008/075369、WO 2008/075370、WO 2010/146578、WO 2012/095849和WO 2013/160895;以及美国临时专利申请号62/938,962。

发明内容

[0010] 根据本发明的一些实施例的一方面,提供了一种物质组合物,其包括:BL-8040 (SEQ ID NO:1) 和以一相对保留时间在0.86至0.88范围内为表征的至少一种化合物,其中所述相对保留时间是使用以下条件而被确定的:一第一流动相,所述第一流动相是pH在约2.9至约3.3范围内的0.017M高氯酸盐(perchlorate)的水溶液;一第二流动相,所述第二流动相是乙腈(acetonitrile);一梯度,其中所述第二流动相的浓度在约50分钟内从约20%的初始浓度增加约10%;一C18反相柱(C18 reverse phase column);在约5至约20微升(μ l)范围内的一注射体积;以及约每分钟1毫升(ml)的一流速,在约40°C的温度下,并且其中BL-8040 (SEQ ID NO:1) 的一相对保留时间被定义为1。

[0011] 根据本发明的一些实施例的一方面,提供了一种物质组合物,其包括:BL-8040 (SEQ ID NO:1) 和以一相对保留时间在0.86至0.88范围内为表征的至少一种化合物,其中根据在约226纳米(nm)的波长处的吸收所确定的,所述至少一种化合物相对于BL-8040 (SEQ

ID NO:1)的总浓度比是在0.075%至0.225%的范围内,其中所述相对保留时间是使用以下条件而被确定的:—第一流动相,所述第一流动相是pH在约2.9至约3.3范围内的0.017M高氯酸盐的水溶液;—第二流动相,所述第二流动相是乙腈;—梯度,其中所述第二流动相的浓度在约50分钟内从约20%的初始浓度增加约10%;—C18反相柱;在约5至约20微升范围内的一注射体积;以及约每分钟1毫升的一流速,在约40°C的温度下,并且其中BL-8040 (SEQ ID NO:1)的一相对保留时间被定义为1。

[0012] 根据本发明的一些实施例的一方面,提供了一种物质组合物,其包括:BL-8040 (SEQ ID NO:1)和以一相对保留时间在0.71至0.73范围内为表征的至少一种化合物,根据在约226纳米的波长处的吸收所确定的,所述至少一种化合物占所述物质组合物中除了BL-8040 (SEQ ID NO:1)以外的所有化合物的至少10%,其中所述相对保留时间是使用以下条件而被确定的:—第一流动相,所述第一流动相是pH在约2.9至约3.3范围内的0.017M高氯酸盐的水溶液;—第二流动相,所述第二流动相是乙腈;—梯度,其中所述第二流动相的浓度在约50分钟内从约20%的初始浓度增加约10%;—C18反相柱;在约5至约20微升范围内的一注射体积;以及约每分钟1毫升的一流速,在约40°C的温度下,并且其中BL-8040 (SEQ ID NO:1)的一相对保留时间被定义为1。

[0013] 根据本发明的一些实施例的一方面,提供了一种药物组合物,其包括:包含根据本文所述的各个实施例中的任一个的BL-8040 (SEQ ID NO:1)的所述物质组合物及其任何组合,以及一药学上可接受的载体。

[0014] 根据涉及以一相对保留时间在0.86至0.88范围内为表征的至少一种化合物的任何实施例中的一些,所述以一相对保留时间在0.86至0.88范围内为表征的至少一种化合物占所述物质组合物中除了BL-8040 (SEQ ID NO:1)以外的所有化合物的至少20%,如根据在约226纳米的波长处的吸收所确定的。

[0015] 根据涉及以一相对保留时间在0.86至0.88范围内为表征的至少一种化合物的任何实施例中的一些,所述以一相对保留时间在0.86至0.88范围内为表征的至少一种化合物占所述物质组合物中除了BL-8040 (SEQ ID NO:1)以外的所有化合物的至少50%,如根据在约226纳米(nm)的波长处的吸收所确定的。

[0016] 根据涉及以一相对保留时间在0.86至0.88范围内为表征的至少一种化合物的任何实施例中的一些,所述以一相对保留时间在0.86至0.88范围内为表征的至少一种化合物包括具有与BL-8040 (SEQ ID NO:1)相同分子量的一化合物和/或具有比BL-8040 (SEQ ID NO:1)的分子量高约80Da的分子量的一化合物。

[0017] 根据涉及以一相对保留时间在0.86至0.88范围内为表征的至少一种化合物的任何实施例中的一些,所述以一相对保留时间在0.86至0.88范围内为表征的至少一种化合物相对于BL-8040 (SEQ ID NO:1)的总浓度比为至少约0.01%、任选地至少约0.05%。

[0018] 根据涉及以一相对保留时间在0.86至0.88范围内为表征的至少一种化合物的任何实施例中的一些,所述以一相对保留时间在0.86至0.88范围内为表征的至少一种化合物相对于BL-8040 (SEQ ID NO:1)的总浓度比为不超过约1%。

[0019] 根据涉及以一相对保留时间在0.86至0.88范围内为表征的至少一种化合物的任何实施例中的一些,所述以一相对保留时间在0.86至0.88范围内为表征的至少一种化合物相对于BL-8040 (SEQ ID NO:1)的总浓度比是在约0.075%至约0.225%的范围内。

[0020] 根据涉及以一相对保留时间在0.86至0.88范围内为表征的至少一种化合物的任何实施例中的一些,所述以一相对保留时间在0.86至0.88范围内为表征的至少一种化合物相对于BL-8040 (SEQ ID NO:1)的总浓度比是在约0.1%至约0.2%的范围内。

[0021] 根据涉及以一相对保留时间在0.86至0.88范围内为表征的至少一种化合物的任何实施例中的一些,所述物质组合物中的环状脱酰胺的BL-8040 (SEQ ID NO:2)的浓度不超过所述以一相对保留时间在0.86至0.88范围内为表征的至少一种化合物的总浓度的50%。

[0022] 根据涉及以一相对保留时间在0.86至0.88范围内为表征的至少一种化合物的任何实施例中的一些,所述物质组合物中的环状D-Lys (Ac) BL-8040 (SEQ ID NO:3)的浓度不超过所述以一相对保留时间在0.86至0.88范围内为表征的至少一种化合物的总浓度的50%。

[0023] 根据涉及以一相对保留时间在0.86至0.88范围内为表征的至少一种化合物的任何实施例中的一些,所述物质组合物中的环状脱酰胺的BL-8040 (SEQ ID NO:2)和环状D-Lys (Ac) BL-8040 (SEQ ID NO:3)的总浓度不超过所述以一相对保留时间在0.86至0.88范围内为表征的至少一种化合物的总浓度的80%。

[0024] 根据涉及以一相对保留时间在0.86至0.88范围内为表征的至少一种化合物的本文所述的任何实施例中的一些,所述物质组合物还包括以一相对保留时间在0.71至0.73范围内为表征的至少一种化合物,根据本文所述的各个实施例中的任一个。

[0025] 根据涉及以一相对保留时间在0.71至0.73范围内为表征的至少一种化合物的本文所述的任何实施例中的一些,所述以一相对保留时间在0.71至0.73范围内为表征的至少一种化合物占所述物质组合物中除了BL-8040 (SEQ ID NO:1)以外的所有化合物的至少10%,如根据在约226纳米的波长处的吸收所确定的。

[0026] 根据涉及以一相对保留时间在0.71至0.73范围内为表征的至少一种化合物的本文所述的任何实施例中的一些,所述以一相对保留时间在0.71至0.73范围内为表征的至少一种化合物相对于BL-8040 (SEQ ID NO:1)的总浓度比为至少约0.01%。

[0027] 根据涉及以一相对保留时间在0.71至0.73范围内为表征的至少一种化合物的本文所述的任何实施例中的一些,所述以一相对保留时间在0.71至0.73范围内为表征的至少一种化合物相对于BL-8040 (SEQ ID NO:1)的总浓度比为不超过约0.5%。

[0028] 根据涉及以一相对保留时间在0.71至0.73范围内为表征的至少一种化合物的本文所述的任何实施例中的一些,所述以一相对保留时间在0.71至0.73范围内为表征的至少一种化合物相对于BL-8040 (SEQ ID NO:1)的总浓度比是在约0.03%至约0.15%的范围内。

[0029] 根据涉及以一相对保留时间在0.71至0.73范围内为表征的至少一种化合物的本文所述的任何实施例中的一些,所述物质组合物中的环状脱酰胺的BL-8040 (SEQ ID NO:2)的浓度不超过所述以一相对保留时间在0.71至0.73范围内为表征的至少一种化合物的总浓度。

[0030] 根据涉及以一相对保留时间在0.71至0.73范围内为表征的至少一种化合物的本文所述的任何实施例中的一些,所述物质组合物中的环状D-Lys (Ac) BL-8040 (SEQ ID NO:3)的浓度不超过所述以一相对保留时间在0.71至0.73范围内为表征的至少一种化合物的总浓度。

[0031] 根据涉及以一相对保留时间在0.71至0.73范围内为表征的至少一种化合物的本

文所述的任何实施例中的一些,所述物质组合物中的环状脱酰胺的BL-8040(SEQ ID NO:2)和环状D-Lys(Ac)BL-8040(SEQ ID NO:3)的总浓度不超过所述以一相对保留时间在0.71至0.73范围内为表征的至少一种化合物的总浓度的150%。

[0032] 根据涉及以一相对保留时间在0.71至0.73范围内为表征的至少一种化合物的本文所述的任何实施例中的一些,所述物质组合物还包括以一相对保留时间在0.86至0.88范围内为表征的至少一种化合物,根据本文所述的各个实施例中的任一个。

[0033] 根据本文所述的任何实施例中的一些,所述任何实施例是涉及以一相对保留时间在0.71至0.73范围内为表征的至少一种化合物和/或以一相对保留时间在0.86至0.88范围内为表征的至少一种化合物,以及其任何组合,所述以一相对保留时间在0.86至0.88范围内为表征的至少一种化合物和所述以一相对保留时间在0.71至0.73范围内为表征的至少一种化合物的总浓度占所述物质组合物中除了BL-8040(SEQ ID NO:1)以外的所有化合物的至少50%,如根据在约226纳米的波长处的吸收所确定的。

[0034] 根据任何实施例中的一些,所述反相柱的特征在于具有以下的至少一个:长度约为250毫米(mm)、内径约为4.6毫米、以及粒径约为5微米(μm)。

[0035] 根据任何实施例中的一些,所述物质组合物的特征在于具有以下的至少两个,以及任选地至少三个:

[0036] (i) 对体内(in vivo)中性粒细胞迁移至外周血(peripheral blood)具有增强的促进作用;

[0037] (ii) 对乳腺癌细胞的体外(in vitro)CXCL12诱导的迁移具有增强的抑制作用;

[0038] (iii) 对T细胞衍生的白血病细胞的体外CXCL12诱导的迁移具有增强的抑制作用;

[0039] (iv) 对一动物模型中的转移性乳腺癌细胞迁移至肺部具有增强的抑制作用;

[0040] (v) 对一动物模型中的迟发型超敏反应(delayed-type hypersensitivity)具有增强的抑制作用;

[0041] (vi) 对一动物模型中的胶原诱导的关节炎(collagen-induced arthritis)具有增强的抑制作用;以及

[0042] (vii) 对体外细胞中CXCL12至CXCR4的结合具有增强的抑制作用,相对于不含有所述以一相对保留时间在0.71至0.73范围内为表征的至少一化合物和所述以一相对保留时间在0.86至0.88范围内为表征的至少一化合物的一相应物质组合物。

[0043] 根据任何实施例中的一些,所述物质组合物的特征在于,相对于不含有所述以一相对保留时间在0.71至0.73范围内为表征的至少一化合物和所述以一相对保留时间在0.86至0.88范围内为表征的至少一化合物的一相应物质组合物,对体内(in vivo)中性粒细胞迁移至外周血具有增强的促进作用。

[0044] 根据本文所述的任何实施例中的一些,所述物质组合物可通过包括以下步骤的一方法来获得:

[0045] (a) 通过固相多肽合成(solid phase peptide synthesis)将多个氨基酸(amino acid)和4-氟苯甲酸(4-fluorobenzoic acid)顺序耦合到一树脂上,从而获得耦合至所述树脂的一线性肽;

[0046] (b) 从所述树脂上裂解所述线性肽,从而获得一游离的线性肽;

[0047] (c) 氧化所述线性肽的多个半胱氨酸残基以形成一分子内二硫键

(intramolecular disulfide bond),从而在溶液中获得具有SEQ ID NO:1的环状肽;以及

[0048] (d)分离具有SEQ ID NO:1的所述环状肽,或其药学上可接受的盐,其中:

[0049] (i)所述耦合步骤是使用二异丙基碳二亚胺(diisopropylcarbodiimide,DIC)与氰基羟基亚胺基乙酸乙酯(ethyl cyanohydroxyiminoacetate)和/或N-羟基苯并三唑(N-hydroxybenzotriazole)的组合来实现;

[0050] (ii)所述裂解步骤是通过将耦合至所述树脂的所述线性肽与包含三氟乙酸(trifluoroacetic acid,TFA)和一清除剂的溶液接触来实现,所述清除剂是选自由二硫赤藓糖醇(dithioerythritol,DTE)和二硫苏糖醇(dithiothreitol,DTT)所组成的群组;

[0051] (iii)所述方法还包括在所述裂解步骤之后沉淀所述游离的线性肽,而不在所述沉淀之前通过蒸发浓缩所述游离的线性肽;

[0052] (iv)所述接触是通过将包含浓度为至少5毫克/毫升的所述线性肽的一水溶液与过氧化氢接触来实现;

[0053] (v)所述分离步骤包括以每公斤所述柱不超过40克环状肽的浓度将所述环状肽加载到一反相色谱柱上,并从所述柱洗脱所述环状肽;

[0054] (vi)所述分离步骤具有SEQ ID NO:1的所述环状肽包括冷冻干燥,并且所述方法还包括在所述冷冻干燥之后研磨所述环状肽;和/或

[0055] (vii)所述树脂的取代度(degree of substitution)为每克至少0.3毫当量,和/或所述树脂是一Rink氨基甲基苯乙烯树脂(Rink aminomethylstyrene(AMS)resin)。

[0056] 根据涉及一物质组合物的本文所述的任何实施例中的一些,所述物质组合物是用于治疗一病况,所述病况可通过BL-8040(SEQ ID NO:1)来治疗。

[0057] 根据涉及一物质组合物的本文所述的任何实施例中的一些,所述物质组合物是用于治疗抑制CXCR4是有利的一病况。

[0058] 根据涉及一物质组合物的本文所述的任何实施例中的一些,所述物质组合物是用于治疗一病况,所述病况是选自由视网膜母细胞瘤(retinoblastoma)、神经外胚层源性肿瘤(neuroectodermal derived tumors)、大细胞肺癌(large cell lung cancer)、多发性骨髓瘤(multiple myeloma)、小神经胶质细胞瘤(microglioma)、神经胶质瘤(glioma)、乳腺癌(breast cancer)、胰腺癌(pancreatic cancer)、血小板减少症(thrombocytopenia)、骨髓抑制风险(risk of bone marrow suppression)和人类免疫缺陷病毒感染(HIV infection)所组成的群组。

[0059] 除非另外定义,否则本文所用的所有技术和/或科学术语具有与本发明所属领域普通技术人员通常理解的一样的含义。尽管在实施或试验本发明实施方案中可使用与本文所述相似或等同的方法及材料,但下面阐述例示性方法和/或材料。在有冲突的情况下,将以本专利说明书(包括定义)为准。另外,所述材料、方法和实施例仅为阐明性的,并非必定为限制性的。

具体实施方式

[0060] 在本发明的一些实施例中,本发明涉及医药产品,更具体地说,但不限于包含肽(例如BL-8040(SEQ ID NO:1))的新型物质组合物,其可用于治疗诸如癌症和/或关节炎等病症,以及涉及其制备方法。

[0061] 在详细解释本发明的至少一个实施例之前,应当理解,本发明的应用不一定限于以下描述中阐述的或由实施例举例说明的细节。本发明能够有其他实施例或能够以各种方式实践或实施。

[0062] 经过艰苦的实验,发明人揭露了包含具有有利生物活性的BL-8040(SEQ ID NO:1)肽的新颖物质组合物,其可以有利地在所述肽的大规模合成中进行制备,同时也适用于药物施用的制剂配方。

[0063] 根据本发明的一些实施例的一方面,提供了一种物质组合物,其包括:BL-8040(SEQ ID NO:1)和以一相对保留时间在0.86至0.88范围内为表征的至少一种化合物和/或以一相对保留时间在0.71至0.73范围内为表征的至少一种化合物,如根据本文所述的与相对保留时间有关的任何实施例所确定的。

[0064] 在本文中,术语“BL-8040”是指具有SEQ ID NO:1的环状肽。

[0065] 在此,“环状”肽是指包含通过二硫键连接的一对半胱氨酸残基的肽。例如,“具有SEQ ID NO:1的环状肽”是指其两个半胱氨酸残基通过二硫键连接的SEQ ID NO:1。

[0066] 根据本文所述的任何实施例中的一些,所述物质组合物包括以一相对保留时间在0.86至0.88范围内为表征的至少一种化合物,根据本文所述的任何相应实施例(例如,根据本文所描述的任何相应实施例的量)。在一些这样的实施例中,至少一种化合物的相对保留时间在0.865至0.88的范围内。在一些实施例中,相对保留时间在0.868至0.878的范围内。在一些实施例中,相对保留时间在0.870至0.876的范围内。

[0067] 根据本文所述的任何实施例中的一些,所述物质组合物包括以一相对保留时间在0.71至0.73范围内为表征的至少一种化合物,根据本文所述的任何相应实施例(例如根据本文所描述的任何相应实施例的量)。在一些这样的实施例中,所述至少一种化合物的相对保留时间在0.715至0.73的范围内。在一些实施例中,所述相对保留时间在0.718至0.728的范围内。在一些实施例中,所述相对保留时间在0.719至0.726的范围内。

[0068] 根据本文所述的任何实施例中的一些,所述物质组合物包括:以一相对保留时间在0.86至0.88范围内为表征的至少一种化合物,根据本文所述的任何相应实施例(例如,根据本文所描述的任何相应实施例的量);以及以一相对保留时间在0.71至0.73范围内为表征的至少一种化合物,根据本文所述的任何相应实施例(例如,根据本文所描述的任何相应实施例的量)。

[0069] 在本文中,无论何时指示从0.86到0.88或从0.71到0.73的范围,所述范围分别包括从0.860到0.880或从0.710到0.730的范围,以及任何中间值(其可以用作上限或下限)及其之间的子范围。

[0070] 本文中,术语“相对保留时间”是指在进行高效液相色谱(HPLC)时化合物(例如,本文所述物质组合物的组分)相对于参考化合物的保留时间(在相同条件下)的一保留时间,所述参考化合物在本文中为BL-8040(SEQ ID NO:1)。因此,BL-8040(SEQ ID NO:1)的相对保留时间根据定义等于1。

[0071] 此外,术语“相对保留时间”是根据化合物保留最大浓度的时间(例如模式)来确定的。因此,例如,定义为具有0.87的保留时间的化合物可以包括以0.84至0.90的保留时间离开色谱柱的单个分子(例如,呈钟形曲线分布)。然而,这种化合物的所有分子的保留时间将被认为是0.87,因此“在0.86到0.88的范围内”。

[0072] 相对保留时间优选使用C18反相柱,任选地是基于二氧化硅的C18柱(例如Hypersil Gold™C18柱)。在本文所描述的任何实施例中的一些实施例中,所述反相柱的特征在于以下特征中的至少一个、至少两个或全部:长度约为250毫米,内径约为4.6毫米,粒径约为5微米。

[0073] 根据本文所述的任何相应实施例的相对保留时间优选使用以下来确定:作为第一流动相的pH在约3.0至约3.3范围内的约0.017M高氯酸盐的水溶液;作为一第二流动相的乙腈;以及一梯度,其中所述第二流动相的浓度在约50分钟内从约20%的初始浓度增加约10%(例如,增加10.0%)(例如,从19.3%增加到29.3%或从20%增加到30%)。

[0074] 相对保留时间优选在约40℃的温度下、在约5至约20微升范围内的一注射体积和约每分钟1毫升的一流速被确定。化合物的检测可以任选地通过测定在约226纳米波长下的吸收来实现。在示例性实施例中,安捷伦™1200或安捷伦™1100HPLC系统(Agilent™1200or Agilent™1100HPLC system)被使用。

[0075] 以指示的相对保留时间为特征的物质组合物中的化合物(根据本文所述的任何相应实施例)可以任选地以BL-8040(SEQ ID NO:1)的浓度的至少约0.01%的浓度存在,如根据在约226纳米的波长处的吸收所确定的。

[0076] 在此,短语“根据吸收所确定的”是指化合物的相对浓度(例如,在计算本文所述的百分比时)是通过定量给定波长(例如,226纳米)下的吸收(例如,光密度)来确定的。因此,例如,两个组分(例如,代表物质组合物中的两种不同化合物)如果吸收到相同程度,则将被视为具有相同浓度的化合物,而不管它们是否包含相同浓度的化合物分子;并且在所指示的波长下根本不吸收的化合物将被认为具有零的浓度。

[0077] 在本文所描述的任何实施例中的一些实施例中,物质组合物的特征在于除BL-8040(SEQ ID NO:1)之外的相对低量的化合物和以一相对保留时间在0.71至0.73和/或0.86至0.88表征的至少一种化合物(根据本文所述的任何相应实施例),例如,使得以一相对保留时间在0.71至0.73和/或0.86至0.88表征的至少一种化合物代表除BL-8040(SEQ ID NO:1)以外的所有化合物的相对大比例(例如,根据在约226纳米的波长处的吸收所确定的,如本文所定义)。

[0078] 本文中,术语“除BL-8040以外的所有化合物”是指本文所述物质组合物中非BL-8040(SEQ ID NO:1)的化合物、其反离子(counter-ion)或溶剂(例如,缓冲水溶液)的总和。除了BL-8040(SEQ ID NO:1)之外的化合物可以包括例如化学组成和/或分子构型不同的化合物(例如,BL-8040(SEQ ID NO:1)的立体异构体)。应该理解的是,一些不是BL-8040(SEQ ID NO:1)的化合物可能无法在指示的波长下吸收,因此无法对根据吸收(如本文所定义)所确定的“BL-8040以外的所有化合物”做出实质性贡献。

[0079] 在本文所述的任何相应实施例中的一些实施例中,术语“除BL-8040以外的所有化合物”仅包括在本文所描述的条件所确定的具有至少0.1,任选为0.1至2的相对保留时间的化合物;也就是说,在这些实施例中,相对保留时间在指示范围之外的化合物被排除在“BL-8040以外的化合物”的定义之外(例如,为了便于测量)(根据本文所述的任何相应实施例),即使它们不是反离子或溶剂。在一些实施例中,术语“BL-8040以外的所有化合物”仅包括相对保留时间至少为0.5、任选为0.5-1.5的化合物。

[0080] 在本文所述的任何相应实施例中的一些实施例中,术语“BL-8040以外的所有化合

物”是指BL-8040 (SEQ ID NO:1) 之外的肽化合物的总和;也就是说,非肽的化合物(即,不包括通过酰胺键连接的至少两个氨基酸残基的化合物)在这些实施例中排除在“BL-8040以外的化合物”(根据本文所述的任何相应实施例)的定义之外,即使它们具有所指示的相对保留时间。

[0081] 在不受任何特定理论约束的情况下,相信本质上与BL-8040 (SEQ ID NO:1) 有些相似的肽可以有多种变体(例如,肽中的一个或多个氨基酸残基可以独立地被另一个残基取代、降解和/或取代,例如其立体异构体),其中一些可以提供有利的活性,而非肽化合物不太可能提供有利的活性,因此不太令人感兴趣。

[0082] 根据任何实施例中的一些,所述以一相对保留时间在0.86至0.88范围内为表征的至少一种化合物(根据本文描述的任何相应实施例)包括具有与BL-8040 (SEQ ID NO:1) 相同分子量的一化合物和/或具有比BL-8040 (SEQ ID NO:1) 的分子量高不超过100Da的分子量的一化合物,例如约80Da。如本文所举例说明的,化合物的分子量可根据本领域已知的技术通过质谱法测定,任选地使用液相色谱-质谱法。

[0083] 根据任何实施例中的一些,所述以一相对保留时间在0.86至0.88范围内为表征的至少一种化合物(根据本文描述的任何相应实施例)以一种或多种具有与BL-8040 (SEQ ID NO:1) 相同分子量的化合物和/或一种或更多种具有比BL-8040 (SEQ ID NO:1) 的分子量高约80Da的分子量的物质组成;也就是说,在这些实施例中,不具有上述分子量的化合物被排除在“以一相对保留时间在0.86至0.88范围内为表征的至少一种化合物”(根据本文所述的任何相应的实施例)的定义之外,即使它们具有指示的相对保持时间。在一些这样的实施例中,所述以一相对保留时间在0.86至0.88范围内为表征的至少一种化合物以一种或多种具有与BL-8040 (SEQ ID NO:1) 相同分子量的化合物组成。

[0084] 在本文所描述的任何实施例中的一些实施例中,所述以一相对保留时间在0.86至0.88范围内为表征的至少一种化合物(根据本文所述的任何实施例)相对于BL-8040 (SEQ ID NO:1) 的总浓度比为至少约0.01%。在一些这样的实施例中,总浓度比为至少约0.02%。在一些实施例中,总浓度比为至少约0.03%。在一些实施例中,总浓度比为至少约0.05%。在一些实施例中,总浓度比为至少约0.075%。在一些实施例中,总浓度比为至少约0.1%。在一些实施例中,总浓度比为至少约0.2%。在一些实施例中,总浓度比为至少约0.3%。在一些实施例中,总浓度比为至少约0.4%。在一些实施例中,总浓度比为至少约0.5%。

[0085] 在此的术语“总浓度比”是指(一种或多种)化合物(例如根据本文所述的任何相应实施例具有指示范围内的相对保留率的化合物)的总浓度与另一浓度(例如BL-8040 (SEQ ID NO:1) 的浓度)的比,其表示单位(或者当比率被定义为百分比时为100%);其中所述浓度是通过本文所定义的吸收来确定的。

[0086] 在本文所描述的任何实施例中的一些实施例中,所述以一相对保留时间在0.86至0.88范围内为表征的至少一种化合物(根据本文所述的任何实施例)相对于BL-8040 (SEQ ID NO:1) 的总浓度比为不超过约1%。在一些这样的实施例中,总浓度比在0.01%至1%的范围内。在一些实施例中,总浓度比在0.02%至1%的范围内。在一些实施例中,总浓度比在0.03%至1%的范围内。在一些实施例中,总浓度比在0.05%至1%的范围内。在一些实施例中,总浓度比在0.075%至1%的范围内。在一些实施例中,总浓度比在0.1%至1%的范围内。在一些实施例中,总浓度比在0.2%至1%的范围内。在一些实施例中,总浓度比在0.3%

至1%的范围内。在一些实施例中,总浓度比在0.4%至1%的范围内。在一些实施例中,总浓度比在0.5%至1%的范围内。

[0087] 在本文所描述的任何实施例中的一些实施例中,所述以一相对保留时间在0.86至0.88范围内为表征的至少一种化合物(根据本文所述的任何实施例)相对于BL-8040 (SEQ ID NO:1)的总浓度比为不超过约0.5%。在一些这样的实施例中,总浓度比在0.01%至0.5%的范围内。在一些实施例中,总浓度比在0.02%至0.5%的范围内。在一些实施例中,总浓度比在0.03%至0.5%的范围内。在一些实施例中,总浓度比在0.05%至0.5%的范围内。在一些实施例中,总浓度比在0.075%至0.5%的范围内。在一些实施例中,总浓度比在0.1%至0.5%的范围内。在一些实施例中,总浓度比在0.2%至0.5%的范围内。在一些实施例中,总浓度比在0.3%至0.5%的范围内。

[0088] 在本文所描述的任何实施例中的一些实施例中,所述以一相对保留时间在0.86至0.88范围内为表征的至少一种化合物(根据本文所述的任何实施例)相对于BL-8040 (SEQ ID NO:1)的总浓度比为不超过约0.3%。在一些这样的实施例中,总浓度比在0.01%至0.3%的范围内。在一些实施例中,总浓度比在0.02%至0.3%的范围内。在一些实施例中,总浓度比在0.03%至0.3%的范围内。在一些实施例中,总浓度比在0.05%至0.3%的范围内。在一些实施例中,总浓度比在0.075%至0.3%的范围内。在一些实施例中,总浓度比在0.1%至0.3%的范围内。在一些实施例中,总浓度比在0.2%至0.3%的范围内。

[0089] 在本文所描述的任何实施例中的一些实施例中,所述以一相对保留时间在0.86至0.88范围内为表征的至少一种化合物(根据本文所述的任何实施例)相对于BL-8040 (SEQ ID NO:1)的总浓度比为不超过约0.25%。在一些这样的实施例中,总浓度比在0.01%至0.25%的范围内。在一些实施例中,总浓度比在0.02%至0.25%的范围内。在一些实施例中,总浓度比在0.03%至0.25%的范围内。在一些实施例中,总浓度比在0.05%至0.25%的范围内。在一些实施例中,总浓度比在0.075%至0.25%的范围内。在一些实施例中,总浓度比在0.1%至0.25%的范围内。

[0090] 在本文所描述的任何实施例中的一些实施例中,所述以一相对保留时间在0.86至0.88范围内为表征的至少一种化合物(根据本文所述的任何实施例)相对于BL-8040 (SEQ ID NO:1)的总浓度比为不超过约0.2%。在一些这样的实施例中,总浓度比在0.01%至0.2%的范围内。在一些实施例中,总浓度比在0.02%至0.2%的范围内。在一些实施例中,总浓度比在0.03%至0.2%的范围内。在一些实施例中,总浓度比在0.05%至0.2%的范围内。在一些实施例中,总浓度比在0.075%至0.2%的范围内。

[0091] 在本文所描述的任何实施例中的一些实施例中,所述以一相对保留时间在0.86至0.88范围内为表征的至少一种化合物(根据本文所述的任何实施例)相对于BL-8040 (SEQ ID NO:1)的总浓度比是在约0.075%至约0.225%的范围内。在一些这样的实施例中,所述总浓度比在0.1%至0.2%的范围内。

[0092] 在本文所描述的任何实施例中的一些实施例中,所述以一相对保留时间在0.86至0.88范围内为表征的至少一种化合物(根据本文所述的任何实施例)占所述物质组合物中除了BL-8040 (SEQ ID NO:1)以外的所有化合物的至少20%,如根据在约226纳米的波长处的吸收所确定的(如本文所定义);也就是说,BL-8040 (SEQ ID NO:1)以外的所有化合物的至少20%(如本文所述所确定的)的特征在于所述指示范围内的相对保留时间(例如0.86至

0.88)。在一些这样的实施例中,所述以一相对保留时间在0.86至0.88范围内为表征的至少一种化合物代表物质组合中除BL-8040 (SEQ ID NO:1) 以外的所有化合物的至少30% (如本文所述所确定的)。在一些实施例中,所述以一相对保留时间在0.86至0.88范围内为表征的至少一种化合物代表物质组合中除BL-8040 (SEQ ID NO:1) 以外的所有化合物的至少40% (如本文所述所确定的)。在一些实施例中,所述以一相对保留时间在0.86至0.88范围内为表征的至少一种化合物代表物质组合中除BL-8040 (SEQ ID NO:1) 以外的所有化合物的至少50% (如本文所述所确定的)。在一些实施例中,所述以一相对保留时间在0.86至0.88范围内为表征的至少一种化合物代表物质组合中除BL-8040 (SEQ ID NO:1) 以外的所有化合物的至少60% (如本文所述所确定的)。在一些实施例中,所述以一相对保留时间在0.86至0.88范围内为表征的至少一种化合物代表物质组合中除BL-8040 (SEQ ID NO:1) 以外的所有化合物的至少70% (如本文所述所确定的)。在一些实施例中,所述以一相对保留时间在0.86至0.88范围内为表征的至少一种化合物代表物质组合中除BL-8040 (SEQ ID NO:1) 以外的所有化合物的至少80% (如本文所述所确定的)。在一些实施例中,所述以一相对保留时间在0.86至0.88范围内为表征的至少一种化合物代表物质组合中除BL-8040 (SEQ ID NO:1) 以外的所有化合物的至少90% (如本文所述所确定的)。

[0093] 在本文所描述的任何实施例中的一实施例中,所述以一相对保留时间在0.71至0.73范围内为表征的至少一种化合物(根据本文所述的任何实施例)相对于BL-8040 (SEQ ID NO:1) 的总浓度比(如本文所定义)为至少约0.01%。在一些这样的实施例中,总浓度比为至少约0.02%。在一些实施例中,总浓度比为至少约0.03%。在一些实施例中,总浓度比为至少约0.05%。在一些实施例中,总浓度比为至少约0.075%。在一些实施例中,总浓度比为至少约0.1%。在一些实施例中,总浓度比为至少约0.2%。在一些实施例中,总浓度比为至少约0.3%。在一些实施例中,总浓度比为至少约0.4%。

[0094] 在本文所描述的任何实施例中的一实施例中,所述以一相对保留时间在0.71至0.73范围内为表征的至少一种化合物(根据本文所述的任何实施例)相对于BL-8040 (SEQ ID NO:1) 的总浓度比为不超过约0.5%。在一些这样的实施例中,总浓度比在0.01%至0.5%的范围内。在一些实施例中,总浓度比在0.02%至0.5%的范围内。在一些实施例中,总浓度比在0.03%至0.5%的范围内。在一些实施例中,总浓度比在0.05%至0.5%的范围内。在一些实施例中,总浓度比在0.075%至0.5%的范围内。在一些实施例中,总浓度比在0.1%至0.5%的范围内。在一些实施例中,总浓度比在0.2%至0.5%的范围内。在一些实施例中,总浓度比在0.3%至0.5%的范围内。

[0095] 在本文所描述的任何实施例中的一实施例中,所述以一相对保留时间在0.71至0.73范围内为表征的至少一种化合物(根据本文所述的任何实施例)相对于BL-8040 (SEQ ID NO:1) 的总浓度比为不超过约0.3%。在一些这样的实施例中,总浓度比在0.01%至0.3%的范围内。在一些实施例中,总浓度比在0.02%至0.3%的范围内。在一些实施例中,总浓度比在0.03%至0.3%的范围内。在一些实施例中,总浓度比在0.05%至0.3%的范围内。在一些实施例中,总浓度比在0.075%至0.3%的范围内。在一些实施例中,总浓度比在0.1%至0.3%的范围内。在一些实施例中,总浓度比在0.2%至0.3%的范围内。

[0096] 在本文所描述的任何实施例中的一实施例中,所述以一相对保留时间在0.71至0.73范围内为表征的至少一种化合物(根据本文所述的任何实施例)相对于BL-8040 (SEQ

ID NO:1) 的总浓度比为不超过约0.15%。在一些这样的实施例中,总浓度比在0.01%至0.15%的范围内。在一些实施例中,总浓度比在0.02%至0.15%的范围内。在一些实施例中,总浓度比在0.03%至0.15%的范围内。在一些实施例中,总浓度比在0.05%至0.15%的范围内。在一些实施例中,总浓度比在0.075%至0.15%的范围内。在一些实施例中,总浓度比在0.1%至0.15%的范围内。

[0097] 在本文所描述的任何实施例中的一些实施例中,所述以一相对保留时间在0.71至0.73范围内为表征的至少一种化合物(根据本文所述的任何实施例)占所述物质组合中除了BL-8040 (SEQ ID NO:1) 以外的所有化合物的至少10%,如根据在约226纳米的波长处的吸收所确定的(如本文所定义)。在一些这样的实施例中,所述以一相对保留时间在0.71至0.73范围内为表征的至少一种化合物代表物质组合中除BL-8040 (SEQ ID NO:1) 以外的所有化合物的至少20%(如本文所述所确定的)。在一些实施例中,所述以一相对保留时间在0.71至0.73范围内为表征的至少一种化合物代表物质组合中除BL-8040 (SEQ ID NO:1) 以外的所有化合物的至少30%(如本文所述所确定的)。在一些实施例中,所述以一相对保留时间在0.71至0.73范围内为表征的至少一种化合物代表物质组合中除BL-8040 (SEQ ID NO:1) 以外的所有化合物的至少40%(如本文所述所确定的)。在一些实施例中,所述以一相对保留时间在0.71至0.73范围内为表征的至少一种化合物代表物质组合中除BL-8040 (SEQ ID NO:1) 以外的所有化合物的至少50%(如本文所述所确定的)。在一些实施例中,所述以一相对保留时间在0.71至0.73范围内为表征的至少一种化合物代表物质组合中除BL-8040 (SEQ ID NO:1) 以外的所有化合物的至少60%(如本文所述所确定的)。在一些实施例中,所述以一相对保留时间在0.71至0.73范围内为表征的至少一种化合物代表物质组合中除BL-8040 (SEQ ID NO:1) 以外的所有化合物的至少70%(如本文所述所确定的)。在一些实施例中,所述以一相对保留时间在0.71至0.73范围内为表征的至少一种化合物代表物质组合中除BL-8040 (SEQ ID NO:1) 以外的所有化合物的至少80%(如本文所述所确定的)。

[0098] 在本文所描述的任何实施例中的一些实施例中,所述以一相对保留时间在0.71至0.73范围内为表征的至少一种化合物(根据本文所述的任何实施例)与所述以一相对保留时间在0.86至0.88范围内为表征的至少一种化合物(根据本文所述的任何实施例)相对于BL-8040 (SEQ ID NO:1) 的总浓度占所述物质组合中除了BL-8040 (SEQ ID NO:1) 以外的所有化合物的至少50%,如根据在约226纳米的波长处的吸收所确定的(如本文所定义)。在一些这样的实施例中,总浓度代表物质组合中除BL-8040 (SEQ ID NO:1) 以外的所有化合物的至少60%(如本文所述所确定的)。在一些实施例中,总浓度代表物质组合中除BL-8040 (SEQ ID NO:1) 以外的所有化合物的至少70%(如本文所述所确定的)。在一些实施例中,总浓度代表物质组合中除BL-8040 (SEQ ID NO:1) 以外的所有化合物的至少80%(如本文所述所确定的)。在一些实施例中,总浓度代表物质组合中除BL-8040 (SEQ ID NO:1) 以外的所有化合物的至少90%(如本文所述所确定的)。在一些实施例中,总浓度代表物质组合中除BL-8040 (SEQ ID NO:1) 以外的所有化合物的至少95%(如本文所述所确定的)。在一些实施例中,总浓度代表物质组合中除BL-8040 (SEQ ID NO:1) 以外的所有化合物的至少98%(如本文所述所确定的)。在一些实施例中,总浓度代表物质组合中除BL-8040 (SEQ ID NO:1) 以外的所有化合物的至少99%(如本文所述所确定的)。

[0099] 在本文所描述的任何实施例中的一些实施例中,物质组合物的特征在于相对低量的脱酰胺BL-8040 (SEQ ID NO:2) (其中C末端是羧酸而不是酰胺) 和/或D-Lys (Ac) BL-8040 (SEQ ID NO:3) (其中D-Lys残基是乙酰化的)。

[0100] 在本文所描述的任何实施例中的一些实施例中,所述物质组合物中的环状脱酰胺的BL-8040 (SEQ ID NO:2) 的浓度不超过所述以一相对保留时间在0.86至0.88范围内为表征的至少一种化合物的总浓度的50%,根据本文所述的任何实施例。在一些这样的实施例中,所述环状脱酰胺BL-8040 (SEQ ID NO:2) 的浓度不超过上述以一相对保留时间在0.86至0.88范围内为表征的至少一种化合物的总浓度的30%。在一些这样的实施例中,所述环状脱酰胺BL-8040 (SEQ ID NO:2) 的浓度不超过上述以一相对保留时间在0.86至0.88范围内为表征的至少一种化合物的总浓度的20%。在一些这样的实施例中,所述环状脱酰胺BL-8040 (SEQ ID NO:2) 的浓度不超过上述以一相对保留时间在0.86至0.88范围内为表征的至少一种化合物的总浓度的10%。在一些这样的实施例中,所述环状脱酰胺BL-8040 (SEQ ID NO:2) 的浓度不超过上述以一相对保留时间在0.86至0.88范围内为表征的至少一种化合物的总浓度的5%。在一些这样的实施例中,所述环状脱酰胺BL-8040 (SEQ ID NO:2) 的浓度不超过上述以一相对保留时间在0.86至0.88范围内为表征的至少一种化合物的总浓度的3%。在一些这样的实施例中,所述环状脱酰胺BL-8040 (SEQ ID NO:2) 的浓度不超过上述以一相对保留时间在0.86至0.88范围内为表征的至少一种化合物的总浓度的2%。在一些这样的实施例中,所述环状脱酰胺BL-8040 (SEQ ID NO:2) 的浓度不超过上述以一相对保留时间在0.86至0.88范围内为表征的至少一种化合物的总浓度的1%。

[0101] 在本文所描述的任何实施例中的一些实施例中,所述物质组合物中的环状脱酰胺的BL-8040 (SEQ ID NO:2) 的浓度不超过所述以一相对保留时间在0.71至0.73范围内为表征的至少一种化合物的总浓度,根据本文描述的任何实施例。在一些这样的实施例中,所述环状脱酰胺BL-8040 (SEQ ID NO:2) 的浓度不超过上述以一相对保留时间在0.71至0.73范围内为表征的至少一种化合物的总浓度的60%。在一些这样的实施例中,所述环状脱酰胺BL-8040 (SEQ ID NO:2) 的浓度不超过上述以一相对保留时间在0.71至0.73范围内为表征的至少一种化合物的总浓度的40%。在一些这样的实施例中,所述环状脱酰胺BL-8040 (SEQ ID NO:2) 的浓度不超过上述以一相对保留时间在0.71至0.73范围内为表征的至少一种化合物的总浓度的20%。在一些这样的实施例中,所述环状脱酰胺BL-8040 (SEQ ID NO:2) 的浓度不超过上述以一相对保留时间在0.71至0.73范围内为表征的至少一种化合物的总浓度的10%。在一些这样的实施例中,所述环状脱酰胺BL-8040 (SEQ ID NO:2) 的浓度不超过上述以一相对保留时间在0.71至0.73范围内为表征的至少一种化合物的总浓度的5%。在一些这样的实施例中,所述环状脱酰胺BL-8040 (SEQ ID NO:2) 的浓度不超过上述以一相对保留时间在0.71至0.73范围内为表征的至少一种化合物的总浓度的2%。在一些这样的实施例中,所述环状脱酰胺BL-8040 (SEQ ID NO:2) 的浓度不超过上述以一相对保留时间在0.71至0.73范围内为表征的至少一种化合物的总浓度的1%。

[0102] 在本文所描述的任何实施例中的一些实施例中,所述物质组合物中的环状D-Lys (Ac) BL-8040 (SEQ ID NO:3) 的浓度不超过所述以一相对保留时间在0.86至0.88范围内为表征的至少一种化合物的总浓度的50%,根据本文所述的任何实施例。在一些这样的实施例中,环状D-Lys (Ac) BL-8040 (SEQ ID NO:3) 的浓度不超过上述以一相对保留时间在0.86

至0.88范围内为表征的至少一种化合物的总浓度的30%。在一些这样的实施例中,环状D-Lys(Ac)BL-8040(SEQ ID NO:3)的浓度不超过上述以一相对保留时间在0.86至0.88范围内为表征的至少一种化合物的总浓度的20%。在一些这样的实施例中,环状D-Lys(Ac)BL-8040(SEQ ID NO:3)的浓度不超过上述以一相对保留时间在0.86至0.88范围内为表征的至少一种化合物的总浓度的10%。在一些这样的实施例中,环状D-Lys(Ac)BL-8040(SEQ ID NO:3)的浓度不超过上述以一相对保留时间在0.86至0.88范围内为表征的至少一种化合物的总浓度的5%。在一些这样的实施例中,环状D-Lys(Ac)BL-8040(SEQ ID NO:3)的浓度不超过上述以一相对保留时间在0.86至0.88范围内为表征的至少一种化合物的总浓度的3%。在一些这样的实施例中,环状D-Lys(Ac)BL-8040(SEQ ID NO:3)的浓度不超过上述以一相对保留时间在0.86至0.88范围内为表征的至少一种化合物的总浓度的2%。在一些这样的实施例中,环状D-Lys(Ac)BL-8040(SEQ ID NO:3)的浓度不超过上述以一相对保留时间在0.86至0.88范围内为表征的至少一种化合物的总浓度的1%。

[0103] 在本文所描述的任何实施例中的一些实施例中,所述物质组合物中的环状D-Lys(Ac)BL-8040(SEQ ID NO:3)的浓度不超过所述以一相对保留时间在0.71至0.73范围内为表征的至少一种化合物的总浓度,根据本文所述的任何实施例。在一些这样的实施例中,环状D-Lys(Ac)BL-8040(SEQ ID NO:3)的浓度不超过上述以一相对保留时间在0.71至0.73范围内为表征的至少一种化合物的总浓度的60%。在一些这样的实施例中,环状D-Lys(Ac)BL-8040(SEQ ID NO:3)的浓度不超过上述以一相对保留时间在0.71至0.73范围内为表征的至少一种化合物的总浓度的40%。在一些这样的实施例中,环状D-Lys(Ac)BL-8040(SEQ ID NO:3)的浓度不超过上述以一相对保留时间在0.71至0.73范围内为表征的至少一种化合物的总浓度的20%。在一些这样的实施例中,环状D-Lys(Ac)BL-8040(SEQ ID NO:3)的浓度不超过上述以一相对保留时间在0.71至0.73范围内为表征的至少一种化合物的总浓度的10%。在一些这样的实施例中,环状D-Lys(Ac)BL-8040(SEQ ID NO:3)的浓度不超过上述以一相对保留时间在0.71至0.73范围内为表征的至少一种化合物的总浓度的5%。在一些这样的实施例中,环状D-Lys(Ac)BL-8040(SEQ ID NO:3)的浓度不超过上述以一相对保留时间在0.71至0.73范围内为表征的至少一种化合物的总浓度的2%。在一些这样的实施例中,环状D-Lys(Ac)BL-8040(SEQ ID NO:3)的浓度不超过上述以一相对保留时间在0.71至0.73范围内为表征的至少一种化合物的总浓度的1%。

[0104] 在本文所描述的任何实施例中的一些实施例中,所述物质组合物中的环状脱酰胺的BL-8040(SEQ ID NO:2)和环状D-Lys(Ac)BL-8040(SEQ ID NO:3)的总浓度不超过所述以一相对保留时间在0.86至0.88范围内为表征的至少一种化合物的总浓度的80%,根据本文所述的任何实施例。在一些这样的实施例中,环状脱酰胺的BL-8040(SEQ ID NO:2)和环状D-Lys(Ac)BL-8040(SEQ ID NO:3)的总浓度不超过上述以一相对保留时间在0.86至0.88范围内为表征的至少一种化合物的总浓度的60%。在一些这样的实施例中,环状脱酰胺的BL-8040(SEQ ID NO:2)和环状D-Lys(Ac)BL-8040(SEQ ID NO:3)的总浓度不超过上述以一相对保留时间在0.86至0.88范围内为表征的至少一种化合物的总浓度的50%。在一些这样的实施例中,环状脱酰胺的BL-8040(SEQ ID NO:2)和环状D-Lys(Ac)BL-8040(SEQ ID NO:3)的总浓度不超过上述以一相对保留时间在0.86至0.88范围内为表征的至少一种化合物的总浓度的40%。在一些这样的实施例中,环状脱酰胺的BL-8040(SEQ ID NO:2)和环状D-Lys

(Ac) BL-8040 (SEQ ID NO:3) 的总浓度不超过上述以一相对保留时间在0.86至0.88范围内为表征的至少一种化合物的总浓度的30%。在一些这样的实施例中,环状脱酰胺的BL-8040 (SEQ ID NO:2) 和环状D-Lys (Ac) BL-8040 (SEQ ID NO:3) 的总浓度不超过上述以一相对保留时间在0.86至0.88范围内为表征的至少一种化合物的总浓度的20%。在一些这样的实施例中,环状脱酰胺的BL-8040 (SEQ ID NO:2) 和环状D-Lys (Ac) BL-8040 (SEQ ID NO:3) 的总浓度不超过上述以一相对保留时间在0.86至0.88范围内为表征的至少一种化合物的总浓度的10%。在一些这样的实施例中,环状脱酰胺的BL-8040 (SEQ ID NO:2) 和环状D-Lys (Ac) BL-8040 (SEQ ID NO:3) 的总浓度不超过上述以一相对保留时间在0.86至0.88范围内为表征的至少一种化合物的总浓度的5%。在一些这样的实施例中,环状脱酰胺的BL-8040 (SEQ ID NO:2) 和环状D-Lys (Ac) BL-8040 (SEQ ID NO:3) 的总浓度不超过上述以一相对保留时间在0.86至0.88范围内为表征的至少一种化合物的总浓度的2%。

[0105] 在本文所描述的任何实施例中的一些实施例中,所述物质组合物中的环状脱酰胺的BL-8040 (SEQ ID NO:2) 和环状D-Lys (Ac) BL-8040 (SEQ ID NO:3) 的总浓度不超过所述以一相对保留时间在0.71至0.73范围内为表征的至少一种化合物的总浓度的150%,根据本文所述的任何实施例。在一些这样的实施例中,环状脱酰胺的BL-8040 (SEQ ID NO:2) 和环状D-Lys (Ac) BL-8040 (SEQ ID NO:3) 的总浓度不超过上述以一相对保留时间在0.71至0.73范围内为表征的至少一种化合物的总浓度的120%。在一些这样的实施例中,环状脱酰胺的BL-8040 (SEQ ID NO:2) 和环状D-Lys (Ac) BL-8040 (SEQ ID NO:3) 的总浓度不超过上述以一相对保留时间在0.71至0.73范围内为表征的至少一种化合物的总浓度。在一些这样的实施例中,环状脱酰胺的BL-8040 (SEQ ID NO:2) 和环状D-Lys (Ac) BL-8040 (SEQ ID NO:3) 的总浓度不超过上述以一相对保留时间在0.71至0.73范围内为表征的至少一种化合物的总浓度的80%。在一些这样的实施例中,环状脱酰胺的BL-8040 (SEQ ID NO:2) 和环状D-Lys (Ac) BL-8040 (SEQ ID NO:3) 的总浓度不超过上述以一相对保留时间在0.71至0.73范围内为表征的至少一种化合物的总浓度的60%。在一些这样的实施例中,环状脱酰胺的BL-8040 (SEQ ID NO:2) 和环状D-Lys (Ac) BL-8040 (SEQ ID NO:3) 的总浓度不超过上述以一相对保留时间在0.71至0.73范围内为表征的至少一种化合物的总浓度的40%。在一些这样的实施例中,环状脱酰胺的BL-8040 (SEQ ID NO:2) 和环状D-Lys (Ac) BL-8040 (SEQ ID NO:3) 的总浓度不超过上述以一相对保留时间在0.71至0.73范围内为表征的至少一种化合物的总浓度的20%。在一些这样的实施例中,环状脱酰胺的BL-8040 (SEQ ID NO:2) 和环状D-Lys (Ac) BL-8040 (SEQ ID NO:3) 的总浓度不超过上述以一相对保留时间在0.71至0.73范围内为表征的至少一种化合物的总浓度的10%。在一些这样的实施例中,环状脱酰胺的BL-8040 (SEQ ID NO:2) 和环状D-Lys (Ac) BL-8040 (SEQ ID NO:3) 的总浓度不超过上述以一相对保留时间在0.71至0.73范围内为表征的至少一种化合物的总浓度的5%。

[0106] 在不受任何特定理论约束的情况下,相信SEQ ID NO:2和/或SEQ ID NO:3的环状形式不一定比相应的非环状形式更有害,而是非环状形式通常会相当罕见(例如,在具有SEQ ID NO:1的肽主要为环状形式的条件下),因此为了方便可以任选地忽略。

[0107] 上述肽-环状脱酰胺BL-8040 (SEQ ID NO:2) 和/或环状D-Lys (Ac) BL-8040 (SEQ ID NO:3) -可任选地通过在本文所述条件下确定保留时间来定量,例如,使用肽的参考样品来精确鉴定相对保留时间(相对于BL-8040 (SEQ ID NO:1) 的保留时间,如本文所定义)。例如,

在本文所述的HPLC条件下,环状脱酰胺BL-8040(SEQ ID NO:2)的相对保留时间通常为约0.91,环状D-Lys(Ac)BL-8040(SEQ ID NO:3)的相对保持时间为约1.10。

[0108] 方法:

[0109] 如本文所举例说明的,本文所述的物质组合物可任选地使用固相合成来制备,其中肽(以受保护的形式)被形成成为附着于一树脂,然后从树脂上裂解(同时去除保护基团)。分子内二硫键形成环状肽,然后可以通过Cys残基的氧化而被形成。

[0110] 在本文所描述的任何实施例中的一些实施例中,所述方法是一大规模方法。

[0111] 本文中术语“大规模方法”是指制备至少100克(在所述方法的单次运行中)最终产品(BL-8040(SEQ ID NO:1))的方法。

[0112] 在本文描述的涉及大规模方法的任何实施例中,制备至少250克BL-8040(SEQ ID NO:1)肽,或至少500克环状肽,或至少1公斤环状肽,或至少3公斤环状肽,甚至至少可以制备10公斤的环肽。

[0113] 根据本发明的一些实施例,本文所述物质组合物可通过本文所述的方法获得。

[0114] 在本文所述的与方法有关的任何实施例中的一些实施例中,根据所述的任何相应实施例获得的物质组合物与除BL-8040(SEQ ID NO:1)之外的次要组分的特征集合相关联,例如,代表所述方法的“标志物(signature)”。

[0115] 除BL-8040(SEQ ID NO:1)以外的所有化合物的总和,如根据本文所述的任何相应实施例所定义,在本文中也可替换地称为“标志组合物(signatory composition)”,其表征了本文所述方法。

[0116] 在不受任何特定理论约束的情况下,相信标志组合物与本文所述的增强的生物活性相关(例如在与生物活性相关的部分中)。

[0117] 根据本发明的一些实施例,如本文所述的方法提供了标志物质组合物(如本文所描述的标志物),其包含BL-8040(SEQ ID NO:1)和除BL-8040(SEQ ID NO:1)以外的化合物的有利的标志组合物,如本文在任何相应实施例中所描述的。

[0118] 如本文所述,所述方法优选包括通过固相肽合成(根据本领域已知的一般程序)将氨基酸和4-氟-苯甲酸依序偶联至一树脂(例如Rink AMS树脂),以获得偶联至树脂的线性肽。依序偶联的顺序是Arg、Cys、Cit(瓜氨酸)、Arg、Tyr、Pro、DLys(D-赖氨酸)、Lys、Cit、Tyr、Cys、Nal(萘基丙氨酸)、Arg、Arg、4-氟-苯甲酸。

[0119] 所述方法还包括从树脂上裂解通过偶联形成的肽,从而获得非环状形式的具有SEQ ID NO:1的游离肽,并氧化其中的半胱氨酸残基以形成分子内二硫键,从而获得环状形式(在溶液中)。

[0120] 偶联包括在羧酸盐基团(例如,氨基酸或N-端羧酸的)和胺基基团(例如,第一步骤中的树脂的或后续步骤中的N-端的)之间形成酰胺键,并且优选使用本领域已知的适合于酰胺键形成的一种或多种偶联试剂来实现,例如,碳二亚胺(例如,1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺、二环己基碳二亚胺和/或二异丙基碳二亚胺(diisopropylcarbodiimide, DIC))、铵/脲(例如,HATU、HBTU、TBTU和/或HCTU)或磷盐(例如,PyBOP和/或PyAOP)和/或丙磷酸酐。

[0121] 所述一种或多种偶联剂可选地包括碳二亚胺(例如,二异丙基碳二亚胺(diisopropylcarbodiimide, DIC))和附加试剂(例如,与碳二亚胺的摩尔浓度约相同),例

如羟基三唑(例如,1-羟基苯并三唑(HOBt)或1-羟基-7-氮杂苯并三氮唑(HOAt)和/或氰基羟基亚氨基乙酸酯(例如,氰基羟基亚氨基乙酸乙酯)。

[0122] 可选地使用碳二亚胺和氰基羟基亚氨基乙酸酯进行偶联,例如,其中碳二亚胺和/或氰基羟基亚氨基乙酸酯以约两倍的摩尔过量(相对于所偶联的氨基酸或其它羧酸)使用。

[0123] 可选地使用碳二亚胺与氰基羟基亚氨基乙酸乙酯和/或N-羟基苯并三唑进行偶联,例如,其中所述碳二亚胺和/或氰基羟基亚氨基乙酸乙酯和/或N-羟基苯并三唑以约两倍的摩尔过量(相对于所偶联的氨基酸或其它羧酸)使用。

[0124] 可选地使用二异丙基碳二亚胺(DIC)与氰基羟基亚氨基乙酸乙酯和/或N-羟基苯并三唑进行进行偶联,例如,其中所述DIC和氰基羟基亚氨基乙酸乙酯和/或N-羟基苯并三唑以约两倍的摩尔过量(相对于所偶联的氨基酸或其它羧酸)使用。

[0125] 在每一个氨基酸偶联步骤中,氨基酸的N端由容易去除的基团保护,优选苄基甲氧基羰基(Fmoc),其可以任选地被弱碱如哌啶(例如20%至50%哌啶在DMF中)裂解。哌啶在DMF中的示例性浓度为约20%。

[0126] 例如,Fmoc基团可任选地通过在哌啶溶液中洗涤两次(根据本文所述的任何实施例)来去除,任选地一次5-10分钟,然后任选地一次25-30分钟;然后洗涤树脂(例如,在不含哌啶的DMF中)以除去碱(可以任选地通过测定pH来确定碱)。

[0127] 此外,某些氨基酸的侧链可以通过容易去除的基团(其不会被上述弱碱裂解)保护,例如叔丁氧基。因此,Tyr中的侧链羟基可以优选地被叔丁基(t-Bu)保护(以形成叔丁氧基),并且在(L或D)Lys中的侧链胺基(例如,在Lys、Trp和His中)可以被叔丁氧基羰基(Boc)(其包含叔丁氧基)保护;在这两种情况下,裂解(例如,在酸性环境中)可能会重新生成未受保护的羟基或胺基。类似地,Cys的侧链硫代羟基基团可以优选地用三苯甲基(Trt)保护,和/或Arg的侧链胍基团可以优选地用2,2,4,6,7-五甲基-2,3-二氢苯并咪唑-5-磺酰基(Pbf)保护;每一个都可以任选地在酸性环境中裂解。已知上述侧链保护基团与Fmoc的使用特别兼容。本领域技术人员将了解适用于氨基酸侧链中特定基团的额外保护基团,以及它们彼此之间以及与各种N-端保护基团的兼容性。

[0128] 氨基酸顺序偶联的树脂可选地是Rink氨基甲基苯乙烯(aminomethylstyrene, AMS)树脂(被Rink连接符取代的氨基甲基苯乙烯树脂)。Rink AMS树脂任选地被Fmoc基团保护,其可以在偶联之前被去除以暴露胺基团(第一个氨基酸偶联至其上)。

[0129] 氨基酸依次偶联的树脂(可选Rink AMS树脂)的取代度可选地为每克树脂至少0.3毫当量(例如,每克树脂0.3至0.11毫当量),任选地每克树脂至少0.6毫当量,任选地每克树脂0.6至1.1毫当量,并且任选地每克树脂0.6至0.9毫当量。

[0130] 在每个偶联步骤之前,任选地用溶剂例如二甲基甲酰胺(DMF)洗涤树脂(例如一次或两次),例如以促进树脂的溶胀。在一些示例性实施例中,在树脂去保护(例如,根据本文所述的任何相应实施例去除Fmoc基团)和第一氨基酸的偶联之前,将树脂洗涤20-30分钟,并且在每个随后的偶联步骤之前洗涤(例如两次)约2分钟。

[0131] 优选通过使肽(偶联至树脂的)与包含酸例如三氟乙酸(trifluoroacetic acid, TFA)的液体接触来实现肽(由依次耦合来形成)从树脂的裂解以及保护基团从氨基酸侧链的裂解。液体中TFA的浓度任选为至少约80重量%,或至少约90重量%,或至少约95重量%(例如,其中余量主要是水)。

[0132] 用于裂解的液体(例如,酸性液体)任选地还包含清除剂(例如,在裂解过程中可能形成的反应性阳离子物质的清除剂),例如硫醇(例如,乙二硫醇、二硫赤藓糖醇、二硫苏糖醇)、三烷基硅烷(例如,三异丙基硅烷)、苯酚(例如,间甲酚)和/或水。

[0133] 二硫苏糖醇(Dithiothreitol, DTT)和/或二硫赤藓醇(dithioerythritol, DTE)是合适的清除剂的实例,可选地其中液体是包含TFA(例如,以本文所述的浓度)和DTT和/或DTE的溶液,优选与水组合。在用于裂解的溶液中DTT和/或DTE的(总)浓度任选地为至少10毫克/毫升(mg/mL)(例如,从10至500毫克/毫升,或从10至200毫克/毫升,或10至100毫克/毫升,或者从10至50毫克/毫升),任选地至少25毫克/毫升(例如从25至500毫克/毫升,或从25至200毫克/毫升,或25至100毫克/毫升,或者从25至50毫克/毫升),任选地至少50毫克/毫升(例如,从50至500毫克/毫升,或从50至200毫克/毫升,或50至100毫克/毫升),和任选地约50毫克/毫升。

[0134] 当肽从树脂上裂解时,优选例如通过添加肽不溶的液体来沉淀游离的肽。任选地在沉淀之前通过蒸发溶液的一部分溶剂来浓缩游离的肽,从而减少溶液的体积(例如,约65%至约70%)。或者,在沉淀之前不进行游离的肽的浓缩。

[0135] 在本文所描述的任何实施例中的一些实施例中,进行游离的肽的沉淀,而在沉淀之前不浓缩游离的肽。

[0136] 肽的沉淀任选地通过添加二烷基醚例如叔丁基甲基醚(*tert*-butyl methyl ether, MTBE)来实现。

[0137] MTBE任选地与己烷混合。在一些实施例中,将MTBE和己烷的混合物(任选地冷却,例如,至约5°C至约15°C范围内的温度)以每克树脂至少40毫升混合物和任选地每克树脂约45毫升混合物的体积添加到肽中。示例性的MTBE和己烷的混合物由体积比为60:40(MTBE:己烷)的MTBE和己烷组成。

[0138] 沉淀的肽任选地通过例如冷冻干燥或真空干燥。在示例性实施例中,通过真空进行干燥。

[0139] 如本文所述,通过氧化得到的肽的半胱氨酸残基可以形成分子内二硫键(导致肽的环化)。可以任选地使用本领域中已知的任何合适的技术。

[0140] 这样的氧化可选地是通过使肽与过氧化氢接触来实现的,例如,通过逐渐(例如,逐滴)添加过氧化氢溶液(例如,水中约1.5重量%的过氧化氢)来实现。过氧化氢与一对Cys残基的摩尔比(例如,与肽的摩尔比,其中肽恰好包含两个Cys残基如SEQ ID NO:1)优选为至少1:1(即,每对Cys残留至少有一个过氧化氢分子),任选为至少2:1,任选为至少3:1,和任选为至少4:1。过氧化氢与一对Cys残基(例如与肽)的示例性摩尔比为约5:1。可替代地或附加地,可以任选地加入过氧化氢,直到不残留硫代羟基为止(例如,通过合适的测定法,例如埃尔曼试验测定)。

[0141] 氧化可选地是通过使包含浓度为至少5毫克/毫升(例如,5至20毫克/毫升,或5至15毫克/毫升,或5至10毫克/毫升,或约10毫克/毫升)的肽的水溶液与过氧化氢接触来实现的(例如,根据本文描述的各个实施例中的任一个)。任选地,肽浓度为至少10毫克/毫升(例如,10至20毫克/毫升,或10至15毫克/毫升)。所述水溶液可选地是弱碱性的,例如碳酸氢铵(NH_4HCO_3)的水溶液。碳酸氢铵的示例性浓度为约0.1M。

[0142] 所述方法优选进一步包括分离所述得到的BL-8040(SEQ ID NO:1)。由于分离程序

不是100%完美的,因此保留了一些额外的化合物(如本文所述)。可以任选地使用本领域中已知的任何合适的技术。

[0143] 肽的分离可选地包括色谱法,例如制备型高效液相色谱法(HPLC)的至少一个步骤(例如,任选地一个或两个步骤)。例如,使用C18柱。分离可选地包括将得到的肽(例如,在本文所描述的HPLC的至少一个步骤中)以每千克柱不超过40克肽(按柱的树脂重量计)的浓度加载在反相色谱柱(例如,C18柱)上;和/或可选地以每千克柱至少4克肽(例如,4至40克或4至30克或4至25克)(按柱的树脂重量计)的浓度,可选地以每千克柱至少10克肽(例如,10至40克或10至30克或10至25克)的浓度,以及可选地以每千克柱至少20克肽(例如,20至40克或20至30克或20至25克)的浓度。

[0144] 例如,使用缓冲溶液(例如,根据本文描述的任何相应实施例,与乙腈梯度组合)洗脱加载在柱上的肽(根据本文描述的任何相应实施例)。缓冲溶液的pH任选地在1.5至3、任选地2.0至2.5、任选地约2.25的范围内。可选地可以使用磷酸三乙铵(triethylammonium phosphate)缓冲液从柱中洗脱肽,例如,以至少约0.01M、或至少约0.03M、或至少约0.1M的浓度。在示例性实施例中,磷酸三乙铵(triethylammonium phosphate)的浓度约为0.1M。

[0145] 任选地用乙腈梯度进行HPLC柱的洗脱。梯度任选地包括以每分钟0.1%乙腈至每分钟2%乙腈范围内的速率(任选地随时间变化)增加乙腈浓度,例如每5-6分钟增加约1%和/或每分钟增加约1%。可替换地或附加地,梯度任选地包括将乙腈的浓度(例如,从0%)增加到10%至40%、或20%至30%、或至约25%的范围内的浓度。

[0146] 示例性梯度(例如,使用根据本文描述的任何相应实施例的磷酸三乙铵(triethylammonium phosphate)缓冲液)包含约8分钟内的0%乙腈,约5分钟内从0%至约5%的乙腈(例如,每分钟约1%的速率),和约120分钟内约5%至约25%乙腈(例如,每分钟约0.17%的速率)。

[0147] 可选地,将洗脱的肽第二次加载到柱上(根据本文描述的任何相应实施例)并例如使用缓冲溶液(例如与乙腈梯度组合,根据至本文描述的任何相应实施例)洗脱。乙酸缓冲液(例如,乙酸/乙酸铵)可以任选地用于从柱中洗脱肽(例如,为了获得乙酸盐形式的肽),例如,浓度为至少约5mM、或至少约20mM、或至少约35mM。在示例性实施例中,乙酸盐的浓度为约35mM。

[0148] 用于第二洗脱的示例性梯度(例如,使用根据本文描述的相应实施例中的任一个的乙酸缓冲液)包含0%乙腈持续8分钟,以及在110分钟内从0%至22%乙腈(每分钟0.2%的比率)。

[0149] 所述方法任选进一步包括对通过色谱法获得的产物进行冷冻干燥(例如,根据本文描述的任何相应实施例)。

[0150] 可选地,所述方法的特征在于以下特征中(i)-(vii)中的至少一个、或至少两个、或至少三个、或至少四个、或至少五个、或至少六个:

[0151] (i) 使用二异丙基碳二亚胺(diisopropylcarbodiimide, DIC)与氰基羟基亚氨基乙酸乙酯(ethyl cyanohydroxyiminoacetate)和/或N-羟基苯并三唑(N-hydroxybenzotriazole)的组合(例如根据本文所述的任何相应实施例)进行偶联;

[0152] (ii) 通过使与树脂偶联的线性肽与包含三氟乙酸(trifluoroacetic acid, TFA)和清除剂的溶液接触来实现肽从树脂的裂解,所述清除剂为二硫苏糖醇(dithiothreitol,

DTT) 和/或二硫赤藓糖醇(dithioerythritol, DTE) (例如, 根据本文描述的任何相应实施例);

[0153] (iii) 所述方法还包括在裂解后沉淀游离的线性肽, 而不在沉淀肽之前通过蒸发浓缩游离的线性肽(例如, 根据本文所述的任何相应实施例);

[0154] (iv) 所述氧化步骤包括使包含浓度至少5毫克/毫升的线性肽的水溶液与过氧化氢接触(例如, 根据本文所述的任何相应实施例);

[0155] (v) 分离所述肽包括将所述环肽以每千克柱不超过40克环肽的浓度装载在反相色谱柱上, 并从所述柱洗脱所述环肽(例如, 根据本文所述的任何相应实施例);

[0156] (vi) 分离所述环肽包括冷冻干燥, 并且所述方法进一步包括在冷冻干燥后研磨所述环肽(例如, 根据本文所述的各个实施例中的任一个); 和/或

[0157] (vii) 用于肽合成的树脂的取代度是至少0.3毫当量/克和/或树脂是Rink AMS树脂(例如, 根据本文描述的任何相应实施例)。

[0158] 生物活性:

[0159] 在任何相应实施例中的一些实施例中, 根据本文所述的任何相应实施例的含BL-8040(SEQ ID NO:1)的物质组合物与相应的含BL-8040(SEQ ID NO:1)的物质组合物(例如, 反离子和溶剂), 而不含相对保留率为0.71至0.73和/或0.86至0.88的化合物(根据本文所述的任何相应实施例)。

[0160] 在任何相应实施例中的一些实施例中, 物质组合物的生物活性的特征在于促进体内(in vivo)中性粒细胞迁移至外周血(这也可以被视为抑制迁移到骨髓), 例如在小鼠中。

[0161] 如本文所举例说明的, 根据本发明实施例的物质组合物(例如, 具有包含相对保留时间为约0.72和约0.87的化合物的标志组合物)与外周血中中性粒细胞增加的几乎两倍增强有关, 相对于包含相同量的BL-8040(SEQ ID NO:1)而不含上述额外化合物的物质的对照组合物。

[0162] 在任何相应实施例中的一些实施例中, 通过向小鼠皮下注射5mg/kg在200微升PBS中重构的BL-8040(SEQ ID NO:1)来测定体内中性粒细胞向外周血迁移的促进, 然后在注射后2小时使小鼠出血(例如, 通过用肝素心脏穿刺到管中), 并相对于对照(未治疗)小鼠量化外周血中成熟中性粒细胞的数量(例如, 流式细胞术)。

[0163] 在任何相应实施例中的一些实施例中, 物质组合物的生物活性的特征在于以下一种或多种:

[0164] (i) 促进体内(in vivo)中性粒细胞迁移至外周血(这也可以被认为是对迁移到骨髓的抑制), 例如在小鼠中;

[0165] (ii) 抑制乳腺癌细胞的体外(in vitro)CXCL12诱导的迁移;

[0166] (iii) 抑制T细胞衍生的白血病细胞的体外CXCL12诱导的迁移;

[0167] (iv) 抑制一动物(例如老鼠)模型中的转移性乳腺癌细胞迁移至肺部;

[0168] (v) 抑制一动物(例如老鼠)模型中的迟发型超敏反应;

[0169] (vi) 抑制一动物(例如老鼠)模型中的胶原诱导的关节炎; 以及

[0170] (vii) 抑制体外细胞(例如Jurkat细胞)中CXCL12至CXCR4的结合(例如, 增加CXCL12的IC50)。

[0171] 在一些相应实施例中, 物质组合物的生物活性的特征在于活性(i) - (vii)中的至

少两种。在一些实施例中,物质组合物的生物活性的特征在于(i)-(vii)中的至少三种活性。

[0172] 根据本文所述的任何相应实施例的增强的生物活性任选地特征在于相关定量参数(例如,参数相对于对照的倍数变化)的增加或减少至少10%,任选地至少20%,任选地最少30%,以及任选地至少50%(例如根据本文所述的程序测定)。例如,根据本文所述的任一相应实施例的对体内中性粒细胞迁移至外周血具有增强的促进作用任选地特征在于外周血中中性粒细胞水平增加至少10%、任选地至少20%、任选地最少30%和任选地至少50%(例如根据本文所述的方法所确定的)。

[0173] 活性(i)-(vii)可任选地使用如美国专利7,423,007中所述和/或如本文实施例部分中所述的程序来评估。

[0174] 在任何相应实施例中的一些实施例中,活性(ii)和(iii)(体外CXCL12诱导的迁移的抑制)通过评估细胞通过分离两个隔室的合适的微孔膜和/或插入物(例如Transwell®板)的迁移来确定。将含有BL-8040(SEQ ID NO:1)组合物的CXCL12(100nM用于乳腺癌细胞,30nM用于白血病细胞)和细胞生长培养基(可选600微升DMEM和0.1%牛血清白蛋白)添加到第一(例如上部)隔间,将测试的BL-8040(SEQ ID NO:1)成分、MDA-MB-231乳腺癌细胞或SUP-T1白血病细胞(例如,2x 10⁶细胞/毫升)和细胞生长培养基(可选100微升DMEM和0.1%牛血清白蛋白)添加到第二(例如,下部)隔间。在适合细胞生长和活动的条件下(例如37°C),通过流式细胞仪和/或固定和染色(例如,使用25%甲醇和0.5%结晶紫),定量培养(例如,对于乳腺癌细胞为15小时,对于白血病细胞为4小时)时通过膜和/或插入的细胞数量,并与不含BL-8040(SEQ ID NO:1)的对照样品进行比较。

[0175] 在任何相应实施例中的一些实施例中,通过将10⁶MDA-MB-231人乳腺癌细胞静脉植入小鼠(可选5周龄雌性CB-17SCID小鼠)的尾部来确定活性(iv)(抑制转移性乳腺癌细胞向肺部的迁移)。将包含生理盐水的BL-8040(SEQ ID NO:1)组合物在四周内逐渐施用给小鼠(任选地使用缓释渗透泵)以施用约18.2毫克/公斤/天),所述生理盐水被调节至BL-8040的浓度为80毫克/毫升。然后评估小鼠肺部的癌症细胞数量,可选择通过气管注射Evan's Blue溶液(例如0.2%,2毫升),然后将肺部浸泡在Bouin's液体中,进行染色和固定。

[0176] 在任何相应实施例中的一些实施例中,活性(v)(迟发型超敏反应的抑制)根据通过将绵羊红细胞注射到致敏小鼠的脚踝中而产生的炎症程度(由脚踝厚度的变化表示)来确定。为了使小鼠增敏,将悬浮在生理盐水溶液中的绵羊红细胞(每50微升2x 10⁷个细胞)皮下给药于小鼠(任选6周龄雄性BALB/c小鼠)的左后肢脚踝,5天后,将每50微升10⁸个细胞的绵羊红血细胞皮下给药至右后肢脚踝。在抗原诱导之前和之后约24小时,测定脚踝厚度。从致敏前一天开始,将包含PBS的BL-8040(SEQ ID NO:1)组合物逐渐给药至小鼠(任选使用缓释渗透泵),以给药约4、约8、约24和/或约120微克/天的BL-804(SEQ ID NO:1)。

[0177] 在任何相应实施例中的一些实施例中,活性(vi)(对胶原诱导的关节炎的抑制)通过在小鼠(任选6周龄雄性DBA/1JN小鼠)中通过皮内注射(例如,注射到尾部底部)包含1毫克/毫升牛II型胶原、0.025M乙酸和50%(按体积计)弗氏完全佐剂的乳液产生胶原诱导的炎性关节炎来测定,随后在注射后21天进行类似的免疫接种。在第二次免疫后的两周内,任选地测量体重和/或后肢厚度,并任选地进行关节炎评分。关节炎可选择在每条肢体的0-3

分处进行评分,并以相同的总分进行评估(12分为满分;0=正常;1=单个手指的轻度肿胀或肿胀;2=多个手指的中度肿胀或肿胀,3=严重肿胀)。II型胶原特异性IgG2a抗体任选地使用任何合适的技术进行定量(在两周期结束时),任选地通过本文实施例部分中描述的程序进行定量。对胶原诱导的关节炎的抑制可任选地表现为对体重减轻的抑制、关节炎评分的降低和/或II型胶原特异性抗体的降低。

[0178] 在任何相应实施例中的一些实施例中,活性(vii)(抑制细胞中CXCL12与CXCR4的结合)任选地在Jurkat人T细胞白血病细胞中使用放射性标记的CXCL12来测定(例如增加CXCL12的IC₅₀)。将200pM的¹²⁵I-CXCL12与悬浮在pH约为7的缓冲液(例如,Dulbecco的PBS溶液,pH 7.0,含有0.5%牛血清白蛋白和20mM HEPES)中的Jurkat细胞(任选地以6×10⁶个细胞/毫升)和用缓冲液稀释的测试的BL-8040(SEQ ID NO:1)物质组合物一起孵育,以1:2:1的体积比(例如,缓冲液中的25μl放射性标记的¹²⁵I-CXCL12、50微升Jurkat细胞溶液和25微升BL-8040(SEQ ID NO:1)组合物)。样品在室温下进行固定反应1小时,然后测定每个样品的放射性。

[0179] 配方和用途:

[0180] 根据本文所述的任何相应实施例的包含BL-8040(SEQ ID NO:1)的物质组合物(以及除BL-8040(SEQ ID NO:1)之外的化合物)可以任选地用于治疗可由BL-8040(SEQ ID NO:1)治疗的病况。

[0181] 根据本发明的一些实施例的一方面,提供了一种根据本文所述的任何相应实施例的物质组合物于制造用于治疗一可由BL-8040(SEQ ID NO:1)治疗的病况的一药物的用途。

[0182] 根据本发明的一些实施例的一方面,提供了一种治疗一可由BL-8040(SEQ ID NO:1)治疗的病况的方法,所述方法包括向有需要的一受试者施用根据本文描述的任何相应实施例的一物质组合物。

[0183] 在本文描述的与治疗有关的任何实施例中的一些,所述治疗可以为抑制CXCR4是有利的任何治疗。

[0184] 预计在本申请到期的专利有效期内,将开发出许多相关的治疗方法,本文所用术语“病症”、“可由BL-8040治疗的”和“抑制CXCR4的治疗是有利的”的范围旨在先验地包括所有这些新技术。

[0185] 在本文所描述的任何实施例中的一些实施例中,可由BL-8040(SEQ ID NO:1)治疗的病症是癌症或关节炎(例如,慢性类风湿性关节炎),如美国专利号US 7,423,007所述(其内容通过引用并入本文中,特别是关于可由所述肽治疗的病症的内容)。

[0186] 可通过BL-8040(SEQ ID NO:1)治疗(根据本文所述的任何方面)的病症的实例包括但不限于视网膜母细胞瘤和/或神经外胚层衍生的肿瘤,例如,专利合作条约申请公开W0 2012/095849中所述(其内容通过引用并入本文,特别是关于可由所述肽治疗的病症的内容);大细胞肺癌,例如,专利合作条约申请公开W0 2013/160895中所述(其内容通过引用并入本文中,特别是关于可由所述肽治疗的病症的内容);多发性骨髓瘤、微胶质瘤和/或神经胶质瘤,例如,专利合作条约申请公开W0 2008/075370中所述(其内容通过引用并入本文,特别是关于可由所述肽治疗的病症的内容);乳腺癌和/或胰腺癌,例如,美国专利号US 7,423,007所述;血小板减少症,例如,专利合作条约申请公开W0 2010/146578中所述(其内容通过引用并入本文,特别是关于可由所述肽治疗的病症的内容);骨髓抑制的风险,例如,

专利合作条约申请公开WO 2008/075369中所述(其内容通过引用并入本文,特别是关于可由所述肽治疗的病症的内容);以及HIV感染,例如,美国专利US 8,435,939中所述(其内容通过引用并入本文,特别是关于可由所述肽治疗的病症的内容)。

[0187] BL-8040 (SEQ ID NO:1) 的合适的类似物和衍生物描述于美国专利US 7,423,007 和US 8,435,939以及专利合作条约申请公开WO 2008/075369、WO 2008/075370、WO 2010/146578、WO 2012/095849和WO 2013/160895(其各自的内容通过引用并入本文,特别是关于SEQ ID NO:1的类似物和衍生物的内容)

[0188] 根据本文所述的任何实施例的包括BL-8040 (SEQ ID NO:1) 和除了BL-8040 (SEQ ID NO:1) 以外的化合物的一物质组合物可被施用于一生物体本身(organism per se),或在一药物组合物中,其中其与合适的载体或赋形剂混合。

[0189] 如本文所用,“药物组合物”是指一种或多种本文所述的活性成分与其它化学组分(例如生理学上合适的载体和赋形剂)的制剂。药物组合物的目的是便于向生物体施用化合物。

[0190] 本文中,术语“活性成分”是指BL-8040 (SEQ ID NO:1),并且可以进一步包括任选地与BL-8040 (SEQ ID NO:1)配制的任何额外的治疗活性剂。

[0191] 下文中,词语“生理学上可接受的载体”和“药学上可接受的载体”可互换使用,它们是指不会对生物体造成显著刺激且不会消除所施用化合物的生物活性和性质的载体或稀释剂。佐剂包括在这些词语中。

[0192] 本文中,术语“赋形剂”是指添加到药物组合物中以进一步便于施用活性成分的惰性物质。赋形剂的实例包括但不限于碳酸钙、磷酸钙、各种糖类和淀粉类型、纤维素衍生物、明胶、植物油和聚乙二醇。

[0193] 可在“Remington's Pharmaceutical Sciences”,Mack Publishing Co.,Easton,PA的最新版中找到用于药物的配制和给药的技术,其通过引用并入本发明。

[0194] 合适的施用途径可以例如包括口服、直肠、经粘膜,特别是经鼻,肠内或肠胃外递送,包括肌内、皮下和髓内注射以及鞘内,直接心室内,心内,例如进入右或左心室腔、进入普通冠状动脉、静脉内、腹膜内、鼻内或眼内注射。

[0195] 或者,可以以局部方式而不是全身方式施用药物组合物,例如通过将药物组合物直接注射到患者的组织区域中。

[0196] 本发明的一些实施例的药物组合物可以通过本领域公知的方法进行制备,例如通过常规的混合、溶解、制粒、制糖衣丸、研磨、乳化、包封、包埋或冻干方法。

[0197] 因此,根据本发明的一些实施例的所使用的药物组合物可以利用一种或多种生理学上可接受的载体(其包括赋形剂和助剂)以常规方式进行配制,其中载体有助于将活性成分加工成可药用的制剂。适当的制剂取决于所选的施用途径。

[0198] 对于注射,药物组合物的活性成分可以配制于水溶液中,优选生理上相容的缓冲液中,例如Hank's溶液、Ringer's溶液或生理盐缓冲液。对于经粘膜施用,适合于渗透屏障的渗透剂被用于制剂中。这种渗透剂通常是本领域中已知的。

[0199] 对于口服施用,可以容易地通过将活性成分与本领域公知的药学上可接受的载体组合在一起配制药物组合物。这类载体使得药物组合物能够被配制成片剂、丸剂、糖衣丸、胶囊、液体、凝胶、糖浆剂、浆液、悬浮液等,用于患者口服摄取。用于口服使用的药理学

制剂可以利用固体赋形剂来制备,任选地在添加合适的助剂(如果需要的话)之后研磨所得混合物,加工混合物颗粒,以获得片剂或糖衣丸芯。合适的赋形剂特别是填充剂,例如糖类,包括乳糖、蔗糖、甘露糖醇或山梨糖醇;纤维素制剂,例如玉米淀粉、小麦淀粉、大米淀粉、马铃薯淀粉、明胶、黄蓍胶(gumtragacanth)、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羧甲基纤维素钠;和/或生理学上可接受的聚合物,例如聚乙烯吡咯烷酮(PVP)。如果需要,可以加入崩解剂,例如交联聚乙烯吡咯烷酮、琼脂或海藻酸或其盐,例如海藻酸钠。

[0200] 糖衣丸芯具有合适的包衣。为此目的,可以使用浓缩的糖溶液,其可以任选地含有阿拉伯树胶、滑石、聚乙烯吡咯烷酮、卡波姆凝胶、聚乙二醇、二氧化钛、漆溶液(lacquersolutions)和合适的有机溶剂或溶剂混合物。可将染料或颜料添加到片剂或糖衣丸包衣中,以用于鉴别或表征活性化合物药物的不同组合。

[0201] 可口服使用的药物组合物包括由明胶制成的推入配合式(push-fit)胶囊,以及由明胶和增塑剂(例如甘油或山梨糖醇)制成的密封软胶囊。推入配合式胶囊可含有活性成分和填充剂(例如乳糖)、粘合剂(例如淀粉)、润滑剂(例如滑石或硬脂酸镁)和任选的稳定剂的混合物。在软胶囊中,活性成分可以溶解或悬浮在合适的液体中,例如脂肪油、液体石蜡或液体聚乙二醇。此外,可以加入稳定剂。用于口服施用的所有制剂应为适于所选施用途径的剂量。

[0202] 对于含服(buccal administration)施用,组合物可以采取以常规方式配制的片剂或锭剂的形式。

[0203] 对于经鼻吸入施用,根据本发明的一些实施例所使用的包含活性成分的组合物方便地以气溶胶喷雾形式从加压包装或喷雾器中,使用合适的推进剂例如二氯二氟甲烷、三氯氟甲烷、二氯四氟乙烷或二氧化碳进行递送。在加压气溶胶的情况下,可以通过提供一阀门来递送经计量的数量来确定剂量单位。分配器中使用的例如明胶的胶囊和药盒(cartridges)可以被配制含有化合物和合适的粉末基质如乳糖或淀粉的粉末混合物。

[0204] 本文所述的药物组合物可以配制成用于肠胃外施用,例如通过弹丸式注射(bolus injection)或连续输注。用于注射的制剂可以以单位剂型存在于例如在安瓿中或在多剂量容器中,任选地添加有防腐剂。组合物可以是在油性或水性媒介物中的悬浮液、溶液或乳液,并且可以含有配制剂,例如助悬剂、稳定剂和/或分散剂。

[0205] 用于肠胃外施用的药物组合物包括水溶性形式的活性制剂的水溶液。另外,活性成分的悬浮液可以制备成适当的油基或水基注射悬浮液。合适的亲脂性溶剂或媒介物包括脂肪油如芝麻油,或合成的脂肪酸酯如油酸乙酯、甘油三酯或脂质体。水性注射悬浮液可含有增加悬浮液粘度的物质,例如羧甲基纤维素钠、山梨糖醇或葡聚糖(dextran)。任选地,悬浮液还可以含有合适的稳定剂或增大活性成分溶解度的试剂,以允许制备高浓度的溶液。

[0206] 或者,活性成分可以是粉末形式,用于在使用前与合适的媒介物例如无菌、无热原的水基溶液混合。

[0207] 本发明的一些实施例的药物组合物还可以使用例如常规栓剂基质如可可脂(cocoa butter)或其它甘油酯配制成直肠组合物,如栓剂或保留灌肠剂(retentionenemas)。

[0208] 本发明的一些实施例的上下文中,适于使用的药物组合物包括其中活性成分的含量能有效地实现预期目的的组合物。更具体地,BL-8040(SEQ ID NO:1)肽的治疗有效量是

指有效预防、减轻或改善病症(例如,如本文所讨论的癌症或关节炎)的症状或延长所治疗的受试者的生存期的肽的量。

[0209] 治疗有效量的确定完全在本领域技术人员的能力范围内,特别是根据本文提供的详细公开内容进行确定。确切的制剂、施用途径和剂量可以由各位医师根据患者的状况来选择。(参见,例如Fingl等人1975年,在“ThePharmacological Basis of Therapeutics”, Ch.1p.1)。

[0210] 取决于待治疗的病症的严重性和响应性,给药可以是单次或多次施用,治疗过程持续数天至数周。或直到治愈或达到疾病状态的减轻。

[0211] 当然,待施用的组合物的量将取决于所治疗的受试者、病痛的严重程度、施用方式、处方医师的判断等。

[0212] 如果需要,本发明一些实施例的组合物可以存在于包装或分配器装置中,例如FDA批准的试剂盒,其可以含有一种或多种含有活性成分的单位剂型。该包装可以例如包含金属或塑料箔,例如泡罩包装。包装或分配器装置可以附有施用说明书。该包装或分配器还可以以监管药物的制造、使用或销售的政府机构规定的形式顺应与容器相关的通知,其中该通知反映了该机构对组合物或人或兽医施用的形式的批准。这种通知例如可以是美国食品和药物管理局批准的处方药物的标签或批准的产品插页。还可以制备包含配制在相容的药物载体中的本发明制剂的组合物,将其置于适当的容器中,并标记用于治疗指定的病症,如本文进一步详述的。

[0213] 其他定义:

[0214] 如本文所用,术语“约”是指 $\pm 10\%$ 。在本文所述的任何相应实施例中的一些实施例中,术语“约”是指 $\pm 5\%$ 。

[0215] 术语“包括(comprises)”、“包括(comprising)”、“包括(includes)”、“包括(including)”、“具有”和它们的连接词是指“包括但不限于”。

[0216] 术语“由……组成”是指“包括且限于”。

[0217] 术语“基本上由……组成”是指组合物、方法或结构可以包括另外的成分、步骤和/或部分,但仅在所述另外的成分、步骤和/或部分不会实质上改变所要求保护的组合物、方法或结构的基本特性和新颖特性时才满足。

[0218] 如本文所用,单数形式“一个/一种(a)”、“一个/一种(a)”和“该(所述)”包括复数引用,除非上下文另有明确规定。例如,术语“一种化合物”或“至少一种化合物”可以包括多种化合物,包括它们的混合物。

[0219] 在该整篇申请中,本发明的各种实施例可以以范围格式呈现。应当理解,范围格式的描述仅仅是为了方便和简洁,不应当被解释为对本发明范围的不可改变的限制。因此,范围的描述应被认为已经具体公开了所有可能的子范围以及该范围内的各个数值。例如,诸如1至6的范围的描述应被认为已经具体公开了子范围,如1至3、1至4、1至5、2至4、2至6、3至6等,以及该范围内的各个数字,例如1、2、3、4、5和6。不管范围的宽度如何,这都是适用的。

[0220] 每当在本文中指示数值范围时,其意指包括在所指示的范围内的任何所引用的数字(分数或整数)。词语“在第一指示数字和第二指示数字之间的间距/范围”和“从第一指示数字到第二指示数字的间距/范围”在本文中可互换使用,并且意指包括所述第一和第二指示数字以及它们之间的所有分数和整数。

[0221] 术语“治疗”是指抑制,防止或阻止病理状态(疾病,障碍或病症)的发展和/或导致病理状态的减少,缓解或消退。本领域技术人员将理解,可以使用各种方法和检测以评估病理状态的发展,类似地,各种方法和检测可用于评估病理状态的减少,缓解或消退。

[0222] 如本文中所用,术语“预防”指阻止疾病、病症或病状在可能有疾病风险,但尚未诊断为患病的受试者中发生。

[0223] 如本文中所用,术语“受试者”包括患有该病的任何年龄的哺乳动物,优选人类。优选地,该术语包括有患上该病的风险的个体。

[0224] 如本文所用,术语“方法”是指用于实现给定任务的方式、手段、技术和程序,包括但不限于在化学、药理学、生物学、生物化学和医学领域的技术人员已知的或易于从已知方式、手段、技术和程序开发的那些方式、手段、技术和程序。

[0225] 当提及特定的序列时,这种提及应理解为还包括基本上对应于其互补序列的序列,包括由例如测序错误、克隆错误或导致碱基替换的其他改变引起的微小序列变异、碱基缺失或碱基添加,前提是此类变异的频率小于50个核苷酸中的1个,或者,小于100个核苷酸中的1个,或者,小于200个核苷酸中的1个,或者,小于500个核苷酸中的1个,或者,小于1000个核苷酸中的1个,或者,小于5,000个核苷酸中的1个,或者,小于10,000个核苷酸中的1个。

[0226] 应当理解,为清楚起见,在不同的实施例的上下文中描述的本发明的某些特征也可以在单个实施例中以组合的形式提供。相反,为简洁起见,在单个实施例的上下文中描述的本发明的各种特征也可以单独地或以任何合适的子组合来提供,或者在本发明的任何其它描述的实施例中适当地提供。在各种实施例的上下文中描述的某些特征不应被认为是那些实施例的必要特征,除非该实施例在没有那些元件的情况下无法操作。

[0227] 如上文所述和如所附权利要求部分所述的本发明的各种实施例和方面在以下实施例中找到实验支持。

[0228] 实施例

[0229] 现在参考以下实施例,结合以上描述,以非限制性方式例示本发明的一些实施例。

[0230] 实施例1

[0231] 根据一些实施例的BL-8040的大规模相合成:

[0232] 环状肽BL-8040 (SEQ ID NO:1)是通过大规模(825mmo1)固相合成制备的,其中固相合成反应步骤重复14次以构建整个肽,从C-端氨基酸开始,到N-端氨基酸结束。每个氨基酸的添加分两步进行:第一步包括从添加到肽序列的最后一个氨基酸的N-端(或当添加第一个氨基酸时从树脂)去除Fmoc保护基团,然后将连续的氨基酸连接到树脂上的肽的延长部分。在树脂上添加到肽中的最后一个残基是不含Fmoc基团的4-氟苯甲酰基。

[0233] 最终产量为468克(25%)

[0234] 树脂:

[0235] 所述树脂是取代度在0.3至0.6毫当量/克范围内的Fmoc-Rink AMS树脂。

[0236] Fmoc保护基团的去除:

[0237] 使用20%哌啶的二甲基甲酰胺(DMF)溶液(每克初始树脂10毫升)从N-端(添加到肽序列的最后一个氨基酸)或树脂除去Fmoc保护基团。在下一个氨基酸反应之前,用DMF洗涤除去了哌啶溶液,这通过测试洗涤液的pH值来证实。

[0238] 氨基酸的附着:

[0239] 使用二异丙基碳二亚胺(diisopropylcarbodiimide, DIC)与HOBt(N-羟基苯并三唑)组合作为活化剂,以合适的氨基酸衍生物的形式偶联氨基酸。Cys、Arg、Tyr和Lys(D-Lys或L-Lys)分别被保护为Cys(Trt)、Arg(Pbf)、Tyr(t-Bu)和Lys(Boc)(D-或L-)。在最后的步骤中,将4-氟苯甲酸(4-fluorobenzoic acid)而不是氨基酸偶联。氨基酸(或4-氟苯甲酸)、DIC和HOBt量的计算是基于两倍过量的取代和批量。

[0240] 在每个循环结束时使用茚三酮和四氯苯醌测试进行过程中监测,以评估偶联步骤。阴性测试结果表明不存在游离氨基(完全偶联)。如果测试呈阳性,表明存在未反应的氨基(偶联不完全),则可以延长偶联反应,或者可以对受保护的氨基酸衍生物进行重新偶联。

[0241] 合成循环完成后,用DMF/异丙醇(1:1)溶液洗涤树脂-肽并用氮气干燥。

[0242] 裂解和脱保护:

[0243] 进行裂解以将肽分子从其支持性树脂上分离并去除保护基。用含有5%水的95%三氟乙酸(trifluoroacetic acid, TFA)和50毫克/毫升(mg/mL)二硫赤藓糖醇(dithioerythritol, DTE)作为清除剂(每克树脂10毫升基于TFA的裂解溶液)在环境温度下进行酸解反应,例如3.25-3.5小时。

[0244] 然后过滤树脂并用TFA冲洗两次,以完成肽的提取。

[0245] 在真空下,在旋转蒸发器中(约35°C)将肽溶液的体积减少至原始体积的约30-35%。

[0246] 然后用叔丁基甲基醚(tert-butyl methyl ether, MTBE)/己烷(60:40v/v)的冷冻混合物(-10±5°C)以每克树脂32毫升的体积沉淀肽。

[0247] 粗产物通过过滤分离,用MTBE洗涤,并在氮气流下在过滤器上干燥以除去大部分溶剂。

[0248] 然后将获得的粗(直链)肽溶解在90%乙酸中,将获得的溶液分布在冻干烧瓶中,外壳冷冻并在多支管冻干机上冷冻干燥。

[0249] 通过RP-HPLC分析肽的纯度,并通过质谱分析确认其同一性。

[0250] 氧化环化:

[0251] 粗直链肽通过在0.1M碳酸氢铵(NH_4HCO_3)溶液中用过氧化氢氧化环化,如下:

[0252] 将粗直链肽以10毫克/毫升的浓度溶解在0.1M NH_4HCO_3 中,并加入等体积的0.1M NH_4HCO_3 以将肽稀释至5毫克/毫升浓度。

[0253] 然后在25-30分钟的时间内向肽溶液中滴加1.5%过氧化氢的水溶液(过量5倍)。使用埃尔曼试验(Ellman test)监测反应,以确认不存在游离巯基。

[0254] 反应完成后,通过加入纯TFA将反应混合物酸化至pH 2-3,所得溶液“原样”用于TEAP(磷酸三乙铵)纯化步骤。

[0255] 第一次制备型HPLC柱(TEAP纯化):

[0256] 环化步骤完成后获得的溶液在制备型RP-HPLC C18柱上通过分离纯化,10 μm , 120 Å Daisogel™, 装载约2.4L溶液,每千克树脂含有约11.7克粗制肽。

[0257] 使用0.1M磷酸三乙铵(triethylammonium phosphate, TEAP)缓冲液(pH2.25)和乙腈(ACN)梯度洗脱肽。梯度如下:0%乙腈8分钟,5分钟内从0%乙腈到5%乙腈(每分钟1%的速率),120分钟内从5%乙腈到25%乙腈(每分钟0.17%的速率)。

[0258] 收集洗脱组分、取样并通过HPLC进行测试,以确定哪些组分纯度足够($\geq 95\%$),可

以合并用于第二个色谱纯化步骤。第一次RP-HPLC纯化中不符合纯度验收标准的亲水性和疏水性组分将被保留,并可进行重新处理,以最大限度地提高总产量。

[0259] 第二次制备型HPLC柱(乙酸纯化):

[0260] 合并从TEAP注射中获得的纯化组分,用水1:1稀释,并在 $10\mu\text{m}$, 120\AA Daisogel™C18柱上分离肽,以每千克树脂约2.7升的体积加载,并用35mM乙酸缓冲液和乙腈梯度洗脱。梯度如下:0%乙腈8分钟,110分钟内从0%乙腈到22%乙腈(每分钟0.2%的速率)。在加载肽后和开始洗脱梯度之前用四倍柱体积的0.1M乙酸铵洗涤柱以获得乙酸盐形式的肽。通过230纳米处的紫外吸收来监测组分收集。

[0261] 所获得的组合物含有纯度为99.58%的BL-8040(SEQ ID NO:1)(即,与所有峰面积之和相比的峰面积)。检测到另外三个峰:一个相对保留时间为0.72,浓度为0.105%;另一个在0.87的相对保留时间和0.108%的浓度下;和相对保留时间为0.91的第三种,鉴定为环状C-末端脱酰胺的BL-8040(SEQ ID NO:2),浓度为0.055%。没有观察到至少0.05%的其它峰。

[0262] 实施例2

[0263] 根据一些实施例的BL-8040的大规模相合成:

[0264] 根据实施例1中描述的程序制备环状肽BL-8040(SEQ ID NO:1)。使用Agilent™1200高效液相色谱系统和Hypersil Gold™C18反相柱(250mm长,4.6mm内径,5 μm 粒径)通过反相高效液相色谱法(HPLC)评估肽纯度。流动相A为0.017M高氯酸(HClO_4) (pH 3),流动相B为乙腈(100%),50分钟内流动相B的梯度为19.4%-29.4%。温度为40°C,注射体积为20 μl ,流速为1毫升/分钟,通过在226纳米波长下的吸收进行检测。

[0265] 产物BL-8040(SEQ ID NO:1)在21.165分钟(定义为相对保留时间=1.00)的保留时间下被检测到。在18.481分钟的保留时间(即,0.873的相对保留时间)和0.148%的浓度(即,与所有峰面积之和相比的峰面积)下检测到另一个峰。没有观察到其他显著的(即 $\geq 0.05\%$)峰。

[0266] BL-8040(SEQ ID NO:1)的同一性通过具有与BL-8040(SEQ ID NO:1)的参比样品基本相同的HPLC保留时间以及通过傅立叶变换红外(Fourier transform infrared, FTIR)光谱和氨基酸分析来确认。

[0267] 通过质谱分析揭示了m/z值为1080.3的主离子峰的存在,其被鉴定为对应于 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$,其中M为2158.6Da,这与BL-8040(SEQ ID NO:1)的预测分子量一致。

[0268] 实施例3

[0269] 根据一些实施例的BL-8040的大规模相合成:

[0270] 根据实施例1中描述的程序制备环状肽peptide BL-8040(SEQ ID NO:1)。如实施例2中所述,通过反相HPLC评估肽纯度,不同之处在于流动相A的pH为3.3,流动相B的梯度在50分钟内为19.8%至29.8%。

[0271] 产物BL-8040(SEQ ID NO:1)在20.866分钟的保留时间(定义为相对保留时间=1.00)下被检测到。观察到另外两个峰:一个在18.168分钟的保持时间,即0.871的相对保留时间,浓度为0.156%;在15.008分钟的保留时间,即0.719的相对保留时间和0.062%的浓度下,较小的一个。没有观察到其他显著的(即 $\geq 0.05\%$)峰。

[0272] BL-8040(SEQ ID NO:1)的同一性通过具有与参考样品基本相同的HPLC保留时间

以及通过傅立叶变换红外 (FTIR) 光谱和氨基酸分析来确认。

[0273] 通过质谱分析揭示存在 m/z 值为1080.4和720.8的两个主离子峰,其被鉴定为对应于 $[m+2H]^{2+}$ 和 $[m+3H]^{3+}$,其中M为2159Da,这与BL-8040 (SEQ ID NO:1)的预测分子量一致。

[0274] 将肽溶解在缓冲水溶液 (pH 7) 中 (用甘露醇作为赋形剂)。根据本文所述程序,通过反相HPLC评估肽纯度 (注射体积20微升),并在溶液在 $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 下储存1、3、6、9、12、18、24和36个月后重新评估。在0.88 (浓度0.15%)的相对保留时间和0.72 (浓度0.06%)的比较保留时间下观察到上述另外的化合物。没有观察到其他显著的 (即 $\geq 0.05\%$) 峰。

[0275] 上述每种化合物的浓度在36个月的过程中基本保持不变。36个月后,0.72处的峰值浓度非常轻微地降低到0.14%,并且在0.97的相对保留时间处出现另一个峰值,浓度为0.05%。

[0276] 在储存过程中没有显著变化表明,以约0.72和约0.87的相对保留时间为特征的附加化合物与制备BL-8040 (SEQ ID NO:1) 化合物的过程有关,而不是与溶液中的降解有关。

[0277] 实施例4

[0278] 根据一些实施例的BL-8040的大规模相合成:

[0279] 根据实施例1中描述的程序制备环状肽BL-8040 (SEQ ID NO:1)。如实施例2中所述通过反相HPLC评估肽纯度,不同之处在于流动相B的梯度在50分钟内为19.3%-29.3%。

[0280] 在20.675分钟的保留时间 (定义为相对保留时间=1.00) 检测到产物BL-8040 (SEQ ID NO:1)。观察到三个额外的峰:在17.911和17.999分钟的保留时有两个重叠峰,即相对保留时间分别为0.866和0.871,浓度分别为0.10和0.13;以及在22.223分钟的保留时间,即1.075的相对保留时间和0.05%的浓度下的第三个峰。没有观察到其他显著的 (即 $\geq 0.05\%$) 峰。

[0281] 通过质谱分析揭示存在 m/z 值为1080.3和720.8的两个主离子峰,其被鉴定为对应于 $[m+2H]^{2+}$ 和 $[m+3H]^{3+}$,其中M为2159Da,这与BL-8040 (SEQ ID NO:1)的预测分子量一致。

[0282] 将肽溶解在缓冲水溶液 (pH 7) 中 (用甘露醇作为赋形剂)。根据本文所述程序,通过反相HPLC评估肽纯度 (注射体积20 μl),并在溶液在 $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 下储存1、3、6、9、12、18和24个月后重新评估。在0.87的相对保留时间 (0.23%的浓度),对应于上述重叠峰,和1.09的相对保持时间 (0.05%的浓度) 观察到上述另外的化合物,以及在0.72的相对保持时,和0.05%的浓度,和1.96的相对保留时间观察到两个另外的峰,并且浓度为0.06%。没有观察到其他显著的 (即 $\geq 0.05\%$) 峰。

[0283] 以0.72和0.87的相对保留时间为特征的额外化合物的浓度在24个月的过程中保持不变,而以1.09和1.96的相对保留次数为特征的其他化合物的浓度降至0.05%以下。

[0284] 在储存过程中没有显著变化表明,以约0.72和约0.87的相对保留时间为特征的附加化合物与制备BL-8040 (SEQ ID NO:1) 化合物的过程有关,而不是与溶液中的降解有关。

[0285] 实施例5

[0286] 根据一些实施例的BL-8040的大规模相合成:

[0287] 根据实施例1中描述的程序制备环状肽BL-8040 (SEQ ID NO:1)。如实施例2中所述通过反相HPLC评估肽纯度,不同之处在于流动相B的梯度在50分钟内为19.3%-29.3%。

[0288] 产物BL-8040 (SEQ ID NO:1) 在21.000分钟的保留时间 (定义为相对保留时间=1.00) 下被检测到。观察到另外两个峰:一个在18.268分钟的保持时间,即0.870的相对保留

时间,浓度为0.22%;而较小的一个在15.252分钟的保留时间,即0.726的相对保留时间,以及0.05%的浓度下。没有观察到其他显著的(即 $\geq 0.05\%$)峰。

[0289] BL-8040 (SEQ ID NO:1) 的同一性通过具有与参考样品基本相同的HPLC保留时间以及通过傅立叶变换红外(FTIR)光谱和氨基酸分析来确认。

[0290] 通过质谱分析揭示存在m/z值为1080.4和720.8的两个主离子峰,其被鉴定为对应于 $[m+2H]^{2+}$ 和 $[m+3H]^{3+}$,其中M为2159Da,这与BL-8040 (SEQ ID NO:1) 的预测分子量一致。

[0291] 附加峰的附加液相色谱-质谱(LC/MS)分析表明存在两个重叠峰,一个化合物的特征在于分子量为2159Da(可能是BL-8040 (SEQ ID NO:1) 的异构体),另一个化合物特征在于分子重量为2239Da,比BL-8040 (SEQ ID NO:1) 的分子量高约80Da)。

[0292] 鉴于上述情况,在0.870的相对保留时间处的峰被确定为包括两个重叠的峰,一个具有18.26分钟的保留时间和0.10%的浓度,另一个具有1827分钟的保持时间和0.12%的浓度。

[0293] 将肽溶解在缓冲水溶液(pH 7)中(用甘露醇作为赋形剂)。根据本文所述程序(注射体积20 μ l),通过反相HPLC评估溶液的肽纯度,并在溶液在 $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 下储存6、12和24个月后重新评估。在0.87的相对保留时间(0.21%的浓度)下观察到上述额外化合物,对应于上述重叠峰,在0.72的相对保留时(0.05%的浓度)观察到。没有观察到其他显著(即 $\geq 0.05\%$)峰。额外化合物的浓度在24个月的过程中保持不变。

[0294] 在储存过程中没有显著变化表明,以约0.72和约0.87的相对保留时间为特征的化合物与制备BL-8040 (SEQ ID NO:1) 化合物的过程有关,而不是与溶液中的降解有关。

[0295] 实施例6

[0296] 根据一些实施例的BL-8040的大规模相合成:

[0297] 根据实施例1中描述的程序制备环状肽BL-8040 (SEQ ID NO:1)。如实施例2中所述,通过反相HPLC评估肽纯度,不同之处在于流动相B的梯度在50分钟内为20%至30%,注射体积为5 μ l,并且使用AgilentTM1100HPLC系统。

[0298] 产物BL-8040 (SEQ ID NO:1) 在22.421分钟的保留时间(定义为相对保留时间=1.00)下被检测到。在19.635分钟(即0.876的相对保留时间)和0.10%的浓度下观察到额外的峰。没有观察到其他显著的(即 $\geq 0.05\%$)峰。

[0299] 将肽分两批溶解在缓冲水溶液(pH 7)中(以甘露醇作为赋形剂)。根据本文所述程序,通过反相HPLC评估溶液的肽纯度(注射体积20 μ l)。在一批中,观察到上述另外的化合物的相对保留时间为0.87,浓度为0.10%。在另一批中,观察到上述化合物的相对保留时间为0.87,浓度为0.11%;以及在0.92的相对保留时间和0.05%的浓度下的附加峰,其归因于环状脱酰胺的BL-8040 (SEQ ID NO:2)。没有观察到其他显著的(即 $\geq 0.05\%$)峰。

[0300] 实施例7

[0301] 根据一些实施例的BL-8040的大规模相合成:

[0302] 根据实施例1中描述的程序制备环状肽BL-8040 (SEQ ID NO:1)。如实施例6中所述,通过反相HPLC评价肽纯度。

[0303] 产物BL-8040 (SEQ ID NO:1) 在22.035分钟的保留时间(定义为相对保留时间=1.00)下被检测到。观察到另外两个峰:一个在19.259分钟的保持时间,即0.874的相对保留时间,和0.08%的浓度;另一种是保留时间为15.845分钟,即相对保留时间为0.719,浓度为

0.11%。没有观察到其他显著的(即 $\geq 0.05\%$)峰。

[0304] 将肽分两批溶解在缓冲水溶液(pH 7)中(以甘露醇作为赋形剂)。根据本文所述程序,通过反相HPLC评估溶液的肽纯度(注射体积20 μ l)。在0.87(浓度0.08%)的相对保留时间和0.72(浓度0.11%)的比较保留时间下观察到上述另外的化合物。没有观察到其他显著的(即 $\geq 0.05\%$)峰。

[0305] 在 $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 下储存3、6、9和12个月后,重新评估其中一批的肽纯度。上述每种附加化合物的浓度在12个月的过程中基本保持不变。

[0306] 在储存过程中没有显著变化表明,以约0.72和约0.87的相对保留时间为特征的化合物与制备BL-8040(SEQ ID NO:1)化合物的过程有关,而不是与溶液中的降解有关。

[0307] 参考例

[0308] BL-8040的固相合成:

[0309] BL-8040(SEQ ID NO:1)在Rink酰胺树脂上通过固相肽合成以5个不同批次制备。以HOBt/TBTU(羟基苯并三唑的四氟硼酸盐-苯并三氮唑脲衍生物)和有机碱(DIPEA或collidine)在DMF中作为偶联剂,以乙酸酐进行乙酰化封端。使用三氟乙酸(TFA)、十二烷基硫醇(DDM)、水和三异丙基硅烷(TIS)从树脂上裂解合成的肽,并在甲基叔丁基醚(MTBE)中沉淀。然后通过反相HPLC用0.1%三氟乙酸和乙腈梯度纯化得到的线性肽;将收集的级分浓缩,然后在乙酸中使用碘进行氧化来实现肽的环化。

[0310] 肽纯度(对于5批中的每一批)通过具有0.1%三氟乙酸和乙腈梯度的反相HPLC评估,然后通过具有乙酸缓冲液的反相HPLC进行评估。

[0311] BL-8040(SEQ ID NO:1)在每个批次中的纯度在96.70%至99.28%的范围内。显著的附加化合物包括环状C-末端脱酰胺的BL-8040(SEQ ID NO:2),其特征在于相对保留时间为0.91,并且在5批中的4批中以0.259%至0.373%的浓度存在;和具有乙酰化D-Lys(SEQ ID NO:3)的环状BL-8040,其特征在于1.10的相对保留时间,并且在5批中的4批中以0.054%至0.223%的浓度存在。

[0312] 在5批中的3批中检测到另一种以相对保留时间为0.86-0.88为特征的化合物,其浓度占除BL-8040(SEQ ID NO:1)以外的总化合物的4%至15%。仅在5批中的一批中检测到特征为相对保留时间为0.71-0.73的额外化合物,其浓度仅占除BL-8040(SEQ ID NO:1)以外的总化合物的2%。

[0313] 实施例8

[0314] 包含BL-8040的组合物对体内中性粒细胞迁移的影响

[0315] BL-8040(SEQ ID NO:1)是CXCR4趋化因子受体的拮抗剂。CXCR4介导的细胞活性的诱导负责白细胞附着到骨髓基质细胞上。因此,CXCR4活性的抑制(例如,通过BL-8040(SEQ ID NO:1))预计将诱导白细胞(包括但不限于中性粒细胞)从骨髓基质中分离,以及随后细胞迁移到外周血。

[0316] 通过评价注射后中性粒细胞向外周血的迁移,比较了如实施例1和参考实施例1中所述制备的包含BL-8040(SEQ ID NO:1)的组合物生物活性。

[0317] 小鼠皮下注射单剂量5毫克/公斤的BL-8040(SEQ ID NO:1),在200微升PBS中重构。在BL-8040(SEQ ID NO:1)注射后2小时,通过用肝素将小鼠心脏穿刺到管中使其放血。流式细胞术用于评估外周血中成熟中性粒细胞的数量,并计算相对于对照小鼠的增加。

[0318] 如表1所示,通过评估中性粒细胞迁移确定,保留时间为约0.87和0.72的化合物的存在(与BL-8040(SEQ ID NO:1)一起)与更强的生物活性相关。

[0319] 表1、通过不同技术制备的BL-8040(SEQ ID NO:1)组合物(含有或不含相对保留时间(RRT)为0.87和0.72的化合物)对注射后中性粒细胞迁移至外周血的影响

[0320]	BL-8040 (SEQ ID NO: 1)的合成	中性粒细胞数量的增加倍数	RRT = 0.87	RRT = 0.72
	实施例 1	9.9	0.108 %	0.105 %
	参考例 1	5.6	< 0.05 %	< 0.05 %

[0321] 实施例9

[0322] 含有BL-8040的组合物抑制CXCL12诱导的乳腺癌细胞迁移

[0323] 评估BL-8040 (SEQ ID NO:1)组合物对CXCL12诱导的乳腺癌细胞迁移的抑制活性,因为CXCL12是CXCR4的天然配体(可选地使用如美国专利号7,423,007所述的程序)。将包括保留时间为约0.87和0.72的化合物的BL-8040(SEQ ID NO:1)组合物(任选地如实施例1-7中任一项所述制备)的抑制活性与缺乏保留时间为大约0.87和0.7的此类化合物的BL-800(SEQ ID NO:1)组合物的抑制活性(任选地按参考实施例1中所述制得)进行比较。

[0324] 用纤连蛋白溶液(任选约10微克/毫升)处理Transwell®插入物(任选在37°C下6小时)并干燥,然后将含有BL-8040(SEQ ID NO:1)组合物的CXCL12(任选100nM)和细胞生长培养基(任选600微升含0.1%牛血清白蛋白的DMEM)添加到Transwell®板的下腔中。将测试的BL-8040(SEQ ID NO:1)成分、乳腺癌细胞(可选MDA-MB-231细胞,2x 10⁶细胞/毫升)和细胞生长培养基(可选100微升DMEM和0.1%牛血清白蛋白)添加到上室。孵育(任选地在37°C,5%CO₂存在下孵育约15小时)后,任选地通过固定和染色(例如,用25%甲醇和0.5%结晶紫)对孔下表面上的细胞进行定量,并与不含BL-8040(SEQ ID NO:1)的对照样品进行比较。

[0325] 实施例10

[0326] 包含BL-8040的组合物抑制CXCL12诱导的白血病细胞迁移

[0327] 评估BL-8040(SEQ ID NO:1)组合物对CXCL12诱导的T细胞衍生的白血病细胞迁移的抑制活性(任选地使用如美国专利7,423,007中所述的程序)。将包括保留时间为约0.87和0.72的化合物的BL-8040(SEQ ID NO:1)组合物(任选地如实施例1-7中任一项所述制备)的抑制活性与缺乏保留时间为大约0.87和0.7的此类化合物的BL-8040(SEQ ID NO:1)组合物的抑制活性(任选地按参考实施例1中所述制得)进行比较。

[0328] 将具有BL-8040(SEQ ID NO:1)组合物的CXCL12(任选地30nM)和细胞生长培养基(任选地600微升具有0.1%牛血清白蛋白的DMEM)加入到Transwell®板的下腔中。将测试的BL-8040(SEQ ID NO:1)组合物和白血病细胞(任选2x 10⁶个细胞/毫升的SUP-T1细胞)和细胞生长培养基(任选100微升含有0.1%牛血清白蛋白的DMEM)加入到上室中。孵育后(任选地在37°C、5%CO₂存在下孵育约4小时),任选地使用库尔特计数器对移动到下腔室的细胞数量进行定量,并与不含BL-8040(SEQ ID NO:1)的对照样品进行比较。

[0329] 实施例11

[0330] 包含BL-8040的组合物在动物模型中的抗转移活性

[0331] 在动物模型中评估BL-8040 (SEQ ID NO:1) 组合物抑制转移性乳腺癌细胞迁移的能力(可选地使用如美国专利号7,423,007所述的程序)。将包括保留时间为约0.87和0.72的化合物的BL-8040 (SEQ ID NO:1) 组合物(任选地如实施例1-7中任一项所述制备)的抑制活性与缺乏保留时间为大约0.87和0.7的此类化合物的BL-8040 (SEQ ID NO:1) 组合物的抑制活性(任选地按参考实施例1中所述制得)进行比较。

[0332] 将乳腺癌细胞(可选 10^6 MDA-MB-231人类乳腺癌细胞)静脉植入小鼠(可选5周龄雌性CB-17SCID小鼠)的尾部。将包含生理盐水的BL-8040 (SEQ ID NO:1) 组合物(任选地调节至BL-8040的浓度为80毫克/毫升)逐渐(任选地在四周内)施用给小鼠(任选地使用缓释渗透泵,施用药约18.2毫克/公斤/天)。

[0333] 然后评估小鼠肺部的癌症细胞数量,可选择通过气管注射Evan's Blue溶液(例如0.2%,2毫升),然后将肺部浸泡在Bouin's液体中,染色、固定并观察转移灶(黄染药水),并与不含BL-8040 (SEQ ID NO:1) 的对照样品进行比较。

[0334] 实施例12

[0335] 包含BL-8040的组合物对动物模型中迟发型超敏反应(DTH)的影响

[0336] BL-8040 (SEQ ID NO:1) 组合物抑制迟发型超敏反应(DTH)的能力在动物模型中被评估(任选地使用如美国专利号7,423,007中所述的程序)。将包括保留时间为约0.87和0.72的化合物的BL-8040 (SEQ ID NO:1) 组合物(任选地如实施例1-7中任一项所述制备)的抑制活性与缺乏保留时间为大约0.87和0.7的此类化合物的BL-8040 (SEQ ID NO:1) 组合物的抑制活性(任选地按参考实施例1中所述制得)进行比较。

[0337] 悬浮在生理盐水溶液中的绵羊红细胞(任选每50微升 2×10^7 个细胞)经小鼠(任选6周龄雄性BALB/c小鼠)皮下给药(任选左后肢脚踝)。5天后,在小鼠的第二个位置(可选地至右后肢的脚踝)皮下给予更大剂量的绵羊红细胞(可选地为每50微升 10^8 个细胞),并诱导DTH反应。在抗原诱导之前和之后约24小时,对第二位置的炎症进行定量(例如,通过测定脚踝厚度),并用作DTH的定量指标。

[0338] 从致敏前一天开始,将包含PBS的BL-8040 (SEQ ID NO:1) 组合物逐渐给予小鼠(任选地使用缓释渗透泵,给予约4、约8、约24和/或约120微克/天)。然后将与BL-8040 (SEQ ID NO:1) 组合物的DTH反应与未给予BL-8040 (SEQ ID NO:1) 的对照小鼠的DTH响应进行比较。

[0339] 实施例13

[0340] 包含BL-8040的组合物对动物模型中胶原诱导的关节炎的影响

[0341] BL-8040 (SEQ ID NO:1) 组合物抑制胶原诱导的关节炎发展的能力在动物模型中评估(任选地使用如美国专利7,423,007中所述的程序)。将包括保留时间为约0.87和0.72的化合物的BL-8040 (SEQ ID NO:1) 组合物(任选地如实施例1-7中任一项所述制备)的抑制活性与缺乏保留时间为大约0.87和0.7的此类化合物的BL-8040 (SEQ ID NO:1) 组合物的抑制活性(任选地按参考实施例1中所述制得)进行比较。

[0342] 将牛II型胶原(Bovine type II collagen)溶解在乙酸(任选0.05M)溶液中(任选2毫克/毫升),并用等体积的FCA(弗氏完全佐剂)制备乳液。将乳液(任选50微升)皮内(任选在尾部底部)注射给小鼠(任选6周龄雄性DBA/1JN小鼠),随后(任选注射后约21天)通过类似免疫致敏。在第二次免疫后(任选地持续约两周),测量体重和/或后肢厚度,并进行关节

炎评分。关节炎可选择在每条肢体的0-3分处进行评分,并以相同的总分进行评估(12分为满分;0=正常;1=单个手指的轻度肿胀或肿胀;2=多个手指的中度肿胀或肿胀,3=严重肿胀)。在这段时间结束时(可选两周),采集四肢和血清。

[0343] 然后使用任何合适的技术,任选地通过以下程序对II型胶原特异性抗体(例如IgG2a抗体)进行定量:在免疫板上封闭牛II型胶原(例如,PBS溶液中的10微克/毫升)后,加入x1000稀释的小鼠血清(例如,100微升),并在室温下保持(例如,约2小时);清洗后,加入抗小鼠IgG2a抗体(x1000稀释液);清洁后,加入TMB并在室温下保持(例如,约30分钟),加入等量的H₂SO₄,并在约450纳米处测定吸收。

[0344] 从第二次免疫的前一天开始,将包含PBS的BL-8040(SEQ ID NO:1)组合物逐渐(任选地在两周的过程中)施用给小鼠(任选地使用缓释渗透泵,以每小时施用约0.5微升)。

[0345] 然后将施用BL-8040(SEQ ID NO:1)组合物时的关节炎评分、体重减轻和/或胶原特异性抗体水平与未施用BL-8040(SEQ ID NO:1)的对照小鼠的关节炎得分、体重减轻、和/或胶原蛋白特异性抗体水平进行比较。

[0346] 实施例14

[0347] 包含BL-8040的组合物对CXCL12与CXCR4结合的影响

[0348] BL-8040(SEQ ID NO:1)组合物抑制CXCL12与CXCR4结合的能力在体外细胞中评估(任选地使用如美国专利7,423,007中所述的程序)。将包括保留时间为约0.87和0.72的化合物的BL-8040(SEQ ID NO:1)组合物(任选地如实施例1-7中任一项所述制备)的抑制活性与缺乏保留时间为大约0.87和0.7的此类化合物的BL-8040(SEQ ID NO:1)组合物的抑制活性(任选地按参考实施例1中所述制得)进行比较。

[0349] 放射性标记的CXCL12(任选200pM的¹²⁵I-CXCL120)用于定量表达CXCR4的细胞(任选Jurkat人T细胞白血病细胞)中CXCL12与CXCR4结合。任选地,将50微升Jurkat细胞(6x10⁶个细胞/毫升)悬浮在缓冲液(Dulbecco的PBS溶液,pH 7.0,含有0.5%牛血清白蛋白和20mM HEPES)中,将25微升经缓冲液稀释的测试BL-8040组合物和25微升放射性标记的CXCL12溶液分别分配到板的各个孔中,并在室温下进行固定反应1小时,然后测定每个井的放射性。

[0350] 不具有BL-8040(SEQ ID NO:1)的对照样品可用于表示无结合抑制,而具有非放射性标记的CXCL12(任选地100nM)的对照样本可用于表示完全结合抑制。

[0351] 尽管已经结合其特定实施例描述了本发明,但很明显,对于本领域技术人员而言,许多替代、修改及变化会是显而易见的。因此,其旨在包括落入所附权利要求的精神及广泛范围内的所有此类替代、修改及变化。

[0352] 申请人的意图是,本说明书中提及的所有出版物、专利及专利申请均在本文中通过引用整体并入本说明书中,达到如同每个单独的出版物、专利或专利申请被具体及单独地指出通过引用并入本文的相同程度。另外,本申请中任何参考文献的引用或识别不应被解释为承认这样的参考文献可作为本发明的现有技术。在使用章节标题的范围内,不应将其解释为必然的限制。此外,本申请的任何优先权文件通过引用整体并入本文。

序列表

- <110> 百欧林纳克斯有限公司
百欧肯治疗有限公司
埃弗拉特·哈尔波芬格
阿姆农·佩莱德
埃拉·索拉尼
- <120> BL-8040的组合物
- <130> 90159
- <150> US 63/131,871
- <151> 2020-12-30
- <160> 3
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 14
- <212> PRT
- <213> 人工序列
- <220>
- <223> 合成肽
- <220>
- <221> MOD_RES
- <222> (1) .. (1)
- <223> 4-氟苯甲酰基精氨酸
- <220>
- <221> MOD_RES
- <222> (3) .. (3)
- <223> 3-(2-萘基)丙氨酸
- <220>
- <221> MOD_RES
- <222> (6) .. (6)
- <223> 瓜氨酸
- <220>
- <221> MOD_RES
- <222> (8) .. (8)
- <223> D-赖氨酸
- <220>
- <221> MOD_RES
- <222> (12) .. (12)
- <223> 瓜氨酸

- <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成肽
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1) .. (1)
 <223> 4-氟苯甲酰基精氨酸
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3) .. (3)
 <223> 3-(2-萘基)丙氨酸
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (6) .. (6)
 <223> 瓜氨酸
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8) .. (8)
 <223> N-乙酰-D-赖氨酸
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (12) .. (12)
 <223> 瓜氨酸
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (14) .. (14)
 <223> C'酰胺化的
 <400> 3

Xaa Arg Xaa Cys Tyr Xaa Lys Xaa Pro Tyr Arg Xaa Cys Arg

1

5

10