



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117567639 A

(43) 申请公布日 2024. 02. 20

(21) 申请号 202311469512.8

A61K 47/60 (2017.01)

(22) 申请日 2018.10.28

A61K 38/10 (2006.01)

(30) 优先权数据

A61P 35/00 (2006.01)

62/578,213 2017.10.27 US

A61P 29/00 (2006.01)

A61P 37/02 (2006.01)

(62) 分案原申请数据

201880070271.0 2018.10.28

(71) 申请人 俄亥俄州国家创新基金会

地址 美国俄亥俄州

(72) 发明人 裴德华

(74) 专利代理机构 北京柏杉松知识产权代理事

务所(普通合伙) 11413

专利代理师 于作琛 王春伟

(51) Int. Cl.

C07K 19/00 (2006.01)

A61K 47/64 (2017.01)

权利要求书3页 说明书42页

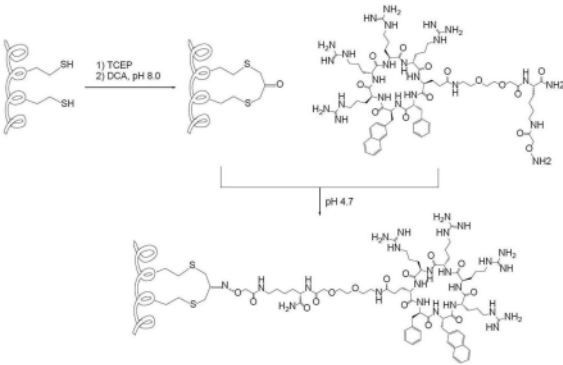
序列表(电子公布) 附图51页

(54) 发明名称

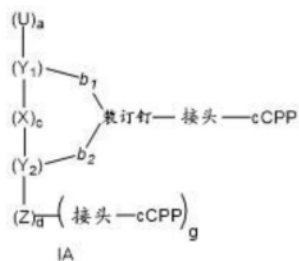
用于细胞内递送装订肽的多肽缀合物

(57) 摘要

本公开提供了新颖的多肽缀合物。本文公开的所述多肽缀合物包含装订肽,所述装订肽包含肽和以 α 螺旋构象保持所述肽的至少一个装订钉;以及环状细胞穿膜肽(cCPP),所述cCPP直接或间接地缀合至所述装订肽。本公开证明了cCPP可用于赋予装订肽一致的细胞渗透性。



1. 一种多肽缀合物, 其中所述多肽缀合物具有根据式IA的结构:



其中:

在每种情况下,X和Z中的每一者独立地选自氨基酸;

U在每种情况下独立地选自氨基酸;

a为3至6;

c为3;

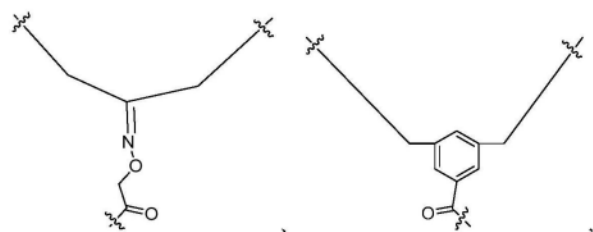
d为3至6;

g为0;

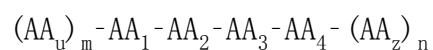
Y_1 是半胱氨酸, 其中 b_1 为半胱氨酸上的硫原子;

Y_2 是半胱氨酸, 其中 b_2 为半胱氨酸上的硫原子;

其中装订钉包括具有下式的基团:



其中所述cCPP是具有包含式II的序列的环状肽:



II

其中:

AA_u 、 AA_1 、 AA_2 、 AA_3 、 AA_4 和 AA_z 中的每一者独立地选自D或L氨基酸,m和n中的每一者为1;并

且

其中:

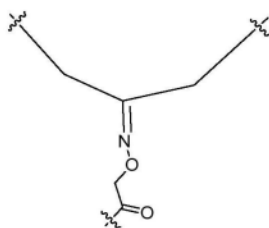
AA_u 、 AA_1 、 AA_2 、 AA_3 、 AA_4 和 AA_z 中的至少两个独立地为精氨酸, 并且

AA_u 、 AA_1 、 AA_2 、 AA_3 、 AA_4 和 AA_z 中的至少两个独立地为疏水氨基酸。

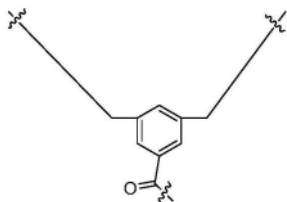
2. 根据权利要求1所述的多肽缀合物, 其中a为3或4。

3. 根据权利要求1或2所述的多肽缀合物, 其中d为3或4。

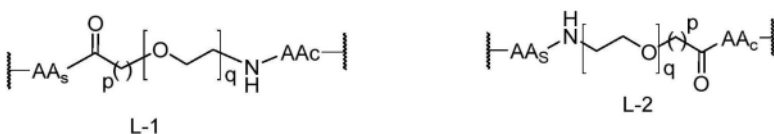
4. 根据权利要求1-3中任一项所述的多肽缀合物, 其中装订钉包括具有下式的基团:



5. 根据权利要求1-3中任一项所述的多肽缀合物,其中装订钉包括具有下式的基团:



6. 根据权利要求1-5中任一项所述的多肽缀合物,其中所述接头具有L-1或L-2的结构:



其中

AA_s是装订钉上的氨基酸的侧链或末端;

AA_c是cCPP的氨基酸的侧链或末端;

p是0至10的整数;并且

q是1至50的整数。

7. 根据权利要求1-6中任一项所述的多肽缀合物,其中AA_u、AA₁、AA₂、AA₃、AA₄和AA_z中的至少三个独立地为精氨酸。

8. 根据权利要求1-6中任一项所述的多肽缀合物,其中AA_u、AA₁、AA₂、AA₃、AA₄和AA_z中的四个独立地为精氨酸。

9. 根据权利要求7或8所述的多肽缀合物,其中三个精氨酸彼此相邻。

10. 根据权利要求7-9中任一项所述的多肽缀合物,其中三个疏水氨基酸彼此相邻。

11. 根据权利要求7-10中任一项所述的多肽缀合物,其中三个疏水氨基酸是连续的并且三个精氨酸是连续的。

12. 根据权利要求1-11中任一项所述的多肽缀合物,其中AA_u、AA₁、AA₂、AA₃、AA₄和AA_z中的至少三个相对具有交替立体化学构造。

13. 根据权利要求1-12中任一项所述的多肽缀合物,其中AA_u、AA₁、AA₂、AA₃、AA₄和AA_z中的每个疏水氨基酸独立地选自甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、蛋氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、脯氨酸、萘丙氨酸、苯甘氨酸、均苯丙氨酸、酪氨酸、环己丙氨酸、哌啶-2-羧酸、环己丙氨酸、去亮氨酸、3-(3-苯并噻吩基)-丙氨酸、3-(2-喹啉基)-丙氨酸、O-苄基丝氨酸、3-(4-(苄氧基)苯基)-丙氨酸、S-(4-甲基苄基)半胱氨酸、N-(萘-2-基)谷氨酰胺、3-(1,1'-联苯-4-基)-丙氨酸、叔亮氨酸或烟碱酰赖氨酸,每一者任选地由一个或多个取代基取代。

14. 根据权利要求1-13中任一项所述的多肽缀合物,其中AA_u、AA₁、AA₂、AA₃、AA₄和AA_z中的每个疏水氨基酸独立地为疏水芳香族氨基酸。

15. 根据权利要求14所述的多肽缀合物,其中芳香族疏水氨基酸为萘丙氨酸、苯甘氨

酸、高苯丙氨酸、苯丙氨酸、色氨酸或酪氨酸,每一者任选地由一个或多个取代基取代。

用于细胞内递送装订肽的多肽缀合物

[0001] 本申请是申请日为2018年10月28日、申请号为201880070271.0、发明名称为“用于细胞内递送装订肽的多肽缀合物”的发明专利申请的分案申请。

技术领域

[0002] 本申请涉及装订肽,具体涉及用于细胞内递送装订肽的多肽缀合物。

背景技术

[0003] 装订肽作为一类激动人心的靶向细胞内蛋白质相互作用(PPI)的治疗剂,已成为传统小分子和生物制剂的挑战性靶点。Verdine G.L.等人,Methods Enzymol.503,3-33(2012);Walensky,L.D.等人,J.Med.Chem.57,6275-6288(2014)。它们概括了生物活性 α 螺旋的结构和特异性,在体内能够抵抗蛋白质的降解,并且在适当的设计下,能够接触到哺乳动物细胞的胞浆和细胞核。以促凋亡蛋白BID的BCL-2同源性3(BH3)结构域为模型,首次在细胞内应用碳氢化合物装订的 α -螺旋,揭示了它们通过能量依赖的大胞饮机制吸收细胞的能力,从而激活了凋亡信号级联。Chu,Q.等人,Med.Chem.Comm.6,111-119(2015)(clinicaltrials.gov标识号:NCT02264613)。

[0004] 尽管装订肽作为一种新的靶向先前难治的蛋白质的治疗具有显著的前景,但设计具有一致细胞通透性的装订肽仍是一个重大挑战。许多因素,包括 α -螺旋度、正电荷、肽序列、装订钉组合物和位置,似乎都会影响细胞的摄取倾向。最近,对Verdine和Walensky实验室的几百种装订肽的综合分析表明,最佳的疏水性、正电荷和螺旋含量以及适当的装订钉位置是细胞摄取的关键驱动因素,而过量的疏水性和正电荷可在高肽剂量下触发膜裂解。参见Chu,Q.等人,Med.Chem.Comm.6,111-119(2015);Nature Chemical Biology.12,845-852(2016)。从这些研究中可以清楚地看到,许多装订肽要么是不渗透的,要么是对细胞膜渗透性差,这限制了装订肽作为治疗剂的应用。

[0005] 因此,本领域需要具有增强的细胞通透性的改进的装订肽。

发明内容

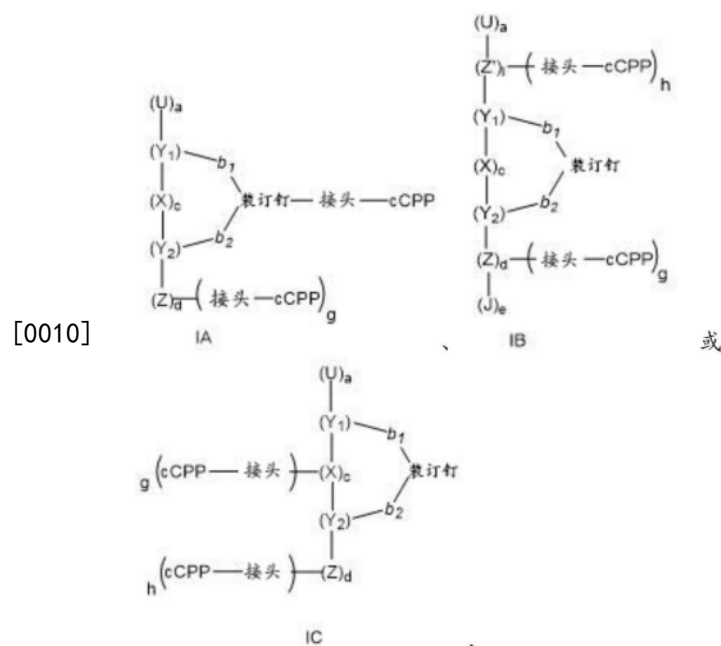
[0006] 本发明提供用于细胞内递送装订肽的多肽缀合物。本发明的即时公开表明,环状细胞穿透肽(cCPP)可用于赋予装订肽一致细胞通透性。此外,还提供了两种将 α -螺旋肽钉合和缀合到cCPP的方法。

[0007] 在实施例中,本公开提供了多肽缀合物,其包含:包含肽的装订肽和将该肽保持 α 螺旋构象的至少一个装订钉,以及直接或间接与该装订肽结合的至少一个环状细胞穿透肽(cCPP)。在实施例中,本公开的cCPP直接或间接地缀合到该装订钉。在进一步的实施例中,该cCPP直接或间接地缀合到该肽。在更进一步的实施例中,该cCPP直接或间接地缀合到该肽的N末端。在其他实施例中,该cCPP直接或间接地缀合到该肽的C末端。在进一步的实施例中,该cCPP直接或间接地缀合到该肽的氨基酸的侧链。在本发明的多肽缀合物中,该装订钉可选自由以下各项组成的组:酰胺、亚烷基、N-亚烷基、亚烯基、亚炔基、芳基、环烷基、环烯

基、环炔基、杂环基和杂芳基,这些基团中的每一者被任选地取代。

[0008] 本发明的多肽缀合物还可包含接头,其共价结合到cCPP上的氨基酸以及该肽或该装订钉上的氨基酸。在一些实施例中,该接头通过二硫键共价地结合到该装订肽。在进一步的实施例中,该接头可选自由以下各项组成的组:至少一种氨基酸、亚烷基、亚烯基、亚炔基、芳基、环烷基、环烯基、环炔基、杂环基、杂芳基、醚以及它们的组合,这些基团中的每一者被任选地取代。在实施例中,该接头能够在该多肽缀合物进入细胞的胞浆后从该cCPP释放该装订肽。

[0009] 本发明的多肽缀合物可具有根据式IA、IB或IC的结构:



[0011] 其中:

[0012] 在每种情况下,X和Z中的每一者独立地选自某一氨基酸;

[0013] U在每种情况下并且当存在时独立地选自某一氨基酸;

[0014] J在每种情况下并且当存在时独立地选自某一氨基酸;

[0015] Z'在每种情况下并且当存在时独立地选自某一氨基酸;

[0016] a是0到500之间的数字;

[0017] c为至少3;

[0018] d为在从1到500的范围内的数字;

[0019] e为在从0到500的范围内的数字;

[0020] g和h中的每一者独立地且在每种情况下为0或1,前提条件是在至少一种情况下g

[0021] 为1;

[0022] i是0到100之间的数字;

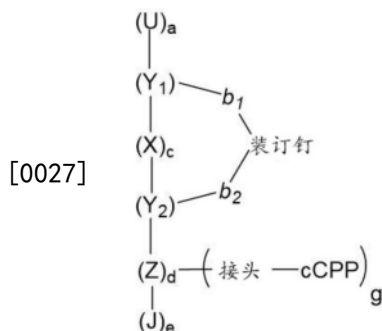
[0023] Y_1 是一种氨基酸,其具有形成到该装订钉的第一键合基团(b_1)的侧链,而 Y_2 是一种氨基酸,其具有形成到该装订钉的第二键合基团(b_2)的侧链。

[0024] 在一些实施例中,c是3到30之间的数字。在一些实施例中,c是3、6或10。在进一步的实施例中, b_1 和 b_2 中的每一者独立地选自键、芳基、硫醚、二硫化物、酰胺、酯和醚。

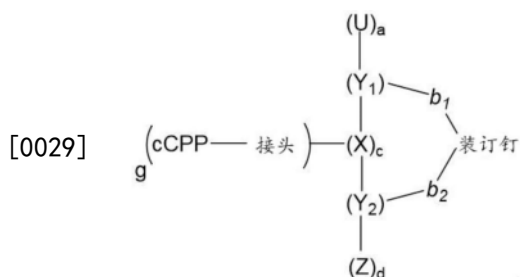
[0025] 在实施例中,不存在J,并且Z可以是肽的N末端或C末端。在实施例中,J存在,e为1,

并且J可以是肽的N末端或C末端。在进一步的实施例中,J存在,e为2或更大,并且末端J为肽的N末端或C末端。在其他实施例中,不存在U,并且Z'为肽的N末端或C末端。在实施例中,U存在,a为1,并且U为肽的N末端或C末端。在实施例中,U存在,a为2或更大,并且末端U为肽的N末端或C末端。

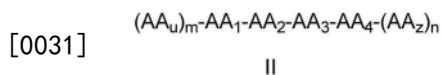
[0026] 在实施例中,式IB的多肽缀合物可具有以下结构:



[0028] 在实施例中,式IC的多肽缀合物可具有以下结构:



[0030] 在实施例中,cCPP可具有包含式II的序列:



[0032] 其中:

[0033] AA₁、AA₂、AA₃和AA₄中的每一者独立地选自D或L氨基酸,

[0034] AA₁和AA₂的每一者在每种情况下并且当存在时独立地选自D或L氨基酸,并且

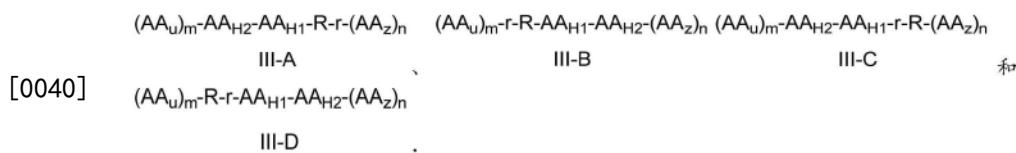
[0035] m和n独立地选自从0到6的数字;并且

[0036] 其中:

[0037] 选自由在每种情况下并且当存在时的AA_u、AA₁、AA₂、AA₃、AA₄和在每种情况下并且当存在时的AA₇组成的组的至少两个氨基酸独立地为精氨酸,并且

[0038] 选自由在每种情况下并且当存在时的AA_u、AA₁、AA₂、AA₃、AA₄和在每种情况下并且当存在时的AA_v组成的组的至少两个氨基酸独立地为疏水氨基酸。

[0039] 在一些实施例中,cCPP具有包含式IIIA-D中任一种的序列:



[0041] 其中:

[0042] AA_{H1}和AA_{H2}的每一者独立地为D或L疏水氨基酸;

[0043] AA₁和AA₂的每一者在每种情况下并且当存在时独立地为D或L氨基酸;并且

[0044] m和n独立地选自从0到6的数字。

[0045] 本公开还提供了一种含有本文公开的多肽缀合物的细胞。

[0046] 本公开还提供了一种用于细胞递送装订肽的方法,该方法包括使细胞与本文公开的多肽缀合物接触。

[0047] 此外,本公开提供了一种治疗有需要的患者的方法,包括向该患者施用本文公开的多肽缀合物。该患者可能患有选自癌症、炎性疾病或病症和自身免疫性疾病或病症的疾病或病症。

[0048] 此外,本公开提供了一种用于制备本文公开的多肽缀合物的方法,该方法包括将装订肽与cCPP缀合。在其他实施例中,本公开提供了一种制备本文公开的多肽缀合物的方法,该方法包括将肽缀合到至少一个cCPP并装订该肽。

[0049] 本公开还提供了一种包含本文公开的多肽缀合物的药物组合物。

附图说明

[0050] 图1是显示用于合成以DCA为装订钉的cCPP-装订肽的策略的示意图。

[0051] 图2是生存曲线,显示了装订肽2(3-1-1-DCA)、CPP9-装订肽4和5(3-1-1-DCA-CP9峰1和峰2)和nutlin-3对野生型p53细胞系(HCT116 WT)和p53基因敲除细胞系(HCT116 p53-/-)生存能力的影响。

[0052] 图3A-3B是显示用于合成以BBA为装订钉/接头的cCPP-装订肽的两种不同策略的示意图。图3A显示了树脂上的装订策略,在此期间该螺旋肽、BBA装订钉/接头和cCPP在树脂上顺序合成。图3B显示了一种液相装订策略,在此策略中,BBA-衍生的cCPP和螺旋肽分别合成,然后在液相进行装订/缀合。

[0053] 图4显示了具有和不具有CPP9缀合的装订肽的细胞进入效率的比较。用5 μ M FITC-标记的肽在37 $^{\circ}$ C下处理HeLa细胞2h,洗涤去除多余的肽,并进行活细胞共聚焦显微镜观察。I,DIC;II,GFP通道;III,I和II的重叠。

[0054] 图5显示了产品的未装订肽4和5(立体异构体)、HPLC色谱图和低分辨率MALDI-TOF MS谱(保留时间=32分钟)的化学结构。

[0055] 图6显示了产品的装订肽3的化学结构、HPLC色谱图和低分辨率MALDI-TOF MS谱(保留时间=30.5分钟)。

[0056] 图7显示了氨基-cCPP9的化学结构、HPLC色谱图和低分辨率MALDI-TOF MS谱(保留时间=22分钟)。

[0057] 图8A显示了已通过接头与cCPP(cCPP 9)缀合的装订肽4和5(立体异构体)的化学结构和HPLC色谱图。图8B显示了氨基-cCPP9(保留时间峰=23分钟)、结构4(保留时间峰=33.5分钟)和结构5(保留时间峰=34.5分钟)的低分辨率MALDI-TOF MS谱。

[0058] 图9显示了装订、标记的肽10的化学结构、HPLC色谱图和MS谱。

[0059] 图10A-10B显示了通过接头与cCPP缀合的装订、标记的肽11的化学结构、HPLC色谱图(图10A)和MS谱(图10B)。

[0060] 图11A-11B显示了装订、标记的肽12的化学结构、HPLC色谱图(图11A)和MS谱(图11B)。

[0061] 图12A-12B显示了通过接头与cCPP缀合的装订、标记的肽13的化学结构、HPLC色谱

图(图12A)和MS谱(图12B)。

[0062] 图13显示了装订、标记的肽14的化学结构、HPLC色谱图和MS谱。

[0063] 图14A-14B显示了通过接头与cCPP缀合的装订、标记的肽15的化学结构、HPLC色谱图(图14A)和MS谱(图14B)。

[0064] 图15显示了装订、标记的肽16的化学结构、HPLC色谱图和MS谱。

[0065] 图16A-16B显示了通过接头与cCPP缀合的装订、标记的肽17的化学结构、HPLC色谱图(图16A)和MS谱(图16B)。

[0066] 图17显示了装订、标记的肽18的化学结构、HPLC色谱图和MS谱。

[0067] 图18A-18B显示了通过接头与cCPP缀合的装订、标记的肽19的化学结构、HPLC色谱图(图18A)和MS谱(图18B)。

[0068] 图19显示了已通过接头缀合到cCPP的装订、标记的肽21的化学结构和HPLC色谱图。

[0069] 图20A-20D显示了酰胺装订肽和缀合物的化学结构,包括sPDI肽22(图20A)、CPP9-sPDI肽缀合物23(图20B)、R9-sPDI肽缀合物24(图20C)和Tat-sPDI肽缀合物25(图20D)。CPP9、R9和Tat分别通过附接到C末端的接头与肽缀合。

[0070] 图21显示了缀合或不缀合的装订肽的细胞进入效率的比较。图像来自结构22(sPDI)、结构23(CPP9-sPDI)、结构24(R9-sPDI)和结构25(Tat-sPDI)。在N末端具有Lys(FITC)的类似物用于共焦成像。

[0071] 图22显示了无细胞竞争分析的图表,比较了sPDI(结构22)、CPP9-sPDI(结构23)和CPP9-sPDI F10A突变体的功能性胞浆递送。在MDM2(15nM)和未标记的sPDI、CPP9-缀合的装订PDI(CPP9-sPDI;结构23)的存在下,利用FITC-标记的MDM2配体(15nM)或CPP9-sPDI F10A突变体(0-5 μ M)作为竞争肽浓度的函数获得荧光偏振(FP)图的数据。

[0072] 图23显示了一个抗增殖试验的图表,用MTT法测定了在10% FBS存在下,CPP9-sPDI(结构23)、Nutlin-3a、R9-sPDI(结构24)、sPDI(结构22)、CPP9-sPDI(F10A)和Tat-sPDI(结构25,0-20 μ M)对SJSA-1细胞系的存活率的影响。提供了每种试验化合物的IC₅₀值(μ M)。

[0073] 图24显示了CPP9-sPDI(结构23)的抗增殖活性由凋亡途径介导。在10% FBS存在下,测定了抑制剂作用48小时后Annexin V+/PI+和Annexin V+/PI-SJSA-1细胞的百分率。

[0074] 图25是一个图表,显示了CPP9-sPDI(结构23)在37°C时在25%人血清中的稳定性。

具体实施方式

[0075] 在描述本发明时,本文中未定义的所有术语具有其共同的技术认可的含意。本领域技术人员应当理解本领域未明确定义的任何术语或者表达方式具有其共同接受的定义。在以下描述是关于本发明的特定实施例或特定用途的范围内,其意在仅是说明性的,而不是限制所要求保护的发明。以下描述旨在涵盖如所附权利要求中定义的、包含在本发明的精神和范围中的所有备选方案、修改和等同物。

[0076] 定义

[0077] 此处使用的“氨基酸”是指本公开的装订肽缀合物中存在的部分。如本文所用,“疏水氨基酸”是指在侧链上具有疏水基团(例如,烷基链)的氨基酸。类似地,“芳香族氨基酸”是指在侧链上具有芳香族基团(例如,苯基)的氨基酸。

[0078] “亚烷基”或“亚烷基链”是指完全饱和、直链或支链的二价碳氢化合物链自由基，具有一至四十个碳原子。 C_2-C_{40} 亚烷基的非限制性实例包括乙烯、丙烯、-正丁烯基、亚乙烯基、亚丙烯基、正亚丁烯基、亚丙炔基、正亚丁炔基等。--在一些实施例中，亚烷基链通过单键直接或间接地附接到cCPP，并且通过单键直接或间接地附接到装订钉或肽。在一些实施例中，亚烷基链直接或间接地独立地附接到肽的第一氨基酸的侧链和肽的第二氨基酸。除非说明书中另有特别说明，否则可以任选地取代如本文所述的亚烷基链。

[0079] “亚烯基”或“亚烯基链”是指直链或支链的二价碳氢化合物链自由基，具有二到四十个碳原子，并具有一个或多个碳-碳双键。 C_2-C_{40} 亚烯基的非限制性实例包括乙烯、丙烯、丁烯等。在一些实施例中，亚烯基链通过单键直接或间接地附接到cCPP，并且通过单键直接或间接地附接到装订钉或肽。在一些实施例中，亚烯基链直接或间接地独立地附接到肽的第一氨基酸的侧链和肽的第二氨基酸。除非说明书中另有特别说明，否则可任选地取代亚炔基链。

[0080] “亚炔基”或“亚炔基链”是指直链或支链的二价碳氢化合物链自由基，具有二到四十个碳原子，并具有一个或多个碳-碳三键。 C_2-C_{40} 亚炔基的非限制性实例包括亚乙炔基、亚丙炔基等。在一些实施例中，亚炔基链通过单键直接或间接地连接到cCPP，并且通过单键直接或间接地连接到装订钉或肽。在一些实施例中，亚炔基链直接或间接地独立地附接到肽的第一氨基酸的侧链，并且直接或间接地附接到肽的第二氨基酸。除非说明书中另有特别说明，否则可以任选地取代亚炔基链。

[0081] “芳基”是指含有氢、6到40个碳原子和至少一个芳香族环组成的碳氢化合物环系二价自由基。为了本发明的目的，芳基二价自由基可以是单环、双环、三环或四环环系，其可以包括熔融或桥接环系。芳基二价自由基包括但不限于来自以下物质的芳基二价自由基：醋蒎烯、蒈烯、醋菲烯、蒎、蒎、苯、屈、茛蒎、茛、as-二环戊二烯并苯、s-二环戊二烯并苯、二氢化茛、茛、茛、菲、茛和苯并菲。在一些实施例中，芳基二价自由基通过单键直接或间接地连接到cCPP，并且通过单键直接或间接地连接到装订钉或肽。在一些实施例中，芳基直接或间接地独立地附接到肽的第一氨基酸的侧链，并且直接或间接地附接到装订钉或肽的第二氨基酸。除非说明书中另有特别说明，否则可以任选地取代芳基。

[0082] “环烷基”是指具有3到40个碳原子和至少一个环的稳定的非-芳香族单环或多环完全饱和碳氢化合物二价自由基，其中该环仅由碳原子和氢原子组成，其可包括熔融或桥接环系。单环环烷基二价自由基包括，例如，环丙基、环丁基、环戊基、环己基、环庚基和环辛基。多环环烷基二价自由基包括例如金刚烷基、降冰片基、十烷基、7,7-二甲基-双环[2.2.1]庚基等。在一些实施例中，环烷基二价自由基通过单键直接或间接地连接到cCPP，并且通过单键直接或间接地连接到装订钉或肽。在一些实施例中，环烷基直接或间接地独立地附接到肽的第一氨基酸的侧链，并且直接或间接地附接到装订钉或肽的第二氨基酸。除非说明书中另有特别说明，否则可以任选地取代环烷基。

[0083] “环烯基”是指具有3到40个碳原子、至少一个具有一个或多个碳-碳双键的环的稳定的非-芳香族单环或多环碳氢化合物二价自由基，其中该环仅由碳和氢原子组成，其可包括熔融或桥接环系。单环环烯基自由基包括例如环戊烯基、环己烯基、环庚基、环辛烯基等。多环环烯基自由基包括例如双环[2.2.1]庚-2-烯基等。在一些实施例中，环烯基二价自由基通过单键直接或间接地附接到cCPP，并且通过单键直接或间接地连接到装订钉或肽。在

一些实施例中,环烯基直接或间接地独立地附接到肽的第一氨基酸的侧链,并且直接或间接地附接到装订钉或肽的第二氨基酸。除非说明书中另有特别说明,否则可以任选地取代环烯基。

[0084] “环炔基”是指具有3到40个碳原子、至少一个具有一个或多个碳-碳三键的环的稳定的非-芳香族单环或多环碳氢化合物二价自由基,其中该环仅由碳和氢原子组成,其可包括熔融或桥接环系。单环环烷基包括,例如,环庚基、环辛基等。在一些实施例中,环炔基二价自由基通过单键直接或间接地附接到cCPP,并且通过单键直接或间接地连接到装订钉或肽。在一些实施例中,环炔基直接或间接地独立地附接到肽的第一氨基酸的侧链,并且直接或间接地附接到装订钉或肽的第二氨基酸。除非说明书中另有特别说明,否则可以任选地取代环炔基。

[0085] “杂环基”、“杂环(“heterocyclic ring”或“heterocycle”)”是指稳定的3-至20-元芳香族或非芳香族环二价自由基,其由二至十二个碳原子和一至六个杂原子(选自由氮、氧和硫组成的组)组成。杂环基或杂环包括如下定义的杂芳基。除非说明书中另有特别说明,否则杂环基自由基可以是单环、双环、三环或四环环系,其可以包括熔融或桥接环系;并且杂环基自由基中的氮、碳或硫原子可以任选地氧化;氮原子可以任选地被季铵化;并且杂环基自由基可以部分或完全饱和。此类杂环基自由基的实例包括但不限于二恶唑基、噻吩基[1,3]二噻吩基、十氢异喹啉基、咪唑啉基、咪唑烷基、异噻唑烷基、异恶唑烷基、吗啉基、八氢吲哚基、八氢异吲哚基、2-氧哌嗪基、2-氧哌啶基、2-氧哌啶基、恶唑烷基、哌啶基、哌嗪基、4-哌啶基、吡咯烷基、吡唑烷基、奎宁环基、噻唑烷基、四氢呋喃基、三噻吩基、四氢吡喃基、硫代吗啉基、噻吗啉基、1-氧-硫代吗啉基和1,1-二氧-硫代吗啉基。在一些实施例中,杂环基二价自由基通过单键直接或间接地附接到cCPP,并且通过单键直接或间接地附接到装订钉或肽。在一些实施例中,杂环基独立地直接或间接地附接到肽的第一氨基酸的侧链,并且直接或间接地附接到装订钉或肽的第二氨基酸。除非说明书中另有特别说明,否则可任选地取代杂环基。

[0086] “杂芳基”是指含有氢原子、一个到十三个碳原子、一个到六个杂原子(选自由氮、氧和硫组成的基团)和至少一个芳香族环的5-到20-元环系自由基。就本发明而言,杂环基自由基可以是单环、双环、三环或四环环系,其可以包括熔融或桥接环系;并且杂环基自由基中的氮、碳或硫原子可以任选地氧化;氮原子可以任选地被季铵化。实例包括但不限于:氮杂卓基、吡啶基、苯并咪唑基、苯并噻唑基、苯并吲哚基、苯并二氧杂环戊烯基、苯并呋喃基、苯并恶唑基、苯并噻唑基、苯并噻二唑基、苯并[b][1,4]二氧杂环庚三烯基、1,4-苯并二噁烷基、苯并萘呋喃基、苯并恶唑基、苯并间二氧杂环戊烯基、苯并二噁英基、苯并吡喃基、苯并呋喃基、苯并呋喃壬基、苯并噻吩基、苯并三唑基、苯并[4,6]咪唑并[1,2-a]吡啶基、咪唑基、噻吩基、二苯并呋喃基、二苯并噻吩基、呋喃基、异噻唑基、咪唑基、吲唑基、吲哚基、吲唑基、异吲哚基、吲哚基、异吲哚基、异喹啉基、吲哚基、异恶唑基、萘啶基、恶二唑基、2-氧氮杂平基、恶唑基、环氧乙烷基、1-氧化吡啶基、1-氧化嘧啶基、1-氧化吡嗪基、1-氧化哒嗪基、1-苯基-1H-吡咯基、吩嗪基、吩噻嗪基、phenoxazinyl、酞嗪基、蝶啶基、嘌呤基、吡咯基、吡唑基、吡啶基、吡嗪基、嘧啶基、哒嗪基、噻唑啉基、噻喔啉基、噻啉基、奎宁环基、异喹啉基、四氢喹啉基、噻唑基、噻二唑基、三唑基、四唑基、三嗪基和噻吩基。在一些实施例中,杂芳基二价自由基通过单键直接或间接地附接到cCPP,并且通过单键直接或间接地附接到装订钉

或肽。在一些实施例中,杂芳基直接或间接地独立地附接到肽的第一氨基酸的侧链,并且直接或间接地附接到装订钉或肽的第二氨基酸。除非说明书中另有特别说明,否则可以任选地取代杂芳基。

[0087] 本文中使用的术语“醚”是指具有式 $-(R_1)_m-O-(R_2)_n-$ 的二价自由基部分,其中 m 、 n 和 z 中的每一者独立地选自1到40,并且 R_1 和 R_2 中的每一者独立地为亚烷基、亚烯基、亚炔基、芳基、杂芳基、环烷基、环烯基、环炔基或杂环基。在一些实施例中, R_1 和 R_2 中的每一者独立地为直链或支链亚烷基。在特定实施例中,醚具有式 $-(CH_2)_m-O-(CH_2)_n-$,其中 m 、 n 和 z 中的每一者独立地选自1到40。实例包括聚乙二醇。醚通过单键直接或间接地附接到cCPP,并且通过单键直接或间接地附接到装订钉或肽。除非说明书中另有特别说明,否则可以任选地取代醚。

[0088] 本文中使用的术语“N-亚烷基”是指如上所定义的亚烷基二价自由基,其含有至少一个氮原子,并且亚烷基自由基与分子其余部分的附着点是通过亚烷基自由基。在一些实施例中,附着点可以任选地为氮原子。除非说明书中另有特别说明,否则可任选地取代N-亚烷基。

[0089] 如本文所用,“肽”或“多肽”包含由肽(酰胺)键连接在一起的氨基酸残基的聚合物。如本文所使用的一个或多个术语,指任何大小、结构或功能的蛋白质、多肽和肽。典型地,肽或多肽至少有三个氨基酸长。肽或多肽可指单个蛋白质或蛋白质集合。本发明的肽可含有天然氨基酸和/或非天然氨基酸(即,不存在于自然界但可并入多肽链的化合物)。本领域已知的氨基酸类似物也可以替代使用。肽或多肽中的一个或多个氨基酸可通过添加化学实体(诸如碳水化合物基、羟基、磷酸盐基、法尼基、异黄酮基、脂肪酸基、用于缀合、功能化或其他修饰的接头)来修饰。肽或多肽也可以是单分子或多分子复合物,诸如蛋白质。肽或多肽可能只是天然蛋白质或肽的片段。肽或多肽可以是天然的、重组的或合成的,或其任意组合。

[0090] “装订”或“肽装订”是一种策略,用于限制典型地为 α 螺旋构象的肽。通过共价连接肽上两个氨基酸的侧链来进行装订,从而形成肽大环。装订通常涉及将至少两个部分引入肽中,该至少两个部分能够经历反应以在该至少两个部分之间生成至少一个交联剂。该部分可以是引入肽序列的具有适当侧链的两个氨基酸,或者该部分可以是侧链的化学修饰。装订对二级结构(诸如 α -螺旋结构)提供了约束。可以优化交联剂的长度和几何结构以改进所需二级结构含量的产率。例如,提供的约束可以防止二级结构展开和/或可以加强二级结构的形状。例如,防止展开的二级结构更稳定。

[0091] “装订肽”是包含装订钉的肽(如本文详细描述)。更具体地,装订肽是其中肽上的一个或多个氨基酸交联以将肽保持在特定二级结构(诸如 α 螺旋构象)中的肽。装订肽的肽包含选定数量的天然或非天然氨基酸,并且还包含至少两个部分,该至少两个部分进行反应以在该至少两个部分之间生成至少一个交联剂,该交联剂调节例如肽的稳定性。

[0092] “缝合”肽是包含一个以上(例如,两个、三个、四个、五个、六个等)装订钉的装订肽。

[0093] 本文中使用的术语“取代的”是指上述任何基团(即,亚烷基、亚烯基、亚炔基、芳基、碳环基、环烷基、环烯基、环炔基、杂环基、杂芳基和/或醚),其中至少一个氢原子被至少一个非氢原子取代,该非氢原子诸如但不限于:卤素原子,诸如F、Cl、Br和I;诸如羟基、烷氧

基和酯基中的氧原子；诸如硫醇基、硫代烷基、砷基、磺酰基和亚砷基中的硫原子；诸如胺、酰胺、烷基胺、二烷基胺、芳胺、烷基芳胺、二芳胺、N-氧化物、酰亚胺和烯胺中的氮原子；诸如三烷基硅基、二烷基硅基、烷基二芳基硅基和三芳基硅基中的硅原子；以及各种其他基团中的其他杂原子。“取代的”还指上述任何一个基团，其中一个或多个氢原子被一个高阶键（例如，双键或三键）取代到杂原子，诸如氧、羰基、羧基和酯基中的氧；诸如亚胺、肟、肟和肟等基团中的氮。例如，“取代的”包括上述任何一个基团，其中一个或多个氢原子被 $-\text{NR}_g\text{R}_h$ 、 $-\text{NR}_g\text{C}(=\text{O})\text{R}_h$ 、 $-\text{NR}_g\text{C}(=\text{O})\text{NR}_g\text{R}_h$ 、 $-\text{NR}_g\text{C}(=\text{O})\text{OR}_h$ 、 $-\text{NR}_g\text{SO}_2\text{R}_h$ 、 $-\text{OC}(=\text{O})\text{NR}_g\text{R}_h$ 、 $-\text{OR}_g$ 、 $-\text{SR}_g$ 、 $-\text{SOR}_g$ 、 $-\text{SO}_2\text{R}_g$ 、 $-\text{OSO}_2\text{R}_g$ 、 $-\text{SO}_2\text{OR}_g$ 、 $=\text{NSO}_2\text{R}_g$ 和 $-\text{SO}_2\text{NR}_g\text{R}_h$ 取代。“取代的”也指上述任何一个基团，其中一个或多个氢原子被 $-\text{C}(=\text{O})\text{R}_g$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{OR}_g$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{NR}_g\text{R}_h$ 、 $-\text{CH}_2\text{SO}_2\text{R}_g$ 、 $-\text{CH}_2\text{SO}_2\text{NR}_g\text{R}_h$ 取代。在前述中， R_g 和 R_h 是相同或不同且独立的氢、烷基、烯基、炔基、烷氧基、烷基氨基、硫代烷基、芳基、烷基、环烷基、环烯基、环炔基、环烷基烷基、卤代烷基、卤代烯基、卤代炔基、杂环基、N-杂环基、杂环基烷基、杂芳基、N-杂芳基和/或杂芳基烷基。“取代的”还指上述任何基团，其中一个或多个氢原子被与氨基、氰基、羟基、亚胺、硝基、氧基、硫氧基、卤代、烷基、烯基、炔基、烷氧基、烷基氨基、硫烷基、芳基、芳烷基、环烷基、环烯基、环炔基、环烷基烷基、卤代烷基、卤代烯基、卤代炔基、杂环基、N-杂环基、杂环基烷基、杂芳基、N-杂芳基和/或杂芳基烷基的键取代。此外，前述取代基中的每一者也可以任选地被上述取代基中的一个或多个取代。此外，本领域技术人员将认识到，“取代的”还包括将本文所述基团上的一个或多个氢原子替换为官能团，并且官能团经历反应以与cCPP、装订钉或肽形成共价键。反应产物也被认为是取代基。例如，在接头与装订钉缀合的实施方式中，该装订钉可适当地被能够与接头形成键的基团取代。在一些实施例中，所述样品可被羰基（例如，酮或醛）取代，该羰基在与具有亲核羟胺的接头偶联时形成肟（例如，图1）。在另一个实例中，上述任一基团可在第一位置被与适当氨基酸CPP（例如，赖氨酸）形成酰胺键的羧酸（即， $-\text{C}(=\text{O})\text{OH}$ ）取代。或者，或者另外，可以用亲电基团（例如， $-\text{C}(=\text{O})\text{H}$ 、 $-\text{CO}_2\text{R}_g$ 、-卤化物等，其中 R_g 是离开基团）替换上述任何基团，该亲电基团与肽的N末端形成键，或者用亲核基团（ $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHR}_g$ 、 $-\text{OH}$ 等）替换上述任何基团，该亲核基团与肽的C末端形成键。在其他实施例中，该基团被巯基取代，该巯基与肽中的半胱氨酸（或具有巯基的氨基酸类似物）形成二硫键。

[0094] 本文中提及上述基团的术语“自由基”是指参与与所附部分形成键的电子。例如，当本文公开的多肽缀合物包含将cCCP缀合到该装订肽的醚接头。在缀合之前，醚接头被定义为二价自由基。为了形成多肽缀合物，二价自由基的一个电子以单键形式与cCCP共享，并且另一个电子以单键形式与该装订肽共享。

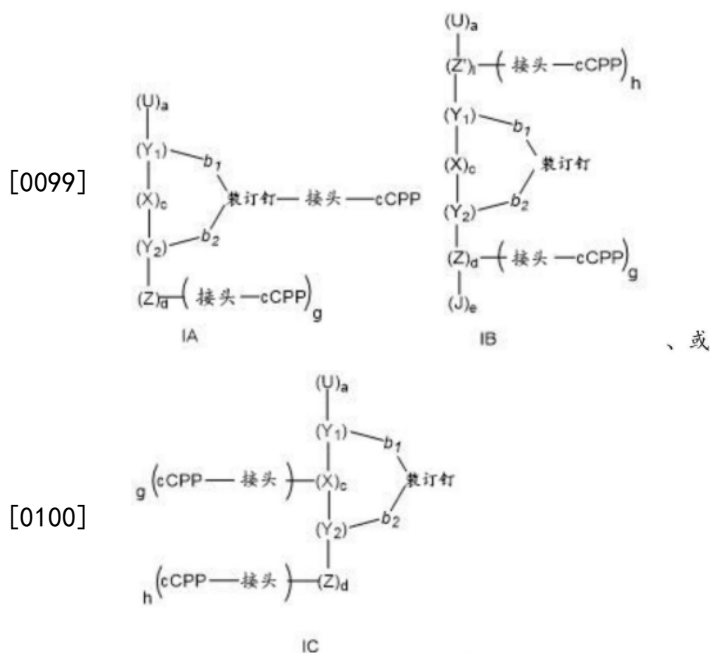
[0095] 当与所附或缀合结合使用时，术语“间接”指的是组之间的连接（例如，cCPP和装订肽），这是使用接头实现的。例如，根据一些实施例，接头可用于间接地将cCPP连接到装订钉。

[0096] 多肽缀合物

[0097] 在各种实施例中，本公开提供了多肽缀合物，其包括：包含肽的装订肽和将该肽保持 α 螺旋构象的至少一个装订钉，以及直接或间接与该装订肽结合的至少一个环状细胞穿透肽（cCPP）。cCPP可以在任何合适的位置与装订肽结合。在一些实施例中，该cCPP可直接或间接地缀合到该装订钉。在其他实施例中，该cCPP可直接或间接地缀合到位于任何适当位置的肽，包括缀合到肽中氨基酸的侧链或缀合到肽的N或C末端。因此，在一些实施例中，该

cCPP可直接或间接地缀合到该肽的N末端。在其他实施例中,该cCPP可直接或间接地缀合到该肽的C末端。仍然在其他实施例中,该cCPP可直接或间接地缀合到该肽的氨基酸的侧链。

[0098] 本发明的多肽缀合物可具有根据式IA、IB或IC的结构:



[0101] 在一些实施例中,在每种情况下,X和Z中的每一者独立地选自某一氨基酸。在一些实施例中,U在每种情况下并且当存在时独立地选自某一氨基酸。在一些实施例中,J在每种情况下并且当存在时独立地选自某一氨基酸。在一些实施例中,Z'在每种情况下并且当存在时独立地选自氨基酸。

[0102] 在一些实施例中,d为在从1到500的范围内的数字。在一些实施例中,e为在从1到500的范围内的数字。在一些实施例中,i为在从0到100的范围内的数字。

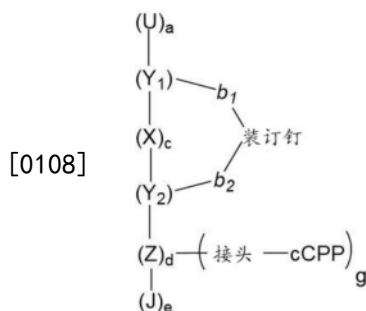
[0103] 在一些实施例中,g和h中的每一者独立地且在每种情况下为0或1,前提条件是在至少一种情况下g为1。因此,在一些实施例中,该肽缀合物可包含1个cCPP-接头部分(例如,当在式IB中d=1,g=1,且h=0时)或大于cCPP-接头部分(例如,当在式IB中d=2,g=2且h=0时;或当在式IB中d=10,g=2且h=0时)。

[0104] 在一些实施例中,a是0到500之间的数字。在一些实施例中,c为至少3。在一些实施例中,c可以是任意数字,3或更大,使得装订钉(如本文所述)是 α 螺旋的相同面。在一些实施例中,c是3、6或10。在进一步的实施例中,b₁和b₂中的每一者独立地选自键、芳基、硫醚、二硫化物、酰胺、酯和醚。

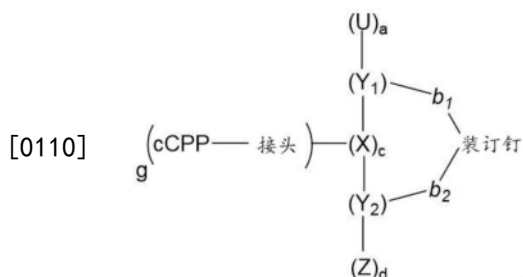
[0105] 在一些实施例中,Y₁是一种氨基酸,其具有形成到该装订钉的第一键合基团(b₁)的侧链,而Y₂是一种氨基酸,其具有形成到该装订钉的第二键合基团(b₂)的侧链。

[0106] 本公开设想式IA、IB或IC的结构可被解释为具有N到C或C到N方向。也就是说,结构的顶部可以是N末端或C末端。类似地,结构的底部可以是C末端或N末端。在实施例中,不存在J,并且Z可以是肽的N末端或C末端。在实施例中,J存在,e为1,并且J可以是肽的N末端或C末端。在进一步的实施例中,J存在,e为2或更大,并且末端J为肽的N末端或C末端。在其他实施例中,U不存在,并且Z'为肽的N末端或C末端。在实施例中,U存在,a为1,并且U为肽的N末端或C末端。在实施例中,U存在,a为2或更大,并且末端U为肽的N末端或C末端。

[0107] 在实施例中,式IB的多肽缀合物可具有以下结构:



[0109] 在实施例中,式IC的多肽缀合物可具有以下结构:



[0111] 肽

[0112] 本文所公开的多肽缀合物中使用的肽可以是含有至少一个具有 α -螺旋结构区域的任何肽。 α -螺旋是一种常见的二级结构基序,在许多蛋白质中起着重要的功能作用。在实施例中,该肽可主要为 α 螺旋构象,或肽可为包括一个或多个 α 螺旋区域的较大蛋白质的一部分。如上所述,该装订钉适合位于基本上保持 α 螺旋构象。

[0113] 肽可以是自然产生的,也可以是专门设计来与靶点相互作用的(例如,抑制蛋白质-蛋白质相互作用)。在一些实施例中,肽可衍生自天然存在的肽,其适当修饰以促进与装订钉、接头和/或cCPP或其组合的缀合。因此,肽中的氨基酸(X、Z、U、J、Y₁、Y₂和Z'中的每一者,在每种情况下并且当存在时)独立地选自任何天然或非天然氨基酸,并且可以独立地指肽中自然出现或引入肽中的氨基酸。术语“非天然氨基酸”是指类似于天然氨基酸的有机化合物,其结构类似于天然氨基酸,从而模拟天然氨基酸的结构和反应性。非天然氨基酸可以是修饰的氨基酸和/或氨基酸类似物,其不是20种常见的天然氨基酸或稀有的天然氨基酸硒代半胱氨酸或吡咯赖氨酸之一。非天然氨基酸也可以是天然氨基酸的D-异构体。适合氨基酸的实例包括但不限于丙氨酸、别异亮氨酸、精氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸、甘氨酸、组氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、蛋氨酸、萘丙氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、焦谷氨酸、丝氨酸、苏氨酸、色氨酸、酪氨酸、缬氨酸、2,3-二氨基丙酸衍生物、或其组合。表1列出了这些和其他及本文所用的它们的缩写。

[0114] 表1. 氨基酸缩写

[0115]

氨基酸	缩写 * L-氨基酸	缩写 * D-氨基酸
丙氨酸	Ala (A)	ala (a)
异亮氨酸	Alle	aile
精氨酸	Arg (R)	arg (r)
天冬酰胺	Asn (N)	asn (n)
天冬氨酸	Asp (D)	asp (d)
半胱氨酸	Cys (C)	cys (c)
环己基丙氨酸	Cha	cha
2,3-二氨基丙酸	Dap	dap
4-氟苯丙氨酸	Fpa (Σ)	fpa
谷氨酸	Glu (E)	glu (e)
谷氨酰胺	Gln (Q)	gln (q)
甘氨酸	Gly (G)	gly (g)
组氨酸	His (H)	his (h)
高脯氨酸 (又名哌啶酸)	Pip (Θ)	pip (θ)
异亮氨酸	Ile (I)	ile (i)
亮氨酸	Leu (L)	leu (l)
赖氨酸	Lys (K)	lys (k)
蛋氨酸	Met (M)	met (m)
萘丙氨酸	Nal (Φ)	nal (ϕ)
去亮氨酸	Nle (Ω)	nle (ω)
苯丙氨酸	Phe (F)	phe (f)
苯甘氨酸	Phg (Ψ)	phg (ψ)
4-(磷酸二氟甲基)苯丙氨酸	F ₂ Pmp (Λ)	f ₂ pmp (λ)
脯氨酸	Pro (P)	pro (p)
肌氨酸	Sar (Ξ)	sar (ξ)
硒代半胱氨酸	Sec (U)	sec (u)

[0116]

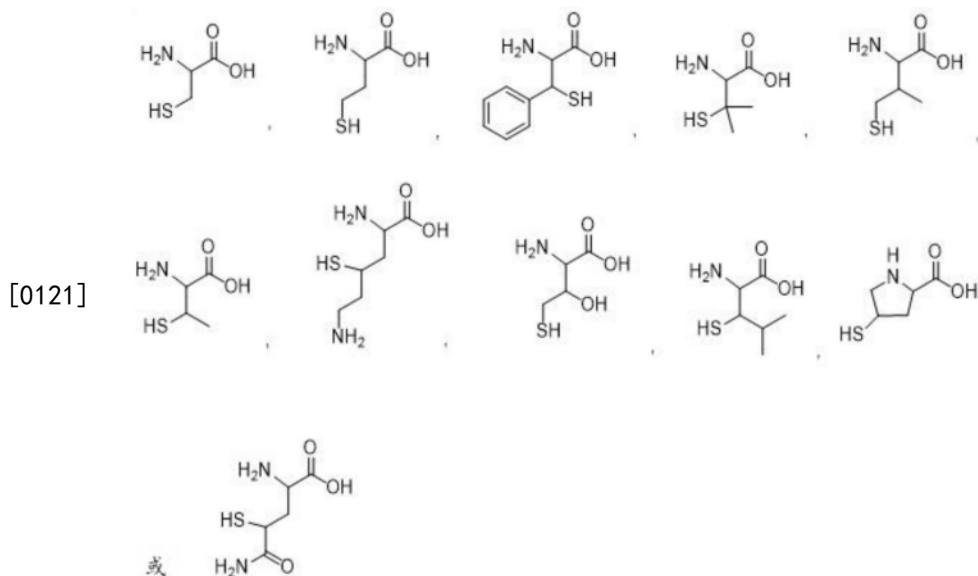
氨基酸	缩写 * L-氨基酸	缩写 * D-氨基酸
丝氨酸	Ser (S)	ser (s)
苏氨酸	Thr (T)	thr (y)
酪氨酸	Tyr (Y)	tyr (y)
色氨酸	Trp (W)	trp (w)
缬氨酸	Val (V)	val (v)
2,3-二氨基丙酸	Dap	dap

[0117] *单字母缩写:当用大写字母表示时,表示L-氨基酸形式,当用小写字母表示时,表示D-氨基酸。

[0118] 在一些实施例中, Y₁是一种氨基酸, 其具有形成到该装订钉的第一键合基团 (b₁) 的侧链, 而 Y₂是一种氨基酸, 其具有形成到该装订钉的第二键合基团 (b₂) 的侧链。因此, Y₁和 Y₂中的每一者的前体可以独立地为具有侧链的任何氨基酸, 该侧链适合或可以被修饰为适合共价结合该装订钉。此类氨基酸的非限制性实例包括半胱氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺和赖氨酸及其类似物 (例如, 在侧链中具有另外的碳氢化合物, 诸如同型半胱氨酸)。

[0119] 可引入本文公开的肽的氨基酸类似物的进一步实例包括具有烯烃侧链、炔侧链或腈侧链的氨基酸类似物,因为这些侧链可用于形成该装订钉(例如,在烯烃或两个含烯烃的侧链的之间的环闭合复分解过程中)或缀合该装订钉。仍然在其他实施例中, Y_1 的前体可以是具有侧链的氨基酸,该侧链适于共价结合(例如,形成酰胺键)到 Y_2 的前体的侧链。在这些实施例中,这些氨基酸类似物的侧链之间的“反应产物”是该装订钉。例如,在某些实施例中, Y_1 的前体是赖氨酸, Y_2 的前体是天冬氨酸, Y_1 前体侧链上的氨基与 Y_2 前体侧链上的羧基反应形成酰胺,该酰胺是该装订钉。作为另一实例, Y_1 的前体可以是侧链上具有炔烃的氨基酸类似物,而 Y_2 的前体可以是侧链上具有叠氮化物的氨基酸,并且这些基团反应形成三唑。

[0120] 具体而言, 实施例 1 中, 肽可含有一个或多个氨基酸, 其侧链包含硫醇基 (即, 在缀合到接头、cCPP 和/或装订钉之前)。该硫醇基可用于通过形成硫醚、硫酯或二硫化物使 cCPP、接头和/或装订钉缀合。具有巯基的氨基酸类似物的非限制性实例包括半胱氨酸、同型半胱氨酸和以下任何氨基酸类似物:



[0122] 如前所述,上述基团是允许装订钉、接头和/或cCCP缀合的前体。具体地,为了将该装订钉、接头和/或cCCP与肽缀合,上述基团中硫醇的氢被该钉、接头或cCPP的键取代。

[0123] 用于本发明的肽的一个实例是MDM2蛋白质的配体, 诸如 α -螺旋肽Ac-LTFEHYWAQLTS(SEQ ID NO:1) (“PDI”)。这种配体能够与MDM2蛋白结合, 从而破坏MDM2与p53的相互作用。破坏MDM2/p53相互作用的肽可能在许多应用中有用, 包括但不限于控制软组织肉瘤(在野生型p53存在下过度表达MDM2)。这些癌症可能是由能够截获MDM2的小分子控制的, 从而防止p53的抑制。本发明的肽可根据本领域技术人员已知的方法合成。例如, 可使用标准固相肽合成(SPPS)来合成肽。

[0124] 装订钉

[0125] 本文所述的装订钉稳定肽的生物活性 α -螺旋结构,例如,赋予蛋白酶抗性、细胞外

显率和生物活性。该装订钉可以是任何能够以 α 螺旋构象固定肽的合成支架。在实施例中,该装订钉增强肽的天然 α 螺旋构象,从而保持对其蛋白质靶点的结合亲和力。

[0126] 肽装订的方法是本领域技术人员所已知的。在一些实施例中,肽装订可能需要生成包含两种天然或非天然氨基酸(即 Y_1 和 Y_2 的前体)的多肽,其具有适于装订的官能团的侧链。在某些实施例中, Y_1 和 Y_2 的前体侧可反应以形成该装订钉。在其他实施例中, Y_1 和 Y_2 的侧前体具有适于缀合装订钉的侧链(即,侧链具有适当的官能团,以通过形成键合基团 b_1 或 b_2 来结合装订钉)。仍然在其他实施例中,该装订钉是通过用共价键替换分子内氢键而形成的,例如,通过用交联所述对侧氨基酸的基团替换参与分子内氢键相互作用的对侧氨基酸上的氢原子和羰基。此类修饰的实例描述于Joy, S. T. 等人, Chem. Commun (Camb.) 52 (33), 5738-5741), 和Zhao, H. 等人, Angew. Chem. Int. Ed. 2016, 55, 12088-12093, 其每一者整体通过引用并入本文。

[0127] 形成或与该装订钉结合的氨基酸通常在肽链中间隔开,使得它们的侧链基本上位于折叠肽的相同面上。因此,对于 α -螺旋肽,氨基酸侧链典型地位于 α 螺旋的基本相同面上。螺旋每转一圈,肽同一面上的相反氨基酸之间的距离约为5.4 Å。因此,在各种实施例中,该装订钉是将这些相反氨基酸保持在约5.4 Å距离的任何适当部分,从而保持 α 螺旋构象。因此,在实施例中,该装订钉的大小可在约5 Å到约6 Å之间、约10 Å到约12 Å之间、约15 Å到约17 Å之间、约21 Å到约23 Å之间、约26 Å到约28 Å之间、约31 Å到约34 Å之间,包括介于两者之间所有值和子范围。在其他实施例中,该装订钉的大小可为约5 Å、约5.5 Å、约6 Å、约10.5 Å、约11 Å、约11.5 Å、约12 Å、约16.5 Å、约17 Å、约17.5 Å、约22 Å、约22.5 Å、约23 Å、约23.5 Å、约25.5 Å、约26 Å、约26.5 Å、约27 Å、约27.5 Å、约28 Å、约28.5 Å、约30.5 Å、约31 Å、约31.5 Å、约32 Å、约32.5 Å、约33 Å、约33.5 Å、约34 Å、或约34.5 Å。

[0128] 对于 α 螺旋中的单圈装订,该装订钉与之缀合的氨基酸通常位于第 i 、 $i+4$ 位置。对于 α 螺旋中的双圈装订,氨基酸通常位于第 i 、 $i+7$ 位置。对于 α 螺旋中的三圈装订,氨基酸通常位于第 i 、 $i+11$ 位置。在其他实施例中,本文所公开的多肽缀合物可含有两个或更多装订钉(也称为缝合肽)。例如,该装订钉可以位于第 i 、 $i+4$ 位置和第 $i+7$ 、 $i+11$ 位置。

[0129] 在各种实施例中, Y_1 和 Y_2 之间的氨基酸的数量(即式IA-IC中的“ c ”)是适当数量的氨基酸,使该装订钉基本上位于 α 螺旋的相同面上。在实施例中, c 为至少3。在其他实施例中, c 是3到30之间的数字。仍然在其他实施例中, c 是3、6或10。

[0130] 在一些实施例中,该装订钉可选自由以下各项组成的组:亚烷基、N-亚烷基、亚烯基、亚炔基、芳基、环烷基、环烯基、环炔基、杂环基和杂芳基,其中每一者被任选地取代。装订钉的非限制性实例包括乳胺钉、碳氢化合物钉、CuAAC钉、双硫醚钉、全氟苯钉和硫醚钉。

[0131] 本领域的技术人员已知多种替代装订方法,每种方法使用不同形式的大环化化学并产生具有不同生物活性特性的装订肽。例如,装订可以是单部件装订。单部件装订包括两个氨基酸的侧链之间的直接键形成反应。在一些实施例中,该单部件装订技术可包括肽中氨基酸侧链之间的酰胺键形成。在一些实施例中,该单部件装订技术可包括例如,环闭合复分解、内酰胺化、环加成(诸如Cu(I)催化的叠氮-炔环加成(CuAAC,“点击反应”))、可逆反应(诸如形成二硫键或肟键)或硫醚形成。装订技术可以是双部件装订。双部件装订涉及一种双功能接头化合物,其通过与感兴趣肽中的两种互补的天然或非天然或非天然氨基酸反应形成装订钉。例如,双部件装订可以使用例如光开关接头或功能化的“双击”接头。当该装订

钉通过点击反应缀合时, b_1 和 b_2 中的每一者都是三唑, 其可以任选地被取代。也就是说, 在一些实施例中, Y_1 和 Y_2 的前体独立地为氨基酸类似物, 其侧链上具有炔基或侧链上具有叠氮基团, 并且这些基团与具有互补炔基和/或叠氮基团的装订钉的前体反应形成三唑。该点击反应也可用于通过双部件装订来生产装订钉, 在这种情况下, 该装订钉是三唑并且 b_1 和 b_2 不存在。因此, 当上述技术中的任何一种用于将装订钉缀合至肽时, b_1 和 b_2 可独立地为形成的键合基团。在一些实施例中, b_1 和 b_2 中的每一者独立地不存在或选自芳基 (例如, 三唑)、硫醚、二硫化物、酰胺、酯和醚。

[0132] 适于在本发明的装订肽中使用的装订钉和装订方法的另外的实例描述于 Walensky, L.D. 等人, J. Med. Chem., 57, 6275-6288 (2014), Lau, Y.H. 等人, Chem. Soc. Rev., 00, 1-12 (2014), Joy, S.T. 等人, Chem. Commun (Camb.) 52 (33), 5738-5741, 和 Zhao, H. 等人, Angew. Chem. Int. Ed. 2016, 55, 12088-12093, 其每一者整体通过引用并入本文。

[0133] 环状细胞穿透肽 (cCPP)

[0134] 环状细胞穿透肽可将不渗透的装订肽有效地递送到细胞胞浆和细胞核。本文公开的多肽缀合物的 cCPP 可以是或包括任何有助于细胞摄取本文公开的多肽缀合物的氨基酸序列。适用于本文所述的多肽缀合物和方法中的 cCPP 可包括自然发生序列、修饰的序列和合成序列。在实施例中, cCPP 中的氨基酸总数可以在 4 到约 20 个氨基酸之间, 例如, 约 5、约 6、约 7、约 8、约 9、约 10、约 11、约 12、约 13、约 14、约 15、约 16、约 17、约 18 和约 19 个氨基酸, 包括介于两者之间的所有范围和子范围。在一些实施例中, 本文公开的 cCPP 包含约 4 至约 13 个氨基酸。在特定实施例中, 本文公开的 CPP 包含约 6 至约 10 个氨基酸, 或约 6 至约 8 个氨基酸。

[0135] cCPP 中的每个氨基酸可以独立地为天然或非天然氨基酸。

[0136] 在一些实施例中, cCPP 可包括至少两个精氨酸和至少两个疏水氨基酸的任意组合。在一些实施例中, cCPP 可包括两到三个精氨酸和至少两个疏水氨基酸的任意组合。

[0137] 在一些实施例中, 本文所述用于多肽缀合物的 cCPP 具有包含式 3 的结构:

[0138] $(AA_u)_m - AA_1 - AA_2 - AA_3 - AA_4 - (AA_z)_n$

[0139] 3

[0140] 其中:

[0141] AA_1 、 AA_2 、 AA_3 和 AA_4 中的每一者独立地选自 D 或 L 氨基酸,

[0142] AA_u 和 AA_z 的每一者在每种情况下并且当存在时独立地选自 D 或 L 氨基酸, 并且

[0143] m 和 n 独立选自从 0 到 6 的数字; 并且

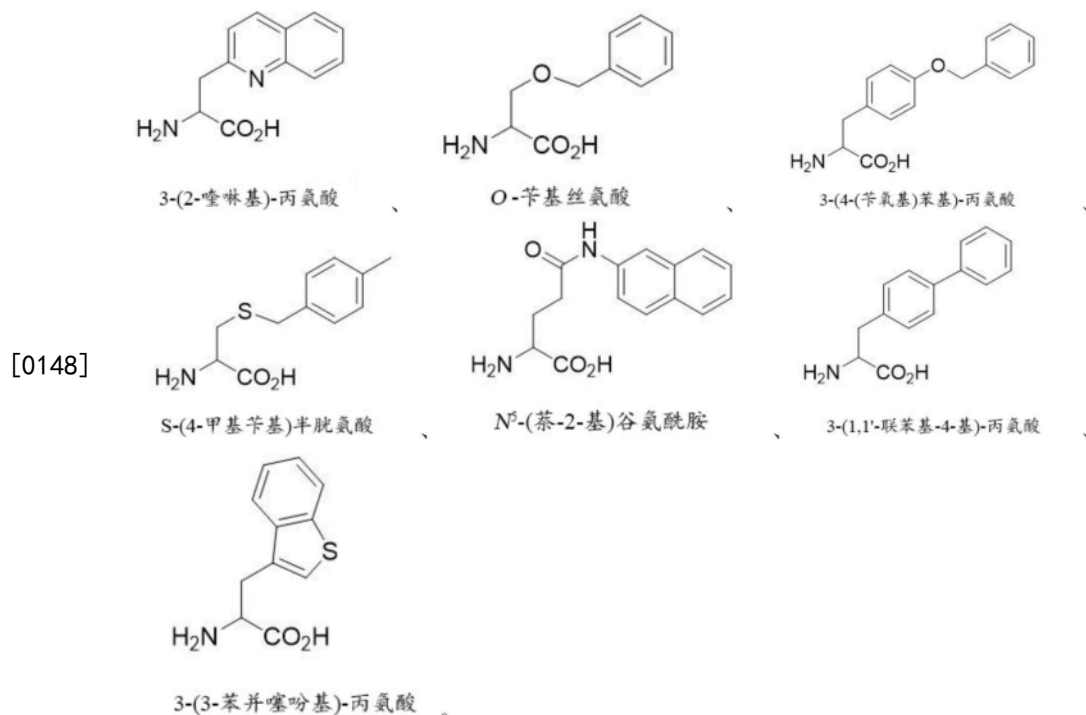
[0144] 其中:

[0145] 当存在时的 AA_u 、 AA_1 、 AA_2 、 AA_3 、 AA_4 和当存在时的 AA_z 中的至少两个独立地为精氨酸, 并且

[0146] 当存在时的 AA_u 、 AA_1 、 AA_2 、 AA_3 、 AA_4 和当存在时的 AA_z 中的至少两个独立地为疏水氨基酸。

[0147] 在一些实施例中, 每个疏水氨基酸独立地选自甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、蛋氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、脯氨酸、萘丙氨酸、苯甘氨酸、均苯丙氨酸、酪氨酸、环己丙氨酸、哌啶-2-羧酸、环己丙氨酸、去亮氨酸, 3-(3-苯并噻吩基)-丙氨酸、3-(2-喹啉基)-丙氨酸、0-苄基丝氨酸、3-(4-(苄氧基)苯基)-丙氨酸、S-(4-甲基苄基)半胱氨酸、N-(萘-2-基)谷氨酰胺、3-(1,1'-联苯-4-基)-丙氨酸、叔亮氨酸或烟碱酰赖氨酸, 每一者任选地由一

个或多个取代基取代。下面提供了其中一些非天然芳香族疏水氨基酸的结构(在并入本文公开的肽之前)。在特定实施例中,每个疏水氨基酸独立地为疏水芳香族氨基酸。在一些实施例中,该芳香族疏水氨基酸为萘丙氨酸、苯甘氨酸、高苯丙氨酸、苯丙氨酸、色氨酸或酪氨酸,每一者任选地由一个或多个取代基取代。在特定实施例中,该疏水氨基酸为吡啶-2-羧酸、萘丙氨酸、色氨酸或苯丙氨酸,每一者任选地由一个或多个取代基取代。



[0149] 任选取代基可以是不显著降低cCPP的胞浆递送效率的任何原子或基团,例如,不将相对胞浆递送效率降低到小于c(F Φ RRRRQ)的取代基。在一些实施例中,任选取代基可以是疏水取代基或亲水取代基。在某些实施例中,任选取代基是疏水取代基。在一些实施例中,取代基增加疏水氨基酸的溶剂可及表面积(如本文所定义)。在一些实施例中,取代基可以是卤素、烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、杂环基、芳基、杂芳基、烷氧基、芳氧基、酰基、烷基氨甲酰基、烷基碳酰胺基、烷氧羰基、烷基硫基或芳硫基。在一些实施例中,取代基是一个或多个卤素原子。

[0150] 相对于疏水性值较低的氨基酸,可以选择疏水性值较高的氨基酸来改进cCPP的胞浆递送效率。在一些实施例中,每个疏水氨基酸独立地具有大于甘氨酸的疏水性值。在其他实施例中,每个疏水氨基酸独立地为具有大于丙氨酸的疏水性值的疏水氨基酸。仍然在其他实施例中,每个疏水氨基酸独立地具有大于或等于苯丙氨酸的疏水性值。可使用本领域已知的疏水性级别来测量疏水性。下表2列出了各种氨基酸的疏水性值,其由Eisenberg和Weiss所报道(Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.1984;81(1):140-144),Engleman,等人(Ann.Rev.of Biophys.Biophys.Chem.1986;1986(15):321-53),Kyte和Doolittle(J.Mol.Biol.1982;157(1):105-132),Hoop和Woods(Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.1981;78(6):3824-3828),以及Janin(Nature.1979;277(5696):491-492),其全部内容整体通过引用并入本文。在特定实施例中,使用Engleman等人报道的疏水性级别来测量疏水性。

[0151] 表2.

[0152]

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

[0153]

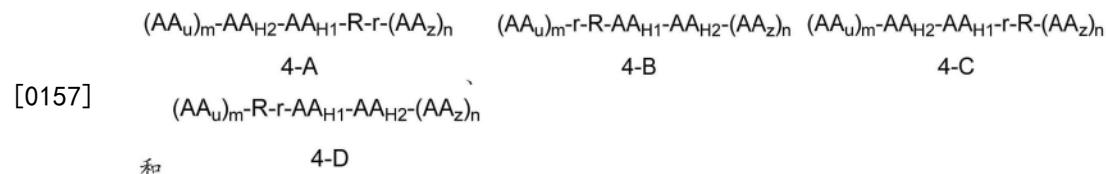
氨基酸	组	Eisenberg 和 Weiss	Engleman 等人	Kyrie 和 Doolittle	Hoop 和 Woods	Janin
Pro	非极性	-0.07	-0.2	-1.6	0.0	-0.3
Thr	不带电荷/极性	-0.18	1.2	-0.7	-0.4	-0.2
Ser	不带电荷/极性	-0.26	0.6	-0.8	0.3	-0.1
His	带电荷的	-0.40	-3.0	-3.2	-0.5	-0.1
Glu	带电荷的	-0.62	-8.2	-3.5	3.0	-0.7
Asn	不带电荷/极性	-0.64	-4.8	-3.5	0.2	-0.5
Gln	不带电荷/极性	-0.69	-4.1	-3.5	0.2	-0.7
Asp	带电荷的	-0.72	-9.2	-3.5	3.0	-0.6
Lys	带电荷的	-1.10	-8.8	-3.9	3.0	-1.8
Arg	带电荷的	-1.80	-12.3	-4.5	3.0	-1.4

[0154] 可以选择氨基酸的手性来改进胞质递送效率。在一些实施例中,至少两个氨基酸具有相反的手性。在一些实施例中,该具有相反手性的至少两个氨基酸可以彼此相邻。在一些实施例中,至少三个氨基酸相对具有交替立体化学。在一些实施例中,该至少三个相对具有交替手性的氨基酸可以彼此相邻。在一些实施例中,至少两个氨基酸具有相同的手性。在一些实施例中,该具有相同手性的至少两个氨基酸可以彼此相邻。在一些实施例中,至少两个氨基酸具有相同的手性,并且至少两个氨基酸具有相反的手性。在一些实施例中,该具有相反手性的至少两个氨基酸可以与该具有相同手性的至少两个氨基酸相邻。因此,在一些实施例中,cCPP中的相邻氨基酸可以具有以下任一序列:D-L;L-D;D-L-L-D;L-D-D-L;L-D-L-L-D;D-L-D-D-L;D-L-L-D-L;或L-D-D-L-D。

[0155] 在一些实施例中,精氨酸与疏水氨基酸相邻。在一些实施例中,该精氨酸具有与该疏水氨基酸相同的手性。在一些实施例中,至少两个精氨酸彼此相邻。仍然在其他实施例中,三个精氨酸彼此相邻。在一些实施例中,至少两个疏水氨基酸彼此相邻。在其他实施例中,至少三个疏水氨基酸彼此相邻。在其他实施例中,本文所述的cCPP包含至少两个连续的疏水氨基酸和至少两个连续的精氨酸。在进一步的实施例中,一个疏水氨基酸与一个精氨

酸相邻。仍然在其他实施例中,本文所述的cCPP包含至少三个连续的疏水氨基酸和三个连续的精氨酸。在进一步的实施例中,一个疏水氨基酸与一个精氨酸相邻。这些氨基酸的各种组合可以具有D和L氨基酸的任何排列,例如,上述序列。

[0156] 在一些实施例中,本文所述的cCPP中的任何四个相邻氨基酸(例如,根据式2的cCPP)可以具有以下序列之一:AA_{H2}-AA_{H1}-R-r、AA_{H2}-AA_{H1}-r-R、R-r-AA_{H1}-AA_{H2}、或r-R-AA_{H1}-AA_{H2},其中AA_{H1}和AA_{H2}中的每一者独立地为疏水氨基酸。因此,在一些实施例中,本文所述的多肽缀合物中使用的cCPP具有根据式4A-D中任一个的结构:



[0158] 其中:

[0159] AA_{H1}和AA_{H2}中的每一者独立地为疏水氨基酸;

[0160] AA_u和AA_z中的每一者在每种情况下并且当存在时独立地为任何氨基酸;并且

[0161] m和n独立选自从0到6的数字。

[0162] 在一些实施例中,式4-A至4-D的CPP中的氨基酸总数(包括r、R、AA_{H1}、AA_{H2}) 在6到10之间。在一些实施例中,氨基酸的总数为6。在一些实施例中,氨基酸的总数为7。在一些实施例中,氨基酸的总数为8。在一些实施例中,氨基酸的总数为9。在一些实施例中,氨基酸的总数为10。

[0163] 在一些实施例中,m和n的和为2到6。在一些实施例中,m和n的和为2。在一些实施例中,m和n的和为3。在一些实施例中,m和n的和为4。在一些实施例中,m和n的和为5。在一些实施例中,m和n的和为6。在一些实施例中,m为0。在一些实施例中,m为1。在一些实施例中,m为2。在一些实施例中,m为3。在一些实施例中,m为4。在一些实施例中,m为5。在一些实施例中,m为6。在一些实施例中,n为0。在一些实施例中,n为1。在一些实施例中,n为2。在一些实施例中,n为3。在一些实施例中,n为4。在一些实施例中,n为5。在一些实施例中,n为6。

[0164] 在一些实施例中,每个疏水氨基酸独立地选自甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、蛋氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、脯氨酸、萘丙氨酸、苯甘氨酸、均苯丙氨酸、酪氨酸、环己丙氨酸、哌啶-2-羧酸、环己丙氨酸、去亮氨酸,3-(3-苯并噻吩基)-丙氨酸、3-(2-喹啉基)-丙氨酸、0-苄基丝氨酸、3-(4-(苄氧基)苯基)-丙氨酸、S-(4-甲基苄基)半胱氨酸、N-(萘-2-基)谷氨酰胺、3-(1,1'-联苯-4-基)-丙氨酸、叔亮氨酸或烟碱酰赖氨酸,每一者任选地由一个或多个取代基取代。在特定实施例中,每个疏水氨基酸独立地为疏水芳香族氨基酸。在一些实施例中,该芳香族疏水氨基酸为萘丙氨酸、苯甘氨酸、高苯丙氨酸、苯丙氨酸、色氨酸或酪氨酸,每一者任选地由一个或多个取代基取代。在特定实施例中,该疏水氨基酸为哌啶-2-羧酸、萘丙氨酸、色氨酸或苯丙氨酸,每一者任选地由一个或多个取代基取代。

[0165] 在一些实施例中,AA_{H1}和AA_{H2}中的每一者独立地为疏水氨基酸,其疏水性值大于甘氨酸。在其他实施例中,AA_{H1}和AA_{H2}中的每一者独立地为疏水氨基酸,其疏水性值大于丙氨酸。仍然在其他实施例中,AA_{H1}和AA_{H2}中的每一者独立地为疏水氨基酸,其疏水性值大于苯丙氨酸,例如,如使用上述疏水性级别测量的那样,包括Eisenberg和Weiss (Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.1984;81(1):140-144),Engleman,等人(Ann.Rev.of

Biophys. Biophys. Chem. 1986; 1986 (15) : 321-53), Kyte和Doolittle (J. Mol. Biol. 1982; 157 (1) : 105-132), Hoop和Woods (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1981; 78 (6) : 3824-3828), 以及Janin (Nature. 1979; 277 (5696) : 491-492), (参见上表1)。在特定实施例中, 使用Engleman等人报道的疏水性级别来测量疏水性。

[0166] 也发现在D-Arg或L-Arg的N或C末端存在疏水氨基酸, 或其组合, 改进了cCPP (和所附货物) 的胞浆摄取。例如, 在一些实施例中, 本文公开的cCPP可以包括AA_{H1}-D-Arg或D-Arg-AA_{H1}。在其他实施例中, 本文公开的cCPP可以包括AA_{H1}-L-Arg或L-Arg-AA_{H1}。

[0167] 可以选择D-Arg或L-Arg或其组合 (即AA_{H1}) 的N或C末端上的疏水氨基酸的大小, 以改进CPP的胞浆递送效率。例如, 与具有较小疏水氨基酸的其他相同序列相比, D-Arg或L-Arg或其组合的N或C末端上较大的疏水氨基酸改进了胞浆递送效率。疏水氨基酸的大小可根据疏水氨基酸的分子量、疏水氨基酸的空间效应、侧链的溶剂可及表面积 (SASA) 或其组合来测量。在一些实施例中, 根据疏水氨基酸的分子量来测量疏水氨基酸的大小, 并且较大的疏水氨基酸具有分子量至少约为90g/mol、或至少约为130g/mol、或至少约为141g/mol的侧链。在其他实施例中, 根据疏水性侧链的SASA来测量氨基酸的大小, 并且较大的疏水氨基酸具有SASA大于丙氨酸或大于甘氨酸的侧链。在其他实施例中, AA_{H1}具有疏水性侧链, 其SASA大于或等于约哌啶-2-羧酸、大于或等于约色氨酸、大于或等于约苯丙氨酸、或等于或大于约萘丙氨酸。在一些实施例中, AA_{H1}具有具有SASA的侧链侧, 该SASA为至少约200 Å²、至少约210 Å²、至少约220 Å²、至少约240 Å²、至少约250 Å²、至少约260 Å²、至少约270 Å²、至少约280 Å²、至少约290 Å²、至少约300 Å²、至少约310 Å²、至少约320 Å²、或至少约330 Å²。在一些实施例中, AA_{H2}具有具有SASA的侧链侧, 该SASA为至少约200 Å²、至少约210 Å²、至少约220 Å²、至少约240 Å²、至少约250 Å²、至少约260 Å²、至少约270 Å²、至少约280 Å²、至少约290 Å²、至少约300 Å²、至少约310 Å²、至少约320 Å²、或者至少约330 Å²。在一些实施例中, AA_{H1}和AA_{H2}的侧链具有组合的SASA, 该SASA为至少约350 Å²、至少约360 Å²、至少约370 Å²、至少约380 Å²、至少约390 Å²、至少约400 Å²、至少约410 Å²、至少约420 Å²、至少约430 Å²、至少约440 Å²、至少约450 Å²、至少约460 Å²、至少约470 Å²、至少约480 Å²、至少约490 Å²、至少约500 Å²、至少约510 Å²、至少约520 Å²、至少约530 Å²、至少约540 Å²、至少约550 Å²、至少约560 Å²、至少约570 Å²、至少约580 Å²、至少约590 Å²、至少约600 Å²、至少约610 Å²、至少约620 Å²、至少约630 Å²、至少约640 Å²、至少约650 Å²、至少约660 Å²、至少约670 Å²、至少约680 Å²、至少约690 Å²、或至少约700 Å²。在一些实施例中, AA_{H2}是具有小于或等于AA_{H1}的疏水性侧链的SASA的侧链的疏水氨基酸。举例来说, 但不限于, 与具有Phe-Arg基序的其他相同的CPP相比, 具有Nal-Arg基序的cCPP表现出改进的胞浆递送效率; 与具有Nal-Phe-Arg基序的其他相同的cCPP相比, 具有Phe-Nal-Arg基序的cCPP表现出更高的胞浆递送效率; 并且与具有nal-Phe-Arg基序的其他相同的cCPP相比, phe-Nal-Arg基序表现出改进的胞浆递送效率。

[0168] 如本文所用, “疏水性表面积”或“SASA”是指可接触到溶剂的氨基酸侧链的表面积 (报道为平方 Angstroms; Å²)。在特定实施例中, 使用Shrake&Rupley (J Mol Biol. 79 (2) : 351-71) 开发的“滚动球”算法计算SASA, 其出于所有目的而全文以引入方式并入。这个算法使用特定半径的溶剂“球”来探测分子的表面。该球的典型值是1.4 Å, 近似于水分子的半径。

[0169] 某些侧链的SASA值如下表3所示。在某些实施例中, 本文所述的SASA值基于由Tien等人报道的下表3中所列的理论值。(PLOS ONE 8 (11) : e80635. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080635>, 其出于所有目的而全文以引入方式并入。

[0170] 表3.氨基酸侧链的SASA值。

残基	理论	经验	Miller 等人 (1987)	Rose 等人(1985)
丙氨酸	129.0	121.0	113.0	118.1
精氨酸	274.0	265.0	241.0	256.0
天冬酰胺	195.0	187.0	158.0	165.5
天冬氨酸	193.0	187.0	151.0	158.7
半胱氨酸	167.0	148.0	140.0	146.1
谷氨酸	223.0	214.0	183.0	186.2
谷氨酰胺	225.0	214.0	189.0	193.2
甘氨酸	104.0	97.0	85.0	88.1
组氨酸	224.0	216.0	194.0	202.5

残基	理论	经验	Miller 等人 (1987)	Rose 等人(1985)
异亮氨酸	197.0	195.0	182.0	181.0
亮氨酸	201.0	191.0	180.0	193.1
赖氨酸	236.0	230.0	211.0	225.8
蛋氨酸	224.0	203.0	204.0	203.4
苯丙氨酸	240.0	228.0	218.0	222.8
脯氨酸	159.0	154.0	143.0	146.8
丝氨酸	155.0	143.0	122.0	129.8
苏氨酸	172.0	163.0	146.0	152.5
色氨酸	285.0	264.0	259.0	266.3
酪氨酸	263.0	255.0	229.0	236.8
缬氨酸	174.0	165.0	160.0	164.5

[0173] 在一些实施例中,cCPP不包括 $AA_{H2}-AA_{H1}-R-r$ 、 $AA_{H2}-AA_{H1}-r-R$ 、 $R-r-AA_{H1}-AA_{H2}$ 或 $r-R-AA_{H1}-AA_{H2}$ 的N和/或C末端上的疏水氨基酸。在替代实施例中,cCPP不包括具有侧链比 AA_{H1} 或 AA_{H2} 中的至少一个大(如本文所述)的疏水氨基酸。在进一步的实施例中,cCPP不包括具有比表面积大于 AA_{H1} 的侧链的疏水氨基酸。例如,在 AA_{H1} 或 AA_{H2} 中的至少一个为苯丙氨酸的实施例中,cCPP不进一步包括苯丙氨酸(尽管cCPP包括至少一个小于 AA_{H1} 和 AA_{H2} 的疏水氨基酸,例如,亮氨酸)。仍然在其他实施例中,除了 $AA_{H2}-AA_{H1}-R-r$ 、 $AA_{H2}-AA_{H1}-r-R$ 、 $R-r-AA_{H1}-AA_{H2}$ 或 $r-R-AA_{H1}-AA_{H2}$ 中的疏水氨基酸之外,cCPP不包括苯丙氨酸。

[0174] 氨基酸(即D或L氨基酸)的手性可被选择以提高cCPP(以及如下所述的所附货物)的胞浆递送效率。在一些实施例中,精氨酸(例如, AA_{H1})的N或C末端上的疏水氨基酸具有与相邻精氨酸相同或相反的手性。在一些实施例中, AA_{H1} 具有与相邻精氨酸相反的手性。例如,当精氨酸是D-arg(即“r”)时, AA_{H1} 是D- AA_{H1} ,并且当精氨酸是L-Arg(即“R”)时, AA_{H1} 是L- AA_{H1} 。因此,在一些实施例中,本文公开的cCPP可包括以下基序中的至少一个:D- AA_{H1} -D-arg、D-arg-D- AA_{H1} 、L- AA_{H1} -L-Arg或L-Arg-L- AA_{H1} 。在特定实施例中,当精氨酸为D-arg时, AA_{H1} 可为D-

nal、D-trp或D-phe。在另一个非限制性实例中,当精氨酸为L-Arg时,AA_H可以是L-Nal、L-Trp或L-Phe。

[0175] 在一些实施例中,本文所述的cCPP包括三个精氨酸。因此,在一些实施例中,本文所述的cCPP包括以下序列之一:AA_{H2}-AA_{H1}-R-r-R、AA_{H2}-AA_{H1}-R-r-r、AA_{H2}-AA_{H1}-r-R-R、AA_{H2}-AA_{H1}-r-R-r、R-R-r-AA_{H1}-AA_{H2}、r-R-r-AA_{H1}-AA_{H2}、r-r-R-AA_{H1}-AA_{H2}或R-r-R-AA_{H1}-AA_{H2}。在特定实施例中,cCPP具有以下序列之一:AA_{H2}-AA_{H1}-R-r-R、AA_{H2}-AA_{H1}-r-R-r、r-R-r-AA_{H1}-AA_{H2}或R-r-R-AA_{H1}-AA_{H2}。在一些实施例中,可选择AAH₁和AAH₂的手性以提高胞质摄取效率,例如,如上所述,其中AAH₁具有与相邻精氨酸相同的手性,而AAH₁和AAH₂具有相反的手性。

[0176] 在一些实施例中,本文所述的cCPP包括三个疏水氨基酸。因此,在一些实施例中,本文所述的cCPP包括以下序列之一:AA_{H3}-AA_{H2}-AA_{H1}-R-r、AA_{H3}-AA_{H2}-AA_{H1}-R-r、AA_{H3}-AA_{H2}-AA_{H1}-r-R、AA_{H3}-AA_{H2}-AA_{H1}-r-R、R-r-AA_{H1}-AA_{H2}-AA_{H3}、R-r-AA_{H1}-AA_{H2}-AA_{H3}、r-R-AA_{H1}-AA_{H2}-AA_{H3}或r-R-AA_{H1}-AA_{H2}-AA_{H3},其中AA_{H3}是上述任何疏水氨基酸,例如,哌啶-2-羧酸、萘丙氨酸、色氨酸或苯丙氨酸。在一些实施例中,可选择AA_{H1}、AA_{H2}和AA_{H3}的手性以提高胞质摄取效率,例如,如上所述,其中AAH₁具有与相邻精氨酸相同的手性,而AA_{H1}和AA_{H2}具有相反的手性。在其他实施例中,AA_{H1}、AA_{H2}和AA_{H3}的大小可被选择以提高胞质摄取效率,例如,如上所述,其中AA_{H3}具有小于或等于AA_{H1}和/或AA_{H2}的SAS。

[0177] 在一些实施例中,AA_{H1}和AA_{H2}具有相同或相反的手性。在某些实施例中,AA_{H1}和AA_{H2}具有相反的手性。因此,在一些实施例中,本文公开的cCPP包括以下序列中的至少一个:D-AA_{H2}-L-AA_{H1}-R-r;L-AA_{H2}-D-AA_{H1}-r-R;R-r-D-AA_{H1}-L-AA_{H2};或r-R-L-AA_{H1}-D-AA_{H1},其中D-AA_{H1}和D-AA_{H2}中的每一者是具有D构型的疏水氨基酸,而L-AA_{H1}和L-AA_{H2}中的每一者是具有L构型的疏水氨基酸。在一些实施例中,D-AA_{H1}和D-AA_{H2}中的每一者独立地选自由D-pip、D-nal、D-trp和D-phe组成的组。在特定实施例中,D-AA_{H1}或D-AA_{H2}是D-nal。在其他特定实施例中,D-AA_{H1}是D-nal。在一些实施例中,L-AA_{H1}和L-AA_{H2}中的每一者独立地选自由L-Pip、L-Nal、L-Trp和L-Phe组成的组。在特定实施例中,L-AA_{H1}和L-AA_{H2}中的每一者都是L-Nal。

[0178] 如上所述,本公开提供了对环肽序列的各种修饰,其可提高胞浆递送效率。在一些实施例中,可以通过比较具有修饰的序列的CPP的胞质递送效率与适当的对照序列来测量改进的胞质摄取效率。在一些实施例中,对照序列不包括特定的修饰(例如,匹配R和AA_{H1}的手性),但在其他方面与修饰的序列相同。在其他实施例中,对照具有以下序列:环状(FΦRRRRQ)

[0179] 如本文所用,胞质递送效率是指cCPP穿过细胞膜进入胞质的能力。在实施例中,cCPP的胞浆递送效率不依赖于受体或细胞类型。胞浆递送效率可以指绝对胞浆递送效率或相对胞浆递送效率。

[0180] 绝对胞浆递送效率是生长培养基中cCPP(或多肽缀合物)的胞浆浓度与cCPP(或多肽缀合物)的浓度之比。相对胞浆递送效率是指与胞浆中对照cCPP的浓度相比,胞浆中cCPP的浓度。量化可以通过荧光标记cCPP(例如,使用FITC染料)和使用本领域中众所周知的技术测量荧光强度来实现。

[0181] 在特定实施例中,通过比较(i)由细胞类型(例如,HeLa细胞)内化的本发明cCPP的量与(ii)由相同细胞类型内化的对照cCPP的量来确定相对胞浆递送效率。为了测量相对胞质递送效率,可以在本发明的细胞穿透肽存在下将细胞类型培养特定时间段(例如,30分

钟、1小时、2小时等),之后使用本领域已知的方法(例如,荧光显微镜)量化细胞内化的cCPP的量。另外,将相同浓度的对照cCPP在同一时间段内在细胞类型存在的情况下培养,并且量化由细胞内化的对照cCPP的量。

[0182] 在其他实施例中,可通过测量具有用于细胞内靶点的修饰的序列的cCPP的 IC_{50} ,并将具有修饰的序列的cCPP的 IC_{50} 与适当的对照序列(如本文所述)进行比较来确定相对胞质递送效率。

[0183] 在一些实施例中,与例如环状(F Φ RRRRQ)或线性细胞穿透肽序列(诸如HIV-TAT、聚精氨酸序列等)相比,本文所述的cCPP的相对胞浆递送效率在约1%到约1000%之间,例如、约1%、约5%、约10%、约20%、约30%、约40%、约50%、约60%、约70%、约80%、约90%、约100%、约110%、约120%、约130%、约140%、约150%、约160%、约170%、约180%、约190%、约200%、约210%、约220%、约230%、约240%、约250%、约260%、约270%、约280%、约290%、约300%、约310%、约320%、约330%、约340%、约350%、约360%、约370%、约380%、约390%、约400%、约410%、约420%、约430%、约440%、约450%、约460%、约470%、约480%、约490%、约500%、约510%、约520%、约530%、约540%、约550%、约560%、约570%、约580%、约590%、约600%、约610%、约620%、约630%、约640%、约650%、约660%、约670%、约680%、约690%、约700%、约710%、约720%、约730%、约740%、约750%、约760%、约770%、约780%、约790%、约800%、约810%、约820%、约830%、约840%、约850%、约860%、约870%、约880%、约890%、约900%、约910%、约920%、约930%、约940%、约950%、约960%、约970%、约980%或约1000%,包括介于两者之间所有值和子范围。

[0184] 在其他实施例中,约40%至约100%的绝对胞浆递送效率,例如约45%、约50%、约55%、约60%、约65%、约70%、约75%、约80%、约85%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%,包括介于两者之间所有值和子范围。

[0185] 表4提供了合适的环状细胞穿透肽的非限制性实例。

[0186] 表4. 环状细胞穿透肽的实例。

[0187]

ID	cCPP 序列
PCT 1	环状 (FΦRRRQ)
PCT 2	环状 (FΦRRRC)
PCT 3	环状 (FΦRRRU)
PCT 4	环状 (RRRΦFQ)
PCT 5	环状 (RRRRΦF)
PCT 6	环状 (FΦRRRR)
PCT 7	环状 (FΦrRrRq)
PCT 8	环状 (FΦrRrRQ)
PCT 9	环状 (FΦRRRRQ)
PCT 10	环状 (fΦRrRrQ)
PCT 11	环状 (RRFRΦRQ)
PCT 12	环状 (FRRRRΦQ)
PCT 13	环状 (rRFRΦRQ)
PCT 14	环状 (RRΦFRRQ)
PCT 15	环状 (CRRRRFWQ) (SEQ ID NO:2, 仅加下划线的部分)
PCT 16	环状 (FfΦRrRrQ)
PCT 17	环状 (FFΦRRRRQ)
PCT 18	环状 (RFRFRΦRQ)
PCT 19	环状 (URRRRFWQ) (SEQ ID NO:3, 仅加下划线的部分)
PCT 20	环状 (CRRRRFWQ) (SEQ ID NO:4, 仅加下划线的部分)
PCT 21	环状 (FΦRRRRQK)
PCT 22	环状 (FΦRRRRQC)
PCT 23	环状 (fΦRrRrRQ)
PCT 24	环状 (FΦRRRRRQ)
PCT 25	环状 (RRRRΦFDΩC)

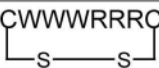
[0188]

PCT 26	环状 (FΦRRR)
PCT 27	环状 (<u>FWRRR</u>) (SEQ ID NO:5, 仅加下划线的部分)
PCT 28	环状 (RRRΦF)
PCT 29	环状 (<u>RRRWF</u>) (SEQ ID NO:6, 仅加下划线的部分)
SAR 1	环状 (FΦRRRRQ)
SAR 19	环状 (<u>FFRRRQ</u>) (SEQ ID NO:7, 仅加下划线的部分)
SAR 20	环状 (FFrRrQ)
SAR 21	环状 (FFRrRQ)
SAR 22	环状 (<u>FRFRRQ</u>) (SEQ ID NO:8, 仅加下划线的部分)
SAR 23	环状 (<u>FRRFRQ</u>) (SEQ ID NO:9, 仅加下划线的部分)
SAR 24	环状 (<u>FRRRFQ</u>) (SEQ ID NO:10, 仅加下划线的部分)
SAR 25	环状 (GΦRRRQ)
SAR 26	环状 (<u>FFFRAQ</u>) (SEQ ID NO:11, 仅加下划线的部分)
SAR 27	环状(<u>FFFRQ</u>) (SEQ ID NO:12, 仅加下划线的部分)
SAR 28	环状 (FFRRRRQ) (SEQ ID NO:13, 仅加下划线的部分)
SAR 29	环状(<u>FRRFRQ</u>) (SEQ ID NO:14, 仅加下划线的部分)
SAR 30	环状(<u>FRRFRQ</u>) (SEQ ID NO:15, 仅加下划线的部分)
SAR 31	环状(<u>RFFRRQ</u>) (SEQ ID NO:16, 仅加下划线的部分)
SAR 32	环状(<u>RFRFRQ</u>) (SEQ ID NO:17, 仅加下划线的部分)
SAR 33	环状(<u>FRFRRQ</u>) (SEQ ID NO:18, 仅加下划线的部分)
SAR 34	环状(<u>FFRRRQ</u>) (SEQ ID NO:19, 仅加下划线的部分)
SAR 35	环状(<u>FFRRRFQ</u>) (SEQ ID NO:20, 仅加下划线的部分)
SAR 36	环状(<u>FRFFRRQ</u>) (SEQ ID NO:21, 仅加下划线的部分)
SAR 37	环状(<u>RRFFFRQ</u>) (SEQ ID NO:22, 仅加下划线的部分)
SAR 38	环状(<u>FFRFRQ</u>) (SEQ ID NO:23, 仅加下划线的部分)
SAR 39	环状(<u>FFRRFRQ</u>) (SEQ ID NO:24, 仅加下划线的部分)
SAR 40	环状(<u>FRRFRQ</u>) (SEQ ID NO:25, 仅加下划线的部分)
SAR 41	环状(<u>FRRFRQ</u>) (SEQ ID NO:26, 仅加下划线的部分)
SAR 42	环状(<u>FRFRFRQ</u>) (SEQ ID NO:27, 仅加下划线的部分)
SAR 43	环状(<u>RFFRFRQ</u>) (SEQ ID NO:28, 仅加下划线的部分)

[0189]

SAR 44	环状 (GΦRRRRQ)
SAR 45	环状(<u>FFFRRRRQ</u>) (SEQ ID NO:29, 仅加下划线的部分)
SAR 46	环状(<u>RFFRRRRQ</u>) (SEQ ID NO:30, 仅加下划线的部分)
SAR 47	环状(<u>RRFFRRRQ</u>) (SEQ ID NO:31, 仅加下划线的部分)
SAR 48	环状(<u>RFFFRRRQ</u>) (SEQ ID NO:32, 仅加下划线的部分)
SAR 49	环状(<u>RRFFFRRQ</u>) (SEQ ID NO:33, 仅加下划线的部分)
SAR 50	环状(<u>FFRRFRRQ</u>) (SEQ ID NO:34, 仅加下划线的部分)
SAR 51	环状(<u>FFRRRRFQ</u>) (SEQ ID NO:35, 仅加下划线的部分)
SAR 52	环状(<u>FRRFRRRQ</u>) (SEQ ID NO:36, 仅加下划线的部分)
SAR 53	环状(<u>FFRRRRRRQ</u>) (SEQ ID NO:37, 仅加下划线的部分)
SAR 54	环状(<u>FFRRRRRRRQ</u>) (SEQ ID NO:38, 仅加下划线的部分)
SAR 55	环状 (FΦRrRrQ)
SAR 56	环状 (<u>XXRRRRQ</u>) (SEQ ID NO:39, 仅加下划线的部分)
SAR 57	环状 (FfRrRrQ)
SAR 58	环状 (fFfRrRrQ)
SAR 59	环状 (fFfRrRrQ)
SAR 60	环状 (FfRrRrQ)
SAR 61	环状 (fFΦRrRrQ)
SAR 62	环状 (fΦfRrRrQ)
SAR 63	环状 (ΦFfRrRrQ)
SAR 64	环状 (FΦRrRrQ)
SAR 65	环状 (fΦRrRrQ)
SAR 66	Ac-(Lys-fFfRrRrD)
SAR 67	Ac-(Dap-fFfRrRrD)
SAR 68	CWRRRRRC └─S──S─┘
SAR 69	CWWRRRRRC └─S──S─┘
SAR 70	CFWRRRRRC └─S──S─┘

[0190]

SAR 71	
Pin1 15	环状 (Pip-Nal-Arg-Glu-arg-arg-glu)
Pin1 16	环状 (Pip-Nal-Arg-Arg-arg-arg-glu)
Pin1 17	环状 (Pip-Nal-Nal-Arg-arg-arg-glu)
Pin1 18	环状 (Pip-Nal-Nal-Arg-arg-arg-Glu)
Pin1 19	环状 (Pip-Nal-Phe-Arg-arg-arg-glu)
Pin1 20	环状 (Pip-Nal-Phe-Arg-arg-arg-Glu)
Pin1 21	环状 (Pip-Nal-phe-Arg-arg-arg-glu)
Pin1 22	环状 (Pip-Nal-phe-Arg-arg-arg-Glu)
Pin1 23	环状 (Pip-Nal-nal-Arg-arg-arg-Glu)
Pin1 24	环状 (Pip-Nal-nal-Arg-arg-arg-glu)
Rev-13	[Pim-RQRR-Nlys]GRRR ^b
hLF	
cTat	[KrRrGrKkRrE] ^c
cR10	[KrRrRrRrRrRE] ^c
L-50	[RVTRTGKRRIRRpP]
L-51	[RTRTRGKRRIRVpP]
[WR]₄	[WRWRWRWR]
MCoTI-II	
Rotstein 等人, <i>Chem.Eur.J.</i> 2011	[P-Cha-r-Cha-r-Cha-r-Cha-r-G] ^d
Lian 等人, <i>J. Am. Chem.Soc.</i> 2014	Tm(SvP-F ₂ Pmp-H)-Dap-(FΦRRRR-Dap)] ^f
Lian 等人, <i>J. Am. Chem.Soc.</i> 2014	[Tm(a-Sar-D-pThr-Pip-ΦRAa)-Dap-(FΦRRRR-Dap)] ^f
IA8b	[CRRSRRGCGRRSRRCG] ^g
Dod-[R_s]	[K(Dod)RRRR]

[0191]

LK-3	LKKLCKLLKKLCKLAG LKKLCKLLKKLCKLAG
	RRRR-[KRRRE] ^c
	RRR-[KRRRRE] ^c
	RR-[KRRRRRE] ^c
	R-[KRRRRRRE] ^c
[CR]₄	[CRCRCRCR]
cyc3	[Pra-LRKRLRKFRN-AzK] ^h
PMB	T-Dap-[Dap-Dap-f-L-Dap-Dap-T]
GPMB	T-Agp-[Dap-Agp-f-L-Agp-Agp-T]
cCPP1	环状 (FΦRRRRQ)
cCPP12	环状 (FfΦRrRrQ)
cCPP9	环状 (fΦRrRrQ)
cCPP11	环状 (fΦRrRrRQ)
cCPP18	环状 (FΦrRrRq)
cCPP13	环状 (FΦrRrRQ)
cCPP6	环状 (FΦRRRRRQ)
cCPP3	环状 (RRFRΦRQ)
cCPP7	环状 (FFΦRRRRQ)
cCPP8	环状 (RFRFRΦRQ)
cCPP5	环状 (FΦRRRQ)
cCPP4	环状 (FRRRRΦQ)
cCPP10	环状 (rRFRΦRQ)
cCPP2	环状 (RRΦFRRQ)

[0192] Φ是L-2-萘丙氨酸;Pim是庚二酸;Nlys是赖氨酸类肽残基;D-pThr是D-磷酸苏氨酸;Pip是L-哌啶-2-羧酸;Cha是L-3-环己基-丙氨酸;Tm是均苯三甲酸;Dap是L-2,3-二氨基丙酸;Sar是肌氨酸;F₂Pmp是L-二氟磷酰基甲基苯丙氨酸;Dod是十二烷酰基;Pra是L-炔丙基甘氨酸;AzK是L-6-叠氮基-2-氨基己酸;Agp是L-2-氨基-3-胍基丙氨酸;^b Pim与Nlys之间的环化;^c Lys与Glu之间的环化;^d 通过与氮丙啶醛和异氰酸酯发生多组分反应进行大环化;^e Gln残基的主链之间的环化;^f 用Tm双环化的两个Dap残基的N末端胺和侧链;^g 用三(溴甲基)苯双环化的三个Cys侧链;^h 通过Pra与Azk之间的点击反应环化。

[0193] 另外,本文所述的多肽缀合物和方法中使用的cCPP可包括在以下参考文献中公开的任何序列:美国申请号15/312,878(美国公布号US2017/0190743 A1);美国申请号15/360,719(美国公布号US2017/0355730);PCT/US2017/060881(以及由此产生的美国公布);以及PCT/US2017/062951(以及由此产生的美国公布),这些参考文献中的每一者出于所有目的而全文以引入方式并入。

[0194] 在一些实施例中,cCPP使得细胞溶质递送效率与直链细胞穿膜肽的序列(诸如HIV-TAT、聚精氨酸等)相比提高约1.1倍至约30倍,例如约1.2倍、约1.3倍、约1.4倍、约1.5

倍、约1.6倍、约1.7倍、约1.8倍、约1.9倍、约2.0倍、约2.5倍、约3.0倍、约3.5倍、约4.0倍、约4.5倍、约5.0倍、约5.5倍、约6.0倍、约6.5倍、约7.0倍、约7.5倍、约8.0倍、约8.5倍、约9.0倍、约10倍、约10.5倍、约11.0倍、约11.5倍、约12.0倍、约12.5倍、约13.0倍、约13.5倍、约14.0倍、约14.5倍、约15.0倍、约15.5倍、约16.0倍、约16.5倍、约17.0倍、约17.5倍、约18.0倍、约18.5倍、约19.0倍、约19.5倍、约20倍、约20.5倍、约21.0倍、约21.5倍、约22.0倍、约22.5倍、约23.0倍、约23.5倍、约24.0倍、约24.5倍、约25.0倍、约25.5倍、约26.0倍、约26.5倍、约27.0倍、约27.5倍、约28.0倍、约28.5倍、约29.0倍或约29.5倍,包括它们之间的所有值和子范围。

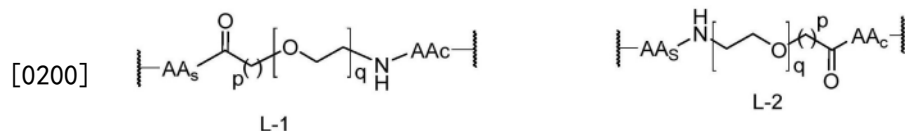
[0195] 接头

[0196] 如上所述,cCPP可直接缀合至装订肽(例如,通过cCPP上氨基酸的侧链与装订肽上的适当基团之间的共价键),或者可使用接头来将cCPP缀合至装订肽。如本文所用,“接头”是指在本文所公开的多肽缀合物的两个或更多个部件(例如,cCPP和经由装订钉装订的肽或该肽)之间形成共价键的部分。

[0197] 在各种实施例中,接头与cCPP上的氨基酸和该肽或该装订钉上的氨基酸共价结合。接头可以是缀合cCPP部分、肽和装订钉中的两个或更多个的任何部分。在一些实施例中,接头可以是氨基酸。在其他实施例中,接头的前体可以是能够与cCPP、肽,装订钉以及它们的组合中的氨基酸形成两个或更多个键的任何合适的分子。因此,在各种实施例中,接头的前体具有两个或更多个官能团,该两个或更多个官能团中的每一个能够与cCPP部分、肽和装订钉中的至少两个形成共价键。例如,接头可以与cCPP部分、肽或装订钉中的任何氨基酸的N末端、C末端或侧链或它们的组合共价结合。在特定实施例中,接头在cCPP与肽之间形成共价键。

[0198] 在一些实施例中,接头选自由以下项组成的组:至少一种氨基酸、亚烷基、亚烯基、亚炔基、芳基、环烷基、环烯基、环炔基、杂环基、杂芳基、醚,它们中的每一者可以如上所定义地被任选地取代。接头的非限制性示例包括聚乙二醇,该聚乙二醇任选地缀合至赖氨酸残基。

[0199] 在一些实施例中,接头与装订肽上的氨基酸的N末端或C末端共价结合,或与cCPP、肽或装订钉上的谷氨酰胺、天冬酰胺或赖氨酸的侧链,或谷氨酰胺或天冬酰胺的经修饰的侧链(例如,具有氨基的被还原的侧链)共价结合。在特定的实施例中,接头与cCPP上的谷氨酰胺侧链形成键。在其他特定的实施例中,本文所述的接头具有L-1或L-2的结构:



[0201] 其中

[0202] AA_s是肽或装订钉上的氨基酸的侧链或末端;

[0203] AA_c是cCPP的氨基酸的侧链或末端;

[0204] p是0至10的整数;并且

[0205] q是1至50的整数。

[0206] 在一些实施例中,在多肽缀合物进入细胞的细胞溶质后,接头能够从cCPP释放装订肽。在一些实施例中,接头包含基团,或在与cCPP、肽、装订钉或它们的组合结合后形成基

团,该基团在细胞溶质摄取多肽缀合物后被切割以从而释放肽。生理上可切割的连接基团的非限制性示例包括碳酸根、硫代碳酸根、硫代酯、二硫键、亚砷、胍、蛋白酶可切割的二肽接头等。

[0207] 例如,在实施例,接头经由二硫键(例如与位于装订肽或cCPP中的半胱氨酸或半胱氨酸类似物的侧链的二硫键)与装订肽共价结合。在一些实施例中,二硫键在接头的前体上的硫醇基与肽上的具有硫醇基的半胱氨酸或氨基酸类似物的侧链之间形成,其中所述硫醇基中的每一个上的氢键被与硫原子的键合所取代。上文讨论了可与本文所公开的多肽缀合物一起使用的具有巯基的氨基酸类似物的非限制性示例。

[0208] 治疗方法

[0209] 如上所述,本文所述的多肽缀合物可用于治疗或预防有此需要的患者的疾病、疾患或病症。在一些实施例中,治疗是指部分或完全地缓解、改善、减轻、抑制、延迟发作、降低患者的疾病、疾患或病症的严重性和/或发生率。

[0210] 如本文所用的术语“改善”、“增加”、“减少”、“降低”等表示相对于对照的值。在一些实施例中,合适的对照是基线测量,例如同一个体在本文描述的治疗起始之前的测量,或在没有本文描述的治疗的情况下一个对照个体(或多个对照个体)的测量。

[0211] 被治疗的个体(也称为“患者”)是指患有疾病、疾患或病症或具有发展成疾病、疾患或病症的可能性的个体(胎儿、婴儿、儿童、青少年或成年人类)。

[0212] 在一些实施例中,个体是最近被诊断出患有疾病、疾患或病症的个体。通常,早治疗(在诊断后尽快开始治疗)对于使疾病、疾患或病症的影响最小化以及使治疗的益处最大化而言是重要的。

[0213] 在一些实施例中,多肽缀合物可用于治疗被诊断为癌症的个体。本发明的多肽缀合物可用于治疗例如以下癌症:脑瘤,如听神经鞘瘤;星形细胞瘤,如纤维性星形细胞瘤、原浆性星形细胞瘤、肥胖细胞型星形细胞瘤(gemistocytary astrocytoma)、间变性星形细胞瘤、毛细胞型星形细胞瘤、成胶质细胞瘤、神经胶质肉瘤、多形性黄色星形细胞瘤、室管膜下大细胞巨细胞型星形细胞瘤和婴儿促纤维增生型星形细胞瘤;脑淋巴瘤、脑转移;垂体肿瘤,诸如催乳素瘤、垂体偶发瘤(hypophyseal incidentaloma)、HGH(人类生长激素)产生的腺瘤及促肾上腺皮质素腺瘤、颅咽管瘤、神经管胚细胞瘤、脑膜瘤及少突神经胶质瘤;神经肿瘤(例如植物神经系统的肿瘤,例如神经胚细胞瘤、神经节瘤、副神经节瘤(亲铬性细胞瘤、嗜铬细胞瘤)及颈动脉球肿瘤,末梢神经系统上的肿瘤(例如截肢性神经瘤、神经纤维瘤、神经细胞瘤(neurinoma)(神经鞘瘤(neurilemmoma)、神经鞘瘤(Schwannoma))及恶性神经鞘瘤),以及中枢神经系统的肿瘤(例如脑瘤及骨髓肿瘤);肠癌(例如直肠、结肠、肛门及十二指肠的癌);眼睑肿瘤(眼睑器官的基底细胞癌或腺癌);视网膜母细胞瘤;胰腺癌;膀胱癌;肺肿瘤(支气管癌小细胞肺癌(SCLC)、非小细胞肺癌(NSCLC)例如梭形细胞板上皮癌、腺癌(腺泡癌、乳突癌、细支气管肺泡癌)及大细胞支气管癌(巨细胞癌、透明细胞癌));乳腺癌(例如导管、小叶、粘液或小管癌、佩吉特氏癌(Paget's carcinoma));非霍奇金淋巴瘤(B淋巴或T淋巴NHL)(例如毛细胞白血病、伯基特淋巴瘤(Burkitt's lymphoma)或蕈状肉芽肿(mucosis fungoides));霍奇金病;子宫癌(子宫体癌或子宫内膜癌);CUP综合征(未知原发性癌症);卵巢癌(卵巢癌粘液或浆液性囊肿、子宫内膜肿瘤、透明细胞肿瘤、布伦纳氏肿瘤(Brenner's tumour));胆囊癌;胆管癌(例如肝门胆管肿瘤(Klatskin tumor));睾丸癌(生

殖或非生殖细胞肿瘤)；喉癌(例如声带的声门上、声门及声门下肿瘤)；骨癌(例如骨软骨瘤、软骨瘤、软骨母细胞瘤、软骨粘液性纤维瘤、软骨肉瘤、骨瘤、骨样骨瘤、骨胚细胞瘤、骨肉瘤、非骨化性骨纤维瘤、纤维骨瘤、促纤维化骨纤维瘤、骨纤维肉瘤、恶性纤维性组织细胞瘤、破骨细胞瘤或巨细胞肿瘤、尤因氏肉瘤(Ewing's sarcoma)、及浆细胞瘤)，头颈肿瘤(HNO肿瘤)(例如唇及口腔的肿瘤(唇、舌、口腔的癌)、鼻咽癌(鼻的肿瘤、淋巴上皮瘤)、咽癌、口咽癌、扁桃腺癌(扁桃体恶性黑色素瘤(tonsil malignoma))及舌(底)的癌、下咽癌、喉癌(喉头癌)、副鼻窦及鼻腔的肿瘤、唾液腺及耳的肿瘤)；肝细胞癌(liver cell carcinoma)(肝细胞瘤(hepatocellular carcinoma)(HCC))；白血病(例如急性白血病(例如急性淋巴/淋巴母细胞白血病(ALL)、急性髓细胞性白血病(AML))；慢性淋巴性白血病(CLL)、慢性髓细胞性白血病(CML))；胃癌(乳突、小管或粘液腺癌、腺鳞状细胞癌、鳞状或未分化癌；恶性黑色素瘤(例如浅表播散性(SSM)、结节性(NMM)、恶性雀斑性(LMM)、肢端性(ALM)或无黑色素性恶性黑色素瘤(AMM))；肾癌(例如肾细胞癌(肾上腺瘤或格拉维茨氏肿瘤(Grawitz's tumour)))；食道癌；阴茎癌；前列腺癌；阴道癌(阴道肿瘤或子宫颈癌)；甲状腺癌(例如乳突、滤泡、髓或未分化性甲状腺癌)；胸腺癌(胸腺瘤)；尿道癌(尿道癌(carcinoma of the urethra)、尿道上皮癌)及外阴癌。

[0214] 在其他实施例中，多肽缀合物可用于治疗炎性疾病或疾患。该炎性疾病或疾患可能是呼吸道疾病，诸如哮喘或慢性阻塞性肺疾病；慢性退行性疾病，诸如类风湿性关节炎、骨关节炎或骨质疏松症；皮肤病症，诸如银屑病、硬皮病、特应性皮炎、鱼鳞病、天疱疮、痤疮，皮肤老化或皱纹；慢性脱髓鞘疾病，诸如多发性硬化症；炎症性肠病，诸如溃疡性结肠炎或克罗恩氏病；牙科疾病，诸如牙周疾病或牙龈炎；炎性指甲疾病，诸如指甲牛皮癣；扁平苔藓、斑秃、全身性红斑狼疮、糖尿病性肾病、狼疮性肾炎、IgA肾病或肾小球性肾炎、移植抗宿主疾病或眼科病症。

[0215] 在其他实施例中，该多肽缀合物用于治疗自身免疫疾病或病症。自身免疫疾病或病症可以是胰岛素依赖型糖尿病、多发性硬化症、类风湿性关节炎、自身免疫性葡萄膜炎、原发性胆汁性肝硬化、重症肌无力、干燥综合征、寻常型天疱疮、硬皮病、恶性贫血、全身性红斑狼疮、格拉夫病(Grave's disease)、炎症性肠病、乳糜泻、自身免疫性甲状腺疾病(诸如桥本氏病)、自身免疫性肝病、艾迪生氏病、移植排斥、移植抗宿主病、宿主抗移植病、强直性脊柱炎、恰加斯氏病(Chagas disease)、慢性阻塞性肺疾病、克罗恩病、皮炎、子宫内膜异位症、古德帕斯彻氏综合征(Goodpasture's syndrome)、格林-巴利综合征(Guillain-Barré syndrome, GBS)、化脓性汗腺炎、川崎病、IgA肾病、特发性血小板减少性紫癜、间质性膀胱炎、混合性结缔组织病、硬斑病、发作性睡病、神经性肌强直、牛皮癣、银屑病性关节炎、多发性肌炎、复发性多软骨炎、结节病、精神分裂症、僵人综合征、颞动脉炎、溃疡性结肠炎、血管炎、白癜风、韦格纳肉芽肿病，以及它们的组合。

[0216] 本文提供的多肽缀合物可以例如通过破坏天然蛋白质-蛋白质、蛋白质-配体和/或蛋白质-受体相互作用来治疗上述疾病、疾患或病症。例如，许多生物学上重要的蛋白质/蛋白质相互作用，诸如p53/MDM2和Bcl-X1/Bak，是由一种蛋白质介导的，该蛋白向其接受螺旋的配偶体的间隙(cleft)中提供螺旋。在所有报告的癌症病例的几乎一半中已经鉴定出p53与MDM2的相互作用以及p53基因的突变(参见Shair Chem.&Biol.1997,4,791,该参考文献的全部内容以引用方式并入本文)。当对细胞施加应力时，据信p53会指挥导致细胞周期

停滞和DNA修复或程序性细胞死亡的应答。除了直接改变p53蛋白质的功能的p53基因突变外,p53还可通过MDM2改变来改变。MDM2蛋白质已显示为与p53结合,并通过与p53的反式激活结构域缔合来破坏转录激活。例如,衍生自p53的反式激活结构域的具有11个氨基酸的肽形成了2.5匝的两亲性 α -螺旋,该两亲性 α -螺旋插入到MDM2裂隙中。

[0217] 联合疗法

[0218] 在一些实施例中,本文公开的多肽缀合物可以与其他疗法组合施用。多种多肽缀合物可以作为相同治疗方案的组成部分同时、顺序地或在不同的时间点施用。

[0219] 在一些实施例中,本文公开的多肽缀合物是与一种或多种化学治疗剂联合施用的。可以与根据本发明的化合物联合施用的化疗剂包括但不限于激素、激素类似物和抗激素剂(例如,它莫西芬(tamoxifen)、托瑞米芬(toremifene)、雷洛昔芬(raloxifene)、氟维司群(fulvestrant)、醋酸甲地孕酮、氟他胺、尼鲁米特(nilutamide)、比卡鲁胺、氨鲁米特(aminoglutethimide)、醋酸环丙孕酮、非那雄胺、醋酸布舍瑞林(buserelin acetate)、氟氢可的松、氟甲睾酮、甲羟孕酮、奥曲肽)、芳香酶抑制剂(例如,阿那曲唑(anastrozole)、来曲唑(letrozole)、利阿唑(liarozole)、伏氯唑(vorozole)、依西美坦(exemestane)、阿他美坦(atamestane))、LHRH激动剂和拮抗剂(例如醋酸戈舍瑞林(goserelin acetate)、luprolide)、生长因子抑制剂(生长因子是诸如“血小板衍化生长因子”和“肝细胞生长因子”,抑制剂是例如“生长因子”抗体、“生长因子受体”抗体和酪氨酸激酶抑制剂,例如吉非替尼(gefitinib)、拉帕替尼(lapatinib)和曲妥珠单抗(trastuzumab));信号转导抑制剂(例如,伊马替尼(imatinib)和索拉非尼(sorafenib));抗代谢药(例如抗叶酸剂,诸如甲氨蝶呤、培美曲塞(pemetrexed)和雷替曲塞(raltitrexed);嘧啶类似物,诸如5-氟尿嘧啶、卡培他滨(capecitabine)和吉西他滨(gemcitabine);嘌呤和腺苷类似物,诸如巯基嘌呤、硫鸟嘌呤、克拉屈滨(cladribine)和喷司他丁(pentostatin)、阿糖胞苷、氟达拉滨);抗肿瘤抗生素(例如蒽环类抗生素,诸如阿霉素(doxorubicin)、柔红霉素(daunorubicin)、表柔比星(epirubicin)和伊达比星(idarubicin)、丝裂霉素-C、博莱霉素(bleomycin)、更生霉素(dactinomycin)、普卡霉素(plicamycin)、链脲霉素(streptozocin));铂衍生物(例如顺铂、奥沙利铂、卡铂);烷基化试剂(例如,雌莫司汀(estramustine)、氮芥(meclorothamine)、美法仑、苯丁酸氮芥、白消安(busulphan)、达卡巴嗪(dacarbazine)、环磷酰胺、异环磷酰胺、替莫唑胺、亚硝基脲(诸如卡莫司汀(carmustine)和洛莫司汀(lomustine)、噻替派(thiotepa));抗有丝分裂剂(例如长春花生物碱,诸如长春花碱、长春地辛、长春瑞滨和长春新碱;以及紫杉烷类,诸如紫杉醇、多西紫杉醇);拓扑异构酶抑制剂(例如表鬼臼毒素类,诸如依托泊苷(etoposide)和磷酸依托泊苷(etopophos)、替尼泊苷、安吡啶(amsacrine)、拓扑替康(topotecan)、伊立替康(irinotecan)、米托蒽醌)和各种化疗剂,诸如氨磷汀、阿那格雷、氯膦酸盐(clodronate)、非格司亭(filgrastin)、干扰素 α 、甲酰四氢叶酸(leucovorin)、利妥昔单抗(rituximab)、丙卡巴嗪(procarbazine)、左旋咪唑(levamisole)、美司钠(mesna)、米托坦(mitotane)、帕米膦酸二钠(pamidronate)和卟吩姆钠(porfimer)。

[0220] 制备方法

[0221] 如本领域技术人员所理解的,本文描述的多肽缀合物可以以有机合成领域的技术人员已知的各种方式或其变型来制备。本文所述的化合物可以由容易获得的起始材料制

备。最佳反应条件可以随所使用的特定反应物或溶剂而变化,但是此类条件可以由本领域技术人员确定。

[0222] 本文所述的化合物的变化包括对关于每种化合物所述的各种成分的添加、减去或移动。类似地,当一个分子中存在一个或多个手性中心时,可以改变分子的手性。另外,化合物合成可涉及各种化学基团的保护和脱保护。保护和脱保护的使用以及适当保护基的选择可以由本领域技术人员确定。保护基的化学性质可见于例如Wuts和Greene, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 第4版, Wiley&Sons, 2006中,该参考文献整体以引用方式并入本文。

[0223] 用于制备所公开的化合物和组合物的起始材料和试剂可从商业供应商处获得,所述商业供应商为诸如Aldrich Chemical Co., (Milwaukee,WI)、Acros Organics (Morris Plains,NJ)、Fisher Scientific (Pittsburgh,PA)、Sigma (St.Louis,MO)、Pfizer (New York,NY)、GlaxoSmithKline (Raleigh,NC)、Merck (Whitehouse Station,NJ)、Johnson&Johnson (New Brunswick,NJ)、Aventis (Bridgewater,NJ)、AstraZeneca (Wilmington,DE)、Novartis (Basel,Switzerland)、Wyeth (Madison,NJ)、Bristol-Myers-Squibb (New York,NY)、Roche (Basel,Switzerland)、Lilly (Indianapolis,IN)、Abbott (Abbott Park,IL)、Schering Plough (Kenilworth,Nj),或Boehringer Ingelheim (Ingelheim,Germany);或者是通过本领域技术人员已知的方法按照参考文献中所述的方法制备的,所述参考文献为诸如Fieser and Fieser's *Reagents for Organic Synthesis*, 第1-17卷 (John Wiley and Sons, 1991); Rodd's *Chemistry of Carbon Compounds*, 第1-5卷和增刊 (Elsevier Science Publishers, 1989); *Organic Reactions*, 第1-40卷 (John Wiley and Sons, 1991); March's *Advanced Organic Chemistry*, (John Wiley and Sons, 第4版); 以及 Larock's *Comprehensive Organic Transformations* (VCH Publishers Inc., 1989)。可以从商业来源获得其他材料,诸如本文所公开的药物载体。

[0224] 用于产生本文所述化合物的反应可以在溶剂中进行,该溶剂可以由有机合成领域的技术人员进行选择。在进行反应的条件(即温度和压力)下,溶剂可以基本上不与起始材料(反应物)、中间体或产物反应。反应可以在一种溶剂或多于一种溶剂的混合物中进行。可以根据本领域已知的任何合适的方法来监测产物或中间体的形成。例如,可以通过光谱手段(诸如核磁共振光谱(例如, ^1H 或 ^{13}C)红外光谱、分光光度法(例如,紫外-可见光)或质谱法)或者通过色谱法(诸如高效液相色谱(HPLC)或薄层色谱)来监测产物形成。

[0225] 所公开的化合物可以通过固相肽合成来制备,其中氨基酸 α -N-末端被酸保护基或碱保护基保护。此类保护基应具有对肽键形成条件稳定,同时易于去除而不会破坏生长中的肽链或使该生长中的肽链中所包含的任何手性中心外消旋的性质。合适的保护基是9-苄基甲氧基羰基(Fmoc)、叔丁氧基羰基(Boc)、苄氧基羰基(Cbz)、联苯基异丙氧基羰基、叔戊氧基羰基、异冰片氧基羰基、 α,α -二甲基-3,5-二甲氧基苄氧基羰基、邻硝基苯基亚磺酰基、2-氰基-叔丁氧羰基等。9-苄基甲氧基羰基(Fmoc)保护基对于所公开的化合物的合成而言是特别优选的。其他优选的侧链保护基是:用于侧链氨基(如赖氨酸和精氨酸)的2,2,5,7,8-五甲基苯并二氢吡喃-6-磺酰基(pmc)、硝基、对甲苯磺酰基、4-甲氧基苯-磺酰基、Cbz、Boc和金刚烷氧基羰基;用于酪氨酸的苄基、邻溴苄氧基-羰基、2,6-二氯苄基、异丙基、叔丁基(t-Bu)、环己基、环戊基(cyclopentyl)和乙酰基(Ac);用于丝氨酸的叔丁基、苄基和四氢

吡喃基;用于组氨酸的三苯甲基、苄基、Cbz、对甲苯磺酰基和2,4-二硝基苯基;用于色氨酸的甲酰基;用于天冬氨酸和谷氨酸的苄基和叔丁基,以及用于半胱氨酸的三苯甲基(triphenylmethyl/trityl)。在固相肽合成方法中,将 α -C-末端氨基酸附接至合适的固相支持体或树脂。用于上述合成的合适的固相支持体是对逐步缩合-脱保护反应的试剂和反应条件呈惰性并且不溶于所用介质的那些材料。用于 α -C-末端羧基肽的合成的固相支持体是可从Applied Biosystems(Foster City, Calif.)获得的4-羟甲基苯氧基甲基-共聚(苯乙烯-1%二乙烯基苯)或4-(2',4'-二甲氧基苯基-Fmoc-氨基甲基)苯氧基乙酰胺基乙基树脂。在存在或不存在4-二甲基氨基吡啶(DMAP)、1-羟基苯并三唑(HOBT)、苯并三唑-1-基氧基-三(二甲基氨基)磷鎓六氟磷酸盐(BOP)或双(2-氧代-3-噁唑烷基)氯化磷(BOPC1)的情况下,借助于在介于10°C与50°C之间的温度下在诸如二氯甲烷或DMF等溶剂中进行N,N'-二环己基碳二亚胺(DCC)、N,N'-二异丙基碳二亚胺(DIC)或O-苯并三唑-1-基-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸酯(HBTU)介导的偶联约1至约24小时,使 α -C-末端氨基酸与树脂偶联。当固相支持体是4-(2',4'-二甲氧基苯基-Fmoc-氨基甲基)苯氧基-乙酰胺基乙基树脂时,在与如上所述的 α -C-末端氨基酸偶联之前,将Fmoc基团用仲胺,优选哌啶切割下来。用于与脱保护的4-(2',4'-二甲氧基苯基-Fmoc-氨基甲基)苯氧基-乙酰胺基乙基树脂偶联的一种方法是在DMF中的O-苯并三唑-1-基-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸酯(HBTU,1当量)和1-羟基苯并三唑(HOBT,1当量)。连续的受保护氨基酸的偶联可以在自动多肽合成仪中进行。在一个示例中,生长中的肽链的氨基酸中的 α -N-末端被Fmoc保护。通过用仲胺,优选哌啶进行处理,从生长中的肽的 α -N-末端侧去除Fmoc保护基。然后以约3倍摩尔过量引入每种受保护的氨基酸,并且偶联优选在DMF中进行。偶联剂可以是O-苯并三唑-1-基-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸酯(HBTU,1当量)和1-羟基苯并三唑(HOBT,1当量)。在固相合成结束时,以连续或单次操作的方式将多肽从树脂中取出并脱保护。通过用包含苯甲硫醚(thianisole)、水、乙二硫醇和三氟乙酸的切割试剂处理与树脂结合的多肽,可以以单一操作方式完成多肽的取出和脱保护。在多肽的 α -C-末端为烷基酰胺的情况下,通过用烷基胺进行氨解来切割树脂。另选地,肽可以通过例如用甲醇进行酯基转移,之后进行氨解或直接氨基转移来取出。可以在此时纯化受保护的肽,或直接用于下一步。侧链保护基的去除可以使用上述的切割混合物来完成。完全脱保护的肽可以通过采用以下类型中的任何一种或所有的一系列色谱步骤纯化:弱碱性树脂(乙酸盐形式)上进行的离子交换;在未衍生化的聚苯乙烯-二乙烯基苯上进行的疏水吸附色谱法(例如,Amberlite XAD);硅胶吸附色谱;在羧甲基纤维素上进行的离子交换色谱;分配色谱,例如在Sephadex G-25、LH-20上进行的分配色谱,或逆流分配;高效液相色谱(HPLC),尤其是在辛基甲硅烷基-硅胶或十八烷基甲硅烷基-硅胶键合相柱填充物上的反相HPLC。

[0226] 施用方法

[0227] 所公开的多肽缀合物和包含所述多肽缀合物的组合物的体内应用可以通过本领域技术人员目前或预期已知的任何合适的方法和技术来完成。例如,可以以生理上或药学上可接受的形式配制所公开的化合物,并通过本领域已知的任何合适途径(包括例如口服和肠胃外施途径)施用。如本文所用,术语肠胃外包括皮下、皮内、静脉内、肌肉内、腹膜内和胸骨内施用,诸如通过注射施用。如本领域的技术人员可容易确定的,所公开的化合物或组合物的施用可以是单次施用,或以连续或不同的间隔进行施用。

[0228] 本文公开的化合物以及包含该化合物的组合物也可以利用脂质体技术、缓释胶囊、可植入泵和可生物降解的容器来施用。这些递送方法可以有利地在延长的时间段内提供均匀的剂量。所述化合物也可以其盐衍生物形式或晶体形式施用。

[0229] 可以根据用于制备药学上可接受的组合物的已知方法来配制本文所公开的化合物。在对于本领域技术人员而言众所周知并且容易获得的许多来源中对配方进行了详细描述。例如E.W.Martin所著的Remington's Pharmaceutical Science (1995)描述了可以与所公开的方法结合使用的配方。通常,本文所公开的化合物可以被配制为使得有效量的该化合物与合适的载体组合以便促进该化合物的有效施用。所使用的组合物也可以为多种形式。这些形式包括例如固体、半固体和液体剂型,诸如片剂、丸剂、粉末剂、液体溶液或混悬剂、栓剂、可注射和可输注的溶液剂,以及喷雾剂。优选的形式取决于预期的施用模式和治疗应用。所述组合物还优选地包含本领域技术人员已知的常规药学上可接受的载体和稀释剂。用于与该化合物一起使用的载体或稀释剂的示例包括乙醇、二甲基亚砷、甘油、氧化铝、淀粉、盐水,以及等效的载体和稀释剂。为了提供此类剂量的施用以进行期望治疗处理,基于包含载体或稀释剂的总组合物的重量,本文所公开的组合物可以有利地包含介于约0.1重量%与100重量%之间的一种或多种主题化合物的总重量。

[0230] 适于施用的制剂包括例如无菌注射水溶液,该无菌注射水溶液可含有抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂和溶质,所述溶质使该制剂与预期接受者的血液等渗;以及水性和非水性无菌混悬剂,该水性和非水性无菌混悬剂可包含悬浮剂和增稠剂。所述制剂可以存在于单位剂量或多剂量容器(例如密封的安瓿瓶和小瓶)中,并且可以在使用前在仅需要无菌液体载体(例如注射用水)条件的冷冻干燥(冻干)条件下贮藏。临时注射溶液和混悬剂可以由无菌粉末、颗粒、片剂等制备。应当理解的是,除了上述特别提及的成分之外,本文所公开的组合物还可以包含本领域中关于所讨论的制剂类型的其他常规试剂。

[0231] 本文公开的化合物和包含所述化合物的组合物可以通过与细胞直接接触或经由载体手段递送至细胞。用于将化合物和组合物递送至细胞的载体手段是本领域中已知的,并且包括例如将组合物包封在脂质体部分中。用于将本文公开的化合物和组合物递送至细胞的另一种方法包括将化合物附着于靶向递送至靶细胞的蛋白质或核酸。美国专利号6,960,648和美国申请公布号2003/0032594和2002/0120100公开了可以与另一种组合物偶联并使该组合物跨生物膜移位的氨基酸序列。美国申请公布号20020035243还描述了用于跨细胞膜转运生物部分以进行细胞内递送的组合物。化合物也可以掺入聚合物中,所述聚合物的示例包括用于颅内肿瘤的聚(D-L丙交酯-共聚-乙交酯)聚合物;20:80摩尔比的聚[双(对羧基苯氧基)丙烷:癸二酸](如用于GLIADEL的);软骨素;几丁质;和壳聚糖。

[0232] 本文公开的化合物和组合物,包括其药学上可接受的盐或前药,可以通过输注或注射而静脉内、肌内或腹膜内地施用。活性剂或其盐的溶液可以在水中制备,任选地与无毒的表面活性剂混合。分散体也可在甘油、液体聚乙二醇、三醋精以及它们的混合物中和在油中制备。在一般的储存和使用条件下,这些制剂可含有防腐剂以防止微生物的生长。

[0233] 适于注射或输注的药物剂型可包括包含活性成分的无菌水溶液或分散液或无菌粉末,所述药物剂型适于临用时制备无菌可注射或可输注溶液或分散液,任选地包封在脂质体中。最终剂型应是在制造和储存条件下无菌的、流动的且稳定的。液体载体或媒介物可以是溶剂或液体分散介质,该溶剂或液体分散介质包括例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙

二醇、液体聚乙二醇等)、植物油、无毒甘油酯,以及它们的合适混合物。适当的流动性可以例如通过形成脂质体、通过在分散液的情况下维持所需的粒径或通过使用表面活性剂来维持。任选地,可以通过各种其他抗菌剂和抗真菌剂(例如,对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸、硫柳汞等)来防止微生物的作用。在许多情况下,将优选地包括等渗剂,例如糖、缓冲剂或氯化钠。可以通过包含延迟吸收的试剂(例如单硬脂酸铝和明胶)来实现可注射组合物的延长吸收。

[0234] 通过将所需量的本文所公开的化合物和/或试剂与根据需要的上文列举的各种其他成分一起掺入适当的溶剂中,之后进行过滤灭菌来制备无菌注射溶液。在用于制备无菌注射溶液的无菌粉末的情况下,优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥技术,所述技术产生了活性成分加上在先前经无菌过滤的溶液中存在的任何其他所需成分的粉末。

[0235] 本文所公开的化合物和试剂及药物组合物的有用剂量可通过在动物模型中比较它们的体外活性和体内活性来确定。将小鼠和其他动物中的有效剂量外推至人类的方法是本领域中已知的。

[0236] 组合物的施用剂量范围是大到足以产生所需的影响症状或疾患的效应的施用剂量。剂量不应太大以致引起不利副作用,例如不希望的交叉反应、过敏反应等。通常,剂量将随患者的年龄、病症、性别和疾病程度而变化,并且可以由本领域技术人员确定。如果有任何禁忌症,也可以由个体医生来调整剂量。剂量可以变化,并且可以每天一剂量或多剂量给予,持续一天或几天。

[0237] 还公开了包含本文所公开的化合物与药学上可接受的载体的组合的药物组合物。包含一定量的化合物的适用于口服、局部或肠胃外施用的药物组合物构成了优选的方面。施用于患者,特别是人的剂量应足以在合理的时间范围内在患者体内实现治疗反应,而没有致死毒性,并且优选地引起不超过可接受水平的副作用或发病率。本领域技术人员将认识到剂量将取决于多种因素,该多种因素包括受试者的状况(健康)、受试者的体重、同时治疗的种类(如果有的话)、治疗频率、治疗比率,以及病理状况的严重程度和阶段。

[0238] 还公开了在一个或多个容器中包含本文所公开的化合物的试剂盒。所公开的试剂盒可任选地包含药学上可接受的载体和/或稀释剂。在一个实施例中,试剂盒包含一种或多种如本文所述的其他组分、辅助剂或佐剂。在另一个实施例中,试剂盒包含一种或多种抗癌剂,诸如本文所述的那些抗癌剂。在一个实施例中,试剂盒包括描述如何施用该试剂盒的化合物或组合物的说明书或包装材料。试剂盒的容器可以为任何合适的材料,例如玻璃、塑料、金属等,并且可以是任何合适的尺寸、形状或构造。在一个实施例中,本文所公开的化合物和/或试剂是作为固体(诸如片剂、丸剂或粉末剂形式)在试剂盒中提供的。在另一个实施例中,本文所公开的化合物和/或试剂是作为液体或溶液在试剂盒中提供的。在一个实施例中,试剂盒包括含有液体或溶液形式的本文所公开的化合物和/或试剂的安瓿瓶或注射器。

[0239] 描述了本发明的多个实施例。然而,应该理解,在不脱离本发明的精神和范围的情况下,可以进行各种修改。因此,其他实施例在以下权利要求的范围内。

[0240] 本文已引用了许多出版物、专利和专利申请。所引用的出版物、专利和专利申请中的每一者都以引用方式整体并入本文,其程度如同每个单独的出版物、专利或专利申请被具体地且单独地以引用方式整体并入一样。

[0241] 实例

[0242] 实例1:环状CPP装订肽缀合物的设计策略和合成

[0243] 我们选择通过使用汇集合成方法(图1)来制备cCPP装订肽缀合物。首先,通过标准固相肽合成(SPPS)合成货物肽,其中在位置i和i+4处掺入了两个同型半胱氨酸残基。在从树脂上切割下并进行侧链脱保护后,用1.5当量的1,3-二氯丙酮(DCA)处理该肽以将该肽装订成 α 螺旋构象。该装订工序还将酮基掺入装订肽中,以便随后与cCPP进行生物正交缀合。接下来,使用附接到Gln侧链的微型PEG-Lys(Mtt)接头通过SPPS来合成cCPP[例如, CPP9]。当仍在树脂上时,通过用5%三氟乙酸(TFA)进行处理来选择性地去除Lys侧链上的Mtt基团,并将暴露的胺用Boc-氨氧乙酰基部分酰化。从树脂上切割下并用TFA进行侧链脱保护得到了用亲核羟胺基衍生化的CPP9(氨氧基-CPP9;图1)。最后,将DCA-装订肽和氨氧基-CPP9在水溶液(pH 4.7)中经由形成肟键而缀合。应注意的是,肟的形成导致了两种不同的立体异构体(Z和E异构体)。

[0244] 实例2:抗MDM2-p53相互作用的细胞渗透性装订肽

[0245] 作为概念验证,我们合成了抗MDM2-p53相互作用的细胞渗透性装订肽。p53蛋白质的激活可以保护生物体免受携带具有潜在致癌突变的受损DNA的细胞的增殖。MDM2是一种p53特异性E3泛素连接酶,是p53的主要细胞拮抗剂,作用以限制癌细胞中的p53生长抑制功能。MDM2介导p53的单泛素化和蛋白酶体降解。用小分子和装订肽破坏p53-MDM2复合物已成为用WT p53蛋白治疗癌症的流行方法。参见Wade, M.等人, Nature Reviews Cancer 13, 83-96 (2013)。

[0246] 我们选择了先前报道的MDM2配体Ac-LTFEHYWAQLTS (SEQ ID NO:1) (“PDI”;参见Phan, J.等人, J. Biol. Chem. 285, 2174-2183 (2010)), 并经由微型PEG-Lys接头用异硫氰酸荧光素(FITC)在其C末端进行标记。将FITC标记的肽(表5, 肽1)结合至MDM2, 其中 K_D 值为80nM, 类似于所报道的值。对于装订, 我们用同型半胱氨酸残基分别替换Glu-4和Ala-8或His-5和Gln-9, 并如上所述用DCA装订两个所得肽(表5, 肽2和肽3)。使肽2和肽3结合至MDM2, 其中 K_D 值分别为144nM和171nM。肽2由于其稍微更高的效力而被选择与如上所述的CPP9结合, 以得到两种立体异构体肽4和肽5, 将它们通过HPLC分离(图5), 但是它们在肟部分处的实际Z/E构型是未确定的。通过在基于荧光各向异性(FA)的测定中检查肽4和肽5与FITC标记的肽1竞争结合MDM2的能力来确定肽4和肽5对MDM2的结合亲和力。肽4和肽5显示的 IC_{50} 值分别为220nM和201nM(表1), 表明与CPP9的缀合不会显著影响装订肽与MDM2的结合。

[0247] 表5. 肽基MDM2配体的序列和效价

[0248]

结 构 / 肽 ID	序 列 ^a (C 项到 N 项)	K_D 或 IC_{50} (nM)
1	Ac-L-T-F-E-H-Y-W-A-Q-L-T-S-miniPEG-K-(dye)	80 ± 10
2	Ac-L-T-F-hom oC-H-Y-W-hom oC-Q-L-T-S-miniPEG-K-(dye) DCA	144 ± 28
3	Ac-L-T-F-E-hom oC-Y-W-A-hom oC-L-T-S-miniPEG-K-(dye) DCA	171 ± 36
4	Ac-L-T-F-hom oC-H-Y-W-hom oC-Q-L-T-S-miniPEG-K DCA CP9	220 ± 19
5	Ac-L-T-F-hom oC-H-Y-W-hom oC-Q-L-T-S-miniPEG-K DCA CP9	201 ± 12

[0249] ^a微型PEG是8-氨基-3,6-二氧杂辛酸;hom oC是高半胱氨酸;DCA是1,3-二氯丙酮。报道的值是FITC-肽1-3的 K_D 值和未标记的肽4和5的 IC_{50} 值。

[0250] 使用MTT活力测定测试了肽4和5对带有WT (HCT116 p53+/+) 和突变p53基因 (HCT116 p53-/-) 的人结肠癌细胞系的抗癌活性。肽4和5剂量依赖性地降低了WT p53细胞的活力,而未降低p53突变细胞的活力(图2)。Nutlin-3是一种小分子MDM2抑制剂,其同样以如先前报道的剂量依赖性方式选择性地杀伤WT p53细胞。参见Vassilev, L.T.等人, Science, 303, 844-848 (2004)。

[0251] 另一方面,不含CPP9的装订肽(肽2)显示为对任何一种细胞系均无明显效应,这据推测是因为其无法穿透细胞膜(参见下文)。

[0252] 实例3:肽装订和与3,5-双(溴甲基)苯甲酸的缀合

[0253] 基于肟的缀合方法的主要限制是形成了两种不同的立体异构体,这会使产物分离和进一步的临床开发复杂化。为了克服该限制,我们接下来采用3,5-双(溴甲基)苯甲酸(“BBA”)作为装订剂。先前已经使用结构相似的化合物间二甲苯二溴化物来装订 α -螺旋肽。参见Jo, H.等人, J Am Chem Soc. 134, 17704-17713 (2012)。间二甲苯二溴化物在空间邻近范围内与两个半胱氨酸快速反应,从而以高产率和低试剂/肽化学计量比形成单一的装订肽产物。我们开发了两种将 α -螺旋肽与BBA装订/缀合的方法。在第一种方法(图3A)中,首先通过标准固相肽合成(SPPS)在固体载体上合成含有两种乙酰氨基甲基(Acm)保护半胱氨酸的载货肽。用Hg(OAc)₂除去Acm基团,暴露的自由巯醇与BBA烷基化。在树脂上,苯甲酸基团在偶联剂(例如, HATU)存在下与N-Fmoc-1,3-二氨基丙烷连接剂反应生成胺基,胺基用作SPPS随后合成 β -Ala-CPP9的处理剂。

[0254] 在第二种方法(图3B)中, CPP9是在固相上用miniPEG-Lys(Mtt)接头合成的。用5% TFA选择性地除去赖氨酸侧链上的Mtt基团,并用HATU作为偶联剂将暴露的胺与BBA偶联。用TFA从树脂和侧链上解离,然后用HPLC纯化得到BBA衍生的CPP9,然后在中性水溶液中简单地混合这两个肽,将其与完全脱保护的含半胱氨酸的肽结合。

[0255] 第一种方法的优点是整个CPP-装订肽可以在固相上合成,产物只需纯化一次。另一方面,第二种方法具有模块化和收敛性,可用于快速生成大量不同的CPP/货物组合进行

测试,以识别最优的CPP-货物缀合物。

[0256] 实例4:CPP9使细胞对装订肽的通透性保持一致

[0257] 我们将装订/缀合方法(图3B)应用于已知的MDM2配体Ac-LTFEHYWAQLTS (SEQ ID NO:1) (“PDI”)。参见Hu,B.等人,Cancer Res.67,8810-8817(2007)。Glu-4和Ala-8残基被半胱氨酸(肽6和肽7)或同型半胱氨酸(肽8和肽9)取代,所得肽与BBA装订并与CPP9缀合(表2,肽7和肽9)。作为对照(不含CPP),我们还将肽与间二甲苯二溴化物结合,得到中性疏水性短肽(肽6和肽8)。用5(6)-羧基萘荧光素(NF)标记肽的C末端,用柔性miniPEG-Lys接头,并用流式细胞仪定量细胞内荧光,评价肽的胞浆进入效率。当pKa为7.8时,NF在胞浆和细胞核的中性环境(pH 7.4)中呈荧光,但在酸性内质体/溶酶体($\text{pH} \leq 6.0$)中几乎没有荧光。如所料,两种CPP9缀合肽(肽7和肽9)均易于细胞渗透,与CPP9(100%)相比,其胞浆进入效率分别为497%和30%,CPP9是迄今报道的最活跃的CPP之一。不幸的是,未缀合肽6和肽8溶解性差,其细胞摄取效率无法可靠测定。为了增加水溶性,我们将肽6的N末端亮氨酸替换为谷氨酸,得到肽10,并在肽10的N末端添加第二谷氨酸残基以产生肽12(表6)。肽10和肽12分别与CPP9缀合产生肽11和肽13。值得注意的是,当用5 μM 肽10或肽12(无CPP)在37 $^{\circ}\text{C}$ 下处理HeLa细胞2h导致最小的细胞摄取(两者均为2.8%)时,肽与CPP9的缀合分别将其胞浆进入效率提高了48倍和86倍(表6,肽11和13)。

[0258] 为了验证细胞通透性的显著改善是否普遍适用于其他装订肽,我们合成了四对附加的装订肽(有或没有与CPP9缀合),并比较了它们的胞浆进入效率(表6,肽14-21)。在分析了200多个装订肽之后,Verdine和同事们先前报道了肽14是最具细胞通透性的装订肽之一,而肽16、肽18和肽20是通透性最低的。参见Chu,Q.,Med.Chem.Commun.6,111-119(2015)。与Verdine的发现一致,二甲苯-装订肽14(无CPP)显示出良好的细胞通透性(占CPP9的47%),而肽16和肽18则没有(分别为2.5%和8.9%)。由于溶解度有限,无法测定肽20的胞浆效率。再次,与CPP9缀合后,所有四种肽(15、17、19和21)都具有高度的细胞通透性,显示出比未结合的肽提高了11-152倍。CPP9缀肽(30-508%)细胞通透性的变化可能至少部分是由于与血清蛋白的差异结合所致(本研究中的所有流式细胞术实验均在10%胎牛血清存在的情况下进行)。一般来说,疏水性物质容易与血清蛋白结合和/或聚集,导致细胞摄取效率的更大降低。

[0259] 表6中的四对肽也用FITC标记,并用活细胞共聚焦显微镜监测它们进入HeLa细胞的情况(图4)。在所有四种情况下,仅装订肽(无CPP)表现出最小的摄取,而CPP9肽缀合物有效地进入细胞。与流式细胞仪的数据一致,在整个细胞体积中都存在弥散荧光,表明有相当一部分的内吞肽从内质体逃逸到胞浆和细胞核中。综上所述,我们的数据表明,与cCPP(例如,CPP9)缀合能够使装订肽具有高且一致的细胞通透性。

[0260] 表6. 与CPP9缀合和不缀合的装订 α -螺旋肽序列和胞浆进入效率

[0261]

结构/肽 ID	序列 ^a (C项到N项)	钉	细胞摄取 (MFI ^{NF} , %) ^b
CPP9	环状(f- Φ -R-r-R-r-Q)-miniPEG-K(NF)-NH ₂	N/A	100

[0262]

6	Ac- <u>LT</u> FCHYWCQLTS-miniPEG-K(NF)-NH ₂ (SEQ ID NO:40, 仅带下划线部分)	二甲苯	ND
7	Ac- <u>LT</u> FCHYWCQLTS-miniPEG-K(NF)-NH ₂ (SEQ ID NO:40, 仅带下划线部分)	BBA-CPP9	497 ± 22
8	Ac- <u>LT</u> FhCHYWhCQLTS-miniPEG-K(NF)-NH ₂ (SEQ ID NO:41, 仅带下划线部分)	二甲苯	ND
9	Ac- <u>LT</u> FhCHYWhCQLTS-miniPEG-K(NF)-NH ₂ (SEQ ID NO:41, 仅带下划线部分)	BBA-CPP9	30 ± 5
10	Ac- <u>ET</u> FCHYWCQLTS-miniPEG-K(NF)-NH ₂ (SEQ ID NO:42, 仅带下划线部分)	二甲苯	2.8 ± 0.1
11	Ac- <u>ET</u> FCHYWCQLTS-miniPEG-K(NF)-NH ₂ (SEQ ID NO:42, 仅带下划线部分)	BBA-CPP9	135 ± 46
12	Ac- <u>EET</u> FCHYWCQLTS-miniPEG-K(NF)-NH ₂ (SEQ ID NO:43, 仅带下划线部分)	二甲苯	2.8 ± 0.5
13	Ac- <u>EET</u> FCHYWCQLTS-miniPEG-K(NF)-NH ₂ (SEQ ID NO:43, 仅带下划线部分)	BBA-CPP9	242 ± 17
14	NF-βA- <u>RKFCRLFC</u> -NH ₂ (SEQ ID NO:44, 仅带下划线部分)	二甲苯	47 ± 9
15	NF-βA- <u>RKFCRLFC</u> -NH ₂ (SEQ ID NO:44, 仅带下划线部分)	BBA-CPP9	508 ± 214
16	NF-βA- <u>ENPECILDCHVQRVM</u> -NH ₂ (SEQ ID NO:45, 仅带下划线部分)	二甲苯	2.5 ± 0.5
17	NF-βA- <u>ENPECILDCHVQRVM</u> -NH ₂ (SEQ ID NO:45, 仅带下划线部分)	BBA-CPP9	381 ± 129
18	NF-βA- <u>NPECILDCHVQRVM</u> -NH ₂ (SEQ ID NO:46, 仅带下划线部分)	二甲苯	8.9 ± 2.9
19	NF-βA- <u>NPECILDCHVQRVM</u> -NH ₂ (SEQ ID NO:46, 仅带下划线部分)	BBA-CPP9	112 ± 21
20	NF-βA- <u>TYRGAAQCAAQCVREV</u> -NH ₂ (SEQ ID NO:47, 仅带下划线部分)	二甲苯	ND
21	NF-βA- <u>TYRGAAQCAAQCVREV</u> -NH ₂ (SEQ ID NO:47, 仅带下划线部分)	BBA-CPP9	83 ± 8

[0263]

[0264] ^a Φ, L-2-萘基丙氨酸; βA, β-丙氨酸; r, D-精氨酸; NF, 5(6)-羧基萘荧光素; hC, 同型半胱氨酸; BBA, 3,5-二甲基苯甲酰; miniPEG, 8-氨基-3,6-二氧辛酸。

[0265] ^b 报告的所有值都是相对于CPP9的值, CPP9的定义是100%。ND, 由于水溶性有限, 未测定。

[0266] 实例5: 装订肽的生物化学或生物活性

[0267] 肽6-13是MDM2配体PDI的变体, 被测试与MDM2结合。半胱氨酸取代Glu-4和Ala-8残

基, BBA装订降低MDM2-结合亲和力约2.5倍(肽1和肽6的 $K_D=80\text{nM}$ 和 190nM)。与CPP9的缀合使MDM2结合亲和力进一步降低约2倍(肽7的 $K_D\sim 300\text{nM}$) (表7)。用同型半胱氨酸替换Glu-4和Ala-8, 然后用BBA装订, MDM2结合亲和力提高了5倍(肽8的 $K_D=14\text{nM}$), 但与CPP9的进一步缀合则降低亲和力约8倍(肽9的 $K_D=114\text{nM}$)。将Leu-1替换为Glu可将肽6的结合亲和力提高5倍(肽10的 $K_D=36\text{nM}$), 这可能是通过与肽配体N末端附近带正电荷的MDM2表面进行静电作用而实现的。再次, 与CPP9的缀合使MDM2结合亲和力降低了6倍(肽11的 $K_D=225\text{nM}$)。然而, 在肽11的N末端添加第二个Glu并没有进一步提高结合亲和力(肽13的 $K_D=365\text{nM}$)。

[0268] 表7. BBA-装订 α -螺旋肽的MDM2结合亲和力

结构/肽 ID	序列 ^a (C项到N项)	钉	K_D (nM)
1	Ac-LTFEHYWAQLTS-miniPEG-K(FITC)-NH ₂ (SEQ ID NO:1, 仅带下划线部分)	无	80 ± 10
6	Ac-LTFCHYWCQLTS-miniPEG-K(FITC)-NH ₂ (SEQ ID NO:40, 仅带下划线部分)	BBA	190 ± 150
7	Ac-LTFCHYWCQLTS-miniPEG-K(FITC)-NH ₂ (SEQ ID NO:40, 仅带下划线部分)	BBA-CPP9	约 300
8	Ac-LTFhCHYWhCQLTS-miniPEG-K(FITC)-NH ₂ (SEQ ID NO:41, 仅带下划线部分)	BBA	15 ± 9
9	Ac-LTFhCHYWhCQLTS-miniPEG-K(FITC)-NH ₂ (SEQ ID NO:41, 仅带下划线部分)	BBA-CPP9	114 ± 19
10	Ac-ETFCHYWCQLTS-miniPEG-K(FITC)-NH ₂	二甲苯	36 ± 8
	(SEQ ID NO:42, 仅带下划线部分)		
11	Ac-ETFCHYWCQLTS-miniPEG-K(FITC)-NH ₂ (SEQ ID NO:42, 仅带下划线部分)	BBA-CPP9	225 ± 19
12	Ac-EETFCHYWCQLTS-miniPEG-K(FITC)-NH ₂ (SEQ ID NO:43, 仅带下划线部分)	二甲苯	187 ± 37
13	Ac-EETFCHYWCQLTS-miniPEG-K(FITC)-NH ₂ (SEQ ID NO:43, 仅带下划线部分)	BBA-CPP9	365 ± 82

[0271] ^a hC, 同型半胱氨酸; BBA, 3,5-二甲基苯甲酰; miniPEG, 8-氨基-3,6-二氧辛酸。

[0272] 实例6: 缀合到各种肽转导结构域(PTD)的装订肽的胞浆递送

[0273] 对一系列的装订肽进行了评估, 以比较不同肽转导结构域(PTD)对装订MDM2抑制剂sPDI胞浆递送的影响(图20A-20D)。结构22表明, PDI序列由在天冬氨酸和赖氨酸残基之间形成的酰胺基装订。每个缀合物(图20B-20D)还包含一个连接到CPP9(结构23)、R9(结构24)或Tat(结构25)的C末端接头。

[0274] 为了评估每个缀合物的传递能力, 用FITC标记肽22-25, 并用活细胞共聚焦显微镜监测其进入HeLa细胞的情况(图21)。用 $5\mu\text{M}$ FITC-标记的肽在 37°C 下处理HeLa细胞2h, 并洗涤去除多余的肽。治疗后获得的图像显示, 仅装订肽(结构22)的摄取量最小, 而缀合物不同程度地进入细胞。递送sPDI最有效的缀合物是CPP9-缀合肽23。R9和Tat均能将MDM2抑制剂

递送入胞浆,但效率明显降低。这一数据再次表明,与cCPP(例如, CPP9)的缀合能够使装订肽具有高且一致的细胞通透性。

[0275] 实例7:与CPP9缀合的MDM2抑制剂sPDI递送

[0276] 采用无细胞竞争法测定荧光偏振度,以确定CPP9将钉合的MDM2抑制剂有效地递送到靶点的程度。在本研究中,sPDI以98.4nM的 IC_{50} 有效地抑制MDM2作为竞争肽浓度的功能。CPP9-sPDI也是一种有效的抑制剂,其 IC_{50} 为63.3nM,显示出活性提高。在不受任何特定理论约束的情况下,为了使缀合物具有活性,它必须在不受其他部分干扰的情况下将sPDI肽递送到MDM2。结果表明, CPP9-sPDI的配置不影响sPDI与MDM2之间的交互作用。这并不是F10A突变株的情况,其活性显著降低,这一发现证实了肽序列对MDM2抑制的重要性。

[0277] 实例8:CPP9-sPDI抗增殖作用的评估

[0278] 此外,还评估了CPP9-sPDI(结构23)的抗增殖作用。图23比较了用MTT法测定的10% FBS作用72小时后, CPP9-sPDI、Nutlin-3a、R9-sPDI、sPDI、CPP9-sPDI(F10A)和Tat-sPDI(0-20 μ M)对SJSA-1细胞株活力的影响。与已知的MDM2抑制剂Nutlin-3a相比, CPP9-sPDI的细胞毒性增强, IC_{50} 值为3.86 μ M。其他缀合物的活性显著降低(>20 μ M),这表明PTDs诸如R9和Tat将抑制剂递送到靶点的效率较低。与CPP9-sPDI相比, F10A肽突变体导致细胞毒性降低5倍以上;这一发现加强了sPDI对MDM2的抑制作用,而不是CPP9或其片段。值得注意的是,尽管在无细胞结合试验中,该肽显示出与CPP9-sPDI相当的效果,但sPDI也具有显著的细胞毒性降低(图22)。

[0279] 还考虑了CPP9-sPDI对MDM2抑制剂胞浆递送的作用方式(MOA)。利用流式细胞术检测annexin V⁺/碘化丙二钠⁺(PI⁺) SJSA-1细胞,图24显示CPP9-sPDI的抗增殖活性是通过凋亡途径介导的。这种行为与Nutlin-3a相似, Nutlin-3a在某些癌细胞系中诱导p53-依赖性凋亡。在本研究中,在10% FBS存在的情况下,用抑制剂治疗48小时后,测定Annexin V⁺/PI⁺和Annexin V⁺/PI-SJSA-1细胞的百分比。

[0280] 将其与25%人血清在37℃孵育24小时,评估CPP9-sPDI的血清稳定性。图25显示在此期间CPP9-sPDI稳步下降,因此在研究结束时检测到25%的化合物。观察到的血清稳定性水平(货物区)可能会影响该化合物测定的 IC_{50} 值。

[0281] 实验细节

[0282] 肽合成和标记。以2-(7-氮杂-1H-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基尿嘧啶六氟磷酸(HATU)为偶联剂,在Rink酰胺树脂上用SPPS人工合成多肽。偶联反应通常包括5当量的Fmoc-氨基酸、5当量的HATU和10当量的二异丙基乙胺(DIPEA),并在R.T.下进行45min。肽被从树脂上切下并通过在R.T.下用92.5% TFA、2.5%水、2.5%三异丙基硅烷和2.5%1,3-二甲氧基苯处理3h来脱保护。溶剂通过在溶液中流动N₂来去除,并将残渣用冷二乙醚研磨。粗肽经C₁₈柱反相HPLC纯化,用线性梯度乙腈(含0.05% TFA)在ddH₂O(含0.05% TFA)中洗脱。肽的荧光标记在溶液中进行。冻干肽与5当量的活化荧光标记试剂(例如,异硫氰酸荧光素或5(6)-羧基萘荧光素琥珀酰亚胺酯)和5种等效的DIPEA在DMF中反应2h,用TFA猝灭反应,用HPLC重新纯化标记肽,并用MALDI-TOF质谱法确认其真实性。

[0283] 用DCA装订肽。将含半胱氨酸的肽溶解在含有100mM NH₄HCO₃(pH=8.1)和1.1当量三(2-羧乙基)膦(TCEP)的1mL DMF中,得到约0.1mM的肽浓度。溶液在旋转摇床上以R.T.混合孵育1h。之后,在混合物中加入1.5当量DMF中的二氯丙酮,并将溶液在RT下孵育3h(混

合)。反应产物经反相HPLC纯化,MALDI-TOF-MS分析。

[0284] 氨氧基-CPP9的合成。CPP9由标准SPPS合成,在C末端加入miniPEG-N^e-4-甲氧基三甲基-L-赖氨酸部分。在树脂上,用2% (v/v) TFA在DCM中处理1h,选择性地去赖氨酸侧链上的Mtt基团,然后用5当量 (Boc-氨基氧基) 乙酸、5当量二异丙基碳化二亚胺 (DIC) 和5当量的在DCM/DMF (1:1v/v) 中的HOBT,孵育树脂1h(两次)。由此产生的氨氧基-CPP9肽被从树脂上切下,用HPLC纯化,并用MALDI-TOF MS分析,如前所述。

[0285] 肟法合成CPP9-装订肽缀合物。将DCA-装订肽 (0.5mM) 溶解于10mL的含有100mM苯胺的100mM NH₄OAc溶液 (pH 4.5) 中。将氨氧基-CPP9 (2.0当量) 添加到上述溶液中,并将混合物在R.T.孵育过夜(混合)。反应产物经装有C18柱的反相HPLC和纯化,用10-60%乙腈在ddH₂O (含0.05% TFA) 中线性梯度洗脱。MALDI-TOF MS证实了反应产物的真实性(实例见图S1)。

[0286] GST-MDM2的表达及纯化。用原核表达载体pGEX-6P-2转化大肠杆菌BL21 (DE3) 细胞,该载体编码人MDM2基因(残基17-125)。在37℃条件下,在添加100μg/mL氨苄西林的Luria肉汤中培养细胞至0.6的OD₆₀₀,并通过添加1mM IPTG在30℃条件下诱导蛋白表达5h。以2000rpm离心造粒细胞30min。将细胞颗粒重新悬浮在50mL的裂解缓冲液 (50mM Tris-HCl, pH 7.4, 300mM NaCl, 2.5mM EDTA, 0.02% NaN₃和2mM DTT) 中,并在冰上进行超声裂解。将裂解液在SS-34固定角转子中以15000rpm离心30min。将上清液装载到谷胱甘肽-Sepharose柱上,用含有10mM GSH的裂解缓冲液洗脱结合蛋白。

[0287] MTT法。将HCT116 p53野生型和HCT116 p53^{-/-}细胞接种于96孔板中,每孔3x 10³个细胞,隔夜生长。将不同浓度的肽 (0-12.5μM) 添加到加入10% FBS和1%青霉素/链霉素的McCoy's 5A培养基中,并在37℃和5% CO₂存在下培养48h。之后,向每个孔中加入10μLMTT储备溶液 (5mg/mL),将平板在37℃下孵育4h。添加100μL SDS-HCl溶解溶液,并将平板在37℃下孵育过夜。在570nm处,在Tecan微量滴定板阅读器上测量形成的甲臞产品的吸光度。

[0288] 流式细胞术。将HeLa细胞以1.5x 10⁵细胞/孔的速度接种于12孔板中24h。第二天,将羧基荧光素标记的肽 (5μM) 添加到添加有10%胎牛血清 (FBS) 和1%青霉素/链霉素的DMEM培养基中,并在37℃和5% CO₂存在下孵育2h。去除含有肽的培养基,用DPBS清洗细胞两次。用0.25%胰蛋白酶从平板中分离细胞,250g离心5min造粒,DPBS洗涤2次,DPBS再悬浮,BD FACS LSR II或Aria III流式细胞仪分析。对于Nf-标记的肽,用633-nm激光激发,分析其在APC通道中的荧光发射。使用Flowjo软件(Tree Star)分析数据。

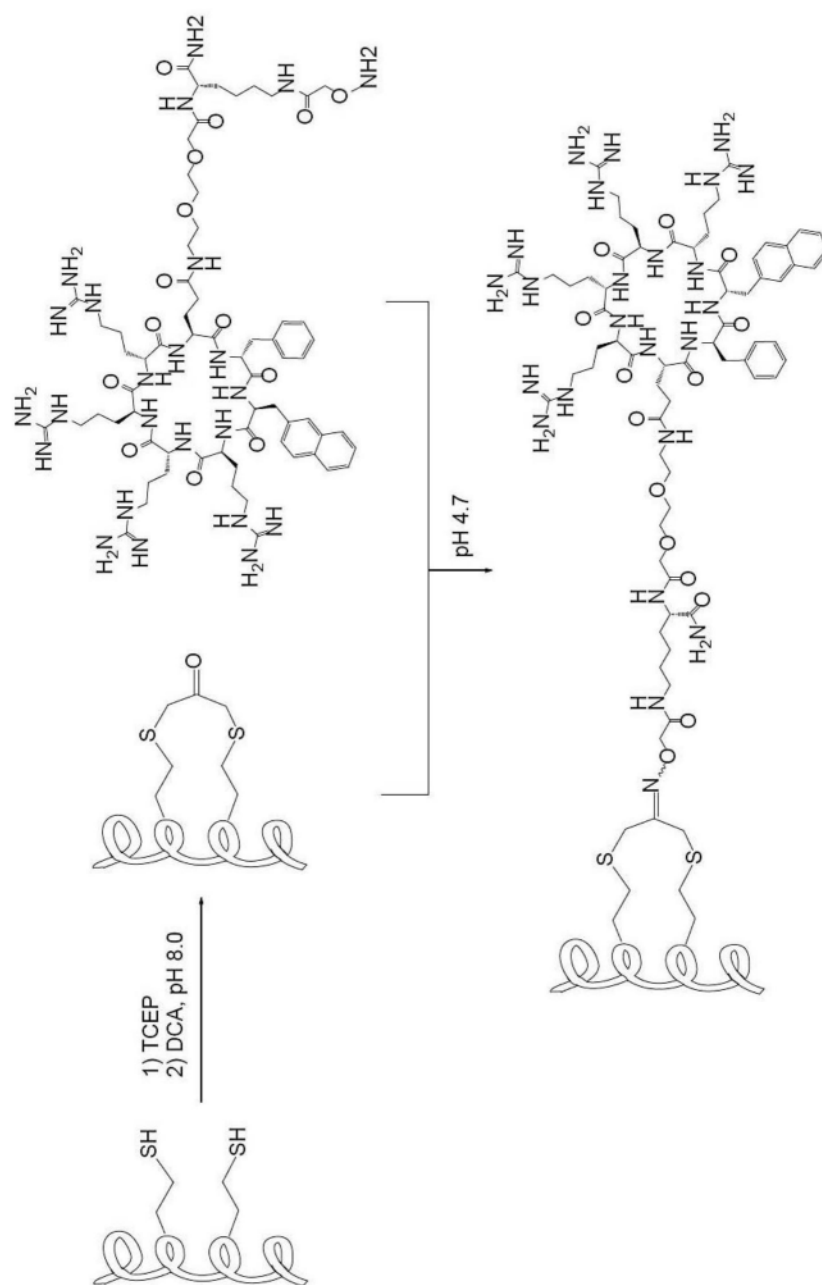


图1

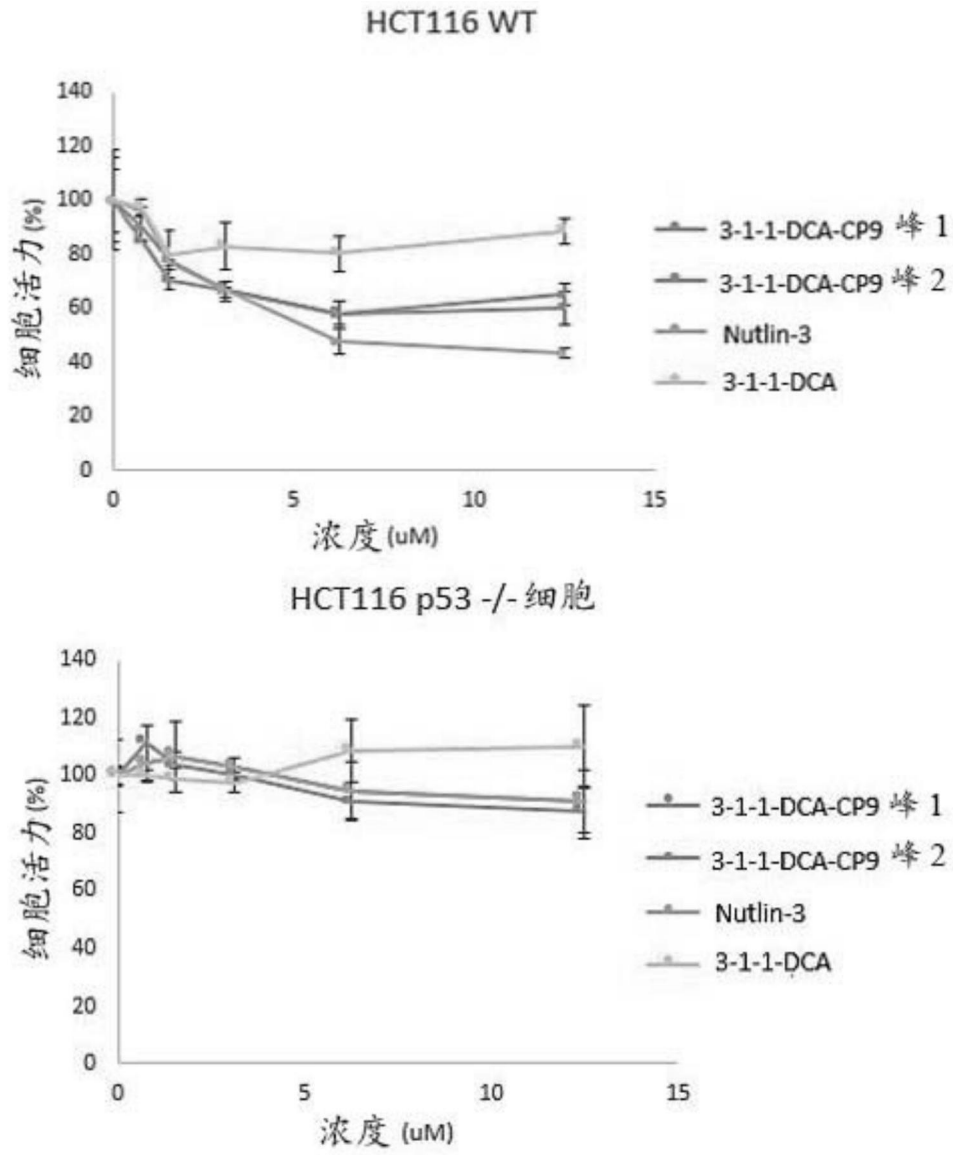


图2

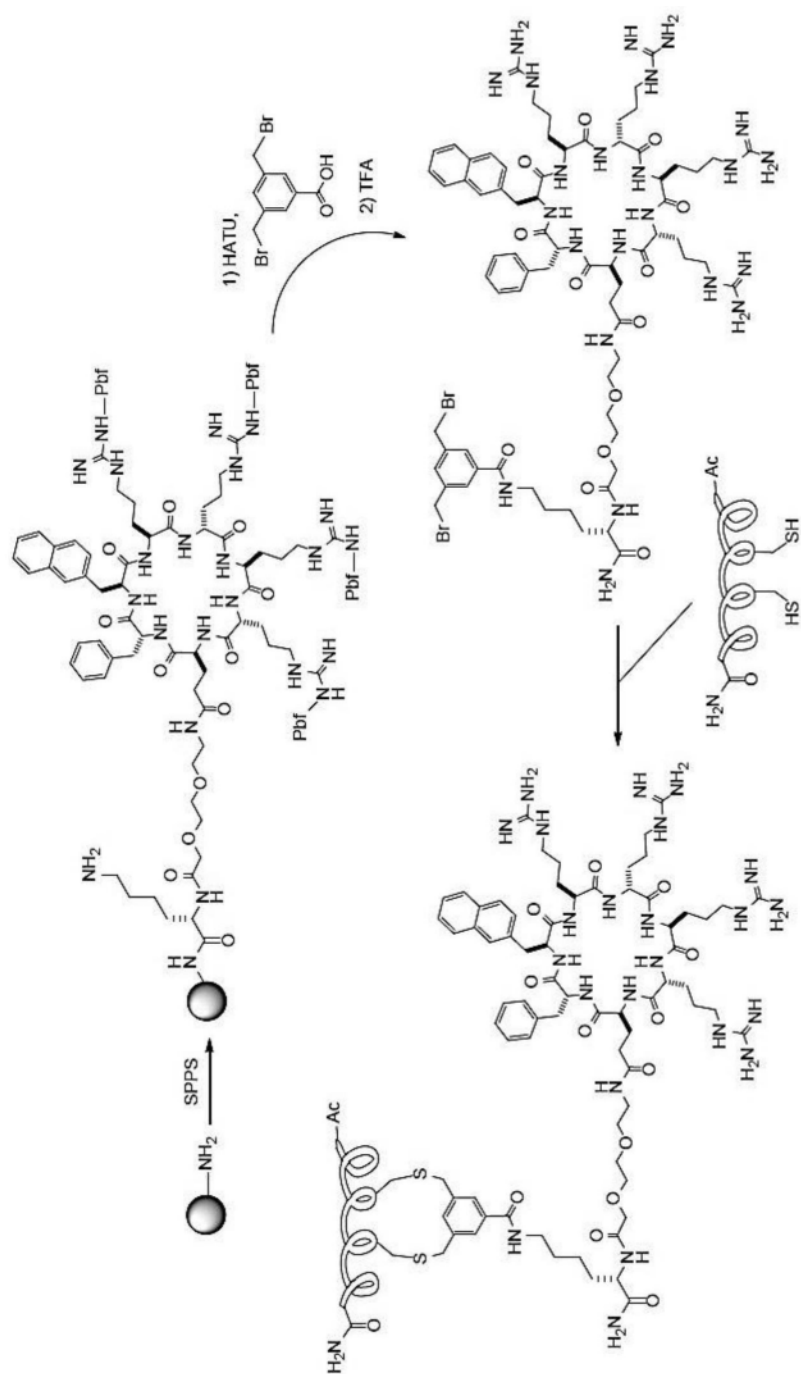


图3B

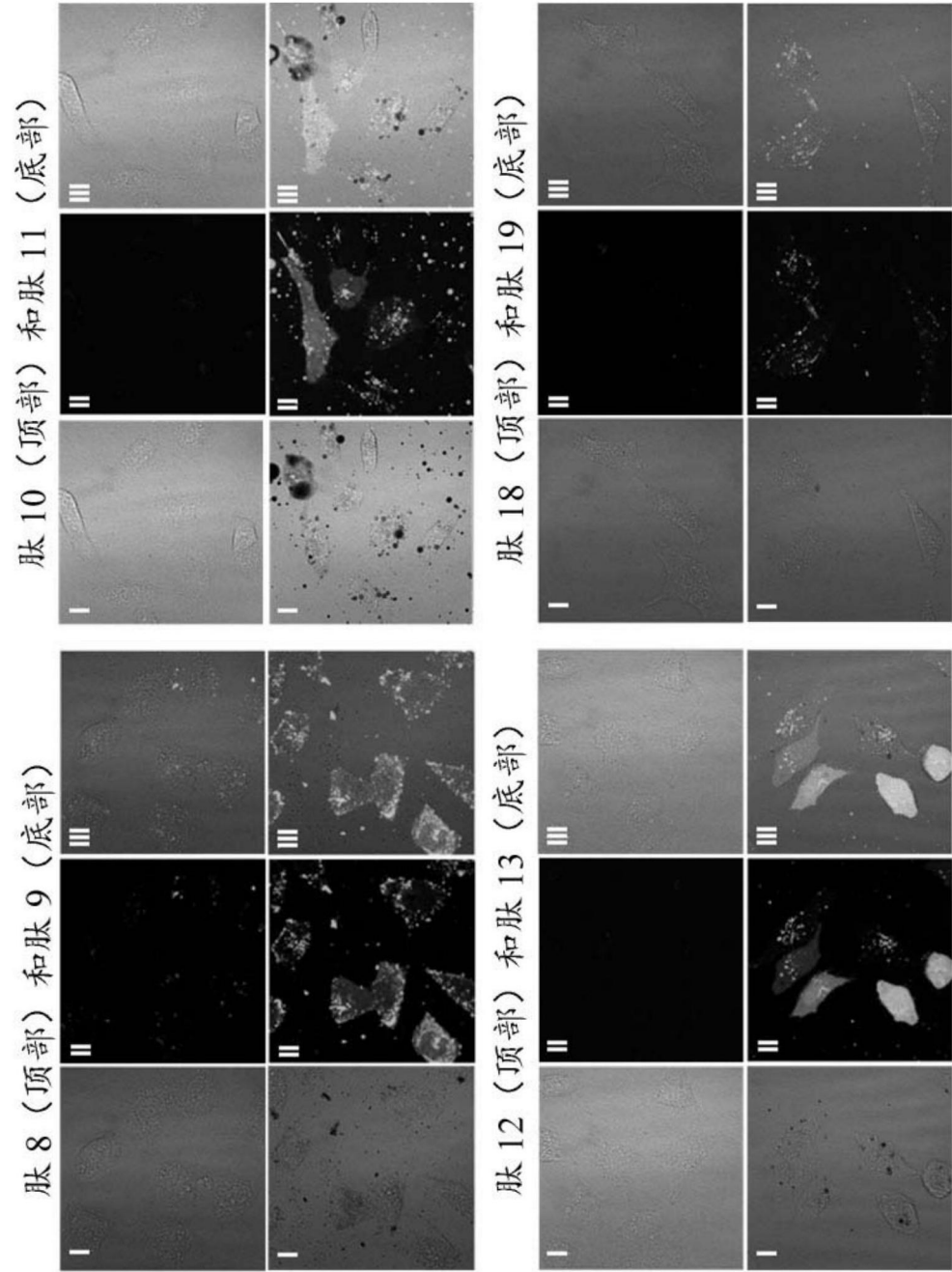


图4

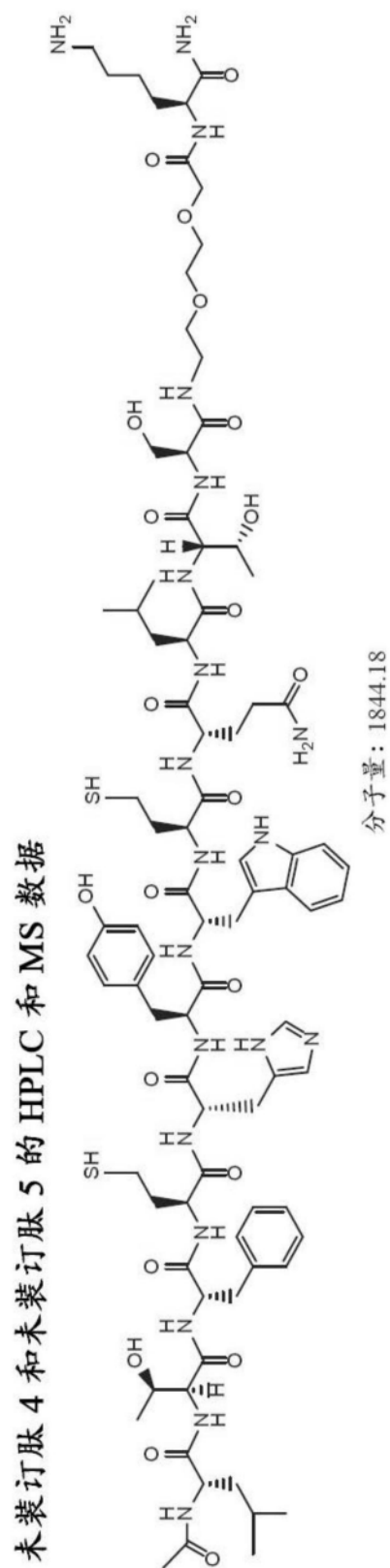


图5

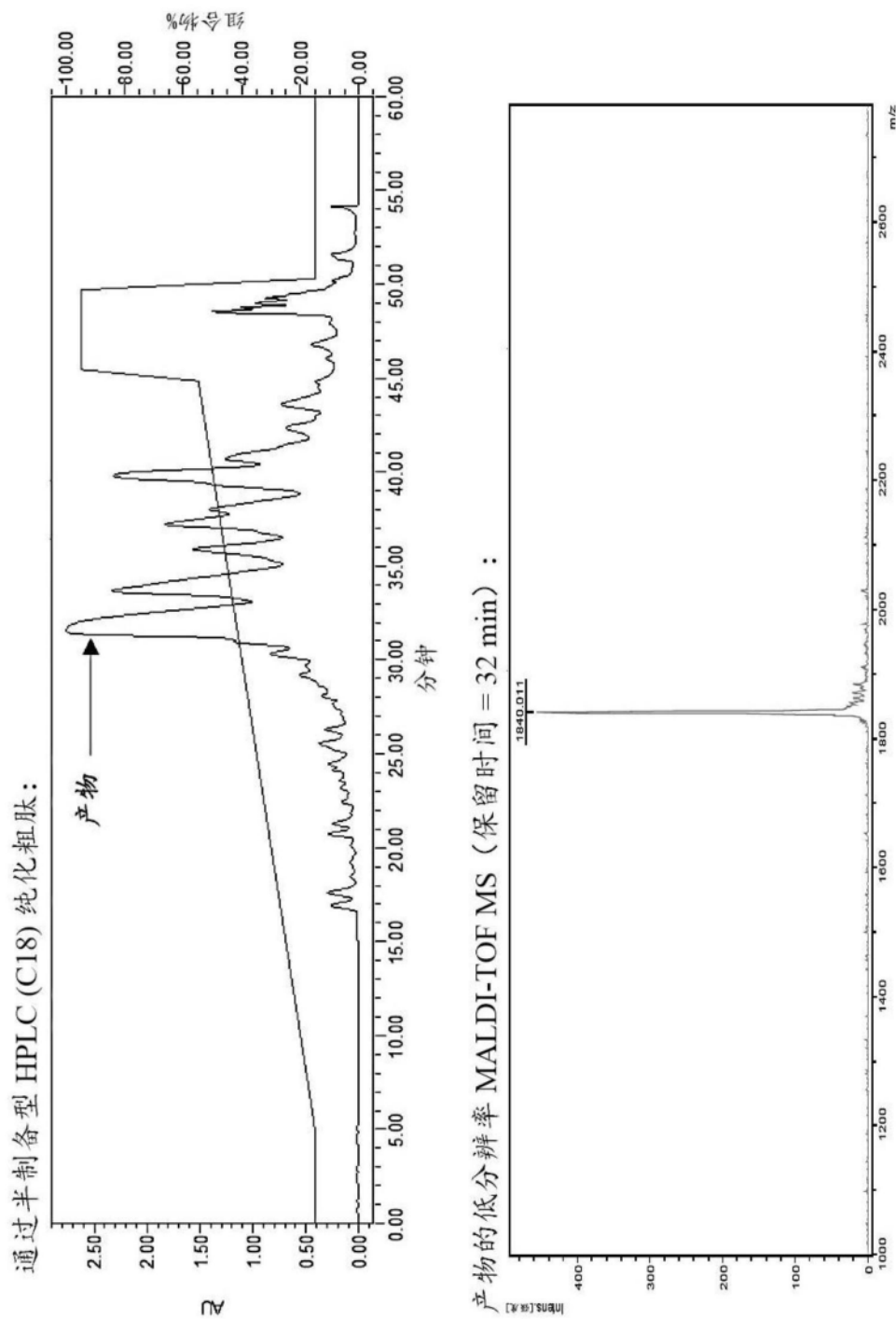


图5(续图)

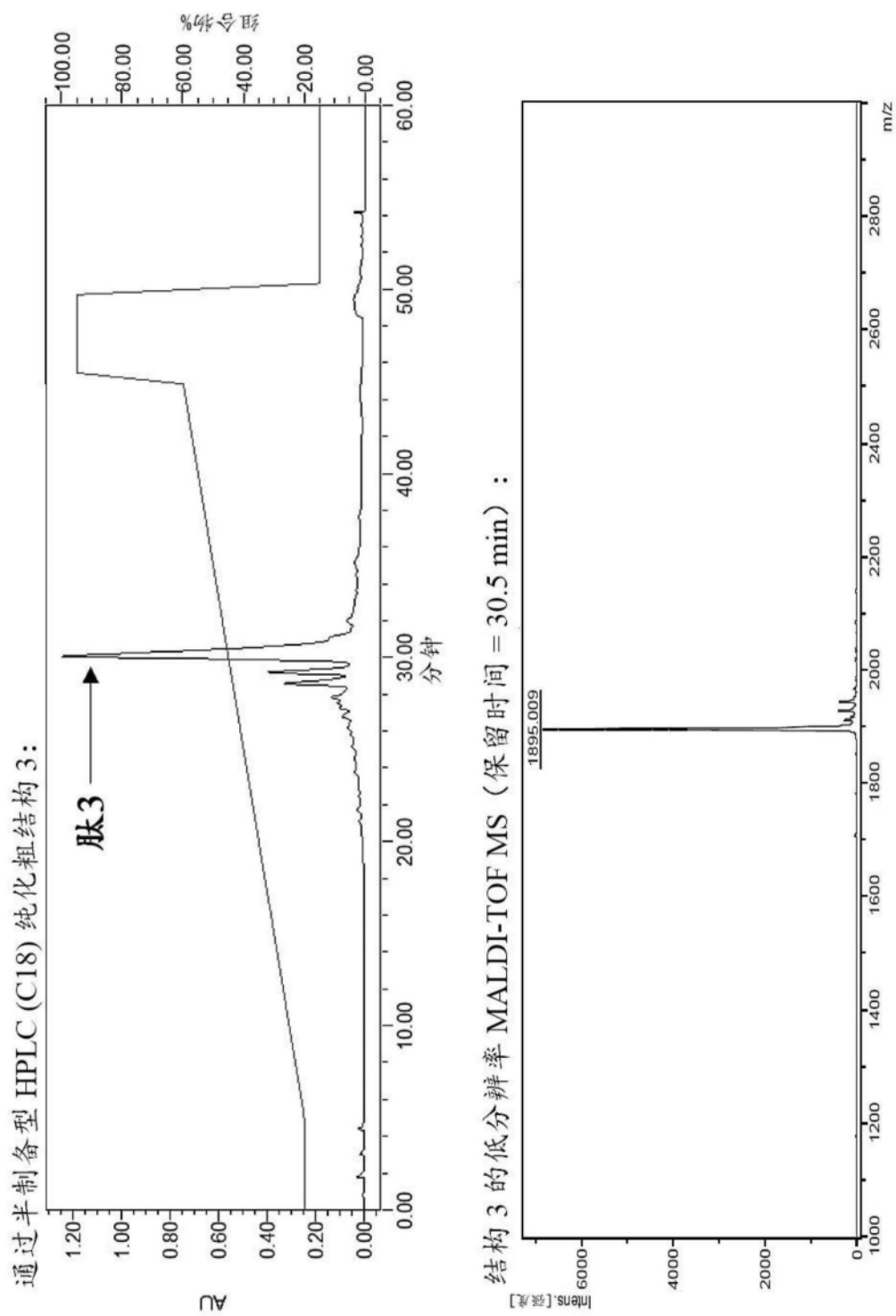
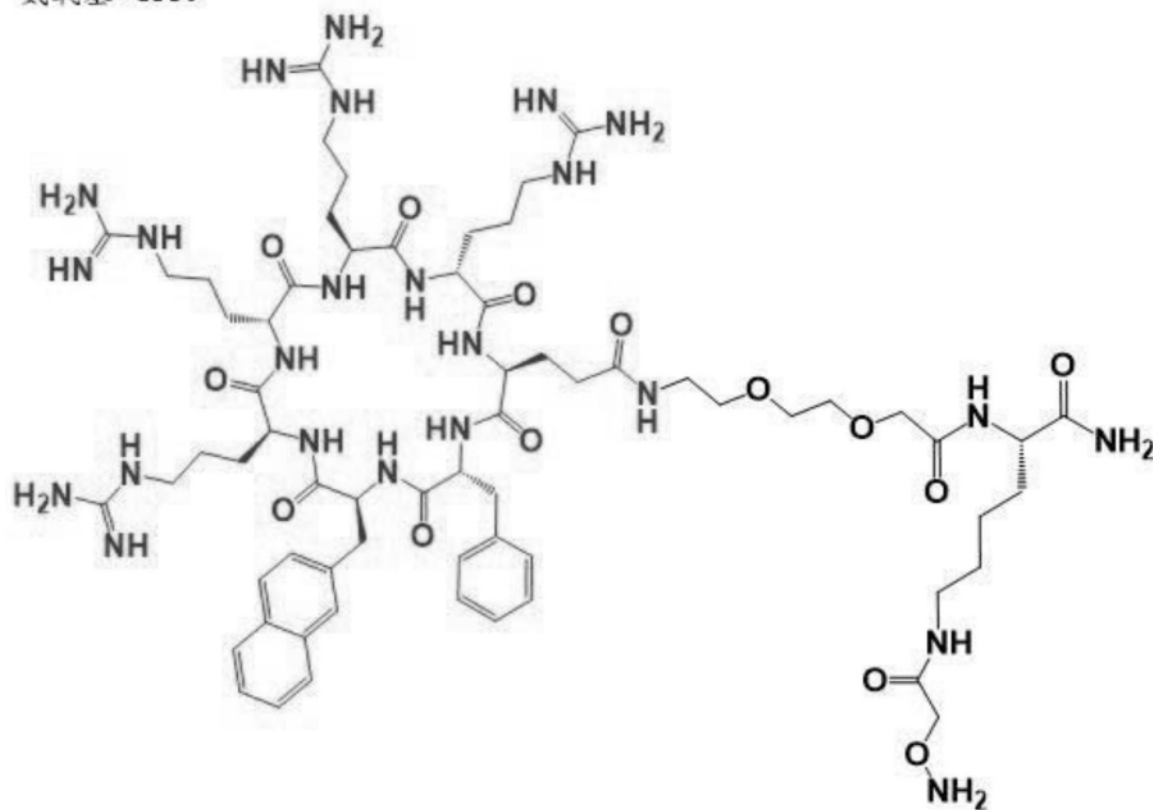


图6(续图)

氨基羧基-CPP9



分子量: 1443.69

图7

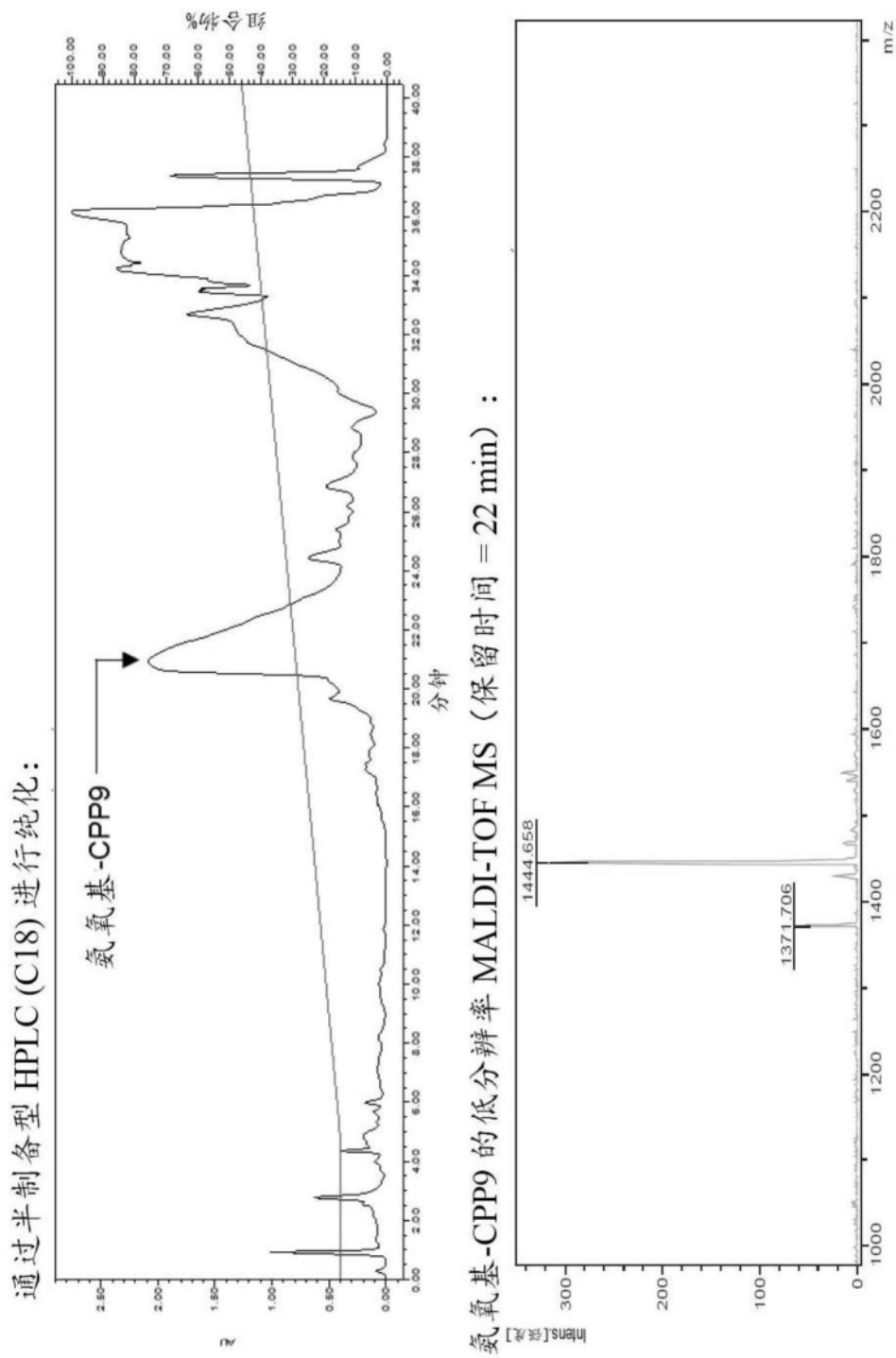


图7 (续图)

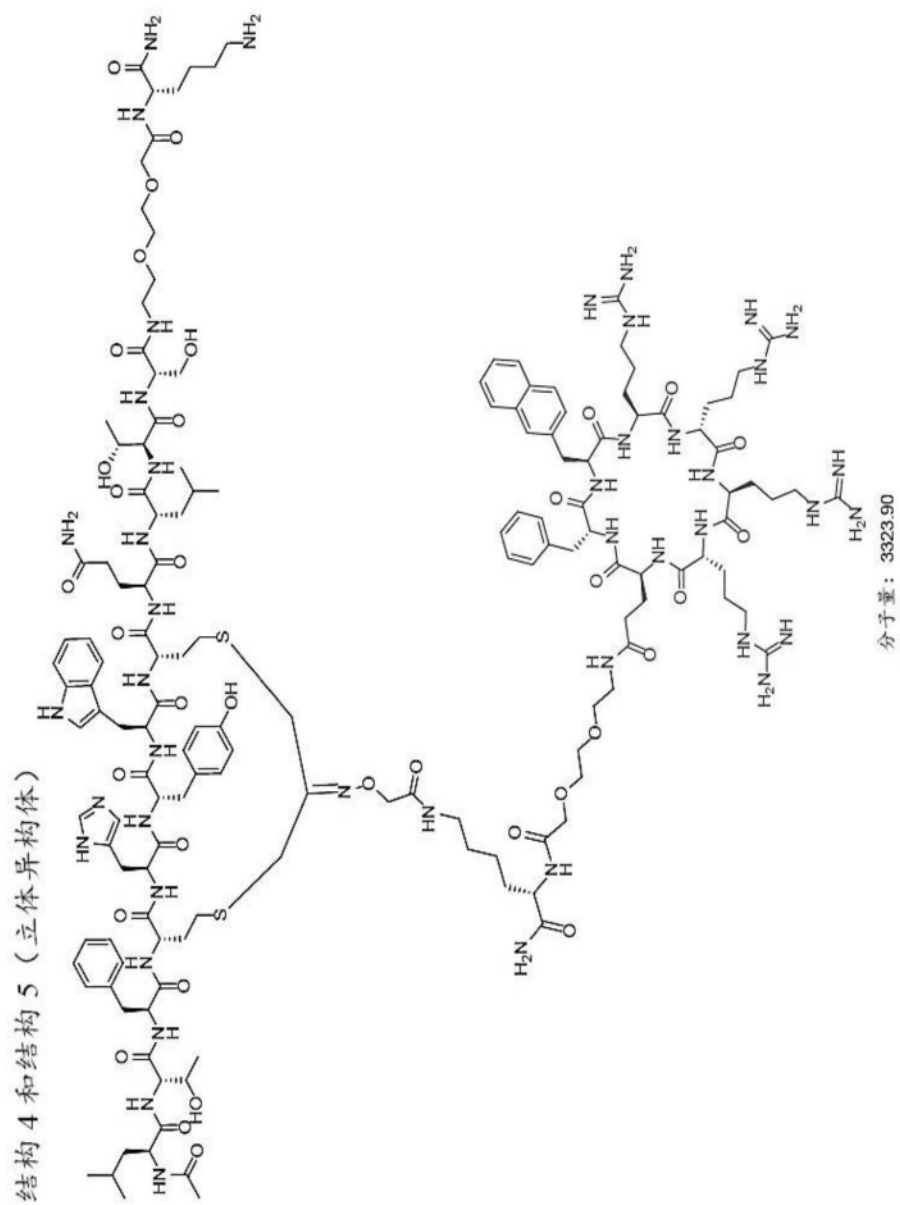


图8A

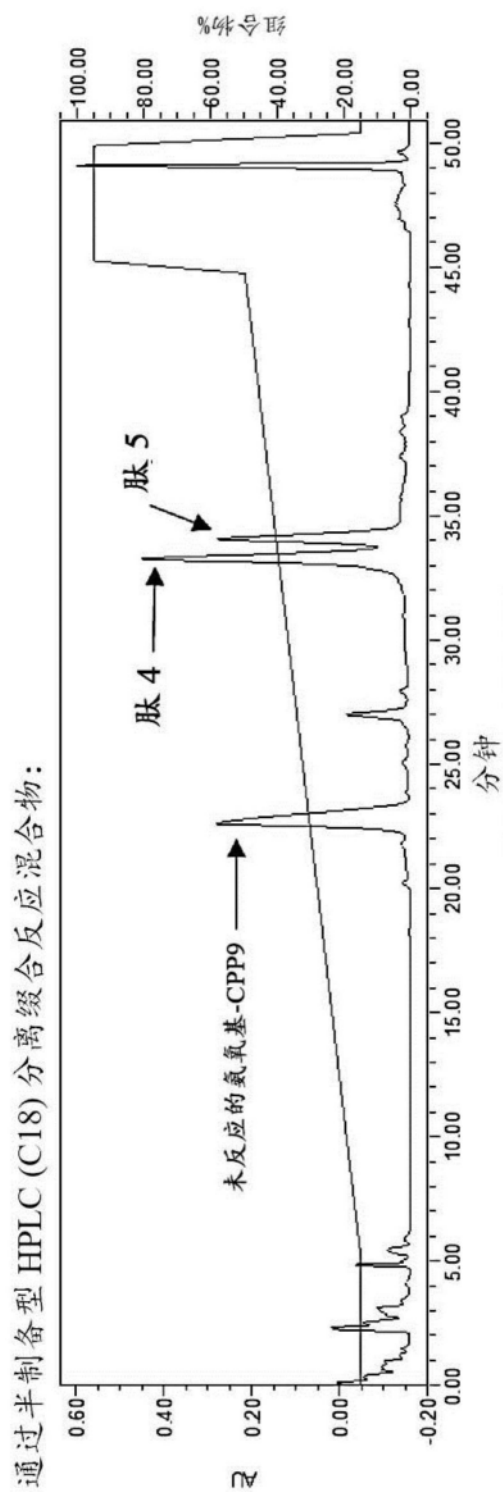


图8A(续图)

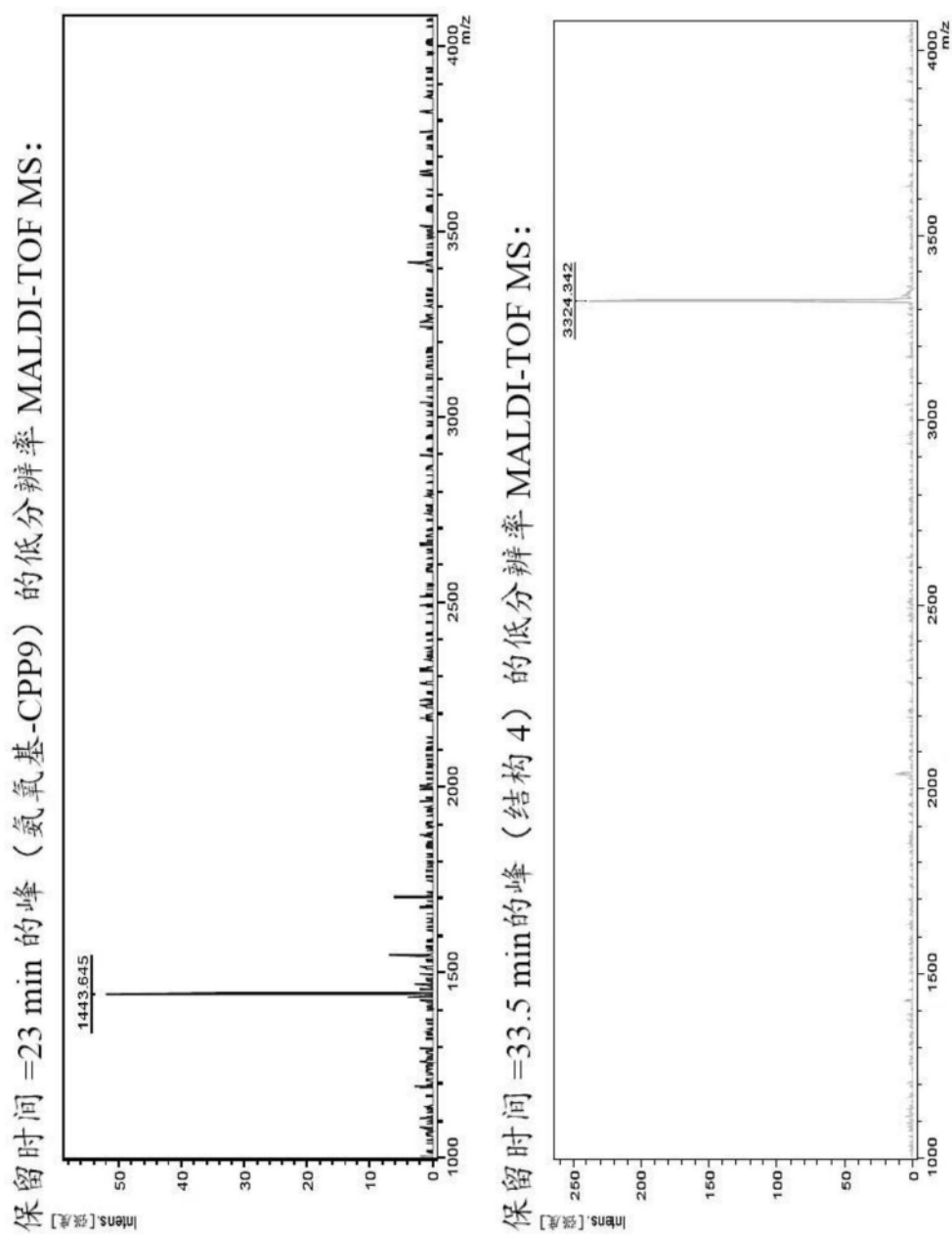


图8B

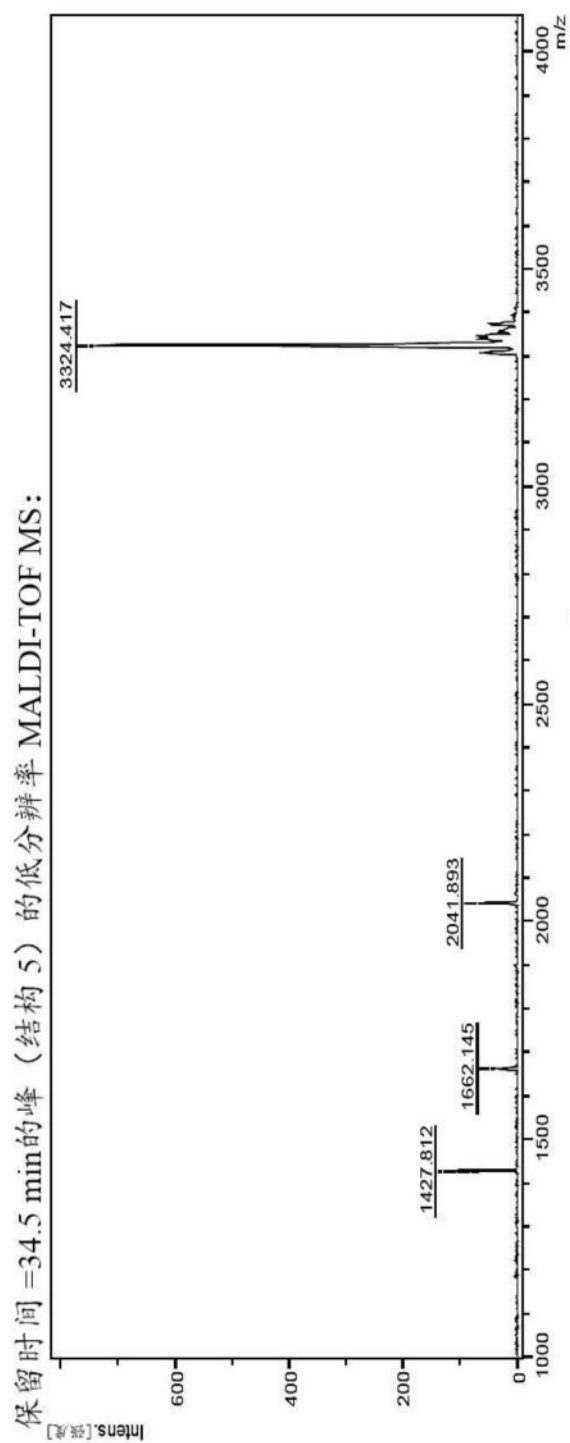
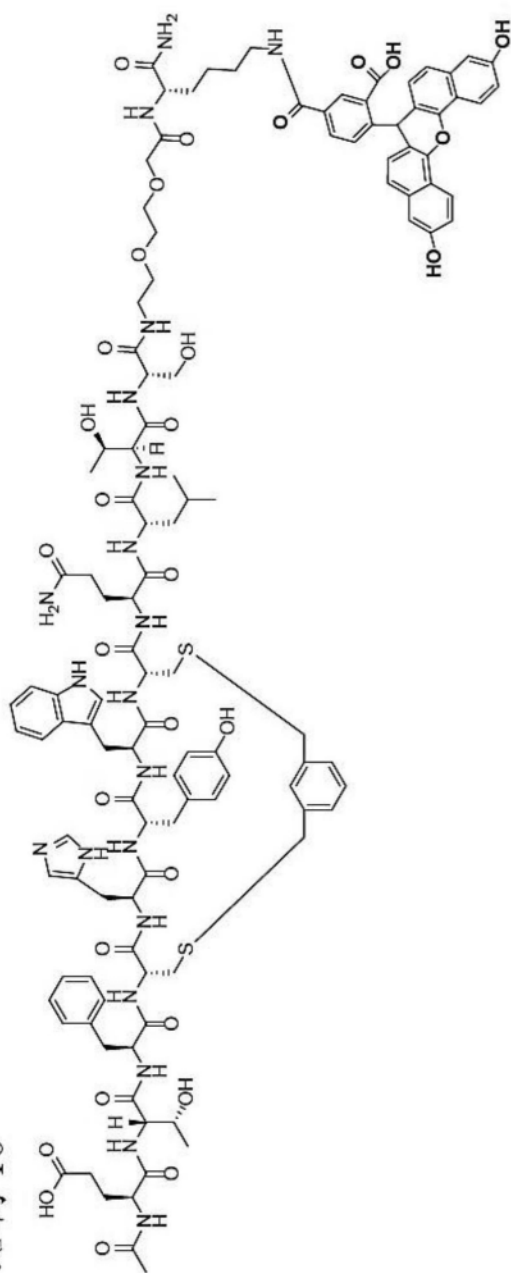


图8B(续图)

结构 10



分子量: 2394.66

通过半制备型 HPLC (214 nm) 纯化粗装订肽:

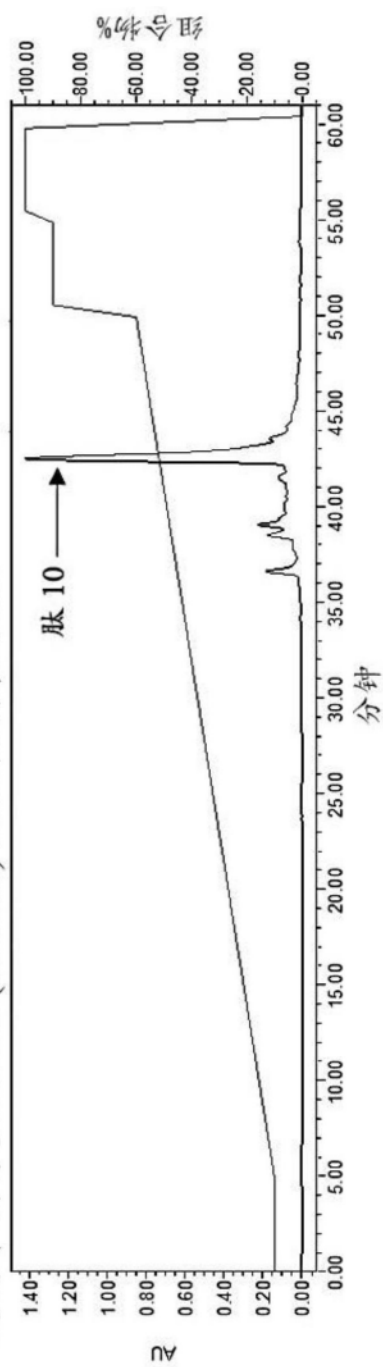


图9

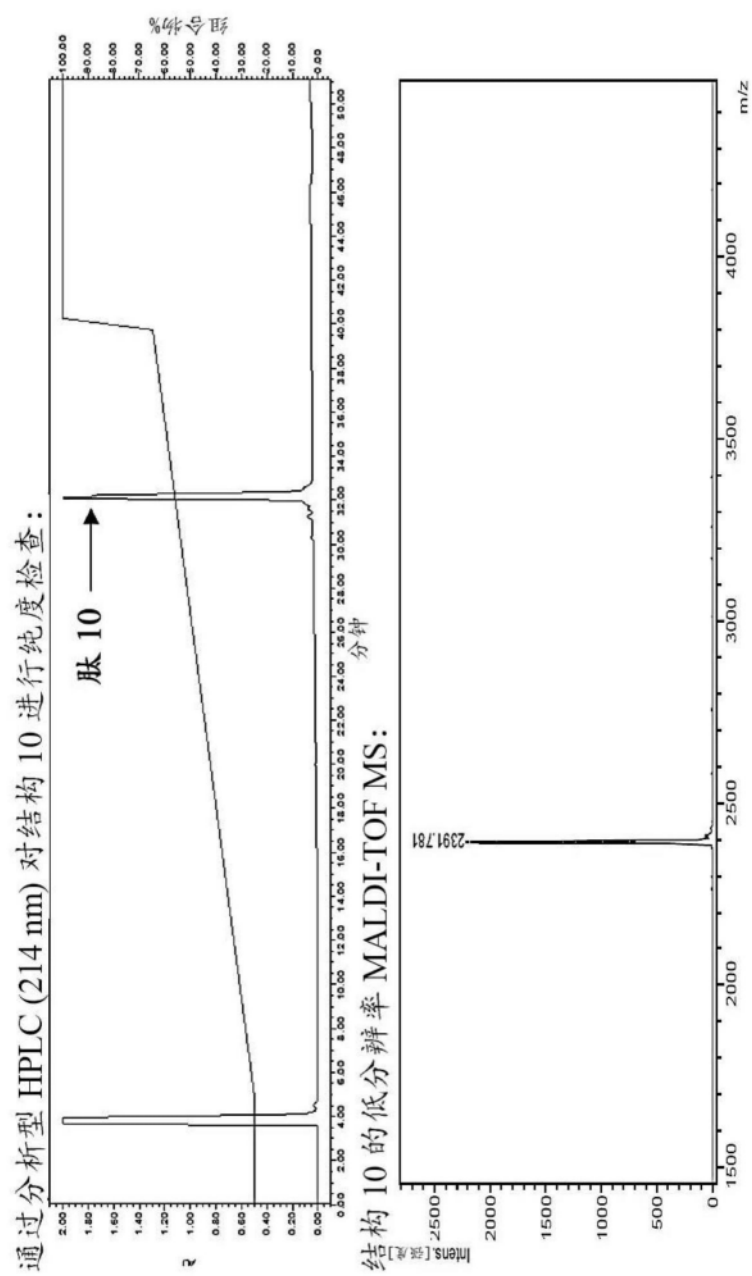


图9(续图)

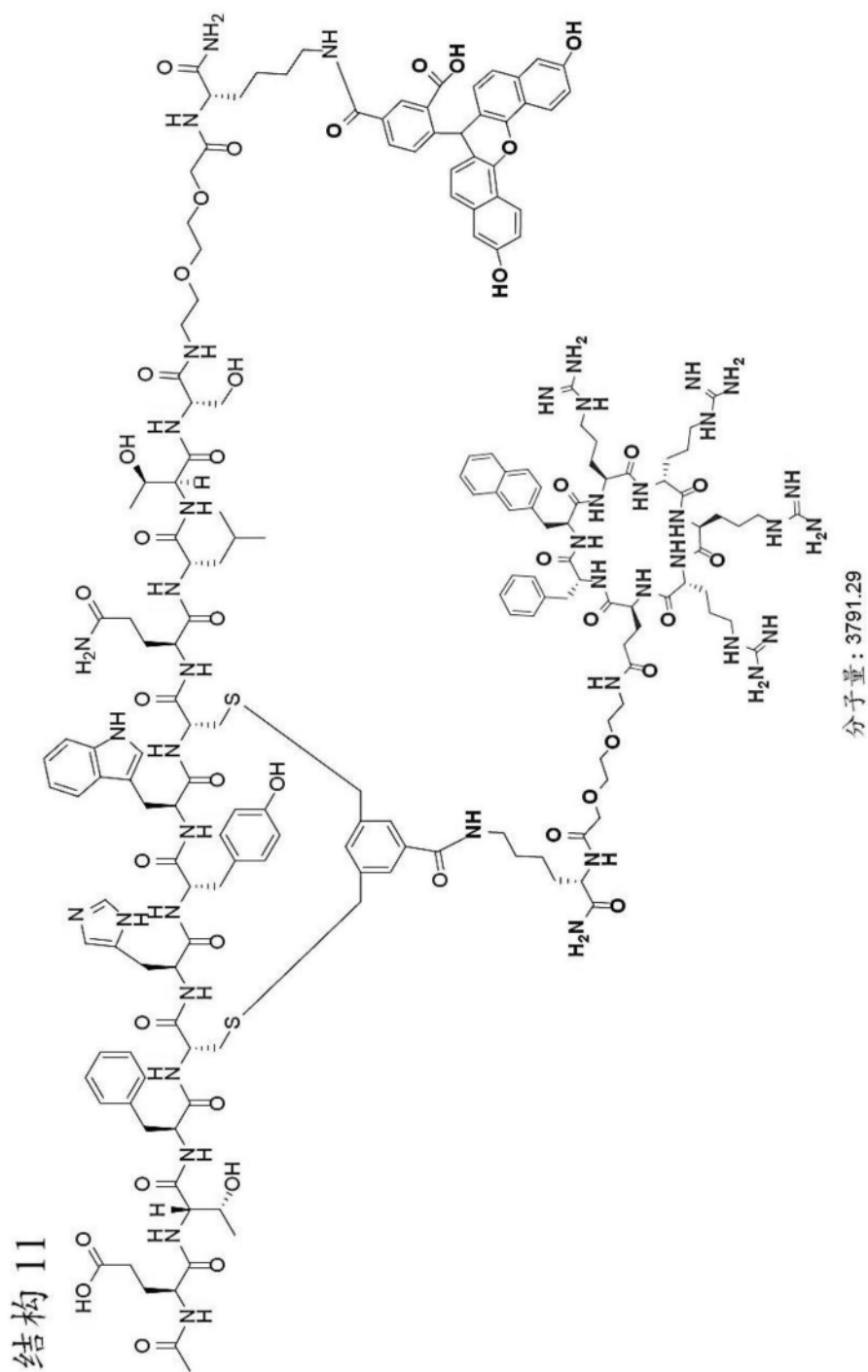


图10A

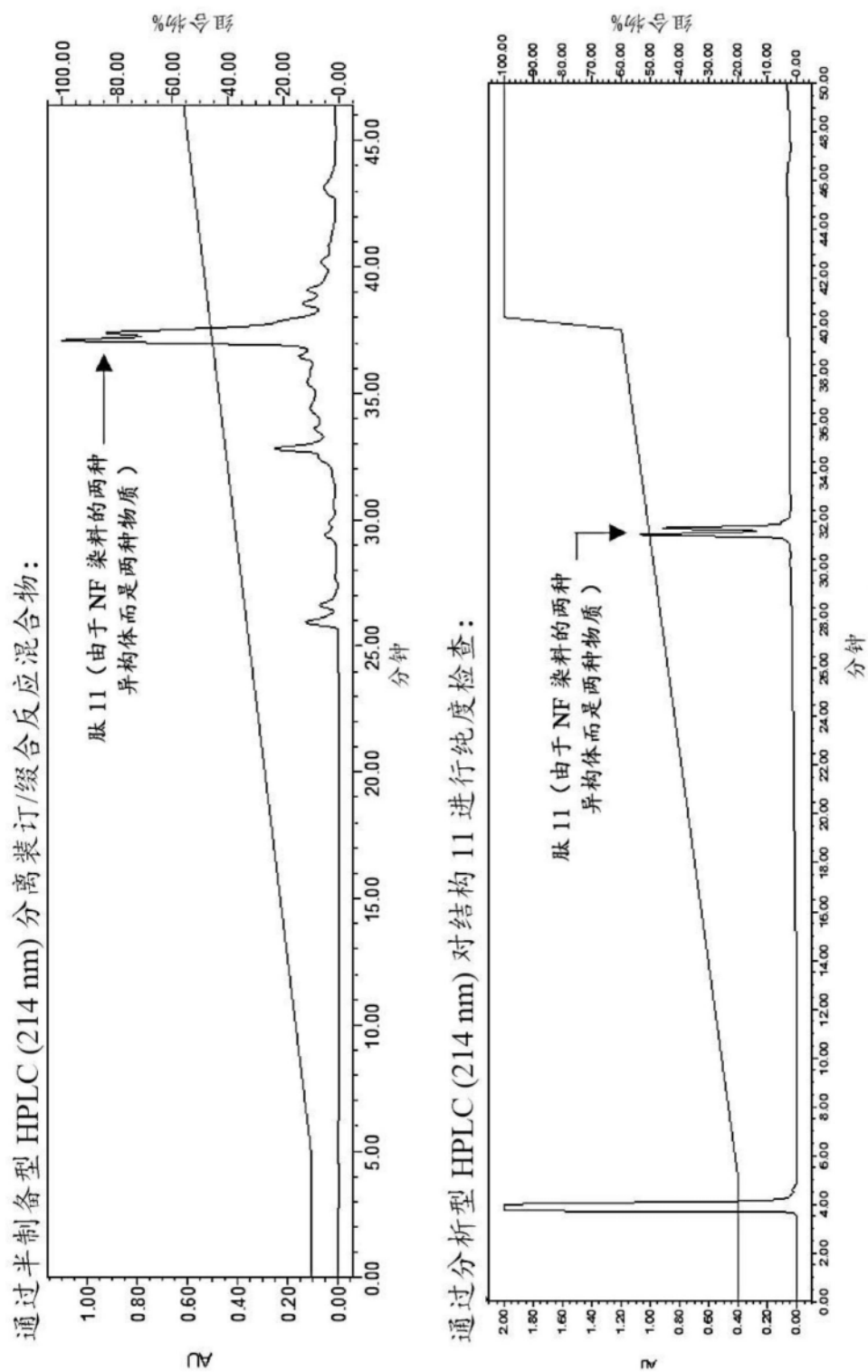


图10A(续图)

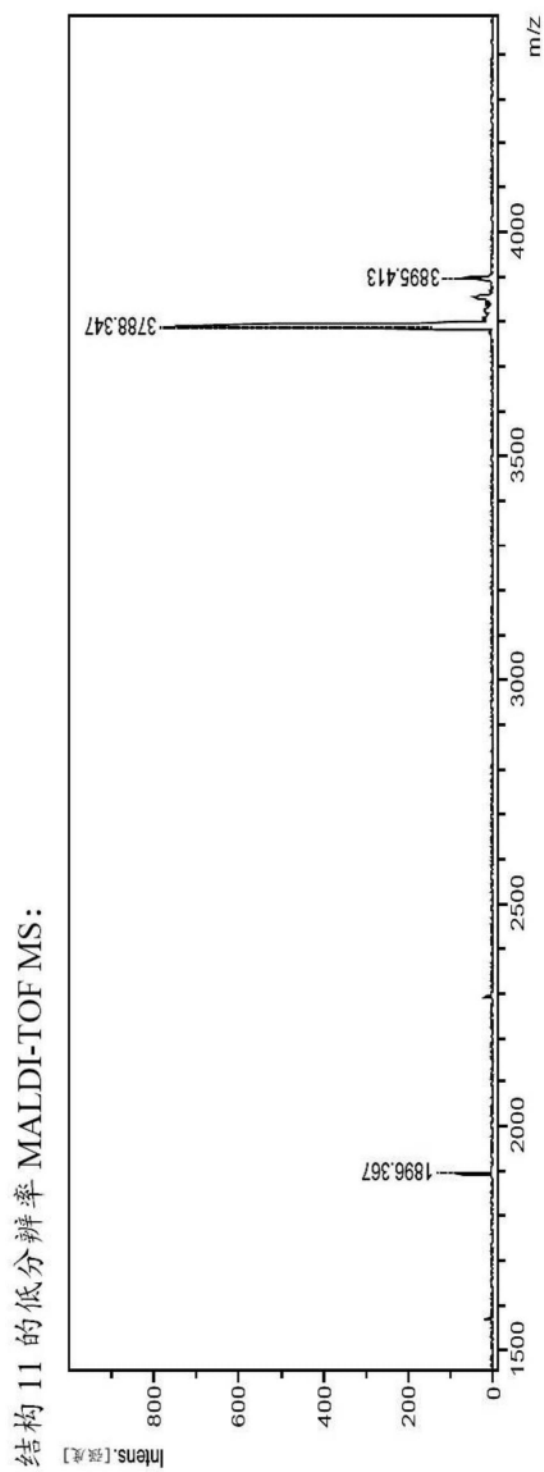
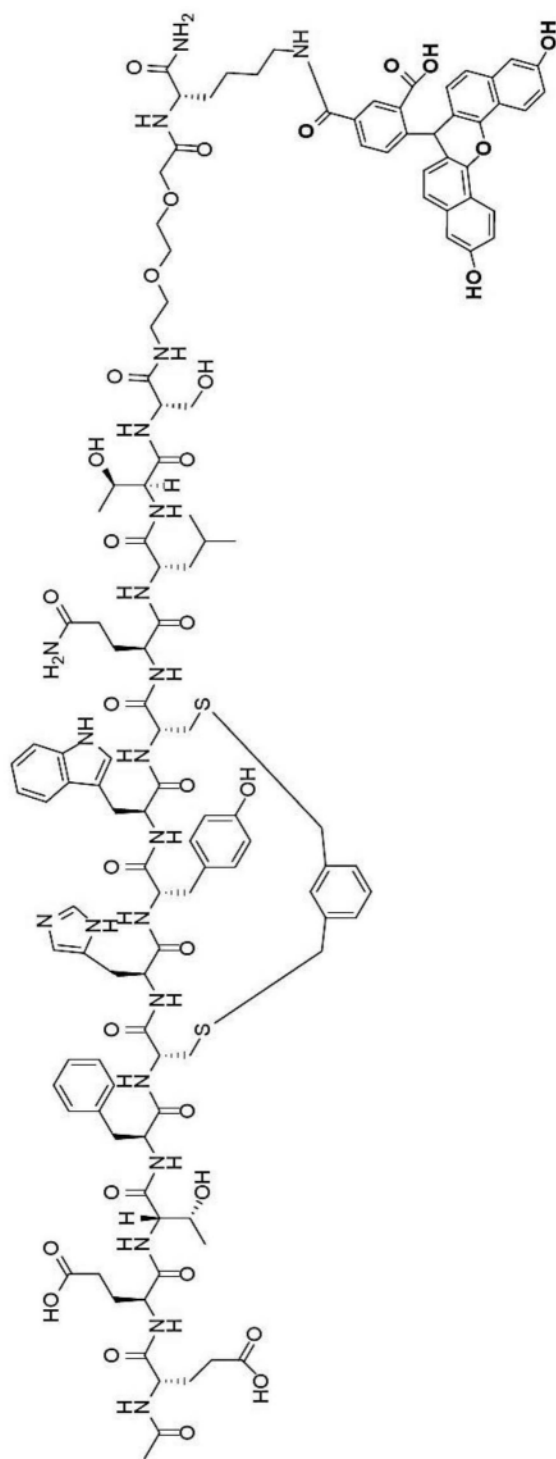


图10B

结构 12



分子量: 2523.77

图11A

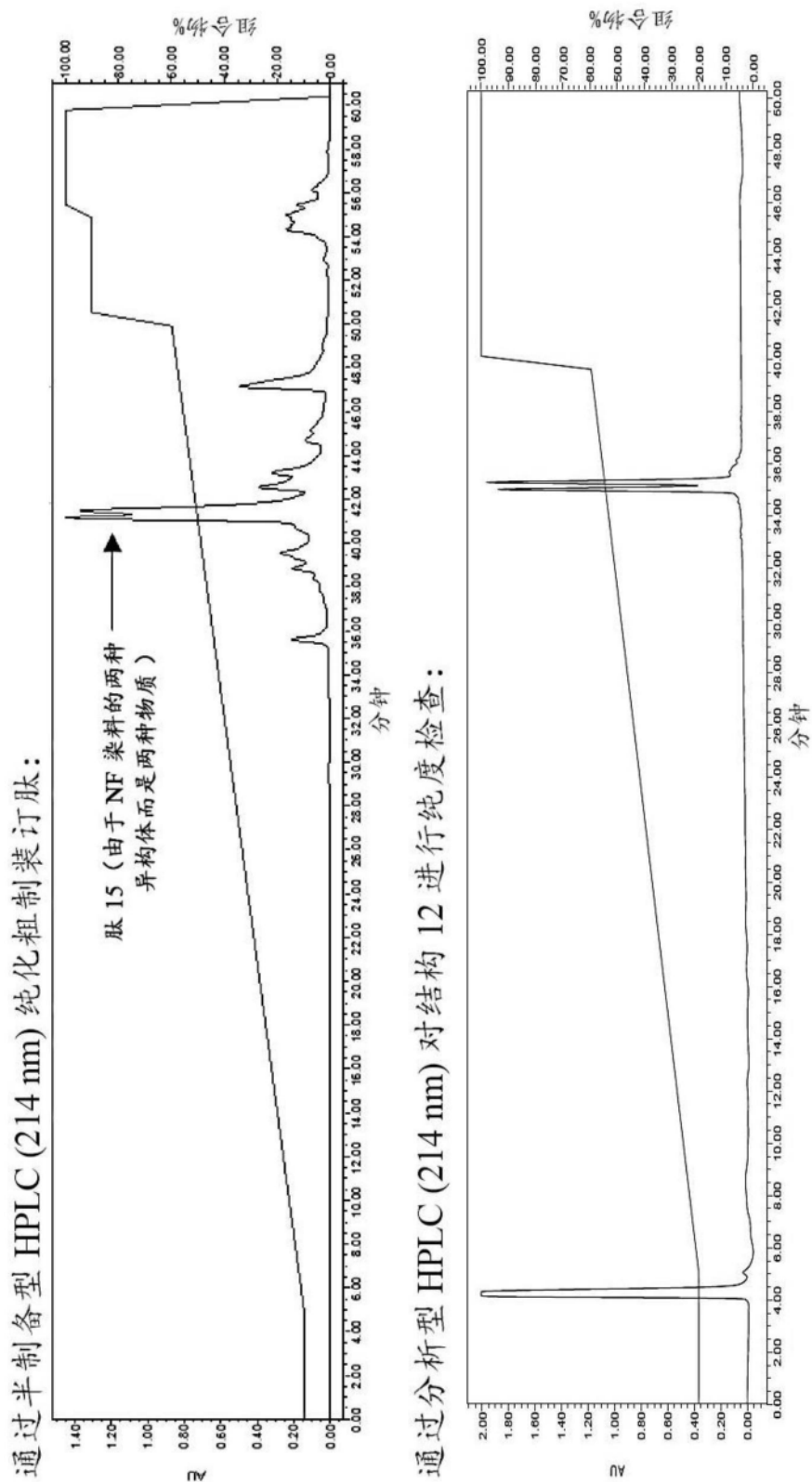


图11A (续图)

结构 12 的低分辨率 MALDI-TOF MS:

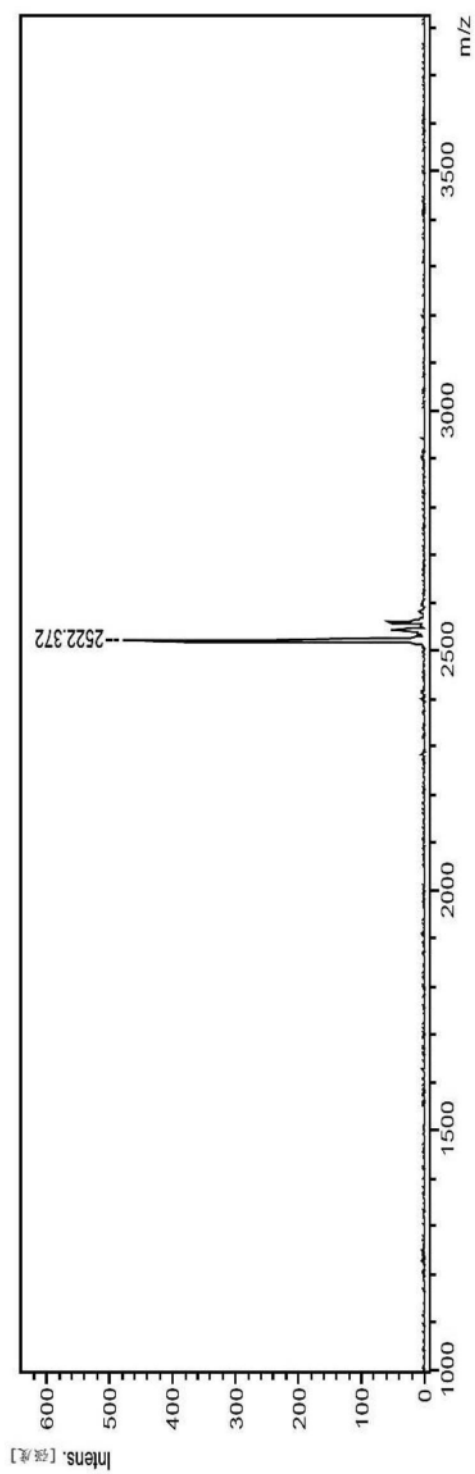
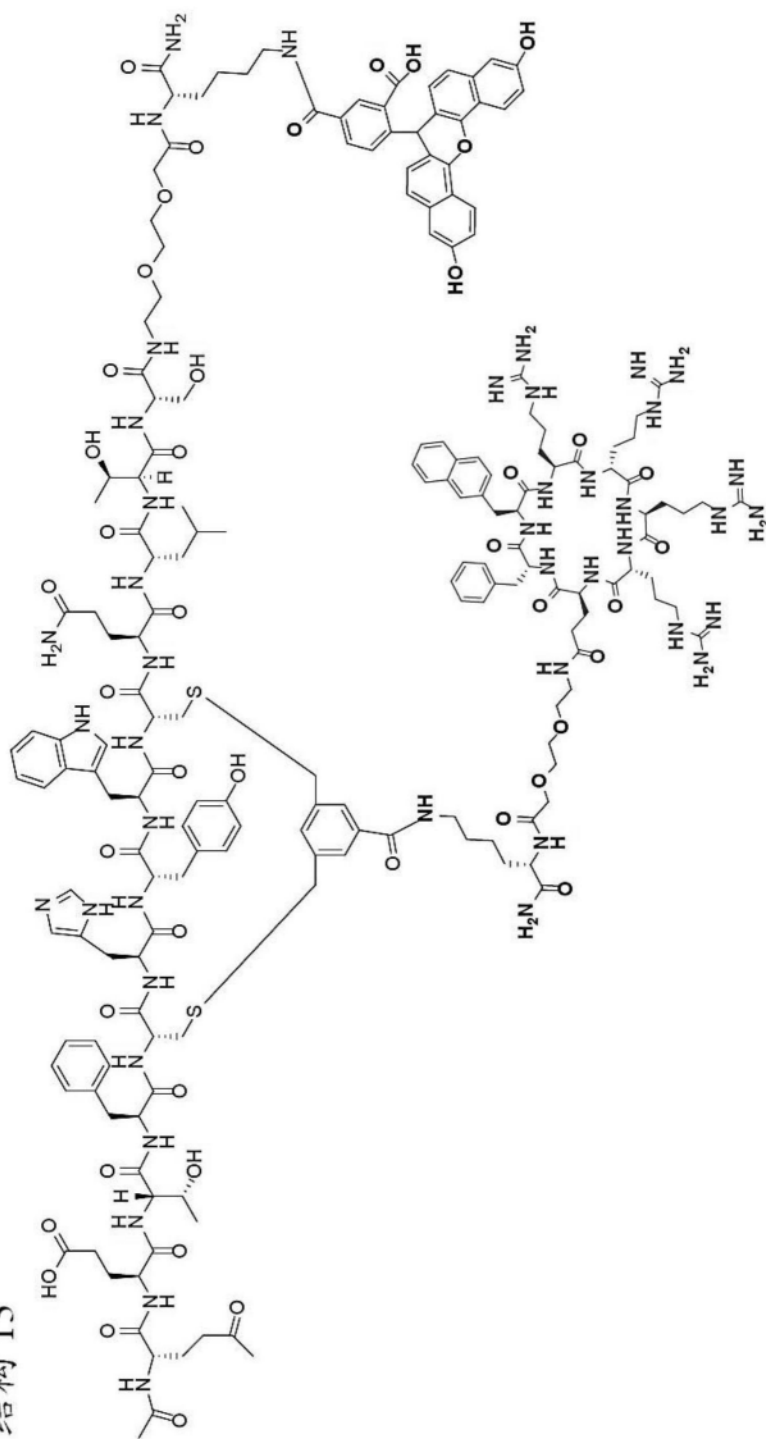


图11B

结构 13



分子量: 3918.43

图12A

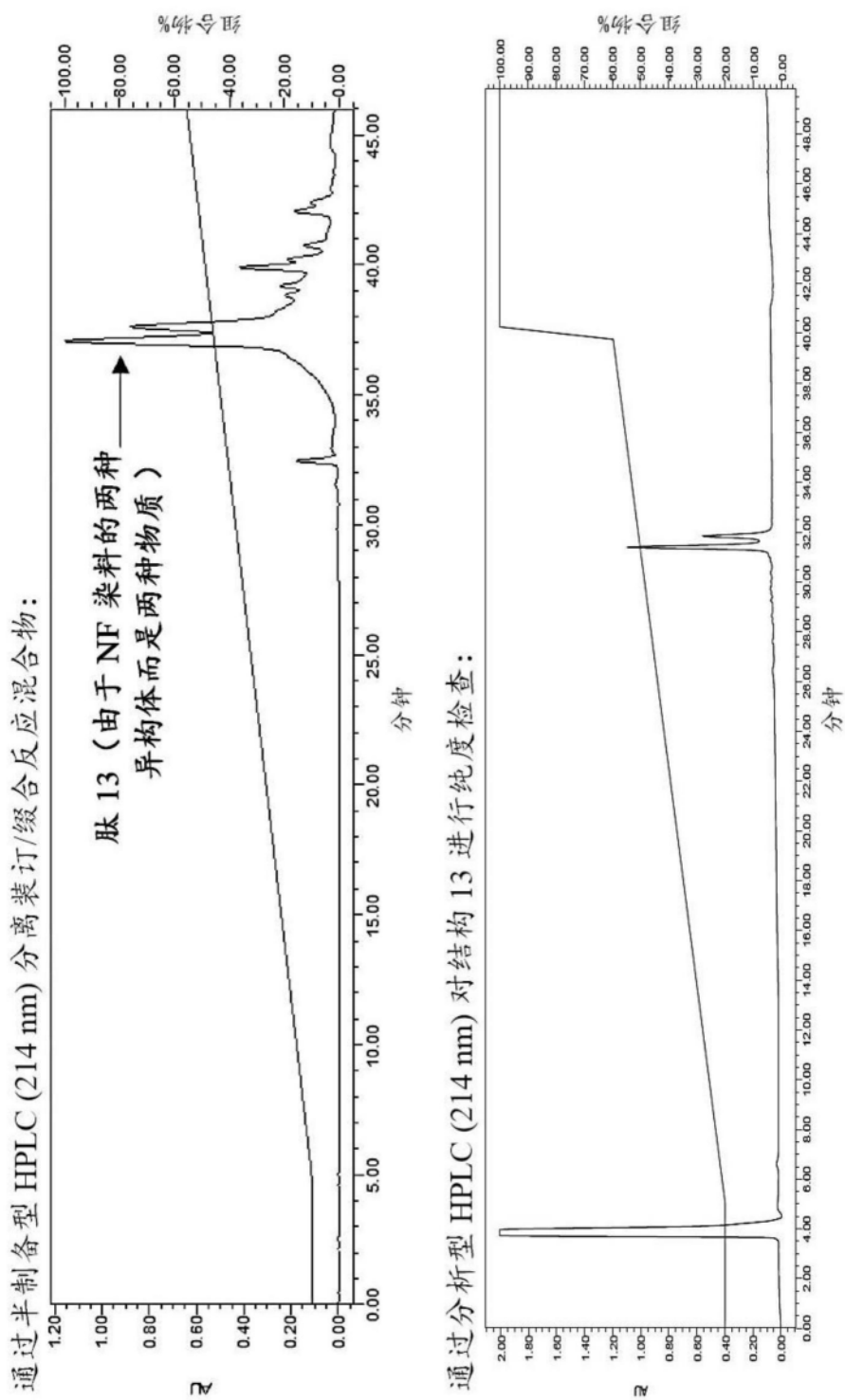


图12A(续图)

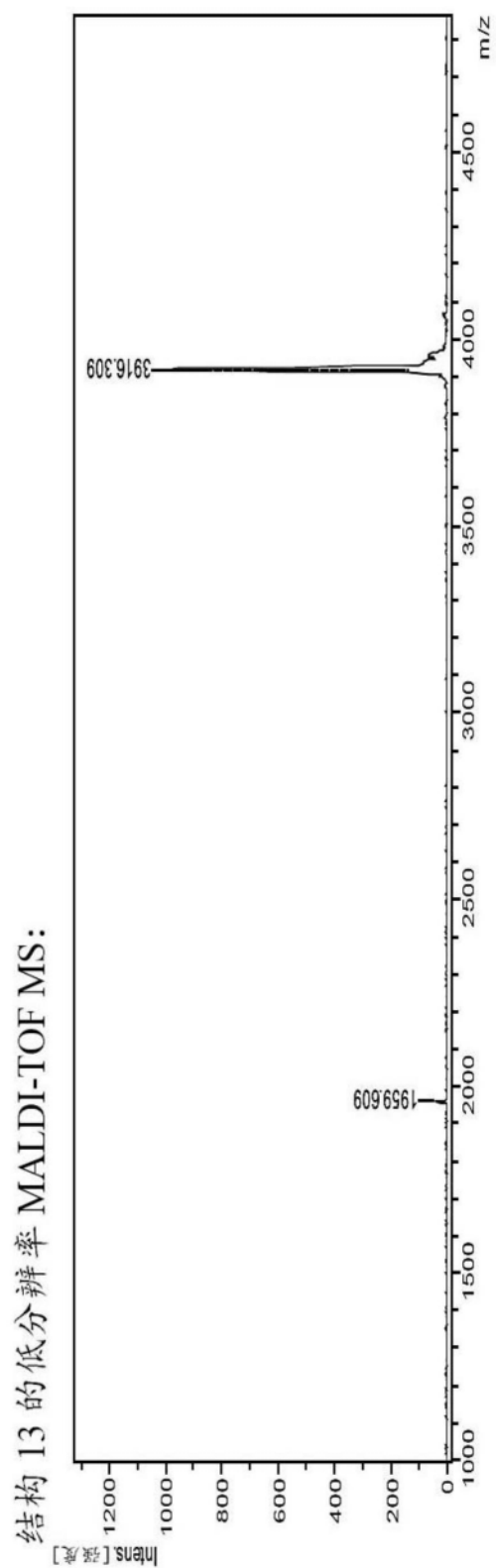
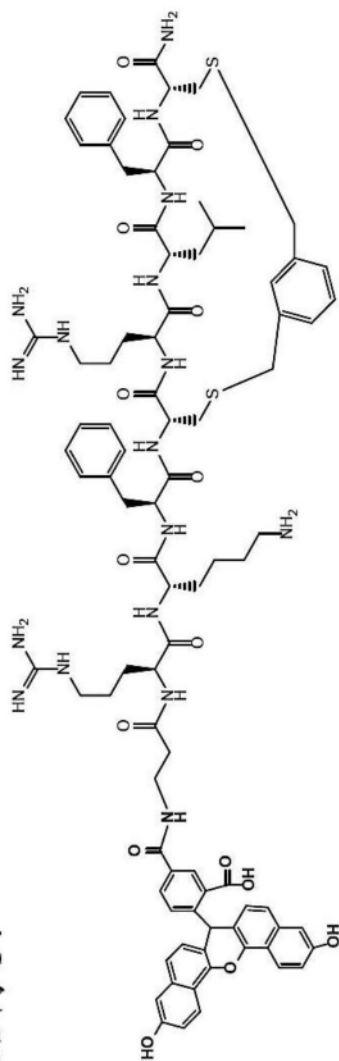


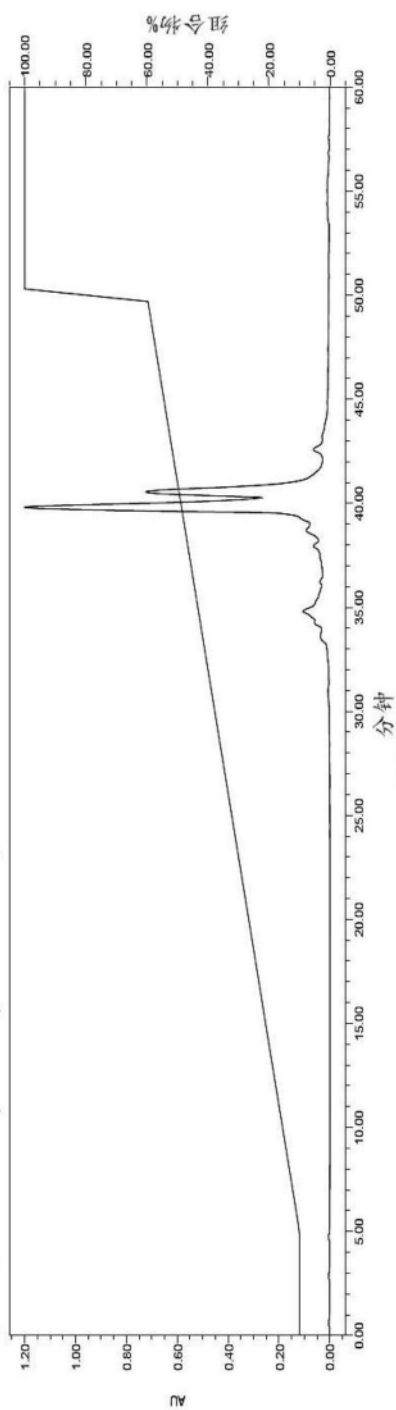
图12B

结构 14



分子量: 1705.03

通过半制备型 HPLC (214 nm) 纯化粗制装订肽:



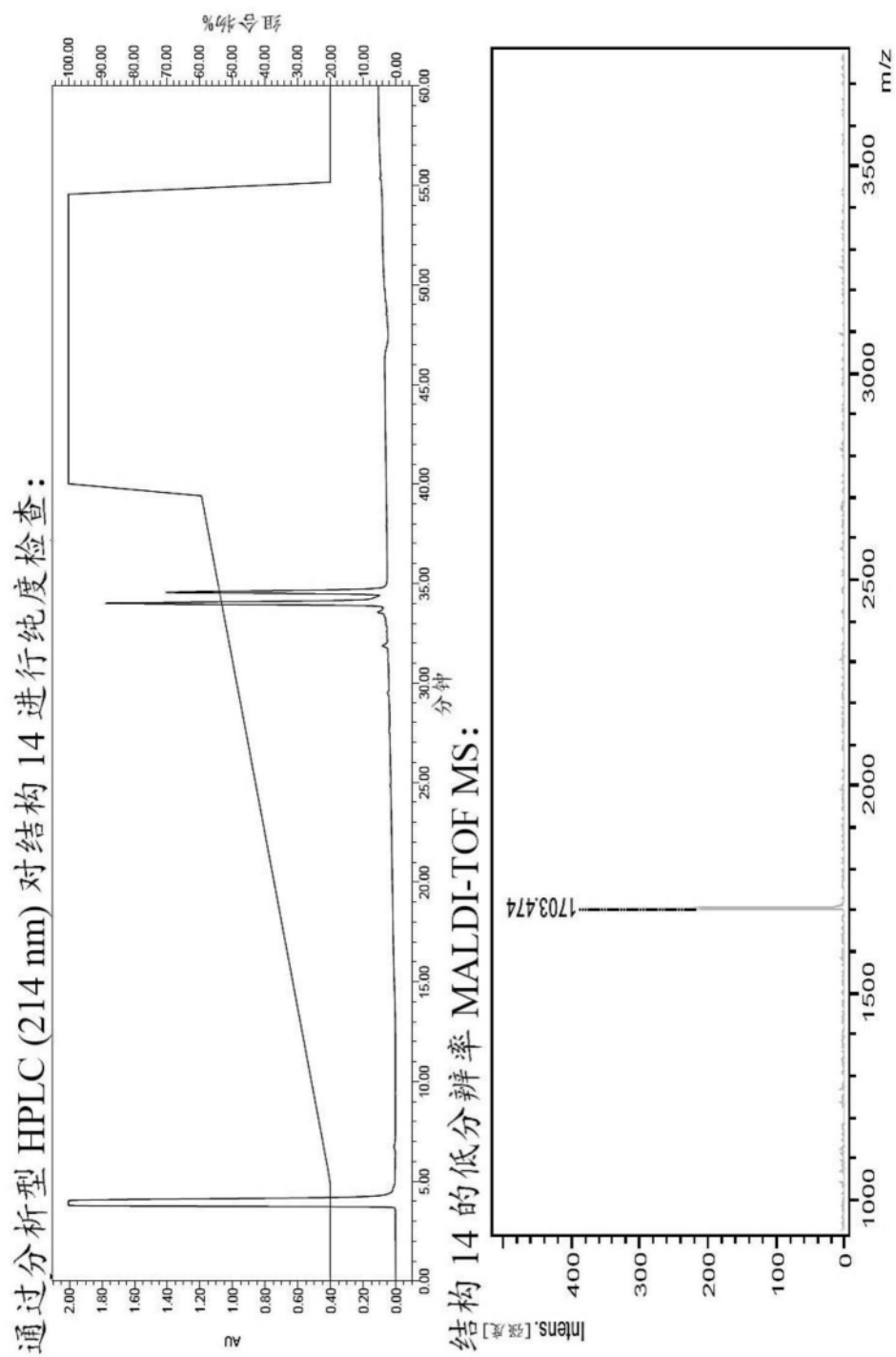
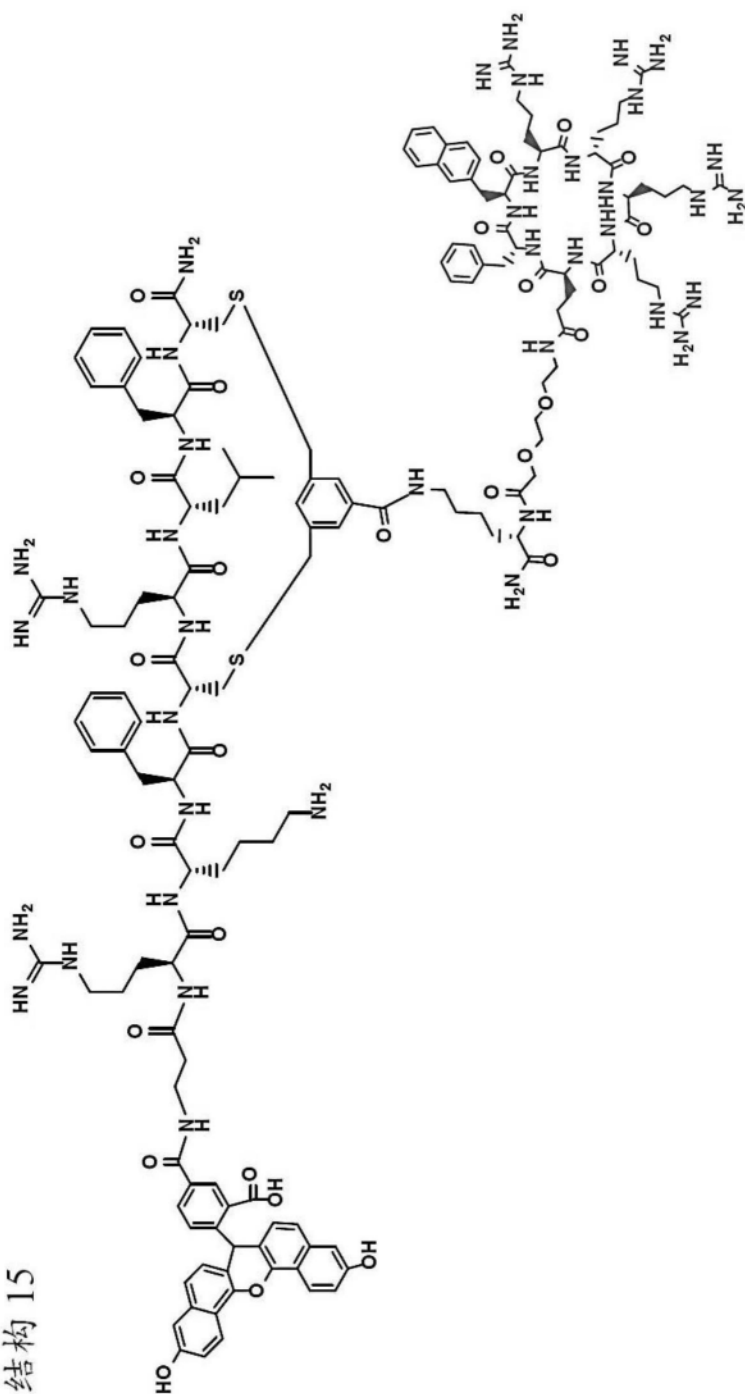


图13(续图)

结构 15



分子量: 3101.66

图14A

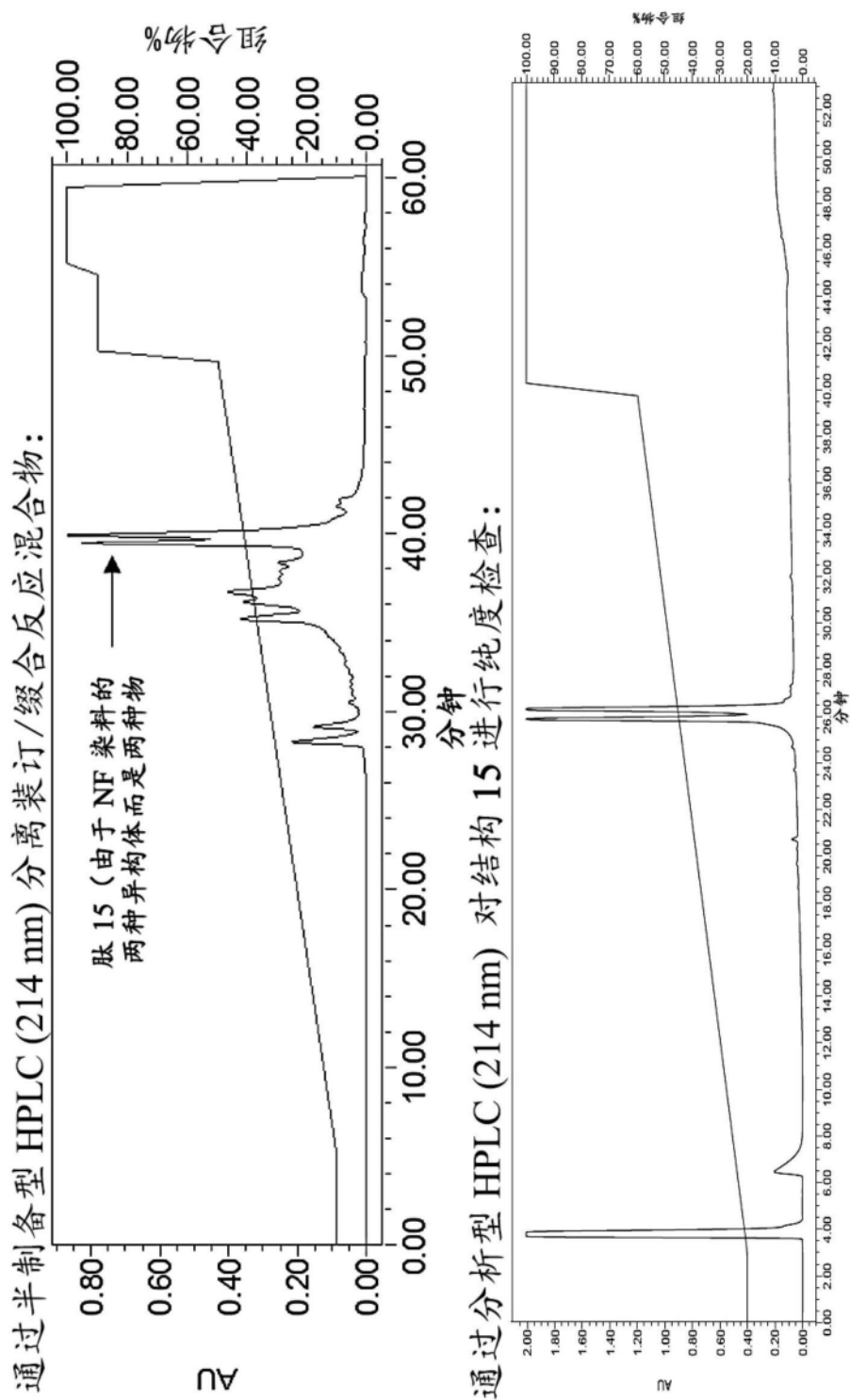


图14A (续图)

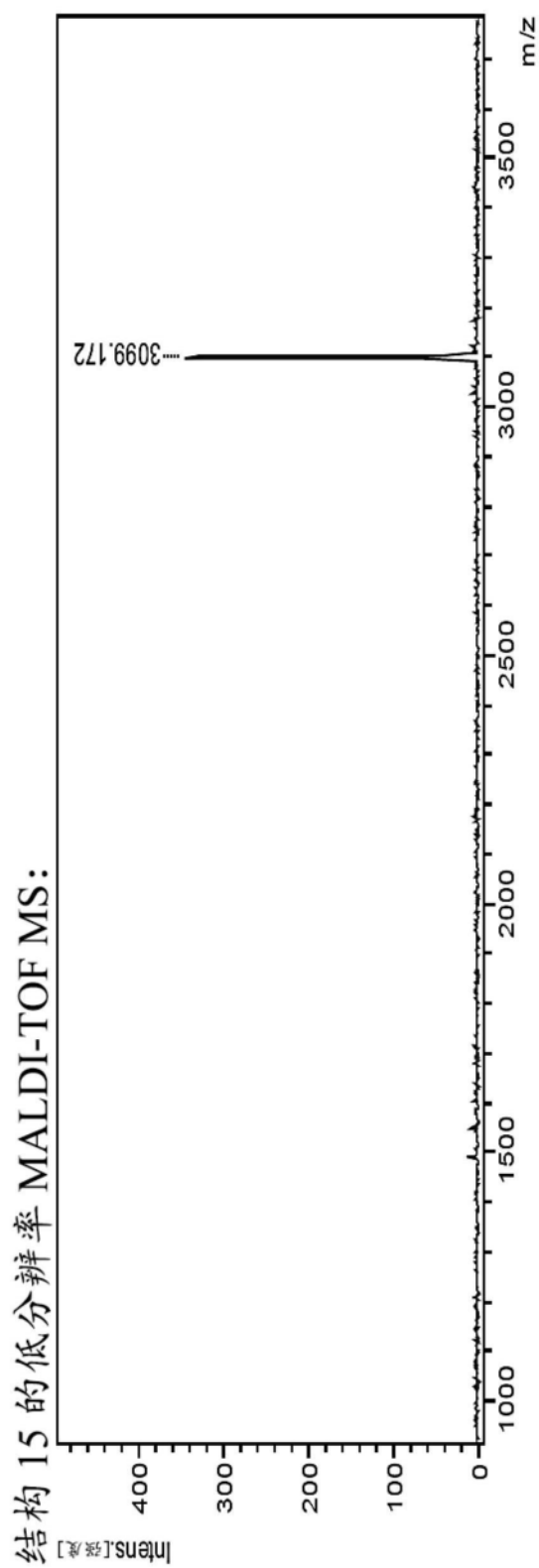
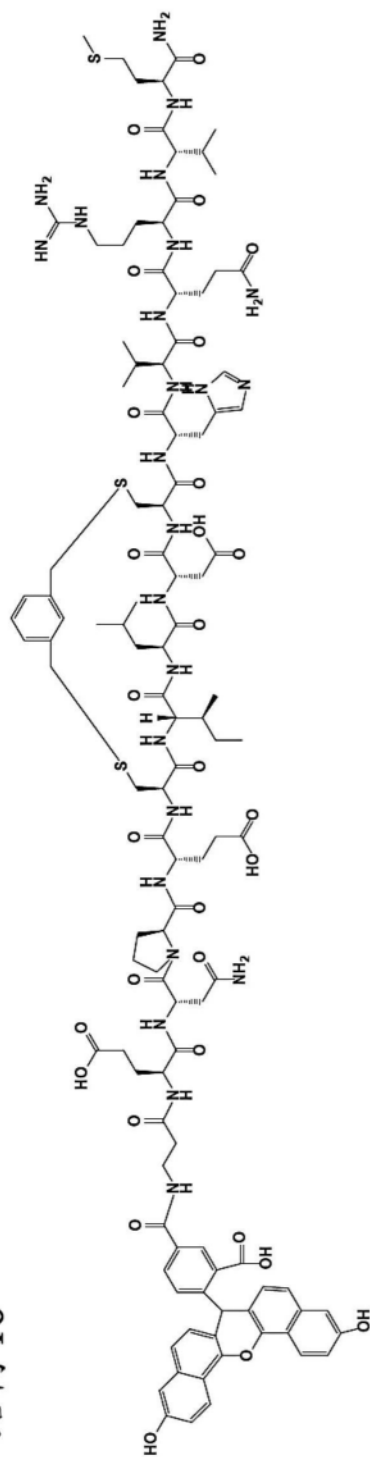


图14B

结构 16



分子量: 2418.75

通过半制备型 HPLC (214 nm) 纯化粗制装订肽:

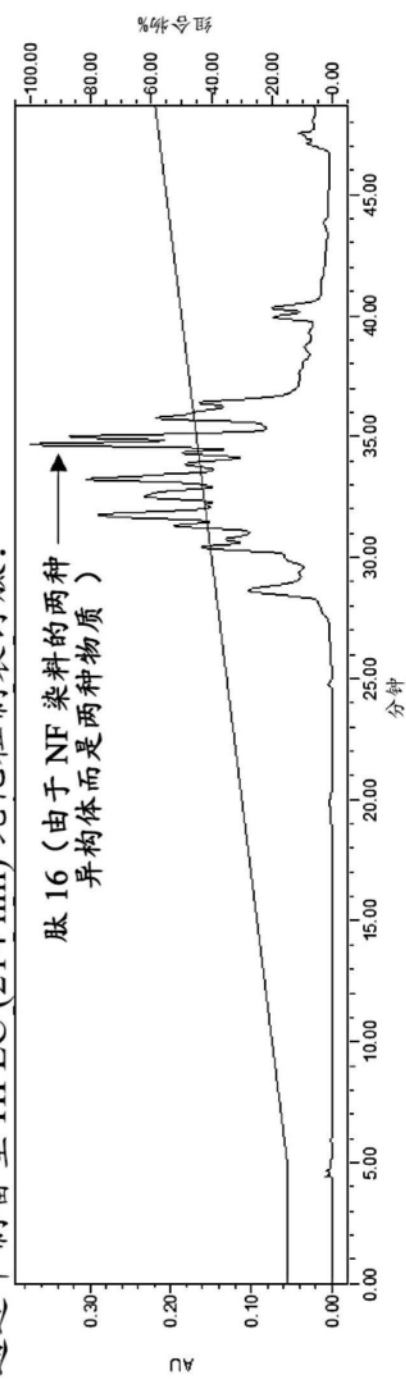


图15

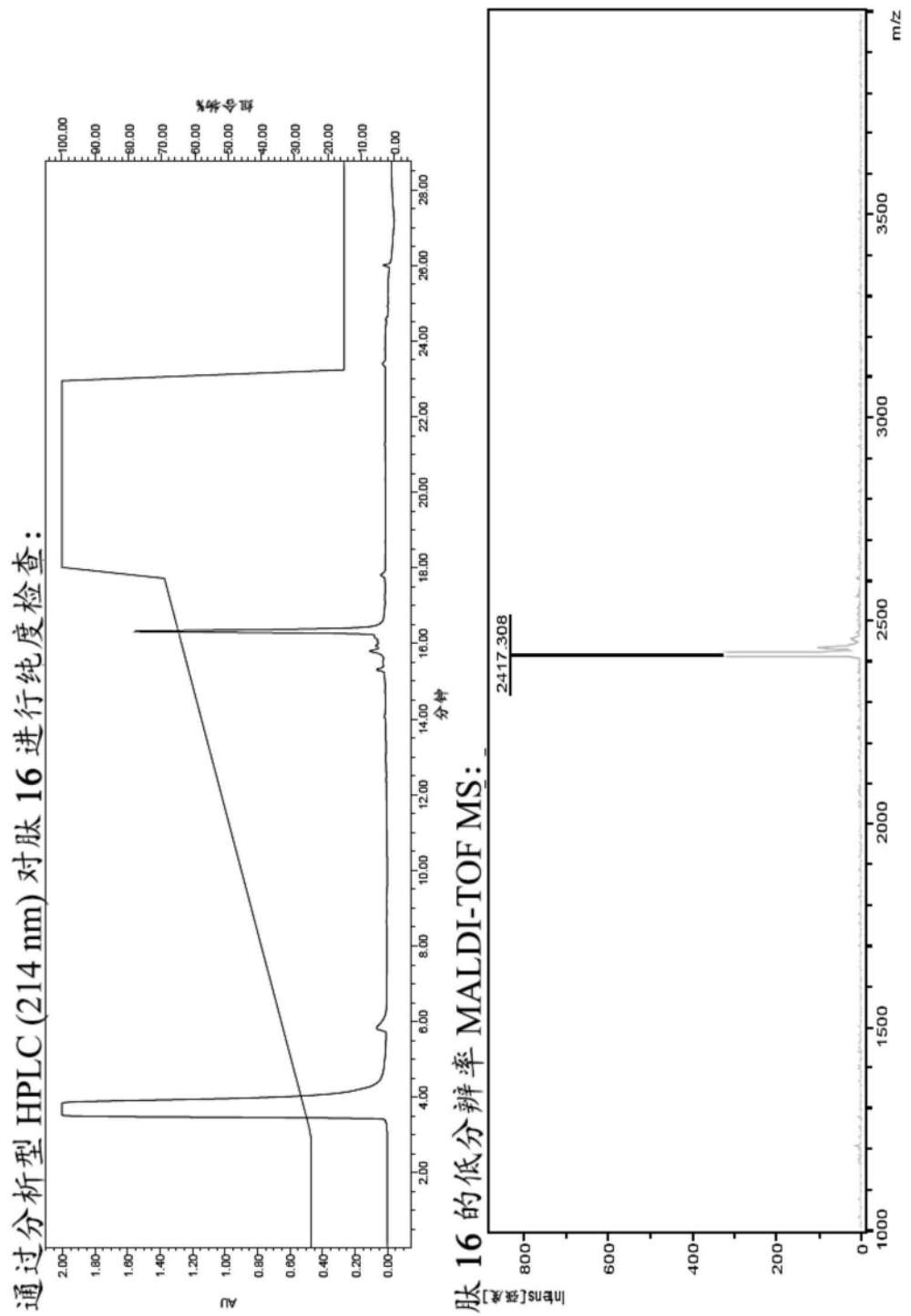
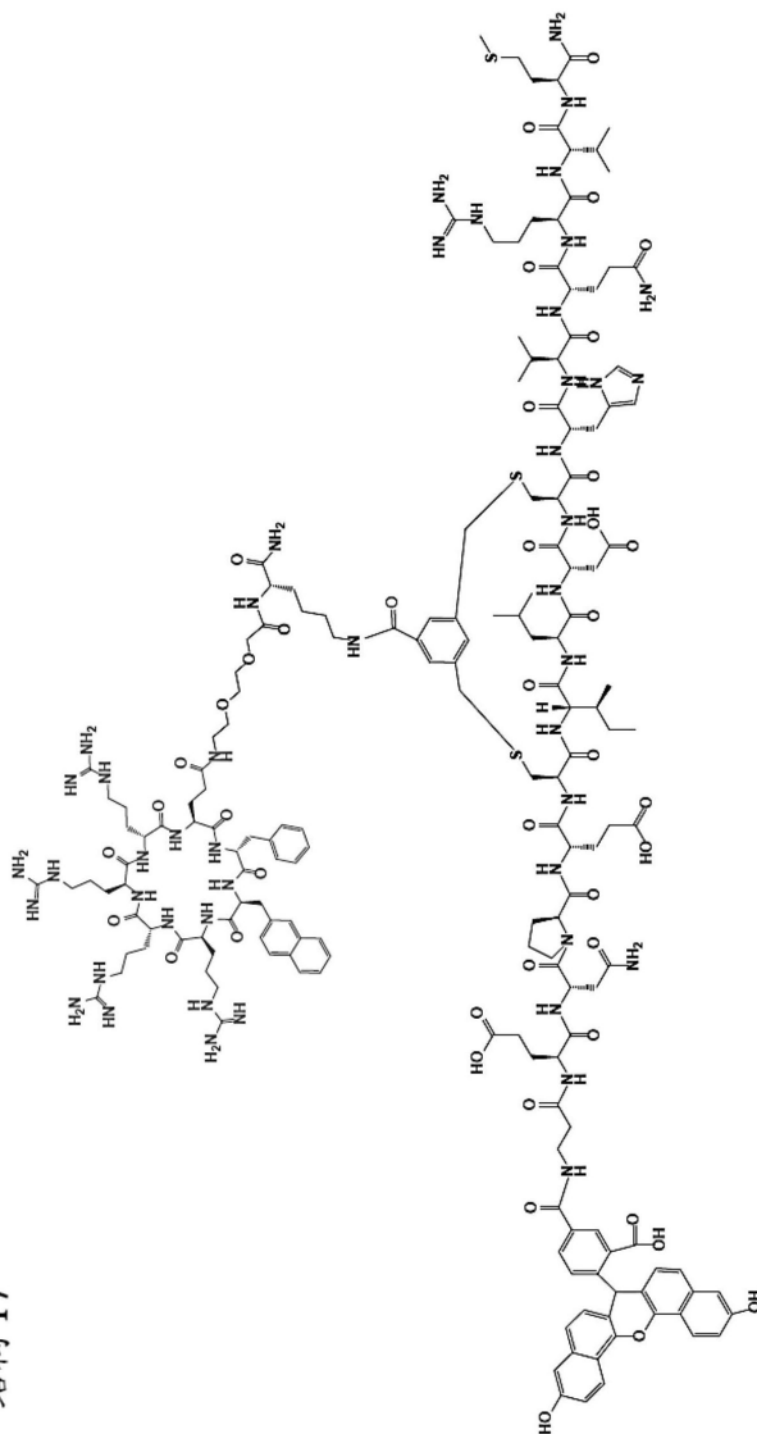


图15(续图)

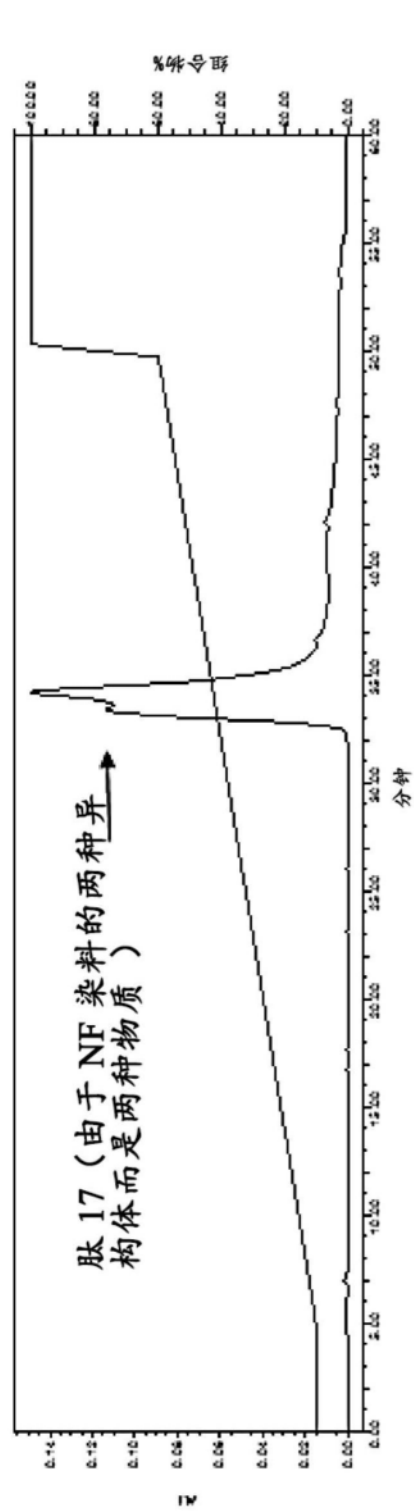
结构 17



分子量: 3815.37

图16A

通过半制备型 HPLC (214 nm) 分离装订/缀合反应混合物:



通过分析型 HPLC (214 nm) 对结构 17 进行纯度检查:

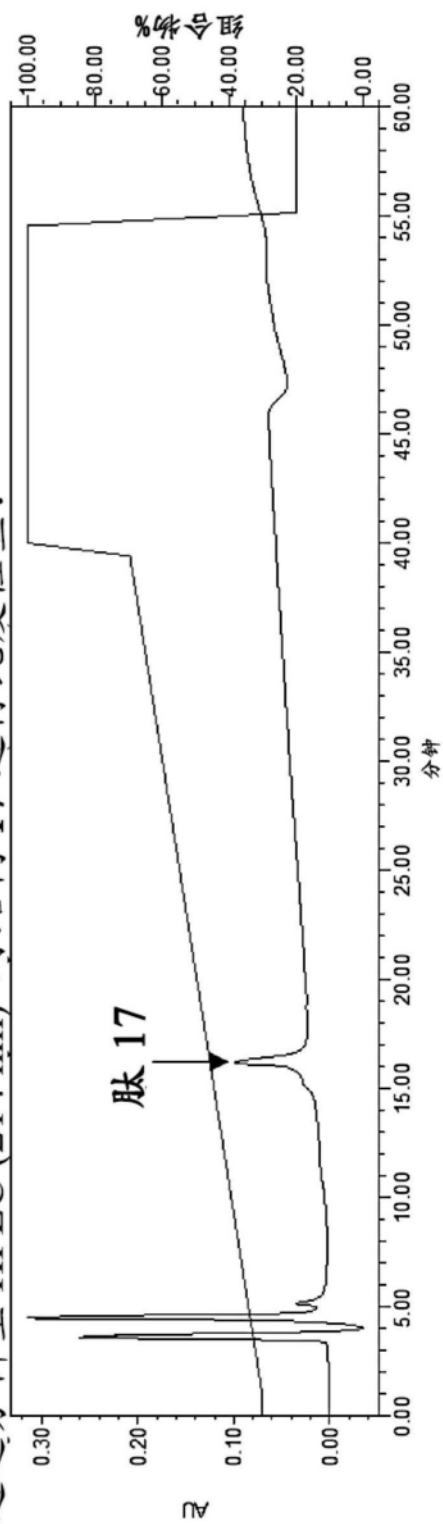


图16A (续图)

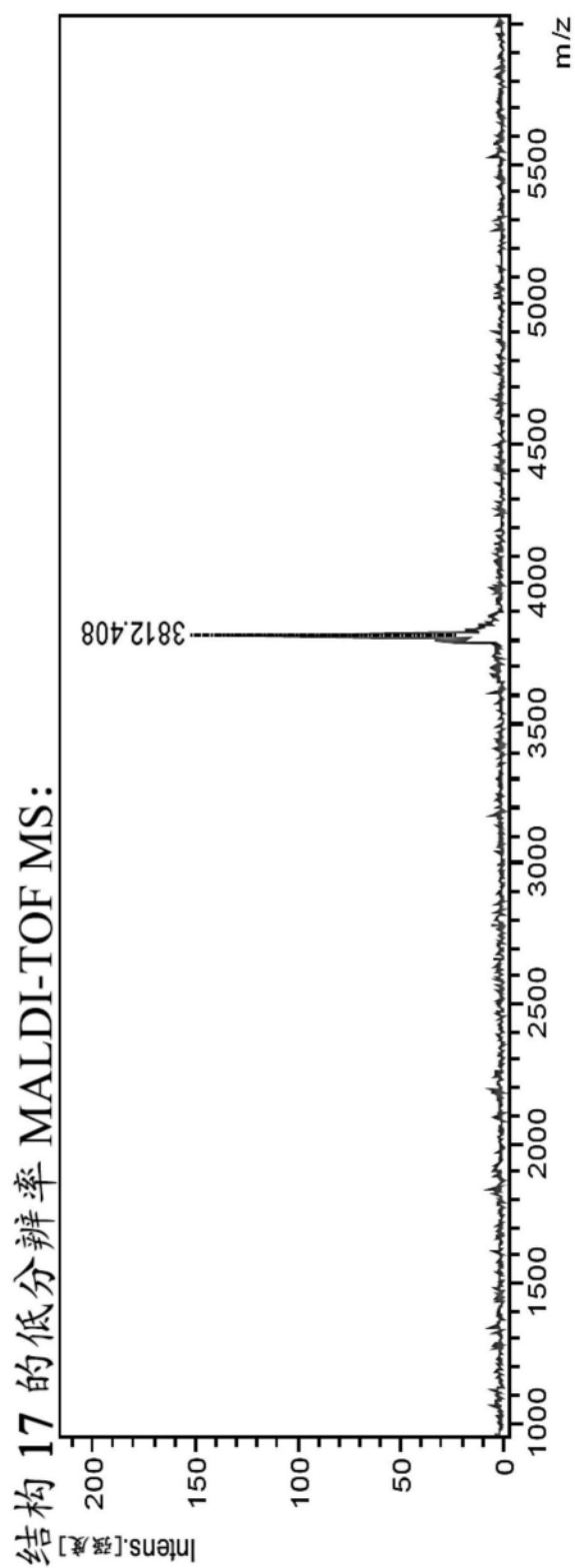
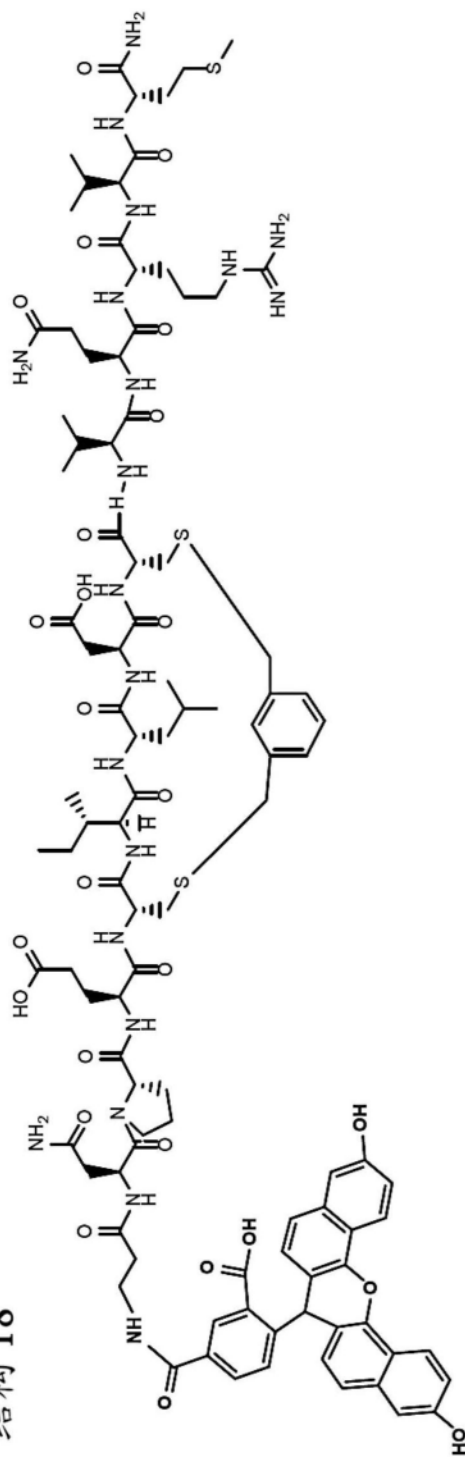


图16B

结构 18



分子量: 2289.63
通过半制备型 HPLC (214 nm) 纯化粗制肽:

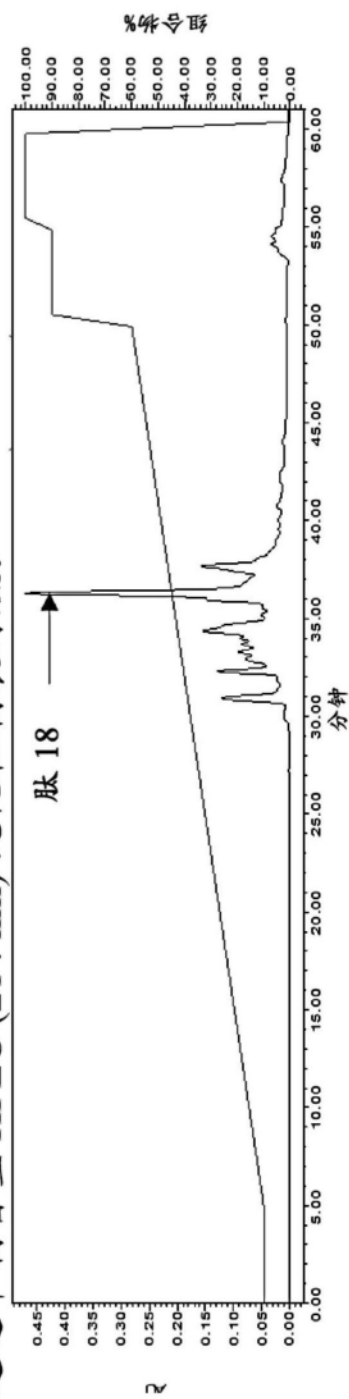


图17

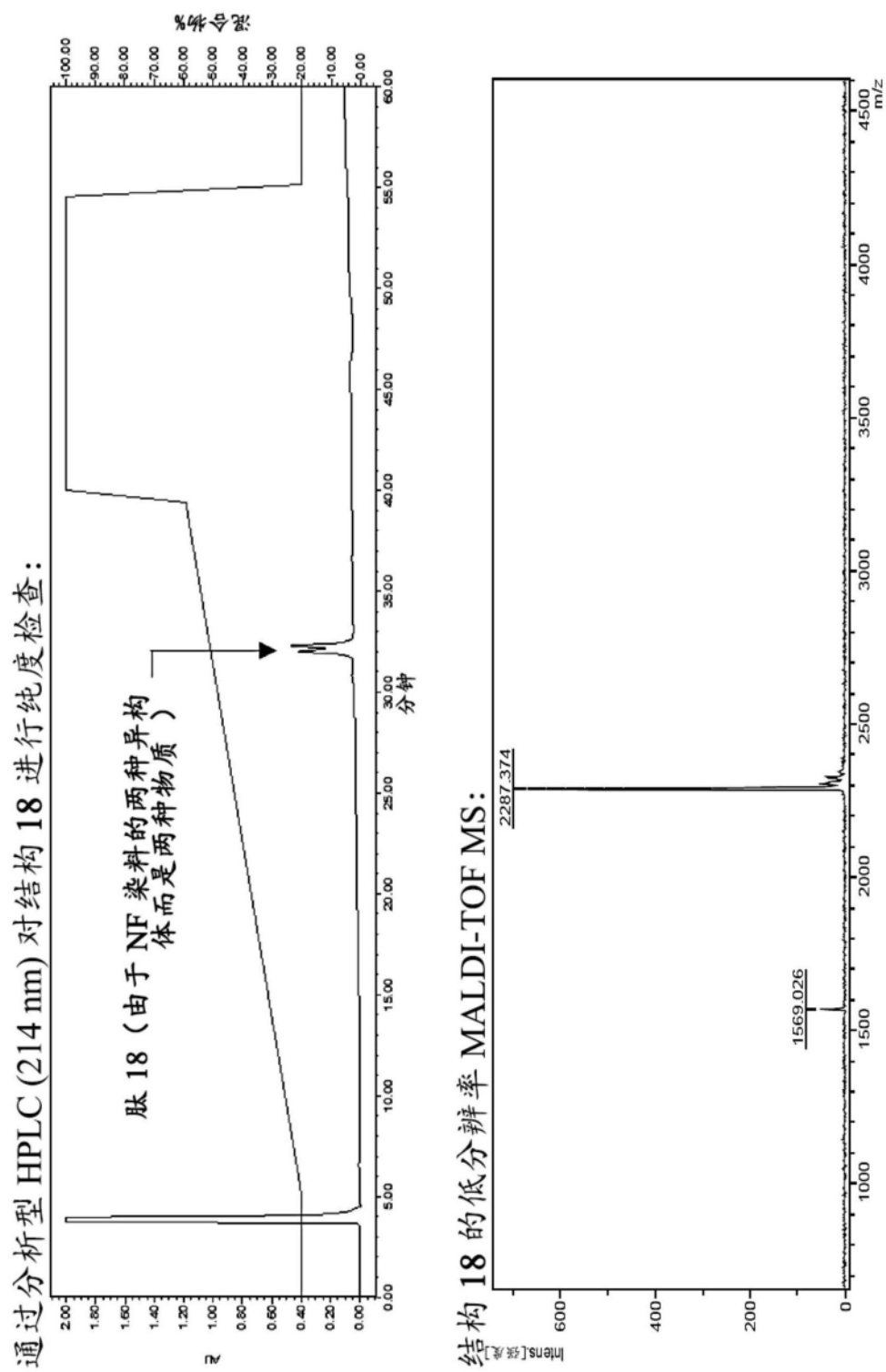


图17(续图)

结构 19

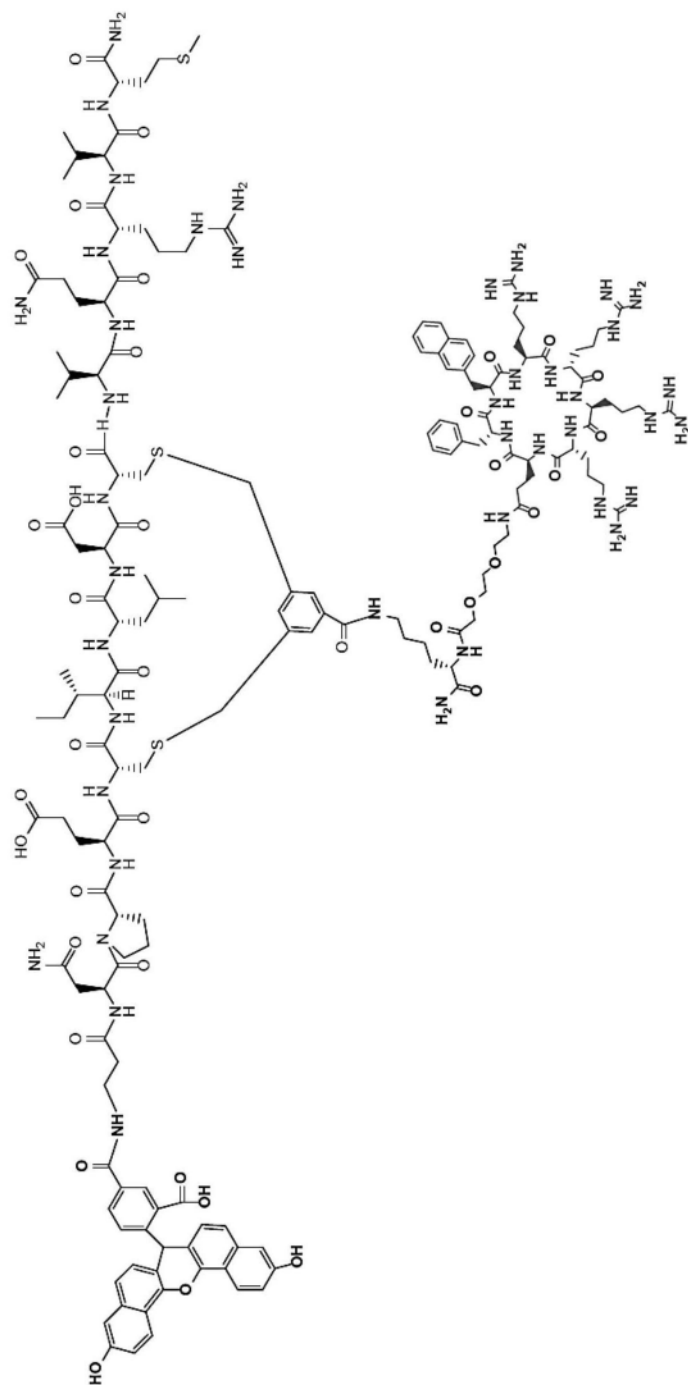
分子量:
3686.26

图18A

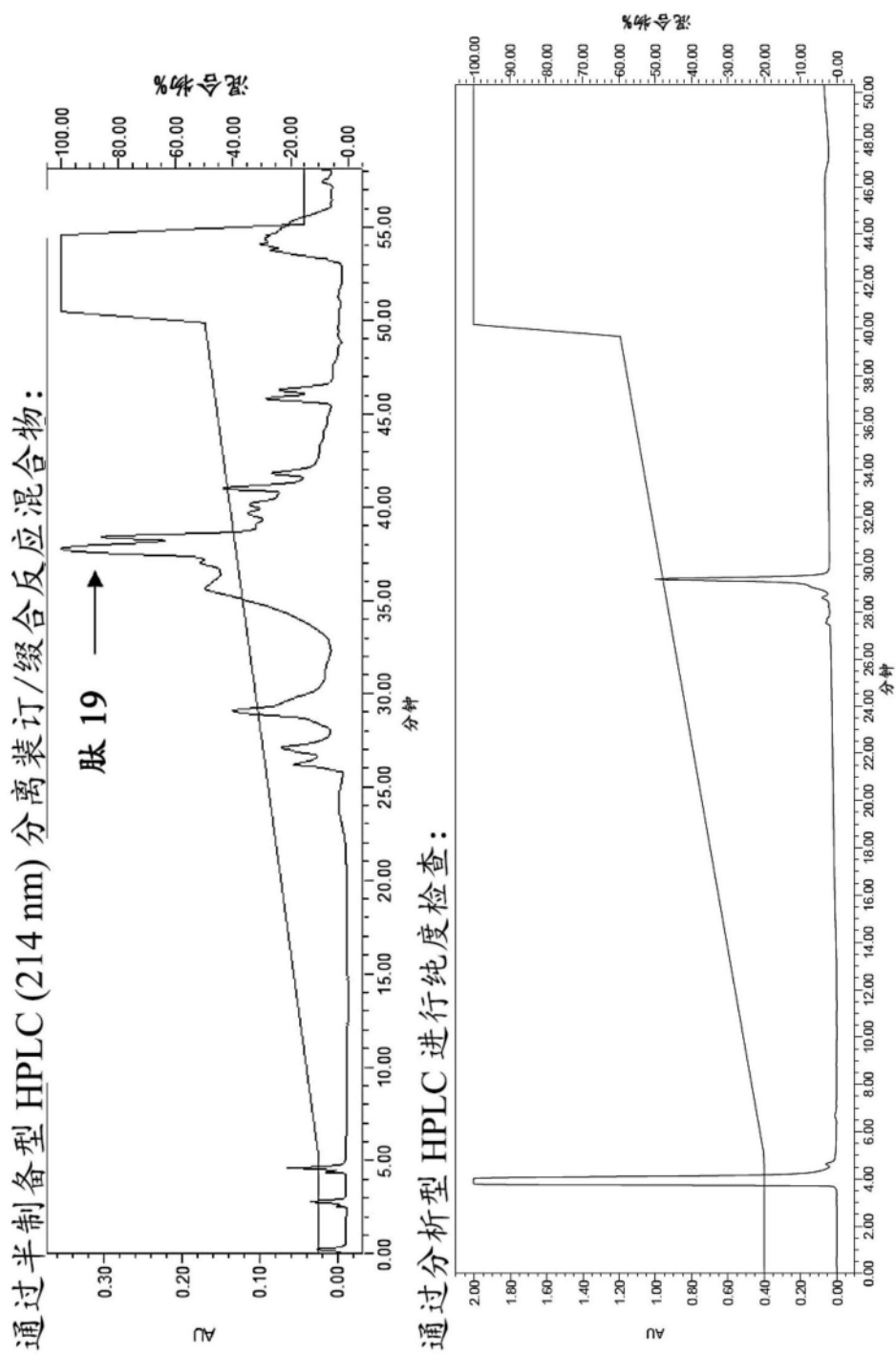


图18A (续图)

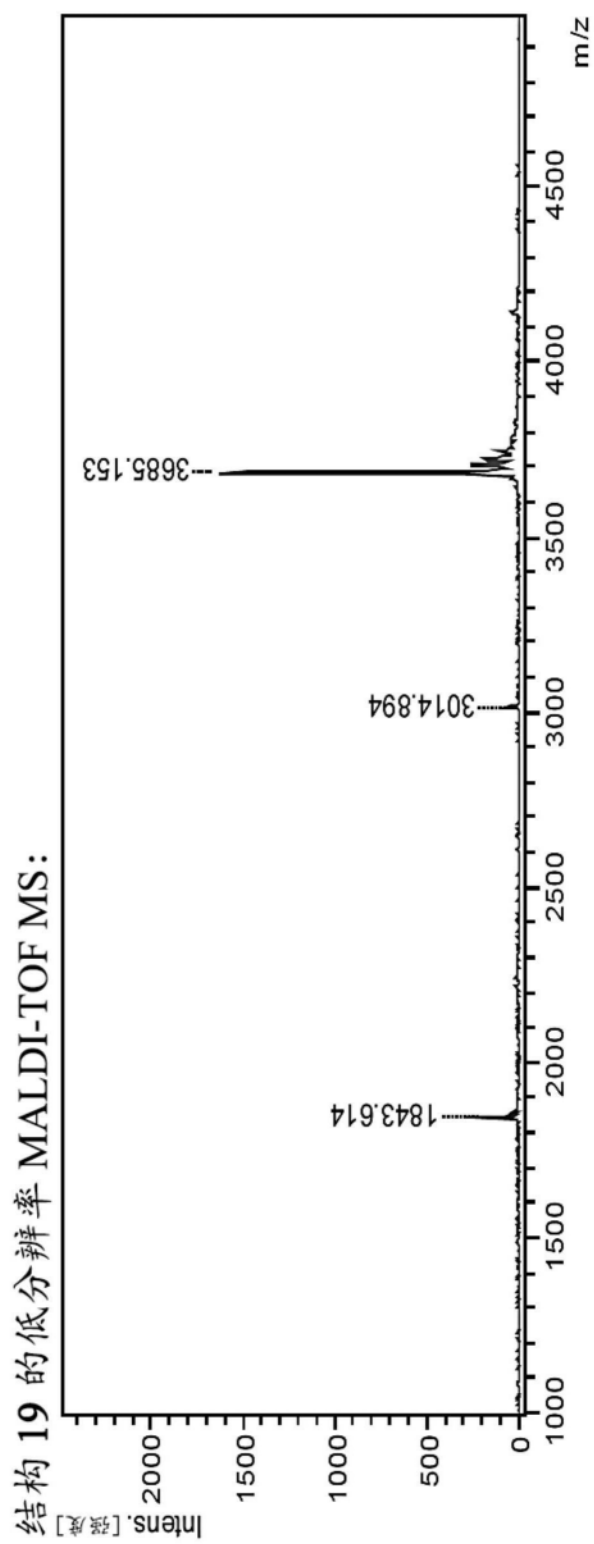
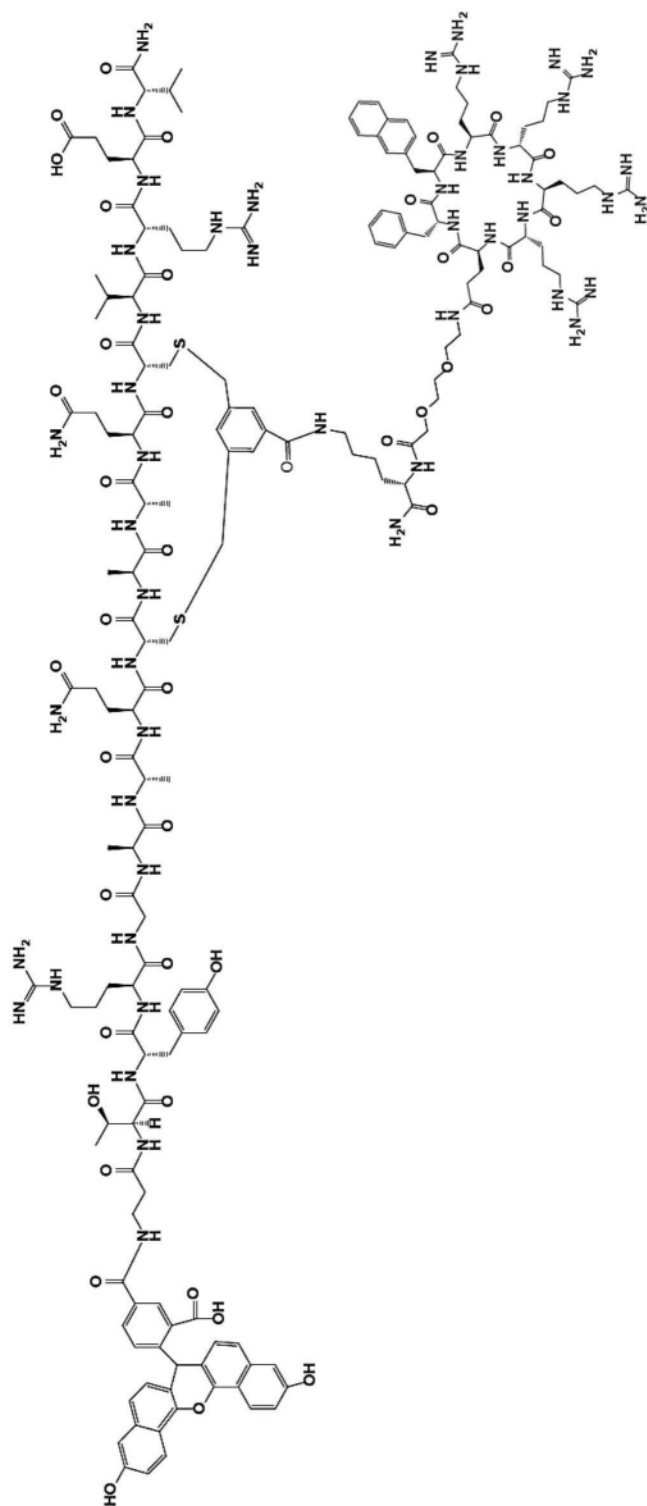


图18B

结构 21



分子量: 3755.26

图19

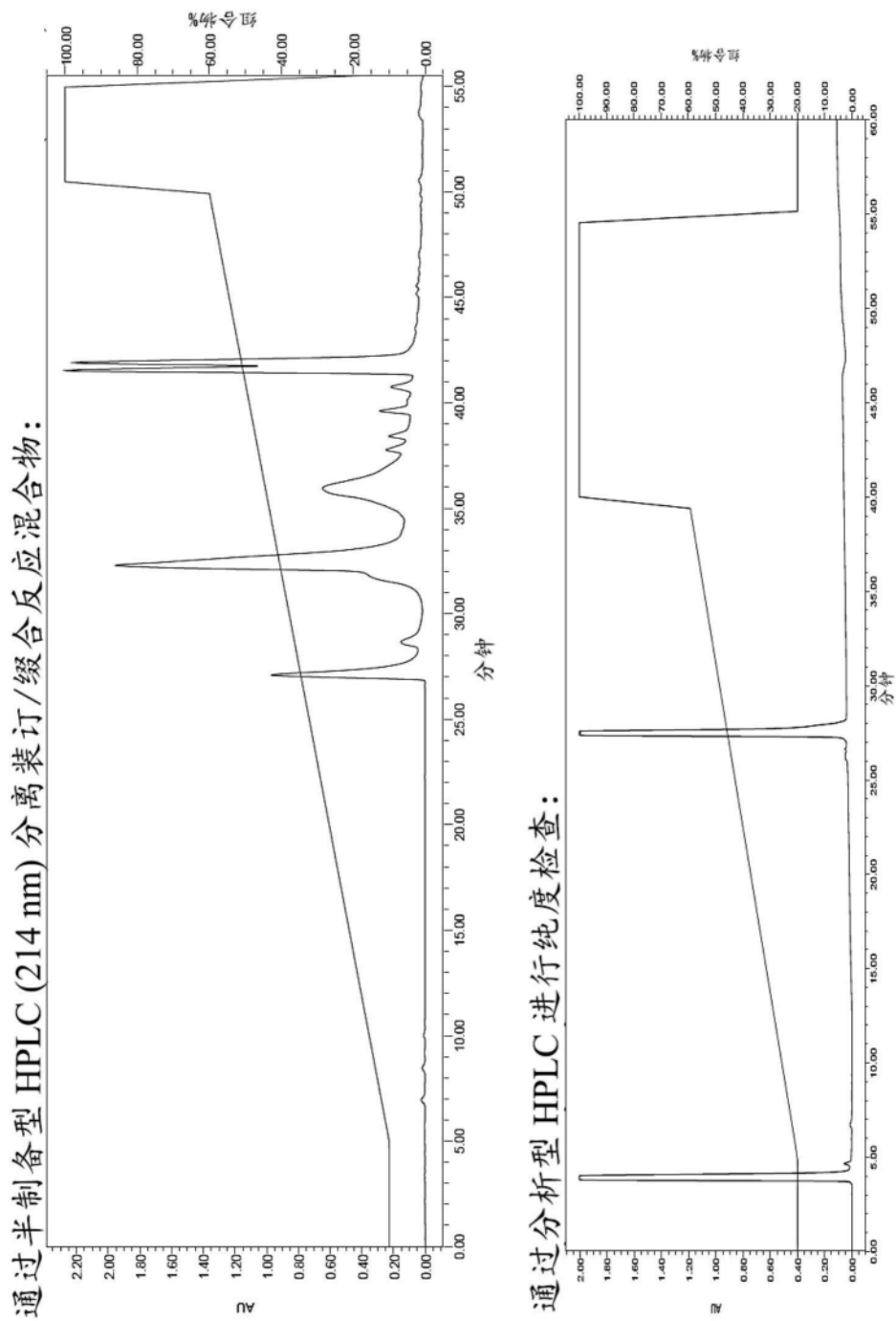


图19(续图)

结构 22 (sPDI)

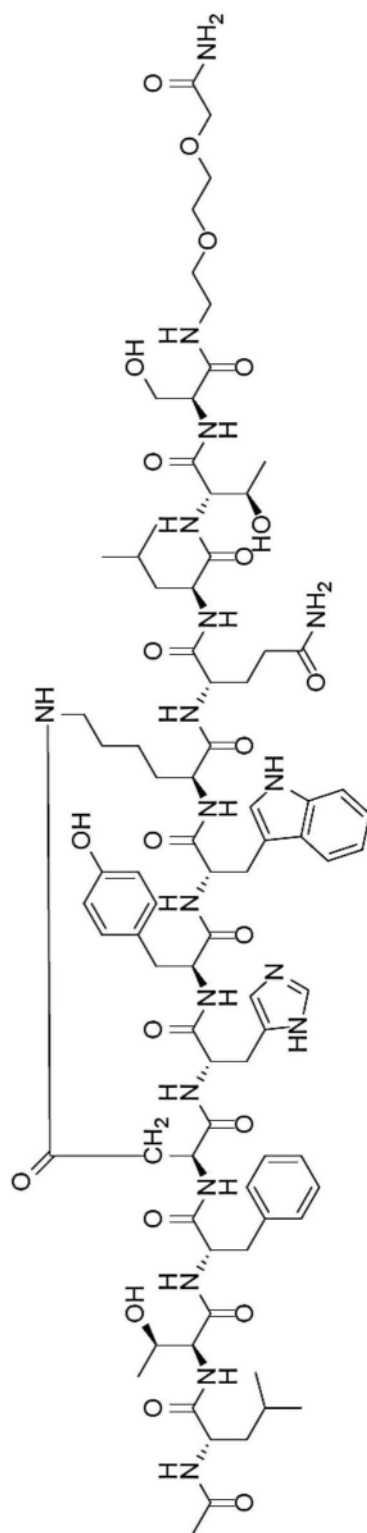


图20A

结构 24 (R9-sPDI)

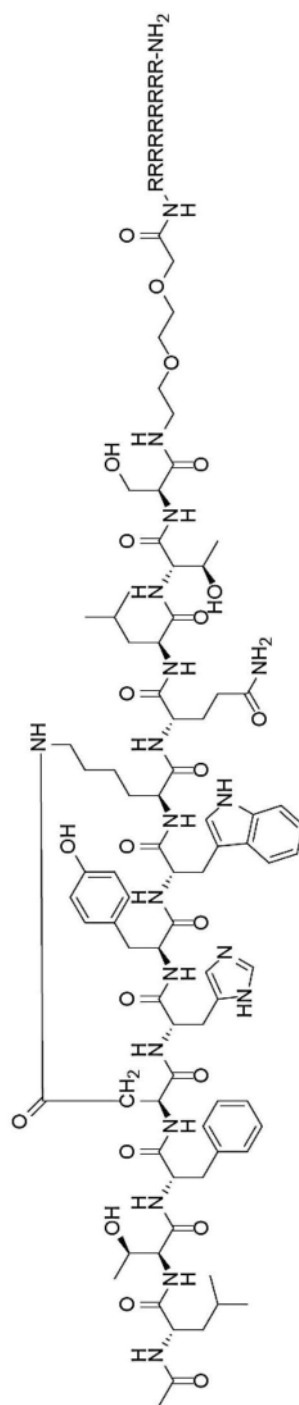


图20C

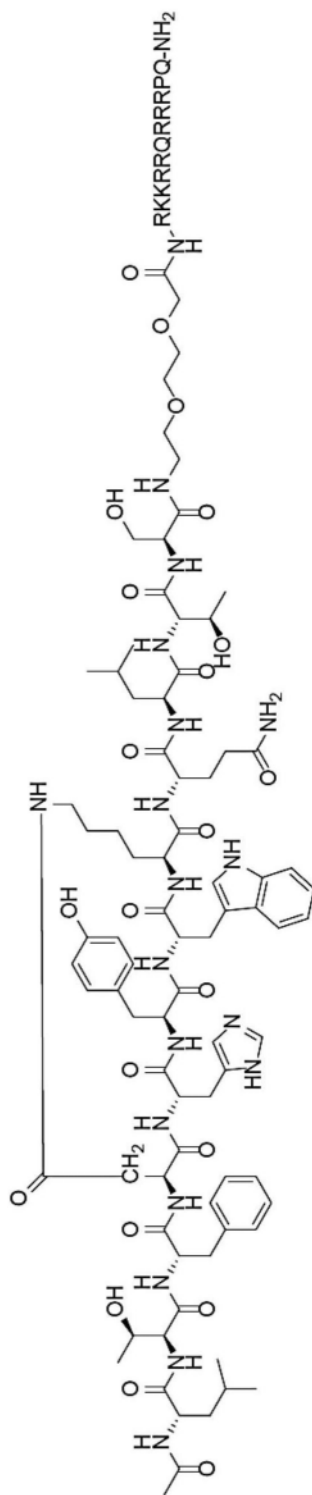


图20D

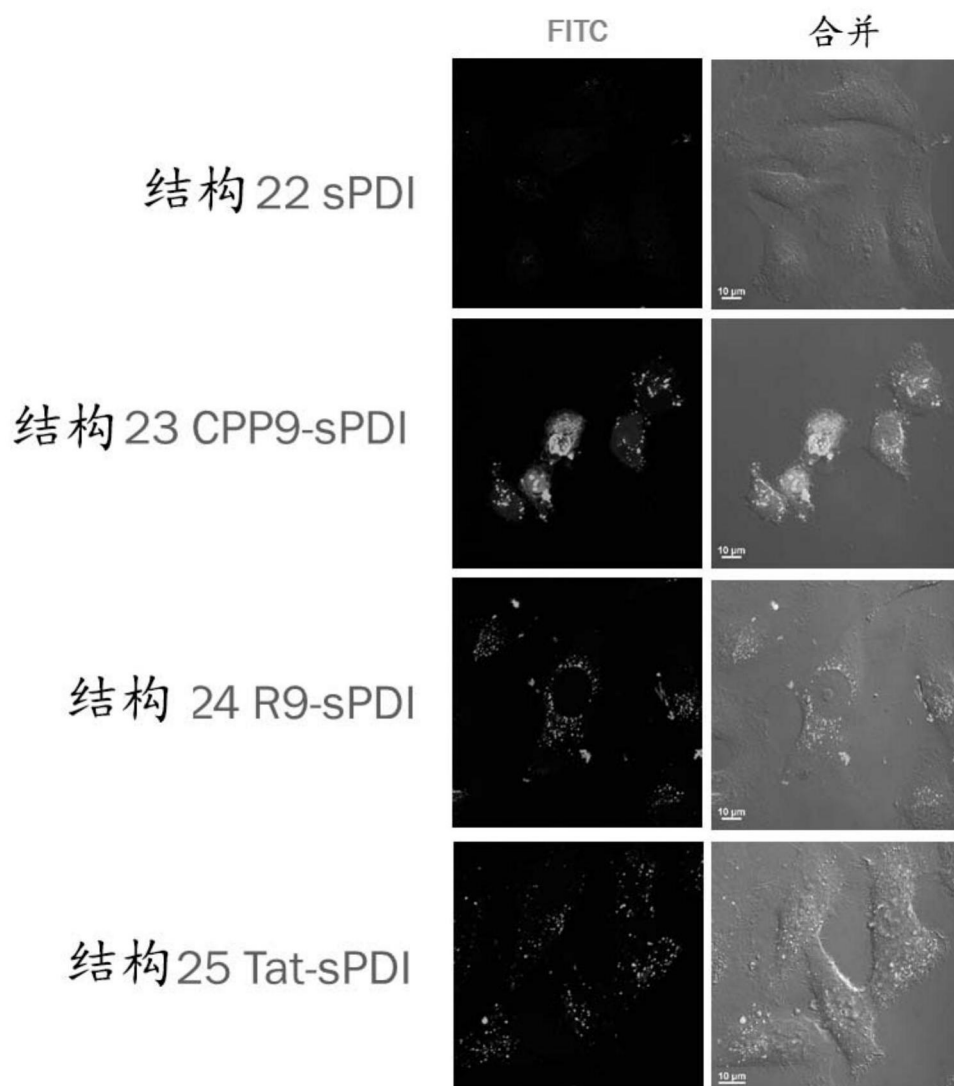


图21

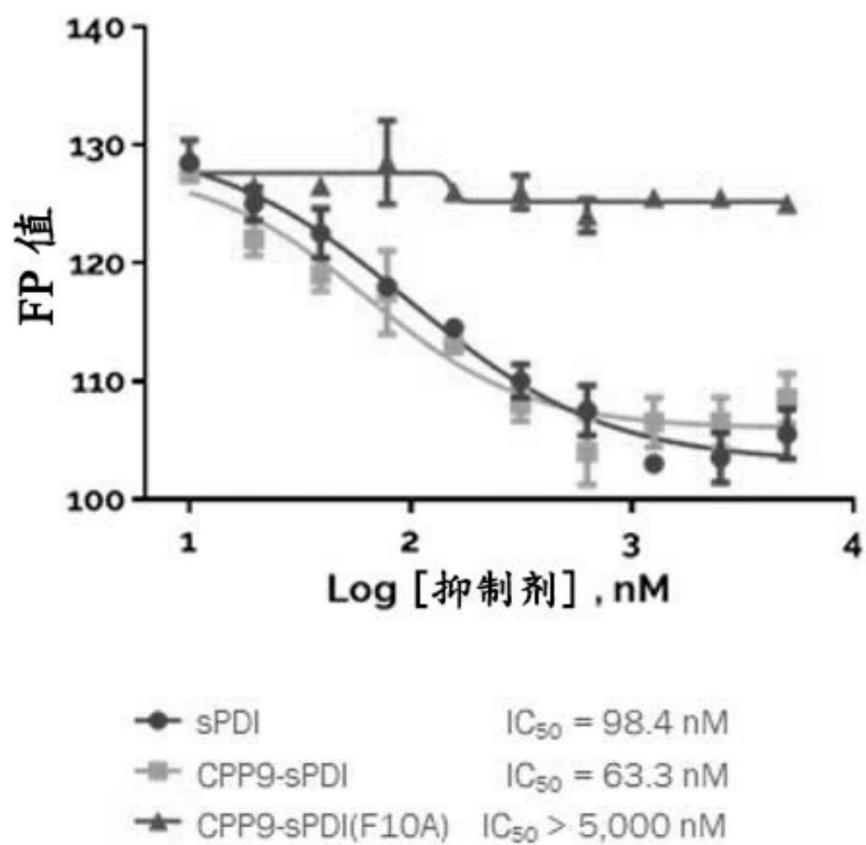


图22

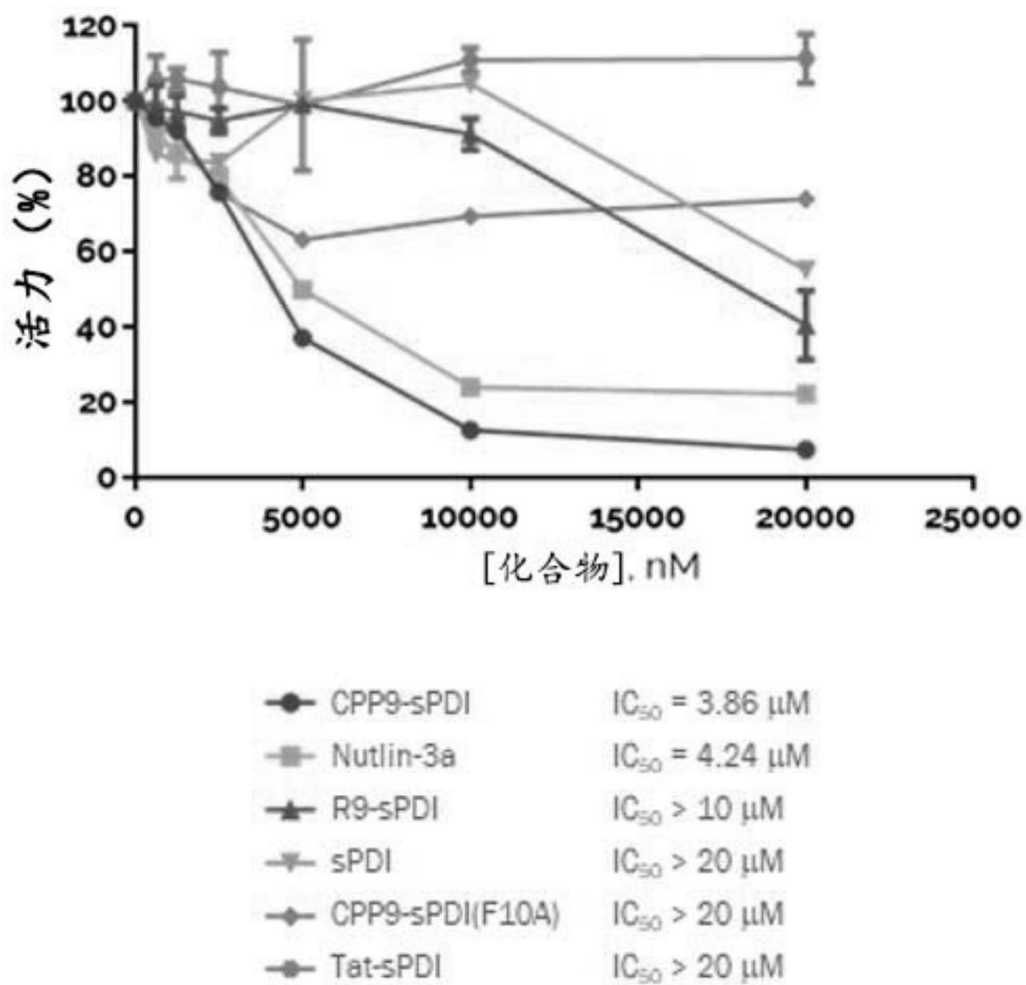


图23

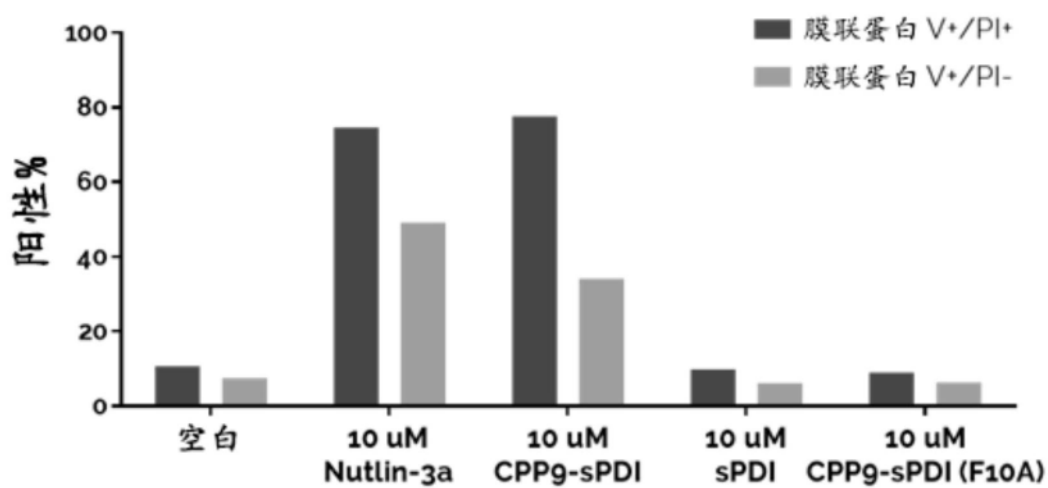


图24

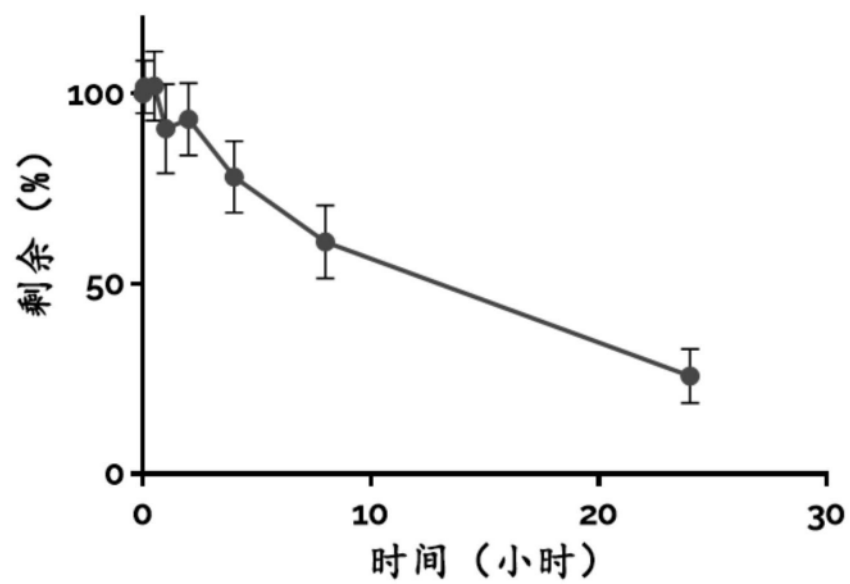


图25