



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117295755 A

(43) 申请公布日 2023. 12. 26

(21) 申请号 202280033562.9

(22) 申请日 2022.05.12

(30) 优先权数据

21173587.3 2021.05.12 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.11.07

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2022/062893 2022.05.12

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/238530 EN 2022.11.17

(71) 申请人 哥本哈根大学

地址 丹麦哥本哈根

(72) 发明人 V·塞雷凯特

C·R·O·比奇-巴特林

K·斯特罗姆戈德

(74) 专利代理机构 隆天知识产权代理有限公司

72003

专利代理师 付文川

(51) Int.Cl.

G07K 5/103 (2006.01)

权利要求书10页 说明书54页

序列表34页 附图11页

(54) 发明名称

PSD-95抑制剂及其用途

(57) 摘要

本发明是关于能够结合至PSD-95的PDZ结构域的化合物及其作为由PSD-95介导的蛋白-蛋白相互作用的抑制剂的医学用途。

1. 一种化合物或其药学上可接受的盐,所述化合物包含:

a. 第一肽 ( $P_1$ ),所述第一肽包含氨基酸序列 $X_2TX_3V$ (SEQ ID NO:53) 或由其组成,其中 $X_2$ 选自E和S;

$X_3$ 选自L、T、V、R和D;

b. 第二肽 ( $P_2$ ),所述第二肽包含氨基酸序列 $X_5TX_6V$ (SEQ ID NO:55) 或由其组成,其中 $X_5$ 选自E和S;

$X_6$ 选自L、T、V、R和D;和

c. 细胞穿透肽 (CPP), 其选自以下:

i. 由3至20个L-精氨酸残基组成的聚-L-精氨酸肽 (聚-Arg);

ii. yGrkkrrrqr (SEQ ID NO:9, D-TAT);

iii. RQIKIWFQNRRMKWKK (SEQ ID NO:14, L-Pen);

iv. rqikiwfnrrmkwkk (SEQ ID NO:15, D-Pen);

v. RKKRRRESRKKRRRES (SEQ ID NO:17, L-DPV3);

vi. LLILRRRIRKQAHHSK (SEQ ID NO:18, L-pVEC);

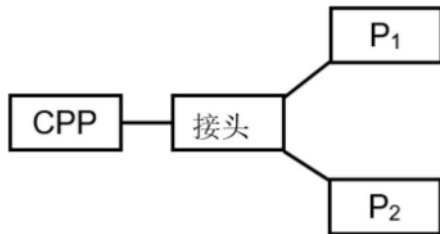
vii. KLALKLALKALKAAALKLA (SEQ ID NO:16, L-MAP);

viii. PLIYLRLLRGQF (SEQ ID NO:19, L-TP2);

ix. |(Dap)KAPETALD| (SEQ ID NO:21, MiniAp4);和

x. |Ff (Na12)RrRrQ|GABA-K (SEQ ID NO:22, CPP12),

其中所述CPP经由其C末端连接至接头,且 $P_1$ 和 $P_2$ 经由其N末端结合至所述接头,且所述化合物具有式(I)的通式结构:



式(I)

2. 如权利要求1所述的化合物,其中,

$P_1$ 包含序列 $X_1X_2TX_3V$ (SEQ ID NO:54) 或由其组成,其中 $X_1$ 选自K、V和I;

$X_2$ 选自E和S;且

$X_3$ 选自L、T、V、R和D;

$P_2$ 包含序列 $X_4X_5TX_6V$ (SEQ ID NO:56) 或由其组成,其中 $X_4$ 选自K、V和I;

$X_5$ 选自E和S;且

$X_6$ 选自L、T、V、R和D。

3. 如前述权利要求中任一项所述的化合物,其中 $P_1$ 和/或 $P_2$ 由4至10个氨基酸残基、例如5个氨基酸残基组成。

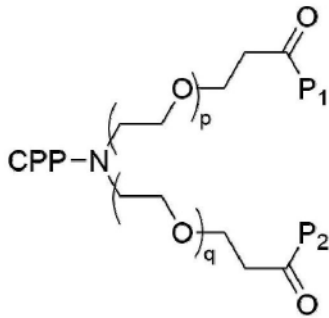
4. 如前述权利要求中任一项所述的化合物,其中 $X_3$ 和 $X_6$ 选自L、T、V和R。

5. 如前述权利要求中任一项所述的化合物,其中所述接头包含一个或多个PEG单元。

6. 如前述权利要求中任一项所述的化合物,其中所述接头包含一个或多个PEG单元,其中所述PEG单元中的一个的至少一个氧原子被氮原子替代以获得NPEG。

7. 如前述权利要求中任一项所述的化合物,其中所述接头包含一个或多个PEG单元,其中所述PEG单元中的一个的至少一个氧原子被氮原子替代以获得NPEG,且其中所述CPP通过酰胺键连接至所述接头的所述氮原子。

8. 如前述权利要求中任一项所述的化合物,其中所述接头包含一个或多个PEG单元,其中所述PEG单元中的一个的至少一个氧原子被氮原子替代以获得NPEG,且其中所述CPP通过酰胺键连接至所述接头的所述氮原子,且所述化合物具有式(III)的通式结构:



式(III)

其中

p是0至10的整数;且

q是0至10的整数。

9. 如前述权利要求中任一项所述的化合物,其中 $P_1$ 与 $P_2$ 相同。

10. 如前述权利要求中任一项所述的化合物,其中 $P_1$ 和 $P_2$ 由氨基酸序列KETLV (SEQ ID NO:2) 组成。

11. 如权利要求1至9中任一项所述的化合物,其中 $P_1$ 和 $P_2$ 由氨基酸序列KETT V (SEQ ID NO:3) 组成。

12. 如权利要求1至9中任一项所述的化合物,其中 $P_1$ 和 $P_2$ 由氨基酸序列KETV V (SEQ ID NO:4) 组成。

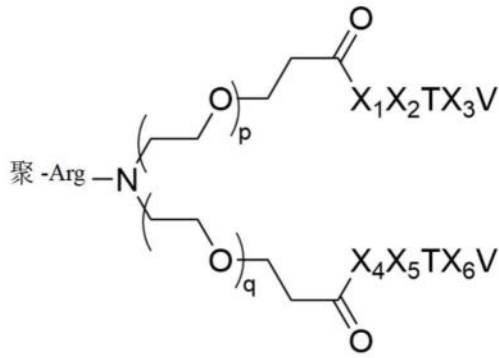
13. 如权利要求1至9中任一项所述的化合物,其中 $P_1$ 和 $P_2$ 由氨基酸序列KETR V (SEQ ID NO:5) 组成。

14. 如权利要求1至3或5至9中任一项所述的化合物,其中 $P_1$ 和 $P_2$ 由氨基酸序列ISTD V (SEQ ID NO:6) 组成。

15. 如权利要求1至9中任一项所述的化合物,其中 $P_1$ 和 $P_2$ 由氨基酸序列VETV V (SEQ ID NO:7) 组成。

16. 如前述权利要求中任一项所述的化合物,其中所述CPP是聚-L-精氨酸肽(聚-Arg), 其由3至20个L-精氨酸残基,例如3至15个、例如3至12个、例如3至10个L-精氨酸残基组成。

17. 如前述权利要求中任一项所述的化合物,其中所述化合物具有式(VI)的通式结构:



式(VI)

其中

$X_1$ 选自K、V和I；

$X_2$ 选自E和S；且

$X_3$ 选自L、T、V、R和D；

$X_4$ 选自K、V和I；

$X_5$ 选自E和S；

$X_6$ 选自L、T、V、R和D；

p是0至10的整数；

q是0至10的整数；且

聚-Arg是由3至20个L-精氨酸残基组成的聚-L-精氨酸肽。

18. 如前述权利要求中任一项所述的化合物,其中所述聚-Arg由3至20个L-精氨酸残基,例如3至15个、例如3至12个、例如3至10个L-精氨酸残基组成。

19. 如前述权利要求中任一项所述的化合物,其中所述CPP是RRRRRRRRR (SEQ ID NO: 12)。

20. 如权利要求1至18中任一项所述的化合物,其中所述CPP是RRRRRRRRR (SEQ ID NO: 57)。

21. 如权利要求1至18中任一项所述的化合物,其中所述CPP是RRRRRRR (SEQ ID NO: 58)。

22. 如权利要求1至18中任一项所述的化合物,其中所述CPP是RRRRRR (SEQ ID NO: 59)。

23. 如权利要求1至18中任一项所述的化合物,其中所述CPP是RRRRR (SEQ ID NO: 60)。

24. 如权利要求1至18中任一项所述的化合物,其中所述CPP是RRRR (SEQ ID NO: 61)。

25. 如权利要求1至18中任一项所述的化合物,其中所述CPP是RRR。

26. 如权利要求1至15中任一项所述的化合物,其中所述CPP是yGrkkrrqrrr (SEQ ID NO: 9, D-TAT)。

27. 如权利要求1至15中任一项所述的化合物,其中所述CPP是RQIKIWFQNRMMKWK (SEQ ID NO: 14, L-Pen)。

28. 如权利要求1至15中任一项所述的化合物,其中所述CPP是rqikiwfnrrmkwk (SEQ ID NO: 15, D-Pen)。

29. 如权利要求1至15中任一项所述的化合物,其中所述CPP是RKKRRRESRKKRRRES (SEQ

ID NO:17,L-DPV3)。

30. 如权利要求1至15中任一项所述的化合物,其中所述CPP是LLIILRRRIRKQAHHSK (SEQ ID NO:18,L-pVEC)。

31. 如权利要求1至15中任一项所述的化合物,其中所述CPP是KLALKLALKALKKAALKLA (SEQ ID NO:16,L-MAP)。

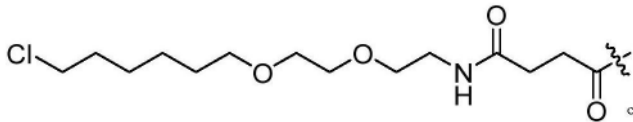
32. 如权利要求1至15中任一项所述的化合物,其中所述CPP是PLIYLRLLRGQF (SEQ ID NO:19,L-TP2)。

33. 如权利要求1至15中任一项所述的化合物,其中所述CPP是|(Dap)KAPETALD| (SEQ ID NO:21,MiniAp4)。

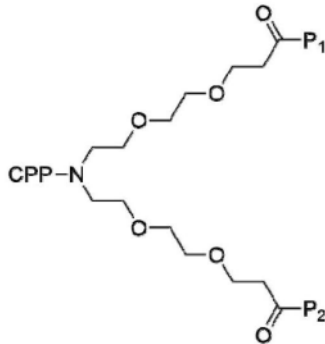
34. 如权利要求1至15中任一项所述的化合物,其中所述CPP是|Ff(Na12)RrRrQ|GABA-K (SEQ ID NO:22, CPP12)。

35. 如权利要求8或17中任一项所述的化合物,其中p是2且q是2。

36. 如前述权利要求中任一项所述的化合物,其中所述CPP的N末端被乙酰化,或其中所述CPP的N末端连接有氯烷烃标签(CA),其具有以下结构:



37. 如权利要求1所述的化合物,其中所述化合物具有式 (XXVIII) 的通式结构:



式(XXVIII)

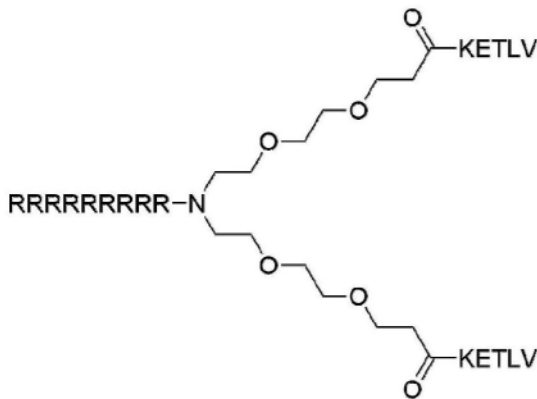
其中 $P_1$ 、 $P_2$ 和CPP是:

	<b>P<sub>1</sub></b>	<b>P<sub>2</sub></b>	<b>CPP</b>	
i.	KETLV (SEQ ID NO: 2)	KETLV (SEQ ID NO: 2)	L-Arg <sub>9</sub>	RRRRRRRRR (SEQ ID NO: 12)
ii.	KETLV (SEQ ID NO: 2)	KETLV (SEQ ID NO: 2)	L-Arg <sub>7</sub>	RRRRRRR (SEQ ID NO: 58)
iii.	KETLV (SEQ ID NO: 2)	KETLV (SEQ ID NO: 2)	L-Arg <sub>6</sub>	RRRRRR (SEQ ID NO: 59)
iv.	KETLV (SEQ ID NO: 2)	KETLV (SEQ ID NO: 2)	L-Arg <sub>5</sub>	RRRRR (SEQ ID NO: 60)
v.	KETLV (SEQ ID NO: 2)	KETLV (SEQ ID NO: 2)	L-Arg <sub>4</sub>	RRRR (SEQ ID NO: 61)
vi.	KETLV (SEQ ID NO: 2)	KETLV (SEQ ID NO: 2)	L-Arg <sub>3</sub>	RRR
vii.	KETTV	KETTV	L-Arg <sub>9</sub>	RRRRRRRRR

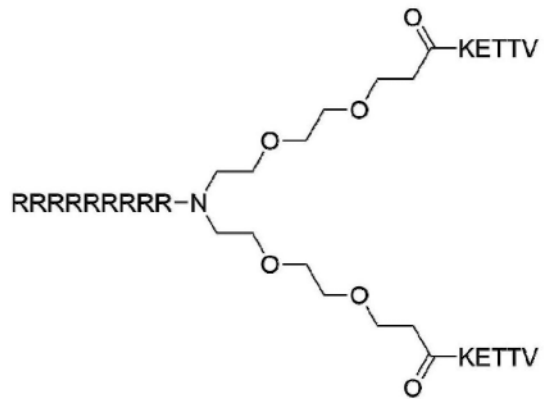
	(SEQ ID NO: 3)	(SEQ ID NO: 3)		(SEQ ID NO: 12)
viii.	KETVV (SEQ ID NO: 4)	KETVV (SEQ ID NO: 4)	L-Arg <sub>9</sub>	RRRRRRRRR (SEQ ID NO: 12)
ix.	KETRV (SEQ ID NO: 5)	KETRV (SEQ ID NO: 5)	L-Arg <sub>9</sub>	RRRRRRRRR (SEQ ID NO: 12)
x.	ISTDV (SEQ ID NO: 6)	ISTDV (SEQ ID NO: 6)	L-Arg <sub>9</sub>	RRRRRRRRR (SEQ ID NO: 12)
xi.	VETVV (SEQ ID NO: 7)	VETVV (SEQ ID NO: 7)	L-Arg <sub>9</sub>	RRRRRRRRR (SEQ ID NO: 12)
xii.	IETDV (SEQ ID NO: 1)	IETDV (SEQ ID NO: 1)	L-Arg <sub>9</sub>	RRRRRRRRR (SEQ ID NO: 12)
xiii.	IETDV (SEQ ID NO: 1)	IETDV (SEQ ID NO: 1)	L-Arg <sub>7</sub>	RRRRRRR (SEQ ID NO: 58)
xiv.	IETDV (SEQ ID NO: 1)	IETDV (SEQ ID NO: 1)	L-Arg <sub>5</sub>	RRRRR (SEQ ID NO: 60)
xv.	IETDV (SEQ ID NO: 1)	IETDV (SEQ ID NO: 1)	L-Arg <sub>3</sub>	RRR

并且,其中所述CPP的N末端任选地被乙酰化。

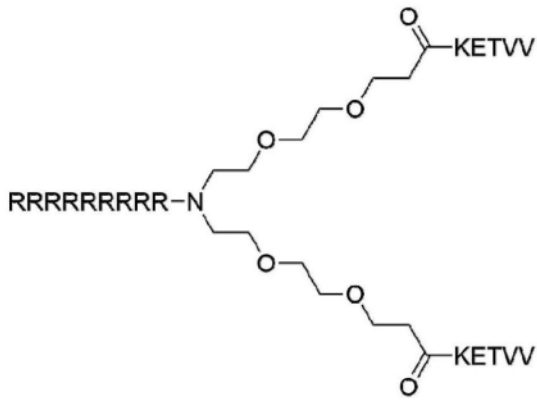
38. 如权利要求1所述的化合物,其中所述化合物选自式(X)至式(XXIII):



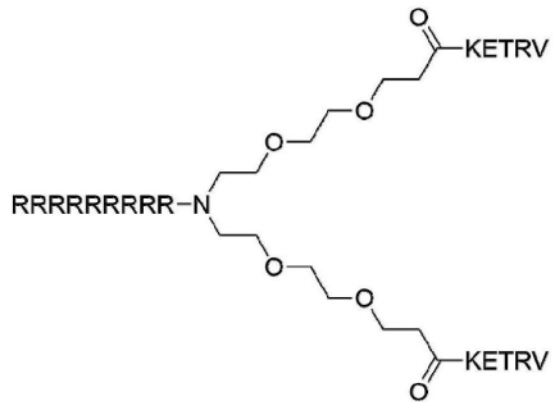
式(X)



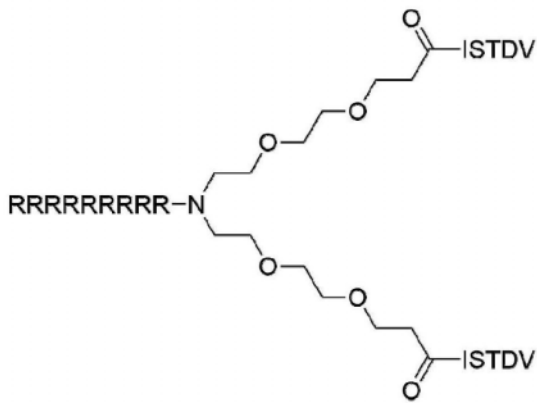
式(XI)



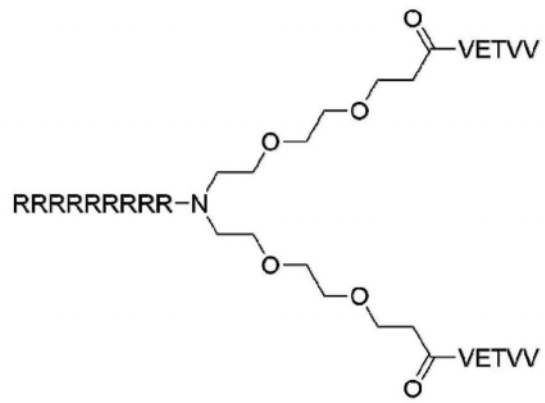
式(XII)



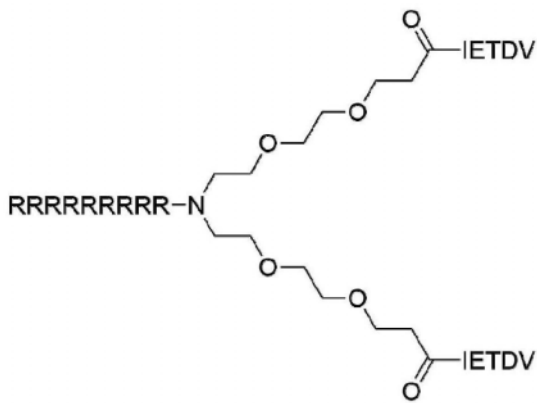
式(XIII)



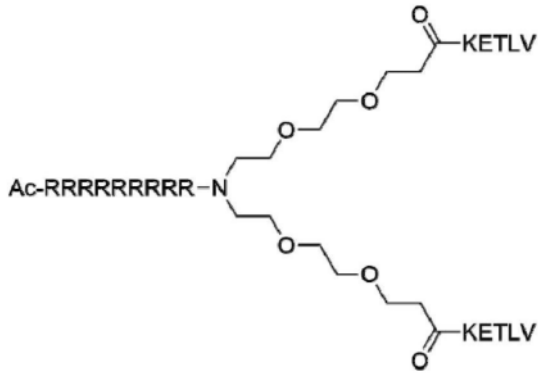
式(XIV)



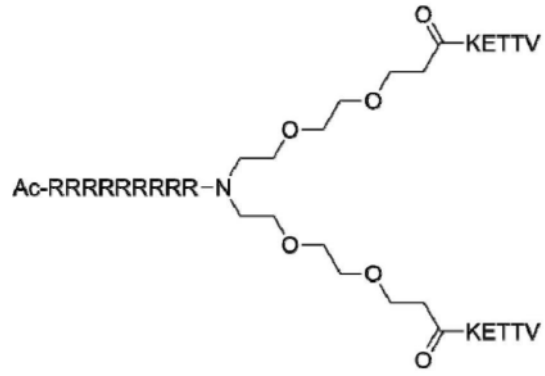
式(XV)



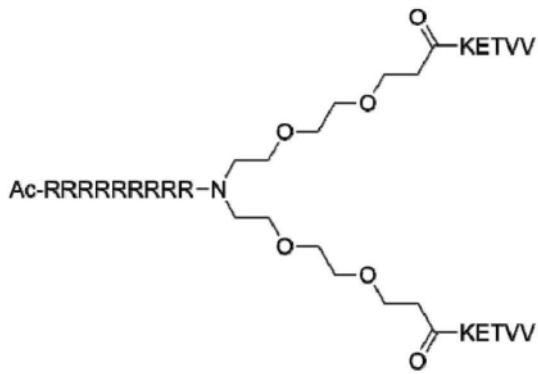
式(XVI)



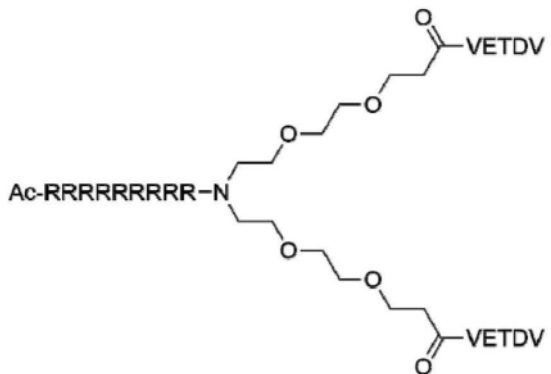
式(XVII)



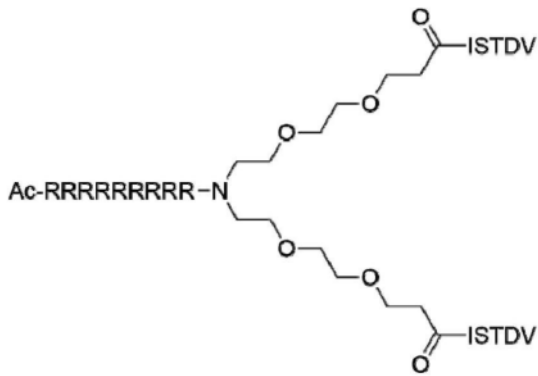
式(XVIII)



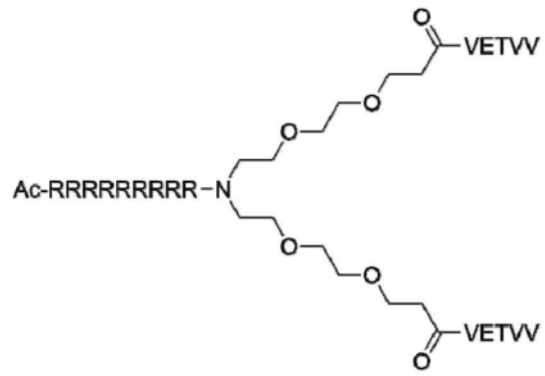
式(XIX)



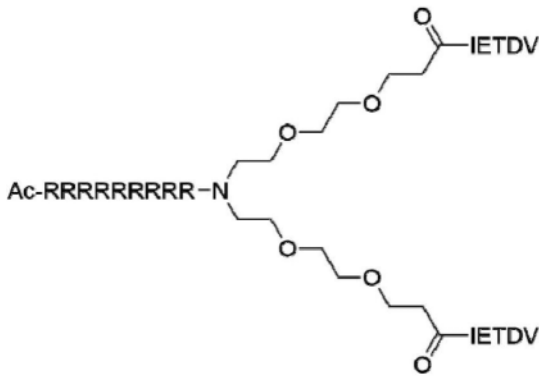
式(XX)



式(XXI)



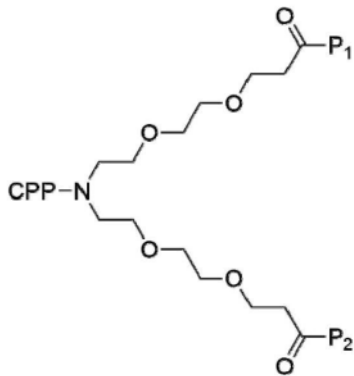
式(XXII)



式(XXIII)

39. 如权利要求1至3、5至9、35或36中任一项所述的化合物,其中 $P_1$ 和 $P_2$ 由氨基酸序列 IETDV (SEQ ID NO:1) 组成,且所述CPP选自以下:rqikiwfqnrrmkwkk (SEQ ID NO:15,D-Pen);LLIILRRRIRKQAHASK (SEQ ID NO:18,L-pVEC);PLIYLRLLRGQF (SEQ ID NO:19,L-TP2);|(Dap)KAPETALD| (SEQ ID NO:21,MiniAp4);和|Ff (Na12)RrRrQ|GABA-K (SEQ ID NO:22, CPP12)。

40. 如权利要求1所述的化合物,其中所述化合物具有式 (XXVIII) 的通式结构:



式(XXVIII)

其中 $P_1$ 和 $P_2$ 由氨基酸序列 IETDV (SEQ ID NO:1) 组成,且所述CPP选自以下:rqikiwfqnrrmkwkk (SEQ ID NO:15,D-Pen);LLIILRRRIRKQAHASK (SEQ ID NO:18,L-pVEC);PLIYLRLLRGQF (SEQ ID NO:19,L-TP2);|(Dap)KAPETALD| (SEQ ID NO:21,MiniAp4);和|Ff (Na12)RrRrQ|GABA-K (SEQ ID NO:22, CPP12)。

41. 如前述权利要求中任一项所述的化合物,其中所述化合物是PSD-95抑制剂。

42. 如前述权利要求中任一项所述的化合物,其用作药物。

43. 如权利要求1至41中任一项所述的化合物,用于治疗、预防、减轻兴奋毒性相关疾病和/或延迟其发展,所述兴奋毒性相关疾病是例如卒中,例如选自急性缺血性卒中和蛛网膜下出血。

44. 一种制造如权利要求1至41中任一项所述的化合物的方法,其包括以下一般步骤:

- 合成肽 $P_1/P_2$ ;
- 使用 $OPEG_n$ 或 $NPEG_n$ 接头将a)的肽二聚化,其中“n”是PEG部分的数量;
- 将CPP标签连接于所述NPEG接头的N处,例如通过使用自动化肽合成仪。

45. 一种制造如权利要求1至41中任一项所述的化合物的方法,其包括以下一般步骤:
- a. 提供Ns-NPEG二酸接头;
  - b. 使用基于Fmoc的固相肽合成来制备肽 $P_1/P_2$ ;
  - c. 使用所述Ns-NPEG二酸接头将Fmoc去保护的肽 $P_1/P_2$ 二聚化,形成接头-二聚体缀合物;和
  - d. 将CPP连接于所述接头-二聚体缀合物的NPEG接头的N,例如通过使用自动化肽合成仪。

## PSD-95抑制剂及其用途

### 【技术领域】

[0001] 本发明是关于能够结合至PSD-95的PDZ结构域的化合物及其作为由PSD-95介导的蛋白-蛋白相互作用的抑制剂的医学用途。

### 【背景技术】

[0002] PSD-95是神经元突触中的支架蛋白,其经由其PSD-95/盘大(Discs-large)/ZO-1(PDZ)结构域与N-甲基-D-天冬氨酸盐(NMDA)受体(Kornau等人,1995)和神经元一氧化氮合酶(nNOS)相互作用。在大脑缺血期间,过量谷氨酸盐释放导致NMDA受体过度活化以及细胞内Ca<sup>2+</sup>和NO水平有害升高,此最终会诱导兴奋毒性,从而导致神经元死亡和脑损伤(Aarts等人,2002;Dawson等人,1991;Huang等人,1994;Sattler等人,1999)。PSD-95正被探究为急性缺血性卒中(AIS)和脑的相关缺血性病况的药物靶标。

[0003] 最近在3期临床试验ESCAPE-NA1(Hill等人,2020)中检查20聚体肽奈尼肽(nerinetide,亦称为Tat-NR2B9c或NA-1),该临床试验评估除标准护理(例如阿替普酶(alteplase,组织纤维蛋白溶酶原活化剂,tPA))外,用奈尼肽治疗是否会改良患有缺血性卒中且正经受血管内血栓切除术的患者的临床结果(Hill等人,2020)。研究中包括总共1105名患者,其中659名患者接受tPA治疗,且446名患者未接受tPA治疗。发现尽管奈尼肽在接受阿替普酶的患者中并非有效的,但在未接受阿替普酶的组中,奈尼肽可改良功能结果、降低死亡率且减小梗塞体积(Hill等人,2020)。最近证实,奈尼肽与tPA之间的药物-药物相互作用可解释tPA治疗组中效应的缺乏。具体而言,tPA生成胞浆素,其是裂解奈尼肽的丝氨酸蛋白酶(Mayor-Nunez等人,2021)。因此,药物与施用血栓溶解剂(其是AIS的标准护理)相容是高度有利的。

[0004] 奈尼肽对靶PSD-95具有相对较低的亲合力,此促使设计二聚体化合物,例如Tat-N-二聚体和O-二聚体,亦分别称为UCCB01-144(AB144)和UCCB01-125(Bach等人,2009,2012;WO 2010/004003、WO 2012/156308;Kucharz等人,2017)。在体外荧光极化(FP)分析中,奈尼肽对PSD-95的PDZ1和PDZ2的K<sub>i</sub>值是5-10μM(Bach等人,2012)。相比之下,AB144和UCCB01-125因其二聚体结构和二价性质而同时结合PSD-95的PDZ1和PDZ2,从而使得对PDZ1-2的亲合力(K<sub>i</sub>值分别为4.6nM和9.5nM)是单体奈尼肽亲和力的500-1000倍(Bach等人,2012)。在经受永久性大脑中动脉闭塞(pMCAO)的小鼠中,与盐水的效应相比,在缺血后30min给予的AB144(3nmol/g)的单一静脉内(i.v.)浓注注射在缺血后存活期的6h和48h分别使梗塞体积减小40%和37%(Bach等人,2012)。另外,诸如握力和旋转棒表现的功能性结果得以改善且因此与梗塞大小的减小相关联。在相同实验条件和剂量(3nmol/g)下,奈尼肽并未显示显著的神经保护性质(Bach等人,2012)。同样,不具Tat部分的UCCB01-125并未达到脑且不显示神经保护性质(Bach等人,2012)。

[0005] 因此,PSD-95被视为用于治疗急性病况(例如蛛网膜下出血(SAH)和AIS)的尤其有希望的药物靶标。重要的是,PSD-95位于细胞内,因此靶向PSD-95的任何药物需要有效地穿过细胞膜并结合至PSD-95。

**【发明内容】**

[0006] 本发明人已开发出对PSD-95具有高亲和力的一系列新颖化合物。与已知PSD-95抑制剂如奈尼肽相比,本发明的化合物具有改改善的细胞摄取和高得多的胞浆素(plasmin)稳定性。因此,本发明的化合物可用于治疗兴奋毒性相关疾病,例如AIS和SAH,且与标准护理(例如血栓溶解剂)相容。

[0007] 在一个方面中,本发明是关于化合物,其包含:

a. 第一肽( $P_1$ ),该第一肽包含氨基酸序列 $X_2TX_3V$ (SEQ ID NO:53)或由其组成,其中 $X_2$ 选自由E和S组成的组;

$X_3$ 选自由L、T、V、R和D组成的组;

b. 第二肽( $P_2$ ),该第二肽包含氨基酸序列 $X_5TX_6V$ (SEQ ID NO:55)或由其组成,其中 $X_5$ 选自由E和S组成的组;

$X_6$ 选自由L、T、V、R和D组成的组;和

c. 细胞穿透肽(CPP),其选自由以下组成的组:

i. 由3至20个L-精氨酸残基组成的聚-L-精氨酸肽(聚-Arg);

ii. yGrkkrrqrrr(SEQ ID NO:9,D-TAT);

iii. RQIKIWFQNRRMKWKK(SEQ ID NO:14,L-Pen);

iv. rqikiwfnrrmkwkk(SEQ ID NO:15,D-Pen);

v. RKKRRRESRKKRRRES(SEQ ID NO:17,L-DPV3);

vi. LLILRRRIRKQAHASK(SEQ ID NO:18,L-pVEC);

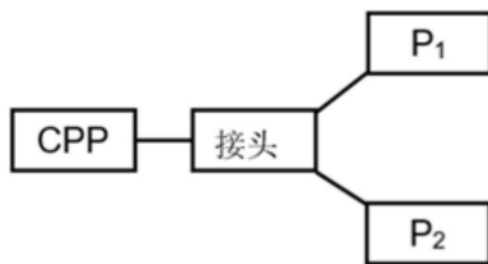
vii. KLALKLALKALKALKLA(SEQ ID NO:16,L-MAP);

viii. PLIYLRLLRGQF(SEQ ID NO:19,L-TP2);

ix. |(Dap)KAPETALD|(SEQ ID NO:21,MiniAp4);和

x. |Ff(Na12)RrRrQ|GABA-K(SEQ ID NO:22, CPP12),

其中CPP经由其C末端连接至接头,且 $P_1$ 和 $P_2$ 经由其N末端结合至接头,且化合物具有式(I)的通式结构:



式(I)

或其药学上可接受的盐。

[0008] 在另一方面中,本发明是关于如本文所定义的化合物,用作药物。

[0009] 在另一方面中,本发明是关于如本文所定义的化合物,用于治疗、预防、减轻兴奋毒性相关疾病(例如卒中,例如选自急性缺血性卒中和蛛网膜下出血)和/或延迟其发展。

[0010] 在另一方面中,本发明是关于如本文所定义的化合物,用于治疗或预防疼痛。

[0011] 另外,本发明是关于制造如本文所定义的化合物的方法。

### 【附图说明】

[0012] 图1.0-PEG<sub>4</sub>二聚体(化合物1至7)对PSD-95PDZ1-2的亲合力,如通过FP所测定。数据呈现为平均值+SEM,n=3。

图2.连有Ac-TAT和Ac-聚Arg的二聚体配体对PSD-95PDZ1-2的亲合力,如通过FP所测定。数据呈现为平均值+SEM,n=3。

图3.连有不同CPP标签(SEQ ID 8至22)的N-PEG<sub>4</sub>(IETDV)<sub>2</sub>对PSD-95PDZ1-2的亲合力,如通过FP所测定。数据呈现为平均值+SEM,n=3。

图4.连有聚Arg CPP标签的NPEG<sub>4</sub>-(KETLV)<sub>2</sub>二聚体配体对PSD-95PDZ1-2的亲合力,如通过FP所测定。数据呈现为平均值+SEM,n=3。

图5.连有Ac-TAT和Ac-聚Arg的二聚体配体的半衰期,如在体外胞浆素稳定性分析中所测定。数据呈现为平均值+SEM,n=3。

图6.连有不同CPP标签(SEQ ID 8至22)的N-PEG<sub>4</sub>(IETDV)<sub>2</sub>的半衰期,如在体外胞浆素稳定性分析中所测定。数据呈现为平均值+SEM,n=3。

图7.连有Ac-TAT和Ac-聚Arg的二聚体配体的细胞摄取,如通过CAPA所测定。数据呈现为平均值+SEM,n=3。

图8.连有不同CPP标签(SEQ ID 8至22)的N-PEG<sub>4</sub>(IETDV)<sub>2</sub>的细胞摄取,如通过CAPA所测定。数据呈现为平均值+SEM,n=3。

图9.连有不同聚Arg CPP标签的N-PEG<sub>4</sub>(IETDV)<sub>2</sub>和N-PEG<sub>4</sub>(KETLV)<sub>2</sub>的细胞摄取,如通过CAPA所测定。数据呈现为平均值+SEM,n=3。

图10.连有聚Arg CPP标签的N-PEG<sub>4</sub>(IETDV)<sub>2</sub>和N-PEG<sub>4</sub>(KETLV)<sub>2</sub>的半衰期,如在人类血浆稳定性分析中所测定。数据呈现为平均值±SEM,n=3。

图11.结合至PSD-95的PDZ1-2的化合物的通式结构。R<sub>1</sub>至R<sub>5</sub>是如本文所述的氨基酸侧链且R<sub>6</sub>表示如本文所述的CPP标签。

### 【具体实施方式】

#### 定义

[0013] **酰胺键**:如本文所用的术语“酰胺键”是通过羧酸与胺之间的反应(伴随水的消去)形成的化学键。当反应介于两个氨基酸残基之间时,因反应形成的键称为肽连接(肽键)。

[0014] **包含**:如本文所用的术语“包含”应以包括的方式来理解。因此,作为实例,包含化合物X的组合物可包含化合物X和任选的其他化合物。

[0015] **二聚体**:如本文所用的术语二聚体是指通过化学或物理相互作用结合的两个相同或不不同的化学部分。作为实例,二聚体可为同二聚体,例如通过接头连接的两个相同的化学部分。二聚体亦可为异二聚体,例如通过接头连接的两个不同的化学部分。二聚体的实例是本发明的PSD-95抑制剂,其是包含借助接头共价连接的两个肽的化合物,其中这些肽能够同时结合至PSD-95的PDZ1和PDZ2结构域或与其相互作用。

[0016] **二肽**:如本文所用的术语“二肽”是指通过肽键连接的两个天然或非天然氨基酸。

[0017] **脂肪酸**:如本文所用的术语脂肪酸(缩写为FA)通常是指具有长脂族碳链的羧酸,

其可为饱和或不饱和的。脂肪酸可选自短链脂肪酸 (SCFA)、中链脂肪酸 (MCFA)、长链脂肪酸 (LCFA) 和极长链脂肪酸 (VLCFA)。短链脂肪酸 (SCFA) 是具有少于6个碳的脂族尾的脂肪酸 (即丁酸)。中链脂肪酸 (MCFA) 是具有6-12个碳的脂族尾的脂肪酸,其可形成中链三酸甘油酯。长链脂肪酸 (LCFA) 是具有13至21个碳的脂族尾的脂肪酸。极长链脂肪酸 (VLCFA) 是具有长于22个碳的脂族尾的脂肪酸。本发明的脂肪酸可为本领域技术人员已知的任何适宜脂肪酸或脂肪酸衍生物。

[0018] **非蛋白氨基酸**:非蛋白氨基酸,亦称为非编码、非标准或非天然氨基酸,其是不由遗传密码编码的氨基酸。非蛋白氨基酸的非穷举清单包括 $\gamma$ -氨基丁酸、L-3-(2-萘基)丙氨酸、L-2,3-二氨基丙酸、 $\alpha$ -氨基-正丁酸、正缬氨酸、正亮氨酸、异亮氨酸、别异亮氨酸、叔亮氨酸、 $\alpha$ -氨基-正庚酸、哌可酸 (pipercolic acid)、 $\alpha,\beta$ -二氨基丙酸、 $\alpha,\gamma$ -二氨基丁酸、鸟氨酸、别苏氨酸、高半胱氨酸、高丝氨酸、 $\beta$ -丙氨酸、 $\beta$ -氨基-正丁酸、 $\beta$ -氨基异丁酸、 $\alpha$ -氨基异丁酸、异缬氨酸、肌氨酸、N-乙基甘氨酸、N-丙基甘氨酸、N-异丙基甘氨酸、N-甲基丙氨酸、N-乙基丙氨酸、N-甲基 $\beta$ -丙氨酸、N-乙基 $\beta$ -丙氨酸、异丝氨酸和 $\alpha$ -羟基- $\gamma$ -氨基丁酸。

[0019] **蛋白氨基酸**:蛋白氨基酸,亦称为天然氨基酸,包括丙氨酸、半胱氨酸、硒基半胱氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、苯丙氨酸、甘氨酸、组氨酸、异亮氨酸、赖氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、天冬酰胺、脯氨酸、吡咯赖氨酸、谷氨酰胺、精氨酸、丝氨酸、苏氨酸、缬氨酸、色氨酸和酪氨酸。大写字母缩写指示L-氨基酸,而小写字母缩写指示D-氨基酸。

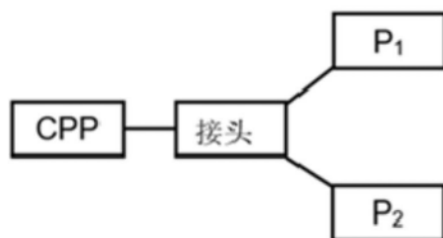
[0020] **PDZ**:如本文所用的术语"PDZ"是指突触后密度蛋白-95 (postsynaptic density protein-95, PSD-95)、果蝇同源盘大肿瘤抑制剂 (DlgA)、闭合小带-1蛋白 (zonula occludens-1, zo-1)。

[0021] **PSD-95**:如本文所用的术语"PSD-95"是指突触后密度蛋白-95。

[0022] **PSD-95抑制剂**:如本文所用的术语"PSD-95抑制剂"是指结合至PSD-95的PDZ1、PDZ2或PDZ1和PDZ2二者且抑制细胞中由这些PDZ结构域促进的蛋白-蛋白相互作用的化合物。由PSD-95抑制剂抑制的相互作用的实例是nNOS、PSD-95与NMDA受体之间的三元复合物形成。

化合物

[0023] 在一个方面中,本发明是关于化合物,其包含连接至细胞穿透肽 (CPP) 的第一肽 ( $P_1$ )。在一个实施方式中, $P_1$ 经由接头连接至CPP。在一个实施方式中,化合物进一步包含第二肽 ( $P_2$ )。在一个实施方式中, CPP经由接头连接至 $P_1$ 和 $P_2$ 。因此,在一个实施方式中, CPP经由其C末端连接至接头,且 $P_1$ 和 $P_2$ 经由其N末端结合至接头,且化合物具有式(I)的以下通式结构:



式(I)。

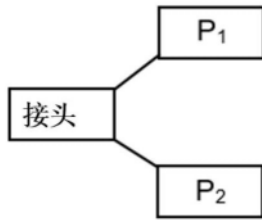
[0024] 因此,在一个实施方式中,本发明的化合物包含第一肽 ( $P_1$ ) 和第二肽 ( $P_2$ ),其中 $P_1$ 和 $P_2$ 两者皆能够同时结合至PSD-95的PDZ1和PDZ2结构域,即化合物是二聚体PSD-95抑制

剂。

[0025] 在一个方面中,本发明是关于包含肽( $P_1$ )的化合物,该肽包含氨基酸序列 $X_2TX_3V$ (SEQ ID NO:53)或由其组成,其中

- a.  $X_2$ 选自由E和S组成的组;且
- b.  $X_3$ 选自由L、T、V、R和D组成的组,  
且其中 $P_1$ 连接至细胞穿透肽(CPP)。

[0026] 在另一方面中,本发明是关于化合物,其包含经由接头连接至第二肽( $P_2$ )的第一肽( $P_1$ ),例如具有式(XXIV)的通式结构的化合物:



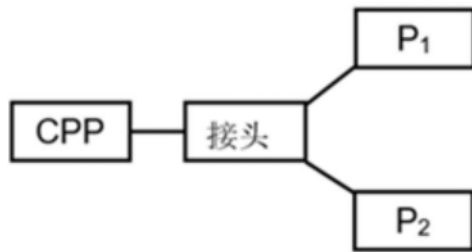
式(XXIV)

其中接头、 $P_1$ 和 $P_2$ 是如本文所定义。优选地, $P_1$ 和 $P_2$ 包含KETLV(SEQ ID NO:2)、KETTV(SEQ ID NO:3)、KETVV(SEQ ID NO:4)、KETRV(SEQ ID NO:5)、ISTDV(SEQ ID NO:6)或VETVV(SEQ ID NO:7)或由其组成。任选地,接头进一步结合至细胞穿透肽(CPP)或白蛋白结合部分,由此增加肽对膜或血脑屏障的穿越。白蛋白结合部分可为任何合适的与白蛋白结合的化学基团。优选地,白蛋白结合部分是脂肪酸。在一个实施方式中,接头进一步结合至CPP,即化合物具有式(I)的通式结构。

[0027] 在一个方面中,本发明是关于化合物,其包含:

- a. 第一肽( $P_1$ ),该第一肽包含氨基酸序列 $X_2TX_3V$ (SEQ ID NO:53)或由其组成,其中  
 $X_2$ 选自由E和S组成的组;  
 $X_3$ 选自由L、T、V、R和D组成的组;
- b. 第二肽( $P_2$ ),该第二肽包含氨基酸序列 $X_5TX_6V$ (SEQ ID NO:55)或由其组成,其中  
 $X_5$ 选自由E和S组成的组;  
 $X_6$ 选自由L、T、V、R和D组成的组;和
- c. 细胞穿透肽(CPP),其选自由以下组成的组:
  - i. 由3至20个L-精氨酸残基组成的聚-L-精氨酸肽(聚-Arg);
  - ii. yGrkkrrqrrr(SEQ ID NO:9,D-TAT);
  - iii. RQIKIWFQNRRMKWKK(SEQ ID NO:14,L-Pen);
  - iv. rqikiwfnrrmkwkk(SEQ ID NO:15,D-Pen);
  - v. RKKRRRESRKKRRRES(SEQ ID NO:17,L-DPV3);
  - vi. LLIIILRRRIRKQAHASK(SEQ ID NO:18,L-pVEC);
  - vii. KLALKLALKALKLA(SEQ ID NO:16,L-MAP);
  - viii. PLIYLRLLRGQF(SEQ ID NO:19,L-TP2);
  - ix. |(Dap)KAPETALD|(SEQ ID NO:21,MiniAp4);和
  - x. |Ff(Na12)RrRrQ|GABA-K(SEQ ID NO:22,CPP12),

其中CPP经由其C末端连接至接头,且P<sub>1</sub>和P<sub>2</sub>经由其N末端结合至接头,且化合物具有式(I)的通式结构:



式(I)

或其药学上可接受的盐。

结合肽P1和P2

[0028] 肽P<sub>1</sub>和P<sub>2</sub>对PSD-95的PDZ1和PDZ2结构域具有高亲和力。在一个实施方式中,化合物是PSD-95抑制剂,即化合物能够结合至PSD-95的一个或多个PDZ结构域。

[0029] 在一个实施方式中,化合物包含第一肽(P<sub>1</sub>),该第一肽包含氨基酸序列X<sub>2</sub>TX<sub>3</sub>V(SEQ ID NO:53)或由其组成,其中

- a. X<sub>2</sub>选自由E和S组成的组;且
- b. X<sub>3</sub>选自由L、T、V、R和D组成的组。

[0030] 在一个实施方式中,P<sub>1</sub>包含序列X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>TX<sub>3</sub>V(SEQ ID NO:54)或由其组成,其中a. X<sub>1</sub>选自由K、V和I组成的组;

- b. X<sub>2</sub>选自由E和S组成的组;且
- c. X<sub>3</sub>选自由L、T、V、R和D组成的组。

[0031] 在一个实施方式中,P<sub>1</sub>包含IETDV(SEQ ID NO:1)或由其组成。在一个实施方式中,P<sub>1</sub>包含KETLV(SEQ ID NO:2)或由其组成。在一个实施方式中,P<sub>1</sub>包含KETTIV(SEQ ID NO:3)或由其组成。在一个实施方式中,P<sub>1</sub>包含KETVV(SEQ ID NO:4)或由其组成。在一个实施方式中,P<sub>1</sub>包含KETRV(SEQ ID NO:5)或由其组成。在一个实施方式中,P<sub>1</sub>包含ISTDV(SEQ ID NO:6)或由其组成。在一个实施方式中,P<sub>1</sub>包含VETVV(SEQ ID NO:7)或由其组成。

[0032] 在一个实施方式中,P<sub>1</sub>由4至10个氨基酸残基(例如5个氨基酸残基,例如6个氨基酸残基)组成。超过SEQ ID NO:53或SEQ ID NO:54中给出的氨基酸残基的氨基酸残基可为蛋白氨基酸或非蛋白氨基酸。

[0033] 在一个实施方式中,化合物进一步包含第二肽(P<sub>2</sub>),该第二肽包含氨基酸序列X<sub>5</sub>TX<sub>6</sub>V(SEQ ID NO:55)或由其组成,其中

- a. X<sub>5</sub>选自由E和S组成的组;且
- b. X<sub>6</sub>选自由L、T、V、R和D组成的组。

[0034] 在一个实施方式中,P<sub>2</sub>包含序列X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>TX<sub>6</sub>V(SEQ ID NO:56)或由其组成,其中

- a. X<sub>4</sub>选自由K、V和I组成的组;
- b. X<sub>5</sub>选自由E和S组成的组;且
- c. X<sub>6</sub>选自由L、T、V、R和D组成的组。

[0035] 在一个实施方式中,P<sub>2</sub>包含IETDV(SEQ ID NO:1)或由其组成。在一个实施方式中,

P<sub>2</sub>包含KETLV (SEQ ID NO:2) 或由其组成。在一个实施方式中, P<sub>2</sub>包含KETTV (SEQ ID NO:3) 或由其组成。在一个实施方式中, P<sub>2</sub>包含KETVV (SEQ ID NO:4) 或由其组成。在一个实施方式中, P<sub>2</sub>包含KETRV (SEQ ID NO:5) 或由其组成。在一个实施方式中, P<sub>2</sub>包含ISTDV (SEQ ID NO:6) 或由其组成。在一个实施方式中, P<sub>2</sub>包含VETVV (SEQ ID NO:7) 或由其组成。

[0036] 在一个实施方式中, P<sub>2</sub>由4至10个氨基酸残基(例如5个氨基酸残基, 例如6个氨基酸残基)组成。超过SEQ ID NO:55或SEQ ID NO:56中给出的氨基酸残基的氨基酸残基可为蛋白氨基酸或非蛋白氨基酸。

[0037] 在一个实施方式中, P<sub>1</sub>和P<sub>2</sub>是相同的。

[0038] 在一个实施方式中, 当X<sub>2</sub>是E时, 则X<sub>3</sub>不为D。在一个实施方式中, 当X<sub>5</sub>是E时, 则X<sub>6</sub>不为D。在一个实施方式中, P<sub>1</sub>和/或P<sub>2</sub>不为IETDV (SEQ ID NO:1)。

[0039] 在优选实施方式中, 肽P<sub>1</sub>和P<sub>2</sub>经由其N末端结合至接头或CPP。在一个实施方式中, 氨基酸序列X<sub>2</sub>TX<sub>3</sub>V (SEQ ID NO:53) 是P<sub>1</sub>的C末端。在一个实施方式中, 氨基酸序列X<sub>5</sub>TX<sub>6</sub>V (SEQ ID NO:55) 是P<sub>2</sub>的C末端。

#### 细胞穿透肽 (CPP)

[0040] 本发明的化合物包含连接至细胞穿透肽 (CPP) 的肽P<sub>1</sub>。CPP的特征在于能够穿过哺乳动物细胞的血脑屏障 (BBB) 和/或质膜, 且由此可引起与其连接的货物分子(例如肽、蛋白质、寡核苷酸)的细胞内递送。

[0041] 在一个实施方式中, CPP是聚-L-精氨酸肽(聚-Arg)。在一个实施方式中, 聚-Arg由3至20个L-精氨酸残基组成。在一个实施方式中, 聚-Arg由5至10个L-精氨酸残基(例如7至10个L-精氨酸残基, 例如8或9个L-精氨酸残基)组成。在一个实施方式中, 聚-Arg由3至10个L-精氨酸残基组成。在一个实施方式中, CPP包含氨基酸序列RRRRRRRR (L-Arg<sub>9</sub>, SEQ ID NO:12) 或由其组成。在一个实施方式中, CPP包含氨基酸序列RRRRRRRR (L-Arg<sub>8</sub>, SEQ ID NO:57) 或由其组成。在一个实施方式中, CPP包含氨基酸序列RRRRRRR (L-Arg<sub>7</sub>, SEQ ID NO:58) 或由其组成。在一个实施方式中, CPP包含氨基酸序列RRRRRR (L-Arg<sub>6</sub>, SEQ ID NO:59) 或由其组成。在一个实施方式中, CPP包含氨基酸序列RRRRR (L-Arg<sub>5</sub>, SEQ ID NO:60) 或由其组成。在一个实施方式中, CPP包含氨基酸序列RRRR (L-Arg<sub>4</sub>, SEQ ID NO:61) 或由其组成。在一个实施方式中, CPP包含氨基酸序列RRR (L-Arg<sub>3</sub>) 或由其组成。

[0042] 在一个实施方式中, CPP选自表1中给出的CPP。

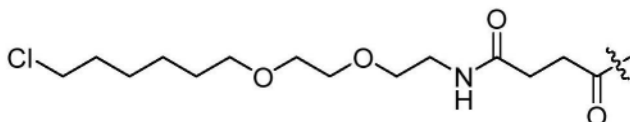
#### 表1. 细胞穿透肽。

名称	序列	SEQ ID NO:
L-TAT	YGRKKRRQRRR	8
D-TAT	yGrkrrqrrr	9
mTAT	rRrGrKkRr	10
riTAT	rrrqrrkkr	11
L-Arg <sub>9</sub>	RRRRRRRRR	12
L-Arg <sub>8</sub>	RRRRRRRR	57
L-Arg <sub>7</sub>	RRRRRRR	58
L-Arg <sub>6</sub>	RRRRRR	59
L-Arg <sub>5</sub>	RRRRR	60
L-Arg <sub>4</sub>	RRRR	61
L-Arg <sub>3</sub>	RRR	
D-Arg <sub>9</sub>	rrrrrrrrr	13
L-Pen	RQIKIWFQNRRMKWKK	14
D-Pen	rqikiwfnrrmkwkk	15
L-MAP	KLALKLALKALKAAKLA	16
L-DPV3	RKKRRRESRKKRRRES	17
L-pVEC	LLIILRRRIRKQAHAAHSK	18
L-TP2	PLIYLRLLRGQF	19
D-TP2	pliyrlrrGqf	20
MiniAp4	(Dap)KAPETALD	21
CPP12	Ff(Nal2)RrRrQ GABA-K	22

[0043] 在一个实施方式中, CPP包含选自以下的肽: 聚-L-精氨酸肽(聚-Arg), 例如L-Arg<sub>9</sub>; D-TAT; L-Pen; D-Pen; L-DPV3; L-pVEC; L-MAP; L-TP2; MiniAp4和CPP12。在一个实施方式中, CPP选自由以下组成的组: 聚-L-精氨酸肽(聚-Arg), 例如L-Arg<sub>9</sub>; D-TAT; L-Pen; D-Pen; L-DPV3; L-pVEC; L-MAP; L-TP2; MiniAp4和CPP12。在一个实施方式中, CPP是D-TAT。在一个实施方式中, CPP是L-Pen。在一个实施方式中, CPP是D-Pen。在一个实施方式中, CPP是L-DPV3。在一个实施方式中, CPP是L-pVEC。在一个实施方式中, CPP是L-MAP。在一个实施方式中, CPP是L-TP2。在一个实施方式中, CPP是MiniAp4。在一个实施方式中, CPP是CPP12。

[0044] 在一个实施方式中, CPP包含不超过20个氨基酸残基, 例如不超过19个、例如不超过18个、例如不超过17个、例如不超过16个、例如不超过15个、例如不超过14个、例如不超过13个、例如不超过12个、例如不超过11个、例如不超过10个、例如不超过9个、例如不超过8个、例如不超过7个氨基酸残基。

[0045] 在一些实施方式中, CPP结合至非肽部分。举例而言, CPP可经甲基化或乙酰化。在一些实施方式中, 当肽在本文中定义为由特定氨基酸残基序列组成时, 所述肽并不结合至任何其他氨基酸残基, 但所述肽可结合至非肽部分, 只要与非肽部分的结合不会产生另一氨基酸序列即可。在一些实施方式中, CPP的N末端结合至非肽部分。在一些实施方式中, CPP的C末端结合至非肽部分。在一些实施方式中, CPP的N末端经乙酰化, 即结合至化学结构  $\text{CH}_3\text{C}(\text{O})-$ 。举例而言, CPP可为由9个L-精氨酸残基组成的聚-Arg肽, 其在N末端经乙酰化。在一些实施方式中, CPP的N末端结合至氯烷烃标签 (CA), 其具有以下结构:

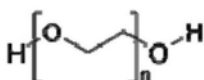


[0046] 在一个实施方式中, CPP的N末端经甲基化。在另一实施方式中, CPP的N末端经甲酰化。

#### 接头

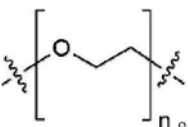
[0047] 如本文所用的术语“接头”是指在一个化学实体和另一个化学实体之间形成连接的一个或多个原子。作为实例, 本文所提及的“接头”可通过与两个PDZ结构域结合肽 $P_1$ 和 $P_2$ 的每一N末端形成连接来连结这些肽。多种接头是本领域已知的。接头可为例如化学接头或肽接头或其组合。在一个实施方式中, 接头包含活性官能基, 例如亲电子或亲核官能基, 其可用于将接头附接至每个肽。

[0048] 在一个实施方式中, 接头包含一个或多个聚乙二醇 (PEG) 单元。PEG是乙二醇的聚合物, 其具有化学式  $\text{C}_{2n}\text{H}_{4n+2}\text{O}_{n+1}$  和以下重复结构:



其中n是整数。

[0049] 因此, PEG单元具有以下结构:



[0050] 举例而言, 由4个PEG部分组成的聚合物或PEG4对应于4个乙二醇部分的聚合物 ( $n=4$ )。

[0051] 术语“PEG单元”和“PEG部分”在本文中可互换使用。

[0052] 在一个实施方式中, 一个PEG单元的至少一个氧原子经氮原子替代以获得NPEG。如本文所用的术语“乙二醇部分”是指构成PEG或NPEG接头的结构单元。

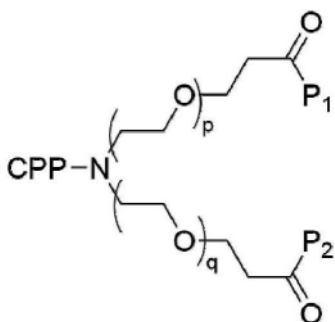
[0053] 在一个实施方式中, 两种PDZ结构域结合肽 $P_1$ 和 $P_2$ 的N末端经由包含一个或多个PEG单元的接头彼此连接, 其中PEG单元的至少一个氧原子任选地经氮原子替代。在一个实施方式中,  $P_1$ 和/或 $P_2$ 各自经由间隔基团、例如经由短烷烃链而结合至PEG/NPEG单元。

[0054] 在一个实施方式中, 接头包含一个或多个PEG单元, 其中一个PEG单元的至少一个氧原子经氮原子替代以获得NPEG。

[0055] 在一个实施方式中, 接头包含NPEG单元且CPP经由化学键直接或间接连接至NPEG接头主链中的氮原子以连接至接头。CPP与NPEG接头的氮的连接可经由以下来介导: 酰胺

键、1,3-偶极环加成(例如铜催化的叠氮化物-炔烃环加成)、马来酰亚胺偶联(maleimide coupling)、二硫键或氨基反应性亲电子基团,选自N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)酯、对硝基苯基酯、碳酸琥珀酰亚胺基酯(succinimidyl carbonate)、碳酸对硝基苯基(p-nitrophenyl carbonate)、氨基甲酸琥珀酰亚胺基酯(succinimidyl urethane)、异氰酸酯、异硫氰酸酯、酰基叠氮化物、磺酰氯、醛、碳酸酯、亚氨基酯(imidioester)或酸酐;和硫基反应性基团,选自卤乙酰基、烷基卤化物衍生物、氮丙啶(aziridine)、丙烯酰基衍生物芳化剂。在一个实施方式中,接头包含一个或多个PEG单元,其中一个PEG单元的至少一个氧原子经氮原子替代以获得NPEG,且其中CPP通过酰胺键连接至接头的氮原子。可选地,CPP与包含NPEG单元的接头的氮的连接可经由间隔基团来介导,其中合适的间隔基团可为例如任何氨基酸;短烷烃链或短PEG/NPEG链。

[0056] 在一个实施方式中,接头包含NPEG单元且CPP通过酰胺键连接至接头的氮原子。举例而言,在一个实施方式中,化合物具有式(III)的通式结构:



式(III)

其中

CPP、 $P_1$ 和 $P_2$ 是如本文所定义;

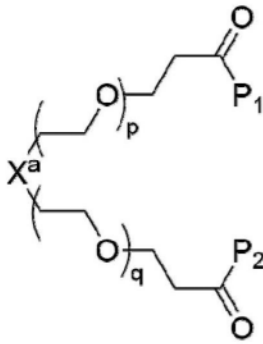
p是0至10的整数;且

q是0至10的整数。

[0057] 在一个实施方式中, $p=q$ 。在一个实施方式中, $p>q$ 。在一个实施方式中, $p<q$ 。在一个实施方式中,p和q的和是介于1与20之间的整数。在一个实施方式中,p是选自0、1、2、3、4、5、6、7、8、9和10的整数。在一个实施方式中,p是0至4的整数。在一个实施方式中,q是选自0、1、2、3、4、5、6、7、8、9和10的整数。在一个实施方式中,q是0至4的整数。在一个实施方式中,乙二醇部分的总数 $p+q$ 介于2与12之间,例如2、例如4、例如6、例如8、例如10、例如12。在一个实施方式中,乙二醇部分的总数 $p+q$ 是4。在一个实施方式中,p是2且q是2。

总体二聚体结构

[0058] 在一个实施方式中,化合物具有式(XXV)的通式结构:



式(XXV)

其中

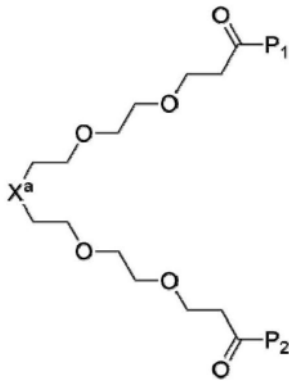
$P_1$ 和 $P_2$ 是如本文所定义;

$X^a$ 选自  $\text{CPP-N}$ 、 $\text{HN}$  和  $\text{-O-}$ ; CPP是如本文所定义;

$p$ 是0至10的整数;且

$q$ 是0至10的整数。

[0059] 在一个实施方式中, $p$ 和 $q$ 是2,且化合物具有式(XXVI)的通式结构:



式(XXVI)。

[0060] 在一个实施方式中,化合物具有式(XXVI),其中 $X^a$ 是-O-且 $P_1$ 和 $P_2$ 是KETLV (SEQ ID NO:2),由此形成化合物2,即 $\text{OPEG}_4\text{- (KETLV)}_2$ 。

[0061] 在一个实施方式中,化合物具有式(XXVI),其中 $X^a$ 是-O-且 $P_1$ 和 $P_2$ 是KETTV (SEQ ID NO:3),由此形成化合物3,即 $\text{OPEG}_4\text{- (KETTV)}_2$ 。

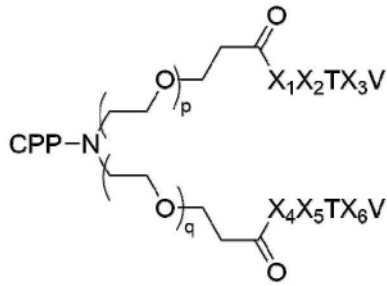
[0062] 在一个实施方式中,化合物具有式(XXVI),其中 $X^a$ 是-O-且 $P_1$ 和 $P_2$ 是KETVV (SEQ ID NO:4),由此形成化合物4,即 $\text{OPEG}_4\text{- (KETVV)}_2$ 。

[0063] 在一个实施方式中,化合物具有式(XXVI),其中 $X^a$ 是-O-且 $P_1$ 和 $P_2$ 是KETRV (SEQ ID NO:5),由此形成化合物5,即 $\text{OPEG}_4\text{- (KETRV)}_2$ 。

[0064] 在一个实施方式中,化合物具有式(XXVI),其中 $X^a$ 是-O-且 $P_1$ 和 $P_2$ 是ISTDV (SEQ ID NO:6),由此形成化合物6,即 $\text{OPEG}_4\text{- (ISTDV)}_2$ 。

[0065] 在一个实施方式中,化合物具有式(XXVI),其中 $X^a$ 是-O-且 $P_1$ 和 $P_2$ 是VETVV (SEQ ID NO:7),由此形成化合物7,即 $\text{OPEG}_4\text{- (VETVV)}_2$ 。

[0066] 在一个实施方式中,化合物具有式(V)的通式结构:



式(V)

其中

CPP是如本文所定义；

$X_1$ 选自由K、V和I组成的组；

$X_2$ 选自由E和S组成的组；且

$X_3$ 选自由L、T、V、R和D组成的组；

$X_4$ 选自由K、V和I组成的组；

$X_5$ 选自由E和S组成的组；

$X_6$ 选自由L、T、V、R和D组成的组；

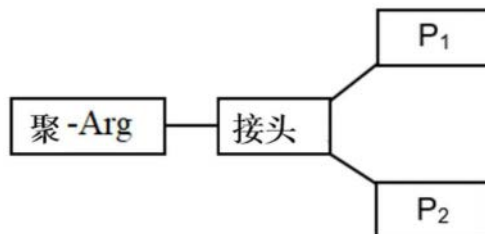
p是0至10的整数；且

q是0至10的整数。

[0067] 式(V)化合物(其中p和q是2)进一步绘示于图11中。 $R_1$ 至 $R_5$ 是肽 $X_1X_2TX_3V$ (SEQ ID NO:54)和 $X_4X_5TX_6V$ (SEQ ID NO:56)的氨基酸侧链,且 $R_6$ 表示如本文所述的CPP标签。

作为CPP的聚-Arg

[0068] 在一个实施方式中, CPP是聚-L-精氨酸肽(聚-Arg)。因此,在一个实施方式中,化合物具有式(II)的以下通式结构:



式(II)

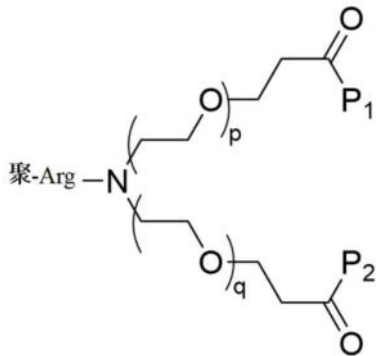
其中聚-Arg、接头、 $P_1$ 和 $P_2$ 是如本文所定义。

[0069] 在一个实施方式中, CPP是由3至20个L-精氨酸残基组成的聚-L-精氨酸肽(聚-Arg)。在一个实施方式中, CPP是由3至15个L-精氨酸残基组成的聚-L-精氨酸肽(聚-Arg)。在一个实施方式中, CPP是由3至12个L-精氨酸残基组成的聚-L-精氨酸肽(聚-Arg)。在一个实施方式中, CPP是由3至10个L-精氨酸残基组成的聚-L-精氨酸肽(聚-Arg)。在一个实施方式中, 聚-Arg的N末端任选地经修饰, 例如任选地经乙酰化。

[0070] 具有聚-Arg CPP标签(例如L-Arg<sub>9</sub>(SEQ ID NO:12))的本发明化合物具有低 $CP_{50}$ 值(实施例4, 图7-9), 即细胞摄取是高度有效的, 这表明优异的BBB穿透和细胞内递送。令人惊奇的是, 含有CPP L-Arg<sub>9</sub>(SEQ ID NO:12)的化合物展现与含有D-氨基酸或大环CPP的化合

物相当的体外胞浆素半衰期时间(图5-6)。有趣的是,含有L-Arg<sub>9</sub>的化合物的半衰期显著优于含有L-TAT(SEQ ID NO 8)的化合物的半衰期(图5)。

[0071] 在一个实施方式中, CPP是聚-Arg且接头是包含NPEG单元的PEG接头, 且CPP通过酰胺键连接至接头的氮原子。因此, 在一个实施方式中, 化合物具有式(IV)的通式结构:



式(IV)

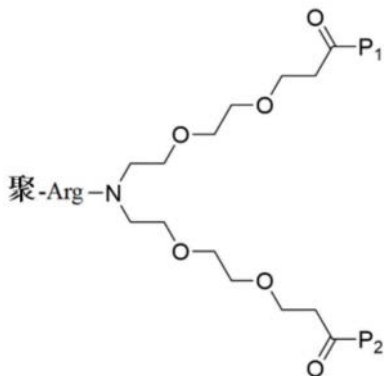
其中

聚-Arg、P<sub>1</sub>和P<sub>2</sub>是如本文所定义;

p是0至10的整数;且

q是0至10的整数。

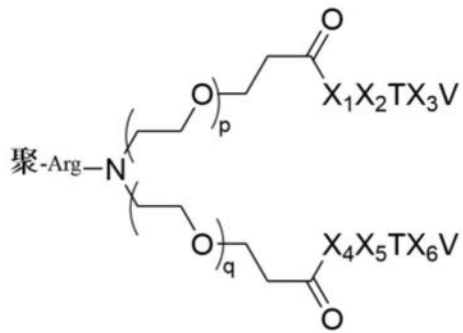
[0072] 在一个实施方式中, p是2且q是2。因此, 在一个实施方式中, 化合物具有式(VII)的通式结构:



式(VII)

其中聚-Arg、P<sub>1</sub>和P<sub>2</sub>是如本文所定义。

[0073] 在一个实施方式中, 化合物具有式(VI)的通式结构:



式(VI)

其中

$X_1$ 选自由K、V和I组成的组；

$X_2$ 选自由E和S组成的组；且

$X_3$ 选自由L、T、V、R和D组成的组；

$X_4$ 选自由K、V和I组成的组；

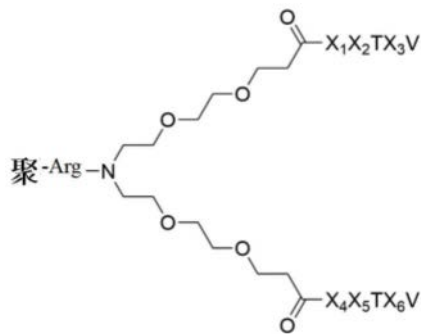
$X_5$ 选自由E和S组成的组；

$X_6$ 选自由L、T、V、R和D组成的组；

p是0至10的整数；且

q是0至10的整数。

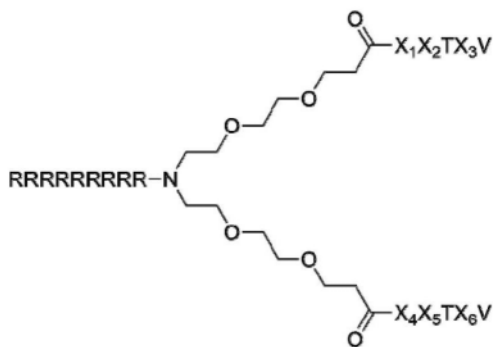
[0074] 在一个实施方式中，p是2且q是2。因此，在一个实施方式中，化合物具有式(VIII)的通式结构：



式(VIII)

其中聚-Arg、 $X_1$ 、 $X_2$ 、 $X_3$ 、 $X_4$ 、 $X_5$ 和 $X_6$ 是如本文所定义。

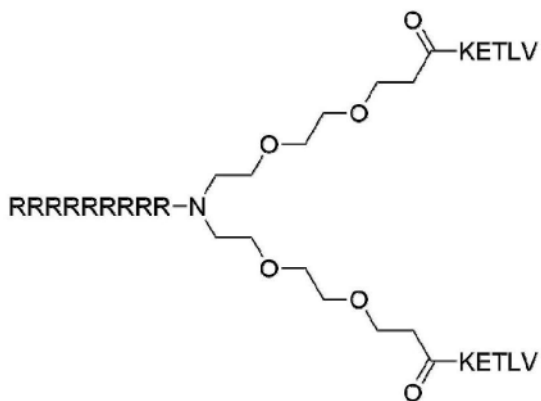
[0075] 在一个实施方式中，CPP是L-Arg<sub>9</sub>，p是2且q是2。因此，在一个实施方式中，化合物具有式(IX)的通式结构：



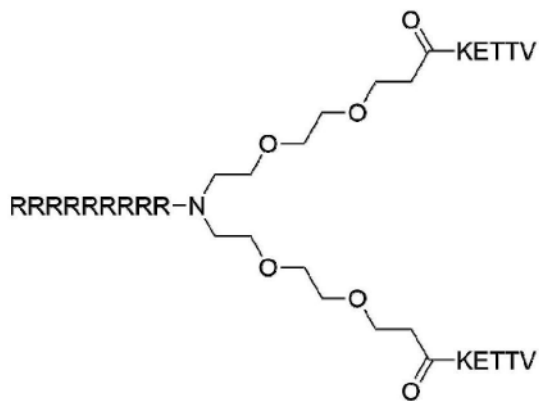
式(IX)

其中 $X_1$ 、 $X_2$ 、 $X_3$ 、 $X_4$ 、 $X_5$ 和 $X_6$ 是如本文所定义。

[0076] 在一个实施方式中,化合物选自式(X)至(XVI):

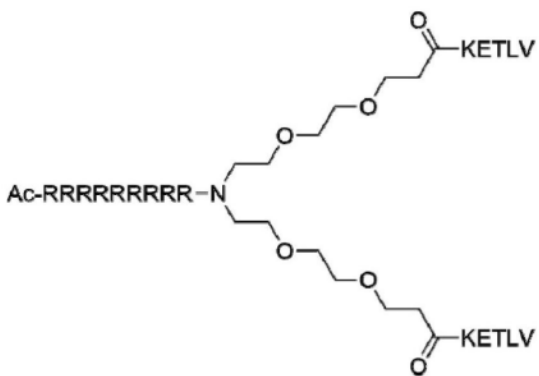


式(X)

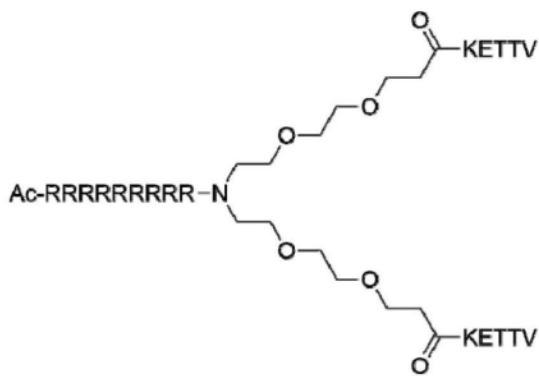


式(XI)

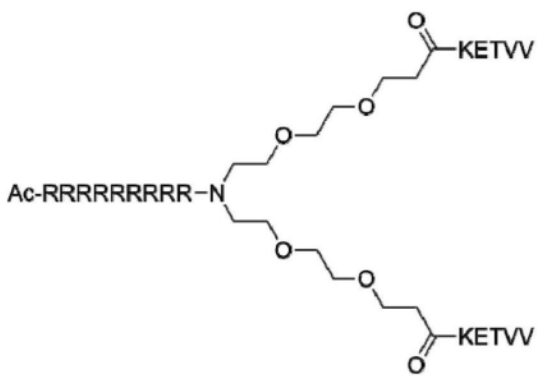




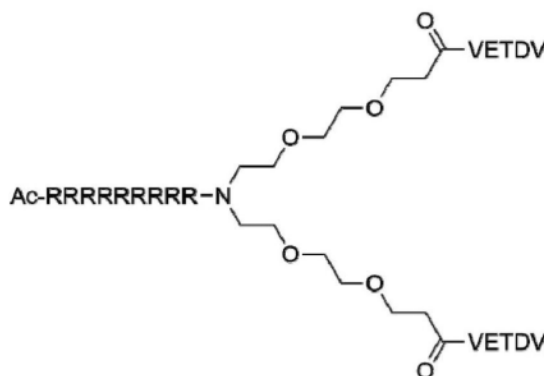
式(XVII)



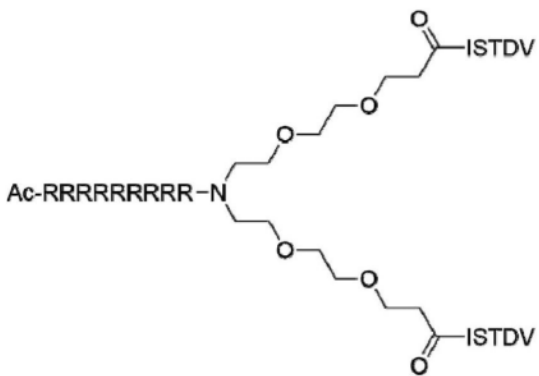
式(XVIII)



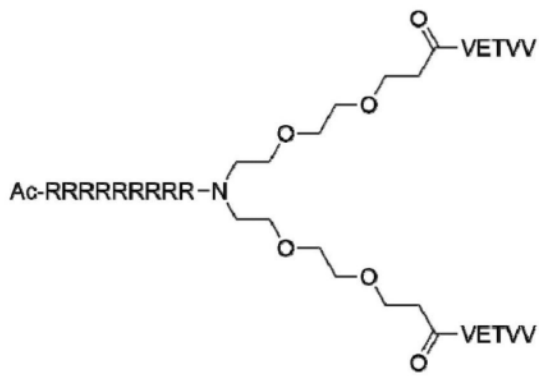
式(XIX)



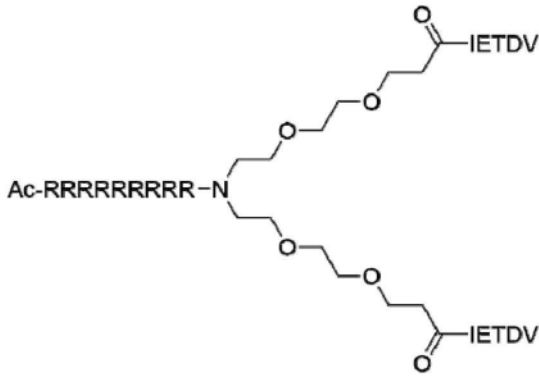
式(XX)



式(XXI)



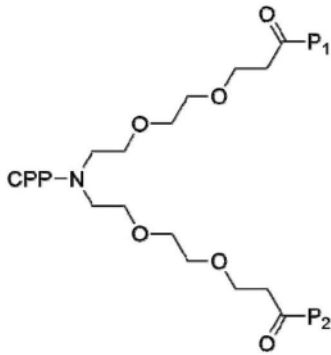
式(XXII)



式(XXIII)

特定化合物

[0078] 在一个实施方式中,化合物具有CPP-NPEG<sub>4</sub>-(P<sub>1</sub>)(P<sub>2</sub>)的通式结构,即化合物具有式(XXVIII):



式(XXVIII)

且CPP、P<sub>1</sub>和P<sub>2</sub>是如表2中所定义。在一个实施方式中,化合物选自由化合物9至63组成的组。

表2.本发明的所例示化合物。

化合物	式	P <sub>1</sub> , P <sub>2</sub>	CPP	
8 (AB144)		IETDV (SEQ ID NO: 1)	L-TAT	YGRKKRRQRRR- (SEQ ID NO: 8)
9		IETDV (SEQ ID NO: 1)	L-TAT	Ac-YGRKKRRQRRR- (SEQ ID NO: 23)
10		IETDV	L-TAT	CA-YGRKKRRQRRR-

		(SEQ ID NO: 1)		(SEQ ID NO: 24)
11		KETLV (SEQ ID NO: 2)	L-TAT	Ac-YGRKKRRQRRR- (SEQ ID NO: 23)
12		KETLV (SEQ ID NO: 2)	L-TAT	CA-YGRKKRRQRRR- (SEQ ID NO: 24)
13		KETTV (SEQ ID NO: 3)	L-TAT	Ac-YGRKKRRQRRR- (SEQ ID NO: 23)
14		KETTV (SEQ ID NO: 3)	L-TAT	CA-YGRKKRRQRRR- (SEQ ID NO: 24)
15		KETVV (SEQ ID NO: 4)	L-TAT	Ac-YGRKKRRQRRR- (SEQ ID NO: 23)
16		KETVV (SEQ ID NO: 4)	L-TAT	CA-YGRKKRRQRRR- (SEQ ID NO: 24)
17		KETRV (SEQ ID NO: 5)	L-TAT	Ac-YGRKKRRQRRR- (SEQ ID NO: 23)
18		KETRV (SEQ ID NO: 5)	L-TAT	CA-YGRKKRRQRRR- (SEQ ID NO: 24)
19		ISTDV (SEQ ID NO: 6)	L-TAT	Ac-YGRKKRRQRRR- (SEQ ID NO: 23)
20		ISTDV (SEQ ID NO: 6)	L-TAT	CA-YGRKKRRQRRR- (SEQ ID NO: 24)
21		VETVV (SEQ ID NO: 7)	L-TAT	Ac-YGRKKRRQRRR- (SEQ ID NO: 23)
22		VETVV (SEQ ID NO: 7)	L-TAT	CA-YGRKKRRQRRR- (SEQ ID NO: 24)
23	(XVII)	KETLV (SEQ ID NO: 2)	L-Arg <sup>9</sup>	Ac-RRRRRRRRR- (SEQ ID NO: 25)
24		KETLV (SEQ ID NO: 2)	L-Arg <sup>9</sup>	CA-RRRRRRRRR- (SEQ ID NO: 26)
25	(XVIII)	KETTV (SEQ ID NO: 3)	L-Arg <sup>9</sup>	Ac-RRRRRRRRR- (SEQ ID NO: 25)

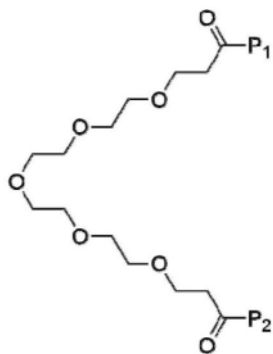
26		KETTV (SEQ ID NO: 3)	L-Argo	CA-RRRRRRRRR- (SEQ ID NO: 26)
27	(XIX)	KETVV (SEQ ID NO: 4)	L-Argo	Ac-RRRRRRRRR- (SEQ ID NO: 25)
28		KETVV (SEQ ID NO: 4)	L-Argo	CA-RRRRRRRRR- (SEQ ID NO: 26)
29	(XX)	KETRV (SEQ ID NO: 5)	L-Argo	Ac-RRRRRRRRR- (SEQ ID NO: 25)
30		KETRV (SEQ ID NO: 5)	L-Argo	CA-RRRRRRRRR- (SEQ ID NO: 26)
31	(XXI)	ISTDV (SEQ ID NO: 6)	L-Argo	Ac-RRRRRRRRR- (SEQ ID NO: 25)
32		ISTDV (SEQ ID NO: 6)	L-Argo	CA-RRRRRRRRR- (SEQ ID NO: 26)
33	(XXII)	VETVV (SEQ ID NO: 7)	L-Argo	Ac-RRRRRRRRR- (SEQ ID NO: 23)
34		VETVV (SEQ ID NO: 7)	L-Argo	CA-RRRRRRRRR- (SEQ ID NO: 26)
35	(XXIII)	IETDV (SEQ ID NO: 1)	L-Argo	Ac-RRRRRRRRR- (SEQ ID NO: 25)
36		IETDV (SEQ ID NO: 1)	L-Argo	CA-RRRRRRRRR- (SEQ ID NO: 26)
38		IETDV (SEQ ID NO: 1)	D-TAT	Ac-ygrkkrrqrrr- (SEQ ID NO: 27)
39		IETDV (SEQ ID NO: 1)	D-TAT	CA-ygrkkrrqrrr- (SEQ ID NO: 28)
40		IETDV (SEQ ID NO: 1)	mTAT	Ac-rRrGrKkRr- (SEQ ID BO: 29)
41		IETDV (SEQ ID NO: 1)	mTAT	CA-rRrGrKkRr- (SEQ ID NO: 30)
42		IETDV	riTAT	Ac-rrrqrkkrr-

		(SEQ ID NO: 1)		(SEQ ID NO: 31)
43		IETDV (SEQ ID NO: 1)	riTAT	CA-rrrqrkkk- (SEQ ID NO: 32)
44		IETDV (SEQ ID NO: 1)	D-Arg <sup>9</sup>	Ac-rrrrrrrr- (SEQ ID NO: 33)
45		IETDV (SEQ ID NO: 1)	D-Arg <sup>9</sup>	CA-rrrrrrrr- (SEQ ID NO: 34)
46		IETDV (SEQ ID NO: 1)	L-Pen	Ac-RQIKIWFQNRRMKWKK- (SEQ ID NO: 35)
47		IETDV (SEQ ID NO: 1)	L-Pen	CA-RQIKIWFQNRRMKWKK- (SEQ ID NO: 36)
48		IETDV (SEQ ID NO: 1)	D-Pen	Ac-rqikiwfnrrmkwkk- (SEQ ID NO: 37)
49		IETDV (SEQ ID NO: 1)	D-Pen	CA-rqikiwfnrrmkwkk- (SEQ ID NO: 38)
50		IETDV (SEQ ID NO: 1)	L-DPV3	Ac-RKKRRRESRKKRRRES- (SEQ ID NO: 39)
51		IETDV (SEQ ID NO: 1)	L-DPV3	CA-RKKRRRESRKKRRRES- (SEQ ID NO: 40)
52		IETDV (SEQ ID NO: 1)	L-pVEC	Ac-LLIILRRRIRKQAHASK- (SEQ ID NO: 41)
53		IETDV (SEQ ID NO: 1)	L-pVEC	CA-LLIILRRRIRKQAHASK- (SEQ ID NO: 42)
54		IETDV (SEQ ID NO: 1)	L-MAP	Ac-KLALKLALKALKALKLA- (SEQ ID NO: 43)
55		IETDV (SEQ ID NO: 1)	L-MAP	CA-KLALKLALKALKALKLA- (SEQ ID NO: 44)
56		IETDV (SEQ ID NO: 1)	L-TP2	Ac-PLIYLRLLRGQF- (SEQ ID NO: 45)
57		IETDV (SEQ ID NO: 1)	L-TP2	CA-PLIYLRLLRGQF- (SEQ ID NO: 46)

58		IETDV (SEQ ID NO: 1)	D-TP2	Ac-plylrlrGqf- (SEQ ID NO: 47)
59		IETDV (SEQ ID NO: 1)	D-TP2	CA-plylrlrGqf- (SEQ ID NO: 48)
60		IETDV (SEQ ID NO: 1)	MiniAp4	Ac- (Dap)KAPETALD  (SEQ ID NO: 49)
61		IETDV (SEQ ID NO: 1)	MiniAp4	CA- (Dap)KAPETALD  (SEQ ID NO: 50)
62		IETDV (SEQ ID NO: 1)	CPP12	Ff(Nal2)RrRrQ GABA-K- (SEQ ID NO: 51)
63		IETDV (SEQ ID NO: 1)	CPP12	Ff(Nal2)RrRrQ GABA-K(CA)- (SEQ ID NO: 52)
64		IETDV (SEQ ID NO: 1)	L-Arg <sub>7</sub>	CA-RRRRRRR- (SEQ ID NO: 68)
65		IETDV (SEQ ID NO: 1)	L-Arg <sub>5</sub>	CA-RRRRR- (SEQ ID NO: 70)
66		IETDV (SEQ ID NO: 1)	L-Arg <sub>3</sub>	CA-RRR-
67		KETLV (SEQ ID NO: 2)	L-Arg <sub>7</sub>	Ac-RRRRRRR- (SEQ ID NO: 63)
68		KETLV (SEQ ID NO: 2)	L-Arg <sub>7</sub>	CA-RRRRRRR- (SEQ ID NO: 68)
69		KETLV (SEQ ID NO: 2)	L-Arg <sub>6</sub>	Ac-RRRRRRR- (SEQ ID NO: 64)
70		KETLV (SEQ ID NO: 2)	L-Arg <sub>6</sub>	CA-RRRRRRR- (SEQ ID NO: 69)
71		KETLV (SEQ ID NO: 2)	L-Arg <sub>5</sub>	Ac-RRRRR- (SEQ ID NO: 65)
72		KETLV (SEQ ID NO: 2)	L-Arg <sub>5</sub>	CA-RRRRR- (SEQ ID NO: 70)
73		KETLV	L-Arg <sub>4</sub>	Ac-RRRR-

		(SEQ ID NO: 2)		(SEQ ID NO: 66)
74		KETLV (SEQ ID NO: 2)	L-Arg <sub>4</sub>	CA-RRRR- (SEQ ID NO: 71)
75		KETLV (SEQ ID NO: 2)	L-Arg <sub>3</sub>	CA-RRR-

[0079] 在一个实施方式中,化合物具有式 (XXVII) :



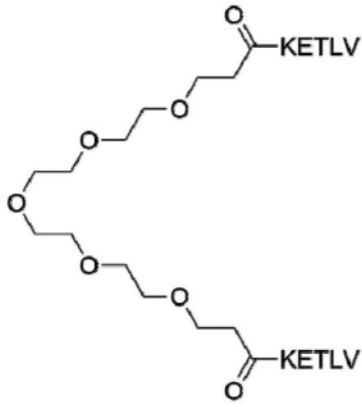
式(XXVII)

且P<sub>1</sub>和P<sub>2</sub>是如表3中所定义。在一个实施方式中,化合物选自由化合物2至7组成的组。

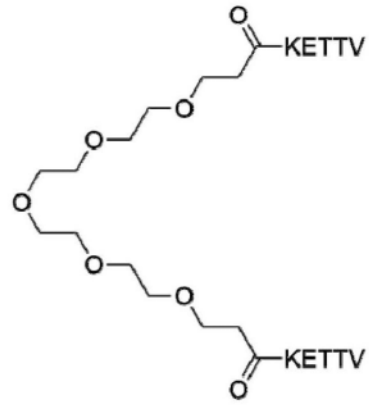
表3.本发明的所例示化合物。

化合物	式	P <sub>1</sub> , P <sub>2</sub>	名称
1 (UCCB01-125)		<i>IETDV</i> (SEQ ID NO: 1)	<i>OPEG<sub>4</sub>-(IETDV)<sub>2</sub></i>
2	(XXIX)	KETLV (SEQ ID NO: 2)	<i>OPEG<sub>4</sub>-(KETLV)<sub>2</sub></i>
3	(XXX)	KETTV (SEQ ID NO: 3)	<i>OPEG<sub>4</sub>-(KETTV)<sub>2</sub></i>
4	(XXXI)	KETVV (SEQ ID NO: 4)	<i>OPEG<sub>4</sub>-(KETVV)<sub>2</sub></i>
5	(XXXII)	KETRV (SEQ ID NO: 5)	<i>OPEG<sub>4</sub>-(KETRV)<sub>2</sub></i>
6	(XXXIII)	ISTDV (SEQ ID NO: 6)	<i>OPEG<sub>4</sub>-(ISTDV)<sub>2</sub></i>
7	(XXXIV)	VETVV (SEQ ID NO: 7)	<i>OPEG<sub>4</sub>-(VETVV)<sub>2</sub></i>

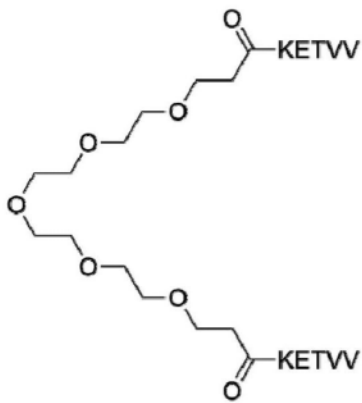
[0080] 在一个实施方式中,化合物选自式 (XXIX) 至 (XXXIV) :



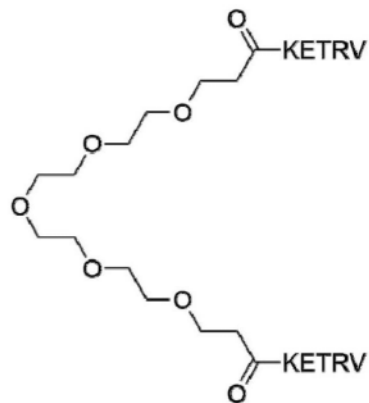
式(XXIX)



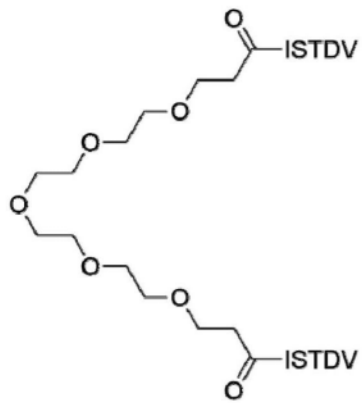
式(XXX)



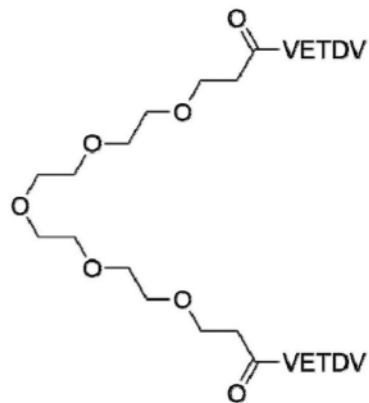
式(XXXI)



式(XXXII)



式(XXXIII)



式(XXXIV)

[0081] 在一个实施方式中,  $P_1$ 和 $P_2$ 由氨基酸序列IETDV (SEQ ID NO:1) 组成且CPP选自由以下组成的组: D-Pen (rqikiwfnrrmkwkk, SEQ ID NO:15); L-pVEC (LLIILRRRIRKQAHASK, SEQ ID NO:18); L-TP2 (PLIYLRLLRGQF, SEQ ID NO:19); MiniAp4 (| (Dap) KAPETALD |, SEQ ID NO:21); 和CPP12 (| Ff (Na12) RrRrQ | GABA-K, SEQ ID NO:22)。

盐和前药

[0082] 如本文所定义的化合物可以是所述化合物的药学上可接受的盐或前药的形式。在本发明的一个实施方式中,如本文所定义的化合物可被配制为所述化合物的药学上可接受的加成盐或水合物,例如但不限于 $K^+$ 、 $Na^+$ ,以及非盐,例如 $H^+$ 。

#### 医药组合物

[0083] 在一个方面中,本发明是关于医药组合物,其包含如本文所定义的化合物。将本发明的化合物配制成医药组合物是本领域公知的,且进一步阐述于Gennaro(编),2000, Remington: The Science and Practice of Pharmacy,第20版,Lippincott, Williams & Wilkins (2000); 和Ansel等人,1999, Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems,第7版,Lippincott Williams & Wilkins Publishers中。

#### 膜渗透性

[0084] 由于PSD-95位于细胞内,故对于任何靶向PSD-95的药物来说,有效地穿过细胞膜是必要的。为评价如本文所定义化合物的细胞渗透性和向胞质的递送,可使用细胞氯烷烃穿透分析(CAPA) (Peraro等人,2018)。此分析利用经设计以共价结合氯烷烃(CA)分子的经修饰的卤烷烃去卤素酶。使用表达包含HaloTag、绿色荧光蛋白(GFP)和线粒体靶向肽的融合蛋白的HeLa细胞系来报告胞质递送。CAPA的一般格式是脉冲-追踪分析(Deprey和Kritzer,2020)。将表达HaloTag酶的细胞与用CA标记的肽一起孵育。当这些CA肽穿透细胞膜且到达胞质时,其将结合至HaloTag并与HaloTag反应(脉冲步骤)。在洗涤步骤后,将细胞与定量穿透细胞膜且与剩余未反应的HaloTag位点反应的用CA标记的染料一起孵育(追踪步骤)。使用流式细胞术来测量细胞的荧光强度,且所测量荧光与到达所穿透细胞的CA肽的量成反比且因此可用于评价胞质递送。所获得的数据通常表示为 $CP_{50}$ 值,其是观察到50%细胞穿透时的浓度。化合物的 $CP_{50}$ 值可如实施例4中所述来测量。实施例4显示,所述化合物的细胞摄取很大程度上取决于所采用的CPP,所测量的 $CP_{50}$ 值介于 $86.1\mu M$ (化合物22)至 $0.68\mu M$ (化合物30)的范围内(图7)。另外,结合至一系列CPP标签(SEQ ID NO 8至22)的NPEG<sub>4</sub>(IETDV)<sub>2</sub>的细胞摄取效率产生无法预测的 $CP_{50}$ 值范围(图8)。

[0085] 在一个实施方式中,化合物的 $CP_{50}$ 值不大于 $250\mu M$ ,例如不大于 $200\mu M$ ,例如不大于 $150\mu M$ ,例如不大于 $100\mu M$ ,例如不大于 $80\mu M$ ,例如不大于 $70\mu M$ ,例如不大于 $60\mu M$ ,例如不大于 $50\mu M$ ,例如不大于 $40\mu M$ ,例如不大于 $30\mu M$ ,例如不大于 $20\mu M$ ,例如不大于 $15\mu M$ ,例如不大于 $10\mu M$ ,例如不大于 $5\mu M$ 。优选地,化合物的 $CP_{50}$ 值不大于 $60\mu M$ 。

#### 胞浆素稳定性

[0086] 缺血性卒中(亦称为“脑缺血”或“大脑缺血”)通常由将血液供应至脑的动脉的堵塞引起。堵塞会减少到达脑的血流量和氧,从而导致脑细胞损伤或死亡。血管的堵塞可使用一系列机械装置或使用静脉内或动脉内递送的“凝块破坏剂”来移除。在这些凝块破坏剂中有组织纤维蛋白溶酶原因子(tPA),其自纤维蛋白溶酶原生成胞浆素。重组tPA的实例是阿替普酶、瑞替普酶(reteplase)和替奈普酶(tenecteplase),且分解凝块的其他血栓溶解药物包括链球菌激酶(streptokinase)、尿激酶(urokinase)和去氨普酶(desmotaplastase)。

[0087] 在一个实施方式中,将本发明的化合物施用至接受tPA或重组tPA的受试者,该tPA或重组tPA是AIS的标准护理。因此,化合物与施用tPA(包括生成胞浆素,其是丝氨酸蛋白酶)相容是必要的。

[0088] 在实施例3中测定本发明化合物的体外胞浆素稳定性。在一个实施方式中,化合物

在实施例3中所述的胞浆素稳定性分析中在胞浆素存在下的半衰期是至少10min,例如至少30min、例如至少1h、例如至少2h、例如至少3h、例如至少4h、例如至少5h、例如至少6h、例如至少7h、例如至少8h、例如至少9h、例如至少10h、例如至少15h、例如至少20h、例如至少30h。

对PSD-95的PDZ1-2的亲合力

[0089] 优选地,本发明的化合物对PSD-95的PDZ1-2具有纳摩尔范围的亲合力,从而使其成为高度强效的抑制剂。对PSD-95的PDZ1-2的亲合力是降低达到治疗效果所需的药物浓度阈值的关键因素,这在当药物必须穿过血脑屏障(BBB)以到达其靶标时尤其重要,因为BBB往往将限制靶标处药物浓度的累积。

[0090] 在一些实施方式中,本发明的化合物是同时结合至PDZ1和PDZ2的二聚体PSD-95抑制剂,此可解释其对这些结构域的高亲合力。

[0091] 如实施例2中所述,所获得的本发明化合物对PSD-95的PDZ1-2的亲合力处于低纳摩尔范围,且类似于L-TAT-NPEG<sub>4</sub>(IETDV)<sub>2</sub>。

[0092] 在一个实施方式中,化合物对PSD-95的PDZ1-2的K<sub>i</sub>值不大于100nM,例如不大于80nM、例如不大于70nM、例如不大于60nM、例如不大于50nM、例如不大于40nM、例如不大于30nM、例如不大于20nM、例如不大于10nM。

医学用途

[0093] 在一个方面中,如本文所定义的本发明化合物用作药物。

[0094] PSD-95的PDZ1和PDZ2结构域与多种蛋白相互作用,包括同时结合NMDA型亲离子型谷氨酸盐受体和产一氧化氮(NO)酶nNOS。NMDA受体是兴奋毒性的主要介导剂,即谷氨酸盐介导的神经毒性,其参与神经退化疾病和急性脑损伤。PSD-95分别经由PDZ1和PDZ2同时结合NMDA受体(主要是GluN2A和GluN2B亚单元)和nNOS。NMDA受体的活化引起钙离子流入,活化nNOS,由此生成NO。因此,PSD-95介导NMDA受体活化与NO产生之间的特定关联,此若持续较长时间则可能对细胞有害,且是谷氨酸盐介导的神经毒性的关键促进剂。已知通过靶向PSD-95抑制nNOS/PSD-95/NMDA受体相互作用的三元复合物会通过损害钙离子进入与NO产生之间的功能性连接来防止小鼠的缺血性脑损伤,同时NMDA受体的生理功能(例如离子流和促存活信号传导途径)保持完整。兴奋毒性的特异性抑制可通过使用PSD-95抑制剂扰乱细胞内nNOS/PSD-95/NMDA受体复合物来获得。

[0095] 本发明的化合物是PSD-95抑制剂且因此能够抑制兴奋毒性。因此,本发明的化合物可用于治疗多种疾病,尤其是神经疾病,且尤其是部分由兴奋毒性介导的疾病。这些疾病和病况包括卒中、癫痫、缺氧、与卒中无关的创伤性CNS损伤(例如创伤性脑损伤和脊髓损伤)、其他大脑缺血、阿兹海默病(Alzheimer's disease)和帕金森氏病(Parkinson's disease)。

[0096] 在一个方面中,本发明是关于如本文所定义的化合物用于预防、治疗、减轻兴奋毒性相关疾病和/或延迟其发展。在一个实施方式中,兴奋毒性相关疾病是卒中。在一个实施方式中,兴奋毒性相关疾病是缺血性卒中。在一个实施方式中,兴奋毒性相关疾病是大脑缺血。在一个实施方式中,兴奋毒性相关疾病是急性缺血性卒中。在一个实施方式中,兴奋毒性相关疾病是蛛网膜下出血。

[0097] 在一个方面中,本发明是关于如本文所定义的化合物在制备用来预防、治疗、减轻兴奋毒性相关疾病和/或延迟其发展的药物中的用途。

[0098] 在一个方面中,本发明是关于预防、治疗、减轻兴奋毒性相关疾病和/或延迟其发展的方法,该方法包括施用治疗有效量的如本文所定义的化合物。

[0099] 在一个方面中,本发明是关于化合物用于减小和/或抵抗兴奋毒性的损伤效应。在一个实施方式中,化合物用于减小卒中的损伤效应。在一个实施方式中,化合物用于治疗急性缺血性卒中的损伤效应。在一个实施方式中,化合物用于治疗蛛网膜下出血的损伤效应。

[0100] 在一个方面中,本发明是关于抵抗和/或减小兴奋毒性对受试者脑或脊髓的损伤效应的方法,该方法包括向受试者施用有效量的如本文所定义的化合物以抵抗和/或减小损伤效应的步骤。

[0101] 在一个方面中,本发明是关于治疗、减轻由兴奋毒性介导的病况或延迟其发展的方法,包括向患有病况或具有患病况风险的人类受试者施用如本文所定义的化合物。

[0102] 在一个方面中,本发明是关于治疗或抑制或延迟受试者的由兴奋毒性介导的病况的至少一种迹象或症状的方法,其包括向患有病况或具有与病况相关的风险因子的受试者施用如本文所定义的化合物。在一个实施方式中,该病况是卒中或创伤性CNS损伤。在一个实施方式中,兴奋毒性相关疾病是对CNS的缺血性或创伤性损伤/CNS中的缺血性或创伤性损伤/CNS的缺血性或创伤性损伤。

[0103] 在一个方面中,本发明是关于减小患有卒中的受试者的卒中损伤效应的方法,包括向受试者施用有效量的如本文所定义的化合物以减小卒中的损伤效应。

[0104] 如本文所用的”卒中”是一般术语,其是指由供应脑的一条或多条血管闭塞或出血导致细胞死亡而引起的病况。如本文所用的”缺血性卒中”是指由供应脑的一条或多条血管闭塞引起的卒中。缺血性卒中的类型包括例如栓塞性卒中、心源性卒中、血栓性卒中、大血管血栓形成、腔隙梗塞、动脉-动脉卒中和隐源性卒中。”大脑缺血”是其中动脉堵塞限制富含氧的血液递送至脑、从而引起脑组织损伤的病况。大脑缺血有时称为脑缺血或脑血管缺血。

[0105] 如本文所用的”出血性卒中”是指由供应脑的一条或多条血管出血引起的卒中。出血性卒中的类型包括例如硬膜下卒中、实质内卒中、硬膜外卒中和蛛网膜下卒中。

[0106] 在一个实施方式中,可通过本发明化合物治疗的疾病是缺血性或创伤性CNS损伤。在一个方面中,本发明是关于减小受试者脑或脊髓的创伤性损伤或缺血的损伤效应的方法,该方法包括用如本文所定义的化合物治疗该受试者以实现该减小。

[0107] 在一个方面中,本发明是关于抑制由于血管内手术导致的大脑缺血的方法,包括以可有效抑制大脑缺血的方案向经受血管内手术的受试者施用如本文所定义的化合物。

[0108] 在一个方面中,本发明是关于抑制因治疗动脉瘤的血管内手术、诊断性血管摄影术或颈动脉支架术引起的缺血性损伤的方法,包括向经受治疗动脉瘤的血管内手术或诊断性血管摄影术的受试者施用如本文所定义化合物的有效方案。

[0109] 在一个方面中,本发明是关于如本文所定义的化合物用于抑制因神经手术引起的缺血性损伤。在一个实施方式中,所述神经手术是脑的诊断性血管摄影术或治疗动脉瘤的血管内手术。

[0110] 在一些实施方式中,化合物与再灌注疗法组合施用。在一个实施方式中,化合物和再灌注同时、依序或单独施用于受试者。

[0111] 如本文所用的术语“再灌注疗法”是指通过或围绕所堵塞动脉恢复血流的医学治

疗。再灌注疗法包括药剂和机械再灌注。所述药剂可以是用于称为血栓溶解的过程中的血栓溶解剂或纤维溶解剂。在一些实施方式中,再灌注疗法是通过施用血栓溶解剂(例如纤维蛋白溶酶原活化剂,例如tPA)来实施。

[0112] 在一个实施方式中,化合物是化合物8 (AB144),且该化合物与纤维蛋白溶酶原活化剂(例如tPA)组合施用。

[0113] 在一些实施方式中,再灌注疗法是机械再灌注,包括手术。所实施的手术可为微创血管内程序。

[0114] 机械再灌注装置包括动脉内导管、气球、支架和各种凝块取出装置。

[0115] 在一个实施方式中,化合物与血栓溶解剂组合施用,且化合物和血栓溶解剂同时、依序或单独施用于受试者。

[0116] 在一个方面中,本发明是关于治疗缺血对中枢神经系统的损伤效应的方法,其包括

a) 向患有缺血或具有缺血风险的受试者施用如本文所定义的化合物,和

b) 对受试者实施再灌注疗法,

其中化合物和再灌注疗法治疗缺血对受试者中枢神经系统的损伤效应。

[0117] 在一个方面中,本发明是关于如本文所定义的化合物用于治疗缺血对患有缺血或具有缺血风险的受试者的中枢神经系统的损伤效应,其中对受试者实施再灌注疗法,且化合物和再灌注疗法治疗缺血对受试者中枢神经系统的损伤效应。

[0118] 在一个实施方式中,所述方法进一步包括将血栓溶解剂同时、依序或单独施用于受试者。

[0119] 在一个方面中,本发明是关于试剂盒,其包含至少两个单独单位剂型(A)和(B),其中

(A) 包含如本文所定义的化合物;且

(B) 包含血栓溶解剂。

[0120] 在一个方面中,如本文所定义的试剂盒用于治疗缺血对中枢神经系统的损伤效应,其中(A)和(B)是同时、依序或单独施用于受试者。

[0121] 在一个方面中,本发明是关于如本文所定义的化合物用于治疗蛛网膜下出血的损伤效应。如本文所用的术语“蛛网膜下出血”是指蛛网膜下腔的出血状态。

[0122] 在一个方面中,本发明是关于治疗受试者的蛛网膜下出血的方法,其包括向患有蛛网膜下出血的受试者施用如本文所定义的化合物,其中受试者的神经认知缺陷的发展得以抑制。

[0123] 在一个方面中,本发明是关于抑制受试者的蛛网膜下出血的神经功能缺陷或神经认知缺陷的发展的方法,包括向患有蛛网膜下出血的受试者施用如本文所定义的化合物,其中受试者的神经功能缺陷或神经认知缺陷的发展得以抑制。

[0124] 可通过本发明化合物治疗的已知与兴奋毒性无关的其他神经疾病包括焦虑和疼痛。靶向PSD-95的二聚体配体作为慢性疼痛和缺血性卒中的治疗处于临床前/临床评估下(Andreasen等人,Neuropharmacol,2013,67,193-200;Bach等人,PNAS USA,2012,109,3317-3322)。在一个实施方式中,如本文所定义的化合物用于治疗或预防疼痛。

[0125] 在一个实施方式中,如本文所提及的受试者是哺乳动物,例如人类。

合成

[0126] 如本文所定义的本发明化合物可通过包括以下一般步骤的方法制造:

- a) 合成如本文所定义的肽 $P_1/P_2$ ;
- b) 使用OPEG<sub>n</sub>或NPEG<sub>n</sub>接头将a)的肽二聚化,其中“n”是PEG部分的数量;
- c) 将CPP标签附接至NPEG接头的N处,例如通过使用自动化肽合成仪。

[0127] 在一个实施方式中,化合物是通过包括以下一般步骤的方法制造:

- a) 提供Ns-NPEG二酸接头;
- b) 使用基于Fmoc的固相肽合成来制备肽 $P_1/P_2$ ;
- c) 使用Ns-NPEG二酸接头将Fmoc脱保护的肽 $P_1/P_2$ 二聚化,形成接头-二聚体缀合物;和

d) 将CPP附接至接头-二聚体缀合物的NPEG接头的N,例如通过使用自动化肽合成仪。

[0128] 在一个实施方式中,本发明的化合物是如下文所述合成。

[0129] Ns-NPEG二酸接头:

[0130] “Ns-NPEG二酸接头”是其中用接头氮上的邻-硝基苯磺酰基(Ns)保护基团在氮上保护NPEG接头的结构,且其中NPEG接头的末端包含羧酸。该化学试剂或结构单元(building block)用于将两个肽部分 $P_1$ 和 $P_2$ 二聚化。

[0131] 邻-硝基苯磺酰基(Ns)保护的NPEG接头是在固相上或在溶液中产生。

[0132] 固相程序通常开始于使用适用于特定树脂的有机溶剂(例如DCM、DMF、ACN、THF)和碱(例如DIPEA、DBU、柯林碱(collidine)、NMM),用Fmoc-NH-PEG-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH加载可用于固相肽合成的固体支持物(例如2-氯三苯甲基氯树脂)。

[0133] 可在适当溶剂(例如DMF、DCM、ACN、THF)中通过碱(例如哌啶、二甲胺、吗啉、六氢吡嗪、二环己胺、DMAP)移除Fmoc基团。

[0134] 可使用碱(例如DIPEA、DBU、柯林碱、NMM)和适当溶剂(例如THF、DCM)将邻-硝基苯磺酰氯偶联至游离胺,以获得Ns-NH-PEG-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COO-树脂。

[0135] 可通过使用光延化学(Mitsunobu-chemistry)将接头产物的第二部分连接至树脂结合的接头部分。用三苯基膦、HO-PEG-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOtBu、溶剂和偶氮二甲酸的酯或酰胺试剂(例如偶氮二甲酸二异丙基酯,DIAD;偶氮二甲酸二乙酯,DEAD;1,1'-(偶氮二羰基)-二哌啶,ADDP)处理树脂。

[0136] 通过用酸(例如三氟乙酸(TFA))处理树脂获得最终的Ns-NPEG二酸接头。

[0137] 可通过用Ns保护NH<sub>2</sub>-PEG-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOtBu的胺基、然后在溶液中使用三苯基膦和DIAD、DEAD或ADDP或类似试剂、HO-PEG-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOtBu和适当溶剂(THF、DCM)进行光延化学来实施溶液相程序。然后通过用酸(例如TFA)处理获得最终的Ns保护的NPEG-接头。

[0138] 肽合成:通过基于Fmoc的固相肽合成,使用固体支持物(例如2-氯三苯甲基氯树脂或王氏树脂(Wang resin))、Fmoc保护的氨基酸、碱、偶联试剂(例如HBTU[N,N,N',N'-四甲基-0-(1H-苯并三唑-1-基)脲六氟磷酸盐]、0-(7-氮杂苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸盐[HATU]、PyBOB、DIC/HOBt)和溶剂,来合成肽序列。可选地,对于偶联试剂,可使用Fmoc保护的氨基酸的活化酯(例如五氟苯基、琥珀酰亚胺)。

[0139] 二聚化:通过树脂上二聚化过程,通过用亚化学计量量(例如1/6)的Ns-NPEG二酸

接头、碱、偶联试剂和适当溶剂(例如DMF、DCM、THF)重复处理树脂,用Ns-NPEG二酸接头对Fmoc脱保护的树脂结合肽进行二聚化。可选地,对于偶联试剂,可使用Ns-NPEG接头的活化酯。

[0140] 二聚化过程亦可在溶液中进行,其使用Ns-NPEG接头的活化酯(例如五氟苯基、琥珀酰亚胺)以及1-羟基-7-氮杂苯并三唑(HOAt)或羟基苯并三唑(HOBT)和合适的侧链保护的肽(例如叔丁基)在溶剂(例如ACN、DMF、DCM、THF)中进行。另外,溶液中的二聚化可使用Ns-NPEG二酸接头、偶联试剂(例如HBTU、HATU等)、碱和溶剂来进行。

[0141] 通过巯基乙醇和1,8-二氮杂二环[5.4.0]十一-7-烯(DBU)或通过苯硫酚钠移除Ns基团。

[0142] 将CPP附接至接头-二聚体缀合物的NPEG接头的NH部分:首先,将氨基酸连接至NPEG接头的NH部分,随后遵循树脂上Fmoc SPPS的标准(人工/自动化)来合成CPP。

[0143] 可通过在碱水溶液(例如NaOH、LiOH)和乙腈中搅拌裂解产物、然后用TFA或HCl酸化来移除酯保护基团。

[0144] 通过冻干和用HPLC或类似层析方法纯化来获得本发明的最终化合物。

[0145] 在另一实施方式中,本发明化合物的合成是如实施例1中所概述来实施。

#### 条目

1. 一种化合物,其包含第一肽( $P_1$ ),该第一肽包含氨基酸序列 $X_2TX_3V$ (SEQ ID NO: 53)或由其组成,其中

a.  $X_2$ 选自自由E和S组成的组;且

b.  $X_3$ 选自自由L、T、V、R和D组成的组,

其中 $P_1$ 连接至细胞穿透肽(CPP)。

2. 一种化合物,其包含通过接头连接至第二肽( $P_2$ )的第一肽( $P_1$ ),其中 $P_1$ 和 $P_2$ 包含选自以下的氨基酸序列或由选自以下的氨基酸序列组成:KETLV(SEQ ID NO:2)、KETTV(SEQ ID NO:3)、KETVV(SEQ ID NO:4)、KETRV(SEQ ID NO:5)、ISTDV(SEQ ID NO:6)和VETVV(SEQ ID NO:7)。

3. 如条目2的化合物,其中 $P_1$ 和 $P_2$ 经由接头连接至细胞穿透肽(CPP)或白蛋白结合部分,由此增加肽对膜或血脑屏障的穿越。

4. 如前述条目中任一者的化合物,其中化合物的 $CP_{50}$ 值不大于 $250\mu\text{M}$ ,例如不大于 $200\mu\text{M}$ ,例如不大于 $150\mu\text{M}$ ,例如不大于 $100\mu\text{M}$ ,例如不大于 $80\mu\text{M}$ ,例如不大于 $70\mu\text{M}$ ,例如不大于 $60\mu\text{M}$ ,例如不大于 $50\mu\text{M}$ ,例如不大于 $40\mu\text{M}$ ,例如不大于 $30\mu\text{M}$ ,例如不大于 $20\mu\text{M}$ ,例如不大于 $15\mu\text{M}$ ,例如不大于 $10\mu\text{M}$ ,例如不大于 $5\mu\text{M}$ 。

5. 如前述条目中任一者的化合物,其中化合物在胞浆素稳定性分析中的半衰期是至少10min,例如至少30min,例如至少1h,例如至少2h,例如至少3h,例如至少4h,例如至少5h,例如至少6h,例如至少7h,例如至少8h,例如至少9h,例如至少10h,例如至少15h,例如至少20h,例如至少30h。

6. 如前述条目中任一者的化合物,其中化合物对PSD-95的PDZ1-2的 $K_i$ 值不大于100nM,例如不大于80nM,例如不大于70nM,例如不大于60nM,例如不大于50nM,例如不大于40nM,例如不大于30nM,例如不大于20nM,例如不大于10nM。

7. 如前述条目中任一者的化合物,其中CPP是聚-L-精氨酸肽(聚-Arg)。

8. 如条目7的化合物,其中聚-Arg由5至10个L-精氨酸残基、例如7至10个L-精氨酸残基、例如8或9个L-精氨酸残基组成。

9. 如条目7的化合物,其中聚-Arg包含氨基酸序列RRRRRRRRR (SEQ ID NO:12) 或由其组成。

10. 如条目1至6中任一者的化合物,其中CPP是L-TAT (YGRKKRRQRRR, SEQ ID NO:8)。

11. 如条目1至6中任一者的化合物,其中CPP是D-TAT (yGrkrrrqrrr, SEQ ID NO:9)。

12. 如条目1至6中任一者的化合物,其中CPP是mTAT (rRrGrKkRr, SEQ ID NO:10)。

13. 如条目1至6中任一者的化合物,其中CPP是riTAT (rrrqrrkkr, SEQ ID NO:11)。

14. 如条目1至6中任一者的化合物,其中CPP是D-Arg<sub>9</sub> (rrrrrrrrr, SEQ ID NO:13)。

15. 如条目1至6中任一者的化合物,其中CPP是L-Pen (RQIKIWFQNRRMKWKK, SEQ ID NO:14)。

16. 如条目1至6中任一者的化合物,其中CPP是D-Pen (rqikiwfnrrmkwkk, SEQ ID NO:15)。

17. 如条目1至6中任一者的化合物,其中CPP是L-DPV3 (RKKRRRESRKKRRRES, SEQ ID NO:17)。

18. 如条目1至6中任一者的化合物,其中CPP是L-pVEC (LLIILRRRIRKQAHASK, SEQ ID NO:18)。

19. 如条目1至6中任一者的化合物,其中CPP是L-MAP (KLALKLALKALKAALKLA, SEQ ID NO:16)。

20. 如条目1至6中任一者的化合物,其中CPP是L-TP2 (PLIYLRLLRGQF, SEQ ID NO:19)。

21. 如条目1至6中任一者的化合物,其中CPP是D-TP2 (pliyrlrlrGqf, SEQ ID NO:20)。

22. 如条目1至6中任一者的化合物,其中CPP是MiniAp4 (| (Dap) KAPETALD |, SEQ ID NO:21)。

23. 如条目1至6中任一者的化合物,其中CPP是CPP12 (| Ff (Na12) RrRrQ | GABA-K, SEQ ID NO:22)。

24. 如前述条目中任一者的化合物,其中氨基酸序列X<sub>2</sub>TX<sub>3</sub>V (SEQ ID NO:53) 是P<sub>1</sub>的C末端。

25. 如前述条目中任一者的化合物,其中P<sub>1</sub>由4至10个氨基酸残基、例如5个氨基酸残基、例如6个氨基酸残基组成。

26. 如前述条目中任一者的化合物,其中P<sub>1</sub>包含序列X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>TX<sub>3</sub>V (SEQ ID NO:54) 或由其组成,其中

- a. X<sub>1</sub>选自由K、V和I组成的组;
- b. X<sub>2</sub>选自由E和S组成的组;且
- c. X<sub>3</sub>选自由L、T、V、R和D组成的组。

27. 如前述条目中任一者的化合物,其中 $P_1$ 包含KETLV (SEQ ID NO:2)、KETTV (SEQ ID NO:3)、KETVV (SEQ ID NO:4)、KETRV (SEQ ID NO:5)、ISTDV (SEQ ID NO:6)、VETVV (SEQ ID NO:7)和IETDV (SEQ ID NO:1)或由其组成。

28. 如前述条目中任一者的化合物,其中化合物包含第二肽( $P_2$ ),该第二肽包含氨基酸序列 $X_5TX_6V$  (SEQ ID NO:55)或由其组成,其中

- a.  $X_5$ 选自由E和S组成的组;且
- b.  $X_6$ 选自由L、T、V、R和D组成的组。

29. 如前述条目中任一者的化合物,其中氨基酸序列 $X_5TX_6V$  (SEQ ID NO:55)是 $P_2$ 的C末端。

30. 如前述条目中任一者的化合物,其中 $P_2$ 由4至10个氨基酸残基、例如5个氨基酸残基、例如6个氨基酸残基组成。

31. 如前述条目中任一者的化合物,其中 $P_2$ 包含序列 $X_4X_5TX_6V$  (SEQ ID NO:56)或由其组成,其中

- a.  $X_4$ 选自由K、V和I组成的组;
- b.  $X_5$ 选自由E和S组成的组;且
- c.  $X_6$ 选自由L、T、V、R和D组成的组。

32. 如前述条目中任一者的化合物,其中 $P_2$ 包含选自以下的氨基酸序列或由选自以下的氨基酸序列组成:KETLV (SEQ ID NO:2)、KETTV (SEQ ID NO:3)、KETVV (SEQ ID NO:4)、KETRV (SEQ ID NO:5)、ISTDV (SEQ ID NO:6)、VETVV (SEQ ID NO:7)和IETDV (SEQ ID NO:1)。

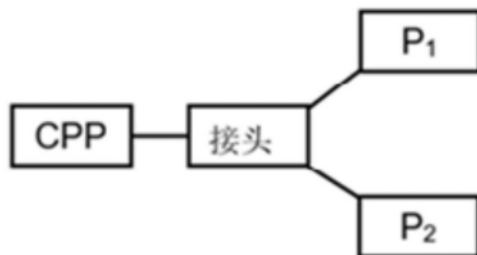
33. 如前述条目中任一者的化合物,其中 $P_1$ 和 $P_2$ 是相同的。

34. 如前述条目中任一者的化合物,其中 $P_1$ 和 $P_2$ 经由其N末端结合至接头。

35. 如前述条目中任一者的化合物,其中CPP (例如聚-Arg) 经由接头连接至 $P_1$ 。

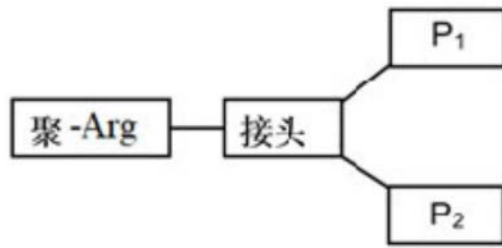
36. 如前述条目中任一者的化合物,其中CPP (例如聚-Arg) 经由接头连接至 $P_1$ 和 $P_2$ 。

37. 如前述条目中任一者的化合物,其中CPP (例如聚-Arg) 经由其C末端连接至接头,且 $P_1$ 和 $P_2$ 经由其N末端结合至接头,且化合物具有式(I)的以下通式结构:



式(I)。

38. 如前述条目中任一者的化合物,其中CPP是聚-Arg且化合物具有式(II)的以下通式结构:



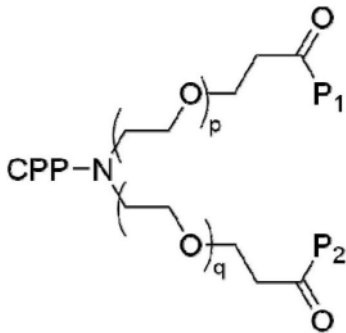
式(II)。

39. 如前述条目中任一者的化合物,其中接头包含一个或多个PEG单元。

40. 如条目39的化合物,其中一个PEG单元的至少一个氧原子经氮原子取代以获得NPEG。

41. 如前述条目中任一者的化合物,其中接头包含NPEG单元且CPP(例如聚-Arg)通过酰胺键连接至接头的氮原子。

42. 如前述条目中任一者的化合物,其中化合物具有式(III)的通式结构:



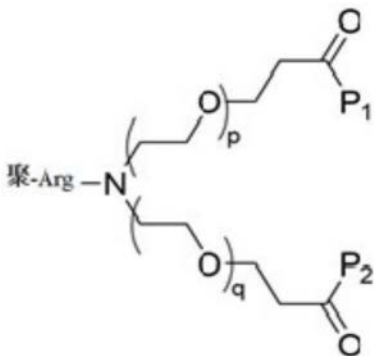
式(III)

其中

p是0至10的整数;且

q是0至10的整数。

43. 如前述条目中任一者的化合物,其中化合物具有式(IV)的通式结构:



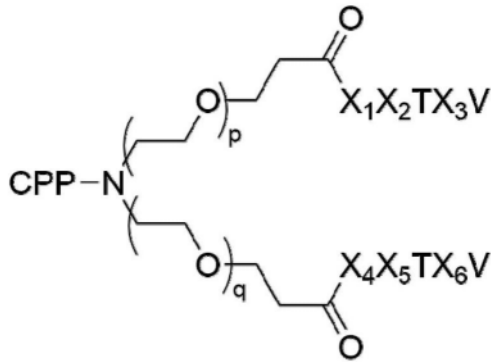
式(IV)

其中

p是0至10的整数;且

q是0至10的整数。

44. 如前述条目中任一者的化合物,其中化合物具有式(V)的通式结构:



式(V)

其中

$\text{X}_1$ 选自由K、V和I组成的组;

$\text{X}_2$ 选自由E和S组成的组;且

$\text{X}_3$ 选自由L、T、V、R和D组成的组;

$\text{X}_4$ 选自由K、V和I组成的组;

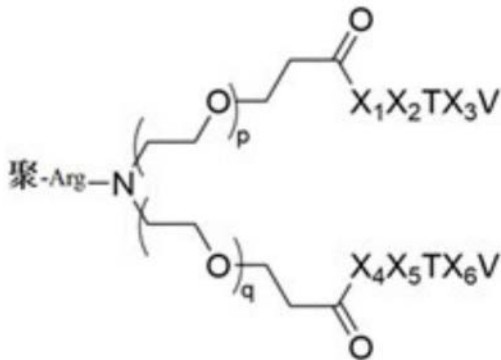
$\text{X}_5$ 选自由E和S组成的组;

$\text{X}_6$ 选自由L、T、V、R和D组成的组;

p是0至10的整数;且

q是0至10的整数。

45. 如前述条目中任一者的化合物,其中化合物具有式(VI)的通式结构:



式(VI)

其中

$\text{X}_1$ 选自由K、V和I组成的组;

$\text{X}_2$ 选自由E和S组成的组;且

$\text{X}_3$ 选自由L、T、V、R和D组成的组;

$\text{X}_4$ 选自由K、V和I组成的组;

$\text{X}_5$ 选自由E和S组成的组;

$\text{X}_6$ 选自由L、T、V、R和D组成的组;

p是0至10的整数;且

q是0至10的整数。

46. 如前述条目中任一者的化合物,其中 $p=q$ 。

47. 如前述条目中任一者的化合物,其中 $p>q$ 。

48. 如前述条目中任一者的化合物,其中 $p<q$ 。

49. 如前述条目中任一者的化合物,其中p和q的和是介于1与20之间的整数。

50. 如前述条目中任一者的化合物,其中乙二醇部分的数量p选自0个、1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个和10个乙二醇部分。

51. 如前述条目中任一者的化合物,其中乙二醇部分的数量p是0至4。

52. 如前述条目中任一者的化合物,其中乙二醇部分的数量q选自0个、1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个和10个乙二醇部分。

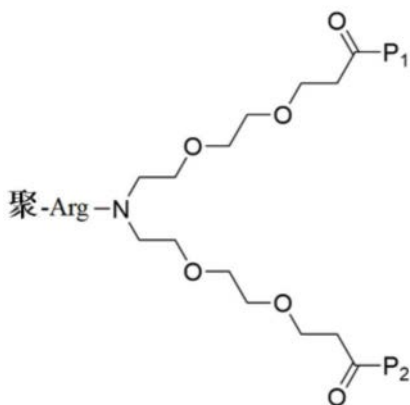
53. 如前述条目中任一者的化合物,其中乙二醇部分的数量q是0至4。

54. 如前述条目中任一者的化合物,其中乙二醇部分的总数 $p+q$ 介于2与12之间,例如2,例如4,例如6,例如8,例如10,例如12。

55. 如前述条目中任一者的化合物,其中乙二醇部分的总数 $p+q$ 是4。

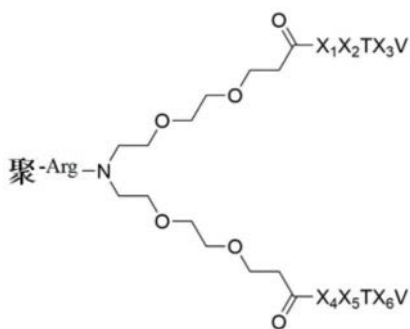
56. 如前述条目中任一者的化合物,其中p是2且q是2。

57. 如前述条目中任一者的化合物,其中化合物具有式(VII)的通式结构:



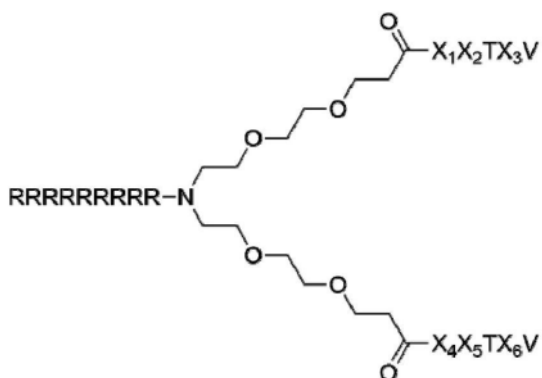
式(VII)。

58. 如前述条目中任一者的化合物,其中化合物具有式(VIII)的通式结构:



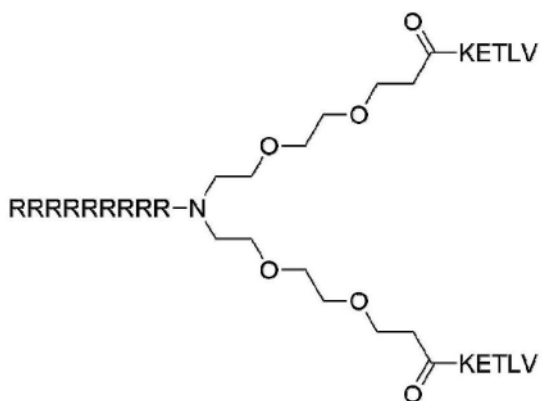
式(VIII)。

59. 如前述条目中任一者的化合物,其中化合物具有式(IX)的通式结构:

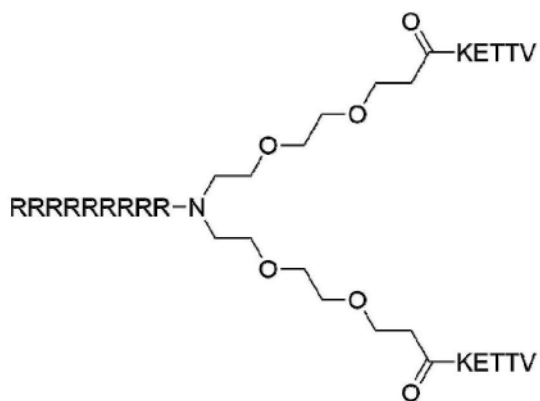


式(IX)。

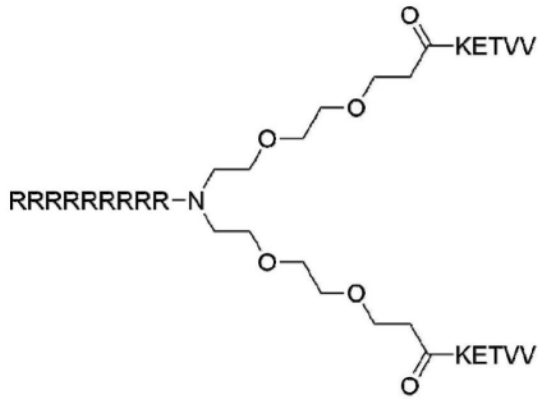
60. 如前述条目中任一者的化合物,其中化合物选自式(X)至(XVI):



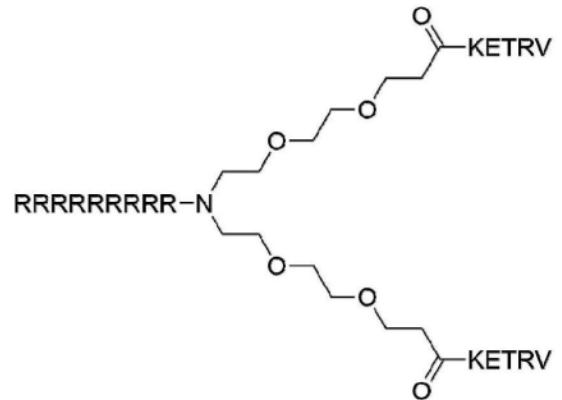
式(X)



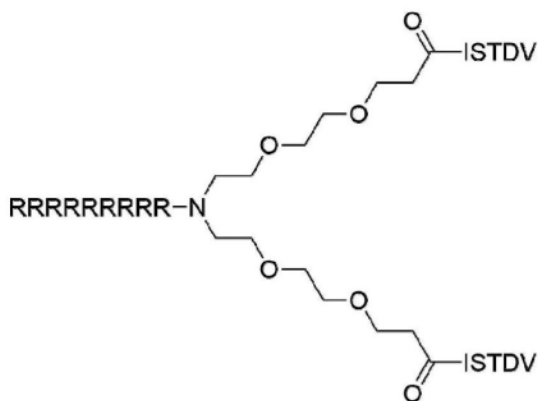
式(XI)



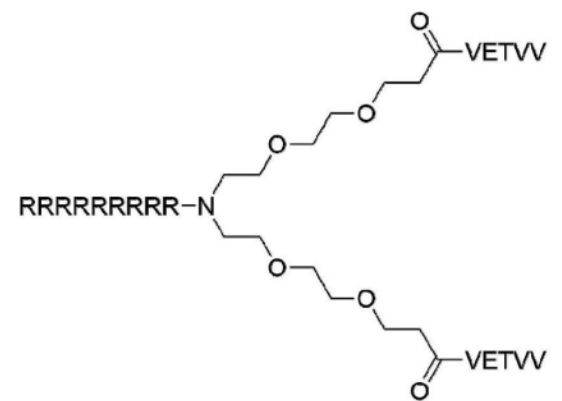
式(XII)



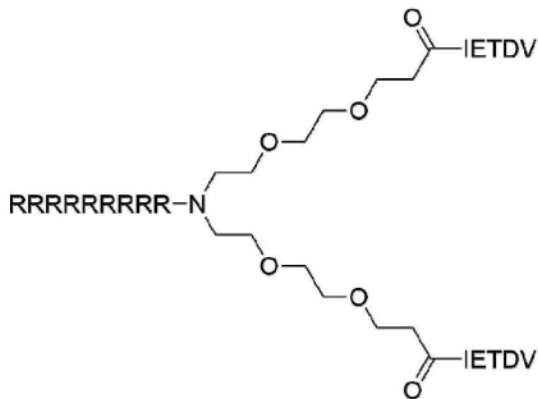
式(XIII)



式(XIV)



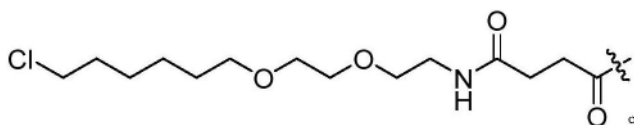
式(XV)



式(XVI)

61. 如前述条目中任一者的化合物,其中CPP的N末端经乙酰化。

62. 如条目1至60中任一者的化合物,其中CPP的N末端结合至氯烷烃标签(CA),其具有以下结构:



63. 如条目1至60中任一者的化合物,其中CPP的N末端经甲基化。

64. 如条目1至60中任一者的化合物,其中CPP的N末端经甲酰化。

65. 如前述条目中任一者的化合物,其呈所述化合物的药学上可接受的盐或前药的形式。

66. 一种化合物,其包含

a. 第一肽( $P_1$ ),该第一肽包含氨基酸序列 $X_2TX_3V$ (SEQ ID NO:53)或由其组成,其中 $X_2$ 选自由E和S组成的组;

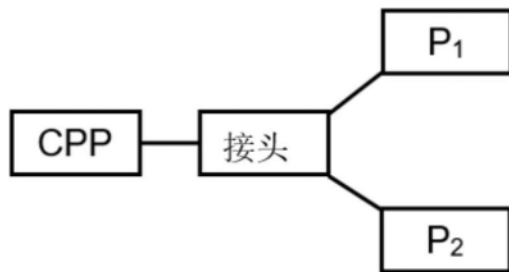
$X_3$ 选自由L、T、V、R和D组成的组;

b. 第二肽( $P_2$ ),该第二肽包含氨基酸序列 $X_5TX_6V$ (SEQ ID NO:55)或由其组成,其中 $X_5$ 选自由E和S组成的组;

$X_6$ 选自由L、T、V、R和D组成的组;和

c. 细胞穿透肽(CPP),

其中所述CPP经由其C末端连接至接头,且 $P_1$ 和 $P_2$ 经由其N末端结合至该接头,且所述化合物具有式(I)的通式结构:



式(I)

且其中化合物具有不大于 $20\mu\text{M}$ 的 $\text{CP}_{50}$ 值。

67. 如条目66的化合物,其中 $P_1$ 包含序列 $X_1X_2TX_3V$ (SEQ ID NO:54)或由其组成,其中

$X_1$ 选自由K、V和I组成的组;

$X_2$ 选自由E和S组成的组;且

$X_3$ 选自由L、T、V、R和D组成的组;

且其中 $P_2$ 包含序列 $X_4X_5TX_6V$ (SEQ ID NO:56)或由其组成,其中

$X_4$ 选自由K、V和I组成的组;

$X_5$ 选自由E和S组成的组;且

$X_6$ 选自由L、T、V、R和D组成的组。

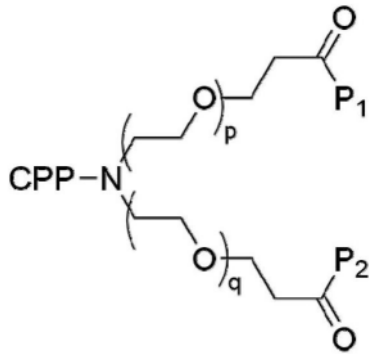
68. 如条目66或67中任一者的化合物,其中 $P_1$ 和/或 $P_2$ 由4至10个氨基酸残基、例如5个氨基酸残基组成。

69. 如条目66至68中任一者的化合物,其中 $X_3$ 和 $X_6$ 选自L、T、V和R。

70. 如条目66至68中任一者的化合物,其中 $P_1$ 和 $P_2$ 由选自以下的氨基酸序列组成: KETLV(SEQ ID NO:2)、KETTV(SEQ ID NO:3)、KETVV(SEQ ID NO:4)、KETRV(SEQ ID NO:5)、ISTDV(SEQ ID NO:6)和VETVV(SEQ ID NO:7)。

71. 如条目66至70中任一者的化合物,其中接头包含一个或多个PEG单元,其中一

个PEG单元的至少一个氧原子经氮原子替代以获得NPEG,且其中CPP通过酰胺键连接至接头的氮原子,且所述化合物具有式(III)的通式结构:



式(III)

其中

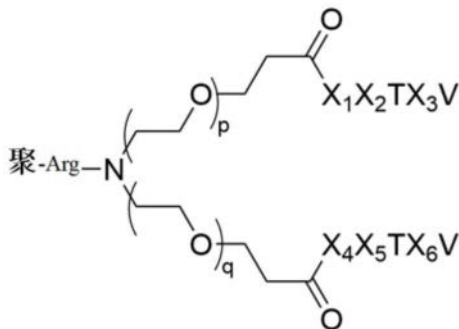
p是0至10的整数;且

q是0至10的整数。

72. 如条目66至72中任一者的化合物,其中CPP选自由以下组成的组:聚-L-精氨酸肽(聚-Arg);D-TAT(yGrkkrrqrrr,SEQ ID NO:9);L-Pen(RQIKIWFQNRRMKWKK,SEQ ID NO:14);D-Pen(rqikiwfnrrmkwkk,SEQ ID NO:15);L-DPV3(RKKRRRESRKKRRRES,SEQ ID NO:17);L-pVEC(LLIILRRRIRKQAHASK,SEQ ID NO:18);L-MAP(KLALKLALKALKALKLA,SEQ ID NO:16);L-TP2(PLIYLRLLRGQF,SEQ ID NO:19);MiniAp4(|(Dap)KAPETALD|,SEQ ID NO:21);和CPP12(|Ff(Na12)RrRrQ|GABA-K,SEQ ID NO:22)。

73. 如条目66至72中任一者的化合物,其中CPP包含聚-L-精氨酸肽(聚-Arg),例如由5至10个L-精氨酸残基、例如8或9个L-精氨酸残基组成的聚-Arg,或由以上组成,例如其中聚-Arg包含氨基酸序列RRRRRRRRR(SEQ ID NO:12)或由其组成。

74. 如条目66至73中任一者的化合物,其中化合物具有式(VI)的通式结构:



式(VI)

其中

X<sub>1</sub>选自由K、V和I组成的组;

X<sub>2</sub>选自由E和S组成的组;且

X<sub>3</sub>选自由L、T、V、R和D组成的组;

X<sub>4</sub>选自由K、V和I组成的组;

X<sub>5</sub>选自由E和S组成的组;

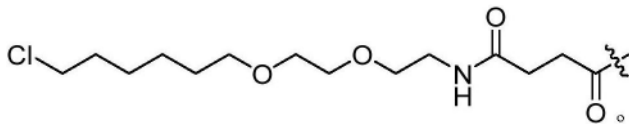
$X_6$ 选自由L、T、V、R和D组成的组；

p是0至10的整数；且

q是0至10的整数。

75. 如条目66至74中任一者的化合物,其中p是2且q是2。

76. 如条目66至75中任一者的化合物,其中CPP的N末端经乙酰化或其中CPP的N末端结合至氯烷烃标签(CA),其具有以下结构:



77. 如前述条目中任一者的化合物,其中化合物是PSD-95抑制剂。

78. 一种医药组合物,其包含如前述条目中任一者的化合物。

79. 如前述条目中任一者的化合物,其用作药物。

80. 如条目1至76中任一者的化合物,其用于治疗、预防、减轻兴奋毒性相关疾病和/或延迟其发展。

81. 如条目80使用的化合物,其中兴奋毒性相关疾病是卒中。

82. 如条目80使用的化合物,其中兴奋毒性相关疾病是缺血性卒中。

83. 如条目80使用的化合物,其中兴奋毒性相关疾病是大脑缺血。

84. 如条目80使用的化合物,其中兴奋毒性相关疾病是急性缺血性卒中。

85. 如条目80使用的化合物,其中兴奋毒性相关疾病是蛛网膜下出血。

86. 如条目1至76中任一者的化合物,其用于治疗或预防疼痛。

87. 一种试剂盒,其包含至少两个单独单位剂型(A)和(B),其中

(A) 包含如条目1至77中任一者的化合物;且

(B) 包含血栓溶解剂。

88. 如条目87的试剂盒,其用于治疗、预防、减轻兴奋毒性相关疾病和/或疼痛和/或延迟其发展,其中(A)和(B)同时、依序或单独施用于受试者。

## 实施例

### 实施例1:合成

[0146] 如先前所述合成树脂结合的化合物2至7(OPEG<sub>4</sub>-KETLV、OPEG<sub>4</sub>-KETTIV、OPEG<sub>4</sub>-KETVV、OPEG<sub>4</sub>-KETRV、OPEG<sub>4</sub>-ISTDV和OPEG<sub>4</sub>-VETVV):Bach等人,Angew.Chem.Int.Ed.,2009,48,9685。

[0147] 如先前Bach等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,2012,109,3317所述合成树脂结合的NPEG<sub>4</sub>-IETDV、NPEG<sub>4</sub>-KETLV、NPEG<sub>4</sub>-KETTIV、NPEG<sub>4</sub>-KETVV、NPEG<sub>4</sub>-KETRV、NPEG<sub>4</sub>-ISTDV和NPEG<sub>4</sub>-VETVV。使用O-(1H-6-氯苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脲六氟磷酸盐(HCTU)作为偶联试剂,将直链CPP(L-TAT、DTAT、mTAT、riTAT、聚R、D-聚R、L-Pen、D-Pen、L-pVEC、L-MAP、L-DPV3、L-TP2、D-TP2、MiniAp4、CPP12)的第一C末端氨基酸(Fmoc-Ala-OH、Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH、Fmoc-D-Arg(Pbf)-OH、Fmoc-Asp(OAll)-OH、Fmoc-L-Lys(Boc)-OH、Fmoc-D-Lys(Boc)-OH、Fmoc-L-Lys(Ns)-OH、Fmoc-L-Phe-OH、Fmoc-D-Phe-OH、Fmoc-L-Ser(tBu)-OH)人工偶联至NPEG<sub>4</sub>接头的氮三次。随后,使用自动化肽合成仪(Prelude X,Gyros Protein Technologies,US)完成CPP的合成。为使用Prelude X进行合成,将所有试剂制备为DMF中的

溶液:Fmoc保护的氨基酸(0.2M)、HCTU(0.4M)和DIPEA(1.0M)。使用以下方案完成序列延伸:去保护( $2 \times 2$ min, rt, 350rpm振荡)和偶联( $3 \times 10$ min,  $50^\circ\text{C}$ , 350rpm振荡)。使用比树脂加载过量5倍的Fmoc-氨基酸/HCTU/DIPEA(1:1:2.5)混合物对氨基酸进行三重偶联。将含环状CPP(MiniAp4和CPP12)的肽用二氯甲烷(DCM)中的20eq.  $\text{PhSiH}_3$ 和0.2eq.  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ 在氮下处理 $2 \times 15$ min以移除烯丙基和烯丙氧羰基(alloc)保护基团。用DCM、然后用二甲基甲酰胺(DMF)洗涤树脂。通过将肽用DMF中的2eq. (苯并三唑-1-基氧基)三吡咯烷基磷六氟磷酸盐(PyBOP)和2eq. DIPEA在室温下处理16h以进行Asp/Dap的侧链和或Glu的C末端和Phe的N末端之间的环化反应,然后用DMF洗涤。成功合成用CPP标记的二聚体肽后,将树脂分成两份。使用DMF:乙酸酐:DIPEA(8:1.5:0.5)混合物将树脂结合肽的一部分的N末端封端两次达10min。用氯烷烃标签(CA)将树脂结合肽的另一部分的N末端官能化。使用CA:PyBOP:DIPEA于DMF中的混合物(3:3:10)将CA标签偶联至用CPP标记的肽的N末端的氨基团达16h。在含CPP12的肽的情形下,在CA标签偶联之前,通过添加DMF(2mL)中的1,8-二氮杂二环[5.4.0]十一-7-烯(DBU, 0.5mmol)和DMF(2mL)中的巯基乙醇(0.5mmol)并振荡30min来移除邻-硝基苯磺酰基(Ns)。在DMF中流动洗涤(flow-wash)后,将巯基乙醇/DBU处理重复四次。在DMF中最终流动洗涤后,CA标签偶联至Lys残基的侧链氮。

[0148] 用TFA/三异丙基硅烷/2,2'-(伸乙基二氧基)二乙烷硫醇(DODT)/ $\text{H}_2\text{O}$ (90/2.5/2.5)使肽化合物2至75从干燥树脂分裂下来达2h,然后过滤,蒸发,用冰冷醚沉淀,冻干,并通过制备型RP-HPLC纯化。通过LC-MS表征最终肽配体的分子量,并通过UPLC(214nm)表征最终肽配体的纯度(>95%)。

[0149] 如上文所述,合成也可以以40mmol或高达100mmol的规模实施,从而获得本文所报导肽化合物的数克制备物。

[0150] 本文所述的肽化合物表现出优异的溶解性质,达到25mg/mL浓度以及更高浓度。

[0151] 本实施例证实,配体可以以纯的形式被合成、纯化和获得。

#### 实施例2:对PSD-95的PDZ1-2的亲合力的测定

[0152] 使用如Bach等人,Proc.Nat1.Acad.Sci.USA,2012,109,3317所述的体外荧光极化(FP)分析测量化合物1至75对PSD-95的PDZ1-2的结合亲和力。首先,获得饱和结合曲线以确定荧光二聚体探针与PSD-95的PDZ1-2之间的相互作用的 $K_D$ 值。将递增浓度的PDZ1-2(0.015-30nM)添加至恒定浓度的探针(0.5nM)中。在635/670nm的激发/发射波长下测量样品的荧光极化(FP),并使用软件GraphPad Prism将所生成FP值拟合至一位点结合模型(one site binding model)。然后,通过异源竞争结合分析评估未经标记的肽对PSD-95PDZ12的亲和力,其中使用与饱和结合实验相同的条件,将所测试的肽以递增浓度(0.4-960nM,最终浓度)添加至固定量的PSD-95PDZ12(4nM)和探针(0.5nM)中。将FP值拟合至GraphPad prism中的一位点竞争(可变斜率)模型(one site competition(variable slope)model)。如先前Nikolovska-Coleska等人,Anal.Biochem.,2004,332,261所述,将所得 $\text{IC}_{50}$ 值转化成 $K_i$ 值。

[0153] 本实施例描述了如何测定配体结合至PSD-95的PDZ1-2的亲和力。结果呈现于表4至表7以及图1至图4中。总而言之,所测试的化合物表现出与化合物1相当的低纳摩尔范围内的亲和力( $K_i$ 值)。

表4.结合亲和力( $K_i$ ),表示为平均值 $\pm$ SEM(图1)。

化合物	配体	CPP	CPP序列	$K_i$ [nM]
1	OPEG <sub>4</sub> - (IETDV) <sub>2</sub>	-	-	13.7±1.6
2	OPEG <sub>4</sub> - (KETLV) <sub>2</sub>	-	-	11.1±0.3
3	OPEG <sub>4</sub> - (KETTV) <sub>2</sub>	-	-	14.4±0.4
4	OPEG <sub>4</sub> - (KETVV) <sub>2</sub>	-	-	15.8±1.2
5	OPEG <sub>4</sub> - (KETRV) <sub>2</sub>	-	-	53.2±3.8
6	OPEG <sub>4</sub> - (ISTDV) <sub>2</sub>	-	-	53.1±4.4
7	OPEG <sub>4</sub> - (VETVV) <sub>2</sub>	-	-	17.0±0.6

数据表示为 $n \geq 3$ 。

表5. 对连有L-TAT或L-Arg<sub>9</sub>的二聚体配体的结合亲和力( $K_i$ ), 表示为平均值±SEM (图2)。

化合物	配体	CPP	CPP序列	$K_i$ [nM]
8	NPEG <sub>4</sub> - (IETDV) <sub>2</sub>	L-TAT	YGRKKRRQRRR-	7.2±1.5
9	NPEG <sub>4</sub> - (IETDV) <sub>2</sub>	L-TAT	Ac-YGRKKRRQRRR-	12.5±1.1
11	NPEG <sub>4</sub> - (KETLV) <sub>2</sub>	L-TAT	Ac-YGRKKRRQRRR-	5.4±0.9
13	NPEG <sub>4</sub> - (KETTV) <sub>2</sub>	L-TAT	Ac-YGRKKRRQRRR-	6.5±0.7
15	NPEG <sub>4</sub> - (KETVV) <sub>2</sub>	L-TAT	Ac-YGRKKRRQRRR-	2.1±0.2
17	NPEG <sub>4</sub> - (KETRV) <sub>2</sub>	L-TAT	Ac-YGRKKRRQRRR-	6.6±0.6
19	NPEG <sub>4</sub> - (ISTDV) <sub>2</sub>	L-TAT	Ac-YGRKKRRQRRR-	36.1±1.8
21	NPEG <sub>4</sub> - (VETVV) <sub>2</sub>	L-TAT	Ac-YGRKKRRQRRR-	15.8±1.6
35	NPEG <sub>4</sub> - (IETDV) <sub>2</sub>	L-Arg <sub>9</sub>	Ac-RRRRRRRRR-	16.0±0.6
23	NPEG <sub>4</sub> - (KETLV) <sub>2</sub>	L-Arg <sub>9</sub>	Ac-RRRRRRRRR-	7.8±0.4
25	NPEG <sub>4</sub> - (KETTV) <sub>2</sub>	L-Arg <sub>9</sub>	Ac-RRRRRRRRR-	5.6±0.8
27	NPEG <sub>4</sub> - (KETVV) <sub>2</sub>	L-Arg <sub>9</sub>	Ac-RRRRRRRRR-	6.3±0.7
29	NPEG <sub>4</sub> - (KETRV) <sub>2</sub>	L-Arg <sub>9</sub>	Ac-RRRRRRRRR-	10.1±1.3
31	NPEG <sub>4</sub> - (ISTDV) <sub>2</sub>	L-Arg <sub>9</sub>	Ac-RRRRRRRRR-	62.3±2.4
33	NPEG <sub>4</sub> - (VETVV) <sub>2</sub>	L-Arg <sub>9</sub>	Ac-RRRRRRRRR-	19.9±2.8

数据表示为 $n \geq 3$ ; Ac=N末端乙酰化。

表6. 对连有不同CPP标签的NPEG<sub>4</sub>- (IETDV)<sub>2</sub>二聚体配体的结合亲和力( $K_i$ ), 表示为平均值±SEM (图3)。

化合物	配体	CPP	CPP 序列	$K_i$ [nM]
8	NPEG <sub>4</sub> -(IETDV) <sub>2</sub>	L-TAT	YGRKKRRQRRR-	7.2 ± 1.5
9	NPEG <sub>4</sub> -(IETDV) <sub>2</sub>	L-TAT	Ac-YGRKKRRQRRR-	12.5 ± 1.1
38	NPEG <sub>4</sub> -(IETDV) <sub>2</sub>	D-TAT	Ac-yGrkkrrqrrr-	11.8 ± 0.8
40	NPEG <sub>4</sub> -(IETDV) <sub>2</sub>	mTAT	Ac-rRrGrKkRr-	11.9 ± 2.7
42	NPEG <sub>4</sub> -(IETDV) <sub>2</sub>	riTAT	Ac-rrrqrrkkr-	14.4 ± 0.6
35	NPEG <sub>4</sub> -(IETDV) <sub>2</sub>	L-Arg <sub>9</sub>	Ac-RRRRRRRRR-	11.0 ± 1.3
44	NPEG <sub>4</sub> -(IETDV) <sub>2</sub>	D-Arg <sub>9</sub>	Ac-rrrrrrrrr-	8.6 ± 0.4
46	NPEG <sub>4</sub> -(IETDV) <sub>2</sub>	L-Pen	Ac-RQIKIWFQNRRMKWKK -	11.3 ± 1.9
48	NPEG <sub>4</sub> -(IETDV) <sub>2</sub>	D-Pen	Ac-rqikiwfnrrmkwkk-	7.8 ± 0.7
50	NPEG <sub>4</sub> -(IETDV) <sub>2</sub>	L-DPV3	Ac-RKKRRRESRKKRRRES-	16.6 ± 3.2
52	NPEG <sub>4</sub> -(IETDV) <sub>2</sub>	L-pVEC	Ac-LLIILRRRIRKQAHASK -	13.3 ± 2.2
54	NPEG <sub>4</sub> -(IETDV) <sub>2</sub>	L-MAP	Ac-KLALKLALKALKALK LA-	22.4 ± 0.8
56	NPEG <sub>4</sub> -(IETDV) <sub>2</sub>	L-TP2	Ac-PLIYLRLLRGQF-	12.1 ± 1.3
58	NPEG <sub>4</sub> -(IETDV) <sub>2</sub>	D-TP2	Ac-pliylrlrGqf-	11.9 ± 0.7
60	NPEG <sub>4</sub> -(IETDV) <sub>2</sub>	MiniAp4	Ac- (Dap)KAPETALD -	12.1 ± 1.3
62	NPEG <sub>4</sub> -(IETDV) <sub>2</sub>	CPP12	Ff(Nal2)RrRrQ GABA-K-	12.5 ± 1.1

数据表示为 $n \geq 3$ ; Ac = N末端乙酰化。

表7. 对连有聚Arg CPP标签的NPEG<sub>4</sub>-(KETLV)<sub>2</sub>二聚体配体的结合亲和力( $K_i$ ), 表示为平均值±SEM(图4)。

化合物	配体	CPP	CPP 序列	$K_i$ [nM]
67	NPEG <sub>4</sub> -(KETLV) <sub>2</sub>	L-Arg <sub>7</sub>	Ac-RRRRRRR-	5.8 ± 0.6
69	NPEG <sub>4</sub> -(KETLV) <sub>2</sub>	L-Arg <sub>6</sub>	Ac-RRRRRRR-	8.6 ± 0.3
71	NPEG <sub>4</sub> -(KETLV) <sub>2</sub>	L-Arg <sub>5</sub>	Ac-RRRRRRR-	10.9 ± 1.3
72	NPEG <sub>4</sub> -(KETLV) <sub>2</sub>	L-Arg <sub>4</sub>	Ac-RRRRR-	11.1 ± 0.9

数据表示为 $n \geq 3$ ; Ac = N末端乙酰化。

实施例3: 配体的体外胞浆素稳定性

[0154] 通过将100 $\mu$ M配体在补充有胞浆素 (5ug/mL) 的磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 中在37 $^{\circ}$ C下孵育0-1440分钟来测定化合物8至62的体外胞浆素稳定性。在孵育期间的所选时间点,通过用80 $\mu$ L 50%乙腈 (ACN) 处理,从80 $\mu$ L分析基质中提取配体。过滤样品并通过UPLC进行分析以确定剩余配体的量。进行LC-MS分析以确认配体完整性并鉴别裂解位点。

[0155] 本实施例描述了如何测定结合至PSD-95的PDZ1-2的配体的体外胞浆素稳定性。结果呈现于表8和表9以及图5和图6中。总而言之,含有CPP L-Arg<sub>9</sub> (SEQ ID NO 12) 的所测试化合物表现出与含有D-氨基酸或大环CPP的化合物相当的体外胞浆素半衰期时间(图6)。出人意料的是,含有L-Arg<sub>9</sub>的化合物的半衰期显著优于含有L-TAT (SEQ ID NO 8) 的化合物的半衰期(图5和图6)。

表8. 连有L-TAT或L-Arg<sub>9</sub>的NPEG<sub>4</sub>二聚体配体的体外胞浆素稳定性,半衰期时间表示为平均值 $\pm$ SEM(图5)。

化合物	配体	CPP	CPP 序列	T <sub>1/2</sub> [分钟]
8	NPEG <sub>4</sub> -(IETDV) <sub>2</sub>	L-TAT	YGRKKRRQRRR-	543 $\pm$ 60
9	NPEG <sub>4</sub> -(IETDV) <sub>2</sub>	L-TAT	Ac-YGRKKRRQRRR-	229 $\pm$ 129
11	NPEG <sub>4</sub> -(KETLV) <sub>2</sub>	L-TAT	Ac-YGRKKRRQRRR-	346 $\pm$ 105
13	NPEG <sub>4</sub> -(KETTV) <sub>2</sub>	L-TAT	Ac-YGRKKRRQRRR-	570 $\pm$ 180
15	NPEG <sub>4</sub> -(KETVV) <sub>2</sub>	L-TAT	Ac-YGRKKRRQRRR-	385 $\pm$ 130
17	NPEG <sub>4</sub> -(KETRV) <sub>2</sub>	L-TAT	Ac-YGRKKRRQRRR-	385 $\pm$ 130
19	NPEG <sub>4</sub> -(ISTDV) <sub>2</sub>	L-TAT	Ac-YGRKKRRQRRR-	534 $\pm$ 40
21	NPEG <sub>4</sub> -(VETVV) <sub>2</sub>	L-TAT	Ac-YGRKKRRQRRR-	532 $\pm$ 41
35	NPEG <sub>4</sub> -(IETDV) <sub>2</sub>	L-Arg <sub>9</sub>	Ac-RRRRRRRRR-	1492 $\pm$ 114
23	NPEG <sub>4</sub> -(KETLV) <sub>2</sub>	L-Arg <sub>9</sub>	Ac-RRRRRRRRR-	2618 $\pm$ 276
25	NPEG <sub>4</sub> -(KETTV) <sub>2</sub>	L-Arg <sub>9</sub>	Ac-RRRRRRRRR-	1152 $\pm$ 203
27	NPEG <sub>4</sub> -(KETVV) <sub>2</sub>	L-Arg <sub>9</sub>	Ac-RRRRRRRRR-	1530 $\pm$ 578
29	NPEG <sub>4</sub> -(KETRV) <sub>2</sub>	L-Arg <sub>9</sub>	Ac-RRRRRRRRR-	1003 $\pm$ 171
31	NPEG <sub>4</sub> -(ISTDV) <sub>2</sub>	L-Arg <sub>9</sub>	Ac-RRRRRRRRR-	1405 $\pm$ 124
33	NPEG <sub>4</sub> -(VETVV) <sub>2</sub>	L-Arg <sub>9</sub>	Ac-RRRRRRRRR-	479 $\pm$ 77

数据表示为n $\geq$ 3;Ac=N末端乙酰化。

表9. 连有不同CPP标签的NPEG<sub>4</sub>-(IETDV)<sub>2</sub>二聚体配体的体外胞浆素稳定性,半衰期时间表示为平均值 $\pm$ SEM(图6)。

化合物	配体	CPP	CPP 序列	T <sub>1/2</sub> [分钟]
8	NPEG <sub>4</sub> -(IETDV) <sub>2</sub>	L-TAT	YGRKKRRQRRR-	543 ± 60
9	NPEG <sub>4</sub> -(IETDV) <sub>2</sub>	L-TAT	Ac-YGRKKRRQRRR-	229 ± 129
38	NPEG <sub>4</sub> -(IETDV) <sub>2</sub>	D-TAT	Ac-ygrkkrrqrrr-	1440 ± 0
40	NPEG <sub>4</sub> -(IETDV) <sub>2</sub>	mTAT	Ac-rRrGrKkRr-	1440 ± 0
42	NPEG <sub>4</sub> -(IETDV) <sub>2</sub>	riTAT	Ac-rrrqrrkkr-	1440 ± 0
35	NPEG <sub>4</sub> -(IETDV) <sub>2</sub>	L-Arg <sub>9</sub>	Ac-RRRRRRRRR-	1492 ± 114
44	NPEG <sub>4</sub> -(IETDV) <sub>2</sub>	D-Arg <sub>9</sub>	Ac-rrrrrrrrr-	1440 ± 0
46	NPEG <sub>4</sub> -(IETDV) <sub>2</sub>	L-Pen	Ac-RQIKIWFQNRRMKW KK-	94 ± 8
48	NPEG <sub>4</sub> -(IETDV) <sub>2</sub>	D-Pen	Ac-rqikiwfnrrmkwkk-	1440 ± 0
50	NPEG <sub>4</sub> -(IETDV) <sub>2</sub>	L-DPV3	Ac-RKKRRRESRKKRRRE S-	169 ± 20
52	NPEG <sub>4</sub> -(IETDV) <sub>2</sub>	L-pVEC	Ac-LLIILRRRIRKQAHAAH SK-	49 ± 9
54	NPEG <sub>4</sub> -(IETDV) <sub>2</sub>	L-MAP	Ac-KLALKLALKALKAA LKLA-	13 ± 4
56	NPEG <sub>4</sub> -(IETDV) <sub>2</sub>	L-TP2	Ac-PLIYLRLLRGQF-	910 ± 0
58	NPEG <sub>4</sub> -(IETDV) <sub>2</sub>	D-TP2	Ac-pliylrlrGqf-	1440 ± 0
60	NPEG <sub>4</sub> -(IETDV) <sub>2</sub>	MiniAp4	Ac- (Dap)KAPETALD -	1440 ± 0
62	NPEG <sub>4</sub> -(IETDV) <sub>2</sub>	CPP12	Ff(Nal2)RrRrQ GABA-K-	1440 ± 0

数据表示为 $n \geq 3$ ; Ac = N末端乙酰化。

#### 实施例4: 配体的膜渗透性和细胞摄取的测定

[0156] 在稳定表达仅位于胞质中的HaloGFP的HeLa细胞中测定化合物10至75的膜渗透性。在实验前一天将细胞以40,000个细胞/孔的密度接种。在将生长培养基抽出并更换为100 $\mu$ L Opti-MEM后,将配体于Opti-MEM中的25 $\mu$ L所制备连续稀释物添加至细胞(恒定DMSO浓度)中,并将板在37 $^{\circ}$ C和5% CO<sub>2</sub>下孵育4h。抽出孔的内容物,并用新鲜Opti-MEM将细胞洗涤15min。抽出洗涤液后,将细胞与TAMRA-CA (5 $\mu$ M)一起孵育15min。抽出追踪溶液后,用Opti-MEM将细胞洗涤30min。移除洗涤液后,将细胞胰蛋白酶化,重悬浮于PBS (2% FBS)中,并使用台式流式细胞仪进行分析。使用无配体和无TAMRA-CA对照孔,对所获得的荧光强度数据进行标准化并绘图剂量为反应曲线。所报告CP<sub>50</sub>值表示半最大红色荧光,其表现与配体的细胞穿透相反。

[0157] 本实施例描述了如何测定结合至PSD-95的PDZ1-2的用CA标记的化合物的膜渗透

性和细胞摄取。结果呈现于表10至表12以及图7至图9中。总而言之,所测试化合物显示显著不同的细胞摄取效率,其在很大程度上取决于所采用的CPP。令人惊奇的是, CPP标签L-Arg<sub>9</sub> (SEQ ID NO 12) 和L-pVEC (SEQ ID NO:18) 产生最低的CP<sub>50</sub>值(图8)。取决于二聚体配体, L-Arg<sub>9</sub>进一步促进高度有效的细胞摄取且CP<sub>50</sub>值低于1 $\mu$ M(图7),表明优异的BBB穿透和细胞内递送。另外, L-Arg<sub>9</sub> CPP标签可截短至7个、6个、5个或4个精氨酸(参见表12)而不丢失其细胞穿透性质(图9)。

表10. 连有L-TAT和L-Arg<sub>9</sub>的NPEG<sub>4</sub>二聚体配体的膜渗透性和细胞摄取, CP<sub>50</sub>表示为平均值 $\pm$ SEM(图7)。

化合物	配体	CPP	CPP 序列	CP <sub>50</sub> [ $\mu$ M]
10	NPEG <sub>4</sub> -(IETDV) <sub>2</sub>	L-TAT	CA-YGRKKRRQRRR-	55.1 $\pm$ 3.0
12	NPEG <sub>4</sub> -(KETLV) <sub>2</sub>	L-TAT	CA-YGRKKRRQRRR-	72.5 $\pm$ 4.4
14	NPEG <sub>4</sub> -(KETTV) <sub>2</sub>	L-TAT	CA-YGRKKRRQRRR-	78.4 $\pm$ 3.9
16	NPEG <sub>4</sub> -(KETVV) <sub>2</sub>	L-TAT	CA-YGRKKRRQRRR-	81.8 $\pm$ 1.2
18	NPEG <sub>4</sub> -(KETRV) <sub>2</sub>	L-TAT	CA-YGRKKRRQRRR-	47.7 $\pm$ 1.0
20	NPEG <sub>4</sub> -(ISTDV) <sub>2</sub>	L-TAT	CA-YGRKKRRQRRR-	41.9 $\pm$ 1.6
22	NPEG <sub>4</sub> -(VETVV) <sub>2</sub>	L-TAT	CA-YGRKKRRQRRR-	86.1 $\pm$ 4.5
36	NPEG <sub>4</sub> -(IETDV) <sub>2</sub>	L-Arg <sub>9</sub>	CA-RRRRRRRRR-	3.25 $\pm$ 0.19
24	NPEG <sub>4</sub> -(KETLV) <sub>2</sub>	L-Arg <sub>9</sub>	CA-RRRRRRRRR-	0.78 $\pm$ 0.05
26	NPEG <sub>4</sub> -(KETTV) <sub>2</sub>	L-Arg <sub>9</sub>	CA-RRRRRRRRR-	0.74 $\pm$ 0.09
28	NPEG <sub>4</sub> -(KETVV) <sub>2</sub>	L-Arg <sub>9</sub>	CA-RRRRRRRRR-	0.79 $\pm$ 0.06
30	NPEG <sub>4</sub> -(KETRV) <sub>2</sub>	L-Arg <sub>9</sub>	CA-RRRRRRRRR-	0.68 $\pm$ 0.05
32	NPEG <sub>4</sub> -(ISTDV) <sub>2</sub>	L-Arg <sub>9</sub>	CA-RRRRRRRRR-	1.05 $\pm$ 0.15
34	NPEG <sub>4</sub> -(VETVV) <sub>2</sub>	L-Arg <sub>9</sub>	CA-RRRRRRRRR-	0.84 $\pm$ 0.15

数据表示为n $\geq$ 3; Ac=N末端乙酰化。

表11. 连有不同CPP标签的NPEG<sub>4</sub>-(IETDV)<sub>2</sub>二聚体配体的膜渗透性和细胞摄取, CP<sub>50</sub>表示为平均值 $\pm$ SEM(图8)。

化合物	配体	CPP	CPP 序列	CP <sub>50</sub> [μM]
10	NPEG <sub>4</sub> -(IETDV) <sub>2</sub>	L-TAT	CA-YGRKKRRQRRR-	55.1 ± 3.0
39	NPEG <sub>4</sub> -(IETDV) <sub>2</sub>	D-TAT	CA-yGrkrrqrrr-	10.7 ± 0.7
41	NPEG <sub>4</sub> -(IETDV) <sub>2</sub>	mTAT	CA-rRrGrKkRr-	180 ± 8.2
43	NPEG <sub>4</sub> -(IETDV) <sub>2</sub>	riTAT	CA-rrrqrrkkr-	221 ± 36
36	NPEG <sub>4</sub> -(IETDV) <sub>2</sub>	L-Arg <sub>9</sub>	CA-RRRRRRRRR-	3.3 ± 0.2
45	NPEG <sub>4</sub> -(IETDV) <sub>2</sub>	D-Arg <sub>9</sub>	CA-rrrrrrrrr-	161 ± 25
47	NPEG <sub>4</sub> -(IETDV) <sub>2</sub>	L-Pen	CA-RQIKIWFQNRRMKWKK-	5.0 ± 0.4
49	NPEG <sub>4</sub> -(IETDV) <sub>2</sub>	D-Pen	CA-rqikiwfnrrmkwkk-	18.8 ± 1.5
51	NPEG <sub>4</sub> -(IETDV) <sub>2</sub>	L-DPV3	CA-RKKRRRESRKKRRRES-	3.2 ± 0.5
53	NPEG <sub>4</sub> -(IETDV) <sub>2</sub>	L-pVEC	CA-LLIILRRRIRKQAHAAHSK-	1.7 ± 0.1
55	NPEG <sub>4</sub> -(IETDV) <sub>2</sub>	L-MAP	CA-KLALKLALKALKAALKL A-	3.7 ± 0.3
57	NPEG <sub>4</sub> -(IETDV) <sub>2</sub>	L-TP2	CA-PLIYLRLLRGQF-	17.9 ± 0.3
59	NPEG <sub>4</sub> -(IETDV) <sub>2</sub>	D-TP2	CA-plylrlrlrGqf-	67.2 ± 5.3
61	NPEG <sub>4</sub> -(IETDV) <sub>2</sub>	MiniAp4	CA- (Dap)KAPETALD -	13.2 ± 0.4
63	NPEG <sub>4</sub> -(IETDV) <sub>2</sub>	CPP12	Ff(Nal2)RrRrQ GABA-K(CA)-	11.2 ± 0.7

数据表示为n≥3;Ac=N末端乙酰化。

表12. 连有聚Arg CPP标签的NPEG<sub>4</sub>-(IETDV)<sub>2</sub>和NPEG<sub>4</sub>-(KETLV)<sub>2</sub>二聚体配体的膜渗透性和细胞摄取, CP<sub>50</sub>表示为平均值±SEM(图9)。

化合物	配体	CPP	CPP 序列	CP <sub>50</sub> [μM]
64	NPEG <sub>4</sub> -(IETDV) <sub>2</sub>	L-Arg <sub>7</sub>	CA-RRRRRRR-	1.66 ± 0.43
65	NPEG <sub>4</sub> -(IETDV) <sub>2</sub>	L-Arg <sub>5</sub>	CA-RRRRR-	1.17 ± 0.37
66	NPEG <sub>4</sub> -(IETDV) <sub>2</sub>	L-Arg <sub>3</sub>	CA-RRR-	3.71 ± 0.30
68	NPEG <sub>4</sub> -(KETLV) <sub>2</sub>	L-Arg <sub>7</sub>	CA-RRRRRRR-	0.58 ± 0.09
70	NPEG <sub>4</sub> -(KETLV) <sub>2</sub>	L-Arg <sub>6</sub>	CA-RRRRRRR-	0.51 ± 0.08
72	NPEG <sub>4</sub> -(KETLV) <sub>2</sub>	L-Arg <sub>5</sub>	CA-RRRRR-	0.66 ± 0.14
74	NPEG <sub>4</sub> -(KETLV) <sub>2</sub>	L-Arg <sub>4</sub>	CA-RRRR-	0.37 ± 0.08
75	NPEG <sub>4</sub> -(KETLV) <sub>2</sub>	L-Arg <sub>3</sub>	CA-RRR-	7.36 ± 0.31

数据表示为n≥3;Ac=N末端乙酰化。

实施例5: 体外血浆稳定性的测定

[0158] 通过将100μM配体在未稀释的汇集人类血浆中在37℃下孵育1440分钟, 来测定化

合物8、23、35、67、69、71和73的体外血浆稳定性。在孵育期间的所选时间点,通过将分析基质添加至6M尿素中、然后使用丙酮中的20% TCA进行沉淀,从分析基质中提取配体。在过夜孵育后,将样品过滤并通过UPLC进行分析以确定剩余配体的量。进行LC-MS分析以确认配体完整性并鉴别裂解位点。

[0159] 本实施例描述了如何测定结合至PSD-95的PDZ1-2的配体的体外血浆稳定性。结果呈现于表13和图10中。总而言之,L-Arg<sub>9</sub> CPP标签可截短至7个、6个、5个或4个精氨酸(参见表13)而不显著降低对人类血浆的稳定性。

表13. 连有聚Arg CPP标签的NPEG<sub>4</sub>-(KETLV)<sub>2</sub>二聚体配体的体外血浆稳定性,半衰期时间表示为平均值±SEM(图10)。

化合物	配体	CPP	CPP 序列	T <sub>1/2</sub> [分钟]
8	NPEG <sub>4</sub> -(IETDV) <sub>2</sub>	L-TAT	YGRKKRRQRRR-	1440 ± 0
35	NPEG <sub>4</sub> -(IETDV) <sub>2</sub>	L-Arg <sub>9</sub>	Ac-RRRRRRRRR-	1440 ± 0
23	NPEG <sub>4</sub> -(KETLV) <sub>2</sub>	L-Arg <sub>9</sub>	Ac-RRRRRRRRR-	1440 ± 0
67	NPEG <sub>4</sub> -(KETLV) <sub>2</sub>	L-Arg <sub>7</sub>	Ac-RRRRRRR-	1440 ± 0
69	NPEG <sub>4</sub> -(KETLV) <sub>2</sub>	L-Arg <sub>6</sub>	Ac-RRRRRR-	1440 ± 0
71	NPEG <sub>4</sub> -(KETLV) <sub>2</sub>	L-Arg <sub>5</sub>	Ac-RRRRR-	1266 ± 138
73	NPEG <sub>4</sub> -(KETLV) <sub>2</sub>	L-Arg <sub>4</sub>	Ac-RRRR-	912 ± 216

数据表示为n≥3;Ac=N末端乙酰化。

实施例6: i.v. 注射后体内脑水平的测定

[0160] 使用等渗盐水作为媒介物,向雌性Balb/c小鼠(4组,每组3只动物)施用18nmol/g体重的目标化合物。组1用于获得i.v.注射后在所选时间点(注射后最多4h)的血液浓度概况。组2至4用于测定三个不同时间点的血液和脑浓度。因此,在i.v.注射后的所选时间点终止动物,收集相关组织且使用适当方法(LC-MS/MS)进行分析。

[0161] 本实施例描述了如何测定结合至PSD-95的PDZ1-2的配体的体内脑水平。另外,测定了血液对脑比率和相关组织靶向效率,从而告知了化合物穿过血脑屏障并到达脑中靶标的能力。

实施例7:使用pMCAO小鼠模型测定对卒中诱发的损伤的体内神经保护效应。

[0162] 关于实验和手术细节参见Bach等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,2012,109,3317。简言之,在随机化、双盲、安慰剂对照研究中,在C57BL/6J小鼠中使用永久性大脑中动脉闭塞(pMCAO)模型来测量缺血性梗塞的程度。麻醉和动脉闭塞后,在手术后30min向动物给药。使手术后6h存活的动物终止,并小心地取出脑。将脑固定并切片后,进行梗塞体积分析,并计算总梗塞体积。

[0163] 本实施例描述了如何测定结合至PSD-95的PDZ1-2的配体的体内神经保护效应。读出参数是化合物治疗组相对于安慰剂对照组的梗塞体积。

序列

SEQ ID NO	序列	注释
1	IETDV	
2	KETLV	
3	KETTV	
4	KETVV	
5	KETRV	
6	ISTDV	
7	VETVV	
8	YGRKKRRQRRR	L-TAT
9	yGrkkrrqrrr	D-TAT
10	rRrGrKkRr	mTAT
11	rrrqrrkkr	riTAT
12	RRRRRRRRR	L-Arg <sub>9</sub>
13	rrrrrrrrr	D-Arg <sub>9</sub>
14	RQIKIWFQNRRMKWKK	L-Pen
15	rqikiwfnrrmkwkk	D-Pen
16	KLALKLALKALKAALKLA	L-MAP
17	RKKRRRESRKKRRRES	L-DPV3
18	LLIILRRRIRKQAHASK	L-pVEC
19	PLIYLRLLRGQF	L-TP2
20	pliyrlrlrGqf	D-TP2
21	((Dap)KAPETALD	MiniAp4 经由 D 和 Dap 的侧链至侧链大内酰胺化 Dap 是 L-2,3-二氨基丙酸
22	Ff(Nal2)RrRrQ GABA-K	CPP12 经由 Q 和 F 的头至尾大内酰胺化 Nal2 是 L-2-萘基丙氨酸

23	Ac-YGRKKRRQRRR-	L-TAT N 末端乙酰化
24	CA-YGRKKRRQRRR-	L-TAT N 末端结合氯烷烃 (CA)
25	Ac-RRRRRRRRR-	L-Arg <sub>9</sub> N 末端乙酰化
26	CA-RRRRRRRRR-	L-Arg <sub>9</sub> N 末端结合氯烷烃 (CA)
27	Ac-ygrkkrqrrr-	D-TAT N 末端乙酰化
28	CA-ygrkkrqrrr-	D-TAT N 末端结合氯烷烃 (CA)
29	Ac-rRrGrKkRr-	mTAT N 末端乙酰化
30	CA-rRrGrKkRr-	mTAT N 末端结合氯烷烃 (CA)
31	Ac-rrrqrrkkr-	riTAT N 末端乙酰化
32	CA-rrrqrrkkr-	riTAT N 末端结合氯烷烃 (CA)
33	Ac-rrrrrrrrr-	D-Arg <sub>9</sub> N 末端乙酰化
34	CA-rrrrrrrrr-	D-Arg <sub>9</sub> N 末端结合氯烷烃 (CA)
35	Ac-RQIKIWFQNRRMKWKK-	L-Pen N 末端乙酰化
36	CA-RQIKIWFQNRRMKWKK-	L-Pen N 末端结合氯烷烃 (CA)
37	Ac-rqikiwfnrrmkwkk-	D-Pen N 末端乙酰化
38	CA-rqikiwfnrrmkwkk-	D-Pen

		N 末端结合氯烷烃 (CA)
39	Ac-RKKRRRESRKKRRRES-	L-DPV3 N 末端乙酰化
40	CA-RKKRRRESRKKRRRES-	L-DPV3 N 末端结合氯烷烃 (CA)
41	Ac-LLIILRRRIRKQAHAAHSK-	L-pVEC N 末端乙酰化
42	CA-LLIILRRRIRKQAHAAHSK-	L-pVEC N 末端结合氯烷烃 (CA)
43	Ac-KLALKLALKALKAALKLA-	L-MAP N 末端乙酰化
44	CA-KLALKLALKALKAALKLA-	L-MAP N 末端结合氯烷烃 (CA)
45	Ac-PLIYLRLLRGQF-	L-TP2 N 末端乙酰化
46	CA-PLIYLRLLRGQF-	L-TP2 N 末端结合氯烷烃 (CA)
47	Ac-pliylrllrGqf- N 末端乙酰化	D-TP2 N 末端乙酰化
48	CA-pliylrllrGqf-	D-TP2 N 末端结合氯烷烃 (CA)
49	Ac- (Dap)KAPETALD  N 末端乙酰化	MiniAp4 N 末端乙酰化
50	CA- (Dap)KAPETALD	MiniAp4 N 末端结合氯烷烃
51	Ff(Nal2)RrRrQ GABA-K-	CPP12 K 的侧链无修饰
52	Ff(Nal2)RrRrQ GABA-K(CA)-	CPP12 氯烷烃(CA)结合至 K 的侧链中的胺
53	X <sub>2</sub> TX <sub>3</sub> V	X <sub>2</sub> 是E或S X <sub>3</sub> 是L、T、V、R或D

54	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> TX <sub>3</sub> V	X <sub>1</sub> 是K、V或I X <sub>2</sub> 是E或S X <sub>3</sub> 是L、T、V、R或D
55	X <sub>5</sub> TX <sub>6</sub> V	X <sub>5</sub> 是E或S X <sub>6</sub> 是L、T、V、R或D
56	X <sub>4</sub> X <sub>5</sub> TX <sub>6</sub> V	X <sub>4</sub> 是K、V或I X <sub>5</sub> 是E或S X <sub>6</sub> 是L、T、V、R或D
57	RRRRRRRR	L-Arg <sub>8</sub>
58	RRRRRRR	L-Arg <sub>7</sub>
59	RRRRRR	L-Arg <sub>6</sub>
60	RRRRR	L-Arg <sub>5</sub>
61	RRRR	L-Arg <sub>4</sub>
62	Ac-RRRRRRRR-	L-Arg <sub>8</sub> N末端乙酰化
63	Ac-RRRRRRR-	L-Arg <sub>7</sub> N末端乙酰化
64	Ac-RRRRRR-	L-Arg <sub>6</sub> N末端乙酰化
65	Ac-RRRRR-	L-Arg <sub>5</sub> N末端乙酰化
66	Ac-RRRR-	L-Arg <sub>4</sub> N末端乙酰化
67	CA-RRRRRRRR-	L-Arg <sub>8</sub> N末端结合氯烷烃 (CA)
68	CA-RRRRRRR-	L-Arg <sub>7</sub> N末端结合氯烷烃 (CA)
69	CA-RRRRRR-	L-Arg <sub>6</sub> N末端结合氯烷烃 (CA)
70	CA-RRRRR-	L-Arg <sub>5</sub> N末端结合氯烷烃 (CA)

71	CA-RRRR-	L-Arg4 N末端结合氯烷烃 (CA)
----	----------	-------------------------

## 参考文献

Aarts, M., Liu, Y., Liu, L., Besshoh, S., Arundine, M., Gurd, J.W., Wang, Y.T., Salter, M.W., Tymianski, M., 2002. Treatment of ischemic brain damage by perturbing NMDA receptor-PSD-95 protein interactions. *Science* 298, 846-850.

J.T. Andreasen, A. Bach, M. Gynther, A. Nasser, J. Mogensen, K. Strømgaard, D.S. Pickering, UCCB01-125, a dimeric inhibitor of PSD-95, reduces inflammatory pain without disrupting cognitive or motor performance: comparison with the NMDA receptor antagonist MK-801, *Neuropharmacology*, 67, 193-200 (2013).

Bach, A., Chi, C.N., Pang, G.F., Olsen, L., Kristensen, A.S., Jemth, P., Strømgaard, K., Design and synthesis of highly potent and plasma-stable dimeric inhibitors of the PSD-95-NMDA receptor interaction. *Angew. Chem. Int. Ed.* 48, 9685-9689 (2009).

Bach, A., Clausen, B.H., Møller, M., Vestergaard, B., Chi, C.N., Round, A., Sørensen, P.L., Nissen, K.B., Kastrop, J.S., Gajhede, M., Jemth, P., Kristensen, A.S., Lundström, P., Lambertsen, K.L., Strømgaard, K., A high-affinity, dimeric inhibitor of PSD-95 bivalently interacts with PDZ1-2 and protects against ischemic brain damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 3317-3322 (2012).

Dawson, V.L., Dawson, T.M., London, E.D., Brecht, D.S., Snyder, S.H., 1991. Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 6368-6371.

Deprey, K.; Kritzer, J.A., 2020. Quantitative measurement of cytosolic penetration using the chloroalkane penetration assay. *Method. Enzymol.* 641, 277-309.

Hill et al. 2020. Efficacy and safety of nerinetide for the treatment of acute ischaemic stroke (ESCAPE-NA1): A multicentre, double-blind, randomised controlled trial. *Lancet* 395, 878-887.

Huang, Z., Huang, P.L., Panahian, N., Dalkara, T., Fishman, M.C., Moskowitz, M.A., 1994. Effects of cerebral ischemia in mice deficient in neuronal nitric oxide synthase. *Science* 265, 1883-1885.

Kornau, H.C., Schenker, L.T., Kennedy, M.B., Seeburg, P.H., 1995. Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95. *Science* 269, 1737-1740.

Kucharz, K., Rasmussen, I.S., Bach, A., Strømgaard, K., Lauritzen, M., PSD-95 uncoupling from NMDA receptors by Tat-N-dimer ameliorates neuronal depolarization in cortical spreading depression. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 37,

1820-1828(2017) .

Mayor-Nunez,D.,Ji,Z.,Sun,X.,Teves,L.,Garman,J.D.,Tymianski,M.,  
2021.Plasmin-resistant PSD-95 inhibitors resolve effect-modifying drug-drug  
interactions between alteplase and nerinetide in acute stroke,  
Sci.Transl.Med.13,eabb1498.

Peraro,L.;Deprey,K.L.;Moser,M.K.;Zou,Z.;Ball,H.L.;Levine,B.;Kritzer,  
J.A.,2018.Cell Penetration Profiling Using the Chloroalkane Penetration  
Assay.J.Am.Chem.Soc.140,11360-11369.

Sattler,R.,Xiong,Z.,Lu,W.Y.,Hafner,M.,MacDonald,J.F.,Tymianski,M.,  
1999.Specific coupling of NMDA receptor activation to nitric oxide  
neurotoxicity by PSD-95 protein.Science 284,1845-1848.

## 序列表

<110> 哥本哈根大学 (University of Copenhagen)  
<120> PSD-95抑制剂及其用途  
<130> P5985PC00  
<160> 71  
<170> PatentIn version 3.5  
<210> 1  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 合成肽  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1) .. (5)  
<400> 1  
Ile Glu Thr Asp Val  
1                    5  
<210> 2  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 合成肽  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1) .. (5)  
<400> 2  
Lys Glu Thr Leu Val  
1                    5  
<210> 3  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 合成肽  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE

<222> (1) .. (5)  
<400> 3  
Lys Glu Thr Thr Val  
1 5  
<210> 4  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 合成肽  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1) .. (5)  
<400> 4  
Lys Glu Thr Val Val  
1 5  
<210> 5  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 合成肽  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1) .. (5)  
<400> 5  
Lys Glu Thr Arg Val  
1 5  
<210> 6  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 合成肽  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1) .. (5)  
<400> 6  
Ile Ser Thr Asp Val



<223> D氨基酸  
 <400> 9  
 Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg  
 1                   5                   10  
 <210> 10  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成肽  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1) .. (9)  
 <223> mTAT  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1) .. (1)  
 <223> D氨基酸  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (3) .. (3)  
 <223> D氨基酸  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (5) .. (5)  
 <223> D氨基酸  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (7) .. (7)  
 <223> D氨基酸  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (9) .. (9)  
 <223> D氨基酸  
 <400> 10  
 Arg Arg Arg Gly Arg Lys Lys Arg Arg  
 1                   5  
 <210> 11  
 <211> 9





<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (1) .. (19)

<223> L-MAP

<400> 16

Lys Leu Ala Leu Lys Leu Ala Leu Lys Ala Leu Lys Ala Ala Leu Lys

1

5

10

15

Leu Ala

<210> 17

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (1) .. (16)

<223> L-DPV3

<400> 17

Arg Lys Lys Arg Arg Arg Glu Ser Arg Lys Lys Arg Arg Arg Glu Ser

1

5

10

15

<210> 18

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (1) .. (18)

<223> L-pVEC

<400> 18

Leu Leu Ile Ile Leu Arg Arg Arg Ile Arg Lys Gln Ala His Ala His

1

5

10

15

Ser Lys

<210> 19





<222> (7) .. (7)  
 <223> D氨基酸  
 <400> 22  
 Phe Phe Xaa Arg Arg Arg Arg Gln Gly Ala Asx Ala Lys  
 1 5 10  
 <210> 23  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成肽  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1) .. (11)  
 <223> L-TAT  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1) .. (1)  
 <223> 乙酰化  
 <400> 23  
 Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg  
 1 5 10  
 <210> 24  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成肽  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1) .. (11)  
 <223> L-TAT  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1) .. (1)  
 <223> N末端结合至氯烷烃 (CA)  
 <400> 24  
 Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg  
 1 5 10

<210> 25  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成肽  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1) .. (9)  
 <223> L-Arg9  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1) .. (1)  
 <223> N末端乙酰化  
 <400> 25  
 Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg  
 1 5  
 <210> 26  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成肽  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1) .. (9)  
 <223> L-Arg9  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1) .. (1)  
 <223> N末端结合至氯烷烃 (CA)  
 <400> 26  
 Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg  
 1 5  
 <210> 27  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>



- <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成肽  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1) .. (9)  
 <223> mTAT  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1) .. (1)  
 <223> N末端乙酰化  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1) .. (1)  
 <223> D氨基酸  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (3) .. (3)  
 <223> D氨基酸  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (5) .. (5)  
 <223> D氨基酸  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (7) .. (7)  
 <223> D氨基酸  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (9) .. (9)  
 <223> D氨基酸  
 <400> 29  
 Arg Arg Arg Gly Arg Lys Lys Arg Arg  
 1                    5  
 <210> 30  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列



<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1) .. (9)  
 <223> riTAT  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1) .. (1)  
 <223> N末端乙酰化  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1) .. (9)  
 <223> D氨基酸  
 <400> 31  
 Arg Arg Arg Gln Arg Arg Lys Lys Arg  
 1                    5  
 <210> 32  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成肽  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1) .. (9)  
 <223> riTAT  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1) .. (9)  
 <223> D氨基酸  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1) .. (1)  
 <223> N末端结合至氯烷烃 (CA)  
 <400> 32  
 Arg Arg Arg Gln Arg Arg Lys Lys Arg  
 1                    5  
 <210> 33  
 <211> 9  
 <212> PRT

<213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成肽  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1) .. (9)  
 <223> D-Arg9  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1) .. (9)  
 <223> D氨基酸  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1) .. (1)  
 <223> N末端乙酰化  
 <400> 33  
 Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg  
 1 5  
 <210> 34  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成肽  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1) .. (9)  
 <223> D-Arg9  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1) .. (9)  
 <223> D氨基酸  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1) .. (1)  
 <223> N末端结合至氯烷烃 (CA)  
 <400> 34  
 Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg  
 1 5

<210> 35  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成肽  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1) .. (16)  
 <223> L-Pen  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1) .. (1)  
 <223> N末端乙酰化  
 <400> 35  
 Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys  
 1                    5                                    10                                    15  
 <210> 36  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成肽  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1) .. (16)  
 <223> L-Pen  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1) .. (1)  
 <223> N末端结合至氯烷烃 (CA)  
 <400> 36  
 Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys  
 1                    5                                    10                                    15  
 <210> 37  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>





<221> MISC\_FEATURE

<222> (1) .. (18)

<223> L-pVEC

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (1) .. (1)

<223> N末端乙酰化

<400> 41

Leu Leu Ile Ile Leu Arg Arg Arg Ile Arg Lys Gln Ala His Ala His

1

5

10

15

Ser Lys

<210> 42

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (1) .. (18)

<223> L-pVEC

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (1) .. (1)

<223> N末端结合至氯烷烃 (CA)

<400> 42

Leu Leu Ile Ile Leu Arg Arg Arg Ile Arg Lys Gln Ala His Ala His

1

5

10

15

Ser Lys

<210> 43

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (1) .. (18)

<223> L-MAP













<223> X是K, V或I  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (2) .. (2)  
<223> X是E或S  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (4) .. (4)  
<223> X是L, T, V, R或D  
<400> 54  
Xaa Xaa Thr Xaa Val  
1 5  
<210> 55  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 合成肽  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1) .. (4)  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1) .. (1)  
<223> X是E或S  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (3) .. (3)  
<223> X是L, T, V, R或D  
<400> 55  
Xaa Thr Xaa Val  
1  
<210> 56  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 合成肽  
<220>

<221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1) .. (5)  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1) .. (1)  
 <223> X是K, V或I  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2) .. (2)  
 <223> X是E或S  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (4) .. (4)  
 <223> X是L, T, V, R或D  
 <400> 56  
 Xaa Xaa Thr Xaa Val  
 1 5  
 <210> 57  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成肽  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1) .. (8)  
 <223> L-Arg8  
 <400> 57  
 Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg  
 1 5  
 <210> 58  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成肽  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1) .. (7)

<223> L-Arg7  
 <400> 58  
 Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg  
 1 5  
 <210> 59  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成肽  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1) .. (6)  
 <223> L-Arg6  
 <400> 59  
 Arg Arg Arg Arg Arg Arg  
 1 5  
 <210> 60  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成肽  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1) .. (5)  
 <223> L-Arg5  
 <400> 60  
 Arg Arg Arg Arg Arg  
 1 5  
 <210> 61  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成肽  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1) .. (4)

<223> L-Arg4  
 <400> 61  
 Arg Arg Arg Arg  
 1  
 <210> 62  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成肽  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1) .. (8)  
 <223> L-Arg8  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1) .. (1)  
 <223> N末端乙酰化  
 <400> 62  
 Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg  
 1 5  
 <210> 63  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 合成肽  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1) .. (7)  
 <223> L-Arg7  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1) .. (1)  
 <223> N末端乙酰化  
 <400> 63  
 Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg  
 1 5  
 <210> 64



<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1) .. (4)  
<223> L-Arg4  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1) .. (1)  
<223> N末端乙酰化  
<400> 66  
Arg Arg Arg Arg  
1  
<210> 67  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 合成肽  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1) .. (8)  
<223> L-Arg8  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1) .. (1)  
<223> N末端结合至氯烷烃 (CA)  
<400> 67  
Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg  
1 5  
<210> 68  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 合成肽  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1) .. (7)  
<223> L-Arg7  
<220>

<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1) .. (1)  
<223> N末端结合至氯烷烃 (CA)  
<400> 68  
Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg  
1 5  
<210> 69  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 合成肽  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1) .. (6)  
<223> L-Arg6  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1) .. (1)  
<223> N末端结合至氯烷烃 (CA)  
<400> 69  
Arg Arg Arg Arg Arg Arg  
1 5  
<210> 70  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 合成肽  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1) .. (5)  
<223> L-Arg5  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1) .. (1)  
<223> N末端结合至氯烷烃 (CA)  
<400> 70  
Arg Arg Arg Arg Arg



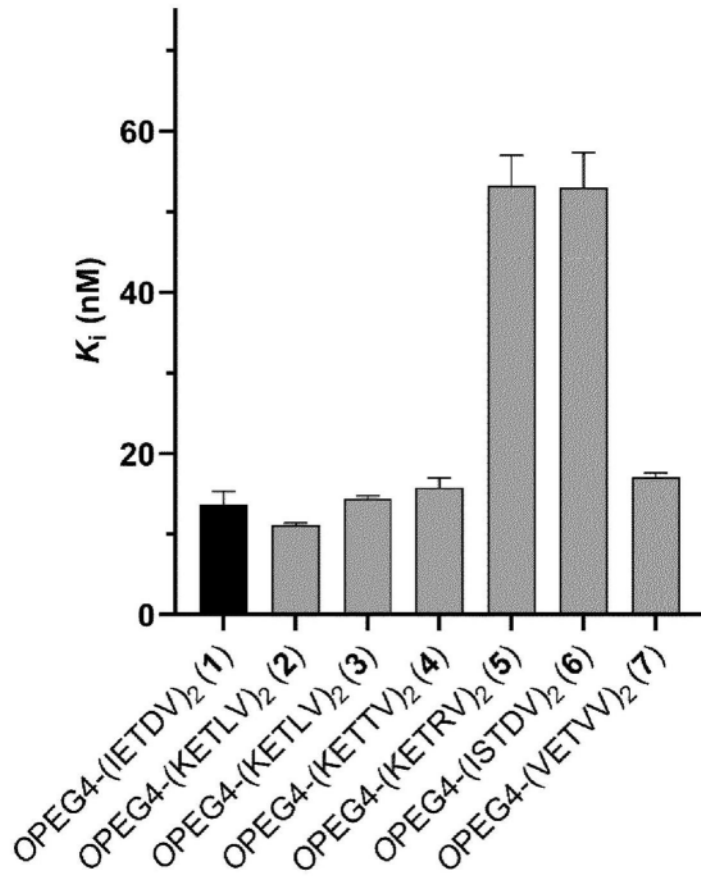


图1

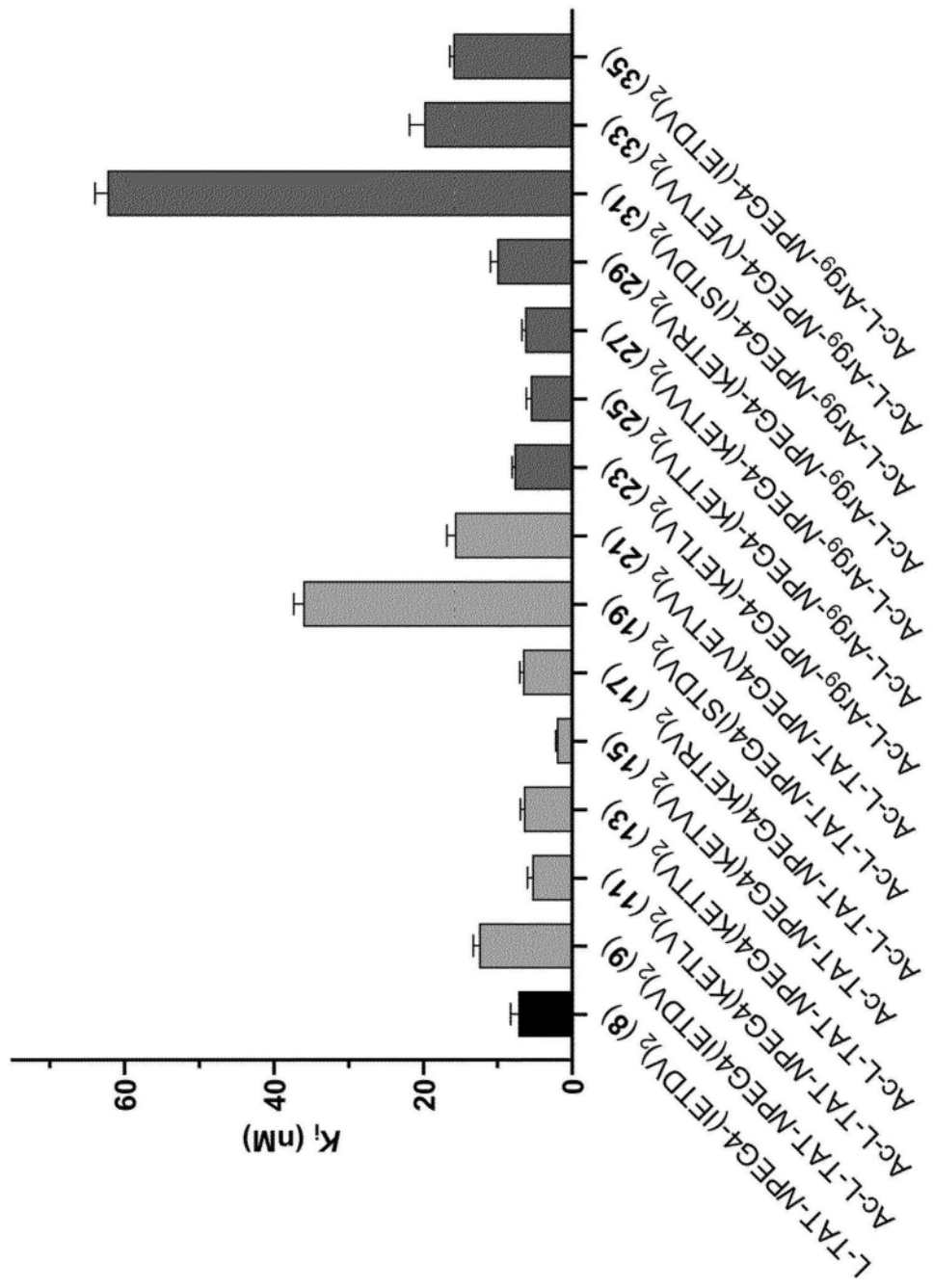


图2

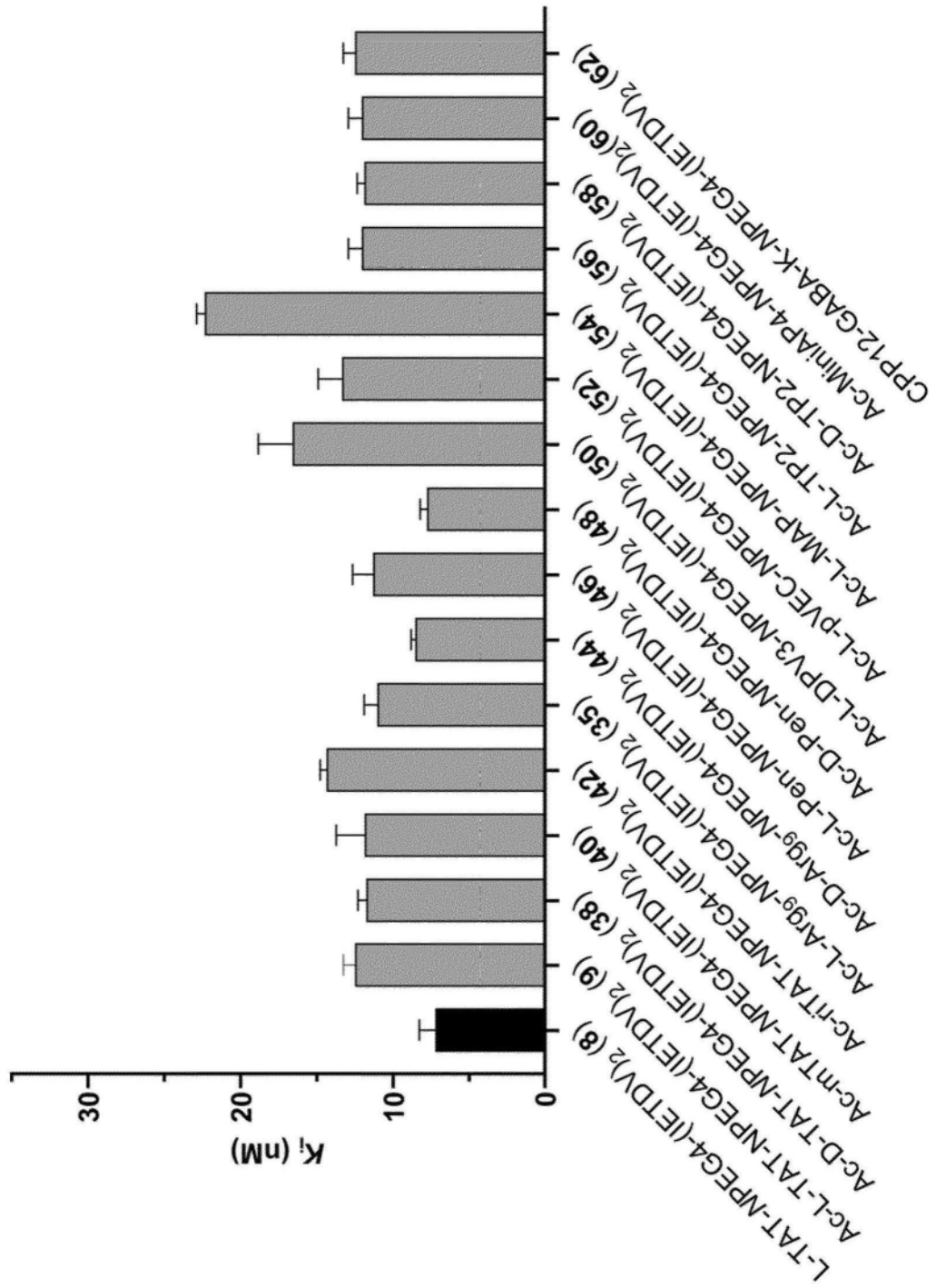


图3

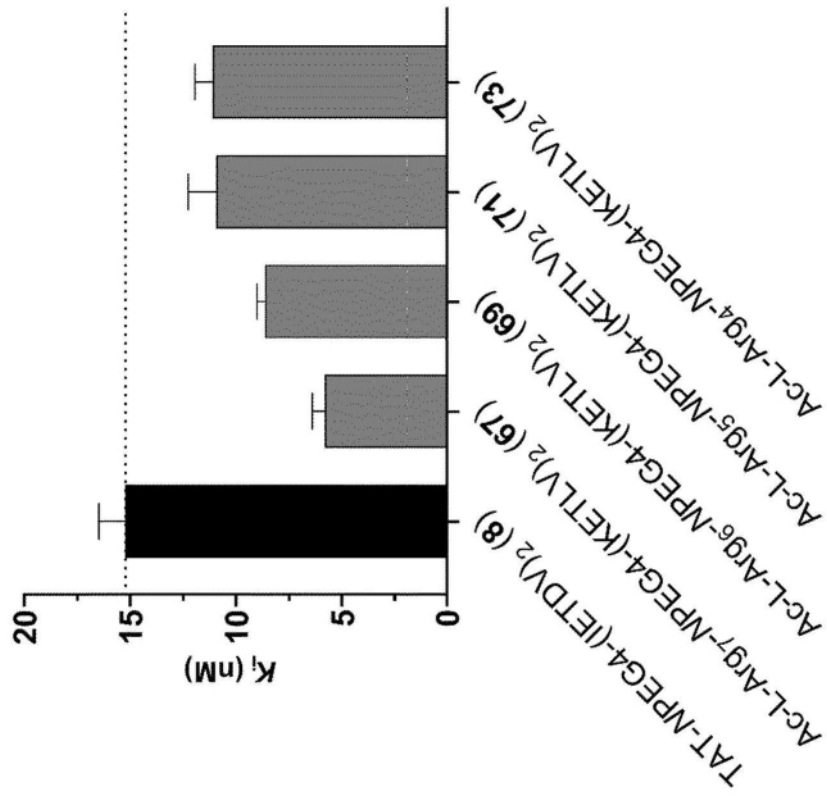


图4

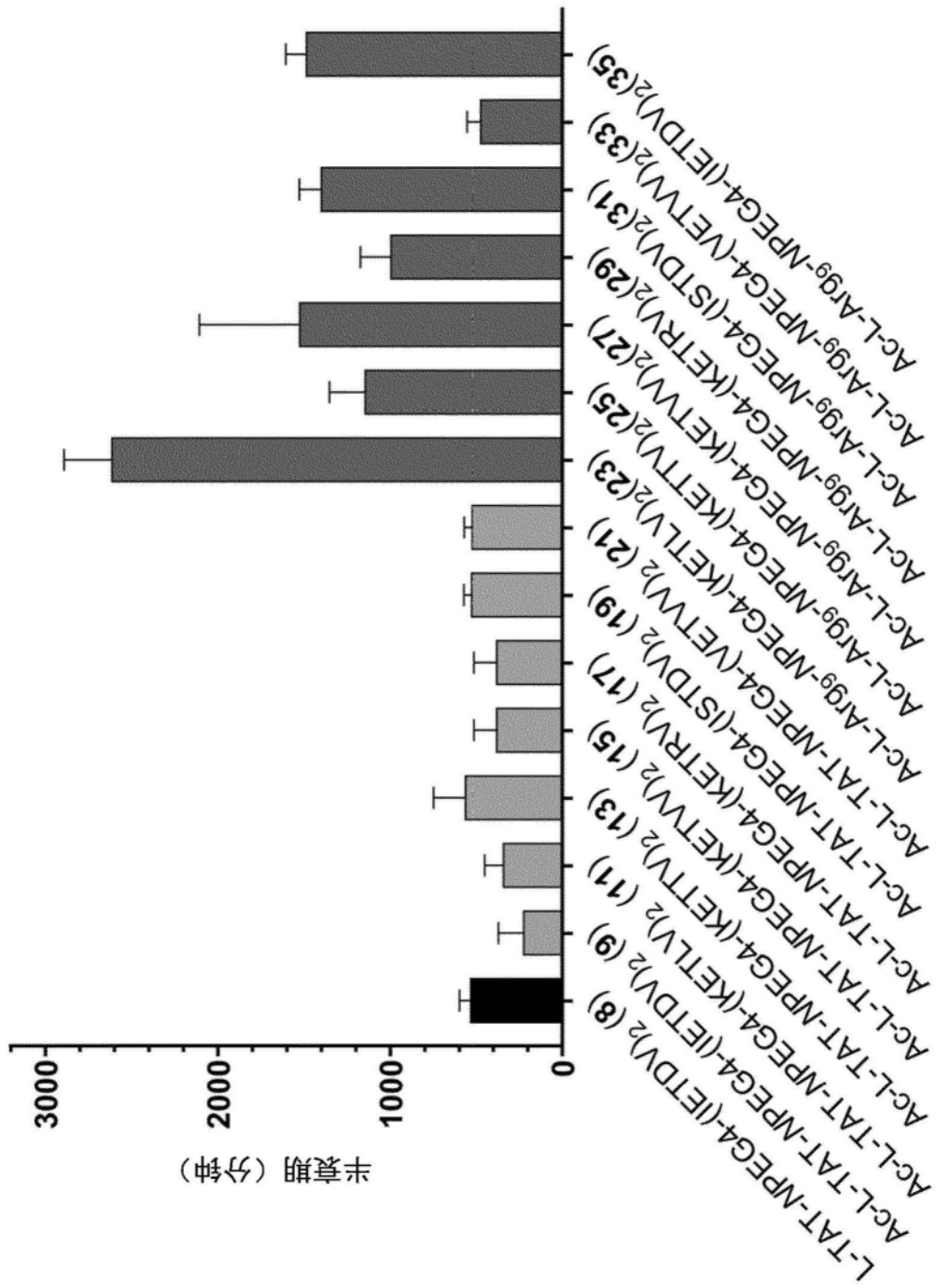


图5

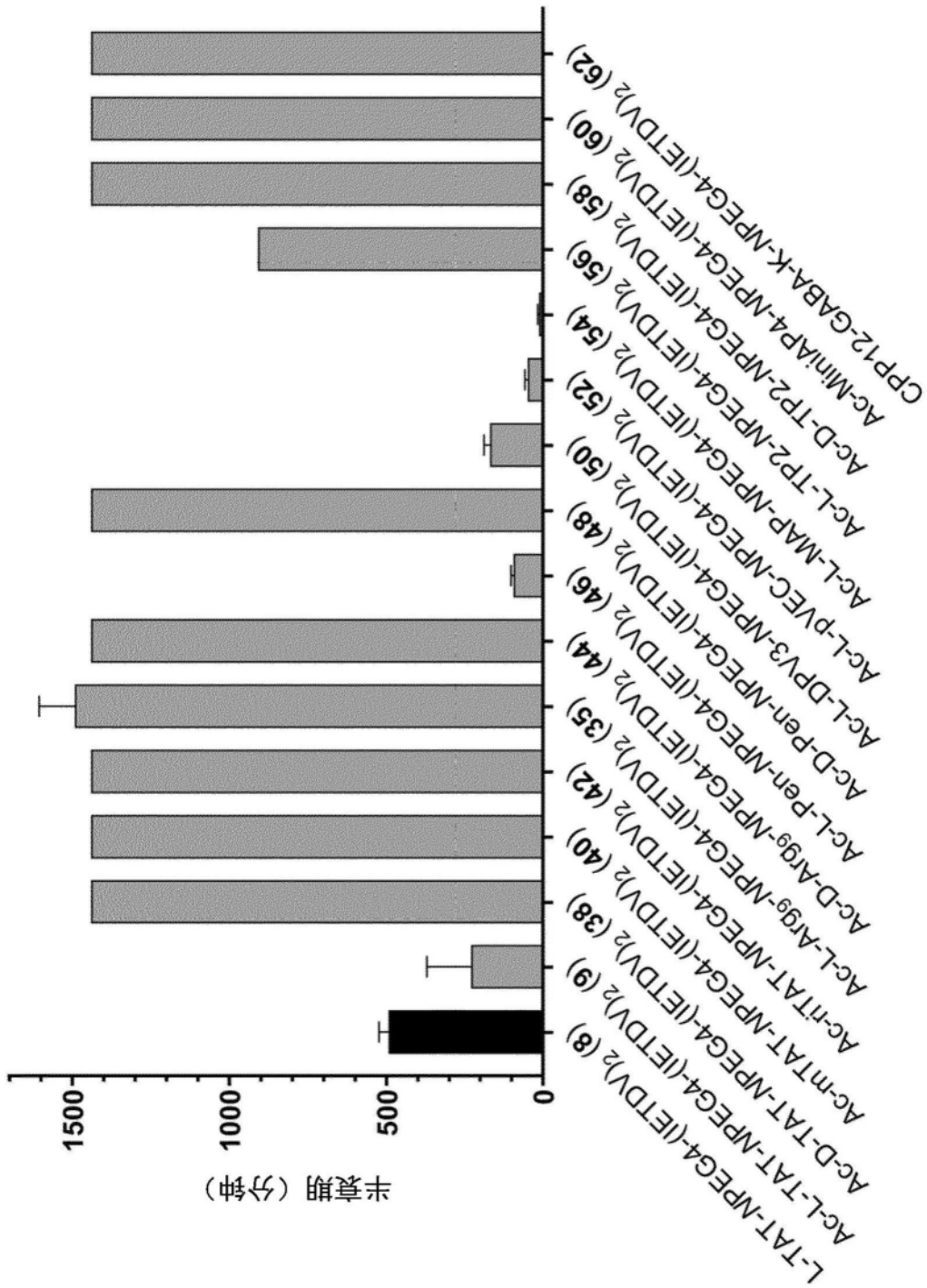


图6

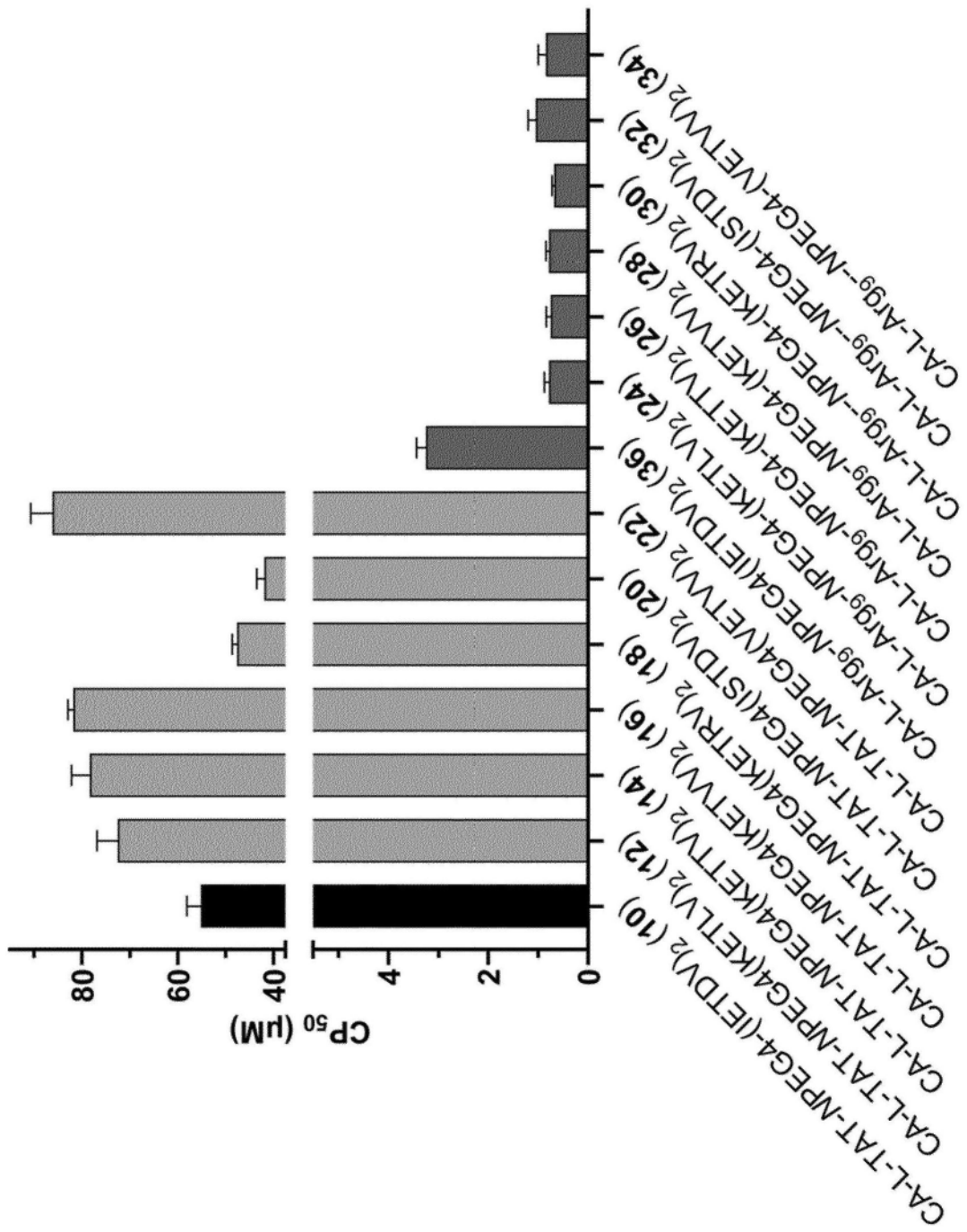


图7

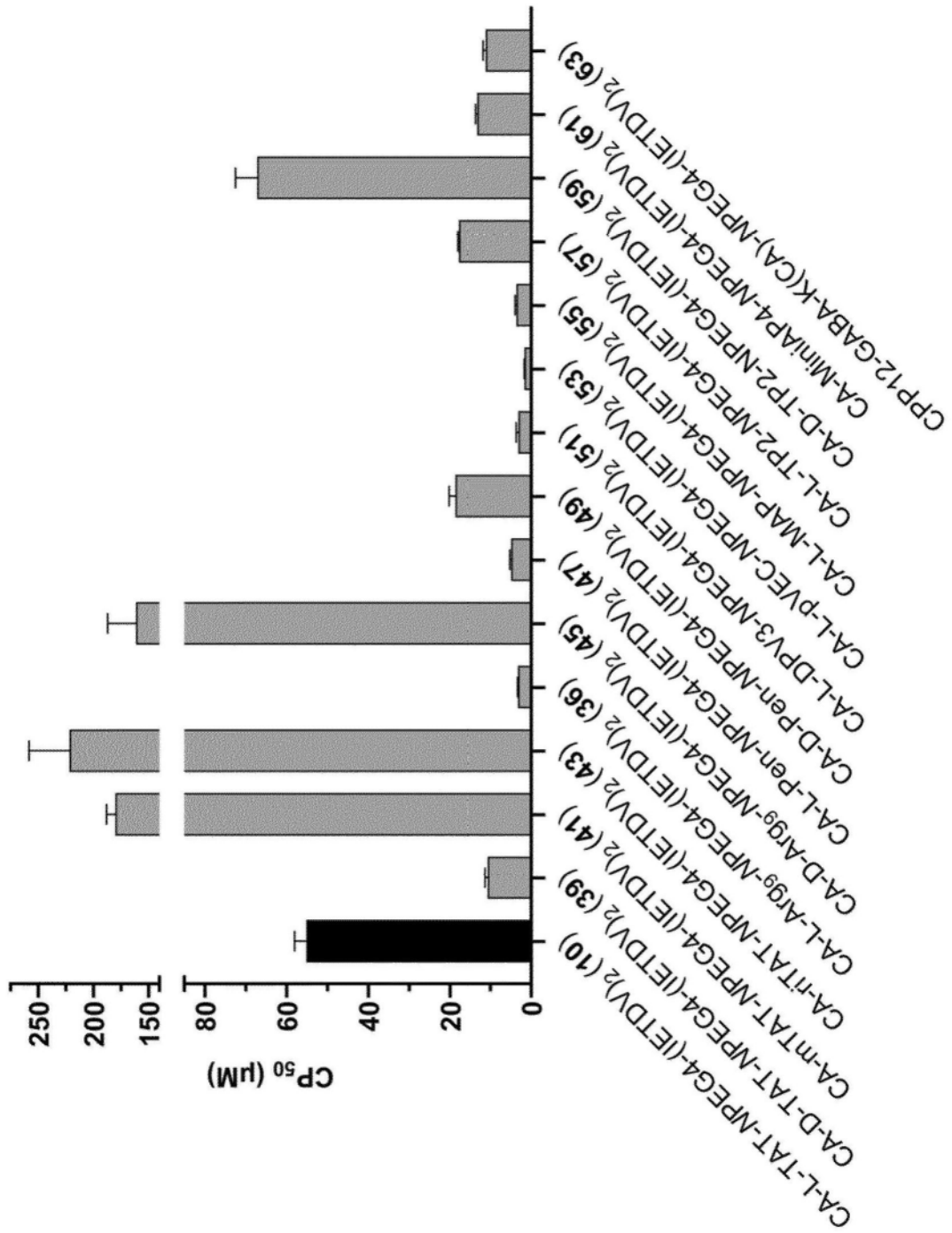


图8

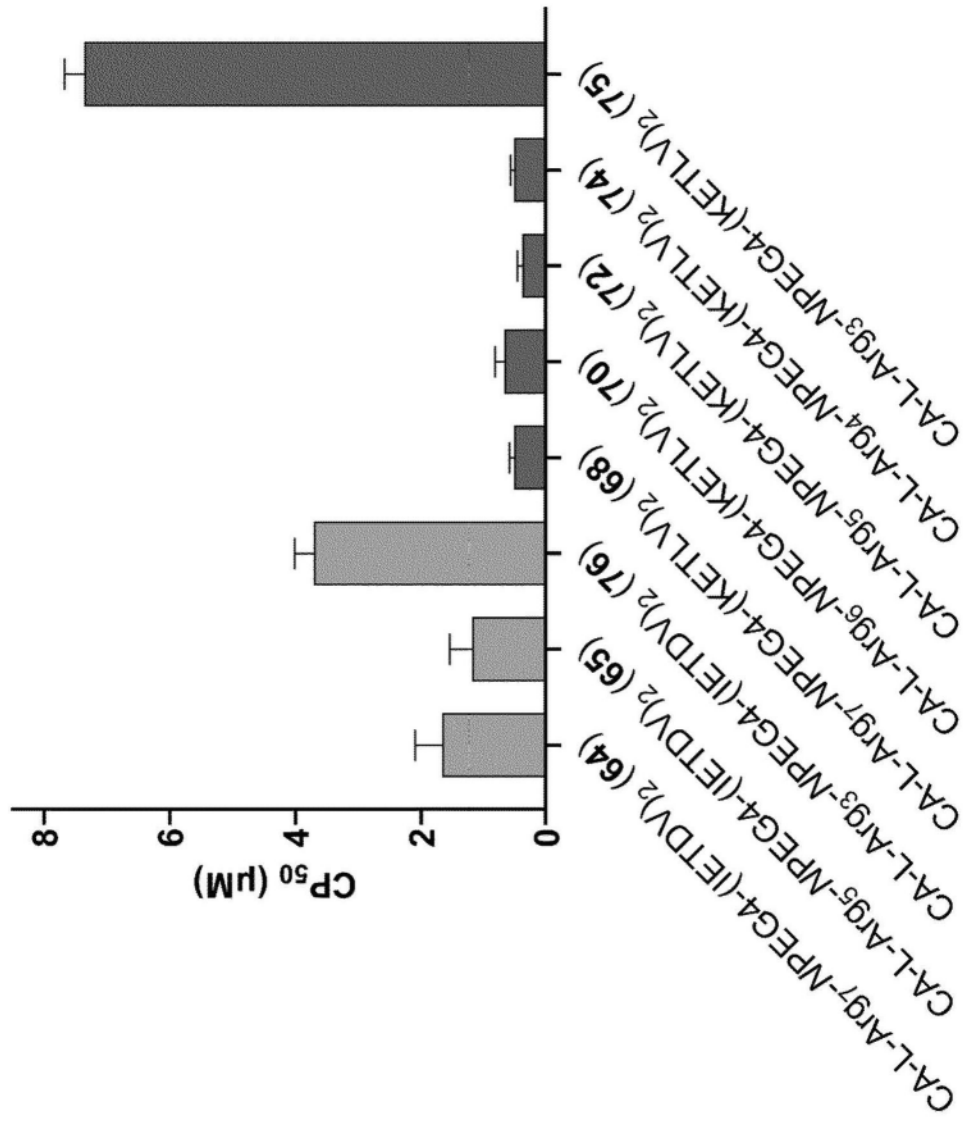


图9

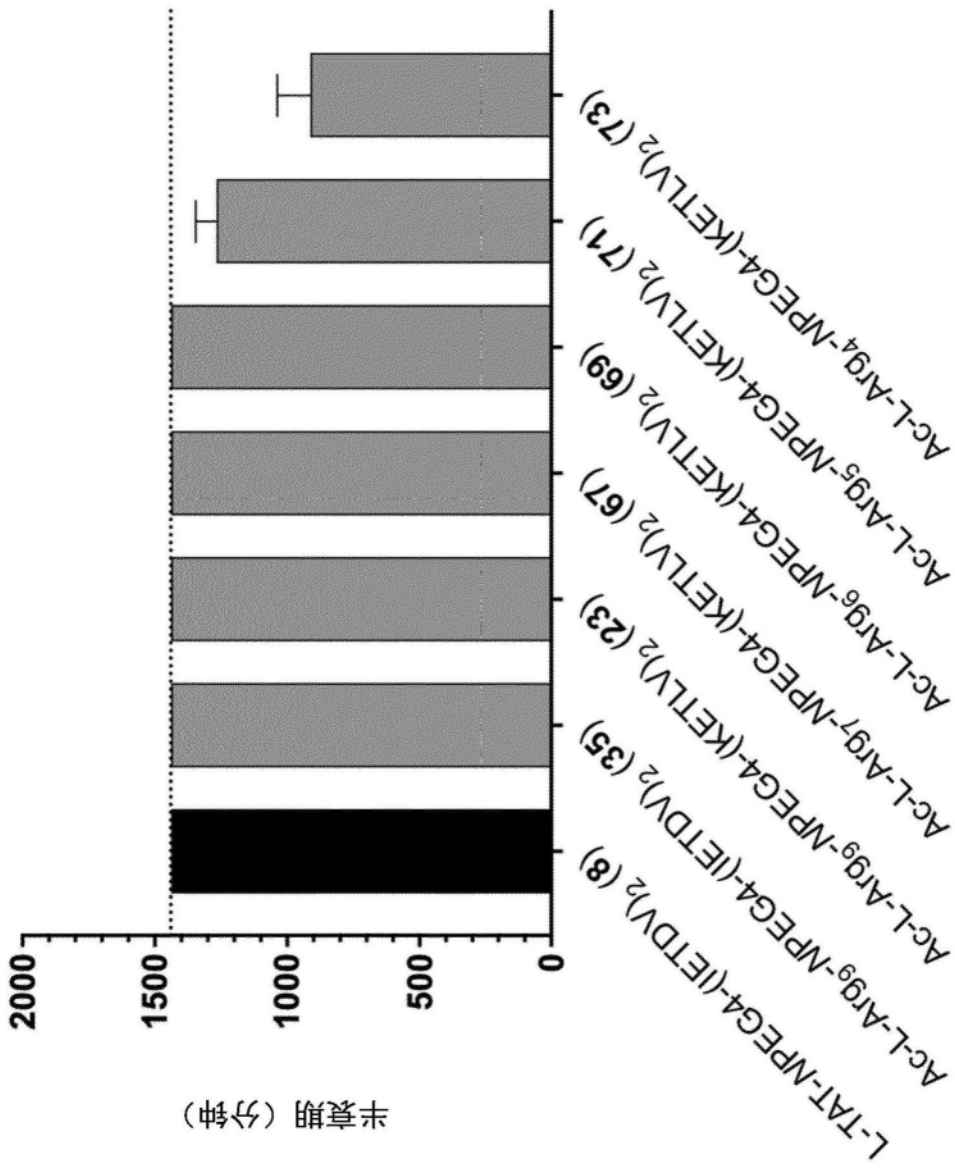


图10

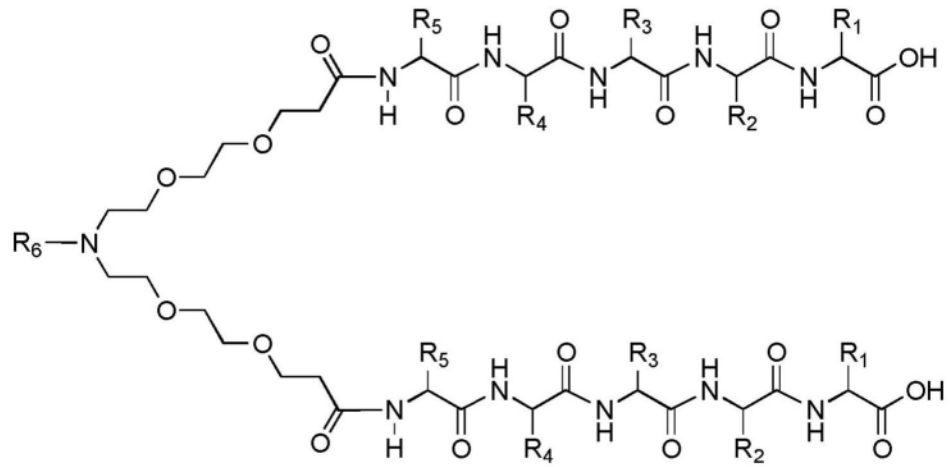


图11