



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103429269 B

(45) 授权公告日 2016. 05. 11

(21) 申请号 201280013736. 1

(22) 申请日 2012. 03. 16

(30) 优先权数据

11305309. 4 2011. 03. 18 EP

61/590, 992 2012. 01. 26 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2013. 09. 17

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2012/054674 2012. 03. 16

(87) PCT国际申请的公布数据

W02012/126833 EN 2012. 09. 27

(73) 专利权人 巴斯德研究所

地址 法国巴黎

专利权人 国家科学研究中心

巴黎第十一大学

(72) 发明人 F·巴勒斯克 H·洛尔塔雅各布

D·博纳夫

(74) 专利代理机构 北京戈程知识产权代理有限公司

11314

代理人 程伟 韩文华

(51) Int. Cl.

A61K 47/48(2006. 01)

C07K 14/705(2006. 01)

A61P 31/18(2006. 01)

(56) 对比文件

EP 2087911 A1, 2009. 08. 12, 说明书摘要, 权利要求 1-20, 说明书第 87-114 段.

CN 101516909 A, 2009. 08. 26, 说明书摘要, 权利要求 1, 13, 17-23, 说明书第 10 页第 3-9 段.

审查员 王斯婷

权利要求书3页 说明书25页

序列表9页 附图7页

(54) 发明名称

含有与聚阴离子多肽偶联的、衍生自 CD4 受体的肽的用于治疗艾滋病的共轭分子

(57) 摘要

本发明涉及共轭分子及其制备方法, 所述共轭分子含有衍生自 CD4 受体的肽, 所述肽通过接头与有机分子偶联。所述有机分子包括 5 至 21 个氨基酸阴离子多肽。所述共轭分子可以用于抗病

1. 含有衍生自 CD4 受体的肽的共轭分子, 所述肽通过接头偶联至有机分子, 其中:

• 所述衍生自 CD4 受体的肽含有下列通用序列 (I):

$\text{Xaa}^f - \text{P1} - \text{Lys} - \text{Cys} - \text{P2} - \text{Cys} - \text{P3} - \text{Cys} - \text{Xaa}^g - \text{Xaa}^h - \text{Xaa}^i - \text{Xaa}^j - \text{Cys} - \text{Xaa}^k - \text{Cys} - \text{Xaa}^l - \text{Xaa}^m$, (I)

其中:

-P1 代表 3 至 6 个氨基酸残基,

-P2 代表 2 至 4 个氨基酸残基,

-P3 代表 6 至 10 个氨基酸残基,

-Xaa^f代表 N-乙酰半胱氨酸 (Ac-Cys) 或 3-巯基丙酸 (TPA),

-Xaa^g代表 Ala 或 Gln,

-Xaa^h代表 Gly 或 (D)Asp 或 Ser,

-Xaaⁱ代表 Ser 或 His 或 Asn,

-Xaa^j代表联苯基丙氨酸 (Bip)、苯丙氨酸或 [β]-萘基丙氨酸,

-Xaa^k代表 Thr 或 Ala,

-Xaa^l代表 Gly、Val 或 Leu, 且

-Xaa^m代表 -NH₂或 -OH,

P1、P2 和 P3 中的氨基酸残基是天然或非天然的, 相同或不同的, P1、P2 和 P3 中的所述残基都与 Lys 残基不同, 且 P1、P2 和 P3 具有共同或非共同的序列, 且

• 所述有机分子包括:

- 具有序列 S-(X-D-X-S)_n 的阴离子多肽, 其中 n 代表 1 至 5 之间的整数, S 代表丝氨酸且 D 代表天冬氨酸, 并且 X 选自酪氨酸、磺基酪氨酸、酪氨酸磺酸酯、氨基辛二酸、和对-羧甲基苯丙氨酸, 其中各 X 基团相同或不同,

- 分子基团 A-Z, 其中:

○ A 包括选自如下的式 -CO(CH₂)₃NH-CO(CH₂)₂-、-CO(CH₂)_p-NH-CO-(CH₂)_q-、-CO(CH₂-CH₂)-(O-CH₂-CH₂)_p-NH-CO-(CH₂)_q-、-CO(CH₂)_p-NH-CO-(CH₂-CH₂-O)_q-(CH₂-CH₂)- 和 -CO(CH₂-CH₂)-(O-CH₂-CH₂)_p-NH-CO-(CH₂-CH₂-O)_q-(CH₂-CH₂)-, 其中 p 代表包括在 1 和 10 之间的整数, q 代表包括在 1 和 10 之间的整数, 其中第一个羰基偶联至阴离子多肽的 N-端, 以及

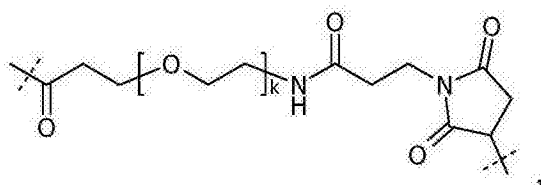
○ Z 表示卤原子、巯基或马来酰亚胺基,

所述阴离子多肽通过式 A-Z 的所述分子基团被连接至接头, 以及所述接头在其末端之一共价结合至所述衍生自 CD4 受体的肽的通用序列 (I) 中存在的氨基酸残基 Lys 的游离氨基 (-NH₂), 并且所述接头在其另一末端共价结合至所述有机分子的 Z 基团。

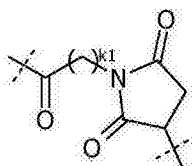
2. 根据权利要求 1 所述的共轭分子, 其中 A 代表式 -CO(CH₂)₃NH-CO(CH₂)₂- 的基团。

3. 根据权利要求 1 所述的共轭分子, 其中所述通用序列 (I) 的衍生自 CD4 受体的肽的序列选自序列 SEQ ID No. 1 或 SEQ ID No. 2。

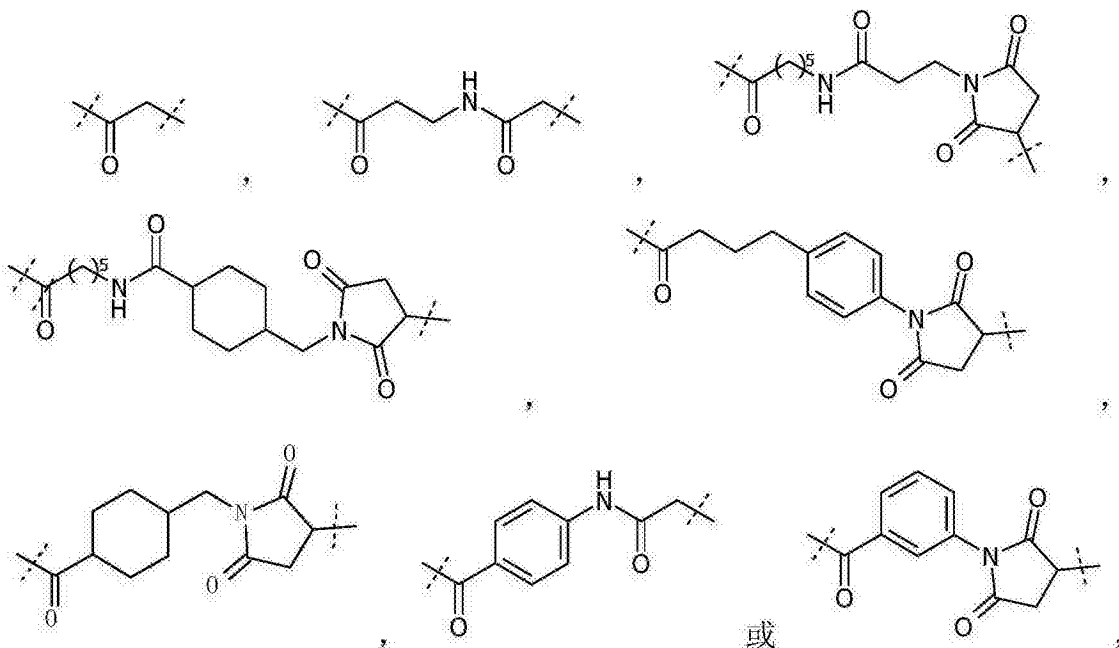
4. 根据权利要求 1 所述的共轭分子, 其中所述接头选自:



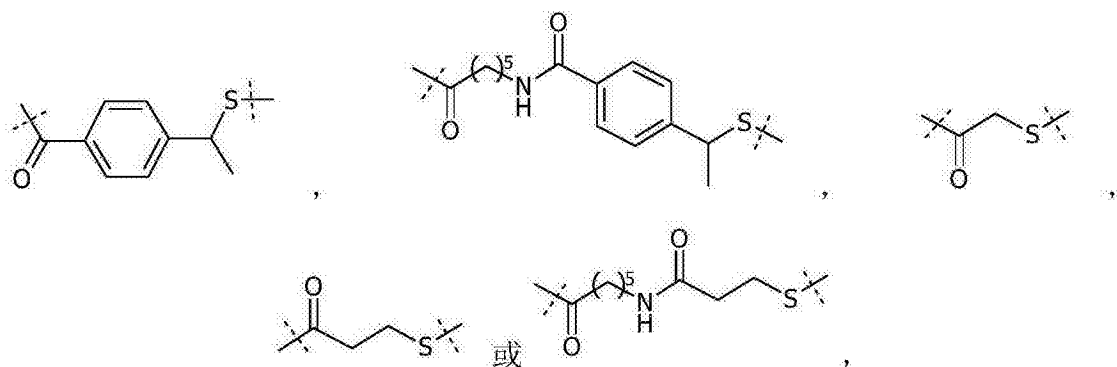
其中 k 代表包括在 2 至 24 之间的整数,



其中 k_1 代表等于 1、2、3、5 和 10 的整数,



当 Z 代表巯基时,以及选自:



当 Z 代表马来酰亚胺基团或卤原子时。

5. 根据权利要求 1 所述的共轭分子,其中所述阴离子多肽由 13 个氨基酸组成。
6. 根据权利要求 1 所述的共轭分子,其中所述各 X 基团相同。
7. 根据权利要求 1 所述的共轭分子,其中 X 为磺基酪氨酸。
8. 根据权利要求 1 所述的共轭分子,其中所述阴离子多肽具有序列 S-X-D-X-S-X-D-X-S-X-D-X-S (SEQ ID NO:19)。
9. 根据权利要求 1 所述的共轭分子,其中所述阴离子多肽具有选自如下的序列:
S-(Y-D-Y-S)_n、S-(Y_{S03}-D-Y_{S03}-S)_n、S-(Y_{SN}-D-Y_{SN}-S)_n、S-(pF-D-pF-S)_n 和 S-(Asu-D-Asu-S)_n,

其中 n 代表包括在 1 和 5 之间的整数, S 代表丝氨酸和 D 代表天冬氨酸, Y 代表酪氨酸, Y_{S03} 代表磺基酪氨酸, Y_{SN} 代表酪氨酸磺酸酯, pF 代表对 - 羧甲基苯丙氨酸以及 Asu 代表氨基辛二酸。

10. 根据权利要求 1 所述的共轭分子, 其中所述阴离子多肽具有选自如下的序列: S-Y-D-Y-S-Y-D-Y-S-Y-D-Y-S (SEQ ID NO:8)、S- Y_{S03} -D- Y_{S03} -S- Y_{S03} -D- Y_{S03} -S- Y_{S03} -D- Y_{S03} -S (SEQ ID NO:4)、S- Y_{SN} -D- Y_{SN} -S- Y_{SN} -D- Y_{SN} -S- Y_{SN} -D- Y_{SN} -S (SEQ ID NO:5)、S-pF-D-pF-S-pF-D-pF-S-pF-D-pF-S (SEQ ID NO:6)、S-Asu-D-Asu-S-Asu-D-Asu-S-Asu-D-Asu-S (SEQ ID NO:7)、S- Y_{S03} -D- Y_{S03} -S- Y_{S03} -D-Y-S-Y-D-Y-S (SEQ ID NO:20) 和 S-Y-D-Y-S-Y-D- Y_{S03} -S- Y_{S03} -D- Y_{S03} -S (SEQ ID NO:21), 其中 S 代表丝氨酸, D 代表天冬氨酸, Y 代表酪氨酸, Y_{S03} 代表磺基酪氨酸, Y_{SN} 代表酪氨酸磺酸酯, pF 代表对 - 羧甲基苯丙氨酸以及 Asu 代表氨基辛二酸。

11. 根据权利要求 1 所述的共轭分子, 其中:

- 衍生自 CD4 受体的肽选自序列 SEQ ID NO:1 和 SEQ ID NO:2,
- 接头是 $CO-(CH_2CH_2O)_2CH_2CH_2NHC(O)(CH_2)_2$ - 吡咯烷基 -2,5- 二酮,
- 有机分子包括具有如下序列的阴离子多肽: 如权利要求 10 中所定义的 S- Y_{S03} -D- Y_{S03} -S- Y_{S03} -D- Y_{S03} -S- Y_{S03} -D- Y_{S03} -S, 其通过式 A-Z 的分子基团连接至接头, 其中 A 是 $-CO(CH_2)_3NH-CO(CH_2)_2-$ 以及 Z 是巯基。

12. 根据权利要求 1-11 任一项所述的共轭分子用于制备治疗艾滋病的药物的用途。

13. 药物组合物, 其含有根据权利要求 1-11 任一项所述的共轭分子以及药学上可接受的载体。

14. 制备根据权利要求 1-11 任一项所述的共轭分子的方法, 其特征在于所述方法包括下列步骤:

a. 用带有两个活性基团的双官能化合物接触如权利要求 1 所定义的通用序列 (I) 的衍生自 CD4 受体的肽, 从而两个活性基团中的一个与存在于通用序列 (I) 中的氨基酸 Lys 残基的游离氨基 ($-NH_2$) 形成共价键, 以获得带有双官能团的第二活性基团的活化肽, 以及

b. 用如权利要求 1 所定义的带有官能团的有机分子接触步骤 (a) 中获得的活化肽, 从而所述活化肽的活性基团与有机分子的官能团形成共价键, 以获得所述共轭分子。

15. 制备根据权利要求 1-11 任一项所述的共轭分子的方法, 其特征在于所述方法包括下列步骤:

a. 用带有两个活性基团的双官能化合物接触如权利要求 1 所定义的通用序列 (I) 的衍生自 CD4 受体的肽, 从而两个活性基团中的一个与存在于通用序列 (I) 中的氨基酸 Lys 残基的游离氨基 ($-NH_2$) 形成共价键, 以获得带有双官能团的第二活性基团的活化肽, 以及

b. 用相当于如权利要求 1 所定义的带有巯基的有机分子接触步骤 (a) 中获得的活化肽, 其中巯基 (SH) 已被保护性巯基保护, 从而所述活化肽的活性基团与有机分子的巯基官能团形成共价键, 以获得所述共轭分子。

含有与聚阴离子多肽偶联的、衍生自 CD4 受体的肽的用于治疗艾滋病的共轭分子

技术领域

[0001] 本发明涉及含有衍生自 CD4 受体的肽和有机分子的共轭分子,有机分子例如聚阴离子多肽。该共轭分子可以用于抗病毒治疗,也就是用于艾滋病的治疗。本发明进一步涉及制备所述共轭分子的方法。

背景技术

[0002] 在大量血清反应阳性的 HIV 患者中,结合核苷(NRTI)、非 - 核苷(NNRTI)和 / 或蛋白酶抑制剂(PI)的三联疗法导致病毒载量(viral charge)降低至检测水平以下。这些治疗同时靶向逆转录和蛋白质水解。这种功效已经导致由 HIV 感染导致的死亡数目的本质的减少。但不幸地,约 80% 的患者显示了抗病毒抗性的基因型,更忧虑地,45.5% 的病毒群对 NRTI/PI 联合治疗具有抗性,而 26% 对三种抗 - HIV 类的联合治疗具有抗性(Tamalet 等人, AIDS. 2003Nov7; 17(16):2383 - 8)。这种观察特别令人不安,是因为在 70% 接受治疗的患者中发现长期三联疗法治疗的副作用(皮下脂肪萎缩、脂肪营养不良、高三酸甘油酯血症、高胆固醇血症、神经病等)导致顺应性差以及通常导致抗性的治疗“突然”停止。因此,优先考虑开发具有较少副作用和没有交叉抗性的较低严重形式的治疗,尽管市场上目前可以得到大量的药物。鉴于此,有必要以 HIV 复制步骤为靶向,而非逆转录和蛋白质水解。

[0003] 在病毒性感染循环中,病毒进入细胞是重要步骤。该过程被分成两个阶段:第一,病毒在细胞表面与特定宿主受体相互作用,接着病毒遗传物质渗透入靶细胞。关于 HIV,参与粘附和进入机制的分子伴侣已很好地确定。gp120 病毒包膜糖蛋白,通过结合宿主细胞的跨膜糖蛋白 CD4,本质上决定病毒 / 细胞相互作用的复合物。这种相互作用导致 gp120 中构象的改变, gp120 暴露出特定的表位,称为 CD4- 诱导(CD4i),因此建立趋化因子受体(基本上为 CCR5 和 CXCR4)的结合位点。因此,CCR5 和 CXCR4 在细胞表面充当 gp120 共受体。第二种相互作用导致 gp120/gp41 蛋白质复合物的重新组织和细胞 / 病毒膜融合的开始。

[0004] 通过所用共受体的类型定义 HIV 病毒的细胞趋向性。更具体地说,所谓的 X4 或“T 向性(T - tropic)”病毒倾向于感染在它们的表面表达 CXCR4 的细胞株,例如 T 淋巴细胞。所谓的 R5 或“M 向性(M - tropic)”病毒使用共受体 CCR5 且主要感染巨噬细胞和单核细胞。R5 或 X4 病毒的存在通常与完全不同的艾滋病发展阶段相关(对 R5 无症状阶段, X4 病毒的出现通常与不利的疾病发展结果相联系,表明共受体 CXCR4 的用途是艾滋病发病机理的重要因素)。由于 gp120 带有对 CCR5 和 CXCR4 识别的结构决定簇,所以 R5 和 X4 病毒代表两种分开的靶标。

[0005] 国际专利申请 W02008/015273 中显示,衍生自 CD4 受体的特定活化的肽可以和有机分子选择性反应,提供化学定义地共价共轭物。这种活化需要在衍生自 CD4 受体的肽序列中的特定位置上插入一个且只有一个氨基酸残基赖氨酸。这种插入允许在 miniCD4 合成和纯化之后,通过接头将有机化合物和化学物(chemistries)偶联。

[0006] W02009/098147 中公开了多种潜在抗病毒衍生物,抗病毒衍生物由包含 CD4 肽的

共轭分子组成,其中 CD4 肽通过接头特异性地偶联至聚阴离子硫酸类肝素(HS)。这些共轭物表现出强大的抗病毒活性。通过 gp120 中存在至少两种不同的 HS 识别位点激发 HS 的作用,即 V3 可变环和 CD4 (CD4i)诱导的位点:mCD4-HS 的 CD4 部分(moiety)被认为是通过直接相互作用触发 gp120 的构象变化,因此导致 CD4i 表位的暴露,然后共价结合的 HS 可以与 CD4i 表位相互作用,从而削弱 X4 和 R5 细胞系的 HIV 病毒感染。

[0007] 由抑制病毒附着至细胞组成的这种方法是治疗有利的,因为它直接靶向病毒而非细胞本身。因此,其没有用结合至共受体的疗法所观察到的细胞作用。另外,考虑到保留作为各种病毒向性功能而参与其中的位点,根据本发明的化合物应当与不同的病毒分离株的 gp120 相互作用。尽管可能误导认为绝不会产生抗性,无论如何可以预期和其它治疗相比它将以低得多的比例发生。事实上, gp120 的 CD4 位点需保持完整以便继续结合 CD4,如参与和聚阴离子多糖的结合以便与共受体相互作用的碱性残基。这两个位点中任何一个突变的确都将导致病毒传染性降低。

[0008] 本发明人现在已经鉴定了一种新共轭分子,其能够阻断 HIV 病毒进入到细胞中。它们表明, mCD4 共轭分子中存在硫酸类肝素低聚糖,对于抑制病毒进入 X4 或 R5 细胞系而言不是绝对必需的,并且通过由 5 至 21,有利地 5 至 17、特别是 5、9、13、17 或 21,优选 13 个氨基酸组成的阴离子多肽代替以前所用的 HS 分子,也可以得到非常有效的抗病毒活性。在一个优选的实施方式中,一些氨基酸带负电荷,特别是至少 1 个,有利地至少 2 个,优选至少 3 个。在更优选的实施方式中,3、4、5、6、7、8、9、10、11、12 或 13 个氨基酸带负电荷(取决于阴离子多肽的长度)。在最优选的实施方式中,当阴离子多肽由 13 个氨基酸组成时,9 个氨基酸带负电荷。更重要的是,它们还表明,令人惊讶的是,这些新 mCD4 共轭分子(包括所述阴离子多肽),相较于现有技术中所公开的共轭分子,对 R5 或 X4 病毒都具有更好的抗病毒活性。

发明内容

[0009] 根据第一方面,本发明涵盖含有衍生自 CD4 受体的肽的共轭分子,所述肽通过接头被偶联至有机分子,其中

[0010] • 所述衍生自 CD4 受体的肽含有下列通用序列(I):

[0011] $\text{Xaa}^f\text{-P1-Lys-Cys-P2-Cys-P3-Cys-Xaa}^g\text{-Xaa}^h\text{-Xaa}^i\text{-Xaa}^j\text{-Cys-Xaa}^k\text{-Cys-Xaa}^l\text{-Xaa}^m$, (I)

[0012] 其中:

[0013] -P1 代表 3 至 6 个氨基酸残基,

[0014] -P2 代表 2 至 4 个氨基酸残基,

[0015] -P3 代表 6 至 10 个氨基酸残基,

[0016] -Xaa^f代表 N-乙酰半胱氨酸(Ac-Cys)或巯基丙酸(thiopropionic acid)(TPA),

[0017] -Xaa^g代表 Ala 或 Gln,

[0018] -Xaa^h代表 Gly 或(D) Asp 或 Ser,

[0019] -Xaaⁱ表示 Ser 或 His 或 Asn,

[0020] -Xaa^j代表联苯基丙氨酸(Bip)、苯丙氨酸或[β]-萘基丙氨酸,

[0021] -Xaa^k代表 Thr 或 Ala,

[0022] -Xaa^l代表 Gly、Val 或 Leu, 并且

[0023] -Xaa^m的代表 -NH₂或 -OH,

[0024] P1、P2 和 P3 中氨基酸残基是天然的或非天然的, 相同或不同的, P1、P2 和 P3 的所述残基均不同于 Lys 残基, 并且 P1、P2 和 P3 具有共同的或不同的序列, 以及

[0025] • 所述有机分子包括

[0026] - 阴离子多肽, 其由 5 至 21, 有利地 5 至 17, 优选 13 个天然或非天然的、相同或不同的氨基酸残基组成, 其中至少 3 个, 特别是 3 至 15, 如 3 至 13 个氨基酸带负电荷,

[0027] - 分子基团 A-Z, 其中:

[0028] ○ A 包括选自如下的式 -CO(CH₂)₃NH-CO(CH₂)₂-、-CO(CH₂)_p-NH-CO-(CH₂)_q-、-CO(CH₂-CH₂)-(O-CH₂-CH₂)_p-NH-CO-(CH₂)_q-、-CO(CH₂)_p-NH-CO-(CH₂-CH₂-O)_q-(CH₂-CH₂)-和 -CO(CH₂-CH₂)-(O-CH₂-CH₂)_p-NH-CO-(CH₂-CH₂-O)_q-(CH₂-CH₂)-, 其中 p 代表包括在 1 和 10 之间的整数, q 代表包括在 1 和 10 之间的整数, 其中第一个羰基偶联至 N-端丝氨酸的 α NH₂, 有利地 A 代表式 -CO(CH₂)₃NH-CO(CH₂)₂- 的基团, 以及

[0029] ○ Z 表示卤原子、巯基或马来酰亚胺基团,

[0030] 所述阴离子多肽通过式 A-Z 的所述分子基团被连接至接头, 以及所述接头在其末端之一共价结合至所述衍生自 CD4 受体的肽的通用序列(I)中存在的氨基酸残基 Lys 的游离氨基(-NH₂), 并且所述接头在其另一末端共价结合至所述有机分子的 Z 基团。

[0031] 优选 P3 含有至少一个碱性氨基酸, 所述碱性氨基酸甚至更优选为精氨酸。在 CD4 受体片段该部分中存在碱性氨基酸残基有助于其结合 gp120 蛋白。因此, 本 发明人更优选将至少一个碱性氨基酸引入 P3, 优选精氨酸。因此, 其保持了在 pH7-8 时在衍生物中不反应的碱性部分, 但是发现该碱性部分对于 miniCD4 肽结合 gp120 蛋白是有用的。

[0032] 在本申请中, 术语“miniCD4 肽”、“CD4 肽”和“miniCD4”可互换使用, 表示衍生自 CD4 受体的肽, 其包括或由上面定义的通用序列(I)组成。

[0033] 如 W02009/098147 中所公开的, 要求本发明的 miniCD4 肽包含一个且只有一个赖氨酸(Lys)氨基酸残基, 且所述赖氨酸位于通用序列(I)中所定义的位置。通用序列(I)中的 Cys 残基允许形成三个 miniCD4 折叠回来所需的二硫键。当它位于通用序列(I)的肽的 N-端位置时, 巯基丙酸(TPA)使得有可能降低 N-端的阻碍并克服胺基团的存在。因此, 根据一个优选的实施方案, Xaa^f代表通用序列(I)中的 TPA。

[0034] Bip 增加在腔中与糖蛋白 gp120 的接触, 其中 CD4 受体的 Phe43 位于腔中。因此, 在一个优选的实施方案中, Xaa^j代表 Bip。无论如何, 有利地在通用序列(I)中令 Phe 作为 Xaa^j, 因为结构分析表明这种 miniCD4 可有效模拟 CD4 (Huang CC 等人, Structure. 2005May;13(5):755-68)。因此, 根据另一个优选的实施方案, Xaa^j代表 Phe。

[0035] 衍生自 CD4 受体的通用序列(I)的肽形成 α-螺旋结构, 随后是 β 片层。氨基酸 Xaa^g-Xaa^h-Xaaⁱ-Xaa^j-Cys-Xaa^k-Cys-Xaa^l参与 gp120 结合的重要途径。这些肽显示和 sCD4 (可溶性 CD4) 相似的 IC₅₀ (对 gp120 的亲性)。

[0036] 可以通过常规固相化学合成技术制备本发明的 CD4 肽, 例如根据 Fmoc 固相肽合成方法(“Fmoc solid phase peptide synthesis, a practical approach”, W. C. Chan 和 P. D. White 编辑, Oxford University Press, 2000)和 / 或通过基因重组。

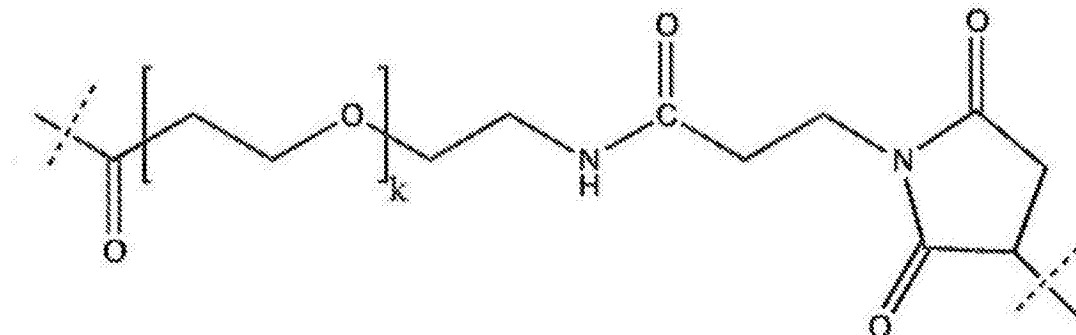
[0037] 优选地, 所述 CD4 肽选自序列 SEQ ID NO:1 和 SEQ ID NO:2。更优选地, 本发明的

CD4 肽具有 SEQ ID NO :1 所示的序列。

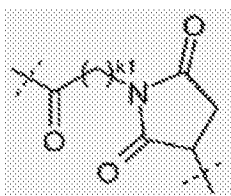
[0038] 在本发明中术语“接头”是指通过如下所定义的双官能化合物与衍生自 CD4 受体的肽和有机分子偶联所获得的接头。因此,接头的长度随所用双官能化合物的功能而变化。

[0039] 特别是,接头有利地选自:

[0040]



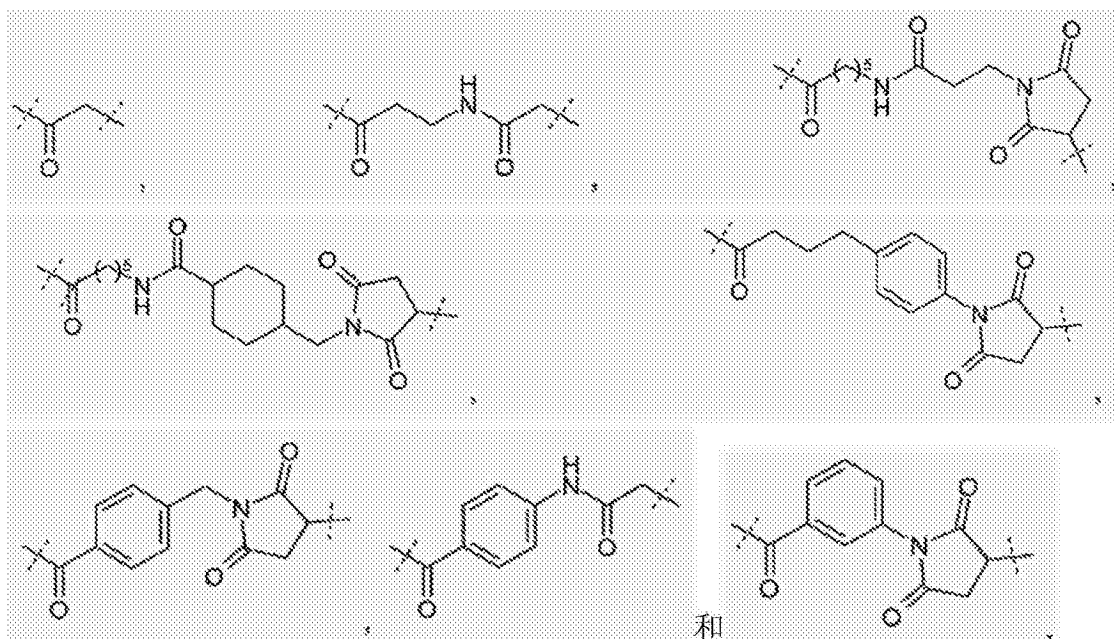
[0041] 其中 k 代表包括在 2 至 24 之间的整数, 有利地 2、4、8 或 12,



[0042]  k1 代表包括在 1 和 10 之间的整数,因此等于 1、2、3、4、5、6、7、8、

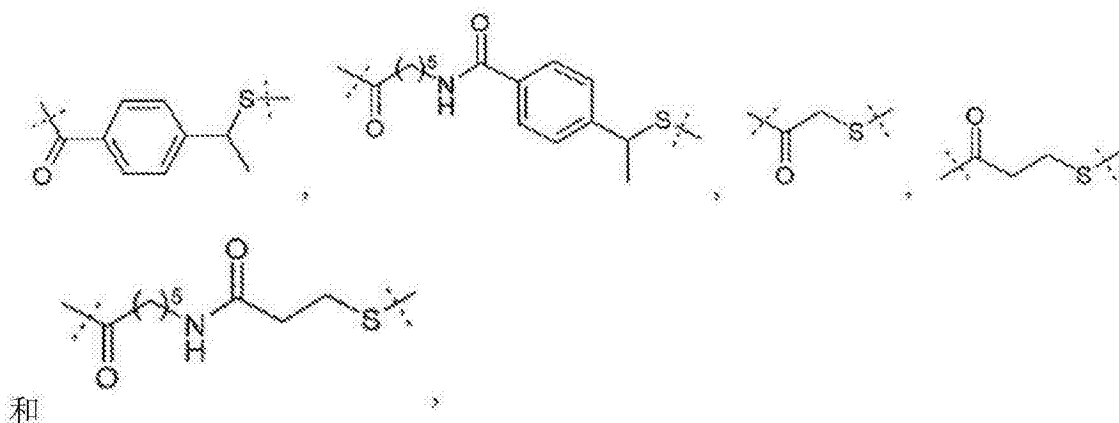
9 或 10, 有利地等于 1、2、3、5 或 10,

[0043]



[0044] 当 Z 代表巯基时, 以及选自:

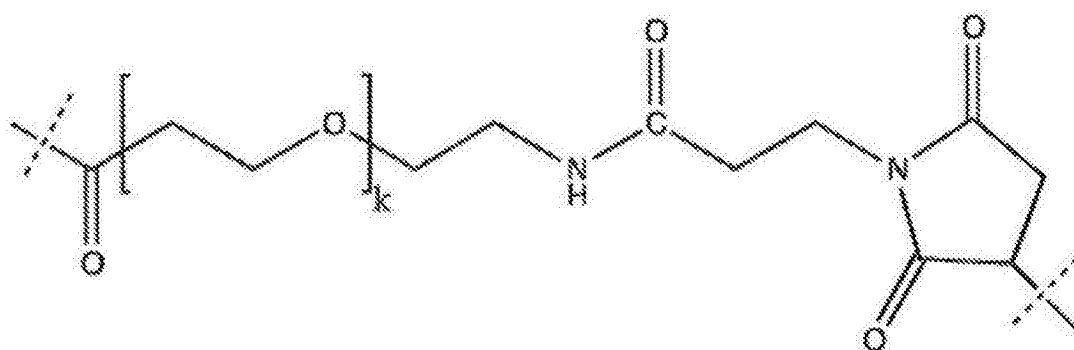
[0045]



[0046] 当 Z 代表马来酰亚胺基团或卤原子时。

[0047] 在一个优选的实施方式中,接头选自:

[0048]



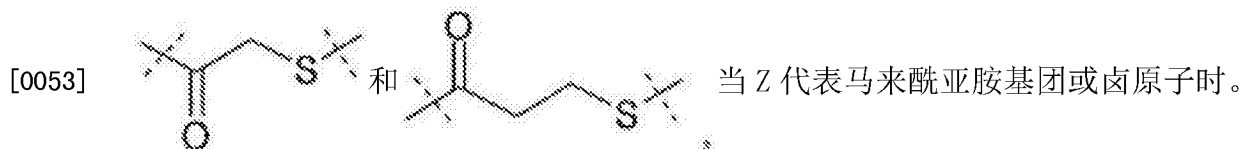
[0049] k 代表包括在 2 至 24 之间的整数,有利地 2、4、8 或 12,以及



3、4、5、6、7、8、9 或 10,有利地等于 1、2、3、5 或 10,

[0051] 当 Z 代表巯基时,

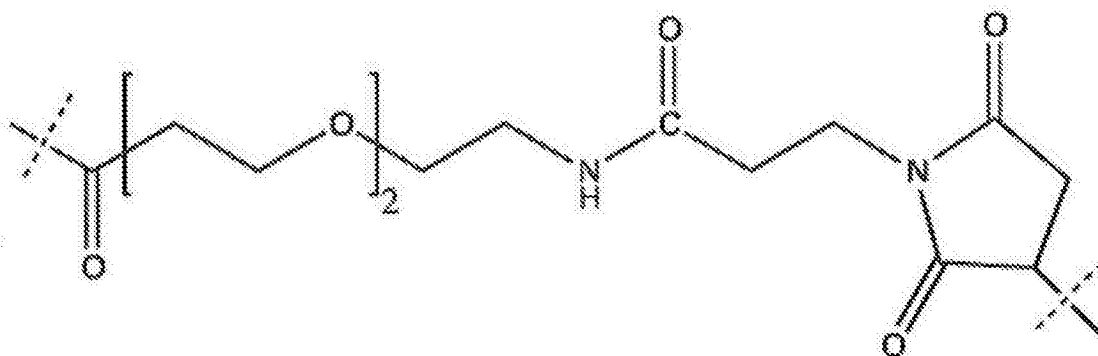
[0052] 选自:



[0054] 从而这样的接头对应着使用琥珀酰亚胺基-6-[β-马来酰亚胺基丙酰氨基]己酸酯(SMPH)、NHS-PEO_n-马来酰亚胺(其中 n 代表包括在 2 至 24 之间的整数,有利地 2、4、8 或 12)、SATA (N-琥珀酰亚胺基-S-乙酰硫代乙酸酯)和 SATP (N-琥珀酰亚胺基-S-乙酰硫代丙酸酯)作为双官能化合物。

[0055] 在另一个优选的实施方式中,接头是

[0056]



[0057] 本发明的共轭分子包括阴离子多肽,所述阴离子多肽由 13 个氨基酸组成,其中 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12 或 13 个氨基酸残基带负电荷。在一个优选的实施方案中,阴离子多肽由 13 个氨基酸组成,其中 9 个氨基酸残基带负电荷。

[0058] 有利地,本发明的阴离子肽通过 N-端连接至式 I 化合物的 A 基团。有利地,所述阴离子肽和 A 基团之间形成的键是肽键,因此包括所述肽的氨基(NH₂)和 A 基团上的羧基(COOH)。

[0059] 不受理论的约束,可以认为所述 13 个氨基酸长的阴离子多肽减弱了 CD4i 暴露位点和 CXCR4 (或 CCR5) 趋化因子受体之间的相互作用,从而减弱细胞 / 病毒膜融合的启动。

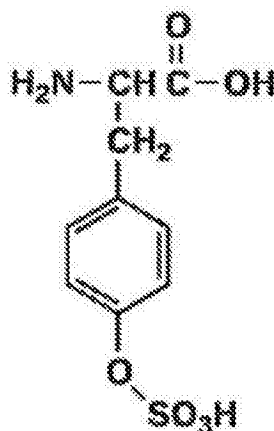
[0060] 在本发明这个意义上,“氨基酸”是指所有 D 或 L 形式的天然 α-氨基酸残基(例如丙氨酸(Ala)、精氨酸(Arg)、天冬酰胺(Asn)、天冬氨酸(Asp)、半胱氨酸(Cys)、谷氨酰胺(Gln)、谷氨酸(Glu)、甘氨酸(Gly)、组氨酸(His)、异亮氨酸(Ile)、亮氨酸(Leu)、赖氨酸(Lys)、蛋氨酸(Met)、苯丙氨酸(Phe)、脯氨酸(Pro)、丝氨酸(Ser)、苏氨酸(Thr)、色氨酸(Trp)、酪氨酸(Tyr)和缬氨酸(Val)),以及非天然氨基酸(例如,β-丙氨酸、烯丙基甘氨酸、叔亮氨酸、正亮氨酸(Nle)、3-氨基己二酸、2-氨基苯甲酸、3-氨基苯甲酸、4-氨基苯甲酸、2-氨基丁酸、4-氨基-1-羧甲基哌啶、1-氨基-1-环丁烷羧酸、4-氨基环己基乙酸、1-氨基-1-环己烷羧酸、(1R,2R)-2-氨基环己烷羧酸、(1R,2S)-2-氨基环己烷羧酸、(1S,2R)-2-氨基环己烷羧酸、(1S,2S)-2-氨基环己烷羧酸、3-氨基环己烷羧酸、4-氨基环己烷羧酸、(1R,2R)-2-氨基环戊烷羧酸、(1R,2S)-2-氨基环戊烷羧酸、1-氨基-1-环戊烷羧酸、1-氨基-1-环丙烷羧酸、4-(2-氨基乙氧基)-苯甲酸、3-氨基甲基苯甲酸、4-氨基甲基苯甲酸、2-氨基丁酸、4-氨基丁酸、6-氨基己酸、1-氨基茚满-1-羧酸、4-氨基甲基-苯乙酸、4-氨基苯基乙酸、3-氨基-2-萘甲酸、4-氨基苯丁酸、4-氨基-5-(3-吡啶基)-戊酸、(4R,5S)-4-氨基-5-甲基庚酸、(R)-4-氨基-5-甲基己酸、(R)-4-氨基-6-甲基硫代己酸、(S)-4-氨基-戊酸、(R)-4-氨基-5-苯基戊酸、4-氨基苯基丙酸、(R)-4-氨基庚二酸、(4R,5R)-4-氨基-5-羟基己酸、(R)-4-氨基-5-羟基戊酸、(R)-4-氨基-5-(对-羟基苯基)-戊酸、8-氨基辛酸、(2S,4R)-4-氨基-吡咯烷-2-羧酸、(2S,4S)-4-氨基-吡咯烷-2-羧酸、氮杂环丁烷-2-羧酸、(2S,4R)-4-苄基-吡咯烷-2-羧酸、(S)-4,8-二氨基辛酸、叔丁基甘氨酸、γ-羧基谷氨酸、β-环己基丙氨酸,瓜氨酸、2,3-二氨基丙酸、马尿酸、环己基高丙氨酸(homocyclohexylalanine)、moleucine (无对应译文)、高苯丙氨酸、4-羟基脯氨酸、吡啶啉-2-羧酸、异哌啶酸、磺基酪氨酸(sulfonyltyrosine)、氨基辛二酸、对-羧甲基苯丙氨酸、α-甲基-丙氨酸、烟酸、正缬氨酸、八氢吡啶-2-羧酸、鸟氨酸、青霉胺、苯基甘氨酸(Phg)、4-苄基-吡咯烷-2-羧酸、哌啶酸、炔丙基甘氨酸、3-吡啶基丙氨酸

(3-pyridinylalanine)、4-吡啶基丙氨酸(4-pyridinylalanine)、1-吡咯烷-3-羧酸、肌氨酸、他汀类药物、四氢异喹啉-1-羧酸、1,2,3,4-四氢异喹啉-3-羧酸、氨甲环酸、4,4-二氟脯氨酸、4-氟脯氨酸、 α -(3,4-二氟苄基)-脯氨酸、 γ -(3,4-二氟苄基)-脯氨酸、 α -(三氟甲基)苯丙氨酸、六氟亮氨酸、5,5,5-三氟亮氨酸、6,6,6-三氟正亮氨酸、2-(三氟甲基)亮氨酸、2-(三氟甲基)正亮氨酸、4,4,4-三氟缬氨酸、4,4,4,4',4',4'-六氟缬氨酸、五氟苯丙氨酸、2,3-二氟苯丙氨酸、2,4-二氟苯丙氨酸、2,5-二氟苯丙氨酸、2,6-二氟苯丙氨酸、3,4-二氟苯丙氨酸、3,5-二氟苯丙氨酸、3,3-二氟-3-(4-氟苯基)丙氨酸、2,3-二氟苄基甘氨酸、2,4-二氟苄基甘氨酸、2,5-二氟苄基甘氨酸、3,4-二氟苄基甘氨酸、4,4-二氟乙基甘氨酸、4,4,4-三氟乙基甘氨酸和六氟正亮氨酸)。术语还包括带有常规氨基保护基团(例如,乙酰基、叔丁氧羰基、苄氧羰基或9-芴基甲基羰基(fluorenylmethylcarbonyl))的天然和非天然氨基酸,以及在羧基端(有利地通过 C_1 - C_{18} 烷基、酯、苄基酰胺或苄基酰胺或酰胺,分别赋予如下式的羧基端: $-CO$ (C_1 - C_{18} 烷基)、 $-COO$ (C_1 - C_{18} 烷基)、 $-CONH$ 苄基、 $CONH$ 苄基、或 $CONH_2$) 保护的天然和非天然氨基酸。

[0061] 如此处所用,术语“阴离子”指带负电荷的分子,例如其在电解中迁移到正极。另外,“带负电荷”的氨基酸指带有侧链电荷的氨基酸,侧链电荷在 pH7.4 时呈负值。因此,根据本发明的带负电荷的氨基酸残基包括,例如天冬氨酸、酪氨酸、磺基酪氨酸、酪氨酸磺酸酯、氨基辛二酸、对-羧甲基苯丙氨酸、和谷氨酸残基。

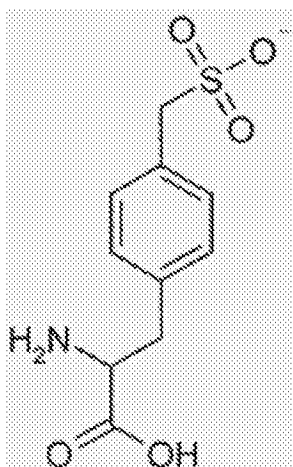
[0062] 如此处所用,磺基酪氨酸(或 2-氨基-3-(4-(磺基)苯基)丙酸)是具有下式的非天然氨基酸:

[0063]



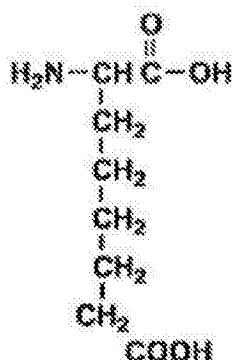
[0064] 如此处所用,术语“酪氨酸磺酸酯”(或“2-氨基-3-(4-(磺基)苯基)丙酸”)是指具有下式的非天然氨基酸:

[0065]



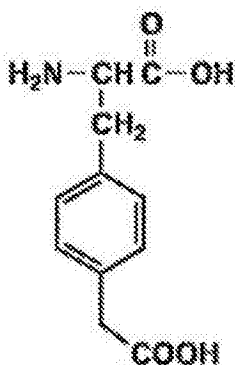
[0066] 根据本发明,氨基辛二酸是具有下式的非天然氨基酸:

[0067]



[0068] 如此处所用,对-羧甲基苯丙氨酸是指具有下式的非天然氨基酸:

[0069]



[0070] 在本发明的一个实施方式中,所述阴离子多肽由 13 个相同的带负电荷的氨基酸组成。它可以是,例如,由 13 个天冬氨酸残基(SEQ ID NO:9)、13 个磺基酪氨酸残基(SEQ ID NO:10)、13 个酪氨酸磺酸酯残基(SEQ ID NO:11)、13 个氨基辛二酸残基(SEQ ID NO:12)、13 个对-羧甲基苯丙氨酸残基(SEQ ID NO:13)和 13 个谷氨酸残基(SEQ ID NO:3)组成的多肽。在一个优选的实施方式中,所述相同氨基酸是谷氨酸 E 以及本发明共轭分子的阴离子多肽是 SEQ ID NO:3。

[0071] 在本发明的另一个实施方式中,本发明的阴离子肽包括带负电荷的和不带电荷的氨基酸。优选地,所述阴离子肽包括至少一个带负电的氨基酸和至少另一个氨基酸。优选地,所述其它氨基酸是携带极性不带电荷的侧链的氨基酸。这样的氨基酸包括,例如丝氨

酸、苏氨酸、天冬酰胺和谷氨酰胺。在另一个优选的实施方式中,所述其它氨基酸是丝氨酸或苏氨酸。在又一个优选的实施方案中,所述其它氨基酸是丝氨酸。在另一个优选的实施方式中,带负电荷的氨基酸是天冬氨酸。

[0072] 在又一个优选的实施方案中,本发明所述阴离子多肽,除了至少一个其它氨基酸,还包括至少两个不同的带负电荷的氨基酸。在这种情况下,所述阴离子多肽具有例如序列 $S-(X-D-X-S)_n$, 比如 $S-X-D-X-S-X-D-X-S-X-D-X-S$, 其中 n 是包括在 1 和 5 之间的整数,优选 3, S 代表丝氨酸, D 代表天冬氨酸, 以及 X 选自:酪氨酸、磺基酪氨酸、酪氨酸磺酸酯、氨基辛二酸和对-羧甲基苯丙氨酸(SEQ ID NO:19)以及其中各 X 基团可以是相同的或不同的,优选是相同的。

[0073] 在本实施方式中,所述阴离子多肽可以尤其具有以下的任意序列:

[0074] $-S-(Y_{S03}-D-Y_{S03}-S)_n$, 比如 $S-Y_{S03}-D-Y_{S03}-S-Y_{S03}-D-Y_{S03}-S-Y_{S03}-D-Y_{S03}-S$ (SEQ ID NO:4), 其中 Y_{S03} 是磺基酪氨酸;

[0075] $-S-(Y_{SN}-D-Y_{SN}-S)_n$, 比如 $S-Y_{SN}-D-Y_{SN}-S-Y_{SN}-D-Y_{SN}-S-Y_{SN}-D-Y_{SN}-S$ (SEQ ID NO:5), 其中 Y_{S03} 是酪氨酸磺酸酯;

[0076] $-S-(pF-D-pF-S)_n$, 比如 $S-pF-D-pF-S-pF-D-pF-S-pF-D-pF-S$ (SEQ ID NO:6), 其中 pF 是对-羧甲基苯丙氨酸;

[0077] $-S-(Asu-D-Asu-S)_n$, 比如 $S-Asu-D-Asu-S-Asu-D-Asu-F-Asu-F-D-Asu-S$ (SEQ ID NO:7), 其中 Asu 是氨基辛二酸;以及

[0078] $-S-(Y-D-Y-S)_n$, 比如 $S-Y-D-Y-S-Y-D-Y-S-Y-D-Y-S$ (SEQ ID NO:8), 其中 Y 是酪氨酸。

[0079] 阴离子多肽也可以具有下面的序列:

[0080] $-S-Y_{S03}-D-Y_{S03}-S-Y_{S03}-D-Y-S-Y-D-Y-S$ (SEQ ID NO:20) 或

[0081] $-S-Y-D-Y-S-Y-D-Y_{S03}-S-Y_{S03}-D-Y_{S03}-S$ (SEQ ID NO:21)。

[0082] 根据本发明最优选, X 代表磺基酪氨酸。因此,在最优选的实施方案中,本发明的阴离子多肽具有序列: $S-(Y_{S03}-D-Y_{S03}-S)_n$, 以及尤其是 $S-Y_{S03}-D-Y_{S03}-S-Y_{S03}-D-Y_{S03}-S-Y_{S03}-D-Y_{S03}-S$ (SEQ ID NO:4)。

[0083] 在具体的实施方式中,本发明的共轭分子含有衍生自 CD4 受体的肽,所述肽通过接头偶联至有机分子,其中:

[0084] - 衍生自 CD4 受体的肽选自序列 SEQ ID NO:1 和 SEQ ID NO:2,

[0085] - 接头是 $CO-(CH_2O)_2CH_2NHC(O)(CH_2)_2$ -吡咯烷基-2,5-二酮,

[0086] - 有机分子包括具有选自如下的序列的阴离子多肽: $S-(Y_{S03}-D-Y_{S03}-S)_n$ 、 $S-(Y_{SN}-D-Y_{SN}-S)_n$ 、 $S-(pF-D-pF-S)_n$ 、 $S-(Asu-D-Asu-S)_n$ 和 $S-(Y-D-Y-S)_n$; 尤其选自: $S-Y_{S03}-D-Y_{S03}-S-Y_{S03}-D-Y_{S03}-S-Y_{S03}-D-Y_{S03}-S$ (SEQ ID NO:4)、 $S-Y_{SN}-D-Y_{SN}-S-Y_{SN}-D-Y_{SN}-S-Y_{SN}-D-Y_{SN}-S$ (SEQ ID NO:5)、 $S-pF-D-pF-S-pF-D-pF-S-pF-D-pF-S$ (SEQ ID NO:6)、 $S-Asu-D-Asu-S-Asu-D-Asu-F-Asu-F-D-Asu-S$ (SEQ ID NO:7)、 $S-Y-D-Y-S-Y-D-Y-S-Y-D-Y-S$ (SEQ ID NO:8), 所述序列通过式 A-Z 的分子基团连接至接头, 其中 A 是 $-NHC(O)(CH_2)_3NH-CO(CH_2)_2-$ 以及 Z 是巯基。

[0087] 在一个优选的实施方案中,本发明的共轭分子包括衍生自 CD4 受体的肽, 衍生自 CD4 受体的肽选自序列 SEQ ID No. 1 和 SEQ ID No. 2, 所述肽通过接头 $CO-(CH_2O)_2CH_2NHC(O)(CH_2)_2$ 吡咯烷基-2,5-二酮偶联至有机分子, 阴离子多肽具有序列

$S-(Y_{S03}-D-Y_{S03}-S)_n$, 以及尤其是 $S-Y_{S03}-D-Y_{S03}-S-Y_{S03}-D-Y_{S03}-S-Y_{S03}-D-Y_{S03}-S$ (SEQ ID NO4), 所述序列通过式 A-Z 的分子基团连接至接头, 其中 A 是 $-NHCO(CH_2)_3NH-CO(CH_2)_2-$ 以及 Z 为巯基。

[0088] 本发明的共轭物, 通过阻断病毒附着至细胞膜上以及随后的病毒进入, 能抑制 HIV 进入细胞。因此, 本发明的共轭物可以用于治疗。更优选地, 本发明的共轭物可用于治疗病毒感染。甚至更优选地, 所述共轭物可用于治疗艾滋病。因此, 根据第二方面, 本发明涵盖如上所定义的共轭分子, 其作为药物的用途。本发明还涉及用于治疗病毒感染, 特别是用于治疗艾滋病的如上所定义的共轭物。如上所定义的共轭分子在制造用于抗病毒治疗特别是用于艾滋病治疗的药物中的用途也是本发明的一个目的。

[0089] 根据第三方面, 本发明涵盖了药物组合物, 该药物组合物包括如上所定义的共轭分子和药学上可接受的载体。该组合物可以用作药物, 优选用于治疗病毒感染, 并且, 更优选用于治疗艾滋病。

[0090] 在用于口服、鼻内、舌下、皮下、肌肉内、静脉内、经皮、局部或直肠施用的本发明的药物组合物中, 活性成分可以单位形式施用、其与常规药物载体混合施用至动物或人类。用于施用的合适的施用单位形式包括用于口服施用的形式(例如片剂、明胶胶囊剂、粉剂、颗粒剂和口服溶液或混悬液)、用于舌下和含服施用的形式、用于皮下、肌肉内、静脉内、鼻内或眼内施用的形式和用于直肠施用的形式。

[0091] 除了载体和本发明的共轭物外, 本发明的药物组合物可以含有本领域中公知的各种稀释剂、填充剂、盐、缓冲剂、稳定剂、增溶剂、和其它材料。

[0092] 如此处所用, “药学上可接受的载体” 包括生理上相容的溶剂、缓冲液、盐溶液、分散介质、包衣、抗菌和抗真菌剂、等渗和吸收延迟剂等的任何和全部。根据预期的施用途径选择载体类型。在各种实施方式中, 载体适于静脉内、腹膜内、皮下、肌肉内、局部、经皮或口服施用。药学上可接受的载体包括无菌水溶液或分散液以及无菌注射溶液或分散液的即配型无菌粉末。用于药物活性物质的介质和试剂的使用在本领域中是众所周知的。一个典型的用于静脉输注的药物组合物可以被制成以含有 250ml 无菌林格氏溶液和 100mg 的组合。用于制备肠胃外可施用的化合物的实际方法对于本领域技术人员是已知的或显而易见的, 并更详细地描述于例如 Remington's Pharmaceutical Science, 第 17 版, Mack Publishing Company, Easton, Pa. (1985) 及其第 18 版和第 19 版, 并入此处作为参考。

[0093] 优选组合物中的共轭分子以有效量配制。“有效量” 是指, 在剂量下持续必要的时间, 足以获得所需结果(比如诱导肿瘤细胞凋亡)的有效量。“治疗有效量” 是指足以影响某种疾病状态的治疗过程的量。治疗有效量也是药物的治疗有益作用优于任何毒性或有害作用的量。

[0094] 可调整剂量方案以提供最佳的响应。例如, 可以施用单次大剂量(bolus), 可随着时间的推移施用几个分开的剂量, 或按比例减少或增加剂量。可以向受试者施用本发明的组合物以影响受试者中的病毒感染。如此处所用, 术语“受试者” 意图包括对病毒感染易感的活的生物体, 特别包括哺乳动物, 如兔、狗、猫、小鼠、大鼠、猴、其转基因品种, 优选人类。

[0095] 对于治疗应用, 以药学上可接受的剂型, 比如上面讨论的那些, 包括可作为大剂量通过静脉内或持续一段时间连续输注而向人类施用的那些剂型, 通过肌肉内、腹膜内、脑脊髓内(intracerebrospinal)、皮下、关节内、滑膜内、鞘内、口服、局部或吸入途径, 向哺乳动

物优选人施用本发明的共轭分子。

[0096] 本发明还涉及抗病毒的治疗方法,优选抗艾滋病的治疗方法,包括向有需求的患者施用本发明的共轭分子或包含共轭分子的药物组合物。

[0097] 第四方面,本发明提供一种如上定义的共轭分子的制备方法,其特征在于方法包括以下步骤:

[0098] a. 用带有两个活性基团的双官能化合物接触如上定义的通用序列(I)的 miniCD4 肽,使两个活性基团中的一个与通用序列(I)中存在的氨基酸 Lys 残基的游离氨基($-\text{NH}_2$)形成共价键,以便获得带有双官能化合物第二活性基团的活化肽,以及

[0099] b. 用带有如上定义的官能团的有机分子接触步骤(a)获得的活化肽,其中如上定义的官能团带有巯基,其中巯基(SH)已被保护性巯基(protective thiol group)所保护,从而活化肽的活性基团与有机分子的官能团,无论官能团被保护与否,形成共价键以获得共轭分子。

[0100] 在本申请中,步骤(a)获得的化合物将被无差别地称为“活化肽”、“活化 miniCD4”、“活化 CD4 肽”或“活化 miniCD4 肽”。

[0101] 根据本发明的官能团是指卤原子、马来酰亚胺、巯基或保护性巯基。

[0102] 本发明中所用术语“保护性巯基”是指硫原子被 S- 保护基所取代以保护巯基免于合成过程中不希望的反应。常用的 S- 保护基公开于 Greene, “Protective Groups In Organic Synthesis” (John Wiley&Sons, New York(1981))。S- 保护基包括取代的或未取代的苄基醚,如对甲氧基苄基或对硝基苄基、三苯甲基醚、硫醚、硫代乙酸酯或硫缩醛。优选地,所述受保护的巯基是硫代乙酰基。

[0103] 当有机化合物带有保护性巯基时,所述保护性基团在步骤(b)之前或期间进行脱保护以恢复游离巯基,并允许该巯基与活化肽的活性基团偶联。

[0104] 衍生自 CD4 受体的肽的特征与上面所定义的相同。具体而言,P3 优选含有至少一个碱性氨基酸,所述碱性氨基酸甚至更优选为精氨酸。根据一个优选的实施方案, Xaa^f 代表通用序列(I)中的 TPA。根据另一个优选的实施方案, Xaa^j 代表 Phe。优选,通用序列(I)的衍生自 CD4 受体的肽的序列选自序列 SEQ ID NO:1 和 SEQ ID NO:2,有利地 SEQ ID NO:1。

[0105] 本专利申请中术语“双官能化合物”是指并入两个活性基团的任何化合物,其中两个活性基团中的一个能与存在于通用序列(I)中的氨基酸 Lys 残基的游离氨基($-\text{NH}_2$)形成共价键,且另一个活性基团能与有机分子形成共价键。

[0106] 本领域技术人员非常清楚能用于本发明框架内的双官能化合物。也就是,本发明的双官能化合物可以选自下列非限制性的列表:NHS- PEO_n -马来酰亚胺,其中 n 是包括在 2 至 24 之间的整数,有利地 n=2、4、8 或 12,硫代 -KMUS (N-[k-马来酰亚胺基十一烷酰氧基]硫代琥珀酰亚胺酯)、LC-SMCC (琥珀酰亚胺基-4-[N-马来酰亚胺基甲基]环己烷-1-羧基-[6-氨基己酸酯])、KMUA (N-k-马来酰亚胺基十一烷酸)、SMPB (琥珀酰亚胺基-4-[p-马来酰亚胺基苯基]丁酸酯)、硫代-SMPB (硫代琥珀酰亚胺基-4-[p-马来酰亚胺基苯基]丁酸酯)、硫代-SIAB (N-硫代琥珀酰亚胺基[4-碘乙酰基]氨基苯甲酸酯)、SIAB (N-琥珀酰亚胺基[4-碘乙酰基]氨基苯甲酸)、硫代-EMCS ([N-e-马来酰亚胺基己酰氧基]硫代琥珀酰亚胺酯)、EMCA (N-e-马来酰亚胺基己酸)、EMCS ([N-e-马来酰亚胺基己酰氧基]琥珀酰亚胺酯)、SMCC (琥珀酰亚胺基-4-[N-马来酰亚胺基

甲基]环己烷-1-羧酸酯)、硫代-SMCC(硫代琥珀酰亚胺基4-[N-马来酰亚胺基甲基]环己烷-1-羧酸酯)、MBS(m-马来酰亚胺基苯甲酰基-N-羟基琥珀酰亚胺酯)、硫代-MBS(m-马来酰亚胺基苯甲酰基-N-羟基硫代琥珀酰亚胺酯)、GMBS(N-[g-马来酰亚胺基丁酰氧基]琥珀酰亚胺酯)、硫代-GMBS(N-[g-马来酰亚胺基丁酰氧基]硫代琥珀酰亚胺酯)、SPDP(N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶二硫代)丙酸酯)、SBAP(琥珀酰亚胺基3-[溴乙酰氨基]丙酸酯)、BMPS(N-[β]-马来酰亚胺基丙酰氧基]琥珀酰亚胺酯)、BMPA(N-[β]-马来酰亚胺基丙酸)、AMAS N-(α-马来酰亚胺基乙酰氧基)琥珀酰亚胺酯)、SIA(N-琥珀酰亚胺基碘乙酸酯)、SMPH(琥珀酰亚胺基-6-[β-马来酰亚胺基丙酰氨基]己酸酯)、SATA(N-琥珀酰亚胺基-S-乙酰硫代乙酸酯)和SATP(N-琥珀酰亚胺基-S-乙酰硫代丙酸酯)。

[0107] 根据本发明, NHS-PEO_n-马来酰亚胺, 其中 n=2, 也被称为琥珀酰亚胺基-[(N-马来酰亚胺基丙酰氨基)-二甘醇]酯,

[0108] NHS-PEO_n-马来酰亚胺, 其中 n=4, 也被称为琥珀酰亚胺基-[(N-马来酰亚胺基丙酰氨基)-四甘醇]酯,

[0109] NHS-PEO_n-马来酰亚胺, 其中 n=8, 也被称为琥珀酰亚胺基-[(N-马来酰亚胺基丙酰氨基)-八甘醇]酯,

[0110] NHS-PEO_n-马来酰亚胺, 其中 n=12, 也被称为琥珀酰亚胺基-[(N-马来酰亚胺基丙酰氨基)-十二甘醇]酯。

[0111] 能与存在于通用序列(I)中的氨基酸 Lys 残基的游离氨基(-NH₂)形成共价键的活性基团可以是任何活性酯基团。

[0112] 优选, 能与存在于通用序列(I)中的氨基酸 Lys 残基的游离氨基(-NH₂)形成共价键的活性基团是活性基团 N-羟基琥珀酰亚胺酯(NHS)或 N-羟基-4-硫代-琥珀酰亚胺酯, 有利地为 NHS 活性基团。甚至更优选, 双官能化物的两个活性基团是不同的(杂双官能基团), 且两个基团中的一个为 NHS 活性基团或 N-羟基-4-硫代-琥珀酰亚胺酯, 有利地为 NHS 活性基团。

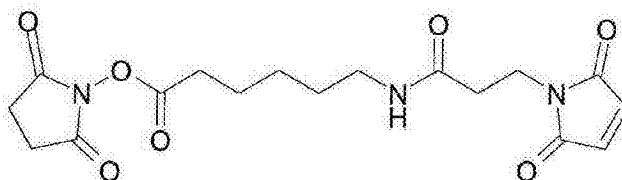
[0113] 有利地, 当有机分子的官能团为巯基或保护性巯基时, 能与有机分子的官能团形成共价基团的双官能化物的活性基团为卤原子或马来酰亚胺基, 当有机分子的官能团为卤原子或马来酰亚胺基时, 所述双官能化物的活性基团为如上所定义的巯基或保护性巯基。

[0114] 根据一个优选的实施方案, 当有机分子的官能团为巯基或保护性巯基时, 双官能化合物选自琥珀酰亚胺基-6-[β-马来酰亚胺基丙酰氨基]己酸酯(SMPH)和 NHS-PEO_n-马来酰亚胺, n 为包括在 2 至 24 之间的整数, 有利地为 2、4、8 或 12。

[0115] 根据一个特别优选的实施方案, 双官能化合物为 SMPH。

[0116] SMPH 的分子结构如下:

[0117]

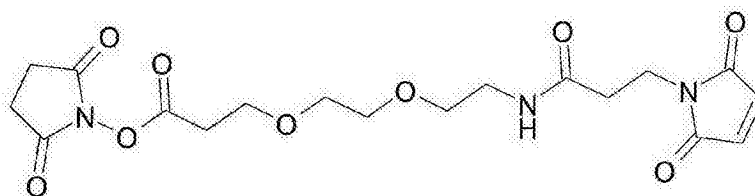


SMPH

[0118] 根据另一个特别优选的实施方案,双官能化合物为琥珀酰亚胺基 - [(N - 马来酰亚胺基丙酰氨基) - 二甘醇] 酯,也称为 NHS - PEO₂ - 马来酰亚胺,琥珀酰亚胺基 - [(N - 马来酰亚胺基丙酰氨基) - 四甘醇] 酯,也称为 NHS - PEO₄ - 马来酰亚胺,琥珀酰亚胺基 - [(N - 马来酰亚胺基丙酰氨基) - 八甘醇] 酯,也称为 NHS - PEO₈ - 马来酰亚胺,琥珀酰亚胺基 - [(N - 马来酰亚胺基丙酰氨基) - 十二甘醇] 酯,也称为 NHS - PEO₁₂ - 马来酰亚胺,更优选双官能化合物为 NHS - PEO_n - 马来酰亚胺。

[0119] NHS-PEO₉-马来酰亚胺的分子结构如下：

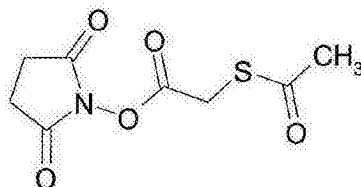
[0120]



[0121] 根据另一个特别优选的实施方案,当有机分子的官能团为卤原子或马来酰亚胺基时,所述双官能化合物选自 N-琥珀酰亚胺基-S-乙酰硫代乙酸酯(SATA)或 N-琥珀酰亚胺基-S-乙酰硫代丙酸酯(SATP)。

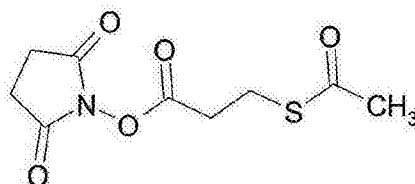
[0122] SATA 的分子结构如下：

[0123]



[0124] SATP 的分子结构如下：

[0125]



[0126] 所述双官能化合物可以从 PIERCE (Rockford, IL) 获得。

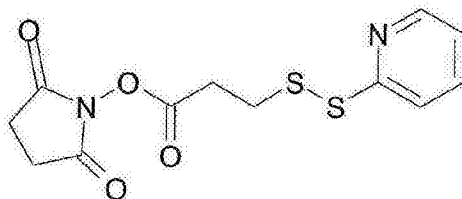
[0127] 再次优选, 当 Xaa^f代表 TPA 时, 本发明的方法包括用于制备通用序列 (I) 的衍生自 CD4 受体的肽的初步步骤, 所述步骤包括用 N - 琥珀酰亚胺基 - 3 - (2 - 吡啶二硫代) 丙酸酯 (SPDP) 接触如下通用序列 (III) 的衍生自 CD4 受体的肽, 从而在通用序列 (III) 的衍生自 CD4 受体的肽的 N 端引入 TPA:

[0128] 1-Lys-Cys-P2-Cys-P3-Cys-Xaa^g-Xaa^h-Xaaⁱ-Xaa^j-Cys-Xaa^k-Cys-Xaa^l-Xaa^m, (III)

[0129] 其中 P1 至 P3 和 Xaa^a至 Xaa^m如通用序列 (I) 中所定义。

[0130] SPDP 的分子结构如下：

[0131]



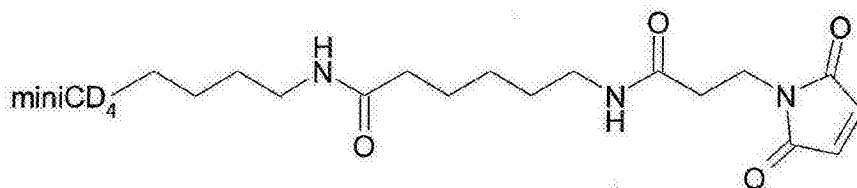
[0132] 此外,作为能通过共价键偶联至有机分子的活性基团的实例,可以引用下列基团:马来酰亚胺或溴乙酰基, S-S-吡啶或硫代乙酰基。

[0133] 当 miniCD4 被受保护的巯基(例如,硫代乙酰基)活化时,其有可能偶联至带有例如马来酰亚胺基的有机分子。当聚阴离子多肽被巯基或受保护的巯基,例如硫代乙酰基官能化有问题时,这是可能的。那么,这称为“逆偶联”。

[0134] 优选地,所述活性基团为马来酰亚胺基。

[0135] 当 SMPH 为所用双官能化合物时,本发明的活化肽(其活性基团为马来酰亚胺)的分子结构如下：

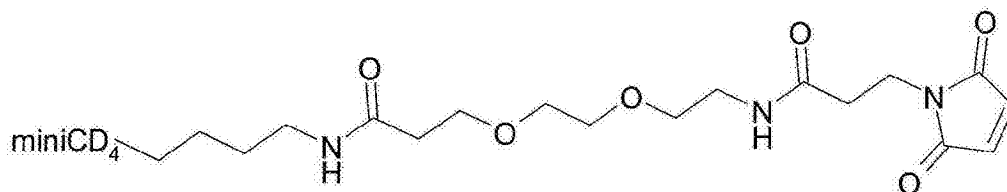
[0136]



[0137] 在本申请中,术语“SMPH 活化的 miniCD4 肽”是指本发明的活化肽,其氨基酸 Lys 残基经衍生自 SMPH 的接头,有利地通过胺键,共价键合至马来酰亚胺活性基团。

[0138] 根据另一个有利的实施方案,当 NHS-PEO₂-马来酰亚胺为所用双官能化合物时,本发明的活化肽(其活性基团为马来酰亚胺基)的分子结构如下：

[0139]

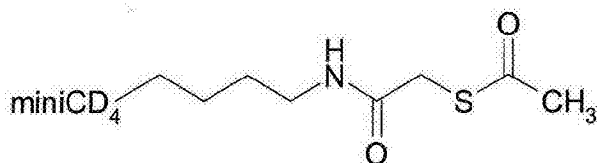


[0140] 在本申请中,术语“经 PEO₂接头的马来酰亚胺活化的 miniCD4 肽”是指本发明的活化肽,其氨基酸 Lys 残基经 PEO₂接头,有利地通过胺键,共价键合至马来酰亚胺活性基团。

[0141] 根据另一个优选,所述活性基团为硫代乙酰基。

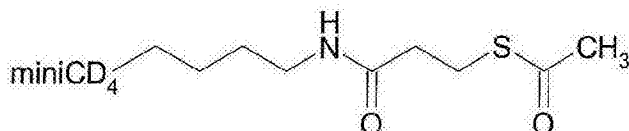
[0142] 例如,当 SATA 为所用双官能化合物时,本发明的活化肽(其活性基团为硫代乙酰基)的分子结构如下：

[0143]



[0144] 相似地,当 SATP 为所用双官能化合物时,本发明的活化肽(其活性基团为硫代乙酰基)的分子结构如下:

[0145]



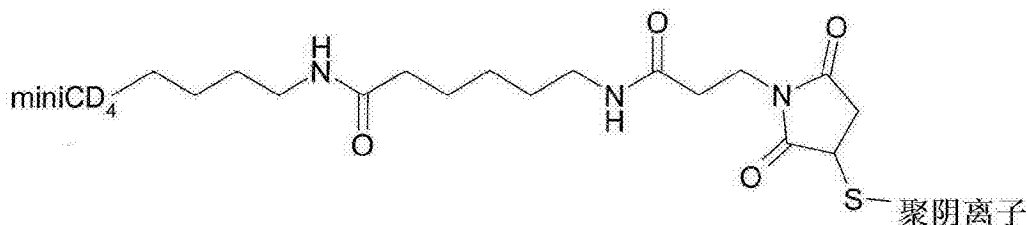
[0146] 硫代乙酰基为巯基的受保护形式。为了巯基的脱保护,我们使用例如羟胺。该步骤与偶联至有机分子所带有的马来酰亚胺基同时进行。

[0147] 在本申请中,术语“SATA 活化的 miniCD4 肽”和“SATP 活化的 miniCD4 肽”是指本发明的活化肽,其氨基酸 Lys 残基经衍生自 SATA 或 SATP 的接头,有利地通过胺键,共价键合至受保护的巯基(例如,硫代乙酰基)。

[0148] 因此,根据一个具体实施方案,活化肽的活性基团为马来酰亚胺基,且有机分子带有巯基或硫代乙酰基。

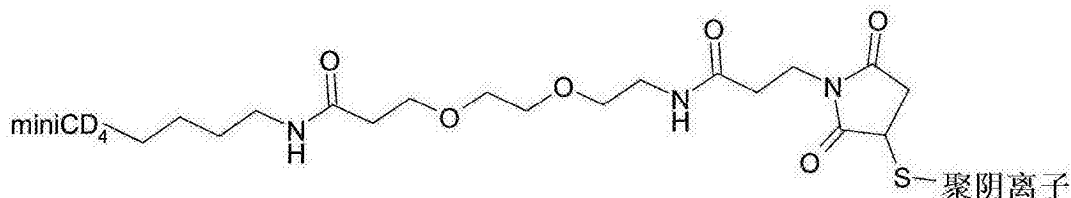
[0149] 当 SMPH 作为双官能化合物用于偶联时,本发明共轭分子的分子结构如下,其中共轭分子包括通用序列 (I) 的衍生自 CD4 受体的肽,所述肽偶联至带有巯基或受保护的巯基(例如硫代乙酰基)的修饰阴离子多肽(聚阴离子):

[0150]



[0151] 当 NHS-PEO₂-马来酰亚胺作为所用双官能化合物时,其也可以是下列共轭分子:

[0152]



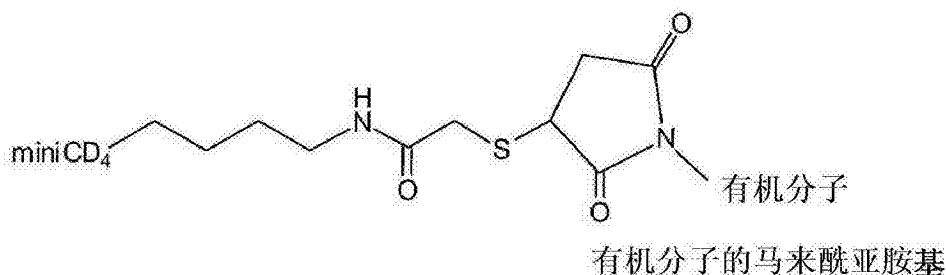
[0153] 根据另一个实施方案,本发明的共轭分子含有衍生自 CD4 受体的肽和带有马来酰亚胺或卤素基团的有机分子,其中所述肽含有通用序列 (I) 或由通用序列 (I) 组成,优选序列 SEQ ID NO:1。

[0154] 根据另一个具体实施方案,活化肽的活性基团为硫代乙酰基,且有机分子带有马来酰亚胺或卤素基团。

[0155] 例如,当 SATA 用于偶联时,共轭分子的分子结构如下,该共轭分子含有通用序列

(I) 的衍生自 CD4 受体的肽, 所述肽偶联至带有马来酰亚胺基的有机分子:

[0156]



[0157] 根据本发明, 所述阴离子多肽(本发明的有机分子)可以通过本领域中公知的任何常规合成方法进行制备。用于制备活化肽和共轭分子的本发明方法的操作条件为本领域技术人员所熟知, 正如如下实施例所阐述的。

[0158] 下面的实施例和附图阐明本发明, 但不以任何方式限制本发明的范围。

附图说明

[0159] 图 1 公开了本发明的肽的结构。

[0160] 图 2 代表包含在本发明共轭分子中的阴离子多肽的 HPLC 谱(从上至下: P3Y_{S03}、P3Y、P3pF、P3Asu 和 E13)。

[0161] 图 3 代表偶联至 S- 乙酰硫代丙酸酯(SATP)基团的本发明阴离子多肽的 HPLC 谱。

[0162] 图 4 代表本发明共轭肽的 HPLC 谱。

[0163] 图 5 代表通过表面等离子体共振(SPR-Biacore)技术进行的结合分析的结果, 并显示 mAb17b (15 μg/ml) 与包被有来自 X4(MN) 或 R5(YU2) 病毒的 gp120 的表面的相互作用, 用 100nM 如下进行预处理: 单独 mCD4(A)、mCD4-P3Y(B) 或 mCD4-P3YS03(C)。当表面包被有 mAb17b 时(D 和 G), 来自 X4(MN) 的 gp120 或来自 R5(YU2) 的 gp120 的相互作用依赖于 mCD4 (其诱导 mAb17b 表位的暴露) 的存在, 但是当用 mCD4-P3Y 或 mCD4-P3YS03 替代 mCD4 时, 相互作用完全被抑制。当表面包被有 sCD4 时(E 和 H), 相互作用被 mCD4 部分抑制, 被 mCD4-P3Y 或 mCD4-P3YS03 完全抑制。当表面包被有肝素时(F), 相互作用不被 mCD4 抑制, 被 mCD4-P3Y 和 mCD4-P3YS03 部分抑制, 后者更具活性。

具体实施方式

[0164] 实施例

[0165] 实施例 1: 本发明共轭分子的合成

[0166] 1.1 式 H-γ-Abu-SXD_{S03}SXD_{S03}SXD_{S03}-OH 的肽的合成, 其中 X=Y_{S03}(P3YS03)、Y(P3Y)、Asu(P3Asu)、或 pF(P3pF); H-γ-Abu-SY_{S03}DY_{S03}SY_{S03}DYSYDYS-OH (Nter3 硫酸酯); H-γ-Abu-SYDYSYDY_{S03}SY_{S03}DY_{S03}S-OH (Cter3 硫酸酯); 和 H-γ-Abu-(Glu)₁₃-OH(E13); 其中 γ-Abu: NH₂-(CH₂)₃-CO。

[0167] 如下实施例描述式 H-γ-Abu-SXD_{S03}SXD_{S03}SXD_{S03}-OH 的修饰肽的合成, 其中 X=Y_{S03}(P3YS03)、Y(P3Y)、Asu(P3Asu) 或 pF(P3pF); H-γ-Abu-SY_{S03}DY_{S03}SY_{S03}DYSYDYS-OH (Nter3 硫酸酯); H-γ-Abu-SYDYSYDY_{S03}SY_{S03}DY_{S03}S-OH (Cter3 硫酸酯); H-γ-Abu-(Glu)₁₃-OH(E13); 其中 γ-Abu: NH₂-(CH₂)₃-CO。此式中, 本发明的阴离子肽(除了

肽 E13 以外) 对应着 SXDXSXDXSXDXS-OH (SEQ ID NO:19), 其中 X 如上(相同或不同)。

[0168] 所得修饰肽为:

[0169] P3YSO3 (SEQ ID NO:14): $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_3-\text{CO}-\text{S}-\text{Y}_{\text{SO3}}-\text{D}-\text{Y}_{\text{SO3}}-\text{S}-\text{Y}_{\text{SO3}}-\text{D}-\text{Y}_{\text{SO3}}-\text{S}-\text{Y}_{\text{SO3}}-\text{D}-\text{Y}_{\text{SO3}}-\text{S}$

[0170] P3Y (SEQ ID NO:15): $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_3-\text{CO}-\text{S}-\text{Y}-\text{D}-\text{Y}-\text{S}-\text{Y}-\text{D}-\text{Y}-\text{S}-\text{Y}-\text{D}-\text{Y}-\text{S}$

[0171] P3pF (SEQ ID NO:16): $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_3-\text{CO}-\text{S}-\text{pF}-\text{D}-\text{pF}-\text{S}-\text{pF}-\text{D}-\text{pF}-\text{S}-\text{pF}-\text{D}-\text{pF}-\text{S}$

[0172] P3Asu (SEQ ID NO:17): $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_3-\text{CO}-\text{S}-\text{Asu}-\text{D}-\text{Asu}-\text{S}-\text{Asu}-\text{D}-\text{Asu}-\text{F}-\text{Asu}-\text{F}-\text{D}-\text{Asu}-\text{S}$

[0173] E13 (SEQ ID NO:18): $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_3-\text{CO}-\text{EEEEEEEEEEEEEEEE}$

[0174] Nter3 硫酸酯 (SEQ ID NO:20): $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_3-\text{CO}-\text{S}-\text{Y}_{\text{SO3}}-\text{D}-\text{Y}_{\text{SO3}}-\text{S}-\text{Y}_{\text{SO3}}-\text{D}-\text{Y}-\text{S}-\text{Y}-\text{D}-\text{Y}-\text{S}$

[0175] Cter3 硫酸酯 (SEQ ID NO:21): $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_3-\text{CO}-\text{S}-\text{Y}-\text{D}-\text{Y}-\text{S}-\text{Y}-\text{D}-\text{Y}_{\text{SO3}}-\text{S}-\text{Y}_{\text{SO3}}-\text{D}-\text{Y}_{\text{SO3}}-\text{S}$

[0176] 试剂

[0177] 树脂购自 RAPP Polymere GmbH, Fmoc AAs, HATU、NMP、DMF、TFA 来自 Applied Biosystems 和 Sigma 的 Piperidin。Fmoc-Tyr(SO3, NnBu4)-OH 和 Fmoc- γ -氨基丁酸-OH(γ -Abu) 来自 Novabiochem, (S)-Fmoc-2-氨基-辛二酸-8-叔-丁酯(Asu) 来自 Polypeptides 以及 Fmoc-L-4(0-叔丁基羧甲基)-Phe-OH(pF) 来自 Anaspec。HPLC 级三乙胺乙酸缓冲液来自 GlenResearch。N-琥珀酰亚胺基-S-乙酰硫代丙酸酯(SATP)来自 Pierce。

[0178] 用于肽合成的通用操作

[0179] 在 Applied433 肽合成仪上在 H-Ser(tBu)-2-ClTrt-PS-树脂 (100 μmoles ; 0.78mmole/g) 上合成肽。在 Fmoc-Glu(tBu)-PHB-PS-树脂 (100 μmoles ; 0.61mmole/g) 上合成 E13 肽。用 10 当量的 Fmoc 氨基酸和 HATU/DIEA 活化进行链延伸。在室温下持续 1 小时 30, 通过 TFA/TIS/H₂O (95/2, 5/2, 5) 处理从树脂上释放肽, 除了硫酸化肽, 其在 4°C(冰浴)进行。通过冷二乙醚沉淀分离粗肽, 通过加入 3%NH₄OH 使其溶于水, 除了硫酸化肽, 其迅速溶于 100mM 碳酸氢铵缓冲液中。冻干后, 通过 C18RP-HPLC 使用 50mM NEt₃-AcOH 水溶液(对于硫酸化的和 E13 肽, 100mM) 和 CH₃CN 作为洗脱剂纯化粗肽。通过质谱(Waters ionspray Q-TOF-micro) 检查纯化肽, 通过氨基酸分析(Hitachi L-8800 设备) 定性。通过分析型 C18RP-HPLC 使用 50mM NEt₃-AcOH 水溶液中的 CH₃CN 线性梯度持续 20 分钟控制肽纯度(Waters Symetry C18-300A, 3.5 μm , 2.1x100mm 柱, 0.35ml/min 流速)。

[0180] 表 1: 通过 HPLC 进行的肽纯度分析

[0181]

肽	总产量 (%)	式	预期质量 (单一同位素)	观察值	HPLC 保留时间(min)
P3YSO3	4	$C_{82}H_{98}N_{14}O_{49}S_6$	2253.3835 [M-H] ⁻	2253.3164	8.3 (10-30%持续 20min)
P3Y	8	$C_{82}H_{98}N_{14}O_{31}$	1775.6601 [M+H] ⁺	1775.6370	11.7
P3pF	14	$C_{94}H_{110}N_{14}O_{37}$	2027.7235 [M+H] ⁺	2027.7490	6.2
P3Asu	10	$C_{76}H_{122}N_{14}O_{37}$	1823.8174 [M+H] ⁺	1823.8474	16.5 (0-10%持续 20 min)
E13	73	$C_{69}H_{100}N_{14}O_{41}$	1781.6170 [M+H] ⁺	1781.6299	12.1
Nter3 硫酸酯	41	$C_{82}H_{98}N_{14}O_{40}S_3$	2015.9495 M (平均)	2015.6544	12.242 (5-25%持续 20min)
Cter3 硫酸酯	46	$C_{82}H_{98}N_{14}O_{40}S_3$	2015.9495 M (平均)	2015.6346	12.454 (5-25%持续 20min)

[0182] 1. 2S - 乙酰硫代丙酸酯肽 (SATP 肽)

[0183] 肽溶于 100mM 磷酸钠缓冲液 pH8.2 (1mM 终浓度)。通过持续 40min 逐步加入 10 当量 SATP(0.26M 于 DMSO 中)引入 S- 乙酰硫代丙酸酯基团。1 小时 30 后,通过 C18RP-HPLC 使用在 50mM NEt3-AcOH 水溶液中的 CH₃CN 线性梯度持续 20 分钟纯化 S - 乙酰硫代丙酸酯肽(C18-300Å, 5 μm, 10x250mm 柱, 6ml/min 流速)。通过分析型 C18RP-HPLC 使用在 50mM NEt3-AcOH 水溶液中的 CH₃CN 线性梯度持续 20 分钟控制 SATP 衍生肽纯度(Waters Symetry C18-300Å, 3.5 μm, 2.1x100mm 柱, 0.35ml/min 流速)。

[0184] 表 2 :S - 乙酰硫代丙酸酯肽的纯度分析

[0185]

肽-SATP	产量 (%)	式	预期质量 (单一同位素)	观察值	HPLC 保留时间(min) (5-25%持续 20min)
P3YSO3-SATP	60	$C_{87}H_{104}N_{14}O_{51}S_7$	2383.3942 [M-H] ⁻	2383.4316	11.6
P3Y-SATP	43	$C_{87}H_{104}N_{14}O_{33}S_1$	1903.6533 [M-H] ⁻	1903.6781	16.0
P3pF-SATP	50	$C_{99}H_{116}N_{14}O_{39}S_1$	2155.7167 [M-H] ⁻	2155.7869	9.3
P3Asu-SATP	36	$C_{81}H_{128}N_{14}O_{39}S_1$	1953.8262 [M+H] ⁺	1953.7822	15.2*
E13-SATP	34	$C_{74}H_{106}N_{14}O_{43}S_1$	1909.6181 [M-H] ⁻	1909.6188	6.3
Nter3 硫酸酯-SATP	52	$C_{87}H_{104}N_{14}O_{42}S_4$	2146.1159 M (平均)	2146.1746	11.0 (10-30%持续 20min)
Cter3 硫酸酯-SATP	57	$C_{87}H_{104}N_{14}O_{42}S_4$	2146.1159 M (平均)	2146.1357	11.3 (10-30%持续 20min)

[0186] * 在 0.08%TFA 水溶液中, CH₃CN 的 10-30% 线性梯度持续 20min。

[0187] 1.3. 马来酰亚胺活化的 miniCD4(mCD4-Mal)

[0188] 按 W02009/098147 和 Nature Chemical Biology, 2009, 5(10), 743-748 中所述, 获得本发明的 mini-CD4 肽。

[0189] Mini-CD4-PEO2- 马来酰亚胺 =mini-CD4+ 接头

[0190] 在 1ml H₂O 中 10mg mCD4(MW:2897;3.4mmoles) 的溶液稀释于 1ml 磷酸盐缓冲液 0.1M pH8 中。4.5mg NHS-PEO₂- 马来酰亚胺 (MW:325;13.8mmoles;4 当量) 搅拌加入至 20 μl DMSO 的此浑浊溶液中。10 分钟后, 85%(HPLC) 的起始材料转化成马来酰亚胺衍生物。由于马来酰亚胺基团在 pH8 时的稳定性低, 偶联反应直接加载至 SepaK C18 柱上, 该柱用 TFA0.08% 水溶液中的 10%CH₃CN 校正。用 50%CH₃CN 洗脱马来酰亚胺衍生物。冻干后, 而后在半制备型柱上纯化化合物。

[0191] 1.4. mCD4- 肽共轭物

[0192] SATP 肽溶于 100mM 磷酸钠缓冲液 pH7.2(1mM 终浓度)。加入 100mM 磷酸钠缓冲液 (4N NaOH 调整至 pH7.2) 中 100 当量的 0.5M NH₂OH, HCl。通过 HPLC 监测巯基官能的脱保护。30min 后, 加入 H₂O 中 0.3 当量的 mCD4-Mal (1.5mM)。30min 后, 通过 C18RP-HPLC 使用在 50mM NEt₃-AcOH 水溶液中的 CH₃CN 线性梯度持续 20 分钟纯化 mCD4- 肽共轭物 (C18-300Å, 5 μm, 10x250mm 柱, 6ml/min 流速)。通过分析型 C18RP-HPLC 使用在 50mM NEt₃-AcOH 水溶液中的 CH₃CN 线性梯度持续 20 分钟控制 mCD4- 肽共轭物 (Waters Symetry C18-300Å, 3.5 μm, 2.1x100mm 柱, 0.35ml/min 流速), 负离子模式质谱以及氨基酸分析定量。

[0193] 表 3 :mCD4- 肽共轭物的 HPLC 分析

[0194]

共轭物	产量 (%)	式	预期质量 (平均)	观察值	HPLC 保留时间 (min) (20-40% 持续 20min)
mCD4-P3YSO3	47	C ₂₂₁ H ₃₁₄ N ₅₄ O ₈₈ S ₁₃	5552.0933	5551.5127	11.5
mCD4-P3Y	38	C ₂₂₁ H ₃₁₄ N ₅₄ O ₇₀ S ₇	5071.7081	5071.5005	12.8
mCD4-P3pF	67	C ₂₃₃ H ₃₂₆ N ₅₄ O ₇₆ S ₇	5323.9318	5323.5850	10.7
mCD4-P3Asu	23	C ₂₁₅ H ₃₃₈ N ₅₄ O ₇₆ S ₇	5119.8291	5119.5283	10.8
mCD4-E13	58	C ₂₀₈ H ₃₁₆ N ₅₄ O ₈₀ S ₇	5077.5750	5077.1021	11.4
mCD4-Nter3 硫酸酯	36	C ₂₂₁ H ₃₁₄ N ₅₄ O ₇₉ S ₁₀	5311.9007	5311.5166	13.9 (20-35%持续 20min)
mCD4-Cter3 硫酸酯	43	C ₂₂₁ H ₃₁₄ N ₅₄ O ₇₉ S ₁₀	5311.9007	5311.4155	14.0 (20-35%持续 20min)

[0195] 对照肽 mCD4-HS12 的合成按照 W0/2009/098147 和 Nature Chemical Biology, 2009, 5(10), 743-748 中所述的进行。

[0196] 实施例 2 :Biacore 评价

[0197] 2.1. 操作

[0198] 采用两种不同 gp120, 其源自 X4 型分离物(gp120MN) 和 R5 型分离物(gp120YU2)。通过表面等离子体共振(Biacore)测量不同分子对 gp120 与各种受体或共受体相互作用的抑制能力。

[0199] 为此,根据(Vivès 等人. J. Biol. Chem. 279, 54327-54333, 2005)所描述的操作,蛋白(在此情况下是 gp120 包膜蛋白)可以固定在生物传感器(Sensorchip CM4Biacore)的表面。当注射至包被有 MN(X4) 或 YU2(R5) gp120 包膜的表面时, mCD4 结合并暴露 gp120 上的 CD4i 表位,该表位负责 mAb17b 的包膜结合(图 5A) (mAb17b 抗体识别 CD4 诱导的表位并模拟共受体 CCR5 或 CXCR4)。当 mCD4 或待测试化合物注射至这些表面时, gp120 和 mAb17b 之间的相互作用信号测量为时间的函数(图 5A 至 C)。

[0200] 在另一套实验中, mAb17b 包被至表面上, 以及 gp120 单独(灰线)或用 mCD4 预先孵育后、或待测试化合物注射至这些表面(图 5D 和 5G)。 gp120 和 mAb17b 之间的相互作用信号测量为时间的函数。

[0201] 在另一套实验中, sCD4 包被至表面上, 以及 gp120 单独(灰线) 或用待测试化合物预先孵育后, 注射至这些表面(图 5E 和 5H)。 gp120 和 sCD4 之间的相互作用信号测量为时间的函数。

[0202] 在另一套实验中, 肝素包被至表面上, 以及 gp120 单独(灰线)或用待测试化合物预先孵育后, 注射至这些表面(图 5F)。 gp120 和肝素之间的相互作用信号测量为时间的函数。

[0203] 浅色线和深色线之间的差异, 显示测试化合物对于(vis-à-vis) gp120 和固定在生物传感器上的分子之间的相互作用的抑制能力。

[0204] 2. 2. 结果

[0205] mCD4-P3Y_{S03}完全抑制 mAb17b 结合至 gp120/mCD4 复合物

[0206] 当注射至包被有 MN(X4) 或 YU2(R5) 包膜的 gp120 表面时, mCD4 结合并暴露 gp120 上的 CD4i 表位, 该表位负责 mAb17b 的包膜结合(如 5A)。用 mCD4-P3Y 和 mCD4-P3Y_{S03}进行的相同实验(分别图 5B 和 5C)显示 mCD4-P3Y 部分抑制 mAb17b 对 MN(X4) 的结合(图 5B), 而 mCD4-P3Y_{S03}完全抑制 mAb17b 对 MN(X4) 和 YU2(R5) 的结合(图 5C)。

[0207] mCD4-P3Y_{S03}完全抑制 MN(X4) 包膜对 mAb17b 和 CD4 的结合, 以及部分抑制对肝素的结合

[0208] 当注射至 mAb17b 表面时, MN 包膜不结合 17b 表面(CD4i 表位被掩盖, 浅色线, 图 5D)。当 gp120 包膜处于和 mCD4 的复合物中时, 发生这种结合。当注射入与 mCD4-P3Y_{S03}的复合物时, 结合被完全抑制(图 5D)。MN 包膜结合 CD4 表面。当注入和 mCD4-P3Y_{S03}的复合物时, 结合被完全抑制(图 5E), 而 mCD4-P3Y_{S03}仅部分抑制 MN 对肝素的结合(图 5F)。

[0209] mCD4-P3YS03 完全抑制 YU2(R5) 包膜对 mAb17b 和 CD4 的结合

[0210] 当注射至 mAb17b 表面时, YU2 包膜部分结合 17b 表面。当注射 mCD4/YU2 复合物时, 这种结合被增强。这种结合被 mCD4-P3Y_{S03}完全抑制(图 5G)。YU2 包膜结合 CD4 表面。当注入与 mCD4-P3Y_{S03}的复合物时, 结合被完全抑制(图 5H)。由于 YU2 包膜不结合肝素表面, 在肝素表面上的实验未进行。

[0211] 实施例 3: 本发明的肽对 X4- 向性 HIV-1-LAI 和 R5- 向性 HIV-1/Ba-L 株的抗病毒活性

[0212] 3. 1. 操作

[0213] 如 W0/2009/098147 和 Nature Chemical Biology, 2009, 5(10), 743-748 中所述进行抗病毒活性。

[0214] 简言之, 在植物血细胞凝集素 -P (PHA-P) - 活化的外周血液单核细胞 (PBMC) 上体

外扩增和滴定 X4- 向性 HIV-1-LAI (Barre-Sinoussi, Science220, 868-71, 1983) 或 R5- 向性 HIV-1/Ba-L (Gartner 等人, Science233, 215-9, 1986) 株。使用 Kärber 公式计算组织培养感染剂量 (Kärber, Arch. Exp. Path. Pharmac. 162, 480-483, 1931)。对于抗病毒试验, 使用每种药物的六个浓度 (在 $0.5 \mu\text{M}$ 至 160pM 之间 1:5 稀释) 预处理 30 分钟 PHA-P- 活化的 PBMC, 并用 X4- 向性 LAI 或 R5- 向性 Ba-L 株的一百 50% 组织培养感染剂量 (TCID₅₀) 感染。在培养阶段维持用药, 在感染后第 7 天收集细胞上清液并在 -20°C 贮存。在这些实验中使用叠氮胸苷 (AZT) 作为内部对照。通过使用 RetroSys HIV RT 试剂盒 (Innovagen) 在细胞培养上清液中通过定量逆转录酶 (RT) 的活性测定病毒的复制。平行地, 通过甲基四唑盐 (MTT) 试验在第 7 天在未感染的 PHA-P- 活化的 PBMC 中评价样品的细胞毒性。实验一式三份的进行, 使用 SoftMaxPro 软件计算 50、70 和 90% 有效剂量和细胞毒剂量。

[0215] 用每种调查中的药物 (1:5 稀释 $0.5 \mu\text{M}$ 至 160pM 之间) 处理 PHA-P- 活化的 PBMC, 并用 100TCID₅₀ 的 HIV-1-LAI (X4 向性) 或 /Ba-L (R5 向性) 株感染 PHA-P- 活化的 PBMC。在培养过程维持分子和病毒, 在感染后第 7 天收集细胞上清液用于逆转录酶活性的定量。实验一式三份的进行, 使用 SoftMaxPro 软件计算 50、70 和 90% 有效剂量 (ED), 以 nM 计 ($\pm$ S. D.)。所有这些分子均没有显示超过 $1 \mu\text{M}$ 的细胞毒性。

[0216] 3.2. 结果

[0217] 当单独使用时, 在最高测试浓度下 (500nM) 没有阴离子肽表现出抗病毒活性。然而, 当与 mCD4 共轭时, 它们显示对 LAI 和 / 或 Ba-L 株的抑制活性, 对于 mCD4-P3YSO₃ 低至 0.5nM 的有效剂量给出 50% 的抑制 (ED₅₀), 对于 mCD4-HS₁₂ 相当于 1.4nM (见下表 4)。

[0218] 表 4: 本发明共轭肽的抗病毒活性 (抑制 50、70 和 90% HIV-1 复制所需的有效剂量 (ED, 三次测定的平均值), 以 nM ($\pm$ s. d.) 表示)

[0219]

		VIH-1-LAI(X4)		VIH-1/Ba-L(R5)	
		平均	$\pm$ S.D *	平均	$\pm$ S.D
P3YSO3	ED50	>500	—	>500	—
	ED70	>500	—	>500	—
	ED90	>500	—	>500	—
P3Y	ED50	>500	—	>500	—
	ED70	>500	—	>500	—
	ED90	>500	—	>500	—
P3pF	ED50	>500	—	>500	—
	ED70	>500	—	>500	—
	ED90	>500	—	>500	—
P3Asu	ED50	>500	—	>500	—
	ED70	>500	—	>500	—
	ED90	>500	—	>500	—

[0220]

		VIH-1-LAI(X4)		VIH-1/Ba-L(R5)	
		平均	± S.D *	平均	± S.D
E13	ED50	>500	—	>500	—
	ED70	>500	—	>500	—
	ED90	>500	—	>500	—
mCD4	ED50	201	161	>500	—
	ED70	242	169	>500	—
	ED90	317	187	>500	—
mCD4P3YSO3	ED50	0.5	0.2	1.3	1.1
	ED70	0.6	0.3	3.1	2.7
	ED90	1.1	0.8	20	9.2
mCD4 P3Y	ED50	98	36	454	104
	ED70	124	74	498	11
	ED90	160	125	>500	—
mCD4 P3pF	ED50	8.2	6.5	245	196
	ED70	11	7.4	>500	—
	ED90	20	11	>500	—
mCD4P3Asu	ED50	15	5	499	4.3
	ED70	20	7	>500	—
	ED90	31	14	>500	—
mCD4 E13	ED50	30	25	435	159
	ED70	36	31	451	121
	ED90	48	41	>500	—
mCD4-PEO2-HP12L	ED50	1.4	1.2	18	9.6
	ED70	1.7	1.6	215	231
	ED90	3.5	5.3	>500	—
AZT	ED50	11	6	8.7	7.0
	ED70	21	15	16	11
	ED90	60	53	38	28
*SD:标准偏差					

[0221] 这些分子均未显示高达最高测试剂量的细胞毒性(0.5 μM)。

[0222] 实施例4:mCD4-P3YSO3 对 92UG029、SF162、92US723、96USHIPS4、92HT599 和 98IN017 株的抗病毒活性

[0223] 4.1. 操作

[0224] 抗病毒分析延伸到一系列更加临床相关的主要株,包括 92UG029、SF162、92US723、96USHIPS4、92HT599 和 98IN017。

[0225] 用参照淋巴向性 HIV-1/LAI 株(Barre-Sinoussi 等人,1983)或用参照巨噬细胞向性 HIV-1/Ba-L 株(Gartner 等人,1986)感染植物血细胞凝集素(PHA)-P-活化的 PBMC。这些病毒在体外用 PHA-P-活化的血单核细胞扩增。病毒储液(含临床分离物)用 PHA-P-活化的 PBMC 滴定,使用 Kärber 公式计算 50% 组织培养感染剂量(TCID50)(Kärber, 1931)。用 5 个浓度(在 500nM 至 320pM 之间 1:5 稀释)的各待测试分子孵育病毒(125TCID50)30 分钟,并加入至 150000PBMC (m. o. i. ~ 0.001)。在感染后第 7 天收集细胞上清液并在 -20℃ 贮存。在有些情况下,在病毒攻击之前将化合物加入至细胞。通过使用 Lenti RT Activity 试剂盒(Cavisi)在细胞培养上清液中通过定量逆转录酶(RT)的活性测定病毒复制,使用 AZT

作为参照抗 HIV-1 分子。平行地,使用比色甲基四唑盐(MTS/PMS)分析(Promega)在第 7 天在未感染的 PHA-P- 活化的 PBMC 中评价细胞毒性。实验一式三份的进行,使用 SoftMaxPro 软件计算 50、70 和 90% 有效剂量(ED)。

[0226] 4.2. 结果

[0227] 如下表 5 中所示,mCD4-P3YSO3 显示高水平的抗病毒活性,其特征在于对于它们五个而言 ED₅₀ 在 0.2 至 1.2nM 的范围,对于 HIV-198IN017 (一种 clade C 病毒)是 29nM。对于 LAI 和 Ba-L 株,mCD4 或 P3YSO₃仅为微弱的活性或没有活性,进一步支持了偶联策略所诱导的很强的协同效应。没有分子在高达 1 μM 时表现出细胞毒性。

[0228] 表 5 :AZT、mCD4-P3YSO₃、P3YSO₃和 mCD4 对临床 HIV-1 分离物的抗 HIV-1 活性(抑制 50、70 和 90%HIV-1 复制所需的有效剂量(ED,三次测定的平均值),以 nM(±s. d.) 表示)

[0229]

病毒株: Clade-向性		92UG029 A-X4	SF162 B-R5	92US723 B-R5/X4	96USHIPS 4 B-R5/X4	92HT599 B-X4	98IN01 7 C-X4
AZT	ED ₅₀	7±0	8±7	8±0.1	19±9	9±4	8±3
	ED ₇₀	16±3	13±8	17±1	27±11	22±5	19±5
	ED ₉₀	61±17	31±3	59±19	56±15	110±13	108±25
mCD4-P3YSO ₃	ED ₅₀	0.2±0.0	0.3±0.2	0.3±0.1	1.2±1	0.5±0.2	29±18
	ED ₇₀	0.3±0.1	0.4±0.3	0.35±0.2	1.6±1.2	1.3±0.9	147±9
	ED ₉₀	0.8±0.3	0.9±0.2	0.45±0.2	3±1.4	3.5±0.0	> 500
P3YSO ₃	ED ₅₀	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
	ED ₇₀	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
	ED ₉₀	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
mCD4	ED ₅₀	403±76	245±155	23±1	> 500	355±155	> 500
	ED ₇₀	> 500	352±105	34±10	> 500	> 500	> 500
	ED ₉₀	> 500	> 500	52±22	> 500	> 500	> 500

[0230] 我们还观察到 mCD4-P3YSO3 不需要用待活化的病毒进行预先孵育。实际上,在病毒攻击之前将分子加入至细胞,或在细胞感染恢复之前将分子加入至病毒,结果一致(cf. 表 7)。

[0231] 表 7 :AZT、mCD4-P3YSO3、P3YSO3 和 mCD4 对 LAI HIV-1 的抗 HIV-1 活性(当化合物用细胞或用病毒预先孵育时,抑制 50、70 和 90%HIV-1 复制所需的有效剂量(ED,三次测定的平均值),以 nM(±s. d.) 表示)

[0232]

		预处理的细胞	预处理的病毒
AZT	ED ₅₀	16.5 ± 12	20 ± 12

[0233]

	ED ₇₀	33 ± 18	38 ± 18
	ED ₉₀	96 ± 11	111 ± 40
mCD4- P3YSO₃	ED ₅₀	0.5 ± 0.2	0.5 ± 0.3
	ED ₇₀	0.6 ± 0.2	0.7 ± 0.3
	ED ₉₀	1 ± 0.2	0.9 ± 0.2
P3YSO₃	ED ₅₀	> 500	> 500
	ED ₇₀	> 500	> 500
	ED ₉₀	> 500	> 500
mCD4	ED ₅₀	310 ± 190	406 ± 94
	ED ₇₀	> 500	474 ± 27
	ED ₉₀	> 500	> 500

[0234] 实施例 5 :mCD4-P3YSO₃对 SHIVsf162p3 细胞的细胞内抗病毒活性

[0235] 5.1. 操作

[0236] 使用 HIV LTR 控制下表达荧光素酶的 TZN-b1 细胞。这些细胞表达高水平的 CD4 和 CCR5,并易于感染 HIV-1/-2 和 SIV。这些细胞一经感染,病毒 Tat 将诱导荧光素酶的转录。Luc 信号和感染量成比例。我们将待测试化合物(mCD4、mCD4-HS12 或 mCD4-P3YSO₃)的系列稀释添加至细胞中,并随后添加病毒。48 小时后,读出得到的 Luc 信号。

[0237] 试验一式两份进行。

[0238] 5.2. 结果

[0239] 获得的结果显示于下表 6。

[0240]

	EC50 (nM)	
	第一次实验	第二次实验
mCD4	4617	6126
mCD4-HS12	781	631
mCD4-P3YSO ₃	34	37

[0241] 结论

[0242] 因此,本研究表明相对较小的合成分子,其包括连接至阴离子多肽的 3kDaCD4 模拟物,能有效地模拟若干大的 gp120 配体,包括 CD4 和识别 mAb 的共受体结合位点。值得注意的是,在本发明中所描述的共轭物中和 R5 和 X4- 向性 HIV-1,这是一个显著的优势,因为出现利用 CXCR4 的病毒株能危害 CCR5 特异性拮抗剂的疗效,而对于 CXCR4 尚没有可用的抑制剂。

[0243] 令人惊讶的是,本发明的肽,对于 X4 和 R5 病毒株,都比现有技术中的分子(mCD4-HS12)表现出更好的抗病毒活性,从而可以提高对 HIV 病毒进入宿主细胞的抑制。

[0244] 共轭分子 mCD4-P3Y₅₀₃具有比任何其它测试化合物好得多的抑制作用(针对 X4 和 R5,ED50 分别为 0.5 和 1.3)。

[0245] 缩写:

[0246] Fmoc :9 - 芴甲氧羰基

- [0247] DMF :二甲基甲酰胺
- [0248] HATU: 六氟磷酸化N[(二甲基氨基)-1H-1,2,3-三氮唑并[4,5-b]吡啶-1-基亚甲基]-N-甲基甲胺的N-氧化物
- [0249] DIEA :二异丙基乙基胺
- [0250] SPDP :N-琥珀酰亚胺基-3(2-吡啶二硫代)丙酸酯
- [0251] TFA :三氟乙酸
- [0252] EDT :乙二硫醇
- [0253] TIS :三异丙基硅烷
- [0254] DTT :1,4-二硫苏糖醇
- [0255] MPLC :中压液相色谱
- [0256] ES⁺MS :电喷雾质谱, 正模式
- [0257] GSH :还原型谷胱甘肽
- [0258] GSSG :氧化型谷胱甘肽
- [0259] HPLC :高效液相色谱
- [0260] RP-HPLC :反相高效液相色谱
- [0261] SMPH :琥珀酰亚胺基-6-[β-马来酰亚胺基丙酰氨基]己酸酯
- [0262] SATP :N-琥珀酰亚胺基-S-乙酰硫代丙酸酯
- [0263] RT :室温
- [0264] Rt :保留时间
- [0265] Cbz :苄氧基羰基
- [0266] pMBn :对甲氧苄基
- [0267] Bn :苄基
- [0268] Ac :乙酰基
- [0269] Me :甲基
- [0270] Et :乙基
- [0271] eq :当量
- [0272] HRMS :高分辨质谱
- [0273] ESI :电喷雾电离
- [0274] LC-ESI-TOF-MS :液相色谱 / 电喷雾电离飞行时间质谱
- [0275] LCMS :液相色谱 / 质谱
- [0276] DMSO :二甲基亚砷。

[0001]

序列表

<110> 巴斯德研究所
国家科学研究中心
巴黎第十一大学

<120> 含有与聚阴离子多肽偶联的、衍生自CD4受体的肽的用于治疗艾滋病的新共轭分子

<130> D29525

<150> EP 11305309.4
<151> 2011-03-18

<150> US 61/590,992
<151> 2012-01-26

<160> 21

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 26
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> CD4衍生肽

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> TPA-Asn

<220>
<221> misc_feature
<222> (22)..(22)
<223> Xaa代表联苯基丙氨酸

<220>
<221> MOD_RES
<222> (26)..(26)
<223> Val-NH2

<400> 1
Asn Leu His Lys Cys Gln Leu Arg Cys Ser Ser Leu Gly Leu Leu Gly
1 5 10 15
Arg Cys Ala Gly Ser Xaa Cys Ala Cys Val
20 25

<210> 2
<211> 26
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> CD4衍生肽

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> TPA-Asn

<220>
<221> misc_feature
<222> (22)..(22)
<223> Xaa代表联苯基丙氨酸

<400> 2
Asn Leu His Lys Cys Gln Leu Arg Cys Ser Ser Leu Gly Leu Leu Gly
1 5 10 15

[0002]

Arg Cys Ala Gly Ser Xaa Cys Ala Cys Val
20 25

<210> 3
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 人工肽

<400> 3

Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu
1 5 10

<210> 4
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 人工肽

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> Xaa代表磺基酪氨酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> Xaa代表磺基酪氨酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> Xaa代表磺基酪氨酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> Xaa代表磺基酪氨酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> Xaa代表磺基酪氨酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> Xaa代表磺基酪氨酸

<400> 4

Ser Xaa Asp Xaa Ser Xaa Asp Xaa Ser Xaa Asp Xaa Ser
1 5 10

<210> 5
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 人工肽

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)

[0003]

<223> Xaa代表醛氨酸磷酸酯

<220>

<221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> Xaa代表醛氨酸磷酸酯

<220>

<221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> Xaa代表醛氨酸磷酸酯

<220>

<221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> Xaa代表醛氨酸磷酸酯

<220>

<221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> Xaa代表醛氨酸磷酸酯

<220>

<221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> Xaa代表醛氨酸磷酸酯

<400> 5

Ser Xaa Asp Xaa Ser Xaa Asp Xaa Ser Xaa Asp Xaa Ser
1 5 10

<210> 6

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 人工肽

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa代表对-羧甲基苯丙氨酸

<220>

<221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> Xaa代表对-羧甲基苯丙氨酸

<220>

<221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> Xaa代表对-羧甲基苯丙氨酸

<220>

<221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> Xaa代表对-羧甲基苯丙氨酸

<220>

<221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> Xaa代表对-羧甲基苯丙氨酸

<220>

<221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> Xaa代表对-羧甲基苯丙氨酸

<400> 6

Ser Xaa Asp Xaa Ser Xaa Asp Xaa Ser Xaa Asp Xaa Ser
1 5 10

[0004]

<210> 7
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 人工肽

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> Xaa代表氨基辛二酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> Xaa代表氨基辛二酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> Xaa代表氨基辛二酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> Xaa代表氨基辛二酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> Xaa代表氨基辛二酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(13)
<223> Xaa代表氨基辛二酸

<400> 7
Ser Xaa Asp Xaa Ser Xaa Asp Xaa Phe Xaa Phe Asp Xaa Ser
1 5 10

<210> 8
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 人工肽

<400> 8
Ser Tyr Asp Tyr Ser Tyr Asp Tyr Ser Tyr Asp Tyr Ser
1 5 10

<210> 9
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 人工肽

<400> 9
Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp
1 5 10

<210> 10

[0005]

<211> 13
 <212> PRT
 <213> 人工

 <220>
 <223> 人工肽

 <220>
 <221> misc feature
 <222> (1)..(13)
 <223> Xaa代表磺基酪氨酸

 <400> 10
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5 10

 <210> 11
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 人工

 <220>
 <223> 人工肽

 <220>
 <221> misc feature
 <222> (1)..(13)
 <223> Xaa代表酪氨酸磷酸酯

 <400> 11
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5 10

 <210> 12
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 人工

 <220>
 <223> 人工肽

 <220>
 <221> misc feature
 <222> (1)..(13)
 <223> Xaa代表氨基辛二酸

 <400> 12
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5 10

 <210> 13
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 人工

 <220>
 <223> 人工肽

 <220>
 <221> misc feature
 <222> (1)..(13)
 <223> Xaa代表对-羧甲基苯丙氨酸

 <400> 13
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

[0006]

1	5	10
<210> 14		
<211> 13		
<212> PRT		
<213> 人工		
<220>		
<223> 人工肽		
<220>		
<221> MOD_RES		
<222> (1)..(1)		
<223> NH ₂ -(CH ₂) ₃ -CO-Ser		
<220>		
<221> misc feature		
<222> (2)..(2)		
<223> Xaa代表磺基酪氨酸		
<220>		
<221> misc feature		
<222> (4)..(4)		
<223> Xaa代表磺基酪氨酸		
<220>		
<221> misc feature		
<222> (6)..(6)		
<223> Xaa代表磺基酪氨酸		
<220>		
<221> misc feature		
<222> (8)..(8)		
<223> Xaa代表磺基酪氨酸		
<220>		
<221> misc feature		
<222> (10)..(10)		
<223> Xaa代表磺基酪氨酸		
<220>		
<221> misc feature		
<222> (12)..(12)		
<223> Xaa代表磺基酪氨酸		
<400> 14		
Ser Xaa Asp Xaa Ser Xaa Asp Xaa Ser Xaa Asp Xaa Ser		
1 5 10		
<210> 15		
<211> 13		
<212> PRT		
<213> 人工		
<220>		
<223> 人工肽		
<220>		
<221> MOD_RES		
<222> (1)..(1)		
<223> NH ₂ -(CH ₂) ₃ -CO-Ser		
<400> 15		
Ser Tyr Asp Tyr Ser Tyr Asp Tyr Ser Tyr Asp Tyr Ser		
1 5 10		
<210> 16		
<211> 13		
<212> PRT		

[0007]

<213> 人工

<220>
<223> 人工肽

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> NH₂-(CH₂)₃-CO-Ser

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> Xaa代表对-羧甲基苯丙氨酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> Xaa代表对-羧甲基苯丙氨酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> Xaa代表对-羧甲基苯丙氨酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> Xaa代表对-羧甲基苯丙氨酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> Xaa代表对-羧甲基苯丙氨酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> Xaa代表对-羧甲基苯丙氨酸

<400> 16

Ser Xaa Asp Xaa Ser Xaa Asp Xaa Ser Xaa Asp Xaa Ser
1 5 10

<210> 17
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 人工肽

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> NH₂-(CH₂)₃-CO-Ser

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> Xaa代表氨基辛二酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> Xaa代表氨基辛二酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> Xaa代表氨基辛二酸

[0008]

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> Xaa代表氨基辛二酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> Xaa代表氨基辛二酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(13)
<223> Xaa代表氨基辛二酸

<400> 17

Ser Xaa Asp Xaa Ser Xaa Asp Xaa Phe Xaa Phe Asp Xaa Ser
1 5 10

<210> 18
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 人工肽

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> NH₂-(CH₂)₃-CO-Glu

<400> 18

Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu
1 5 10

<210> 19
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 人工肽

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> Xaa选自: 酪氨酸、磺基酪氨酸、酪氨酸磺酸酯、氨基辛二酸和对-羧甲基苯丙氨酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> Xaa选自: 酪氨酸、磺基酪氨酸、酪氨酸磺酸酯、氨基辛二酸和对-羧甲基苯丙氨酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> Xaa选自: 酪氨酸、磺基酪氨酸、酪氨酸磺酸酯、氨基辛二酸和对-羧甲基苯丙氨酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> Xaa选自: 酪氨酸、磺基酪氨酸、酪氨酸磺酸酯、氨基辛二酸和对-羧甲基苯丙氨酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> Xaa选自: 酪氨酸、磺基酪氨酸、酪氨酸磺酸酯、氨基辛二酸和对-羧甲基苯丙氨酸

<220>

[0009]

<221> misc feature
 <222> (12)..(12)
 <223> Xaa选自: 酪氨酸、磺基酪氨酸、酪氨酸磺酸酯、氨基辛二酸和对-羧甲基苯丙氨酸
 <400> 19

Ser Xaa Asp Xaa Ser Xaa Asp Xaa Ser Xaa Asp Xaa Ser
 1 5 10

<210> 20
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 阴离子多肽

<220>
 <221> misc feature
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa代表磺基酪氨酸

<220>
 <221> misc feature
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa代表磺基酪氨酸

<220>
 <221> misc feature
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa代表磺基酪氨酸

<400> 20

Ser Xaa Asp Xaa Ser Xaa Asp Tyr Ser Tyr Asp Tyr Ser
 1 5 10

<210> 21
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 阴离子多肽

<220>
 <221> misc feature
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa代表磺基酪氨酸

<220>
 <221> misc feature
 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa代表磺基酪氨酸

<220>
 <221> misc feature
 <222> (12)..(12)
 <223> Xaa代表磺基酪氨酸

<400> 21

Ser Tyr Asp Tyr Ser Tyr Asp Xaa Ser Xaa Asp Xaa Ser
 1 5 10

1

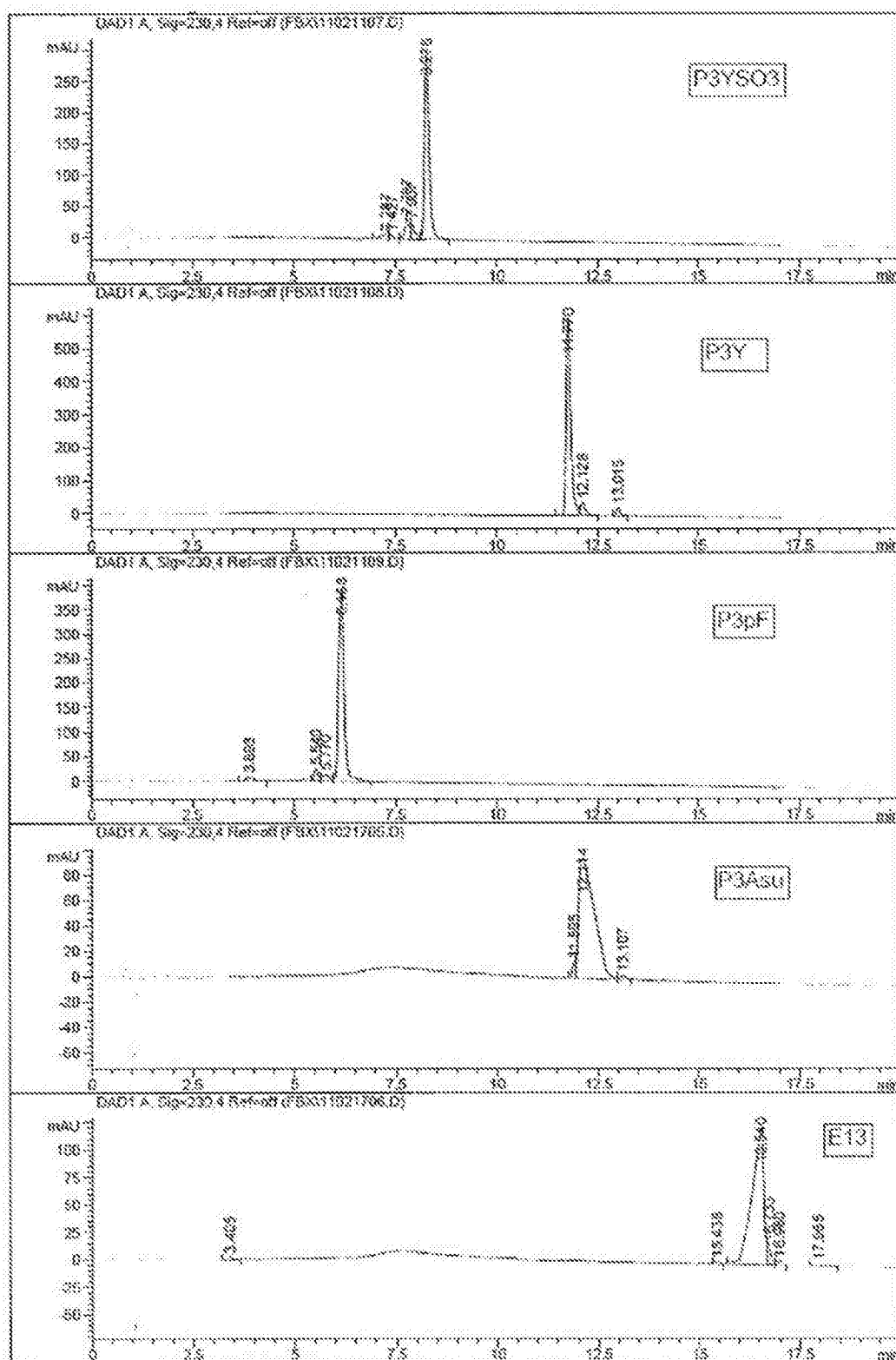


图 2

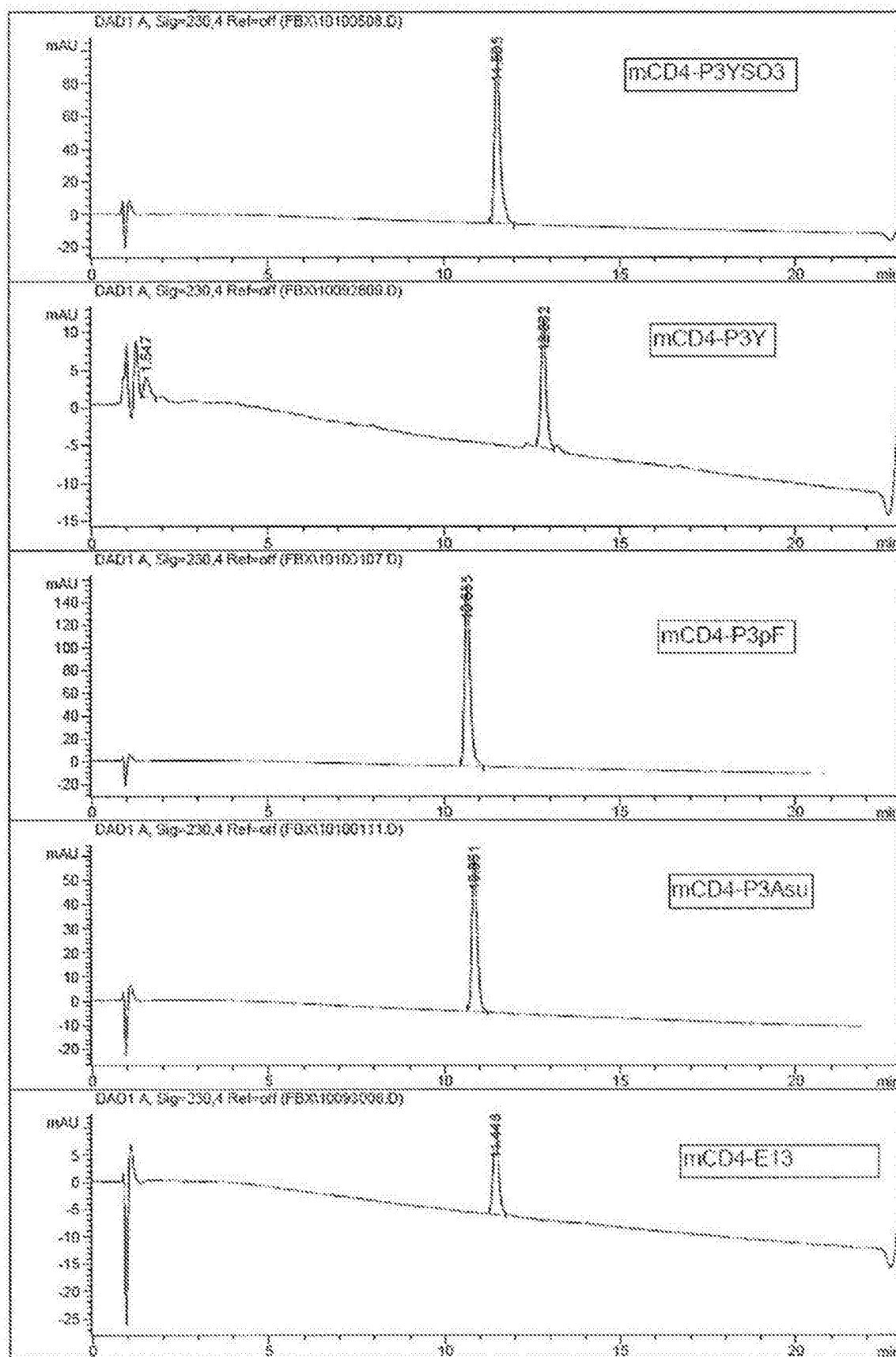
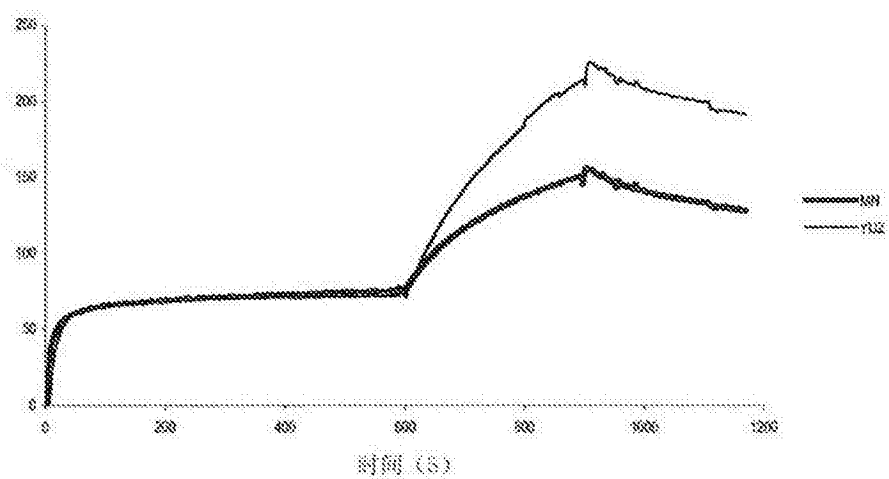
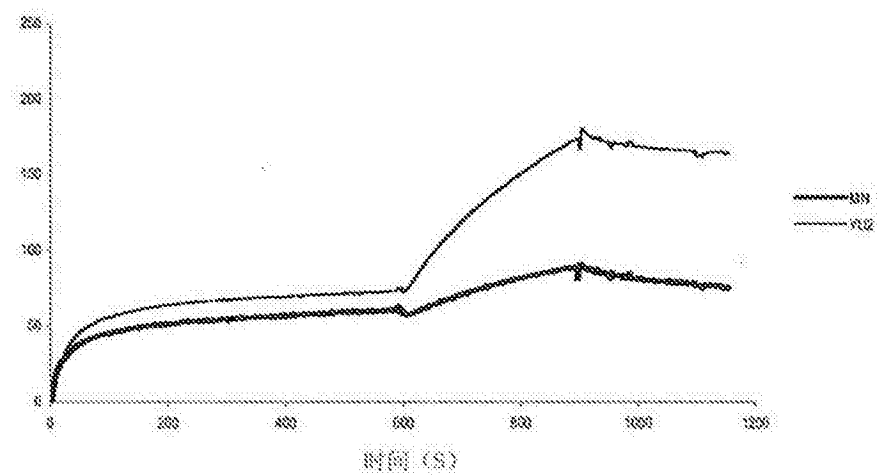


图 4

A



B



C

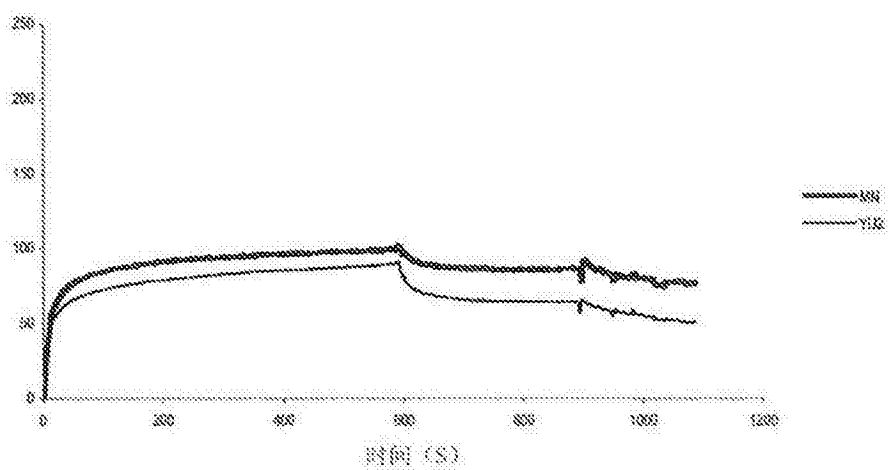
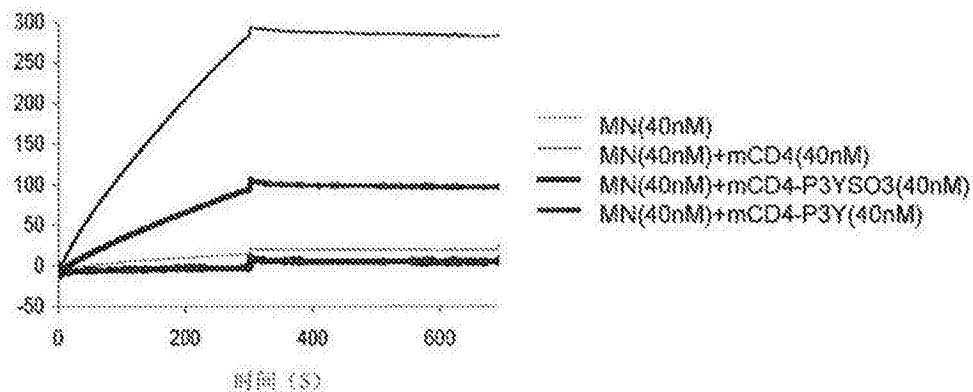
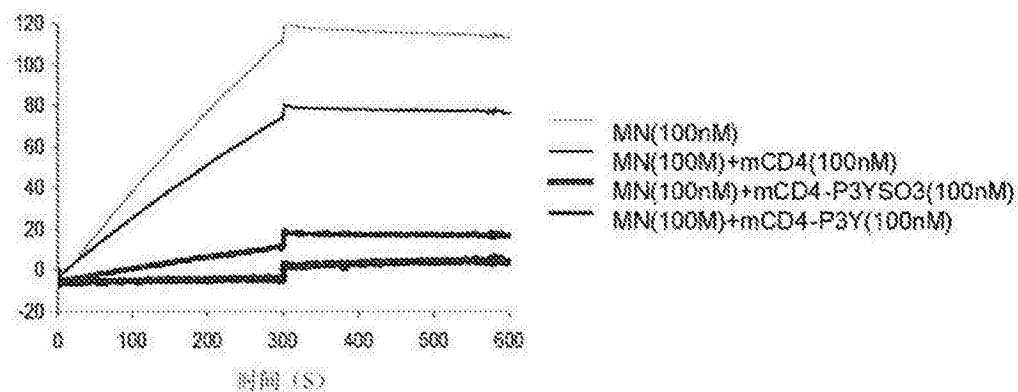


图 5

D



E



F

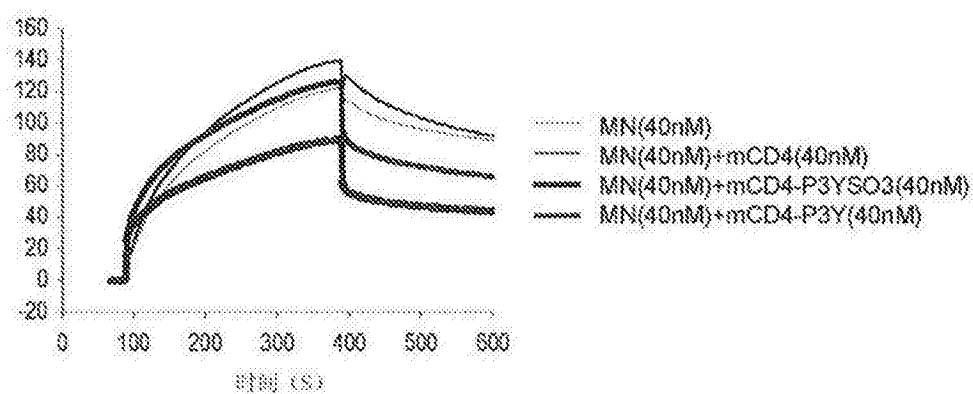
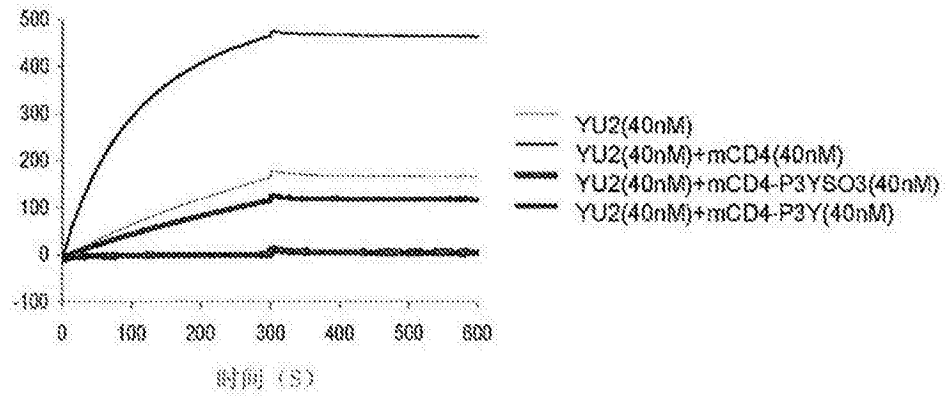


图5(续)

G



H

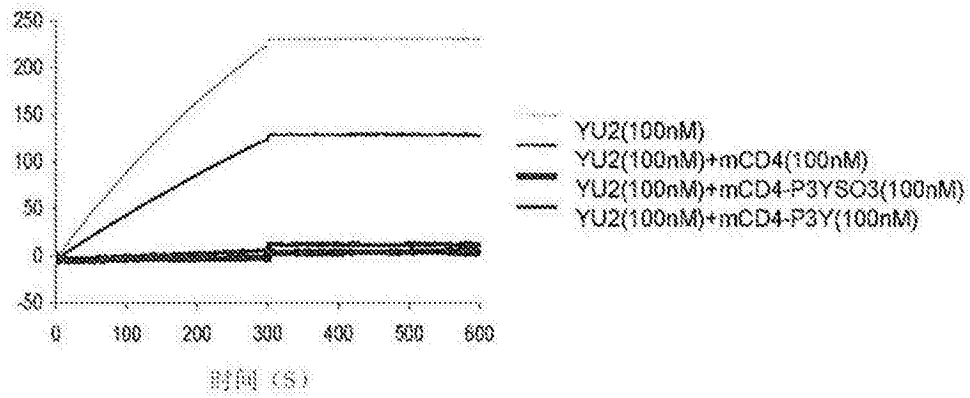


图5(续)