(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105828832 A
(43)申请公布日 2016.08.03

(21)申请号 201480065303.X
(22)申请日 2014.11.26
(30)优先权数据
PA201370735 2013.12.01 DK
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2016.05.30
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/DK2014/050402 2014.11.26
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2015/078477 EN 2015.06.04
(71)申请人 哥本哈根大学
地址 丹麦哥本哈根
(72)发明人 K·斯特罗姆加德 A·巴赫
K·B·尼森
(74)专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494
代理人 封新琴
(51)Int.Cl.
A61K 38/17(2006.01)

权利要求书14页 说明书27页
序列表5页 附图8页

(54)发明名称

PSD-95的二聚抑制剂的脂肪酸衍生物

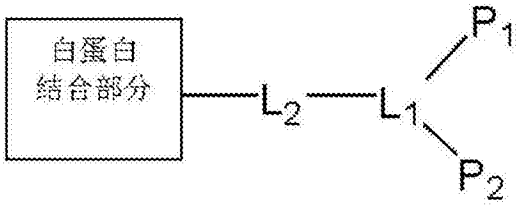
(57)摘要

本发明提供了能够结合PSD-95的PDZ域的脂肪酸衍生的化合物，及其作为PSD-95介导的蛋白质-蛋白质相互作用的抑制剂的医药用途。

CN 105828832 A

1.化合物，其包含第一肽(P_1)和第二肽(P_2)，其中P_1和P_2各自包含至少两个蛋白质或非蛋白质氨基酸残基，并且其中P_1和P_2均通过其N-末端与第一接头L_1缀合，并且其中L_1包含聚乙二醇(PEG)，其中所述PEG的至少一个氧原子被氮原子替换以得到NPEG，并且其中白蛋白结合部分通过酰胺键或者通过任选的接头L_2与NPEG的氮原子连接。

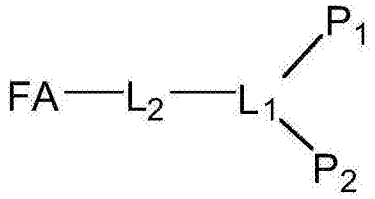
2.根据权利要求1的化合物，其中所述化合物具有式(I)的一般结构：



式(I)

3.根据前述权利要求中任一项的化合物，其中所述白蛋白结合部分是脂肪酸(FA)。

4.根据前述权利要求中任一项的化合物，其中所述化合物具有式(II)的一般结构：



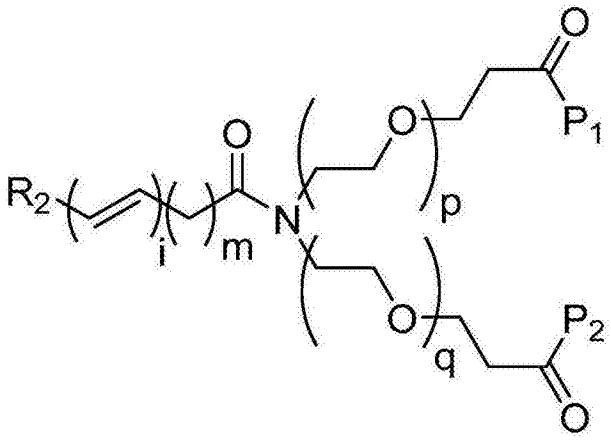
式(II)

5.根据前述权利要求中任一项的化合物，其中所述脂肪酸是饱和或不饱和脂肪酸。

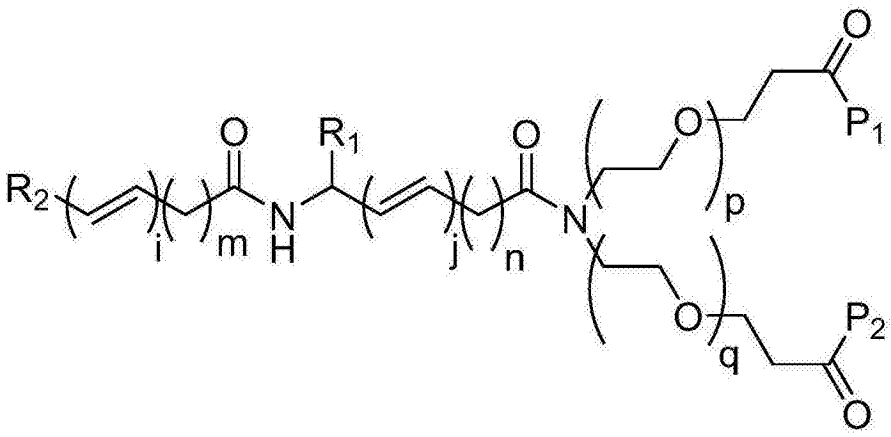
6.根据前述权利要求中任一项的化合物，其中通过第二接头L_2将所述脂肪酸与NPEG接头(L_1)的氮原子连接，其中L_2包含氮原子。

7.根据前述权利要求中任一项的化合物，其中第二接头L_2包含一个或多个部分，其选自γ-Glu、γ-丁酸(GABA)、5-氨基戊酸(5-Ava)、蛋白质氨基酸、非蛋白质氨基酸，和具有通式H_2N-[Q]-COOH的任何化合物，其中Q为任何合适的一个或多个原子。

8.根据前述权利要求中任一项的化合物，其中所述化合物具有式(III)或(IV)的一般结构：



式(III)



式(IV)

其中

R_1和R_2各自选自H和COOH，

n为0-48的整数，

m为1-48的整数，

p为0-28的整数，

q为0-28的整数，

i为0-12的整数，

j为0-12的整数，

P_1和P_2各自选自肽，其包含至少两个蛋白质或非蛋白质氨基酸残基。

9.根据前述权利要求中任一项的化合物，其中p＝q。

10.根据前述权利要求中任一项的化合物，其中p>q。

11.根据前述权利要求中任一项的化合物，其中p<q。

12.根据前述权利要求中任一项的化合物，其中p和q的总和是1-28的整数。

13.根据前述权利要求中任一项的化合物，其中乙二醇部分的数目p选自0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27或28。

14.根据前述权利要求中任一项的化合物，其中乙二醇部分的数目p为0-4。

15.根据前述权利要求中任一项的化合物，其中乙二醇部分的数目q选自0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27或28个乙二醇部分。

16.根据前述权利要求中任一项的化合物，其中乙二醇部分的数目q为0-4。

17.根据前述权利要求中任一项的化合物，其中乙二醇部分的总数p+q为2-12。

18.根据前述权利要求中任一项的化合物，其中乙二醇部分的总数p+q为4。

19.根据前述权利要求中任一项的化合物，其中乙二醇部分的总数p+q为6。

20.根据前述权利要求中任一项的化合物，其中n为选自0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47和48的整数。

21.根据前述权利要求中任一项的化合物，其中n为1-3的整数。

22.根据前述权利要求中任一项的化合物，其中n＝1。

23.根据前述权利要求中任一项的化合物，其中n＝2。

24.根据前述权利要求中任一项的化合物，其中n＝3。

25.根据前述权利要求中任一项的化合物，其中m为选自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和48的整数。

26.根据前述权利要求中任一项的化合物，其中m为10-16的整数。

27.根据前述权利要求中任一项的化合物，其中m＝10。

28.根据前述权利要求中任一项的化合物，其中m＝16。

29.根据前述权利要求中任一项的化合物，其中所述脂肪酸为C_4-C_{22}脂肪酸。

30.根据前述权利要求中任一项的化合物，其中所述脂肪酸选自辛酸、癸酸、月桂酸、肉豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸、花生酸、山嵛酸、二十四烷酸和蜡酸。

31.根据前述权利要求中任一项的化合物，其中所述脂肪酸选自肉豆蔻烯酸、棕榈油酸、十六碳烯酸、油酸、反油酸、异油酸、亚油酸、反式亚麻酸、α-亚麻酸、花生四烯酸、二十碳五烯酸、芥酸和二十二碳六烯酸。

32.根据前述权利要求中任一项的化合物，其中

P_1包含氨基酸序列$X_4X_3X_2X_1$(SEQ ID NO:1)，和

P_2包含氨基酸序列$Z_4Z_3Z_2Z_1$(SEQ ID NO:2)，

其中

a)X_1和/或Z_1为选自I、L和V的氨基酸残基，

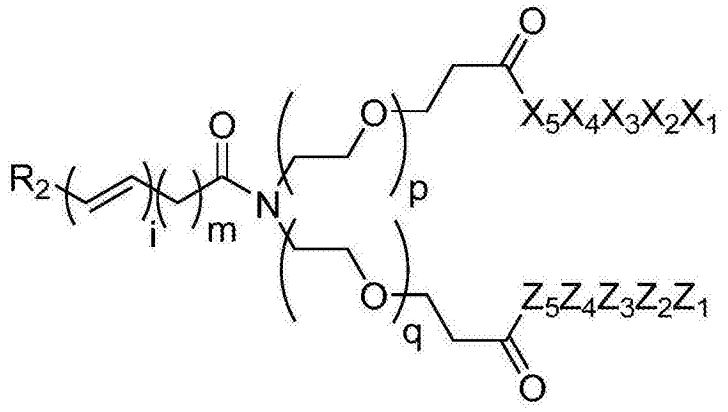
b)X_2和/或Z_2为选自A、D、E、Q、N、S、V、N-Me-A、N-Me-D、N-Me-E、N-Me-Q、N-Me-N、N-Me-S和N-Me-V的氨基酸残基，

c)X_3和/或Z_3为选自S和T的氨基酸残基，

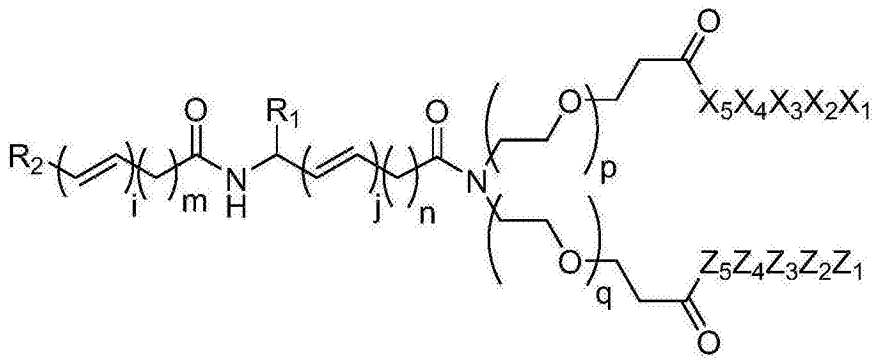
d)X_4和/或Z_4为选自E、Q、A、N和S的氨基酸残基，

其中X_1和Z_1均各自表示最终的包含游离羧酸的C-末端氨基酸残基。

33.根据前述权利要求中任一项的化合物，其中所述化合物具有式(V)或(VI)的一般结构：



式(V)



式(VI)

其中

R_1和R_2各自选自H和COOH，

n为0-48的整数，

m为1-48的整数，和

p为0-28的整数，

q为0-28的整数，

i为0-12的整数，

j为0-12的整数，

X_5和/或Z_5为任选氨基酸残基、肽或多肽，

X_4和/或Z_4为选自E、Q、A、N和S的氨基酸残基，

X_3和/或Z_3为选自S和T的氨基酸残基，

X_2和/或Z_2为选自A、D、E、Q、N、S、V、N-Me-A、N-Me-D、N-Me-E、N-Me-Q、N-Me-N、N-Me-S和N-Me-V的氨基酸残基，

X_1和/或Z_1为选自I、L和V的氨基酸残基。

34.根据前述权利要求中任一项的化合物，其中X_5为蛋白质或非蛋白质氨基酸残基。

35.根据前述权利要求中任一项的化合物，其中X_5为选自I、A、L和V的氨基酸残基。

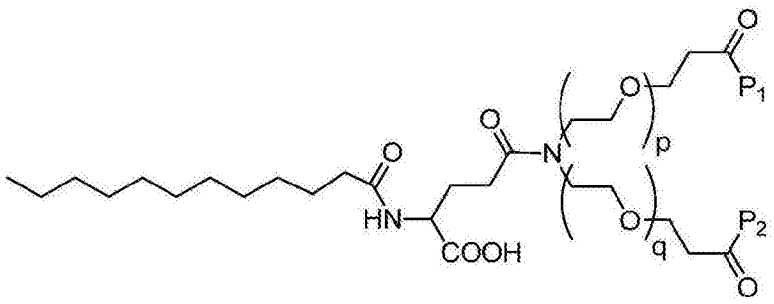
36.根据前述权利要求中任一项的化合物，其中X_5为肽或多肽，其具有由2-100个氨基酸残基组成的氨基酸序列，其中所述肽或多肽的C末端是选自I、A、L和V的氨基酸残基。

37.根据权利要求2和3中任一项的化合物，其中X_5为肽，其包含2至100个残基，例如2至90个氨基酸残基，例如2至80个氨基酸残基，例如2至70个氨基酸残基，例如2至60个氨基酸残基，例如2至50个氨基酸残基，例如2至40个氨基酸残基，例如2至30个氨基酸残基，例如2至20个氨基酸残基，例如2至10个氨基酸残基，例如2至9个氨基酸残基，例如2至8个氨基酸残基，例如2至7个氨基酸残基，例如2至6个氨基酸残基，例如2至5个氨基酸残基，例如2至4

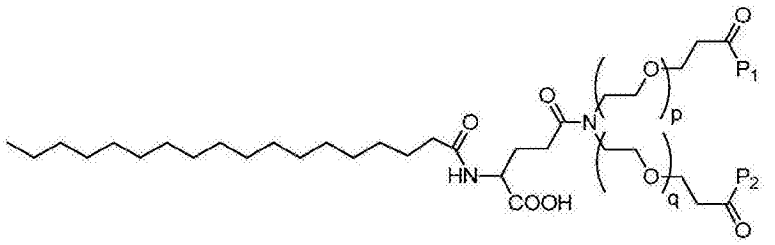
个氨基酸残基，例如2至3个氨基酸残基，其中C末端是选自I、A、L和V的氨基酸。

38.根据前述权利要求中任一项的化合物，其中所述化合物选自：

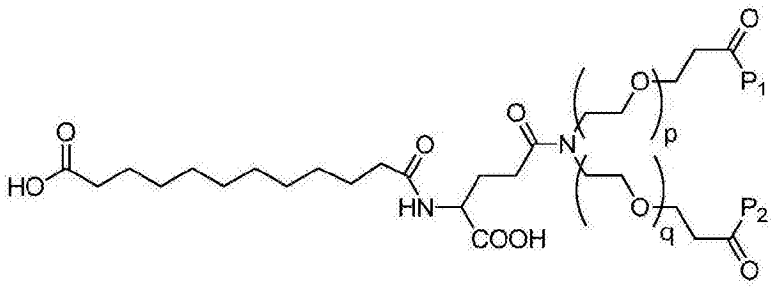
a) KBN41**(5)**
衍生物



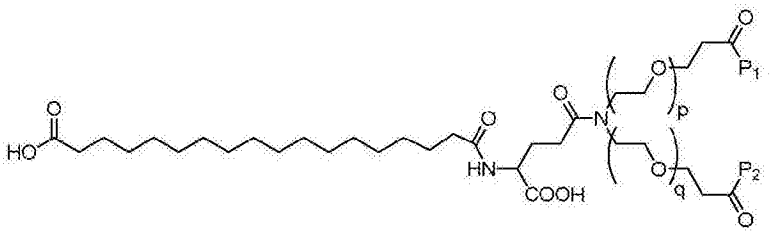
b) KBN42**(7)**
衍生物



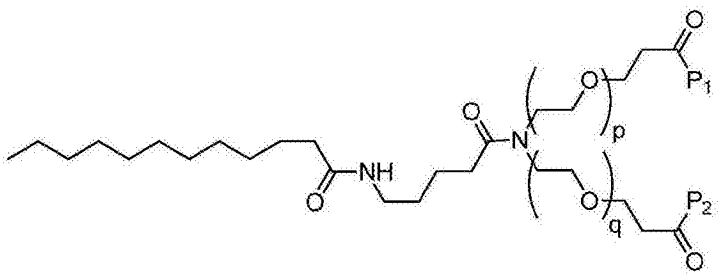
c) KBN43**(6)**
衍生物



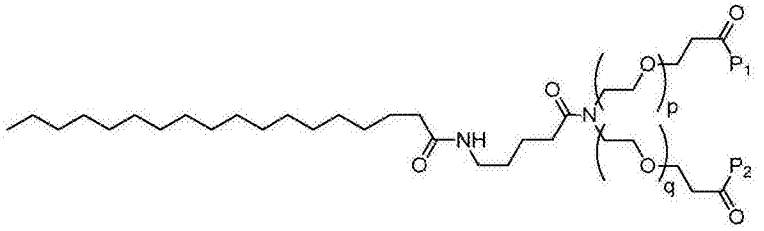
d) KBN44**(8)**
衍生物



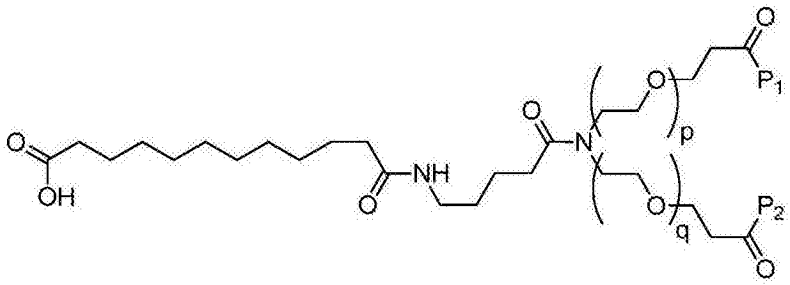
e) KBN45**(9)**
衍生物



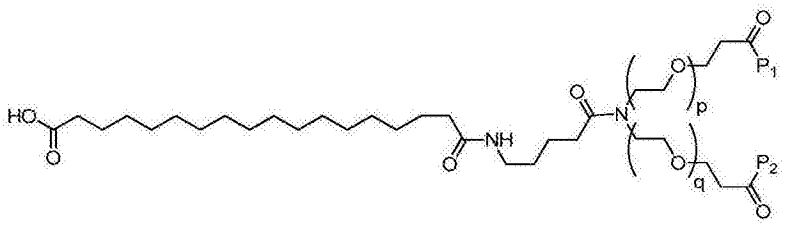
f) KBN46
(11)
衍生物



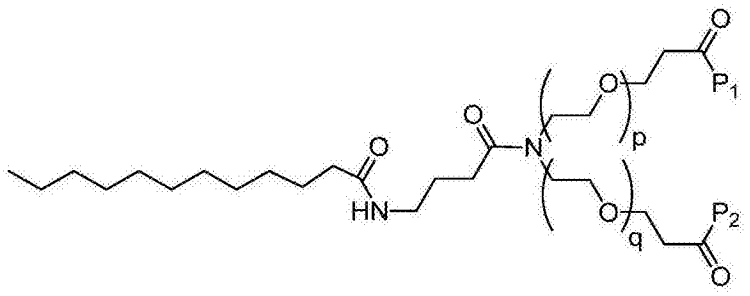
g) KBN47
(10)
衍生物



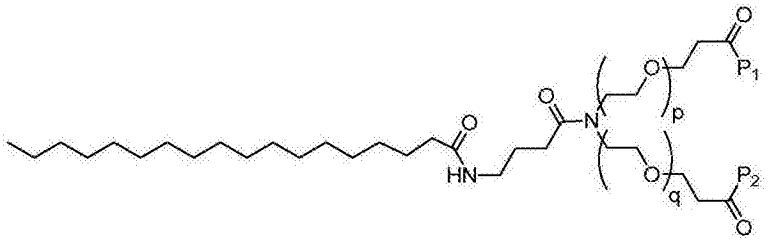
h) KBN48
(12)
衍生物



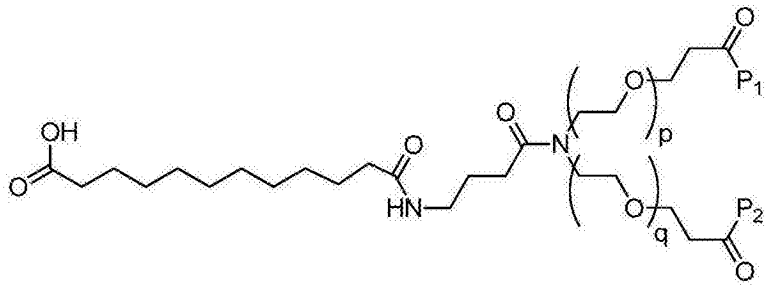
i) KBN52(**1**)
衍生物



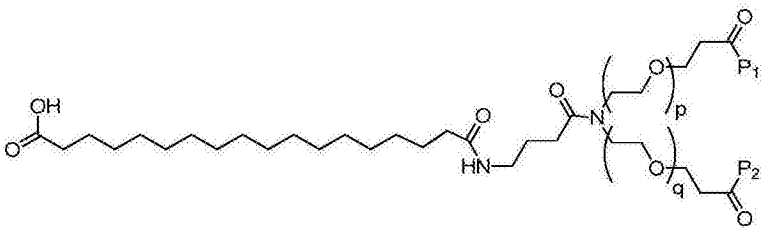
j) KBN53(**3**)
衍生物



k) KBN54(**4**)
衍生物

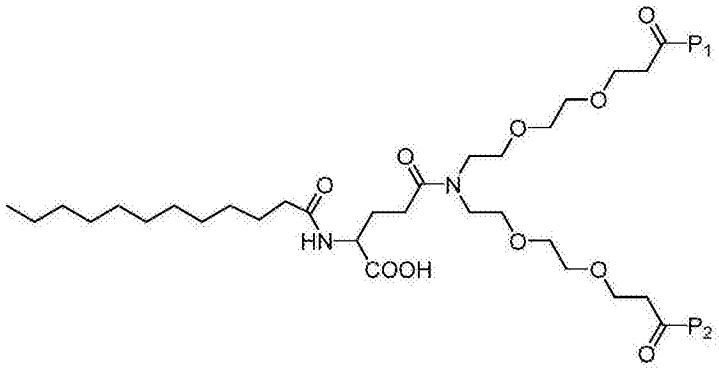


l) KBN55(**4**)
衍生物

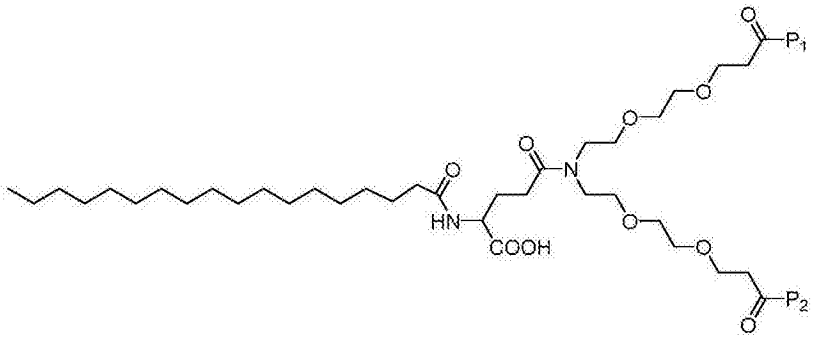


39.根据前述权利要求中任一项的化合物,其中所述化合物选自:

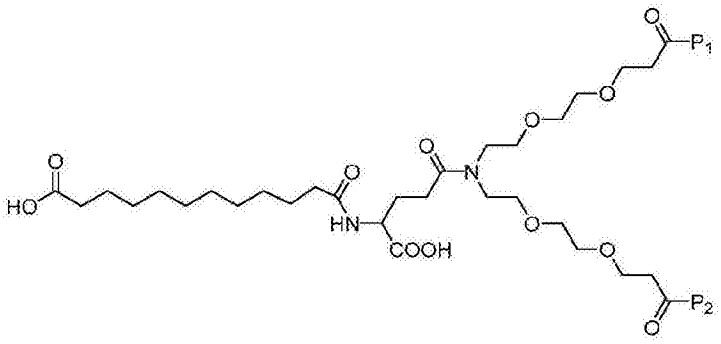
a) KBN41 (**5**)
衍生物



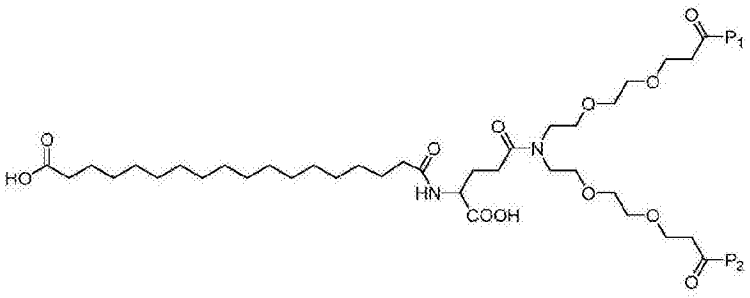
b) KBN42 (**7**)
衍生物



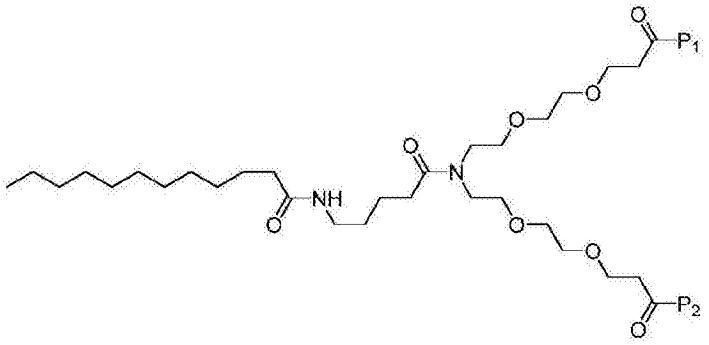
c) KBN43 (**6**)
衍生物



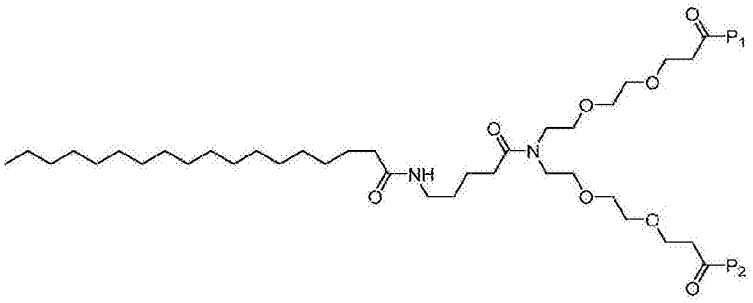
d) KBN44 (**8**)
衍生物



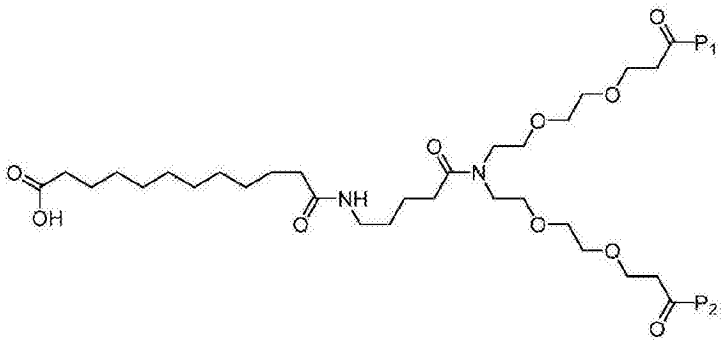
e) KBN45 (**9**)
衍生物



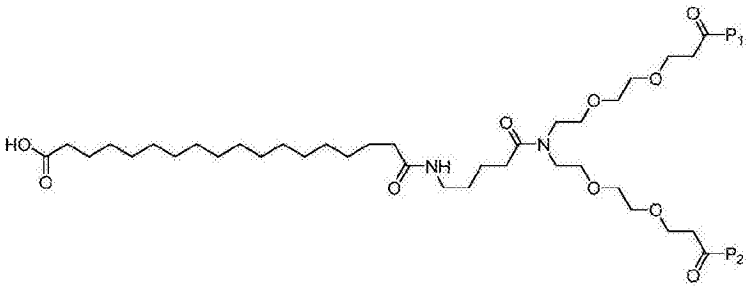
f) KBN46
(**11**)
衍生物



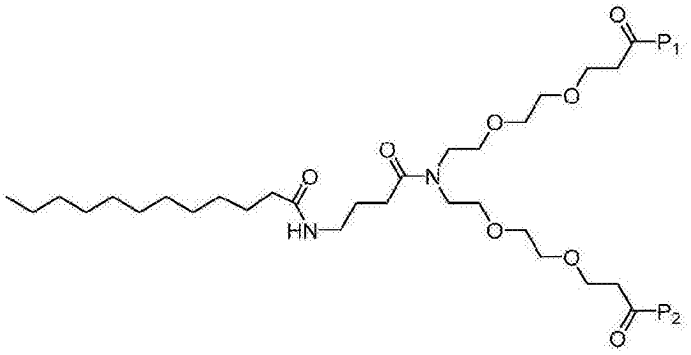
g) KBN47
(**10**)
衍生物



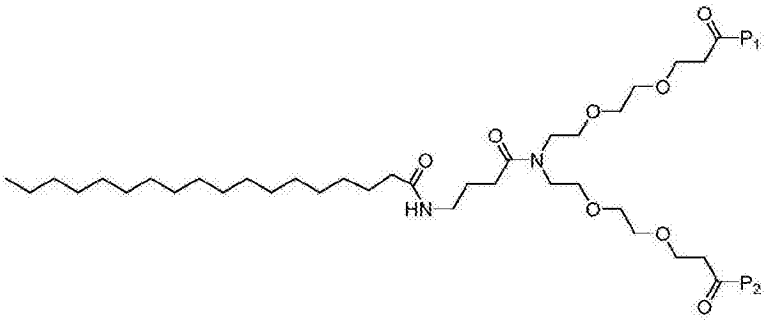
h) KBN48 (**12**) 衍生物



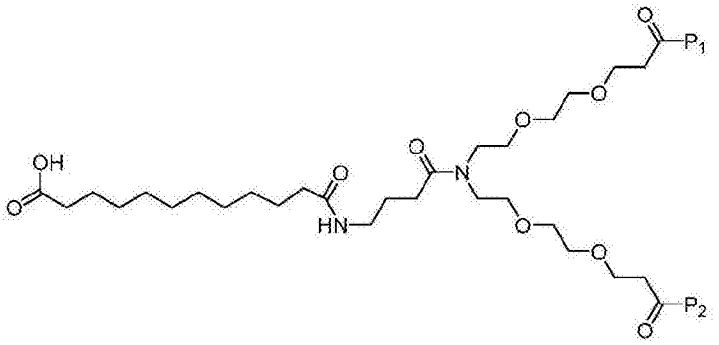
i) KBN52 (**1**) 衍生物



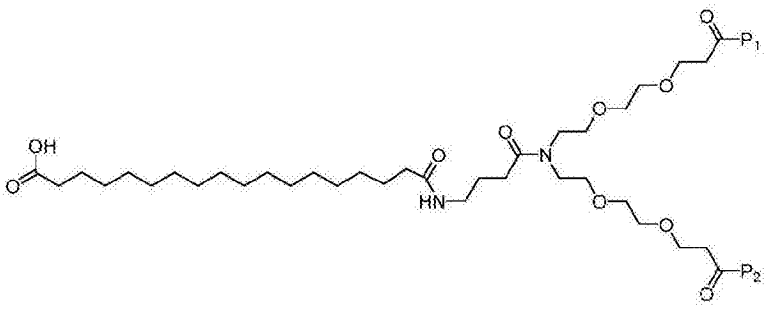
j) KBN53 (**3**) 衍生物



k) KBN54 (**2**) 衍生物

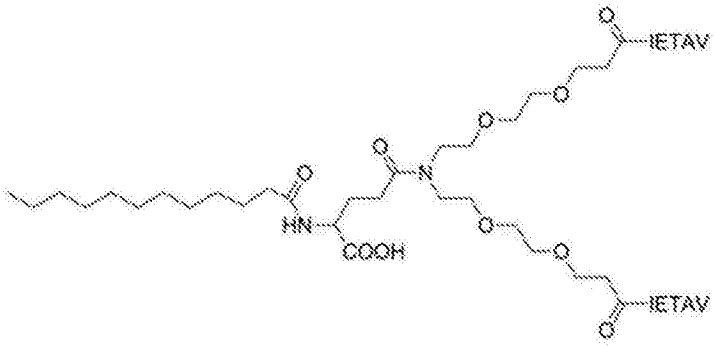


l) KBN55 (**4**) 衍生物

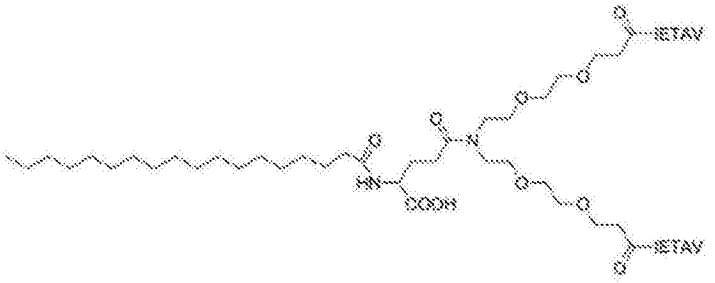


40.根据前述权利要求中任一项的化合物,其中所述化合物选自:

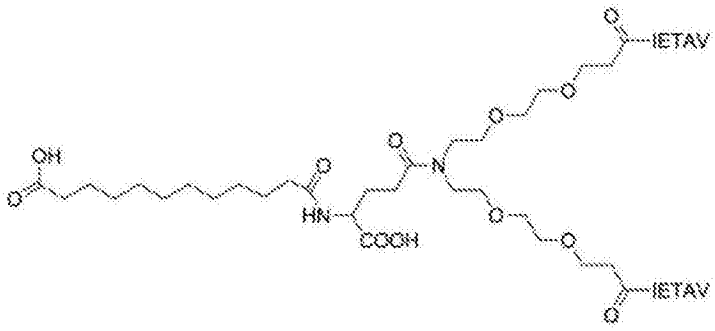
a) KBN41
(**5**)



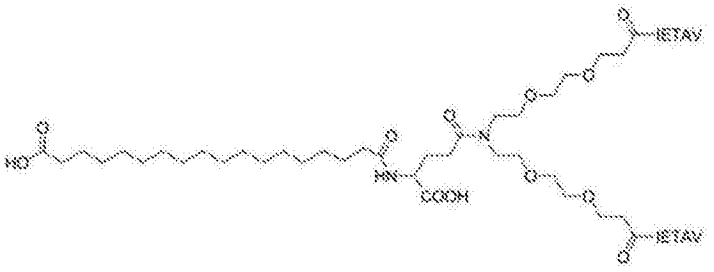
b) KBN42
(**7**)



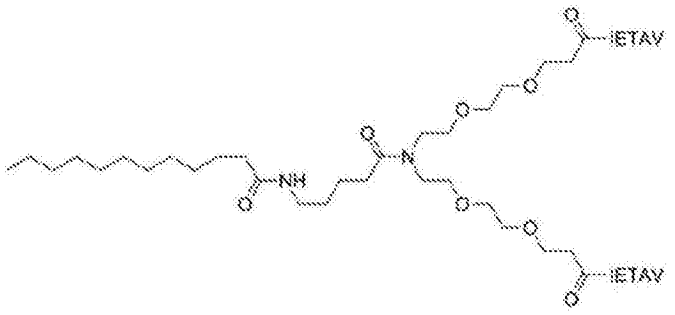
c) KBN43
(**6**)



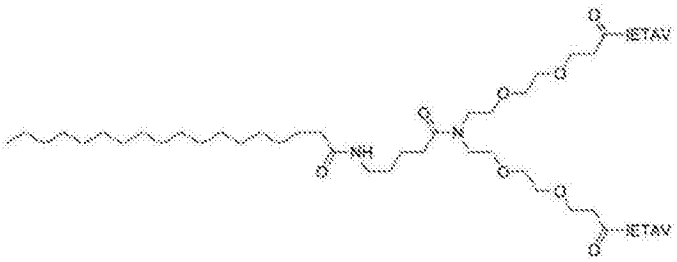
d) KBN44
(**8**)



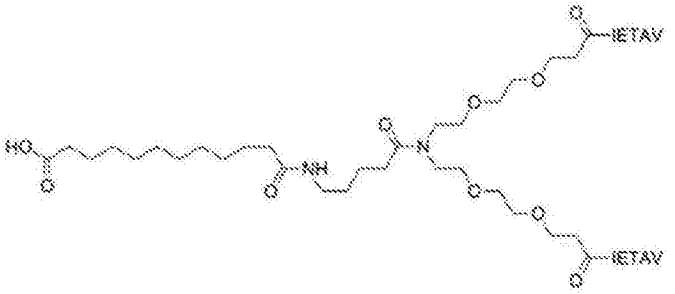
e) KBN45
(**9**)



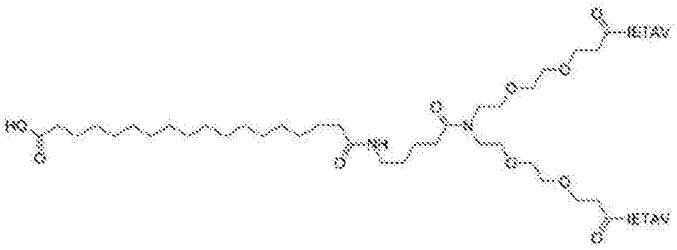
f) KBN46
(**11**)



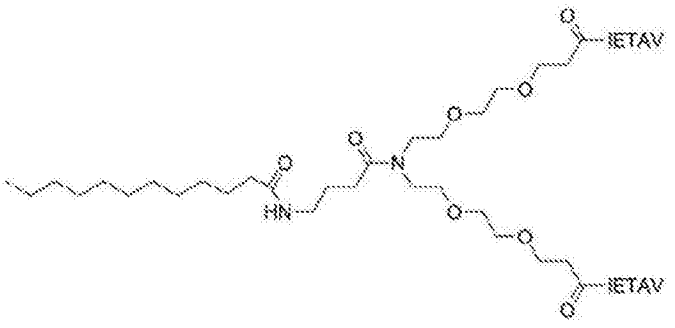
g) KBN47
(**10**)



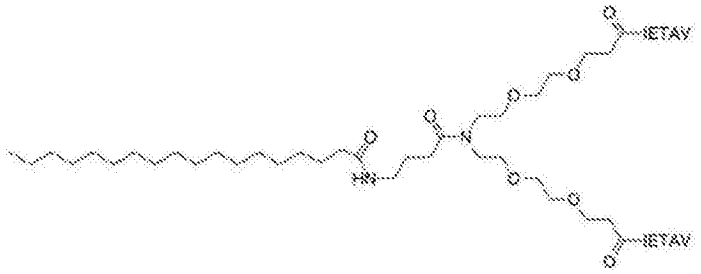
h) KBN48
(**12**)



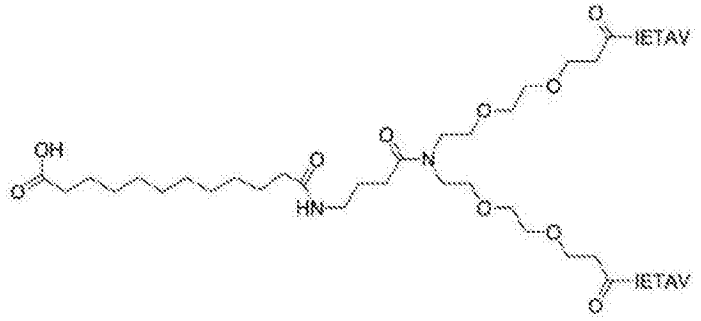
j) KBN52
(**1**)



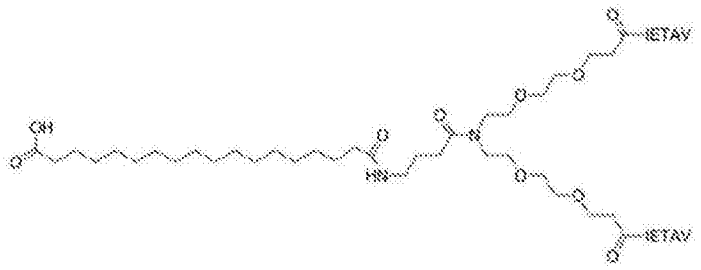
k) KBN53
(3)



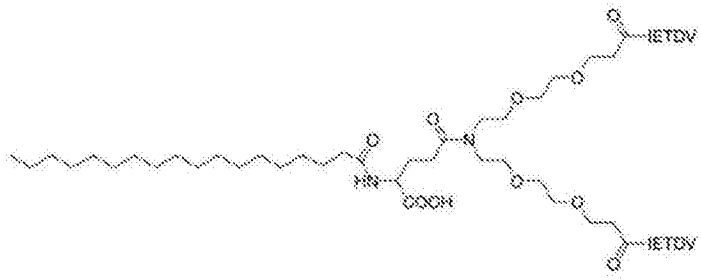
l) KBN54
(2)



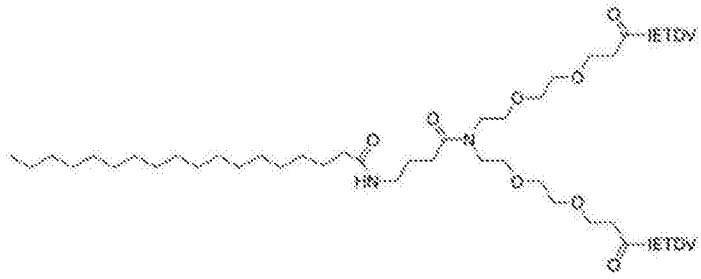
m) KBN55
(4)



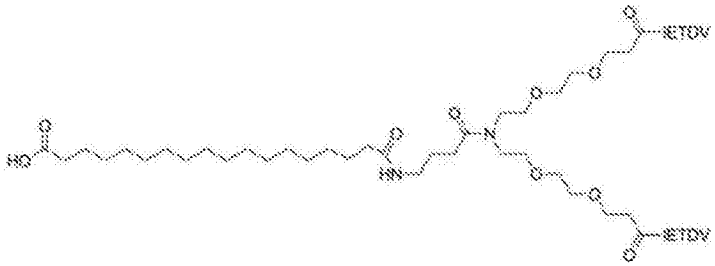
n) KBN63
(15)



o) KBN64
(13)



p) KBN65
(14)



41.根据前述权利要求中任一项的化合物，其为所述化合物的药用盐或前药形式。

42.根据前述权利要求中任一项的化合物，其用作药物。

43.根据权利要求1-41中任一项的化合物，其用于治疗或预防疼痛。

44.根据权利要求1-41中任一项的化合物，其用于治疗或预防兴奋性毒性相关疾病。

45.根据权利要求44的化合物，其中所述疾病为对CNS的缺血性或外伤性损伤/CNS中的缺血性或外伤性损伤/CNS的缺血性或外伤性损伤。

46.制备根据权利要求1-41中任一项的化合物的方法，所述方法包括下列步骤：

a)制备Ns-NPEG二酸接头，

b)使用基于Fmoc的固相肽合成来制备肽，

c)用Ns-NPEG二酸接头使Fmoc-脱保护的肽二聚化，

d)任选通过中间体接头，例如氨基酸接头(L_2)，使脂肪酸与接头-二聚体缀合物偶联。

47.根据权利要求46的方法(步骤a)，其中邻硝基苯磺酰基(Ns)-保护的NPEG接头在固相上或溶液中制备。

48.根据权利要求47的方法，其中固相操作通过如下进行：用Fmoc-NH-PEG-CH_2CH_2COOH装载适合固相肽合成的固体载体，例如2-氯三苯甲基氯树脂，所述操作使用有机溶剂例如DCM、DMF、ACN或THF；和碱例如DIPEA、DBU、三甲基吡啶或NMM。

49.根据权利要求47-48中任一项的方法，其中Fmoc基团通过碱例如哌啶、二甲基胺、吗啉、哌嗪、二环己基胺或DMAP在适当溶剂例如DMF、DCM、ACN、THF中移去。

50.根据权利要求47-49中任一项的方法，其中使用合适的碱例如DIPEA和合适的溶剂例如THF、DCM将邻硝基苯磺酰氯与游离胺偶联，由此获得Ns-NH-PEG-CH_2CH_2COO-树脂。

51.根据权利要求47-50中任一项的方法，其中使用Mitsunobu化学将接头产物的第二部分与树脂连接的接头部分连接，且其中随后用三苯基膦、HO-PEG-$CH_2CH_2COOtBu$、溶剂和偶氮二羧酸的酯或酰胺试剂例如偶氮二羧酸二异丙酯(DIAD)、偶氮二羧酸二乙酯(DEAD)或1,1'-(偶氮二羰基)-二哌啶(ADDP)处理树脂，随后用酸例如三氟乙酸(TFA)处理树脂，由此得到最终的Ns-NPEG二酸接头。

52.根据权利要求46的方法(步骤a)，其中溶液相操作通过如下进行：用Ns保护NH_2-PEG-$CH_2CH_2COOtBu$的氨基，然后使用三苯基膦和DIAD、DEAD或ADDP或类似试剂、HO-PEG-$CH_2CH_2COOtBu$以及适当溶剂(THF、DCM)进行溶液中的Mitsunobu化学，并用酸例如TFA处理，由此得到Ns-保护的NPEG-接头。

53.根据权利要求46的方法(步骤b)，其中使用基于Fmoc的固相肽合成来合成肽，该合成使用固体载体例如2-氯三苯甲基氯树脂或Wang树脂，Fmoc-保护的氨基酸，碱，偶联试剂例如HBTU[N,N,N′,N′-四甲基-O-(1H-苯并三唑-1-基)脲鎓六氟磷酸盐]、O-(7-氮杂苯并三唑-1-基)-N,N,N′,N′-四甲基脲鎓六氟磷酸盐[HATU]、PyBOB、DIC/HOBt，和溶剂；或者通过

使用Fmoc-保护的氨基酸的活化酯，例如五氟苯基酯、琥珀酰亚胺酯来合成肽。

54.根据权利要求46的方法(步骤c)，其中用Ns-NPEG二酸接头使用树脂上二聚化方法使Fmoc-脱保护的树脂连接的肽二聚化，所述树脂上二聚化方法包括用亚化学计量量例如1/6的Ns-NPEG二酸接头、碱、偶联试剂和适当溶剂例如DMF、DCM或者THF反复处理树脂；或者通过使用Ns-NPEG接头的活化酯例如五氟苯基酯或琥珀酰亚胺酯。

55.根据权利要求46的方法(步骤c)，其中所述二聚化方法在溶液中进行，其使用Ns-NPEG接头的活化酯例如五氟苯基酯或琥珀酰亚胺酯以及1-羟基-7-氮杂苯并三唑(HOAt)或羟基苯并三唑(HOBt)和适当的侧链保护肽例如叔丁基；在溶剂例如ACN、DMF、DCM或THF中。

56.根据权利要求46的方法(步骤c)，其中所述二聚化方法在溶液中进行，其使用Ns-NPEG二酸接头、偶联试剂(例如HBTU、HATU等)、碱和溶剂。

57.根据权利要求54-56中任一项的方法，其进一步包括以下步骤：通过硫醇例如巯基乙醇和1,8-二氮杂二环[5.4.0]十一碳-7-烯(DBU)或者通过苯硫酚钠移去Ns-基团。

58.根据权利要求46的方法(步骤d)，其还包括使用偶联试剂和活化用碱或者使用活化酯使脂肪酸与接头-二聚体缀合物偶联。

59.根据权利要求46的方法(步骤d)，其还包括使氨基酸接头与NPEG-二聚的且树脂结合的肽的游离氮偶联，其通过连续偶联Fmoc-保护的接头例如Fmoc-Glu-OtBu、Fmoc-GABA或Fmoc-5-Ava-OH进行；通过使用偶联试剂和活化用碱或者通过Fmoc-保护的氨基酸接头的活化酯进行。

60.根据权利要求58-59中任一项的方法，其中脂肪酸的羧基任选作为酯例如甲酯保护。

61.根据权利要求46-60中任一项的方法，其中任选从树脂切割脂肪酸连接的二聚化配体，使用伴随的通过酸例如TFA或HCl进行的侧链脱保护。

62.根据权利要求46-61中任一项的方法，其中酯保护基团通过如下移去：在含水碱例如NaOH或LiOH中搅拌切割的产物；然后使用TFA或HCl酸化。

63.根据权利要求46-62中任一项的方法，其中通过冻干和使用色谱方法的纯化获得最终产物。

64.根据权利要求63的方法，其中使用HPLC进行纯化。

PSD-95的二聚抑制剂的脂肪酸衍生物

技术领域

[0001] 本发明涉及能够与PSD-95的PDZ域结合的化合物，以及其作为PSD-95介导的蛋白质-蛋白质相互作用的抑制剂的医药用途。

背景技术

[0002] 突触后密度蛋白质-95(PSD-95)是人类中由DLG4(大盘状同系物4(disks large homolog 4))基因编码的蛋白质。PSD-95是膜相关鸟苷酸激酶(MAGUK)家族成员并且与PSD-93一起募集为相同NMDA受体和钾通道组。

[0003] PSD-95是含PDZ域的蛋白质的MAGUK家族的最佳研究成员。类似于所有MAGUK家族蛋白质，其包括三个PDZ域、一个SH3域和一个经连接子区域连接的鸟苷酸激酶样域(GK)。其几乎仅位于神经元的突触后密度，并且涉及锚定突触蛋白质。其直接和间接结合配偶体(partner)包括神经连接蛋白质、神经元型一氧化氮合酶(nNOS)、N-甲基-d-天冬氨酸(NMDA)受体、AMPA受体和钾通道。

[0004] PDZ域是各种有机体包括人的支架蛋白质中主要发现的具有80-90个氨基酸的常见结构域。PDZ是三种蛋白质—PSD-95、果蝇大盘状肿瘤抑制基因(Drosophila disc large tumor suppressor,Dlg1)和闭锁小带蛋白质-1(ZO-1)—的第一个英文字母的缩写词，所述三种蛋白质是最先发现的包含所述域的蛋白质。

[0005] 通常，PDZ域通过与其C末端结合而与其他蛋白质相互作用。这通过β折叠增加(β-sheet augmentation)实现，这是指PDZ域中的β折叠通过加入结合配偶体蛋白质的C末端延长并由此形成延长的β折叠样结构。

[0006] PDZ域发现于真核和真细菌界中均有的大量蛋白质中，而它们在古生菌蛋白质中仅存在极少实例。PSD-95的三个PDZ域，即PDZ1-3，与具有类似共有序列例如Ser/Thr-X-Val/Ile/Leu-COOH的肽配体结合。

[0007] PDZ域与C-末端肽的相互作用的结构基础首先由与天然肽配体CRIPT(序列：YKQTSV)络合的PSD-95的PDZ3的X-射线晶体结构阐明。PDZ3包含六个反平行的β-链(βA-βF)和两个α-螺旋(αA和αB)，并且C-末端肽配体结合于βB链和αB螺旋之间的凹槽中。肽配体的两个残基被认为对于亲和性和特异性是特别重要的，其为从C-末端开始数的第一个(P^0)和第三个(P^{-2})氨基酸。P^0位的氨基酸侧链伸出至疏水口袋中并且需要具有脂族侧链的氨基酸(Val、Ile和Leu)。在PDZ3-CRIPT X-射线晶体结构中，Ser或Thr(P^{-2})的羟基氧与His372的咪唑侧链的氮形成氢键，并且该相互作用已显示为PDZ域/配体相互作用的亲和性的重要决定因素。PDZ域的保守的Gly-Leu-Gly-Phe(PDZ3中的322-325位)基序和带正电荷的残基(PSD-95PDZ3中的Arg318)介导与C末端羧酸酯基团的结合。

[0008] PSD-95的PDZ1和PDZ2域与若干蛋白质相互作用，包括同时结合NMDA-型亲离子谷氨酸受体和一氧化氮(NO)合酶nNOS。NMDA受体是兴奋性毒性的主要介导物，即，谷氨酸介导的神经毒性，其涉及神经变性疾病和急性脑损伤，并且虽然NMDA受体的拮抗剂通过防止谷氨酸介导的离子流有效降低兴奋性毒性，但是它们还阻止生理学重要过程。因此，NMDA受体

拮抗剂不能用于例如中风的临床试验，这是由于低耐受性和缺乏效力。相反，兴奋性毒性的特异性抑制可以通过使用PSD-95抑制剂扰乱细胞内nNOS/PSD-95/NMDA受体络合物而获得。

[0009] PSD-95分别通过PDZ1和PDZ2同时结合NMDA受体，主要为GluN2A和GluN2B亚单位，和nNOS。激活NMDA受体引起钙离子流入，其激活nNOS，由此导致NO产生。因此，PSD-95介导NMDA受体激活和NO产生之间的特定缔合(association)，其如果持续较长时间则对细胞是有害的，并且是谷氨酸介导的神经毒性的关键促进剂。通过靶标PSD-95抑制nNOS/PSD-95/NMDA受体相互作用的三元络合物，其已知为通过损害钙离子进入和NO产生之间的功能连接而防止小鼠中的缺血性脑损伤，同时生理功能例如离子流和NMDA受体的促生存信号转导途径仍保持完整。WO2010/004003公开了通过由聚乙二醇接头(PEG)连接的二聚肽配体抑制PSD-95的概念。这些二聚体同时结合PSD-95的PDZ1和PDZ2域。

[0010] 靶向PSD-95的二聚化配体作为慢性疼痛治疗处于临床前评价中(Andreasen等人，Neuropharmacol，2013，67，193-200；Bach等人，PNAS USA，2012，109，3317-3322)。然而，治疗肽通常易受从血液中除去以及通过肾清除和肝代谢而降解的影响。因此，需要改善药代动力学性质并且因此增加二聚肽配体的稳定性和半衰期。

发明内容

[0011] 为了解决关于提供改善的药代动力学性质和增加PSD-95二聚肽配体的体内稳定性的所述问题，本发明描述了一类新的化合物，其中两个肽配体通过接头例如NPEG接头连接，其中一种或多种脂肪酸或脂肪酸衍生物已直接结合NPEG接头或通过其他接头结合。

[0012] 本发明人由此开发了二聚PSD-95配体的衍生物，其与未连接脂肪酸的化合物，例如WO2010/004003公开的化合物相比，具有改善的体外血浆半衰期。此外，该化合物显示出皮下给药时在皮下储库(depot)中增加的保留时间(residence time)。

[0013] 在一个方面，本发明涉及包含第一肽(P_1)和第二肽(P_2)的化合物，其中P_1和P_2各自包含至少两个蛋白质或非蛋白质氨基酸残基，并且其中P_1和P_2均通过其N-末端与第一接头L_1连接，并且其中L_1包含聚乙二醇(PEG)，其中所述PEG的至少一个氧原子被氮原子替换以得到NPEG，并且其中白蛋白结合部分通过酰胺键或者通过任选的接头L_2与NPEG的氮原子连接。

[0014] 已经证明了本发明的化合物与PSD-95的PDZ1-2结合(当选择如本文所定义的P_1和P_2时)。由于PSD-95是治疗的重要靶标，因此本发明一方面涉及用作药物的本文定义的化合物。

[0015] 更具体地，本发明的化合物可以一方面用于治疗或预防兴奋性毒性相关疾病，或者预防和/或治疗疼痛。

[0016] 本发明化合物可以通过包括下述步骤的方法按计划合成：

[0017] a)制备Ns-NPEG二酸接头，

[0018] b)使用基于Fmoc的固相肽合成制备肽，

[0019] c)使Fmoc-脱保护的肽与Ns-NPEG二酸接头二聚化，

[0020] d)任选通过中间体接头，例如氨基酸接头(L_2)，使脂肪酸与接头-二聚体缀合物偶联。

附图说明

[0021] 图1:参比配体UCCB01-125和UCCB01-144的结构。首字母表示L-氨基酸,除了'N'(氮)、'O'(氧)。

[0022] 图2:FA-连接的二聚化配体(1-12)和UCCB01-125和UCCB01-144的HSA的亲和性。数据显示为平均值±SEM,n=3。

[0023] 图3:如经FP测定的FA-连接的二聚化配体(1-12)和UCCB01-125和UCCB01-144与PSD-95PDZ1-2的亲和性。A)在TBS中测量;B)在TBS+HSA中测量;C)在TBS+HSA中测量,fu校正。数据显示为平均值±SEM,n≥3。

[0024] 图4:化合物(UCCB01-125、1、4、7、13)的体外血浆稳定性。计算的半衰期为:UCCB01-125:1.7h;1:23.6h;4、7和13:>24h。

[0025] 图5:大鼠皮下给药后二聚化配体UCCB01-125(两个剂量)和化合物1、4、7和13的血浆分布。

[0026] 图6:FA-连接的二聚化配体(1-12)的合成。该图的方案1中例示的合成的反应条件如下:(a)Fmoc-GABA-OH/Fmoc-(l)-Glu-OtBu/Fmoc-5-Ava,HATU,三甲基吡啶,DMF(1h x2),然后20%哌啶/DMF;(b)FA1/FA2/FA3/FA4,HBTU,DIPEA,DMF/DCM,45min,然后TFA/TIPS/H_2O(90/5/5);(c)0.5M LiOH,H_2O/ACN(75/25),30min,然后TFA至pH<2。三角形表示E和T为经侧链保护的(叔丁基)。

[0027] 图7:十八烷二酸二甲酯的单皂化。反应条件:(a)NaOH(1eq.),MeOH,45℃,O/N。

具体实施方式

[0028] I.定义

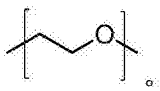
[0029] 酰胺键:本文使用的术语'酰胺键'是通过羧酸和胺之间的反应(并且伴随消除水)形成的化学键。当反应是在两个氨基酸残基之间进行时,作为反应结果形成的键称为肽键(peptide linkage,peptide bond);

[0030] 包含:本文使用的术语'包含'应以包括方式理解。因此,例如,包含化合物X的组合物可以包含化合物X和任选其他化合物。

[0031] 二聚体:本文使用的术语二聚体是指经化学或物理相互作用缔合的两个相同或不相同的化学部分。例如,二聚体可以是同源二聚体,例如经接头连接的两个相同肽。二聚体也可以是异源二聚体,例如经接头连接的两个不同肽。二聚体的实例是本发明的PSD-95抑制剂,其是包含通过接头的方式共价连接的两个肽或肽类似物的化合物,其中所述肽或肽类似物能够同时与PSD-95的PDZ1和PDZ2结合或相互作用。

[0032] 二肽:本文使用的术语'二肽'是指经肽键连接的两个天然或非天然氨基酸。

[0033] 乙二醇部分:本文使用的术语'乙二醇部分'是指组成PEG或NPEG接头的结构单元。`乙二醇部分′的另一个名字是`氧乙烯(oxyethylene)′,并且单体单元的化学式是:

[0034] 。

[0035] 脂肪酸:本文使用的术语脂肪酸(缩写为FA)通常是指具有长脂族碳链的羧酸,其可以为饱和或不饱和的。脂肪酸可以选自短链脂肪酸(SCFA)、中链脂肪酸(MCFA)、长链脂肪

酸(LCFA)和极长链脂肪酸(VLCFA)。短链脂肪酸(SCFA)是具有少于六个碳的脂族尾部的脂肪酸(即,丁酸)。中链脂肪酸(MCFA)是具有6-12个碳的脂族尾部的脂肪酸,其可以形成中链甘油三酯。长链脂肪酸(LCFA)是具有13-21个碳的脂族尾部的脂肪酸。极长链脂肪酸(VLCFA)是具有长于22个碳的脂族尾部的脂肪酸。本发明的脂肪酸可以是本领域技术人员已知的任何合适的脂肪酸或者脂肪酸衍生物。

[0036] 接头:本文使用的术语'接头'是指形成从一个化学实体到另一个的连接的一个或多个原子。例如,'第一接头'在本文是指PEG或NPEG,其通过与其各个N-末端形成连接而将两个PDZ-域结合肽连接在一起。

[0037] 非蛋白质氨基酸:非蛋白质氨基酸还称为非编码的、非标准的或非天然氨基酸,其不由遗传密码编码。非蛋白质氨基酸的非穷尽列举包括α-氨基-正丁酸、正缬氨酸、正亮氨酸、异亮氨酸、别异亮氨酸、叔亮氨酸、α-氨基-正庚酸、哌啶羧酸(pipecolic acid)、α,β-二氨基丙酸、α,γ-二氨基丁酸、鸟氨酸、别苏氨酸、高半胱氨酸、高丝氨酸、β-丙氨酸、β-氨基-正丁酸、β-氨基异丁酸、γ-氨基丁酸、α-氨基异丁酸、异缬氨酸、肌氨酸、N-乙基甘氨酸、N-丙基甘氨酸、N-异丙基甘氨酸、N-甲基丙氨酸、N-乙基丙氨酸、N-甲基β-丙氨酸、N-乙基β-丙氨酸、异丝氨酸和α-羟基-γ-氨基丁酸。

[0038] NPEG:本文使用的术语NPEG是PEG接头的接头衍生物,但是其中一个或多个骨架氧原子被氮原子替换。

[0039] Ns-NPEG二酸接头:'Ns-NPEG二酸接头'是这样的结构,其中在接头氮上NPEG接头的氮被邻-硝基苯磺酰基(Ns)保护基保护,并且其中NPEG接头的末端包含羧酸。这种化学试剂或构造块(building block)用于使两个肽部分P_1和P_2二聚。

[0040] PDZ:本文使用的术语'PDZ'是指突触后密度蛋白质-95(Postsynaptic density protein-95,PSD-95)、果蝇大盘状肿瘤抑制基因(Drosophila homologue discs large tumor suppressor,DlgA)和闭锁小带蛋白质-1(Zonula occludens-1protein,zo-1)。

[0041] PEG:本文使用的术语'PEG'是指上文讨论的乙二醇部分的聚合物。PEG具有化学式$C_{2n+2}H_{4n+6}O_{n+2}$,并且重复结构为:

[0042] 

[0043] 其中例如12个PEG部分或PEG12相当于12个乙二醇部分的聚合物。

[0044] 药代动力学分布:本文使用的术语'药代动力学分布'是指本文所述化合物的吸收于血流中、分布于组织中、代谢和排泄的体内特征。药代动力学分布包括的参数的实例是体外血浆半衰期,其模拟血浆蛋白酶代谢化合物。

[0045] 蛋白质氨基酸:还称为天然氨基酸的蛋白质氨基酸包括丙氨酸、半胱氨酸、硒代半胱氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、苯丙氨酸、甘氨酸、组氨酸、异亮氨酸、赖氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、天冬酰胺、脯氨酸、吡咯赖氨酸、谷氨酰胺、精氨酸、丝氨酸、苏氨酸、缬氨酸、色氨酸和酪氨酸。

[0046] PSD-95:本文使用的术语'PSD-95'是指突触后密度蛋白质-95。

[0047] PSD-95抑制剂:本文使用的术语'PSD-95抑制剂'是指与PSD95的PDZ1、PDZ2或PDZ1和PDZ2二者结合并且抑制由细胞中这些PDZ域促进的蛋白质-蛋白质相互作用的化合物。PSD-95抑制剂抑制的相互作用的实例是nNOS、PSD-95和NMDA受体之间的三元络合物形成。

[0048] II.具有改善的血浆半衰期的二聚化合物

[0049] 靶向PSD-95的二聚化配体作为慢性疼痛和缺血性中风的治疗处于临床前评价中(Andreasen等人,Neuropharmacol,2013,67,193-200;Bach等人,PNAS USA,2012,109,3317-3322)。然而,治疗肽通常易受蛋白酶降解和肾过滤和/或肝代谢消除的影响(Tang等人,J Pharm Sci,2004,93,2184-204)。由于二聚化配体的有限大小,它们可能通过肾过滤从血液中清除,这是因为肾通常过滤出分子量低于60kDa的化合物(Dennis等人,J BiolChem2002,277,35035-43)。为了制备更适合慢性疾病例如神经性疼痛的临床应用的二聚肽配体,给药方案应该尽可能简单,优选每日一次,以增加顺应性(Claxton等人,ClinTher 2001,23,1296-310)。此外,患者通过适当途径的自我给药,例如皮下(s.c.)给药,优于i.v.(静脉内)注射。皮下给药的主要限制是需要药物高度有效、高度浓缩、可溶并从循环缓慢降解和排泄的低注射体积的要求(Dychter等人,J InfusNurs 2012,35,154-60)。此外,药物应该在注射储库中稳定并且缓慢吸收于循环中以延长药物作用(Havelund等人,Pharm Res 2004,21,1498-504)。因此,二聚肽配体的药代动力学分布和体内半衰期应该进一步优化以解决这些问题。

[0050] 白蛋白结合

[0051] 人血清白蛋白(HSA)是人血清中最丰富的蛋白质,占55%的总血清蛋白质(Elsadek等人,J Control Release 2012,157,4-28),其提供解决这些问题的机会。HSA的平均血液浓度为520-830μM,并且分子量为约66.5kDa(Kragh-Hansen等人,Biol Pharm Bull 2002,25,695-704)。HSA在血液、肌肉组织和皮肤中是丰富的(Sleep等人,BiochimBiophysActa 2013,1830,5526-34),但是在正常条件下不存在于神经元内。然而,在其中血脑屏障(BBB)受损的疾病状态例如中风中,其可能进入神经元(Løberg,APMIS 1993,101,777-83)。HSA充当许多内源性配体例如脂肪酸(FAs)、血红素、胆红素和色氨酸(Simard等人,PNAS USA,2005,102,17958-63;Kragh-Hansen等人,Biol Pharm Bull 2002,25,695-704)和药物例如华法林和地西泮以及金属离子的运输和储库蛋白(Yamasaki等人,BiochimBiophysActa 2013,1830,5435-43)。

[0052] 已经广泛研究了HSA的结构,并且HSA的多于90个不同x-射线结构储存在具有71个不同配体的蛋白质数据库(Protein Data Bank,PDB,26/09/2013存入)。HSA是具有80x80x30 Å的合适尺寸的心型分子,并且由三个类似域(I、II和III)组成,其被进一步分为两个亚域(a和b)(Sugio等人,Protein Eng 1999,12,439-46)。大部分药物在Sudlow's位点I(还称为华法林位点)和II(还称为地西泮位点)结合(Elsadek等人,J Control Release 2012,157,4-28;Yamasaki等人,BiochimBiophysActa 2013,1830,5435-43),由在1975年通过荧光光谱鉴定位点的Sudlow和同事的创举工作命名(Sudlow等人,MolPharmacol 1975,11,824-32)。已经绘制了两个药物结合位点,并且分别在亚域IIa(来自亚域IIIa和IIb中的残基)和IIIa内发现(Yamasaki等人,BiochimBiophysActa 2013,1830,5435-43)。Sudlow's位点I和II的一般结合的一个重要例外是脂肪酸(FAs)。

[0053] 从1970开始已知药物的高HSA结合增加药物半衰期的概念。然而,使用HSA增加治疗肽和蛋白质的半衰期的具体概念发展得更缓慢,从2002(约250个出版物/年)至2010(约500个出版物/年)每年出版物数目加倍(Elsadek等人,J Control Release 2012,157,4-28)。已经描述了若干基于肽的HSA结合部分,包括HSA结合序列,其由噬菌体展示鉴定

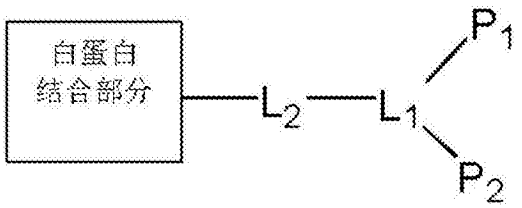
(Dennis等人,J BiolChem2002,277,35035-43),从天然来源(Jonsson等人,Protein Eng Des Sel 2008,21,515-27)和所谓的adnectins(Lipovsek等人,Protein Eng Des Sel 2011,24,3-9)分离。然而,这些可能易受蛋白酶降解的影响,其在目前的皮下给药的情况下可能特别成问题,其中假设开发的化合物于皮下储库中保留若干小时。

[0054] 总体结构

[0055] 为了改善药代动力学分布,本发明人研究了脂肪酸和接头类型对HSA亲和性、PSD-95亲和性和产生的化合物的疏水性的影响。在这种情况下,已经鉴定了提供所需HSA-结合分布和人血浆中增强的稳定性的新化合物。

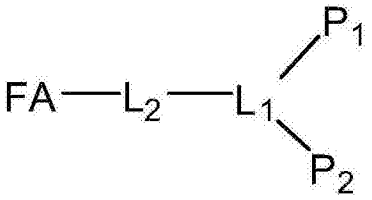
[0056] 因此,在一个方面,本发明涉及包含第一肽(P_1)和第二肽(P_2)的化合物,其中P_1和P_2各自包含至少两个蛋白质或非蛋白质氨基酸残基,并且其中P_1和P_2均通过其N-末端与第一接头L_1连接,并且其中L_1包含聚乙二醇(PEG),其中所述PEG的至少一个氧原子被氮原子替换以得到NPEG,并且其中白蛋白结合部分通过酰胺键或者通过任选的接头L_2与NPEG的氮原子连接。

[0057] 在某些实施方案中,所述化合物具有通式(I):

[0058] 

式(I)

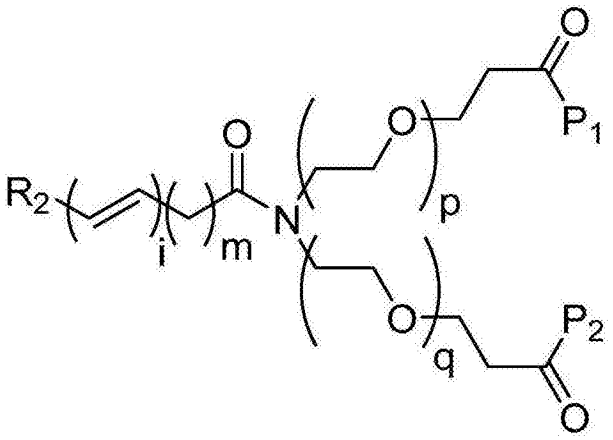
[0059] 白蛋白结合部分可以是任何合适的结合白蛋白的化学基团,优选的白蛋白结合部分是脂肪酸(FA)。在一个实施方案中,所述化合物因此具有通式(II):

[0060] 

式(II)

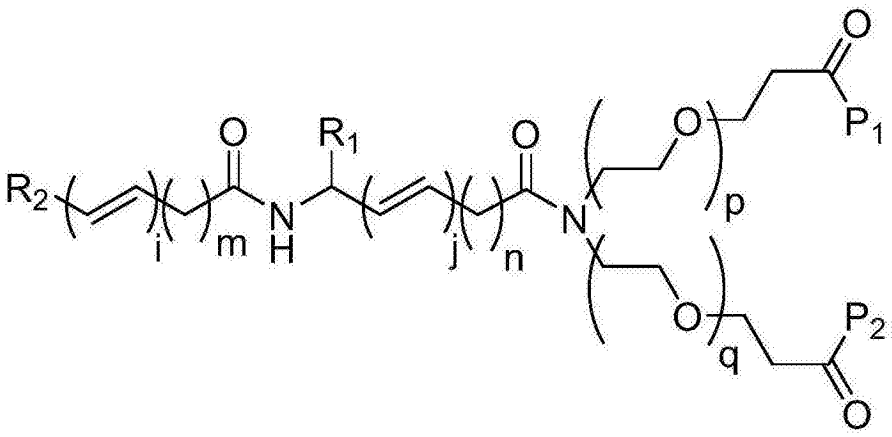
[0061] 脂肪酸可以是任何合适的脂肪酸,例如饱和或不饱和脂肪酸。如上面式(I)和(II)所例示的,白蛋白结合部分例如脂肪酸可以通过第二接头L_2任选与NPEG接头(L_1)的氮原子连接。在其中包括第二接头L_2的实施方案中,该接头包含氮原子。

[0062] 在一个实施方案中,本发明的化合物具有式(III)或(IV)的一般结构:



式(III)

[0063]



式(IV)

[0064] 其中

[0065] R_1和R_2各自选自H和COOH，

[0066] n为0-48的整数，

[0067] m为1-48的整数，

[0068] p为0-28的整数，

[0069] q为0-28的整数，

[0070] i为0-12的整数，

[0071] j为0-12的整数，

[0072] 并且其中P_1和P_2各自选自肽，其包含至少两个蛋白质或非蛋白质氨基酸残基。

[0073] 第一接头(L_1)

[0074] 脂肪酸在活性肽P_1和P_2上显示的性质依赖于这些部分连接的方式。通过第一接头L_1和第二接头L_2实现连接。WO 2012/156308在某种程度上描述了第一接头L_1，其由形成聚乙二醇的许多乙二醇部分组成，其中一个氧原子已被氮原子替换以形成NPEG接头。NPEG接头可例示为在氮原子两侧的每侧上为一定数目(p,q)的乙二醇部分。

[0075] 在本发明的不同实施方案中在氮原子两侧的乙二醇部分的数目是可变的。在一个实施方案中，一侧乙二醇部分的数目(p)与另一侧乙二醇部分的数目相同，即，p＝q。在其他实施方案中p>q或p<q。

[0076] 在一个实施方案中，p和q的总和是0-28的整数，例如其中乙二醇部分的数目p选自0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27或28。

[0077] 在一个实施方案中，乙二醇部分的数目p为1-4，因为该范围的p提供了对PSD-95的最高亲和性。

[0078] 在一个实施方案中，乙二醇部分的数目q选自0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27或28个乙二醇部分。

[0079] 在一个实施方案中，乙二醇部分的数目q为1-4，因为该范围的q提供了对PSD-95的最高亲和性。

[0080] 在一个实施方案中，乙二醇部分的总数p+q为2-12，因为该范围内的接头长度提供了对PSD-95的最高亲和性。

[0081] 在一个实施方案中，乙二醇部分的数目p+q为4，因为该范围的接头长度提供了对PSD-95的极最高亲和性。

[0082] 在另一实施方案中，乙二醇部分的数目p+q为6，因为该范围的接头长度提供了对PSD-95的极高亲和性。

[0083] 第二接头(L_2)

[0084] 第二接头L_2是任选的并且取决于特定目的所需的物理或化学性质可以被包括或排除。若存在，第二接头L_2包含氮原子。第二接头L_2可以例如选自γ-Glu、γ-丁酸(GABA)、5-氨基戊酸(5-Ava)、蛋白质氨基酸、非蛋白质氨基酸和具有通式H_2N-[Q]-COOH的任何化合物，其中Q是任何合适的一个或多个原子或分子。

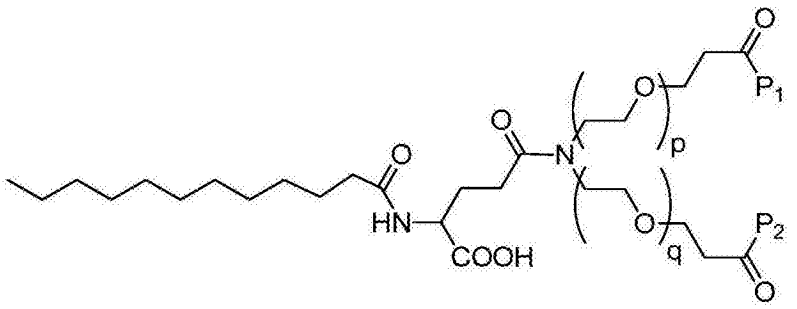
[0085] 如上文所述，第二接头可以包含重复碳部分，由此形成例如烷基或烯基链。重复单元(i)和/或(m)的数目可以取决于所需性质而变化。因此，i和/或m是各自选自0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47和48的整数。

[0086] 在一个实施方案中，n是1-3的整数，例如在其中n＝1或n＝2或n＝3的实施方案中。

[0087] 在某些实施方案中，i和/或j是0-12的整数，例如选自0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11和12的整数。

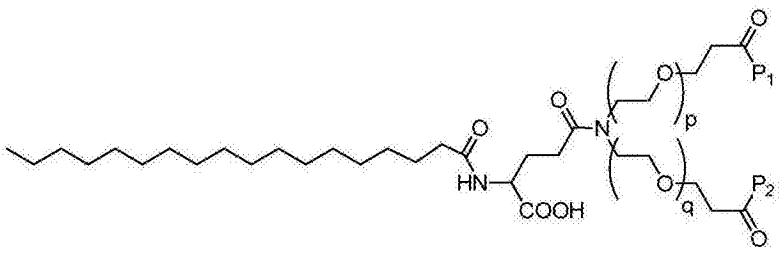
[0088] 在某些实施方案中，选择接头L_1和L_2使得本发明的化合物选自：

a) KBN41
衍生物

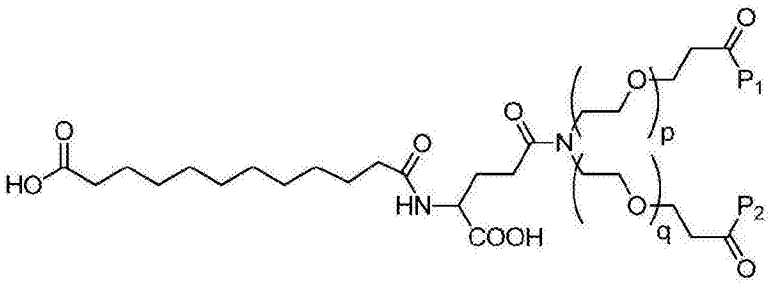


[0089]

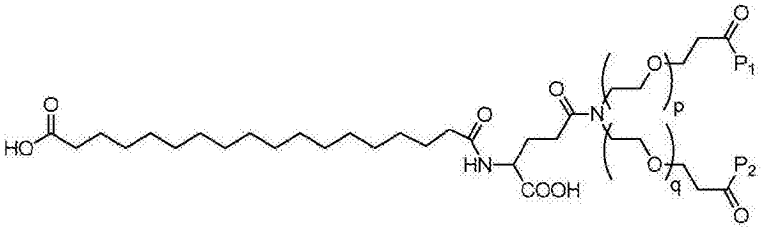
b) KBN42
衍生物



c) KBN43
衍生物

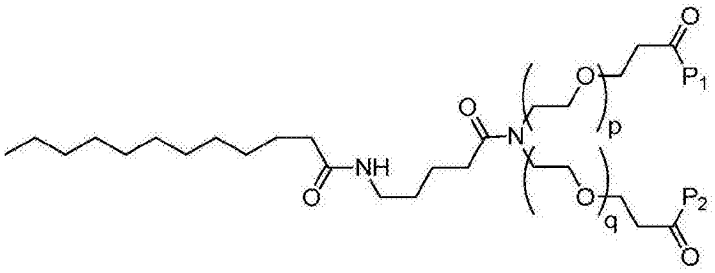


d) KBN44
衍生物

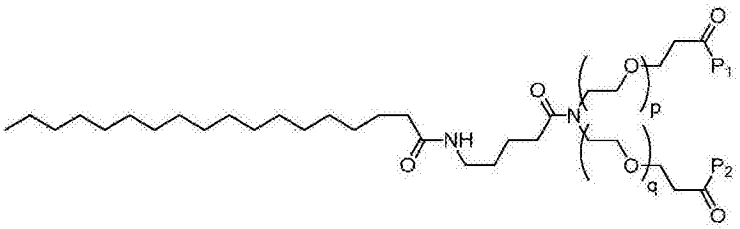


e) KBN45
衍生物

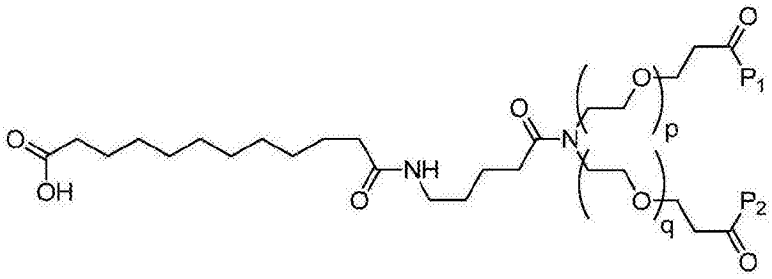
[0090]



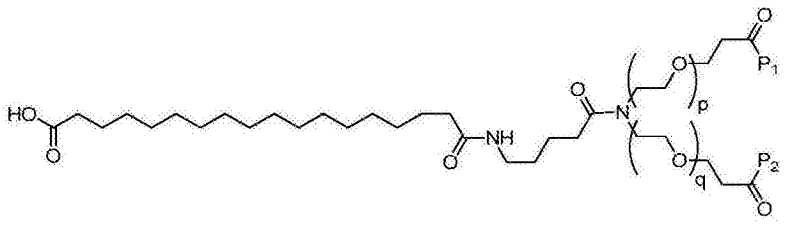
f) KBN46
衍生物



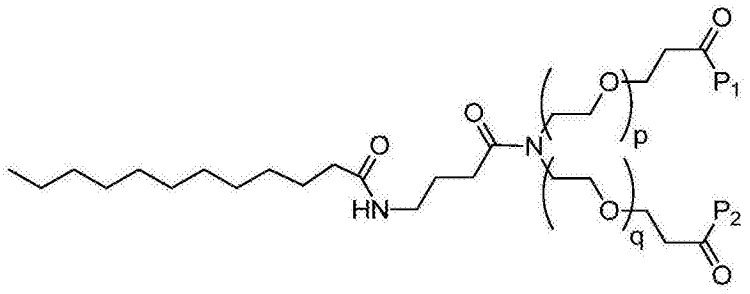
g) KBN47
衍生物



h) KBN48
衍生物

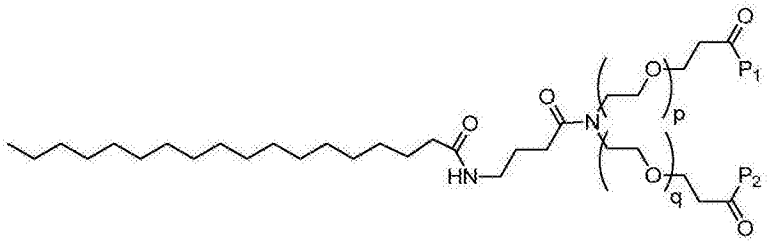


i) KBN52
衍生物

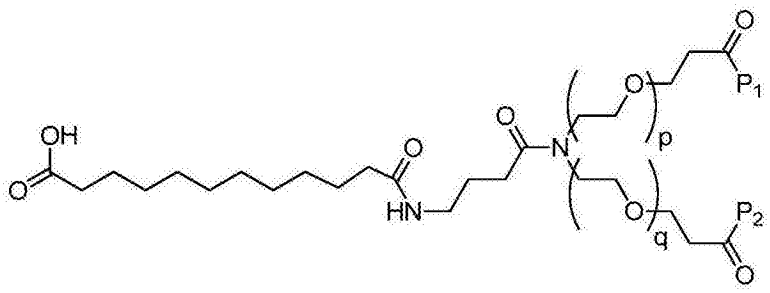


j) KBN53
衍生物

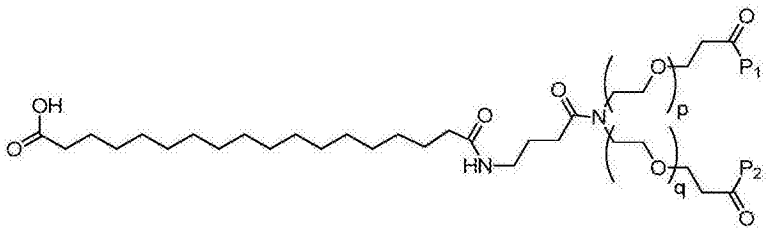
[0091]



k) KBN54
衍生物

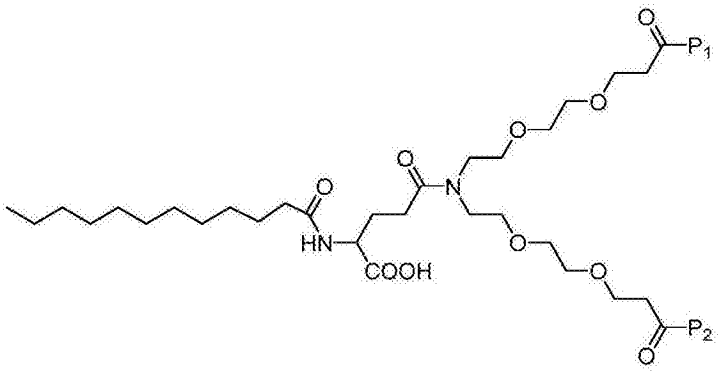


l) KBN55
衍生物

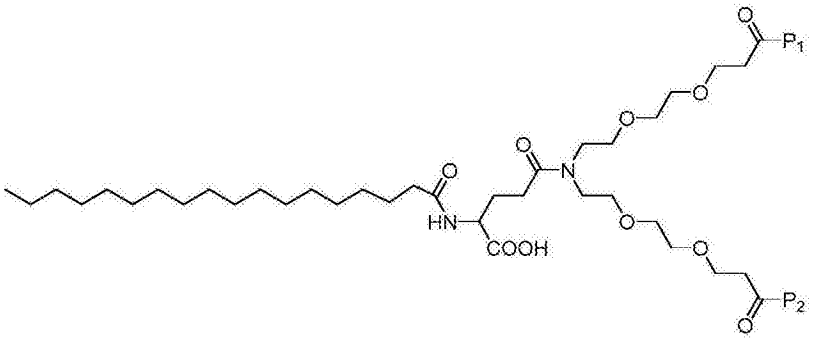


[0092] 在进一步的实施方案中,选择接头使得本发明的化合物选自:

a) KBN41
衍生物

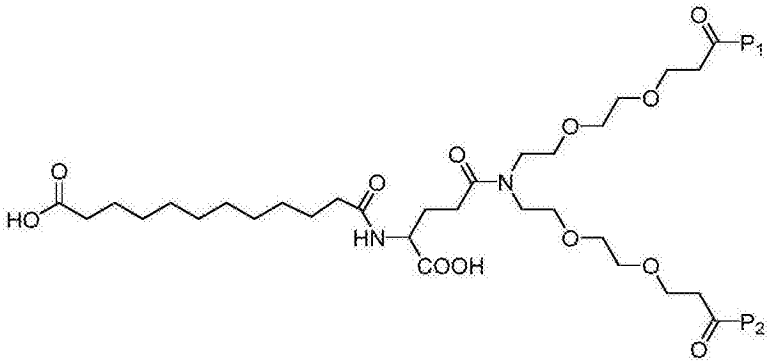


b) KBN42
衍生物

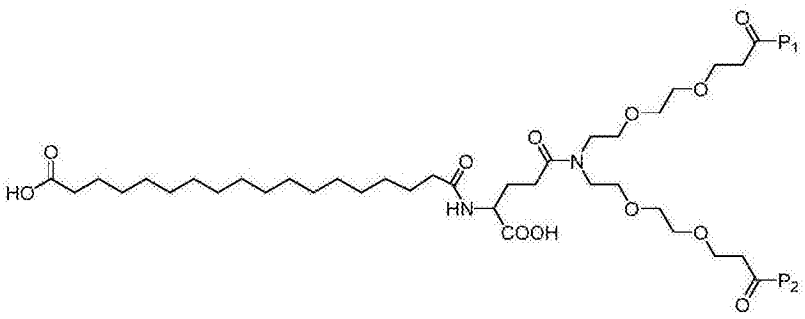


[0093]

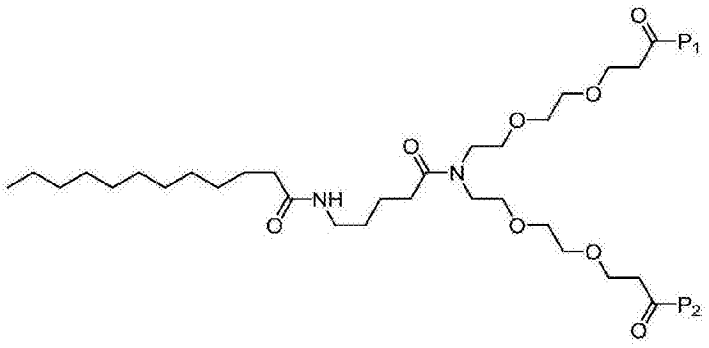
c) KBN43
衍生物



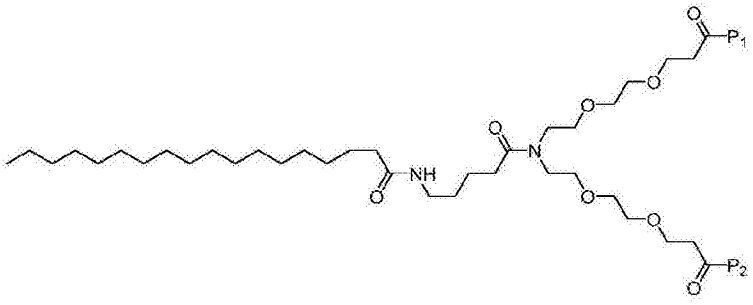
d) KBN44
衍生物



e) KBN45 衍生物

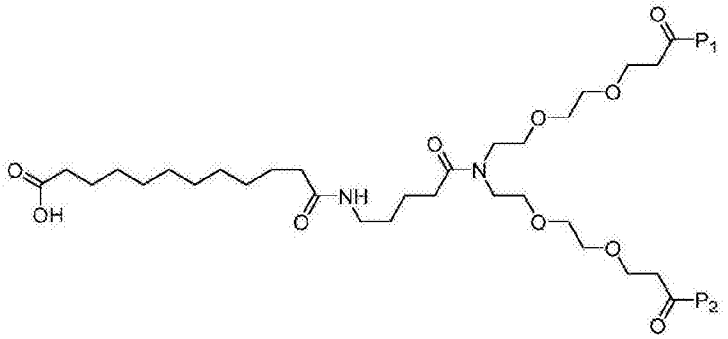


f) KBN46 衍生物

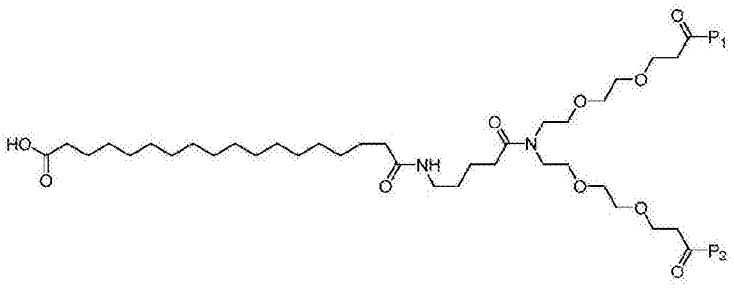


g) KBN47 衍生物

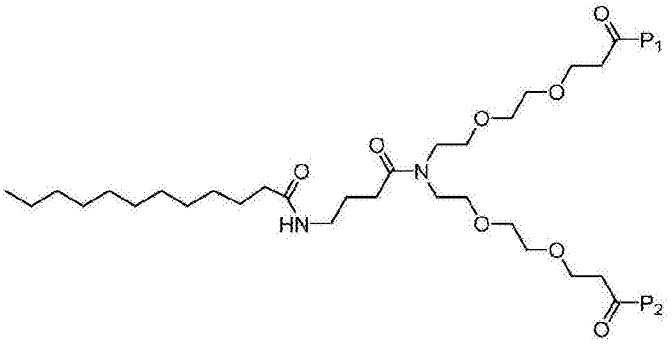
[0094]



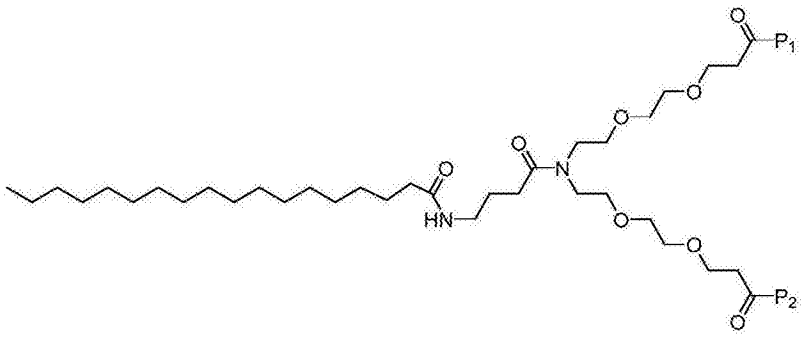
h) KBN48 衍生物



i) KBN52 衍生物

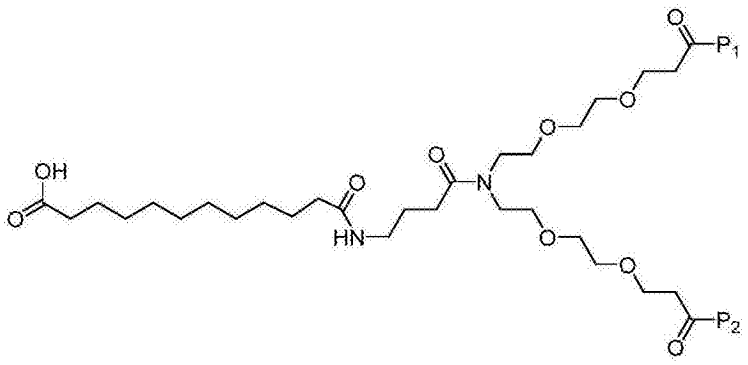


j) KBN53
衍生物

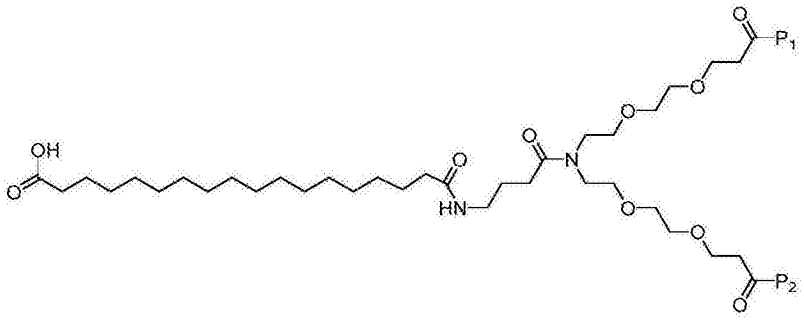


k) KBN54
衍生物

[0095]



l) KBN55
衍生物



[0096] 脂肪酸(FA)

[0097] 脂肪酸是饱和或不饱和的具有脂族尾部(链)的羧酸。大部分天然发现的脂肪酸具有4-28的偶数个碳原子的链。脂肪酸通常源自甘油三酯或磷脂。当它们不与其他分子连接时,它们称为游离脂肪酸。

[0098] 具有碳碳双键的脂肪酸称为不饱和脂肪酸,而没有双键的脂肪酸称为饱和脂肪酸。不饱和脂肪酸在碳原子之间具有一个或多个双键。在某些实施方案中,本发明的化合物包含不饱和脂肪酸。在这种实施方案中,通式(III)、(IV)、(V)或(VI)的指示物(i)和/或(j)是各自选自0-12的整数,例如选自0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11和12的整数。

[0099] 不饱和脂肪酸可以顺式或反式构型,或者二者的混合物获得。

[0100] 顺式构型是指相邻氢原子在双键同侧上。双键的刚性固定其构象并且在顺式异构体的情况下,引起链弯曲并且限制脂肪酸的构象自由。链具有的顺式构型的双键越多,柔性越小。当链具有许多顺式构型的双键时,其以其最易获得的构象变得完全弯曲。例如,具有一个双键的油酸在其中具有"扭结(kink)",而具有两个双键的亚油酸具有更显著的弯曲。具有三个双键的α-亚麻酸具有钩状形状。在受限环境中,其效果为例如当脂肪酸为脂质双分子层的一部分磷脂或脂质液滴的甘油三酯时,顺式双键限制脂肪酸紧密包裹的能力并且因此可能影响膜或脂肪的熔化温度。

[0101] 相反，反式构型是指两个相邻氢原子结合于双键的相对两侧。因此，它们不引起链过度弯曲，并且它们的形状类似于直链饱和脂肪酸。

[0102] 选择任何适合预定目的的脂肪酸，包括顺式、反式或混合脂肪酸，均在本发明的范围内。

[0103] 本发明的化合物可以包含任何合适的脂肪酸或脂肪酸衍生物。在一个实施方案中，脂肪酸是通式(III)或(IV)定义的脂肪酸，其中m是选自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和48的整数，例如其中m是10-16的整数，例如其中m＝10或其中m＝16，其毫无疑问地确定高度HSA相互作用(表1)。

[0104] 本发明的脂肪酸可以为C_4-C_{22}脂肪酸或选自辛酸、癸酸、月桂酸、肉豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸、花生酸、山嵛酸、二十四烷酸、蜡酸、肉豆蔻烯酸、棕榈油酸、十六碳烯酸、油酸、反油酸、异油酸、亚油酸、反式亚麻酸、α-亚麻酸、花生四烯酸、二十碳五烯酸、芥酸和二十二碳六烯酸的脂肪酸。

[0105] 肽(P_1和P_2)

[0106] 本发明的化合物包含两个肽P_1和P_2。P_1和P_2可各自为任何肽，各自包含至少两个氨基酸残基，并且本发明的二聚化合物因此可以适合预定目的。

[0107] 在优选的实施方案中，本发明的化合物为PSD-95抑制剂，其中两个肽与PSD-95的PDZ1-2结合。因此，在某些实施方案中，化合物为通式(I)、(II)、(III)或(IV)中任一者限定的化合物，其中：

[0108] P_1包含氨基酸序列$X_4X_3X_2X_1$(SEQ ID NO:1)，和

[0109] P_2包含氨基酸序列$Z_4Z_3Z_2Z_1$(SEQ ID NO:2)，

[0110] 其中

[0111] a)X_1和/或Z_1为选自I、L和V的氨基酸残基，

[0112] b)X_2和/或Z_2为选自A、D、E、Q、N、S、V、N-Me-A、N-Me-D、N-Me-E、N-Me-Q、N-Me-N、N-Me-S和N-Me-V的氨基酸残基，

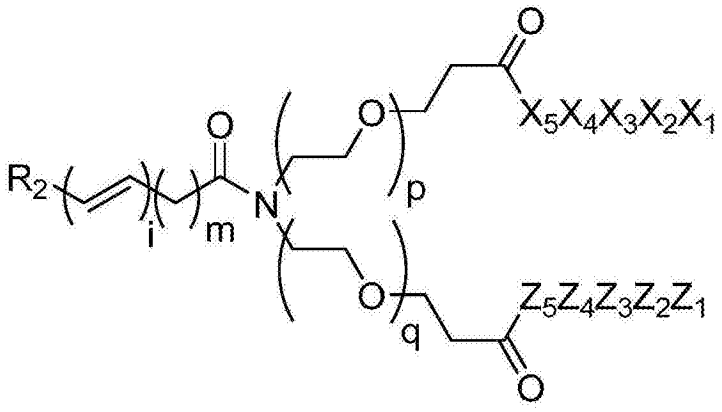
[0113] c)X_3和/或Z_3为选自S和T的氨基酸残基，

[0114] d)X_4和/或Z_4为选自E、Q、A、N和S的氨基酸残基，

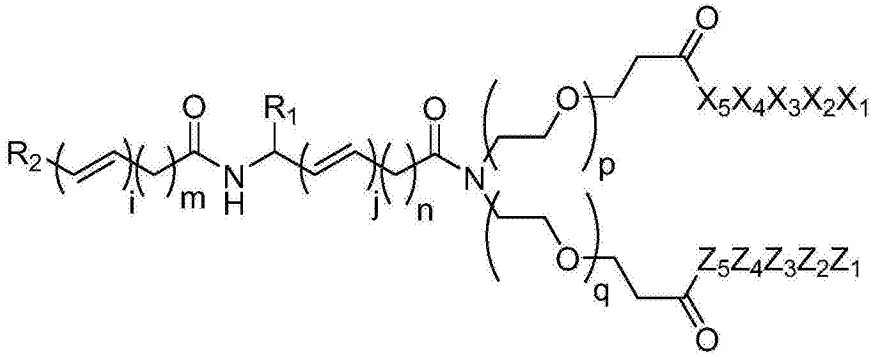
[0115] 其中X_1和Z_1均各自表示包含游离羧酸的最终C-末端氨基酸残基。

[0116] 因此，在某些实施方案中，本发明的化合物具有式(V)或(VI)的一般结构：

[0117]



式(V)



式(VI)

[0118] 其中

[0119] R_1和R_2各自选自H和COOH，

[0120] n为0-48的整数，

[0121] m为1-48的整数，和

[0122] p为0-28的整数，

[0123] q为0-28的整数，

[0124] i为0-12的整数，

[0125] j为0-12的整数，

[0126] X_5和/或Z_5为任选的氨基酸残基、肽或多肽，

[0127] X_4和/或Z_4为选自E、Q、A、N和S的氨基酸残基，

[0128] X_3和/或Z_3为选自S和T的氨基酸残基，

[0129] X_2和/或Z_2为选自A、D、E、Q、N、S、V、N-Me-A、N-Me-D、N-Me-E、N-Me-Q、N-Me-N、N-Me-S和N-Me-V的氨基酸残基，

[0130] X_1和/或Z_1为选自I、L和V的氨基酸残基。

[0131] 如果X_5为单一氨基酸残基，则其选自蛋白质和非蛋白质氨基酸残基。

[0132] 在一个实施方案中，X_5为选自I、A、L和V的氨基酸残基。

[0133] X_5也可以为具有由2-100个氨基酸残基组成的氨基酸序列的肽或多肽，其中所述肽或多肽的C末端是选自I、A、L和V的氨基酸残基。

[0134] 在本发明的某些实施方案中，X_5为包含2-100个残基的肽，例如2-90个氨基酸残基，例如2-80个氨基酸残基，例如2-70个氨基酸残基，例如2-60个氨基酸残基，例如2-50个氨基酸残基，例如2-40个氨基酸残基，例如2-30个氨基酸残基，例如2-20个氨基酸残基，例如2-10个氨基酸残基，例如2-9个氨基酸残基，例如2-8个氨基酸残基，例如2-7个氨基酸残基，例如2-6个氨基酸残基，例如2-5个氨基酸残基，例如2-4个氨基酸残基，例如2-3个氨基

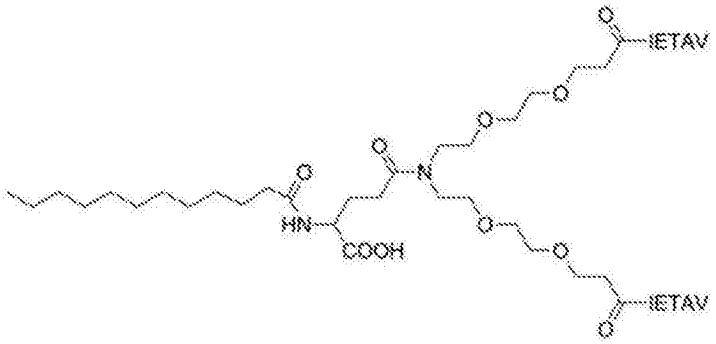
酸残基，其中C末端是选自I、A、L和V的氨基酸。

[0135] 本发明的概念通常是可得的，如通式(I)、(II)、(III)、(IV)、(V)和(V)例示的，本发明人已经制备了本发明内的许多化合物，包括适合与PSD-95的PDZ1-2结合的P_1和P_2的肽基序。

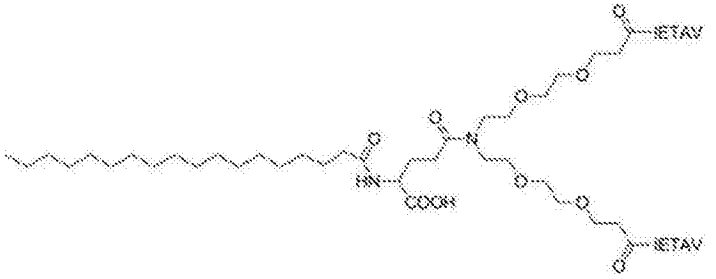
[0136] 因此，在一个实施方案中，本发明的化合物选自：

a) KBN41
(5)

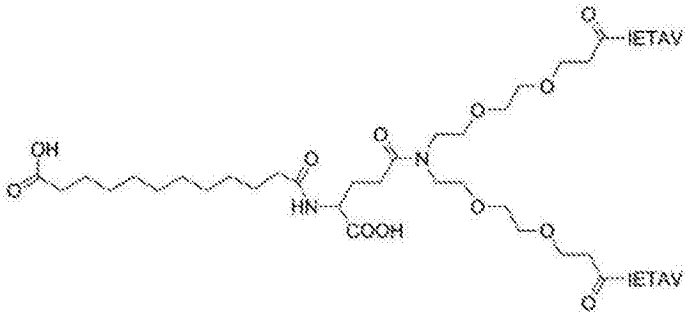
[0137]



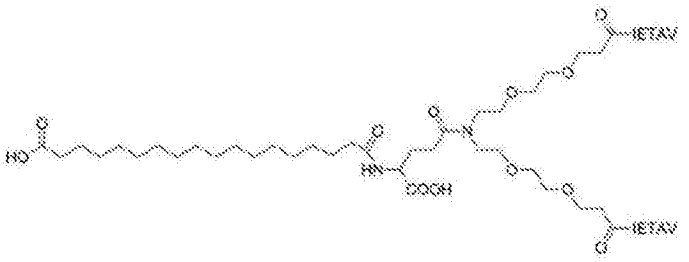
b) KBN42
(7)



c) KBN43 (6)

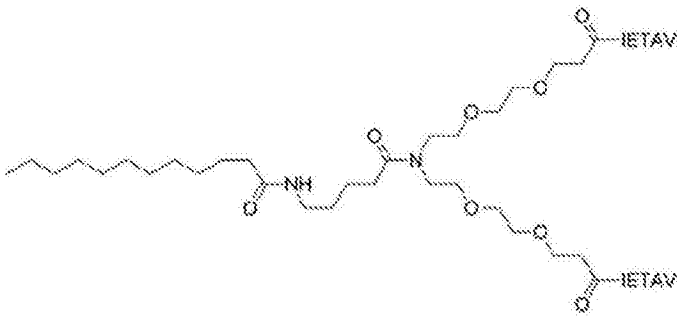


d) KBN44 (8)

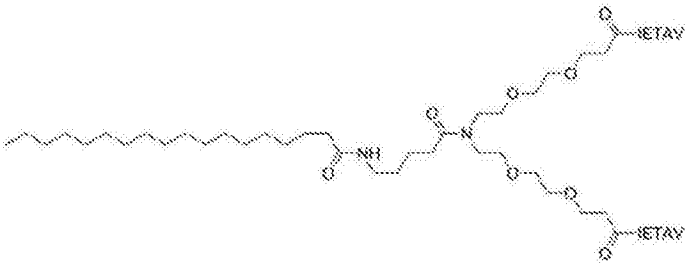


e) KBN45 (9)

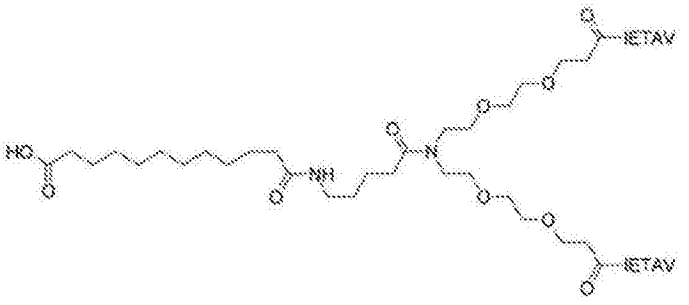
[0138]



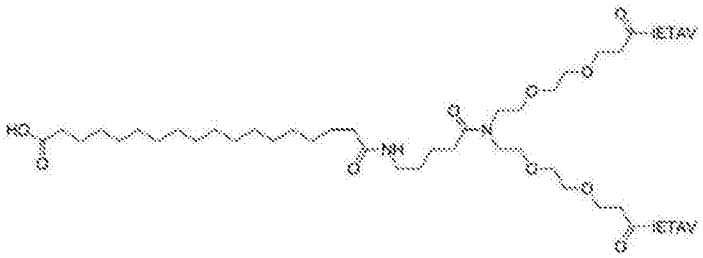
f) KBN46 (11)



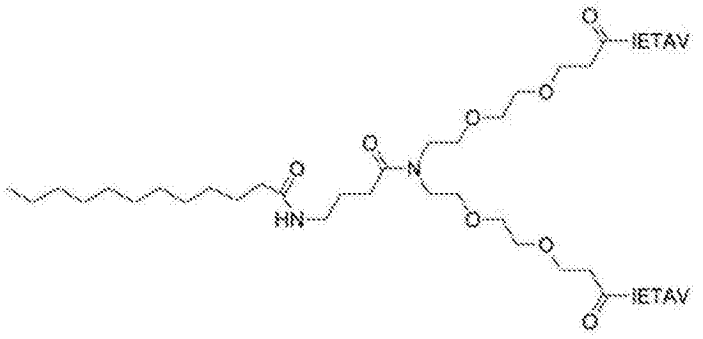
g) KBN47 (10)



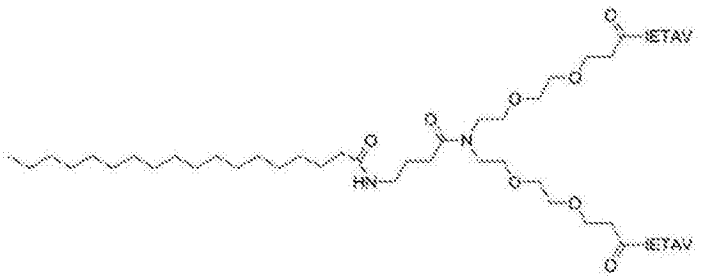
h) KBN48
(**12**)



j) KBN52
(**1**)

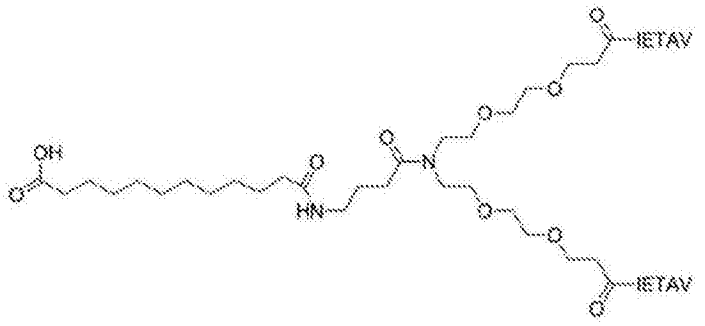


k) KBN53
(**3**)

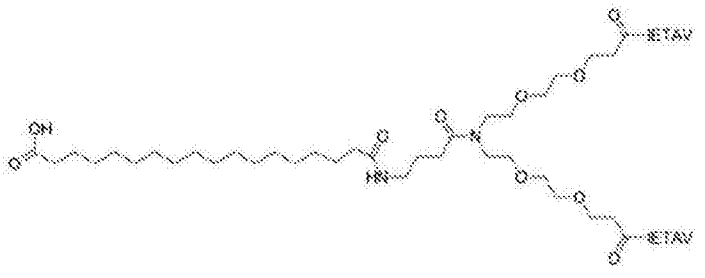


[0139]

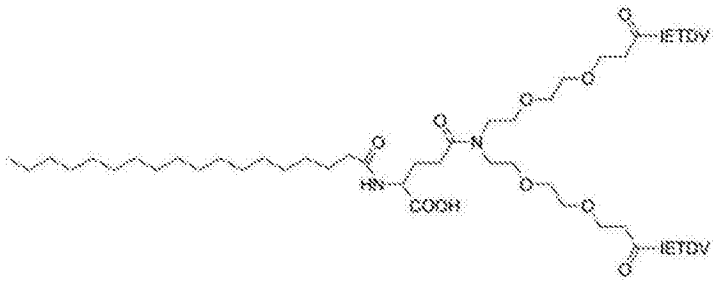
l) KBN54
(**2**)



m) KBN55
(**4**)

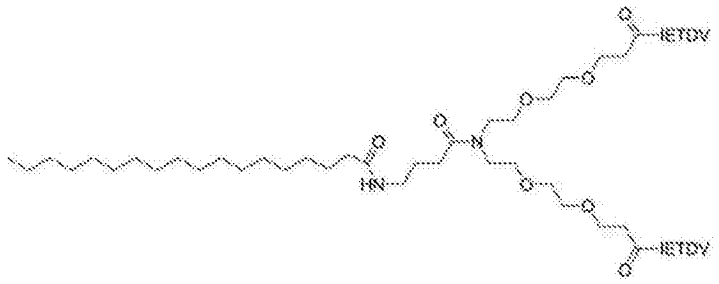


n) KBN63
(15)

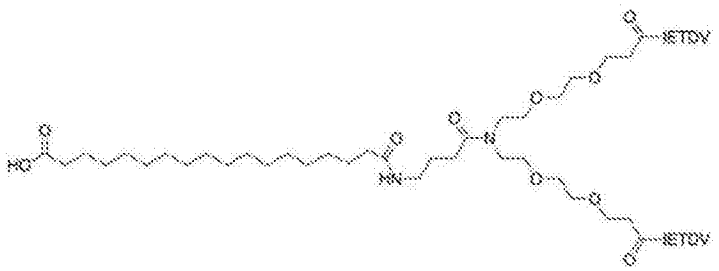


o) KBN64
(13)

[0140]



p) KBN65
(14)



[0141] 盐形式

[0142] 本文定义的化合物可以为所述化合物的药用盐或前药形式。在本发明的一个实施方案中，通式(I)、(II)、(III)、(IV)、(V)和(VI)中任一个定义的化合物可以配制为所述化合物的药用加成盐或水合物，例如但不限于K^+、Na^+盐以及非盐例如H^+。

[0143] III.医药用途

[0144] 在一个方面，本文定义的本发明化合物用作药物。

[0145] 在一个实施方案中，本文定义的化合物用于治疗或预防疼痛。

[0146] 在另一个实施方案中，本文定义的化合物用于治疗或预防兴奋性毒性相关疾病。

[0147] 在进一步的实施方案中，可通过本发明化合物治疗的疾病为CNS的缺血性或外伤性损伤。

[0148] IV.合成

[0149] 本文定义的本发明的脂肪酸衍生的PSD-95抑制剂可以通过包括如下一般步骤的方法制备：

[0150] a)制备Ns-NPEG二酸接头，

[0151] b)使用基于Fmoc的固相肽合成制备肽，

[0152] c)使Fmoc-脱保护的肽与Ns-NPEG二酸接头二聚，

[0153] d)任选通过中间体接头，例如氨基酸接头(L_2)，使脂肪酸与接头-二聚体缀合物偶

联。

[0154] 在一个实施方案中，可以如下所定义来合成本发明的化合物。

[0155] Ns-NPEG二酸接头：在固相上或在溶液中制备邻硝基苯磺酰基(Ns)-保护的NPEG接头。

[0156] 固相操作通常由用Fmoc-NH-PEG-CH_2CH_2COOH装载可用于固相肽合成的固体载体(例如2-氯三苯甲基氯树脂)开始，该操作使用针对具体树脂的合适的有机溶剂(例如DCM、DMF、ACN、THF)和碱(例如DIPEA、DBU、三甲基吡啶、NMM)。

[0157] Fmoc基团可以通过碱(例如哌啶、二甲基胺、吗啉、哌嗪、二环己基胺、DMAP)在适当溶剂(例如DMF、DCM、ACN、THF)中移去。

[0158] 可使用碱(例如DIPEA、DBU、三甲基吡啶、NMM)和适当溶剂(例如THF、DCM)使邻硝基苯磺酰氯与游离胺偶联以得到Ns-NH-PEG-CH_2CH_2COO-树脂。

[0159] 可通过使用Mitsunobu-化学将接头产物的第二部分与树脂连接的接头部分连接。用三苯基膦、HO-PEG-$CH_2CH_2COOtBu$、溶剂和偶氮二羧酸的酯或酰胺试剂(例如偶氮二羧酸二异丙酯，DIAD；偶氮二羧酸二乙酯，DEAD；1,1'-(偶氮二羰基)-二哌啶，ADDP)处理树脂。

[0160] 通过用酸例如三氟乙酸(TFA)处理树脂获得最终的Ns-NPEG二酸接头。

[0161] 固相操作可以通过如下进行：用Ns保护NH_2-PEG-$CH_2CH_2COOtBu$的氨基，随后使用三苯基膦和DIAD、DEAD或ADDP或类似试剂、HO-PEG-$CH_2CH_2COOtBu$和适当溶剂(THF、DCM)进行在溶液中的Mitsunobu化学。然后通过用酸例如TFA处理获得最终的Ns-保护的NPEG-接头。

[0162] 肽合成：通过基于Fmoc的固相肽合成使用固体载体(例如2-氯三苯甲基氯树脂或Wang树脂)、Fmoc-保护的氨基酸、碱、偶联试剂(例如HBTU[N,N,N′,N′-四甲基-O-(1H-苯并三唑-1-基)脲鎓六氟磷酸盐]、O-(7-氮杂苯并三唑-1-基)-N,N,N′,N′-四甲基脲鎓六氟磷酸盐[HATU]、PyBOB、DIC/HOBt)和溶剂合成肽序列。除了偶联试剂，还可以使用Fmoc-保护的氨基酸的活化酯(例如五氟苯基酯、琥珀酰亚胺酯)。

[0163] 二聚化：经树脂上二聚化(on-resin dimerization)方法通过在碱、偶联试剂和适当溶剂(例如DMF、DCM、THF)中用亚化学计量的量(例如1/6)的Ns-NPEG二酸接头反复处理树脂，使Fmoc-脱保护的树脂连接肽与Ns-NPEG二酸接头二聚化。除了偶联试剂外，还可以使用Ns-NPEG接头的活化酯。

[0164] 还可以使用Ns-NPEG接头的活化酯(例如五氟苯基酯、琥珀酰亚胺酯)以及1-羟基-7-氮杂苯并三唑(HOAt)或羟基苯并三唑(HOBt)和适当的侧链保护的肽(例如叔丁基)在溶剂(例如ACN、DMF、DCM、THF)中而在溶液中形成二聚化的方法。而且，溶液中的二聚化可以使用Ns-NPEG二酸接头、偶联试剂(例如HBTU、HATU等)、碱和溶剂来进行。

[0165] Ns-基团通过巯基乙醇和1,8-二氮杂二环[5.4.0]十一碳-7-烯(DBU)或者通过苯硫酚钠移去。

[0166] 接头和脂肪酸缀合：可以通过Fmoc-保护的接头(例如Fmoc-Glu-OtBu、Fmoc-GABA、Fmoc-5-Ava-OH)的连续偶联使用偶联试剂和用于活化的碱，使氨基酸接头与NPEG-二聚化的且树脂连接的肽的游离氮偶联。除了偶联试剂外，还可以使用Fmoc-保护的氨基酸接头的活化酯。随后通过脱保护方法移去Fmoc基团。

[0167] 使用偶联试剂和用于活化的碱使脂肪酸与接头-二聚体缀合物偶联。或者，作为活化酯偶联。如果脂肪酸含有羧基，除了与接头-二聚体缀合物的胺反应的羧基外，这些还可

以作为酯例如甲酯保护。

[0168] 可将脂肪酸-连接的二聚化配体与树脂分离并伴随使用酸例如TFA或HCl的侧链脱保护。

[0169] 可通过在含水碱(例如NaOH、LiOH)和乙腈中搅拌分离的产物,随后用TFA或HCl酸化来移去酯保护基团。

[0170] 通过冻干和HPLC纯化或者类似色谱方法获得本发明的化合物。

[0171] 在进一步的实施方案中,本发明的化合物的合成如实施例1所定义来进行。

[0172] 实施例

[0173] 实施例1:合成

[0174] 如先前所述合成树脂连接的NPEG4IETAV(SEQ ID NO:3)二聚化配体(I1)(Bach等人,PNAS USA,2012,109,3317-3322)。由此,通过两个连续偶联使用HATU作为偶联试剂、随后用哌啶/DMF脱保护,使适当保护的接头(分别为Fmoc-GABA-OH、Fmoc-(1)-Glu-OtBu和Fmoc-5-Ava)与NPEG4接头中的氮连接,得到中间体I2-4(图6)。使用固相肽合成条件容易得使脂肪酸(FA1-4,图6)与接头中释放的氮连接,并与树脂分离,同时伴随侧链保护基的脱保护。然后通过皂化分离的产物、随后酸化,移去单保护的FA构造块(十二烷二酸甲酯和十八烷二酸甲酯,FA2和FA4)的末端甲基保护基(图6)。冻干后,将粗产物溶于100%DMSO并通过大规模C18RP-HPLC纯化。冻干半纯的馏分(50-90%纯度),再次溶于DMSO/ACN/H_2O并通过制备C4RP-HPLC纯化(>95%纯度)。

[0175] 图6例示了FA-连接的二聚化配体(1-12)的合成。方案1的反应条件如下:(a)Fmoc-GABA-OH/Fmoc-(1)-Glu-OtBu/Fmoc-5-Ava,HATU,三甲基吡啶,DMF(1h x2),然后20%哌啶/DMF;(b)FA1/FA2/FA3/FA4,HBTU,DIPEA,DMF/DCM,45min,然后TFA/TIPS/H_2O(90/5/5);(c)0.5M LiOH,H_2O/ACN(75/25),30min,然后TFA至pH<2。三角形表示E和T是经侧链保护的(叔丁基)。

[0176] 十八烷二酸单甲酯(FA4)不是可商购得到的,而是通过用一当量的NaOH单皂化相应的二甲酯来合成,如先前所述(Jonassen等人,Pharm Res,2012,29,2104-2114)(图7)。

[0177] 总之,实施例1证明了本发明化合物可以合成并以纯的形式获得。

[0178] 实施例2:测定对HSA的亲和性的方法

[0179] 使用Transil^{XL} HAS结合测定试剂盒(Sovicell GMBH,Leipzig,Germany)评价合成的FA-连接的二聚化配体(1-12)的HSA亲和性。还针对比较测试了二聚化配体UCCB01-125(Bach等人,Angew.Chem,Int.Ed,2009,48,9685-9689)和UCCB01-144(Bach等人,PNAS USA,2012,109,3317-3322)(表1,图1)。

[0180] 测定试剂盒由具有增加浓度的固定HSA的预填充的孔以及两个无HSA的对照孔组成。已经以随机模式固定HSA以确保HSA上的所有结合位点是可用的。为了进行测定,用已知浓度的测试化合物孵育孔,并且使用分析RP-HPLC(C8柱)量化化合物的未结合量。由RP-HPLC数据通过与无HSA的对照样品比较来计算每个数据点的未结合药物的分数(f_u)。然后针对孔中总HSA浓度(c_{HSA})绘制每个数据点的HSA-结合药物($f_b=1-f_u$)与未结合药物的比例,并拟合为线性模型,如方程1所给出,从而得到作为拟合曲线的斜率的$1/K_D$。

[0181] 方程1:$\frac{f_b}{f_u}=\frac{1}{K_D}c_{HSA}$

[0182] 在方程1中，假定药物结合HSA的浓度([HSA-D])远低于孔中HSA的总浓度([HSA-D]<<c_{HSA})。已经设计了测定试剂盒，使得该假定对于其中f_u>1％的化合物是有效的。

[0183] 使用计算的K_D-值，使用方程2计算在HAS的生理浓度(588μM)的f_b。

[0184] 方程2：$f_b = 1 - \frac{1}{1 + \frac{c_{HSA}}{K_D}}$

[0185] 总之，实施例2证明了可以测定以及如何测定本发明化合物与人血清白蛋白(HSA)的结合。

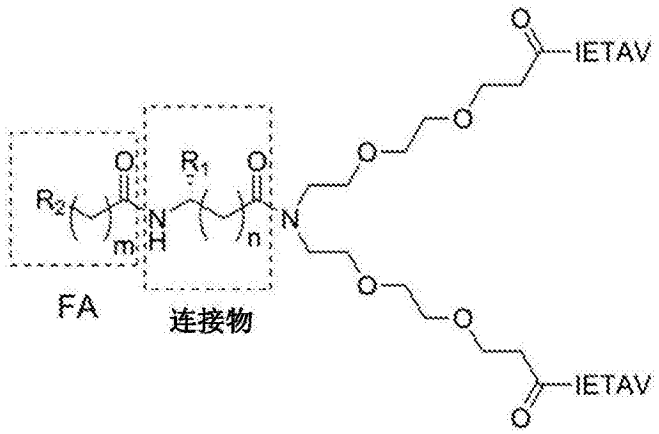
[0186] 实施例3：对HSA的亲和性

[0187] 不含FAs的二聚化配体UCCB01-125和UCCB01-144显示HSA亲和性分别为154.3μM和317.5μM，其相对于HSA结合分数(f_b)分别为75％和65％(表1)。然而，所有FA-连接的二聚化配体(1-12)显示与无FA的配体相比，对HSA的亲和性明显更高，且相应的f_b值更高(表1)。因此，这清楚地证明了作为将FA与二聚化配体缀合的结果，HSA结合得到了显著增强。

[0188] 与具有较短接头(GABA，γGlu)的化合物相比，含有较长5-Ava接头的化合物通常具有略低的对HAS的亲和性(表1，图2)。γGlu接头(R1)中的其他酸部分似乎对此处合成的FA-连接的二聚化配体的HSA亲和性没有任何影响(表1，图2)。这与其他蛋白质-配体体系中观察到的相反(Hackett等人，Adv Drug Deliv Rev，2013，65，1331-1339)，并且表明γGlu接头的游离羧酸酯不是本发明化合物与HSA连接的必需特征。

[0189] 与连接较短FAs(m＝10)的二聚化配体相比，与长FAs(m＝16)连接的二聚化配体显示更好的HSA亲和性(表1)；并且末端羧基(R2)对HSA亲和性具有负面影响(表1和图2)。

[0190] 表1：针对FA-连接的二聚化配体(1-12)和二聚化配体UCCB01-125和UCCB01-144的HAS结合以及结合化合物的计算分数[a]

[0191] 

[0192]

化合物	接头	FA	m	R_2	K_D(HSA) (μM)	f_b(%)
1	GABA, n=2, R_1=H	C12:0	10	CH_3	26.6 ± 1.1	95.7 ± 0.2
2		C11:0-COOH	10	COOH	49.3 ± 4.7	92.3 ± 0.7
3		C18:0	16	CH_3	4.8 ± 1.1	99.2 ± 0.2
4		C17:0-COOH	16	COOH	19.4 ± 3.6	96.5 ± 0.6
5	γGlu, n=2, R_1=COOH	C12:0	10	CH_3	25.8 ± 3.2	95.8 ± 0.5
6		C11:0-COOH	10	COOH	64.6 ± 9.3	90.1 ± 1.3
7		C18:0	16	CH_3	6.8 ± 1.2	98.9 ± 0.2
8		C17:0-COOH	16	COOH	34.3 ± 0.3	94.5 ± 0.1
9	5-Ava, n=3, R_1=H	C12:0	10	CH_3	55.7 ± 5.2	91.4 ± 0.7
10		C11:0-COOH	10	COOH	240.0 ± 11	71.0 ± 1.0
11		C18:0	16	CH_3	12.7 ± 0.9	97.9 ± 0.2
12		C17:0-COOH	16	COOH	23.5 ± 3.9	96.2 ± 0.6
UCCB01-125	-	-	-	-	154.3 ± 15.8	77.6 ± 1.8
UCCB01-144	-	-	-	-	317.5 ± 38.6	65.3 ± 2.9

[0193] [a]数据显示为平均值±SEM,n=3

[0194] 总之,实施例3证明了与非FA-衍生的二聚化参比肽相比,本发明化合物具有增加的HSA亲和性。

[0195] 实施例4:测定对PSD-95的PDZ1-2亲和性的方法:

[0196] 使用体外荧光偏振(FP)测定测量对PSD-95的亲和性,如Bach等人(PNAS USA,2012,109,3317-3322)所述。首先,获得饱和结合曲线以确定二聚化荧光探针和PSD-95PDZ1-2之间的相互作用的K_D值。于恒定浓度(0.5nM)的探针中加入增加浓度的PDZ1-2。在激发/发射波长635/670nm测量样品的荧光偏振,并使用程序GraphPad Prism将FP值拟合至一个位点结合模型。然后,在异种竞争结合测定中确定非荧光二聚化配体和PDZ1-2之间的亲和性,其中向固定浓度的二聚化探针(0.5nM)和PDZ1-2(4nM)中加入增加浓度的配体。在GraphPad Prism中将FP值拟合至一个位点竞争(可变斜率)模型。将所得IC_{50}转换为竞争抑制常数,K_i值,如Nikolovska-Coleska等人,Anal Biochem,2004,332,261-273所述。如上所述用1%HSA在该测定中进行改良的FP测定。

[0197] 总之,实施例4证明了如何测试本发明化合物与PSD-95的PDZ1-2的结合。

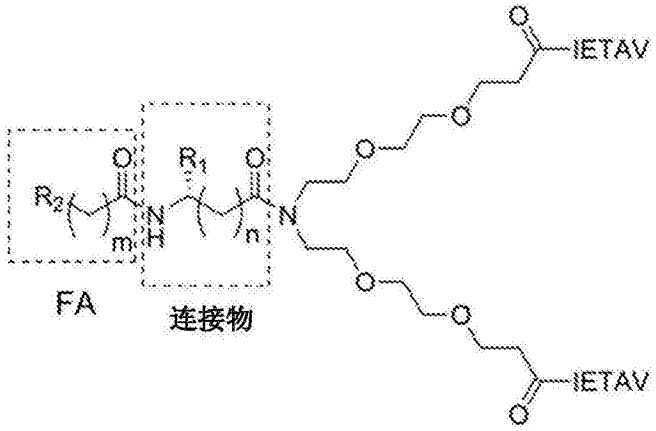
[0198] 实施例5:对PSD-95的PDZ1-2的亲和性:

[0199] 在FP测定中评价合成的FA-连接的二聚化配体对PSD-95 PDZ1-2的亲和性。使用UCCB01-125和UCCB01-144作为参比化合物(Bach等人,PNAS USA,2012,109,3317-3322)(表2,图3)。申请人首先使用简单的tris-缓冲盐水(TBS)缓冲剂测量亲和性(表2,图3A);但是,此外,申请人通过进行FP测定用存在于测定缓冲剂中的HSA研究HSA是否影响FA-连接的二聚体结合PSD95 PDZ1-2的能力(表2,图3B)。由于探针与较高浓度HSA的结合,此处将HSA浓度设定为1%(~150μM),其约为估计的生理学血液浓度(520-830μM)的四分之一(Kragh-Hansen等人,Biol Pharm Bull 2002,25,695-704)。

[0200] 对于传统小分子药物,普遍接受的是药物的未结合部分自由扩散穿过膜并且通过

与其靶标相互作用发挥生理学效应(Berezhkovskiy等人,J Pharm Sci2007,96,249-257)。即,如果药物与另一分子结合,则其不能同时与靶标相互作用。为了说明这一点,在150μM的HSA浓度由方程2(fu=1-fb)计算未结合药物分数(fu),并且针对计算的fu校正FP测定数据(TBS+HSA)(表2,图3C)。

[0201] 表2:如经FP[a]测定的FA-连接的二聚化配体(1-12)和二聚化配体(UCCB01-125和UCCB01-144)的对PSD-95PDZ1-2的亲和性、未结合药物的计算分数(f_u)[b]、f_u-校正的FP数据[a]以及如经RP-HPLC(C8柱)[c]测定的化合物的保留时间(R_t)。

[0202] 

[0203]

化合物	接头	FA	m	R_2	K_i(PSD95) (nM)	K_i(PSD95) + HSA (nM)	f_u (%)	K_i(PSD95), 游离配体 (nM)	R_t (min)
1	GABA n=2, R_1=H	C12:0	10	CH_3	13.6 ± 0.6	27.2 ± 2.9	15.1	3.2 ± 1.0	46
2		C11:0-COOH	10	COOH	15.4 ± 1.2	27.9 ± 2.7	24.7	5.5 ± 0.7	38
3		C18:0	16	CH_3	11.1 ±0.6	1889± 155	3.1	57.2± 4.9	61
4		C17:0-COOH	16	COOH	11.4 ± 0.6	5717 ± 298	11.5	654± 34	48
5	γGlu, n=2, R_1=COOH	C12:0	10	CH_3	30.2 ± 4.2	24.0 ± 0.6	14.7	2.4 ± 0.1	46
6		C11:0-COOH	10	COOH	33.7 ± 1.6	26.4 ± 2.6	30.1	7.0 ± 0.9	37
7		C18:0	16	CH_3	17.0 ± 0.6	1391 ± 184	4.3	59.1 ± 7.8	59
8		C17:0-COOH	16	COOH	9.2 ± 1.6	3594± 132	18.6	669± 25	47
9	5-Ava, n=2, R_1=H	C12:0	10	CH_3	20.5 ± 1.1	13.4 ± 1.4	27.1	2.6± 0.5	48
10		C11:0-COOH	10	COOH	13.9 ± 2.1	18.5 ± 0.6	61.5	10.9 ± 0.4	38
11		C18:0	16	CH_3	26.5 ± 0.2	1889 ± 100	7.8	16.8 ± 3.3	61
12		C17:0-COOH	16	COOH	11.5 ± 1.2	2926± 335	8.3	250±37	49
UCCB01-125	-	-	-	-	-	14.3 ± 1.1	9.7 ± 1.0	50.7	4.1 ± 0.5	28
UCCB01-144	-	-	-	-	-	4.3 ± 0.1	10.5 ± 0.9	67.9	6.7 ± 0.6	24

[0204] [a]在TBS和含1%HSA的TBS中记录FP数据。数据显示为平均值±SEM,n≥3.

[0205] [b]根据方程2计算的F_u,f_b=1-f_u,[c]n=1.

[0206] 对于所有FA-连接的二聚化配体而言,其在TBS中对PSD-95 PDZ1-2的亲和性与UCCB01-125的亲和性是可比的(表2,图3A),这表明PSD-95PDZ1-2亲和性不受FA-衍生化影响。

[0207] 含1%HSA的TBS中的PSD-95 PDZ1-2亲和性在化合物之间显著并且系统地变化(表2,图3B)。与较长FAs(C18:0或C17:0-COOH)连接的二聚化配体所具有的PSD-95 PDZ1-2亲和

性通常明显小于与较短FAs(C12:0或C11:0-COOH)连接的二聚化配体的亲和性的1/50。

[0208] 当针对fu校正FP数据时(表2,图3C),显示每个接头系列内PSD-95PDZ1-2亲和性的系统排序。C12:0-连接的二聚化配体(1、5、9)具有最高亲和性,随后是C11:0-COOH(2、6、10)、C18:0(3、7、11)和C17:0-COOH(4、8、12)。

[0209] Fu-校正的FP数据还显示当在TBS+HSA中进行FP测量时,观察到的C18:0-连接的二聚化配体3、7和11的50-倍亲和性损失主要由化合物与HSA的高度结合导致,尽管与TBS中记录的FP数据相比3和7观察到4-5倍的PSD-95亲和性降低(3:K_i=57.2nM vs 11.1nM;7:K_i=59.1nM vs 17.0nM,表2),但是在目前的情况下,亲和性降低是HSA-依赖性的,这是因为在TBS中未观察到亲和性下降。

[0210] 两个5-Ava-连接的二聚化配体11和12与相应的GABA和γGlu-连接的二聚化配体(3、4、7和8)相比,受HAS的影响较少。

[0211] 总之,实施例5证明了本发明的化合物与PSD-95的PDZ1-2结合。

[0212] 实施例6:FA-连接的二聚化配体的疏水性

[0213] 具有对HSA最高亲和性的化合物(3、7、11)也是最具疏水性的合成化合物,如通过分析性RP-HPLC测定的保留时间(R_t)判断(表2)。为了增加亲水性并由此增加这些化合物的溶解度,制备3和7的类似物,其中用IETDV(SEQ ID NO:4)而非IETAV(SEQ ID NO:3)替换肽序列(13,15;表3),这是因为由Asp(D)部分引入的额外电荷可以增加二聚体的亲水性。也合成了含有末端酸部分的最高HSA亲和性化合物的IETDV类似物(4)并测试(14)用于比较。使用适当的肽序列(IETDV)作为起始点与1-12类似地合成这些FA连接的二聚体(图6)。

[0214] 相对于基于IETAV的化合物(3、4、7)而言,HPLC分析显示对于基于IETDV的化合物(13-15)的R_t值较小地减少或没有减少,并且因此疏水性较小地降低或没有降低;但是观察到HSA亲和性系统地降低(表3)。例如,在分析性RP-HPLC上13比IETAV类似物早3分钟洗脱出(13:58min,3:61min,表3),但是HSA亲和性降低(13:K_D=83.0μM,3:K_D=4.8μM,表3)。

[0215] 表3:具有不同肽序列的FA-连接的二聚类似物的比较。3、4和7肽序列IETAV(SEQ ID NO:3);13、14和15肽序列IETDV(SEQ ID NO:4)。

[0216]

化合物	接头	FA	K_D(HSA) (μM)	K_i(PSD-95) (nM)	K_i(PSD-95) + HSA (nM)	f_u (%)	K_i(PSD-95), 游离配体 (nM)	R_t (min)
3	GABA	C18:0	4.8 ± 1.1	11.1 ±0.6	1889± 155	3.1	57.2± 4.9	61
4	GABA	C17:0-COOH	19.4 ± 3.6	11.4 ± 0.6	5717± 298	11.5	654± 34	48
7	γGlu	C18:0	6.8 ± 1.2	17.0 ± 0.6	1391 ± 184	4.3	59.1 ± 7.8	59

[0217]

13	GABA	C18:0	83.0 ± 11.0	8.0 ± 0.8	2514± 149	35.6	896 ± 53	58
14	GABA	C17:0-COOH	116.0 ± 7.6	29.3 ± 0.7	770± 27	43.6	1097 ± 65	47
15	γGlu	C18:0	55.0 ± 3.4	6.7 ± 0.6	3806± 287	26.8	1022 ± 77	59

[0218] 总之,实施例6证明了HSA亲和性不仅依赖于选择的脂肪酸,而且依赖于选择的肽序列。

[0219] 实施例7:化合物1、4、7和13的血浆稳定性

[0220] 在改良版本的体外血浆稳定性测定中评价1、4、7和13的血浆稳定性(Bach等人,Angew.Chem,Int.Ed,2009,48,9685-9689)。在原始操作中,在人血浆中孵育研究的化合物。然后在合适的时间点将样品取出并通过用三氯乙酸(TCA)沉淀除去血清蛋白,然后通过RP-HPLC分析上清液。将获得的峰面积标准化为T_0的量并拟合至一阶衰减模型以计算半衰期。当将该方法应用于FA-连接的二聚化配体时,样品回收率低(<5%)。这是由在TCA沉淀期间除去作为HSA-结合的复合物的FA-连接的二聚化配体导致。因此,在TCA沉淀之前,进行样品在固体盐酸胍(GnHCl)中的溶解至6M最终浓度。其目的是呈现样品中的HSA,由此释放FA-连接的二聚化配体。

[0221] 在体外血浆稳定性测定中所有FA-连接的二聚化配体比UCCB01-125更稳定(图4)。不受理论限制,预期这是由于化合物的更高HSA结合,由此降低了酶消化可得的游离化合物浓度。含有较短C12:0FA的化合物(1)比高度稳定的含有更长C18:0或C17:0-COOH FA的化合物降解更快(4、7、13)。延长的稳定性可解释为增加的HSA亲和性(其防止蛋白酶使基于二聚肽的化合物分裂)以及经FA介导的位阻。

[0222] 总之,实施例7证明了体外评价血浆稳定性的方法,且与非FA-连接的参比化合物相比,本发明的FA连接的二聚化合物具有增加的血浆稳定性和半衰期。

[0223] 实施例8:体内药代动力学研究

[0224] 为了测定FA-连接的化合物的药代动力学性质,申请人在雄性Wistar大鼠中单次皮下(s.c.)推注后通过LC-MS/MS测量血液中所选化合物的浓度(图5)。由此,显而易见的是所有FA-连接的二聚化配体与无FA的二聚化配体(UCCB01-125)相比具有较长的$T_{1/2}$和更大的T_{max}(表4和图5)。1的效果最小,但是4、7和13非常显著,其显示$T_{1/2}$大于8小时,相当于与UCCB01-125相比>16-倍增加。增加的T_{max}可解释为由注射位点的延长的吸收。总之,这些性质能够通过皮下储库注射给药并且由此缓慢和持续释放化合物进入血液,由此需要较少给药即可保持药物相关血液浓度。

[0225] 表4:大鼠中皮下注射后FA-连接的二聚化配体的药代动力学参数

[0226]

化合物	接头	FA	肽序列	剂量 (mg/kg)	$T_{½}$ (h)[a]	T_{max} (h)[a]
UCCB01-125	-	-	IETAV	3	0.561 ± 0.101	0.5 ± 0
				30	0.450 ± 0.068	0.5 ± 0
1	GABA	C12	IETAV	15	0.768 ± 0.045	0.833 ± 0.167
4	GABA	C17:0-COOH	IETAV	15	8.13 ± 0.50	4.67 ± 0.66
7	γGlu	C18:0	IETAV	10	10.7 ± 0.58	6.00 ± 1.15
13	GABA	C18:0	IETDV	10	16.3 ± 2.81	8.00 ± 0

[0227] [a]数据表示为平均值±SEM,n=3。

[0228] 实施例9:序列

[0229] SEQ ID NO:1

[0230] $X_4X_3X_2X_1$

[0231] 其中

[0232] X_4为选自E、Q、A、N和S的氨基酸残基,

[0233] X_3为选自S和T的氨基酸残基，

[0234] X_2为选自A、D、E、Q、N、S、V、N-Me-A、N-Me-D、N-Me-E、N-Me-Q、N-Me-N、N-Me-S和N-Me-V的氨基酸残基，

[0235] X_1为选自I、L和V的氨基酸残基。

[0236] SEQ ID NO:2

[0237] $Z_4Z_3Z_2Z_1$

[0238] 其中

[0239] Z_4为选自E、Q、A、N和S的氨基酸残基，

[0240] Z_3为选自S和T的氨基酸残基，

[0241] Z_2为选自A、D、E、Q、N、S、V、N-Me-A、N-Me-D、N-Me-E、N-Me-Q、N-Me-N、N-Me-S和N-Me-V的氨基酸残基，

[0242] Z_1为选自I、L和V的氨基酸残基。

[0243] SEQ ID NO:3

[0244] IETAV

[0245] SEQ ID NO:4

[0246] IETDV

[0247] SEQ ID NO:5

[0248] $X_5X_4X_3X_2X_1$

[0249] 其中

[0250] X_5为任意氨基酸残基，

[0251] X_4为选自E、Q、A、N和S的氨基酸残基，

[0252] X_3为选自S和T的氨基酸残基，

[0253] X_2为选自A、D、E、Q、N、S、V、N-Me-A、N-Me-D、N-Me-E、N-Me-Q、N-Me-N、N-Me-S和N-Me-V的氨基酸残基，

[0254] X_1为选自I、L和V的氨基酸残基。

[0255] SEQ ID NO:6

[0256] $Z_5Z_4Z_3Z_2Z_1$

[0257] 其中

[0258] Z_5为任意氨基酸残基，

[0259] Z_4为选自E、Q、A、N和S的氨基酸残基，

[0260] Z_3为选自S和T的氨基酸残基，

[0261] Z_2为选自A、D、E、Q、N、S、V、N-Me-A、N-Me-D、N-Me-E、N-Me-Q、N-Me-N、N-Me-S和N-Me-V的氨基酸残基，

[0262] Z_1为选自I、L和V的氨基酸残基。

序列表

<110> 哥本哈根大学

<120> PSD-95 的二聚抑制剂的脂肪酸衍生物

<130> P3416PC00

<160> 6

<170> 专利版本 3.5

<210> 1
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> X 独立为任何氨基酸

[0001] <220>
<221> 位点
<222> (1)..(4)
<223> 肽 1

<220>
<221> 位点
<222> (1)..(1)
<223> 说明书中的 X4; 选自 E、Q、A、N 和 S 的氨基酸残基

<220>
<221> 位点
<222> (2)..(2)
<223> 说明书中的 X3; 选自 S 和 T 的氨基酸残基

<220>
<221> 位点
<222> (3)..(3)
<223> 说明书中的 X2; 选自 A、D、E、Q、N、S、V、N-Me-A、N-Me-D、N-Me-E、N-Me-Q、N-Me-N、N-Me-S 和 N-Me-V 的氨基酸残基

<220>

<221> 位点
<222> (4)..(4)
<223> 说明书中的 X1; 选自 I、L 和 V 的氨基酸残基

<400> 1

Xaa Xaa Xaa Xaa
1

<210> 2
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> X 独立为任何氨基酸

<220>
<221> 位点
<222> (1)..(4)
[0002] <223> 肽 2

<220>
<221> 位点
<222> (1)..(1)
<223> 说明书中的 Z4; 选自 E、Q、A、N 和 S 的氨基酸残基

<220>
<221> 位点
<222> (2)..(2)
<223> 说明书中的 Z3; 选自 S 和 T 的氨基酸残基

<220>
<221> 位点
<222> (3)..(3)
<223> 说明书中的 Z2; 选自 A、D、E、Q、N、S、V、N-Me-A、N-Me-D、N-Me-E、N-Me-Q、N-Me-N、N-Me-S 和 N-Me-V 的氨基酸残基

<220>
<221> 位点
<222> (4)..(4)
<223> 说明书中的 Z1; 选自 I、L 和 V 的氨基酸残基

<400> 2

Xaa Xaa Xaa Xaa
1

<210> 3
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 特定肽

<220>
<221> 肽
<222> (1)..(5)
<223> 特定肽

<400> 3

[0003]

Ile Glu Thr Ala Val
1 5

<210> 4
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 特定肽

<220>
<221> 肽
<222> (1)..(5)
<223> 特定肽

<400> 4

Ile Glu Thr Asp Val

1 5

<210> 5
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> X 独立为任何氨基酸

<220>
<221> 位点
<222> (1)..(1)
<223> 说明书中的 X5; 任何氨基酸残基

<220>
<221> 位点
<222> (2)..(2)
<223> 说明书中的 X4; 选自 E、Q、A、N 和 S 的氨基酸残基

[0004]

<220>
<221> 位点
<222> (3)..(3)
<223> 说明书中的 X3; 选自 S 和 T 的氨基酸残基

<220>
<221> 位点
<222> (4)..(4)
<223> 说明书中的 X2; 选自 A、D、E、Q、N、S、V、N-Me-A、N-Me-D、N-Me-E、N-Me-Q、N-Me-N、N-Me-S 和 N-Me-V 的氨基酸残基

<220>
<221> 位点
<222> (5)..(5)
<223> 说明书中的 X1; 选自 I、L 和 V 的氨基酸残基

<400> 5

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5

[0005]

<210> 6
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> X 独立为任何氨基酸

<220>
<221> 位点
<222> (1)..(1)
<223> 说明书中的 Z5; 任何氨基酸残基

<220>
<221> 位点
<222> (2)..(2)
<223> 说明书中的 Z4; 选自 E、Q、A、N 和 S 的氨基酸残基

<220>
<221> 位点
<222> (3)..(3)
<223> 说明书中的 Z3; 选自 S 和 T 的氨基酸残基

<220>
<221> 位点
<222> (4)..(4)
<223> 说明书中的 Z2; 选自 A、D、E、Q、N、S、V、N-Me-A、N-Me-D、N-Me-E、N-Me-Q、N-Me-N、N-Me-S 和 N-Me-V 的氨基酸残基

<220>
<221> 位点
<222> (5)..(5)
<223> 说明书中的 Z1; 选自 I、L 和 V 的氨基酸残基

<400> 6

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5

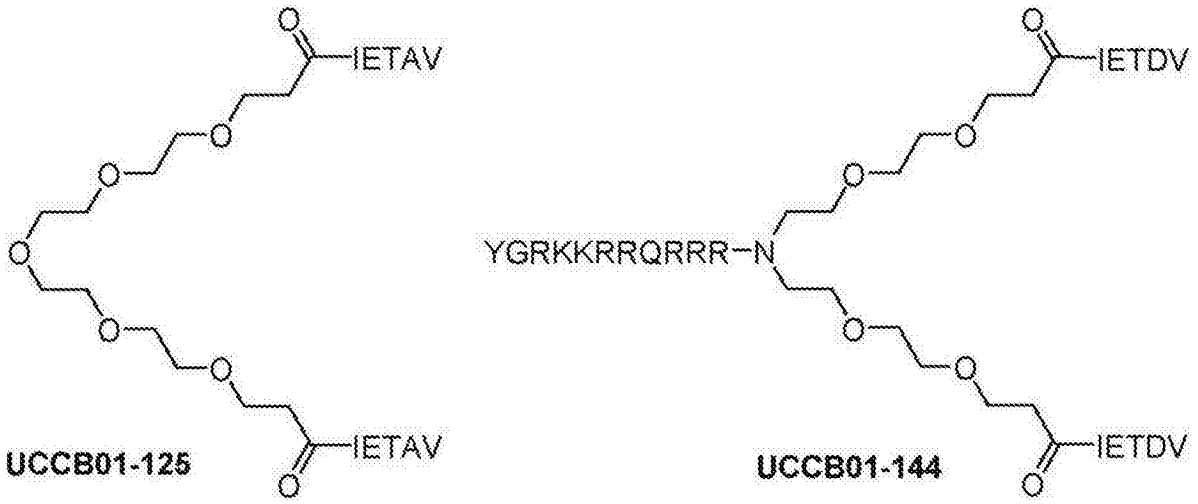


图1

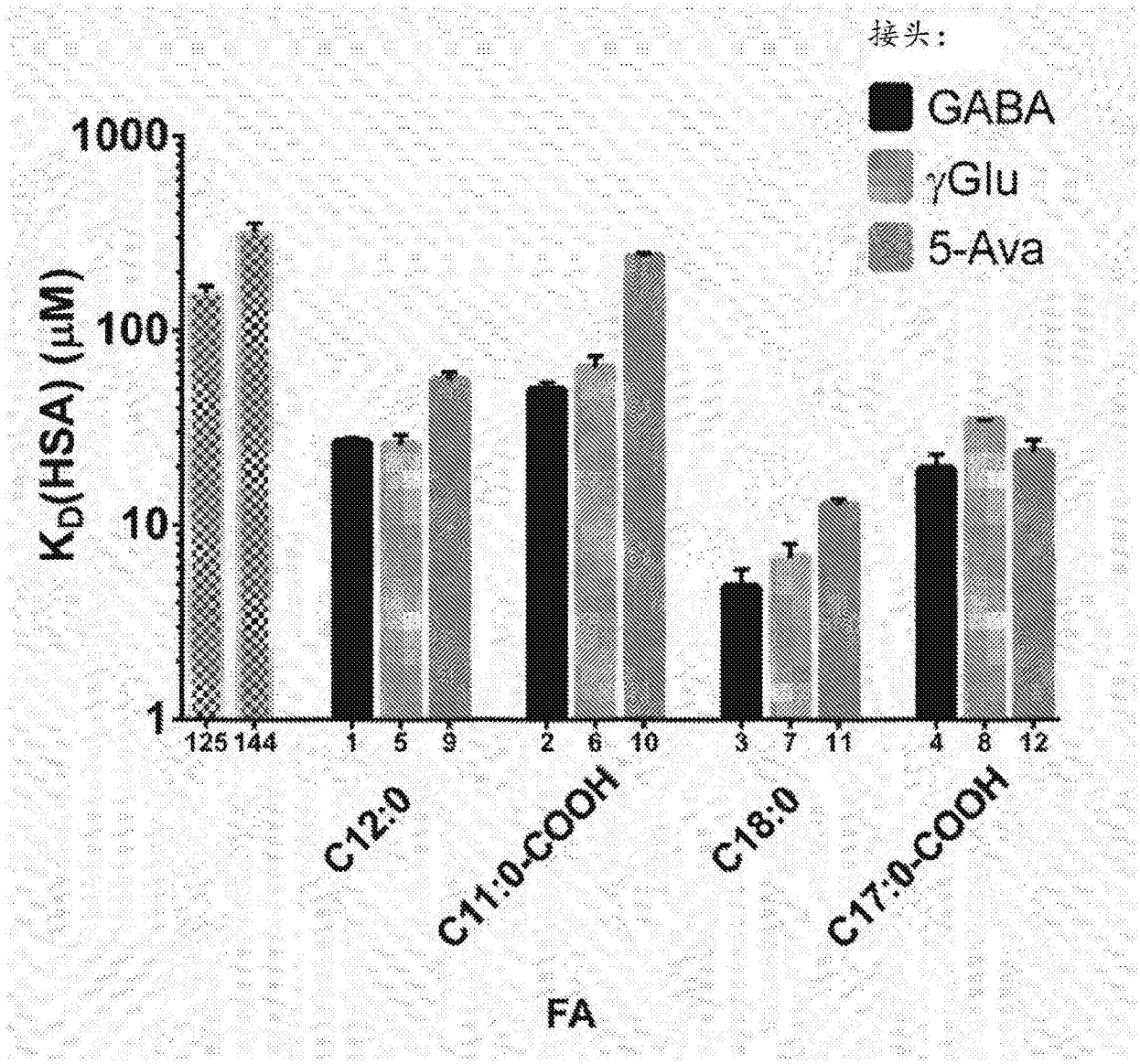

接头:
GABA
γGlu
5-Ava
1000
100
10
1
K_D(HSA) (μM)
125 144 1 5 9 2 6 10 3 7 11 4 8 12
C12:0
C11:0-COOH
C18:0
C17:0-COOH
FA

图2

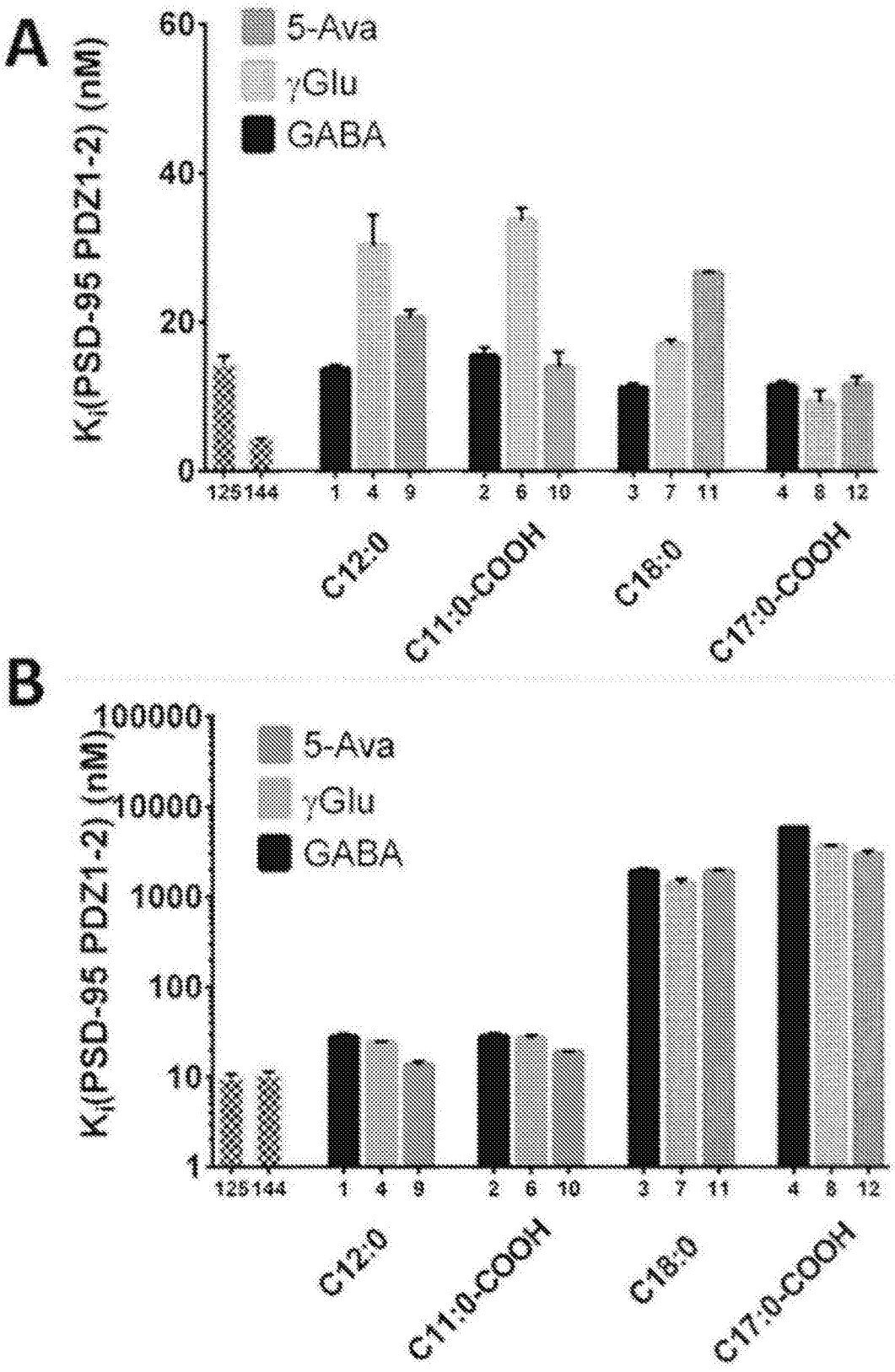

A
B
5-Ava
γGlu
GABA
Ki(PSD-95 PDZ1-2) (nM)
60
40
20
0
100000
10000
1000
100
10
1
125 144 1 4 9 2 6 10 3 7 11 4 8 12
C12:0
C11:0-COOH
C18:0
C17:0-COOH

图3

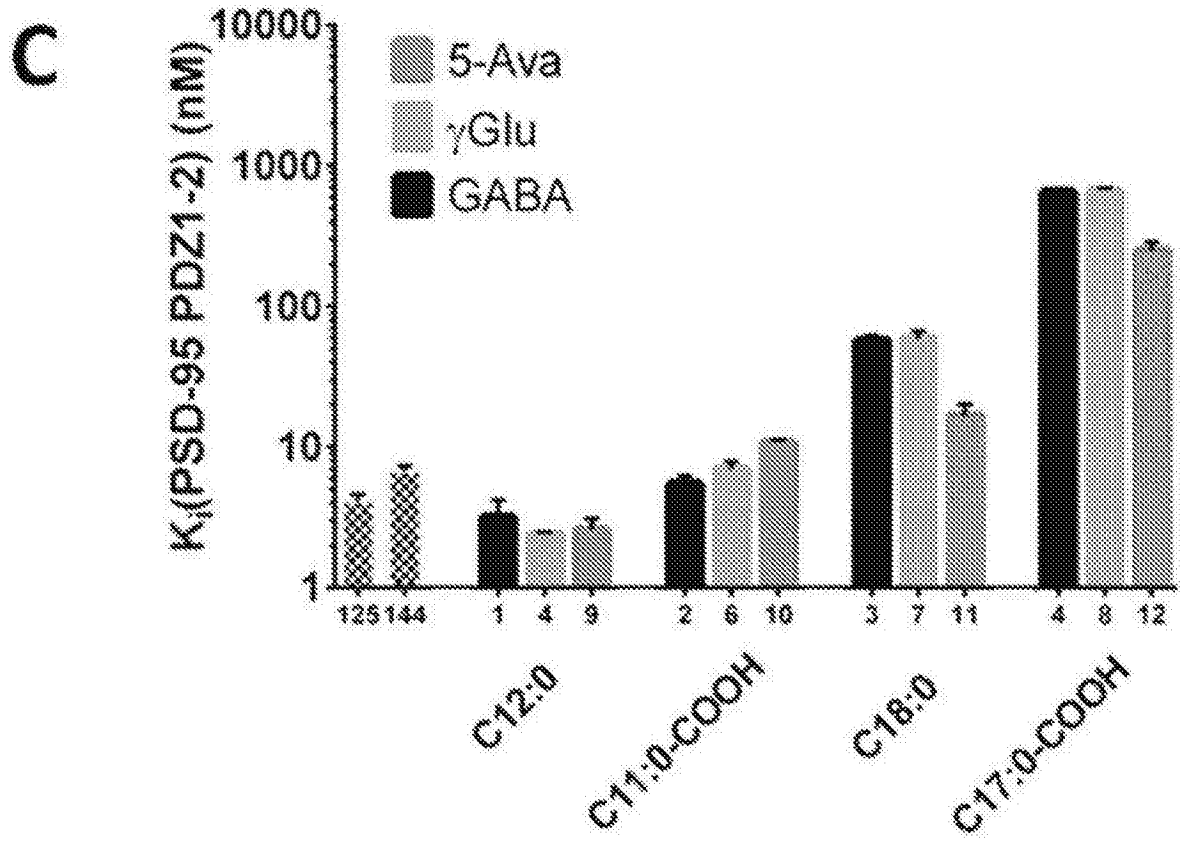

C
10000
1000
100
10
1
K_i(PSD-95 PDZ1-2) (nM)
5-Ava
γGlu
GABA
125 144 1 4 9 2 6 10 3 7 11 4 8 12
C12:0
C11:0-COOH
C18:0
C17:0-COOH

图3(续)

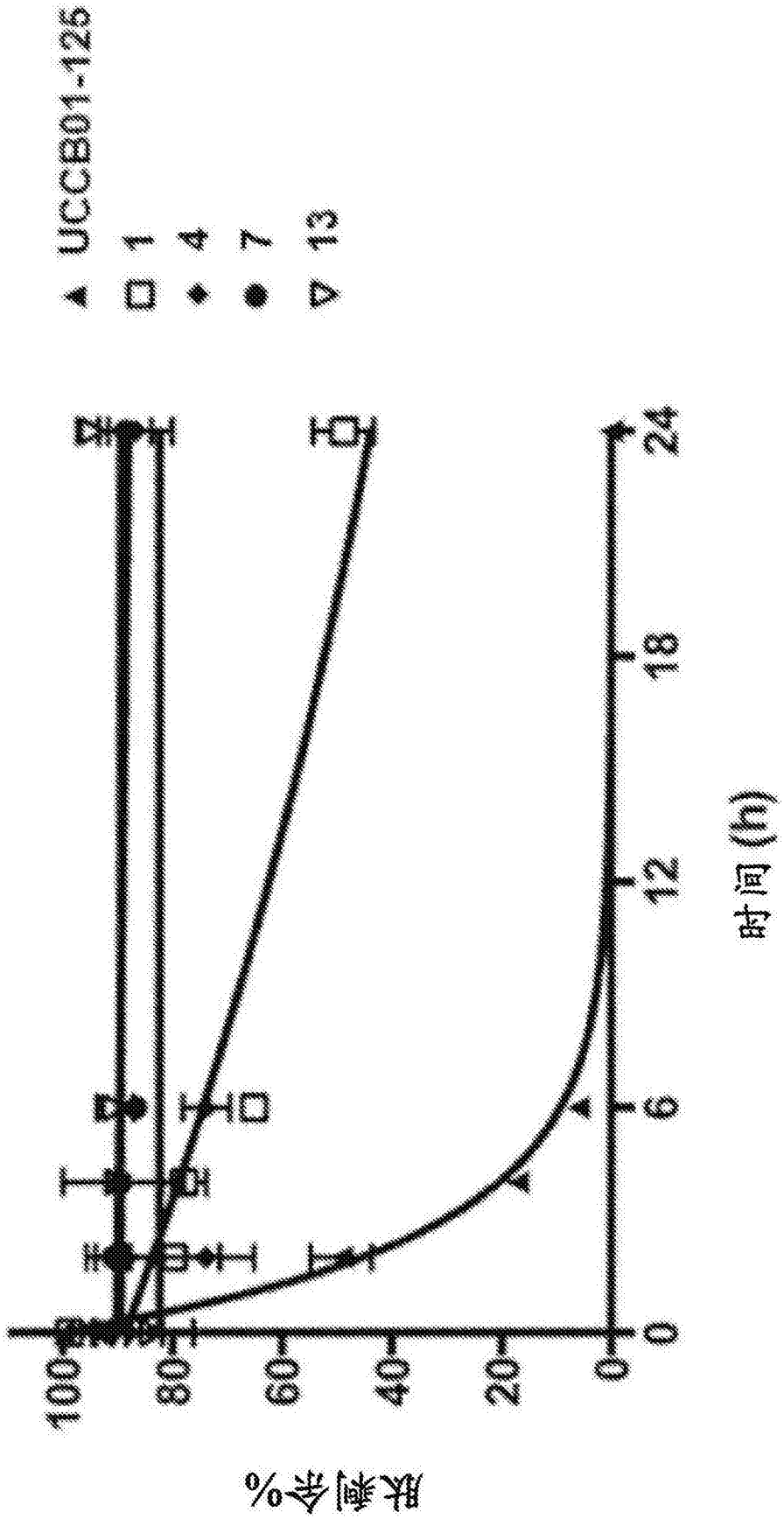


图4

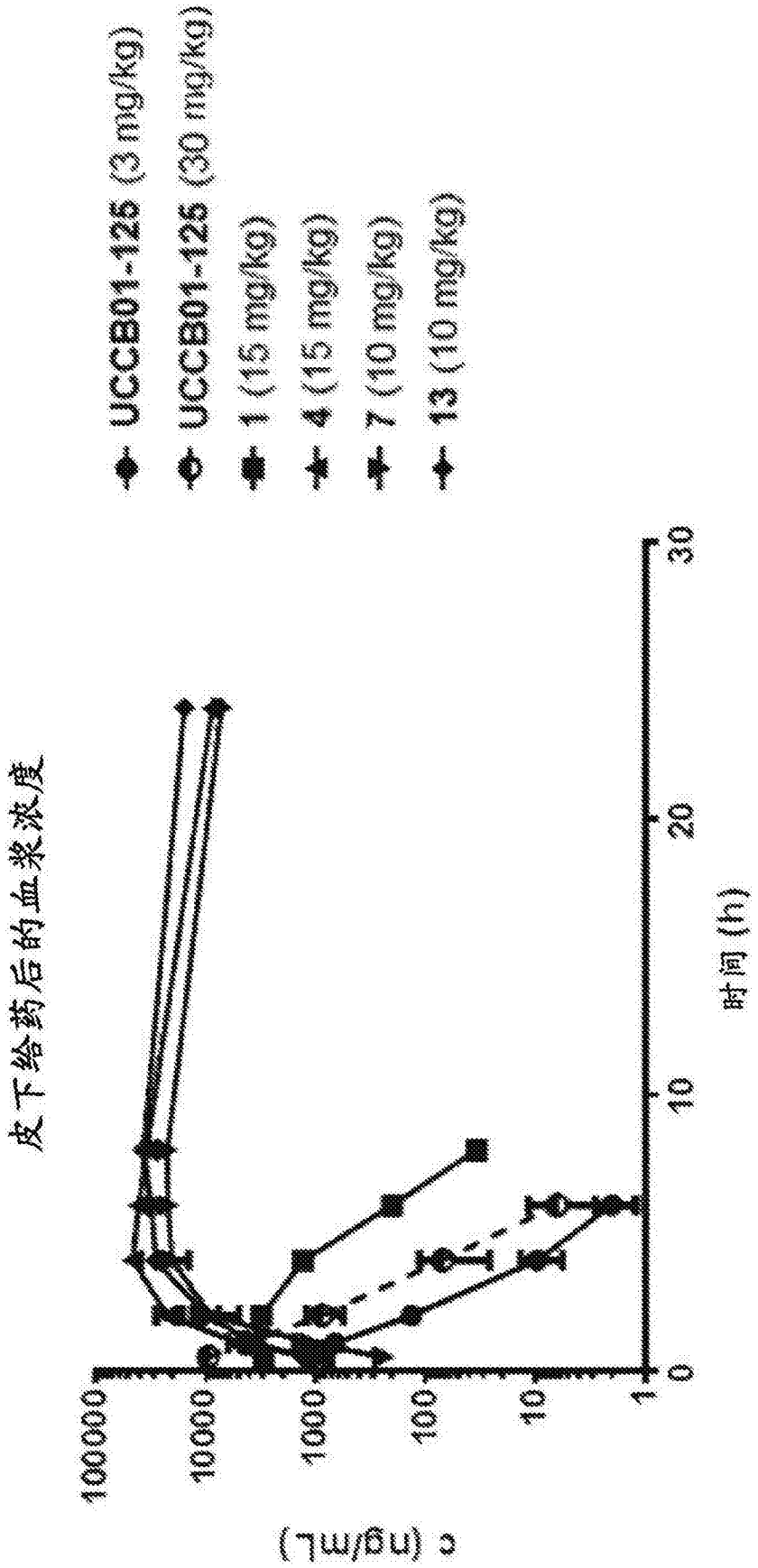

UCCB01-125 (3 mg/kg)
UCCB01-125 (30 mg/kg)
1 (15 mg/kg)
4 (15 mg/kg)
7 (10 mg/kg)
13 (10 mg/kg)
皮下给药后的血浆浓度
c (ng/mL)
100000
10000
1000
100
10
1
0
10
20
30
时间 (h)

图5

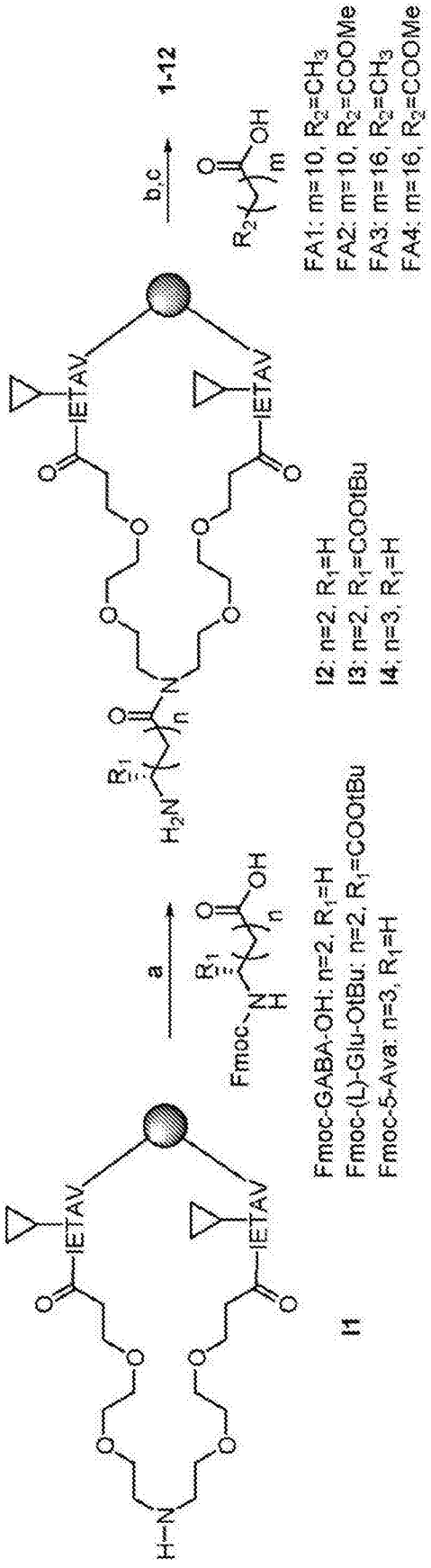

I1
a
Fmoc-GABA-OH: n=2, R1=H
Fmoc-(L)-Glu-OtBu: n=2, R1=COOtBu
Fmoc-5-Ava: n=3, R1=H
I2: n=2, R1=H
I3: n=2, R1=COOtBu
I4: n=3, R1=H
b,c
1-12
FA1: m=10, R2=CH3
FA2: m=10, R2=COOMe
FA3: m=16, R2=CH3
FA4: m=16, R2=COOMe

图6

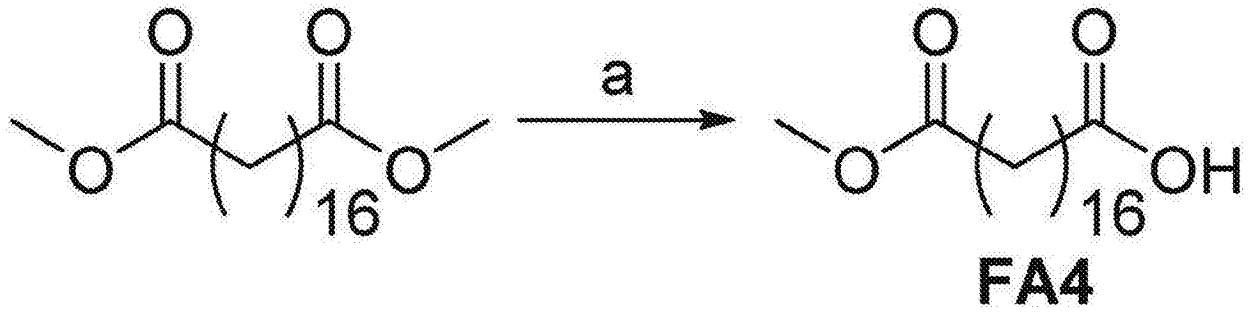


图7