



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109069577 A

(43)申请公布日 2018.12.21

(21)申请号 201780015408.8

M·S·凯

(22)申请日 2017.01.06

(74)专利代理机构 北京市君合律师事务所

11517

(30)优先权数据

代理人 吴瑜 顾云峰

62/276,201 2016.01.07 US

62/372,257 2016.08.08 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

(51)Int.Cl.

2018.09.05

A61K 38/08(2006.01)

A61K 38/10(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

C07K 7/08(2006.01)

PCT/US2017/012640 2017.01.06

A61P 31/18(2006.01)

A61K 47/50(2006.01)

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/120549 EN 2017.07.13

(71)申请人 纳维根公司

地址 美国犹他州

申请人 犹他大学研究基金会

权利要求书3页 说明书41页

序列表3页 附图10页

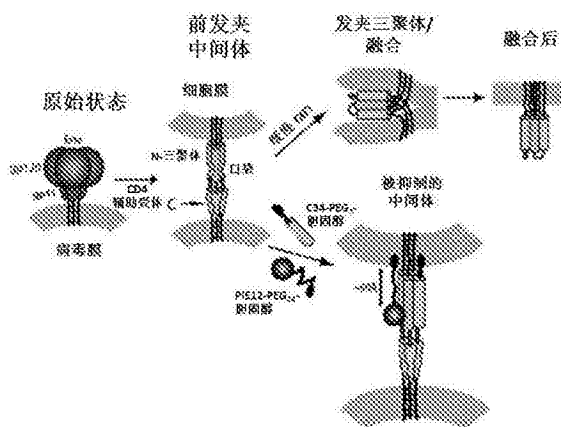
(72)发明人 B·D·韦尔奇 J·N·弗朗西斯

(54)发明名称

HIV进入的D-肽抑制剂以及使用方法

(57)摘要

本申请公开了D-肽组合物和用于抑制HIV进入宿主细胞的方法。



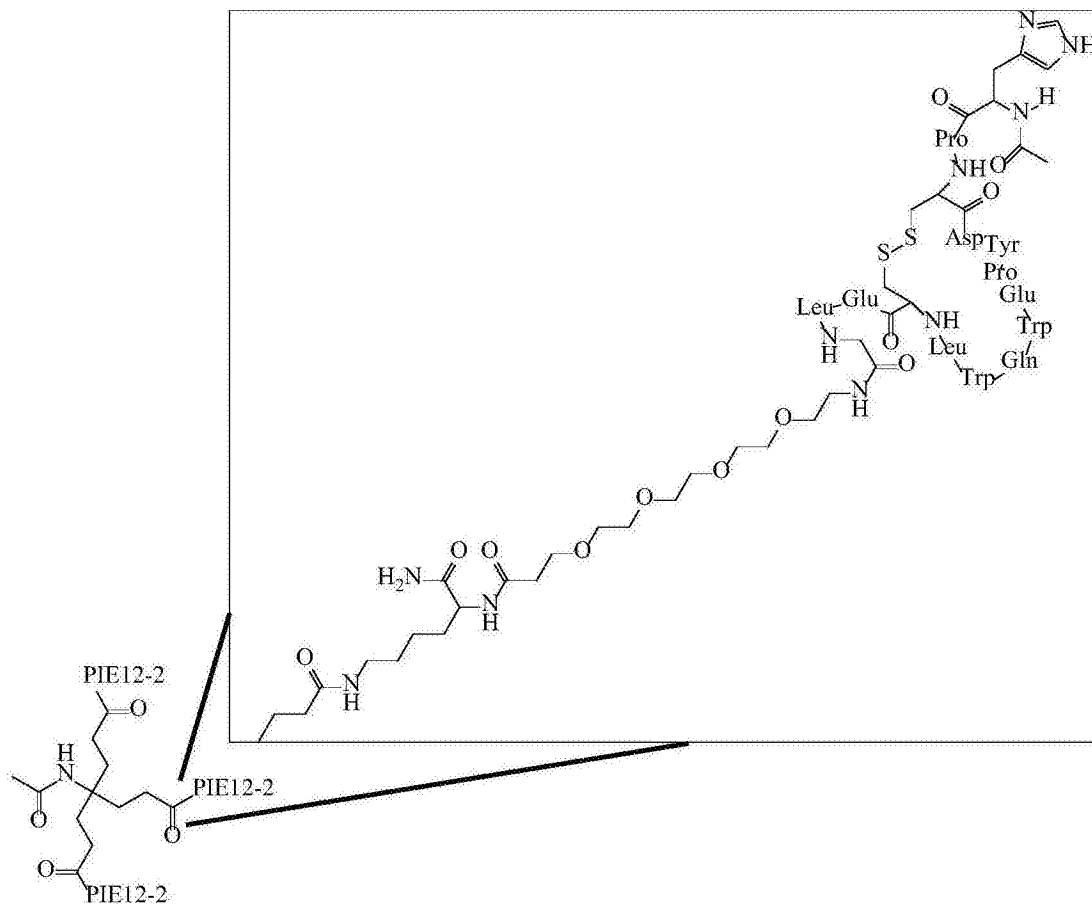
1. 一种组合物,其包含至少一个PIE12-2D-肽,所述PIE12-2D-肽包含SEQ ID NO:3[Ac-HPCDYPEWQWLCELG-(PEG₄)-K-NH₂],其中所述至少一个PIE12-2D-肽与HIV gp41的N-三聚体口袋相互作用。

2. 根据权利要求1所述的组合物,其包含至少两个PIE12-2D-肽,所述PIE12-2D-肽包含SEQ ID NO:3[Ac-HPCDYPEWQWLCELG-(PEG₄)-K-NH₂]

3. 根据权利要求1所述的组合物,其包含至少三个PIE12-2D-肽,所述PIE12-2D-肽包含SEQ ID NO:3[Ac-HPCDYPEWQWLCELG-(PEG₄)-K-NH₂]

4. 根据权利要求1-3中任一项所述的组合物,其中每个PIE12-2D-肽经由酰胺键与包含三个臂的多聚体支架的臂连接,所述酰胺键在所述PIE12-2D-肽的C-末端D-赖氨酸的ε氨基基团和所述多聚体支架的所述臂的羧基之间,其中所述多聚体支架基于4-氨基-4-(2-羧乙基)庚二酸。

5. 根据权利要求4所述的组合物,其中每个PIE12-2D-肽以及与所述多聚体支架的连接如以下结构所示:



6. 根据权利要求4或5所述的组合物,其还包含第四臂,所述第四臂经由聚乙二醇(PEG)接头将胆固醇部分连接至所述多聚体支架,其中所述第四臂中的乙二醇重复单元的总数范围为12-132。

7. 根据权利要求6所述的组合物,其中所述第四臂中的乙二醇重复单元的总数范围为24-48。

8. 根据权利要求6或7所述的组合物,其中所述PEG接头包含串联的第一PEG链和第二

PEG链,其将所述胆固醇部分连接至所述多聚体支架。

9. 根据权利要求6-8中任一项所述的组合物,其中所述第四臂中乙二醇重复单元的总数是32。

10. 根据权利要求8所述的组合物,其中分别地,所述第一PEG链包含31、30、29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个乙二醇重复单元,并且所述第二PEG链包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30或31个乙二醇重复单元。

11. 根据权利要求10所述的组合物,其中所述第一PEG链包含28个乙二醇重复单元并且所述第二PEG链包含4个乙二醇重复单元。

12. 根据权利要求5-11中任一项所述的组合物,其中所述PEG接头经由酰胺键与所述多聚体支架连接。

13. 根据权利要求8-12中任一项所述的组合物,其中所述第二PEG链经由酰胺键与所述第一PEG链连接。

14. 根据权利要求12或13所述的组合物,其中所述第一或第二PEG链包含NHS酯基团用于产生所述酰胺键连接。

15. 根据权利要求5-14中任一项所述的组合物,其中所述胆固醇部分经由氨基甲酸酯键与所述PEG接头连接。

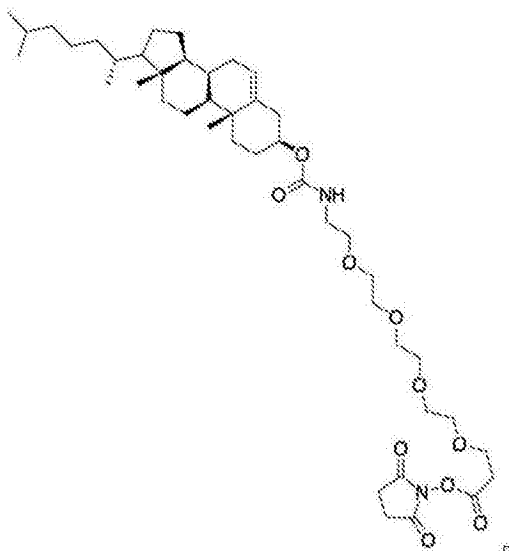
16. 根据权利要求15所述的组合物,其中所述胆固醇部分是胆甾醇氯甲酸酯。

17. 根据权利要求8-16中任一项所述的组合物,其中在所述胆固醇部分和第二PEG链连接之前,所述第一PEG链与所述多聚体支架连接。

18. 根据权利要求17所述的组合物,其中在将所述第一PEG链连接至所述多聚体支架后,在所述胆固醇部分和第二PEG链连接之前纯化所述组合物。

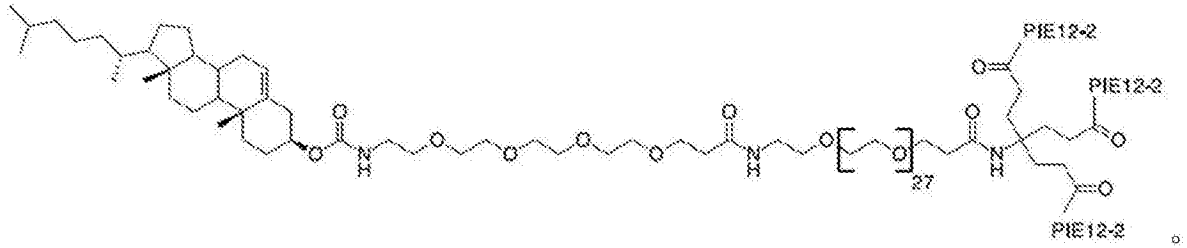
19. 根据权利要求5-18中任一项所述的组合物,其中向所述第四臂加入所述胆固醇部分不会产生立体异构体。

20. 根据权利要求8-19中任一项所述的组合物,其中所述胆固醇部分经由所述第二PEG链与所述多聚体支架的第四臂连接,并且是如下图所示的胆固醇基-PEG4-NHS酯:



21. 根据权利要求6所述的组合物,其包含至少一个具有以下结构的三聚体的PIE12-

2D-肽-胆固醇缀合物:



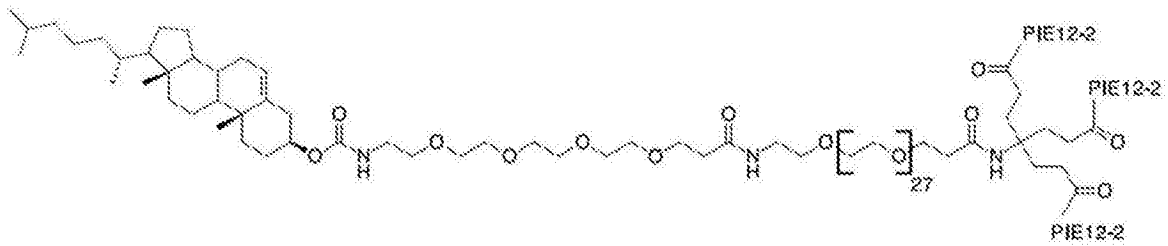
22. 一种药物组合物,其包含权利要求1-21中任一项所述的组合物以及药物载体。

23. 根据权利要求1-22中任一项所述的组合物,其还包含至少一种抗病毒剂,所述抗病毒剂选自病毒复制抑制剂、病毒蛋白酶抑制剂、病毒逆转录酶抑制剂、病毒进入抑制剂、病毒整合酶抑制剂、病毒Rev抑制剂、病毒Tat抑制剂、病毒Nef抑制剂、病毒Vpr抑制剂、病毒Vpu抑制剂和病毒Vif抑制剂。

24. 一种抑制HIV进入宿主细胞的方法,包括将所述病毒暴露于权利要求1-23中任一项所述的组合物,从而抑制HIV进入所述宿主细胞。

25. 一种治疗受试者中HIV感染的方法,包括向所述受试者施用有效量的权利要求1-23中任一项所述的组合物,从而治疗HIV感染。

26. 一种合成三聚体D-肽-胆固醇缀合物的方法,所述三聚体D-肽-胆固醇缀合物具有以下结构:



其中所述方法包括图6中所示的步骤。

HIV进入的D-肽抑制剂以及使用方法

[0001] 关于序列表的声明

[0002] 与本申请相关的序列表以文本格式提供,以代替纸质副本,并且通过引用并入本说明书中。包含所述序列表的文本文件的名称是690181_405WO_SEQUENCE_LISTING.txt。该文本文件为2.4KB,创建于2017年1月5日,并通过EFS-Web以电子方式提交。

背景技术

[0003] HIV进入由病毒包膜糖蛋白介导,其包含非共价结合的表面(gp120)和跨膜(gp41)亚基。Gp120主要参与细胞受体的识别,而gp41直接介导膜融合。当将从gp41N-和C-肽区域(N-和C-肽)分离出的肽在溶液中混合时,它们形成六螺旋束,代表了融合后的gp41结构。三个N-肽形成中心平行的三聚体卷曲螺旋(N-三聚体),其被三个反平行的螺旋C-肽包围,所述三个反平行的螺旋C-肽嵌入相邻N-肽之间的长槽中。这种结构的重要性显示为N-和C-肽对HIV进入的强势的负性抑制。

[0004] 已有的抑制和结构数据支持HIV膜融合的工作模型(图1)。最初,gp120与细胞的CD4和趋化因子辅助受体(通常为CXCR4或CCR5)相互作用,引起gp120较大的构象变化,该变化通过gp41-gp120的界面蔓延至gp41。然后Gp41经过结构重排,释放其N-末端融合肽,该N-末端融合肽嵌入靶细胞膜中。在该融合阶段,gp41采用延伸的“前发夹中间体”构象,其连接病毒和细胞膜并暴露出N-三聚体区域。该中间体存在时间相对较长(数分钟),但最终随着每个gp41单体的N-和C-肽区域结合形成发夹结构而崩解。三个这样的发夹(三聚体发夹)形成6螺旋束,其迫使病毒和细胞膜紧密并置(apposition)并导致膜融合。该结构可能对应于gp41融合活性状态的核心,并且显示出与来自流感病毒、莫洛尼鼠白血病病毒和猿猴免疫缺陷病毒(SIV)的包膜融合蛋白以及埃博拉病毒可能的融合结构的相似性。

[0005] 根据该模型,结合N-三聚体并防止发夹形成的抑制剂能够抑制病毒的进入。许多结合N-三聚体的肽、蛋白质和小分子抑制剂的发现已经很好地支持了这一点。N-三聚体的一个特别有趣的特征是由其17个C-末端残基形成的深疏水“口袋”。该口袋作为抑制性靶点具有几个让人欣喜的特征,包括:(1)非常高度保守的序列,(2)在病毒进入中的重要作用,(3)易受短肽抑制的紧凑的结合位点,和(4)已有了几种被设计出的肽(例如,真实模仿该口袋结构的IQN17、IZN17、5-螺旋、NCCGN13)。本领域需要具有合适的药代动力学特性的肽,其能够有效地抑制HIV进入宿主细胞。本公开提供了解决这些需求的途径和实施方案,并且还提供了其他相关优点。

[0006] 发明简述

[0007] 实施方式1.一种组合物,其包含至少一个PIE12-2D-肽,所述PIE12-2D-肽包含SEQ ID NO:3[HPCDYPEWQWLCELG-(PEG₄)-K],其中所述至少一个PIE12-2D-肽与HIV gp41的N-三聚体口袋相互作用。

[0008] 实施方式2.根据实施方式1所述的组合物,其包含至少两个PIE12-2D-肽,所述PIE12-2D-肽包含SEQ ID NO:3[HPCDYPEWQWLCELG-(PEG₄)-K]。

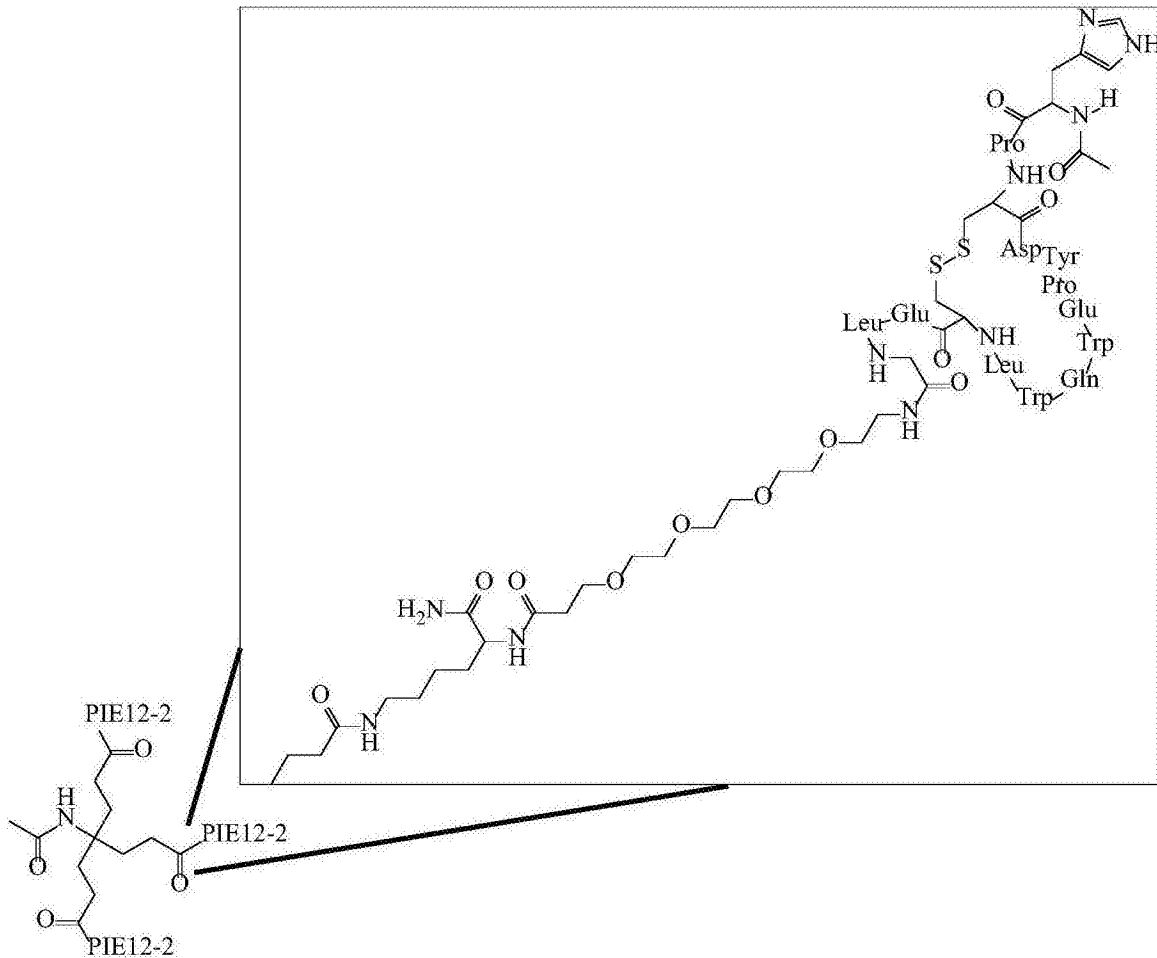
[0009] 实施方式3.根据实施方式1所述的组合物,其包含至少三个PIE12-2D-肽,所述

PIE12-2D-肽包含SEQ ID NO:3[HPCDYPEWQWLCELG-(PEG₄)-K]。

[0010] 实施方式4.根据实施方式1-3中任一项所述的组合物,其中每个PIE12-2D-肽经由酰胺键与包含三个臂的多聚体支架的臂连接,所述酰胺键在所述PIE12-2D-肽的C-末端D-赖氨酸的ε氨基基团和所述多聚体支架的所述臂的羧基之间,其中所述多聚体支架基于4-氨基-4-(2-羧乙基)庚二酸。

[0011] 实施方式5.根据实施方式4所述的组合物,其中每个PIE12-2D-肽以及与所述多聚体支架的连接如以下结构所示:

[0012]



[0013] 实施方式6.根据实施方式4或5所述的组合物,其还包含第四臂,所述第四臂经由聚乙二醇(PEG)接头将胆固醇部分连接至所述多聚体支架,其中所述第四臂中的乙二醇重复单元的总数范围为12-132。

[0014] 实施方式7.根据实施方式6所述的组合物,其中所述第四臂中的乙二醇重复单元的总数范围为24-48。

[0015] 实施方式8.根据实施方式6或7所述的组合物,其中所述PEG接头包含串联的第一PEG链和第二PEG链,其将所述胆固醇部分连接至所述多聚体支架。

[0016] 实施方式9.根据实施方式6-8中任一项所述的组合物,其中所述第四臂中乙二醇重复单元的总数是32。

[0017] 实施方式10.根据实施方式8所述的组合物,其中分别地,所述第一PEG链包含31、

30、29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个乙二醇重复单元,并且所述第二PEG链包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30或31个乙二醇重复单元。

[0018] 实施方式11.根据实施方式10所述的组合物,其中所述第一PEG链包含28个乙二醇重复单元并且所述第二PEG链包含4个乙二醇重复单元。

[0019] 实施方式12.根据实施方式5-11中任一项所述的组合物,其中所述PEG接头经由酰胺键与所述多聚体支架连接。

[0020] 实施方式13.根据实施方式8-12中任一项所述的组合物,其中所述第二PEG链经由酰胺键与所述第一PEG链连接。

[0021] 实施方式14.根据实施方式12或13所述的组合物,其中所述第一或第二PEG链包含NHS酯基团用于产生所述酰胺键连接。

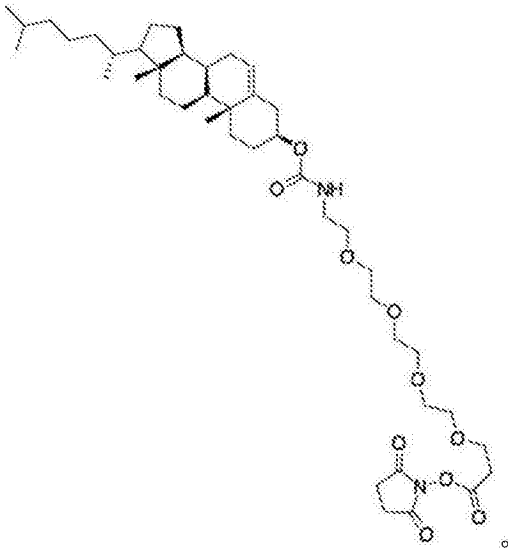
[0022] 实施方式15.根据实施方式5-14中任一项所述的组合物,其中所述胆固醇部分经由氨基甲酸酯键与所述PEG接头连接。

[0023] 实施方式16.根据实施方式15所述的组合物,其中所述胆固醇部分是胆甾醇氯甲酸酯。

[0024] 实施方式17.根据实施方式8-16中任一项所述的组合物,其中在所述胆固醇部分和第二PEG链连接之前,所述第一PEG链与所述多聚体支架连接。

[0025] 实施方式18.根据实施方式17所述的组合物,其中在将所述第一PEG链连接至所述多聚体支架后,在所述胆固醇部分和第二PEG链连接之前纯化所述组合物。

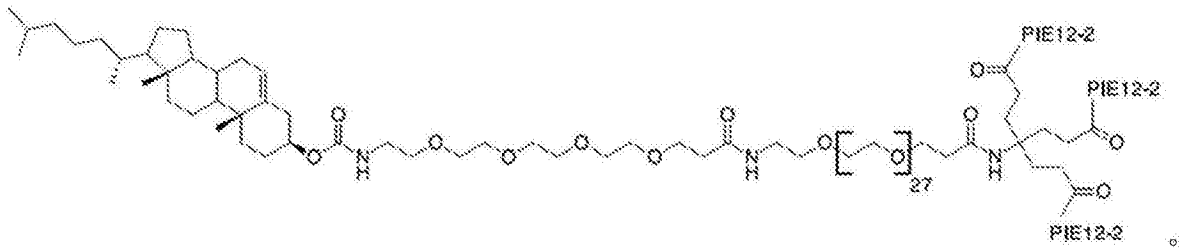
[0026] 实施方式19.根据实施方式5-18中任一项所述的组合物,其中向所述第四臂加入所述胆固醇部分不会产生立体异构体。实施方式20.根据实施方式8-19中任一项所述的组合物,其中所述胆固醇部分经由所述第二PEG链与所述多聚体支架的第四臂连接,并且是如下图所示的胆固醇基-PEG4-NHS酯:



[0027]

[0028] 实施方式21.根据实施方式6所述的组合物,其包含至少一个具有以下结构的三聚体的PIE12-2D-肽-胆固醇缀合物:

[0029]



[0030] 实施方式22.一种药物组合物,其包含实施方式1-21中任一项所述的组合物以及药物载体。

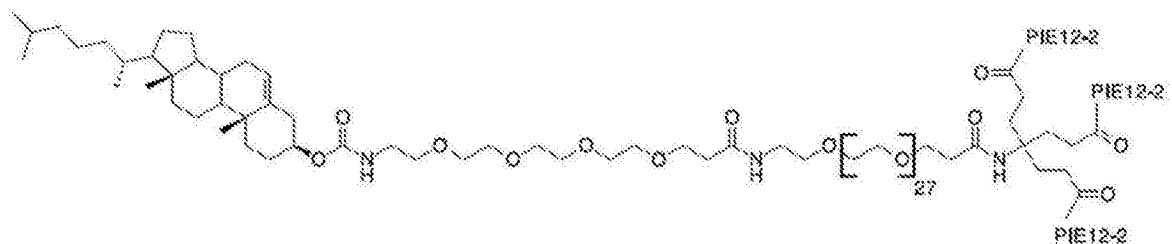
[0031] 实施方式23.根据实施方式1-22中任一项所述的组合物,其还包含至少一种抗病毒剂,所述抗病毒剂选自病毒复制抑制剂、病毒蛋白酶抑制剂、病毒逆转录酶抑制剂、病毒进入抑制剂、病毒整合酶抑制剂、病毒Rev抑制剂、病毒Tat抑制剂、病毒Nef抑制剂、病毒Vpr抑制剂、病毒Vpu抑制剂和病毒Vif抑制剂。

[0032] 实施方式24.一种抑制HIV进入宿主细胞的方法,包括将所述病毒暴露于实施方式1-23中任一项所述的组合物,从而抑制HIV进入所述宿主细胞。

[0033] 实施方式25.一种治疗受试者中HIV感染的方法,包括向所述受试者施用有效量的实施方式1-24中任一项所述的组合物,从而治疗HIV感染。

[0034] 实施方式26.一种合成三聚体D-肽-胆固醇缀合物的方法,所述三聚体D-肽-胆固醇缀合物具有以下结构:

[0035]



[0036] 其中所述方法包括图6中所示的步骤。

[0037] 附图简述

[0038] 图1描绘了HIV进入途径的实施方式。也显示了gp41融合肽和跨膜结构域。为清楚起见,在前发夹中间体中省略了gp120。

[0039] 图2描绘了第四臂上选定的药代动力学(PK)增强部分的示意图,从上到下为:与PEG24间隔区连接的Y-枝化PEG(PEG40);与PEG24间隔区连接的C18烷烃链;与PEG24间隔区连接的C16烷烃链;与PEG24间隔区连接的棕榈酸酯;与PEG24间隔区连接的硫代胆固醇;以及与串联的PEG4链和PEG28链连接的胆固醇基。

[0040] 图3A-B的图A描绘了CPT24(胆固醇-PEG24-PIE12三聚体)的结构以及图B描绘了CPT31(胆固醇-PEG32-PIE12-2三聚体)的结构。

[0041] 图4A-B的图A描绘了PIE12肽与用于CPT24的多聚体支架臂的连接以及图B描绘了PIE12-2肽与用于CPT31的多聚体支架臂的连接。(A)在PEG4的末端氨基和支架肽臂的羧基之间形成酰胺键。(B)在D-赖氨酸侧链的ε氨基基团和支架肽臂的羧基之间形成酰胺键。

[0042] 图5A-B描绘了用于CPT24和CPT31的多聚体支架。(A)CPT24使用3-{2-氨基-3-(2-

羧基乙氧基)-2-[(2-羧基乙氧基)甲基]丙氧基}丙酸支架。(B) CPT31使用4-氨基-4-(2-羧乙基)庚二酸支架。

[0043] 图6描绘了CPT31的示例性合成方法的概览。在步骤(1)中,使用(1-[双(二甲基氨基)亚甲基]-1H-1,2,3-三唑并[4,5-b]吡啶-3-氧化六氟磷酸盐)(HATU)将FMOC-PEG28-COOH缀合至氨基三酯多聚体支架,得到FMOC-PEG28-三酯。在步骤(2)中,将FMOC-PEG28-三酯完全脱保护以得到FMOC-PEG28-三酸。在步骤(3)中,使用N'N'-二琥珀酰亚胺碳酸酯活化FMOC-PEG28-三酸。在步骤(4)中,经由支架上的NHS酯与位于C-末端赖氨酸残基侧链上的PIE12-2肽的唯一的伯胺的反应,使三个PIE12-2D-肽与支架缀合,得到FMOC-PEG28-PIE12-2三聚体。在步骤(5)中,使用哌啶从FMOC-PEG28-PIE12-2三聚体中除去FMOC保护基团,得到NH₂-PEG28-PIE12-2三聚体。在步骤(6)中,将NH₂-PEG28-PIE12-2三聚体与胆固醇基-PEG4-NHS缀合,得到CPT31。

[0044] 图7描绘了HPLC分析迹线,其显示了合成CPT31的图6步骤4中的反应。该图显示了表示PIE12-2单体的峰以及表示向FMOC-PEG28-triNHS支架添加1、2和3个PIE12-2肽的峰(分别为+1,+2,+3峰)。特意在次优条件下进行迹线分析以显示所有可能的产物。当使用高质量的支架并在最佳条件下进行时,产率显著提高。

[0045] 图8描绘了HPLC分析迹线,其显示了合成CPT31的图6步骤5中的反应。在使用哌啶从FMOC-PEG28-PIE12-2三聚体中除去FMOC保护基团以得到NH₂-PEG28-PIE12-2三聚体后,显示了与图7中相同的峰。特意在次优条件下进行迹线分析以显示所有可能的产物。当使用高质量支架并在最佳条件下进行时,产率显著提高。

[0046] 图9描绘了合成CPT31的图6步骤5中的反应的HPLC制备迹线。特意在次优条件下进行迹线分析以显示所有可能的产物。当使用高质量支架并在最佳条件下进行时,产率显著提高。

[0047] 图10描绘了HPLC分析迹线,其显示将胆固醇部分添加到多聚体支架的PEG₂₈末端的游离氨基上(图6的步骤6)。特意在次优条件下进行迹线分析以显示所有可能的产物。当使用高质量支架并在最佳条件下进行时,产率显著提高。

[0048] 发明详述

[0049] 本申请公开了可用于所公开的方法和组合物,可以与其一起使用,可以用于制备其或者是其产物的材料、组合物和组分。本申请公开了这些材料和其他材料,并且应当理解,当公开这些材料的组合、子集、相互作用、分组等时,虽然这些化合物的单个的和集合的和随机排列的多种组合的每一种可能不会明确地公开,但是在本申请中对每一个都是具体包括和描述的。例如,如果公开并讨论了多肽并且讨论了可以对包括所述多肽在内的许多分子进行许多修饰,则除非特别指出相反的情况,否则均具体包括了多肽的每种和每个组合和排列以及可能的修饰。因此,如果公开了一类分子A、B和C以及公开了一类分子D、E和F以及组合分子A-D的实例,那么即使没有将每种情况单独列举出来,也会单独地以及共同地包括每种情况。因此,在该实施例中,组合A-E、A-F、B-D、B-E、B-F、C-D、C-E和C-F中的每一个都是具体包括的,并且应该认为其通过公开A、B和C、D、E和F,和示例组合A-D而公开。同样地,还特别考虑和公开了这些的任何子集或组合。因此,例如,A-E、B-F和C-E的亚组是特别考虑的,并且应该认为其通过公开A、B和C、D、E和F,和示例组合A-D而公开。该概念适用于本申请的所有方面,包括但不限于,制备和使用所公开的组合物的方法中的步骤。因此,如果

存在可以执行的各种其他步骤,则应当理解,这些其他步骤中的每一个都可以利用所公开方法的任何特定实施方式或实施方式的组合来执行,并且每个这样的组合是具体包括的并且应该被认为在此公开。

[0050] 本领域技术人员将认识到或能够使用不超过常规的实验来确定本申请所述方法和组合物的具体实施方式的许多等同方式。应当理解,所公开的方法和组合物不限于所描述的特定方法、方案和试剂,因为这些可以变化。还应当理解,本申请使用的术语仅用于描述特定实施方式的目的,并不意图限制本发明的范围,本发明的范围仅受所附权利要求的限制。

[0051] 在更详细地阐述本发明之前,提供本申请中使用的某些术语的定义可能有助于理解本发明。在本发明全文中阐述了其他定义。

[0052] 在本说明书中,除非另有说明,否则任何浓度范围、百分比范围、比例范围或整数范围应被理解为包括所述范围内的任何整数值,并且在适当时,包括其分数(例如,整数的十分之一和百分之一)。此外,除非另有说明,否则本申请所述的与任意物理特征相关的任意数值范围,例如聚合物的亚基,尺寸或厚度,应被理解为包括所述范围内的任何整数。除非另有说明,否则本申请所用的术语“约”是指所示范围、值或结构的 $\pm 20\%$ 。术语“基本上由.....组成”将权利要求的范围限制于指定的材料或步骤,或者限制于实质上不影响所要求保护的发明的基本和新颖特征的材料或步骤。应当理解,本申请所用的术语“一(a)”和“一个(an)”是指所列举组分中的“一个或多个”。替代选择(例如,“或”)的使用应被理解为表示所述替代选择中的一个、两个或其任何组合。如本申请使用的术语“包括”,“具有”和“包含”同义使用,该术语和其变化形式应被解释成是非限制性的。

[0053] 公开了用于制备公开的组合物的组分以及在本申请公开的方法中使用的所述组合物本身。

[0054] 合成的C-肽(对应于C-螺旋的肽),例如DP178和C34,是HIV-1膜融合的有效抑制剂,并且对实验室适应的毒株和原代分离株都有效。基于gp41核的结构特征,这些肽被认为通过显性抑制机制(dominant-negative mechanism)起作用,其中外源C-肽与gp41的中心卷曲螺旋结合并导致其失活。这些肽有可能作用于gp41的前发夹中间体,所述前发夹中间体在gp41的天然结构(即,存在于游离病毒颗粒上的非融合构象)被gp120/CD4/辅助受体的相互作用干扰时产生。该前发夹中间体具有暴露的N-卷曲螺旋,从而允许C-肽在形成融合活性发夹结构之前结合并灭活gp41。因此,以高亲和力结合该空腔并阻止正常的N-和C-螺旋配对的化合物是有效的HIV-1抑制剂。此外,腔内残留物在多种HIV-1分离株中是高度保守的。由于结构高度保守,靶向该位点的药物对多种HIV分离株具有广泛活性。

[0055] 如本申请所述,在HIV-1包膜蛋白gp41亚基的N-螺旋卷曲螺旋表面上的口袋是药物靶点。类似地,在能够引起AIDS的其他病原体(如HIV-2)上的或在非人哺乳动物中引起AIDS样病症的病原体(如SIV)上的空腔也是药物靶标。可以使用已有的方法(例如,镜像噬菌体展示方法,组合化学,计算方法和其他药物筛选和药物化学方法)来鉴定肽,D-肽(包括多聚体),以及肽模拟物和小分子,其以足够的亲和力结合HIV-1(和/或HIV-2)的卷曲螺旋空腔以干扰病毒进入细胞,从而抑制病毒感染。镜像噬菌体展示已被用于鉴定与HIV-1gp41的N-螺旋卷曲螺旋表面上的空腔结合的D-肽。

[0056] 组合物

[0057] 肽

[0058] 本申请公开了组合物,所述组合物包含至少一个与HIV gp41的N-三聚体口袋相互作用的改进的D-肽(例如,PIE12-2)。例如,所述D-肽可以结合HIV包膜糖蛋白gp41(例如,HIV-1,HIV-2)的N-螺旋卷曲螺旋表面上的空腔。该D-肽可以具有任何长度,只要其具有足够的长度以便以该种方式结合所述空腔即可;即其干扰N-螺旋卷曲螺旋空腔和病毒gp41的C-肽区域的氨基酸残基的相互作用,并防止或抑制病毒进入所述细胞。例如,所述肽在长度上可以包含至少2、3、4、5、6、7、8、9或10个核心氨基酸残基。如本申请所述,所述氨基酸残基可以是天然存在的或非天然存在的或经修饰的。结合HIV gp41的N-三聚体的肽的实例可以在美国专利公开2010/0184663和2014/0323392中找到,其各自通过引用整体并入本申请。

[0059] D-肽是具有与天然存在的肽手性相反的手性肽。因此,D-肽不能用作酶的有效底物,因此不像L-肽那样容易降解。此外,没有已知的靶向D-肽的有效免疫应答,因此,它们不会引发与L-氨基酸肽引发的免疫应答相当的免疫应答。此外,D-肽相对于L-肽具有几个潜在的优势,包括:(1)D-肽对蛋白酶具有抗性,这种性质可以显著增加血清半衰期,(2)L-肽必须注射给药以避免消化,但是短D-肽在口服给药时可以被全身吸收,以及(3)D-肽代表了结构多样性的丰富来源,这是因为其可以结合具有独特的界面几何形状的靶标,而L-肽却不能。

[0060] 如本申请所述鉴定的D-肽的实例如下所示。在某些实施方式中,D-肽被称为口袋特异性进入抑制剂(PIE)。这种D-肽抑制剂的实例是PIE12-2,其由序列Ac-HPCDYPEWQWLCELG-PEG₄-K-NH₂(SEQ ID NO:3)表示,其是PIE12和PIE12-PEG₄的改进的变体,所述PIE12和PIE12-PEG₄先前已经描述过(参见,美国专利公开2010/0184663和2014/0323392)。在某些实施方式中,可以将一个或多个N-末端赖氨酸残基添加至D-肽以改进水溶性。本申请公开的D-肽的特定实施方式可以被显示为在氨基酸序列之前具有接头序列“PEG”。

[0061] 表1中公开了可用于本申请公开的方法和组合物的D-肽的各种实例。

[0062] 表1:PIE12 D-肽

[0063]

肽的名称	序列(均为D-氨基酸)	SEQ ID NO:#
PIE12*	Ac-HPCDYPEWQWLCELGK-NH ₂	1
PIE12-PEG ₄ *	Ac-HPCDYPEWQWLCELGK(PEG ₄)-NH ₂	2
PIE12-2*	Ac-HPCDYPEWQWLCELG-PEG ₄ -K-NH ₂	3

[0064] *D-肽优选在N-末端用乙酰基(“Ac”)封端,并且在C-末端用酰胺(“NH₂”)基封端。

[0065] 如本申请使用的术语“D-氨基酸残基”是指具有与D-甘油醛相同的绝对构象的 α -氨基酸残基。

[0066] 本申请公开的组合物的实施方式包括肽、所述肽的部分和所述肽的变体/衍生物,其能被用作HIV进入细胞的抑制剂。本申请公开的肽或这些肽的一部分的特定实施方式可有助于抑制HIV感染,所述这些肽的一部分足以装入(fit into)位于卷曲螺旋的C-末端的疏水口袋并防止C-肽区域与gp41的N-肽区域的相互作用。所表示的任何肽或其衍生物的一部分的大小可以是2至20个(从2至20的任意数量的残基)氨基酸残基。在具体的实施方式中,可以使用这样的D-肽:其至少包含共有序列EWXWL(SEQ ID NO:4)或至少包含序列WXWL

(SEQ ID NO:5)。当本申请所述的D-肽除了共有序列之外还包括氨基酸残基时,所述其他的氨基酸残基和所述D-肽的大小可以参考本申请所述的肽进行选择,或者可以独立于这些肽进行设计,只要肽可以装入疏水口袋并充当抑制剂即可。其他的氨基酸残基也可以存在于本申请所述D-肽的N-末端、C-末端或者两端,从而产生更大的肽。或者,可以选择其他氨基酸残基,例如,以增强结合亲和力。例如,这种肽可以包括保守的氨基酸残基,其所在的位置可以与其在本申请公开的肽中存在的位置相同。在一些实施方式中,所述肽可以包含所述核心序列“WXWL”(SEQ ID NO:5)。

[0067] 在本申请公开的肽的一些实施方式中,所述肽可以包含氨基酸残基,所述氨基酸残基可以与本申请公开的任何肽中的这些位置处的氨基酸残基不同(例如,可以是异亮氨酸或天冬酰胺或在本申请公开的肽中没有出现的其他氨基酸残基)或者可以被另一肽中特定位置处的氨基酸残基替代或取代。可以使用除天然蛋白质中发现的20种L-氨基酸的D-型之外的氨基酸残基。例如,可以进行这样的改变以增强所述肽的生物利用度、结合亲和力或其他特征。D-肽可以包含本申请公开的肽中存在的保守氨基酸残基,但是它们可以被比表1中所示的间隔氨基酸残基数量更少(或更多)的氨基酸残基分开。例如,在共有序列中第一半胱氨酸和谷氨酸之间可以存在少于五个氨基酸残基。或者,这两个残基可以被五个以上的氨基酸残基分开。还可以进行内部修饰(例如,以增强结合力或提升肽的溶解度)。D-肽可在其N-末端具有其他部分或氨基酸。例如,可以添加这样的部分:其阻断所述N-末端或除去本该存在于所述N-末端处的电荷。所述部分可以是,例如,阻断部分,如与组氨酸(H)直接连接的乙酰基(Ac),或者与连接至H的N-末端的一个或多个其他的氨基酸残基连接的乙酰基(如与一个或多个赖氨酸残基连接的乙酰基,所述赖氨酸残基反过来与N-末端H连接)。

[0068] 另外,D-肽可在其C-末端具有其他的和/或改变的部分或氨基酸。例如,可以改变所述C末端的赖氨酸残基和/或可以在所述C末端添加一个或多个残基,例如以增强结合力。或者,可以包括除氨基酸残基之外的功能(化学)基团以产生本申请公开的抑制剂的抑制剂。例如,这些其他的化学基团可以存在于N-末端,C-末端,两端或内部。

[0069] 可以经由合适的接头(例如,氨基酸残基接头或其他化学部分)连接两个或多个D-肽以提升抑制的效力。或者,可以经由合适的接头将一种或多种D-肽连接至分子(药物)以提升抑制的效力,所述分子(药物)结合HIV gp120,CD4,CCR5,CXCR4或HIV gp41的非口袋区域。

[0070] 关于本申请所公开的肽的命名法,将不同的肽家族称为x聚体,其中x应是半胱氨酸残基之间的残基数。所述x聚体被称为“核心肽”。例如,SEQ ID NO:1的D-肽由16个残基(HPCDYPEWQWLCELGK)组成,因此在标准技术中将其称为16-聚体。然而,在本申请公开的某些实施方式中,半胱氨酸(C)之间的残基长度是8,因此其应是8聚体(并且被认为是具有8个核心残基),并且在整个申请中都这样指代。在特定的实施方式中,将在所述两个Cys残基之外的氨基酸称为“侧翼”序列。该命名方案允许区分不同的肽家族,所述肽家族在两个Cys残基之间的残基数量不同,但由于其侧翼序列的差异,可以在总肽长度上变化。例如,SEQ ID NO:1的D-肽具有16个残基的长度(HPCDYPEWQWLCELGK),是8-聚体肽家族的成员(因为它具有8个核心残基),并且具有N-末端侧翼序列HP和C-末端侧翼序列ELGK。除了本申请公开的存在于肽上的核心残基和侧翼残基之外,本申请公开的所有肽可以包含封闭的N-和C-末端。例如,N-末端可被乙酰基(Ac)封闭,C-末端可被氨基(NH₂)封闭。所述乙酰基可以是作为

肽合成过程的一部分而添加的N-末端乙酰基。所述C-末端酰胺和所述N-末端乙酰基优选是本公开内容所述的D-肽组分。

[0071] 在一些实施方式中,鉴于在鉴定D-肽中所用的镜像噬菌体展示文库的设计,本发明所述D-肽可以在N-末端侧接“GA”残基并在C-末端侧接“AA”残基。这些氨基酸残基中的一些或全部可以进行改变、替换或删除,以产生具有例如改变的吸收、分布、代谢和/或排泄的D-肽。在一个实施方式中,通过在所述C-末端酰胺之前紧接着加入甘氨酸残基来修饰所述C-末端。在另一实施方式中,大多数C-末端的“A”被改变/修饰,或被不同的氨基酸残基取代,或删除。在又一个实施方式中,将氨基酸添加至所述C-末端和/或N-末端。因此,本申请认为所述N-末端“GA”残基和C-末端“AA”残基均可被取代或额外侧接以增强效力。例如,可以将一个或两个赖氨酸添加至所述C末端“AA”残基以产生特定PIE的单个或双个赖氨酸变体。还例如,可以修饰所述N-末端Lys以在所述N-末端包含“HP”残基。

[0072] 本公开内容包括的一种D-肽的氨基酸序列是HPCDYPEWQWLCELG-PEG₄-K (SEQ ID NO:6),并且在优选的实施方式中是Ac-HPCDYPEWQWLCELG-PEG₄-K-NH₂ (SEQ ID NO:3),其也称为PIE12-2。除了PEG4部分插入到肽骨架中甘氨酸和赖氨酸残基之间,所述PIE12-2肽具有与PIE12 (SEQ ID NO:1) 相同的氨基酸序列。所述修饰导致合成产率提高和合成复杂性降低,因为它不像PIE12一样需要正交赖氨酸保护基团。

[0073] 在一个方面,本公开提供了包含至少一个D-肽的组合物,所述D-肽包含SEQ ID NO:6 [HPCDYPEWQWLCELG-PEG₄-K],其中所述至少一个D-肽与HIV gp41的N-三聚体口袋相互作用。在某些实施方式中,所述组合物包含至少两个含有SEQ ID NO:6 [HPCDYPEWQWLCELG-(PEG₄)-K]的D-肽。在某些实施方式中,所述组合物包含至少三个含有SEQ ID NO:6 [HPCDYPEWQWLCELG-(PEG₄)-K]的D-肽。在又一个实施方式中,所述组合物包含多个含有SEQ ID NO:6 [HPCDYPEWQWLCELG-(PEG₄)-K]的D-肽。在优选的实施方式中,所述D-肽可以包含被乙酰基基团(Ac)封闭的N-末端和被氨基基团(NH₂)封闭的C-末端。在某些实施方式中,所述D-肽包含Ac-HPCDYPEWQWLCELG-(PEG₄)-K-NH₂ (SEQ ID NO:3) 或由其组成。

[0074] 多聚体

[0075] 在某些实施方式中,本申请公开的肽还可以表现为多聚体,例如二聚体或三聚体。例如,当所述多聚体是二聚体时,所述二聚体可以由两个相同的肽组成,或者可以由两个不同的肽组成。或者,所述多聚体也可以是三聚体。当所述多聚体为三聚体时,所述三聚体可以由两个相同的肽和一个不同的肽,或三个相同的肽,或三个不同的肽组成,其每个都彼此不同。

[0076] 本申请公开了本申请所述的肽的多聚体。在某些实施方式中,本申请公开的多聚体可以包含至少一个D-肽(例如,PIE12-2),其与病毒跨膜蛋白的N-三聚体口袋相互作用。所述多聚体可以是二聚体、三聚体或更高级的多聚体,例如四聚体,但也可以包括具有5、6、7、8、9、10、11或12个D-肽的多聚体。因此,本申请公开了包含多聚体的组合物,所述多聚体包括一个或多个本公开所述的D-肽(例如,PIE12-2)。在某些实施方式中,所述多聚体是同源多聚体或异源多聚体。在某些实施方式中,所述组合物包含至少一个由两个PIE12-2D-肽(SEQ ID NO:3)组成的二聚体。在其他实施方式中,所述组合物包含至少一个由三个PIE12-2D-肽(SEQ ID NO:3)组成的三聚体。在又一个实施方式中,所述组合物包含PIE12-2D-肽(SEQ ID NO:3)的多个同源二聚体或同源三聚体。包含至少一个PIE12-2D-肽(SEQ ID NO:

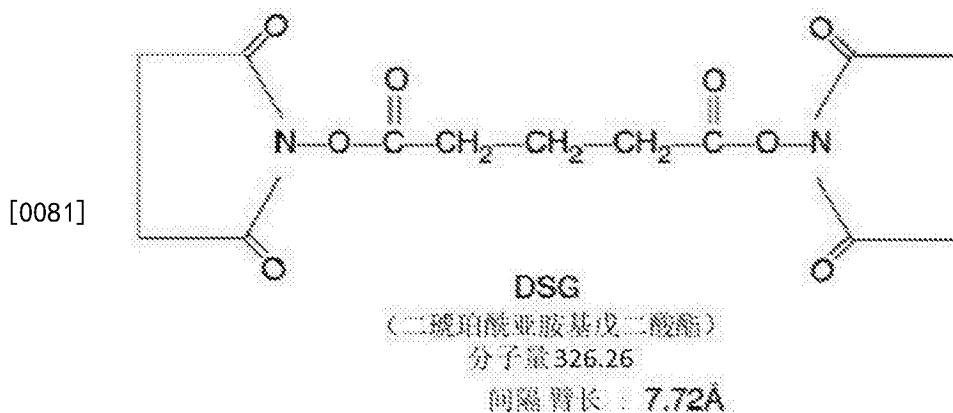
3)的异源多聚体可以由US2014/0323392和US2010/0184663中公开的其他PIE D-肽组成,其各自通过引用整体并入本申请。

[0077] 应当理解,并且如本申请预期,所公开的D-肽可交联以形成多聚体。在某些实施方式中,所述多聚体可以通过使用多聚体支架进行交联。交联剂的一个实例是聚乙二醇(PEG),其经由N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)-酯(与Lys反应)或马来酰亚胺(与Cys反应)衍生而来。在其他实施方式中,交联剂还可以含有两种不同的连接化学剂(例如,一端为NHS-酯,另一端为马来酰亚胺)。在特定的实施方式中,D-肽也可以通过在两个Cys残基之间直接形成的二硫键而连接。

[0078] 在某些实施方式中,所述多聚体支架可以是包含三个NHS酯基团的三聚体支架。在特定的实施方式中,所述多聚体支架可以是包含三个NHS酯基团的同源三聚体支架或异源三聚体支架。此外,在其他实施方式中,所述多聚体支架可以是包含三个NHS酯基团和第四正交基团的四聚体支架。在此类实施方式中,所述多聚体支架可以是包含三个NHS酯基团和第四正交基团的异源四聚体支架。另外,所公开的交联剂和多聚体支架的特定实施方式可包含三、二-赖氨酸,苯环,磷酸酯或肽核心。本申请公开的用于所公开的组合物其他交联剂包含硫醇反应性基团,例如卤代乙酰基(例如,碘乙酸酯)、吡啶基二硫化物(例如,HPDP)和其他硫醇。

[0079] 连接的D-肽可以是本申请公开的任何一种D-肽,并且所述D-肽可以彼此相同或可以彼此不同。当存在二聚体时,所述两种D-肽的N-末端可以彼此交联。或者,所述D-肽的C-末端可以是交联的。另外,一个D-肽的N-末端和另一个D-肽的C-末端是交联的。当存在三聚体时,所述D-肽的N-末端和C-末端可以以任何组合连接。例如,它们可以以下任何一种排列连接:N-N/C-C—肽1的N末端与肽2的N末端连接;肽2的C末端与肽3的C末端连接。当使用这种命名时,有16种可能的三聚体谱系:X/Y,其中X和Y=N-N、N-C、C-N或C-C。D-肽与中心支架的连接也可以通过N-或C-末端或内部位置或这些的组合。因此,例如,本申请认为,一个或多个D-肽可以在内部残基交联而不在末端交联处交联。还认为,在三聚体中,内部交联剂可用于一个肽对(例如,肽1至肽2),并且末端交联剂(N-或C-末端)可用于将肽2交联至肽3。

[0080] 如本申请使用的多聚体命名方案描述了肽的连接方式。例如,C4C-PIE12-三聚体意味着三个PIE12肽通过C-到C-末端连接的方式使用PEG₄间隔区连接。注意:长度为零的间隔区可以是各种短交联剂中的任一种(例如,BS3、DSG或DST)。DSG的结构如下:



[0082] 如本申请使用的术语“PIE12-三聚体”是多聚体的通用术语,其表示具有略微不同的化学组成的多个分子,其具有通过各种交联策略连接在一起的三个PIE12单体。在某些实

实施方式中,一类PIE12-三聚体可以通过使用各种长度的PEG交联剂连接单体而不使用中心支架来构建。在这样的实施方式中,所述三聚体可以指定为,例如,C_xC-PIE12-三聚体,其中“C_xC”代表通过赖氨酸侧链的独特的伯胺连接PIE12单体,其中所述赖氨酸残基位于所述肽单体的C-末端。在其他实施方式中,N_xN-PIE12-三聚体代表通过位于N-末端的赖氨酸连接。在上下文中,“x”是指连接各个单体的交联剂中PEG单元的数量。在特定的实施方式中,含有两个赖氨酸的中心单体可用于制备这种类型的三聚体。这种类型的三聚体的替代名称是,例如,C5C(PIE12)₃,其中下标“3”表示三聚体。

[0083] “PIE12-2三聚体”是指通过各种交联策略(例如使用各种长度的PEG交联剂,同时使用或不使用中心支架)连接在一起的三个PIE12-2单体肽(SEQ ID NO:3)。

[0084] 如本申请所述,PIE12-2三聚体的一些实施方式可以使用中心多聚体支架来构建,所述中心多聚体支架在其核心含有三价原子(即氮),并且有三个PEG接头或不同长度的“臂”将PIE12-2单体连接成三聚体。在其他实施方式中,所述中心多聚体支架可以包括在所述多聚体支架的核心处使用四价原子(即,碳),同时有例如,各种长度的三个PEG接头连接各个PIE12-2单体。

[0085] 在某些实施方式中,可以使用碳核心支架组装PIE12-2三聚体的效能增强型版本,其中通过利用所述四价支架的第四臂将增强效能的载荷部分连接至PIE12-2三聚体。在此类实施方式中,可使用各种长度的PEG单元(即12-132个PEG单元)将各种部分连接至第4臂。PIE12-2三聚体的一个实例是chol-PEG₃₂-PIE12-2三聚体,其中“chol”是胆固醇(cholesterol)的缩写,并且“PEG₃₂”是指第四臂的乙二醇重复单元的总数。在某些实施方式中,乙二醇重复单元的总数范围为24-36。在某些实施方式中,乙二醇重复单元的总数是32。所述第四臂可以由单个PEG链或串联的第一PEG链和第二PEG链组成,其将增强效能的载荷部分连接至所述多聚体支架。在特定的实施方式中,可以通过各种化学反应将增强效能的载荷部分连接至所述第4臂PEG单元。

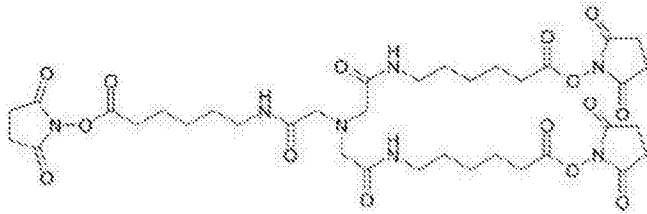
[0086] 本申请公开的多聚体可以由肽的任何组合制成,包括表1中公开的肽,或其变体,使得所述多聚体可以抑制病毒进入细胞。在某些实施方式中,所述多聚体可以包含一个PIE12-2D-肽,两个PIE12-2D-肽,或三个或更多个PIE12-2D-肽。在此类实施方式中,所有的肽可以是相同的,或者其可以由D-肽的任何组合组成,包括本申请中公开的和没有具体公开的D-肽。在特定的实施方式中,至少一个D-肽可以包含序列Ac-HPCDYPEWQWLCELG-(PEG₄)-K-NH₂(SEQ ID NO:3)。

[0087] 多聚体支架

[0088] 作为制备多聚体的替代策略,可将中心多聚体支架用于连接一个或多个PIE D-肽(例如,如SEQ ID NO:1所示的PIE12,如SEQ ID NO:2所示的PIE12-PEG₄,或者如SEQ ID NO:3所示的PIE12-2)。例如,在一个实施方式中,中心多聚体支架用于连接一个或多个PIE12-2肽。在特定的实施方式中,本申请公开的多聚体支架可以包含中心三官能交联剂三(琥珀酰亚胺基)氨基三乙酸酯,例如TSAT,其含有三个N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)酯基团。在一些实施方式中,该几何形状被称为“爪”,因为该构型类似于鹰爪。该策略的两个实例是(1)短爪(其直接将TSAT连接至所述肽)和(2)长爪(其使用延伸形式的TSAT(LC-TSAT),其在TSAT和所述肽之间含有其他的六原子间隔区)。还可以使用其他间隔区长度或组合物(例如,PEG)。

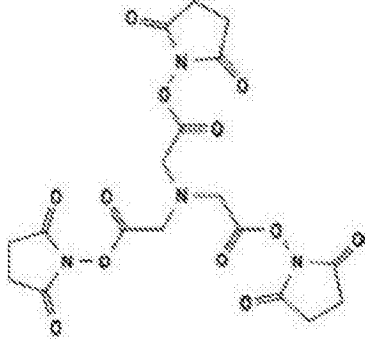
[0089] 以下代表LC-TSAT:

[0090]



[0091] 以下代表TSAT:

[0092]

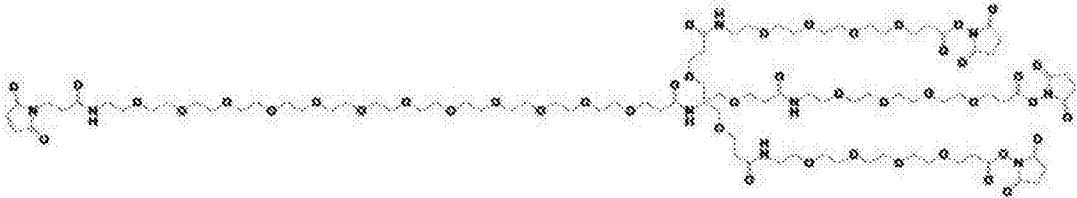


[0093] “过度改造”未来的D-肽是指即使在达到效能极限后也要提高亲和性。此类抑制剂在体外并不显示出改善的抗病毒效能,但具有结合能量(亲和力)的储备,其充当抵抗潜在抗性突变的“抗性电容”(即,适度影响结合亲和力的抗性突变对效能没有影响)。这种“抗性电容”特性阻止了多个细微突变的逐步积累,所述突变组合起来赋予抗性。单个突变对抑制剂效能没有影响,并且在存在抑制剂的条件下不赋予生长优势。这种“抗性电容”对于三聚体D-肽抑制剂可能特别有益,因为抗性突变同时影响所有三个口袋。在某些实施方式中,作为对抗性发展的进一步防御,本申请公开的三聚体D-肽也可以通过使用三种不同的D-肽序列来构建,每种具有不同的抗性谱。这种异源三聚体将对抗性发展提供显著的额外屏障。

[0094] 异源四聚体

[0095] 本申请所公开的PIE12-2三聚体是HIV进入的有效抑制剂。所述PIE12-2三聚体包含对前体化合物CPT24(胆固醇-PEG₂₄-PIE12三聚体)的进一步修饰,其允许PIE12-2三聚体: 1) 更容易合成并且具有更高的产率; 2) 具有增强的药代动力学特性(例如,通过减少肾过滤,因为它小于肾小球过滤的截留分子量); 3) 允许局部集中在HIV进入所发生的细胞表面上; 4) 通过克服动力学效能极限来提高效能。在特定的实施方式中,为了制备具有一些或所有这些改善的性质的PIE12-2三聚体,可以使用定制设计的异源四聚体PEG支架。该支架通常具有三个臂,所述臂具有一类反应基团(例如,NHS酯),用于连接所述PIE D-肽。第四个基团通常具有较长的PEG臂,具有与其他三个臂正交的反应性基团(例如,如果三个臂具有NHS酯,则为马来酰亚胺)。该模块化的异源四聚体支架的设计允许直接修饰任何PEG臂的长度,并且显著简化具有附接的增强效能的载荷的三聚体PIE D-肽的合成。以下是用于PIE12三聚体的异源四聚体PEG支架的实例(参见US2014/0323392)。该支架基于3-{2-氨基-3-(2-羧基乙氧基)-2-[(2-羧基乙氧基)甲基]丙氧基}丙酸支架,其也被本申请公开的CPT24化合物所用。

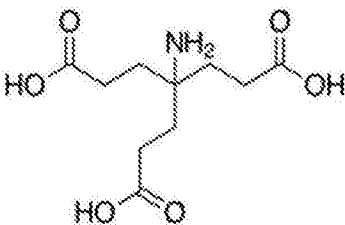
[0096]



[0097] 在某些实施方式中,本发明公开的组合物包含多聚体支架,例如异源四聚体支架,其可被修饰成包含增强效能的载荷分子。如本申请所使用,增强效能的载荷分子是增强本申请公开的组合物的效能的载荷分子。在一些实施方式中,增强效能的载荷分子包含具有药代动力学增强特性的载荷分子。在其他实施方式中,增强效能的载荷包含具有膜定位特性的载荷分子。在特定的实施方式中,所述增强效能的载荷分子可以包含增强药代动力学的载荷分子,其包括能降低附着肽清除率的任何基团。例如,本申请公开了包含具有增强效能的载荷分子的多聚体支架的组合物,其中所述增强效能的载荷分子是甾醇(例如胆固醇)或其类似物(例如硫代胆固醇)、白蛋白、聚乙二醇(例如,线性或分支的)、糖、麦芽糖结合蛋白、血清白蛋白、泛素、链霉亲和素、免疫球蛋白结构域、匙孔血蓝蛋白、抹香鲸肌球蛋白、牛胰蛋白酶抑制剂、绿色荧光蛋白、金颗粒、磁性颗粒、琼脂糖珠、乳糖珠、烷烃链(例如,C8、C16、C18烷烃链)或脂肪酸(例如,C8脂肪酸、C16脂肪酸、C18脂肪酸、棕榈酸酯)。在其他实施方式中,所述增强效能的载荷分子可以是多个多聚体的连接,例如多个三聚体的连接(以增加分子量和减少肾过滤)。在某些实施方式中,胆甾醇氯甲酸酯前体与所述多聚体支架连接。因此,例如,本申请公开了包含一种或多种D-肽PIE12-2肽、多聚体支架和增强效能的载荷分子的组合物,其中所述增强效能的载荷分子是胆固醇或其类似物。

[0098] 在某些实施方式中,本申请公开的组合物包括具有多聚体支架的PIE12-2多聚体(例如,三聚体),所述多聚体支架基于如图所示的4-氨基-4-(2-羧乙基)庚二酸:

[0099]

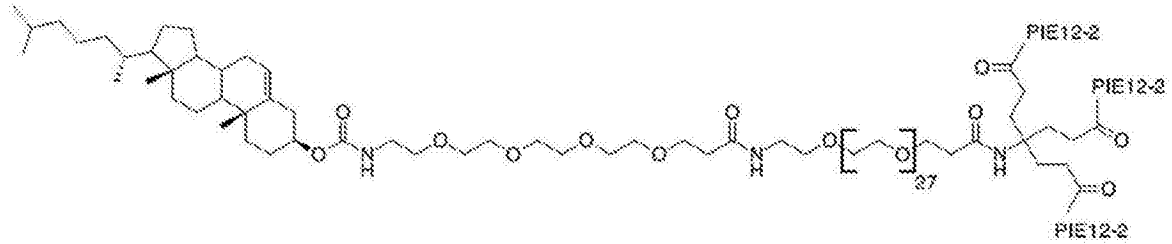


[0100] 所述4-氨基-4-(2-羧乙基)庚二酸多聚体支架由本申请公开的CPT31化合物使用。所述4-氨基-4-(2-羧乙基)庚二酸多聚体支架和3-{2-氨基-3-(2-羧乙氧基)-2-[(2-羧乙氧基)甲基]丙氧基}丙酸多聚体支架均包含四面体的碳核心(图5)。然而,对4-氨基-4-(2-羧乙基)庚二酸多聚体支架的使用使得能以较低成本进行大规模合成。

[0101] 在某些实施方式中,本申请公开的PIE12-2多聚体包含的每个PIE12-2D-肽与包含三个臂的多聚体支架的臂,经由酰胺键,连接在所述PIE12-2D-肽的C-末端D-赖氨酸的ε氨基基团和所述多聚体支架的所述臂的羧基之间,其中所述多聚体支架基于4-氨基-4-(2-羧乙基)庚二酸。

[0102] 在特定的实施方式中,本申请公开的组合物包括至少一个具有增强药代动力学的载荷的PIE12-2三聚体,其具有以下结构:

[0103]



[0104] (也被称为CPT31)

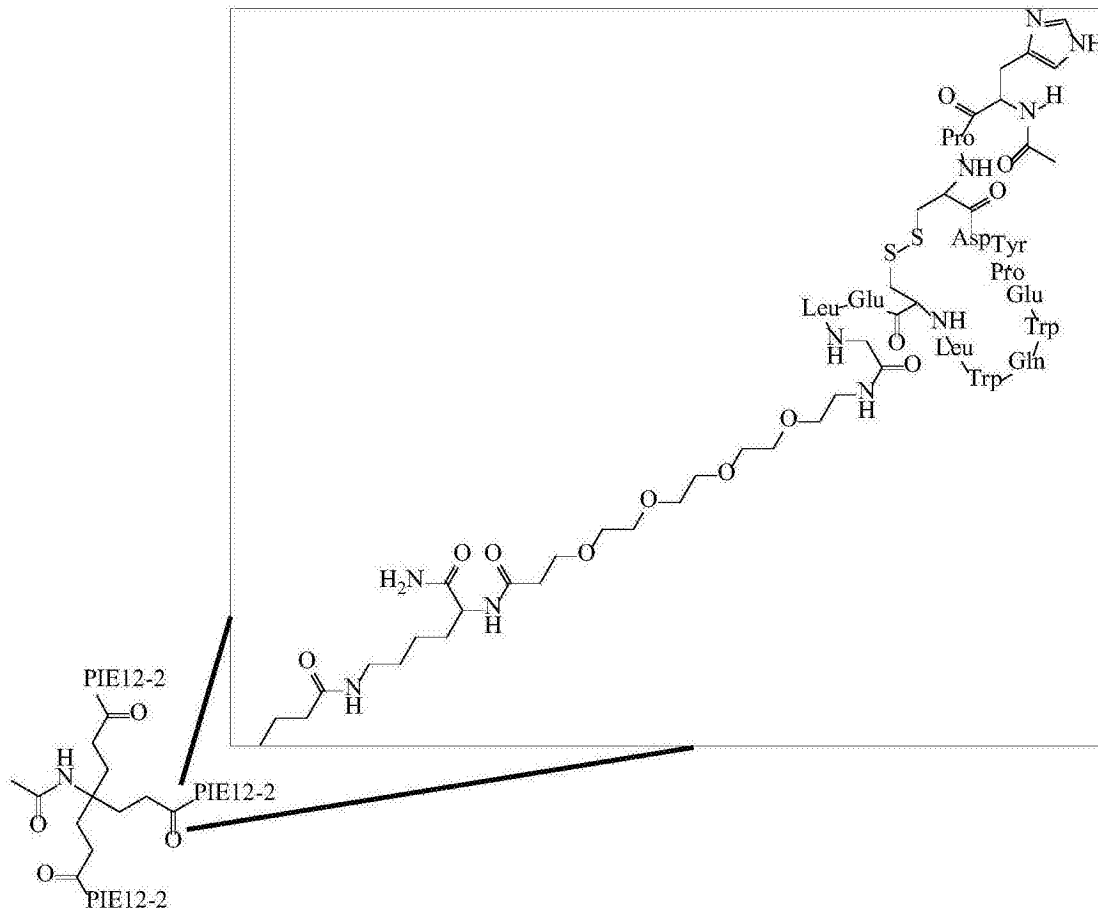
[0105] CPT31的单各向同性分子量为9029.37Da,化学式为 $C_{423}H_{637}N_{75}O_{129}S_6$ 。

[0106] 如前所述,PIE12-2的肽序列是PIE12的变体。PIE12三聚体CPT24(硫代胆固醇-PEG24-PIE12三聚体)使用PEG4间隔区经由在C-末端D-赖氨酸一侧的 ϵ 氨基基团处的酰胺键与每个PIE12 (SEQ ID NO:1) 单体连接,由此产生“PIE12-PEG4” (SEQ ID NO:2)。PIE12-PEG4的连接通过PEG4的末端氨基基团与支架的羧基基团之间的缩合实现,产生酰胺键(图4A)。PIE12-PEG4的合成在合成上更复杂。因此,肽的产率更低,并且合成需要在C-末端D-赖氨酸处进行非标准氨基酸侧链保护。通过将所述PEG4接头移动到所述C-末端D-赖氨酸和相邻甘氨酸之间的肽骨架中来产生PIE12-2。因此,通过缩合(图4B),经由在C-末端D-赖氨酸的 ϵ 氨基基团与支架的羧基之间形成酰胺键来实现PIE12-2与支架的连接,无需使用正交Lys保护基团。

[0107] 在其他实施方式中,可以将包含2、3、5、6、7或8个乙二醇重复单元的PEG接头插入到在PIE12-2肽的甘氨酸残基和C末端赖氨酸残基之间的PIE12-2臂中。

[0108] 在某些实施方式中,本申请公开的PIE12-2多聚体包含PIE12-2D-肽以及与多聚体支架的连接,如以下结构所示:

[0109]



[0110] 本申请还公开了PEG接头。在某些实施方式中,产生多聚体的所述PEG化可以产生不同长度的PEG接头。在特定的实施方式中,使用这种PEG接头在增强效能的载荷分子(例如胆固醇)和D-肽口袋特异性的进入抑制剂(例如,PIÉ12-2单体,PIÉ12-2多聚体)之间提供空间。应当理解并在本申请中预期,所述PEG接头的长度可以提高所述组合物的IC₅₀和半衰期。然而,接头太笨重也会产生不利的效应。因此,本申请公开了这样的组合物,其中所述PEG接头是在增强效能的载荷分子和D-肽口袋特异性的进入抑制剂之间的接头,所述PEG接头包含12-132个,或优选地,24-48个乙二醇重复单元。在某些实施方式中,所述PEG接头可以总共具有12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、或132个乙二醇重复单元。所述PEG接头可以由单个PEG链或串联的第一PEG链和第二PEG链组成。可以使用本领域已知的各种化学物质使所述增强效能的载荷分子(例如胆固醇)与所述PEG链缀合。例如,胆固醇可以经由氨基甲酸酯与PEG链缀合,所述氨基甲酸酯通过卤化甲酸胆固醇(例如,胆甾醇氯甲酸酯)与胺反应形成。在另一个实例中,胆固醇可以通过酰胺与所述PEG链缀合,所述酰胺通过羧酸胆固醇和胺之间的缩合形成。在另一个实例中,胆固醇可以通过酰胺与PEG链缀合,所述酰胺由胆固醇-NHS或任何

其他活性酯(例如PFP)形成。在另一个实例中,胆固醇可以通过酰胺与所述PEG链缀合,所述酰胺通过酮与胺(异脲)反应形成。在另一个实例中,胆固醇可以经由硫醚键与所述PEG链缀合,所述硫醚键通过硫醇(例如硫代胆固醇)与马来酰亚胺酯的反应形成。在另一个实例中,胆固醇可以经由醚键与所述PEG链缀合,例如经由胆固醇-PEG上的末端羟基和所述多聚体支架的第四臂的所述PEG接头之间的脱水反应。在又一个实例中,胆固醇可以经由点击化学与所述PEG链缀合,例如叠氮化物和炔烃之间的Huisgen 1,3-二环环加成反应。在某些实施方式中,经由所述PEG接头将所述胆固醇部分添加至所述多聚体支架的第四臂不产生立体异构体。

[0111] 如前所述的CPT24化合物(参见US2014/0323392)使用连续的PEG24链将硫代胆固醇加入到PIE12三聚体支架中(图3A)。如本申请所公开的,示例性PIE12-2三聚体在所述第四臂使用两个串联的PEG链,将增强效能的载荷分子连接至所述多聚体支架(图3B)。该变化显著提高了在添加胆固醇之前纯化所述肽三聚体的能力,导致产率和纯度提高。在某些实施方式中,PIE12-2三聚体包含第四臂,所述第四臂经由串联连接的第一和第二聚乙二醇(PEG)链将增强效能的载荷分子(例如,胆固醇部分)连接至所述多聚体支架,其中所述第四臂中来自所述第一和第二PEG链的乙二醇重复单元的总数范围为12至132或24至48。在某些实施方式中,所述第四臂中来自所述第一和第二PEG链的乙二醇重复单元的总数为12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131或132。因此,对于总共32个乙二醇重复单元,本申请分别公开了包含31、30、29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个乙二醇重复单元的第一PEG链和包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30或31个乙二醇重复单元的第二PEG链。在一个具体的实施方式中,所述第一PEG链包含28个乙二醇重复单元,并且所述第二PEG链包含4个乙二醇重复单元。除非另有说明,否则应理解,包含“n”个乙二醇重复单元的PEG链被称为PEG_n。例如,PEG₄是指具有4个乙二醇重复单元的PEG链。

[0112] 先前的PIE三聚体支架经由第四PEG臂使用马来酰亚胺酯与硫代胆固醇连接。马来酰亚胺酯是有问题的,因为硫代胆固醇能够在马来酰亚胺环的C3或C4处发生反应,产生非常难以分离的立体异构体。此外,马来酰亚胺酯可以经过碱依赖性开环反应以产生线性的5-碳链。相反,包含多聚体支架(例如,4-氨基-4-(2-羧乙基)庚二酸)的示例性PIE12-2三聚体利用胆甾醇氯甲酸酯前体,其与所述第四臂PEG链的末端氨基反应以产生胆固醇氨基甲酸酯键连接(图3B)。该连接不会产生立体中心,并且不会发生降解而产生不想要的副产物。在所述利用多聚体支架的PIE12-2三聚体的某些实施方式中,所述胆固醇部分在所述多聚体支架的所述第四臂上的存在不产生立体异构体。

[0113] 在某些实施方式中,所述第一PEG链经由酰胺键与所述多聚体支架连接。在某些实施方式中,所述第二PEG链经由酰胺键与所述第一PEG链连接。在某些实施方式中,第一或第二PEG链或两者都包含NHS酯基团,用于产生所述酰胺键连接。所述胆固醇部分可以经由氨

基甲酸酯键连接与所述第二PEG链连接。

[0114] 在某些实施方式中,在所述胆固醇部分与第二PEG链连接之前,将所述第一PEG链与所述PIE12-2多聚体支架连接。在另一个实施方式中,其中在将所述第一PEG链连接至所述多聚体支架后,于所述胆固醇部分和第二PEG链连接之前纯化所述组合物。

[0115] 因此,应当理解,所公开的组合物可包含本申请公开的所有特征的集合(culmination),例如一个或多个D-肽,多聚体支架,增强效能的载荷,以及D-肽侧翼区的修饰,以及PEG接头。因此,本申请公开了包含一个或多个D-肽以及增强效能的载荷的组合物,其中所述一个或多个D-肽通过多聚体支架连接,其中所述多聚体支架任选地经由PEG接头与所述D-肽连接,并且其中所述增强效能的载荷经由PEG接头连接至所述多聚体支架。

[0116] 如本申请所公开的多聚体支架可用于基于多聚体支架的针对多聚体D-肽药物优化(肽的几何形状和经由缀合的定位载荷定位至作用位点)的设计方法。在某些实施方式中,基于多聚体支架的设计允许支架中进行改变以适应各种载荷和化学反应(例如,“点击”化学),以及快速优化PEG臂长度。例如,对于在内涵体内经历膜融合的病毒(如HIV和埃博拉病毒)来说,本申请公开的基于多聚体支架的策略可用于鉴定和连接靶向内涵体部分以将抑制剂定位至病毒进入的位点,并提升抑制剂的效能。另外,本申请所公开的基于多聚体支架策略的特定实施方式可以允许鉴定以及缀合至各种增强效能的载荷,以调节药代动力学性质(例如,大的枝化PEG,白蛋白或白蛋白结合肽)和膜定位。

[0117] 多聚体的亲和力

[0118] 本申请公开了包含如本申请公开的PIE12-2多聚体和N-三聚体分子的组合物,其中当所述多聚体与所述N-三聚体分子结合时,其对所述N-三聚体分子具有更高的亲和力,相较于单肽或对照肽对所述N-三聚体分子的亲和力而言。所述单肽或对照肽可以与所述多聚体的一个组分相同,或者所述单肽可以是不包含在所述多聚体中的不同的肽。

[0119] 相较于所述多聚体的单独一个组分的亲和力,所述多聚体可显示出对所述N-三聚体的亲和力提升约2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、20倍、25倍、30倍、40倍、50倍、100倍、200倍、300倍、400倍、500倍、1000倍、2000倍、3000倍、4000倍、5000倍或10,000倍。

[0120] 所述多聚体可具有本申请公开的任何特征或性质。本申请公开的任何多聚体都能够具有如本申请所述的亲合力,并且它们中的任何一种都可以与本申请公开的方法一起使用以增强抑制病毒进入。

[0121] 药物组合物

[0122] 本申请公开的PIE12-2肽及其多聚体(例如,CPT31)(或者称为组合物)也可以在药学上可接受的载体进行体内施用。“药学上可接受的”是指非生物学上或其它方面不良的材料,即,所述材料可与本申请公开的肽一起施用于受试者,同时不会引起任何不良的生物学效应或者以有害的方式与所述含有它的药物组合物的任何其他组分相互作用。如本领域技术人员所熟知的,天然地选择载体以使所述活性成分的任何降解最小化,并使所述受试者中的任何不良副作用最小化。

[0123] 所述组合物可以口服、胃肠外(例如,静脉内)、通过肌肉注射、通过腹腔内注射、通过皮下注射、透皮、体外、局部施用等,包括局部鼻内施用或吸入施用。如本申请使用的“局部鼻内施用”是指通过一个或两个鼻孔将所述组合物递送进入鼻和鼻通道中,并且可包括通过喷雾机制或液滴机制,或通过雾化递送。通过吸入剂施用所述组合物可经由通过喷雾

或液滴机制的递送而通过鼻或口。通过插管也可直接递送到呼吸系统的任何区域(例如,肺)。所需组合物的确切的量会因受试者而异,取决于受试者的种属,年龄,体重和一般状况,疾病的严重程度,其施用方式等。因此,不可能为每种组合物指定确切的量。然而,考虑到本申请中的教导,本领域普通技术人员可以仅使用常规实验来确定适当的量。

[0124] 所述组合物的肠胃外施用(如果使用的话)通常以注射为特征。注射剂可以常规形式制备,可以是液体溶液或悬浮液,适于注射前在液体中悬浮溶液的固体形式,或者是乳液。最近更新的肠胃外施用的方法涉及使用缓慢释放或持续释放系统(即贮库),以使得保持恒定的剂量。参见,例如,美国专利号3,610,795,其通过引用并入本申请。

[0125] 所述组合物,包括PIE12-2肽及其多聚体(例如CPT31),可以在治疗上与药学上可接受的载体结合使用。合适的载体及其制剂描述在Remington:The Science and Practice of Pharmacy (第19版) ed.A.R.Gennaro,Mack Publishing Company,Easton,PA 1995。通常,在所述制剂中使用适量的药学上可接受的盐以使所述制剂等渗。所述药学上可接受的载体的实例包括,但不限于,盐水,林格氏溶液和右旋糖溶液。所述溶液的pH可以从约5至约8,以及可选地从约7至约7.5。其他的载体包括持续释放制剂,例如含有抗体的固体疏水聚合物的半透性基质,所述基质是成形制品的形式,例如薄膜、脂质体或微粒。对于本领域技术人员显而易见的是,某些载体可能是更优选的,这取决于例如施用途径和所施用的组合物的浓度。

[0126] 药物载体是本领域技术人员已知的。最典型的是施用于人的药物的标准载体,包括诸如无菌水、盐水和生理pH下缓冲溶液的溶液。所述组合物可以肌肉内或皮下施用。其他化合物将根据本领域技术人员使用的标准程序来施用。

[0127] 除选择的分子外,药物组合物还可包括载体、增稠剂、稀释剂、缓冲剂、防腐剂、表面活性剂等。药物组合物还可包含一种或多种活性成分,例如抗微生物剂、抗炎剂、麻醉剂等。

[0128] 所述药物组合物可以多种方式施用,这取决于是否需要局部或全身治疗,以及待治疗区域。施用可以是局部(包括眼部、阴道、直肠、鼻内施用)、口服、通过吸入、或肠胃外施用,例如通过静脉内滴注、皮下、腹腔内或肌肉注射。所公开的肽及其多聚体可以静脉内、腹腔内、肌肉内、皮下、腔内或透皮的方式施用。

[0129] 肠胃外施用的制剂包括无菌水溶液或非水溶液、悬浮液和乳液。非水溶剂的实例是丙二醇、聚乙二醇、植物油如橄榄油、以及可注射的有机酯如油酸乙酯。水性的载体包括水、醇/水溶液、乳液或悬浮液,包括盐水和缓冲介质。肠胃外载体包括氯化钠溶液、林格氏右旋糖、右旋糖和氯化钠、乳酸林格氏液或固定油。静脉内载体包括液体和营养补充剂、电解质补充剂(例如基于林格氏右旋糖的补充剂)等。还可以存在防腐剂和其他添加剂,例如抗微生物剂、抗氧化剂、螯合剂和惰性气体等。

[0130] 用于局部施用的制剂可包括软膏、洗剂、乳膏、凝胶、滴剂、栓剂、喷雾剂、液体和粉末。常规的药物载体,水性的、粉末的或油性的基质,增稠剂等可能是必需的或想要的。

[0131] 用于口服施用的组合物包括粉末或颗粒、在水或非水介质中的悬浮液或溶液、胶囊、小药囊或片剂。可能需要增稠剂、调味剂、稀释剂、乳化剂、助分散剂或粘合剂。另外,本申请认为,针对口服施用而设计的组合物可进一步包含肠渗透剂。

[0132] 一些组合物可以作为药学上可接受的酸-或碱-加成盐而施用,所述酸-或碱-加成

盐通过与无机酸(如盐酸、氢溴酸、高氯酸、硝酸、硫氰酸、硫酸和磷酸)和有机酸(如甲酸、乙酸、丙酸、乙醇酸、乳酸、丙酮酸、草酸、丙二酸、琥珀酸、马来酸和富马酸)反应形成,或通过与无机碱(如氢氧化钠、氢氧化铵、氢氧化钾)和有机碱(如单、二、三烷基和芳基胺以及取代的乙醇胺)反应形成。

[0133] 治疗用途

[0134] 用于施用本申请公开的组合物(包括本申请公开的PIE12-2肽及其多聚体(例如, CPT31))的有效剂量和时间表可凭经验确定,并且进行此类确定是在本领域技术范围内。用于施用所述组合物的剂量范围足够大,以能够产生影响症状/病症的所需效果。剂量不应大到引起不良的副作用,例如不希望的交叉反应、过敏反应等。通常,所述剂量将随着患者的年龄、状况、性别和患病程度,施用途径,或者在所述给药方案中是否包括其他药物而变化,并且可以由本领域技术人员确定。在有任何禁忌症的情况下,各个医生可以调整所述剂量。剂量可以变化,并且可以每天一次或多次给药进行施用,持续一天或几天。对于给定类别的药物产品,特别是D-肽,可以在文献中找到关于适当剂量的指导。在整个文献中可以找到这种指导的实例。例如,已经被FDA批准的肽FUZEON®可以作为本申请公开的肽所需剂量的指导。在一个实施方式中,单独使用的肽或其多聚体的通常日剂量的范围可以是每天约1 μ g/kg至高达100mg/kg体重或更多,这取决于上述因素。此外,本申请公开的肽可以每天、每天、每周、每月或每年施用数次,这取决于受试者的状况、其他治疗模式等。本领域技术人员可以容易地确定合适的给药时间表。

[0135] 在施用公开的组合物(例如用于治疗、抑制或预防病毒(如HIV)感染的肽)后,可以用本领域技术人员熟知的各种方法评估肽或其多聚体的功效。例如,通过观察组合物抑制病毒进入,本领域普通技术人员将理解,本申请公开的组合物(例如D-肽)能有效治疗或抑制受试者的病毒感染。还可以通过测定受感染的受试者中未感染细胞的数量来确定施用所公开组合物的功效。这样的治疗是有效的治疗:其抑制受试者或患者中未感染细胞初始或进一步减少,或导致例如HIV阳性受试者中未感染细胞数量增加。预防性治疗(即预防性试剂)的功效也可以通过使用间接感染测定法来评估,例如CD4+细胞计数,抗病毒抗体水平,以及用于检测病毒RNA水平的PCR。

[0136] 本申请公开的抑制HIV进入的组合物,即微生物杀灭剂,可以预防性地施用给处于正暴露于HIV风险的或已经刚刚暴露于HIV的患者或受试者。在已经刚刚暴露于病毒(如HIV)但尚未在血液或其他体液中显示病毒存在(通过PCR或其他检测病毒的测试法测得)的受试者中,用肽或其多聚体进行治疗包括向所述受试者施用治疗有效剂量的如本申请所述的组合物、肽或多聚体,使得所述病毒感染细胞的能力被部分或完全地抑制。

[0137] 所公开的肽可用于通过抑制HIV跨膜蛋白来抑制HIV进入。术语“抑制HIV跨膜蛋白”是指减少能够进入宿主细胞的HIV颗粒数量。它可以表示完全抑制,换句话说,没有病毒颗粒能够进入细胞,或者其可以表示部分抑制,是指在给定系统中,当与未治疗系统或对照比较时,能够进入细胞的HIV颗粒的数量减少。能够进入细胞的HIV颗粒数量可以有1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、

68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的减少,或任何更大、更少的量,或在这些量之间。另外,“抑制HIV进入”表示减少HIV病毒粒子融合和进入宿主细胞。

[0138] 制备组合物的方法

[0139] 除非另外特别说明,否则本申请公开的组合物和执行所公开方法所必需的组合物可以使用本领域技术人员已知的针对特定试剂或化合物的任何方法制备。

[0140] 本申请公开的肽可以例如通过二硫键交联连接。例如,本申请公开的D-肽具有通过二硫键连接的两个Cys残基,其使所述肽环化并产生更坚实和结构化的肽。已知这种二硫化物具有增强的抗病毒性质。有许多用于环化肽的本领域技术人员已知的替代方法。例如,可以使用内酰胺或其他化学桥连,PEG或其他化学交联剂,肽连接或二硫键(硒代半胱氨酸之间)来环化肽。

[0141] 也可通过蛋白质化学技术将两个或更多个肽或多肽连接在一起。例如,可以使用目前可用的实验室设备,使用FMOC(9-芴基甲氧基羰基)或Boc(叔丁氧基羰基)化学来化学合成肽或多肽。(Applied Biosystems, Inc., 福斯特城, 加利福尼亚州)。本领域技术人员可以容易地理解,对应于所公开的蛋白质的肽或多肽例如,可以通过标准化学反应合成。例如,可以合成肽或多肽并且不将其从其合成树脂解离下来,但是可以合成肽或蛋白质的另一个片段并随后将其从树脂上解离下来,进而暴露出在另一片段上被功能性封闭的末端基团。通过肽缩合反应,这两个片段可以分别经由其羧基和氨基末端处的肽键共价连接,以形成抗体或其片段。(Grant GA (1992) *Synthetic Peptides: A User Guide*. W.H. Freeman and Co., N.Y. (1992); Bodansky M and Trost B., Ed. (1993) *Principles of Peptide Synthesis*. SpringerVerlag Inc., NY (该文献至少与肽合成有关的部分通过引用并入本申请)。一旦解离,这些独立的肽或多肽可以经由类似的肽缩合反应连接形成肽或其片段。

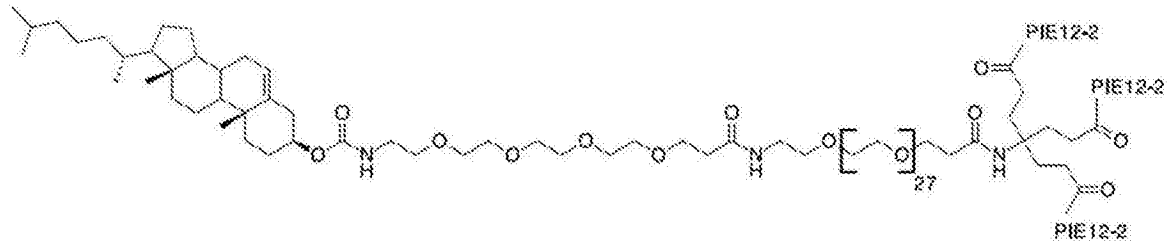
[0142] 例如,克隆或合成肽片段的酶促连接允许相对短的肽片段连接以产生更大的肽片段、多肽或完整的蛋白质结构域 (Abrahmsen L et al., *Biochemistry*, 30:4151 (1991))。或者,合成肽的天然化学连接可用于从较短的肽片段合成构建大的肽或多肽。该方法由两步化学反应组成 (Dawson et al. *Synthesis of Proteins by Native Chemical Ligation*. *Science*, 266:776779 (1994))。第一步是未保护的合成肽硫酯与另一个含有氨基末端Cys残基的未保护肽片段的化学选择性反应,以得到硫酯连接的中间体作为初始共价产物。在不改变反应条件的情况下,该中间体经历自发的快速分子内反应以在连接位点形成天然肽键 (Baggiolini M et al. (1992) *FEBS Lett.* 307:97-101; ClarkLewis I et al., *J. Biol. Chem.*, 269:16075 (1994); ClarkLewis I et al., *Biochemistry*, 30:3128 (1991); Rajarathnam K et al., *Biochemistry* 33:6623-30 (1994))。

[0143] 或者,未保护的肽区段是化学连接的,其中由于化学连接而在肽区段之间形成的键是非天然(非肽)键 (Schnolzer, M et al. *Science*, 256:221 (1992))。该技术已被用于合成蛋白质结构域类似物以及具有完全生物活性的大量相对纯的蛋白质 (deLisle Milton RC et al., *Techniques in Protein Chemistry IV*. Academic Press, New York, pp. 257267 (1992))。

[0144] 镜像噬菌体展示可用于发现与N-三聚体口袋结合并以适度的效力抑制HIV-1进入的D-肽。例如,在使用镜像噬菌体展示筛选D-肽时,可以从HIV糖蛋白的第一L-肽合成第一D-肽。所述第一L-肽可以是天然存在的L-肽,或者可以是设计的肽序列和天然肽序列的嵌合体。该方法可以进一步包括筛选特异性结合所述第一D-肽的第二L-肽;然后,可以合成与所述第二L-肽为镜像的第二D-肽。在本申请所述的D-肽筛选方法的一个方面,可首先用D-氨基酸合成N-三聚体靶标,产生天然L-N-三聚体靶标的镜像。D-N-三聚体靶标可用于标准的基于肽的筛选如噬菌体展示、核糖体展示和/或CIS展示,以鉴定与D-N-三聚体结合的L-肽。然后可以用D-氨基酸合成鉴定的L-肽。根据对称定律,所得的D-肽结合天然L-N-三聚体,并因此靶向HIV前发夹中间体的N-三聚体区域,从而治疗或抑制HIV感染。该筛选方法还描述于Schumacher, et al., Identification of D-peptide ligands through mirror-image phage display, Science, 1996 Mar 29; 271 (5257): 1854-7中,其通过引用整体并入本申请。

[0145] 本发明还提供了合成具有以下结构的三聚体D-肽-胆固醇缀合物的方法,

[0146]



[0147] (也称为CPT31)

[0148] 其中所述方法包括图6中所示的步骤。合成方法的进一步细节也在本申请所述的实施例中列出。

[0149] 抑制病毒进入的方法

[0150] 本申请公开了抑制HIV传播或进入宿主细胞,或抑制HIV进入的方法,包括将HIV暴露于本申请公开的组合物、PIE12-2肽或其多聚体(例如,CPT31),从而抑制HIV传播进所述宿主细胞。在某些实施方式中,所述宿主细胞是人。本申请还公开了治疗受试者中HIV感染的方法,包括向所述受试者施用有效量的本申请公开的组合物、PIE12-2肽或多聚体(例如CPT31),从而治疗HIV感染。HIV病毒的实例包括HIV-1和HIV-2。所述肽或多聚体可以在药物组合物中。还公开了施用本申请所述的药物组合物的方法。

[0151] 本申请公开的方法可以与其他病毒疗法或抗病毒剂联合使用。可以使用这些抗病毒剂中的一种或多种,并且它们可以在用本申请公开的组合物治疗之前、期间或之后施用。例如,在正在进行治疗中,本申请包含的组合物可以与其他治疗剂同时施用于所述受试者,这意味着它们可以在用所公开的组合物治疗前约48小时,24小时,12小时,8小时,4小时,2小时,1小时,30分钟,20分钟,10分钟,5分钟或1分钟进行施用。其他治疗方法也可在用本申请公开的组合物治疗之前施用。“治疗前”是指给予另一种形式的治疗,然后在施用当前治疗之前停止,或者可以在此之前立即给予,然后之后再次施用。在这种情况下,抗病毒治疗的其他方法可以提前数年、数月、数周、数天、数小时或数分钟进行施用。其他治疗方法也可在用本申请公开的组合物治疗后施用。“治疗后”是指在施用当前治疗后施用另一种形式的治疗,或者可以在之前施用,然后之后再次施用。在给予当前治疗的数年、数月、数周、

数天、数小时或数分钟后,给予这种额外的抗病毒治疗。

[0152] 其他的一种或多种抗病毒剂可选自病毒复制抑制剂、病毒蛋白酶抑制剂、病毒逆转录酶抑制剂、病毒进入抑制剂、病毒整合酶抑制剂、病毒Rev抑制剂、病毒Tat抑制剂、病毒Nef抑制剂、病毒Vpr抑制剂、病毒Vpu抑制剂或病毒Vif抑制剂。

[0153] 抗病毒化合物的其他实例包括,但不限于,金刚烷胺、金刚乙胺、扎那米韦和奥司他韦(达菲),用于治疗流感及其相关症状。用于治疗HIV的抗病毒化合物包括Combivir®(拉米夫定-齐多夫定)、CRIVAN®(茚地那韦)、EMTRIVA®(恩曲他滨)、EPIVIR®(拉米夫定)、FORTOVASE®(沙奎那韦-sg)、HIVID®(扎西他滨)、INVIRASE®(沙奎那韦-hg)、KALETRA®(洛匹那韦-利托那韦)、LEXIVATM(福沙那韦)、NORVIR®(利托那韦)、RITROVIR®(齐多夫定)、SUSTIVA®(依法韦仑)、VIDEXEC®(地丹诺辛)、VIDEX®(地丹诺辛)、VIRACEPT®(奈非那韦)、VIRAMUNE®(奈韦拉平)、ZERIT®(司他夫定)、ZIAGEN®(阿巴卡韦)、FUZEON®(恩夫韦肽)、RESCRIPTOR®(地拉夫定)、REYATAZ®(阿扎那韦)、TRIZIVIR®(阿巴卡韦-拉米夫定-齐多夫定)、VIREAD®(富马酸替诺福韦二吡呋酯)、ISENTRESS®(拉替拉韦)、SELZENTRY®(马拉维若)和AGENERASE®(安瑞那韦)。

实施例

[0154] 实施例1

[0155] 材料和方法

[0156] PIE12-三聚体和PIE12-三聚体缀合物的合成

[0157] PIE12(Ac-HPCDYPEWQWLCELGK)由RS Synthesis(路易斯维尔,肯塔基州)合成。如前所述合成了PIE12-三聚体和马来酰亚胺-PEG24-PIE12-三聚体(参见Francis et al., 2012, Bioconjug. Chem. 23:1252-1258, 美国专利公开2014/0323392, 其各自通过引用整体并入本申请)。以相似的方式,通过将马来酰亚胺-PEG24-PIE12-三聚体(3mM)分别与4.5mM 硫代胆固醇(Sigma Aldrich#136115), 1-辛硫醇(4.5mM, Sigma Aldrich#471836), 1-十六烷硫醇(4.5mM, Sigma Aldrich#52270)或1-十八烷硫醇(4.5mM, Sigma Aldrich#01858)在含有Et₃N(200mM)的二甲基乙酰胺(DMAC)中室温反应60分钟,合成缀合了胆固醇(具有PEG24第四臂间隔区的胆固醇-PIE12-三聚体, CPT24)、C8、C16或C18的PIE12-三聚体,然后通过RP-HPLC纯化。通过首先将马来酰亚胺-PEG24-PIE12-三聚体(3mM)与D-半胱氨酸(4.5mM)在含有Et₃N(200mM)的DMAC中室温反应60分钟合成棕榈酸酯缀合的PIE12-三聚体,然后通过RP-HPLC纯化。然后将得到的产物Cys-PEG24-PIE12-三聚体(2mM)与棕榈酸NHS酯(5mM, Sigma Aldrich#P1162)在含有Et₃N(500mM)的DMAC中室温反应45min,然后通过RP-HPLC纯化。通过将Cys-PEG24-PIE12-三聚体(2mM)与NHS-PEG4-NHS(ChemPep#281903)反应,随后依次与2.5mM 40kDa的Y枝化的PEG-胺(JenKem, A0010)反应,合成40kD PEG-PEG24-PIE12三聚体(PEG40-PIE12三聚体),然后通过RP-HPLC纯化。

[0158] FMOC-PEG28-triNHS的合成

[0159] 将FMOC-PEG28-COOH(Polypure, #15137-2790, 10mmoles)、氨基三酯(Frontier Scientific, #NTN1963, 11mmoles)和1-羟基-7-氮杂苯并三唑(Aapptec, CXZ012, 9.8mmoles)悬浮于20ml二氯甲烷中。在加入N,N'-二环己基碳二亚胺(Sigma Aldrich,

D80002, 9.8mmoles), 将该溶液置于冰上并搅拌20分钟。将该反应在冰上搅拌30分钟, 然后在搅拌下升温至室温持续12小时, 然后使用二氯甲烷中的乙醇梯度通过快速色谱法 (Biotage Zip柱) 进行纯化。然后通过旋转蒸发干燥所得产物, 得到粘稠的琥珀色油状物。然后将其溶于二氯甲烷 (5ml/g) 中并在搅拌下置于冰上。向其中逐滴加入20当量的三氟乙酸, 搅拌反应30分钟, 然后升温至室温。3小时后, 使用在乙腈中梯度混合的水, 通过反相色谱法 (Biotage C18快速柱) 纯化所述反应。将所得产物冻干, 然后从甲苯中反复干燥。将得到的FMOC-PEG28-三酸悬浮在乙腈中至浓度为500mM, 向其中加入N,N'-二琥珀酰亚胺基碳酸酯 (Sigma Aldrich, #225827) 至1650mM, 然后加入三乙胺至400mM。将反应在45°C下搅拌45分钟, 然后使用在二氯甲烷中梯度混合的乙醇用快速色谱法 (Biotage ZIP柱) 纯化。

[0160] 胆固醇-PEG4-NHS的合成

[0161] 将FMOC-PEG4-COOH (ChemPep, #280109) 悬浮在二氯甲烷中至浓度为200mM。向其中加入5当量的N,N-二异丙基乙胺 (DIPEA, Sigma Aldrich), 然后将该溶液加入至2-氯三苯甲基氯树脂 (Aapptec, #RTZ001) 中。将混合物在氩气下搅拌2小时, 然后用二氯甲烷 (3x) 洗涤, 接着用二氯甲烷: 甲醇: DIPEA (17:2:1) 洗涤, 然后用二氯甲烷 (3x) 洗涤。向其中加入二甲基甲酰胺: 二氯甲烷: 吡啶 (1:1:1) 的溶液以除去FMOC保护基团, 并且该反应在氩气下搅拌40分钟, 然后用二甲基甲酰胺洗涤, 然后用二甲基甲酰胺: 二氯甲烷 (1:1) 洗涤, 然后用二氯甲烷洗涤。向树脂中加入2当量的胆甾醇氯甲酸酯 (Sigma Aldrich, #C77007) 和3当量的DIPEA的二氯甲烷溶液。将该反应在氩气下搅拌12小时, 然后用二氯甲烷洗涤。解离胆固醇基-PEG4-COOH是在100ml 5%三氟乙酸 (TFA) 的二氯甲烷溶液中进行, 同时搅拌2小时。通过旋转蒸发干燥所得溶液, 然后通过快速色谱法 (Biotage ZIP球柱) 使用在二氯甲烷中梯度混合的乙醇进行纯化。

[0162] 然后将胆固醇基-PEG4-COOH溶解在乙腈中至浓度为800mM, 然后加入1.1当量的N,N'-二琥珀酰亚胺基碳酸酯 (Sigma Aldrich, #225827), 接着加入0.8当量的三乙胺。将溶液加热至45°C并搅拌60分钟, 然后通过快速色谱法 (Biotage ZIP球柱) 使用在二氯甲烷中梯度混合的乙醇进行纯化。通过旋转蒸发将所得产物充分干燥, 得到粘稠的黄色油状物。

[0163] CPT31的合成

[0164] PIE12-2单体 (Ac-HPCDYPEWQWLCELG-PEG4-K-NH₂) 由Ambiopharm, Inc. (北奥古斯塔, 南卡罗来纳州) 均使用D-氨基酸合成。将PIE12-2悬浮在用三乙胺 (150mM) 缓冲的二甲基乙酰胺中至浓度为20mM。向其中加入FMOC-PEG28-triNHS至浓度为6.06mM。在室温下反应进行2小时, 然后加入吡啶至30%并且将反应混合40分钟以除去Fmoc基团。然后通过RP-HPLC (Waters X-Bridge C18柱) 纯化NH₂-PEG28-PIE12-2三聚体。将该产物 (10mM) 与胆固醇基-PEG4-NHS (12mM) 在经三乙胺 (150mM) 缓冲的二甲基乙酰胺中反应90分钟, 并通过RP-HPLC (Waters X-Bridge C18柱) 纯化以产生CPT31 (具有PEG32第四臂间隔区的胆固醇-PIE12-2-三聚体)。

[0165] 假病毒颗粒进入测定

[0166] 如前所述进行假病毒颗粒测定 (Welch et al., 2010, J. Virol. 84:11235-44; Welch et al., 2007, Proc. Natl. Acad. Sci. 104:16827-16833, 其各自均通过引用整体并入本申请)。简而言之, 在96孔板的HOS-CD4-CXCR4 (对于HXB2) 或HOS-CD4-CCR5 (对于JRFL) 单层上一式四份地产生每种抑制剂的六点系列稀释, 之后加入HXB2 (X4) 或JRFL (R5) 荧光素酶

报告子的假病毒颗粒。2天后,使用GloLysis缓冲液(Promega)裂解细胞,并加入BrightGlo荧光素酶底物(Promega)。在PolarStar Optima (BMG) 读板仪上读取发光,并将其归一化至未抑制的对照组。绘制抑制曲线并对标准的IC₅₀方程拟合,用于归一化数据 $[(1-c)/(IC_{50}+c)]$,使用KaleidaGraph (Synergy Software) 通过每个点的标准误差对其进行加权。报告的IC₅₀值是至少两个独立的一式四份测定的平均值。

[0167] 广度分析

[0168] 针对HIV-1分离株的国际参考组(NIH AIDS试剂程序)进行了广度分析。在存在8 μ g/ml DEAE右旋糖酐的情况下,针对所检测的59种病毒中的每一种,在96孔板中的T2M-B1细胞单层中测试了1和10nM下的CPT31。将病毒与细胞和抑制剂一起孵育30小时,然后用50 μ l GloLysis缓冲液(Promega)裂解细胞,并加入50 μ l BrightGlo (Promega)。在PolarStar Optima (BMG) 读板仪上读取发光,并将其归一化至未抑制的对照组。报告值是未抑制的值相比的抑制百分比,并且是至少两次独立测定的平均值,每次测定重复4次。

[0169] 啮齿动物药代动力学

[0170] 对于PIE12单体缀合物,由Invitex (海沃德,加利福尼亚州)进行了生命体研究。在Navigen (盐湖城,犹他州)进行了三聚体缀合物的生命体研究。对于每个研究,如表3中所述对三只Sprague Dawley大鼠(0.22-0.44kg)进行给药。在每个时间点,使用肝素锂获取血浆。对于CPT24、CPT24-5kD和CPT31,在Calvert Laboratories Inc. (斯科特乡,宾夕法尼亚州)进行了生命体研究。对每种途径的三只雄性大鼠给药CPT24或CPT24-5kD,其以2mg/mL配制于50mM HEPES (pH7.4)中。对于皮下(SC)和静脉内(IV)施用,均递送了1mg/kg的剂量,并且在IV组的5分钟至24小时以及SC组的15分钟至48小时的时间点收集血浆(K₂EDTA)样品。对于每个途径的两只雄性大鼠给药CPT31,其以2mg/mL配制于50mM HEPES (pH7.4)中。对于皮下和静脉内施用,均递送了1mg/kg的剂量,并且在IV组的5分钟至16小时以及SC组的15分钟至24小时的时间点收集血浆(K₂EDTA)样品。在生物分析之前,于-80 $^{\circ}$ C储存并运输血浆样品。

[0171] 非人灵长类动物药代动力学

[0172] 由Calvert Laboratories (斯科特乡,宾夕法尼亚州)进行了生命体研究。对一组三只雄性食蟹猴(首次给药时为3.4-3.9kg)施用CPT31 (2mg/ml于50mM HEPES中,pH 7.4),以1mg/kg (0.5ml/kg)的剂量单次推注到隐静脉中。在IV给药时,在给药后0.083、0.167、0.25、0.5、1、2、4、8、16和24h收集1ml血液样品到含有K₂EDTA的冷冻管中,倒置混合,并离心(3000rpm,4 $^{\circ}$ C,15min)以分离血浆。将血浆储存在-80 $^{\circ}$ C直至生物分析。

[0173] 在13天的清洗期后,对研究动物以3mg/kg的剂量将单次皮下剂量的CPT31 (10mg/ml于50mM HEPES中,pH7.4)施用到肩胛骨之间的背部松弛皮肤中。在给药前、给药后0.25、0.5、1、2、4、8、16、24和48小时收集血浆样品。如上所述处理收集到的血液样品。给药前的样品证实药物水平低于定量下限(5.00nM)。

[0174] 定量生物分析

[0175] PIE12-三聚体缀合物

[0176] 将内标掺入样品中,然后用两倍体积的98%乙腈/2%甲酸进行沉淀。使用MRM方法,采用与AB Sciex API 3000三重四极杆质谱仪配对的Agilent HPLC系统(Waters X-Bridge BEH C18柱),通过LC/MS/MS分析上清液。脂质缀合物需要较低的源温度(300 $^{\circ}$ C对

500℃)以提高重现性。对于所有的研究,在每组三只大鼠后,通过25%水/25%甲醇/25%异丙醇/25%乙腈等度梯度洗脱30分钟以除去残留的磷脂,从而进行柱再生。

[0177] 每种分析物的质量转变如下:PIE12-三聚体(1431.7/180.1),棕榈酸酯-PEG24-PIE12-三聚体(1466.5/554.4),C16-PEG24-PIE12-三聚体(1450.1/453.4),C18-PEG24-PIE12-三聚体(1454.5/481.3)和胆固醇-PEG24-PIE12-三聚体(1474.2/1694.9)。

[0178] 大鼠血浆-Calvert研究中的CPT24

[0179] 用3倍体积的含有2%甲酸(v/v)和1.56μM作为内标的CPT12的冰冷乙腈沉淀每个时间点的50微升血浆等分样品。离心后,将8μL上清液注射到Poroshell 300 SB-C8柱(2.1x75mm,5μm)(Agilent Technologies)上。使用由含0.2%甲酸的5mM醋酸铵缓冲水溶液和含0.2%甲酸的乙腈/异丙醇(1:1)组成的梯度,以0.65mL/min的流速,在Agilent 1290 UHPLC系统上分离分析物(CPT24)和内标(CPT12)。柱温保持在70℃。离子由正离子模式下的双电喷雾源形成,并在Agilent四极杆飞行时间(Q-TOF)质谱仪(6540A)上检测。用MassHunter定量分析软件(Agilent V.B.06)处理提取离子色谱图。用m/z 1476.7156,m/z窗口40ppm来提取CPT24的峰面积。该离子对应于6+电荷态簇中第二丰富的C13同位素峰,并代表(M+5H+NH₄)⁶⁺离子簇的M+7同位素。用m/z 1662.5882,m/z窗口200ppm来提取CPT12的峰面积。该离子对应于5+电荷态簇中最丰富的C13同位素峰,并代表(M+5H)⁵⁺离子簇的M+6同位素。通过将分析物/IS的峰面积比值与浓度范围从15.6nM至2,000nM的8点校准曲线比较来确定血浆浓度。

[0180] 大鼠血浆-Calvert研究中的CPT24-5kD

[0181] 用2.5倍体积的含有2%三氟乙酸(v/v)和370nM作为内标的CPT12的冰冷乙腈沉淀每个时间点的50微升血浆等分样品。离心后,将10μL上清液注射到Poroshell 300 SB-C8柱(2.1x75mm,5μm)(Agilent Technologies)上。使用由含0.2%甲酸的10mM醋酸铵缓冲水溶液和含0.2%甲酸的乙腈/异丙醇(1:1)组成的梯度,以0.70mL/min的流速,在Agilent 1290 UHPLC系统上分离分析物(CPT24)和内标(CPT12)。柱温保持在70℃。离子由正离子模式下的双电喷雾源形成,并在Agilent四极杆飞行时间(Q-TOF)质谱仪(6540A)上检测。用MassHunter定量分析软件(Agilent V.B.06)处理提取离子色谱图。由于5kD PEG的多分散性,用三个单独的m/z离子1074.2127、1157.9981和1159.3843,每个的m/z窗口为200ppm来提取CPT24-5kD的峰面积。这些离子对应于14+和13+电荷态。用m/z 1662.5882,m/z窗口100ppm来提取CPT12的峰面积。该离子对应于5+电荷态簇中最丰富的C13同位素峰,并代表(M+5H)⁵⁺离子簇的M+6同位素。通过将分析物/IS的峰面积比值与浓度范围从15.6nM至2,000nM的8点校准曲线比较来确定血浆浓度。

[0182] 大鼠血浆-Calvert研究中的CPT31

[0183] 用5倍体积的含有1%甲酸(v/v)的冰冷乙腈沉淀每个时间点的50微升血浆等分样品。不使用内标。离心后,将1μL上清液注射到Poroshell 120 EC-C8柱(2.1x5mm,2.7μm)(Agilent Technologies)上。使用由20mM碳酸氢铵缓冲水溶液和含乙腈组成的梯度,以0.45mL/min的流速,在Agilent 1290 UHPLC系统上分离分析物(CPT31)。柱温保持在40℃。离子由正离子模式下的双射流喷雾电喷雾源形成,并在Agilent四极杆飞行时间(Q-TOF)质谱仪(6540A)上检测。用MassHunter定量分析软件(Agilent V.B.06)处理提取离子色谱图。用m/z 1508.7473,m/z窗口40ppm来提取CPT31的峰面积。该离子对应于6+电荷态簇中第二

丰富的C13同位素峰,并代表 (M+5H+NH4)⁶⁺离子簇的M+7同位素。通过将分析物峰面积与浓度范围从5.00nM至4,000nM的8点校准曲线比较来确定血浆浓度。

[0184] 猴血浆-Calvert研究中的CPT31

[0185] 在每种PIE12-2单体(总共三种)上用另外的甘氨酸合成了内标CPT31-IS,使分子量增加171.1Da。将CPT31-IS掺到血浆样品(200μl)至浓度为60或150nM,然后在2%NH₄OH的乙腈(500μl)中沉淀血浆。离心后,将上清液应用于强阴离子交换固相萃取96孔板(SOLAμSAX,2mg/ml 96孔板)。首先用400μl的2%NH₄OH甲醇溶液调节阴离子交换板,然后用400μl的2%NH₄OH水溶液调节。然后将沉淀的上清液(500μl)加载到每个孔中,接着用500μl的2%NH₄OH水溶液洗涤,然后用500μl的甲醇洗涤。使用两份50μl的2%甲酸的甲醇溶液洗脱样品。

[0186] 使用Agilent Infinity 1290HPLC系统进行LC-MS分析,该系统与配备有双射流喷雾ESI源的Agilent 6450A Q-TOF质谱仪配对。使用含20mM碳酸氢铵(pH 7.9)的水和乙腈梯度,以0.45ml/min的流速,将样品(1μl)注射在Thermo Scientific Accupore 150 C4柱(2.1x50mm,2.6μm)上。通过5.00-2,000nM CPT31的标准曲线分析样品。

[0187] 药代动力学数据拟合

[0188] 使用Phoenix版v.6.4 WinNonlin(Pharsight, 卡里,北卡罗来纳州)用非隔室分析拟合所有生物分析数据。

[0189] 结果

[0190] PIE12-三聚体包含三个PIE12单体,每个都含有独特的伯胺(C-末端Lys的ε氨基),其使用同双功能PEG4-NHS酯交联剂与支架偶联。我们先前报道的4臂支架的第4臂由PEG24间隔区组成,其终止于马来酰亚胺(巯基反应性)基团(图2)。正交马来酰亚胺的反应性为将各种缀合物偶联至PIE12-三聚体提供了便利的方法,以探索缀合物的效力和该分子的PK性质。缀合物选自临床上成功的且有希望的临床前增强PK的部分(下文讨论)。

[0191] 表1:PIE12 D-肽

[0192]

肽	序列(所有D-氨基酸)	SEQ ID NO:#
PIE12	Ac-HPCDYPEWQWLCELGK-NH ₂	1
PIE12-PEG ₄	Ac-HPCDYPEWQWLCELGK(PEG ⁴)-NH ₂	2
PIE12-2	Ac-HPCDYPEWQWLCELG-PEG ⁴ -K-NH ₂	3

[0193] PEG化

[0194] 基于11种FDA批准产品的结果,PEG化是一种经证实的用于增强PK性质的策略。PEG缀合主要通过增加药物尺寸以减少肾过滤来改善半衰期,但也可以降低易感蛋白的蛋白水解和免疫原性。PEG化的主要挑战是添加足够的PEG来增加半衰期而不损害缀合物的活性(例如,结合位点的空间位阻)。大多数批准的PEG化的化合物,通过单个或多个附着,以20-40kDa的缀合PEG为特征。PEG缀合特别有效,因为PEG相对于其质量具有较大的流体动力学半径。

[0195] PEGASYS,一种用于治疗丙型肝炎病毒(HCV)的PEG缀合的干扰素,是一种研究特别广泛的PEG化蛋白。它的特征为具有单个枝化40kDa PEG,其更有优势是因为与同等质量的直链PEG相比(Fee,Biotech and bioengineering),枝化的PEG链可以通过保护不受蛋白水

解而更好地增加半衰期和保留活性 (Reddy, Adv drug deliv. Reviews)。与未缀合的干扰素相比, PEGASYS的IV半衰期延长了约20倍(人中, 65对3.8小时), 其分布容积低了5倍。因此, 清除速度减慢100倍 (Fishburn, J. of Pharm sci), 使得能够每周一次皮下给药。

[0196] 将类似的40kDa Y-枝化的PEG与PIE12-三聚体 (PEG40-PIE12-三聚体) 偶联以试图增强其PK性质。PEG40与PIE12-三聚体的缀合使效力降低了13倍和34倍(分别为HXB2和JRFL, 表2), 这可能归因于围绕gp41口袋的空间干扰 (Hamburger, JBC, Eckert, Protein Sci)。在PEGASYS中, 相同的PEG将活性降低了14倍, 同时将循环半衰期增加了25倍 (Fishburn, J. of Pharm Sciences)。当将PEG40与PIE12-单体连接时, 观察到循环半衰期相似地增加了~15倍(数据未显示), 并且预期在PIE12-三聚体的情况下具有相似的循环半衰期。虽然这种半衰期的显著增加在效力损失和分子质量增加~5倍的情形下仍然是有利的, 但PEG40-PIE12-三聚体并不是被测试用于每周给药或每月给药(通过贮库制剂)的最有利化合物, 并且没有对其继续开发。

[0197] 表2: 各种PIE12缀合物的抗病毒效力

[0198]

化合物	HXB2 (nM)	JRFL (nM)
PIE12-三聚体	0.72±0.04*	2.1±0.28*
PEG40-PIE12-三聚体	9.5±1.4	71±12
棕榈-PIE12-三聚体	0.225±0.008	0.540±0.041
C16-PIE12-三聚体	0.09±0.014*	0.11±0.012*
C18-PIE12-三聚体	0.054±0.018*	0.087±0.012*
CPT24	0.013±0.0013*	0.019±0.003*
CPT24-5kD	ND	0.026±0.007
CPT31	ND	0.015±0.007

[0199] (*来源于Francis, et al. Bioconjugates)

[0200] 酰化

[0201] 通过酰化增强PK被认为主要基于脂肪酸与人血清白蛋白(HSA)的强的相互作用(中到低nM) (Spector, J. of Lipid research/Richieri, Biochemistry/Richieri, J. of Lipid research), 所述人血清白蛋白可循环19天。酰化的其他PK益处包括自我结合, 其延长从皮下空间的吸收 (Nordisk: Havelund, Pharm research), 以及与细胞膜的相互作用。酰化延长半衰期的一个例子是Victoza (利拉鲁肽), 一种与棕榈酸酯缀合的GLP-1类似物, 其使得能够每日一次皮下给药以治疗2型糖尿病。

[0202] 在生理学上, 游离(未酯化成甘油)脂肪酸(FFA)在与HSA结合的条件下循环, 并且棕榈酸和硬脂酸(分别为具有16或18个碳原子的脂肪酸)是循环FFA的主要形式 (Tuei, life sciences)。值得注意的是, FFA不会显著结合任何其他循环颗粒, 包括低密度脂蛋白(LDL) (Spector, J. of lipid research), 并且FFA与HSA结合的位点跟大多数小分子不同。

[0203] 使用Cys作为桥连, 产生对我们的4-臂3-(2-氨基-3-(2-羧基乙氧基)-2-[(2-羧基乙氧基)甲基]丙氧基)丙酸支架的必要反应性, 实现棕榈酸酯与PIE12-三聚体(棕榈-PIE12-三聚体)的缀合。与未缀合的PIE12-三聚体相比, 棕榈酰化导致效力(HXB2和JRFL株)适度增加了3-4倍(表2)。棕榈-PIE12-三聚体还使IV半衰期增加>3倍并使清除率降低~14倍, 由此

改善PK性质。此外,棕榈-PIE12-三聚体在SC给药时是完全生物可利用的,并且通过该给药途径表观半衰期延长了~3倍(基于末端相消除)。

[0204] 表3:大鼠中PIE12-三聚体和缀合物的IV和SC血浆PK参数平均值

[0205]

化合物	施用途	剂 量 (mg/kg)	T _{1/2} (hr)	T _{max} (hr)	C ₀ 或 C _{max} (nM)	AUC (0-inf) (hr*nM)	Vz (obs) (mL/kg)	Cl (obs) (mL/hr/kg)	F (%)
PIE12- 三聚体	IV	1.0	0.55	NA	275	168	700	835	NA
	SC	1.0	0.81	0.5	80	208	NA	NA	96
棕榈- PIE12- 三聚体	IV	1.2	1.83	NA	2242	2241	140	61	NA
	SC	1.2	2.23	1.0	585	2313	NA	NA	103
C16-PIE12- 三聚体	IV	1.0	0.93	NA	1875	1155	140	100	NA
	SC	1.0	1.18	1.0	192	442	NA	NA	38
C18-PIE12- 三聚体	IV	1.0	1.05	NA	900	766	230	150	NA
	SC	1.0	1.39	2.0	196	713	NA	NA	93
CPT24	IV	1.0	1.77	NA	1112	2394	130	47	NA
	SC	1.0	2.71	4.0	304	1748	NA	NA	73

[0206] n=3, NA=不适用

[0207] 烷化

[0208] 基于先前将脂肪酸的脂肪链确定为白蛋白相互作用的关键部分的工作(Spector, J. of lipid research),还研究了烷烃缀合。烷烃与脂肪酰基的不同仅在于缺失单个末端羰基,并且市售的巯基-烷烃通过使用支架上第四臂的马来酰亚胺化学使合成变得容易且直接。

[0209] 巯基-烷烃与链长为16或18个碳的脂肪链(分别为C16-PIE12-三聚体或C18-PIE12-三聚体)的缀合,这在效力的大幅提升(8至24倍)以及在IV或SC给药时半衰期的适度增加方面具有相似的结果,但清除率下降更明显,这可能归因于血浆蛋白结合增加。

[0210] 棕榈酰化的和巯基-烷基化的缀合物之间的半衰期差异令人诧异。C16-PIE12-三聚体的额外的疏水性可能会增加膜的亲和力,这可能是与棕榈-PIE12-三聚体相比抗病毒效力增强的机制。有趣的是,作为含有疏水性更强的烷烃的抑制剂,C18-PIE12-三聚体也显

示出从皮下空间吸收延长,但与棕榈-PIE12-三聚体相比,这种效应并未增加SC给药的表现半衰期,因为后者具有更低的清除率。

[0211] 胆固醇缀合

[0212] HIV C-肽抑制剂的胆固醇缀合增加了小鼠中的半衰期(Ingallinella,PNAS)。作为一种没有FDA批准的例子新策略,这种效应的机制尚不清楚。可能涉及细胞膜和HSA结合的组合,但是这些相互作用很微弱(Charbonneau,J.of phys chem)(Peng,Protein and peptide letters)并且是瞬时的(Francis,Bioconjugates)。

[0213] 将市售的硫代胆固醇直接偶联到基于3-[2-氨基-3-(2-羧乙氧基)-2-[(2-羧乙氧基)甲基]丙氧基]丙酸的支架(具有PEG24第四臂间隔区的胆固醇-PIE12-三聚体,CPT24)的第四臂马来酰亚胺上,并且该缀合物表现出了效力的最大改善,显示出对JRFL株效力显著提高了110倍。CPT24也显示出了PK的最大改善,使IV和SC半衰期增加了>3倍(分别增加到1.8小时和2.7小时)并且使清除率降低了~18倍。

[0214] 虽然已知胆固醇与HSA相互作用,但其亲和力比棕榈酸酯低。因此,CPT24增强PK性质可能归因于膜的相互作用(Ingallinella et al,PNAS)。这种解释与CPT24从皮下空间吸收率延长(大鼠中为4h T_{max})以及与胆固醇相关的效力增强是一致的,已知胆固醇集中在脂质筏中,即病毒进入的位点。

[0215] 为了确定增加PEG基团的大小是否会进一步降低清除率,合成了合成的CPT24-5kD,其在PIE12-三聚体和硫代胆固醇之间包括5kDa的线性多分散PEG。先前已经显示,增加硫代胆固醇和PIE12-三聚体之间的PEG间隔区的长度对效力几乎没有影响,并且如所预期的,CPT24-5kD的效力与CPT24相当(表2)。

[0216] 表3中呈现的所有PK数据通过使用相同的动物方案和类似的生物分析方法产生。使用不同的动物方案和改进的生物分析方法产生表4中的数据(使用WinNonLin软件进行所有的PK拟合)。使用更新的方案/方法重复CPT24的PK研究。除了 C_0 及其导出的参数之外,重复CPT24数据与原始数据类似,可能是由于表4中收集的数据具有更早的采样时间。

[0217] 对于IV和SC施用,与CPT24相比,添加5kDa PEG导致半衰期延长(分别为3.5倍和1.8倍)(表4)。然而,CPT24的生物利用度大于CPT24-5kD(分别为51%和34%),表明添加的PEG质量导致皮下空间或淋巴系统中的额外代谢。总之,添加PEG的有益的PK效应不足以保证与5kDa PEG相关的增加的复杂性,5kDa PEG是多分散的,这不同于原始的PEG24第四臂。

[0218] 表4:大鼠中PIE12-三聚体的胆固醇缀合物的IV和SC血浆PK参数平均值

[0219]

化合物	施用途径	剂量 (mg/kg)	T _{1/2} (hr)	T _{max} (hr)	C ₀ 或 C _{max} (nM)	AUC (0-inf) (hr*nM)	Vz (obs) (mL/kg)	Cl (obs) (mL/hr/kg)	F (%)
CPT24*	IV	1.0	1.62	NA	4526	4660	57	24	NA
	SC	1.0	3.88	2	395	2394	NA	NA	51.4
CPT24-5kD*	IV	1.0	5.62	NA	1098	4578	118	14.6	NA
	SC	1.0	7.21	4	89	1557	NA	NA	34.0
CPT31 [†]	IV	1.0	3.25	NA	2953	3844	134	29	NA
	SC	1.0	5.4	2	261	2110	NA	NA	55

[0220] *n=3, †n=2, NA=不适用

[0221] 重新设计胆固醇-PIE12-三聚体

[0222] 如上所述, PEG支架的第一次重复包含三个臂, 所述臂经NHS酯官能化, 用于与PIE12上的独特伯胺反应, 而第四臂经马来酰亚胺基团官能化用于与硫醇反应。虽然对于快速测试多种缀合物具有功能性和有效性, 但由于马来酰亚胺-硫醇反应引入了异质立体中心, 因此该支架并不是理想的药物基质。

[0223] 因此, 重新设计支架以避免引入立体中心, 同时简化合成, 提高产率和可扩展性, 并降低(支架和最终产物的)成本。该改造的支架包含三个用NHS酯官能化的短臂和末端为经F-moc保护的独特伯胺的第四臂(高质量单分散PEG28)。在PIE12-2单体与三种NHS酯反应并除去所述第四臂上的F-moc后, 通过HPLC纯化该三聚体中间体。接着, 将胆固醇-PEG₄-NHS酯与所述第四臂上的伯胺缀合。对所述三聚体中间体的纯化简化了合成, 因为主要污染物PIE12-2二聚体(在三聚化期间由支架上的NHS酯的竞争性水解引起)在与胆固醇缀合之前可以容易地通过HPLC纯化而分离。在胆固醇缀合后, 显著转变为更晚的HPLC保留时间, 但二聚体与正确的三聚体最终产物之间的分离更少。另外, PEG接头在三个肽臂中的每一个上的位置从Lys侧链(PIE12GK-PEG4)(其在固相肽合成(CPPS)期间需要正交保护)移动到肽骨架(PIE12G-PEG4-K), 其中不需要额外的试剂或合成步骤。重新设计的分子CPT31具有第4臂, 其通过32个PEG单元(相比于CPT24的24个)将胆固醇与三聚体分离, 不具有任何异质立体中心, 并且生产更容易、更有效。像CPT24那样, CPT31在生理pH下可溶于标准水性缓冲液(例如, PBS, HEPES)中至~40mg/mL。

[0224] 将CPT31与CPT24比较意外地显示, 这些修饰导致了改善的PK性质。相对于CPT24在大鼠中的1.62小时, CPT31的IV半衰期平均增加至3.25小时, 并且相对于CPT24 SC给药的3.8小时, CPT31的半衰期平均增加至5.4小时(表4)。对于该观察结果的可能的解释是CPT24中与硫代胆固醇相邻的庞大的马来酰亚胺基团阻碍了胆固醇插进膜中。CPT31对JRFL株的效力也适度改善, 从19pM至15pM, 进一步证明了修饰的胆固醇连接能改善膜结合。

[0225] 确定了CPT31在非人灵长类动物(NHP)中的PK性质以支持在该明确的动物模型中的未来功效研究。三只雄性食蟹猴以1mg/kg IV给药。在2周的清洗期后, 这些动物以3mg/kg

(潜在的高剂量,用于评估NHP中的治疗功效) SC给药。重要的是,没有观察到不良反应。这些数据总结在表5中。与从大鼠数据的简单类比预测的PK性质相比,CPT31在NHP中具有更有利的PK性质,表现在IV和SC半衰期更长,生物利用度升高和清除率降低。

[0226] 表5:雄性食蟹猴中CPT31的IV和SC血浆PK参数平均值

[0227]

化合物	途径	剂量 (mg/kg)	T _{1/2} (hr)	T _{max} (hr)	C ₀ 或 C _{max} (nM)	AUC (0-inf) (hr*nM)	Vz (obs) (mL/kg)	Cl (obs) (mL/hr/kg)	F (%)
CPT31	IV	1.0	7.4	NA	3110	11619	97	9.5	NA
	SC	3.0	18.8	8	922	29434	NA	NA	80.4

[0228] n=3,NA=不适用

[0229] 为了检验CPT31对代表性的具有复制能力的HIV株的功效,测试了在1nM和10nM下对59种国际原代分离株的感染抑制,所述分离株由来自进化枝A,B和D以及循环重组形式AE和AG的10种病毒,和来自进化枝C的9种病毒(国际HIV-1分离株组,NIH AIDS试剂计划)组成,数据显示在表6中。在1nM时,CPT31对59种测试株中的49种产生了极好的抑制(>90%)。对于在1nM下未被抑制>90%的株中,有4种在10nM时被抑制了90%以上。在那些未被抑制的株中,两个具有良好表征的口袋突变(Q577R),其阻止了口袋的结合。所有抑制效果差的株都为进化枝C或D。许多抑制效果差的株具有非常低的效价,并且对于这些株可能低估了CPT31的抑制活性。这说明了CPT31对广泛的代表性株具有抑制作用。

[0230] 表6.CPT 31对60种国际HIV-1初级分离株的抑制活性。

[0231]

病毒	进化枝	1 nM 的抑制	10 nM 的抑制
92UG029	A	95.2	98.2
KER2008	A	84.1	85.3
KER2018	A	94.8	97.5
KNH1088	A	98.5	99.6
KNH1135	A	80.6	83.4
KNH1144	A	78.2	80.6
KNH1207	A	92.1	98.2
KNH1209	A	94.3	95.2
KSM4030	A	93.6	95.6
93RW024	A	97.0	99.3
0503M02138	AE	95.2	98.0
CM235/GS020	AE	81.8	98.7
CM244	AE	95.4	99.5
CM240/GS022	AE	83.8	95.0
NI1046	AE	99.1	99.7
NI1052	AE	98.0	99.7
NI1149	AE	92.9	97.4
NP1251	AE	97.0	98.4
NP1525	AE	98.8	99.3

[0232]

NP1695	AE	95.7	97.0
55815	AG	98.8	99.5
CAM0002	AG	95.6	99.7
CAM0013	AG	98.4	99.7
CAM0014	AG	98.8	99.5
CAM0015	AG	96.0	97.0
CAM0005	AG	98.4	99.8
CAM0008	AG	96.8	99.7
CAM1475MV	AG	98.3	98.8
CAM1970LE	AG	97.3	98.5
DJ263/GS003	AG	96.7	99.2
873	B	93.6	98.7
3343IN	B	97.6	99.1
Ba-L	B	96.9	99.8
BK132/GS009	B	99.7	99.8
BX08	B	94.2	99.5
BZ167	B	99.4	99.8
MN/H9	B	99.3	100.0
NP1538	B	95.0	99.4
US1/GS0004	B	95.3	97.7
US4/GS007	B	91.1	98.7
56313	C	97.9	99.3
20635-4	C	99.0	99.6
PBL286	C	95.8	99.0
PBL288	C	3.0	12.0
SE364/GS015	C	91.6	97.7
SM145/GS016	C	30.6	75.7
TZA246	C	98.3	98.4
TZA68	C	97.7	99.7
TZBD9/11	C	84.7	85.4
57128	D	35.2	37.3
301965	D	96.1	97.7

[0233]	93UG065	D	93.7	94.4
	A03349M1	D	93.6	99.5
	A07412M1	D	92.0	96.7
	A08483M1	D	69.2	72.3
	D26830M4	D	95.3	98.5
	E08364M4	D	50.7	58.6
	J32228M4	D	96.1	98.0
	NKU3006	D	97.2	99.8

[0234] 总结

[0235] PEG化在增加半衰期方面产生最大的PK增强作用,但折损了效力。棕榈酸酯缀合能适度改善半衰期和效力,但程度低于胆固醇。烷烃缀合改善了效力,但对于改善半衰期几乎没有作用。在测试的缀合物中,胆固醇最显著地改善PIE12-三聚体的效力和PK性质,同时还保持良好的溶解性。

[0236] 由每个缀合产生的分布体积的减小意义不明,因为不清楚要到达哪个组织区室才能成功抑制以及阻断HIV传播。然而,很明显,Fuzeon与HSA高度结合(Trimeris,1-18),具有减少的人体分布容积,并能成功抑制HIV。

[0237] 与之前的化合物CPT24相比,重新设计的候选药物CPT31纳入了能简化其合成、提高可扩展性和消除异质性的设计元素。此外,CPT31意外地改善了PK以及提升了抗病毒效力。

[0238] 首先,改变了PIE12肽序列。从PIE12的D-肽单体序列(Ac-HPCDYPEWQWLCELGK-NH₂,均为D-氨基酸(SEQ ID NO:1))开始,CPT24利用了聚乙二醇(PEG)间隔区(PEG4),经由C-末端D-赖氨酸侧链的ε氨基基团上的酰胺键与每个D-肽连接。这在图3A中表示为“PIE12-PEG4”。PIE12-PEG4与多聚体支架的连接通过PEG4的末端氨基基团与支架的羧基之间的缩合来实现,产生酰胺键(图4A)。虽然是功能性的,但PIE12-PEG4在合成上更复杂。因此,肽的产率较低,并且合成需要在C-末端的D-赖氨酸处进行非标准氨基酸侧链保护。

[0239] 对于CPT31的合成,改变PIE12的序列以提高合成产率并降低复杂性。为此,将PEG4接头移至肽骨架,成为PIE12肽序列中的残基。CPT31 PIE12变体在图3B中表示为“PIE12-2”,其利用了C末端的D-赖氨酸和相邻甘氨酸之间的PEG4间隔区。因此,通过缩合,经由C-末端D-赖氨酸的ε氨基基团与支架的羧基基团之间的酰胺键实现PIE12-2与支架的连接(图4B),无需正交Lys保护基团。

[0240] 第二个变化是CPT24与CPT31的三聚体支架比较。两者都具有四面体碳核心,但是在连接肽的三个短臂的组成上不同。这种差异在图5中突出显示。CPT24使用3-{2-氨基-3-(2-羧乙氧基)-2-[(2-羧乙氧基)甲基]丙氧基}丙酸支架(图5A),而CPT31使用4-氨基-4-(2-羧乙基)庚二酸支架(图5B)。这种变化使得能以较低成本进行大规模合成。

[0241] 第三个变化是在第四PEG臂组成上的差异,所述第四PEG臂将肽三聚体与胆固醇支架连接。CPT24使用连续的PEG24链将硫代胆固醇与肽三聚体连接,而CPT31使用两个串联的PEG链。第一PEG链PEG28通过酰胺键与肽支架连接。第二PEG链PEG4通过酰胺键与PEG28连

接,以及通过氨基甲酸酯与胆固醇连接。这种差异可以在图3B中看到。这种变化导致在加入胆固醇基-PEG4-NHS之前显著改善纯化肽三聚体的能力。在CPT24的合成中,硫代胆固醇在肽添加后缀合,但是在相同的反应中。这使得胆固醇化三聚体的纯化变得困难,因为添加胆固醇使得难以区分胆固醇化的二聚体(主要污染物)和三聚体(所需产物),从而降低了产率。在CPT31的合成中,PIE12-2D-肽与支架缀合,并且在添加胆固醇之前纯化肽三聚体,从而显著提高产率和纯度。此外,由于更充分地跨越了从细胞表面到病毒糖蛋白的距离,第四PEG臂的轻微伸长导致抗病毒效力提高~20%(从19pM到15pM)。

[0242] 使用与胆固醇连接的第二PEG链(PEG4)(胆固醇基-PEG4-NHS)来缀合肽三聚体的另一个优点是降低了脱靶缀合。尝试将胆固醇直接与肽三聚体缀合会导致脱靶缀合。将胆甾醇氯甲酸酯缀合至PEG4链以产生胆固醇基-PEG4-COOH,然后用NHS活化以形成胆固醇基-PEG4-NHS,会导致对伯胺基团的高缀合特异性,其中在PEG28链的末端的PIE12-2三聚体中仅存在一个所述伯胺基团。

[0243] 通过在添加胆固醇之前将肽缀合至多聚体支架来提供进一步的优势。尝试开发胆固醇基-PEG28-triNHS(具有缀合在PEG28链末端的胆固醇基的支架,向其中添加肽)是有问题的。虽然成功合成了胆固醇-PEG28-三酸,但是,难以活化这些酸并且肽不会与之缀合。不希望受理论束缚,产物可能形成了阻碍酸活化的胶束,并且所述肽不能很好地偶联,因为减少胶束形成的溶剂与肽的溶解性不相容。

[0244] 第四个变化是增强药代动力学的载荷分子的组合物。CPT24利用经由马来酰亚胺酯与PEG24的氨基末端缀合的硫代胆固醇部分。马来酰亚胺酯是有问题的,因为硫代胆固醇能够在马来酰亚胺环的C3或C4处反应,产生极难分离的立体异构体。此外,马来酰亚胺酯可以经过碱依赖性的开环反应以产生线性的5-碳链。CPT31利用胆甾醇氯甲酸酯前体,所述前体与第四臂PEG链的末端氨基基团反应,产生胆固醇基氨基甲酸酯连接键。该连接不会产生立体中心,并且不会经过降解而产生不想要的副产物。

[0245] CPT31在非人灵长类动物中的中低等pM效力,18小时的皮下半衰期,低清除率和优异的生物利用度使得CPT31成为治疗和/或预防HIV-1的非常有前景的候选药物。CPT31的最终目标是当施用适当的皮下缓释贮库时以实现每月一次的皮下给药,所述缓释贮库如来自GalaxoSmithKline的GSK744LA(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25589631>)和来自Tibotec/Janssen Sciences的利匹韦林(TMC278)(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20160045>)。考虑到CPT31的极强的效力和PK性质,估计在每月给予~40mg剂量的70kg人中,药物水平可以维持在较强的治疗水平(是PBMC中人血清调节IC₉₀的4倍)并持续1个月,鉴于现有的贮库制剂技术,这是可以实现的。

[0246] 实施例2

[0247] CPT31的其他合成方法

[0248] FMOC-PEG28-triNHS的合成

[0249] 以下描述概括了使用FMOC-PEG28-COOH或BOC-PEG28-NHS和氨基三酯合成FMOC-PEG28-triNHS(也参见图6,步骤(1)-(3))。

[0250] (1) 为了将FMOC-PEG28-COOH与氨基三酯支架缀合,将FMOC-PEG28-COOH溶解在合适的极性有机溶剂(例如二甲基甲酰胺,二甲基乙酰胺,乙腈或丙酮)中至浓度为200mM。向其中加入1当量的(1-[双(甲基氨基)亚甲基]-1H-1,2,3-三唑并[4,5-b]吡啶-3-氧化六氟

FMOC-PEG28-三酯溶解在DCM (20%溶液) 中,并置于冰浴中冷却。一旦冷却了,边搅拌边逐滴加入25当量TFA/酸基团(总共75当量)。30分钟后,使反应升温至室温,并继续反应60分钟。然后通过旋转蒸发干燥反应产物以除去DCM和TFA,然后重悬于20%乙腈中。然后使用含有0.1%TFA的水/乙腈梯度在Biotage Isolera™快速纯化系统上使用反相快速柱纯化该溶液。正确的产物(除去了所有三个叔丁基团)在梯度洗脱中最早洗脱出来。在脱保护不完全的情况下,-1和-2叔丁基物质在正确的产物和原料之间洗脱出来。通过旋转蒸发干燥所得的产物,然后可以在长时间的旋转蒸发之后,从甲苯中进行重复的共沸蒸馏以除去残留的水。替代的干燥方法包括重结晶或冻干。获得了100%产率的FMOC-PEG28-三酸。

[0258] FMOC-PEG28-三酸也可使用与上述相同的梯度(乙醇的DCM溶液梯度)通过快速色谱法进行纯化。然而,充分地干燥产物是至关重要的,因为在后续步骤中存在乙醇是很严重的后果,实质上倾向于发生三个酸的酯交换反应。还测试了用其它更易挥发的极性溶剂来洗脱FMOC-PEG28-三酸以降低酯交换的可能性,但是由于该分子具有三个酸和长PEG链导致强极性,因此优选乙醇或甲醇。使用改进的闪蒸溶剂系统可能可以降低这种复杂性,然而,由于产率的严重损失,优选反相快速柱。

[0259] (3) 使用N'N'-二琥珀酰亚胺基碳酸酯活化FMOC-PEG28-三酸。将1.8克FMOC-PEG27-氨基三酸(1.014mmol),909mg N'N'-二琥珀酰亚胺基碳酸酯(3.55mmol,1.15x每个酸)和750μmol Et3N加入到12ml无水乙腈中(也参见,图6,步骤(3))。将反应物搅拌90分钟,然后通过快速色谱法进行纯化(0-10%甲醇梯度的DCM溶液,产物的FMOC基团在215nm处有信号)。通过旋转蒸发立即干燥产物,得到总共2.2克(85%产率)的透明玻璃状产物。

[0260] 该方法改编自Ogura et al. (Tetrahedron Letters, 1979, 49:4745-4746)。Ogura等人建议羧酸:DSC:吡啶摩尔比为1:1:1,但这并不适合活化FMOC-PEG28-三酸,因为吡啶会非常快速地除去FMOC基团。然而,在活化没有FMOC基团的三酸的其他情况下,可以使用如Ogura等人描述的方案。如果使用碱稳定的保护基团如BOC来代替FMOC,则优选使用等摩尔比的吡啶来代替如上所述的0.2x Et3N。或者,HOSu可用作活化剂。

[0261] PIE12-2肽与多聚体支架的缀合

[0262] 通过支架上的NHS酯(每个支架臂有1个NHS,每个分子有3个臂)与位于C-末端赖氨酸的侧链上的PIE12-2的独特伯胺反应来实现PIE12与来自图6步骤(3)的活化支架的缀合(也参见图6,步骤(4))。这是肽上唯一的游离胺。

[0263] 该反应在叔碱三甲胺(Et3N)存在下,在惰性气体下,于干燥的极性有机溶剂二甲基乙酰胺中进行。PIE12-2肽以相对于支架为3.3:1的摩尔比,或以相对于每个NHS酯为1.1:1的摩尔比(因为每个三聚体分子具有3个臂和3个NHS酯,最终比率为3.3:1)用于反应中。在最终反应溶液中,PIE12-2肽浓度为10mM,支架浓度为3.03mM,以及Et3N浓度为150mM。

[0264] 为了建立反应,在开始肽缀合反应之前立即在DMAc中制备合适浓度(通常为250mM)的支架储备液。将PIE12-2肽溶解在DMAc中至浓度为12mM,并加入所需的TEA以在最终体积中达到150mM。将支架加到反应中,然后加入任何另外的DMAc以达到最终反应浓度。

[0265] 将反应在室温下维持120分钟。通过HPLC验证反应进程。图7的HPLC迹线显示了起始材料,以及代表添加1、2和3个PIE12-2肽的三个峰(该反应在次优条件下进行以说明三种物质)。+3肽的峰代表所需产物。在使用高活性NHS酯支架的条件下,+1产物很少(通常没有),并且+2产物比+1产物少得多。鉴于此,优选在非常高质量的干燥溶剂中和干燥惰性气

体下将肽与支架缀合。胺污染与PIE12-2肽竞争并降低产率。水会水解NHS酯并降低产率。当使用DMF作为反应溶剂时,发现即使是高质量的DMF也比DMAc具有更多的胺污染,并且随着时间的推移DMF分解形成游离胺。

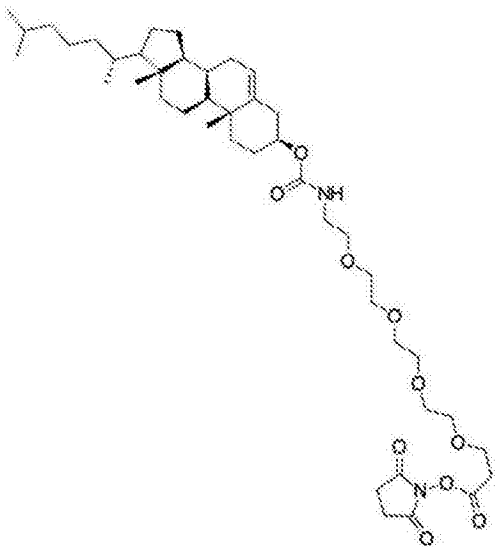
[0266] 反应产率高度依赖于FMOC-PEG28-triNHS支架的状态。使用高活性支架(例如,所有三个臂都是NHS活化的)的条件下,产率为~75%。该值是指肽的量与掺入支架中肽的质量相比较。由于PIE12-2肽的使用超过了支架,如果按照本申请所述进行反应,则产率永远不会超过85%。PIE12-2二聚体几乎总是以低水平存在,但通过使用高质量的干燥溶剂和新制备的高质量支架可以降低其含量。

[0267] 一旦缀合反应完成(通常约120分钟),将哌啶加入到反应中至终浓度为25%以除去FMOC保护基团(也参见图6,步骤(5))。使该组合反应30分钟,然后通过HPLC(Waters XBridge Peptide BEH C18柱)纯化。这一步是定量的。脱保护反应的分析型HPLC迹线示于图8中,并且脱保护反应的制备型HPLC迹线示于图9中。优选地,通过HPLC从粗反应混合物中纯化脱保护的三聚体。该反应步骤可能是CPT31合成中最关键的步骤,并且最易于损失严重。尝试采用沉淀至MTBE中来纯化三聚体(在FMOC脱保护之后)导致了所有组分被沉淀,并且没能实现纯化。此外,从DMAc中以相对较小的比例沉淀到MTBE中,导致损失了大量可溶于DMAc/MTBE溶液中的物料。

[0268] 胆固醇基-PEG4-NHS的固相合成

[0269] 在最终缀合步骤中,将胆固醇基-PEG4-NHS与NH₂-PEG28-PIE12-2三聚体偶联。尝试开发胆固醇基-PEG28-triNHS(具有缀合在PEG28链末端的胆固醇基的支架,向其中加入肽)是有问题的。虽然成功合成了胆固醇-PEG28-三酸,但是,难以活化这些酸并且肽不会与此缀合。不希望受理论束缚,产物可能形成了阻止酸活化的胶束,并且肽不能很好地偶联,因为减少胶束形成的溶剂与肽溶解性不相容。

[0270] 因此,开发了一种合成方法,其中在加入胆固醇之前将肽偶联到多聚体支架上。这种方法也得益于另一个原因。一旦加入胆固醇,就很难通过HPLC纯化来鉴别附着有适当的三个PIE12-2单体的多聚体支架和附着有一个和两个PIE12-2肽的多聚体支架。



[0271]

[0272] 胆固醇基-PEG4-NHS

[0273] 774.5029Da(单一同位素质量)

[0274] $C_{43}H_{70}N_2O_{10}$

[0275] 使用固体载体(例如,2-氯三苯甲基氯树脂,一种非常酸不稳定的树脂)进行胆固醇基-PEG4-NHS分子(上文)的合成,其使得合成过程更容易。优选地,不使用标准树脂,因为苛性酸中的解离条件能促进胆固醇的修饰(主要通过胆固醇环2中的双键加成,但是也可以进行其他修饰)。

[0276] 示例性的合成反应总结如下。将22.12克2-氯三苯甲基氯树脂(22.56mmol活性位点,1.1x酸)在无水二氯甲烷(DCM)中溶胀30分钟,然后用DCM洗涤3次。向其中加入10克Fmoc-PEG4-COOH(20.51mmol)的60ml含有17.86ml DIPEA(5x酸)的DCM溶液。气体的变化清楚地反映了该反应的发生。在搅拌下使反应进行90分钟(氮气鼓泡通过RV)。将树脂用DCM洗涤5次。通过加入100ml DCM:MeOH:DIPEA(17:2:1)并气体搅拌60分钟以将剩余的活性位点封端。将树脂用DCM洗涤5次。

[0277] 然后通过加入100ml DMF:DCM:哌啶(1:1:1)并混合30分钟,将Fmoc基团脱保护。然后将树脂用1:1的DMF:DCM洗涤3次,然后用DCM洗涤2次。然后将胆甾醇氯甲酸酯(18克,41.02mmol,2x胺)加入含有DIPEA(41.02mmol,1x胆甾醇氯甲酸酯)的60ml DCM中。将该组合物在气体搅拌下反应60分钟,然后用DCM洗涤5次。

[0278] 使用100ml 5%TFA的DCM溶液将产物从树脂上解离,持续2小时。收集解离混合物,并用20ml DCM冲洗树脂,其与解离混合物结合在一起。将洗脱液用旋转蒸发部分干燥,然后使用120g Biotage ZIP柱在Biotage Isolera™快速纯化系统(0-50%异丙醇(IPA)的己烷溶液梯度)上通过快速色谱法纯化,在254nm进行检测。通过旋转蒸发将产物彻底干燥,得到粘稠的淡黄色油状物,总计9.6克,产率为65%。

[0279] 然后将该产物重新悬浮在无水乙腈中并加热至40℃。向其中加入N,N-二琥珀酰亚胺碳酸酯(1.1x酸)和三乙胺(2xDSC)。将该反应在40℃下搅拌60分钟(再次,气体的变化反映了反应的发生),然后通过快速色谱法(0-100%乙醇的DCM溶液)纯化,在254nm检测。通过旋转蒸发将产物彻底干燥,得到终产物胆固醇基-PEG4-NHS,产率为90%。

[0280] 胆固醇基-PEG4-NHS的液相合成

[0281] 作为固相合成的替代方案,使用了胆固醇基-PEG4-COOH的液相合成方法。将NH₂-PEG4-COOH溶解在二氯甲烷中至浓度为0.5M。加入1当量的胆甾醇氯甲酸酯,搅拌溶液直至胆甾醇氯甲酸酯完全溶解。然后加入0.6当量的N,N-二异丙基乙胺(DIPEA),并将反应在室温于大气下搅拌4小时。通过加入0.6当量的乙酸来淬灭反应,并通过旋转蒸发干燥粗产物,然后使用异丙醇的二氯甲烷溶液梯度通过快速色谱法进行纯化,以90%的产率得到纯的最终产物胆固醇基-PEG4-COOH,为粘稠的琥珀色油状物。

[0282] 通过质谱法验证该产物的质量,并通过LC/MS与固相合成的胆固醇基-PEG4-COOH进行比较。

[0283] 本发明所述的液相方法与固相合成途径相比具有实质性改进。显著提高了产率,并且所述液相方法不需要使用显著过量的胆甾醇氯甲酸酯,其为一种昂贵的试剂。此外,通过舍弃固相载体,降低了反应成本并消除了反应的可变性。最后,通过舍弃固相载体,不再需要将不稳定的胆固醇暴露于TFA(强有机酸),从而避免了胆固醇基团改性(例如氧化)的可能性。

[0284] 向PEG28-PIE12-2三聚体添加胆固醇

[0285] CPT31合成的最后一步是将胆固醇添加至NH₂-PEG28-PIE12-2三聚体第四臂的PEG28链的末端胺上,其通过胆固醇基-PEG4-NHS的NHS酯与所述第四臂的PEG胺的反应介导。胆固醇基-PEG4-NHS含有活性NHS酯。优选地,胆固醇基-PEG4-NHS在-20℃下储存在容器中,直到建立缀合反应以保持NHS的活性。使用前将胆固醇基-PEG4-NHS加热至室温。在升温至室温之前不要打开胆固醇基-PEG4-NHS的容器,以避免冷凝引起NHS损失。一旦胆固醇基-PEG4-NHS为室温,则制备无水二甲基乙酰胺(DMAc)的储备溶液。在存在三甲胺(优选新鲜的)的条件下,在高规格DMAc中进行该反应。该反应对水非常敏感。由于这个原因,使用高规格的DMAc和新鲜三甲胺。较旧三甲胺可以形成伯胺和仲胺,其可以与肽竞争缀合至NHS酯基团。优选地,在使用之前24小时,加入分子筛以进一步降低DMAc中水的含量。优选地,二甲基甲酰胺不用作溶剂,除非其非常干燥且是新鲜制备的。二甲基甲酰胺具有分解并形成伯胺和仲胺的趋势,这可能显著降低反应效率。反应条件与上述类似,首先将肽三聚体溶解在DMAc中至浓度为10mM以上(10mM-100mM),然后加入三甲胺,接着加入胆固醇基-PEG4-NHS(1.1-2当量),然后调节体积使三聚体为10mM。反应在室温下进行,搅拌/搅动2-3小时,然后通过HPLC纯化。终产物粘在玻璃上,可能造成严重损失。优选地,将终产物收集在塑料容器中,并且所有下游步骤都在塑料容器中进行(例如,冻干)。如下面的迹线所示,加入胆固醇时峰移位很大。当反应条件正确时(例如,过量的胆固醇基-PEG-NHS),该步骤的产率几乎是定量的。图10中所示的HPLC迹线显示了有意的较低的产率,以说明缀合时的峰移。优选地,在一天内完成所述纯化反应的偶联。

[0286] Fmoc-PEG28-triPFP的合成

[0287] 为了评价在CPT31的合成中使用更稳定的五氟苯酚(PFP)酯代替NHS酯作为官能团,合成了Fmoc-PEG28-triPFP并评价了其在标准CPT31反应条件下的稳定性。

[0288] 基本上如Fmoc-PEG28-triNHS的合成所述的那样合成了Fmoc-PEG28-triPFP。简而言之,将Fmoc-PEG28-三酸在搅拌下溶于适当体积的加热至40℃的乙腈中。一旦完全溶解,加入4当量(相对于Fmoc-PEG28-三酸而言)的PFP碳酸酯,然后加入1当量的三甲胺(相对于Fmoc-PEG28-三酸而言)。该反应在40℃于大气下进行,并定期分析以确定活化是否完全。在反应过程中,加入了另外4当量以实现支架的充分活化以用于进一步的评估(产率为~40%)。

[0289] 一旦反应完成,便使用乙醇的二氯甲烷溶液梯度通过快速色谱法纯化产物,并通过旋转蒸发干燥所得产物,以产生粘稠的稻草色油状物。

[0290] 为了评估由于通过使用更稳定的PFP酯在肽偶联期间产率提高的可能性,从而建立了标准的肽偶联反应。将3.3当量的PIE12-2(相对于支架而言)溶解在二甲基乙酰胺中至浓度为10mM。向其中加入三甲胺至终浓度为150mM。最后,将Fmoc-PEG28-triPFP支架溶解在最小体积的二甲基乙酰胺中并加入到反应中。通过HPLC定期监测反应,直至观察不到进一步的进展(24小时),并使用UV吸光度通过整合反应产物的峰面积来定量所得的产率。

[0291] 使用PFP碳酸酯成功活化了Fmoc-PEG28-三酸以产生Fmoc-PEG28-triPFP。Fmoc-PEG28-triPFP之间的肽偶联反应的产率显示,在24小时后约有50%转化为所需的Fmoc-PEG28-(PIE12-2)₃。

[0292] 为了比较起见,Fmoc-PEG28-triNHS反应在3小时内达到有~80%转化为Fmoc-PEG28-PIE12₃,与PFP酯相比,产率显著提高。

[0293] 此外,用PFP酯活化FMOC-PEG28-三酸支架更加困难。为了实现三酸支架的相似的活化率,当使用PFP碳酸酯时,需要两倍量的碳酸酯。这可能归因于PFP酯尺寸变大,从而导致活化位点处的空间位阻。

[0294] 考虑到PFP碳酸酯比二琥珀酰亚胺基碳酸酯贵约20倍,并且为了活化所述支架至少需要两倍量,因此PFP酯显著提高了合成酯活化的支架的成本。

[0295] 另外观察到,PFP酯的反应速率明显慢于NHS酯的反应速率。这使得CPT31的合成需要更长的反应时间,并且因此,肽暴露于有机溶剂和碱的时间更长。这种暴露提升了肽修饰的风险,这可能是通过标准纯化方法不能分离的。由于这些原因,除非未来能改善反应产率并降低成本,否则NHS酯是用于合成CPT31的合成途径。

[0296] 尽管PFP酯能提供比相关的NHS酯更高的稳定性,但是除非能改善与PFP酯相关的反应产率并降低成本,否则优选使用NHS酯进行CPT31的合成。NHS酯活化比PFP酯活化成本低得多,NHS酯具有比PFP酯更快的反应速率,并且NHS酯提供更高的FMOC-PEG28-(PIE12-2)₃产率。

[0297] 本说明书中提及的和/或在申请数据页中列出的所有的美国专利、美国专利申请公开、美国专利申请、外国专利、外国专利申请和非专利出版物,包括美国临时专利申请号62/276,201和美国临时专利申请号62/372,257,都通过引用整体并入本申请。

[0298] 可以将上述各种实施方式组合以提供进一步的实施方式。如果有需要,可以修改实施方式的各方面以采用各种专利、申请和出版物的概念来提供其他的实施方式。根据以上详细描述,可以对实施方式进行这些改变和其他改变。

[0299] 通常,在以下权利要求中,所使用的术语不应被解释为将权利要求限制于说明书和权利要求中公开的具体实施方式,而是应该被解释为包括所有可能的实施方式以及这些权利要求所享有的等同物的全部范围。因此,权利要求不受本公开的限制。

序列表

<110> 纳维根公司

犹他大学研究基金会

B·D·韦尔奇

J·N·弗朗西斯

M·S·凯

<120> HIV进入的D-肽抑制剂以及使用方法

<130> 690181.405W0

<140> PCT

<141> 2017-01-06

<150> US 62/276,201

<151> 2016-01-07

<150> US 62/372,257

<151> 2016-08-08

<160> 6

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 16

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 合成D-肽

<220>

<221> 酰胺化

<222> 1

<220>

<221> 乙酰化

<222> 16

<400> 1

His Pro Cys Asp Tyr Pro Glu Trp Gln Trp Leu Cys Glu Leu Gly Lys

1

5

10

15

<210> 2

<211> 16

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 合成D-肽

<220>

<221> 乙酰化

<222> 1

<220>

<221> MOD_RES

<222> 16

<223> PEG4与Lys侧链连接

<220>

<221> 酰胺化

<222> 16

<400> 2

His Pro Cys Asp Tyr Pro Glu Trp Gln Trp Leu Cys Glu Leu Gly Lys

1

5

10

15

<210> 3

<211> 16

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 合成D-肽

<220>

<221> 乙酰化

<222> 1

<220>

<221> MOD_RES

<222> 15

<223> PEG4在位置15-16处直接插入Gly和Lys之间的肽骨架中

<220>

<221> 酰胺化

<222> 16

<400> 3

His Pro Cys Asp Tyr Pro Glu Trp Gln Trp Leu Cys Glu Leu Gly Lys

1

5

10

15

<210> 4

<211> 5

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 合成D-肽

<220>

<221> 变体

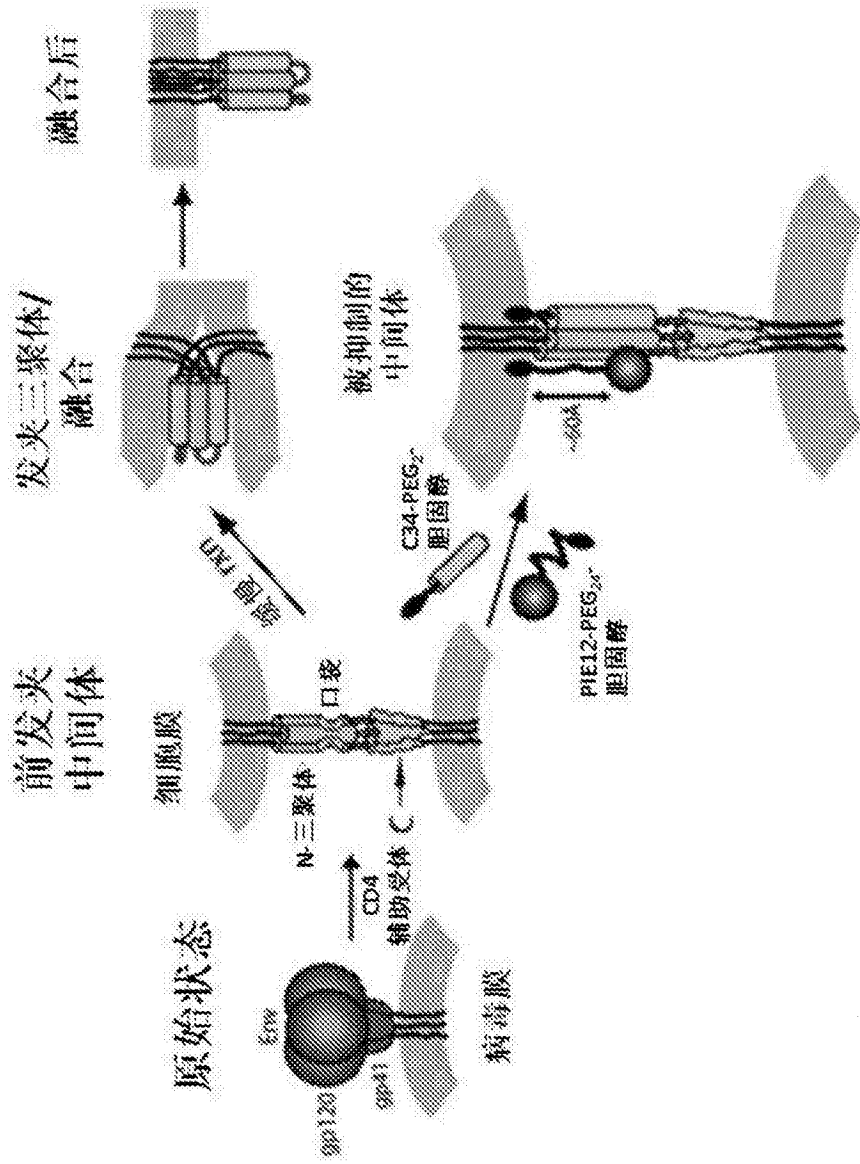


图1

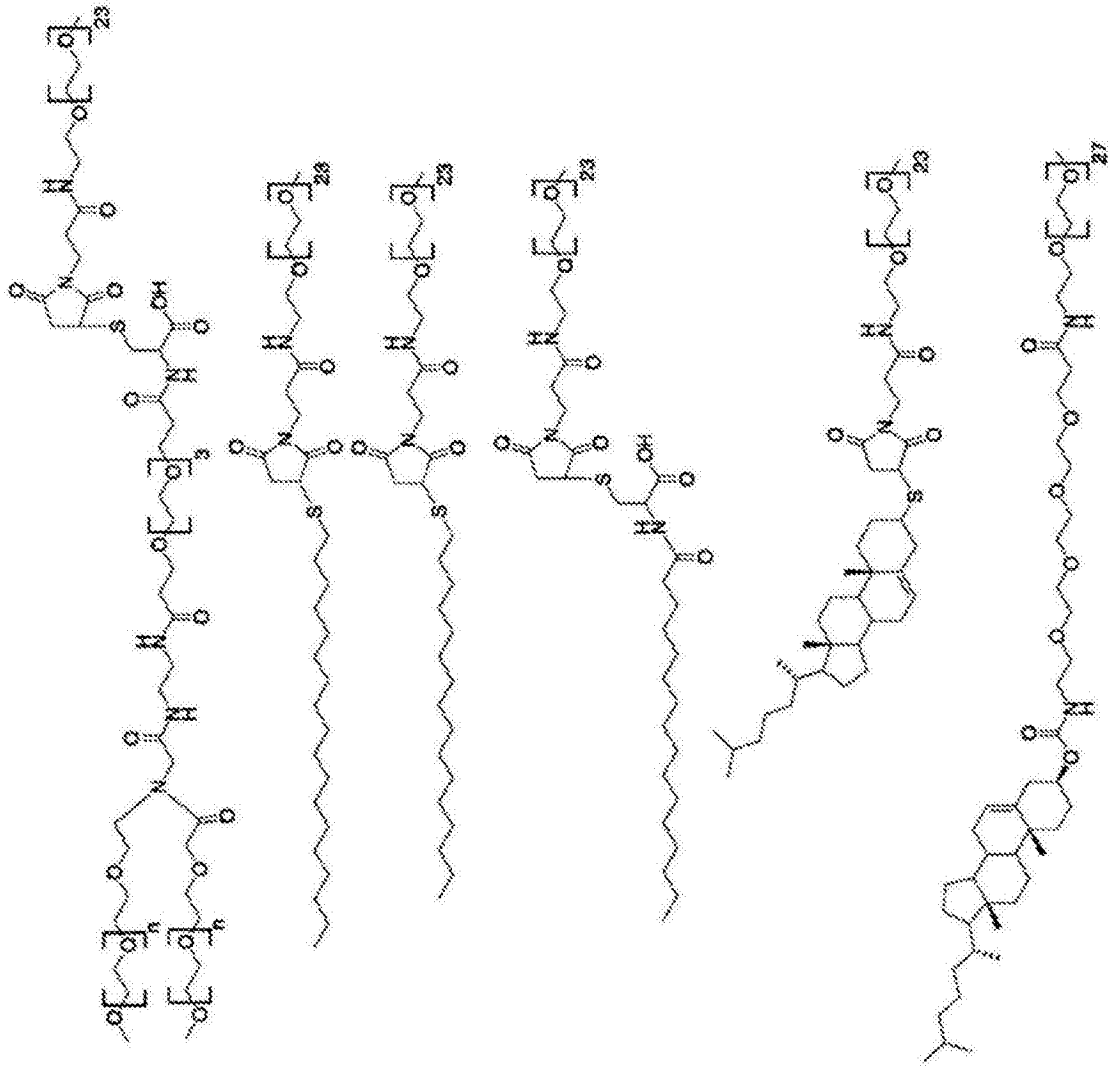


图2

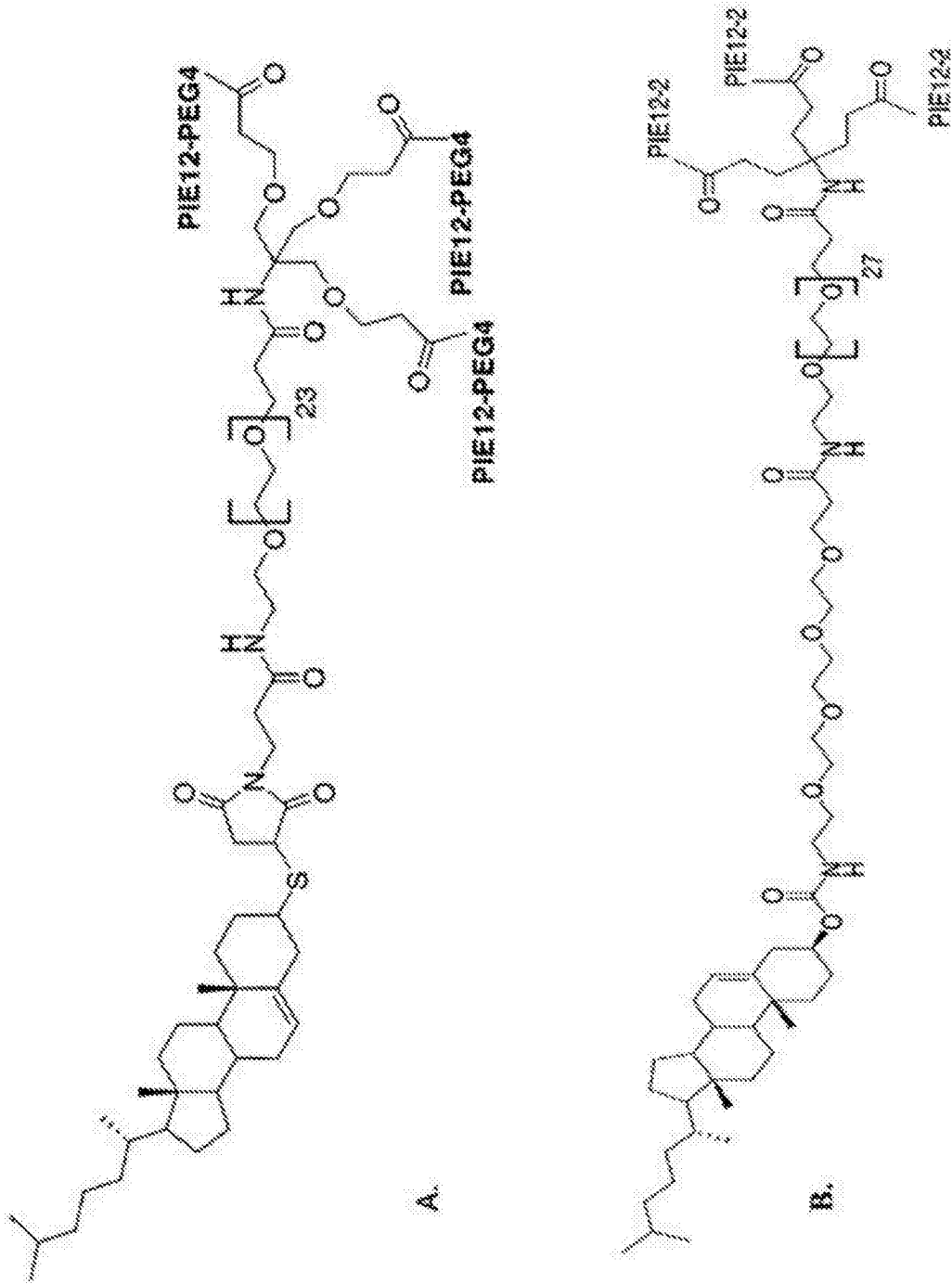


图3

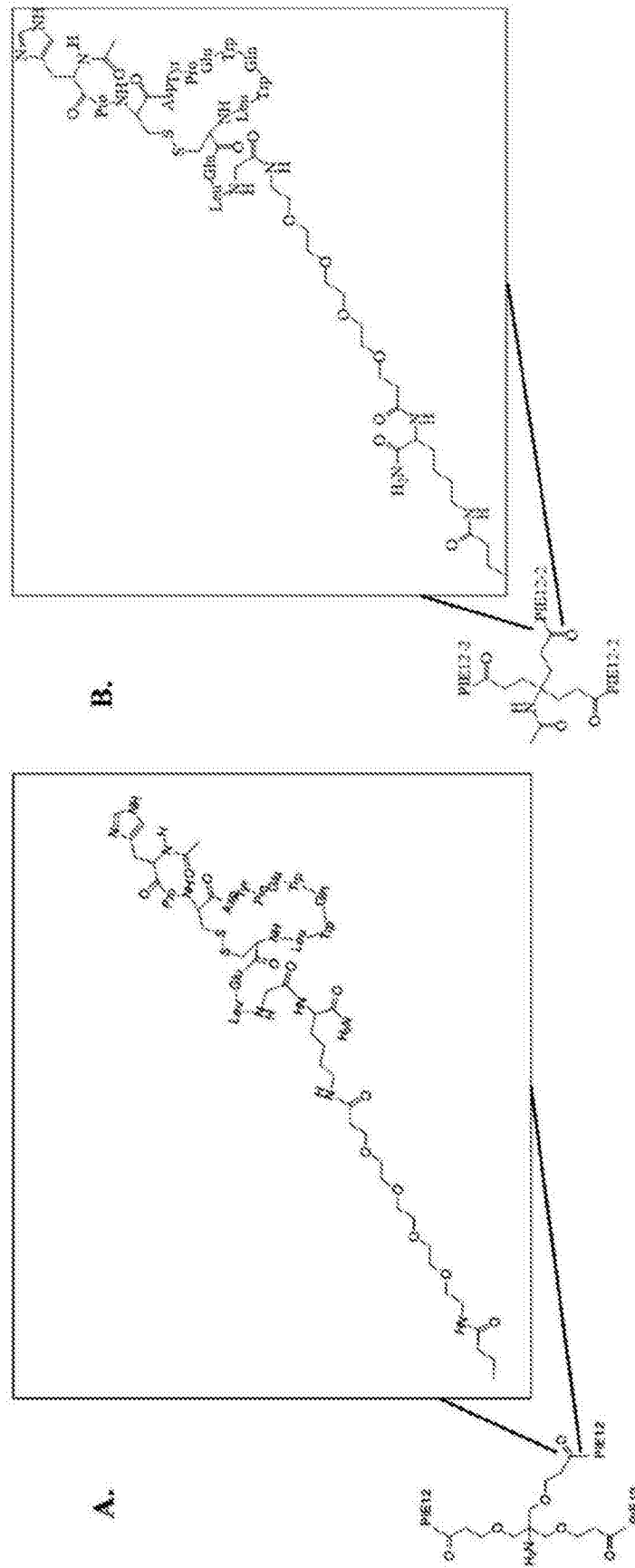


图4

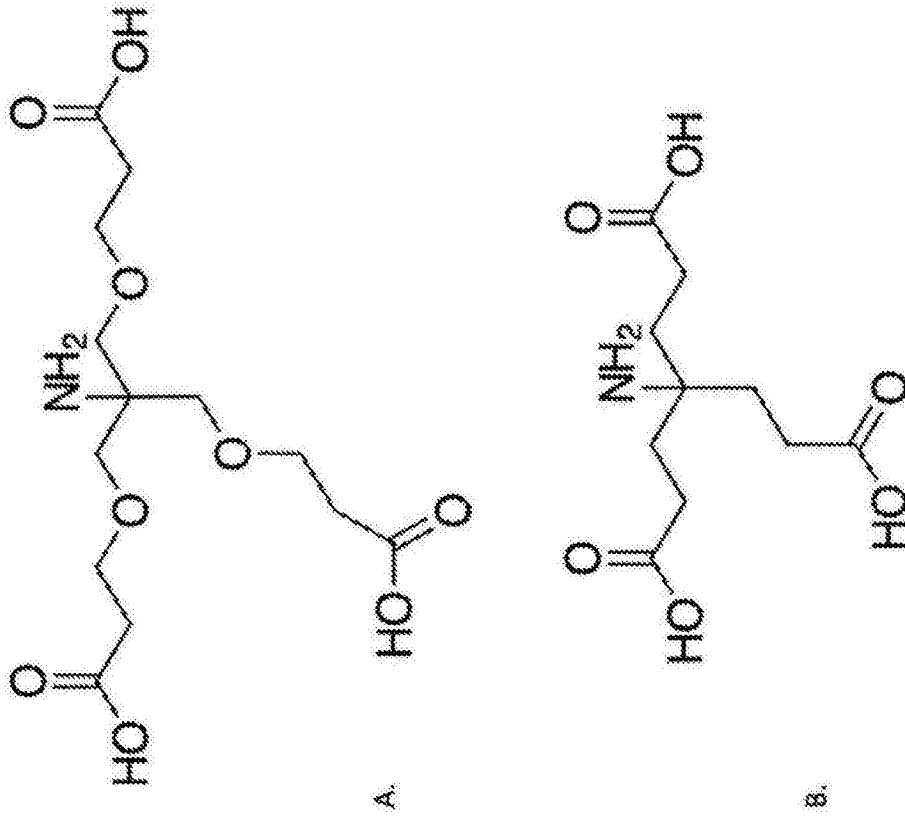


图5

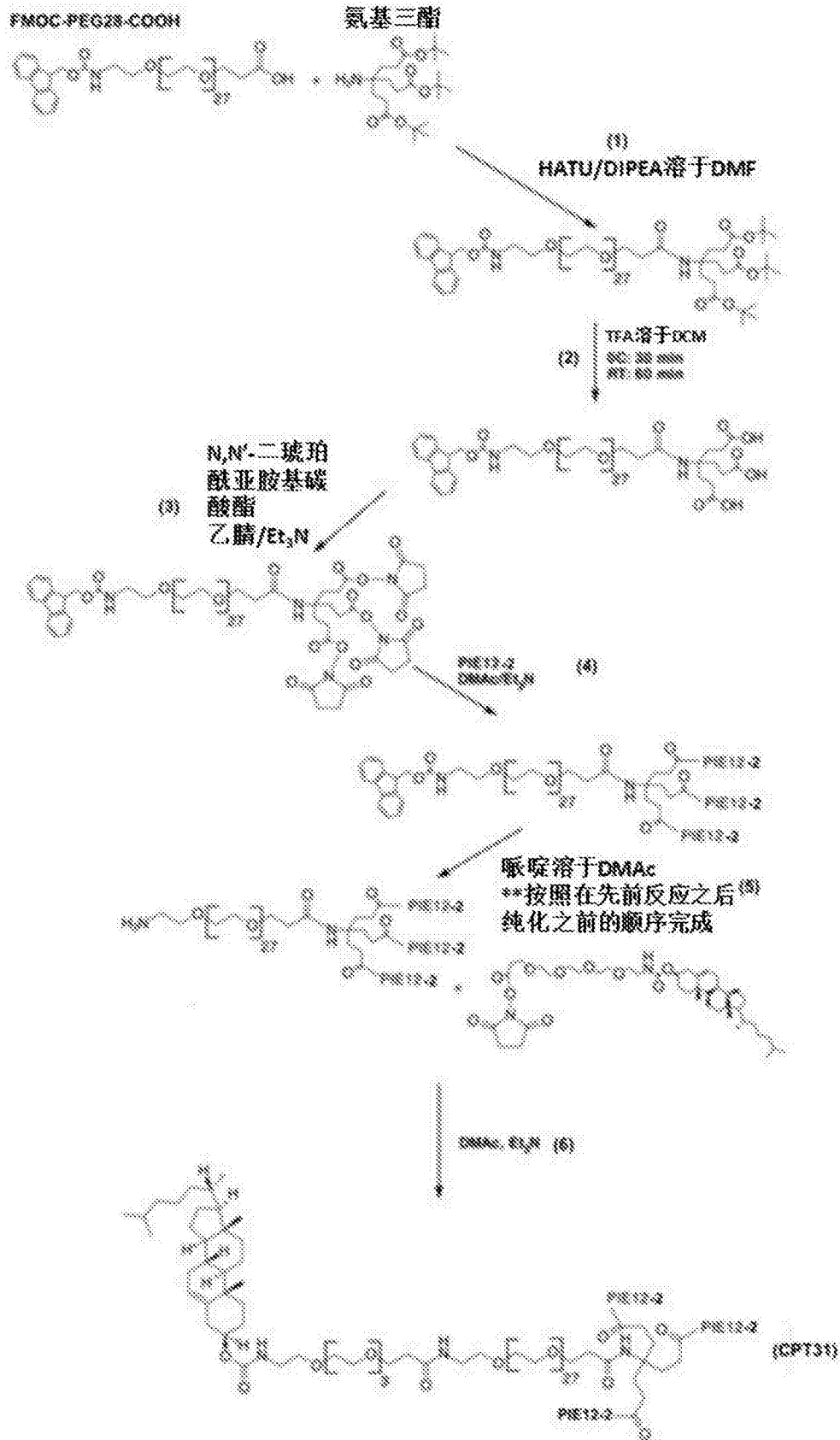


图6

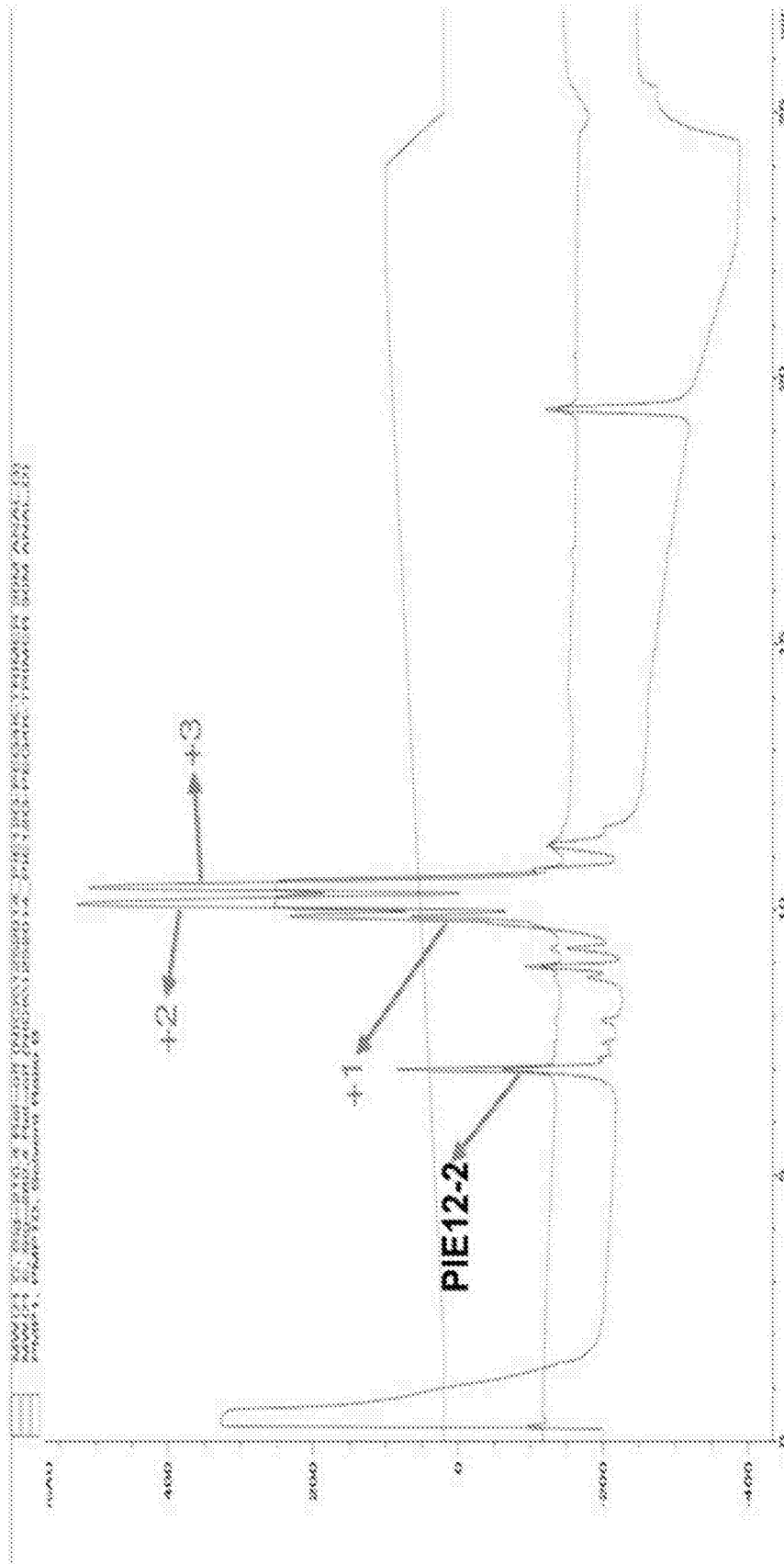


图7

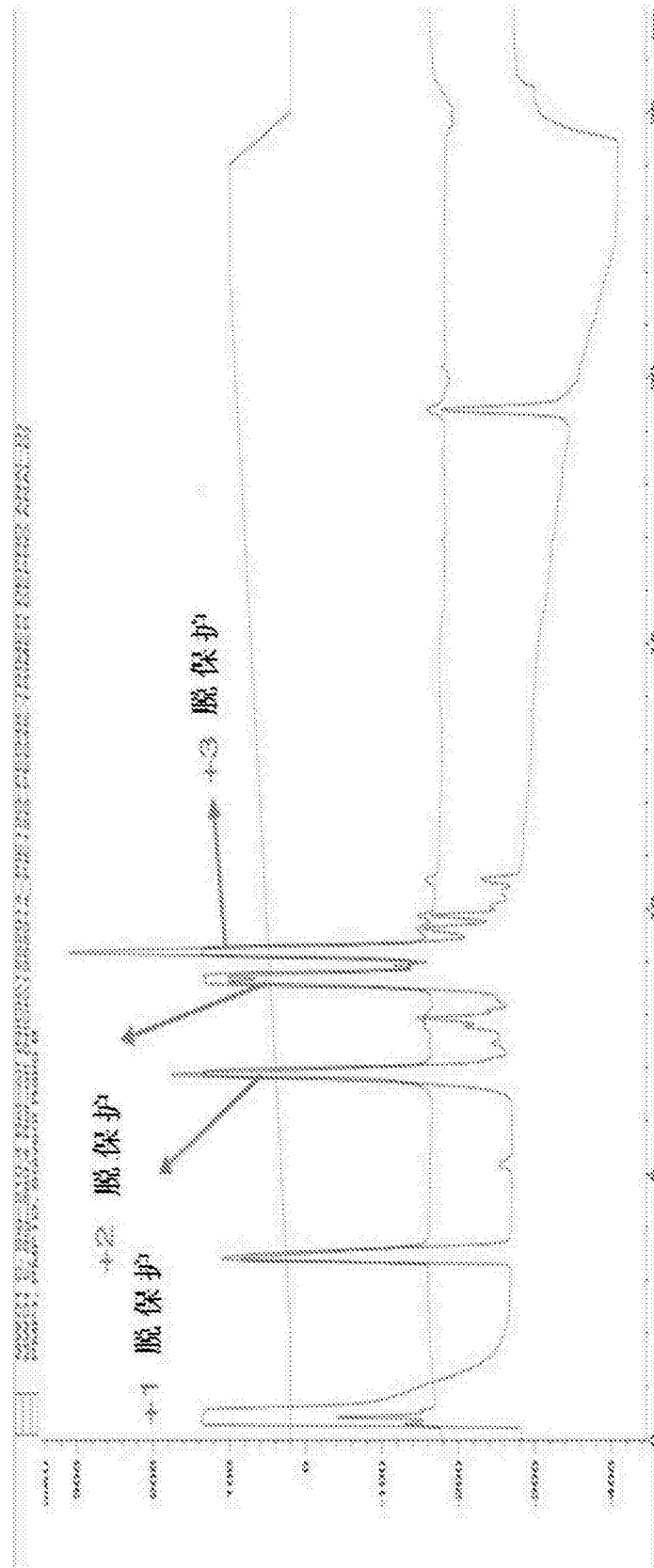


图8

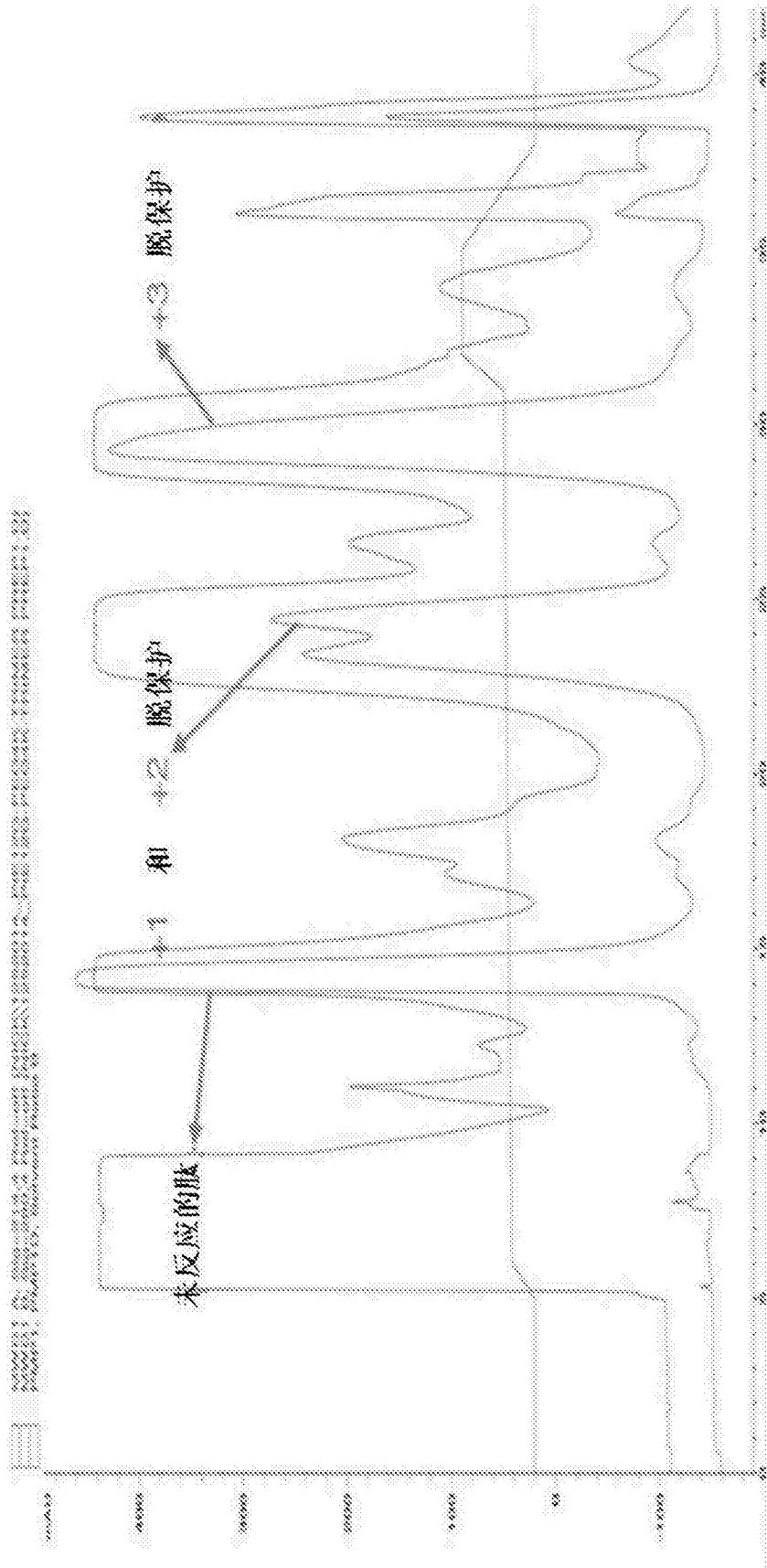


图9

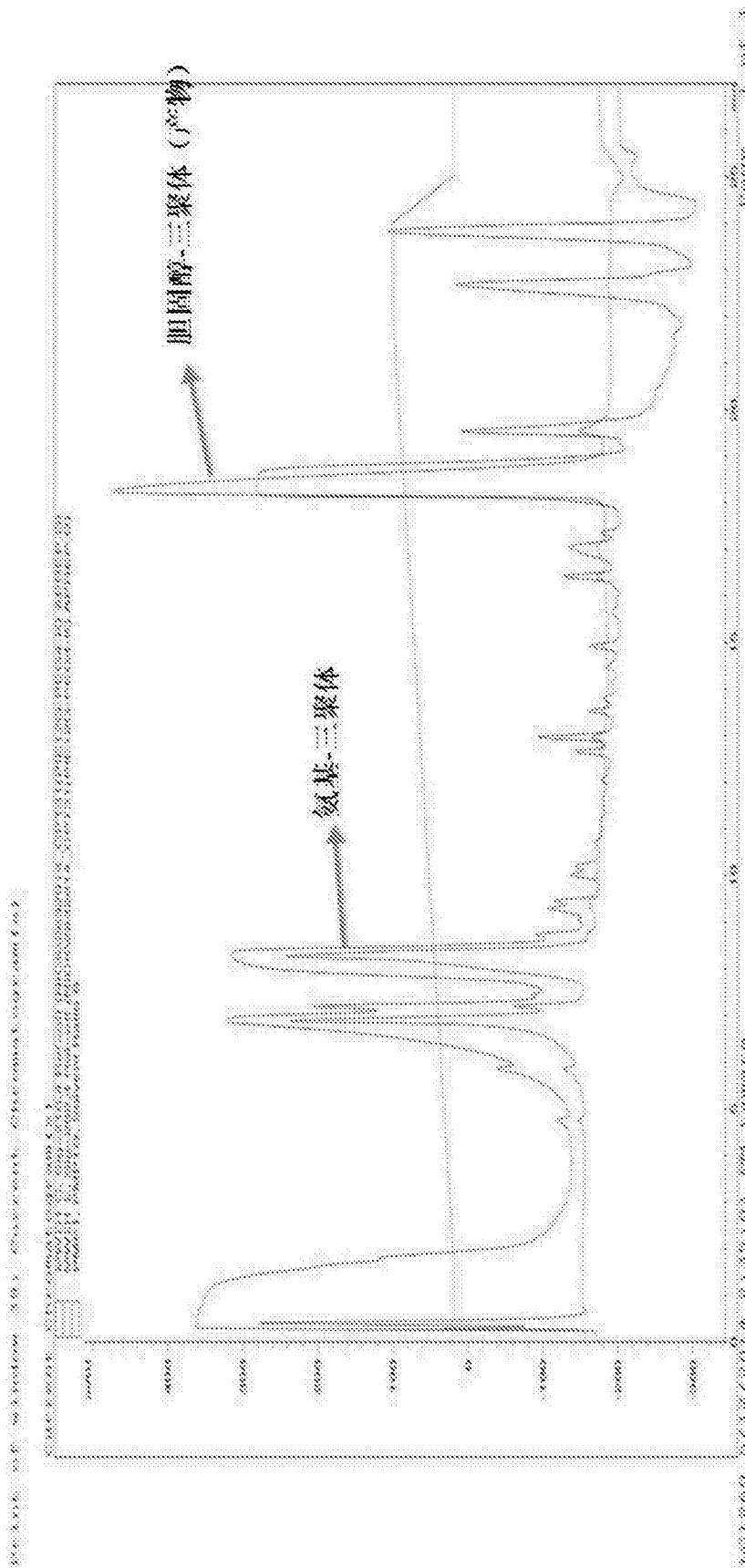


图10