

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
A61K 47/48 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200780042576.2

[43] 公开日 2009 年 10 月 14 日

[11] 公开号 CN 101557829A

[22] 申请日 2007.9.26

[21] 申请号 200780042576.2

[30] 优先权

[32] 2006.9.27 [33] EP [31] 06020286.8

[32] 2007.7.5 [33] EP [31] 07013218.8

[86] 国际申请 PCT/EP2007/008396 2007.9.26

[87] 国际公布 WO2008/037463 英 2008.4.3

[85] 进入国家阶段日期 2009.5.15

[71] 申请人 保罗·博蒂

地址 瑞士韦塞

[72] 发明人 保罗·博蒂

[74] 专利代理机构 北京康信知识产权代理有限公司

代理人 李丙林 张英

权利要求书 11 页 说明书 39 页 序列表 1 页
附图 9 页

[54] 发明名称

增强向生物系统递送的装置和方法

[57] 摘要

本发明涉及一种肽或多肽, (a) 其发生如下的酯化或硫酯化: (i) 在 C-末端的羧基处与胍基烷醇、胍基烷硫醇、被胍基取代且具有游离羟基的 PEG、或被胍基和巯基取代的 PEG; (ii) 在一个或多个 Asp 或 Glu 残基(如果存在)的侧链羧基与胍基烷醇、胍基烷硫醇、被胍基取代且具有游离羟基的 PEG、或被胍基和巯基取代的 PEG; (iii) 在一个或多个 Ser、Thr 或 Tyr 残基(如果存在)的羟基与胍基链烷酸或者被胍基和羧基取代的 PEG; (iv) 在一个或多个 Cys 残基(如果存在)的巯基与胍基链烷酸或被胍基和羧基取代的 PEG; 和/或(v) 在 N-末端与胍基链烷酸或被胍基和羧基取代的 PEG, 其中所述 N-末端在之前已用 α -或 β -羟基酸加以酰胺化, 并且其中所述酯是在所述 α -或 β -羟基酸的羟基和所述胍基链烷酸或所述被胍基和羧基取代的

PEG 的羧基之间形成的; 和/或(b) 其包含一个或多个二硫化物, 该二硫化物是在 Cys 残基(如果存在)的巯基和胍基烷硫醇或被胍基和巯基取代的 PEG 之间形成的。

1. 一种肽或多肽，

(a) 其发生如下酯化或硫酯化

(i) 在 C-末端的羧基处与胍基烷醇、胍基烷硫醇、被胍基取代且具有游离羟基的 PEG、或被胍基和巯基取代的 PEG;

(ii) 在如果存在的一个或多个 Asp 或 Glu 残基的侧链羧基处，与胍基烷醇、胍基烷硫醇、被胍基取代且具有游离羟基的 PEG、或被胍基和巯基取代的 PEG;

(iii) 在如果存在的一个或多个 Ser、Thr 或 Tyr 残基的羟基处，与胍基链烷酸或被胍基和羧基取代的 PEG;

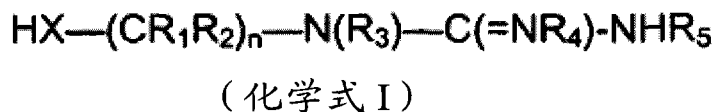
(iv) 在如果存在的一个或多个 Cys 残基的巯基处，与胍基链烷酸或被胍基和羧基取代的 PEG; 和/或

(v) 在 N-末端处与胍基链烷酸或被胍基和羧基取代的 PEG，其中所述 N-末端之前已用 α -或 β -羟基酸进行酰胺化，并且其中所述酯在所述 α -或 β -羟基酸的羟基和所述胍基链烷酸或所述被胍基和羧基取代的 PEG 的羧基之间形成;

和/或

(b) 其包含一个或多个二硫化物，所述二硫化物在如果存在的 Cys 残基的巯基与胍基烷硫醇或被胍基和巯基取代的 PEG 之间形成。

2. 根据权利要求1所述的肽或多肽,其中,所述胍基烷醇或胍基烷硫醇具有以下结构:



其中:

X 是 O 或 S;

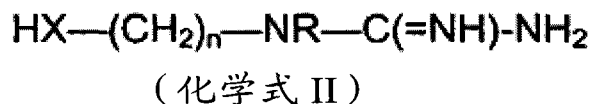
R_1 和 R_2 各自独立地选自 H、卤素、 NH_2 、具有 1 至 5 个碳原子的烷基、芳基、和杂芳基;

n 是 2 至 15 的整数;

R_3 是 H 或者具有 1 至 5 个碳原子的烷基; 以及

R_4 和 R_5 独立地选自 H、具有 1 至 5 个碳原子的烷基、芳基、杂芳基,其中带有 R_4 或 R_5 基团的 N 可以是所述杂芳基环的环原子; 和/或 R_4 和 R_5 可以一起选择以形成杂芳基环。

3. 根据权利要求1或2所述的肽或多肽,其中,所述胍基烷醇或胍基烷硫醇具有以下结构:



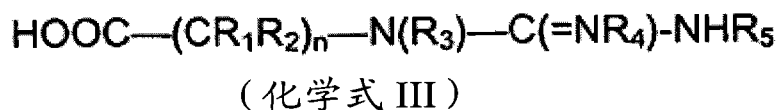
其中:

X 是 O 或 S;

n 是 2 至 10 的整数; 以及

R 是 H 或具有 1 至 5 个碳原子的烷基。

4. 根据权利要求 1 至 3 中任一项所述的肽或多肽, 其中, 所述胍基链烷酸具有以下结构:



其中:

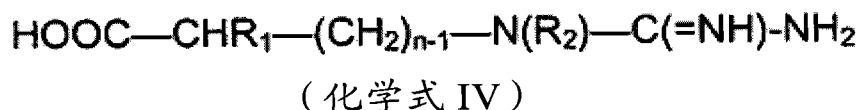
R_1 和 R_2 各自独立地选自 H、卤素、 NH_2 、具有 1 至 5 个碳原子的烷基、芳基、和杂芳基;

n 是 2 至 15 的整数;

R_3 是 H 或具有 1 至 5 个碳原子的烷基; 以及

R_4 和 R_5 独立地选自 H、具有 1 至 5 个碳原子的烷基、芳基、杂芳基, 其中带有 R_4 或 R_5 基团的 N 可以是所述杂芳基环的环原子; 和/或 R_4 和 R_5 可以一起选择以形成杂芳基环。

5. 根据权利要求 1 至 4 中任一项所述的肽或多肽, 其中, 所述胍基链烷酸具有以下结构:



其中:

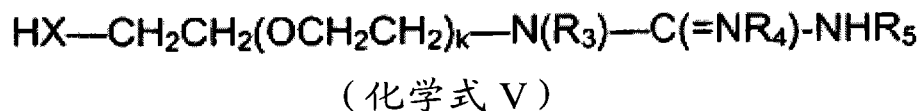
R_1 是 H 或 NH_2 ;

n 是 2 至 10 的整数; 以及

R_2 是 H 或具有 1 至 5 个碳原子的烷基。

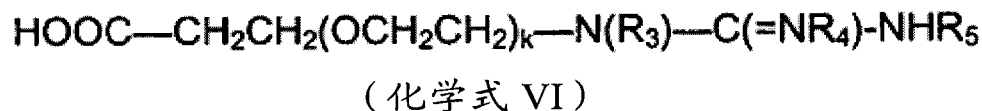
6. 根据权利要求 2 至 5 中任一项所述的肽或多肽, 其中, n 是 4 至 9, 优选为 4 至 6。

7. 根据权利要求 2 至 6 中任一项所述的肽或多肽, 其中, 所述被胍基取代且具有游离羟基的 PEG 或所述被胍基和巯基取代的 PEG 分别具有以下结构:



其中 k 是 1 至 12 的整数, 并且 X、R₃、R₄ 和 R₅ 是如在权利要求 2 中所限定的。

8. 根据权利要求 2 至 7 中任一项所述的肽或多肽, 其中, 所述被胍基和羧基取代的 PEG 具有以下结构:



其中 k 是 1 至 12 的整数, 并且 X、R₃、R₄ 和 R₅ 是如在权利要求 4 中所限定的。

9. 根据权利要求 2 至 8 中任一项所述的肽或多肽, 其中, k 为 1 至 3。
10. 根据权利要求 2 或 4 至 9 中任一项所述的肽或多肽, 其中, -C(=NR₄)-NHR₅ 是嘧啶-2-基、喹唑啉-2-基、咪唑-2-基或苯并咪唑-2-基。
11. 根据前述权利要求中任一项所述的肽或多肽, 其中:

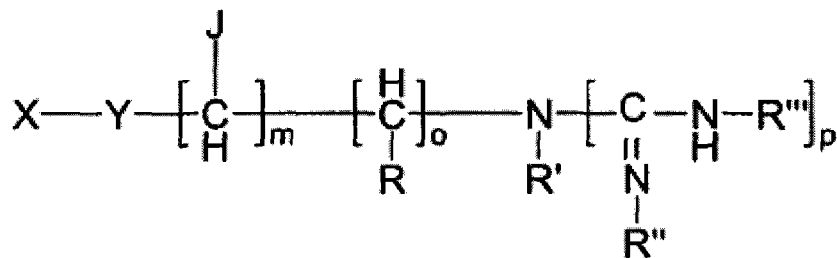
(a) 如果没有发生如在前述权利要求中所限定的酯化或硫酸酯化, 则所述 C-末端的羧基与脂肪醇发生酯化; 和/或

(b) 如果没有与 α-或 β-羟基酸发生酰胺化, 则所述 N-末端的氨基与脂肪酸发生酰胺化。

12. 根据权利要求 11 所述的肽或多肽, 其中, 所述脂肪醇和/或所述脂肪酸包含 5 至 15 个碳原子, 优选 9 个碳原子。
13. 根据前述权利要求中任一项所述的肽或多肽, 其中, 胍基数量为 4 至 20, 优选为 7 至 15, 并且最优选为 9, 所述胍基包括如果存在的任何 Arg 残基的胍基, 其中至少一个胍基包含在如权利要求 1 至 10 中任一项所限定的胍基烷醇、胍基烷硫醇、胍基链烷酸、被胍基取代且具有游离羟基的 PEG、被胍基和巯基取代的 PEG 或被胍基和羧基取代的 PEG 中。
14. 根据权利要求 1 至 13 中任一项所述的肽或多肽, 其中, 所述肽或多肽是肽-PNA 嵌合体的一部分。
15. 一种核酸:
 - (a) 其在以下位置中的一个或多个处与胍基链烷酸或被胍基和羧基取代的 PEG 发生酯化:
 - (i) 5'-末端 5'羟基;
 - (ii) 3'-末端 3'羟基;
 - (iii) 5'-或 3'-末端 2'羟基; 和
 - (iv) 内部 2'羟基;
 - (b) 其在一个、多个或所有磷酸处与胍基烷醇或被胍基取代且具有游离羟基的 PEG 发生酯化; 和/或
 - (c) 其具有与胍基烷醇或被胍基取代的 PEG 而转化成缩醛的 2'羟基。
16. 根据权利要求 15 所述的核酸, 其中, 如果没有与胍基烷醇发生酯化, 则一个或多个末端磷酸与脂肪醇发生酯化。

17. 根据权利要求 15 或 16 所述的核酸，其中，所述核酸是 DNA、RNA 或 siRNA。
18. 一种带有一个或多个胍基的脂质体或胶束，其中，所述一个或多个胍基通过在生理条件下可解离的官能团连接于所述脂质体或胶束。
19. 根据权利要求 18 所述的脂质体或胶束，其中，所述官能团是酯基团。
20. 根据权利要求 18 或 19 所述的脂质体或胶束，其中，所述脂质体或胶束发生如下酯化：
 - (a) 在一个或多个羟基处，与胍基链烷酸或被胍基和羧基取代的 PEG；和/或
 - (b) 在一个或多个酸基团如磷酸和羧基处，与胍基醇、胍基烷硫醇、被胍基取代且具有游离羟基的 PEG、或被胍基和巯基取代的 PEG。
21. 根据权利要求 18 至 20 中任一项所述的脂质体或胶束，其中，所述脂质体或胶束的伯氨基被转化成胍基。
22. 根据权利要求 20 或 21 所述的脂质体或胶束，其中，所述羟基是选自磷脂酰肌醇、磷脂酰甘油、单酰基甘油和二酰基甘油的脂质的羟基，其中所述脂质包含在所述脂质体或胶束中；或者所述羟基是包含在所述脂质体或胶束中的 PEG 部分的末端羟基。
23. 根据权利要求 21 或 22 所述的脂质体或胶束，其中，所述伯氨基是磷脂酰乙醇胺的伯氨基，或者是 PEG 部分的伯氨基，其中所述 PEG 部分的末端羟基部分被伯氨基取代。

24. 根据权利要求14至17任一项所述的核酸或权利要求18至23中任一项所述的脂质体或胶束,其中,所述胍基烷醇或胍基烷硫醇是如在权利要求2、3、6或10中任一项所限定的胍基烷醇或胍基烷硫醇。
25. 根据权利要求14至17中任一项所述的核酸或权利要求16至22中任一项所述的脂质体或胶束,其中,所述胍基链烷酸是如在权利要求4至7中任一项所限定的胍基链烷酸。
26. 根据权利要求14至17中任一项所述的核酸或权利要求18至23中任一项所述的脂质体或胶束,其中,所述被胍基取代且具有游离羟基的PEG或所述被胍基和巯基取代的PEG是如在权利要求7或9中所限定的。
27. 根据权利要求14至17中任一项所述的核酸或权利要求18至23中任一项所述的脂质体或胶束,其中,所述被胍基和羧基取代的PEG是如在权利要求8或9中所限定的。
28. 一种药物组合物,包含根据权利要求1至13或18中任一项所述的肽或多肽、和/或权利要求14至17或24至27中任一项所述的核酸、和/或权利要求18至27中任一项所述的脂质体或胶束。
29. 一种增强聚合物、脂质体或胶束越过生物屏障的能力的方法,所述聚合物、脂质体或胶束具有一个或多个羧基、羟基、巯基、和/或磷酸基,所述方法包括修饰所述基团中的至少一个以获得



化学式 VII

其中对于每一次出现的化学式 VII 独立地

- (a) X 是 $-(\text{C}=\text{O})$; Y 是 O 或 S;
- (b) X 是 $-\text{O}$ 或 $-\text{S}$; Y 是 $(\text{C}=\text{O})$ 或 $(\text{CHR}_a)-\text{O}$;
- (c) X-Y 是 $-\text{S}-\text{S}$; 或
- (d) X 是 $-\text{O}-\text{P}(=\text{O})\text{OR}_p$; Y 是 O 或 S;

以及

每一次出现的 J 独立地选自 H、卤素、 NH_2 、具有 1 至 15 个碳原子的烷基、和 $[\text{CHR}]_o-\text{NR}'-\text{CH}(\text{NHR}'')-\text{NH}-\text{R}'''$;

R、R'、R''、R'''、 R_a 和 R_p 各自独立地选自 H、具有 1 至 15 个碳原子的烷基、和取代或未取代的芳基; 其中 R 和 R'、R' 和 R''、和/或 R'' 和 R''' 可以一起选择以形成环状结构;

烷基可以是取代的;

m 是 0 至 10 的整数; 其中如果 J 是 $[\text{CHR}]_o-\text{NR}'-\text{CH}(\text{NHR}'')-\text{NH}-\text{R}'''$, 则 m 是 1;

o 是 1 至 15 的整数; 以及

p 是 0 或 1; 其中如果

p 是 0, 则带有 R' 的 N 的自由价用 H 填充。

30. 根据权利要求 29 所述的方法, 其中, 所述聚合物是肽、多肽或核酸。

31. 一种增强肽或多肽越过生物屏障的能力的方法，包括以下步骤：

(a) 形成一个或多个酯或硫酯：

(i) 在 C-末端的羧基处，与胍基烷醇、胍基烷硫醇、被胍基取代且具有游离羟基的 PEG、或被胍基和巯基取代的 PEG；

(ii) 在如果存在的一个或多个 Asp 或 Glu 残基的侧链羧基处，与胍基烷醇、胍基烷硫醇、被胍基取代且具有游离羟基的 PEG、或被胍基和巯基取代的 PEG；

(iii) 在如果存在的一个或多个 Ser、Thr 或 Tyr 残基的羟基处，与胍基链烷酸；

(iv) 在如果存在的一个或多个 Cys 残基的巯基处，与胍基链烷酸或被胍基和羧基取代的 PEG；和/或

(v) 在 N-末端处与胍基链烷酸或被胍基和羧基取代的 PEG，其中所述 N-末端之前已用 α -或 β -羟基酸进行酰胺化，并且其中所述酯在所述 α -或 β -羟基酸的羟基和所述胍基链烷酸或所述被胍基和羧基取代的 PEG 的羧基之间形成；

和/或

(b) 形成一个或多个二硫化物，所述二硫化物在如果存在的 Cys 残基的巯基与胍基烷硫醇或被胍基和巯基取代的 PEG 之间形成。

32. 根据权利要求 29 至 31 中任一项所述的方法，其中，所述生物屏障选自细胞膜、粘膜和血脑屏障。

33. 根据权利要求 31 或 32 所述的方法，进一步包括以下步骤：

(a) 如果所述 C-末端没有发生如权利要求 31 所限定的酯化, 则在所述 C-末端的羧基处与脂肪醇形成酯或硫酯; 和/或

(b) 所述 N-末端的氨基与脂肪酸发生酰胺化。

34. 根据权利要求 33 所述的方法, 其中, 所述脂肪醇和/或所述脂肪酸包含 5 至 15 个碳原子, 优选 9 个碳原子。

35. 根据权利要求 29 至 34 中任一项所述的方法, 其中, 在形成酯、硫酯、乙酸酯、二硫化物和/或磷酸酯之后胍基的数量, 其中所述胍基的数量包括如果存在的任何 Arg 残基的胍基数, 为 5 至 20, 更优选为 7 至 15, 并且最优选为 9。

36. 一种增强核酸越过生物屏障的能力的方法, 包括以下步骤:

(a) 在以下位置中的一个或多个处与胍基链烷酸或被胍基和羧基取代的 PEG 形成酯:

(i) 5'-末端 5'羟基;

(ii) 3'-末端 3'羟基;

(iii) 5'-或 3'-末端 2'羟基; 和

(iv) 内部 2'羟基;

(b) 在一个、多个磷酸处与胍基烷醇或被胍基取代且具有游离羟基的 PEG 形成酯; 和/或

(c) 在 2'羟基和胍基烷醇或被胍基取代的 PEG 之间形成缩醛。

37. 根据权利要求 36 所述的方法, 进一步包括使一个或多个末端磷酸与脂肪醇发生酯化。

38. 一种增强脂质体或胶束越过生物屏障的能力的方法,包括以下步骤:
- (a) 在所述脂质体或胶束的一个或多个羟基处,与胍基链烷酸或被胍基和羧基取代的 PEG 形成酯; 和/或
 - (b) 在一个或多个酸基团如磷酸或羧基处,与胍基醇、胍基烷硫醇、被胍基取代且具有游离羟基的 PEG、或被胍基和巯基取代的 PEG 形成酯; 和/或
 - (c) 将所述脂质体或胶束的伯氨基转化成胍基。
39. 根据权利要求 31 至 38 中任一项所述的方法,其中,所述胍基烷醇或胍基烷硫醇是如在权利要求 2、3、6 或 7 中任一项所限定的胍基烷醇或胍基烷硫醇。
40. 根据权利要求 31 至 39 中任一项所述的方法,其中,所述胍基链烷酸是如在权利要求 4 至 7 中任一项所限定的胍基链烷酸。
41. 根据权利要求 31 至 40 中任一项所述的方法,其中,所述被胍基取代且具有游离羟基的 PEG 或所述被胍基和巯基取代的 PEG 是如在权利要求 7 或 9 中所限定的。
42. 根据权利要求 31 至 41 中任一项所述的方法,其中,所述被胍基和羧基取代的 PEG 是如在权利要求 8 或 9 中所限定的。

增强向生物系统递送的装置和方法

技术领域

本发明涉及一种肽或多肽, (a) 其发生如下酯化或硫酯化: (i) 在 C-末端的羧基 (carboxylate) 与胍基烷醇 (guanidinium alkanol)、胍基烷硫醇 (guanidinium alkanethiol)、被胍基 (guanidinium group) 取代且具有游离羟基的 PEG、或被胍基和巯基取代的 PEG (发生酯化或硫酯化); (ii) 在一个或多个 Asp 或 Glu 残基 (如果存在) 的侧链羧基与胍基烷醇、胍基烷硫醇、被胍基取代且具有游离羟基的 PEG、或被胍基和巯基取代的 PEG (发生酯化或硫酯化); (iii) 在一个或多个 Ser、Thr 或 Tyr 残基 (如果存在) 的羟基与胍基链烷酸 (guanidinium alkanoic acid) 或者被胍基和羧基取代的 PEG (发生酯化或硫酯化); (iv) 在一个或多个 Cys 残基 (如果存在) 的巯基与胍基链烷酸或被胍基和羧基取代的 PEG (发生酯化或硫酯化); 和/或 (v) 在 N-末端与胍基链烷酸或被胍基和羧基取代的 PEG (发生酯化或硫酯化), 其中所述 N-末端在之前已用 α -或 β -羟基酸加以酰胺化, 并且其中所述酯是在所述 α -或 β -羟基酸的羟基和所述胍基链烷酸或所述被胍基和羧基取代的 PEG 的羧基之间形成的; 和/或 (b) 其包含一个或多个二硫化物 (基团), 该二硫化物是在 Cys 残基 (如果存在) 的巯基和胍基烷硫醇或被胍基和巯基取代的 PEG 之间形成的。

背景技术

在说明书中，引述了大量包括专利申请和生产商手册的文献。尽管不认为与本发明的可专利性相关，但是这些文献的披露内容通过引用以其整体结合于此。

渐增的大量药理学活性试剂是肽或蛋白质性质或包含核酸。在许多情况下，这样的药物的给药仅能够以侵入性方式实现。然而，侵入性给药经常仅能够通过医务人员实施或者至少对于患者是麻烦的。此外，静脉内给药经常必需显著降解肝中的药物。然而，不幸地，非侵入性给药由于大部分上述药物带有静电荷而对于这些药物是不可获得的。静电荷，尤其是负电荷的存在通常使得细胞膜对于这样的药理学活性试剂是难以逾越的屏障。

存在一组肽，也称为膜穿透性肽，包括 Antennapedia 肽（参见例如，Zorco and Langel, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57, 529-545 (2005)）。这些膜穿透性肽能够有效地越过细胞的质膜，或者单独地或连接于蛋白质“负荷（cargo）”。膜穿透性肽通常是两性分子并且在生理 pH 下带有大量正电荷。事实上，最有效的细胞穿透性肽中的一种简单地是聚精氨酸。细胞输入（cell import）的机制可能是荷电状态（charge state）的结果，因为迄今还没有报道过在 D-肽和 L-肽之间的差异。

Poduslo 等（*Biochemistry* 43, 6064-6075 (2004)）描述了具有高血脑屏障通透性的磁共振对比剂的设计和化学合成。这种对比剂是一种衍生的蛋粉样蛋白- β 肽。衍生包括用天冬酰基（asparagyl）/谷酰基-4-氨基丁烷残基替代 Asp 和 Glu 残基。换句话说，天冬氨酸和谷氨酸的羧化物与 1,4-二氨基-丁烷形成酰胺键。认为这些修饰产生了能够越过血脑屏障的衍生肽。

Vigneron 等 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 9682-9686 (1996)) 描述了胍-胆固醇阳离子脂质作为胶束 (micelle, 胶粒) 和脂质体的成分, 其中待被转染的多核苷酸存在于该胶束或脂质体的内腔中。报道了胍基似乎特别很好适合于与多核苷酸的磷酸残基相互作用, 通过其能够建立一对氢键。作为结果, 促进或使得能够自发形成 DNA/脂质聚集体。

Prokai 等 (Med. Res. Rev. 20, 367-416 (2000)) 描述了基于亲脂性二氢吡啶氧化还原成离子的、脂不溶性吡啶盐的化学递送系统。由于血液和脑各自的氧化还原电位使得氧化在脑中而不是在血液 中发生, 所以接着该氧化形式在中枢神经系统中被捕获。因而, 观察到可操作地连接于这种化学递送系统的药物越过血脑屏障的有效易位。

然而, 现有技术未能提供简单的、可逆的且非免疫原性的增强蛋白质、核酸、脂质体或胶束 (微团, micelle) 越过人体或动物体中的膜性质屏障的能力的装置。

发明内容

鉴于这些局限, 因此, 本发明的技术问题是提供改进的或可替换的装置和方法, 用于改变药学活性试剂的药理学性能。

因此, 本发明涉及一种肽或多肽, (a) 其发生如下酯化或硫酯化: (i) 在 C-末端的羧基与胍基烷醇、胍基烷硫醇、被胍基取代且具有游离羟基的 PEG、或被胍基和巯基取代的 PEG; (ii) 在一个或多个 Asp 或 Glu 残基 (如果存在) 的侧链羧基与胍基烷醇、胍基烷硫醇、被胍基取代且具有游离羟基的 PEG、或被胍基和巯基取代的 PEG; (iii) 在一个或多个 Ser、Thr 或 Tyr 残基 (如果存在) 的羟基与胍基链烷酸或者被胍基和羧基取代的 PEG; (iv) 在一个或多个

Cys 残基（如果存在）的巯基与胍基链烷酸或被胍基和羧基取代的 PEG；和/或(v)在 N-末端与胍基链烷酸或被胍基和羧基取代的 PEG，其中所述 N-末端在之前已用 α -或 β -羧基酸加以酰胺化，并且其中所述酯是在所述 α -或 β -羧基酸的羟基和所述胍基链烷酸或所述被胍基和羧基取代的 PEG 的羧基之间形成的；和/或(b)其包含一个或多个二硫化物（基团），该二硫化物是在 Cys 残基（如果存在）的巯基和胍基烷硫醇或被胍基和巯基取代的 PEG 之间形成的。

如本文使用的，术语“肽”是指由至多 30 个氨基酸构成的氨基酸的缩聚物。如本文使用的，术语“多肽”是指多于 30 个氨基酸的缩聚物。应当理解，术语“多肽”包括蛋白质。优选的多肽是蛋白质。此外，术语“肽”和“多肽”都包括蛋白质片段和合成分子。此外，抗体及其片段和衍生物根据它们的大小由这些术语之一包含。优选地，根据本发明的肽或多肽不同于天然肽或多肽，或者不同于待改进的药理学性能仅在于其根据(a)被酯化和/或硫酯化和/或其根据(b)包含一个或多个二硫化物基团的肽或多肽。

术语“(被)酯化”和“(被)硫酯化”是指存在一个或多个酯官能团-C(=O)O-或硫酯官能团-C(=S)O-，其中该酯或硫酯的酸、醇或硫醇成分由在酯化或硫酯化之前的形式的肽或多肽提供。这同样适用于根据(b)的二硫化物，因为二硫化物的硫原子之一由所述肽或多肽的 Cys 残基的巯基提供。换句话说，术语“(被)酯化”、“(被)硫酯化”和“形成二硫化物”提供根据本发明的肽或多肽的结构表征，依据其构成部分，即在一侧上为未发生根据(a)的酯化或硫酯化并且不包含根据(b)的一个或多个硫化物的肽或多肽，优选天然肽或多肽，而在另一侧上为所述胍基烷醇、胍基烷硫醇或胍基链烷酸。

本发明的肽和多肽依据构成部分进行限定，即在一侧上的肽或多肽为其药理学性能待改进的天然肽或多肽，以及在另一侧上为本

文限定的含胍基化合物（胍基烷醇、胍基烷硫醇、胍基链烷酸等）。这些构成部分在本发明的肽和多肽中通过酯键、硫酯键和/或二硫键彼此共价连接。示例性肽/多肽示于本文的实施例和所附附图中。

根据本发明的胍基烷醇是带有胍基-NH-C(=NH)-NH₂ 和羟基的烷烃。在一个优选实施方式中，不存在其他官能团。还优选的是 ω-胍基烷-1-醇。这加以必要的更改同样适用于根据本发明的胍基烷硫醇和胍基链烷酸。因此，胍基链烷酸是带有羧基和胍基的烷烃。优选为 ω-胍基烷-1-酸。

如上所述，PEG 链-CH₂CH₂(OCH₂CH₂)_k-可以代替上述烷烃，其中出现所述胍基烷醇、胍基烷硫醇和/或胍基链烷酸中的一个或多个，由此得到所述被胍基取代且具有游离羟基的 PEG、所述被胍基和巯基取代的 PEG 或者所述被胍基和羧基取代的 PEG。用 PEG 代替烷烃部分是减少用本发明的肽或多肽进行处理的副作用（如果有的话）的一种方式。

实施方式(v)开启了一种用于在不可利用可选方式(i)至(iv)中的任一种或者这些可选方式已经用尽的情况下引入胍基或其他胍基的途径。优选的 α-羟基酸是乙醇酸（2-羟基乙酸）和乳酸（2-羟基丙酸）。优选的 β-羟基酸是 3-羟基丙酸。

示例性实施方式在图 1 和 2 中示出。

在肽或多肽中引入一个或多个胍基显著地增强了所述肽或多肽越过（穿越）生物膜的能力（参见本文披露的实施例）。实施方式(i)和(ii)是特别有利的，因为伴随胍基的引入，羧基（或羧酸）的负电荷（同样是对膜跨越的显著障碍）消失。换句话说，单个措施导致了肽或多肽经由两种不同机制越过生物屏障如细胞膜的能力增强。

在根据本发明的肽或多肽中存在的酯、硫酯和二硫化物(基团)的共同点是它们在生理条件下的可逆性。在越过生物屏障如膜后,所述二硫化物与它们的还原形式处于平衡,而所述酯或硫酯易于水解或解离(切割, cleavable)。净效应是肽或多肽仅暂时被酯化或硫酯化和/或仅暂时包含一个或多个二硫化物。以酯化/硫酯化/二硫化物形式,肽或多肽表现出增强的越过生物屏障的递送,而在越过所述屏障之后,该肽或多肽的形式被恢复,其不含有或基本上不含有根据本发明的酯、硫酯或二硫化物,并且需要同样构成的肽或多肽活性试剂的递送。术语递送是指一种试剂到有机体、组织或细胞中的一个部位的运输。因而,肽或多肽的衍生形式,即根据本发明的肽或多肽具有足够短的半衰期(half-life)以防止免疫系统的有害反应。

在越过生物屏障之后,酯或硫酯基的解离和二硫化物的还原的进一步结果是所述平衡向易位形式移动。因而,肽或多肽在酯或硫酯的解离或者二硫化物的还原之后被有效捕获在所述生物屏障中。

与此一致的是,该易位的肽表现出如本文所披露的实施例中所描述的完全生物活性。对于这种原理的说明,参见图3。

酯化和硫酯化是特别有利的,因为已知酯酶在肿瘤中、在大脑中以及在细胞内部是特别具有活性的。随着肽或多肽活性试剂越过血脑屏障的递送,同样,也特别考虑了利用根据本发明的肽或多肽对肿瘤和癌症的治疗。

如果所有可选项(a)(i)至(v)以及(b)都是可利用的,则优选利用可选项(i)和(ii),因为由此不仅引入了期望的胍基,而且阻止越过生物屏障的羧基的负电荷也被去除。

对于在根据本发明的胍基烷醇、胍基烷硫醇或胍基链烷酸中的烷基链的长度，优选为较长的烷基链如具有四个或更多个碳原子的烷基链。

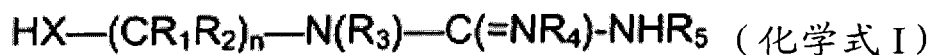
对于在根据本发明的肽或多肽中的胍基的空间分布，其中术语“胍基”包括包含在精氨酸残基中的胍基，优选所述胍基在可能程度上横跨（cross）所述肽或多肽的序列而均匀分布。换句话说，如果可能，优选避免胍基在肽或多肽的一个区域中成簇，而在根据本发明的所述肽或多肽的剩余部分没有或基本上没有胍残基。尽管没有消除根据本发明的肽或多肽越过生物屏障的吸收，但是相比于更均匀的分布，成簇可能在一定程度上减少吸收（参见 Rothbard et al., J. Med. Chem. 45, 3612-3618 (2002)）。均匀分布，即避免成簇可通过以下方式中的任一种实现。在肽的情况下，尤其是在具有 20 个或更少残基的肽的情况下，根据本发明的肽可以通过由氨基酸结构单元的合成而获得，其中被酯化的氨基酸在期望的位置使用。也就是，例如，代替 Asp 或 Glu，人们使用了在如上所限定的侧链羧基处被酯化的 Asp 或 Glu。在较长肽和多肽的情况下，这种合成方法是较少优选的。通过控制一侧上天然肽或多肽的摩尔比或者其药理学性能需要改进的肽或多肽的摩尔比，以及在另一侧上的上述含胍基的化合物（胍基烷醇、胍基烷硫醇、胍基链烷酸、被胍基取代且具有游离羟基的 PEG、用胍基和巯基取代的 PEG 以及被胍基和羧基取代的 PEG）的摩尔比，然后可以获得均匀分布。

通过避免使用现有技术的细胞穿透肽作为增强肽或多肽活性试剂的药理学性能如递送的手段，使得这样的肽或多肽活性试剂的生产明显更经济。此外，避免了所述细胞穿透肽可能的长期引起过敏或免疫原性效应。

在其中根据本发明的多肽或肽的那些情况下，与不是药理学活性的或者在较低程度上是药理学活性的没有根据（i）至（iv）中的

任一项发生酯化或硫酯化、并且没有根据 (v) 发生酰胺化和酯化或硫酯化以及没有包含根据 (b) 的二硫化物的肽或多肽相反, 根据本发明的肽或多肽是前药形式。然后, 在递送后, 酯和/或硫酯的解离和/或二硫化物的还原以延迟和/或递送依赖性的方式产生了药理学活性肽或多肽, 其中递送包括越过生物屏障。

在根据本发明的肽或多肽的一个优选实施方式中, 胍基烷醇或胍基烷硫醇具有以下结构:



其中:

X 是 O 或 S;

R_1 和 R_2 各自独立地选自 H、卤素、 NH_2 、具有 1 至 5 个碳原子的烷基、芳基和杂芳基;

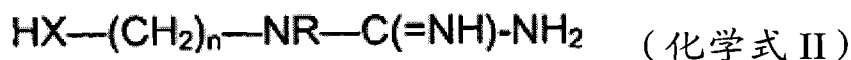
n 是 2 至 15 的整数;

R_3 是 H 或者具有 1 至 5 个碳原子的烷基; 以及

R_4 和 R_5 独立地选自 H、具有 1 至 5 个碳原子的烷基、芳基、杂芳基, 其中带有 R_4 或 R_5 基团的 N 可以是杂芳基环的环原子; 和/或 R_4 和 R_5 可以一起选择以获得杂芳基环。

在一个可替换实施方式中, 有意考虑了比以上限定的值更大的 n 值。这样的更大的值包括 n=20、25 或 30 的值。

在一个更优选的实施方式中, 胍基烷醇或胍基烷硫醇具有以下结构:



其中:

X 是 O 或 S;

n 是 2 至 10 的整数; 以及

R 是 H 或具有 1 至 5 个碳原子的烷基。

在一个进一步优选的实施方式中, 胍基链烷酸具有以下结构:



其中:

R_1 和 R_2 各自独立地选自 H、卤素、 NH_2 、具有 1 至 5 个碳原子的烷基、芳基和杂芳基;

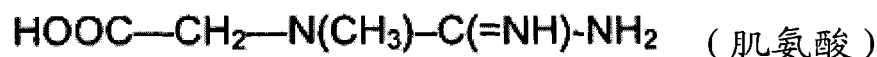
n 是 2 至 15 的整数;

R_3 是 H 或具有 1 至 5 个碳原子的烷基; 以及

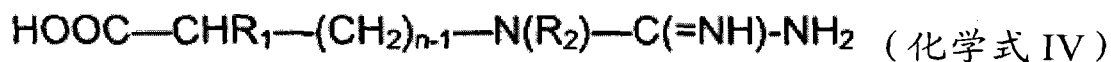
R_4 和 R_5 独立地选自 H、具有 1 至 5 个碳原子的烷基、芳基、杂芳基, 其中带有 R_4 或 R_5 基团的 N 可以是杂芳基环的环原子; 和/或 R_4 和 R_5 可以一起选择以获得杂芳基环。

在一个可替换实施方式中, 有意地考虑了比上述限定的值更大的 n 值。这样的更大值包括 n=20、25 或 30 的值。

优选地, 所述胍基链烷酸是肌氨酸 (creatine) 或胍基-乙酸, 其化学式如下所示:



在一个更优选实施方式中, 胍基链烷酸具有以下结构:



其中:

R_1 是 H 或 NH_2 ;

n 是 2 至 10 的整数; 以及

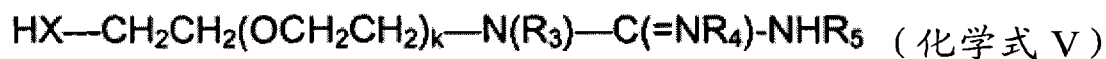
R_2 是 H 或具有 1 至 5 个碳原子的烷基。

在一个优选的实施方式中, 所述胍基链烷酸是精氨酸, 即 R_1 是 NH_2 ; R_2 是 H 并且 n 是 4。

通常, 优选的 n 值为 4 至 9, 更优选为 4 至 6。

在一个优选的实施方式中, 所述具有 1 至 5 个碳原子的烷基是甲基。

在本发明的肽或多肽的一个进一步优选的实施方式中, 所述被胍基取代且具有游离羟基的 PEG 或所述被胍基和巯基取代的 PEG 分别具有以下结构:



其中 k 是 1 至 12 的整数, 并且 X 、 R_3 、 R_4 和 R_5 是如上限定的。

在本发明的肽或多肽的一个进一步优选的实施方式中, 所述被胍基和羧基取代的 PEG 具有以下结构:



其中 k 是 1 至 12 的整数, 并且 X 、 R_3 、 R_4 和 R_5 是如上限定的。可替换地, 所述被胍基和羧基取代的 PEG 具有以下化学式



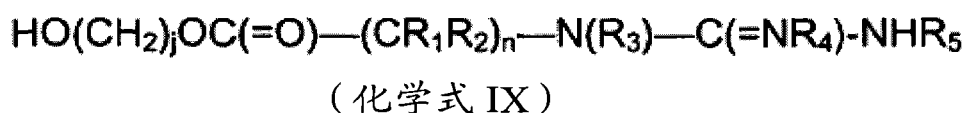
这样的化合物例如通过使 α -卤代 (α -溴代或 α -碘代) 乙酸叔丁酯与在另一端带有被保护的胍基 (例如 N,N' 双-Z、或 N-甲苯磺酰基保护基团) 的 PEG 分子的自由末端羟基反应而可获得。在酸性条件下最后去除叔丁酯保护基团产生易于用例如肽或多肽的如上限定的羟基发生酯化的期望化合物。

优选地, k 为 1 至 3。

在本发明的肽或多肽的一个优选实施方式中, $-\text{C}(=\text{NR}_4)-\text{NHR}_5$ 是嘧啶-2-基、喹唑啉-2-基、咪唑-2-基或苯并咪唑-2-基。换句话说, 以及在以上优选实施方式中陈述的, 根据本发明的胍基烷醇、胍基烷硫醇、胍基链烷酸、被胍基取代且具有游离羟基的 PEG、被胍基和巯基取代的 PEG 或者被胍基和羧基取代的 PEG 的胍基可以包含在环中, 如以上提及的杂芳基环。

在一个进一步优选的实施方式中, 所述胍基链烷酸或所述被胍基和羧基取代的 PEG 不是直接用 Ser、Thr、Tyr 或 Cys 残基的羟基或巯基分别酯化或硫酯化, 而是用聚合物或低聚物接头 (其又包含对于与肽或多肽的酯化可利用的官能团) 来插入。优选地, 并且进一步解释地, 所述聚合物或低聚物接头是聚乙二醇 (PEG)、或烷基-二醇, 优选地为烷基-1, ω -二醇, 或者多元醇如甘油。因此, 优选的接头具有通式 $\text{HO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_i\text{H}$ 或 $\text{HO}(\text{CH}_2)_j\text{OH}$ 或 $\text{HO}-\text{CH}_2-[\text{CH}(\text{OH})]_{(j-2)}-\text{CH}_2-\text{OH}$ 。优选的 i 值为 1 至 10 的整数, 更优选为 2、3、4 或 5。优选的 j 值为 1 至 20 的整数, 优选为 2 至 10 的值。如果根据本发明的胍基链烷酸或被胍基和羧基取代的 PEG 连接于这样的接头, 则酯键在位于一侧上的胍基链烷酸或被胍基和羧基取代的 PEG 的羧基和在另一侧上的接头的末端羟基之间形成。因此, 获得含胍基的部分, 其具有对于酯化可利用的末端羟基, 该

末端羟基是没有参与该接头和根据本发明的胍基链烷酸或被胍基和羧基取代的 PEG 之间的酯键接的接头的末端羟基。获得的分子具有游离羟基，其可与肽或多肽的羧基发生酯化。因此，获得的分子可与肽或多肽的 C-末端羧基或与一个或多个 Asp 或 Glu 残基(如果存在)的侧链羧基发生酯化。换句话说，所述分子可以代替在主要实施方式中陈述的胍基烷醇。优选的与接头发生酯化的胍基链烷酸在以下化学式 VI 和 VII 中示出，其中优选的 i 和 j 的值限定如上，并且 R₁、R₂、R₃、R₄ 和 R₅ 是如结合化学式 III 和 IV 所限定的。



这经过必要的修改同样适用于被胍基和羧基取代的 PEG。

在本发明的肽或多肽的一个进一步优选实施方式中，(a) C-末端的羧基(如果没有发生如上所述的酯化或硫酯化)与脂肪醇发生酯化；和/或(b) N-末端的氨基(如果没有与 α-或 β-羟基酸发生酰胺化)与脂肪酸发生酰胺化。术语“被酰胺化”或“酰胺化”是指在羧基和氨基之间形成酰胺键-CO-NH-。

在本发明的肽或多肽中脂肪醇和/或脂肪酸的存在增强了所述肽或多肽的疏水性，由此增大了对在递送过程中需要越过的膜的脂双层的亲脂性环境的亲和性。同样，根据该优选实施方式的肽或多肽包含两种不同类型的促进膜附着和内在化的部分，即由所述脂肪醇和/或所述脂肪酸提供的疏水基团以及一个或多个胍基。

根据本发明的脂肪酸是具有长的脂肪族尾部的羧酸。该尾部是饱和的或不饱和的并且优选是未支化的。根据本发明的脂肪酸具有至少四个碳原子。优选地，所述脂肪酸的碳原子数不超过 30。

根据本发明的脂肪醇是具有至少四个碳原子的伯醇或仲醇。根据本发明的脂肪醇可以是饱和的或不饱和的。优选地，所述脂肪醇的碳原子数不超过 30。

在一个优选实施方式中，所述脂肪醇和/或所述脂肪酸包含 5 至 15 个碳原子，优选为 9 个碳原子。

因此，优选的脂肪醇包括 1-戊醇、1-己醇、1-庚醇、1-辛醇、1-壬醇、1-癸醇、1-十一烷醇、1-十二烷醇、1-十三烷醇、1-十四烷醇和 1-十五烷醇。类似地，根据本发明优选的脂肪酸包括戊酸、己酸、庚酸、辛酸、壬酸、癸酸、十一烷酸、十二烷酸、十三烷酸、十四烷酸和十五烷酸。更优选的分别是 1-壬醇和壬酸。

在本发明的肽或多肽的一个进一步优选的实施方式中，胍基（包括如果存在的任何 Arg 残基的胍基）的数量为 4 至 20，更优选为 7 至 15，并且最优选为 9，其中至少一个胍基包含在如上所述的胍基烷醇、胍基烷硫醇、胍基链烷酸、被胍基取代且具有游离羟基的 PEG、被胍基和巯基取代的 PEG 或被胍基和羧基取代的 PEG 中。还优选的是，根据本发明的肽或多肽不带有净负电荷。因此，如果所有 Asp 和 Glu 残基的羧基且包括 C-末端羧基的总数超过 20，则优选本发明的肽或多肽在所有所述羧基处发生酯化。

在本发明的肽或多肽的一个优选实施方式中，所述肽或多肽是肽-PNA 嵌合体的一部分。术语“PNA”是指“肽核酸”并且在以下进一步论述。

本发明还涉及一种核酸，(a) 其在以下的一个或多个位置与胍基链烷酸或被胍基和羧基取代的 PEG 发生酯化：(i) 5'-末端 5'羟基；(ii) 3'-末端 3'羟基；(iii) 5'-或 3'-末端 2'羟基；以及 (iv) 内部 2'羟基；(b) 其在一个、多个或所有磷酸 (phosphate) 处与胍基烷醇或被胍基取代且具有游离羟基的 PEG 发生酯化；和/或 (c) 其具有转化成带有胍基烷醇或被胍基取代的 PEG 的缩醛的 2'羟基。

在一个优选的实施方式中，仅使用选项 (b)。

优选地，所述缩醛是甲醛缩醛 (formaldehyde acetal)。可替换地，所述缩醛的醛成分可以不同于甲醛的醛并且具有通式 $R_a\text{-CHO}$ ，其中 R_a 在本文中限定如下。将所述 2'羟基转化成缩醛的装置和方法在本领域描述过并且在下文进一步提及。

在提及 2'羟基的程度上，应理解，根据本发明的核酸是或者包括 RNA。用于衍生寡核糖核苷酸的 2'羟基位置的方法在本领域是已知的并且在例如 Rastogi and Usher (Nucleic Acids Research 23, 4872-4877 (1995)) 中描述过。明确考虑了其他类型的核酸，即除了 RNA 之外，在下文进一步论述。

图 6 中示出了核酸的一个实例。图 6 所示的磷酸参与三个酯键，其中的两个是与该核糖的仲羟基，并且第三个是与如上所述的胍基烷醇。在体内条件下，与胍基烷醇形成的酯将会通过酯酶水解或解离，因为 (i) 胍基烷醇的羟基是伯羟基以及 (ii) 对应的磷酸酯朝向本发明的核酸的外部可接近表面而定位。这不适用于是糖-磷酸酯骨架一部分的酯键（其因此更稳定）。

在一个进一步优选的实施方式中，在本发明核酸的一个、多个或所有磷酸处的与胍基烷醇生成的酯或与脂肪醇生成的酯可经由两步机制在体内解离。例如由 Parang 等 (Current Medicinal Chemistry,

2000, 7, 995-1039) 所描述的, 磷酸酯经由分子内消除而被解离, 该分子内消除是通过受分子内重排的官能度被释放的第一次解离所引发。在图 7 中提供了一个实例。在图 7 中, 硫化物的解离导致形成 2-巯基酯, 其又经由硫杂丙环的形成而发生分子内解离。类似地, 还考虑了“安全捕获 (safety catch)” 方案, 其中在醇的 β -位具有吸电子基如酮的构建体可作为缩醛 (不是吸电子的) 临时保护。缩醛的合成后去除或体内解离释放吸电子酮基, 并由此促进经由 β -消除的磷酸酯解离。

在一个进一步优选的实施方式中, 如果没有与胍基烷醇发生酯化, 则一个或多个末端磷酸与脂肪醇发生酯化。

由于磷酸是三元酸, 所以末端磷酸可以与一个或两个当量的醇发生酯化。因此, 末端磷酸可以与一个当量的胍基烷醇和一个当量的脂肪醇发生酯化。而且, 考虑了末端磷酸与两个当量的脂肪醇的酯化。而且, 仅一个当量的醇 (胍基烷醇或脂肪醇) 可以连接于末端磷酸。

如本文使用的, 术语“核酸” 包括单链和双链核酸。

根据本发明优选的双链核酸在一个末端磷酸 (第一链的 5'-末端磷酸) 与一个当量的脂肪醇发生酯化并且在另一末端磷酸 (第二链的 5'-末端磷酸) 与一个当量的胍基烷醇发生酯化。可选地, 在根据本发明的优选双链核酸中, 如上限定的位置 (a) (i) 至 (iv) 和/或 (b) 中的一个或多个可以如上所述发生酯化。应当理解, 在这种情况下, 根据 (b) 的磷酸是内部磷酸。

根据本发明优选的单链核酸在 5'-末端磷酸与一个当量的脂肪醇发生酯化并且在上述一个或多个位置 (b) 与至少一个当量的胍基烷醇发生酯化。应当理解, 在这种情况下, 根据 (b) 的磷酸是

内部磷酸。可替换地或除了与胍基烷醇在一个或多个内部磷酸处发生酯化外，所述根据本发明优选的单链核酸在如上限定的位置 (a) (i)至(iv)的一个或多个处与一个或多个胍基链烷酸发生酯化。

类似于在根据本发明的肽或多肽中的羧酸的酯化，在根据本发明的核酸中的磷酸的酯化用于双重目的：(i) 引入胍基；和 (ii) 去除负电荷。两个目的利用与胍基烷醇的酯化这个单一措施而实现。

在一个进一步优选的实施方式中，所述胍基链烷酸或所述被胍基和羧基取代的 PEG 不是如在 (a) (i)至(iv)中的任一个中所限定的与核酸的羟基直接发生酯化，而是与聚合物或低聚物接头（其又包含可用于与核酸酯化的官能团）发生酯化。优选地，并且进一步解释地，所述聚合物或低聚物接头是聚乙二醇 (PEG)，或烷基-二醇，优选烷基-1,ω-二醇，或者多元醇如甘油。因此，优选的接头具有通式 $\text{HO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_i\text{H}$ 或 $\text{HO}(\text{CH}_2)_j\text{OH}$ 或 $\text{HO}-\text{CH}_2-[\text{CH}(\text{OH})]_{(j-2)}-\text{CH}_2-\text{OH}$ 。优选的 i 值为 1 至 10 的整数，更优选为 2、3、4 或 5。优选的 j 值为 1 至 20 的整数，优选为 2 至 10 的值。如果根据本发明的胍基链烷酸或被胍基和羧基取代的 PEG 连接于这样的接头，则酯键为在一侧上的胍基链烷酸或被胍基和羧基取代的 PEG 的羧基和在另一侧上的接头的末端羟基之间形成。因此，获得含胍基的部分，其具有对于酯化可利用的末端羟基，该末端羟基是没有参与该接头和根据本发明的胍基链烷酸或被胍基和羧基取代的 PEG 之间的酯键的接头的末端羟基。换句话说，获得的分子具有可与核酸的磷酸发生酯化的游离羟基。因此，获得的分子可与如在以上 (b) 中所限定的核酸的磷酸发生酯化。即，所述分子可以代替如在涉及根据本发明的核酸的实施方式的项目 (b) 中所陈述的胍基烷醇。优选的与接头发生酯化的胍基链烷酸在本文中上面示出；参见化学式 VI 和 VII。这经过必要的修改同样适用于被胍基和羧基取代的 PEG。

在一个进一步优选的实施方式中，所述核酸是 DNA、RNA 或 siRNA。依照本发明，核酸分子包括 DNA，如 cDNA 或基因组 DNA，以及 RNA。应当理解，如本文使用的术语“RNA”包含所有形式的 RNA，包括 mRNA、ncRNA（非编码 RNA）、tRNA 和 rRNA。术语“非编码 RNA”包括 siRNA（小干扰 RNA）、miRNA（微小 RNA）、rasiRNA（重复相关 RNA）、snoRNA（小核仁 RNA）、以及 snRNA（小核 RNA）。优选地，叙述“RNA”的实施方式涉及 mRNA。同时，其他形式的 RNA，包括上述的特定形式，都在各个实施方式中有意地加以考虑。此外包括的是基因组 RNA，如在 RNA 病毒的 RNA 的情况下。

还包括的是本领域已知的核酸模拟分子，如 DNA 或 RNA 的合成或半合成衍生物和混合聚合物（正义（有义）和反义链）。它们可以包含另外的非天然的或衍生的核苷碱基，如本领域技术人员易于理解的。根据本发明，这样的核酸模拟分子或核酸衍生物包括硫代磷酸（酯）核酸、氨基磷酸酯核酸、2'-O-甲氧乙基核糖核酸、吗啉代核酸、己糖醇核酸（HNA）和锁定核酸（LNA）（参见，例如 Braasch and Corey, *Chemistry & Biology* 8, 1-7 (2001)）。LNA 是一种 RNA 衍生物，其中核糖环通过在 2'-氧和 4'-碳之间的亚甲基键接封闭。

对于本发明的目的，肽核酸（PNA）是聚酰胺类型的 DNA 类似物。对于腺嘌呤、鸟嘌呤、胸腺嘧啶和胞嘧啶的相应衍生物的单体单元可商业获得（例如从 Perceptive Biosystems）。PNA 是具有代替 DNA 或 RNA 的糖-磷酸酯骨架的酰胺骨架的合成 DNA-模拟物。因此，DNA 的某些成分，如磷、磷氧化物、或脱氧核糖衍生物在 PNA 中不存在。如由 Nielsen et al., *Science* 254:1497 (1991); 和 Egholm et al., *Nature* 365:666 (1993) 所披露的，PNA 特异性地且紧密地结合于互补 DNA 链并且不被核酸酶所降解。此外，它们在酸性

条件下是稳定的并且抵抗蛋白酶 (Demidov et al. (1994), *Biochem. Pharmacol.*, 48, 1310-1313)。相比于相应的 DNA-DNA 双螺旋的稳定性, 它们的静电中性骨架增大对互补 DNA 的结合强度 (Wittung et al. (1994), *Nature* 368, 561-563; Ray and Norden (2000), *Faseb J.*, 14, 1041-1060)。实际上, PNA 比 DNA 本身更强地结合于 DNA。这可能是因为在这两个链之间没有静电排斥, 并且聚酰胺骨架是更柔性的。因此, PNA/DNA 双螺旋在比 DNA/DNA 双螺旋更宽范围的严格条件下结合, 使得更容易实施多重杂合。由于更强的结合而可使用比利用 DNA 更小的探针。另外, 更有可能的是, 单个碱基错配可利用 PNA/DNA 杂合加以确定, 因为 PNA/DNA 15-mer 中的单个错配使熔点 (T_m) 降低了 8°C - 20°C , 相对于 DNA/DNA 15-mer 双螺旋降低的 4°C - 16°C 。由此改进完好匹配和错配之间的区分。由于其不带电的性质, PNA 也允许 DNA 样品在低盐或无盐条件下进行杂合, 因为没有如两个带负电的 DNA 链之间需要抵消的链间排斥。因此, 靶 DNA 在杂合条件下具有更少的二级结构并且对于探针分子更易于接近。

此外考虑的是, 根据本发明的所述核酸是 PNA。PNA 可以在聚酰胺骨架的 α -碳处通过引入带有胍基的部分而衍生, 由此获得根据本发明的是 PNA 的核酸。

根据本发明的 PNA 嵌合体是包含一个或多个 PNA 部分的分子。该嵌合分子的剩余部分可以包括一个或多个 DNA 部分 (PNA-DNA 嵌合体) 或者一个或多个 (多) 肽部分 ((多) 肽-PNA 嵌合体)。根据本发明的 (多) 肽-DNA 嵌合体是包含一个或多个 (多) 肽部分和一个或多个 DNA 部分的分子。也考虑了包含 PNA、肽和 DNA 部分的分子。嵌合分子的一部分的长度可以在 1 至 N-1 个碱基、其等价物或者氨基酸的范围, 其中 “N” 是整个分子的碱基、其等价物或氨基酸的总数。

结合上述 PNA、(多)肽、PNA 嵌合体和肽-DNA 嵌合体的术语“衍生物”涉及这样的分子，其中这些分子包含一个或多个不同于 PNA、(多)肽和 DNA 的其他基团或取代基。考虑了本领域已知的以及用于合成这些分子的所有基团或取代基，如保护基团，和/或涉及这些分子应用的所有基团或取代基，如标签(标记)和(可解离)接头。

此外，本发明涉及带有一个或多个胍基的脂质体或胶束，其中一个或多个胍基通过在生理条件下可解离的官能团连接于该脂质体或胶束。

根据本发明的脂质体是具有包含磷脂和可选的胆固醇的膜双层的泡囊，优选球形泡囊。脂质体可以包含具有混合脂质链的天然来源的磷脂(如卵磷脂酰乙醇胺(egg phosphatidylethanolamine))，或者由纯表面活性成分如 DOPE(二油酰基磷脂酰乙醇胺(dioleoylphosphatidylethanolamine))构成。通常但不是通过定义地，脂质体包含含水溶液的核。由于其独特的性能，所以脂质体用于药物递送。对于本发明的目的，考虑了期望将其递送至生物系统的脂质体，如在其外部含有一种或多种药理学活性试剂的脂质体。脂质体可以在疏水膜内部封闭含水溶液的区域；溶解的亲水溶质不易于通过脂质。疏水化学品可溶解在膜中，并且以这种方式，脂质体可带有疏水分子和亲水分子。为了将这些分子递送至作用部位，脂质体的脂质双层可与其他双层如细胞膜融合，从而递送脂质体内含物。通过在试剂如 DNA 或药物(其通常不能分散通过膜)的溶液中制备脂质体，所述试剂可被(不受限制地)递送通过脂质双层。脂质体对于将 DNA 转化或转染至宿主细胞中的用途称为脂转染。脂质体研究中的其他进展已经能够允许脂质体可以避免通过身体免疫系统，特别地，网状内皮系统(RES)的检测。这些脂质体称为“秘密脂质体(stealth liposome)”，并且利用连接(studding)膜

的外部的 PEG（聚乙二醇）来构建。PEG 涂层（在体内是惰性的）对于药物递送机制允许更长的循环寿命。

根据本发明的胶束是表面活性分子的聚集体，通常分散在液体中。含水溶液中的典型胶束形成了具有与周围溶剂接触的亲水“头部”区域的聚集体，整合该胶束中心的疏水尾部区域。可替换地，胶束可以具有双层结构。胶束的中心包含其他物质，例如诸如期望将其递送至生物系统的药理学活性试剂的物质。通常，胶束在形状上大致是球形。胶束的形状和大小是其表面活性分子的分子几何学和溶液条件如表面活性剂浓度、温度、pH 和离子强度的函数。

胶束通常是不含胆固醇的。优选根据本发明的脂质体和胶束是不含胆固醇的，或者在存在胆固醇的情况下，所述胆固醇是未修饰的、天然胆固醇。

对于本发明的目的，重要的是，所有所述胍基或其重要部分位于所述脂质体或胶束的外表面。

在一个优选的实施方式中，所述官能团是酯基团。在生理条件下是可解离的根据本发明的其他官能团是缩醛、二硫化物、硫酯和磷酸酯。

在一个进一步优选的实施方式中，所述脂质体或胶束发生以下酯化：（a）在一个或多个羟基处与胍基链烷酸或被胍基和羧基取代的 PEG 发生酯化；和/或（b）在一个或多个酸基团如磷酸和羧酸处与胍基烷醇、胍基烷硫醇、被胍基取代且具有游离羟基的 PEG、或被胍基和巯基取代的 PEG 发生酯化。

优选地，所述羟基是伯羟基，即结合于片段-CH₂R 的羟基。相比于仲羟基或叔羟基，伯羟基在酯化后产生更快速和/或在更大程度

上被解离的酯。更快速解离和/或在更大程度上的解离是优选的，因为它们使得需要更快速形成和/或更大程度地形成不含有或基本上不含有所述胍基的脂质体或胶束形式，其附着用于暂时增强越过生物屏障如生物膜的能力的目的。

在根据本发明的脂质体或胶束的一个进一步优选的实施方式中，所述脂质体或胶束的伯氨基转化成胍基。伯氨基可通过使用商业可获得或已知的“胍基化试剂”而转化成胍基结构。用于伯胺胍基化的合适装置和方法例如在 Feichtinger et al., (J. Org. Chem. 63, 8432-8439 (1998))或 Brand and Brand (Organic Syntheses 3, 440 (1955))中描述过。根据 Feichtinger et al., 胍基化试剂的两个氮被保护并且反应在有机溶剂中以高收率发生。接着，在反应完成之后，必须去除保护基团，主要是经由酸解离。根据 Brand and Brand, 胍基化试剂保持为未反应形式的盐（氮没有被共价保护）。接着，在将伯胺加入到碱性 pH 的水/含水混合物之后，获得期望的产物。后一个程序避免了保护基团的最后的去除。

在一个进一步优选的实施方式中，羟基是选自磷脂酰肌醇、磷脂酰甘油、单酰基甘油和二酰基甘油的脂质的羟基，其中所述脂质包含在脂质体或胶束中；或者是包含在脂质体或胶束中的 PEG 部分的末端羟基。PEG 部分作为脂质体和胶束的成分的极性头部基团的用途在本领域是已知的。

优选地，所述伯氨基是磷脂酰乙醇胺的伯氨基，或者是 PEG 部分的伯氨基，其中所述 PEG 部分的末端羟基部分被伯氨基代替。

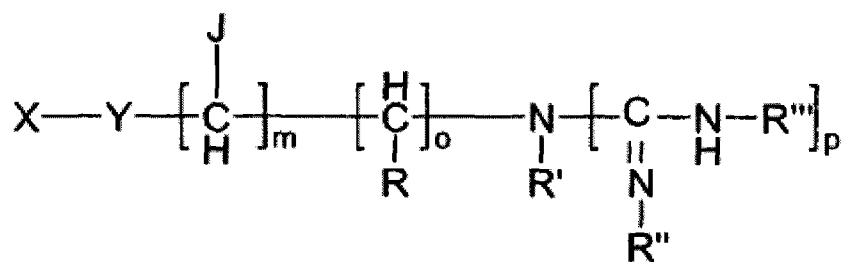
优选地，包含在本发明的核酸、脂质体或胶束中的胍基烷醇、胍基烷硫醇、胍基链烷酸、被胍基取代且具有游离羟基的 PEG、被胍基和巯基取代的 PEG 以及被胍基和羧基取代的 PEG 如上文所限定的结合于根据本发明的肽和多肽。涉及这些化合物的进一步解释

以及进一步优选的实施方式经过必要的修改也适用于根据本发明的核酸、脂质体和胶束。

本发明还涉及药物组合物, 包含根据本发明的肽或多肽和/或根据本发明的核酸和/或根据本发明的脂质体或胶束。

该药物组合物可以进一步包含药用载体、赋形剂和/或稀释剂。合适药用载体、赋形剂和/或稀释剂的实例在本领域是熟知的, 并且包括磷酸缓冲盐水溶液、水、乳液, 如油/水乳液, 各种类型的润湿剂、无菌溶液等。包含这样的载体的组合物可以通过熟知的常规方法配制。这些药物组合物可以合适剂量给予对象。合适组合物的给药可以通过不同方式实现, 例如通过静脉内、腹膜内、皮下、肌内、局部、皮内、鼻内或支气管内给药。组合物也可以直接给予到靶部位, 例如通过生物递送(也称为“基因枪”)至外部或内部靶部位。剂量方案将由主治医生和临床因素确定。如在医学领域中熟知的, 对于任何一个患者的剂量取决于许多因素, 包括患者体重、体表面积、年龄、要给予的具体化合物、性别、给药时间和途径、总体健康、以及同时要给予的其他药物。蛋白质性质的药学活性物质可以每个剂量以 1 ng 至 10 mg/kg 体重存在; 然而, 也考虑低于或高于这个示例性范围的剂量, 特别是考虑到前述因素。如果方案是连续注入, 则还应当在 1 μ g 至 10 mg 单位/kg 体重/分钟的范围内。

此外, 本发明提供了一种增强聚合物、脂质体或胶束越过生物屏障的能力的方法, 该聚合物、脂质体或胶束具有一个或多个羧基、羟基、巯基和/或磷酸基团, 该方法包括修饰所述基团中的至少一个以获得化学式 VII 的化合物的步骤,



化学式 VII

其中对于每一次出现的化学式 VII 独立地

- (a) X 是 $-(\text{C}=\text{O})$; Y 是 O 或 S;
- (b) X 是 $-\text{O}$ 或 $-\text{S}$; Y 是 $(\text{C}=\text{O})$ 或 $(\text{CHR}_a)-\text{O}$;
- (c) X-Y 是 $-\text{S}-\text{S}$; 或者
- (d) X 是 $-\text{O}-\text{P}(=\text{O})\text{OR}_p$; Y 是 O 或 S;

以及

每一个 J 独立地选自 H、卤素、 NH_2 、具有 1 至 15 个碳原子的烷基、和 $[\text{CHR}]_o-\text{NR}'-\text{CH}(\text{NHR}'')-\text{NH}-\text{R}'''$;

R 、 R' 、 R'' 、 R''' 、 R_a 和 R_p 各自独立地选自 H、具有 1 至 15 个碳原子的烷基、和取代或未取代的芳基; 其中 R 和 R' 、 R' 和 R'' 、和/或 R'' 和 R''' 可以一起选择以形成环状结构;

烷基可以是取代的;

m 是 0 至 10 的整数; 其中如果 J 是 $[\text{CHR}]_o-\text{NR}'-\text{CH}(\text{NHR}'')-\text{NH}-\text{R}'''$, 则 m 是 1;

o 是 1 至 15 的整数; 以及

p 是 0 或 1; 其中如果 p 是 0, 则带有 R' 的 N 的自由价用 H 填充。

化学式 VII 包括所述羧基、羟基、巯基或磷酸基团, 考虑了其通过本发明方法的修饰。因此, 片段 X-Y 在 (a) 的情况下是酯或硫酯基团; 在 (b) 的情况下是酯、硫酯或缩醛基团; 在 (c) 的情

况下是二硫化物以及在(d)的情况下是磷酸酯或硫代磷酸酯。X包含自由价,如在(a)至(d)中指出的,其是将待修饰的羧基、羟基、巯基或磷酸基团连接至所述聚合物、脂质体或胶束的键。

由于J也可以是 $[\text{CHR}]_o\text{-NR}'\text{-CH}(\text{NHR}'')\text{-NH-R}'''$,所以根据本发明的方法允许在所述羧基、羟基、巯基或磷酸基团的任一个处引入双-胍基取代基。

优选地,m和o的和为4、5或6。还优选的是,烷基是甲基。

在本发明方法的一个优选实施方式中,所述聚合物是肽、多肽或核酸。

因此,根据本发明上述的肽、多肽或核酸经由本发明的方法是可获得的。

本发明还提供了一种增强肽或多肽越过生物屏障的能力的方法,包括以下步骤:(a)如下形成一个或多个酯或硫酯(i)在C-末端的羧基处与胍基烷醇、胍基烷硫醇、被胍基取代且具有游离羟基的PEG、或被胍基和巯基取代的PEG(形成酯或硫酯);(ii)如果存在的一个或多个Asp或Glu残基的侧链羧基处与胍基烷醇、胍基烷硫醇、被胍基取代且具有游离羟基的PEG、或被胍基和巯基取代的PEG(形成酯或硫酯);(iii)如果存在的话,在一个或多个Ser、Thr或Tyr残基的羟基处与胍基链烷酸(形成酯或硫酯);(iv)如果存在的话,在一个或多个Cys残基的巯基处与胍基链烷酸或被胍基和羧基取代的PEG(形成酯或硫酯);和/或(v)在N-末端处与胍基链烷酸或被胍基和羧基取代的PEG(形成酯或硫酯),其中所述N-末端之前已用 α -或 β -羟基酸进行酰胺化,并且其中在所述 α -或 β -羟基酸的羟基和所述胍基链烷酸或所述被胍基和羧基取代的PEG的羧基之间形成酯;和/或(b)形成一个或多个二硫化物,该

二硫化物在 Cys 残基（如果存在）的巯基和胍基烷硫醇或被胍基和巯基取代的 PEG 之间形成。

本文以上描述的本发明的主要实施方式的定义、优点和优选实施方式经过必要的修改也适用于根据本发明的增强肽或多肽越过生物屏障的能力的上述方法。

在根据本发明的方法的一个优选实施方式中，生物屏障选自细胞膜、粘膜和血脑屏障。

在一个进一步优选的实施方式中，根据本发明的增强肽或多肽越过生物屏障的能力的方法，所述方法进一步包括以下步骤：（a）在 C-末端的羧基处与脂肪醇形成酯或硫酯，条件是所述 C-末端没有如上所述发生酯化；和/或（b）N-末端的氨基与脂肪酸的酰胺化。

在一个更优选的实施方式中，所述脂肪醇和/或所述脂肪酸包含 5 至 15 个碳原子，优选 9 个碳原子。

分别涉及所述脂肪酸或所述脂肪醇、以及结合本发明的肽或多肽在本文上面所描述的定义、优点和优选实施方式经过必要的修改适用于本方法。

在一个进一步优选实施方式中，在形成酯、硫酯、乙酸酯、二硫化物和/或磷酸酯之后的胍基数量为 5 至 20 个，更优选为 7 至 15 个，并且最优选 9 个，其中所述胍基数量包括如果存在的任何 Arg 残基的胍基。

此外，本发明提供了一种增强核酸越过生物屏障的能力的方法，包括以下步骤：（a）在以下位置中的一个或多个处，与胍基链烷酸或被胍基和羧基取代的 PEG 形成酯：（i）5'-末端 5'羟基；（ii）

3'-末端 3'羟基; (iii) 5'-或 3'-末端 2'羟基; 和 (iv) 内部 2'羟基;
(b) 在一个或多个磷酸处, 与胍基烷醇或被胍基取代且具有游离羟基的 PEG 形成酯; 和/或在 2'羟基和胍基烷醇或被胍基取代的 PEG 之间形成缩醛。

优选地, 所述缩醛是甲醛缩醛。可替换地, 所述缩醛的醛成分可以是不同于甲醛的醛并且具有通式 $R_a\text{-CHO}$, 其中 R_a 在本文中限定如下。

在磷酸基处与胍基烷醇或被胍基取代的 PEG 发生酯化的核酸可通过修改的标准方案 (Vinayak et al., *Nucleic Acids Research*, 20, 1265-1269 (1992); Ogilvie et al., *P.N.A.S.* 85, 5764-5768 (1988)) 进行制备。代替标准的氰乙基保护基团, 其在被采用以从固体载体解离生物聚合物的碱性条件下被去除, 可采用利用碱-不稳定基团 (Fmoc) 或还原-不稳定部分 (硝基, 苄基和三氯乙基) 保护的胍基烷醇或被胍基取代的 PEG。在碱-易脱胍基保护基团的情况下, 用来脱去所合成的寡核苷酸的最终碱性处理将伴随地去除胍基保护基团。在还原条件下可裂解的胍基保护基团的情况下, 在寡核苷酸从固体载体解离以最终去除胍基保护基团之后, 需要在还原条件下的额外步骤。

核酸, 其是在 2'位置利用胍基烷醇或被胍基取代的 PEG 经由缩醛基团衍生的, 可通过修改的标准方案 (例如, Rastogi et al., *Nucleic Acids Research* 23, 4872-4873 (1995)) 进行制备。胍基烷醇或在一端被胍基取代的 PEG 可用来与在 2'位置的羟基形成缩醛。该缩醛在寡核苷酸从固体载体解离过程中是稳定的。

在一个进一步优选的实施方式中, 所述方法进一步包括利用脂肪醇酯化一个或多个末端磷酸。

如结合根据本发明的核酸所述的定义、优点和优选实施方式经过必要的修改适用于增强根据本发明的核酸越过生物屏障的能力的方法。

此外，本发明提供了一种增强脂质体或胶束越过生物屏障的能力的方法，包括以下步骤：(a) 在所述脂质体或胶束的一个或多个羟基处，与胍基链烷酸或被胍基和羧基取代的 PEG 形成酯；和/或 (b) 在一个或多个酸基如磷酸或羧酸处，与胍基醇、胍基烷硫醇、被胍基取代且具有游离羟基的 PEG、或被胍基和巯基取代的 PEG 形成酯；和/或 (c) 将所述脂质体或胶束的伯氨基转化成胍基。

根据本发明的脂质体或胶束的制备可以通过使用胍基链烷酸或被胍基和羧基取代的 PEG 实现，以在所述脂质体或胶束的一个或多个羟基处形成酯。所述脂质体或胶束的羟基可以由组分两性脂质如磷脂酰甘油提供。例如，磷脂酰甘油或磷脂酰二-醇（具有与烷基或 PEG 链酯化的磷酸酯的磷脂，该 PEG 链具有两个自由端，每一端带有羟基）在游离末端羟基或巯基处与胍基羧酸发生酯化。例如，商业可获得的 N,N'-双-叔丁氧基羰基胍乙酸可经由 DCC-HOBT-DMAP 偶联而偶联于 DMF/DCM 混合物中的磷脂酰甘油。在纯化后，TFA 处理去除了双-Boc 基团并产生期望的化合物。

根据本发明的脂质体或胶束的制备也可如下实现：通过使用胍基醇、胍基烷硫醇、被胍基取代且具有游离羟基的 PEG 或被胍基和巯基取代的 PEG，其例如与是所述脂质体或胶束的组分的磷脂酰-丝氨酸、磷脂酰-丝氨酸发生酯化。在这种情况下，氨基酸部分（丝氨酸）的游离羧基与所述胍基醇、胍基烷硫醇、被胍基取代且具有游离羟基的 PEG、或与所述被胍基和巯基取代的 PEG 发生酯化。

将所述脂质体或胶束的伯氨基转化成胍基，可容易地通过利用过量的能够将伯氨基转化成胍基如 1,3-二-Boc-2-甲基异硫脲来处理

例如具有伯氨基的阳离子表面活性剂如磷脂酰乙醇胺（所述阳离子表面活性剂是所述脂质体或胶束的组分）实现。例如，在室温下，在非亲核性碱（如 TEA 或 DIEA）存在下，磷脂酰乙醇胺可在 DCM（二氯甲烷）中与 2 至 3 当量的 1,3-二-Boc-2-甲基异硫脲反应 24 至 48 小时。反应可通过 UV-茚三酮检测而加以监控。在蒸发溶剂和分离反应材料之后，对于解离 Boc 基团必需的用 TFA 的最后处理来产生具有游离胍基的期望产物。

将伯氨基转化成胍基的方法在上文中描述过。

如结合根据本发明的脂质体和胶束在本文中描述的定义、优点和优选实施方式经过必要的修改适用于根据本发明的增强脂质体或胶束越过生物屏障的能力的方法。尤其是，所述胍基烷醇、所述胍基烷硫醇、所述胍基链烷酸、所述被胍基取代且具有游离羟基的 PEG、所述被胍基和巯基取代的 PEG、以及所述被胍基和羧基取代的 PEG 优选为如上文所限定的。

附图说明

附图示出了：

图 1：相比于天然 Arg 残基（右），根据本发明修饰的示例性 Glu 残基（左，中）。如由在主链氮和羧基碳上的自由价所指出的，该 Glu 残基嵌入在肽结构中。

图 2：包含天然 Lys 和 Arg 残基以及 Asp 或 Glu 残基的肽的示意图（左），其中 Asp 和 Glu 残基根据本发明发生了修饰（右）。

图 3：举例说明肽的骨架和侧链的修饰的示例性示意图。

图 4: SCF-报告构建体的精氨酸-酯修饰的肽链段输出至内质网。Y-轴: 报告构建体的表现出 Golgi-染色 (蓝色) 的细胞的%: 2-小时预处理和 1-小时 ER-至 Golgi (高尔基) 运输。Arg-正常肽相当于未处理细胞的 ER-至 Golgi 运输。

图 5: SCF 运输至细胞表面的精氨酸-酯肽递送和抑制 (16 小时)。左图: 没有肽; 正常 SCF 膜染色。右图: 精氨酸-酯肽 (100 μ M); 移向细胞内 SCF 染色。

图 6: 本发明的核酸的实例。所示核酸可以是通过在游离 5'-和 3'-羟基处形成磷酸-二酯键的长核酸的一部分。

图 7: 体内磷酸酯解离机制, 通过初始二硫化物还原, 接着分子内解离。

图 8: 实施例 1 的肽的 HPLC 色谱。

图 9: 实施例 1 的肽的质谱。

具体实施方式

以下实施例举例说明本发明, 但不应解释为是限制性的。

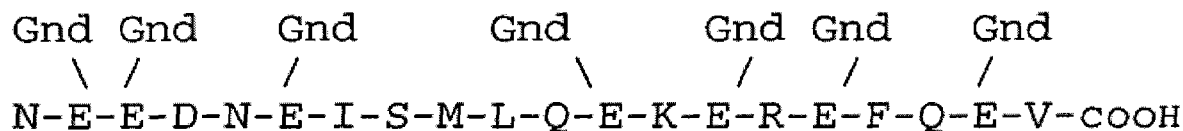
实施例 1

在没有使用基因融合 (即, 细胞穿透性) 肽的情况下, SCF (干细胞因子) 的 20-mer 肽抑制剂的递送

靶肽 (对于 SCF 的 ER 输出所要求的):

N-E-E-D-N-E-I-S-M-L-Q-E-K-E-R-E-F-Q-E-V-cooH

相应的精氨酸-酯-肽，即该肽根据本发明通过谷氨酸的羧基与胍基烷醇发生酯化而被修饰；



Gnd=胍基

天冬氨酸侧链用甲基酯保护：Boc-Asp(OMe)-OH。

I. 假精氨酸-衍生的 SFC 衍生物：

胍基经由酯键被化学地引入到谷氨酸侧链中，通过 4 碳的烷基链（丁基）而与羧酸分离。胍基保护基团是双-Z（N,N'二苄氧羰基）。

策略：Boc/Fmoc 策略。

使用的前体：Fmoc-Glu(O 丁基胍基 bisZ（双 Z）)-OH。

树脂：Boc-Val-Pam 树脂 RAPP 聚合物。0.59 mmol/g。0.2 mmol 规模合成。

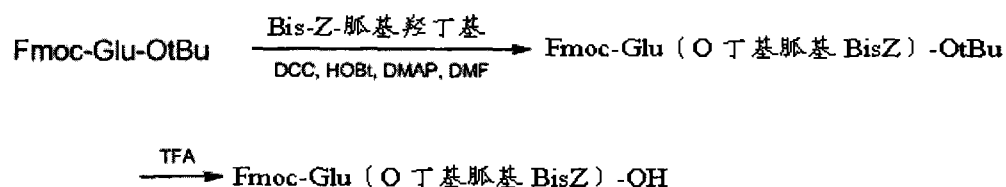
偶联剂：前体用 BOP 而其他用 HCTU。

固相肽合成使用人工偶联（manual coupling）完成。TFA 解离时间较短（1 x1 分钟）以避免 BisZ 切割。Fmoc 基团使用标准 20% 哌啶循环。最后，实施 HF 解离。产物的纯度和同一性通过 HPLC（参见图 8）和 MS-Maldi-TOF（预期 M+H=3346，实验值 3347；参见图 9）加以确认。

II. 前体的合成：

Fmoc-Glu (OBisZ 胍基丁基) -OH

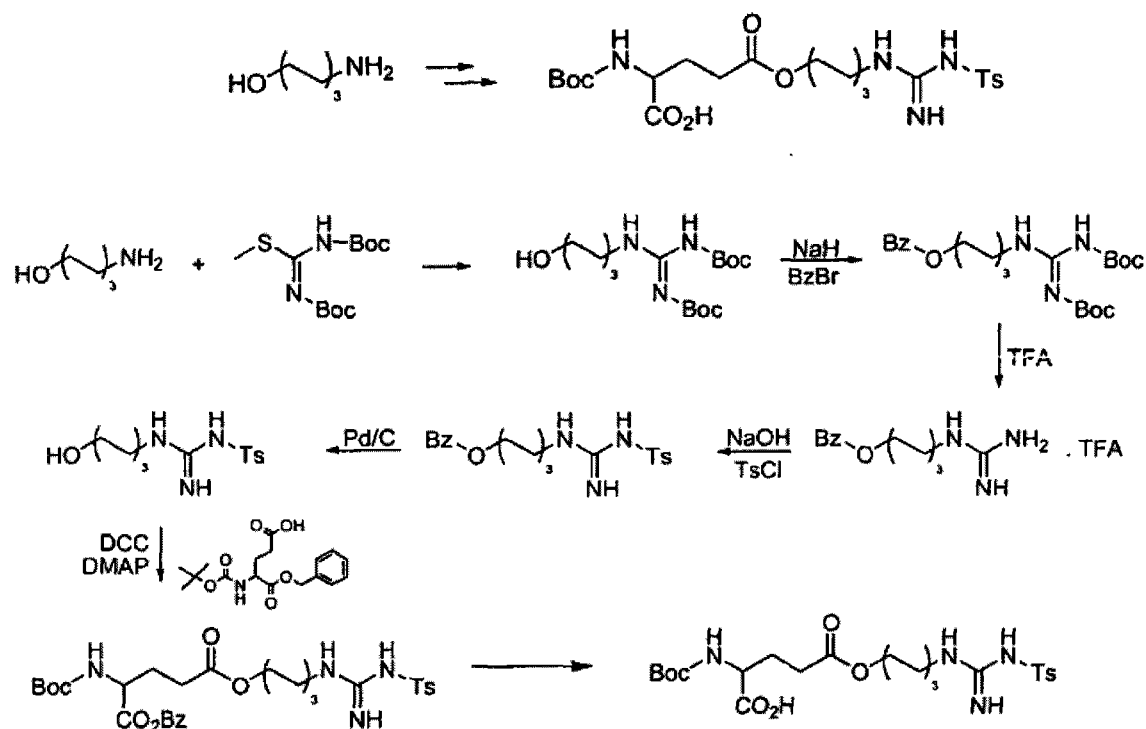
起始材料: Fmoc-Glu-OtBu



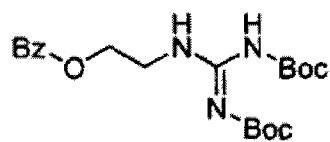
实验方案:

Cos-7 细胞在玻璃盖玻片上在含 10%血清的 DMEM 中放置过夜。为了进行分析,我们将肽以 1 mM 悬浮在 PBS (磷酸缓冲盐水) 中,将其在完全培养基中稀释至最终浓度。我们在 15 或 30 分钟之后清洗细胞并用 PBS 清洗一次,并用多聚甲醛 (4%) 固定 10 分钟,并在 PBS 中照相。

为了改善该策略, (i) 使用较长的碳间隔物以避免可能的副反应 (内酰胺形成), 以及 (ii) 使用所有的 Boc 化学以简化链装配。在这种情况下, 利用 6-氨基-1-己醇开始以获得易于 Boc 固相肽合成的氨基酸:



实施例 2

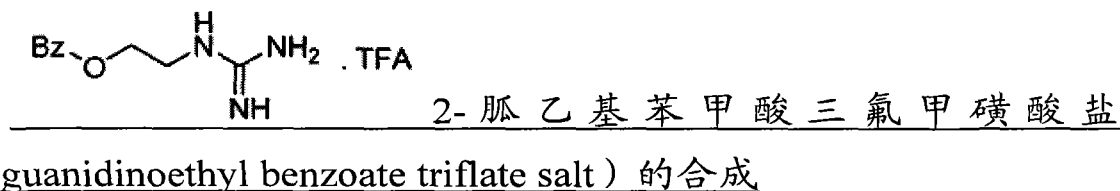


1-(2-(苄氧基)乙基)-N,N'-二-Boc-胍的合成

将 49.9 mg (1 mmol, 1 eq.) 的 NaH 在氮气下悬浮在 10 mL 的干燥 THF 中。将 298.3 mg (1 mmol, 1 eq.) 的 1-(6-羧乙基)-N,N'-二-Boc-胍在 10 mL 干燥 THF 中的溶液在 10 分钟内逐滴加入。该溶液在室温下搅拌 1 小时并逐滴加入 0.12 mL (1 mmol, 1 eq.) 的溴化苄。反应在室温下搅拌 2 小时 30 分钟并通过 TLC 检查。加入 44.9 mg (1 mmol, 1 eq.) 的 NaH。在 5 小时 30 分钟 (总反应时间) 之后, TLC 表明很少继续前进, 并允许反应搅拌过夜。加入一些水并在真空下除去有机溶剂。水相用乙醚提取三次。有机相在无水 Na₂SO₄ 上进行干燥并蒸发, 而获得 430.0 mg 的无色油状物。该油状物通过在硅石上的闪层析 (洗提液 AcOEt: 戊烷 1:9; R_f=0.26) 进

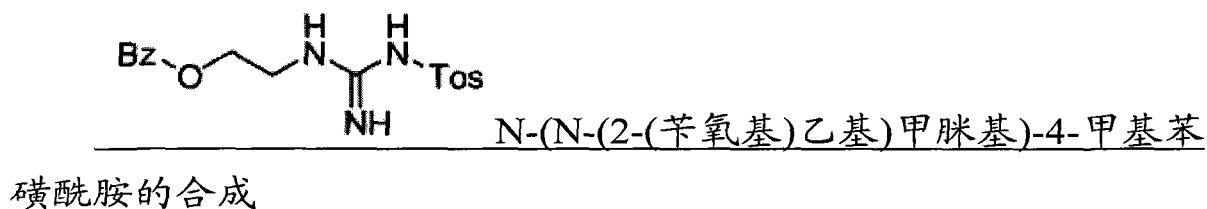
行纯化, 获得为无色油状物的 315.5 mg (0.8 mmol) 的 1-(2-(苄氧基)乙基)-N,N'-二-Boc-胍 (收率=80%)。

实施例 3



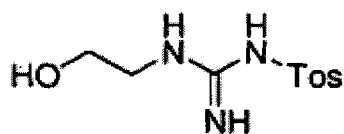
将 4 mL (52 mmol, 65 eq.) 的 TFA 加入到 315.5 mg (0.8 mmol, 1 eq.) 的 1-(2-(苄氧基)乙基)-N,N'-二-Boc-胍并在室温下搅拌 3 小时。蒸发该溶液, 获得 336.9 mg (1.1 mmol) 为浅橙色油状物的 2-胍乙基苯甲酸三氟甲磺酸盐 (收率=110%)。

实施例 4



将 164.5 mg (0.4 mmol, 1 eq.) 的 2-胍乙基苯甲酸三氟甲磺酸盐溶解在一定的丙酮中。加入 4 mL 的 4 M NaOH 溶液。将 86.1 mg (0.44 mmol, 1.1 eq.) 的甲苯-4-磺酰基-氯溶解在丙酮中并加入到该反应混合物中。反应在室温下搅拌 2 小时, 并将反应用 6 M HCl 溶液中和。真空下除去丙酮。水相用 AcOEt 提取 3 次。有机相在无水 Na₂SO₄ 上干燥并蒸发, 得到 174.8 mg 的无色油状物。白色晶体的形成在一周结束时发生。这些晶体用 AcOEt 洗涤以除去周围的油状物。83.8 mg (0.24 mmol) 的 N-(N-(2-(苄氧基)乙基)甲脒基)-4-甲基苯磺酰胺作为白色晶体回收 (收率=60%)。

实施例 5

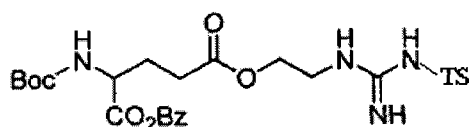


N-(N-(2-羟乙基)甲脒基)-4-甲基苯磺酰胺

的合成

将 83.8 mg (0.24 mmol) 的 N-(N-(2-(苄氧基)乙基)甲脒基)-4-甲基苯磺酰胺在氮气下溶解在 MeOH 中。加入几 mg 的在活性炭上的 10% 钯。在 H₂ 气氛下剧烈搅拌该反应之前，进行 3 次真空氢气冲洗。在 2 小时之后，通过 TLC (洗提液 AcOEt: 戊烷 9:1) 发现没有转化，并加入在活性炭上的起始钯的量的大约 5 倍的钯。反应搅拌过夜。TLC 表明形成更具极性的产物，除非反应远没有完成。加入 1 mL 的乙酸。在反应完成一小时之后。反应在硅藻土上过滤并蒸发溶剂，获得 62.8 mg (0.24 mmol) 为白色固体的 N-(N-(2-羟乙基)甲脒基)-4-甲基苯磺酰胺 (收率=100%)。

实施例 6



苯甲酸 1-亚氨基-13,13-二甲基-1-(4-

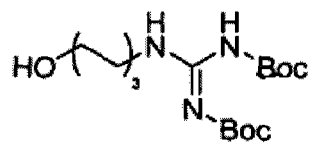
甲基苯基磺酰基)-6,11-二氧代-5,12-二氧杂-2,10-二氮杂十四烷-9-羧酸酐的合成

将 62.8 mg (0.24 mmol, 1 eq.) 的 N-(N-(2-羟乙基)甲脒基)-4-甲基苯磺酰胺和 82.7 mg (0.24 mmol, 1 eq.) 的 Boc-L-谷氨酸 1-苄酯在氮气下溶解在干燥二氯甲烷中。加入 7.45 mg (0.05 mmol, 0.2 eq.) 的 DMAP 和 55.3 mg (0.26 mmol, 1 eq.) 的 DCC。反应在室温下搅拌过夜。出现白色沉淀并通过过滤移出。真空下蒸发溶剂，获得 184.1 mg 的白色固体。将该白色固体溶解在二氯甲烷中并通过

制备的 TLC (洗提液纯 AcOEt, $R_f=0.65$) 进行纯化。回收得到无色油状的 83.2 mg (0.14 mmol) 的苯甲酸 1-亚氨基-13,13-二甲基-1-(4-甲基苯基磺酰基)-6,11-二氧代-5,12-二氧杂-2,10-二氮杂十四烷-9-羧酸酐 (收率=60%)。

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ = 1.12 (m, 1H), 1.41 (s, 9H), 1.86 (m, 1H), 2.18 (m, 1H), 2.39 (m, 5H), 3.41 (m, 1H), 3.61 (m, 1H), 4.01 (m, 1H), 4.26 (m, 1H), 4.35 (m, 1H), 5.17 (q, $J=11.98$ Hz, 2H), 5.33 (d, $J=8.83$ Hz, 1H), 6.49 (m, 2H), 7.22 (d, $J=8.20$ Hz, 2H), 7.34 (m, 5H), 7.77 (d, $J=8.19$ Hz, 2H)。

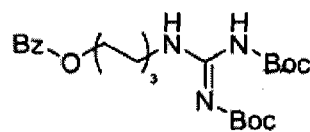
实施例 7



1-(6-羟己基)-N,N'-二-Boc-脲的合成

将 7.255 g (24.99 mmol, 1 eq.) 的 1,3-二-Boc-2-甲基异硫脲、4.101 g (34.98 mmol, 1.4 eq.) 的 6-氨基-1-己醇和 614.5 mg (5 mmol, 0.2 eq.) 的 DMAP 溶解在 140 mL 的二氯甲烷中。反应在室温下搅拌, 接着通过 TLC (洗提液 AcOEt:戊烷 3:7)。在大约 60 小时之后, 反应完成。真空下蒸发溶剂(在罩盖下并在 NaOCl 溶液中鼓入气体, 蒸发 MeSH)。获得的油状物溶解在二氯甲烷中(白色片状物仍然存在), 并用 1M KHSO_4 溶液洗涤 3 次, 用盐水洗涤 1 次。有机相在无水 Na_2SO_4 上干燥并在真空下蒸发溶剂, 获得 10.43 g 的无色油状物。该油状物通过在硅藻土上的闪层析(洗提液 AcOEt:戊烷 1:1; $R_f=0.43$) 进行纯化, 获得 8.447 g (23.50 mmol) 无色油状物的 1-(6-羟己基)-N,N'-二-Boc-脲(收率=94%), 该无色油状物过夜后变为白色固体。 $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ = 1.42 (m, 5H), 1.52 (s, 10H), 1.53 (s, 10H), 1.58 (t, $J=6.94$ Hz, 2H), 1.64 (m, 2H), 3.61 (m, 2H), 3.65 (t, $J=6.64$ Hz, 2H)。

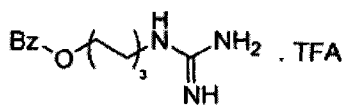
实施例 8



1-(2-(苄氧基)己基)-N,N'-二-Boc-脯的合成

将 1.300 g (32.49 mmol, 1.3 eq.) 的氢化钠在氮气下悬浮在 170 mL 的干燥 THF 中。将 8.983 g (24.99 mmol, 1 eq.) 溶解在干燥 THF 中的 1-(6-羧己基)-N,N'-二-Boc-脯逐滴加入到该悬浮液。反应在室温下搅拌 45 min。在 10 min 内逐滴加入 3.6 mL (29.99 mmol, 1.2 eq.) 的溴化苄。反应在室温下搅拌过夜。反应通过 TLC 检查并且反应没有完成。加入 0.833 g (20.82 mmol) 的氢化钠。在 1 小时之后, TLC 仍相同并加入 0.810 g (20.24 mmol) 的氢化钠。在 3 小时后, 在 TLC 上没有观察到变化, 加入 1.396 g (34.89 mmol) 的氢化钠和 1.6 mL (13.33 mmol) 的溴化苄。反应搅拌过夜并且 TLC 仍相同。反应通过加入水淬灭直至清亮溶液。真空除去 THF。水相用乙醚提取 3 次。有机相在无水 Na₂SO₄ 上干燥并蒸发, 获得 15.44 g 的浅黄色油状物。该油状物通过在硅藻土上的闪层析 (洗提液 AcOEt: 戊烷 1:9; R_f=0.43) 纯化, 获得 3.78 g 无色油状物的 1-(2-(苄氧基)己基)-N,N'-二-Boc-脯 (收率=34%)。¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 1.39 (m, 5H), 1.50 (s, 9H), 1.51 (s, 9H), 1.61 (m, 5H), 3.45 (m, 4H), 4.50 (m, 2H), 7.28 (m, 1H), 7.34 (m, 4H)。

实施例 9

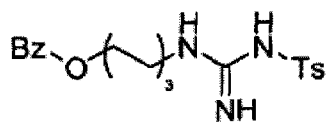


2-脯基己基苯甲酸三氟甲磺酸盐的合成

将 4.61 g (10.3 mmol, 1 eq.) 的 1-(2-(苄氧基)己基)-N,N'-二-Boc-脯溶解在 49 mL (669 mmol, 65 eq.) 的 TFA 中。反应在室温下搅

拌 3 小时。该 TFA 在真空下除去, 获得 6.06 g 的褐色油状物 (收率 =162%)。

实施例 10

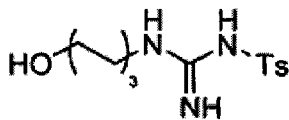


N-(N-(6-(苄氧基)己基)甲脒基)-4-甲基苯磺

酰胺的合成

将 6.06 g (10.3 mmol, 1 eq.) 的粗 2-胍基己基苯甲酸三氟甲磺酸盐溶解在丙酮中并加入 50 mL 的 4M NaOH 溶液。将 2.377 g (12.4 mmol, 1.2 eq.) 的甲苯-4-磺酰基-氯溶解在丙酮中并加入到反应混合物中。当褐色油状物在溶液上方出现时, 加入丙酮直至完全溶解。反应在室温下搅拌过夜。反应通过加入 37% HCl 溶液进行中和 (pH=6, 石蕊试纸)。真空下除去丙酮并将水相用 AcOEt 提取 3 次。有机相在无水 Na₂SO₄ 上干燥并蒸发溶剂, 获得 5.23 g 的浅黄色油状物。该油状物通过硅土上的闪层析 (洗提液 AcOEt: 戊烷 6:4; R_f=0.52) 纯化, 获得 3.20 g (7.9 mmol) 无色油状物的 N-(N-(6-苄氧基)己基)甲脒基-4-甲基苯磺酰胺 (收率 77%)。¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ= 1.27 (m, 5H), 1.44 (m, 2H), 1.55 (m, 2H), 2.38 (s, 3H), 3.11 (s, 2H), 3.44 (t, J=6.62 Hz, 3H), 4.48 (s, 2H), 6.30 (s, 3H), 7.22 (d, J=8.20, 2H), 7.28 (m, 1H), 7.33 (m, 2H), 7.73 (d, J=8.19 Hz, 2H)。

实施例 11

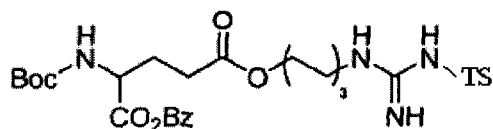


N-(N-(6-羟己基)甲脒基)-4-甲基苯磺酰胺的

合成

将 3.20 g (7.9 mmol) 的 N-(N-(6-苄氧基)己基)甲脒基)-4-甲基苯磺酰胺在氮气下溶解在 MeOH 中。加入几 mg 在活性炭上的 10% 钯。加入 1 mL 的乙酸。在 H₂ 气氛下剧烈搅拌反应之前进行 3 次真空氢气冲洗。反应在室温下剧烈搅拌 3 小时并通过 TLC 检查。发现没有转化并加入 2 mL 的乙酸。在 1 小时之后, TLC 表明没有转化并加入更多的在活性炭上的 10% 钯。在 3 天之后, TLC 表明完全转化并将溶液在硅藻土上过滤, 蒸发溶剂, 获得 2.480 g 浅黄色油状的 N-(N-(6-羟己基)甲脒基)-4-甲基苯磺酰胺 (收率=100%)。

实施例 12

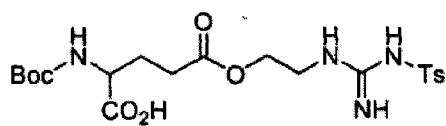


1-苄基 5-(6-(3-甲磺酰基胍基)己

基)-2-(叔丁氧基羰基氨基)戊二酸酯的合成

将 2.48 g (7.9 mmol, 1 eq.) 的 N-(N-(6-羟己基)甲脒基)-4-甲基苯磺酰胺和 2.67 g (7.9 mmol, 1 eq.) 的 Boc-L-谷氨酸 1-苄基酯在氮气下溶解在干燥二氯甲烷中。在室温下加入 198.9 mg (1.58 mmol, 0.2 eq.) 的 DMAP 和 1.810 g (8.7 mmol, 1.1 eq.) 的 DCC。反应搅拌过夜并出现白色沉淀。通过过滤移出该沉淀并蒸发溶剂, 获得 5.99 g 的混合黄色油状物/固体化合物。该化合物通过在硅土上的闪层析 (洗提液纯 AcOEt; R_f=0.71) 纯化, 获得 4.83 g 的浅黄色油状物 (收率=97%)。

实施例 13



1-亚氨基-17,17-二甲基-1-(4-甲基苯基亚磺酰氨基)-10,15-二氧代-9,16-二氧杂-2,14-二氮杂十八烷-13-羧酸的合成

将 103.6 mg (0.16 mmol) 的 1-苄基 5-(6-(3-甲磺酰基胍基)己基)-2-(叔丁氧基羰基氨基)戊二酸酯在氮气下溶解在 MeOH 中。加入几 mg 在活性炭上的 10% 钯。在 H₂ 气氛下剧烈搅拌反应 2 天之前进行 3 次真空氢气冲洗。反应在硅藻土上过滤并蒸发溶剂，获得 74.4 mg 的无色油状物 (收率=86%)。

<110> 保罗.博蒂 (Botti, Paolo)
<120> 增强向生物系统递送的装置和方法
<130> P25149VAP
<150> EP 06020286.8
<151> 2006-09-27
<150> EP 07013218.8
<151> 2007-07-05
<160> 1
<170> PatentIn version 3.3
<210> 1
<211> 20
<212> PRT
<213> homo sapiens
<400> 1
Asn Glu Glu Asp Asn Glu Ile Ser Met Leu Gln Glu Lys Glu Arg Glu
1 5 10 15

Phe Gln Glu Val
20

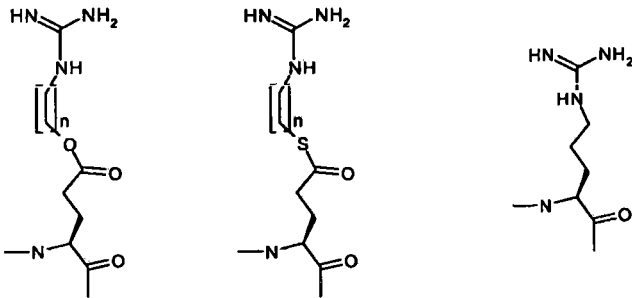


图 1

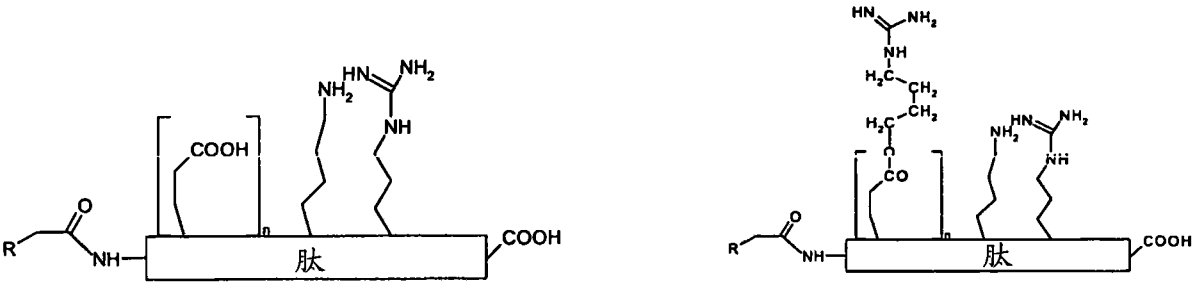


图 2

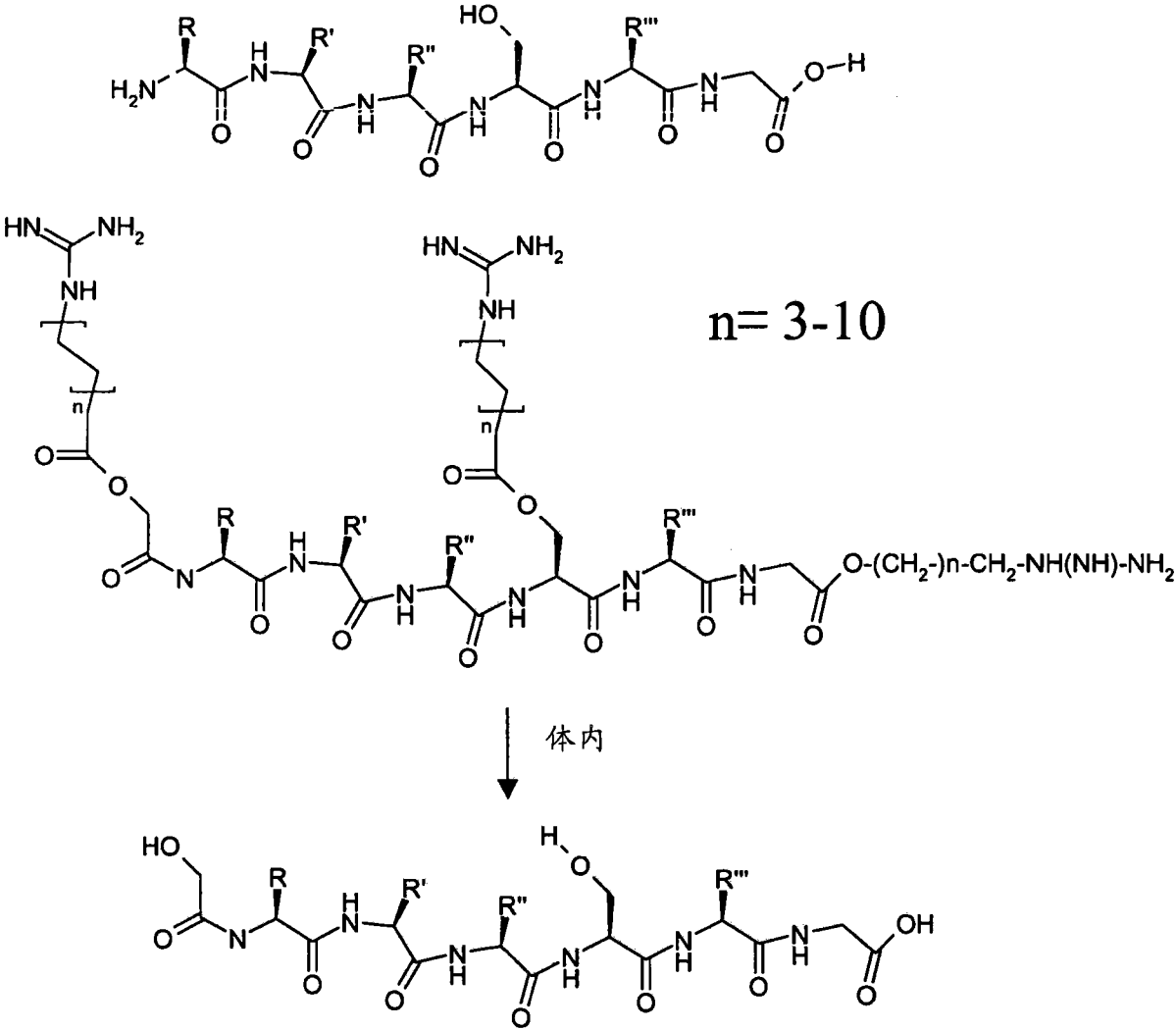


图 3

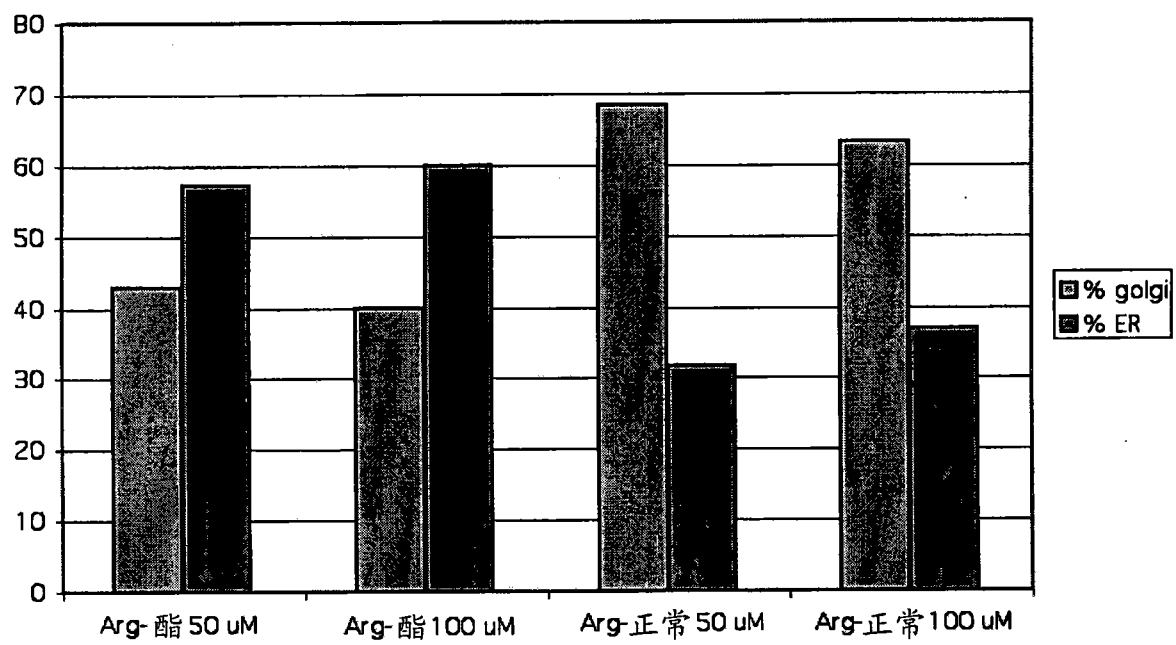


图 4

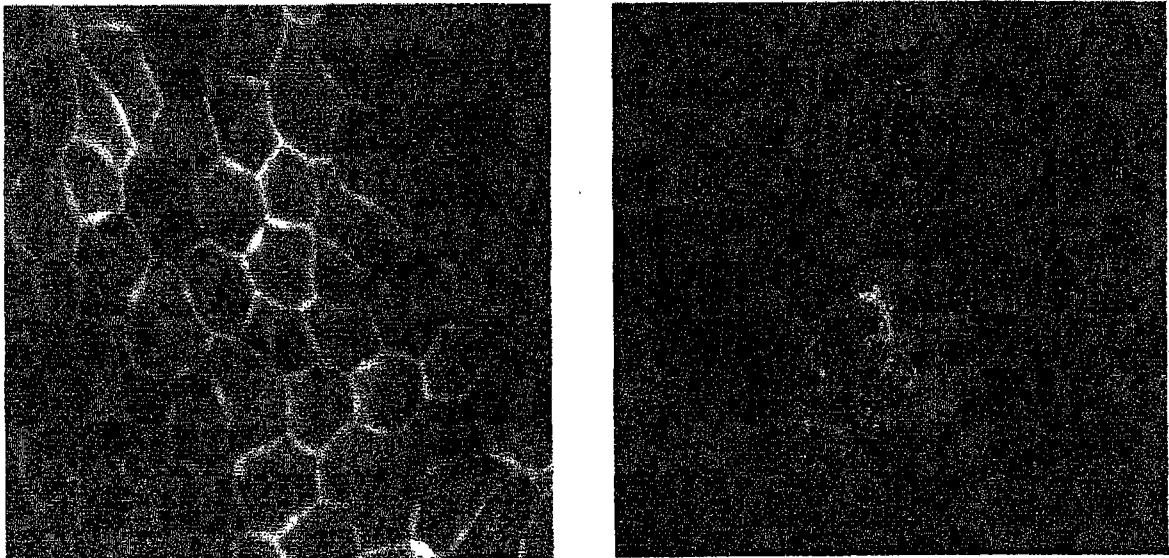


图 5

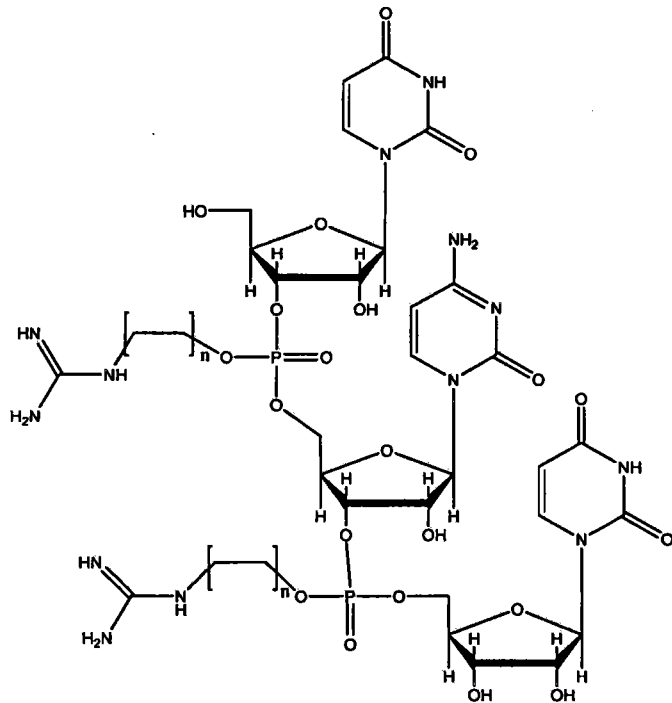


图 6

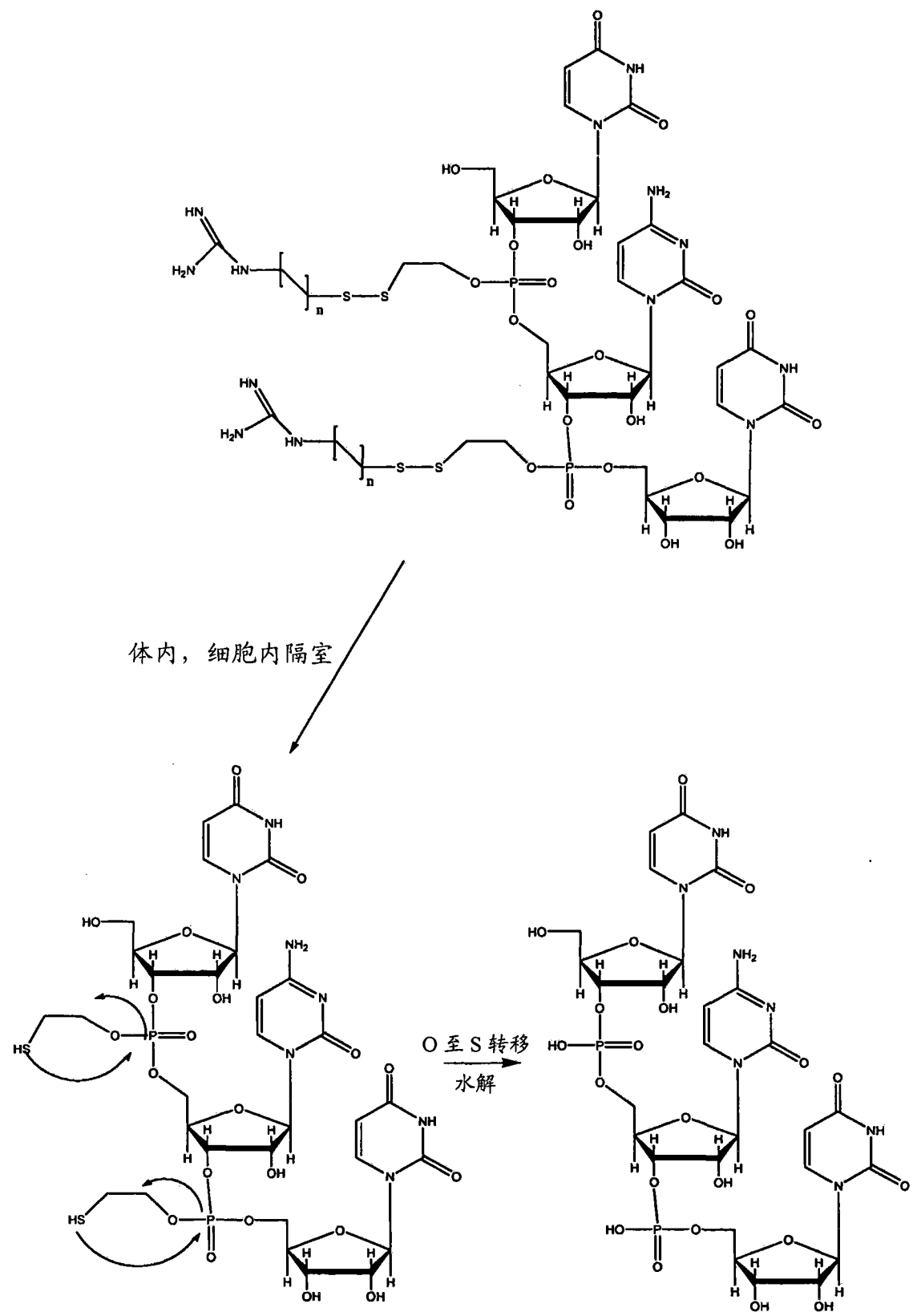
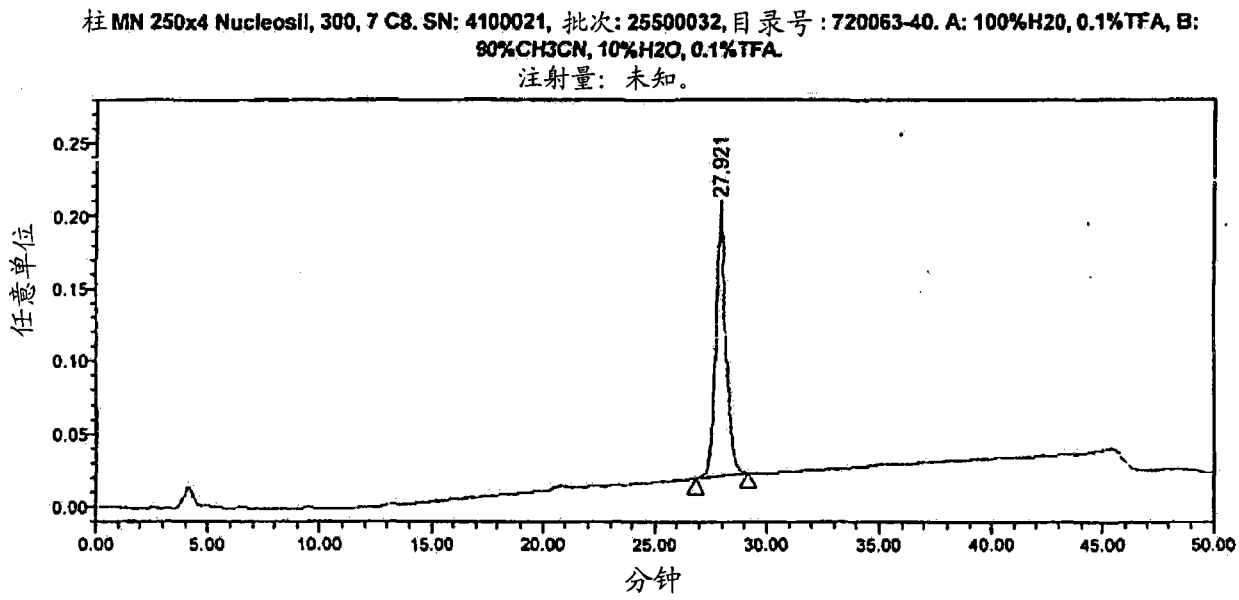


图 7



—— 样品名称 Imhof 最终 HPLC 双 ; 小瓶 3; 注射 1 次; 通道 W2996; 获取时间 25.04.2006 20:12:40

峰结果

	名称	RT	面积	%面积
1		27.921	5846531	100.00

图 8

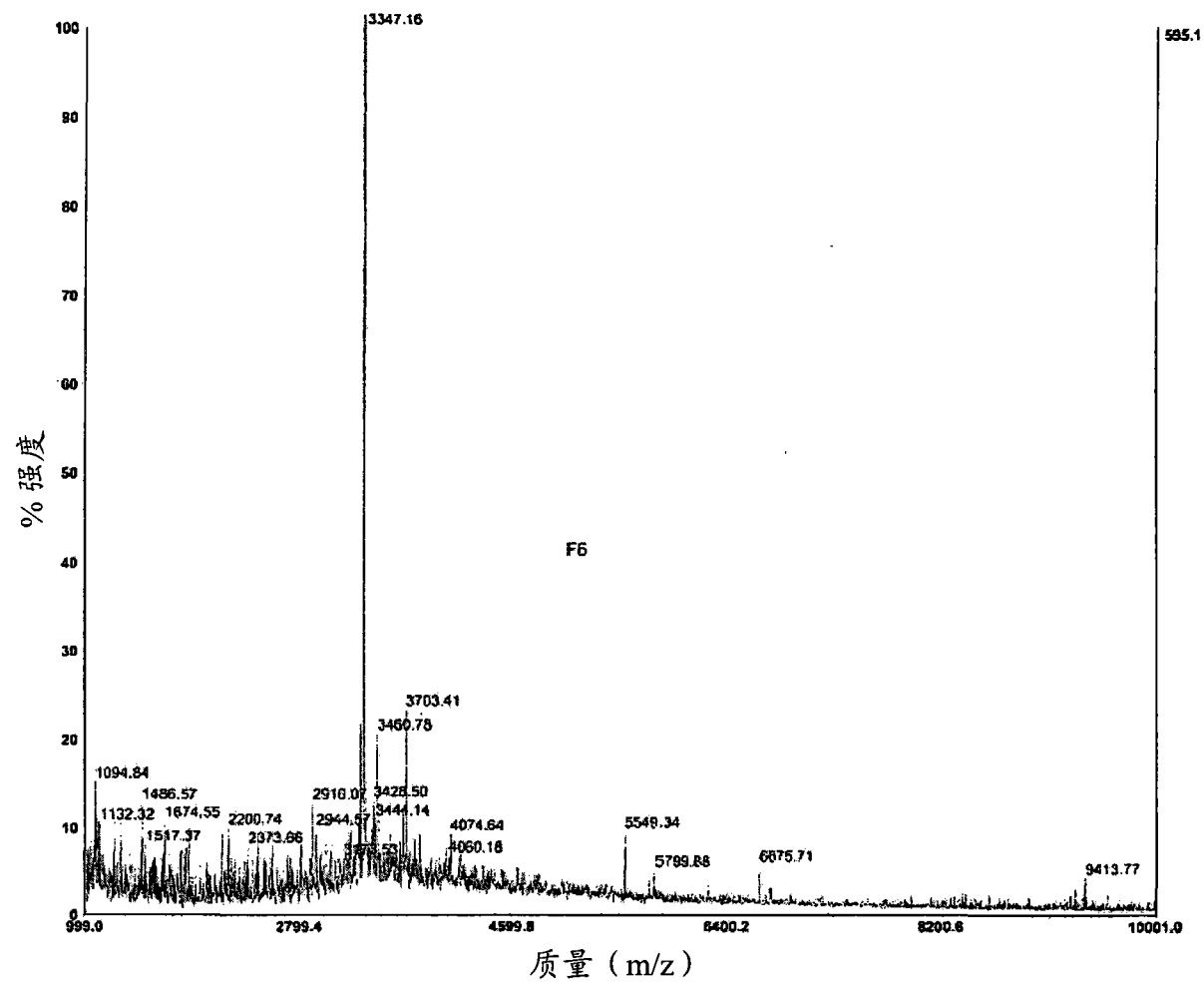


图 9