

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
A61K 38/00 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200480040651.8

[43] 公开日 2007 年 1 月 31 日

[11] 公开号 CN 1905893A

[22] 申请日 2004.12.6

[21] 申请号 200480040651.8

[30] 优先权

[32] 2003.12.5 [33] US [31] 60/527,442

[86] 国际申请 PCT/US2004/040546 2004.12.6

[87] 国际公布 WO2005/056576 英 2005.6.23

[85] 进入国家阶段日期 2006.7.19

[71] 申请人 西北大学

地址 美国伊利诺伊州

[72] 发明人 S·I·斯图普 M·O·居莱尔

[74] 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司
代理人 赵蓉民 路小龙

权利要求书 3 页 说明书 11 页 附图 6 页

[54] 发明名称

分支的肽两亲物、相关的表位组合物和其自组装的结构

[57] 摘要

本发明提供了含有可提供旁侧氨基基团的一个或多个残基的分支肽两亲化合物，所述氨基基团用于将一个或多个表位序列连接到其上，这样的化合物和相关的组合物用于增强表位呈递。

1. 非线性肽两亲化合物，其包括肽组分，该肽组分包括至少一个含有侧链氨基基团的氨基酸残基，所述氨基基团连接到与所述肽组分为非线性关系的组分，所述肽组分与疏水组分连接。

2. 权利要求 1 的化合物，其中所述残基是天然存在的氨基酸。

3. 权利要求 2 的化合物，其中所述氨基酸是赖氨酸。

4. 权利要求 3 的化合物，其中所述肽组分包括至少两个赖氨酸残基。

5. 权利要求 4 的化合物，其中所述非线性组分包括生物活性表位序列。

6. 权利要求 5 的化合物，其中所述表位序列选自 RDGS、PHSRN、IKVAV、YIGSR 和噬菌体展示过程的识别产物。

7. 权利要求 6 的化合物，其中所述两个赖氨酸残基中的每一个都被连接有所述表位序列中的一个表位序列。

8. 权利要求 1 的化合物，其中所述肽组分含有选自丙氨酸、甘氨酸、亮氨酸、半胱氨酸和丝氨酸的残基。

9. 权利要求 1 的化合物，其中所述疏水组分包括从约 C₆ 至约 C₂₂ 的烷基部分。

10. 权利要求 9 的化合物，其中所述烷基部分被连接到所述肽组分的 C 末端附近的赖氨酸残基。

11. 权利要求 10 的化合物，其中所述肽组分包括至少两个赖氨酸残基，至少一个所述残基连接到生物活性表位序列，所述生物活性表位序列选自 RDGS、PHSRN、IKVAV、YIGSR 和噬菌体展示过程的识别产物。

12. 权利要求 11 的化合物，其中至少一个所述序列被连接到光谱探针组分上。

13. 权利要求 11 的化合物，被组装成胶束构型。

14. 包含非线性肽两亲化合物的系统，所述肽两亲化合物包括肽组分、连接到所述肽组分的疏水组分，所述肽组分包括至少一个含有侧链氨基基团的氨基酸残基，所述氨基基团连接到生物活性表位序列上，所述化合物处在液体介质中。

15. 权利要求 14 的系统，其中所述残基是天然存在的氨基酸。

16. 权利要求 15 的系统，其中所述氨基酸是赖氨酸。

17. 权利要求 14 的系统，其中所述表位序列选自 RDGS、PHSRN、IKVAV、YIGSR 和噬菌体展示过程的识别产物。

18. 权利要求 17 的系统，其中所述疏水组分被连接到所述肽组分的旁侧氨基基团。

19. 权利要求 18 的系统，其中所述肽组分含有选自丙氨酸、甘氨酸和亮氨酸的残基。

20. 权利要求 17 的系统，其中所述介质处于生理 pH 值，所述系统包括所述化合物的组合物。

21. 使用肽两亲物的侧链氨基基团来呈递生物学活性表位序列的方法，所述方法包括：

提供多个肽两亲化合物，每一所述化合物包括疏水组分和肽组分，至少一个所述化合物包含至少一个含有侧链氨基基团的氨基酸残基；和
将生物学活性表位序列连接到所述氨基基团。

22. 权利要求 21 的方法，其中所述肽组分包括在其 N 末端附近的赖氨酸残基。

23. 权利要求 22 的方法，其中所述表位序列选自 RDGS、PHSRN、IKVAV、YIGSR 和噬菌体展示过程的识别产物。

24. 权利要求 22 的方法，其中所述肽组分的 N 末端包括两个赖氨酸残基。

25. 权利要求 24 的方法，其中所述残基中的每一个被连接到表位序列，所述表位序列选自 RDGS、PHSRN、IKVAV、YIGSR 和噬菌体展示过程的识别产物。

26. 权利要求 22 的方法，其中所述化合物处于含水介质中，并且所述介质的 pH 被调整以将所述化合物组装成圆柱状胶束。

27. 权利要求 21 的方法，其中所述化合物中的至少一个化合物包括含有至少两个赖氨酸残基的肽组分。

28. 权利要求 27 的方法，其中所述残基的每一个被连接到表位序列，所述表位序列选自 RDGS、PHSRN、IKVAV、YIGSR 和噬菌体展示过程的识别产物。

29. 权利要求 28 的方法，其中所述残基中的一个被连接到 RDGS 表位，并且所述残基中的一个被连接到 PHSRN 表位。

30. 权利要求 29 的方法，其中所述化合物处于含水介质中，并且通过使用所述介质中的试剂被组装。

分支的肽两亲物、相关的表位组合物和其自组装的结构

[001] 本申请要求2003年12月5日提交的申请系列号为60/527,442的优先权权益，该申请通过参考整体并入本文。

[002] 由于美国能源部对西北大学(Northwestern University)的资助(资助号DE-FG02-00ER54810)，美国政府对该发明拥有某些权利。

背景技术

[003] 生物学中配体和受体之间的分子识别需要合适的表位呈递(presentation of epitopes)。在胞外基质中的细胞粘附配体(cellular adhesion ligands)在细胞粘附和附着中起着关键的作用，其影响着细胞增殖、分化和维持常规的代谢活动。最近，人们已经对设计支架(scaffolds)产生了极大的兴趣，所述支架用人工表位模拟细胞结构，以便触发在再生医学或靶向化学治疗中重要的生物学事件。已经报道了因在这些人工细胞支架上的信号分布和结构呈递的变化而导致的细胞应答差异。例如，已被发现，细胞粘附配体之间的纳米级间距的变化可以改善信号识别和随后的细胞增殖。在用于合成生物材料的各种方法中，自组装是特别有吸引力的工具，其可以由能够封装细胞和原位组装的分子溶液制造出支架。

发明概述

[004] 根据前面的描述，本发明的目标是提供分子结构(architecture)，其用于传递和呈递生物学活性表位，从而解决本领域的各种问题，包括上面提出的那些。本领域技术人员理解的是，本发明的一个或多个方面可以满足某些目标，而一个或多个其他方面可以满足某些其他目标。全面地考虑，不必每一个目标都等同地适用于本发明的每一个方面。因此，对于本发明的任一方面，下面的目标可以看作选择。

[005] 本发明的一个目标是提供能够自组装的用于各种生物活性表位的结构呈递的化合物和相关组合物。

[006] 本发明的另一个目标是提供包括可增强表位呈递和相应的信号识别的化合物的分子结构。

[007] 本发明的另一个目标可以是提供各种两亲性(amphiphilic)肽化合物，其具有用于分开表位/细胞粘附配体的三维结构，这样的化合物能够在生理条件下自组装，用于呈递和分配这样的表位/细胞粘附配体。

[008] 通过本概述和下面描述的某些实施方案，本发明的其他目标、特征、益处和优点将变得明显，并对于具有各种两亲化合物、自组装技术和肽合成知识的本领

域技术人员来说,将更加显而易见。从上面的描述以及随附的实施例、数据、附图和所有从中获得的合理推论——单独考虑或者与并入本文的参考文献一起考虑,这些目标、特征、益处和优点将变得明显。

[009] 部分地,本发明可以包括非线性肽两亲化合物。这样的化合物包括肽组分(peptide component),该肽组分包括至少一个含有侧链氨基基团的氨基酸残基。该氨基基团可以偶联或直接键合到与该肽组分的长度或纵向轴为非线性关系的组分。为了提供这样的化合物两亲性特征,肽组分偶联到疏水组分或直接与疏水组分结合。如在下面更详细论述的,前述的氨基酸残基可以是天然或非天然存在的氨基酸。同样地,侧链氨基基团可以在掺入到肽组分之前或之后衍生自另一官能基团。而且,如本领域技术人员所理解的,这样的悬侧(pendency)可以包含功能上能够偶联或直接键合另一组分从而使化合物具有分支或非线性构型的任何基团。不管怎样,在某些实施方案中,这样的残基可以是若干天然存在的氨基酸中的一种,包括但不限于赖氨酸。

[010] 整合入至少两个这样的残基,可以用来将该肽组分与一个或多个生物活性表位序列连接。这样的序列包括但不限于在2003年2月18日提交的同时在审申请系列号10/368,517(国际公开号WO 03/070749)以及2004年12月6日与本申请同时提交的题为“Self Assembling Peptide Amphiphiles and Related Methods for Growth Factor Delivery”的同时在审申请中提供的序列,两申请的每一个都通过参考整体并入本文。因此,这样的序列可以选自己知的和/或可获得的细胞粘附配体,它们涉及例如细胞增殖、分化和/或代谢,其生物拟态变体(biomimetic variations),和/或可以与各种生长因子和/或相关的形态发生蛋白、肽或其它关联分子组分相互作用的结合序列,这样的结合序列可以通过已知的噬菌体展示过程(phage display processes)鉴定,包括但不限于在前述的共同在审、同时提交的申请中描述的那些。

[011] 如下面更详细描述,如本领域所知道的那样排列和/或构型(例如,进一步的分支或环状构型)的此类表位序列,可以与本发明的两亲化合物的肽组分在其N末端或附近偶联或直接结合。无论此残基是赖氨酸还是别的这样的天然存在的氨基酸,表位数量和身份可以随这样的残基和可利用的侧链化学功能而变化。类似地,肽组分的长度或序列可以根据期望的柔性、电荷和/或分子间吸引或结合的能力而变化。此类化合物的疏水组分也可以变化(例如,~C₆至~C₂₂烷基或取代的烷基、饱和或不饱和,等等),它们仅仅受所获得的两亲性特征和对此类化合物的相关系统的影响限制。

[012] 如下面更充分描述的,本发明涉及分支的肽两亲物(PAs),它们的实施方案可以在生理pH条件下自组装成纳米纤维。例如,通过加入pH7.4的磷酸盐缓冲液,以及在碱性条件下或者在生理条件下,此类具有分支的肽序列的PA自组装成柱状胶束,其形成自我支持(self-supporting)的凝胶样品。这样的具有分支肽序列的PA可以更好地将生物学活性肽序列暴露在自组装的纳米纤维的表面上。具有分支

肽组分的肽两亲物也允许由单个肽两亲物呈递多个表位。这样的生物学活性肽表位的例子包括但不限于下述序列，包括 Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS)、Pro-His-Ser-Arg-Asn (PHSRN)、Ile-Lys-Val-Ala-Val (KVAV)，和 Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg (YIGSR)。这样的肽序列或表位可以被用于但不限于，赋予此类化合物或组装物 (assemblies) 细胞粘附活性或细胞受体结合特性。

[013] 本发明的一个实施方案可以包括具有表位的分支肽两亲物，其当自组装时，将一个或多个表位与促进细胞粘附的协同序列一起置于纳米纤维构型的外围。本发明的另一实施方案可以包括在分支 PA 化合物上存在一个以上的生物学功能基团。不受任何理论限制，认为，分支 (branching) 使得能够更好地接近和呈递其组装物表面上的基团和/或表位。

[014] 本发明的另一实施方案可以包括治疗方法，包括向细胞施用本发明的任意肽两亲物，目的是进行组织修复或使骨生长，但不限于此。在某些实施方案中，肽两亲物在施用之前进行自组装，或在细胞接触或施用于细胞环境之时或之后进行自组装。不受限制，包括具有分支肽部分的肽两亲物的自组装纳米纤维也可以包括细胞或治疗剂或组合物，其与胶束的疏水性组分或胶束表面上的一个或多个表位缔合，它们可以作为治疗的一部分被传递给细胞样品或哺乳动物/患者细胞位点或组织位点。这样的实施方案可以封装已经结合到它们的表位或者以其他方式存在的各种细胞和/或治疗剂，诸如但不限于消炎化合物、化学治疗化合物和他们的组合。

[015] 包括分支肽序列的肽两亲物可以被用于医疗应用，根据它们期望的功能可以选择不同的表位。由这些肽两亲物自组装形成的材料可以被用作体外或体内组织移植、重建组织生长或组织生长的支架。具有分支肽序列的肽两亲物的两亲性特征可以被用来在纳米纤维的核心中封装疏水性药物。此外，提出了光谱探针的应用，Gd 络合 DOTA 分子可以作为纳米纤维的其中一个表位而被附着，用于体内或体外的组织或细胞的磁共振成像研究。

附图说明

[016] 部分地，通过考虑下面的描述、随附的权利要求书和附图，本发明实施方案的其他方面、特征、益处和优点将变得明显。其中：

[017] 图 1 显示了本发明的肽两亲物(1)、(2)和(3)的分子结构。

[018] 图 2 显示了本发明的肽两亲物(4)和(5)的分子结构。

[019] 图 3-4 显示了本发明的肽两亲物(6)和(7)的分子结构。

[020] 图 5 提供了两亲物结构 8-10。

[021] 图 6-7 示意地图示说明了代表性的肽两亲化合物的合成。

某些实施方案的详细描述

[022] 本发明的实施方案包括带有分支肽序列的肽两亲物，其可以自组装形成胶束（micelles）。这样的胶束包括但不限于柱状纤维或纳米纤维。尽管本文中公开的自组装的结构是纳米纤维，但本发明包括任何自组装的结构，本发明不限于纳米纤维。

[023] 在本发明中，肽两亲物可以具有一个以上的分支，各种基团可以偶联或化学结合到这些分支上。这些基团或表位可以具有生物学活性，并且可以包括但不限于氨基酸、细胞粘附肽序列、肽、来自噬菌体展示过程的肽和蛋白序列、荧光探针、放射性探针、磁探针和这些的组合。如在图 1-4 以例子的方式显示的，具有分支肽组分的肽两亲物可以包括但是不限于：具有连接到分支氨基酸（branching amino acid）诸如但不限于赖氨酸（K）的一个或多个肽或氨基酸残基的那些肽两亲物（例如 PA6）；具有连接到分支氨基酸诸如但不限于赖氨酸（K）的表位和侧链肽或氨基酸残基的那些肽两亲物（例如 PA1、4 和 7）；具有连接到分支氨基酸诸如但不限于赖氨酸（K）的两个或更多个相同表位的那些肽两亲物（例如 PA2）；具有连接到分支氨基酸诸如但不限于赖氨酸（K）的多个表位的那些肽两亲物（例如 PA 3 和 5）。

[024] 仅作为例子，本发明的肽两亲物（7）具有疏水组分和分支肽组分，所述疏水组分可以是 C₁₆ 烷基链。肽组分包含分支氨基酸残基赖氨酸（K）和表位（DOTA-KG-RGDS-K），如图 4 所示，见后。

[025] 在 PA7 中，肽组分(K-LLL-AAA-(K))在 C 末端用赖氨酸连接至疏水组分。通过分支氨基酸(例如 K)，肽组分可以具有至少两个与其非线性的组分。其中一个肽分支或两个肽分支可以包括生物学活性表位，诸如但不限于氨基酸、细胞粘附序列、肽、来自噬菌体展示过程的肽和蛋白序列、荧光探针、磁探针或它们的组合。

[026] 在自组装的纳米纤维中存在具有分支肽序列的肽两亲物，使得分支肽上的表位可以更好地暴露于外部分子、更好地被外部分子接近或为外部分子利用。这种可及性对于生物医学应用诸如但不限于组织再生、组织移植物的支架、细胞识别和重建性手术都具有重要的益处。

[027] 在本发明的分支肽(1)中的单个 RGDS 序列的呈递是本发明的生物活性肽两亲物的一个非限制性的例子，生物活性肽两亲物被设计成处于它们自组装的纳米纤维的周围的更容易被识别的表位。现有技术中的线性 PA 仅能含有一个表位。在本发明的分支系统中，一个以上的表位可以被使用以改善生物学活性。为了这个目的，细胞粘附表位的具有协同作用的序列也可以在同一 PA 上合成，如例如图 1 中的 PA3 和图 2 中的 PA5 所示。目前，加入离子或将 pH 变为酸性或碱性条件是用以形成传统 PA 纳米纤维的方法。本发明的分支 PA 有利地在中性 pH 和碱性条件下形成纳米纤维和自支持凝胶。在生理 pH 中形成纳米纤维，对于此类肽两亲物的大多数生物学应用而言，是个理想的特性。通过固相合成，多个功能基团可以被连接到这些分支 PA。荧光探针可以被连接到赖氨酸氨基酸的自由胺基团上。由

本发明的肽两亲物制成的纳米纤维的亲水性表面上的自由胺基团可以为其它离子敏感探针 (ion sensing probe) 所利用。DOTA 分支 PA7 只是这类肽两亲化合物的一个例子。在分支 PA7 上的 Gd 络合 DOTA 部分可以用于磁共振成像应用中的弛豫研究 (relaxation studies)。

[028] 各种介质或试剂可以被用来使本发明的肽两亲物发生自组装。这样的介质可以包括但不限于带互补电荷的肽两亲物、酸或碱、多价离子、脱水作用和它们的组合。优选地, 在生理 pH 或碱性条件或者在实现生理 pH 或碱性条件后, 本发明的分支 PA 形成纳米纤维和自支持凝胶 (self-supporting gels)。

[029] 具有可用于偶联其他肽的侧链氨基基团的氨基酸可以被用来合成本发明的肽两亲物的分支结构。一个或多个这样的残基可以被整合入肽组分, 以产生多个分支位点。图 1 中的肽两亲物 1 在肽两亲物主架 (backbone) 上具有分支氨基酸赖氨酸, 其形成到 RGDS-K 表位和另一赖氨酸(K-)的分支。当需要一个以上的分支时, 多个氨基酸——每一个携带有侧链和/或氨基基团——可以被使用, 如图 1 所示的肽两亲物(2)。赖氨酸可以被用于合成本发明的肽两亲物的分支, 因为它具有两个功能胺基团, 这些胺基团可以被用来修饰它的化学特征。然而, 本发明不限于赖氨酸, 其他携带有两个或更多个功能基团——其可以被转化为胺或其他可用于肽的固相合成的官能团——的氨基酸也可以被用于分支氨基酸。例如, 可以使用具有胺侧链的氨基酸, 包括但不限于天然存在的氨基酸和非天然存在的氨基酸, 诸如 β 或 γ 氨基酸。优选地, 选择分支氨基酸, 这样, 它们可以被修饰, 从而至少形成 α 和 ϵ 胺侧基 (side groups)。这些 α 和 ϵ 胺侧基可以被用于延续分支的肽合成。正交保护基团(orthogonal protecting group)可被用于一个或多个胺侧基上, 以确保不同的化学作用能够在它们上面独立地进行。例如, 为了连接疏水组分, 可以使用正交保护基团策略, 而不破坏 α 胺保护。在这种情况下, ϵ 胺保护可以被去除, 烷基链被偶联到该去保护的氨基酸上。

[030] 通过使用多个选择的分支氨基酸, 可以增加分支。例如, 一个分支赖氨酸可以提供 2 个活性分支位点, 额外的 2 个赖氨酸可以提供 4 个活性分支位点, 额外的 4 个赖氨酸可以提供 8 个活性分支位点。

[031] 根据分支设计, 选择赖氨酸残基的 α 和 ϵ 胺保护。如果期望有两个不同的分支, Mtt 基团被用于赖氨酸侧链保护。为了产生第一个分支, Fmoc 基团可以被去除, 而不去除 Mtt 保护。完成第一个分支序列后, 最后一个氨基酸选择用 Boc 保护, 所述 Boc 保护能够抵抗 Mtt 切割条件。Mtt 然后被除去, 以便产生 PA 的第二个分支。如果期望两个类似的分支, Fmoc 侧链保护的赖氨酸被用于制备 PA。通过哌啶溶液, 两 Fmoc 基团被去除, 并且 PA 的两分支同时被制成。

[032] 分支 PA 和其自组装的胶束可以被用于组织工程、组织重建、合成疫苗设计、药物传递、磁共振成像和传感器应用。这些 PA 的两亲性特征也可以被用于分离单壁碳纳米管 (single walled carbon nanotubes)。例如, 分支 PA 6, 如在图 3 中所示,

可以被用于封装疏水药物或其他治疗用分子。包括具有分支肽部分的肽两亲物的自组装纳米纤维也可以包括细胞或治疗组合物，这些细胞或治疗组合物位于胶束的核心或偶联到胶束表面上的一个或多个表位，这些细胞或治疗组合物可以作为治疗的一部分被传递到细胞样品或包括细胞或组织的患者某位置。当纳米纤维是预先模制的或预成形的支架形式时，纳米纤维可以封装各种细胞或治疗组合物，或将各种细胞或治疗组合物与它们的表位结合，这些细胞或治疗组合物诸如但不限于消炎化合物、化学治疗化合物和它们的组合，它们可以作为治疗的一部分被传递到细胞样品或包括细胞或组织的患者的某一位置。

[033] 在某些实施方案中，本发明的 PA 化合物通常可以包括疏水性烷基组分和分支肽组分。根据肽组分中氨基酸残基的排列和选择，分支肽组分可以包括带电荷的基团、表位和生物信号。亲水性氨基酸可以带电荷，并且可以被用于提供在含水环境中一定程度的溶解性。在含水环境中，这样的肽两亲物能够自组装成柱状的胶束或纳米纤维，其具有朝向中心的疏水组分尾部，和沿着外围表面暴露的通常为亲水性的功能肽分支肽。分支肽组分相对于疏水组分具有较大体积，便赋予了 PA 化合物大致圆锥的形状。尽管不希望受到理论限制，但认为，这种形状以及片段的疏水和亲水排列在 PA 自组装中发挥关键作用。由于分支肽基团沿着纤维的长度方向被暴露在外，生物活性表位或生物信号便可以呈递给环境。

[034] 为了增强 PA 化合物的强度 (robustness)，肽组分可以包括一个或多个半胱氨酸残基，如图 3 的 PA(6) 中所示，半胱氨酸被连接到赖氨酸 (如图所示) 或其他氨基酸诸如但不限于丙氨酸或甘氨酸。当组装时，相邻的半胱氨酸残基的 S-H 配体足够接近，以致于可以形成稳定的二硫键；暴露于氧化条件诸如碘或氧可导致二硫键的形成和交联的纤维。这样的 PA 的一个多用途的特征是可逆的交联。当使用还原剂诸如二硫苏糖醇 (DTT) 时，PA 纤维可以被解散。另外，PA 可以自组装，从而改进它的适应性以用于医学用途。

[035] 疏水组分可以是碳氢化合物，诸如但不限于烷基部分或可以被用来提供两亲功能的其他结构。这样的部分的尺寸可以是变化的，但是在某些实施方案中，长度范围为约 C_6 和大于 C_6 。肽两亲物的该组分用于产生 PA 分子的圆锥形分子形状的较细部分。也可以使用其他化学基团诸如三乙炔，其提供了疏水性和允许自组装成肽两亲物的形状。疏水组分被共价偶联或结合到肽组分，如上所述。

[036] 如上讨论的，如果需要交联的话，分支 PA 化合物组分的肽组分可以包括半胱氨酸残基。无论如何，其他氨基酸诸如但不限于丙氨酸、丝氨酸或亮氨酸可以被用于该区域 (例如 SLSL 或 AAAA，如本文中更详细描述)。这样的无半胱氨酸的组分可能更适合于原位生物应用，在那里环境可能更难以控制交联。对系统的 SLSL 修饰有望导致较缓慢的纳米纤维组装。不希望受到理论限制，认为，大体积的亮氨酸侧链可能需要更多的时间来组装成纤维。缓慢的自组装也可能在功能性

的原位环境诸如手术室中具有更大的应用，在其中纳米纤维的延时形成可能是有利的。肽组分也可以包括残基诸如但不限于甘氨酸，以提供结构上的柔性。

[037] 肽组分可以包括任何天然存在的或非天然存在的氨基酸，包括但不限于带电荷的或亲水性的氨基酸，诸如赖氨酸、丝氨酸、磷酸化的丝氨酸、二氨基丙酸、二氨基丁酸和天冬氨酸，对它们的选择可以提供带电荷的肽两亲物，诸如图 3 中示出的 PA6。在接近生理 pH 的条件下，这样的带电荷的肽-两亲物可以带正电或带负电。肽组分是 PA 化合物中体积相对较大的、带电荷的片段，其连同一个或多个分支，提供了圆锥形分子几何学上最宽的区域。

[038] 不同的 PA 化合物的混合物的自组装也能够沿着不同长度和/或氨基酸序列的相应肽组分的自组装纳米纤维的长度方向，呈递不同的氨基酸序列。而且，可以考虑，不同尺寸的分支肽两亲物，或不同尺寸的分支肽两亲物和填充肽两亲物（filler peptide amphiphiles）的混合物，或它们的组合的自组装，可以自组装成纳米纤维或其他其他胶束，它们具有在自组装的纳米纤维或胶束的表面上伸出的肽两亲物。

[039] 本发明的各种肽两亲化合物和分支 PA 可以用本领域普通技术人员熟知的制备技术合成，包括那些公开在前述的共同在审已公布的申请和 2002 年 11 月 14 提交的共同在审申请系列号 10/294,114（国际公布号 WO03/054146）中的制备技术，它们通过参考整体并入本文；和对那些最初由 Stupp 等(参见例如 J.D. Hartgerink, E. Beniash 和 S.I. Stupp, *Science* 294, 1683-1688, 2001)描述的方法的修改，该文献通过参考整体并入本文。在这些参考文献中阐述的合成方案可以运用于本发明。肽两亲物可以是它们充分质子化的形式、部分质子化的形式或者酸或碱加成盐。一般而言，这样的肽两亲物可以通过标准的固相肽化学方法制备，包括在肽的 N 末端或附近加入疏水尾。取决于期望的两亲物组成或肽序列，使用已知的程序和合成技术或其直接的修饰（straight-forward modifications），可以对这些合成方法进行修饰，如本领域技术人员知道的以及意识到的。例如疏水尾被结合到赖氨酸侧链上的胺基团，而不是手性碳上的胺基团。

本发明的实施例

[040] 下面的非限制性实施例和数据阐释了涉及本发明的化合物、系统和/或方法的各种方面和特征，包括其上联接有一个或多个生物活性表位序列的各种分支肽两亲化合物的自组装物，这样的化合物可以通过本文中描述的合成方法获得，以及通过那些通过参考并入本文的共同在审申请中描述的方法获得。与现有技术相比，本发明的化合物、系统和/或方法提供了令人惊奇的、意想不到的和出乎意料的结果和数据。尽管本发明的效用通过使用若干两亲肽化合物、分支构型和/或可以就此使用的表位序列来举例说明，但本领域技术人员理解的是，用各种其他肽化合物和偶联到其上的表位也能获得可媲美的结果，这与本发明的范围是相称的。

实施例 1

[041] 本实施例描述了包括分支肽片段的肽两亲物的制备。(参考前述的并入的申请, 和随后提供的合成细节, 结合下面的图 6 和 7)。所有肽通过 Fmoc 固相肽合成 (Fmoc SPPS) 方案合成。Fmoc、Boc 和 4-甲基三苯甲基 (Methyltrityl) (Mtt) 保护的氨基酸、MBHA Rink 酰胺树脂和 HBTU 购自 NovaBiochem。其他化学制品购自 Fischer 或 Aldrich, 收到后便使用。肽在 MBHA Rink 酰胺树脂上构建。氨基酸偶联用 4 当量 Fmoc 保护的氨基酸、3.95 当量的 HBTU 和 6 当量的 DIEA 进行 4 h。

[042] Fmoc 脱保护用 30% 哌啶/DMF 溶液进行 10 min。Mtt 的去除用 1% TFA/二氯甲烷溶液, 在 TIS 存在下, 进行 5 分钟。用比率为 97.5: 2.5 的 TFA: TIS 的混合物, 从树脂上切下肽, 进行 3 h。通过旋转蒸发, 除去过量的 TFA。用冷的醚磨碎剩余的粘性肽溶液, 所得的白色产物在真空下干燥。通过基质辅助激光解吸电离-飞行时间质谱 (MALDI-TOF MS) 和/或电喷雾离子化质谱 (ESI-MS) 表征 PA。

[043] 在多孔碳涂覆的 TEM 栅格上, 用 PA 的 1 wt % 胶, 制备透射电子显微术 (TEM) 样品。用 2% 的磷钨酸溶液, 进行负染。通过将含有 2 wt % PA 的水溶液和磷酸盐缓冲液 (pH=7.4) 一比一混合, 制备用于 TEM 的 1 wt % PA 胶。

[044] 首先, 树脂在 DMF 中溶胀 30 min, 然后用 30% 哌啶/DMF 溶液除去树脂上的 Fmoc 保护基团。然后, 将 Fmoc-Lys (Mtt)-OH 偶联到树脂。用 1% TFA/二氯甲烷溶液除去赖氨酸侧链保护基团, Mtt, 而不切除 Fmoc 保护。用氨基酸偶联试剂, 将棕榈酸 (C₁₆ 烷基链) 偶联到树脂。棕榈酸偶联完成之后, 用哌啶溶液除去 Fmoc, 用同样的方式 (Fmoc SPPS) 连接 PA 的杆 (rod) 部分的氨基酸。

[045] 赖氨酸被选择以合成 PA 的分支。根据分支设计, 选择赖氨酸的 α 和 ϵ 胺保护。如果期望有两个不同的分支, Mtt 基团被用于赖氨酸侧链保护。为了产生第一个分支, Fmoc 基团可以被去除, 而不去除 Mtt 保护。完成第一个分支序列后, 最后一个氨基酸被选择用 Boc 保护, 所述 Boc 保护能够抵抗 Mtt 切割条件。Mtt 然后被除去, 以便产生 PA 的第二个分支。如果期望两个类似的分支, Fmoc 侧链保护的赖氨酸被用于制备 PA。通过哌啶溶液, 两 Fmoc 基团被去除, 并且 PA 的两分支同时被制成。

实施例 2

[046] 下面描述的一系列分子示例性阐释了新的分支 PA 结构, 该结构被设计成能够通过使用大体积的具空间位阻的肽结构, 增加纳米纤维表面上的表位对受体的可及性。代表性的非限制性分子含有赖氨酸枝状部分, 并且类似于并入本文的其他类型的线性 PA, 自组装形成通过纳米纤维的网络形成的含水凝胶。如图 5 中所示, 分子含有肽序列 KXXXAAAK (X=G 或 L), 接着一个饱和十六碳烷基片断, 枝状分支在赖氨酸残基处被引入。丙氨酸、甘氨酸和亮氨酸残基被用于促进氢键

合的 β -片形成，这有利于聚集成延伸的结构，诸如圆柱状纳米纤维，而不是聚集成在两亲性自组装中更常见的球形胶束。众所周知的生物学表位 RGDS 存在于胞外蛋白质诸如纤连蛋白 (fibronectin) 和玻连蛋白 (vitronectin) 的细胞结合结构域，它被使用以举例说明一个或更多的生物活性肽整合入此类 PA 系统。已知 RGDS 表位结合整联蛋白受体，并且该分子识别事件在细胞与胞外基质的粘附以及随后的复杂的信号级联中发挥重要的作用。

[047] 合成了具有线性肽结构的分子 8，以将表位的可利用性与本发明的分支 PA 中的表位可利用性进行比较。引入赖氨酸残基以产生非对称的分支分子 9A 和 9B，从而改变自组装之后生物活性肽序列的结构呈递。用与 9A 和 9B 类似的方式，合成分子 10A 和 10B，以引入对称的分支，并研究由单个 PA 分子进行的多个表位的呈递。此外，在分子 9 和 10 中，通过用亮氨酸(R=异丁基)残基替换甘氨酸(R=H)残基，研究了疏水性侧链对表位的结构可及性的影响。为了检测表位的识别和可利用性，每一个 PA 上的 RGDS 序列用生物素基团封端，然后利用异硫氰酸荧光素(FITC)标记的抗生物素蛋白分子的结合来探查生物素的可及性。众所周知，抗生物素蛋白对于生物素具有非常高的亲和力，每一蛋白质具有四个生物素结合位点。该结合亲和力以前已被用于通过改变呈递的生物素部分的数量来研究单层的表面可利用性。荧光团和抗生物素蛋白的生物素结合位点中的氨基酸残基之间的相互作用导致荧光的淬灭。因此，通过弱化该淬灭性相互作用，生物素化的 PA 与荧光标记的抗生物素蛋白的结合将导致明显的荧光恢复现象。

实施例 3

[048] 分支 PA 用固相肽合成(SPPS)方法制备。通过使用正交保护基团化学策略，实现肽片段的分支。(参见 Bourel, L.; Carion, O.; Masse, H. G.; Melnyk, O. *J. Peptide Sci.* 2000, 45, 488-496; 和 Aletras, A.; Barlos, K.; Gatos, D. Koutsogianni, S.; Mamos, P. *J. Peptide Protein Res.* 1995, 6, 264-270.)。在赖氨酸残基的胺上的 Fmoc、Boc 和 4-甲基三苯甲基 (Mtt) 保护基团被用于控制肽的设计，因为这些保护基团中的每一个可以被独立操纵。Fmoc 保护的胺被用于将氨基酸偶联到肽上，Boc 保护基团被用于阻断赖氨酸分支，Mtt 被用于不对称分支的选择性去保护和生长。RGDS 表位被连接到赖氨酸残基的 ϵ 胺上，由于有柔性的四碳连接物，可以增强表位的构象自由度。通过 SPPS 将生物素偶联到肽序列的末端，实现 PA 的生物素化。

实施例 4

[049] 所有 PA 在 pH 为 4 的水中都是可溶的，并且在 pH 增加至约 6.5 以上，浓度大于 0.5 wt % 时，形成自支持的凝胶。发现凝胶的形成可以随 pH 改变而被完全逆转。透射电子显微术(TEM)、原子力显微术(AFM)、FT-IR 和圆二色(CD)光谱术被用于表征分支 PA 分子的自组装。在 pH 7.4 时，自组装的 PA 8-10 的 TEM 显微照

片显示形成了一致的高纵横比的纳米结构，直径为 7 ± 1 nm，长度从几百纳米至几微米。所有 PA 的冻干（冷冻-干燥）凝胶的 FT-IR 显示了肽之间的氢键合，这是基于在 $3280\text{-}3285\text{ cm}^{-1}$ 处 N-H 伸缩峰得出的。在 $1628\text{-}1632\text{ cm}^{-1}$ 处的酰胺 I 峰与该肽二级结构主要的 β -片样特征是一致的，具有一些 α -螺旋和无规卷曲构象，这是由在 $1650\text{-}1675\text{ cm}^{-1}$ 范围内的峰示出的。此外， $\nu_a(\text{CH}_2)$ 由 ca. 2932 至 ca. 2921 cm^{-1} 的漂移表明在棕榈基疏水片段中的高度有序。自组装 PA 的圆二色谱揭示了在 200 和 230 nm 之间的宽峰（ $n\pi^*$ 跃迁），这可以被解释为主要存在的 β 片以及次要存在的 α -螺旋和无规卷曲构象的信号特征。IR 和 CD 结果与具有 β -片特征的氢键结合的 PA 高度有序组装是一致的，这种高度有序的组装导致在纳米纤维内密集填充的分子。

实施例 5

[050] 在 pH 7.4 制备稀释的生物素化 PA 样品，以研究用 FITC-抗生物素蛋白结合的影响。令人感兴趣的是，与线性 PA8 相比，一旦 FITC-抗生物素蛋白结合到生物素化的分支 PA，便观察到荧光发射的明显增加。该结果表明，尽管 TEM 观察到的是相似的结构，但相比那些由线性分子组成的纳米纤维，FITC-抗生物素蛋白对由分支分子构成的纳米纤维的表面上的生物素具有更大的可及性。在线性 PA 系统中，密集的氢键合可能导致纳米纤维的表面上更为紧密的表位堆积，从而阻碍 FITC-抗生物素蛋白与生物素结合，导致较少的荧光发射恢复。然而，在空间位阻分支系统中，生物素对抗生物素蛋白受体增强的可利用性可能表明，在纤维表面上分子堆积不那么显著。此外，将疏水侧链掺入到 PA 结构上，同样改变了表位的可利用性。9B 和 10B 上的生物素可利用性分别明显高于 9A 和 10A 上的生物素可利用性。因此，在这些分子中的疏水侧链也可以影响在组装物中的堆积特性和随后的表位可利用性。

实施例 6

[051] 作为对照，制备了非生物素化形式的 PA8 和 9B，并在同样的条件下用 FITC-抗生物素蛋白测试。没有观察到 FITC-抗生物素蛋白的荧光有明显变化，这表明，增加的荧光不是由抗生物素蛋白非特异性结合到 PA 引起的。这些结果证明了分支和疏水性侧链对纳米纤维外围的表位利用的预期作用。正在进行生物学实验，以确定在纳米纤维上 RGDS 表位呈递中的结构性差异是否以同样的方式影响细胞对该肽序列的更为复杂的识别过程，所述细胞用肽两亲纳米纤维培养。

实施例 7

[052] 如前述的并入的参考文献所描述和提供的，可以制备本发明的肽两亲化合物，以便提供与传统相反的结构极性。比较而言，固相合成通常要求由 C-端至 N-

端合成肽片段。结果，这样的两亲化合物通过用烷基部分在自由 N-端封端而被制备，从而产生在 C-端具有自由酸或酰胺基团的化合物。这里，与之相反，出于涉及生物活性或合成柔性的目的，提供具有自由 N-端的肽两亲物可能是期望的。因此，设计合成途径，以允许在 C-端或其附近引入疏水组分，并提供一个或多个旁侧功能基团，以实现分支和表位偶联。图 6 和 7 示意性地说明了这样的合成修饰。参考图 6，使用正交保护基团，疏水组分（例如烷基部分）在肽生长之前被加入。参考图 7，相应的保护/去保护策略允许在一个或多个赖氨酸残基处产生分支，以及选择性的表位（例如 RGDS）偶联，使得在相应的胶束构型的肽外围以胺封端。

[053] 如前面举例说明的，由分支肽两亲物分子形成的柱状纳米结构存在高密度的表面结合位点。这样的分子的分支共价结构导致结合位点对于探测蛋白质受体具有更大的可及性（accessibility），这被认为在用于生物学和医学的纳米级材料合成的生物学活性超分子设计中有用。

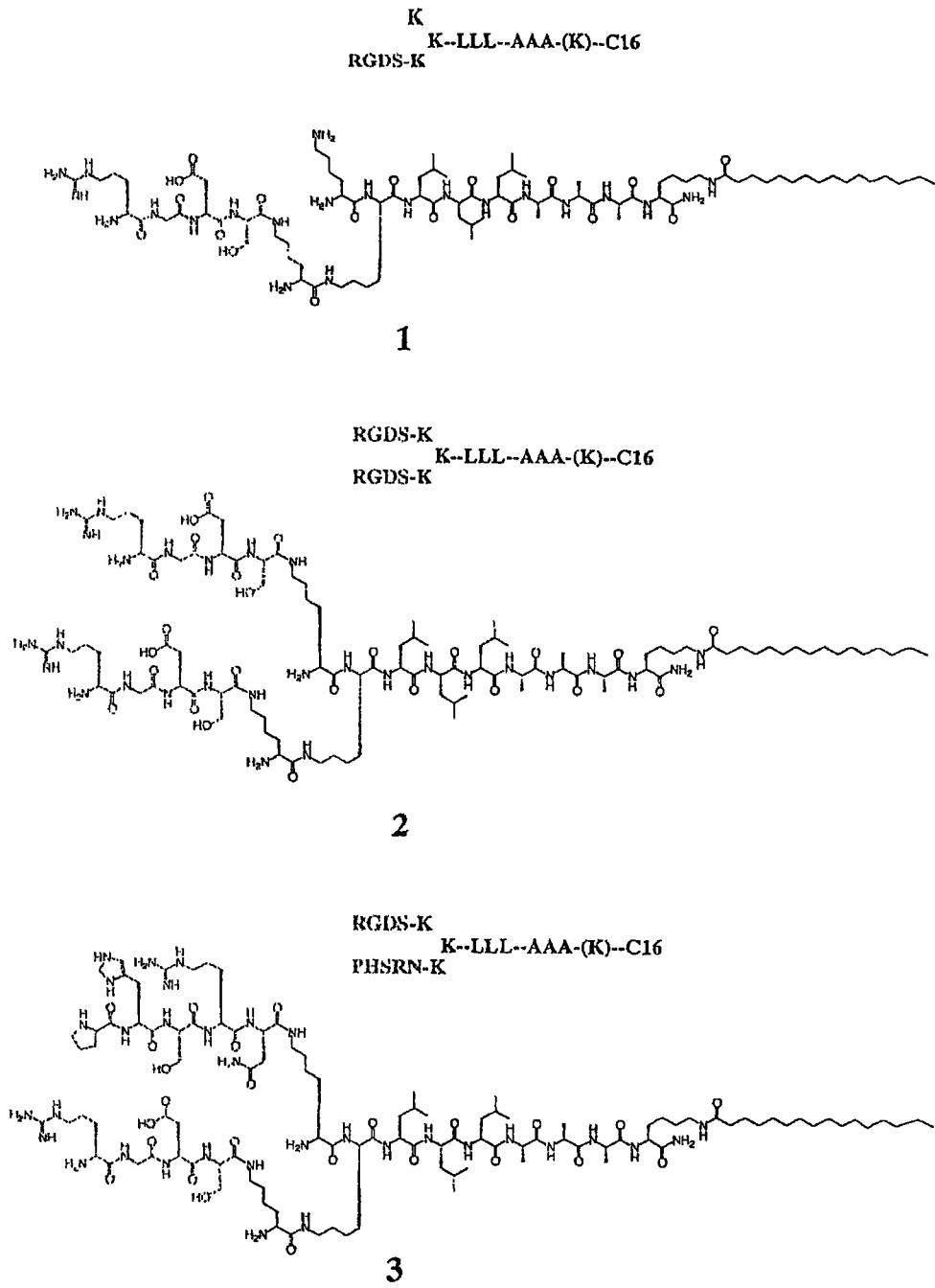


图1

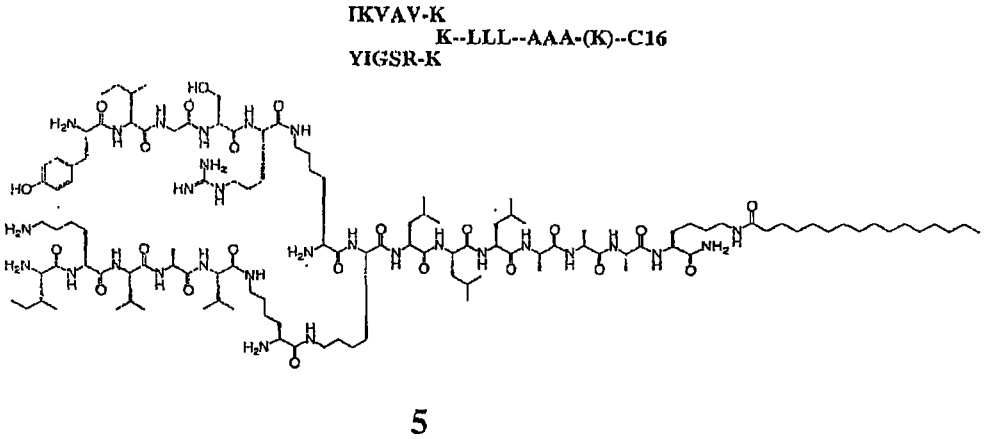
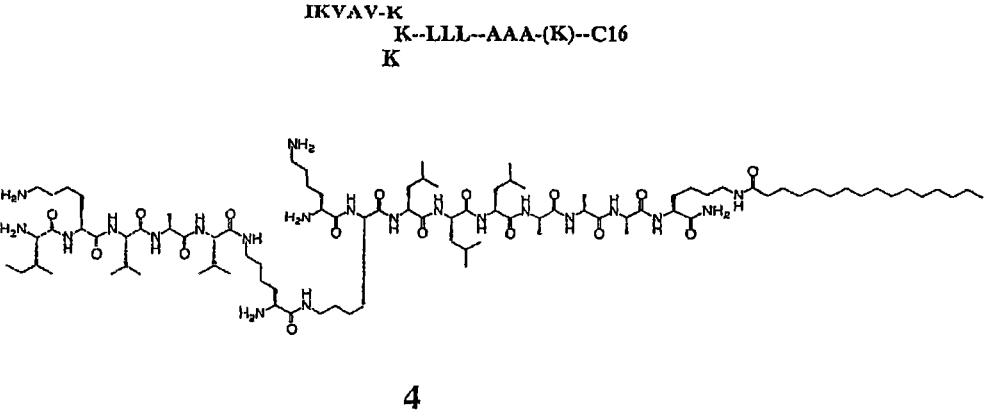
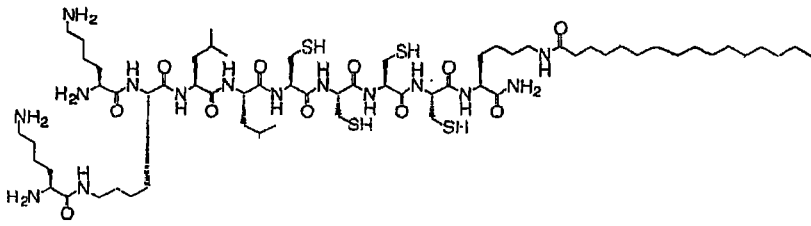
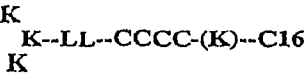


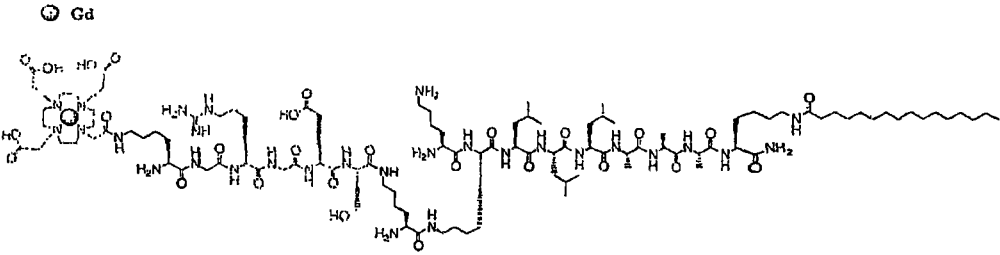
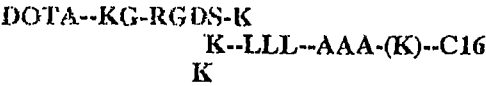
图2



6

带有大量正电荷的分支肽两亲物6

图3



7

图4

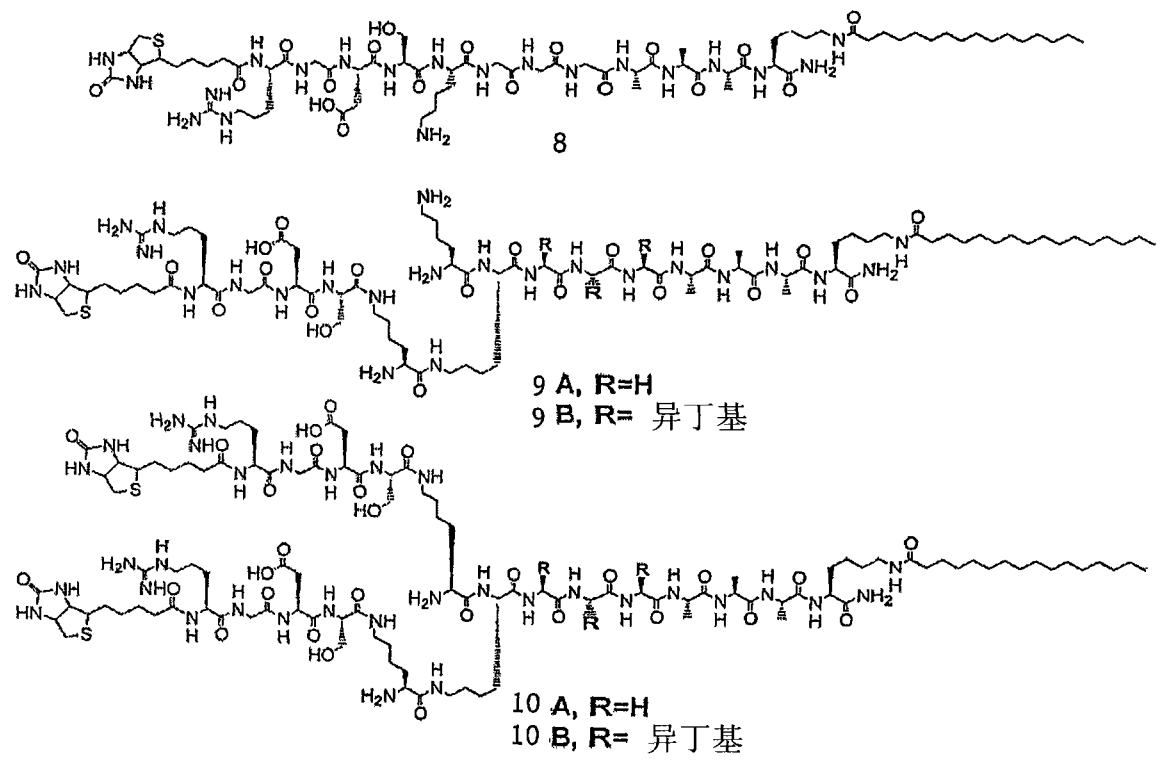


图5

